

발간등록번호

11-1543000-001173-01

곤충자원을 이용한 양돈사료화
이용 기술 및 제품 개발

Development of alternative feed ingredient for swine
using insect resources

국립농업과학원

농림축산식품자료실



0015911

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “농생명산업기술개발사업” 과제(세부과제 “곤충자원을 이용한 양돈사료화 이용 기술 및 제품 개발”)의 보고서로 제출합니다.

2015 년 12 월 29 일

주관연구기관명 : 국립농업과학원

주관연구책임자 : 김 남 정

세부연구책임자 : 김 남 정

연 구 원 : 김성현, 이영보, 박해철,

연 구 원 : 윤형주, 이경용, 이명자,

연 구 원 : 오서연, 이세진, 김경대,

연 구 원 : 유정선, 김종철, 이미룡,

연 구 원 : 심유현, 김시현, 홍진수,

연 구 원 : 김현진, 정우림, 유한빛,

연 구 원 : 김동봉, 이충희, 인주식,

연 구 원 : 안소영

협동연구기관명 : 전북대학교

협동연구책임자 : 김 재 수

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 김 유 용

협동연구기관명 : 은진바이오

협동연구책임자 : 김 동 봉

요 약 문

I. 제 목 : 곤충자원을 이용한 양돈사료화 이용 기술 및 제품 개발

II. 연구성과 목표 대비 실적

(1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		특허		신품종				논문		기타
		출원	등록	품종명칭 등록	품종생산 수입 신고	품종보호		SCI	비SCI	
						출원	등록			
1차 년도	목표	1							1	
	달성	2						1		국제학술발표 1건 국내학술발표 1건
2차 년도	목표	1						2	3	
	달성	1						2	1	국제학술발표 3건 국내학술발표 4건
3차 년도	목표	1	1					2	2	
	달성		2					1	2	국제학술발표 1건 국내학술발표 6건
계	목표	3	1					4	6	
	달성	3	2					4	3	국제학술발표 5건 국내학술발표 11건

(2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	2	2		2	3	
	달성	3			3	3	

Ⅲ. 연구개발의 목적 및 필요성

<목적>

사료용 곤충의 연중 안정적인 대량 생산체계를 확립하고, 폐지의 각 사양단계에 따른 거저리의 사료 이용성 검증과 활용방안을 제시하며, 사료용 고급 단백질원 (어분 등) 대비 사료효율 3% 이상 향상되는 고품질 곤충자원 사료제품을 개발하고자 함.

<필요성>

- 일반적으로 곤충은 영양성분이 높으며 단백질과 지방, 광물질 및 비타민을 풍부히 함유하고 있고, 아미노산 조성은 대부분의 케이스에서 곡물이나 콩류에 비해 우수하고 단쇄 불포화 지방산이 풍부함.
- 구제역 등 질병으로 인한 사료 내 단백질 원료에 대한 안정성논란과 바이오가스 생산 및 무분별한 어획으로 가격이 폭등한 대두박과 어분의 대체원료 사료를 개발하기 위해 곤충의 사료화에 관심이 증대되었음.
- 어분을 사료화 곤충으로 대처할 경우 사료용 단백질원 수급에 매우 긍정적인 효과를 보일 것으로 추정되며, 자돈사료 생산량 165만톤의 5%를 대체한다면 곤충을 사용한 사료시장 참여로 곤충산업기반이 확대될 것으로 기대됨.
- 곤충을 이용한 사료는 매우 안전하고 저단가의 고품질 단백질 사료의 생산을 가능하게 할 수 있으며, 대량생산체계를 구축함으로써 품질 및 공급을 안정시킬 경우 대두박 및 어분을 대체할 수 있는 단백질사료 시장을 개척할 수 있을 것으로 사료됨.

Ⅳ. 연구개발 내용 및 범위

사료용 곤충의 대량생산체계 확립: 지역별 계대사육을 통해 갈색거저리 우수계통을 선발하였고, 산란성 향상을 위한 최적의 생식 환경 조건을 구명하기 위해 온도별 (17.5, 20, 22.5, 25, 27.5, 30℃) 산란성 시험과 최적의 인공사료 개발을 위해 단백질 공급방법을 탐색하였으며, 부화율 향상 조건 구명을 위해 기류형성 유무에 따른 알 보호 사육조건을 조사하였음.

사료용 곤충 생산비용 절감 기술 개발: 번데기 보호 및 우화성충의 수거를 위해 사육상자의 사료에 혼합된 갈색거저리의 배설물을 자동으로 분리 및 배출할 수 있게 하는 거저리 배설물 분리장치를 개발하였고, 수분공급용으로 주는 채소 및 과일을 대체하기 위해서 수분공급용 젤리를 개발하였음. 또한, 사육 담당자의 노력 강도를 고려한 유충사육 표준상자 디자인을 개발하였고, 생산된 갈색거저리의 건조방법을 구명하고자 건조방법에 따른 갈색거저리 영양성분 분석을 실시하였으며, 농가실태조사 및 실증실험을 하고자 전국 갈색거저리 생산농가 및 업체에

대한 생산판매실태를 조사하였음.

사료용 곤충의 실내 대량생산 기술 매뉴얼 개발: 갈색거저리의 특성, 증식기구 해명, 보존 및 관리, 기능성 분석 등에 관한 내용으로 구성된 실내 대량사육 시스템을 확립하기 위한 매뉴얼을 작성하였고, 주류부산물을 활용하여 양질의 저렴한 먹이원을 개발하고자 맥주박, 막걸리박 첨가에 따른 갈색거저리 유충의 발육특성을 조사하였으며, 갈색거저리의 사료용 곤충으로서의 가치를 제고하기 위해 경제성 분석 및 곤충용 사료의 사료효율 조사를 실시하였음.

사료용 곤충의 안정적인 사육환경 조건 확립: 갈색거저리 사육온도에 따른 발병률, 역학 조사를 위해 다양한 온 (20, 25, 30, 35℃)/습도 (저습, 중습, 고습) 조건에서의 병원성을 조사하였으며, 적정 사육 온, 습도 조건 확립을 진행하였음. 또한, 갈색거저리에 병원성을 보이는 다양한 미생물을 분리하였으며, 분리된 미생물(곤충병원성 곰팡이)을 효과적으로 억제하기 위해 시중에 유통 중인 총 40개의 살진균제를 이용한 실험을 진행하였음.

사료용 곤충의 안정적 공급 체계 구축: 갈색거저리 사육과정 중에 발생할 수 있는 미생물을 방제하기 위해 fluazinam과 mancozeb을 밀기울에 spray 처리하여 미생물을 억제하고자 하였음. 또한, 탄력적인 갈색거저리 출하방법을 구명하기 위해 다양한 기간별 (1, 3, 5, 7, 14일)로 산란을 받아 성장 발육 동기화 실험을 진행하였으며, 종태별 보존기술 개발을 위해 알과 번데기를 각각 4℃에 보관 후 2, 4, 6, 8, 10, 12주 간격으로 부화율과 우화율을 조사하는 연구를 수행하였음.

사료용 곤충의 품질 균일화 기술 개발 및 사료의 기능성 제고: 갈색거저리 유충을 Petri dish 조건 (1/10/20/30/40/50 마리)에서 사육함으로써 사육 기간별 길이, 무게 측정 및 단백질 함량을 비교를 통해 대량 사육을 위한 적정 개체군 밀도 연구를 수행하였음. 또한, 다양한 온도별 사육(20, 25, 30, 35℃) 조건에서의 갈색거저리 유충의 충체의 길이, 무게 측정 및 단백질 함량의 비교를 통해 최적 수거시기를 구명하였으며, 갈색거저리 유충의 사료첨가물로서의 약리 효과 검증에 위하여, 갈색거저리 유충 내에서 증식이 가능한 유용 미생물인 *B. bassiana* JEF-133과 4가지 세균인 *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*에 대한 항세균 효과를 확인하였음. 더불어 갈색거저리 유충에서의 antimicrobial peptides (AMPs)의 발현을 통해 사료 첨가제로서의 갈색거저리 유충의 기능성 확보방법에 대한 연구를 수행하였음. 추가적으로 색거저리 유충의 소화 촉진을 위하여 *Cordyceps* 균주를 이용한 갈색거저리 유충 발효조건 실험을 통하여 소화 촉진에 대한 기초 데이터를 확보하였음.

거저리 사료의 영양성분 및 사료 특성 규명: 사료 원료로 사용 가능한 거저리를 사육단계(유충 및 성충)를 나누어 각각의 시료 별로 사료의 특성 중 사료 배합 시 중요한 영양적 지표로 사용되는 수분 함량, 조단백 함량, 조지방 함량 및 조회분 함량의 4가지 일반성분을 분석하였음. 또한 영양성분 분석을 위해 중요 광물질 함량을 분석하였으며, 아미노산과 지방산 조성을 분석함으로써 거저리의 영양학적 특성을 규명하였음.

자돈에서의 곤충 사료의 이용형태 및 사용 가능 수준 규명: 자돈사료 내에서 곤충 원료로써 거저리가 이용 가능한 형태를 확인하기 위해 유충과 성충, 그리고 거저리 부산물로 생산되는 배지를 이용해 급여실험을 하였음. 결과적으로 자돈 사료 내에 이용 가능성을 판단할 때 유충, 성충 그리고 배지 모두 자돈의 영양학적·생리학적 특성들에 부정적인 영향을 거의 주지 않음으로써 형태에 상관없이 원료사료로써 이용이 가능할 것으로 생각됨. 또한 각각 원료 형태 실험들에서 수준별 급여를 실시함으로써 자돈 사료 내에 원료 사료로써 거저리 및 거저리 부산물의 급여 가능 수준 역시 규명하였음.

번식모든에서의 곤충 사료 활용 방안 제시: 임신돈 및 포유돈 시기에 거저리를 이용한 실험 사료를 급여함으로써 번식 모든에서 거저리 원료가 곤충 사료로써 활용 가능한지에 대한 실험을 진행하였고, 그 결과 단백질 원료를 일부나마 대체가 가능할 것으로 분석하였음. 또한 영양학적인 특징뿐만 아니라 번식 생리에 미치는 영향까지 고려하여 실험 결과를 측정하여 결과적으로 번식모든에서 활용 가능성을 분석·제시하였음.

다른 동물성 단백질 사료와의 비교검증: 번식돈 및 자돈에서 주로 활용되는 동물성 단백질 사료인 어분과 유제품을 바탕으로 거저리가 이들 동물성 단백질 원료들을 대체할 수 있는지 비교검증을 실시하였음. 자돈 실험에서는 어분 및 기타 동물성 단백질 원료들을 대체할 수 있는지와 관련된 실험을 진행하였으며 번식돈 실험에서는 포유돈 사료에서 어분을 대체할 수 있는지를 바탕으로 어분, 유단백과 거저리의 비교 검증 실험을 진행하였음.

V. 연구개발결과

사료용 곤충 후보종(갈색거저리, 동애등애, 왕귀뚜라미, 슈퍼밀웍)의 영양성분 분석 결과를 토대로, 사료용 곤충으로 갈색거저리를 선정하였고, 갈색거저리 대량생산에서 우량종을 선별하고 계통을 유지하는 것이 중요하기 때문에 지역별 계대사육을 실시하여 우수개체를 선발하였다.

온도별 성충의 산란성 및 수명을 조사함으로써 산란성 향상을 위한 최적의 생식 환경조건을 구명하고자 하였고, 온도별 성충 경과일수에 대한 패턴을 분석한 결과, 유충의 효율적인 생산을 위해 사육조건은 27.5도가 가장 이상적인 조건임을 알 수 있었다.

사육 환경 및 먹이 관리를 잘 해주면 산란기간을 연장하고, 산란량을 증가시킬 수 있다. 단백질원별 먹이 선호성을 조사한 결과, 먹이 선호성이 가장 높았던 어분을 첨가하여 산란성을 조사하였다. 밀기울 대조군에서는 산란기간이 44.67일, 산란수가 282.27개였으나, 어분 첨가군에서는 125일의 산란기간과 633.67개의 산란수를 나타냈다. 또한, 성충의 수명은 모든 실험군에서 암컷의 수명이 수컷보다 길었으며, 특히 어분 첨가군에서 밀기울 대조군에 비해 긴 수명이 관찰되었다. 최적의 알 보호환경 조건을 구명하고자 알 보호기간 실험을 진행하였다. 사육실(기류 0.029m/s) 안에서는, 밀기울로 알을 덮는 기간을 다르게 하더라도 부화율에는 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나, 기류가 평균 0.538m/s인 인큐베이터 안에서는 밀기울로 덮는 기간이 길어질수록 부화율이 증가되었다. 이 기류 하에서는 적어도 5일정도 알 보호기간이 있어야 부화율이 85% 이상임을 확인하였다.

번데기 보호 및 우화성충을 분리하기 위해 사육상자의 사료에 혼합된 거저리의 배설물을 자동으로 분리 배출할 수 있게 하는 거저리 배설물 분리장치 개발하였다.

거저리와 유충에게 수분공급용으로 주는 채소 및 과일을 대체하기 위해서 수분공급용 젤리를 개발하였다. 수분공급이 용이하며, 사육환경이 개선됨과 동시에 수분과다 공급에 의한 폐사를 막을 수 있어 거저리와 유충의 생존율이 증대되므로 농가의 소득향상에 도움이 될 것으로 기대한다.

사육 작업자의 노동력 강도를 고려하여 유충사육 표준상자의 디자인을 규격화하였다. 폴리프로필렌 박스(가로36 x 세로54 x 높이18 cm)는 가벼워서 작업자에게 용이하였으며, 유충 생육 상태 관찰에 적합하였다.

갈색거저리의 생산량 조절, 장기 보관 및 가공원료로 이용 시 건조과정은 상당히 중요하며, 농가에서 생산 가공 시 건조비용도 고려할 항목이다. 건조방법별 갈색거저리 유충의 영양성분을 분석하였다. 건조 갈색거저리 수분함유량은 80℃ 열풍건조에서 가장 낮았으며, 조지방은 동결건조처리군이 가장 낮았다. 건조방법에 따른 갈색거저리의 아미노산 성분 중 이소루신(Ile)은 높은 온도로 건조 할수록 함유량이 적음을 확인하였다. 무기성분은 칼슘이 80℃ 열풍건조에서 가장 적은 함유량을 보였으며, 인·칼륨·나트륨은 동결건조의 경우가 가장 함유량이 높았다. 아연·구리의 함유량은 건조온도가 높을수록 많아지는 것을 확인하였다.

전국 거저리 생산농가 및 업체 7개소에 대한 생산판매실태를 조사하였다. 거저리 사육 시 문제점을 조사한 결과, 사육시 먼지발생(25%)과 번데기의 수거 문제(25%)가 가장 심각했고, 사료비의 상승 문제(16.7%)가 뒤를 이었다. 그 외에도, 전체 사육기술의 효율화(자동화), 원인모를 폐사, 거저리의 기능성 부여 요구 등의 의견이 있었다. 이에, 사육 시 먼지방지나, 노동력이 적게 드는 번데기 수거기술 등의 사육기술 효율화를 위한 연구와 사료비 상승에 따른 저렴한 비용의 대체사료연구가 시급하며, 거저리의 질병연구와 사료 외 기능성 물질 구명에 대한 연구가 필요하다고 판단된다.

갈색거저리의 특성, 증식기구 해명, 보존 및 관리, 기능성 분석 등에 관한 내용으로 구성된 실내 대량사육 시스템을 확립하기 위한 매뉴얼을 작성하였고, 주류부산물을 활용하여 양질의

저렴한 먹이원을 개발하고자 맥주박, 막걸리박 첨가에 따른 갈색거저리 유충의 발육특성을 조사하였다. 맥주박은 수분이 포함된 상태와 열풍건조 후 분쇄기로 마쇄한 상태의 두 가지를 실험에 활용하였고, 맥주박 및 건조 맥주박 첨가에 따른 7~8령 유충의 발육특성 조사 결과, 열풍건조한 맥주박 (건조 맥주박)에 비해 맥주박에서의 유충 발육이 더 좋았고, 특히 30% 맥주박 첨가군에서 높은 용무게와 짧은 유충 발육기간이 관찰되었다. 막걸리박은 맥주박에 비해 수분함유량이 현저히 많아 탈수기를 이용하여 수분을 최대한 제거한 후 실험에 활용하였고, 건조 막걸리박의 경우, 수분제거 후 열풍건조한 다음 분쇄기를 이용하여 마쇄한 상태를 실험에 활용하였다. 막걸리박 및 건조 막걸리박 첨가에 따른 7~8령 유충의 발육특성 조사 결과, 건조 막걸리박 첨가군에서 보다 막걸리박에서 전체적으로 유충 발육이 더 좋았으며, 밀기울 대조군에서의 유충 발육특성과 유사하였다. 모든 실험군 (밀기울 대조군, 맥주박 및 막걸리박 첨가군) 2~3령 유충에서 전체적으로 유충의 생존율과 용화율이 낮게 관찰되었다.

1차년도에는 갈색거저리 사육온도에 따른 발병률, 역학 조사 및 적정 사육온도 확립과 사육습도에 따른 병률, 역학 조사 및 적정 사육습도 조건을 확립을 진행하였으며, 갈색거저리 병원성 미생물의 특성을 구명하고, 마지막으로 질병 예방을 위한 약제처리 방법에 대한 연구를 수행하였다. 다양한 온 (20, 25, 30, 35℃)/습도 (저습, 중습, 고습) 조건에서의 병원성 평가결과 처리 4일 후 25-30℃에서 가장 높은 병원성이 나타났으며, 35℃에서 가장 낮은 병원성을 확인하였다. 더불어 저습조건과 고습조건에서 병원성의 차이는 나타나지 않음을 확인하였다. 이를 통해 온도 조건이 병원성과 밀접한 관련이 있음을 확인하였다. 갈색거저리에 병원성을 보이는 다양한 미생물을 분리하였으며, 특히 *Beauveria*, *Metarhizum* 균주들에서 높은 병원성이 확인되었다. 병원성이 가장 높은 균주인 *B. bassiana* ERL-1575를 효과적으로 억제하기 위해 시중에 유통중인 총 40개의 살진균제를 이용한 실험을 진행하였으며, 최종적으로 ERL-1575의 포자발아 억제 및 균사생장 억제에 탁월한 효과를 보인 fluazinam과 mancozeb을 선발하였다.

2차년도에는 갈색거저리의 병원미생물 방제 기술 개발, 성장 발육 동기화, 충태별 보존기술 개발, 탄력적 대응을 위한 출하방법 구명 연구를 수행하였다. 갈색거저리 사육과정중에 발생할 수 있는 *B. bassiana* 미생물을 방제하기 위하여 fluazinam과 mancozeb을 spray 방법을 통하여 처리하였다. 처리 5일 후 *B. bassiana*처리구에서는 10%의 생충률을 확인할 수 있었으나, fluazinam과 mancozeb 처리구에서는 100%의 생충률을 확인하였으며, 상기 병원성 미생물을 효과적으로 제어할 수 있음을 확인하였다. 특히 fluazinam의 효과가 가장 우수하였다. 성장 발육 동기화 연구에서는 밀기울이 들어있는 breeding dish에 갓 우화한 성충을 5쌍씩 넣고, 1, 3, 7, 14일 간격으로 새로운 산란을 받은 결과 3일 간격으로 알을 받았을 때 동일한 크기의 개체수를 다양하게 확보할 수 있었다. 충태별 보존기술 연구를 위하여 밀기울이 들어있는 Petri dish에 알과 번데기를 각각 4℃에 보관 후 2, 4, 6, 8, 10, 12주 간격으로 부화율과 우화율을 조사하여 비교한 결과 알 조건이 번데기 조건보다 저온 저장성이 높았다. 산란을 받은 알은 실온에서 약 40%의 부화율을 보였으며, 4℃에 보관하는

기간이 길어질수록 낮은 부화율을 보였다. 4℃에서 2주 간격으로 번데기의 우화율을 확인한 결과 6주 이상 저온에 보관하였을 때 우화율이 급격히 감소되는 것을 확인하였다. 위와 같은 연구 결과를 바탕으로 탄력적인 갈색거저리 출하방법을 제시하였다.

3차년도에는 대량 사육을 위한 적정 개체군 밀도 연구, 최적 수거시기 구명, 갈색거저리 유충의 사료첨가물로서의 약리효과 검증, 기능성 확보방법에 대한 연구를 수행하였다. 대량 사육을 위한 적정 개체군 밀도 연구에서는 밀웜을 Petri dish 조건 (1/10/20/30/40/50 마리)에서 사육함으로써 사육 기간별 길이, 무게 측정 및 단백질 함량을 비교하였다. 1마리 처리구의 총체의 길이 및 무게가 50마리 처리구에 비해 높음을 확인하였으며, 1마리 처리구의 단백질 함량이 30, 40, 50마리 처리구의 단백질 함량보다 높음을 확인하였다. 이를 통해 10~30 마리/dish의 최적 조건을 확인하였다. 최적 수거시기 연구에서는 온도별 사육(20, 25, 30, 35℃)을 통해 총체의 길이, 무게 측정 및 단백질 함량의 비교를 통해 밀웜 사육의 최적온도는 성충의 산란에는 20℃, 유충의 사육에는 30℃ 조건이 가장 적합함을 구명하였다. 더불어 사료용 곤충으로써 최적수거시기 (산란 후 3달 내외)를 구명하였다. 갈색거저리 유충의 약리효과 검증을 위하여, 갈색거저리 내에서 증식이 가능한 유용 미생물인 *B. bassiana* JEF-133의 4가지 세균인 *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*에 대한 항세균 효과를 확인하였다. Gram-positive 세균인 *B. subtilis* 와 *L. monocytogenes*에서 JEF133의 항세균 효과를 확인할 수 있었으며, 그 중 *B. subtilis* 조건에서의 저지원 폭이 가장 크게 확인되었다. 갈색거저리 유충의 소화 촉진을 위하여 *Cordyceps* 균주를 이용한 갈색거저리 유충 발효조건 실험을 통하여 소화가 더 촉진될 수 있는 기초 데이터를 확보하였다. 갈색거저리 유충에서의 antimicrobial peptides (AMPs)의 발현은 사료 첨가제로서의 유충의 기능성을 추가적으로 향상시킬 수 있으며, 형질전환된 *B. bassiana*를 갈색거저리 유충에서 증식시킴으로써 *Bombyx mori* (Bm) cecropin A를 갈색거저리 유충에서 발현하여 항생 효과를 확인하였다.

거저리 원료의 실험 사료 배합은 거저리원료별 자돈 및 육성돈의 외관상 아미노산 회장소화율과 일반성분분석, 아미노산 및 지방산 조성 분석 등을 바탕으로 진행되었다. 거저리는 자돈과 육성돈 모두에서 수치적으로 높은 옥수수 대두박 위주의 일반 사료에 비해 아미노산 소화율을 보였으며, 일반 성분 분석 결과 높은 조단백 수준과 조지방 함량을 보여 단백질 원료의 대체제로서 가능성과 고에너지 원료 사료로써의 활용 가능성을 보였다. 아미노산 및 지방산 조성에 있어서도 현재 이용되고 있는 원료사료들과 비교하였을 때 일부 원료들과 유사한 조성 형태를 가지고 있었다. 또한 키틴질(키토산) 함량이 상대적으로 높은 수치를 보여 면역에 있어서 유용한 물질로 이용될 수 있는 가능성을 보였다.

자돈 사료 내 이용 가능성에 대한 실험들에서, 거저리는 이용에 대한 긍정적인 결과들을 보였다. 자돈 사료 내 거저리 원료를 유충/성충/유충과 성충의 혼합 형태로 급여하였을 경우 모든 처리구에서 수치적으로 향상된 성장성적을 보였으나 유충 단일 급여 처리구에서 가장 나은 성장성적을 보였다. 자돈 사료 내 거저리 원료의 첨가는 대두박을 대체하여 사양성적을 개선시킬

가능성이 높으며 특히 거저리 유충은 다른 거저리의 형태와 비교하였을 때에도 이용성이 가장 높은 것으로 생각된다. 자돈 사료 내 거저리 유충의 첨가 실험에서는 거저리 유충의 첨가수준이 증가함에 따라 자돈 전기 성장 성적이 유의적으로 선형 증가하는 결과를 보였으며 질소 축적률이나 BUN, IGF-1 농도 역시 이를 뒷받침하였다. 자돈 사료 내 거저리 유충은 최소 6% 수준까지는 첨가 가능할 것으로 생각된다. 거저리 유충의 사육기간에 따른 대체 효과 실험에서는 사육기간과 자돈의 생리적 특징들 사이에 어떠한 유의적 차이도 없는 것으로 분석되었다. 자돈 사료 내 거저리 성충의 수준별 첨가실험에서는 거저리 성충 3% 첨가 처리구에서 일반적으로 자돈 사료에 이용되는 단백질 원료인 어분 첨가 처리구와 비슷한 성장성적을 내, 거저리 성충이 어분을 대체할 수 있을 것으로 판단되었다. 또한 이유자돈 사료 내 거저리 성충의 첨가는 수치상으로 항생제 대체제 무첨가 처리구에 비해 설사 빈도를 감소시키는 결과를 보였으며, 특히 거저리 성충의 0.5%를 첨가한 처리구에서 유의적인 차이를 보여 항생제 대체를 위한 원료 사료로써 이용될 수 있는 가능성을 나타내었다.

육성돈 사료 내 급여 실험에서는 거저리 원료의 수급량과 육성돈의 사료 섭취량 및 실험 기간 등을 고려하여 거저리 부산물인 거저리 배지 급여 실험이 진행되었다. 거저리 배지의 급여는 성장성적, 혈액 정상 및 면역 단백질 어느 항목에서도 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이는 거저리 배지가 육성돈 사료 내 6% 까지 첨가하여도 육성돈에게는 어떠한 부정적인 영향을 미치지 않기 때문에, 사료 내에 6%까지 첨가하여도 문제가 없다는 것을 의미하여 거저리 배지가 육성돈 사료의 원료사료로써 이용이 가능하다는 것으로 분석된다.

임신돈 사료 내 거저리원료의 급여 실험에서도 긍정적인 결과를 보였다. 형태별 첨가실험에서, 거저리원료의 첨가는 모돈의 번식 생리나 강건성 및 자돈의 생산성에 어떠한 부정적인 영향을 미치지 않았으며, 초유의 유지방함량을 높여주어 포유 자돈의 건강에 긍정적인 영향을 미칠 수 있다는 결과를 나타냈다. 거저리 유충의 수준별 첨가 실험에서 거저리 유충의 첨가는 임신돈의 생리에는 부정적인 영향을 전혀 미치지 않으면서 복당 체중을 증가시키는 결과를 보였다. 결과적으로 거저리 유충은 임신돈 사료 내 3%까지 첨가할 수 있을 것으로 생각된다.

포유모돈을 대상으로 한 거저리 유충의 수준별 첨가 실험에서, 거저리 유충의 첨가는 포유모돈의 생리적 변화에는 유의적인 영향을 미치지 못하지만, 사료섭취량을 증가시켜 포유자돈의 성장능력을 향상시키는 것으로 나타났다. 거저리 유충의 첨가가 돈유의 성분에 유의적인 영향을 주지는 못하였지만, 기호성을 증진시킴으로써 포유모돈의 사료섭취량을 증가시키고 유생산량을 증가시킴으로써 포유자돈의 성장을 촉진할 수 있을 것이라는 결과를 나타냈다. 첨가 수준의 경우 거저리 유충을 3%까지 첨가 하여도 모돈의 생리적 변화 및 포유자돈의 성장에 부정적인 영향을 미치지 않을 것으로 사료된다. 포유모돈 사료 내 어분대체 목적으로 거저리 유충을 첨가하였을 시, 거저리를 2% 처리하였을 때 생리적 특성에는 어떠한 부정적 영향도 미치지 않으면서 자돈 폐사율을 감소시키고 혈중 BUN과 간수치에 부정적 영향을 미치지 않는 결과를 나타냈다. 따라서 포유돈 사료 내 거저리 유충을 1~2% 첨가하여 어분을 4%까지 대체하는 것이 가능할 것으로 판단된다. 거저리 유충을 지방대체 목적으로 첨가하는 경우 포유모돈의

생리나 번식 성적등을 고려하였을 때 지방질 원료를 2%까지 대체할 수 있을 것으로 보이지만, 포유자돈의 간 건강에 부정적인 영향을 미칠 수 있는 가능성을 나타내 거저리 원료의 지방질 대체에 있어서는 검토가 필요할 것으로 사료된다.

1차년도에는 거저리원료별 자돈 및 육성돈의 외관상 아미노산 회장소화율을 측정, 자돈 사료 내 거저리의 첨가 형태 규명, 자돈 사료 내 거저리 유충의 적정 첨가수준을 조사, 그리고 거저리 및 거저리 활용 원료사료의 영양성분 및 유효 성분 검사를 위한 실험들이 진행되었다. 실험 결과 거저리는 식물성 단백질 원료와 비슷하거나 높은 수준의 아미노산 소화율, 높은 수준의 조단백 및 조지방 함량으로 인한 고단백·고에너지 원료로써의 이용 가능성을 보였으며 자돈에 있어서 거저리 유충이 성충이나 혼합 방식보다 더 가치가 높은 원료 형태로 분석되었다. 또한 적정 첨가 수준에서도 최소 6%까지 이용이 가능할 것으로 나타났다.

2차년도에는 자돈 사료 내 거저리 성충의 적정 첨가수준을 조사, 이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가가 자돈에 미치는 영향 규명, 임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가가 임신모돈에 미치는 영향 조사, 임신모돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 임신기 및 포유기에 미치는 영향 규명, 포유모돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유모돈에 미치는 영향 규명, 육성돈 사료 내 거저리 배지의 첨가가 육성돈에 미치는 영향 및 적정 첨가량 규명 등을 위한 연구를 진행하였다. 거저리 성충의 경우 자돈에게 3%까지 이용이 가능할 것으로 분석되었으나 거저리의 사육 기간은 영향을 미치지 않는 것으로 분석되었다. 임신돈 사료 내 거저리 원료의 경우 거저리 유충이 가장 효과를 높게 나타냈으며 거저리 유충의 첨가는 임신돈이나 자돈의 생리적 특성에는 아무 영향도 미치지 않았으나 임신돈의 복당 체중을 증가시킴으로써 번식성적에는 긍정적인 영향을 미치는 것으로 나타났다. 육성돈에 있어서 거저리 배지의 이용은 육성돈의 성장성적에 어떠한 영향도 미치지 않았으며, 그에 따라 6%까지 이용이 가능할 것으로 분석되었다.

3차년도에는 포유모돈 사료 내 어분대체 원료로써 거저리의 이용 가능성 평가, 이유자돈 사료 내 거저리 성충 첨가에 따른 항생제 대체 효과 검증, 포유모돈 사료 내 지방대체 목적의 거저리 유충의 첨가 가능성 조사 등을 목적으로 한 연구를 진행하였다. 이유자돈에 있어 거저리 성충의 첨가는 이유자돈 시기 자돈 폐사에 가장 큰 영향을 미치는 설사의 빈도를 낮추는 효과를 보여 면역 증강효과가 있을 것으로 판단되었다. 또한 포유모돈 사료 내 어분 대체 원료로써 거저리는 2%까지 첨가할 수 있고 그로 인해 어분을 4%까지 대체할 수 있을 것으로 판단되었고 지방 대체의 목적으로도 2%까지 첨가할 수 있을 것으로 생각되나 지방 대체의 목적일 경우 포유 자돈에게 미치는 영향에서는 부정적인 결과를 나타냈다.

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

<연구성과>

관련 논문 7편, 특허 출원 3건, 특허 등록 2건을 정량적 성과로 확보하였다.

1. 논문발표 7건

(1) 곤충에 발생하는 질병 미생물 (*I. fumosorosea*)의 이용성 관련 논문 발표

저널명 : Pest Management Science 69, 576-581. 2013. (IF : 2.743)

논문명 : An oil-based formulation of *Isaria fumosorosea* blastospores for management of greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae)

관련내용 : 곤충병원성 미생물중의 하나인 *Isaria fumosorosea*가 생산하는 blastospores 의 기본적인 특성과 이러한 미생물이 곤충에 병원성을 유도하는 기작 및 환경조건에 대한 연구 내용임.

(2) 곤충에 발생하는 질병 미생물 (*B. bassiana*)의 이용성 관련 논문 발표

저널명 : Pest Management Science 70, 1186-1191. 2014. (IF : 2.694)

논문명 : A novel approach: *Beauveria bassiana* granules applied to nursery soil for management of rice water weevils in paddy fields

관련내용 : 곤충병원성 미생물중의 하나인 *Beauveria bassiana*의 기본적인 생물학적인 특성과 본 미생물이 곤충에 병원성을 보이는 환경조건과 수분 조건에 대한 연구 내용임.

(3) 갈색거저리 유충에 발생하는 병원성 미생물 제어 관련 논문 발표

저널명 : Entomological Research 44, 236-243. 2014. (IF : 0.398)

논문명 : Management of entomopathogenic fungi in cultures of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)

관련내용 : 갈색거저리 유충에 발생하는 다양한 곤충 병원성 미생물을 분리 동정하였으며, 효과적인 제어를 위한 40종의 살균활성 물질에 대한 평가 및 효과적인 적용 방법에 대한 연구 내용임.

(4) 갈색거저리 유충의 기능성 제고 관련 논문 발표

저널명 : Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 42, 151-156. 2015. (IF : 1.525)

논문명 : Production of antibacterial *Bombyx mori* cecropin A in mealworm-pathogenic *Beauveria bassiana* ERL1170

관련내용 : 갈색거저리의 기능성을 제고하기 위하여, *B. mori* 유래 cecropin 단백질을 발현하기 위한 recombinant *B. bassiana* 제작과 이를 이용 (곤충 유충에서 재조합 미생물 증식)한 갈색거저리 유충내에서의 항생 단백질인 cecropin의 생산에 대한 연구임.

(5) 꼬리명주나비 관련 논문 발표

저널명 : International Journal of Industrial Entomology 29(1), 153-161. 2014.

논문명 : Temperature-Dependent Development of the Swallowtail Butterfly, *Sericanus montela* Gray

관련내용 : 꼬리명주나비의 발달기간, 생존율은 15~35도의 다양한 온도에서 초기(배아)와 유충 발달단계에서 조사되었다. 배발생과정은 적정범위에서 벗어나는 온도 조건에서 약간의 변화에 의해서도 큰 영향을 받을 수 있음을 확인하였음.

(6) 갈색거저리 관련 논문 발표

저널명 : Journal of Sericultural and Entomological Science 53(1), 1-5. 2015.

논문명 : Growth characteristics of mealworm *Tenebrio molitor*

관련내용 : 다양한 범위의 온도, 광주기, 사육밀도에서 갈색거저리의 생리적 특성을 구명하고자 연구를 수행하였으며, 효율적인 실내 대량사육 시스템 확립을 위해 활용할 수 있음.

(7) 아메리카왕거저리 관련 논문 발표

저널명 : International Journal of Industrial Entomology 30(2), 45-49. 2015.

논문명 : Developmental characteristics of *Zophobas atratus* (Coleoptera:Tenebrionidae) larvae in different instars

관련내용 : 갈색거저리와 더불어 사료용 곤충으로 활용될 수 있는 아메리카왕거저리 유충의 령별 발육특성을 조사하였으며, 이 결과는 아메리카왕거저리 유충의 생리적 특성을 구명하기 위한 유관연구에 도움이 될 수 있음.

(8) 거저리 유충 첨가 실험 관련 논문 발표

저널명 : Asian-Australasian Journal of Animal Science(2nd revision)

논문명 : Supplementation of mealworm (*Tenebrio Molitor* larva) on growth performance, nutrient digestibility and blood profiles in weaning pigs

관련내용 : 자돈 사료 내에 거저리 유충의 첨가가 자돈의 성장성적, 영양소 소화율 및 혈액 성상에 미치는 영향을 규명하고 이를 바탕으로 거저리 유충의 적정 첨가 수준을 제시할 수 있음.

2. 특허 : 특허 출원 3건, 특허 등록 2건

(1) 특허 출원 1건

특허명 : 갈색거저리 발육기간 단축 방법

출원번호 : 10-2014-0134933

관련내용 : 갈색거저리 대량생산을 위해 사육환경조건인 온도, 광주기 및 사육형태조건을 조절하여 발육기간을 단축하고자 하였음. 집단사육시 개별사육보다 발육기간 및 생존율이 향상되었고, 특히 집단사육시 저온에서도 사육이 가능하였음. 사육온도가 높을수록 유충 및 용의 발육기간은 짧아졌고, 광주기별 갈색거저리 유충발육기간 단축 조건은 장일조건임을 확인하였음. 수분공급 횟수는 주 3회가 적합하였음.

(2) 특허 출원 및 등록 1건

특허명 : 거저리과 유충의 수분공급용 젤리형 조성물 및 이의 제조방법

출원번호 : 10-1508-7420000

관련내용 : 거저리과 유충에게 수분공급용으로 통상적으로 제공되었던 채소 또는 과일 껍질 대신 수분공급용 젤리형 조성물이 제공됨. 수분공급이 용이하며, 사육환경이 개선됨과 동시에 수분과다 공급에 의한 폐사를 막을 수 있어 거저리과 유충의 생존율이 증대되므로 농가의 소득향상에 도움이 될 것으로 기대함.

(3) 특허 출원 및 등록 1건

특허명 : 거저리 배설물 분리장치

출원번호 : 20-2013-0002902

관련내용 : 번데기 보호 및 우화성충을 분리하기 위해 사육상자의 사료에 혼합된 거저리의 배설물을 자동으로 분리 배출할 수 있게 하는 거저리 배설물 분리장치 개발하였음. 배설물 분리에 따른 작업시간 및 노동력을 현저히 줄일 수 있을 뿐만 아니라 배설물 분리작업 시 먼지의 발생을 억제하여 작업 환경을 개선할 수 있음.

<성과 활용계획>

1. 실용화 계획

(1) 기술실시 1건

계약(활용)명 : 거저리 배설물 분리장치

계약(활용)기간 : 2014. 01. 01. ~ 2014. 12. 31.

지재권 종류 : 특허출원

출원번호 : 20-2013-0002902

실시기관 : 월천곤충사랑

(2) 기술실시 1건

계약(활용)명 : 갈색거저리 유충 발육기간 단축방법

계약(활용)기간 : 2015. 02. 01. ~ 2016. 01. 31.

지재권 종류 : 특허출원

출원번호 : 10-2014-0134933

실시기관 : 월천곤충사랑

(3) 기술실시 1건

계약(활용)명 : 거저리와 유충의 수분공급용 젤리형 조성물 및 이의 제조방법

계약(활용)기간 : 2015. 11. 30. ~ 2018. 11. 30.

지재권 종류 : 특허

등록번호 : 10-1508742

실시기관 : (주)MG내츄럴

2. 기술확산 계획

(1) 교육 1건

교육기간: 2014. 03. 11

교육 및 컨설팅명: 곤충산업 창업아카데미 현장실습 교육

교육 및 컨설팅 교재명: 갈색거저리 사육기술

주요내용: 갈색거저리의 연구배경, 국내외 연구동향 및 사육기술과 활용방안 설명

기대효과: 곤충산업 활성화 및 갈색거저리 전문 사육농가 육성

장소: 국립농업과학원

(2) 교육 2건

교육기간: 2014. 06. 18

교육 및 컨설팅명: 경기농업대학 곤충산업과 교육과정

교육 및 컨설팅 교재명: 사료용 곤충의 이해

주요내용: 사료용 곤충의 활용방안 및 사육 기술

기대효과: 사료용 곤충 농가 육성 및 전문인력 양성

장소: 경기농업기술교육센터

(3) 교육 3건

교육기간: 2015. 05. 11 ~ 2015. 05. 15

교육 및 컨설팅명: 곤충산업 교육

교육 및 컨설팅 교재명: 곤충산업

주요내용: 곤충산업 육성법과 정책, 사료용 곤충 활용 전략

기대효과: 곤충산업 육성, 곤충분야 신시장 창출로 인한 곤충농가 소득 증대

장소: 농촌인적자원개발센터

SUMMARY

I. Title : Development of alternative feed ingredient for swine using insect resources

II. Research Achievement and Goal

(1) Research Goal

(Unit: Case)

Year		Patent		Paper		etc.
		Application	Registered	SCI	Non-SCI	
2013	Goal	1			1	
	Achieved	2		1		International Presentation 1 Domestic Presentation 1
2014	Goal	1		2	3	
	Achieved	1		2	1	International Presentation 3 Domestic Presentation 4
2015	Goal	1	1	2	2	
	Achieved		2	1	2	International Presentation 1 Domestic Presentation 6
Sum	Goal	3	1	4	6	
	Achieved	3	2	4	3	International Presentation 5 Domestic Presentation 11

(2) Goal for Research Application

(Unit : Case)

Division		Technique Transfer	Commercialized	Government Report	Education	News	etc.
Research Application	Goal	2	2		2	3	
	Achieved	3			3	3	

III. Purpose and Needs

<Purpose>

We want to establish the stable insect production system for animal feed, to provide the scientific background and application of insect feed for each life stage of swine

production, and to develop high quality feed with insect that is more than 3 efficient than conventional quality feed.

<Needs>

- Generally, insects contain high quality nutrient especially protein, fat, minerals, and vitamins. In addition, amino acid composition of insects is better than crops and beans with rich unsaturated fatty acids.
- Insects have been focused as a feed ingredient as a surrogate for expensive fish cake and soybean cake because of overfishing and food safety issues that was raised by animal diseases such as foot-and-mouth disease.
- Insect industry will be expanded when insects will replace only 5 % of fish cake that has been served as a protein sources in animal feed which is produced 1.65 million tons for small swine.
- Insect can be used as a good protein source for animal feed because it is much safer and cheaper than conventional protein sources such as fish cake and soybean cake. Insects may be a safe highly quality feed ingredient with low price when stable mass-production system is established.

IV. Research scope and contents

To establish mass-insect-rearing system for feed ingredient: selecting a superior line by culture breeding, investigating the best protein source by manual feeding test and the optimal temperature for high oviposition efficiency by testing six temperatures (17.5, 20, 22.5, 25, 27.5, 30°C), and comparing rearing conditions for egg protection by different air circulation systems.

Developing price-reducing technique for insect production: developing an automated byproduct separation system for mealworm rearing cage for removing feces, and making an insect jelly as a water source to replacing other expensive water sources such as vegetables and fruits. In additions, developing the standard rearing cage to reduce the labor, analyzing the nutritional factors to verify insect drying methods, and investigating insect rearing farmers and distributors.

Developing technical manuals for insect mass-rearing for feed ingredient:

developing technical manuals for a standard rearing system describing characteristics, reproduction mechanisms, preserving and maintenance, functional analysis of mealworms, investigating developing characteristics for mealworms when they are fed on byproduct of alcohol beverages such as beer and makgeoli, and investigating the economic analysis for mealworms as a feed ingredient and the efficiency of feeds with insects.

Establishment of mealworm-rearing system for animal feeds: To investigate the relationship between rearing temperature and disease occurrence in mealworm, diverse temperature conditions such as 20, 25, 30 and 35°C and low, middle and high humidity conditions were considered in the rearing. Mealworm-pathogenic fungal pathogens were isolated and identified using a ITS-specific primers, and to effectively control the occurrence of the pathogens, commercially available fungicides were used to examine their control efficacy.

Set-up of a mealworm supply system for animal feeds: To efficiently control the possible mealworm-pathogenic fungal pathogens in the rearing conditions, two anti-fungal fungicides, such as fluazinam and mancozeb were added to the wheat bran as a feed for mealworms by spray method. Synchronization of the mealworm stages was investigated by making the adults have oviposition for a given time of periods, such as 1, 3, 5, 7, and 14 days for the supply of the same size of stages. Egg and pupal stages of mealworms were kept at 4°C for 2, 4, 6, 8, 10 and 12 weeks and their survival and development were examined for stability of the stages at low temperature.

Development of high quality mealworm production technology and improvement of functionality of mealworm for animal feeds: When the mealworms were reared in Petri-dish conditions at 1, 10, 20, 30, 40 and 50 larvae per dish, the length, weight and the amount of total protein of mealworms were investigated for optimize a suitable rearing density of mealworm, considering to reach the highest production efficiency. Additionally the length, weight and the amount of protein of mealworms at diverse temperature conditions, such as 20, 25, 30, and 30°C were investigated to determine the time point to harvest the mealworms for animal feeds. To increase the function of mealworms as animal feeds, biologically useful microorganism, *Beauveria bassiana* JEF-133 was inoculated to the mealworms and the

mealworm–JEF–133 complex was assayed against mammalian pathogens, such as *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*. Expression of *B. mori* cecropin A in mealworms was conducted by the inoculation of recombinant *B. bassiana* containing the gene to the insects, resulting in the enhancement of the value of mealworms. Lastly digestion of mealworms was investigated by the use of *Cordyceps* isolates.

Evaluating nutritional value and characteristic of mealworm: proximate analyzing mealworm to evaluate moisture, crude protein, crude fat and ash contents, estimating essential mineral, and measuring amino acid and fatty acid profile.

Investigating the most effective form and supplementation level of mealworm: conducting comparing experiment with mealworm larva, adult and medium to figure out the most effective form of mealworm as a feed stuff, concluding that 3 kinds of mealworm showed no negative nutritional or physiological effects on weaning pigs so they are proved to have no reason not to use as a feed stuff, and evaluating optimal level of mealworm supplementation.

Developing efficient way to use mealworm as a feed stuff: adopting mealworm to gestating sow and lactating sow diet to evaluate mealworm to be a feed stuff, developing mealworm as a alternative feed stuff for protein, and conducting experiments to figure out effect of mealworm on physiological traits and reproductive performance.

Comparing mealworm to other protein source of feed: comparing mealworm to animal derived protein sources like fish meal and whey powder, conducting experiment to investigate mealworm to be a alternative protein source in weaning pig diets and to be a alternative protein source or fat source in lactating sow diets.

V. Results

Based on nutritional factor analysis of candidate insects (mealworms, black soldier flies, oriental garden crickets, super mealworms), mealworms were selected for an insect as a feed ingredient, and the superior lines were selected by culture breeding to maintain superior lines for mass–production.

The optimal reproduction condition was investigated by oviposition rate and life span test in different temperature conditions. Based on this test, 27.5°C was identified as the optimal temperature for larval production by analyzing the pattern for life stages in different temperatures.

The oviposition duration and amount of eggs can be increased by controlling rearing condition and feed. Based on the protein source preference test, fish cake was added for analyzing oviposition pattern. With wheat bran as a control feed, the oviposition duration was 44.67 days with 282.27 eggs, and that with fish cake was 125 days with 633.67 eggs. The life span for females were longer than that for males in all the cases, and the life span with fish cake was longer than that with wheat bran. Egg protection experiment was conducted to verify the optimal egg protection condition. There was no significant difference whether eggs were covered or not in the laboratory condition (airflow 0.029m/s). However, covering eggs with wheat bran increased hatching rate in the incubator with average airflow of 0.538m/s. Under this condition, at least five days required to get more than 85% hatching rate.

An automated byproduct separation device was developed for mealworm rearing cage to protect pupae and emerging adults.

A jelly for water source was developed to replace expensive vegetables and fruits that were used as a water source. It will help to improve larval survivorship by escaping too much water supply, and finally it will result in increasing farmers' income.

The rearing cage was standardized to reduce the labor. The polypropylen box (36 x 54 x 18 cm (width x length x height)) is light, easy to handle, and it is transparent so the insect can be easily checked from outside of the rearing box.

Insect drying process is important to manage inventory and to maintain insect for a long term as well as to control production cost. Therefore, different insect drying processes were compared by its nutritional factors. The water content was the lowest with 80°C warm-drying, and the crude protein content was the lowest with freeze-drying. Isoleucine, a kind of amino acids, was reduced as the drying temperature was increased. Among various minerals, calcium content was the lowest with 80°C warm-drying, and phosphate, potassium, and sodium contents were the richest with freeze-drying. Zinc and copper contents were increased as the drying temperature is increased.

The current status of production and distribution of nationwide farmers and seven distributors were investigated. When the hurdles for rearing mealworm investigated,

dust in the rearing facilities (25%) and difficulties for collecting pupae (25%) were the biggest, and increasing feed price (16.7%) was the next hurdle. In addition, total automation for rearing mealworm, unknown death of insects, finding useful materials from mealworms were also listed. Therefore, the new techniques for reducing dust in the rearing facilities and collecting pupae with less labor are needed to be developed as well as alternative insect feed for lowering production cost is needed to be found. In addition, disease from mealworm and functional materials from mealworm are also required to be investigated to improve the quality of insect and to expand the market.

A rearing manual was published for describing characteristics, explaining reproduction mechanisms, improving preservation and maintenance, and analyzing functional materials. To find better insect feed, developmental characteristics were investigated with byproducts of alcohol beverage such as beer and makgeoli. Byproduct of beer was tested with wet form as well as trituration after warm-dried form. When wet form and dried form of beer byproducts compared, warm-dried beer byproduct were better for developing of 7th ~ 8th larval instars especially more body weight gain and shorter developing period was observed with 30% of beer byproduct. Byproduct of makgeoli have more water content than byproduct of beer, so wet form was prepared with spin-dry and dried form was prepared with trituration after spin-dry and warm-dry. When the effects of wet and dry form of makgeoli byproduct on 7th ~ 8th larval instars, wet form of it have much better effects on larval development, and it is similar to the wheat bran control group. However, the survivorships and pupation rate of 2nd ~ 3rd larval instars were lower with all the treatments (a wheat bran control group, beer byproduct added group, and makgeoli byproduct added group).

The mealworm-rearing system for animal feeds was explored in this work. To investigate the relationship between rearing temperature and disease occurrence in mealworm, diverse temperature conditions such as 20, 25, 30 and 35°C and low, middle and high humidity conditions were considered in the rearing. As a result, in the temperature of 25–30°C, the highest pathogenicity was observed in 4 days after inoculation. The lowest virulence was found at 35°C. The pathogenicity was not significantly related to the humidity levels. Mealworm-pathogenic fungal pathogens were isolated and identified using ITS-specific primers, and to effectively control the occurrence of the pathogens, commercially available fungicides were used to

examine their control efficacy. Generally *Beauveria* and *Metarhizium* species showed high virulence compared to the other pathogens. To suppress the fungal pathogen, such as *B. bassiana* ERL1575, a bioassay was conducted and finally two fungicides were selected.

The mealworm supply system for animal feeds was established. To efficiently control the possible mealworm-pathogenic fungal pathogens in the rearing conditions, two anti-fungal fungicides, such as fluazinam and mancozeb were added to the wheat bran as a feed for mealworms by spray method. The treatment of fluazinam and mancozeb showed ~100% of control efficacy but the control showed less than 10% of survival of the larvae. Synchronization of the mealworm stages was investigated by making the adults have oviposition for a given time of periods, such as 1, 3, 5, 7, and 14 days for the supply of the same size of stages. From the experiment, 3 days of oviposition reached the maxima rate of synchronization of the development. Egg and pupal stages of mealworms were kept at 4°C for 2, 4, 6, 8, 10 and 12 weeks and their survival and development were examined for stability of the stages at low temperature. When compared, egg was much better than pupal stages in the storage at the low temperature conditions.

The development of high quality mealworm production technology and improvement of functionality of mealworm for animal feeds was conducted. When the mealworms were reared in Petri-dish conditions at 1, 10, 20, 30, 40 and 50 larvae per dish, the length, weight and the amount of total protein of mealworms were investigated for optimize a suitable rearing density of mealworm, considering to reach the highest production efficiency. Additionally the length, weight and the amount of protein of mealworms at diverse temperature conditions, such as 20, 25, 30, and 30°C were investigated to determine the time point to harvest the mealworms for animal feeds. Finally 10-30 larvae per dish was suggested as the best rearing density. To increase the function of mealworms as animal feeds, biologically useful microorganism, *Beauveria bassiana* JEF-133 was inoculated to the mealworms and the mealworm-JEF-133 complex was assayed against mammalian pathogens, such as *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*. Expression of *B. mori* cecropin A in mealworms was conducted by the inoculation of recombinant *B. bassiana* containing the gene to the insects, resulting in the enhancement of the value of mealworms. Lastly digestion of mealworms was

investigated by the use of *Cordyceps* isolates.

Formulating experimental diet was conducted with apparent amino acid digestibility, proximate analysis, amino acid profile and fatty acid profile data from our experiment.

Mealworm showed numerically higher amino acid digestibility than corn-soy bean meal diet. Also, mealworm showed high level of crude protein and crude fat contents to be an alternative protein source or high-energy contents feed stuff. Amino acid profile and fatty acid profile was similar to most-using feed stuff. High contents of chitinous substance(chitosan) suggests mealworm to be an immunity enhancing material.

Experiments on weaning pigs showed positive results of mealworm supplementation to usability as a feed stuff in weaning pig diets. Among the mealworm larva, adult, and mixture of them, larva showed the most increased growth performance though all of treatments showed improved performance. Supplementation of mealworm, especially mealworm larva, can improve growth performance alternative to soy bean meal. Supported by change in nitrogen retention, blood urea nitrogen and insulin like growth factor-1, Larva supplement experiment showed linearly increasing growth performance in formal period of weaning pig(phase 1) as supplementation level of larva increased. As a result, supplementation of mealworm larva can be reached to 6% level. Breeding period showed no difference between them. In mealworm adult supplement experiment, 3% of supplementation treatment showed similar growth performance to control group with fish meal diet. As a immunity enhancing material, mealworm adult showed significant decrease in 0.5% supplemented treatment.

For growing to finishing pig experiment, mealworm waste was used, considered by production of mealworm and mealworm by-product, feed intake of growing and finishing pig and experimental period. Mealworm medium supplementation showed no negative effect on growth performance, blood profile and immunoglobulin till 6%. Therefore mealworm waste can be a feed stuff for growing to finishing pig diet.

Experiment for gestating sow also showed positive result. Supplementation of mealworm showed no negative effects on reproductive performance, healthiness of sow or growth performance of piglets regardless of mealworm form. Mealworm supplementation increased fat contents in colostrum to improve healthiness of piglets. Mealworm seems to be supplemented in gestating sow diets till 3%.

In lactating sow experiments, supplementation of larva had no effect on

physiological trait of sows but increased feed intake to improve milk yield by increasing palatability. As a result, improvement in growth performance for weaning pigs can be expected. Supplementation of mealworm larva can be adopted till 3%. Mealworm larva supplementation for alternative to fish meal can be used till 2%. 2% supplementation of mealworm larva to reduce 4% of fish meal decreased piglet mortality without any negative effect on BUN. Supplementing larva to alternative for fat can be adopted till 2% without no negative effect on sows but possibility of decreasing liver condition was found.

In the first year of experiment, estimating apparent amino acid digestibility of mealworm in weaning and growing pig, evaluating nutritional value of mealworm, investigating proper form of mealworm to supplement and figuring out proper level of mealworm supplementation on weaning pig diet experiments were conducted. As a result, mealworm showed similar or higher amino acid digestibility, high level of crude protein and crude fat contents to be a high-protein, high-energy containing feed stuff. Mealworm larva showed higher potential for feed stuff than adult or mixture, and can be used to be more than 6%.

In the second year, experiments for figuring optimal supplementation level of mealworm adult in weaning pig diet, comparing effects of raising period of larva on weaning pigs, evaluating diverse form of mealworm as a feed stuff in lactating sow diets, investigating proper level of supplementation level of mealworm larva in gestating sow diet to gestating and lactating sow, figuring optimal level of mealworm larva supplementation level in lactating sow diet and evaluating mealworm waste as a feed stuff for growing pig were conducted. Mealworm adult can be used in weaning diets till 3% and raising period of mealworm larva had no significant effect on weaning pigs. Mealworm larva showed the highest piglet weight per sow among different form of mealworm(larva, adult and waste). Mealworm waste had no negative effect on growth performance of growing pigs till 6%.

In the 3rd year, experiments for evaluating mealworm as an alternative to fish meal and to fat source on lactating sows, estimating usability of mealworm to replace of antibiotics were conducted. To weaning pigs, supplementation of 0.5% of mealworm adult decreased diarrhea incidence significantly by enhancing immunity of weaning pig. Mealworm larva can replace 4% of fish meal but replacing fat source to mealworm showed negative effect on piglets.

CONTENTS

Chapter 1	Overview	26
Chapter 2	State of the Art Report (domestic and global)	28
Chapter 3	Results	34
Chapter 4	Achievement and Contribution	348
Chapter 5	Application Plan	351
Chapter 6	Related Informations	356
Chapter 7	References	358
Appendix		366

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 및 성과목표	26
제 2 장	국내외 기술개발 현황	28
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	34
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	348
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	351
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	356
제 7 장	참고문헌	358
<별첨>	특허 및 논문	366

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 1 절 연구개발의 목적, 필요성 및 범위

- 세계 곤충산업의 시장규모는 07년 11조원이었으며, 2020년에는 38조원까지 늘어날 전망으로 이미 세계 각국은 곤충산업을 국가 전략산업으로 지정하여 정책적으로 육성하여 왔음.
- 2009년 “곤충산업의 육성 및 지원에 관한 법률” 이 제정되고, 2010년 8월에 동 법이 시행됨에 따라 이제 국가 정책적으로 곤충산업을 체계적으로 보완 발전시킬 수 있는 디딤돌이 마련되었음.
- 현재 국내 곤충산업은 식용, 약용, 애완, 생태학습 등 초보단계이며 사료 및 식의약품분야는 이제 조성이 시작되고 있음. 이 중 사료용 곤충은 식용·약용곤충과 함께 향후 블루오션 시장으로 꼽히고 있으나 사육기반이 초기단계임.
- 구제역 등 질병으로 인한 사료 내 단백질 원료에 대한 안정성논란과 바이오가스 생산 및 무분별한 어획으로 가격이 폭등한 대두박과 어분의 대체원료 사료를 개발하기 위해 곤충의 사료화에 관심이 증대되었음.
- 어분을 사료화 곤충으로 대체할 경우 사료용 단백질원 수급에 매우 긍정적인 효과를 보일 것으로 추정되며, 자돈사료 생산량 165만톤의 5%를 대체한다면 곤충을 사용한 사료시장 참여로 곤충산업기반이 확대될 것으로 기대됨.
- 일반적으로 곤충은 영양성분이 높으며 단백질과 지방, 광물질 및 비타민을 풍부히 함유하고 있고, 아미노산 조성은 대부분의 케이스에서 곡물이나 콩류에 비해 우수하고 단쇄 불포화 지방산의 풍부함.
- 곤충을 이용한 사료는 매우 안전하고 저단가의 고품질 단백질 사료의 생산을 가능하게 할 수 있으며, 대량생산체계를 구축함으로써 품질 및 공급을 안정시킬 경우 대두박 및 어분을 대체할 수 있는 단백질사료 시장을 개척할 수 있을 것으로 사료됨.

제 2 절 연구성과 목표 대비 실적

(1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		특허		신품중				논문		기타
		출원	등록	품명 명칭	중등 등록	품수 중 입 신 고	생 산 관 매 신 호	품중보호		
								출원	등록	
1차 년도	목표	1							1	
	달성	2						1		국제학술발표 1건 국내학술발표 1건
2차 년도	목표	1						2	3	
	달성	1						2	1	국제학술발표 3건 국내학술발표 4건
3차 년도	목표	1	1					2	2	
	달성		2					1	2	국제학술발표 1건 국내학술발표 6건
계	목표	3	1					4	6	
	달성	3	2					4	3	국제학술발표 5건 국내학술발표 11건

(2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	2	2		2	3	
	달성	3			3	3	

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

1. 국내 현황

- 곤충산업은 식용, 약용, 애완, 생태학습, 가축사료, 천적산업 뿐만 아니라 생명과학과 의학 분야 등 다양한 전략산업으로 급부상하고 있음.
- 국내에서도 2000년 이후부터 곤충산업에 대한 투자가 본격적으로 시작됐음. 국내 곤충산업의 시장 규모는 2009년 1570억원으로 추정되며 2015년까지 3000억 규모로 성장을 전망 하고 있음. 가장 규모가 큰 분야는 화분 매개로 전체 시장 규모의 34%를 차지하고 있으며, 곤충시장이 화분매개용이나 천적용 곤충을 중심으로 형성 되어 있음.
- 농림수산식품부는 2015년까지 곤충산업 육성에 1100억원을 투자해 연간 시장 규모를 3000억원까지 확대할 계획을 발표하였음.
- 현재 국내 곤충산업은 식용, 약용, 애완, 생태학습 등 초보단계이며 사료 및 식의약용분야 는 이제 조성이 시작되고 있음. 이 중 사료용 곤충은 식용·약용곤충과 함께 향후 블루오션 시장으로 꼽히고 있으나 사육기반이 초기단계임. 국내 곤충시장은 주로 화분곤충을 중심으로 생산되고 있으나 곤충의 영양적 가치를 감안하면 동물성 단백질 사료의 생산 측면에서 접근할 필요가 있음.
- 현재 사료용 곤충을 생산하고 있는 농가는 국내 3~4개 농가이며 영세적으로 이루어짐. 귀뚜라미, 밀웬 등이 사료용 곤충으로 판매되고 있으며 애완용으로 사육되는 파충류나 어류에 급여하거나 낚시미끼로 이용됨.
- 경기도 화성시 기산동에 있는 귀뚜라미농원의 경우 귀뚜라미 판매로 연매출 1억4000만 원 을 달성해 언론에 보도된 적이 있음.
- 귀뚜라미의 가격은 마리당 40~50원, 밀웬은 마리당 80원 정도로 가축의 단백질원으로 이용되 기 위해서는 대량공급체계 구축을 통해 생산단가를 낮출 필요가 있음.
- 국내에서는 갈색거저리를 사료용 곤충으로 도입할 계획이며 중국의 Haocheng mealworm Inc.에서 수입예정임. 외부와 격리되어 현지의 축산위생관리법에 의해 관리됨. Haocheng mealworm Inc.는 미국의 농무성의 허가를 받아 미국으로 거저리를 수출 중임.
- 전라남도와 한국유용곤충연구소에서 90%이상을 수입에 의존하고 있는 양식장 및 산란계 어분 시장을 목표로 사료용곤충 연구를 수행(2012-2014)하고 있으며, 연간 1천억원 정도 의 시장형성을 기대하고 있음.

- 사료용 곤충의 유전자원의 안정적인 계대 보전체계가 확립되지 않았으며, 장기적인 보관 기술이 개발되지 않았음. 연중 실내 계대 사육에 의해 증체가 약화되어 질병 발생률이 높고 단백질 함량이 감소될 우려가 있음.
- 사료용 곤충의 소비층이 얇기 때문에 생산에 한계가 있으며, 생물을 배합사료로 이용하기 어려움. 따라서 가축사료화를 위해서는 대량생산체계와 1차 가공방법의 도입이 필요함.

2. 국외현황

- 세계 곤충산업의 시장규모는 07년 11조원이었으며, 2020년에는 38조원까지 늘어날 전망이다. 세계 각국은 과거부터 곤충산업을 국가 전략산업으로 지정하여 정책적으로 육성하여 왔음.
- 세계 곤충시장은 매년 증가되고 있으며, 일본은 애완용 곤충시장, 유럽은 화분매개곤충, 북미지역은 천적곤충, 아시아지역은 식의약품 곤충시장을 특징으로 하여 시장규모가 커지고 있음. 이외에 기능성 식품이나 약용곤충, 축산분뇨 및 쓰레기 분해곤충, 가축사료용 곤충 등이 신규시장을 형성하고 있음.
- 가축가금과 어류 양식업의 발달로 인해 동물성 단백질원을 수급하기 위해 파리번데기, 거저리, 메뚜기 등 곤충을 산업화하여 생산하고 있음.
- 미국은 귀뚜라미시장만 연간 1500억원 규모로 산업적으로 이용되고 있음. 중국의 경우 현재 약 10조원 규모의 곤충시장을 가지고 있는 것으로 추정되며 중국의 전갈생산은 이미 산업화 되었으며, 귀뚜라미나 물방개 또한 준산업화 되었고 사료용 거저리를 USDA의 허가를 받아 미국으로 수출하고 있음.
- Neptune사는 2008년 어분을 대체하기 위해 곤충의 단백질을 추출한 단백질 사료를 개발하였으며 Ziegler Bros사와 매달 40톤의 공급 계약을 맺었음.
- 사료화 곤충시장은 세계시장에서도 조류, 어류, 파충류 등 애완동물 사료를 중심으로 생성되어있으며 아직까지 양계, 양돈 등 가축사료의 단백질원을 목표로 생산되지는 않고 있음. 하지만 어분을 대체하려는 목적으로 다양한 연구들이 수행되고 있음.

3. 기술적인 측면

- 곤충은 자연계에서 매우 많은 바이오매스를 차지하고 있음. 대부분의 곤충은 먹이사슬에서 첫 번째 포식자이며 번식이 매우 빠르고 유기물의 순환에 기여하며, 많은 곤충들은 식물의 단백질을 곤충단백질로 변화시켜 매우 효율적으로 축적함. 같은 양의 사료를 소와 메뚜기에 게 준다고 가정할 때 메뚜기 생산량이 소고기 생산량의 9배 수준으로 효율이 높음. (그림

1)

- 일반적으로 곤충은 영양성분이 높으며 단백질과 지방, 광물질 및 비타민을 풍부히 함유하고 있고, 아미노산 조성은 대부분의 케이스에서 곡물이나 콩류에 비해 우수하고 단쇄 불포화 지방산의 풍부함. (FAO)

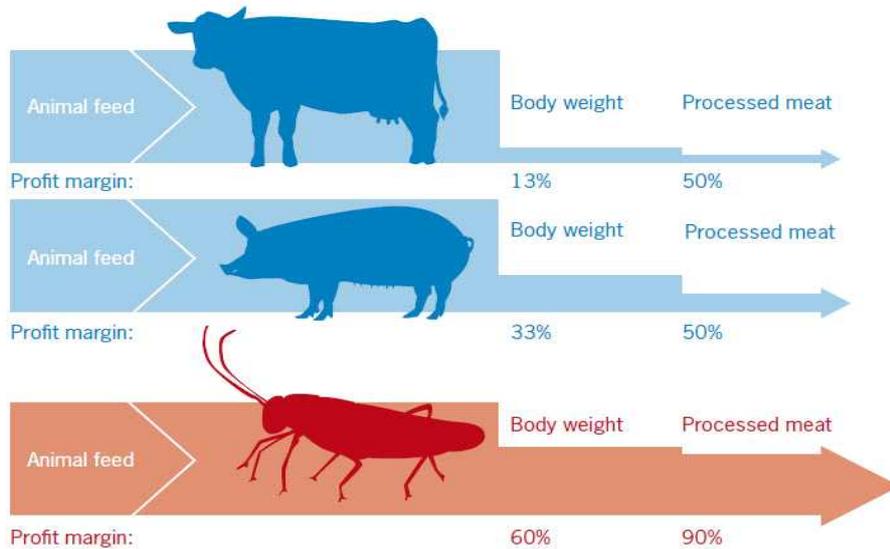


그림 1. 소, 돼지 및 곤충의 사료 효율 및 가공 효율

- 곤충류는 단백질 함량이 육류이상으로 높음. 식용가능 곤충의 단백질함량은 약 44~70% 수준으로 (Ramos-Elorduy, 1987), 보통 필수 아미노산이 풍부하나 표준화된 사양방법이 개발되지 않은 곤충의 경우 대상곤충이 섭취하는 물질에 따라 단백질 품질에 차이가 큼.
- 귀뚜라미, 동애등에, 메뚜기, 거저리 등은 여러 연구를 통해 동물사료에 단백질원으로서의 우수한 가치가 입증되었음.
- 굼벵이나 동애등에는 이미 대규모로 생산이 가능하며 사료로 이용가능성을 모색하고 있음. 이러한 연구는 유기물 쓰레기를 곤충을 통해 처리하는 연구의 부가적인 연구로 수행되고 있음.
- 건조 동애등에의 번데기는 약 42% 단백질과 35% 지방을 함유하고 있으며 오메가3 지방산이 풍부함(Newton 등, 1977). 닭 (Hale, 1973), 돼지 (Newron 1977), 무지개송어 (St-Hilaire 등, 2007) 및 메기 (newton 등, 2004) 등에서 대상동물의 성장을 증진시키거나 대조구와 동일한 효과를 보임이 증명되었음.
- 동애등에의 번데기가루는 무지개송어의 경우 어분의 25%수준까지 대체가 가능하며, 동애등에의 지방과 단백질의 분리를 통해 60%이상의 단백질을 함유한 원료사료를 개발할 수 있음.

- Anand 등 (2005)은 4종류의 메뚜기를 비교하여 동물사료에 이용가능성을 제시하였음.
- 거저리는 대두박과 유사한 단백질 원료로 양계 사료에 급여할 수 있으며 methionine이 제한아미노산으로 밝혀짐 (Goulet 등, 1978, Ramos-Elorduy 등, 2002). 흰쥐를 기준으로 급여했을 경우 거저리는 집파리나 귀뚜라미에 비해 단위 무게 당 에너지 함유량이 높음.
- 거저리는 딱정벌레의 일종으로 거저리의 유충인 밀웜은 설치류나 파충류 및 조류의 사료로 이용되어왔음. 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 methionine함량을 제외하면 우유단백질인 카제인이나 농축대두단백과 비슷하며, 생산 단가가 매우 낮음.
- 갈색거저리 (*Tenebrio molitor*)의 유충의 영양적 가치와 생산방법에 대한 다양한 연구들이 진행되었으며 (Hernandez 1987; Legunes와 Garcia 1994), 거저리와 유사한 *Alphitobius diaperinus* (Despins, 1994), *Tribolium castaneum* (Vohra 등, 1983) 등의 딱정벌레류를 조류에서 급여하여도 사료 섭취량, 성장 및 육질에 부정적인 영향이 나타나지 않았음.

표 1. 거저리의 유충(밀웜), 번데기 및 성충의 건조시 영양성분

(Ramos-elorduy et al., 2002)

	g/100g dry matter		
	Larvae	Pupae	Adult
Protein	47.7	53.1	60.2
Fat	37.7	36.7	20.8
Mineral	3.0	3.2	2.7
Crude fiber	5.0	5.1	16.3
Nitrogen free extract	7.1	1.9	0.0
Cal/kg	554.3	550.0	427.9

- Ramos-elorduy 등(2002)의 연구에서 밀웜을 육계사료에 10% 수준까지 첨가하였을 경우 사양성적에 대조구와 차이가 나타나지 않았음.
- 동애등에, 거저리, 귀뚜라미 대표적인 사료용 곤충들은 잡식성으로 쓰레기등 유기물을 다양하게 섭취할 수 있으나, 밀웜의 영양성분이 섭취한 물질에 따라 변동이 심하다는 것이 증명되었음 (Ramos-elorduy 등, 2002). 따라서 균일한 품질의 사료용 곤충생산을 위해서는 곤충용 사료 및 생산체계를 표준화시킬 필요가 있음.

4. 경제-산업적 측면

- 대두박과 어분은 가축사료 시장에서 대표적인 단백질사료로 바이오에탄올 생산과 생산량의 한계, 과도한 남획 등으로 인해 가격이 급격히 상승해왔음.
- 육분이나 어분, 대두박 등 동물사료에서 단백질성 원료사료의 가격비중은 축종에 따라 최대 60~70%를 차지하기도 함.
- 특히 어분은 어린동물의 단백질원으로 이용되어 왔고 국내 13개사에서 연간 약 4만톤이 생산되고 있으며, 수입산은 17개국에서 연간 약 5만톤을 수입하고 있음. 어분의 가격은 지속적으로 상승해 왔으며 2005년 어분가격은 699~733달러/톤에서 2010년 1805~1989달러/톤으로 급등하였음.

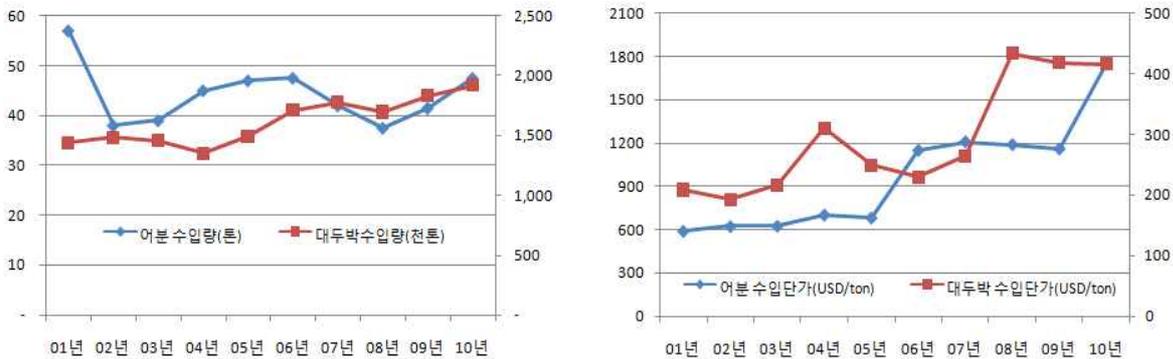


그림 2. 어분 및 대두박의 수입 및 가격 동향

(농림수산식품부, 한국해양수산개발원, 2011)

- 어분의 가격상승은 2005년 이후 과도한 남획으로 인해 어분 공급이 수요를 따르지 못하게 된것에 기인하며 어분을 사료화 곤충으로 대체할 경우 사료용 단백질원 수급에 매우 긍정적인 효과를 보일 것으로 추정됨.
- 양돈 배합사료 시장규모는 3조원으로 연간 약 5,355천톤이 생산됨. 돼지, 닭 등의 가축은 동물성 단백질을 식물성단백질보다 선호하며, 이중 자돈사료 생산량 165만톤의 5%를 대체한다면 곤충을 사용한 사료시장 참여로 곤충산업기반이 확대될 것으로 기대됨.
- 곤충을 이용한 사료는 조류를 대상으로 개발되어 왔으며 양돈에 비해 닭을 대상으로 다양한 연구들이 수행되어 왔으므로 양계산업에 곤충사료의 급여 또한 시장을 형성할 수 있을 것으로 기대됨.
- 현시점에서 가축사료용 사료화곤충의 시장은 애완동물 위주로 형성되어 있으며 가축을 대상으로 한 시장은 세계적으로 매우 협소함. 어분을 대체하기 목적으로 긍정적인 연구결과들이 발표된 것에 비해 대규모로 산업화되지 못했음. 따라서 시장형성 및 단가하락을 위한 대량생산체계의 구축과 경쟁력 확보가 필수적임.

5. 사회·문화적 측면

- 광우병 등 동물성 단백질 사료에 의한 가축 질병에 대한 우려가 늘어가면서 안전한 단백질 동물공급원으로서 사료곤충의 가치가 부각되고 있음. 현재까지 113개국에서 약 1,500종의 곤충이 식용이 가능한 것으로 알려져 있으며, 식용곤충에 대한 거부감은 존재하지만 동물사료로의 이용에 대한 거부감은 없음.
- 동애등에의 유충은 유충기를 지나는 동안 가축분뇨의 영양성분의 3/4를 흡수하여 번데기를 생성할 수 있으며, 유해한 냄새나 유해 박테리아, 파리의 번식 등을 억제하는 효과가 있음. 집파리의 유충을 이용할 시 양계장에서 발생하는 오염을 줄일 수 있으며, 밀웜 등도 음식물 쓰레기 등을 이용하여 생산이 가능함.
- 곤충사료화와 축산분뇨 및 유기물쓰레기 처리를 연계하여 가축분뇨 처리비용을 절감하고 퇴비생산에 접목할수 있는 가능성이 높음. 동애등에의 유충을 양계분뇨를 이용하여 키울시 분뇨 내 E.coli와 Salmonella를 감소시킨다는 보고가 있음 (Erickson 등, 2004).
- 곤충은 영양적인 가치 외에도 항생제가 필요하지 않으며 사람과 공유하는 질병이 없음. 쓰레기나 분뇨를 이용하여 생산이 가능하며, 어둠속에서 좁은 공간에 모여 있는 것을 선호하기 때문에 공간적인 제약이 적고 동물복지에 대한 우려가 없는 등의 다양한 장점을 가지고 있음.
- 이러한 곤충의 특징은 매우 안전하고 저단가의 고품질 단백질 사료의 생산을 가능하게 할 수 있으며, 대량생산체계를 구축함으로써 품질 및 공급을 안정시킬 경우 대두박 및 어분을 대체할 수 있는 단백질사료 시장을 개척할 수 있을 것으로 사료됨.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 1년차(2012년~2013년)

제1세부과제 :사료용 곤충 생산 증대 기술 개발

시험 1. 사료용 곤충 우수계통 선발

1. 사료용 곤충 후보종 영양성분 분석

최근 동물성 단백질사료의 주원료인 어분의 가격급등 및 품귀현상으로 세계 각국이 어분 확보를 위해 치열히 경쟁 중이며, 앞으로도 어분 가격은 지속적으로 상승할 것으로 전망한다. 따라서, 고영양소를 함유한 곤충을 이용하여 기존 어분을 대체할 수 있는 경제적인 사료 개발이 필요한 실정이다.

4종의 곤충(갈색거저리, 동애등애, 왕귀뚜라미, 슈퍼밀웜)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 것으로 확인하였다.

4가지 시료 모두 뛰어난 조단백질원의 역할을 할 것이라 기대되며, 특히 동애등애는 수분, 조지방, 조섬유, 조회분 함량에서도 높은 수치를 보였다. 갈색거저리와 슈퍼밀웜은 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. 아미노산 성분에서는 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. 시스테인 함량은 4가지 시료에서 비교적 다른 아미노산에 비해 낮게 측정되었으며, 슈퍼밀웜은 낮은 수치의 메치오닌이 측정되었다. 무기성분은 4가지 시료 모두 인체에 독성이 강한 비소, 카드뮴, 납이 검출되지 않아 안정성이 입증되었다. 특히 동애등애는 다른 시료에 비해 압도적으로 높은 칼슘을 함유하였으며, 다른 무기성분 또한 비교적 높은 수치를 나타내었다. 갈색거저리와 슈퍼밀웜은 칼슘과 망간이 다른 시료에 비해 현저히 낮았다.

표 1. 사료용 곤충 후보종 영양성분 분석

시료명	성분별 분석결과 (%)				
	수분	조단백질	조지방	조섬유	조회분
갈색거저리	0.76	46.42	39.42	5.13	3.26
동애등애	1.74	41.54	36.45	7.09	8.24
왕귀뚜라미	4.97	65.92	12.10	6.78	5.75
슈퍼밀웬	0.30	45.36	40.54	5.85	2.47

아미노산(%)	갈색거저리	동애등애	왕귀뚜라미	슈퍼밀웬
시스테인(CYS)	0.338	0.288	0.558	0.338
메치오닌(MET)	0.506	0.709	0.850	0.412
아스파르트산(ASP)	3.695	3.869	6.018	3.452
트레오닌(THR)	1.922	1.689	2.386	1.666
세린(SER)	2.204	1.785	3.368	1.719
글루탐산(GLU)	5.816	4.595	7.690	5.464
글리신(GLY)	2.493	2.266	3.065	2.084
알라닌(ALA)	3.740	2.770	5.083	3.086
발린(VAL)	2.367	1.900	2.682	2.120
이소루신(Ile)	1.911	1.649	2.287	1.823
루신(Leu)	3.574	3.035	4.928	3.196
타이로신(Tyr)	3.281	2.726	3.096	3.074
페닐알라닌(Phe)	1.690	1.740	2.080	1.693
라이신(Lys)	2.153	2.281	3.286	2.024
히스티딘(His)	1.341	1.201	1.388	1.259
아르기닌(Arg)	2.308	1.980	4.205	2.109
프롤린(Pro)	2.967	2.234	3.367	2.290

무기성분(mg/kg)	갈색거저리	동애등에	왕귀뚜라미	슈퍼밀웬
비소(As)	0.00	0.00	0.00	0.00
칼슘(Ca)	34.78	2995.82	144.14	53.15
카드뮴(Cd)	0.00	0.00	0.00	0.00
구리(Cu)	18.44	13.30	24.76	9.82
수은(Hg)	0.078	0.077	0.180	0.072
칼륨(K)	7475.33	6198.00	10695.83	7111.51
마그네슘(Mg)	1902.67	2075.90	1515.00	1000.06
망간(Mn)	7.80	89.60	154.97	12.08
나트륨(Na)	1013.62	1598.08	3873.00	1301.59
인(P)	6701.93	5711.13	8924.64	5298.34
납(Pb)	0.00	0.00	0.00	0.00
아연(Zn)	115.61	67.26	280.49	79.52

미생물	갈색거저리	동애등에	왕귀뚜라미	슈퍼밀웬
<i>E. coli</i> 0157:H7	불검출	불검출	불검출	불검출
Salmonella spp.(정성)	불검출	불검출	불검출	불검출

지방산(%)	갈색거저리	동애등에	왕귀뚜라미	슈퍼밀웬
Myristic acid(C14:0)	3.03	9.66	0.69	1.37
Palmitic acid(C16:0)	17.36	23.79	15.61	30.22
Palmitoleic acid(C16:1n7)	2.55	5.92	3.30	3.48
Stearic acid(C18:0)	2.63	5.11	6.52	6.56
Oleic acid(C18:1n9)	43.06	31.43	27.96	35.89
Vaccenic acid(C18:1n7)	0.00	0.00	0.00	0.00

Linoleic acid(C18:2n6)	29.80	20.19	43.71	21.47
γ -Linoleic acid(C18:3n6)	0.06	0.10	0.07	0.12
Linolenic acid(C18:3n3)	1.30	2.23	1.46	0.78
Eicosenoic acid(C20:1n9)	0.20	0.92	0.69	0.11
Arachidonic acid(C20:4n6)	0.00	0.65	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	23.02	38.57	22.82	38.15
불포화 지방산	76.98	61.43	77.18	61.85
-단가	45.82	38.27	31.95	39.48
-다가	31.16	23.16	45.23	22.37

2. 갈색거저리 우수개체 선발

갈색거저리 대량생산에서 품종의 효과와 반응은 매우 중요하다. 갈색거저리 우수계통 선발을 위한 지역별 계대사육을 실시하였으며, 사육온도는 25~30℃ 사이를 유지하고, 성충의 사료는 영양을 풍부하게 하여 생육조사하였다.

- 지역별 갈색거저리 확보 : 농과원, 경기, 경남, 부산, 전남

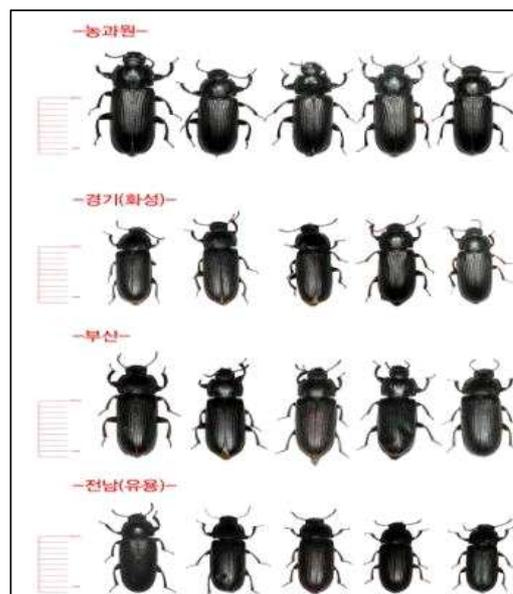


그림 1. 지역별 갈색거저리 성충

시험 2. 산란성 향상을 위한 최적의 생식 환경 조건 구명

1. 온도별 성충의 산란성 및 수명

성충의 생존 기간 동안, 온도별 성충의 산란성 및 수명을 비교한 결과, 총 산란수는 25~30℃ 일 때 419.3~470.95개로 가장 높았으며, 특히 27.5℃ 조건에서 470.95개로 가장 높은 총 산란수를 보였다. 그 외 17.5℃~22.5℃ 에서 산란수는 156.1~255.6개로 낮은 수치를 나타냈다. 산란전 기간은 17.5℃ (10일)를 제외한 나머지 조건에서 모두 6~7일로 큰 차이를 보이지 않았다. 산란기간은 27.5℃일 때, 137일로 가장 긴 기간을 가졌으며 17.5℃에서도 이와 비슷하게 134일로 비교적 긴 산란기간을 가졌다. 30℃ 조건에서는, 산란기간이 100일로 가장 짧게 나타났고, 20℃일 때도 110.5일로 비교적 짧은 산란기간을 가졌다. 성충의 수명은 25℃에서는 수컷보다 암컷의 수명이 길었고, 17.5℃, 20℃, 22.5℃, 27.5℃ 조건에서는 암컷보다 수컷의 수명이 길다는 것을 확인할 수 있었다. 30℃ 일 때는 암컷과 수컷이 각각 100일, 98.6일로 비슷한 수명을 보였다(표2).

표 2. 온도에 따른 산란특성

온도 (℃)	산란전기간 (일)	총 산란수 (개)	산란기간 (일)	수명 (일)	
				암컷	수컷
17.5	10.00	156.10	134.00	142.80	182.22
20	7.00	207.30	110.50	104.10	121.20
22.5	6.00	255.60	125.00	129.10	140.20
25	6.50	419.30	121.50	145.00	127.50
27.5	7.00	470.95	137.00	107.40	144.80
30	6.50	412.35	100.00	100.00	98.60

온도별 성충 경과 일수에 대한 패턴을 분석한 결과, 일반적으로 갈색거저리 유충의 대량 생산을 위해 성충의 사육기간이 약 2개월임을 고려했을 때, 61일까지 가장 높은 산란수/마리를 보인 것은 27.5℃ (396개)와 30℃ (366개)의 조건이었다. 특히 27.5℃ 조건에서는, 가장 높은 산란기간 (137일) 및 총 산란수 (470.95일) (그림 2)를 나타냄과 더불어, 산란수/마리에서도 가장 높은 수치를 나타냈다. 하지만 총 산란수 419.3개로 높은 수치를 보인 25℃ 조건에서는 (그림 2), 6개월 동안 산란수/마리는 273개로 비교적 낮은 수치를 보였다. 그 밖에 6개월 동안 가장 낮은 산란수/마리를 보인 것은 20℃ (102개)이었으며, 17.5℃ (146개)와 22.5℃ (190개)에서도 낮은 수치를 보였다. 결과적으로, 유충의 효율적인 생산 위해, 사육조건은 27.5℃가 가장 이상적인 조건임을 알 수 있었다.

산란수 (개)/ 마리

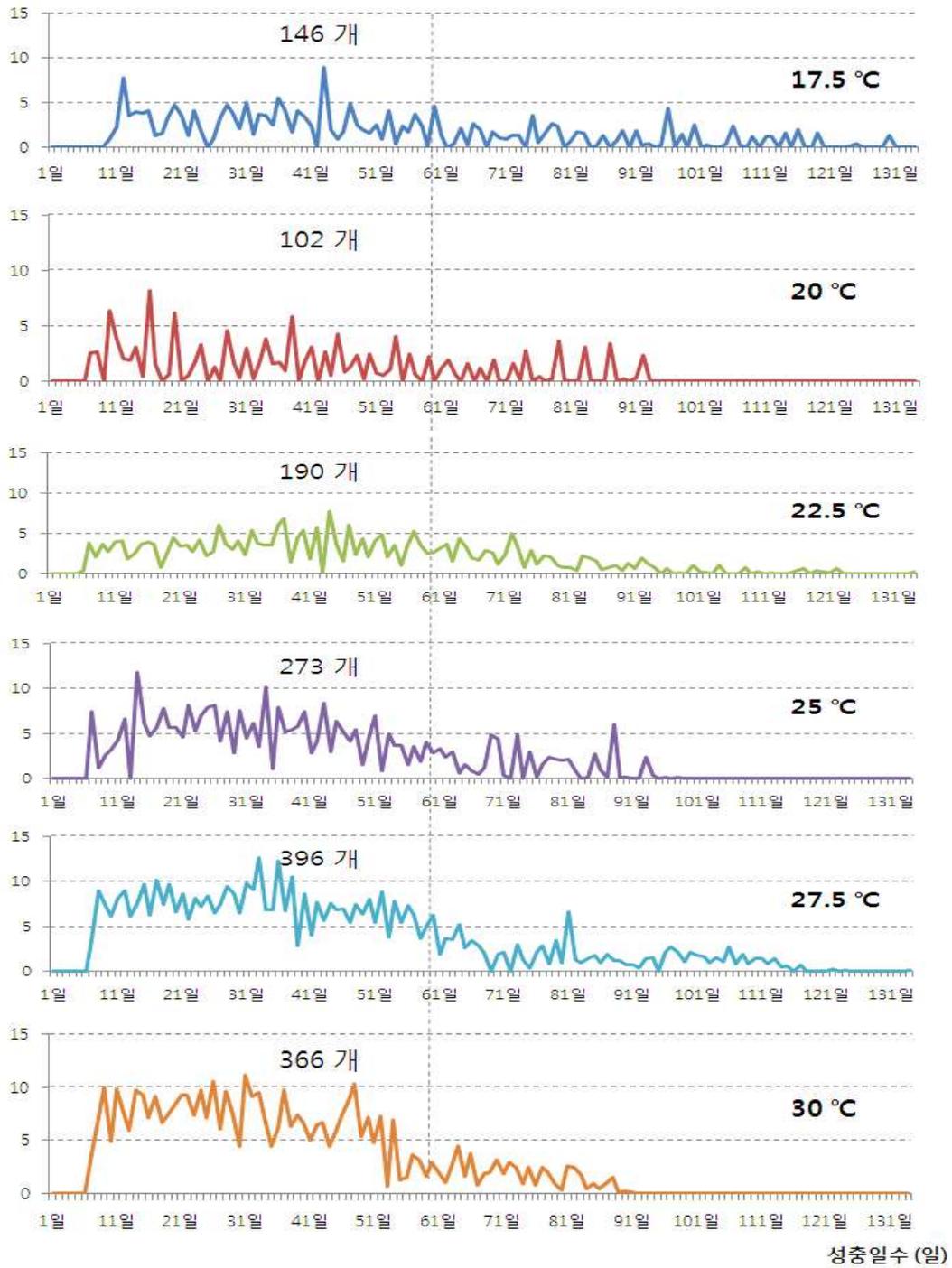


그림 2. 온도에 따른 산란수

시험 3. 성충 인공사료 개발

갈색거저리 성충의 식성은 잡식성이며 뒷날개는 퇴화되어 날지 못하며, 기어가는 속도는 빠르다. 우화 4-5일 이후에는 교미와 산란을 시작한다. 사육환경 및 먹이관리를 잘해주면 산란기를 연장하고 산란량을 증가시킬 수 있다.

- 단백질원별 갈색거저리 먹이선호성 : 어분에 대한 선호성 양호



그림 3. 단백질원별 먹이 선호성 : 밀기울, 닭가슴살, 어분, 참치

1. 어분첨가에 따른 산란성 시험

가. 실험방법

먹이 용기는 1cm x 10cm이며 모든 실험군에 동일한 크기로 사용되었고, 성충을 암, 수 5쌍을 사육하여 산란 전 기간, 산란기간, 산란수, 수명을 매일 관찰하였다. 일반적으로 갈색거저리를 사육할 때 쓰는 먹이 공급용 밀기울과 수분공급을 위한 배추를 각각 7g씩 첨가해 대조군으로 사용하였으며, 배추는 주 2회 공급되었다. 어분첨가 실험군에서는 밀기울을 기본적으로 7g 공급해 주었으며, 주 2회 배추를 7g을 공급한 것과 안한 것을 비교 관찰하였다. 사료 공급 방법은 밀기울 7g을 넣고, 어분 7g을 주 2회씩 공급해주었고, 어분의 특성상 쉽게 가루가 날리기 때문에 원활한 먹이공급을 위해 2ml/어분 1g의 수분을 어분에 공급해주었다. 모든 실험군은 3회 반복되었다.

나. 실험결과

대조군과 비교할 때, 밀기울에 어분을 첨가한 모든 실험군에서 산란수, 산란기간, 수명 등이 좋았으며 특히 밀기울에 어분만 첨가된 조건의 결과가 가장 좋았다. 어분 첨가군에서 밀기울과 배추를 넣어줄 때 산란 전 기간은 4.67일, 밀기울만 넣어줄 때는 5.67일로 대조군 산란 전 기간의 9일과 비교할 때 짧은 산란 전 기간을 가졌다. 그리고 어분 첨가군에서 밀기울과 배추를 넣은 조건에서는 산란기간 107.67일과 산란수 588.47개를 나타내었다. 또한 어분 첨가군에서 밀기울만 넣은 조건에서는 125일의 산란기간과, 633.67개의 산란수를 나타내었다. 이는 어분첨가군의 산란기간과 산란수가 대조군(밀기울 + 배추)의 44.67일, 282.27개보다 훨씬 좋은 수치였다. 성충의 수명은 모든 실험군에서 암컷의 수명이 수컷보다 길었으

며, 대조군에서 자란 성충의 수명 (암컷: 80.27일, 수컷: 53.40일)보다, 어분, 밀기울, 배추에서 자란 성충 (암컷: 98.53일, 수컷: 81.80일)과 어분과 밀기울에서 자란 성충의 수명 (암컷: 108일, 수컷: 79.67일)이 길었다.

표3. 어분첨가에 따른 산란성 및 성충의 수명

사료성분		대조군 (밀기울 + 배추)	어분 첨가 (밀기울 + 배추)	어분 첨가 (밀기울)
산란 전 기간 (일)		9.00	4.67	5.67
산란기간 (일)		44.67	107.67	125.00
산란수 (개)/마리		282.27	588.47	633.67
수명 (일)	암컷	80.27	98.53	108.00
	수컷	53.40	81.80	79.67

시험 4. 부화율 향상 조건 구명

1. 알 보호기간 실험

갈색거저리의 알 받기는 간단하다. 별도의 채란판을 넣어 주지 않고 먹고 살아가는 밀기울이나 보릿가루 속에 넣기 때문이다. 그래서 별도의 장치 없이 알을 관찰하기 힘들고 알 받을 장소의 환경 또한 중요하다.

사육실(기류 0.029m/s) 안에서는, 밀기울로 알을 덮는 기간을 다르게 하더라도 부화율에는 큰 차이를 보이지 않았다.

인큐베이터 안에서는, 밀기울로 덮는 기간이 길어질수록 부화율이 증가되었다. 인큐베이터 안의 기류는 평균 0.538m/s이다. 이 기류하에서는 적어도 5일정도 알 보호기간이 있어야 부화율이 85% 이상임을 확인하였다.

표4. 기류형성이 부화율에 미치는 영향. (위) 사육실, (아래)인큐베이터

25℃ 사육실 용기 (높이 1cm, 지름 10cm), 밀기울 (7g)							
알 수 (개)	66	114	93	66	59	96	43
보호기간 (일)	1	2	3	4	5	6	7
부화율 (%)	100	91.2	89.3	93.9	94.9	100	97.7

25℃ 인큐베이터 용기 (높이 1cm, 지름 10cm), 밀기울 (7g)							
알 수 (개)	62	121	94	110	86	121	156
보호기간 (일)	1	2	3	4	5	6	7
부화율 (%)	0	0	0	51.8	86.1	86.8	100

시험 5. 거저리 사육농장 실태 조사안 작성 후 농가현장방문을 통한 설문지

* 전남, 경기 등 15곳 완료

표5. 농가 현장방문 설문지 양식

농가 현황	상호						
	주소						
	연락처				핸드폰		
운영 현황	농장규모						
	사육시설 형 태	콘크리트(철골) <input type="checkbox"/> 판넬 <input type="checkbox"/> 컨테이너 <input type="checkbox"/> 비닐하우스 <input type="checkbox"/> 유리온실 <input type="checkbox"/> 기타 <input type="checkbox"/> ()					
	난방형태	지열 <input type="checkbox"/> 전기보일러 <input type="checkbox"/> 연탄보일러 <input type="checkbox"/> 기타 <input type="checkbox"/> ()					
	운영기간						
	소유권	소유 <input type="checkbox"/> 임대 <input type="checkbox"/>					
	고용형태	구분	가족			고용	
인원		명			명		
성별		남 명/ 여 명			남 명/ 여 명		
연령 대		30대 <input type="checkbox"/> 40대 <input type="checkbox"/> 50대 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 60대 <input type="checkbox"/> 70대이상 <input type="checkbox"/>			30대 <input type="checkbox"/> 40대 <input type="checkbox"/> 50대 <input type="checkbox"/> 60대 <input type="checkbox"/> 70대이상 <input type="checkbox"/>		
정보 수집	교육이수	• 농장과 관련한 전문교육을 받은 적이 있습니까? 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/>					

		• 곤충관련 <input type="checkbox"/> 마케팅관련 <input type="checkbox"/> 기타 <input type="checkbox"/> (과정:)
	정보처	• 인터넷 <input type="checkbox"/> 책자 <input type="checkbox"/> TV <input type="checkbox"/> 신문 <input type="checkbox"/> 동종업체 <input type="checkbox"/> 농진청 <input type="checkbox"/> • 기타 ()
판매처		

시설 현황	형태	사육실 <input type="checkbox"/> 작업실 <input type="checkbox"/> 냉장실 <input type="checkbox"/> 사무실 <input type="checkbox"/> 창고 <input type="checkbox"/> 기타()	
	규모	사육시설(평/m ²)	기타시설 (평/m ²)
	기타 (사진 등)		

사육 용기	재질	
	크기	
	기타 (사진 등)	

먹이	
----	--

사육 및 판매량	사육량 (현재 사육두수)	
	판매횟수	주 ()회/ 월 ()회/ 기타: (회)
	1회	갈색거저리 (Kg , 귀뚜라미 (Kg),

	판매량 (사료용 곤충)	기타(kg)
사육상 문제점 분석		

제 2 절 2년차(2013년~2014년)

제1세부과제 :사료용 곤충 대량생산 기술개발

시험 1. 번데기 보호 및 우화성충의 분리 방법

1. 거저리 배설물 분리장치 개발

번데기 및 성충 수거를 위해 사육상자의 사료에 혼합된 거저리의 배설물을 자동으로 분리 배출할 수 있게 한다.

가. 작동방법

거저리 배설물 분리장치(100)를 이용해 사료에 혼합된 배설물을 분리 배출하기 위해서는, 우선 진동발생수단(110)의 진동테이블(116) 상에 배출호퍼(120)를 올려놓은 상태에서 다시 배출호퍼(120)의 상부에 배설물 분리용기(130)의 하부를 끼움 결합시킨다. 배설물 분리용기(130)가 배출호퍼(120)에 끼운 후 결합되면, 작업자는 거저리 또는 거저리 유충의 배설물이 혼합된 사료를 배설물 분리용기(130)에 담은 후, 진동발생수단(110)을 작동시킨다. 이때 배설물 분리용기(130)에는 배설물이 혼합된 사료와 함께 사육되는 거저리 또는 거저리 유충도 함께 담겨진다. 그리고 진동발생수단(110)을 작동시키면, 진동발생수단(110)의 진동유닛은 진동을 생성하는데, 진동유닛에서 생성된 진동은 진동테이블(116), 진동테이블(116)에 올려진 배출호퍼(120) 및 배설물 분리용기(130)로 전달된다. 이렇게 배설물 분리용기(130)까지 전달되는 진동에 의해서 배설물 분리용기(130) 내의 사료 및 배설물은 요동하게 되고, 그 결과 배설물 분리용기(130) 내의 배설물은 메쉬망으로 이루어진 배설물 분리용기(130)의 바닥면(134)을 통해 배출호퍼(120)의 배출 경사판(124) 측을 떨어지고, 배출 경사판(124) 측으로 떨어진 배설물은 배출 경사판(124)을 따라 안내된 후, 호퍼 본체(122)에 형성된 배출공(126)을 통해 외부로 배출된다.

이와 같이 형성된 본 거저리 배설물 분리장치(100)는 바닥면(134)이 메쉬망으로 이루어지고 배설물이 혼합된 사료가 담겨지는 배설물 분리용기(130)와, 상부에 배설물 분리용기(130)가 안치되고 배설물 분리용기(130)에서 분리되는 배설물을 외부로 배출하는 배출호퍼(120), 및 배설물 분리용기(130)가 안치된 배출호퍼(120)에 주기적으로 반복되는 진동을 제공하는 진동발생수단(110)을 포함함으로써, 사료에 혼합된 거저리의 배설물을 자동으로 분리 배출할 수 있기 때문에 배설물 분리에 따른 작업시간 및 노동력을 현저히 줄일 수 있음.

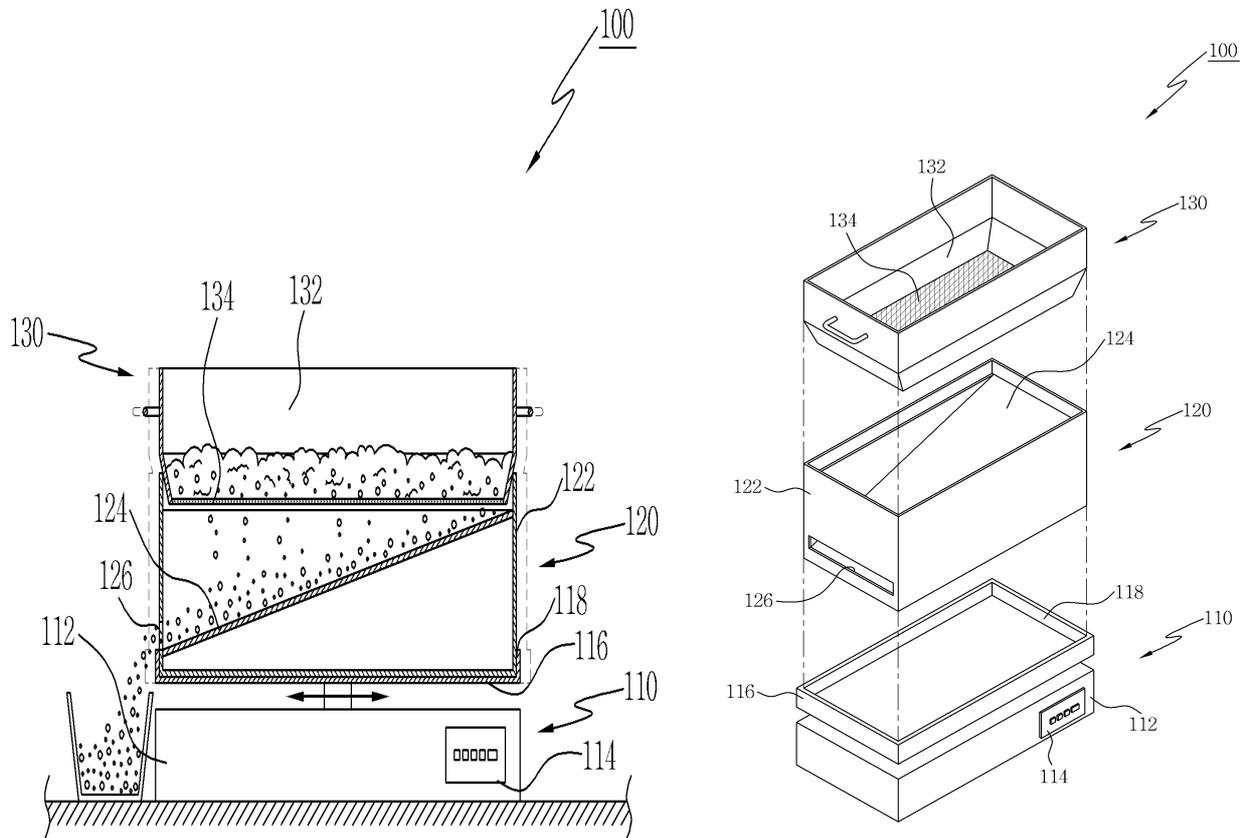


그림 1. 거저리 배설물 분리장치

나. 개발 목적

본 고안은 사육상자의 사료에 혼합된 거저리의 배설물을 자동으로 분리 배출할 수 있게 함으로써, 배설물 분리에 따른 작업시간 및 노동력을 현저히 줄일 수 있을 뿐만 아니라 배설물 분리작업시 먼지의 발생을 억제하여 작업 환경을 개선할 수 있게 하는 거저리 배설물 분리장치를 제공하기 위한 것이다.

다. 개발 구성

본 고안에 따른 거저리 배설물 분리장치는, 바닥면이 메쉬망으로 이루어지고 배설물이 혼합된 사료가 담겨지는 배설물 분리용기와, 상부에 배설물 분리용기가 안치되고 배설물 분리용기에서 분리되는 배설물을 외부로 배출하는 배출호퍼, 및 배설물 분리용기가 안치된 배출호퍼에 주기적으로 반복되는 진동을 제공하는 진동발생수단을 포함한 것이다.

라. 개발 효과

사료에 혼합된 거저리의 배설물을 자동으로 분리 배출할 수 있기 때문에 배설 분리에 따른 작업시간 및 노동력을 현저히 줄일 수 있는 이점이 있다. 그리고 본 고안에 따른 거저리 배설물 분리장치는, 진동을 이용하여 배설물 분리용기의 내의 배설물을 분리하기 때문에 배설

물 분리작업 시 먼지의 발생을 억제하여 쾌적한 작업 환경을 조성할 수 있게 하는 이점이 있다.

- 배설물 분리장치의 하부의 양쪽바닥 가장자리는 배설물이 빠져나가기 쉽게 경사지도록.



그림 2. 거저리 배설물 분리방법 비교

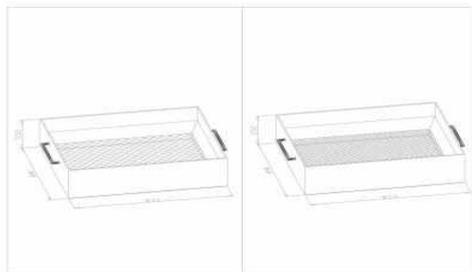


그림 3. 거저리 배설물 분리장치 모식도

- 배설물 분리장치의 하부에는 배설물만 빠져나올 수 있도록 유층망은 0.2mm이하, 성층은 5.00mm이하의 메쉬를 갖는 망이 구비되어 있음
 - 중층유층의 체폭 : 평균 0.29mm (0.26~0.35mm)
 - 성층의 체폭 : 평균 5.46mm (4.22~6.07mm)

· 배설물

- 150 μ m 체(망): 배설물 분리 안됨
- 210 μ m 체(망): 배설물 분리 안됨
- 250 μ m 체(망): 배설물 분리 안됨
- 600 μ m 체(망): 배설물 분리 가능



2. 구조물 및 소도구를 이용한 수거 방법



- 키친타월심(휴지심) 이용
 - 상자 내 공간활용으로도 좋으며,
 - 대부분 성충들이 휴지심 속으로 들어가 있어 수거에 양호



- 계란판 이용
 - 상자 내 공간활용으로도 좋으며,
 - 성충들이 계란판 속보다는 위로 올라가 활동을 하기 때문에 수거용으로 양호



- 인조잎 이용
 - 상자 내 공간 활용으로도 좋으나,
 - 수거용으로는 미흡



- 망 이용
 - 수거용으로 양호



- 포트 이용
 - 수거용으로 양호, 개체사육이라 노동력 많이 필요

시험 2. 비타민 및 수분공급용 채소·과일 대체 수분공급 방법 개발

갈색거저리는 주로 먹이로부터 수분을 얻는다. 수분은 갈색거저리가 생명유지활동을 위한 매개체이기에 대부분 채소(배추, 당근, 무 등)와 과일(수박 등)껍질을 저장곡물인 밀기울 등과 함께 공급한다.

한편, 갈색거저리의 사육과정 중에서 사육상자 안에 갈색거저리의 배설물이 늘 사료와 같이 혼합되어 있으므로 갈색거저리도 그렇게 같은 환경에서 생활한다. 이 때문에 사료의 위생이 매우 중요하다. 사료의 품질유지는 양호한 상태 하의 제일 중요한 요소인 사료의 함수량에 달려 있다.

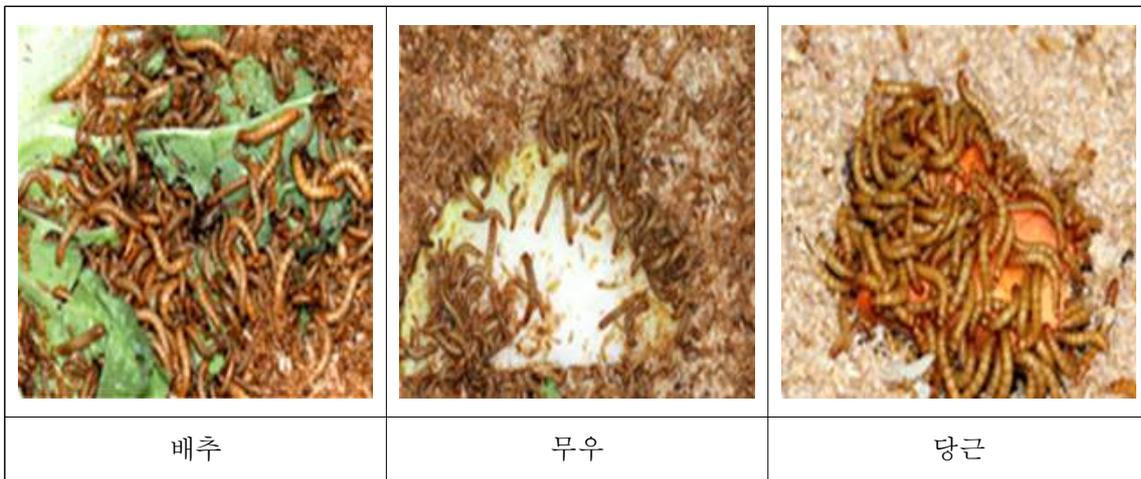


그림 4. 수분공급용 채소를 먹는 갈색거저리

본 연구는 수분공급용으로 주는 채소 및 과일을 대체하기 위해서 수분공급용 젤리를 개발하고자 수행되었다.

1. 수분공급용 젤리 개발

거저리와 유충 수분공급용 젤리형 조성물은 물 95~99.8 중량%와 한천 0.2~5중량% 및 무기질과 비타민을 더 포함하는 것이다.

표 1. 수분공급용 젤리 제조방법

재 료	용 량
Wesson salt mixture(무기질)	8g
vitamin premix(종합비타민제)	10g
agar(성형제)	10g
물	1000ml

- ① 물(1000ml)와 agar(10g), Wesson salt mixture(8g)을 넣고 hot plate위에 올린 다음 마그네틱바를 넣은 후 온도가 80℃ 올라갈 때까지 가열하여 물질들을 녹여준다.
- ② hot plate의 가열을 멈추고 온도가 55℃가 될 때 까지 마그네틱바는 계속 돌려서 물질들을 녹여준다.
- ③ 온도가 55℃가 되면 vitamin premix(10g)를 넣어 녹여준다.
- ④ vitamin premix가 다 녹으면 용기에 담아 서서히 식혀 굳혀준다.

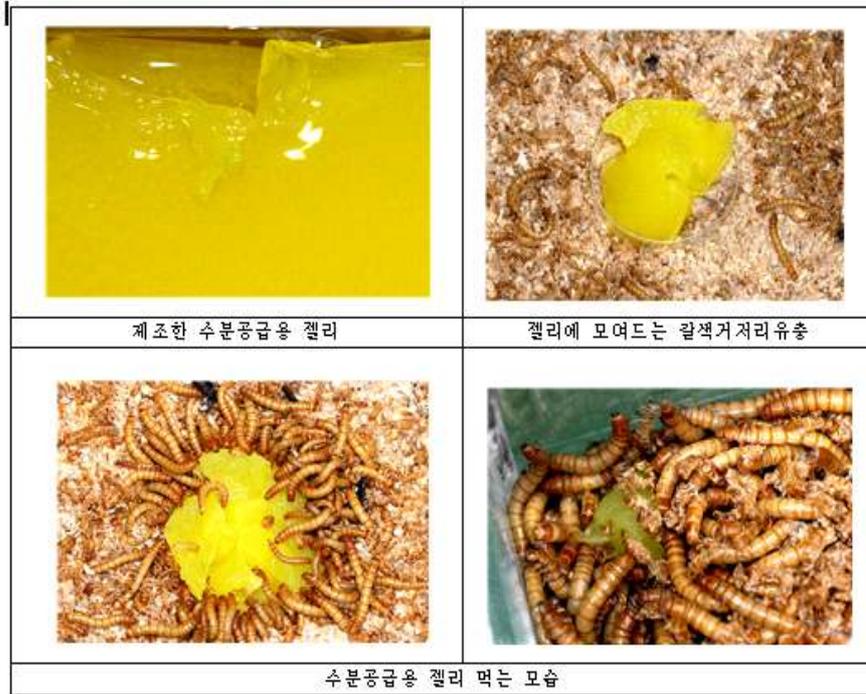


그림 5. 갈색거저리 유충 수분공급용 젤리

2. 수분공급용 젤리 사육 시험

가. 실험방법

사육상자 내 밀기울과 수분공급용 젤리 및 채소(배추)를 5cm x 5cm로 잘라서 밀기울 위에 넣어주었다. 젤리와 채소는 동일한 3회/ 주 교체하였다. 사육실 환경조건은 25±1℃, 습도 40-50%로 설정하였고, 공시곤충은 갈색거저리 부화유충 10마리씩 10구를 설정(총 100마리)하여 실험하였다.

나. 수분공급용 젤리 사육 성적

갈색거저리의 유충은 저작형(씹어 먹는 형)이라 수분공급용 젤리는 유충먹이로 적합하다. 먹이원별 생육조사를 한 결과, 수분공급용 젤리를 먹은 유충은 채소를 공급한 것보다 번데기·성충의 무게가 증가하였으며 체장도 길었다. 뿐만 아니라 생존율(유충에서 성충까

지)은 1.6배가 높았다. 젤리형태라 사료의 위생 양호 및 수분과다에 의한 폐사를 막을 수 있다.



표 2. 먹이원에 따른 유충의 발육 특성

먹이원	유충기간 (일)	번데기무게 (g)	번데기기간 (일)	성충 무게 (g)	성충체장 (cm)	생존율 (%)
젤리	123.43±22.28	0.22±0.04	7.70±1.90	0.18±0.04	1.66±0.10	47.00%
채소 (배추)	123.72±16.94	0.20±0.04	7.52±1.92	0.17±0.03	1.61±0.14	29.00%

다. 한천함량에 따른 수분공급용 섭취 장면 및 젤리 상태

한천함량 (중량%)	섭취 장면	젤리상태
0.1	-	- 젤리화 안됨
0.2		- 젤리형태 띄지만 칼로 자를시 물이 많이 생겨 수저로 공급해야함 - 물이 많아 유충이 젤리에 빠지는 경우가 생김
0.3		- 젤리형태 띄지만 칼로 자를 시 물이 많이 생겨 수저로 공급해야함

0.4		<ul style="list-style-type: none"> - 젤리형태 띄지만 칼로 자를시 물이 많이 생겨 수저로 공급해야함
0.5		<ul style="list-style-type: none"> - 젤리형태 뿔
3		<ul style="list-style-type: none"> - 젤리형태 띄지만, 딱딱한 질감을 가짐
5		<ul style="list-style-type: none"> - 젤리형태 띄지만, 딱딱한 질감을 가짐
10		<ul style="list-style-type: none"> - 젤리화 안됨

시험 3. 유충사육 표준상자 디자인 개발

공장규모화 생산에서는 사육 작업자의 노력강도 및 사육도구의 규격화로 생산관리에 편리해야 한다. 사육상자의 규격은 길이와 폭은 300~800mm, 40~800mm으로 각 사육상에 맞추어 제작하고 단, 높이는 50~60mm이상이어야 한다. 사육상자는 어떤 종류의 재질을 선택하더라도 상관없으나, 바닥이 평평하고 기울거나 뒤틀리면 안 되고, 견고하고 오래가며, 가벼운 것이 좋다. 일부 농가에서는 단단한 종이와 쓰던 합판을 이용하여 나무 사육상자를 만들어 사용하는데, 주의할 점은 상자내부측면에 갈색거저리가 벽을 타고 오르지 못하도록 테이핑을 해야 한다.

	
<ul style="list-style-type: none"> · 폴리프로필렌 박스(540x360x180mm) - 가벼워서 작업자에게 양호, 유충 생육 상태 관찰 용이, 단, 상자높이가 높음 	<ul style="list-style-type: none"> · 2단 아크릴 서랍장(아크릴) - 유충 생육 관찰 용이, 작업자 노력 강도 높음
	
<ul style="list-style-type: none"> · 플라스틱 서랍장 - 상자 무게는 가벼움, 각 서랍 분리가 안되며, 배설물 분리가 어려움 	<ul style="list-style-type: none"> · 3단 서랍장(아크릴) - 유충 생육 관찰 용이, 작업자 노력 강도 높음
	
<ul style="list-style-type: none"> · 플라스틱상자 (595x385x150mm) - 상자가 무거움(하중 : 20kg) - 손잡이가 없어 작업자에게는 불편 	<ul style="list-style-type: none"> · 종이상자 - 상자내부측면에 갈색거저리가 벽을 타고 오르지 못하도록 테이핑 필요

시험 4. 건조방법 구명

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

표 3. 시료분석 항목, 관련 고시 및 분석기기

<분석기관: 농업기술실용화재단>

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	FOSSsoxtec™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

1. 건조방법별 갈색거저리 영양성분 분석

건조 갈색거저리 수분함유량은 80℃ 열풍건조에서 가장 낮았으며, 조지방은 동결건조처리군이 가장 낮았다.

시료명	성분별 분석 결과 (%)				
	수분	조단백질	조지방	조섬유	조회분
50℃ 열풍건조	4.81	45.93	36.89	4.94	2.57
70℃ 열풍건조	3.72	45.39	37.65	4.98	2.81
80℃ 열풍건조	0.76	46.42	39.42	5.13	3.26
동결건조	5.33	46.44	32.70	4.58	2.86

건조방법에 따른 갈색거저리의 아미노산 성분 중 이소루신(Ile)은 높은 온도로 건조할수록 함유량이 적음을 확인하였다.

아미노산 (%)	50℃ 열풍건조	70℃ 열풍건조	80℃ 열풍건조	동결건조
시스테인(CYS)	0.336	0.322	0.338	0.517
메치오닌(MET)	0.487	0.422	0.506	0.672
아스파르트산(ASP)	3.673	3.625	3.695	3.591
트레오닌(THR)	1.874	1.838	1.922	1.807
세린(SER)	2.188	2.112	2.204	2.091
글루탐산(GLU)	5.924	5.890	5.816	5.676
글리신(GLY)	2.326	2.336	2.493	2.410
알라닌(ALA)	3.587	3.371	3.740	3.685
발린(VAL)	2.607	2.520	2.367	2.439
이소루신(Ile)	2.018	1.945	1.911	3.556
루신(Leu)	3.537	3.420	3.574	3.405
타이로신(Tyr)	3.454	3.118	3.281	3.460
페닐알라닌(Phe)	1.810	1.650	1.690	1.759
라이신(Lys)	2.402	2.294	2.153	2.906
히스티딘(His)	1.361	1.288	1.341	1.527
아르기닌(Arg)	2.244	2.259	2.308	2.434
프롤린(Pro)	2.649	2.514	2.967	3.019

건조방법에 따른 갈색거저리의 무기성분은 칼슘이 80℃열풍건조에서 가장 적은 함유량을 보였으며, 인·칼륨·나트륨은 동결건조의 경우가 가장 함유량이 높았다. 아연·구리의 함유량은 건조온도가 높을수록 많아지는 것을 확인하였다.

무기성분 (mg/kg)	50℃ 열풍건조	70℃ 열풍건조	80℃ 열풍건조	동결건조
Ca(칼슘)	446.73	599.12	340.78	434.59
P(인)	5921.64	6276.03	6701.93	7060.7
K(칼륨)	6602.08	7122.57	7475.33	9479.73
Na(나트륨)	919.87	1013.61	1013.62	3644.84
Mg(마그네슘)	2130.40	2592.38	1902.67	2026.88
Zn(아연)	112.67	127.46	115.61	104.28
Cu(구리)	18.53	19.19	18.44	13.27
Pb(납)	0.00	0.00	0.00	0.00
Cd(카드뮴)	0.00	0.00	0.00	0.00
As(비소)	0.00	0.00	0.00	0.00
Hg(수은)	0.029	0.036	0.078	0.050

E. coli 0157:H7	불검출	불검출	불검출	불검출
Salmonella spp.(정성)	불검출	불검출	불검출	불검출

지방산 (%)	50℃ 열풍건조	70℃ 열풍건조	80℃ 열풍건조	동결건조
Myristic acid(C14:0)	3.37	2.96	3.03	3.05
Palmitic acid(C16:0)	17.20	17.55	17.36	16.72
Palmitoleic acid(C16:1n7)	2.66	2.41	2.55	2.67
Stearic acid(C18:0)	2.81	2.84	2.63	2.49
Oleic acid(C18:1n9)	44.68	43.79	43.06	43.17
Vaccenic acid(C18:1n7)	0.00	0.00	0.00	0.03
Linoleic acid(C18:2n6)	28.06	28.85	29.80	30.23
γ-Linoleic acid(C18:3n6)	0.04	0.06	0.06	0.05

Linolenic acid(C18:3n3)	0.98	1.32	1.30	1.36
Eicosenoic acid(C20:1n9)	0.20	0.22	0.20	0.24
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	23.38	23.36	23.02	22.26
불포화 지방산	76.62	76.64	76.98	77.74
-단가	47.54	46.42	45.82	46.10
-다가	29.08	30.23	31.16	31.64

시험 5. 사료용 곤충 우수계통 선발

1. 갈색거저리 우수개체 선발

갈색거저리 대량생산에서 품종의 효과와 반응은 매우 중요하다.

가. 갈색거저리 우수계통 선발을 위한 지역별 계대사육

25~30℃ 사이 유지하고, 성충의 사료는 영양이 풍부하게 하여 사육한다.

- 지역별 갈색거저리 확보 : 농과원, 경기, 경남, 부산, 전남

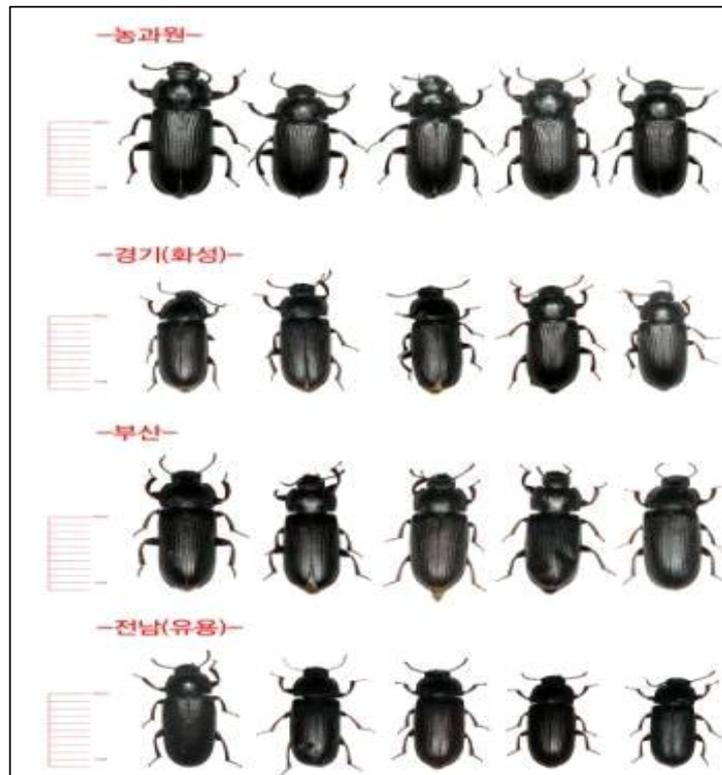


그림 6. 지역별 갈색거저리 성충

시험 6. 사료용 곤충 사육농가 실태 조사

1. 갈색거저리 생산시설 현황

전국 거저리 생산농가 및 업체 7개소에 대한 생산판매실태를 조사하였다. 갈색거저리의 생산 시설 현황에 대해 조사한 결과, 사육시설의 규모는 평균 $247.3 \pm 110.6\text{m}^2$ 로 나타났다. 시설 형태는 판넬이 62.5%로 가장 많았고, 비닐하우스, 컨테이너 순 이었다. 노동력은 가족(57.1%)으로 이루어진 경우가 외부고용(42.9%)보다 많았다. 결과를 통해, 일부 판매업체를 제외한 갈색거저리 생산농가들은 소규모 가족노동형임을 알 수 있었다. 또한, 갈색거저리 사육관련 교육은 이수자가 83.3%로 대부분이 교육을 받았고, 주로 곤충 및 마케팅에 대한 교육을 받은 것으로 조사되었다. 갈색거저리의 사육 현황을 조사한 결과, 먹이는 밀기울이 54.5%로 가장 많았고 그 외에도 호박, 무를 비롯한 각종 채소(36.4%)와 발효톱밥(9.1%)도 사용하였다. 사육용기는 크게 플라스틱과 종이재질의 상자를 이용했으며, 플라스틱(71.4%)을 종이(28.6%)보다 2배 이상 선호했다. 갈색거저리 사육 시 문제점을 조사한 결과, 사육시 먼지발생(25%)과 번데기의 수거 문제(25%)가 가장 심각했고, 사료비의 상승 문제(16.7%)가 뒤를 이었다. 그 외에도, 전체 사육기술의 효율화(자동화), 원인모를 폐사, 갈색거저리의 기능성 부여 요구 등 의견이 있었다. 이에, 사육 시 먼지 방지나, 노동력이 적게 드는 번데기 수거기술 등의 사육기술 효율화를 위한 연구와 사료비 상승에 따른 저렴한 단가의 대체사료 연구가 시급하며, 갈색거저리의 질병연구나 사료 외 기능성 물질구명에 대한 연구가 필요하다고 판단된다.

상호	농장규모	사육시설	난방	운영기간	소유권
(주)한국유용 곤충연구소	부지 8천평, 건평 800평	판넬	전기보일러	10년	소유
빛가람 곤충 영농조합법인			전기보일러		
귀뚜리랑 개구리랑 영농조합법인		판넬, 컨테이너, 비닐하우스	전기보일러	5년	소유
농업회사법인(주) 한국유용곤충연구소	20평	판넬	전기보일러	2년	소유
귀뚜라미 농장	140평	비닐하우스	냉난방기	4계절	임대
유림곤충농장	50평	판넬	냉난방공조 시스템	2012~	소유
월천곤충사랑	57평	판넬	전기보일러	6개월	소유

상호	시설현황				사육용기			먹이
	형태	사육 시설	기타 시설	기타	재질	크기	기타	
(주)한국유용 곤충연구소	사육실	20평	30평		플라스틱 사각통			밀기울, 무
빛가람곤충 영농조합법인				마이크로파 건조기: 천3백만원 (기기), 회수율 (40%)→ 38%→ 35%	종이 (코팅지), 플라스틱 (병발생), 나무 (냄새, 먹음), 비닐 (먹음)		사육상자: 4개월→ 상품 (가공), 기어올 라오는 것 (1년이상 사용가능)	
귀뚜리랑 개구리랑 영농조합법인	사육실	200평	700평		플라스틱			밀기울
농업회사법인 (주) 한국유용곤 충연구소	사육실, 작업실, 냉장실, 사무실, 창고	20평	25평	사육실외 시설은 공동사육 시설임	플라스틱	27x45x 10cm		밀기울
귀뚜라미 농장	사육실, 작업실, 냉장실, 사무실, 창고					높이15x 가로750 x세로 340cm		밀기울, 야채
유림 곤충농장	사육실, 사무실	50평			플라스틱, 종이상자	여러 가지		밀기울, 발효뽕밥
월천 곤충사랑	사육실, 사무실	57평	0평	100T 판넬	종이박스	가로30, 세로70		밀기울, 각종야채 , 호박

상호	고용형태(가족)			고용형태(고용)			전문교육이수 여부	교육과정	정보처	판매처
	인원	성별	연령대	인원	성별	연령대				
(주)한국유용 곤충연구소				24명	남(17), 여(7)	30~ 50대	있음	곤충관련	인터넷, 동종업체, 농진청	월드
빛가람 곤충 영농조합법인										온라인
귀뚜리랑 개구리랑 영농조합법인	1명	여	30대				있음	곤충관련, 마케팅관련	인터넷, 책자, 농진청	
농업회사법인 (주)한국유용 곤충연구소				1명	여 (1)	30대	없음		인터넷, 동종업체, 농진청	식품회사 (월드웨이)
귀뚜라미 농장	3명		40~ 50대	1	여 (1)	50대	있음	곤충관련, 마케팅관련, 세무, 역량강화	인터넷, 농진청	동물원, 펫샵 (도매상), 개인
유림곤충농장	2명	남 (1) 여 (1)	50~ 60대				있음	곤충관련	동종업체	자가판매
월천곤충사랑	2명	남 (1) 여 (1)	50대				있음	곤충관련 (곤충산업)	농진청	없음

상호	사육 및 판매량			사육상 문제점
	사육량	판매횟수	1회 판매량	
(주)한국유용 곤충연구소	알:241통, 소:132통, 중:30통, 대:48통, 채란12통, 번데기:5통, 채란통: 종이12통			사육기술부재, 사료비 비쌌, 자동화 기술필요(먹이공급), 폐사원인규명, 번데기 수거, 먼지 발생
빛가람 곤충 영농조합법인	사육통: 1통(1억2천만원) (제조업), 도기술원 (3천2백5십만원), 15kg/박스(생산)			건조밀워→ 오일:올레인산→ 화장품원료/비누, → 식품:동충하초 → 기능성부여
귀뚜라미 개구리 영농조합법인	500kg	주5회, 월20회	갈색거저리:3kg 귀뚜라미:10kg	
농업회사법인(주) 한국유용 곤충연구소	200,000마리	2회	갈색거저리:40kg	번데기·성충 분리시 일손 많이 필요함, 분진 발생이 많음
귀뚜라미 농장	연 1.7톤	주5회, 월20회		사료값 상승으로 원가상승, 대체사료 개발이 절실함
유림곤충농장				
월천곤충사랑	200박스 (박스당 약2천마리)			번데기 고르기, 성충고르기, 배설물 치워주기(먼지가 많이 남)

2. 농가실증실험

가. 실험방법

- ① 플라스틱 박스(가로 36cm, 세로 27cm, 높이 8cm)에 밀기울(100g)을 깔고 7~10령 내외의 유충 100마리 10반복을 넣어 주었다.
- ② 실험군마다 배추로 주 1회 수분공급하고 성충이 될 때까지 주 1회 관찰하였다.
※ 온도 27℃, 습도 60~70% 내외(경기도 동두천 거저리 사육농가)

나. 조사내용

매주 금요일 온·습도, 생존율을 측정하고, 폐사체를 수거하였다.

	
<p>거저리류 사육농가(경기 동두천)</p>	<p>조류 등 애완동물 먹이용</p>
	
<p>사육장 모습</p>	<p>실증시험</p>

다. 조사결과

9~10명 유충으로 농가실증시험을 한 결과 생존율이 86%를 확인하였다.

조사일	생존수	사체수	폐사율	멸실수	멸실율	온도 (°C)	습도 (%)	비고
5.16(금)	1,000	0	0%	0	0%	27	67	
5.23(금)	953	26	2.6%	21	2.1%	28	50	
5.30(금)	943	8	0.85%	2	0.21%	33	40~65	9번에서 응애 발생
6. 5(목)	936	7	0.75%	0	0%	28~30	45~65	
6.13(금)	935	1	0.11%	0	0%	28	65	모든 상자 응애 발생
6.19(목)	934	0	0%	1	0.11%	28	60	용화 3, 소형4
6.27(금)	923 (유충 815)	9	0.98%	2	0.22%	29	52	성충 1, 용화 107 (성충, 번데기 회수)

7. 4(금)	796 (유충 411)	16	2.0%	3	0.38%	32	49	성충 22, 용화 363 (성충, 번데기 회수)
7.11(금)	402 (유충 123)	9	2.2%	0	0%	34~36	40~54	성충 22, 용화 257 (성충, 번데기 회수)
7.18(금)	120 (유충54)	3	2.5%	0	0%	35	50	성충 15, 용화 51 (성충, 번데기 회수)
7.25(금)	53 (유충42)	0	0%	1	1.9%	33	50	성충 2, 용화 9 (성충, 번데기 회수)
8. 1(금)	42 (유충36)	0	0%	0	0%	32	40	전량 회수

제 3 절 3년차(2014년~2015년)

제1세부과제 :사료용 곤충 대량생산 기술개발

시험 1. 맥주박 첨가에 따른 갈색거저리 유충의 발육특성 조사

1. 맥주박(농업부산물) 첨가에 따른 갈색거저리 유충의 발육특성

- 시험방법

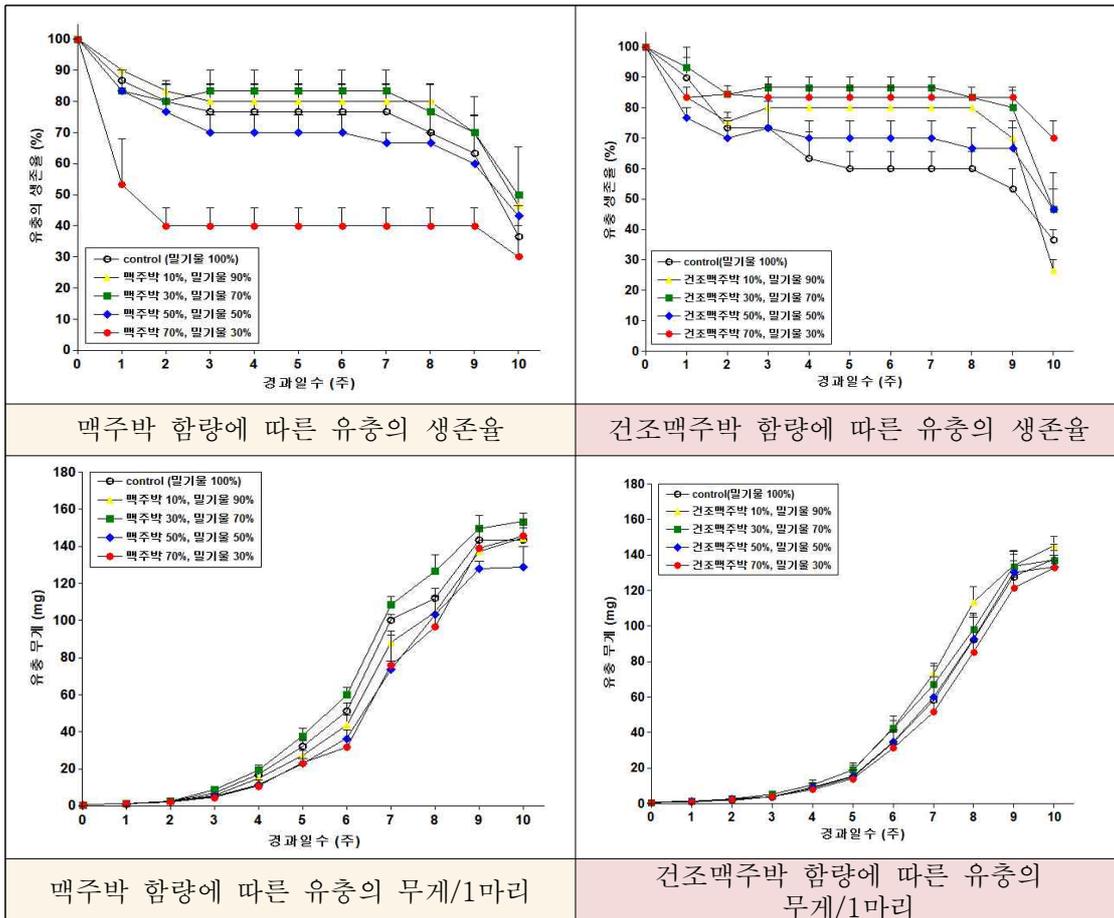
- ① 갈색거저리 2~3령 유충(모든 실험군은 유충 10마리) 및 7~8령 유충(모든 실험군 유충 30마리)을 지름 10 cm, 높이 4 cm 용기에 넣고 대조군(G1; 100% 밀기울), 실험군 1(G2; 10% 맥주박, 90% 밀기울), 실험군2(G3; 30% 맥주박, 70% 밀기울), 실험군 3(G4; 50% 맥주박, 50% 밀기울), 실험군4(G5; 70% 맥주박, 30% 밀기울)를 맥주박의 수분을 제거하지 않은 상태의 실험군과 열풍건조한 실험군을 따로 만들었다. 3회 반복실험하였다.

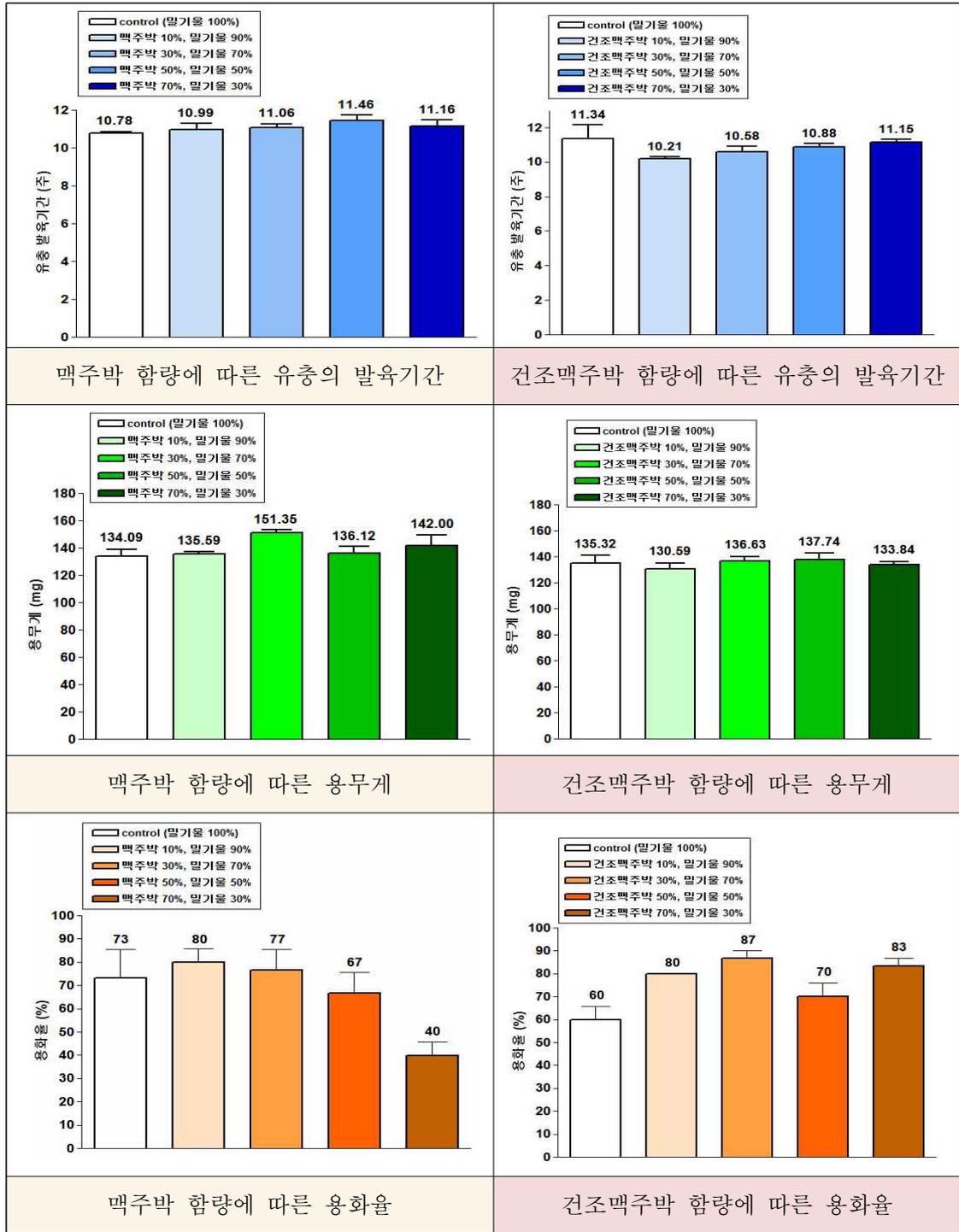
- ② 원활한 수분 공급을 위해 1주일마다 1회 배추 7g을 공급하였다.

- ③ 유충의 생존율, 유충무게/마리, 용화율, 용무게, 유충 발육기간을 비교 관찰하였다.

