

완결과제 최종보고서

일반과제(○), 보안과제()

(과제번호 : PJ010034)

곤충을 이용한 양식어류용 사료원료 개발

Development of insect-based aquaculture feed ingredient

국립농업과학원

연구수행기간
2014.01 ~ 2016.12

농촌진흥청

제 출 문

농촌진흥청장 귀하

본 보고서를 “곤충을 이용한 양식어류용 사료원료 개발”(개발기간 : 2014.02. ~ 2016.12.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

제1세부연구과제 : 양식어류 사료용 곤충 대량 생산 기술 개발

제1협동연구과제 : 곤충사료의 양식어류 및 수질환경에 대한 영향 분석 평가

제2협동연구과제 : 곤충사료의 생산관리 및 품질균일화 기술 개발

2017 . 2 . 27 .

제1세부 연구기관명 : 국립농업과학원

제1세부 연구책임자 : 이 경 용

참여 연구원 : 김 남 정, 이 영 보, 윤 형 주, 송 성 호, 김 선 영, 오 서 연, 신 민 지

제1협동 연구기관명 : 중부대학교

제1협동 협동연구책임자 : 정 태 호

참여 연구원 : 박 철, 신 기 욱, 이 승 원, 나 윤 회, 윤 성 태

제2협동 연구기관명 : (주) 사조동아원

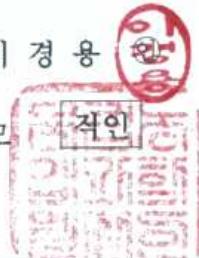
제2협동 협동연구책임자 : 김 주 민

참여 연구원 : 신 승 철, 이 제 현, 유 선 종, 김 윤 강, 서 효 원

주관연구책임자 : 이 경 용

작인

주관연구기관장 : 이 진 모



농촌진흥청 농업과학기술 연구개발사업 운영규정 제51조에 따라 보고서
열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제번호	PJ010034		연구기간	2014. 02. 01 - 2016. 12. 31
연구사업명	단위사업명	국책 기술개발사업		
	세부사업명	농업 곤충자원기술개발사업		
	내역사업명	농업 곤충자원기술개발사업		
연구과제명	주관과제명	곤충을 이용한 양식어류용 사료원료 개발		
	세부(협동) 과제명	(1세부) 양식어류 사료용 곤충 대량 생산 기술 개발 (1협동) 곤충사료의 양식어류 및 수질환경에 대한 영향 분석 평가 (2협동) 곤충사료의 생산관리 및 품질균일화 기술 개발		
연구책임자	구분	연구기관	소속	성명
	1세부	국립농업과학원	국립농업과학원	이경용
	1협동	중부대학교	중부대학교	정태호
	2협동	(주)사조동아원	(주)사조동아원	김주민
총 연구기간 참여 연구원 수	총: 26 명 내부: 6 명 외부: 20 명	총 연구개발비	정부: 840천원 민간: 90천원 계: 930천원	
위탁연구기관명 및 연구책임자	중부대학교, 정태호	참여기업명	(주) 사조동아원	
국제공동연구	상대국명:	상대국	연구기관명:	
<input type="checkbox"/> 갈색거저리 대량생산 기술개발 <input type="checkbox"/> 사육환경 개선 사육온도(270, 습도(65)RH), 맥미 신란 및 부화조건 구명 <input type="checkbox"/> 농스 phẩm부신물 이용 맥미원 개발 맥주박 맥걸박 30% 참기로사료비 30% 절감 <input type="checkbox"/> 장기저장법 구명: 15령 유충 10°C 저장(250일 보존, 생존율 70%) <input type="checkbox"/> 유충 수거 및 배설물 분리 동시 가능한 장치 개발 <input type="checkbox"/> 발육기간 단축방법 구명 발육기간과 생존율을 고려, 주 3회 수분공급 <input type="checkbox"/> 갈색거저리 이용 양식어류사료의 급이효과 <input type="checkbox"/> 흰다리새우의 경우 곤충분 5%를 섞어 먹인 결과, 기존 양식어류용 사료 대비, 체중 30% 증가, ATP 함량 37.7% 증가 및 면역력 지표인 BGBP 등의 빌현량 3배 이상 증가 <input type="checkbox"/> 넙치의 경우 곤충분 10%를 섞어 먹인 결과, 체중 15% 증가 <input type="checkbox"/> 노폐물의 함량은 낮고 용존산소량은 높게 유지되어 양식장의 수질환경 개선에도 효과 확인 <input type="checkbox"/> 곤충을 이용한 양식어류용 배합사료 원료 및 제품 개발 <input type="checkbox"/> 갈색거저리를 이용한 새우사료용 조성물 및 이의 제조방법 개발(14 특허출원) <input type="checkbox"/> 갈색거저리를 이용한 넙치사료용 조성물 및 이의 제조방법 개발(16 특허출원) <input type="checkbox"/> 갈색거저리 원료분쇄 곤충유 착유 및 곤충박 배합법 구명(지방문제 해결)	보고서 면수			

〈 국 문 요 약 문 〉

연구의 목적 및 내용	양식어류용 사료곤충 대량생산 체계 구축				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 양식어류용 사료곤충 선발 ○ 사료용곤충의 사육 효율 향상 기술 개발 ○ 곤충 사료화를 위한 건조방법 및 분말 조건 확립 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> - 사료용 곤충 대량생산 기술개발로 새로운 곤충사료시장 개척 - 양질저렴한 사료용 갈색거저리 먹이원 개발로 생산비 절감 효과 				
중심어 (5개 이내)	곤충	대량생산	곤충사료	양식어류	분말제조

〈 Summary 〉

Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Establishment of mass insect production system as a feed for fish farming ○ A Study on the development of insects mass-rearing system for feed ingredient ○ Feeding test / nutritional p\advantage / toxicity / water quality assessment / aquaculture field test of shrimp and flatfish ○ Quality control manual for feed prodiction 				
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development of the Maximum Efficiency Enhancement Technology for Enhancing ProductivitySelection of candidate insect as a feed for fish farming <ul style="list-style-type: none"> - Improvement of mass production efficiency of insect as a feed - Standardization of insect drying and grinding methods for a insect feed ○ Immunity / anti-disease / nutritional effect assessment of shrimp and flatfish ○ Anaysis of enteric microflora of shrimp and flatfish and aquatic microorganisms ○ Development of quality control technology and quality standard 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> - Finding a insect feed market with mass insect production technology - Production cost reduction with high quality mealworm as a feed for fish faming - Immunity / anti-disease / nutritional effect assessment of shrimp and flatfish by insect-based feed - Development of quality control technology and quality standard of insect-based feed - Expansion of insect industry as new growth engine - Boosting the Rural Economy and Reducing the Cost of Feed Goods by insect-based feed prodiction technology in Korean feed industry - Securing the source of national origin technology 				
Keywords	insect	mass production	insect feed	shrimp	powder manufacture

〈 목 차 〉

제 1 장 연구개발과제의 개요	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황	7
제 3 장 연구수행 내용 및 결과	9
제 4 장 목표달성을 및 관련분야에의 기여도	126
제 5 장 연구결과의 활용계획 등	127
제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	128
제 7 장 연구개발성과의 보안등급	128
제 8 장 기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비현황	128
제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 ..	129
제 10장 연구개발과제의 대표적 연구실적	131
제 11장 기타사항	132
제 12장 참고문헌	132

제 1 장 연구 개발 과제의 개요

제1절 : 연구 개발 목적

현재 어류는 동물성 단백질의 43%(육류 39%, 우유 등 기타 18%)를 점유하는 매우 중요한 식품으로 자리 잡고 있다. 전 세계 약 30억 명의 사람들이 어류에서 동물성 단백질 소비량 중 20%를 섭취하고 있으며(FAO (2014) The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Opportunities and Challenges.Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. 243pp.) 일부 국가의 경우, 동물성 단백질 소비량의 50%를 충족하고 있다(Smith MD, et al. (2010) Sustainability and Global Seafood. Science 327(5967):784–786). 그러나 FAO(2002)의 보고에 따르면 세계적으로 어류자원의 28%가 남획되고 있으며 .세계 어업은 지난 10년간 1.6%의 성장률로 정체기를 맞고 있다. 현재 무분별한 남획과 지구 온난화 등의 환경적 영향으로 어획만으로는 증가하는 수산물 수요를 충족시킬 수 없는 실정이다(Funk CC & Brown ME (2009) Declining global per capita agricultural production and warming oceans threaten food security. Food Security 1(3):271–289.). 세계의 인구의 지속적인 증가에 따라 수산물 단백질 공급 요구는 양식생산량의 증대를 요구하고 있으며 그 역할은 더욱 커지고 있다.

국내에서는 새우와 넙치가 영양학적 우수성 및 식생활 수준의 향상으로 웰빙식품으로서 주목받고 있다. 따라서 흰 다리 새우(Whiteleg shrimp, Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei, formerly Penaeus vannamei)와 넙치(광어, Olive flounder, Japanese flounder, Bastard halibut, Paralichthys olivaceus)는 지속적으로 생산이 증가할 것으로 예상되는 거대한 양식 시장을 형성하고 있다. 잡는 어업에서 기르는 어업으로”라는 흐름이 전 지구적인 규모로 확산되면서 세계 전체의 어획량 가운데 양식의 비율이 2011년에는 40.1%에 달했으며, 최근 약 30년간 양식 비율은 6배 이상, 생산량도 13배 이상 증가한 것으로 보고 됐다(유엔 식량농업기구(FAO) 마티센 어업국장의 교도 통신과의 인터뷰, 2013-10-20).

특히, 전 세계적으로 심각한 수산물 남획에 대한 대안으로 유엔은 수산물의 비중 중 양식산업의 비중을, 양식산업의 비용 중 가장 큰 부분을 차지하는 단백질원 사료 원료에 주목하고 있다. 어분은 아미노산의 균형이나 필수지방산, 에너지, 영양소 함량, 소화율, 기호성 등에 있어 양어사료 뿐 아니라 대부분의 양축용 사료에 필수 원료로 이용되고 있으나, 공급량이 세계적으로 급증하고 있는 양식산업 및 축산업의 수요량에 미치지 못하여 어분 같은 고품질의 단백질 사료원료는 사료비를 높이는 주요 요인 중의 하나이다.

곤충사료 개발의 주요 목적은 배합사료 내 어분의 양을 최소화하여 사료비를 경감시키면서/어류의 성장과 번식에 필요한 필수 아미노산과 균형 있는 영양을 공급하고/영양소 소화율을 증가시키/생물학적 대사는 증가시키고/영양소 배출은 줄여/수질오염을 방지하는 것이다. 양식 어류 사료에 적합한 곤충 종 탐색 및 선발, 양질저렴한 곤충 먹이원 개발, 생체사료 건조방법 구명, 생산성 향상을 위한 사육 효율 극대화 기술 개발, 곤충 사료화를 위한 건조방법 및 분말 조건을 확립하여 양식어류용 사료곤충 대량생산 체계를 구축하고자 한다.

갈색거저리 대량생산 기술 개발로 새로운 곤충사료시장 개척, 양질저렴한 갈색거저리 유충 먹이원 개발로 생산비 절감 효과, 사료곤충의 대량생산 시스템 확립 및 주요 곤충자원의 대량 사육 원천기술 확보 대량생산 기술의 개발을 통해 전문적인 사료용 곤충 생산 농가를 육성할

가능성을 가지며, 곤충을 이용한 사료시장 참여로 곤충산업 기반 확대, 곤충 사료자원 확보로 수입사료 원료 절감 효과, 곤충 사료 제조·가공 활성화로 곤충사료산업을 육성할 수 있을 것으로 판단된다.

또한, 곤충은 종에 따라 차이는 있지만 고지방, 고단백질 그리고 고미네랄 식품으로서의 가치를 지니고 있어 어분 뿐 아니라 탈지대두분의 대체제로도 고품질 저비용의 농가 소득원으로서 국내 농촌 경제에 지속가능한 신성장 동력이 될 수 있다. 따라서, 국내의 훙다리새우와 넙치 양식으로 고부가가치를 창출하기 위해 어분 같은 고품질 단백질 사료원료의 대체가 필요하다. 즉 본 연구는 국내 농업 산업을 발전시킬 신성장동력으로서 곤충산업기반 확대 뿐 아니라 농촌경제 활성화, 사료원가 절감 및 신 사료시장 개척을 위한 고품질의 단백질 사료 원료 대체제를 연구하여 곤충을 이용한 양식어류용 사료를 개발하고자 하였다.

제2절 : 연구 개발의 필요성

가. 곤충대량사육기술 개발의 필요성

곤충이 가축의 사료로 활용될 수 있는 주요한 요인은 곤충이 가진 영양소의 이용효율에 있다. 곤충이 섭식하는 식물성 단백질은 곤충의 체내에서 동물성 단백질로 변환되어 축적되는데, 일반적으로 가축에 비해 4배에서 최고 9배 수준으로 영양소를 효율적으로 축적한다. 곤충은 대체적으로 필수아미노산이 풍부하며, 갈색거저리, 동애등에, 메뚜기 및 귀뚜라미 등은 다양한 사료 연구를 통해 동물 사료에 필수적인 단백질원으로서의 가치가 입증되어왔다(Choi *et al.*, 2015). 중국에서는 100여년전부터 갈색거저리가 사육되어졌으며 최근에는 식용, 가금류 사료 및 애완동물 먹이로의 산업이 활발히 진행되고 있고(Liu *et al.*, 2011), 국내에서 10여년 전부터 갈색거저리 유충은 고단백 영양성분으로 애완동물의 사료로 활용되고 있다(Ravzanaadii 등, 2012; Koo *et al.*, 2013). 특히, 갈색거저리는 풍부한 지방, 단백질, 다양한 종류의 아미노산, 불포화지방산, 미네랄을 함유하고 있으며(Kim *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 1997; Yoo *et al.*, 2013), 갈색거저리의 필수 아미노산 함량은 돼지고기, 양고기, 콩보다 높고, 쇠고기, 생선과 비슷한 것으로 보고되었다(Li *et al.*, 2012). 또한 갈색거저리는 짧은 생활사와 강한 생존율 때문에 낮은 사료비로 사육이 가능하며 (He *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2014; Tian and Xu, 2003; Wu *et al.*, 2008; Zanuncio *et al.*, 2000), 사육시 평소에 거의 사용되지 않는 wheat straw, tangerine shell, and spent mushroom substrate 같은 농식품부산물을 갈색거저리의 먹이원으로 사용할 수 있어 친환경적이다. 따라서 이를 산업적으로 이용하기 위한 많은 연구들이 진행 중에 있다(Kim *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2012).

갈색거저리는 최근 사료용 곤충 및 식용 곤충으로서 상업화를 목적으로 대량증식하는 농가가 많이 생겨남에 따라 대량사육기술의 보급이 필요한 실정이다. 따라서 본 연구를 통해 양식어류 사료에 적합한 곤충 종을 선발하여 양질의 저렴한 먹이원을 개발하고 생산성 향상을 위한 사육 효율 극대화 기술 개발, 곤충 사료화를 위한 건조방법 및 분말 조건을 확립하여 최종적으로 양식어류용 사료 곤충의 대량생산 체계를 구축하는 일은 반드시 필요하다.

나. 양식 새우의 산업적/학문적 연구의 필요성

흰다리새우 (Whiteleg shrimp, Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, formerly *Penaeus vannamei*)는 가장 저렴한 종묘 가격대를 형성하며 30cm 크기로 양식하거나 성장하는 수익성 양식 대상새우로, 백새우라고도 불린다. 온도 0도~32도까지의 수질에서 양식 가능하며, 섭씨 20~30도에서 성장이 가장 빠르며 Eastern Pacific Ocean에 널리 양식되는 어종이며, 물이 없는 상태에서 24시간 운송 시 85% 정도가 생존 가능하며, 양식기간은 대체로 2개월 후 9~12g / 3개월 후 16~22g에 출하하며, 종묘 1톤으로 약 20~50톤 정도가 어획 가능한, 전 세계적으로 인기 있는 어종으로 사료 기준 2016년 아시아에서만 276 만 톤이 생산된다.

질병에 쉽게 감염되는 특성에도 불구하고 전 세계적으로 양식이 확장되는 추세이며, 중국은 흰다리새우 양식양에서 세계 최대 국가로 계속 번성하고 있으며 2002년의 양식양은 270,000 톤, 2003년에는 300,000 톤으로 예견되어 중국의 총 새우 생산량 중 양식양이 71%을 점유하고 있다.

타우라증후군바이러스(TSV, Taura Syndrome virus), 전염성 피하 및 조혈괴사바이러스(IHHNV, Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus), 흰반점증후군바이러스(WSSV, White Spot Syndrome Virus), 노란머리바이러스(YHV, Yellowhead virus), 림프기관액포바이러스(LOVV, Lymphoid Organ Vacuolization Virus)의 바이러스성 질병 외 간체장궤사(NHP, Necrotizing hepatopancreatitis)와 같은 대표적인 새우질병의 예방과 통제는 병리학, 새우생리학 및 유전학과 아울러 영양, 환경 및 외부독성학과 같은 타 관련 연구분야의 지식을 고려하며 면역을 증가시키는 통합적이 접근 방안이 요망되는 바, 곤충사료의 투여가 이들 다양한 질병에 대한 내성을 포함하여, 성장률, 기호성, 영양학적 가치와 더불어 어떤 가치를 가지는지에 대한 분자생물학적 분석이 필요하다.

기타 아시아 국가들에서도 흰다리새우 양식업이 성행하고 있어 2003년 태국의 총 양식양은 120,000 톤, 베트남 및 인도네시아는 각각 30,000 톤 대만, 필리핀, 말레이시아 및 인도의 총 양식양은 수천 톤에 달함. 2002년 아시아 지역에서의 총 흰다리새우 양식양은 316,000 톤이며 2003년에는 거의 500,000 톤에 달할 것으로 추정되는데 이를 수출 금액으로 환산하면 40억 달러에 달한다. 생활사를 쉽게 통제할 수 있고 양식호지에서 어미 새우로까지 생산이 가능하므로 어미새우와 치하를 자연산에 의존하지 않아도 되게 하였으며/순치가 용이하고/성장률이 빠르며/높은 입식밀도에서도 양식이 가능할 뿐 아니라/낮은 염분도와 수온에 대하여서도 내성이 강하며/사료 중 단백질의 함량에 대해 민감도가 낮아 곤충 사료의 영양학적 특성 및 독성 및 면역학적 Risk가 낮아 비교적 성공적인 연구 성과 도출 및 산업화가 용이할 것으로 사료된다.

다. 양식 넙치(광어)의 산업적/학문적 연구의 필요성

넙치(광어, Olive flounder, Japanese flounder, Bastard halibut, *Paralichthys olivaceus*)는 어식성이며, 어분 다량의 사료가 사용되는 어종(약 60%)으로, 단백질원의 대체 물질 개발이 시급한 과제로 제시되는 국내 대표적인 양식 어종임. 저서성 어류로서 체형이 납작하여 그 형태가 특이 하며, 다른 어류와 상이한 점은 두 눈이 머리의 한쪽 편에 모여 있는 것으로, 유영 진행방향(꼬리에서부터 두부방향으로)에서 원쪽에 눈이 위치하여 가자미류(도다리, 오른쪽에 위치)와 구분된다.

광염성 어류로서 우리나라와 일본 연·근해, 발해만, 동중국해 등에 분포하며, 서식온도는 10~27°C 범위이고 최적 사육수온은 21~24°C로서 수온 10°C 이하와 27°C 이상에서는 거의 먹이를 섭취하지 않는다.

자연에서의 넙치 식성은 어릴 때에는 요각류, 젖새우류 등 소형 갑각류를 먹으며, 성장하게 되면 주로 작은 어류를 작아 먹는 육식성으로 변하고, 그 외 새우류, 갯가재류 등 대형 갑각류와 오징어, 패류 등을 먹는 특징을 가지고 있어 국내 최대 양식 어종이며 대중적인 어종으로서 곤충사료의 적용 연구의 가치 뿐 아니라 어류 품질을 향상시킬 수 있는 특정 단계에만 처리하는 사료로의 개발 연구 가치를 부여하는 중요한 어종이다.

자연에서의 연령별 전장 및 체중 변화는 알려져 있으며, 적조발생기 및 하계 어병 예방을 위한 지침, 추계 및 동계 사육관리 지침에 사료 첨가제 또는 곤충사료 원료 형태별 사육시험을 통해 표준 사료비와의 비교 분석 및 바이러스성 상피증생증, 해산버나바이러스병, 림포시스터스병, 랍도바이러스병, 바이러스성 신경괴사증 등의 바이러스성 질병과 에드워드병, 활주세균증, 비브리오, 연쇄구균증, 장관백탁증 등의 세균성 질병, 백점병, 트리코디나병, 스쿠티카병과 같이 대표적으로 넙치양식시 발생되는 질병에 대한 면역학적 평가 및 독성평가를 수행 할 필요가 있다.

넙치는 제주도를 중심으로 (전국 생산량 중 53.9% 이상이며, 생산 금액 역시 54.9% 이상임) 높은 양식 수익성을 자랑하는 인기 양식 어종이며, 일본 및 중국의 소비량이 가장 많이 증가하고 있는 세계적으로 인기 있는 흰살 생선이고, 국내 최대의 양식생산어종으로, 사료 기준 2012년 20,000 여톤이 생산되었으며, 2016년 생사료 사용 금지 시행 시 80,000 여 톤으로 생산량이 급증할 것으로 예상된다.

넙치양식장은 생산량의 증가, 물의 절약, 오염 배출수의 감소, 에너지 절약이 가능하면서도 환경오염과 질병에 의한 문제점들을 극복하기에 용이한 순환여과 양식 기술의 개발이 대두되고 있으며, 양식산업의 비중면에서 곤충사료의 적용 시 수족관 시험 뿐 아니라 현장적용 시 수질오염 및 환경영향평가에 대한 연구 결과가 특히 중요할 것으로 판단되는 어종이다.

라. 수질영향평가와 장내세균총/수중미생물 환경 분석의 필요성

최근 양식 사료의 주단백질원인 어분의 생산량 감소와 사료비 절감을 위한 대체 단백질 사료원 개발에 관한 다양한 연구가 세계적으로 활발히 진행되고 있으며, 이것에 수반되어지는 양식의 수질오염과 인 배출문제에 있어서도 수질환경보호를 위해 연구의 중요성이 날로 확대되어지고 있다.

곤충 사료의 적용 시험 후 배출수 및 수조 내 대사물질에 의한 수질오염을 감소하기 위해 사료의 질적 개선에 대한 연구가 동시에 진행되어야 하며, 특히 영양학적 측면에서 어류가 먹지 않은 사료와 어류의 대사 배설물 같은 입자상의 인이 수질분석 및 환경오염 평가에 있어 중요한 항목이라 할 수 있다.

환경정책기본법시행령에 의해 수질 및 수생태계 환경기준은 수질오염으로부터 건전한 수생태계를 유지하고, 물의 이용목적에 적합한 수질을 보전하기 위한 미래지향적인 연구 내용으로, 양식수생동물을 위한 곤충 사료의 개발에 있어 필히 동시적으로 수행되어야 할 필요성이 있어 환경부의 일반적인 수질 분석 기준을 준수하여 하천과 호수의 생활환경항목과 건강보호항목을 응용하여 기준을 마련하고, 연구를 수행 할 필요가 있다.

마. 연구개발의 중요성

미국을 비롯한 선진국에서는 이미 곤충을 이용한 어분 사료를 제조 연구 중이며, 친환경/고 품질의 사료 단백질 공급원으로서의 가치를 입증하고 본격적인 상업화가 진행 중이며, 전 세계 최대의 시장인 중국에서의 새우 및 넙치 소비 증가는 양식어류사료에서 가장 높은 비중을 차지하는 단백질 부분에 대해 곤충유래의 대체 가능성에 대한 연구의 필요성을 부각시키고 연구 결과의 산업화 및 현장 적용 결과의 성공 가능성을 예측하게 한다.

국내 환경에 적합한 사료용 곤충의 선별 및 대량생산체계 구축, 사료화 및 품질관리 체계 확립을 통해 상업화를 안정시키고 연구개발을 지속하여 어종별 맞춤형 사료 및 사료첨가제와 특정 단계용 고효율 사료의 개발이 환경 및 수질영향평가를 통해 친환경 자원임이 밝혀진다면, 농촌 경제에 신성장 동력을 발굴하여 정부 핵심과제인 지속가능한 성장을 이룰 수 있는 창조 경제의 기틀을 마련하는데 이바지 할 수 있을 것으로 사료된다.

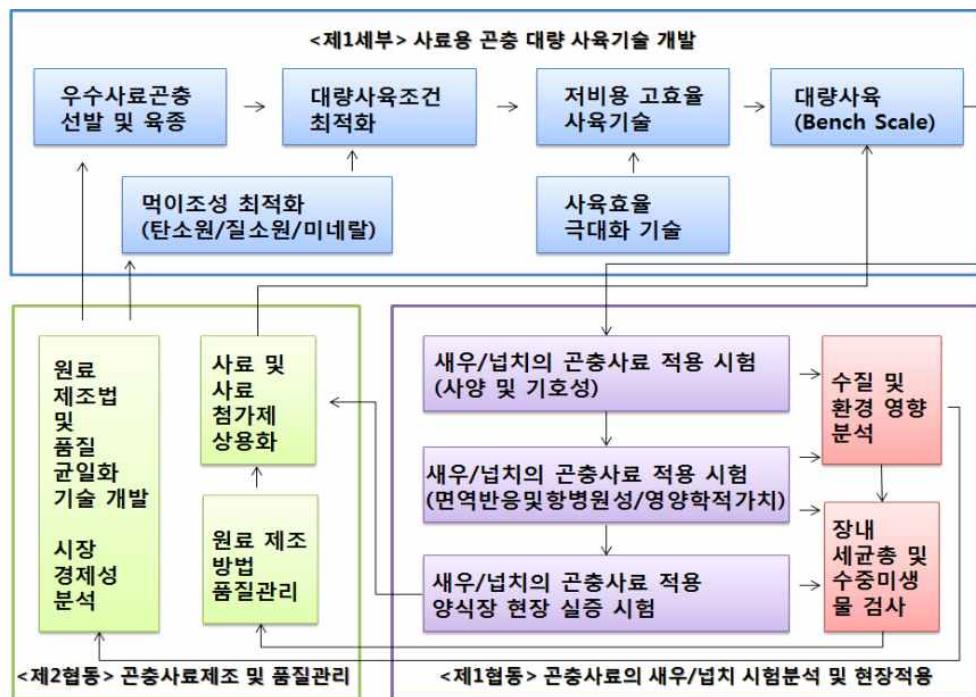
제3절 : 연구 개발 범위

본 연구과제의 목표는 “**곤충을 이용한 양식어류용 사료 원료 개발**”을 소과제로 설정하여, 제1세부과제에서 유용 곤충 선발 및 대량생산에 대한 연구를 수행하며, 협동1과제에서 양식어류 중 새우와 넙치에서 사양시험/영양학적가치/독성시험/면역학적 항병원성 효과 및 양식장에서의 실증 시험과 수질/환경분석 및 미생물 메타유전체학(metagenomics) 분석을 수행함. 제2 협동과제에서는 곤충사료를 실제로 제조하며 품질관리 매뉴얼을 작성하며, 상용화를 통한 곤충 산업화를 위한 연구개발을 수행한다.

본 연구과제의 목표인 “**곤충을 이용한 양식어류용 사료 원료 개발**”을 달성하기 위한 추진전략으로서 각 분야의 전문가로 구성된 팀을 구성하여, 제1세부과제에서 유용 곤충 선발 및 대량 생산에 대한 연구를 수행하며, 협동1과제에서 양식어류 중 새우와 넙치에서 사양시험/영양학적 가치/독성시험/면역학적 항병원성 효과 및 양식장에서의 실증 시험과 수질/환경분석 및 미생물 메타유전체학(metagenomics) 분석을 수행함. 제2협동과제에서는 곤충사료를 실제로 제조하며 품질관리 매뉴얼을 작성하며, 상용화를 통한 곤충산업의 산업화를 위한 연구개발을 수행하여 5개의 연구개발 Track이 동시에 진행하며 상호 유기적인 정보 피드백 협력체계를 구성한다.

구분	내 용
최종목표	곤충을 이용한 양식어류용 사료원료 개발
세부목표	양식어류에 적합한 곤충 종 선발 및 경제적 대량생산 체계 구축 곤충사료의 양식어류 및 수질환경에 대한 영향 분석 평가 곤충사료의 생산관리 및 품질균일화 기술 개발

본 연구과제의 팀 구성 및 연구 범위에 따른 추진 체계는 다음 도식과 같다.



제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 : 국내 연구 현황

국립수산과학원(원장 손재학)은 2012년 3월 국립수산과학원에서 열린 한·미 해양과학기술협력 제6차 양식분과 패널회의에서 ‘어분 대체사료개발’이 최우선 연구 과제로 선정됐다고 밝혔다. 태평양수산관리위원회(PFMC)의 보고서에 따르면 2000년대 들어 중국 등 동남아지역을 중심으로 양식생산량이 크게 늘면서 양식사료 단백질원인 어분 생산을 위한 잡어류 수요가 늘어나는 반면 수산물의 지속적인 남획과 기후변화 등으로 어획량은 정체 내지 감소추세를 보이고 있어 미국의 잡어류 보호정책으로 어분가격 상승시 양식업계를 비롯한 수산업계의 어려움이 가중될 수 있으므로 국제 어분가격변화를 주시하는 동시에 어분수입의존도를 낮추기 위한 관심과 지원을 확대해 나가야할 것이다 (안재현 한국해양수산개발원(KMI) 전문연구원, 2012).

국내에서 곤충 및 양식 어류를 대상으로 한 연구과제는 다음과 같다: 식용곤충을 이용한 양식 사료 어분대체원 개발 (순천향대, 2015), 곤충자원을 이용한 양돈사료화 이용 기술 및 제품 개발 (농과원, 2013), 어류 양식장 및 산란계 어분 시장을 목표로 사료용 곤충 연구 (유용곤충연구소, 2012), 품목(산업곤충)별 농업소득 향상 운영 매뉴얼(축산분야) (농진청, 2011), 농업분야 곤충자원 활용실태와 향후과제 (한국농촌경제연구원, 2007).

제2절 : 국외 연구 현황

Neptune Industries사는 미시시피 대학과 공동으로 곤충을 사료의 단백질 원료로 사용하기 위한 연구를 수행 하여 곤충에서 추출한 단백질을 “Ento-Protein™”이라 명명하고 상업적인 생산 중이며 (USDA, 2013), 영국에서는 식물성 단백질 발효를 통한 어분 대체 사료를 연구하고 있다 (영국 리버풀대학교, 2012). 일본송어촉진협회는 박즙이 함유된 양조장 건조곡물 (DDGS)의 양식사료 활용실험에서 사료의 비용절감과 아울러 양식어류의 중중률이 동일하거나 더욱 더 향상되었음을 확인하였다 (DDGS 세미나, 2010). 또한, 곤충이 함유된 무지개송어용 사료가 연구되었다 (Idaho state university, 2009). 중국은 1950연대 사육을 도입했고, 이후 지속적으로 사회에 확산되어, 각종 특별한 종류의 경제적 동물사육에 응용된 살아있는 생체사료로 장기간의 사육, 황분충 (갈색거저리)에 대한 고급 가공기술을 연구하여 이미 황분충유, 사료 (가축, 물고기, 새우용), 신선도 유지제, 생체비료 등의 상품을 개발하고 있다.

귀뚜라미, 메뚜기, 거저리 등은 여러 연구를 통해 동물사료에 단백질원으로서의 우수한 가치가 입증되었다. 거저리는 대두박과 유사한 단백질 원료로 양계 사료에 급여할 수 있으며 메티오닌이 제한 아미노산으로 밝혀졌다 (Gourlet *et al.*, 1978, Ramos-Elorduy *et al.*, 2002). 훙취를 기준으로 급여했을 경우 거저리는 집파리나 귀뚜라미에 비해 단위 무게 당 에너지 함유량이 높았다.

거저리의 유충인 밀웜은 설치류나 파충류 및 조류의 사료로 이용되어왔다. 세계전역에 걸쳐 서식하며 곡물 및 곡류 부산물 등에 해를 끼치는 해충이나 육류나 깃털 등 다양한 물질을 섭취할 수 있고 영양적 가치가 높음 (Gourlet *et al.*, 1978). 거저리의 영양적 가치는 메티오닌 함량을 제외하면 우유단백질인 카제인이나 농축대두단백과 비슷하며, 생산단가가 매우 낮다. 갈색거저리의 유충의 영양적 가치와 생산방법에 대한 다양한 연구들이 진행되었으

며 (Hernandez, 1987; Lagunes and Garcia 1994), 거저리와 유사한 *Alphitobius diaperinus*, *Tribolium castaneum* (Despins, 1994) 등의 딱정벌레류를 조류에서 급여 하여도 사료 섭취량, 성장 및 육질에 부정적인 영향이 나타나지 않았다. 건조 동애등에의 번데기는 약 42% 단백질과 35% 지방을 함유하고 있으며 오메가3 지방산이 풍부하다 (Newton *et al.*, 1977). 닭 (Hale, 1973), 돼지 (Newton, 1977), 무지개송어 및 메기(St-Hilaire *et al.*, 2007) 등에서 대상동물의 성장을 증진시키거나 대조구와 동일한 효과를 보임이 증명되었다. 동애등에의 번데기가루는 무지개송어의 경우 어분의 25% 수준까지 대체가 가능하며, 동애등에의 지방과 단백질의 분리를 통해 60% 이상의 단백질을 함유한 원료사료를 개발할 수 있다.

제3절 : 국내외 연구현황 비교 및 필요 연구 분야

미국을 비롯한 선진국에서는 이미 곤충을 이용한 어분 사료를 제조 연구 중이며, 친환경/고품질의 사료 단백질 공급원으로서의 가치를 입증하고 본격적인 상업화가 진행 중이며, 전세계 최대의 시장인 중국에서의 새우 및 넙치 소비 증가는 양식어류 사료에서 가장 높은 비중을 차지하는 단백질 부분에 대해 곤충유래의 대체 가능성에 대한 연구의 필요성을 부각시키고 연구결과의 산업화 및 현장 적용 결과의 성공 가능성을 예측하게 한다.

국내 환경에 적합한 사료용 곤충의 선별 및 대량생산체계 구축, 사료화 및 품질관리 체계 확립을 통해 상업화를 안정시키고 연구개발을 지속하여 어종별 맞춤형 사료 및 사료첨가제와 특정 단계용 고효율 사료의 개발이 환경 및 수질영향평가를 통해 친환경 자원임이 밝혀진다면, 농촌 경제에 신성장 동력을 발굴하여 정부핵심과제인 지속가능한 성장을 이룰 수 있는 창조경제의 기틀을 마련하는데 이바지할 수 있을 것으로 사료된다.

제 3 장 연구 수행 내용 및 결과

제1절 : 양식어류 사료용 곤충 종 선발 및 곤충 먹이원 개발

가. 양식어류용 곤충 선발

사료용 곤충의 영양성분(단백질 함량이 높고) 및 사육측면(성장이 빠르며 번식률이 아주 높음) 등을 고려하여 고밀도 집약적 생산이 가능한 후보 곤충을 선발하였다.

	거저리류	귀뚜라미류
사육면적 (80*80cm)		
사육상		
	탈출 방지를 위해서 사육상자 높이 3~4cm 여유만 있으면 됨	탈출방지를 위해 사육상자 뚜껑 필요
소도구	소도구 불필요	입체사육을 위한 다양한 구조물

사료용 곤충(곤충산업의 육성 및 지원에 관한 법령 시행규칙 제5조 제1항, 거저리류, 귀뚜라미류, 동애등에류 등)의 영양성분(단백질 함량이 높고) 및 사육측면(성장이 빠르며 번식률이 아주 높으며. 주로 밀기울이나 농작물 줄기, 겨, 폐기채소 등을 먹는다) 등을 고려 시 고밀도 집약적 생산과 사료화가 충분히 가능하기에 양어사료화 후보 곤충으로 거저리류 선발하였다.

※ 갈색거저리 사육 현황: 공장규모화 생산에서는 사육 작업자의 노력강도 및 사육도구의 규격화로 생산관리에 편리해야 한다. 사육상자는 몇 가지만 고려하여 선택 가능하나, 바닥이 평평하고 견고하고 오래가며가벼운 것이 좋다. 일부 농가에서는 단단한 종이와 쓰던 합판을 이용하여 나무 사육상자를 만들어 사용하는데, 주의할 사항은 상자 내부 측면에 갈색거저리가 벽을 타고 오르지 못하도록 테이핑을 해야 한다.



- 폴리프로필렌 박스(540×360×180mm)
 - 가벼워서 작업자에게 양호, 유충 생육상태 관찰 용이, 단, 상자높이가 높음.

- 종이상자
 - 상자 내부측면에 갈색거저리가 벽을 타고 오르지 못하도록 테이핑 필요



- 플라스틱 서랍장
 - 상자 무게는 가벼우나, 각 서랍을 분리가 안 되며, 배설물 분리가 어려움

- 플라스틱상자(595×385×150mm)
 - 상자가 무거움(상자무게: 20kg)
 - 손잡이가 없어 작업자에게는 불편

표 1. 갈색거저리와 귀뚜라미 영양성분 비교

시료명	성분별 분석 결과 (%)				
	수분	조단백질	조지방	조섬유	조회분
갈색거저리	열풍건조	0.76	46.42	39.42	5.13
	동결건조	5.33	46.44	32.70	4.58
귀뚜라미	4.97	65.92	12.10	6.78	5.75

아미노산(%)	갈색거저리		귀뚜라미
	열풍건조	동결건조	
시스테인(CYS)	0.34	0.52	0.56
메티오닌(MET)	0.51	0.67	0.85
아스파르트산(ASP)	3.70	3.59	6.02
트레오닌(THR)	1.92	1.81	2.39
세린(SER)	2.20	2.09	3.37
글루탐산(GLU)	5.82	5.68	7.69
글리신(GLY)	2.49	2.41	3.07
알라닌(ALA)	3.74	3.69	5.08
발린(VAL)	2.37	2.44	2.68
이소루신(Ile)	1.91	3.56	2.29
루신(Leu)	3.57	3.41	4.93
타이로신(Tyr)	3.28	3.46	3.10
페닐알라닌(Phe)	1.69	1.76	2.08
라이신(Lys)	2.15	2.91	3.29
히스티딘(His)	1.34	1.53	1.39
아르기닌(Arg)	2.31	2.43	4.21
프롤린(Pro)	2.97	3.02	3.37

곤충(갈색거저리, 왕귀뚜라미)은 단백질 40~65%과 지방, 광물질(칼슘, 마그네슘, 인) 및 비타민을 풍부히 함유하고 있고 또한, 인체에 독성이 강한 비소, 카드뮴, 납이 검출되지 않아 단백질 사료원료로서의 가치가 있는 것을 확인하였다. 사료용 곤충 시료 모두 뛰어난 조단백질원의 역할을 할 것이라 기대되며, 특히 갈색거저리는 수분공급을 제외하고는 나머지 성분에서 비교적 높은 수치를 보였으며, 충분한 수분공급만 있다면 사료로서의 가치는 충분히 있다. 왕귀뚜라미는 수분공급에 있어 가장 효율적인 시료라 예상되며, 만약 사료 사용 시 부족한 조지방을 보충하는 게 필요하다.

무기성분 (mg/kg)	갈색거저리		귀뚜라미
	열풍건조	동결건조	
칼슘(Ca)	340.78	434.59	144.14
인(P)	6701.93	7060.70	8924.64
칼륨(K)	7475.33	9479.73	10695.83
나트륨(Na)	1013.62	3644.84	3873.00
마그네슘(Mg)	1902.67	2026.88	1515.00
아연(Zn)	115.61	104.28	280.49
구리(Cu)	18.44	13.27	24.76
납(Pb)	0.00	0.00	0.00
카드뮴(Cd)	0.00	0.00	0.00
비소(As)	0.00	0.00	0.00
수은(Hg)	0.08	0.05	0.18

<i>E. coli</i> O157:H7	불검출	불검출	불검출
<i>Salmonella</i> spp.(정성)	불검출	불검출	불검출

지방	갈색거저리		귀뚜라미
	열풍건조	동결건조	
포화 지방산	23.02	22.26	22.82
불포화 지방산	76.98	77.74	77.18
단가	45.82	46.1	31.95
다가	31.16	31.64	45.23

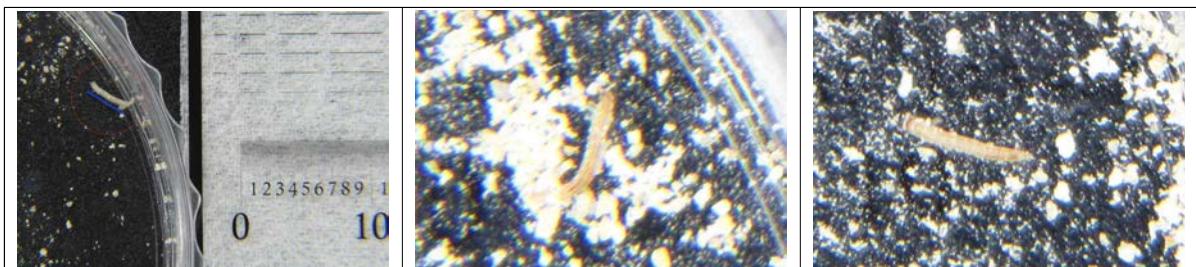
왕귀뚜라미가 타이로신을 제외한 모든 아미노산 수치에서 가장 높은 수치를 기록했으며, 타이로신이 가장 높게 나온 갈색거저리와 비교했을 때도 큰 차이는 없었다. 비록 나머지 시료에서 왕귀뚜라미 보다 낮은 아미노산 함량을 나타냈지만, 그 차이는 크지 않았다. 무기성분은 시료 모두 인체에 독성이 강한 비소, 카드뮴, 납이 검출되지 않아 안정성이 입증되었다. 귀뚜라미는 갈색거저리보다 칼슘과 마그네슘이 낮았고, 아연은 높았다. 지방산은 두 시료 모두 비슷한 성분을 가지고 있음을 확인하였다.

나. 거저리류(아메리카왕거저리) 유충 단계별 발육특성 조사

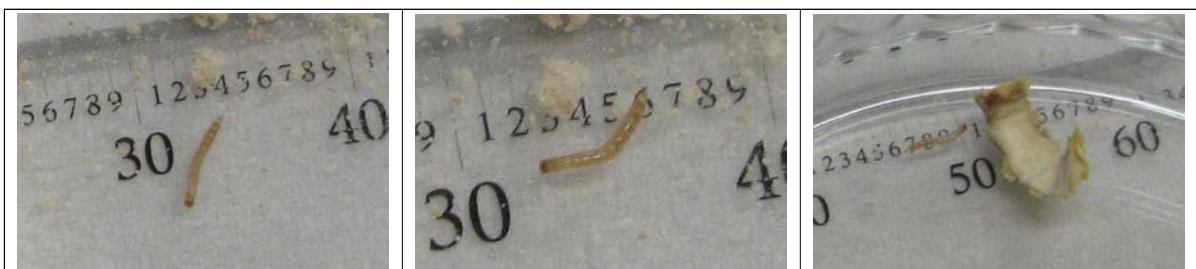
[1령: 부화직후, 평균 2.99mm]



[2령: 평균 3.35mm]



[3령: 평균 4.37mm]



[4령: 평균 5.01mm]



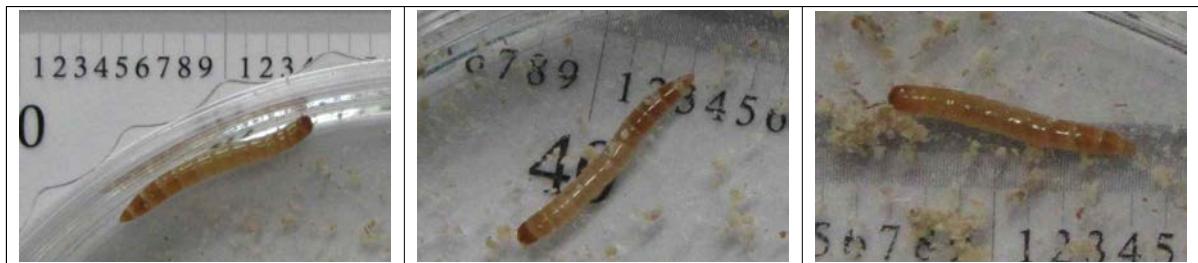
[5령: 평균 6.16mm]



[6령: 평균 7.22mm]



[7령: 평균 8.44mm]



[8령: 평균 9.68mm]



[9령: 평균 11.83mm]



[10령: 평균 14.36mm]



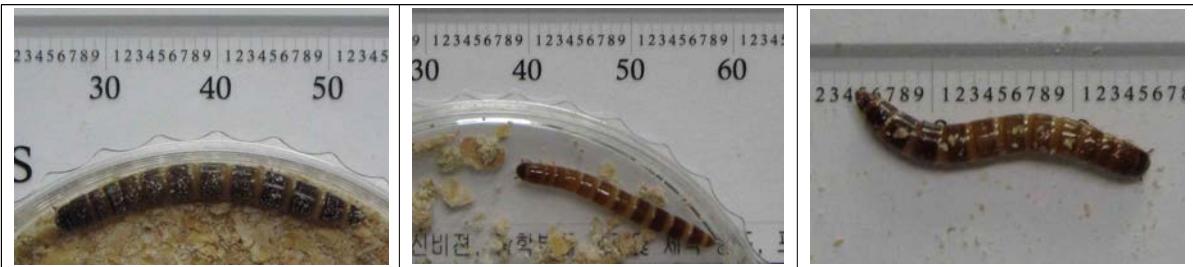
[11령: 평균 16.52mm]



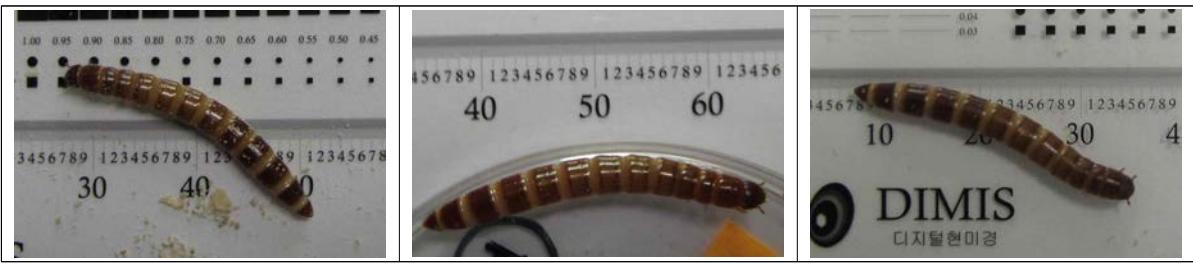
[12령: 평균 19.76mm]



[13령: 평균 24.85mm]



[14령: 평균 30.49mm]



[15령: 평균 35.61mm]



[16령: 평균 41.58mm]



[17령: 평균 45.21mm]



[18령: 평균 47.13mm]



[노숙유충]



[변태기]



[신성충]



아메리카왕거저리 유충은 풍부한 영양성분과 높은 단백질로 살아있는 상태로 동물의 먹이원으로 이용될 뿐만 아니라, 식용곤충으로 활용될 가능성이 높다. 활용도가 높은 아메리카왕거저리 유충의 대량생산을 위해서 유충단계별 발육특성을 밝히는 것은 중요한 의미가 있다. 유충은 부화 전 8-9일의 부화기간을 가졌으며, 1령은 3-4일의 발육기간을 가졌다. 성충이 되기 전에, 대부분의 유충은

15령-18령을 지낸다. 16령과 17령에서 25.71%의 높은 용화율이 관찰되었다. 체장은 각각의 연속적인 령과 함께 점차적으로 증가되었고, 18령에서 최대치를 나타냈다. 유충의 색상은 1령에서 흰색이었으나, 2령 이후부터 점차 갈색이 되었다.

다. 양식어류용 곤충 먹이원 개발

플라스틱 박스(가로 36cm, 세로 27cm, 높이 8cm)에 밀기울을 깔고 노숙이전(가장 왕성한 움직임과 섭식을 하는 시기) 3 ~ 4cm 내외의 유충 30마리 3반복을 넣어 주었다. 먹이로 탈지대두분(10g), 어분(10g)을 페트리디쉬에 넣고 실험군마다 배추(10g)로 주2회 수분 공급하고 관찰(25°C)하였다. 매일 각 페트리디쉬의 각각의 먹이(대두박, 어분)의 선호성 및 감소량을 측정하였다.

(1) 거저리과 유충의 단백질원(동물성 및 식물성) 먹이선호도 조사



그림 1. 거저리과 유충
A, 아메리카왕거저리; B, 갈색거저리

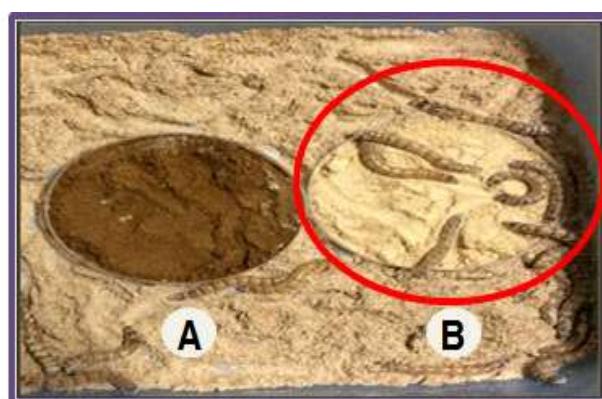


그림 2. 아메리카왕거저리 유충 먹이 선호도 조사

표 2. 아메리카왕거저리 유충의 사료성분에 따른 먹이 섭취율

사료 성분	탈지 대두분 100%	탈지대두분 50%, 밀기울 50%	어분 100%	어분 50%, 밀기울 50%
먹이 섭취율(%)	52.4 ± 16.4	27.9 ± 1.2	9.3 ± 5.4	13.1 ± 2.0

(2) 식물성단백질 첨가에 따른 거저리류 유충의 발육특성

·대상곤충 : 갈색거저리

* 19주 경과 시험 성적

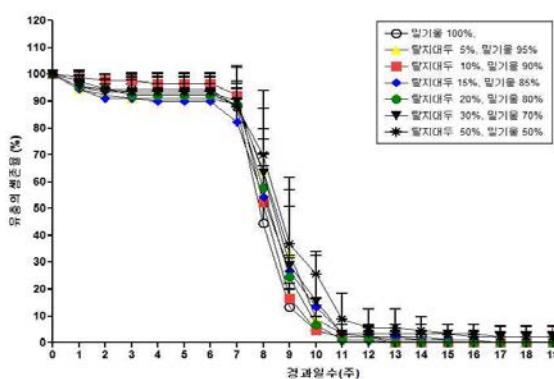


그림 3. 탈지대두분 함량에 따른 유충의 생존율

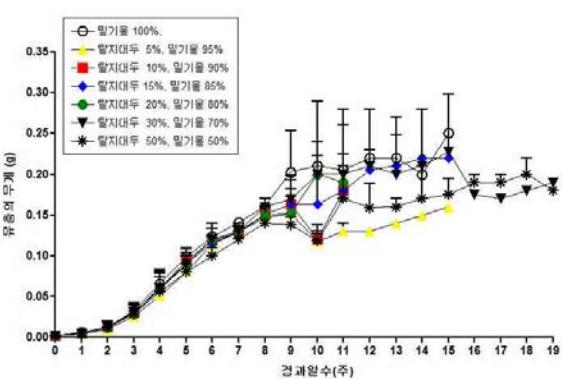


그림 4. 탈지대두분 함량에 따른 유충의 무게

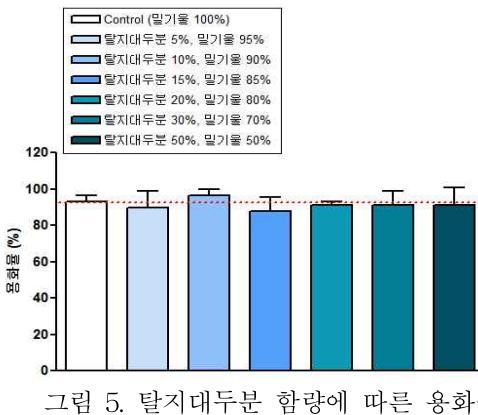


그림 5. 탈지대두분 함량에 따른 용화율

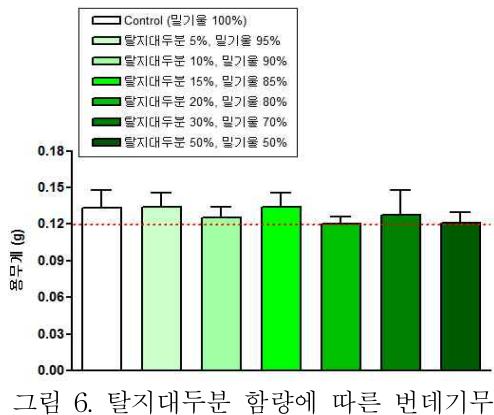


그림 6. 탈지대두분 함량에 따른 번데기무게

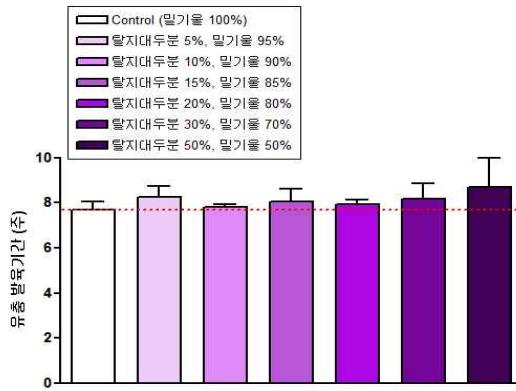


그림 7. 탈지대두분 함량에 따른 유충의 발육기간

일반적으로 갈색거저리 농가에서, 8주 동안 유충을 생산하는 것을 고려할 때, 모든 실험군에서 7주 동안 control과 비슷한 생존율을 보였으며, 특히 8-10주 동안 탈지대두분 20%-50% 첨가조건에서 밀기울 대조군에 비해 더 높은 생존율을 나타냈다. 8주간 유충무개는 모든 탈지대두분 첨가군에서 control과 유사하게 나타났으며, 8주 이후에는 밀기울 대조군에 비해 다소 낮은 무개가 관찰되었다. 용화율은 모든 탈지대두분 첨가조건에서 control과 유사한 수치로 나타났으며, 탈지대두분 10% 첨가군에서는 control 보다 약간 높았다. 번데기무개는 탈지대두분 5%, 15%, 30% 첨가조건에서는 control과 거의 비슷하였고, 탈지대두분 10%, 20% 첨가조건에서 control 보다 약간 낮은 수치가 나타났으며, 탈지대두분 50% 첨가조건에서는 control에 비해 가장 낮게 관찰되었다. 유충의 발육기간은 탈지대두분 5-30% 첨가조건에서는 control과 유사하게 나타났으나, 탈지대두분 50% 첨가조건에서는 control에 비해 약간 길었다.

