

발 간 등 록 번 호

12-1541000-000879-01

집파리 유충으로부터 사료용 항생제 대체물질의 개발

(A study on the development
of antibiotic replacements for feed supplements
from house fly maggot, *Musca domestica*)

파리유충 대량 사육생산 및 추출시스템 개발 (협동과제 1)

(Development of extraction system and large scale for
yield of house fly maggot)

파리유충 추출물로부터 항생 펩타이드의 구조구명(협동과제 2)

(A study on the structure of antibacterial peptide from
extracts of house fly maggot)

강원대학교 산학협력단

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “집과리 유충으로부터 사료용 항생제 대체물질의 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011년 9월 02일

주관연구기관명 : 강원대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 박 병 성

세부연구책임자 : 박 병 성

연 구 원 : 오 진 석

연 구 원 : 박 상 오

연 구 원 : 신 재 홍

연 구 원 : 안 용 식

협동연구기관명 : 서울대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 이 봉 진

협동연구기관명 : (주)비씨월드제약

협동연구책임자 : 서 혜 란

요 약 문

I. 제 목

집파리 유충으로부터 사료용 항생제 대체물질의 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

항생제를 사람 및 가축에게 오·남용함으로써 생체 내에서는 선택적으로 항생제에 내성을 나타내는 강력한 세균(super bacteria, super bug), 예로서, 메티실린, 반코마이신 및 퀴놀렌에 대한 내성 황색포도상구균 (MRSA, VRSA, QRSA; Methicillin, Vancomycin, Quinolone resistant *Streptococcus aureus*)과 *Salmonella typhimurium* DT 104 등 강력한 항생제 내성균의 출현으로 전 세계가 긴장하고 있다.

가축을 사육할 때 배합사료 중의 항생제 및 축산농가에서 비밀리에 투여하는 항생제가 내성균을 증가시키는 원인이 되고, 항생제가 잔류된 축산식품을 섭취한 사람에서 항생제 내성균이 출현할 수 있으며, 안전축산물 생산저해로 소비자 선호도가 떨어져 궁극적으로 사회적, 경제적 손실을 유발할 수 있다. 항생제를 사용하지 않을 경우 발생할 수 있는 축산업의 피해와 손실을 줄이고 지속적인 가축의 생산성 향상을 위해 항생제를 대체할 수 있는 새로운 항생제 대체물질의 연구개발이 시급한 실정이다.

파리유충 추출물(maggot extracts)으로부터 *Staphylococcus aureus* 와 *Bacillus subtilis* 대하여 항균효과를 갖는 단백질, 펩타이드의 분석이 진행되었으며 새로운 항균단백질이 존재함이 밝혀졌다. 그러나 아직 파리유충 추출물 유래 항균성 단백질의 명확한 구조 및 아미노산 배열, 다양한 장 내 유해균에 대한 항균활성 작용기작은 명확하게 밝혀지지 않았고, 특히 파리유충 추출물의 항생제 대체효과에 관한 표준환경 및 생산현장에서 동물실험은 진행된 것이 전혀 없다.

파리유충 추출물이 항생제 대체효과를 갖는다는 사실은 가축에서 항생제를 사용하지 않고서도 생산성을 향상시킬 수 있고 웰빙시대 소비자가 요구하는 무항생제 안전축산물의 생산으로 수입축산물에 대한 국내 축산물의 품질개선에 기여할 수 있을 것으로 본다. 그러나, 가축생산현장에서 동물의 장내 비피더스균의 활성효과 및 면역능력 증진에 따른 안전축산물 생산을 위한 적절한 항생제 대체물질로서 파리유충 추출물을 이용한 가축생산 및 축산물의 품질에 관하여 측정된 바 없다.

본 연구에서는 유해곤충으로 알려진 파리유충으로부터 항생추출물을 이용하여 브로일러와 돼지 사료에 첨가, 급여함으로써 사료용 항생제 대체물질로서의 유용성을 확보하기 위해 수행하였으며, 파리유충 유래 항생물질의 구조분석 및 유충의 대량 생산, 추출시스템을 개발하였다. 본 연구 결과, 파리 유충 추출물로부터 항균 효과를 지닌 단백질 및 펩타이드의 순수 분리 및 구조 분석하고 이러한 연구를 통해 단백질 및 펩타이드의 구조를 기반으로 하는 약물의 설계 및 (SBDD) 시스템을 확립할 수 있으며 물질 특허를 통한 독점적 지위를 누릴 수 있으며 경제성을 지닌 사료용 항생제 대체시장 확보를 통한 안전 축산식품의 생산, 공급에 기여할 수 있을 것으로

로 본다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 동물사료용 항생제 대체제로서 파리유충 추출물의 사료용 항생제 대체효과, 파리유충의 생산시스템 개발 그리고 추출물의 항생 펩타이드 구조구명을 목적으로 2년간 연구를 수행하였다. 연구내용과 범위를 요약하면 다음과 같다.

1차년도 세부과제는 브로일러사료 내 항균성 파리유충 추출물의 적정 첨가수준 결정, 닭의 생산성과 닭고기 품질평가 및 *in vivo* 항균활성기작 구명, 생산현장 적용시험 그리고 브로일러에 대한 *Salmonella* challenge trials를 수행하였다. 협동연구과제 1은 유충 대량 사육을 위한 생산시스템 설계 및 운영을 그리고 협동연구과제 2는 파리유충 추출물의 항균효과를 조사하였다.

2차년도 세부과제는 무항생제 안전 돈육 생산을 위한 파리유충 추출물의 항생제 대체효과를 구명하기 위하여 돼지 배합사료 내 파리유충 추출물의 적정 첨가수준 결정시험으로써 자돈과 육성돈에 대한 성장능력과 항균활성 기작을 구명하였다. 협동연구과제 1은 유충 추출물의 대량생산 시스템을 개발하기 위해 추출 공정분석 및 통합 공정시스템 보완설계 및 제작으로 통합 시스템 운영방법을 개발하였다. 협동연구과제2는 파리유충 추출물의 항균효과를 지닌 단백질, 펩타이드의 구조 분석을 진행하여 강한 활성을 가지는 새로운 유형의 항생펩타이드성 물질 발굴함으로써 무항생제 안전 축산식품 생산기술을 개발하였다.

Ⅳ. 연구개발결과

○ 1년차 연구결과: 브로일러 사료 내 파리유충 추출물 (파리유충 추출물 5, 10, 15, 20% 함유 프리믹스를 배합사료 내 0.10% 첨가비교 실험)의 적정 첨가수준 결정 실험을 수행하였고 살모넬라 공격접종 및 양계농가를 대상으로 실증실험에 의한 경제성을 평가하였다. 부화 후 35일 동안 파리유충 추출물을 섭취한 브로일러의 사양성적과 도체특성은 파리유충 추출물 함유사료를 섭취한 처리구가 항생제 첨가구에 비해서 통계적으로 유의하게 높았다. 파리유충 추출물을 섭취한 브로일러에서 면역기관 무게 및 혈청 IgG는 항생제 첨가구와 비교할 때 유의하게 높았다. 혈액 중성지방, 총콜레스테롤, 저밀도지질단백질 콜레스테롤 수준은 항생제 첨가구와 비교할 때 파리유충 추출물을 섭취한 처리구가 유의하게 낮았다. 항생제 처첨가구와 비교할 때 장 내 유익한 미생물로 알려진 *Bifidobacteria*와 *Lactobacillus*는 파리유충 추출물을 섭취한 처리구가 유의하게 높았으나 그 반대로 유해한 미생물 *Escherichia coli*, *Salmonella*는 유의하게 감소하였다. 파리유충 추출물을 섭취한 처리구의 맹장에서 acetic acid, propionic acid 함량은 유의하게 증가한 반면에 butyric acid, valeric acid 함량은 유의하게 감소하였다. 파리유충 추출물을 섭취한 처리구 닭고기의 보수력은 높았으나 TBARS와 콜레스테롤은 유의하게 낮아졌다. 농가실증실험에 의해 진행된 파리유충 추출물을 섭취한 닭에서 경제성 평가결과 대조구와 비교할 때 파리유충 추출물 10%를 함유하는 프리믹스 0.1% 첨가구에서 출하율 96%로 높은 생존율을 나타냈다. 한 마리당 증체량은 0.21 kg (16.40%)의 높은 증가를 나타냈으며 마리당 판매금액은 462원이 더 높았고 사육비는 87원이 적게 든 것으로 확인되었다. 이상의 결과에서 파리유충 추출물의 적정 첨가수준은 “10% 추출물 함유 프리믹스를 배합사료 내

0.1%” 가 최적일 것으로 나타났다.

파리유충의 사양성적 (Growth performance)은 대두박 배지군에서 유충을 경제적으로 생산할 수 있었다. 파리 유충을 생산하기 위한 시스템으로 가능한 고정비용인 시스템 비용을 최소화하고 그 구조를 단순화하여 고장이 없는 시스템을 설계하였다. 유충이 탈출하지 못하게 박스형태의 구조로 경제성 있는 플라스틱상자 중에서 NTC111을 선택하였다. 유충의 완전한 분리를 유도하기 위해 개량 회전 분리기와 수작업을 병행하여 처리할 수 있는 장치를 제작하였다.

4가지 실험방법 즉 1) 동결한 파리유충 (*Muscadomestica*) 10g을 클로로포름과 메탄올 혼합 (2:1)용액에 현탁 후 여과와 건조의 과정을 3번 반복하였다. 2) 동결한 파리유충 10g을 준비한 완충용액 에서 혼합기를 이용하여 10분간 저온에서 분쇄하였다. 그리고 분쇄된 액을 12,000 x g, 4 °C에서 30분간 원심분리 하였다. 3) 동결한 파리유충 100g 을 시험 2와 같은 방법으로 추출하고 ` 추출 액을 Gel filtration column (Superdex75 10/300 GL)을 이용 20 mM Na-Phosphate buffer (pH 6)을 이동상으로 하여 분리하였다. 4) 동결한 파리유충 100g을 준비한 완충용액 에서 혼합기를 이용하여 10분간 저온에서 분쇄하였다. 그리고, 분쇄된 액을 12,000 x g, 4 °C에서 30분간 원심분리 하였으며 상기와 같은 파리유충 추출물로부터 항생물질 성분을 분리하는데 성공하였다.

O 2년차 연구결과: 돼지 사료 내 파리유충 추출물 (파리유충 추출물 10, 15, 20% 함유 프리믹스를 배합사료 내 0.10% 첨가비교 실험)의 적정 첨가수준을 항생제 첨가군과 비교하였으며 양돈농가를 대상으로 실증실험에 의한 경제성을 평가하였다. 실험 I 에서 자돈의 성장능력은 항생제 첨가군과 비교할 때 파리유충 추출물 10% 처리군은 비슷하였으나 파리유충 추출물 15%와 20% 처리군은 유의하게 높았다. 혈액 면역물질 IgG는 항생제 첨가군과 비교할 때 파리유충 추출물 처리군이 유의하게 높았다. 파리유충 추출물을 섭취한 자돈의 분변에서 조사한 장 내 유해한 미생물 *Escherichia coli*, *Salmonella*는 유의하게 감소하였다. 항생제 첨가군과 비교할 때 파리유충 추출물을 섭취한 자돈의 분변에서 조사한 짧은 사슬지방산의 짧은 사슬지방산 가운데 acetic acid, propionic acid는 높았고 butyric acid, isobutyric acid, valeric acid, isovaleric acid는 낮았으며 통계적으로 유의차가 있었다.

실험 II는 실험 I의 결과로부터 선정된 돼지 사료 내 파리유충 추출물 15% 함유 프리믹스를 배합사료 내 0.10% 첨가하여 항생제 첨가군과 비교하였으며 양돈농가를 대상으로 실증실험에 의한 경제성을 평가하였다. 육성비육돈의 성장능력은 대조군과 비교할 때 파리유충 추출물 첨가군이 유의하게 높았다. 비육말기에 측정된 혈액 중성지방, 총콜레스테롤, 저밀도지질단백질 콜레스테롤 수준은 대조군과 비교할 때 파리유충 추출물 첨가군이 유의하게 낮았다. 혈액 면역물질 IgG는 항생제 첨가군과 비교할 때 파리유충 추출물 첨가군이 유의하게 높았다. 파리유충 추출물을 섭취한 자돈의 분변에서 조사한 장 내 유해한 미생물 *Escherichia coli*, *Salmonella*는 유의하게 감소하였다. 파리유충 추출물을 급여하여 얻어진 돼지고기 지방산 조성을 대조군과 비교할 때 파리유충 추출물 첨가군에서 돼지고기의 맛과 관련한 올레인산 (18:1n-9)의 함량이 유의하게 높았으며 콜레스테롤 함량은 유의하게 낮았다. 농가실증실험에 의해 진행된 파리유충 추출물을 섭취한 돼지에서 경제성 평가결과 대조군과 비교할 때 파리유충 추출물 첨가군에서 두당 수익은 2,052원 높았으며 사료요구율은 0.07 개선효과를 나타냈으며 3,465원 사료비 절감효과를 기대할 수 있었다. 이상의 결과에서 돼지사료 내 파리유충 추출물의 적정 첨가

수준은 “15% 추출물 함유 프리믹스를 배합사료 내 0.1%”가 최적일 것으로 나타났다.

협동과제 1과 2 연구팀은 파리 유충으로부터 추출된 물질들을 분획하는데 성공하여서 항균 활성을 나타내는 항생물질 후보를 확보하는데 성공하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

파리유충을 이용한 가축사료용 항생제 대체물질을 개발하여 실제 닭고기와 돼지고기 생산에 적용함으로써 항생제 내성 문제해결 및 항생제를 사용하지 않은 친환경적 축산 및 유기축산의 발전에 기여하고 농가소득 증대를 꾀 할 수 있을 것으로 기대된다.

무항생제 안전축산식품을 생산할 수 있어 수입 축산식품에 대한 국내 축산물의 고품질화 및 국민건강 증진에 기여할 수 있다.

파리유충으로부터 항생제 대체물질의 개발기술은 중국이 앞선 것으로 조사되었으나 실제로 생산현장 적용결과는 아직 보고되지 않았으므로 기술적 분야에서 세계적 우위를 차지할 것으로 사료된다.

본 연구를 통해서 얻은 항생 물질 후보들의 3차원 구조를 밝힘으로써 효율적인 신약개발 방법으로 알려져 있는 구조에 기반한 신약 개발방법을 이용하여서 기존의 항생제와는 다른 메커니즘을 가지는 새로운 유형의 활성물질을 매우 효율적이고 합리적으로 설계할 수 있을 것으로 기대하고 있다. 특히나 신약개발사업은 기술우위에 따른 독점력이 강하고 지적재산권으로서의 부가 가치가 매우 높은 산업이므로 전세계적으로 활발히 진행되고 있는 항생제 시장에서 선점적인 지위를 가질 수 있게 될 것으로 기대할 수 있다.

SUMMARY

I. Title

A study on the development of antibiotic replacements for feed supplements from house fly maggot, *Musca domestica*

II. Research Necessity and Objectives

World is tense with concerns over super bacteria that develop tolerance against antibiotics selectively in the body of host as a result of misuse or abuse of antibiotics on human or animal, such as methicillin, vancomycin and quinolone resistant *Streptococcus aureus* (MRSA, VRSA, QRSA) and strong antibiotic resistant bacteria such as *Salmonella typhimurium* DT 104.

Illegal use of antibiotics as an additive to animal feeds or covert abuse of antibiotics to livestock animals by stock farms not only results in increased number of antibiotic-resistant bacteria but also create antibiotic-resistant bacteria in human who consumed stock farm products made from animals that were fed with antibiotics. Harming the production of safe stock farm products will lose consumers' popularity which may lead to social and economic loss. Research and development of new alternative substances to antibiotics that can replace the existing antibiotics is urgently required to alleviate the possible damage and loss that may occur from not using antibiotics and to ensure continuous improvement of the productivity of stock farming.

Analysis of protein and peptide from fly maggot extract that have *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* resistance was performed and the existence of antibacterial protein was known. However, exact structure and amino acid alignment of antibacterial protein derived from fly maggot extracts and the mechanism of antibacterial action against various pathogenic bacteria in the intestine were not clearly known yet and, especially, there has been no animal trials performed in standard environment or production field on antibiotic substitution effect of fly maggot extracts.

The fact that fly maggot extracts has antibiotic substitution effect means productivity of stock farming can be achieved without using antibiotics and the production of antibiotic-free safe stock farm products will contribute to the quality improvement of domestic stock farm product in comparison with

imported goods. However, no measurement has been taken for the active effect of bifidobacteria in the intestine of animals in livestock production sites and the quality of stock farm products that were produced using fly maggot extracts as an appropriate substitute for antibiotics for the production of safe stock farm products.

In this study, we used antibacterial extracts from maggot of flies, common vermine, and added it to the feeds of broilers and pigs in order to establish its usefulness as an antibiotics substitute. Also, we performed structure analysis of fly maggot-derived antibiotic substance and developed a production and extraction system. We believe that the results of this study will contribute to the production and supply of safe stock farm products through securing the market for economic antibiotics substitute for stock feeds.

we successfully extract purified proteins and peptides which have strong antimicrobial activity from fly larvae. Obtained antibiotic candidates could be used for developing innovative antibiotics by using SBDD (Structure Based Drug Discovery) method.

III. Research Scope and Contents

This study was conducted for two years for the purpose of establishing the effect of fly maggot extracts as a substitutive substance for antibiotics for animal feeds, developing the fly larvae production system and finding out the structure of antibiotic peptide. The content and the scope of study are summarized below:

The study topics during the first year were: determination of optimal levels of antibiotic fly maggot extracts to be added to broiler feed; assessment of the productivity of broilers and the quality of broiler meat; establishment of the mechanism of antibiotic activity *in vivo*; production application test; and *Salmonella* challenge trials on broilers. The collaborative study subject 1 focused on design and operation of production system for mass breeding of fly maggot and the collaborative study subject 2 focused on antibiotic effect of fly maggot extracts.

The study topic during the second year was the determination of optimal levels of fly maggot extracts to be added to assorted pig feed to establish the antibiotics substitution effect of fly maggot extracts for the production of safe antibiotics-free pork. The collaborative study subject 1 focused on the development of integrated system operation method through extraction process analysis and supplementary design and production of integrated process system for the development of mass fly maggot extracts production system. The collaborative study subject 2 focused on the structural analysis

of antibacterial protein and peptide extracted from fly maggot.

IV. Results and Proposal of the Practical Use

(1) Results of Research Development

○ **Results of first year study:** Experiment was conducted to determine the optimal levels of fly maggot extracts in broiler feed (comparative test of adding 0.10% of pre-mixture containing 5, 10, 15 and 20% respectively of fly maggot extracts to assorted feed) and its economic efficiency was assessed through field test by using it for *Salmonella* vaccination and as feed additive at broiler farm sites. The growth performance and conductor characteristics of broilers in the group fed with feed containing fly maggot extracts ('fly maggot extract treatment group') for 35 days were significantly higher statistically than others in the group fed with feed containing antibiotics ('antibiotics treatment group'). Weight of immune organ and serum IgG were significantly higher in broilers fed with feed containing fly maggot extracts compared with the antibiotics treatment group. Compared with the broiler in the antibiotics treatment group, blood triglyceride, total cholesterol, low density lipoprotein cholesterol levels were significantly higher in the broilers in group treated with fly maggot extracts. While the numbers of harmful *Escherichia coli* and *Salmonella* decreased significantly in the fly maggot extracts treatment group compared with the antibiotics treatment group. The contents of acetic acid and propionic acid in the appendices increased significantly but the contents of butyric acid and valeric acid decreased significantly in the fly maggot extracts treatment group compared with the antibiotics treatment group. In the broiler meat from the fly maggot extracts treatment group, water holding capacity was high but TBARS and cholesterol decrease significantly. In the comparative field tests for economic assessment on broilers at stock farm sites between the fly maggot extracts treatment group and the antibiotics treatment group, high survival rate with 96% shipment appeared in the group fed with 0.1% pre-mixture containing 10% fly maggot extracts. Weight gain per animal increased considerably by 0.21 kg (16.40%) and the broilers in this group were sold at the price KRW 462 higher while the cost of breeding was reduced by KRW 87 per animal. Based on these results, the optimal content of fly maggot extracts was shown to be "Assorted feed with 0.1% pre-mixture containing 10% fly maggot extracts".

The growth performance of fly maggot enabled economic production of fly

maggot on thin soybean meal culture medium. For the production of fly maggot, we designed a fault-free production system by minimizing the fixed cost consisting of system cost and simplifying the structure. Among economic plastic vessels, economic box-type NTC111 was chosen to ensure containment of fly maggot within the vessel. In order to induce complete separation of fly maggot, a device was devised and prepared that allows operation of centrifuge as well as manual work.

Four test methods were used: 1) A suspension of 10 g of frozen fly maggot (*Muscadomestica*) in the compound solution of chloroform and methanol (2:1) was prepared and subjected it to three repeated cycles of filtration and drying 2) 10 g of frozen fly maggot in buffer solution was ground at low temperature for 10 minutes using a mixer and the resulting solution was subjected to a centrifugation at 12,000 x g, 4 °C for 30 minutes. 3) 100g of frozen fly maggot was processed by using the same method as 2) and separation was performed using Gel filtration column (Superde x 75 10/300 GL) in which 20 mM Na-Phosphate buffer (pH 6) was a mobile phase. 4) 100 g of frozen fly maggot in buffer solution was ground at low temperature for 10 minutes using a mixer and the resulting solution was subjected to a centrifugation at 12,000 x g, 4 °C for 30 minutes. We succeeded in separating the antibiotic substance from the fly maggot extracts obtained from the above processes.

● **Results of second year study:** The optimal content of fly maggot extracts in pig feed was tested (test of 0.10% addition of pre-mixture containing 10, 15 and 20% respectively of fly maggot extracts to assorted feed) against antibiotics-added feed and its economic efficiency was assessed by field test on pigs at actual pig farms. Results of Experiment I showed that the growth performance level of young pigs in the group treated with 10% fly maggot extracts was similar to the growth performance of antibiotics treatment group but the growth performance of young pigs in the groups treated with 15% and 20% fly maggot extracts respectively were higher than that of the antibiotics treatment group. The levels of blood immune substance, IgG were significantly higher in the fly maggot extracts treatment group than in the antibiotics treatment group. Measurement of harmful microorganisms, *Escherichia coli* and *Salmonella*, were significantly lower compared with the measurements in antibiotics treatment group. Measurements of the contents of short-chain fatty acids were taken from the feces of young pigs that were fed with fly maggot extracts and results showed that the contents of acetic acid and propionic acid were higher and the contents of butyric acid, isobutyric acid, valeric acid and isovaleric acid were lower compared with

the antibiotics treatment group and the differences were statistically significant.

In the Experiment II, 0.10% of pre-mixture containing 15% of fly maggot extracts was added to the assorted feed that was determined from the Experiment I and the results were compared with the results from antibiotics treatment group. Also, economy of this feed mixture was evaluated using field tests on the pigs at the actual pig farms. Comparison of the growth performance of growing-finishing pigs showed higher result in fly maggot extracts treatment group than in the control group. The levels of blood triglyceride, total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol were significantly lower in the fly maggot extracts group than in the control group. The levels of the blood immunity substances, IgG were higher in fly maggot extracts treatment group compared with the antibiotics treatment group. Measurement of beneficial microorganisms, *Bifidobacteria* and *Lactobacillus*, existing in the intestine of young pig that were fed with fly maggot extracts were taken from the feces of the animals and results were significantly higher but the measurements of harmful microorganisms, *Escherichia coli* and *Salmonella*, were significantly lower compared with the measurements in antibiotics treatment group. Measurements of the contents of fatty acids were taken from the meat of the pigs that were fed with fly maggot extract and results showed that the contents of oleic acid (18:1n-9), that is related to the taste of pork, was significantly higher and the contents of cholesterol was significantly lower compared with the antibiotics treatment group. Economic evaluation by field tests at the pig farms was performed on the pigs in the fly maggot extracts treatment group and the results showed higher profit by KRW 2,052 per animal, improvement of feed conversion rate by 0.07 and reduction of feed cost be KRW 3,465 per animal compared with antibiotics treatment group. Based on these results, the optimal levels of fly maggot extracts in pig feed was found to be "assorted feed with 0.1% of pre-mixture containing 15% fly maggot extracts."