- 시험결과

· 대상곤충: 2~3령 갈색거저리



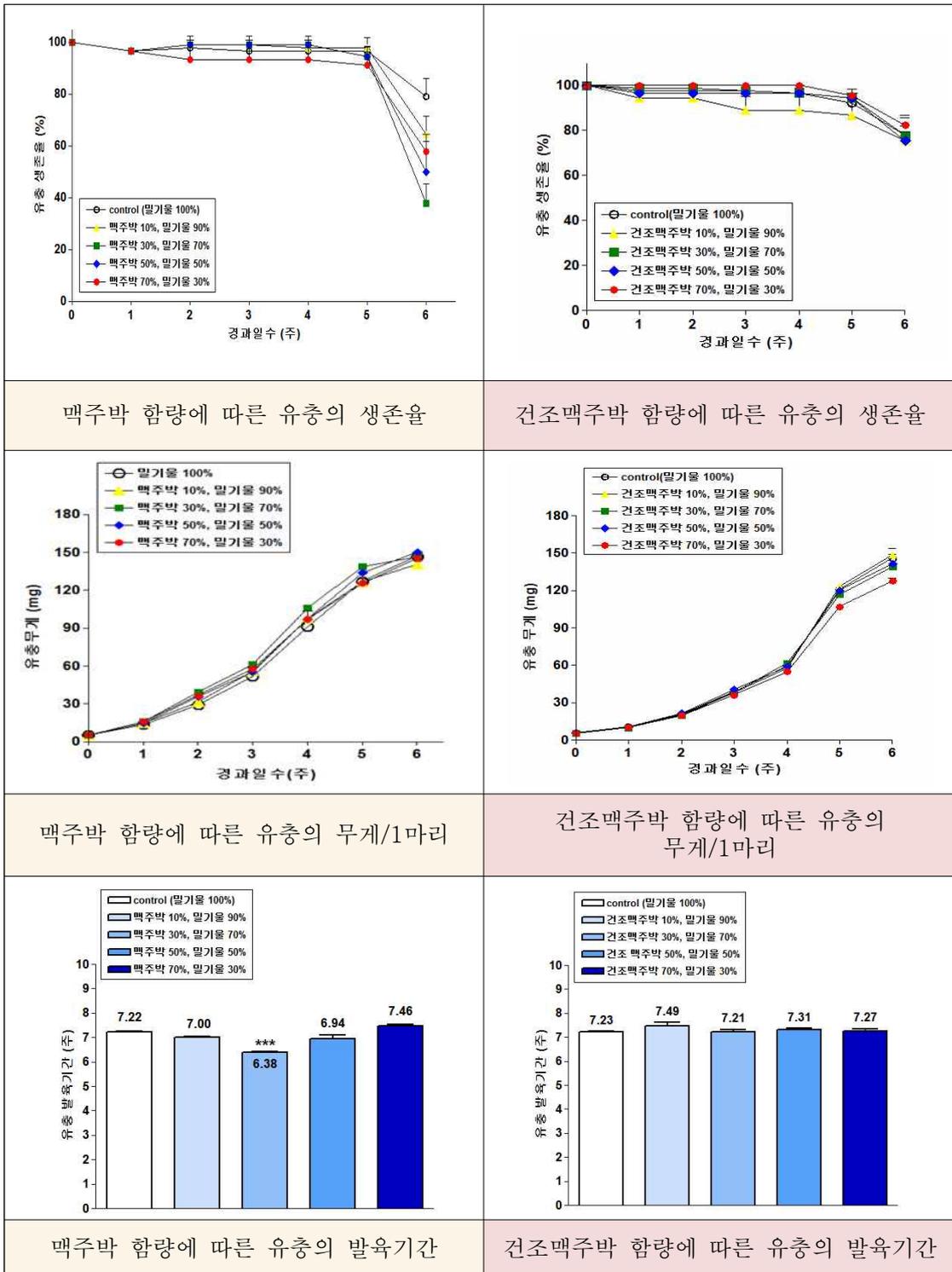


맥주박 함량에 따른 유충의 생존율은 9주까지 관찰했을 때, 맥주박 10%, 30% 첨가군에서 control군에 비해 높은 생존율이 나타났고, 맥주박 50%, 70% 첨가군에서는 control군에 비해 낮은 생존율이 관찰되었다. 10주에는 맥주박 70% 첨가군을 제외한 모든 실험군에서 control군에 비해 높은 유충 생존율이 나타났다. 7주차 관찰에서는 control군과 맥주박 10%, 30%, 50% 첨가군 간 0.9~1.1배로 거의 차이가 없었던 반면에, 맥주박 70% 첨가군에서는 0.5배의 낮은 생존율이 나타났다. 맥주박 함량에 따른 유충의 무게는 10주까지 관찰했을 때, 맥주박 30% 첨가군을 제외한 모든 실험군에서 control보다 낮은 무게가 관찰되었다. 6주차 관찰에서

control군에 비해 맥주박 30% 첨가군에서 1.2배 높은 유충 무게가 나타났고, 맥주박 70% 첨가군에서는 0.6배 낮은 유충 무게가 관찰되었다. 맥주박 함량에 따른 유충의 발육기간은 control군에 비해 모든 맥주박 첨가군에서 길게 나타났으며, 맥주박 50% 첨가군에서 가장 긴 유충 발육기간이 관찰되었다. 맥주박 함량에 따른 용무게는 control군과 맥주박 10%, 50% 첨가군에서 유사하게 나타났으나, 맥주박 30%와 70% 첨가군에서는 1.1배 높은 용무게가 관찰되었다. 맥주박 함량에 따른 용화율은 control군과 비교했을 때, 맥주박 10%, 30% 첨가군에서 비슷하였고, 맥주박 50% 첨가군은 0.9배, 맥주박 70% 첨가군에서는 0.6배 낮은 용화율이 나타났다.

건조맥주박 함량에 따른 유충의 생존율은 맥주박 30% 첨가군을 제외한 모든 실험군에서 control군과 비교했을 때, 낮은 생존율이 관찰되었다. 5주에서 7주까지 유충의 생존율은 모든 건조맥주박 첨가군에서 control군보다 1.2~1.4배 높은 생존율이 관찰되었다. 10주차에서는 건조맥주박 70% 첨가군에서 1.9배 높은 생존율을 나타냈으나, 건조맥주박 10% 첨가군에서는 0.7배 낮았다. 유충의 무게는 10주까지 전반적으로 건조맥주박 10% 첨가군에서 가장 높은 유충무게가 관찰되었으며, 건조맥주박 70% 첨가군에서의 유충무게가 가장 낮았다. 7주째 유충 무게의 증가량이 가장 컸으며, 건조맥주박 10% 첨가군은 control에 비해 1.3배 높았고, 건조맥주박 70% 첨가군은 0.9배 낮았다. 유충의 발육기간은 control군에 비해 모든 건조맥주박 첨가군에서 약간 짧았다. 용무게는 control군과 비교했을 때, 건조맥주박 10% 첨가군에서 가장 낮았고, 건조맥주박 50% 첨가군에서 가장 높았으나 전체적으로 control군과 모든 건조맥주박 첨가군의 용무게는 거의 차이가 없었다. 용화율은 control군에 비해 모든 건조맥주박 첨가군에서 1.2~1.5배만큼 높았으나 통계적으로 유의한 수준은 아니었다.

· 대상곤충: 7~8령 갈색거저리





맥주박 함량에 따른 유충의 생존율은 5주까지 control군과 비교시, 모든 맥주박 첨가군과 차이가 없었다. 6주차에는 control군에 비해 모든 맥주박 첨가군에서 0.5~0.8배 낮은 생존율이 관찰되었다. 유충 무게는 전체적으로 맥주박 30% 첨가군에서 가장 높게 나타났으며, 2주차 맥주박 30%, 70% 첨가군에서 control군에 비해 1.3배 높은 유충무게가 관찰되었다. control군과 비교했을 때, 모든 맥주박 첨가군의 유충무게는 1.0~1.3배 높았다. 유충 발육기간은 맥주박 30% 첨가군에서만 통계적으로 유의한 수준으로 짧았으며, 나머지 맥주박 첨가군은 control군과 유사한 발육기간이 나타났다. 용무게는 control군과 비교시, 맥주박 30% 첨가군만 0.9배 낮았고, 나머지 첨가군은 1.0~1.1배로 유사한 수치를 나타냈다. 용화율의 경우, 모든 첨가군에서 control군과 거의 비슷한 높은 용화율이 관찰되었다.

건조맥주박 함량에 따른 유충의 생존율은 control군과 비교할 때 모든 건조맥주박 첨가군에서 0.9~1.1배로 거의 차이가 없었다. 유충무게는 건조맥주박 70% 첨가군을 제외한 모든 첨가군에서 control군과 유사한 수치를 나타냈다. 유충 발육기간 및 용무게는 모든 건조맥주박 첨가군에서 control군과 차이가 없었다. 용화율은 건조맥주박 10% 첨가군에서 control군에 비해 0.9배 낮은 용화율이 관찰되었으나, 나머지 모든 건조맥주박 첨가군은 control군과 유사한 수치를 나타냈다.

시험 2. 막걸리박 첨가에 따른 갈색거저리 유충의 발육특성 조사

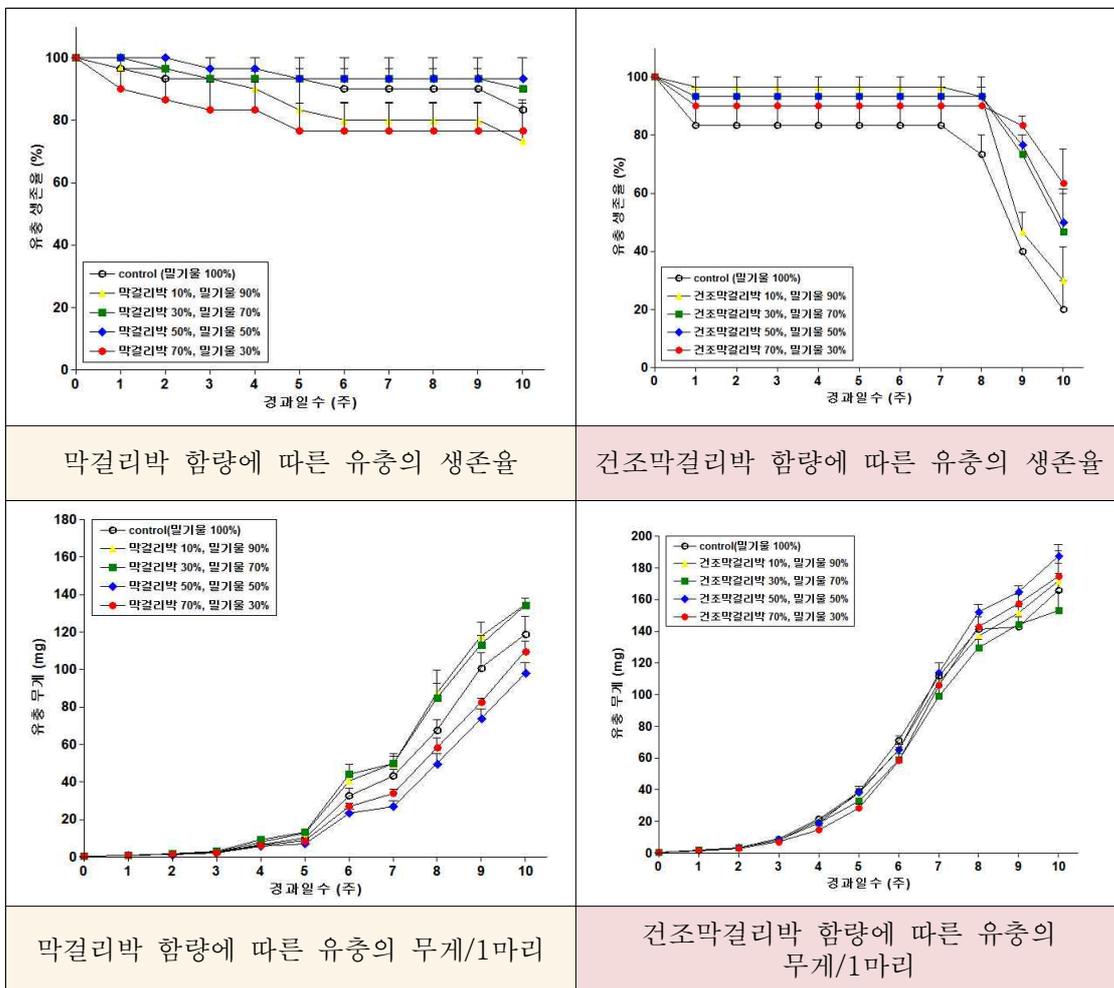
1. 막걸리박(농업부산물) 첨가에 따른 갈색거저리 유충의 발육특성

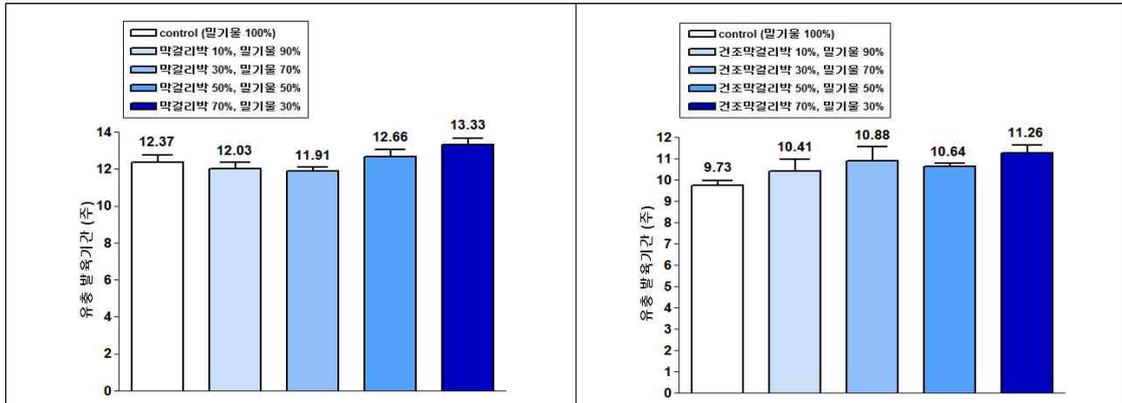
- 시험방법

- ① 갈색거저리 2~3령유충(모든 실험군은 유충 10마리) 및 7~8령 유충(모든 실험군 유충 30마리)을 지름 10 cm, 높이 4 cm 용기에 넣고 대조군(G1; 100% 밀기울), 실험군 1(G2; 10% 막걸리박, 90% 밀기울), 실험군2(G3; 30% 막걸리박, 70% 밀기울), 실험군 3(G4; 50% 막걸리박, 50% 밀기울), 실험군4(G5; 70% 막걸리박, 30% 밀기울)를 막걸리박의 수분을 제거하지 않은 상태의 실험군과 열풍건조한 실험군을 따로 만들었다. 3회 반복 실험하였다.
- ② 원활한 수분 공급을 위해 1주일마다 1회 배추 7g을 공급하였다.
- ③ 유충의 생존율, 유충무게/마리, 용화율, 용무게, 유충 발육기간을 비교관찰하였다.

- 시험결과

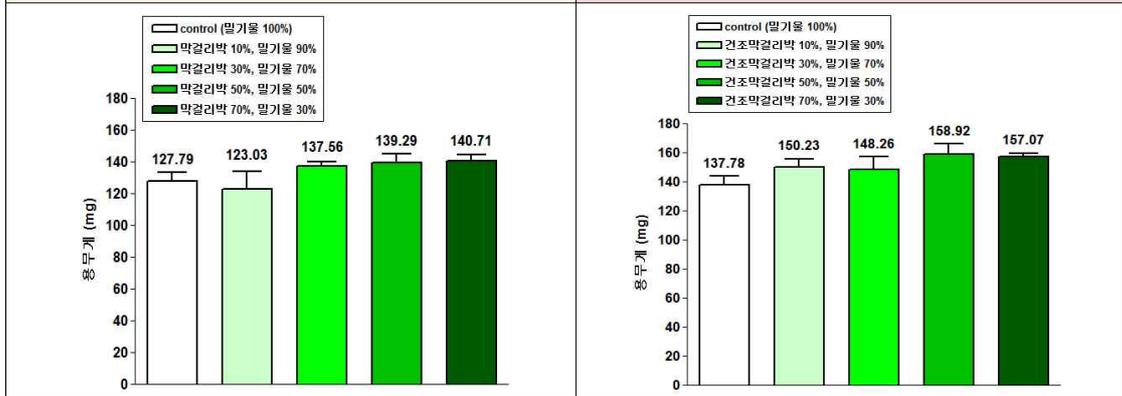
· 대상곤충: 2~3령 갈색거저리





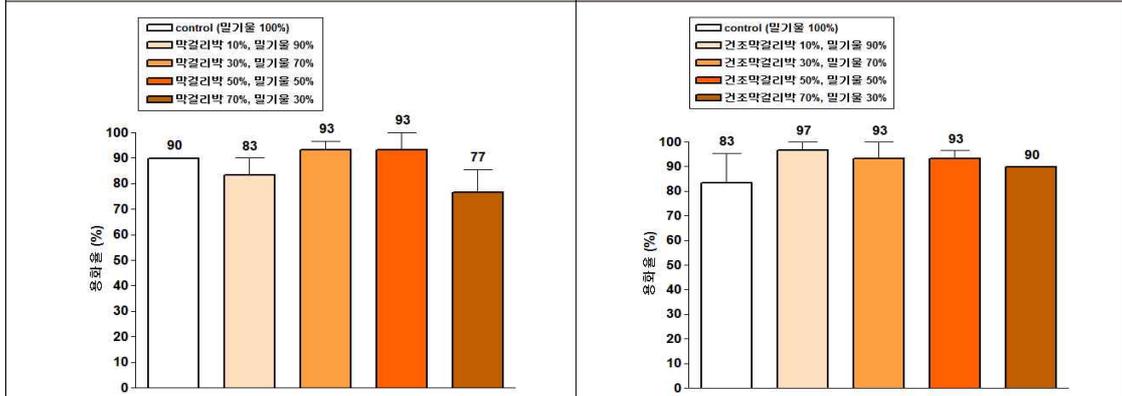
막걸리박 함량에 따른 유충의 발육기간

건조막걸리박 함량에 따른 유충의 발육기간



막걸리박 함량에 따른 용무게

건조막걸리박 함량에 따른 용무게



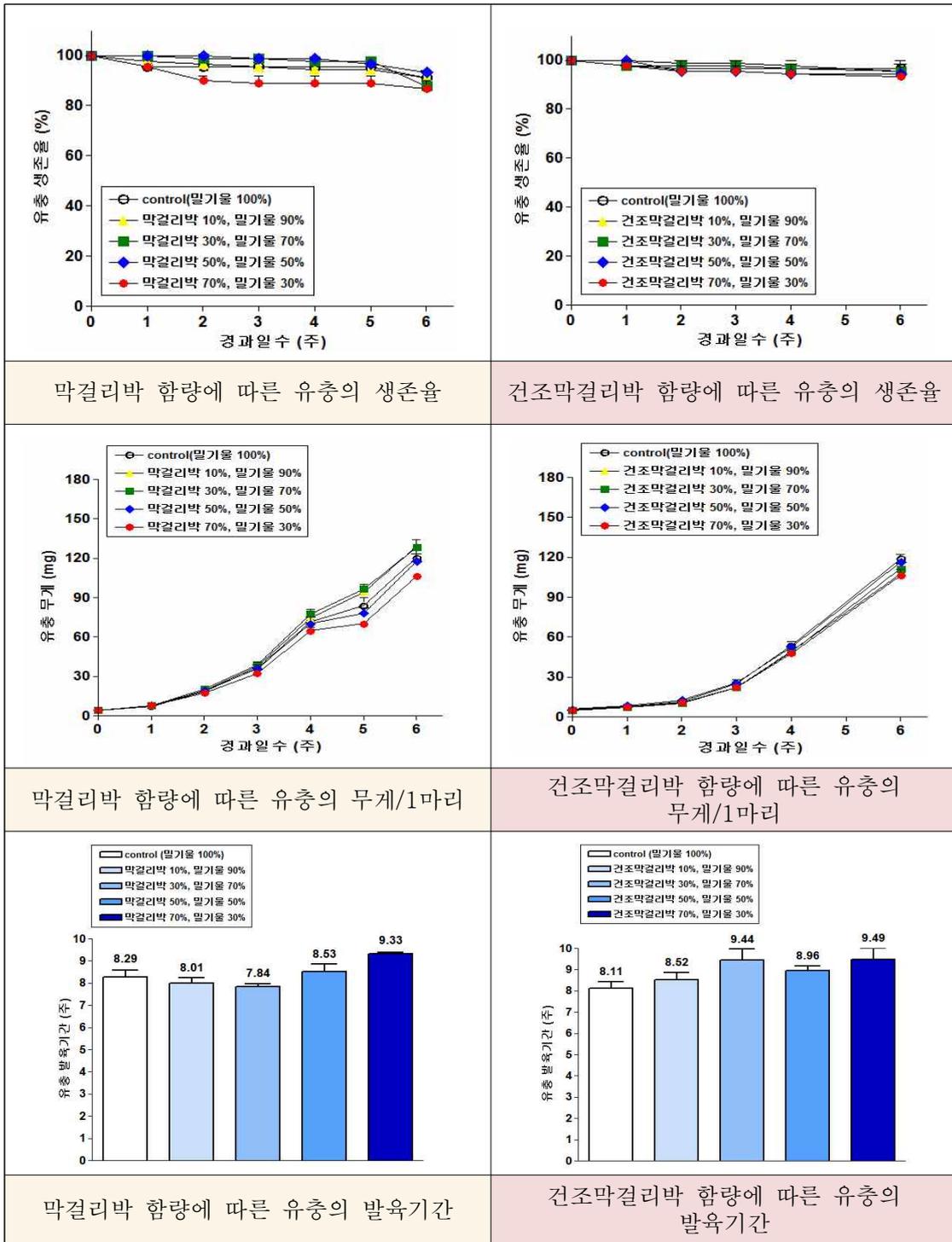
막걸리박 함량에 따른 용화율

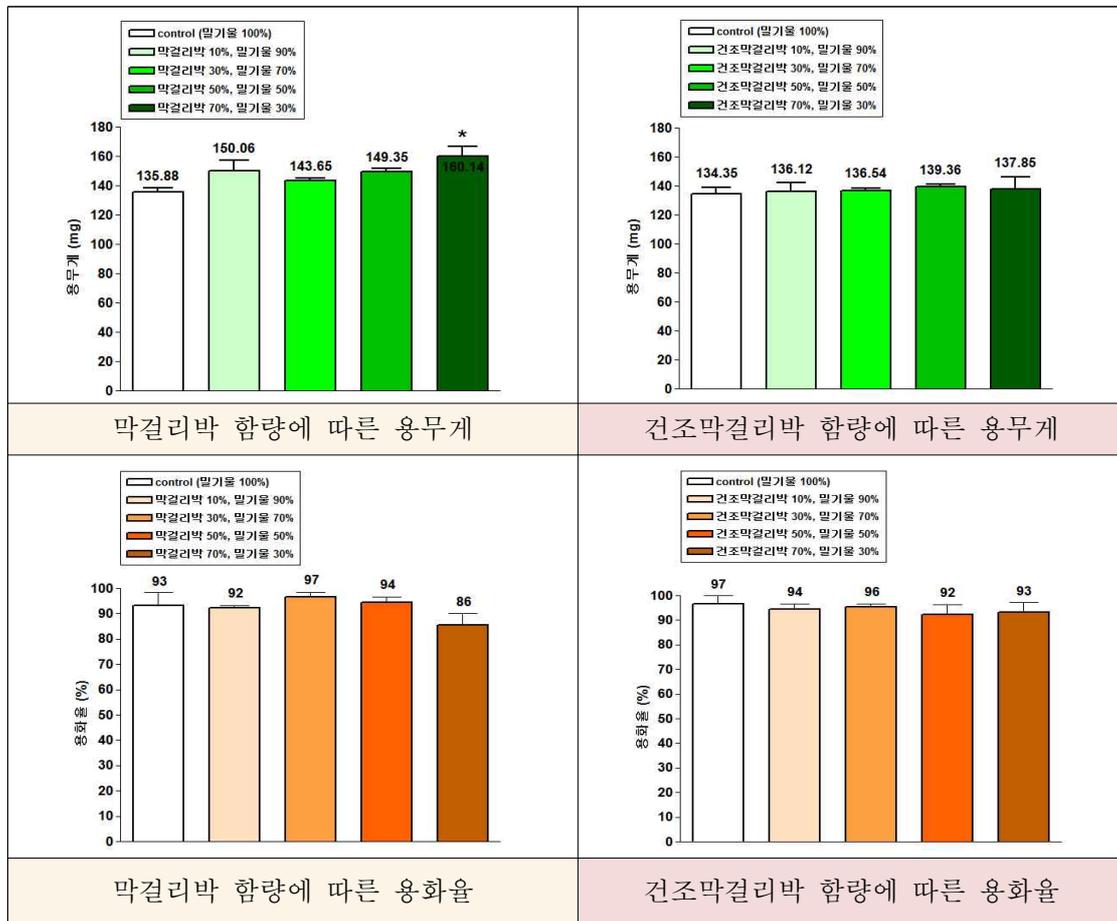
건조막걸리박 함량에 따른 용화율

막걸리박 함량에 따른 유충의 생존율은 control군과 비교했을 때, 모든 막걸리박 첨가군에서 0.9~1.1배로 차이가 거의 없었다. 유충 무게는 전체적으로 막걸리박 10%, 30% 첨가군은 control군에 비해 높았으나, 막걸리박 50%, 70% 첨가군은 낮았다. 특히, 6주와 8주차의 유충 무게 증가율이 높았으며, 6주차에는 막걸리박 30% 첨가군은 1.3배 높았으며, 막걸리박 50% 첨가군에서는 0.7배 낮았다. 8주차에는 막걸리박 10%, 30% 첨가군의 경우 control군에 비해 1.3배 높았고, 막걸리박 50% 첨가군에서 0.7배 낮게 관찰되었다. 유충의 발육기간은 막걸리박 70% 첨가군의 경우 control군에 비해 1.1배 길었으나, 나머지 막걸리 첨가군에서는 비슷하였다. 용무게는 막걸리박 10% 첨가군은 control군과 차이가 없었고, 나머지 막걸리박 첨가군에서는 1.1배 높게 관찰되었다. 용화율은 막걸리박 30%, 50% 첨가군에서 control군과 유사한 수치가 나타났고, 막걸리박 10%, 70% 첨가군에서는 0.9배 낮은 용화율이 관찰되었다.

건조막걸리박 함량에 따른 유충의 생존율은 1주~7주까지 거의 비슷한 경향을 나타냈다. 건조막걸리박 10% 첨가군에서 control군에 비해 1.2배 높은 유충 생존율이 관찰되었고, 30%~70% 첨가군에서는 1.1배 높게 나타났다. 8주차에는 건조막걸리박 10%~50% 첨가군의 경우 1.3배 높게 나타났고, 건조막걸리박 70% 첨가군에서 1.2배 높았다. 9주차에는 건조막걸리박 10% 첨가군에서 1.2배, 건조막걸리박 30%와 50% 첨가군의 경우 1.8~1.9배 높게 나타났고, 건조막걸리박 70% 첨가군에서 2.1배 높았다. 10주차 유충의 생존율은 control군과 비교시, 건조막걸리박 10% 첨가군에서 1.5배, 30%와 50% 첨가군에서 2.3~2.5배, 70% 첨가군에서 3.2배 높은 유충 생존율이 관찰되었다. 유충무게는 전체적으로 control군과 모든 건조막걸리박 첨가군 간 차이가 거의 없었다. 9주차에서 control군에 비해 모든 건조막걸리박에서 1.1~1.2배 높은 유충무게가 관찰되었다. 유충 발육기간은 control군에 비해 모든 건조막걸리박 첨가군에서 1.1~1.2배 긴 발육기간이 관찰되었다. 용무게는 모든 건조막걸리박 첨가군에서 control군과 비교했을 때, 1.1~1.2배 높은 용무게가 나타났고, 건조막걸리박 50% 첨가군에서 가장 높았다. 용화율은 control군에 비해 모든 건조막걸리박 첨가군에서 1.1~1.2배 더 높게 관찰되었다.

· 대상곤충: 7~8령 갈색거저리





막걸리박 함량에 따른 유충의 생존율은 6주까지 관찰한 결과, control군과 모든 막걸리박 첨가군을 비교했을 때, 거의 차이가 없었다. 유충무게는 2~4주차에는 control군에 비해 10%, 30% 막걸리박 첨가군에서 1.0~1.1배 높았고, 70% 막걸리박 첨가군에서 0.9배 낮게 관찰되었다. 5~6주차에는 10%, 30% 첨가군에서 1.0~1.2배 높았고, 50%와 70% 첨가군에서 control군에 비해 0.8~0.9배 낮은 유충무게가 나타났다. 유충 발육기간은 10%, 50%, 70% 막걸리박 첨가군에서는 control군에 비해 1.0~1.1배 길게 관찰되었으나, 30% 막걸리박 첨가군에서는 0.9배 짧은 발육기간이 나타났다. 용무게는 모든 막걸리박 첨가군에서 control군에 비해 높은 용무게가 나타났으며, 특히 70% 막걸리박 첨가군에서는 용무게가 1.2배 높게 관찰되었다. 용화율은 10%, 30%, 50% 막걸리박은 control군과 유사하였고, 70% 막걸리박 첨가군은 0.9배 낮게 나타났다.

건조막걸리박 함량에 따른 유충의 생존율은 6주까지 관찰했을 때, 모든 건조막걸리박 첨가군에서 control군과 유사한 생존율이 관찰되었다. 유충무게는 10%, 30%, 70% 건조막걸리박 첨가군에서 control군에 비해 0.9배 낮게 관찰되었고, 50% 건조막걸리박 첨가군은 비슷한 수치를 나타냈다. 유충 발육기간은 control군과 비교했을 때, 10%, 50% 건조막걸리박 첨가군은 1.1배, 30%, 70% 건조막걸리박 첨가군은 1.2배 긴 발육기간이 나타났다. 용무게와 용화율은 control군과 모든 건조막걸리박 첨가군 간에 차이가 거의 없었다.

○ 사료용 곤충 생태파악에 의한 실내 대량사육 시스템 확립 매뉴얼 작성

- 갈색거저리의 특성 파악 및 분석, 증식기구 해명, 보존 및 관리, 기능성 분석에 관한 내용으로 그림과 글을 적절히 활용한 실용도 높은 갈색거저리 사육 매뉴얼을 작성하였다.

· 갈색거저리 사육 매뉴얼 제목: 갈색거저리 대량사육



갈색거저리 대량사육



· 갈색거저리 대량사육 목차

목 차

제 1장. 갈색거저리 전망	
1. 국내 이용현황	1
2. 국외 이용현황	3
3. 전망	6
제 2장. 일반적인 특성	
1. 분류학적 특성	11
2. 생물학적 특성	11
제 3장. 사육 방법	
1. 알	16
가. 알 받기 및 관리	16
나. 부화기간	20
다. 온도별 발육특성	20
2. 유충	22
가. 발육특성	24
나. 배설물 분리	26
다. 사육상자 종류에 따른 특징	27
라. 발육기간 단축	30
마. 증·장기 보존방법	31
3. 번데기	34
가. 번데기 관리	34
나. 번데기 분리	35
4. 성충	37
가. 온도에 따른 산란성	38
나. 구조물 및 소도구를 이용한 우화성충 수거방법	41
제 4장. 갈색거저리 생체자원 및 부산물의 기능성 분석	
1. 유충·성충·탈피각·배설물의 성분분석	42
2. 유충·성충·탈피각·배설물에 대한 유해 미생물 분석	46
3. 건조방법별 영양성분 분석	46
제 5장. 대체 먹이원 개발	
1. 주 먹이원	51
2. 유충용 먹이원	51
3. 성충용 먹이원	53
4. 비타민 및 수분공급용 채소·과일 대체 수분공급용 젤리 ..	55
제 6장. 병원균 방제	
1. 밀웜 사충에서의 병원균의 분리 및 동정	57
2. 곤충병원성 곰팡이 방제용 화학약제 선발(포자발아 억제) ..	60
3. 곤충병원성 곰팡이 방제용 화학약제 선발(균사생장억제) ..	63
4. 대상 곤충의 병원 미생물 방제기술	65
참고문헌	67

제 1세부과제(사료용 곤충 대량생산 기술개발) 총결론

1. 연구결과 요약

사료용 곤충 후보종(갈색거저리, 동애등애, 왕귀뚜라미, 슈퍼밀웜)의 영양성분 분석 결과를 토대로, 사료용 곤충으로 갈색거저리를 선정하였고, 지역별 계대사육을 실시하여 우수개체를 선발하였다. 온도별 성충 경과일수에 대한 패턴을 분석한 결과, 유충의 효율적인 생산을 위해 사육조건은 27.5도가 가장 이상적인 조건임을 알 수 있었다.

사육 환경 및 먹이 관리를 잘 해주면 산란기간을 연장하고, 산란량을 증가시킬 수 있다. 동물성단백질원인 어분을 첨가하여 산란성을 조사하였다. 밀기울 대조군에서는 산란기간이 44.67일, 산란수가 282.27개였으나, 어분 첨가군에서는 125일의 산란기간과 633.67개의 산란수를 나타냈다. 또한, 성충의 수명은 모든 실험군에서 암컷의 수명이 수컷보다 길었으며, 특히 어분 첨가군에서 밀기울 대조군에 비해 긴 수명이 관찰되었다. 최적의 알 보호환경 조건을 구명하고자 알 보호기간 실험을 진행하였다. 사육실(기류 0.029m/s) 안에서는, 밀기울로 알을 덮는 기간을 다르게 하더라도 부화율에는 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나, 기류가 평균 0.538m/s인 인큐베이터 안에서는 밀기울로 덮는 기간이 길어질수록 부화율이 증가되었다. 이 기류 하에서는 적어도 5일정도 알 보호기간이 있어야 부화율이 85% 이상임을 확인하였다.

번데기 보호 및 우화성충을 분리하기 위해 사육상자의 사료에 혼합된 거저리의 배설물을 자동으로 분리·배출할 수 있는 거저리 배설물 분리장치 개발하였다.

거저리와 유충에게 수분공급용으로 주는 채소 및 과일을 대체하기 위해서 수분공급용 젤리를 개발하였다. 수분공급이 용이하며, 사육환경이 개선됨과 동시에 수분과다 공급에 의한 폐사를 막을 수 있어 거저리와 유충의 생존율이 증대되므로 농가의 소득향상에 도움이 될 것으로 기대한다.

사육 작업자의 노동력 강도를 고려하여 유충사육 표준상자의 디자인을 규격화하였다. 폴리프로필렌 박스(가로36 x 세로54 x 높이18 cm)는 가벼워서 작업자에게 용이하였으며, 유충 생육상태 관찰에 적합하였다.

갈색거저리의 생산량 조절, 장기 보관 및 가공원료로 이용 시 건조과정은 상당히 중요하며, 농가에서 생산 가공 시 건조비용도 고려할 항목이다. 건조방법별 갈색거저리 유충의 영양성분을 분석하였다. 건조 갈색거저리 수분함유량은 80℃열풍건조에서 가장 낮았으며, 조지방은 동결건조처리군이 가장 낮았다. 건조방법에 따른 갈색거저리의 아미노산 성분 중 이소루신(IIe)은 높은 온도로 건조 할수록 함유량이 적음을 확인하였다. 무기성분은 칼슘이 80℃열풍건조에서 가장 적은 함유량을 보였으며, 인·칼륨·나트륨은 동결건조의 경우가 가장 함유량이 높았다. 아연·구리의 함유량은 건조온도가 높을수록 많아지는 것을 확인하였다.

전국 거저리 생산농가 및 업체 7개소에 대한 생산판매실태를 조사하였다. 거저리 사육 시 문제점을 조사한 결과, 사육시 먼지발생(25%)과 번데기의 수거 문제(25%)가 가장 심각했고, 사료비의 상승 문제(16.7%)가 뒤를 이었다. 그 외에도, 전체 사육기술의 효율화(자동화), 원

인모를 폐사, 거저리의 기능성 부여 요구 등의 의견이 있었다. 이에, 사육 시 먼지방지나, 노동력이 적게 드는 번데기 수거기술 등의 사육기술 효율화를 위한 연구와 사료비 상승에 따른 저렴한 비용의 대체사료연구가 시급하며, 거저리의 질병연구와 사료 외 기능성 물질 구명에 대한 연구가 필요하다고 판단된다.

갈색거저리의 특성, 증식기구 해명, 보존 및 관리, 기능성 분석 등에 관한 내용으로 구성된 실내 대량사육 시스템을 확립하기 위한 매뉴얼을 작성하였고, 주류부산물을 활용하여 양질의 저렴한 먹이원을 개발하고자 맥주박, 막걸리박 첨가에 따른 갈색거저리 유충의 발육특성을 조사하였다. 열풍건조한 맥주박 (건조 맥주박)에 비해 맥주박에서의 유충 발육이 더 좋았고, 특히 30% 맥주박 첨가군에서 높은 용무게와 짧은 유충 발육기간이 관찰되었다. 막걸리박은 맥주박에 비해 수분함유량이 현저히 많아 탈수기를 이용하여 수분을 최대한 제거한 후 실험에 활용하였고, 건조 막걸리박의 경우, 수분제거 후 열풍건조한 다음 분쇄기를 이용하여 마쇄한 상태를 실험에 활용하였다. 막걸리박 및 건조 막걸리박 첨가에 따른 7~8령 유충의 발육특성 조사 결과, 건조 막걸리박 첨가군에서 보다 막걸리박에서 전체적으로 유충 발육이 더 좋았으며, 밀기울 대조군에서의 유충 발육특성과 유사하였다.

2. 산업적 성과

생산량 증대 및 단위면적당 사육효율 극대화를 위한 최적의 사육 메카니즘을 구명하였고, 안정적인 사육 환경 조건을 확립하였으며, 사료용 곤충의 대량 사육기준 설정 및 매뉴얼을 제작하였다. 또한, 현 연구를 통해 도출한 결과로, 사료용 갈색거저리의 생산 품질 균일화 및 안정적 출하 방법을 구축하였다.

따라서, 사료용 곤충 사육 농가를 육성하여 사육기술을 보급할 수 있다.

3. 과학기술적 성과

갈색거저리를 사료원료로 사용할 경우, 동물성 단백질 및 지방질 원료사료 대체가 가능하며, 수입산 동물성 단백질 물량대체로 인한 외화절약 및 시장 안정 및 갈색거저리 원료의 항생제 대체효과를 통한 부가가치를 창출할 가능성을 가진다. 또한, 3년간 연구를 통한 갈색거저리의 순환교배로 우수 계통의 연중 사육 및 사료용 곤충의 안정적인 대량생산 체계 확립에 대한 과학적 기술 성과가 높음을 인정받았으며, 이를 토대로 실용화 기술로 발전할 가능성을 가지고 있다. 현재 갈색거저리 사료원료는 기존의 양돈사료와 중국에서 생산한 갈색거저리 사료원료와 비교시 경제적인 측면에서 가격경쟁력이 떨어지기 때문에 기존 사료와의 차별성 (고단백, 저지방 먹이원, 항생제프리 먹이원)을 토대로 기능성이 강조되고 향상된 먹이원을 위한 연구개발이 향후 필요하다.

4. 성과활용을 위한 제안

사료용 곤충 사육을 위해 양질의 저렴한 먹이원 개발을 위한 연구를 본 과제 3년차에서 농식품부산물(맥주박, 막걸리박)을 이용한 갈색거저리 유충 발육특성조사 연구에서 수행하였으며, 기존의 밀기울과 비교시 비슷하거나 향상된 유충의 발육양상을 확인할 수 있었다. 또한, 맥주박 50%, 막걸리박 50%로 밀기울을 대체하여 공급할 경우, 생산비 절감효과를 가질 것으로 예상된다. 갈색거저리 부화에 적합한 온도는 17.5~27.5℃였으며, 최적의 알 보호환경 조건(부화율 향상 조건)을 구명하고자 알 보호기간 시험을 실시하였다. 사육실(기류 0.029m/s) 안에서는 밀기울로 알을 덮는 기간을 다르게 하더라도 부화율에는 큰 차이를 보이지 않았으나, 기류가 평균 0.538m/s인 인큐베이터 안에서는 밀기울로 덮는 기간이 길어질수록 부화율이 증가하였다. 이 기류 하에서는 적어도 5일 정도의 알 보호기간이 있어야 부화율이 85% 이상임을 확인하였다. 곤충사육시 먼지 유발 요인은 배설물을 체로 치거나, 배설물 분리장치 사용시 기존의 먹이원인 밀기울로 인해 발생되기 때문에, 먼지가 덜 발생하는 양질의 밀기울 대체먹이원 개발이 차후에 필요할 것으로 생각된다.

제 4 절 1년차(2012년~2013년)

제1협동과제 : 사료용 곤충의 안정적 공급 기술 개발

1. 갈색거저리 유충에 대한 곤충 병원성 진균의 병원성 확인

- 실험방법 : 이 실험은 3차에 걸쳐 진행하였으며, 곤충병원성 진균 중 병원성이 높은 균주를 선발하였다.

<1차 실험>



- ① 균주들을 1/4 SDA 배지에 25°C 조건에서 배양 후 갈색거저리 유충을 5마리씩 넣어주고, 무처리한 대조군에도 갈색거저리 유충 5마리를 넣어준다.
- ② 밀웬 5마리를 하루 정도 균에 노출 시키고 무처리 Petri dish로 옮긴다. 밀웬의 먹이인 밀기울을 넣어서 아사하지 않게 한다.
- ③ 접종 후부터 매일 밀웬의 치사율과 특징을 조사, 기록한다.

- 실험에 사용된 균주 : *Beauveria bassiana* (DBB2507, ERL836, ERL1050, ERL1057, ERL1170, ERL1575, ERL1576, ERL1578), *Metarhizium anisopilae*

<2, 3차 실험>

실험 방법은 1차 실험과 동일하게 진행하였다.

- 2차 실험 사용 균주 : *B. bassiana* (ERL836, ERL1050, ERL1051, ERL1170, ERL1575, ERL1576, ERL1578, DBB2507)

- 3차 실험 사용 균주 : *M. anisopilae* (Ma KACC 40223, Ma KACC 40230, Ma KACC 40231, Ma KACC 40969)

<4차 실험>

갈색거저리 유충에 노출시킬 곤충병원성 진균을 선발하여 1.0×10^7 conidia/ml로 1/4 Sabouraud Dextrose Agar(1/4 SDA, 90×15 mm dish) 배지에 *B. bassiana* (ERL836,

ERL1575, ERL1576, ERL1578, DBB2507)와 *M. anisopilae* (JEF003, JEF004, Ma KACC40231, Ma KACC10969)를 도말하여 25℃에 7일 동안 배양하였다. 배양된 균주에 갈색거저리 2령충을 각각 10마리씩 24시간 노출 후 밀기울이 있는(약 6 g) 깨끗한 Petri dish에 옮겨 5일 동안 관찰하였다.

- 실험 결과:

<1차 실험>

B. bassiana ERL1576 균주가 3일차에 모두 갈색거저리 유충을 치사시켰으며, 14일차에는 control, ERL1050, JEF001을 제외한 모든 균주에서 갈색거저리 유충이 치사되는 것을 확인하였다(Fig. 1, Fig. 2).

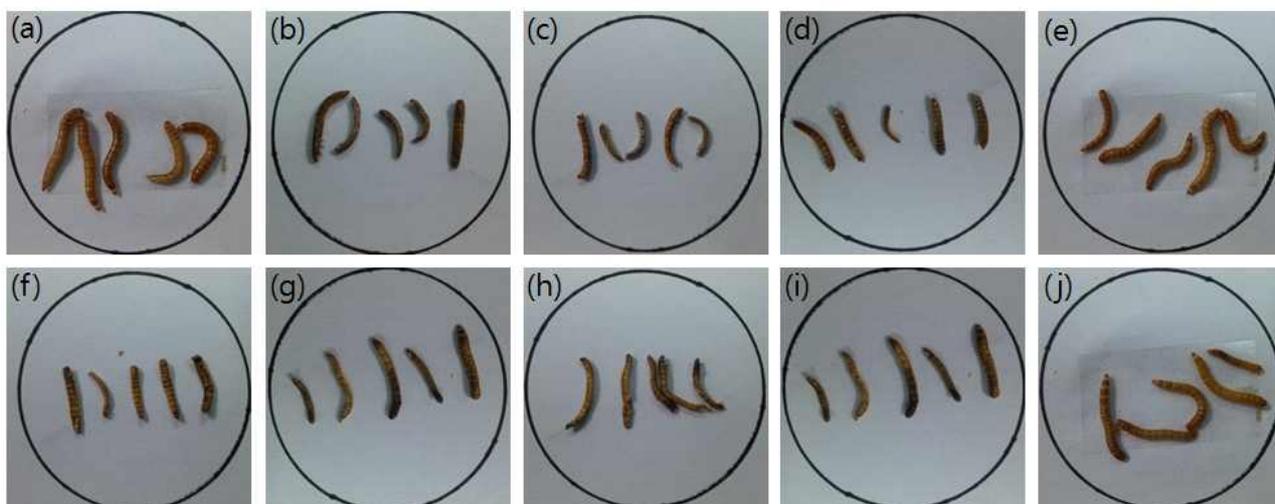


Fig. 1. 갈색거저리 유충에 대한 균주의 감염성 확인. (a), control (*Bb*); (b), DBB2507 (*Bb*); (c), ERL836 (*Bb*); (d), ERL1050 (*Bb*); (e), ERL1057 (*Bb*); (f), ERL1170 (*Bb*); (g), ERL1575 (*Bb*); (h), ERL1576 (*Bb*); (i), ERL1578 (*Bb*), (j), *M. anisopilae*. *Bb* : *Beauveria bassiana*.

<2차 실험>

실험 결과, *B. bassiana* 균주의 ERL1575에서 3일차에 갈색거저리 유충이 모두 치사되었으며, 4일차에 *B. bassiana* ERL836 균주에서 갈색거저리 유충이 모두 치사되었다. 5일차에는 *B. bassiana* ERL1578, ERL1050, DBB2507 균주에서 생충수가 1~2 정도로 갈색거저리 유충을 치사되었다. 균주 중 *B. bassiana* ERL1575가 병원성이 높은 것으로 확인되었다(Fig. 3, Fig. 4).



Fig. 2. 갈색거저리 유충에 대한 균주의 감염성 확인. *Ma* : *M. anisopilae*.

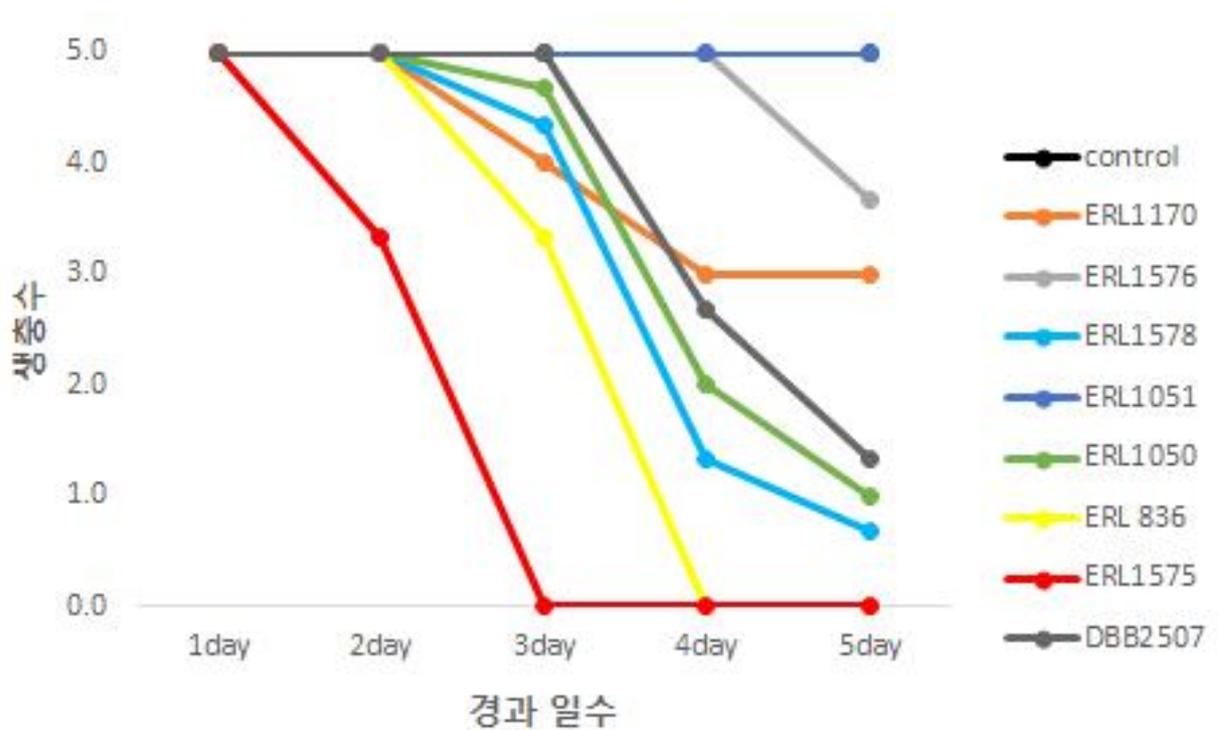


Fig. 3. *B. bassiana* 균주에 의한 갈색거저리 유충의 감염양상



Fig. 4. *B. bassiana* 균주별 일차에 따른 갈색거저리 유충의 감염양상
 (a), Control; (b), ERL836; (c), ERL1050; (d), ERL1051;
 (e), ERL1170; (f), ERL1575; (g), ERL1576;
 (h), ERL1578; (i), DBB2507.

<3차 실험>

Ma KACC 40969 균주에서 1일차부터 갈색거저리 유충이 치사되기 시작하였고, 3일차에는 1마리 이하로 생존수가 있었으며, 4일차에는 0에 가깝게 갈색거저리 유충이 치사되었다 (Fig. 5, Fig. 6).



Fig. 5. 갈색거저리 유충에 대한 *M. anisopilae* (Ma KACC) 균주의 병원성 확인. (a), control; (b), M. KACC 40223; (c), M. KACC 40230; (d), M. KACC 40231; (e), M. KACC 40969.



Fig. 6. 갈색거저리 유충에 대한 *M. anisopilae* (Ma KACC) 균주의 감염양상

<4차 실험>

균주 노출한 뒤 5일 동안 관찰한 결과 갈색거저리에 대한 병원성이 높은 균주로 *B. bassiana* ERL1575를 확인하였다(Fig. 7, Fig. 8).

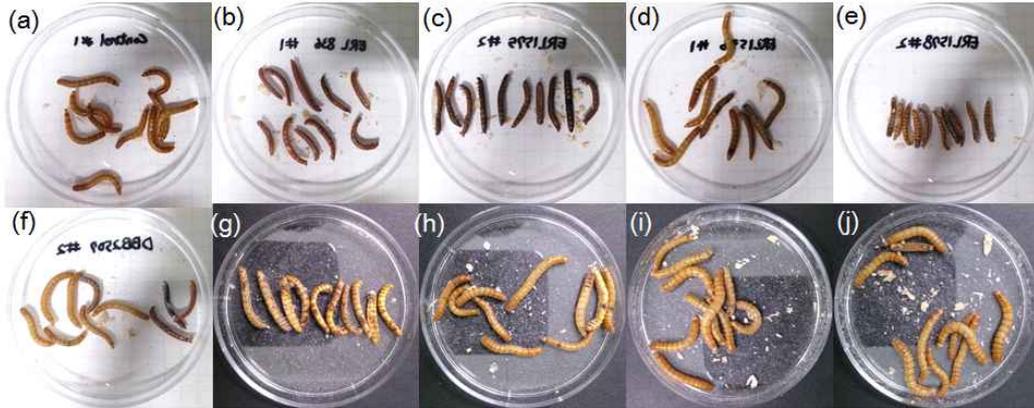


Fig. 7. 갈색거저리 유충을 균주에 24 h 노출한 후 밀기울이 채워진 petri dish에 옮긴 뒤 5일 후 관찰. (a), Control (*Bb*); (b), ERL836 (*Bb*); (c), ERL1575 (*Bb*); (d), ERL1576 (*Bb*); (e), ERL1578 (*Bb*); (f), DBB2507 (*Bb*); (g), *M. anisopilae* (1); (h), *M. anisopilae* (2); (i), M.KACC40231 (*Ma*); and (j), M.KACC10969 (*Ma*).

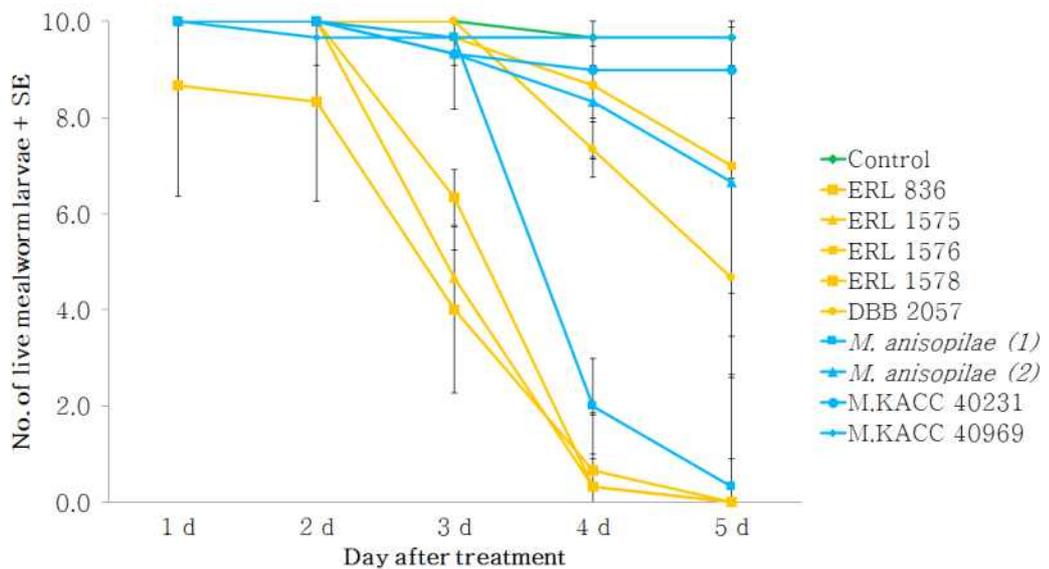


그림 8. 실험실 조건에서 갈색거저리 2령충에 대한 *B. bassiana* (노란색) 와 *M. anisopilae* (파란색)의 감염율

2. 사육 온도에 따른 대상 곤충의 발병률, 역학 조사 및 적정 사육온도 확립, 사육 습도에 따른 대상 곤충의 발병률, 역학 조사 및 적정 사육습도 확립



Fig. 9. *M. anisopilae* 감염에 의한 갈색거저리 유충에 나타난 병징. 왼쪽은 감염되지 않은 갈색거저리 유충이며, 오른쪽은 *M. anisopilae*에 의해 감염된 갈색거저리 유충

가. 온도와 습도에 따른 갈색거저리 유충의 병원성 양상

- 실험방법 :

<1차 실험>

1/4 Sabouraud Dextrose Agar (1/4 SDA, 90×15 mm dish)에 *Beauveria bassiana* ERL1576를 배양한 후 배양된 균주에 갈색거저리 2령충을 30마리씩 24시간 노출시켰다. 24시간 동안 노출 후 갈색거저리 유충을 밀기울이 있는(약 6 g) 깨끗한 petri dish(60×15 mm)에 옮겨준다(10 마리/dish). 습도조건으로 1차 증류수를 1 ml, 2 ml, 3 ml 조건으로 분무하고, 온도는 20℃, 25℃, 30℃, 35℃로 조건을 달리하였다(대조군 : 균처리를 하지 않은 1 set를 준비한다). tray에 담고 비닐봉투로 덮어 바람의 영향을 최소화하여 조건별로 인큐베이터에 보관하여 5일 동안 관찰하였다. 각 실험의 처리는 3반복으로 실시하였다.

<2차 실험>

갈색거저리 유충을 밀기울이 있는(약 6 g) 깨끗한 petri dish(90×15 mm)에 옮겨주고 (10 마리/dish), *B. bassiana* ERL1575 균주를 1.0×10^6 conidia/ml로 1 ml씩 처리한다. 습도조건으로 1차 증류수를 1 ml, 2 ml, 3 ml 조건으로 분무하고 온도는 20℃, 25℃, 30℃, 35℃로 조건을 달리하였다(대조군 : 균처리를 하지 않은 1 set를 준비한다). tray에 담고 비닐봉투로 덮어 바람의 영향을 최소화하여 조건별로 인큐베이터에 보관하여 5일 동안 관찰하였다. 각 실험의 처리는 3반복으로 실시하였다.

<3차 실험>

2차 실험과 방법은 동일하다. 실험 균주 : *M. anisopilae* Ma KACC 40969

- 실험결과 :

<1차 실험>

습도 조건에서는 *B. bassiana* ERL1576의 감염률에 영향을 주지 않았지만, 온도 조건의 경우 35℃에서 갈색거저리 유충의 치사량이 낮은 것으로 확인하였고, 이를 통해 감염률이 다른 온도에 비해 낮은 것을 확인하였다(Fig. 10, Fig. 11, Fig. 12).

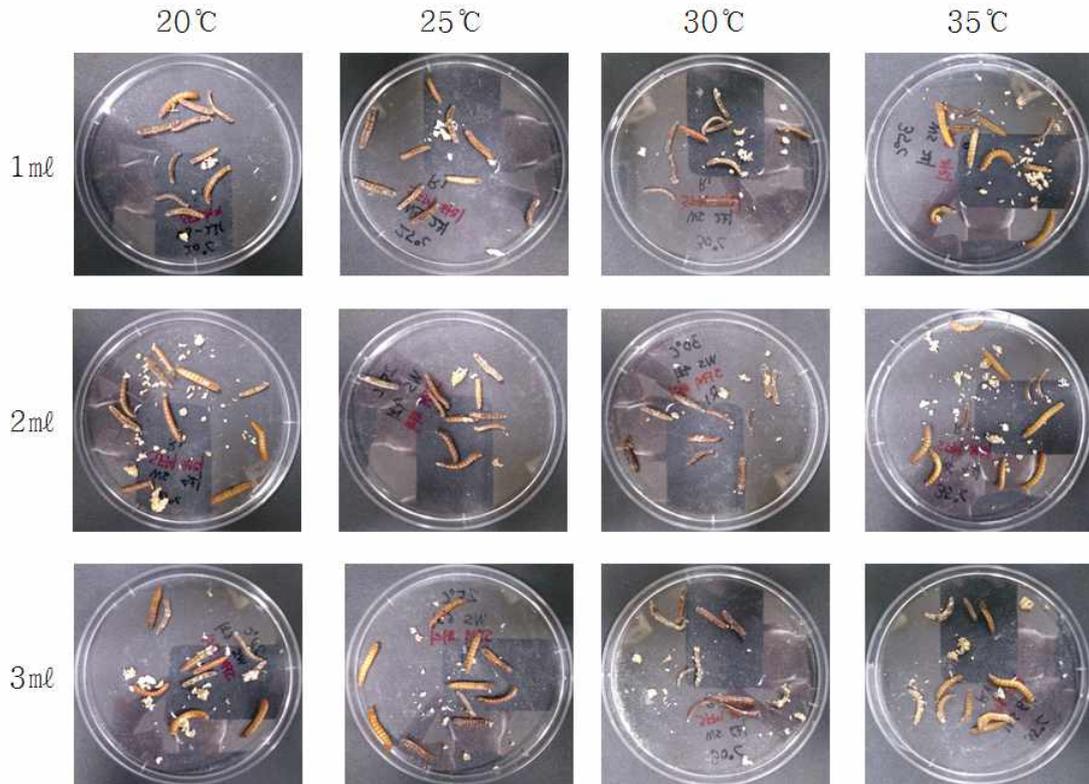


Fig. 10. *B. bassiana* ERL1576 균주가 배양된 배지에 1일간 갈색거저리 유충을 노출시킨 후 밀기울이 채워진 petri dish에 옮겨준 뒤 각 온습도별 조건에서의 5일 후 관찰한 갈색거저리 유충

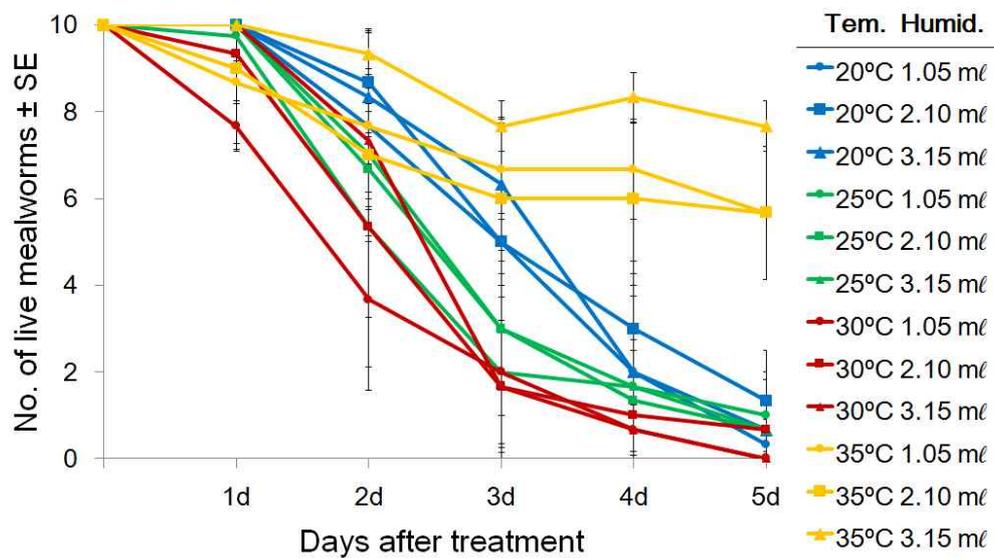


Fig. 11. 온도와 습도 조건에 따른 갈색거저리에 대한 *B. bassiana* ERL1576의 감염율

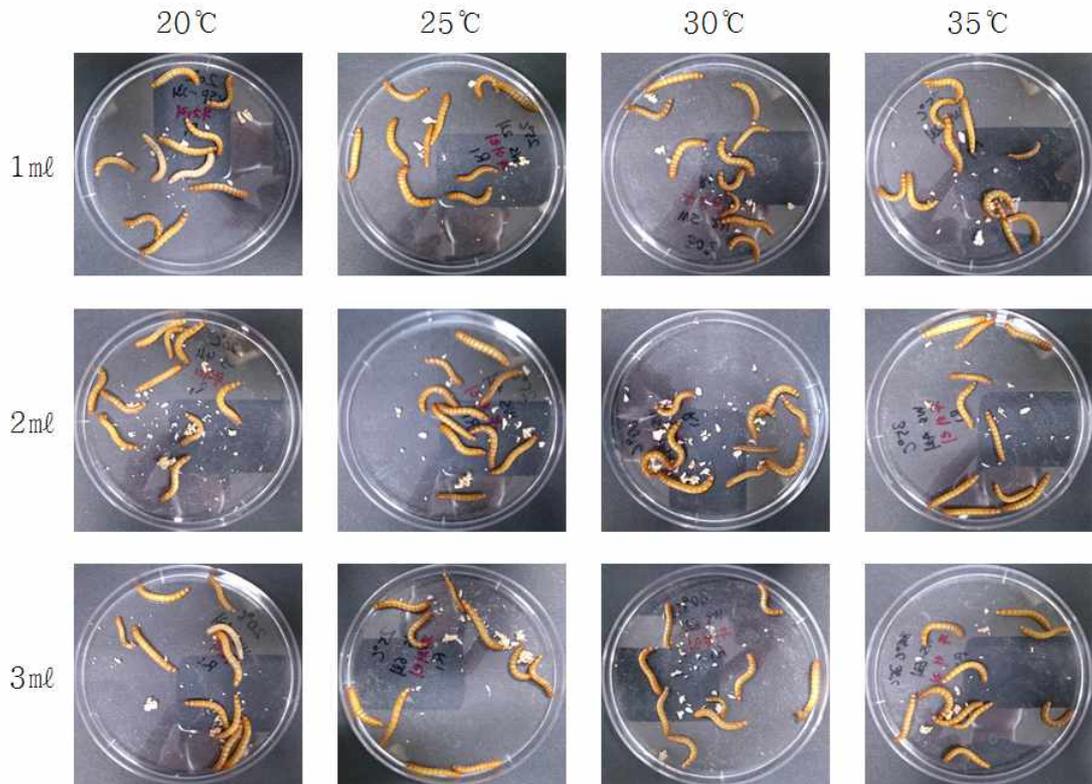


Fig. 12. *B. bassiana* ERL1576 균주가 배양되지 않은 배지에 1일간 노출 후 밀기울이 있는 petri dish에 옮겨준 뒤 각 온도와 습도에 따른 5일 후 관찰한 갈색거저리 유충

<2차 실험>

spray 처리시 균의 감염되지 않아서 갈색거저리 유충의 치사되지 않았다(Fig. 13, Fig. 14).

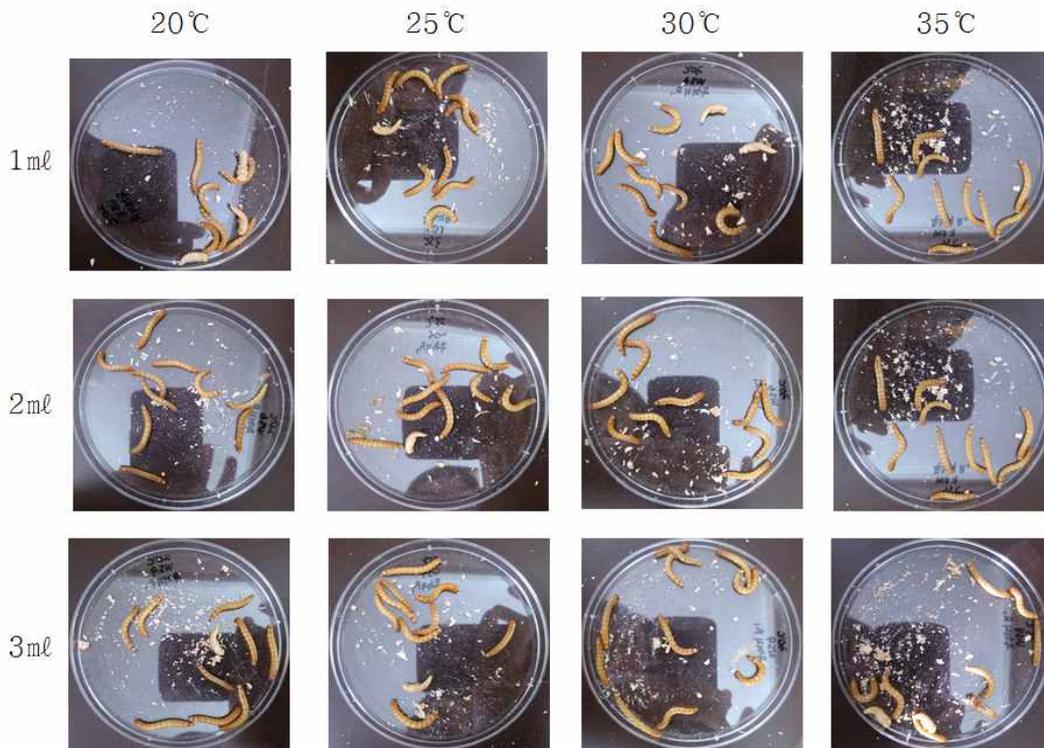


Fig. 13. 균주를 접종하지 않고 온도와 습도에 따른 갈색거저리 유충의 감염성 확인

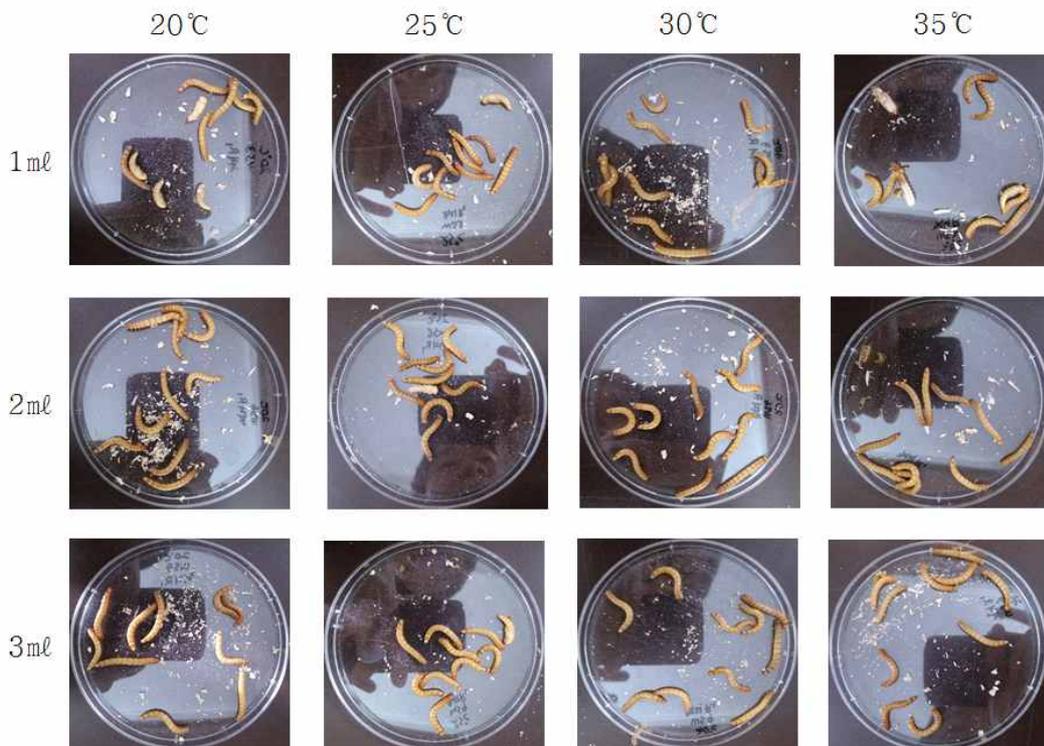


Fig. 14. *B. bassiana* ERL1575 균주를 갈색거저리 유충에 spray 접종시 온도와 습도에 따른 감염성 확인

<3차 실험>

spray 처리시 균의 감염되지 않아서 갈색거저리 유충의 치사되지 않았다(Fig. 15, Fig. 16).

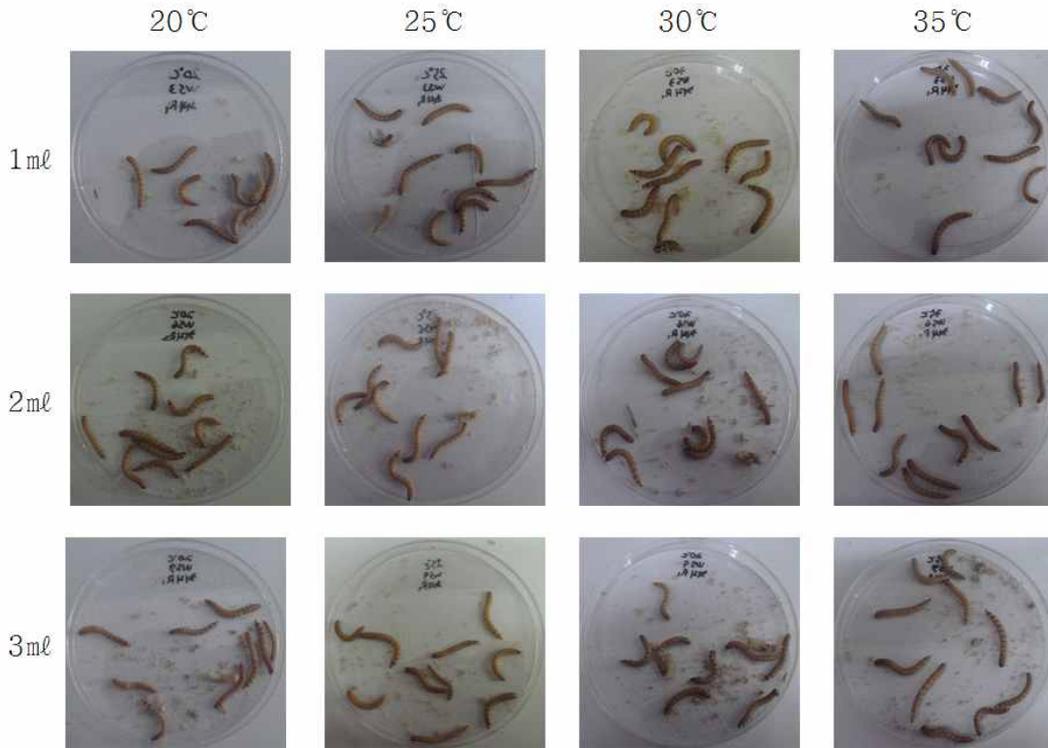


Fig. 15. *M. anisopilae* Ma KACC 40969 균주를 갈색거저리 유충에 spray 미접종시 온도와 습도에 따른 감염성 확인

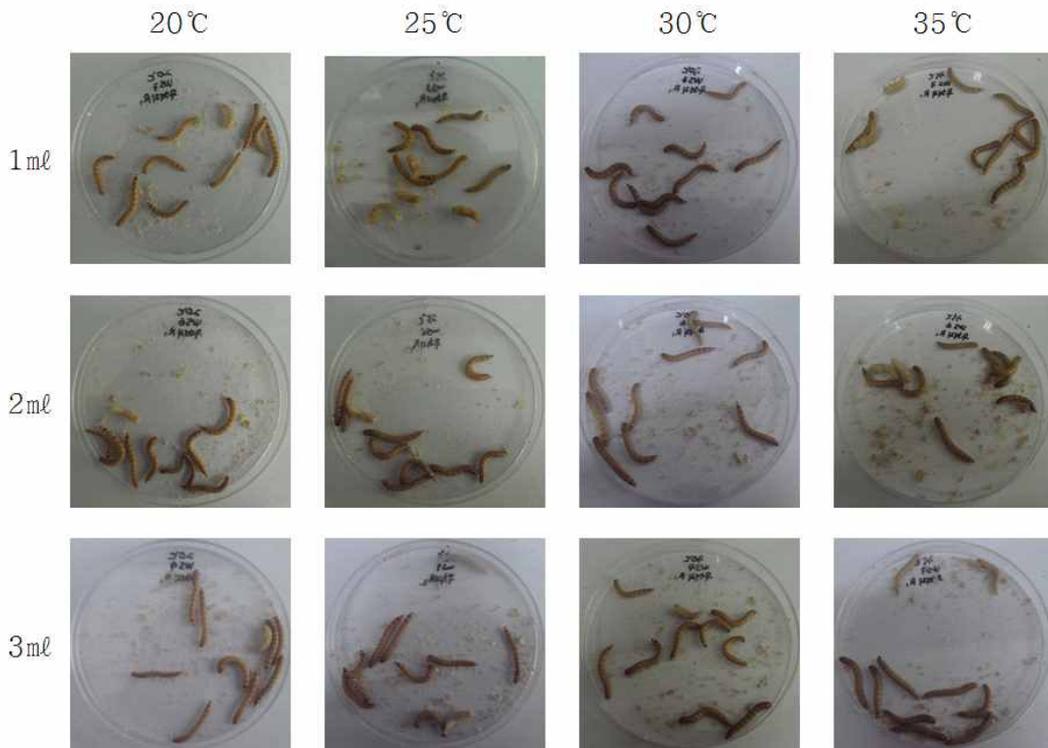


Fig. 16. *M. anisopilae* Ma KACC 40969 균주를 갈색거저리 유충에 spray 접종시 온도와 습도에 따른 감염성 확인

3. 대상 곤충의 병원미생물 특성 구명

가. 곤충병원성 진균의 성장속도



- 실험방법

1/4 SDA 배지에 각 균주에서 떼어낸 agar block을 왼쪽과 같이 정중앙에 놓고 25°C조건에서 배양 후 진균의 성장하는 모습을 관찰하였고, 자라는 진균의 반지름의 길이를 일차별로 측정하였다.

· 실험에 사용한 균주 : *B. bassiana* (ERL1170, ERL1575, ERL1576), *M. anisopilae*.

- 실험결과

균주에 따른 균사의 생장은 다음 그림과 같이 진행되었다(그림 17, 그림 18).

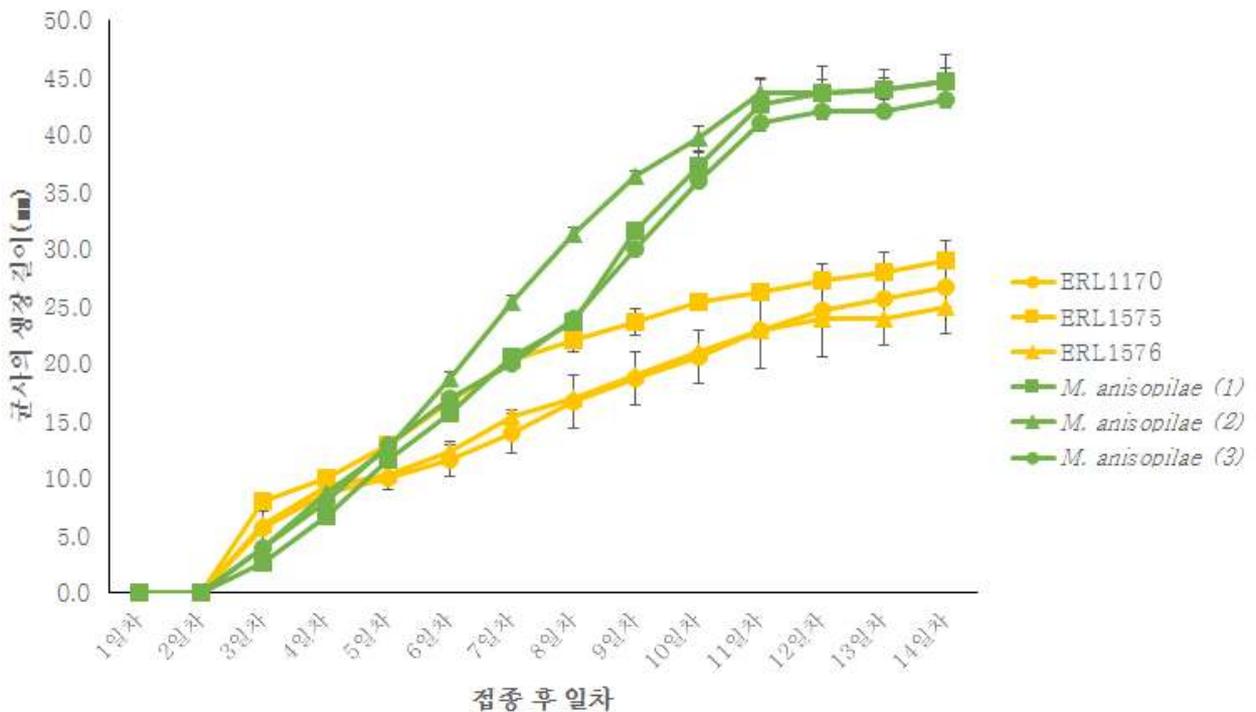


Fig. 17. 진균이 배양된 agar block을 1/4 SDA배지에 다시 25°C 조건에서 배양 후 자라는 균사의 일차별 반지름 측정 길이

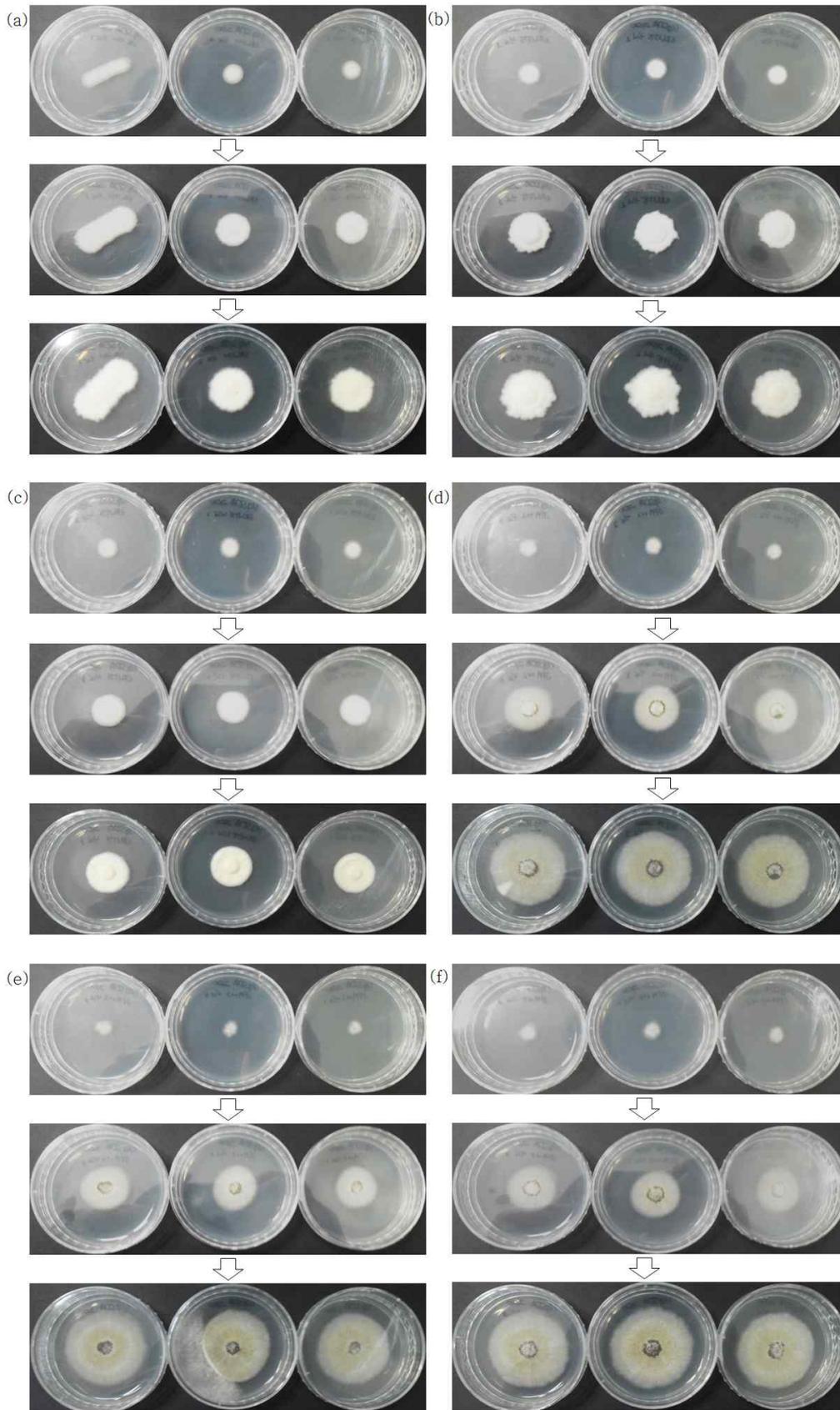


Fig. 18. 시간 경과에 따른 균사의 생장 (a), ERL1170 (*Bb*); (b), ERL1575 (*Bb*); (c), ERL1576 (*Bb*); (d), *M. anisopilae* (3); (e), *M. anisopilae* (1); (f), *M. anisopilae* (2)

나. 섭식과 분무조건으로 병원성 진균을 갈색거저리 유충에 접종하는 방법 간의 병원성 비교
 - 실험방법

병원성 진균을 섭식을 통해 갈색거저리 유충에 접종하는 방법은 균주(*B. bassiana* ERL 1575)가 배양된 1/4 SDA배지에 갈색거저리 유충을 10마리씩 1일간 균주에 노출한 후 밀기울이 채워진 Petridish (60×15 mm)에 옮겨주었다.

병원성 진균을 분무를 통해 갈색거저리 유충에 접종하는 방법은 밀기울이 채워진 Petri dish(60×15 mm)에 갈색거저리 유충을 10마리씩 넣어준 뒤, 균주의 포자현탁액 (*B. bassiana* ERL1575, 1.0×10^7 conidia/ml)를 1 ml 분무하였다.

섭식과 분무조건 실험의 처리는 3반복으로 실시하였으며, 5일 동안 감염률을 관찰하였다.

- 실험결과

병원균을 분무 처리할 경우 갈색거저리 유충이 낮은 치사량을 보였지만 균을 배양한 배지에 갈색거저리 유충을 노출시킬 경우 섭식을 통해 높은 치사량을 보였다(그림 19).

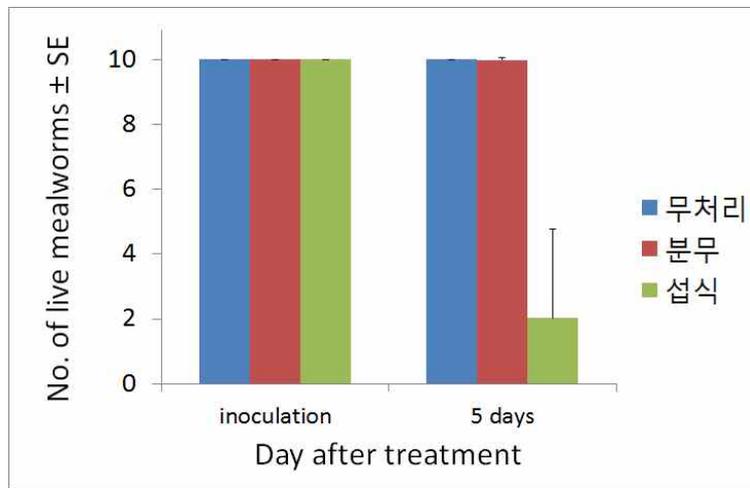


Fig. 19. 섭식과 분무조건으로 병원성 진균을 갈색거저리 유충에 접종하는 방법 간의 병원성 확인

4. 대상 곤충의 질병 예방을 위한 약제 처리 (천연물 또는 화학적 처리방법 연구)

가. 곤충병원성 곰팡이 방제용 화학약제 선발 (포자발아 억제)

- 실험방법 :

<1차 실험>

B. bassiana ERL1575의 포자를 1.0×10^7 conidia/ml로 0.03% silwet에 조제한 후 50 μ l/plate 로 도말하였다. 균주를 도말한 배지에 Control (3차 증류수), 추천량, 추천량/2, 추천량/5 살균제를 동일한 배지 내에 1 μ l씩 떨어뜨렸다. 처리된 배지는 25℃ 인큐베이터에 5일 동안 배양 후 관찰하였다.

<2차 실험>

1차 실험과 방법은 동일하다. 균주는 *M. anisopilae* 을 이용하였다.

- 실험결과

<1차 실험>

B. bassiana ERL1575을 포자발아 억제 실험 결과 Fluazinam, Oxin-copper, Mancozeb, Dithianon 살균제가 뚜렷한 병원균의 포자 발아 억제효과를 보였다(Fig. 20, Fig. 21).

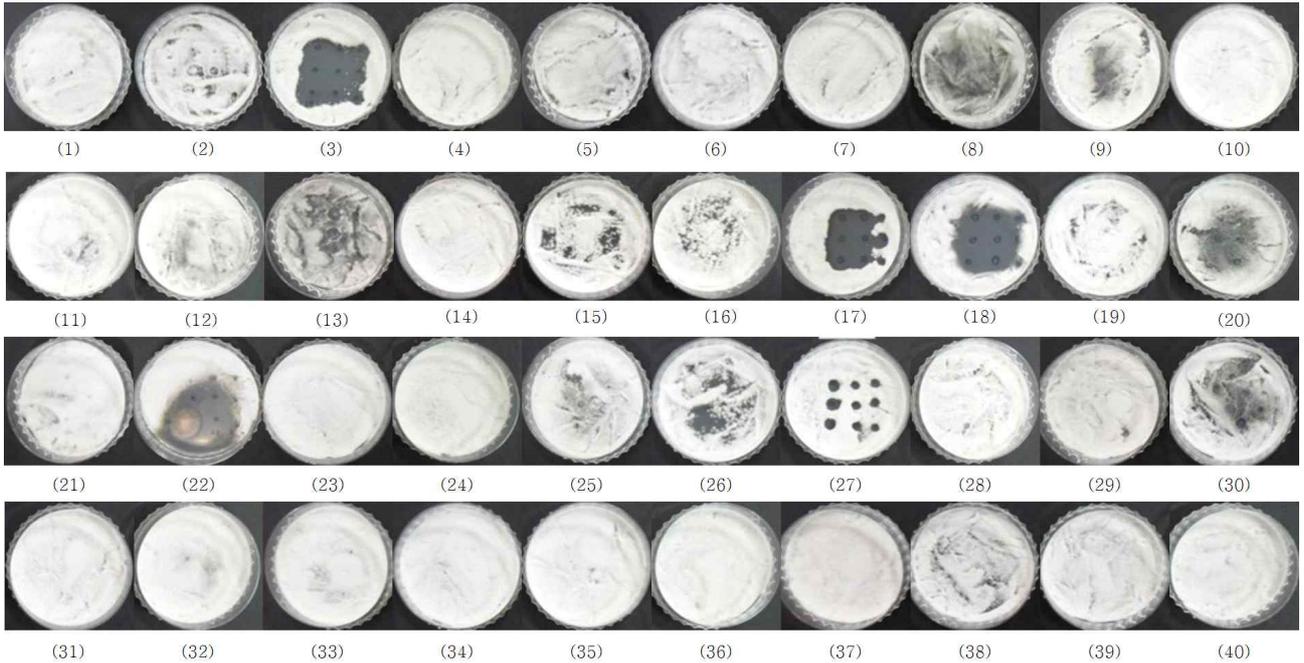


Fig. 20. *B. bassiana* ERL1575에 대한 40개의 방제용 화학약제를 이용한 포자발아 억제 (1), Iminoctadine triacetate; (2), Iminoctadine tris (albesilate); (3), Fluazinam; (4), Iprodione; (5), Procymidone; (6), Copper - Hydroxide; (7), Bordeaux mixture; (8), Metrafenone; (9), Benomyl; (10), Amisulbrom; (11), Kresoxim-methyl; (12), Trifloxystrobin; (13), Azoxystrobin; (14), Cyazofamid; (15), Thifluzamide; (16), Pencycuron; (17), Oxine-copper; (18), Mancozeb; (19), Etridiazole; (20), Prochloraz; (21), Mandipropamid; (22), Carbendazim; (23), Thiophanate-methyl; (24), Carpropamid; (25), Fluquinconazole; (26), Oxolinic acid; (27), Dithianon; (28), Tetraconazole; (29), Tricyclazole; (30), Bitertanol; (31), Tetraconazole; (32), Triflumizole; (33), Difenoconazole; (34), Fenoxanil; (35), Cyprodinil; (36), Fenarimol; (37), Streptomycin; (38), Polyoxin B; (39), Validamycin-A; and (40), Orysastrobin

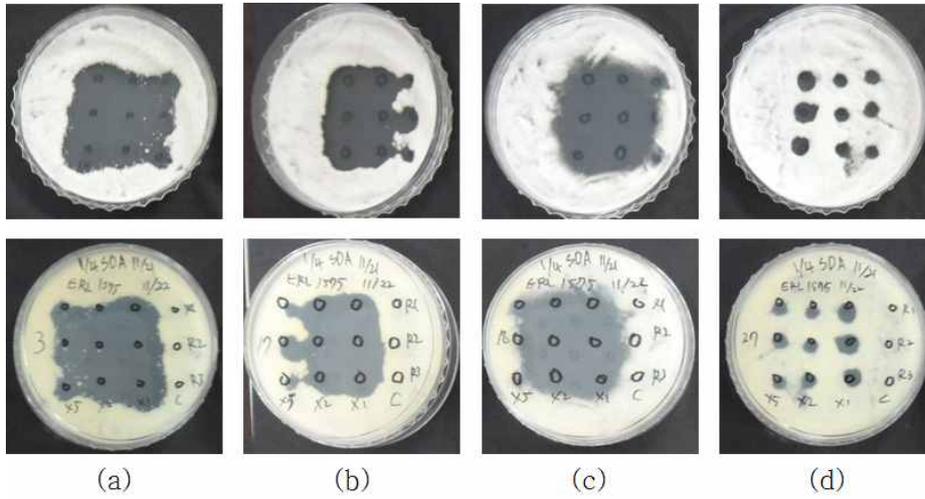


Fig. 21. 포자발아 억제에 효과적인 약제에 의한 *B. bassiana* ERL1575가 억제된 모습(위 : 앞면, 아래 : 뒷면). (a), Fluazinam; (b), Oxine - copper; (c), Mancozeb; (d), Dithianon

<2차 실험>

M. anisopilae 의 포자발아 억제 실험 결과 Fluazinam, Mancozeb, Dithianon 살균제가 뚜렷한 병원균의 포자 발아 억제효과를 보였다(Fig. 22, Fig. 23).

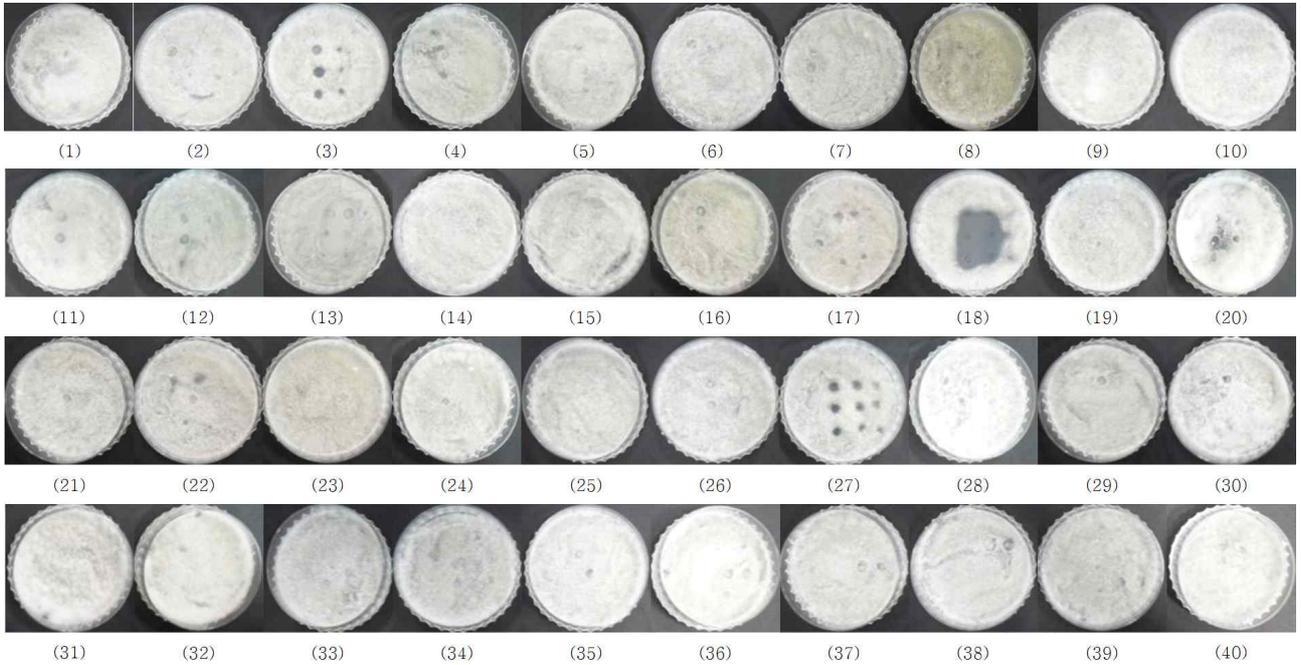


Fig. 22. *M. anisopilae* 에 대한 40개의 방제용 화학약제를 이용한 포자발아 억제 (1), Iminoctadine triacetate; (2), Iminoctadine tris (albesilate); (3), Fluazinam; (4), Iprodione; (5), Procymidone; (6), Copper - Hydroxide; (7), Bordeaux mixture; (8), Metrafenone; (9), Benomyl; (10), Amisulbrom; (11), Kresoxim-methyl; (12), Trifloxystrobin; (13), Azoxystrobin; (14), Cyazofamid; (15), Thifluzamide; (16), Pencycuron; (17), Oxine-copper; (18), Mancozeb; (19), Etridiazole; (20), Prochloraz; (21), Mandipropamid; (22), Carbendazim; (23), Thiophanate-methyl; (24), Carpropamid; (25), Fluquinconazole; (26), Oxolinic acid; (27), Dithianon; (28), Tetraconazole; (29), Tricyclazole; (30), Bitertanol; (31), Tetraconazole; (32), Triflumizole; (33), Difenoconazole; (34), Fenoxanil; (35), Cyprodinil; (36), Fenarimol; (37), Streptomycin; (38), Polyoxin B; (39), Validamycin-A; and (40), Orysastrobin

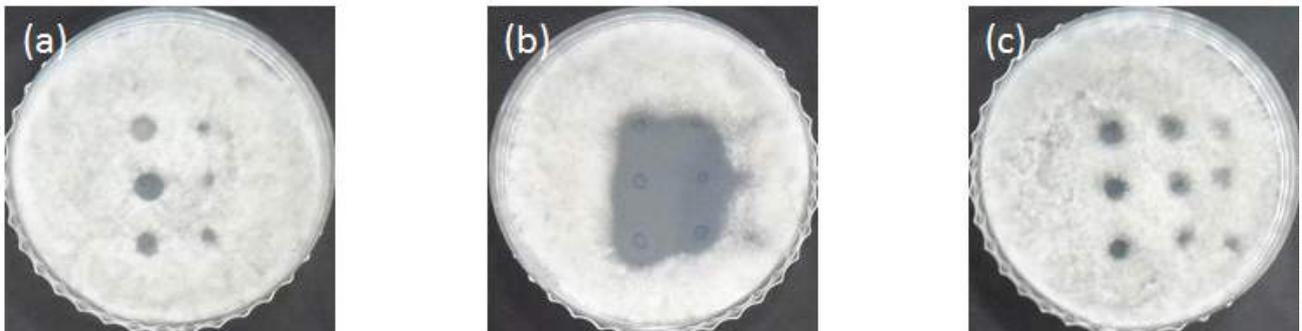
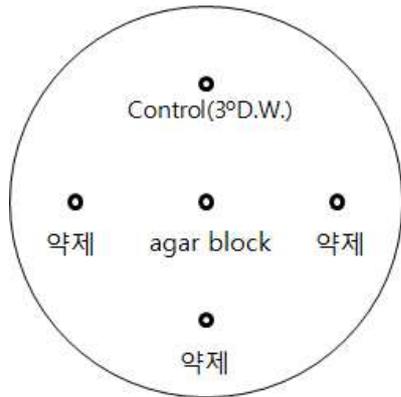


Fig. 23. *M. anisopilae* 에 대한 포자발아 억제가 효과적인 약제. (a), Fluazinam (b), Mancozeb (c), Dithianon

나. 곤충병원성 곰팡이 방제용 화학약제 선발 (균사 성장 억제)

- 실험 방법



Potato dextrose agar (PDA) 배지에 멸균된 filter paper disc를 가운데에 한 장 놓고, 그 주위로 2 cm 떨어진 거리로 4장 올려놓았다. 가운데 올려진 filter paper disc에는 진균의 포자현탁액(1.0×10^7 conidia/ml)을 떨어뜨리고, 주위 4장에는 정해진 화학약제(화학약제는 각각 기준량, 기준량의 2배, 기준량의 5배로 처리)를 떨어뜨렸다. 이 후 균사의 성장을 확인하고, 균사의 성장을 억제시키는 약제를 관찰하였다.

- 실험 결과

균사 성장 억제 실험을 통한 곤충병원성 진균을 방제하기 위한 약제로는 fluazinam이 효과적인 것을 확인하였다(Table 1, Fig. 24, Fig. 25).

Table 1. 균주에 따른 약제의 희석배수별 균사 성장억제 양상

chemical	Inhibition of conidial germination																										
	Fluazinam			Benomyl			Oxine-copper			Mancozeb			Prochloraz			Carbendazim			Dithianon			Bitertanol					
Dilution (RD×)	1	2	5	1	2	5	1	2	5	1	2	5	1	2	5	1	2	5	1	2	5	1	2	5			
Fungus																											
ERL1575	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	+	-	-	N/T	N/T	N/T
<i>Bb</i> ERL1576	+	+	+	-	-	-	-	-	-	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	-	N/T	N/T	-
DBB2507	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	-	-	-	N/T	N/T	N/T
(1)	N/T	N/T	+	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	-	N/T	N/T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N/T	N/T	N/T
<i>Ma</i> (2)	+	+	+	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	-	N/T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(3)	+	+	+	N/T	N/T	N/T	-	-	-	-	-	-	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T

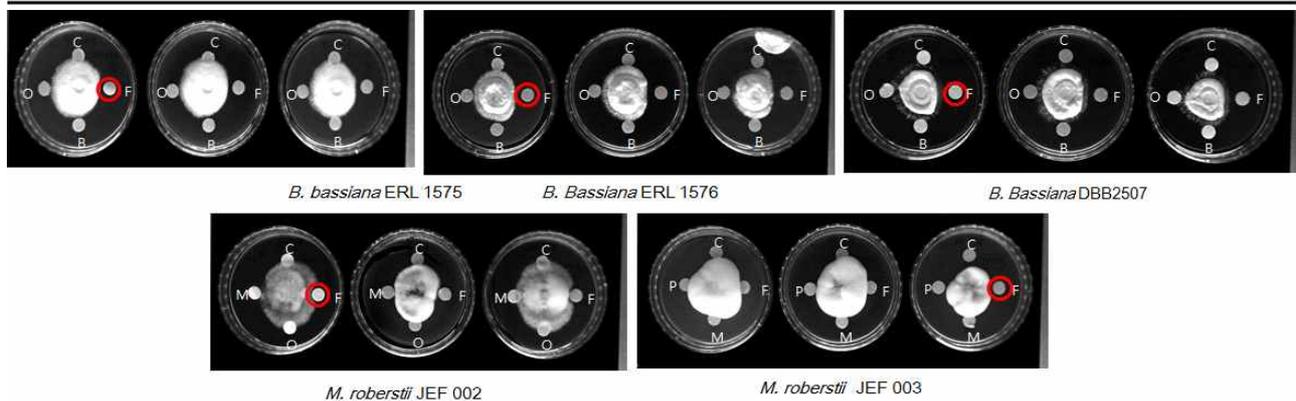


Fig. 24. *B. bassiana*와 *M. anisopilae* 균주에 대한 Fluazinam의 균사 성장억제 효과

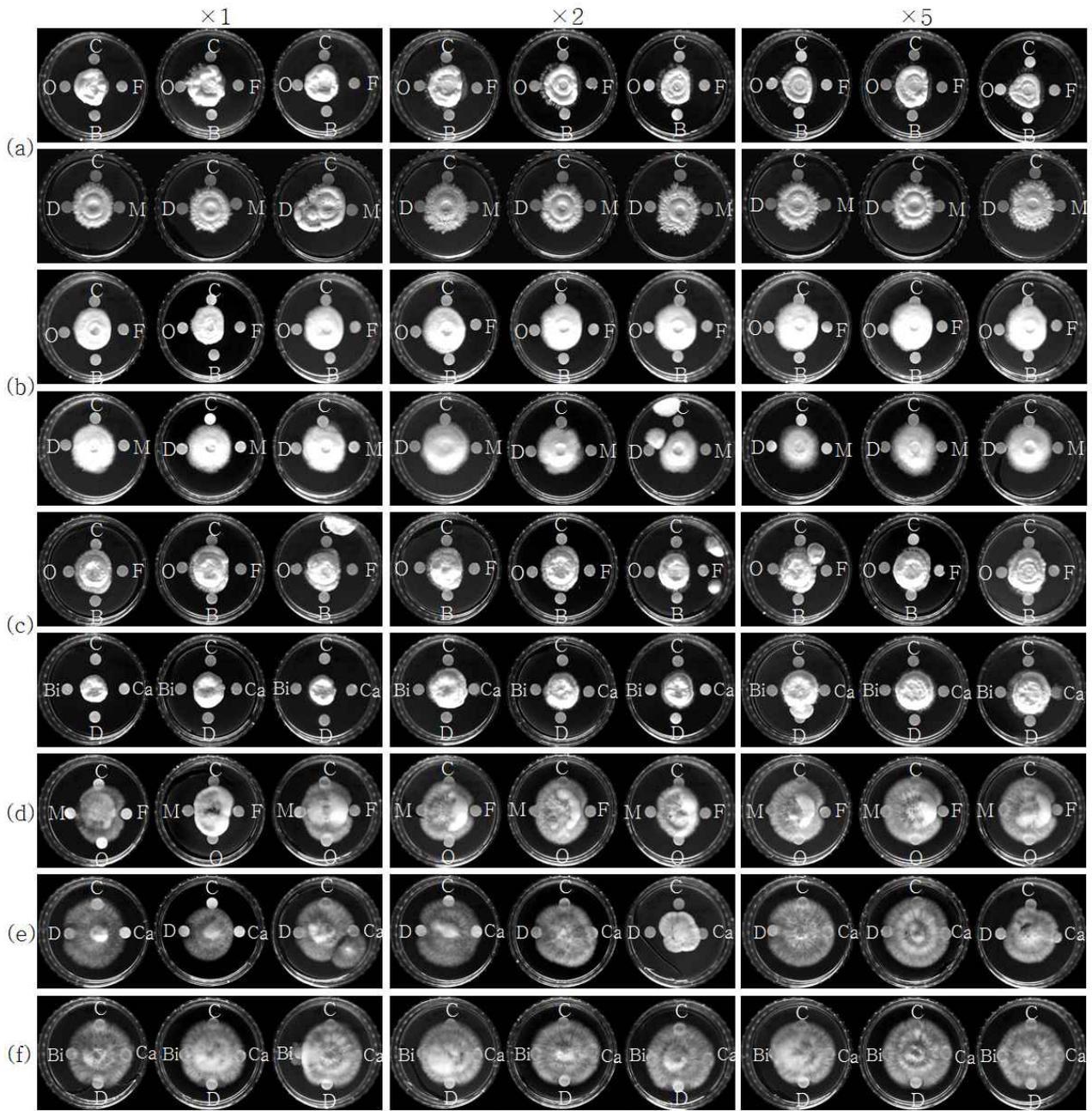


Fig. 25. 균주에 따른 약제의 희석배수별 균사 성장억제 실험 (a), DBB2507 (*Bb*); (b), ERL1575 (*Bb*); (c), ERL1576 (*Bb*); (d), *M. anisopilae* (3); (e), *M. anisopilae* (1); (f), *M. anisopilae* (2). C, Control; F, Fluazinam; B, Benomyl; O, Oxine-copper; M, Mancozeb; Ca, Carbendazim; D, Dithianon; Bi, Bitertanol

제 5 절 1년차(2013년~2014년)

제1협동과제 : 사료용 곤충의 안정적 공급 기술 개발

1. 밀웬 사충에서의 병원균의 분리 및 동정

<1차 실험>

⇒ 실험 방법

- 거즈 3겹을 비커에 고정시킨 후 사육 중 발견된 밀웬 사충을 거즈에 올려 표면소독을 진행하였다. 표면소독은 1% NaClO, 70% Ethanol, 3 ‘ 증류수를 이용하여 진행되었다.
- 밀웬 사육 중 발견된 사충을 수거해 비커에 거즈를 3겹으로 올려 고정시킨 후 사충을 거즈 위에 올렸다. 1% NaClO, 70% Ethanol, 3 ‘D.W. 순서대로 1.5 ml 씩 spray 되었으며, 각 단계별로 1분씩 대기하였다. 표면소독을 마친 밀웬 사충은 90 mm filter paper-sterilized (Whatman, Maidstone, England) 위에서 10분간 표면을 건조시켰으며, 본 과정은 모두 Clean bench에서 진행되었다.
- 표면이 건조된 사충은 각 각 ¼ Sabrouaud Dextrose Agar (SDA; Difco)+Dodine (Sigma) 와 ¼ SDA에 치상되었으며, 실험은 27℃ incubator에서 배양되었다.



Fig. 26. 밀웬 사충을 표면소독 후 배지(¼ SDA+Dodine)에 치상

⇒ 실험 결과

소독처리 3~4일 후 밀웬 사충에서 mycosis가 확인되었다(Fig. 27, Fig. 28).



Fig. 27. 배지에 치상된 밀웬 사충 (6일차)



Fig. 28. mycosis가 관찰된 밀웬 사충

<2차 실험>

⇒ 실험 방법

- 실험 방법은 사충의 표면 살균처리구와 비처리구로 나누어 진행하였으며, 소독구의 경우 1차 실험과 동일한 방법으로 진행되었다.
- 비소독구의 경우 사육 중 생긴 사충을 ¼SDA+Dodine 배지에 치상한 후 관찰하였다.

⇒ 실험 결과

치상 6일 후 밀웬 사충에서 mycosis가 관찰되었다 (Fig. 29, Fig. 30).

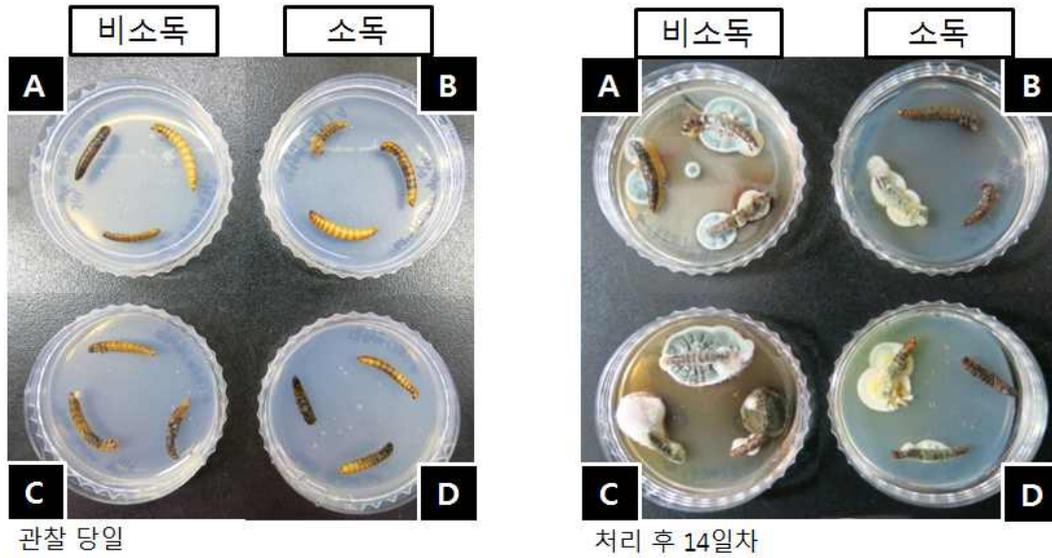


Fig. 29. 표면소독 처리구와 비소독구로 나누어 밀웬 사충에서 균의 생장을 관찰



Fig. 30. $\frac{1}{4}$ SDA+Dodine 배지에 치상한 밀웬 사충

<3차 실험>

- 밀웬 사충으로부터 분리된 6종의 균주를 ¼SDA에 Spreading (1×10^7 conidia/ml) 하여, 27 °C에서 5일 동안 배양하였으며, 밀웬 5마리를 하루 동안 배양체에 노출시켰다 (Fig. 31).
- 처리 후 밀웬을 밀기울 1 g이 들어있는 새로운 Petri dish(SPL, Korea)에 옮긴 후 실온 조건에서 생충률을 관찰하였다.

※ Control 조건은 아무것도 배양시키지 않은 ¼SDA 배지에 노출시켰으며, 전체 실험은 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 사육실 조건에서 수행되었다.

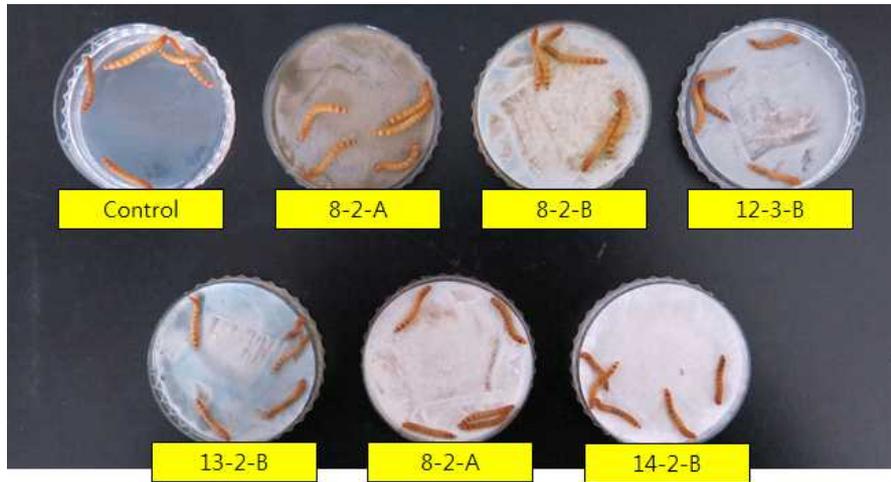


Fig. 31. 밀웬 사충에서 분리된 6종의 균을 이용한 병원성 검정

⇒ 실험 결과

밀웬 사충에서 분리한 6종의 균은 밀웬에 대해 병원성이 없다고 확인되었다 (Table 2).

Table 2. 밀웬 사충에서 분리한 균(8-2-A; 8-2-B; 12-3-B; 12-2-B; 14-2-A; 14-2-B)을 이용한 병원성 검정

Day after treatment (day)	No. of live mealworm						
	control	8-2-A	8-2-B	12-3-B	12-2-B	14-2-A	14-2-B
0	5	5	5	5	5	5	5
1	5	5	5	5	5	5	5
2	5	5	5	5	5	5	5
3	5	5	5	5	5	5	5
4	5	5	5	5	5	5	5
5	5	5	5	5	5	5	5
6	5	5	5	5	5	5	5
7	5	5	5	5	5	5	5
8	5	5	5	5	5	5	5

<4차 실험>

⇒ 실험 방법

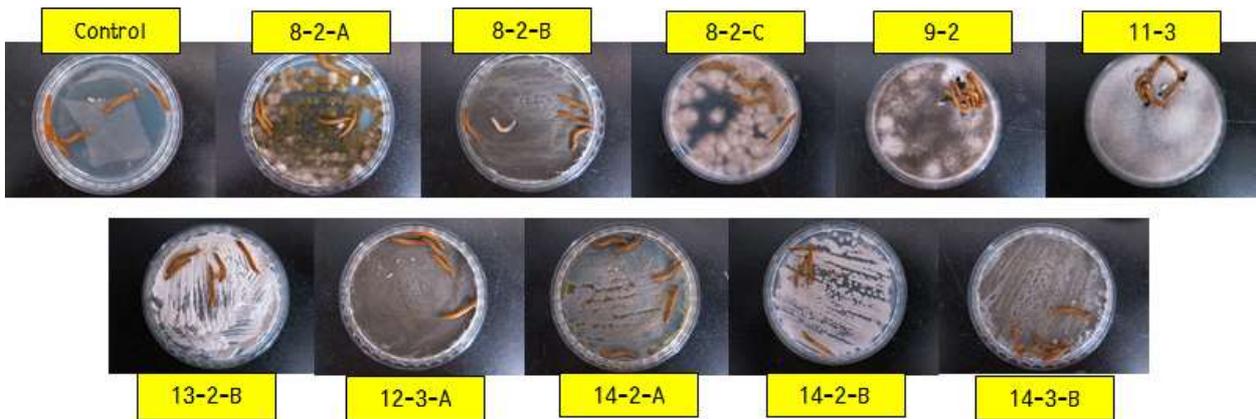


Fig. 32. 밀웬 사충에서 분리된 10종의 균을 이용한 병원성 검정.

- 밀웬 사충으로부터 분리된 10종의 균주를 ¼SDA에 Streaking 하여, 27 °C에서 5일 동안 배양하였으며, 밀웬 5마리를 하루 동안 배양체에 노출시켰다 (Fig. 32).
- 처리 후 밀웬을 밀기울 1 g이 들어있는 새로운 Petri dish에 옮긴 후 실온 조건에서 생충률을 관찰하였다.

※ Control 조건은 아무것도 배양시키지 않은 ¼SDA 배지에 노출시켰으며, 전체 실험은 25±2°C 사육실 조건에서 수행되었다.

▶ gDNA extraction

10 종의 균 (8-2-A, 8-2-B, 8-2-C, 9-2, 11-3, 12-3-A, 13-2-B, 14-2-A, 14-2-B, 14-3-B)에서 균사가 많은 부분을 1x1 cm 로 긁어내 1.5 ml micro test tube (SPL, Korea)에 extraction buffer (1 M KCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) 400 μ l와 함께 넣고 30초씩 3회 반복하여 파쇄한다. 파쇄액은 4°C에서 10,000 rpm으로 6 분간 원심분리 후, 상층액 350 μ l와 Isopropanol 300 μ l를 혼합한 뒤, 다시 4°C에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여, DNA를 침전시켰다. 침전물을 70% 에탄올로 세척하고 건조한 후 EB buffer에 용해하였다.

▶ PCR 검정

PCR기기 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 다음과 같은 조건에서 증폭하였다. 처음에 94°C에서 5분, 94°C 60초, 62°C 30초, 72°C 30초를 30회 실시하였고, 최종적으로 72°C에서 3분간 post maturation 시켰다. Forward primer인 ITS 1의 염기서열은 5' -TCC GTA GGT GAA CCT GCG G- 3'이고, reverse primer인 ITS 4의 염기서열은 5' -TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'이며, PCR 산물의 전기영동은 0.8% agarose gel + EtBr을 사용하여 140 V로 25분 실시한 후 사진촬영을 하였다.

▶ Purification (Qiagen, Hilden, Germany)

PB와 PRC 산물을 5:1 volume으로 혼합한 후, Qiaquick spin column 에 옮겨, 13,000 rpm 으로 1분간 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 그 후 700 μ l PE buffer 넣고 5분 기다린 후 13,000 rpm으로 1분간 원심분리를 2회 반복하였다. Spin column 에 남아있는 용액을 1.5 ml Micro test tube로 옮긴 후 50 μ l EB를 넣고 5분 기다린 후 또다시 13,000 rpm으로 1분간 원심분리를 2회 반복하였다. 최종적으로 얻어진 산물은 4 °C에 보관하였다.

√ 최종적으로 얻어진 산물을 마크로젠(<http://dna.macrogen.com/kor/>)에 보내 시퀀싱 의뢰를 진행하였다.

⇒ 실험 결과

- 처리 6일 후 12-3-A 처리구에서 100% 치사율을 확인되었다 (Fig. 33).
- 12-3-A 균의 동정 결과 *Beauveria bassiana* strain 로 확인되었다 (Fig. 33, Table 3).

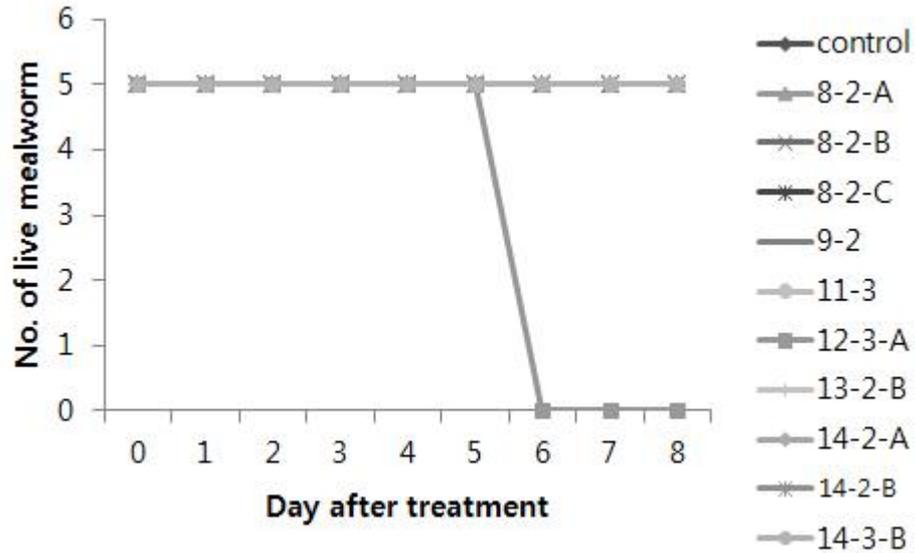


Fig. 33. 밀웜 사충에서 분리된 10종의 균(8-2-A; 8-2-B; 8-2-C; 9-2; 11-3; 12-3-A; 13-2-B; 14-2-A; 14-2-B 14-3-B)을 이용한 밀웜에 대한 병원성 검정

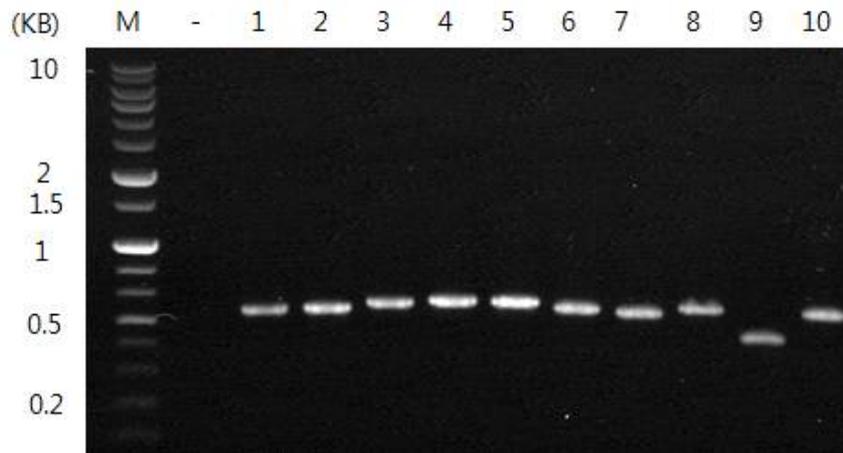


Fig 34. 밀웜 사충에서 분리된 10종의 균(8-2-A; 8-2-B; 8-2-C; 9-2; 11-3; 12-3-A; 13-2-B; 14-2-A; 14-3-B)을 gDNA extraction 후 ITS primer를 이용한 전기영동. Marker; (-), negative control; (1), 8-2-A; (2), 8-2-B; (3), 8-2-C; (4), 9-2; (5), 11-3; (6), 12-3-A; (7), 13-2-B; (8), 14-2-A; (9), 14-2-B; (10), 14-3-B.

Table 3. 밀웬 사충에서 분리된 10종의 균(8-2-A; 8-2-B; 8-2-C; 9-2; 11-3; 12-3-A; 13-2-B; 14-2-A; 14-3-B)의 동정 결과

CODE	동정 결과
8-2-A	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> <i>Ascomycota</i> sp.
8-2-B	<i>Penicillium citrinum</i> <i>Penicillium griseofulvum</i>
8-2-C	<i>Leptosphaeria microscopica</i> <i>Pleosporales</i> sp.
9-2	<i>Alternaria oregonensis</i> <i>Lewia infectoria</i>
11-3	<i>Alternaria infectoria</i> <i>Alternaria triticina</i> <i>Lewia infectoria</i>
12-3-A	<i>Beauveria bassiana</i> <i>Cordyceps</i> sp.
13-2-B	<i>Penicillium citrinum</i> <i>Penicillium griseofulvum</i>
14-2-A	<i>Penicillium polonicum</i> <i>Penicillium commune</i> (98%)
14-2-B	PCR 결과가 나오지 않음
14-3-B	<i>Penicillium sclerotiorum</i> (90%)

<5차 실험>

⇒ 실험 방법

- JEF 133 (*Beauveria bassiana*) 균주를 ¼SDA에 Streaking 하여, 27 °C에서 5일 동안 배양하였으며, 밀웬 5마리를 하루 동안 배양체에 노출시켰다 (Fig. 35).
- 처리 후 밀웬을 밀기울 1 g이 들어있는 새로운 Petri dish에 옮긴 후 실온 조건에서 생충률을 관찰하였다.
- 사충이 발생하면 ¼SDA 배지에 치상 후 코흐의 법칙을 통해 JEF 133이 맞는지 동정하였다.

※ Control 조건은 아무것도 배양시키지 않은 ¼SDA 배지에 노출시켰으며, 전체 실험은 25±2°C 사육실 조건에서 수행되었다.

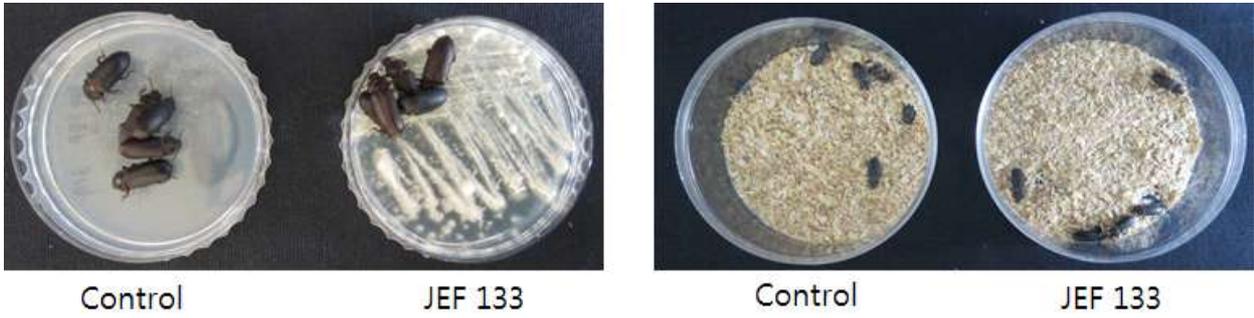


Fig. 35. JEF 133 (*Beauveria bassiana*)을 이용한 갈색거저리에서의 병원성 검정.

⇒실험 결과

- 처리 후 JEF 133 처리구에서 모두 100% 사충율이 확인되었다. 또한 SDA/4 배지에 치사된 갈색거저리를 치상한 결과 JEF 133 균주를 분리할 수 있었다 (fig. 36, fig. 37).

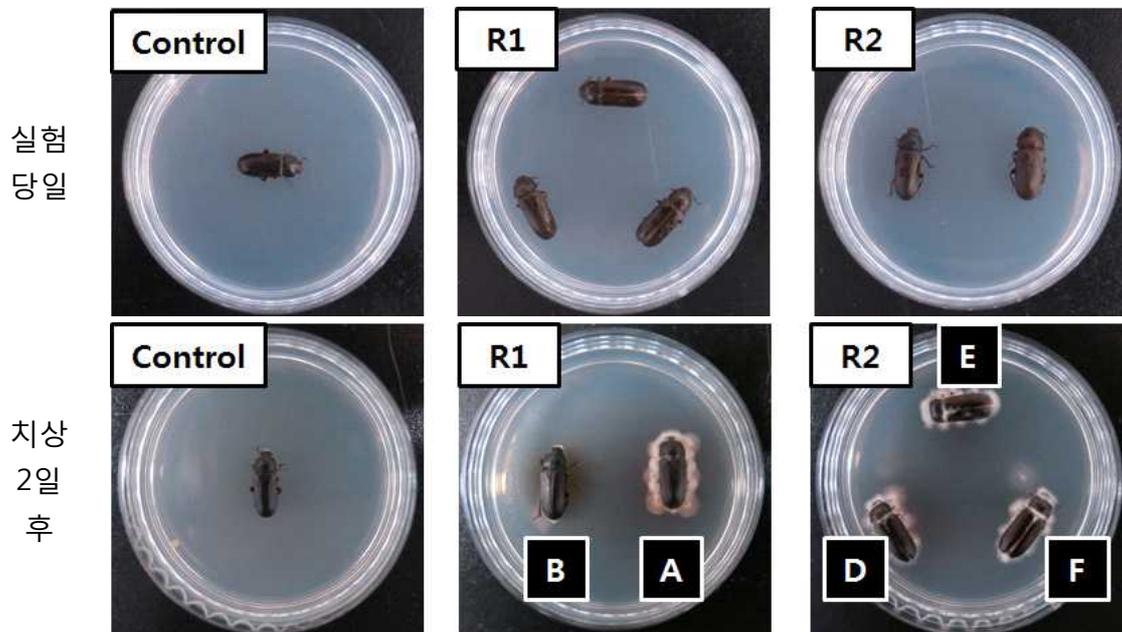


Fig. 36. SDA/4 배지에 치상된 치사된 갈색거저리

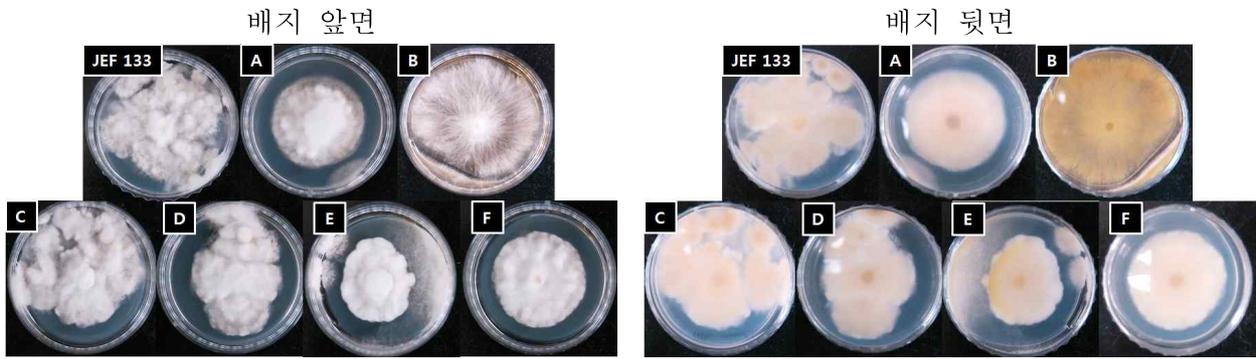


Fig. 37. JEF 133에 노출시킨 갈색거저리의 사충에서 균을 분리하여 배양(14일 후)

2. 대상 곤충의 병원미생물 방제 기술

- 실험방법

<1차 실험>

- 6 g의 밀기울이 들어있는 Petri dish (90mm × 15mm)에 균주 및 약제를 처리하였다.

Table 4. 균주 및 약제 처리 기준표

처리구	처리 방법
Control	밀웜 + D.W 6 ml
ERL1575	밀웜 + D.W 5 ml + ERL1575* 1 ml
Fluazinam	밀웜 + D.W 6 ml + Fluazinam**
Mancozeb	밀웜 + D.W 6 ml + Mancozeb***
ERL1575+Fluazinam	밀웜 + D.W 5 ml + ERL1575* 1 ml
ERL1575+Mancozeb	밀웜 + D.W 5 ml + ERL1575* 1 ml

*ERL1575의 농도는 1.75×10^6 conidia/ml

**Fluazinam: 약제 기준량(×500)으로 희석하여 2회 스프레이 분무

***Mancozeb: 약제 기준량(×500)으로 희석하여 2회 스프레이 분무

- 균주 및 약제 처리 3일 후 충체의 크기와 stage가 비슷한 밀웜을 10마리씩 선별해 약제 처리가 된 plate에 접종한 뒤 30℃에서 생충률을 관찰하였다.

⇒ 실험 결과

-ERL1575 균 및 약제 처리를 각각 2번 spray한 조건에서는 모든 조건에서 사충이 발견되지 않았다 (table 5).

Table 5. ERL1575 (*Beauveria bassiana*); Fluazinam; Mancozeb을 처리한 조건을 25℃에서 7일간 보관한 후 생충수 조사

처리 후 기간 (day)	0			7		
반복 수	R1	R2	R3	R1	R2	R3
밀웬	10	10	10	10	10	10
밀웬 + ERL1575	10	10	10	10	10	10
밀웬 + Fluazinam	10	10	10	10	10	10
밀웬 + Mancozeb	10	10	10	10	10	10
밀웬 + ERL1575 + Fluazinam	10	10	10	10	10	10
밀웬 + ERL1575 + Mancozeb	10	10	10	10	10	10

<2차 실험>

⇒ 실험 방법

- 6 g의 밀기울이 들어있는 Petri dish (90mm × 15mm)에 균주 및 약제를 처리하였다 (Fig. 38).
- 균주 및 약제 처리는 다음의 표를 참고하였다 (Table 6).

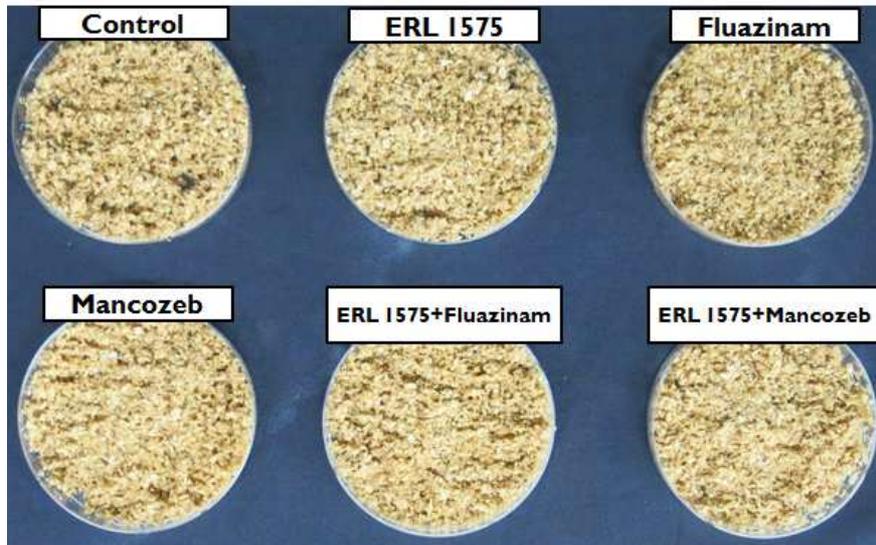


Fig. 38. 밀기울에 ERL1575(*Beauveria bassiana*); Fluazinam; Mancozeb 처리

Table 6. 균주 및 약제 처리 기준표

처리구	처리 방법
Control	밀웁 + D.W 6 ml
ERL1575	밀웁 + D.W 5 ml + ERL1575* 1 ml
Fluazinam	밀웁 + D.W 6 ml + Fluazinam**
Mancozeb	밀웁 + D.W 6 ml + Mancozeb***
ERL1575+Fluazinam	밀웁 + D.W 5 ml + ERL1575* 1 ml
ERL1575+Mancozeb	밀웁 + D.W 5 ml + ERL 575* 1 ml

*ERL 1575의 농도는 2.3×10^8 conidia/ml

**Fluazinam: 약제 기준량($\times 500$)으로 희석하여 3회 스프레이 분무

***Mancozeb: 약제 기준량($\times 500$)으로 희석하여 3회 스프레이 분무

- 균주 및 약제 처리 3일 후 충체의 크기와 stage가 비슷한 밀웁을 10마리씩 선별해 약제 처리가 된 plate에 접종한 뒤 30℃에서 생충률을 관찰하였다.

⇒ 실험 결과

- ERL1575 처리구와 ERL1575+Fluazinam 처리구에서 사충이 발견되었으나 물곰팡이가 함께 발생된 것을 확인하였다 (Fig. 39, Table 7).



Fig. 39. ERL1575 (*Beauveria bassiana*); Fluazinam; Mancozeb을 처리한 조건을 25℃에 7일간 보관.

Table 7. ERL1575 (*Beauveria bassiana*); Fluazinam; Mancozeb을 처리한 조건을 25℃에 7일간 보관

조건	생충수	비고
Control	10.0±0.00	물곰팡이의 발생 확인
ERL1575	7.7±1.53	ERL1575 발생 확인
Fluazinam	9.7±0.58	
Mancozeb	10.0±0.00	물곰팡이의 발생 확인
ERL1575+Fluazinam	7.3±4.62	물곰팡이 + ERL1575 발생 확인
ERL1575+Mancozeb	10.0±0.00	물곰팡이 + ERL1575 발생 확인

<3차 실험>

⇒실험 방법

- 6 g의 밀기울이 들어있는 Petri dish (90mm × 15mm)에 균주 및 약제를 처리하였다.
- 균주 및 약제 처리는 다음의 표를 참고하였다 (Table 8).

Table 8. 균주 및 약제 처리 기준표

처리구	처리 방법
Control	밀웍 + D.W 6 ml
ERL1575	밀웍 + D.W 5 ml + ERL1575* 1 ml
Fluazinam	밀웍 + D.W 6 ml + Fluazinam**
Mancozeb	밀웍 + D.W 6 ml + Mancozeb***
ERL1575+Fluazinam	밀웍 + D.W 5 ml + ERL1575* 1 ml
ERL1575+Mancozeb	밀웍 + D.W 5 ml + ERL1575* 1 ml

*ERL1575의 농도는 1.0×10^7 conidia/ml

**Fluazinam: 약제 기준량($\times 500$)으로 희석하여 3회 스프레이 분무

***Mancozeb: 약제 기준량($\times 500$)으로 희석하여 3회 스프레이 분무

- 균주 및 약제 처리 3일 후 충체의 크기와 stage가 비슷한 밀웍을 10마리씩 선별해 약제 처리가 된 plate에 접종한 뒤 30℃에서 생충률을 관찰하였다.



Fig. 40. ERL1575 (*Beauveria bassiana*); Fluazinam; Mancozeb을 조건에 맞게 처리

⇒ 실험 결과

- ERL 1575를 처리한 조건에서는 3일 이후 80% 이상의 밀웍이 치사되었으나, ERL 1575와 Fluazinam 또는 Mancozeb을 처리한 조건에서는 시간이 경과하여도 높은 생충수를 유지하였다 (Fig. 41).



Fig. 41. 조건에 맞게 처리된 ERL1575 (*Beauveria bassiana*); Fluazinam; Mancozeb (7일차)

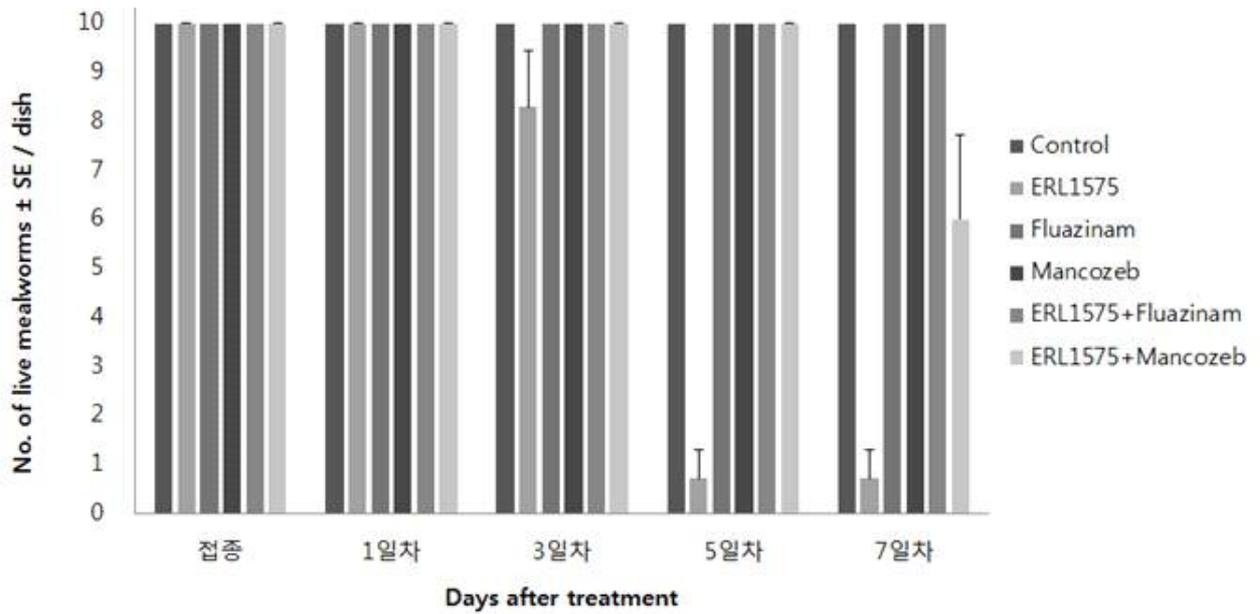


Fig. 42. 조건에 맞게 처리된 ERL1575 (*Beauveria bassiana*); Fluazinam; Mancozeb의 시간 경과에 따른 생충수

3. 대상 곤충의 성장발육 동기화 ①

<1차 실험>

⇒ 실험 방법

- 우화시기가 비슷한 성충(± 10 days)을 모아 암·수 비율을 동일하게 맞춰주기 위해 교미중인 성충 5쌍을 Breeding dish에 넣어주었다.
- 산란을 위한 밀기울과 수분 및 영양 공급을 위한 배추를 공급한 뒤, 각 조건 (1일/3일/7일/14일)동안 산란을 받아 한달 뒤 각각의 조건에서의 유충을 개체수별로 길이, 두께를 조사하였다.

⇒ 실험 결과

- 각 실험 결과의 밀웜 stage별 충체 크기 및 두께는 다음 표에 의거하였다 (Table. 9).
- 7일 동안 산란을 받아 사육하면 비슷한 시기의 령충을 다량 얻을 수 있다고 확인되었다 (Fig. 43, 44, 45).