·대상곤충 : 아메리카왕거저리

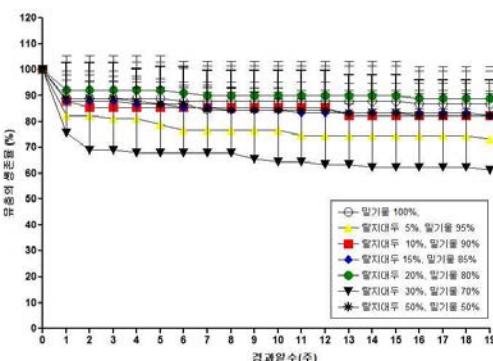


그림 8. 탈지대두분 함량에 따른 유충의 생존율

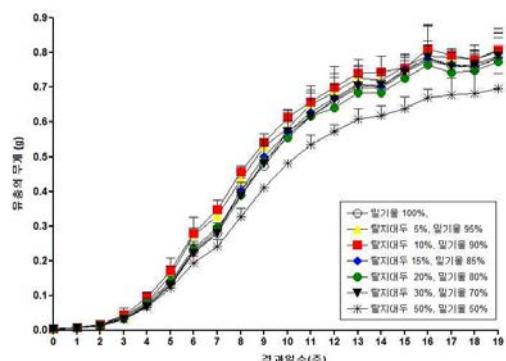


그림 9. 탈지대두분 함량에 따른 유충의 무게

아메리카왕거저리의 발육특성 조사에서 19주차 시험성적은 2주~19주차의 유충의 생존율은 거의 일정하게 나타났으며, 탈지대두분 5%, 30% 첨가조건을 제외하고는 control과 유사한 생존율이 관찰되었다. 19주까지 유충의 무게는 control 포함한 모든 실험군에서 증가양상을 보였고, 탈지대두분 10%에서 가장 큰 증가양상이 관찰되었고, 탈지대두분 50% 첨가군의 경우 control에 비해 다소 낮은 유충의 무게가 나타났다.

(3) 동물성단백질 첨가에 따른 거저리류 유충의 발육특성

· 대상곤충 : 갈색거저리

* 19주 경과 시험 성적

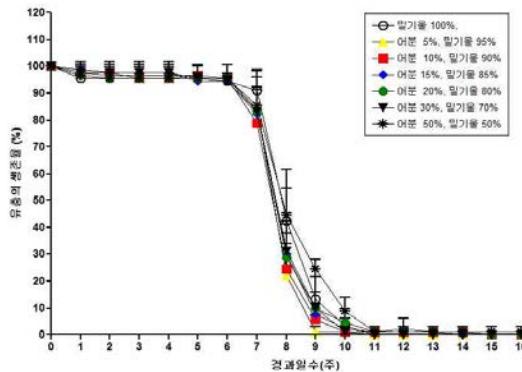


그림 10. 어분 함량에 따른 유충의 생존율

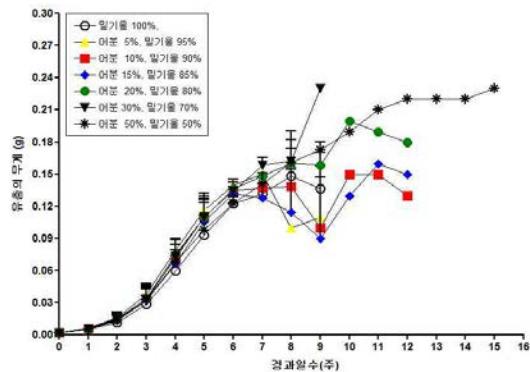


그림 11. 어분 함량에 따른 유충의 무게

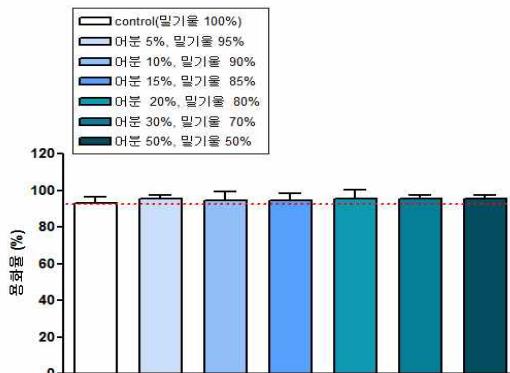


그림 12. 어분 함량에 따른 용화율

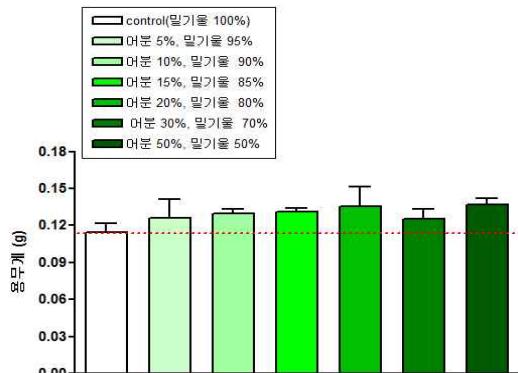


그림 13. 어분 함량에 따른 번데기 무게

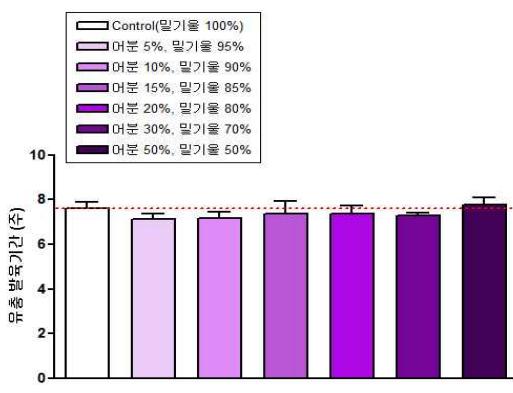


그림 14. 어분 함량에 따른 유충 발육기간

일반적으로 갈색거저리 농가에서, 8주 동안 유충을 생산하는 것을 고려할 때, 모든 실험군에서 control과 비슷한 생존율을 보였으며, 특히 8~9주 동안 50% 어분 첨가조건에서는

밀기울 대조군에 비해 약간 높은 생존율을 나타냈다. 8주간 유충무게는 모든 어분 첨가군에서 control과 유사하게 나타났으며, 특히 9주째 관찰에서 5-15% 어분 첨가군은 control 보다 낮았고, 20-50% 어분 첨가조건에서는 control 보다 높게 관찰되었다.

용화율은 모든 어분 첨가조건에서 control과 거의 비슷하였고, 용무개는 control에 비해 모든 어분 첨가조건에서 조금 높게 나타났으며, 특히 어분 20%, 50% 첨가조건에서 높게 관찰되었다. 유충 발육기간은 control과 모든 어분 첨가조건에서 비슷하게 관찰되었다.

·대상곤충 : 아메리카왕거저리

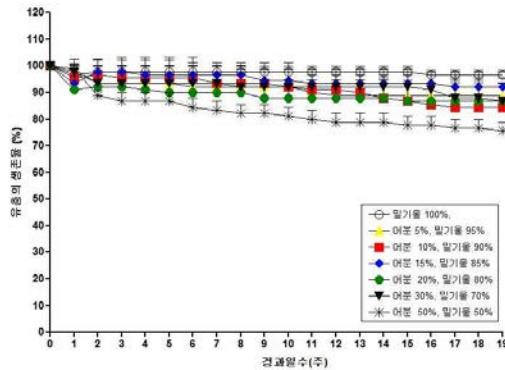


그림 15. 어분 함량에 따른 유충의 생존율

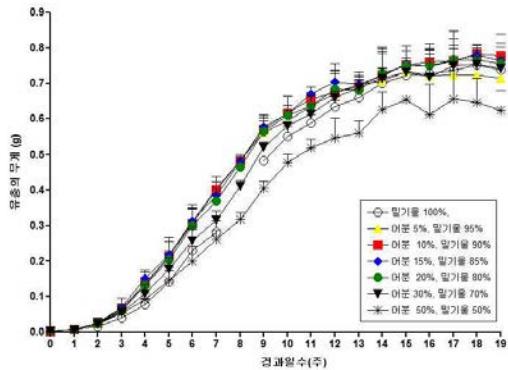


그림 16. 어분 함량에 따른 유충의 무게

아메리카왕거저리의 발육특성 조사에서 19주차 시험성적은 2주-19주의 유충의 생존율은 거의 일정하게 나타났으며, 탈지대두분 50% 첨가조건에서는 control에 비해 약간 낮은 생존율이 관찰되었다. 19주까지 유충의 무게는 control 포함한 모든 실험군에서 비슷한 증가양상을 나타냈고, 어분 50% 첨가군의 경우 control에 비해 다소 낮은 유충의 무게가 관찰되었다.

라. 식물성단백질 첨가에 따른 갈색거저리 산란성 시험

같은 날짜에 우화된 암,수 5쌍의 신성충을 밀기울 7g이 깔린 페트리디쉬 (지름 10cm, 높이 1cm)에 옮기고, 성충이 나가지 못하도록 플라스틱 박스 (가로 27cm, 세로 36cm, 높이 8cm)에 넣어주었다. 원활한 수분 공급을 위해 일주일마다 1회 배추 7 g 및 거즈에 적신 물을 함께 공급하였다. 매일 페트리디쉬 (채란판)를 25 °C 사육실에서 페트리디쉬에 있는 밀기울을 걷어낸 후, 매일 산란 기간, 산란수를 확인하였고, 결과의 신뢰성을 위해 실험은 3회 반복하였다. 또한, 페트리디쉬 바닥 외에 밀기울 표면에 보이지 않게 알이 붙어 있을 가능성이 있으므로 밀기울에 남아있는 알은 따로 산란수를 기록하여 총산란수에 반영하였다. 산란수 측정 후, 암,수 5쌍의 성충을 새로운 밀기울 7 g이 깔린 페트리디쉬에 옮겼다. 먹이 비율은 밀기울 100%를 대조군으로 삼고, 식물성 단백질(탈지대두분) 및 동물성 단백질(어분) 첨가 실험군은 실험시료와 비율을 고려하여 혼합하였다.

사료 성분	control (밀기울 100%)	탈지대두분 10%, 밀기울 90%	탈지대두분 30%, 밀기울 70%	탈지대두분 50%, 밀기울 50%
산란기간 (일)	75.67	74.67	75.33	76.00
산란수 범위 (개)	1.60 – 16.20	1.07 – 16.00	1.53 – 16.80	0.73 – 16.40
산란수/암컷 1마리 (개)	453.73	462.93	447.93	432.13

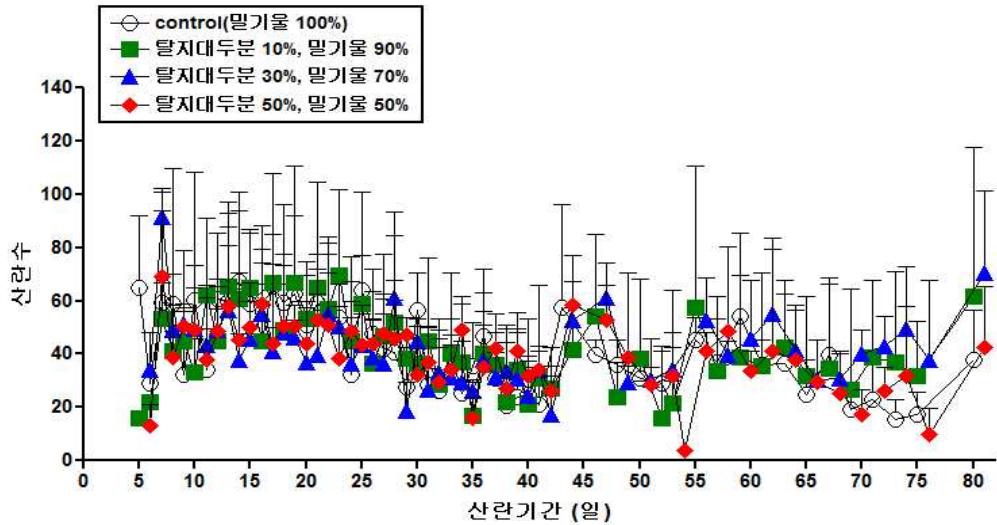


그림 17. 탈지대두분 첨가에 따른 산란기간별 평균 산란수 (암, 수 5쌍 기준, 3회 반복)

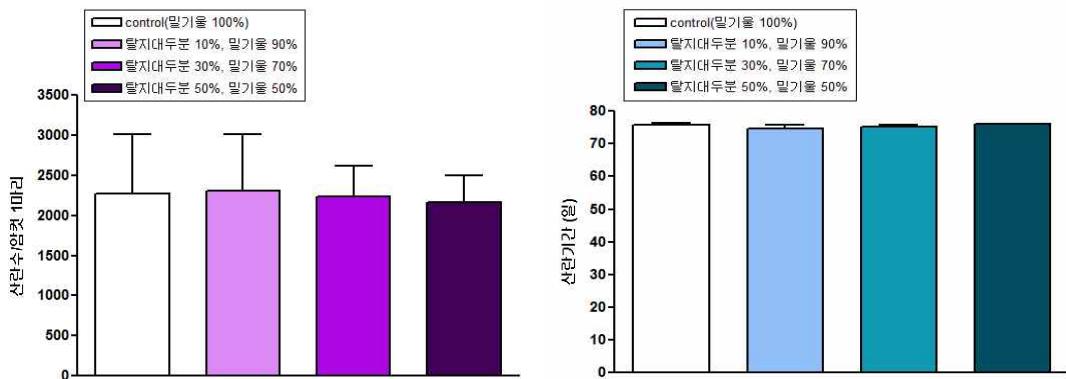


그림 18. 탈지대두분 첨가에 따른 산란수/암컷 1마리

그림 19. 탈지대두분 첨가에 따른 산란기간

밀기울에 식물성 단백질인 탈지대두분을 함량에 따라 첨가한 모든 실험군의 산란기간, 산란수 범위, 산란수/암컷 1마리를 조사한 결과, 밀기울 대조군과 탈지대두분 함량에 따른 모든 실험군에서 산란수 및 산란기간에 거의 차이가 나타나지 않았다.

마. 동물성단백질 첨가에 따른 갈색거저리 산란성 시험

사료 성분	control (밀기울 100%)	어분 10%, 밀기울 90%	어분 30%, 밀기울 70%	어분 50%, 밀기울 50%
산란기간 (일)	75.33±1.15	70.33±1.53**	69.00±0.58**	64.00±0.58**
산란수 범위 (개)	1.60 – 16.20	2.27 – 19.27	2.80 – 22.93	1.67 – 23.13
산란수/암컷 1마리 (개)	453.73±148.73	490.33±101.81	580.87±30.04	534.20±41.25

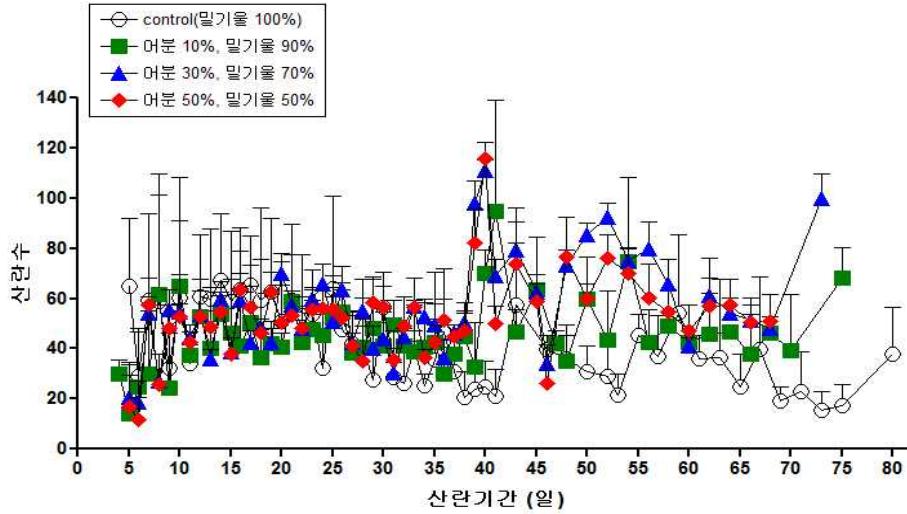


그림 20. 어분 첨가에 따른 산란기간별 평균 산란수 (암, 수 5쌍 기준, 3회 반복)

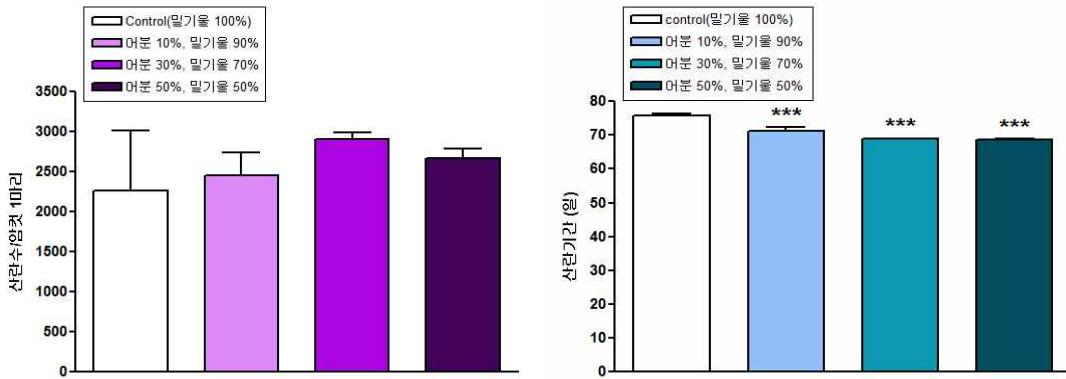


그림 21. 어분 첨가에 따른 산란수/암컷 1마리

그림 22. 어분 첨가에 따른 산란기간

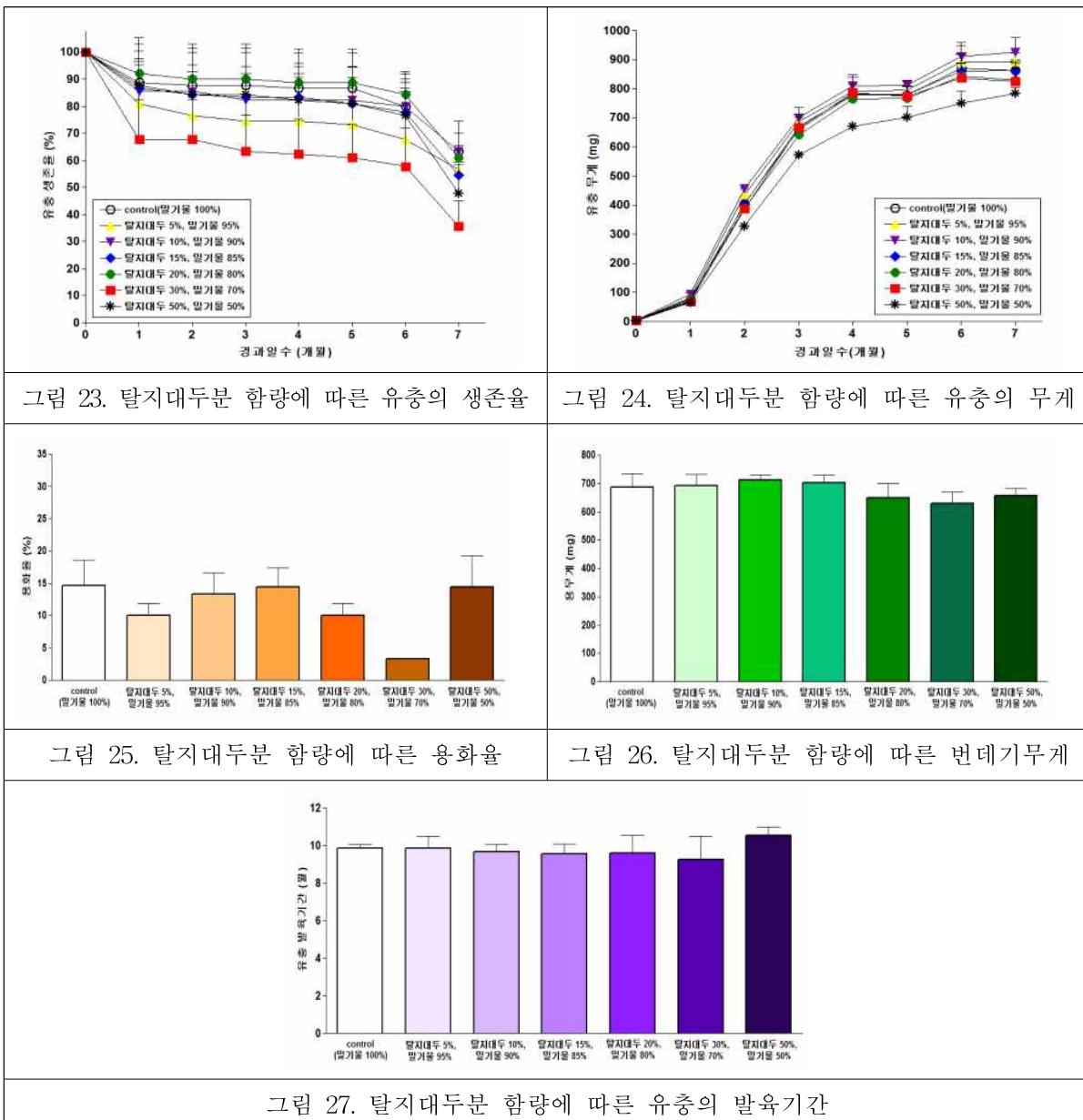
산란수/암컷 1마리는 밀기울 대조군에 비해 어분을 첨가한 모든 실험군에서 더 많았고, 어분 30%, 밀기울 70% 첨가 조건에서의 산란수가 가장 많았다. 산란기간은 밀기울 대조군에 비해 어분을 첨가한 모든 실험군에서 2일~8일 짧게 나타났으며, 모든 어분 첨가조건의 산란기간은 통계적으로 유의한 수준으로 대조군에 비해 짧았다.

제2절 : 생체시료 건조방법 구명 및 사육 효율 극대화 기술 개발

가. 거저리류 유충 먹이원 개발

(1) 탈지대두분(식물성 단백질) 첨가에 따른 아메리카왕거저리 유충의 발육특성 조사

아메리카왕거저리 7~8령 유충(모든 실험군은 유충 30마리)을 지름 10 cm, 높이 4 cm 용기에 넣고 대조군(G1; 100% 밀기울), 실험군1(G2; 5% 탈지대두분, 95% 밀기울), 실험군2(G3; 10% 탈지대두분, 90% 밀기울), 실험군3(G4; 15% 탈지대두분, 85% 밀기울), 실험군4(G5; 20% 탈지대두분, 80% 밀기울), 실험군5(G6; 30% 탈지대두분, 70% 밀기울), 실험군6(G7; 50% 탈지대두분, 50% 밀기울)을 만들고, 3회 반복실험하였다. 원활한 수분 공급을 위해 1주 일마다 1회 배추 7g을 공급하였다. 유충의 생존율, 유충무게/마리, 용화율, 용무게, 유충 발육기간을 비교관찰하였다.



탈지대두분 함량에 따른 유충의 생존율은 control군과 탈지대두 20% 첨가군에서 비슷하게 관찰되었으며, 탈지대두 10%, 15%, 50% 첨가군에서 비슷하게 관찰되었으나 control군에 비해 약간 낮은 생존율이 나타났고, 탈지대두 5% 첨가군 및 탈지대두 30% 첨가군에서는 control군에 비해 낮은 생존율이 관찰되었다. 유충무게는 전체적으로 증가폭이 비슷하였으나, 탈지대두 50%에서는 다른 첨가군에 비해 증가폭이 낮게 관찰되었다. 유충의 발육기간은 control군과 비교했을 때, 탈지대두 5%, 10%, 15%, 20%, 30% 첨가군은 비슷하였으나, 탈지대두 50% 첨가군에서는 조금 긴 발육기간이 관찰되었다. 전체적으로 용화율이 낮게 관찰되었고, 탈지대두 10%, 15%, 50% 첨가군에서는 control군과 비슷한 용화율이 나타났고, 탈지대두 5%, 20% 첨가군은 control군에 비해 조금 낮은 용화율이 관찰되었고, 탈지대두 30% 첨가군에서는 가장 낮은 용화율이 관찰되었다. 탈지대두 함량에 따른 번데기무게는 모든 군에서 비슷하게 관찰되었다.

유충의 전반적인 발육특성을 고려했을 때, 탈지대두 10~20% 첨가군이 적합할 것으로 판단된다.

(2) 어분(동물성 단백질) 첨가에 따른 아메리카왕거저리 유충의 발육특성 조사

아메리카왕거저리 7~8령 유충(모든 실험군은 유충 30마리)을 지름 10 cm, 높이 4 cm 용기에 넣고 대조군(G1; 100% 밀기울), 실험군1(G2; 5% 어분, 95% 밀기울), 실험군2(G3; 10% 어분, 90% 밀기울), 실험군3(G4; 15% 어분, 85% 밀기울), 실험군4(G5; 20% 어분, 80% 밀기울), 실험군5(G6; 30% 어분, 70% 밀기울), 실험군6(G7; 50% 어분, 50% 밀기울)을 만들고, 3회 반복실험하였다. 원활한 수분 공급을 위해 1주일마다 1회 배추 7g을 공급하였다. 유충의 생존율, 유충무게/마리, 용화율, 용무게, 유충 발육기간을 비교관찰하였다.

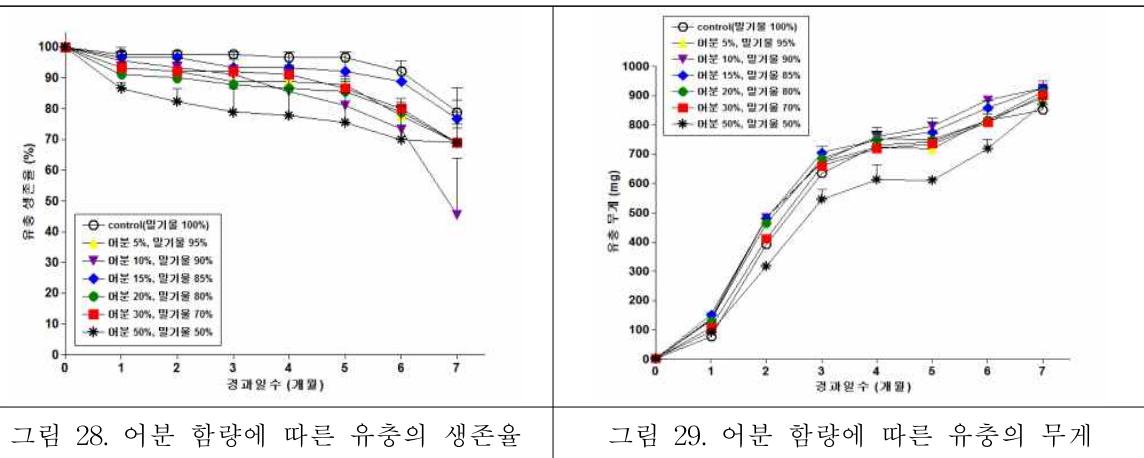


그림 28. 어분 함량에 따른 유충의 생존율

그림 29. 어분 함량에 따른 유충의 무게

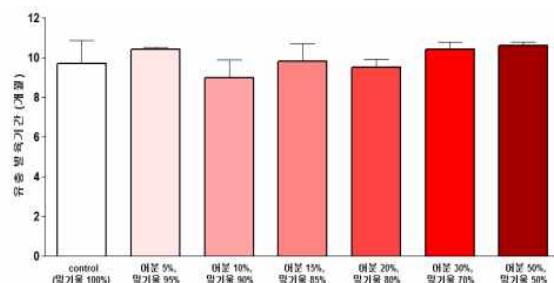


그림 30. 어분 함량에 따른 유충의 발육기간

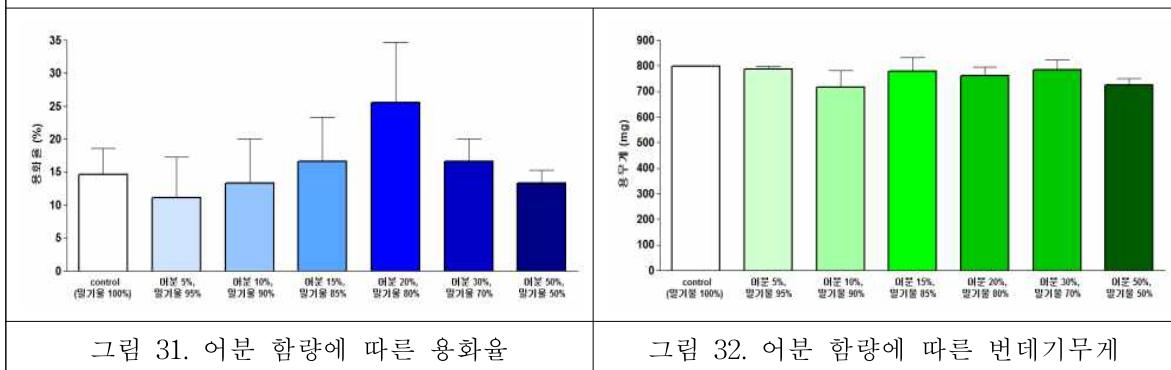


그림 31. 어분 함량에 따른 용화율

그림 32. 어분 함량에 따른 번데기무게

어분 함량에 따른 유충의 생존율은 control과 어분 15% 첨가군에서 비슷한 수치로 높게 관찰되었고, 어분 5%, 10%, 20%, 30% 첨가군에서 control군 보다 약간 낮은 생존율이 나타났고, 어분 50%에서 가장 낮은 생존율이 관찰되었다. 유충의 무게는 어분 50% 첨가군을 제외한 control군을 포함한 모든 첨가군에서 비슷하게 나타났으며, 50% 첨가군에서 유충 무게가 가장 낮게 관찰되었다. 유충 발육기간은 control군을 포함한 모든 첨가군에서 비슷하게 나타났다. 용화율은 전체적으로 낮게 관찰되었으나, 어분 20% 첨가군에서 control군보다 높은 용화율이 관

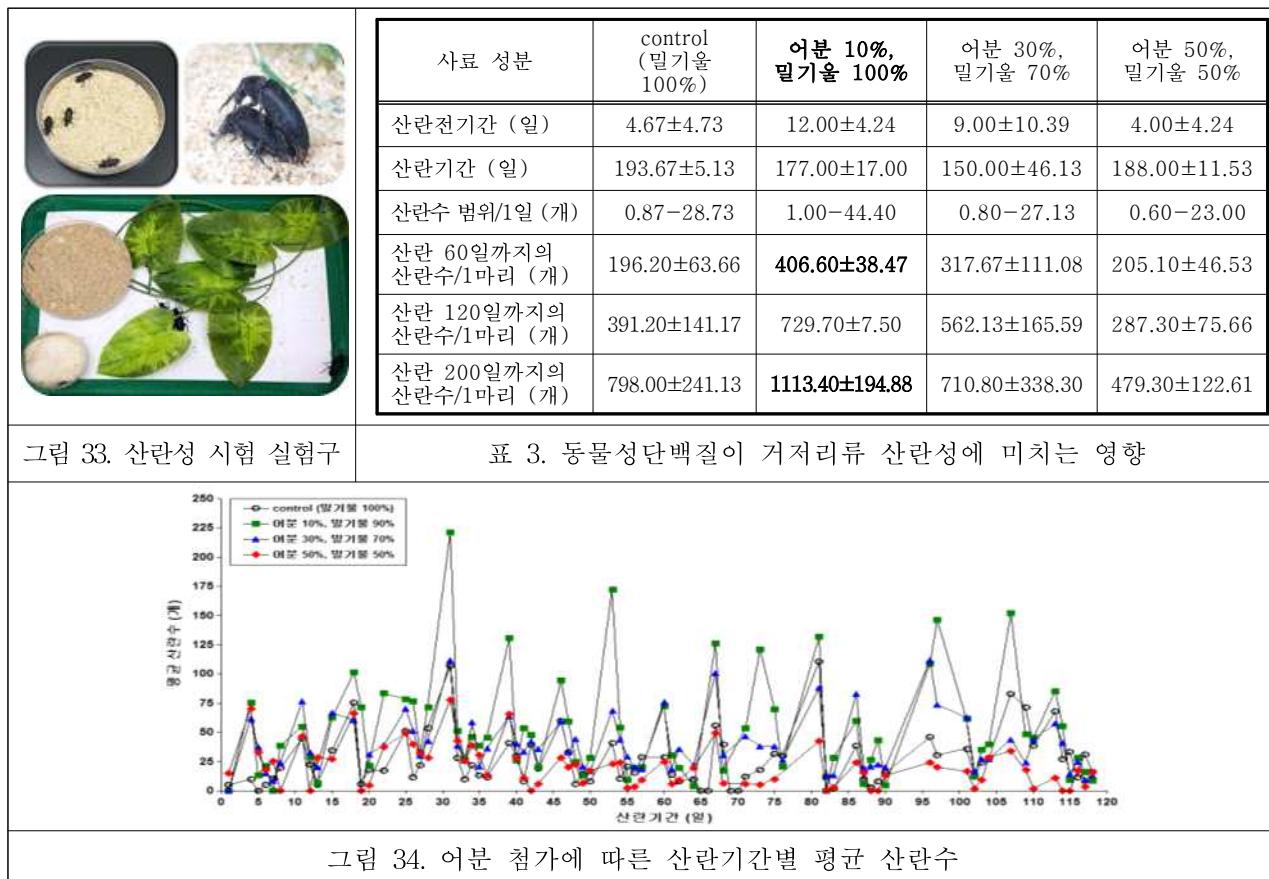
찰되었다. 번데기무게는 모든 실험군에서 비슷하게 나타났다.

어분 함량에 따른 전반적인 유충의 발육특성조사 결과를 고려했을 때, 어분 15%-20% 첨가군이 적합하다고 판단된다.

나. 동물성 단백질원 첨가에 따른 거저리류 성충의 산란성 조사

(1) 어분 첨가에 따른 아메리카왕거저리 성충의 산란성 조사

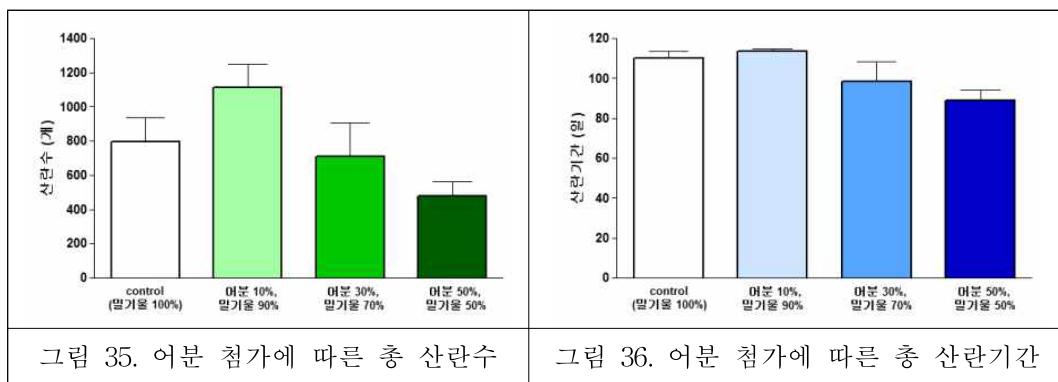
비슷한 시기에 우화된 암·수 5쌍의 성충을 대조군(G1; 100% 밀기울), 실험군1(G2; 10% 어분, 90% 밀기울), 실험군2(G3; 30% 어분, 70% 밀기울), 실험군3(G4; 50% 어분, 50% 밀기울)이 깔린 페트리디쉬(지름 10 cm, 높이 1 cm)에 옮기고, 성충이 나가지 못하도록 플라스틱 박스(가로 27 × 세로 36 × 높이 8 cm)에 넣어주고, 3회 반복실험하였다. 먹이 비율은 밀기울 7g을 100%를 기준으로 실험시료와 비율을 고려하여 혼합하였다. 원활한 수분 공급을 위해 1주일마다 1회 배추 7g 및 거즈에 적신 물을 함께 공급하였고, 어두운 곳을 좋아하는 습성을 고려하여 인조 빛을 넣어주었다. 매일 페트리디쉬(채란판)에 있는 밀기울을 걷어낸 후 산란수를 확인하였다. 또한, 페트리디쉬 바닥 외에 밀기울 표면에 보이지 않게 알이 붙어 있을 가능성이 있으므로 밀기울에 남아있는 알은 따로 산란수를 기록하여 총산란수에 반영하였다. 산란수 측정 후, 암·수 5쌍의 성충을 새로운 밀기울 7g이 깔린 페트리디쉬에 옮겼다.



산란전기간은 control과 어분 50% 첨가군에서 4~5일로 비슷하게 나타났으나, 어분 10%와 어분 30% 첨가군에서는 9~12일로 2배 정도 길게 관찰되었다. 산란기간은 control군에서 가장 길었고, 어분 30% 첨가군에서 가장 짧게 나타났다. 아메리카왕거저리는 갈색거저리에 비해 산란

기간이 길게 나타났으며, control군에 비해 어분 10% 첨가군에서 산란 60일까지의 산란수는 control군에 비해 2배 이상 많았으며, 120일까지의 산란수는 1.8배이상, 200일까지의 산란수도 1.3배이상으로 control군에 비해 많은 산란수를 나타냈다. 어분 10% 첨가군에서는 산란 60일과 120일까지는 control보다 높은 산란수를 나타냈으나, 200일까지의 산란수는 control보다 적게 관찰되었다.

어분 50% 첨가군의 경우, 산란 60일까지의 산란수는 control과 비슷하게 나타났으나, 120일과 200일까지의 산란수는 control군보다 적은 산란수가 관찰되었다.



산란기간별 평균 산란수의 경우, 어분을 10% 첨가한 군에서 30일째의 산란수가 가장 많았다. 어분 첨가에 따른 총 산란수는 control에 비해 어분 10% 첨가군에서 약 1.4배 정도 많은 산란수가 관찰된 반면에 어분 30% 첨가군은 control보다 조금 적은 산란수를 나타냈고, 어분 50% 첨가군은 control군에 비해 약 0.6배 적은 산란수가 나타났다. 총 산란기간은 control군과 어분 10% 첨가군의 경우 비슷한 수치로 나타났고, 어분 30%와 어분 50% 첨가군에서는 control에 비해 낮게 나타났다.

다. 아메리카왕거저리 사육모형 개발

(1) 유충 사육밀도 조사

9령-10령 유충을 사육상자(규격: 가로 12 × 세로 10 × 높이 8 cm)에 각각 25마리, 50마리, 75마리, 100마리, 150마리, 200마리씩 넣어 사육하였고 밀기울은 각각 300g 넣어주었고, 3회 반복실험하였다. 수분공급을 위해 배추를 주마다 2회씩 주었다. 주 1회씩 유충의 생존율 및 유충의 무게를 측정하였다. 유충 사육에 적정한 밀도를 구명하기 위해 본 실험을 수행하였고, 현재 실험은 진행 중에 있으며, 용화율 및 용무게까지 측정할 예정이다. 9령 유충에서 시작하여 18주까지 밀도에 따른 유충의 생존율과 유충의 무게를 측정하였다.



그림 37. 유충 밀도실험

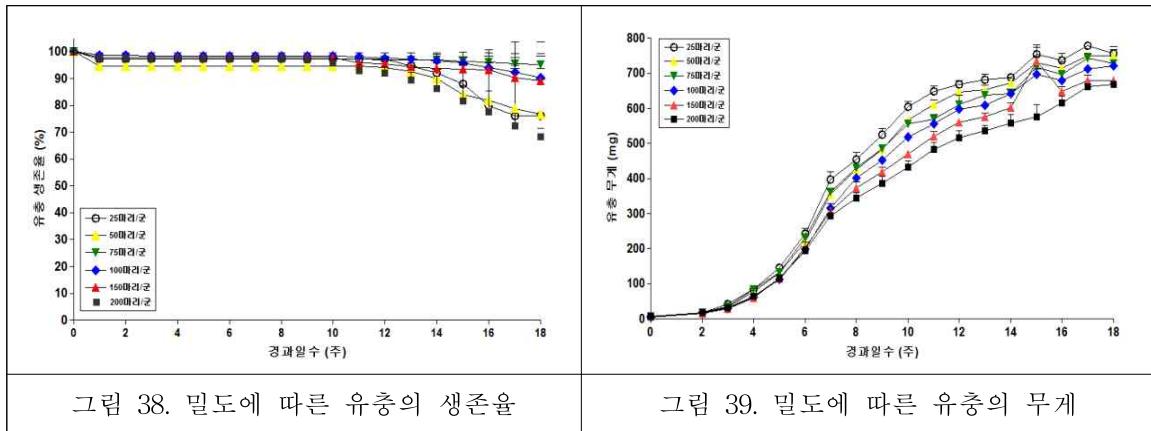


그림 38. 밀도에 따른 유충의 생존율

그림 39. 밀도에 따른 유충의 무게

유충의 생존율은 모든 밀도에서 약 10주까지 변화가 거의 없다가 10주 이후부터 생존율이 떨어지기 시작하였고, 특히 200마리 군에서 60%대의 모든 군에서 가장 낮은 생존율이 관찰되었다. 유충의 무게는 18주까지 관찰했을 때, 전체적으로 25마리 군에서 가장 증가폭이 크게 나타났으며, 200마리 군에서는 가장 낮은 무게 증가율이 관찰되었다. 10주-11주 정도에서 군 간 무게 증가폭의 차이가 크게 나타났으며, 17주부터 유충무게의 증가폭이 작게 관찰되었다.

(2) 용화율 향상 실험

아메리카왕거저리 유충 사육농가에서 부화유충이나 부화유충으로부터 4개월 정도되었을 때, 대량 폐사되는 경우가 많이 나타났다. 따라서, 유충의 폐사율을 낮추고, 용화율을 향상시키는 방법을 모색하는 게 필수적이며, 아메리카왕거저리 종령유충의 어둡고 독립된 공간을 선호하는 습성을 고려하여 구조물을 활용하여 용화율을 향상시키는 실험을 진행하였다.

부화유충으로부터 4개월된 유충을 구조물 없이 사육상자에 밀기울만 바닥재로 깔아놓은 ① control군, ② 깔짚을 바닥재로 깔고 오아시스를 넣은 군, ③ 깔짚을 바닥재로 깔고 그 위에 계란판을 놓은 후, 차광용 덮개로 마분지를 덮은 군으로 나누어 각각 100마리씩 넣어 주었다. 5-7일 정도의 간격으로 유충의 사망률과 용화율을 조사하였고, 3회 반복실험하였다.



실험 시작일로부터 104일까지의 유충 사망률은 무처리군인 control군은 11.67%, 깔짚과 오아시스 첨가군은 8.33%, 깔짚, 계란판과 마분지 첨가군에서는 3.33%였다. 모든 실험군에서 유충의 사망률은 높지 않았으며, 특히 계란판과 마분지 첨가군에서 5% 미만의 낮은 유충 사망률이 관찰되었다. 용화율은 무처리 대조군의 경우, 104일까지 측정하였을 때 전반적으로 1% 미만의 낮은 용화율을 나타냈고, 99일째 3%로 낮은 용화율을 나타냈다. 오아시스 첨가군에서는 46일(18%)과 68일(20%)에 집중적으로 번데기가 나왔고, 전체 용화율은 61.00%로 높은 편이었다. 계란판

에 암막효과를 가지는 마분지를 덮은 군은 14일(19.33%), 19일(17.33%), 25일(14.00%)에 집중적으로 번데기가 나왔고, 다른 실험군에 비해 비교적 빠른 시기에 번데기가 만들어졌다.

아메리카왕거저리의 용화율을 높이기 위해서는 어둡고 독립된 환경을 조성해주는 것이 필요하며, 계란판에 마분지를 덮어주었을 때가 용화시기가 빨리 나타나고, 80% 이상의 높은 용화율을 나타냈다.

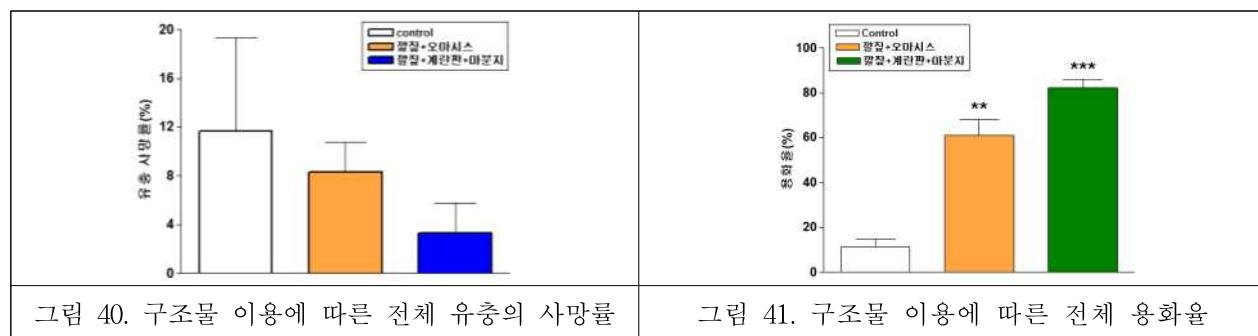


그림 41. 구조물 이용에 따른 전체 용화율

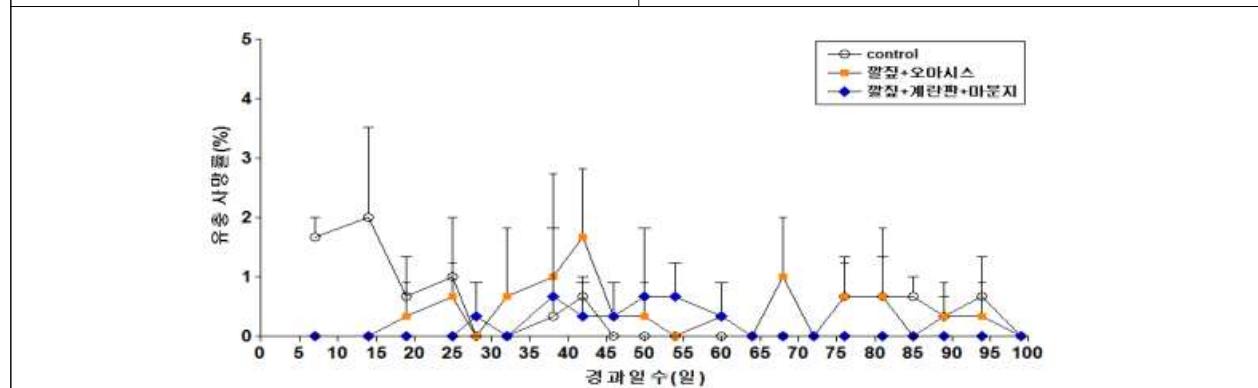
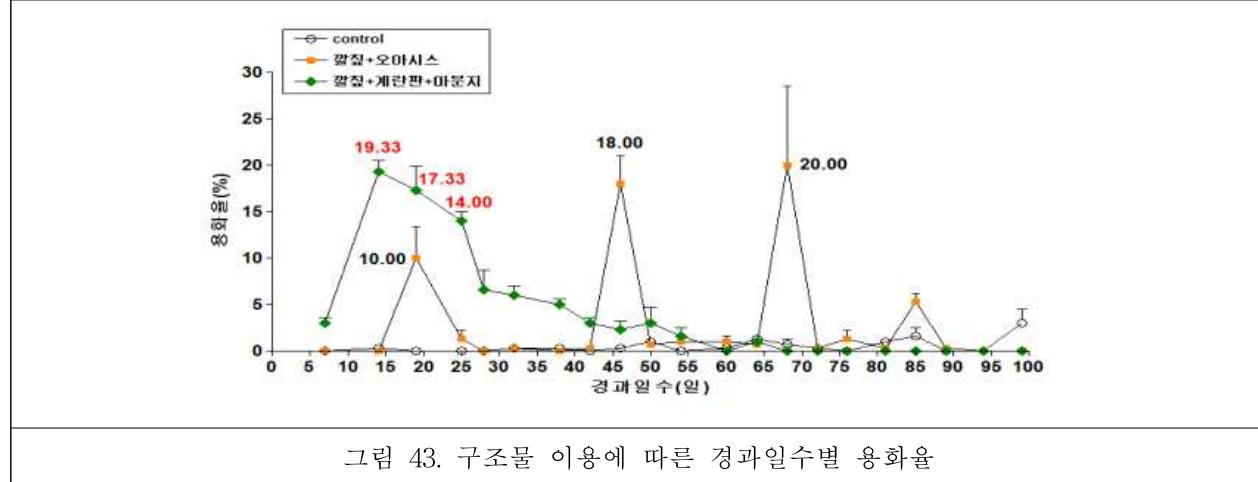


그림 42. 구조물 이용에 따른 경과일수별 유충의 사망률



따라서, 본 실험결과에 따르면 밀기울을 바닥재로 깐 후 계란판을 놓고 마분지를 덮는 방법이 아메리카왕거저리 유충의 용화율을 향상시키는 최적의 조건이었다.

라. 생체시료 건조방법 구명

(1) 건조방법에 따른 갈색거저리의 영양성분 분석

갈색거저리의 생산량 조절, 장기 보관 및 가공원료로 이용 시 건조과정은 상당히 중요하며, 농가에서 생산 가공 시 건조비용도 고려할 항목이다.

표 4. 시료분석 (농업기술실용화재단)

분석 항목	분석 방법	분석기기명
수분	사료관리법 농림부 고시 제2009-14호	venticell CZ/222R
조회분	사료관리법 농림부 고시 제2009-14호	VecstarFurnacedivison
조단백질	AOAC office method 2003.05	FOSS kieltec analyzer
조지방	AOAC office method 2003.05	FOSS soxtec TM 2050
아미노산	사료관리법 농림부 고시 제2009-14호	Hitachi L-8900 amino acid analyzer
무기물	사료관리법 농림부 고시 제2009-14호	GBC Inductively coupled plasma Integra XL
조섬유, NDF, ADF	AOAC office method 2003.05	ANKOM2000W



*

그림 44. 건조방법에 따른 갈색거저리 유충

건조 갈색거저리 수분함유량은 동결건조에서 가장 높았고 열풍건조에서 가장 낮았다. 조단백질은 중적외선건조에서 가장 높았으며, 조지방과 조섬유는 열풍건조에서 가장 높았다. 조회분은 동결건조에서 중적외선건조에서 가장 높았으며, 동결건조에서 가장 낮았다.

표 5. 건조방법에 따른 일반조성분

건조 방법	분석 항목(%)				
	수분	조단백질	조지방	조섬유	조회분
열풍건조	3.84	45.01	37.06	5.98	3.49
동결건조	5.33	46.44	32.70	4.58	2.86
마이크로파건조	3.42	50.03	32.54	5.92	3.49
중적외선건조	4.34	50.80	35.02	5.92	3.82

건조방법에 따른 갈색거저리의 아미노산 성분 중 시스테인(CYS)과 메티오닌(MET)은 중적외선건조에서 가장 높았고, 동결건조에서 가장 낮았다. 알라닌(ALA)과 이소루신(IIE)은 동결건조에서 가장 높게 나타났고, 열풍건조에서 가장 낮았다. 아스파르트산(ASP)·트레오닌(THR)·세린(SER)·글루탐산(GLU)·페닐알라닌(Phe)은 마이크로파건조에서 가장 높았고, 열풍건조에서 가장 낮았다. 시스테인(CYS)과 메티오닌(MET)은 중적외선건조에서 가장 높았고, 동결건조에서 가장 낮았다. 글리신(GLY)·발린(VAL)·루신(Leu)·타이로신(Tyr)·라이신(Lys)·히스티딘(His)·아르기닌(Arg)·프롤린(Pro)은 중적외선건조에서 가장 높았고, 열풍건조에서 가장 낮았다.