(2) Suggestion to practical use

Development of antibiotics substitutes from fly maggot for stock feed and practicing the use of it in actual breeding of broilers and pigs will contribute to solving the problem of antibiotics resistance, promoting the antibiotics-free eco-friendly stockbreeding and the advancement of organic stockbreeding as well as increasing the income of stock farms.

Since It enables the production of safe antibiotics-free stock farm products It can contribute to the improvement of both the quality of

domestic stock farm products as compared with the imported products and the public health.

China is known to be the pioneer in development technology for antibiotics substitute from fly maggot. However, since no report is available on the results of the application of the technology in actual production, our development is expected to lead the technology of the world in this field.

CONTENTS

Chapter 1 Overview of research projects

Chapter 2 Current technology state in Korea and abroad

Chapter 3 Research results

Chapter 4 Achievements and contribution

Chapter 5 Future planning

Chapter 6 International scientific and technical information collected during research

Chapter 7 References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황	1
제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과	1
제 1 절 : 제 1 세부 과제	1
제 2 절 파리유충 대량 사육생산 및 추출시스템 개발 (협동과제 1)	35
제 3 절 파리유충 추출물로부터 항생 펩타이드의 구조구명(협동과제 2)	59
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	69
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	70
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	71
제 7 장 참고문헌	72

제 1 장 연구개발과제의 개요

집파리 유충으로부터 가축사료용 새로운 항생제 대체 물질을 발굴하고 이를 통해서 새로운 항생 펩타이드의 3차구조를 규명하는 것을 목표로 한다. 또한 구조에 근거한 항생제가 개발될 경우 부작용이나 효능 면에서는 지금까지 개발된 다른 항생제보다 뛰어날 것으로 기대된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

전세계에서 항생제 개발을 위해 그동안 개발하지 못했던 펩타이드성 약물에 주목하고 이들 펩타이드성 약물을 각종 천연물 및 다양한 생물로부터 추출하여 이들을 가공함으로써 크기를 대폭 줄이려는 시도가 선진국에서 시도가 되고 있다. 집파리 유충 유래 펩타이드성 약물은 새로운 약물 작용 메커니즘을 갖고 있을 가능성이 있어 항생제 내성균 문제를 해결할 가능성이 있다.

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 : 제 1 세부 과제

1. 브로일러에 대한 파리유충 에탄올추출물의 사료용 항생제 대체효과 (실험 I)

가. 서론

항생제를 사람 및 가축에게 오·남용함으로써 생체 내에서는 선택적으로 항생제에 대한 내성을 나타내는 강력한 세균(super bacteria)이 출현하였다. 환경에서 항생제 내성유전자(antibiotic resistance genes)의 수평적인 이동 (Shakibaie et al., 2009), 물고기 (Matyar et al., 2004)와 축산식품 (Toroglu et al., 2009; Jones et al., 2002)에서 내성균 및 병원체 입원 중인 환자 (Cosgrove et al., 2005)에서 Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA), Vancomycin-resistant enterococcus (VRE)의 출현은 심각한 사회적 현안이 되었다 (Toroglu et al., 2005; Perl, 1999). 특히, 친환경 유기축산의 대두로 EU는 2005년부터 유기축산물 생산에 이용되는 사료는 100% 유기사료를 사용하여야 하며 항생제는 더 이상 허용되지 않을 것을 규정하였고 (Commission Regulation EC 2277, 2003) 2006년 1월부터 시행하고 있다 (European Union Commission, 2005). 우리나라는 농림부농림부고시 제 2004-72호에 의하여 2007년 12월부터 18종 (항콕시딕제 9종, 성장촉진제 9종)으로 제한하였고 2012년 가축에 대한 성장촉진제로서 항생제의 사용은 전면 금지할 예정이다. 공장집약형 축산업에서 사료용 항생제를 사

용하지 않을 경우 발생할 수 있는 피해와 손실을 줄이고 지속적인 가축의 생산성 향상을 위해 항생제를 대체할 수 있는 새로운 항생제 대체물질의 개발이 시급한 실정이다 (Dibner and Richards, 2005). 따라서 항생제 내성균주의 출현에 관한 우려가 없으면서 항생제를 대체할 수 있는 파리유충으로부터 항균활성물질의 개발이 활발히 진행되고 있다.

파리유충 (*Musca domestica* L.)을 이용한 생체치료(biotherapy)는 20세기 초에 고질적인 연조직(soft tissue)의 골수염과 화농성 감염의 치료를 위해 이용되었으나 항생제 내성균의 출현으로 재도입되었다 (Sherman et al., 2000). 특히 관심사는 파리유충의 분비물, 추출물이 지닌 MRSA에 대한 잠재적 항균효과를 갖는다는 점이었다 (Bexfield et al., 2004). 파리유충 생체치료의 기본적인 작용기작은 몇 가지 활력(activity)에 기인한 상승작용(synergistic actions)으로 볼 수 있으며 그 가운데 가장 핵심은 파리유충 분비물, 추출물의 항균활성이라고 할 수 있다 (Bexfield et al., 2004; Vistnes et al., 1981). 파리유충을 이용한 화상과 욕창환자 및 수술 후 MRSA 감염환자에 대한 생체치료에서 의료용 파리유충의 중요한 작용은 괴사 및 감염조직의 용해에 의한 상처표면제거, 세균을 죽임에 의한 상처의 살균, 상처의 치유촉진 등으로 알려졌으며, 기존의 치료에 효과가 없었던 만성적인 상처 및 항생제 내성치료에 효과적인 것으로 알려졌다. 그러나 살아있는 유충보다는 오히려 분비물과 추출물을 이용하는 것이 많은 잇점을 나타낼 수 있는 것으로 평가되고 있다 (Jaklic et al., 2008; Sherman et al., 2000). 파리유충 분비물에 함유된 단백질 가수분해효소(proteolytic enzymes)는 상처 내에 존재하는 일반적인 세포 밖 교질성분(extracellular matrix)을 분해하고 변형시킴으로서 상처를 치료하고 새로운 조직을 형성하게 해주는 것으로 알려졌다 (Horobin, et al., 2005; Lerch et al., 2003). 파리유충으로부터 5가지 조성으로 구성된 염기와 중성단백질인 항균활성물질 (Wang and Sun, 1997), *Staphylococcus aureus* 와 *Bacillus subtilis* 대하여 항균효과를 갖는 항균활성 단백질 (20-22 kDa) (Chunju et al., 2004), 고온에서 활성이 강하고 그람 양성균 및 그람 음성균에 항균활성을 지닌 항균펩타이드 (10 kDa)의 분리, cecropin의 항균펩타이드 유전자클로닝 및 *E. coli*에서 재조합 발현된 항균펩타이드의 항균활성이 보고되었다 (Liang et al., 2006). 선행연구에서 본 연구책임자는 파리유충으로부터 얻어진 수용성단백질 효소분해물에서 MRSA 억제력을 갖는 5 kDa 이하의 펩타이드가 존재함을 보고하였다 (Yoon et al., 2008; Jang et al., 2007). 상기와 같이 비록 파리유충의 MRSA에 대한 항균활성의 연구가 많이 진행되었으나 에탄올추출물에 대한 항균활성작용 및 실용화연구는 보고된 바 없다. 본 연구의 주 목적은 파리유충 에탄올추출물의 양계사료용 항생제 대체제로서 이용성을 규명하는데 있었다. 이를 위하여 브로일러 사료 내 파리유충 에탄올추출물의 적정 첨가수준 결정 실험을 수행하였고 살모넬라 공격접종 및 양계농가를 대상으로 실증실험에 의한 경제성을 평가하였다.

나. 재 료 및 방 법

(1) 실험동물 및 실험설계

동물을 포함한 모든 실험절차는 유럽실험동물취급면허 교재에서 제시된 과학적이고 윤리적인 규정을 따랐으며 (Scot. manual, 1994) 실험수행을 위한 승인은 강원대학교 동물실험윤

리위원회로부터 얻었다. 로스계통 (Ross 308)의 성감별을 실시한 부화 1일령 수컷 브로일러 540수를 6처리구×3반복(반복 당 30수)으로 완전임의 배치하였다. 실험처리구는 T1 (대조구), T2 (Avilamycin 8 ppm), T3 (파리유충에탄올 추출물 프리믹스, EP 0.1%: premix containing ethanol extracts of maggot, MEP 5%), T4 (EP 0.1%: premix containing ethanol extracts of maggot, MEP 10%), T5 (EP 0.1%: premix containing ethanol extracts of maggot, MEP 15%), T6 (EP 0.1%: premix containing ethanol extracts of maggot, MEP 20%)로 구분하였다.

(2) 실험사료 및 사양관리

실험사료는 미국의 NRC 사양표준 (1994)에서 제시한 브로일러의 영양소 요구량을 충족 또는 초과할 수 있도록 옥수수, 대두박 위주로 배합하였으며 항생제 8 ppm과 파리유충 에탄올추출물 프리믹스의 첨가수준은 옥수수의 양을 줄여서 조절하였다. 조단백질과 대사에너지 함량을 동일한 수준으로 조절해 주었다 (Table 1). 배합된 실험사료는 서늘한 장소에 보관하면서 물과 함께 무제한 급여하였다. 부화 후 35일 동안 표준상태 (밀도 10 마리/m²)하에서 사육하였으며 각펜은 깔짚으로써 왕겨를 바닥 10 cm 높이로 깔아주었다. 브로일러는 전기 (1-21 일)와 후기 (22-35 일)로 구분하여 사육하였으며 사육실의 온도는 입추당일에서 3일까지 33℃로 유지하였고, 그 다음부터 주당 2~3℃씩 낮췄으며 22일부터 25℃로 유지하였다. 상대습도는 70%로 유지하였고 24시간 연속조명을 실시하였으며 자동환기시스템을 이용하여 일일 3-5회 환기를 해주었다.

(3) 사양성적 및 도체특성

브로일러의 성장에 따른 각 단계 별 성장능력 즉, 사료섭취량, 증체량 및 사료효율은 3주령과 5주령에 각각 측정하였다. 사료효율은 일정한 기간 중의 사료섭취량을 증체량으로 나눈 값으로 나타냈다. 실험동물의 사육이 종료되면 각 처리구별로 평균체중에 가까운 닭으로써 18수씩 (반복펜 당 6수씩)을 선별하여 실험동물 안락사 권장 (Close et al., 1997)에 따라서 경추탈골 (Cervical dislocation)에 의해서 스트레스를 주지 않고 안정적으로 희생하였다. 도체율 (Dressing percent)은 생체중에 대한 도체중 (깃털, 혈액, 머리, 다리 및 내장을 제외한 무게)의 비율로써 계산하였다. 머리는 첫 번째 목뼈에서 잘라냈으며 다리는 무릎 정강이 부위를 잘라냈다. 가슴살과 닭 껍질을 포함한 다리살의 무게비율은 각각 도체중에 대한 무게비율로서 계산하였고, 간, 근위, 복강지방, 면역기관 (흉선, 비장, F낭)의 무게는 생체중에 대한 비율로서 나타냈다. 복강지방은 복강과 근위주변의 지방을 모두 취해서 측정하였다.

Table 1. Composition of experimental basal diets for broiler chickens
(% as-fed)

Ingredient	Experimental diets	
	Grower (1-21 days)	Finisher (22-35 days)
Yellow corn ground	52.00	50.00
Soybean meal, 47% CP	34.00	25.00
Corn gluten meal	4.70	5.70
Wheat meal	-	10.00
Tallow	5.00	5.00
Limestone	1.25	1.25
Dicalcium phosphate	1.70	1.70
Salt	0.25	0.25
DL-Met, 50%	0.30	0.30
L-Lys-HCl, 78%	0.30	0.30
Trace mineral premix ¹⁾	0.34	0.34
Vitamin premix ²⁾	0.16	0.16
Total	100	100
Calculated values ³⁾		
ME, kcal/kg	3,100	3,150
CP, %	22.00	20.00
Lys, %	1.32	1.15
Met, %	0.52	0.50
Met+ Cys, %	0.78	0.73
Ca, %	1.00	0.90
Available P, %	0.45	0.40

¹⁾ Supplied per kilogram of diet: Fe, 80 mg; Zn, 80 mg; Mn, 70 mg; Cu, 7 mg; I, 1.20 mg; Se, 0.30 mg; Co, 0.70 mg.

²⁾ Supplied per kilogram of diet: vitamin A (retinyl acetate). 10,500 IU; vitamin D3, 4,100 IU; vitamin E (DL- α -tocopheryl acetate). 45 mg; vitamin K3, 3.0mg; thiamin, 2.5 mg; riboflavin, 5mg; vitaminB6, 5mg; vitaminB12, 0.02mg; biotin. 0.18mg; niacin. 44 mg; pantothenic acid. 17 mg; folic acid. 1.5 mg.

³⁾ Calculated as-fed values from NRC (1994).

(4) 혈액지질과 면역물질

실험 종료 시에 각 처리구 당 18수씩 (반복편 당 6수씩)을 임의로 선정하여 날개정맥으로부터 plain tube (Greine Co Ltd, Australia)를 이용해서 1mL 혈액을 채취하였다. 혈청 (serum)은 4℃로 유지된 원심분리기 (RC-3, SORVALL Co., USA)를 이용하여 15분간 3,000 rpm으로 혈액을 원심분리에 의해서 얻었다. 분리된 혈청은 액체질소가스를 이용하여

급속동결한 다음에 분석 시까지 -20°C 냉동 보관 하였다. 중성지방, 총콜레스테롤, 고밀도지단백 콜레스테롤 그리고 저밀도지단백 콜레스테롤은 자동혈액분석기 (Autoanalyzer 7150, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 상업용 효소킷 (Sigma Co. Ltd., USA)에 의해서 분석하였다. 혈액 면역물질은 Constantinoiu 등(2007)에 의해서 제시된 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, Bethyl laboratories., Inc., USA)에 의해서 측정하였다. IgG (chicken IgG ELISA quantitation set, E30-104), IgA (chicken IgA ELISA quantitation set, E30-103) 및 IgM (chicken IgM ELISA quantitation set, E30-102)을 이용하여 반응시킨 다음 microplate reader (Molecular Devices, Inc., New York, USA)에 의해서 450 nm에서 흡광도를 측정하여 항체의 양을 계산하였다.

(5) 맹장 미생물

희생한 닭으로부터 처리구 당 18수씩 (반복편 당 6수씩)을 선정하여 맹장을 채취하였다. 장내 미생물을 조사하기 위해서 안락사 이후 무균적인 방법으로 맹장을 채취하여 얼음 위에서 유지하였다. 미생물 배양 시까지 AnaeroGen sachets (Oxoid, Hampshire, UK)가 갖춰진 Sealed anaerobic jars (Oxoid, Basingstoke, UK)에서 혐기상태로 유지하였다. 맹장 내용물을 균질화한 후 1.0 g을 멸균된 인산완충식염수 (Phosphorus buffered saline; PBS 0.1 M, pH 7.0) 9 mL에 혼합하여 10배 희석 (1:9, wt/vol)하였다. 계수를 위하여 멸균된 혐기성 생리식염수를 이용하여 일련의 희석을 계속하였다. 모든 절차는 Anaerobic chamber (5% hydrogen, 5% CO₂, balanced nitrogen)에서 혐기상태로 이루어졌다. 미생물 배양은 10²~10⁷ 농도로 희석된 시료를 멸균된 평판배지에 각각 100 μL 씩 분주하였다. 해당 미생물에 대한 배지로는 Lactobacillus SPP.(MRS agar, Oxoid, Basingstoke, UK); Bifidobacterium SPP.(Bifidobacterium selective agar, BIM-25medium., Munoa and Pares, 1988); Salmonella(SSagar Difco, CM0099); Escherichia coli (McConkey Purple agar)이었다. Salmonella와 Escherichia coli는 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 호기배양하였고, Lactobacillus SPP. 와 Bifidobacterium SPP.는 Anaero Gensachets가 갖춰진 Sealed anaerobic jars를 이용한 혐기상태하에서 37 $^{\circ}\text{C}$ 로 각각 48, 72시간 정지배양한 후 미생물카운터로써 colony의 수를 조사하여, 맹장내용물 g당 균수 (CFU, colony-forming unit/g of fresh cecal content)로써 상용로그를 취하여 제시하였다.

(6) 짧은 사슬지방산

희생한 닭으로부터 처리구 당 18수씩 (반복편 당 6수씩)을 선정하여 맹장을 채취하였고 용적이 적었기 때문에 처리구 당 6개 시료를 한군데 모아서 하나의 시료로 하여 짧은 사슬지방산을 측정하였다. acetate, propionate, butyrate, isobutyrate, valerate 그리고 isovalerate의 농도를 Gas chromatographic system (model GC-15A, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)에 의해서 측정하였다(Zhang et al., 2003). 맹장내용물 약 5 g을 스크류캡튜브에서 증류수 5 mL를 이용하여 부유하였다. 시료를 ultraturrax를 이용하여 균

질화한 다음 4 °C, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액 1mL를 앰플병으로 옮긴 후 0.2 mL의 metaphosphoric acid solution을 첨가하였다. 시료를 균질화한 다음에 앰플병을 30분 이상 얼음상자 위에서 유지하였다. GC 분석하기 전에 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. GC는 불꽃이온화검출기와 polyethylene glycol column(Hewlett Packard, 30 m × 320 μm × 0.50 μm)가 부착되었으며 칼럼은 운반가스로서 고순도 N₂(1.8 mL/min)와 함께 100-150°C에서 운전하였다.

(7) TBARS

4°C에 7일간 저장하면서 지방산패도 (TBARS, thiobarbituric acid reactive substances)를 측정하였다. 닭 껍질을 포함한 다리살 5 g, 증류수 15 mL 그리고 butylated hydroxyanisole (BHA) 50 μL를 혼합하여 homogenizer (Ultra-Turrax T25, IKL-Labortechnik, Germany)로 10,000 rpm에서 20초간 균질화 하였다. 균질액 1 mL와 60°C에서 용해한 thiobarbituric acid 1.3% (wt/vol)를 함유하는 50%의 trichloroacetic acid 혼합용액 (TBA/TCA) 2 mL를 넣고 교반기에서 10초간 혼합하였다. 발색을 위하여 혼합물을 90°C 항온수조에서 15분 동안 가온한 다음 실온까지 냉각시켰다. 4 °C로 조절된 Automatic refrigerated centrifuge (RC-3, SORVALL Co., USA) 2,200 ×g에서 15분간 원심분리 후 상등액을 얻었다. 상등액을 Spectrophotometer (UV mini-1240, Shimadzu, Japan)를 이용하여 531 nm에서 흡광도를 측정하였다. 증류수 1 mL와 TBA/TCA 혼합용액 2 mL를 함유하는 맹검(blank)의 측정치와 비교하였고, 그 차이 값에 상용계수 5.88을 곱해서 닭고기의 TBARS 량을 MDA mg kg⁻¹으로 표시하였다. MDA 형성을 위해 수용액에서 스스로 분해되는 tetrathoxypropane (Sigma, St. Louis, MO)을 표준물질로 사용하였다 (Burge and Aust, 1978).

(8) pH

닭고기의 pH는 안락사 후 3시간 이내에 발골전 도체로부터 오른쪽 흉부에서 측정하였으며, 대기온도에서 pH 4.0과 7.00 완충액으로 보정한 유리전극 (insertion glass electrode)이 부착된 휴대용 pH meter(Crison 507, Crison, Milan, Italy)를 이용해서 유리전극을 닭고기에 직접 접촉하여 측정하였다(Berri et al.,2008).

(9) 보수력

보수력(WHC, water holding capacity) 측정을 위해 가슴살 0.5 g을 정확하게 달아서 플렉시유리판(plexi-glass plate 11.5×5.0×0.8 cm³)에 놓인 여과지(Whatman No. 2, International Ltd, England)의 중앙에 올려놓았다. Digitizing area-line meter (Super PLANIX-a, Tamaya Technics Inc., Japan)을 이용하여 35~50 kg/cm²의 압력으로 2분 간 압착하였다. 고기조직이 묻어있는 부분의 면적과 수분이 젖어있는 부분의 총 면적을 비교하여 백분율로써 나타냈다 (Hofmann et al., 1982).

(10) 닭고기 조성분

닭고기의 일반조성분 함량은 AOAC(1990) 방법에 의해서 분석하였다.

(11) 닭고기 지질과 콜레스테롤

닭고기의 지질 함량을 측정하기위해서 각 처리구 당 6마리씩 반복 펜 당 2마리의 생통닭을 선정하여 뼈를 제외한 닭껍질, 다리살, 가슴살을 가정용 믹서기에서 통째로 분쇄하여 실험재료 로써 이용하였다. 닭고기의 지질은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라서 닭고기 5 g을 혼합 유기용매 (chloroform : methanol = 2 : 1) 200 mL와 0.88% KCl 6 mL를 가한 후 homogenizer (Ultra-Turrax T25, IKL-Labortechnik, Germany)에서 3분간 교 반하여 균질화하였다. 균질물을 4 °C로 조절된 Automatic refrigerated centrifuge (RC-3, SORVALL Co., USA) 2,200×g에서 15분간 원심분리 후 지질층을 1차로 분리 하였으며 이 과정을 3회 반복해서 지질층을 분리하였다. 회전식진공농축기 (Rotary evaporator N-100, EYELA., Japan)를 이용해서 질소가스를 서서히 유입하면서 45°C에 서 농축하여 지질을 얻었다. 총지질은 농축 후 얻어진 무게를 달아서 측정하였다. 콜레스테롤 함량은 내부표준물질 사용방법을 사용하여 Direct saponification gas chromatographic 방법에 따라서 실시하였다 (Naemi et al., 1995). 콜레스테롤 표준물질은 Sigma Chemical Co (St, Louis MO, U.S.A)로부터 구입하여 표준용액 (stock solution of 2 mg mL⁻¹ hexane)을 제조하였다. 표준용액을 hexane으로 희석하여 10-80 μL의 콜레스테롤을 함유하는 working solution을 제조하여 각각의 working stand solution 1 μL를 주입하여 검량곡선을 작성하였다. 내부표준물질로서 180 μg의 5α-cholestane (Sigma Chemical Co, St, Louis MO, U.S.A), 닭고기 0.5 g을 새롭게 제조한 methanolic potassium hydroxide solution (0.5 M) 5 mL와 혼합하여 균질화하였다. 균질물을 80°C shaking water bath에서 30분 동안 가열하여서 검화하였다. 검화 후 식힌 다음에 증류수 1 mL와 hexane 5 mL를 첨가하여 2,000 ×g에서 15분간 원심분리한 후 콜레스테롤을 함유하는 상등액을 얻었다. 상등액 1 μL를 Gas chromatographic analyser 에 주입하여 콜레스테롤을 측정하였다. 불꽃이온화검출기, 자동시료주입기 (model AOC-17 Shimadzu Corp.) 및 Chromatography data system (model Class-VP Shimadzu Corp.)이 갖춰진 Gas chromatographic system (model GC-15A, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)을 이용하였다. 1.0 μm의 필름 두께로서 SPB-1 (Supelco Inc, Bellefonte, PA, USA) 코팅된 fused silica capillary column (15 m × 0.32 mm i.d)을 사용하였다. 칼럼의 온도는 분당 2°C씩 상승하면서 250°C-275°C로 프로그램화되었으며 이 상태에서 12분 동안 유지하였다. Oven 온도는 285°C로 하였다. injection port 와 flame ionization detector 온도는 300°C로 조절하였다. helium carrier gas의 속도는 분당 2 mL, hydrogen gas는 분당 30 mL, 그리고 공기는 분당 300 mL로 유지하였다. 모든 분석은 20:1의 split ratio에서 수행하였다. 콜레스테롤 회수율은 98.3%이었다.

(12) 관능검사

관능평가를 위해서 각 처리구로부터 3마리의 시료를 채취하였다. 관능검사는 닭 가슴살을 삼계탕 형식으로 끓는 물에 가열 후 조리하였다. 조리된 닭 가슴살을 이용하여 30분 이내에 관능평가실에서 닭고기의 맛을 위주로 관능평가를 실시하였다. 관능검사 요원은 14명의 대학생(남자 7명, 여자 7명)을 선발하여 평가내용을 충분히 알 수 있도록 훈련을 시킨 후 실험에 응하도록 하였다. 평가항목은 닭고기의 맛과 향(taste, flavor), 육색(color), 다즙성(jucness), 조직감(texture), 전체기호도(overall acceptability) 등 이었고 각 항목별로 9점 척도법을 사용하였으며 1점에서 9점으로 갈수록 닭고기 맛의 특성이 우수한 것으로 하였다.