Table 9. 밀웜의 령충별 충체 길이 및 두께 기준표

구분	길이	두께
1 령충	1 cm 미만	1 mm 미만
2 령충	1 ~ 1.5 cm	1 mm 미만
3 령충	1.5 ~ 2 cm	1 mm 미만
4 령충	1.5 ~ 2 cm	1 mm 이상
5 령충	2 cm 이상	2 mm 이상

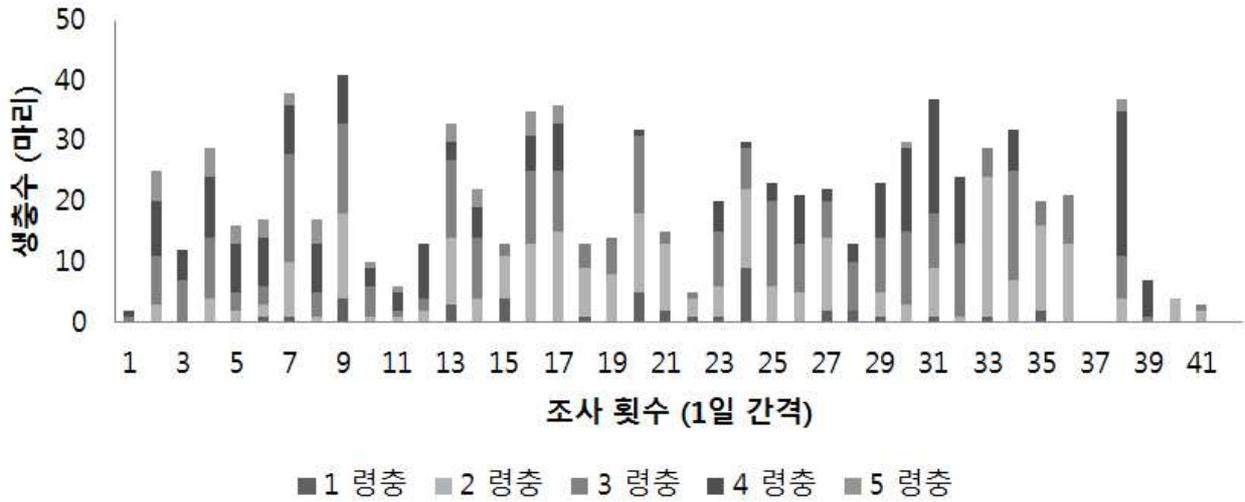


Fig. 44. 1일 간격으로 산란을 받은 령층별 마리 수

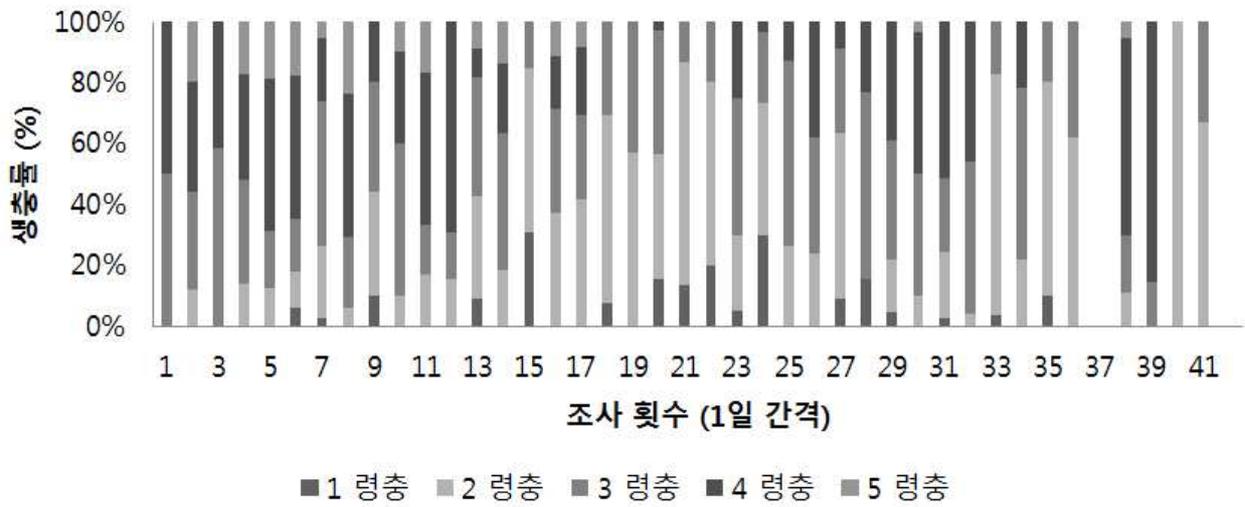


Fig. 45. 1일 간격으로 산란을 받은 령층별 생충률(%)

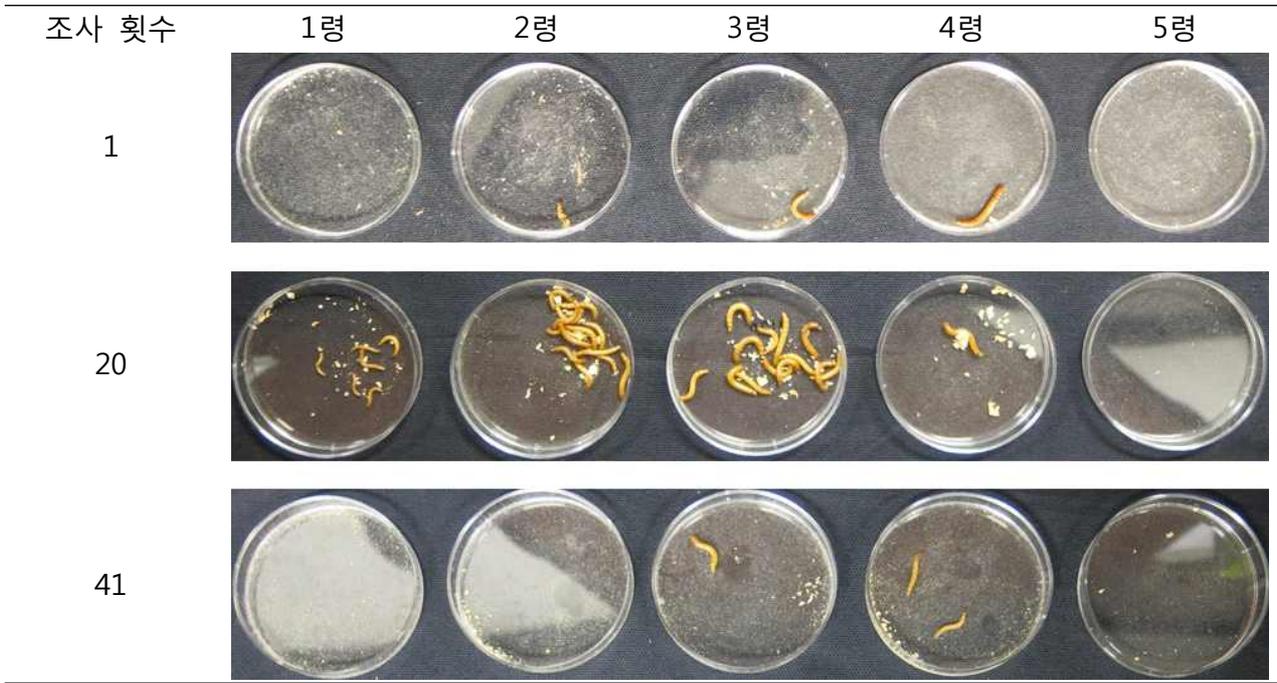


Fig. 46. 1일 간격으로 산란을 받았을 때의 밀웬 Stage 분포

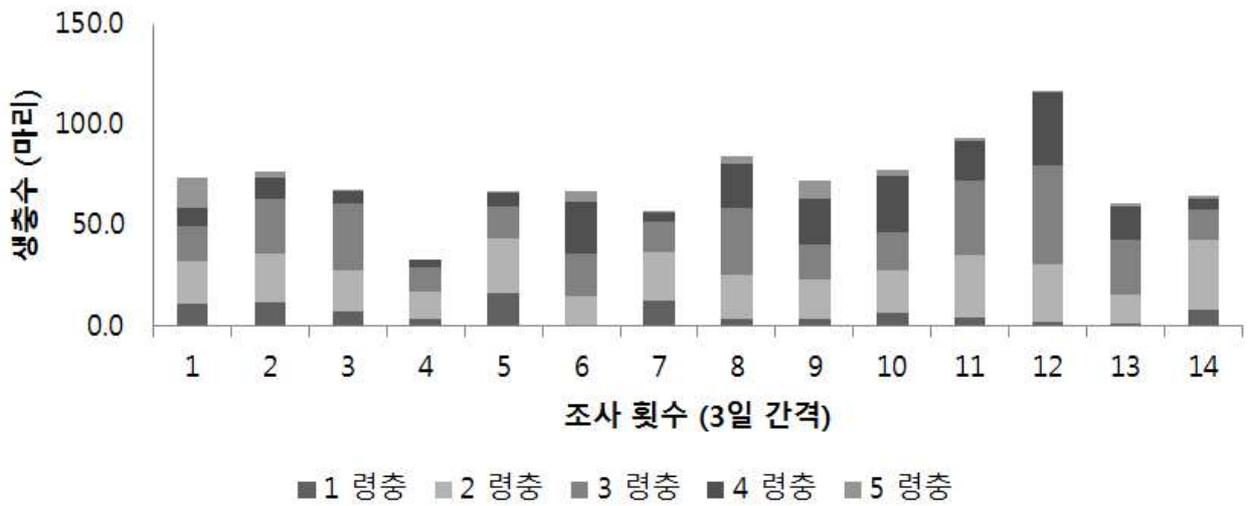


Fig. 47. 3일 간격으로 산란을 받은 령층별 마리 수

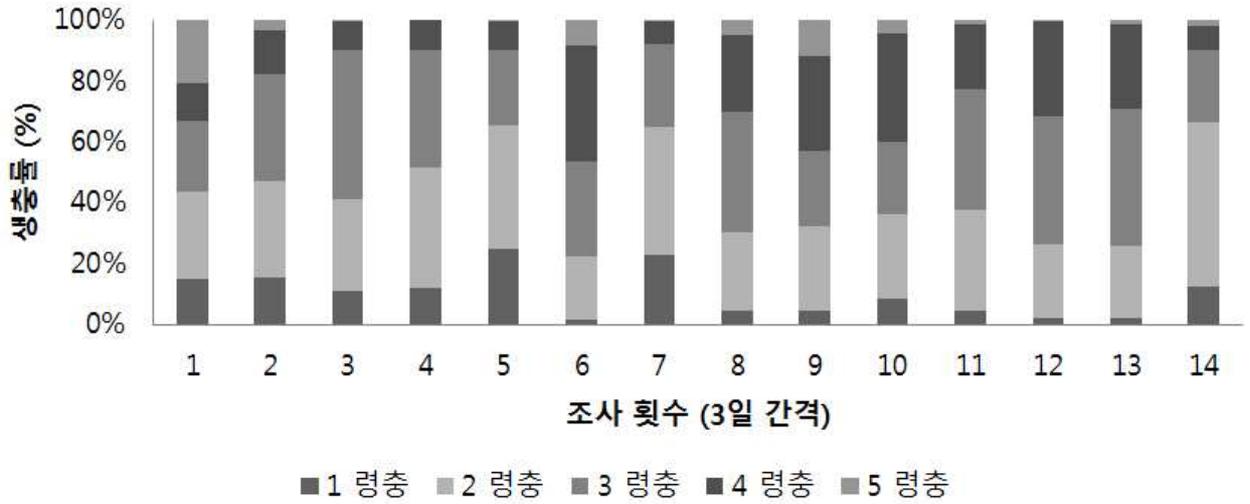


Fig. 48. 3일 간격으로 산란을 받은 령층별 생충률(%)

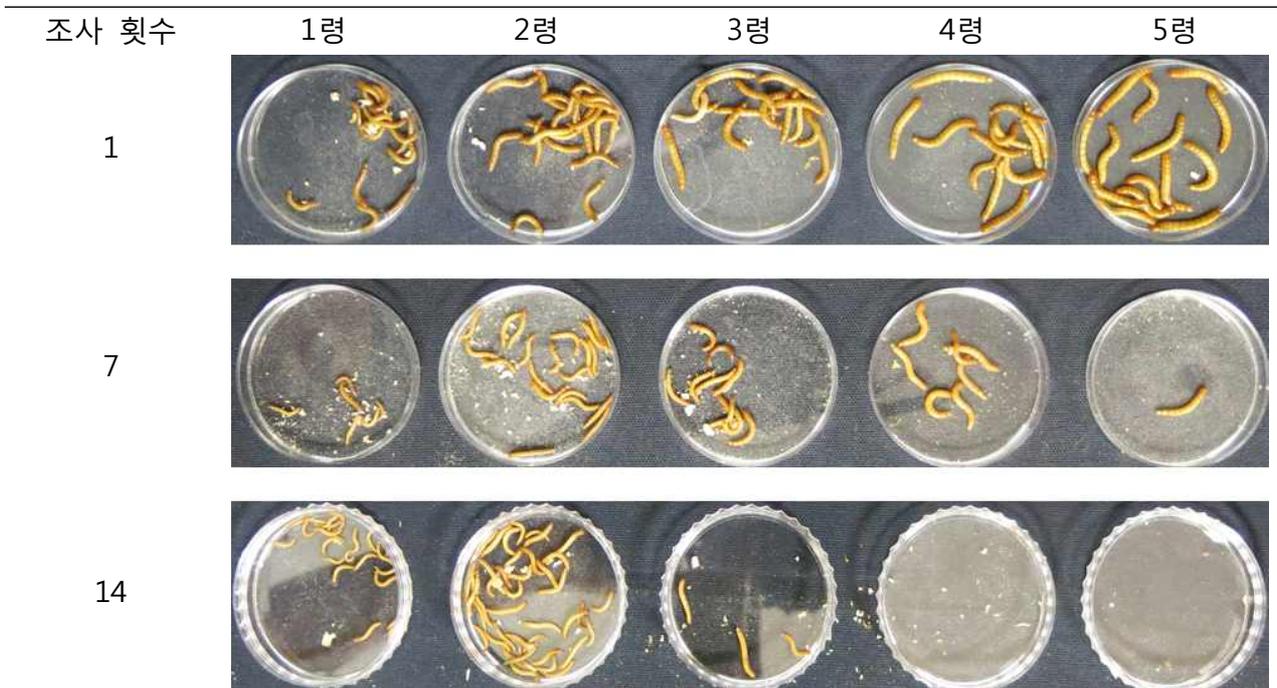


Fig. 49. 3일 간격으로 산란을 받은 밀웜 Stage 분포

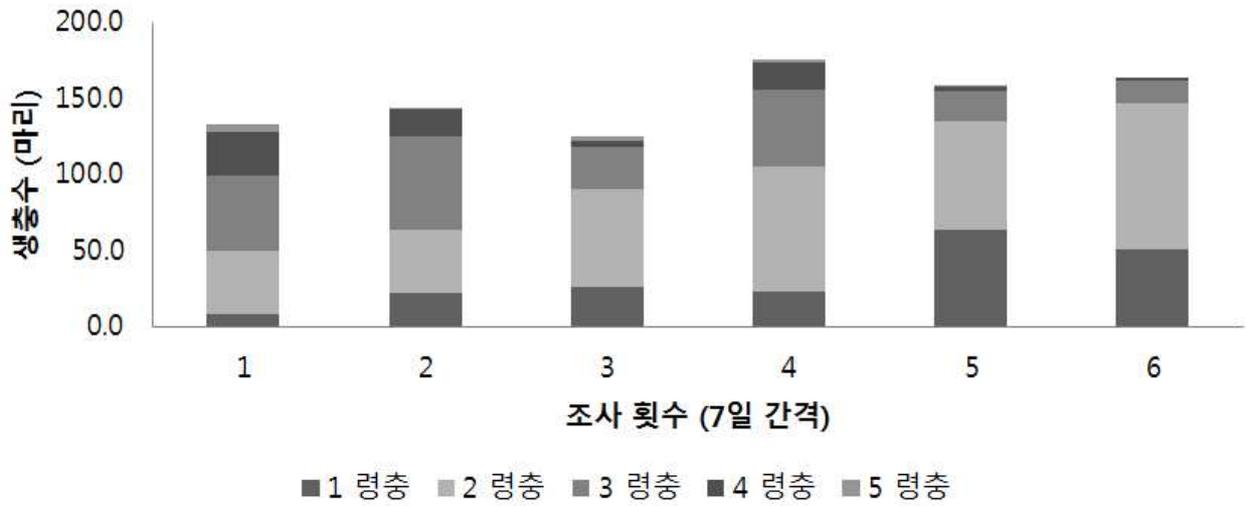


Fig. 50. 7일 간격으로 산란을 받은 령층별 마리 수

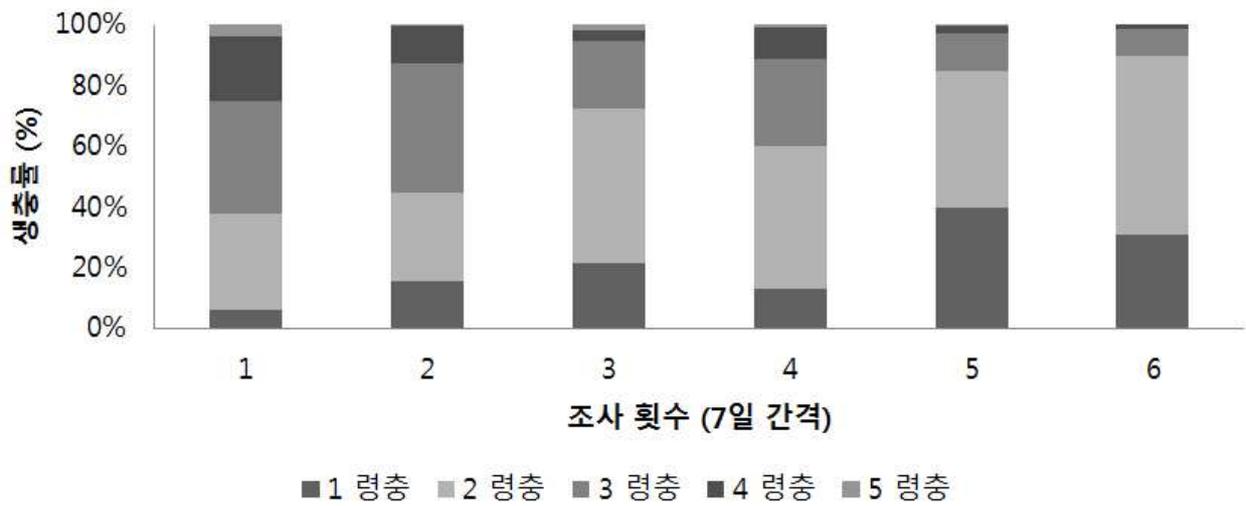


Fig. 51. 7일 간격으로 산란을 받은 령층별 생충률(%)



Fig. 52. 7일 간격으로 산란을 받은 밀웬 Stage 분포

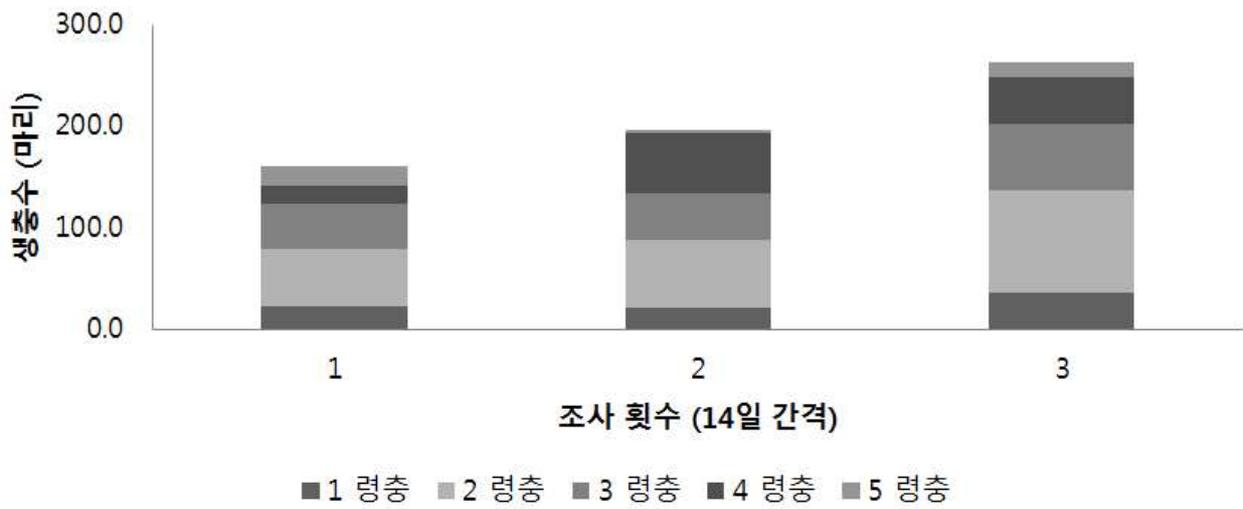


Fig. 53. 14일 간격으로 산란을 받은 령층별 마리 수

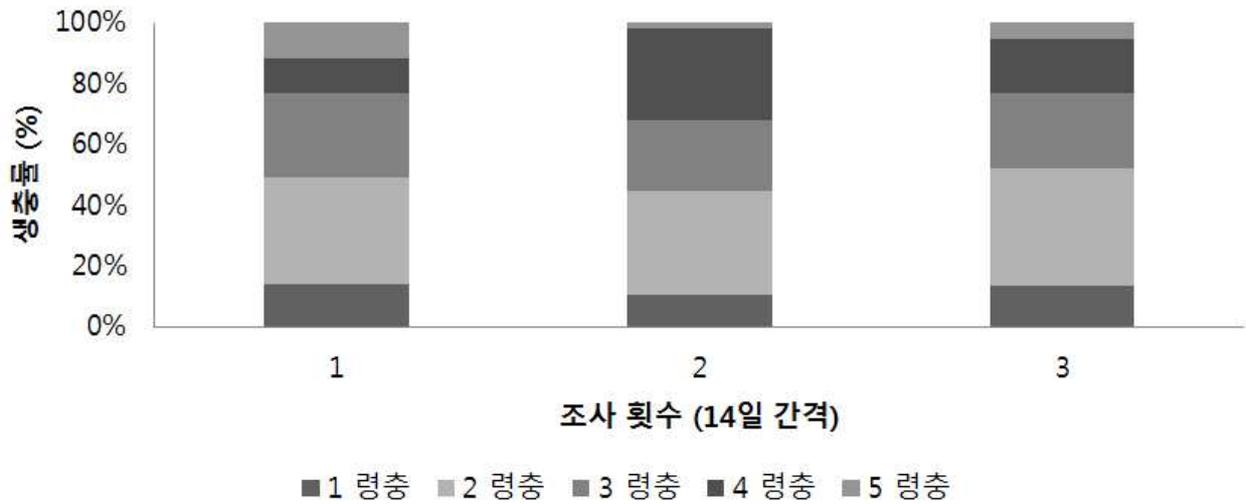


Fig. 54. 14일 간격으로 산란을 받은 령충별 생충률(%)

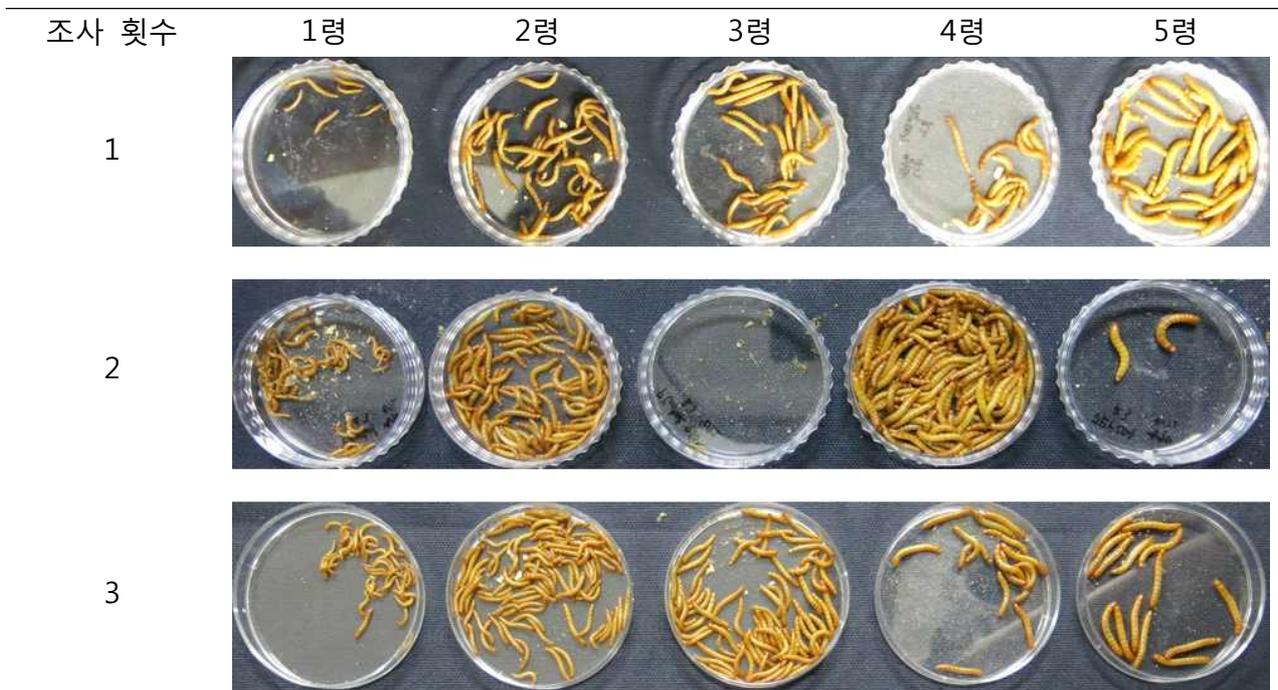


Fig. 55. 14일 간격으로 산란을 받은 밀웜 Stage 분포

4. 대상 곤충의 성장발육 동기화 ②

<1차 실험>

⇒ 실험 방법

- 갓 우화한 성충 5쌍은 6 g의 밀기울을 넣은 breeding dish에 6가지 먹이조건 (배춧잎, 무, 오이, 호박, 당근, 감자)을 각각의 breeding dish에 넣어준 뒤, 3주간 생충률과 산란율을 관찰하였다 (Fig. 56).
- 실험 조건은 온도 $27 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $33 \pm 2\%$, 광주기 16 L: 8D의 조건에서 진행되었다.
- *갓 우화한 성충을 사용하였다 (± 3 일).
- **먹이는 2일 간격으로 신선한 먹이를 공급하였다.



Fig. 56. 갈색거저리 먹이별 동기화 실험

⇒ 실험 결과

- 갈색거저리의 산란수를 비교하였을 때 무, 배추, 감자 순으로 산란수가 많았으나, 생충률과 함께 비교하면 배추를 먹이로 공급하였을 때 가장 높은 생충률과 산란수를 확인할 수 있었다 (Fig. 57, 58, Table 10).

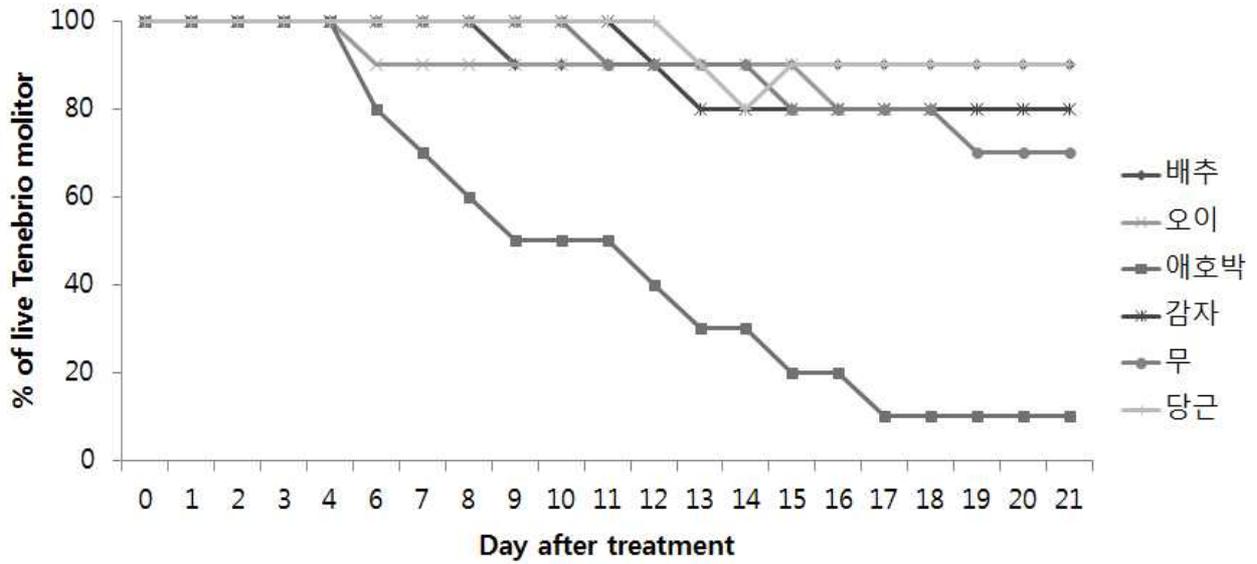


Fig. 57. 처리 후 시간 경과에 따른 갈색거저리의 생충률

Table 10. 6종류의 먹이에 따른 7일 후 산란수

	배추	오이	애호박	감자	무	당근
산란수	890	774	14	823	933	513

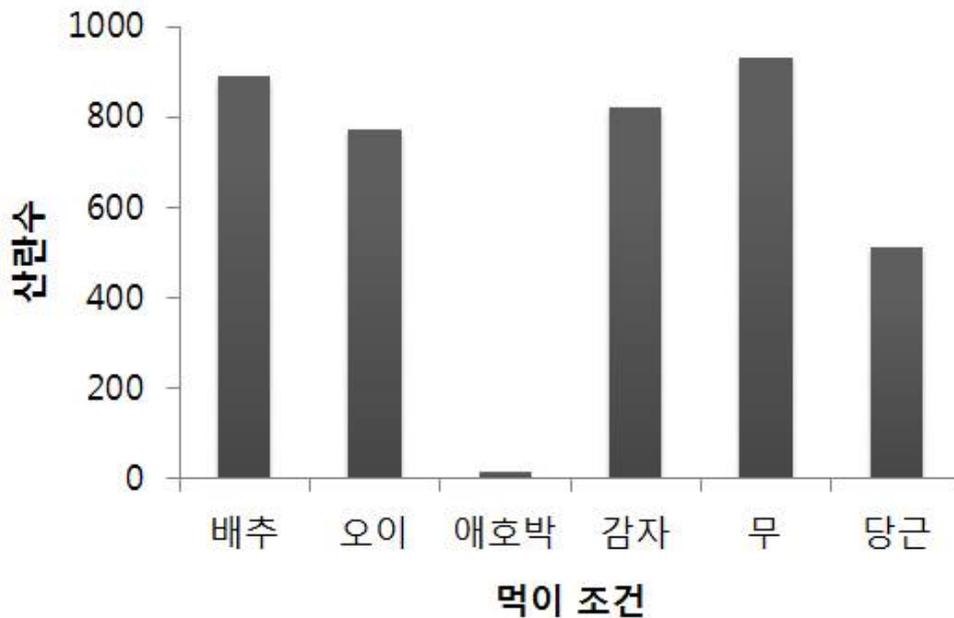


Fig. 58. 먹이 조건에 따른 갈색거저리의 산란수

5. 층태별 보존 기술 개발①- 알

<1차 실험>

⇒ 실험 방법

- 비슷한 시기에 우화한 성충을 모아 유산지를 설치한 cage에서 10일 동안 산란을 받아, 산란을 받은 유산지를 꺼내 3개의 난피를 모아 빈 Petri dish에 넣었다. Control/3일/6일/9일/12일 조건에 맞춰 4℃ 보관하였다 (control은 실온보관).
- 조건에 맞는 시간이 경과하면 저온에서 꺼내 온도 27±2℃, 습도 33±2%, 광주기 16 L: 8D의 사육실 조건에 보관하였으며, 1주 간격으로 각 조건에서의 유충의 생장을 비교하고 사진으로 기록하였다.

*갓 우화한 성충으로부터 알을 받아야 하며, 성충이 우화한 시기도 비슷하게 진행하였다 (±3일).

**알의 개수를 동일하게 진행하였다 (난피로 추정되는 덩어리로 3개씩 진행).

***공급해주는 먹이. 즉, 밀기울의 양도 동일하게 진행하였다 (2 g).

****3반복으로 진행하였다.

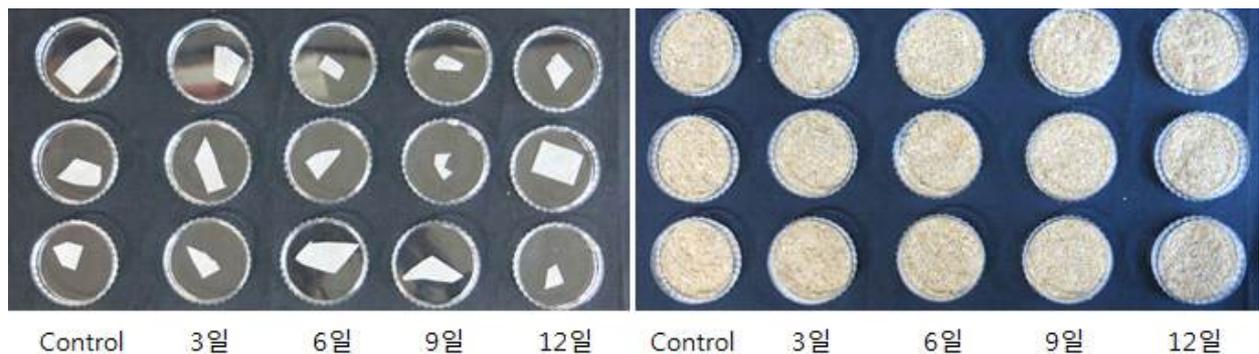


Fig. 59. Petri dish에 각 조건별로 비슷한 수의 알이 있는 유산지를 놓고, 2 g의 밀기울을 공급

⇒ 실험 결과

- 부화한 유충이 보이지 않았다.

<2차 실험>

⇒ 실험 방법

- 비슷한 시기에 우화한 성충을 모아 유산지를 설치한 cage에서 10일 동안 산란을 받아, 산란을 받은 유산지를 꺼내 3개의 난피를 모아 빈 Petri dish에 넣었다. Control/3일/6일/9일/12일/15일/18일 조건에 맞춰 4℃ 보관하였다 (control은 실온보관).
- 조건에 맞는 시간이 경과하면 저온에서 꺼내 온도 27±2℃, 습도 33±2%, 광주기 16 L: 8D의 사육실 조건에 보관하였으며, 1주 간격으로 각 조건에서의 유충의 생장을 비교하고 사진으로 기록하였다.

*갓 우화한 성충으로부터 알을 받아야 하며, 성충이 우화한 시기도 비슷하게 진행하였다 (±3일).

**알의 개수를 동일하게 진행하였다 (난피로 추정되는 덩어리로 3개씩 진행).

***공급해주는 먹이. 즉, 밀기울의 양도 동일하게 진행하였다 (2 g).

****3반복으로 진행하였다.



Fig. 60. Petri dish에 각 조건별로 비슷한 수의 알이 있는 유산지를 놓고, 2 g의 밀기울을 공급

⇒ 실험 결과

- 부화한 유충은 발견되었으나, 그 수가 매우 적었고 그마저도 치사되어있는 것을 확인하였다. 또한 관찰 결과 난피라 추정하였던 것이 하나의 알임을 확인하였다.

<3차 실험>

⇒ 실험 방법

- 비슷한 시기에 우화한 성충을 모아 유산지를 설치한 cage에서 10일 동안 산란을 받아, 산란을 받은 유산지를 꺼내 3개의 난피를 모아 빈 Petri dish에 넣었다. Control/3일/6일/9일/12일/15일/18일 조건에 맞춰 4℃ 보관하였다 (control은 실온보관).
- 조건에 맞는 시간이 경과하면 저온에서 꺼내 온도 27±2℃, 습도 33±2%, 광주기 16 L: 8D의 사육실 조건에 보관하였으며, 1주 간격으로 각 조건에서의 유충의 생장을 비교하고 사진으로 기록하였다.

*갓 우화한 성충으로부터 알을 받아야 하며, 성충이 우화한 시기도 비슷하게 진행하였다 (±3일).

**알의 개수를 동일하게 진행하였다 (난피로 추정되는 덩어리로 3개씩 진행).

***공급해주는 먹이. 즉, 밀기울의 양도 동일하게 진행하였다 (2 g).

****3반복으로 진행하였다.

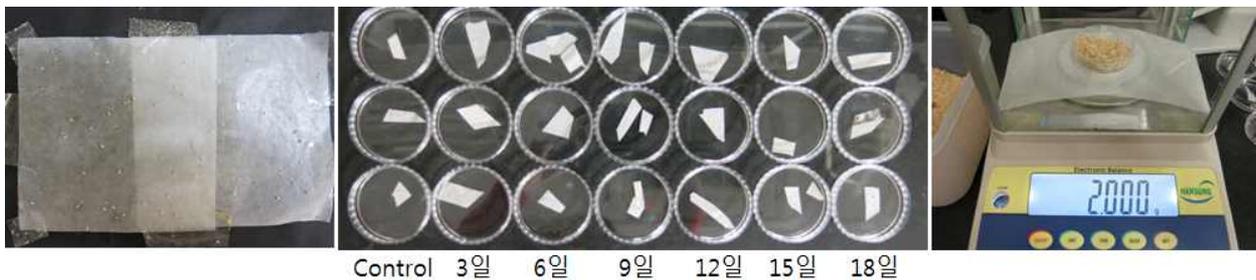


Fig. 61. Petri dish에 각 조건별로 비슷한 수의 알이 있는 유산지를 놓고, 2 g의 밀기울을 공급



Fig. 62. 부화 과정 중 치사된 유충

⇒ 실험 결과

- 부화과정 중 치사된 유충이 확인되었다 (Fig. 63).

<4차 실험>

⇒ 실험 방법

- 비슷한 시기에 우화한 성충 1쌍을 밀기울이 들어있는 Petri dish에서 3일 동안 산란을 받은 뒤 새로운 Petri dish에 동일한 개수의 알을 모았다. Control/3일/6일/9일/12일/15일/18일 조건에 맞춰 4℃ 보관하였다 (control은 실온보관).
- 조건에 맞는 시간이 경과하면 저온에서 꺼내 온도 $27 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $33 \pm 2\%$, 광주기 16 L: 8D의 사육실 조건에 보관하였으며, 1주 간격으로 각 조건에서의 유충의 성장을 비교하고 사진으로 기록하였다.

*가 우화한 성충으로부터 알을 받아야 하며, 성충이 우화한 시기도 비슷하게 진행하였다 (± 3 일).

**알의 개수를 동일하게 진행하였다 (30개).

***공급해주는 먹이. 즉, 밀기울의 양도 동일하게 진행하였다 (2 g).

****3반복으로 진행하였다.

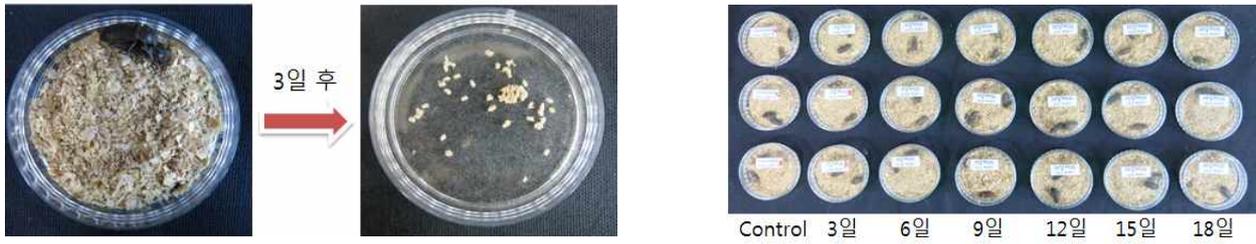


Fig. 63. Petri dish에 각 조건별로 비슷한 시기에 우화한 성충을 넣어 산란을 받은 뒤 2 g의 밀기울을 공급

⇒ 실험 결과

- 알의 부화율이 저조한 것을 확인하였다.

<5차 실험>

⇒ 실험 방법

- 비슷한 시기에 우화한 성충 2쌍을 밀기울이 들어있는 Petri dish에서 3일 동안 산란을 받은 뒤 3일 후 성충을 제거하였다. 알은 Control/3일/6일/9일/12일/15일/18일 조건에 맞춰 4℃ 보관하였다 (control은 실온보관).
- 조건에 맞는 시간이 경과하면 저온에서 꺼내 온도 $27 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $33 \pm 2\%$, 광주기 16 L: 8D의 사육실 조건에 보관하였으며, 1주 간격으로 각 조건에서의 유충의 생장을 비교하고 사진으로 기록하였다.

*갓 우화한 성충으로부터 알을 받아야 하며, 성충이 우화한 시기도 비슷하게 진행하였다 (± 3 일).

**공급해주는 먹이. 즉, 밀기울의 양도 동일하게 진행하였다 (6 g).

***3반복으로 진행하였다.

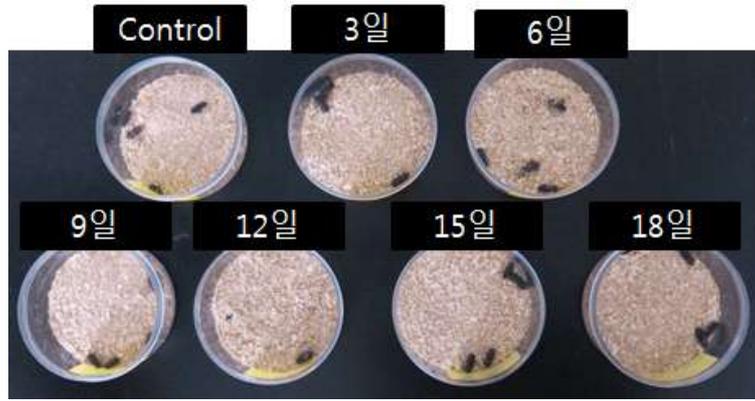


Fig. 64. Breeding dish에 각 조건별로 비슷한 시기에 우화한 성충을 넣어 산란을 받는 모습

⇒ 실험 결과

- Control과 저온보관 6일차에서 가장 높은 부화율을 보였으며, 저온 보관기간이 길어질수록 낮은 부화율을 보였다. 이처럼 각 조건별로 미미하지만 부화율의 차이를 보였다 (Fig. 68).

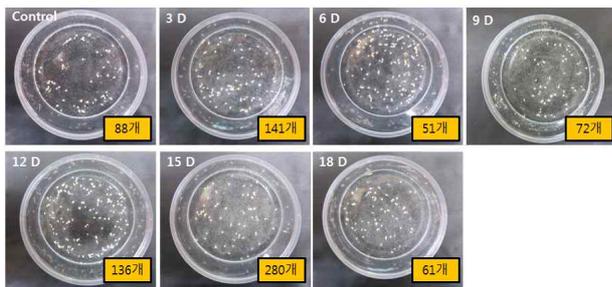


Fig. 65. 저온보관 기간별 산란 수

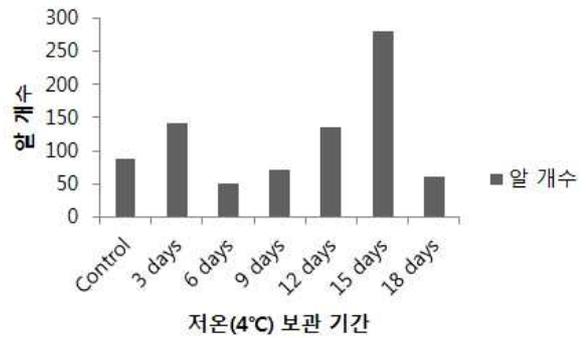


Fig. 66. 저온보관 기간별 산란 수

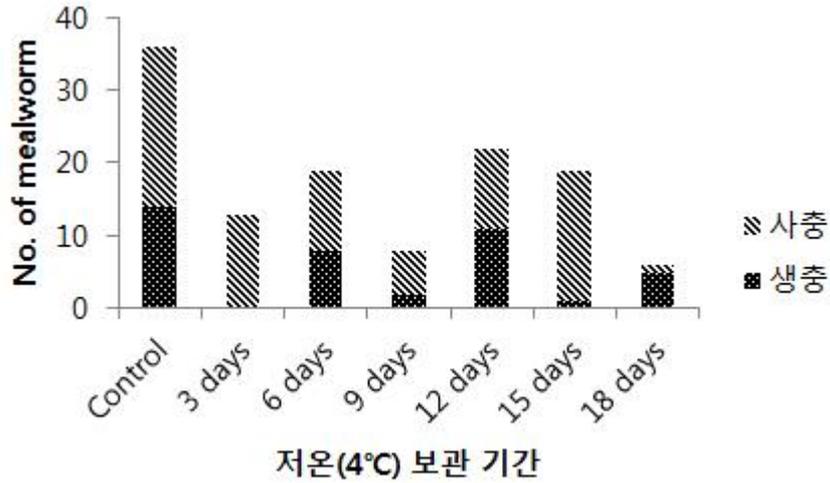


Fig. 67. 저온보관 기간별 사충수와 생충수

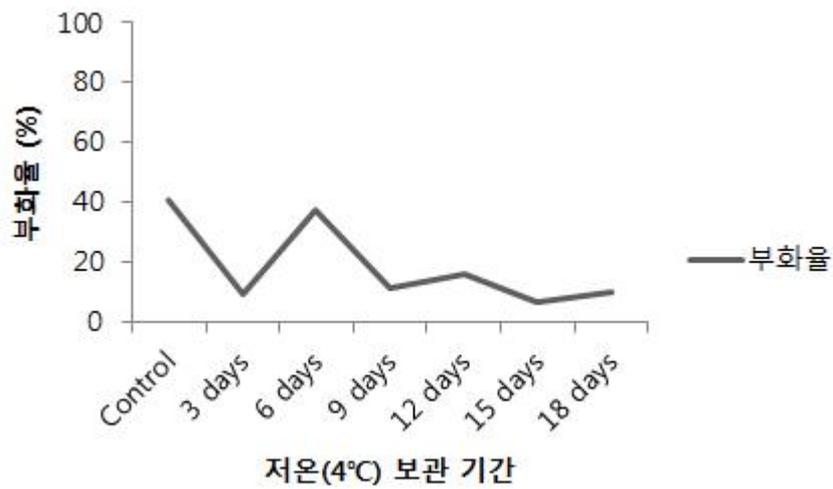


Fig. 68. 저온보관 기간별 유충의 부화율

<6차 실험>

⇒ 실험 방법

- 비슷한 시기에 우화한 성충 2쌍을 밀기울이 들어있는 Petri dish에서 3일 동안 산란을 받은 뒤 3일 후 성충을 제거하였다. 알은 Control/3일/6일/9일/12일/15일/18일 조건에 맞춰 4°C 보관하였다 (control은 실온보관).
- 조건에 맞는 시간이 경과하면 저온에서 꺼내 온도 $27 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $33 \pm 2\%$, 광주기 16 L: 8D의 사육실 조건에 보관하였으며, 1주 간격으로 각 조건에서의 유충의 성장을 비교하고 사진으로 기록하였다.

*갓 우화된 성충으로부터 알을 받아야 하며, 성충이 우화된 시기도 비슷하게 진행하였다 (±3일).

**공급해주는 먹이. 즉, 밀기울의 양도 동일하게 진행하였다 (6 g).

***3반복으로 진행하였다.

⇒ 실험 결과

⇒ <5차 실험>과 <6차 실험>의 부화율

- Control의 부화율이 <50%로 낮은 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 73).

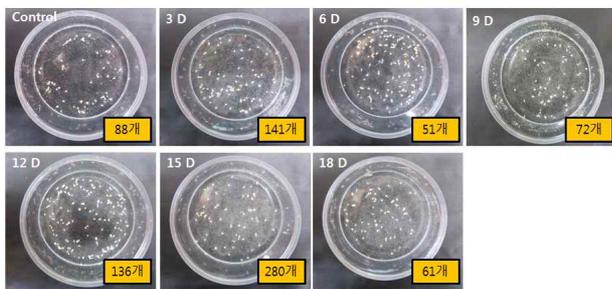


Fig. 69. 저온보관 기간별 산란 수

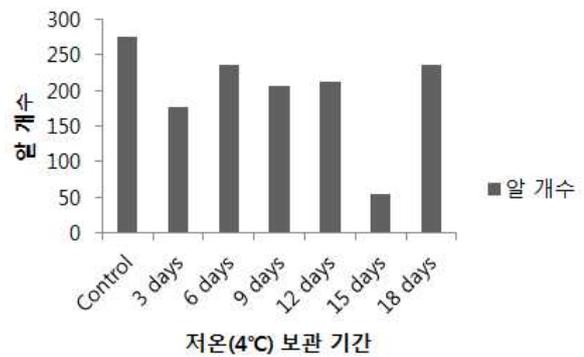


Fig. 70. 저온보관 기간별 산란 수

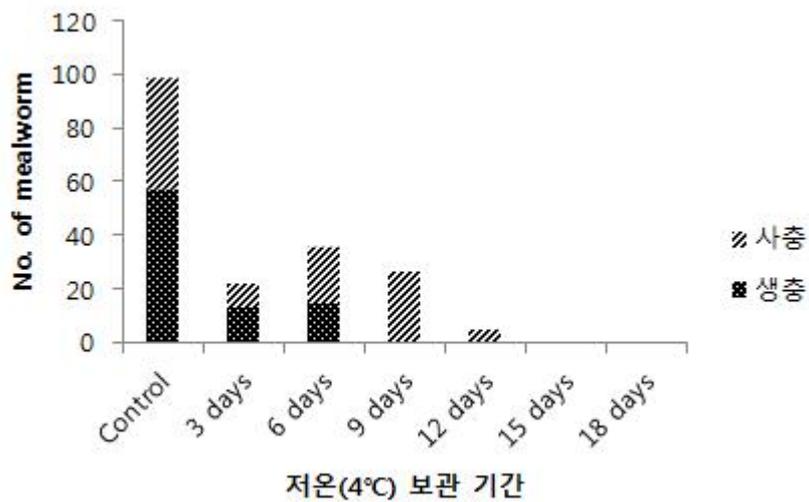


Fig. 71. 저온보관 기간별 사충수와 생충수

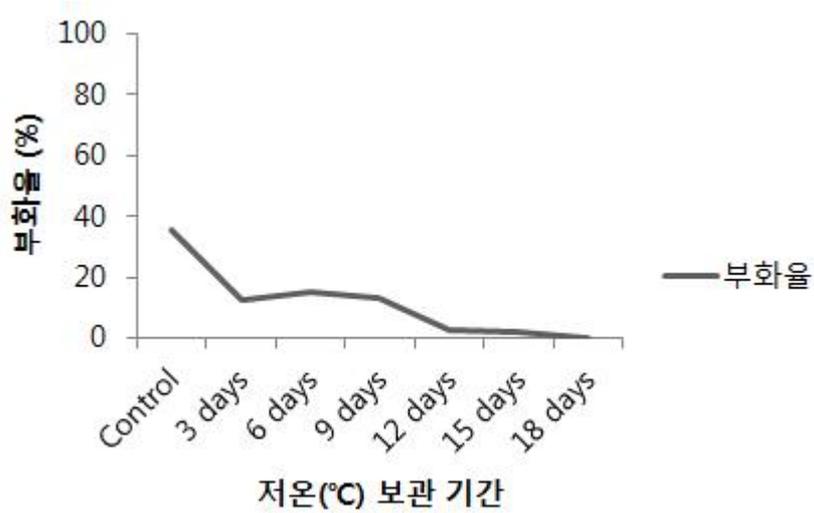


Fig. 72. 저온보관 기간별 유충의 부화율

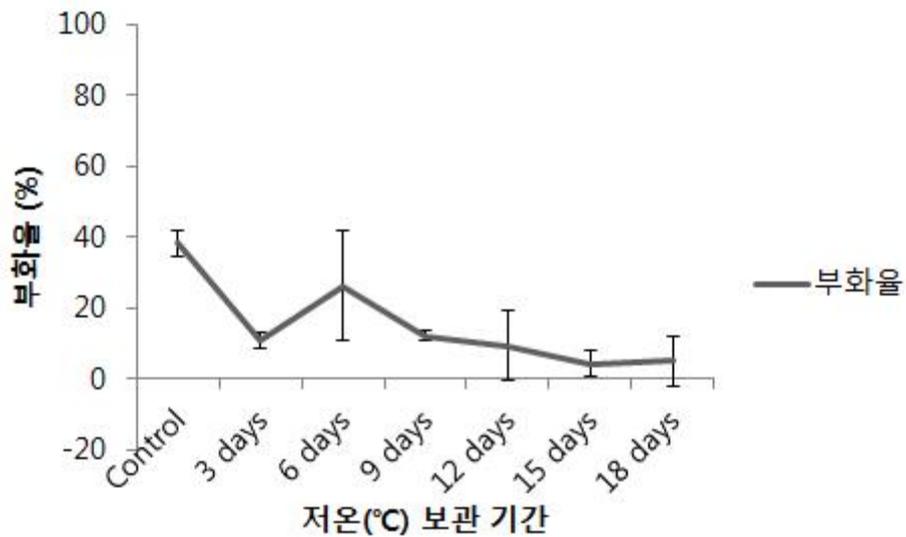


Fig. 73. 저온보관 기간별 유충의 부화율(R1, R2)

- Control에서 가장 높은 부화율을 보였으며, 저온 보관기간이 길어질수록 부화율이 점점 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다. 이처럼 각 조건별로 미미하지만 부화율의 차이를 보였으나, control에서 부화율이 <50%으로 확인되어서 반복실험을 통해 데이터의 신뢰성을 높여야한다 (Fig. 73).

6. 층태별 보존 기술 개발②- 번데기

<1차 실험>

⇒ 실험 방법

- Petri dish에 밀기울을 넣고, 10마리의 번데기를 넣은 후 각 조건 (2주/4주/6주/8주/10주/12주)동안 저온 (4℃)에 보관 후 실온조건 (25℃)으로 옮겨 관찰하였다.

*비슷한 시기의 번데기를 사용하였다.

**2주마다 번데기의 우화율을 관찰하였다.



Fig. 74. 밀기울이 들어있는 Petri dish에 보관된 번데기

⇒ 실험 결과

- 저온조건 (4℃)에 2주, 4주, 6주, 8주, 10주, 12주 조건으로 보관하였을 때 (Fig. 74), 2주와 4주 동안 보관한 후의 번데기의 경우는 실온에 보관하였을 때 >90%의 번데기가 우화하는 것을 확인할 수 있었다. 반면 8주, 10주, 12주 동안 보관한 번데기의 경우 0%의 우화율을 확인하였다 (Fig. 76, 77).

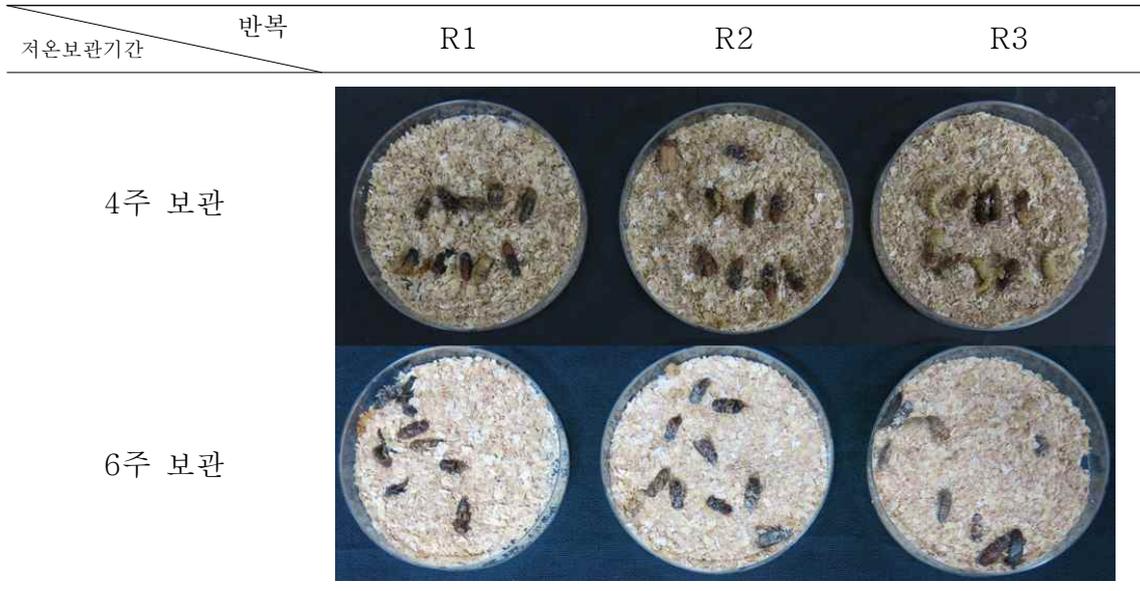


Fig. 75. 저온(4℃)에 4주, 6주 동안 보관된 10마리의 번데기

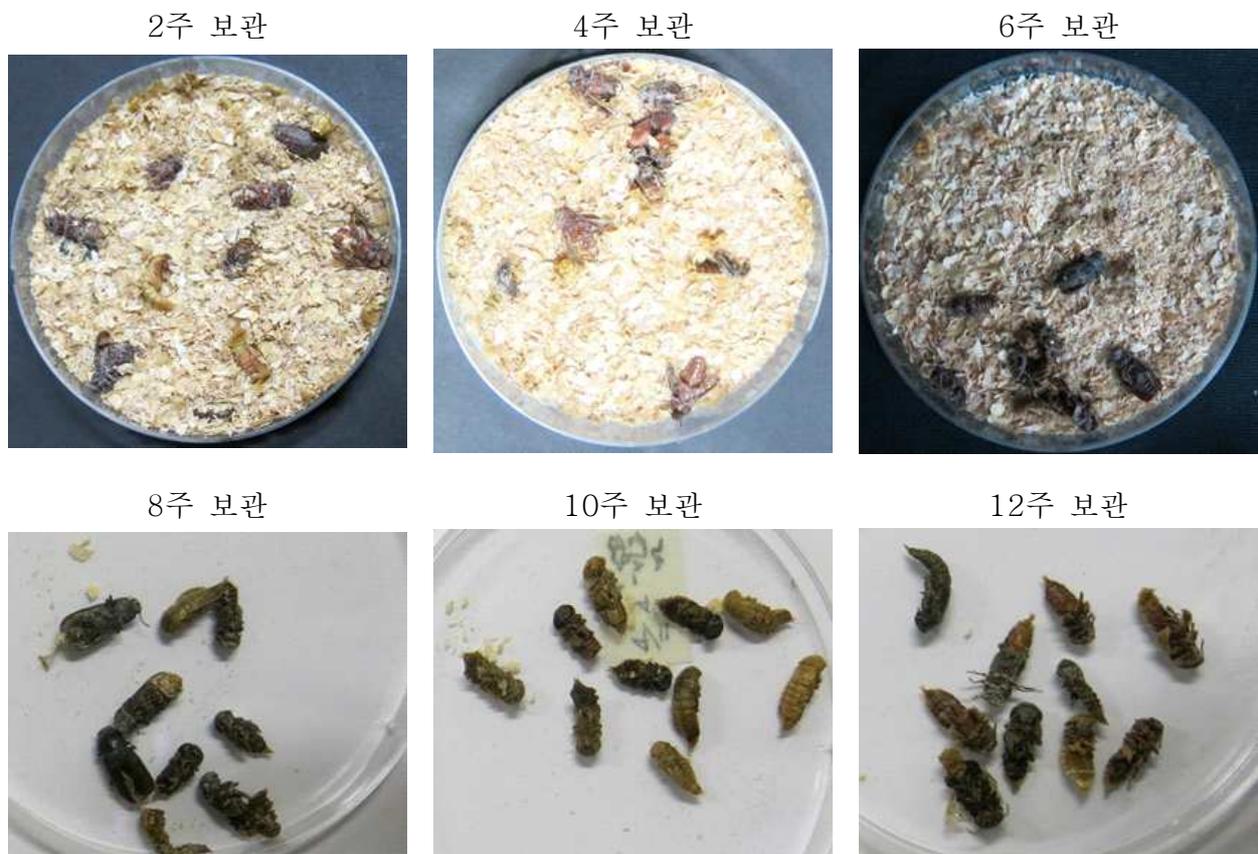


Fig. 76. 저온(4℃)에 4주, 6주 동안 보관한 후 실온(25℃)에 7일 동안 보관된 10마리의 번데기

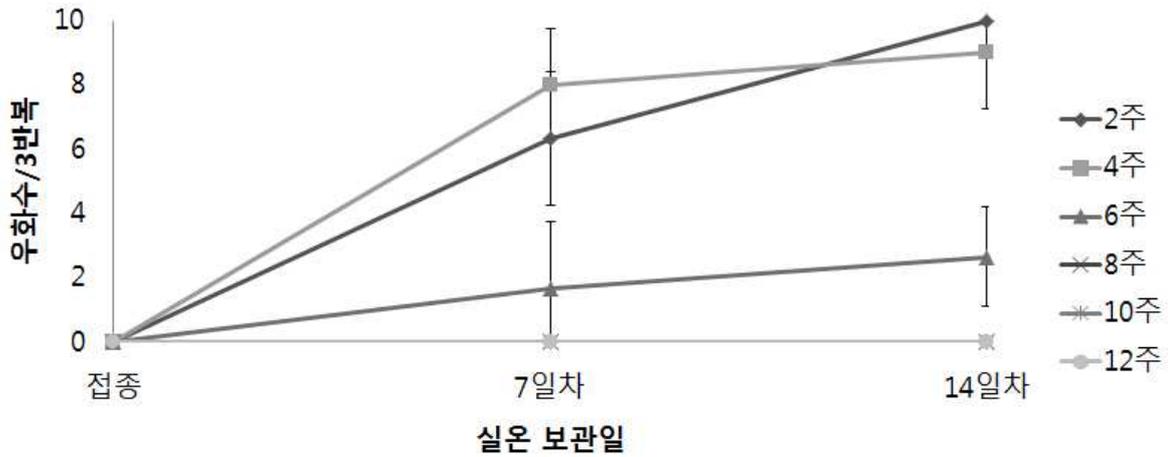


Fig. 77. 갈색거저리 번데기를 저온(4℃)에 각각 2주, 4주, 6주, 8주, 10주, 12주 동안 보관 후 실온에 보관하였을 때, 일차별 우화수

7. 탄력적 대응을 위한 출하방법 규명

실험명	결과	내용
동기화		비슷한 stage의 령충을 다량 확보하기 위해선 성충으로 부터 7일 동안 산란을 받는 것이 효율적임을 확인하였다.
사육방법		갈색거저리의 높은 산란수를 위해서는 배추, 감자, 무를 기주로 하여 사육하는 것이 효율적이라는 것을 확인하였다. 또한 높은 생충률을 위해서는 배추, 당근, 감자, 오이를 공급하는 것이 효율적임을 확인하였다. 두 결과를 통합하였을 때, 배추를 공급할 때 가장 높은 생충률과 산란수를 확인할 수 있었다.
저온 보관 (알)		산란을 받은 알은 실온에서 약 40%의 부화율을 보였으며, 저온(4℃) 보관이 길어질수록 낮은 부화율을 보였다.

<p>저온 보관 (번데기)</p>		<p>저온에서 2주 간격으로 번데기의 우화수를 조사한 결과 4주차 보관까지는 높은 우화수를 확인할 수 있었으나 6주 이상 저온에 보관한 경우 우화수가 급격하게 감소함을 확인하였다.</p>
<p>병원 미생물 방제</p>		<p>사육과정 중 발생하는 곤충병원성 진균을 방제하기 위한 방법으로 Fluazinam 혹은 Mancozeb을 밀기울에 섞어주었을 때 진균을 효과적으로 억제함을 확인하였다.</p>

제 6 절 3년차(2014년~2015년)

제1협동과제 : 사료용 곤충의 안정적 공급 기술 개발

1. 대량사육을 위한 적정 개체군 밀도

<1차 실험>

⇒ 실험 방법

- 밀기울을 넣은 Petri dish에 0.5 cm 의 밀웜을 각각 1/10/20/30/40/50 마리씩 넣어주었다.
- 동일한 생육조건을 위해 밀기울을 3.0g 씩 공급되었다.
- $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ 조건에 보관 후 2주 간격으로 밀웜 총체의 길이 및 무게를 측정하였으며, 최종적으로 각 조건별 단백질 함량 또한 측정되었다.

⇒ 실험 결과

- 1마리 처리 조건에서 총체의 길이 및 무게가 가장 높게 측정되었다.
- 단백질 함량 또한 1마리 조건이 가장 높다고 판단되었다.
- 이를 통해 개체군의 밀도와 개체의 크기 및 단백질 함량은 밀접한 관계가 있다고 판단되었다.

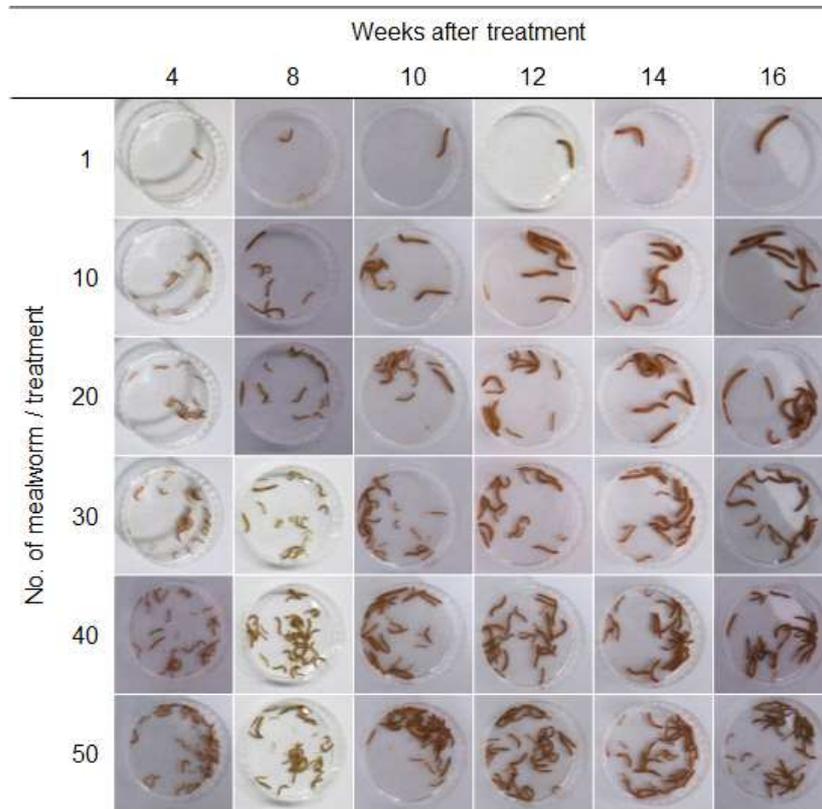


Fig. 78. 처리 밀도별 밀웜의 성장비교

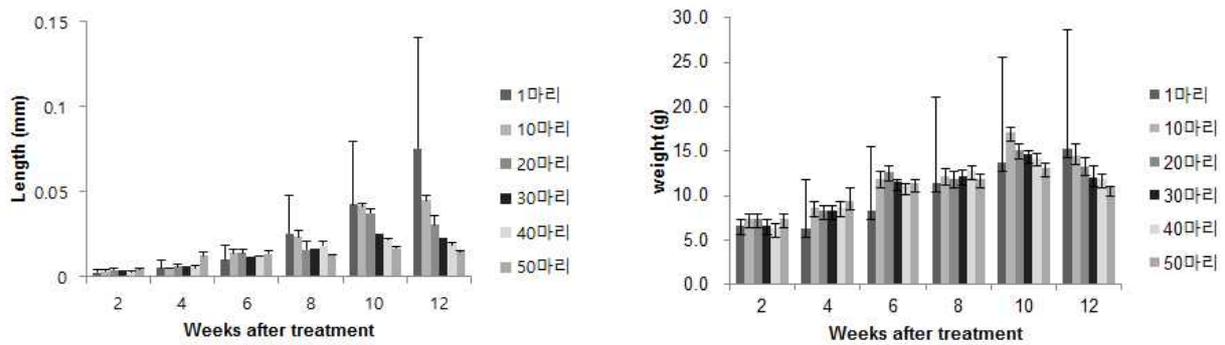


Fig. 79. 밀웜 처리 밀도별 총체의 길이(왼), 총체의 무게(오)

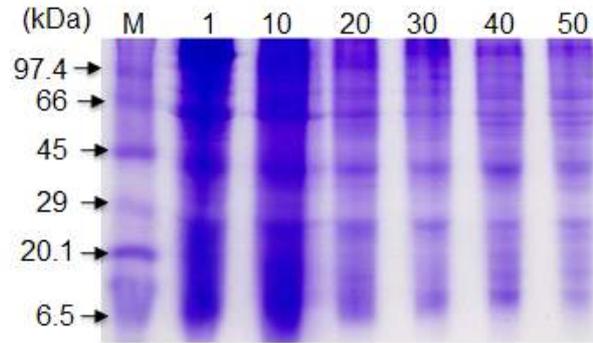


Fig. 80. 밀웜 처리 밀도별 SDS-PAGE

2. 사료용 곤충의 최적수거 시기

<1차 실험>

⇒ 실험 방법

- 밀기울을 넣은 Breeding dish 에 갓 우화한 성충 5쌍을 넣어주었다.
- 밀웜이 들어있는 Breeding dish를 습도 10%의 20, 25, 30, 35℃ incubator에 보관되었다.
- 2주 간격으로 밀웜 총체의 길이 및 무게를 측정하였으며, 최종적으로 각 조건별 단백질 함량 또한 측정되었다.
- 먹이 및 수분공급을 위해 배추를 2일마다 공급하였으며, 실험은 2반복으로 진행되었다.

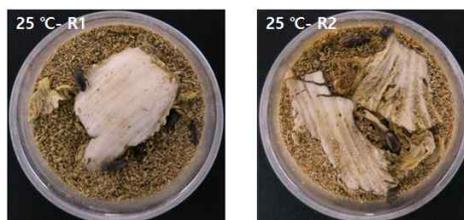


Fig. 81. 처리 4주 후 오염된 25℃ 처리구

⇒ 실험 결과

- 처리 4주 후 25℃ 보관 중이던 incubator의 오염으로 25℃ 처리구를 폐기하였다(Fig. 81).
- 처리 12주 후 실험을 종료하였으며, 30℃ 보관 조건에서 가장 빠른 밀웜 유충의 성장속도를 확인할 수 있었으며, 20℃ 보관 조건에서는 반대로 가장 낮은 성장속도를 확인하였다.

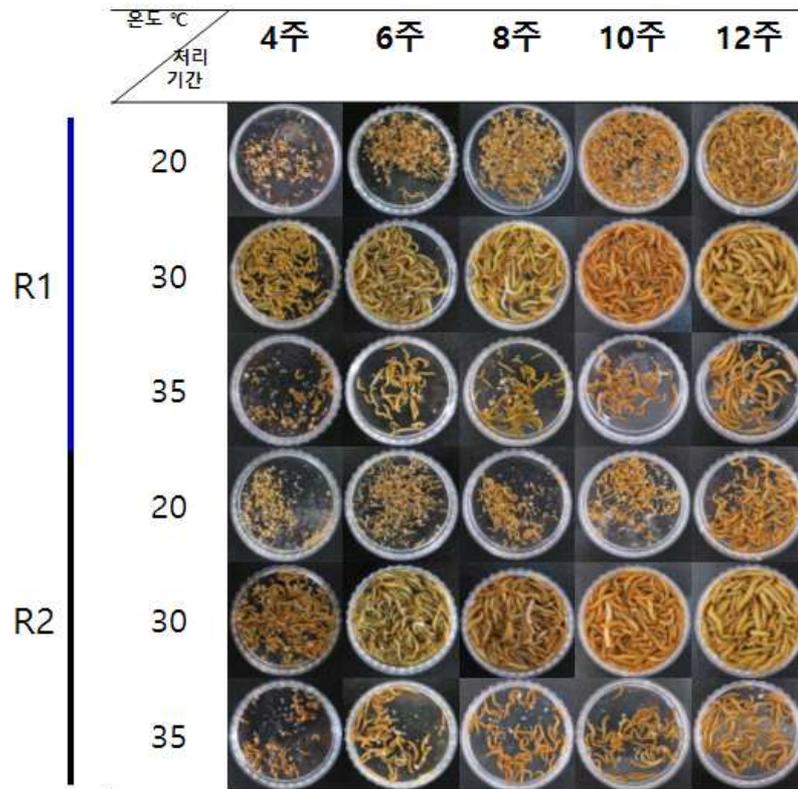


Fig. 82. 온도별 밀웜의 성장비교

Table 11. SDS-PAGE에 사용되어진 밀웜 조건표

Sample 선정	20 °C	30 °C	35 °C
길이 (cm)	0.90	1.90	1.38

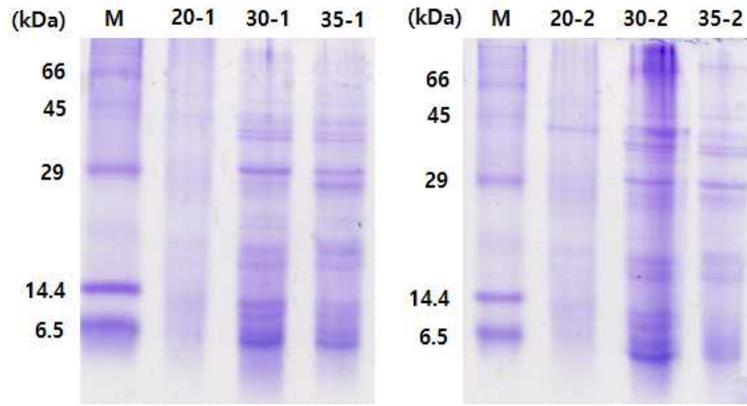


Fig. 83. 온도별 밀웜의 SDS-PAGE

<2차 실험>

⇒ 실험 방법

- 밀기울을 넣은 Breeding dish 에 갓 우화한 성충 5쌍을 넣어주었다.
- 밀웜이 들어있는 Breeding dish를 습도 10%의 20, 25, 30, 35℃ incubator에 보관되었다.
- 2주 동안 산란을 받은 뒤 Breeding dish의 성충은 모두 제거되었다.
- 성충 제거 후 2주 간격으로 밀웜 총체의 길이 및 무게를 측정하였으며, 최종적으로 각 조건별 단백질 함량 또한 측정되었다.
- 먹이 및 수분공급을 위해 배추를 2일마다 공급하였으며, 실험은 2반복으로 진행되었다.

⇒ 실험 결과

- 20℃ 처리구의 생충수가 12주차를 기점으로 급격히 감소되는 것을 확인하였다(fig. 85).
- 산란율은 20℃ 처리구에서 가장 높았으며, 35℃ 처리구에서 가장 낮음을 확인하였다.
- 30℃ 보관 조건에서 가장 빠른 밀웜 유충의 성장속도를 확인할 수 있었으며, 20℃ 보관 조건에서는 반대로 가장 낮은 성장속도를 확인하였다(fig. 86, 87).

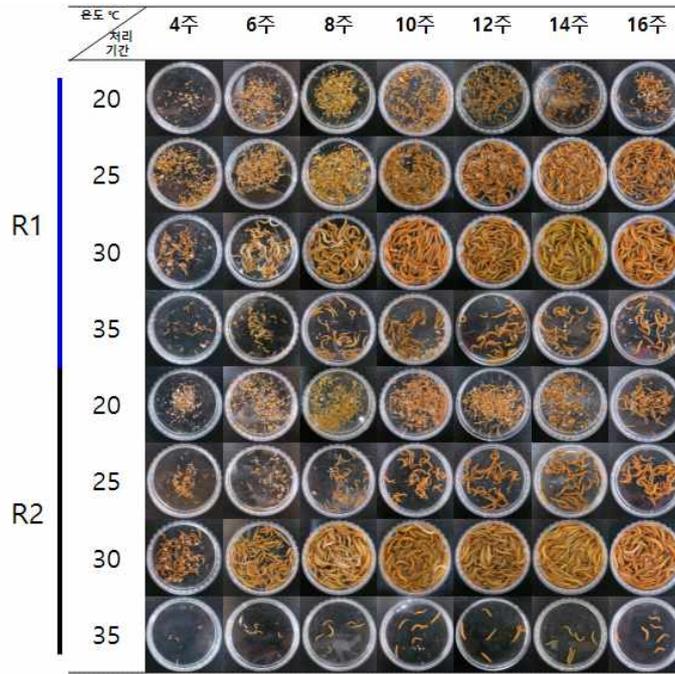


Fig. 84. 온도별 밀웜의 성장비교

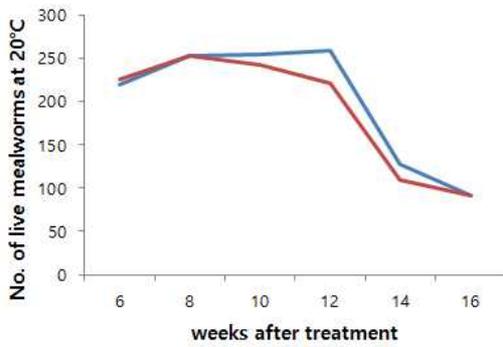


Fig. 85. 20°C 처리구에서의 주차별 밀웜 생충수

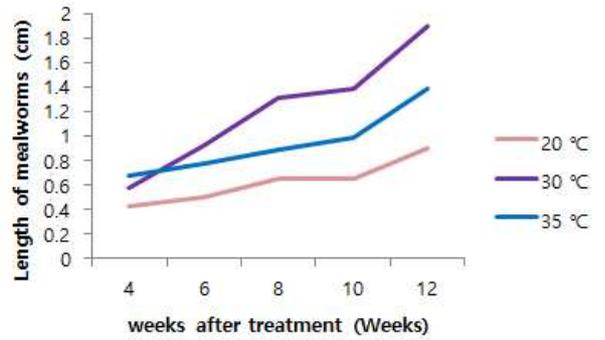


Fig. 86. 온도별 밀웜 총체 크기의 변화

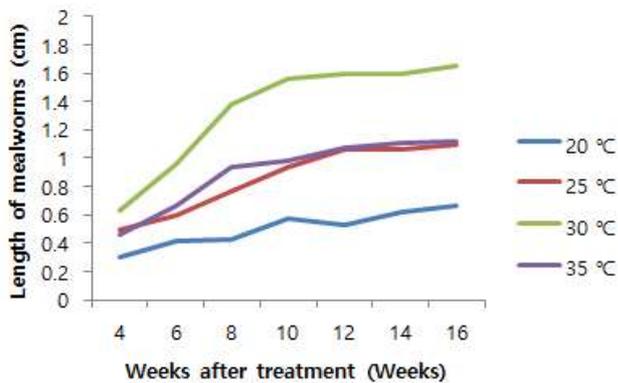


Fig. 87. 온도별 밀웜 총체 크기의 변화

<3차 실험>

산란수가 가장 높았던 20℃ 처리구와 성장속도가 가장 빨랐던 30℃ 처리구간 비교를 위해 본 실험을 진행하였다. 처리구는 다음의 표에 의거하였다(Table 12).

Table 12. 최적수거시기 실험 처리 조건표

조건	산란	사육
1	20℃	30℃
2	20℃	20℃
3	30℃	30℃

- 밀기울을 넣은 Breeding dish 에 갓 우화한 성충 5쌍을 넣어주었다.
- 밀웬이 들어있는 Breeding dish를 습도 10%의 20, 30℃ incubator에 보관되었다.
- 2주 동안 산란을 받은 뒤 Breeding dish의 성충은 모두 제거되었다.
- 조건 1은 20℃에서 산란 받은 뒤 30℃ 사육조건으로 진행되었으며, 조건2는 20℃, 조건3은 30℃ 온도에서 산란과 사육이 모두 진행되었다.
- 2주 간격으로 밀웬 충체의 길이 및 무게를 측정하였으며, 최종적으로 각 조건별 단백질 함량 또한 측정되었다.
- 먹이 및 수분공급을 위해 배추를 2일마다 공급하였으며, 실험은 2반복으로 진행되었다.

⇒ 실험 결과

Table 13. 온도 조건별 산란수 비교

No. of eggs (개)	1R	2R	3R	Average
20℃	124	82	286	164.0
30℃	148	108	97	117.6
20->30℃	196	153	142	163.6

- 20℃ 조건의 산란수가 30℃에 비해 높은 것을 확인할 수 있었다(Table 13).
- 생충수는 20℃에서 산란을 받아 30℃에서 사육을 한 조건이 가장 높았다. (Fig. 88)
- 충체의 길이 및 무게는 30℃조건에서 가장 높은 값을 확인할 수 있었다. (Fig. 89, 90)

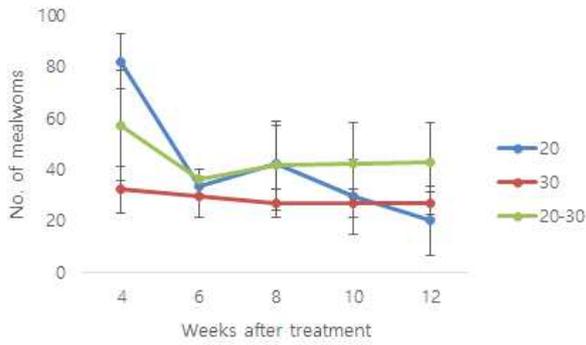


Fig. 88. 온도별 밀웜 개체수 변화

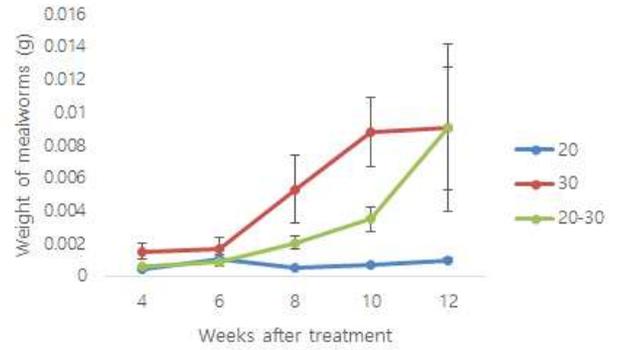


Fig. 89. 온도별 밀웜 무게의 변화

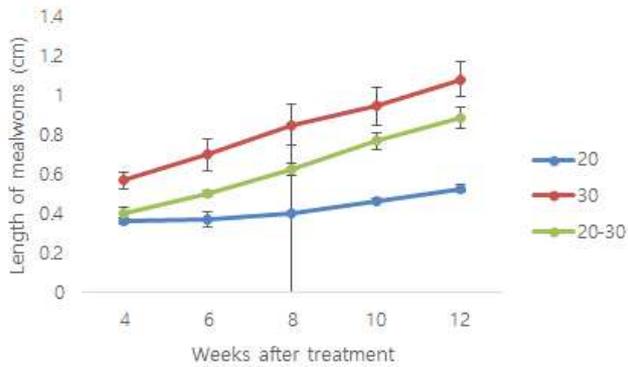


Fig. 90. 온도별 밀웜 총체 크기의 변화

- 앞선 1, 2, 3차 실험의 결과를 통해 밀웜 사육 조건은 20 °C 에서 산란을 받은 뒤 30°C 조건에서 사육하는 조건이 가장 적합하다고 판단된다. 또한 밀웜 총체의 크기, 무게 및 생충수를 비교하였을 때, 20°C 조건은 성충의 산란에는 적합한 온도이지만, 유충의 생육에는 적합하지 않은 온도라고 판단되어진다.

3. 대상 곤충의 사료 첨가물을 이용한 약리 효과 검증

<항세균 효과>

⇒ 실험방법

- *B. bassiana* JEF133의 4가지 세균(*Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *salmonella typhimurium*)에 대한 항세균 효과를 확인하기 위해 다음의 실험은 진행되었다 (Table 14).
- JEF133은 SSYP medium에서 150 rpm, 27°C 조건으로 7일 동안 배양되었다.
- JEF133의 항세균 효과는 다음의 2가지 조건으로 진행되었다.
 - 조건1: Luria Bertani (LB, Difco) 배지에 각각 50 μ l의 세균을 도말되었으며, SSYP에 7일간 배양시킨 JEF133 현탁액은 paper disk 위에 5 μ l 처리되었다.
 - 조건2: Paper disc에 JEF133 현탁액은 5 μ l 처리되었으며, 2일간 27°C 조건에서 배양 후 50 μ l의 세균은 paper disc 주변에 처리되었다.
- Negative control 조건은 3차 증류수가 처리되었으며, Positive control 조건에는 50 ppm ampicillin이 처리되었다.

Table 14. 항세균 효과에 사용된 세균의 종류

Bacteria		Antibacterial activity
Gram-positive	<i>Bacillus subtilis</i>	+
	<i>Listeria monocytogenes</i>	+
Gram-negative	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-
	<i>Salmonella typhimurium</i>	-

⇒ 실험 결과

- 조건 1에서는 세균의 생육속도가 처리한 균(JEF133)에 비해 너무 빨라 관찰이 용이하지 않았다 (Fig. 91).
- 조건 2의 경우 Gram-positive 세균인 *B. subtilis* 와 *L. monocytogenes*에서 JEF133의 항세균 효과를 확인할 수 있었으며 (Fig. 15), 그 중 *B. subtilis* 조건에서의 저지력 폭이 가장 크게 확인되었다 (table 15).

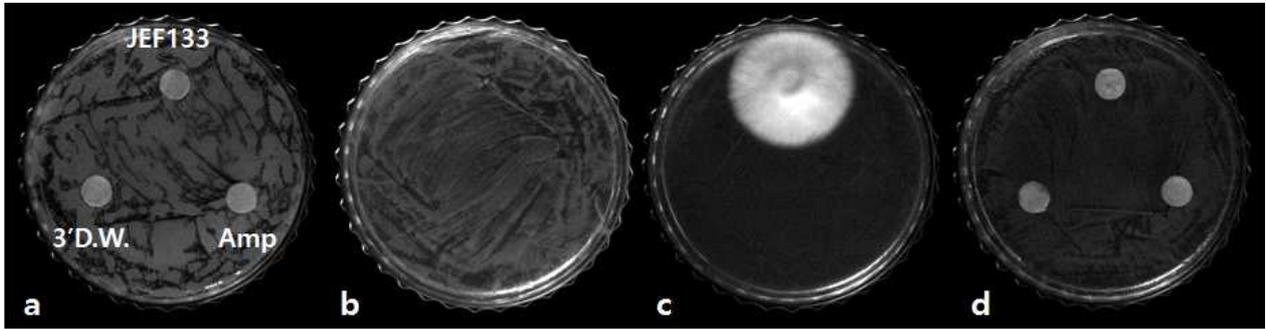


Fig. 91. JEF133의 4가지 세균에 대한 항세균 효과 (조건 1).

(a), *Bacillus subtilis* 처리구; (b), *Escherichia coli* O157:H7 처리구;
 (c), *Listeria monocytogenes* 처리구 and (d), *salmonella typhimurium* 처리구.

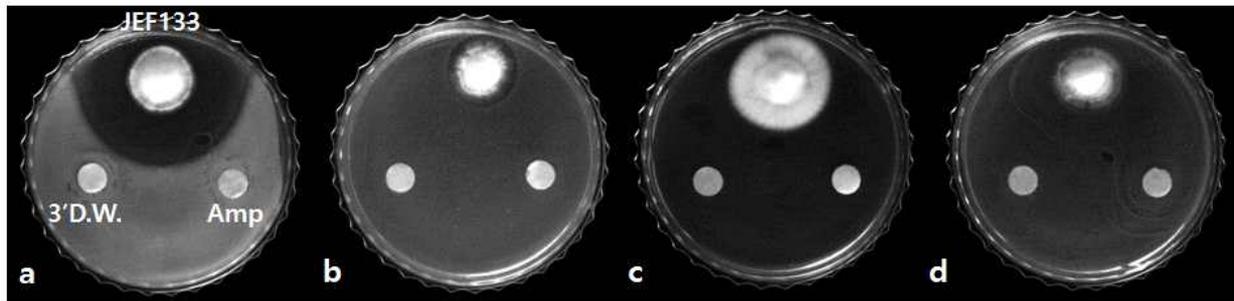


Fig. 92. JEF133의 4가지 세균에 대한 항세균 효과(조건 2)

(a), *Bacillus subtilis* 처리구; (b), *Escherichia coli* O157:H7 처리구;
 (c), *Listeria monocytogenes* 처리구 and (d), *salmonella typhimurium* 처리구

Table 15. JEF133의 4가지 세균에 대한 항세균 효과 (조건 2)

(조건 2)	균사 지름	저지원 폭	50 ppm AMP
<i>B. subtilis</i>	15	10	-
<i>E. coli</i>	12	2	-
<i>L. monocytogenes</i>	24	1	-
<i>S. typhimurium</i>	14	1	2

(단위: mm)

<밀웬 소화 촉진을 위한 발효실험>

- *Cordyceps* 균주를 이용한 갈색거저리 유충에서의 항생물질 생산과 가축사료로써의 소화촉진을 돕기 위해 본 실험은 진행되었다.

<1차 실험>

⇒ 실험 방법

- 동결건조 된 밀웜은 powder화 되어 본 실험에 사용되었으며, SDB 액체배지에 밀웜 powder를 1% 넣은 배지는 제조되었다 (Fig. 16).
- SDB + 1% mealworm powder 배지에 *Cordyceps militaris*를 접종하여 150 rpm, 27°C 조건에서 배양되어 2반복으로 진행되었다.
- 무처리 조건에는 SDB배지에 1% mealworm powder만 처리되었으며, 처리군과의 비교를 위해 SDB배지에 *C. militaris*만 배양시킨 control 조건은 설정되었다.
- 배양액은 150 rpm, 27°C 조건에서 배양되었다.

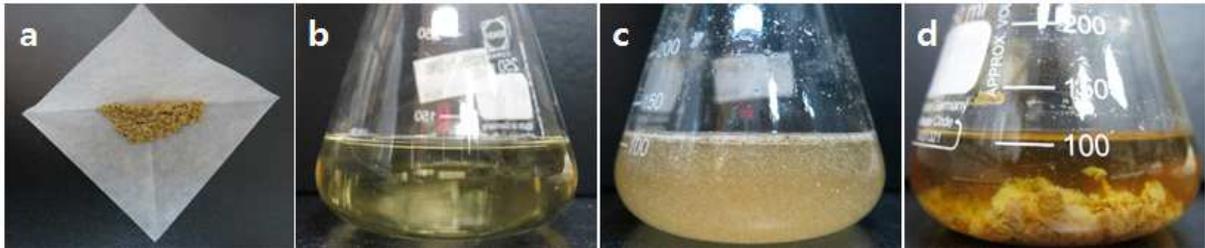


Fig. 93. Mealworm powder 함유 배지 제작. a, 1 g mealworm powder; b, 100 ml Sabroud Dextrose Broth; c, 1 g mealworm powder + 100 ml SDB and d, 멸균된 1 g mealworm powder + 100 ml Sabroud Dextrose Broth.

⇒ 실험결과

- 배양기간 별 육안으로 관찰한 결과 mealworm powder 1g만 배양시킨 무처리 조건은 시간이 경과하여도 큰 차이를 보이지 않았지만, mealworm powder 배지에 *C. militaris*가 처리된 조건에서는 시간이 경과할수록 배양액의 색이 *C. militaris*만 배양된 조건과 비슷한 양상을 보였다 (Fig. 17).
- 처리 20일 후 배양액의 하단을 관찰한 결과 mealworm powder의 침전물에 조건별 차이가 있었다. Mealworm powder만 넣어준 조건에 비해 Mealworm powder에 *C. militaris*를 처리한 조건에서의 침전물의 양이 적게 관찰되었다 (Fig. 18). 이는 밀웜 powder가 균에 의해 분해된 것으로 추측되며, 정확한 판단을 위해 추가적인 실험이 필요한 것으로 사료된다.
- 처리 20일 후 배양액을 광학현미경 하에서 관찰한 결과 Mealworm powder만 넣어준 조건에서는 불투명한 물질들이 많이 관찰되었음에 비해 Mealworm powder에 *C. militaris*를 처리한 조건에서는 비교적 투명한 물질이 많이 관찰되었다 (Fig. 96). 이는 mealworm powder가 균에 분해된 것으로 판단되며, 정확한 결론을 내리기 위해서는 추가적인 실험이 필요할 것으로 사료된다.

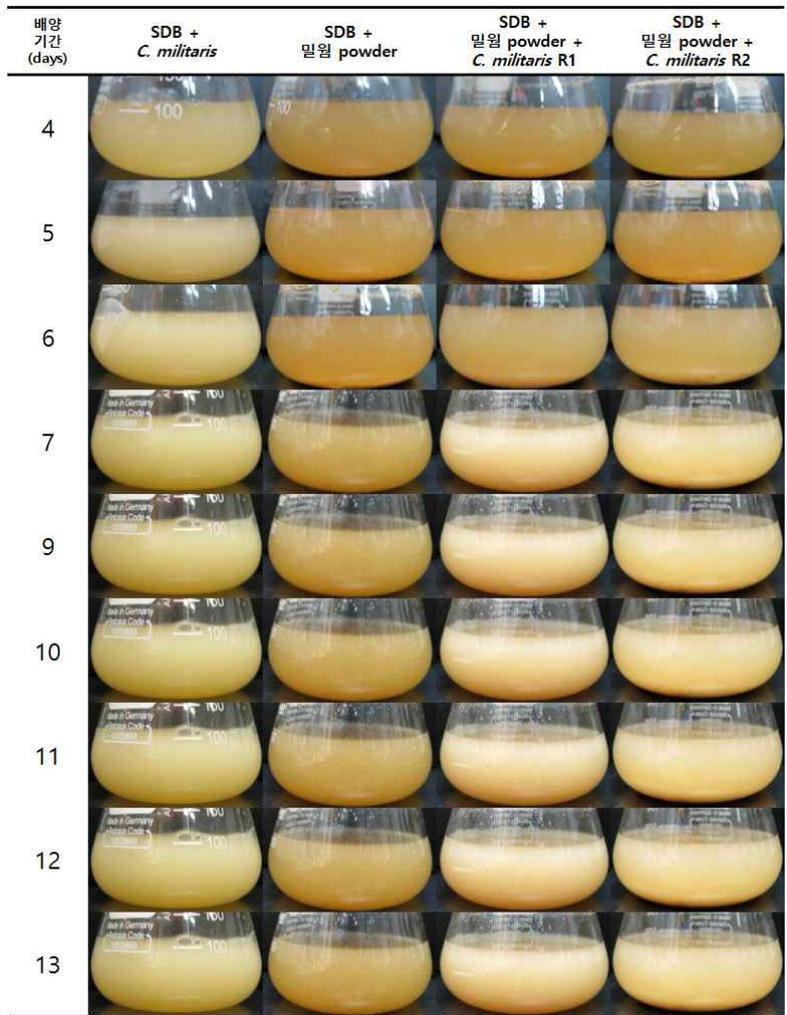


Fig. 94. 배양 시간별 mealworm powder 배양액의 변화양상

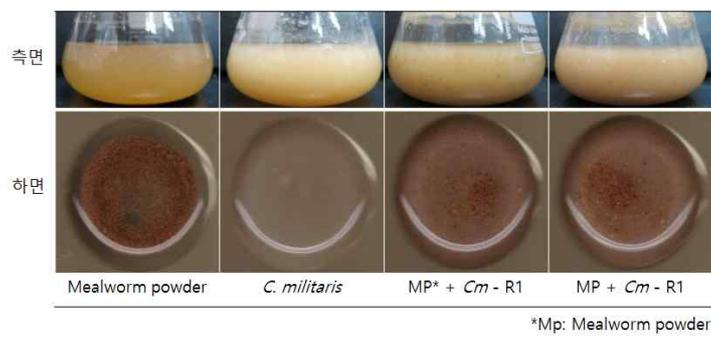


Fig. 95. 배양 20일 후 배양액의 측면과 하면 관찰

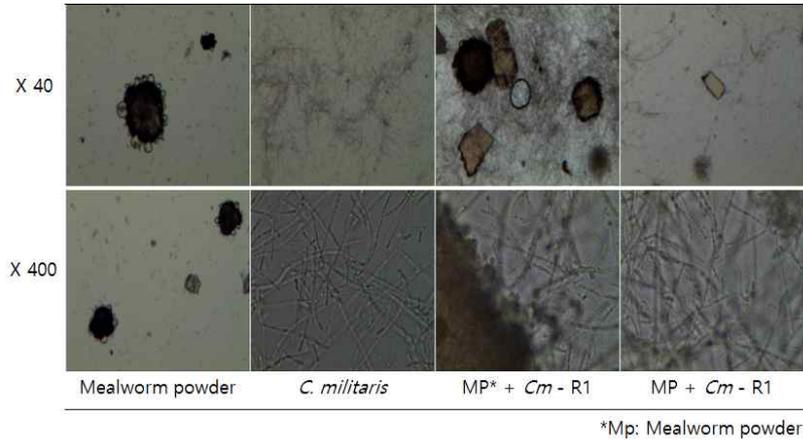


Fig. 96. 배양 20일 후 광학현미경 하에서 관찰된 배양액

<2차 실험>

⇒ 실험 방법

- 동결건조 된 밀웜은 powder화 되어 본 실험에 사용되었으며, SDB 액체배지에 밀웜 powder를 1% 넣은 배지는 제조되었다.
- SDB + 1% mealworm powder 배지에 *C. militaris*를 접종하여 150 rpm, 27°C 조건에서 배양되어 3가지 포자농도로 처리되었다 (Table 16).
- Control 1 조건에는 SDB배지에 1% mealworm powder만 처리되었으며, 처리군과의 비교를 위해 SDB배지에 *C. militaris*만 배양시킨 control 2조건은 설정되었다.
- 배양액은 150 rpm, 27°C 조건에서 배양되었다.

Table 16. Mealworm powder 분해실험 처리 조건

배지	구분	Mealworm powder	<i>Cordyceps militaris</i> concentration (conidia/mL)
	control 1	1%	
20 mL SDB	control 2		1×10^4
			1×10^5
			1×10^6
	조건 1	1%	1×10^4
			1×10^5
			1×10^6

⇒ 실험 결과

- 처리 14일 동안 배양액의 하단을 관찰한 결과 mealworm powder의 침전물에 조건별 차이가 있었으나 농도간 차이는 없는 것으로 판단되었다. Mealworm powder만 넣어준 조건에 비

해 Mealworm powder에 *C. militaris* 를 처리한 조건에서의 침전물의 양이 적게 관찰되었다. 이는 밀웜 powder가 균에 의해 분해된 것으로 추측되며, 정확한 판단을 위해 추가적인 실험이 필요한 것으로 사료된다.

- 처리 14일 후의 배양액을 광학현미경 하에서 관찰한 결과 Mealworm powder만 넣어준 조건에서는 불투명한 물질들이 많이 관찰되었음에 비해 Mealworm powder에 *C. militaris*를 처리한 조건에서는 비교적 투명한 물질이 많이 관찰되었다 (Fig. 104). 이는 mealworm powder가 균에 분해된 것으로 판단되며, 정확한 결론을 내리기 위해서는 추가적인 실험이 필요할 것으로 사료된다.

- 처리 14일 후의 배양액을 광학현미경 하에서 관찰한 결과 Mealworm powder만 처리된 Control 1 조건에서 잡균에 의한 오염이 관찰되었다. 균으로 인한 mealworm powder의 분해는 이루어지지 않았으나, control로써의 기준은 상실되었다고 판단되었다.

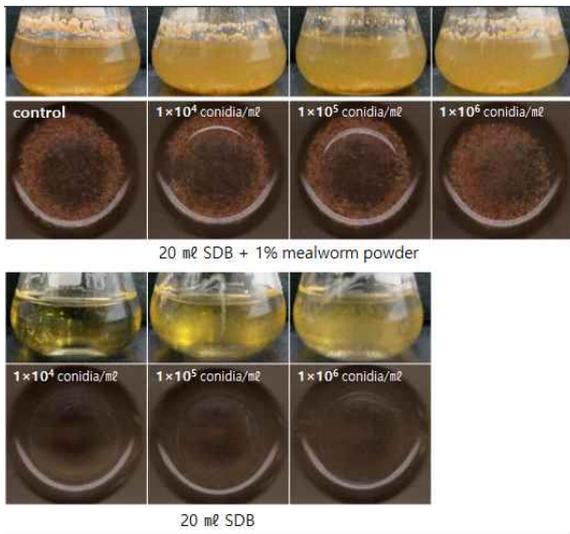


Fig. 97. 처리 2일 후 배양액

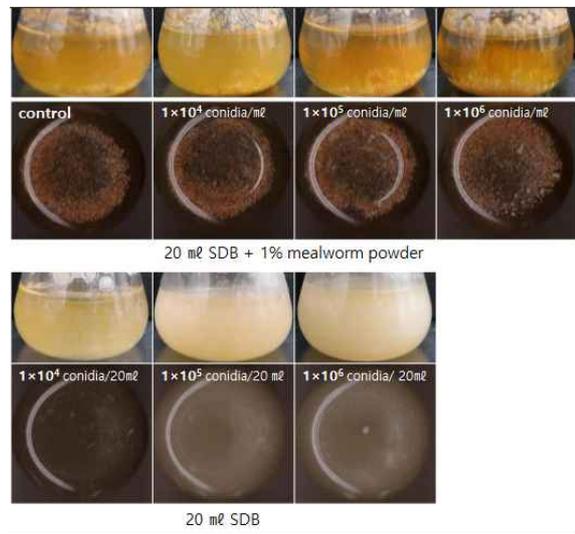


Fig. 98. 처리 4일 후 배양액

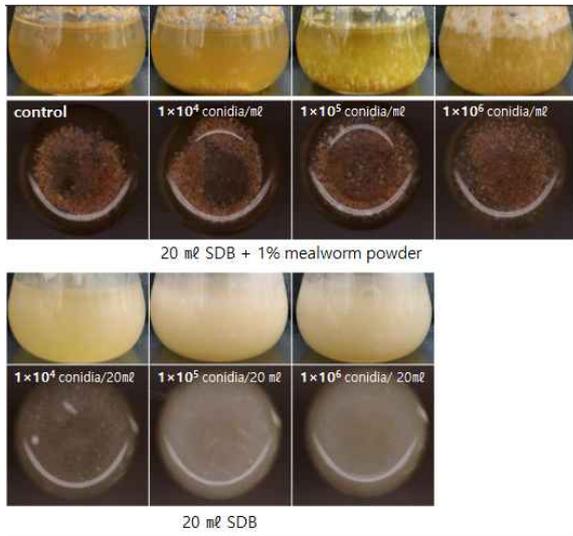


Fig. 99. 처리 6일 후 배양액

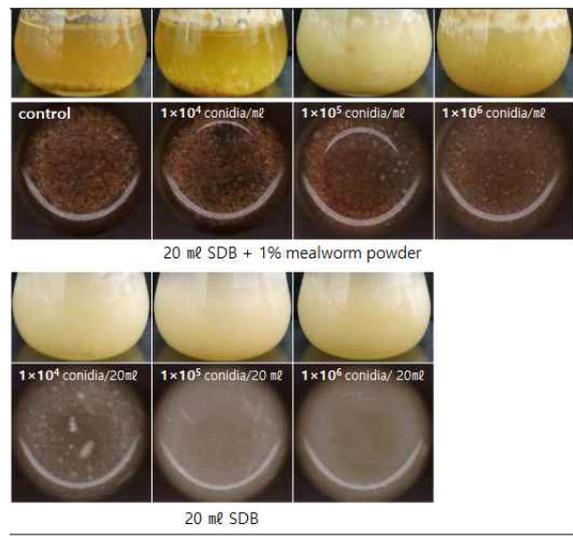


Fig. 100. 처리 8일 후 배양액

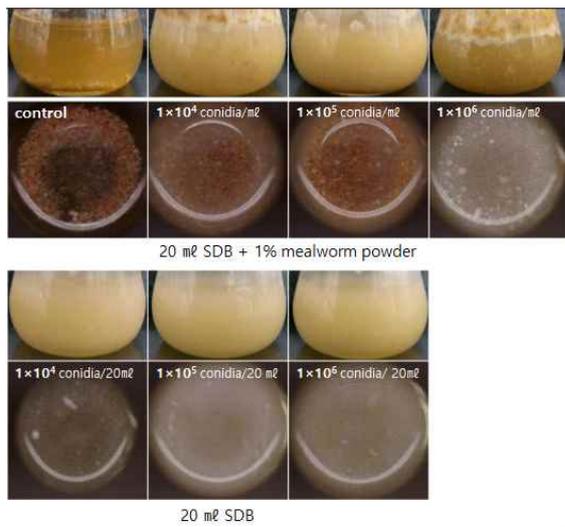


Fig. 101. 처리 10일 후 배양액

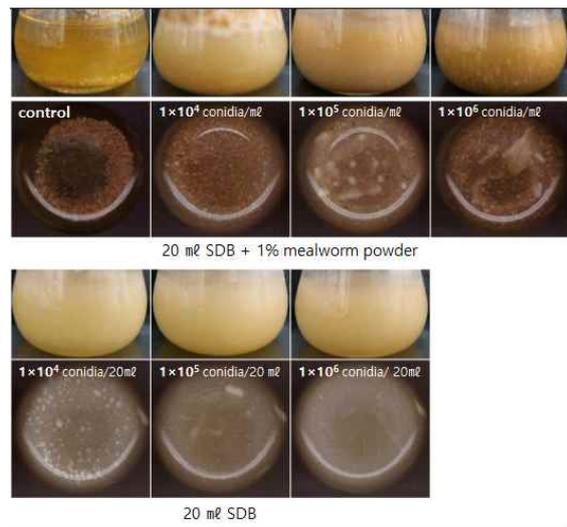


Fig. 102. 처리 12일 후 배양액

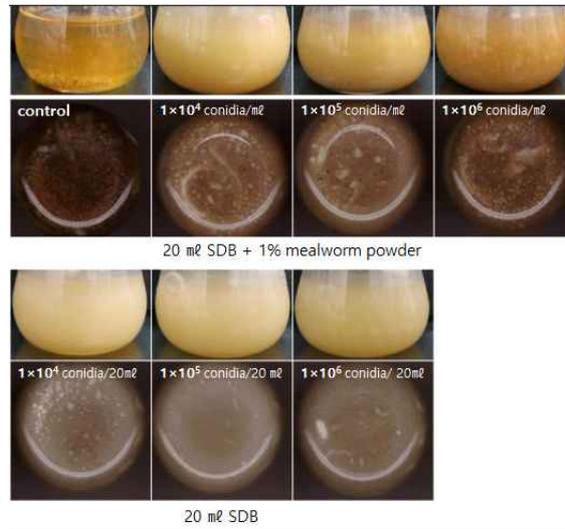


Fig. 103. 처리 14일 후 배양액

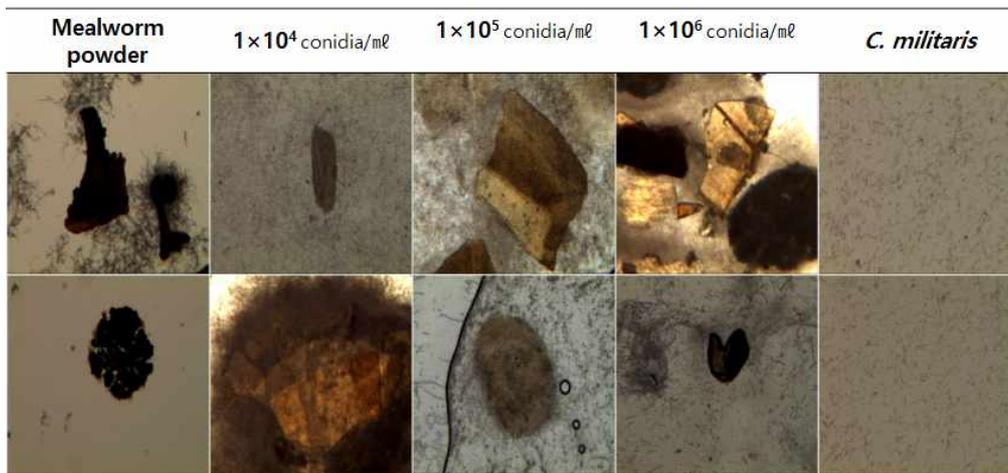


Fig. 104. 배양 20일 후 광학현미경 하에서 관찰된 배양액

4. 사료용 곤충의 기능성 확보방법 수립

<Bbs cecropin A vector 제작>

⇒ 실험방법

pBluescript II KS(+)-egfp에서 *gpdA* promoter와 *trpC* terminator를 포함하는 *egfp* expression cassette를 *SacI*과 *Clal*을 이용하여 phosphinothricin (PPT)를 포함하는 pBARKS1 vector에 integration 시켰다. 그 후 *XbaI*와 *BamHI* 제한효소를 이용하여 pGEM-Bbs-cecropin A로부터 *Bbs-cecropin A* fragment를 절단하였고, 이 site에 pBARKS1-egfp의 *egfp* gene를 *NcoI*과 *BamHI*을 이용해 절단 후 ligation 시켜 최종적으로 pBARKS1-Bbs-cecropin A (6293-bp)를 제작하였다.

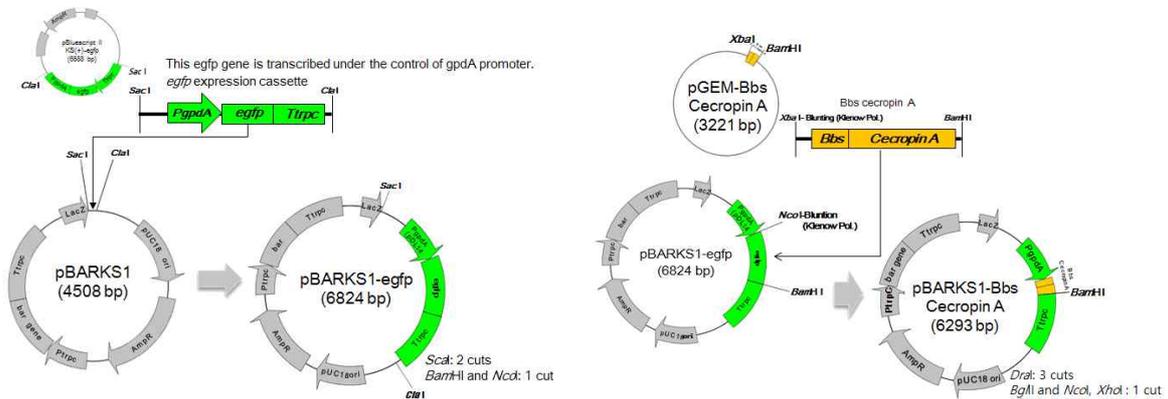


Fig. 105. pBARKSI-egfp vector(왼), pBARKSI-Bbs-cecropin A vector(오) 제작 map.

⇒ 실험 결과

-다음의 Primer(5 '-CAG TTC GAG CTT TCC CAC-3' , 18 mers, Tm: 61 ° C, Sec st.: None , Dimer: No)를 이용해 Sequencing 한 결과 Genbank에 등록된 pBARKS1-Bbs-cecropin A (GenBank: D17394)와 100% 일치함을 확인하였다.

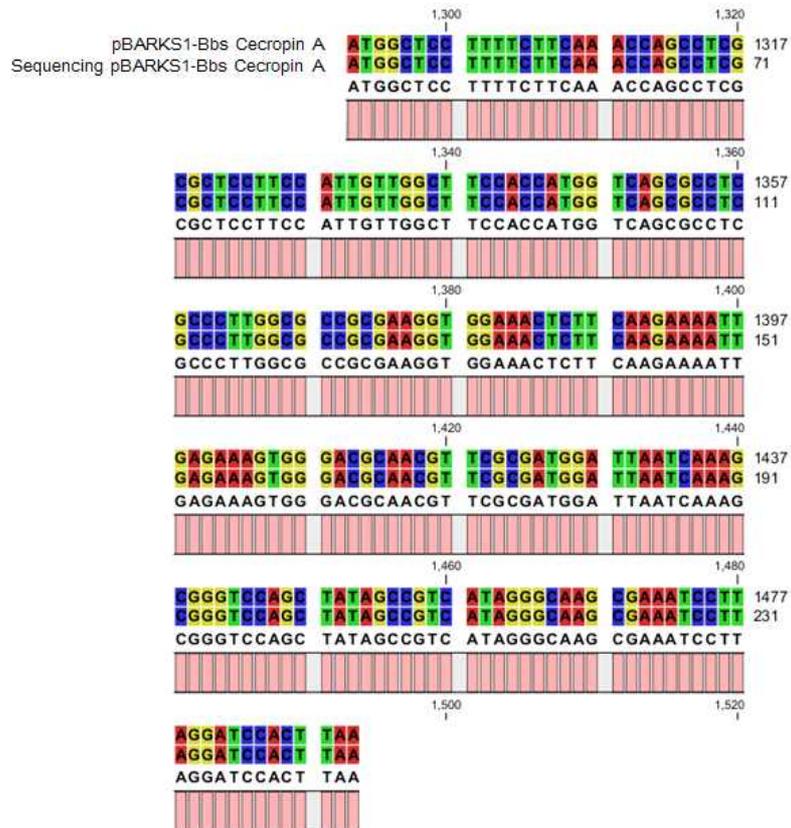


Fig. 106. pBARKS1-Bbs-cecropin A 의 sequencing 정보.

<Fungal transformation>

⇒ 실험 방법

- 곤충병원성 진균인 *Beauveria bassiana* ERL1170과 앞서 제작된 vector인 pBARKS1-Bbs-cecropin A를 이용하여 Restriction Enzyme-Mediated Intergration(REMI) - driselase 방법으로 실험은 진행되었다.
- JEF1170은 50ml SSYP에 25°C, 150 rpm 조건으로 4일간 배양되었으며, 배양된 10 ml의 SSYP solution은 50ml YPG에 25°C, 150 rpm 조건으로 12시간 동안 배양되었다.
- *Hind*III, K2 buffer (10x)를 이용하여 pBARKS1-egfp (2000ng)를 cutting 되었다.
- YPG에 배양된 배양액은 1 ml씩 Eppendorf tube에 옮겨졌으며, 12,000 rpm 에 5분간 4°C 조건에서 원심분리 된 후 상층액은 제거되었다.
- 500 μ l의 1M NH₄Cl을 넣은 뒤, 12,000 rpm 에 10분간 4°C 조건에서 원심분리 된 후 상층액은 제거되었다.
- 500 μ l의 Driselase solution (0.1 g Driselase, 7 ml 1M NH₄Cl)을 넣은 뒤, Shacking

- incubator에서 30°C, 100 rpm 조건으로 5시간 동안 배양되었다.
- 그 후 12,000 rpm 에 10분간 4°C 조건에서 원심분리 된 후 상층액은 제거되었다.
 - 500 μl 의 1M NH_4Cl 을 넣은 뒤, 12,000 rpm 에 10분간 4°C 조건에서 원심분리 된 후 상층액은 제거되었다.
 - 150 μl 의 STC (1.2 M Sorbitol, 10 mM Tris, 50 mM CaCl_2)을 상층액은 제거된 Eppendorf tube에 넣고 2개의 tube는 하나로 합쳐졌다.
 - Ice에 예냉된 15 ml Conical tube에 용액은 옮겨졌다.
 - 앞선 과정에 3 μl *Hind*III와 100 μl pBARKSI-egfp를 넣은 후 pipet을 이용해 잘 섞은 뒤 ice에서 10분간 incubation 되었다.
 - PEG 4000 (1M CaCl_2 , 1M Tris, PEG)를 천천히 넣은 뒤 pipetting 후 ice에서 15분간 incubation 되었다.
 - 1 ml 의 STC를 넣어준 뒤 Regeneration medium 배지에 200 μl 씩 도말한 뒤 30°C 조건으로 약 12-15시간(Over night) 동안 배양되었다.
 - 400 μl ppt1800을 배지에 처리한 뒤 흡수시킨 후 30°C 조건으로 3일 동안 배양되었다.
 - colony는 Czapek + ppt600배지에 streaking 되었다.

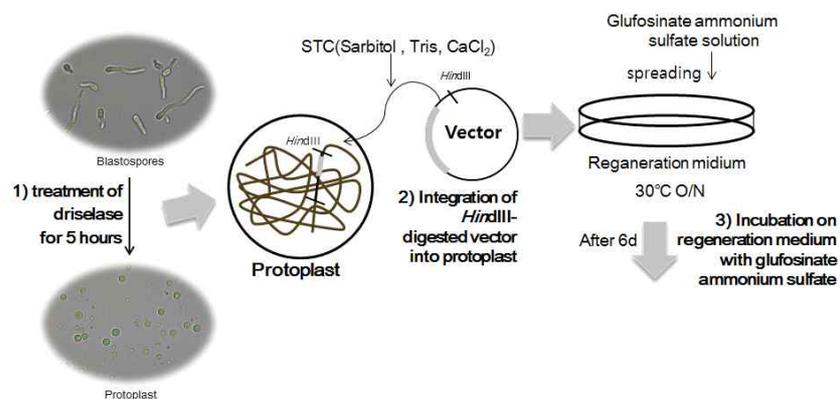


Fig. 107. Restriction Enzyme-Mediated Intergrate 모식도

⇒실험 결과

- 많은 Transformants가 확보되었다.

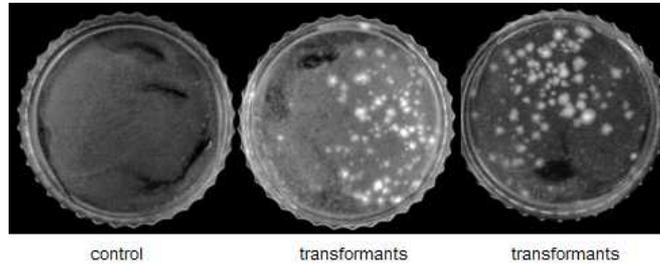


Fig. 108. Restriction Enzyme-Mediated Intergration을 통해 확보된 transformants.

<Antibacterial activity -ERL1170-pBARKSI-Bbs-cecropin A transformant>

⇒ 실험 방법

- wild type (ERL1170)과 ERL1170-pBARKSI-Bbs-cecropin A transformant의 4가지 세균(*Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli O157:H7*, *salmonella typhimurium*)에 대한 항세균효과를 확인하기 위해 다음의 실험은 진행되었다.
- wild type (ERL1170)과 ERL1170-pBARKSI-Bbs-cecropin A transformant는 SDA/4 배지에서 25°C 조건으로 7일 동안 배양되었다.
- Czapek agar(*B. subtilis*), LB agar(*L. monocytogenes*, *E. coli O157:H7*, *s. typhimurium*) 조건으로 각각 100 μ l의 세균을 도말 후, 7일 동안 균이 배양된 배지의 Agar block (지름 5 mm)은 세균이 도말된 배지에 치상되었다.

⇒ 실험 결과

- 항세균 효과를 통해 ERL1170-pBARKSI-Bbs-cecropin A transformant D-6 균주가 선발되었다.
- ERL1170-pBARKSI-Bbs-cecropin A transformant D-6 균주는 Gram-positive 세균(*B. subtilis*, *L. monocytogenes*)에 대해서는 clear zone을 형성하였지만, Gram-negative 세균(*E. coli O157:H7*, *s. typhimurium*)에 대해서는 효과를 나타내지 않았다.

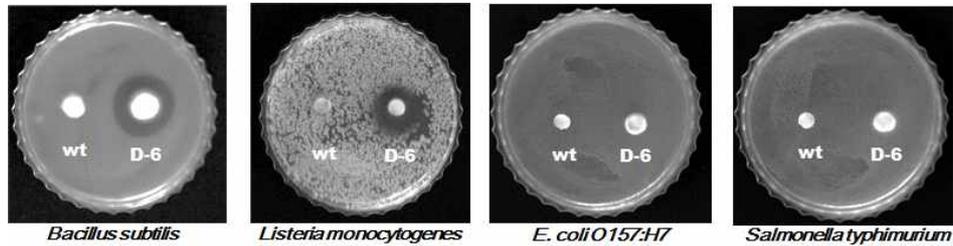


Fig. 109. ERL1170-pBARKSI-Bbs-cecropin A transformant D-6의
4가지 세균에 대한 항세균 효과

<Reverse transcription PCR>

⇒ 실험 방법

- ERL1170-pBARKSI-Bbs-cecropin A transformant D-6에서 Bbs-cecropin A primer를 통해 Bbs-cecropin A 유전자를 확인하고자 하였다.
- RNA extraction은 5일 동안 배양된 균주를 이용해 Trizol(Invitrogen, CA, USA) 방법으로 진행되었다.
- RT-PCR은 Bbs-cecropin A-F (CTCGCGCTCCTTCCATT, 17 mers, Tm: 60 °C, Sec st.: None, Dimer: No) 와 RT-PCR은 Bbs-cecropin A-R (TCGCTTGCCCTATGACG, 17 mers, Tm: 59 °C, Sec st.: None, Dimer: No) Primer를 사용하여 진행되었다.
- Control로써, *B. bassiana* 18S rRNA-specific primer-F(TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA, 20 mers, Tm: 64 °C, Sec st.: None, Dimer: No), *B. bassiana* 18S rRNA-specific primer-R (CCA ACG GAG ACC TTG TTA CG, 20 mers, Tm: 64 °C, Sec st.: None, Dimer: No)가 RT-PCR에 사용되었다.

⇒ 실험 결과

- ERL1170-pBARKSI-Bbs-cecropin A transformant D-6에서 Bbs-cecropin A 유전자가 발현되었음을 확인하였으며, 18S rRNA PCR을 통해 RNA가 extraction 되었음을 확인하였다.

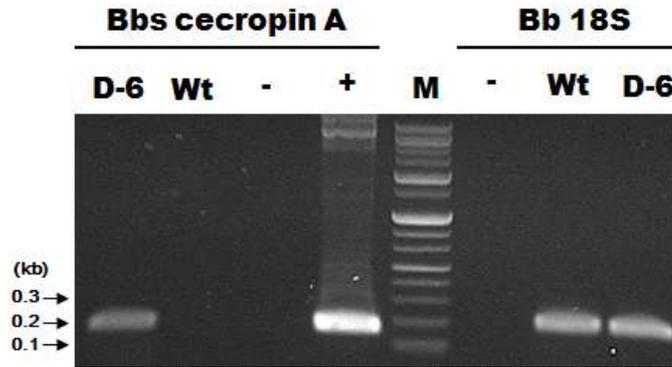


Fig. 110. ERL1170-pBARKS1-Bbs-cecropin A transformant D-6의 RT-PCR, Lane: M, 1Kb(+) DNA Ladder; +, pBARKS1-Bbs cecropin A; -, D.W.; Wt, wild type ERL1170; and D-6, ERL1170-pBARKS1-Bbs-cecropin A transformant D-6

<Western blot>

⇒ 실험 방법

- wild type (ERL1170)과 ERL1170-pBARKS1-Bbs-cecropin A transformant D-6는 ¼ Sabouraud dextrose broth (SDB/4)에 25°C, 150 rpm 조건으로 5일 동안 배양되었다.
- 배양액은 3M filter paper 와 syringe filter (0.25 μm)로 상층액 부분은 분리되었다.
- SDS-PAGE를 통해 얻어진 gel은 PVDF membrane으로 옮겨졌다.
- Transfer 후 PBST (10 mM tris Cl PH8.0, 100mM NaCl, 0.05% Tween-20)로 5분간, 3회 세척되었다.
- 5% skim milk in PBST (100 ml)로 4°C에서 over night 또는 실온에서 1시간 동안 incubation 되었다.
- PBST로 5분간, 3회 세척 후, 첫 번째 Ab를 PBST에 1/1,000 희석하여 실온에서 1시간동안 hyb 시킨다.
- PBST로 5분간, 3회 세척 후, 두 번째 Ab를 PBST에 2,000 ~ 4,000배 희석하여 실온에서 1시간동안 hyb 시킨다.
- PBST로 강하게 5분간, 5회 세척되었다.
- luminol reagent SC-2048 (Santa Cruz Biotechnology Co., USA)를 사용하여 이미지는 분석되었다.

⇒ 실험 결과

- ERL1170-pBARKS1-Bbs-cecropin A transformant D-6에서 cecropin A가 발현되었음을 확인하였다.

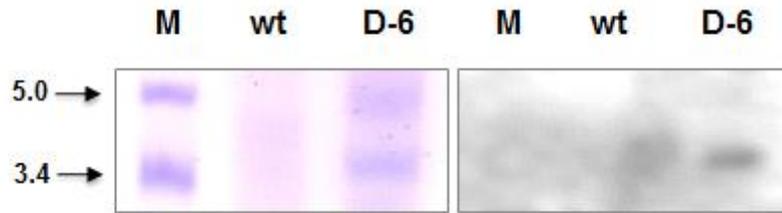


Fig. 111. ERL1170-pBARKS1-Bbs-cecropin A transformant D-6의 SDS-PAGE 및 Western blot, Lane: M, protein size marker; Wt, ERL 1170 wild type; D-6, ERL 1170 - pBARKS1-Bbs cecropin A transformant D-6

<Fungal inoculation to yellow mealworms>

⇒ 실험 방법

- 10마리의 밀웜 3령충은 2 g의 밀기울이 들어있는, 지름 60-mm Petri dish에 처리되었으며, 활동성을 감소시키기 위해 4°C 조건에서 20분간 처리되었다.
- 10 ml wild type (ERL1170)과 ERL1170-pBARKS1-Bbs-cecropin A transformant D-6의 포자현탁액 (1×10^7 conidia/ml)은 micro spray를 이용하여 분무 처리 되었다.
- 처리된 밀웜은 25°C, 16:8(L/D) 조건에 보관되었으며, 실험은 3반복으로 진행되었다.
- 치사되는 개체는 매일 counting 되었으며, 처리 7일 후 사충은 freeze-dried되어 powder 화 되었다.
- Mealworm powder를 이용하여 Antibacterial activity를 진행하였다.

⇒ 실험 결과

- ERL1170-pBARKS1-Bbs-cecropin A transformant D-6 균주는 *B. subtilis*, *L. monocytogenes*에 대해서 clear zone을 형성함을 확인하였다.

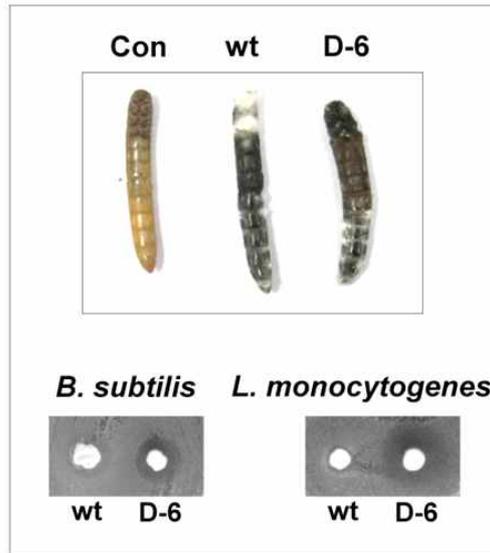


Fig. 112. 균이 감염된 밀웬 충체를 이용한 항세균 효과 검정

제 7 절 1년차(2012년~2013년)

제2협동과제 : 대상축종에서의 곤충사료의 사양기술 및 활용방안 개발

실험 1. 거저리 및 거저리 활용 원료사료의 자돈 및 육성돈에서의 회장소화율을 기반으로 단백질 원료사료로의 활용 가능성 규명

1. 서론 (Introduction)

현재의 양돈 배합 사료에는 옥수수나 대두박, 밀, 소맥피 등이 많이 사용되고 있다. 이 중에서 대두박은 가격이 높고 양질의 단백질 공급원으로 사용되는 원료로 최근 곡물 가격 증가 추세에 따라 지속적으로 가격이 상승하고 있다. 따라서 세계적으로 비싼 원료인 대두박을 대체할 수 있는 단백질 원료를 찾기 위한 연구의 필요성이 점점 가중되고 있고, 실질적으로 많은 연구가 수행되고 있다. 가축 사료에서 단백질 원료로 사용되기 위해서는 몇 가지 조건이 있다. 우선 가격이 기존에 배합사료에 쓰이는 원료보다 저렴해야 하고, 기존의 원료를 대체했을 경우에 동물의 성장능력이 저하되지 않아야 한다. 또한 세계적으로 생산량이 많아 꾸준한 물량을 확보하는데 어려움이 없어야 하며, 저장성도 우수해야 한다. 현재 이러한 여러 가지 조건을 충족하는 대체원료로 주목받고 있는 것이 곤충자원으로 거저리가 있다. 곤충은 단백질과 지방, 광물질 및 비타민을 풍부히 함유하여 영양소 함량이 높고, 특히 단백질 함량 및 이용률이 높아 식물성 단백질 원료들의 대체원으로 일찍이 관심을 받았다 (De Foliart, 1975). 일반적인 곤충의 단백질함량은 40-75g/100g 으로 육분의 단백질함량과 비슷하며, 거저리의 영양적 가치는 methionine 함량을 제외하면 우유단백질인 카제인이나 농축대두단백과 비슷하지만 경제적 측면에서 생산 단가는 매우 낮은 편이다(Ramos-elorduy 등, 2002). 본 실험에서는 이러한 배경을 바탕으로 단백질 원료사료 대체 가능성을 가지고 있는 거저리를 자돈 및 육성돈 사료에 급여하여 어느 정도 수준까지 대체할 수 있을지 아미노산 회장 소화율 분석 결과를 바탕으로 객관적으로 평가해 보았다.

2. 재료 및 방법 (Materials and Methods)

1) 실험 동물 및 실험 설계

3원 교잡종 ([Yorkshire × Landrace]) × Duroc) 자돈 및 육성돈을 공시하였으며, 수원시 권선구 탑동 서울대학교 농생대 부속 실험목장에서 회장소화율 실험을 실시하였다. 각각의 실험돈은 회장말단에 T-canula를 설치하였으며 (Stein 등, 1998), 0.93 m x 1.53 m의 대사를 내에서 2주간의 회복기간을 가졌다. 실내 온도는 24℃로 유지되었으며, 체중을 고려하여

완전임의배치법 (Completely randomized design;CRD)으로 배치하였다.

2) 실험 사료, 사료급여 및 샘플채취

실험사료는 옥수수-대두박 위주로 실험사료의 기초사료(basal diet)를 배합하였으며, 기초사료의 단백질 원료 및 미량원료들을 조정하여 각각의 실험사료에 거저리 원료 (유충, 성충, 유충+사육배지, 성충+사육배지)를 5%씩 첨가하였다. 모든 실험 사료는 자돈과 육성돈의 성장 단계의 영양소 요구량을 고려하여 설계되었으며, 시험사료의 모든 영양소 수준은 NRC(2012)와 같거나 높게 설정하였다. 사료는 각 실험돈의 체중을 기준으로 유지에너지 요구량의 2배(NRC, 1998)를 정량하여 하루에 두 차례로 (7:00, 19:00) 나눠 급여하였으며, 적응기 4일이 지난 후, 3일 동안 8:00에서 20:00시 사이에 회장소화물 샘플을 채취하였다. 음수의 경우 무제한 채식이 가능하도록 하였다. 채취 된 샘플은 미생물로 인한 아미노산 서열의 변화를 막기 위하여, 샘플링 후 즉시 이동되어, -60℃의 초저온냉동고 (deep freezer)에서 보관되었고, 이후에 동결건조와 분쇄 과정 (1 mm wiley mill)을 거치고, 아미노산 분석에 이용되었다.

3) 화학 분석

분쇄된 각각의 회장소화물 샘플들은 각각의 아미노산과 크롬분석에 이용되었다. 크롬분석의 경우 Williams (1962)의 방법에 따라 분석하였으며, 각각의 아미노산 염기서열의 경우 Beckman 6300 Amino Acid Analyzer (Beckman Instruments Corp., Palo Alto, CA)를 이용하여 ninhydrin법으로 분석하였다. 전처리는 stable amino acid 계열 (Lys 등)의 경우 염산처리방법이, 황 함유 아미노산 (Met, Cys) 계열의 경우 과개미산 전처리 방법이 사용되었다.

4) 소화율 계산 및 통계 분석

외관상 회장 소화율 (apparent ileal amino acid digestibility; AID)과 표준 회장 소화율 (standardized ileal amino acid digestibility; SID)이 아미노산 소화율의 객관적인 지표로서 Stein (1999a, 2001)의 방법에 따라 계산되었다. 기초 내생 손실 (basal endogenous losses)은 무질소사료를 급여한 이후에 회장말단에서 채취한 소화물을 이용하여 측정하였다 (Stein 등, 1999b). 소화율의 계산은 사료와 회장소화물의 상대적인 크롬 농도를 가지고 보정하여 계산하였으며, 계산식은 아래와 같다.

- (i) Apparent ileal digestibility (AID, %) =
- $$100 - ([ND / NF] \times [CrF / CrD] \times 100)$$
- * ND = 회장소화물의 영양소 농도
NF = 사료의 영양소 농도
CrF = 사료의 크롬 농도

CrD = 소화물의 크롬 농도

(ii) Basal endogenous AA losses (EAL) = (ND × [CrF / CrD])

* EAL은 N-free diet를 이용하여 측정

(iii) Standardized ileal digestibility (SID, %) = AID + ([EAL / NF]
× 100)

통계분석은 SAS의 일반선형모형 (GLM)을 이용하여 수집된 자료에 대한 유의성 검정을 실시하였으며, 자돈 및 육성돈 각각의 개체를 실험단위로 (CRD) 하여 최소 유의차 (LSD) 다중 검정법에 의해 처리간 결과를 비교하였다. P < 0.05인 경우 유의차가 있는 것으로, P < 0.01인 경우 고도의 유의차가 있는 것으로 고려하였다.

3. 실험 결과 및 고찰 (Results and Discussion)

1) 외관상 아미노산 회장소화율

자돈에서의 거저리 원료의 외관상 아미노산 회장소화율에 대한 결과를 표 3에 나타냈다. 자돈의 외관상 아미노산 회장소화율을 측정한 결과, 옥수수, 대두박 위주의 기초사료를 급여시의 아미노산 소화율과 거저리 유충, 성충, 배지를 급여한 자돈의 외관상 아미노산 회장소화율에는 통계적인 유의차는 나타나지 않았다. 그러나, 전체적인 외관상 아미노산 회장소화율을 고려해 본 결과, 거저리 성충-거저리 유충 순으로 아미노산 소화율이 높았으며, 옥수수-대두박 위주의 기초사료를 급여한 대조구에 비해 외관상 아미노산 회장소화율이 수치적으로 높은 것으로 나타났다. 이는 일반적으로 동물성단백질의 이용율이 식물성 단백질원에 비해 높기 때문에 (Aguilar-Miranda 등, 2002; Hardouin 등, 2003) 거저리 유충 및 성충의 외관상 아미노산 회장 소화율 또한 높은 결과로 나타난 것으로 사료된다. 육성돈에서의 거저리 원료의 외관상 아미노산 회장소화율에 대한 결과를 표 4에 나타냈다. 회장소화율 측정결과, 육성돈의 거저리 원료들의 아미노산 외관상소화율은 대조구와 통계적인 유의차는 나타나지 않았지만, 수치적으로 대조구의 외관상 아미노산 소화율보다 높은 수치를 나타내었다. 특히 glycine 소화율에서 거저리유충의 회장소화율이 가장 높게 나타났으며, 거저리 유충 및 성충 처리구의 회장소화율이 대조구에 비해 높은 결과가 나타났다 (P=0.03). 이러한 결과는 자돈에서의 회장소화율 결과와 일치하는 결과를 보이며, 육성돈에서도 동물성단백질인 거저리 원료들의 외관상아미노산 회장소화율의 결과가 식물성단백질원료 위주인 대조구에 비해 수치적으로 높은 결과가 나타난 것으로 사료된다.

표 3. 사료 내 거저리원료의 종류별 첨가가 자돈의 외관상 회장 소화율(AID)에 미치는 영향

Criteria	Treatment ¹				SEM ²	P-value
	대조구	유충	성충	배지		
Total amino acid	64.42	67.91	76.66	67.06	3.355	0.64
Aspartate	63.06	65.10	75.70	64.97	3.682	0.65
Threonine	49.80	58.76	67.95	53.45	4.774	0.56
Serine	59.61	65.42	73.26	61.89	3.857	0.63
Glutamate	71.51	71.28	81.67	73.39	2.795	0.64
Glycine	30.21	50.75	59.77	44.92	6.803	0.45
Alanine	42.58	59.04	66.37	53.71	5.422	0.41
Valine	53.65	61.84	69.16	58.47	4.147	0.56
Isoleucine	57.66	68.83	73.71	61.60	3.946	0.31
Leucine	62.75	69.24	77.44	66.78	3.583	0.46
Tyrosine	68.27	76.54	80.46	72.25	3.417	0.59
Phenylalanine	70.30	72.94	80.48	71.29	2.881	0.60
Lysine	68.22	67.98	80.11	71.73	3.143	0.58
Histidine	63.76	72.41	76.85	66.74	3.570	0.56
Arginine	78.59	79.40	85.47	73.82	2.353	0.42
Proline	74.24	71.95	83.49	74.48	2.719	0.59
Methionine	75.42	76.22	75.20	75.02	1.741	0.98
Cysteine	44.88	51.96	60.33	47.74	5.064	0.68

¹ Treatment:

² Standard error of the mean.

표 4. 사료 내 거저리원료의 종류별 첨가가 육성돈의 외관상 회장 소화율(AID)에 미치는 영향

Criteria	Treatment ¹				SEM ²	P-value
	대조구	유충	성충	배지		
Total amino acid	83.97	95.75	92.02	88.65	1.869	0.15
Aspartate	75.56	94.42	88.28	83.24	3.109	0.21
Threonine	70.32	93.28	87.35	81.61	3.556	0.14
Serine	78.09	94.77	89.86	85.87	2.564	0.13
Glutamate	90.23	97.09	94.65	92.60	1.128	0.19
Glycine	70.77 ^c	91.29 ^a	85.62 ^{ab}	78.36 ^{bc}	2.983	0.03
Alanine	79.43	94.58	89.28	82.07	2.540	0.11
Valine	80.09	94.24	89.71	82.90	2.406	0.14
Isoleucine	73.16	93.51	88.28	79.46	3.297	0.12
Leucine	83.48	95.47	92.78	89.10	1.850	0.12
Tyrosine	77.26	95.84	92.00	88.40	2.727	0.09
Phenylalanine	83.79	95.98	92.74	89.73	1.880	0.14
Lysine	84.86	96.53	92.68	90.20	1.935	0.21
Histidine	83.16	96.38	91.83	90.10	2.025	0.14
Arginine	83.66	96.09	92.68	90.24	1.837	0.12
Proline	90.71	97.25	94.94	92.92	1.109	0.22
Methionine	88.70	96.76	94.14	90.21	1.449	0.17
Cysteine	81.56	95.24	91.46	88.17	2.142	0.14

¹ Treatment:

² Standard error of the mean.

^{abc} Means with different superscripts in the same row significantly differ ($P < 0.05$).

4. 결론 (Conclusion)

본 연구는 사료 내 거저리원료의 종류별로 자돈 및 육성돈의 외관상 아미노산 회장소화율을 측정하기 위하여 수행되었다. 실험결과 자돈의 외관상 아미노산 회장소화율에서는 옥수수, 대두박 위주의 사료를 급여한 대조구에 비해 거저리원료 처리구들간의 통계적인 유의차는 나타나지 않았으나, 수치적으로 거저리원료 처리구들의 아미노산 소화율이 높게 나타났으며, 육성돈에서도 마찬가지로 거저리원료 처리구들의 아미노산 소화율이 대조구에 비해 수치적으로 높게 나타났다. 결론적으로, 동물성 단백질인 거저리 원료들(유충, 성충)은 식물성 단백질원료들에 비해 외관상 아미노산 소화율이 높은 것으로 사료된다.

실험 2. 거저리 사료 및 거저리 활용 사료의 이용성 규명을 통한 자돈 사료 내 거저리 첨가 형태 규명

1. 서론 (Introduction)

대두박과 어분은 가축사료 시장에서 대표적인 단백질사료로 바이오에탄올 생산과 생산량의 한계, 과도한 남획 등으로 인해 가격이 급격히 상승해왔다. 이러한 원료사료의 부족은 필연적으로 사료 가격의 상승을 야기 시켰으며, 원료사료의 90% 이상을 수입에 의존하는 우리나라의 경우 원료 사료의 가격변동은 더욱 큰 위협이 된다. 따라서 새로운 단백질 원료사료를 개발하고자 다양한 연구들이 수행되어 왔으나 여전히 적합한 대안이 제시되고 있지 못한 상황이다.

곤충은 단백질과 지방, 광물질 및 비타민을 풍부히 함유하여 영양소 함량이 높고, 특히 단백질 함량 및 이용율이 높아 식물성 단백질 원료들의 대체원으로 일찍이 관심을 받았다 (De Foliart, 1975). 일반적인 곤충의 단백질함량은 40-75g/100g 으로 육분의 단백질함량과 비슷하며, 일부 곤충들은 육분에 비하여 많은 필수지방산과 리놀레익산 및 리놀레닉산을 함유하고 있으며 다량의 아연과 철분이 함유하고 있는 것으로 조사되었다(De Foliart, 1992). 동애 등에, 거저리, 귀뚜라미 등은 대표적인 사료 곤충으로 애완동물이나 양어 사료에서 일부 성과가 보고되었고 양계사료에서의 효과가 입증된 예가 있으나 섭취하는 물질에 의한 품질의 변화와 대량생산의 실패로 인해 크게 발전되지 못하고 있다. 따라서 곤충 사료의 개발을 위해서는 대상 곤충의 영양적 특성의 파악과 사육 방법의 균일화 및 급여 형태가 반드시 선행되어야 한다.

사료화의 대상이 되는 곤충 중 갈색거저리 (*Tenebrio molitor*)는 딱정벌레의 일종으로, 거저리의 유충인 밀웜은 설치류나 파충류 및 조류의 사료로 이용되어 왔다. 마찬가지로 거저리와 유사한 딱정벌레류인 *Alphitobius diaperinus* (Despins, 1994), *Tribolium castaneum* (Vohra 등, 1978) 등의 조류 사료화 가능성 또한 증명되었다. 거저리의 영양적 가치는 methionine 함량을 제외하면 우유단백질인 카제인이나 농축대두단백과 비슷하지만 경제적 측

면에서 생산 단가는 매우 낮은 편이며 (Ramos-elorduy 등, 2002), 지방함량이 높아 가축의 에너지 공급원으로서도 집파리나 귀뚜라미에 비해 우수한 것으로 알려져 있다. 하지만 이러한 기존의 연구들은 주로 거저리의 유충인 밀웜을 대상으로 진행이 되어 거저리의 성충이나 생산 부산물인 탈피각 등에 대한 연구가 미흡하고, 대상 축종 또한 조류나 어류, 파충류 등에 한정되어 왔다.

따라서 본 연구는 동물성 단백질 원료에 대한 의존도가 높은 자돈을 대상으로 갈색거저리의 성장 단계와 배지와 혼합급여를 통해 거저리 원료사료의 이용가능성을 평가하여 자돈사료에 적합한 거저리 원료사료의 활용방법을 조사하기 위해 수행되었다.

2. 재료 및 방법 (Materials and Methods)

1) 실험 동물 및 실험 설계

28 ± 3일령에 이유한 평균 체중 7.40 ± 0.40 kg의 삼원 교잡종 ([Yorkshire x Landrace] x Duroc) 이유자돈 120두를 공시하여, Phase I 2주, Phase II 2주로 총 4주 동안 사양실험을 수행하였다. 전체 5처리 6반복 돈방 당 4두씩 성별과 체중에 따라 난괴법 (RCBD; Randomized Completely Block Design)으로 배치하였다. 실험의 처리구는 1) CON (대조구) : NRC (2012)의 요구량을 충족시키는 기초사료 (basal diet), 2) L5 : basal diet + 거저리 유충 5%, 3) A5 : basal diet + 거저리 성충 5%, 4) LW5 : basal diet + 거저리 유충 및 배지 5%, 5) AW5 : basal diet + 거저리 성충 및 배지 5% 였다.

2) 실험 사료

옥수수-대두박 위주로 실험사료의 기초사료(basal diet)를 배합하였으며, 기초사료의 단백질 원료 및 미량원료들을 조정하여 각각의 실험사료에 거저리 원료 (유충, 성충, 유충+사육배지, 성충+사육배지)를 5%씩 첨가하였다. 모든 실험 사료는 자돈의 성장단계의 영양소 요구량을 고려하여 설계되었으며, 실험사료의 모든 영양소 수준은 NRC(2012)와 같거나 높게 설정하였다. 각 실험사료의 원료 및 화학적 조성은 표 1(Phase I) 및 표 2 (Phase II)에 나타내었다.

표 1. 실험사료의 사료배합비와 성분표 (Phase I)

Ingredients, %	Con	L5	A5	LW5	AW5
EP corn	33.27	36.11	38.18	34.74	34.79
SBM-44	25.95	20.30	18.23	22.54	21.36
SPC	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
Whey powder	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Lactose	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
Barley	13.60	14.00	12.66	11.97	12.40
Soy-oil	2.91	0.34	1.51	1.50	2.14
MCP	1.25	1.21	1.26	1.12	1.14
Limestone	0.92	0.95	0.95	1.01	0.99
L-Lysine · HCl	0.36	0.35	0.46	0.38	0.43
DL-methionine	0.10	0.10	0.11	0.10	0.11
Vit. Mix ¹⁾	1.25	1.21	1.26	1.12	1.14
Min. Mix ²⁾	0.92	0.95	0.95	1.01	0.99
Salt	0.36	0.35	0.46	0.38	0.43
Choline-Cl(25%)	0.10	0.10	0.11	0.10	0.11
ZnO	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Molitor Larva	0.00	5.00	0.00	0.00	0.00
Molitor Adult	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00
Larva+Waste	0.00	0.00	0.00	5.00	0.00
Adult+Waste	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition ³⁾					
ME, kcal/kg	3,400	3,400	3,400	3,400	3,400
CP, %	20.56	20.56	20.56	20.56	20.56
Lysine, %	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35
Methionine, %	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39
Ca, %	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Total P, %	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65

¹⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D₃, 1,600IU; vitamin E, 32IU; d-biotin, 64g; riboflavin, 3.2mg; calcium pantothenic acid, 8mg; niacin, 16mg; vitamin B₁₂, 12g; vitamin K, 2.4mg.

²⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1mg; I, 0.3mg; Mn, 24.8mg; CuSO₄, 54.1mg; Fe, 127.3mg; Zn, 84.7mg; Co, 0.3mg.