갈색거저리 유충은 건조방법에 따른 아미노산 성분에 차이가 없었다.

표 6. 건조방법에 따른 아미노산

분석 항목	건조 방법			
	열풍 건조	동결 건조	마이크로파건조	중적외선건조
아미노산 (%)				
시스테인(CYS)	0.40	0.34	0.44	0.46
메티오닌(MET)	0.74	0.51	0.57	0.58
아스파르트산(ASP)	3.13	3.70	4.21	4.04
트레오닌(THR)	1.77	1.92	2.13	1.97
세린(SER)	2.08	2.20	2.47	2.26
글루탐산(GLU)	4.82	5.82	5.98	5.94
글리신(GLY)	2.16	2.49	2.51	2.54
알라닌(ALA)	3.46	3.74	3.47	3.49
발린(VAL)	2.36	2.37	2.55	2.59
이소루신(Ile)	1.56	1.91	1.80	1.91
루신(Leu)	2.86	3.57	3.45	3.89
타이로신(Tyr)	2.53	3.28	3.63	3.89
페닐알라닌(Phe)	1.44	1.69	1.85	1.83
라이신(Lys)	1.85	2.15	2.64	2.73
히스티딘(His)	0.99	1.34	1.55	1.61
아르기닌(Arg)	1.80	2.31	2.41	2.64
프롤린(Pro)	2.61	2.97	3.07	3.36

건조방법에 따른 갈색거저리 유충의 무기성분에서 칼슘은 마이크로파건조에서 가장 높게 나타났으며 중적외선건조에 비해 1.7배 높았고, 중적외선건조에서 가장 낮게 나타났다. 인은 마이크로파건조에서 가장 높았으며 동결건조에 비해 1.3배 높은 수치를 나타냈고, 동결건조에서 가장 낮았다. 칼륨은 열풍건조에서 가장 높게 나타났고, 가장 낮게 측정된 마이크로파건조에서보다 1.1배 정도 높았다. 나트륨은 중적외선건조에서 가장 높았으며, 가장 낮은 열풍건조에서보다 1.8배 정도 높았다. 마그네슘은 마이크로파건조에서 가장 높았으며, 가장 낮았던 중적외선건조에서보다 1.4배 높은 수치를 나타냈다. 아연은 마이크로파건조에서 가장 높은 수치를 나타냈으

며, 가장 낮았던 열풍건조에서보다 1.1배 높았다. 구리는 마이크로파건조에서 가장 높았으며, 중적외선건조보다 4배가량 높게 측정되었다. 건조방법에 따른 갈색거저리의 유해성분 중, 납·카드뮴·비소는 모든 처리군에서 검출되지 않았고, 수은은 모든 건조 처리군에서 미량이 검출되었으며, 중적외선 건조 처리군에서 가장 낮게 확인되었다.

유해미생물인 *E. coli* O157:H7와 *Salmonella* spp.(정성)은 모든 건조처리군에서 검출되지 않았다.

표 7. 건조방법에 따른 무기질

분석 항목	건조 방법			
	열풍건조	동결건조	마이크로파건조	중적외선건조
칼슘(Ca)	363.20	340.78	458.14	263.26
인(P)	7020.38	6701.93	8426.64	7300.98
칼륨(K)	7759.51	7475.33	7133.63	7365.38
나트륨(Na)	838.51	1013.62	1353.99	1530.62
마그네슘(Mg)	2174.22	1902.67	2623.56	1899.32
아연(Zn)	114.98	115.61	126.37	119.01
구리(Cu)	14.28	18.44	22.33	5.58

표 8. 건조방법에 따른 유해성분

유해성분(mg/kg)	열풍건조	동결건조	마이크로파건조	중적외선건조
납(Pb)	0.00	0.00	0.00	0.00
카드뮴(Cd)	0.00	0.00	0.00	0.00
As(비소)	0.00	0.00	0.00	0.00
Hg(수은)	0.031	0.078	0.080	0.021
유해미생물	열풍 건조	동결 건조	마이크로파건조	중적외선건조
<i>E. coli</i> O157:H7	불검출	불검출	불검출	불검출
<i>Salmonella</i> spp.(정성)	불검출	불검출	불검출	불검출

Palmitoleic acid(C16:ln7)은 마이크로파건조에서 가장 높게 나타났으며, 중적외선건조에서보다 1.6배 높았다. Oleic acid(C18:ln9)는 열풍건조에서 가장 높았고, 마이크로파건조에서보다 1.2배 높게 나타났다. Linoleic acid(C18:2n6)는 마이크로파건조에서 가장 높았으며, 가장 낮은 수치를 보였던 열풍건조에서보다 1.3배 높았다. Linolenic acid(C18:3n3)는 마이크로파건조에서 가장 높았고, 열풍건조에서보다 2배가량 높게 나타났다. Vaccenic acid(C18:ln7)·Arachidonic acid(C20:4n6)·Eicosapentaenoic acid(EPA)(C20:5n3)·Docosatetraenoic acid(C22:4n6)·Docosahexaenoic acid(DHA)(C22:6n3)는 모든 시료에서 검출되지 않았다.

표 9. 건조방법에 따른 지방산

분석 항목	건조 방법			
	열풍건조	동결건조	마이크로파건조	중적외선건조
Myristic acid(C14:0)	3.27	3.03	3.62	3.97
Palmitic acid(C16:0)	16.67	17.36	15.54	16.37
Palmitoleic acid(C16:ln7)	2.30	2.55	3.12	1.98
Stearic acid(C18:0)	2.75	2.63	2.41	2.53
Oleic acid(C18:ln9)	49.38	43.06	41.84	47.26
Vaccenic acid(C18:ln7)	0.00	0.00	0.00	0.00
Linoleic acid(C18:2n6)	24.79	29.80	31.89	26.94
γ-Linoleic acid(C18:3n6)	0.04	0.06	0.05	0.00
Linolenic acid(C18:3n3)	0.66	1.30	1.35	0.80
Eicosenoic acid(C20:ln9)	0.14	0.20	0.18	0.16
Arachidonic acid(C20:4n6)	0.00	0.00	0.00	0.00
Eicosapentaenoic acid(EPA)(C20:5n3)	0.00	0.00	0.00	0.00
Docosatetraenoic acid(C22:4n6)	0.00	0.00	0.00	0.00
Docosahexaenoic acid(DHA)(C22:6n3)	0.00	0.00	0.00	0.00
지방산(합계)	100.00	100.00	100.00	100.00
포화 지방산	22.69	23.02	21.56	22.87
불포화 지방산	77.31	76.98	78.44	77.13
-단가	51.82	45.82	45.14	49.39
-다가	25.50	31.16	33.29	27.73

(2) 건조방법에 따른 아메리카왕거저리의 영양성분 분석

아메리카왕거저리의 생산량 조절, 장기 보관 및 가공원료로 이용 시 건조과정은 상당히 중요하며, 농가에서 생산 가공 시 건조비용도 고려할 항목이다.



그림 45. 건조방법에 따른 아메리카왕거저리 유충

건조 아메리카왕거저리 유충의 수분함유량은 마이크로파건조에서 가장 높게 나타났으며, 중적 외선건조에서보다 4배가량 높았다. 조단백질은 열풍건조에서 가장 높았으며, 마이크로파건조에서보다 1.2배 높은 수치였다. 조지방은 모든 시료에서 거의 비슷하게 나타났으며, 열풍건조에서 가장 높았다. 조섬유는 열풍건조에서 가장 높았고, 마이크로파건조에서보다 1.2배 높게 나타났다. 조회분은 열풍건조에서 가장 높게 나타났으며, 마이크로파건조와 중적외선건조에서 보다 1.2배 높았다.

표 10. 건조방법에 따른 일반조성분

건조 방법	분석 항목(%)				
	수분	조단백질	조지방	조섬유	조회분
열풍건조	3.73	49.02	39.66	6.00	3.50
동결건조	4.16	48.47	38.01	5.19	3.47
마이크로파건조	6.56	42.19	38.26	4.89	2.90
중적외선건조	1.65	47.15	39.26	5.59	2.90

시스테인(CYS)과 메치오닌(MET)은 동결건조에서 가장 높게 나타났고, 시스테인(CYS)은 마이크로파건조에서보다 1.2배 높은 수치가 나타났고, 메티오닌(MET)은 마이크로파건조에서보다 1.7배 높게 나타났다. 아스파르트산(ASP)·트레오닌(THR)·세린(SER)·글루탐산(GLU)·글리신(GLY)·알라닌(ALA)·이소루신(Ile)·루신(Leu)·타이로신(Tyr)·페닐알라닌(Phe)·라이신(Lys)·히스티딘(His)·아르기닌(Arg)·프롤린(Pro)은 모두 마이크로파건조에서 가장 높았으며, 중적 외선건조에서보다 1.3~1.4배 높은 수치를 나타냈다. 발린(VAL)은 열풍건조에서 가장 높은 수치를 나타냈고, 중적외선건조에서보다 1.4배 높았다. 타이로신(Tyr)은 마이크로파건조에서 가장 높게 나타났고, 중적외선건조에서보다 1.6배 높은 수치를 나타냈다.

표 11. 건조방법에 따른 아미노산

분석 항목	건조 방법				
	아미노산(%)	열풍건조	동결건조	마이크로파건조	중적외선건조
시스테인(CYS)	0.439	0.503	0.414	0.434	
메치오닌(MET)	0.733	0.771	0.463	0.479	
아스파르트산(ASP)	3.915	3.841	4.490	3.425	
트레오닌(THR)	2.011	1.974	2.281	1.751	
세린(SER)	2.228	2.297	2.488	1.868	
글루탐산(GLU)	6.129	6.154	7.064	5.528	
글리신(GLY)	2.317	2.245	2.418	1.778	
알라닌(ALA)	3.581	3.474	3.648	2.628	
발린(VAL)	2.799	2.793	2.645	1.978	

분석 항목	건조 방법			
아미노산(%)	열풍건조	동결건조	마이크로파건조	중적외선건조
이소루신(Ile)	1.768	1.745	1.990	1.517
루신(Leu)	3.206	2.996	3.530	2.680
타이로신(Tyr)	3.306	3.451	3.518	2.260
페닐알라닌(Phe)	1.704	1.726	1.916	1.425
라이신(Lys)	2.328	2.326	2.853	2.228
히스티딘(His)	1.274	1.295	1.591	1.131
아르기닌(Arg)	2.186	2.128	2.710	2.098
프롤린(Pro)	2.530	2.506	2.782	1.924

아메리카왕거저리 유충의 무기성분 중, 칼슘은 동결건조에서 가장 높았으며, 마이크로파건조에서보다 2.2배 높은 수치를 나타냈다. 인은 마이크로파건조에서 가장 높게 나타났으며, 열풍건조에서보다 1.2배 높았다. 칼륨은 중적외선건조에서 가장 높았으며, 열풍건조에서보다 1.1배 높게 나타났다. 나트륨은 중적외선건조에서 가장 높게 나타났으며, 열풍건조에서보다 1.3배 높았다. 마그네슘은 마이크로파건조에서 가장 높았으며, 중적외선건조에서보다 1.2배 높게 나타났다. 아연은 마이크로파건조에서 가장 높았으며, 중적외선건조에서보다 1.3배 높은 수치를 나타냈다. 구리는 마이크로파건조에서 가장 높게 나타났으며, 동결건조에서보다 3.2배 높았다.

표 12. 건조방법에 따른 무기질

분석 항목	건조 방법			
무기질(mg/kg)	열풍건조	동결건조	마이크로파건조	중적외선건조
칼슘(Ca)	467.29	916.00	407.19	523.90
인(P)	5718.00	6028.58	6881.52	6543.41
칼륨(K)	7080.83	7578.83	7463.05	7828.68
나트륨(Na)	1167.40	1316.29	1208.37	1490.92
마그네슘(Mg)	1142.06	1125.14	1374.59	1110.19
아연(Zn)	86.74	74.53	91.89	70.42
구리(Cu)	6.62	3.79	12.11	10.12

표 13. 건조방법에 따른 유해성분

유해성분(mg/kg)	열풍건조	동결건조	마이크로파건조	중적외선건조
납(Pb)	0.00	0.00	0.00	0.00
카드뮴(Cd)	0.00	0.00	0.00	0.00
비소(As)	0.00	0.00	0.00	0.00
수은(Hg)	0.05	0.04	0.05	0.08
유해미생물	열풍건조	동결건조	마이크로파건조	중적외선건조
<i>E. coli</i> O157:H7	불검출	불검출	불검출	불검출
<i>Salmonella</i> spp.(정성)	불검출	불검출	불검출	불검출

건조방법에 따른 아메리카왕거저리의 유해성분 중, 납·카드뮴·비소는 모든 처리군에서 검출되지 않았고, 수은은 모든 건조 처리군에서 미량이 검출되었다. 유해미생물인 *E. coli* 0157:H7와 *Salmonella* spp.(정성)은 모든 처리군에서 검출되지 않았다.

Myristic acid(C14:0)는 동결건조에서 가장 높게 나타났고, 마이크로파건조에서보다 2.1배 높았다. Palmitic acid(C16:0)는 열풍건조에서 가장 높았고, 마이크로파건조에서보다 1.1배 높게 나타났다. Palmitoleic acid(C16:ln7)는 동결건조에서 가장 높았고, 마이크로파건조에서보다 3.3배 높았다. Stearic acid(C18:0)는 마이크로파건조에서 가장 높았으며, 동결건조에서보다 1.5배 높게 나타났다. Oleic acid(C18:ln9)는 열풍건조에서 가장 높았고, 중적외선건조에서보다 1.1배 높았다. Vaccenic acid(C18:ln7)은 모든 시료에서 검출되지 않았다. Linoleic acid(C18:2n6)는 중적외선건조에서 가장 높았고, 열풍건조에서보다 1.3배 높았다. γ-Linoleic acid(C18:3n6)은 마이크로파건조에서 가장 높았으며, 가장 낮게 검출된 동결건조에서보다 24.8배 높았다. Linolenic acid(C18:3n3)은 중적외선건조에서 가장 높았고, 동결건조와 마이크로파 건조에서보다 3.8배 높게 나타났다. Eicosenoic acid(C20:ln9)은 동결건조와 마이크로파건조에서 높게 나타났고, 중적외선건조에서보다 2.1배 높았다. Arachidonic acid(C20:4n6)는 중적외선건조에서만 검출되었다. Eicosapentaenoic acid(EPA)(C20:5n3)·Docosatetraenoic acid(C22:4n6)·Docosahexaenoic acid(DHA)(C22:6n3)는 모든 시료에서 검출되지 않았다. 포화지방산은 모든 시료에서 차이가 거의 없었으며, 불포화지방산 중 단가는 열풍건조에서 가장 높았고, 마이크로파건조에서보다 1.1배 높게 나타났다. 불포화지방산 중 다가는 중적외선건조에서 가장 높았고, 열풍건조에서보다 1.3배 높았다.

표 14. 건조방법에 따른 지방산

분석 항목	건조 방법			
	열풍건조	동결건조	마이크로파건조	중적외선건조
Myristic acid(C14:0)	1.31	1.34	0.63	1.04
Palmitic acid(C16:0)	31.94	31.29	29.70	28.55
Palmitoleic acid(C16:ln7)	2.59	3.42	1.03	1.89
Stearic acid(C18:0)	6.51	5.93	9.02	7.52
Oleic acid(C18:ln9)	37.58	36.65	34.55	34.29
Vaccenic acid(C18:ln7)	0.00	0.00	0.00	0.00
Linoleic acid(C18:2n6)	19.37	20.46	23.44	25.40

분석 항목	건조 방법			
지방산(%)	열풍건조	동결건조	マイ크로파건조	중적외선건조
γ-Linoleic acid(C18:3n6)	0.06	0.05	1.24	0.13
Linolenic acid(C18:3n3)	0.47	0.63	0.17	0.87
Eicosenoic acid(C20:1n9)	0.17	0.23	0.23	0.11
Arachidonic acid(C20:4n6)	0.00	0.00	0.00	0.19
Eicosapentaenoic acid(EPA)(C20:5n3)	0.00	0.00	0.00	0.00
Docosatetraenoic acid(C22:4n6)	0.00	0.00	0.00	0.00
Docosahexaenoic acid(DHA)(C22:6n3)	0.00	0.00	0.00	0.00
지방산(합계)	100.00	100.00	100.00	100.00
포화 지방산	39.76	38.56	39.35	37.11
불포화 지방산	60.24	61.44	60.65	62.89
-단가	40.33	40.29	35.81	36.30
-다가	19.90	21.15	24.84	26.59

제3절 : 곤충 사료화를 위한 건조방법 및 분말 조건 확립

가. 농업부산물을 급이한 거저리류 유충의 영양성분 분석

표 15. 분석항목에 따른 분석방법

분석 항목	분석 방법	분석법 고시	분석 기기
수분	가열 감량법	사료표준분석방법	venticell CZ/222R
조회분	600℃ 회화법	사료표준분석방법	VecstarFurnacedivision
조단백질	Kjeldahl법	AOAC	FOSS kieltec analyzer
조지방	에테르 추출법	AOAC	Foss soxtec TM 2050
아미노산	이온교환크로마토그래피법 (Ninhydrin법)	사료표준분석방법	Hitachi L-8900 amino acid analyzer
지방산	가스 크로마토그래피법	사료표준분석방법	Agilent Technologies, US/HP 6890
무기질 (유해성분 포함)	유도결합플라즈마발광분석법 (ICP)	사료표준분석방법	GBC inductively coupled plasma IntegraXL
유해미생물 (<i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> spp.)	1) <i>E. coli</i> O157:H7 ; 선택배지를 이용한 분리배양법/생화학적 확인시험 2) <i>Salmonella</i> ; 선택배지를 이용한 분리배양법/생화학적 확인시험	비료의 이화학적 검사방법	필요 시 Vitek 사용

(1) 농업부산물 급이에 따른 갈색거저리 유충의 영양성분 분석

표 16. 농업부산물 급이에 따른 갈색거저리 유충의 일반조성분

일반성분 (%)	Control (밀기울 100%)	맥주박 50%, 밀기울 50%	막걸리박 50%, 밀기울 50%
수분	4.33	4.64	5.19
조단백질	46.85	45.02	43.51
조지방	32.12	33.46	39.13
조섬유	5.28	5.85	5.15
조회분	3.17	2.84	3.27

표준먹이원인 밀기울과 농업부산물(맥주박 50%, 막걸리박 50%) 첨가군 모두에서 조단백질 함량은 40%이상, 조지방은 30%이상이었다.

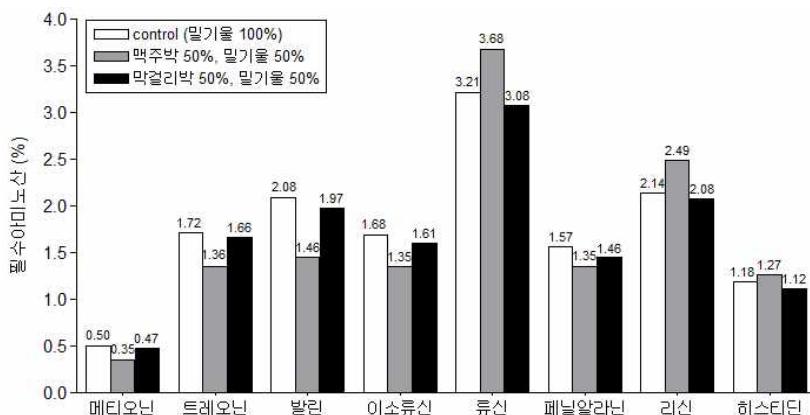


그림 46. 농업부산물 급이에 따른 갈색거저리 유충의 필수아미노산

필수아미노산은 밀기울 대조군>막걸리박 50% 첨가군>맥주박 50% 첨가군, 비필수아미노산은 밀기울 대조군=맥주박 50% 첨가군>막걸리박 50% 첨가군으로, 모든 군에서 비슷하였다.

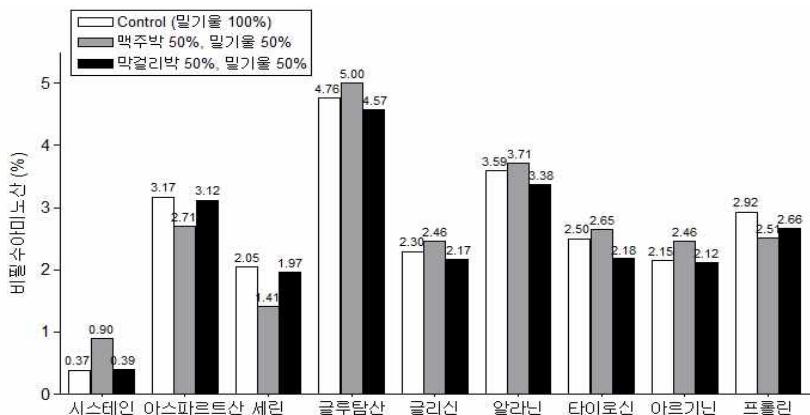


그림 47. 농업부산물 급이에 따른 갈색거저리 유충의 비필수아미노산

포화지방산은 밀기울 대조군>맥주박 50% 첨가군, 불포화지방산은 밀기울 대조군<맥주박 50% 첨가군 순이었다. 올레인산은 모든 군에서 40%이상, 불포화지방산 중 가장 높은 함량을 나타냈다. 불포화지방산 중, 두 번째로 높은 함량인 리놀레산은 맥주박 50% 첨가군에서 밀기울 대조군에 비해 1.2배 높았다. 리놀렌산은 맥주박 50% 첨가군에서 밀기울 대조군과 비교 시 1.6배 높았다.

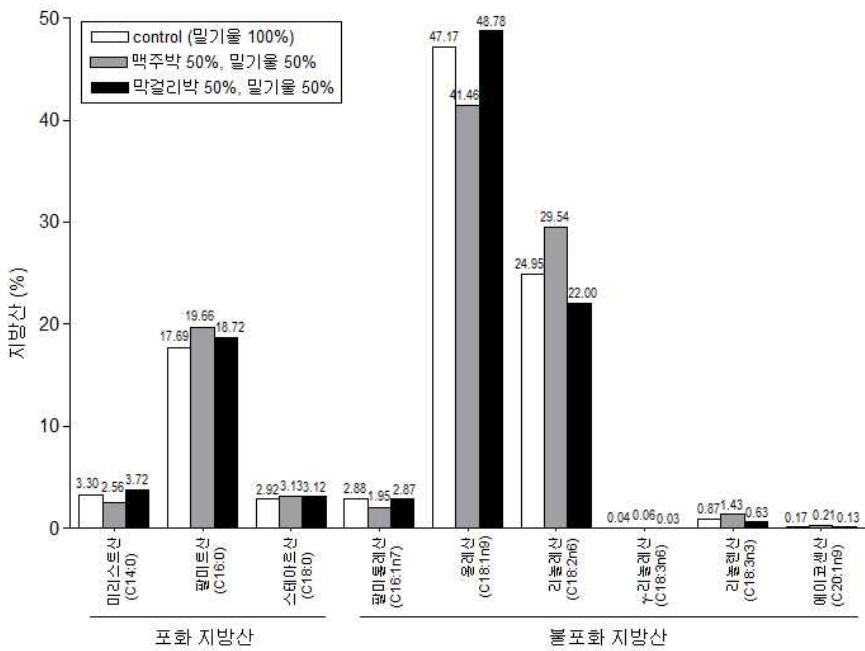


그림 48. 농업부산물 급이에 따른 갈색거저리 유충의 지방산

무기질은 밀기울 대조군과 비교시 맥주박 50% 첨가군에서 아연, 망간, 나트륨 함량이 높고, 막걸리박 50% 첨가군에서 구리, 칼슘, 마그네슘, 인 함량이 높았다.

표 17. 농업부산물 급이에 따른 갈색거저리 유충의 무기질

분석 항목	성분명	control (밀기울 100%)	맥주박 50%, 밀기울 50%	막걸리박 50%, 밀기울 50%
무기질 (mg/kg)	구리(Cu)	12.88	4.32	15.42
	아연(Zn)	120.38	200.62	119.77
	칼슘(Ca)	266.27	208.08	318.66
	칼륨(K)	3316.24	2135.55	3270.12
	마그네슘(Mg)	941.19	608.72	1047.46
	망간(Mn)	16.37	24.79	12.64
	나트륨(Na)	465.23	636.91	447.33
	인(P)	2012.62	1585.78	2025.76

유해물질 중, 중금속은 맥주박 50% 첨가군에서만 0.011mg/kg 검출되었으나 사료 제한기준인 0.5mg/kg 보다 훨씬 낮으며, 유해미생물 2종은 검출되지 않았다.

표 18. 농업부산물 급이에 따른 갈색거저리 유충의 유해물질

분석 항목	성분명	control (밀기울 100%)	맥주박 50%, 밀기울 50%	막걸리박 50%, 밀기울 50%
중금속 (mg/kg)	납(Pb)	0.00	0.00	0.00
	수은(Hg)	0.00	0.011	0.00
	비소(As)	0.00	0.00	0.00
	카드뮴(Cd)	0.00	0.00	0.00
병원성 미생물	<i>E. coli</i> O157:H7	불검출	불검출	불검출
	<i>Salmonella</i> spp.(정성)	불검출	불검출	불검출

(2) 농업부산물 급이에 따른 아메리카왕거저리 유충의 영양성분 분석

표 19. 농업부산물 급이에 따른 아메리카왕거저리 유충의 일반조성분

일반성분 (%)	표준먹이원		대체먹이원	
	Control (밀기울 100%)	맥주박 50%, 밀기울 50%	막걸리박 50%, 밀기울 50%	
수분	5.30	6.66	3.81	
조단백질	40.44	47.08	42.43	
조지방	45.62	36.30	41.31	
조섬유	4.95	4.84	5.58	
조회분	2.53	2.53	2.36	

일반조성분은 밀기울과 맥주박 50% 첨가군 및 막걸리박 50% 첨가군 비교 시 조단백질 함량은 40%이상, 조지방은 30%이상이며, 맥주박 50% 첨가군에서 조단백질 함량이 밀기울 대조군과 비교 시 1.2배로 가장 높았다.

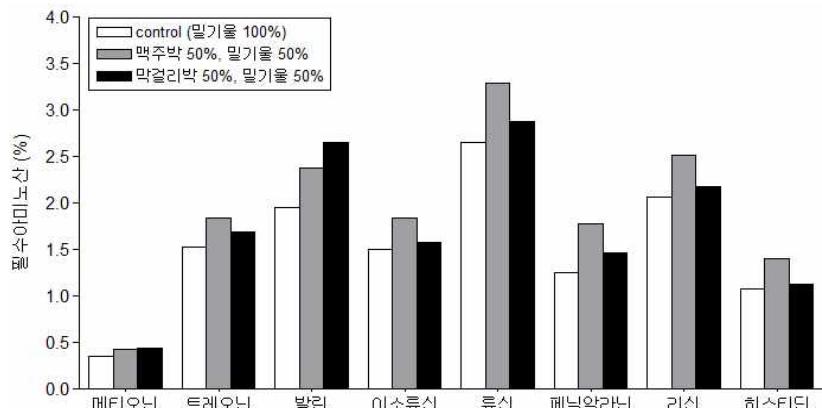


그림 49. 농업부산물 급이에 따른 아메리카왕거저리 유충의 필수아미노산

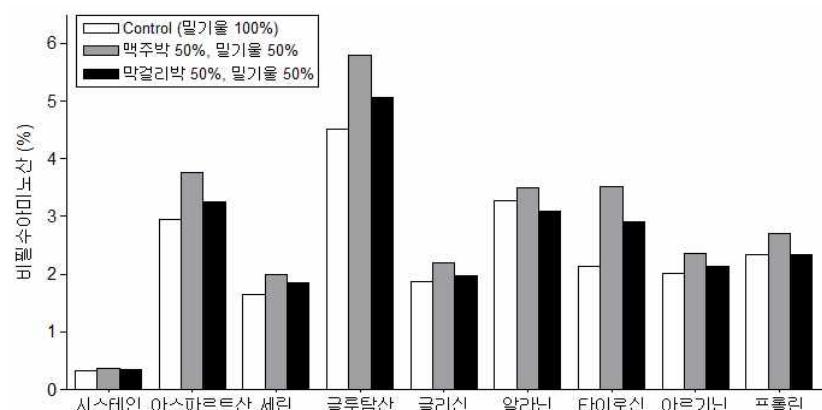


그림 50. 농업부산물 급이에 따른 아메리카왕거저리 유충의 비필수아미노산

아미노산은 필수아미노산과 비필수아미노산 모두에서 대부분 맥주박 50% 첨가군 > 막걸리박 50% 첨가군 > 밀기울 대조군 순이었고, 막걸리박 50% 첨가군에서는 밀기울 대조군보다 약간 높았고, 맥주박 50% 첨가군은 가장 높았다.

지방산 중 포화지방산은 팔미트산 함량(막걸리박 50% 첨가군>밀기울 대조군>맥주박 50% 첨가군)이 가장 높았다. 불포화지방산 중 가장 높은 함량인 올레인산은 밀기울 대조군에서 38.40%, 맥주박 50% 첨가군에서 29.22%로, 맥주박 50% 첨가군에서 1.3배 낮았고, 막걸리박 50% 첨가군에서는 38.52%로 밀기울 대조군과 비슷하였다. 불포화지방산 중, 두 번째로 높은 함량인 리놀레산은 맥주박 50% 첨가군에서 밀기울 대조군에 비해 1.6배 높았고 막걸리박 50% 첨가군에서 1.2배 낮았다. 리놀렌산은 맥주박 50% 첨가군에서 밀기울 대조군과 비교 시 2.5배 높았다.

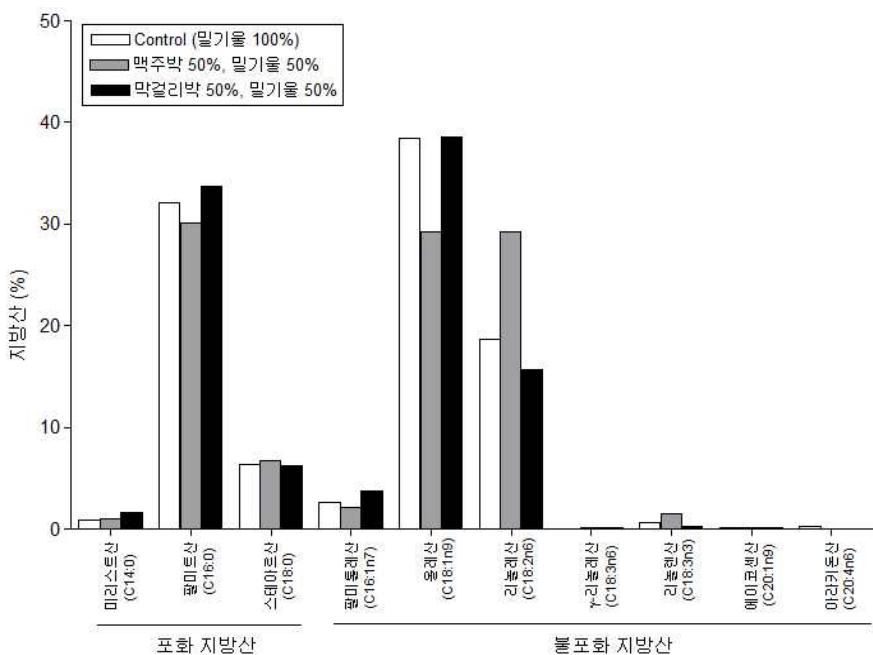


그림 51. 농업부산물 급이에 따른 아메리카왕거저리 유충의 지방산

표 20. 농업부산물 급이에 따른 아메리카왕거저리 유충의 무기질

	성분명	control (밀기울 100%)	맥주박 50%, 밀기울 50%	막걸리박 50%, 밀기울 50%
무기질 (mg/kg)	구리(Cu)	14.27	12.30	16.69
	아연(Zn)	83.69	84.12	162.22
	칼슘(Ca)	418.81	558.92	911.59
	칼륨(K)	7810.90	7466.95	7245.23
	마그네슘(Mg)	1125.47	1078.96	1006.03
	망간(Mn)	14.48	12.21	15.19
	나트륨(Na)	1168.82	1121.24	1376.26
	인(P)	5701.57	5537.33	4813.41

칼륨, 마그네슘, 인을 제외한 모든 무기질 함량은 막걸리박 50% 첨가군에서 가장 높았다(밀기울 대조군에 비해 칼슘에서 2.2배, 망간에서 1.1배). 모든 군에서 가장 높은 함량인 칼륨은 밀기울 대조군에서 가장 높았고, 막걸리박 50% 첨가군에서 가장 낮았다. 두 번째로 높은 함량인 인은 밀기울 대조군과 맥주박 50% 첨가군에서 비슷하였고, 막걸리박 50% 첨가군에서 밀기울 대조군에 비해 1.2배 낮았다.

유해물질 중, 중금속(납, 비소, 수은, 카드뮴)과 유해미생물 2종 모두 검출되지 않았다.

표 21. 농업부산물 급이에 따른 아메리카왕거저리 유충의 유해물질

분석 항목	성분명	control (밀기울 100%)	맥주 백 50%, 밀기울 50%	막걸리 백 50%, 밀기울 50%
중금속 (mg/kg)	납(Pb)	0.00	0.00	0.00
	수은(Hg)	0.00	0.00	0.00
	비소(As)	0.00	0.00	0.00
	카드뮴(Cd)	0.00	0.00	0.00
병원성 미생물	<i>E. coli</i> O157:H7	불검출	불검출	불검출
	<i>Salmonella</i> spp.(정성)	불검출	불검출	불검출

나. 건조방법별 분말사료 조건 확립

(1) 건조방법별 갈색거저리 유충의 부피 비교

건조 갈색거저리 유충의 부피는 마이크로파건조>동결건조>중적외선건조>열풍건조 순이었다.



(2) 건조방법별 갈색거저리 분말의 색상 및 특성 비교

건조 갈색거저리 유충 분말의 색상은 동결건조<마이크로파건조<중적외선건조<열풍건조 순이었다. 냄새는 이취에 해당하는 쪐내는 마이크로파건조 분말에서 가장 심하였고, 열풍건조 분말에서 가장 약했다. 고소한 냄새는 동결건조, 마이크로파건조, 중적외선건조 분말에서 비슷하였고, 열풍건조 분말에서 강하였다. 영양성분 중, 조단백질과 조지방 함량은 건조방법에 상관없이 거의 비슷하였다.

평가항목	건조방법			
	동결건조	마이크로파건조	중적외선 건조	열풍건조
색상				
냄새	찌내	약함	보통	약함
	고소함	약함	약함	매우 강함
촉감	유분	보통	강함	매우 강함
영양성분 (%)	조단백질	46.44	50.03	50.80
	조지방	32.70	32.54	35.02
				37.06

(3) 갈색거저리 유충 분말의 유통기한 설정

유지의 변패를 알기 위해 색상, 맛, 향기에 관한 관능평가를 통해 조사하지만, 보통 산가, 과산화물가 등의 정상치와 비교하여 판정한다.

수분함량은 저온보관에서는 6개월 시료에서 가장 낮고, 상온보관에서는 보관기간에 비례하여 수분함량이 높다. 조단백질 함량은 마이크로파건조에서 보관온도와 상관없이 50%이상, 열풍건조에서 45%이상 조지방은 마이크로파건조에서 26%이상, 열풍건조에서 32%이상이었다. 히스타민은 마이크로파건조에서 3개월 시료에서만 검출, 열풍건조에서는 보관기간에 비례하여 6개월에서 가장 높았다.

산가는 열풍건조에서 보관기간에 비례하여 나타나며, 상온에서는 1개월 시료에서도 높았다. 과산화물가는 마이크로파건조 및 열풍건조 분말의 6개월 보관시료에서 높았다. 농업부산물(맥주 박 50%, 막걸리박 50% 첨가)은 영양성분 분석 결과에 따르면, 표준먹이원인 밀기울 100%의 영양성분과 비교시 손색이 없으므로 거저리류 유충의 밀기울 대체먹이로 활용가능하다.

갈색거저리 유충의 건조방법과 분말사료 조건은 일반조성분 및 유지의 산화 및 산폐도, 알레르기 반응을 고려할 때, 마이크로파 건조방법으로 저온(2.5°C) 보관으로 3-6개월 이내로 보관이 적합하다.

① 보관온도 : 저온 (2.5°C)

건조방법		마이크로파건조			열풍건조		
보관기간(개월)		1	3	6	1	3	6
측정항목	수분 (%)	7.14	7.24	7.18	8.16	6.05	6.33
	조단백질 (%)	54.81	54.20	54.87	45.51	45.58	46.33
	조지방 (%)	28.13	28.25	26.65	33.49	38.24	33.72
	조회분 (%)	3.73	4.16	3.60	3.23	3.36	2.98
	히스타민 (ppm)	불검출	1.33	불검출	4.90	7.66	14.25
	산가, AV (mgKOH/g)	1.00	2.31	3.26	35.69	42.52	93.51
	과산화물가, POV (meq/Kg)	0.01	0.01	6.20	0.07	0.22	10.01
	휘발성염기태질소(VBN)	0.02	0.07	0.02	0.06	0.06	0.05

② 보관온도 : 상온 (25°C)

건조방법		마이크로파건조			열풍건조		
보관기간(개월)		1	3	6	1	3	6
측정항목	수분 (%)	6.93	7.21	8.23	7.78	7.83	9.74
	조단백질 (%)	53.94	55.10	54.38	45.50	45.22	45.07
	조지방 (%)	27.08	27.87	26.82	32.87	33.99	32.83
	조회분 (%)	3.55	3.86	3.48	3.34	3.33	3.24
	히스타민 (ppm)	불검출	0.94	불검출	5.93	4.81	11.29
	산가, AV (mgKOH/g)	3.86	3.45	7.47	64.34	70.92	95.88
	과산화물가, POV (meq/Kg)	0.13	4.08	19.90	0.01	0.01	0.01
	휘발성염기태질소(VBN)	0.03	0.11	0.02	0.07	0.07	0.11

제4절 : 양식 새우 적용 시험

가. 곤충사료에 의한 양식 새우의 발육 특성 비교 시험 및 기호성 조사

(1) 새우 성장비교시험 대상종의 선정 및 기초자료 조사 (흰다리새우, *Litopenaeus vannamei*)

흰다리 새우는 멕시코에서 페루에 이르는 중남미대륙의 태평양 연안에서 기원, 1978~1979년 사이 아시아지역에 실험목적으로 도입되었다. 상업적으로 양식이 시작된 것은 1996년부터이며 (중국 및 대만), 2000~2001년부터 아시아 대부분의 연안국들이 상업적인 양식을 시작, 중국은 흰다리새우 양식량에서 세계 최대 국가로 수출산업으로서의 가치가 증대되고 있다. (2002년 기준 270,000톤)

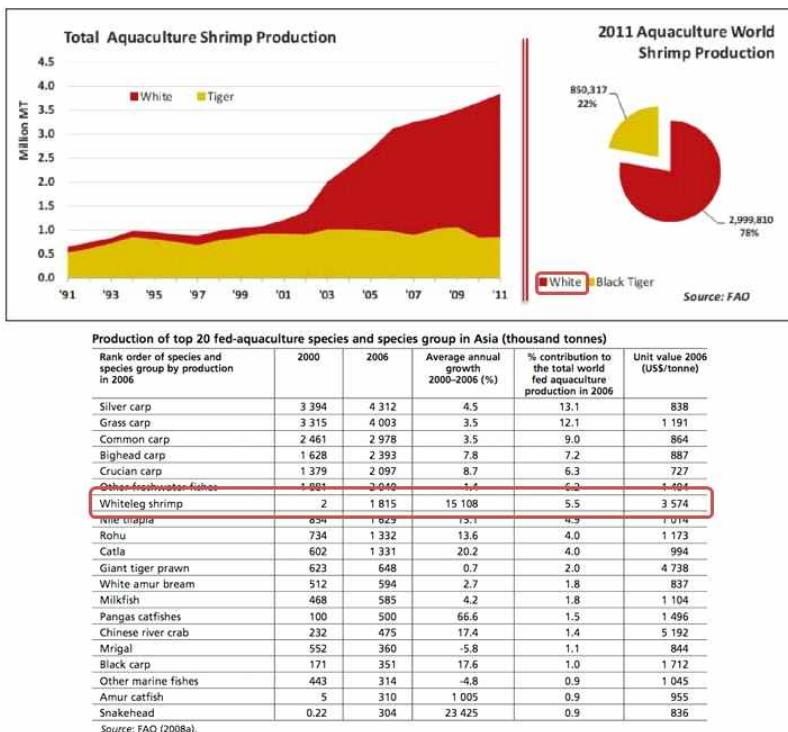


그림2-1. 흰다리새우의 산업적 가치

L. vannamei 선정 이유는 갑각류 중 해산 새우 양식이 주류이며, 2002년 기준 총 양식 새우 생산량 중 3종의 새우가 75% 점유하고 있고 (보리새우과, Penaeidae; 홍다리얼룩새우 (*Penaeus monodon*), 대하 (*Fenneropenaeus chinensis*), 흰다리새우) *L. vannamei*의 성장률 및 생리학적 특성이 본 과제의 연구목표와 일치하기 때문이다. 흰다리새우는 20g 이후 성장률이 현저하게 둔화, 그러나 홍다리얼룩새우에 비교하여 주당 성장률은 더 높은 편이다. 입식밀도에 있어 흰다리새우는 비교적 비호전적이며, 고밀도양식(60~150마/m²) 이상 가능(400마)하고, 흰다리새우는 염분도에 내성이 강하여 0.5~45‰(퍼밀)에서도 생존이 가능하다. 저수온에 내성이 있으며, 단백질요구량도 비교적 낮아 20~25% (홍다리새우 등은 36~42%)이다. 질병감수성은 주로 WSD(White Spot Disease, 흰반점병), TS (Taura Syndrome, 타우라 증후군),

IHHNV(*Infectious hypodermal & haematopoietic necrosis virus*, 피하감염 및 조혈괴사 바이러스), BMN(*Baculoviral Midut Gland Necrosis*, 배풀로바이러스중장선괴사병), Vibriosis(비브리오병)이 다발 질병으로 알려져 있고, 모하의 사육 및 산란에 기술이 필요하며 다소 복잡하나, 부화장에서의 유생 생존률이 50~60%로 비교적 높아 곤충유래 양어 사료 개발에 적합한 것으로 조사되었다. 맛에 있어 미국시장에서 선호도가 높으며, 아시아지역에서의 시장수요가 매우 높고 양식 생존률은 일반적으로 80~90%로 높은 편이며 생산 단가 역시 아시아 지역에서 대체로 1.9~2.0달러/kg이다.

(2) 곤충사료에 의한 *L. vannamei* 성장비교시험 및 기호성 시험 실시

시험은 5월에 치하 입식하고, 6월에 시험사료투여 시작하고, 9월에 시험종료 및 자료분석, 곤충사료와 기존사료에 대한 기호성 비교 시험(9주령 이후 실시)을 실시되었다. 세부1/협동2 팀 회의를 통해 새우사료의 어분대체율 결정(0%, 25%, 50%, 100%)하고, 협동2에서 제조한 새우시험사료를 *L. Vannamei* 영양학적 에너지요구량을 기초로 사료급여 플랜 작성 및 투여하였다. 단백질원으로 어분과 곤충분의 함량조성비율을 달리하여 3개의 시험군(25%, 50%, 100% 어분 대체군) 및 1개의 대조군(0% 어분 대체군) 설치(조사항목: 생존률, 성장률(Length(mm)&Weight(g)), 2년차 과제를 위한 기초 샘플링 실시하였다. (Stock:Histochemistry /Immunohistochemistry용 sample in NBF, Molecular analysis용 sample in Deep freezer)

사육 조건은 미국 플로리다 대학의 2003년 발표된 “용수의 무환수 집약식 새우양식 사업” 연구 결과에 기초하여 적용하였다. (Economic Analysis of an Intensive, Zero-Water Exchange, Saltwater Shrimp Culture Demonstration Project in Nicaragua. Noticias del día. 17 de octubre de 2003)

상기의 사육조건에 대해 간략히 소개하자면, 집약식 용수의 비교체 과정은 생물학적 안전성(biosecurity)가 높으며, 새우에게 위해를 가할 수 있는 새로운 물로 교체하지 않고 일반 호지에서는 날개수차(paddle-wheel aerator)와 벤튜리효과(venture effects)를 운영하거나 수조시설에서 기폭기를 사용하여 각종 집적물들을 청결하게 유지 가능한 것으로 연구된 바 있으며 현재 국내 대부분의 흰다리 새우 양식에서 선호되는 사육 조건으로 3년차 시험 계획인 양식장에서의 직접 적용에 대비하였다. 각 실험구별로 1톤 원형수조를 사용하였으며, 수조당(군별) 2,000미의 치하를 곤충사료에 의한 성장비교시험에 사용하였다. (PL20 stage에 최초 수조 입식 실시) 수조내 시험 조건에 의해 양식현장 조건과의 variables 발생을 보정하기 위해 새우 양식장 실제 환경에 준하여 2KW 전기히터를 이용하여 가온하고 조도와 광주기는 국내 여름 자연적 생산 환경을 적용하여 인위적인 조도와 광주기 조절을 하지 않고 일반적인 국내 흰다리새우 양식 환경에 맞추어 시험을 실시하였다.

치하는 국내 양식새우의 일반적 입식시기 및 현장사육시설에 대한 예비사육 일정(호지 입식 전 약 30~50일)을 적용한 후 시험을 실시하였으며, 충남 태안의 용수산에서 PL(Post Larva) stage 20일령을 구입 후 PL 70일령부터 성장비교시험을 실시하였다. 체중 측정은 g단위 소�数점 2자리까지 측정 가능한 미세전자저울을 사용하였으며, mm단위 소�数점 2자리까지 측정 가능한 전자식 디지털 버니어캘리퍼스를 사용하여 체장을 측정하였다.

매 주차 계측 시 기초 샘플링을 실시(Histochemistry/Immunohistochemistry용 sample in NBF, Molecular analysis용 sample in Deep freezer)하였으며, 실험 종료 후 증체율

(percent weight gain,%), 일간성장률 (specific growth rate, %/day), 사료효율(feed efficiency,%) 및 생존율(survival,%)을 분석하였다. 대조군의 시험 결과에 대한 시험군간의 유의성 검증을 위해 모든 통계수치는 평균±표준오차(SEM)로 표기하였으며, 각각 시험군 사이의 통계학적 유의성은 student t-test로 검정하였고(이분산가정), 유의수준 95% (p-value<0.05)에서 유의성검증을 실시하였다. 본 시험의 디자인은 표2-1과 같이 *L. vannamei* 영양소 요구량에 맞추어 권장급여율을 작성하였다.

표2-1. 실험 디자인과 권장 급여율

실험일	예상체중(g)	예상생존율(%)	한수조당 Biomass(g)	권장 급여율(%)
1	2.38	100	4760	3.5
2	2.53	99.5	5034.7	3.48
3	2.68	99	5306.4	3.46
4	2.83	98.5	5575.1	3.44
5	2.98	98	5840.8	3.42
6	3.13	97.5	6103.5	3.4
7	3.28	97	6363.2	3.38
8	3.43	96.5	6619.9	3.36
9	3.58	96	6873.6	3.34
10	3.73	95.5	7124.3	3.32
11	3.93	95	7467	3.3
12	4.13	94.5	7805.7	3.28
13	4.33	94	8140.4	3.26
14	4.53	93.5	8471.1	3.24
15	4.73	93	8797.8	3.22
16	4.93	92.5	9120.5	3.2
17	5.13	92	9439.2	3.18
18	5.33	91.5	9753.9	3.16
19	5.53	91	10064.6	3.14
20	5.73	90.5	10371.3	3.12
21	5.93	90	10674	3.1
22	6.13	89.5	10972.7	3.08
23	6.33	89	11267.4	3.06
24	6.53	88.5	11558.1	3.04
25	6.73	88	11844.8	3.02
26	7.03	87.5	12302.5	3
27	7.33	87	12754.2	2.98
28	7.63	86.5	13199.9	2.96
29	7.93	86	13639.6	2.94
30	8.23	85.5	14073.3	2.92
31	8.53	85	14501	2.9
32	8.83	84.5	14922.7	2.88
33	9.13	84	15338.4	2.86
34	9.43	83.5	15748.1	2.84
35	9.73	83	16151.8	2.82
36	10.03	82.5	16549.5	2.8
37	10.33	82	16941.2	2.78
38	10.63	81.5	17326.9	2.76
39	10.95	81	17739	2.74
40	11.27	80.5	18144.7	2.72
41	11.59	80	18544	2.7
42	11.91	79.5	18936.9	2.68
43	12.23	79	19323.4	2.66
44	12.55	78.5	19703.5	2.64
45	12.87	78	20077.2	2.62

46	13.19	77.5	20444.5	2.6
47	13.51	77	20805.4	2.58
48	13.83	76.5	21159.9	2.56
49	14.15	76	21508	2.54
50	14.47	75.5	21849.7	2.52
51	14.79	75	22185	2.5
52	15.11	74.5	22513.9	2.48
53	15.43	74	22836.4	2.46
54	15.75	73.5	23152.5	2.44
55	16.07	73	23462.2	2.42
56	16.39	72.5	23765.5	2.4
57	16.71	72	24062.4	2.38
58	17.03	71.5	24352.9	2.36
59	17.35	71	24637	2.34
60	17.67	70.5	24914.7	2.32
61	17.99	70	25186	2.3
62	18.31	69.5	25450.9	2.28
63	18.63	69	25709.4	2.26
64	18.95	68.5	25961.5	2.24
65	19.27	68	26207.2	2.22
66	19.59	67.5	26446.5	2.2
67	19.91	67	26679.4	2.18
68	20.23	66.5	26905.9	2.16
69	20.55	66	27126	2.14
70	20.87	65.5	27339.7	2.12
71	21.19	65	27547	2.1
72	21.51	64.5	27747.9	2.08



<1기의 대조군과 3기의 실험군 설정>



<집약식 용수 비교체 과정 및 기폭기 사용>



<Length 측정(mm), Week 0>



<Length 측정(mm), Week 8>

그림2-2. 1차년도 새우 성장 사양시험 수행

기호성 검증을 위하여 Alberto J.P. Nunes et al. Behavioral response to selected feed attractants and stimulants in Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei. Aquaculture 260 (2006) 244 -254.에서 소개된 새우 기호성 시험 디자인을 그대로 적용하였으며, 길로틴 open 후 출발한 개체만을 전체 counting 개체로 반영하였고, 이 중 각각의 attractant(시험사료)에 이끌려 사료 섭취를 시작한 개체만을 Positive Choice로 판단하였다.

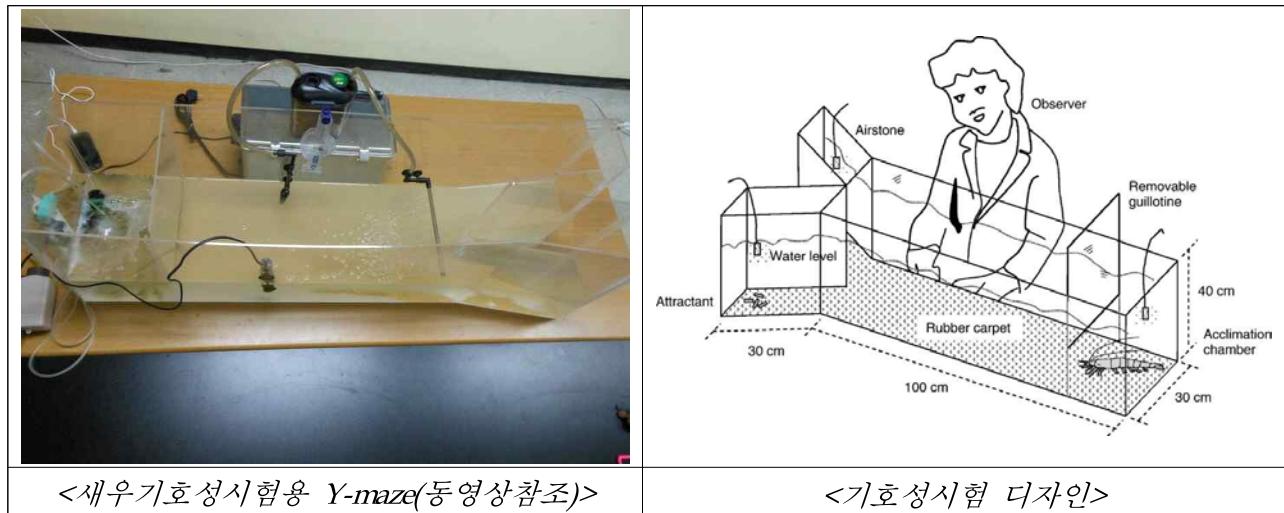


그림2-3. 새우 기호성 시험 수행

(3) 결과 및 고찰

양식 흰다리 새우에 대한 곤충 사료의 성장비교시험 결과, W3 이후 어분 50%, 100% 대체군에서 성장률이 확연히 증가하였다.