(13) 살모넬라 공격접종

닭에서 분리된 자연균주 *Salmonella gallinarum* (ATCC 9184) 균주를 사용하였다. 균주 100 μ L에 tryptic soy broth (catalog no. 211822, Becton Dickinson, Sparks, MD) 10 mL를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 8시간 배양과정을 3회 반복에 의해서 활성화하였다. Bacterial cell은 3,000rpm에서 원심분리에 의해서 0.9% 멸균생리식염수로 3회 세척하였다. 균체는 0.9% 멸균생리식염수 mL 당 109 cfu 농도가 되도록 Spectrophotometer를 이용하여 조절하였으며 적절한 접종농도로 희석하여 사용하였다. 각 처리군에서 *Salmonella*의 농도는 xylose-Lys-deoxycholate (XLD) agar를 이용, 도말하여 계수하였으며, 그 결과를 cfu(colony-forming units)로서 제시하였다.

미생물학적 검사에 의해 *Salmonella*의 감염이 되지 않은 1일령 브로일러(Ross 308) 200마리를 이용하였다. 대조군(생리식염수 0.25 mL 경구투여)과 4개의 서로 다른 농도의 파리유충 에탄올추출물 투여군(생리식염수 0.25 mL에 병아리 체중 kg당 추출물 5, 10, 15, 20 mg씩 용해하여 각각 경구투여)으로 나누어 각각 그룹 당 40 마리씩 완전임의배치하였다. 항생제가 첨가되지 않은 시판 병아리사료를 무제한 급여하였고 물도 자유섭취토록 하였다. 병아리 당 생리식염수 0.25 mL에 약 104 cfu의 균주농도로서 경구투여기(Zonde)에 의해서 공격접종하였다. 균주를 공격접종 한 다음, 한 시간이 지난 후 대조군에게 적용하였던 존재를 이용하여 파리유충 에탄올 추출물을 병아리 체중 kg당 5, 10, 20 mg씩 구분하여 경구투여하였다. 모든 실험에서, 파리유충 에탄올추출물의 효율성을 측정하기 위하여 *Salmonella gallinarum* 회수율을 아래와 같이 조사하였다. 경구투여한 후 24시간 후 CO₂에 의해서 안락사하였다. 맹장을 채취하여 살모넬라 농축을 위해 tetrathionate broth (catalog no. 210420, Becton Dickinson)에 넣고 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 밤샘 배양하였다. 농축이후에 살모넬라 분리를 위해 mL 당 novobiocin(NO, Catalog No. N-1628, Sigma, St. Louis, MO) 25 μ g과 naladixic acid(NA, Catalog No. N-4382, Sigma) 20 μ g을 함유하는 XLD agar plates (catalog no. 278820, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)에 노출하여 밤샘 배양하였고 살모넬라 균종의 존재 유무를 기록하였다. 맹장을 멸균시료백(Catalog No. B00679WA, Nasco, Fort Atkinson, WI)에서 균질화한 후 각각의 멸균시료백에 멸균생리식염수 3mL를 첨가, 희석하였다. 희석액 100 μ L를 mL 당 novobiocin 25 μ g과 naladixic acid 20 μ g을 함유하는 XLD agar plates에 노출하여 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터

에서 24시간 배양한 다음 균수를 측정하였다(Higgins et al., 2007).

(14) 경제성 분석

로스계통 (Ross 308)의 성감별을 실시한 부화 1일령 수컷 브로일러 1,000수를 경기도 포천에 위치한 경원종장(포천시 영북면 자일리 671번지, 김태경 사장, 011-745-7495)에서 2009년 12월 18일부터 2010년 1월 17일까지 31일간 실증실험을 수행하였다. 실증실험 처리구는 브로일러 사료 내 파리유충 에탄올추출물의 적정 첨가수준 결정 실험에서 항생제 대체 효과가 뚜렷한 것으로 나타난 T4 (파리유충에탄올 추출물 프리믹스, EP 0.1%: premix containing ethanol extracts of maggot, MEP 10%)로 선정하였다.

(15) 닭고기 지방산

상기 농가 실증실험 닭고기를 이용하여 닭고기의 지방산 조성을 분석하였다. 지질의 메칠화 과정은 Morrison and Smith (1967)의 방법을 변형하여 실시하였으며 이를 간단히 기술하면 다음과 같다. 농축된 지질 분획 중 4-5 mg을 검화용 반응 용기에 넣고 새롭게 제조한 0.5N methanolic NaOH (2 g NaOH/ 100 mL methanol)를 1 mL 첨가하여 15분간 가열한 후 냉각한다. 냉각 후 methylation 용 시약인 14% BF₃-methanol 2 mL를 가한 후 다시 15분간 가열한다. 실온까지 충분히 냉각시킨 다음 1 mL의 heptane과 2 mL의 NaCl 포화용액을 가하여 1분간 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치한다. 상등액을 1 μ L를 취하여 flame-ionization detector가 부착된 Gas chromatographic system (model GC-15A, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)에 주입하여 지방산을 분석하였다. Omegawax 250 capillary column (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness, Supelco, Bellefonte, PA)을 사용하였다. 분석기기의 조건은 injector temp. 240 $^{\circ}$ C, detector temp. 250 $^{\circ}$ C, oven temp. 160 $^{\circ}$ C, carrier gas로써 helium (4.7 mL/min)을 이용하였으며 split ratio는 1:20이었다. 표준용액으로는 미국 Supelco사의 PUFA No. 2, animal source 제품을 이용하였다.

(16) 통계분석

자료는 SAS software의 GLM procedure를 사용하여 분산분석 (ANOVA)에 의해서 분석하였분석하였고 Duncan' 's multiple range test에 의해서 모든 자료에 대한 통계적인 유의차는 P < 0.05에서 검정하였다 (SAS, 2004).

다. 결 과 및 고 찰

(1) 브로일러의 성장능력

부화 후 35일 동안 파리유충 에탄올추출물을 섭취한 브로일러의 사양성적은 Table 2에 나타났다.

전체기간 중 증체량은 T3와 T2가 동일하였음을 제외하면 파리유충 에탄올추출물 함유사료

를 섭취한 처리구가 항생제 첨가구에 비해서 통계적으로 유의하게 높았다. 사료섭취량은 T1, T2와 비교할 때 파리유충 에탄올추출물을 섭취한 처리구, T3-T6에서 유의하게 높은 섭취량을 나타냈다. 사료효율은 T2와 T3 간 유의차가 나타나지 않았으나 T2와 T4-T6간 통계적인 유의차가 있었다. 한편, T1, T2, T3간 유의차는 나타나지 않았다. 항생제 첨가구와 비교할 때 파리유충 에탄올추출물을 섭취한 브로일러에서 증체량이 높았던 점은 파리유충 에탄올추출물 처리구의 맹장에서 건강에 유익한 *Lactobacillus* 와 *Bifidobacteria*의 성장이 촉진되었고 (Table 6), 면역기관인 흉선, 비장 및 F낭무게의 증가로 혈액 면역물질이 높아졌기 (Table 4) 때문으로 볼 수 있다. 결론적으로 브로일러 사료 내 파리유충 에탄올추출물 10%를 함유하는 프리믹스 0.1% 이상을 첨가해주면 항생제를 확실하게 대체할 수 있는 브로일러 증체효과를 기대할 수 있을 것으로 나타났다.

(2) 도체특성

파리유충 에탄올추출물을 섭취한 브로일러에서 조사한 도체특성은 Table 3에 나타났다. 도체중은 T2, T3 간 유의차가 나타나지 않았으나 T2와 T4-T6간 통계적인 유의차가 있었다. 닭 가슴살, 다리살 무게는 T2와 T4의 다리살 무게가 비슷하였음을 제외하면 T1, T2에 비해서 파리유충 에탄올추출물 첨가구, T3-T6가 통계적으로 유의하게 높았다. 복강지방 무게는 T1, T2, T3가 T5, T6에 비해서 유의하게 높았으나 T4, T5, T6 사이 그리고 T1, T2, T3, T4 사이의 유의차는 없었다. 지질대사에서 혈액지질은 생체조직으로 이동되어 에너지를 발생하는데 사용되고 여분의 지질은 복강조직에 축적된다는 점은 널리 알려진 이론이다. 파리유충 에탄올추출물의 혈액지질 감소작용 (Table 5)에 의해 복강조직으로 이동한 지질수준이 낮아져서 복강지방이 감소하였을 것으로 추정할 수 있다. 이 결과로 보아 브로일러 사료 내 파리유충 에탄올추출물 10%를 함유하는 프리믹스 0.1% 이상을 첨가해주면 항생제를 확실하게 대체할 수 있는 브로일러 도체성적 향상을 기대할 수 있을 것으로 나타났다.

(3) 혈액 면역물질 및 면역기관 무게

파리유충 에탄올추출물을 섭취한 브로일러의 혈액 면역물질 및 면역기관 무게변화는 Table 4에 나타내었다. 혈액면역물질 F낭, 비장, 흉선 무게는 T2, T3 간 유의차가 나타나지 않았으나 T2와 비교할 때 T4-T6에서 통계적으로 높은 유의차가 있었다. 혈액 면역물질 IgG, IgM, IgA는 T2, T3 간 유의차가 나타나지 않았으나 T2와 비교할 때 T4-T6에서 통계적으로 높은 유의차가 있었다. 파리유충 에탄올추출물을 섭취한 브로일러에서 혈청 IgG가 높았던 점은 체액성면역 능력을 향상시키는 데 있어서 파리유충 에탄올추출물의 효율성이 높았음을 의미한다. 면역단백질은 골수의 B-cell에서 만들어지며 가금에서 IgG, IgA, IgM은 포유동물의 면역단백질과 생물학적 특성이 비슷하다. 혈액 IgG의 농도는 가장 높고 생체면역력을 담당하므로 혈액 IgG의 역가는 체액성면역의 지표가 된다 (Higgins, 1975). 흉선은 항체생산을 위한 중요한 기관으로써 여기에 제시한 흉선지수에 관한 자료는 파리유충 에탄올추출물이 브로일러에서 흉선세포의 증식능력을 증가시켰음을 시사해준다. 닭의 면역체계는 흰쥐, 생쥐와 같은 포유동물과 약간 차이가 있다. F낭은 가금에서 일정한 편이며 B-림프구 (B-lymphocyte)의 발달 및 기능적인 성숙연구에 사용되었다. 닭이 성숙하면서 흉선과 F낭

이 발달하고 이와 함께 닭의 면역반응은 비장과 림프절에 의존하게 된다. 닭의 면역상태의 조절은 동물의 건강에 유익한 효과를 나타낼 수 있으며 생산성을 증가시키는 효과를 기대할 수 있다 (Tizard, 2002). 닭에서 면역단백질은 IgM을 IgG로 전환하는 기작 또는 IgA를 성공적으로 작용시키는데 필수적인 F낭, 기타 연관된 림프기관 및 흉선에 의존하고 있다 (Bienenstock et al., 1973). 따라서 면역단백질을 함유하는 세포생산의 증가 및 높아진 혈액 면역단백질의 농도는 파리유충 에탄올추출물을 섭취한 닭에서 발견된 림프기관의 회귀 결과일 것으로 볼 수 있다. 이상의 결과는 브로일러 사료 내 파리유충 에탄올추출물 10% 이상을 함유하는 프리믹스 0.1% 이상을 첨가해주면 항생제 첨가구에 비해서 면역기관 세포활성화로 혈액 면역물질 생성량을 증가시켜줌으로써 브로일러의 생산성 향상을 기대할 수 있음을 나타낸다.

Table 2. Performance of broilers fed the experimental diets for 35 days

Days	Treatments ¹⁾						PSE ²⁾
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
----- Body weight gain(g)-----							
1-21	828 ^c	857 ^b	867 ^b	890 ^a	893 ^a	896 ^a	6.6309
22-35	987 ^c	1,058 ^b	1,063 ^b	1,096 ^a	1,108 ^a	1,096 ^a	2.7871
1-35	1,815 ^c	1,915 ^b	1,930 ^b	1,986 ^a	2,001 ^a	1,992 ^a	17.964
----- Feed intake(g) -----							
1-21	1,568 ^c	1,579 ^b	1,586 ^{ab}	1,591 ^a	1,594 ^a	1,598 ^a	6.9025
22-35	1,226 ^c	1,257 ^b	1,280 ^a	1,287 ^a	1,298 ^a	1,285 ^a	15.403
1-35	2,794 ^c	2,836 ^b	2,866 ^a	2,878 ^a	2,882 ^a	2,875 ^a	18.112
----- Feed efficiency -----							
1-21	0.52 ^c	0.54 ^{bc}	0.54 ^{bc}	0.55 ^{ab}	0.56 ^a	0.56 ^a	0.0033
22-35	0.80 ^b	0.84 ^a	0.83 ^{ab}	0.85 ^a	0.85 ^a	0.85 ^a	0.0056
1-35	0.65 ^c	0.67 ^{bc}	0.67 ^{bc}	0.69 ^a	0.69 ^a	0.69 ^a	0.0027

¹⁾ T1: control, T2: 8ppm of antibiotics, T3: EP 0.1% (premix containing ethanol extracts of maggot, MEP 5%), T4: MEP 10%, T5: MEP 15%, T6: MEP 20%.

²⁾ Pooled standard error of mean values.

^{a,b,c} Mean values with different superscripts are significantly different at p<0.05

Table 3. Characteristics of carcass of broilers fed the experimental diets for 35 days

Item ²⁾	Treatments ¹⁾						PSE ³⁾
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
Carcass weight (g)	1,315 ^c	1,391 ^b	1,404 ^b	1,443 ^a	1,455 ^a	1,448 ^a	17.271
Dressing percentage (%)	72.45 ^b	72.65 ^{ab}	72.75 ^a	72.66 ^{ab}	72.75 ^a	72.69 ^{ab}	0.2859
Breast muscle (%)	22.77 ^c	23.12 ^b	23.54 ^a	23.77 ^a	23.71 ^a	23.69 ^a	0.3758
Thigh muscle (%)	18.87 ^c	19.50 ^b	19.87 ^a	19.68 ^{ab}	19.77 ^a	19.80 ^a	0.3663
Gizzard (%)	1.83	1.84	1.81	1.82	1.80	1.85	0.0817
Liver (%)	2.75	2.80	2.81	2.79	2.83	2.82	0.0797
Abdominal fat (%)	1.80 ^a	1.86 ^a	1.81 ^a	1.75 ^{ab}	1.70 ^b	1.68 ^b	0.0989

¹⁾ T1: control, T2: 8ppm of antibiotics, T3: EP 0.1% (premix containing ethanol extracts of maggot, MEP 5%), T4: MEP 10%, T5: MEP 15%, T6: MEP 20%.

²⁾ % of breast and thigh muscle to carcass weight; % of gizzard, liver and abdominal fat to body weight.

³⁾ Pooled standard error of mean values.

^{a,b,c} Mean values with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

Table 4. Indices of main immune organs and serum immunoglobulin from of broilers fed the experimental diets for 35 days

Item ²⁾	Treatments ¹⁾						PSE ³⁾
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
Bursa(F-sac) (g)	0.91 ^c	1.13 ^b	1.13 ^b	1.25 ^a	1.21 ^a	1.20 ^a	0.1022
Spleen (g)	1.55 ^c	1.77 ^b	1.75 ^b	1.98 ^a	1.88 ^a	1.97 ^a	0.1759
Thymus (g)	0.78 ^c	1.28 ^b	1.28 ^b	2.39 ^a	2.37 ^a	2.35 ^a	0.1693
IgG (µg/mL)	60.9 ^d	118.2 ^c	115.2 ^c	138.7 ^a	128.9 ^b	135.5 ^a	6.5407
IgM (µg/mL)	40.22 ^e	49.90 ^d	65.05 ^b	62.88 ^c	68.19 ^a	65.75 ^b	2.3405
IgA (µg/mL)	30.15 ^d	29.38 ^d	31.07 ^d	44.74 ^c	55.10 ^a	48.57 ^b	3.7164

¹⁾ T1: control, T2: 8ppm of antibiotics, T3: EP 0.1% (premix containing ethanol extracts of maggot, MEP 5%), T4: MEP 10%, T5: MEP 15%, T6: MEP 20%.

²⁾ g per kg body weight.

³⁾ Pooled standard error of mean values.

^{a,b,c,d,e} Mean values with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

(4) 혈액 지질변화

파리유충 에탄올추출물을 섭취한 브로일러의 혈액 면역물질 및 면역기관 무게변화는 Table 5에 나타내었다. 혈액 중성지방(TAG), 총콜레스테롤(TC), 저밀도지질단백질 콜레스테롤

(LDLC) 수준은 T1, T2와 비교할 때 파리유충 에탄올추출물을 섭취한 처리구, T3-T6에서 유의하게 높은 섭취량을 나타냈다. 한편, 고밀도지질단백질 콜레스테롤(HDLC)은 그 반대로 나타났으며, 혈액지질의 모든 항목에서 T1과 T2 사이의 유의차는 나타나지 않았다.

Table 5. Levels of TAG, TC, HDL·C, LDL·C in plasma from broilers fed the experimental diets for 35 days (Unit : mg/dL)

Item ²⁾	Treatments ¹⁾						PSE ³⁾
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
TAG	125.37 ^a	126.07 ^a	114.22 ^b	106.82 ^c	98.28 ^d	98.58 ^d	5.2071
TC	110.47 ^a	110.53 ^a	102.25 ^b	94.58 ^c	96.07 ^c	95.70 ^c	7.1028
HDL·C	29.01 ^c	28.67 ^c	31.97 ^b	32.60 ^b	37.57 ^a	37.17 ^a	3.0515
LDL·C	56.38 ^a	56.65 ^a	47.44 ^b	40.61 ^c	38.84 ^c	38.81 ^c	5.0338

¹⁾ T1: control, T2: 8ppm of antibiotics, T3: EP 0.1% (premix containing ethanol extracts of maggot, MEP 5%), T4: MEP 10%, T5: MEP 15%, T6: MEP 20%.

²⁾ TAG : triacylglyceride, TC : total cholesterol, HDL·C : high density lipoprotein cholesterol, LDL·C : low density lipoprotein cholesterol.

³⁾ Pooled standard error of mean values.

^{a,b,c,d} Mean values with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

(5) 맹장 미생물 변화

파리유충 에탄올추출물을 섭취한 브로일러의 맹장 내용물에서 조사한 미생물의 변화는 Table 6에 나타내었다. 장 내 유익한 미생물로 알려진 Bifidobacteria와 Lactobacillus는 파리유충 에탄올추출물을 섭취한 T3-T6가 T1, T2에 비해서 유의하게 높았으나, 유해한 미생물 Escherichia coli, Salmonella는 T3-T6가 T1, T2에 비해서 유의하게 감소한 결과를 나타냈다. 소화관에서 미생물의 중요성은 장 상피세포에 필요한 에너지를 공급해주는 발효산물의 합성에 있어서 장 미생물의 역할, 소화관 면역체계의 자극, 비타민 K의 합성 그리고 외인성 병원성 세균의 군락화에 대한 저항성을 나타내는 것이다 (Tako et al., 2008). Lactobacillus 와 Bifidobacteria는 동물의 건강에서 유익한 미생물로써 잘 알려져 있으며, E. coli, Clostridium perfringens와 같은 기타 미생물은 유해할 수 있다 (Devaraj et al., 2002). Bifidobacteria, Lactobacillus의 장 내 군총은 영양소와 장 부착부위에 대하여 잠재적인 병원체와 경쟁하고 있기 때문에 장 내 병원균 집단을 낮춘다. 또한, Bifidobacteria, Lactobacillus는 E. coli에 대하여 활성적인 물질의 박테리옌 (bacteriocin)을 분비하며 Bifidobacteria는 유기산과 기타 미생물에 대한 기질을 생성한다. Lactobacillus의 발효로부터 생성된 대부분의 유기산은 젖산과 초산이다. 이러한 모든 기질은 병원균에 의한 장 군락화를 억압할 수 있다 (Zhang et al., 2002). 파리유충 에탄올추출물 처리구에서 나타난 맹장 E. coli, Salmonella 군수가 유의하게 낮아진 이유는 바로 이러한 기질의 일부라고 생각할 수 있다. 닭에서 Salmonella 군락화의 주요 장소는 맹장이며

Salmonella는 병아리에서 설사 및 심각한 체중손실과 같은 살모넬라 감염증을 일으킨다는 점은 널리 알려져 있는 사실이다. 파리유충 에탄올추출물을 섭취한 브로일러에서 E.coli와 Salmonella가 낮아진 점은 맹장 내 존재하는 Bifidobacteria, Lactobacillus가 유의하게 높아진 점과 관련이 있다. 본 연구결과 파리유충 에탄올추출물을 섭취한 브로일러의 맹장내용물에서 건강을 증진시키는 Bifidobacteria, Lactobacillus 균의 성장을 선택적으로 자극하는 효과가 나타났으며 이익이 되지 않거나 또는 유해한 병원체 E. coli, Salmonella의 증식을 억제하는 것으로 나타났다. 또한, 항생제 첨가구 및 대조구와 비교해 볼 때, 파리유충 에탄올추출물 처리구의 맹장에서 건강에 유익한 Lactobacillus와 Bifidobacteria의 성장이 촉진되었고, 면역기관의 무게가 증가된 점 (Table 4)으로 보아서 파리유충 에탄올추출물을 브로일러 사료에 항생제 대체재로써 이용할 경우 병아리의 설사를 예방하고 성장을 촉진할 수 있는 항균성장촉진제로서 비피도스균의 활성화효과를 갖을 것으로 사료된다. 이상의 결과는 브로일러 사료 내 파리유충 에탄올추출물을 함유하는 프리믹스 0.1% 이상을 첨가해주면 항생제 첨가구에 비해서 장내 미생물군총을 조절하여줌으로써 브로일러의 생산성 향상을 기대할 수 있음을 시사해준다.

Table 6. Viable cell counts of microflora in cecal digesta of broilers fed the experimental diets for 35 days (log cfu/g content)

Item	Treatments ¹⁾						PSE ²⁾
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
<i>Bifidobacteria</i>	5.26 ^d	7.89 ^c	9.31 ^b	9.29 ^b	9.83 ^a	10.05 ^a	0.5007
<i>Lactobacillus</i>	5.19 ^c	8.04 ^b	10.43 ^a	10.57 ^a	10.80 ^a	10.75 ^a	0.2650
<i>Escherichia coli</i>	9.01 ^a	7.11 ^b	5.87 ^c	5.14 ^d	4.89 ^e	4.85 ^e	0.1512
<i>Salmonella</i>	9.22 ^a	8.10 ^b	7.03 ^c	7.09 ^c	6.55 ^d	6.67 ^d	0.4304

¹⁾ T1: control, T2: 8ppm of antibiotics, T3: EP 0.1% (premix containing ethanol extracts of maggot, MEP 5%), T4: MEP 10%, T5: MEP 15%, T6: MEP 20%.

²⁾ Pooled standard error of mean values.

^{a,b,c,d,e} Mean values with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

(6) 짧은 사슬지방산

파리유충 에탄올추출물을 섭취한 브로일러의 맹장 내용물에서 조사한 짧은 사슬지방산의 변화는 Table 7에 나타내었다. 짧은 사슬지방산의 총량, acetic acid, propionic acid, butyric acid, isobutyric acid, valeric acid, isovaleric acid 함량은 T2, T3 간 유의차가 나타나지 않았으나 T2와 T4-T6간 통계적인 유의차가 있었다. 항생제 첨가구 T2와 비교할 때 파리유충 에탄올추출물을 섭취한 처리구 T4-T6에서 장내 환경에 유익하고 면역능력 향상에 기여하는 acetic acid, propionic acid 함량은 유의하게 증가한 반면에 장내 환경에 유해한 butyric acid, valeric acid 함량은 유의하게 감소하였다. 이상의 결과는 브로일러 사료 내 파리유충 에탄올추출물 10%을 함유하는 프리믹스 0.1% 이상을 첨가해주면 항생제

첨가구에 비해서 장내 짧은 사슬지방산의 생성량을 증가시켜줌으로써 브로일러의 면역능력 증가를 꾀함으로써 궁극적으로 생산성 향상을 기대할 수 있음을 시사해준다.