³⁾ Calculated values

표 2. 실험사료의 사료배합비와 성분표 (Phase II)

Ingredients, %	Con	L5	A5	LW5	AW5
EP corn	44.70	45.63	48.49	43.90	45.13
SBM-44	20.92	15.12	13.10	17.23	16.20
SPC	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Lactose	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Barley	19.99	22.30	20.17	20.77	19.94
Soy-oil	2.52	0.10	1.21	1.26	1.82
MCP	1.07	1.04	1.09	0.94	0.96
Limestone	0.69	0.72	0.72	0.76	0.75
L-Lysine · HCl	0.39	0.37	0.49	0.41	0.46
DL-methionine	0.08	0.08	0.09	0.09	0.10
Vit. Mix ¹⁾	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Min. Mix ²⁾	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Choline-Cl(25%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
ZnO	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Molitor Larva	0.00	5.00	0.00	0.00	0.00
Molitor Adult	0.00	0.00	5.00	0.00	0.00
Larva+Waste	0.00	0.00	0.00	5.00	0.00
Adult+Waste	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition ³⁾					
ME, kcal/kg	3,400	3,400	3,400	3,400	3,400
CP, %	20.56	20.56	20.56	20.56	20.56
Lysine, %	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35
Methionine, %	0.39	0.39	0.44	0.44	0.44
Ca, %	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Total P, %	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65

¹⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D₃, 1,600IU; vitamin E, 32IU; d-biotin, 64g; riboflavin, 3.2mg; calcium pantothenic acid, 8mg; niacin, 16mg; vitamin B₁₂, 12g; vitamin K, 2.4mg.

²⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1mg; I, 0.3mg; Mn, 24.8mg; CuSO₄, 54.1mg; Fe, 127.3mg; Zn, 84.7mg; Co, 0.3mg.

³⁾ Calculated values

3) 사양 실험

사양실험돈은 콘크리트-슬랫 바닥에서 $1.90 \times 2.15 \times 0.40$ m³ 크기의 돈방에서 사육되었다. 각 돈방에는 하나의 사료 급이기와 니플 급수기가 설치되어 전체 실험 기간 동안 물과 사료를 자유 채식 (*ad libitum*)하도록 하였다. 돈방 온도는 실험 개시 후 첫 일주일간은 30℃를 유지하였으며, 매주 1℃씩 낮추어 4주차에는 27℃를 유지하게 하였다. 사양실험 기간은 각각 Phase I 2주, Phase II 2주 2단계로 사육되었다. 체중 및 사료 섭취량은 사육 단계 및 사료 종류의 변동 시점을 고려하여, 실험 개시(Initial)기간을 기점으로 2주마다 측정하여 일당증체량 (average daily gain; ADG), 일일사료섭취량 (average daily feed intake; ADFI), 사료효율 (gain/feed ratio; G/F ratio)을 계산하였다.

4) 영양소 소화율

처리 당 4 두씩 평균체중 11.65 ± 0.98 kg 인 삼원교잡종 ([Yorkshire \times Landrace] \times Duroc) 거세돈 20두를 완전임의배치법 (CRD; completely randomized design)으로 대사틀에 1 두씩 배치하였다. 5일의 적응기를 가진 뒤 6일째부터 본 실험을 개시하였다. 사료를 매일 오전 7시와 오후 7시에 117g씩 급여하였으며, 물은 자유롭게 채식하도록 하였다. 실험 개시 시 급여하는 사료량의 0.5% 만큼 산화크롬 (Cr_2O_3)을 칭량하여 개시 지시제로 사용하였으며 실험 종료 시에는 급여하는 사료량의 0.5% 만큼 산화철 (Fe_2O_3)을 칭량하여 종료 지시제로 사용하였다. 분 채취는 분에서 산화크롬을 확인한 시점부터 산화철을 확인할 때까지 실시하였다. 뇨는 실험기간 동안 매일 오후 7시에 채취하였다. 암모니아의 증발을 막기 위해 뇨 수집용기에 0.1N H_2SO_4 용액 50ml를 첨가하였으며 수집용기에 유리섬유를 설치하여 뇨를 여과하고 채취하였다. 실험기간 동안 채취한 뇨는 샘플별로 2,000 ml로 mass up 한 뒤 100 ml 씩 튜브에 담고 분은 무게를 잰 뒤 -20℃의 냉동고에 실험 종료 시까지 보관하였다. 채취가 끝난 뒤 분은 샘플별로 60℃ drying oven에서 72시간 건조한 후 Wiley mill (1mm 스크린)을 이용하여 분쇄하였다. 사료 및 분뇨의 일반 성분 분석은 AOAC (1995) 방법으로 수행되었으며 건물, 수분, 조단백, 조지방, 조회분을 분석하여 영양소 소화율을 계산하였다.

5) 혈액 성상

혈중 요소태질소 (BUN : Blood Urea Nitrogen) 및 IGF-1을 조사하기 위해 실험 개시 시점에 임의적으로 6두의 경정맥에서 혈액을 채혈하였으며, 실험 개시 이후에는 각 사육단계 별 체중 측정 시 각 처리별로 6두씩 총 24두의 혈액을 채취하였다. 혈액은 disposable culture tube에 포집하여 3,000 rpm, 4℃ 상태에서 15분 동안 원심분리 하였다. 분리된 혈청은 micro tube에 옮겨서 분석 시까지 -20℃에 보관하였다. 혈청의 BUN과 IGF-1은 각각 자동생화학 분석기 (ADVIA 1650, Japan)와 호르몬 분석기 (Immulite 2000, DPC, SUA)를 이용하여 분석되었다.

6) 통계 분석

통계분석은 SAS의 General Linear Model (GLM)을 이용하여 수집된 자료의 유의성을 검정하였다. 성장성적의 경우 돈방을 experimental unit으로 설정하였으며, 혈액분석과 영양소 소화율의 경우 각 개체를 unit으로 설정하였다. 유의적 차이는 최소 유의차 (LSD) 다중검정법에 의해 처리간 결과를 비교하였으며, $P < 0.05$ 인 경우 유의차가 있는 것으로, $P < 0.01$ 인 경우 고도의 유의차가 있는 것으로 고려하였으며, $0.05 \leq P < 0.10$ 일 경우 경향이 있는 것으로 간주하였다.

3. 실험 결과 및 고찰 (Results and Discussion)

1) 사양성적 (Feeding trial)

자돈 사료 내 거저리 원료의 첨가가 자돈의 성장성적에 미치는 영향을 표 3에 제시하였다. 사양실험 결과, 자돈의 체중과 증체량, 일당사료섭취량에서 거저리 원료의 첨가에 따른 통계적 유의차가 발생하지 않았다. 모든 거저리 첨가구의 증체량은 대조구에 비해 높은 것으로 나타났으며, 특히 거저리의 유충을 첨가한 처리구 (L5)가 대조구와 다른 처리구에 비해 높은 체중, 사료섭취량 및 증체량을 보였다. 사료 효율의 경우 Phase II에 거저리 원료의 첨가에 따른 처리구간의 유의차가 발생하였으며, 거저리 성충에 배지를 혼합급여한 AW5처리구가 대조구나 유충을 급여한 처리구에 비해 낮은 사료 효율을 나타냈다 ($P < 0.05$). 또한 배지와 혼합급여 유무와 관계없이 유충을 급여한 처리구들이 성충을 급여한 처리구들에 비해 수치상으로 높은 사료 효율을 보였다.

본 실험의 선행연구에서 사육배지의 영양적 조성이 불량한 것으로 나타나 배지를 첨가할 경우 사양성적의 저하가 우려되었다. 본 실험의 결과에서는 거저리 사육배지를 급여한 두 처리구 (LW5, AW5)를 비교했을 시 배지에 의한 부정적인 효과가 나타났다고 할 수는 없으나, 유충에 배지를 급여한 경우 (LW5) 거저리 첨가 처리구중 가장 낮은 섭취량을 보였으며, 성충에 배지를 혼합급여한 경우 (AW5) 모든 처리구 중 가장 낮은 사료 효율이 관찰되었다.

표 3. 이유자돈 사료 내 거저리 원료의 첨가가 이유자돈의 성장성적에 미치는 영향¹⁾

	Control	L5	A5	LW5	AW5	SEM ²⁾
Body weight, kg						
Initial	7.41	7.43	7.36	7.40	7.38	0.298
2 wk	8.11	8.64	8.14	8.15	8.40	0.393
4 wk	13.43	14.63	13.67	13.51	13.66	0.592
Average daily gain, g						
0-2 wk	50	86	55	53	72	9.8
2-4 wk	380	428	395	383	376	15.9
0-4 wk	215	257	225	218	224	12.1
Average daily feed intake, g						
0-2 wk	208	234	207	207	225	12.2
2-4 wk	578	681	650	609	654	24.3
0-4 wk	393	457	428	408	439	17.0
Gain:Feed ratio						
0-2 wk	0.213	0.330	0.235	0.225	0.233	0.0406
2-4 wk	0.646 ^a	0.633 ^a	0.609 ^{ab}	0.630 ^a	0.571 ^b	0.0085
0-4 wk	0.531	0.558	0.521	0.533	0.497	0.0113

¹⁾ A total of 128 crossbred pigs were fed from average initial body weight 7.98 ± 0.83 kg and the average of final weight was 13.78kg.

²⁾ Standard error of mean.

^{a b} Means in a same row with different superscript letters were significantly different ($P < 0.05$).

2) 영양소 소화율 (Nutrient digestibility)

자돈 사료 내 거저리 원료의 첨가가 영양소 소화율에 미치는 영향을 표 4에 나타내었다. 건물(dry matter)과 조단백질(crude protein)의 소화율에서 거저리 유충의 소화율이 가장 높았으며 대조구에 비해 유의적으로 소화율이 증가하였다 ($P < 0.05$). 조지방 소화율의 경우 유의적인 차이가 나타나지는 않았으나 거저리 성충을 첨가한 처리구를 제외한 나머지 처리구가 모두 대조구에 비해 수치상으로 증가하였다. 질소 축적량을 분석한 결과 유충을 첨가한 처리구의 분변을 통한 질소의 배출량이 다른 처리구에 비해 유의적으로 감소하였으며 ($P < 0.05$), 뇨를 통한 질소의 배출 또한 대조구에 비해 낮은 경향이 나타나 ($P = 0.06$), 결과적으로 거저리 유충을 첨가한 처리구의 질소 소화율이 대조구에 비해 높게 관찰되었다 ($P = 0.09$). 거저리의 성충을 첨가한 A5처리구의 경우 다른 거저리 처리구에 비해 낮은 질소 축적율이 발견되었는데 이는 질소 섭취량이 다른 처리구에 비해 높았기 때문으로 추정되며, 사료의 배합 시 단백질 함량이 동일하도록 배합되었으므로 분석과정에서의 오차로 인한 결과인 것으로 사료된다.

거저리 첨가 형태에 따른 돼지에서의 소화율의 차이는 보고된 바가 없으나, 본 연구의 결과 자돈에서의 이용성은 거저리가 유충의 형태일 때 가장 높은 것으로 사료되며, 소화율 실험의 결과는 사양실험에서 사료에 거저리 유충을 첨가한 처리구가 가장 높은 증체량을 보인 결과에 대한 근거가 된다.

표 4. 이유자돈 사료 내 거저리 원료의 첨가가 이유자돈의 영양소 소화율에 미치는 영향¹⁾

	Control	L5	A5	LW5	AW5	SEM ²⁾
Apparent nutrient digestibility, %						
Dry matter	88.66 ^{bc}	90.16 ^a	89.77 ^{ab}	88.09 ^c	89.15 ^{abc}	0.249
Crude protein	84.64 ^b	87.19 ^a	84.14 ^b	83.39 ^b	84.11 ^b	0.395
Crude fat	52.65	66.23	51.25	58.76	59.94	1.914
Ash	48.50	53.98	58.21	47.91	48.84	1.495
Nitrogen retention ³⁾ , g/day						
N-intake	5.88	5.93	6.50	5.75	5.99	0.065
N-feces	0.90 ^a	0.73 ^b	1.03 ^a	0.98 ^a	0.95 ^a	0.030
N-urine	3.38 ^d	2.18 ^e	3.39 ^d	2.14 ^{de}	2.34 ^{de}	0.194
N-retention	1.60	3.02	2.01	2.63	2.70	0.186
N-digest, %	27.24 ^e	50.97 ^d	32.22 ^{de}	45.67 ^{de}	45.09 ^{de}	3.173

¹⁾ 20 pigs were used from an average initial BW of 11.65 ± 0.98 kg

²⁾ Standard error of mean.

³⁾ N retention = N intake (g) - Fecal N (g) - Urinary N (g)

^{a b c} Means in a same row with different superscript letters were significantly different (P<0.05).

^{d e f} Means in a same row with different superscript letters were significantly different (P<0.10).

3) 혈액 성장(Blood urea nitrogen, IGF-1)

자돈 사료 내 거저리 원료의 첨가가 이유자돈의 BUN (blood urea nitrogen)과 IGF-1에 미치는 영향에 대해서 표 5에 나타내었다. 혈중 내 BUN의 농도는 사료 내 단백질의 공급과 연관이 있으며 체내에서는 식이아미노산과의 관계와 부의 상관관계 (negative correlation)를 갖는다(Eggum, 1970). 따라서 BUN의 농도는 체내의 단일 아미노산과 단백질 요구량의 지표로 사용되어 왔다 (Taylor 등, 1982; Coma 등, 1995). 본 실험의 결과 2주차에서 자돈 사료 내 거저리 원료의 첨가 형태는 BUN 농도에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났지만 모든 거저리 원료 첨가가 대조구에 비해 낮은 BUN 농도를 보였다. 4주차의 결과에서는 거저리 원료의 첨가에 따른 경향이 발견되었으며 거저리 성충과 배지를 혼합 급여한 처리구가 유충을 첨가한 처리구와 유충과 배지를 혼합 첨가한 처리구에 비해 낮은 BUN 농도를 보였다 (P=0.07). 이는 사양성적과 소화율 실험의 결과와는 다른 맥락을 보였으며 대조구에 비해서 모든 처리구의 BUN 농도의 개선은 이뤄지지 않은 것으로 사료된다.

IGF-1은 성장호르몬의 자극에 의해 분비되며 조직의 성장과 분화에 관여하여 성장이 필요한 세포에 에너지를 공급하고 심혈관계의 구조와 기능의 조절과 뼈의 성장에도 매우 중요한 역할을 한다(Bayes-Genis, 2000). 실험 전 구간에 걸쳐서 IGF-1의 혈중 농도는 처리구간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 결과적으로 혈액성상의 분석결과 거저리 원료를 첨가한 사료의 급여는 기존의 사료를 섭취하는 것과 유사한 수준의 BUN과 혈중 IGF-1 농도를 보이는 것으로 나타났으나 혈액성상을 개선하지는 못하는 것으로 나타났다.

표 5. 이유자돈 사료 내 거저리 원료의 첨가가 이유자돈의 혈액성상에 미치는 영향

	Control	L5	A5	LW5	AW5	SEM ¹⁾
Apparent nutrient digestibility, %						
Initial	9.4	9.4	9.4	9.4	9.4	
2 week	15.9	13.5	13.2	14.5	14.8	0.50
4 week	12.8 ^{abc}	13.1 ^{ab}	10.3 ^{bc}	13.4 ^a	9.9 ^c	0.48
Nitrogen retention, g/day						
Initial	92.2	92.2	92.2	92.2	92.2	
2 week	90.4	94.1	77.5	104.4	79.0	5.91
4 week	135.0	105.7	135.5	105.0	107.1	7.50

¹⁾ Standard error of means.

4. 결론 (Conclusion)

본 연구는 자돈 사료 내 거저리 원료의 첨가가 자돈의 성장성적, 혈액성상 및 영양소 소화율에 미치는 영향을 규명하여 자돈 사료 내 거저리의 첨가 형태를 판단하기 위해 수행되었다.

자돈의 사양성적에서는 자돈의 체중과 일당 증체량 및 일당 사료 섭취량에서 거저리 원료들의 첨가에 따른 유의적인 차이가 발견되지는 않았으나 거저리 유충을 5% 첨가할 경우 대조구와 다른 거저리 첨가구에 비해 수치상으로 높은 일당 증체량과 사료 섭취량을 나타냈다. 또한 사육 배지를 거저리의 유충이나 성충과 함께 급여한 처리구들이 대조구에 비해서 사양성적이 저하되지는 않았으나 유충 형태의 단일 급여가 가장 자돈의 성장에 유리한 것으로 판단된다.

소화율 실험에서도 거저리 유충을 첨가한 처리구의 건물 및 조단백질 소화율이 대조구에 비해 유의적으로 개선되는 결과가 나타났으며, 질소 소화율에서도 거저리 유충의 소화율이 대조구에 비해 높은 경향을 보였다.

혈액성상의 경우 BUN과 혈중 IGF-1 농도가 조사되었으며 사양성적 및 소화율 실험의 결과와는 거저리 유충을 급여가 혈액성상을 개선하지 못한 것으로 나타났고 대조구와 유사한 것으로 평가되었다.

결론적으로 자돈 사료 내 거저리 원료의 첨가는 대두박을 대체하고 사양성적을 개선시킬 가능성이 높으며, 특히 거저리 유충의 경우 다른 거저리의 형태에 비해 이용성이 가장 높은 것으로 나타나 자돈에 거저리의 급여는 유충단계에서 섭취시키는 것이 가장 유리한 것으로 사료된다.

실험 3. 거저리 원료사료의 급여수준이 자돈의 성장 및 기호성에 미치는 영향 규명

1. 서론 (Introduction)

이유는 돼지의 일생에 있어서 가장 중요한 시기로, 자돈은 고품사료를 효율적으로 이용할 수 있는 소화 능력을 얻기 전에 모돈에서 격리가 되고 기준에 섭취하던 모유에서 곡물위주의 고품 사료에 적응해야 하게 된다. 이는 환경변화와 함께 자돈에게 큰 스트레스를 유발하게 되며, 성장정체나 설사를 발생시키게 되는 주원인이 된다. 따라서 자돈사료는 유제품이나 건조혈청, 어분 등의 기호성이 뛰어나며 이용성이 높은 동물성 단백질을 원료를 첨가하여 배합하는 것이 일반적이다. 하지만 동물성 단백질 원료는 대두박 등 식물성 단백질에 비해 가격이 높으며, 최근 광우병 등 질병에 대한 우려로 인해 동물성 단백질에 대한 신뢰가 떨어져 새로운 대체 원료에 대한 요구가 커지고 있다.

일반적으로 식용으로 쓸 수 있는 곤충은 약 1,500종이 있으며 이중 대부분의 종들이 단백질원으로서 동물사료에 사용될 수 있다(Liew 등 2001). 이러한 곤충 중 거저리는 세계전역에 걸쳐 서식하며 곡물 및 곡류 부산물 등에 해를 끼치는 해충이나, 갯털 등 다양한 물질을 섭취할 수 있고 영양적 가치가 매우 높아 오래전부터 관심이 되어왔다(Gourlet 등, 1978). 특히 갈색거저리 (*Tenebrio molitor*)의 유충인 밀웜은 귀뚜라미와 더불어 설치류나 파충류 및 조류의 생사료로 가장 널리 활용되고 있는 곤충 자원으로 갈색거저리의 유충의 영양적 가치와 생산방법에 대해서는 조류나 양어를 대상으로 긍정적인 결과들이 도출되었으며 (Hernandez, 1987; Legunes와 Garcia, 1994), Ramos-elorduy 등(2002)의 연구에서 거저리 유충을 육계사료에 10% 수준까지 첨가하여도 사양성적에서 대조구와 차이가 나타나지 않았다고 보고하였다. 따라서 거저리의 자돈사료에 적용은 다른 동물에서와 같이 동물성 단백질 원료로의 활용 가능성이 높을 것으로 사료되며, 곤충시장의 확대에 기여하리라 추정되지만, 갈색 거저리의 폐지에서의 급여효과는 현재까지 연구가 거의 이루어지지 않았으며 중화권을 중심으로 연구가 시작되고 있는 시점에 있다.

본 연구의 선행 실험에서 거저리의 유충이 성충이나 부산물에 비해 자돈에서의 이용성이 높은 것이 처음으로 제시되었으며, 본 연구는 자돈사료에서 거저리 유충의 활용방안을 모색하기 위한 일환으로 갈색거저리 유충을 수준별로 급여하여 자돈사료에서의 적정 첨가가능 수준을 검증하기 위해 수행되었다.

2. 재료 및 방법 (Materials and Methods)

1) 실험 동물 및 실험 설계

28 ± 3일령에 이유했던 평균 체중 8.40 ± 0.10 kg의 삼원 교잡종 ([Yorkshire x Landrace] x Duroc) 이유자돈 120두를 공시하여, 전체 5처리 6반복 돈방 당 4두씩 성별과

체중에 따라 난괴법 (RCBD; Randomized Completely Block Design)으로 배치하였다. 사양 실험은 Phase I 2주, Phase II 3주로 나누어 총 5주간 진행되었다. 실험의 처리구는 NRC(2012)의 영양소 요구량을 충족하는 기초사료를 급이한 처리구를 대조구로 설정하고 기초사료의 1.5%, 3.0%, 4.5% 및 6%를 거저리 유충으로 대체하여 총 5개 처리구를 구성하였다.

2) 실험 사료

실험사료는 옥수수-대두박 위주로 기초사료(basal diet)에 처리구별로 거저리 유충을 0.0%, 1.5%, 3.0%, 4.5% 및 6.0%를 첨가하고 기타 원료사료들을 조정하여 자돈의 성장단계에 따라 영양소 요구량 (NRC, 2012)에 맞게 배합하였다. 실험사료의 대사에너지 (ME; metabolizable energy)는 Phase I (0~2주)에 3400 kcal/kg, Phase II (3~5주)에 3350 kcal/kg으로 설정하였으며, 단백질 함량은 Phase I에 20.56%, Phase II에 18.88%로, 라이신 (lysine)의 함량은 Phase I에 1.35%, Phase II에 1.23%에 맞춰 배합하였다. 기타 아미노산, 비타민 및 광물질 요구량 또한 NRC(2012)의 요구수준과 같거나 높은 수준으로 충족시켰으며, 실험사료의 원료 및 화학적 조성은 표 1 (phase I), 표 2 (phase II)에 제시하였다.

표 1. 실험사료의 사료배합비와 성분표 (Phase I)

Ingredients, %	Control	<i>Tenebrio molitor</i> Larva			
		1.5%	3.0%	4.5%	6.0%
EP corn	30.95	31.03	31.02	31.05	31.04
SBM(44%)	35.10	33.34	31.51	29.80	28.01
Molitor Larva	0.00	1.50	3.00	4.50	6.00
Whey powder	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Lactose	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
Barley	12.42	13.32	14.37	15.26	16.29
Soy-oil	3.22	2.51	1.79	1.10	0.39
MCP	1.22	1.22	1.20	1.20	1.19
Limestone	0.94	0.94	0.94	0.96	0.96
L-Lysine · HCl	0.40	0.39	0.39	0.39	0.38
DL-methionine	0.11	0.11	0.11	0.10	0.10
Vit. Mix ¹⁾	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Min. Mix ²⁾	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Choline-Cl(25%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
ZnO	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical Composition ³⁾					
ME (kcal/kg)	3,400	3,400	3,400	3,400	3,400
CP (%)	20.56	20.56	20.56	20.56	20.56
Lysine (%)	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35
Methionine (%)	0.39	0.39	0.44	0.44	0.44
Ca (%)	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Total P (%)	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65

¹⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D3,1.600IU; vitamin E, 32IU; d-biotin, 64g; riboflavin, 3.2mg; calcium pantothenic acid, 8mg; niacin, 16mg; vitamin B12, 12g; vitaminK, 2.4mg.

²⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1mg; I, 0.3mg; Mn, 24.8mg; CuSO4, 54.1mg; Fe, 127.3mg; Zn, 84.7mg; Co, 0.3mg.

³⁾ Calculated values

표 2. 실험사료의 사료배합비와 성분표 (Phase II)

Ingredients, %	Control	<i>Tenebrio molitor</i> Larva			
		1.5%	3.0%	4.5%	6.0%
EP corn	32.55	33.49	34.44	35.38	36.29
SBM(44%)	27.28	25.61	23.95	22.27	20.63
Molitor Larva	0.00	1.50	3.00	4.50	6.00
Lactose	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Barley	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00
Soy-oil	3.42	2.65	1.87	1.10	0.34
MCP	1.03	1.00	1.01	1.00	1.00
Limestone	0.66	0.69	0.68	0.70	0.71
L-Lysine · HCl	0.43	0.43	0.42	0.42	0.41
DL-methionine	0.09	0.09	0.09	0.09	0.08
Vit. Mix ¹⁾	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Min. Mix ²⁾	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Choline-Cl(25%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical Composition ³⁾					
ME (kcal/kg)	3,350	3,350	3,350	3,350	3,350
CP (%)	18.88	18.88	18.88	18.88	18.88
Lysine (%)	1.23	1.23	1.23	1.23	1.23
Methionine (%)	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36
Ca (%)	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70
Total P (%)	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60

¹⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D3,1,600IU; vitamin E, 32IU; d-biotin, 64g; riboflavin, 3.2mg; calcium pantothenic acid, 8mg; niacin, 16mg; vitamin B12, 12g; vitaminK, 2.4mg.

²⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1mg; I, 0.3mg; Mn, 24.8mg; CuSO4, 54.1mg; Fe, 127.3mg; Zn, 84.7mg; Co, 0.3mg.

³⁾ Calculated values

3) 사양 실험

사양실험은 경기도 수원시 소재의 서울대학교 부속실험목장에서 수행되었으며, 콘크리트-슬랫 바닥에 $1.90 \times 2.15 \times 0.40$ m 크기의 돈방에서 사육되었다. 각 돈방에는 하나의 사료 급이기와 니플 급수기가 설치되어 전체 실험 기간 동안 물과 사료를 자유 채식 (*ad libitum*)하도록 하였다. 돈방 온도는 실험 개시 후 첫 일주일간은 30°C를 유지하였으며, 매주 1°C씩 낮추어 4주차에는 27°C를 유지하게 하였다. 사양실험은 각각 Phase I 2주, Phase II 3주 총 5주간 진행되었다. 체중 및 사료 섭취량은 사육 단계 및 사료 종류의 변동 시점을 고려하여, 실험 개시(Initial)기간을 기점으로 2주차와 5주차에 측정하여 일당증체량 (average daily gain; ADG), 일일사료섭취량 (average daily feed intake; ADFI), 사료효율 (gain/feed ratio; G/F ratio)을 계산하였다.

4) 영양소 소화율

평균체중 10.05 ± 0.98 kg 인 삼원교잡종 ([Yorkshire \times Landrace] \times Duroc) 거세돈 4처리 5반복 총 20두를 완전임의배치법 (CRD; completely randomized design)으로 대사틀에 1 두씩 배치하였다. 5일의 적응기를 가진 뒤 6일째부터 본 실험을 개시하였다. 사료를 매일 오전 7시와 오후 7시에 117g씩 급여하였으며, 물은 자유롭게 채식하도록 하였다. 실험 개시 시 급여하는 사료량의 0.5% 만큼 산화크롬 (Cr_2O_3)을 칭량하여 개시 지시제로 사용하였으며 실험 종료 시에는 급여하는 사료량의 0.5% 만큼 산화철 (Fe_2O_3)을 칭량하여 종료 지시제로 사용하였다. 분 채취는 분에서 산화크롬을 확인한 시점부터 산화철을 확인할 때까지 실시하였고, 뇨는 실험기간 동안 매일 오후 7시에 하였다. 암모니아의 증발을 막기 위해 뇨 수집용기에 0.1N H_2SO_4 용액 50ml를 첨가하였으며 수집용기에 유리섬유를 설치하여 뇨를 여과하고 채취하였다. 실험기간 동안 채취한 뇨는 샘플별로 2,000 ml로 mass up 한 뒤 100 ml 씩 튜브에 담고 분은 무게를 잰 뒤 -20°C의 냉동고에 실험 종료 시까지 보관하였다. 채취가 끝난 뒤 분은 샘플별로 60°C drying oven에서 72시간 건조한 후 Wiley mill (1mm 스크린)을 이용하여 분쇄하였다. 사료 및 분뇨의 일반 성분 분석은 AOAC (1995) 방법으로 수행되었으며 건물, 수분, 조단백, 조지방, 조회분을 분석하여 영양소 소화율을 계산하였다.

5) 혈액 성분

혈중 요소태질소 (BUN : Blood Urea Nitrogen) 및 IGF-1을 조사하기 위해 실험 개시 시점에 임의적으로 6두의 경정맥에서 혈액을 채혈하였으며, 실험 개시 이후에는 각 사육단계 별 체중 측정 시 각 처리별로 6두씩 총 24두의 혈액을 채취하였다. 혈액은 disposable culture tube에 포집하여 3,000 rpm, 4 °C 상태에서 15분 동안 원심분리 하였다. 분리된 혈청은 micro tube에 옮겨서 분석 시까지 -20 °C에 보관하였다. 혈청의 BUN과 IGF-1은 각각 자동생화학 분석기 (ADVIA 1650, Japan)와 호르몬 분석기 (Immulite 2000, DPC, SUA)를 이용하여 분석되었다.

6) 통계 분석

통계분석은 SAS의 General Linear Model (GLM)을 이용하여 수집된 자료의 유의성을 검정하였다. 성장성적의 경우 돈방울 experimental unit으로 설정하였으며, 혈액분석과 영양소 소화율의 경우 각 개체를 unit으로 설정하였다. 거저리 유충의 첨가수준의 증가에 따른 효과를 추정하기 위해 orthogonal polynomial contrast를 통해 거저리 유충의 첨가수준에 따른 linear 및 quadratic effect를 조사하였으며, $P < 0.05$ 인 경우 유의차가 있는 것으로, $P < 0.01$ 인 경우 고도의 유의차가 있는 것으로 간주하였다. $0.05 \leq P < 0.10$ 일 경우 경향이 있는 것으로 고려하였다.

3. 실험 결과 및 고찰 (Results and Discussion)

1) 사양성적 (Feeding trial)

자돈 사료 내 거저리 유충의 첨가가 자돈의 성장성적에 미치는 영향을 표 3에 나타내었다. 2주차와 5주차 체중에서 거저리 유충의 첨가량이 늘어날수록 체중이 증가하는 linear response가 발견되었다($P=0.01$). Phase I의 결과 거저리 유충이 첨가할수록 증체량과 사료 섭취량의 유의적인 개선이 나타났다 (linear, $P < 0.01$). Phase II에서도 Phase I과 마찬가지로 거저리 유충의 첨가에 따라 증체량이 linear 하게 증가하는 경향이 나타났으며 (linear, $P=0.09$), 비록 유의차는 없었지만 사료 섭취량에서도 거저리 유충의 첨가에 따른 섭취량의 증가가 관찰되었다. 사료 효율에서는 비록 Phase I과 Phase II 각 사양단계에 거저리 유충의 첨가에 따른 유의적인 증가는 없었지만 수치적인 증가가 나타났으며, 총 사양기간을 기준으로 거저리 유충의 첨가에 따라 사료 효율이 증가되는 경향이 나타났다 (linear, $P=0.07$). 이는 선행연구에서 자돈 사료 내 거저리 유충을 5% 첨가하였을 시 자돈의 사양성적을 개선시켰다는 결과와 유사하며, 최근 발표된 58일령의 거저리 분말 유충을 2%, 4%, 6% 자돈사료에 첨가했을 때 거저리 첨가수준이 증가함에 따라서 체중이 증가했다는 Chen 등 (2012)의 결과와도 유사하다. Yang 등(2010)은 거저리로 사료 중의 어분을 대체하기 위하여 거저리를 사용하였을 때, 어분을 급여한 처리구와 비슷한 성장성적 결과를 얻었는데, 이러한 결과의 주요 원인은 거저리의 우수한 향미가 자돈의 소화액의 분비를 자극하고 장내의 소화운동을 촉진함에 기인한다고 평가하였다.

전체적인 성장성적의 결과를 보았을 때, 자돈사료 내 거저리 유충의 첨가는 주로 0-2주의 체중, 사료섭취량, 일당증체량을 크게 개선시키는 것으로 나타났고 2-5주에서도 사양성적을 개선시켰다. 따라서 본 실험의 결과는 자돈사료에서 기존 단백질 원료의 대체뿐만 아니라 거저리 유충이 자돈사료에 첨가되었을 시 자돈의 사양성적을 전반적으로 개선시킬 수 있다는 것을 의미하며, 최대 6% 이상을 첨가하여도 사양성적에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료 된다.

표 3. 이유자돈 사료 내 거저리 유충의 첨가가 이유자돈의 성장성적에 미치는 영향¹⁾

	Control	<i>Tenebrio molitor</i> Larva				SEM ²⁾	P-value	
		1.5%	3.0%	4.5%	6.0%		Lin.	Quad.
Initial	8.05	8.04	8.05	8.04	8.04			
2 wk	9.63	9.80	10.01	10.51	10.66	0.310	0.01	0.83
5 wk	17.78	18.34	19.10	19.77	20.22	0.531	0.01	0.90
Average daily gain, g								
0-2 wk	113	126	140	176	188	11.6	0.01	0.81
2-5 wk	388	407	433	441	455	15.2	0.09	0.82
0-5 wk	278	294	316	335	348	11.0	0.01	0.91
Average daily feed intake, g								
0-2 wk	250	270	283	336	349	13.3	0.01	0.77
2-5 wk	721	736	754	753	773	25.4	0.44	0.96
0-5 wk	532	550	566	586	604	17.3	0.05	0.96
Gain/feed rate								
0-2 wk	0.452	0.467	0.495	0.524	0.539	0.028	0.25	0.28
2-5 wk	0.539	0.552	0.575	0.586	0.589	0.015	0.24	0.89
0-5 wk	0.521	0.538	0.565	0.573	0.576	0.011	0.07	0.62

¹⁾ A total of 120 crossbred pigs were fed from average initial body weight 8.04 ± 0.01 kg

²⁾ Standard error of means.

2) 영양소 소화율 (Nutrient digestibility)

자돈 사료 내 거저리 유충의 첨가가 자돈의 영양소 소화율에 미치는 영향을 표 4에 나타내었다. 건물(dry matter)과 조단백질(crude protein)의 소화율은 거저리 유충의 첨가수준이 증가할수록 높아졌으며(linear, $P < 0.05$), 조회분에서도 거저리 유충의 첨가수준이 증가함에 따라 소화율이 높아지는 경향이 나타났다(linear, $P = 0.06$). 이는 선행연구에서 자돈 사료 내 거저리 유충을 5% 첨가하였을 시 자돈의 건물과 조단백질 소화율이 증가되었다는 결과와 유사하다. 지방의 소화율은 거저리의 첨가에 따라 큰 변화가 관찰되지 않았으며, 이는 선행연구에서 거저리 유충을 5% 첨가했을 시 조지방의 소화율이 증가하는 경향이 나타났던 것과는 다른 결과가 관찰되었다.

Hwangbo 등(2009)은 거저리 유충의 영양성분과 비슷한 파리 유충을 이용하여 육계사료에 첨가하였는데 파리유충의 단백질 소화율은 대두박 단백질의 소화율 보다 높으며 각종 아미노산의 소화율도 파리유충이 높다는 결과를 얻었다. 이와 같이 거저리 유충은 동물성 단백질 공급원으로서 대조구의 대두박 단백질보다 건물과 조단백질, 조회분의 소화율이 높아서 자돈의 영양소 이용률을 증가시키는 것으로 사료된다. 질소축적량을 분석한 결과, 분으로 배출되는 질소의 함량은 거저리 유충의 첨가수준이 증가함에 따라 감소하였으며($P = 0.05$), 이에 따라 질소 축적률은 거저리 유충의 첨가량이 증가할수록 높아지는 결과가 나타났다($P = 0.04$).

결론적으로 자돈 사료내 거저리 유충의 첨가는 자돈의 건물, 조단백질, 조회분의 소화율을 향상시키며, 거저리 유충의 첨가수준이 높아짐에 따라 체내 질소이용률이 증가하게 되어 질소 축적량을 증가시키는 것으로 사료된다. 이러한 영양소 소화율 실험의 결과는 거저리 유충의 첨가에 따라 일당 증체량이 증가된 사양성적의 결과와 맥락이 일치한다.

표 4. 이유자돈 사료 내 거저리 유충의 첨가가 이유자돈의 소화율에 미치는 영향¹⁾

	Control	<i>Tenebrio molitor</i> Larva				SEM ²⁾	P-value	
		1.5%	3.0%	4.5%	6.0%		Lin.	Quad.
Nutrient digestibility, %								
Dry matter	90.13	92.33	92.93	93.80	94.22	0.715	0.05	0.53
Crude protein	85.51	89.93	91.33	92.15	93.04	1.216	0.04	0.41
Crude ash	67.62	67.17	71.11	72.20	76.01	1.841	0.06	0.66
Crude fat	81.40	81.67	82.96	82.79	81.55	1.328	0.87	0.65
N-retention, g/day								
N-intake	5.01	5.18	5.38	5.30	5.36			
N-feces	0.72	0.52	0.47	0.42	0.37	0.060	0.05	0.48
N-urine	2.30	2.50	2.60	2.51	2.55	0.159	0.71	0.76
N-retention	1.99	2.16	2.31	2.37	2.43	0.162	0.04	0.85

¹⁾ A total of 120 crossbred pigs were fed from average initial body weight 8.04 ± 0.01 kg

²⁾ Standard error of means.

3) 혈액 성분(Blood urea nitrogen, IGF-1)

자돈 사료 내 거저리 유충의 첨가가 자돈의 혈중 요소태질소(BUN; blood urea nitrogen)와 혈중 IGF-1 분비에 미치는 영향을 표 5에 나타내었다. BUN은 아미노산의 이용에 대한 대표적인 지표로 사용되어 왔다(Eggum, 1970). BUN은 단백질 섭취와 그 품질에 직접적인 연관성을 가지는 것으로 알려져 있으며 (Eggum, 1970; Hahn 등, 1995), 섭취한 질소의 체내 유지에 관련이 있고 밝혀졌다 (Whang과 Easter, 2000). 본 실험결과, 사양실험기간 동안 전 실험개체의 BUN농도 범위는 9.4~14.87mg/dl로 일반적인 BUN 수치를 나타내었다. 2주차에서는 거저리 유충의 첨가수준이 증가함에 따라 혈중 BUN 농도가 낮아지는 경향이 나타났으며 (linear effect, P=0.08), 5주차에서도 거저리 유충의 첨가에 따라 유의적BUN의 감소가 발견되었다(linear effect, P=0.05).

인슐린 유사 성장인자(IGF-1)는 성장호르몬의 자극으로 분비되며 조직들의 성장과 분화에 관여하는 인자로 심혈관계의 구조와 기능의 조절에도 중요하고 뼈의 성장에도 매우 중요한 역할을 한다 (Bayes-Genis, 2000). 또한 IGF-1은 성장에 관여하는 세포에 에너지를 공급하는 역할을 하며, 자돈의 성장과 밀접한 관계를 가진다. 본 실험의 결과 2주차에서 자돈 사료내 거저리 유충의 첨가는 혈중 IGF-1의 농도에 유의적인 영향을 미치지 않은 것으로 나타났으나 거저리의 첨가구들의 IGF-1 농도가 대조구에 비해 수치적으로 높게 관찰되었으며, 5

주차에서는 거저리 유충의 첨가량이 증가함에 따라 유의적으로 IGF-1의 농도가 증가되었다 (linear, $P < 0.03$).

혈액성상의 분석결과를 종합하면 자돈사료 내 거저리 유충의 첨가는 BUN을 감소시키고 혈중 IGF-1를 증가시키는 것으로 사료되며, 이러한 결과는 거저리 유충의 첨가수준이 증가할수록 자돈의 조단백질과 질소이용률이 높아진 영양소 소화율 실험과 맥락을 같이하며, 거저리 유충의 첨가에 따른 사양성적의 향상을 뒷받침하는 근거가 된다.

표 5. 자돈 사료 내 거저리 유충의 첨가가 이유자돈의 BUN 및 IGF-1 농도에 미치는 영향

	Control	<i>Tenebrio molitor</i> Larva				SEM ¹⁾	P-value	
		1.5%	3.0%	4.5%	6.0%		Lin.	Quad.
BUN, mg/dL								
Initial	9.40	9.40	9.40	9.40	9.40			
2 week	14.87	14.27	12.15	12.03	12.08	0.617	0.08	0.52
5 week	12.02	11.12	10.85	10.32	10.28	0.658	0.05	0.85
IGF-1, ng/mL								
Initial	75.12	75.12	75.12	75.12	75.12			
2 week	83.77	87.77	86.10	87.13	93.08	3.169	0.37	0.78
5 week	107.67	123.00	129.58	131.48	136.34	4.007	0.03	0.44

¹⁾ Standard error of means.

4. 결론 (Conclusion)

본 연구는 자돈 사료 내 거저리 유충의 첨가가 자돈의 성장성적, 혈액성상 및 영양소 소화율에 미치는 영향을 규명하여 거저리 유충의 적정 첨가수준을 조사하기 위해 수행되었다.

자돈의 성장성적에서는 거저리 유충의 첨가수준이 증가함에 따라 0-2주의 체중, 사료섭취량, 일당증체량 및 사료효율이 유의적으로 선형으로 증가하는 결과가 나타났으며, 2-5주에는 비록 유의적인 효과는 없었으나 성장성적이 개선되는 경향이나 수치적인 증가가 지속되었으며, 결과적으로 5주간의 사양기간동안 거저리 유충의 자돈 사료 내 첨가는 자돈의 사양성적을 유의적으로 향상시켰다.

영양소 소화율에서는, 사료 내 거저리 유충의 첨가수준이 증함에 따라 자돈의 건물, 조단백질, 조회분의 소화율이 높아지는 경향을 보였으며, 체내 질소이용률이 증가하게 되어 질소축적량이 높아지는 결과가 나타났다. 이러한 결과는 거저리 유충의 동물성 단백질 원료로서 자돈에게 높은 이용성을 가진다는 것을 의미한다.

혈중 BUN과 IGF-1 농도를 분석한 결과, 거저리 유충의 첨가수준이 증가할수록 자돈의 질소이용률이 증가하게 되어 혈중 BUN농도가 감소하는 효과가 나타났으며, 혈중 IGF-1농도는 거저리 유충의 첨가량이 증가함에 따라 증가하였다. 사료 내 거저리 유충의 첨가수준이 증가함에 따라 혈중 BUN농도가 낮아지고, IGF-1의 분비가 증가하는 결과는 거저리 유충의 첨가가

자돈사료의 질소이용률을 향상시키며, 체내에서 IGF-1의 분비를 촉진시켜 자돈의 성장을 극대화 시키는데 영향을 미친 것으로 사료된다.

결론적으로 자돈 사료 내 거저리 유충의 첨가는 자돈기 5주간에 걸쳐 자돈의 영양소 이용률을 개선하고 혈중 IGF-1의 분비를 촉진시켜 자돈의 성장성적을 향상시켰으며, 본 실험에서 설정한 6% 수준까지 첨가량의 증가에 따른 꾸준한 성적개선효과를 보여, 자돈사료내 거저리 유충의 첨가 가능수준은 최소 6%를 넘는 것으로 사료된다.

[참여기업-은진 바이오]

실험 1. 거저리 및 거저리 활용 원료사료의 영양성분 및 유효성분 검사를 통한 거저리의 사료화 특성규명

1. 서론 (Introduction)

세계 곤충산업의 시장규모는 07년 11조원이었으며, 2020년에는 38조원까지 늘어날 전망으로 이미 세계 각국은 곤충산업을 국가 전략산업으로 지정하여 정책적으로 육성되어 왔다. 국내에서는 2009년 “곤충산업의 육성 및 지원에 관한 법률”이 제정되고, 2010년 8월에 동 법이 시행됨에 따라 이제 국가 정책적으로 곤충산업이 체계적으로 발전될 수 있는 기반이 마련되고 있는 실정이다. 현재 국내 곤충산업은 식용, 약용, 애완, 생태학습 등 기초적인 단계이며 사료 및 식의약용분야는 이제 조성이 시작되고 있는 상태이며, 이중 사료용 곤충은 식용 및 약용곤충과 함께 향후 블루오션 시장으로 꼽히고 있으나 아직은 초기적인 사육기반을 갖추고 있다. 국내에서도 2000년 이후부터 곤충산업에 대한 투자가 본격적으로 시작되었으며, 국내 곤충산업의 시장 규모는 2009년 1,570억원으로 추정되며 2015년까지 3,000억 규모로 성장될 것으로 전망되고 있다.

곤충은 번식이 매우 빠르고 유기물의 순환에 기여하여, 대사 과정에서 식물체의 단백질을 매우 효율적으로 곤충 단백질로 변화하여 축적한다. 곤충은 먹이사슬에서 첫 번째 포식자로 자연계에서 매우 높은 바이오매스를 차지하고 있으며, 식용이 가능한 곤충류의 단백질함량은 약 44~70% 수준으로(Ramos-Elorduy, 1987) 사람이나 가축의 일반적인 동물성 단백질 섭취원인 육류 이상의 단백질을 함유하고 있다. 이외에도 곤충은 지방, 광물질 및 비타민 등의 공급원으로 활용이 가능하며, 이러한 곤충의 영양적 가치는 현재까지 113개국에서 약 1,500종의 곤충이 식용으로 활용된다는 점에서 증명된다.

곤충이 가축의 사료로 활용될 수 있는 조건은 무엇보다 영양소의 이용효율에 있다. 식물성 단백질은 곤충의 체내에서 동물성 단백질로 합성되고 축적되며, 뼈나 내장같이 가공과정에서의 유실되는 부분이 거의 없어 소나 돼지 등의 가축에 비해 4배에서 최고 9배 수준의 효율적으로 영양소를 축적한다. 곤충체는 보통 필수 아미노산이 풍부하며, 귀뚜라미, 동애등에, 메뚜기, 거저리 등은 여러 연구를 통해 동물사료에 단백질원으로서의 우수한 가치가 입증되어왔다. 곤충의 아미노산 조성은 대부분의 경우에서 곡물이나 두과류에 비해 우수한 것으로 알려져 있으며 단쇄 불포화 지방산이 풍부하여 지방의 이용효율 또한 기대할 수 있다.

지금까지 알려진 여러 곤충 중 갈색거저리는 딱정벌레의 일종으로 세계전역에 걸쳐 서식하며 반려동물의 사료뿐만 아니라 네덜란드와 멕시코를 비롯한 남미, 유럽, 중국에서 식용으로 널리 사용되고 있다. 거저리의 유충인 밀웜은 설치류나 파충류 및 조류의 사료로 이용되어왔으며 깃털 등 가축들이 활용하기 어려운 다양한 물질을 섭취할 수 있고 영양적 가치가 매우 높

다 (Gourlet 등, 1978). 거저리의 영양적 가치는 methionine 함량을 제외하면 우유단백질인 카제인이나 농축대두단백과 비슷한 것으로 알려져 있으며, 갈색거저리(Tenebrio molitor)의 유충의 영양적 가치와 생산방법에 대한 다양한 연구들이 진행되어왔다.(Hernandez 1987; Legunes와 Garcia, 1994).

곤충의 가축 사료화는 새로운 단백질 원료의 개발이라는 측면에서 고무적인 일이지만 사료화에 앞서 해결해야 할 문제점 또한 존재한다. 곤충을 사료화 하는데 있어서 가장 큰 문제 중 하나는 표준화된 사양방법이 개발되지 않은 곤충의 경우 대상곤충이 섭취하는 물질에 따라 단백질 품질에 차이가 크다는 점이며, 이로 인해 곤충의 사료가치를 평가하기가 어렵다는 점이다. 밀웜의 영양성분이 섭취한 물질에 따라 변동이 심하다는 것이 증명되었으며 (Ramos-elorduy 등, 2002), 최종생산물의 영양소 변이는 곤충의 사료화에 있어서 치명적인 문제가 된다. 따라서 본 연구는 거저리를 동물사료로 활용하기 위하여 밀기울을 섭취 거저리의 성장단계 및 형태별 영양소 함량과 사료가치를 증명하기 위해 수행되었다.

2. 재료 및 방법 (Materials and Methods)

1) 일반성분 분석 (Proximate analysis)

일반성분 분석은 AOAC(1990)방법에 준하였으며, 수분함량은 105℃ 건조법으로, 조단백질은 조단백질 분석기(Kjeltec 2200, Foss, Sweden)를 이용하여 분석하였다. 조지방은 Soxhlet 추출법을 이용하였고, 조회분은 회화로(JR11-402, 현대화공(주), 대한민국)에서 600℃로 8시간동안 회화시킨 후 그 함량을 백분율(%)로 나타내었다.

2) 광물질 분석 (Mineral analysis)

거저리 원료사료의 광물질 조성은 서울대학교 동물영양학 생화학실 분석 프로토콜에 따라 전처리되었으며 서울대학교 농생명과학공동기기원(NICEM)에 의뢰하여 분석하였다.

3) 아미노산 분석 (Amino acid analysis)

거저리 원료의 아미노산 조성은 Beckman 6300 Amino Acid Analyzer (Beckman Instruments Corp., Palo Alto, CA)를 이용하여 ninhydrin법으로 분석하였으며. 전처리는 stable amino acid 계열 (Lys 등)의 경우 염산처리방법이, 황함유 아미노산 (Met, Cys) 계열의 경우 과개미산 전처리 방법이 사용되었다.

4) 지방산 분석 (Fatty acid analysis)

거저리 원료들의 지방산 조성은 AOAC(2000)에 방법에 준하였으며, gas chromatography(Agilent, US)로 분석되었다.

3. 실험 결과 및 고찰 (Results and Discussion)

1) 일반성분 및 주요 광물질 분석

거저리의 유충, 성충 및 사육배지 (탈피각+분)의 일반성분과 광물질 함량을 분석한 결과 유충, 성충 및 배지의 수분 함량은 각각 6.34%, 6.31% 및 9.05%로 열풍 건조를 하여도 배지의 수분함량이 소량 높은 것으로 나타났다 (표 1). 단백질 원료로 가장 중요한 항목인 조단백질 함량은 각각 43.27%, 59.77% 및 18.03%로 성충의 조단백질 함량이 가장 높았으며 Ramos-Elorduy 등 (2002)의 연구 결과와 유사한 함량을 보였다 (유충 47.7%, 성충 60.2%, DM bases). 이는 육류 15.2~34.7%나 어류 10.4~47.7%와 (KFDA 2011) 비교했을 때 거저리의 성충과 유충의 조단백질 함량이 우수한 편인 것으로 사료된다. 양돈 산업에서 주요 단백질 원료로 활용되는 대두박이나 어분과 비교할 경우 거저리 유충은 탈피 대두박 수준, 성충은 어분의 단백질을 대체할 만한 가능성을 보여준다고 볼 수 있으며, 탈피각과 분의 경우 주 단백질 원료로 활용하기에는 부족한 단백질 함량을 나타냈다 (그림 1).

거저리 원료들의 조지방 함량은 약 32.93%, 14.60% 및 2.99%로 나타나 유충의 경우 지방의 함량이 매우 높았으며 성충 또한 대두박이나 어분에 비해 높은 것으로 조사되었다. 이는 거저리 원료를 사료 내 에너지원으로 활용할 수 있다는 것을 의미하나, 어분 이상으로 빠른 산패를 초래할 가능성 또한 고려해야 할 것으로 사료된다.

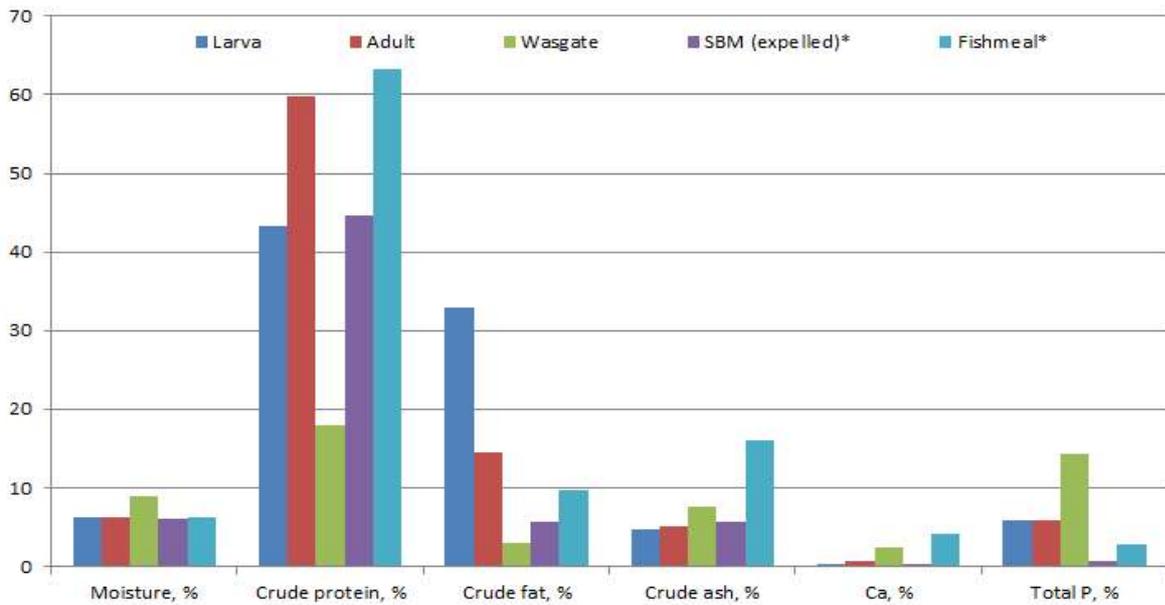
거저리 유충, 성충 및 배지의 조회분 함량은 각각 3.86%, 5.16% 및 7.57%였으며 사육 배지의 칼슘 및 인의 함량이 매우 높게 나타났다. 이는 배지의 주 성분이 거저리의 탈피과정에서 발생한 탈피각이기 때문인 것으로 사료된다. 인 함량의 경우 기존의 대두박이나 어분에 비해 전체적으로 높게 나타났다.

표 1. 갈색거저리의 일반성분 및 광물질 함량

	Larva	Adult	Wastage ¹⁾
Proximate analysis, %			
Moisture	6.34	6.31	9.05
Crude protein	43.27	59.77	18.03
Crude fat	32.93	14.60	2.99
Crude ash	4.86	5.16	7.57
Mineral, mg/kg			
Calcium	376	805	2,547
Magnesium	1,716	1,650	5,115
Phosphate	5,840	5,840	14,451

¹⁾ Wastage: exuvium and excreta

그림 1. 거저리 원료와 기존 단백질 원료사료의 성분 비교



(NRC, 2012)

2) 아미노산 분석

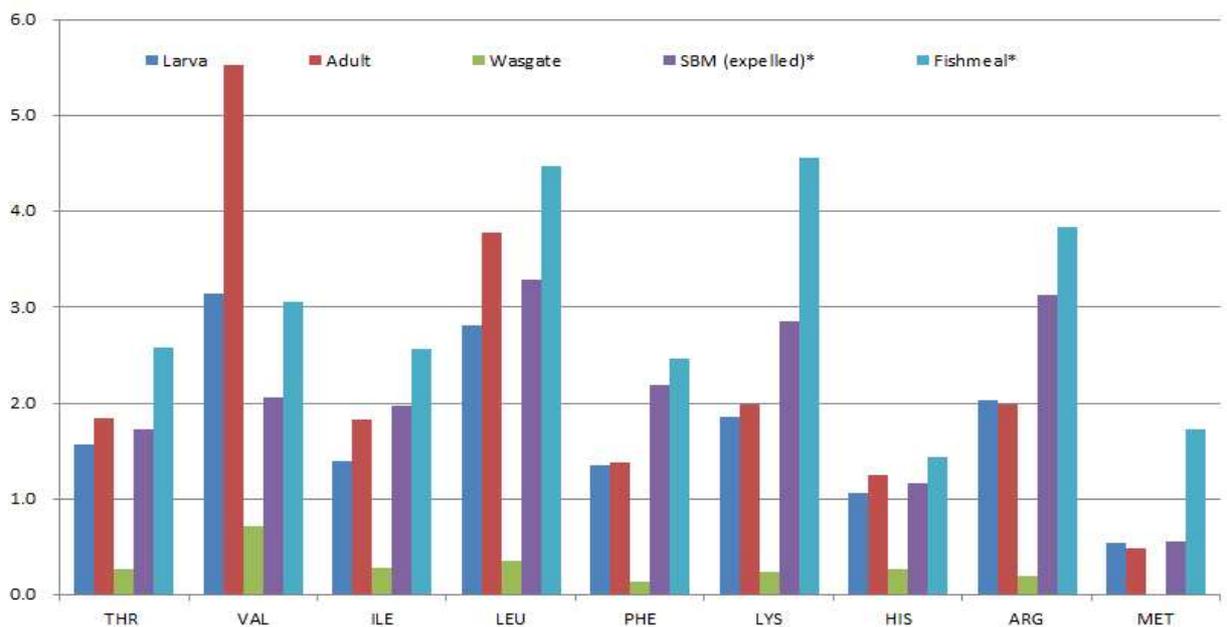
거저리의 유충, 성충 및 사육배지 (탈피각+분)의 아미노산 분석 결과, 아미노산 함량이 조 단백질 함량에 비해 다소 떨어지는 것으로 나타났다. 거저리 유충과 성충은 valine과 leucine의 함량이 상대적으로 높은 것으로 조사되었다. 자돈의 사료에서 부족하기 쉬운 제한아미노산 중 lysine의 경우 유충 1.74%, 성충 1.86%로 대두박이나 어분에 비해 다시 낮게 나타났다. 기존의 연구에서 methionine이 거저리의 주요 제한아미노산으로 밝혀졌으나 (Goulet 등, 1978; Ramos-Elorduy 등, 2002), 본 실험에서의 분석결과에서는 거저리의 유충 및 성충의 methionine 함량이 대두박과 유사한 것으로 나타났고 어분에 비해서는 부족한 것으로 조사되었다. 거저리의 유충 및 성충의 threonine 함량 또한 대두박과 유사하였다. 거저리 사육배지의 경우 탈피각과 거저리의 배설물은 조단백질 함량에 비해 아미노산 함량이 매우 낮은 것으로 나타났으며 아미노산 조성 또한 조약하여 가축의 단백질 원료로 활용하기에는 부적절한 것으로 사료된다. 아미노산의 분석결과를 바탕으로 판단하면 거저리의 유충과 성충은 단백질 원료로써 대두박과 유사하게 활용될 수 있을 것이라고 추정된다.

표 2. 갈색거저리의 아미노산 조성 (DM bases)

	Larva	Adult	Wastage ¹⁾
Amino acids, %			
ASP	3.07	3.38	0.46
THR	1.57	1.84	0.27
SER	1.86	1.89	0.29
GLU	4.57	4.76	0.76
GLY	2.04	4.00	0.56
ALA	3.15	3.48	0.36
VAL	3.14	5.52	0.72
ILE	1.39	1.83	0.28
LEU	2.81	3.78	0.36
TYR	2.63	1.76	<0.01
PHE	1.36	1.38	0.14
LYS	1.86	1.99	0.24
HIS	1.07	1.25	0.28
ARG	2.03	1.99	0.20
PRO	2.23	2.41	0.22
MET	0.54	0.49	<0.01
CYS	0.35	0.42	0.15
Total	35.66	42.15	5.07

¹⁾ Wastage: exuvium and excreta

그림 2. 거저리 원료와 기존 단백질 원료사료의 아미노산 조성 비교 (DM bases, %)



(NRC, 2012)

3) 지방산 조성

거저리 유층, 성층, 유층 배지 및 성층 배지 혼합물의 지방산 조성은 표 3.에 나타내었다. 거저리 유층의 경우 지방 함량 기준 57.055 %의 지방산 함량을 보였으며, 거의 대부분이 C18 불포화 지방산 함량에서 비롯되었다. 특히 1번, 9번 탄소 및 2번, 6번 탄소에 이중결합이 있는 불포화 지방산이 전체 지방산 함량의 각각 40.8 %, 33.6 %를 차지하는 것으로 밝혀졌다.

거저리 유층 배지의 경우 거저리 유층에 비해 상대적으로 낮은 수준의 지방산 함량을 나타내었으며(48.633 %), 거저리 유층과 마찬가지로 C18 불포화 지방산의 함량이 많은 부분을 차지하였다.

C18 불포화 지방산의 경우 불포화 지방산에서 상당히 중요한 역할을 하는 불포화 지방산이며 특히 2, 6번 탄소 불포화 지방산의 경우 전지 대두에도 많이 포함되어있는 지방산으로 알려져 있어, 거저리 유층 및 유층 배지가 사료 배합에 있어서 전지 대두를 대체할 가능성이 있을 것으로 생각된다.

거저리 성층 배지에는 80.376 %의 지방산이 포함되어있는 것으로 나타났으며 거의 대부분이 C15 불포화 지방산인 것으로(92.7 %) 추정된다. C15:1 지방산은 pentadecenoic acid라 불리며 원료 사료로 쓰이는 물질들 중에는 우지에 포함되어있는 물질이기 때문에, 거저리 성층 배지의 경우 우지를 대체할 가능성이 있을 것으로 생각된다.

표 3. 거저리 원료의 지방산 조성

Criteria	거저리 유층	거저리 유층+배지	거저리 성층+배지
Fatty acid analysis, %			
C4			
C6			
C8			
C10			
C11			
C12			
C13			
C14	1.626	1.465	
C14:1			
C15	4.053	2.711	5.860
C15:1		5.753	74.516
C16	5.324	3.797	
C16:1	1.208	0.801	
C17			
C17:1			
C18	1.370	0.918	
C18 1n9 c and	23.263	17.295	
C 18 2n6 c and	19.157	14.397	
C18 3n6	1.054	1.496	
C18 3n3			
C20			
C20:1			
C20:2			
C20 3n6 and C21			
C20 3n3			
C20 4n6			
C20 5n3			
C22			
C22 1n9			
C22:2			
C23			
C24			
C22 6n3 and C24			
Total	57.055	48.633	80.376

4. 결론

본 실험은 거저리 및 거저리 활용 원료사료의 영양성분 및 유효 성분 검사를 통해 거저리와 그 부산물이 사료화 하였을 경우 가질 수 있는 특성들을 규명하기 위해 진행되었다.

거저리 유충, 성충 및 사육 배지의 일반성분 결과 건조 거저리 및 배지 상태에서도 수분 함량이 다소 있는 것으로 나타났으며, 영양소 함량 중 조단백질 수준이 유충, 성충 및 배지에서 가장 많은 함량을 차지하는 것으로 나타났다(43.27 %, 59.77 %, 18.03 %). 거저리 유충의 경우 탈피 대두박 수준, 성충의 경우 어분 수준의 조단백 함량을 보이기 때문에 현재 사용되는 단백질 원료를 대체하는 데에 문제가 없을 것으로 생각되며, 배지의 경우 상대적으로 다른 원료에 비해 조단백 수준이 떨어지는 것으로 나타났다. 거저리 원료들의 조지방 함량은 32.93%, 14.60% 및 2.99%로 유충에서 그 함량이 특히 높은 것으로 나타났으며 이는 거저리 원료가 고에너지 원료 사료로 사용될 수 있음을 나타내고 있다. 다만 지방 함량이 높기 때문에 지방 산패가 일어날 가능성이 다소 높음에 주의하여 사용해야 할 것이다. 조회분 함량은 각각 3.86%, 5.16% 및 7.57%였으며 특히 칼슘과 인 함량이 높게 나타났다.

아미노산의 경우 아미노산의 함량이 조단백질 함량에 비해 다소 떨어지는 것으로 나타났으며 배지의 경우 단백질 및 아미노산 원료로써 동물 사료에 사용되기에는 적절하지 않을 정도로 낮은 수준을 보였다. 유충 및 성충의 아미노산 분석 결과, 일반적인 원료 사료에서 제한되기 쉬운 아미노산 중 lysine 함량의 경우 대두박이나 어분 등의 원료에 비해 다소 낮은 수준을 보였다. 다른 제한 아미노산인 methionine의 경우 대두박과 유사한 수준인 것으로 나타나 아미노산 원료로써 대두박과 유사하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

지방산의 경우 거저리 부산물 종류에 상관없이 불포화 지방산 함량이 높은 수준인 것으로 나타났으며, 유충과 유충 배지의 경우 C18 불포화 지방산이, 성충 배지의 경우 C15 불포화 지방산이 높은 함량을 보였다. 따라서 유충과 유충 배지의 경우 전지 대두와 유사한 지방산 조성을 보였기 때문에 전지 대두의 대체제로써 사용이 가능할 것으로 생각되며, 성충의 경우 우지와 비슷한 수준의 지방산 조성을 보이기 때문에 우지의 대체제로써 사용이 가능할 것으로 생각된다.

제 8 절 2년차(2013년~2014년)

제2협동과제: 대상축종에서 곤충사료의 사양기술 및 활용방안 개발

실험 1. 자돈 사료 내 거저리 성충의 수준별 첨가가 자돈의 성장에 미치는 영향 규명 및 적정 첨가 수준 결정

1. 서 론 (Introduction)

이유는 돼지의 일생에 있어서 가장 중요한 시기로, 자돈은 고품사료를 효율적으로 이용할 수 있는 소화 능력을 얻기 전에 모돈에서 격리가 되고 기존에 섭취하던 모유에서 곡물위주의 고품 사료에 적응해야 하게 된다. 이는 환경변화와 함께 자돈에게 큰 스트레스를 유발하게 되며, 성장정체나 설사를 발생시키게 되는 주원인이 된다. 따라서 자돈사료는 유제품이나 건조혈청, 어분 등의 기호성이 뛰어나며 이용성이 높은 동물성 단백질 원료를 첨가하여 배합하는 것이 일반적이다. 하지만 동물성 단백질 원료는 대두박 등 식물성 단백질에 비해 가격이 높으며, 최근 광우병 등 질병에 대한 우려로 인해 동물성 단백질 대한 신뢰가 떨어져 새로운 대체 원료에 대한 요구가 커지고 있다.

일반적으로 식용으로 쓸 수 있는 곤충은 약 1,500종이 있으며 이중 대부분의 종들이 단백질 원료로서 동물사료에 사용될 수 있다(Liew 등 2001). 이러한 곤충 중 거저리는 세계전역에 걸쳐 서식하며 곡물 및 곡류 부산물 등에 해를 끼치는 해충이나, 갯털 등 다양한 물질을 섭취할 수 있고 영양적 가치가 매우 높아 오래전부터 관심이 되어왔다(Gourlet 등, 1978). 특히 갈색거저리 (*Tenebrio molitor*)의 성충인 밀웜은 귀뚜라미와 더불어 설치류나 파충류 및 조류의 생사료로 가장 널리 활용되고 있는 곤충 자원으로, Ramos-elorduy 등(2002)의 연구에서 거저리 성충을 육계사료에 10% 수준까지 첨가하여도 사양성적에서 대조구와 차이가 나타나지 않았다고 보고하였다. 따라서 거저리의 자돈사료에 적용은 다른 동물에서와 같이 동물성 단백질 원료로의 활용가능성이 높을 것으로 사료되며, 곤충시장의 확대에 기여하리라 추정되지만, 갈색 거저리의 돼지에서의 급여효과는 현재까지 연구가 거의 이루어지지 않았으며 중화권을 중심으로 연구가 시작되고 있는 시점에 있다.

본 연구의 선행 실험에서 거저리의 성충이 자돈에서의 이용성이 높은 것이 처음으로 제시되었으며, 본 연구는 자돈사료에서 거저리 갈색거저리 성충을 수준별로 급여하여 자돈사료에서의 적정 첨가가능 수준을 검증하기 위해 수행되었다.

2. 재료 및 방법 (Materials and Methods)

1) 실험 동물 및 실험 설계

28 ± 3일령에 이유한 평균 체중 7.50 ± 1.323 kg의 삼원 교잡종 ([Yorkshire x Landrace] x Duroc) 이유자돈 80두를 공시하여, 전체 4처리 5반복 돈방 당 4두씩 성별과 체중에 따라 난괴법 (RCBD; Randomized Completely Block Design)으로 배치하였다. 사양 실험은 Phase I 2주, Phase II 3주로 나누어 총 5주간 진행되었다. 실험의 처리구는 NRC(2012)의 영양소 요구량을 충족하는 기초사료를 급이한 처리구를 대조구로 설정하고 기초사료의 어분3%를 1%, 2%, 및 3%를 거저리 성충으로 대체하여 총 4개 처리구를 구성하였다.

2) 실험 사료

실험사료는 옥수수-대두박 위주의 기초사료(basal diet)에 어분 3%를 첨가하고, 처리구별로 거저리 성충을 1%, 2% 및 3%를 어분 대신 첨가하고 기타 원료사료들을 조정하여 자돈의 성장단계에 따라 영양소 요구량 (NRC, 2012)에 맞거나 초과하게 배합하였다. 실험사료의 대사에너지 (ME; metabolizable energy)는 Phase I (0~2주), Phase II (3~5주) 모두 3300 kcal/kg으로 설정하였으며, 단백질 함량은 Phase I 에 20.56%, Phase II 에 20.09%로, 라이신 (lysine)의 함량은 Phase I 에 1.35%, Phase II 에 1.23%에 맞춰 배합하였다. 기타 아미노산, 비타민 및 광물질 요구량 또한 NRC(2012)의 요구수준과 같거나 높은 수준으로 충족시켰으며, 실험사료의 원료 및 화학적 조성은 표 1 (phase I), 표 2 (phase II)에 제시하였다.

표 1. 실험사료의 사료배합비와 성분표 (Phase I)

Ingredients, %	Control	<i>Tenebrio molitor</i> Imago		
		1%	2%	3%
Corn	24.08	24.23	25.78	27.38
SBM	27.58	30.58	29.10	27.59
Whey powder	3.00	3.00	3.00	3.00
Lactose	8.00	8.00	8.00	8.00
Barley	25.00	25.00	25.00	25.00
Wheat bran	3.60	2.36	1.70	1.00
Soy-oil	2.72	2.50	2.06	1.61
Fish meal	3.00	0.00	0.00	0.00
<i>Tenebrio Molitor</i> Imago	0.00	1.00	2.00	3.00
DCP	1.65	1.51	1.50	1.49
Limestone	0.30	0.67	0.69	0.72
L-Lysine-HCl	0.39	0.44	0.46	0.49
DL-met	0.08	0.11	0.11	0.12
Vit. Mix	0.10	0.10	0.10	0.10
Min. Mix	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20
Choline-Cl(25%)	0.10	0.10	0.10	0.10
ZnO	0.10	0.10	0.10	0.10
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical Composition ³⁾				
ME (kcal/kg)	3,300	3,300	3,300	3,300
CP (%)	20.56	20.56	20.56	20.56
Lysine (%)	1.35	1.35	1.35	1.35
Methionine (%)	0.40	0.39	0.39	0.40
Ca (%)	0.80	0.80	0.80	0.80
Total P (%)	0.65	0.65	0.65	0.65

¹⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D3,1,600IU; vitamin E, 32IU; d-biotin, 64g; riboflavin, 3.2mg; calcium pantothenic acid, 8mg; niacin, 16mg; vitamin B12, 12g; vitaminK, 2.4mg.

²⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1mg; I, 0.3mg; Mn, 24.8mg; CuSO₄, 54.1mg; Fe, 127.3mg; Zn, 84.7mg; Co, 0.3mg.

³⁾ Calculated values

표 2. 실험사료의 사료배합비와 성분표 (Phase II)

Ingredients, %	Control	<i>Tenebrio molitor</i> Imago		
		1%	2%	3%
Corn	35.59	34.60	35.60	36.44
SBM	26.31	29.29	27.78	26.21
Whey powder	0.00	0.00	0.00	0.00
Lactose	4.00	4.00	4.00	4.00
Barley	25.00	25.00	25.00	25.00
Wheat bran	1.68	1.01	0.79	0.75
Soy-oil	2.18	2.32	2.01	1.74
Fish meal	3.00	0.00	0.00	0.00
<i>Tenebrio Molitor</i> Imago	0.00	1.00	2.00	3.00
DCP	0.89	1.24	1.25	1.25
Limestone	0.51	0.62	0.63	0.64
L-Lysine-HCl	0.29	0.35	0.36	0.39
DL-met	0.05	0.07	0.08	0.08
Vit. Mix	0.10	0.10	0.10	0.10
Min. Mix	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20
Choline-Cl(25%)	0.10	0.10	0.10	0.10
ZnO	0.00	0.00	0.00	0.00
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical Composition ³⁾				
ME (kcal/kg)	3,300	3,300	3,300	3,300
CP (%)	20.09	20.09	20.09	20.09
Lysine (%)	1.23	1.23	1.23	1.23
Methionine (%)	0.37	0.36	0.36	0.36
Ca (%)	0.70	0.70	0.70	0.70
Total P (%)	0.60	0.60	0.60	0.60

¹⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D3,1,600IU; vitamin E, 32IU; d-biotin, 64g; riboflavin, 3.2mg; calcium pantothenic acid, 8mg; niacin, 16mg; vitamin B12, 12g; vitaminK, 2.4mg.

²⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1mg; I, 0.3mg; Mn, 24.8mg; CuSO4, 54.1mg; Fe, 127.3mg; Zn, 84.7mg; Co, 0.3mg.

³⁾ Calculated values

3) 사양 실험

사양실험은 경기도 수원시 소재의 서울대학교 부속실험목장에서 수행되었으며, 콘크리트-슬랫 바닥에 $1.90 \times 2.15 \times 0.40$ m 크기의 돈방에서 사육되었다. 각 돈방에는 하나의 사료 급이기와 니플 급수기가 설치되어 전체 실험 기간 동안 물과 사료를 자유 채식 (*ad libitum*)하도록 하였다. 돈방 온도는 실험 개시 후 첫 일주일간은 31℃를 유지하였으며, 매주 1℃씩 낮추어 4주차에는 28℃를 유지하게 하였다. 사양실험은 각각 Phase I 2주, Phase II 3주 총 5주간 진행되었다. 체중 및 사료 섭취량은 사육 단계 및 사료 종류의 변동 시점을 고려하여, 실험 개시(Initial)기간을 기점으로 2주차와 5주차에 측정하여 일당증체량 (average daily gain; ADG), 일일사료섭취량 (average daily feed intake; ADFI), 사료효율 (gain/feed ratio; G/F ratio)을 계산하였다.

4) 혈액 성상

혈중 요소태질소 (BUN : Blood Urea Nitrogen) 및 IGF-1을 조사하기 위해 실험 개시 시점에 임의적으로 6두의 경정맥에서 혈액을 채혈하였으며, 실험 개시 이후에는 각 사육단계별 체중 측정 시 각 처리별로 6두씩 총 24두의 혈액을 채취하였다. 혈액은 disposable culture tube에 포집하여 3,000 rpm, 4℃ 상태에서 15분 동안 원심분리 하였다. 분리된 혈청은 micro tube에 옮겨서 분석 시까지 -20℃에 보관하였다. 혈청의 BUN과 IGF-1은 각각 자동생화학 분석기 (ADVIA 1650, Japan)와 호르몬 분석기 (Immulite 2000, DPC, SUA)를 이용하여 분석되었다. 면역 성상 측정에 필요한 IgG (Immunoglobulin G), IgA (Immunoglobulin A)는 보관된 혈액을 ELISA 분석방법으로 측정하였다 (ELISA Starter Accessory Package, Pig IgG ELISA Quantitation Kit, Pig IgA ELISA Quantitation Kit; Bethyl).

5) 통계 분석

통계분석은 SAS의 General Linear Model (GLM)을 이용하여 수집된 자료의 유의성을 검정하였다. 성장성적의 경우 돈방을 experimental unit으로 설정하였으며, 혈액분석과 영양소 소화율의 경우 각 개체를 unit으로 설정하였다. 거저리 성충의 첨가수준의 증가에 따른 효과를 추정하기 위해 orthogonal polynomial contrast를 통해 거저리 성충의 첨가수준에 따른 linear 및 quadratic effect를 조사하였으며, $P < 0.05$ 인 경우 유의차가 있는 것으로, $P < 0.01$ 인 경우 고도의 유의차가 있는 것으로 간주하였다. $0.05 \leq P < 0.10$ 일 경우 경향이 있는 것으로 고려하였다.

3. 실험 결과 및 고찰 (Results and Discussion)

1) 사양성적 (Feeding trial)

자돈 사료 내 거저리 성충의 첨가가 자돈의 성장성적에 미치는 영향을 표 3에 나타내었다.

모든 체중에서 거저리 성충 첨가량에 대한 유의적 차이는 나타나지 않았다. 또한, 일당 증체량이나 사료섭취량에서도 유의적 차이를 찾지 못했다. 이는 선행연구에서 거저리로 사료 중의 어분을 대체하기 위하여 거저리를 사용하였을 때, 어분을 급여한 처리구와 비슷한 성장성적 결과를 얻었는데, 이러한 결과의 주요 원인은 거저리의 우수한 향미가 자돈의 소화액의 분비를 자극하고 장내의 소화운동을 촉진함에 기인한다고 평가하였다 (Yang 등., 2010)

따라서 본 실험의 결과는 자돈사료에서 기존 단백질 원료를 거저리 성충으로 대체하였을 때 성장성적에 영향을 끼치지 않는다고 할 수 있으며, 최대 3%를 첨가하여도 사양성적에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

표 3. 이유자돈 사료 내 거저리 성충의 첨가가 이유자돈의 성장성적에 미치는 영향¹⁾

	Control	<i>Tenebrio molitor</i> Imago			SEM ²⁾	P-value	
		1%	2%	3%		Lin.	Quad.
Initial	7.50	7.50	7.50	7.50			
2 wk	12.80	12.46	12.87	12.69	0.436	0.97	0.89
5 wk	24.82	23.75	24.84	24.38	0.692	0.41	0.66
Average daily gain, g							
0-2 wk	379	354	383	371	15.2	0.54	0.62
2-5 wk	578	538	566	553	14.4	0.36	0.96
0-5 wk	497	465	495	441	13.9	0.73	0.62
Average daily feed intake, g							
0-2 wk	492	496	523	524	18.0	0.88	0.14
2-5 wk	1044	888	1007	956	34.8	0.14	0.79
0-5 wk	823	731	813	783	25.3	0.17	0.59
Gain/feed rate							
0-2 wk	0.767	0.709	0.733	0.709	0.0093	0.80	0.56
2-5 wk	0.557	0.624	0.564	0.583	0.0170	0.31	0.66
0-5 wk	0.605	0.647	0.610	0.571	0.1597	0.23	0.25

¹⁾ A total of 80 crossbred pigs were fed from average initial body weight 7.50 ± 1.323 kg

²⁾ Standard error of means.

2) 혈액 성분(Blood urea nitrogen, IGF-1)

자돈 사료 내 거저리 성충의 첨가가 자돈의 혈중 요소태질소(BUN; blood urea nitrogen)와 혈중 IGF-1 분비에 미치는 영향을 표 5에 나타내었다. BUN은 아미노산의 이용에 대한 대표적인 지표로 사용되어 왔다(Eggum, 1970). BUN은 단백질 섭취와 그 품질에 직접적인 연관성을 가지는 것으로 알려져 있으며 (Eggum, 1970; Hahn 등, 1995), 섭취한 질소의 체내 유지에 관련이 있고 밝혀졌다 (Whang과 Easter, 2000). 본 실험결과, 사양실험기간 동안 전 실험개체의 BUN농도 범위는 9.03~18.05mg/dl로 일반적인 BUN 수치를 나타내었다. 5주차에서는 거저리 성충의 첨가에 따라 유의적인 BUN의 감소가 발견되었다 (linear and quadratic effect, $P < 0.01$).

인슐린 유사 성장인자(IGF-1)는 성장호르몬의 자극으로 분비되며 조직들의 성장과 분화에 관여하는 인자로 심혈관계의 구조와 기능의 조절에도 중요하고 뼈의 성장에도 매우 중요한 역할을 한다 (Bayes-Genis, 2000). 또한 IGF-1은 성장에 관하여하는 세포에 에너지를 공급하는 역할을 하며, 자돈의 성장과 밀접한 관계를 가진다. 본 실험의 결과 모든 phase 에서 자돈 사료내 거저리 성충의 첨가는 혈중 IGF-1의 농도에 유의적인 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다.

혈액성상의 분석결과를 종합하면 자돈사료 내 거저리 성충의 첨가는 BUN을 감소시키고 혈중 IGF-1에는 영향을 끼치지 않는 것으로 사료되며, 이러한 결과는 거저리 성충의 첨가수준이 증가할수록 자돈의 조단백질과 질소이용률이 높아진 영양소 소화율 실험과 맥락을 같이하며, 거저리 성충이 단백질 원료로써 어분을 대체 가능한 것으로 사료된다.

표 4. 자돈 사료 내 거저리 성충의 첨가가 이유자돈의 BUN 및 IGF-1 농도에 미치는 영향

	Control	<i>Tenebrio molitor</i> Imago			SEM ¹⁾	P-value	
		1%	2%	3%		Lin. ²⁾	Quad. ²⁾
BUN, mg/dL							
Initial	14.70	14.70	14.70	14.70			
2 week	13.87	11.58	14.20	13.48	0.584	0.28	0.38
5 week	18.05 ^A	13.47 ^B	9.03 ^C	10.95 ^{BC}	0.866	<0.01	<0.01
IGF-1, ng/mL							
Initial	43.90	43.90	43.90	43.90			
2 week	173.17	159.90	138.73	144.13	11.971	0.64	0.26
5 week	222.37	208.83	209.68	218.20	12.215	0.68	0.95

¹⁾ Standard error of means.

²⁾ Lin.: linear value, Quad.: quadratic value.

^{ABC} Means in a same row with different superscript letters significantly differ (P<0.05)

3) 면역 성장(IgG, IgA)

거저리 성충의 첨가가 자돈의 면역형성에 미치는 영향을 표 6 에 나타냈다. 면역글로부린 G (IgG)는 전체 사양기간에서 처리구 간 유의적 차이를 나타내지 않았으며, 면역글로부린 A(IgA) 또한 이유 후 2주차 와 5주차에서 처리구 간의 유의적 차이는 나타나지 않았다.

몇몇 선행 연구에서는 거저리에 포함되어 있는 키틴 성분이 면역 성장에 복잡한 반응을 나타낸다고 보고되었으며 (Lee 등., 2008), 이 복잡한 반응은 동물의 면역 상태를 증진시킨다고 하였다 (Harikrishnan 등., 2012). 반면에, 거저리에 포함되어 있는 벤조퀴논 성분은 동물 사료에서 독으로 작용될 수 있다고 Wu 등이 2009년에 발표 하였다.

하지만 본 실험의 전체 사양 기간 동안의 거저리 첨가 수준에 따른 혈청 내 IgG 와 IgA 의 농도에 악영향이 없었으므로, 최대 3%까지의 거저리 성충의 첨가는 어분 3% 를 대체 가능 할 것으로 사료된다.

표 5. 자돈 사료 내 거저리 성충의 첨가가 이유자돈의 IgG 및 IgA 농도에 미치는 영향

	Control	<i>Tenebrio molitor</i> Imago			SEM ¹⁾	P-value	
		1%	2%	3%		Lin. ²⁾	Quad. ²⁾
IgG, mg/ml							
Initial	4.42	4.42	4.42	4.42			
2 week	2.12	1.98	1.93	2.09	0.098	0.23	0.34
5 week	4.23	3.80	3.58	4.24	0.102	0.06	0.20
IgA, mg/ml							
Initial	0.44	0.44	0.44	0.44			
2 week	1.57	1.53	1.58	1.61	0.092	0.71	0.98
5 week	2.22	2.09	2.10	2.18	0.123	0.68	0.95

¹⁾ Standard error of means.

²⁾ Lin.: linear value, Quad.: quadratic value.

4. 결론 (Conclusion)

본 연구는 자돈 사료 내 거저리 성충의 첨가가 자돈의 성장성적, 혈액성상에 미치는 영향을 규명하여 거저리 성충의 적정 첨가수준을 조사하기 위해 수행되었다.

자돈의 성장성적에서는 거저리 성충의 첨가수준이 증가함에 따라 전체 사양기간동안 자돈의 성장 성적에는 영향을 끼치지 않았으며, 결과적으로 5주간의 사양기간동안 거저리 성충의 자돈 사료 내 첨가는 어분을 함유하고 있는 대조구와 비슷한 사양 성적을 나타내었다.

혈중 BUN과 IGF-1 농도를 분석한 결과, 거저리 성충의 첨가수준이 증가할수록 자돈의 질소이용률이 증가하게 되어 혈중 BUN농도가 감소하는 효과가 나타났으며, 혈중 IGF-1농도에는 아무런 영향을 끼치지 않았다. 사료 내 거저리 성충의 첨가수준이 증가함에 따라 혈중 BUN농도가 감소하는 결과는 거저리 성충의 첨가가 자돈사료의 질소이용률을 향상시키며, IGF-1에 있어서는, 체내에서 IGF-1의 분비에 악영향을 끼치지 않는 것으로 사료된다.

혈중 IgG 와 IgA 농도에서도, 거저리 성충을 3% 까지 첨가하여도 유의적 차이가 나타나지 않았다.

결론적으로 자돈 사료 내 거저리 성충의 첨가는 자돈기 5주간에 걸쳐 자돈의 영양소 이용률을 개선하고 다른 사양성적에서 악영향을 끼치지 않고, 본 실험에서 설정한 3% 수준이 대조구의 어분 3% 와 비슷한 성장성적을 내는 것으로 보아, 자돈사료내 거저리 성충의 첨가가 어분을 대체할 것으로 사료된다.

실험 2. 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 유충원료의 사료 내 첨가효과 규명

1. 서론 (Introduction)

중국의 경제 성장에 따른 육류소비량이 증가함에 따라서 축산업은 성장세를 보이고 있으며, 이러한 성장세 중 사료산업의 급격한 발전이 이루어지고 있는 상황이다. 양돈 배합사료에는 옥수수나 대두박, 밀, 보리 등이 많이 사용되고 있다. 이 중에서 대두박은 가격이 높고 양질의 단백질의 공급원으로 사용되는 원료로 최근 세계의 이상기후로 인한 공급량 감소 추세에 따라 지속적으로 가격이 상승하고 있다. 이러한 상황 속에서 대두박을 대체할 수 있는 단백질 원료를 찾기 위한 연구에 대한 관심이 증가하고 있으며, 이러한 연구 중 동물성 사료원료 중 곤충을 첨가하는 연구가 활발히 이루어지고 있다.

곤충은 단백질과 지방, 및 광물질을 풍부히 함유하여 영양소 함량도 높고, 특히 단백질 함량 및 이용률이 높아 식물성 단백질 원료의 대체원으로 관심을 받았다(Aguilar-Miranda 등., 2002; Hardouin 등., 2003). 일반적인 곤충의 단백질함량은 40-75g/100g으로 육분의 단백질함량과 비슷하며, 일부 곤충들은 육분에 비하여 많은 필수지방산과 리놀레익산 및 리놀레닉산을 함유하고 있으며 다량의 아연과 철분이 함유하고 있는 것으로 조사되었다(De Foliart, 1989). Ramos-elorduy 등(2002)의 연구에서 거저리를 육계사료에 10% 수준까지 첨가하였을 경우 사양성적이 대조구와 비교하여도 차이가 없었다고 발표하였으며, 신 등(2012)도 곤충원료인 거저리를 육계에 급여하여도 사료섭취량, 성장 및 육질에 부정적인 영향이 나타나지 않았으며, 김 등(2013)의 연구에서도 거저리 유충을 6%까지 증량 급여하였을 때 이유자돈의 성적에 유해한 영향이 없다고 밝혔다. 이러한 연구결과와 더불어 사료자원으로 거저리의 이용은 저단가의 고품질 단백질 원료의 공급원으로 이용가능 할 수 있으며, 품질 및 안전성을 확보하여 대량생산체계를 구축할 경우 대두박을 대체할 수 있는 단백질사료 시장을 개척할 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 본 연구를 통하여, 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 유충원료의 사료 내 첨가 통하여 자돈 사료 내 거저리 첨가 효과를 규명하고자 한다.

2. 재료 및 방법 (Materials and Methods)

1) 실험 동물 및 실험 설계

28 ± 3일령에 이유향 평균 체중 6.82 ± 0.222kg인 삼원 교잡종 ([Yorkshire x Landrace] x Duroc) 이유자돈 128두를 공시하여, Phase I 2주, Phase II 3주로 총 5주 동안 사양실험을 수행하였다. 전체 4처리 8반복 돈방 당 4두씩 성별과 체중에 따라 난괴법(RCBD; Randomized Completely Block Design)으로 배치하였다. 실험의 처리구는 다음과 같다. 1)control (대조구) : basal diet ; NRC (2012)의 요구량을 충족시키는 corn-soy bean meal based diet, 2) Larva 6% : basal diet + 12령 거저리 유충 6%, 3)

Finish/Larva 6% : basal diet + 유충 종령 거저리 6%, 4) Pupa 6% : basal diet + 거저리 번데기 6% 로 구성하여 실험을 수행하였다.

2) 실험 사료

옥수수-대두박 위주로 실험사료의 기초사료(basal diet)를 배합하였으며, 사육단계에 따라 영양소 요구량 (NRC, 2012)을 고려하여 배합을 실시하였다. 실험사료의 대사에너지 (ME; metabolizable energy)는 Phase I (0~2주)에 3300.00kcal/kg 이었고, Phase II (2~5주)에 3300.00kcal/kg 이었다.

단백질 함량은 Phase I 에서 20.56%, Phase II에서 18.88%로, 라이신(lysine)의 함량은 phase I 에서 1.35%, Phase II에서 1.23%에 맞춰 배합하였다. 거저리원료는 처리구별로 거저리 유충 6%, 노숙 거저리 6%, 거저리 번데기 6% 가 각각 첨가되었으며, 옥수수와 대두박을 통해 영양소 요구량을 충족시켜 주었다. 조단백질, 비타민, 미량광물질 및 다른 영양소들은 NRC (2012)의 요구수준과 같거나 높게 배합하였으며, 주요 실험사료의 원료 및 화학적 조성은 표 1 (phase I), 표 2 (phase II)에 제시된 바와 같다.

표 1. 실험사료의 사료배합비와 성분표(Phase I)

Ingredients, %	Control	Larva 6%	Finish/ Larva 6%	Pupa 6%
Corn	26.20	26.00	24.89	25.25
SBM-44	32.44	25.34	26.66	26.30
Whey powder	3.00	3.00	3.00	3.00
Lactose	8.00	8.00	8.00	8.00
Barley	25.00	25.00	25.00	25.00
wheat bran	0.00	3.35	3.18	3.15
Soy-oil	2.09	0.00	0.00	0.00
DCP	1.45	1.45	1.42	1.42
Limestone	0.70	0.76	0.75	0.75
L-Lysine · HCl	0.42	0.40	0.40	0.43
DL-methionine	0.10	0.10	0.10	0.10
Vit. Mix ¹⁾	0.10	0.10	0.10	0.10
Min. Mix ²⁾	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20
Choline-Cl(25%)	0.10	0.10	0.10	0.10
ZnO	0.10	0.10	0.10	0.10
Larva	0.00	6.00	0.00	0.00
Finish/Larva	0.00	0.00	6.00	0.00
Pupa	0.00	0.00	0.00	6.00
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition ³⁾				
ME, kcal/kg	3300.00	3300.06	3300.00	3300.06
CP, %	20.56	20.56	20.56	20.56
Lysine, %	1.35	1.35	1.35	1.35
Methionine, %	0.39	0.39	0.39	0.39
Ca, %	0.80	0.80	0.80	0.80
Total P, %	0.65	0.65	0.65	0.65

¹⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D₃, 1,600IU; vitamin E, 32IU; d-biotin, 64g; riboflavin, 3.2mg; calcium pantothenic acid, 8mg; niacin, 16mg; vitamin B₁₂, 12g; vitamin K, 2.4mg.

²⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1mg; I, 0.3mg; Mn, 24.8mg; CuSO₄, 54.1mg; Fe, 127.3mg; Zn, 84.7mg; Co, 0.3mg.

³⁾ Calculated values

표 2. 실험사료의 사료배합비와 성분표 (Phase II)

Ingredients, %	Control	Larva 6%	Finish/ Larva 6%	Pupa 6%
Corn	32.76	35.17	34.09	34.45
SBM-44	26.91	20.11	21.43	21.06
Lactose	4.00	4.00	4.00	4.00
Barley	30.00	30.00	30.00	30.00
wheat bran	0.75	1.84	1.63	1.61
Soy-oil	2.72	0.00	0.00	0.00
DCP	1.27	1.27	1.24	1.24
Limestone	0.57	0.62	0.62	0.62
L-Lysine · HCl	0.43	0.41	0.41	0.44
DL-methionine	0.09	0.08	0.08	0.08
Vit. Mix ¹⁾	0.10	0.10	0.10	0.10
Min. Mix ²⁾	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20
Choline-Cl(25%)	0.10	0.10	0.10	0.10
ZnO	0.00	0.00	0.00	0.00
Larva	0.00	6.00	0.00	0.00
Finish/Larva	0.00	0.00	6.00	0.00
Pupa	0.00	0.00	0.00	6.00
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition ³⁾				
ME, kcal/kg	3300.07	3300.06	3300.09	3300.05
CP, %	18.88	18.88	18.88	18.88
Lysine, %	1.23	1.23	1.23	1.23
Methionine, %	0.36	0.36	0.36	0.36
Ca, %	0.70	0.70	0.70	0.70
Total P, %	0.60	0.60	0.60	0.60

¹⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D₃, 1,600IU; vitamin E, 32IU; d-biotin, 64g; riboflavin, 3.2mg; calcium pantothenic acid, 8mg; niacin, 16mg; vitamin B₁₂, 12g; vitamin K, 2.4mg.

²⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1mg; I, 0.3mg; Mn, 24.8mg; CuSO₄, 54.1mg; Fe, 127.3mg; Zn, 84.7mg; Co, 0.3mg.

³⁾ Calculated values

3) 사양 실험

사양실험은 경기도 수원시 소재의 서울대학교 부속실험목장에서 수행되었으며, 콘크리트-슬랫 바닥에서 $1.90 \times 2.15 \times 0.40 \text{ m}^2$ 크기의 돈방에서 사육되었다. 각 돈방에는 하나의 사료 급이기와 니플 급수기가 설치되어있어 전체 실험 기간 동안 물과 사료는 무제한 자유 채식 (*ad libitum*)하도록 하였다. 돈방 온도는 실험 개시 후 첫 일주일간은 30°C 를 유지하였으며, 매주 1°C 씩 낮추어 4주차에는 27°C 를 유지하게 하였다. 사양실험 기간은 각각 Phase I 2주, Phase II 3주 총 5주간 진행되었다. 체중 및 사료 섭취량은 사육 단계 및 사료 종류의 변동 시점을 고려하여, 실험 개시(Initial)기간을 기점으로 2주차와 5주차에 측정하여 일당증체량 (average daily gain; ADG), 일일사료섭취량 (average daily feed intake; ADFI), 사료효율 (gain/feed ratio; G/F ratio)을 계산하였다.

4) 영양소 소화율

처리당 3 두씩 평균체중 $15.66 \pm 1.77\text{kg}$ 인 삼원교잡종 ([Yorkshire \times Landrace] \times Duroc) 거세돈 12두를 완전임의배치법 (CRD; completely randomized design)으로 대사틀에 1 두씩 배치하였다. 5일의 적응기를 가진 뒤 6일째부터 본 실험을 개시하였다. 사료를 매일 오전 7시와 오후 7시에 156g 씩 급여하였으며, 물은 자유롭게 채식하도록 하였다. 실험 개시 시 급여하는 사료량의 0.5% 만큼 산화크롬 (Cr_2O_3)을 칭량하여 개시 지시제로 사용하였으며 실험 종료 시에는 급여하는 사료량의 0.5% 만큼 산화철 (Fe_2O_3)을 칭량하여 종료 지시제로 사용하였다. 분 채취는 분에서 산화크롬을 확인한 시점부터 산화철을 확인할 때까지 실시하였다. 뇨는 실험기간 동안 매일 오후 7시에 채취하였다. 암모니아의 증발을 막기위해 뇨 수집용기에 $0.1\text{N H}_2\text{SO}_4$ 용액 50ml 를 첨가하였으며 유리섬유를 뇨 수집용기에 설치하여 여과한 뇨를 채취하였다. 실험기간 동안 채취한 뇨는 샘플별로 $2,000 \text{ ml}$ 로 mass up 한 뒤 100 ml 씩 튜브에 담고 분은 무게를 잰 뒤 -20°C 의 냉동고에 분석까지 보관하였다. 채취가 끝난 뒤 분은 샘플별로 60°C drying oven에서 72시간 건조한 후 Wiley mill (1mm 스크린)을 이용하여 분쇄하였다. 분, 뇨의 일반 성분 분석을 위해 AOAC (1995) 방법으로 건물, 수분, 조단백, 조지방, 조회분, 조섬유 등을 분석하였다.

5) 혈액 성분

실험 개시 시 혈중 요소태질소 (BUN : Blood Urea Nitrogen) 및 IGF-1을 조사하기위해 임의적으로 경정맥에서 6두의 혈액을 채혈하였으며, 실험 개시 일 이후에는 각 사육단계별 체중 측정시 처리별로 6두씩 총 24두의 혈액을 채취하였다. 혈액은 disposable culture tube에 포집하여 $3,000 \text{ rpm}$, 4°C 상태로 15분 동안 원심분리 하였다. 그 후 micro tube 보관용기에 혈청만을 분리하여 분석 시까지 -20°C 로 보관하였다. BUN은 자동생화학 분석기 ADVIA 1650, Japan을 이용하여 분석하였다. IGF-1은 호르몬 분석기를 이용하여 분석하였다 (Immulite 2000, DPC, SUA).

6) 통계 분석

사료, 분 및 뇨의 일반성분 분석은 AOAC(1995) 방법에 따라 실시하였으며, 본 실험의 data는 SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC)의 Mixed procedure를 이용하여 난괴법 실험 design으로서 통계분석을 실시하였다. 성장성적 data의 경우 한 돈방이 experimental unit으로 (RCBD), 혈액성상, 영양소 소화율의 경우 실험돈 1두가 experimental unit으로 (CRD) 설정하였다. 유의적 차이는 SAS (Saxton, 1998)의 PDMIX800 macro를 이용하여 문자로 구분되었다. 모든 통계적 분석에 있어 $P < 0.05$ 인 경우 유의차가 있는 것으로, $P < 0.01$ 인 경우 고도의 유의차가 있는 것으로 간주하였다.

3. 실험 결과 및 고찰 (Results and Discussion)

1) 사양성적 (Feeding trial)

이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가가 자돈의 성장성적에 미치는 영향을 표 3에 나타내었다. 사양실험 결과, 0-2주차 그리고 3-5주차 기간 동안 자돈의 체중, 증체량, 사료섭취량 그리고 사료효율에서 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가에 따른 통계적 유의차가 발생하지 않았다. 이는 대조구(control)와 비교해보았을 때, 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료 첨가한 사료를 급여한 자돈의 성장성적에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

Viroje and Malin (1989) 거저리 유충을 이유자돈 사료에 첨가하여 사양실험 결과 체중, 일당증체량, 사료 효율에 있어서 부정적인 영향을 미치지 않는다는 결과와 맥락이 일치하였으며, Makkar 등 (2014) 거저리 유충을 육계사료에 첨가하여 사양실험을 하였을 때 사양성적에 부정적인 영향을 미치지 않는다는 연구결과와 일치하였다.

본 실험결과를 바탕으로 거저리 원료의 사육기간에 따른 이유자돈 사료 내 거저리원료의 첨가는 이유자돈 성장성적에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

표 3. 이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가가 이유자돈의 성장 성적에 미치는 영향¹⁾

Item	Treatments				SEM ²⁾	P-value
	Control	Larva 6%	Finish/ Larva 6%	Pupa6%		
Body weight, kg						
Initial	6.83	6.81	6.83	6.81	0.222	
2 wk	8.66	8.77	8.59	8.55	0.301	0.94
5 wk	18.83	18.24	17.98	18.06	0.567	0.77
Average daily gain, g						
0-2 wk	130	142	125	124	8.248	0.90
3-5 wk	484	450	447	452	14.386	0.62
0-5 wk	343	327	318	321	11.195	0.76
Average daily feed intake, g						
0-2 wk	259	233	226	229	8.101	0.45
3-5 wk	673	633	644	636	16.964	0.72
0-5 wk	466	433	435	432	11.787	0.57
Gain/feed rate						
0-2 wk	0.492	0.593	0.551	0.510	0.026	0.52
3-5 wk	0.718	0.714	0.691	0.709	0.010	0.82
0-5 wk	0.731	0.756	0.728	0.737	0.010	0.65

¹ 12 pigs were used from an average initial BW of 15.66 ± 1.77 kg

² Standard error of mean.

2) 영양소 소화율 (Nutrient digestibility)

거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가가 자돈의 영양소 소화율에 미치는 영향을 표 4에 나타내었다. 본 연구에서 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가에 따른 이유자돈의 영양소 소화율을 측정된 결과, 건물(dry matter), 조단백질(crude protein), 조지방(crude fat), 조회분(ash)의 소화율에는 처리구간에 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 질소 축적률에서도 처리구간의 유의적인 차이는 보이지 않았다.

Pretorius 등 (2011) 거저리 유충과 거저리 번데기를 이유자돈 사료에 첨가하여 소화율 분석을 실시한 결과 거저리 유충 그리고 번데기를 첨가한 처리구에서 유의적인 차이를 보이지 않았던 결과와 맥락이 일치하였다.

결론적으로 자돈 사료내 거저리 유충의 사육기간에 따른 첨가는 자돈의 건물, 조단백질, 조회분의 소화율에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

표 4. 이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가가 이유자돈의 영양소 소화율에 미치는 영향¹

Item	Treatments				SEM ²⁾	P-value
	Control	Larva 6%	Finish/ Larva 6%	Pupa6%		
Nutrient digestibility, %						
Dry matter	89.95	89.04	88.06	87.37	0.553	0.41
Crude protein	90.95	90.10	90.48	89.05	0.588	0.79
Crude ash	67.95	65.59	57.10	55.70	2.167	0.07
Crude fat	65.68	63.67	60.33	55.45	1.871	0.25
N-retention, g/day						
N-intake	8.98	9.03	9.21	9.34		
N-feces	0.81	0.89	0.88	1.04	0.054	0.64
N-urine	3.43	3.76	4.25	4.58	0.233	0.23
N-retention	4.74	4.38	4.08	3.72	0.214	0.38
N-digestibility	52.78	48.46	44.11	40.23	2.409	0.26

¹ 12 pigs were used from an average initial BW of 15.66 ± 1.77 kg

² Standard error of mean.

³ N retention = N intake (g) - Fecal N (g) - Urinary N (g)

3) 혈액 정상(Blood urea nitrogen, IGF-1)

이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가가 이유자돈의 BUN (blood urea nitrogen)과 IGF-1에 미치는 영향에 대해서 표 5에 나타내었다. 혈중 내 BUN의 농도는 사료 내 단백질의 공급과 연관이 있으며 체내에서는 식이아미노산과의 관계와 부의 상관관계 (negative correlation)를 갖는다(Eggum, 1970). 그래서 BUN의 농도는 체내의 단일 아미노산과 단백질 요구량의 지표로 사용되어왔다 (Cai 등, 1996; Taylor 등, 1982; Coma 등, 1995).

실험 전 구간에 걸쳐서 BUN의 혈중 농도는 처리구간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 결과적으로 이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가는 혈액 내 IGF-1 농도에 유의적인 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

IGF-1은 성장호르몬의 자극에 의해 분비되며 조직의 성장과 분화에 관여하여 성장이 필요

한 세포에 에너지를 공급하는 역할을 한다. 또한, 가장 중요한 기능으로 심혈관계의 구조와 기능의 조절과 뼈의 성장에도 매우 중요한 역할을 한다(Bayes-Genis, 2000). 실험 전 구간에 걸쳐서 IGF-1의 혈중 농도는 처리구간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 결과적으로 이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가는 혈액 내 IGF-1 농도에 유의적인 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

표 5. 이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가가 이유자돈의 혈액 성장에 미치는 영향

Item	Treatments				SEM ¹	P-value
	Control	Larva 6%	Finish/ Larva 6%	Pupa6%		
BUN						
Initial	13.70	13.70	13.70	13.70		
2 week	14.70	32.48	15.18	36.63	6.382	0.341
5 week	11.80	12.87	10.85	11.70	0.394	0.198
IGF-1						
Initial	33.88	33.88	33.88	33.88		
2 week	90.51	74.75	83.35	51.03	6.198	0.135
5 week	35.10	21.60	16.82	25.37	12.132	0.855

¹ Standard error of mean.

4) 폐사율(Mortality)

사양실험 기간 동안 이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가가 이유자돈의 폐사율에 미치는 영향을 조사하였다. 총 5주간의 사양실험동안 128두의 이유자돈 실험돈 중 폐사는 총 5마리 발생하였으며, 결과적으로 총 폐사율 3.9% 미만으로 실험 종료되었다. 각 처리구당 1마리씩의 폐사가 발생한다. 대조구 1두, 거저리 유충을 6%첨가한 처리구 2두, 거저리 노숙유충을 6%첨가한 처리구 1두 그리고 거저리 번데기 6% 첨가한 처리구 1두가 폐사하였다. 하지만 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가가 이유자돈의 폐사율에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다. 이러한 이유로 이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가는 영양적인 측면이나 건강성 측면에서 부정적인 영향을 끼치지 않아 폐사율이 낮은 것으로 사료된다.

4. 결론 (Conclusion)

본 연구는 이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가가 자돈의 성장성적, 혈액성상 및 영양소 소화율에 미치는 영향을 규명하고자 수행되었다.

거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가는 자돈의 성장성적에 있어 전 구간 (Phase1, Phase2)에 자돈의 체중, 증체량, 사료섭취량 그리고 사료효율에서 처리구간에 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 자돈의 성장성적에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

영양소 소화율을 측정한 결과, 건물(dry matter), 조단백질(crude protein), 조지방(crude fat), 조회분(ash)의 소화율에는 처리구간에 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 질소 축적률에서도 처리구간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이는 Pretorius 등 (2011) 거저리 유충과 거저리 번데기를 이유자돈 사료 내 첨가하여 소화율 분석을 실시한 결과 소화율에 부정적인 영향을 미치지 않는다는 연구결과 같은 맥락을 보였다.

혈중 BUN과 IGF-1 농도를 분석한 결과, 일당사료섭취량에서는 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가는 BUN 수치에 영향을 주지 않는 것으로 나타났으며, 혈중 IGF-1농도 또한 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가는 IGF-1 농도에 유의적인 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

사양실험 기간 동안 총 폐사율 3.9% 미만으로 나타났으며, 이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가는 영양적인 측면이나 건강성 측면에서 부정적인 영향을 끼치지 않아 폐사율이 낮은 것으로 사료된다.

결론적으로 자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가는 자돈의 성장성적, 영양소 소화율, 혈액성상 그리고 폐사율에 유해한 영향을 주지 않는다.

실험 3. 거저리 원료사료의 형태에 따른 임신 포유돈의 생리 변화 규명

1. 서론 (Introduction)

전세계적으로 곤충산업에 대한 높은 관심과 투자로, 곤충산업의 시장규모는 2007년 11조원이었으며, 2020년에는 38조원까지 늘어날 전망으로, 세계 각국은 곤충산업을 국가전략산업으로 지정하여 정책적으로 육성하고 있는 실정이다. 아시아 지역에서는 특히 식의약품 곤충시장의 규모가 특징적으로 확대되고 있다. 곤충 사료화 시장은 조류, 어류, 파충류 등 애완동물 사료를 중심으로 발달되어 있으며 아직까지 양계 및 양돈 등의 가축을 대상으로 하는 단백질 원료로는 생산되고 있지는 않고 있다.

현재 국내 곤충산업은 식용, 약용, 애완 등 초보단계이며 사료 및 식의약품분야는 이제 조성이 시작되고 있는 단계이지만, 또한 사료용 곤충의 대량생산체계 및 1차 가공방법 등의 개발이 이루어지고 있는 사육기반이 초기단계이다. 국내에서는 갈색거저리를 사료용 곤충으로 도입하여 단백질 원료로써 이용성을 높이고자 지속적인 연구가 진행 중에 있다. 일반적으로 곤충사료의 영양소 이용효율이 식물성 원료에 비해 높아 단백질 원료로서의 가치가 높다. 거저리의 단백질은 곤충의 체내에서 동물성 단백질로 합성되고 축적되며, 뼈나 내장같이 가공과정에서의 유실되는 부분이 거의 없어 소나 돼지 등의 가축에 비해 4배에서 최고 9배 수준의 효율적으로 영양소를 축적할 수 있으며, 동물성 단백질의 특성상 높은 이용률을 가지게 된다. 곤충체는 보통 필수 아미노산이 풍부하며, 귀뚜라미, 동애등애, 메뚜기, 거저리 등은 여러 연구를 통해 동물사료에 단백질원료로서의 우수한 가치가 입증되어왔다. 곤충의 아미노산 조성은 대부분의 경우에서 곡물이나 두과류에 비해 우수한 것으로 알려져 있으며 단쇄 불포화 지방산이 풍부하여 지방의 이용효율 또한 기대할 수 있다. 이러한 곤충을 대상으로 개발한 사료개발은 매우 안전하고 저비용의 고품질 단백질 원료의 생산을 가능하게 할 수 있으며, 대량생산체계를 구축함으로써 품질 및 공급을 안정시킬 경우, 사료 내 대두박 및 어분 원료를 대체할 수 있는 단백질 원료사료 시장을 개척할 수 있을 것으로 사료된다.

새로운 단백질 사료원료자원의 개발을 위한 거저리 원료의 연구는 매우 고무적인 일이지만, 사료 내 거저리 원료 사용에 대한 검증시험은 필수적으로 수행되어야 하는 선결과제이다. 따라서 본 연구에서는 임신모돈에서 거저리 원료의 사료화 가능성을 조사하기 위하여 거저리 원료의 형태별 첨가효과에 관한 연구가 수행되었다.

2. 재료 및 방법 (Materials and Methods)

1) 실험 동물 및 실험 설계 (Experimental animal and design)

본 실험은 평균체중 240.1 ± 16.02 kg의 F1 교잡종 (Yorkshire \times Landrace) 경산 모돈 24두를 공시하여, 체중과 등지방 두께에 따라 4개 처리구에 완전임의배치법(CRD;

completely randomized design)으로 배치하여 수행되었다. 실험돈군은 임신돈 스톨($2.4 \times 0.64\text{m}^2$)에서 사양되었으며 종부 후 110일령에 분만틀(분만틀의 넓이 $2.5 \times 1.8\text{m}^2$, 높이 500mm)로 이동시켜 분만실험 및 포유기 실험을 진행하였다. 실험돈은 임신이 확정된 임신돈들을 대상으로 75일령부터 실험사료를 급여하였고 사료 급여량은 실험농장의 사료급여프로그램에 따라 조정되었다. 실험은 임신 75일령부터 시작하여 분만 시까지 임신기 사양실험을 진행하고 분만 후 포유 21일령까지 포유기 실험을 진행하였다. 실험처리구는 사료 내 거저리 원료의 종류별 첨가로 결정하였으며, 거저리 유충, 거저리 유충+배지, 거저리유충+성충의 거저리 원료를 준비하여 실험사료에 각각 3%씩 첨가하였다. 임신기 사양실험 중에는 배합된 처리구에 맞는 배합된 실험사료를 급여하였으며, 포유기 사양실험 중에는 동일한 포유모돈 시판사료를 급여하였다.

2) 실험 사료 (Experimental diet)

실험 사료는 옥수수-대두박 위주의 기초사료에 거저리 유충의 첨가수준을 점차적으로 증가시키며 배합하였으며, 거저리 원료사료는 대조구에 0% 첨가하고, 거저리 유충 처리구에는 거저리 유충 3%, 거저리유충+배지 처리구에는 유충과 배지를 각각 1.5%씩 첨가하였으며, 거저리유충+성충 처리구에는 거저리 유충과 성충을 각각 1.5%씩 첨가하여 거저리 원료사료를 첨가한 처리구는 총 3%의 거저리 원료를 첨가한 것으로 배합하였다. 실험사료는 기타 원료사료들을 조정하여 임신모돈의 영양소 요구량 (NRC, 1998)을 충족하도록 배합하였다. 임신돈 실험사료의 대사에너지 (ME; metabolizable energy)는 3,265 kcal/kg으로 설정하였으며, 조단백질 함량은 12.9%, 라이신(lysine)의 함량은 0.74%에 맞춰 배합하였다. 기타 아미노산, 비타민 및 광물질 요구량 또한 NRC(1998)의 요구수준과 같거나 높은 수준으로 충족시켰으며, 실험사료의 원료 및 화학적 조성은 표 1에 제시하였다. 포유돈 실험사료는 부경양돈농협에서 생산되는 포유모돈용 시판사료를 동일하게 급여하였다.

표 1. 실험사료의 사료배합비와 화학적 조성

Ingredients, %	Treatment ¹⁾			
	CON	L3	LW3	LA3
Corn	77.65	76.50	74.66	76.81
SBM-46	9.67	10.93	12.12	10.27
Tallow	0.89	0.23	0.87	0.52
Fishmeal	3.00	0.00	0.00	0.00
Wheat bran	5.00	5.00	5.00	5.00
<i>Tenebrio molitor</i> larva	0.00	3.00	0.00	1.50
<i>Tenebrio molitor</i> imago	0.00	0.00	1.50	1.50
<i>Tenebrio molitor</i> waste	0.00	0.00	1.50	0.00
L-lysine · HCl	0.32	0.36	0.39	0.41
DL-methionine	0.00	0.03	0.04	0.03
DCP	2.15	2.48	2.42	2.49
Limestone	0.72	0.87	0.90	0.87
Vit. Mix ²⁾	0.10	0.10	0.10	0.10
Min. Mix ³⁾	0.10	0.10	0.10	0.10
Choline chloride-50	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30
Sum	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical Composition ⁴⁾				
ME (kcal/kg)	3,265.04	3,265.10	3,265.10	3,265.11
CP (%)	12.90	12.90	12.90	12.90
Lysine (%)	0.74	0.74	0.74	0.74
Methionine (%)	0.24	0.23	0.23	0.23
Ca (%)	0.90	0.90	0.90	0.90
Total P (%)	0.70	0.70	0.70	0.70

¹⁾ Treatment: CON: corn-SBM based diet, L3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 3%, LW3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + waste 1.5%, LA3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + imago 1.5%.

²⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D3, 1,600 IU; vitamin E, 32 IU; d-biotin, 64g; riboflavin, 3.2mg; calcium pantothenic acid, 8mg; niacin, 16mg; vitamin B12, 12g; vitamin K, 2.4mg.

³⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1mg; I, 0.3mg; Mn, 24.8mg; CuSO₄, 54.1mg; Fe, 127.3mg; Zn, 84.7mg; Co, 0.3mg.

⁴⁾ Calculated values

3) 사양 실험 및 관리 (Growth trial and management)

본 실험에서 온도와 환기량은 환기팬과 자동제어장치에 의하여 자동으로 조절되었으며, 전체 실험기간 동안 물은 자유채식(*ad libitum*)토록 하였다. 사료는 임신기에는 각 처리구에 맞게 오전(8:30)에 일일 1회 급여하였으며 급여량은 2.4kg/일로 75일령부터 110일령까지 동일량을 급여하였다. 임신 110일령에 임신돈들을 분만사로 이동시켰으며 이동 후부터 분만시까지 사료를 단계적으로 감량 급여하여 분만에 대비하였다. 분만 후에는 4일령까지 제한 급이를 하다가 5일령부터는 각 처리구에 따라 물과 사료를 자유채식 (*ad libitum*)토록 하였다. 신생자

돈들은 출생 후 24시간 이내에 견치, 단미, 철분주사, 이각을 실시하였고, 각 그룹 안에서 양자를 보낸 후 실험이 개시되었고 수태지의 거세는 분만 후 3일령에 일괄적으로 이루어졌다.

4) 샘플 채취 (Sampling)

임신기 체중 및 등지방 두께 측정은 각각 임신 75일령, 95일령, 110일령에 시행되었다. 분만 종료 후 총산자수, 생존산자수, 사산 및 미라수가 기록되었으며 각 자돈의 체중과 복당 자돈체중을 측정하였다. 포유기에는 분만 24시간 이내와 21일령에 모돈의 체중 및 등지방 두께를 측정하였으며, 포유자돈의 체중과 사료섭취량을 측정하여 이를 바탕으로 사양성적을 계산하였다. 모돈의 모유성분을 조사하기 위해 혈관에 옥시토신 0.5 ml를 주사하여 젖 분비를 촉진한 후 돈유를 채취하여 유성분 분석기(MilkoScan FT20, FOSS Electric Co., Denmark)로 유지방(fat), 유단백질(protein), 락토오즈(lactose), 총 고형물(Total solid), 무지고형물(Solids not fat : SNF)을 측정하였다. 각 일령의 체중 측정 시 경정맥에서 혈액을 채취하였으며, 채집된 혈액은 4℃에서 3,000 rpm 으로 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고 분석 전까지 냉동보관(-20℃)하였다.

5) 통계 분석

통계분석은 SAS의 General Linear Model (GLM)을 이용하여 수집된 자료의 유의성을 검정하였다. 성장성적의 경우 개별 모돈을 experimental unit으로 설정하였으며, 혈액분석과 모유분석의 경우 각 개체를 unit으로 설정하였다. 통계분석에 따른 유의성 검정시, $P < 0.05$ 인 경우 유의차가 있는 것으로, $P < 0.01$ 인 경우 고도의 유의차가 있는 것으로 간주하였다. $0.05 \leq P < 0.10$ 일 경우 경향이 있는 것으로 고려하였다.

3. 실험 결과 및 고찰 (Results and Discussion)

1) 임신기 체중 및 등지방 변화

임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가가 임신기 모돈의 체중 및 등지방 변화에 미치는 영향을 표 2에 제시하였다. 사양실험 결과, 거저리 원료의 형태별 첨가는 임신돈의 체중, 증체량, 등지방 두께 및 등지방 두께 변화에 유의적인 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 임신 75일령부터 임신돈 사료 내 거저리원료를 유충, 유충+배지, 유충+성충으로 3%까지 첨가하여도 임신돈의 체형변화에는 대조구와 동일한 성적을 내며, 부정적인 영향은 미치지 않는 결과인 것으로 사료된다.

표 2. 거저리 원료의 형태별 급여가 임신돈의 성장성적에 미치는 영향

Criteria	Treatment ¹⁾				SEM ²⁾	P-value
	CON	L3	LW3	LA3		
No. of sows	6	6	6	6		
Body weight, kg						
Initial (75 day)	240.7	240.0	245.4	234.3	3.34	0.66
90ay	249.3	245.6	254.6	241.5	3.47	0.54
110 day	270.1	269.2	275.7	265.9	3.72	0.83
BW gain(75-110d)	29.4	29.2	30.3	31.7	1.29	0.93
Backfat thickness, mm						
Initial (75 day)	20.4	21.7	21.3	21.3	0.91	0.98
90ay	20.1	20.3	21.4	22.2	0.85	0.84
110 day	21.0	22.3	21.6	22.2	0.82	0.96
BF gain(75-110d)	0.6	0.6	0.3	0.9	0.37	0.95

¹⁾ Treatment: CON: corn-SBM based diet, L3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 3%, LW3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + waste 1.5%, LA3%: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + imago 1.5%.

²⁾ Standard error of means.

2) 임신기 혈액성상

임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가가 임신기 모돈의 혈액성상에 미치는 영향을 표 3에 제시하였다. 임신기 모돈의 혈액을 75일령, 90일령, 110일령에 채취하여 분석한 결과, 거저리 원료의 형태별 첨가에 따른 임신 모돈의 혈중 glucose, insulin, BUN, total protein 농도에 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 대조구에 비해서도 차이가 나지 않았다. 혈중 FFA 농도에서는 90일령에 거저리 원료를 첨가한 처리구들의 혈중 농도가 대조구에 비해 유의적인 낮은 결과가 나타났지만(P=0.01), 110일령에서는 처리구간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

간 건강의 대표적인 지표로 사용되는 AST와 ALT농도에서는 거저리 원료의 형태별 첨가에 따른 대조구와 통계적 유의차는 나타나지 않았다. 이를 통해 임신돈 사료 내 거저리 원료사료의 형태별 첨가가 임신모돈의 혈액성상에 유의적인 영향을 미치지 않으며, 임신돈의 간 건강에도 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

표 3. 거저리 원료의 형태별 급여가 임신모돈의 혈액성상에 미치는 영향

Criteria	Treatment ¹⁾				SEM ²⁾	P-value
	CON	L3	LW3	LA3		
Glucose, mg/dL						
75 d	77.17	77.17	77.17	77.17		
90 d	63.50	71.25	73.50	69.00	2.318	0.57
110 d	73.00	69.50	73.50	75.00	1.321	0.60
Insulin, μ U/mL						
75 d	0.097	0.097	0.097	0.097		
90 d	0.065	0.096	0.104	0.102	0.010	0.51
110 d	0.067	0.079	0.074	0.112	0.007	0.12
BUN, mg/dL						
75 d	12.18	12.18	12.18	12.18		
90 d	9.78	12.30	9.70	10.75	0.512	0.34
110 d	10.55	11.10	9.38	10.45	0.461	0.71
Total protein, g/dL						
75 d	7.70	7.70	7.70	7.70		
90 d	7.73	7.95	7.43	7.45	0.089	0.18
110 d	7.23	7.15	6.83	7.10	0.105	0.69
FFA,						
75 d	42.67	42.67	42.67	42.67		
90 d	61.50 ^a	48.25 ^b	38.75 ^b	49.00 ^b	3.596	0.01
110 d	58.50	53.25	62.00	71.75	6.017	0.79
AST, U/L						
75 d	17.33	17.33	17.33	17.33		
90 d	17.75	19.25	17.50	17.50	1.109	0.85
110 d	14.75	16.25	30.50	15.15	3.526	0.38
ALT, U/L						
75 d	25.00	25.00	25.00	25.00		
90 d	33.50	30.25	27.50	30.00	0.780	0.10
110 d	30.00	27.25	26.00	26.75	0.922	0.42

¹⁾ Treatment: CON: corn-SBM based diet, L3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 3%, LW3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + waste 1.5%, LA3%: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + imago 1.5%.

²⁾ Standard error of means.

^{ab} Means in a same row with different superscript significantly different (P<0.05)

3) 분만 성적 (Reproductive performance)

임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가가 모돈의 번식성적에 미치는 영향을 표 4에 제시하였다. 총산자, 미라, 생시자돈수에서는 처리구간의 유의차가 나타나지 않았지만, 사산수(stillborn)에서 거저리 원료들을 첨가한 처리구들의 사산수가 대조구에 비해 유의적으로 감소하는 결과가 나타났다 (P=0.04). 복당 체중(litter weight) 및 자돈 체중(piglet weight)에서는 처리구간의 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 복당생시체중(alive litter weight) 및 생시자돈체중(alive piglet weight)에서도 처리구간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 이러한 결과를 종합하여볼 때, 거저리 원료를 형태별로 3%씩 첨가하여도 모돈의 분만성적에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

표 4. 거저리 원료의 형태별 급여가 임신돈의 분만성적에 미치는 영향

Criteria	Treatment ¹⁾				SEM ²⁾	P-value
	CON	L3	LW3	LA3		
Total born, pigs/litter	13.83	12.80	11.33	11.40	0.815	0.71
Still born, pigs/litter	2.17 ^a	1.00 ^{ab}	0.50 ^b	0.80 ^b	0.231	0.04
Mummy, pigs/litter	0.17	0.20	0.50	0.20	0.150	0.83
Born alive, pigs/litter	11.50	11.60	10.33	10.40	0.673	0.84
Litter weight, kg	19.36	19.48	18.64	18.93	0.768	0.97
Piglet weight, kg	1.40	1.52	1.65	1.66	0.058	0.66
Alive litter weight, kg	16.71	18.08	17.17	17.40	0.627	0.82
Alive piglet weight, kg	1.45	1.56	1.66	1.67	0.061	0.63

¹⁾ Treatment: CON: corn-SBM based diet, L3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 3%, LW3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + waste 1.5%, LA3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + imago 1.5%.

²⁾ Standard error of means.

^{ab} Means in a same row with different superscript significantly different (P<0.05)

4) 포유기 모돈의 체중 및 등지방 변화

임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가가 포유모돈의 포유기 체형변화에 미치는 영향을 표 5에 제시하였다. 3주간의 포유기 실험결과, 임신기의 거저리원료의 형태별 첨가사료를 급여한 모돈의 포유기 체형변화에는 대조구에 비해 차이가 없는 것으로 나타났다. 포유개시시 및 포유종료시(3주)의 체중과 등지방 두께 모두 처리구간의 통계적 유의차가 나타나지 않았으며, 각각의 체중변화량 및 등지방두께 변화량에서도 처리구간의 통계적인 유의차는 나타나지 않았다. 포유기 사료섭취량에서는 대조구의 사료섭취량이 다른 처리구들에 비해 수치적으로 높지만, 통계적으로 유의적인 차이가 나지는 않았다. 이유 후 재귀발정일(WEI)을 측정한 결과 처리구간의 통계적 유의차는 나타나지 않았지만, 거저리 유충과 성충을 혼합하여 첨가한 처리구의 WEI가 다른 처리구들에 비해 수치적으로 짧게 나타났다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때, 임신돈에 거저리원료를 다양한 형태로 급여하여도 포유기 모돈의 체형변화, 사료섭취량, 이유 후 재귀발정일이 대조구에 비해 유의적인 차이가 없으며, 부정적인 영향 또한 없는 것으로 사료된다.

표 5. 거저리 원료의 형태별 급여가 포유기 모돈의 체형변화에 미치는 영향

Criteria	Treatment ¹⁾				SEM ²⁾	P-value
	CON	L3	LW3	LA3		
No. of sows	6	5	5	6		
Body weight, kg						
24 hrs postpartum	237.3	241.9	240.5	240.7	3.22	0.98
Day 21 of lactation	234.8	242.3	230.0	240.5	3.63	0.67
Changes (0-21d)	-2.5	0.4	-10.5	-0.2	1.90	0.11
Backfat thickness, mm						
24 hrs postpartum	19.8	21.3	22.5	21.0	0.83	0.79
Day 21 of lactation	18.6	18.6	21.7	20.9	0.95	0.68
Changes (0-21d)	-1.2	-2.7	-0.8	-0.1	0.43	0.22
ADFI, kg	6.20	5.92	5.71	5.71	0.095	0.22
WEI, day	4.25	4.38	4.20	3.88	0.103	0.48

¹⁾ Treatment: CON: corn-SBM based diet, L3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 3%, LW3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + waste 1.5%, LA3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + imago 1.5%.

²⁾ Standard error of means.

5) 포유기 자돈의 성장 성적

임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가가 포유기 모돈의 포유성적에 미치는 영향을 표 6에 제시하였다. 3주간의 포유성적 결과에서, 처리구에 따른 포유개시두수 및 이유두수에서 처리구간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 복당체중 및 자돈체중에서도 포유개시시 및 포유 3주차에서 대조구와 거저리 처리구들 간에 통계적 유의차는 나타나지 않았다. 또한 복당증체량 및 자돈증체량에서도 처리구간에 통계적 유의차가 나타나지 않았다. 그러므로 임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가는 대조구에 비하여 포유기 모돈의 포유성적 및 자돈성적에 대등한 결과를 가지는 것으로 사료된다.

표 6. 거저리 원료의 형태별 급여가 포유자돈의 성장성적에 미치는 영향

Criteria	Treatment ¹⁾				SEM ²⁾	P-value
	CON	L3	LW3	LA3		
Cross-fostered, pigs	11.17	11.80	11.17	10.80	0.270	0.63
Weaned pigs	10.83	11.60	10.33	9.80	0.298	0.22
Litter weight, kg						
After cross-fostering	16.68	16.76	16.73	17.60	0.473	0.96
Day 21 of lactation	68.41	68.32	61.95	61.32	1.898	0.31
Weight gain, kg	51.73	51.56	45.21	43.72	1.785	0.19
Piglet weight, kg						
After cross-fostering	1.49	1.43	1.53	1.64	0.053	0.58
Day 21 of lactation	6.29	5.90	6.11	6.29	0.460	0.82
Weight gain, kg	4.80	4.48	4.58	4.64	0.142	0.90

¹⁾ Treatment: CON: corn-SBM based diet, L3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 3%, LW3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + waste 1.5%, LA3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + imago 1.5%.

²⁾ Standard error of means.

6) 포유기 혈액성상

임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가가 포유기 모돈의 혈액성상에 미치는 영향을 표 7에 제시하였다. 포유모돈의 혈액을 포유개시시 및 포유3주차에 채취하여 분석한 결과, 처리구에 따른 포유모돈의 혈중 FFA, glucose, insulin, BUN, total protein의 유의적인 효과는 나타나지 않았다. 그렇지만, 간건강을 나타내는 지표인 ALT항목에서 대조구에 비해 거저리 처리구들의 농도가 유의적으로 낮게 나타나는 결과를 보였다 ($P=0.03$). 거저리 원료의 첨가가 포유모돈의 혈중 ALT농도를 감소시키는 효과를 보였지만, 구체적으로 어떤 메카니즘으로 작용하는지에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가가 포유기 자돈의 혈액성상에 미치는 영향을 표 8에 제시하였다. 포유기 자돈의 혈중 FFA, BUN, total protein 농도에는 처리구간의 차이가 없었지만, 혈중 glucose농도에서는 거저리유충과 성충을 혼합한 처리구의 혈중 glucose농도가 다른 처리구들에 비해 높은 경향이 나타났다 ($P=0.08$). 포유자돈은 모돈으로부터 섭취한 젖을 통하여 영양분을 공급받음으로, 포유개시시의 포유자돈의 혈중 glucose가 높다는 것은 모돈의 태중에서 공급받은 glucose가 많이 축적되어 있었거나, 포유모돈의 양질의 초유를 공급받았다는 것을 의미하며, 포유초반 에너지원 공급이 다른 처리구들에 비해 원활하여 포유자돈의 건강, 성장, 체온유지에 긍정적인 영향을 줄 수 있는 것으로 사료된다. 포유자돈의 ALT와 AST농도에서는 대조구에 비해 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 결과적으로 임신돈 사료 내 거저리 유충+성충의 급여가 생시자돈의 혈중 glucose를 높여 포유자돈의 건강성 및 성장에 긍정적인 영향을 주는 것으로 사료된다.

표 7. 거저리 원료의 형태별 급여가 포유모돈의 혈액성상에 미치는 영향

Criteria	Treatment ¹⁾				SEM ²⁾	P-value
	CON	L3	LW3	LA3		
Free fatty acid, μ Eq/L						
24 hrs postpartum	297.3	365.3	339.0	525.5	71.77	0.77
21 d	332.3	169.3	191.3	222.8	66.71	0.85
Glucose, mg/dL						
24 hrs postpartum	93.3	92.0	105.3	91.3	2.43	0.19
21 d	72.0	78.8	72.8	82.3	4.73	0.87
Insulin, μ U/mL						
24 hrs postpartum	0.13	0.13	0.13	0.13	0.012	0.99
21 d	0.20	0.14	0.32	0.41	0.067	0.47
BUN, mg/dL						
24 hrs postpartum	11.2	11.4	13.9	11.1	0.71	0.40
21 d	17.6	18.0	16.3	19.4	0.79	0.67
Total protein, g/dL						
24 hrs postpartum	6.98	6.98	6.83	6.70	0.10	0.81
21 d	7.53	7.13	7.43	7.53	0.11	0.55
AST, U/L						
24 hrs postpartum	48.8	61.3	86.8	62.3	7.26	0.16
21 d	33.0	51.0	25.0	29.8	4.99	0.24
ALT, U/L						
24 hrs postpartum	28.3	29.0	29.3	26.3	0.86	0.59
21 d	37.0 ^a	32.8 ^{ab}	26.8 ^b	30.8 ^b	1.40	0.03

¹⁾ Treatment: CON: corn-SBM based diet, L3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 3%, LW3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + waste 1.5%, LA3%: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + imago 1.5%.

²⁾ Standard error of means.

^{ab} Means in a same row with different superscript significantly different (P<0.05)

표 8. 거저리 원료의 형태별 급여가 포유자돈의 혈액성상에 미치는 영향

Criteria	Treatment ¹⁾				SEM ²⁾	P-value
	CON	L3	LW3	LA3		
Free fatty acid, μ Eq/L						
24 hrs postpartum	269.5	232.3	288.5	216.0	30.48	0.87
21 d	343.5	397.3	333.3	388.3	29.33	0.86
Glucose, mg/dL						
24 hrs postpartum	104.0 ^B	117.3 ^{AB}	109.3 ^B	150.8 ^A	6.73	0.08
21 d	123.5	109.0	115.8	123.0	3.34	0.36
BUN, mg/dL						
24 hrs postpartum	21.2	18.2	16.1	21.4	1.20	0.30
21 d	10.8	10.5	10.8	8.8	0.55	0.11
Total protein, g/dL						
24 hrs postpartum	5.80	5.30	7.03	5.55	0.28	0.17
21 d	5.15	5.20	5.15	4.80	0.08	0.28
AST, U/L						
24 hrs postpartum	99.8	124.3	140.5	104.3	10.52	0.60
21 d	59.5	49.0	55.5	78.8	8.49	0.71
ALT, U/L						
24 hrs postpartum	27.8	30.8	36.0	31.0	2.73	0.82
21 d	32.5	35.8	29.0	38.8	1.86	0.35

¹⁾ Treatment: CON: corn-SBM based diet, L3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 3%, LW3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + waste 1.5%, LA3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + imago 1.5%.

²⁾ Standard error of means.

^{AB} Means in a same row with different superscript significantly different (P<0.10)

7) 유성분의 변화

임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가가 포유기 모돈의 혈액성상에 미치는 영향을 표 9에 제시하였다. 임신돈 사료 내 거저리 원료의 첨가가, 포유기 모돈의 유성분 조성에 미치는 영향을 조사한 결과, 거저리 원료의 형태별 첨가는 모유 내 카제인(casein), 유단백질(protein), 락토오스(lactose), 고형분(total solid), 무지고형분(solid not fat), 유리지방산(free fatty acid)조성에는 유의적인 영향을 미치지 못하였다. 그러나 초유 내 유지방 함량에서 거저리원료를 형태별로 첨가한 처리구들의 유지방 함량이 대조구에 비해 유의적 높은 경향이 나타났다 (P=0.07). 이를 통해, 임신기 사료 내 거저리 원료의 첨가는 포유돈의 초유 내 유지방함량을 높여주는 효과를 가지며, 거저리의 첨가 형태에 따른 큰 차이는 없는 것으로 사료된다.

표 9. 임신기 사료 내 거저리 원료의 형태별 첨가가 모유 성분에 미치는 영향

Criteria	Treatment ¹⁾				SEM ²⁾	P-value
	CON	L3	LW3	LA3		
Casein, %						
Colostrum	6.01	7.34	6.72	6.21	0.402	0.62
21 d	4.73	4.63	4.57	4.61	0.050	0.80
Fat, %						
Colostrum	5.53 ^B	7.74 ^A	7.12 ^{AB}	7.54 ^A	0.338	0.07
21 d	6.46	7.42	7.45	8.24	0.354	0.49
Protein, %						
Colostrum	7.56	9.47	8.50	7.95	0.584	0.66
21 d	5.26	5.07	5.15	5.03	0.061	0.60
Lactose, %						
Colostrum	4.63	3.95	4.56	4.23	0.180	0.52
21 d	6.17	6.13	5.81	5.94	0.099	0.62
Total solid, %						
Colostrum	19.86	24.04	22.63	22.13	0.762	0.22
21 d	19.33	20.03	19.90	20.77	0.354	0.68
Solid not fat, %						
Colostrum	12.69	13.97	13.46	12.59	0.456	0.63
21 d	11.67	11.38	11.14	11.15	0.106	0.33
Free fatty acid, %						
Colostrum	4.65	4.54	4.26	4.42	0.101	0.49
21 d	3.57	4.40	4.06	3.49	0.151	0.18

¹⁾ Treatment: CON: corn-SBM based diet, L3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 3%, LW3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + waste 1.5%, LA3%: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + imago 1.5%.

²⁾ Standard error of means.

^{AB} Means in a same row with different superscript significantly different (P<0.10).

4. 결론 (Conclusion)

본 연구는 임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가가 임신모돈의 번식성적, 포유성적, 혈액성상, 모유성분에 미치는 영향을 조사하기 위해 수행되었다. 본 연구를 수행한 결과, 임신기 모돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가는 모돈의 임신기 체형변화 및 포유기 체형변화에는 대조구와 차이가 없었으며, 번식성적 및 포유성적에서도 대조구에 비해 거저리 원료를 첨가한 처리구들의 성적에 차이가 나타나지 않았다. 임신기 및 포유기 모돈의 혈액성상에서는 거저리 원료의 형태별 첨가에 따른 부정적인 영향은 나타나지 않았으며, 포유자돈의 포유개시시 혈중 glucose가 높아지는 결과가 나타났다. 또한 초유 내 유지지방함량에서도 거저리원료를 첨가한 처리구들의 유지지방함량이 높아지는 효과를 기대할 수 있는 것으로 나타났다. 결론적으로 임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가는 대조구에 비해 모돈 및 자돈의 생산성 및 건강성에 부정적인 영향을 미치지 않으며, 초유의 유지지방함량을 높여주어 포유개시시의 자돈의 건강성에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료된다.

실험 4. 거저리 원료사료의 수준별 급여가 임신 모돈의 생리적 변화와 분만성적에 미치는 영향 규명

1. 서론 (Introduction)

전세계적으로 곤충산업에 대한 높은 관심과 투자로, 곤충산업의 시장규모는 2007년 11조원이었으며, 2020년에는 38조원까지 늘어날 전망으로, 세계 각국은 곤충산업을 국가전략산업으로 지정하여 정책적으로 육성하고 있는 실정이다. 아시아 지역에서는 특히 식의약품 곤충시장의 규모가 특징적으로 확대되고 있으며, 이외에도 기능성 식품이나 약용곤충, 축산분뇨 및 쓰레기 분해곤충, 가축사료용 곤충 등이 개발되고 있다. 곤충 사료화 시장은 조류, 어류, 파충류 등 애완동물 사료를 중심으로 발달되어 있으며 아직까지 양계 및 양돈 등의 가축을 대상으로 하는 단백질 원료로는 생산되고 있지는 않고 있다.

현재 국내 곤충산업은 식용, 약용, 애완 등 초보단계이며 사료 및 식의약품분야는 이제 조성이 시작되고 있는 단계이지만, 또한 사료용 곤충의 대량생산체계 및 1차 가공방법 등의 개발이 이루어지고 있는 사육기반이 초기단계이다. 국내에서는 갈색거저리를 사료용 곤충으로 도입하여 단백질 원료로써 이용성을 높이고자 지속적인 연구가 진행 중에 있다. 일반적으로 곤충사료의 영양소 이용효율이 식물성 원료에 비해 높아 단백질 원료로서의 가치가 높다. 식물성 단백질은 곤충의 체내에서 동물성 단백질로 합성되고 축적되며, 뼈나 내장같이 가공과정에서의 유실되는 부분이 거의 없어 소나 돼지 등의 가축에 비해 4배에서 최고 9배 수준의 효율적으로 영양소를 축적할 수 있으며, 동물성 단백질의 특성상 높은 이용률을 가지게 된다. 곤충체는 보통 필수 아미노산이 풍부하며, 귀뚜라미, 동애등에, 메뚜기, 거저리 등은 여러 연구를 통해 동

물사료에 단백질원으로서의 우수한 가치가 입증되어왔다. 곤충의 아미노산 조성은 대부분의 경우에서 곡물이나 두과류에 비해 우수한 것으로 알려져 있으며 단쇄 불포화 지방산이 풍부하여 지방의 이용효율 또한 기대할 수 있다. 이러한 곤충을 대상으로 개발한 사료개발은 매우 안전하고 저비용의 고품질 단백질 원료의 생산을 가능하게 할 수 있으며, 대량생산체계를 구축함으로써 품질 및 공급을 안정시킬 경우, 사료 내 대두박 및 어분 원료를 대체할 수 있는 단백질 원료사료 시장을 개척할 수 있을 것으로 사료된다.

새로운 단백질 사료원료자원의 개발을 위한 거저리 원료의 연구는 매우 고무적인 일이지만, 사료 내 거저리 원료 사용에 대한 검증시험은 필수적으로 수행되어야 하는 선결과제이다. 따라서 본 연구에서는 임신모돈에서 거저리 원료의 사료화 가능성을 조사하기 위하여 수행되었다.

2. 재료 및 방법 (Materials and Methods)

1) 실험 동물 및 실험 설계 (Experimental animal and design)

본 실험은 평균체중 241.15 ± 4.22 kg의 F1 교잡종 (Yorkshire \times Landrace) 경산 모돈 24두를 공시하여, 체중과 등지방 두께에 따라 4개 처리구에 완전임의배치법(CRD; completely randomized design)으로 배치하여 수행되었다. 실험돈군은 임신돈 스톨($2.4 \times 0.64\text{m}^2$)에서 사양되었으며 중부 후 110일령에 분만틀(분만틀의 넓이 $2.5 \times 1.8\text{m}^2$, 높이 500mm)로 이동시켜 분만실험 및 포유기 실험을 진행하였다. 실험돈은 임신이 확정된 임신돈들을 대상으로 75일령부터 실험사료를 급여하였고 사료 급여량은 실험농장의 사료급여프로그램에 따라 조정되었다. 실험은 임신 75일령부터 시작하여 분만 시까지 임신기 사양실험을 진행하고 분만 후 포유 21일령까지 포유기 실험을 진행하였다. 실험처리구는 사료 내 거저리 유충의 첨가수준으로 결정하였으며, 거저리 유충의 첨가수준은 0%, 1%, 2%, 3%로 설정하였다. 임신기 사양실험 중에는 배합된 처리구에 맞는 배합된 실험사료를 급여하였으며, 포유기 사양실험 중에는 동일한 포유모돈 시판사료를 급여하였다.

2) 실험 사료 (Experimental diet)

실험 사료는 옥수수-대두박 위주의 기초사료에 거저리 유충의 첨가수준을 점차적으로 증가시키며 배합하였으며, 거저리 유충은 대조구에 0% 첨가하고, 1%, 2%, 3%로 첨가하였다. 실험사료는 기타 원료사료들을 조정하여 임신모돈의 영양소 요구량 (NRC, 1998)을 충족하도록 배합하였다. 임신돈 실험사료의 대사에너지 (ME; metabolizable energy)는 3,265 kcal/kg으로 설정하였으며, 조단백질 함량은 12.9%, 라이신(lysine)의 함량은 0.74%에 맞춰 배합하였다. 기타 아미노산, 비타민 및 광물질 요구량 또한 NRC(1998)의 요구수준과 같거나 높은 수준으로 충족시켰으며, 실험사료의 원료 및 화학적 조성은 표 1에 제시하였다. 포유돈 실험사료는 부경양돈농협에서 생산되는 포유모돈용 시판사료를 동일하게 급여하였다.