표2-2. 시험군별 체중 계측치 (g, MEAN±SEM)

	W0	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8
기준사료(0%)	2.43±0.54	2.46±0.61	4.45±1.74	4.32±1.77	5.39±1.05	6.44±1.52	7.98±2.56	8.25±2.82	9.16±2.16
어분25%대체	2.43±0.54	3.53±0.40	4.39±1.03	4.55±1.05	6.08±1.46	7.73±1.11	7.85±2.20	8.75±1.27	9.90±3.22
어분50%대체	2.43±0.54	2.77±0.66	4.68±0.99	5.17±1.40	6.05±1.48	7.86±1.69	8.38±1.63	9.45±1.68	11.05±3.05
어분100%대체									10.36±1.65

통계처리 전의 성장률 추이를 봐도 어분 25%, 50%, 100% 대체군에서 대조군에 비해 확연한 성장률 향상이 관찰되었으며, 기존 사료의 성장률에 비해 어분25% 대체군의 경우 30.55%, 어분50% 대체군의 경우 78.01%, 어분 100% 대체군의 경우 49.40%의 성장률 향상 효과가 관찰되었다.

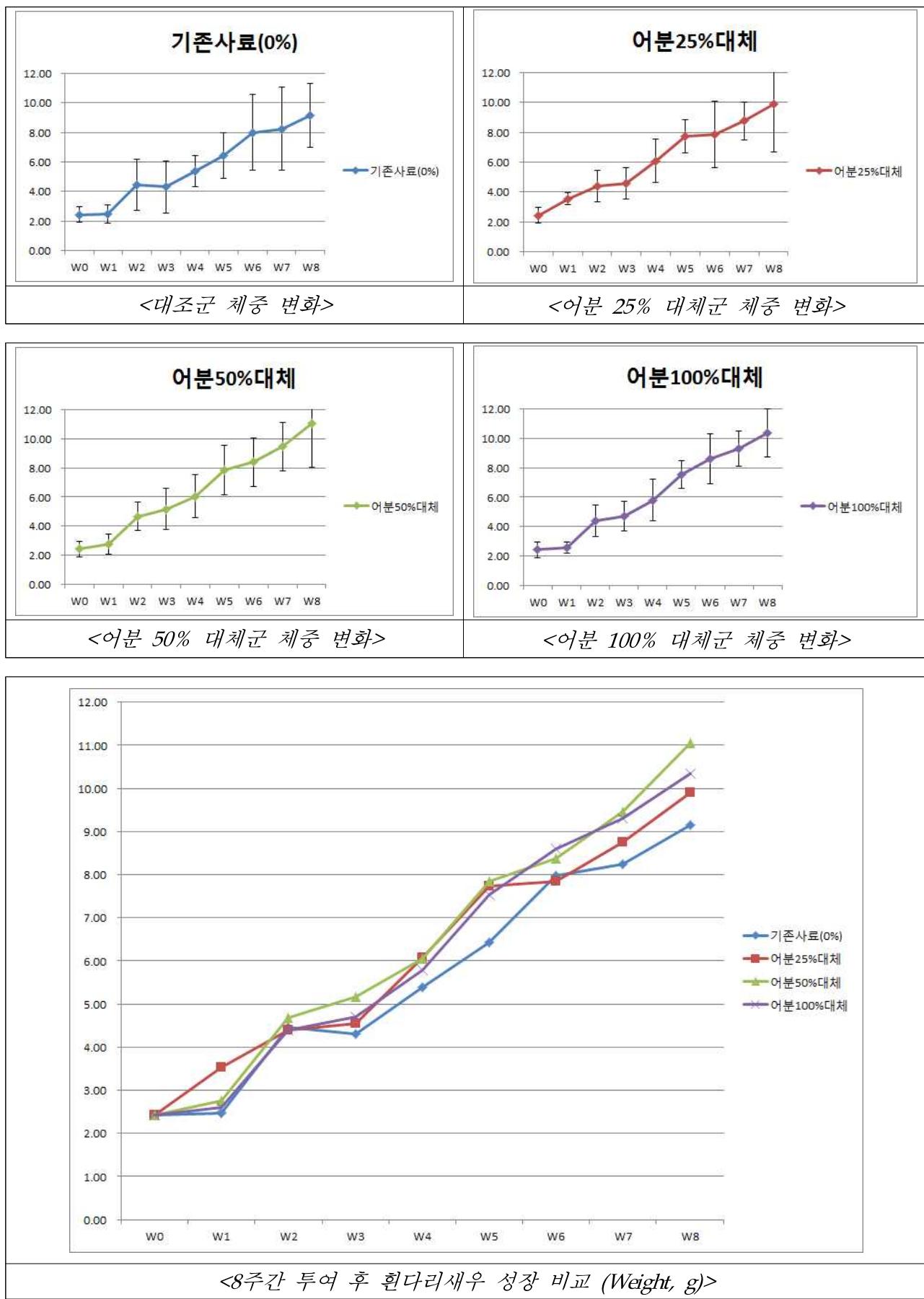


그림2-4. 통계처리 전 성장률

시험 결과에 대한 통계학적 유의성 검정 결과 95% 신뢰수준에서 어분 50% 대체군과 100% 대체군에서 유의한 성장률의 향상이 확인되었다. 각 주간 성장률의 비교에서 어분 50%, 100% 대체군의 경우 시험 초기 (PL70~PL80령)상대적으로 성장률이 크지 않았으나, PL80령 이후 꾸준히 대조군보다 더 나은 성장률 수치를 보였다. 차후 추가시험을 통해 PL20령~PL80령에 대한 곤충사료의 성장률 증가 효과에 대해 2년차에 추가시험을 실시하기로 하였다.

표2-3. 통계학적 검증 결과

실험군	체중(g)			
	투여전	투여후	증감	
기존사료(0%)	2.43±0.53	9.16±2.16	6.73	-
어분25%대체	2.43±0.53	9.90±3.22	7.47	<i>p=0.19</i>
어분50%대체	2.43±0.53	11.05±3.04	8.62	<i>p<0.05</i>
어분100%대체	2.43±0.53	10.36±1.65	7.93	<i>p<0.05</i>

<시험 결과에 대한 통계학적 유의성 검정결과 (95% 신뢰수준, *t-test*)>

주간성장률(%)	W1-W0	W2-W1	W3-W2	W4-W3	W5-W4	W6-W5	W7-W6		최종성장률(%)
기존사료(0%)	1.46	80.73	-3.12	24.98	19.32	24.01	3.33	11.04	276.91
어분25%대체	45.40	24.31	3.70	33.44	27.23	1.55	11.41	13.17	307.46
어분50%대체	13.91	69.10	10.44	17.07	29.85	6.70	12.78	16.91	354.93
어분100%대체	7.03	69.33	7.09	22.89	30.24	13.94	8.28	11.25	326.31

<주간성장률 (%)>

Parameter	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 5
Initial weight, g	2.43±0.53	2.43±0.53	2.43±0.53	2.43±0.53
Final weight, g	9.16±2.16	9.90±3.22	11.05±3.04	10.36±1.65
WG (Weight Gain), g	6.73±1.63	7.47±2.69	8.01±2.51	7.93±1.12
SGR (Specific Growth Rate)	2.37±0.78	2.51±1.18	2.70±1.12	2.59±0.51
FCR (Feed Conversion Ratio)	3.21±0.13	2.89±0.08	2.69±0.09	2.72±0.19
Survival, %	>98.00±0.0	>98.00±0.0	>98.00±0.0	>98.00±0.0

WG = $W_2 - W_1$, where W_2 = mean final weight, W_1 = mean initial weight.

FCR = Feed offered / live weight gain.

SGR = $(\ln W_2 - \ln W_1 / T) \times 100$; where W_2 = final weight of fish, W_1 = initial weight of fish, T = experimental period (day).

Survival (%) = $F_2 / F_1 \times 100$; F_1 = number of fish at the beginning of experiment, and F_2 = number of fish at the end of the experiment.

All calculations were based on the triplicate tank treatment (χ , intervariance exists)

<Growth performance of *L. vannamei* fed with the experimental diets>

WG, SGR, FCR 수치의 비교에서는 Diet3(50%어분 대체군) 실험군이 가장 우수한 사양성적을 보이는 것으로 확인되며, 전체군에서 생존률이 높아 사료 조건 외 시험에 영향을 미칠 수 있는 사육조건이 매우 우수한 것으로 판단되었다. 100%어분 대체군, 0% 어분대체군의 시험사료를 사용하여 intra-variance와 inter-variance를 최대한 배제하기 위한 실험디자인으로 기호성시험을 수행하였으며, Positive Choice score에서 통계적으로 유의한 차이를 보여 곤충원료에 대한 흰다리새우의 기호성이 월등한 것으로 확인되며, 이는 동영상 자료를 통해 확인 가능하다.

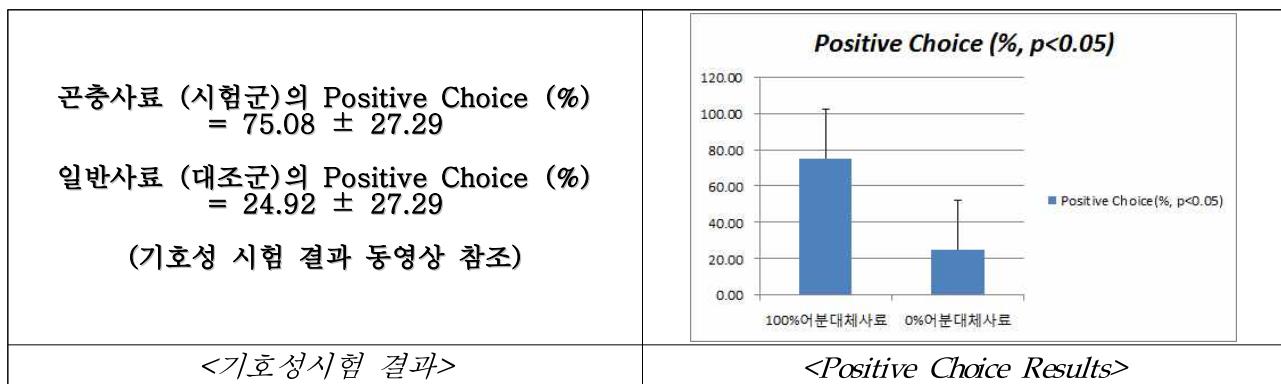


그림2-5. 기호성 시험 결과

나. 곤충사료에 의한 양식 새우의 면역반응/항병원성/영양학적 가치 분석

(1) 곤충사료에 의한 흰다리새우(*L. vannamei*) 성장비교시험(재연) 및 영양학적 가치 분석

1년차 연구결과에 의한 곤충사료의 흰다리새우에 대한 성장촉진효과를 확신 및 반복·재연 분석하기 위해 사양시험 재실시하였다. 시험일정은 입식 및 시험사료 투여 시작(9월) 후 시험종료 및 자료분석 (10월)을 실시하였으며, 1년차 연구 시 설정한 흰다리새우의 어분 대체율을 적용하였다. (0%/25%/50%/100%)

협동2연구팀에서 제조한 새우시험사료를 흰다리새우 영양학적 에너지요구량을 기초로 1년차와 동일하게 사료급여 플랜 작성하고 투여하였다. 결과 도출 후, 1년차에 확보한 기초데이터에 2년차 반복시험의 데이터를 합산 적용함으로서 재연성을 확보하였고, 수조내 시험 조건에 의해 양식현장 조건과의 variables 발생을 보정하기 위해 새우 양식장 실제 환경에 준하여 2KW 전기히터를 이용하여 가온하고 조도와 광주기는 국내 여름 자연적 생산 환경을 적용하여 인위적인 조도와 광주기 조절을 하지 않고 일반적인 국내 흰다리새우 양식 환경에 맞추어 시험을 실시하였다. 체중 측정은 g단위 소�数점 2자리까지 측정 가능한 미세전자저울을 사용하였으며, 2년차 재연시험에서는 디지털 베니어캘리퍼스를 이용한 체장은 측정하지 않았다. 실험 종료 후 증체율 (percent weight gain,%), 일간성장률 (specific growth rate, %/day), 사료효율 (feed efficiency,%) 및 생존율(survival,%)을 종합 분석하였고, 대조군의 시험 결과에 대한 시험군간의 유의성 검증을 위해 모든 통계수치는 평균±표준오차(SEM)로 표기하였으며, 각각 시험군 사이의 통계학적 유의성은 student t-test로 검정하였고(이분산가정), 유의수준 95% (p-value<0.05)에서 유의성검증을 실시하였다.

(2) 기준사료와 곤충사료에 의한 양식새우의 영양학적 가치 분석을 위한 가식성 부위 근육 내 ATP 저장량 분석

근육은 기본적으로 세포내의 ATP라는 생화학적 에너지를 사용하여 수축이라는 생리학적 현상을 발생시킨다. 활성산소에 의한 근육조직의 산화적 손상 역시 세포막의 지질 과산화 현상

및 세포 내 DNA의 산화적 손상과 관련되어 세포의 생존에 필수적인 ATP 생성량의 감소 및 세포 생존률에 영향을 끼치게 된다. 즉, 근육 내 ATP 저장량의 감소는 해산 무척추동물인 새우의 활력지표로서 중요하며, 특히 가식성 부위의 ATP 저장량의 정량분석을 통해 사후경직 후 신선도와 육질의 단단함(높을수록 양질의 씹히는 맛을 제공하며, 육질 향상의 지표가 됨)에 기여하므로 가식적 부위의 근육 세포 내 ATP 정량 분석이 중요하다고 할 수 있다. 가식성 부위 근육 내 ATP저장량의 분석 실험 내용은 다음과 같이 수행하였다.

- Colormetric assay법을 이용
- 그룹별 샘플링한 새우의 가식성부위 근육을 채취함
- homogenizer를 사용하여 조직 분쇄 후 샘플:PCA agent를 5:1로 사용함
- 13,000g로 2분간 원심분리 후 상층액을 준비한 튜브로 옮김
- PCA agent 사용량의 1/5에 해당하는 neutralization agent 처리 후 ATP assay를 시작함
- ATP standard를 준비함 (0,2,4,6,8,10 nm)
- 50uL의 샘플에 ATP assay buffer 44uL, ATP probe 2uL, ATP converter 2uL, Developer mix 2uL를 master mix로 준비하여 혼합 후 30분간 반응시키고 OD 570nm로 수치를 확인함

(3) 곤충사료에 의한 양식 새우의 면역반응 가치 분석

흰다리새우에게 가장 치명적인 질환인 WSSV(White Spot Syndrom Virus)와 관련하여, 바이러스에 대한 내성 관련 유전자에 대한 연구를 통해 바이러스성 질환에 감염 시 새우의 면역 체계와 방어 메카니즘에 대한 다양한 연구결과가 제시된 바 있다. 새우의 간췌장(hepatopancreas)에서 생산되는 다양한 종류의 면역관련 유전자들의 발현 분석 결과를 토대로 곤충사료의 투여 시 흰다리새우의 바이러스 감염에 대한 면역반응과 관련된 유전자 marker를 검색하였다.

특히, 기존 연구에서 흰다리새우의 바이러스에 대한 방어 능력을 획득한 새우 개체에서 발현량이 상승함이 확인된 분자생물학적 지표 물질에 대해 집중적으로 검색을 실시하여 곤충사료 투여 시 새우의 면역을 향상시키는 효과가 있는지에 대한 유효성 검토하였다.

Jenny Rodriguez et al. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp (2000) Acuaquulture. p.109–119 논문을 참조하여 성장촉진과 관련된 흰다리새우의 건강 지표를 설정하였다.(각각의 면역력 지표 유전자의 의의는 다음과 같음)

Beta-glucan binding protein(BGBP): 무척추생물의 면역계에서 pattern recognition proteins, 항체와 같은 역할이며 가장 중추적인 역할

LPS, b-glucan binding protein: 무척추생물의 면역계에서 pattern recognition proteins, 항체와 같은 역할이며 그 중 세균에 대한 인식

Haemocyanin: 연체동물과 갑각류의 혈립프 속에 존재하며 산소분자와 가역적으로 결합하여 산소운반역할

Prophenoloxidase(proPO): 혈구 내에 존재하며 체액성 면역반응에서 매우 중요한 역할, BGBP에 의한 recognition의 proPO를 activation

Transglutaminase: Factor XIII, Clotting protein과 함께 갑각류의 혈액응고에 관여, antimicrobial peptide 생성에 관여

Crustin: 갑각류에서 생산되는 antimicrobial peptides(AMPs)

Penaedin-3a: 새우에서 AMPs 역할과 cytokine 역할을 동시에 함

Lysozyme: 새우에서, AMPs 역할을 하며 bacterial infection에 의해 생산 자극

Superoxide dimutase: 감염성 질환에서 유발된 oxidative stress에 대해 phagocytosis activation으로 cellular defense 관여

일반적으로 널리 알려진 RT-PCR 프로토콜을 사용하여 hepatopancreas에서 10개 면역지표의 유전자 발현량을 정량 분석하였으며, qRT-PCR과 real-time RT-PCR은 다음과 같이 수행하였다.

- 새우의 간췌장은 액체질소를 부어 얼린 뒤 분쇄 및 homogenizer로 재분쇄
- 신뢰할 수 있는 TRIzol method로 total RNA 추출
- Chlorform의 비중을 이용하여 aqueous phase의 RNA 회수
- Oligo dT primer를 사용하여 RT과정 진행
- cDNA 합성 후 정량하여 (모든 sample의 DNA를 1.0ug/ul로 산출) 후 qRT-PCR 실시
- Gel-documentation 및 Ct값 상대정량 실시
- primer design은 표2-4, 2-5와 같다.

표2-4. RT-PCR을 위한 primer design

Target gene	GenBank #	Forward/reverse sequence	Products (bp)
b-actin	AF300705	5'-TGTGTGACGACGAAGTAGCC-3' 5'-TGGTCGTAAAGGTGTAACCA-3'	605 bp
Beta-glucan binding protein	AY249858	5'-CGTGAGGTTCCCCAGTATGG-3' 5'-TTCGGTTGGATGGCTAAAG-3' 5'-TCGTCAGCATTGTGGAATC-3' 5'-GAAGTCGTAGCCGTAAGC-3'	1002 bp 583 bp
LPS, b-glucan binding protein	AY723297	5'-CAGCAGRATGAAGGGCTTCG-3' 5'-TATCTGCTGATGACATGGCG-3' 5'-CTGGCTCTAGCAGAACCTC-3' 5'-CCTCGTCCACGTAGAACTCC-3'	1203 bp 399 bp
Haemocyanin	X82502	5'-AATGCAGCCTACTTCCGTAC-3' 5'-TTATCGGGGTACACGCCATG-3' 5'-CACCAACTTACCGTCCGATT-3' 5'-GGTGGCAGTTTCGAAGTGT-3'	1525 bp 453 bp
Prophenoloxidase	AY723296	5'-GGAATTGTTTACTACATGCATCAGC-3' 5'-GGAACAAGTCATCCACGAGCTT-3'	563 bp
Transglutaminase	BE188522	5'-CAACCTGGAGGTTACAAGC-3' 5'-CAAAGCTCTYGGKAAATACG-3'	535 bp
Crustin	AF430076	5'-ATTCTGTGCGGCCTCTTAC-3' 5'-ATCGGTCGTTCTCAGATGG-3'	539 bp
Penaeidin 3a	Y14926	5'-AGCCTCACCTGCAGAGACCA-3' 5'-AATCAGGATCRCAGKCTTTCAC-3'	378 bp
Lysozyme	AY170126	5'-TTCGGGAAGTGCAGATTG-3' 5'-AATGGAAACCCTTGAGT-3'	475 bp
Superoxide dismutase	AY486424	5'-GAGAAGAAGTTGGCTGAGCT-3' 5'-ATGTTGGTCCAGAAGATGG-3'	467 bp

표2-5. qRT-PCR을 위한 primer design

Target gene	GenBank #	Forward/reverse sequence	Products (bp)
b-actin	AF300705	5'-CCACGAGACCACCTACAAC-3' 5'-AGCGAGGGCAGTGATTTC-3'	142 bp
Beta-glucan binding protein	AY249858	5'-ACGAGAACGGACAAGAAAGTG-3' 5'-TTCAGCATAGAAGCCATCAGG-3'	137 bp
LPS, b-glucan binding protein	AY723297	5'-ACCGCAGCATCAGTTATACC-3' 5'-GTCATCGCCCTTCCAGTTG-3'	77 bp
Haemocyanin	X82502	5'-GTCTTAGTGGTTCTGGGCTTGTC-3' 5'-GGTCTCCGTCCTGAATGTCTCC-3'	124 bp
Prophenoloxidase	AY723296	5'-CGGTGACAAAGTT CCTCTTC-3' 5'-GCAGGTCGCCGTAGTAAG-3'	122 bp
Transglutaminase	BE188522	5'-TTCACAAGCCTGACATCACC-3' 5'-GCAGCAGTGGGATAGGGTTA-3'	99 bp
Crustin	AF430076	5'-ACGAGGCAACCATGAAGG-3' 5'-AACCACCACCAACACCTAC-3'	141 bp
Penaedin-3a	Y14926	5'-CACCCCTCGTGAGACCTTG-3' 5'-AATATCCCTTCCCACGTGAC-3'	121 bp
Lysozyme	AY170126	5'-GGACTACGGCATCTTCCAGA-3' 5'-ATCGGACATCAGATCGGAAC-3'	97 bp
Superoxide dimutase	AY486424	5'-TCATGCTTGCCACCTCTC-3' 5'-CCGCTTCAACCAACTTCTTC-3'	143 bp

(4) 곤충사료에 의한 양식 새우의 항병원성 가치 분석

WSSV 공격접종을 통한 기존사료와 곤충사료에 의한 양식새우의 항병원성 증진효과 확인 WSSV(White Spot Syndrom Virus)에 감염된 새우는 외골격에 흰색의 반점이 나타나는 특징을 나타내며, 감염 후 3~10일 안에 100%의 치사율을 보이는 것으로 알려졌다. 특히 양식수의 환경요인과 새우의 WSSV 집단 발병은 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났으며 전반적인 연구 결과는 새우가 WSSV에 감염되었다 하더라도 수환경이 양호하면 대량폐사에는 이르지 않는 것으로 밝혀 진 바 있으므로, 공격접종은 양식 호지와 유사한 환경인 “용수의 무환수 집약식 환경”에서 실시하였다. 충남 태안에서 발생한 WSSV폐사체를 FUJIKURA KASEI CO.,LTD의 새우 백점병 진단 시약(SHRIMPLE)로 진단 후 증상 및 진단검사 결과를 기초로 WSSV를 진단 후 액체질소에서 분쇄한 사체를 이용하여 공격접종을 실시하였다.

SHRIMPLE 진단 키트를 사용한 WSSV진단은 다음과 같이 수행하였다.

- 새우를 깨끗한 담수로 세척한 후 복지를 절단하여 마이크로튜브에 넣음
- 그라인더 막대로 마이크로튜브 안의 복지를 10회 이상 찧어서 잘 분쇄
- 5분 방치 후 스포이드로 상층액을 뽑은 후 검출플레이트 구멍에 3-4방울 점적
- 15분 후에 검출 플레이트에 나타난 발색 띠가 2개이면 양성임
- *in vivo challenge test*는 동일한 양의 사체 분쇄물(1g)을 Group1/2/3/4 수조에 투입 후 12시간 단위로 폐사 발생유무를 확인하여 데이터를 도출하였음

(5) Haemogram count를 통한 기존사료와 곤충사료에 의한 양식새우의 면역증진효과 및 항병원성 확인

새우에서의 혈구측정은 크게 THC (Total Haemocyte Count) 와 DHC (Differential Haemocyte Count) 의 두 가지 방법이 있는데, 대부분의 흰다리새우 관련 연구에서 hemolymph의 THC에 대한 측정만으로 충분히 면역능력에 대한 지표가 될 수 있다고 보고된 바 있다. 흰다리새우의 THC는 간편히 hemocytometer로 identification이 가능하며, 좀 더 specific한 면역기전의 탐색을 위해서는 혈구에 대한 differential count가 필요하여 2차 추가 사양시험 후 THC count 및 DHC를 실시하였다.

(6) 곤충사료의 양식새우에 대한 생체안전성 평가 (독성평가)

1년차 사양시험 결과 survival ratio가 모든 군에서 (0, 25, 50, 10%) $98.00\% \pm 0.0$ 으로 기존사료와 곤충사료 모두 8주 투여에 의한 독성은 없는 것으로 추정하였다. 그러나, 곤충사료 투여에 의한 흰다리 새우 성장을 증진 효과를 뒷받침하기 위해 사양시험 후 주요 장기에 대한 조직학적 분석이 필요하다고 판단되었다. 2년차 재연성시험 실시 후 NBF에 장기 표본을 고정하여 조직학적 분석을 실시하였으며, 다음과 같은 순서로 진행하였다.

조직처리 → 표본포매 → microtome으로 삭정(trimming 및 facing) → block냉각 → slide 제작 및 염색 → mounting의 일반적인 조직 표본 제작 절차를 준수하여 슬라이드를 제작

(7) 결과 및 고찰

RT-PCR을 통해 새우 면역력 지표 9종에 대한 gel-documentation을 실시하고, 곤충사료 투여에 의해 유의한 발현양상의 변화 추이를 보이는 지표에 대해 real-time PCR을 통해 정량분석 실시하였다.

1차 prevalance analyses 결과 (2주간 곤충사료 투여 후) 기존 연구결과의 전체 맥락에서는 일치(곤충사료 투여군이 면역지표 향당)하나, 발현량의 증가가 다소 혼동되며 정량분석에 투입된 샘플이 제한적이라 재연성평가를 위한 8주간 곤충사료 투여 후 다시 정량평가를 실시하기로 하였다.

1차 prevalance analyses에서는 BGBP (beta-glucan binding protein, 새우의 비특이적 면역에서 가장 중요한 지표: 척추동물의 항체와 같은 역할)이 곤충사료투여군 모두에서 증가하였으나 투여전에 비해 통계적으로 유의함이 확인되었고, Crustin (새우에서 생성되는 항생물질로 추정되는 펩타이드, AMPs)이 유의한 정도의 증가 양상이 관찰되지 않았고, ProPO (Prophenoloxidase, 새우의 병원체에 대한 방어기작에서 과립세포와 같은 세포성 면역 이외에 선천면역을 담당하는 물질) 역시 유의한 pattern 발견되지 않았음, 그 외 6종의 marker 모두 명확한 band의 pattern이 확인되지 않아, 8주간 실시하는 재연성 확보 사양시험에서 모든 샘플에 대해 재분석을 실시하기로 하였다.

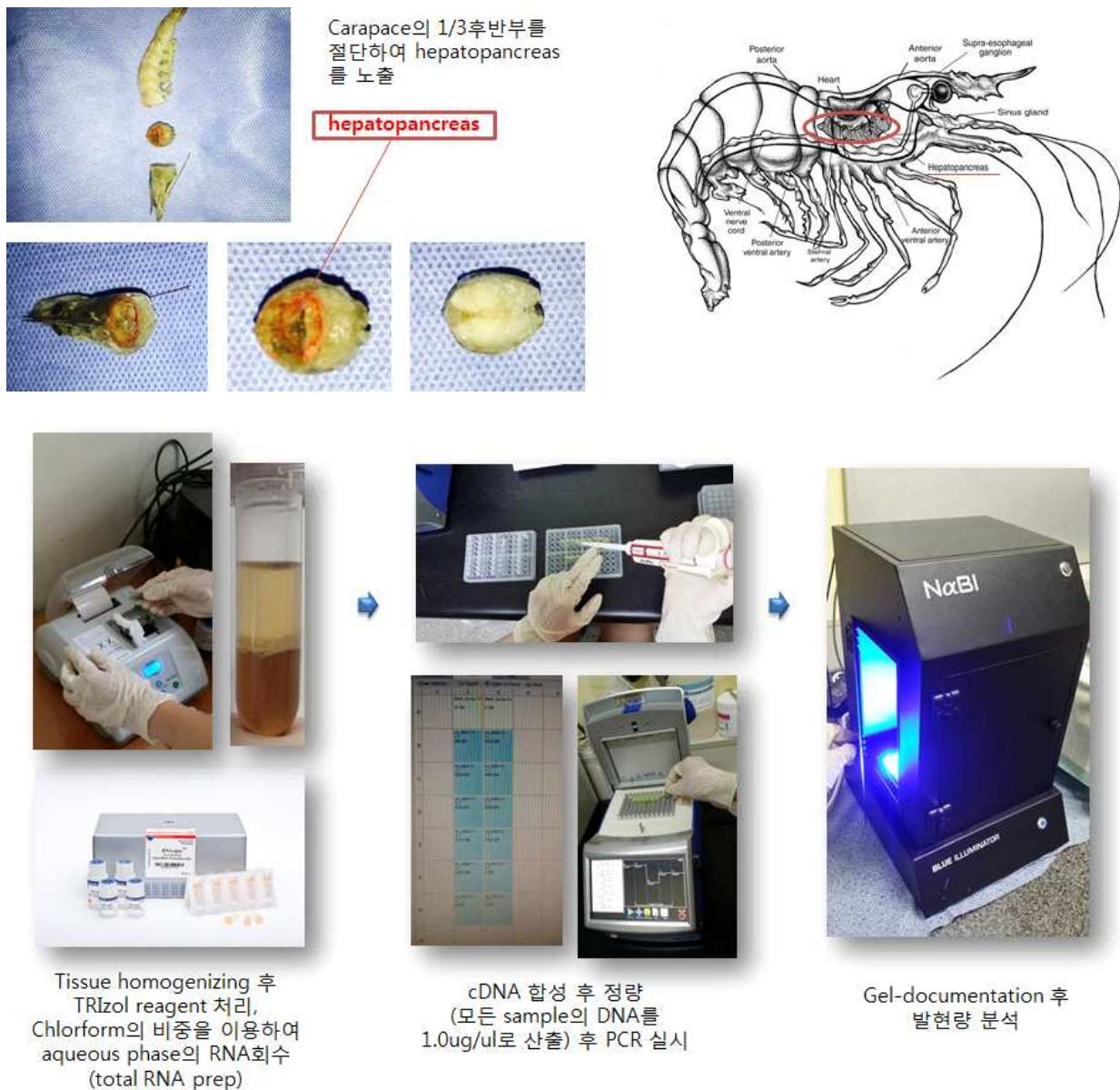


그림2-6. hepatopancreas 적출 및 새우 면역력 지표 marker의 발현량 분석

8주간 곤충사료 투여 후 25%, 50%, 100% 어분대체사료 투여군에서 유의한 발현pattern의 변화가 관찰된 BGBP (beta-glucan binding protein), proPO (prophenoloxidase), Crustin에 대해 real-time PCR분석을 실시하였으며, GROUP1(대조군)의 발현량에 대해 상대정량을 실시하였다. (PCR7700 사용: ABI Prism sequence detector, Applied Biosystems).

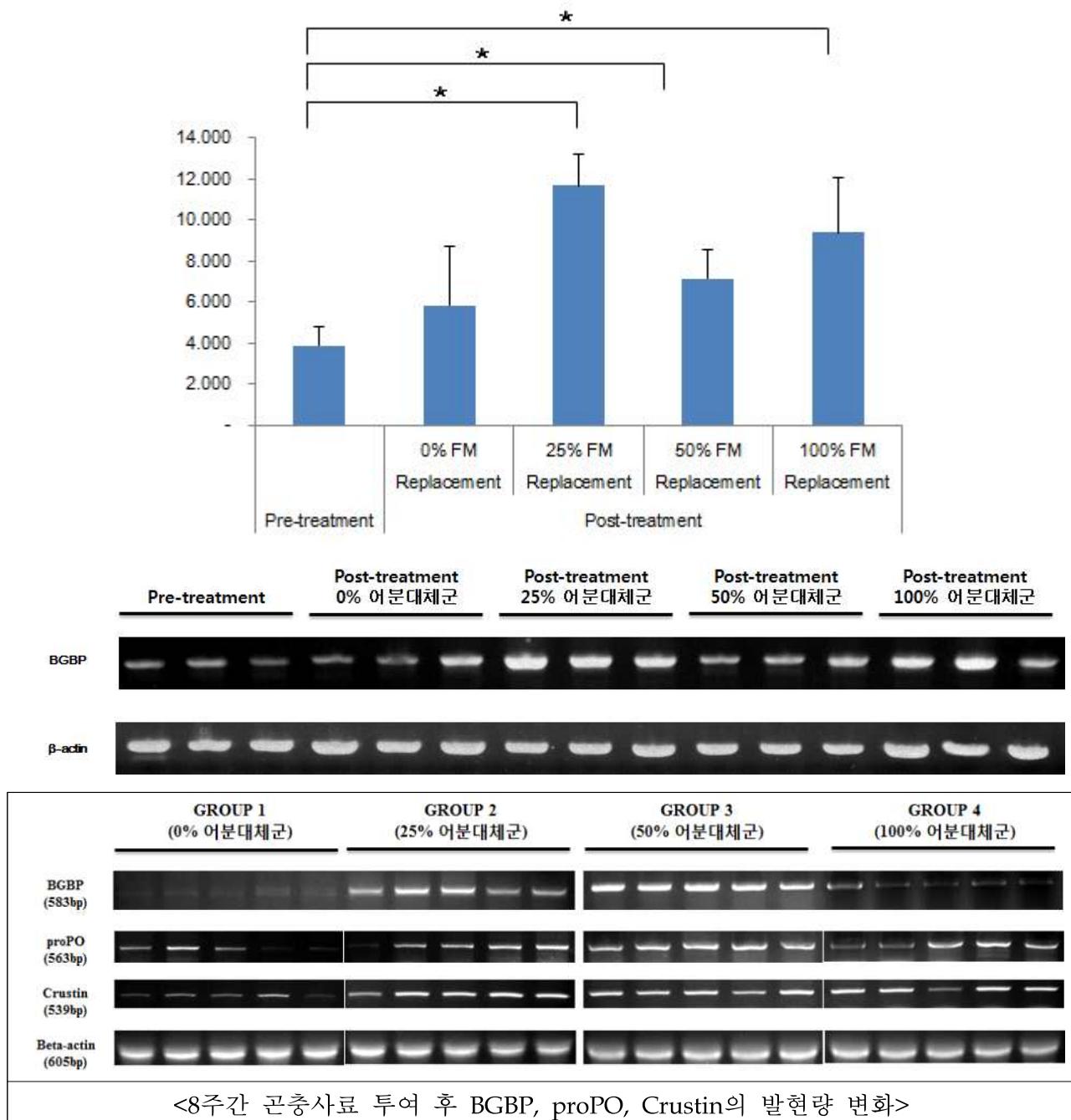


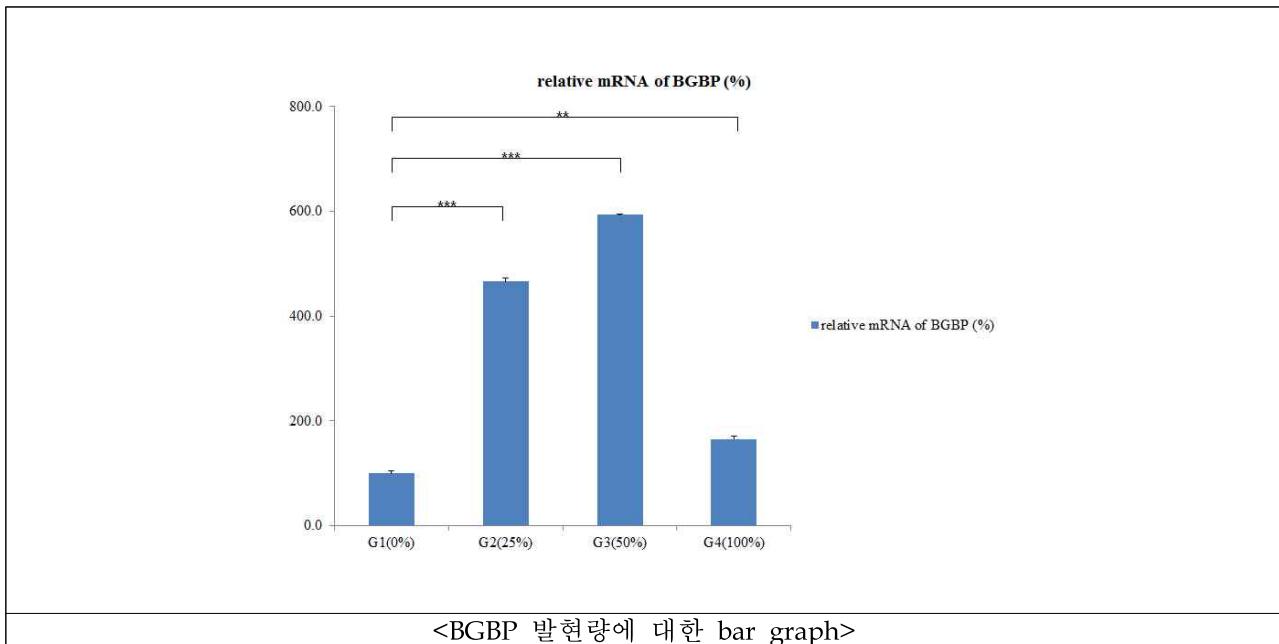
그림 2-7. 2주간 곤충사료 투여 후 BGBP의 곤충사료 투여 전/후 발현량 변화 확인

표 2-6. 통계학적 검증

	G1(0%)	G2(25%)	G3(50%)	G4(100%)
relative mRNA of BGBP (%)	100.00	465.97	593.48	164.87
relative mRNA of proPO (%)	100.00	233.58	1396.79	366.17
relative mRNA of Crustin (%)	100.00	204.61	170.33	88.40
	G1(0%)	G2(25%)	G3(50%)	G4(100%)
t-test of BGBP (%) vs NC	-	0.002	0.000	0.025
t-test of proPO (%) vs NC	-	0.000	0.012	0.002
t-test of Crustin (%) vs NC	-	0.052	0.042	0.392

<대조군(NC) 대비 mRNA 발현량(%)과 통계학적 유의 검증 결과>

BGBP의 발현량은 대조군(NC, 100%) 대비 25%어분대체군의 경우 466% 발현량 증가 ($p<0.01$, 99%신뢰수준), 50%어분대체군의 경우 593% 발현량 증가 ($p<0.01$, 99%신뢰수준), 그리고 100%어분대체군에서 164%의 발현량 증가 ($p<0.05$, 95%신뢰수준) 가 확인되었다.



<BGBP 발현량에 대한 bar graph>

그림 2-8. BGBP

proPO의 발현량은 대조군(NC, 100%) 대비 25%어분대체군의 경우 234% 발현량 증가 ($p<0.01$, 99%신뢰수준), 50%어분대체군의 경우 1397% 발현량 증가 ($p<0.05$, 95%신뢰수준), 그리고 100%어분대체군에서 366%의 발현량 ($p<0.01$, 99%신뢰수준) 가 확인되었다.

Crustin의 발현량은 대조군(NC, 100%) 대비 25%어분대체군의 경우 205% 발현량 증가 ($p=0.052$), 50%어분대체군의 경우 170% 발현량 증가 ($p<0.05$, 95%신뢰수준), 그리고 100%어분대체군에서 88%의 발현량 감소 ($p=0.392$) 가 확인되었다.

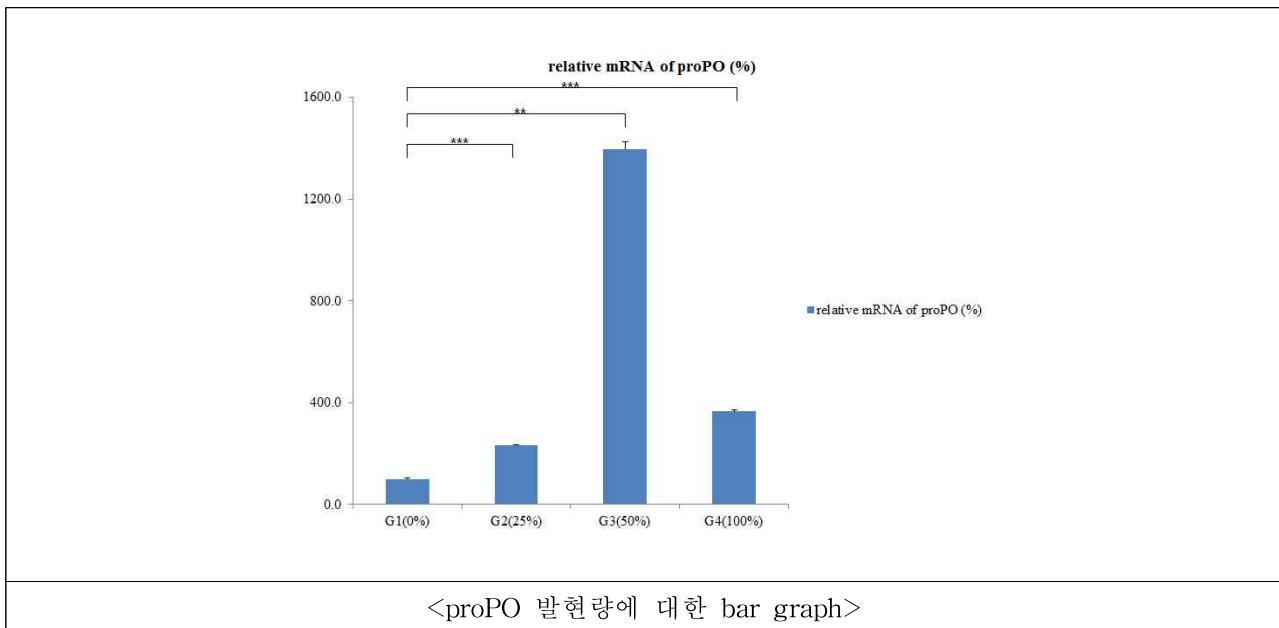


그림 2-9. proPO

Crustin의 발현량은 25%, 50% 모두에서 증가한 것으로 보이나, 50%어분대체사료 투여군에서만 통계학적으로 유의한 결과가 도출되었다. Crustin은 multi-domain을 보유하고, C-terminal 부위에 cysteine-rich region을 (12개의 cysteines) 가지고 있는 hydrophobic peptides로서 그람양성균에 대한 항균작용을 가지고 있으며, penaeidin과 함께 antimicrobial peptides(AMPs)의 일종이다. (Yu-Chi Wang, Poh-Shing Chang and Houng-Yung Chen. Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology 23 (2007) 1161-1177)

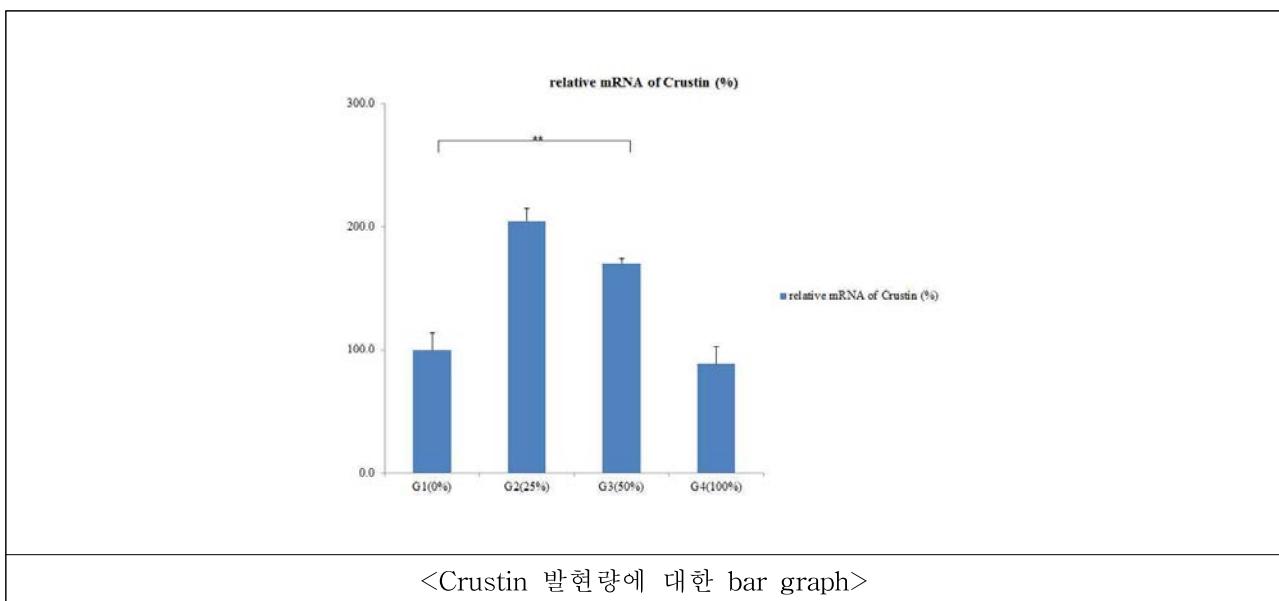


그림 2-10. BGBP

곤충사료에 의한 양식새우의 항병원성 증진효과를 확인하기 위하여 WSSV 공격시험을 수행한 결과(군별 10마리), 50% 어분대체사료 투여군에서 0% 어분대체사료(기존사료)에 비해 누적

폐사율이 현저히 Delay 됨을 확인하여 곤충사료 투여에 의한 면역력 증진 효과를 확인하였다. 공격접종 후 Diet1(0%어분대체군)에서는 하루 만에 폐사체가 확인 되었으나, 대체로 어분 대체군 모두 (Diet2,3 and 4)에서 폐사체의 출현이 하루 이틀 늦춰지는 것이 확인되었으며, 50%어분대체군의 경우 공격접종 후 5,6,7일 이후까지 누적폐사율이 60~70%를 유지하는 것을 확인하였다. 본 공격접종시험 결과를 바탕으로 곤충분에 의한 어분 대체 사료가 훤다리새우의 면역력의 증가를 통해 항병원성 사료로서의 가치를 가질 것으로 사료된다.

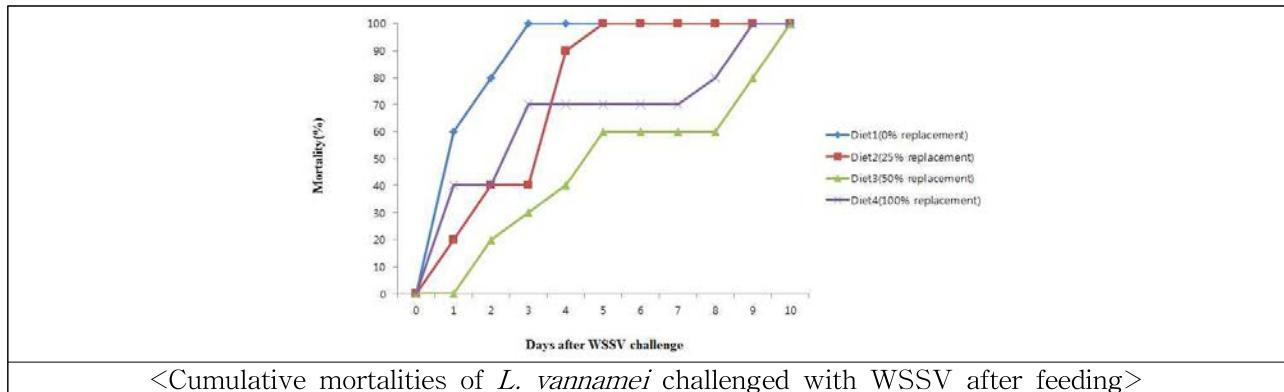


그림 2-11. 항병원성 검증

Haemogram count를 통한 기존사료와 곤충사료에 의한 양식새우의 면역증진효과 및 항병원성 확인 한 결과, 곤충사료의 면역증진 및 항병원성 효과를 확인하기 위해 새우의 hemolymph를 분리하여 total hemolymph counting(THC)를 실시하였으며, 곤충사료 투여군 모두에서 THC의 유의한 증가가 확인되었다.(p<0.01)

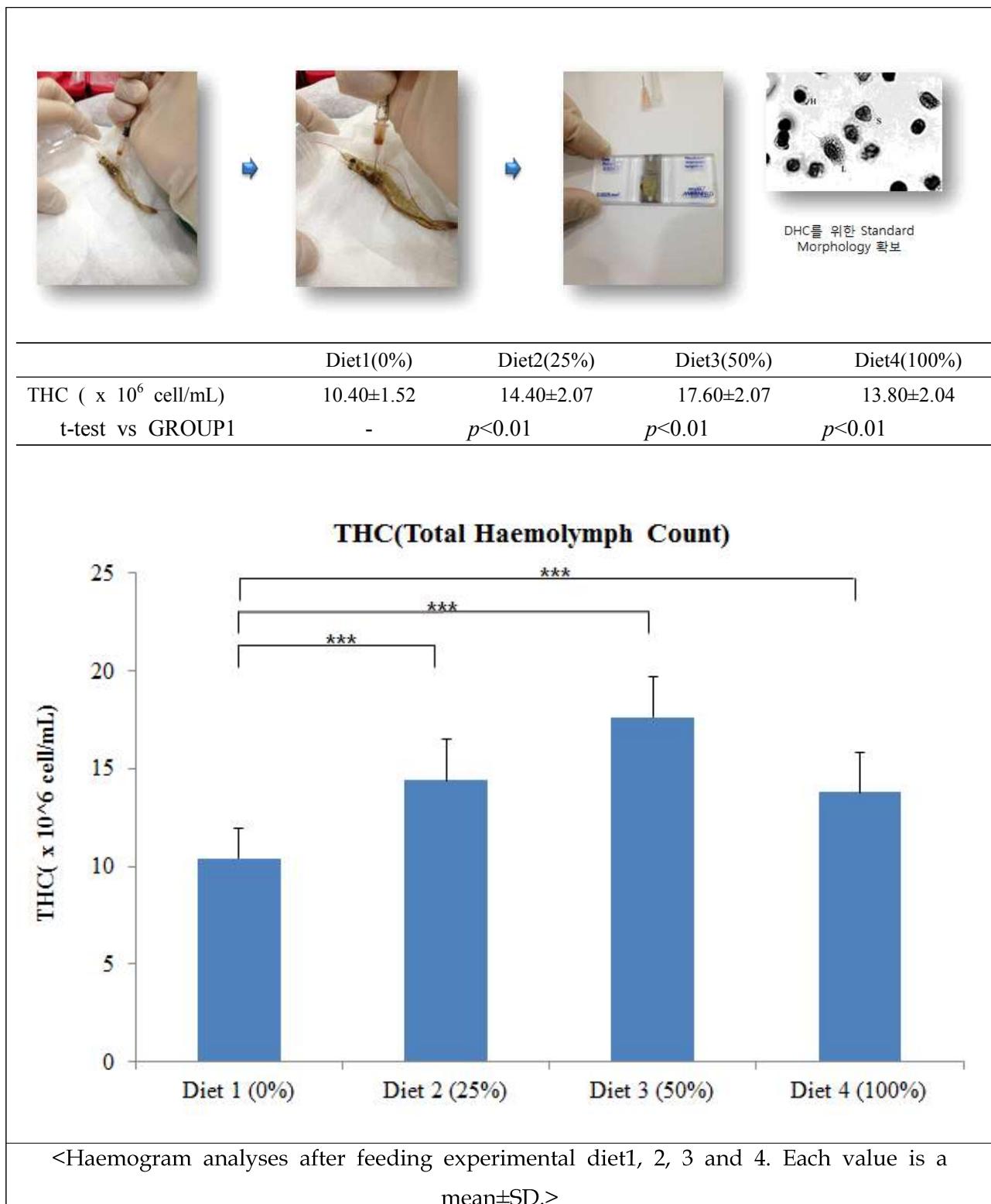


그림 2-12. cytology

곧중 50%대체 사료군에서 대체로 total hemocytes의 숫자가 증가된 것이 확인되었으며, phagocytic reaction으로 추정되는 haemocytes agglutination이 관찰되었다. 새우의 혈구는 형태학적, 생리학적, 세포화학적 특징에 의해서 투명구, 반과립구, 과립구의 3가지로 구분되며 각각 독특한 생물학적 기능을 수행하였다. 투명구(hyaline cell, H)는 주로 식세포작용을 하며 반

과립구(small granulocyte, SG)는 결절형성, 세포독성기능, 페놀산화효소 활성 (phenoloxidase activity) 등을 수행하며, 특히 과립구(Large granulocyte, LG)는 페놀산화효소 활성이 매우 강한 것으로 보고된 바 있다.