Table 7. Concentrations of short chain fatty acids (SCFA) in cecal contents of broilers fed the experimental diets for 35 days(Unit: $\mu\text{mol/g}$ of cecal content)

Fatty acids	Treatments ¹⁾						PSE ²⁾
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
Acetic acid (C2)	47.36 ^c	87.09 ^b	85.31 ^b	108.59 ^a	117.63 ^a	121.35 ^a	22.185
Propionic acid (C3)	8.09 ^c	18.34 ^b	18.03 ^b	26.57 ^a	28.80 ^a	28.15 ^a	8.2641
Butyric acid (C4)	11.51 ^a	7.74 ^b	7.87 ^b	5.14 ^c	4.89 ^c	5.38 ^c	2.1509
Isobutyric acid	9.50 ^a	8.09 ^b	7.88 ^b	5.67 ^c	5.80 ^c	5.75 ^c	2.6037
Valeric acid (C5)	5.22 ^a	2.66 ^b	2.93 ^b	2.09 ^c	1.55 ^d	1.67 ^d	0.4807
Isovaleric acid	3.72 ^a	3.66 ^a	3.70 ^a	3.17 ^b	3.21 ^b	2.58 ^c	0.2273
Total SCFA	85.40 ^d	127.58 ^c	125.72 ^c	151.23 ^b	161.88 ^a	164.88 ^a	15.701

¹⁾ T1: control, T2: 8ppm of antibiotics, T3: EP 0.1% (premix containing ethanol extracts of maggot, MEP 5%), T4: MEP 10%, T5: MEP 15%, T6: MEP 20%.

²⁾ Pooled standard error of mean values.

^{a,b,c,d} Mean values with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

(7) 닭고기의 pH, 보수력, TBARS

파리유충 에탄올추출물을 섭취한 닭고기의 pH와 보수력은 Table 8에 나타났다. pH는 모든 처리구 가운데서 대조구인 T1이 가장 높았으나 T2와 T3, T4, T5, T6 간 통계적인 유의차는 없었다. 육즙손실로서 측정된 닭고기 가슴살의 보수력은 T1, T2와 비교할 때 파리유충 에탄올추출물을 섭취한 처리구 T3-T6가 유의하게 증가하였다.

Table 8. pH, water holding capacity (WHC) in chicken breast muscle

Item	Treatments ¹⁾						PSE ²⁾
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
pH	5.96 ^a	5.83 ^b	5.81 ^b	5.80 ^b	5.81 ^b	5.79 ^b	0.0104
WHC	52.67 ^d	54.28 ^c	55.51 ^b	55.81 ^{ab}	56.77 ^a	55.65 ^b	0.0305

¹⁾ T1: control, T2: 8ppm of antibiotics, T3: EP (premix containing ethanol extracts of maggot, MEP 5%), T4: MEP 10%, T5: MEP 15%, T6: MEP 20%.

²⁾ Pooled standard error of mean values.

^{a,b,c,d} Mean values with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

파리유충 에탄올추출물을 섭취한 닭고기의 저장 중 TBARS 변화는 Table 9에 나타냈다. 닭 껍질을 포함한 다리살의 저온저장 중 지방산패도를 나타내는 TBARS 값은 저장일수가 증가함에 따라서 높아졌으며, T1 및 T2 사이에는 유의차가 없었으나 파리유충 에탄올추출물을 섭취한 처리구 T3-T6는 유의하게 낮은 경향이 뚜렷하였다.

Table 9. TBARS values in chicken thigh muscle with skin during storage days at 5°C¹⁾

Storage days	Treatments ²⁾						PSE ³⁾
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
0	0.17	0.16	0.16	0.15	0.17	0.14	0.0406
3	0.38 ^a	0.37 ^a	0.29 ^b	0.27 ^b	0.25 ^b	0.27 ^b	0.0818
5	0.75 ^a	0.71 ^a	0.57 ^b	0.46 ^b	0.47 ^b	0.50 ^b	0.1216
7	0.91 ^a	0.88 ^a	0.76 ^b	0.60 ^c	0.61 ^c	0.63 ^c	0.1515

¹⁾ TBARS : thiobarbituric reactive substance (malondialdehyde mg/kg).

²⁾ T1: control, T2: 8ppm of antibiotics, T3: EP (premix containing ethanol extracts of maggot, MEP 5%), T4: MEP 10%, T5: MEP 15%, T6: MEP 20%.

³⁾ Pooled standard error of mean values.

^{a,b,c} Mean values with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

본 결과에서 나타난 새로운 사실은 브로일러 사료 내 파리유충 에탄올추출물을 첨가급여하게 됨으로서 닭고기의 저장성 연장효과를 높일 수 있다는 점이다. 일반적으로 pH는 근육 산 함량을 직접적으로 반영한 것으로 볼 수 있으며, 전단력, 육즙손실, 육색에 영향을 준다. 또한 근육 pH 변이는 글리코겐의 분해와 관련이 있고, 도살 직전 급성 스트레스에 반응하여 증가된 카테콜아민은 도살이후 pH의 감소율과 글리코겐 분해를 증가시키는 한편 도체의 온도는 여전히 높고, 스트레스 돈육을 생산하게 된다 (Young et al., 2003). 닭 가슴살에서 보수력의 증가는 TBARS 억제에 의한 항산화 상태의 개선에 기인한 것으로 볼 수 있으며 이는 사후 낮아진 pH와 관련이 있을 수 있다. 육즙손실 또는 물 손실율은 근육 내 영양소 함량, 향기, 색깔, 경도, 맛이 영향받을 수 있다는 점에 의한 보수력 측정을 위해서 널리 연구되었다. 근육 내 낮아진 보수력은 육즙의 흘러나움, 수용성 영양소와 향의 손실을 야기할 수 있기 때문에 근육은 건조해지고, 단단해지며, 맛이 없게 되고, 고기의 품질이 떨어진다(Tian and Yu, 2001). 지질산화는 육질을 낮추는 요인이며 malondialdehyde는 지질의 수용성 분해산물로써 고기 내 지질산화의 정도를 반영하는데 널리 사용될 수 있는 지표이다(Raharjo and Sofos, 1993). 증가된 항산화상태는 지질산화에서 야기된 스트레스에 대한 보호능력이 클 것으로 보기 때문에, 파리유충 에탄올추출물 첨가에 따른 TBARS의 억제효과는 곧 닭고기의 저장성 연장효과를 갖는 것으로 생각할 수 있다.

(8) 닭고기의 조성분, 콜레스테롤

파리유충 에탄올추출물을 섭취한 닭고기의 조성분과 콜레스테롤 함량은 Table 10에 나타났다. 수분과 조단백질은 T2, T3 간 유의차가 없었음을 제외하면 파리유충 에탄올추출물을 섭취한 처리구 T4-T6가 유의하게 높았다. 조지방과 콜레스테롤은 항생제 첨가구 T2와 비교할 때 파리유충 에탄올추출물을 섭취한 처리구 T3-T6가 유의하게 감소하였다. 혈액 콜레스테롤이 근육조직으로 이동되어 닭고기에 축적된다는 점은 널리 알려져 있다. 닭고기의 콜레스테롤이 감소한 이유는 파리유충 에탄올추출물 처리구에서 혈액지질이 낮아진 점 (Table 5)에 기인하였을 것으로 추정할 수 있다. 본 연구결과 브로일러 사료 내 파리유충 에탄올추출물을 첨가해주면 닭고기의 단백질 함량을 높이고 조지방과 콜레스테롤 함량을 낮출 수 있음을 확인하였다.

Table 10. Proximate analysis and cholesterol content in whole chicken meat from broilers fed the experimental diets for 35 days

Item	Treatments ¹⁾						PSE ²⁾
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
Mositure (%)	73.94 ^c	75.08 ^b	75.27 ^{ab}	75.86 ^a	75.97 ^a	75.81 ^a	0.2170
Crude protein (%)	19.81 ^c	20.94 ^b	21.35 ^{ab}	21.93 ^a	22.09 ^a	21.88 ^a	0.1068
Crude fat (%)	5.51 ^a	5.14 ^b	4.63 ^c	4.53 ^c	4.09 ^d	4.08 ^d	0.0309
Crude ash (%)	0.93 ^c	1.18 ^b	1.20 ^b	1.29 ^{ab}	1.19 ^b	1.39 ^a	0.0088
Cholesterol (mg/100g)	56.43 ^a	56.29 ^a	50.17 ^b	49.05 ^c	49.01 ^c	48.20 ^d	0.1272

¹⁾ T1: control, T2: 8ppm of antibiotics, T3: EP (premix containing ethanol extracts of maggot, MEP 5%), T4: MEP 10%, T5: MEP 15%, T6: MEP 20%.

²⁾ Pooled standard error of mean values.

^{a,b,c,d} Mean values with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

(9) 관능검사

파리유충 에탄올추출물을 섭취한 닭고기의 관능검사 결과는 Table 11에 나타났다. 관능평가 성적이 9에 가까우면 매우 우수한 것이며 1에 가까울수록 나쁜 것이다. 전체적인 기호도는 T1과 T2가 서로 비슷하였고 T5가 가장 높았던 점을 제외하면 항생제 첨가구 T2와 파리유충 에탄올추출물을 섭취한 T3, T4, T6 사이에 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

(10) 살모넬라 공격접종

파리유충 에탄올추출물을 섭취한 닭에서 살모넬라 공격접종 결과는 Table 12에 나타났다. 대조구 T1과 비교할 때 파리유충 에탄올추출물을 섭취한 T2, T3, T4, T5에서 살모넬라 회수율과 균수는 유의하게 감소되었음을 관찰하였으며, 이러한 결과로 보아 파리유충 에탄올

추출물이 브로일러의 살모넬라 감염증 예방에도 큰 효과가 있는 것으로 사료된다.

Table 11. Sensory evaluation of boiled chicken breast muscle

Item	Treatments ¹⁾						PSE ²⁾
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
Color	8.36 ^b	8.49 ^b	8.31 ^b	8.59 ^{ab}	8.63 ^a	8.35 ^b	0.1288
Flavor	8.59 ^b	8.34 ^c	8.43 ^{bc}	8.57 ^b	8.80 ^a	8.15 ^d	0.1041
Taste	8.01 ^b	8.11 ^b	8.87 ^a	8.14 ^b	8.89 ^a	8.85 ^a	0.8509
Texture	8.22 ^d	8.66 ^c	8.93 ^b	9.09 ^b	9.55 ^a	8.67 ^c	0.2177
Total acceptability	8.32 ^c	8.58 ^{bc}	8.69 ^b	8.79 ^b	9.05 ^a	8.67 ^b	0.2401

¹⁾ T1: control, T2: 8ppm of antibiotics, T3: EP 0.1% (premix containing ethanol extracts of maggot, MEP 5%), T4: MEP 10%, T5: MEP 15%, T6: MEP 20%.

²⁾ Pooled standard error of mean values.

^{a,b,c} Mean values with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

Table 12. Salmonella recovered from ceca of broiler chicks 48h post-treatment

Item	Treatments ¹⁾					PSE ³⁾
	T1	T2	T3	T4	T5	
Salmonella-positive samples/total samples ²⁾ (%)	39/40 (90)*	9/40 (30)*	10/40 (25)*	8/40 (20)*	6/40 (15)*	0.0020
Log ₁₀ cfu/g of feces	6.12 ^a	3.47 ^b	2.62 ^c	2.32 ^c	1.72 ^d	0.0075

¹⁾ T1: control, T2: 5 mg of MEP/kg of body weight, T3: 10 mg of MEP/kg of body weight, T4: 15 mg of MEP/kg of body weight, T5: 20 mg of MEP/kg of body weight.

²⁾ No Salmonella Enteritidis was recovered from groups not receiving the Salmonella Enteritidis challenge in these experiments.

³⁾ Pooled standard error of mean values.

^{a,b,c,d} Mean values with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

* An asterisk indicates the values within an experiment are different ($P < 0.05$).

Salmonella gallinarum과 Salmonella pullorum은 닭에서 각각 가금티프스와 가금추백리 [poiuyrew1q6등을 일으켜 양계산업에서 막대한 경제적 손실을 일으킨다. 그리고 Salmonella typhimurium, Salmonella enteritidis가 닭에서 감염빈도나 보균율이 높은 것으로 보고되었고 Salmonella typhimurium은 가금에서 설사 및 패혈증을 일으키는 것으로 알려졌다.

(11) 농가실증 실험 경제성

농가실증실험에 의해 진행된 파리유충 에탄올추출물을 섭취한 닭에서 경제성 평가결과는 Table 13에 나타났다. 대조구 T1과 비교할 때 파리유충 에탄올추출물 10%를 함유하는 프리믹스 0.1% 첨가구 T4에서 출하율 96%로 높은 생존율을 나타냈고, 한 마리당 증체량은 0.21 kg (16.40%)의 높은 증가를 나타냈으며, 마리당 판매금액은 462원이 더 높았다. 한편, 사료섭취량은 높았으나 증체량이 더 높았기 때문에 사료요구율 역시 낮게 나타났으며 사육비에서도 87원이 적게 든 것으로 확인되었다.

Table 13. Economic analysis by field test for 31 days

Item	Treatments ¹⁾	
	T1	T4
Body weight gain, kg/head	1.28	1.49
Feed intake, kg/head	2.20	2.45
Feed conversion ratio	1.72	1.64
Raising cost ²⁾	544	457
Sale cost (×2,200 won/kg)	2,816	3,278
Marketing rate (%)	92	96

¹⁾ T1: control, T4: EP 0.1% (premix containing ethanol extracts of maggot, MEP 10%)., Rate of marketing: T1, 92%.. T4, 96%.

²⁾ Raising cost included rice hull cost, pharmaceutical cost, feeding cost, feed cost and fuel cost.

(12) 닭고기 지방산

농가실증실험에 의해 진행된 파리유충 에탄올추출물을 섭취한 닭고기의 지방산 조성은 Table 14에 나타났다. 대조구 T1과 비교할 때 파리유충 에탄올추출물 10%를 함유하는 프리믹스 0.1% 첨가구 T4에서 닭고기의 맛과 관련한 올레인산(18:1n-9)의 함량이 유의하게 높았다($p < 0.05$).

Table 14. Fatty acid composition of whole chicken meat from broilers fed the experimental diets by field test for 31 days

(% of total fatty acid)

Fatty acid	Treatments ¹⁾		PSE ⁵⁾
	T1	T4	
14:0	0.86	0.50	0.0128
16:0	30.11 ^b	33.56 ^a	0.4392
16:1n-7	2.89	2.10	0.1041
18:0	8.51	8.17	0.2208
18:1n-9	40.81 ^b	42.19 ^a	0.9017
18:2n-6	16.82 ^a	13.47 ^b	0.3011
18:3n-6	- ⁴⁾	-	-
18:3n-3	-	-	-
20:1n-9	-	-	-
20:5n-3	-	-	-
22:6n-3	-	-	-
SFA ²⁾	39.48 ^b	42.23 ^a	0.3019
UFA ³⁾	60.52 ^a	57.77 ^b	0.2548

¹⁾ T1: control, T4: EP 0.1% (premix containing ethanol extracts of maggot, MEP 10%)

²⁾ SFA: saturated fatty acid. ³⁾ UFA: unsaturated fatty acid. ⁴⁾ Not detected.

⁵⁾ Pooled standard error of mean values.

^{a,b} Mean values with different superscripts are significantly different at p<0.05.

2. 돼지에 대한 파리유충 에탄올추출물의 사료용 항생제 대체효과 (실험 II)

가. 서론

경제성장과 국민소득의 증가는 먹을거리의 다양화로 인한 육식 위주의 식생활문화를 정착시켰다. 현대 축산업은 공장집약화 및 대규모화 되면서 생산성 향상 위주의 단순경영 체제에서 인체에 대한 건강 기능성 및 유해물로부터의 안전성까지 복합적인 기능을 요구하는 시대로 변모하고 있다. 인간의 생명과 장수에 직결된 건강과 질병에 대한 관심도가 증가함에 따라 친환경 및 유기축산물에 대한 소비가 대폭적으로 증가하고 있는 추세이다. 이와 함께 항생제 내성균의 문제가 심각한 사회적 현안이 되고 있으며 WTO/FTA 체결이 이루어짐에 따라서 축산식품의 수입개방화에 대응하고 웰빙 시대 소비자들의 건강 지향성 먹을거리에 대한 관심이 높아지고 있다. 특히, 친환경 유기축산의 대두로 EU는 2005년부터 유기축산물 생산에 이용되는 사료는 100% 유기사료를 사용하여야 하며 항생제는 더 이상 허용되지 않을 것을 규정하였고 2006년 1월부터 시행하고 있다 (European Union Commission, 2005). 우리나라는 2012년 가축에 대한 성장촉진제로서 항생제의 사용은 전면 금지할 예정이다.

항생제 잔류문제가 심각한 실정으로 알려진 중국산 닭고기를 비롯하여 축산물에 잔류할 수 있는 항생제 내성 문제를 해결하기 위한 수단으로서 가축사료에 첨가되는 항생제 대체물질의 개발이 필요하다 (Patterson and Burkholder, 2003). 식품 안전성 측면에서 항생물질 잔

류문제가 없는 안전 축산물에 대한 선호도가 증가함에 따라 동물산업 부문에서는 사료 내에 항생제를 첨가하지 않은 무항생제 안전 축산물을 생산하려는 많은 노력을 기울이고 있으나 질병 발생과 생산성 감소 등의 다양한 어려움에 직면하고 있는 실정이다. 공장집약형 축산업은 환경오염, 질병감염의 급속한 전파 및 동물복지 위협 등의 환경생물학적인 측면에서 많은 문제점이 제기되었다. 지난 세기 동안 사람과 가축의 질병예방 및 치료와 동시에 가축의 생산성을 높이기 위해 항생제의 오남용과 지속적인 사용이 있었다. 그 결과로써 항생제 내성균이 출현하여 심각한 사회적 문제를 일으키고 있으며 새로운 현안이 되었다. 공장집약형 축산업에서 사료용 항생제를 사용하지 않을 경우 발생할 수 있는 피해와 손실을 줄이고 지속적인 가축의 생산성 향상을 위해 항생제를 대체할 수 있는 새로운 항생제 대체물질의 개발이 시급한 실정이다. 따라서 항생제 내성균주의 출현에 관한 우려가 없으면서 항생제를 대체할 수 있는 천연물로부터 새로운 유기축산 사료용 항균활성물질의 개발이 시급한 현안이다 (Hong et al., 2008; Dibner and Richards, 2005; Commission Regulation EC 2277, 2003; Patterson and Burkholder, 2003; Dareish et al., 2002; Walker and Duffy, 1998).

1928년 알렉산더 플레밍에 의해서 최초의 항생제 “페니실린”이 개발된 이후에 항생제는 원래 세균감염의 예방과 치료를 위해서 사용되었다. 1950년대부터 일부 항생제가 브로일러와 같은 가축의 성장촉진, 사료효율 개선을 통하여 생산성을 증대할 목적으로 축산분야에서 사용되기 시작하였다. 항생제는 미생물에 의해 생산되는 대사물질이며 미량의 사용으로 유해 세균의 발육을 억제하거나 사멸시키는 작용을 갖는다. 항생제는 그동안 인류의 보건의료와 복지에 크게 기여한 최고의 의약품으로써 세균의 감염에 대한 치료 수단으로 이용되었다. 그러나 항균 성장촉진제로서 항생제의 지속적인 사용은 인간의 건강과 농업에 있어서 내성균의 국제적인 출현으로 심각한 사회문제로서 대두되었다. 동물에게 사용된 대부분의 항생제는 인간에게 사용된 항생제의 유사물질이며 세균은 인간 항생제에 대하여 저항성을 키우는 능력이 있다. 가축 사료에 첨가되는 항생제의 사용 규제에 의해 발생할 수 있는 치명적인 질환은 그람음성세균 감염성 질환이다. 특히 이유자돈의 감염성 설사에 의한 폐사율 증가는 양돈장의 생산성을 크게 떨어뜨릴 수 있다.

집파리 유충을 이용한 화상 및 욕창환자에 대한 생체치료(biotherapy) 기술이 최신 의학 분야에 접목되기 시작했다. 1930년-1940년의 세계대전 중 발생한 군인들의 총상환자 치료에 최초로 이용되었던 파리유충은 의학연구 및 상처치료물질로써 영국을 비롯한 유럽지역에서는 오래전부터 이용되고 있다. 그러나 파리유충으로부터 추출한 물질의 사람과 동물에 대한 생체활성 효과는 검토된 것이 거의 없다 (Bexfield et al., 2004; Sherman et al., 2000). 파리유충 분비물과 추출물은 강력한 항균활성을 갖는 것으로 알려졌으며 (Jaklic et al., 2008; ; Bexfield et al., 2004; Sherman et al., 2000; Vistnes et al., 1981), 파리유충으로부터 5가지 조성으로 구성된 염기와 중성단백질인 항균활성물질 (Wang and Sun, 1997), *Staphylococcus aureus* 와 *Bacillus subtilis* 대하여 항균효과를 갖는 항균활성 단백질 (20-22 kDa) (Chunju et al., 2004), 고온에서 활성이 강하고 그람 양성균 및 그람 음성균에 항균활성을 지닌 항균펩타이드 (10 kDa)의 분리, cecropin의 항균펩타이드 유전자클로닝 및 *E. coli*에서 재조합 발현된 항균펩타이드의 항균활성이 보고되었다 (Liang et al., 2006). 선행연구에서 본 연구책임자는 파리유충으로부터 얻어진 수용성단백질 효소분해물에서 MRSA 억제력을 갖는 5 kDa 이하의 펩타이드가 존재함을 보고하였다

(Yoon et al., 2008; Jang et al., 2007). 그러나 아직까지 돼지에 대한 사료용 항생제 대체효과는 보고된 것이 거의 없다.

본 연구는 파리유충 에탄올추출물의 돼지사료용 항생제 대체제로서 이용성을 규명하기 위해 수행하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 실험동물 및 실험설계

동물을 포함한 모든 실험절차는 유럽실험동물취급면허 교재에서 제시된 과학적이고 윤리적인 규정을 따랐으며 (Scot. manual, 1994) 실험수행을 위한 승인은 강원대학교 동물실험윤리위원회로부터 얻었다.

실험 I은 표준환경 조건에서 3원 교잡종 [(Landrace x Yorkshire) x Duroc] 70일령의 이유자돈 (평균 체중 $37.01 \pm 1.20\text{kg}$) 200 마리를 이용하여 성별과 체중에 따라 5처리 4반복, 반복 돈방 당 10마리씩 완전임의배치하였다. 5개의 처리구는 T1 (무첨가군), T2 (항생제 Avilamycin 8ppm 첨가군), T3 (MEP 10%), T4 (MEP 15%), T5 (MEP 20%)로 구분하였다. 파리유충 추출물 프리믹스 (MEP: Premix containing ethanol extracts of Maggot)를 제조 후 배합사료 내 0.1% 첨가하여 30일간의 급여실험을 진행하였다.

실험 II는 젤라농장 (충남 부여군 홍산면 조현리 478-1)에서 체중 $59.40 \pm 1.15\text{kg}$ 인 3원 교잡종 [(Landrace x Yorkshire)xDuroc] 육성비육돈 숫컷 160 마리를 이용하여 2처리 4반복, 반복 돈방 당 20마리씩 완전임의배치하였다. 실험 I의 결과로부터 선정된 파리유충 추출물의 최적 첨가수준인 파리유충 추출물 15% 함유하는 프리믹스 (MEP 15%)를 제조 후 실험사료 내 0.1% 첨가하여 60일 간 사양실험을 진행하였다. 2개의 처리구는 T1 (무첨가군), T2 (MEP 15%)로 구분하였다.