표 1. 실험사료의 사료배합비와 화학적 조성

Ingredients, %	<i>Tenebrio molitor</i> Larva			
	0 %	1 %	2 %	3 %
Corn	77.62	77.48	77.34	77.22
SBM-46	9.70	9.70	9.70	9.70
Tallow	0.90	0.63	0.36	0.08
Fishmeal	3.00	2.27	1.54	0.80
Wheat bran	5.00	5.00	5.00	5.00
<i>Tenebrio molitor</i> larva	0.00	1.00	2.00	3.00
L-lysine · HCl	0.31	0.33	0.34	0.35
DL-methionine	0.00	0.00	0.01	0.02
DCP	2.15	2.22	2.29	2.37
Limestone	0.72	0.77	0.82	0.86
Vit. Mix ¹⁾	0.10	0.10	0.10	0.10
Min. Mix ²⁾	0.10	0.10	0.10	0.10
Choline chloride-50	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30
Sum	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical Composition ³⁾				
ME (kcal/kg)	3,265.00	3,265.00	3,265.00	3,265.00
CP (%)	12.90	12.90	12.90	12.90
Lysine (%)	0.74	0.74	0.74	0.74
Methionine (%)	0.23	0.23	0.23	0.23
Ca (%)	0.90	0.90	0.90	0.90
Total P (%)	0.70	0.70	0.70	0.70

¹⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D3, 1,600 IU; vitamin E, 32 IU; d-biotin, 64g; riboflavin, 3.2mg; calcium pantothenic acid, 8mg; niacin, 16mg; vitamin B12, 12g; vitamin K, 2.4mg.

²⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1mg; I, 0.3mg; Mn, 24.8mg; CuSO4, 54.1mg; Fe, 127.3mg; Zn, 84.7mg; Co, 0.3mg.

³⁾ Calculated values

3) 사양 실험 및 관리 (Growth trial and management)

본 실험에서 온도와 환기량은 환기팬과 자동제어장치에 의하여 자동으로 조절되었으며, 전체 실험기간 동안 물은 자유채식 (*ad libitum*) 토록 하였다. 사료는 임신기에는 각 처리구에 맞게 오전(8:30)에 일일 1회 급여하였으며 급여량은 2.4kg/일로 75일령부터 110일령까지 동일량을 급여하였다. 임신 110일령에 임신돈들을 분만사로 이동시켰으며 이동 후부터 분만 시까지 사료를 단계적으로 감량 급여하여 분만에 대비하였다. 분만 후에는 4일령까지 제한 급이를 하다가 5일령부터는 각 처리구에 따라 물과 사료를 자유채식 (*ad libitum*) 토록 하였다. 신생 자돈들은 출생 후 24시간 이내에 견치, 단미, 철분주사, 이각을 실시하였고, 각 그룹 안에서 양자를 보낸 후 실험이 개시되었고 수태지의 거세는 분만 후 3일령에 일괄적으로 이루어졌다.

4) 샘플 채취 (Sampling)

임신기 체중 및 등지방 두께 측정은 각각 임신 75일령, 95일령, 110일령에 시행되었다. 분만 종료 후 총산자수, 생존산자수, 사산 및 미라수가 기록되었으며 각 자돈의 체중과 복당 자돈체중을 측정하였다. 포유기에는 분만 24시간 이내와 21일령에 모든의 체중 및 등지방 두께를 측정하였으며, 포유자돈의 체중과 사료섭취량을 측정하여 이를 바탕으로 사양성적을 계산하였다. 모든의 모유성분을 조사하기 위해 혈관에 옥시토신 0.5 ml를 주사하여 젖 분비를 촉진한 후 돈유를 채취하여 유성분 분석기(MilkoScan FT20, FOSS Electric Co., Denmark)로 유지방(fat), 유단백질(protein), 락토오즈(lactose), 총 고형물(Total solid), 무지고형물(Solids not fat : SNF)을 측정하였다. 각 일령의 체중 측정 시 경정맥에서 혈액을 채취하였으며, 채집된 혈액은 4°C에서 3,000 rpm 으로 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고 분석 전까지 냉동보관(-20°C)하였다.

5) 통계 분석

통계분석은 SAS의 General Linear Model (GLM)을 이용하여 수집된 자료의 유의성을 검정하였다. 성장성적의 경우 개별 모돈을 experimental unit으로 설정하였으며, 혈액분석과 모유분석의 경우 각 개체를 unit으로 설정하였다. 거저리 유충의 첨가수준의 증가에 따른 효과를 추정하기 위해 orthogonal polynomial contrast를 통해 거저리 유충의 첨가수준에 따른 linear 및 quadratic effect를 조사하였으며, $P < 0.05$ 인 경우 유의차가 있는 것으로, $P < 0.01$ 인 경우 고도의 유의차가 있는 것으로 간주하였다. $0.05 \leq P < 0.10$ 일 경우 경향이 있는 것으로 고려하였다.

3. 실험 결과 및 고찰 (Results and Discussion)

1) 임신기 체중 및 등지방 변화

임신돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 임신기 모돈의 체중 및 등지방 변화에 미치는 영향을 표 2에 제시하였다. 사양실험 결과, 거저리 유충의 수준별 첨가는 임신돈의 체중, 증체량, 등지방 두께 및 등지방 두께 변화에 유의적인 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 임신 75일령부터 임신돈 사료 내 거저리 유충을 3%까지 첨가하여도 임신돈의 체형변화에는 부정적인 영향을 미치지 않는 결과인 것으로 사료된다.

표 2. 거저리 유충의 수준별 급여가 임신돈의 성장성적에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
No. of sows	6	6	6	6			
Body weight, kg							
Initial (75 day)	241.5	240.1	239.7	243.3	4.22	0.73	0.90
95day	250.4	250.7	247.3	251.7	4.42	0.89	0.86
110 day	258.1	262.8	260.4	264.0	4.68	0.72	0.78
Weight gain, kg							
Initial ~ 95day	8.9	10.6	7.6	8.4	0.98	0.67	0.43
95~ 110 day	7.7	12.1	13.2	12.3	1.65	0.40	0.44
Overall period	16.6	22.7	20.8	20.8	1.82	0.32	0.78
Backfat thickness, mm							
Initial (75 day)	21.2	21.1	20.3	20.7	0.93	0.95	0.75
95day	21.3	23.0	21.8	22.3	0.92	0.58	0.95
110 day	22.8	23.8	23.3	21.8	0.99	0.62	0.73
Backfat gan, mm							
Initial ~ 95 day	0.1	1.9	1.5	1.6	0.53	0.32	0.67
95~ 110 day	1.5	0.8	1.5	-0.5	0.53	0.83	0.62
Overall period	1.6	2.7	3.0	1.1	0.48	0.24	0.93

¹ Standard error of means.

2) 임신기 혈액성상

임신돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 임신기 모돈의 체중 및 등지방 변화에 미치는 영향을 표 3에 제시하였다. 혈액 분석 결과, 임신기 동안의 glucose, insulin, bun, total protein의 농도에는 거저리 유충의 수준별 첨가에 따른 통계적 유의차가 나타나지 않았다. 간 건강의 대표적인 지표로 사용되는 AST와 ALT에서도 거저리 유충의 수준별 첨가에 따른 통계적 유의차는 나타나지 않았다. 이를 통해 임신돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가는 임신 모돈의 혈액성상에 유의적인 영향을 미치지 못하며, 간 건강에도 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

표 3. 거저리 유충의 수준별 급여가 임신모돈의 혈액성상에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
Glucose, mg/dL							
75 d	92.5	92.5	92.5	92.5			
95 d	63.0	51.3	49.5	51.5	4.20	0.44	0.53
110 d	74.7	75.5	61.0	74.8	2.75	0.62	0.18
Insulin, μ U/mL							
75 d	2.6	2.6	2.6	2.6			
95 d	0.70	0.50	0.63	0.40	0.09	0.67	0.65
110 d	0.68	0.63	0.50	0.70	0.06	0.55	0.70
BUN, mg/dL							
75 d	13.9	13.9	13.9	13.9			
95 d	11.0	40.5	22.3	21.6	5.79	0.16	0.78
110 d	11.5	10.6	24.4	10.9	3.60	0.75	0.40
Total protein, g/dL							
75 d	7.2	7.2	7.2	7.2			
95 d	7.4	9.4	8.6	8.8	0.42	0.22	0.76
110 d	7.2	7.5	8.2	7.4	2.24	0.47	0.38
AST, U/L							
75 d	58.8	58.8	58.8	58.8			
95 d	13.5	9.4	13.3	9.6	1.85	0.68	1.00
110 d	21.0	32.5	23.8	19.3	2.14	0.11	0.20
ALT, U/L							
75 d	24.0	24.0	24.0	24.0			
95 d	29.5	33.3	29.0	20.8	2.14	0.33	0.16
110 d	30.7	31.0	32.5	24.5	1.34	0.44	0.37

¹⁾ Standard error of means.

2) 분만 성적 (Reproductive performance)

임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 분만성적에 미치는 영향을 표4에 나타내었다. 총산자수와 생시자돈수에서는 처리구에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았으며, 사산과 미라 수에는 차이가 없었으며, 사산에 영향을 미치는 요인으로는 산차, 총산자수, 분만 시 소요 시간, 생시체중, 난산 및 모돈의 체형 등이 관여하는 것으로 알려져 있으나, 본 실험에서는 처리구에 따른 유의적인 영향이 나타나지 않았다(Leenhouders 등, 1999; Lucia 등, 2002; Schneider, 2002). 복당 체중에서는 거저리 유충의 첨가수준이 증가함에 따라 복당 체중도 linear하게 증가하는 결과가 나타났다 ($P < 0.01$). 이러한 결과는 사산 및 복당 생시체중을 고려하지 않고 복당 체중만을 고려해보았을 때, 임신돈 사료 내 거저리 유충의 첨가가 모돈의 복당 체중을 높일 수 있는 가능성이 있지만, 여러 연구에서 섭취한 단백질의 축적은 대부분이 모돈의 체내 및 자궁에 축적되며 소량만이 태아로 전달되어 축적되는 것으로 보고되고 있다 (Salmon-Legagneur and Rerat, 1962; Salmon-Legagneur, 1965; Elsley 등., 1967). 따라서 식물성 원료에 비하여 소화율이 높은 동물성 원료인 거저리 유충의 첨가가 복당 체중에 미치는 영향을 알아보기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

표 4. 임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 분만성적에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
Total born, pigs/litter	13.0	14.0	14.8	13.5	0.47	0.37	0.66
Still born, pigs/litter	0.0	1.3	1.0	1.8	0.29	0.20	0.19
Mummy, pigs/litter	0.0	0.0	0.0	0.2	0.04	0.65	0.40
Born alive, pigs/litter	13.0	12.7	13.8	11.5	0.51	0.84	0.70
Litter weight, kg	18.03	22.17	21.98	20.87	0.500	<0.01	0.12
Piglet weight, kg	1.45	1.60	1.54	1.57	0.050	0.34	0.66
Litter live weight, kg	18.62	20.34	21.13	18.73	0.575	0.14	0.72
Live piglet weight, kg	1.45	1.58	1.57	1.68	0.053	0.49	0.21

¹⁾ Standard error of means.

3) 포유기 모돈의 체중 및 등지방 변화

임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유모돈의 체중과 등지방 두께 및 사료섭취량에 미치는 영향을 표 5에 나타내었다. 분만 직후 및 포유기 21일령에 모돈의 체중, 등지방 및 각각의 변화량을 측정된 결과, 거저리 유충의 첨가수준에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았지만, 거저리 유충의 첨가수준이 증가함에 따라 체손실이 linear하게 증가하는 유의적 경향이 나타났다 (P=0.06). 체손실의 증가는 LH 호르몬의 분비를 감소시키며, 이에 따라 다음 산차의 배란수를 감소시켜 재귀발정일이 연장되는 등의 부정적인 결과들이 유발될 수 있다 (Neil, 1996; Quesnel 등, 1998). 그렇지만, 이러한 결과는 표 5에 제시된 복당 포유자돈의 마리수와 증체량을 고려해보았을 때 거저리 유충을 첨가한 처리구의 유생산 요구량이 높아짐에 따라 체손실이 증가한 것으로 사료된다. 또한, 포유기 사료섭취량에서는 처리구간의 통계적 유의차가 발생하지 않았으며, 이는 임신기 사료 내 거저리 유충의 첨가가 포유기 사료섭취량에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 결론적으로, 임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가는 포유모돈의 체형변화 및 사료섭취량에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

표 5. 임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유모돈에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
No. of sows	6	6	5	6			
Body weight, kg							
24 hrs postpartum	246.8	241.6	225.5	244.9	1.40	0.40	0.40
Day 21 of lactation	246.0	230.0	221.2	237.6	5.01	0.15	0.48
Changes (0-21d)	-0.8	-11.6	-3.6	-7.3	1.69	0.06	0.88
Backfat thickness, m							
24 hrs postpartum	20.8	22.7	21.5	21.0	1.21	0.51	0.89
Day 21 of lactation	20.3	20.1	18.3	19.3	0.85	0.89	0.46
Changes (0-21d)	-0.6	-2.6	-2.7	-1.8	0.64	0.19	0.53
ADFI, kg	5.1	4.6	4.1	4.9	0.14	0.31	0.64

¹⁾ Standard error of means.

4) 포유기 자돈의 성장 성적

임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유자돈의 성장성적에 미치는 영향을 표 6에 나타내었다.

포유자돈은 이유 전까지 모돈의 젖을 섭취함으로써 필요한 영양분을 공급받는다. 이에 따라 포유자돈의 성장은 자돈의 모유섭취량과 모돈의 유생산량과 높은 연관성을 가지게 되며 (Hartmann 등, 1984), 포유자돈의 성장률을 통하여 모돈의 유생산량을 간접적으로 추정하기도 한다 (Lewis 등, 1978). 실험 결과, 포유자돈의 체중 및 증체량에서 처리구에 따른 통계적 유의차가 발생하지 않았으며, 이러한 결과는 해당 처리구가 포유자돈의 성장에 유의미한 영향을 미치지 못하였으며, 포유모돈의 유생산량에도 차이가 없었음을 의미한다. 또한 거저리 유충을 2% 첨가한 처리구의 포유자돈 증체량이 수치적으로 가장 낮게 나타났는데 이는 해당 처리구의 포유모돈의 사료섭취량에 따른 결과인 것으로 사료된다.

표 6. 임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유자돈의 성장성적에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
Cross-fostered, pigs	12.5	12.5	12.6	12.0	0.25	0.83	0.60
Weaned pigs	10.8	11.8	11.0	11.0	0.22	0.18	0.47
Mortality, %	12.7	5.5	12.0	8.0	1.80	0.23	0.85
Litter weight, kg							
After cross-fostering	18.03	19.78	20.03	19.27	0.503	0.19	0.42
Day 21 of lactation	53.25	61.14	57.48	59.24	1.994	0.23	0.73
Weight gain, kg	35.22	41.37	31.20	39.97	1.804	0.34	0.89
Piglet weight, kg							
After cross-fostering	1.46	1.58	1.61	1.61	0.046	0.33	0.28
Day 21 of lactation	4.93	5.13	5.21	5.38	0.126	0.61	0.19
Weight gain, kg	3.47	3.55	3.00	3.77	0.117	0.94	0.40

¹⁾ Standard error of means.

5) 포유기 혈액성상

임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유모돈의 혈액성상에 미치는 영향을 표 7에 나타내었다. 포유기 모돈의 혈액성상을 분석한 결과, free fatty acid, glucose, insulin, total protein에서는 처리구간의 유의적인 차이가 나타나지 않았지만, BUN에서 거저리 유충의 첨가수준이 증가함에 따라 BUN농도가 linear하게 증가하는 유의적 경향이 나타났다 ($P < 0.10$). 혈액 내의 BUN (blood urea nitrogen) 농도는 체내의 필수 영양소중 하나인 아미노산의 이용에 대한 대표적인 지표(Eggum, 1970)로, 섭취한 질소의 체내 유지와 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Whang과 Easter, 2000). 또한 Bergner (1977)는 혈청 내 urea 농도와 사료의 생물가 (biological value)에 역의 상관관계가 있다고 밝힘으로써 BUN이 동물의 단백질 요구량을 결정하거나 (Hatori 등, 1994; Cai 등, 1996), 단일 아미노산의 요구량을 결정하는 지표(Taylor 등, 1985; Coma 등 1995)로서 사용되고 있다. 따라서 본 실험의 BUN농도 결과를 통해, 임신기 동안의 거저리 유충의 수준별 첨가는 분만 직후 포유개시시의 BUN농도를 유의적으로 증가시키는 경향을 가지는 것으로 나타났으며, 비교적 소화율이 높은 동물성단백질인 거저리 유충의 첨가로 분만직후의 단백질 이용율의 저하로 BUN이 증가하게 된 것으로 사료된다. 포유모돈의 간 건강을 측정하기 위해서 AST와 ALT 농도를 조사한 결과, 처리구에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았으므로 임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가는 포유모돈의 간 건강에 유해한 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다.

임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유기 자돈의 혈액성상에 미치는 영향을 표 8에 나타내었다. 혈액성상 분석 결과, 포유자돈의 혈액 성분 중 glucose, total protein, AST, ALT 항목에서는 처리구간의 통계적 유의차가 나타나지 않았다. free fatty acid 항목에서는 포유자돈의 3주차 혈중 농도에서 임신기 사료 내 거저리 유충의 첨가수준이 증가함에 따라 그

농도가 linear 하게 증가하는 결과가 나타났다 (P<0.05) 반면에 BUN 항목에서는 임신기 사료 내 거저리 유충의 첨가수준이 증가함에 따라 그 농도가 linear하게 감소하는 결과가 나타났다 (P<0.05). 이러한 결과는 임신기 사료 내 거저리 유충의 첨가수준이 증가함에 따라 포유자돈의 혈중 free fatty acid 농도가 높아짐에 따라 포유자돈의 지방산 이용률이 높아졌음을 의미하여, 혈중 BUN농도가 감소함에 따라 단백질 이용률은 유의적으로 증가하는 결과로 사료 된다.

표 7. 거저리 유충의 수준별 급여가 포유모돈의 혈액성상에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
Free fatty acid, μ Eq/L							
24 hrs postpartum	197.8	370.5	310.8	279.5	39.80	0.23	0.90
21 d	169.5	137.3	60.5	178.3	40.59	0.59	0.70
Glucose, mg/dL							
24 hrs postpartum	81.0	86.0	78.8	80.5	4.78	0.79	0.73
21 d	71.3	70.3	73.8	61.3	4.35	0.84	0.76
Insulin, μ U/mL							
24 hrs postpartum	2.3	2.8	1.6	4.3	0.44	0.73	0.62
21 d	3.2	2.0	3.9	3.4	0.65	0.68	0.50
BUN, mg/dL							
24 hrs postpartum	11.2	10.1	8.6	12.8	0.62	0.07	0.92
21 d	17.5	17.2	17.3	20.7	0.83	0.55	0.32
Total protein, g/dL							
24 hrs postpartum	6.9	7.1	7.1	7.2	0.13	0.76	0.60
21 d	8.1	8.4	8.2	7.8	0.14	0.37	0.38
AST, U/L							
24 hrs postpartum	49.0	57.0	46.3	53.0	3.40	0.60	0.65
21 d	43.5	52.0	57.3	54.3	4.46	0.34	0.24
ALT, U/L							
24 hrs postpartum	28.0	29.8	28.5	24.0	1.06	0.29	0.21
21 d	30.0	28.0	32.3	28.5	0.96	0.78	0.45

¹⁾ Standard error of means.

표 8. 임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 급여가 포유자돈의 혈액성상에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
Free fatty acid, μ Eq/L							
24 hrs postpartum	139.0	137.5	153.3	145.5	10.65	0.98	0.66
21 d	214.8	386.5	355.3	262.0	26.99	<0.01	0.83
Glucose, mg/dL							
24 hrs postpartum	63.3	99.3	86.5	93.3	7.45	0.16	0.58
21 d	107.3	106.3	111.5	76.8	7.54	0.68	0.47
BUN, mg/dL							
24 hrs postpartum	23.8	15.3	17.2	20.0	1.45	0.04	0.74
21 d	9.63	7.3	7.4	8.3	0.80	0.28	0.69
Total protein, g/dL							
24 hrs postpartum	6.0	5.5	6.3	6.3	0.27	0.52	0.29
21 d	4.6	4.9	5.0	5.1	0.09	0.34	0.24
AST, U/L							
24 hrs postpartum	117.5	143.0	133.8	140.8	12.35	0.59	0.81
21 d	71.3	65.8	67.5	63.3	2.39	0.52	0.46
ALT, U/L							
24 hrs postpartum	41.8	38.5	45.0	46.5	2.50	0.68	0.37
21 d	36.3	42.5	40.8	37.5	2.37	0.33	0.96

¹⁾ Standard error of means.

6) 유성분의 변화

임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 모유 성분에 미치는 영향을 표 9에 나타내었다. 분만 후 24시간 이내의 초유 및 포유 21일차의 돈유성분을 분석한 결과, 카제인, 유단백질, 락토오즈, 무지유고형분 및 유리지방산 함량에서 임신기 사료 내 거저리 유충의 첨가에 따른 특별한 효과가 발견되지 않았다. 유지방과 유고형분에서는 거저리 유충을 2% 첨가했던 처리구가 다른 처리구들에 비해 유의적으로 높은 결과 ($P < 0.05$, $P < 0.10$)가 나타났지만, 초유에서 직접적인 영향이 나타나지 않고 포유 21일령에 이러한 결과가 나타난 것으로 보아 거저리 유충의 첨가에 의한 효과라기보다는 유생산과 관련된 다른 요인들에 의한 결과인 것으로 사료된다. 결론적으로 임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가는 포유기 모돈의 유성분에는 유의적인 영향을 미치지 못하는 것으로 사료된다.

표 9. 임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 모유 성분에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
Casein, %							
Colostrum	6.71	4.73	5.37	6.82	0.494	0.12	0.71
21 d	4.48	4.34	4.57	4.24	0.072	0.90	0.98
Fat, %							
Colostrum	7.25	6.95	6.62	7.64	0.345	0.61	0.97
21 d	6.20 ^b	6.01 ^b	7.62 ^a	6.00 ^b	0.259	0.52	0.08
Protein, %							
Colostrum	8.43	5.75	6.65	8.66	0.689	0.12	0.68
21 d	4.90	4.78	5.08	4.64	0.086	0.93	0.92
Lactose, %							
Colostrum	4.34	4.75	4.58	4.24	0.154	0.23	0.62
21 d	6.15	6.12	5.88	6.20	0.058	0.42	0.40
Total solid, %							
Colostrum	22.37	19.17	19.86	22.93	0.973	0.19	0.76
21 d	18.51 ^{AB}	18.09 ^B	20.04 ^A	18.01 ^B	0.344	0.74	0.17
Solid not fat, %							
Colostrum	13.29	10.95	11.83	13.35	0.566	0.12	0.68
21 d	11.26	11.19	11.22	11.09	0.080	0.91	0.68
Free fatty acid, %							
Colostrum	4.21	4.25	4.39	4.02	0.143	0.73	0.93
21 d	4.48	3.59	3.35	3.65	0.262	0.29	0.39

¹⁾ Standard error of means.

^{ab} Means in a same row with different superscript significantly different (P<0.05).

^{AB} Means in a same row with different superscript significantly different (P<0.10).

4. 결론 (Conclusion)

본 연구는 임신모돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 임신돈의 생리적 변화, 번식성적, 포유기 모돈의 생리적 변화 및 포유자돈의 성장성적, 혈액성상 및 유성분에 미치는 영향을 규명하여 거저리 유충의 적정 첨가수준을 조사하기 위해 수행되었다. 연구 결과, 임신돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가는 임신돈의 체형변화 및 번식성적에 부정적인 영향을 미치지 않았으며 오히려 복당 체중이 증가하는 결과가 나타났다. 또한 임신돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가는 포유돈의 체형변화 및 사료섭취량에 유의적인 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났으며, 포유자돈의 성장성적 및 유성분 함량을 고려해보았을 때 거저리 유충의 첨가는 포유자돈의 성장에 부정적인 영향을 미치지 못하는 것으로 사료된다. 본 연구에서는 임신돈 사료 내 거저리 유충을 3%까지 첨가하여도 임신돈의 체형변화, 번식성적, 포유자돈 성적에 부정적인 영향을 미치지 않았지만, 실험사료의 급여기간이 임신 75일령부터인 점을 감안해볼 때 임신초기부터 급여하여 추가적인 거저리 유충의 첨가효과를 규명해야 할 것이다.

실험 5. 거저리 원료 사료의 수준별 급여가 포유모돈의 생리적 변화와 포유성적에 미치는 영향 규명

1. 서론 (Introduction)

사료화의 대상이 되는 곤충 중 갈색거저리 (*Tenebrio molitor*)는 딱정벌레의 일종으로, 거저리의 유충인 밀웜은 설치류나 파충류 및 조류의 사료로 이용되어 왔다. 마찬가지로 거저리와 유사한 딱정벌레류인 *Alphitobius diaperinus* (Despins, 1994), *Tribolium castaneum* (Vohra 등, 1978) 등의 조류 사료화 가능성 또한 증명되었다. 거저리의 영양적 가치는 methionine 함량을 제외하면 우유단백질인 카제인이나 농축대두단백과 비슷하지만 경제적 측면에서 생산 단가는 매우 낮은 편이며 (Ramos-elorduy 등, 2002), 지방함량이 높아 가축의 에너지 공급원으로서도 집파리나 귀뚜라미에 비해 우수한 것으로 알려져 있다. 하지만 이러한 기존의 연구들은 주로 거저리의 유충인 밀웜을 대상으로 진행이 되어 거저리의 성충이나 생산 부산물인 탈피각 등에 대한 연구가 미흡하고, 대상 축종 또한 조류나 어류, 파충류 등에 한정되어 왔다.

일반적으로 어분, SDPP 등의 동물성 단백질 원료들은 식물성 단백질 원료들에 비하여 동물 체내에서의 영양소 소화율이 높으며, 여러 연구결과 들을 통하여서도 곤충자원의 단백질 및 아미노산 소화율이 대두박에 비해 높다는 결과가 보고되고 있다 (Hwangbo 등, 2009).

포유모돈에 있어서 사료섭취량의 극대화는 매우 중요한 사양관리 포인트가 된다. 포유기 모돈의 사료섭취량 증대는 유생산량 증가로 이어지 포유자돈의 성장률이 높아지고 (Hartmann 등, 1984), 포유기간 중의 모돈의 체손실을 최소화하여 재귀발정일 단축으로 다음 산차의 번식성적에도 긍정적인 영향을 미칠 수 있기 때문이다 (Libal 등, 1977; Nelssen 등, 1985; Tokach 등, 1992; Koketsu 등, 1996a, 1996b, 1998). 거저리 원료는 동물성 단백질 원료로서 기호성이 뛰어나고 영양소 이용성이 높기 때문에, 단백질 원료로서 포유기에 사용될 경우 포유모돈 및 포유자돈에게 긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 단백질 원료인 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유모돈에 미치는 영향을 조사하고자 수행되었다.

2. 재료 및 방법 (Materials and Methods)

1) 실험 동물 및 실험 환경 (Experimental animal and housing)

평균체중 233.58 ± 4.50 kg의 2원 교잡종 (Yorkshire x Landrace) 포유모돈 24두를 공시하여, 체중과 등지방, 산차 및 복당체중을 고려하여 분만직후에 4처리 6반복, 완전임의 배치법(CRD; completely randomized design)에 따라 각각의 처리구에 배치하였다. 자돈을 대상으로 출생 후 24시간 이내에 견치, 단미, 철분주사 및 이각을 실시하였고, 복당 체중 및 포유두수를 맞춰 양자를 보냈으며, 분만 후 3일령에 거세를 실시하였다. 실험 모돈은 110일령에

온도 조절이 용이한 분만사로 이송되었으며, 2.5 x 1.8 m²의 사료 및 물의 자유 급이가 가능한 분만틀 내에서 실험 기간 동안 사육되었다.

2) 실험 설계 및 실험 사료 (Experimental design and diet)

실험 처리구는 옥수수-대두박 위주의 기초사료에 거저리 유층의 첨가수준에 따라 구분하였다. 거저리 유층은 대조구에 0% 첨가하고, 1%, 2%, 3%로 첨가수준을 증가시켰다.

실험사료는 옥수수-대두박 위주의 기초사료에 처리구별로 거저리 유층을 0%, 1%, 2% 및 3%를 첨가하고 기타 원료사료들을 조정하여 포유모돈의 영양소 요구량 (NRC, 1998)을 충족하도록 배합하였다. 실험사료의 대사에너지 (ME; metabolizable energy)는 3,265 kcal/kg으로 설정하였으며, 조단백질 함량은 16.8%로, 라이신(lysine)의 함량은 1.09%에 맞춰 배합하였다. 기타 아미노산, 비타민 및 광물질 요구량 또한 NRC(1998)의 요구수준과 같거나 높은 수준으로 충족시켰으며, 실험사료의 원료 및 화학적 조성은 표 1에 제시하였다.

표 1. 실험사료의 사료배합비와 화학적 조성

Ingredients, %	<i>Tenebrio molitor</i> Larva			
	0 %	1 %	2 %	3 %
Corn	68.51	68.85	69.15	69.50
SBM-45	25.12	24.07	23.02	21.95
Sugar molasses	1.00	1.11	1.23	1.32
Soy oil	1.21	0.85	0.50	0.13
L-lysine · HCl	0.40	0.39	0.39	0.38
DCP	2.33	2.33	2.33	2.33
Limestone	0.85	0.85	0.85	0.86
DL-methionine	0.05	0.02	0.00	0.00
Vit. Mix ¹⁾	0.10	0.10	0.10	0.10
Min. Mix ²⁾	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.23	0.23	0.23	0.23
Choline chloride-50	0.10	0.10	0.10	0.10
<i>Tenebrio molitor</i> larva	0.00	1.00	2.00	3.00
Sum	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical Composition ³⁾				
ME (kcal/kg)	3,265.00	3,265.00	3,265.00	3,265.00
CP (%)	16.80	16.80	16.80	16.80
Lysine (%)	1.09	1.09	1.09	1.09
Methionine (%)	0.25	0.25	0.25	0.25
Ca (%)	0.90	0.90	0.90	0.90
Total P (%)	0.70	0.70	0.70	0.70

¹⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D3,1,600IU; vitamin E, 32IU; d-biotin, 64g; riboflavin, 3.2mg; calcium pantothenic acid, 8mg; niacin, 16mg; vitamin B12, 12g; vitaminK, 2.4mg.

²⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1mg; I, 0.3mg; Mn, 24.8mg; CuSO4, 54.1mg; Fe, 127.3mg; Zn, 84.7mg; Co, 0.3mg.

³⁾ Calculated values

3) 샘플 채취 및 조사 항목 (Sample collection and measurements)

- ① 포유 모돈의 체중, 사료 섭취량, 등지방 두께 및 사료섭취량의 변화: 포유기 모돈의 생리적 변화 정도를 판별하기 위하여 분만 후 24 시간 이내 및 이유 시의 체중, P2 부위의 등지방 두께 및 사료섭취량을 측정하였다.
- ② 포유 자돈의 성장능력 및 포유 모돈의 포유능력: 양자처리 후 포유를 개시하고 분만 후 24 시간 이내 및 이유 시의 자돈의 체중 및 증체량을 측정하였다
- ③ 모돈의 모유특성을 조사하기 위해 분만 후 24시간 이내 (초유) 및 21일에 혈관에 옥시토신 0.5 ml를 주사하여 젖분비를 촉진한 후 돈유 샘플을 채취하였다. 유성분 분석기 (MilkoScan FT20, FOSS Electric Co., Denmark)로 카제인(casein), 유지방 (fat), 유단백질 (protein), 락토오스 (lactose), 유고형분(total solid), 무지유고형분 (Solids Not Fat: SNF) 및 유리지방산(free fatty acid) 함량을 측정하였다.

4) 통계 분석

통계분석은 SAS의 General Linear Model (GLM)을 이용하여 수집된 자료의 유의성을 검정하였다. 성장성적의 경우 개별 모돈을 experimental unit으로 설정하였으며, 혈액분석과 모유분석의 경우 각 개체를 unit으로 설정하였다. 거저리 유충의 첨가수준의 증가에 따른 효과를 추정하기 위해 orthogonal polynomial contrast를 통해 거저리 유충의 첨가수준에 따른 linear 및 quadratic effect를 조사하였으며, $P < 0.05$ 인 경우 유의차가 있는 것으로, $P < 0.01$ 인 경우 고도의 유의차가 있는 것으로 간주하였다. $0.05 \leq P < 0.10$ 일 경우 경향이 있는 것으로 고려하였다.

3. 실험 결과 및 고찰 (Results and Discussion)

1) 포유모돈의 생리적 변화 및 사료섭취량

포유모돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유모돈의 생리적 변화 및 사료섭취량에 미치는 영향을 표 2에 나타내었다. 3주간의 포유기간 동안 포유모돈의 체중 변화에는 처리구간의 유의적인 차이가 없었으며, 등지방 두께에서도 처리구간의 통계적 유의차가 발견되지 않았다. 그렇지만, 일일사료섭취량에서는 대조구(CON)에 비하여 거저리 유충을 첨가한 처리구들의 일일사료섭취량(ADFI)가 유의적으로 높은 결과가 나타났으며($P < 0.05$), 거저리 유충의 첨가수준이 증가함에 따라 사료섭취량도 유의적으로 증가하는 linear effect가 나타났다 (Linear response, $P = 0.04$). 포유기의 사료섭취량은 유전적 요인 (품종), 감각적 요인 (후각, 미각) 및 환경적 요인 (온도, 습도, 환기, 급이기 형태) 등의 영향을 받으며, 사료 내 영양소 및 에너지 함량과 같은 영양적 요인에 의해서도 영향을 받는다(ARC, 1981; Baldwin, 1985; Fowler, 1985; NRC, 1998). 포유모돈은 분만직후에 체유지에 필요한 최소한의 영양소요구량을 충족시킬 정도의 영양분을 공급받아야 하며, 1~2주차에 사료섭취량이 최대에 도달한 후에는 무제한 급여 방식이 일반적으로 행해지고 있다 (Koketsu 등, 1996a, 1996c). 포유모돈의 사료섭취량이 감소하면 체손실이 증가하여 LH 호르몬의 분비를 감소시키며, 이에 따라 배란수가 감소하고 재귀발정일이 연장되는 등의 부정적인 영향들이 유발될 수 있다 (Neil, 1996; Quesnel 등, 1998). 이와는 반대로, 포유모돈의 사료섭취량이 증가하면 체손실 감소와 재귀발정일 단축으로 모돈의 생산성이 증진되고 자돈의 체중 또한 증가되는 효과를 기대할 수 있다 (Libal 등, 1977; Nelssen 등, 1985; Tokach 등, 1992; Koketsu 등, 1996a, 1996b, 1998). 본 실험에서 포유모돈의 사료섭취량이 linear 하게 증가 하는 것으로 보아 포유모돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 기호성을 증진시킨 것으로 생각되며, 결과적으로 포유모돈의 생산성에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.

표 2. 거저리 유충의 수준별 급여가 포유모돈의 성장성적에 미치는 영향¹⁾

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ²⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
No. of sows	6	6	6	6			
Body weight, kg							
24 hrs postpartum	223.2	241.4	235.0	234.8	4.50	0.22	0.79
Day 21 of lactation	216.8	235.9	227.8	223.2	5.05	0.22	0.94
Changes (0-21d)	-6.4	-5.5	-7.2	-11.6	2.03	0.75	0.46
Backfat thickness, m							
24 hrs postpartum	22.0	22.5	20.3	20.7	0.89	0.90	0.41
Day 21 of lactation	18.9	20.5	16.8	19.3	0.95	0.81	0.46
Changes (0-21d)	-3.1	-2.0	-3.5	-1.4	0.52	0.83	0.94
ADFI, kg	4.48 ^b	5.61 ^a	5.54 ^a	5.56 ^a	0.174	0.04	0.16

¹⁾ Initial average weight of sows: 233.58 ± kg BW

²⁾ Standard error of means.

^{ab} Means in a same row with different superscript significantly different (P<0.05).

2) 포유자돈의 성장능력

포유모돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유자돈의 성장능력에 미치는 영향을 표 3에 나타내었다. 실험 결과, litter weight과 piglet weight에서는 거저리 유충의 수준별 첨가에 따른 처리구간의 통계적인 유의차가 나타나지 않았다. 거저리 유충의 수준별 첨가에 따른 linear-quadratic effect가 나타나지는 않았지만, 수치상으로 거저리 유충의 첨가수준이 증가함에 따라 21일째 litter weight와 weight gain이 높아지는 결과가 나타났지만 개별 piglet weight과 weight gain에서는 처리구간의 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 통계적 유의차는 발생하지 않았지만 대조구가 거저리 첨가 처리구들에 비하여 폐사율이 높아 포유두수가 적기 때문인 것으로 사료된다. 또한, 포유자돈의 성장은 자돈의 모유섭취량과 모돈의 유생산량과 높은 연관성을 가지게 되며 (Hartmann 등, 1984), 포유자돈의 성장률을 통하여 모돈의 유생산량을 간접적으로 추정하기도 한다는 연구결과들을 고려해 볼 때 (Lewis 등, 1978), 거저리 유충의 첨가로 인한 포유모돈의 사료섭취량 증가가 포유자돈의 성장에 유의적인 영향을 미친 것으로 사료된다. 이를 통하여, 포유모돈 사료 내 거저리 유충의 첨가는 포유 모돈의 사료섭취량을 증가시켜, 복당 자돈 체중을 높여주고 폐사율을 감소시키는데 긍정적인 효과를 미치는 것으로 사료된다.

표 3. 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유자돈의 성장성적에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
Cross-fostered, pigs	11.2	11.7	11.3	11.2	0.22	0.42	0.71
Weaned pigs	9.8	10.7	10.5	10.7	0.30	0.36	0.55
Mortality, %	11.9	8.6	7.4	4.5	2.10	0.75	0.41
Litter weight, kg							
After cross-fostering	18.23	18.82	18.76	18.11	0.536	0.64	0.94
Day 21 of lactation	50.21	60.71	63.23	64.04	2.761	0.22	0.14
Weight gain, kg	31.98	41.89	44.47	45.93	2.539	0.21	0.11
Piglet weight, kg							
After cross-fostering	1.64	1.62	1.68	1.63	0.055	0.99	0.82
Day 21 of lactation	5.06	5.67	6.16	6.03	0.234	0.40	0.17
Weight gain, kg	4.42	4.05	4.48	4.40	0.197	0.31	0.11

¹⁾ Standard error of means.

3) 혈액 성분

포유모돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유모돈 및 포유자돈의 혈액성상에 미치는 영향을 표 4,5 에 나타내었다. 혈액 분석 결과, 포유모돈의 혈중 free fatty acid, glucose, insulin, BUN, total protein 농도에는 처리구간의 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 간 건강 지표로 사용되는 AST, ALT농도에서도 처리구간의 유의적인 차이가 나타나지 않아 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유모돈의 간 건강에 유해한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 포유자돈의 혈중 free fatty acid, glucose, BUN, total protein 농도를 조사한 결과, 처리구에 따른 유의적인 영향은 나타나지 않았다.

표 4. 거저리 유충의 수준별 급여가 포유모돈의 혈액성상에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
Free fatty acid, μ Eq/L							
24 hrs postpartum	368.2	368.2	368.2	368.2			
21 d	449.3	77.7	101.3	157.7	92.44	0.22	0.51
Glucose, mg/dL							
24 hrs postpartum	92.5	92.5	92.5	92.5			
21 d	77.7	67.7	72.0	78.3	2.59	0.12	0.60
Insulin, μ U/mL							
24 hrs postpartum	2.6	2.6	2.6	2.6			
21 d	7.3	1.6	1.3	1.2	1.21	0.51	0.26
BUN, mg/dL							
24 hrs postpartum	13.9	13.9	13.9	13.9			
21 d	17.5	18.7	17.9	17.8	0.64	0.64	0.89
Total protein, g/dL							
24 hrs postpartum	7.2	7.2	7.2	7.2			
21 d	8.5	8.0	7.8	7.9	0.13	0.18	0.20
AST, U/L							
24 hrs postpartum	58.8	58.8	58.8	58.8			
21 d	108.7	92.7	67.0	56.0	14.51	0.81	0.28
ALT, U/L							
24 hrs postpartum	24.0	24.0	24.0	24.0			
21 d	37.3	37.0	32.7	28.7	2.42	0.86	0.12

¹⁾ Standard error of means.

표 5. 거저리 유충의 수준별 급여가 포유자돈의 혈액성상에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
Free fatty acid, μ Eq/L							
24 hrs postpartum	228.5	228.5	228.5	228.5			
21 d	384.0	288.7	237.7	342.7	38.95	0.29	0.56
Glucose, mg/dL							
24 hrs postpartum	106.0	106.0	106.0	106.0			
21 d	116.3	105.7	110.7	115.3	5.30	0.58	0.89
BUN, mg/dL							
24 hrs postpartum	19.3	19.3	19.3	19.3			
21 d	15.4	10.6	5.9	8.7	1.74	0.29	0.14
Total protein, g/dL							
24 hrs postpartum	6.1	6.1	6.1	6.1			
21 d	4.9	5.3	4.6	5.0	0.10	0.51	0.17
AST, U/L							
24 hrs postpartum	103.8	103.8	103.8	103.8			
21 d	73.0	58.0	62.0	84.3	7.98	0.33	0.61
ALT, U/L							
24 hrs postpartum	29.0	29.0	29.0	29.0			
21 d	47.7	36.7	36.0	40.0	3.05	0.11	0.38

¹⁾ Standard error of means.

4) 모유 성분 분석

포유모돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유모돈의 유성분에 미치는 영향을 표 6에 나타내었다. 분만 후 24시간 이내의 초유 및 품 21일차의 돈유성분을 분석한 결과, 카제인, 유지방, 유단백, 락토오즈, 유고형분, 무지유고형분, 유리지방산 함량에서 포유모돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가에 따른 유의적인 효과가 발견되지 않았다. 모유의 성분은 사료를 통한 영양소의 공급 (Jackson 등, 1995) 및 모돈의 상태 (Klaver 등, 1981) 등에 따라서 달라진다고 보고되고 있다. 본 연구결과, 거저리 유충의 첨가는 포유 모돈의 유성분에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

표 6. 거저리 유충의 수준별 급여가 모유 성분에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
Casein, %							
Colostrum	8.15	8.15	8.15	8.15			
21 d	4.62	4.40	4.35	4.33	0.083	0.46	0.37
Fat, %							
Colostrum	7.71	7.71	7.71	7.71			
21 d	7.22	6.02	5.72	6.12	0.297	0.14	0.23
Protein, %							
Colostrum	10.50	10.50	10.50	10.50			
21 d	5.13	4.89	4.80	4.82	0.090	0.44	0.36
Lactose, %							
Colostrum	3.96	3.96	3.96	3.96			
21 d	5.76	6.12	6.15	6.09	0.081	0.18	0.32
Total solid, %							
Colostrum	25.0	25.0	25.0	25.0			
21 d	19.6	18.2	17.9	18.3	0.338	0.17	0.26
Solid not fat, %							
Colostrum	14.9	14.9	14.9	14.9			
21 d	11.1	11.3	11.2	11.1	0.065	0.48	0.79
Free fatty acid, %							
Colostrum	4.27	4.27	4.27	4.27			
21 d	2.80	4.35	3.99	3.61	0.314	0.13	0.74

¹⁾ Standard error of means.

4. 결론 (Conclusion)

본 연구는 포유모돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유모돈의 생리적 변화 및 포유자돈의 성장성적, 혈액성상 및 유성분에 미치는 영향을 규명하여 거저리 유충의 적정 첨가수준을 조사하기 위해 수행되었다. 연구 결과, 포유모돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가는 포유모돈의 생리적 변화에는 유의적인 영향을 미치지 못하지만, 사료섭취량을 증가시켜 포유자돈의 성장능력을 향상시키는 것으로 나타났다. 거저리 유충의 수준별 첨가는 유성분에 유의적

인 영향을 주지는 못하였지만, 포유모돈의 사료섭취량 증가로 유생산량이 증가되는 효과가 나타난 것으로 사료된다. 결론적으로 포유모돈 사료 내 거저리 유층의 첨가는 기호성을 증진시켜 포유모돈의 사료섭취량을 증가시키며, 거저리 유층의 첨가수준을 3%까지 증가시켜도 모돈의 생리적 변화 및 포유자돈의 성장에 부정적인 영향을 미치지 않는다.

실험1. 곤충 원료의 기능성 물질 탐구

1. 서 론

키토산은 키틴이 알칼리와 만나 만들어지는 글루코사민 중합체로써 화학적으로는 뮤코 다당류의 일종인 키틴이 분해되어 만들어진 물질이다. 키토산은 주로 새우나 게 등 갑각류에 많이 함유되어있으며, 그 외에도 곤충의 껍질이나 오징어 뼈에도 많이 함유되어있다. 키토산은 분자구조가 인체조직과 매우 유사하기 때문에 인체 친화성이 있고 체내에서 별다른 면역반응을 일으키지 않기 때문에 식품이나 약품으로써 중요한 물질이다. 산업 쪽에서는 식품첨가물의 하나로 사용되고 있다.

키토산은 지방이 축적되는 것을 막고, 유해 콜레스테롤을 배출시키는 역할을 하여 체내 콜레스테롤 농도를 조절하는 효과가 있다. 또한 항균 작용 및 면역력을 높이는 역할을 하며, 상처를 급속히 치유하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그렇기 때문에 우리나라에서는 지난 1995년 키토산 가공 식품이 건강보조식품 품목군에 추가되었다.

이러한 키토산의 작용은 양돈용으로도 유용할 것으로 생각된다. 콜레스테롤을 조절하는 효과는 육성 비육돈에 있어서 비육으로 인해 콜레스테롤 축적이 일어나기 쉬워 심혈관계 질병이 있을 수 있는 돼지에게 급여되면 이러한 질병들을 저지할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 면역력을 증강시키는 효과 및 상처 치유를 촉진시키는 효과는, 밀사 사육이 진행되고 있는 일반 농가들에서 항생제 급여가 금지된 현재, 카니발리즘 등으로 인한 항원 감염을 저지하고, 치유를 가속화하는 효과가 있을 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 거저리 내 키토산의 실용화를 위해, 거저리 유충과 성충에 포함되어 있는 키토산 함량을 분석하여 이들 함량이 어느 정도 되는지를 확인하기 위해 진행되었다.

2. 실험 방법 및 재료

키토산 함량 분석은 아래의 protocol에 따라 거저리 유충과 거저리 성충을 대상으로 시행되었으며 이를 통해 거저리 내 키토산 함량을 측정하였다.

곱게 간 거저리 유충 및 성충 시료 1g를 채취하여 산성에서 시료를 모두 녹인 후, 증류수를 가하여 100 mL의 검사액을 만든다. 10 mL의 검사액과 염산 7mL, 그리고 증류수를 첨가해 20mL를 만들어 다시 5mL를 채취한 뒤, 밀봉하여 105℃에서 24시간 분해한다. 감압 농축기를 이용해 염산 및 증류수를 제거하고 다시 증류수 5mL를 첨가한 뒤 녹지 않은 물질들은 걸러 낸다. 이 중 1mL와 아세틸 아세톤 2mL를 혼합하고 96℃에서 1시간 동안 가열한 후 흐르는 물에 냉각하여 96% 에탄올 20mL와 p-디메틸아미노벤즈알데히드 시약 2mL를 혼합하여

실온에서 2시간 동안 방치한 뒤, 530nm에서 분광광도계를 사용해(KHSI-A-066) 흡광도를 측정한다.

3. 실험 결과 및 고찰

거저리 유충 및 성충 내 키토산 함량을 표 1.에 나타내었다. 건조 거저리 유충의 경우 11.5594 mg/g의 키토산 함량을 나타내고 있으며, 건조 거저리 성충의 경우 20.3821 mg/g의 함량을 나타내었다. 따라서 키토산 추출 및 실용화 가능성을 기준으로 판단해 볼 때, 거저리 성충이 유충에 비해 약 2배 가까운 키토산을 함유함으로써, 실제로 더 유용할 것으로 생각된다.

다만, 유충의 경우 성충에 비해 키틴질이 함유되어 있을 것으로 보이는 곤충 외피가 적고, 건조 전 상태로 미루어 보았을 때 단단한 껍질을 가지고 있지 못하지만, 그럼에도 불구하고 거저리 유충 내 키토산 함량이 결코 적다고 볼 수 없다. 또한 거저리 성충의 경우 유충에 비해 생산에 시간이 오래 걸리고, 따라서 생산성이 떨어지는 점을 고려할 때, 육성 비육돈 사료 내 포함된 형태로 급여된다는 점을 고려하면 거저리 유충이 성충에 비해 이용 가능성이 높다고 생각된다.

표 1. 거저리 유충 및 성충 내 키토산 함량

Item	Treatment		SEM ¹
	건조 거저리 유충	건조 거저리 성충	
키토산 함량, mg/g			
Trial 1	11.6257	20.5584	
Trial 2	11.8014	20.0070	
Trial 3	11.2510	20.5812	
Average	11.5594	20.3821	4.418

¹ Standard error of mean

4. 결론 (Conclusion)

본 연구에서는 거저리 내 키토산의 실용화를 위해, 거저리 유충과 성충에 포함되어 있는 키토산 함량을 분석하여 이들 함량이 어느 정도 되는지를 확인하기 위해 진행되었다.

건조 거저리 유충의 경우 11.5594 mg/g의 키토산 함량을 나타내었으며, 건조 거저리 성충은 20.3821 mg/g의 함량을 나타내었다. 그러나 비록 거저리 성충이 유충에 비해 약 2배 가까운 키토산을 함유하는 결과를 보였지만, 거저리 성충의 경우 유충에 비해 생산에 시간이 오래 걸리고, 따라서 생산성이 떨어지는 점을 고려할 때, 육성 비육돈 사료 내 포함된 형태로

실용 가능한 형태는 거저리 성충 보다는 거저리 유충일 것으로 생각할 수 있다.

키토산 함유율이 높은 물질로 갑각류의 껍질을 생각해 볼 수 있으나, 게나 새우 등의 껍질은 사료 내에 첨가하기 위해 분쇄하는 과정이 거저리에 비해 힘들고 오래걸리며, 또한 분쇄한다 할지라도 상대적으로 단단하기 때문에 돼지의 소화관 내에서 분해 및 흡수되기 힘들 것으로 생각된다. 그런 점에서 거저리는 가공이 쉽고 소화율이 높기 때문에 양돈 사료 내 키토산 공급원으로써 그 가치가 높다고 할 수 있다.

2) 혈액 성분(Blood urea nitrogen, IGF-1)

자돈 사료 내 거저리 성충의 첨가가 자돈의 혈중요소태질소(BUN; blood urea nitrogen)와 혈중 IGF-1 분비에 미치는 영향을 표 5에 나타내었다. BUN은 아미노산의 이용에 대한 대표적인 지표로 사용되어 왔다(Eggum, 1970). BUN은 단백질 섭취와 그 품질에 직접적인 연관성을 가지는 것으로 알려져 있으며 (Eggum, 1970; Hahn 등, 1995), 섭취한 질소의 체내 유지에 관련이 있고 밝혀졌다 (Whang과 Easter, 2000). 본 실험결과, 사양실험기간 동안 전 실험개체의 BUN농도 범위는 9.03~18.05mg/dl로 일반적인 BUN 수치를 나타내었다. 5주차에서는 거저리 성충의 첨가에 따라 유의적인 BUN의 감소가 발견되었다 (linear and quadratic effect, $P<0.01$).

인슐린 유사 성장인자(IGF-1)는 성장호르몬의 자극으로 분비되며 조직들의 성장과 분화에 관여하는 인자로 심혈관계의 구조와 기능의 조절에도 중요하고 뼈의 성장에도 매우 중요한 역할을 한다 (Bayes-Genis, 2000). 또한 IGF-1은 성장에 관여하는 세포에 에너지를 공급하는 역할을 하며, 자돈의 성장과 밀접한 관계를 가진다. 본 실험의 결과 모든 phase 에서 자돈 사료내 거저리 성충의 첨가는 혈중 IGF-1의 농도에 유의적인 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다.

혈액성상의 분석결과를 종합하면 자돈사료 내 거저리 성충의 첨가는 BUN을 감소시키고 혈중 IGF-1에는 영향을 끼치지 않는 것으로 사료되며, 이러한 결과는 거저리 성충의 첨가수준이 증가할수록 자돈의 조단백질과 질소이용률이 높아진 영양소 소화율 실험과 맥락을 같이하며, 거저리 성충이 단백질 원료로써 어분을 대체 가능할 것으로 사료된다.

표 4. 자돈 사료 내 거저리 성충의 첨가가 이유자돈의 BUN 및 IGF-1 농도에 미치는 영향

	Control	<i>Tenebrio molitor</i> Imago			SEM ¹⁾	P-value	
		1%	2%	3%		Lin. ²⁾	Quad. ²⁾
BUN, mg/dL							
Initial	14.70	14.70	14.70	14.70			
2 week	13.87	11.58	14.20	13.48	0.584	0.28	0.38
5 week	18.05 ^A	13.47 ^B	9.03 ^C	10.95 ^{BC}	0.866	<0.01	<0.01
IGF-1, ng/mL							
Initial	43.90	43.90	43.90	43.90			
2 week	173.17	159.90	138.73	144.13	11.971	0.64	0.26
5 week	222.37	208.83	209.68	218.20	12.215	0.68	0.95

¹⁾ Standard error of means.

²⁾ Lin.: linear value, Quad.: quadratic value.

^{ABC} Means in a same row with different superscript letters significantly differ (P<0.05)

3) 면역 성장(IgG, IgA)

거저리 성충의 첨가가 자돈의 면역형성에 미치는 영향을 표 6 에 나타냈다. 면역글로부린 G (IgG)는 전체 사양기간에서 처리구 간 유의적 차이를 나타내지 않았으며, 면역글로부린 A(IgA) 또한 이유 후 2주차 와 5주차에서 처리구 간의 유의적 차이는 나타나지 않았다.

몇몇 선행 연구에서는 거저리에 포함되어 있는 키틴 성분이 면역 성장에 복잡한 반응을 나타낸다고 보고되었으며 (Lee et al., 2008), 이 복잡한 반응은 동물의 면역 상태를 증진시킨다고 하였다 (Harikrishnan et al., 2012). 반면에, 거저리에 포함되어 있는 벤조퀴논 성분은 동물 사료에서 독으로 작용될 수 있다고 Wu 등이 2009년에 발표하였다.

하지만 본 실험의 전체 사양 기간 동안의 거저리 첨가 수준에 따른 혈청내 IgG 와 IgA 의 농도에 악영향이 없었으므로, 최대 3% 까지의 거저리 성충의 첨가는 어분 3%를 대체 가능할 것으로 사료된다.

표 5. 자돈 사료 내 거저리 성충의 첨가가 이유자돈의 IgG 및 IgA 농도에 미치는 영향

	Control	<i>Tenebrio molitor</i> Imago			SEM ¹⁾	P-value	
		1%	2%	3%		Lin. ²⁾	Quad. ²⁾
IgG, mg/ml							
Initial	4.42	4.42	4.42	4.42			
2 week	2.12	1.98	1.93	2.09	0.098	0.23	0.34
5 week	4.23	3.80	3.58	4.24	0.102	0.06	0.20
IgA, mg/ml							
Initial	0.44	0.44	0.44	0.44			
2 week	1.57	1.53	1.58	1.61	0.092	0.71	0.98
5 week	2.22	2.09	2.10	2.18	0.123	0.68	0.95

¹⁾ Standard error of means.

²⁾ Lin.: linear value, Quad.: quadratic value.

4. 결론 (Conclusion)

본 연구는 자돈 사료 내 거저리 성충의 첨가가 자돈의 성장성적, 혈액성상에 미치는 영향을 규명하여 거저리 성충의 적정 첨가수준을 조사하기 위해 수행되었다.

자돈의 성장성적에서는 거저리 성충의 첨가수준이 증가함에 따라 전체 사양기간동안 자돈의 성장 성적에는 영향을 끼치지 않았으며, 결과적으로 5주간의 사양기간동안 거저리 성충의 자돈 사료 내 첨가는 어분을 함유하고 있는 대조구와 비슷한 사양 성적을 나타내었다.

혈중 BUN과 IGF-1 농도를 분석한 결과, 거저리 성충의 첨가수준이 증가할수록 자돈의 질소이용률이 증가하게 되어 혈중 BUN농도가 감소하는 효과가 나타났으며, 혈중 IGF-1농도에는 아무런 영향을 끼치지 않았다. 사료 내 거저리 성충의 첨가수준이 증가함에 따라 혈중 BUN농도가 감소하는 결과는 거저리 성충의 첨가가 자돈사료의 질소이용률을 향상시키며, IGF-1에 있어서는, 체내에서 IGF-1의 분비에 악영향을 끼치지 않는 것으로 사료된다.

혈중 IgG 와 IgA 농도에서도, 거저리 성충을 3% 까지 첨가하여도 유의적 차이가 나타나지 않았다.

결론적으로 자돈 사료 내 거저리 성충의 첨가는 자돈기 5주간에 걸쳐 자돈의 영양소 이용률을 개선하고 다른 사양성적에서 악영향을 끼치지 않고, 본 실험에서 설정한 3% 수준이 대조구의 어분 3% 와 비슷한 성장성적을 내는 것으로 보아, 자돈사료내 거저리 성충의 첨가가 어분을 대체할 것으로 사료된다.

실험 2. 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 유충원료의 사료 내 첨가효과 규명

1. 서 론 (Introduction)

중국의 경제 성장에 따른 육류소비량이 증가함에 따라서 축산업은 성장세를 보이고 있으며, 이러한 성장세 중 사료산업의 급격한 발전이 이루어지고 있는 상황이다. 양돈 배합사료에는 옥수수나 대두박, 밀, 보리 등이 많이 사용되고 있다. 이 중에서 대두박은 가격이 높고 양질의 단백질의 공급원으로 사용되는 원료로 최근 세계의 이상기후로 인한 공급량 감소 추세에 따라 지속적으로 가격이 상승하고 있다. 이러한 상황 속에서 대두박을 대체할 수 있는 단백질 원료를 찾기 위한 연구에 대한 관심이 증가하고 있으며, 이러한 연구 중 동물성 사료원료 중 곤충을 첨가하는 연구가 활발히 이루어지고 있다.

곤충은 단백질과 지방, 및 광물질을 풍부히 함유하여 영양소 함량도 높고, 특히 단백질 함량 및 이용율이 높아 식물성 단백질원료의 대체원으로 관심을 받았다(Aguilar-Miranda et al., 2002; Hardouin et al., 2003). 일반적인 곤충의 단백질함량은 40-75g/100g으로 육분의 단백질함량과 비슷하며, 일부 곤충들은 육분에 비하여 많은 필수지방산과 리놀레익산 및 리놀레닉산을 함유하고 있으며 다량의 아연과 철분이 함유하고 있는 것으로 조사되었다(De Foliart, 1989). Ramos-elorduy 등(2002)의 연구에서 거저리를 육계사료에 10% 수준까지 첨가하였을 경우 사양성적이 대조구와 비교하여도 차이가 없었다고 발표하였으며, 신 등(2012)도 곤충 원료인 거저리를 육계에 급여하여도 사료섭취량, 성장 및 육질에 부정적인 영향이 나타나지 않았으며, 김 등(2013)의 연구에서도 거저리 유충을 6%까지 증량 급여하였을 때 이유자돈의 성적에 유해한 영향이 없다고 밝혔다. 이러한 연구결과와 더불어 사료자원으로 거저리의 이용은 저단가의 고품질 단백질 원료의 공급원으로 이용가능 할 수 있으며, 품질 및 안전성을 확보하여 대량생산체계를 구축할 경우 대두박을 대체할 수 있는 단백질사료 시장을 개척할 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 본 연구를 통하여, 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 유충원료의 사료 내 첨가 통하여 자돈 사료 내 거저리 첨가 효과를 규명하고자 한다.

2. 재료 및 방법 (Materials and Methods)

1) 실험 동물 및 실험 설계

28 ± 3일령에 이유했던 평균 체중 6.82 ± 0.222kg인 삼원 교잡종 ([Yorkshire x Landrace] x Duroc) 이유자돈 128두를 공시하여, Phase I 2주, Phase II 3주로 총 5주 동안 사양실험을 수행하였다. 전체 4처리 8반복 돈방 당 4두씩 성별과 체중에 따라 난괴법(RCBD; Randomized Completely Block Design)으로 배치하였다. 실험의 처리구는 다음과 같다. 1)control (대조구) : basal diet ; NRC (2012)의 요구량을 충족시키는 corn-soy bean meal based diet, 2) Larva 6% : basal diet + 12령 거저리 유충 6%, 3)

Finish/Larva 6% : basal diet + 유충 종령 거저리 6%, 4) Pupa 6% : basal diet + 거저리 번데기 6% 로 구성하여 실험을 수행하였다.

2) 실험 사료

옥수수-대두박 위주로 실험사료의 기초사료(basal diet)를 배합하였으며, 사육단계에 따라 영양소 요구량 (NRC, 2012)을 고려하여 배합을 실시하였다. 실험사료의 대사에너지 (ME; metabolizable energy)는 Phase I (0~2주)에 3300.00kcal/kg 이었고, Phase II (2~5주)에 3300.00kcal/kg 이었다.

단백질 함량은 Phase I 에서 20.56%, Phase II에서 18.88%로, 라이신(lysine)의 함량은 phase I 에서 1.35%, Phase II에서 1.23%에 맞춰 배합하였다. 거저리원료는 처리구별로 거저리 유충 6%, 노숙 거저리 6%, 거저리 번데기 6% 가 각각 첨가되었으며, 옥수수와 대두박을 통해 영양소 요구량을 충족시켜 주었다. 조단백질, 비타민, 미량광물질 및 다른 영양소들은 NRC (2012)의 요구수준과 같거나 높게 배합하였으며, 주요 실험사료의 원료 및 화학적 조성은 표 1 (phase I), 표 2 (phase II)에 제시된 바와 같다.

표 1. 실험사료의 사료배합비와 성분표(Phase I)

Ingredients, %	Control	Larva 6%	Finish/ Larva 6%	Pupa 6%
Corn	26.20	26.00	24.89	25.25
SBM-44	32.44	25.34	26.66	26.30
Whey powder	3.00	3.00	3.00	3.00
Lactose	8.00	8.00	8.00	8.00
Barley	25.00	25.00	25.00	25.00
wheat bran	0.00	3.35	3.18	3.15
Soy-oil	2.09	0.00	0.00	0.00
DCP	1.45	1.45	1.42	1.42
Limestone	0.70	0.76	0.75	0.75
L-Lysine · HCl	0.42	0.40	0.40	0.43
DL-methionine	0.10	0.10	0.10	0.10
Vit. Mix ¹⁾	0.10	0.10	0.10	0.10
Min. Mix ²⁾	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20
Choline-Cl(25%)	0.10	0.10	0.10	0.10
ZnO	0.10	0.10	0.10	0.10
Larva	0.00	6.00	0.00	0.00
Finish/Larva	0.00	0.00	6.00	0.00
Pupa	0.00	0.00	0.00	6.00
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition ³⁾				
ME, kcal/kg	3300.00	3300.06	3300.00	3300.06
CP, %	20.56	20.56	20.56	20.56
Lysine, %	1.35	1.35	1.35	1.35
Methionine, %	0.39	0.39	0.39	0.39
Ca, %	0.80	0.80	0.80	0.80
Total P, %	0.65	0.65	0.65	0.65

¹⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D₃, 1,600IU; vitamin E, 32IU; d-biotin, 64g; riboflavin, 3.2mg; calcium pantothenic acid, 8mg; niacin, 16mg; vitamin B₁₂, 12g; vitamin K, 2.4mg.

²⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1mg; I, 0.3mg; Mn, 24.8mg; CuSO₄, 54.1mg; Fe, 127.3mg; Zn, 84.7mg; Co, 0.3mg.

³⁾ Calculated values

표 2. 실험사료의 사료배합비와 성분표 (Phase II)

Ingredients, %	Control	Larva 6%	Finish/ Larva 6%	Pupa 6%
Corn	32.76	35.17	34.09	34.45
SBM-44	26.91	20.11	21.43	21.06
Lactose	4.00	4.00	4.00	4.00
Barley	30.00	30.00	30.00	30.00
wheat bran	0.75	1.84	1.63	1.61
Soy-oil	2.72	0.00	0.00	0.00
DCP	1.27	1.27	1.24	1.24
Limestone	0.57	0.62	0.62	0.62
L-Lysine · HCl	0.43	0.41	0.41	0.44
DL-methionine	0.09	0.08	0.08	0.08
Vit. Mix ¹⁾	0.10	0.10	0.10	0.10
Min. Mix ²⁾	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20
Choline-Cl(25%)	0.10	0.10	0.10	0.10
ZnO	0.00	0.00	0.00	0.00
Larva	0.00	6.00	0.00	0.00
Finish/Larva	0.00	0.00	6.00	0.00
Pupa	0.00	0.00	0.00	6.00
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition ³⁾				
ME, kcal/kg	3300.07	3300.06	3300.09	3300.05
CP, %	18.88	18.88	18.88	18.88
Lysine, %	1.23	1.23	1.23	1.23
Methionine, %	0.36	0.36	0.36	0.36
Ca, %	0.70	0.70	0.70	0.70
Total P, %	0.60	0.60	0.60	0.60

¹⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D₃, 1,600IU; vitamin E, 32IU; d-biotin, 64g; riboflavin, 3.2mg; calcium pantothenic acid, 8mg; niacin, 16mg; vitamin B₁₂, 12g; vitamin K, 2.4mg.

²⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1mg; I, 0.3mg; Mn, 24.8mg; CuSO₄, 54.1mg; Fe, 127.3mg; Zn, 84.7mg; Co, 0.3mg.

³⁾ Calculated values

3) 사양 실험

사양실험은 경기도 수원시 소재의 서울대학교 부속실험목장에서 수행되었으며, 콘크리트-슬랫 바닥에서 $1.90 \times 2.15 \times 0.40$ m³ 크기의 돈방에서 사육되었다. 각 돈방에는 하나의 사료 급이기와 니플 급수기가 설치되어있어 전체 실험 기간 동안 물과 사료는 무제한 자유 채식 (*ad libitum*)하도록 하였다. 돈방 온도는 실험 개시 후 첫 일주일간은 30℃를 유지하였으며, 매주 1℃씩 낮추어 4주차에는 27℃를 유지하게 하였다. 사양실험 기간은 각각 Phase I 2주, Phase II 3주 총 5주간 진행되었다. 체중 및 사료 섭취량은 사육 단계 및 사료 종류의 변동 시점을 고려하여, 실험 개시(Initial)기간을 기점으로 2주차와 5주차에 측정하여 일당증체량 (average daily gain; ADG), 일일사료섭취량 (average daily feed intake; ADFI), 사료효율 (gain/feed ratio; G/F ratio)을 계산하였다.

4) 영양소 소화율

처리당 3 두씩 평균체중 15.66 ± 1.77 kg 인 삼원교잡종 ([Yorkshire \times Landrace] \times Duroc) 거세돈 12두를 완전임의배치법 (CRD; completely randomized design)으로 대사틀에 1 두씩 배치하였다. 5일의 적응기를 가진 뒤 6일째부터 본 실험을 개시하였다. 사료를 매일 오전 7시와 오후 7시에 156g씩 급여하였으며, 물은 자유롭게 채식하도록 하였다. 실험 개시 시 급여하는 사료량의 0.5% 만큼 산화크롬 (Cr_2O_3)을 칭량하여 개시 지시제로 사용하였으며 실험 종료 시에는 급여하는 사료량의 0.5% 만큼 산화철 (Fe_2O_3)을 칭량하여 종료 지시제로 사용하였다. 분 채취는 분에서 산화크롬을 확인한 시점부터 산화철을 확인할 때까지 실시하였다. 뇨는 실험기간 동안 매일 오후 7시에 채취하였다. 암모니아의 증발을 막기 위해 뇨 수집용기에 0.1N H_2SO_4 용액 50ml를 첨가하였으며 유리섬유를 뇨 수집용기에 설치하여 여과한 뇨를 채취하였다. 실험기간 동안 채취한 뇨는 샘플별로 2,000 ml로 mass up 한 뒤 100 ml 씩 튜브에 담고 분은 무게를 잰 뒤 -20℃의 냉동고에 분석까지 보관하였다. 채취가 끝난 뒤 분은 샘플별로 60℃ drying oven에서 72시간 건조한 후 Wiley mill (1mm 스크린)을 이용하여 분쇄하였다. 분, 뇨의 일반 성분 분석을 위해 AOAC (1995) 방법으로 건물, 수분, 조단백, 조지방, 조회분, 조섬유 등을 분석하였다.

5) 혈액 성분

실험 개시 시 혈중 요소태질소 (BUN : Blood Urea Nitrogen) 및 IGF-1을 조사하기 위해 임의적으로 경정맥에서 6두의 혈액을 채혈하였으며, 실험 개시 일 이후에는 각 사육단계별 체중 측정시 처리별로 6두씩 총 24두의 혈액을 채취하였다. 혈액은 disposable culture tube에 포집하여 3,000 rpm, 4℃ 상태로 15분 동안 원심분리 하였다. 그 후 micro tube 보관용기에 혈청만을 분리하여 분석 시까지 -20℃로 보관하였다. BUN은 자동생화학 분석기 ADVIA 1650, Japan을 이용하여 분석하였다. IGF-1은 호르몬 분석기를 이용하여 분석하였다 (Immulite 2000, DPC, SUA).

6) 통계 분석

사료, 분 및 뇨의 일반성분 분석은 AOAC(1995) 방법에 따라 실시하였으며, 본 실험의 data는 SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC)의 Mixed procedure를 이용하여 난괴법 실험 design으로서 통계분석을 실시하였다. 성장성적 data의 경우 한 돈방이 experimental unit으로 (RCBD), 혈액성상, 영양소 소화율의 경우 실험돈 1두가 experimental unit으로 (CRD) 설정하였다. 유의적 차이는 SAS (Saxton, 1998)의 PDMIX800 macro를 이용하여 문자로 구분되었다. 모든 통계적 분석에 있어 $P < 0.05$ 인 경우 유의차가 있는 것으로, $P < 0.01$ 인 경우 고도의 유의차가 있는 것으로 간주하였다.

3. 실험 결과 및 고찰 (Results and Discussion)

1) 사양성적 (Feeding trial)

이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가가 자돈의 성장성적에 미치는 영향을 표 3에 나타내었다. 사양실험 결과, 0-2주차 그리고 3-5주차 기간 동안 자돈의 체중, 증체량, 사료섭취량 그리고 사료효율에서 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가에 따른 통계적 유의차가 발생하지 않았다. 이는 대조구(control)와 비교해보았을 때, 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료 첨가한 사료를 급여한 자돈의 성장성적에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

Viroje and Malin (1989) 거저리 유충을 이유자돈 사료에 첨가하여 사양실험 결과 체중, 일당증체량, 사료 효율에 있어서 부정적인 영향을 미치지 않는다는 결과와 맥락이 일치하였으며, Makkar 등 (2014) 거저리 유충을 육계사료에 첨가하여 사양실험을 하였을 때 사양성적에 부정적인 영향을 미치지 않는다는 연구결과와 일치하였다.

본 실험결과를 바탕으로 거저리 원료의 사육기간에 따른 이유자돈 사료 내 거저리원료의 첨가는 이유자돈 성장성적에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

표 3. 이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가가 이유자돈의 성장 성적에 미치는 영향¹⁾

Item	Treatments				SEM ²⁾	P-value
	Control	Larva 6%	Finish/ Larva 6%	Pupa6%		
Body weight, kg						
Initial	6.83	6.81	6.83	6.81	0.222	
2 wk	8.66	8.77	8.59	8.55	0.301	0.94
5 wk	18.83	18.24	17.98	18.06	0.567	0.77
Average daily gain, g						
0-2 wk	130	142	125	124	8.248	0.90
3-5 wk	484	450	447	452	14.386	0.62
0-5 wk	343	327	318	321	11.195	0.76
Average daily feed intake, g						
0-2 wk	259	233	226	229	8.101	0.45
3-5 wk	673	633	644	636	16.964	0.72
0-5 wk	466	433	435	432	11.787	0.57
Gain/feed rate						
0-2 wk	0.492	0.593	0.551	0.510	0.026	0.52
3-5 wk	0.718	0.714	0.691	0.709	0.010	0.82
0-5 wk	0.731	0.756	0.728	0.737	0.010	0.65

¹ 12 pigs were used from an average initial BW of 15.66 ± 1.77 kg

² Standard error of mean.

2) 영양소 소화율 (Nutrient digestibility)

거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가가 자돈의 영양소 소화율에 미치는 영향을 표 4에 나타내었다. 본 연구에서 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가에 따른 이유자돈의 영양소 소화율을 측정된 결과, 건물(dry matter), 조단백질(crude protein), 조지방(crude fat), 조회분(ash)의 소화율에는 처리구간에 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 질소 축적률에서도 처리구간의 유의적인 차이는 보이지 않았다.

Pretorius 등 (2011) 거저리 유충과 거저리 번데기를 이유자돈 사료에 첨가하여 소화율 분석을 실시한 결과 거저리 유충 그리고 번데기를 첨가한 처리구에서 유의적인 차이를 보이지 않았던 결과와 맥락이 일치하였다.

결론적으로 자돈 사료내 거저리 유충의 사육기간에 따른 첨가는 자돈의 건물, 조단백질, 조회분의 소화율에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

표 4. 이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가가 이유자돈의 영양소 소화율에 미치는 영향¹

Item	Treatments				SEM ²⁾	P-value
	Control	Larva 6%	Finish/ Larva 6%	Pupa6%		
Nutrient digestibility, %						
Dry matter	89.95	89.04	88.06	87.37	0.553	0.41
Crude protein	90.95	90.10	90.48	89.05	0.588	0.79
Crude ash	67.95	65.59	57.10	55.70	2.167	0.07
Crude fat	65.68	63.67	60.33	55.45	1.871	0.25
N-retention, g/day						
N-intake	8.98	9.03	9.21	9.34		
N-feces	0.81	0.89	0.88	1.04	0.054	0.64
N-urine	3.43	3.76	4.25	4.58	0.233	0.23
N-retention	4.74	4.38	4.08	3.72	0.214	0.38
N-digestibility	52.78	48.46	44.11	40.23	2.409	0.26

¹ 12 pigs were used from an average initial BW of 15.66 ± 1.77 kg

² Standard error of mean.

³ N retention = N intake (g) - Fecal N (g) - Urinary N (g)

3) 혈액 성분(Blood urea nitrogen, IGF-1)

이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가가 이유자돈의 BUN (blood urea nitrogen)과 IGF-1에 미치는 영향에 대해서 표 5에 나타내었다. 혈중 내 BUN의 농도는 사료 내 단백질의 공급과 연관이 있으며 체내에서는 식이아미노산과의 관계와 부의 상관관계 (negative correlation)를 갖는다(Eggum, 1970). 그래서 BUN의 농도는 체내의 단일 아미노산과 단백질 요구량의 지표로 사용되어 왔다 (Cai 등, 1996; Taylor 등, 1982; Coma 등, 1995).

실험 전 구간에 걸쳐서 BUN의 혈중 농도는 처리구간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 결과적으로 이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가는 혈액 내 IGF-1 농도에 유의적인 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

IGF-1은 성장호르몬의 자극에 의해 분비되며 조직의 성장과 분화에 관여하여 성장이 필요

한 세포에 에너지를 공급하는 역할을 한다. 또한, 가장 중요한 기능으로 심혈관계의 구조와 기능의 조절과 뼈의 성장에도 매우 중요한 역할을 한다(Bayes-Genis, 2000). 실험 전 구간에 걸쳐서 IGF-1의 혈중 농도는 처리구간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 결과적으로 이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가는 혈액 내 IGF-1 농도에 유의적인 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

표 5. 이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가가 이유자돈의 혈액 성장에 미치는 영향

Item	Treatments				SEM ¹	P-value
	Control	Larva 6%	Finish/ Larva 6%	Pupa6%		
BUN						
Initial	13.70	13.70	13.70	13.70		
2 week	14.70	32.48	15.18	36.63	6.382	0.341
5 week	11.80	12.87	10.85	11.70	0.394	0.198
IGF-1						
Initial	33.88	33.88	33.88	33.88		
2 week	90.51	74.75	83.35	51.03	6.198	0.135
5 week	35.10	21.60	16.82	25.37	12.132	0.855

¹ Standard error of mean.

4) 폐사율(Mortality)

사양실험 기간 동안 이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가가 이유자돈의 폐사율에 미치는 영향을 조사하였다. 총 5주간의 사양실험동안 128두의 이유자돈 실험돈 중 폐사는 총 5마리 발생하였으며, 결과적으로 총 폐사율 3.9% 미만으로 실험 종료되었다. 각 처리구당 1마리씩의 폐사가 발생한다. 대조구 1두, 거저리 유충을 6%첨가한 처리구 2두, 거저리 노숙유충을 6%첨가한 처리구 1두 그리고 거저리 번데기 6% 첨가한 처리구 1두가 폐사하였다. 하지만 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가가 이유자돈의 폐사율에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다. 이러한 이유로 이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가는 영양적인 측면이나 건강성 측면에서 부정적인 영향을 끼치지 않아 폐사율이 낮은 것으로 사료된다.

4. 결론 (Conclusion)

본 연구는 이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가가 자돈의 성장성적, 혈액성상 및 영양소 소화율에 미치는 영향을 규명하고자 수행되었다.

거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가는 자돈의 성장성적에 있어 전 구간 (Phase1, Phase2)에 자돈의 체중, 증체량, 사료섭취량 그리고 사료효율에서 처리구간에 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 자돈의 성장성적에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

영양소 소화율을 측정된 결과, 건물(dry matter), 조단백질(crude protein), 조지방(crude fat), 조회분(ash)의 소화율에는 처리구간에 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 질소 축적률에서도 처리구간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이는 Pretorius 등 (2011) 거저리 유충과 거저리 번데기를 이유자돈 사료 내 첨가하여 소화율 분석을 실시한 결과 소화율에 부정적인 영향을 미치지 않는다는 연구결과 같은 맥락을 보였다.

혈중 BUN과 IGF-1 농도를 분석한 결과, 일당사료섭취량에서는 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가는 BUN 수치에 영향을 주지 않는 것으로 나타났으며, 혈중 IGF-1농도 또한 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가는 IGF-1 농도에 유의적인 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

사양실험 기간 동안 총 폐사율 3.9% 미만으로 나타났으며, 이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가는 영양적인 측면이나 건강성 측면에서 부정적인 영향을 끼치지 않아 폐사율이 낮은 것으로 사료된다.

결론적으로 자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가는 자돈의 성장성적, 영양소 소화율, 혈액성상 그리고 폐사율에 유해한 영향을 주지 않는다.

실험 3. 거저리 원료사료의 형태에 따른 임신 포유돈의 생리 변화 규명

1. 서론 (Introduction)

전세계적으로 곤충산업에 대한 높은 관심과 투자로, 곤충산업의 시장규모는 2007년 11조원이었으며, 2020년에는 38조원까지 늘어날 전망으로, 세계 각국은 곤충산업을 국가전략산업으로 지정하여 정책적으로 육성하고 있는 실정이다. 아시아 지역에서는 특히 식의약품 곤충시장의 규모가 특징적으로 확대되고 있다. 곤충 사료화 시장은 조류, 어류, 파충류 등 애완동물 사료를 중심으로 발달되어 있으며 아직까지 양계 및 양돈 등의 가축을 대상으로 하는 단백질 원료로는 생산되고 있지는 않고 있다.

현재 국내 곤충산업은 식용, 약용, 애완 등 초보단계이며 사료 및 식의약품분야는 이제 조성이 시작되고 있는 단계이지만, 또한 사료용 곤충의 대량생산체계 및 1차 가공방법 등의 개발이 이루어지고 있는 사육기반이 초기단계이다. 국내에서는 갈색거저리를 사료용 곤충으로 도입하여 단백질 원료로써 이용성을 높이고자 지속적인 연구가 진행 중에 있다. 일반적으로 곤충사료의 영양소 이용효율이 식물성 원료에 비해 높아 단백질 원료로서의 가치가 높다. 거저리의 단백질은 곤충의 체내에서 동물성 단백질로 합성되고 축적되며, 뼈나 내장같이 가공과정에서의 유실되는 부분이 거의 없어 소나 돼지 등의 가축에 비해 4배에서 최고 9배 수준의 효율적으로 영양소를 축적할 수 있으며, 동물성 단백질의 특성상 높은 이용률을 가지게 된다. 곤충체는 보통 필수 아미노산이 풍부하며, 귀뚜라미, 동애등애, 메뚜기, 거저리 등은 여러 연구를 통해 동물사료에 단백질원으로서의 우수한 가치가 입증되어왔다. 곤충의 아미노산 조성은 대부분의 경우에서 곡물이나 두과류에 비해 우수한 것으로 알려져 있으며 단쇄 불포화 지방산이 풍부하여 지방의 이용효율 또한 기대할 수 있다. 이러한 곤충을 대상으로 개발한 사료개발은 매우 안전하고 저비용의 고품질 단백질 원료의 생산을 가능하게 할 수 있으며, 대량생산체계를 구축함으로써 품질 및 공급을 안정시킬 경우, 사료 내 대두박 및 어분 원료를 대체할 수 있는 단백질 원료사료 시장을 개척할 수 있을 것으로 사료된다.

새로운 단백질 사료원료자원의 개발을 위한 거저리 원료의 연구는 매우 고무적인 일이지만, 사료 내 거저리 원료 사용에 대한 검증시험은 필수적으로 수행되어야 하는 선결과제이다. 따라서 본 연구에서는 임신모돈에서 거저리 원료의 사료화 가능성을 조사하기 위하여 거저리 원료의 형태별 첨가효과에 관한 연구가 수행되었다.

2. 재료 및 방법 (Materials and Methods)

1) 실험 동물 및 실험 설계 (Experimental animal and design)

본 실험은 평균체중 240.1 ± 16.02 kg의 F1 교잡종 (Yorkshire \times Landrace) 경산 모돈 24두를 공시하여, 체중과 등지방 두께에 따라 4개 처리구에 완전임의배치법(CRD;

completely randomized design)으로 배치하여 수행되었다. 실험돈군은 임신돈 스톨($2.4 \times 0.64\text{m}^2$)에서 사양되었으며 종부 후 110일령에 분만틀(분만틀의 넓이 $2.5 \times 1.8\text{m}^2$, 높이 500mm)로 이동시켜 분만실험 및 포유기 실험을 진행하였다. 실험돈은 임신이 확정된 임신돈들을 대상으로 75일령부터 실험사료를 급여하였고 사료 급여량은 실험농장의 사료급여프로그램에 따라 조정되었다. 실험은 임신 75일령부터 시작하여 분만 시까지 임신기 사양실험을 진행하고 분만 후 포유 21일령까지 포유기 실험을 진행하였다. 실험처리구는 사료 내 거저리 원료의 종류별 첨가로 결정하였으며, 거저리 유충, 거저리 유충+배지, 거저리유충+성충의 거저리 원료를 준비하여 실험사료에 각각 3%씩 첨가하였다. 임신기 사양실험 중에는 배합된 처리구에 맞는 배합된 실험사료를 급여하였으며, 포유기 사양실험 중에는 동일한 포유모돈 시판사료를 급여하였다.

2) 실험 사료 (Experimental diet)

실험 사료는 옥수수-대두박 위주의 기초사료에 거저리 유충의 첨가수준을 점차적으로 증가시키며 배합하였으며, 거저리 원료사료는 대조구에 0% 첨가하고, 거저리 유충 처리구에는 거저리 유충 3%, 거저리유충+배지 처리구에는 유충과 배지를 각각 1.5%씩 첨가하였으며, 거저리유충+성충 처리구에는 거저리 유충과 성충을 각각 1.5%씩 첨가하여 거저리 원료사료를 첨가한 처리구는 총 3%의 거저리 원료를 첨가한 것으로 배합하였다. 실험사료는 기타 원료사료들을 조정하여 임신모돈의 영양소 요구량 (NRC, 1998)을 충족하도록 배합하였다. 임신돈 실험사료의 대사에너지 (ME; metabolizable energy)는 3,265 kcal/kg으로 설정하였으며, 조단백질 함량은 12.9%, 라이신(lysine)의 함량은 0.74%에 맞춰 배합하였다. 기타 아미노산, 비타민 및 광물질 요구량 또한 NRC(1998)의 요구수준과 같거나 높은 수준으로 충족시켰으며, 실험사료의 원료 및 화학적 조성은 표 1에 제시하였다. 포유돈 실험사료는 부경양돈농협에서 생산되는 포유모돈용 시판사료를 동일하게 급여하였다.

표 1. 실험사료의 사료배합비와 화학적 조성

Ingredients, %	Treatment ¹⁾			
	CON	L3	LW3	LA3
Corn	77.65	76.50	74.66	76.81
SBM-46	9.67	10.93	12.12	10.27
Tallow	0.89	0.23	0.87	0.52
Fishmeal	3.00	0.00	0.00	0.00
Wheat bran	5.00	5.00	5.00	5.00
<i>Tenebrio molitor</i> larva	0.00	3.00	0.00	1.50
<i>Tenebrio molitor</i> imago	0.00	0.00	1.50	1.50
<i>Tenebrio molitor</i> waste	0.00	0.00	1.50	0.00
L-lysine · HCl	0.32	0.36	0.39	0.41
DL-methionine	0.00	0.03	0.04	0.03
DCP	2.15	2.48	2.42	2.49
Limestone	0.72	0.87	0.90	0.87
Vit. Mix ²⁾	0.10	0.10	0.10	0.10
Min. Mix ³⁾	0.10	0.10	0.10	0.10
Choline chloride-50	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30
Sum	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical Composition ⁴⁾				
ME (kcal/kg)	3,265.04	3,265.10	3,265.10	3,265.11
CP (%)	12.90	12.90	12.90	12.90
Lysine (%)	0.74	0.74	0.74	0.74
Methionine (%)	0.24	0.23	0.23	0.23
Ca (%)	0.90	0.90	0.90	0.90
Total P (%)	0.70	0.70	0.70	0.70

¹⁾ Treatment: CON: corn-SBM based diet, L3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 3%, LW3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + waste 1.5%, LA3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + imago 1.5%.

²⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D3, 1,600 IU; vitamin E, 32 IU; d-biotin, 64g; riboflavin, 3.2mg; calcium pantothenic acid, 8mg; niacin, 16mg; vitamin B12, 12g; vitamin K, 2.4mg.

³⁾ Provided the following per kilogram of diet: Se, 0.1mg; I, 0.3mg; Mn, 24.8mg; CuSO₄, 54.1mg; Fe, 127.3mg; Zn, 84.7mg; Co, 0.3mg.

⁴⁾ Calculated values

3) 사양 실험 및 관리 (Growth trial and management)

본 실험에서 온도와 환기량은 환기팬과 자동제어장치에 의하여 자동으로 조절되었으며, 전체 실험기간 동안 물은 자유채식(*ad libitum*)토록 하였다. 사료는 임신기에는 각 처리구에 맞게 오전(8:30)에 일일 1회 급여하였으며 급여량은 2.4kg/일로 75일령부터 110일령까지 동일량을 급여하였다. 임신 110일령에 임신돈들을 분만사로 이동시켰으며 이동 후부터 분만시까지 사료를 단계적으로 감량 급여하여 분만에 대비하였다. 분만 후에는 4일령까지 제한 급이를 하다가 5일령부터는 각 처리구에 따라 물과 사료를 자유채식 (*ad libitum*)토록 하였다. 신생자돈들은 출생 후 24시간 이내에 견치, 단미, 철분주사, 이각을 실시하였고, 각 그룹 안에서 양자를 보낸 후 실험이 개시되었고 수태지의 거세는 분만 후 3일령에 일괄적으로 이루어졌다.

4) 샘플 채취 (Sampling)

임신기 체중 및 등지방 두께 측정은 각각 임신 75일령, 95일령, 110일령에 시행되었다. 분만 종료 후 총산자수, 생존산자수, 사산 및 미라수가 기록되었으며 각 자돈의 체중과 복당 자돈체중을 측정하였다. 포유기에는 분만 24시간 이내와 21일령에 모돈의 체중 및 등지방 두께를 측정하였으며, 포유자돈의 체중과 사료섭취량을 측정하여 이를 바탕으로 사양성적을 계산하였다. 모돈의 모유성분을 조사하기 위해 혈관에 옥시토신 0.5 ml를 주사하여 젖 분비를 촉진한 후 돈유를 채취하여 유성분 분석기(MilkoScan FT20, FOSS Electric Co., Denmark)로 유지방(fat), 유단백질(protein), 락토오즈(lactose), 총 고형물(Total solid), 무지고형물(Solids not fat : SNF)을 측정하였다. 각 일령의 체중 측정 시 경정맥에서 혈액을 채취하였으며, 채집된 혈액은 4°C에서 3,000 rpm 으로 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고 분석 전까지 냉동보관(-20°C)하였다.

5) 통계 분석

통계분석은 SAS의 General Linear Model (GLM)을 이용하여 수집된 자료의 유의성을 검정하였다. 성장성적의 경우 개별 모돈을 experimental unit으로 설정하였으며, 혈액분석과 모유분석의 경우 각 개체를 unit으로 설정하였다. 통계분석에 따른 유의성 검정시, $P < 0.05$ 인 경우 유의차가 있는 것으로, $P < 0.01$ 인 경우 고도의 유의차가 있는 것으로 간주하였다. $0.05 \leq P < 0.10$ 일 경우 경향이 있는 것으로 고려하였다.

3. 실험 결과 및 고찰 (Results and Discussion)

1) 임신기 체중 및 등지방 변화

임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가가 임신기 모돈의 체중 및 등지방 변화에 미치는 영향을 표 2에 제시하였다. 사양실험 결과, 거저리 원료의 형태별 첨가는 임신돈의 체중, 증체량, 등지방 두께 및 등지방 두께 변화에 유의적인 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. 이

러한 결과는 임신 75일령부터 임신돈 사료 내 거저리원료를 유충, 유충+배지, 유충+성충 으
로 3%까지 첨가하여도 임신돈의 체형변화에는 대조구와 동일한 성적을 내며, 부정적인 영향
은 미치지 않는 결과인 것으로 사료된다.

표 2. 거저리 원료의 형태별 급여가 임신돈의 성장성적에 미치는 영향

Criteria	Treatment ¹⁾				SEM ²⁾	P-value
	CON	L3	LW3	LA3		
No. of sows	6	6	6	6		
Body weight, kg						
Initial (75 day)	240.7	240.0	245.4	234.3	3.34	0.66
90ay	249.3	245.6	254.6	241.5	3.47	0.54
110 day	270.1	269.2	275.7	265.9	3.72	0.83
BW gain(75-110d)	29.4	29.2	30.3	31.7	1.29	0.93
Backfat thickness, mm						
Initial (75 day)	20.4	21.7	21.3	21.3	0.91	0.98
90ay	20.1	20.3	21.4	22.2	0.85	0.84
110 day	21.0	22.3	21.6	22.2	0.82	0.96
BF gain(75-110d)	0.6	0.6	0.3	0.9	0.37	0.95

¹⁾ Treatment: CON: corn-SBM based diet, L3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 3%, LW3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + waste 1.5%, LA3%: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + imago 1.5%.

²⁾ Standard error of means.

2) 임신기 혈액성상

임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가가 임신기 모돈의 혈액성상에 미치는 영향을 표 3
에 제시하였다. 임신기 모돈의 혈액을 75일령, 90일령, 110일령에 채취하여 분석한 결과, 거
저리 원료의 형태별 첨가에 따른 임신 모돈의 혈중 glucose, insulin, BUN, total protein 농
도에 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 대조구에 비해서도 차이가 나지 않았다. 혈중 FFA
농도에서는 90일령에 거저리 원료를 첨가한 처리구들의 혈중 농도가 대조구에 비해 유의적인
낮은 결과가 나타났지만(P=0.01), 110일령에서는 처리구간의 유의적인 차이가 나타나지 않
았다.

간건강의 대표적인 지표로 사용되는 AST와 ALT농도에서는 거저리 원료의 형태별 첨가에
따른 대조구와 통계적 유의차는 나타나지 않았다. 이를 통해 임신돈 사료 내 거저리 원료사료
의 형태별 첨가가 임신모돈의 혈액성상에 유의적인 영향을 미치지 않으며, 임신돈의 간 건강에
도 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

표 3. 거저리 원료의 형태별 급여가 임신모돈의 혈액성상에 미치는 영향

Criteria	Treatment ¹⁾				SEM ²⁾	P-value
	CON	L3	LW3	LA3		
Glucose, mg/dL						
75 d	77.17	77.17	77.17	77.17		
90 d	63.50	71.25	73.50	69.00	2.318	0.57
110 d	73.00	69.50	73.50	75.00	1.321	0.60
Insulin, μ U/mL						
75 d	0.097	0.097	0.097	0.097		
90 d	0.065	0.096	0.104	0.102	0.010	0.51
110 d	0.067	0.079	0.074	0.112	0.007	0.12
BUN, mg/dL						
75 d	12.18	12.18	12.18	12.18		
90 d	9.78	12.30	9.70	10.75	0.512	0.34
110 d	10.55	11.10	9.38	10.45	0.461	0.71
Total protein, g/dL						
75 d	7.70	7.70	7.70	7.70		
90 d	7.73	7.95	7.43	7.45	0.089	0.18
110 d	7.23	7.15	6.83	7.10	0.105	0.69
FFA,						
75 d	42.67	42.67	42.67	42.67		
90 d	61.50 ^a	48.25 ^b	38.75 ^b	49.00 ^b	3.596	0.01
110 d	58.50	53.25	62.00	71.75	6.017	0.79
AST, U/L						
75 d	17.33	17.33	17.33	17.33		
90 d	17.75	19.25	17.50	17.50	1.109	0.85
110 d	14.75	16.25	30.50	15.15	3.526	0.38
ALT, U/L						
75 d	25.00	25.00	25.00	25.00		
90 d	33.50	30.25	27.50	30.00	0.780	0.10
110 d	30.00	27.25	26.00	26.75	0.922	0.42

¹⁾ Treatment: CON: corn-SBM based diet, L3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 3%, LW3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + waste 1.5%, LA3%: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + imago 1.5%.

²⁾ Standard error of means.

^{ab} Means in a same row with different superscript significantly different (P<0.05)

3) 분만 성적 (Reproductive performance)

임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가가 모든의 번식성적에 미치는 영향을 표 4에 제시하였다. 총산자, 미라, 생시자돈수에서는 처리구간의 유의차가 나타나지 않았지만, 사산수(stillborn)에서 거저리 원료들을 첨가한 처리구들의 사산수가 대조구에 비해 유의적으로 감소하는 결과가 나타났다 (P=0.04). 복당 체중(litter weight) 및 자돈 체중(piglet weight)에서는 처리구간의 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 복당생시체중(alive litter weight) 및 생시자돈체중(alive piglet weight)에서도 처리구간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 이러한 결과를 종합하여볼 때, 거저리 원료를 형태별로 3%씩 첨가하여도 모든의 분만성적에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

표 4. 거저리 원료의 형태별 급여가 임신돈의 분만성적에 미치는 영향

Criteria	Treatment ¹⁾				SEM ²⁾	P-value
	CON	L3	LW3	LA3		
Total born, pigs/litter	13.83	12.80	11.33	11.40	0.815	0.71
Still born, pigs/litter	2.17 ^a	1.00 ^{ab}	0.50 ^b	0.80 ^b	0.231	0.04
Mummy, pigs/litter	0.17	0.20	0.50	0.20	0.150	0.83
Born alive, pigs/litter	11.50	11.60	10.33	10.40	0.673	0.84
Litter weight, kg	19.36	19.48	18.64	18.93	0.768	0.97
Piglet weight, kg	1.40	1.52	1.65	1.66	0.058	0.66
Alive litter weight, kg	16.71	18.08	17.17	17.40	0.627	0.82
Alive piglet weight, kg	1.45	1.56	1.66	1.67	0.061	0.63

¹⁾ Treatment: CON: corn-SBM based diet, L3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 3%, LW3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + waste 1.5%, LA3%: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + imago 1.5%.

²⁾ Standard error of means.

^{ab} Means in a same row with different superscript significantly different (P<0.05)

4) 포유기 모든의 체중 및 등지방 변화

임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가가 포유모든의 포유기 체형변화에 미치는 영향을 표 5에 제시하였다. 3주간의 포유기 실험결과, 임신기의 거저리원료의 형태별 첨가사료를 급여한 모든의 포유기 체형변화에는 대조구에 비해 차이가 없는 것으로 나타났다. 포유개시시 및 포유종료시(3주)의 체중과 등지방 두께 모두 처리구간의 통계적 유의차가 나타나지 않았으며, 각각의 체중변화량 및 등지방두께 변화량에서도 처리구간의 통계적인 유의차는 나타나지 않았다. 포유기 사료섭취량에서는 대조구의 사료섭취량이 다른 처리구들에 비해 수치적으로 높지만, 통계적으로 유의적인 차이가 나지는 않았다. 이유 후 재귀발정일(WEI)을 측정한 결과 처리구간의 통계적 유의차는 나타나지 않았지만, 거저리 유충과 성충을 혼합하여 첨가한 처리구의 WEI가 다른 처리구들에 비해 수치적으로 짧게 나타났다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때, 임신돈에 거저리원료를 다양한 형태로 급여하여도 포유기 모든의 체형변화, 사료섭취량, 이유 후 재귀발정일이 대조구에 비해 유의적인 차이가 없으며, 부정적인 영향 또한 없는 것으로 사료된다.

표 5. 거저리 원료의 형태별 급여가 포유기 모돈의 체형변화에 미치는 영향

Criteria	Treatment ¹⁾				SEM ²⁾	P-value
	CON	L3	LW3	LA3		
No. of sows	6	5	5	6		
Body weight, kg						
24 hrs postpartum	237.3	241.9	240.5	240.7	3.22	0.98
Day 21 of lactation	234.8	242.3	230.0	240.5	3.63	0.67
Changes (0-21d)	-2.5	0.4	-10.5	-0.2	1.90	0.11
Backfat thickness, mm						
24 hrs postpartum	19.8	21.3	22.5	21.0	0.83	0.79
Day 21 of lactation	18.6	18.6	21.7	20.9	0.95	0.68
Changes (0-21d)	-1.2	-2.7	-0.8	-0.1	0.43	0.22
ADFI, kg	6.20	5.92	5.71	5.71	0.095	0.22
WEI, day	4.25	4.38	4.20	3.88	0.103	0.48

¹⁾ Treatment: CON: corn-SBM based diet, L3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 3%, LW3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + waste 1.5%, LA3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + imago 1.5%.

²⁾ Standard error of means.

5) 포유기 자돈의 성장 성적

임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가가 포유기 모돈의 포유성적에 미치는 영향을 표 6에 제시하였다. 3주간의 포유성적 결과에서, 처리구에 따른 포유개시두수 및 이유두수에서 처리구간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 복당체중 및 자돈체중에서도 포유개시시 및 포유 3주차에서 대조구와 거저리 처리구들 간에 통계적 유의차는 나타나지 않았다. 또한 복당증체량 및 자돈증체량에서도 처리구 간에 통계적 유의차가 나타나지 않았다. 그러므로 임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가는 대조구에 비하여 포유기 모돈의 포유성적 및 자돈성적에 대등한 결과를 가지는 것으로 사료된다.

표 6. 거저리 원료의 형태별 급여가 포유자돈의 성장성적에 미치는 영향

Criteria	Treatment ¹⁾				SEM ²⁾	P-value
	CON	L3	LW3	LA3		
Cross-fostered, pigs	11.17	11.80	11.17	10.80	0.270	0.63
Weaned pigs	10.83	11.60	10.33	9.80	0.298	0.22
Litter weight, kg						
After cross-fostering	16.68	16.76	16.73	17.60	0.473	0.96
Day 21 of lactation	68.41	68.32	61.95	61.32	1.898	0.31
Weight gain, kg	51.73	51.56	45.21	43.72	1.785	0.19
Piglet weight, kg						
After cross-fostering	1.49	1.43	1.53	1.64	0.053	0.58
Day 21 of lactation	6.29	5.90	6.11	6.29	0.460	0.82
Weight gain, kg	4.80	4.48	4.58	4.64	0.142	0.90

¹⁾ Treatment: CON: corn-SBM based diet, L3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 3%, LW3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + waste 1.5%, LA3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + imago 1.5%.

²⁾ Standard error of means.

6) 포유기 혈액성상

임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가가 포유기 모돈의 혈액성상에 미치는 영향을 표 7에 제시하였다. 포유모돈의 혈액을 포유개시시 및 포유3주차에 채취하여 분석한 결과, 처리구에 따른 포유모돈의 혈중 FFA, glucose, insulin, BUN, total protein의 유의적인 효과는 나타나지 않았다. 그렇지만, 간건강을 나타내는 지표인 ALT항목에서 대조구에 비해 거저리 처리구들의 농도가 유의적으로 낮게 나타나는 결과를 보였다 (P=0.03). 거저리 원료의 첨가가 포유모돈의 혈중 ALT농도를 감소시키는 효과를 보였지만, 구체적으로 어떤 메카니즘으로 작용하는지에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가가 포유기 자돈의 혈액성상에 미치는 영향을 표 8에 제시하였다. 포유기 자돈의 혈중 FFA, BUN, total protein 농도에는 처리구간의 차이가 없었지만, 혈중 glucose농도에서는 거저리유충과 성충을 혼합한 처리구의 혈중 glucose농도가 다른 처리구들에 비해 높은 경향이 나타났다 (P=0.08). 포유자돈은 모돈으로부터 섭취한 젖을 통하여 영양분을 공급받음으로, 포유개시시의 포유자돈의 혈중 glucose가 높다는 것은 모돈의 태중에서 공급받은 glucose가 많이 축적되어 있었거나, 포유모돈의 양질의 초유를 공급받았다는 것을 의미하며, 포유초반 에너지원 공급이 다른 처리구들에 비해 원활하여 포유자돈의 건강, 성장, 체온유지에 긍정적인 영향을 줄 수 있는 것으로 사료된다. 포유자돈의 ALT와 AST농도에서는 대조구에 비해 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 결과적으로 임신돈 사료 내 거저리 유충+성충의 급여가 생시자돈의 혈중 glucose를 높여 포유자돈의 건강성 및 성장에 긍정적인 영향을 주는 것으로 사료된다.

표 7. 거저리 원료의 형태별 급여가 포유모돈의 혈액성상에 미치는 영향

Criteria	Treatment ¹⁾				SEM ²⁾	P-value
	CON	L3	LW3	LA3		
Free fatty acid, μ Eq/L						
24 hrs postpartum	297.3	365.3	339.0	525.5	71.77	0.77
21 d	332.3	169.3	191.3	222.8	66.71	0.85
Glucose, mg/dL						
24 hrs postpartum	93.3	92.0	105.3	91.3	2.43	0.19
21 d	72.0	78.8	72.8	82.3	4.73	0.87
Insulin, μ U/mL						
24 hrs postpartum	0.13	0.13	0.13	0.13	0.012	0.99
21 d	0.20	0.14	0.32	0.41	0.067	0.47
BUN, mg/dL						
24 hrs postpartum	11.2	11.4	13.9	11.1	0.71	0.40
21 d	17.6	18.0	16.3	19.4	0.79	0.67
Total protein, g/dL						
24 hrs postpartum	6.98	6.98	6.83	6.70	0.10	0.81
21 d	7.53	7.13	7.43	7.53	0.11	0.55
AST, U/L						
24 hrs postpartum	48.8	61.3	86.8	62.3	7.26	0.16
21 d	33.0	51.0	25.0	29.8	4.99	0.24
ALT, U/L						
24 hrs postpartum	28.3	29.0	29.3	26.3	0.86	0.59
21 d	37.0 ^a	32.8 ^{ab}	26.8 ^b	30.8 ^b	1.40	0.03

¹⁾ Treatment: CON: corn-SBM based diet, L3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 3%, LW3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + waste 1.5%, LA3%: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + imago 1.5%.

²⁾ Standard error of means.

^{ab} Means in a same row with different superscript significantly different (P<0.05)

표 8. 거저리 원료의 형태별 급여가 포유자돈의 혈액성상에 미치는 영향

Criteria	Treatment ¹⁾				SEM ²⁾	P-value
	CON	L3	LW3	LA3		
Free fatty acid, μ Eq/L						
24 hrs postpartum	269.5	232.3	288.5	216.0	30.48	0.87
21 d	343.5	397.3	333.3	388.3	29.33	0.86
Glucose, mg/dL						
24 hrs postpartum	104.0 ^B	117.3 ^{AB}	109.3 ^B	150.8 ^A	6.73	0.08
21 d	123.5	109.0	115.8	123.0	3.34	0.36
BUN, mg/dL						
24 hrs postpartum	21.2	18.2	16.1	21.4	1.20	0.30
21 d	10.8	10.5	10.8	8.8	0.55	0.11
Total protein, g/dL						
24 hrs postpartum	5.80	5.30	7.03	5.55	0.28	0.17
21 d	5.15	5.20	5.15	4.80	0.08	0.28
AST, U/L						
24 hrs postpartum	99.8	124.3	140.5	104.3	10.52	0.60
21 d	59.5	49.0	55.5	78.8	8.49	0.71
ALT, U/L						
24 hrs postpartum	27.8	30.8	36.0	31.0	2.73	0.82
21 d	32.5	35.8	29.0	38.8	1.86	0.35

¹⁾ Treatment: CON: corn-SBM based diet, L3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 3%, LW3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + waste 1.5%, LA3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + imago 1.5%.

²⁾ Standard error of means.

^{AB} Means in a same row with different superscript significantly different (P<0.10)

7) 유성분의 변화

임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가가 포유기 모돈의 혈액성상에 미치는 영향을 표 9에 제시하였다. 임신돈 사료 내 거저리 원료의 첨가가, 포유기 모돈의 유성분 조성에 미치는 영향을 조사한 결과, 거저리 원료의 형태별 첨가는 모유 내 카제인(casein), 유단백질(protein), 락토오스(lactose), 고형분(total solid), 무지고형분(solid not fat), 유리지방산(free fatty acid)조성에는 유의적인 영향을 미치지 못하였다. 그러나 초유 내 유지방 함량에서 거저리원료를 형태별로 첨가한 처리구들의 유지방 함량이 대조구에 비해 유의적 높은 경향이 나타났다 (P=0.07). 이를 통해, 임신기 사료 내 거저리 원료의 첨가는 포유돈의 초유 내 유지방함량을 높여주는 효과를 가지며, 거저리의 첨가 형태에 따른 큰 차이는 없는 것으로 사료된다.

표 9. 임신기 사료 내 거저리 원료의 형태별 첨가가 모유 성분에 미치는 영향

Criteria	Treatment ¹⁾				SEM ²⁾	P-value
	CON	L3	LW3	LA3		
Casein, %						
Colostrum	6.01	7.34	6.72	6.21	0.402	0.62
21 d	4.73	4.63	4.57	4.61	0.050	0.80
Fat, %						
Colostrum	5.53 ^B	7.74 ^A	7.12 ^{AB}	7.54 ^A	0.338	0.07
21 d	6.46	7.42	7.45	8.24	0.354	0.49
Protein, %						
Colostrum	7.56	9.47	8.50	7.95	0.584	0.66
21 d	5.26	5.07	5.15	5.03	0.061	0.60
Lactose, %						
Colostrum	4.63	3.95	4.56	4.23	0.180	0.52
21 d	6.17	6.13	5.81	5.94	0.099	0.62
Total solid, %						
Colostrum	19.86	24.04	22.63	22.13	0.762	0.22
21 d	19.33	20.03	19.90	20.77	0.354	0.68
Solid not fat, %						
Colostrum	12.69	13.97	13.46	12.59	0.456	0.63
21 d	11.67	11.38	11.14	11.15	0.106	0.33
Free fatty acid, %						
Colostrum	4.65	4.54	4.26	4.42	0.101	0.49
21 d	3.57	4.40	4.06	3.49	0.151	0.18

¹⁾ Treatment: CON: corn-SBM based diet, L3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 3%, LW3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + waste 1.5%, LA3: basal diet + *tenebrio molitor* larva 1.5% + imago 1.5%.

²⁾ Standard error of means.

^{AB} Means in a same row with different superscript significantly different (P<0.10).

4. 결론 (Conclusion)

본 연구는 임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가가 임신모돈의 번식성적, 포유성적, 혈액성상, 모유성분에 미치는 영향을 조사하기 위해 수행되었다. 본 연구를 수행한 결과, 임신기 모돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가는 모돈의 임신기 체형변화 및 포유기 체형변화에는 대조구와 차이가 없었으며, 번식성적 및 포유성적에서도 대조구에 비해 거저리 원료를 첨가한 처리구들의 성적에 차이가 나타나지 않았다. 임신기 및 포유기 모돈의 혈액성상에서는 거저리 원료의 형태별 첨가에 따른 부정적인 영향은 나타나지 않았으며, 포유자돈의 포유개시시 혈중 glucose가 높아지는 결과가 나타났다. 또한 초유 내 유지지방함량에서도 거저리원료를 첨가한 처리구들의 유지지방함량이 높아지는 효과를 기대할 수 있는 것으로 나타났다. 결론적으로 임신돈 사료 내 거저리원료의 형태별 첨가는 대조구에 비해 모돈 및 자돈의 생산성 및 건강성에 부정적인 영향을 미치지 않으며, 초유의 유지지방함량을 높여주어 포유개시시의 자돈의 건강성에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료된다.

실험 4. 거저리 원료사료의 수준별 급여가 임신 모돈의 생리적 변화와 분만성적에 미치는 영향 규명

1. 서론 (Introduction)

전세계적으로 곤충산업에 대한 높은 관심과 투자로, 곤충산업의 시장규모는 2007년 11조원이었으며, 2020년에는 38조원까지 늘어날 전망으로, 세계 각국은 곤충산업을 국가전략산업으로 지정하여 정책적으로 육성하고 있는 실정이다. 아시아 지역에서는 특히 식의약품 곤충시장의 규모가 특징적으로 확대되고 있으며, 이외에도 기능성 식품이나 약용곤충, 축산분뇨 및 쓰레기 분해곤충, 가축사료용 곤충 등이 개발되고 있다. 곤충 사료화 시장은 조류, 어류, 파충류 등 애완동물 사료를 중심으로 발달되어 있으며 아직까지 양계 및 양돈 등의 가축을 대상으로 하는 단백질 원료로는 생산되고 있지는 않고 있다.

현재 국내 곤충산업은 식용, 약용, 애완 등 초보단계이며 사료 및 식의약품분야는 이제 조성이 시작되고 있는 단계이지만, 또한 사료용 곤충의 대량생산체계 및 1차 가공방법 등의 개발이 이루어지고 있는 사육기반이 초기단계이다. 국내에서는 갈색거저리를 사료용 곤충으로 도입하여 단백질 원료로써 이용성을 높이고자 지속적인 연구가 진행 중에 있다. 일반적으로 곤충사료의 영양소 이용효율이 식물성 원료에 비해 높아 단백질 원료로서의 가치가 높다. 식물성 단백질은 곤충의 체내에서 동물성 단백질로 합성되고 축적되며, 뼈나 내장같이 가공과정에서의 유실되는 부분이 거의 없어 소나 돼지 등의 가축에 비해 4배에서 최고 9배 수준의 효율적으로 영양소를 축적할 수 있으며, 동물성 단백질의 특성상 높은 이용률을 가지게 된다. 곤충체는 보통 필수 아미노산이 풍부하며, 귀뚜라미, 동애등애, 메뚜기, 거저리 등은 여러 연구를 통해 동물사료에 단백질원으로서의 우수한 가치가 입증되어왔다. 곤충의 아미노산 조성은 대부분의 경우에서 곡물이나 두과류에 비해 우수한 것으로 알려져 있으며 단쇄 불포화 지방산이 풍부하여 지방의 이용효율 또한 기대할 수 있다. 이러한 곤충을 대상으로 개발한 사료개발은 매우 안전하고 저비용의 고품질 단백질 원료의 생산을 가능하게 할 수 있으며, 대량생산체계를 구축함으로써 품질 및 공급을 안정시킬 경우, 사료 내 대두박 및 어분 원료를 대체할 수 있는 단백질 원료사료 시장을 개척할 수 있을 것으로 사료된다.

새로운 단백질 사료원료자원의 개발을 위한 거저리 원료의 연구는 매우 고무적인 일이지만, 사료 내 거저리 원료 사용에 대한 검증시험은 필수적으로 수행되어야 하는 선결과제이다. 따라서 본 연구에서는 임신모돈에서 거저리 원료의 사료화 가능성을 조사하기 위하여 수행되었다.

2. 재료 및 방법 (Materials and Methods)

1) 실험 동물 및 실험 설계 (Experimental animal and design)

본 실험은 평균체중 241.15 ± 4.22 kg의 F1 교잡종 (Yorkshire \times Landrace) 경산 모돈 24두를 공시하여, 체중과 등지방 두께에 따라 4개 처리구에 완전임의배치법(CRD; completely randomized design)으로 배치하여 수행되었다. 실험돈군은 임신돈 스톨($2.4 \times 0.64\text{m}^2$)에서 사양되었으며 중부 후 110일령에 분만틀(분만틀의 넓이 $2.5 \times 1.8\text{m}^2$, 높이 500mm)로 이동시켜 분만실험 및 포유기 실험을 진행하였다. 실험돈은 임신이 확정된 임신돈들을 대상으로 75일령부터 실험사료를 급여하였고 사료 급여량은 실험농장의 사료급여프로그램에 따라 조정되었다. 실험은 임신 75일령부터 시작하여 분만 시까지 임신기 사양실험을 진행하고 분만 후 포유 21일령까지 포유기 실험을 진행하였다. 실험처리구는 사료 내 거저리 유충의 첨가수준으로 결정하였으며, 거저리 유충의 첨가수준은 0%, 1%, 2%, 3%로 설정하였다. 임신기 사양실험 중에는 배합된 처리구에 맞는 배합된 실험사료를 급여하였으며, 포유기 사양실험 중에는 동일한 포유모돈 시판사료를 급여하였다.

2) 실험 사료 (Experimental diet)

실험 사료는 옥수수-대두박 위주의 기초사료에 거저리 유충의 첨가수준을 점차적으로 증가시키며 배합하였으며, 거저리 유충은 대조구에 0% 첨가하고, 1%, 2%, 3%로 첨가하였다. 실험사료는 기타 원료사료들을 조정하여 임신모돈의 영양소 요구량 (NRC, 1998)을 충족하도록 배합하였다. 임신돈 실험사료의 대사에너지 (ME; metabolizable energy)는 3,265 kcal/kg으로 설정하였으며, 조단백질 함량은 12.9%, 라이신(lysine)의 함량은 0.74%에 맞춰 배합하였다. 기타 아미노산, 비타민 및 광물질 요구량 또한 NRC(1998)의 요구수준과 같거나 높은 수준으로 충족시켰으며, 실험사료의 원료 및 화학적 조성은 표 1에 제시하였다. 포유돈 실험사료는 부경양돈농협에서 생산되는 포유모돈용 시판사료를 동일하게 급여하였다.

표 1. 실험사료의 사료배합비와 화학적 조성

Ingredients, %	<i>Tenebrio molitor</i> Larva			
	0 %	1 %	2 %	3 %
Corn	77.62	77.48	77.34	77.22
SBM-46	9.70	9.70	9.70	9.70
Tallow	0.90	0.63	0.36	0.08
Fishmeal	3.00	2.27	1.54	0.80
Wheat bran	5.00	5.00	5.00	5.00
<i>Tenebrio molitor</i> larva	0.00	1.00	2.00	3.00
L-lysine · HCl	0.31	0.33	0.34	0.35
DL-methionine	0.00	0.00	0.01	0.02
DCP	2.15	2.22	2.29	2.37
Limestone	0.72	0.77	0.82	0.86
Vit. Mix ¹⁾	0.10	0.10	0.10	0.10
Min. Mix ²⁾	0.10	0.10	0.10	0.10
Choline chloride-50	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30
Sum	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical Composition ³⁾				
ME (kcal/kg)	3,265.00	3,265.00	3,265.00	3,265.00
CP (%)	12.90	12.90	12.90	12.90
Lysine (%)	0.74	0.74	0.74	0.74
Methionine (%)	0.23	0.23	0.23	0.23
Ca (%)	0.90	0.90	0.90	0.90
Total P (%)	0.70	0.70	0.70	0.70

¹⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D3,1,600IU; vitamin E, 32IU; d-biotin, 64g; riboflavin, 3.2mg; calcium pantothenic acid, 8mg; niacin, 16mg; vitamin B12, 12g; vitaminK, 2.4mg.

²⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1mg; I, 0.3mg; Mn, 24.8mg; CuSO4, 54.1mg; Fe, 127.3mg; Zn, 84.7mg; Co, 0.3mg.

³⁾ Calculated values

3) 사양 실험 및 관리 (Growth trial and management)

본 실험에서 온도와 환기량은 환기팬과 자동제어장치에 의하여 자동으로 조절되었으며, 전체 실험기간 동안 물은 자유채식(*ad libitum*)토록 하였다. 사료는 임신기에는 각 처리구에 맞게 오전(8:30)에 일일 1회 급여하였으며 급여량은 2.4kg/일로 75일령부터 110일령까지 동일량을 급여하였다. 임신 110일령에 임신돈들을 분만사로 이동시켰으며 이동 후부터 분만 시까지 사료를 단계적으로 감량 급여하여 분만에 대비하였다. 분만 후에는 4일령까지 제한 급여를 하다가 5일령부터는 각 처리구에 따라 물과 사료를 자유채식 (*ad libitum*)토록 하였다. 신생 자돈들은 출생 후 24시간 이내에 견치, 단미, 철분주사, 이각을 실시하였고, 각 그룹 안에서 양자를 보낸 후 실험이 개시되었고 수태지의 거세는 분만 후 3일령에 일괄적으로 이루어졌다.

4) 샘플 채취 (Sampling)

임신기 체중 및 등지방 두께 측정은 각각 임신 75일령, 95일령, 110일령에 시행되었다. 분만 종료 후 총산자수, 생존산자수, 사산 및 미라수가 기록되었으며 각 자돈의 체중과 복당 자돈체중을 측정하였다. 포유기에는 분만 24시간 이내와 21일령에 모든의 체중 및 등지방 두께를 측정하였으며, 포유자돈의 체중과 사료섭취량을 측정하여 이를 바탕으로 사양성적을 계산하였다. 모든의 모유성분을 조사하기 위해 혈관에 옥시토신 0.5 ml를 주사하여 젖 분비를 촉진한 후 돈유를 채취하여 유성분 분석기(MilkoScan FT20, FOSS Electric Co., Denmark)로 유지방(fat), 유단백질(protein), 락토오즈(lactose), 총 고형물(Total solid), 무지고형물(Solids not fat : SNF)을 측정하였다. 각 일령의 체중 측정 시 경정맥에서 혈액을 채취하였으며, 채집된 혈액은 4°C에서 3,000 rpm 으로 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고 분석 전까지 냉동보관(-20°C)하였다.

5) 통계 분석

통계분석은 SAS의 General Linear Model (GLM)을 이용하여 수집된 자료의 유의성을 검정하였다. 성장성적의 경우 개별 모돈을 experimental unit으로 설정하였으며, 혈액분석과 모유분석의 경우 각 개체를 unit으로 설정하였다. 거저리 유충의 첨가수준의 증가에 따른 효과를 추정하기 위해 orthogonal polynomial contrast를 통해 거저리 유충의 첨가수준에 따른 linear 및 quadratic effect를 조사하였으며, $P < 0.05$ 인 경우 유의차가 있는 것으로, $P < 0.01$ 인 경우 고도의 유의차가 있는 것으로 간주하였다. $0.05 \leq P < 0.10$ 일 경우 경향이 있는 것으로 고려하였다.

3. 실험 결과 및 고찰 (Results and Discussion)

1) 임신기 체중 및 등지방 변화

임신돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 임신기 모돈의 체중 및 등지방 변화에 미치는 영향을 표 2에 제시하였다. 사양실험 결과, 거저리 유충의 수준별 첨가는 임신돈의 체중, 증체량, 등지방 두께 및 등지방 두께 변화에 유의적인 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 임신 75일령부터 임신돈 사료 내 거저리 유충을 3%까지 첨가하여도 임신돈의 체형변화에는 부정적인 영향을 미치지 않는 결과인 것으로 사료된다.

표 2. 거저리 유충의 수준별 급여가 임신돈의 성장성적에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
No. of sows	6	6	6	6			
Body weight, kg							
Initial (75 day)	241.5	240.1	239.7	243.3	4.22	0.73	0.90
95day	250.4	250.7	247.3	251.7	4.42	0.89	0.86
110 day	258.1	262.8	260.4	264.0	4.68	0.72	0.78
Weight gain, kg							
Initial ~ 95day	8.9	10.6	7.6	8.4	0.98	0.67	0.43
95~ 110 day	7.7	12.1	13.2	12.3	1.65	0.40	0.44
Overall period	16.6	22.7	20.8	20.8	1.82	0.32	0.78
Backfat thickness, mm							
Initial (75 day)	21.2	21.1	20.3	20.7	0.93	0.95	0.75
95day	21.3	23.0	21.8	22.3	0.92	0.58	0.95
110 day	22.8	23.8	23.3	21.8	0.99	0.62	0.73
Backfat gan, mm							
Initial ~ 95 day	0.1	1.9	1.5	1.6	0.53	0.32	0.67
95~ 110 day	1.5	0.8	1.5	-0.5	0.53	0.83	0.62
Overall period	1.6	2.7	3.0	1.1	0.48	0.24	0.93

¹ Standard error of means.

2) 임신기 혈액성상

임신돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 임신기 모돈의 체중 및 등지방 변화에 미치는 영향을 표 3에 제시하였다. 혈액 분석 결과, 임신기 동안의 glucose, insulin, bun, total protein의 농도에는 거저리 유충의 수준별 첨가에 따른 통계적 유의차가 나타나지 않았다. 간 건강의 대표적인 지표로 사용되는 AST와 ALT에서도 거저리 유충의 수준별 첨가에 따른 통계적 유의차는 나타나지 않았다. 이를 통해 임신돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가는 임신 모돈의 혈액성상에 유의적인 영향을 미치지 못하며, 간 건강에도 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

표 3. 거저리 유충의 수준별 급여가 임신모돈의 혈액성상에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
Glucose, mg/dL							
75 d	92.5	92.5	92.5	92.5			
95 d	63.0	51.3	49.5	51.5	4.20	0.44	0.53
110 d	74.7	75.5	61.0	74.8	2.75	0.62	0.18
Insulin, μ U/mL							
75 d	2.6	2.6	2.6	2.6			
95 d	0.70	0.50	0.63	0.40	0.09	0.67	0.65
110 d	0.68	0.63	0.50	0.70	0.06	0.55	0.70
BUN, mg/dL							
75 d	13.9	13.9	13.9	13.9			
95 d	11.0	40.5	22.3	21.6	5.79	0.16	0.78
110 d	11.5	10.6	24.4	10.9	3.60	0.75	0.40
Total protein, g/dL							
75 d	7.2	7.2	7.2	7.2			
95 d	7.4	9.4	8.6	8.8	0.42	0.22	0.76
110 d	7.2	7.5	8.2	7.4	2.24	0.47	0.38
AST, U/L							
75 d	58.8	58.8	58.8	58.8			
95 d	13.5	9.4	13.3	9.6	1.85	0.68	1.00
110 d	21.0	32.5	23.8	19.3	2.14	0.11	0.20
ALT, U/L							
75 d	24.0	24.0	24.0	24.0			
95 d	29.5	33.3	29.0	20.8	2.14	0.33	0.16
110 d	30.7	31.0	32.5	24.5	1.34	0.44	0.37

¹⁾ Standard error of means.

2) 분만 성적 (Reproductive performance)

임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 분만성적에 미치는 영향을 표4에 나타내었다. 총산자수와 생시자돈수에서는 처리구에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았으며, 사산과 미라 수에는 차이가 없었으며, 사산에 영향을 미치는 요인으로는 산차, 총산자수, 분만 시 소요 시간, 생시체중, 난산 및 모돈의 체형 등이 관여하는 것으로 알려져 있으나, 본 실험에서는

처리구에 따른 유의적인 영향이 나타나지 않았다(Leenhouders 등, 1999; Lucia 등, 2002; Schneider, 2002). 복당 체중에서는 거저리 유충의 첨가수준이 증가함에 따라 복당 체중도 linear하게 증가하는 결과가 나타났다 ($P < 0.01$). 이러한 결과는 사산 및 복당 생시체중을 고려하지 않고 복당 체중만을 고려해보았을 때, 임신돈 사료 내 거저리 유충의 첨가가 모든의 복당 체중을 높일 수 있는 가능성이 있지만, 여러 연구에서 섭취한 단백질의 축적은 대부분이 모돈의 체내 및 자궁에 축적되며 소량만이 태아로 전달되어 축적되는 것으로 보고되고 있다 (Salmon-Legagneur and Rerat, 1962; Salmon-Legagneur, 1965; Elsley 등., 1967). 따라서 식물성 원료에 비하여 소화율이 높은 동물성 원료인 거저리 유충의 첨가가 복당 체중에 미치는 영향을 알아보기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

표 4. 임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 분만성적에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
Total born, pigs/litter	13.0	14.0	14.8	13.5	0.47	0.37	0.66
Still born, pigs/litter	0.0	1.3	1.0	1.8	0.29	0.20	0.19
Mummy, pigs/litter	0.0	0.0	0.0	0.2	0.04	0.65	0.40
Born alive, pigs/litter	13.0	12.7	13.8	11.5	0.51	0.84	0.70
Litter weight, kg	18.03	22.17	21.98	20.87	0.500	<0.01	0.12
Piglet weight, kg	1.45	1.60	1.54	1.57	0.050	0.34	0.66
Litter live weight, kg	18.62	20.34	21.13	18.73	0.575	0.14	0.72
Live piglet weight, kg	1.45	1.58	1.57	1.68	0.053	0.49	0.21

¹⁾ Standard error of means.

3) 포유기 모돈의 체중 및 등지방 변화

임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유모돈의 체중과 등지방 두께 및 사료섭취량에 미치는 영향을 표 5에 나타내었다. 분만 직후 및 포유기 21일령에 모돈의 체중, 등지방 및 각각의 변화량을 측정된 결과, 거저리 유충의 첨가수준에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았지만, 거저리 유충의 첨가수준이 증가함에 따라 체손실이 linear 하게 증가하는 유의적 경향이 나타났다 ($P = 0.06$). 체손실의 증가는 LH 호르몬의 분비를 감소시키며, 이에 따라 다음 산차의 배란수를 감소시켜 재귀발정일이 연장되는 등의 부정적인 결과들이 유발될 수 있다 (Neil, 1996; Quesnel 등, 1998). 그렇지만, 이러한 결과는 표 5에 제시된 복당 포유자돈의 마리수와 증체량을 고려해보았을 때 거저리 유충을 첨가한 처리구의 유생산 요구량이 높아짐에 따라 체손실이 증가한 것으로 사료된다. 또한, 포유기 사료섭취량에서는 처리구간의 통계적 유의차가 발생하지 않았으며, 이는 임신기 사료 내 거저리 유충의 첨가가 포유기 사료섭취량에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 결론적으로, 임신돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가는 포유돈의 체형변화 및 사료섭취량에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

표 5. 임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유모돈에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
No. of sows	6	6	5	6			
Body weight, kg							
24 hrs postpartum	246.8	241.6	225.5	244.9	1.40	0.40	0.40
Day 21 of lactation	246.0	230.0	221.2	237.6	5.01	0.15	0.48
Changes (0-21d)	-0.8	-11.6	-3.6	-7.3	1.69	0.06	0.88
Backfat thickness, m							
24 hrs postpartum	20.8	22.7	21.5	21.0	1.21	0.51	0.89
Day 21 of lactation	20.3	20.1	18.3	19.3	0.85	0.89	0.46
Changes (0-21d)	-0.6	-2.6	-2.7	-1.8	0.64	0.19	0.53
ADFI, kg	5.1	4.6	4.1	4.9	0.14	0.31	0.64

¹⁾ Standard error of means.

4) 포유기 자돈의 성장 성적

임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유자돈의 성장성적에 미치는 영향을 표 6에 나타내었다.

포유자돈은 이유 전까지 모돈의 젖을 섭취함으로써 필요한 영양분을 공급받는다. 이에 따라 포유자돈의 성장은 자돈의 모유섭취량과 모돈의 유생산량과 높은 연관성을 가지게 되며 (Hartmann 등, 1984), 포유자돈의 성장률을 통하여 모돈의 유생산량을 간접적으로 추정하기도 한다 (Lewis 등, 1978). 실험 결과, 포유자돈의 체중 및 증체량에서 처리구에 따른 통계적 유의차가 발생하지 않았으며, 이러한 결과는 해당 처리구가 포유자돈의 성장에 유의미한 영향을 미치지 못하였으며, 포유모돈의 유생산량에도 차이가 없었음을 의미한다. 또한 거저리 유충을 2% 첨가한 처리구의 포유자돈 증체량이 수치적으로 가장 낮게 나타났는데 이는 해당 처리구의 포유모돈의 사료섭취량에 따른 결과인 것으로 사료된다.

표 6. 임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유자돈의 성장성적에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
Cross-fostered, pigs	12.5	12.5	12.6	12.0	0.25	0.83	0.60
Weaned pigs	10.8	11.8	11.0	11.0	0.22	0.18	0.47
Mortality, %	12.7	5.5	12.0	8.0	1.80	0.23	0.85
Litter weight, kg							
After cross-fostering	18.03	19.78	20.03	19.27	0.503	0.19	0.42
Day 21 of lactation	53.25	61.14	57.48	59.24	1.994	0.23	0.73
Weight gain, kg	35.22	41.37	31.20	39.97	1.804	0.34	0.89
Piglet weight, kg							
After cross-fostering	1.46	1.58	1.61	1.61	0.046	0.33	0.28
Day 21 of lactation	4.93	5.13	5.21	5.38	0.126	0.61	0.19
Weight gain, kg	3.47	3.55	3.00	3.77	0.117	0.94	0.40

¹⁾ Standard error of means.

5) 포유기 혈액성상

임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유모돈의 혈액성상에 미치는 영향을 표 7에 나타내었다. 포유기 모돈의 혈액성상을 분석한 결과, free fatty acid, glucose, insulin, total protein에서는 처리구간의 유의적인 차이가 나타나지 않았지만, BUN에서 거저리 유충의 첨가수준이 증가함에 따라 BUN농도가 linear하게 증가하는 유의적 경향이 나타났다 ($P < 0.10$). 혈액 내의 BUN (blood urea nitrogen) 농도는 체내의 필수 영양소중 하나인 아미노산의 이용에 대한 대표적인 지표(Eggum, 1970)로, 섭취한 질소의 체내 유지와 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Whang과 Easter, 2000). 또한 Bergner (1977)는 혈청 내 urea 농도와 사료의 생물가 (biological value)에 역의 상관관계가 있다고 밝힘으로써 BUN이 동물의 단백질 요구량을 결정하거나 (Hatori 등, 1994; Cai 등, 1996), 단일 아미노산의 요구량을 결정하는 지표(Taylor 등, 1985; Coma 등 1995)로서 사용되고 있다. 따라서 본 실험의 BUN농도 결과를 통해, 임신기 동안의 거저리 유충의 수준별 첨가는 분만 직후 포유개시시의 BUN농도를 유의적으로 증가시키는 경향을 가지는 것으로 나타났으며, 비교적 소화율이 높은 동물성단백질인 거저리 유충의 첨가로 분만직후의 단백질 이용율의 저하로 BUN이 증가하게 된 것으로 사료된다. 포유모돈의 간 건강을 측정하기 위해서 AST와 ALT 농도를 조사한 결과, 처리구에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았으므로 임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가는 포유모돈의 간 건강에 유해한 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다.

임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유기 자돈의 혈액성상에 미치는 영향을 표 8에 나타내었다. 혈액성상 분석 결과, 포유자돈의 혈액 성분 중 glucose, total protein, AST, ALT 항목에서는 처리구간의 통계적 유의차가 나타나지 않았다. free fatty acid 항목에서는

포유자돈의 3주차 혈중 농도에서 임신기 사료 내 거저리 유충의 첨가수준이 증가함에 따라 그 농도가 linear 하게 증가하는 결과가 나타났다 (P<0.05) 반면에 BUN 항목에서는 임신기 사료 내 거저리 유충의 첨가수준이 증가함에 따라 그 농도가 linear하게 감소하는 결과가 나타났다 (P<0.05). 이러한 결과는 임신기 사료 내 거저리 유충의 첨가수준이 증가함에 따라 포유자돈의 혈중 free fatty acid 농도가 높아짐에 따라 포유자돈의 지방산 이용률이 높아졌음을 의미하여, 혈중 BUN농도가 감소함에 따라 단백질 이용률은 유의적으로 증가하는 결과로 사료 된다.

표 7. 거저리 유충의 수준별 급여가 포유모돈의 혈액성상에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
Free fatty acid, μ Eq/L							
24 hrs postpartum	197.8	370.5	310.8	279.5	39.80	0.23	0.90
21 d	169.5	137.3	60.5	178.3	40.59	0.59	0.70
Glucose, mg/dL							
24 hrs postpartum	81.0	86.0	78.8	80.5	4.78	0.79	0.73
21 d	71.3	70.3	73.8	61.3	4.35	0.84	0.76
Insulin, μ U/mL							
24 hrs postpartum	2.3	2.8	1.6	4.3	0.44	0.73	0.62
21 d	3.2	2.0	3.9	3.4	0.65	0.68	0.50
BUN, mg/dL							
24 hrs postpartum	11.2	10.1	8.6	12.8	0.62	0.07	0.92
21 d	17.5	17.2	17.3	20.7	0.83	0.55	0.32
Total protein, g/dL							
24 hrs postpartum	6.9	7.1	7.1	7.2	0.13	0.76	0.60
21 d	8.1	8.4	8.2	7.8	0.14	0.37	0.38
AST, U/L							
24 hrs postpartum	49.0	57.0	46.3	53.0	3.40	0.60	0.65
21 d	43.5	52.0	57.3	54.3	4.46	0.34	0.24
ALT, U/L							
24 hrs postpartum	28.0	29.8	28.5	24.0	1.06	0.29	0.21
21 d	30.0	28.0	32.3	28.5	0.96	0.78	0.45

¹⁾ Standard error of means.

표 8. 임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 급여가 포유자돈의 혈액성상에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
Free fatty acid, μ Eq/L							
24 hrs postpartum	139.0	137.5	153.3	145.5	10.65	0.98	0.66
21 d	214.8	386.5	355.3	262.0	26.99	<0.01	0.83
Glucose, mg/dL							
24 hrs postpartum	63.3	99.3	86.5	93.3	7.45	0.16	0.58
21 d	107.3	106.3	111.5	76.8	7.54	0.68	0.47
BUN, mg/dL							
24 hrs postpartum	23.8	15.3	17.2	20.0	1.45	0.04	0.74
21 d	9.63	7.3	7.4	8.3	0.80	0.28	0.69
Total protein, g/dL							
24 hrs postpartum	6.0	5.5	6.3	6.3	0.27	0.52	0.29
21 d	4.6	4.9	5.0	5.1	0.09	0.34	0.24
AST, U/L							
24 hrs postpartum	117.5	143.0	133.8	140.8	12.35	0.59	0.81
21 d	71.3	65.8	67.5	63.3	2.39	0.52	0.46
ALT, U/L							
24 hrs postpartum	41.8	38.5	45.0	46.5	2.50	0.68	0.37
21 d	36.3	42.5	40.8	37.5	2.37	0.33	0.96

¹⁾ Standard error of means.

6) 유성분의 변화

임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 모유 성분에 미치는 영향을 표 9에 나타내었다. 분만 후 24시간 이내의 초유 및 포유 21일차의 돈유성분을 분석한 결과, 카제인, 유단백질, 락토오즈, 무지유고형분 및 유리지방산 함량에서 임신기 사료 내 거저리 유충의 첨가에 따른 특별한 효과가 발견되지 않았다. 유지방과 유고형분에서는 거저리 유충을 2% 첨가했던 처리구가 다른 처리구들에 비해 유의적으로 높은 결과 ($P < 0.05$, $P < 0.10$)가 나타났지만, 초유에서 직접적인 영향이 나타나지 않고 포유 21일령에 이러한 결과가 나타난 것으로 보아 거저리 유충의 첨가에 의한 효과라기보다는 유생산과 관련된 다른 요인들에 의한 결과인 것으로 사료된다. 결론적으로 임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가는 포유기 모돈의 유성분에는 유의적인 영향을 미치지 못하는 것으로 사료된다.

표 9. 임신기 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 모유 성분에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
Casein, %							
Colostrum	6.71	4.73	5.37	6.82	0.494	0.12	0.71
21 d	4.48	4.34	4.57	4.24	0.072	0.90	0.98
Fat, %							
Colostrum	7.25	6.95	6.62	7.64	0.345	0.61	0.97
21 d	6.20 ^b	6.01 ^b	7.62 ^a	6.00 ^b	0.259	0.52	0.08
Protein, %							
Colostrum	8.43	5.75	6.65	8.66	0.689	0.12	0.68
21 d	4.90	4.78	5.08	4.64	0.086	0.93	0.92
Lactose, %							
Colostrum	4.34	4.75	4.58	4.24	0.154	0.23	0.62
21 d	6.15	6.12	5.88	6.20	0.058	0.42	0.40
Total solid, %							
Colostrum	22.37	19.17	19.86	22.93	0.973	0.19	0.76
21 d	18.51 ^{AB}	18.09 ^B	20.04 ^A	18.01 ^B	0.344	0.74	0.17
Solid not fat, %							
Colostrum	13.29	10.95	11.83	13.35	0.566	0.12	0.68
21 d	11.26	11.19	11.22	11.09	0.080	0.91	0.68
Free fatty acid, %							
Colostrum	4.21	4.25	4.39	4.02	0.143	0.73	0.93
21 d	4.48	3.59	3.35	3.65	0.262	0.29	0.39

¹⁾ Standard error of means.

^{ab} Means in a same row with different superscript significantly different (P<0.05).

^{AB} Means in a same row with different superscript significantly different (P<0.10).

4. 결론 (Conclusion)

본 연구는 임신모돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 임신돈의 생리적 변화, 번식성적, 포유기 모돈의 생리적 변화 및 포유자돈의 성장성적, 혈액성상 및 유성분에 미치는 영향을 규명하여 거저리 유충의 적정 첨가수준을 조사하기 위해 수행되었다. 연구 결과, 임신돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가는 임신돈의 체형변화 및 번식성적에 부정적인 영향을 미치지 않았으며 오히려 복당 체중이 증가하는 결과가 나타났다. 또한 임신돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가는 포유돈의 체형변화 및 사료섭취량에 유의적인 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났으며, 포유자돈의 성장성적 및 유성분 함량을 고려해보았을 때 거저리 유충의 첨가는 포유자돈의 성장에 부정적인 영향을 미치지 못하는 것으로 사료된다. 본 연구에서는 임신돈 사료 내 거저리 유충을 3%까지 첨가하여도 임신돈의 체형변화, 번식성적, 포유자돈 성적에 부정적인 영향을 미치지 않았지만, 실험사료의 급여기간이 임신 75일령부터인 점을 감안해볼 때 임신초기부터 급여하여 추가적인 거저리 유충의 첨가효과를 규명해야 할 것이다.

실험 5. 거저리 원료 사료의 수준별 급여가 포유모돈의 생리적 변화와 포유성적에 미치는 영향 규명

1. 서론 (Introduction)

사료화의 대상이 되는 곤충 중 갈색거저리 (*Tenebrio molitor*)는 딱정벌레의 일종으로, 거저리의 유충인 밀웜은 설치류나 파충류 및 조류의 사료로 이용되어 왔다. 마찬가지로 거저리와 유사한 딱정벌레류인 *Alphitobius diaperinus* (Despins, 1994), *Tribolium castaneum* (Vohra 등, 1978) 등의 조류 사료화 가능성 또한 증명되었다. 거저리의 영양적 가치는 methionine 함량을 제외하면 우유단백질인 카제인이나 농축대두단백과 비슷하지만 경제적 측면에서 생산 단가는 매우 낮은 편이며 (Ramos-elorduy 등, 2002), 지방함량이 높아 가축의 에너지 공급원으로서도 집파리나 귀뚜라미에 비해 우수한 것으로 알려져 있다. 하지만 이러한 기존의 연구들은 주로 거저리의 유충인 밀웜을 대상으로 진행이 되어 거저리의 성충이나 생산 부산물인 탈피각 등에 대한 연구가 미흡하고, 대상 축종 또한 조류나 어류, 파충류 등에 한정되어 왔다.

일반적으로 어분, SDPP 등의 동물성 단백질 원료들은 식물성 단백질 원료들에 비하여 동물체내에서의 영양소 소화율이 높으며, 여러 연구결과 들을 통하여서도 곤충자원의 단백질 및 아미노산 소화율이 대두박에 비해 높다는 결과가 보고되고 있다 (Hwangbo 등, 2009).

포유모돈에 있어서 사료섭취량의 극대화는 매우 중요한 사양관리 포인트가 된다. 포유기 모돈의 사료섭취량 증대는 유생산량 증가로 이어지 포유자돈의 성장률이 높아지고 (Hartmann 등, 1984), 포유기간 중의 모돈의 체손실을 최소화하여 재귀발정일 단축으로 다음 산차의 번식성적에도 긍정적인 영향을 미칠 수 있기 때문이다 (Libal 등, 1977; Nelssen 등, 1985; Tokach 등, 1992; Koketsu 등, 1996a, 1996b, 1998). 거저리 원료는 동물성 단백질 원료로서 기호성이 뛰어나고 영양소 이용성이 높기 때문에, 단백질 원료로서 포유기에 사용될 경우 포유모돈 및 포유자돈에게 긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 단백질 원료인 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유모돈에 미치는 영향을 조사하고자 수행되었다.

2. 재료 및 방법 (Materials and Methods)

1) 실험 동물 및 실험 환경 (Experimental animal and housing)

평균체중 233.58 ± 4.50 kg의 2원 교잡종 (Yorkshire x Landrace) 포유모돈 24두를 공시하여, 체중과 등지방, 산차 및 복당체중을 고려하여 분만직후에 4처리 6반복, 완전임의 배치법(CRD; completely randomized design)에 따라 각각의 처리구에 배치하였다. 자돈을 대상으로 출생 후 24시간 이내에 견치, 단미, 철분주사 및 이각을 실시하였고, 복당 체중 및 포유두수를 맞춰 양자를 보냈으며, 분만 후 3일령에 거세를 실시하였다. 실험 모돈은 110일령에

온도 조절이 용이한 분만사로 이송되었으며, 2.5 x 1.8 m²의 사료 및 물의 자유 급이가 가능한 분만틀 내에서 실험 기간 동안 사육되었다.