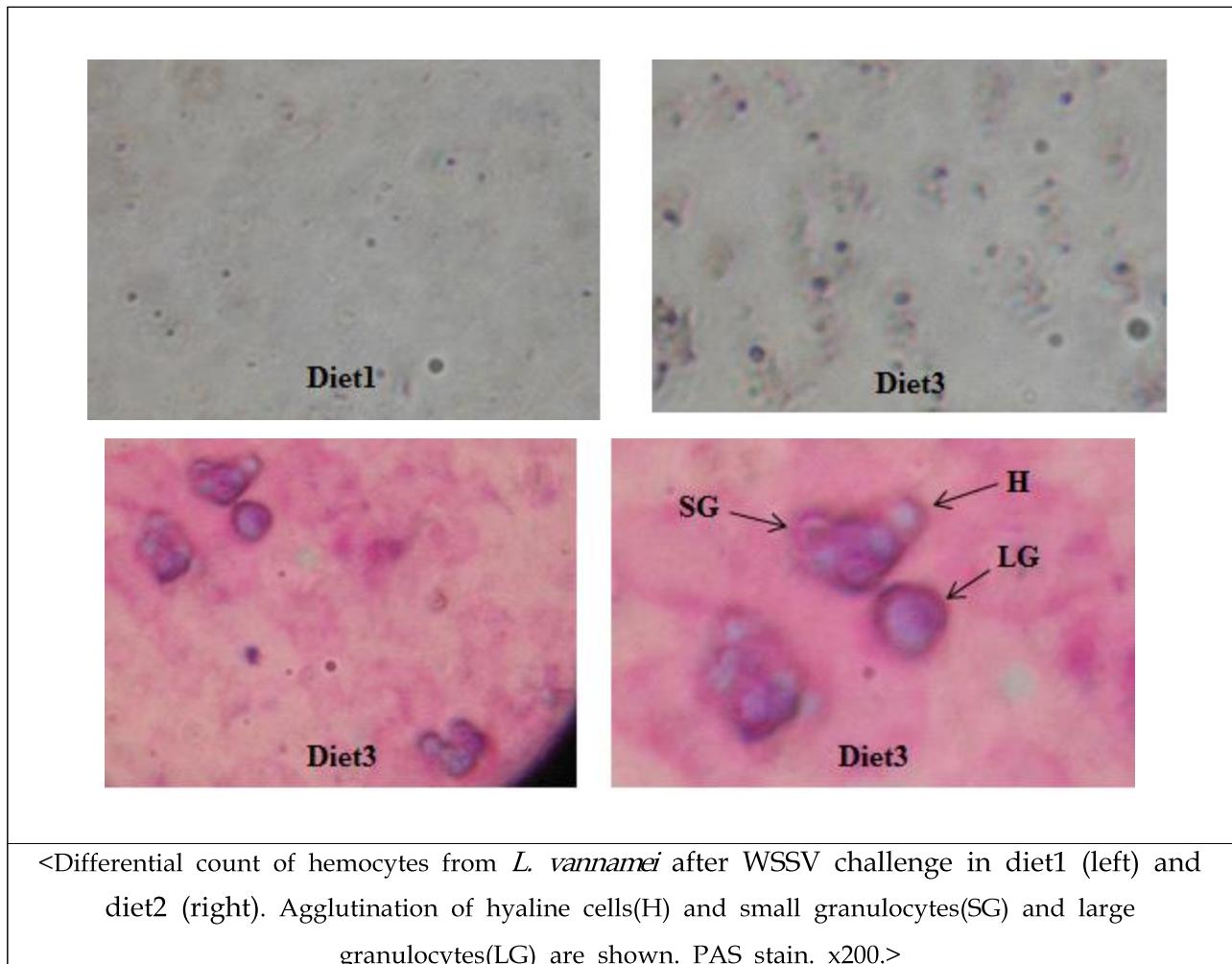
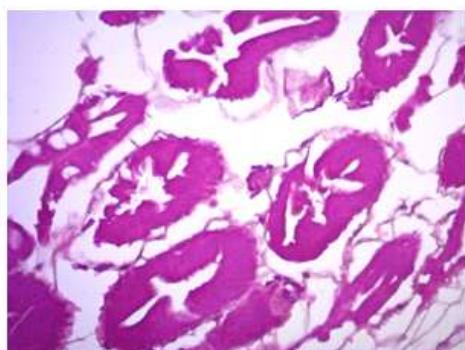


그림 2-13. Differential Counting

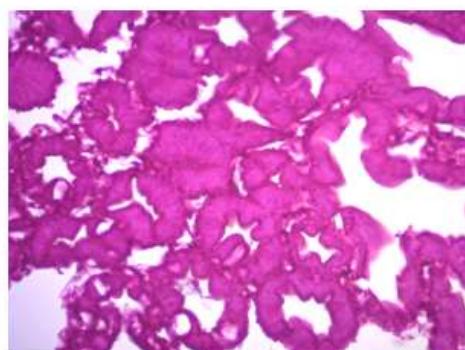
곤충사료의 생체안정성 평가를 위해 diet1, diet2, diet3 와 diet4 투여군의 hepatopancrease, intestine과 muscle의 조직분석을 수행하였다. 모든 group에서 독성을 의심할 만한 염증세포의 침윤 및 세포괴사 소견이 발견되지 않았으며, 조직구조도 정상으로 판정되어 어분을 곤충분으로 25%, 50%, 100% 대체한 사료 투여에 의한 독성이 없는 것으로 확인되었다.

Hepatopancreas

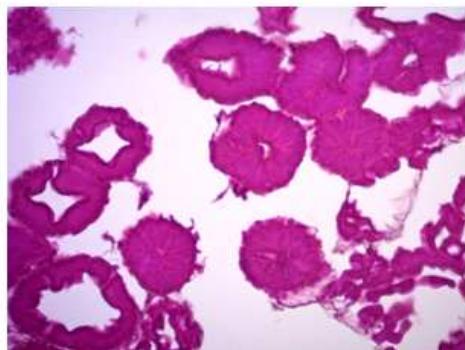
Diet1



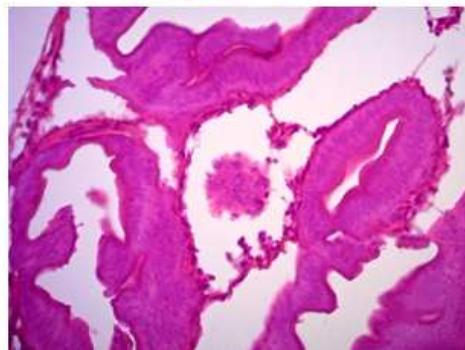
Diet2



Diet3



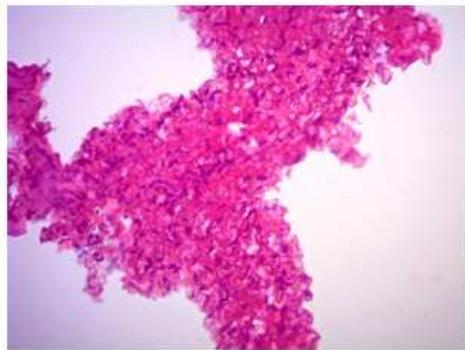
Diet4



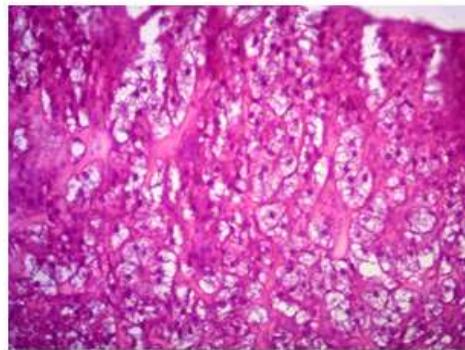
<Histopathologic analyses of hepatopancreas from *L. vannamei* after feeding diet1, diet2, diet3 and diet4. H&E stain. x200.>

Intestine

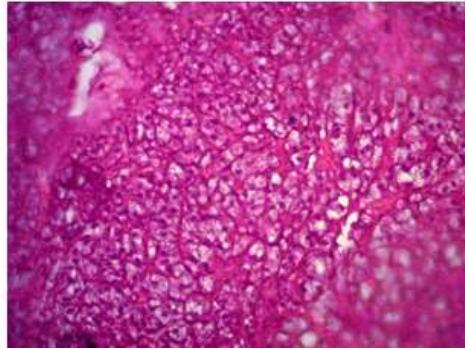
Diet1



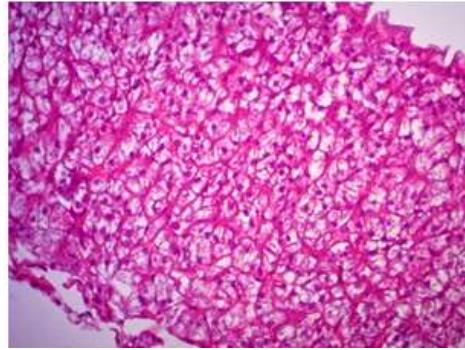
Diet2



Diet3



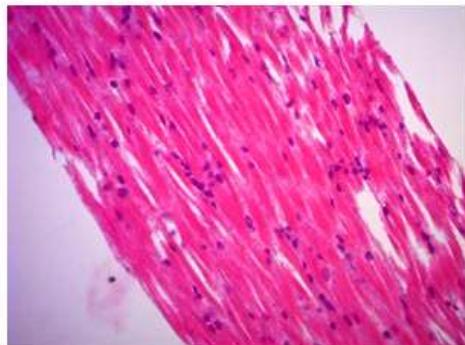
Diet4



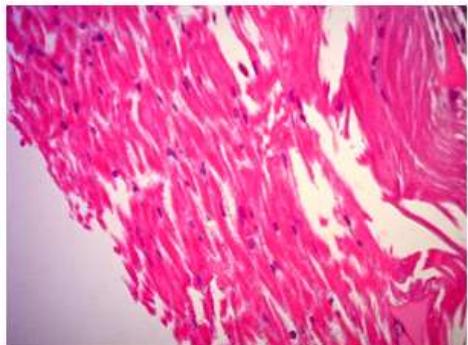
<Histopathologic analyses of intestine from *L. vannamei* after feeding diet1, diet2, diet3 and diet4. H&E stain. x200.>

Muscle

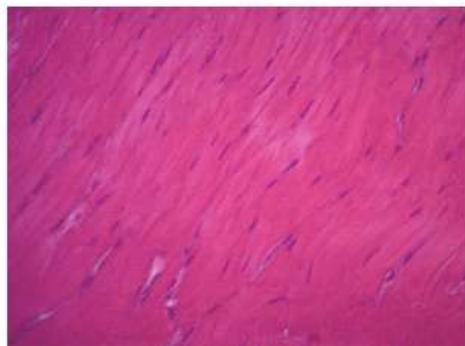
Diet1



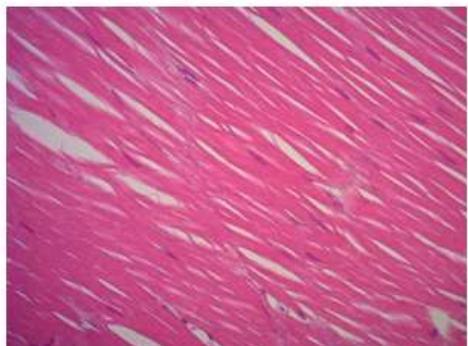
Diet2



Diet3



Diet4



<Histopathologic analyses of muscle from *L. vannamei* after feeding diet1, diet2, diet3 and diet4. H&E stain. x200.>

그림 2-14. 무독성 확인

곤충사료에 의한 흰다리새우(*L. vannamei*) 성장비교시험 반복 재연 및 영양학적 가치 분석을 실시하여 반복실험 데이터를 확보하였다.



체중측정을 통한 Weight Calibration



8개 수조에 동일 중량의 개체를 Distribution



2주간 0%, 25%, 50%, 100% 곤충 사료를 투여



2주후 RT-PCR용시료 및 hemolymph 채취

<재연성 확보를 위한 2년차 추가 사양시험 실시-1>



그림2-15. 반복시험

곤충사료 투여 후 흰다리 새우 성장촉진 효과를 확인하고, 건강/면역지표 유전자 변화를 확인하기 위해 4월부터 5월, 9월부터 10월까지 반복사양시험을 실시하였다.

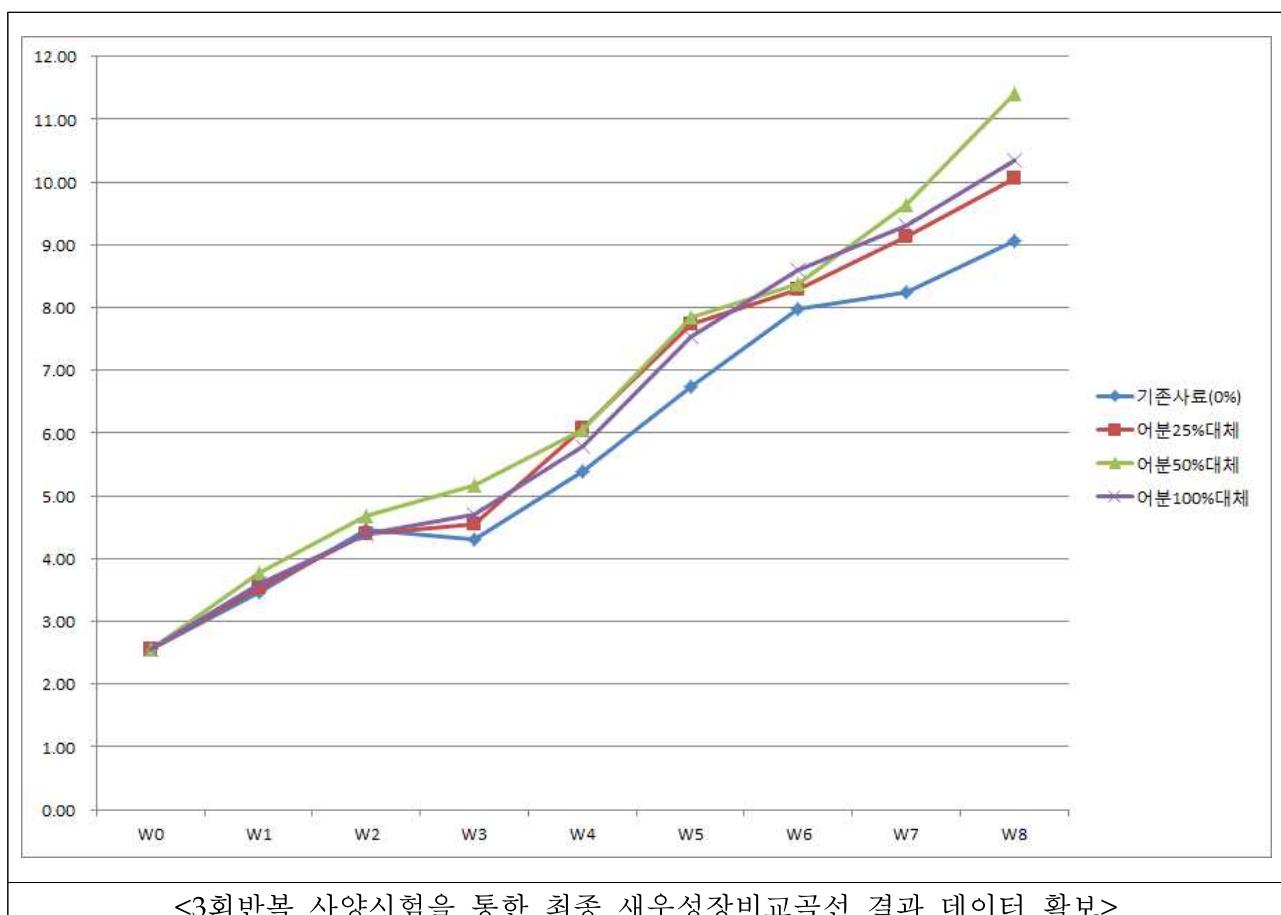


그림2-16. 반복시험 결과 데이터 합산으로 오차 감소

곤충사료 투여 후 흰다리새우 성장촉진 효과를 확인하였으며, 반복실험을 통해 어분 50%대체군의 탁월한 성장촉진효과를 확인하였였다. 또한, 주간 성장률의 비교에서 어분 대체군(실험군)

의 성장률 향상 효과가 사양시험 초기 (PL70~PL80령)에는 기존 사료와 상대적으로 비슷한 성장률을 보였으나, PL80령 이후 꾸준히 대조군보다 더 나은 성장률 수치를 보여 육성기 사료에 적합할 것으로 판단된다.

표2-7. 반복시험 후 통계처리

실험군	체중(g)			t-test (vs 0%대체군)
	투여전	투여후	증감(g)	
기존사료(0%)	2.39±0.49	9.06±2.05	+6.67	-
어분25%대체	2.39±0.49	10.05±3.06	+7.66	p<0.05
어분50%대체	2.39±0.49	11.41±2.082	+9.02	p<0.05
어분100%대체	2.39±0.49	10.36±1.57	+7.97	p<0.05

<통계학적 유의성 검정 결과 (95% 신뢰수준, t-test 결과)>

시험 결과에 대한 통계학적 유의성 검정 결과 95% 신뢰수준에서 어분 25%, 50%, 100% 대체군 모두 기존사료 대비 통계적으로 유의한 성장률의 향상이 확인되었다. 대조군 대비(+6.67g), 25% 어분대체군의 경우 14%성장률 향상, 50% 어분대체군의 경우 35%성장률 향상, 100% 어분대체군의 경우 19% 성장률 향상효과가 확인되었다.

표2-8. 통계처리 후 데이터

Parameter	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4
Initial weight, g	2.39±0.49	2.39±0.49	2.39±0.49	2.39±0.49
Final weight, g	9.06±2.05	10.05±3.06	11.41±2.08	10.36±1.57
WG (Weight Gain), g	6.67±1.56	7.66±2.57	9.02±1.59	7.97±1.08
SGR (Specific Growth Rate)	2.37±0.09	2.56±0.11	2.79±0.09	2.61±0.07
FCR (Feed Conversion Ratio)	3.21±0.13	2.89±0.08	2.69±0.09	2.72±0.19
Survival, %	>98.00±0.0	>98.00±0.0	>98.00±0.0	>98.00±0.0

WG = $W_2 - W_1$, where W_2 = mean final weight, W_1 = mean initial weight.
 FCR = Feed offered / live weight gain.
 SGR = $(\ln W_2 - \ln W_1 / T) \times 100$; where W_2 = final weight of fish, W_1 = initial weight of fish, T = experimental period (day).
 Survival (%) = $F_2 / F_1 \times 100$; F_1 = number of fish at the beginning of experiment, and F_2 = number of fish at the end of the experiment.
 All calculations were based on the triplicate tank treatment (x, inter variance exists)

<Growth performance of *L. vannamei* fed with the experimental diets>

WG, SGR, FCR 모두 diet3(50% 어분 대체군)이 가장 우수한 사양성적을 보였으며, 25%/100% 어분 대체군도 기존 사료에 비해 사양성적이 높음을 확인하였다. 재연성 확인 사양시험에서 무환수식과 환수식 모든 반복시험에서 생존률이 높아 사료 조건 외 시험에 영향을 미칠 수 있는 사육조건이 최소화되어 사양시험 결과의 유의성이 향상되었다.

기존사료와 곤충사료에 의한 양식새우의 영양학적 가치 분석을 위한 가식성 부위 근육 내 ATP 저장량 분석을 통해 8주간 곤충사료를 투여하는 사양시험 실시 후 가식성부위 근육 내 ATP저장량 분석을 수행하였다. internal variance 및 external variance 배재를 위해 서로 다른 개체 3마리씩을 sacrifice하여 3회반복 실시하였으며, standard curve곡선의 회귀분석을 통해 각 샘플의 근육 내 ATP 저장량 (nM)을 산출하였다. 가식부위 근육 내 ATP함량 분석에서 대

조군 대비(4.44nmM), 25% 어분대체군의 경우 63.42% 통계적으로 유의하게 증가하였으며,($p<0.05$, 95% 신뢰수준) 50% 어분대체군의 경우 230% 통계적으로 유의하게 증가 ($p<0.01$, 99% 신뢰수준) 되었음을 확인하였다.

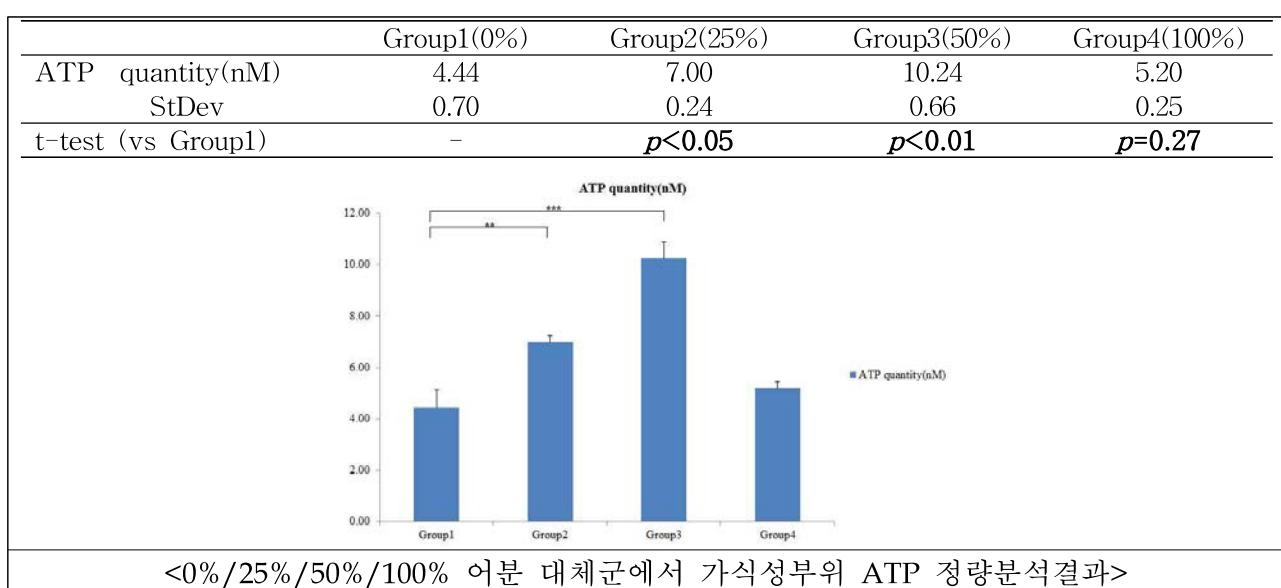
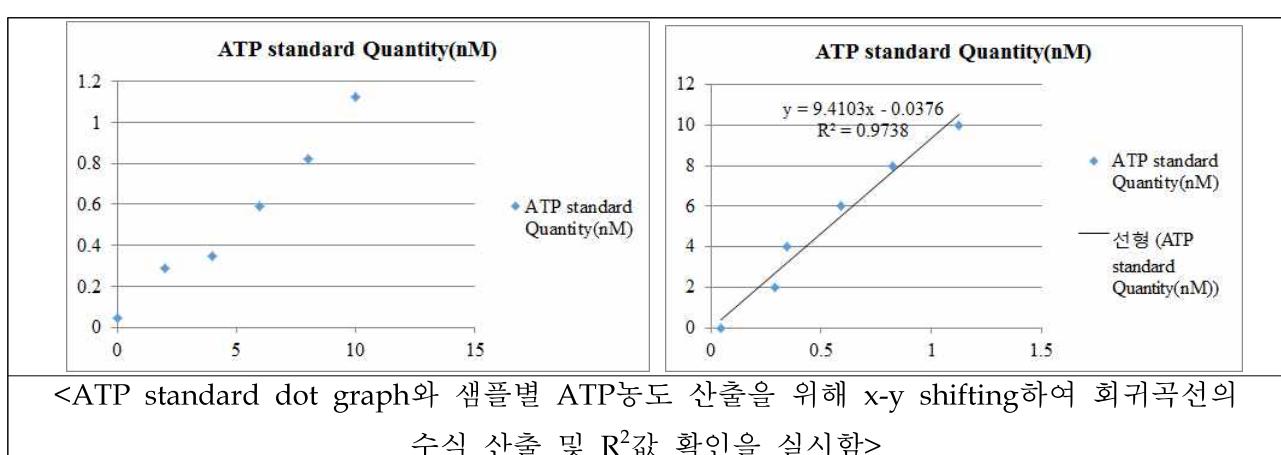


그림2-16. ATP저장량 데이터 도출

다. 곤충사료의 새우 양식장 현장 실증 시험

(1) 현장적용시험

1,2년차에서 확인된 성장촉진효과 및 면역증진효과에 대해 양식흰다리새우의 현장실증시험을 실시하였다. 흰다리새우 양식장에서의 현장실증시험 조건은 1,2년차 새우양식시험과 대체로 동일한 조건에서 실시하였으며, 수조가 아닌 호지에서의 현장적용 효능 평가를 위해 일반적인 양식장 조건을 모두 준용하였다.

1,2년차에서 확인된 성장촉진효과를 혼장실증시험을 통해 확인할 수 있었으며, 양식장 혼장 실증 시험 종료 후 일반사료 투여군과 25%여분 대체사료 투여군의 체중 비교를 통해 성장률을 확인하였다.



그림2-17. 3년차 혁장적용시험

곧 충사료 12주 투여 후 흰다리새우 1,2년차 결과와 동일하게 3년차 현장 적용 시험에서도 성장 촉진 효과를 확인하였으며, 경제성 분석을 통해 도출한 최적 어분 대체비율인 25% 대체군의 탁월한 성장 촉진 효과를 확인하였다.

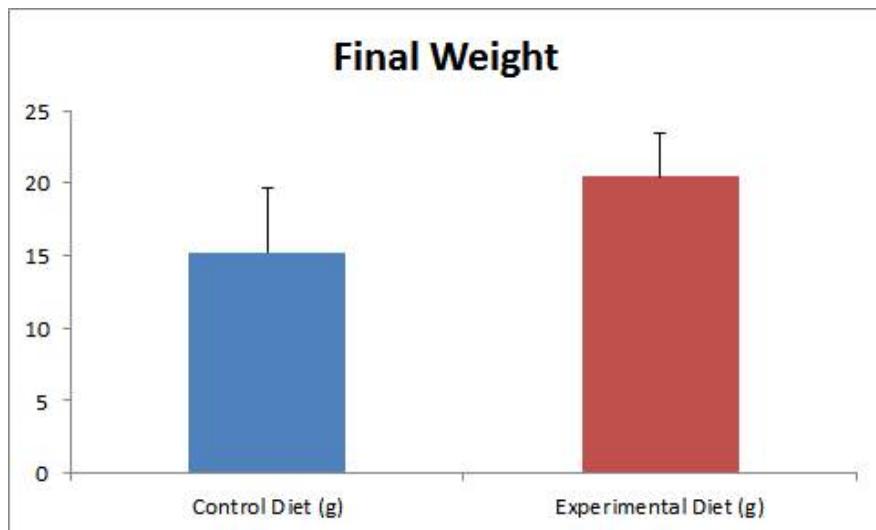


그림2-18. 현장적용시험 결과 최종 어체중

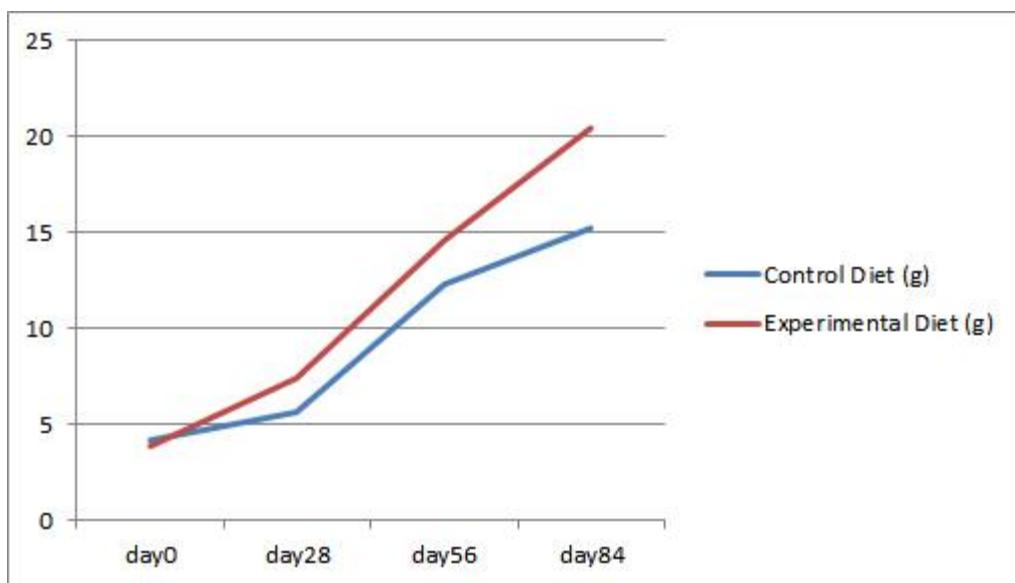


그림2-19. 3년차 현장적용시험 결과 성장 추이 곡선

또한, 주간 성장률의 비교에서 1,2년차 시험결과와 동일하게 PL80령 이후 (현장 실증시험 시 day 28 이후) 대조군보다 더 나은 성장촉진효과를 보이므로, 육성기 사료에 적합할 것으로 결론을 내릴 수 있었다.

표2-9. 통계학적 유의성 검정결과 (99% 신뢰수준, t-test결과

실험군	체중(g)			t-test (vs 0%대체군)
	투여전	투여후	증감(g)	
기준사료(0%)	4.16±1.44	15.25±4.38	+11.09	-
어분25%대체	3.91±1.65	20.45±2.98	+16.54	<i>p<0.001</i>

현장실증시험 결과에 대한 통계학적 유의성 검정 결과 99% 신뢰수준에서 어분 25% 대체군

사료가 기존사료 대비 99.9% 유의수준에서 통계적으로 유의하게 성장 촉진 효과가 있는 것으로 확인되었다. 시험군사료인 25% 어분대체 사료가 대조군 대비(+11.09g) 49.14%성장률 향상 효과가 확인되었다. 현장실증시험 실시 후 2년차 시험과 동일하게 가식성부위 근육 내 ATP저장량 분석을 수행하였다. 가식부위 근육 내 ATP함량 분석에서 대조군 대비(4.09mnM), 실험군(25% 어분대체사료 투여군)의 경우 37.65% 통계적으로 유의하게 증가하였음을 확인하였다. ($p<0.01$, 99% 신뢰수준)

표2-10. 현장실증시험 후 가식성부위 ATP 정량분석결과

	Control Diet	Experimental Diet
ATP quantity(nM)	4.09	9.72
StDev	1.94	1.92
t-test (vs Control Diet Group)	-	$p<0.01$

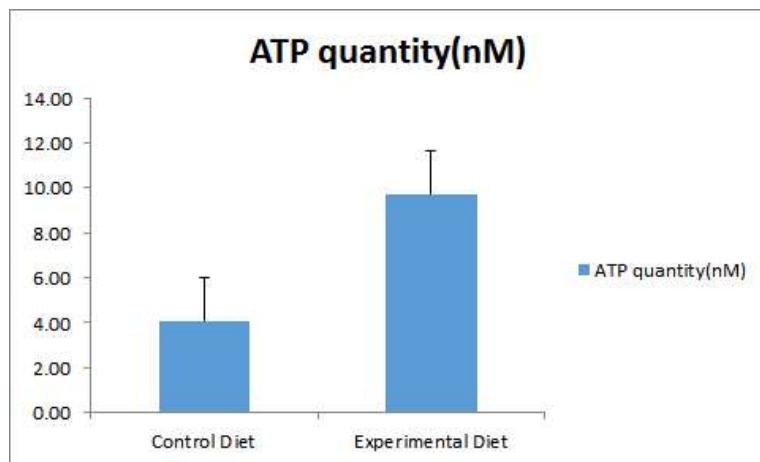
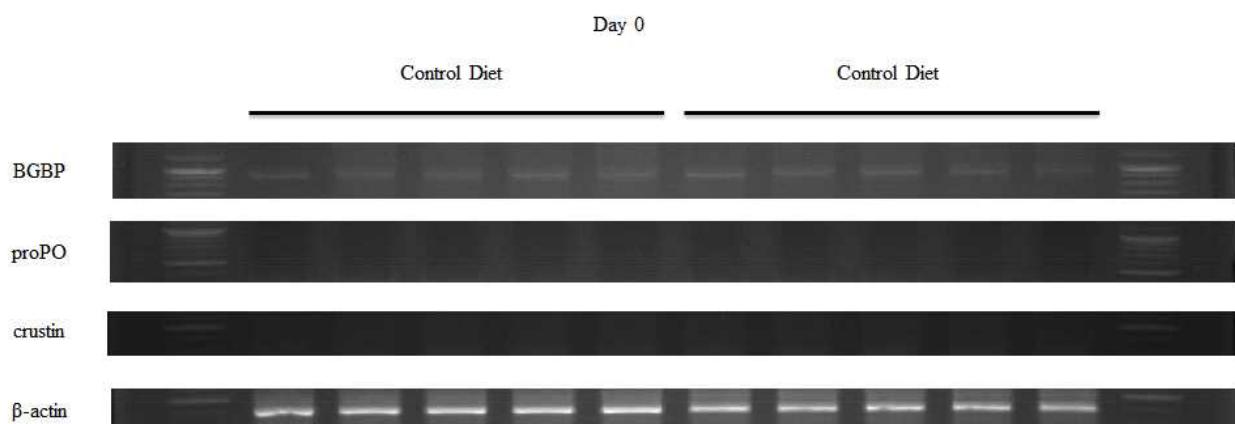


그림2-20. 현장실증시험 후 가식성부위 ATP 정량분석결과

2년차와 동일하게 RT-PCR을 통해 2년차에서 선정된 새우 면역력 지표 3종에 대한 gel-documentation을 실시하고, 곤충사료 투여에 의해 유의한 발현양상의 변화 추이를 보이는 지표에 대해 real-time PCR을 통해 정량분석 실시하였다. 현장적용 시 면역력 증가와 관련한 데이터는 동일한 패턴을 보였다.



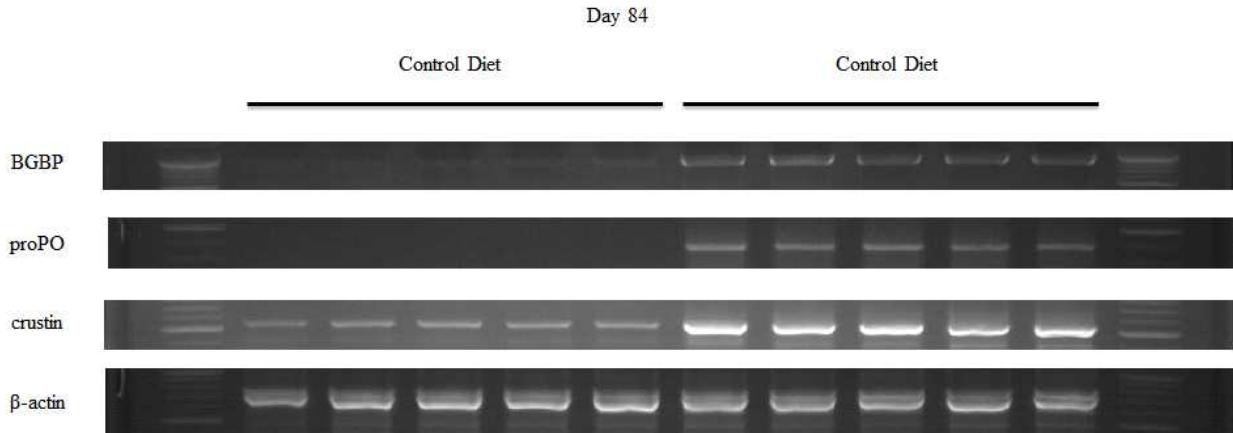


그림2-20. 현장실증시험 후 면역지표의 발현량 변화 패턴 확인

1, 2년차 연구결과와 동일하게 곤충사료 투여 후 새우 면역력 지표인 BGBP, proPO, crustin의 유전자 발현량이 상당량 증가하였음을 확인할 수 있었다.

BGBP (beta-glucan binding protein, 새우의 비특이적 면역에서 가장 중요한 지표: 척추동물의 항체와 같은 역할)이 곤충사료투여군에서 투여전에 비해 통계적으로 유의하게 증가함이 확인되었고, Crustin (새우에서 생성되는 항생물질로 추정되는 펩타이드, AMPs) 역시 통계적으로 유의한 증가 양상이 관찰되었으며, ProPO (Prophenoloxidase, 새우의 병원체에 대한 방어기작에서 과립세포와 같은 세포성 면역 이외에 선천면역을 담당하는 물질) 역시 유의한 pattern의 증가가 확인되어, 1, 2년차에서 확인된 결과와 동일하게 곤충사료 투여군에서 흰다리새우의 면역지표를 향상, 즉 면역력 향상 효과가 있음이 명확히 확인되었다.

특히, 면역력 지표의 향상은 본 현장실증시험에서 day 0의 지표 발현량이 모두 0에 가까웠으나, 곤충사료 투여 1일후부터 곤충사료 투여군의 면역지표가 증가되어 day 84까지 지속됨을 확인할 수 있었다.

12주간 일반사료(대조군) 투여군과 곤충사료 투여군 (시험군, 25%어분대체사료)에서 흰다리새우의 면역력 지표인 BGBP (beta-glucan binding protein), proPO (prophenoloxidase), Crustin의 유전자 발현량에 대해 real-time PCR분석을 실시하였으며, 데이터는 대조군의 발현량에 대해 상대정량으로 도출하였다. (PCR7700 사용: ABI Prism sequence detecter, Applied Biosystems)

표2-11. 현장실증시험 후 대조군(CD, Control Diet) 대비 mRNA 발현량(%)과 통계학적 유의검증 결과, Day84

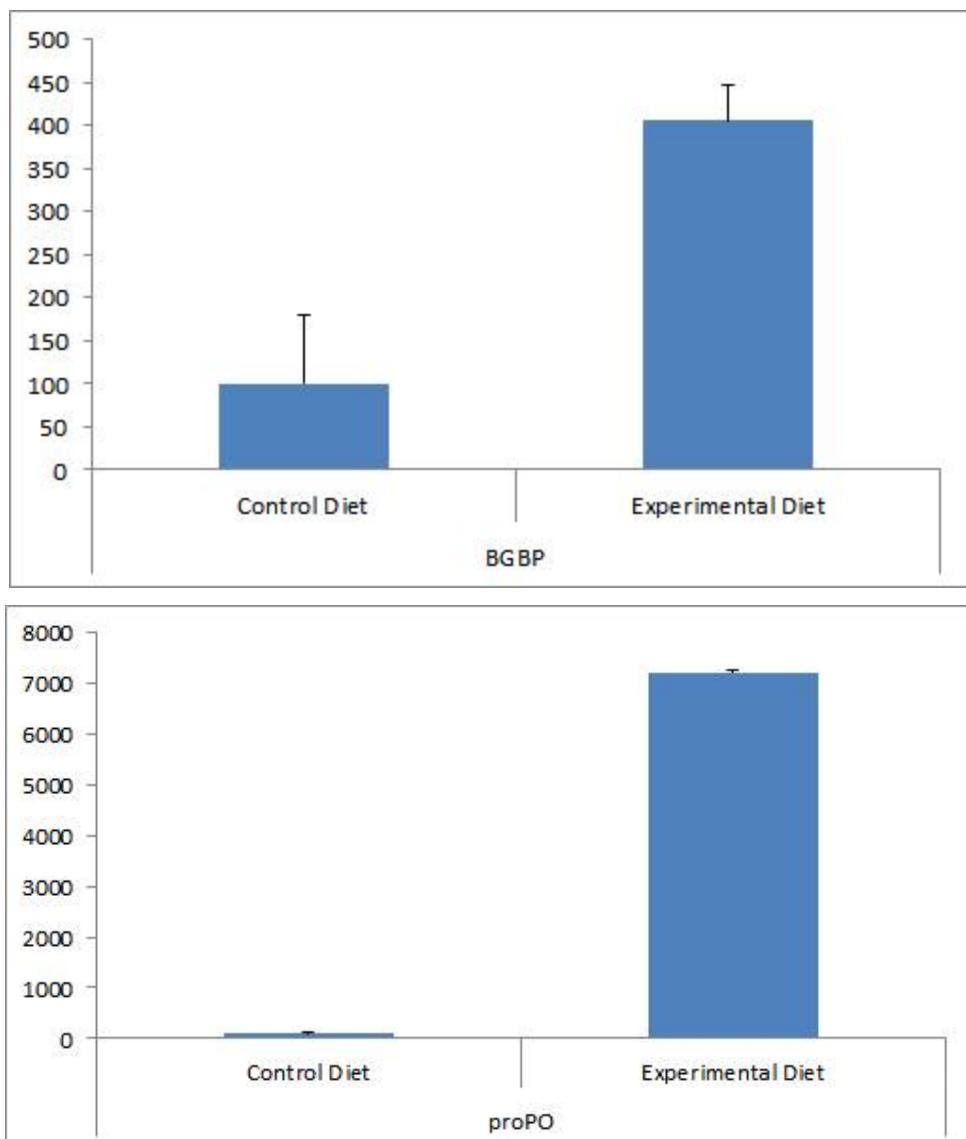
	Control Diet	Experimental Diet
relative mRNA of BGBP (%)	100.00±80.86	405.63±42.38
relative mRNA of proPO (%)	100.00±29.86	7216.13±55.24
relative mRNA of Crustin (%)	100.00±22.31	418.54±4.14

	Control Diet	Experimental Diet
t-test of BGBP (%) vs CD	-	0.006
t-test of proPO (%) vs CD	-	0.008
t-test of Crustin (%) vs CD	-	<0.001

BGBP의 발현량은 곤충사료 투여군에서 대조군 대비 약 300% 이상 발현량이 증가하는 것으로 확인되었으며($p<0.01$, 99%신뢰수준), 이는 1,2년차 보다 더욱 향상된 면역증진효과가 현장 실증시험에서 확인 된 것으로 결론내릴 수 있는 결과이다.

proPO의 발현량은 곤충사료 투여군에서 대조군 대비 약 7,100% 이상 발현량이 증가되어 엄청난 차이가 나는 것으로 확인되었으며($p<0.01$, 99%신뢰수준), 이 역시 1,2년차 보다 더욱 향상된 면역증진효과가 현장실증시험에서 확인 된 것으로 결론내릴 수 있는 결과이다.

crustin의 발현량은 곤충사료 투여군에서 대조군 대비 약 318% 발현량이 증가하는 것으로 확인되었으며($p<0.001$, 99.9%신뢰수준), 이를 통해 곤충사료의 투여로 양식장 현장 적용시에도 흰다리새우의 선천면역능력 증진효과가 탁월함을 확신하게 하는 결과이다.



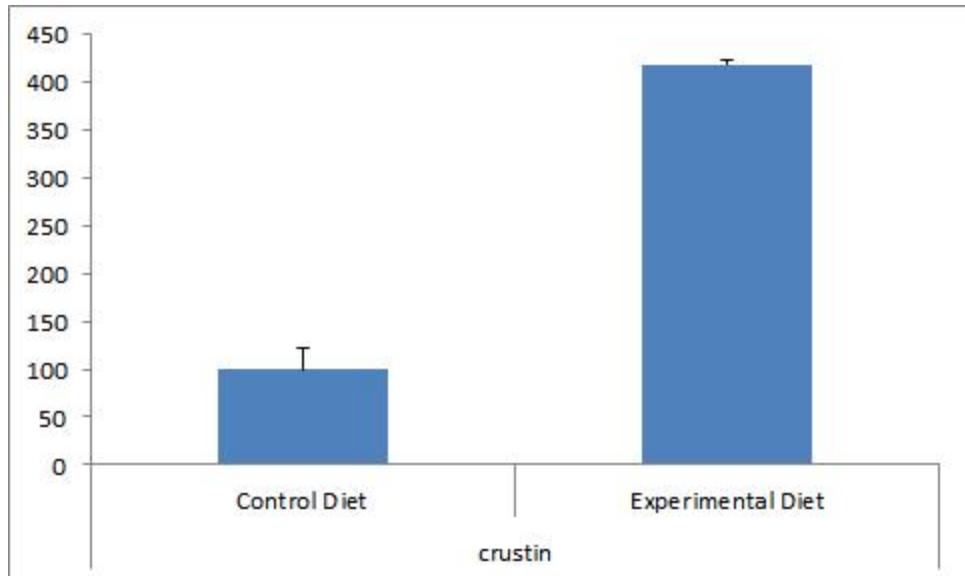


그림2-21. 현장실증시험 후 면역지표의 통계학적 유의성 검증 결과

제5절 : 양식 넙치 적용 시험

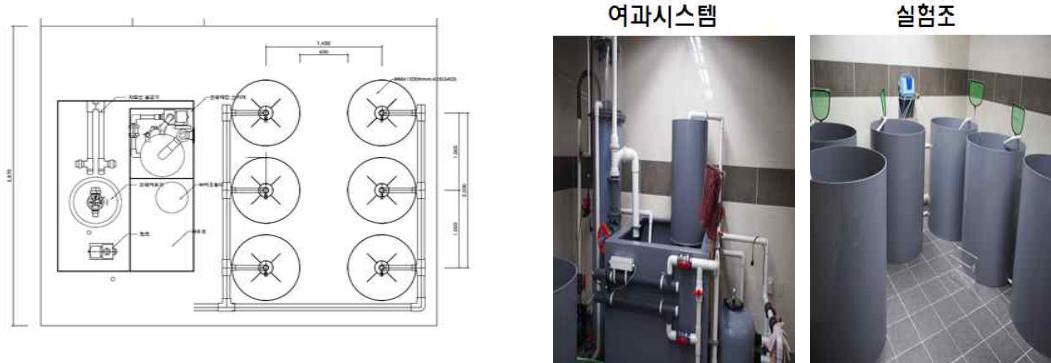
가. 곤충사료에 의한 양식넙치의 발육특성 비교시험 및 기호성 조사

어분대체제로서 곤충분을 이용한 혼합 사료를 제조하여 넙치의 치어기 및 육성기에서 성장비교 시험 및 수질 평가를 수행하였다.

(1) 공시어류 및 사양환경

(가) 순환연과시스템

① 본 시험을 수행하기 위해 그림 3-1과 같이 순환연과시스템을 제작하였고 그 시스템에는 냉각기, 자외선 살균기, 생물학적 및 물리학적 여과기 그리고 스키머를 설치하였고 실험조로는 6개의 수조($1200 \times 700 \times 600$ mm)를 두었다.



<순환연과시스템의 설계>

<현장사진>

그림 3-1. 넙치에서 곤충분 사료의 성장 시험을 위한 순환연과시스템

② 공시어류의 구입 및 시스템에 도입에 앞서 해수 6톤을 본 여과시스템에 저장한 후 하루에 두 번 일반적인 수질 검사를 통해 수질의 안전화(용존산소량, $11.46 \pm 0.15\text{mg/L}$; pH 8.14 ± 0.02 ; 수온 21.5 ± 0.26)를 도모하였고 그 후 공시어류를 본 여과시스템에 도입하였다.

(나) 공시어류

넙치의 치어는 옥지도의 한 양어장에서 구입하였고 육성어의 경우 군산에 한 수산물 유통회사를 통해 구입하였다. 넙치는 활어차에 의해 운송되었고 곤충분 사료를 투여하기 7일간의 순치기간을 거쳐 전 4 군으로 분류하였고 분류 시 체중을 측정하였다. 구입 시 치어의 평균체중은 $133 \pm 2.92\text{g}$ 이었고 육성의 경우 $291.31 \pm 8.10\text{g}$ 이었다.

(2) 곤충분 사료의 급여 시험

(가) 시험방법

① 곤충분 사료 성장 효과 시험

사료의 투여는 체중측정 후 1일간의 공식기간을 거친 후 곤충분 농도 별 사료를 각 시험군에 43일 동안 매일 아침에 경구로 투여하였다. 각 시험조의 투여한 사료는 어분 대체 농도로 곤충분의 0%, 5%, 10% 그리고 15%의 농도로 제2협동에서 제작한 사료를 사용하였고 시험군 별 개체수는 치어일 경우 30마리 그리고 육성어의 경우 20마리로 분류하였다. 사료 급이율은 치어에서 각 군의 총체중의 1% (39.9g)를 급여하였고 육성어에서는 총체중의 1%(57g)을 투여하였다. 사료별 섭이량의 조사는 공시어가 사료에 대한 반응이 전혀 없을 때까지 사료를 투여하였고 남은 사료량과 먹지 않고 남은 투여된 사료는 배수로에서 수집하여 건조량의 합으로 산출하였다.

일주일에 한번 저수조의 해수는 새롭게 수송된 해수로 교체하였음. 사료 투여 후 공시어의 육안적 임상소견 및 먹이반응을 매일 관찰하였으며 43일 간 투여 후 체중을 측정하였고 체중의 변화, weight gain(%), specific growth rate (SGR), feed conversion ration(FCR)을 조사하였으며, 통계학적 유의성은 Excel 프로그램을 이용한 t-test에 의해 조사하였다.

② 곤충분 사료 급여 후 병리조직학적 검사

1차년도에서 성어 넙치 (체중 287.5g)에 곤충사료분 5%, 10% 그리고 15%가 혼합된 곤충사료 그리고 일반사료(곤충분 0%)의 사료를 투여한 군에서 무작위로 3마리를 선택하여 간, 비장 그리고 근육조직으로 hematoxylin-eosin (H-E) 염색에 의한 병리조직학적 검사를 수행하였다.

(나) 육성어에서 시험결과

① 곤충분 사료의 성장 효과

육성어에서 곤충분 농도 0%인 사료에서 43일 후 투여 전에 비해 체중의 57g 이 증가하였으며 5% 시험사료군에서는 31g 의 체중 증가를 보였으며, 가장 큰 체중의 변화는 10% 시험사료군에

서 평균 121g의 증가를 보여 대조군 대비 64.55%의 성장을 증가를 관찰하였다. Weight gain은 0%, 5%, 10% 곤충분 사료가 혼합된 사료의 경우 각각 19.65%, 10.69% 그리고 42.10%이었으며 SGR과 FCR 산출 시 10% 사료 투여군에서 다른 군에 비해 유의적으로 더 높은 수치를 보였다 (표 3-1, 3-2). 그러므로, 어분 대체율 10%의 곤충분이 첨가된 사료를 투여할 경우 대조군과 다른 시험군에 비해 훨씬 더 성장이 촉진되는 것을 알 수 있었다.

실험 종료 시 각 군에서 무작위로 3마리 개체를 무작위로 추출하여 체중 및 간중량을 측정하여 간중량지수(hepatosomatic index; HSI)를 산출하였다. HSI는 간에서 에너지 보존상태를 평가하기 위해 사용하는데 독성물질에 노출 시에 저하되는 것으로 알려져 있다. 부검 후 총간중량을 측정한 결과 10% 곤충분 투여군에서는 일반사료 투여군에 비해 HSI는 약간 높았지만 유의적인 차이는 없었음(p value<0.05). 그러나, 15% 투여군에서는 다른군에 비해 HSI가 유의적으로 낮은 것을 알 수 있었다(표 3-3). 또한, 부검 시 15% 투여군의 경우 간이 다른 군에 비해 비정상적으로 충혈되었다.

표 3-1. 곤충분 농도 별 넙치 육성기에서 성장 비교 시험

	0%	5%	10%	15%
Initial weight (g)	287.5±7.24	287.5±7.24	287.5±7.24	287.5±7.24
Final weight (g)	344.0±73.59	318.22±61.39	408.55±64.97	272.0±39.04
weight gain (%)	19.65	10.69	42.10	-5.22
SGR	0.270±0.164	0.093±0.369	0.445±0.089	-
FCR	3.69	0.95	12.08	-0.38

SGR (specific growth rate) : [(log of final wt-log of initial wt)/no. of days]X100

FCR (feed conversion ratio) : feed given (dry wt)/body wt X gain (wet wt)

표 3-2. 곤충분 농도 별 넙치 육성기에서 성장 비교 시험 통계 분석

Comparisons	<i>p</i> values	
	Weight gain	SGR
0% vs. 5%	0.172	0.142
0% vs. 10%	0.029	0.031
0% vs. 15%	0.015	0.017
5% vs. 10%	0.027	0.026
5% vs. 15%	0.282	0.328
10% vs. 15%	0.001	0.002

표 3-3. 곤충분 농도 별 급여 후 넙치 육성기에서 간중량지수의 비교

곤충분 농도	HSI
0%	1.362±0.513
5%	1.090±0.322
10%	1.708±0.789
15%	0.539±0.133

② 곤충분 사료의 급여에 따른 누적 생존율 조사

육성어에서 곤충분 농도 0%인 사료에서 43일 후 투여 전에 비해 체중의 57g이 증가하였으며 5% 시험사료군에서는 31g의 체중 증가를 보였으며, 가장 큰 체중의 변화는 10% 시험사료군에서 평균 121g의 증가를 보여 대조군 대비 64.55%의 성장률 증가를 관찰하였다. 어분 대체를 위한 곤충분 농도를 0%, 5%, 10% 그리고 15%를 혼합한 사료를 투여하여 매일 생존율을 조사 하였던바 (그림 3-2) 대조군(곤충분 0% 사료투여군)에서 첫 폐사체는 투여 후 16일째에 발생 하였고 이후 실험 종료직전까지 어떠한 폐사를 유발하지 않았다 (누적생존율 95%). 곤충분 5%가 혼합된 사료를 투여한 군에서는 12일째에 한 마리 개체에서 첫 폐사가 발생하였고 15일 째 그리고 16일째에 각 한 마리씩 폐사가 유발하여 실험종료 직전 누적생존율은 85%였다. 곤충분 10%가 혼합된 사료를 투여한 군에서는 어떠한 폐사체도 관찰되지 않았으며, 곤충분 15% 가 혼합된 사료를 투여한 군에서는 7일째에 한 마리 개체에서 첫 폐사가 유발된 이후로 투여 24일째 까지 6마리의 개체가 더 폐사하여 누적 생존율은 65%였다.