(2) 실험사료 및 사양관리

실험 I과 II의 사료는 실험처리와 관계없이 미국의 NRC 사양표준 (1994)에서 제시한 돼지의 영양소 요구량을 충족 또는 초과할 수 있도록 옥수수, 대두박 위주로 배합하였으며 항생제와 파리유충 추출물 프리믹스 (MEP)의 첨가수준은 옥수수의 양을 줄여서 조절하였다. 조단백질과 대사에너지 함량을 동일한 수준으로 조절해 주었다 (Table 1, Table 2). 배합된 실험사료는 서늘한 장소에 보관하면서 물과 함께 무제한 급여하였다. 돼지는 환경적으로 제어된 틈밥돈사에서 사육하였으며 20-23°C의 실온과 60% 상대습도에서 유지되었다. 각 돈방은 실험기간 동안 물과 사료를 자유롭게 섭취할 수 있도록 자가급이기와 니플음수기를 부착하였다.

Table 1. The formula and nutrient composition of the experimental diets (Expt. I)¹⁾
(as-fed % of diets)

Ingredients	Percentage
Corn grain	43.40
Wheat grain	11.40
Lupine seed	9.00
Soybean meal (45%)	23.30
Rapeseed meal	2.00
Fish meal (50%)	1.00
Limestone	1.02
Salt	0.30
Dicalcium phosphate	1.17
Yeast culture	0.18
Mineral premix ¹⁾	0.15
Vitamin premix ²⁾	0.10
Threonine (96%)	0.03
L-lysine-HCl (98%)	0.35
Molasses	2.00
Tallow	4.60
Total	100
<hr/>	
Chemical composition	
DE (kcal/kg)	3,617
Crude protein (%)	19.45
Lysine (%)	1.22
Cystine (%)	0.30
Methionine (%)	0.34
Methionine+ Cystine (%)	0.64
Calcium (%)	0.75
Phosphorous (%)	0.62

¹⁾ Provided per kg of diets: 200mg of Cu; 80mg of Fe; 180mg of Zn; 13mg of Mn; 0.4mg of I; 0.15mg of Co; 0.35 mg of Se.

²⁾ Provided per kg of diets: 20,000 IU of Vit. A; 4,000 IU of Vit. D₃; 75 IU of Vit. E; 12mg of Vit. K₃; 4mg of Vit. B₂; 1mg of Vit. B₆; 60µg of Vit. B₁₂; 50mg of Pantothenic acid; 120mg of Niacin; 0.08mg of Biotin.

Table 2. The formula and nutrient composition of the experimental diets (Expt. II)¹⁾ (% of diets)

Ingredients	Percentage
Corn grain	48.00
Wheat grain	10.00
Lupine seed	11.00
Soybean meal (45%)	14.20
Rape seed	3.00
DDGS	3.00
Limestone	0.94
Salt	0.30
Dicalcium phosphate	1.17
Yeast culture	0.18
Mineral premix ¹⁾	0.15
Vitamin premix ²⁾	0.10
Threonine (96%)	0.05
L-lysine-HCl (98%)	0.33
Molasses	3.00
Tallow	5.00
Total	100
.....	
Chemical composition	
.....	
DE (kcal/kg)	3,600
Crude protein, %	17.00
Lysine (%)	0.97
Cystine (%)	0.27
Methionine (%)	0.25
Methionine+ Cystine (%)	0.52
Calcium (%)	0.77
Phosphorous (%)	0.53

¹⁾ Provided per kg of diets: 200mg of Cu; 80mg of Fe; 180mg of Zn; 13mg of Mn; 0.4mg of I; 0.15mg of Co; 0.35 mg of Se.

²⁾ Provided per kg of diets: 20,000 IU of Vit. A; 4,000 IU of Vit. D₃; 75 IU of Vit. E; 12mg of Vit. K₃; 4mg of Vit. B₂; 1mg of Vit. B₆; 60µg of Vit. B₁₂; 50mg of Pantothenic acid; 120mg of Niacin; 0.08mg of Biotin.

(3) 성장능력 및 설사빈도

실험 I에서 이유자돈의 성장능력 즉, 일일 평균 사료섭취량(ADFI: average daily feed intake), 일일 평균 증체량(ADWG: average daily weight gain) 및 사료효율(FE: feed efficiency)을 조사하기 위하여 돈방 당 개시체중, 15일, 30일째의 체중과 사료섭취량을 각각 측정하였으며 이유자돈의 설사 빈도를 조사하였다. 사료효율은 일정한 기간 중의 사료섭취량을 증체량으로 나눈 값으로 나타냈다.

실험 II에서 육성비육돈의 돈방 당 사료섭취량, 증체량 및 사료효율을 실험개시, 35일, 60일에 각각 측정하여 ADFI, ADWG 및 FE를 계산하였다.

(4) 혈액지질

실험 II의 종료 시에 각 처리구 당 5마리씩 육성비육돈의 경정맥(Cervical vein)으로부터 K₃EDTA vacutainer tube 속으로 1.0 mL 혈액을 채취하였다. 혈장 (Plasma)은 4℃로 유지된 원심분리기 (RC-3, SORVALL Co., USA)를 이용하여 15분간 3,000 rpm으로 혈액을 원심분리에 의해서 얻었다. 분리된 혈장은 액체질소가스를 이용하여 급속동결한 다음에 분석 시까지 -20℃ 냉동보관 하였다. 혈액 중성지방, 총콜레스테롤, 고밀도지단백 콜레스테롤 그리고 저밀도지단백 콜레스테롤은 상업용 효소키트 (Sigma Co. Ltd., USA)를 이용하여 분석하였다.

(5) 혈액 면역물질

실험 I과 실험II의 종료 시에 각 처리구 당 5마리씩의 자돈과 비육돈의 경정맥으로부터 Clot activator vacuum tube (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ, USA) 속으로 1mL 혈액을 채취하였다. 혈청 (Serum)은 4℃로 유지된 원심분리기 (RC-3, SORVALL Co., USA)를 이용하여 15분간 3,000 rpm으로 혈액을 원심분리에 의해서 얻었다. 혈액 면역물질 IgG의 측정은 면역비탁법 (Nephelometry, Behring Nephelometer II, Dade Behring Marburg GmbH, Germany)을 사용하여 측정하였다.

(6) 분변 중의 미생물

실험 I과 실험 II의 종료 시에 자돈과 육성비육돈에서 각각 처리구 반복 돈방으로부터 분변을 채취하여 미생물 변화를 조사하였다. 분변을 균질화한 후 1.0 g을 멸균된 인산완충식염수 (Phosphorus buffered saline; PBS 0.1 M, pH 7.0) 9 mL에 혼합하여 10배 희석 (1:9, wt/vol)하였다. 계수를 위하여 멸균된 생리식염수를 이용하여 일련의 희석을 계속하였다. 미생물 배양은 10^{-1} ~ 10^{-7} 농도로 희석된 시료를 멸균된 평판배지에 각각 100 μ L씩 분주하였다. 총호기성균 (배지: TSA, Tryptic Soy Agar), *Salmonella* (배지: SSagar Difco, CM0099); *Escherichia coli* (배지: McConkey Purple agar)을 37℃에서 24시간 호기배양한 후 미생물카운터로써 colony의 수를 조사하였다. 분변 g당 균수 (CFU,

colony-forming unit/g of fresh cecal content)로써 상용로그를 취하여 제시하였다.

(7) 짧은 사슬지방산

실험 I의 종료 시에 자돈에서 각각 처리구 반복 돈방으로부터 분변을 채취하여 짧은 사슬 지방산을 측정하였다. Acetate, Propionate, Butyrate, Isobutyrate, Valerate 그리고 Isovalerate의 농도를 Gas chromatographic system (model GC-15A, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)에 의해서 측정하였다 (Zhang *et al.*, 2003). 분변 약 5 g을 스크류캡 튜브에서 증류수 5 mL를 이용하여 부유하였다. 시료를 Ultra turrax T25 homogenizer (Janke and Kunkel, IKA Labortechnik)를 이용하여 균질화한 다음 4 °C, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액 1mL를 앰플병으로 옮긴 후 0.2 mL의 Metaphosphoric acid solution을 첨가하였다. 시료를 균질화한 다음에 앰플병을 30분 이상 얼음상자 위에서 유지하였다. GC 분석하기 전에 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. GC는 불꽃이온화검출기와 Polyethylene glycol column (Hewlett Packard, 30 m × 320 μm × 0.50 μm)가 부착되었으며 칼럼은 운반가스로서 고순도 N₂ (1.8 mL/min)와 함께 100-150 °C에서 운전하였다.

(8) 돼지고기 지방산

실험 II의 종료 시에 돼지고기의 지방산 조성을 분석하기 위해서 도축 후 처리군 당 5마리의 돼지로부터 각각 1 kg씩의 삼겹살과 등심을 얻었다. 가정용 믹서기를 이용하여 분쇄하였고 분쇄된 시료에서 3부위를 임의로 선정하여 하나의 시료로부터 3반복 지방산 분석용 공시 재료를 각각 취했다. 돼지고기의 지질은 Folch 등(1957)의 방법에 따라서 공시 재료 일정량과 항산화제 BHT (Butylated hydroxy toluene)를 함유하는 혼합 유기용매 (Chloroform:Methanol=2:1)를 20배의 비율 (vol./wt.)로 가한 후 Ultra Turrax T25 homogenizer 2,500rpm에서 회당 10초씩 3회 격렬하게 교반, 여과하고 일정량의 증류수를 가하여 혼합하였고 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 지질층을 1차로 분리하였다. 이 과정을 3회 반복해서 추출된 지질을 최종적으로 질소가스를 이용하여 농축하였다. 지질의 메틸화과정은 Morrison과 Smith의 방법 (1967)을 변형하여 실시하였으며 이를 간단히 기술하면 다음과 같다. 농축된 지질 분획 중 4~5 mg을 검화용 반응 용기에 넣고 새롭게 제조한 0.5 N methanolic NaOH (2 g NaOH/ 100 mL methanol)를 1 mL 첨가하여 15분간 가열한 후 냉각한다. 냉각 후 Methylation 용 시약인 BF₃-methanol (Boron trifluoride) 2 mL를 가한 후 다시 15분간 가열한다. 실온까지 충분히 냉각시킨 다음 다시 1 mL의 Heptane과 2 mL의 NaCl 포화용액을 가하여 1분간 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치한다. 상등액을 1~2 μL를 취하여 지방산 분석용 GLC(ACEM 6000 Model, 영인 과학, 한국)에 주입하여 지방산을 분석하였으며 각 처리구의 반복 개체 시료 당 3회 반복으로 측정하였다. 표준용액으로는 미국 Supelco사 제품 (37 Component FAME Mix, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO)을 이용하였으며 내부 표준물질로써 Nonadecanoic acid (19:0)를 사용하였다. SP™-2560 Capillary GC Column (L×I.D. 100m×0.25mm, df 0.20 μm Omegawax 320 capillary column. USA)을

사용하였으며 시작 온도를 8분 동안 150℃로 프로그램 하였고 그 다음에 분당 2℃ 씩 높여서 150-190℃로 온도를 올렸으며 최종 온도를 190℃로 고정하였다. 헬륨을 Carrier gas로써 사용하였으며 분당 40 mL 유속으로 조절하였다. Split ratio는 100:1로 하였다. Injection의 온도는 250℃, Detector의 온도는 265℃로 조절하였다.

(9) 돼지고기 콜레스테롤

상기 8항의 삼겹살과 등심을 가정용 믹서기로 분쇄하였고 분쇄된 시료에서 3부위를 임의로 선정하여 하나의 시료로부터 3반복 콜레스테롤 분석용 공시 재료를 각각 취했다. 상기 기술한 방법과 동일하게 지질을 분리, 농축하였다. 콜레스테롤 함량은 내부표준물질 사용방법을 사용하여 Direct saponification gas chromatographic방법에 따라서 실시하였다 (Naeemi 등, 1995). 콜레스테롤 표준물질은 Sigma Chemical Co (St, Louis MO, U.S.A)로부터 구입하여 표준용액 (헥산 mL 당 stock solution 2 mg 함유)을 제조하였다. 표준용액을 헥산으로 희석하여 10-80 μ L의 콜레스테롤을 함유하는 working solution을 제조하여 각각의 working stand solution 1 μ L를 주입하여 검량곡선을 작성하였다. 내부표준물질로서 180 μ g의 5 α -cholestane (Sigma Chemical Co, St, Louis MO, U.S.A), 돼지고기 0.5 g을 새롭게 제조한 methanolic potassium hydroxide solution (0.5 M) 5 mL와 혼합하여 균질화하였다. 균질물을 80℃ shaking water bath에서 30분 동안 가열하여서 검화하였다. 검화 후 식힌 다음에 증류수 1 mL와 헥산 5 mL를 첨가하여 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 콜레스테롤을 함유하는 상등액을 얻었다. 상등액 1 μ L를 Gas chromatographic analyser에 주입하여 콜레스테롤을 측정하였다. 불꽃이온화검출기, 자동시료주입기 (model AOC-17 Shimadzu Corp.) 및 Chromatography data system (model Class-VP Shimadzu Corp.)이 갖춰진 Gas chromatographic system (model GC-15A, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)을 이용하였다. 1.0 μ m의 필름 두께로서 SPB-1 (Supelco Inc, Bellefonte, PA, USA) 코팅된 fused silica capillary column (15 m \times 0.32 mm i.d)을 사용하였다. 칼럼의 온도는 분당 2℃씩 상승하면서 250℃-275℃로 프로그램화되었으며 이 상태에서 12분 동안 유지하였다. Oven 온도는 285℃로 하였다. injection port 와 flame ionization detector 온도는 300℃로 조절하였다. helium carrier gas의 속도는 분당 2 mL, hydrogen gas는 분당 30 mL, 그리고 공기는 분당 300 mL로 유지하였다. 모든 분석은 20:1의 split ratio에서 수행하였다. 콜레스테롤 회수율은 98.3%이었다.

(10) 경제성분석

실험 II로부터 농가 실증실험에 의해 진행된 파리유충 추출물 15%를 함유하는 프리믹스 0.10%가 혼합된 배합사료를 섭취한 돼지에서 경제성을 평가하기 위해 두당 증체량, 사료섭취량, 사료요구율 그리고 판매수익을 조사하였다.

(11) 통계분석

실험 I에서 얻어진 모든 자료는 SAS software의 GLM procedure를 사용하여 분산분석 (ANOVA)을 진행한 후 Duncan's multiple range test에 의해서 통계적인 유의차를 검정하였으며 실험 II의 모든 자료는 T-test를 이용하여 통계적인 유의차를 검정하였다. 본 실험에서 얻어진 모든 자료에 대한 통계처리 결과는 95% 신뢰수준에서 유의성을 검정하였다 ($P < 0.05$) (SAS, 2004).

다. 결과 및 고찰

(1) 돼지의 성장능력

파리유충 추출물을 섭취한 돼지의 성장능력은 Table 3, Table 4에서 보는 바와 같다.

실험 I에서 자돈의 성장능력은 항생제 첨가군과 비교할 때 MEP 10% 처리군은 비슷하였으나 MEP 15%와 MEP 20% 처리군은 유의하게 높았다 (Table 3).

실험 II에서 육성비육돈의 성장능력은 대조군과 비교할 때 MEP 15% 처리군이 유의하게 높았다 (Table 4).

실험 I과 실험 II에서 항생제 첨가군과 비교할 때 파리유충 추출물을 섭취한 돼지에서 증체량이 높았던 점은 파리유충 추출물 처리군의 분변에서 동물의 건강에 유해한 살모넬라와 대장균의 검출이 낮았으며 (Table 7, Table 8) 건강에 유익한 *Lactobacillus* 와 *Bifidobacteria*의 성장 (분석하지 않았음)이 촉진되었기 때문으로 추정해 볼 수 있다. 이와 같은 장내 미생물의 작용은 짧은 사슬지방산을 증가시키고 (Table 9) 혈액 면역물질을 높였을 것으로 (Table 6) 사료된다. 결론적으로 돼지 사료 내 파리유충 추출물 15%를 함유하는 프리믹스 0.1% 이상을 첨가해주면 항생제를 대체할 수 있는 돼지의 성장능력을 향상시킬 수 있을 것으로 나타났다.

(2) 혈액 지질변화

실험 II에서 파리유충 추출물을 섭취한 돼지의 혈액 지질변화는 Table 5에서 보는 바와 같다. 실험종료일에 측정된 혈액 중성지방, 총콜레스테롤, 저밀도지질단백질 콜레스테롤 수준은 대조군과 비교할 때 MEP 15% 처리군이 유의하게 낮았다.

MEP 15% 처리군에서 혈액지질의 감소율은 대조군과 비교할 때 중성지방 19.66%, 총콜레스테롤 16.57%, 저밀도지질단백질 콜레스테롤 49.90%로 나타났다.

(3) 혈액 면역물질

파리유충 추출물을 섭취한 돼지의 혈액 면역물질 변화는 Table 6에서 보는 바와 같다. 실험 I과 실험 II에서 돼지의 혈액 면역물질 IgG는 항생제 첨가군 및 대조군과 비교할 때 파리유충 추출물 10% 이상 첨가군에서 유의하게 높았다. 실험 I에서 돼지의 혈액 면역물질

IgG의 증가율은 대조구 및 항생제 첨가구와 비교할 때 파리유충 추출물 10% 이상 첨가군에서 각각 0.68-1.21배, 0.25-0.65배 증가하였으며 실험 II의 경우 대조구와 비교할 때 파리유충 추출물 15% 첨가군이 1.51배 증가하였다.

Table 3. Growth performance of weaning swine fed the experimental diets for 30 days (Exp. I)¹⁾

Item	T1	T2	T3	T4	T5	PSE ⁵⁾	p-value
0~15 days							
ADG ²⁾ , g	801 ^c	876 ^b	880 ^b	920 ^a	918 ^a	10.7052	0.0001
ADFI ³⁾ , g	1,907 ^b	1,920 ^a	1,920 ^a	1,925 ^a	1,922 ^a	3.1606	0.015
FCR ⁴⁾	2.38 ^a	2.19 ^b	2.10 ^c	2.09 ^c	2.09 ^c	0.0294	0.0001
16~30 days							
ADG, g	857 ^c	915 ^b	917 ^b	980 ^a	975 ^a	12.4448	0.0001
ADFI, g	1,920 ^b	1,930 ^{ab}	1,935 ^a	1,940 ^a	1,930 ^{ab}	1.6440	0.014
FCR	2.24 ^a	2.10 ^b	2.11 ^b	1.98 ^c	1.98 ^c	0.0250	0.0001
0~30 days							
Initial weight, kg	37.40	37.25	37.41	37.36	37.40	0.0550	0.273
Final weight, kg	62.27 ^c	64.12 ^b	64.37 ^b	65.86 ^a	65.80 ^a	0.3435	0.0001
ADG, g	828 ^c	895 ^b	899 ^b	950 ^a	947 ^a	12.2512	0.0001
ADFI, g	1,918 ^b	1,925 ^{ab}	1,928 ^{ab}	1,933 ^a	1,926 ^{ab}	1.7933	0.141
FCR	2.31 ^a	2.15 ^b	2.14 ^b	2.03 ^c	2.03 ^c	0.0286	0.0001

¹⁾ T1: control, T2: 8ppm of avilamycin, T3: MEP 10% (premix containing 10% of maggot extracts) : T4: MEP 15% (premix containing 15% of maggot extracts), T5: MEP 20 (premix containing 20% of maggot extracts).

²⁾ Average daily weight gain. ³⁾ Average daily feed intake. ⁴⁾ Feed conversion ratio.

⁵⁾ Pool standard error of mean values.

^{a,b,c} Mean values with different superscripts are significantly different at p<0.05.

Table 4. Growth performance of finishing swine fed the experimental diets for 60 days (Exp. II)¹⁾

Item	Control	MEP 15%	p-value
0~30 days			
ADG ²⁾ , g	886 ^b ±1.21 ⁵⁾	980 ^a ±2.88	0.0001
ADFI ³⁾ , g	2,497 ^a ±3.84	2,320 ^b ±3.93	0.0001
FCR ⁴⁾	2.81 ^a ±0.008	2.36 ^b ±0.02	0.0001
31~60 days			
ADG, g	664 ^b ±1.53	821 ^a ±35.82	0.035
ADFI, g	2,520 ^a ±4.04	2,430 ^b ±2.97	0.0001
FCR	3.80 ^a ±0.008	2.96 ^b ±0.008	0.0001
0~60 days			
Initial weight, kg	60.21±0.04	60.17±0.03	-
Final weight, kg	106.7 ^b ±0.32	114.2 ^a ±0.30	0.0001
ADG, g	774 ^b ±2.03	901 ^a ±2.03	0.0001
ADFI, g	2,508±4.04	2,375±3.48	0.820
FCR	3.24 ^a ±0.02	2.63 ^b ±0.01	0.0001

¹⁾ MEP 15% : premix containing 15% of maggot extracts.

²⁾ Average daily weight gain. ³⁾ Average daily feed intake.

⁴⁾ Feed conversion ratio. ⁵⁾ Mean values±standard error.

^{a,b} Mean values with different superscripts are significantly different at p<0.05.

Table 5. Levels of TAG, TC, HDL · C, LDL · C in plasma from swine fed the experimental diets for 30 days (Exp. II) (Unit : mg/dL)

Item ²⁾	Treatments ¹⁾		p-value
	Control	MEP 15%	
TAG	85.75 ^a ±0.34 ³⁾	68.89 ^b ±0.47	0.0001
TC	130.74 ^a ±0.75	109.08 ^b ±0.77	0.0001
HDL·C	60.09 ^b ±0.41	73.68 ^a ±0.27	0.0001
LDL·C	70.38 ^a ±0.24	35.26 ^b ±0.25	0.0001

¹⁾ MEP 15% : premix containing 15% of maggot extracts.

²⁾ TAG : triacylglyceride, TC : total cholesterol, HDL·C : high density lipoprotein cholesterol, LDL·C : low density lipoprotein cholesterol. ³⁾ Mean values±standard error.

^{a,b} Mean values with different superscripts are significantly different at p<0.05.

Table 6. Indices of main immune organs and serum immunogloblin from swine fed the experimental diets (Unit : $\mu\text{g/mL}$)

Item	Treatments ¹⁾					PSE ²⁾	p-value
	T1	T2	T3	T4	T5		
IgG from Exp. I	80.79 ^e	108.2 ^d	135.7 ^c	178.5 ^a	168.9 ^b	9.7709	0.0001
IgG from Exp. II	74.21 ^b ± 0.34 ³⁾	-	-	186.3 ^a ± 1.13	-	-	0.0001

¹⁾ T1: control, T2: 8ppm of avilamycin, T3: MEP 10% (premix containing 10% of maggot extracts) : T4: MEP 15% (premix containing 15% of maggot extracts), T5: MEP 20 (premix containing 20% of maggot extracts).

²⁾ Pooled standard error of mean values. ³⁾ Mean values \pm standard error.

^{a,b,c,d,e} Mean values with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

(4) 분변 중 미생물 변화

파리유충 추출물을 섭취한 돼지의 분변 중 미생물 변화는 Table 7, Table 8에서 보는 바와 같다.

실험 I 과 실험 II에서 파리유충 추출물을 섭취한 자돈의 분변에서 조사한 장 내 호기성균과 함께 유해한 미생물 *Escherichia coli*, *Salmonella*는 유의하게 감소하였으며 특히, 이 유자돈의 경우 돈방을 관찰한 결과 대조구와 비교할 때 설사빈도는 매우 낮은 것으로 확인되었다. 이는 파리유충 추출물을 섭취한 처리구의 분변에서 상기 보고한 유해한 미생물 수가 낮았던 점과 관련이 있을 것으로 사료된다. 일반적으로 대장균은 장 용모세포에서 유해균의 군락을 형성하여 독소를 생성하고 이로 인하여 자돈의 장관은 장액을 분비하며 액상의 설사를 하는 것으로 알려져 있다.

Table 7. Viable cell counts of microflora in feces of swine fed the experimental diets for 30 days (Exp. I) (Unit : log cfu/g feces)

Item	Treatments ¹⁾					PSE ²⁾	p-value
	T1	T2	T3	T4	T5		
Total aerobic bacteria (* 10 ⁷)	85.27 ^a	57.89 ^b	55.31 ^c	40.29 ^d	35.83 ^e	4.6940	0.0001
<i>Escherichia coli</i> (* 10 ⁵)	49.01 ^a	30.01 ^b	15.87 ^c	8.14 ^d	8.89 ^e	4.2334	0.0001
<i>Salmonella</i> (* 10 ⁵)	55.92 ^a	28.18 ^b	17.07 ^c	8.15 ^d	8.07 ^d	4.7792	0.0001

¹⁾ T1: control, T2: 8ppm of avilamycin, T3: MEP 10% (premix containing 10% of maggot extracts) : T4: MEP 15% (premix containing 15% of maggot extracts), T5: MEP 20 (premix containing 20% of maggot extracts).