2) 실험 설계 및 실험 사료 (Experimental design and diet)

실험 처리구는 옥수수-대두박 위주의 기초사료에 거저리 유층의 첨가수준에 따라 구분하였다. 거저리 유층은 대조구에 0% 첨가하고, 1%, 2%, 3%로 첨가수준을 증가시켰다.

실험사료는 옥수수-대두박 위주의 기초사료에 처리구별로 거저리 유층을 0%, 1%, 2% 및 3%를 첨가하고 기타 원료사료들을 조정하여 포유모돈의 영양소 요구량 (NRC, 1998)을 충족하도록 배합하였다. 실험사료의 대사에너지 (ME; metabolizable energy)는 3,265 kcal/kg으로 설정하였으며, 조단백질 함량은 16.8%로, 라이신(lysine)의 함량은 1.09%에 맞춰 배합하였다. 기타 아미노산, 비타민 및 광물질 요구량 또한 NRC(1998)의 요구수준과 같거나 높은 수준으로 충족시켰으며, 실험사료의 원료 및 화학적 조성은 표 1에 제시하였다.

표 1. 실험사료의 사료배합비와 화학적 조성

Ingredients, %	<i>Tenebrio molitor</i> Larva			
	0 %	1 %	2 %	3 %
Corn	68.51	68.85	69.15	69.50
SBM-45	25.12	24.07	23.02	21.95
Sugar molasses	1.00	1.11	1.23	1.32
Soy oil	1.21	0.85	0.50	0.13
L-lysine · HCl	0.40	0.39	0.39	0.38
DCP	2.33	2.33	2.33	2.33
Limestone	0.85	0.85	0.85	0.86
DL-methionine	0.05	0.02	0.00	0.00
Vit. Mix ¹⁾	0.10	0.10	0.10	0.10
Min. Mix ²⁾	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.23	0.23	0.23	0.23
Choline chloride-50	0.10	0.10	0.10	0.10
<i>Tenebrio molitor</i> larva	0.00	1.00	2.00	3.00
Sum	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical Composition ³⁾				
ME (kcal/kg)	3,265.00	3,265.00	3,265.00	3,265.00
CP (%)	16.80	16.80	16.80	16.80
Lysine (%)	1.09	1.09	1.09	1.09
Methionine (%)	0.25	0.25	0.25	0.25
Ca (%)	0.90	0.90	0.90	0.90
Total P (%)	0.70	0.70	0.70	0.70

¹⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D3,1,600IU; vitamin E, 32IU; d-biotin, 64g; riboflavin, 3.2mg; calcium pantothenic acid, 8mg; niacin, 16mg; vitamin B12, 12g; vitaminK, 2.4mg.

²⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1mg; I, 0.3mg; Mn, 24.8mg; CuSO4, 54.1mg; Fe, 127.3mg; Zn, 84.7mg; Co, 0.3mg.

³⁾ Calculated values

3) 샘플 채취 및 조사 항목 (Sample collection and measurements)

- ① 포유 모돈의 체중, 사료 섭취량, 등지방 두께 및 사료섭취량의 변화: 포유기 모돈의 생리적 변화 정도를 판별하기 위하여 분만 후 24 시간 이내 및 이유 시의 체중, P2 부위의 등지방 두께 및 사료섭취량을 측정하였다.
- ② 포유 자돈의 성장능력 및 포유 모돈의 포유능력: 양자처리 후 포유를 개시하고 분만 후 24 시간 이내 및 이유 시의 자돈의 체중 및 증체량을 측정하였다
- ③ 모돈의 모유특성을 조사하기 위해 분만 후 24시간 이내 (초유) 및 21일에 혈관에 옥시토신 0.5 ml를 주사하여 젖분비를 촉진한 후 돈유 샘플을 채취하였다. 유성분 분석기 (MilkoScan FT20, FOSS Electric Co., Denmark)로 카제인(casein), 유지방 (fat), 유단백질 (protein), 락토오스 (lactose), 유고형분(total solid), 무지유고형분 (Solids Not Fat: SNF) 및 유리지방산(free fatty acid) 함량을 측정하였다.

4) 통계 분석

통계분석은 SAS의 General Linear Model (GLM)을 이용하여 수집된 자료의 유의성을 검정하였다. 성장성적의 경우 개별 모돈을 experimental unit으로 설정하였으며, 혈액분석과 모유분석의 경우 각 개체를 unit으로 설정하였다. 거저리 유충의 첨가수준의 증가에 따른 효과를 추정하기 위해 orthogonal polynomial contrast를 통해 거저리 유충의 첨가수준에 따른 linear 및 quadratic effect를 조사하였으며, $P < 0.05$ 인 경우 유의차가 있는 것으로, $P < 0.01$ 인 경우 고도의 유의차가 있는 것으로 간주하였다. $0.05 \leq P < 0.10$ 일 경우 경향이 있는 것으로 고려하였다.

3. 실험 결과 및 고찰 (Results and Discussion)

1) 포유모돈의 생리적 변화 및 사료섭취량

포유모돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유모돈의 생리적 변화 및 사료섭취량에 미치는 영향을 표 2에 나타내었다. 3주간의 포유기간 동안 포유모돈의 체중 변화에는 처리구간의 유의적인 차이가 없었으며, 등지방 두께에서도 처리구간의 통계적 유의차가 발견되지 않았다. 그렇지만, 일일사료섭취량에서는 대조구(CON)에 비하여 거저리 유충을 첨가한 처리구들의 일일사료섭취량(ADFI)가 유의적으로 높은 결과가 나타났으며 ($P < 0.05$), 거저리 유충의 첨가수준이 증가함에 따라 사료섭취량도 유의적으로 증가하는 linear effect가 나타났다 (Linear response, $P = 0.04$). 포유기의 사료섭취량은 유전적 요인 (품종), 감각적 요인 (후각, 미각) 및 환경적 요인 (온도, 습도, 환기, 급이기 형태) 등의 영향을 받으며, 사료 내 영양소 및 에너지 함량과 같은 영양적 요인에 의해서도 영향을 받는다 (ARC, 1981; Baldwin, 1985; Fowler, 1985; NRC, 1998). 포유모돈은 분만직후에 체유지에 필요한 최소한의 영양소요구량을 충족시킬 정도의 영양분을 공급받아야 하며, 1~2주차에 사료섭취량이 최대에 도달한 후에는 무제한 급여 방식이 일반적으로 행해지고 있다 (Koketsu 등, 1996a, 1996c). 포유모돈의 사료섭취량이 감소하면 체손실이 증가하여 LH 호르몬의 분비를 감소시키며, 이에 따라 배란수가 감소하고 재귀발정일이 연장되는 등의 부정적인 영향들이 유발될 수 있다 (Neil, 1996; Quesnel 등, 1998). 이와는 반대로, 포유모돈의 사료섭취량이 증가하면 체손실 감소와 재귀발정일 단축으로 모돈의 생산성이 증진되고 자돈의 체중 또한 증가되는 효과를 기대할 수 있다 (Libal 등, 1977; Nelssen 등, 1985; Tokach 등, 1992; Koketsu 등, 1996a, 1996b, 1998). 본 실험에서 포유모돈의 사료섭취량이 linear 하게 증가 하는 것으로 보아 포유모돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 기호성을 증진시킨 것으로 생각 되며, 결과적으로 포유모돈의 생산성에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.

표 2. 거저리 유충의 수준별 급여가 포유모돈의 성장성적에 미치는 영향¹⁾

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ²⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
No. of sows	6	6	6	6			
Body weight, kg							
24 hrs postpartum	223.2	241.4	235.0	234.8	4.50	0.22	0.79
Day 21 of lactation	216.8	235.9	227.8	223.2	5.05	0.22	0.94
Changes (0-21d)	-6.4	-5.5	-7.2	-11.6	2.03	0.75	0.46
Backfat thickness, m							
24 hrs postpartum	22.0	22.5	20.3	20.7	0.89	0.90	0.41
Day 21 of lactation	18.9	20.5	16.8	19.3	0.95	0.81	0.46
Changes (0-21d)	-3.1	-2.0	-3.5	-1.4	0.52	0.83	0.94
ADFI, kg	4.48 ^b	5.61 ^a	5.54 ^a	5.56 ^a	0.174	0.04	0.16

¹⁾ Initial average weight of sows: 233.58 ± kg BW

²⁾ Standard error of means.

^{ab} Means in a same row with different superscript significantly different (P<0.05).

2) 포유자돈의 성장능력

포유모돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유자돈의 성장능력에 미치는 영향을 표 3에 나타내었다. 실험 결과, litter weight과 piglet weight에서는 거저리 유충의 수준별 첨가에 따른 처리구간의 통계적인 유의차가 나타나지 않았다. 거저리 유충의 수준별 첨가에 따른 linear-quadratic effect가 나타나지는 않았지만, 수치상으로 거저리 유충의 첨가수준이 증가함에 따라 21일째 litter weight와 weight gain이 높아지는 결과가 나타났지만 개별 piglet weight과 weight gain에서는 처리구간의 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 통계적 유의차는 발생하지 않았지만 대조구가 거저리 첨가 처리구들에 비하여 폐사율이 높아 포유두수가 적기 때문인 것으로 사료된다. 또한, 포유자돈의 성장은 자돈의 모유섭취량과 모돈의 유생산량과 높은 연관성을 가지게 되며 (Hartmann 등, 1984), 포유자돈의 성장률을 통하여 모돈의 유생산량을 간접적으로 추정하기도 한다는 연구결과들을 고려해 볼 때 (Lewis 등, 1978), 거저리 유충의 첨가로 인한 포유모돈의 사료섭취량 증가가 포유자돈의 성장에 유의적인 영향을 미친 것으로 사료된다. 이를 통하여, 포유모돈 사료 내 거저리 유충의 첨가는 포유 모돈의 사료섭취량을 증가시켜, 복당 자돈 체중을 높여주고 폐사율을 감소시키는데 긍정적인 효과를 미치는 것으로 사료된다.

표 3. 거저리 유충의 수준별 급여가 포유자돈의 성장성적에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
Cross-fostered, pigs	11.2	11.7	11.3	11.2	0.22	0.42	0.71
Weaned pigs	9.8	10.7	10.5	10.7	0.30	0.36	0.55
Mortality, %	11.9	8.6	7.4	4.5	2.10	0.75	0.41
Litter weight, kg							
After cross-fostering	18.23	18.82	18.76	18.11	0.536	0.64	0.94
Day 21 of lactation	50.21	60.71	63.23	64.04	2.761	0.22	0.14
Weight gain, kg	31.98	41.89	44.47	45.93	2.539	0.21	0.11
Piglet weight, kg							
After cross-fostering	1.64	1.62	1.68	1.63	0.055	0.99	0.82
Day 21 of lactation	5.06	5.67	6.16	6.03	0.234	0.40	0.17
Weight gain, kg	4.42	4.05	4.48	4.40	0.197	0.31	0.11

¹⁾ Standard error of means.

3) 혈액 성분

포유모돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유모돈 및 포유자돈의 혈액성상에 미치는 영향을 표 4,5 에 나타내었다. 혈액 분석 결과, 포유모돈의 혈중 free fatty acid, glucose, insulin, BUN, total protein 농도에는 처리구간의 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 간 건강 지표로 사용되는 AST, ALT농도에서도 처리구간의 유의적인 차이가 나타나지 않아 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유모돈의 간 건강에 유해한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 포유자돈의 혈중 free fatty acid, glucose, BUN, total protein 농도를 조사한 결과, 처리구에 따른 유의적인 영향은 나타나지 않았다.

표 4. 거저리 유충의 수준별 급여가 포유모돈의 혈액성상에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
Free fatty acid, μ Eq/L							
24 hrs postpartum	368.2	368.2	368.2	368.2			
21 d	449.3	77.7	101.3	157.7	92.44	0.22	0.51
Glucose, mg/dL							
24 hrs postpartum	92.5	92.5	92.5	92.5			
21 d	77.7	67.7	72.0	78.3	2.59	0.12	0.60
Insulin, μ U/mL							
24 hrs postpartum	2.6	2.6	2.6	2.6			
21 d	7.3	1.6	1.3	1.2	1.21	0.51	0.26
BUN, mg/dL							
24 hrs postpartum	13.9	13.9	13.9	13.9			
21 d	17.5	18.7	17.9	17.8	0.64	0.64	0.89
Total protein, g/dL							
24 hrs postpartum	7.2	7.2	7.2	7.2			
21 d	8.5	8.0	7.8	7.9	0.13	0.18	0.20
AST, U/L							
24 hrs postpartum	58.8	58.8	58.8	58.8			
21 d	108.7	92.7	67.0	56.0	14.51	0.81	0.28
ALT, U/L							
24 hrs postpartum	24.0	24.0	24.0	24.0			
21 d	37.3	37.0	32.7	28.7	2.42	0.86	0.12

¹⁾ Standard error of means.

표 5. 거저리 유충의 수준별 급여가 포유자돈의 혈액성상에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
Free fatty acid, μ Eq/L							
24 hrs postpartum	228.5	228.5	228.5	228.5			
21 d	384.0	288.7	237.7	342.7	38.95	0.29	0.56
Glucose, mg/dL							
24 hrs postpartum	106.0	106.0	106.0	106.0			
21 d	116.3	105.7	110.7	115.3	5.30	0.58	0.89
BUN, mg/dL							
24 hrs postpartum	19.3	19.3	19.3	19.3			
21 d	15.4	10.6	5.9	8.7	1.74	0.29	0.14
Total protein, g/dL							
24 hrs postpartum	6.1	6.1	6.1	6.1			
21 d	4.9	5.3	4.6	5.0	0.10	0.51	0.17
AST, U/L							
24 hrs postpartum	103.8	103.8	103.8	103.8			
21 d	73.0	58.0	62.0	84.3	7.98	0.33	0.61
ALT, U/L							
24 hrs postpartum	29.0	29.0	29.0	29.0			
21 d	47.7	36.7	36.0	40.0	3.05	0.11	0.38

¹⁾ Standard error of means.

4) 모유 성분 분석

포유모돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유모돈의 유성분에 미치는 영향을 표 6에 나타내었다. 분만 후 24시간 이내의 초유 및 품 21일차의 돈유성분을 분석한 결과, 카제인, 유지방, 유단백, 락토오즈, 유고형분, 무지유고형분, 유리지방산 함량에서 포유모돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가에 따른 유의적인 효과가 발견되지 않았다. 모유의 성분은 사료를 통한 영양소의 공급 (Jackson 등, 1995) 및 모돈의 상태 (Klaver 등, 1981) 등에 따라서 달라진다고 보고되고 있다. 본 연구결과, 거저리 유충의 첨가는 포유 모돈의 유성분에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

표 6. 거저리 유충의 수준별 급여가 모유 성분에 미치는 영향

Criteria	<i>Tenebrio molitor</i> larva				SEM ¹⁾	P-value	
	0 %	1 %	2 %	3 %		Lin.	Quad.
Casein, %							
Colostrum	8.15	8.15	8.15	8.15			
21 d	4.62	4.40	4.35	4.33	0.083	0.46	0.37
Fat, %							
Colostrum	7.71	7.71	7.71	7.71			
21 d	7.22	6.02	5.72	6.12	0.297	0.14	0.23
Protein, %							
Colostrum	10.50	10.50	10.50	10.50			
21 d	5.13	4.89	4.80	4.82	0.090	0.44	0.36
Lactose, %							
Colostrum	3.96	3.96	3.96	3.96			
21 d	5.76	6.12	6.15	6.09	0.081	0.18	0.32
Total solid, %							
Colostrum	25.0	25.0	25.0	25.0			
21 d	19.6	18.2	17.9	18.3	0.338	0.17	0.26
Solid not fat, %							
Colostrum	14.9	14.9	14.9	14.9			
21 d	11.1	11.3	11.2	11.1	0.065	0.48	0.79
Free fatty acid, %							
Colostrum	4.27	4.27	4.27	4.27			
21 d	2.80	4.35	3.99	3.61	0.314	0.13	0.74

¹⁾ Standard error of means.

4. 결론 (Conclusion)

본 연구는 포유모돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가가 포유모돈의 생리적 변화 및 포유자돈의 성장성적, 혈액성상 및 유성분에 미치는 영향을 규명하여 거저리 유충의 적정 첨가수준을 조사하기 위해 수행되었다. 연구 결과, 포유모돈 사료 내 거저리 유충의 수준별 첨가는 포유모돈의 생리적 변화에는 유의적인 영향을 미치지 못하지만, 사료섭취량을 증가시켜 포유자돈의 성장능력을 향상시키는 것으로 나타났다. 거저리 유충의 수준별 첨가는 유성분에 유의적

인 영향을 주지는 못하였지만, 포유모돈의 사료섭취량 증가로 유생산량이 증가되는 효과가 나타난 것으로 사료된다. 결론적으로 포유모돈 사료 내 거저리 유층의 첨가는 기호성을 증진시켜 포유모돈의 사료섭취량을 증가시키며, 거저리 유층의 첨가수준을 3%까지 증가시켜도 모돈의 생리적 변화 및 포유자돈의 성장에 부정적인 영향을 미치지 않는다.

실험1. 곤충 원료의 기능성 물질 탐구

1. 서 론

키토산은 키틴이 알칼리와 만나 만들어지는 글루코사민 중합체로써 화학적으로는 뮤코 다당류의 일종인 키틴이 분해되어 만들어진 물질이다. 키토산은 주로 새우나 게 등 갑각류에 많이 함유되어있으며, 그 외에도 곤충의 껍질이나 오징어 뼈에도 많이 함유되어있다. 키토산은 분자구조가 인체조직과 매우 유사하기 때문에 인체 친화성이 있고 체내에서 별다른 면역반응을 일으키지 않기 때문에 식품이나 약품으로써 중요한 물질이다. 산업 쪽에서는 식품첨가물의 하나로 사용되고 있다.

키토산은 지방이 축적되는 것을 막고, 유해 콜레스테롤을 배출시키는 역할을 하여 체내 콜레스테롤 농도를 조절하는 효과가 있다. 또한 항균 작용 및 면역력을 높이는 역할을 하며, 상처를 급속히 치유하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그렇기 때문에 우리나라에서는 지난 1995년 키토산 가공 식품이 건강보조식품 품목군에 추가되었다.

이러한 키토산의 작용은 양돈용으로도 유용할 것으로 생각된다. 콜레스테롤을 조절하는 효과는 육성 비육돈에 있어서 비육으로 인해 콜레스테롤 축적이 일어나기 쉬워 심혈관계 질병이 있을 수 있는 돼지에게 급여되면 이러한 질병들을 저지할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 면역력을 증강시키는 효과 및 상처 치유를 촉진시키는 효과는, 밀사 사육이 진행되고 있는 일반 농가들에서 항생제 급여가 금지된 현재, 카니발리즘 등으로 인한 항원 감염을 저지하고, 치유를 가속화하는 효과가 있을 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 거저리 내 키토산의 실용화를 위해, 거저리 유충과 성충에 포함되어 있는 키토산 함량을 분석하여 이들 함량이 어느 정도 되는지를 확인하기 위해 진행되었다.

2. 실험 방법 및 재료

키토산 함량 분석은 아래의 protocol에 따라 거저리 유충과 거저리 성충을 대상으로 시행되었으며 이를 통해 거저리 내 키토산 함량을 측정하였다.

곱게 간 거저리 유충 및 성충 시료 1g를 채취하여 산성에서 시료를 모두 녹인 후, 증류수를 가하여 100 mL의 검사액을 만든다. 10 mL의 검사액과 염산 7mL, 그리고 증류수를 첨가해 20mL를 만들어 다시 5mL를 채취한 뒤, 밀봉하여 105℃에서 24시간 분해한다. 감압 농축기를 이용해 염산 및 증류수를 제거하고 다시 증류수 5mL를 첨가한 뒤 녹지 않은 물질들은 걸러 낸다. 이 중 1mL와 아세틸 아세톤 2mL를 혼합하고 96℃에서 1시간 동안 가열한 후 흐르는 물에 냉각하여 96% 에탄올 20mL와 p-디메틸아미노벤즈알데히드 시약 2mL를 혼합하여

실온에서 2시간 동안 방치한 뒤, 530nm에서 분광광도계를 사용해(KHSI-A-066) 흡광도를 측정한다.

3. 실험 결과 및 고찰

거저리 유충 및 성충 내 키토산 함량을 표 1.에 나타내었다. 건조 거저리 유충의 경우 11.5594 mg/g의 키토산 함량을 나타내고 있으며, 건조 거저리 성충의 경우 20.3821 mg/g의 함량을 나타내었다. 따라서 키토산 추출 및 실용화 가능성을 기준으로 판단해 볼 때, 거저리 성충이 유충에 비해 약 2배 가까운 키토산을 함유함으로써, 실제로 더 유용할 것으로 생각된다.

다만, 유충의 경우 성충에 비해 키틴질이 함유되어 있을 것으로 보이는 곤충 외피가 적고, 건조 전 상태로 미루어 보았을 때 단단한 껍질을 가지고 있지 못하지만, 그럼에도 불구하고 거저리 유충 내 키토산 함량이 결코 적다고 볼 수 없다. 또한 거저리 성충의 경우 유충에 비해 생산에 시간이 오래 걸리고, 따라서 생산성이 떨어지는 점을 고려할 때, 육성 비육돈 사료 내 포함된 형태로 급여된다는 점을 고려하면 거저리 유충이 성충에 비해 이용 가능성이 높다고 생각된다.

표 1. 거저리 유충 및 성충 내 키토산 함량

Item	Treatment		SEM ¹
	건조 거저리 유충	건조 거저리 성충	
키토산 함량, mg/g			
Trial 1	11.6257	20.5584	
Trial 2	11.8014	20.0070	
Trial 3	11.2510	20.5812	
Average	11.5594	20.3821	4.418

¹ Standard error of mean

4. 결론 (Conclusion)

본 연구에서는 거저리 내 키토산의 실용화를 위해, 거저리 유충과 성충에 포함되어 있는 키토산 함량을 분석하여 이들 함량이 어느 정도 되는지를 확인하기 위해 진행되었다.

건조 거저리 유충의 경우 11.5594 mg/g의 키토산 함량을 나타내었으며, 건조 거저리 성충은 20.3821 mg/g의 함량을 나타내었다. 그러나 비록 거저리 성충이 유충에 비해 약 2배 가까운 키토산을 함유하는 결과를 보였지만, 거저리 성충의 경우 유충에 비해 생산에 시간이 오래 걸리고, 따라서 생산성이 떨어지는 점을 고려할 때, 육성 비육돈 사료 내 포함된 형태로

실용 가능한 형태는 거저리 성충 보다는 거저리 유충일 것으로 생각할 수 있다.

키토산 함유율이 높은 물질로 갑각류의 껍질을 생각해 볼 수 있으나, 게나 새우 등의 껍질은 사료 내에 첨가하기 위해 분쇄하는 과정이 거저리에 비해 힘들고 오래걸리며, 또한 분쇄한다 할지라도 상대적으로 단단하기 때문에 돼지의 소화관 내에서 분해 및 흡수되기 힘들 것으로 생각된다. 그런 점에서 거저리는 가공이 쉽고 소화율이 높기 때문에 양돈 사료 내 키토산 공급원으로써 그 가치가 높다고 할 수 있다.

제 3 절 3년차(2014년~2015년)

제2협동과제 : 대상축종에서 곤충사료의 사양기술 및 활용방안 개발

실험1. 거저리 사육 부산물의 사료화 활용 가능성 조사

1. 서 론 (Introduction)

Fish meal과 Whey powder는 자돈사료에서 가장 많이 사용되는 동물성 단백질원이며 높은 아미노산함량과 소화가 잘 되는 특성을 가지고 있어 고품사료를 처음 섭취하게 되는 이유 자돈에게 중요한 단백질 원료이다. 그러나 높은 원료가격으로 돼지고기 생산액 증가를 야기하고 있어 대체 가능한 동물성 단백질 원료가 필요한 상황이다 (Zhao 등., 2014).

곤충은 여러 종류의 동물에서 중요한 자연식품으로 인식되어왔다. 거저리 (*Tenebrio molitor L.*)는 작은 포유류와 파충류를 포함한 애완동물의 먹이로 이용되고 있으며, 곤충 체내에 44-70%의 단백질을 함유하고 있어서 좋은 사료원이기도하다 (Ramos 등. 1990). 농업적으로도 거저리와 같은 식용 곤충들은 단백질, 지질, 탄수화물, 비타민 함량이 높아서 사료원으로 우수하게 평가되고 있다 (Moreki 등 2012).

최근 우리나라에서 갈색거저리 산업화는 친환경 골분 및 어분 등 사료시장의 발전으로 개발 이용성이 증대되고 있으며 사육기술의 대중화로 여러 곳에서 대량사육이 가능해졌고 그에 따른 생산량도 증가하였다. 국내에서 갈색거저리의 이용은 애완동물의 생체사료로 활용하거나 실험용으로 사육하는 수준이었으나 최근 곤충산업에 대한 관심이 높아지면서 갈색거저리 유충은 식품의약품안전처로부터 2014년 7월 한시적 식품원료로 인정받았으며, 기능성 가축사료로 개발하여 산업화하려는 연구들이 이루어지고 있다. 일반적으로 곤충사료의 영양소 이용효율이 식물성 원료에 비해 높아 단백질 원료로서의 가치가 높다. 거저리의 영양적 가치는 methionine함량을 제외하면 우유단백질인 카제인이나 농축대두단백과 비슷하지만 경제적 측면에서 생산 단가는 매우 낮은 편이며 (Ramos 등., 1990), 지방함량이 높아 가축의 에너지 공급원으로서도 집파리나 귀뚜라미에 비해 우수한 것으로 알려져 있다.

따라서 새로운 동물성 단백질 원료인 거저리에 대한 검증시험은 필수적으로 수행되어야 한다. 본 연구를 통하여, 자돈 사료 내 거저리 유충의 첨가가 기존 동물성 단백질 원료를 대체할 수 있는지 규명하고자 한다.

2. 재료 및 방법 (Materials and Methods)

1) 실험 동물 및 실험 설계

사양 실험을 위해 평균 체중 $37.50 \pm 1.213\text{kg}$ 인 삼원 교잡종 ([Yorkshire x Landrace]

x Duroc) 육성돈 96두를 공시하여, Phase I 3주, Phase II 3주로 총 6주 동안 사양실험을 수행하였다. 전체 4처리 6반복 돈방 당 4두씩 성별과 체중에 따라 난괴법 (RCBD; Randomized Completely Block Design)으로 배치하였다.

2) 실험 사료

옥수수-대두박 위주로 실험사료의 기초사료(basal diet)를 배합하였으며, 사육단계에 따라 영양소 요구량 (NRC, 1998)을 고려하여 배합을 실시하였으나 CP는 예외적으로 NRC, 2012 기준 Total nitrogen에 6.25를 곱한 값을 요구량으로 설정하였다. 실험사료의 대사에너지 (ME; metabolizable energy)는 Phase I (1~3주), Phase II (4~6주) 모두 3265kcal/kg 이었다. 단백질 함량은 Phase I 에서 18.00%, Phase II 에서 16.30%로, 라이신(lysine)의 함량은 phase I 에서 0.95%, Phase II 에서 0.83%에 맞춰 배합하였다. 거저리 사육 배지는 처리구 별로 0, 2, 4, 6%가 첨가되었으며, 옥수수와 대두박을 통해 영양소 요구량을 충족시켜 주었다. 주요 실험사료의 원료 및 화학적 조성은 표 1 (phase I)에 제시된 바와 같다.

표 1. 실험사료의 사료배합비와 성분표 (Phase I)

Ingredients	W0	W2	W4	W6
EP Corn	52.54	49.57	46.63	43.68
SBM-44	25.99	26.05	26.10	26.15
Barley	18.01	18.00	18.00	18.00
Soy-oil	0.91	1.82	2.72	3.62
Molitor Waste	0.00	2.00	4.00	6.00
MCP	1.05	1.02	0.98	0.95
Limestone	0.68	0.71	0.74	0.76
L-Lysine-HCl	0.13	0.13	0.14	0.14
DL-met	0.05	0.06	0.06	0.06
Vit. Mix	0.12	0.12	0.12	0.12
Min. Mix	0.12	0.12	0.12	0.12
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20
Choline-Cl(25%)	0.10	0.10	0.10	0.10
ZnO	0.10	0.10	0.10	0.10
Sum	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition ³⁾				
ME, kcal/kg	3,265	3,265	3,265	3,265
CP, %	20.56	20.56	20.56	20.56
Lysine, %	1.35	1.35	1.35	1.35
Methionine, %	0.35	0.35	0.35	0.35
Ca, %	0.80	0.80	0.80	0.80
Total P, %	0.65	0.65	0.65	0.65

¹⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D₃, 1,600IU; vitamin E, 32IU; d-biotin, 64g; riboflavin, 3.2mg; calcium pantothenic acid, 8mg; niacin, 16mg; vitamin B₁₂, 12g; vitamin K, 2.4mg

²⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1mg; I, 0.3mg; Mn, 24.8mg; CuSO₄, 54.1mg; Fe, 127.3mg; Zn, 84.7mg; Co, 0.3mg

³⁾ Calculated values

표 2. 실험사료의 사료배합비와 성분표 (Phase II)

Ingredients	M0	M2	M4	M6
EP Corn	58.12	55.13	52.19	49.24
SBM-44	21.44	21.51	21.56	21.61
Barley	18.01	18.01	18.01	18.01
Soy-oil	0.39	1.31	2.21	3.10
Molitor Waste	0.00	2.00	4.00	6.00
MCP	0.68	0.65	0.61	0.58
Limestone	0.58	0.61	0.64	0.66
L-Lysine-HCl	0.11	0.11	0.11	0.12
DL-met	0.03	0.03	0.04	0.04
Vit. Mix	0.12	0.12	0.12	0.12
Min. Mix	0.12	0.12	0.12	0.12
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20
Choline-Cl(25%)	0.10	0.10	0.10	0.10
ZnO	0.10	0.10	0.10	0.10
Sum	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition ³⁾				
ME, kcal/kg	3,265	3,265	3,265	3,265
CP, %	18.88	18.88	18.88	18.88
Lysine, %	1.15	1.15	1.15	1.15
Methionine, %	0.30	0.30	0.30	0.30
Ca, %	0.70	0.70	0.70	0.70
Total P, %	0.60	0.60	0.60	0.60

¹⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D₃, 1,600IU; vitamin E, 32IU; d-biotin, 64g; riboflavin, 3.2mg; calcium pantothenic acid, 8mg; niacin, 16mg; vitamin B₁₂, 12g; vitamin K, 2.4mg

²⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1mg; I, 0.3mg; Mn, 24.8mg; CuSO₄, 54.1mg; Fe, 127.3mg; Zn, 84.7mg; Co, 0.3mg

³⁾ Calculated values

3) 사양실험 (Housing)

사양실험은 육성전기 3주 육성후기 3주로 총 6주간 진행되었다. 육성-비육기에는 슬롯-콘크리트 바닥이 있는 돈사로 이동하여 사육되었다. 각 돈방에 하나의 사료 급이기와 두 개의 니플 급수기가 설치되어 있었다. 전체 실험 기간 동안 물과 사료는 무제한 자유채식(*ad libitum*)하도록 하였다. 돈방 온도는 23-26℃ 정도를 유지하였으며, 체중 및 사료 섭취량은 사육 단계 및 사료의 변동 시점을 고려하여 개시 시점 (initial), 육성전기 (1-3주), 육성후기 (4-6주) 의 종료일에 측정하였으며, 각 사육 단계에 맞추어 일당증체량 (ADG : Average Daily Gain), 일당사료섭취량 (ADFI : Average Daily Feed Intake), 사료효율 (G/F ratio : Gain per Feed ratio)을 측정하였다.

4) 혈액성상 (Blood profiles)

혈액은 각 시기별로 처리 당 6두씩을 선발하여 경정맥에서 채취하여 혈액성상을 분석하였다. 혈액은 disposable culture tube에 포집하여 3,000rpm, 4℃ 상태로 15분 동안 원심분리하였다. 그 후 micro tube 보관용기에 혈청만을 분리하여 분석 시까지 -20℃로 보관하였다. 보관된 혈액은 혈액 분석기를 통하여 각 사육시기별로 Blood urea nitrogen (BUN)은 혈액분석기 (Ciba-Corning model, Ciba Corning Diagnostics Co.)를 이용하여 분석하였고, Total protein, Total cholesterol은 enzymatic colorimetric assay 방법으로, Creatinine은 kinetic colorimetry assay 방법으로, 그리고 glucose는 enzymatic kinetic assay 방법으로 혈액분석기 (Modular analytics, PE, Roche, Germany)를 이용하여 분석하였다.

5) 화학 분석 및 통계분석 (Chemical and Statistical analysis)

사료, 분 및 뇨의 일반성분 분석은 AOAC(1995) 방법에 따라 실시하였으며, 본 실험의 data는 SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC)의 Mixed procedure를 이용하여 난괴법 실험 design으로서 통계분석을 실시하였다. 성장성적 data의 경우 한 돈방이 experimental unit으로 (RCBD), 혈액성상 경우 실험돈 1두가 experimental unit으로 (CRD) 설정하였다. 유의적 차이는 SAS (Saxton, 1998)의 PDMIX800 macro를 이용하여 문자로 구분되었다. 모든 통계적 분석에 있어 $P < 0.05$ 인 경우 유의차가 있는 것으로, $P < 0.01$ 인 경우 고도의 유의차가 있는 것으로 간주하였다.

3. 실험 결과 및 고찰 (Results and Discussions)

1) 성장 성적 (Growth performance)

거저리 배지의 수준별 급여가 육성돈의 성장 성적에 미치는 영향을 표 5에 나타내었다. 육성 6주 동안 거저리 배지를 첨가한 처리구와 옥수수-대두박 위주의 대조구를 비교하였을 때, 체중, 일당증체량, 사료섭취량, 사료효율에 있어서 통계적으로 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 수준별로 거저리 배지를 첨가한 처리구와 대조구 간의 유의적인 차이가 없는 것을 때, 거저리 배지를 육성돈 사료 내에 6%까지 첨가하여도 육성돈의 성장에는 부정적인 영향을 미치지 않으며, 옥수수와 대두박을 대체가능한 것으로 판단되었다.

다만 육성기 전체 평균 Gain/Feed ratio를 놓고 보았을 때, 배지의 첨가량이 증가함에 따라 linear하게 사료 효율이 증가하는 경향을 보였기 때문에, 거저리 배지를 사료에 첨가하는 것이 6% 한도 내에서는 성장 성적에 도움이 된다고 할 수 있다.

표 5. 거저리 배지의 수준별 급여가 육성돈의 성장성적에 미치는 영향

Criteria	Treatment				SEM ¹⁾	P-value	
	M0	M2	M4	M6		Lin.	Quad.
Body Weight, kg							
Initial	37.50	37.51	37.51	37.51	0.004	-	-
3 week	53.10	54.50	54.29	54.81	0.647	0.274	0.417
6 week	71.05	73.16	73.12	73.06	0.891	0.420	0.652
ADG, g							
1-3 week	743	809	799	824	30.7	0.310	0.437
4-6 week	855	888	896	869	16.2	0.659	0.924
1-6 week	799	849	848	846	21.0	0.445	0.663
ADFI, g							
1-3 week	2,101	2,176	2,130	2,096	32.1	0.821	0.662
4-6 week	2,604	2,700	2,683	2,534	66.2	0.587	0.969
1-6 week	2,352	2,438	2,406	2,315	47.7	0.510	0.831
G/F ratio							
1-3 week	0.351	0.376	0.385	0.397	0.0167	0.219	0.824
4-6 week	0.328	0.329	0.336	0.343	0.0061	0.641	0.903
1-6 week	0.339 ^B	0.348 ^{AB}	0.355 ^{AB}	0.368 ^A	0.0105	0.053	0.784

¹⁾ Standard error of mean

^{ABC} Means in a same row with different superscript letters with tendency (0.05<P<0.10)

2) 혈액 성상 (Blood profile)

거저리 배지를 육성돈 사료 내 첨가하였을 시, 육성돈의 혈액 성상에 미치는 영향을 표 6에 나타내었다. Cortisol, Glucose, IGF-1, 그리고 BUN 항목 모두 전 구간에서 처리구 간 통계적 유의차가 발생하지 않았다.

Cortisol은 육성돈에게 스트레스 상황이 발생하였을 때 주로 만들어지는 물질로서, 육성돈의 스트레스 지수를 나타내는 데에 사용된다. 3주차와 6주차 실험에서, Cortisol 수준에는 어떠한 유의차도 발생하지 않았다. 따라서 거저리 배지를 첨가하였을 때 육성돈에게서 거저리 배지 사료로 인한 스트레스는 없다고 볼 수 있다.

Glucose는 혈중 당 농도를 측정하는 것으로써, 거저리 및 배지에는 섬유소가 포함되어 있기 때문에, 이에 대한 소화 및 이용 정도를 유추할 수 있는 지표로써 측정되었다. 분석 결과 처리구 간 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 다만 6주차 혈당에서 거저리 배지의 첨가에 따라 유의적으로 linear한 경향이 나타났으나, 배지가 4% 첨가되었을 때 혈당이 가장 낮고, 6% 첨가되었을 때 혈당이 가장 높은 것으로 미루어볼 때, 유의미한 결과로는 생각되지 않는다. 따라서 본 실험에서 실험 전 구간에 걸쳐 거저리 배지 수준 증가에 따른 혈중 glucose의 함량에 변화가 없는 것으로 미루어 볼 때, 거저리 배지를 첨가하여도, 당의 이용률에는 어떠한 영향도 미치지 않는 것으로 사료된다.

IGF-1 (Insuline-like Growth Factor)은 성장 인자로써 육성돈의 체성장과 관련된 호르몬이다. 본 실험에서는 전 구간에 걸쳐 어떠한 유의적인 차이도 발견되지 않았기 때문에 사료 내에 배지가 첨가되어도 육성돈의 성장 인자에는 영향이 없다고 볼 수 있다.

BUN(blood urea nitrogen)은 체내의 필수 영양소 중 하나인 아미노산의 이용에 대한 대표적인 지표(Eggum, 1970)로 단백질 섭취와 품질에 직접적인 연관성을 가지며(Eggum, 1970; Hann 등, 1995), 섭취한 질소의 체내 유지에 관여한다(Whang과 Easter, 2000). 실험 결과 BUN 농도에서는 처리구 간 통계적인 유의차가 발생하지 않았기 때문에, 사료 내에 배지가 첨가되어도 단백질 이용률에는 어떤 영향도 주지 않는 것으로 사료된다.

표 6. 거저리 배지의 수준별 급여가 육성돈의 혈액성상에 미치는 영향

Criteria	Treatment				SEM ¹⁾	P-value	
	M0	M2	M4	M6		Lin.	Quad.
Cortisol, $\mu\text{g/dL}$							
Initial	1.93	1.93	1.93	1.93			
3 week	5.08	4.43	5.02	3.80	0.518	0.777	0.502
6 week	1.18	3.82	2.55	2.50	0.931	0.210	0.186
Glucose, mg/dL							
Initial	99.33	99.33	99.33	99.33			
3 week	90.00	93.33	91.33	89.17	1.574	0.806	0.721
6 week	88.83 ^{AB}	89.17 ^{AB}	84.00 ^B	93.67 ^A	3.421	0.073	0.071
IGF-1, ng/mL							
Initial	208.35	208.35	208.35	208.35			
3 week	226.47	256.67	224.95	194.97	21.821	0.249	0.496
6 week	204.73	219.35	196.95	184.13	12.759	0.689	0.625
Blood urea nitrogen, mg/dL							
Initial	9.93	9.93	9.93	9.93			
3 week	12.53	13.37	12.83	12.68	0.314	0.952	0.723
6 week	14.13	15.33	13.27	14.30	0.734	0.704	0.265

¹⁾ Standard error of mean

^{ABC} Means in a same row with different superscript letters with tendency (0.05<P<0.10)

3) 면역 단백질 (Immunoglobulin)

거저리 배지를 육성돈 사료 내 첨가하였을 시, 육성돈의 면역 단백질 농도에 미치는 영향을 표 7에 나타내었다. IgA, IgG 항목 모두 전 구간에서 처리구 간 통계적 유의차가 발생하지 않았다.

IgA는 면역 글로불린의 일종으로써 면역 글로불린 중 약 20%를 차지한다. IgA는 타액, 상기도분비액, 장관이나 요에도 존재하고 이들 점액중의 IgA는 분비항체로서 점막면에서의 감염 방어에 관여한다. 본 실험에서 IgA는 배지의 첨가량 증가에 따라 어떠한 유의적인 차이도 보이지 않았다. 다만 6주차 IgA 농도에서 통계상으로는 linear한 경향이 나타났으나 유의적인 차이는 아닌 것으로 생각된다.

IgG는 면역글로불린의 약 8할 이상을 차지하는 물질로써, 주로 독소나 바이러스의 중화, 침강, 응집반응 등에 관여한다. 본 실험에서 배지의 첨가는 혈중 IgG 농도에 어떠한 유의적인 차이도 보이지 않았다.

이로 볼 때, 거저리 배지의 첨가는 육성돈의 면역력에 있어 어떠한 영향도 주지 않음을 알 수 있다.

표 7. 거저리 배지의 수준별 급여가 육성돈의 면역 단백질 농도에 미치는 영향

Criteria	Treatment				SEM ¹⁾	P-value	
	M0	M2	M4	M6		Lin.	Quad.
IgA, mg/10 ⁴ mL							
Initial	0.206	0.206	0.206	0.206			
3 week	0.161	0.130	0.158	0.172	0.016	0.331	0.511
6 week	0.127 ^B	0.159 ^{AB}	0.131 ^B	0.237 ^A	0.044	0.067	0.163
IgG, mg/5 × 10 ⁴ mL							
Initial	15.123	15.123	15.123	15.123			
3 week	13.205	12.198	12.030	14.875	1.131	0.132	0.590
6 week	15.889	14.186	17.532	14.449	1.333	0.619	0.213

¹⁾ Standard error of mean

^{ABC} Means in a same row with different superscript letters with tendency (0.05 < P < 0.10)

4. 결론

본 실험은 육성돈 사료 내 거저리 배지의 첨가가 육성돈의 성장성적, 혈액 성분 및 면역 단백질 농도에 미치는 영향을 알아보고, 적정 첨가량을 규명하기 위해 실행되었다.

성장성적에 있어서, 체중, 일당 증체량, 일당 사료 섭취량 및 사료 효율에 있어서 어떠한 유의적인 차이도 없었다. 또한 혈액 성상에 있어서도 Cortisol, Glucose, IGF-1 및 BUN에서 어떤 유의적 영향도 발견되지 않았다. 마지막으로 면역 글로블린 농도에 있어서도 유의적인 차이는 발견되지 않았다.

따라서 이를 바탕으로 미루어 볼 때, 사료 내 거저리 배지의 첨가는 6% 까지 첨가하여도 육성돈에게는 어떠한 부정적인 영향을 미치지 않기 때문에, 사료 내에 6%까지 첨가하여도 괜찮을 것으로 생각된다.

실험 2. 어분 및 기타 동물성 단백질 사료들에 대한 대체 가능성 평가

1. 서론 (Introduction)

Fish meal과 Whey powder는 자돈사료에서 가장 많이 사용되는 동물성 단백질원이며 높은 아미노산함량과 소화가 잘 되는 특성을 가지고 있어 고품사료를 처음 섭취하게 되는 이유 자돈에게 중요한 단백질 원료이다. 그러나 높은 원료가격으로 돼지고기 생산액 증가를 야기하고 있어 대체 가능한 동물성 단백질 원료가 필요한 상황이다 (Zhao 등., 2014).

곤충은 여러 종류의 동물에서 중요한 자연식품으로 인식되어왔다. 거저리 (*Tenebrio molitor L.*)는 작은 포유류와 파충류를 포함한 애완동물의 먹이로 이용되고 있으며, 곤충 체내에 44-70%의 단백질을 함유하고 있어서 좋은 사료원이기도하다 (Ramos 등. 1990). 농업적으로도 거저리와 같은 식용 곤충들은 단백질, 지질, 탄수화물, 비타민 함량이 높아서 사료원으로 우수하게 평가되고 있다 (Moreki 등 2012).

최근 우리나라에서 갈색거저리 산업화는 친환경 골분 및 어분 등 사료시장의 발전으로 개발 이용성이 증대되고 있으며 사육기술의 대중화로 여러 곳에서 대량사육이 가능해졌고 그에 따른 생산량도 증가하였다. 국내에서 갈색거저리의 이용은 애완동물의 생체사료로 활용하거나 실험용으로 사육하는 수준이었으나 최근 곤충산업에 대한 관심이 높아지면서 갈색거저리 유충은 식품의약품안전처로부터 2014년 7월 한시적 식품원료로 인정받았으며, 기능성 가축사료로 개발하여 산업화하려는 연구들이 이루어지고 있다. 일반적으로 곤충사료의 영양소 이용효율이 식물성 원료에 비해 높아 단백질 원료로서의 가치가 높다. 거저리의 영양적 가치는 methionine 함량을 제외하면 우유단백질인 카제인이나 농축대두단백과 비슷하지만 경제적 측면에서 생산 단가는 매우 낮은 편이며 (Ramos 등., 1990), 지방함량이 높아 가축의 에너지 공급원으로서도 집파리나 귀뚜라미에 비해 우수한 것으로 알려져 있다.

따라서 새로운 동물성 단백질 원료인 거저리에 대한 검증시험은 필수적으로 수행되어야 한다. 본 연구를 통하여, 자돈 사료 내 거저리 유충의 첨가가 기존 동물성 단백질원료를 대체 할 수 있는지 규명하고자 한다.

2. 재료 및 방법 (Materials and Methods)

1) 실험 동물 및 실험 설계

28 ± 3일령에 이유했던 평균 체중 5.80 ± 1.439kg인 삼원 교잡종 ([Yorkshire x Landrace] x Duroc) 이유자돈 160두를 공시하여, Phase I 2주, Phase II 3주로 총 5주 동안 사양실험을 수행하였다. 전체 4처리 5반복 돈방 당 8두씩 성별과 체중에 따라 난괴법 (RCBD; Randomized Completely Block Design)으로 배치하였다.

2) 실험 사료

옥수수-대두박 위주로 실험사료의 기초사료(basal diet)를 배합하였으며, 사육단계에 따라 영양소 요구량 (NRC, 1998)을 고려하여 배합을 실시하였으나 CP는 예외적으로 NRC, 2012 기준 Total nitrogen에 6.25를 곱한 값을 요구량으로 설정하였다. 실험사료의 대사에너지 (ME; metabolizable energy)는 Phase I (0~2주), Phase II (2~5주) 모두 3265kcal/kg 이었다. 단백질 함량은 Phase I 에서 20.56%, Phase II 에서 18.88%로, 라이신(lysine)의 함량은 phase I 에서 1.35%, Phase II 에서 1.15%에 맞춰 배합하였다. 동물성 단백질은 처리구당 Fish meal 3%, Whey powder 3%, Larva 3%가 각각 첨가되었으며, 옥수수와 대두박을 통해 영양소 요구량을 충족시켜 주었다. 주요 실험사료의 원료 및 화학적 조성은 표 1 (phase I)에 제시된 바와 같다.

표 1. 실험사료의 사료배합비와 성분표 (Phase I)

Ingredients	Control	Fish meal 3%	Whey powder 3%	Larva 3%
Corn	35.43	37.49	32.81	37.01
SBM	34.56	30.10	34.22	31.30
Barley	15.00	15.00	15.00	15.00
Fish meal	0.00	3.00	0.00	0.00
Larva	0.00	0.00	0.00	3.00
Whey powder	0.00	0.00	3.00	0.00
Lactose	10.00	10.00	10.00	10.00
Soy-oil	1.37	1.28	1.40	0.05
MDCP	1.46	1.25	1.40	1.42
Limestone	1.03	0.83	1.03	1.07
L-Lysine-HCl, 78%	0.29	0.25	0.28	0.30
DL-met, 80%	0.09	0.05	0.09	0.08
L-threonine, 99%	0.08	0.05	0.07	0.08
Vit. Mix	0.10	0.10	0.10	0.10
Min. Mix	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30
Choline-Cl(50%)	0.10	0.10	0.10	0.10
ZnO	0.10	0.10	0.10	0.10
Sum	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition ³⁾				
ME, kcal/kg	3,265	3,265	3,265	3,265
CP, %	20.56	20.56	20.56	20.56
Lysine, %	1.35	1.35	1.35	1.35
Methionine, %	0.35	0.35	0.35	0.35
Ca, %	0.80	0.80	0.80	0.80
Total P, %	0.65	0.65	0.65	0.65

¹⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D₃, 1,600IU; vitamin E, 32IU; d-biotin, 64g; riboflavin, 3.2mg; calcium pantothenic acid, 8mg; niacin, 16mg; vitamin B₁₂, 12g; vitamin K, 2.4mg

²⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1mg; I, 0.3mg; Mn, 24.8mg; CuSO₄, 54.1mg; Fe, 127.3mg; Zn, 84.7mg; Co, 0.3mg

³⁾ Calculated values

표 2. 실험사료의 사료배합비와 성분표 (Phase II)

Ingredients	Control	Fish meal 3%	Whey powder 3%	Larva 3%
Corn	44.08	46.17	41.46	45.66
SBM	29.45	24.97	29.11	26.18
Barley	17.00	17.00	17.00	17.00
Fish meal	0.00	3.00	0.00	0.00
Larva	0.00	0.00	0.00	3.00
Whey powder	0.00	0.00	3.00	0.00
Lactose	5.00	5.00	5.00	5.00
Soy-oil	1.41	1.31	1.45	0.09
MDCP	1.23	1.01	1.17	1.20
Limestone	0.88	0.68	0.88	0.91
L-Lysine-HCl, 78%	0.19	0.15	0.18	0.20
DL-met, 80%	0.04	0.01	0.04	0.04
L-threonine, 99%	0.03	0.01	0.02	0.03
Vit. Mix	0.10	0.10	0.10	0.10
Min. Mix	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30
Choline-Cl(50%)	0.10	0.10	0.10	0.10
ZnO	0.10	0.10	0.10	0.10
Sum	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition ³⁾				
ME, kcal/kg	3,265	3,265	3,265	3,265
CP, %	18.88	18.88	18.88	18.88
Lysine, %	1.15	1.15	1.15	1.15
Methionine, %	0.30	0.30	0.30	0.30
Ca, %	0.70	0.70	0.70	0.70
Total P, %	0.60	0.60	0.60	0.60

¹⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D₃, 1,600IU; vitamin E, 32IU; d-biotin, 64g; riboflavin, 3.2mg; calcium pantothenic acid, 8mg; niacin, 16mg; vitamin B₁₂, 12g; vitamin K, 2.4mg

²⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1mg; I, 0.3mg; Mn, 24.8mg; CuSO₄, 54.1mg; Fe, 127.3mg; Zn, 84.7mg; Co, 0.3mg

³⁾ Calculated values

3) 사양 실험

각 돈방에는 하나의 사료 급이기와 니플 급수기가 설치되어있어 전체 실험 기간 동안 물과 사료는 무제한 자유 채식 (*ad libitum*)하도록 하였다. 돈방 온도는 실험 개시 후 첫 일주일간은 31℃를 유지하였으며, 매주 1℃씩 낮추어 4주차에는 28℃를 유지하게 하였다. 사양실험 기간은 각각 Phase I 2주, Phase II 3주 총 5주간 진행되었다. 체중 및 사료 섭취량은 사육 단계 및 사료 종류의 변동 시점을 고려하여, 실험 개시(Initial)기간을 기점으로 2주차와 5주차에 측정하여 일당증체량 (average daily gain; ADG), 일일사료섭취량 (average daily feed intake; ADFI), 사료효율 (gain/feed ratio; G/F ratio)을 계산하였다.

4) 혈액 정상

실험 개시 시 혈중 요소태질소 (BUN : Blood Urea Nitrogen) 및 IGF-1을 조사하기 위해 실험 개시 시점에 임의적으로 경정맥에서 6두의 혈액을 채혈하였으며, 실험 개시 일 이후에는 각 사육단계별 체중 측정 시 처리별로 6두씩 총 30두의 혈액을 채취하였다. 혈액은 disposable culture tube에 포집하여 3,000 rpm, 4℃ 상태로 15분 동안 원심분리 하였다. 그 후 micro tube 보관용기에 혈청만을 분리하여 분석 시까지 -20℃로 보관하였다. BUN은 자동생화학 분석기 (ADVIA 1650, Japan)와 호르몬 분석기 (Immulite 2000, DPC, SUA)를 이용하여 분석하였다. IGF-1은 호르몬 분석기를 이용하여 분석하였다 (Immulite 2000, DPC, SUA).

5) 설사 빈도

설사빈도 측정은 시험 개시 후 매일 오전 8시에 사양 실험돈을 대상으로 측정하였으며, 각 돈방의 모든 자돈들을 대상으로 항문주위의 수양성 설사(watery diarrhea)흔적을 가진 개체수를 파악하였다. 설사빈도는 수양성 설사 흔적이 없는 돈방의 설사빈도를 1으로 측정하였으며, 모든 개체의 항문 주위가 수양성 설사 흔적을 보였을 때의 설사빈도를 5로 하여 전 시험 기간 동안 측정하였다.

6) 경제성 분석

경제성 분석은 한양사료에서 생산되는 자돈사료 가격을 기준으로 산출하였으며, 전 사양 기간 동안 이유자돈의 1kg 단위증체에 소요되는 사료비용은 본 시험의 사양성적에서 나온 사료 섭취량과 증체량을 기준으로 분석하였다.

7) 통계 분석

본 실험의 data는 SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC)의 Linear Quadratic, ANOVA를 이용하여 통계분석을 실시하였다. 성장성적 data의 경우 한 돈방이 experimental unit으로 설정하였으며, 혈액분석의 경우 실험돈 각 개체를 unit으로 설정하였다. 거저리 유충의 첨가에 따

른 효과를 추정하기 위해 orthogonal polynomial contrast를 통해 거저리 유충의 첨가수준에 따른 linear 및 quadratic effect를 조사하였으며, 모든 통계적 분석에 있어 $P < 0.05$ 인 경우 유의차가 있는 것으로, $P < 0.01$ 인 경우 고도의 유의차가 있는 것으로 간주하였다.

3. 실험 결과 및 고찰 (Results and Discussion)

1) 사양성적 (Feeding trial)

자돈사료 내 거저리 유충 첨가가 이유자돈의 성장성적에 미치는 영향을 표 1에 제시하였다. 사양실험 결과, 성장성적에서 Body Weight, ADG, ADFI가 통계적인 유의차가 나타났다. 체중은 0-2주차까지는 유의차를 보이지 않은 반면 5주차 에서 A처리구(Fish meal 3%)가 C처리구(Larva 3%)에 비해 12% 높은 성장성적을 보였다($p < 0.02$). 일당 증체량에서는 A처리구, B처리구(Whey powder 3%)가 C처리구에 비해 유의적인 차이를 보이지는 않았지만 수치상으로 23%, 21% 높은 수준을 보였다. 또한 일당 섭취량에서도 A처리구, B처리구가 C처리구에 비해 유의적인 차이를 보이지는 않았지만 수치상으로 10%, 8% 높은 수준을 보였다.

일반적으로 이유 후 소화불량, 스트레스 등과 같은 이유로 아미노산 함량과 소화율이 높은 동물성 단백질 원료인 Fish meal과 Whey powder를 이유자돈 사료 내에 첨가한다(Zhao 등., 2014). 하지만 이는 곧 높은 생산비를 야기하며 대체가능한 다른 동물성 단백질 원료의 필요성을 느끼게 한다. 그 대안으로 곤충(*Tenebrio molitor*) 단백질이 있는데 그 중에서 Larva가 가장 높은 조단백질 함유량을 가지고 있으며 에너지수준 또한 높다. (Deng 등., 2008)에 의하면 산란계 사료 내 단백질원으로 Larva를 첨가했을 때 산란율, 사료 효율이 각각 5.06%, 6.9% 향상 하였다. 또한 육계 사료 내에 첨가 하였을 때에도 높은 증체량과 사료섭취량, 효율을 보였다 (Shen 등., 2006).

본 시험결과 이유자돈 사료내 단백질원료로 Larva의 첨가가 이유자돈의 성장능력에 있어서 기존 단백질원료인 Fish meal과 Whey powder를 대체하기는 힘들것으로 사료된다.

표 3. 자돈사료 내 기존 단백질원료 대체

Criteria	Treatment				SEM ¹⁾	P-value
	Con	A	B	C		
Body weight, kg						
Initial	5.80	5.80	5.80	5.80	—	—
2week	6.73	7.35	7.13	6.97	0.389	0.06
5week	10.40 ^c	12.61 ^a	12.42 ^{ab}	11.05 ^{bc}	0.723	0.02
ADG, g						
0-2 week	69	110	94	83	8.431	0.09
3-5 week	163 ^c	246 ^{ab}	252 ^a	186 ^{bc}	18.703	0.02
0-5 week	123 ^b	194 ^a	189 ^a	150 ^{ab}	13.715	0.02
ADFI, g						
0-2 week	144	173	170	162	9.341	0.23
3-5 week	449 ^b	563 ^a	553 ^a	504 ^{ab}	28.488	0.03
0-5 week	327 ^b	407 ^a	400 ^a	367 ^{ab}	20.096	0.01
G:F ratio						
0-2 week	0.448	0.632	0.540	0.504	0.031	0.11
3-5 week	0.355	0.444	0.449	0.369	0.022	0.32
0-5 week	0.371	0.484	0.464	0.408	0.023	0.26

¹⁾Standard error of the mean.

^{abc} Means in a same row with different superscript letters significantly differ (P<0.05).

2) 혈액 성분 (Blood urea nitrogen, IGF-1)

자돈 사료 내 거저리 유충의 첨가가 자돈의 혈중 요소태질소(BUN; blood urea nitrogen)와 혈중 IGF-1 분비에 미치는 영향을 표 4에 나타내었다. BUN은 아미노산의 이용에 대한 대표적인 지표로 사용되어 왔다(Eggum, 1970). 혈중 BUN 농도를 분석한 결과, 자돈 사료 내 단백질 원료에 따른 통계적인 유의차를 보이지 않았다 (P>0.05). 따라서 자돈 사료 내 기존 단백질원료 대체제로 거저리 원료의 첨가가 BUN 농도에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다. 결과적으로 BUN 농도의 개선은 이뤄지지 않은 것으로 사료된다.

인슐린 유사 성장인자(IGF-1)는 성장호르몬의 자극으로 분비되며 조직들의 성장과 분화에 관여하는 인자로 심혈관계의 구조와 기능의 조절에도 중요하고 뼈의 성장에도 매우 중요한 역할을 한다. 또한 영양상태에 의해 크게 좌우되며 영양상태가 불량할 경우 인슐린 유사 성장인자의 분비가 감소하게 된다.(Bayes-Genis, 2000).

본 실험결과 동물성 단백질 대체제로 거저리 유충첨가가 자돈 혈액 내 유사 성장인자에 유의적인 영향을 나타내지 않았다 (P>0.05).

결과적으로 혈액성상의 분석결과 동물성 단백질원료 대체제로써 거저리 유충의 첨가가 기존 동물성 단백질 원료인 Fish meal과 Whey powder를 섭취하는 것과 유사한 수준의 BUN과

혈중 IGF-1 농도를 보이는 것으로 나타났으나 혈액성상을 개선하지는 못하는 것으로 나타났다.

표 4. 자돈사료 내 단백질원료가 이유자돈의 BUN 및 IGF-1 농도에 미치는 영향

Criteria	Treatment				SEM ¹⁾	P-value	
	Con	A	B	C		Linear	Quadratic
BUN ²⁾ , mg/dL							
Initial	9.35	9.35	9.35	9.35			
2week	13.90	12.50	9.98	13.53	0.871	0.69	0.19
5week	13.47	14.15	12.93	12.23	0.573	0.26	0.86
IGF-1, ng/mL							
Initial	52.98	52.98	52.98	52.98			
2week	45.88	72.35	66.42	60.97	4.714	0.41	0.98
5week	52.97	67.78	54.50	53.85	4.793	0.25	0.54

¹⁾Standard error of the mean.

²⁾Blood urea nitrogen

3) 설사빈도

자돈사료 내 단백질 원료가 이유자돈의 설사빈도에 미치는 영향을 표 3에 제시하였다. 실험 결과, 설사빈도에서 자돈기 전 기간 동안 모든 처리구에서 통계적인 유의차를 보이지 않았다. 하지만 수치상으로 이유자돈 전기인 0-2주 동안에서의 설사빈도가 이유자돈 후기인 3-5주에 비해 높게 나타난 것을 볼 수가 있다.

일반적으로 이유자돈은 신체적으로 성숙이 완전하지 않기 때문에 잦은 설사빈도와 높은 폐사율을 보인다. 액상에서 고형사료 전환으로 인해 소화불량과 같은 문제를 초래하게 되는데 이러한 현상은 소화기관의 미발달을 의미한다(Ji 등., 2009). 또한 이유 후 소화불량, 스트레스 등과 같은 이유로 아미노산 함량과 소화율이 높은 동물성 단백질 원료인 Fish meal과 Whey powder를 이유자돈 사료 내에 첨가하는데 이는 높은 생산비용을 야기한다(Zhao 등., 2014).

자돈은 이유를 하면서 급격한 환경의 변화와 수송스트레스, 사료교체에 따른 영양 스트레스로 인하여 이유 초기에 설사가 많이 발생한다(Monjan 등., 1977). 병원성 미생물 (대장균 등)이 장 용모에 부착되어 기생하면서 독소를 배출하고 용모를 탈락시킨다. 그로 인해 용모가 짧아지고 용모에서 분비되는 소화효소의 양도 감소하며, 영양소를 흡수할 수 있는 면적도 감소하게 되어 설사가 발생하게 된다(Manzainlla., 2004). 본 실험결과 자돈사료 내 단백질원료 종류가 자돈의 설사빈도에 부정적인 영향을 주지 않는다고 사료된다.

표 4. 자돈사료 내 단백질원료가 이유자돈의 설사빈도에 미치는 영향

Criteria	Treatment				SEM ¹⁾	P-value	
	Con	A	B	C		Linear	Quadratic
Diarrhea scores ²⁾							
0-2 week	2.96	2.97	2.97	2.00	0.039	0.72	0.99
3-5 week	1.95	2.08	2.05	1.92	0.039	0.11	0.55
0-5 week	1.94	2.06	2.06	1.98	0.040	0.31	0.63

¹⁾Standard error of the mean.

²⁾ 0: No signs of diarrhea in pen, 5: All objects have sings of diarrhea in pen

4) 경제성 분석

자돈사료 내 단백질 원료가 양돈생산 경제성에 미치는 영향을 표 6에 제시하였다. 경제성 분석은 사료 원료비를 기준으로 하여 계산하였으며, 이유전기 사료가격은 kg당 Control처리구 526원, A처리구 593원, B처리구 555원, C처리구 1,246원 이유후기 사료가격은 kg당 Control처리구 490원, A처리구 557원, B처리구 519원, C처리구 1,210원으로 경제성을 분석하였다. 자돈사료 내 단백질원료 가격을 비교해 보면 kg당 Fish meal 2,980원, Whey powder 1,340원, Larva 25,000원 이었다. 거저리의 가격이 비싼 이유는 거저리 생산 농가수의 부족에 따른 낮은 생산성이 주원인으로 사료된다. 처리구간 사료가격과 표 6에 제시된 성장성적을 기준으로 이유자돈 1kg 증체 시 필요한 사료비용을 보게 되면, 통계적으로 유의적 차이가 나타났다. 이는 거저리 성충의 높은 생산비로 인한 결과로 사료된다. 결과적으로 본 시험의 성장성적과 사료비를 통해 계산되어진 이유 후 두당 총 사료비는 거저리 성충을 첨가한 처리구에서 가장 높게 나타났으며 이를 통해 자돈사료 내 단백질 원료로써 거저리 성충의 첨가가 양돈 농가의 경제적 이득을 증대시키기는 어려울 것으로 사료된다.

표 6. 자돈사료 내 단백질원료가 경제성에 미치는 영향

Criteria	Treatment				SEM ¹⁾	P-value	
	Con	A	B	C		Lin.	Quad.
Weaning phase I (0-2 week)							
Feed cost, ₩/kg ²⁾	526	593	555	1,246	68.563	<0.01	<0.01
Total weight gain, kg/head	0.93	1.55	1.33	1.17	0.119	<0.01	0.95
Total feed intake, kg/head	2.02	2.43	2.39	2.27	0.130	0.06	0.47
Feed cost/weight gain, ₩/kg	1,063	1,441	1,328	2,829	180.799	0.48	<0.01
Weaning phase II (3-5 week)							
Feed cost, ₩/kg	490	557	519	1,210	68.563	<0.01	<0.01
Total weight gain, kg/head	3.67	5.26	5.30	4.09	0.375	0.01	0.62
Total feed intake, kg/head	9.45	11.82	11.61	10.57	0.598	<0.01	0.43
Feed cost/weight gain, ₩/kg	4,629	6,585	6,027	12,793	814.802	0.67	<0.01
Overall (0-5 week)							
Total feed cost, ₩/kg	5,692	8,025	7,355	15,621	986.015	<0.01	<0.01
Total weight gain, kg/head	4.60	6.81	6.63	5.25	0.469	0.05	0.35
Feed cost/weight gain, ₩/kg	1,326	1,249	1,149	3,000	184.973	<0.01	<0.01

¹⁾ Standard error of mean

²⁾ Feed cost/weight gain (₩/kg)=[Total feed intake (kg/head) × Total feed cost (₩/head)] ÷ Total weight gain (kg/head)

실험 3. 포유돈 사료에서 어분의 대체 가능성 평가

1. 서론 (Introduction)

최근 전 세계적으로 곤충자원에 대한 관심이 높아짐에 따라, 곤충자원시장은 2007년 11조 원 규모에서 2020년 38조원 규모로 확대가 예상되고 있다. 국내의 곤충산업시장도 마찬가지로 2009년 1570억 원 규모에서 2015년 3조원 규모로 급성장하고 있는 추세이다. 국내의 사료 및 의약곤충용 시장은 2015년 기준으로 700억 원 규모로 추산되고 있으며, 그 발전가능성이 높아 국가전략산업으로 지속적으로 투자되고 있는 실정이다. 거저리(*tenebrio molitor*)는 동물성 단백질로 영양소 함량과 영양소 이용률이 식물성 단백질보다 높다. 또한 거저리는 단백질 원료로써 값비싼 대두박이나 어분을 대체할 가능성이 있어 대체사료자원으로써 주목을 받고 있으며, 동물성 단백질이 가지고 있는 질병전파의 위험성이 거의 없어 새로운 동물성 단백질 원료로써의 전망이 매우 좋은 편이다. 거저리 유충의 영양소 함량을 대두박 및 어분과 비교해보았을 때, 조단백질 함량은 대두박에 비해서는 높고 어분에 비해서는 낮은 편이지만, 조지방 함량은 이 두 원료사료에 비해 높은 편이다 (NRC, 2012). 아미노산 조성에서는 거저리 유충의 lysine 함량은 대두박에 비해 높은 편이지만 methionine 함량은 대두박에 비해 낮은 것으로 알려져 있다 (NRC, 2012). 따라서 본 연구에서는 어분의 대체사료자원으로써의 거저리 유충의 가능성을 평가해보고자, 포유돈 사료 내 거저리 유충의 첨가가 어분이 가지는 효과에 비해 얼마만큼의 대체효과를 가질 수 있는지를 평가하고자 한다.

2. 재료 및 방법 (Materials and Methods)

1) 실험 동물 및 실험 환경 (Experimental animal and housing)

평균체중 237.2 ± 5.50 kg의 2원 교잡종 (Yorkshire x Landrace) 포유모돈 25두를 공시하여, 체중과 등지방, 산차 및 복당체중을 고려하여 분만직후에 5처리 5반복, 완전임의 배치법(CRD; completely randomized design)에 따라 각각의 처리구에 배치하였다. 자돈을 대상으로 출생 후 24시간 이내에 견치, 단미, 철분주사 및 이각을 실시하였고, 복당 체중 및 포유두수를 맞춰 양자를 보냈으며, 분만 후 3일령에 거세를 실시하였다. 실험 모돈은 110일령에 온도 조절이 용이한 분만사로 이송되었으며, 2.5×1.8 m²의 사료 및 물의 자유 급이가 가능한 분만틀 내에서 실험 기간 동안 사육되었다.

2) 실험 설계 및 실험 사료 (Experimental desing and diet)

실험 처리구는 옥수수-대두박 위주의 기초사료로 구성된 대조구에 단백질 원료인 어분 (fish meal)을 2% 및 4% 첨가한 처리구들(FM2, FM4)과 기초사료에 거저리유충을 1% 및

2% 첨가한 처리구들(L1, L2)로 구성하였다.

실험사료는 포유모돈의 영양소 요구량 (NRC, 1998)을 충족하도록 배합하였다. 실험사료의 대사에너지 (ME; metabolizable energy)는 3,265 kcal/kg으로 설정하였으며, 조단백질 함량은 16.8%로, 라이신(lysine)의 함량은 1.09%에 맞춰 배합하였다. 기타 아미노산, 비타민 및 광물질 요구량 또한 NRC(1998)의 요구수준과 같거나 높은 수준으로 충족시켰으며, 실험사료의 원료 및 화학적 조성은 표 1에 제시하였다.

표 1. 실험사료의 사료배합비와 화학적 조성

Ingredients, %	<i>Tenebrio molitor</i> Larva				
	Con	FM2	FM4	L1	L2
Corn	66.14	66.12	66.04	64.60	63.05
SBM	24.96	21.76	18.48	23.52	22.06
Wheat bran	2.90	4.47	6.24	4.89	6.94
Tallow	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
L-lysine · HCl (78%)	0.28	0.27	0.26	0.29	0.29
DL-methionine (99%)	0.04	0.02	0.00	0.04	0.04
MDCP	1.73	1.48	1.20	1.66	1.59
Limestone	1.35	1.28	1.18	1.40	1.43
Vit. Mix ¹⁾	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Min. Mix ²⁾	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Choline chloride-50	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Fish meal	0.00	2.00	4.00	0.00	0.00
<i>Tenebrio molitor</i> larva	0.00	0.00	0.00	1.00	2.00
Sum	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical Composition ³⁾					
ME (kcal/kg)	3,265.04	3,265.06	3,265.03	3,265.06	3,265.03
CP (%)	16.80	16.80	16.80	16.80	16.80
Lysine (%)	1.09	1.09	1.09	1.09	1.09
Methionine (%)	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29
Ca (%)	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Total P (%)	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70

¹⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 12,000 IU; vitamin D₃, 2,000IU; vitamin E, 100IU; vitamin K₃, 4.50mg; thiamine, 2mg; riboflavin, 7.2mg; pantothenic acid, 30mg; niacin, 45mg; vitamin B₅, 4.5g; biotin, 0.5mg; folic acid, 3.50mg; vitamin B₁₂, 0.03mg.

²⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.15mg; I, 0.3mg; Mn, 37mg; Cu, 11mg; Fe, 150mg; Zn, 85mg; Co, 2.0mg; Se, 0.30mg, Cr, 500mg.

³⁾ Calculated values

3) 샘플 채취 및 조사 항목 (Sample collection and measurements)

① 포유 모돈의 체중, 사료 섭취량, 등지방 두께 및 사료섭취량의 변화: 포유기 모돈의 생리적 변화 정도를 판별하기 위하여 분만 후 24 시간 이내 및 이유 시의 체중, P2 부위의 등지방 두께 및 사료섭취량을 측정하였다.

② 포유 자돈의 성장능력 및 포유 모돈의 포유능력: 양자처리 후 포유를 개시하고 분만 후 24 시간 이내 및 이유 시의 자돈의 체중 및 증체량을 측정하였다

③ 모돈 및 자돈의 혈액성상: 분만 후 24시간 이내 및 포유 21일령의 모돈 및 자돈의 혈액을 경정맥에서 채취하여 serum tube에 포집하였다. 채취한 혈액은 serum tube에 포집하여 3,000rpm, 4℃ 상태로 15분 동안 원심분리 하였다. 그 후 micro tube 보관용기에 혈청만을

분리하여 분석 시까지 -20°C 로 보관하였다. 보관된 혈액은 혈액분석기 (Ciba-Corning model, Ciba Corning Diagnostics Co.)를 이용하여 분석하였다.

④ 모돈의 돈유성상 : 분만 후 24시간 이내 (초유) 및 21일에 혈관에 옥시토신 0.5 ml를 주사하여 젖분비를 촉진한 후 돈유 샘플을 채취하였다. 유성분 분석기 (Milkoscan FT20, FOSS Electric Co., Denmark)로 카제인(casein), 유지방 (fat), 유단백질 (protein), 락토오스 (lactose), 유고형분(total solid), 무지유고형분 (Solids Not Fat: SNF) 및 유리지방산 (free fatty acid) 함량을 측정하였다.

4) 통계 분석

통계분석은 SAS의 General Linear Model (GLM)을 이용하여 수집된 자료의 유의성을 검정하였다. 성장성적의 경우 개별 모돈을 experimental unit으로 설정하였으며, 혈액분석과 모유분석의 경우 각 개체를 unit으로 설정하였다. $P<0.05$ 인 경우 유의차가 있는 것으로, $P<0.01$ 인 경우 고도의 유의차가 있는 것으로 간주하였다. $0.05\leq P<0.10$ 일 경우 경향이 있는 것으로 고려하였다.

3. 실험 결과 및 고찰 (Results and Discussion)

1) 포유모돈의 생리적 변화 및 사료섭취량, 재귀발정일

포유모돈 사료 내 어분대체 목적으로 거저리 유충을 첨가하였을 시 포유모돈의 생리적 변화 및 사료섭취량, 재귀발정일에 미치는 영향을 표 2에 제시하였다. 실험 결과, 포유기 21일째의 모돈의 체중 및 체중변화량에서는 처리구간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 또한 등지방 두께에서도 포유 21일째의 등지방 두께 및 등지방 두께 변화량에서 처리구간의 유의적인 통계적 차이는 나타나지 않았다. 포유기 일일사료섭취량(ADFI) 및 재귀발정일(WEI)을 측정한 결과, 처리구간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때, 포유돈 사료 내 거저리 유충을 2%까지 첨가하였을 시, 어분을 4%까지 첨가했을 때와 동일한 동물성 단백질 원료로써의 효과를 가지는 것으로 사료된다.

표 2. 포유돈 사료 내 어분대체 목적의 거저리 유충의 첨가가 포유모돈의 성장성적에 미치는 영향¹⁾

Criteria	Treatment					SEM ²⁾	P-value
	CON	F2	F4	L1	L2		
No. of sows	5	5	5	5	5		
Body weight, kg							
24 hrs postpartum	238.8	235.4	243.9	236.1	232.0	5.56	0.97
Day 21 of lactation	216.9	231.3	232.3	228.9	223.3	5.72	0.92
BW changes (0-21d)	-21.9	-4.1	-11.6	-7.2	-8.7	2.29	0.19
Backfat thickness, m							
24 hrs postpartum	20.8	20.3	22.2	20.7	21.1	1.07	0.99
Day 21 of lactation	17.5	16.9	19.5	18.7	20.2	1.03	0.84
BF changes (0-21d)	-3.3	-3.4	-2.7	-2.0	-0.9	0.56	0.64
ADFI, kg	4.37	5.15	4.31	5.71	5.23	0.259	0.47
WEI, day	5.00	5.10	5.20	4.90	5.25	0.210	0.98

¹⁾ Initial average body weight of sows: 237.2 ± 5.5kg

²⁾ Standard error of means.

2) 포유자돈의 성장능력

포유모돈 사료 내 어분대체 목적으로 거저리 유충을 첨가하였을 시 포유자돈의 성장성적에 미치는 영향을 표 3에 제시하였다. 포유기 3주령의 포유두수 및 폐사율에서는 처리구간의 통계적 유의차는 나타나지 않았으나, 거저리 유충을 2% 첨가한 L2처리구에서 포유기간 중 폐사율이 가장 낮게 나타났다. 포유기의 복당체중(litter weight)을 보면, 3주령의 복당 체중 및 복당 체중 증체량에서 처리구간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 포유기 자돈의 개별체중(piglet weight)에서도 3주령의 체중 및 3주 동안의 증체량은 처리구에 따른 유의적인 영향이 나타나지 않았다. 이러한 포유기 자돈의 성장성적을 종합하여 볼 때, 거저리 유충을 1% 및 2% 첨가하여도, 포유기 사료 내 어분을 4% 첨가한 것도 대등한 효과를 기대할 수 있으며, 오히려 거저리 2% 첨가시 포유자돈의 폐사율이 감소하여 이유두수 증가의 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

표 3. 포유돈 사료 내 어분대체 목적의 거저리 유충의 첨가가 포유자돈의 성장성적에 미치는 영향

Criteria	Treatment					SEM ¹⁾	P-value
	CON	F2	F4	L1	L2		
No. of piglet (initial)	11.60	11.40	11.80	12.00	11.80	0.14	0.48
No. of piglet (3 wk)	10.40	9.60	10.60	10.60	11.40	0.24	0.24
Mortality, %	10.34	15.79	10.17	11.67	3.39		
Litter weight, kg							
After cross-fostering	18.30	15.47	17.85	17.83	19.29	0.49	0.15
Day 21 of lactation	60.13	55.39	61.45	63.96	62.34	2.35	0.79
Weight gain (0-21d)	41.83	39.92	43.60	46.13	43.05	2.19	0.92
Piglet weight, kg							
After cross-fostering	1.57	1.38	1.52	1.49	1.64	0.04	0.41
Day 21 of lactation	5.73	5.62	5.83	6.09	5.46	0.19	0.81
Weight gain (0-21d)	4.16	4.24	4.31	4.60	3.82	0.17	0.64

¹⁾ Standard error of means.

3) 포유모돈의 혈액 성상

포유모돈 사료 내 어분대체 목적으로 거저리 유충을 첨가하였을 시 포유모돈의 혈액성상에 미치는 영향을 표 4에 제시하였다. 혈중 단백질 농도의 지표인 albumin, creatinine, total protein의 혈중 농도에서는 처리구간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 또한, 질소이용율의 지표(Eggum, 1970; Whang과 Easter, 2000) 로 사용되고 있는 혈중 BUN 농도에서도 처리구간의 통계적 유의차는 발견되지 않았다. 간건강 지표인 AST(aspartate aminotransperase)와 ALT(alanine aminotransaminase)농도를 분석한 결과, 처리구간의 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 이를 통해 거저리 유충을 2% 첨가하였을 시 모돈의 간 건강에는 부정적인 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다. 결론적으로, 거저리 유충을 2% 까지 첨가하여도 모돈의 단백질 및 질소 이용률에는 어분처리구와 대비하여 차이가 없었으며, 간 건강에서도 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

표 4. 포유돈 사료 내 어분대체 목적의 거저리 유충의 첨가가 포유모돈의 혈액성상에 미치는 영향

Criteria	Treatment					SEM ¹⁾	P-value
	CON	F2	F4	L1	L2		
Albumin, g/dL							
24 hrs postpartum	4.33	4.33	4.33	4.33	4.33		
Day 21 of lactation	4.63	4.33	4.43	4.07	4.50	0.089	0.40
Creatinine, mg/dL							
24 hrs postpartum	3.01	3.01	3.01	3.01	3.01		
Day 21 of lactation	2.41	2.73	2.14	2.47	2.50	0.093	0.47
Total protein, g/dL							
24 hrs postpartum	7.02	7.02	7.02	7.02	7.02		
Day 21 of lactation	7.47	7.40	7.50	7.40	7.47	0.134	0.99
BUN, mg/dL							
24 hrs postpartum	13.57	13.57	13.57	13.57	13.57		
Day 21 of lactation	18.33	19.43	19.57	16.87	18.30	0.634	0.67
AST, U/L							
24 hrs postpartum	44.83	44.83	44.83	44.83	44.83		
Day 21 of lactation	30.33	31.33	34.00	35.67	29.33	2.821	0.96
ALT, U/L							
24 hrs postpartum	21.33	21.33	21.33	21.33	21.33		
Day 21 of lactation	30.66	29.67	32.00	30.33	30.00	1.133	0.98

¹⁾ Standard error of means.

4) 포유자돈의 혈액 성상

포유모돈 사료 내 어분대체 목적으로 거저리 유충을 첨가하였을 시 포유자돈의 혈액성상에 미치는 영향을 표 5에 제시하였다. 혈중 단백질 농도의 지표인 albumin, creatinine, total protein의 혈중 농도에서는 처리구간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 또한, 질소이용율의 지표로 사용되고 있는 혈중 BUN 농도에서도 처리구간의 통계적 유의차는 발견되지 않았다. 간 건강 지표인 AST와 ALT농도를 분석한 결과, AST 농도에서는 처리구간의 유의차가 발생하지 않았지만, ALT 농도에서는 거저리 유충을 2% 첨가한 L2 처리구의 혈중 농도가 가장 높은 수준으로 나타났지만, 어분처리구(F2, F4)들에 비해서 통계적 유의차는 나타나지 않았다. 반면에 거저리 유충을 1% 첨가한 L1 처리구에서는 어분처리구들(F2, F4)에 비해 낮은 혈중 ALT 농도를 유지하였으며, 대조구와도 유의적인 차이가 나지 않았다. 이러한 결과를 통해, 거저리 유충을 1% 첨가 시 포유자돈의 간 건강에는 부정적인 영향을 미치지 않으며, 거저리 유충을 2% 첨가 시에는 어분을 2% 및 4% 첨가한 것과 동일한 영향을 미치는 것으로 사

료된다.

표 5. 포유돈 사료 내 어분대체 목적의 거저리 유층의 첨가가 포유자돈의 혈액성상에 미치는 영향

Criteria	Treatment					SEM ¹⁾	P-value
	CON	F2	F4	L1	L2		
Albumin, g/dL							
24 hrs postpartum	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20		
Day 21 of lactation	3.50	3.43	3.30	3.43	3.27	0.076	0.90
Creatinine, mg/dL							
24 hrs postpartum	0.68	0.68	0.68	0.68	0.68		
Day 21 of lactation	0.72	0.71	0.52	0.78	0.60	0.039	0.31
Total protein, g/dL							
24 hrs postpartum	5.62	5.62	5.62	5.62	5.62		
Day 21 of lactation	4.77	4.63	4.47	4.60	4.67	0.088	0.88
BUN, mg/dL							
24 hrs postpartum	18.07	18.07	18.07	18.07	18.07		
Day 21 of lactation	5.90	10.93	6.50	5.77	9.43	0.881	0.26
AST, U/L							
24 hrs postpartum	120.00	120.00	120.00	120.00	120.00		
Day 21 of lactation	38.00	59.67	52.67	45.67	57.33	4.138	0.56
ALT, U/L							
24 hrs postpartum	37.33	37.33	37.33	37.33	37.33		
Day 21 of lactation	27.00 ^b	40.67 ^{ab}	41.00 ^{ab}	24.67 ^b	47.33 ^a	3.038	0.07

¹⁾ Standard error of means.

^{ab} Means in a same row with different superscript significantly different (P<0.10).

5) 모유 성분 분석

포유모돈 사료 내 어분대체 목적으로 거저리 유층을 첨가하였을 시 포유모돈의 초유 및 모유 성분에 미치는 영향을 표 6에 제시하였다. 초유 및 모유(21일) 내 카제인(casein), 유지방(fat), 유단백(protein), 락토오스(lactose), 고형분(total solid), 무지고형분(solid not fat)에 서는 처리구간의 통계적 유의차가 나타나지 않았다. 유리지방산(free fatty acid)에서 대조구의 비율이 다른 처리구들에 비해 높은 경향이 나타났다 (P=0.06). 여러 결과들을 종합적으로 분석해 볼 때, 포유돈 사료 내 거저리 유층의 첨가는 어분 첨가 처리구에 비해 대등한 모유성상을 가지는 것으로 나타났다.

표 6. 포유돈 사료 내 어분대체 목적의 거저리 유층의 첨가가 모유 성분에 미치는 영향

Criteria	Treatment					SEM ¹⁾	P-value
	CON	F2	F4	L1	L2		
Casein, %							
Colostrum	5.20	5.20	5.20	5.20	5.20		
Day 21 of lactation	4.15	4.16	4.36	4.66	4.29	0.129	0.77
Fat, %							
Colostrum	7.89	7.89	7.89	7.89	7.89		
Day 21 of lactation	4.40	7.86	6.73	7.24	6.84	0.467	0.15
Protein, %							
Colostrum	6.51	6.51	6.51	6.51	6.51		
Day 21 of lactation	5.14	4.57	4.68	5.14	4.64	0.197	0.83
Lactose, %							
Colostrum	4.64	4.64	4.64	4.64	4.64		
Day 21 of lactation	5.21	5.78	5.89	5.63	5.91	0.134	0.44
Total solid, %							
Colostrum	21.12	21.12	21.12	21.12	21.12		
Day 21 of lactation	16.81	19.56	18.50	19.41	18.73	0.487	0.41
Solid not fat, %							
Colostrum	11.40	11.40	11.40	11.40	11.40		
Day 21 of lactation	10.71	10.54	11.02	11.24	10.94	0.128	0.53
Free fatty acid, %							
Colostrum	4.44	4.44	4.44	4.44	4.44		
Day 21 of lactation	8.57 ^a	3.79 ^b	3.44 ^b	2.75 ^b	4.07 ^b	0.722	0.06

¹⁾ Standard error of means.

^{ab} Means in a same row with different superscript significantly different (P<0.10).

4. 결론 (Conclusion)

포유모돈 사료 내 어분대체 목적으로 거저리 유층을 첨가하였을 시 포유모돈의 생리적 변화 및 포유기 사료섭취량, 재귀발정일에는 어분처리구에 비해 유의적인 차이가 나타나지 않았고, 포유자돈의 성장성적에서도 어분처리구와 대등한 성장성적을 보여주었으며, 오히려 거저리 2% 처리구의 자돈 폐사율이 감소하는 결과가 나타나 이유두수 증가효과를 기대할 수 있다. 모돈의 혈액성상에서는 거저리 유층을 2%까지 첨가하여도 어분 처리구에 비해 단백질 이용률 및 간수치에 차이가 나지 않았으며, 포유자돈의 혈액성상에서도 어분 처리구에 비해 부정적인 영향이 나타나지 않고 동물성단백질로서의 대등한 효과를 가지는 것으로 나타났다. 모유성분에서는 거저리 유층의 첨가가 어분 첨가 처리구와 대등한 유성분 조성을 가지는 것으로 나타났다. 결론적으로, 포유돈 사료 내 거저리 유층을 1% 및 2% 첨가하여도, 어분을 4% 까지 사료에 첨가한 효과와 대등한 결과를 기대할 수 있는 것으로 사료된다.

실험 4. 자돈에서의 생리활성 가능성 구명 및 생리활성 효과를 활용한 항생제 대체 효과 규명

1. 서론 (Introduction)

육류 소비량은 1950년에 4천 4백만 톤 이던 것이 2009년에는 2억 8천 4백만 톤으로 증가했고, 연간 개인 소비량도 증가하는 추세이다. 또한 세계 곡물 수확량의 약 35% 가량이 동물성 단백질 생산에 쓰이면서 육류 소비는 곡물 소비와 더 나아가 세계 식량 안보에도 큰 영향을 미치게 되었다. 이에 따라 새로운 단백질 공급원 중 하나로 곤충을 사료 내 첨가하는 연구가 진행되고 있다. 약 1500종의 곤충이 식용으로 이용될 수 있으며, 이중 대부분의 종들이 동물 사료 내 단백질원으로 사용 가능하다(Ng Liew 등 2001).

세계 곤충산업의 시장규모는 2020년 38조원까지 늘어날 전망으로, 국내에서도 2009년부터 곤충산업이 체계적으로 발전할 수 있게 국가 정책적 기반을 마련하고 있는 실정이다. 국내 곤충 산업은 2011년 1680억 원 규모에서 2015년 2980억 원 규모로 4년 만에 2배 가깝게 성장했으며 2020년에는 7000억 원 규모로 성장할 것으로 예상하고 있다. 농촌진흥청의 발표에 따르면 국내 대부분의 곤충의 쓰임새는 식용, 농약 대체품, 화분 매개체, 신약 원료 등으로 빠르게 확장되고 있으며, 식용, 사료용, 의약품 분야로는 2011년 25억 원 규모에서 2015년에는 700억 원 규모로 성장할 것으로 추정하였다. 이와 같이 급속도로 발전 하고 있는 산업 분야로 앞으로의 발전 가능성은 무궁무진하다.

일반적으로 식용이 가능한 곤충의 단백질 함량은 44~70% 수준으로(Ramos-Elorduy, 1989) 육분의 단백질 함량과 비슷하며 특히 거저리 같은 경우에는 지방함량이 높아 가축의 에너지 공급원으로서도 주목을 받고 있다. 다른 일부 곤충들은 육분에 비해 필수 지방산과 Linoleic 및 Linolenic acid 을 많이 함유하고 있으며 다량의 아연과 철분이 함유하고 있는 것으로 조사 되었다(DeFoliart, 1992). 이와 같이 곤충들의 영양적 가치도 높게 평가되고 있고, 곤충의 이용성 또한 높게 평가되고 있다(Aguilar-Miranda 등 2002, Hardouin 등 2003).

우리나라에서는 2011년 7월 1일부터 배합사료 내 항생제 금지 법안이 본격적으로 시행되었고, 이에 따른 사료 내 항생제 대체 방안을 찾기 위한 많은 연구들이 있다. 그리고 국내에서는 거저리를 이용해 새로운 원료 사료 공급원으로서 어떠한 가치와 가능성이 있는지에 대해 많은 연구를 진행하고 있다. 따라서 본 연구를 통하여, 자돈 사료 내 거저리 성충의 첨가를 통하여 항생제 대체 효과를 규명하고자 한다.

2. 재료 및 방법 (Materials and Methods)

1) 실험 동물 및 실험 설계

28 ± 3일령에 이유향 평균 체중 5.76 ± 1.057kg인 삼원 교잡종 ([Yorkshire x Landrace] x Duroc) 이유자돈 120두를 공시하여, Phase I 2주, Phase II 3주로 총 5주 동

안 사양실험을 수행하였다. 전체 5처리 3반복 돈방 당 8두씩 성별과 체중에 따라 난괴법 (RCBD; Randomized Completely Block Design)으로 배치하였다.

2) 실험 사료

옥수수-대두박 위주로 실험사료의 기초사료(basal diet)를 배합하였으며, 사육단계에 따라 영양소 요구량 (NRC, 1998)을 고려하여 배합을 실시하였으나 CP는 예외적으로 NRC, 2012 기준 Total nitrogen에 6.25를 곱한 값을 요구량으로 설정하였다. 실험사료의 대사에너지 (ME; metabolizable energy)는 Phase I (0~2주), Phase II (2~5주) 모두 3265kcal/kg 이었다. 단백질 함량은 Phase I 에서 20.56%, Phase II에서 18.88%로, 라이신(lysine)의 함량은 phase I 에서 1.35%, Phase II에서 1.15%에 맞춰 배합하였다. Antibiotics는 (주)제일바이오에서 생산하는 colistin2.0을 사용하였고 거저리원료는 처리구별 거저리 성충 0.1%, 0.5%, 1% 가 각각 첨가되었으며, 옥수수와 대두박을 통해 영양소 요구량을 충족시켜 주었다. 주요 실험사료의 원료 및 화학적 조성은 표 1 (phase I), 표 2 (phase II)에 제시된 바와 같다.

표 1. 실험사료의 사료배합비와 성분표 (Phase I)

Ingredients	Con	A	B	C	D
Corn	31.04	30.70	30.98	31.18	31.48
SBM	31.57	32.43	32.32	32.20	31.91
Barley	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
Whey powder	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Lactose	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
Soypeptide	2.53	1.84	1.76	1.34	0.94
Soy-oil	1.32	1.39	1.29	1.20	1.08
MDCP	1.40	1.40	1.40	1.41	1.40
Limestone	1.02	1.02	1.02	1.02	1.03
L-Lysine-HCl, 78%	0.26	0.26	0.27	0.28	0.29
DL-met, 80%	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
L-threonine, 99%	0.07	0.07	0.07	0.08	0.08
Vit. Mix ¹⁾	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Min. Mix ²⁾	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Choline-Cl(50%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
ZnO	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Antibiotic	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00
Imago	0.00	0.00	0.10	0.50	1.00
Sum	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition ³⁾					
ME, kcal/kg	3,265	3,265	3,265	3,265	3,265
CP, %	20.56	20.56	20.56	20.56	20.56
Lysine, %	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35
Methionine, %	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
Ca, %	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Total P, %	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65

¹⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D₃, 1,600IU; vitamin E, 32IU; d-biotin, 64g; riboflavin, 3.2mg; calcium pantothenic acid, 8mg; niacin, 16mg; vitamin B₁₂, 12g; vitamin K, 2.4mg

²⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1mg; I, 0.3mg; Mn, 24.8mg; CuSO₄, 54.1mg; Fe, 127.3mg; Zn, 84.7mg; Co, 0.3mg

³⁾ Calculated values

표 2. 실험사료의 사료배합비와 성분표 (Phase II)

Ingredients	Control	A	B	C	D
Corn	44.55	44.45	44.69	44.89	45.06
SBM	26.92	26.38	26.32	26.21	26.72
Barley	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
Whey powder	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Lactose	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Soypeptide	2.18	2.66	2.56	2.14	1.05
Soy-oil	1.35	1.42	1.33	1.24	1.12
MDCP	1.19	1.18	1.18	1.19	1.20
Limestone	0.89	0.89	0.90	0.90	0.90
L-Lysine-HCl, 78%	0.17	0.17	0.17	0.18	0.20
DL-met, 80%	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
L-threonine, 99%	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Vit. Mix ¹⁾	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Min. Mix ²⁾	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Choline-Cl(50%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
ZnO	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Antibiotic	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00
Imago	0.00	0.00	0.10	0.50	1.00
Sum	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical composition ³⁾					
ME, kcal/kg	3,265	3,265	3,265	3,265	3,265
CP, %	18.88	18.88	18.88	18.88	18.88
Lysine, %	1.15	1.15	1.15	1.15	1.15
Methionine, %	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Ca, %	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70
Total P, %	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60

¹⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D₃, 1,600IU; vitamin E, 32IU; d-biotin, 64g; riboflavin, 3.2mg; calcium pantothenic acid, 8mg; niacin, 16mg; vitamin B₁₂, 12g; vitamin K, 2.4mg

²⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.1mg; I, 0.3mg; Mn, 24.8mg; CuSO₄, 54.1mg; Fe, 127.3mg; Zn, 84.7mg; Co, 0.3mg

³⁾ Calculated values

3) 사양 실험

각 돈방에는 하나의 사료 급이기와 니플 급수기가 설치되어있어 전체 실험 기간 동안 물과 사료는 무제한 자유 채식 (*ad libitum*)하도록 하였다. 돈방 온도는 실험 개시 후 첫 일주일간은 30℃를 유지하였으며, 매주 1℃씩 낮추어 4주차에는 27℃를 유지하게 하였다. 사양실험 기간은 각각 Phase I 2주, Phase II 3주 총 5주간 진행되었다. 체중 및 사료 섭취량은 사육

단계 및 사료 종류의 변동 시점을 고려하여, 실험 개시(Initial)기간을 기점으로 2주차와 5주차에 측정하여 일당증체량 (average daily gain; ADG), 일일사료섭취량 (average daily feed intake; ADFI), 사료효율 (gain/feed ratio; G/F ratio)을 계산하였다.

4) 혈액 정상

실험 개시 시 혈중 요소태질소 (BUN : Blood Urea Nitrogen) 및 IGF-1을 조사하기 위해 실험 개시 시점에 임의적으로 경정맥에서 6두의 혈액을 채혈하였으며, 실험 개시 일 이후에는 각 사육단계별 체중 측정 시 처리별로 6두씩 총 30두의 혈액을 채취하였다. 혈액은 disposable culture tube에 포집하여 3,000 rpm, 4 °C 상태로 15분 동안 원심분리 하였다. 그 후 micro tube 보관용기에 혈청만을 분리하여 분석 시까지 -20 °C로 보관하였다. BUN은 자동생화학 분석기 (ADVIA 1650, Japan)와 호르몬 분석기 (Immulite 2000, DPC, SUA)를 이용하여 분석하였다. IGF-1은 호르몬 분석기를 이용하여 분석하였다 (Immulite 2000, DPC, SUA).

5) 면역 정상

면역글로불린을 조사하기 위해 실험 개시 시점, 2주차, 5주차에 경정맥에서 혈액을 채취하였다. 채혈 후 3,000 rpm, 4°C 으로 15분간 원심 분리하였다. 원심분리 후 혈청을 분리하여 분석 전까지 냉동 보관하였다. 혈청 내 면역글로불린 정상 분석을 위해 IgG와 IgA를 ELISA 방법을 통해 분석이 진행되었으며, 분석 kit로 ELISA accessory starter kit (E101; Bethyl Laboratories Inc., USA)와 quantitation kit (E100; BETHYL)가 사용되었다. 혈청 내 면역글로불린 함량은 mg/g 으로 표시하였다.

6) 설사 빈도

설사빈도 측정은 시험 개시 후 매일 오전 8시에 사양 실험돈을 대상으로 측정하였으며, 각 돈방의 모든 자돈들을 대상으로 항문주위의 수양성 설사(watery diarrhea)흔적을 가진 개체수를 파악하였다. 설사빈도는 수양성 설사 흔적이 없는 돈방의 설사빈도를 0으로 측정하였으며, 모든 개체의 항문 주위가 수양성 설사 흔적을 보였을 때의 설사빈도를 4로 하여 전 시험 기간 동안 측정하였다.

7) 경제성 분석

경제성 분석은 한양사료에서 생산되는 자돈사료 가격을 기준으로 산출하였으며, 거저리는 농가 판매 가격으로 산출하였다. 전 사양 기간 동안 이유자돈의 1kg 단위증체에 소요되는 사료비용은 본 시험의 사양성적에서 나온 사료 섭취량과 증체량을 기준으로 분석하였다.

8) 통계 분석

본 실험의 data는 SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC)의 Linear Quadratic, ANOVA를 이용하여 통계분석을 실시하였다. 성장성적 data의 경우 한 돈방이 experimental unit으로 설정하였으며, 혈액분석의 경우 실험돈 각 개체를 unit으로 설정하였다. 거저리 성충의 첨가수준의 증가에 따른 효과를 추정하기 위해 orthogonal polynomial contrast를 통해 거저리 유충의 첨가수준에 따른 linear 및 quadratic effect를 조사하였으며, 모든 통계적 분석에 있어 $P < 0.05$ 인 경우 유의차가 있는 것으로, $P < 0.01$ 인 경우 고도의 유의차가 있는 것으로 간주하였다.

3. 실험 결과 및 고찰 (Results and Discussion)

1) 사양성적 (Feeding trial)

이유 후 자돈 사료 내 거저리 성충 첨가에 따른 항생제 대체 효과가 자돈의 성장성적에 미치는 영향을 표 3에 나타내었다. 사양실험 결과, 자돈의 체중과 증체량, 일당사료섭취량과 사료 효율에서 통계적 유의차가 발생하지 않았다. 또한 대조구와 거저리 성충 첨가량에 따른 성장성적을 비교한 결과 통계적 유의차가 발생하지 않았다. 이에 따라 사료 내 거저리 성충을 첨가하여 급여했을 때 자돈의 성장성적에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

전 구간에서 유의적 차이는 없었지만 phase I의 결과 거저리 성충을 0.1% 첨가하였을 때 수치상으로 가장 높은 증체량과 일당사료섭취량을 보였고, phase II에서는 antibiotics 0.1% 첨가한 A 처리구에서 가장 높은 증체량과 일당사료섭취량을 보였다. 총 사양기간을 기준으로 보았을 경우에는 거저리 성충 0.1% 첨가하였을 시 수치적으로 가장 높은 사료 효율을 보였다.

표 3. 이유자돈 사료 내 거저리 성충의 첨가가 이유자돈의 성장성적에 미치는 영향¹⁾

Item	Treatments ²⁾					SEM ³⁾	P-value ⁴⁾	
	Con	A	B	C	D		Lin.	Quad.
Body weight, kg								
Initial	5.76	5.76	5.76	5.76	5.76			
2 wk	7.73	7.63	8.17	7.81	7.68	0.310	0.17	0.42
5 wk	15.91	15.25	15.50	15.78	15.96	0.531	0.78	0.88
Average daily gain, g								
0-2 wk	141	134	173	147	137	11.6	0.17	0.42
3-5 wk	390	413	349	379	358	15.2	0.98	0.60
0-5 wk	290	302	278	286	270	11.0	0.82	0.70
Average daily feed intake, g								
0-2 wk	240	202	253	231	217	13.3	0.22	0.80
3-5 wk	651	702	608	660	658	25.4	0.75	0.84
0-5 wk	487	502	466	488	482	17.3	0.90	0.82
Gain/feed ratio								
0-2 wk	0.585	0.658	0.679	0.634	0.620	0.028	0.25	0.14
3-5 wk	0.598	0.587	0.581	0.566	0.552	0.015	0.64	0.44
0-5 wk	0.597	0.599	0.601	0.580	0.565	0.011	0.89	0.61

¹⁾ A total of 120 crossbred pigs were fed from average initial body weight 5.76 ± 1.057 kg

²⁾ Con : Corn-soybean meal based diet, A : Corn-soybean meal based diet + 0.1% Antibiotics,
B : Corn-soybean meal based diet + 0.1% Imago, C : Corn-soybean meal based diet + 0.5% Imago,
D : Corn-soybean meal based diet + 1% Imago

³⁾ Standard error of mean

⁴⁾ Con × *Tenebrio molitor* Imago, non significant (P>0.05)

2) 혈액 성분 (Blood urea nitrogen, IGF-1)

이유 후 자돈 사료 내 거저리 성충 첨가에 따른 항생제 대체 효과가 자돈의 BUN (blood urea nitrogen)과 IGF-1에 미치는 영향에 대해서 표 4에 나타내었다. 혈중 내 BUN의 농도는 사료 내 단백질의 공급과 연관이 있으며 체내에서는 식이아미노산과의 관계와 부의 상관관계 (negative correlation)를 갖는다(Eggum, 1970). 그래서 BUN의 농도는 체내의 단일 아미노산과 단백질 요구량의 지표로 사용되어 왔다 (Cai 등, 1996; Taylor 등, 1982; Coma 등, 1995).

실험 전 구간에 걸쳐서 BUN의 혈중 농도는 처리구간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 결과적으로 이유 후 자돈 사료 내 거저리 성충 첨가에 따른 항생제 대체 효과가 혈액 내 BUN 농도에 유의적인 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

IGF-1은 성장호르몬의 자극에 의해 분비되며 조직의 성장과 분화에 관여하여 성장이 필요한 세포에 에너지를 공급하는 역할을 한다. 또한, 가장 중요한 기능으로 심혈관계의 구조와 기능의 조절과 뼈의 성장에도 매우 중요한 역할을 한다(Bayes-Genis, 2000). 실험 전 구간에 걸쳐서 IGF-1의 혈중 농도는 처리구간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 결과적으로 이유

후 자돈 사료 내 거저리 성충 첨가에 따른 항생제 대체 효과가 혈액 내 IGF-1 농도에 유의적인 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

표 4. 이유자돈 사료 내 거저리 유충의 사육기간에 따른 거저리 원료의 첨가가 이유자돈의 혈액 성장에 미치는 영향¹⁾

Item	Treatments					SEM ²⁾	P-value
	Con	A	B	C	D		
BUN							
Initial	9.30	9.30	9.30	9.30	9.30		
2 week	13.03	14.93	16.87	16.77	14.67	0.687	0.2798
5 week	9.22	10.07	11.50	9.58	10.83	0.374	0.3745
IGF-1							
Initial	38.00	38.00	38.00	38.00	38.00		
2 week	63.20	79.63	92.18	76.02	74.53	5.219	0.6201
5 week	117.93	141.05	106.83	117.90	115.62	6.531	0.6601

¹⁾ A total of 120 crossbred pigs were fed from average initial body weight $5.76 \pm 1.057\text{kg}$ and the average of final weight was 15.68kg

²⁾ Standard error of mean

3) 설사빈도

이유 후 자돈 사료 내 거저리 성충 첨가에 따른 항생제 대체 효과가 이유자돈의 설사빈도에 미치는 영향을 표 5에 제시하였다. 실험 결과, 설사빈도에서 phase I 기간에는 유의적 차이가 없지만 phase II 기간 동안은 거저리 0.5% 처리한 C 처리구에서 가장 낮은 빈도를 보이며 유의적 차이를 나타냈다. 또한 전체적으로 수치상으로 이유자돈 전기인 0-2주 동안에서의 설사 빈도가 이유자돈 후기인 3-5주에 비해 높게 나타난 것을 볼 수가 있다.

일반적으로, 자돈은 이유를 하면서 급격한 환경의 변화와 수송스트레스, 사료교체에 따른 영양 스트레스로 인하여 이유 초기에 설사가 많이 발생한다(Lalles 등, 2007). 보통 3-4일의 잠복기를 가지며 이유 후 일주일내 설사 발생률이 높다. 스트레스로 인한 영양소 소화, 흡수장애와 대장으로 유입되는 수분의 양에 따라 설사를 유발하며 빠른 속도의 소화물 배출과 장내 염증으로 인한 영양소의 흡수저하로 이어져 위축과 탈수가 동반하게 된다(Pluske 등, 1997). 이유스트레스에 의한 낮은 성장률은 용모 위축의 원인이 되며 이는 영양소 소화, 흡수장애를 일으키며(Nabuurs 등, 1991) 사료섭취량 감소는 장염발생과 용모깊이(Villi Height), 용와깊이(Crypt Depth)에 큰 영향을 준다(Pluske 등, 1996). 결과적으로 자돈 사료내 거저리 첨가가 항생제(colistin) 대체제로 0.5% 첨가했을 때 가장 효과적인 것으로 사료된다.

표 5. 자돈 사료 내 거저리 성충의 첨가가 설사 빈도에 미치는 영향

Criteria	Treatment ¹⁾				SEM ²⁾	P-value	
	Con	A	B	C			D
Diarrhea scores ³⁾							
0-2 week	2.60	2.66	2.40	2.40	2.23	0.072	0.443
3-5 week	1.50	1.33	1.30	0.93	1.30	0.073	0.081
0-5 week	1.93	1.83	1.73	1.53	1.66	0.050	0.023

¹⁾ Con : Corn-soybean meal based diet, A : Corn-soybean meal based diet + 0.1% Antibiotics, B : Corn-soybean meal based diet + 0.1% Imago, C : Corn-soybean meal based diet + 0.5% Imago, D : Corn-soybean meal based diet + 1% Imago

²⁾ Standard error of mean

³⁾ 0: No signs of diarrhea in pen, 4: All pigs had signs of diarrhea in pen

4) 면역성상(Ig G, Ig A)

이유 후 자돈 사료 내 거저리 성충 첨가에 따른 항생제 대체 효과가 이유자돈의 면역성상에 미치는 영향을 표 6에 제시하였다. 이유시점을 기준으로 이유, 2주차 5주차에 혈액을 채취하여 혈청에서 IgG와 IgA를 분석하였는데, 처리구간에 통계적 유의차가 나타나지 않았다. 그러나 수치상으로 phase I 기간 동안 IgA는 거저리 0.5% 첨가한 C 처리구에서 가장 높았고, IgG 또한 거저리 0.5% 첨가한 C 처리구에서 가장 높았다. phase II에서 IgA는 거저리 0.5% C 첨가한 처리구에서 가장 높았고 IgG는 거저리 1% 첨가한 D 처리구에서 가장 높았다.

IgG는 체액 면역을 대표하는 것으로 알려져 있으며 태반을 통해 흡수된 IgG는 자돈 출생 직후 면역체계를 관여하며, 이유 후 발생하는 외부 병원균에 의한 자돈의 설사 방어 기작에 핵심적 역할을 한다(Rooke와 Bland, 2002). IgA는 모유에서 가장 많은 비율을 차지하고 있으며, 모돈이 예전에 만났던 병원균에 대한 방어 기억을 포함하고 있다. 모유에서 분비된 secretory IgA 항체는 자돈의 소화기, 호흡기, 비뇨기 등 병원성 대장균에 노출되기 쉬운 부위에서 점막에서 면역 체계를 형성하여, 자돈이 스스로 항체를 생산하기 전까지 구강을 통해서 감염되는 세균에 대한 방어를 담당한다(Brandtzaeg, 2003).

많은 스트레스 요인들은 체액과 세포내 면역에 영향을 주며(Laudenslager 등, 1988; Monjan 과 Collector, 1977) 자돈에게 스트레스는 행동장애, 면역과 생리작용에 많은 변화를 준다(Morrow-Tesch 등, 1994). 실험 결과 자돈 사료내 거저리 첨가에 따른 항생제 대체 효과가 혈중 면역글로불린농도에 관련된 면역성상에 유의적인 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

표 6. 자돈 사료 내 거저리 성충의 첨가가 자돈의 면역성상에 미치는 영향

Criteria	Treatment ¹⁾					SEM ²⁾	P-value
	Con	A	B	C	D		
Serum IgA (mg/ml)							
Weaning	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12		
2 week	0.52	0.62	0.48	0.68	0.63	0.044	0.626
5 week	1.20	1.00	1.15	1.57	0.99	0.104	0.447
Serum IgG (mg/ml)							
Weaning	3.10	3.10	3.10	3.10	3.10		
2 week	3.68	4.11	3.46	4.41	4.28	0.117	0.056
5 week	3.07	3.77	3.37	3.63	3.97	0.181	0.294

¹⁾ Con : Corn-soybean meal based diet, A : Corn-soybean meal based diet + 0.1% Antibiotics, B : Corn-soybean meal based diet + 0.1% Imago, C : Corn-soybean meal based diet + 0.5% Imago, D : Corn-soybean meal based diet + 1% Imago

²⁾ Standard error of mean

5) 경제성 분석

이유 후 자돈 사료 내 거저리 성충 첨가에 따른 항생제 대체 효과가 경제성에 미치는 영향을 표 7에 제시하였다. 경제성 분석은 원료 사료 구입비를 기준으로 하여 계산하였으며, phase I 사료 가격은 kg당 Con은 578원, A는 577원, B는 598원, C는 693원, D는 811원 이었다. phase II 사료 가격은 kg당 Con은 518원, A는 524원, B는 545원, C는 639원, D는 754원 이었다. 처리구간 사료가격과 표 7에 제시된 성장성적을 기준으로 phase I 에서 이유 자돈 1kg 증체 시 필요한 사료비용과 이 기간 동안 총 사료 섭취량에 대한 비용을 보게 되면, 통계적으로 유의적 차이를 볼 수 있었다. 거저리 성충 1%를 첨가한 처리구에서 가장 높은 비용을 보였고, 항생제를 첨가한 처리구에서 가장 낮은 비용을 보였다. 또한 2주 동안 총 사료 섭취량에 따른 가격에서도 거저리 성충 1%를 첨가한 처리구에서 가장 높은 비용을 보였고, 항생제를 첨가한 처리구에서 가장 낮은 비용을 보였다. phase II 에서는 1kg 증체 시 필요한 사료비용에서만 유의적 차이를 보였다. 거저리 성충 1%를 첨가한 처리구에서 가장 높은 비용을 보였고, control 처리구에서 가장 낮은 비용을 보였다. 전 사육기간으로 보게 되면 1kg 증체 시 필요한 사료비용에서 유의적 차이를 보였다. 거저리 성충 1% 첨가한 처리구에서 가장 높은 비용을 보였고, control 처리구에서 가장 낮은 비용을 보였다. 결과적으로 성장성적과 사료비를 통해 계산되어진 이유 후 두당 총 사료비는 phase I 에서만 유의적 차이를 나타냈으며, 다른 구간과 전 구간에서는 유의적 차이는 나타내지 않았지만 수치상으로 거저리 성충 1%를 첨가한 처리구에서 가장 높은 비용을 보였다. 결과적으로 이유 후 자돈 사료 내 거저리 성충 첨가에 따른 항생제 대체 효과가 양돈 농가의 경제적 이득을 증대시키기는 어려울 것으로 사료된다.

표 7. 이유 후 자돈 사료 내 거저리 성충 첨가에 따른 항생제 대체 효과가 농가의 경제성에 미치는 영향

Criteria	Treatment ¹⁾					SEM ²⁾	P-value
	Con	A	B	C	D		
Weaning phase I (0-2 week)							
Feed cost, won/kg	578	577	598	693	811		
Total feed cost per pig, won/kg	1,946	1,635	2,119	2,241	2,464	9.129	0.030
Total weight gain per pig, kg/head	1.97	1.87	2.42	2.06	1.92	0.106	0.371
Total feed intake per pig, kg/head	3.37	2.83	3.54	3.23	3.04	0.112	0.180
Feed cost per weight gain, won/kg	1,007	881	885	1,093	1,325	51.506	0.006
Weaning phase II (3-5 week)							
Feed cost, won/kg ³⁾	518	524	545	639	754	-	
Total feed cost per pig, won/kg	7,080	7,723	6,961	8,851	10,417	549.645	0.080
Total weight gain per pig, kg/head	8.18	7.62	7.33	7.97	8.29	0.434	0.958
Total feed intake per pig, kg/head	13.67	14.74	12.77	13.85	13.82	0.732	0.890
Feed cost per weight gain, won/kg	866	893	942	1,133	1,391	58.593	0.004
Overall (0-5 week)							
Total feed cost, won/kg	9,026	9,358	9,080	11,092	12,881	625.868	0.066
Total weight gain per pig, kg/head	10.15	9.49	9.74	10.02	10.21	0.477	0.986
Feed cost per weight gain, won/kg	908	910	944	1,142	1,385	52.177	0.001
Mortality, head	1	1	1	1	1		

¹⁾ Con : Corn-soybean meal based diet, A : Corn-soybean meal based diet + 0.1% Antibiotics, B : Corn-soybean meal based diet + 0.1% Imago, C : Corn-soybean meal based diet + 0.5% Imago, D : Corn-soybean meal based diet + 1% Imago

²⁾ Standard error of mean

4. 결론 (Conclusion)

본 연구는 이유자돈 사료 내 거저리 성충 첨가에 따른 항생제 대체 효과가 자돈의 성장성적, 혈액성상 및 면역성상에 미치는 영향을 규명하고자 수행되었다.

자돈의 성장성적에서는 전 구간에서 자돈의 체중과 증체량, 일당사료섭취량, 사료효율에는 거저리 성충 첨가에 따른 항생제 대체효과에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 설사빈도에서 수치상으로 이유자돈 전기인 phase I에서의 설사빈도는 A 처리구에서 가장 높았고, 이유자돈 후기인 phase II에서는 Con 처리구가 가장 높은 수치를 보였다. 전 사육기간으로 보았을 때는 거저리 성충 0.5%를 첨가한 C 처리구에서 가장 낮은 수치를 보였으며 유의

적 차이를 보였다($P < 0.05$). 또한 유의적인 차이는 보이지 않았지만 전체적으로 거저리를 첨가한 처리구에서 수치상 다른 처리구에 비해 낮은 값을 보였다. 이러한 결과에 설사빈도에서는 거저리 성충 첨가에 따른 항생제 대체 효과가 있는 것으로 사료된다. 면역성상 분석결과 IgG와 IgA 모두 유의적 차이는 보이지 않았다. 혈중 BUN과 IGF-1 농도를 분석한 결과, 자돈 사료 내 거저리 성충 첨가에 따른 항생제 대체 효과는 BUN 수치에 영향을 주지 않는 것으로 나타났으며, 혈중 IGF-1 농도 또한 유의적인 영향을 주지 않았다. 경제성 분석결과 성장성적과 사료비를 통해 계산되어진 이유 후 두당 총 사료비 결과에 따라 자돈 사료 내 거저리 성충 첨가에 따른 항생제 대체 효과가 농가의 경제적 이득을 증대시키기는 어려울 것으로 사료된다.

결론적으로 자돈 사료 내 항생제 대체제로서 거저리 성충의 첨가는 자돈의 성장성적, 설사빈도, 혈액성상 및 면역 성상에 유해한 영향을 주지 않으며, 거저리 수급이 원활해지고 가격이 안정된다면 대체제로서 유해하지 않을 것으로 사료된다.

실험 5. 지방질 사료로서의 활용방안 조사 - 포유모돈 사료 내 거저리 유충의 지방질 원료 대체효과 평가

1. 서론 (Introduction)

사료화의 대상이 되는 곤충 중 갈색거저리 (*Tenebrio molitor*)는 딱정벌레의 일종으로, 거저리의 유충인 밀웜은 설치류나 파충류 및 조류의 사료로 이용되어 왔다. 국내에서는 주로 화분매개곤충이나 천적용, 학습애완용으로 주로 사육되어 왔으며, 사료용 원료로서는 아직 미비한 수준이다. 국내의 사료 및 의약용 곤충시작의 규모는 700억원 정도로, 앞으로 그 발전가능성이 높아 사료분야의 곤충시장은 그 규모가 점차 커질 것으로 예상된다. 하지만 아직 국내의 사료용 곤충사육농가는 8개 정도로 그 규모가 영세하여, 사료산업에 적용되기 위해서는 대량생산체계 및 사료용 가공체계 확립, 거저리 유충에 대한 실질적인 연구들이 선행되어야 한다. 거저리 유충의 지방함량은 32.7% 정도로 (Ravzanaadii, 2012) 높은 지방함량으로 에너지 및 지방원료로서의 활용가능성도 매우 높다. 거저리 유충의 지방산 조성을 살펴보면, 포화지방산에서는 palmitic acid(C16:0)의 함량이 높은 편이며 (Huang, 2006), 불포화지방산에서는 oleic acid(C18:1)와 linoleic acid(C18:2)의 함량이 높은 편이며 불포화지방산의 함량은 72% 정도로 높은 편이다 (Huang, 2006). 거저리 유충의 지방질함량이 높아 에너지원으로 이용가능성이 높으며, 불포화지방산이 높은 점이 주목을 받고 있으며, 이에 대한 검증 연구가 필요한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 거저리 유충의 지방질 원료사료로서의 가능성을 평가하기 위하여 포유모돈 사료 내 거저리 유충을 첨가하여 지방원료와의 비교를 통하여 거저리 유충의 지방질 사료의 대체효과를 평가하고자 한다.

2. 재료 및 방법 (Materials and Methods)

1) 실험 동물 및 실험 환경 (Experimental animal and housing)

평균체중 244.7 ± 3.0 kg의 2원 교잡종 (Yorkshire x Landrace) 포유모돈 25두를 공시하여, 체중과 등지방, 산차 및 복당체중을 고려하여 분만직후에 5처리 5반복, 완전임의 배치법 (CRD; completely randomized design)에 따라 각각의 처리구에 배치하였다. 자돈을 대상으로 출생 후 24시간 이내에 견치, 단미, 철분주사 및 이각을 실시하였고, 복당 체중 및 포유두 수를 맞춰 양자를 보냈으며, 분만 후 3일령에 거세를 실시하였다. 실험 모돈은 110일령에 온도 조절이 용이한 분만사로 이송되었으며, 2.5×1.8 m²의 사료 및 물의 자유 급이가 가능한 분만틀 내에서 실험 기간 동안 사육되었다.

2) 실험 설계 및 실험 사료 (Experimental design and diet)

실험 처리구는 옥수수-대두박 위주의 기초사료로 구성된 대조구에 지방질원료인 tallow를 1% 및 2% 추가 첨가한 처리구들과 거저리유충을 1% 및 2% 추가 첨가한 처리구들로 구성하

였다.

실험사료는 포유모돈의 영양소 요구량 (NRC, 1998)을 충족하도록 배합하였다. 실험사료의 대사에너지 (ME; metabolizable energy)는 3,265 kcal/kg으로 설정하였으며, 조단백질 함량은 16.8%로, 라이신(lysine)의 함량은 1.09%에 맞춰 배합하였다. 기타 아미노산, 비타민 및 광물질 요구량 또한 NRC(1998)의 요구수준과 같거나 높은 수준으로 충족시켰으며, 실험사료의 원료 및 화학적 조성은 표 1에 제시하였다.

표 1. 실험사료의 사료배합비와 화학적 조성

Ingredients, %	Treatment				
	Con	F1	F2	L1	L2
Corn	66.18	61.67	57.14	64.67	63.12
SBM	25.04	24.26	23.50	23.61	22.16
Wheat bran	2.82	7.16	11.50	4.77	6.79
Tallow	2.00	3.00	4.00	2.00	2.00
L-lysine · HCl (78%)	0.28	0.29	0.30	0.28	0.29
DL-methionine (99%)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
MDCP	1.73	1.60	1.47	1.67	1.60
Limestone	1.35	1.42	1.49	1.40	1.44
Vit. Mix ¹⁾	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Min. Mix ²⁾	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Choline chloride-50	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
<i>Tenebrio molitor</i> larva	0.00	0.00	0.00	1.00	2.00
Sum	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Chemical Composition ³⁾					
ME (kcal/kg)	3,265.02	3,265.03	3,265.03	3,265.02	3,265.06
CP (%)	16.80	16.80	16.80	16.80	16.80
Lysine (%)	1.09	1.09	1.09	1.09	1.09
Methionine (%)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Ca (%)	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Total P (%)	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70

¹⁾ Provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 12,000 IU; vitamin D₃, 2,000IU; vitamin E, 100IU; vitamin K₃, 4.50mg; thiamine, 2mg; riboflavin, 7.2mg; pantothenic acid, 30mg; niacin, 45mg; vitamin B₅, 4.5g; biotin, 0.5mg; folic acid, 3.50mg; vitamin B₁₂, 0.03mg.

²⁾ Provided the following per kilogram of diet : Se, 0.15mg; I, 0.3mg; Mn, 37mg; Cu, 11mg; Fe, 150mg; Zn, 85mg; Co, 2.0mg; Cr, 0.30mg.

³⁾ Calculated values

3) 샘플 채취 및 조사 항목 (Sample collection and measurements)

① 포유 모돈의 체중, 사료 섭취량, 등지방 두께 및 사료섭취량의 변화: 포유기 모돈의 생리적 변화 정도를 판별하기 위하여 분만 후 24 시간 이내 및 이유 시의 체중, P2 부위의 등지방 두께 및 사료섭취량을 측정하였다.

② 포유 자돈의 성장능력 및 포유 모돈의 포유능력: 양자처리 후 포유를 개시하고 분만 후 24 시간 이내 및 이유 시의 자돈의 체중 및 증체량을 측정하였다

③ 모돈 및 자돈의 혈액성상: 분만 후 24시간 이내 및 포유 21일령의 모돈 및 자돈의 혈액을 경정맥에서 채취하여 serum tube에 포집하였다. 채취한 혈액은 serum tube에 포집하여 3,000rpm, 4°C 상태로 15분 동안 원심분리 하였다. 그 후 micro tube 보관용기에 혈청만을 분리하여 분석 시까지 -20°C로 보관하였다. 보관된 혈액은 혈액분석기 (Ciba-Corning

model, Ciba Corning Diagnostics Co.)를 이용하여 분석하였다.

④ 모든의 모유특성을 조사하기 위해 분만 후 24시간 이내 (초유) 및 21일에 혈관에 옥시토신 0.5 ml를 주사하여 젖분비를 촉진한 후 돈유 샘플을 채취하였다. 유성분 분석기 (MilkoScan FT20, FOSS Electric Co., Denmark)로 카제인(casein), 유지방 (fat), 유단백질 (protein), 락토오스 (lactose), 유고형분(total solid), 무지유고형분 (Solids Not Fat: SNF) 및 유리지방산(free fatty acid) 함량을 측정하였다.

4) 통계 분석

통계분석은 SAS의 General Linear Model (GLM)을 이용하여 수집된 자료의 유의성을 검정하였다. 성장성적의 경우 개별 모돈을 experimental unit으로 설정하였으며, 혈액분석과 모유분석의 경우 각 개체를 unit으로 설정하였다. $P < 0.05$ 인 경우 유의차가 있는 것으로, $P < 0.01$ 인 경우 고도의 유의차가 있는 것으로 간주하였다. $0.05 \leq P < 0.10$ 일 경우 경향이 있는 것으로 고려하였다.

3. 실험 결과 및 고찰 (Results and Discussion)

1) 포유모돈의 생리적 변화, 사료섭취량, 재귀발정일

포유모돈 사료 내 지방대체 목적의 거저리 유층의 첨가가 포유모돈의 생리적 변화 및 사료 섭취량, 재귀발정일에 미치는 영향을 표 2에 제시하였다. 포유기 모돈의 체중 및 체중변화량에서는 처리구간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 등지방 두께 및 등지방 두께 변화량에서도 처리구에 따른 유의적인 효과가 나타나지 않았다. 통계적 유의차는 나타나지 않았지만, 거저리 유층을 첨가한 처리구들이 다른 처리구들에 비해 체중 변화량이나 등지방 두께 변화량이 적게 감소하였다. 포유기 일당사료섭취량에서는 거저리 유층의 첨가가 지방을 추가 첨가한 처리구에 비해 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 재귀발정일(WEI)에서도 거저리 유층을 처리구인 L1과 L2 처리구의 재귀발정일이, 대조구 및 지방첨가 처리구(F1, F2)에 비해 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이를 통해, 거저리 유층을 포유모돈 사료 내 1% 및 2% 첨가 하여도 포유모돈의 체중 및 등지방 변화량에는 부정적인 영향을 미치지 않으며, 사료섭취량 및 재귀발정일에서도 지방을 1% 및 2%를 추가로 첨가한 처리구와도 차이가 없는 것으로 나타났다.

표 2. 지방 대체 목적의 거저리 유충의 첨가가 포유모돈의 성장성적에 미치는 영향¹⁾

Criteria	Treatment					SEM ²⁾	P-value
	CON	F1	F2	L1	L2		
No. of sows	5	5	5	5	5		
Body weight, kg							
24 hrs postpartum	250.2	239.4	242.4	248.5	242.9	3.04	0.76
Day 21 of lactation	245.2	234.2	236.7	246.4	241.1	2.73	0.46
BW changes(0-21d)	-5.0	-5.2	-5.7	-2.1	-1.8	1.83	0.96
Backfat thickness, mm							
24 hrs postpartum	26.0	22.1	22.4	21.2	22.6	1.10	0.73
Day 21 of lactation	22.8	18.9	18.8	19.6	21.8	1.05	0.65
BF changes (0-21d)	-3.2	-3.2	-3.6	-1.6	-0.8	0.54	0.49
ADFI, kg	5.34	5.68	5.04	5.10	4.78	0.15	0.46
WEI, day	4.88	5.38	5.13	4.75	5.00	0.13	0.73

¹⁾ Initial average body weight of sows: 244.7 ± 3.0kg

²⁾ Standard error of means.

2) 포유자돈의 성장능력

포유모돈 사료 내 지방대체 목적의 거저리 유충의 첨가가 포유기 자돈의 성장성적에 미치는 영향을 표 3에 나타내었다. 포유개시는 분만직후 24시간 이내에 포유자돈들을 대상으로 실시하였으며, 3주령 포유자돈 두수에서 처리구간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 복당체중 (litter weight)에서는 포유 21일령째의 복당체중 및 복당체중증가량에서 처리구간의 통계적 유의차가 나타나지 않았다. 포유자돈의 개별체중에서도 처리구간의 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 증체량에서도 처리구간의 통계적 유의차가 나타나지 않았다. 이를 통해, 거저리 유충을 1% 및 2% 첨가하였을 경우, 포유모돈 사료 내 지방을 1% 및 2% 추가로 첨가한 효과와 대등한 효과를 가지며, 포유자돈의 성장에도 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

표 3. 지방 대체 목적의 거저리 유충의 첨가가 포유자돈의 성장성적에 미치는 영향

Criteria	Treatment					SEM ¹⁾	P-value
	CON	F1	F2	L1	L2		
No. of piglet (initial)	12.2	12.4	12.4	12.2	12.4	0.095	0.90
No. of piglet (3 wk)	11.8	11.4	11.0	11.0	10.8	0.173	0.34
Death	0.4	1.0	1.4	1.2	1.6		
Litter weight, kg							
After cross-fostering	18.43	17.09	18.57	17.32	16.68	0.463	0.71
Day 21 of lactation	68.56	65.72	64.94	62.04	56.35	1.910	0.36
Weight gain, kg	50.13	48.63	46.37	44.72	39.67	1.723	0.38
Piglet weight, kg							
After cross-fostering	1.51	1.38	1.50	1.42	1.34	0.041	0.70
Day 21 of lactation	5.80	5.76	5.90	5.62	5.23	0.131	0.62
Weight gain, kg	4.29	4.38	4.40	4.20	3.89	0.117	0.72

¹⁾ Standard error of means.

3) 포유모돈의 혈액 성상

포유모돈 사료 내 지방대체 목적의 거저리 유충의 첨가가 포유모돈 혈액성상에 미치는 영향을 표 4에 나타내었다. 모돈의 혈액성상을 측정된 결과, 포유 3주차 모돈의 혈중 glucose와 insulin 농도에서 처리구간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 또한 혈중 지방수치인 total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol에서는 처리구간의 통계적 유의차가 나타나지 않았으며, 다만 혈중 VLDL cholesterol 수치에서 거저리 유충을 1% 첨가한 L1처리구가 가장 높은 농도를 가지는 유의적 경향이 나타났다 (P=0.09). 혈중 BUN 농도에서는 거저리 유충을 2% 첨가한 L2 처리구의 BUN 수치가 다른 처리구들에 비해 유의적으로 낮은 고도의 유의차가 나타났다 (P<0.01). 혈중 BUN 함량은 인체 내의 필수 영양소중 하나인 아미노산의 이용에 대한 대표적인 지표 (Eggum, 1970)로 쓰이는 분석 항목으로 단백질 섭취와 품질에 직접적인 연관성을 가지며, 섭취한 질소의 체내 유지와 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Whang과 Easter, 2000). 실험결과에서 L2처리구의 BUN농도가 가장 낮게 나타난 것으로 보아, 거저리 유충을 2% 첨가하였을 때의 단백질 및 질소 이용률이 다른 처리구들에 비해 높았던 것으로 사료된다. 간 건강의 지표로 사용되는 AST, ALT농도에서도 처리구간의 유의적인 차이가 나타나지 않은 것으로 보아, 거저리 유충의 1% 및 2% 첨가 시 포유모돈의 간 건강에는 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

표 4. 지방 대체 목적의 거저리 유충의 첨가가 포유모돈의 혈액성상에 미치는 영향

Criteria	Treatment					SEM ¹⁾	P-value
	CON	F1	F2	L1	L2		
Glucose, mg/dL							
24 hrs postpartum	91.50	91.50	91.50	91.50	91.50		
Day 21 of lactation	79.00	78.33	78.67	77.33	78.67	1.919	0.99
Insulin, μ U/mL							
24 hrs postpartum	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45		
Day 21 of lactation	1.47	1.03	1.57	2.30	2.77	0.286	0.44
Total cholesterol, mg/dL							
24 hrs postpartum	31.50	31.50	31.50	31.50	31.50		
Day 21 of lactation	64.33	82.67	78.67	60.33	71.67	3.434	0.28
Triglyceride, mg/dL							
24 hrs postpartum	26.50	26.50	26.50	26.50	26.50		
Day 21 of lactation	22.67	22.00	29.67	35.33	29.67	2.040	0.17
HDL cholesterol, mg/dL							
24 hrs postpartum	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00		
Day 21 of lactation	25.00	31.00	28.67	23.33	30.00	1.241	0.29
LDL cholesterol, mg/dL							
24 hrs postpartum	18.17	18.17	18.17	18.17	18.17		
Day 21 of lactation	32.67	46.67	44.67	30.33	36.00	2.652	0.27
VLDL cholesterol							
24 hrs postpartum	5.50	5.50	5.50	5.50	5.50		
Day 21 of lactation	4.33 ^B	4.33 ^{AB}	6.00 ^{AB}	7.00 ^A	6.00 ^{AB}	0.389	0.09
BUN, mg/dL							
24 hrs postpartum	13.57	13.57	13.57	13.57	13.57		
Day 21 of lactation	17.80 ^a	20.60 ^a	19.90 ^a	18.90 ^a	12.87 ^b	0.952	<0.01
AST, U/L							
24 hrs postpartum	39.60	39.60	39.60	39.60	39.60		
Day 21 of lactation	28.67	39.67	30.67	31.67	27.00	2.631	0.43
ALT, U/L							
24 hrs postpartum	21.33	21.33	21.33	21.33	21.33		
Day 21 of lactation	29.67	41.00	36.33	33.67	31.33	2.122	0.56

¹⁾ Standard error of means.

^{ab} Means in a same row with different superscript significantly different (P<0.01).

^{AB} Means in a same row with different superscript significantly different (P<0.10).

4) 포유자돈의 혈액 성상

포유모돈 사료 내 지방대체 목적의 거저리 유충의 첨가가 포유자돈 혈액성상에 미치는 영향을 표 5에 나타내었다. 포유자돈의 혈액성상을 측정한 결과, 21일령의 포유자돈의 BUN 농도와 free fatty acid 농도에서는 처리구간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 또한 혈중 지방 수치인 total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol에서는 처리구간의 통계적 유의차가 나타나지 않았지만, triglyceride와 VLDL cholesterol에서 거저리 유충을 1% 첨가한 L1 처리구의 혈중 농도가 다른 처리구들에 비해 유의적으로 높은 결과가 나타났다 (P<0.01, P<0.01). VLDL(very low density lipoprotein) 콜레스테롤은 간에서 생성되어 중성지방과 콜레스테롤, 인지질 등의 지방을 운반하는 역할을 하며, 내부에 많은 중성지방(triglyceride)를

가지고 있어 이 중성지방을 근육 및 지방조직으로 운송하는 역할을 한다. 본 실험결과에서도 마찬가지로 VLDL 콜레스테롤 농도가 높게 나타났으며, 이와 관계된 중성지방(triglyceride)의 농도도 L1처리구에서 유의적으로 높은 것으로 나타났다. VLDL 콜레스테롤은 주로 간에서 사용되고 남은 중성지방이나 콜레스테롤로부터 형성이 되는데, 주로 간에서 합성된 콜레스테롤과 중성지방을 말초조직으로 보내는 역할을 하는 것을 고려해볼 때, 거저리 유충 2%에 함유된 지방질이 다른 처리구들에 비해 높아서 간에서의 지방허용치를 넘어서 VLDL 콜레스테롤로 배출되는 양이 증가했을 것으로 사료된다.

간 건강 지표인 AST(aspartate aminotransperase)와 ALT(alanine aminotransaminase) 농도를 분석한 결과, AST 농도에서 처리구간의 유의차가 나타나지 않았지만 ALT 농도에서는 거저리 유충을 1% 첨가한 처리구인 L1처리구의 혈중 ALT농도가 다른 처리구들에 비해 유의적으로 높게 나타났다($P=0.03$). 거저리 유충을 2% 첨가한 L2처리구에서도 혈중 ALT 농도가 CON처리구와 F1, F2 처리구에 비해 높은 수치를 기록하였지만, 통계적인 유의차는 발생하지 않았다. 이를 통해 포유모돈 사료 내 거저리 유충을 1% 및 2% 첨가하였을 시, 모돈 섭취한 사료 내 거저리 유충의 미지의 요인(unknown factor)이 작용하여 모돈의 젖을 섭취한 포유자돈의 간수치가 올라가는 결과를 초래할 수 있을 것으로 사료된다.

표 5. 지방 대체 목적의 거저리 유충의 첨가가 포유자돈의 혈액성상에 미치는 영향

Criteria	Treatment					SEM ¹⁾	P-value
	CON	F1	F2	L1	L2		
Total cholesterol, mg/dL							
24 hrs postpartum	29.33	29.33	29.33	29.33	29.33		
Day 21 of lactation	196.3	158.3	153.3	179.3	150.3	12.10	0.82
Triglyceride, mg/dL							
24 hrs postpartum	69.2	69.2	69.2	69.2	69.2		
Day 21 of lactation	95.0 ^b	82.3 ^b	61.7 ^b	190.7 ^a	88.3 ^b	13.67	<0.01
HDL cholesterol, mg/dL							
24 hrs postpartum	16.33	16.33	16.33	16.33	16.33		
Day 21 of lactation	82.33	65.00	58.00	64.33	64.67	3.260	0.24
LDL cholesterol, mg/dL							
24 hrs postpartum	26.33	26.33	26.33	26.33	26.33		
Day 21 of lactation	111.67	89.00	93.33	97.67	75.33	10.976	0.94
VLDL cholesterol							
24 hrs postpartum	18.17	18.17	18.17	18.17	18.17		
Day 21 of lactation	19.00 ^b	16.67 ^b	12.33 ^b	38.00 ^a	17.67 ^b	2.712	<0.01
BUN, mg/dL							
24 hrs postpartum	18.07	18.07	18.07	18.07	18.07		
Day 21 of lactation	6.10	9.03	8.33	11.43	8.47	0.924	0.49
AST, U/L							
24 hrs postpartum	120.00	120.00	120.00	120.00	120.00		
Day 21 of lactation	38.33	57.00	44.67	68.00	49.00	7.847	0.24
ALT, U/L							
24 hrs postpartum	37.33	37.33	37.33	37.33	37.33		
Day 21 of lactation	27.33 ^B	31.67 ^B	34.33 ^B	55.67 ^A	43.67 ^B	3.295	0.03
Free fatty acid, μ Eq/L							
24 hrs postpartum	305.4	305.4	305.4	305.4	305.4		
Day 21 of lactation	424.7	398.3	431.3	550.7	455.3	26.56	0.50

¹⁾ Standard error of means.

^{ab} Means in a same row with different superscript significantly different (P<0.01).

^{AB} Means in a same row with different superscript significantly different (P<0.05).

4) 모유 성분 분석

포유모돈 사료 내 지방대체 목적의 거저리 유충의 첨가가 포유모돈의 유성분에 미치는 영향을 표 6에 나타내었다. 포유모돈의 분만직후의 초유와 포유21일차의 모유를 채취하여 분석한 결과, casein, fat, protein, lactose, free fatty acid에서 처리구간의 통계적인 유의차가 나타나지 않았다. 또한, 고형분(total solid), 무지고형분(solid not fat), citric acid의 함량에서도 처리구간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과로 말미암아, 거저리 유충을 1% 및 2% 첨가하여도 대조구에 비해 모유 성분에 차이가 나지 않으며, 지방을 1% 및 2% 첨가한 처리구의 모유 정상과도 차이가 나지 않는 대등한 결과를 가지는 것으로 나타났다.

표 6. 지방 대체 목적의 거저리 유층의 첨가가 모유 성분에 미치는 영향

Criteria	Treatment					SEM ¹⁾	P-value
	CON	F1	F2	L1	L2		
Casein, %							
Colostrum	5.20	5.20	5.20	5.20	5.20		
Day 21 of lactation	6.03	4.36	4.47	4.39	4.46	0.337	0.52
Fat, %							
Colostrum	7.89	7.89	7.89	7.89	7.89		
Day 21 of lactation	8.04	7.00	6.83	7.51	7.09	0.269	0.69
Protein, %							
Colostrum	6.51	6.51	6.51	6.51	6.51		
Day 21 of lactation	7.20	4.62	4.86	4.67	4.70	0.503	0.49
Lactose, %							
Colostrum	4.64	4.64	4.64	4.64	4.64		
Day 21 of lactation	5.32	6.00	5.89	5.95	6.06	0.135	0.52
Total solid, %							
Colostrum	21.12	21.12	21.12	21.12	21.12		
Day 21 of lactation	22.59	18.88	18.93	19.41	19.12	0.751	0.55
Solid not fat, %							
Colostrum	11.40	11.40	11.40	11.40	11.40		
Day 21 of lactation	12.76	11.00	11.17	10.96	11.13	0.363	0.55
Citric acid, %							
Colostrum	0.119	0.119	0.119	0.119	0.119		
Day 21 of lactation	0.114	0.084	0.092	0.092	0.100	0.006	0.78
Free fatty acid, %							
Colostrum	4.44	4.44	4.44	4.44	4.44		
Day 21 of lactation	3.71	3.89	3.60	3.72	4.23	0.091	0.21

¹⁾ Standard error of means.

4. 결론 (Conclusion)

본 연구는 포유모돈 사료 내 지방대체 목적의 거저리 유층의 첨가가 포유모돈의 생리적 변화 및 번식성적에 미치는 영향을 조사하였다. 포유돈 사료 내 거저리 유층의 첨가는 포유기 모돈의 체중 및 등지방 두께 변화에 부정적인 영향을 미치지 않았으며, 사료섭취량 및 재귀발정 일에서도 지방 첨가 처리구에 비해 차이가 나타나지 않았다. 또한 포유자돈의 성장성적에 있어서도 지방첨가 처리구에 비해 대등한 성장성적을 기록하였다. 포유모돈의 혈액성상에서는 거저리 2% 첨가처리구의 BUN 농도가 낮아 질소 이용률이 향상되는 결과가 나타났으며, 모돈에게는 간 건강에 부정적 영향을 미치지 않았다. 하지만 포유자돈의 ALT 농도가 거저리 1% 처리구에서도 유의적으로 높게 나타나 간 건강에 부정적인 영향을 미칠 가능성이 있는 것으로 나타났다. 결론적으로, 포유돈 사료 내 거저리 유층의 첨가는 지방질 원료를 2%까지 대체할 수 있으며, 모돈의 체형변화 및 포유능력에 대등한 효과를 가지지만, 포유자돈의 간 건강에 부정적인 영향을 미칠 수도 있을 것으로 사료된다.

실험6. 거저리 내 활용 가능한 기능성 물질에 대한 평가

1년차 및 2년차 실험은 각각 거저리 및 거저리 활용 원료사료의 영양성분 및 유효 성분 검사를 통해 거저리와 그 부산물이 사료화 하였을 경우 가질 수 있는 특성들을 규명하는 것과 거저리 내 키토산의 실용화를 위해, 거저리 유충과 성충에 포함되어 있는 키토산 함량을 분석하여 이들 함량이 어느 정도 되는지를 확인하기 위해 진행되었다. 이에 대한 결과들을 바탕으로, 거저리 유충과 성충 및 배지에 다량으로 포함되어있는 물질들을 중심으로 이러한 기능성 물질들에 대한 평가를 내렸다.

거저리 및 거저리 활용 원료사료의 영양성분 및 유효 성분 검사를 통해 거저리와 그 부산물이 사료화 하였을 경우 가질 수 있는 특성들을 규명하기 위한 연구를 바탕으로 영양적인 면을 분석하였을 경우, 거저리 유충, 성충 및 사육 배지에 다량으로 포함되어있는 영양소는 단연 조단백질이라고 할 수 있다. 조단백질은 유충, 성충 및 배지에서 각각 43.27 %, 59.77 %, 18.03 % 포함되어 있다. 그렇기 때문에 거저리 유충은 탈피 대두박을, 성충은 어분을 대체하는 것이 가능할 것으로 보인다. 유충과 유충 배지의 경우 C18 불포화 지방산이 다량 포함되어 있기 때문에, 비슷한 지방산 조성을 가지고 있는 전지 대두의 대체제로써 이용이 가능할 것으로 생각된다. 성충 배지의 경우 C15 불포화 지방산이 높은 함량을 나타냈기 때문에 마찬가지로 지방산 조성이 비슷한 우지의 대체제로써 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

거저리 내 키토산의 실용화를 위해, 거저리 유충과 성충에 포함되어 있는 키토산 함량을 분석하여 이들 함량이 어느 정도 되는지를 확인하기 위해 진행된 실험의 결과를 바탕으로 분석하였을 경우, 거저리 유충은 11.5594 mg/g, 건조 거저리 성충은 20.3821 mg/g의 함량을 나타내었으나, 생산 시간과 생산성을 고려했을 때, 거저리 유충이 키토산 원료 및 공급원으로써 이용 가치가 높다고 할 수 있다.