누적생존율을 비교한 결과 일반사료 그리고 10% 곤충분이 대체된 사료의 경우 다른 시험군에 비해 높은 생존율을 보였고 체중의 증감 결과와 함께 이 농도의 사료가 넙치의 육성기에 가장 좋은 농도인 것으로 사료된다.

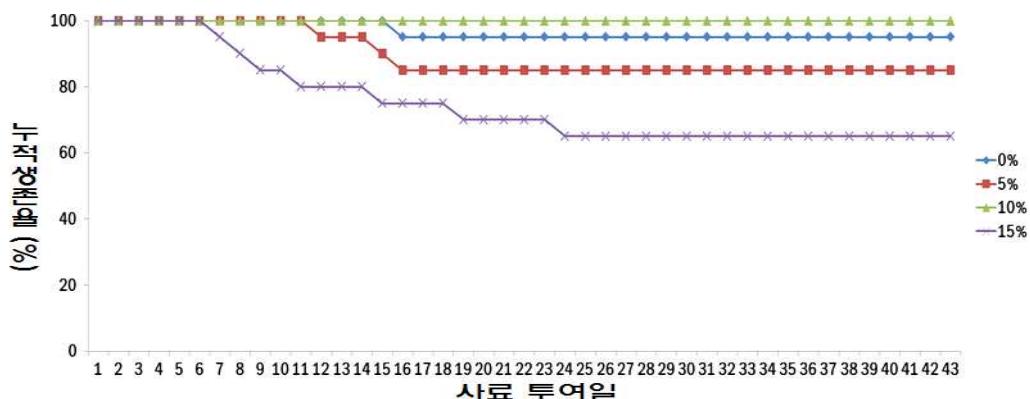


그림 3-2. 곤충분 농도별 사료 투여에 따른 누적생존률 조사

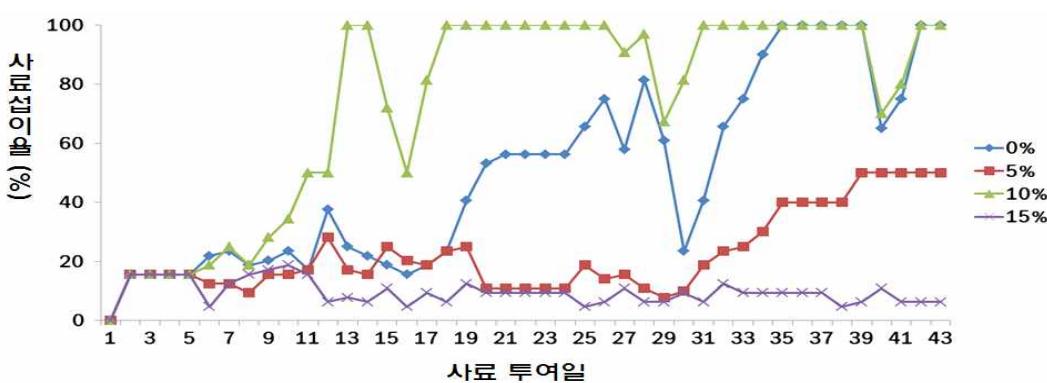


그림 3-3. 곤충분 농도별 사료 투여에 따른 넙치 육성기의 기호성 조사

③ 곤충분 사료의 넙치 육성기에서 기호성 조사

곤충분 농도 별 넙치의 육성기에서 기호성을 조사를 수행하였던 바 곤충분 5%가 혼합된 사료 투여군에서는 투여 후 30일 동안 30% 미만의 섭이율을 보였지만 그 후 점차 증가하여 실험종료 직전 약 50% 미만의 사료섭이율을 보였다. 그러나, 곤충분 15%가 혼합된 사료의 경우 사료섭이량은 매일 20% 미만이었으며 모든 개체는 처음에 사료를 먹으려는 행동을 보이다가 점차 그런 행동이 관찰되지 않았고 실험 종료 직전까지 20% 미만의 섭이율을 보였다 (그림 3-3).

일반사료를 투여한 경우 첫 10일동안 평균 30% 정도의 사료섭이율을 보였으나 투여 19일째부터 사료섭이량이 증가하였으며 실험종료 직전 투여량의 100%를 섭이하는 것으로 관찰되었다.

10% 곤충분이 혼합된 사료의 경우에는 9일째 증가하기 시작하여 13일째에 투여량의 100%를 섭이하는 것으로 관찰되었음. 그리고 실험 종료 직전 이러한 섭이량은 꾸준히 관찰되었다. 한편, 저수조(여과조)의 물갈이를 한 후 일반군과 10% 곤충분 사료를 투여한 군에서는 급격하게 사료섭이율이 변화되는 것을 알 수 있었음. 이것은 여과조의 물갈이시 실험수조의 수위가 낮아짐에 따라 어류에 스트레스로 작용하여 사료섭이량의 변화를 초래하는 것으로 사료된다.

④ 병리조직학적 검사

사료 급여 후 40일 째에 넙치 성어의 간에서 H-E 염색에 의한 병리조직 검사를 수행하였다. 대조군(0% 곤충분 사료)의 간세포는 호산성 염색이 소실되고 세포질의 경계가 뚜렷하였다. 유사한 결과는 10% 곤충분을 급여한 어류의 간에서 관찰되었으나 5% 그리고 15%를 사료를 급여한 군에서는 간세포의 크기가 작으며 그 경계가 명확하게 관찰되지 않으며 호산성 염색이 질게 관찰되었다.

10% 곤충분 배합사료의 간조직에서 주요 특징은 다른 곤충분 농도 투여한 어군에 비해 간세포가 크고 세포질에 무수한 과립이 있는 것으로 보여진다. 곤충분의 지방이 과다 함유로 인한 간조직에 지방이 과잉 축적 시 현 결과 보다 더 깨끗한 세포질을 관찰할 수 있으나 (조직 염색 시 xylene은 지질을 녹임) 10% 투여군의 간세포의 세포질에는 무수한 과립이 있는 것으로 보여 지방이 아닌 글리코겐으로 의심된다(그림3-4).

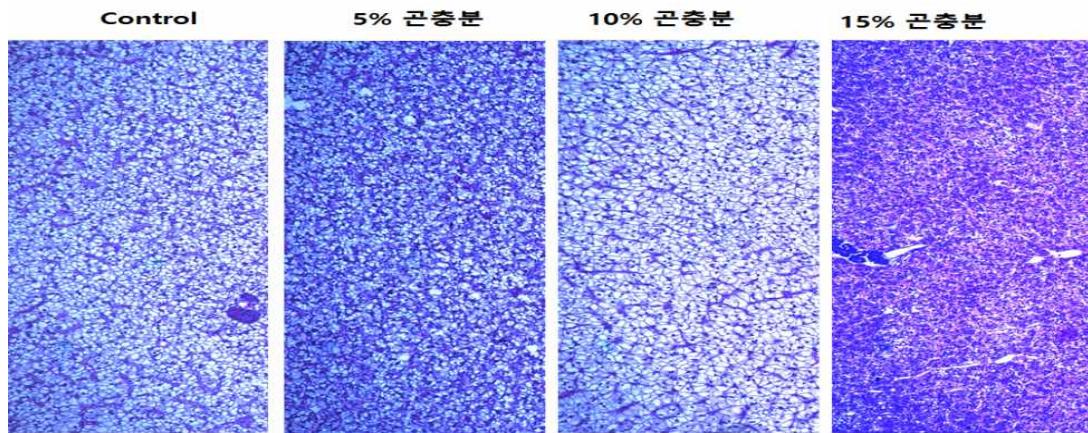


그림 3-4. 곤충분 농도 별로 급이한 넙치 육성기에서 간의 병리조직검사

사료 급여 후 40일 째에 넙치의 비장에서 H-E 염색을 수행한 결과, 간(liver)과 달리 비장에서는 곤충분 농도에 따른 뚜렷한 차이를 관찰할 수 없었다. 다만, 10% 곤충분이 혼합된 사료를 투여한 군에서 melano-macrophage centres(MMC)이 다른 실험군에 비해 현저히 적게 관찰되었다. 어류에서 MMC의 기능은 현재 불분명하지만 만성염증, 노령 및 환경적 스트레스에 의해 그 수가 증가하는 것으로 알려져 있음. 그러므로, 추정컨대 10% 곤충분 사료를 급이한 넙치는 다른 군에 비해 실험 환경에서 발생되는 스트레스에 더 원만한 반응을 보인 것으로 사료된다(그림 3-5).

근육 조직에서 병리조직 검사결과 실험군 별 뚜렷한 차이를 관찰할 수 없었다.

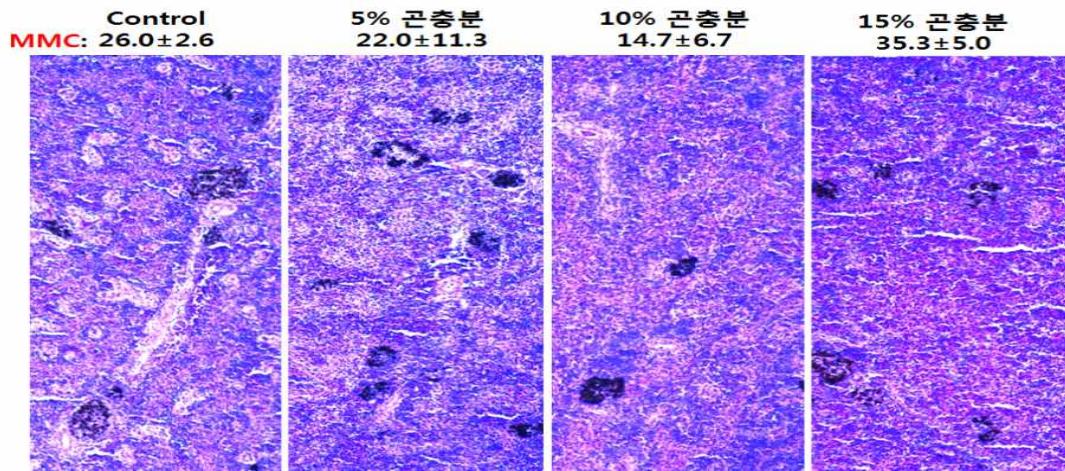


그림 3-4. 곤충분 농도 별로 급이한 넙치 육성기에서 비장의 병리조직검사

(나) 치어에서 시험결과

① 곤충분 사료의 성장 효과

30일 급이 후 체중을 측정한 결과 10% 곤충분 사료 투여군에서 높은 증체량을 보였으나 다른 실험군과 비교 시 유의적인 차이가 없었다. 비록 유의적인 차이는 없었으나 10% 곤충분을 대체한 경우 다른 군에 비해 다소 높은 증체량을 보여 성어 시험 결과와 유사하였다(표 3-4).

표3-4. 넙치 치어에서 곤충분 농도 별 사료의 성장 효과

곤충분 농도	체중 (g)		증체량
	전	후	
0%	139±20.3	170±43.5	31±20.1
5%	132±23.7	169±36.9	37±13.5
10%	136±25.3	199±51.1	63±27.7
15%	127±21.7	171±30.5	44±7.1

나. 곤충 사료에 의한 양식 넙치의 면역반응/항병원성/영양학적 가치 분석

(1) 넙치에서 곤충사료의 독성 검사

성어 넙치의 혈액을 미정맥으로 채취하여 항산화효소에 관여하는 cat(catalase) 그리고 sod(superoxide dismutase)의 발현량 조사 그리고 자가세포사멸에 관여하는 *FasL* gene의 발현량을 조사하였으며 어린 연령의 넙치 (대략 130 g)의 경우 간에서 *cat*, *sod* 그리고 *FasL* gene의 발현량을 조사하여 곤충사료의 항산화 능력을 조사하였다.

(2) 넙치에서 곤충사료의 면역학적 가치 분석

넙치 성어의 경우 혈액에서 proinflammatory cytokines (interleukin(IL)-1 β , IL-12 그리고 tumor necrosis factor(TNF)- α)의 genes에 대한 발현량을 조사하였다.

(3) 넙치에서 곤충사료의 항병원성/영양학적 가치 분석

어린연령의 넙치에서 곤충사료의 항병원성 및 영양학적 가치 분석을 위해 대략 130g의 넙치를 4군으로 분류하여 곤충분 0%(일반사료), 5%, 10% 그리고 15%가 혼합된 사료를 제조하여 30일 동안 투여하여 넙치에 대한 성장효과를 규명하였다. 또한, 어류의 성장에 관여하는 growth hormone을 발현하는 IGF-1 그리고 IGF-2 gene의 qRT-PCR assay에 의한 발현량을 조사하여 곤충사료의 영양학적 가치를 분석하였다. 항병원성 효과는 곤충사료 그리고 일반사료 투여군에서 사료 투여 30일 후에 국내 넙치 양식장에서 빈번하게 발생하는 연쇄구균병의 원인체인 *Streptococcus parauberis*를 제주도 해양수산연구원에서 분양받아 typtic soy agar에서 108CFU/ml이 되도록 배양하여 배양액의 0.1 ml씩 넙치의 복강 내로 투여하여 감염시험을 실시하여 감염 후 매일 임상증상 및 폐사를 기록하여 누적폐사율을 조사하였다.

(4) qRT-PCR assay (real-time PCR)

넙치에서 추출한 조직은 멸균된 blade와 포셉을 사용해 잘게 자른 뒤 tube에 0.5mm zirconium beads와 homogenizer (Benchmark Scientific, USA)를 사용해 균질화하였다. 균질화된 넙치 조직의 RNA는 GenAll Hybrid-R RNA extraction kit (GenAll, Korea)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 Epoch Microplate Spectrophotometer의 Take3 Session (Bioteck, USA) 옵션을 이용해 260, 280 and 320 nm에서 측정함으로써 정량하였다. 정량한 RNA는 -70 °C deepfreezer에 보관하였다.

cDNA 합성은 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA)를 사용해 수행하였다. 100–200 ng/ul 사이의 농도로 희석한 조직 샘플의 RNA 1ul, 2X RT buffer 10 ul, 20X RT enzyme mix 1 ul, Nuclease-free water 8 ul를 섞어 Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) 37 °C에서 1시간, 95 °C 5분 incubation하였다. Real-time PCR에 바로 사용할 cDNA는 4°C에, 보관할 cDNA는 -20°C에 각각 보관하였다.

qRT-PCR assay는 MicroAmp® Optical Tube (Applied Biosystems, USA)에 2 ul의 cDNA, 10 ul의 Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), 그리고 forward, reverse primer (최종 농도 250 nmole)를 넣은 뒤 DEPC water (Bioneer, Korea)를 사용해 총 20 ul의 용량까지 넣어주었다. Applied Biosystems® 7500 Fast (Applied Biosystems, USA) 기기를 사용하였으며 PCR 조건은 SYBR Green Master Mix의 매뉴얼에 따라 95°C에서 10분 동안 반응시킨 후, 95°C에서 15초, 55°C에서 20초 그리고 72°C에서 35초 동안 반응을 45 주기를 반복하였다. PCR 결과의 분석은 ΔCT값을 이용한 상대적인 정량법을 사용하였다. 사용된 PCR primer 목록은 (표 3-5)에 정리하였으며, gene과 sample의 각 endogenous control은 β -actin과 0% 곤충사료를 먹인 넙치의 조직 샘플을 기준으로 설정, 각 면역 호르몬의 증가와 감소를 분석하였다.

표3-5. qRT-PCR assays를 위한 primer sets

Anti-oxidative enzyme (Defence of pathogens)			Reference
CAT	forward	GGCTGAGAACAGTTCCAGTTCAATCC	Shin et al., (2010)
	reverse	CTCCACCTCTGCAAAGTAGTTGAC	
SOD	forward	GGGAATGTGACTGCTGGAAAA	Hur et al. (2013)
	reverse	TTTTCCTAGATCGTCAGCCTTCTC	
FasL	forward	CAGCTGGCTGACCGTGATG	
	reverse	CTTCTCGTCCCTCGATTGTC	
Cytokines			Reference
IL-1 β	forward	GACAGTGAGATGGTGCGATTTC	Hur et al. (2013)
	reverse	ACCATCACTGGCCTGTTGTCT	
TNF- α	forward	AGGAGGCAGCGGAAAAACA	
	reverse	TAGGCGTCCTCCTGACTCTTCT	
IL-12	forward	CTCTCCCTACGCCGAGGAAA	Kim et al., (2013)
	reverse	GCTAATCTGGGGACTGTCGG	
IFN- γ	forward	CTGCCAACACGACTCCC	
	reverse	GCTCTGCTCCTGAAGCGAT	
β -actin	forward	TGCAGAAAGGAGATCACAGCC	
	reverse	ACTCCTGCTTGCTGATCCAC	

Enzymes involved in innate immunity			Reference
Lysozyme	forward	GATCCACTGACTACGGCATCTTC	Hur et al. (2013)
	reverse	TTGATGCCACAATGACATCA	
Insulin-like	Growth Factor		Reference
	IGF-1	forward reverse	TGGGTGAGGTAAGAAATGAC CCAAATGCTTAGCAGGTT
IGF-2	forward	GAGGAACTGCCCGCGTAT	Zhang et al. (2011)
	reverse	GAGGGTTTGCCGTCTGGT	

(나) 곤충분 사료의 넙치의 면역반응/항병원성/영양학적 가치 분석

① 육성어에서 곤충분 사료의 독성 검사(항산화효과 규명)

넙치 성어에 사료 급여 후 40일째에 미정맥(caudal vein)으로부터 채혈 후 RNA를 추출하여 antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD) 그리고 catalase (CAT))의 발현량을 qRT-PCR에 의해 수행하였다(그림 3-5). 그 결과, SOD의 발현량은 5% 그리고 15% 곤충분 사료에서 일반사료 투여군에 비해 증가하였으나 10% 곤충분 사료 투여군에서 일반사료 투여군과 유사한 발현량을 보였다. 그리고, Cat 발현량은 곤충분 농도에 비례하여 증가하는 것을 알 수 있었다.

산화스트레스 시 *FasL*의 발현은 증가하고 세포의 자가사멸(apoptosis)을 초래하므로 *FasL*은 세포 자가사멸 시그널로 인식되고 있음. 곤충분이 어류에서 산화스트레스를 유발하면 *FasL*의 발현량은 증가 되어지나 q-RT PCR assays에 의한 곤충분 농도 별 급이군에서 발현량의 차이를 관찰할 수 없었다.

병리조직검사, 항산화 효소 그리고 *FasL*의 발현량 결과에 따라 넙치 성어에 대한 곤충분의 독성은 없으며 오히려 곤충분은 넙치에 대한 항산화효과를 발휘하는 것으로 고려된다.

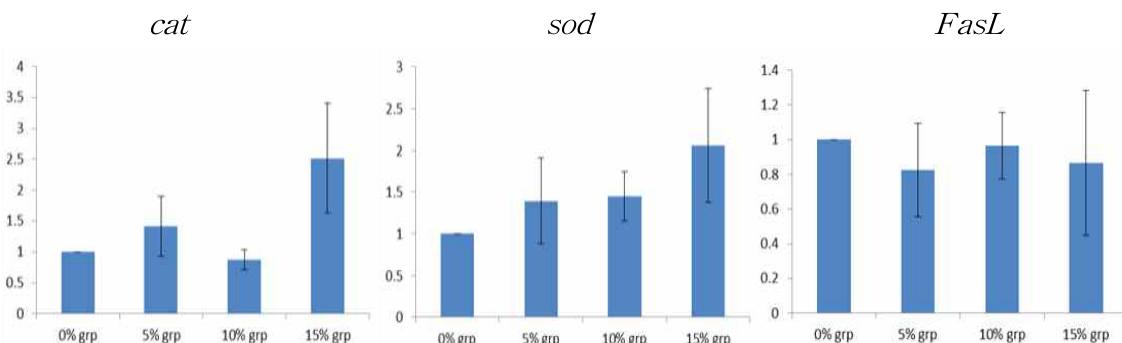


그림 3-5. 곤충분 농도 별 사료 급여 넙치 성어 혈액에서 qRT-PCR에 의한 *cat*, *sod*, *FasL* genes의 발현량 비교

② 육성어에서 곤충분 사료의 면역학적 효과

곤충분 사료의 면역반응을 관찰하기 위해 cytokine들의 발현량을 조사하였던 바 (그림 3-6)

IL-1 β 는 대략 2.5배 그리고 TNF- α 의 경우에는 2배 증가하였다. 그러나, 10%를 급여한 군에서 IL-1 β 는 control군에 비해 낮은 발현량을 보였고 TNF- α 는 충분한 차이를 보이지 않았다. 곤충분 농도 별 사료의 급이에 따라 IL-12의 발현량을 조사하였던 바 일반사료 급이군에 비해 곤충분 사료를 급이한 모든군에서 현저히 감소하였으나 5% 그리고 10% 투여군은 15% 투여군에 비해 훨씬 높은 발현량을 보였다. 곤충분 농도 별 사료를 급이한 모든 군에서 일반 사료 투여군에 비해 IFN- γ 의 발현량은 현저하게 증가하였으며 특히, 10% 곤충분 사료를 급이군에서는 다른 군에 비해 월등히 높은 발현량을 보였다.

IL-1 β 그리고 TNF- α 는 염증반응의 초기에 발현되는 proinflammatory cytokine임. IL-12는 dendritic cells, macrophages 그리고 항원자극에 따른 human B-lymphoblastoid cells (NC-37)에서 생산되는 cytokine으로 그것의 주요 기능은 T cell 그리고 natural killer cell에서 IFN- γ 그리고 TNF의 생산을 촉진하는 것으로 알려져 있으나 어류에서 그 기능은 아직까지 불명확하다. IFN- γ 는 바이러스, 세균 그리고 원충에 대한 선천성 그리고 후천성 면역에 밀접하게 관련되는 cytokine으로 natural killer (NK), natural killer T (NKT) cells, CD4 Th1 그리고 CD8 cytotoxic T lymphocyte (CTL) effector T cells에서 생산되는 것으로 immunostimulatory 그리고 immunomodulatory 효과를 발휘한다고 보고되어 있다. 문헌조사에서 넘치의 에드워드증 (edwardsiellosis)의 예방 및 치료에 있어서 IFN- γ 의 역할이 보고되어 있어 곤충사료는 IFN- γ 에 의한 항병원성 효과를 발휘할 수 있을 것으로 사료된다.

한편, 비특이 면역에 관여하는 lysozyme의 발현량은 곤충분 사료를 급이한 군에서 일반사료 급이군에 비해 감소하는 경향을 보였고 특히, 10% 그리고 15% 곤충분 사료를 투여한 군의 경우 일반사료 투여군에 비해 현저하게 감소하였다.

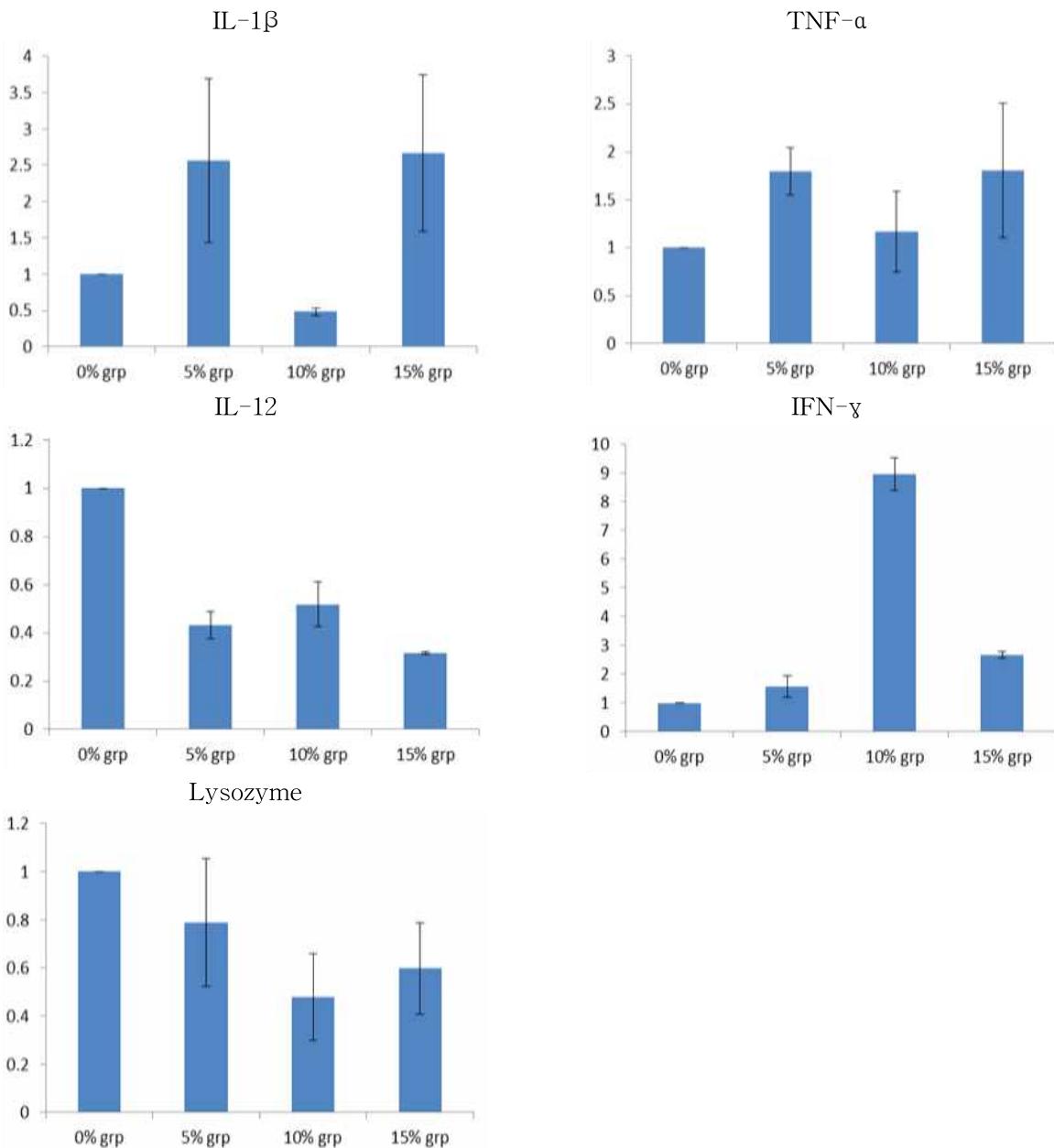


그림 3-6. 곤충분 농도 별 사료 급이 넙치 성어 혈액에서 qRT-PCR에 의한 면역 관련 genes의 발현량 비교

③ 치어어에서 곤충분 사료의 독성 검사(항산화효과 규명)

넙치 치어에서 사료 급여 후 10일째 그리고 30일째에 *cat* 그리고 *sod* genes의 발현량을 조사하였던 바 (그림 3-7) *cat*의 발현량은 10일째에는 곤충분 사료 급이군에서 일반사료 급이군에 비해 낮았으나 30일째에는 5% 그리고 15% 곤충분 사료 그리고 일반사료 급이군들에서 유사한 수준을 보였고 10% 곤충분 사료의 경우 일반사료 급이군에 비해 높은 발현량을 보였다.

Sod gene의 발현량은 10일째에 모든 급이군들에 유사한 수준을 보였으나 30일이 경과 후에는 일반사료 급이군에 비해 곤충분 사료를 급이한 군에서 높은 수준의 발현 양상을 보였다. 특히,

10% 곤충분 사료의 경우 일반사료에 비해 발현량이 높은 것을 알 수 있었다.

넙치 성어에서 *FasL*의 발현량은 모든 굽이군에서 차이가 없었으나 넙치 치어의 간에서 일반사료 굽이군에 비해 곤충분이 혼합된 사료 굽이군에서 낮은 발현량을 보여 넙치 성어에서처럼 치어에서도 곤충분은 항산화효과를 발휘하는 것을 알 수 있었다.

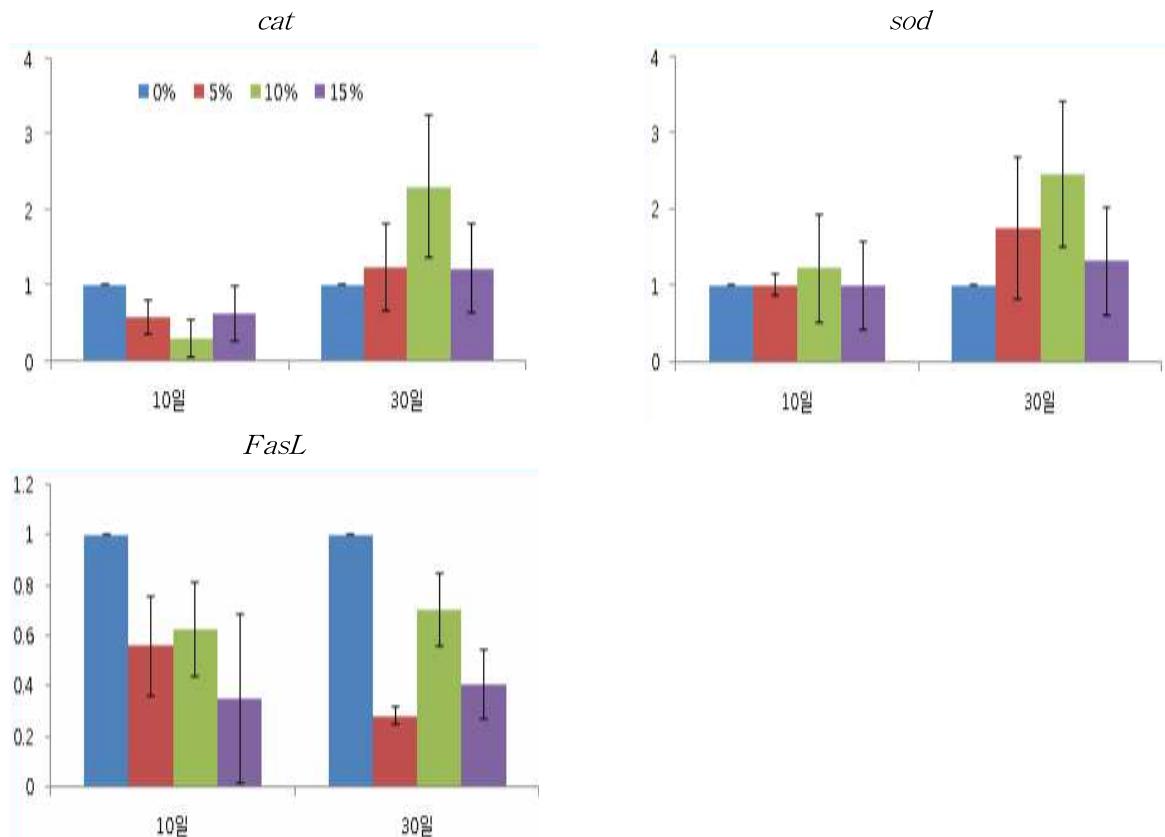


그림 3-7. 곤충분 농도 별 사료 굽이 넙치 치어 혈액에서 qRT-PCR에 의한 *cat*, *sod*, *FasL* genes의 발현량 비교

④ 치어에서 곤충분 사료의 면역학적 효과

성어에서처럼, 치어에서 곤충분 사료 굽이에 따른 면역반응을 관찰하기 위해 cytokine들의 발현량을 조사하였다 (그림 3-8). IL-1 β 그리고 TNF- α 의 발현량은 굽이 후 10일 그리고 30일째에 일반사료 투여군에 비해 낮은 수준을 보여 넙치 치어에서 곤충분에 의한 염증반응은 유발되지 않는 것으로 사료된다. IL-12의 기능은 어류에서 불명확하나 포유류에서는 항원자극에 따른 다양한 면역반응을 유도하는 것으로 알려져 있음. 치어에서 사료 굽이 후 10일 그리고 30일째에 IL-12의 발현량은 일반사료 굽이군에 비해 곤충분 사료 굽이군에서 낮았으나 10% 곤충분 사료의 굽이군에서는 30일째에 다른 군에 비해 높은 발현량을 보였다.

치어에서 곤충분 농도 별 사료를 굽이한 모든 군에서 일반 사료 투여군에 비해 IFN- γ 의 발현량은 10일 그리고 30일째에 낮은 수준이었으나 15% 곤충분 사료를 굽이한 군에서는 간의 IFN- γ 의 발현이 30일 동안 유지되었으나 다른 굽이군들에서는 더 낮은 발현량을 보였다.

Lysozyme의 발현량은 10일째에 모든 급이군에서 유사한 수준이었으나 급이 후 30일째에 10% 그리고 15% 곤충분 사료 급이군에서 일반사료 급이군에 비해 높은 발현을 보였다.

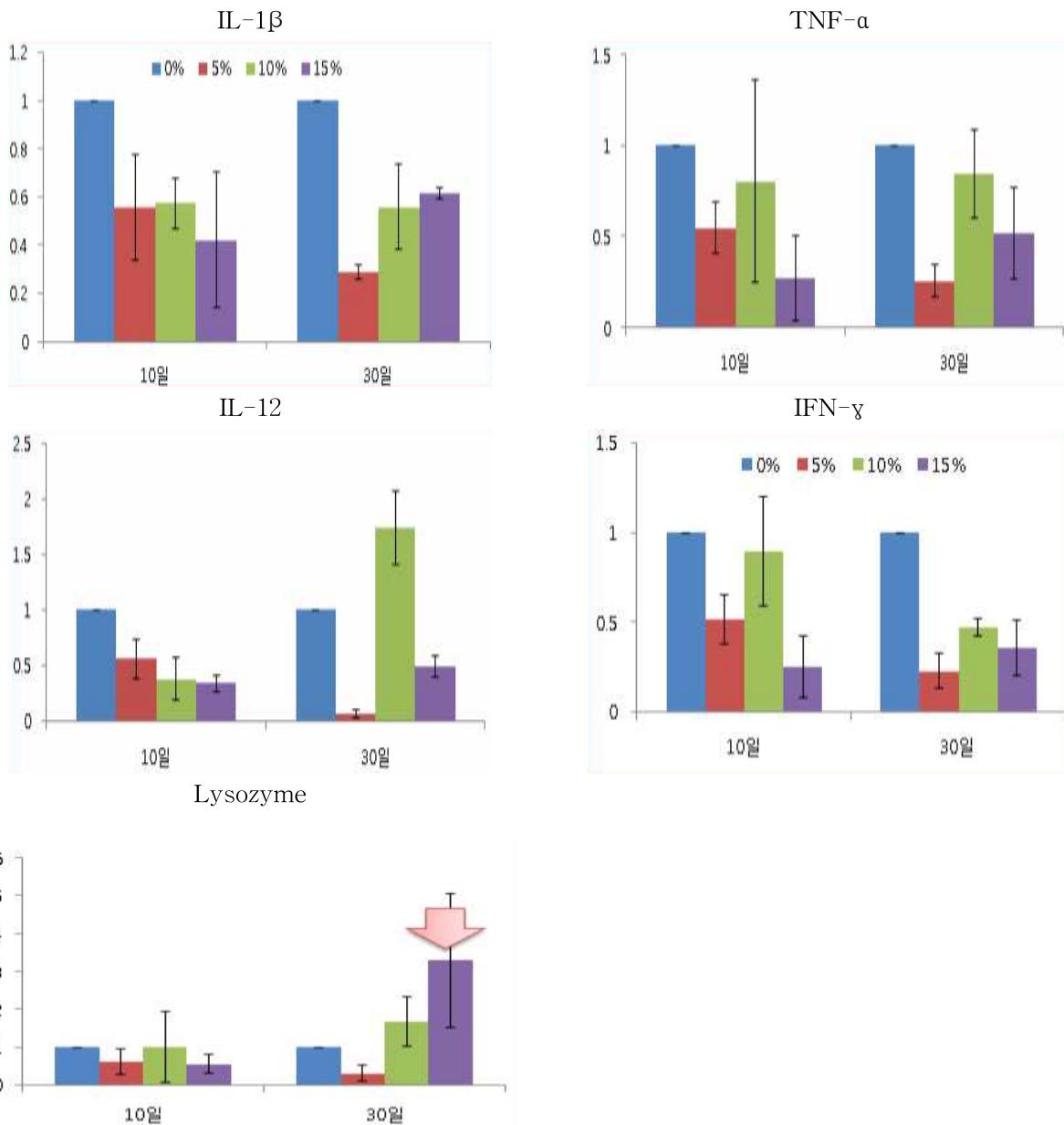


그림 3-8. 곤충분 농도 별 사료 급이 넙치 치어 혈액에서 qRT-PCR에 의한 면역 관련 genes의 발현량 비교

⑤ 치어에서 곤충분 사료의 항병원성/영양학적 효과

넙치 치어에서 사료 급여 후 10일째 그리고 30일째에 무작위로 급이군 별로 3마리씩 부검하여 간에서 성장에 관여하는 호르몬의 발현량을 조사하였다 (그림 3-9). IGF-1 그리고 IGF-2의 발현량은 10일째에 일반사료 투여군에 비해 곤충분 사료를 투여한 군들에서 낮은 발현량을 보였

으며 30일째 또한 10% 곤충분 사료를 제외한 나머지 두군에서 일반사료 투여군 보다 낮은 발현량을 보였으나 10% 곤충분의 경우 일반사료 투여군과 두 호르몬의 발현량은 비슷한 수준으로 측정되었다. 각 급이군 별 10일째의 발현량을 기준으로 30일째 발현량을 측정한 결과 (Figure 10. lower) IGF-1의 발현량은 일반사료 급이군에서 감소하였으나 곤충분 사료의 경우 증가하였다. IGF-2의 경우, 일반사료, 5% 그리고 10% 곤충분 사료에서 그 gene의 발현량은 감소하였으나 10% 곤충분 사료의 경우 증가하였다.

상기의 결과로, 10% 곤충분 사료 급이군에서 보인 성장효과는 IGF-2의 발현 또는 IGF-2 그리고 IGF-1 발현의 상호작용에 의한 것으로 사료된다.

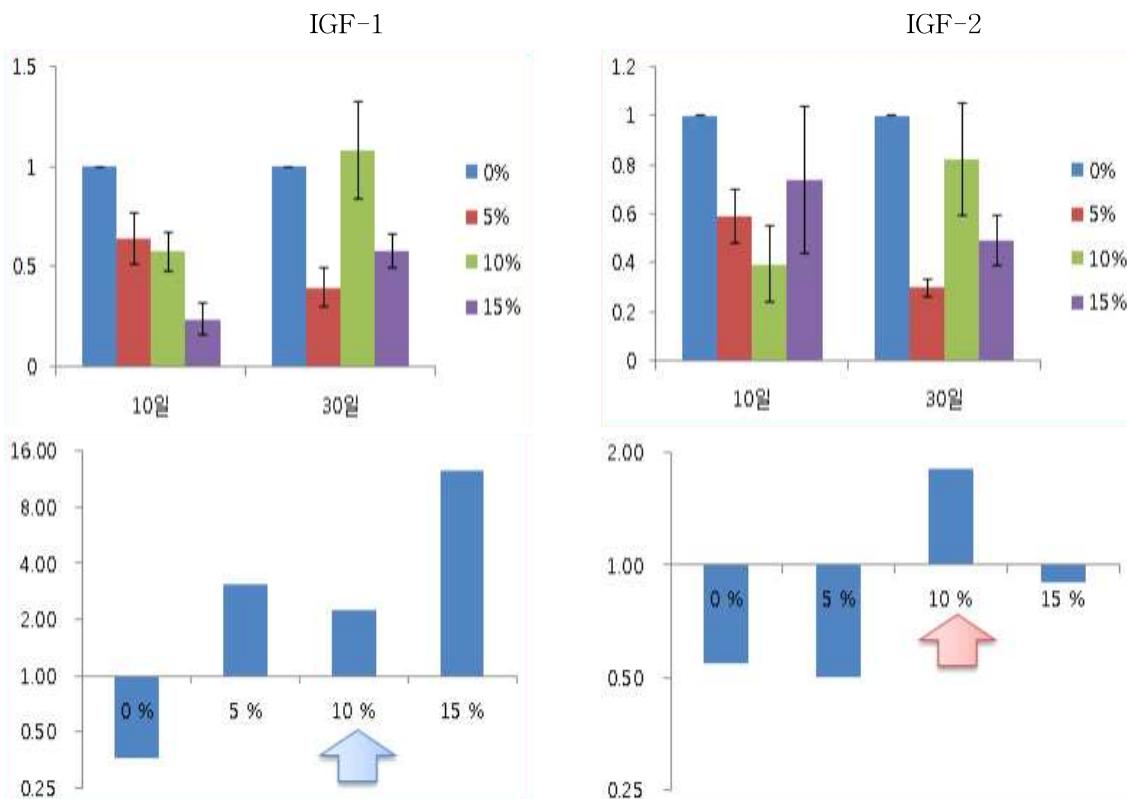


그림 3-9. 치어의 간에서 insulin-like growth factors의 발현량 비교. Upper part, 0% 곤충분 사료 급이군 기준; Lower part, 10일째 발현량 기준

치어에서 30일 간 사료 급여 후 *S. parauberis*의 배양액(10^8 CFU/ml) 0.1 ml을 복강내 감염에 의해 곤충분 농도 별 사료의 항병원성을 규명하고자 하였다(그림 3-10). 감염 실험 하루 전 어류는 절식하였고, 감염 시 어류의 주사 스트레스를 감소하기 위해 Aqui-S를 마취하였고 또한 접종 전 그리고 당일 절식하였다. 공격시험 후 매일 폐사 유무를 기록하였으며 폐사개체가 발생 시 신속히 수조에서 제거하여 세균학적 검사를 수행하였다. 사료 섭이 반응은 감염시험 다음날부터 보였으나 감염 후 3일 점차적으로 감소하여 4일 후 부터는 사료를 전혀 먹지 않았다. 감염 후 11일 째에 첫 폐사는 5% 곤충분 사료를 급이한 군에서 보였으며 실험 종료일(투여 후 20일) 까지 누적폐사율은 92.3%였음. 5% 곤충분 사료 그리고 일반사료(0% 곤충분 사료) 급이 군에서는 13일 째에 각각 2마리 그리고 1마리의 첫 폐사를 보였으며 실험 종류 시 누적폐사율은 각각 84.6% 그리고 92.3%였음. 15% 곤충분 사료를 투여한 군에서 첫 폐사는 감염 후 16일 째 유발되었으며 실험 종료 시 76.9%의 누적폐사율을 보였다. 15% 곤충분 사료 급이군에서

다른 급이군에 비해 3~6일 더 늦은 폐사가 유발되었고 실험 종료까지 높은 생존율을 보여 곤충분 사료는 항병원성이 있을 것으로 사료된다. 이러한 항병원성 효과는 아마도 IFN- γ 유지 그리고 lysozyme의 증가에 의한 것으로 사료된다.

본 실험 결과에서 곤충분 사료의 항병원성 효과는 극히 미비한 것으로 보일 수 있으나 실험실의 제한된 사육 조건, 주사, 그리고 폐사 개체의 잦은 제거 등으로 인한 다양한 스트레스도 실험 결과에 많은 영향을 주었을 것으로 사료되며, 인공감염을 위한 복장 내 접종 그리고 높은 세균수는 양식환경 또는 자연환경에서 발생하는 감염증(감염 후 호발장기에서 병원체의 증식)과 상당한 차이가 있을 것으로 사료된다.

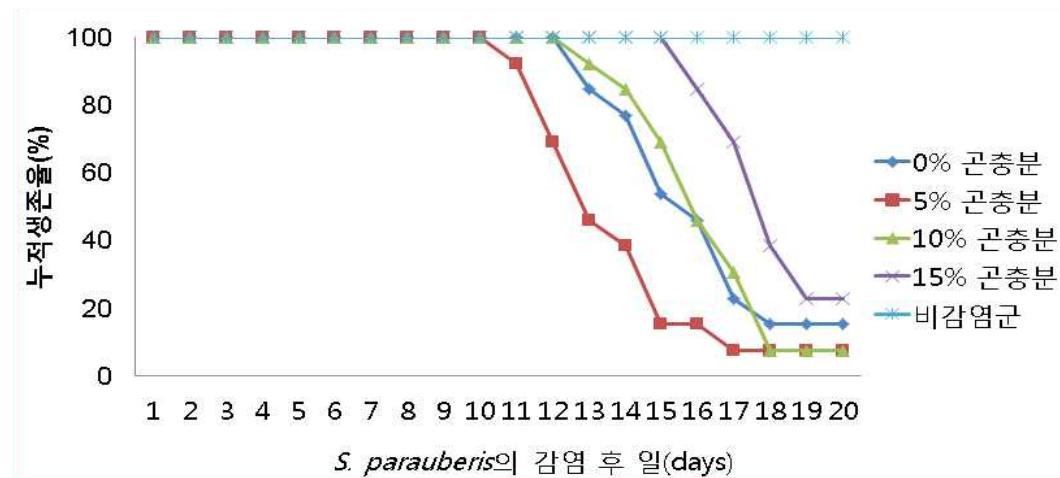


그림 3-10. 넙치 치어에서 곤충분 농도 별 사료의 항병원성 효과 비교

다. 곤충 사료의 넙치 양식장 현장 실증 시험

(1) 넙치 시험어의 준비

곤충분 사료의 성장, 독성, 면역능 가치를 평가하기 위해 현장 시험을 수행하였다. 넙치는 거제도 한 양식장에서 구입하여 대천 동아원수산자원연구소로 수송 하였고 체중 측정 후 표 3-6과 같이 4 그룹으로 분류하였음. 3일간 순차 후 Tank A1 그리고 Tank A2는 일반사료 그리고 Tank B1 그리고 B2는 곤충분사료를 급여 하였다. 본 시험 수행에 앞서 어류 5마리를 부검하여 간, 비장 조직의 마쇄액을 이용하여 기존 국내 넙치 양식장에서 빈번하게 발생하는 세균성 (*S. parauberis*, *S. iniae* 그리고 *Edwardsiella tarda*) 그리고 바이러스성(viral hemorrhagic septicemia virus, infectious hematopoietic necrosis virus, nervous necrosis virus 그리고 infectious pancreatic necrosis virus) 질병 검사를 PCR법 그리고 그 외 세균성 병원체에 대한 배양법에 의해 수행하였음. 수행 결과는 모두 음성이었음. 각 군은 30일 동안 각 그룹의 총 어체중의 1%에 해당하는 곤충분사료 또는 일반사료를 급여하였으며 시험의 종료 후 무작위로 선별된 넙치 (각 그룹당 10마리)에서 체중 및 혈액에서 생화학적 성상 그리고 항산화, 면역학적 그리고 성장에 관여하는 genes의 발현량을 조사하였음.

(2) 넙치 혈액에서 생화학적 성상 검사

넙치의 혈액은 Chem 17 clip을 이용하여 Procyte Dx Hematology Analyzer(IDEXX Inc.)에서 분석하였다.

(3) 기준 사료와 곤충 사료에 의한 양식 넙치의 면역반응/항병원성/영양학적 가치 분석

넙치에서 곤충사료 그리고 일반사료 투여에 따른 면역반응, 항병원성 그리고 영양학적 가치를 평가하기 위하여 혈액, 간 그리고 비장에서 cytokine, 항산화 그리고 성장에 관여하는 다양한 gene(표 3-5)들의 발현량은 qRT-PCR에 의해 수행하였다.

표 3-6. 현장 실험을 위한 일반사료 및 곤충사료 투여군의 분류

사료	일반사료		곤충사료		
	Tanks	A1	A2	B1	B2
Total weight (Kg)		77.5	78.3	75.8	75.8

※개체 평균 무게 389.0±54.14 g

(4) 현장 실증 시험 결과

① 곤충분 사료의 성장 효과

체중의 경우 실험 종료 후 일반사료 투여군에서는 약 390 g 이었으나 곤충분사료 투여군에서는 448g 측정되어 곤충분사료 투여군이 일반사료 투여한 군에 비해 약 57g이 더 증가한 것을 알 수 있었다. 따라서, 10% 곤충분 사료를 투여한 군의 경우 대조군(일반사료 투여군) 대비 17.3%의 더 높은 성장률을 보였다(그림 3-11, 표 3-7).

② 혈액 분석

혈액 내 생화학적 성상 조사(표 3-8, 3-9)의 경우 각 군내 그리고 군별 개체 차이가 매우 심해 비교할 수 없지만 곤충분 사료를 투여군에서는 glucose 그리고 lipase의 수치가 일반 사료군에 비해 높음을 알 수 있었다. Alanine aminotransferase(GOT)는 곤충분사료에서 일반사료군에 비해 낮은 수치를 보였으나 aspartate aminotransferase(GST)의 경우 곤충분사료 투여군에서 일반사료군에 비해 월등히 높은 수치를 보였다.

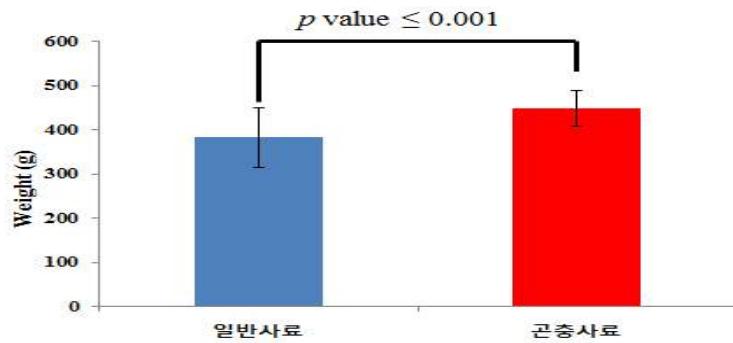


그림 3-11. 현장 실증 시험에서 곤충분 사료의 성장 효과

표 3-7. 곤충분 사료의 성장 효과

Parameters	일반사료	곤충사료
Initial weight (g)	389.0±54.1	389.0±54.1
Final weight (g)	382.1±67.4	448.4±40.7
Weight gain (%)	-1.7	15.20%
Specific growth rate	-0.7	6.20

표 3-8. 혈액분석

Materials	Unit	일반사료투여군(30일후)						곤충사료투여군(30일후)					
		FL-1	FL-2	FL-3	FL-4	FL-5	FL-6	FL-1	FL-2	FL-3	FL-4	FL-5	FL-6
Glucose	mg/dL	55	73	12	48	<10	28	240	264	<10	51	209	<10
Blood Urea Nitrogen	mg/dL	2	2	3	<2	3	2	<2	<2	2	2	<2	4
Creatine	mg/dL	-	-	-	<0.1	<0.1	0.2	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Phosphorus	mg/dL	>16.1	>16.1	>16.1	11.9	12.7	>16.1	>16.1	>16.1	>16.1	14.6	>16.1	13.7
Calcium	mg/dL	1.4	1.3	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	2.1	1.9	<1.0	<1.0	<1.0
Total Protein	g/dL	6.2	5.6	6.3	4.9	5.7	5.1	4.8	5.3	6.3	5.6	6	5.3
Albumin	g/dL	2.1	2.1	2.4	1.8	2	2	1.8	2	2.2	2	2	2
Globulin	g/dL	4.1	3.5	3.9	3.1	3.7	3.1	2.9	3.3	4.2	3.6	4	3.3
Albumin/Globulin Ratio		0.5	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.5	0.6	0.5	0.6
SGOT, alanine aminotransferase	UL	-	32	52	<10	37	<10	46	<10	0.5	<10	<10	49
SGPT, aspartate aminotransferase	UL	-	-	67	27	55	131	-	-	539	54	-	108
Alkaline Phosphatase	UL	200	122	<10	18	28	60	57	89	32	76	72	<10
GammaGlutamyltransferase	UL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TotalBilirubin	mg/dL	0.4	0.5	1.2	0.2	0.7	0.4	0.3	0.4	0.7	0.6	0.4	1
Cholesterol	mg/dL	301	306	110	110	211	146	158	223	166	185	229	8
Amylase	UL	22	22	15	12	24	19	12	12	15	14	22	<5
Lipase	UL	>6000	1986	5109	1029	5275	5713	>6000	5373	1300	5600	5984	4607

표 3-8. 주요 혈액 인자들에 분석

Parameters	일반사료	곤충사료	p value
Albumin	2.07±0.20	2.00±0.13	0.39
Glucose	43.20±23.74	191.00±96.01	0.01
Cholesterol	197.33±90.15	161.50±80.60	0.41
Amylase	19.00±4.65	13.33±5.50	0.09

③ 현장 실증 시험에서 곤충사료의 독성/면역/영양학적 효과

ⓐ 독성효과

넙치의 각 군별 30일간의 사료 급여 후 간, 혈액, 비장에서 RNA를 추출하여 antioxidant enzymes(superoxide dismutase(SOD) 그리고 catalase(CAT)) 그리고 세포의 자가사멸(apoptosis)을 초래하는 FasL의 발현량을 qRT-PCR에 의해 수행하였다 (그림 3-12). 간에서 두 그룹간 유의적인 차이는 없지만 곤충사료를 투여한 군에서 cat 그리고 sod의 발현량 증가

그러나 *FasL*의 발현량은 감소하는 경향을 보였다. 혈액의 경우, *sod*의 발현량은 곤충분 사료 투여군에서 일반사료 투여군에 비해 감소하여하였으나 *cat*의 발현량은 곤충분 사료 투여군에서 증가하는 것을 알 수 있었으나 시험군간의 유의적인 차이는 발견 할 수 없었다. 산화스트레스 시 *FasL*의 발현은 증가되기 때문에 *FasL*은 세포 자가사멸 시그널로 인식되고 있음. 혈액에서 곤충분 사료를 투여한 군에서 일반사료 투여군에 비해 증가하는 경향이 있으나 두 군간의 유의적인 차이는 없었다. 그러나, 이러한 증가는 단지 혈구 세포에서 관찰되어지고 비장에서는 오히려 *FasL*의 발현은 곤충분 사료 투여군에서 일반사료 투여군에 비해 현저히 감소하는 것을 알 수 있었고 간에서는 감소하는 경향을 보였다.