²⁾ Pooled standard error of mean values.

^{a,b,c,d,e} Mean values with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

Table 8. Viable cell counts of microflora in feces of swine fed the experimental diets for 30 days (Exp. II) (Unit : log cfu/g feces)

Item	Treatments ¹⁾		p-value
	Control	MEP 15%	
Total aerobic bacteria (* 10 ⁷)	135.77 ^a ±0.38 ²⁾	56.38 ^b ±0.13	0.0001
<i>Escherichia coli</i> (* 10 ⁵)	109.05 ^a ±0.43	8.74 ^b ±0.04	0.0001
<i>Salmonella</i> (* 10 ⁵)	95.79 ^a ±0.09	8.41 ^b ±0.06	0.0001

¹⁾ MEP 15% : premix containing 15% of maggot extracts.

²⁾ Mean values±standard error.

^{a,b} Mean values with different superscripts are significantly different at p<0.05.

(5) 짧은 사슬지방산

실험 I에서 파리유충 추출물을 섭취한 돼지의 분변 중 짧은 사슬 지방산 변화는 Table 9에서 보는 바와 같다.

파리유충 추출물을 섭취한 자돈의 분변에서 조사한 짧은 사슬지방산의 짧은 사슬지방산은 대조구 및 항생제 첨가구와 비교할 때 Acetic acid, Propionic acid는 높았고 Butyric acid, Isobutyric acid, Valeric acid, Isovaleric acid는 낮았으며 통계적으로 유의차가 있었다.

(6) 돼지고기 콜레스테롤과 지방산 조성

실험 II로부터 파리유충 추출물을 급여하여 얻어진 돼지고기 콜레스테롤과 지방산 조성의 변화는 Table 10에서 보는 바와 같다.

대조구와 비교할 때 파리유충 추출물 15%를 함유하는 프리믹스 0.1% 첨가구에서 콜레스테롤 함량은 낮았으나 돼지고기의 맛과 관련한 올레인산(18:1n-9)의 함량은 유의하게 높았다. 콜레스테롤의 감소율은 파리유충 추출물 첨가구가 대조구와 비교할 때 삼겹살과 등심에서 각각 17.85%, 20.87%로 나타났다. 파리유충 추출물 첨가구에서 돼지고기 콜레스테롤이 낮아진 이유는 혈액 지질이 낮았던 점과 관련이 있는 것으로 볼 수 있다 (Table 5). 혈액 지질은 생체조직으로 이동되어 대사에 쓰이고 축적될 수 있다. 올레인산은 혈액 콜레스테롤을 낮추는 생체활성 기능을 갖는 것으로 새롭게 보고되어 관심사가 되고 있다.

(7) 농가실증 실험 경제성

농가실증실험에 의해 진행된 파리유충 추출물 15%를 섭취한 돼지에서 경제성 평가결과는 Table 11에 나타났다. 대조구와 비교할 때 파리유충 추출물 15%를 함유하는 프리믹스 0.1% 첨가구에서 두당 수익은 2,052원 높았고 사료요구율은 0.08 개선효과를 나타냈으며

3,960원 사료비 절감효과를 기대할 수 있었다.

이상의 결과에서 돼지사료 내 파리유충 추출물의 적정 첨가수준은 “15% 추출물 함유 프리믹스를 배합사료 내 0.1%” 가 최적일 것으로 나타났다.

Table 9. Concentrations of short chain fatty acids (SCFA) in feces of swine fed the experimental diets for 30 days (Ex p. 1)
(Unit: μ mol/g of cecal content)

Fatty acids	Treatments ¹⁾					PSE ²⁾	p-value
	T1	T2	T3	T4	T5		
Acetic acid	36.23 ^e	98.40 ^d	105.37 ^c	130.85 ^b	137.16 ^a	9.5334	0.0001
Propionic acid	11.89 ^d	29.18 ^c	30.18 ^c	52.57 ^b	62.89 ^a	4.7705	0.0001
Butyric acid	20.11 ^a	17.74 ^b	17.87 ^b	8.71 ^c	8.80 ^c	1.3208	0.0001
Isobutyric acid	11.55 ^a	8.10 ^b	7.12 ^c	5.36 ^d	4.18 ^e	0.6667	0.0001
Valeric acid	7.26 ^a	4.61 ^b	3.91 ^c	1.52 ^d	1.02 ^e	0.5986	0.0001
Isovaleric acid	4.02 ^a	3.56 ^b	3.17 ^c	2.15 ^d	2.19 ^d	0.1984	0.0001
Total SCFA	91.06 ^e	161.59 ^d	167.62 ^c	201.16 ^b	216.24 ^a	11.5811	0.0001

¹⁾ T1: control, T2: 8ppm of avilamycin, T3: MEP 10% (premix containing 10% of maggot extracts) : T4: MEP 15% (premix containing 15% of maggot extracts), T5: MEP 20 (premix containing 20% of maggot extracts). ²⁾ Pooled standard error of mean values.

^{a,b,c,d,e} Mean values with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

Table 10. Fatty acid composition and cholesterol contents of pork belly and loin from swine fed the experimental diets by field test for 60 days (Unit : % of total fatty acid)

Cholesterol Fatty acid	Control		MEP 15%		PSE ⁵⁾	p-value
	belly	loin	belly	loin		
Cholesterol, mg/100g pork	116.5 ^a	70.49 ^c	95.71 ^b	55.78 ^d	7.0152	0.0001
8:0	-	-	-	-	-	-
12:0	0.38 ^a	0.25 ^b	0.12 ^c	0.40 ^a	0.0360	0.0001
14:0	1.87 ^a	1.02 ^c	1.69 ^b	0.33 ^d	0.1808	0.0001
16:0	23.44 ^d	25.76 ^b	24.92 ^c	27.65 ^a	0.4709	0.0001
16:1n-9	2.09 ^b	1.98 ^b	2.32 ^a	2.48 ^a	0.0853	0.010
18:0	15.75 ^a	16.08 ^a	14.69 ^b	10.86 ^c	0.6310	0.0001
18:1n-9	40.68 ^c	39.63 ^d	43.45 ^b	45.16 ^a	0.6615	0.0001
18:2n-6	15.18 ^a	14.79 ^b	11.40 ^d	11.82 ^c	0.5177	0.0001
20:0	0.51 ^a	0.32 ^b	0.54 ^a	0.36 ^b	0.0334	0.003
18:3n-3	0.10 ^c	0.17 ^c	0.86 ^b	0.95 ^a	0.1189	0.0001
22:0	-	-	-	-	-	-
22:1	-	-	-	-	-	-
24:0	-	-	-	-	-	-
SFA ²⁾	41.95 ^b	43.43 ^a	42.23 ^b	39.59 ^c	0.4146	0.0001
UFA ³⁾	58.05 ^b	56.57 ^c	57.77 ^b	60.41 ^a	0.4366	0.0001
n-6:n-3	151.8 ^a	87 ^b	13.25 ^c	12.44 ^d	17.5248	0.0001

¹⁾ MEP 15% : premix containing 15% of maggot extracts.

²⁾ SFA: saturated fatty acid. ³⁾ UFA: unsaturated fatty acid. ⁴⁾ Not detected.

⁵⁾ Pooled standard error of mean values.

^{a,b,c,d} Mean values with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

Table 11. Economic analysis from swine fed the experimental diets by field test for 60 days

Item	Treatments ¹⁾		p-value
	Control	MEP 15%	
Body weight gain, g/head/day	774±1.20 ^{2)b}	901±2.18 ^a	0.0001
Feed intake, kg/head/day	2.50±0.33	2.37±0.003	0.591
Feed conversion ratio	0.30±0.003 ^b	0.38±0.003 ^a	0.0001
Crude income (Won)	59,348	61,400	-

¹⁾ MEP 15% : premix containing 15% of maggot extracts.

²⁾ Mean values±standard error.

^{a,b} Mean values with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$.

제 2 절 파리유충 대량 사육생산 및 추출시스템 개발 (협동과제 1)

1. 파리 유충을 생산하기위한 원료 실험 (실험 I)

가. 서론

파리는 일반적으로 동물의 사체, 분변 또는 음식물등에 산란을 하며, 알에서 부화된 어린 유충은 산란된 장소에 놓여진 물질을 먹이로 섭취하여 성장한다. 이와 같이 파리 유충은 다양한 종류의 물질을 먹이로 섭취할 수 있으며, 그 성장속도 및 번식속도가 빠르고 지구 순환계에서 유기 폐기물의 1차 분해자로써의 역할을 감당하고 있다. 이와 같이 파리 유충이 유기 폐기물을 섭취하여 분해한 후에 배설한 분변물 및 섭취과정에서 파리 유충이 분비한 소화액에 의해 분해된 물질을 2차 분해자인 미생물이 섭취 분해함으로써 더욱 작은 단위의 물질로 분해되며, 또한 식물은 미생물에 의해 분해된 작은 물질을 영양분으로 흡수하여 다시 탄수화물과 같은 복합 물질을 만들어 내며, 초식 동물이 식물을 다시 먹이로 섭취함으로써 자연계의 순환이 이루어져 있으며, 파리 유충이 1차분해자로써의 역할이 없다면, 유기 폐기물의 분해 속도가 늦어져 지구는 각종 부패 물질로 가득차게 된다. 이와 같은 파리 유충의 뛰어난 유기물 분해 능력을 이용하여 국내외적으로 축산 분뇨 및 음식물 쓰레기의 분해에 대한 연구를 지속하여 왔으며, 이에 관련된 많은 시스템들이 특허로 출원되어 있다. (예 : 집파리 유충을 이용한 계분의 퇴비화 연구. 2004, 농업과학기술원 황석조외). 이러한 대부분의 시스템들은 파리 성충의 사육 방법과 파리 유충의 유기 폐기물 처리 방법에 대해 초점이 맞추어져 있으며, 몇몇 회사에서 유기 폐기물에서 생산된 파리 유충을 이용하여 가축의 사료로 사용하는 특허를 출원하기도 하였다. (예, (주)정빈바이오, (주)바이오로직, (주)SBD 등등) 그러나 파리 유충을 가축의 사료로 사용함에 있어 몇가지 중요한 조건들을 간과한 채로, 단지 파리 유충의 사료화에만 초점을 맞추고 있다. 사료로서의 조건은 성분의 균일화와 항상성이 보장되어야, 영양학적으로 일관성있는 사료를 가축에게 공급할 수 있음에도 불구하고, 파리 유충이 섭취하는 유기 폐기물의 종류에 따라 파리 유충의 성분이 변함으로 인해, 일관성 있는 영양을 공급할수 없어, 사료를 배합함에 있어, 파리 유충이 생산되는 로트마다 성분분석을 하여야 하므로 시간적으로나 경제적으로 많은 시간과 비용을 소모하게 된다. 이와 같은 현상은 음식물 쓰레기를 이용한 사료를 제조할 때도 같은 문제가 야기된다. 특히 음식물 쓰레기는 수거하는 장소뿐만 아니라 채소와 같은 식물성 폐기물이 다량 유입되는 경우, 파리 유충의 성분에 불균형을 가져올 수도 있어 그 편차가 더욱 커지게 된다.

또한 파리 유충에게 유기 폐기물을 투입하는 경우, 수거 및 이송 중에 다양한 미생물들이 대량으로 유입되거나 증식되게 되는데, 그 중에서도 E. Coli와 같은 혐기성 병원 미생물이 급격하게 증가하게 되며, 그 중에서 독성 물질을 생산하는 Clostridium Botulinum 또는 이와 유사하게 독성물질을 생성하는 미생물이 존재한다면, 파리 유충을 살균한다 할지라도, 독성물질이 존재하게 되어, 파리 유충을 사료로 급여하는 가축에게 피해를 주게 된다. 축산분뇨나 음식물 쓰레기와 같은 유기 폐기물을 파리 유충에게 급여하는 경우에는 수거 및 이송 중에 이와 같이 유해 미생물의 발생과 증식이 필연적이며, 혹 이와 같은 문제를 해결하기 위해 냉동 탑차와 같은 시설이 사용된다면 경제성에서 문제를 일으키게 된다.

이러한 문제를 해결하기 위해서는 유기성 폐기물을 파리 유충 사육의 원료로 사용하는 것이

아니라, 안정된 사료로 사용하고 있는 곡물 및 기타 원료를 대상으로 파리 유충을 사육하기 위한 조건을 도출하며 또한 비교적 염가인 방법의 대량생산 방법을 구상하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 실험동물

파리 유충의 대량 사육을 위한 파리 유충의 선정 조건은, 성충 사육의 편의성 및 마리당 성충의 충란 부화 능력과 유충의 성장 속도 등을 고려해서 선택하게 된다. 일반적으로 선택할 수 있는 파리는 집파리과에 속하는 집파리(*Musca domestica*)와 검정파리과에 속하는 구리금파리(*Phaenicia sericata*)가 있으며, 본 과제에서는 그동안 경험에 의해, 성충 사육에 있어 편리하며, 또한 식물성 원료를 선호하는 집파리를 선택하여 실험하였다.

집파리 유충은 잡식성으로써, 육식성인 금파리 유충과 다르게, 식물성 사료에서도 잘 자라며 일반적으로 개체당 무게가 20mg을 넘으며, 사육조건이 좋으면 개체당 30mg까지도 성장하기도 하다. 집파리 유충이 대량 생산에 적합한 이유는, 성충 사육의 용이성 뿐만 아니라, 동물성 단백질의 공급이 없어도 정상적인 성장을 보이기 때문이다.

본 실험은 처리구당 집파리 충란 100,000개(0.07mg/개)를 기준으로 투입하여 10차 반복하여 실험하였으며, 각각 처리구의 배치는 임의로 배치하였다.

(2) 실험 설계

기존의 방법의 유충 사육방법은 유충 사료위에 직접 충란을 살포하여 사육하는 방법을 사용하였으나, 충란이 습도가 높은 사료에 접하거나 혹은 작은 물방울이라도 물속에 잠기면, 용화율이 현저히 떨어지게 되어, 본 실험에서는 다음과 같이 실험하였다.

(가) 충란을 공급하는 파리 성충은 별도의 사육장에서 사육하여 충란을 채집하고 계량하여 실험에 공급하였으며 사육예로 Fig.1과 같다.

(나) 먼저 충란을 수분 60% 함유된 사료 위에 살포하여, 수분에 잠기지 않는 상태로 용화시킨다.

(다) 용화 후에는 수분이 60%~70%의 상태인 사료를 얇게 깔은 상태에서 용화된 유충을 1일간 사육한다.

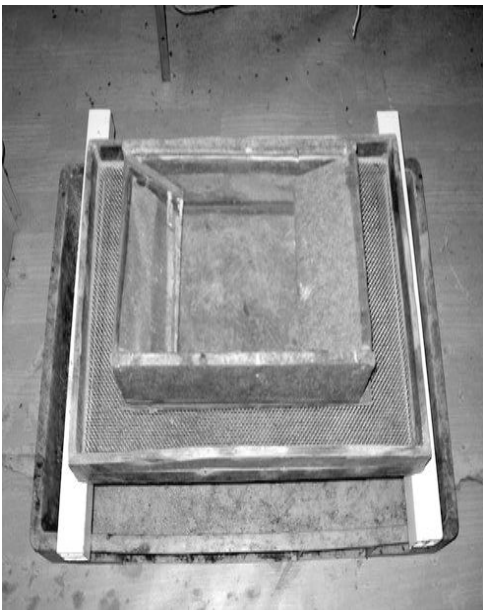
(라) 주 사육상자에 계량된 사료를 각각 5.5kg씩 처리구당 2통 씩 투입하고 수분 상태를 60~85%를 유지하며 사육 온도는 26도 이상을 유지하도록 하고 최대 35도를 넘지 않도록 유지한다.

(마) 주사육상자는 시중에 판매되고 있는 내쇼날 프라스틱 사의 플라스틱 상자를 선택하였고 상자의 내용적은 720mm*440mm*165mm이다. 사육상자 위에 철망을 설치하여 탈출하는 유충을 별도로 수거하도록 하였으며, 철망위에 유충을 사육할 상자를 나무로 제작하여 유충사육실험을 하였다.

(바) 실험은 각각의 처리구에 대해 10회 실험하여 평균치를 구하였다.



<Fig.1 파리 성충 사육장치 및 사육장면>



<Fig.2 유충 사육실험장치 >



<Fig.3 유충 사육실험 >

(3) 실험사료

파리 유충의 구강 구조는 단단한 음식물을 이로 부수어 섭취하는 형태가 아니라, 소화액을 분비하여 딱딱한 물질을 분해한 유동물질을 흡입하는 구조로 되어 있다.

그러므로, 투입되는 사료를 물에 찌거나 삶아 연화하여줄 필요가 있다.

방법으로는 불위에 올려 놓을 수 있는 통에 물과 중량대비 1:3 비율로 투입하여 최소 30분에서 최대 1시간 삶은 후 밀기울을 섞어 원료: 밀기울: 물이 1:0.5:2 의 비율로 맞추어 수분 상태가 65~80%가 되도록 한 후 혼합기에서 잘 혼합하였다.

(4) 사양관리

본 실험을 하기 위해 샌드위치 판넬로 사육실을 구성하였으며, 샌드위치 판넬의 두께는 75mm로 하였다. 환경 조건은 온도가 26도~32도를 유지하도록 하며 최대 35도가 넘지 않

도록 자동제어장치로 관리하였으며, 습도가 80%가 넘지 않도록 관리하였다.
또한 사육과정에서 암모니아가 발생하므로 신기(fresh air)를 분당 2cmm 수준으로 공급하였다.

(5) 조사항목

- (가) 투입된 사료의 총 중량과 사육 후 중량을 측정 유충의 사료 처리 능력을 측정하였다.
- (나) 사육된 유충의 총 중량을 측정하였다.
- (다) 사육된 유충의 처리구당 각각 10마리씩 임의로 선택하여 각각의 길이와 중량을 측정하여 합을 구한 후 다시 10으로 나누어 평균 길이 및 평균 중량을 측정하였다.
- (라) 사료대비 유충의 생산량을 측정하여 사료섭취량을 측정하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 사양 성적 (Growth performance)

각각의 원료에 대해 유충의 성장은 표1에 나타난 것처럼 중량에 있어서 대두박에서 유의적 차이를 보이고 있으며, 기타 다른 원료들에 대해서는 큰 차이를 보이지 않고 있다. 그러나 유충의 전체 중량을 비교해 보면 오히려 대두박과 대두에서 다른 원료와 유의적 차이를 보이고 있다. 이것은 대두박에서의 유충 생존율이 높은 것으로 판단할 수 있으며, 전체 중량에서 대두와 유의적 차이를 보이지 않아 가격이 저렴한 대두박이 유충을 경제적으로 생산하기에 적합한 원료라고 할 수 있다.

표1. 원료에 따른 파리 유충의 성장 및 생산 수율

	대두박	대두	옥수수박	옥수수	밀	현미	비고
주원료중량(g)	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	*주1
사육후중량(g)	4,100	4,540	5,120	5,520	5,610	5,420	*주2
길이(mm)	9.2	10.4	10.4	9.9	9.9	9.3	*주3
중량(mg)	18.1	24.4	24.4	22.8	22.8	20.9	*주3
유충생산량(g)	1,290	1,326	1,050	1,106	1,076	1,094	
잔존물량(g)	2,810	3,210	4,070	4,420	4,530	4,330	

*주1. 원료 투입량 2kg/처리구 + 부원료 밀기울 1kg/처리구

*주2. 주원료와 부원료 및 투입수의 총중량

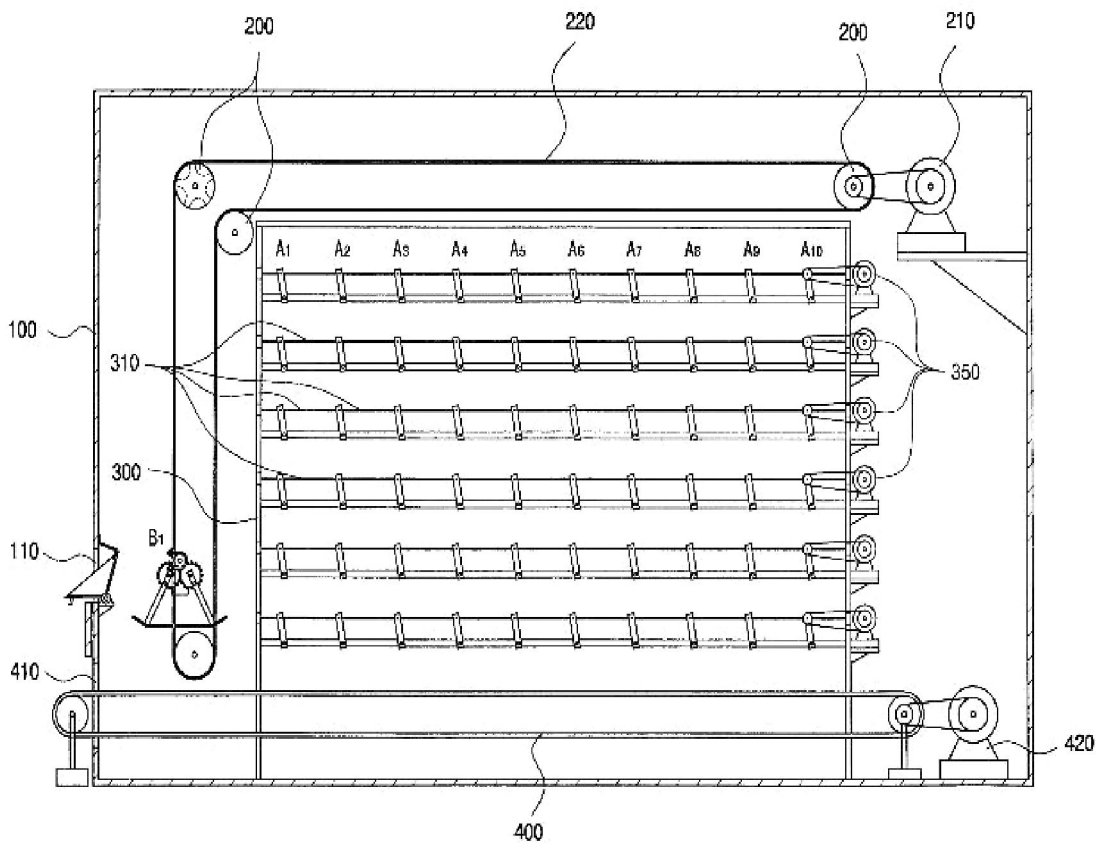
*주3. 10마리당 평균값

2. 유충 대량생산 시스템 설계 (실험 II)

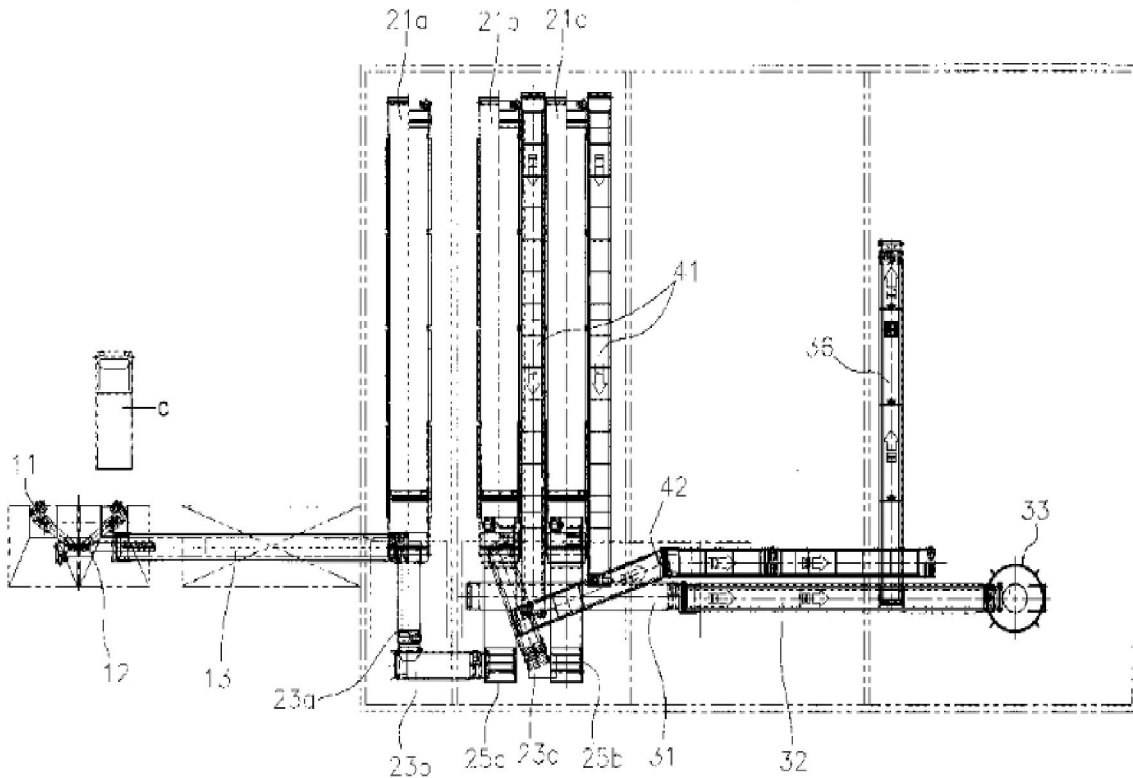
가. 서론

파리 유충을 생산하기 위한 시스템으로 특허 출원되어 있는 상황을 보면 대부분 그림 5와 같이 다단계 벨트를 이용한 생산 시스템으로 구성되어 있다. 그러나 벨트 시스템은 벨트의 길이가 수십m가 되기 때문에 벨트의 탈선등 운영에 있어서 문제가 많이 야기되어 왔고, 또한 단일 대형 구조로 되어 있어, 프레임이 거대하고 복잡하게 구성될 수 밖에 없다. 이는 설비비용의 증가 및 유지 보수비용 및 유지 보수로 인한 가동 중지 시간이 증대되어 운영비용의 증가로 유충 생산 단가를 상승하게 하여 경쟁력을 잃게 한다.