결론적으로, 영양소 함량 및 키토산 함량을 바탕으로 볼 때, 거저리 성충이 거저리 유충이나 배지와 비교하였을 때 조단백 함량, 지방산 함량, 키토산 함량이 높기 때문에 배합 사료 내 동물성 원료로 사용되는 어분이나 우지 등을 대체하는 능력이 더 우수하다고 할 수 있으며 키토산 공급원으로써의 가치도 높은 편이라고 할 수 있다. 즉 동일한 양이 확보되었을 때 성충이 대체원료와 키토산 공급원으로써의 가치가 높다. 그러나 현실적인 측면을 고려하였을 때 성충은 유충이나 배지에 비해 생산 시간이 오래 걸리고 생산성이 떨어지기 때문에 영양적인 측면에서는 가장 우수하나 실질적으로는 이용이 쉽지 않을 것으로 생각된다.

거저리 배지의 경우 영양적인 측면을 살펴보았을 때 거저리 유충 및 성충에 비해 현저하게 그 가치가 떨어져서 현재 사용하고 있는 다른 원료들과 비교해 보았을 때도 가축에게 있어 원료 사료로써 적합하지 않다고 사료된다.

따라서 영양소 함량이 일반적인 단백질 원료들에 비해 떨어지지 않고, 키토산 함유율이 높

아 키토산 함유율이 높은 갑각류에 비해 키토산 공급원으로써 가공이 간단하며, 돼지에게 있어 소화 및 흡수가 용이하다는 영양학적인 측면과, 생산 시간이 짧고 생산성이 높다는 현실적인 측면에서 고려할 때, 거저리 유충이 거저리 내 활용 가능한 기능성 물질들의 공급원으로써 그 가치가 가장 우수하다고 할 수 있다.

제 2 협동과제(대상축종에서 곤충사료의 사양기술 및 활용방안 개발) 총결론

1. 연구결과 요약

거저리 유충은 자돈사료 내 6% 첨가가 가능하며, 6%까지 첨가지 자돈의 성장성적 및 단백질 이용율이 향상되는 결과를 가지며, 번식돈의 경우 거저리 유충을 사료내에 첨가시 분만복당 체중, 포유기 사료섭취량, 포유기 복당자돈증체량이 향상될 수 있다.

거저리 성충은 자돈사료내 성충을 3% 또는 5%를 첨가하여도 대조구에 비해 성장성적에 차이가 나지 않으며 오히려 단백질 이용율은 향상된다.

거저리를 사육한 배지 및 배설물의 경우 육성돈 사료내에 6%까지 첨가하여도 대조구와 비교하여 대등한 성장성적을 나타내었다.

기존의 사료원료들에 대한 거저리 원료의 대체효과를 조사한 결과, 자돈 사료 내 거저리 유충 3%첨가시 어분 및 유청분말을 3%까지 대체가능하였으며, 포유돈 사료에서는 거저리 유충을 1% 및 2% 첨가시 어분 4% 및 우지 2%를 대체할 수 있었다. 또한 거저리 성충 1%는 사료 내 항생제 0.1%를 대체할 수 있는 항생제 대체효과를 가지는 것으로 나타났다.

2. 거저리 원료 활용에 대한 제안

2014년 이후 국제 원료사료 가격의 하락으로 일반적으로 사료에 사용되는 단백질 원료사료들의 가격이 30% 하락한 상황이다. (대두박:630원→ 475원/kg, 어분: 1,200원~1,800원)

중국에서 수입되는 거저리 원료의 경우 kg당 1,200원 수준으로 거저리 기름을 짜고 남은 박류를 제품화 한 것이라 품질 문제가 심각하여 실제 사료업계에서는 사용하지 못하고 있는 실정이다. 국내 곤충농가에서 생산되는 거저리 원료의 생산량이 매우 적기 때문에, 2015년 11월 기준으로 국내산 거저리(밀웍)은 kg당 20,000원 수준으로 유통되고 있다. 따라서 국내에서 생산되는 거저리 원료의 대량생산체계 확립 및 가격경쟁력의 확보가 선결될 경우, 거저리 원료를 이용한 사료(제품)생산이 가능할 것으로 사료된다.

거저리 유충은 원료사료로서 사료영양학적 가치가 매우 우수하며, 거저리 성충은 수급량과 키틴 함량을 고려해 볼 때 기능성 물질로 이용한 것이 적합할 것으로 사료된다.

유럽에서는 거저리 원료의 동물사료사용에 대한 엄격한 가이드라인을 두고 있으며, 거저리 및 검증된 먹이를 급여한 거저리 원료들을 엄선하여 동물사료의 원료로 사용하도록 권장하고 있다. 이러한 유럽의 가이드라인을 국내의 상황에 맞게 도입할 필요가 있으며, 거저리 원료의 사료제품화시 발생할 수 있는 질병 및 독성문제를 원천차단할 수 있어야 한다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 최종 목표 및 달성도

1. 최종 세부 목표

가. 사료용 곤충의 안정적 대량생산체계를 확립하고, 고품질 단백질 사료제품을 개발한다.

- (1) 사료용 곤충 대량생산 기술 개발
- (2) 사료용 곤충의 안정적 공급 기술 개발
- (3) 대상축종에서 곤충사료의 사양기술 및 활용방안 개발
- (4) 곤충자원의 생리활성 기능 탐색 및 첨가제의 활용 가능성 평가

나. 개발된 기술로 특허를 등록하고, 해당기술을 기업체에 기술이전한다.

- (1) 거저리 배설물 분리장치 - 특허 등록 및 기술이전
- (2) 거저리과 유충의 수분공급용 젤리형 조성물 및 이의 제조방법 - 특허 등록 및 기술이전
- (3) 갈색거저리 발육기간 단축방법 - 특허 출원 및 기술이전

2. 달성도

가. 대량생산 기술 개발을 통한 산업화 기반을 마련하였고, 사료곤충 품질 균일화와 안정적 공급기술을 개발하였으며, 곤충사료의 급여 효과 검증 및 부가가치를 발굴하였으며, 곤충사료의 사료화 특성 및 영양가치를 규명하였다.

- (1) 사료용 곤충 대량 생산 체계 확립을 위해 3건의 특허를 출원 및 등록하였고, 관련 연구결과를 국내논문에 게재하였다. (100% 달성)
- (2) 대상 곤충의 병원미생물 방제 기술, 충태별 보존 기술 개발 등의 연구수행 결과를 통해 사료용 곤충의 안정적 공급 체계를 구축하였고, 관련 연구결과를 SCI급 논문에 게재하였다. (100% 달성)

제 2 절 관련분야의 기여도

1. 연구개발 성과의 우수성에 따른 기여

○ 사료용 곤충(갈색거저리), 안정적 대량 사육체계 확립

사료용 곤충(갈색거저리)의 안정적인 생산 시스템 구축을 위해 곤충병원성 미생물의 제어가 중요한 관리 부분 중의 하나이다. 이에 본 연구에서는 온도 및 습도에 따른 대상 곤충의 발병률, 역학 조사 및 적정 사육 온습도를 확립함으로써 사료용 곤충의 안정적 대량 사육 체계를 확립하였으며, 사육과정에서 발생할 수 있는 병원미생물의 특성 구명 및 예방을 위한 화학적 제균 방법을 확립하였다. 또한 사료용 곤충의 성장발육 동기화 및 층태별 보존기술 개발을 통해 탄력적 대응을 위한 출하방법을 구명하였으며, 적정 개체군 밀도 조사 및 최적 수거시기 조사를 통해 사료용 곤충의 품질 균일화 기술을 개발하였다. 더불어 대상 곤충의 사료 첨가물로서의 약리효과 증진을 위한 기능성 확보 방법을 수립함으로써 곤충 사료의 기능성을 제고하였다.

○ 양돈용 곤충사료 이용기술 개발

양돈 사료에서 단백질 원료는 돼지의 성장 발달을 통해 식육의 원료가 되기 때문에 사료에 포함된 영양소 중 에너지와 함께 가장 중요한 요소이다. 일반적으로 양돈 사료에 사용되는 단백질원은 이유 자돈기의 유제품을 제외하면 대부분 식물성 단백질원을 사용하고 있다. 이는 식물성 단백질이 동물성 단백질에 비해 효율이 좋지 때문이 아니라, 육골분이나 어분 등 일반적으로 사용될 수 있는 동물성 단백질들이 보관 도중 변패의 우려가 있어 지속적인 공급에 어려움이 있기 때문이다. 곤충 사료는 이러한 면에서 대안이 될 수 있다. 곤충 원료들은 기존의 동물성 원료와는 다르게 표면적이 넓어 건조가 쉬우며 무엇보다 단기간에 쉽게 양산할 수 있기 때문에 지속적인 공급이 용이하다. 이에 본 연구에서는 곤충 사료, 특히 거저리를 이용한 사료를 만들어 실제 돼지들에게 사양실험을 함으로써 곤충 사료가 실용 가능한지 확인하기 위해 시행되었다. 뿐만 아니라, 거저리의 성장 단계별(유충 및 성충) 이용 가능성 및 효율성에 대한 분석을 진행하였기 때문에 결과적으로 어느 시기의 거저리를 얼마만큼의 함량을 사용할 수 있는가에 대한 가이드라인을 제시할 수 있다.

2. 분야 관련성이 높은 대표성과

본 연구에 활용한 갈색 거저리 유충에 발생하는 병원성 미생물 제어기술과 기능성 제고방법과 관련된 연구결과를 바탕으로 해외 유명저널에 2건의 논문을 투고하였고, 대상 곤충의 대량 생산과 유관한 내용을 특허(국내 특허 2건)화하여 지적재산권을 확보하였다.

가. 갈색거저리 유충에 발생하는 병원성 미생물 제어 관련 논문 발표

- 저널명 : Entomological Research 44, 236-243. 2014. (IF : 0.398)
- 논문명 : Management of entomopathogenic fungi in cultures of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)

나. 갈색거저리 유충의 기능성 제고 관련 논문 발표

- 저널명 : Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 42, 151-156. 2015. (IF : 1.525)
- 논문명 : Production of antibacterial *Bombyx mori* cecropin A in mealworm-pathogenic *Beauveria bassiana* ERL1170

다. 특허 출원 및 등록 1건

- 특허명 : 거저리과 유충의 수분공급용 젤리형 조성물 및 이의 제조방법
- 특허번호 : 제 10-1508742호
- 관련내용 : 거저리과 유충에게 수분공급용으로 통상적으로 제공되었던 채소 또는 과일 껍질 대신 수분공급용 젤리형 조성물의 제공에 관한 것이다. 수분공급이 용이하며, 사육환경이 개선됨과 동시에 수분과다 공급에 의한 폐사를 막을 수 있어 거저리과 유충의 생존율이 증대되므로 농가의 소득향상에 도움이 될 것으로 기대한다.

라. 특허 출원 및 등록 1건

- 특허명 : 거저리 배설물 분리장치
- 특허번호 : 제 20-0476854호
- 관련내용 : 번데기 보호 및 우화성충을 분리하기 위해 사육상자의 사료에 혼합된 거저리의 배설물을 자동으로 분리배출할 수 있게 하는 거저리 배설물 분리장치 개발에 관한 것이다. 배설물 분리에 따른 작업시간 및 노동력을 현저히 줄일 수 있을 뿐만 아니라 배설물 분리작업 시 먼지의 발생을 억제하여 작업 환경을 개선할 수 있다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 연구실적

가. 연구 논문 발표 : 7건

관련 논문 7편, 특허 출원 3건, 특허 등록 2건을 정량적 성과로 확보하였다.

(1) 곤충에 발생하는 질병 미생물 (*I. fumosorosea*)의 이용성 관련 논문 발표

- 저널명 : Pest Management Science 69, 576–581. 2013. (IF : 2.743)
- 논문명 : An oil-based formulation of *Isaria fumosorosea* blastospores for management of greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae).
- 관련내용 : 곤충병원성 미생물중의 하나인 *Isaria fumosorosea*가 생산하는 blastospores 의 기본적인 특성과 이러한 미생물이 곤충에 병원성을 유도하는 기작 및 환경조건에 대한 연구 내용임.

(2) 곤충에 발생하는 질병 미생물 (*B. bassiana*)의 이용성 관련 논문 발표

- 저널명 : Pest Management Science 70, 1186–1191. 2014. (IF : 2.694)
- 논문명 : A novel approach: *Beauveria bassiana* granules applied to nursery soil for management of rice water weevils in paddy fields
- 관련내용 : 곤충병원성 미생물중의 하나인 *Beauveria bassiana*의 기본적인 생물학적인 특성과 본 미생물이 곤충에 병원성을 보이는 환경조건과 수분 조건에 대한 연구 내용임.

(3) 갈색거저리 유충에 발생하는 병원성 미생물 제어 관련 논문 발표

- 저널명 : Entomological Research 44, 236–243. 2014. (IF : 0.398)
- 논문명 : Management of entomopathogenic fungi in cultures of *Tenebrio molitor*(Coleoptera: Tenebrionidae)
- 관련내용 : 갈색거저리 유충에 발생하는 다양한 곤충 병원성 미생물을 분리 동정하였으며, 효과적인 제어를 위한 40종의 살균활성 물질에 대한 평가 및 효과적인 적용 방법에 대한 연구 내용임.

(4) 갈색거저리 유충의 기능성 제고 관련 논문 발표

- 저널명 : Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 42, 151–156.

2015. (IF : 1.525)

- 논문명 : Production of antibacterial *Bombyx mori* cecropin A in mealworm-pathogenic *Beauveria bassiana* ERL1170.
- 관련내용 : 갈색거저리의 기능성을 제고하기 위하여, *B. mori* 유래 cecropin 단백질을 발현하기 위한 recombinant *B. bassiana* 제작과 이를 이용 (곤충 유충에서 재조합 미생물 증식)한 갈색거저리 유충내에서의 항생 단백질인 cecropin의 생산에 대한 연구임.

(5) 꼬리명주나비 관련 논문 발표

저널명 : International Journal of Industrial Entomology 29(1), 153-161. 2014.

논문명 : Temperature-Dependent Development of the Swallowtail Butterfly, *Sericinus montela* Gray

관련내용 : 꼬리명주나비의 발달기간, 생존율은 15~35도의 다양한 온도에서 초기(배아)와 유충 발달단계에서 조사되었다. 배발생과정은 적정범위에서 벗어나는 온도 조건에서 약간의 변화에 의해서도 큰 영향을 받을 수 있음을 확인하였음.

(6) 갈색거저리 관련 논문 발표

- 저널명 : Journal of Sericultural and Entomological Science 53(1), 1-5. 2015.
- 논문명 : Growth characteristics of mealworm *Tenebrio molitor*.
- 관련내용 : 다양한 범위의 온도, 광주기, 사육밀도에서 갈색거저리의 생리적 특성을 구명하고자 연구를 수행하였으며, 효율적인 실내 대량사육 시스템 확립을 위해 활용할 수 있음.

(7) 아메리카왕거저리 관련 논문 발표

- 저널명 : International Journal of Industrial Entomology 30(2), 45-49. 2015.
- 논문명 : Developmental characteristics of *Zophobas atratus*(Coleoptera:Tenebrionidae) larvae in different instars
- 관련내용 : 갈색거저리와 더불어 사료용 곤충으로 활용될 수 있는 아메리카왕거저리 유충의 령별 발육특성을 조사하였으며, 이 결과는 아메리카왕거저리 유충의 생리적 특성을 구명하기 위한 유관연구에 도움이 될 수 있음.

나. 지적재산권 확보 : 특허 출원 3건, 특허 등록 2건

(1) 특허 출원 1건

- 특허명 : 갈색거저리 발육기간 단축 방법
- 출원번호 : 10-2014-0134933

- 관련내용 : 갈색거저리 대량생산을 위해 사육환경조건인 온도, 광주기 및 사육형태조건을 조절하여 발육기간을 단축하고자 하였음.

(2) 특허 출원 및 등록 1건

- 특허명 : 거저리과 유충의 수분공급용 젤리형 조성물 및 이의 제조방법
- 출원번호 : 10-1508-7420000
- 관련내용 : 거저리과 유충에게 수분공급용으로 통상적으로 제공되었던 채소 또는 과일 껍질 대신 수분공급용 젤리형 조성물이 제공됨. 수분공급이 용이하며, 사육환경이 개선됨과 동시에 수분과다 공급에 의한 폐사를 막을 수 있어 거저리과 유충의 생존율이 증대되므로 농가의 소득향상에 도움이 될 것으로 기대함.

(3) 특허 출원 및 등록 1건

- 특허명 : 거저리 배설물 분리장치
- 등록번호 : 20-0476-8540000
- 관련내용 : 번데기 보호 및 우화성충을 분리하기 위해 사육상자의 사료에 혼합된 거저리의 배설물을 자동으로 분리 배출할 수 있게 하는 거저리 배설물 분리장치 개발하였음. 배설물 분리에 따른 작업시간 및 노동력을 현저히 줄일 수 있을 뿐만 아니라 배설물 분리작업 시 먼지의 발생을 억제하여 작업 환경을 개선할 수 있음.

2. 실용화 및 산업화 계획

가. 기술이전

(1) 기술실시 1건

- 계약(활용)명 : 거저리 배설물 분리장치
- 계약(활용)기간 : 2014. 01. 01. ~ 2014. 12. 31.
- 지재권 종류 : 특허출원
- 출원번호 : 20-2013-0002902
- 실시기관 : 월천곤충사랑

(2) 기술실시 1건

- 계약(활용)명 : 갈색거저리 유충 발육기간 단축방법
- 계약(활용)기간 : 2015. 02. 01. ~ 2016. 01. 31.
- 지재권 종류 : 특허출원
- 출원번호 : 10-2014-0134933
- 실시기관 : 월천곤충사랑

(3) 기술실시 1건

- 계약(활용)명 : 거저리와 유충의 수분공급용 젤리형 조성물 및 이의 제조방법
- 계약(활용)기간 : 2015. 11. 30. ~ 2018. 11. 30.
- 지재권 종류 : 특허
- 등록번호 : 10-1508742
- 실시기관 : (주)MG내추럴

나. 기술확산 계획

(1) 교육 1건

- 교육기간: 2014. 03. 11
- 교육 및 컨설팅명: 곤충산업 창업아카데미 현장실습 교육
- 교육 및 컨설팅 교재명: 갈색거저리 사육기술
- 주요내용: 갈색거저리의 연구배경, 국내외 연구동향 및 사육기술과 활용방안 설명
- 기대효과: 곤충산업 활성화 및 갈색거저리 전문 사육농가 육성
- 장소: 국립농업과학원

(2) 교육 2건

- 교육기간: 2014. 06. 18
- 교육 및 컨설팅명: 경기농업대학 곤충산업과 교육과정
- 교육 및 컨설팅 교재명: 사료용 곤충의 이해
- 주요내용: 사료용 곤충의 활용방안 및 사육 기술
- 기대효과: 사료용 곤충 농가 육성 및 전문인력 양성
- 장소: 경기농업기술교육센터

(3) 교육 3건

- 교육기간: 2015. 05. 11 ~ 2015. 05. 15
- 교육 및 컨설팅명: 곤충산업 교육
- 교육 및 컨설팅 교재명: 곤충산업
- 주요내용: 곤충산업 육성법과 정책, 사료용 곤충 활용 전략
- 기대효과: 곤충산업 육성, 곤충분야 신시장 창출로 인한 곤충농가 소득 증대
- 장소: 농촌인적자원개발센터

다. 연구성과 활용에 따른 기대효과

(1) 기술적 측면

- 사료용 곤충의 대량 사육 원천 기술 확보

- 양돈사료 내 거저리 원료의 적정 첨가수준 확립
- 동물성 단백질 및 지방질 원료사료 대체 가능
- 곤충 소재의 고부가가치화 가능: 가공기술 축적, 특화된 기능성 확보

(2) 경제적 측면

- 곤충을 이용한 사료시장 참여로 곤충산업 기반 확대
 - 곤충 사료자원 확보로써 수입사료 원료 절감 효과
 - 수입산 동물성 단백질 물량대체로 외화절약 및 시장 안정
 - 거저리 원료의 항생제 대체효과를 통한 부가가치 창출

(3) 정책적 측면

- 곤충사료 산업 육성 및 기능성 농축산물 생산 가능
 - 양돈의 성장촉진 효과 기대 및 먹거리 안전성 확보
 - 가축질병에 대한 상시적 대응 방안 구축에 기여
 - 곤충사료 제조, 가공 활성화로 곤충사료산업 육성

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

동물단백질의 가격 상승, 식량 안보 불안, 환경 문제, 인구 팽창, 중산층의 단백질 수요 증가 등의 문제와 양식업 생산량의 증가로 인해 어분과 대두의 수요가 높아지고 가격이 상승함에 따라, 양식과 가금류를 위한 곤충 단백질을 개발하는 연구가 요구되고 있는 실정이다. 곤충 기반의 사료제품은 현재 양식과 가축에 사용되는 사료 배합분의 주요 요소인 어분과 대두와 유사한 시장을 형성할 가능성이 있다.

전 세계에서 발견된 곤충은 180만 종으로, 우리가 이미 알고 있는 동물 종류 총수의 70% 이상이다. 이러한 곤충의 가치가 지구상의 마지막 미개발 생물자원으로 재평가되면서 곤충산업의 성장이 가속화되고 있다.

곤충 자원 연구, 곤충 자원 이용, 곤충 산업 개발은 세계적 교류로서 여러 국가에서 곤충을 이용·개발하기 시작했으며, 중국의 경우 오랜 곤충 산업의 역사를 가지고, 연구개발 및 산업화에 매진해오고 있으며, 최근 갈색거저리가 중국의 3대 곤충(꿀벌, 누에, 갈색거저리) 산업 중 하나로 자리매김하면서 갈색거저리 관련 기술의 출원이 급증하고 있는 추세이다.

갈색거저리는 밀짚 등의 농공업 유기 폐기물을 종자로 전환시키는 전환율이 높으며, 잡식성이고, 적응성이 강하여 대규모로 양식하기 쉽고 이미 양식 기술이 많이 알려져 있음. 또한 공장화 사육과 분산 사육이 모두 가능하지만 분산 사육이 적절하여 집중적으로 가공할 수 있어 중국에서 갈색거저리를 활발하게 이용하고 있는 것으로 나타난다.

전체 연도별 특허동향을 살펴보면, 1983년 출원을 시작으로 하여 2000년대 이후 증가세를 보이고 있다.

각 시장국별 출원동향을 살펴보면, 중국이 74%에 달하는 높은 비중으로 가장 많은 특허를 출원한 시장국으로 나타났으며, 그 다음으로 한국이 17%의 점유율을 차지하고 있다.

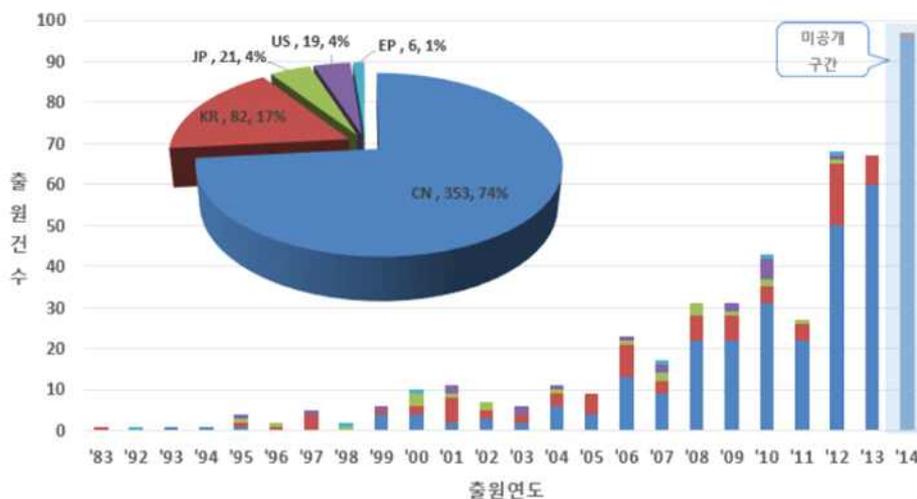


그림 6-1. 전체연도별 특허동향

다만 중국은 대부분 자국 내에만 출원하는 경향이 있어, 해외 진출이 활발하지 않은 것으로 나타났으며, 특정 기술분야(딱정벌레목의 사료개발기술)에 집중하고 있는 것으로 나타났다.

세부기술별 출원 동향을 살펴보면, 가장 많은 점유율을 차지하고 있는 딱정벌레목(AB) 분야에서 가장 많이 이용하고 있는 곤충은 갈색거저리로 나타났으며, 갈색거저리를 이용하여 사료 개발 시, 조류의 사료에 집중되어 기술개발이 이루어지고 있는 것으로 나타났다.

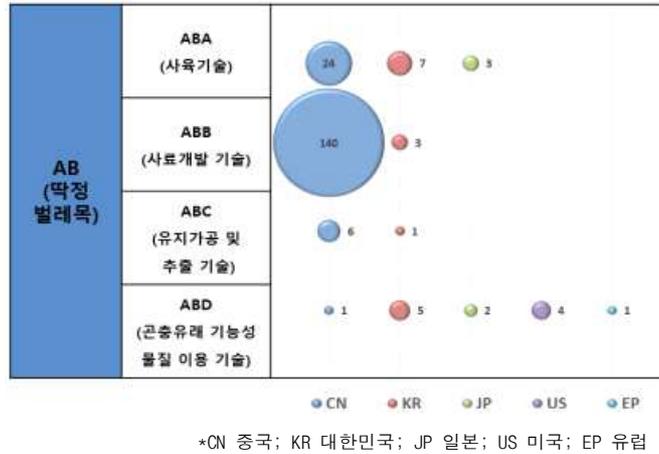


그림 6-2. 딱정벌레목의 세부기술별 IP출원국 분석

또한 최근 갈색거저리에 대한 관심이 급증하고 있는 흐름을 따라, 갈색거저리를 이용하면서 우리나라의 강점인 곤충유래 기능성 물질 이용기술 분야에서 기술력을 확보하는 것 또한 좋은 전략이라고 판단된다. 이미 중국에서 사육기술과 사료개발기술 분야에서 출원활동을 활발히 하며 주도적으로 기술개발활동이 이루어지고 있지만, 자국 내에만 출원하는 경향이 있어, 중국의 앞선 선행기술들을 토대로 기술을 발전시킨다면 기술 개발하는데 있어 시간을 줄일 수 있고, 절약된 시간에 심도 있는 연구를 통해 질적 수준이 높은 기술력을 확보할 수 있을 것으로 판단된다.

제 7 장 참고문헌

Aguilar–Miranda, E. D. ; Lopez, M. G. ; Escamilla–Santana, C. ; Barba de la Rosa, A. P., 2002. Characteristics of maize flour tortilla supplemented with ground *Tenebrio molitor* larvae. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (1): 192–195.

AOAC. 1995. Official methods of analysis (15th ed). Association of official analytical chemists. Washington, D. C., USA.

ARC. 1981. The nutrient requirements of pigs: technical review. rev. ed. slough, england. common wealth agricultural bureaux, xxii, p307.

Baldwin, B. A. 1985. Neural and hormonal mechanisms regulating food intake. *Proc. Nutr. Soc.* 44:303–311.

Barnes, A.I. and M.T. Siva–Jothy. 2000. Density–dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. *Proc R Soc Lond B* 267(1439), 177–182.

Bayes–Genis, A., Cheryl A. Conover, Robert S. Schwartz. The Insulin–Like Growth Factor Axis : A Review of Atherosclerosis and Restenosis. *Circulation Research*. 2000;86:125–130.

Bergner, H. 1977. Protein evaluation and protein metabolism. FEBS 11th Meeting. Copenhagen 1977, 149–160.

Brandtzaeg, P. 2003. Role of secretory antibodies in the defence against infections. *Int J Med Microbiol.* 29, 3–15.

Choi, Y.C. and Song, H.S. 2011. Mass rearing and application technique of mealworm, *Tenebrio molitor*. Applied entomology Division, National Academy of Agricultural Science Press, Korea.

DeFoliart, G. R., 1989. The human use of insects as food and as animal feed. *Bul. Entomol. Soc. Amer.*, 35: 22–35.

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

Eggum, B. O. 1970. Blood urea measurement as a technique for assessing protein quality. Department of physiology and chemistry Copenhagen, Denmark. *Br. J. Nutr.* 24:983–988.

Elsley, F. W. H., M. M. Bannerman, E. V. J. Bathurst, A. G. Bracewell, J. M. M. Cunningham, T. L. Dodsworth, G. J. England, T. J. Forbes and R. Laird. 1967. A study of the effects of different levels of feeding in pregnancy and lactation on sow productivity. *Anita. Prod.* 9:270 (Abstr.).

Fowler, V. R. 1985. The importance of voluntary feed intake in pigs. *Proc. Nutr. Soc.* 44:347–353.

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

Hahn, J. D., R. R. Biehl and D. H. Baker. 1995. Ideal digestible lysine for early and late finishing swine. *J. Anim. Sci.* 73:773.

Hartmann, P. E., I. McCauley, A. D. Gooneratne and Whitely, J. L. 1984. Inadequacies of sow lactation: survival of the fittest. In *Physiological strategies in lactation*. Academic Press : 301–326.

Huang Q, Zhou ZJ, Zhou DG, Hu J, Yang W, Yang CP. 2006. Analysis of Nutritional Component of *Tenebrio molitor* (L.) Pupa. *Sichuan Journal of Zoology*, 2006,25(4):809–813.

Jabir A.R., S.A. Razak and S. Vikineswary. 2012. Nutritive potential and utilization of super worm (*Zophobas morio*) meal in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. Afr. J. Biotechnol., 11(24), 6592–6598.

Jackson, J.R., W.L. Hurley, R.A. Easter, A.H. Jensen & J. Odle, 1995. Effects of induced or delayed parturition and supplemental dietary fat on colostrum and milk composition in sows. J. Anim. Sci. 73:1906–1913.

Julieta Ramos–Elorduy a,c, Ernesto Avila Gonzalez b,c, Alma Rocha Hernandez b,c, and Jos Manuel Pino. Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to Recycle Organic Wastes and as Feed for Broiler Chickens. 2002; 214–220.

Jung, B.H. 2012. Insect fauna of Korea. vol.12, no.5, Darkling Beetles Arthropoda: Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae: Tenebrionae / national institute of biological resources, flora and fauna of Korea, national institute of biological resources press, Korea.

Kim, S.Y., T.H. Chung, S.H. Kim, S.H. Song, N.J. Kim. 2014. Recycling Agricultural Wastes as Feed for Mealworm (*Tenebrio molitor*). Korean J. Appl. Entomol. 53(4):365–371.

Kim, S.Y., J.B. Park, Y.B. Lee, H.J. Yoon, K.Y. Lee, N.J. Kim. 2015. Growth characteristics of mealworm *Tenebrio molitor*. J. Seric. Entomol. Sci. 53(1):1–5.

Kim, S.Y., H.G. Kim, S.H. Song, N.J. Kim. 2015. Developmental characteristics of *Zophobas atratus* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae in different instars. Int. J. Indust. Entomol. 30(2):45–49.

Klaver, J., G.J.M. van Kempen, P.G.B. de Lange, M.W.A. Verstegen and H. Boer, 1981. Milk composition and daily yield of different milk composition as affected by sow condition and lactation/feeding regimen. J. Anim. Sci. 52:1091–1097.

Koketsu, Y., G. D. Dial, J. E. Pettigrew, J. L. Xue, H. Yang and T. Lucia. 1998. Influence of lactation length and feed intake on reproductive performance and blood

concentrations of glucose, insulin and luteinizing hormone in primiparous sows. *Anim. Reprod. Sci.* 52:153–163.

Koketsu, Y., G. D. Dial, J. E. Pettigrew, W. E. Marsh and V. L. King. 1996a. Influence of imposed feed intake patterns during lactation on reproductive performance and on circulating levels of glucose, insulin, and luteinizing hormone in primiparous sows. *J. Anim. Sci.* 74:1036–1046.

Koketsu, Y., G. D. Dial, J. E. Pettigrew and V. L. King. 1996b. Feed intake pattern during lactation and subsequent reproductive performance of sows. *J. Anim. Sci.* 74:2875–2884.

Koketsu, Y., G. D. Dial, J. E. Pettigrew, W. E. Marsh and V. L. King. 1996c. Characterization of feed intake patterns during lactation in commercial swine herds. *J. Anim. Sci.* 74:1202–1210.

Lalles, J. P., P. Bosi, H. Smidt, and C. R. Stokes. 2007. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proc. Nutr. Soc.*, 66:240–268.

Laudenslager, M. L., M. Fleshner, P. Hofstadter, P. E. Held, L. Simons, and S. F. Maier. 1988. Suppression of specific antibody production by inescapable shock: stability under varying conditions. *Brain. Behav. Immunol.* 2, 92–101.

Leenhouders, J. I., Van der Lende, T., Knol, E. F. 1999. Analysis of stillbirth in different lines of pig. *Liv. Prod. Sci.* 57:243–253.

Lee, S.J., S.H. Kim, Y.S. Nai, Y.H. Je, B.L. Parker, J.S. Kim. 2014. Management of entomopathogenic fungi in cultures of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Entomological Research.* 44:236–243.

Lee, S.J., J.S. Yu, B.L. Parker, M. Skinner, Y.H. Je, J.S. Kim. Production of antibacterial *Bombyx mori* cecropin A in mealworm–pathogenic *Beauveria bassiana* ERL1170. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 42:151–156.

- Lewis, A. J., V. C. Speer and D. G. Haught. 1978. Relationship between yield and composition of sow's milk and weight gains of nursing pigs. *J. Anim. Sci.* 47:634.
- Libal, G. W. and R. C. Wahlstrom. 1977. Effect of level of feeding during lactation on sow and pig performance. *J. Anim. Sci.* 41:1524–1525.
- Lucia, T., M. N. Correa., J. C. Deschamps., I. Bianchi., M. A. Donin., A. C. Machado., W. Meincke., and J. E. M. Matheus. 2002. Risk factors for stillbirth in two swine farms in the south of Brazil. *Prev. Vet. Med.* 53:285–292.
- Monjan, A. A and M. I. Collector. 1977. Stress-induced modulation of the immune response. *Science* 196, 307–308.
- Moreki, J.C., B. Tiroesele, S.C. Chiripasi. 2012. Prospects of utilizing insects as alternative sources of protein in poultry diets in Botswana : a review. *Journal of Animal Science Advances.* 2(8), 649–658.
- Morrow Tesch, J. L, J. J. McGlone, J. L. Salak Johnson. 1994. Heat and social stress effects on pig immune measures. *J. Anim. Sci.* 72, 2599–2609.
- Nabuurs. M.J.A. 1991. Etiologic and pathogenic studies on postweaning diarrhea PhD thesis. University of Utrecht, The Netherlands.
- Neil, M. 1996. Ad libitum lactation feeding of sows introduced immediately before, at, or after farrowing. *J. Anim. Sci.* 63:497–505.
- Nelssen, J. L., A. J. Lewis, J. E. R. Peo. and J. D. Crenshaw. 1985. Effect of dietary energy intake during lactation of performance of primiparous sows and their litters. *J. Anim. Sci.* 61:1164–1171.
- Nergui R., S.H. Kim, W.H. Choi, S.J. Hong, N.J. Kim. 2012. Nutritional Value of Mealworm, *Tenebrio molitor* as Food Source. *Int. J. Indust. Entomol.* 25(1):93–98.

Ng WK, Liew FL, Ang LP, Wong KW. 2001. Potential of mealworm (*Tenebrio molitor*) as an alternative protein source in practical diets for African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture Research* 32, 273–280.

NRC. 1998. *Nutrient Requirements of Swine*. National Academy Press, Washington, DC.

NRC. 2012. *Nutrient Requirements of Swine (11th Ed.)*. National Academy press, Washington, D. C.

Park, J.B., W.H. Choi, S.H. Kim, H.J. Jin, Y.S. Han, Y.S. Lee, N.J. Kim. 2014. Developmental characteristics of *Tenebrio molitor* larvae (Coleoptera: Tenebrionidae) in different instars. *Int. J. Indust. Entomol.* 28(1):5–9.

Pluske, J. R., Williams, I. H., Aheme, F. X. 1996. Maintenance of villous height and crypt depth in piglets by providing continuous nutrition after weaning. *J. Anim. Sci.* 62, 131–144.

Pluske, J. R., D.J. Hampson and I.H. Williams. 1977. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science* 51, 215–236.

Quesnel, H. and A. Prunier. 1998a. Effect of insulin administration before weaning on reproductive performance in feed-restricted primiparous sows. *Anim. Reprod. Sci.* 51:119–129.

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

Ramos-Elorduy J, Pino MJM. 1990. Caloric content of some edible insects of Mexico. *Review of Society Qim Mexico.* 34:56–68.

Ravzanaadii, N., Kim, S. H., Choi, W. H., Hong, S. J., and Kim, N. J. 2012. Nutritional Value of Mealworm, *Tenebrio molitor* as Food Source. International Journal of Industrial Entomology, 25(1), 93–98.

Rooke, J. A and I. M. Bland. 2002. The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. Livest. Prod. Sci. 82, 632–639.

SAS. 2004. SAS User's Guide. SAS. Institute. Cray. NC.

Salmon-Legagneur, E. 1965. Quelques aspects des relations nutritionnelles entre la gestation et al lactation chez la truie. Anal. Zootechnic 14:15.

Salmon-Legagneur, E. and A. Rerat. 1962. Nutrition of the sow during pregnancy. In: Nutrition of Pigs and Poultry. Ed. J. T. Morgan and D. Lewis. Proc. Univ. Nottingham Eighth Easter School of Agrie. Scl., Butterworths, London.

Tokach, M. D., J. E.. Pettigrew, B. A. Crooker, G. D. Dial and A. F. Sower, 1992a. Quantitative influence of lysine and energy intake on yield of milk components in the primiparous sow. J. Anim. Sci. 70:1864–1872.

Whang, G. Y. and R. A. Easter. 2000. Blood urea nitrogen as an index of feed efficiency and lean growth potential in growing-finishing swine. Asian-Australian J. Anim. Sci. 13(6):811.

Whang, K. Y and R. A. Easter. 2000. Blood urea nitrogen as an index of feed efficiency and lean growth potential in growing-finishing swine. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 13:811–816.

Yan Zhao, C.W. Alexandra, V.F., L.P. Robert, Sung Woo Kim. 2014. Amino acid fortified diets for weanling pigs replacing fish meal and whey protein concentrate:Effect on growth, immune status, and gut health. J. Anim. Sci. 5:57.

Zhao Y. C. W., V. F. Alexandra, L. P. Robert, S. W. Kim, 2014, Amino acid fortified diets for weanling pigs replacing fish meal and whey protein concentrate:Effect on growth, immune status, and gut health, *J. Anim. Sci.*, 5 : 57–66.

An oil-based formulation of *Isaria fumosorosea* blastospores for management of greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae)

Jae Su Kim,^{a*} Yeon Ho Je,^b Margaret Skinner^c and Bruce L Parker^c

Abstract

BACKGROUND: To date, emphasis has been placed on studying the virulence of *Isaria fumosorosea* conidia rather than the virulence of their blastospores. In the present study, a comparison was made of the efficacy of blastospores of *I. fumosorosea* (SFP-198) versus conidia against greenhouse whitefly (GWF) *Trialeurodes vaporariorum* nymphs and thermotolerance at 50 °C. To improve thermotolerance and potency, the blastospores were suspended in corn oil with a wetting and an insect-filming agent.

RESULTS: Blastospores had similar efficacy against GWF nymphs to conidia in glasshouse conditions but had less thermotolerance than conidia. However, blastospores in corn oil had increased thermotolerance, comparable with that of conidia in corn oil. Application of SFP-198 blastospore oil-based formulation containing isotridecyl alcohol ethoxylated-3EO (TDE-3) and sodium alginate (SA) as adjuvants showed enhanced efficacy (95.7% mortality), compared with the SA-free oil formulation (72.8%) in 10 days.

CONCLUSION: SFP-198 blastospores can be used as an effective biological control agent, given their virulence against GWF, the enhanced thermotolerance in corn oil and the oil-based formulation studies to enhance their efficacy. Blastospores can be easily produced in liquid cultures in less than 4 days, which is significantly shorter than using traditional solid cultures for conidial production.

© 2013 Society of Chemical Industry

Keywords: *Isaria fumosorosea*; blastospores; oil-based formulation; greenhouse whiteflies; thermotolerance

1 INTRODUCTION

Hypocrealean entomopathogenic fungi are widely available biological control agents for managing agriculturally harmful insects.¹ Among biological control agents, fungal pathogens have received more interest because of more effective management of pests with piercing and sucking mouthparts than bacterium-based options such as *Bacillus thuringiensis* and baculovirus.² Several fungal products have been commercialized, such as BotaniGard[®], Mycotrol[®], Vertalec[®], PreFeRal[®] and Priority[®], targeting moths, mites, bugs and whiteflies.³

Most entomopathogenic fungal products have conidia from solid cultures as their active ingredients.^{4,5} The cost of their production is high because of the risk of contamination and the long culturing time required (up to 4 weeks of growth). Moreover, for solid culturing, large spaces with appropriate facilities and skilled technicians are needed for careful handling of culture bags or trays for suitable aeration.⁶ In liquid culturing, the fungi produce blastospores, which are developed from hyphae, and their production is completed in 3–4 days (depending on the culture medium). This short production time reduces the risk of contamination and the cost of production.

The blastospores are easier to produce but less stable, which creates issues for storage and long-term efficacy. Fungal virulence, thermotolerance and storage stability are among the most important factors for successful application of entomopathogenic fungi for pest management.^{7–9} *Isaria fumosorosea* produces blastospores in liquid culture. However, they are less stable than conidia at room temperature. Experiments conducted at the USDA-ARS Bioactive Agents Research Unit in Peoria, Illinois, have shown that blastospores start germinating at a faster rate on the cuticle of silverleaf whiteflies than do conidia. This indicates that the use of blastospores for the development of formulations

* Correspondence to: Jae Su Kim, Department of Agricultural Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561–756, Republic of Korea. E-mail: jskim10@jbnu.ac.kr

a Department of Agricultural Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Chonbuk National University, Jeonju, Republic of Korea

b Department of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea

c Entomology Research Laboratory, University of Vermont, Burlington, VT, USA

would be advantageous over the use of conidia.¹⁰ Blastospores of *I. fumosorosea* are highly infective against a number of insect pests, such as silverleaf whitefly *Bemisia argentifolii* nymphs¹¹ and Mexican bean beetle *Epilachna varivestis* larvae,¹² and often have higher virulence when compared with conidial preparations. It was found that *I. fumosorosea* blastospores were virulent against pecan aphids in the laboratory.¹³ Several different agricultural products have been tested as formulation ingredients, and some have shown promise in maintaining *I. fumosorosea* blastospore viability when the formulations have been freeze dried.¹⁰ A blastospore-based mycoinsecticide of *I. fumosorosea* has been commercialized in European countries under the trade name Preferal[®] wettable granule (WG) by Biobest.⁴ Its conidial product is commercially produced as wettable powder (WP) formulation (Priority[®]) by T. Stanes & Company Ltd in India.⁴ Until now, little interest has been given to the oil-based formulation of *I. fumosorosea* blastospores.

In this work, *I. fumosorosea* SFP-198 blastospores were used to make an oil-based formulation with enhanced insecticidal potency. SFP-198 conidia are efficacious against the pine gall midge (*Thecodiplosis japonensis* Uch. et In.),¹⁴ greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood) and two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch).¹⁵ It was registered as a biopesticide in 2006 by Dongbu Hannong Co., Ltd with the commercial name Bangsiri[®] wettable powder (WP) under the guidelines for the registration of biopesticides in the Republic of Korea. Some studies on virulence and thermotolerance of SFP-198 conidia have been published.^{16–18}

The present study investigated the virulence against greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* nymphs and the thermotolerance of blastospores of *Isaria fumosorosea* SFP-198, compared with SFP-198 conidia. In addition, to improve the thermotolerance, blastospores were suspended in corn oil.¹⁸ For enhanced efficacy, a wetting and an insect-filming agent were added to the corn oil-based blastospore formulation. This research reports, for the first time, the effective use of blastospores of *I. fumosorosea* in oil-based formulation for increasing thermotolerance and efficacy against GWF.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Fungal isolate

I. fumosorosea SFP-198 (KCTC 0499BP) was deposited in the Korean Collection for Type Culture (<http://kctc.kribb.re.kr/>). The isolate was propagated on quarter-strength Sabouraud dextrose agar medium (1/4SDA, pH 6.0) in petri dishes in darkness at 25 ± 1 °C for 14 days.¹⁹

2.2 Solid and liquid cultures

SFP-198 inocula for solid and liquid cultures were prepared by washing the conidia from a plate (90 mm diameter) with 5 mL of 0.2% (0.2 g 100 mL⁻¹) polyoxyethylene sorbitan mono-oleate (Tween 80). The harvested conidial suspension, previously filtered through three layers of sterilized cheesecloth to remove hyphae, was adjusted to 1 × 10⁷ conidia mL⁻¹. For the liquid culture, the conidial suspension was inoculated into quarter-strength Sabouraud dextrose broth (1/4SDB, pH 6.0), ending up with 1 × 10⁵ conidia mL⁻¹ in 200 mL of the broth in a 500 mL baffled flask. It was then incubated at 25 ± 1 °C with shaking (150 rpm) for 3 days. The time for harvesting the culture was determined by the optical density (OD_{600 nm}) of the broth, as measured by a spectrophotometer (UV-260; Shimadzu Co., Tokyo, Japan), and the

number of blastospores was determined using a haemocytometer. In a solid culture, the conidial suspension was inoculated onto 1/4SDA medium at 100 µL plate⁻¹. All plates were incubated at 25 ± 1 °C in darkness for 14 days. Conidia and blastospores were observed under an optical microscope (200×) and a scanning electron microscope, and their sizes were measured using an image capture software (CellSense microscope imaging software, Olympus Inc.).

2.3 Virulence test

The efficacy of SFP-198 blastospores against GWF nymphs in tomatoes was investigated in glasshouse conditions and compared with SFP-198 conidia.²⁰ Fresh five-leaf-stage tomatoes, *Lycopersicon esculentum* M., were placed in a transparent plastic chamber (90 × 30 × 45 cm) with whitefly-proof mesh, and GWF adults were released onto a group of plants at a density of 5 adults plant⁻¹. The adults were taken from a colony maintained in a laboratory. The chambers were held at 25 ± 2 °C and a 16:8 h (L:D) photoperiod with 40 ± 5% relative humidity (RH) in a glasshouse. Tomatoes were considered ready to use for virulence tests when second-instar GWF nymphs were observed (30–40 nymphs plant⁻¹). Before application, the number of second instar per plant was counted, and all adults were removed from the test plants. SFP-198 blastospore and conidial suspensions were adjusted to 1 × 10⁴, 1 × 10⁵ and 1 × 10⁶ propagules mL⁻¹. The suspensions (20 mL plant⁻¹) were sprayed on both sides of the leaves, paying particular attention to the undersides where most GWF nymphs are found. A hand sprayer (Gardena 864, Germany) was used, and applications were done in a spray booth equipped with a turntable (65 cm diameter, 15 rpm) with a constant pressure (12 psi). Following spraying, each plant was covered with a whitefly-proof mesh and transferred to a glasshouse [25 ± 2 °C and 16:8 h (L:D) photoperiod with 40 ± 5% RH]. Plants were arranged in a completely randomized design (CRD). The number of living GWF nymphs per plant was counted 5 and 10 days post-application. GWF nymphs were scored for mortality on the basis of their size compared with the size of nymphs in the non-treated control treatment and the degree of hyphal coverage and/or fungal growth on their exocuticles. Each treatment was replicated 3 times (three plants) within an experimental replicate, and the entire experiment was repeated twice at weekly intervals.

2.4 Thermotolerance assay

The tolerance of blastospores was compared with that of conidia by exposing both to damaging temperatures for increasing periods of time. Water-based suspensions of blastospores and conidia (1 mL each⁻¹) were adjusted to ca 1 × 10⁷ propagules mL⁻¹ and held in a water bath at 50 ± 1 °C for 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min. Additionally, powder forms of blastospores and conidia (0.05 g Eppendorf tube⁻¹), prepared by freeze drying of harvested materials, were placed at 50 ± 1 °C for 60 and 120 min and then suspended in 0.2% Tween 80 solutions (1 × 10⁷ propagules mL⁻¹) for germination tests. Lastly, powder forms of blastospores and conidia (0.05 g Eppendorf tube⁻¹) were suspended in 1 mL of corn oil, and they were placed at 50 ± 1 °C for 60 and 120 min. The same amount of water-based powder suspensions served as controls. A 20 µL sample was taken from each suspension and dropped on 1/4SDA medium for a germination test before (control) and after the thermal stresses. After incubation of all plates at 20 ± 1 °C for 24 h, germination rates (%) were determined by randomly counting the number of germinated and ungerminated propagules among 100

counts microscopically (400×).²¹ Each treatment was replicated 3 times (three samples) within an experimental replicate, and the entire experiment was repeated twice at weekly intervals.

2.5 Wetting time assay

To find an optimal surfactant for enhanced efficacy, the wetting activity of surfactants was compared with that of Tween 80 by measuring the wetting time of GWF nymphs on the solutions. Wetting time was measured by dropping third-instar GWF onto the surface of surfactant solutions (0.05 mL L⁻¹, pH 6) and counting the time it took for a nymph to sink to the bottom of the solution (three replicates treatment⁻¹). All surfactants were provided by Coseal Co. in the Republic of Korea as follows: acetylene diol (Surfynol), secondary alcohol ethoxylated-5EO (SF50), EO/PO/EO block copolymer (RPE8020), sodium lingo sulfonate (SLS), bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate-diethyl sulfosuccinate (EP4P), alcohol ethoxylate-propoxylate (LP209), sodium naphthalene formaldehyde condensate (D425), EO/PO/EO block copolymer (PE62) and isotridecyl alcohol ethoxylated-3EO (TDE-3). Tween 80 and distilled water served as controls. An intact nymph was dropped, ventral side down, onto the solution in an Eppendorf tube (three fresh solutions per treatment) from 2 cm above the surface at room temperature. The entire experiment was repeated twice using different batches of solutions at weekly intervals.

2.6 Oil-based blastospore formulation using wetting and filming agents

Freeze-dried SFP-198 blastospore powder was formulated in an oil-based formulation to enhance insecticidal potency, where TDE-3 as a wetting agent and alginic acid sodium salt as a filming agent were incorporated. Alginic acid sodium salt was used to form a film on the surface of insects, possibly resulting in delayed growth of

the insects and providing enough time for fungal germination and hyphal growth. A formulation without sodium alginate served as a control formulation. A quantity of 5 g of freeze-dried blastospore powder (~2 × 10⁸ blastospores g⁻¹) was added to 70 mL of corn oil, and the mixture was homogenized in a ball miller (Torrance and Sons Co.) at 50 rpm and <10 °C for 30 min. Next, a mixture of emulsifiers (CET-33), 10 mL of ethoxylated castor oil (CO12; CAS No. 61791-12-6; Coseal Co.) and sorbitan monooleate (SMO; CAS No. 1338-43-8; Coseal Co.), in a 7:3 (v/v) ratio, was added to the corn-oil-based blastospore suspension, followed by homogenization for a further 30 min under the same conditions. Then, 5 mL of TDE-3 (CAS No. 24938-91-8; Coseal Co.) and 10 g of alginic acid sodium salt [sodium alginate (SA)] (Sigma-Aldrich, Cat. No. 180947, 15–20 cP at 1 g 100 mL⁻¹ in water) were added to the suspension, and it was homogenized for 30 min, and finally this suspension was designated as SFP-198 blastospore + TDE-3 + SA oil-based formulation. The control formulation without sodium alginate comprised blastospore powder (5 g), corn oil (80 mL), a mixture of CO + SMO (10 mL) and TDE-3 (5 mL) and was designated as SFP-198 blastospore + TDE-3 oil-based formulation. To give the two formulations the same amount of blastospores, 80 mL of corn oil as a carrier was added to the control formulation. The efficacy of the formulations was investigated using the virulence test method described above. SFP-198 blastospore + TDE-3 + SA (or without SA) oil-based formulation was diluted to 1 mL L⁻¹ (1000-fold) with distilled water (pH 6.5). Water treatment served as a control.

2.7 Data analysis

Data on the percentage of living GWF (transformed by arcsine transformation), the germination rates and the wetting time were analyzed by a general linear model (GLM), followed by Tukey's honestly significant difference (HSD). All analyses were conducted using SPSS v.17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, 2009) at an $\alpha = 0.05$ level.

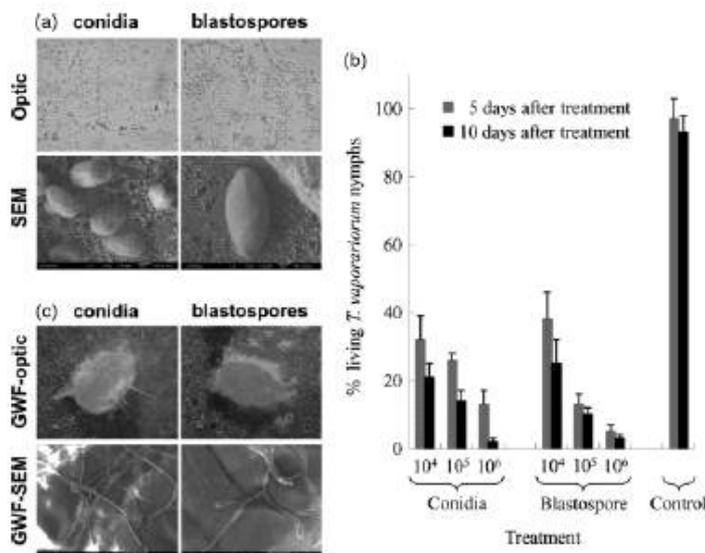


Figure 1. *I. fumosorosea* SFP-198 conidia and blastospores and their virulence against greenhouse whitefly (GWF) *T. vaporariorum* nymphs in glasshouse conditions: (a) morphology of conidia and blastospores under an optical microscope (upper) and a scanning electron microscope (lower); (b) virulence of conidia and blastospores against second-instar *T. vaporariorum* nymphs in glasshouse conditions; (c) mycotized nymphs by conidium and blastospore treatments at 10 days after treatment.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Virulence of conidia and blastospores

SFP-198 conidia were egg shaped and 2–3 μm in size, but the much larger blastospores were 5–10 μm long and elongated in shape (Fig. 1a). Blastospores and conidia had significantly higher insecticidal activity compared with the non-treated control ($F_{6,84} = 938.1$, $P < 0.001$), but no virulence difference between blastospores and conidia was observed (Fig. 1b). At 1×10^6 propagules mL^{-1} of application, blastospore and conidium treatments similarly showed ~80% mortality 10 days after the treatment, compared with ~5% in the non-treated control. Mycotized GWF nymphs were found in both the conidium and blastospore treatments at 10 days, and no significant difference in pathogenesis was observed (Fig. 1c).

Given the above experimental results, not only conidia but also blastospores can be used as an effective biological control agent. Furthermore, fungal culture broth contains various pathogenesis-related components such as mycelia and secondary metabolites responsible for a variety of functions in insect killing,^{22,23} so the use of fungal broth may increase the blastospore-mediated virulence more significantly.

3.2 Thermotolerance of conidia and blastospores

In suspension, conidia were more tolerant at 50 °C for 30 min than blastospores; however, in 60 min, both conidia and blastospores had poor germination ($F_{1,84} = 1456.3$, $P < 0.001$) (Fig. 2a). Similarly, in powder formulations, conidia were more tolerant than blastospores at 50 °C for 2 h ($F_{1,36} = 743.1$, $P < 0.001$) (Fig. 2b); however, blastospores and conidia were similarly more heat

tolerant when suspended in corn oil than when suspended in water ($F_{1,72} = 933.3$, $P < 0.001$) (Fig. 2c).

The different thermotolerances between conidia and blastospores are possibly due to their different conidio- (blastospore) genesis. *I. fumosorosea* conidia are generated by phialidic conidiogenesis and contain metabolites resistant to environmental stresses.²⁴ On the other hand, blastospores are produced by budding from hyphae with weak membranes. However, additional thermotolerance studies using oils can increase the stability of blastospores, as proven in this research. Unsaturated fatty acids, the main components of corn oil, can be involved in enhanced thermotolerance, given the roles of unsaturated fatty acids in protecting cells from thermal stresses.²⁵

Not only thermotolerance but also solar ultraviolet (UV) resistance are among the important requirements for field efficacy of entomopathogenic fungi. The UV-B (280–320 nm) appeared to be the most detrimental part of natural radiation to the conidia of *I. fumosorosea*, *Lecanicillium lecanii* and *B. bassiana*, although UV-A (320–400 nm) was also harmful.^{26–28} *I. fumosorosea* blastospores are possibly more sensitive to UV radiation than conidia, given the previous finding, such as higher UV resistance of *Trichoderma harzianum* conidia than submerged conidia²⁹ and higher thermotolerance of *I. fumosorosea* conidia than blastospores, as shown in this work. However, SFP-198 blastospores might have enhanced UV resistance under this corn-oil-based suspension, where blastospores were filmed with corn oil. Similarly, in the strains of *B. bassiana*, *M. flavoviridae* and *M. anisopliae*, oil suspensions significantly increased conidial UV resistance when exposed to UV-B.^{30–32}

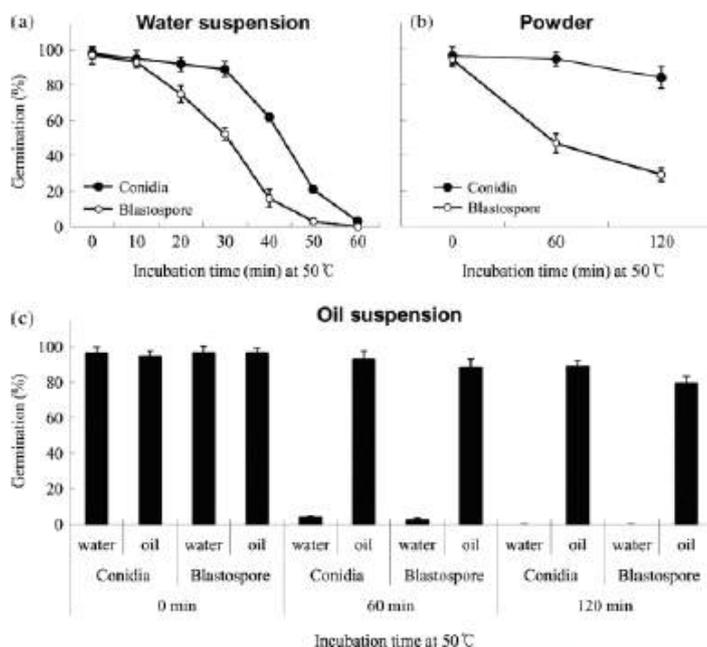


Figure 2. Thermotolerance of SFP-198 conidia and blastospores: (a) germination of conidia and blastospores in suspensions exposed to 50 °C for 60 min; (b) germination of conidia and blastospores in powder exposed to 50 °C for 120 min; (c) germination of conidia and blastospores in corn oil suspension exposed to 50 °C for 120 min.

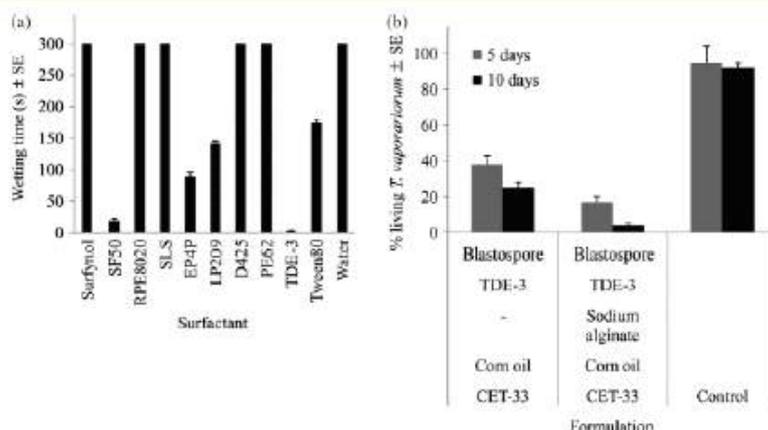


Figure 3. Corn oil-based formulation studies to find an optimal wetting agent and a filming agent. (a) Wetting time (s) of greenhouse whitefly (GWF) *T. vaporariorum* nymphs on surfactant solutions (10 mL L⁻¹, pH 6) as follows: acetylene diol (Surfynol), secondary alcohol ethoxylated-SEO (SF50), EO/PO/EO block copolymer (RPE8020), sodium lauryl sulfonate (SLS), bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate-diethyl sulfosuccinate (EP4P), alcohol ethoxylate-propoxylate (LP209), sodium naphthalene formaldehyde condensate (D425), EO/PO/EO block copolymer (PE62) and isotridecyl alcohol ethoxylated-3EO (TDE-3). (b) Control potency of corn-oil-based blastospore formulations with/without sodium alginate against second-instar *T. vaporariorum* nymphs in glasshouse conditions. CET33: a mixture of emulsifiers (CO + SMO) for corn oil.

3.3 Optimal wetting agent and synergist in oil formulation

GWF nymphs had the shortest wetting time in TDE-3 surfactant solution, followed by SF-50, EP4P, LP209 and Tween 80 ($F_{10,66} = 5318.4$, $P < 0.001$) (Fig. 3a). The improvement by TDE-3 may be explained by the lower hydrophile–lipophile balance (HLB) value – representing a surfactant activity – of TDE-3 (HLB = 9.0) compared with Tween 80 (HLB = 15.0); a lower HLB value means greater lipophilicity and penetrability into lipid compounds, the main components of the outermost part of insect cuticles. Consequently, TDE-3 might serve as a cuticle destroyer when fungal penetration begins. Recently, in the application of the supernatant of *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) SFB-205 (KCCM 10892P), it was found that ethoxylated (3 mol) isotridecyl alcohol (TDE-3) (CAS No. 24938-91-8) as a surfactant was more powerful than Tween 80 in controlling cotton aphids *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) and could be used in an oil-based formulation.²

The SFP-198 blastospore + TDE-3 + SA oil-based formulation had higher control potency than the SFP-198 blastospore + TDE-3 oil-based formulation without sodium alginate (SA) ($F_{2,36} = 1745.7$, $P < 0.001$) (Fig. 3b). The difference in control potency between the two formulations might have resulted from the different levels of viscosities. The formulation containing SA had a viscosity of ~1.8 cP, but the SA-free formulation had a viscosity of ~1.1 cP, compared with the 1.0 cP of water. Filming of GWF nymphs with SA solution possibly delayed the growth of the insects and provided enough time for the fungus effectively to penetrate the cuticle. Additionally, the SA-mediated filming might have its own insecticidal activity, which probably increased the control potency of SFP-198 blastospores. In the application of entomopathogenic fungal pesticides, SA has been mainly used as a pelleting carrier for *B. bassiana* mycelia or conidia to increase viability.^{33,34} Recently, chitin was added to an SA pellet containing *B. bassiana* conidia to increase its virulence.³⁵ Preliminarily, not only sodium alginate but also xanthan gum, chitosan and several kinds of waxy emulsion were tested to increase the viscosity of the diluted oil-based formulation, but only sodium alginate was effective. More effective

filming agents may increase the control potency of blastospores and other biological pest control agents.

This work suggests that blastospores can be alternatively used as effective biological controls given their virulence against GWF, the enhanced thermotolerance in corn oil suspensions and further increased insecticidal activity by the oil-based formulation studies. Blastospores can be easily produced in liquid cultures, taking less than 4 days, significantly shorter than solid cultures for conidial production. The short production time provides advantages in controlling contamination and reducing production costs.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Dr Bong Jin Chung and Mr Young Kwon Kim (Dongbu Hannong Co., Republic of Korea) for their helpful comments and assistance. This research was supported by the Bioindustry Technology Development Programme, Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

REFERENCES

- Roberts DW and Hajek AE, Entomopathogenic fungi as bioinsecticides, in *Frontiers of Industrial Mycology*, ed. by Leatham GF. Chapman and Hall, New York, NY, pp. 114–159 (1992).
- Kim JS, Roh JY, Choi JY, Wang Y, Shim HJ and Je YH, Correlation of the aphicidal activity of *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with enzymes. *Mycol Res* **114**:120–128 (2010).
- Biopesticide Active Ingredient Fact Sheets*. [Online]. Environmental Protection Agency. Available: <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/> [13 May 2012].
- Faria MR and Wraight SP, Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol Control* **43**:237–256 (2007).
- Li Z, Alves SB, Roberts DW, Fan M, Delalibera I, Jr, Tang J et al, Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. *Biocontrol Sci Technol* **20**:117–136 (2010).
- Jackson MA, Payne AR and Odelson DA, Liquid-culture production of blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus* using portable fermentation equipment. *J Ind Microbiol Biotechnol* **31**:149–154 (2004).

- 7 Moore D, Bateman RP, Carey M and Prior C, Long-term storage of *Metarhizium flavoviride* conidia in oil formulations for the control of locusts and grasshoppers. *Biocontrol Sci Technol* **5**:193–199 (1995).
- 8 Devi KU, Sridevi V, Murali-Mohan CH and Padmavathi J, Effect of high temperature and water stress on *in vitro* germination and growth in isolate of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. *J Invertebr Pathol* **88**:181–189 (2005).
- 9 Fernandes EKK, Rangel DEN, Moraes AML, Bittencourt VREP and Roberts DW, Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. *J Invertebr Pathol* **98**:69–78 (2007).
- 10 Vega FE, Jackson MA and McGuire MR, Germination of conidia and blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* on the cuticle of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Mycopathology* **147**:33–35 (1999).
- 11 Poprawski TJ and Jackson MA, Laboratory activity of blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* on *Bemisia argentifolii* nymphs. *Arthropod Manag Tests Entomol Soc Am* **24**:399–400 (1999).
- 12 Behle RW, Garcia-Gutierrez C, Tamez-Guerra P, McGuire MR and Jackson MA, Pathogenicity of blastospores and conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* against larvae of the Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis* Mulsant. *SWest Entomol* **31**:289–289 (2006).
- 13 Shapiro-Ilan DI, Cottrell TE, Jackson MA and Wood BW, Virulence of Hypocreales fungi to pecan aphids (Hemiptera: Aphididae) in the laboratory. *J Invertebr Pathol* **99**:312–317 (2008).
- 14 Lee IK, Shim HJ, Woo SD, Je YH, Yang Z and Kang SK, Variations in growth and pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* pathogenic to the pine gall midge, *Thecodiplosis japonensis*. *J Microbiol Biotechnol* **27**:415–418 (1997).
- 15 Kim JS, Roh JY, Choi JY, Shin SC, Jeon MJ and Je YH, Insecticidal activity of *Paecilomyces fumosoroseus* SFP-198 as a multi-targeting biological control agent against the greenhouse whitefly and the two-spotted spider mite. *Int J Ind Entomol* **17**:181–187 (2008).
- 16 Kim JS, Je YH and Choi JY, Complementary effect of Phloxine B on the insecticidal efficacy of *Isaria fumosorosea* SFP-198 wettable powder against greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* West. *Pest Manag Sci* **66**:1337–1343 (2010).
- 17 Kim JS, Je YH and Roh JY, Production of thermotolerant entomopathogenic *Isaria fumosorosea* SFP-198 conidia in corn–corn oil mixture. *J Ind Microbiol Biotechnol* **37**:419–423 (2010).
- 18 Kim JS, Je YH, Woo EO and Park JS, Persistence of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) SFP-198 conidia in corn oil-based suspension. *Mycopathology* **171**:67–75 (2011).
- 19 Humber RA, Fungi: preservation of cultures, in *Manual of Techniques in Insect Pathology*, ed. by Lacey LA, Academic Press, San Diego, CA, pp. 269–279 (1997).
- 20 Butt TM and Goettel MS, Bioassay of entomopathogenic fungi, in *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*, ed. by Navon A and Ascher KRS, CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK, pp. 141–196 (2000).
- 21 Avery PB, Faull J and Simmonds MSJ, Effect of different photoperiods on the growth, infectivity and colonization of *Trinidadian* strains of *Paecilomyces fumosoroseus* on the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, using a glass slide bioassay. *J Insect Sci* **4**:38–48 (2004).
- 22 St Leger RJ and Screen SE, Prospects for strain improvement of fungal pathogens of insects and weeds, in *Fungi as Biocontrol Agents*, ed. by Butt TM, Jackson C and Magan N. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK, pp. 219–237 (2001).
- 23 Campos RA, Arruda W, Boldo JT, Silvia MV, Barros NM, Azedevo JL, et al, *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. *Curr Microbiol* **50**:257–261 (2005).
- 24 Hallsworth JE and Magan N, Culture age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Appl Environ Microbiol* **62**:2435–2442 (1996).
- 25 Rangel DEN, Anderson AJ and Roberts DW, Evaluating physical and nutritional stress during mycelia growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. *Mycol Res* **112**:1362–1372 (2008).
- 26 Fargues J, Rougier M, Goujet R, Smits N, Coustere C and Itier B, Inactivation of conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by near-ultraviolet (UVB and UVA) and visible radiation. *J Invertebr Pathol* **69**:70–78 (1997).
- 27 Braga GUL, Rangel DEN, Flint SD, Miller CD, Anderson AJ and Roberts DW, Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. *Mycology* **94**:912–920 (2002).
- 28 Shang Y, Duan Z, Huang W, Gao Q and Wang C, Improving UV resistance and virulence of *Beauveria bassiana* by genetic engineering with an exogenous tyrosinase gene. *J Invertebr Pathol* **109**:105–109 (2012).
- 29 Munoz GA, Agosin E, Cotoras M, Sanmartin R and Volpe D, Comparison of aerial and submerged spore properties for *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol Lett* **125**:63–69 (1995).
- 30 Inglis GD, Goettel MS and Johnson DL, Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Biol Control* **5**:581–590 (1995).
- 31 Moore D, Bridge PD, Higgins PM, Bateman RP and Prior C, Ultraviolet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. *Ann Appl Biol* **122**:605–616 (1993).
- 32 Alves RT, Bateman RP, Prior C and Leather SR, Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. *Crop Prot* **17**:675–679 (1998).
- 33 Knudsen G, Johnson RJB and Eschen DJ, Alginate pellet formulation of a *Beauveria bassiana* (Fungi: Hypomycetes) isolate pathogenic to cereal aphids. *J Econ Entomol* **83**:2225–2248 (1990).
- 34 Mola FL and Afkari R, Effects of different vegetable oil formulations on temperature tolerance and storage duration of *Beauveria bassiana* conidia. *Afr J Microbiol Res* **6**:4707–4711 (2012).
- 35 Gerding-González MA, France A, Sepulveda M and Campos J, Use of chitin to improve a *Beauveria bassiana* alginate-pellet formulation. *Biocontrol Sci Technol* **17**:105–110 (2007).

A novel approach: *Beauveria bassiana* granules applied to nursery soil for management of rice water weevils in paddy fields

Jae Su Kim,^{a*} Se Jin Lee,^a Margaret Skinner^b and Bruce L Parker^{a,b}

Abstract

BACKGROUND: Spraying of entomopathogenic fungi formulated as wettable powders and suspension concentrates based on oils or water has been used for the management of crop pests. However, the use of fungal granules to control paddy field pests has not been fully explored. Herein, several *Beauveria bassiana* isolates (ERL1170, ERL1578 and ERL836) were produced as granules using a millet-based solid culture. The granules were applied to the rice nursery 3 days before transplanting, and their control efficacy against rice water weevils was determined in paddy fields.

RESULTS: The solid cultures produced $\sim 1 \times 10^8$ conidia g^{-1} of millet grains 10 days after the inoculation. The granules were applied to the soil in the rice nursery 3 days before the rice seedlings were transplanted in the paddy fields. Rice in plots with granules of ERL1578 had 17.3% leaf damage (74% control efficacy) 14 days post-application, whereas rice plants in the untreated control had 66.5% damage. Rice plants treated in the nursery with ERL1170 and ERL836 had 52–54% damage. In the rice plots previously treated with ERL1578, the smallest numbers of larvae and adults were observed 38 days post-application. In laboratory conditions, ERL 1578-treated larvae turned pink and were covered with mycelial mass.

CONCLUSION: Applications of millet-based *B. bassiana* granules on rice nursery soil can be an effective and efficient biological control strategy for the management of rice water weevils. This method can be relatively inexpensive and requires less labor than practices involving the spraying of fungi directly on rice in paddy fields.

© 2014 Society of Chemical Industry

Keywords: entomopathogenic fungi; *Beauveria bassiana*; millet; rice water weevil

1 INTRODUCTION

Entomopathogenic fungi have potential for controlling agricultural pests worldwide.¹ Several species have been isolated and proven to be virulent to insects in the orders Lepidoptera, Coleoptera, Heteroptera and Diptera. *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* and *Lecanicillium lecanii* are among the most virulent species.² They can be used to control insects with chewing or piercing/sucking mouthparts. This is one of the significant advantages of their use.^{3,4} It is difficult to control heteropteran pests with piercing and sucking mouthparts using entomopathogenic bacteria and viruses.⁵

The insect-killing fungi have a broader spectrum of efficacy than bacteria and viruses, but practical application strategies must be developed for successful pest management. In the laboratory, fungal treatments show high virulence in a short time owing to favorable abiotic conditions such as high humidity and suitable temperatures.^{6,7} Efficacy in the field is often different from that obtained in the laboratory.^{8–10} The difference between biological virulence and ecological virulence of entomopathogenic fungi must be considered. In the field, fungi may encounter low humidity, high temperatures or other negative factors.¹¹ Thus, to achieve high control performance, fungi should be applied to target pests on the basis of the ecological environment.

Using entomopathogenic fungi in paddy fields is a viable approach to management. The fields are usually full of water,

which facilitates conidial germination and speeds fungus penetration into paddy field pests. Paddy field water and soil are nutritious and can facilitate fungal proliferation and disposal to other ecological areas. There are two application methods for management of paddy field pests. One is to apply wettable powder (WP), suspension concentrates based on oils (or water) (SC) or granular (GR) formulations to the surface of rice fields after transplanting. The other is to apply granular formulations to nursery soil before transplanting the rice seedlings. The latter may require less labor than the former.

In paddy fields, rice water weevil, *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel, is among the major pests and severely reduces annual rice production.¹² Overwintered weevils lay their eggs in leaf sheaths below the waterline, and the larvae feed on the roots of developing rice plants, resulting in economic yield reduction. This root pruning reduces the number of tillers and may interfere

* Correspondence to: Jae Su Kim, Department of Agricultural Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Republic of Korea, E-mail: jskim10@jbn.uac.kr

a Department of Agricultural Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Chonbuk National University, Jeonju, Republic of Korea

b Entomology Research Laboratory, University of Vermont, Burlington, VT, USA

with nutrient uptake by plants. Larvae pupate in cocoons that are covered with a compact layer of mud and are attached to rice roots. Adult weevils feed on the upper surface of rice leaves, making narrow longitudinal scars along the leaf midrib. They leave paddy fields in late summer. About 30–35 days are required to develop from egg to adult.

Most entomopathogenic fungi have been applied to agricultural pests using a wettable powder or suspension concentrate spray. Soil applications of fungal granules in paddy fields have not been fully explored, although the application has been investigated in other crop systems.¹³ Herein, *B. bassiana* granules (GR) were produced using a millet-based solid culture, and their efficacy against rice water weevils was determined. The granules were applied to soil in the rice nursery before the seedlings were transplanted into paddy fields. The pathogenicity of this fungus against rice water weevils was confirmed in laboratory conditions.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Fungal isolates

B. bassiana isolates (ERL1170, ERL1578 and ERL836) were obtained from the Entomology Research Laboratory Worldwide Collection of Entomopathogenic Fungi, Burlington, VT, and reidentified by sequencing ITS1 and ITS4 regions. The isolates were grown on quarter-strength Sabouraud dextrose agar (1/4SDA) (pH 6) in darkness at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ for 10 days.¹⁴

2.2 Millet-based solid culture

A solid-substrate culture method was used to produce mycotized millet grains.^{15,16} To prepare inocula for the solid cultures, a conidial suspension from each isolate was added to quarter-strength Sabouraud dextrose broth (1/4SDB). The initial conidial density of the broth was adjusted to 1×10^7 conidia mL^{-1} in a 250 mL flask. Flasks were held on a rotary shaker (150 rpm) at $24 \pm 2^\circ\text{C}$ for 3 days. Millet (*Panicum miliaceum* L.) grains (500 g) were placed in a polyvinyl bag, soaked in 250 mL of water containing citric acid (0.4 mL L^{-1}) and held at 95°C for 2 h. The bag was then autoclaved at 121°C for 15 min and cooled to ambient temperature. The liquid culture broth (5 mL) was introduced into the bag and thoroughly mixed. All bags were held for 10 days at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and a 16:8 h L:D photoperiod. After incubation, the bags were opened, and the contents were dried at ambient temperature for ca 3 days until a moisture content of <5% was reached, which was determined using a moisture analyzer (Sartorius-Omnimark, Arvada, CO). All batches of mycotized millet grains were assessed for conidial concentration and germination. Conidial concentration was determined with a Neubauer hemocytometer, from which the rate of conidia g^{-1} was quantified. To determine the rate of germination for each isolate, three plates of 1/4SDA were inoculated with 0.1 mL of the conidial suspension (1×10^7 conidia mL^{-1}) plate⁻¹ and held in the dark at 25°C for 24 h. From each plate, 400 conidia were inspected, and those with germination tubes longer than their width were considered to have germinated.^{17,18}

2.3 Field trials

Rice (var. Chuchung) seeds were soaked in prochloraz (CAS number 68444-81-5) solution (2000x dilution of Spotak[®] 25% EC; Kyoung-Nong Co., Seoul, Republic of Korea) for 24 h at room temperature, transferred to fresh water and washed daily for 5 days. Germinated seeds were placed on rice nursery soil (Dongbu Farm Hannong Co., Seoul, Republic of Korea) at ca 250 g tray⁻¹

($58 \times 28 \times 2 \text{ cm}^3$) and kept at 30°C for 3 days to initiate the early growth stage of rice. The nursery soil had peatmoss (13–22%), cocopeat (10–15%), vermiculite (40–50%), diatomite (5–20%), zeolite (10–15%) and surfactants (1%) on the label. Then plants were held in a glasshouse at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and $40 \pm 15\%$ relative humidity (RH) for 15 days before transplanting to paddy fields. No fungicides were applied to control possible rice diseases, given the mode of action of entomopathogenic fungi in field conditions. Three days before transplanting (24 May; treatment), ERL1170, ERL1578 and ERL836 GRs were evenly distributed by hand to the rice nursery soil at 50 g tray⁻¹. A batch of isolate GR was applied to three trays, which was replicated 3 times (nine trays per isolate GR). Untreated treatment served as a control. Rice was transplanted using a rice-planting machine (Dong Yang Co., Iksan, Republic of Korea) [27 May; 3 days after treatment (DAT)]. In the fields, each isolate treatment had three replicates (blocks), where one block ($10 \times 5 \text{ m}^2$) received three trays in the transplanting. All blocks were separated using a rectangular plastic plate (height 0.3 m, length 30 m) to prevent the movement of isolate granules and rice water weevils from one area to the next. The percentage leaf damage was examined 14 days post-application (7 June; 14 DAT) by counting the number of total leaves per rice plant (N_0) and the number of damaged leaves (N_d) using the following formula: % damage = $(N_d/N_0) \times 100\%$. In each replication (block), 20 rice plants were randomly investigated. Thirty-eight days after the application (1 July; 38 DAT), the numbers of adults on leaves and larvae on roots were counted in each replication (block). For larval counting, a rice plant was uprooted and washed with tap water in a plastic box ($30 \times 45 \times 25 \text{ cm}^3$), and then larvae in the water were collected by scooping them with a spoon. This field trial was conducted in two different paddy fields (field I: $37^\circ 11' 11.11'' \text{ N}$, $126^\circ 58' 37.22'' \text{ E}$; field II: $37^\circ 10' 54.99'' \text{ N}$, $126^\circ 58' 41.73'' \text{ E}$) at the same dates in Suwon City, South Korea.

2.4 Pathogenicity assay

To investigate the pathogenicity of *B. bassiana* isolates against rice water weevils, the insects were exposed to conidia in petri dishes.⁵ Ten third instars were placed in a 35 mm diameter petri dish containing ~1 g of freshly cut rice roots in 5 mL of sterilized distilled water. A fungal conidial suspension (1×10^6 conidia mL^{-1}) was pipetted into the dish at $100 \mu\text{L dish}^{-1}$ (1×10^5 conidia dish^{-1}), and the dish was shaken for 10 s for even distribution. Dishes without fungal treatments served as an untreated control. All dishes were kept at room temperature (ca 25°C) for 3 days. To confirm the cause of mortality, dead larvae were transferred to moisturized filter paper (1 mL of distilled water per Whatman[®] filter paper) in a petri dish (35 mm diameter). For the control, live larvae from the untreated control treatment were transferred to the same filter paper. Fungal pathogenicity against the larvae was determined 2 and 6 days after the treatment, based on the color of the insect body and the degree of hyphal coverage and/or fungal growth on their exocuticles, in comparison with those in the control treatment.

2.5 Data analysis

Data on conidial productivity, percentage leaf damage and numbers of adults and larvae were analyzed using a general linear model (GLM) and ANOVA, followed by Tukey's honestly significant difference (HSD) and orthogonal contrast analysis for multiple comparisons. All analyses were conducted using SPSS v.17.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, 2009) at the $\alpha = 0.05$ level of significance.

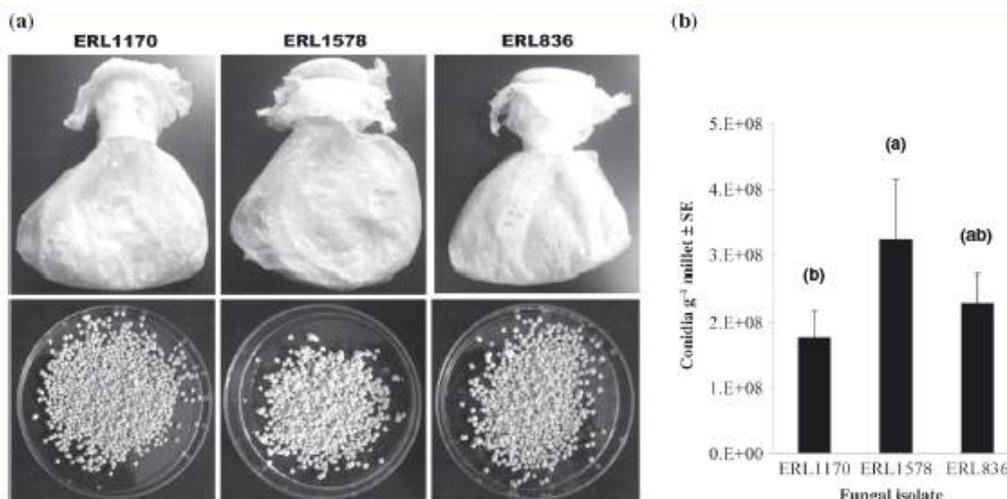


Figure 1. Production of *B. bassiana* granules (GR) in a millet-based solid culture. (a) Solid cultures of ERL isolates on millets in a polyethylene bag and mycotized millet grains; (b) productivity of conidia 10 days after culturing at room temperature. Bars with the same lowercase letter are not significantly different according to Tukey's HSD ($P > 0.05$).

3 RESULTS

3.1 Production of granules

In the millet-based solid cultures, after 10 days at room temperature the millet grains were fully mycotized without being severely clumped together (Fig. 1). ERL1170, ERL1578 and ERL836 produced 1.8×10^8 , 3.2×10^8 and 2.3×10^8 conidia g⁻¹ grains respectively. Conidia had ~98% viability in the germination tests. Numerical differences in conidial production among the isolates were observed, but these differences were not significantly large ($F_{2,18} = 17.3$, $P < 0.001$). Most mycotized grains (>95%) were not severely clumped and were easily dried at room temperature (~25 °C) for 2 days, thus having <5% moisture content.

3.2 Leaf damage and efficacy

When isolates were applied in the nursery, mycelial growth on the soil was observed in all cases (Fig. 2). However, in the paddy fields only soil with ERL1578 showed high efficacy against rice water weevils (Figs 3 and 4). Mycelial mass was observed on the surface of nursery soil at the time of transplanting. After transplanting, some granules floated on the surface of the water in the paddy fields (not flooded), but most were submerged 1 day later. When leaf damage was evaluated 14 days post-application, rice in the ERL1578 treatment had 17% leaf damage (74% control efficacy by Abbott's formula), as opposed to 67% damage in the untreated control. Rice in ERL1170 and ERL836 had 52–54% leaf damage. Efficacy in the ERL1578 treatment was significantly higher than efficacy in the other treatments ($F_{3,16} = 97.1$, $P < 0.001$), but there was no significant difference among ERL1170, ERL836 and the untreated control ($F_{2,12} = 1.19$, $P > 0.05$). Rice weevil counts 38 days post-application showed that soil with ERL1578 had the lowest numbers of adults and larvae compared with the other treatments (Fig. 4). The smallest number of adults (5.1 adults per 5 m²) was found in the ERL1578 treatment ($F_{3,16} = 377.3$, $P < 0.001$). The untreated control had 82.3 adults per 5 m², followed by 16.3 adults per 5 m² (ERL1170) and 26.7 adults per 5 m² (ERL836). ERL1578 treatment had 25.7 larvae per 5 m², and ERL1170, ERL836 and the

control showed 50.3, 51.0 and 84.5 larvae per 5 m² respectively. ERL1578 treatment had significantly smaller populations than the other fungal treatments ($F_{3,16} = 231.5$, $P < 0.001$). During the tests, in Suwon the temperature gradually increased from 19.6 to 26.1 °C (mean = 22.9 ± 2.5 °C), and relative humidity was $74.0 \pm 10.4\%$.

3.3 Observation of pathogenicity

Pathogenicity of ERL1578 against the larvae was observed 2 days after the treatment, and the infected larvae were fully mycotized after 6 days (Fig. 5). Untreated larvae were normal, white in color and actively moved in the petri dishes, where rice roots were placed in the water as feed. However, most of the fungus-treated larvae were dead 2 days after treatment (ERL1578 83.3% mortality, control 3.3% mortality), and their bodies gradually turned pink (Fig. 5). When the dead larvae were transferred to moisturized filter paper in the petri dish, they were soon covered with a mycelial mass. Untreated larvae were not mycotized on the moisturized filter paper.

4 DISCUSSION

The application of ERL1578 fungal granules on rice nursery soil efficiently controlled the populations of rice water weevils in the paddy fields. The fungi grew on the surface of nursery soil. When the fungal grains were applied to nursery soil, the conidia encountered high-humidity conditions from the watering and germinated rapidly, and extensive mycelial masses formed. The fungal mycelial mass on the nursery soil might have resulted from nutrients in the millet and/or from the soil, including nitrogen, phosphorous, potassium and others.¹⁹ Once the young rice plants were transplanted to the paddy field, fungi on the nursery soil and rice plants could be exposed to contact with rice water weevils, followed by their infection and death of weevils, although colonization of the applied fungi was not fully investigated in the nursery soil for paddy fields. However, colonization might be possible given the successful colonization of *B. bassiana* in the

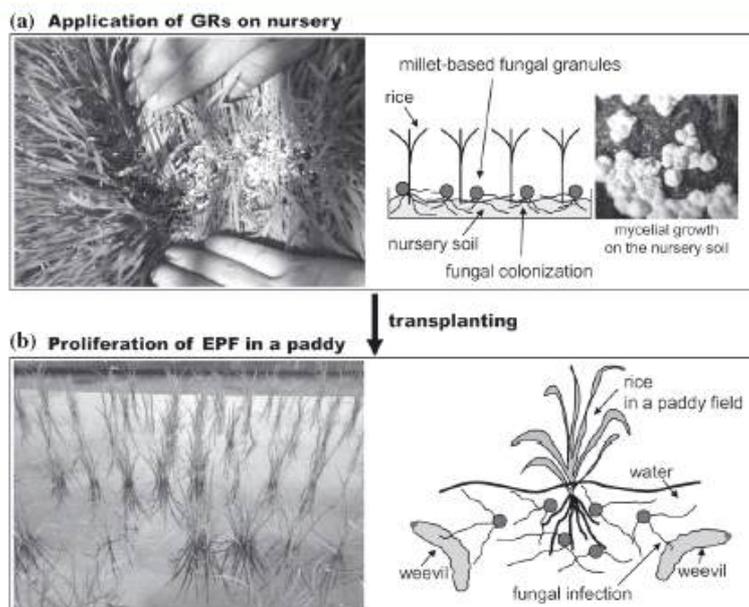


Figure 2. Application of mycotized millet granules (GR) to control rice water weevils in a paddy field. (a) Application of GR on rice nursery soil; (b) proliferation of entomopathogenic fungi (EPF) in a paddy field for controlling the weevils.

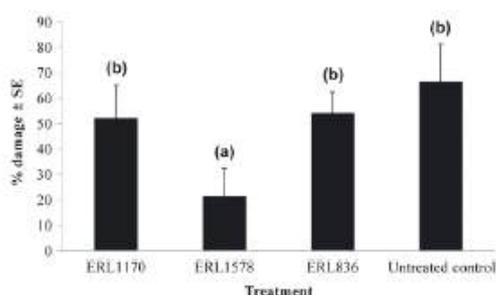


Figure 3. Percentage of rice leaf damage from rice water weevils in a paddy field 14 days after treatment with 50 g of *B. bassiana* per tray (30 x 60 cm²). Bars with the same lowercase letter are not significantly different according to Tukey's HSD ($P > 0.05$).

nursery soil of marigold in a horticulture system.²⁰ This application strategy can reduce labor costs by first treating much smaller areas in the nursery soil, rather than an application in large paddy fields.

Fungal control efficacy often depends on abiotic environmental factors. One of the important abiotic factors for virulence is the relative humidity around the applied fungal granules. In this method, the granules were applied to nursery soil, and after 3 days they were transferred to paddy fields, where the fungi were possibly in contact with water for most of the time. Thus, the application of fungal granules on nursery soil may have less variation in control efficacy compared with sprays on leaves. In the present work, the experiment was repeated 2 times, given the possible influence of the environment. Lastly, the different control efficacy of the three isolates can be explained by the different virulence levels of the

isolates (e.g. activities of chitinolytic enzymes, colonization potential on soil, survival rate, etc.), but this needs to be investigated in subsequent studies.

Additional studies to detect more virulent fungal species or isolates for successful industrialization should be made. The isolates used in this research were from orchard fruits or horticultural soils. New isolates from paddy fields or rice water weevils may result in an increase in control efficacy. Entomopathogenic fungi from paddy fields might be more efficacious owing to adaptation to their native environment, which needs to be clarified in future work. Factors limiting the use of non-native fungal isolates in paddy fields include competition with paddy-field-dwelling microorganisms relevant to nutrition and habitat and a possible negative interaction between the rice plant and the fungus. It is hypothesized that *Metarhizium*, *Isaria*, *Nomuraea* and *Lecanicillium* may have higher virulence than *Beauveria* to rice water weevils.

The timing of a fungal application in the nursery should be investigated, as it may impact upon control efficacy against weevils. Herein the treatments were made 3 days prior to transplanting. This was arbitrary on the authors' part. Rather than a fungal application at transplanting time, an application prior to transplanting may have more advantages. Fungi can be fully grown to cover the rice nursery soil until transplanting and efficiently control paddy field pests. A much earlier application may increase the fungal control efficacy. However, during transplanting, some proliferated mycelial mass in the nursery soil might have been stuck into the paddy field soil, and thus fungi under the paddy field soil possibly did not work well in infecting the weevils. Paddy field soil is clay loam, and suitable aeration as in sandy loam soil cannot be expected.²¹ Fungi that remain in the water of the paddy field could be actively serving as virulent agents. Fungal colonization in the paddy should be precisely clarified in subsequent studies.

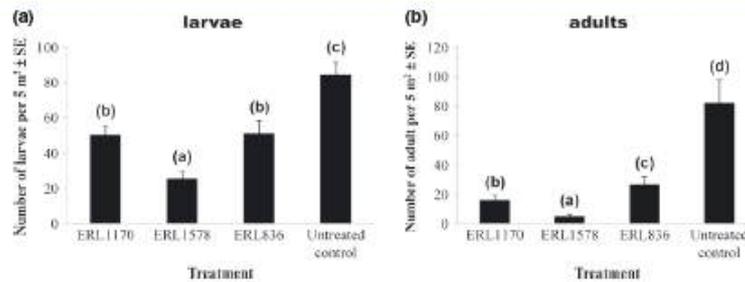


Figure 4. Numbers of rice water weevil larvae (a) and adults (b) in paddy field conditions 38 days after treatment with 50 g of *B. bassiana* GR per tray (30 × 60 cm²). Bars with the same lowercase letter are not significantly different according to Tukey's HSD (*P* > 0.05).



Figure 5. Dead rice water weevils 3 and 6 days after the treatment of *B. bassiana* ERL1578 in laboratory conditions at room temperature.

After transplanting, some fungal granules floated on the surface of the water, although they sank in 2–3 days. Submerging the granules might not reduce fungal activity because of the drastic reduction in oxygen available in water as opposed to air. Mycotized millet granules have a lower specific gravity than water. Conidia in the floating granules may have little chance to come into contact with the water, which induces fungal germination. To reach high levels of fungal colonization in the paddy field, all of the floating granules should be submerged in water, resulting in faster proliferation. A surfactant can be used to submerge floating granules.^{22,23} Technically, fungal granules can be incorporated with a powder type of surfactant in the production process. Alternatively, a surfactant solution can be sprayed on the rice nursery soil before transplanting. Further, the use of a surfactant on the rice nursery soil can reduce the hydrophobicity of fungal granules, which is one of the limitations in the expression of virulence. Essentially, fungal conidia are hydrophobic, and this feature is significantly involved in the cultural conditions.⁸ Fungal growth on the nursery soil can be more actively advanced by reducing hydrophobicity.

Once the fungi colonize the paddy fields (the colonization should be fully investigated in further work), rice water weevil larvae, pupae and emerged adults can be easily exposed to infection, which is followed by a population reduction. Proliferated fungi can also colonize the lower parts of stems, which are very close to the water surface. Thus, other paddy field pests, such as small brown planthopper nymphs and adults, could become infected during feeding. However, the movement of planthoppers on the surface of paddy field water is unknown, as is the virulence of the isolates used.

In the present work, no fungicides were applied to the soil or rice plants, given that activity of the applied fungal granules might be inhibited by fungicides, apart from the prochloraz used for seed decontamination. It was found that prochloraz had no fungicidal activity against *B. bassiana* isolates in the preliminary test. In normal farming, where fungicides are commonly used, the control efficacy of ERL1578 may be lower than indicated by the present field data. To investigate this issue in more detail, the authors tested 40 commercially available fungicides to see whether they could inhibit conidial germination and hyphal growth of ERL1578, although this laboratory assay does not always correlate with efficacy in the field. It was found from the assay that only fluazinam and mancozeb inhibited germination and hyphal growth of ERL1578. Experiments on a combination of ERL1575 and chemical fungicides would be the next research to be done.

To date, chemical pesticides and plant extracts have been used to manage paddy field pests, including rice water weevils, but the occurrence of insect resistance is becoming more prevalent.²⁴ Integrated pest management strategies require safe and environmentally sound biological control agents.^{25,26} Given the present pest management environment, this fungal application method is a potential solution to overcome these problems. Finding isolates with higher virulence and colonization ability can increase the potential for industrialization, and original patent rights can be obtained in the pesticide market.

In conclusion, mycotized *B. bassiana* millet granules can be applied on rice nursery soil for effective management of pests such as rice water weevils in paddy fields. This strategy may be more efficient and cost effective than a fungal spray in paddy fields.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Drs Myoung Eul Jai and Shin Taek Soo (Dongbu Farm Hannong Co., Republic of Korea) for their assistance in field trials, and to Jong Chul Kim, Im Chae Hoon, Lee Sang Sik, Seo Sung Duck and Jeong Seon Yu for their technical assistance. This research was supported by the Bio-industry Technology Development Programme, Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea (Project No. 312026-03-1-CG000).

REFERENCES

- 1 Roberts DW and Hajek AE, Entomopathogenic fungi as bioinsecticides, in *Frontiers of Industrial Mycology*, ed. by Leatham GF. Chapman and Hall, New York, NY, pp. 114–159 (1992).
- 2 Faria MR and Wraight SP, Myco-insecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol Control* **43**:237–256 (2007).

- 3 Li Z, Alves SB, Roberts DW, Fan M, Delalibera Jr, Tang J *et al*, Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. *Biocontrol Sci Technol* **20**:117–136 (2010).
- 4 Behle RW, Garcia-Gutierrez C, Tamez-Guerra P, McGuire MR and Jackson MA, Pathogenicity of blastospores and conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* against larvae of the Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis* Mulsant. *South W Entomol* **31**:289–299 (2006).
- 5 Butt TM and Goettel MS, Bioassay of entomopathogenic fungi, in *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*, ed. by Navon A and Ascher KRS. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK, pp. 141–196 (2000).
- 6 Devi KU, Sridevi V, Murali-Mohan CH and Padmavathi J, Effect of high temperature and water stress on *in vitro* germination and growth in isolate of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. *J Invertebr Pathol* **88**:181–189 (2005).
- 7 Fernandes EKK, Rangel DEN, Moraes AML, Bittencourt VREP and Roberts DW, Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. *J Invertebr Pathol* **98**:69–78 (2007).
- 8 Rangel DEN, Anderson AJ and Roberts DW, Evaluating physical and nutritional stress during mycelia growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. *Mycol Res* **112**:1362–1372 (2008).
- 9 Shapiro-Ilan DI, Cottrell TE, Jackson MA and Wood BW, Virulence of *Hypocreales* fungi to pecan aphids (Hemiptera: Aphididae) in the laboratory. *J Invertebr Pathol* **99**:312–317 (2008).
- 10 Shang Y, Duan Z, Huang W, Gao Q and Wang C, Improving UV resistance and virulence of *Beauveria bassiana* by genetic engineering with an exogenous tyrosinase gene. *J Invertebr Pathol* **109**:105–109 (2012).
- 11 Fargues J, Rougier M, Goujet R, Smits N, Coustere C and Itier B, Inactivation of conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by near-ultraviolet (UVB and UVA) and visible radiation. *J Invertebr Pathol* **69**:70–78 (1997).
- 12 Chen H, Chen Z and Zhou Y, Rice water weevil (Coleoptera: Curculionidae) in mainland China: invasion, spread and control. *Crop Prot* **24**:695–702 (2005).
- 13 Skinner M, Gouli S, Frank CE, Parker BL and Kim JS, Management of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) with granular formulations of entomopathogenic fungi. *Biol Control* **63**:246–252 (2012).
- 14 Humber RA, Fungi: preservation of cultures, in *Manual of Techniques in Insect Pathology*, ed. by Lacey LA. Academic Press, San Diego, CA, pp. 269–279 (1997).
- 15 Li H and Feng MG, Broomcorn millet grain cultures of the entomophthoralean fungus *Zoopthora radicans*: sporulation capacity and infectivity to *Plutella xylostella*. *Mycol Res* **109**:319–325 (2005).
- 16 Bartlett MC and Jaronski ST, Mass production of entomopathogenic fungi for biological control of insects, in *Fungi in Biological Control Systems*, ed. by Burge MN. Manchester University Press, Manchester, UK, pp. 61–85 (1988).
- 17 Avery PB, Faul J and Simmonds MSJ, Effect of different photoperiods on the growth, infectivity and colonization of Trinidadian strains of *Paecilomyces fumosoroseus* on the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, using a glass slide bioassay. *J Insect Sci* **4**:38–48 (2004).
- 18 Kim JS, Je YH and Roh JY, Production of thermotolerant entomopathogenic *Isaria fumosorosea* SFP-198 conidia in corn–corn oil mixture. *J Ind Microbiol Biotechnol* **37**:419–423 (2010).
- 19 Kim JS, Kassa A, Skinner M, Hata T and Parker BL, Production of thermotolerant entomopathogenic fungal conidia on millet grains. *J Ind Microbiol Biotechnol* **38**:697–704 (2011).
- 20 Kim JS, Skinner M, Gouli S and Parker BL, Influence of top-watering on the movement of *Beauveria bassiana*, GHA (Deuteromycota: Hyphomycetes) in potting medium. *Crop Prot* **29**:631–634 (2010).
- 21 Mastura M, Amin MSM and Aimrun W, Characterization of paddy soil compaction based on soil apparent electrical conductivity zones. *Afr J Agric Res* **6**:2506–2515 (2011).
- 22 Burges HD, Formulation of mycoinsecticides, in *Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatment*, ed. by Burges HD. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, pp. 131–186 (1998).
- 23 Kim JS, Parker BL and Skinner M, Effects of culture media on hydrophobicity and thermotolerance of *Bb* and *Ma* conidia, with description of a novel surfactant based hydrophobicity assay. *J Invertebr Pathol* **105**:322–328 (2010).
- 24 St Leger RJ and Screen SE, Prospects for strain improvement of fungal pathogens of insects and weeds, in *Fungi as Biocontrol Agents*, ed. by Butt TM, Jackson C and Magan N. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK, pp. 219–237 (2001).
- 25 Wraight SP, Jackson MA and DeKock SL, Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents, in *Fungal Biocontrol Agents – Progress, Problems, and Potential*, ed. by Butt T, Jackson C and Magan N. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 253–287 (2001).
- 26 Yatin BT, Venkataraman NS, Parija TK, Panneerselvam D, Govindanayagi P and Geetha K, *The New Biopesticide Market*. Business Communications Research, Denver, CO (2006).



RESEARCH PAPER

Management of entomopathogenic fungi in cultures of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)

Se Jin LEE¹, Si Hyeon KIM¹, Yu-Shin NAI¹, Yeon Ho JE², Bruce L. PARKER^{1,3} and Jae Su KIM¹

¹ Department of Agricultural Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Chonbuk National University, Jeonju, Korea

² Department of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture and Life Science, Seoul National University, Seoul, Korea

³ Entomology Research Laboratory, University of Vermont, Burlington, Vermont, USA

Correspondence

Jae Su Kim, Department of Agricultural Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Chonbuk National University, Deokjin-dong 1ga, Deokjin-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do, 561-756, Korea.
Email: jskim10@jbn.u.ac.kr

Received 29 June 2014;
accepted 2 September 2014.

doi: 10.1111/1748-5967.12068

Abstract

Larvae of mealworms *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) have been used as animal feed, but fungal pathogens rapidly downsize the populations, resulting in economic losses. In this work, we established an effective management strategy for fungal pathogens. An entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, was isolated from mealworm cadavers. The bioassay of some isolates of this species at >90% relative humidity revealed that the ERL1575 isolate had the highest virulence. At 20–30% RH, ERL1575 conidia when ingested produced 80% mortality but when sprayed topically produced only <10% mortality. Mealworms that had ingested conidia were exposed to 20, 25, 30 and 35°C and high humidity (>95%) for 5 days. This experiment produced about 90% mortality except at 35°C where mortality was <20%. When 40 fungicides were assayed against ERL1575, fluazinam (1000-fold) and mancozeb (667-fold) significantly inhibited conidial germination and/or hyphal growth. When fluazinam and mancozeb were added to the mealworm diet of conidia-inoculated wheat bran, most were alive 3 days post application. However, 100% mortality resulted 3 days post application in the conidia-inoculated wheat bran without any fungicides. In conclusion, *B. bassiana* isolates are pathogenic at <30°C when they are ingested by mealworms but fluazinam and mancozeb can be used for management to control the pathogen in their cultures.

Key words: *Beauveria bassiana*, entomopathogenic fungi, fluazinam, mancozeb, *Tenebrio molitor*.

Introduction

A large amount of biomass has been obtained from insects for industrial uses such as feed for animals (Huis 2013). Most insects are ranked as the first consumers of plants and they significantly contribute to the cycling of organic materials in the environment (Ramos-Elorduy *et al.* 2002). In regard to nutritional diversity, insects have high levels of proteins, fats, minerals and vitamins, and particularly amino acids, which are more prevalent than those found in cereals and beans (Chavunduka 1975). Crickets, soldier flies, grasshoppers and mealworms are well known to have large amounts of proteins that can be used as feed additives for

animals (Bondari & Sheppard 1987; Sheppard *et al.* 1994; Ng *et al.* 2001; Newton *et al.* 2005; Hahn & Denlinger 2007; St-Hilaire *et al.* 2007; Anand *et al.* 2008; Njidda & Isidahomen 2010). For example, mealworm larvae *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) have been mass-reared worldwide for animal feed. Their protein content is as rich as those found in soybeans and casein, which are used as chicken feed (Gourlet *et al.* 1978; Ghaly & Alkoaik 2009).

In the past, emphasis has been given to larval population density and nutritional development in culture. However, some fungal pathogens are very virulent to mealworms and rapidly downsize populations resulting in huge economic losses. Plants or plant-oriented diets may be the sources of

these fungal contaminants. In this research, we isolated an entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* from the cadavers of *T. molitor* larvae. A more virulent isolate was found from the bioassay of several *B. bassiana* isolates in stock and used in the following work. We established an effective management strategy for fungal pathogens based on the relationship between abiotic conditions and their occurrence and the application of a fungicide library (40 fungicides). The result was effective in mass-rearing of mealworm larvae without fungal contaminants.

Materials and methods

Isolation of fungal pathogens from dead larvae

Dead *T. molitor* larvae were collected from a culture in an insect rearing room, and possible entomopathogenic fungi were isolated according to the Insect Pathology Manual (Humber 1997) and identified by sequencing the ITS regions of extracted gDNA (gDNA extraction kit; Qiagen, Valencia, CA, USA) using primers ITS1F (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') and ITS4F (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') and NCBI BLAST. To confirm the pathogenicity of the mealworm-originated isolates, 10 third instar larvae were placed on 7-day-old isolated fungal cultures on PDA (Difco, Sparks, MD, USA) and kept at room temperature for 10 days (Humber 1997).

Fungal pathogens in stocks

Beauveria bassiana isolates ERL836, 1050, 1051, 1575 and 1576 were provided by personnel at the Entomology Research Laboratory, University of Vermont, USA. *B. bassiana* were isolated from insect cadavers, which were collected from 2002 to 2008 and identified by sequencing the ITS region as described above. They were cultured on quarter-strength Sabouraud dextrose agar media (SDA/4) in darkness at 25°C (Kim *et al.* 2013). To produce conidia, the isolates were grown on SDA/4 for 10 days. Then the conidia were suspended in 0.03% (v/v) siloxane solution (Silwet L-77; Loveland Co, Greely, CA, USA) and adjusted to 1×10^7 conidia/mL in preparation for the following experiments.

Virulence assay

To choose the most virulent fungal pathogen, six *B. bassiana* isolates including the mealworm isolate were first subjected to a virulence assay against *T. molitor* larvae in Petri dishes (Butt & Goettel 2000). For testing, 10 third instar larvae were placed in a 60-mm diameter Petri dish, and a conidial suspension (1×10^7 conidia/mL) was sprayed using a micro-sprayer at rate of 3 mL per dish. Then Petri dishes were sealed with Para-film to maintain >90% relative humidity

(RH) and incubated at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ under conditions of 16 h light : 8 h dark (LD 16:8). The numbers of dead larvae were counted daily for 5 days. This assay was repeated three times, and each treatment was replicated three times in an experimental replicate.

Fungal infection pathway assay

To determine the pathways of fungal pathogens in the rearing of *T. molitor*, ERL1575, the most virulent isolate, was used. Third instar larvae were treated by spraying and by voluntary ingestion with three replicates (Butt & Goettel 2000). Spraying was done as described above. Treated Petri dishes were not covered, to simulate culturing procedures and kept at room temperature ($\sim 25^\circ\text{C}$) and $\sim 30\%$ RH for 24 h. For voluntary ingestion, three fungal agar sections (6 mm diameter) were taken from a 10-day-old culture plate and placed in a Petri dish with 10 third instar larvae and kept for 24 h for ingestion. After 24 h of incubation, all the larvae were transferred to a rearing dish (100 mm diameter \times 41 mm height; SPL Life Sciences, Pocheon, Korea) containing 10 g wheat bran (<5% moisture). The numbers of dead larvae were counted daily for 5 days.

Abiotic factor assay

To investigate the relationship between abiotic factors and virulence of ERL1575, larvae were first allowed voluntary ingestion and then exposed to various temperature and humidity conditions. To vary RH, sterilized distilled water (1.05, 2.10 or 3.15 mL) was sprayed on 3 g aliquots of wheat bran as their diet in a 60-mm-diameter Petri dish. The larvae, which ingested conidia as above, were held in the dishes and kept at 20, 25, 30 or 35°C in an incubator with three replicates. The numbers of dead larvae were counted daily for 5 days. This experiment was repeated three times using different cultures of fungal conidia.

Fungal growth inhibition assay

To determine the inhibition of conidial germination and hyphal growth of ERL1575 by a variety of fungicides, a 50- μL conidial suspension (1×10^7 conidia/mL) was first spread on SDA/4 in Petri dishes. The 40 chemical fungicides (Table 1) used were obtained from the pesticide library of Dongbu Farm Hannong Agrochemical Company (Daejeon City, Korea). Each of the 40 fungicides was prepared at its standard application rate (SD), SD/2 and SD/5 according to the manufacturer's recommendation. Next, 5 μL of each fungicide preparation was dropped on the ERL1575 culture plate with three replicates. Two days later conidial germination was determined by randomly counting the number of germinated conidia per 100 spores under a light microscope

Table 1 Chemical fungicides used in this study

Group	Fungicide	Active ingredient (%)	Formulation type	Standard application dose (SD)
Guanidine	Imminoctadine (triacetate)	25	SL	500x
	Imminoctadine (tris albesilate)	30	SC	1000x
Dinitroaniline	Fluazinam	50	SC	500x
Dicarboximid	Iprodione	50	WP	1000x
	Procyimidone	50	WP	1000x
Copper	Cooper hydroxide	52	WDG	200x
	Bordeaux mixture	75	WDG	500x
Benzophenol	Metrafenone	24	SC	2000x
Benzimidazole	Benomyl	50	WP	1000x
Sulfoamide	Amisulbrom	13	SC	1000x
Strobilurin	Kresoxim-methyl	47	WDG	2000x
	Trifloxystrobin	50	WDG	3000x
	Azoxystrobin	10	WP	1000x
	Orysastrobin	12	SC	2000x
Cyanoimidazole	Cyazofamid	10	SC	400x
Anilide	Thiifuzamide	21	SC	5000x
Urea	Pencycuron	25	WP	1000x
Oxine-copper	Oxine copper	50	WP	500x
Dithiocarbamate	Mancozeb	75	WP	500x
	Etridiazole	25	EC	2000x
Imidazole	Prochloraz	25	EC	2000x
Carboxylicacidamide	Mandipropamid	22	SC	2000x
Carbamate	Carbendazim	60	WP	1000x
	Thiophanate-methyl	40	SC	1000x
Carboxyamide	Carpropamid	15	SC	1500x
Quinazolinetriazole	Fluquinconazole	10	SC	500x
Quinorinone	Oxolinic acid	20	WDG	1000x
Quinone	Dithianon	43	SC	1000x
Triazole	Tetraconazole	12	EC	1000x
	Tricyclazole	75	WP	2000x
	Bitertanol	25	WP	500x
	Hexaconazole	2	SC	2000x
	Triflumizole	30	WP	1000x
	Difenoconazole	10	WDG	2000x
	Fenoxanil	20	SC	1000x
Phenoxyamide	Fenoxanil	20	SC	1000x
	Cypronidil	48	WDG	2000x
Pyrimidine	Fenarimol	12	EC	3000x
	Streptomycin	20	WP	800x
Antibiotics	Polyoxin B	50	SP	5000x
	Validamycin-A	5	SL	1000x

EC, emulsion concentrate; SC, suspension concentrate; SL, soluble liquid; SP, soluble powder; WDG, water dispersible granule; WP, wettable powder.

at 100x magnification. To determine the inhibition of hyphal growth a 7-day-old 6-mm-diameter agar section of ERL1575 was placed on the center of SDA/4 in a Petri dish and a 6-mm-diameter paper disc with 5 µL of the diluted fungicide was placed at the border of the dish. Petri dishes were incubated at 25°C for 10 days. Inhibition of hyphal growth was determined by measuring the inhibition zone between the paper disc and the growing hyphal tip. This experiment was repeated three times using different cultures of fungal conidia.

Application of fungicides to rearing system

Fluazinam (CAS No. 79622-59-6) 50% suspension concentrate (500-fold dilution) and mancozeb (CAS No. 8018-01-7) 75% wettable powder (500-fold dilution), which were selected from the above experiments, were applied to wheat bran, the diet of mealworms, to manage ERL1575. In the rearing dish, 10 mL of ERL1575 suspension (1×10^7 conidia/mL) was evenly mixed with 10 g of sterilized wheat bran. Fungicides were sprayed using a micro-sprayer

Isolate (from cadavers)	Identification	Virulence against <i>T. molitor</i> larvae
M1	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	-
M2	<i>Alternaria oregonensis</i>	-
M3	<i>Alternaria infectoria</i>	-
M4	<i>Penicillium polonicum</i>	-
M5	<i>Penicillium sclerotiorum</i>	-
M6	<i>Penicillium citrinum</i>	-
M7	<i>Beauveria bassiana</i>	+
M8	<i>Leptosphaeria microscopica</i>	-



Figure 1 Isolation of fungi from cadavers of *T. molitor* larvae in cultures and their pathogenicity. Isolate M7 showed pathogenicity (+) against the larvae, but the other isolates did not (-) at 10 days after inoculation.

on the wheat bran at 1.05 mL of diluted suspension (recommended standard dose as above) per dish with three replicates. Dishes without fungicides or fungal inoculum served as controls. Three days post inoculation, 10 third instar larvae were placed in each dish. The numbers of dead mealworms were counted 1, 3, 5 and 7 days later. This experiment was repeated three times using different cultures of fungal conidia.

Data analysis

Data on the percentage of live mealworms were analyzed using the general linear model (GLM), followed by Tukey's honestly significant difference (HSD) for multiple comparisons. All analyses were conducted using SPSS v17.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) at the 0.05 (α) level of significance.

Results

Isolation of mealworm-pathogenic *B. bassiana* isolate

Eight fungi were isolated from the dead population, but the *B. bassiana* isolate M7 alone showed pathogenicity against the larvae (Fig. 1). The other fungal isolates, such as *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium* and *Leptosphaeria* did not show any significant pathogenicity.

Virulence of *B. bassiana* isolates against *T. molitor* larvae

Of the isolates tested, ERL1575 was most efficacious producing about 100% mortality 3 days post treatment ($F_{7,48} = 173.5$, $P < 0.001$) at high RH and ERL1576 was the least efficacious (Fig. 2). The other isolates produced 33% (ERL836) and <10% mortality (M7, ERL1050, ERL1051 and ERL1576) in 3 days, but ERL836, ERL1050 and M7

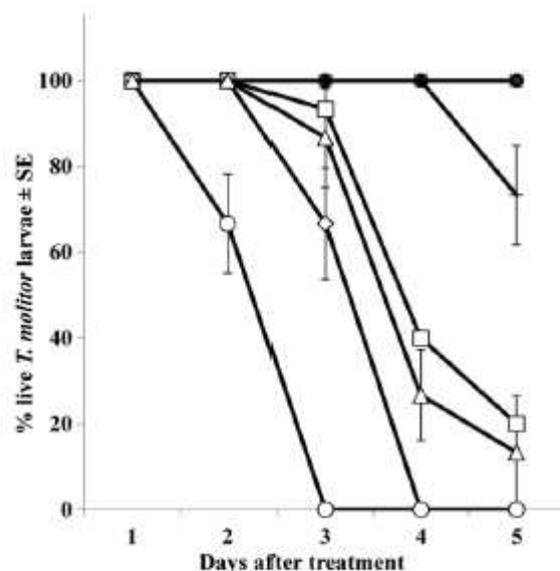


Figure 2 Virulence of several entomopathogenic *B. bassiana* isolates against third instar *T. molitor* larvae after spraying isolates (1×10^7 conidia/mL) under high RH (>90%) in laboratory conditions. ● Control; ○ ERL836; □ ERL1050; ▲ ERL1051; ◇ ERL1575; + ERL1576; ☆ M7 (mealworm-originated).

reached >80% of mortality in 5 days. Dead larvae turned dark brown and rapidly dried.

Relationship between environmental factors and fungal efficacy

When RH < 30%, the spray of ERL1575 was not significantly efficacious against the mealworms 5 days post treatment, but when it was ingested 80% of the larvae died ($F_{2,18} = 78.0$, $P < 0.001$) (Fig. 3). Virulence of ERL1575 was significantly related to temperature ($r^2 = 0.86$, $P < 0.001$) rather than RH ($r^2 = 0.02$, $P = 0.893$) (Fig. 4). At 30°C larval

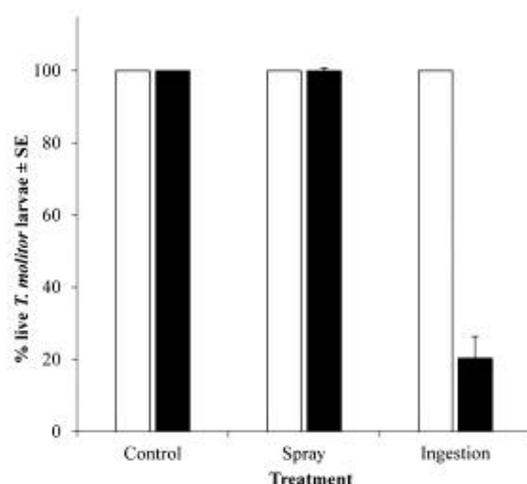


Figure 3 Comparison of the pathogenesis of *B. bassiana* ERL1575 against third instar *T. molitor* larvae between spray- and ingestion-mediated treatments under laboratory conditions 5 days after exposure to ERL1575 at about 30% RH. □ Infestation; ■ 5 days.

mortality occurred sooner than at 25°C and 20°C treatments. At 35°C no significant mortality was observed.

Inhibition of conidial germination and hyphal growth

Of the chemical library tested, fluazinam showed the highest inhibition activity against the germination of ERL1575 conidia with a dose-dependence response, followed by mancozeb, oxine-copper, prochloraz, dithianon, benomyl, carbendazim and bitertanol (Table 2). Fluazinam also strongly inhibited ERL1575 hyphal growth, but the others did not have any significant inhibition activity except mancozeb at standard dose (Table 3).

Control of fungal pathogen in rearing of *T. molitor* larvae

Both fluazinam and mancozeb controlled ERL1575 without any significant adverse effect on the larvae (Fig. 5). Most larvae in the fungus-inoculated wheat bran without any fungicides were dead 7 days after exposure. In 3 days after the introduction of the larvae, about 80% mortality was observed in the non-fungicide treatment. Fluazinam and mancozeb treatments with fungal inoculum showed <5% mortality, similar to the non-treated control.

Discussion

Most fungal isolates from the cadavers of *T. molitor* were saprophytic fungi, but still we had little information what

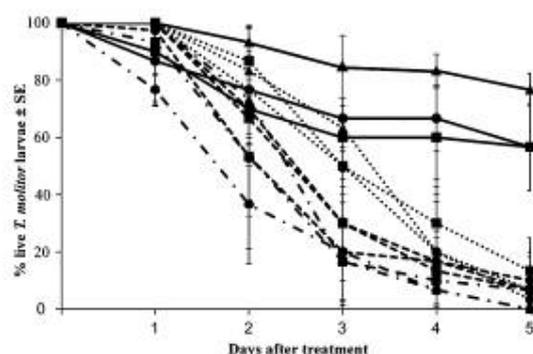


Figure 4 Effect of humidity (which was adjusted by spraying different volumes of water, mL, into the dish) and temperature on the virulence of ingested *B. bassiana* ERL1575 against third instar *T. molitor*. ● 20°C 1.05 mL; ■ 20°C 2.10 mL; ▲ 20°C 3.15 mL; ◆ 25°C 1.05 mL; ▴ 25°C 2.10 mL; ▼ 25°C 3.15 mL; ○ 30°C 1.05 mL; □ 30°C 2.10 mL; ◇ 30°C 3.15 mL; × 35°C 1.05 mL; ☆ 35°C 2.10 mL; ♣ 35°C 3.15 mL.

were the main factors for insect deaths. Bacterial and viral pathogens might be involved in the death of the insects. However, *B. bassiana* isolate was collected from many cadavers of this insect in the larval stages, and consideration should be given to this genus to prevent rapid decrease in population numbers.

It was confirmed that several *B. bassiana* isolates had pathogenicity against *T. molitor* larvae and the virulence was different among those tested. The level of mechanical penetration and the production of cuticle-degrading enzymes such as lipases, proteases, esterases and chitinase (Pedrini *et al.* 2007) are possibly involved. Given the high virulence of this genus, other entomopathogenic fungal genera such as *Metarhizium*, *Lecanicillium*, *Isaria* and *Nomuraea* need to be considered as possible fungal pathogens to mealworms.

Consideration should be given to the different virulence levels between the spray and ingestion methods. In the spray (Fig. 3), the low virulence might be due to the dry conditions of the wheat bran (<5% moisture) used as the culturing diet. Relative humidity is a key factor for high virulence. In routine mealworm rearing, humidity is relatively low because only dried wheat bran, small amounts of vegetables, and small amounts of minerals and vitamins were used. Therefore, contact of virulent conidia on the mealworms maybe insufficient for causing disease; the possibility of fungal infection in dry conditions is quite low.

Relatively high virulence was observed in the ingestion compared to the spray method. Once the conidia entered the insect gut, the outer environment would not influence virulence. In mass culturing, contact of conidia to mealworm cuticle does not usually lead to pathogenesis, which

Table 2 Germination (mean) of *B. bassiana* ERL1575 conidia after exposure to chemical fungicides on SDA/4 at room temperature (about 25°C)

Fungicide	Germination (%)				Fungicide	Germination (%)			
	None	Dilution*				None	Dilution*		
		SD	SD/2	SD/5			SD	SD/2	SD/5
Iminoctadine tris (ace)	98	97	98	96	Prochloraz*	97	11	31	90
Iminoctadine tris (alb)	99	95	98	98	Mandipropamid	98	98	98	97
Fluazinam*	98	3	4	8	Carbendazim*	98	21	87	98
Iprodione	98	97	96	97	Thiophanate-methyl	97	97	98	98
Procymidone	99	95	96	98	Carpropamid	100	94	97	97
Copper hydroxide	98	95	96	97	Fluquinconazole	98	98	98	100
Bordeaux mixture	99	94	94	97	Oxolinic acid	97	97	97	99
Metrafenone	98	95	94	95	Dithianon*	98	5	44	95
Benomyl*	99	8	67	91	Tetraconazole	99	94	94	95
Amisulbrom	100	97	97	99	Tricyclazole	99	96	95	99
Kresoxim-methyl	98	95	97	95	Bitertanol*	98	52	97	99
Trifloxystrobin	99	97	97	97	Hexaconazole	100	97	97	98
Azoxystrobin	97	96	95	96	Triflumizole	100	95	97	98
Dryasastrobin	98	98	98	99	Difenoconazole	98	93	94	95
Cyazofamid	97	98	96	94	Fenoxanil	99	95	95	98
Thifluzamide	98	95	94	97	Cyprodinil	97	98	97	99
Pencycuron	99	96	98	98	Fenarimol	98	100	98	100
Oxine-copper*	98	5	18	84	Streptomycin	97	97	97	99
Mancozeb*	100	3	7	29	Polyoxin B	99	95	100	98
Etridiazole	98	95	97	97	Validamycin-A	97	94	96	98

*Chemical treatment showed a significant decrease ($P < 0.001$) in conidial germination with a dose-dependent manner.

*Each of the 40 fungicides was prepared at its standard application rate (SD), SD/2 and SD/5 according to the manufacturer's recommendation (Table 1).

definitely depends on abiotic conditions such as high relative humidity (Vega & Kaya 2012). Additionally, cuticle composition may retard conidial germination. Hydrocarbon and lipids in the cuticles may serve as inhibitors (Smith & Grula 1982). However, at higher humidity, spraying of fungal pathogens may induce strong virulence. So, keeping the environment as dry as possible is one solution for managing insect-pathogenic fungi in mealworm cultures.

ERL1575 showed lower virulence at 35°C than at other temperatures. Outer temperature is a key factor on pathogenicity. Previous research reported that *B. bassiana* did not grow well at 35°C (Ekesi *et al.* 1999); therefore, it is not unusual that low virulence was observed in this research. The larvae survived at this higher temperature. If there were highly thermotolerant insect pathogenic fungi, they would likely be serious pathogens to the mealworms at high temperatures.

Fluazinam and mancozeb showed different inhibition activities against fungal growth. Fluazinam is dinitroaniline fungicide (Anema *et al.* 1992), a multispectral agent that targets fungal respiration and disrupts the energy production system (Gasztonyi & Lyr 1995). It is effective against Oomycota, Ascomycota, Basidiomycota and mitosporic

fungi and against both conidial germination and hyphal growth, thereby giving it protective action with a good residual effect. The active ingredient, mancozeb, is a fungicide in the dithiocarbamate subclass of the carbamate group. It is used to control a number of fungal diseases such as anthracnose, pythium blight, leaf spot, downy mildew and rust (Berg 1988; Meister 1992). Mancozeb is a non-systemic fungicide with protective and contact action. Mancozeb acts on multiple sites in fungal cells by disrupting lipid metabolism, respiration and production. It has inhibition activity against fungal conidia, but little control activity against hyphal growth. Given the mode of action, fluazinam and mancozeb inhibit conidial germination and are proven safe for the development of *T. molitor* larvae. Based on the results of this work, fluazinam rather than mancozeb may be recommended to control the pathogen.

We isolated *B. bassiana* M7 from the cadavers of *T. molitor* larvae in this work, which may support our idea that a group of *B. bassiana* could be pathogenic to larvae during mass rearing. Thus, we tested the group of *B. bassiana* ERL isolates, which were previously obtained as described above, and found that ERL1575 was more virulent than the M7 isolate. One reason why we used

Table 3 Inhibition activity of fungicides against hyphal growth of *B. bassiana* ERL1575 on SDA/4 after 10 days incubation at room temperature

Fungicide	Inhibition zone (mm) [†]			
	None	Dilution of fungicide [‡]		
		SD	SD/2	SD/5
Fluazinam*	0.0c	5.7a	5.5a	3.7b
Oxine-copper	0.0	0.0	0.0	0.0
Mancozeb*	0.0b	2.1a	0.0b	0.0b
Prochloraz	0.0	0.0	0.0	0.0
Carbendazim	0.0	0.0	0.0	0.0
Dithianon	0.0	0.0	0.0	0.0
Bitertanol	0.0	0.0	0.0	0.0
Benomyl	0.0	0.0	0.0	0.0

*Chemical treatment showed a significant decrease ($P < 0.001$) in the inhibition of hyphal growth with a dose-dependent manner.

[†]Distance (mean) between growing hyphal tip of *B. bassiana* ERL1575 and fungicide-treated paper disc on SDA/4 after 10 days incubation at room temperature (about 25°C).

[‡]Each of the 40 fungicides was prepared at its standard application rate (SD), SD/2 and SD/5 according to the manufacturer's recommendation (Table 1).

Means with the same lower case letter in each row are not significantly different according to Tukey's HSD test ($P > 0.05$).

ERL1575 rather than M7 in the fungicide assay was to select more effective fungicides that could work against the group with high virulence.

In conclusion, contamination of wheat bran can be controlled by spraying fluazinam either before or during rearing of *T. molitor* larvae. Our findings can be used in the mass rearing of insects for animal feed. Careful management of the rearing environment and disinfection of the area with fluazinam should be seriously considered.

Acknowledgments

We are grateful to Dr Nam Jung Kim (National Academy of Agricultural Science, Korea) for providing *T. molitor* larvae. This research was supported by Bio-industry Technology Development Program, Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea.

References

- Anand H, Ganguly A, Haldar P (2008) Potential value of acridids as high protein supplement for poultry feed. *International Journal of Poultry Science* **7**: 722–725.
- Anema PE, Bouwman JJ, Komyoji T, Suzuki K (1992) Fluazinam: a novel fungicide for use against *Phytophthora*

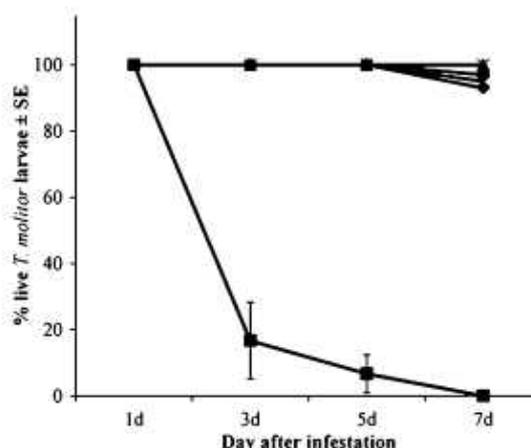


Figure 5 Chemical-based control of *B. bassiana* ERL1575 pathogen in the culturing of *T. molitor*. Fluazinam and mancozeb were diluted and sprayed on the fungus-inoculated wheat bran at 1.05 mL per 60-mm-diameter Petri dish, and in 3 days third instar *T. molitor* larvae were placed in a dish. —○— Control; —■— ERL1575; —▲— Fluazinam; —◆— Mancozeb; —▼— ERL1575+Fluazinam; —◼— ERL1575+Mancozeb.

- infestans* (Cap P) in potatoes. Proceedings of Brighton Crop Protection Conference of Pests and Diseases, Farnham.
- Berg GL (1988) *Farm Chemicals Handbook*. Meister Publishing Co., Willoughby.
- Bondari K, Sheppard DC (1987) Soldier fly, *Hermetia illucens* L., larvae as feed for channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), and blue tilapia, *Oreochromis aureus* (Steindachner). *Aquaculture and Fishery Management* **18**: 209–220.
- Butt TM, Goettel MS (2000) Bioassay of entomopathogenic fungi. In: Navon A, Ascher KRS (eds) *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*, pp 141–196. CABI Publishing, Wallingford.
- Chavunduka DM (1975) Insects as a source of food to the African. *Rhode Island Science News* **9**: 217–220.
- Ekesi S, Maniania NK, Ampong-Nyarko K (1999) Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. *Biocontrol Science and Technology* **9**: 177–185.
- Gasztonyi M, Lyr H (1995) Miscellaneous fungicides. In: Lyr H (ed.) *Modern Selective Fungicides*, pp 389–414. Gustav Fischer, Jena.
- Ghaly AE, Alkokaik FN (2009) The yellow mealworm as a novel source of protein. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* **4**: 319–331.
- Gourlet G, Mullier P, Sinave P, Brisson GJ (1978) Nutritional evaluation of dried *Tenebrio molitor* L. larvae in the rat. *Nutrition Reports International* **18**: 11–15.

- Hahn DA, Denlinger DL (2007) Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization. *Journal of Insect Physiology* **53**: 760–773.
- Huis A (2013) Potential of insects as food and feed in assuring food Security. *Annual Review of Entomology* **58**: 563–583.
- Humber RA (1997) Fungi: preservation of cultures. In: Lacey LA (ed.) *Manual of Techniques in Insect Pathology*, pp 269–279. Academic Press, San Diego.
- Kim JS, Choi JY, Lee SJ *et al.* (2013) Transformation of *Beauveria bassiana* to produce EGFP in *Tenebrio molitor* for use as animal feed additives. *FEMS Microbiology Letters* **344**: 173–178.
- Meister RT (1992) *Farm Chemicals Handbook*. Meister Publishing Co., Willoughby.
- Newton L, Sheppard C, Watson DW, Burtle G, Dove R (2005) *Using the Black Soldier Fly, Hermetia Illucens, as a Value-Added Tool for the Management of Swine Manure*. North Carolina State University, Raleigh.
- Ng WK, Liew FL, Ang LP, Won KW (2001) Potential of mealworm (*Tenebrio molitor*) as an alternative protein source in practical diets for African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture Research* **32**: 273–280.
- Njidda AA, Isidahomen CE (2010) Haematology, blood chemistry and carcass characteristics of growing rabbits fed grasshopper meal as a substitute for fish meal. *Pakistan Veterinary Journal* **30**: 7–12.
- Pedrini N, Crespo R, Juárez MP (2007) Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **146**: 124–137.
- Ramos-Elorduy J, Gonzales EA, Hernandez AR, Pino JM (2002) Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to recycle organic wastes and as feed for broiler chickens. *Journal of Economic Entomology* **95**: 214–220.
- Sheppard DC, Newton GL, Thompson SA, Savage S (1994) A value added manure management system using the black soldier fly. *Bioresource Technology* **50**: 275–279.
- Smith RJ, Grula EA (1982) Toxic components on the larval surface of the corn earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* **37**: 222–230.
- St-Hilaire S, Sheppard C, Tomberlin JK *et al.* (2007) Fly prepupae as a feedstuff for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of the World Aquaculture Society* **38**: 59–67.
- Vega FE, Kaya HK (2012) Fungal entomopathogens. In: Vega FE, Kaya HK (eds) *Insect Pathology*, pp 171–220. Academic Press, Wallingford.

Temperature-Dependent Development of the Swallowtail Butterfly, *Sericinus montela* Gray

Seong-Jin Hong¹, Sun Young Kim¹, Nergui Ravzanaadii, Kyoung-ha Han,
Seong-Hyun Kim and Nam Jung Kim*

Applied Entomology Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju-gun, Jeollabuk-do, 565-851, Republic of Korea

Abstract

The aim of this study is to investigate the effects of ambient thermal environments on the development of swallowtail butterflies (*Sericinus montela* Gray). Developmental durations and survival rates of *S. montela* were examined at two crucial developmental stages, embryonic and larval development, at varying temperatures ranging from 15°C to 35°C. As expected, our results indicated that increasing temperatures decreased the developmental duration and survival rate of the eggs. However, the larvae and pupae showed maximum survival rates at 20.0°C and 25.0°C, and the represented durations were similar to those of the eggs. Larval development was stage-specific, revealing that the fourth and fifth instars at the later stages were more susceptible to temperature variation. When considering both parameters, the optimal development of *S. montela* occurred within the temperature range of 20.0–25.0°C. The lower threshold for the complete development of *S. montela* from eggs to eclosion of adults was calculated at 10.6°C by linear regression analysis. The estimated value is similar to that of other endemic insects distributed in temperate climate zones, which indicates that *S. montela* belongs to a small group of swallowtails adjusted to low ambient temperatures. From the results, we predict that the full development of *S. montela* could be achieved within the temperature range of 17.5–30.0°C. Embryonic development ceased at both test temperature extremes, and no further larval development proceeded after the third instar at 35.0°C. These results suggest that embryogenesis can be significantly influenced by slight variations in the ambient thermal environment that fall below the optimal range.

© 2014 The Korean Society of Sericultural Sciences
Int. J. Indust. Entomol. 29(2), 153-161 (2014)

Received : 20 Oct 2014
Revised : 28 Dec 2014
Accepted : 29 Dec 2014

Keywords:

Swallowtail butterfly,
Sericinus montela Gray,
Temperature,
Developmental duration,
Survival rate

Introduction

Sericinus montela Gray (or *Sericinus telamon* Donovan), a species of swallowtail butterfly (Collins and Morris, 1985), is known for the beauty of its wing phenotype. The unique wing morphology is characterized by a pair of slender tails elongated

from each hindwing in the M3 vein region; therefore, it is called the “tailed butterfly” (Ackery, 1975; Kim and Lee, 1992). Swallowtails typically include all members of the Papilionidae family (Collins, 1991). In general, swallowtails are not only famous for large, colorful, and glamorous wings, but some species also have diverse hindwing tail types (Ackery, 1975). A

*Corresponding author.

Nam Jung Kim

Applied Entomology Division, National Academy of Agricultural Science (NAAS), RDA, 166, Nongsaeungmyeong-ro, Iseo-myeon, Wanju-gun, Jeollabuk-do, 565-851, Republic of Korea
Tel: +82-63-238-2810 / FAX: +82-63-238-3833
E-mail: vastnj@korea.kr

© 2014 The Korean Society of Sericultural Sciences

variety of butterfly specimens, especially swallowtails, have been on display all over the world, and live butterflies are exhibited in indoor gardens and museums for educational and aesthetic purposes.

A representative flight mode of butterflies is fluttering, which is conspicuous because of large flamboyant wings. In addition, the wing couple is attached to the second and third thoraces, but it is not hooked together. This characteristic and the lack of bristles allow their flight to be more elegant. Possible correlations between flight performance and wing shape in swallowtails have been suggested, which might explain the wide range of complex flight patterns (Betts and Wootton, 1988). Field observations of *S. montela* have described fluttering with slow, full strokes when flying upward or climbing (Shin, 1974; Kim and Lee, 1992). However, the downward flight and landing mode utilize gliding without fluttering. *S. montela* spreads its wings when basking or landing instead of folding them vertically (Nam *et al.*, 1998). Therefore, the distinct flight of *S. montela* adds celestial imagery to the beauty of the wings, and this is likely due to its large forewings and particularly long hindwing tails.

Approximately 20,000 butterfly species belong to a small part of the insect order Lepidoptera, which also contains the moth group that is ten times larger (Collins, 1991). Butterflies are divided into five families that are predominantly found in the tropics, but a few species extend to cool temperature latitudes in both hemispheres (Collins, 1991). Most swallowtails are distributed in extremely limited areas rather than widespread areas that are sensitive to habitat and environmental changes. *S. montela* is one of the over 500 species in Papilionidae (Munroe and Ehrlich, 1960), which is endemic to some countries of northeastern Asia, including Russia, China, and Korea (Ackery, 1975; Collins and Morris, 1985). Geographical forms from the northern region (e.g., *ssp. greyni* Fixs.) as well as the central and southern regions (e.g., *ssp. koreana* Fixs.) have been assigned to the subspecies found in Korea (Kim and Hong, 1991). However, extensive research on this species has been published mostly in Japan following introductions from Korea as recent as the late 1970s (Kim and Hong, 1991; Kim and Lee, 1992; Kumon, 1996).

S. montela feeds exclusively on *Aristolochia contorta* Bunge (Aristolochiaceae), which is a source of aristolochic acids in plants (Mix *et al.*, 1983). Aristolochic acids, which can be toxic to humans via inhalation or contact with skin (Merk index), protect *S. montela* caterpillars and adults from predators via

sequestration in the body (Omura *et al.*, 2006). For instance, larvae secrete odoriferous fluid from their defensive glands (osmeteria), which contain five of the eight aristolochic acid compounds found in the host, *A. debilis* (Nishida, 1995). *S. montela* is dimorphic at the adult stage, which is characteristic of primitive insects. In the wild, it is simple to distinguish males and females by the color of their wings. Male wings are bright beige, whereas females have dark brown wings that are described as a melanized pattern (Nam *et al.*, 1998), which has not yet been proven. Like most other butterflies, *S. montela* adults are solitary in behavior. Females lay clutches containing dozens to a hundred eggs on the stems or leaves of the host plant (Shin, 1974). After 5–8 d, larvae hatch from the eggs in a group and pass through five instars with a total developmental time of 16–21 d, depending on the ambient thermal environment and availability of host plants in Korea. Adults survive for about two weeks after pupae metamorphogenesis, which takes 10–12 d unless they enter diapause for overwintering. Taken together, adult emergence takes approximately one month, and completion of the full life cycle lasts up to about 50 d in the field. However, Russian subspecies take 16–19 d for the adult to develop at 20–25°C in the laboratory (Monastyrskiy and Kotlobay, 1995). Therefore, *S. montela* is multivoltine, emerging two or three times a year on average in Korea (Shin, 1974; Kim and Lee, 1992; Nam *et al.*, 1998).

The habitat of *S. montela* in the Gwangneung area, one of the most important sites for insect conservation in Korea, was investigated for a long period of time from 1932 to 2004 (Shin, 1974; Byun *et al.*, 2005). Swallowtail emergence was observed three times a year from 1960 to 1962 (Shin, 1974). Since then, the population has decreased rapidly until only a single male was observed in April 2004, despite the presence of 148 species (67.0% of the S. Korea butterfly fauna) listed in Gwangneung Forest (Byun *et al.*, 2005). As a part of the ecosystem, the world's human population has continuously increased, and it predominantly occupies most of the earth while simultaneously destroying or fragmenting natural habitats, which threatens worldwide biodiversity (Fahrig, 2003; Kim, 2010). Global warming caused by the greenhouse effect is a pernicious threat to swallowtails (Collins and Morris, 1985; Collins, 1991), and many species, including *S. montela*, are facing environmental challenges or further threats. Particularly, because *S. montela* habitats are intimately associated with human-occupied areas, the species is exposed to additional

dangers. Therefore, the butterfly has disappeared near hiking trails, fields, and stream banks where it was previously observed (Kim, 2010). Special attention should be paid to the development of strategies to protect them (Collins and Morris, 1985; Collins, 1991). Since 2005, Hyundai Motor Company has made efforts to reconstitute natural environments that are optimal for *S. montela* by establishing eight ecology laboratories (the so-called "The Ecology Learning Center") in five cities as one of the social responsibilities of the company (<http://www.hyundai-green.com>). Physiological and ecological research on *S. montela* should not only be conducted to provide butterfly habitats and guidelines for introducing them into the field, but it should also support the maintenance of optimal habitats and population control in the ecosystem.

In insects, their physiological processes, behaviors, and survival are susceptible to environmental variations. Temperature, which is one of the parameters, significantly affects gene expression, body size, and color during development, and it can also affect the natural habitats and generation times of species (Blau, 1981; Smith, 1991; Nylin and Gotthard, 1998; Hazel, 2002; Pateman *et al.*, 2012; Kvist *et al.*, 2013). For that reason, a long-standing issue in biology has been the impact of ambient temperature on physiological processes in the biosystem. As many studies of insects have documented, the growth rate increases with increasing temperature to a maximum point, after which increases in temperature result in larval death (Howe, 1967; Guppy, 1969; Poston *et al.*, 1977; Rawlins and Lederhouse, 1981).

In the beginning of the *S. montela* physiological study, we set out to investigate its developmental characteristics and the effects of ambient thermal environments on embryonic and larval development throughout all developmental stages. Our study focuses on an examination of developmental durations and survival rates of eggs, larvae, and pupae under varying temperatures, with the expectation of discovering the most favorable conditions for laboratory rearing.