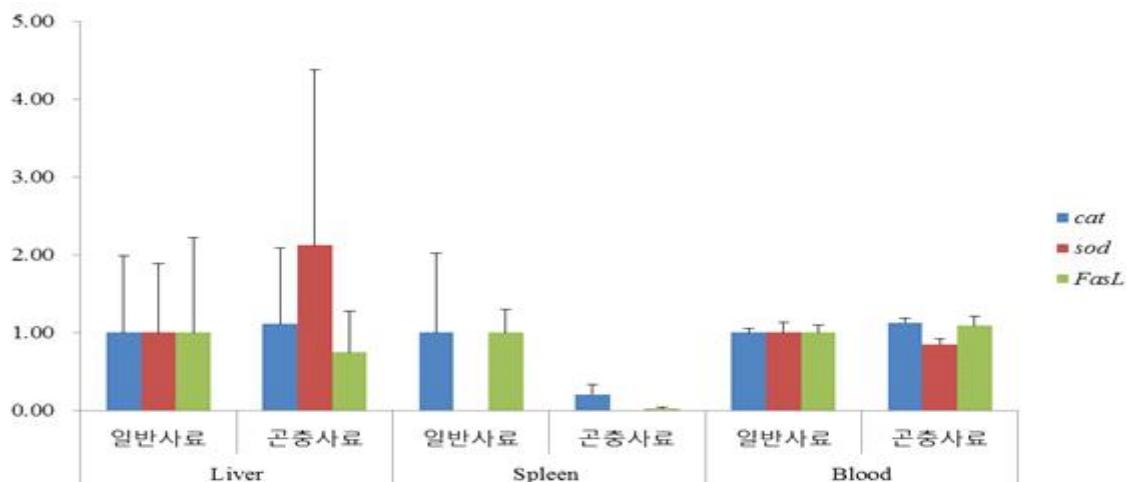


그림 3-12. 현장 실증 시험에서 곤충분 사료의 항산화 효과

④ 면역효과

곤충분 사료 투여군의 간에서 면역반응을 관찰하기 위해 cytokine들의 발현량을 조사한 결과 (그림 3-13) IL-1 β 를 제외한 다른 genes의 발현량은 감소하는 경향을 보였으나 두 그룹간 유의적인 차이는 관찰할 수 없었음. IL-1 β 의 발현량은 두 그룹간 차이를 보이지 않았다. 혈액에서는 곤충분 사료 투여군에서 일반사료 투여군에 비해 IL-1 β 는 증가하였고 TNF- α 의 경우에는 곤충분 사료 투여군에서 감소하는 경향을 보였지만 두 그룹 간 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다. IFN- γ 그리고 IL-12의 발현량은 곤충분 사료를 급이군에서 일반사료 투여군에 비해 높은 경향이 있으나 두 그룹 간 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다. 비장에서는 cytokine의 genes의 발현량은 일반사료 투여군에 비해 곤충사료 투여군에서 현저히 감소되었다.

한편, 비특이 면역에 관여하는 lysozyme의 발현량은 간 그리고 비장에서 곤충분 사료를 급이 한 군에서 일반사료 급이군에 비해 증가하였으나 혈액 그리고 비장의 경우 감소하였지만 장기별 그리고 그룹 간 유의적인 차이는 없었다(그림 3-14).

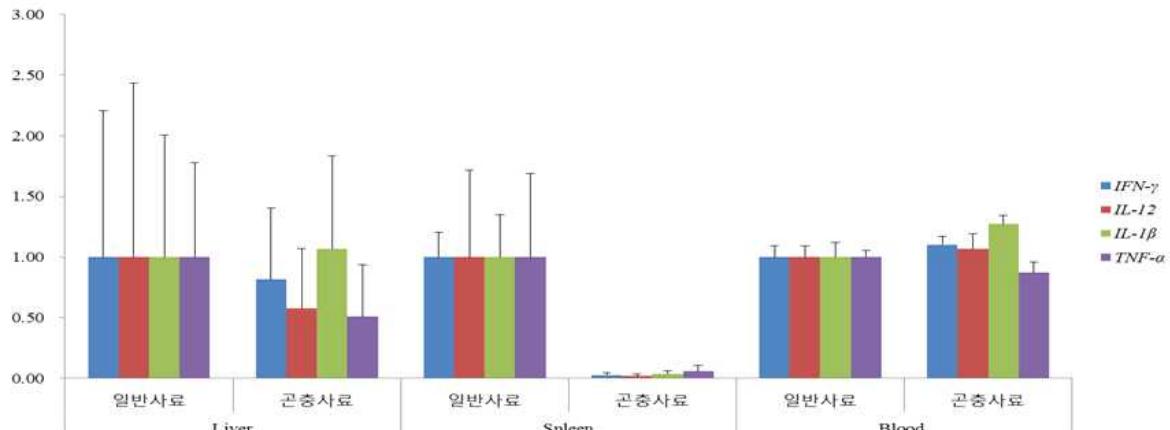


그림 3-13. 현장 실증 시험에서 곤충분 그리고 일반사료 투여군에서 cytokines의 발현량 비교

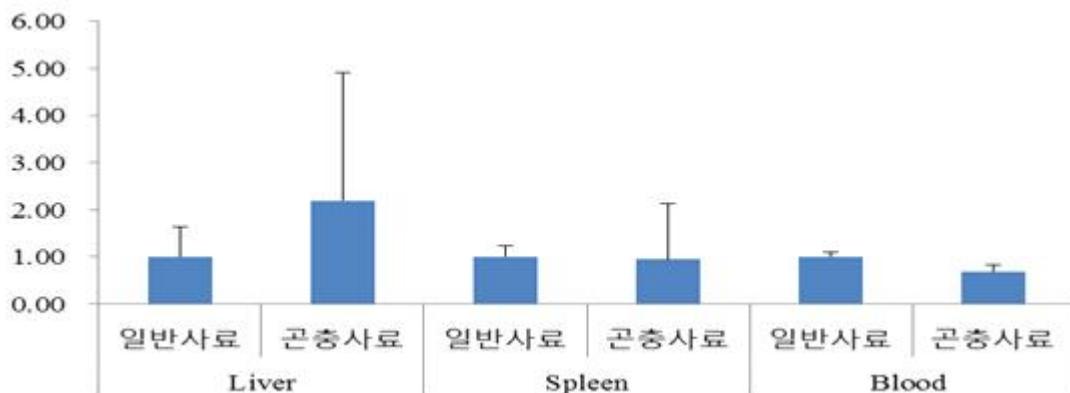


그림 3-14. 현장 실증 시험에서 곤충분 그리고 일반사료 투여군에서 lysozyme의 발현량 비교

④ 성장효과 (insulin-like growth factor에 미치는 효과)

성장에 관여하는 IGF-1 그리고 IGF-2의 발현량은 곤충분 사료를 투여한 군들에서 낮은 발현량을 보였지만 이 역시 두 그룹간 큰 차이가 없었다(그림 3-15).

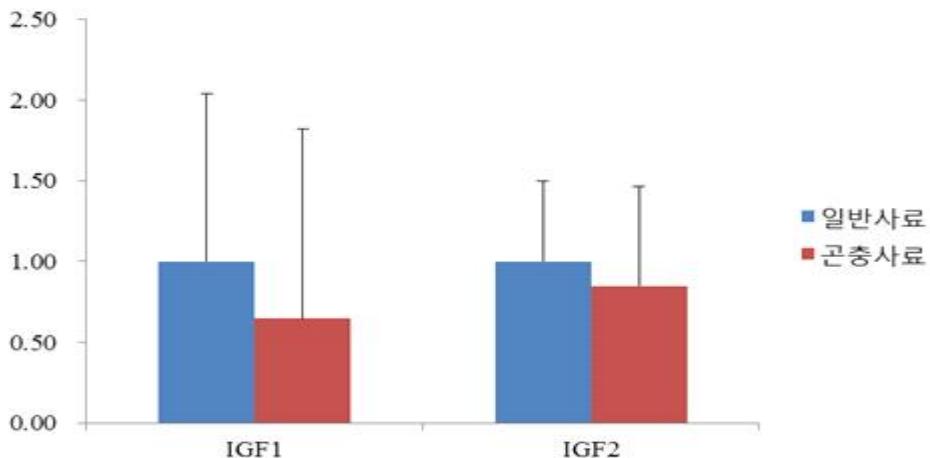


그림 3-15. 현장 실증 시험에서 곤충분 그리고 일반사료 투여군에서 IGF-1 그리고 IGF-2의 발현량 비교

라. 결론

본 연구를 통해 10% 곤충분 사료는 넙치의 성장을 향상하는 것으로 보인다. 또한, *cat*, *sod*의 발현량은 장기 별 차이를 보였으나 곤충분 사료 투여군의 간, 비장 그리고 혈액에서 FasL의 발현량은 일반 사료군에 비해 감소하는 경향을 보여 곤충분 사료에 의한 산화스트레스는 없는 것으로 추정된다. 비록, 싸이토카인의 발현량은 조직 특이적으로 관찰되지만 항병원성 시험에서 곤충분 사료를 투여한 군에서 일반 사료 투여군에 비해 지연된 폐사를 보이기 때문에 곤충분이 어류의 면역에 다소 관여하는 것을 알 수 있었다.

제6절 : 수질환경영향 평가

가. 곤충사료의 수질환경영향 평가분석

(1) 곤충사료의 흰다리새우와 넙치 양식장에서의 수질검사

샘플 수집은 각 양식장 수질평가를 위해 양식장 물 샘플은 각 현장에서 50 ml cornical tube에 채취하였다. 수질 분석 항목으로는 아래와 같은 항목들을 분석하였다.

- ① 총인 (Total phosphorus) : 유기인과 무기인의 합으로 하천 및 호소의 부영양화를 나타내는 중요한 지표이다.
- ② 총질소 (Total nitrogen) : 단백질을 구성하는 주요한 원소이며 단백질의 분해과정에서 질소도 같이 분리된다.
- ③ 아질산성 질소 (Nitrite) : 단백질이 대사하는 과정의 중간 산물이다.
- ④ 암모니아 (Ammonia) : 단백질의 대사과정 중 아미노산의 탈아미노 과정에서 발생하는 산물이다.
- ⑤ 용존산소량 (DO) : 물에 녹아있는 산소의 양 (1기압, 수온 30도에서 7.53이 최대산소포화도)을 의미한다.

⑥ 전기전도도 : 물질에서 전류가 잘 흐르는 정도를 나타내는 물리량이며 해수에서는 염도를 의미한다.

⑦ pH : 산성의 정도를 나타내는 값 (새우의 경우 pH 8 정도가 최적의 상태임)이며 어종별로 적정 산도를 유지하는 것은 성장에 중요한 요소이다.

⑧ 넙치양식조 실험은 순환여과방식을 사용하므로 수질분석 항목으로는 총질소, 총인, 아질산성 질소, 질산성 질소를 측정하였다.

실험조의 수질 측정은 실험실용 수질분광광도계 (DR3900TM, HACH Inc.)을 이용하여 사료 투여 전후를 1주일 간격으로 규칙적으로 측정하였다.



그림 4-1. 수질 측정용 용존산소, pH 및 수온 자동수질 분석기와 수질분광도계



총인



총질소



아질산성 질소



암모니아

그림 4-2. 각 항목별 수질측정시 시약 반응 후의 사진들

(2) 곤충사료의 흰다리새우와 넙치 양식장에서의 수질검사 결과

(가) 흰다리새우 양식장의 수질검사 결과

① 용존산소량(DO)은 곤충분 25%, 50%, 100% 대체사료에서 기존사료보다 높은 용존산소량을 유지하였으며 1기압하에서 최대산소포화도인 7.53에 근접하는 값을 보였다. pH는 곤충분 25%, 50%, 100% 대체사료에서 기존사료보다 8에 가까운 수질의 산성도(pH)를 유지하였으며 흰다리새우는 pH8정도가 살아가는데 있어서 최적의 상태이다. 전기전도도는 곤충분 대체사료와 기존사료가 비교하였을 때 크게 다르지 않았으며 비슷한 전도도를 유지하였다.

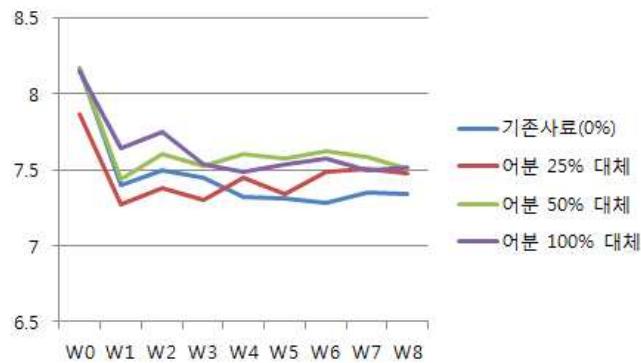


그림 4-3. 8주간 흰다리새우 시험수조의 용존산소량 수치의 변화

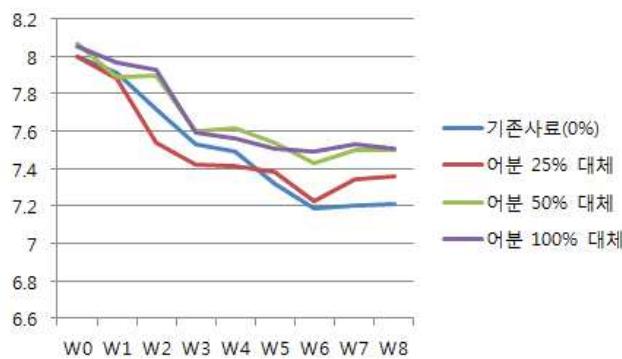


그림 4-4. 8주간 흰다리새우 시험수조의 pH 수치의 변화

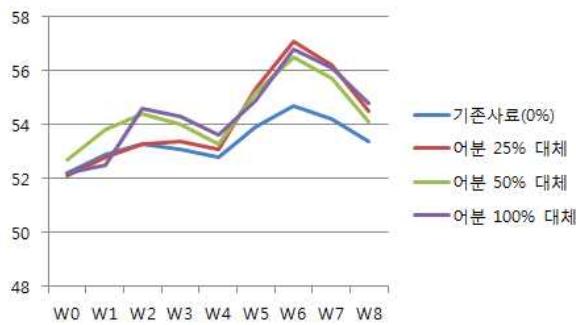


그림 4-5. 8주간 흰다리새우 시험수조의 전기전도도 수치의 변화

- ② 총인은 곤충분 25% 대체사료에서 기존사료보다 낮은 값을 지속적으로 유지하였으며 이는 기존의 방식으로 생산하는 흰다리새우사료보다 곤충분으로 단백질을 25% 대체하였을 때 부영양화의 정도가 약하다는 것을 의미한다. 총질소는 곤충분 50%, 100% 대체사료에서 기존사료보다 낮은 값을 유지하였으며 이 또한 곤충분 대체사료가 기존사료보다 생체내 단백질 이용률이 높고 노폐물 생산이 낮음을 의미한다. 아질산성 질소 역시 곤충분 50%, 100% 대체사료에서 기존사료보다 낮은 값을 유지하였으며 곤충 단백질의 생체내 이용률이 높고 노폐물 생성이 작음을 의미한다. 암모니아는 곤충분 25%, 50%, 100% 대체사료에서 기존사료보다 낮은 값을 유지하였고 이 또한 곤충분 대체사료가 기존사료보다 수질악화정도가 약하다는 것을 의미한다.

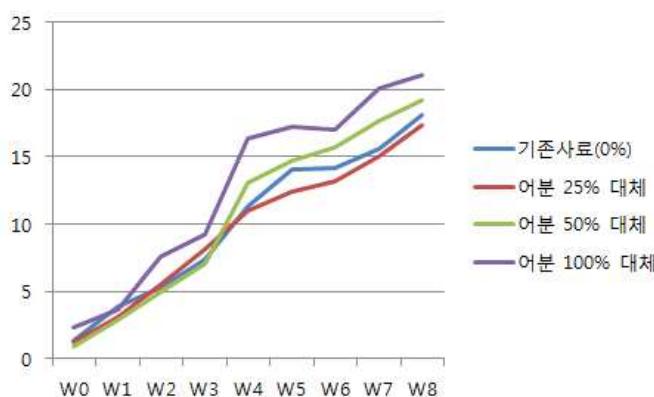


그림 4-6. 8주간 흰다리새우 시험수조의 총인 수치의 변화

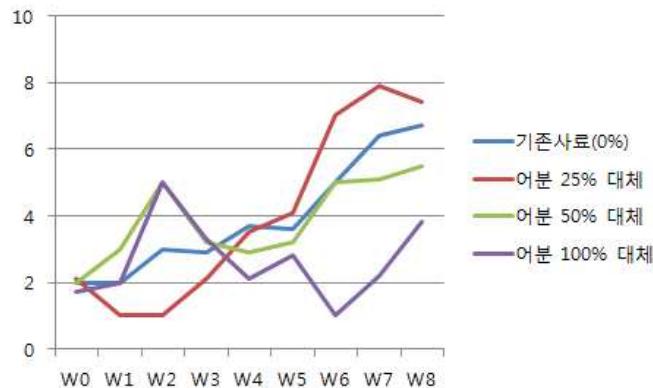


그림 4-7. 8주간 흰다리새우 시험수조의 총질소 수치의 변화

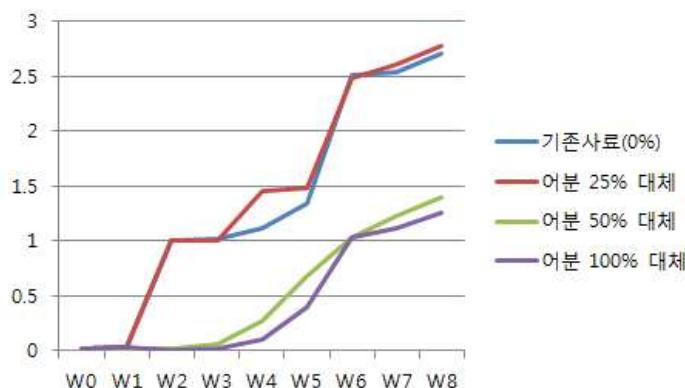


그림 4-8. 8주간 흰다리새우 시험수조의 아질산성 질소 수치의 변화

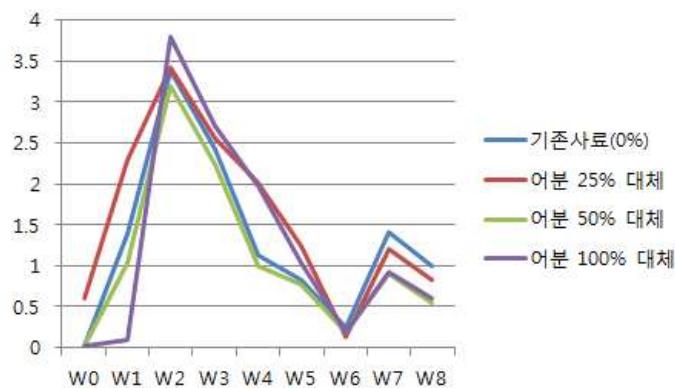


그림 4-9. 8주간 흰다리새우 시험수조의 암모니아 수치의 변화

(나) 넙치 양식장의 수질검사 결과

총인은 곤충분 15% 대체사료에서 기준사료보다 낮은 값을 유지하였다. 곤충분 대체사료가 기준사료보다 수질의 유지에 더 좋은 것으로 판단된다. 총질소는 곤충분 대체사료가 기준사료보다 약간 높은 값을 유지했다. 질산성 질소는 곤충분 10%, 15% 대체사료에서 기준사료보다 낮은 값을 유지하였다. 아질산성 질소는 곤충분 15% 대체사료에서 기준사료보다 낮은 값을 유지하였다.

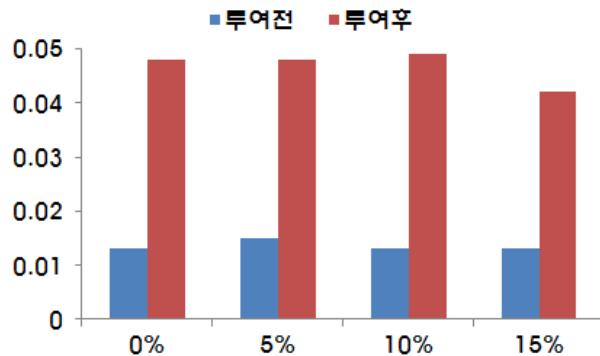


그림 4-10. 4주간 넙치 시험수조의 아질산성 질소 수치의 변화

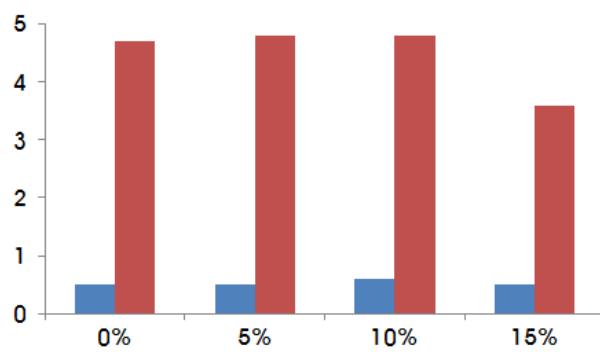


그림 4-11. 4주간 넙치 시험수조의 총인 수치의 변화

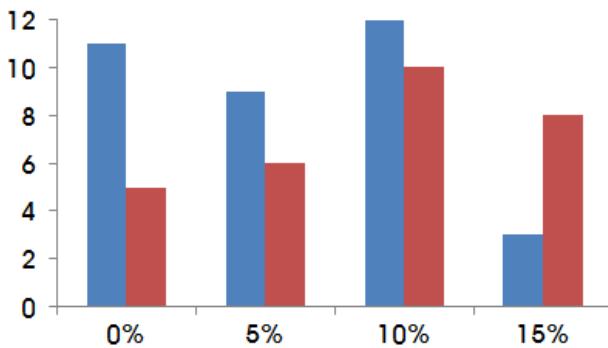


그림 4-12. 4주간 넙치 시험수조의 총질소 수치의 변화

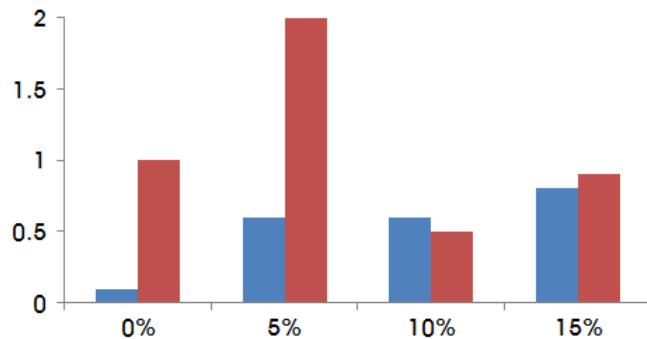


그림 4-13. 4주간 넙치 시험수조의 질산성 질소 수치의 변화

나. 곤충사료에 의한 양식새우와 넙치의 장내세균총 변화 및 수중미생물환경 분석

(1) 곤충사료에 의한 양식새우와 양식넙치 장내세균총 변화 확인

넙치와 흰다리새우에서 곤충사료 그리고 일반사료 투여에 따른 장내세균총의 변화, 특히 면역증강에 관여하는 장내 유익균의 발현 정도를 metagenomic 기법에 의해 수행하였다.

(가) 곤충사료에 의한 양식새우와 양식넙치 장내세균총 변화 확인

① 1년차 사양시험에서 양식새우와 양식넙치의 수중환경분석을 실시하였으며 양식새우에서 50%, 100% 어분대체군에서 단백질 대사산물 (총인, 총질소, 아질산성 질소, 암모니아) 감소 결과를 통해 높은 생체 이용률을 확인하였다. 이로 인해 양식넙치에서도 어분사료 대체군에서 전반적으로 높은 생체 이용률이 확인되었다.

② 새우사양시험의 재연시험과 넙치 치어시험에서 metagenomics 분석을 위해 새우와 넙치의장을 분리 및 확보한 후 DNA정량, PCR 후 증폭작업, Sequencing을 통한 차세대유전자분석기법 (Next Generation Sequencing, NGS)를 통해 새우와 넙치 장내미생물총의 변화를 확인하였고 도출된 데이터를 바탕으로 유익균과 유해균을 구분하여 세균총 변화 양상을 분석하였다.



▶ 새우 수조시험군에서 metagenomics 분석을 위한 장분리 작업



▶ 넙치 수조시험군에서 metagenomics 분석을 위한 장분리 작업



DNA 정량

PCR Amplification

Sequencing

▶ 차세대유전자분석(Next generation sequencing)을 통한 metagenomics 분석

그림 4-14. 곤충사료의 양식어류 장내세균총 영향 분석 평가



그림 4-15. 곤충사료의 양식어류 장내세균총을 Nest generation sequencing 기법으로 데이터
도출

(2) 곤충사료에 의한 흰다리새우와 넙치의 양식장에서 수중미생물 평가

넙치는 실험 수조에 치어입식 및 시험사료투여 시작하여 30일 후 일반사료군과 곤충사료군 넙치양식수조의 물을 채취하여 수생미생물의 다양성을 분석하였고 흰다리새우 양식장의 수

생미생물 평가: 실험 호지에 치하입식 및 시험사료투여 시작하여 4개월 후 일반사료군과 곤충사료군 흰다리새우양식장의 물을 채취하여 수생미생물의 다양성을 분석하였다.

곤충사료의 의한 양식새우와 양식넙치 수중미생물환경 분석을 위해 Vitek2분석과 16s rRNA에 대한 PCR 및 Sequencing을 통해 대장균(*E. coli*) 검사와 제1군 감염병 병원체 검사를 수행하였다. 제1군 감염병 병원체는 다음과 같다: 콜레라균(*Vibrio cholerae*), 장티푸스균(*Salmonella enterica* serovar Typhi), 파라티푸스균(*Salmonella paratyphi*), 세균성이질(*Shigella dysenteriae*, *flexneri*, *boydii*, *sonnei*), 장출혈성대장균(*Enterohemorrhagic E. coli*)

(3) 곤충사료에 의한 양식새우와 양식넙치 장내세균총 변화 확인 결과

넙치 장내 세균총의 변화에 대한 평가를 위해 넙치의 장내용물을 샘플링하였다. 넙치에서 Lactobacillales목은 장내 유익균이고 면역력 증강의 지표이다. 곤충분 0%대체군에서 Lactobacillales목이 0.04% 확인되었으나, 곤충분 5%대체군에서 Lactobacillales목이 2.43% 확인되었고 특히 하위 그룹의 유익세균인 Lactobacillaceae과가 0.03% 확인되었다. 곤충분 10%대체군에서는 Lactobacillales목이 0.86% 확인되었고 특히 하위 그룹의 유익세균인 Lactobacillaceae과가 0.13% 확인되었다. 또한, 곤충분 15%대체군에서 Lactobacillales목이 0.22% 확인되었고 특히 하위그룹의 유익세균인 Lactobacillaceae과가 0.09% 확인되었다. 즉, 양식넙치에서 곤충사료 투여군b모두에서 Lactobacillales목이 대조군 대비 최소 500%에서 최대 6,100% 향상됨을 확인하였다.

(나) 흰다리새우 장내 세균총의 변화에 대한 평가

새우의 장내 세균총으로 알려진 gamma-Proteobacteria강(평균 11.6%분포), Bacilli강 (평균 9.7% 분포), Flavobacteria강 (평균 7.0% 분포), alpha-Proteobacteria강 (평균 9.0% 분포), delta-Proteobacteria강 (평균 6.8% 분포)과 Actinobacteria강 (평균 4.2% 분포)이 본 연구에서도 대부분 분석되었으며 각각 군에서 과증식하는 특정 세균총이 각각 0%군 (Proteobacteria강; 98.94% 분포), 25%군 (Proteobacteria강; 72.38% 분포), 50%군 (Actinobacteria강; 60.48% 분포), 100%군 (Proteobacteria강; 81.97% 분포)으로 분석되었다. 새우에서도 장내 유익균이고 면역력 증강의 지표로 알려진 유산균(Lactobacillales, Bacillaceas)이 0%군에서 0.06% 분포인데 반해 25%군에서 2.44%로 증가, 50%군에서 1.45%로 증가, 100%군에서 0.13% 증가하였다. 특히, 50%군에서는 Lactobacillales목의 하위 그룹이면서 좀 더 유효한 유산균인 Lactobacillaceae과가 0.04% 증가하였다.

(4) 넙치 양식장과 흰다리새우 양식장의 수중미생물 평가

일반사료 투여군과 곤충사료 투여군 모두에서 대장균의 경우 1,000cfu이하로 확인되었으며, 제1군 감염병 병원체 역시 검출되지 않았다.

표 4-1. 넙치 장내세균총 변화 양상

구분	Class (강)	Order (목)	Family (과)	% of total reads	% of valid reads	% of mapped reads
일반사료투여군	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	0.04	0.05	0.07
			Staphylococcaceae	0.02	0.02	0.03
		Lactobacillales	Staphylococcaceae	0.02	0.03	0.04
곤충분5% 대체군	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	0.31	0.36	0.62
			Staphylococcaceae	0.37	0.42	0.73
		Lactobacillales	Aerococcaceae	0.02	0.03	0.04
			Lactobacillaceae	0.01	0.02	0.03
			Streptococcaceae	1.19	1.38	2.36
곤충분10% 대체군	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	0.01	0.01	0.02
			Enterococcaceae	0.04	0.05	0.10
		Lactobacillales	Lactobacillaceae	0.05	0.07	0.13
			Streptococcaceae	0.28	0.31	0.63
			Staphylococcaceae	0.21	0.24	0.41
곤충분15% 대체군	Bacilli	Bacillales	Aerococcaceae	0.03	0.03	0.05
			Lactobacillaceae	0.04	0.04	0.09
		Lactobacillales	Streptococcaceae	0.04	0.05	0.08

표 4-2. 흰다리새우 장내세균총 변화 양상

구분	Class (강)	Order (목)	Family (과)	% of total reads	% of valid reads	% of mapped reads
일반사료투여군	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	0.04	0.05	0.07
		Lactobacillales	Enterococcaceae	0.01	0.01	0.02
			Streptococcaceae	0.02	0.03	0.04
곤충분 25% 대체군	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	0.31	0.36	0.62
			Staphylococcaceae	0.26	0.3	0.51
		Lactobacillales	Aerococcaceae	0.04	0.05	0.08
			Streptococcaceae	1.19	1.38	2.36
			Carnobacteriaceae	0.33	0.37	0.75
곤충분 50% 대체군	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	0.01	0.01	0.03
			Lactobacillaceae	0.02	0.02	0.04
			Streptococcaceae	0.28	0.31	0.63
			Staphylococcaceae	0.12	0.14	0.21
		Bacillales	Aerococcaceae	0.03	0.03	0.05
			Streptococcaceae	0.04	0.05	0.08
곤충분100% 대체군	Bacilli		Staphylococcaceae	0.04	0.05	0.08

표 4-3. 양식흰다리새우와 양식넙치 수중환경 미생물 검사 결과

	대장균(<i>E. coli</i>) 1000(CFU/mL) 이 하	콜레라균 (<i>Vibrio cholerae</i>)	장티푸스균(<i>Salmonella entericaserovar Typhi</i>)	파라티푸스균 (<i>Salmonella paratyphi</i>)	세균성이질 (<i>Shigelladysenteriae, flexneri, boydii, sonnei</i>)	장출혈성대장균 (<i>Enterohemorrhagic E. coli</i>)
일반사료투여군	300 CFU이하	음성	음성	음성	음성	음성
곤충분25% 대체군	300 CFU이하	음성	음성	음성	음성	음성
곤충분50% 대체군	300 CFU이하	음성	음성	음성	음성	음성
곤충분100% 대체군	300 CFU이하	음성	음성	음성	음성	음성

	대장균(<i>E. coli</i>) 1000(CFU/mL) 이 하	콜레라균 (<i>Vibrio cholerae</i>)	장티푸스균(<i>Salmonella entericaserovar Typhi</i>)	파라티푸스균 (<i>Salmonella paratyphi</i>)	세균성이질 (<i>Shigelladysenteriae, flexneri, boydii, sonnei</i>)	장출혈성대장균 (<i>Enterohemorrhagic E. coli</i>)
일반사료투여군	300 CFU이하	음성	음성	음성	음성	음성
곤충분5%	300 CFU이하	음성	음성	음성	음성	음성
곤충분10%	300 CFU이하	음성	음성	음성	음성	음성
곤충분15%	300 CFU이하	음성	음성	음성	음성	음성

다. 양식장 현장 수질 평가 및 환경영향 평가

(1) 곤충사료의 넙치 양식장 수질환경에 대한 영향분석 평가

넙치양식장의 수질검사는 양식장 수질평가를 위한 샘플은 현장에서 50ml cornical tube에 채취하여 DR3900(HACH)에서 분석하였고 넙치 장내 세균총의 변화에 대한 평가를 위해 넙치에서 곤충사료 그리고 일반 사료 투여에 따른 장내 세균총의 변화, 특히 면역증강에 관여하는 장내 유익균의 발현 정도를 metagenomic 기법에 의해 수행하였다.

Next generation sequencing(NGS) 기법을 통한 넙치 양식장의 수생미생물 평가는 실험수조에 치어입식 및 시험사료투여 시작하여 30일 후 일반사료군과 곤충사료군 넙치양식수조의 물을 채취하여 수생미생물의 다양성을 분석하였다.

(2) 곤충사료의 흰다리새우 양식장 수질환경에 대한 영향분석 평가

흰다리새우양식장의 수질검사를 위해 양식장 수질평가를 위한 샘플은 현장에서 50 ml cornical tube에 채취하여 DR3900(HACH)에서 분석하였다. 흰다리새우 장내 세균총의 변화에 대한 평가: 흰다리새우에서 곤충사료 그리고 일반사료 투여에 따른 장내 세균총의 변화, 특히 면역증강에 관여하는 장내 유익균의 발현 정도를 metagenomic 기법에 의해 수행하였다.

Next generation sequencing(NGS) 기법을 통한 흰다리새우 양식장의 수생미생물 평가는 실험 호지에 치하입식 및 시험사료투여 시작하여 4개월 후 일반사료군과 곤충사료군 흰다리새우양식장의 물을 채취하여 수생미생물의 다양성을 분석하였다.

(3) 곤충사료의 넙치 양식장 수질환경에 대한 영향분석평가 결과

(가) 넙치양식장의 수질검사 결과

단백질 대사의 최종산물(노폐물)이 일반사료투여군보다 곤충사료투여군에서 낮은 값을 유지했으며, 이는 일반사료보다 곤충사료의 단백질이 더 생체 이용률이 높다는 것을 의미하고 용존산소량은 일반사료투여군보다 높은 용존산소량을 유지하였으며 전기전도도는 비슷한 수준을 유지하였으며 pH는 일반사료투여군보다 곤충사료투여군이 8에 가까운 값을 유지하였다. 이는 곤충사료가 일반사료에 비해 넙치양식을 위한 수질에 더 좋은 영향을 끼침을 의미한다.

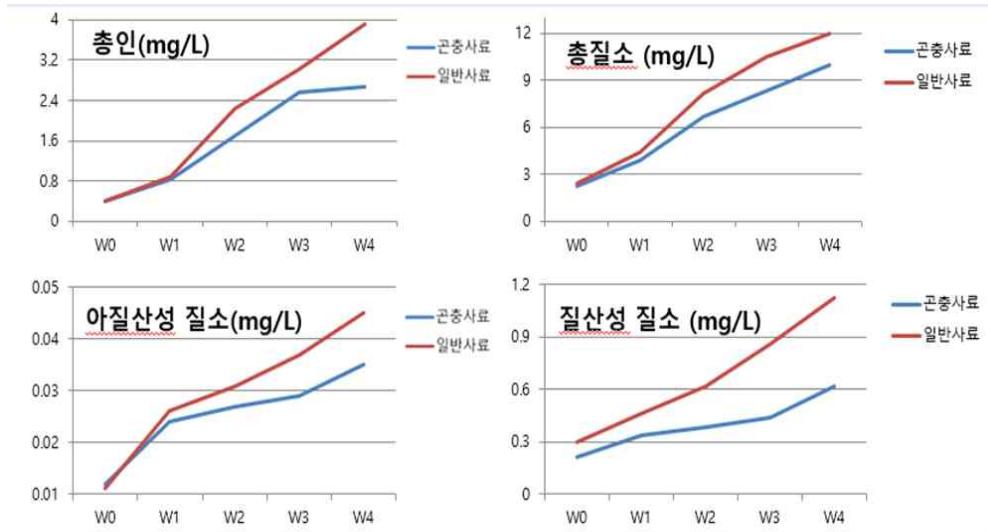


그림 4-16. 30일 동안의 일반사료투여군과 곤충사료투여군 넙치 양식수조의 수질 평가 비교

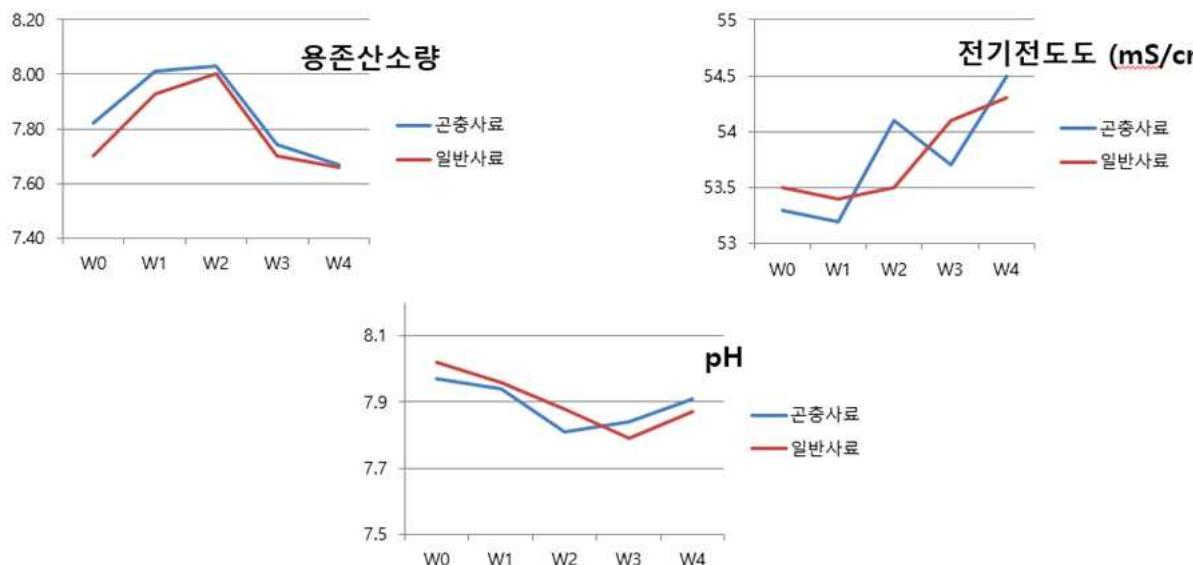


그림 4-17. 30일 동안의 일반사료투여군과 곤충사료투여군 넙치 양식수조의 수질 평가 비교

(나) 넙치 장내세균총의 변화에 대한 평가 결과

넙치에서도 장내 유익균이고 면역력 증강의 지표로 알려진 유산균 Lactobacillales목이 일반사료투여군에서는 0.05% 분포인데 반해 곤충사료투여군에서 0.25%로 증가하였고 특히, 넙치에서도 곤충사료투여군에서 Lactobacillales목의 하위 그룹이면서 좀 더 유효한 유산균인 Lactobacillaceae과가 0.10%로 증가하였다.

구분	Class (강)	Order (목)	Family (과)	% of total reads	% of valid reads	% of mapped reads
일반사료투여군	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	0.05	0.05	0.10
			Staphylococcaceae	0.01	0.02	0.03
		Lactobacillales	Staphylococcaceae	0.03	0.04	0.05
곤충사료투여군	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	0.22	0.24	0.43
			Aerococcaceae	0.03	0.05	0.07
		Lactobacillales	Lactobacillaceae	0.04	0.06	0.10
			Streptococcaceae	0.04	0.05	0.08

그림 4-18. 양식 넙치의 장내세균총 변화에 대한 Metagenomics 분석

(다) 넙치 양식정의 수중미생물 평가 결과

대장균(*E. coli*) 검사 결과 각 군에서 40~300(CFU/ml)로 대장균군 1,000 이하로의 기준과 비교하였을 때 수질은 양호하였으며 제1군 감염성 병원체 검사 결과 콜레라균(*Vibrio cholerae*), 장티푸스균(*Salmonella enterica serovar Typhi*), 파라티푸스균(*Salmonella paratyphi*), 세균성이질(*Shigella dysenteriae, flexneri, boydii, sonnei*), 장출혈성대장균(*Enterohemorrhagic E. coli*)은 검사 결과 음성으로 양호하였다.

	대장균(<i>E. coli</i>) 1000(CFU/mL) 이하	콜레라균 (<i>Vibrio cholerae</i>)	장티푸스균 (<i>Salmonella enterica serovar Typhi</i>)	파라티푸스균 (<i>Salmonella paratyphi</i>)	세균성이질(<i>Shigella dysenteriae, flexneri, boydii, sonnei</i>)	장출혈성대장균 (<i>Enterohemorrhagic E. coli</i>)
일반사료 투여군	300 CFU 이하	음성	음성	음성	음성	음성
곤충사료 투여군	300 CFU 이하	음성	음성	음성	음성	음성

그림 4-19. 넙치의 양식수조에서의 수중미생물환경 평가

(4) 곤충사료의 흰다리새우 양식장 수질환경에 대한 영향분석평가 결과

(가) 흰다리새우 양식장의 수질평가 결과

단백질 대사의 최종산물(노폐물)이 일반사료투여군보다 곤충사료투여군에서 낮은 값을 유지했으며, 이는 일반사료보다 곤충사료의 단백질이 더 생체 이용률이 높다는 것을 의미하고 용존산

소량은 일반사료투여군보다 높은 용존산소량을 유지하였으며 전기전도도는 비슷한 수준을 유지하였으며 pH는 일반사료투여군보다 곤충사료투여군이 8에 가까운 값을 유지하였다.

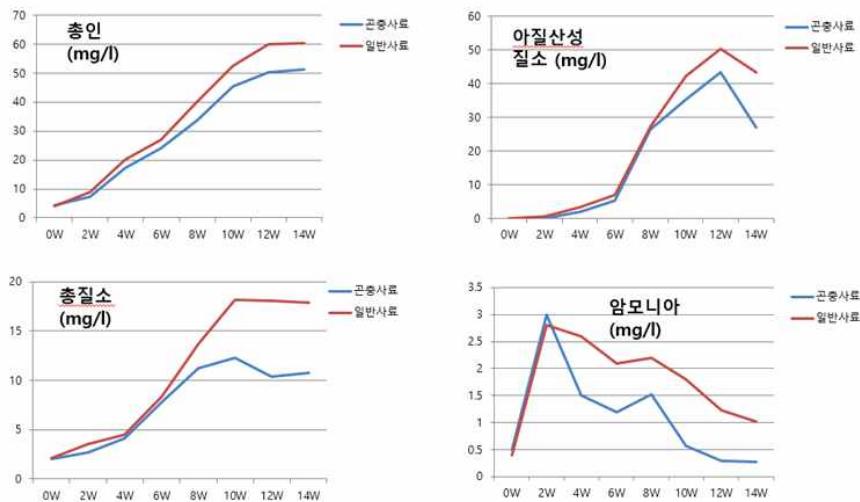


그림 4-20. 14주 동안의 일반사료투여군과 곤충사료투여군 흰다리새우 양식장의 수질평가 비교

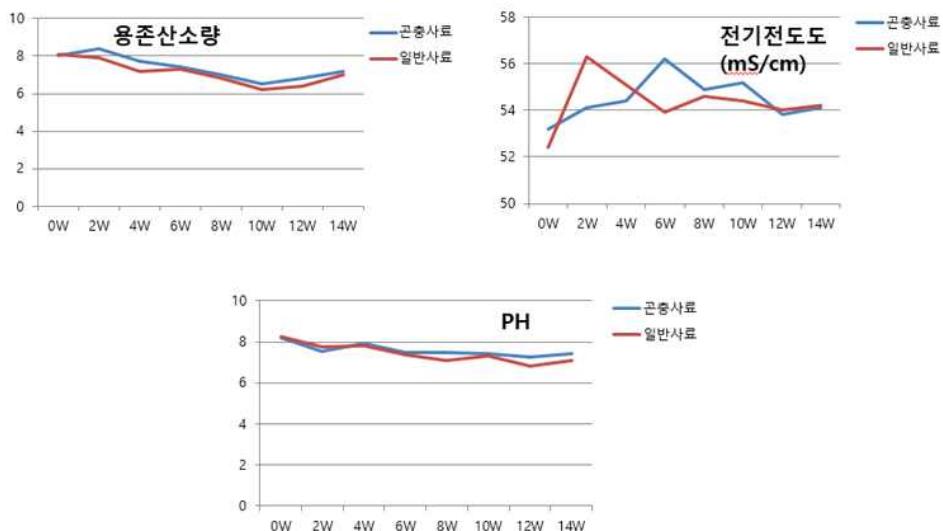


그림 4-21. 14주 동안의 일반사료투여군과 곤충사료투여군 흰다리새우 양식장의 수질평가 비교

(나) 흰다리새우 장내세균총의 변화에 대한 평가 결과

흰다리새우에서 Lactobacillales목은 장내 유익균이고 면역력증강의 지표로 알려져 있으며 본 실험의 일반사료투여군에서는 Lactobacillales목이 0.1% 확인되었으며, 이는 곤충사료투여군보다는 현저히 낮은 수치이며 흰다리새우에서 장내 유익균이고 면역력 증강의 지표로 알려진 유산균인 Lactobacillales목은 총 1.53% 확인되었고 특히 하위 그룹의 더 유효한 그룹인 Lactobacillaceae과가 0.05% 확인되었으며, 이는 일반사료투여군에 비해 월등히 높은 수치이다. 흰다리새우의 장내 세균총으로 알려진 gamma-Proteobacteria강(평균 11.6%분포), Bacilli강 (평

균 9.7% 분포), Flavobacteria강 (평균 7.0% 분포), alpha-Proteobacteria강 (평균 9.0% 분포), delta-Proteobacteria강 (평균 6.8% 분포)과 Actinobacteria강 (평균 4.2% 분포)이 본 연구에서도 대부분 분석되었다 - (노은수 등, 2013년, Korean J Microbiol).

흰다리새우에서도 장내 유익균이고 면역력 증강의 지표로 알려진 유산균 Lactobacillales목이 일반사료투여군에서 0.1% 분포인데 반해 곤충사료투여군에서는 1.53%로 월등히 증가하였으며 특히, 곤충사료투여군에서는 Lactobacillales목의 하위 그룹이면서 좀 더 유효한 유산균인 Lactobacillaceae과가 0.05% 증가하였다.

흰다리새우_일반사료투여군						
Phylum (문)	Class (강)	Order (목)	Family (과)	% of total reads	% of valid reads	% of mapped reads
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Demequinaceae	0.02	0.04	0.06
Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales		0.12	0.22	0.34
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	0.05	0.03	0.08
		Lactobacillales	Enterococcaceae	0.02	0.02	0.04
			Streptococcaceae	0.02	0.03	0.06
	Erysipelotrichi	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	0.01	0.02	0.03
	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	0.01	0.02	0.03
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	0.01	0.01	0.02
		Alteromonadales	Idiomarinaceae	0.02	0.03	0.04
		Vibrionales	Pseudoalteromonadaceae	0.02	0.02	0.03
			Vibriionaceae	10.86	12.04	18.34
	unclassified Gammaproteo bacteria	unclassified Gammaproteo bacteria	unclassified Gammaproteo bacteria	0.03	0.03	0.05
Tenericutes	Mollicutes	Entomoplasmatales	Entomoplasmataceae	0.04	0.05	0.07
				0.11	0.12	0.19

그림 4-22. 일반사료투여군 흰다리새우에서 장내세균총 중 유익균의 평가

흰다리새우_곤충사료투여군						
Phylum (문)	Class (강)	Order (목)	Family (과)	% of total reads	% of valid reads	% of mapped reads
Actinobacteria	Acidimicrobia	Acidimicrobiales	C111	0.18	0.14	0.29
			JdFBG-Bact	0.07	0.08	0.16
			Microthrixaceae	0.01	0.01	0.02
	Actinomycetina	Acidimicrobaceae	0.02	0.02	0.05	
		Corynebacteriaceae	0.01	0.01	0.03	
Bacteroidetes	Flavobacteria	Actinomycetales	25.7	28.95	58.97	
			Microbacteriaceae	0.24	0.27	0.56
			Mycobacteriaceae	0.07	0.08	0.16
	Cytophagia	Nocardioidaceae	0.01	0.01	0.02	
		Bacteroidesaceae	0.28	0.31	0.64	
Chlamydiae	Chlamydias	Chlamydiales	0.01	0.01	0.02	
			Porphyromonadaceae	0.04	0.04	0.08
			Flammeevogiacae	1.64	1.85	3.76
	Cyanobacteria	Chloroplast	Waddliaaceae	0.02	0.02	0.04
			Chlamydiaceae	0.02	0.02	0.04
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Criblamydiaceae	0.01	0.02	0.03
			Parachlamydiaceae	0.04	0.04	0.09
			Waddliaaceae	0.02	0.02	0.04
			Carnobacteriaceae	0.26	0.29	0.6
			Enterococcaceae	0.01	0.02	0.03
			Lactobacillaceae	0.02	0.03	0.05
			Streptococcaceae	0.30	0.34	0.68
			Erysipelotrichaceae	0.02	0.02	0.04

그림 4-23. 곤충사료투여군 흰다리새우에서 장내세균총 중 유익균의 평가

구분	Class (강)	Order (목)	Family (과)	% of total reads	% of valid reads	% of mapped reads
일반사료투여군	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	0.05	0.03	0.08
		Lactobacillales	Enterococcaceae	0.02	0.02	0.04
			Streptococcaceae	0.02	0.03	0.06
곤충사료투여군	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	0.34	0.38	0.77
			Enterococcaceae	0.01	0.02	0.03
			Lactobacillaceae	0.02	0.03	0.05
			Streptococcaceae	0.30	0.34	0.68

그림 4-24. 흰다리새우 장내세균총 변화에 대한 Metagenomics 분석

(다) 흰다리새우 양식장의 수중미생물 평가 결과

대장균(*E. coli*) 검사 결과 각 군에서 40~300(CFU/ml)로 대장균군 1,000 이하로의 기준과 비교하였을 때 수질은 양호하였고 제1군 감염성 병원체 검사 결과 콜레라균(*Vibrio cholerae*), 장티푸스균(*Salmonella enterica* serovar *Typhi*), 파라티푸스균(*Salmonella paratyphi*), 세균성이질(*Shigella dysenteriae*, *flexneri*, *boydii*, *sonnei*), 장출혈성대장균(*Enterohemorrhagic E. coli*)은 검사 결과 음성으로 양호하였다.

	대장균(<i>E. coli</i>) 1000(CFU/mL) 이하	콜레라균(<i>Vibrio cholerae</i>)	장티푸스균(<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhi</i>)	파라티푸스균(<i>Salmonella paratyphi</i>)	세균성이질(<i>Shigella dysenteriae</i> , <i>flexneri</i> , <i>boydii</i> , <i>sonnei</i>)	장출혈성대장균(<i>Enterohemorrhagic E. coli</i>)
일반사료 투여군	300 CFU 이하	음성	음성	음성	음성	음성
곤충사료 투여군	300 CFU 이하	음성	음성	음성	음성	음성

그림 4-25. 넙치의 양식수조에서의 수중미생물환경 평가

라. 결론

본 연구를 통해 곤충분 대체사료는 흰다리새우와 넙치의 장내세균총의 유익균의 증식에 효과가 있는 것으로 판단된다. 장내 유익균의 증식은 양식흰다리새우와 양식넙치의 면역력 증강에 효과가 있을 것으로도 판단된다. 또한, 곤충분 대체사료는 단백질 대사의 최종산물(노폐물)이 기존사료보다 낮은 값을 유지했다는 것은 기존사료의 단백질보다 곤충단백질이 더 생체이용률이 높고 양질임을 의미하는 것으로 사료된다.