이와 같은 문제를 해결하기 위해, 가능한 고정비용인 시스템 비용을 최소화하고, 그 구조를 단순화할 필요가 있어 단순하면서 고장이 없는 시스템을 설계하였다.



<그림 4. 다단식 처리 시스템의 예1>



<그림 5. 다단계 벨트식 파리유충 사육장치의 예>

나. 재료 및 방법

(1) 개념 설계

파리 유충은 성장하면서 다량의 수분과 암모니아를 배출하기 때문에 구조가 복잡한 시스템에서는 유지 보수에 많은 어려움이 발생하였다. 이는 유지 보수로 말미암아 시스템 가동시간이 줄어들을 의미하여 상대적으로 유충의 생산단가가 상승하는 요인으로 발생하였다. 이를 방지하기 위해서는, 시스템 구조가 간단하여야 하며, 유충의 사육실 내에서, 장비를 유지 보수하는 일이 없도록 설계하여야 했다. 그러므로 유충 사육 설비가 유충 사육하는 동안에는 사육실 내에 존재하다가, 사육이 끝나면 사육실에서 분리해 내는 구조가 유지 보수시간을 최소화하며, 사육실의 가동 중지시간을 줄이는 방법으로, 이를 기준으로 하여 랙앤드로우시스템(Rack & Draw System)으로 설계 하였다.

유충을 사육하는 통은 벨트를 대신하며, 이는 유충이 사료를 다 섭취하지 않고 탈출하는 것을 방지하여 사료 효율을 높이는 효과를 기대할 수 있었다. 이와 같은 시스템은 사육실 사육 밀도를 최대화 할 수 있는 장점이 있어, 좁은 공간에서 많은 유충을 사육할 수 있게 한다. 이

렇게 좁은 공간에 많은 유충을 밀식 사육하게 되면, 사육시 발생하는 다량의 수분과 암모니아로 말미암아, 사육환경이 나빠질 수 있으며, 이를 위해서는 다량의 신기(fresh air)를 공급하는 설비를 가져야 한다. 또한 변온 동물일 파리 유충이 성장하기 좋은 환경 조건인 섭씨 26-32도의 온도 및 상대습도를 맞추기 위해 항온 항습장치를 설치하여야 하나, 항온항습 장치는 대습가격이 고가인 관계로 대형화 항온항습 장치의 경우 상대습도 및 온도 32도를 감당할 수 없도의정도로 크므로 이를 대체할 개념의 항온항습 장치를 설계하였다.

(2) 상세 실험 설계

(가) 유충 사육 장치

유충은 개체수가 많거나 조건이 맞지 않는 경우 탈출하여 다른 곳으로 이동하려는 습성이 있어, 일반적인 벨트와 같이 평면적인 구조에서는 유충의 성장이 더딜 뿐 아니라, 다량의 유충이 탈출하게 되므로 사료 섭취율이 떨어지게 된다. 그러므로 유충이 탈출하지 못하게 박스형태의 구조가 유충 사육에 적합하다. 이와 같은 구조로 경제성 있는 통을 선택한 결과 그림 6과 같은 형상의 시중 기성품인 내쇼날 플라스틱의 플라스틱상자 중에서 NTC111을 선택하였다.



· No.	22
· 제품명	NTC 111
· 내용량	49ℓ
· 외부	760×480×175 mm
· 내부	720×440×165 mm

<그림 6. 사육상자로 사용되는 플라스틱상자>

사육상자를 적재하는 구조는 사육 상자 내에서 발생하는 수분과 가스를 신속히 배출할 수 있는 구조와 간격을 유지하여야 하며, 다단으로 설치할 수 있는 구조로 튼튼하게 설계되어야 한다. 이를 위해서 I형 앵글 및 사각 파이프를 사용하여 설계하였으며, 표면은 분체 도장하여 피막이 벗겨지지 않도록 하여 부식을 방지하였다.

적재대의 구조는 3열 7단으로 구성되어 있고, 사육실 조건에 따라 2단 또는 3단으로 적재할 수 있도록 그림 7과 같이 설계하였다.



<그림 7. 사육상자 적재대 및 상자 적재 모습>

(나) 유충 분리 장치

유충이 성장한 후에 잔물과 분리하기 위해 다양한 시험들 시도했으나, 구더기의 특성상 완전한 분리를 유도하는 것이 불가능했다. 분리를 위해 시도한 방법은 다음과 같았다.

① 수작업에 의한 분리

주적으로 유충을 긁어 분리하는 방법을 사용하였다. 약 90%정도의 분리율을 나타냈으며, 다음과 같은 장단점을 표출하였다.

- ㉠ 일정한 시간 내에 처리하기 위해서는 많은 인력과 장소를 필요로 한다.
- ㉡ 단위 생산비가 가장 비싸다.
- ㉢ 설비 투자비가 가장 적다

② 자연 낙하에 의한 방법

유충이 밑으로 내려가는 특성을 이용하여 철망위에 유충과 잔존물의 혼합물을 올려놓고, 유충의 자력으로 철망 밑으로 분리되도록 한다. 문제점은 다음과 같다.

- ㉠ 유충의 움직임에 따라 시간이 결정되나 대체적으로 많은 시간을 필요로 한다.
- ㉡ 처리 시간이 길므로 일정한 시간 내에 처리하려면 많은 장소가 필요로 한다.
- ㉢ 계절에 따라 처리 능력의 변화가 크다.
- ㉣ 약 70%정도 분리가 되며, 2차적인 분리가 필요하다.
- ㉤ 비용이 저렴한 편이다.

③ 기존 회전 분리기 방법

기존의 회전 분리기는 원형 철망이 1단으로 구성되어 있어 단순 분리에 적합한 구조이며, 유충을 분리하기에는 무리가 있었다. 장단점은 다음과 같다.

- ㉠ 설비비가 비싸다.
- ㉡ 단위 시간당 처리 능력이 크다.
- ㉢ 기계당 1가지 철망 눈금을 가지고 있기 때문에, 다양한 크기가 섞여 있는 유충을 분리하기 위해서는 여러대의 기계가 필요하다.

④ 개량 회전 분리기

1단 철망으로 되어있는 기존 회전분리기 내에 다른 크기의 눈을 가진 철망을 설치하여 2단 철망으로 개조하였다. 이를 통해서 한번 투입하여 3단계로 분리할 수 있었다. 이는 기존의 방법보다 다음과 같은 장점을 가지고 있음을 확인하였다.

- ㉠ 단위시간당 처리능력이 가장 크다.
- ㉡ 많은 공간을 필요치 않는다.

그러나 이 방법으로도 유충을 95% 이상 분리하는 것은 쉽지 않았으며, 잔존물의 수분 함량에 따라 처리가 어려운 경우도 발생하였다. 그러므로 이를 해결하기 위해서는, 수작업을 병행하여 처리하도록 하여야 기준치 이상을 분리할 수 있었다.

제작 예는 그림 8 에 도시하였다.



<그림 8. 2단 철망 회전분리기 제작 >

(다) 향온 향습 장치

유충 사육에 적절한 환경 조건은 온도 26도-32도를 유지하며 최대 온도가 35도를 넘지 않아야 하며, 습도는 유충이 성장하면서 다량의 수분을 계속적으로 증발시키기 때문에 습도가 90%이상으로 상승하게 되며, 수분 증발량이 과다하므로 제습장치를 사용하는 것보다 신기(fresh air)를 적절히 공급하여 고습의 내부공기를 상대적으로 저습인 신기(fresh air)로 교체 환기함으로 내부 습도를 80% 내외로 유지하는 것이 유충 사육에 있어서 가장 좋은 결과를 도출하였다. 이때 온도의 변화를 줄이기 위해 열교환기를 사용하여 열을 회수함으로 내부 온도를 유지하도록 설계하였다.

또한 열교환기를 통해서 외부 신기(fresh air)를 공급할 때 동시에 유충 성장시 발생하는 암모니아를 희석시키는 역할을 겸하게 설계하였다.

이에 사용되는 열교환기는 암모니아와 같은 부식성 가스를 다량 포함하고 있기 때문에, 부식에 강한 스테인레스 스틸 또는 기타 내식성 재질로 제작하여야 하며, 사육실의 크기 및 환기량에 따라 열교환기의 용량을 결정하였다.

(라) 추출 시스템

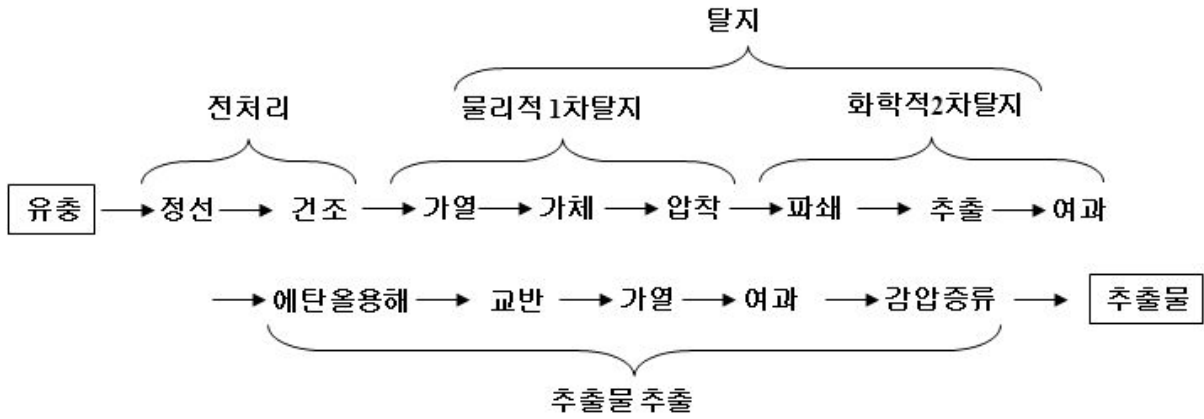
Lab 스케일의 추출에서는 감압 증류시스템으로 추출물을 얻는 것이 적절하다고 할 수 있으나, 대형 시스템에서는 감압 증류 시스템을 대형화하는데 소요되는 비용이 크고 또한 추출 시간이 오래 걸리므로 상용 시스템에서 사용하기는 문제가 있어, 현재 상용화되어 있는 설비 중에서 추출물을 얻기에 적절한 방법으로 스프레이 건조 방식을 채택하였다.

스프레이 건조 방식은 언고자하는 물질이 포함된 용액을 분사하여 입자로 만든 후 고온으로 용매를 증발시켜 물질을 추출하는 방법으로 다량의 물질을 빠른 시간에 추출할 수 있는 기술로 본 과제의 추출 공정에 적용하였다.

3. 유충 추출물의 대량생산 시스템개발 (실험 III)

가. 추출물 생산 공정분석

유충 추출물을 획득하기 위하여 연구실 수준에서 시행한 프로세스를 기반으로 대량생산에 적용할 프로세스를 표1과 같이 정하였다.



< 표1. 유충 추출물 추출 공정도 >

(1) 전처리

전처리는 불순물 혼입을 방지하고 추출을 돕기 위한 공정으로 정선과 건조 과정을 거친다.

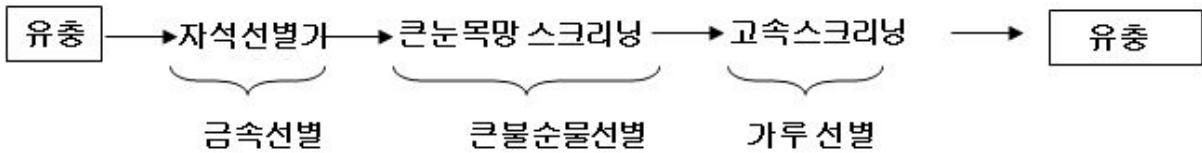
(가) 정선

정선 과정은 원료에 혼입되어 있는 불순물을 제거하는 과정으로서, 유충의 크기가 작고 유충이 정선과정까지는 살아서 움직이기 때문에 움직임을 고려한 정선 과정을 설정하여야 한다. 정선 과정은 크게 3가지로 구분되며, 금속제거와 큰불순물제거 및 가루를 제거하는 공정으로 이루어진다.

- 자석선별기 : 금속 조각 제거
- 큰눈목망 스크린: 큰 불순물 제거
- 고속 스크린 : 가루 및 작은 불순물 제거

정선 프로세스는 표2와 같다.

대량 생산에서는 이물질의 혼입이 자주 발생하므로 세밀한 정선 프로세스를 구성하여야 한다.



< 표2. 정선 프로세스 >

(나) 건조

건조는 살아있는 유충의 움직임이 없애고 추출에 적절한 수분 함량을 유지하기 위한 공정으로 일반적인 열풍건조기를 사용하였다. 이에 사용된 건조기의 제원은 그림1과 표3과 같다. 건조의 또다른 잇점으로는 가열에 의한 세포막 파괴와 단백질응고로 세포막이 쉽게 파괴되어 지방의 추출이 쉽도록 유도하는데 있다.

건조 시간은 80도에서 약 4시간 건조하여 함유율이 10%미만을 유지하게 했다.



< 그림1. 열풍건조기 >

항 목		사 양			
모델명		ROSP-10HB	ROSP-15HB	ROSP-20HB	ROSP-20B
본 체 치 수	전장(mm)	2,754	3,679	4,604	4,604
	전폭(mm)	1,942	1,942	1,942	1,942
	높이(mm)	2,158	2,158	2,158	2,158
표준성능 수용량(kg/배)		2,500	3,600	5,000	5,000
정격전압(V)		단상 220	단상 220	단상 220	단상 220
컨트롤 박스		미니콤	미니콤	미니콤	미니콤
송 풍 기	형식	속류형	속류형	속류형	속류형
	정격출력 (kw)	1.35	1.35	1.35	1.35
버 너	형식	견타입	견타입	견타입	견타입
		자동 석유버너	자동 석유버너	자동 석유버너	자동 석유버너
최대연료 소비량 (x/hr)		5.2	5.2	5.2	5.2
상자수량		7단 42개	7단 70개	7단 84개	상자없음
습도조절기		수동	수동	수동	수동
유형 (r)		400	400	400	400

※ 제품사양은 품질향상을 위해 예고없이 변경될 수도 있습니다.

< 표3. 열풍건조기 제원 >

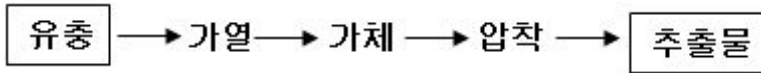
(2) 탈지 공정

탈지공정은 크게 물리적 탈지프로세스와 화학적 탈지프로세스로 나뉘어지며, 본 공정에서는 1차로 물리적 탈지프로세스를 사용했으며, 2차로 화학적 탈지프로세스를 사용하여 유충내의 지질을 제거하였다.

(가) 물리적 1차 탈지

물리적 탈지에는 일반적으로 나사압착기(Screw Press)와 유압식압착기(Hydraulic Press) 및 Expeller가 있으며, 소형에서는 나사식 압착기 및 유압식압착기를 주로 사용하

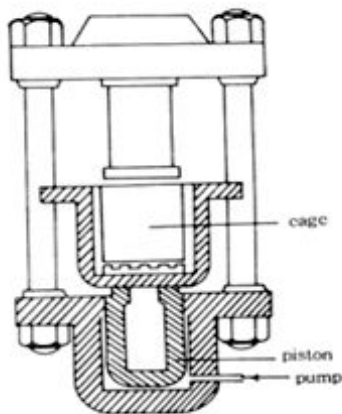
며, 대형에서는 연속생산이 가능한 Expeller를 사용한다. 물리적 탈지 프로세스는 다음 표4와 같으며, 일반적으로 압착기 내에서 3가지 공정이 동시에 진행되므로 한가지 공정으로 간주할 수 있다.



< 표4. 물리적 탈지 공정도 >

본 연구에서는 유압식 압착기를 사용하여 실험하였으며, 대량생산에는 Expeller를 사용할 것을 추천한다. 본 연구에 사용된 유압식압착기의 구조 및 사양은 그림2 와 그림 3 및 표5에 도시되어 있으며 사용압력은 150kg/cm2 전후로 사용하였으며 가열온도는 80도를 유지하였다.

가체는 탈지가 원활이 이루어지도록 압착기 성형틀에 맞도록 성형하는 것을 말하며 Expeller에서는 연속식으로 유충이 투입되므로 이 공정이 생략되어질 수 있다.



< 그림2. 유압식압착기구조 >



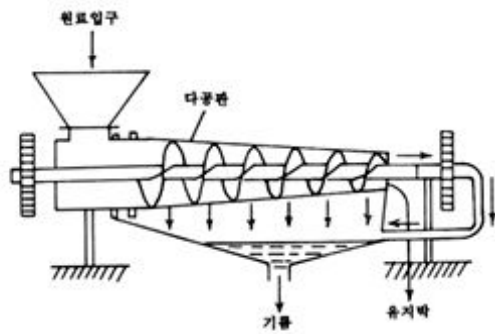
< 그림3. 유압식압착기 예 >

○ 제품 상세 사양

가로	세로	높이	중량	소비전력	정격전압	1회착유량	1시간착유량	수유율
65cm	80cm	137cm	815kg	2.0kw	380v/220v(60Hz)	7kg	28kg(hr)	50%

< 표5. 유압식압착기 제원 >

참고로 대량 생산에 사용될 Expeller의 기본 구조는 그림_과 같으며, 일일 50kg(10시간 기준)을 처리할 수 있는 소형 Expeller에 대한 예는 그림4와 그림5와 같다.



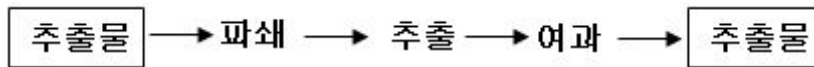
< 그림4. Expeller의 원리와 구조 >



< 그림5. Expeller 예 >

(나) 화학적 탈지프로세스

화학적 탈지를 위한 공정은 표6과 같이 구성하였다.



< 표6. 화학적 탈지 공정도 >

화학적 탈지를 위해서는 지방 및 지질을 용해시키는 용매의 선택이 중요하다. 용매는 다음과 같은 조건을 충족시켜야 한다.

- ① 지방 및 지질은 잘 추출하지만 이외의 물질은 추출하지 말아야 한다.
- ② 인화성 및 폭발성등의 위험성이 적을 것
- ③ 기화열 및 비열이 적어 에너지 손실이 적을 뿐 아니라 재활용을 위한 회수가 쉬운 것.
- ④ 대량으로 취급하기 용이할 것
- ⑤ 저가의 제품일 것

이와 같은 조건을 만족시키며 산업용을 많이 쓰는 용매는 벤젠화합물과 n-hexane이 있으며 본 연구에선 n-hexane을 선택하였다.

각 공정의 프로세스는 아래와 같이 진행하였다.

(가) 파쇄

압착기에서 나온 유지가 분리된 유층은 고압에 의해 단단한 덩어리로 배출되며, 내부에 유지가 잔량 남아있기 때문에, 화학적 탈지를 진행하여야 한다. 용매가 유층의 세포에 쉽게 접촉

하여 유지 잔량을 탈지하기 위해서는 덩어리 된 유층을 잘게 분쇄하여 용매와 접촉이 용이하게 할 필요가 있다. 이를 위해서 분쇄기를 사용하여 압착기에서 배출된 유층 덩어리를 분쇄한다.

과쇄를 위한 분쇄기는 분쇄속도가 빠른 핀밀을 사용하였다. 그림6에 핀밀의 상용설비의 예를 도시하였다.



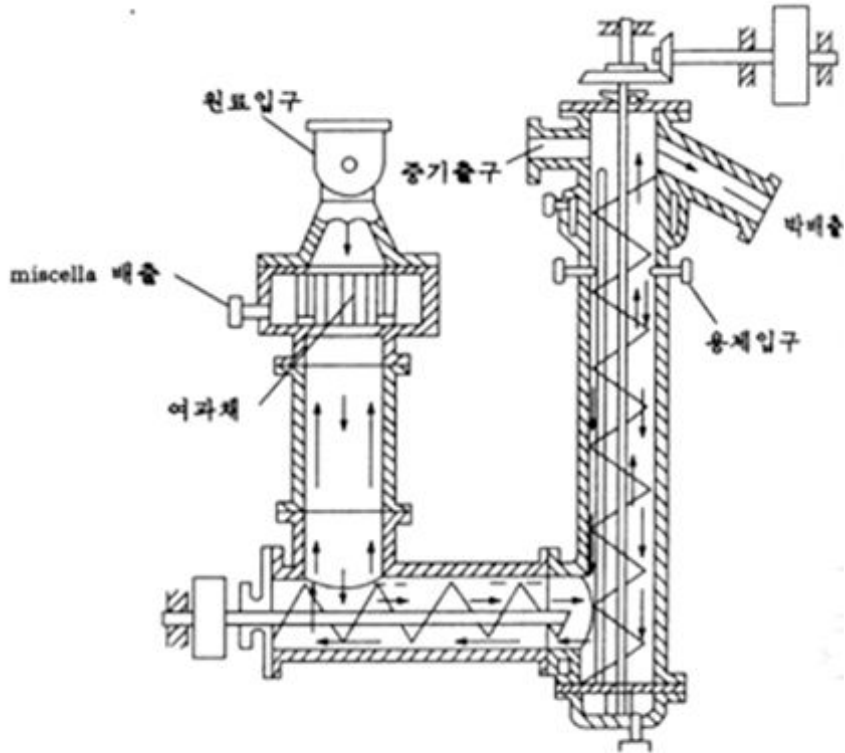
< 그림6. 핀밀 >

핀밀의 입자크기는 핀밀 내부에 있는 메쉬 스크린에 의해 결정되며, 본 실험에서는 10메쉬 선경 0.9mm 스테인레스스틸 메쉬 스크린을 사용하여 입자를 선별하였다.

(나) 추출

추출은 용매 n-hexane을 유층 분말과 중량 대비 1:1.5로 혼합한 후에 2시간동안 교반하여 유지 잔량을 용매에 충분히 용해시켰다. 대량 생산에서의 용매량과 교반 시간은 추출후 추출물에 유지 잔량이 1% 미만이 되도록 결정하도록 한다.

대량 시스템에서는 연속식 추출법을 사용하는데, 대표적인 방식으로 Hilderbrandt식 추출 방식이 있으며 구조와 원리는 그림7에 도시하였다.