Materials and Methods

Experimental insects

Native *S. montela* individuals were collected from Pyeongtaek, in Gyeonggi province, South Korea to establish a rearing system in the laboratory. The butterflies were then maintained for further

investigation in the Division of Applied Entomology at the National Academy of Agricultural Science. They were grown at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ and $50 \pm 10\%$ relative humidity with a photo regime of 16 L: 8 D, and experiments were conducted after two generations to minimize maternal effects. All *S. montela* adults and larvae fed on *A. contorta* plants. The larvae were kept under the following conditions: a small Petri dish (35 mm in diameter and 10 mm in height; 35 mm \times 10 mm) for the first stage; a large Petri dish (60 mm \times 10 mm height) for the second and third stages; and a large Petri dish (100 mm \times 40 mm height) for the final stage.

Experimental protocol

Female butterflies were placed individually in a box, and were hand-mated in order to obtain eggs (Platt, 1969). Each male was removed from the box after mating, allowing the female to lay eggs on *A. contorta*. The female was then released from the cage, and the number of eggs adhering to the stem was counted. The eggs were distributed into chambers set at nine temperature regimes (15.0, 17.5, 20.0, 22.5, 25.0, 27.5, 30.0, 32.0, and 35.0°C) with $50 \pm 10\%$ relative humidity and a 16 L: 8 D photoperiod. Each temperature-specific chamber contained 30 eggs in triplicate. Survivorship and developmental durations from eggs to larvae and larvae to pupae were recorded on a daily basis. On the initial experimental day, the newly hatched larvae grown at 25.0°C were distributed into various temperatures (15.0, 20.0, 25.0, 30.0 and 35.0°C). The food was replenished regularly each morning after examining larval development. When the fifth instar larvae stopped eating, each individual was placed into a separate large Petri dish (100 mm \times 40 mm) where they were allowed to pupate. In addition, when larvae that were consistently reared at 25.0°C reached a pupal stage, they were distributed into 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, and 35.0°C temperature regimes to investigate pupal development and adult eclosion. The duration of the each stadium (until pupation) as well as the survival rate was recorded to the nearest day.

Statistical analysis

Differences in the developmental period of egg, larval, and adult stages were tested by analysis of variance (ANOVA). If significant differences were detected, multiple comparisons were made using Tukey's HSD multiple range test ($p = 0.05$).

Results

Developmental periods and survival rates of *S. montela* at different temperatures

As shown in Table 1, the developmental duration of *S. montela* eggs decreased with increasing temperature within the range of 17.5–30.0°C. At the extreme ends of the test temperatures, 15.0°C and 35.0°C, embryonic development did not proceed, thus representing zero percent survival rates. The longest period was 13.33 ± 1.10 d at 17.5°C, and the shortest was 4.01 ± 0.68 days at 30.0°C. Our data revealed that developmental time exponentially decreased with increasing temperature from 17.5°C to 30.0°C. In the range of 25.0–30.0°C, no significant decreases were observed in developmental durations (from 5.06 ± 0.68 to 4.01 ± 0.68 d). Overall, the development of *S. montela* eggs at higher test temperatures takes a significantly shorter time than at lower temperatures, indicating that *S. montela* embryonic development is temperature-dependent. Further, eggs maintained at 17.5°C had the highest survival rate (92.1%), while the survival rates at higher temperatures, 27.5°C and 30.0°C, abruptly decreased to 64.6% and 35.9%, respectively. The eggs in the range of 20.0–25.0°C successfully hatched with high survival rates of 83.5–84.7%. Taken together, the temperature range of 20.0–25.0°C was observed to be optimal for embryogenesis of *S. montela* individuals with relatively short developmental periods and high survival rates. Representative

Table 1. Developmental periods and survival rates of *S. montela* eggs at different temperatures. Means followed by the same letter are not significantly different ($p < 0.0001$; Tukey's standardized test).

Temperature (°C)	Developmental period (days ± SD)	Survival rate (%)
15.0	- ¹⁾	0
17.5	13.33 ± 1.10a	92.1
20.0	8.43 ± 0.83b	83.9
22.5	6.49 ± 1.12c	84.7
25.0	5.06 ± 0.68d	83.5
27.5	4.38 ± 0.73de	64.6
30.0	4.01 ± 0.68e	35.9
32.5	-	0
35.0	-	0

¹⁾ Did not survive



Fig. 1. Morphological identification of *S. montela* eggs on the stems of the host plant (*A. contorta*) during embryonic development from the first day of oviposition (ovi 0) to hatching (Hat).

Table 2. Stage-specific developmental periods of *S. montela* larvae at different temperatures. Means followed by the same letter are not significantly different ($p = 0.05$; Tukey's standardized test).

Developmental stage	Temperature (°C)				
	15.0	20.0	25.0	30.0	35.0
n*	60	60	90	90	90
1 st instar	6.93 ± 1.48a	3.23 ± 0.66b	2.23 ± 0.50c	1.82 ± 0.39d	1.84 ± 0.69d
2 nd instar	6.60 ± 0.96a	2.96 ± 0.50b	1.95 ± 0.56c	1.07 ± 0.30d	2.56 ± 1.01b
3 rd instar	7.57 ± 1.99a	2.85 ± 0.62b	2.20 ± 0.58c	1.43 ± 0.59d	2.00 ± 1.41cd
4 th instar	9.14 ± 1.540a	3.23 ± 0.70b	2.58 ± 0.57c	2.03 ± 0.63d	- ¹⁾
5 th instar	19.75 ± 4.99a	6.69 ± 0.65b	4.41 ± 0.72c	3.65 ± 0.52d	-
Larva	48.75 ± 4.57a	18.98 ± 1.30b	13.32 ± 1.10c	9.96 ± 1.19d	-
Pupa	28.67 ± 4.51a	11.08 ± 1.26b	6.97 ± 0.45c	5.64 ± 0.68c	7.00 ± 0.00

¹⁾ Did not survive

* Number of individuals tested

morphology of *S. montela* eggs while embryogenesis proceeded at 25.0°C is shown in Fig. 1, and the color of the eggs darkened until hatching.

Inevitably, we observed *S. montela* adults eclosed from the pupae across all test temperature ranges from 15.0°C to 35.0°C (Table 2). The duration became shortest (5.64 ± 0.68 d) when the temperature increased to 30.0°C, and it again increased to 7.00 days at 35.0°C with a 2.2% survival rate instead of a die-off (Table 3). Interestingly, larval development completed even at the lowest temperature of 15.0°C, at which embryonic development ceased (Table 1). In addition, survival rates of the larvae and pupae at 15.0°C were not particularly low at 50.0% and 55.3%, respectively (Table 3). However, developmental durations of the larvae (48.75 ± 4.57 d) and pupae (28.67 ± 4.51 d) were especially long at 15.0°C compared to those surviving at higher test temperatures. Our results indicate that unlike eggs, *S. montela* larvae and pupae can fully develop at lower temperatures despite extremely slow growth.

Similar to embryonic development, the stage-specific development time of *S. montela* larvae significantly decreased with increasing temperatures up to 30.0°C (Table 2). At 35.0°C, the stage-specific durations slightly increased as predicted (Howe 1967; Guppy, 1969; Poston *et al.*, 1977; Rawlins and Lederhouse, 1981), implying a maximum growth rate at 30.0°C among the test temperatures. The durations in the range of 20.0–35.0°C were significantly shorter compared to those at 15.0°C until the third instar stage. Caterpillars accomplished development from the first to the third instars at all the temperatures with high

survival rates (over 90%), except at 35.0°C (Table 3). During the early developmental period until the third instar stage, larval survival rates substantially decreased from 67.8% to 18.5% at 35.0°C. No further development proceeded at the later stages, resulting in zero percent survival rates for both the fourth and fifth instars at 35.0°C. The fourth and fifth instar larvae still showed decreases in the developmental duration at temperatures from 20.0°C to 30.0°C, which was identical to the patterns of the earlier instars. The fourth instar showed high survival rates of 85.1% to 95.1%. By contrast, the survival rates were relatively low (73.1–86.1%) at the fifth stage compared to the four earlier

Table 3. Stage-specific survival rates of *S. montela* larvae at different temperatures. Means followed by the same letter are not significantly different ($p=0.05$; Tukey's standardized test).

Developmental stage	Temperature (°C)				
	15.0	20.0	25.0	30.0	35.0
n ^a	60	60	60	60	60
1 st instar	93.33	95.0	94.4	97.8	67.8
2 nd instar	91.1	100.0	100.0	97.7	44.3
3 rd instar	92.16	96.5	98.8	95.3	18.5
4 th instar	85.1	94.5	94.0	95.1	^b
5 th instar	75.0	98.1	86.1	73.1	-
Larva	50.0	85.0	75.6	63.3	-
Pupa	55.3	92.5	85.4	66.7	2.2

^a Did not survive
^b Number of individuals tested



Fig. 2. Morphology and behavioral patterns of feeding and sleep-like molting of *S. montela* caterpillars at developmental stages, from the 1st instar to the 5th instar.

Table 4. Developmental threshold (DT) and thermal constant (DD) for *S. montela* egg, larval, and pupal stages.

Developmental stage	Regression equation ¹⁾	r ²	DT(°C)	DD (degree-days)
Egg	Y = -0.1523 + 0.0140T	0.676	10.9	74.55
1 st instar	Y = -0.1745 + 0.0245T	0.524	7.11	45.22
2 nd instar	Y = -0.3453 + 0.0367T	0.477	9.40	37.33
3 rd instar	Y = -0.4689 + 0.0406T	0.591	11.54	30.37
4 th instar	Y = -0.2717 + 0.0276T	0.542	9.86	39.87
5 th instar	Y = -0.1507 + 0.148T	0.830	10.20	73.36
Larva	Y = -0.0541 + 0.0052T	0.925	10.39	197.65
Pupa	Y = -0.0961 + 0.0093T	0.907	10.34	125.26
Egg to emergence	Y = -1.8103 + 0.1712T	0.989	10.57	370.52

¹⁾Y = b + aX where Y is development rate and X is the temperature (°C)

stages, with the exception of the 20.0°C treatment. The results suggest that *S. montela* larval development is more susceptible to temperature at later stages, especially after the third larval stage. We also demonstrate that full development of *S. montela* cannot occur at 35.0°C (and probably above 30.0°C).

The representative larvae of *S. montela* at all developmental stages are shown in Fig. 2. A larva feeding on the host plant at each stage is presented in the upper panel, and the sleep-like state of a larva before molting is displayed in the lower panel. The colors of the third, fourth, and fifth larval instars became darker as development proceeded, whereas the first and second exhibited lighter colors. A pair of osmeteria in the prothoracic segment started to protrude at the first instar stage, and became long and thick.

The lower developmental thresholds (DTs) of *S. montela* estimated by linear regression analysis

A linear model was used to determine the developmental thresholds (DTs) based on the temperature variable data found in Tables 1 and 2 (Table 4). At all stages, the estimated values were within approximately 7.0–12.0°C, which fell outside of the temperature range tested in our experiments. The lower thresholds for larvae and pupae were 10.4°C ($p = 0.075$) and 10.3°C ($p = 0.093$), respectively, and the threshold for full development was 10.6°C with high accuracy ($p = 0.011$). Therefore, the lower developmental threshold of *S. montela* from egg to adult that was determined by the linear method

in our study is somewhat convincing. However, the hatching threshold showed the discrepancy between empirical data and the calculated value. The hatching threshold was 10.9°C ($p = 0.324$), which deviated significantly from the experimental data in Table 1 since we did not observe egg hatching at 15.0°C for quite a long period of time (unpublished data). A more accurate estimated value can be obtained if the threshold is determined by a non-linear method. Another possibility is that the survival rate may not be zero if the size of the egg population increases. We also cannot rule out the possibility that the eggs might endure low ambient temperature of 15.0°C much longer than we have observed.

Discussion

In the present study, we have shown that varying thermal environments influence the duration and survival rates of *S. montela* development at all stages from eggs to pupae. Analysis of survival rates suggests that the eggs are able to complete all developmental processes until eclosion in the range of 17.5–30.0°C. Moreover, with analysis of developmental periods, our data have provided strong evidence that optimal development of *S. montela* occurs from 20.0°C to 25.0°C in an indoor rearing system. In the optimal range, both the developmental periods and survival rates of *S. montela* are not significantly affected by variations in temperature. An attempt to develop a method for rearing *S. telamon* under laboratory conditions in Russia

identified similar data for embryonic and larval developmental durations at 20.0–25.0°C (Monastyrskiy and Kotlobay, 1995).

Although the optimal temperatures of *S. montela* development are in the range of 20.0–25.0°C, the larvae can survive at the lowest test temperature of 15.0°C. Total larval development time at the lowest temperature was measured at about 50 d (Table 2), which is exceedingly long and comparable to a whole generation time in the field (Shin, 1974). Therefore, we conclude that the larvae can endure low temperatures for a long period of time, achieving full larval development with delayed growth. Further, maximum egg hatching occurs at 17.5°C with the longest embryonic duration in our study. However, the eggs failed to develop at both test temperature extremes, indicating that embryogenesis of *S. montela* is more sensitive in response to the ambient thermal environment.

The butterflies never completed development at 35.0°C in this study, which has been reported in some other species of Lepidoptera, including the armyworm (Guppy, 1969), the alfalfa butterfly (Sherman and Watt, 1973), and the tropical monarch (Rawlins and Lederhouse, 1981). However, the early instar larvae and pupae of *S. montela* accomplished development at 35.0°C, which is the highest temperature we tested (Table 2 and 3). In agreement with our results, it has been suggested that 37.0°C might be close to the maximum temperature that tiger swallowtails (*Papilio glaucus*) can endure on a continuous basis (Scriber and Lederhouse, 1983). Researchers have observed larval death and progressively poorer growth, although complete development can occur at some stages. Coincidentally, our data have indicated that the developmental duration of *S. montela* larvae or pupae at 30.0°C significantly decreases to half the time compared to that at 20.0°C at the expense of low survival rates (Table 2).

The *S. montela* developmental threshold estimated in this study is quite similar to that of other butterflies and insects including 85 species in which developmental percentages of zero at a temperature of 11.0°C has been reported (Rawlins and Lederhouse, 1981). In contrast, the determined hatching threshold is much lower than the temperature resulting in no embryogenic progress, although the value is close to that of full development. There is an interesting review of the hatching threshold. It has been revealed that the eggs of most insects and mites can hatch with a high percentage at a constant temperature of 15.0°C, and this can also be achieved even at temperatures

3–4°C lower if it varies (Howe, 1967). In addition, at constant temperatures within 2–3°C of developmental limits, the proportion of eggs hatching erratically varies and drops rapidly to zero. Therefore, from the discrepancy between the hatching threshold and empirical data in our study, we assume that longer incubation or larger population size at 15.0°C would disclose whether the eggs could stop embryonic development, or if the survival rate might be slightly higher than zero.

The lower temperature limit permitting development can determine the earliest and latest times of the year for insect emergence, as well as the highest latitude for distribution (Rawlins and Lederhouse, 1981). Korea is located in a temperate climate zone, and thus has four distinct seasons. The annual mean temperature ranges from 10°C to 16°C with the highest from 23°C to 27°C in August (Korea Meteorological Administration (KMA), <http://web.kma.go.kr/eng/index.jsp>). *S. montela* in Korea has been reported to emerge up to five times from April to the middle of October in the Ecology Centers, depending upon the weather in the cities during the year. Therefore, the plan for swallowtail restoration is fairly successful in comparison with observations of three generations from April to the end of September in the Gwangneung area (Shin, 1974).

Amongst many organisms in the animal kingdom, butterflies are considerably valuable as biological indicators for the monitoring of climatic changes and ecological trends (Collins, 1991). *S. montela* is likely one of them because it is monophagous, which primarily limits its habitat. Based on our results, this insect is sensitive to environmental temperatures in that it failed to emerge at 35.0°C. Therefore, the survival of this species could be significantly influenced by increasing global climate temperatures caused by the greenhouse effect. Due to their destruction of natural environments, many industrial companies are encouraged to realize natural threats. Hyundai, an exemplary company, has restored the optimal environment for *S. montela*, which is in danger of extinction. Furthermore, cooperative efforts between the government and companies should be made to restore or protect more endangered species in the ecosystem. In accordance with a plan for swallowtail conservation (Collins, 1991), the strategy for restoration of *S. montela* can be a good example of a species-oriented program. In the same context, some progress has been made in community-oriented conservation of fireflies in Muju and dragonflies in Gurye, which are critical faunal sites for those species in Korea. Furthermore,

there are more beneficial or human-friendly insects in need of conservation such as beetles, crickets, dragon swallowtails, and so on. Since our work on *S. montela* has not yet advanced to provide a substantial amount of information, further research on this butterfly with various experimental approaches is necessary in the near future.

The results obtained in our study suggest optimum thermal environments to rear *S. montela* in the laboratory as well as in the field. A further study focusing on the development of substitutes for its natural food source has been conducted. In addition, more research on aristolochic acids and defense mechanisms is required. The results of this study will be of interest in the examination of whether or not there might be a certain effect of the acids on *S. montela* development. The influence of other developmental parameters of *S. montela*, such as photoperiod and nutrients, should also be studied. Photoperiod and temperature are important variables that induce diapause of pupae. Therefore, research on *S. montela* pupal diapause is essential for the development of methods to control the duration as well as to terminate diapause when necessary.

Acknowledgments

This study was supported by the Bio-industry Technology Development Program, Ministry of Agriculture, Food, and Rural Affairs.

References

- Ackery PR (1975) A guide to the genera and species of Parnassiinae (Lepidoptera: Papilionidae). Bull Br Mus Nat Hist Ent 31, P71-105.
- Betts CR and RJ Wootton (1988) Wing shape and flight behaviour in butterflies (Lepidoptera: Papilionoidea and Hesperioidea): A preliminary analysis. J exp Biol 138, 271-288.
- Blau WS (1981) Life history variation in the black swallowtail butterfly. Oecol 48, 116-122.
- Byun BK, Lee YJ, Weon GJ and Sohm JD (2005) Butterfly fauna of the Gwangneung forest, Korea. J Asia-Pacific Entomol 8, 199-210.
- Collins MN and MG Morris (1985) Threatened swallowtail butterflies of the world: The IUCN red data book. IUCN, Gland.
- Collins MN (1991) Swallowtail butterflies: An action plan for their conservation. Information Press, Oxford.
- Fahrig L (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity. Ann Rev Ecol Syst 34, 487-515.
- Guppy JC (1969) Some effects of temperature on the immature stages of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae), under controlled conditions. Can Entomol 101, 1320-1327.
- Hazel WN (2002) The environmental and genetic control of seasonal polyphenism in larval color and its adaptive significance in a swallowtail butterfly. Evol 56, 342-348.
- Howe RW (1967) Temperature effects on embryonic development in insects. Annu Rev Entomol 12, 15-42.
- Kim DS (2010) Metapopulation dynamics of the oriental long-tailed swallow *Sericinus montela* (Lepidoptera: Papilionidae) in Korea. Kor J Appl Entomol 49, 289-297.
- Kim JH and Hong SS (1991). Distributive analysis of butterflies in Korea, in Chronicle of butterflies in Korea and origin of endemic species of butterflies in Japan, Ziphyeonsa, Seoul.
- Kim JH and Lee WK (1992) A hundred species of butterflies in Korea that we should know about, Hyeonamsa, Seoul.
- Kimura T (1996) Butterflies of Japan (http://www.asahi-net.or.jp/~jy4t-knm/index_r.htm). Accessed January 2013.
- Kvist J, CW Wheat, E Kallioniemi, M Saastamoinen, I Hanski, MJ Frilander (2013) Temperature treatments during larval development reveal extensive heritable and plastic variation in gene expression and life history traits. Mol Ecol 22, 602-19.
- Mix DB, H Guinaudeau, M Shamma. 1983. The aristolochic acids and aristolactams. J Nat Prod 45, 657-666.
- Monastyrskiy AL and AA Kotlobay (1995) Some biological features of *Sericinus telamon* (Papilionidae) and its rearing under laboratory conditions. Entomol Rev 74, 94-97.
- Mumroe E and PR Enrich (1960) Harmonization of concepts of higher classification of the Papilionidae. J Lepid Soc 14, 169-175.
- Nam SH, Lee SY, Lee WK (1998) Insects' Life in Korea V, Korea University Press, Seoul.
- Nishida R (1995) Sequestration of plant secondary compounds by butterflies and moths. Chemoecol 5, 127-138.
- Nylin S and K Gotthard (1998) Plasticity in life-history traits. Annu Rev Entomol 43, 63-83.
- Omura H, K Honda, P Feeny (2006) From terpenoids to aliphatic acids: further evidence for late-instar switch in osmeterial defense as a characteristic trait of swallowtail butterflies in the tribe *Papilionini*. J Chem Ecol 32, 1999-2012.
- Pateman RM, JK Hill, DB Roy, R Fox and CD Thomas (2012)

- Temperature-dependent alterations in host use drive rapid range expansion in a butterfly. *Science* 336, 1028-1030.
- Platt AP (1969) A simple technique for hand-pairing *Limenitis* butterflies (Nymphalidae). *J Lepid Soc* 23,109-112.
- Poston FL, RB Hammond, LP Pedigo (1977) Growth and development of the painted lady on soybeans (Lepidoptera: Nymphalidae). *J Kansas Entomol Soc* 50, 31-36.
- Rawlins JE and RC Lederhouse (1981) Developmental influences of thermal behavior on monarch caterpillars (*Danaus plexippus*): An adaptation of migration (Lepidoptera: Nymphalidae: Danainae). *J Kansas Entomol Soc* 50, 387-408.
- Scriber MJ and RC Lederhouse (1983) Temperature as a factor in the development and feeding ecology of tiger swallowtail caterpillars, *Papilio glaucus* (Lepidoptera). *OIKOS* 40, 95-102.
- Sherman PW and WB Watt (1973) The thermal ecology of some *Colias* butterfly larvae. *J Comp Physiol* 3, 25-40.
- Shin YH (1974) Life history of *Serictus telamon* Donovan in Korea. Theses Collection, Kyung-Hee University, Seoul. 8, 319-325.
- Smith KC (1991) The effects of temperature and daylength on the *Rosa* polyphenism in the Buckeye butterfly, *Precis coenia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *J Res Lepid* 30(3-4), 225-236.
- Wang XP, QS Yang, XM Zhou, S Xu, CL Lei (2009) Effect of photoperiod and temperature on diapause induction and termination in the Swallowtail, *Serictus montahus*. *Physiol Entomol* 34, 158-162.

韓學誌 53(1), 1~5 (2015)
J Seric Entomol Sci
http://dx.doi.org/10.7852/jses.2015.53.1.1
<論 文>

갈색거저리의 발육특성

김선영¹ · 박종빈¹ · 이영보 · 윤형주 · 이경용 · 김남정*
국립농업과학원 농업생물부 곤충산업과

Growth characteristics of mealworm *Tenebrio molitor*

Sun Young Kim¹, Jong Bin Park¹, Young Bo Lee, Hyung Joo Yoon, Kyeong Yong Lee, and Nam Jung Kim*
Applied Entomology Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju-gun, Jeollabuk-do, 565-851, Korea

(Received March 30, 2015, Revised April 27, 2015, Accepted April 29, 2015)

ABSTRACT

As increasing utilization of *Tenebrio molitor* for industry, establishing effective conditions of indoor mass-rearing system become more important. For this reason, the aim of this study was to identify the physiological characteristics of *Tenebrio molitor* in different range of temperatures, photoperiods and rearing densities for mass breeding. As a result, their egg had above 70% hatching rate at 17.5~27.5°C and the egg period was shown 5~7 days in 25~35°C. Consequently, in the consideration of the hatching rates and egg periods, the optimal indoor temperature for rearing was 25~27.5°C. Furthermore, development period of larvae in mass breeding system was shorter than individual breeding system under all the conditions of temperature. Also, the pupal weight was higher in mass breeding system except for 20°C and 25°C. Considering elasticity of demand and weight of production, the effective condition was mass-breeding system at 25°C. In photoperiodic condition, the shortest of larval period was 157.35 day in 14L:10D.

Key words : *Tenebrio molitor*, Temperature, Photoperiodic condition, Rearing density

서 론

갈색거저리(*Tenebrio molitor*)는 딱정벌레목 거저리과에 속하며(Lemos et al. 2011), 비교적 건조한 토양, 바위 밑, 나무 속, 동물들의 은신처, 곡물더미 등에 서식한다고 알려져 있다(Jung 2012). 이는 일반적으로 곡물에 사는 해충으로 인식되어 있지만(Koo et al. 2013, Kim et al. 2014), 최근에는 이를 효율적인 동물사료로 이용하기 위해 각종 영양분석이 진행되고 있다. 갈색거저리는 단백질과 지방이 풍부하며, 여러 종류의 아미노산, 불포화지방산, 무기질을 포함하고 있다(Ye et al. 1997, Huang et al. 2006, Huang et al. 2007, Huang et al. 2011, Yoo et al. 2013, Kim et al. 2014). 더불어, 지구 온난화 지수와 토지 이용도는 우유, 달걀, 돼지고기, 소고기 단백질원을 생산할 때보다 갈색거저리를 사육할 때의 발생률이 훨씬 낮아 미래 대체단백질 공급원으로서 기대됨과 동시에(Ooninx 2012),

인류를 위한 대체식량으로도 각광받고 있다(Megido et al. 2013). 또한 이용도가 낮은 밀짚과 오래된 배추 잎, 버섯 폐배지 등의 농업부산물물을 갈색거저리 사육을 위한 먹이원으로 사용할 수 있어 친환경적(Li et al. 2012, Kim et al. 2014)이다. 따라서 이를 활용하여 충질을 강화시키고, 생산단가를 낮출 수 있는 양질의 대체먹이를 개발하기 위한 연구가 진행 중에 있다(Kim et al. 2014).

일반적으로, 갈색거저리의 사육 시 적정 온도와 습도는 25°C/75% RH이며(Punzo and Mutchmor 1980), 암컷이 페로몬(4-methyl-1-nonanol)을 분비하여 수컷을 유인한다(Tanaka et al. 1986, Bryning et al. 2005). 또한 여러 번 수컷과 교미한 암컷이 교미를 적게 한 암컷보다 산란율이 높은 특징을 가진다(Dmievich et al. 2001). 25°C에서 총령수는 평균적으로 15~17령을 가지며(Park et al. 2014), 적정온도보다 높은 30°C 조건에서는 15~23령을 가지는 특징이 있다(Fiore 1960). 하지만 적정 온도보다 낮은 19°C,

¹These authors contributed equally.
*Corresponding author. E-mail: vastnj@korea.kr

21°C, 23°C 조건에서 사육할 경우, 온도가 높아질수록 움직임이 느려지며(Silva 2012), 또한 초령 유충은 출고 조건한 조건에서 생존율이 낮아지지만(Punzo and Mutchmor 1980), 만약 4°C 조건에서 유충에게 selenium을 먹이면, 먹이지 않는 대조군보다 생존율이 높아지는 것을 관찰할 수 있다고 보고되었다(Audas et al. 1995).

이와 같이 곤충은 온도에 민감하게 반응하기 때문에 (Abdullah 1961) 갈색거저리 대량생산에 있어 온도는 중요한 요인임을 추정할 수 있다. 만약 특정 온도에서 갈색거저리의 부화율, 용화율, 우화율 등에 문제가 나타난다면 대량생산에 큰 차질이 생길 가능성이 크다. 따라서 본 연구는 갈색거저리 실내 대량사육 기술 개발을 위해 다양한 온도 및 광주기 조건에 따른 발육특성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 갈색거저리 사육

갈색거저리 성충은 국립농업과학원 곤충산업과 사육실 (25±3°C, 50~70% RH, 14L:10D)에서 5세대 이상 계대사육한 개체를 사용하였다. 갈색거저리 성충(약 1,000마리)을 아크릴 박스(가로 48×세로 49×높이 33 cm)에서 사육했으며, 주먹이원인 밀기울을 약 0.8 cm 높이로 밀바닥에 깔아주었다. 수분 공급을 위해 각종 신선한 채소(배추, 무, 당근 등)를 주 2회 공급하였고, 사육온도는 온도조절기로 25°C를 유지해 주었다. 광주기 조건은 현재 사육실에서 가장 높은 성충화율을 보이는 14L:10D로 설정하였다.

2. 온도별 부화율 및 부화 전 기간 측정

알을 한 곳에 수집하기 위해 꼬미하고 있는 신성충 30쌍을 밀기울(7 g)이 깔린 페트리디쉬(지름 10 cm, 높이 1 cm)에 옮겨주었고, 성충이 나가지 못하도록 플라스틱 박스(가로 36×세로 27×높이 8 cm)에 넣어 주었다. 알의 존재 유무는 페트리디쉬에 있는 밀기울을 걷어내어, 만약 바닥에 붙어 있는 알이 약 100개 정도 발견되면 다시 새로운 밀기울(7 g)을 넣어 인큐베이터에 옮겨 주었다(페트리디쉬 바닥 외에, 밀기울 표면에도 알이 붙어 있을 가능성이 있기 때문에 정확한 부화율 측정을 위해 밀기울을 새로 교체하였다). 인큐베이터 온도는 각각 12.5°C, 15°C, 17.5°C, 20°C, 22.5°C, 25°C, 27.5°C, 30°C, 32.5°C, 35°C로 설정했으며, 부화한 유충의 수와 날짜를 기록해 온도에 따른 부화율 및 부화 전 기간을 측정하였으며, 3회 반복 실험하였다.

3. 개별사육과 집단사육 간 생리적 차이

한 개의 개별사육 실험군은 갖 부화한 유충을 밀기울

(4 g)이 깔린 페트리디쉬(지름 6 cm, 높이 1.5 cm) 33개에 각각 1마리씩 넣어 주었고, 실험군마다 수분 공급을 배추(3 g)로 해주었다. 반면에 한 개의 집단사육 실험군은 밀기울(15 g)이 깔린 페트리디쉬(지름 10 cm, 높이 4 cm) 10개마다 갖 부화한 유충 10마리를 넣어 주었고, 마찬가지로 실험군마다 배추(7 g)로 주 2회 수분공급을 해주었다. 준비된 실험군을 각각 17.5°C, 20°C, 22.5°C, 25°C, 27.5°C, 30°C 조건으로 설정된 인큐베이터에 넣어준 후, 유충기간, 번데기 기간, 번데기 무게, 성충무게, 성충의 체장을 비교 관찰하였다.

4. 광주기에 따른 생리적 차이

갖 부화한 유충 각각 1마리를 밀기울(4 g)이 깔린 페트리디쉬(지름 6 cm, 높이 1.5 cm)에 넣어주었고, 배추(3 g)로 주 2회 수분 공급을 해주었다. 이들을 25°C 인큐베이터에 넣어 광주기를 각각 10L:14D, 12L:12D, 14L:10D로 설정한 후, 유충기간, 번데기 기간, 번데기 무게, 성충무게, 성충의 체장, 성충화율을 비교관찰하였다.

5. 통계분석

개체사육 및 대량사육에 따른 다양한 온도 조건에서 유충 및 번데기 발육기간, 번데기 및 성충의 무게, 성충 체장과 광주기별 유충과 번데기 발육 기간, 번데기와 성충의 무게, 성충 체장에 대한 통계분석은 One-way ANOVA를 사용하였고, ANOVA test를 거친 모든 데이터는 Tukey HSD method로 사후분석하였다.

결과 및 고찰

온도별 부화율은 17.5~27.5°C 조건에서 70% 이상의 높은 수치를 나타냈다. 이 온도 범위에서 벗어난 조건에서는 60% 이하의 낮은 부화율을 보였다. 그리고, 15°C 조건에서 알에서 유충으로 부화하지 않았던 결과(Koo et al.

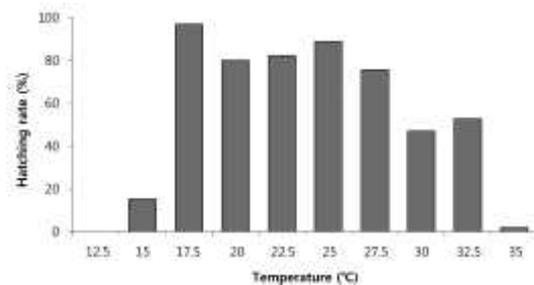


Fig. 1. Hatching rate of *T. molitor* eggs under different temperatures.

Table 1. Egg period of *T. molitor* under different temperatures

Temperature (°C)	Egg period (days, mean ± SD)
12.5	- ¹⁾
15	34.45 ± 1.51
17.5	15.33 ± 0.60
20	14.26 ± 0.44
22.5	9.11 ± 0.31
25	7.54 ± 0.80
27.5	7.00 ± 0.00
30	6.19 ± 0.39
32.5	5.82 ± 0.40
35	5.06 ± 0.36

¹⁾Not survived.

2013)와는 달리, 이 실험에서는 비록 작은 수치이지만 약 17%의 부화율을 보였다(그림 1). 이 결과는 갈색거저리가 다양한 온도 범위 안에서 부화가 가능하다는 것을 보여

주었다. 더 나아가, 15°C와 35°C에서 부화한 유충의 여러 생리적인 특징들을 밝히는 실험을 하여 생존한게 온도를 구명하는 것 또한 중요한 연구가 될 것이라고 생각되었다.

부화 전 기간은 온도가 15°C에서 35°C로 올라가면서 짧아지는 것을 알 수 있었고, 반면에 온도가 내려갈수록 기간이 길어지는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 15°C 조건에서는 다른 조건에 비해 부화 전 기간(34.45 ± 1.51일)이 상당한 차이가 있었다 (표 1). 대량사육 후, 유통하는 시간의 신속성을 생각한다면 5~7일 정도의 부화 기간을 가진 25~35°C 조건이 가장 알맞았다. 더불어, 부화율과 산란 전 기간을 같이 고려했을 때, 가장 적절한 온도는 25~27.5°C였다. 이는 예전의 갈색거저리 사육 최적온도의 결과와도 일치하였다(Punzo and Mutchmor 1980).

온도별 유충의 개별사육과 집단사육에 따른 생리적 특성을 밝히는 실험에서는(표 2~3) 모든 온도 조건에서 집단사육을 한 실험군의 유충 발육기간이 개별사육한 실험군보다 짧았으며, 17.5°C 조건에서 개별사육할 경우 유충은 생존할 수 없었다. 그리고, 집단사육조건에서 17.5°C에

Table 2. Developmental periods of larvae and pupae, body weights of pupae and adults, and body sizes of adults under different temperatures by individual rearing

Temperature (°C)	Larval period (days)	Pupal period (days)	Pupal weight (mg)	Adult weight (mg)	Adult body size (mm)
30	165.06 ± 15.90b ^h	6.00 ± 1.18c	140.00 ± 0.04b	120.00 ± 0.03b	14.80 ± 0.18a
27.5	158.30 ± 11.06b	6.33 ± 2.11c	160.00 ± 0.05b	130.00 ± 0.04b	15.10 ± 0.16a
25	157.35 ± 7.85b	10.20 ± 1.66b	210.00 ± 0.03a	180.00 ± 0.03a	16.30 ± 0.09a
22.5	199.00 ± 8.72a	13.20 ± 1.10a	160.00 ± 0.03b	120.00 ± 0.03b	14.60 ± 0.09a
20	204.14 ± 15.35a	14.00 ± 2.10a	190.00 ± 0.03ab	160.00 ± 0.03ab	15.30 ± 0.15a
17.5	- ²⁾	- ²⁾	- ²⁾	- ²⁾	- ²⁾

The values are indicated as mean ± SD.

¹⁾Means within each column followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ by Tukey HSD method.

²⁾Not survived.

Table 3. Developmental periods of larvae and pupae, body weights of pupae and adults, and body sizes of adults under different temperatures by mass rearing

Temperature (°C)	Larval period (days)	Pupal period (days)	Pupal weight (mg)	Adult weight (mg)	Adult body size (mm)
30	129.01 ± 24.93c ¹⁾	6.76 ± 3.19d	180.00 ± 0.03b	140.00 ± 0.03b	15.60 ± 0.12b
27.5	126.56 ± 18.80d	6.51 ± 1.19d	170.00 ± 0.03b	150.00 ± 0.03b	15.60 ± 0.12b
25	135.89 ± 14.73c	8.48 ± 1.58c	200.00 ± 0.04a	160.00 ± 0.03a	16.20 ± 0.14a
22.5	158.64 ± 13.91b	13.88 ± 2.75b	170.00 ± 0.02b	140.00 ± 0.02b	15.60 ± 0.10b
20	168.59 ± 14.12b	15.50 ± 3.79b	180.00 ± 0.03b	150.00 ± 0.03b	15.80 ± 0.09ab
17.5	215.88 ± 16.55a	20.24 ± 3.31a	180.00 ± 0.03b	160.00 ± 0.08a	15.50 ± 0.11b

The values are indicated as mean ± SD.

¹⁾Means within each column followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ by Tukey HSD method.

Table 4. Developmental periods of larvae and pupae, body weights of pupae and adults, body sizes of adults, and eclosion rate under various photoperiod conditions at 25°C

Photoperiod	Larval period (days)	Pupal period (days)	Pupal weight (mg)	Adult weight (mg)	Adult body size (mm)	Eclosion rate (%)
14L : 10D	157.35 ± 7.85b ¹⁾	10.20 ± 1.66b	210.00 ± 0.03a	180.00 ± 0.03a	16.30 ± 0.09a	45.50
12L : 12D	184.89 ± 16.76a	8.65 ± 2.40a	220.00 ± 0.02a	180.00 ± 0.03a	16.90 ± 0.09a	51.50
10L : 14D	179.56 ± 30.22a	9.75 ± 1.75a	220.00 ± 0.06a	180.00 ± 0.04a	16.40 ± 0.14a	24.20

The values are indicated as mean ± SD.

¹⁾Means within each column followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ by Tukey HSD method.

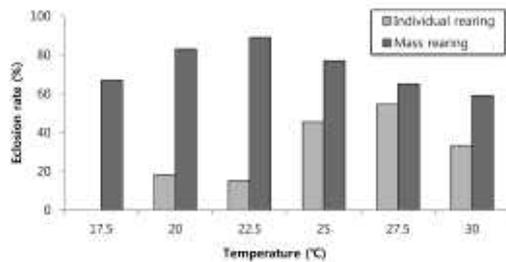


Fig. 2. Eclosion rate of *T. molitor* under different temperatures and rearing types.

서 25°C로 온도가 올라갈수록 유충 발육기간이 짧아짐을 관찰할 수 있었으며, 반면에, 30°C 조건에서는 오히려 27.5°C(126.56일) 조건보다 긴 129.01일의 발육기간을 가진다. 개별사육한 실험군에서는 25°C 조건에서 유충 발육기간이 126.56일로 가장 짧았다. 이 결과는 유충 15마리에게 여러 온도 조건 중, 30°C 조건에서 유충 발육기간이 110.8일로 가장 짧았던 결과와 다소 차이가 있었다(Koo et al., 2013). 이러한 차이는 위 실험에서, 사육 시 개별사육과 집단사육이 여러 생리적 차이를 보인 것처럼, 10마리와 15마리 사이에서도 밀도 변화에 따른 생리적 차이를 나타낼 가능성이 크다고 생각되었다. 따라서 향후 다양한 밀도로 여러 생리적 특징을 구명하는 연구가 필요하다고 판단되었다.

번데기 기간은 집단사육 시, 27.5°C 조건에서 6.51일로 가장 짧았고, 개별사육 시에는 30°C 조건에서 6일로 가장 짧았다. 번데기 무게는 집단사육과 개별사육 모두 25°C 조건에서 각각 200 mg, 210 mg으로 가장 높았으며, 성충 무게도 25°C 조건에서 가장 높았고(집단사육: 160 mg, 개별사육: 180 mg) 체장 역시, 25°C 조건에서 집단 및 개별사육 모두 각각 16.20 mm, 16.30 mm로 가장 길었다.

성충화율은 집단사육한 실험군에서 개별사육보다 높은 수치를 보였다(그림 2). 특히, 집단사육 시 22.5°C 조건에서 89%로 가장 높았으며, 20°C와 25°C 조건에서도 각각

83%, 77%로 높은 우화율을 보였다. 개별사육에서는 27.5°C에서 55%로 가장 높았으며, 나머지 조건에서도 대체적으로 낮은 성충화율을 나타냈다. 갈색거저리의 수요 탄력성을 고려한다면, 유충과 번데기 기간이 짧아야 함과 동시에 우화율도 높아야 하며, 번데기와 성충의 무게 그리고 성충 역시 영양상태에 문제가 없어야 함 것이다. 이를 모두 만족시키는 조건은 25°C에서 집단사육한 실험군이었다.

광주기별 생리적 특성을 밝히는 실험에서는 광주기가 14L : 10D조건일 때 유충기간(157.35일)이 짧았으며, 번데기 기간은 12L : 12D 조건에서 8.65일로 가장 짧았다. 번데기 무게는 12L : 12D와 10L : 14D조건에서 220 mg으로 가장 크게 증가되었지만, 우화 후 성충무게는 모든 조건에서 180 mg으로 동일하였다. 12L : 12D 조건에서 성충의 체장은 가장 길었고, 성충화율도 가장 높았다. 이 결과를 종합해 볼 때, 비록 14L : 10D 조건에서의 성충화율이 12L : 12D 조건보다 조금 낮았지만, 유충기간이 한 달 정도 빠르게 진행됨을 알 수 있었다. 따라서, 수요의 탄력성을 고려한다면 14L : 10D조건이 가장 적합함을 알 수 있었다. 하지만 대체적으로 낮은 성충화율을 나타냈기 때문에, 향후 적합한 광주기를 찾아 생산성을 효율적으로 증대시키는 연구가 필요할 것이다. 더불어, 표 2~3과 그림 2에서 집단사육과 개별사육의 결과가 다르게 나온 것처럼, 이 실험 역시 다른 광주기 조건에 따른 집단사육과 개별사육의 생리적 특성의 차이를 보일 것이라 생각되었다.

적 요

갈색거저리의 산업 활용도가 높아짐에 따라, 효율적인 실내 대량사육 시스템의 확립이 더욱 중요하게 인식되고 있다. 본 연구는 대량사육을 위해 다양한 범위의 온도, 광주기, 사육밀도에서 갈색거저리의 생리적 특성을 알아보고자 수행되었다. 갈색거저리 알은 17.5~27.5°C에서 70% 이상의 부화율을 나타냈고, 부화기간은 25~35°C에서 5~7일로 조사되었다. 결과적으로, 부화율과 산란 전 기간(egg periods)을 고려했을 때, 대량사육을 위해 적절한 실내온

도는 25 ~ 27.5°C였다. 다양한 온도 조건하에서 대량사육 시스템에서 유충의 발육기간은 개별사육 시스템에서 보다 더 짧았다. 번데기 무게는 20°C와 25°C를 제외한 대량사육 시스템에서 좀 더 높게 관찰되었다. 수요 탄력성과 생산중량을 고려했을 때, 가장 효과적인 조건은 25°C에서 대량사육한 실험군이었다. 14L : 10D의 광주기 조건에서 157.35일로 가장 짧은 유충기간을 나타냈다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 생명산업기술개발사업(과제 번호: 312026-3, 세부과제명: 사료용 곤충 대량 생산 기술 개발)의 지원을 받아 이루어진 것입니다.

References

Abdullah M (1961) Behavioural effects of temperature on insects. *Ohio J Sci* **61**(4), 212-219.

Audas A, Hogan GR, Razniak H (1995) Incubation temperature as a modifying factor on survival of *Tenebrio molitor* reared in selenium-containing media. *J Toxicol Environ Health* **44**(1), 115-122.

Bryning GP, Chambers J, Wakefield ME (2005) Identification of a sex pheromone from male yellow mealworm beetles, *Tenebrio molitor*. *J Chem Ecol* **31**(11), 2721-2730.

Drnevich JM, Papke RS, Rauser CL, Rutowski RL (2001) Material benefits from multiple mating in female mealworm beetles (*Tenebrio molitor* L.). *J Insect Behav* **14**(2), 215-230.

Fiore C (1960) Effects of temperature and parental age on the life cycle of the dark mealworm, *Tenebrio obscurus* Fabricius. *J N Y Entomol Soc* **68**(1), 27-35.

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.

Jung BH (2012) Insect fauna of Korea. vol.12, no.5, Darkling Beetles Arthropoda: Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae: Tene-

brionae / national institute of biological resources, flora and fauna of Korea, national institute of biological resources press, Korea.

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.

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.

Lemos WP, Ribeiro RC, Ramalho FS, Serrao JE, Zanuncio JC (2011) The reproductive tract of the males of the zoophytophagous predator *Brontocoris tabidus* (Signoret) (Heteroptera: Pentatomidae) with different diets and ages. *Am J Agr Sci* **6**(1), 12-18.

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. *Acta Astron*, **92**(1), 103-109.

Megido RC, Sablon L, Geuens M, Brostaux Y, Alabi T, Blecker C, Drugmand D, Haubruge E, Francis F (2013) Edible insects acceptance by Belgian consumers: promising attitude for entomophagy development. *J Sensory Stud* **29**(1), 14-20.

Ooninx DGAB (2012) Environmental impact of the production of mealworms as a protein source for humans-a life cycle assessment. *PLoS ONE* **7**(12), e51145.

Park JB, Choi WH, Kim SH, Jin HJ, Han YS, Lee YS, Kim NJ (2014) Developmental characteristics of *Tenebrio molitor* larvae (Coleoptera: Tenebrionidae) in different instars. *Int J Indust Entomol* **28**(1), 5-9.

Punzo E, Mutchmor JA (1980) Effects of temperature, relative humidity and period of exposure on the survival capacity of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J Kansas Entomol Soc* **53**(2), 260-270.

Silva O (2012) A study of the effect of a compromised immune system on *Tenebrio molitor* exposed to environmental bacteria and fungi at increasing temperatures. STEM research project mass academy of math and science, pp. 1-28.

Tanaka Y, Honda H, Ohsawa K, Yamamoto I (1986) A sex attractant of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor*, and its role in mating behavior. *J Pest Sci* **11**, 49-55.

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**(5), 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.

Developmental characteristics of *Zophobas atratus* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae in different instars

Sun Young Kim¹, Hong Geun Kim¹, Sung Ho Song² and Nam Jung Kim^{1*}

¹Applied Entomology Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju-gun, Jeollabuk-do, 565-851, Republic of Korea

²Gyeonggi Do Agricultural Research & Extension Services, Hwaseong-city Gyeonggi-do, 445-784, Republic of Korea

Abstract

The giant mealworm beetle, *Zophobas atratus* (Coleoptera: Tenebrionidae), is reared for commercial purposes as a live feed for animals. In 2011, it was officially introduced in Korea, and since then it has been considered commercially important. This beetle is a good animal feed resource because of its high protein content with balanced nutrients. However, its life stage characteristics have not been clearly described, especially of the larval stage that can be used as commercial products. To this end, in our study, we determined the number of *Z. atratus* larval instars, and described their characteristics at each stage, providing basic information about this beetle. *Z. atratus* larvae required eight to nine d of incubation period before hatching. The first instar period comprised three to four d. There were relatively large variations in each instar period, except for the first instar. Before the adults emerged, most of the individuals passed through 15 to 18 instars. The highest pupation rate, 25.71%, was observed in both 16th and 17th instars. Body length gradually increased with each successive instar and it reached its maximum at the 18th instar. The color of larvae was white at the first instar, and gradually turned brown after the second instar.

© 2015 The Korean Society of Sericultural Sciences
Int. J. Indust. Entomol. 30(2), 45-49 (2015)

Received : 8 May 2015

Revised : 15 Jun 2015

Accepted : 16 Jun 2015

Keywords:

Zophobas atratus,
larva,
body length,
instar

Introduction

Zophobas atratus Fabricius (Coleoptera: Tenebrionidae) is a large neotropical beetle. It is found on fruit bat guano and organic litter in its natural environment (Tschinkel and Willson, 1971; Quennedey *et al.*, 1995). The shape of this beetle is similar to that of mealworm, *Tenebrio molitor*, a well-known food resource for small pets, but it is several times larger than a mealworm. It is not a domestic species of Korea, but originated from South and Central America (Park *et al.*, 2013). In the Animal and Plant Quarantine Agency notification 2013-118, this beetle has been

included in the list of excluded quarantine pests in 2011, and has been allowed to be imported live as animal feed (Animal and Plant Quarantine Agency, 2013).

Z. atratus is larger than *T. molitor*, and is also known as super worm or king worm (Park *et al.*, 2013). It has been used as a protein source for small pets such as birds, reptiles, and small mammals (Jabir *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2013). Moreover, because of the rising prices of fish meal, which is widely used as a protein source in animal feed, alternative protein sources are sought to reduce the production cost of various animal feeds. Recently, insect-based diet has become a strong candidate as

*Corresponding author.

Nam Jung Kim

Applied Entomology Division, National Academy of Agricultural Science (NAAS), RDA, 166, Nongsaeangmyeong-ro, Iseo-myeon, Wanju-gun, Jeollabuk-do, 565-851, Republic of Korea

Tel: +82-63-238-2810 / FAX: +82-63-238-3833

E-mail: vastnj@korea.kr

© 2015 The Korean Society of Sericultural Sciences

an alternative to fish meal because fish raised on insect-based diet showed similar growth performance to those raised on conventional fish meal-based diet (Jabir *et al.*, 2012).

Much attention has been focused on *Z. atratus* because of its economic benefits. Previous studies have reported that *Z. atratus* is highly dependent on isolation for the onset of metamorphosis (Quennedey *et al.*, 1995; Arbi *et al.*, 1997). In crowded conditions, *Z. atratus* larvae showed increasing size and weight, forming supernumerary larval instars that did not pupate until death (Tschinkel and Willson, 1971). This inhibition of pupation induced by crowding conditions has also been described in other tenebrionid species, for example, *Tribolium freeman* (Nakakita, 1982; Kotake *et al.*, 1993; Quennedey *et al.*, 1995).

The number of post-embryonic molts in *T. molitor* is known to range from eight to more than 20 larval molts, depending on various intrinsic and extrinsic factors, such as food quality and individual density (Connat *et al.*, 1991). Previous studies have focused on various abiotic factors, including food quality, humidity (Murray, 1968; Urs and Hopkins, 1973), temperature (Ludwig, 1956), and photoperiod (Tyschchenko and Sheyk Ba, 1986) that affected the number of larval instars. However, the characteristics of different larval stages of *Z. atratus* commercialized in Korea remain unclear. In addition, the precise number of instars that *Z. atratus* larvae go through at the optimal temperature of 25°C is almost unknown. To this end, we investigated the characteristics of *Z. atratus* during different larval stages and determined the average number of larval instars. The results of this study will provide basic information for future investigations on the physiological characteristics of different instars, as well as for more effective commercialization of *Z. atratus*.

Materials & Methods

Breed condition

Z. atratus adults (about 120 individuals) were raised in acrylic boxes (58.2 cm width × 49.5 cm length × 17 cm height) at 25±3°C, 50–70% relative humidity (RH) and a photoperiod of 14L:10D. In each acrylic box, wheat bran (ca. 3 cm deep) was placed as a food source, and a Chinese cabbage leaf was placed on the wheat bran layer as a moisture source. Once a mating couple was observed, they were moved to a petri dish (10 cm

diameter × 1 cm height) containing bran. Eggs with hardened shells were obtained after three d. We collected 40 eggs to count the number of larval instar and to measure the body size. Each egg was transferred to a petri dish (5 cm diameter × 1.5 cm height) containing wheat bran and Chinese cabbage (1 g). This experiment was repeated 3 times.

Counting the number of larval instar and measuring body length of each instar

Each egg was reared in a petri dish (5 cm diameter × 1.5 cm height) with wheat bran at 25±3°C, 50–70% RH, and 14L:10D photoperiod. The condition of the larvae was checked every day to determine the number of instars. When the larval exuvium was observed, the larvae were removed from the petri dishes. After pupation, instar counting was stopped.

To measure the body length of each instar, the body lengths of ten larvae were measured using a Vernier caliper after each larval molting. Generally, the width of the head capsule was measured because it exhibits distinct variation between the larval stages (Hsia and Kao, 1987). In this experiment, however, the body lengths of larvae were also measured because of the small head capsule size during the early larval stages. In addition, we took photographs of each instar using a digital camera (SX220 HS, Canon, Tokyo, Japan).

Results & Discussion

As shown in Table 1, the average incubation period for hatching was eight – nine d, and the duration for the first instar three or four d. Interestingly, the size of larvae was not significantly different for different incubation periods or first instar durations. Between the second and 18th instars, the duration of each instar showed large variations among individuals. The first pupation was observed at the 13th instar even though only 2% of larvae were pupated.

Previous studies have shown that the body size of larvae is highly co-related with the pupation rate (Sehna, 1985). The developmental variability in tenebrionid beetle depends on two parameters: the number of larval instars and the duration of each larval instar. Previous studies have suggested that juvenile hormones play a key role in the mealworm developmental variability, the alimentary periods as well as the percentage of

Table 1. Larval instar period, pupation rate, and pupal weight of the 13th to 18th instars, and body lengths of each larval stage of *Zophobas atratus*.

Instar	Larval period		Pupation rate		Pupal weight		Body length	
	Mean (d)		(%)		(g)		(cm)	
Incubation period	8.38±0.49		-		-		-	
1	3.00±0.46		-		-		0.30±0.40	
2	6.95±1.74		-		-		0.34±0.20	
3	6.39±2.82		-		-		0.44±0.27	
4	9.67±3.25		-		-		0.50±0.39	
5	6.58±2.67		-		-		0.62±0.52	
6	8.81±2.90		-		-		0.72±0.90	
7	9.19±2.61		-		-		0.84±0.94	
8	10.31±5.98		-		-		0.97±1.85	
9	9.00±6.78		-		-		1.18±2.49	
10	7.83±1.48		-		-		1.44±3.22	
11	8.86±3.59		-		-		1.65±3.46	
12	9.36±2.61		-		-		1.98±5.80	
13	10.78±4.18		2.86±0.13		0.60±0.00		2.48±5.94	
14	12.31±3.84		11.43±0.27		0.63±0.06		3.05±5.76	
15	13.03±5.00		17.14±0.39		0.66±0.08		3.56±5.54	
16	13.29±2.85		25.71±0.43		0.64±0.10		4.16±5.43	
17	13.47±2.03		25.71±0.43		0.66±0.04		4.52±3.61	
18	15.33±3.44		17.14±0.37		0.72±0.10		4.71±2.45	

The values are indicated as mean ± SD.

larval molts are increased by juvenoids (Feyereisen, 1985; Connat *et al.*, 1991). In addition, *Z. atratus* is a model organism to study the relationship between external events and endocrine factors that regulate the onset of insect metamorphosis (Riddiford, 1976).

The lack of uniformity among larvae between the second and 18th instars may be caused by variations in nutrition. A study on *Manduca sexta* by Nijhout (1975) revealed that the number of instars increased under poor nutritional conditions. However, it remains to be verified whether this phenomenon occurs in *Z. atratus* or not. Furthermore, the symptoms caused by pathogens are highly similar to those of poor nutritional conditions in *Z. atratus*. It was also revealed that the gregarious nature of *T. molitor* enhanced its ability to resist pathogens (Barnes and Siva-Jothy, 2000). Therefore, further studies are required to investigate whether the duration of each instar is influenced by nutritional status, pathogen activity, or larval behavior.

The first pupation was observed at 13th instar. Approximately 85.70% of pupation was observed between the 15th and 18th instars. The largest proportion of pupae (25.71%) was observed at the 16th and 17th instars. In other words, most of the larvae in this experiment exhibited 15 to 18 instars in their life cycle. *T. molitor* larvae from old parents showed shorter larval period (Tracey, 1958). Moreover, the growth rate of offspring from old parents was delayed (Fiore, 1960). Therefore, we suggest that further studies should investigate larvae from the same age groups to reduce the effects caused by the parents' age. Further studies using a wide range of rearing temperatures might elucidate the effects of rearing temperature on the number of larval stages.

Body length of *Z. atratus* instars increased gradually, and reached the maximum body length in the 18th instar. Mortality was mostly observed between the second and fifth instars; one



Fig. 1. Different larval instars. Photographs were taken after the exuvium was observed.

larva died in the 17th instar. Based on these results, we conclude that more intensive care during the early stages of *Z. atratus* larvae leads to successful pupation when the larvae are reared individually.

The first instar was white, and gradually turned brown from or after the second instar. In particular, the anterior and posterior ends were darker than the middle of the body. Except for the color change, no significant morphological differences were detected in *Z. atratus* larvae (Fig. 1). We also checked the cuticle color, which typically changes based on the population density (Applebaum and Heifetz, 1999), and has been correlated with resistance in a lepidopteran (Reeson *et al.*, 1998).

We observed more severe cannibalism in pupae or larvae that were close to molt in *Z. atratus* under grouped conditions. In addition, successful pupation requires enough space for the each last instar larva. Previous study showed that successful pupation was affected by population density because only *Z. atratus* larvae

with enough isolated space successfully pupated (Tschinkel, 1981). Cannibalism of pharate pupae by active larvae may be the selective factor that evolved to the inhibition of pupation by crowding, higher larval growth rates, and higher fecundity (Tschinkel, 1978; Tschinkel, 1981).

In this study, we determined the incubation period of eggs, the duration of the first instar, and the average number of larval instars in *Z. atratus*. Our results will provide a basis for further studies on this species, as well as an insight into an important protein source in commercial feeds for various animals.

Acknowledgments

This research was supported by the Bio-industry Technology Development Program, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (Project No.312026-3).

References

- Animal and Plant Quarantine Agency. [Online] Insect pests and pet insects. http://www.qia.go.kr/plant/pest/plant_insec_rule.jsp#this.
- Applebaum SW, Heifetz Y (1999) Density-dependent physiological phase in insects. *A Rev Entomol* 44, 317-341.
- Aribi N, Quennedey A, Poinzet N, Delbecq JP (1997) Ecdysteroid titres in a Tenebrionid beetle, *Zophobas atratus*: effects of grouping and isolation. *J Insect Physiol* 43(9), 815-821.
- Barnes AI, Siva-Jothy MT (2000) Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. *Proc R Soc Lond B* 267, 177-182.
- Comtat JL, Delbecq JP, Gliθο I, Delachambre J (1991) The onset of metamorphosis in *Tenebrio molitor* larvae (Insecta, Coleoptera) under grouped, isolated and starved conditions. *J Insect Physiol* 37(9), 653-662.
- Feyereisen R (1985) Regulation of juvenile hormone titer: synthesis. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Eds Kerkut GA and Gilbert LI) Vol 7, pp. 391-429. Pergamon Press, Oxford.
- Flore C (1960) Effects of temperature and parental age on the life cycle of the dark mealworm, *Tenebrio obscurus* Fabricius. *J NY Entomol Soc* 68(1), 27-35.
- Hsia WT, Kao SS (1987) Application of head width measurements for instar determination of corn earworm larvae. *Plant Prot Bull (Taiwan R.O.C)* 29, 277-282.
- Jabir MDAR, Razak SA, Vikineswary S (2012) Nutritive potential and utilization of super worm (*Zophobas morio*) meal in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. *Afr J Biotechnol* 11, 6592-6598.
- Kotaki T, Nakakita H, Kuwahara M (1993) Crowding inhibits pupation in *Tribolium flavum* (Coleoptera: Tenebrionidae): effects of isolation and juvenile hormone analogues on development and pupation. *Appl Entomol Zool* 28, 43-52.
- Ludwig D (1956) Effects of temperature and parental age on the life cycle of the mealworm *Tenebrio molitor* L. *Ann Ent Soc Am* 49, 12-15.
- Murray DRP (1968) The importance of water in the normal growth of larvae of *Tenebrio molitor*. *Entomologia Exp Appl* 11, 149-168.
- Nakakita H (1982) Effect of larval density on pupation of *Tribolium flavum* Hinton (Coleoptera: Tenebrionidae). *Appl Entomol Zool* 17, 209-215.
- Nijhout HF (1975) A threshold size for metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *Biol Bull* 149, 214-225.
- Park HC, Jung BH, Han TM, Lee YB, Kim SH, Kim NJ (2013) Taxonomy of introduced commercial insect, *Zophobas atratus* (Coleoptera: Tenebrionidae) and a comparison of DNA barcoding with similar tenebrionids, *Promethes valgipes* and *Tenebrio molitor* in Korea. *J Seric Entomol Sci* 51(2), 185-190.
- Quennedey A, Aribi N, Everaerts C, Delbecq JP (1995) Postembryonic development of *Zophobas atratus* Fab. (Coleoptera: Tenebrionidae) under crowded or isolated conditions and effects of juvenile hormone analogue applications. *J Insect Physiol* 41(2), 143-152.
- Reeson AF, Wilson K, Gunn A, Hails RS, Goulson D (1998) Baculovirus resistance in the noctuid *Spodoptera exempta* is phenotypically plastic and responds to population density. *Proc R Soc Lond B* 265, 1787-1791.
- Riddiford LM (1976) Hormonal control of insect epidermal cell commitment in vitro. *Nature* 259, 115-117.
- Sehnal F (1985) Growth and life cycles. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Eds Kerkut GA and Gilbert LI) Vol 2, pp. 1-86. Pergamon Press, Oxford.
- Tracey SKM (1958) Effects of parental age on the life cycle of the mealworm, *Tenebrio molitor* Linnaeus. *Ann Ent Soc America* 51, 429-432.
- Tschinkel WR, Willson CD (1971) Inhibition of pupation due to crowding in some tenebrionid beetles. *J Exp Zool* 176, 137-146.
- Tschinkel WR (1978) Dispersal behavior of the larval tenebrionid beetle, *Zophobas rugipes*. *Physiol Zool* 51, 300-313.
- Tschinkel WR (1981) Larval dispersal and cannibalism in a natural population of *Zophobas atratus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Animal Behavior* 29, 990-996.
- Tyschchenko VP, Sheyk Ba A (1986) Photoperiodic regulation of larval growth and pupation of *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Ent Rev* 65, 35-46.
- Urs KCD, Hopkins TL (1973) Effect of moisture on growth rate and development of two strains of *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae). *J Stored Prod Res* 8, 291-297.

Production of antibacterial *Bombyx mori* cecropin A in mealworm-pathogenic *Beauveria bassiana* ERL1170

Se Jin Lee · Jeong Seon Yu · Bruce L. Parker · Margaret Skinner · Yeon Ho Je · Jae Su Kim

Received: 6 May 2014 / Accepted: 19 November 2014 / Published online: 28 November 2014
© Society for Industrial Microbiology and Biotechnology 2014

Abstract Efforts are underway to produce antimicrobial peptides in yellow mealworms (*Tenebrio molitor*), which can be developed as more effective and safer animal feed additives. In this work, we expressed *Bombyx mori* (*Bm*) cecropin-A in mealworms by the infection of transformed entomopathogenic *Beauveria bassiana* ERL1170. The active domain of *Bm cecropin A* gene was tagged with a signal sequence of *B. bassiana* for extracellular secretion, and the fragment was inserted into ERL1170 by the restriction enzyme-mediated integration method. Transformant D-6 showed antibacterial activity against *Bacillus subtilis* and *Listeria monocytogenes*. Against *T. molitor* larvae, D-6 had similar mortality to wild-type, and D6-infected mealworm suspension showed strong antibacterial activity against the two bacteria, but not in the wild-type-infected mealworms, thereby increasing the value of mealworms as animal feed additives.

Keywords *Tenebrio molitor* · Animal feed · Cecropin A · *Beauveria bassiana* · Antibacterial activity

Introduction

Entomopathogenic fungi can be considered as practical platforms for the expression of functional proteins in insects, and the infected mealworm complex has a potential to be used as animal feed additives [13]. Functional proteins can be produced in insects by the infection of genetically engineered-entomopathogenic fungi, and ultimately the mycotized insects can be used as raw materials for feed additives. Yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) has been added to animal feeds, because it has large amount of nutrition [16]. Mealworms in their larval and pupal stages are rich in protein and are easy to rear [7]. Proteins from insects are clean and safe to animals and insects have little chance of being infected by harmful microorganisms or of acquiring diseases [4, 5].

One of the functional proteins, cecropin is a family of potent antibacterial peptides involved in the immune hemolymph of the *Cecropia* moth [17]. Cecropin is synthesized in fat bodies as a preproprotein consisting of 31–39 amino acid residues and adopt an α -helical structure upon interaction with bacterial membranes, resulting in the formation of ion channels [3]. At low concentrations (0.1–5 μ M), cecropin exhibits lytic antibacterial activity against several bacteria, but not against eukaryotic cells [10, 15].

Cecropin has been widely used in many applications [1, 8, 14] but expression of this protein in entomopathogenic fungal expression platforms has not yet been fully exploited. A mealworm-fungus complex containing *B. mori* cecropin A could possibly control bacterial infection in animals. In this work, the antibacterial gene was integrated into an entomopathogenic *Beauveria bassiana* ERL1170 isolate by a restriction enzyme-mediated integration method to investigate the antibacterial activity of a transformed fungus and the infected mealworm complex.

S. J. Lee · J. S. Yu · B. L. Parker · J. S. Kim (✉)
Department of Agricultural Biology, College of Agricultural
and Life Sciences, Chonbuk National University, Jeonju, Korea
e-mail: jskim10@jbnu.ac.kr

B. L. Parker · M. Skinner
Entomology Research Laboratory, University of Vermont,
Burlington, VT, USA

Y. H. Je
Department of Agricultural Biotechnology, College
of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University,
Seoul, Korea

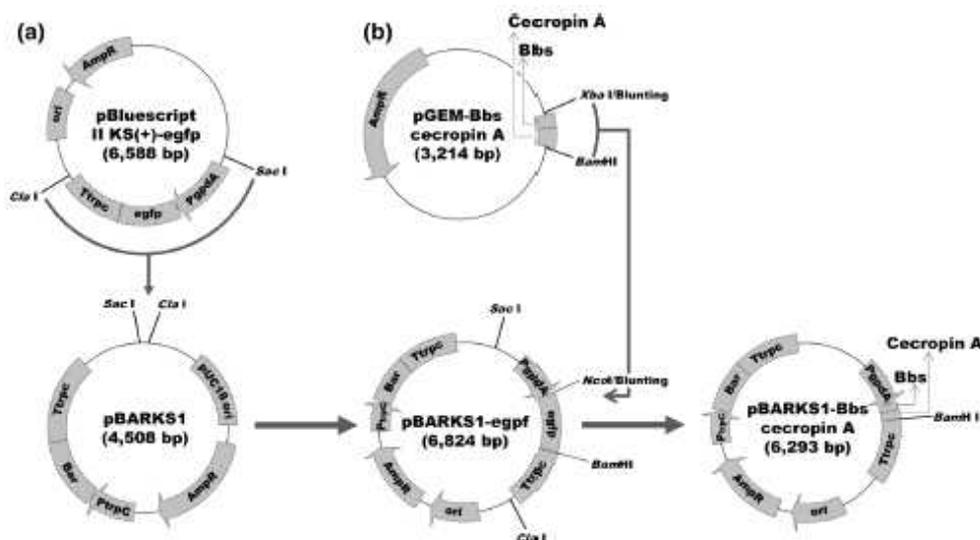


Fig. 1 Construction of the fungal transformation vector, pBARKS1-Bbs-cecropin A containing *B. bassiana* signal (Bbs) and *B. mori* (Bm) cecropin A. **a** Integration of the egfp expression cassette to pBARKS1; and **b** exchange of egfp with Bbs-Bm cecropin A fragment

Materials and methods

Microbial strains and culture media

Beauveria bassiana ERL1170 (ARSEF2060 in USDA-ARS in Ithaca) [11] were maintained on fourth-strength Sabouraud dextrose agar (SDA/4) in darkness at 25 °C for colonial growth. Conidia were harvested and suspended in 0.03 % (v/v) siloxane solution (Silwet L-77[®], Loveland, CO, USA) as a wetting agent. *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used for DNA manipulation, and cultured on Luria–Bertani (LB) medium containing 50 mg/mL ampicillin.

Vector construction

A fungal transformation vector, pBARKS1 (Fungal Genetics Stock Center, USA) was used as a plasmid for vector construction. pBARKS1 (4,508-bp) has a phosphinothricin (PPT)-resistant gene, which is expressed under the control of *trpC* promoter (Fig. 1). First, the 2,393-bp egfp-expression cassette including *gpdA* promoter (*PgpdA*) and *trpC* terminator (*TtrpC*) was digested from the pBluescript II KS(+)-egfp [12] using *Cla*I and *Sac*I (Fig. 1a). The egfp-expression cassette was ligated to pBARKS1, which was previously digested using the same endonucleases. The generated plasmid was designated as pBARKS1-egfp (6,824-bp). Using a HT-oligo[™] synthesizer from BIONEER (<http://www.bioneer.co.kr>), *cecropin A* gene (GenBank: D17394) from *B. mori* was

synthesized. In the gene synthesis, the 5'-end of cecropin A active domain was tagged to the 3'-end of 84-bp *B. bassiana* signal (*Bbs*) fragment of chitinase (GenBank: AY145440) (Fig. 1b). The *Bbs-cecropin A* fragment was flanked with *Xba*I at the 5'-end and *Bam*HI at the 3'-end for ligation and was ligated to pGEM-T vector, ultimately producing pGEM-Bbs-cecropin A (3,214-bp). pGEM-Bbs-cecropin A was digested with *Xba*I/blunting (Klenow pol.) and *Bam*HI, and the *Bbs-cecropin A* (198-bp) was isolated using a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, CA, USA). pBARKS1-egfp was digested with *Nco*I/blunting (Klenow pol.) and *Bam*HI, and the egfp-removed fragment (6,107-bp) was isolated using the same extraction kit. The two isolated fragments were ligated and finally pBARKS1-Bbs-cecropin A (6,293-bp) was generated. All plasmids were confirmed by sequencing.

Fungal transformation

pBARKS1-Bbs-cecropin A was linearized by *Hind*III and integrated into the genomic DNA of ERL1170 by the restriction enzyme-mediated integration method based on protoplasts [6]. Transformants were collected and sequentially grown on 600 µg/mL PPT+ Czapek's solution agar. Putative transformants were sub-cultured twice on SDA/4 at 25 °C. Genomic DNAs were extracted from 5-day old mycelial masses using the quick fungal genomic DNA extraction method [2], and the *bar* and *Bbs-cecropin A* were detected by PCRs with primers Bar-F and Bar-R and primers Bbs-cecropin A-F and Bbs-cecropin A-R (Table 1).

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequence	Size of amplified fragment
Bb 18S rRNA-F	5'-TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA-3'	166 bp
Bb 18S rRNA-R	5'-CCA ACG GAG ACC TTG TTA CG-3'	
Bar-F	5'-AGT CGA CCG TGT ACG TCT CC-3'	241 bp
Bar-R	5'-GAA GTC CAG CTG CCA GAA AC-3'	
Bbs-cecropin A-F	5'-CTC GCG CTC CTT CCA TT-3'	156 bp
Bbs-cecropin A-R	5'-TCG CTT GCC CTA TGA CG-3'	

Verification of expression

Transcription of *Bbs-cecropin A* in the putative transformants was examined by the extraction of RNAs from 5-day-old fungal mycelial masses using the TRIZOL (Invitrogen, CA, USA) method and reverse transcription PCR (RT-PCR) with the primers Bbs-cecropin A-F and Bbs-cecropin A-R. As controls, RT-PCRs with the *B. bassiana* 18S rRNA-specific primers (Table 1) were conducted. For western blotting, transformants and wild-type were cultured in fourth strength Sabouraud dextrose broth (SDB/4) at 25 °C and 150 rpm of shaking for 5 days. Cultured broth was filtered using sterile 3 M filter papers and syringe filters (0.25 µm), and the filtrate was concentrated by ultrafiltration using Amicon tubes (Millipores, MA, USA). The concentrates were subjected to 12 % SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and electrophoretically transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. A polyclonal antibody against cecropin (Novus Biologicals, CO, USA) was used to detect the expression of cecropin A which was secreted from the mycelia of the transformants. The PVDF membrane was incubated with a 1,000-fold dilution of the polyclonal antibody and a 2,000-fold dilution of goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP) as the second antibody. Visualization was conducted under a chemiluminescence image analysis system (Uvitec, Cambridge, UK) using the luminol reagent, SC-2048 (Santa Cruz Biotechnology Co., USA).

Antibacterial activity assay

Antibacterial activities of putative transformants were assayed against two bacteria on LB medium. The two bacteria, *Bacillus subtilis* (KACC15591) and *Listeria monocytogenes* (KACC10550) from the Korean Agricultural Culture Collection (<http://www.genbank.go.kr>) were cultured on LB medium at 27 °C for 3 days. A 50-µl aliquot of bacterial suspension (OD_{600} : ~1.0) was spread on LB medium in a 60-mm diameter Petri dish, and the agar block (5 mm diameter) of a 7-day-old putative transformant was placed on the LB medium with three replicates. Wild-type served as a control. All dishes were held at room temperature (~25 °C), and antibacterial activities of transformants were

examined daily by measuring the diameter of clear zone of the agar blocks (when no clear zone was observed, it was recorded as zero).

Fungal inoculation to mealworms

To inoculate putative transformants to mealworm larvae, 3rd instar larvae were placed in a 60-mm diameter Petri dish (10 larvae/dish) containing 2 g of wheat bran as diet, and they were placed at 4 °C for 20 min to reduce their mobility. For inoculation, a 10-mL aliquot of conidial suspension (1×10^7 conidia/mL) was applied to ten larvae in a dish using a micro sprayer, and the dish was covered with a lid to maintain high humidity conditions. It was replicated three times (three Petri dishes/treatment). Wild-type served as a control. Untreated mealworms served as another control. All dishes were held at 25 °C and at 16:8 (L/D) regimes in an incubator. Mortality was examined daily by counting the number of dead larvae, and the mycelial outgrowth was observed. In 7 days, dead mealworms were collected and freeze-dried to make mealworm powder, and it was subjected to an antibacterial activity assay with some modification to inhibit the fungal growth from the powder. Fluazinam (CAS NO.: 79622-59-6) as an antimycotics was added to phosphate buffered saline (PBS) at 0.25 g/L, and the freeze-dried mealworm powder (0.01 g) was suspended in the 1 mL PBS solution to make 1 % (w/v) suspension. In a preliminary test, fluazinam did not show any clear zone against the bacteria. After the spreading of the bacterial suspension on LB medium, the freeze-dried mealworm suspension was dropped on a sterile paper disk (5 µL/6-mm diameter paper disk).

Results and discussion

Characterization of cecropin A-producing transformant

After the restriction enzyme-mediated fungal transformation, putative transformants (30–50 colonies/dish) were observed on the regeneration medium including phosphinothricin (PPT). A transformant with strong antibacterial activity was selected, and it was designated as D-6. The

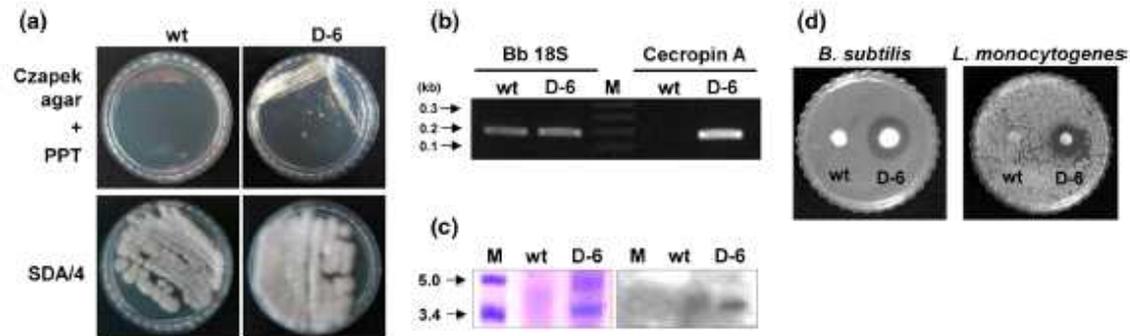


Fig. 2 Characterization of *B. mori* cecropin A-producing transformant D-6. **a** Mycelial growth of wild-type and transformant D-6 on Czapek's solution agar containing phosphinothricin (PPT) and SDA/4 (without PPT); **b** Reverse transcription (RT) PCR of wild type and

transformant D-6 (*B. bassiana* 18S rRNA was used as a control); **c** SDS-PAGE and western blot of wild-type and D-6 supernatants; and **d** Antibacterial activity of wild-type and transformant D-6 against *B. subtilis* and *L. monocytogenes* on LB agar in three days

transformant had a stable growth on the Czapek's solution agar containing PPT during sub-cultures, whereas wild type did not grow on the selection medium (Fig. 2a). On the SDA/4 medium, D-6 showed a slightly different morphology (more mycelial mass was observed) compared to the wild-type (Fig. 2a). From the sequencing of the ITS region of transformant D-6 with primers ITS1-F and ITS4-R, it was identical to the sequence of wild-type (data not shown). The slightly different morphology of D-6 [Less number of conidia were produced in D-6 (c. 5×10^7 conidia/cm²) compared to wild-type (c. 2×10^8 conidia/cm²)] might be resulted from the possible integration of *cecropin A* gene into conidiogenesis-related genes in wild-type genomic DNA, but it needs to be further investigated in a gene characterization study.

Transcription of *Bbs-cecropin A* gene was confirmed by RT-PCR analysis (Fig. 2b) and the expression of cecropin A was confirmed by western blot analysis (Fig. 2c). RT-PCR of transformant D-6 with the primers Bbs-cecropin A-F and Bbs-cecropin A-R showed 156-bp target fragment, but not in wild-type. As an internal control, 18S rRNA-specific RT-PCR product (166-bp) was observed in both wild-type and transformant D-6. The western blot analysis of D-6 supernatant detected ~3.8 kDa protein, but not in the wild-type supernatant, which confirmed that *Bm cecropin A* gene was transcribed and successfully expressed in the fungus. In this work, the production efficiency of cecropin A was investigated by measuring the clear zone of the transformant D-6 in the antibacterial activity assay, however, it needs to be investigated more accurately.

The transformant D-6 showed strong antibacterial activity against *B. subtilis* and *L. monocytogenes* (Fig. 2d), whereas wild-type did not show any significant activity. Compared to the wild-type with no clear zone, transformant D-6 showed 19.3 ± 0.6 mm of diameter (*B. subtilis*)

and 13.1 ± 0.5 mm of diameter (*L. monocytogenes*) of clear zones in 3 days after inoculation. The expressed *B. mori* cecropin A could be mainly involved in the antibacterial activity. If the transformant D-6 was cultured earlier than the bacterial inoculation, it might show much higher antibacterial activity. Control of bacterial growth can be significantly related to the time when the transformant is treated. Additionally, the speed of fungal growth is possibly involved in the antibacterial activity.

Antibacterial activity of the infected mealworm powder

After the infection, transformant D-6 showed similar mortality to wild-type, and mycelial outgrowth (mycosis) was observed in D-6 and wild type 7 days post-infection (Fig. 3a). Any significant difference of mortality between wild-type and D-6 was not observed. In 5 days, >90 % of populations were dead in the fungal treatments (D-6 and wild type), but the untreated control showed <10 % mortality. The median lethal time (LT₅₀) of transformant D-6 was 3.2 ± 0.4 days, and it was similar to the LT₅₀ of wild-type (3.7 ± 0.5 days). The fungal transformation possibly did not disrupt the virulence factors of *B. bassiana*, although it needs to be further investigated by the identification of the flanking region of the fungal genomic DNA using TAIL-PCR or iPCR method. The mortality might be accelerated by increasing the dose of inoculum or raising the relative humidity at fungal infection stage. The stage of *T. molitor* larvae when they were infected by the fungus might be another critical factor of mortality.

The D-6-infected mealworm suspension showed strong antibacterial activity against the two bacteria on LB medium in 3 days, but not in the wild type-infected mealworms (Fig. 3b). The *B. mori* cecropin A was possibly accumulated in *T. molitor* larvae, and the infected

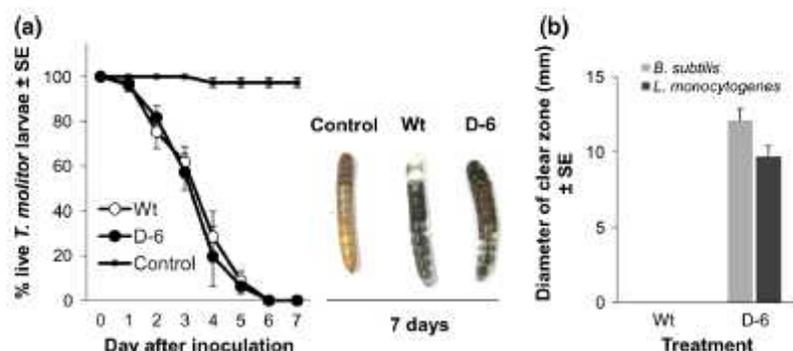


Fig. 3 Antibacterial activity of the transformant D-6-infected mealworm (*T. molitor*) powder. **a** Percentage (%) of live *T. molitor* larvae after the treatment of wild-type and D-6 conidial suspensions (1×10^7 conidia/mL). In 7 days, mycelial outgrowth was observed in both of wild-type and D-6 treatments; and **b** Antibacterial activity of the infected mealworm powder against *B. subtilis* and *L. monocytogenes*

mealworms could be used as an antibacterial material in animal feeds. However, one concern about the utility of the system is the reproducibility of the process (concentration of active cecropin A in the final product in different batches). It can be overcome when the transformant stably keeps the gene over the generations and inoculation factors such as larval stage and quantity of conidia are consistent in batches. Another concern is the safety of the final product containing *B. bassiana* proteins and the antibiotic resistance gene. *Beauveria bassiana* has been reported as safe to human and mammalian [13] and Bm cecropin A has been reported long times ago and now used as additives for foods [14]. However, we need to investigate the safety of the mealworm-*B. bassiana* complex in the following studies. The secreted protein in *T. molitor* larvae will be characterized in the next works, followed by the investigation of feasibility in industrialization.

Some other functional genes can be expressed in this mealworm-based fungal expression platform, such as those encoding edible vaccines, digestive enzymes or other functional peptides. The final mealworm-fungal complex can be used as an animal feed additive and its application possibly expands to human health care products. Integration of AMPs, edible vaccines and useful amino acids to *Cordyceps* species could significantly improve their biological activities [9].

This work suggests that *B. mori* cecropin A was successfully expressed in yellow mealworms by the infection of transformed *B. bassiana* ERL1170 containing the cecropin A-expression cassette. The transformant-infected mealworms showed strong antibacterial activity against *B. subtilis* and *L. monocytogenes*, thereby increasing the value of mealworms as animal feed additives.

on LB agar 3 days after treatment. Infected mealworms were freeze-dried and suspended in phosphate buffer saline at 1% (w/v), which contained fluazinam as an antimycotics to inhibit fungal growth, and the infected mealworm suspension was dropped on a paper disk (5 μ L/6-mm diameter disk)

Acknowledgments We are grateful to Dr. Nam Jung Kim in Rural Development Administration in Republic of Korea for providing mealworms and helpful comments on insect rearing. This research was supported by the Bio-industry Technology Development Program, Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of Korea (Project No.: 312026-03-1-CG000).

References

1. Auvynet C, Rosenstein Y (2009) Multifunctional host defense peptides: antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. *FEBS J* 276:6497–6508
2. Chi MH, Park SY, Lee YH (2009) A quick and safe method for fungal DNA extraction. *Plant Pathol J* 25:108–111
3. Christensen B, Fink J, Merrifield RB, Mauzerall D (1988) Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5072–5076
4. DeFoliart GR (1995) Edible insects as minilivestock. *Biodiv Conserv* 4:306–321
5. DeFoliart GR (1999) Insects as food: Why the western attitude is important. *Ann Rev Entomol* 44:21–50
6. Gaffoor I, Brown DW, Plattner R, Proctor RH, Qi W, Trail F (2005) Functional analysis of the polyketide synthase genes in the filamentous fungus *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Eukaryot Cell* 4:1926–1933
7. Ghaly AE, Alkoik FN (2009) The yellow mealworm as a novel source of protein. *Am J Agric Biol Sci* 4:319–331
8. Guani GE, Santos MT, Lugo Reyes SO, Teran LM (2010) Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol* 135:1–11
9. Holliday JC, Cleaver P, Loomis-Powers M, Patel D (2004) Analysis of quality and techniques for hybridization of medical fungus *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. (Ascomycetes). *Int J Med Mushrooms* 6:151–164
10. Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, Kapur R, Boman HG (1982) Insect immunity: Isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia Pupae*. *Eur J Biochem* 127:207–217

11. Kim JS, Parker BL, Skinner M (2010) Effects of culture media on hydrophobicity and thermotolerance of *Bb* and *Ma* conidia, with description of a novel surfactant based hydrophobicity assay. *J Invertebr Pathol* 105:322–328
12. Kim JS, Choi JY, Lee JH, Park JB, Fu Z, Liu Q, Tao X, Jin BR, Skinner M, Parker BL, Je YH (2013) Bumblebee venom serine protease increases fungal insecticidal virulence by inducing insect melanization. *PLoS One* 8:e62555
13. Kim JS, Choi JY, Lee SJ, Lee JH, Fu Z, Skinner M, Parker BL, Je YH (2013) Transformation of *Beauveria bassiana* to produce EGFP in *Tenebrio molitor* for use as animal feed additives. *FEMS Microbiol Lett* 344:173–178
14. Marr AK, Gooderham WJ, Hancock RE (2006) Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr Opin Pharmacol* 6:468–472
15. Mills D, Hammerschlag FA (1993) Effect of cecropin B on peach pathogens, protoplasts, and cells. *Plant Sci* 93:143–150
16. Ramos-Elorduy J, Moreno JMP, Prado EE, Perez MA, Otero JL, de Guevara OL (1997) Nutritional value of edible insects from the State of Oaxaca, Mexico. *J Food Compos Anal* 10:142–157
17. Steiner H, Hultmark D, Engström A, Bennich H, Bonan HG (1981) Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292:246–248

	(19) 대한민국특허청(KR)	(11) 공개번호	10-2014-0122839
	(12) 공개특허공보(A)	(43) 공개일자	2014년10월21일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	(71) 출원인		
A23K 1/18 (2006.01) A23K 1/175 (2006.01)	대한민국(농촌진흥청장)		
(21) 출원번호	10-2013-0039755	경기도 수원시 권선구 수인로 126 (서문동, 농촌진흥청)	
(22) 출원일자	2013년04월11일	(72) 발명자	김남정
심사청구일자	2013년04월11일		
홍성진			
(뒷면에 계속)			
(74) 대리인			
나동규			

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **거저리과 유층의 수분공급용 젤리형 조성물 및 이의 제조방법**

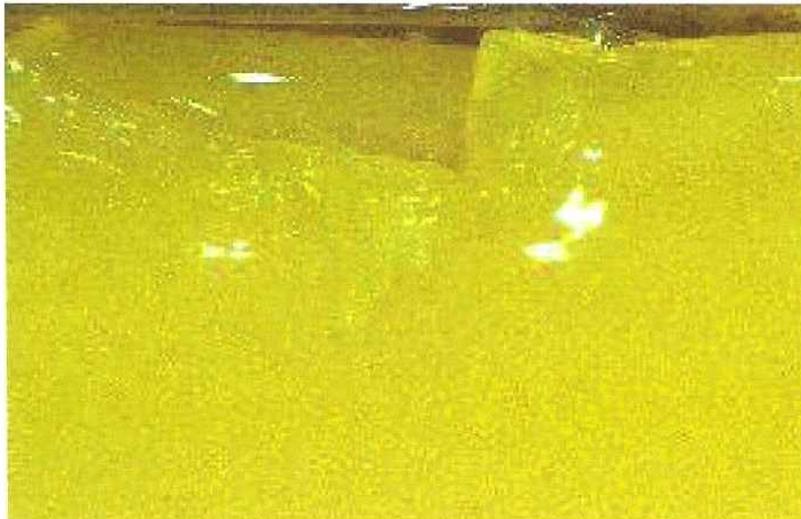
(57) 요약

본 발명은 거저리과 유층의 수분공급용 젤리형 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 거저리과 유층의 수분공급용 젤리형 조성물은 물이 95~99.8 중량%와 한천이 0.2~5 중량%로 포함된다.

본 발명에 의하면, 거저리과 유층에게 수분공급용으로 통상적으로 제공되었던 채소 또는 과일껍질 대신 수분공급용 젤리형 조성물이 제공된다.

대표도 - 도1



(72) 발명자
김성현

이영보

박해철

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ009188

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 곤충자원을 이용한 양돈사료화 이용 기술 및 제품 개발

연구과제명 사료용 곤충 대량 생산 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 국립농업과학원

연구기간 2012.11.26 ~ 2013.11.26

특허청구의 범위

청구항 1

물 95-99.8 중량%와 현탁 0.2-5 중량%로 이루어진,
기저리과 유층의 수분공급용 젤리형 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,
상기 물이 99-99.5 중량%, 상기 현탁이 0.5-1 중량%로 이루어질 수 있는,
기저리과 유층의 수분공급용 젤리형 조성물.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서,
상기 기저리과 유층의 수분공급용 젤리형 조성물은,
무기질과 비타민 중 어느 하나 이상을 더 포함하는,
기저리과 유층의 수분공급용 젤리형 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서,
상기 무기질은 상기 물 중량대비 0.001-0.1 중량%로 이루어진,
기저리과 유층의 수분공급용 젤리형 조성물.

청구항 5

제 3항에 있어서,
상기 무기질은 KI(요오드화칼륨), $ATK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ (황산알루미늄칼륨), $MnSO_4$ (황산망간),
 NaF (플루오린화나트륨), $FePO_4 \cdot 2H_2O$ (인산철), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (황산구리), $MgSO_4$ (황산마그네슘), $NaCl$ (염화나트륨),
 KCl (염화칼륨), $Ca_3(PO_4)_2$ (인산칼슘), $CaCO_3$ (탄산칼슘), KH_2PO_4 (제1인산칼륨)중 선택된 어느 하나 이상인,
기저리과 유층의 수분공급용 젤리형 조성물.

청구항 6

제 3항에 있어서,
상기 비타민은 상기 물 중량대비 0.001-0.1 중량%로 이루어진,
기저리과 유층의 수분공급용 젤리형 조성물.

청구항 7

제 3항에 있어서,

상기 비타민은 비타민 A, 콜레칼시페롤, 초산토코페롤, 메나디온아황산수소나트륨, 엽산치아민, 리보플라빈, 엽산피리독신, 시아노코발라민, 아스코르빈산, 엽산, 니코틴산, 판토텐산칼슘, DL-메치오닌 중 선택된 어느 하나 이상인,

거저리과 유충의 수분공급용 젤리형 조성물.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 선택된 어느 하나의 항에 있어서,

거저리과 유충의 수분공급용 젤리형 조성물을 젤리 형태로 성형하여 거저리과 유충에게 수분을 공급하는,

거저리과 유충의 수분공급용 젤리.

청구항 9

물 95~99.8 중량%과 한천 0.2~5 중량%을 혼합하여 혼합물 제조하는 제 1단계;

상기 혼합물을 75~85℃에서 10~15분동안 가열하여 혼합액을 제조하는 제 2단계 및,

상기 혼합액의 내부온도가 50~60℃로 될 때까지 냉각시켜서 수분공급용 젤리 조성물을 제조하는 제 3단계;를 포함하는,

거저리과 유충의 수분공급용 젤리 제조방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 제 1단계에서 상기 혼합물에는 무기질을 더 포함하는,

거저리과 유충의 수분공급용 젤리 제조방법.

청구항 11

제 9항에 있어서,

상기 제 3단계에서는 상기 혼합액을 냉각시킨 다음 비타민을 더 첨가한 후 녹여서 수분공급용 젤리 조성물을 제조하는 것으로 이루어지는,

거저리과 유충의 수분공급용 젤리 제조방법.

청구항 12

제 9항 내지 제 11항의 제조방법 중 선택된 어느 한 항에 있어서,

상기 제 3단계 후에는 상기 수분공급용 젤리 조성물을 용기에 담아 성형하는 제 4단계;를 더 포함하는,

거저리과 유충의 수분공급용 젤리 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 거저리과 유충의 수분공급용 젤리형 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 거저리과 유충에게 수분공급을 위하여 일반적으로 공급되던 채소 및 과일을 대체하며, 수분과다섭취로 인한 폐사 방지 가능한 거저리과 유충의 수분공급용 젤리형 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 거저리과(*Tenebrionidae*)는 딱정벌레목에 포함되는 곤충으로서, 따뜻하고 건조한 기후에서 흔하게 볼 수 있으며, 대부분 건조하고 부패된 식물이나 동물조직을 먹으며 살아간다.
- [0003] 이러한 거저리과(*Tenebrionidae*)의 성충은 보통 2-35mm 크기에 편평형에서 원통형까지 여러 형태를 갖으며, 유충은 길이가 약 25mm에 원통형의 벌레모양을 하고 있다. 특히 거저리과 유충의 대부분은 애완동물 새나 물고기 또는 고슴도치 등의 먹이로 쓰이며, 그 중에서도 갈색거저리 유충이 가장 많이 이용된다.
- [0004] 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 유충은 밀웜(Mealworm)이라고도 불리우는데, 그 기간은 약 15-20주이나, 번태기간이 비교적 짧아 성장이 빠르며, 번식률도 매우 높으며, 곡식을 먹이로 하는 매우 청결한 곤충이다.
- [0005] 이에, 국내에서는 10여 년 전부터 애완동물의 사료로서 많이 활용되었고, 곤충애호가들이나 동물원 등에서 사육하기 시작하면서, 최근 사료용 곤충으로서 여러가지 장점으로 인해 상업화를 목적으로 대량 증식하는 농가가 생겨나고 있다.
- [0006] 또한, 최근 갈색거저리(*Tenebrio molitor*)는 곤충관련 생리 생태실험을 위한 연구에서 산업곤충으로 활용하기 위한 연구들을 통해 중국에서 농가소득원으로 새로운 영역을 개척하였고, 갈색거저리(*Tenebrio molitor*)의 자원화 이용작업은 세계 여러 나라에서 시작되었는데 프랑스, 독일, 러시아와 일본이 잇달아 시작하였으며, 주로 인공사료, 인공생산, 사육기술, 식용, 약용 및 건강기능성분탐색을 하고 있다.
- [0007] 이러한, 거저리과(*Tenebrionidae*) 유충들은 주로 먹이로부터 수분을 얻어 생존하게 되는데, 여기서 수분은 거저리과 유충의 생명유지활동을 위한 배개체이기에 대부분 채소(배추, 무, 당근 등)와 과일(수박, 사과 등)껍질을 저장곡물과 함께 공급된다.
- [0008] 관련 선행기술로는 한국등록특허 제10-1163708호 "애완곤충용 젤리형 인공사료 조성물의 제조방법" 및 한국등록특허 제10-1055628호 "배추뿌기사나방 유충 사육용 인공사료"에 관한 것이 등록되어 있다.
- [0009] 그러나, 상기 선행기술들은 장수풍뎡이 등 험악한 형의 구기를 가진 애완곤충들에게 적합한 형태로 만들어져, 지작형의 구기를 가진 거저리과 유충에게는 적합하지 않을 뿐만 아니라, 곤충의 성장에 필요한 주 사료를 공급하는 것이 목적이므로, 수분은 별도로 공급해줘야 한다는 문제점이 있다.
- [0010] 또한, 통상적으로 수분공급용으로 공급되는 채소(배추, 무, 당근 등)와 과일(수박, 사과 등)껍질에서는 응애(Mite)가 생기기므로, 상기 거저리과 유충들은 보통 비위생적인 환경에서 생활하고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 거저리과 유충에게 수분공급을 위하여 일반적으로 공급되던 채소 및 과일을 대체할 수 있으며, 수분과다섭취로 인한 폐사를 방지할 수 있는 거저리과 유충의 수분공급용 젤리형 조성물 및 이의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0012] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제들은 이상에서 언급한 기술적 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 거저리과 유충 수분공급용 젤리형 조성물은 물 95-99.8 중량%와 한천 0.2-5 중량%로 이루어지며, 바람직하게는 상기 물은 99-99.5 중량%로, 상기 한천은 0.5-1 중량%로 이루어지는 것이 특징이다.
- [0014] 상기 거저리과 유충의 수분공급용 젤리형 조성물은 무기질과 미다민을 더 포함하는 것이 특징이다.
- [0015] 상기 무기질은 물 중량대비 0.001-0.1 중량%로 포함하는 것이 특징이며, 상기 무기질은 KI(요오드화칼륨), $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ (황산알루미늄칼륨), $MnSO_4$ (황산망간), NaF(플루오린화나트륨), $FePO_4 \cdot 2H_2O$ (인산철), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (황산구리), $MgSO_4$ (황산마그네슘), NaCl(염화나트륨), KCl(염화칼륨), $Ca_3(PO_4)_2$ (인산칼슘), $CaCO_3$ (탄산칼슘), KH_2PO_4 (제1인산칼륨)중 선택된 어느 하나 이상인 것이 특징이다.
- [0016] 상기 미다민은 물 중량대비 0.001-0.1 중량%로 이루어지는 것이 특징이며, 상기 미다민은 비타민 A, 콜레칼시페롤, 초산토코페롤, 메나디온아황산수소나트륨, 엽산치아민, 리보플라빈, 엽산피리독신, 시아노코발라민, 아스코르브산, 엽산, 니코틴산, 판토텐산칼슘, DL-메치오닌 중 선택된 어느 하나 이상인 것이 특징이다.
- [0017] 본 발명의 거저리과 유충의 수분공급용 젤리형 조성물의 제조방법은 물과 한천을 혼합하여 혼합물을 제조하는 제 1단계; 상기 혼합물을 75-85℃에서 10-15분 동안 가열하여 혼합액을 제조하는 제 2단계 및, 상기 혼합액의 온도가 50-60℃로 될 때까지 냉각시켜 수분공급용 젤리 조성물을 제조하는 제 3단계;를 포함하는 것이 특징이다.
- [0018] 상기 제 1단계에서 상기 혼합물에는 무기질을 더 포함하는 것이 특징이다.
- [0019] 상기 제 3단계 후에는 미다민을 더 첨가한 후 녹이는 단계를 더 포함하는 것이 특징이다.
- [0020] 상기 제 3단계 후에는 상기 수분공급용 젤리 조성물을 용기에 담아 성형하는 단계를 더 포함하는 것이 특징이다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명에 의해, 거저리과 유충에게 수분공급용으로 통상적으로 제공되었던 채소 또는 과일껍질 대신 수분공급용 젤리형 조성물이 제공된다.
- [0022] 이에 수분공급이 용이하며, 사육환경이 개선됨과 동시에 수분과다 공급에 의한 폐사를 막을 수 있어, 거저리과 유충의 생존율이 증대되므로 농가의 소득향상이 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 본 발명의 실시예 4에 대한 거저리과 유충의 수분공급용 젤리를 나타낸 도면이다.
 도 2는 본 발명의 간제 거저리 유충이 실시예 4에 대한 수분공급용 젤리를 섭취하는 모습을 나타낸 도면이다.
 A) 수분공급용 젤리를 공급한지 5분 쯤 모습
 B) 수분공급용 젤리를 공급한지 1시간 쯤 모습
 C) 수분공급용 젤리를 공급한지 5시간 쯤 모습
 도 3은 본 발명의 실제 거저리 유충이 실험예 1의 한천 함량에 따른 수분공급용 젤리를 공급한지 1시간 쯤 모습을 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명을 상세하게 설명하며, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 상세한 설명은 생략한다.
- [0025] 거저리과 유충은 일반적으로 채소(배추, 당근, 무 등)와 과일(수박, 사과 등)껍질 등으로부터 수분을 공급받는다.

- [0026] 그러나, 채소와 과일껍질로 인하여 응애(Mite, 진드기)가 생길 수 있어, 거저리과 유충은 비위생적인 환경에서 사육되는 경우가 많다.
- [0027] 이에 본 발명에서는 거저리과 유충을 위생적인 환경하에 사육되도록 함과 동시에 수분과다로 인한 폐사를 방지하기 위하여 기존의 수분공급 방식 대신 수분공급용 젤리형 조성물을 제조하고, 이를 성형하여 수분공급용 젤리를 제공하고자 한다.
- [0028] 이하, 거저리과 유충의 수분공급용 젤리 제조방법을 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0029] 1. 제 1단계: 혼합물 제조
- [0030] 본 발명은 물 95-99.8 중량%와 한천 0.2-5 중량%를 혼합하여 혼합물을 제조하는 본 단계부터 시작되며, 바람직하게 상기 물은 99-99.5 중량%로, 상기 한천은 0.5-1 중량%인 것으로 이루어진다.
- [0031] 이때, 상기 물이 95 중량% 미만으로 혼합되거나 상기 한천이 5 중량% 초과로 혼합될 경우에는 상대적으로 물의 함량대비 상기 한천의 함량이 너무 많아, 상기 조성물이 성형되기도 전에 실온에서 딱딱하게 응고되므로 젤리형태를 이루는데 어려움이 있다. 이에 저착점의 구기를 가지고 있는 거저리과 유충이 먹기에는 적합한 상태를 갖고 있지 않아 오히려 수분섭취에 어려움이 있게 된다.
- [0032] 또한, 상기 물이 99.8 중량%를 초과하거나 상기 한천이 0.2 중량% 미만으로 혼합될 경우에는 상대적으로 상기 한천의 함량이 너무 적어 젤리형태를 이루는데 어려움이 있으며, 또한 수분과다섭취로 인한 폐사가 발생할 우려가 있게 된다.
- [0033] 상기 혼합물에는 무기질이 더 포함되기도 하는데, 바람직하게는 KI(요오드화칼륨), $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ (황산알루미늄칼륨), $MnSO_4$ (황산망간), NaF (플루오린화나트륨), $FePO_4 \cdot 2H_2O$ (인산철), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (황산구리), $MgSO_4$ (황산마그네슘), $NaCl$ (염화나트륨), KCl (염화칼륨), $Ca_3(PO_4)_2$ (인산칼슘), $CaCO_3$ (탄산칼슘), KH_2PO_4 (제1인산칼륨) 중 선택된 어느 하나 이상이 포함되는 것이 좋다.
- [0034] 이 때, 상기 무기질은 물 중량대비 0.001-0.1 중량%로 포함되는 것이 좋다.
- [0035] 상기 무기질은 거저리과 유충이 성충으로 변태할 때 성충의 골격형성에 도움을 주는 성분 중 하나이며, 상기 무기질이 물 중량대비 0.001 중량% 미만으로 첨가될 경우, 성충의 골격형성에 영향력을 나타내지 않아 추가 첨가물질로서의 효능을 얻기 어렵다.
- [0036] 또한 물 중량%가 0.1 중량%를 초과할 경우에는 상대적으로 그 함량이 너무 많아 오히려 젤리화 하는데 악영향을 미치게 된다.
- [0037] 2. 제 2단계: 혼합액 제조
- [0038] 본 단계에서는 상기 혼합물은 75-85℃에서 10-15분동안 가열하여 혼합액을 제조한다.
- [0039] 이 때, 상기 혼합물을 75℃미만에서 10분 미만으로 가열할 경우에는 상기 물에 상기 한천이 완전히 녹지 않아 젤리형태를 이루기 어려우며, 85℃초과에서 15분 초과로 가열할 경우에는 열에 의해 수분이 증발되므로, 보유하고 있는 수분함량이 극히 적게되어 수분공급용으로 사용하기에 적합하지 않게 된다.
- [0040] 3. 제 3단계: 거저리과 유충의 수분공급용 젤리 조성물 제조
- [0041] 본 단계에서는 상기 혼합액의 내부 온도가 50-60℃가 될 때까지 냉각시켜 수분공급용 젤리 조성물을 제조한다.
- [0042] 이 때, 상기 수분공급용 젤리 조성물의 내부 온도가 50℃미만으로 내려질 경우에는 그 온도가 낮아 성형 전에 응고가 이루어져 목직하는 형태를 얻기 어려움이 있으며, 60℃를 초과할 경우에는 하기 추가물질이 침가되었을 때 오히려 높은 온도에 의해 그 성분이 파괴된 우려가 있게 된다.
- [0043] 본 단계 이후에는 상기 제조한 수분공급용 젤리 조성물에 추가물질로 비타민을 더 첨가하여 녹이는 단계를 더 포함하기도 하며, 특히 상기 비타민으로는 비타민 A, 클레칼시페롤, 초산도코페롤, 메나디온아황산수소나트륨, 염산치아민, 리보플라빈, 염산피리독신, 시아노코발라민, 아스코르빈산, 엽산, 니코틴산, 판토텐산칼슘, D-메치오닌 중 선택된 어느 하나 이상을 포함하여 사용하는 것이 좋다.

[0044] 이때, 상기 비타민은 본 발명의 물 중량대비 0.001-0.1 중량%으로 포함되는 것을 특징으로, 본 발명의 물 중량 대비 0.001 중량% 미만으로 첨가될 경우에는 무기질과 마찬가지로 추가물질로서의 효능을 얻기 어려우며, 물 중량대비 0.1 중량%를 초과하여 첨가될 경우 상대적으로 그 한량이 너무 많아 오히려 켈리화 하는데 악영향을 미치게 된다.

[0045] 4. 제 4단계: 거저리과 유충의 수분공급용 켈리 제조

[0046] 본 단계에서는 상기 수분공급용 켈리 조성물을 용기에 담아 성형하여 본 발명의 수분공급용 켈리를 제조하는 단계이다.

[0047] 이때, 상기 수분공급용 켈리 조성물은 원형 또는 사각형 등 원하는 모형의 틀에 담아 실온(20-25℃)에서 60-90분동안 보관하여 성형한다.

[0048] 이렇게 제조된 수분공급용 켈리는 거저리과에 해당되는 유충에게 모두 적용가능하나, 바람직하게는 변태기간이 비교적 짧아 성장이 빠르며, 번식률도 매우 높아 사육용 곤충으로 많이 이용되는 갈색거저리과(*Tenebrio molitor*)를 대상으로 공급하는 것이 가장 좋다.

[0049] 이하에서는 실시예 및 실험예를 들어 본 발명에 관하여 더욱 상세하게 설명할 것이다, 이들 실시예 및 실험예는 단지 설명의 목적을 위한 것으로 본 발명의 보호 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0050] <실시예 1> 본 발명의 거저리과 유충의 수분공급용 켈리의 제조

[0051] 물(1000ml)과 환천(10g)을 혼합하여 혼합물을 제조하였다.

[0052] 상기 혼합물을 핫플레이트(Hot plate)에서 80℃로 10-15분동안 가열하여 혼합액을 제조하였다.

[0053] 그 다음 상기 혼합액의 내부온도가 35℃가 될 때까지 냉각하여 거저리과 유충의 수분공급용 켈리 조성물을 제조하였다.

[0054] 상기 제조된 수분공급용 켈리 조성들을 사각형틀의 용기에 부어 실온(20-25℃)에서 60-90분동안 방치한 후 성형하여, 본 발명의 거저리과 유충의 수분공급용 켈리를 제조하였다.

[0055] <실시예 2> 본 발명의 거저리과 유충의 수분공급용 켈리의 제조

[0056] 물(1000ml)과 환천(10g) 및 무기질(8g)을 혼합하여 혼합물을 제조하였다.

[0057] 이 때, 사용된 무기질은 하기 표1과 같다.

표 1

무기질 종류	함량(8g)
KI(요오드화칼륨)	0.0004
AlK(SO ₄) ₂ · 12H ₂ O (황산알루미늄칼륨)	0.0072
MnSO ₄ (황산망간)	0.016
NaF(플루오린화나트륨)	0.0456
FePO ₄ · 2H ₂ O(인산철)	0.1176
CuSO ₄ · 5H ₂ O(황산구리)	0.0312
MgSO ₄ (황산마그네슘)	0.72
NaCl(염화나트륨)	0.84
Ca ₃ (PO ₄) ₂ (인산칼슘)	1.192
CaCO ₃ (탄산칼슘)	1.68
KH ₂ PO ₄ (제1인산칼륨)	2.48

- [0059] 상기 혼합물을 핫플레이트(Hot plate)에서 80℃로 10~15분동안 가열하여 혼합액을 제조하였다.
- [0060] 그 다음 상기 혼합액의 내부온도가 55℃가 될 때까지 냉각하여 거저리와 유충의 수분공급용 젤리 조성물을 제조하였다.
- [0061] 상기 제조된 수분공급용 젤리 조성물을 사각형태의 용기에 부어 실온(20~25℃)에서 60~90분동안 방치한 후 성형하여, 본 발명의 거저리와 유충의 수분공급용 젤리 를 제조하였다.
- [0062] <실시예 3> 본 발명의 거저리와 유충의 수분공급용 젤리의 제조
- [0063] 물(1000ml)과 한천(10g)을 혼합하여 혼합물을 제조하였다.
- [0064] 이렇게 제조된 상기 혼합물을 핫플레이트(Hot plate)에서 80℃로 10~15분동안 가열하여 혼합액을 제조하였다.
- [0065] 그 다음 상기 혼합액의 내부온도가 55℃가 될 때까지 냉각하여 비타민(10g)을 더 첨가하여 녹여 수분공급용 젤리 조성물을 제조한다.
- [0066] 이 때, 사용된 비타민은 하기 표2과 같다.

표 2

비타민 종류	한량(10g)
비타민 A	50,000 I.U.
콜라칼시페롤	10,000 I.U.
초산도코페롤	20 I.U.
메나디온아황산수소나트륨	20mg
엽산치아딘	13.3mg
리보플라빈	20mg
엽산페리독신	10mg
시아노코발라민	33.3mg
아스코르빈산	20mg
엽산	1.3mg
니코틴산	33.3mg
판토텐산칼슘	33.3mg
DL-메치오닌	266mg

- [0068] 상기 제조된 수분공급용 젤리 조성물을 사각형태의 용기에 부어 실온(20~25℃)에서 60~90분동안 방치한 후 성형하여, 본 발명의 거저리와 유충의 수분공급용 젤리 를 제조하였다.
- [0069] <실시예 4> 본 발명의 거저리와 유충의 수분공급용 젤리의 제조
- [0070] 물(1000ml)과 한천(10g) 및 무기질(8g)을 혼합하여 혼합물을 제조하였다.
- [0071] 이 때, 사용된 무기질은 실시예 2의 표1과 같다.
- [0072] 상기 혼합물을 핫플레이트(Hot plate)에서 80℃로 10~15분동안 가열하여 혼합액을 제조하였다.
- [0073] 그 다음 상기 혼합액의 내부온도가 55℃가 될 때까지 냉각하여 비타민(10g)을 더 첨가하여 녹여 수분공급용 젤리 조성물을 제조한다.
- [0074] 이 때, 사용된 비타민은 실시예 3의 표2와 같다.
- [0075] 상기 제조된 수분공급용 젤리 조성물을 사각형태의 용기에 부어 실온(20~25℃)에서 60~90분동안 방치한 후 성형하여, 본 발명의 거저리와 유충의 수분공급용 젤리 를 제조하였다.(도1)

- [0076] <실험예 1> 한천함량에 따른 수분공급용 젤리 섭취 상태 확인
- [0077] 사육상자내 한천함량에 따른 수분공급용 젤리와 밀기울을 넣어주었다.
- [0078] 사육실 환경조건은 25±1℃, 습도 40~50%로 설정하였으며, 거저리과 유충 중 갈색 거저리 유충을 선택하여 실험을 수행하였다.

표 3

한천함량(중량%)	젤리에 따른 섭취 상태	젤리상태
0.1	-	- 젤리화 안됨
0.2		- 젤리형태 띄지만 칼로 자를시 물이 많이 생겨 수저로 공급해야함 - 물이 많아 유충이 젤리에 빠지는 경우가 생김
0.3		- 젤리형태 띄지만 칼로 자를시 물이 많이 생겨 수저로 공급해야함
0.4		- 젤리형태 띄지만 칼로 자를시 물이 많이 생겨 수저로 공급해야함
0.5		- 젤리형태 됨
1	-	- 젤리형태 됨
3		- 젤리형태 띄지만, 딱딱한 질감을 가짐
5		- 젤리형태 띄지만, 딱딱한 질감을 가짐
10		- 젤리화 안됨

- [0080] 상기 표3에 나타나 있듯이 한천 함량에 따른 수분공급용 젤리 섭취 상태를 확인한 결과, 상기 한천이 0.2-5 중량%로 포함되었을 때, 젤리화가 이루어져 갈색거저리 유충의 섭취 선호도가 높게 나타났다.
- [0081] 반면, 한천 0.1 중량%와 10 중량%로 포함되었을 때, 상기 갈색거저리 유충의 수분공급용 젤리는 젤리화가 이루어 지지 않아, 상기 갈색거저리 유충이 수분공급용 젤리 섭취가 불가능하게 된다.
- [0082] 또한, 도2에 나타나 있듯이 한천 0.2-5 중량%로 포함된 수분공급용 젤리를 갈색거저리 유충에게 공급한 후 시간에 따라 섭취상태를 측정하였을 때, 갈색거저리 유충이 용이하게 섭취함을 확인하였으며, 도3에 나타나 있듯이 공급한 1시간이 지난 뒤 젤리의 섭취 상태를 확인하였을 때, 갈색거저리 유충이 용이하게 섭취함을 확인하였다.
- [0083] <실험예 2> 본 발명의 거저리과 유충의 수분공급용 젤리 사육 실험
- [0084] 사육상자내 밀기울과 실시예 4의 수분공급용 젤리와 채소 및 과일껍질을 넣어주고, 젤리와 채소 및 과일껍질은 주 3회 교체하였다.
- [0085] 사육실 환경조건은 25±1℃, 습도 40~50%로 설정하였으며, 거저리과 중 갈색 거저리를 선택하여, 상기 갈색거저리

리 부화유충을 10마리씩 16구를 설정(총 100마리)하여 실험을 수행하였다.

표 4

[0086]	먹이원	유충기간	번데기 무게(g)	번데기 기간(일)	성충무게 (g)	성충체장 (cm)	생존율 (%)
	수분공급용 켈리 (실시예 4)	123.43 ±22.28	0.22±0.04	7.70±1.90	0.18±0.04	1.66±0.10	47.00%
	채소 및 과일절편	123.72 ±16.94	0.20±0.04	7.52±1.92	0.17±0.03	1.61±0.14	29.00%

[0087] 상기 표4에 나타나 있듯이 먹이원별 생육조사를 한 결과, 통상적으로 제공되고 있었던 채소 및 과일절편을 섭취한 갈색거저리 유충의 경우보다 수분공급용 켈리를 먹은 갈색거저리 유충에서 번데기 및 성충의 무게가 증가하였으며, 체장도 길게 보여졌다.

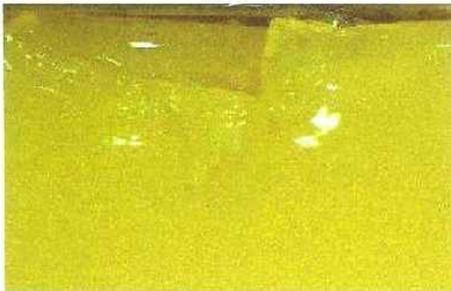
[0088] 뿐만아니라 생존율(유충에서 성충까지)도 1.6배가 높게 보여졌다.

[0089] 이와 같이, 거저리과 유충에게 수분공급용으로 통상적으로 제공되었던 채소 또는 과일절편 대신 수분공급용 켈리형 조성물이 제공될 수 있으며, 이에 수분공급이 용이하며, 사육환경이 개선됨과 동시에 수분과다에 의한 폐사를 막을 수 있어, 거저리과 유충의 생존율이 증대되므로 농가의 소득향상이 기대된다.

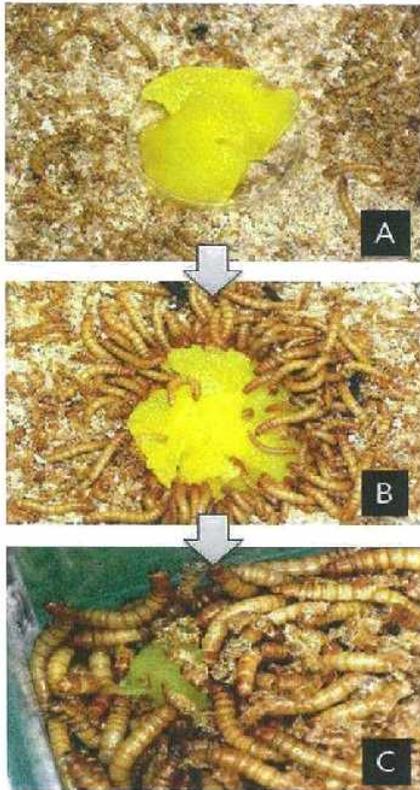
[0090] 상기의 본 발명은 바람직한 실시예를 중심으로 살펴보았으며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 본질적 기술 범위 내에서 상기 본 발명의 상세한 설명과 다른 형태의 실시예들을 구현할 수 있을 것이다. 여기서 본 발명의 본질적 기술범위는 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위의 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

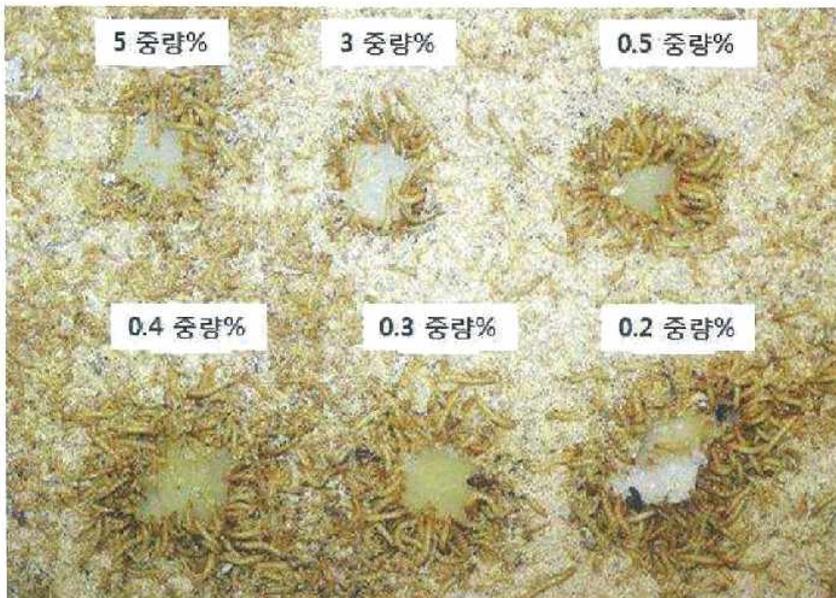
도면1



도면2



도면3



	(19) 대한민국특허청(KR)	(11) 공개번호	20-2014-0005492
	(12) 공개실용신안공보(U)	(43) 공개일자	2014년10월23일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	(71) 출원인		
B07B 1/28 (2006.01) B07B 1/46 (2006.01)	대한민국(농촌진흥청장)		
(21) 출원번호	20-2013-0002902	경기도 수원시 권선구 수인로 126 (서둔동, 농촌진흥청)	
(22) 출원일자	2013년04월15일	(72) 고안자	
심사청구일자	2013년04월15일	김남경	
홍성진			
(뒷면에 계속)			
(74) 대리인			
나동규			

전체 청구항 수 : 총 5 항

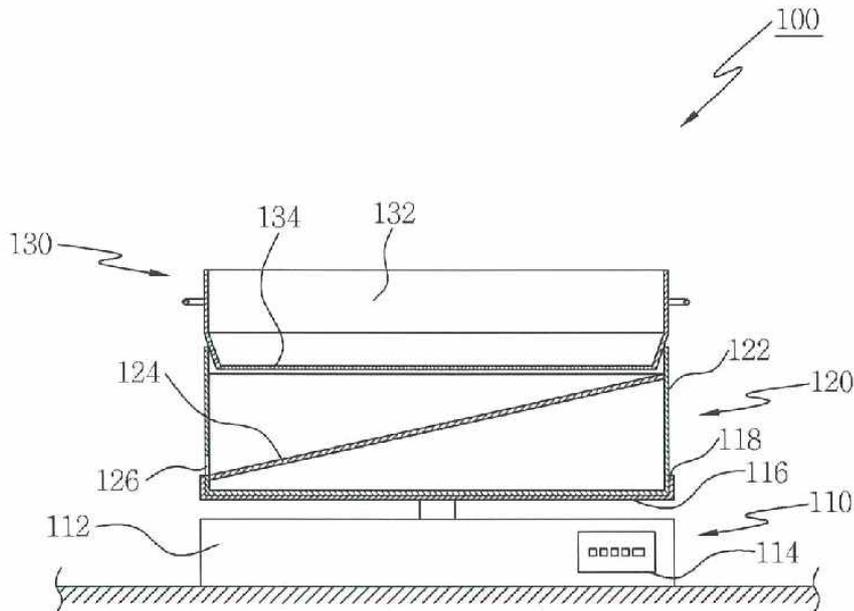
(54) 고안의 명칭 **거저리 배설물 분리장치**

(57) 요약

본 고안은 사육상자의 사료에 혼합된 거저리의 배설물을 자동으로 분리 배출할 수 있게 함으로써, 배설물 분리에 따른 작업시간 및 노동력을 현저히 줄일 수 있을 뿐만 아니라 배설물 분리작업 시 먼지의 발생을 억제하여 작업 환경을 개선할 수 있게 하는 거저리 배설물 분리장치에 관한 것으로, 본 고안에 거저리 배설물 분리장치는 상부

(뒷면에 계속)

대표도 - 도2



가 개방되고 내부에는 배설물이 혼합된 사료가 담겨지는 수용공간부가 마련되며, 바닥면은 메쉬망으로 이루어지 배설물 분리용기; 상부에 상기 배설물 분리용기의 하부가 끼움 결합되고, 배설물 분리용기의 바닥면을 통해 분리되는 배설물을 외부로 배출하는 배출호퍼; 및 진동유닛이 내장된 하우징과, 하우징의 상부에 배치되고 하부가 하우징의 상부를 관통하여 진동유닛에 연동 가능하게 연결되며 상부에는 배출호퍼가 올려지는 진동데이בל을 가지는 진동발생수단;을 포함한다. 그리고 진동발생수단은 배설물 분리 배출 시 배설물 분리용기가 끼움 결합된 배출호퍼에 주기적으로 반복되는 진동을 전달한다.

(72) 고안자 김재수
김성현

김유용

박해철

이영보

이 고안을 지원한 국가연구개발사업

과제그유번호	PJ009188
부처명	농촌진흥청
연구관리전문기관	농촌진흥청
연구사업명	곤충지원을 이용한 양돈사료화 이용 기술 및 제품 개발
연구과제명	사료용 곤충 대량 생산 기술 개발
기 여 율	1/1
주관기관	국립농업과학원
연구기간	2012.11.25 ~ 2015.11.25

실용신안 등록청구의 범위

청구항 1

상부가 개방되고 내부에는 배설물이 혼합된 사료가 담겨지는 수용공간부가 마련되며, 바닥면은 예취망으로 이루어진 배설물 분리용기;

상부에 상기 배설물 분리용기의 하부가 끼움 결합되고, 상기 배설물 분리용기의 상기 바닥면을 통해 분리되는 배설물을 외부로 배출하는 배출호퍼; 및

진동유닛이 내장된 하우징과, 상기 하우징의 상부에 배치되고 하부가 상기 하우징의 상부를 관통하여 상기 진동 유닛에 연동 가능하게 연결되며 상부에는 상기 배출호퍼가 올려지는 진동레이블을 가지는 진동발생수단;을 포함하며,

상기 진동발생수단은 배설물 분리 배출 시 상기 배설물 분리용기가 끼움 결합된 배출호퍼에 주기적으로 반복되는 진동을 전달하는 저저리 배설물 분리장치.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 배출호퍼는,

내부가 중공되고 상부 및 하부가 열린 형상을 가지며 하부가 상기 진동레이블에 올려지는 호퍼 본체; 및

상기 배설물 분리용기에서 분리된 배설물을 외부로 안내할 수 있도록 상기 호퍼 본체의 내부에 제공되는 배출 경사판;을 포함하는 저저리 배설물 분리장치.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 배출호퍼가 올려지는 상기 진동레이블의 가장자리에는 상기 배출호퍼가 진동에 의해 상기 진동레이블에서 이탈되는 것을 방지하는 격벽이 일체로 형성되는 저저리 배설물 분리장치.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 배출 경사판은 상기 호퍼 본체 내부 일측면 상에서 마주하는 상기 호퍼 본체 내부 타측면 상으로 낮아지는 경사를 가지며 연장되며,

상기 호퍼 본체의 타측면 상에는 상기 배출 경사판의 연장단과 인접하는 배출공이 천공되는 저저리 배설물 분리장치.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 배설물 분리용기의 상기 바닥면은 0.2mm이하의 공극, 또는 4.5mm이하의 공극을 가지는 예취망으로 이루어지는 저저리 배설물 분리장치.

명세서

기술분야

[0001] 본 고안은 거저리 배설물 분리장치에 관한 것으로, 보다 상세하게는 사용상자의 사료에 혼합된 거저리의 배설물을 자동으로 분리 배출할 수 있게 하는 거저리 배설물 분리장치에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 갈색거저리는 곤충관련 생리 상태실현을 위한 연구에서 최근의 산업진흥으로 활용하기 위한 연구들을 통해 새로운 농가소득원으로 각광을 받고 있다.

[0003] 갈색거저리의 자원화 이용 작업은 프랑스, 독일, 러시아와 일본이 잇달아 시작하였으며, 국내에서는 10여 년 전부터 해안동물의 사료로서 활용되면서 곤충애호가들이나 동물원 등에서 사용하기 시작하였다. 그리고 최근 국내에서도 상업화를 목적으로 갈색거저리를 대량 증식하는 농가가 생겨나고 있는 실정이다.

[0004] 한편, 갈색거저리의 사육과정 중에서 갈색거저리가 사용되는 사용상자에는 갈색거저리의 배설물이 항상 사료에 혼합되어지는데, 이렇게 배설물이 혼합된 사용상자 내에서 갈색거저리도 사육되기 때문에 유충 생산 시 사용되는 유충의 품질유지를 위해서는 배설물의 분리가 필수적으로 수행되어야 한다.

[0005] 종래 배설물 분리작업은 작업자가 직접 망체를 이용해 배설물을 분리하는 방법이 주로 이용되는데, 이와 같이 작업자가 직접 배설물을 분리함에 따라 작업시간 및 노동력이 많이 소요되는 문제점이 있었다.

[0006] 또한 배설물 분리작업 시 발생하는 먼지에 작업자가 그대로 노출되는 또 다른 문제점이 있었다.

[0007] 따라서 사용상자 내의 거저리 배설물을 자동으로 분리하면서 작업환경을 개선할 수 있게 하는 장치의 개발이 시급한 실정이다.

[0008] 관련 선행기술로는 한국등록실용신안 제 0414963 호(등록일자: 2008년 04월 20일, 명칭: "과리유충 배설물 선별기")가 있다.

고안의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 고안은 사용상자의 사료에 혼합된 거저리의 배설물을 자동으로 분리 배출할 수 있게 함으로써, 배설물 분리에 따른 작업시간 및 노동력을 현저히 줄일 수 있을 뿐만 아니라 배설물 분리작업 시 먼지의 발생을 억제하며 작업 환경을 개선할 수 있게 하는 거저리 배설물 분리장치를 제공하기 위한 것이다.

[0010] 본 고안이 이루고자 하는 기술적 과제들은 이상에서 언급한 기술적 과제들로 제한되지 않는다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 달성하기 위한 본 고안에 따른 거저리 배설물 분리장치는, 상부가 개방되고 내부에는 배설물이 혼합된 사료가 담겨지는 수용공간부가 마련되며, 바닥면은 예취당으로 이루어진 배설물 분리용기; 상부에 상기 배설물 분리용기의 하부가 끼움 결합되고, 배설물 분리용기의 바닥면을 통해 분리되는 배설물을 외부로 배출하는 배출호퍼; 및 진동유닛이 내장된 하우징과, 하우징의 상부에 배치되고 하부가 하우징의 상부를 관통하여 진동유닛에 연동 가능하게 연결되며 상부에는 배출호퍼가 올려지는 진동대이부를 가지는 진동발생수단;을 포함하며, 진동발생수단은 배설물 분리 배출 시 배설물 분리용기가 끼움 결합된 배출호퍼에 주기적으로 반복되는 진동을 전달할 수 있다.

[0012] 구체적으로 배출호퍼는, 내부가 중공되고 상부 및 하부가 열린 형상을 가지며 하부가 진동대이부에 올려지는 호퍼 본체; 및 배설물 분리용기에서 분리된 배설물을 외부로 안내할 수 있도록 호퍼 본체의 내부에 제공되는 배출경사판;을 포함할 수 있다.

- [0013] 구체적으로 배출호퍼가 올려지는 진동데이블의 가장자리에는 배출호퍼가 진동에 의해 진동데이블에서 이탈되는 것을 방지하는 격벽이 일체로 형성될 수 있다.
- [0014] 구체적으로 배출 경사판은 호퍼 본체 내부 일측면 상에서 마주하는 호퍼 본체 내부 타측면 상으로 낮아지는 경사를 가지며 연장되며, 호퍼 본체의 타측면 상에는 배출 경사판의 연장단과 연통하는 배출공이 천공될 수 있다.
- [0015] 구체적으로 배출물 분리용기의 바닥면은 0.2mm이하의 공극, 또는 4.5mm이하의 공극을 가지는 메쉬망으로 이루어질 수 있다.

고안의 효과

- [0016] 이상에서 설명한 바와 같이 본 고안에 따른 거거리 배설물 분리장치는, 바닥면이 메쉬망으로 이루어지고 배설물이 혼합된 사료가 담겨지는 배설물 분리용기와, 상부에 배설물 분리용기가 안치되고 배설물 분리용기에서 분리되는 배설물을 외부로 배출하는 배출호퍼, 및 배설물 분리용기가 안치된 배출호퍼에 주기적으로 반복되는 진동을 제공하는 진동발생수단을 포함함으로써, 사료에 혼합된 거거리의 배설물을 자동으로 분리 배출할 수 있기 때문에 배설물 분리에 따른 작업시간 및 노동력을 현저히 줄일 수 있는 이점이 있다.
- [0017] 그리고 본 고안에 따른 거거리 배설물 분리장치는, 진동을 이용하여 배설물 분리용기의 내의 배설물을 분리하기 때문에 배설물 분리작업 시 먼지의 발생을 억제하여 쾌적한 작업 환경을 조성할 수 있게 하는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 본 고안에 따른 거거리 배설물 분리장치를 나타낸 분해사시도이고,
 도 2는 도 1에 도시된 거거리 배설물 분리장치의 일부분을 전개하여 나타낸 단면도이며, 그리고
 도 3은 본 고안에 따른 거거리 배설물 분리장치의 사용 상태를 나타낸 도면이다.

고안을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 고안의 바람직한 실시예를 상세하게 설명한다. 도면들 중 동일한 구성요소들은 가능한 어느 곳에서든지 동일한 부호로 표시한다. 또한 본 고안의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 상세한 설명은 생략한다.
- [0020] 도 1은 본 고안에 따른 거거리 배설물 분리장치를 나타낸 분해 사시도로서, 본 고안에 따른 거거리 배설물 분리장치(100)는, 거거리 또는 거거리 유형의 배설물이 혼합된 사료가 담겨지는 배설물 분리용기(130)와, 상부에 배설물 분리용기(130)가 안치되고 배설물 분리용기(130)에서 분리되는 배설물을 외부로 배출하는 배출호퍼(120), 및 상부에 배출호퍼(120)가 안치되고 배설물 분리 배출 시 배출호퍼(120)에 주기적으로 반복되는 진동을 제공하는 진동발생수단(110)을 포함하며 이루어진다.
- [0021] 먼저, 진동발생수단(110)은 진동유닛(도시되지 않음), 및 진동유닛에 연동 가능하게 연결되는 진동데이블(118)을 포함한다.
- [0022] 진동유닛은 기계적 또는 전기적인 방법으로 주기적이고 반복적인 진동을 생성하는 것으로, 진동유닛은 도시된 바와 같이 대략 함께 형상을 가지는 하우징(112)의 내부에 배치된다. 여기서 진동유닛의 구성 및 작용은 공지의 기술이므로 상세한 설명은 생략한다. 그리고 진동유닛이 내장된 하우징(112)에는 진동유닛의 작동을 제어할 뿐만 아니라 진동세기 및 진동시간을 제어하는 컨트롤러(114)가 장착되는 것은 누구나 알 수 있을 것이다.
- [0023] 한편, 진동데이블(118)은 수평한 평판 형상으로 제공된다. 이러한 진동데이블(118)은 진동유닛이 내장된 하우징(112)의 상부에 배치되는데, 진동데이블(118)의 하부는 하우징(112)의 상부를 관통하여 진동유닛에 연결된다. 따라서 진동데이블(118)은 진동유닛의 작동에 의해서 주기적이고 반복적으로 좌우, 또는 상하, 또는 진동데이블(118)을 평면에서 봤을 때 가상의 원(circle)을 그리며 회전되도록 구동된다. 이와 같이 형성된 진동발생수단(110)에는 배출호퍼(120)가 올려지고, 배출호퍼(120)에는 배설물 분리용기(130)가 끼운 결합된다.
- [0024] 배출호퍼(120)는 호퍼 본체(122), 및 호퍼 본체(122)의 내부에 제공되는 배출경사판(124)을 포함한다.

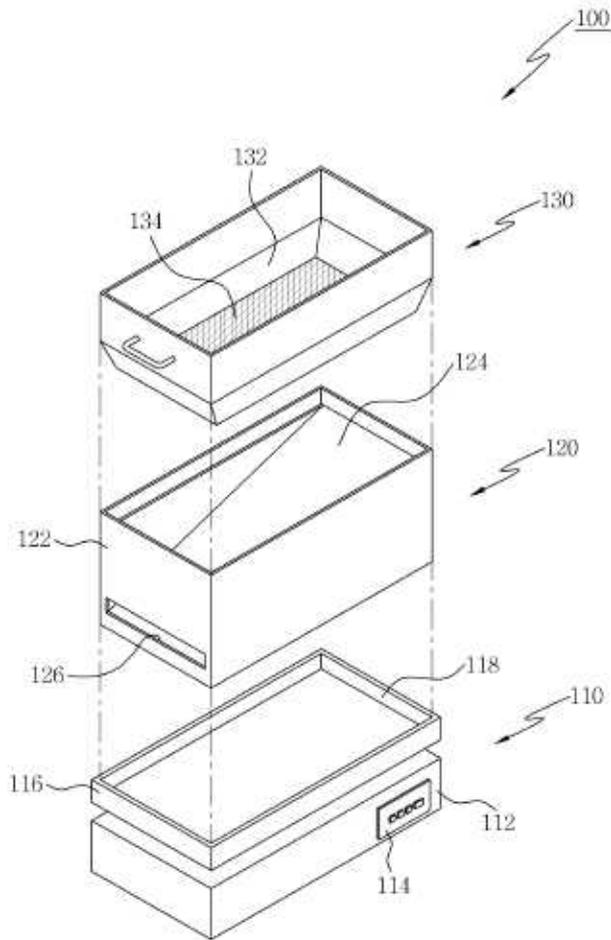
- [0025] 호퍼 본체(122)는 도시된 바와 같이 내부가 중공되고 상부 및 하부 열린 형상을 가진다. 이렇게 형성된 호퍼 본체(122)의 하부는 진동레이블(116)의 상부면 상에 올려지는데, 진동레이블(116)의 가장자리에는 진동레이블(116)에 올려진 배출호퍼(120)가 진동에 의해 진동레이블(116)에서 이탈되는 것을 방지하기 위한 수직한 격벽(115)이 일체로 형성된다.
- [0026] 배출 경사판(124)은 호퍼 본체(122)의 내부 일측면 상에서 마주하는 내부 타측면 상으로 낮아지는 경사를 가지며 연장된다. 이때 호퍼 본체(122)의 타측면 상에는 배출 경사판(124)의 연장단과 연통하는 배출공(128)이 천공된다.
- [0027] 한편, 배설물 분리용기(130)는 도시된 바와 같이 하부가 호퍼 본체(122)의 상부에 끼움 결합된다. 이러한 배설물 분리용기(130)는 상부가 개방되고 내부에는 배설물이 혼합된 사료가 담겨지는 수용공간부(132)가 마련된다. 그리고 배설물 분리용기(130)의 바닥면(134)은 수용공간부(132)에 수용된 배설물이 분리될 수 있도록 통상의 메쉬망으로 이루어진다. 이때 거저리 유층이 사용되는 사료에서 배설물을 분리할 때에는 0.2mm이하의 공극을 가지는 메쉬망으로 바닥면(134)을 형성하고, 거저리, 즉 성층이 사용되는 사료에서 배설물을 분리할 때에는 4.5mm이하의 공극을 가지는 메쉬망으로 바닥면(134)을 형성하는 것이 바람직하다. 이렇게 배설물 분리용기(130)의 바닥면(134)을 0.2mm이하의 공극을 가지는 메쉬망, 또는 4.5mm이하의 공극을 가지는 메쉬망으로 형성하는 것은, 종래 유층의 체폭이 평균 0.29mm이고, 성층의 체폭이 평균 5.48mm이기 때문에 배설물 분리 과정에서 유층 및 성층이 바닥면(134)을 통해 분리되는 것을 방지하기 위해서다.
- [0028] 하기에는 전술한 바와 같이 형성된 본 고안에 따른 거저리 배설물 분리장치의 작동상태를 간략하게 설명한다.
- [0029] 본 고안에 따른 거저리 배설물 분리장치(100)를 이용해 사료에 혼합된 배설물을 분리 배출하기 위해서는, 우선 진동발생수단(110)의 진동레이블(116) 상에 배출호퍼(120)를 올려놓은 상태 하에서 다시 배출호퍼(120)의 상부에 배설물 분리용기(130)의 하부를 끼움 결합시킨다.
- [0030] 배설물 분리용기(130)가 배출호퍼(120)에 끼움 결합되면, 작업자는 거저리 또는 거저리 유층의 배설물이 혼합된 사료를 배설물 분리용기(130)에 담은 후, 진동발생수단(110)을 작동시킨다. 이때 배설물 분리용기(130)에는 배설물이 혼합된 사료와 함께 사용되는 거저리 또는 거저리 유층도 함께 담겨진다.
- [0031] 그리고 전술한 바와 같이 진동발생수단(110)을 작동시키면, 진동발생수단(110)의 진동유닛은 진동을 생성하는데, 진동유닛에서 생성된 진동은 진동레이블(116), 진동레이블(116)에 올려진 배출호퍼(120) 및 배설물 분리용기(130)로 전달된다. 이렇게 배설물 분리용기(130) 까지 전달되는 진동에 의해서 배설물 분리용기(130) 내의 사료 및 배설물은 요동하게 되고, 그 결과 배설물 분리용기(130) 내의 배설물은 메쉬망으로 이루어진 배설물 분리용기(130)의 바닥면(134)을 통해 배출호퍼(120)의 배출 경사판(124) 측을 떨어지고, 배출 경사판(124) 측으로 떨어진 배설물은 배출 경사판(124)을 따라 안내된 후, 호퍼 본체(122)에 형성된 배출공(128)을 통해 외부로 배출된다.
- [0032] 이와 같이 형성된 본 고안에 따른 거저리 배설물 분리장치(100)는 바닥면(134)이 메쉬망으로 이루어지고 배설물이 혼합된 사료가 담겨지는 배설물 분리용기(130)와, 상부에 배설물 분리용기(130)가 안치되고 배설물 분리용기(130)에서 분리되는 배설물을 외부로 배출하는 배출호퍼(120), 및 배설물 분리용기(130)가 안치된 배출호퍼(120)에 주기적으로 반복되는 진동을 제공하는 진동발생수단(110)을 포함함으로써, 사료에 혼합된 거저리의 배설물을 자동으로 분리 배출할 수 있기 때문에 배설물 분리에 따른 작업시간 및 노동력을 현저히 줄일 수 있다.
- [0033] 그리고 본 고안에 따른 거저리 배설물 분리장치(100)는 진동을 이용하여 배설물 분리용기(130)의 내의 배설물을 분리하기 때문에 배설물 분리작업 시 먼지의 발생을 억제하여 쾌적한 작업 환경을 조성할 수 있게 한다.
- [0034] 상기와 같은 거저리 배설물 분리장치(100)는 위에서 설명된 실시예들의 구성과 작동 방식에 한정되는 것이 아니다. 상기 실시예들은 각 실시예들의 전부 또는 일부가 선택적으로 조합되어 다양한 변형이 이루어질 수 있도록 구성될 수도 있다.

부호의 설명

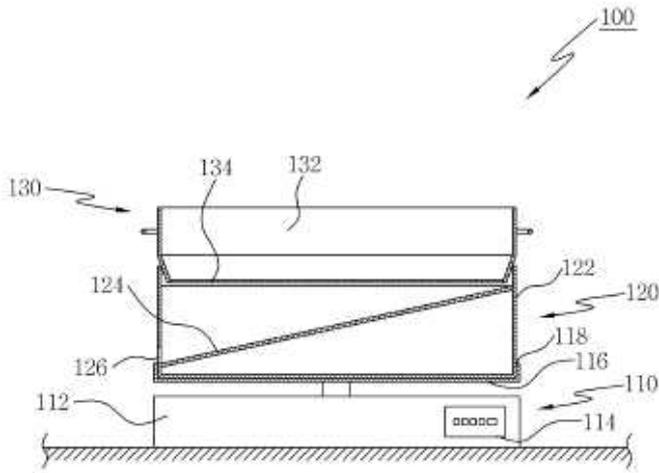
- [0035]
- | | |
|--------------------|--------------|
| 100 : 거저리 배설물 분리장치 | 110 : 진동발생수단 |
| 116 : 진동레이블 | 120 : 배출호퍼 |
| 122 : 호퍼 본체 | 124 : 배출 경사판 |
| 130 : 배설물 분리용기 | 134 : 바닥면 |

도면

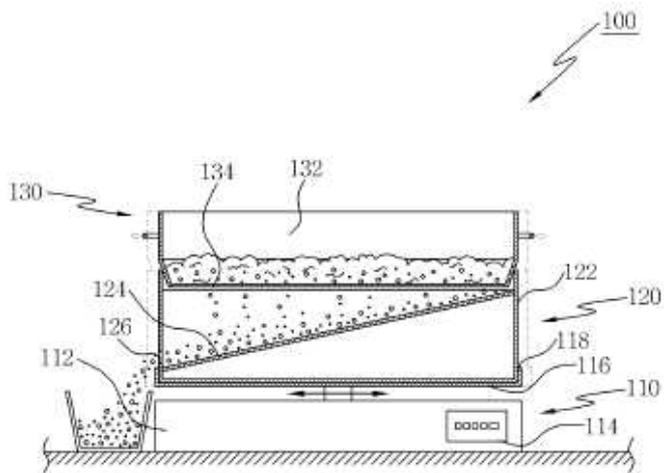
도면1



도면2



도면3



※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.