제7절 : 곤충사료의 생산관리 및 품질 균일화 기술 개발

가. 새우용 배합사료에서 곤충분(Meal worm)의 어분대체사료 제조

국내에서 가장 많이 사육되는 새우종류인 흰다리 새우용 사료에서 사용되는 어분 양의 25%, 50%, 100% 대체하여 새우사료를 제조하였다. 단백질 요구량은 국내에서 사용되는 수준인 38%로 설계하였다. 아미노산 수준은 Akiyama(1991)가 권장한 단백질 대비 아미노산 수준을 따랐다.

표5-1. Penaid shrimp 단백질 요구량

종류	단백질 권장수준(%)
<i>P.azteca</i>	40
<i>P.indicus</i>	43
<i>P.japonicus</i>	52~57
<i>P.monodon</i>	45~50
<i>E.vannamei</i>	30

표5-2. 새우사료 아미노산 요구량 (Akiyama 1991)

	36%	38%	40%
Arginine	2.09	2.20	2.32
Histidine	0.76	0.80	0.84
Isoleucine	1.26	1.33	1.40
Leucine	1.94	2.05	2.16
Lysine	1.91	2.01	2.12
Methionine	0.86	0.91	0.96
Met+Cys	1.30	1.37	1.44
Phenylalanine	1.44	1.52	1.60
Phe+Tyrosine	2.57	2.70	2.84
Threonine	1.30	1.37	1.44
Tryptophan	0.29	0.30	0.32

원료 평가는 CVB를 이용하여 실시했고, 배합비 작업은 영국의 FORMAT 프로그램을 이용하여 진행하였다. 왕귀뚜라미 성분이 어분 성분과 유사하나 현재 여건상 Meal worm 으로 어분 대체하였다. 기타 비타민, 미네랄 등 흰다리 새우의 영양소 요구량은 Akiyama(1991)의 권장량에 맞추어 배합비를 설계하였다. 새우 성장비교시험용 시험사료의 어분 대체율은 0%, 25%, 50%, 100%로 시험사료 배합비를 작성했다. 대조구를 비롯한 네 제품 모두 익스트루더에서 생산할 때 다음 조건으로 생산하였다. 가공온도는 85~116oC , 물주입량 65 리터/ hour. 메인모터 사양은 220V, 15A로 설정하여 수행하였다.



Ingredients #1 CP 대두박 CP 45%	Diet CP 차이 15% - 대두박 비율
Ingredients #1 CP 옥수수 CP 8%	Diet CP 차이 22% - 옥수수 비율
Total 37%	

▼ 대두박 = $15/37 \times 4,000\text{kg}$ (Batch size) = 1,622kg
▼ 옥수수 = $22/37 \times 4,000\text{kg}$ (Batch size) = 2,378kg

Single-Mix						
		(1) (RUN)				
File Optimize Edit View Print Reports Copy Inspect-RM File Macro Help		Recost 20 PIG CREEP Cost difference 0.0 Optimal cost 144.57		RM's in % Metric nutrients Scale dry matter to 100.0 %		
<input checked="" type="checkbox"/> RM's in %	<input checked="" type="checkbox"/> Metric nutrients	<input type="checkbox"/> Scale dry matter to 100.0 %				
INCLUDED Name % NEW Cost		NEW Min.	NEW Max.	Kg		
2+BWHEAT 60.0 116.0		40.225864	60.0	600.0		
45+RFS MICRO 21.37884 169.0		5.0	30.0	213.788		
43+URKA 4.597646 130.0		0.0	4.597646	45.976		
65+GP LIQUID FAT 3.5 178.0		3.15	3.5	35.0		
46+CHILEAN FISHMEAL 3.0 386.0		2.7	3.3	30.0		
50+MOLASSES cane 3.0 69.7		2.7	3.0	30.0		
31+RAPESEED EXT *0 2.649041 81.0		0.0	3.254383	26.49		
59+L LYSINE HCL 0.585496 1450.0		0.585496	0.715606	5.855		
NUTRIENT Units Level		NEW Min.	NEW Max.	Un.coast	Limit	Saving
[VOLUME] % 100.0		100.0	100.0	2.3847	99.233234	1.8285
DRY MATT % 87.695292		*	*	*	*	*
OIL EE % 9.427438		6.0	*	*	*	*
OIL AH % 9.673612		6.0	*	*	*	*
CPROTEIN % 32.050135		23.0	*	*	*	*
FIBRE % 3.5		3.0	3.5	11.5789	3.546006	0.5327
CALCIUM % 0.481407		0.4	0.9	*	*	*

<배합비 작업>

<배합비 작업 프로그램 : FORMAT>

그림5-1. 기타사항

제조방법은 계량, 분쇄, 배합후 익스트루전 처리법으로 진행하였다.

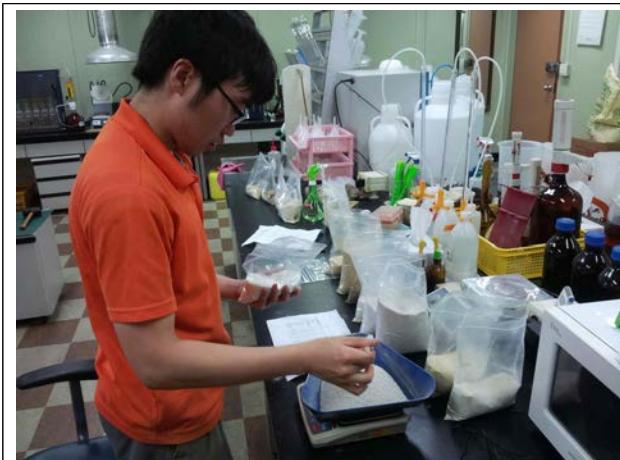
표 5-3. 새우용 시험사료 배합비

	1	2	3	5
Meal worm 의 어분대체율	0%	25%	50%	100%
SBM(Korea,47%)	37.62	38.85	40.63	45.1
Meal Worm		5	10	20
Fish Korea	20	15	10	0
Squid liver Powder	10	10	10	10
Dried Yeast	2	2	2	2
Wheat fl(sauce)	22.44	23.2	21.8	15.8
Fish Oil	1	0.45	.	.
Choline-Liquid(50%)	0.1	0.1	0.1	0.1
Liquid Methionine 71.7%	0.04	0.1	0.17	0.3
Lecithin	1.5	.	.	.
Limestone - S	1.5	1.5	1.5	1.5
Mono Di Calcium Phosphate	2.5	2.5	2.5	3.9

Salt	0.3	0.3	0.3	0.3
Vita -Shrimp	0.5	0.5	0.5	0.5
Mine-Shrimp	0.5	0.5	0.5	0.5
total	100	100	100	100

표5-4. 새우사료 설계치에 따른 영양소 수준

Nutrient	1	2	3	4
어분함량 대비 곤충분(%)	0	25%	50%	100%
##MO	10.65	10.46	10.20	9.21
##CP	38.01	37.99	38.00	38.03
##CFAT	6.04	6.00	7.22	10.50
##CFIBRE	2.24	2.59	2.94	3.67
##ASH	11.61	11.28	9.64	9.17
#CA	2.08	1.99	1.63	1.49
#P	1.56	1.59	1.31	1.41
#LYS	2.47	2.39	2.31	2.16
#MET	0.77	0.77	0.77	0.77
#CYS	0.50	0.50	0.50	0.50
#M+C	1.27	1.27	1.27	1.26
#THR	1.50	1.48	1.47	1.44
#TRP	0.52	0.50	0.47	0.42
#ILE	1.64	1.64	1.63	1.64
#ARG	2.57	2.55	2.53	2.50
#PHE	1.75	1.75	1.76	1.77
#HIS	0.97	0.97	0.97	0.98
#LEU	2.79	2.78	2.78	2.78
#TYR	1.14	1.22	1.31	1.49
#VAL	1.81	1.80	1.79	1.78
#ALA	1.72	1.71	1.71	1.70
#ASP	3.45	3.43	3.40	3.40
#GLU	5.55	5.39	5.22	4.90
#GLY	1.94	1.88	1.82	1.70
#PRO	1.64	1.66	1.68	1.71
#SER	1.55	1.55	1.55	1.56



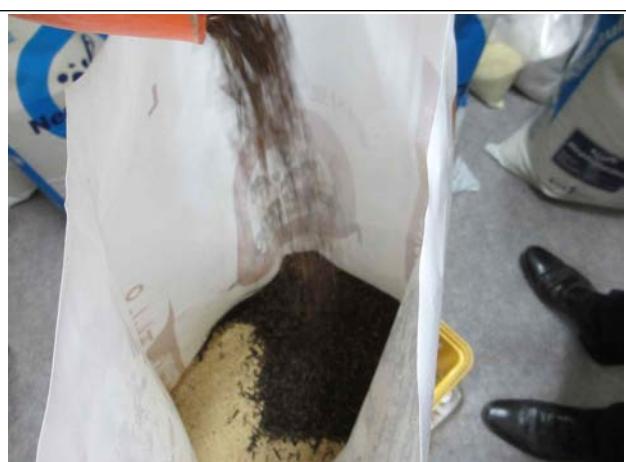
<미 량원료 계량>



<원료 분쇄>



<주 원료계량>



<갈색 거자리 계량>



<칼슘 인 공급원 계량>



<석회석 칼슘 공급원 계량>



그림 5-2. 사료 제조 과정



그림 5-3. 사료 제조기 및 생산 조건

새우사료 생산시에는 4배합비 제품 모두 비슷한 조건으로 생산되었다. 하지만, 분쇄시에 곤충분의 고지방 함량으로 인해 3번, 4번 배합비의 분쇄가 어려운 문제가 발견되었다. 이를 해소할 방법을 모색할 필요가 대두되었다.

나. 넙치용 배합사료에서 곤충사료 원료의 어분대체 제조

국내에서 가장 많이 사용되는 어종인 넙치용 사료에서 사용되는 어분의 5%, 10%, 15%를 대체하여 넙치사료를 제조하였다. 넙치사료 설계에 있어, 단백질 요구량은 국내에서 시판되는 사료들의 대체적인 수준인 52%로 설계하였다. 아미노산 수준은 meal worm의 아미노산 수준을 평가하여 네 제품 모두 유사하게 설정하였다. 계량, 분쇄, 배합후 익스트루전 처리법으로 진행하였고, 사료제조 조건은 분당 660g 생산, 사료크기는 13mm/5mm 크기의 광어시험사료 제조하였다. 전체적으로 새우 사료 제조법과 유사한 방법으로 넙치 사료를 제조하였다.

표 5-5. 넙치용 사료의 어분대체율 결정 및 배합비 산정

		곤충분 0%	곤충분 5%	곤충분 10%	곤충분 15%
2280	밀글루텐	0	0	0.8	2.2
2455	곤충분	0	5	10	15
2500	칠레어분	70.43	65.2	59.8	55.02
2605	오징어내장	3	3	3	3
2752	건조효모	1	1	1	1
3003	소맥분	21	21	20.3	18.4
4022	Fish Oil(코팅)	3	3	3	3
4061	콜린	0.2	0.2	0.2	0.2
4070	라이신	0.15	0.38	0.6	0.8
4076	매치오닌	0	0	0.08	0.16
5300	Vit E	0.1	0.1	0.1	0.1
5304	스테이 C	0.1	0.1	0.1	0.1
5329	물고기 비타민	0.5	0.5	0.5	0.5

5369	물고기 미네랄	0.2	0.2	0.2	0.2
	고운석회석	0.32	0.32	0.32	0.32
		100	100	100	100

표 5-6 .넙치용 사료의 성분분석결과

Nutrients	곤충분0%	곤충분5%	곤충분10%	곤충분15%
##MO	9.44	9.00	8.50	7.91
##CP	53.95	52.77	52.01	52.00
##CFAT	10.45	11.99	13.50	15.06
##CFIBR	0.34	0.64	0.93	1.21
##ASH	10.51	9.89	9.25	8.68
#CA	2.07	1.92	1.77	1.63
#P	1.70	1.61	1.52	1.43
#LYS	4.10	4.10	4.09	4.10
#MET	1.46	1.38	1.37	1.37
#CYS	0.52	0.50	0.50	0.51
#M+C	1.98	1.89	1.87	1.88
#THR	2.23	2.16	2.10	2.06
#TRP	0.61	0.57	0.54	0.51
#ILE	2.23	2.17	2.12	2.11
#ARG	3.20	3.09	2.99	2.92
#PHE	2.11	2.05	2.02	2.02
#HIS	1.39	1.36	1.33	1.33
#LEU	3.89	3.78	3.71	3.69
#TYR	1.62	1.66	1.72	1.80
#VAL	2.63	2.55	2.49	2.47
#ALA	3.26	3.19	3.12	3.08
#ASP	4.82	4.66	4.49	4.38
#GLU	7.03	6.66	6.48	6.49
#GLY	3.43	3.30	3.17	3.09
#PRO	2.35	2.31	2.33	2.43
#SER	2.11	2.05	2.01	2.01

네 구 모두 유사한 형태로 생산되었으며, 부상사료로 만드는 것은 어려웠다. 넙치 사료의 경우, 고단백질(52%)을 요구하여 곤충분 대체에 한계가 있었으며, 곤충분에서 지방을 추출하는 공정이 필요할 것으로 사료되었다.

다. 갈색 거저리 원료 분쇄 개선시험

국산 참깨, 중국산 참깨, 국산 들깨, 중국산 들깨, 그리고 밀웜을 착유했다. 가열교반기를 이용해 가열한 후, 착유기를 이용하여 착유하였다. 갈색 거저리의 경우, 지방 함량이 27%로 분쇄가 어려운 문제가 2014년 과제 수행시 발생하였다. 이의 해결책으로 압착기계를 이용하여 곤충유를 착유한 후, 곤충박과 곤충유를 배합하는 방법을 도모하였다.



그림 5-4. 고지방으로 인한 분쇄 문제 발생



그림 5-5. 착유기



그림 5-6. 각 원료별 착유 과정



갈색 거저리 곤충유의 경우, 식물성원료(참깨, 들깨)보다 착유율이 더 높았다. 갈색 거저리 기름중, 올레익산(C18:1n9) 비중이 높았다. 올레익산은 육류의 풍미개선 효과와 함께, 항암제로서의 역할도 하고 있는 것으로 알려져 있다. 기능성 원료로서의 가치도 있음을 시사한다. 지방산 분석 조성결과, 갈색 거저리 기름의 경우, 동물성 기름임에도 불구하고 필수지방산인 리놀산(C18:2n6)이 높았다. 갈색 거저리 기름중, 오메가3 지방산인 리놀렌산(C18:3n3)의 경우, 함량이 높지 않으나 참깨유 수준을 나타내었다.

표5-8. 건물기준 착유율

원료명	수분	조단백질	조지방	조회분	비고
	%	%	%	%	
곤충분	5.50	55.07	27.24	4.03	착유전
한국참깨	6.17	27.02	45.29	4.75	착유전
중국참깨	5.42	22.63	43.98	4.36	착유전
한국들깨	5.83	27.72	33.31	4.04	착유전
중국들깨	5.91	23.27	36.41	3.26	착유전
곤충분박	0.46	79.03	6.80	6.29	착유후
국산참깨박	0.69	48.46	17.92	8.95	착유후
중국참깨박	0.22	46.78	17.63	9.12	착유후
국산들깨박	0.57	47.82	12.88	6.43	착유후
중국들깨박	0.63	42.13	11.60	5.76	착유후

표 5-7. 시료들의 착유전과 착유후 일반성분 비교

원료명	MOI	CP	C-FAT	ASH	착유율
	%	%	%	%	%
곤충분	0.00	79.40	6.83	6.32	76.30
국산참깨박	0.00	48.80	18.04	9.01	62.62
중국참깨박	0.00	46.88	17.67	9.14	62.00

국산들깨박	0.00	48.09	12.95	6.47	63.38
중국들깨박	0.00	42.40	11.67	5.80	69.83

표 5-9. 원료별 지방산 조성표

	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C18:4	C20:0	C20:1	20:4n	20:5n
													DHA
곤충기름	0.46	4.11	14.01	1.7	2.52	41.82	32.61	1.15		0.16			
어유		7.4	17.4	10.5	4	11.6	1.2	0.8	3		1.6	0.1	17
대두유		0.1	10.3	0.2	3.8	22.8	51	6.8			0.2		
한국참기름			8.57		4.53	37.66	43.93	4.78		0.53			
중국참기름			9.35		5.06	38	45.66	1.22		0.57	0.15		
한국들기름			6.33		1.83	15.51	12.05	64.05			0.12		
중국들기름			6.19		2.31	18.97	13.91	58.47			0.14		

라. 지방 성분 산패 측정 시험

국산 참기름, 중국산 참기름, 국산 들기름, 중국산 들기름, 그리고 갈색 거저리 기름을 상온에서 5개월간 보관한 뒤 산패도를 측정했다. 우리 지방산의 함량을 측정하고, 과산화물의 함량을 측정하여 산패 가능성과 산패 정도를 측정하였다. 5개월 뒤에 산가 및 과산화물가는 표 5-10 과 같다. 다른 식물성유에 비하여 갈색거저리유의 산가와 과산화물가는 훨씬 낮은 값을 보였다. 이는 사료공정서 기준 동물성유 산가 30에 비해 낮은 값이고, 식품공전 기준에 비해서도 안전한 수치를 보여준다. 이는 어분의 일반적 품질 기준인 산가 20, 과산화물가 20에 비교해도 낮은 수치이며 이 실험을 통해, 갈색거저리 기름의 경우, 5개월 이후에도 사용이 가능함을 확인하였다. 2015년 6월 3일~11월 3일 5개월 후 (표5-10)과 같이 지방선분의 산패를 측정하였다.

표 5-10. 원료별 산가, 과산화물가 함량

	산가	과산화물가	비고
갈색거저리유	2.39	6.43	사료 공정서 기준 30
국산 들기름	0.97	111.92	
중국 들기름	1.49	23.50	
한국 참기름	1.36	9.77	
중국 참기름	1.33	5.88	

▶ 식품 공전 : 산가 기준 참기름 4이하, 들기름 5이하

과산화물가 팜올레인유 5이하, 팜스테아릭유 3이하

마. 새우 곤충분 사료 2차 제조 (새우 성장도 및 면역지수 측정) 및 사양시험

1차년도와 같이 2차년도(2015년)에도 새우사료를 동일하게 제조하여 새우 성장도 및 면역지수 측정을 위한 수조내 시험을 실시하였다. 충남 당진에 있는 사조동아원 수조와 논산 수조를 활용하여 흰다리 새우를 육성하여 성장도 및 면역지수를 측정하는 자료로 활용하였다. 성장도는 2014년 태안 양식장 수조사험과 유사한 결과가 도출되었고, 면역지수 측정은 협동1연구팀에서 실시하였다.



그림 5-7. 2차년도 새우성장시험

바. 새우 곤충분 사료 3차 제조 (상용 익스트루더 사용) 및 사양시험

3차년도(2016년)에는 상용 익스트루더를 사용하여 야외 사양시험을 실시하였다. 충남 태안군 남면 소재의 사조동아원 부속 양식시험장에서 직접 흰다리 새우를 육성하여 성장도 및 면역지수를 측정하는 자료로 활용하였다. 시험사료는 경제성 등을 고려하여 곤충분 5%를 사용(어분의 25% 대체)하였다. (표5-11, 5-12) 지방산과 콜레스테롤 수치는 표5-13과 같았다.

표 5-11. 새우 호지 시험사료 배합비

Meal worm의 어분대체율	0%	25% 어분대체 (5% 곤충분사용)	
		38.85	5
SBM(Korea,47%)	37.62		
Meal Worm	0	5	
Fish Korea	20	15	
Squid liver Powder	10	10	
Dried Yeast	2	2	
Wheat fl(sauce)	22.44	23.2	
Fish Oil	1	0.45	
Choline-Liquid(50%)	0.1	0.1	
Liquid Methionine 71.7%	0.04	0.1	
Lecithin	1.5	.	
Limestone - S	1.5	1.5	
Mono Di Calcium Phosphate	2.5	2.5	
Salt	0.3	0.3	
Vita 8-Shrimp	0.5	0.5	
Mine H-Shrimp	0.5	0.5	
total	100	100	

표 5-12. 일반성분 및 아미노산 산출치

Nutrient (Basic compositions & Amino acids %)	Calculated	Calculated
#MO	10.65	10.46
##CP	38.01	37.99
##CFAT	6.04	6.00
##CFIBRE	2.24	2.59
##ASH	11.61	11.28
#CA	2.08	1.99
#P	1.56	1.59
#LYS	2.47	2.39
#MET	0.77	0.77
#CYS	0.50	0.50
#M+C	1.27	1.27
#THR	1.50	1.48
#TRP	0.52	0.50
#ILE	1.64	1.64
#ARG	2.57	2.55
#PHE	1.75	1.75
#HIS	0.97	0.97
#LEU	2.79	2.78
#TYR	1.14	1.22
#VAL	1.81	1.80
#ALA	1.72	1.71
#ASP	3.45	3.43
#GLU	5.55	5.39
#GLY	1.94	1.88
#PRO	1.64	1.66
#SER	1.55	1.55

표 5-13. 지방산 및 콜레스테롤 산출치

Fatty Acids	Calculated	Calculated
#C 14:0	0.54	0.53
#C16:0	2.30	3.65
#C16:1	0.67	0.72
#C18:0	0.46	0.77
#C18:1	2.10	3.77
#C18:2	1.80	2.26
#C18:3	0.29	0.27
EPA	0.64	0.47
DHA	0.48	0.39
Cholesterol	0.08	0.07

3차년도 새우사료 제조 및 현장실증시험의 과정에 대한 자료는 그림 5-8과 같다. 사양시험 기간은 2016년 5월6일 ~ 8월24일 질병 발생으로 포획하게 되었으며, 입식 어체중은 0.6그램 (호지별 입식미수 155,000 미 2구 = 310,000 미), 현장 사육 시험 결과, 대조군에 비해 시험군이 34% 성장이 빨랐다.

경제성 비교를 실시 한 결과, 이를 일반적인 새우양식 사료요구율 1.4에 비교하면 곤충분시험군의 사료요구율은 1.22로 볼 수 있다. 일반적인 새우 양식장 규모를 만 평으로 가정하면 수확량은 15톤. 새우성장을 고려하면 한 달 정도 수확이 당겨질 것으로 보이고 그만큼 비용이 감소됨. 하지만 곤충분 단가가 kg당 50,000 원이면 5% 사용해도 경제성이 없는 것으로 나타났다. 최소한 10,000 원/kg 이하로 단가가 떨어져야 할 것으로 사료된다. 하지만, 곤충분 가격이 10,000 원/kg 이라 하더라도, 사육성적이 계속 증명되지 않는 한, 표면적인 사료가격은 상승하게 되어 사료회사들이 어분보다 훨씬 고가인 곤충분을 사료원료로 사용하기에는 무리가 따를

것으로 보여진다. 하지만, 곤충분 중에서 동애등에의 가격은 Meal worm 보다 훨씬 저렴하게 제시되고 있다. 현실적인 면을 고려할 때, 동애등에를 이용한 어분 대체 시험도 필요할 것으로 사료된다.

새우사료 제조 및 사양시험 과정			
	<계량>	<분쇄 및 배합>	<제조>
<건조 및 냉각>	<포장>	<사양시험>	<수확 및 비교>

그림 5-8. 새우사료 생산 및 사양시험 과정

표 5-12. 새우사료에서 곤충분의 경제성 검토

		대조	시험(5%)	대조	시험(5%)
		곤충분 50,000 원/kg 가정		곤충분 10,000 원/kg 가정	
사료단가	(원/kg)	2,010	6,764	2,010	2,764
사료요구율		1.4	1.22	1.4	1.22
사료비용	원	2,814	8,234	2,814	3,365
50톤 수확시	사료비용(원)	140,700,000	411,721,739	140,700,000	168,243,478
kg 당	한달평균사료비	11,725,000	34,310,145	11,725,000	14,020,290
	인건비(원/2인/월)	8,000,000		8,000,000	
	전기요금(원)	5,000,000		5,000,000	
	기타비용	2,000,000		2,000,000	
소계		167,425,000	446,031,884	167,425,000	182,263,768

사. 넙치 곤충분 사료 3차 제조 및 사양시험

3차년도(2016년)에는 익스트루더를 사용하여 실제 사양시험을 실시하였다. 충남 태안군 남면 소재의 사조동아원 부속 양식시험장에서 직접 넙치 새우를 육성하여 성장도 및 면역지수

를 측정하는 자료로 활용하였다. 시험사료는 1년차 수조시험에서 좋은 성적을 보였던 곤충분 10%구를 시험구로 사용하였다.

표 5-12. 곤충분 광어 사료 배합비

	곤충분 0%	곤충분 10%
소맥분	21	21
어분	70	60
곤충분	0	10
오징어내장	3	3
건조효모	1.5	1.5
비타민	0.5	0.5
미네랄	0.2	0.2
콜린	0.2	0.2
비타민 E	0.1	0.1
스테아 C	0.1	0.1
타우린	0.2	0.2
어유	3.2	3.2
계	100	100

표5-13. 넙치사료의 일반성분과 아미노산 산출치

	곤충분 0%	곤충분 10%
수분	9.44	8.50
조단백질	53.95	52.01
조지방	10.45	13.50
조섬유	0.34	0.93
조회분	10.51	9.25
칼슘	2.07	1.77
인	1.70	1.52
라이신	4.10	4.09
메치오닌	1.46	1.37
시스틴	0.52	0.50
메치오닌+시스틴	1.98	1.87
트레오닌	2.23	2.10
트립토판	0.61	0.54
이소류신	2.23	2.12
알지닌	3.20	2.99
페닐알라닌	2.11	2.02
히스티딘	1.39	1.33
류신	3.89	3.71
타이로신	1.62	1.72
발린	2.63	2.49
알라닌	3.26	3.12
글루타민	7.03	6.48
글라이신	3.43	3.17
프롤린	2.35	2.33
세린	2.11	2.01

현장 사육 시험 결과 대조군에 비해 시험군의 성장이 15% 빨랐다. 이를 사료효율로 계산하면 대조군 일반적 사료효율 대비 1.4 대비, 곤충분 시험군의 사료효율을 1.22로 볼 수 있다. 일반적인 광어양식장 규모를 천평으로 가정하면, 년 수확량은 50톤이 가능하다. 넙치 성장을 고

려하면 한 달 정도 수확이 당겨질 것으로 보이고 그만큼 비용이 줄어들 것으로 보인다. 10% 사용시 경제성이 있으려면, 최소 10,000원/kg 이하로 떨어져야 한다. 하지만, 타 회사들과 경쟁관계에 있는 사료회사들이 사료가격에 반영시키기 위해서는 이보다 더 낮은 가격으로 공급되고 추가적인 사육시험과 검증이 이루어져야 할 것으로 보인다. 새우사료에서도 언급했듯이, 현실적으로는 어분가격에 거의 접근한 동애등에를 이용한 어분대체시험이 필요할 것으로 사료된다.

아. 사료자원화를 위한 곤충분의 형태 변경 시험

곤충을 건조시킨 후에 대두되는 문제가 고지방 함량에 따른 사료원료화 문제이다. 이를 해소하기 위하여 지방을 분리하여 사용하는 방법과 대두박 등의 저지방 원료와의 혼합 후에 사용하는 방안, 그리고 효소처리하여 코팅처리하는 방안 등을 들 수 있다.

대두박과의 혼합			
	<대두박>	<대두박과 밀웜 혼합분쇄>	<밀웜:대두박 1:1>
	<밀웜1:대두박2>	<밀웜:대두박 = 1:2>	<오징어 내장>

그림 5-9 . 곤충분과 대두박의 혼합

대두박과의 혼합은 대두박 : 곤충분 비율을 1:2로 하는 것이 분쇄 등에서 1:1로 하는 것보다 나은 것으로 나타났다. 곤충분에 효소처리하여 페이스트화 하는 것은 효과가 나타나지 않았다. 결론적으로 갈색거저리의 경우, 곤충유와 곤충박을 분리해서 사용하거나, 대두박 등의 저지방 박류와 혼합해서 사용하는 것이 분쇄 등에서 문제를 일으키지 않을 것으로 보여졌다.

곤충분에 효소처리			Alcalase 0.1% Flavourzyme 0.1%
이용성 및 기호성 증대	<밀웜>	<단백질 분해효소>	<효소처리내용>

그림 5-10. 곤충분에 효소 처리 시험

자. Aquaponics에서 곤충사료의 이용 가능성 점검

현재, 세계적으로 관심을 모으고 있는 어류 양식과 식물재배를 병용하는 Aquaponics 형태의 시험을 실시하였다. 수조에서는 철갑상어를 기르면서 곤충사료를 급여하고, 상면여과조에서는 어류가 배설한 분을 이용하여 토마토를 재배하는 실험을 실시하였다. 사료 섭취 후 배설되는 분뇨를 이용하여 토마토를 재배하였고, 수질도 양호하게 관리되었다. 이를 통해 곤충분을 사용한 배합사료를 이용하여 Aquaponics 양식도 가능할 것으로 사료되었다.

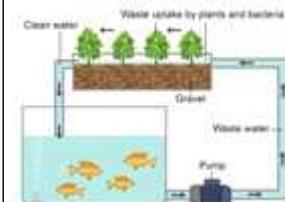
Aquaponics에서 곤충사료 사용가능성 점검			
	<Aquaponics 개념도>	<곤충분 사용 양어사료>	<수조사육>

그림5-11. Aquaponics 간이 시험

차. 곤충분 사료를 이용한 철갑상어 양식

충남 태안에서 곤충분이 5% 함유된 사료와 그렇지 않은 사료를 이용하여 철갑상어의 양식을 실시하여 성장, 생존율 등을 비교하였다. 기간은 2016년 11월 9일부터 2016년 12월13일까지였으며, 대조구는 어분주체의 새우사료를 사용하였고 시험구는 곤충분이 5% 함유된 새우사료를 사용하였다. 공시 시험어종은 철갑상어로, 학명은 *Acipenser transmontanus* 15g 전후의 개체를 사용하였다.

미당 증체율은 유사한 결과를 도출하였으나, 사료요구율은 어분군이 곤충분군보다 나은 결과를 얻었다. (1.71 대 2.18). 하지만 생존율은 곤충분 군이 어분군보다 나은 결과를 얻어 (94.2% 대 76.9%) 전체적으로는 비슷한 결과를 보였다. 따라서 철갑상어에도 곤충분을 어분 대신 사용하는 것이 가능하다고 보여진다.



그림 5-12. 곤충분 함유 사료를 이용한 철갑상어 양식 시험

표 5-14. 철갑상어 사양시험 결과

어분(총 52미)		곤충분5%(총 52미)	
개시평균어체중(g)	14.04	개시평균어체중(g)	15.5
종료평균어체중(g)	21	종료평균어체중(g)	22.3
전체사료섭취량(g)	476.1	전체사료섭취량(g)	727.4
미당사료섭취량(g)	11.9	미당사료섭취량(g)	14.84
전체증체량(g)	110	전체증체량(g)	290
미당증체량(g)	6.96	미당증체량(g)	6.8
미당증체율(%)	49.58	미당증체율(%)	43.93
사료요구율	1.71	사료요구율	2.18
생존율(%)	76.92	생존율(%)	94.23

카. 곤충분 사용에 관한 매뉴얼

(1) 사료관리법상, 동물성단백질내 유해물질 기준을 충족하는 것으로 한다.

표 5-15. 갈색거저리내 유해물질 함량과 사료관리법상 기준

	기준(ppm 이하)	갈색거저리	사료관리법
비소	40	흔적	유해물질(11조1항)
카드뮴	1800	흔적	유해물질(11조1항)
수은	0.5	0.027	유해물질(11조1항)
납	10	흔적	유해물질(11조1항)
크롬	100	흔적	유해물질(11조1항)

(2) 어분을 대체하는 실험에서 어분의 10%를 대체하여도 전혀 문제가 없었다. 따라서, 어분의 품질관리 기준에 부합하도록 다음과 같이 관리기준을 설정한다.

표 5-16. 곤충분에 대한 품질관리 매뉴얼

	내용	비고
1.어분대체비율	10%	사양시험 결과 참조
	산가 10mg KOH/g	어분 20 mg KOH/g
	과산화물가 10 meq/kg	어분 20 meq/kg
	비단백태질소 0.08%	동물성단미원료
	항산화제 150g/M/T	사료관리법
	수분 10% 이하	어분 10%이하가 일반적
	Histamine 300 ppm이하	Histidine 변성물질
	납 10 ppm 이하	
	수은 0.5 ppm 이하	
	크롬 100 ppm 이하	
	비소 40 ppm 이하	
	카드뮴 1800 ppm 이하	
	아플라톡신 10 ppb 이하	
	오크라톡신A 200ppb 이하	
	펩신소화율(0.2%) 90%이상	
	조지방 40% 이하	
	조단백질 45% 이상	
2.품질기준	농약 유기인계, 유기염소계	사료관리법 기준
	살모넬라 D그룹 : 불검출	
	휘발성염기태질소0.5%미만	

제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

제1절 : 목표대비 달성도

당초 목표	가중치(%)	개발 내용	달성도(%)
1) 양식어류 사료용 곤충 대량 생산 체계 구축	30%	1) 생산성 향상을 위한 사육 효율 극대화 기술 개발	100%
2) 새우와 넙치에서 사양시험/영양학적가치/독성시험 및 양식장에서의 실증 시험과 수질/환경분석 분석	50%	2) 기준사료와 곤충사료에 의한 양식 어류(새우와 넙치)의 면역반응/항병원성/영양학적 가치 분석/새우와 넙치의 장내 세균총 변화 및 수중미생물 환경 분석	100%
3) 곤충사료를 실제로 제조하며 품질관리 매뉴얼을 작성	20%	3) 곤충사료의 품질 균일화 기술 개발 및 품질 기준 확정	100%
	100%		100%

제2절 : 정량적 성과(논문게재, 특허출원, 기타)를 기술

성과지표명	연도	당초 목표 (전체)	실적	달성도 (%)	가중치 (%)
논문게재	SCI	10	11	110	20
	비SCI	3	5	167	20
산업재산권	출원	3	5	167	20
	등록	1	2	200	5
학술발표	국제	4	10	250	10
	국내	10	13	130	10
품종	출원				
	등록				
기술이전					
정책자료 기관제출					
영농기술·정보 기관제출					
생물자원 등록 · 기타					
홍보성과		10	33.6	336	5
계		43	81.6	190	100

* ATIS 승인 기준

* 달성도(%) = (실적소계/당초목표전체) × 100

제 5 장 연구 결과의 활용 계획

제1절 : 사업화

- 최근 양식산업으로부터 어류의 생산량은 매년 증가하고 있으며 이와 더불어 배합사료의 생산량 또한 증가하고 있으나 그 배합사료의 주원료인 어분은 과거 다획성 어류의 어획량의 감소, 소비의 급격한 증가등으로 매년 그 가격이 상승하고 있음. 그러므로 양식어류의 주요 단백질원으로서 어분을 대신할 대체물의 개발을 위한 연구가 전 세계적으로 수행되고 있으며, 곤충사료의 제조 및 품질관리 기술의 확보를 통해 관련 특허를 출원 하고, 유관 기관 및 업체에 기술이전 후 기술이전료를 정수하여 정부 재정에 기여하고, 정부 핵심 과제 중 하나인 어분 대체용 곤충자원의 사업화에 구체적으로 기여할 수 있음.
- 곤충자원을 양질의 단백질 공급원으로 활용함과 동시에 품질관리 기술의 확립을 통해 상용화를 이룩하며 애완용, 화분매개용, 해충방제용 등 농업적 측면에서의 활용 가치에 추가하여 중요성을 부각시켜 곤충산업 활성화에 기여할 것으로 사료됨.

제2절 : 현장적용계획

- 선행 연구를 통해 확보된 연구 자료는 유용곤충 산업 발전 방안 수립에 기여하며 실제 활용도 높은 곤충자원의 고부가가치화에 활용하여 침체된 국내 사료 원료 업계 및 창조경제를 실현하는 신 부가가치 산업으로 홍보하여 새로운 성장동력으로서 농촌 경제 활성화에 기여할 수 있음.
- 특허출원 및 연구개발 결과의 해외 발표를 통해 세계적으로 주목받는 곤충자원의 활용에 있어 대한민국 원천기술의 기반을 마련하며, 개발된 사료는 상용화를 통해 국내 사료시장의 비용절감 및 시장 확대에 기여하며, 수출을 통해 시장 확대 및 국내의 발전된 사료 기술을 해외에 홍보하고 수출을 통해 시장을 확대하여 국가 경제에 기여하는 것을 목표로 함.

제3절 : 기대성과 및 파급효과

- 수입산에 의존하고 있는 어분 위주의 양식 어류용 사료 원료 개발에 있어 국내 사료 자원으로서의 곤충자원의 개발 및 이용에 기여하여 농업 발전에 기여하며, 동물자원과학, 수의학의 연계 및 생명공학기술 및 농업생명과학 관련 학문이 동반 발전하여 국가 기술 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 기대됨.
- 국내 양식 농가의 대표적 양식 어종인 넙치와 고부가가치산업으로 동남아시아 등지로의 수출산업으로서의 잠재력을 보유한 새우의 곤충사료에 의한 성장단계별 영양소 요구량을 정확히 밝히고 양어용 사료의 어분 대체비율을 확립하여 양식어종의 체계적인 단계별 사양관리 표준을 확립하고, 독성시험 및 면역학적/영양학적 효용성과 항병원성의 기전까지 분석함으로서 본 선행기술 연구를 토대로 다양한 목적을 가진 양식 어종에 확대 적용 가능한 영양학적 지표 설정, 단계별 표준 사양관리 지침 설정을 통해 농촌진흥청 주도의 곤충자원 활용 시스템의 국제적 주도권을 확보하고 어종별 생산효율성에 기여하고 최종적으로 양식용 사료 제조 비용의 절감으로 농촌경제에 신성장동력을 창조하여 농촌경제 발전에 기여할 수 있을 것으로 사료됨.

- 지구온난화와 기상이변으로 인해 바다수온이 평상시보다 약 3°C 상승하며 어분용 엔쵸비 생산이 감소하고 중국의 수산양식 증가로 전 세계적인 어분 수요는 지속적으로 증가하고 있으나, 어분과 같은 단백질 사료원은 세계적으로 급증하고 있는 양식산업 및 축산업의 수요량에 미치지 못하고 있는 실정으로 사료비를 높이는 주요 요인 중의 하나로 본 선행연구를 통해 새로운 사료원료 시장을 개척하여 국내 곤충산업의 활성화 및 농촌경제에 활력을 불어 넣을 수 있을 것으로 사료됨.
- 곤충자원을 활용한 사료 고품질의 단백질원료의 국내 개발을 통하여 국내 사료산업 및 농업식품산업의 안정화와 신뢰 구축에 기여하고, 과학적인 연구개발을 통해 곤충사료의 상업화를 이룩한다면 국내 사료 기술에 대한 소비자의 신뢰도를 회복할 수 있을 뿐 아니라 기존 영농활용기술과의 연계로 국내 농업자원으로서의 곤충자원의 개발 및 시장 활성화에 기여하며, 산업재산권 확보에 의한 국가 경쟁력의 제고가 가능할 것으로 기대됨.
- 창조경제의 전략적 접근법으로서 곤충사료의 개발은 저비용/고효율의 제품 생산 기술의 확립 및 품질 관리법의 확립으로 전통적인 사료 시장에 새로운 활력소를 부여 가능하며, 상상력과 창의력을 핵심 경제력으로 다양한 형태의 곤충유래 사료를 개발하여 수입 위주의 사료 원료 시장에 활력을 부여하고 수출주도 산업으로의 변신을 꾀할 수 있을 것임.

제 6 장 연구 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보

‘곤충을 이용한 양식어류용 사료 원료 개발’기술 분야의 연도별 전체 특허동향을 살펴보면, 1983년 출원을 시작으로 하여 2000년대 이후 증가세를 보이고 있다. 중국이 353건으로 전체의 74% 점유율을 차지하면서 특허출원이 가장 활발하며, 특허동향의 흐름을 주도하고 있어, 전체 특허동향과 동일한 흐름을 보이고 있다. 구간별 출원인수와 출원건수의 증감정도의 분석을 통한 특허기술 성장단계를 살펴보면, 기술혁신 주체인 출원인수와 기술혁신의 결과인 출원건수가 동시에 증가하는 것으로 나타나 성장기 단계에 있는 것으로 분석되었으며, 최근 급격한 기술개발이 이루어지고 있는 것으로 분석된다. ‘곤충을 이용한 양식어류용 사료 원료 개발’기술 분야의 주요 출원인 Top20을 추출한 결과, 제 1출원인은 34건을 출원한 중국의 合肥市好旺養殖科技有限公司로 나타났으며, 딱정벌레목의 사료개발기술 분야가 주력 기술분야이고, 모두 자국(중국)에만 출원하고 있다. 연도별 세부기술 출원동향을 살펴보면, 딱정벌레목 기술 분야가 가장 큰 점유율(41%)를 차지하고 있고, 2005년 이후 급격히 증가하는 추세를 나타낸다.

세부기술별 IP출원국 분석을 통해, 주요 시장에서 어떠한 세부기술이 중점적으로 특히 출원되고 있는지 살펴본 결과, 중국이 대부분 분야에서 다른 주요국보다 많은 출원을 하고 있고, 특히 딱정벌레목 분야에 대한 집중도가 높은 것으로 분석되었으며, 그 중에서도 딱정벌레목의 사료개발기술 분야에 대한 집중도가 높은 것으로 분석되었다. 가장 많은 점유율을 차지하고 있는 딱정벌레목의 세부기술에 따른 이용곤충을 살펴보면, 사육기술 분야, 사료개발기술 분야, 유지가공 및 추출기술 분야, 곤충유래 기능성 물질 이용기술 분야 모두 갈색거저리의 이용이 압도적으로 많은 것으로 나타난다. 또한 사료개발기술 분야에서는 조류의 사료에 집중되어 기술개발이 이루어지고 있는 것으로 나타난다.

제 7 장 연구 개발 결과의 보안 등급

보안 등급 분류	보안	일반
		<input type="radio"/>
결정 사유	「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음	

제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

○ 기술적 위험요소 분석

- 연구실 안전조치 이행계획 수립

○ 안전관리대책

- 실험실 안전 점검 : 매일 1회 일상 점검 및 매주 1회 정기 점검
 - 일반사항 : 비상출입구, 비상연락망, 비상시 행동요령, 응급치료용구, 정리·정돈 상태
 - 소방시설 : 소화기비치, 소화전 위치표시, 감지기 및 유도등, 난방기구 사용상태
 - 전기시설 : 전기배선 및 차단기, 과부하 사용상태, 전열기 사용
 - 화학약품 : 시약관리대장, 폐기물보관 및 처리, 안전장비, 환기시설(후드, 환풍기)
 - 가스시설 : 관리대장, 가스기구상태, 보관함, 가스배관, 연결호스
- 실험실 안전교육 : 12시간/년 (총 36회)
 - 전기안전방법, 소화기 사용방법 숙지, 비상시 행동요령, 시약 안전 사용 및 보관방법, 폐기물 보관 및 처리 방법

○ 과제 수행단계에서 발생될 수 있는 위험요소: 실험실내 분자생물학적 분석 시 시약에 의해 발생할 수 있는 개인 위험요소만 존재하였다.

○ 과제의 연구책임자 및 연구원은 중부대학교 산학협력단과 전북대학교 산학협력단, 동아원(주)에서 실시하는 연구실 안전교육을 정기적으로 수행하였다.

○ 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 시행규칙에 의거하여 세부 및 협동 과제의 연구활동에 종사하는 연구책임자는 정기적으로 소속 대학이 실시하는 건강검진을 받았다.
(2014~2016년 교직원 건강검진: 중부대학교, 전북대학교)

○ 과제 수행단계에서 발생될 수 있는 위험요소를 분석 한 결과, 실험실 내 경미한 안전사고의 가능성 이외에 사료제조공정상에서는 무인화가 이루어 져 있으므로 위험요소가 존재하지 있으며, 실제 3년간의 연구기간 중 한번도 안전사고 등의 문제점이 발생 한 적이 없었다.

제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문제재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문제재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	Effects of agricultural byproducts, DDG and MSG, on the larval development of mealworms	농과원	주저자	대한민국		2016. 06. 20	단독사사	비SCI
2	논문	갈색거저리 대량사육을 위한 농업부산물 대체 먹이 탐색	농과원	주저자	대한민국		2014. 10. 27	단독사사	비SCI
3	논문	Effects of Korean Red Ginseng marc with aluminum sulfate against pathogen populations in poultry litters	중부대	주저자	대한민국		2015.10	단독사사	SCI
4	논문	Topical allogeneic platelet-rich plasma treatment for a massive cutaneous lesion induced by disseminated intravascular coagulation in a toy breed dog	중부대	주저자	대한민국		2015.03	단독사사	SCI
5	논문	Successful Treatment of Severe Bumble foot in a Northern Goshawk (<i>Accipiter gentilis</i>)	중부대	주저자	대한민국		2015.09	단독사사	비SCI
6	논문	Prevalence of canine behavior problems related to dog-human relationship in South Korea-A pilot study	중부대	주저자	대한민국		2016.04	단독사사	SCI
7	논문	Sorafenib potentiates A B T - 737 - induced apoptosis in human oral cancer cells	중부대	주저자	대한민국		2016.10	단독사사	SCI
8	논문	Dendropanax morbifera Léveillé extract ameliorates memory impairments and inflammatory responses in the hippocampus of streptozotocin-induced type 1 diabetic rats	중부대	주저자	대한민국		2016.12	단독사사	SCI
9	논문	Identification and antibiotic resistance profiling of bacterial isolates from septicemic soft-shelled turtles (<i>Pelodiscus sinensis</i>)	중부대	주저자	대한민국		2016.12	단독사사	SCI
10	논문	Antibiotic resistance and repetitive-element PCR (rep-PCR) fingerprinting in <i>Aeromonas veronii</i> isolates	중부대	주저자	대한민국		2016.12	단독사사	SCI
11	논문	Growth performance and fatty acid profiles of broilers given diets supplemented with fermented red ginseng marc powder combined with red-koji	중부대	주저자	대한민국		2016.12	단독사사	SCI

12	특허출원	거저리과 유충의 사육용 사료조성물	농과원	주저자	대한민국		2015. 11. 10		
13	특허출원	갈색거저리를 이용한 새우 사료용 조성물 및 이의 제조방법	동아원		대한민국		2016.08		
14	영농활용 기관제출	아메리카왕거저리 용화율 향상 기술	농과원				2015. 11		

제 11 장 기타사항

○ 과제책임자 변경

세부과제명	당초계획	변경내용	변경사유 (근거문서 포함)
양식어류 사료용 곤충 대량 생산 기술 개발	주관과제 및 제1세부과제 책임자: 김남정	주관과제 및 제 1세부과제 책임자: 이경용	곤충산업과-549 (2016.3.22.)

제 12 장 참고문헌

Choi HS, Kim SA, Shin HJ, 2015, Present and Perspective on Insect Biotechnology, KSBB Journal, 30(6): 257–267.

Despins JL, 1994, Feeding behavior and growth of turkey poult fed larvae of the dakling beetle (*Alphitobius diaperinus*), Poult Sci, 74: 1526–1533.

Gourlet G, Mullier P, Sinaeve P, Brisson GJ, 1978, Nutritional evaluation of dried *Tenebrio molitor* L. larvae in the rat, Nutrition Reports International, 18: 11–15.

Hale OM, 1973, Dried *Hermetia illucens* larvae (Stratiomyidae) as a feed additive for poultry, Journal of the Georgia Entomological Society, 8: 16 - 20.

He K, Xu ZQ, Dai PL, 2006, The parasitizing behavior of *Scleroderma guani* Xiao et Wu (Hymenoptera: Bethylidae) wasps on *Tenebrio molitor* pupae, Acta Entomol Sin, 49(3): 454–460.

Hernandez C, 1987, Elaboration of a sweet yellow mealworm *T. molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). Thesis. University of Quimica, Auton, Mexico.

Huang Q, Zhou ZJ, Yang W, Hu J, Yang CP, 2005, Screening substitute hosts for mass rearing of *Scleroderma sichuanensis* Xiao (Hymenoptera: Bethylidae), Acta Entomol Sin, 48(3): 375–379.

Huang Q, Zhou ZJ, Zhou DG, Hu J, Yang W, Yang CP, 2006, Analysis of nutritional component of *Tenebrio molitor* L. pupa, Sichuan J Zool, 25(4): 809–813.

Huang Q, Zhou ZJ, Zhou DG, Hu J, Yang W, Yang CP, 2007, Analysis of nutritional components of seven species of insects, Acta Nutr Sin, 29(1): 94–96.

Huang Q, Hu J, Zhou DG, Sun L, Ruan HB, Wang XN, Chen G, Zhu TH, Yang CP, Yang W, 2011, Comparison of growth, development, survivorship and food utilization of two color varieties of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), Acta Entomol Sin, 54(3): 286–292.

Kim SY, Chung TH, Kim SH, Song SH, Kim NJ, 2014, Recycling Agricultural Wastes as Feed for Mealworm (*Tenebrio molitor*), Korean J Appl Entomol, 53(4): 365–371.

Kim SY, Park JB, Lee YB, Yoon HJ, Lee KY, Kim NJ, 2015, Growth characteristics of mealworm *Tenebrio molitor*, J Seric Entomol Sci, 53(1):1–5.

Koo HY, Kim SG, Oh HK, Kim JE, Choi DS, Kim DI, Kim IS, 2013, Temperature-dependent development model of larvae of mealworm beetle, *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae), Korean J Appl Entomol, 52(4): 387–394.

Lagunes LA, Garcia L, 1994, Two Insects Productivity Obtained by Recycling of Organics Made of Animal and Vegetable, Ph. M. Thesis, University of Ciencia, Auton, Mexico.

Li LY, Zhaob Z, Liua H, 2012, Feasibility of feeding yellow mealworm (*Tenebrio molitor* L.) in bioregenerative life support systems as a source of animal protein for humans, Elsevier, 92(1): 103–109.

Liu YS, Choi YC, Song HS, 2011, Breeding and using technology of yellow mealworm beetle (*Tenebrio molitor*), NIAST, RDA, KOREA, pp. 14–30.

Newton GL, Booram CV, Barker RW, Hale OM, 1977, Dried *Hermetia illucens* larvae meal as supplement for swine, J Anim Sci, 44:395–400.

Ramos-Elorduy J, Avila GE, Rocha HA, Pino JM, 2002. Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to recycle organic wastes and as feed for broiler chickens, J Econ Entomol, 95(1): 214–220.

Ravzanaadii N, Kim SH, Choi WH, Hong SJ, Kim NJ, 2012. Nutritional Value of Mealworm, *Tenebrio molitor* as Food Source, International Journal of Industrial

Entomology, 25(1): 93–98.

St-Hilaire S, Cranfill K, McGuire MA, Mosley EE, Tomberlin JK, Newton L, Sealey W, Sheppard C, Irving S, 2007, Fish offal recycling by the Black Soldier Fly produces a foodstuff high in omega 3 fatty acids. Journal of the World Aquaculture Society, 38(2): 309–313.

Tian SP, Xu ZQ, 2003, Effects of different temperatures on the development of *Scleroderma guani* reared with *Tenebrio molitor*, Entomol Knowl, 40(4): 356–359.

Wu H, Wang XY, Li ML, Yang ZQ, Zeng FX, Wang HY, Bai L, Liu SJ, Sun J, 2008, Biology and mass rearing of *Sclerodermus pupariae* Yang et Yao (Hymenoptera: Bethylidae), an important ectoparasitoid of the emerald ash borer, *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) in China, Acta Entomol Sin, 51(1): 46–54.

Ye XQ, Su P, Hu C, 1997, Chemical analysis and evaluation of protein and fat for yellow mealworm (*Tenebrio molitor* L.), J Zhejiang Agric Univ, 23(S): 35–38.

Yoo JM, Hwang JS, Goo TW, Yun EY, 2013, Comparative analysis of nutritional and harmful components in Korean and Chinese mealworms (*Tenebrio molitor*), J Korean Soc Food Sci Nutr, 42(2): 249–254.

Zanuncio JC, Zanuncio TV, Guedes RNC, Ramalho FS, 2000, Effect of feeding on three Eucalyptus species on the development of *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) fed with *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), Biocontr Sci Tech, 10(4): 443–450.

주 의

1. 이 보고서는 농촌진흥청에서 시행한 「농업정책지원기술개발사업」의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농촌진흥청에서 시행한 「농업정책지원기술개발사업」의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.