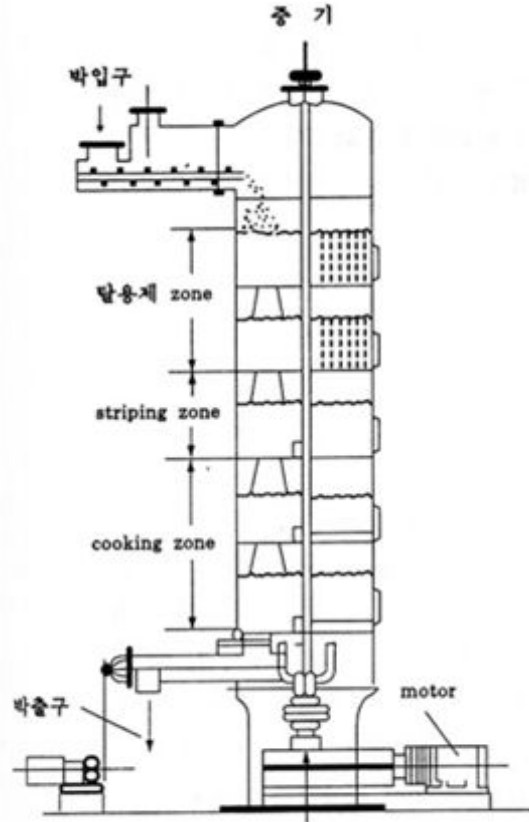


< 그림 7. Hilderbrandt 추출기 >

(다) 여과

충분히 교반된 유충분말과 용매를 와트만 No 4 여과지로 용매 및 유지를 제거한 후 잔존물을 회수하여 상온에서 30분간 건조 시킨다. 건조된 잔존물의 유지 잔량을 측정하여 1%미만이 되도록 유지한다.

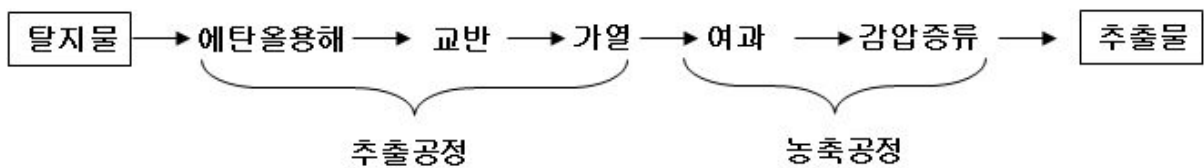
대형 시스템에서는 여과지를 사용하지 않고 대형 설비로 잔존물과 유지 및 용매를 분리하는데 그 구조는 그림8과 같다.



< 그림 8. 추출기 >

나. 추출물 추출 공정

기계적 탈지 공정과 화학적 탈지 공정을 거쳐 유지를 제거한 잔존물로부터 필요한 추출물을 얻기 위하여 다음과 같은 공정을 수행하였다.



< 표 7. 유층 추출물 추출 공정도 >

(1) 추출 목표

대량 생산에 있어서 경제성을 갖추기 위해서는 최종 산물의 생산량을 증가시켜야 하는데, 본 시스템에서는 유층의 생산량 증대와 더불어 추출물의 추출효율을 증대시켜야 한다. 일차년도 연구 결과 추출물 생산수율이 3%를 확보하였고, 2차년도에는 5%의 수율을 목표로 하였다.

수율을 결정짓는 공정은 에탄올 추출 공정이며 농축공정은 액상의 추출물을 고상의 물질로 변

화시키는 공정이므로 수율의 변화에 영향을 주지 않았다.

(2) 추출 공정

실험실에서 시행한 추출 프로세스는 감압 증류 장치를 이용하여 추출하였다. 사용한 용매는 99% 에탄올을 사용하였고, 유충잔존물과 중량대비 1:2의 비율로 혼합하였다. 추출 방법은 감압 증류 장치에 설치된 플라스크에 혼합된 피추출물을 투입하고 회전 교반하면서 70도로 30분간 가열하였다. 이때 발생하는 에탄올 증기는 감압증류 장치 내에 설치되어 있는 콘덴서에 섭씨 15도의 냉각수를 투입하여 응축한 후에 플라스크에 재투입하였다. 추출하는 과정에 감압 장치는 가동하지 않았으므로 상압에서 추출을 시도하였다. 그림9는 실험실에서 추출에 사용한 감압증류 장치의 사진이며, 대량 생산에 사용할 수 있는 추출 장치에 대한 예시로 그림10을 첨부하였다.



< 그림9. 감압증류장치 >



< 그림10. Pilot 감압증류장치 >

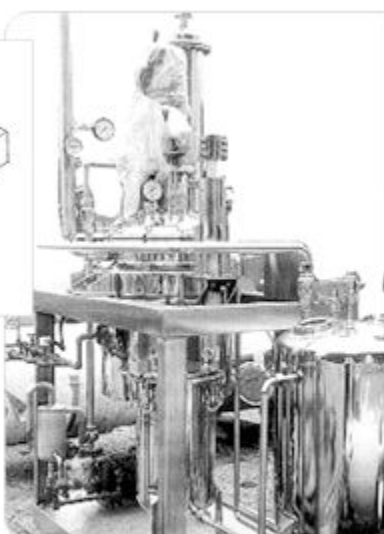
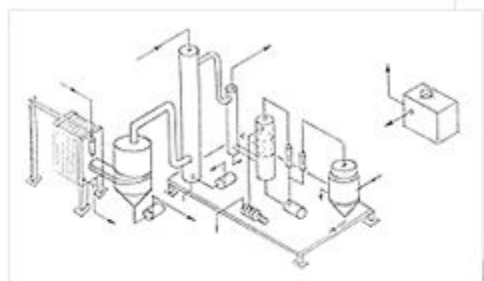
(3) 농축 공정

여과는 여과지 와트만 No4를 사용하여 상온 상압에서 여과하였으며, 추출된 추출액을 감압 증류 장치에 투입하여 온도 섭씨 70도에 10mmHg의 감압 하에 농축 건조하여 추출물 분말을 얻었다.

그림11은 실험실에서 사용한 감압증류장치의 예시이며, 그림12는 대량생산에 사용되어지는 농축 추출기의 예를 보여준다.



< 그림 11. 감압증류장치 >



< 그림 12. 농축 추출기 >

4. 유충 생산 시스템 개선 (실험 IV)

1차년도에 반영하지 않았던 환기 시스템에 대한 기본 데이터를 얻기 위하여, 10kg의 시료를 통해 유충을 사육함으로써, 환기에 필요한 기초 데이터를 획득하였으며, 이를 기준으로 하여 유충 10톤을 생산하기에 필요한 환기량을 결정하였다.

가. 환기 시스템 설계

(1) 환기량 계산

(가) 수분 증발량 계산

실험은 10kg의 시료를 통해 유충을 10회 반복하여 사육하였으며, 표8은 10회 반복 사육 값에 대한 평균값을 표기하였다.

시험 조건은 흡기 온도 26℃ 상대습도 60%로 설정하였으며, 배출온도는 32℃ 상대습도 90%를 유지하도록 하였다.

. 사육일수에 따른 수분 증발량

사육 일수	시작중량 ^(*주1) (kg)	수분증발량 (kg)	당일잔량 ^(*주1) (kg)	당일대비 감량비율(%)	시작중량대비 감량비율(%)
사육 1일차	10.0	0.3	9.7	3.0%	3.0%
사육 2일차	9.7	1.5	8.2	15.5%	15.0%
사육 3일차	8.2	1.1	7.1	13.4%	11.0%
사육 4일차	7.1	0.6	6.5	8.5%	6.0%
사육 5일차	6.5	0.4	6.1	6.2%	4.0%
사육 6일차	6.1	0.2	5.9	3.3%	2.0%
합계		4.1	5.9		41%

*주1. 시작중량 및 당일잔량은 유충중량 및 사료잔량의 합계임.

< 표8. 사육일수에 따른 수분 증발량 >

표8에 명기된 데이터를 기준으로 유충 10톤을 생산하는데 필요한 환기량을 계산하였다.

① 시료가 점유하는 공간

시료가 점유하는 공간에는 시료 사육 박스의 크기뿐만 아니라, 통로 및 환기 공간을 고려하

여 점유공간을 결정하였다.

$$\text{점유공간 } V_s = 1.5 * 1.0 * 0.4 = 0.6\text{m}^3$$

② 배기수분량

배기 온도 32℃ 상대습도 90%의 배기내 절대수분량

$$\text{배기수분량 } W_{out} = 35.5\text{g/m}^3 * 90\% = 31.95\text{g/m}^3$$

③ 흡기수분량

흡기온도 26℃ 상대습도 60%의 흡입공기내 절대수분량

$$\text{흡기수분량 } W_{in} = 25\text{g/m}^3 * 60\% = 15\text{g/m}^3$$

④ 단위흡수수분량

흡기수분량과 배기수분량의 차이만큼 공기가 수분을 흡수함.

$$\text{단위흡수수분량 } W_m = W_{out} - W_{in} = 31.95 - 15 = 16.95\text{g/m}^3$$

⑤ 시료공간최대흡수량

시료점유공간을 기준으로 최대 흡수할 수 있는 수분량

시료공간최대흡수량

$$W_s = W_m * V_{\text{smpl}} = 16.95\text{g/m}^3 * 0.6\text{m}^3 = 10.17\text{g}$$

⑥ 일일평균증발량/시간당평균증발량

사육 기간 6일중 총 증발량이 4.1kg/10kg이므로

$$\text{일일평균증발량 } W_{avgd} = 4,100\text{g} / 6\text{days} = 683.3\text{g/day}$$

$$\text{시간당평균증발량 } W_{avgh} = 683.3 \text{ g/day} / 24 \text{ hr} = 28.47 \text{ g/hr}$$

⑦ 시간당 필요환기횟수

시간당평균증발량을 시료공간최대흡수량으로 나누면 환기에 필요한 회수가 계산된다.

시간당 필요환기횟수

$$Th_r = W_{max} / W_s = 28.47 / 10.17 = 2.79\text{회/hr}$$

⑧ 시간당필요환기량

시료 10kg을 사육하기 위해 소요되는 단위 시간당 환기량

시간당필요환기량

$$V_{req} = V_{\text{smpl}} * Th_r = 0.6\text{m}^3 * 2.79\text{회/hr} = 1.6 \text{ m}^3/\text{hr}$$

⑨ 단위사료투입량

유충 1톤 생산을 위한 수분포함 사료 투입총량

$$\text{단위사료투입량 } Q_{feed} = 7.75\text{톤}$$

⑩ 단위필요환기량

마고트 1톤 생산위한 필요 환기량

단위필요환기량

$$V_{1t} = V_{req} * Q_{feed}/Q_{\text{smpl}} = 1.6 * 7750/10 = 1,240 \text{ m}^3/\text{hr}$$

⑪ 총필요환기량

유충 10톤을 생산하기 위해 필요한환기량

$$\text{총필요환기량 } V_{10t} = 1,240\text{m}^3/\text{hr}/\text{ton} * 10\text{ton} = 12,400\text{m}^3/\text{hr}$$

⑫ 안전필요환기량

안전율 1.5를 적용한 안전필요환기량

$$\text{안전필요환기량 } V_{ttl} = V_{10t} * 1.5 = 18,600\text{m}^3/\text{hr}$$

위 계산식을 Excel 프로그램으로 계산식으로 만들어 입력값의 변동에 따른 계산 결과가 도출되도록 프로그램화 하여 부하 변동에 따른 환기량의 변화를 예측할 수 있도록 하였으며, 프로그램의 기준 계산식은 표9와 같다.

점유공간	가로	세로	높이	Vsmp1	
Vsmp1=가로*세로*높이	1.5	1.0	0.4	0.6	m3
배기조건	온도	포화증기압	상대습도	Wout	
Wout=상대습도*포화증기압	32	35.5	90%	31.95	g/m3
흡기조건	온도	포화증기압	상대습도	Win	
Win=상대습도*포화증기압	26	25	60%	15	g/m3
흡수할수 있는 수분량	Wout	Win	Wm		
Wm=Wout-Win	31.95	15	16.95		g/m3
시료공간내 최대 흡수수분량	Wm	Vsmp1	Ws		
Ws=Wm* Vsmp1	16.95	0.6	10.17		g
일일평균증발량	총증발량	사육일수	시간당증발량		
Wavg=총증발량/6일/24시간	4100	6	28.47		g/hr
시간당 최대 환기횟수	Wmax	Ws	Phr		
Phr=Wmax/ Ws	28.47	10.17	2.79		회/hr
시간당 필요환기량	Vsmp1	Pth	Vreq		
Vreq=Vsmp1 * Pth	0.6	2.79	1.6		m3/hr
구더기 1톤생산 함수사료 투입총량			함수사료총량		
Qfeed= 7.75ton			7750		kg
구더기 1톤생산 환기량	Vreq	Qfeed	Qsmp1	Vton	
Vton=Vreq*Qfeed/Qsmp1	1.6	7750	10	1240	m3/hr
구더기 10톤생산 총환기량	Vton	10톤	V10t		
V10t=Vton *10ton	1240	10	12400		m3/hr
안전율 감안 시간당 환기량	V10t	안전율fs	Vttl		
Vttl = V10t * fs	12400	1.5	18,600		m3/hr

<표9. 환기량 변동 계산 프로그램식>

(나) 환기팬 선정

환기팬으로 시로코팬을 적용하기로 하고 시중에서 공급되는 팬 중에서 이노텍 모델번호 TIS-390GT인 시로코팬을 기준으로 계산하였다.

정압 20mmAg 시 풍량 7400CMH / 안전율 1.5 = 4,970CMH

수량 4대 총풍량 합계 4,970CMH * 4Sets = 19,880CMH > 18,600CMH

4대의 시로코팬으로 최대 19,880CMH의 풍량으로 환기를 함으로써 유층 사육에 적절한 습도를 유지할 수 있다. 이에 계산된 모델의 사진 및 사양과 풍량 그래프를 그림12와 표10 및 도1에 예시하였다.



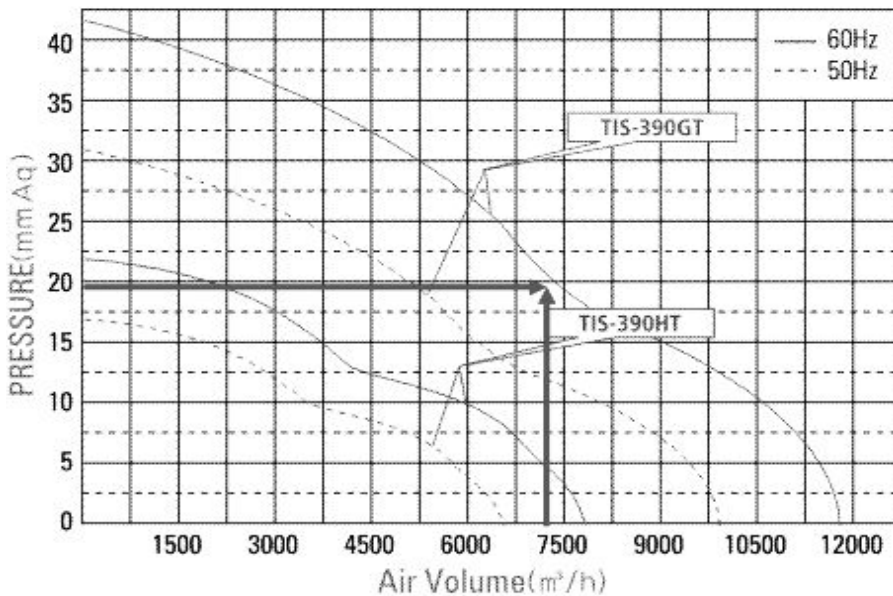
< 그림12. 시로코팬 >

| 사양 SPECIFICATION

모델 \ 구분	날개크기 (mm)	전원 (V/Hz)	극수 (P)	소비전력 (W)	풍량 (m ³ /h)	정압 (mmAq)	중량 (Kg)	소음 (dB)	주문 번호
TIS-390GT	∅390 X 170	3/220-380/60	6	3500	11,800	45	68.0	69	S17
TIS-390HT	∅390 X 170	3/220-380/60	8	1700	7,800	22	68.0	65	S18

< 표10. 시로코팬 제원 >

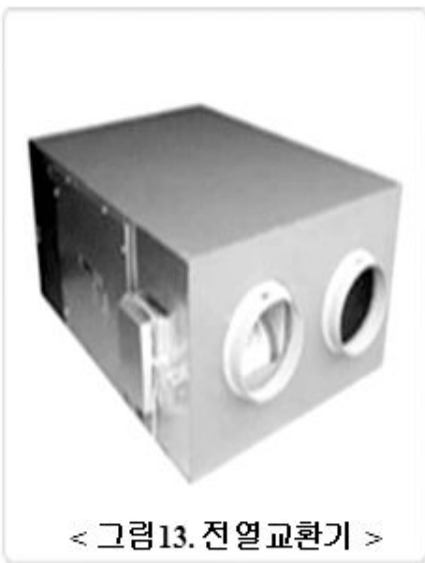
< Performance Curve >



< 도1. 시로코팬 풍량풍압 그래프 >

(다) 열교환 장치

유충을 사육하기 위해서는 흡기온도 26도 전후를 유지하여야 최적의 성장을 보장할 수 있으므로, 동절기에는 외부로 배출되는 배기로부터 배기열을 회수할 필요가 있다. 환기량 계산에 의해 열교환장치의 capacity는 18,000CMH를 가져야 하는데, 열교환장치 1대로 이와 같은 대량의 환기량을 처리하는 것이 비효율적이므로, 약 3000CMH의 처리능력을 보유한 열교환장치를 다수 설치하는 것이 메이테너스를 비롯한 여러면에서 유리하다. 이에 적합한 기성 열교환장치로 은성화학의 3000CMH 모델(번호 ES-3000NC00)을 적용하기로 한다. 은성화학 모델의 형상과 사양이 그림13 및 표11에 표시되어 있다.



항목	단위	ES-3000NC00						
전원	Φ, V, Hz	1φ, 220V, 60Hz						
환기모드	-	전열환기			보통환기			
종속	-	갈	중	약	갈	중	약	
전류	A	7.95	7.27	6.82	-	-	-	
소비전력	W	1750	1600	1500	-	-	-	
풍량	m ³ /h	3000	3000	2500	-	-	-	
기외정압	mmAq	20	15	6	-	-	-	
온도효율	%	75	75	77	-	-	-	
전열교환 효율	난방	%	40	40	42	-	-	-
	냉방	%	60	60	62	-	-	-
헤어필터	-	부직포 필터 + 고성능 필터 (Ceon)						
중량	kg	110						
Size(WxDxH)	mm	1720 × 1102 × 704						
연결덕트구경	mm	350						

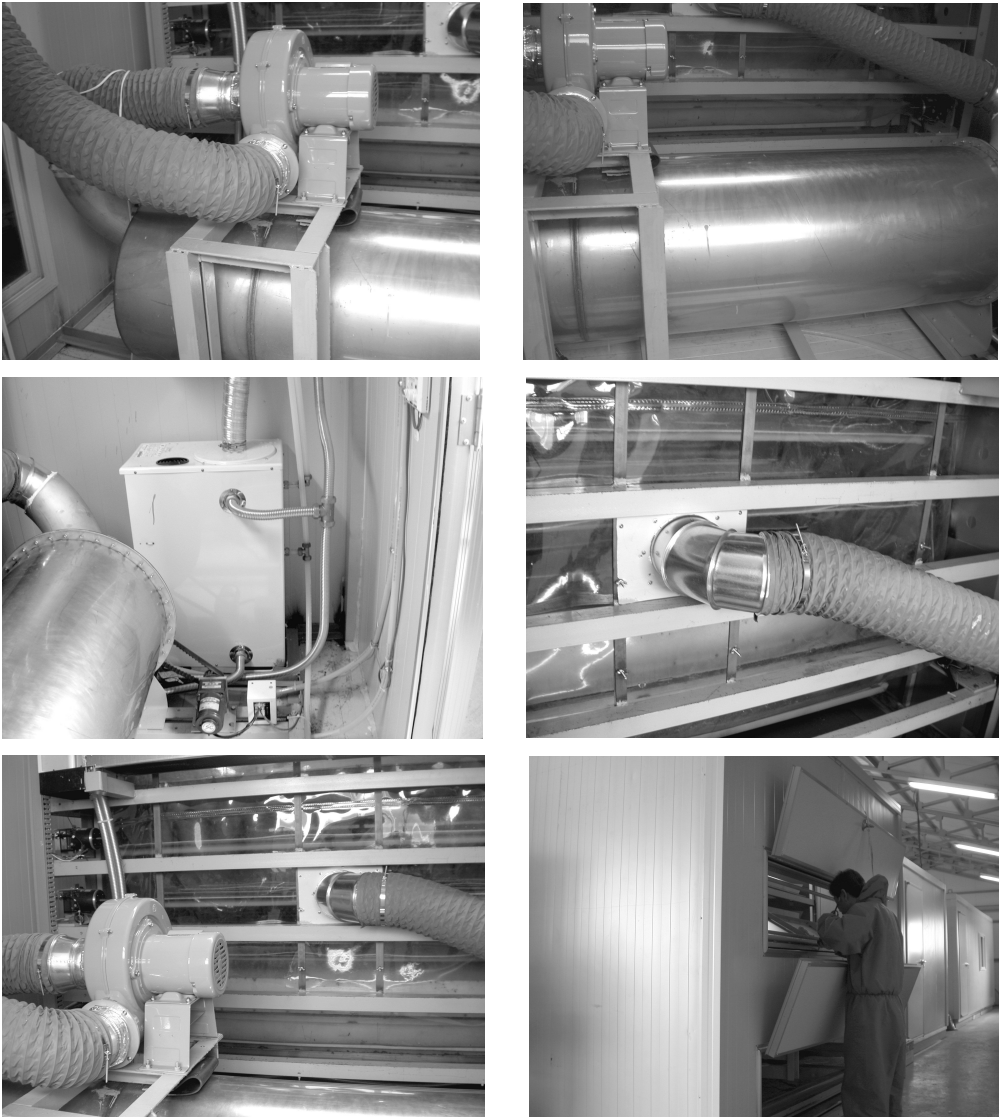
< 표11. 전열교환기 제원 >

위의 열교환장치 6대를 설치할 경우 최대 18,000CMH를 운영할 수 있다. 일반적으로 열교환기의 온도 효율이 75%를 상회하므로 배기온도 32도의 75%인 24도가 흡기온도가 되어 기준온도에는 약간 못미치지만 동절기에는 환기량이 적어지므로 유충의 사육에 지장을 주지 않는 범위에 있다고 할 수 있다.

(라) 악취 저감 장치

유충의 성장과정에서 발생하는 암모니아를 비롯한 다양한 유기성 휘발물질을 제거하기 위하여 바이오필터를 사용하였다.

바이오필터는 (주)에코필에서 제공한 바이오필터용 종균제(상표명 EcoCell)를 사용하여 발생하는 악취를 저감하였다. 종균 사용량은 부하 량에 따라 변동되며, 빈영양화가 발생하지 않는 경우에는 종균을 재투입할 필요가 없었다. 관능법으로 측정된 결과 바이오필터를 거쳐 배출되는 공기의 악취 단계가 1이하로 사람이 느낄수 없었다. 본 실험에 사용된 바이오필터 및 환기구 구조 사진이 그림14 ~ 그림19에 표시되어 있다.



<그림 14~19. 바이오필터와 환기 시스템 구축 예>

(마) 통합시스템 운영

충란 시스템에서 매일 일정한 량의 충란을 받는 것이 쉽지 않기 때문에, 충란 시스템의 운영이 무엇보다도 중요하다. 초기 충란 시스템을 운영하면서 발생한 어려움이란 충란이 일정하게 생산되지 않기 때문에 이에 따른 유충 생산에 필요한 사료를 준비하는 것과 밸런스가 맞지 않는 경우가 많이 발생하였다. 그러므로, 충란 생산량의 부하에 맞춰서 유충 시스템을 탄력적으로 운영하는 것이 연계에 있어 키포인트라 할수 있으며, 유충 시스템에 의해 충란 시스템이 영향을 받지 않는 단방향이므로 충란의 확보가 무엇보다 더 중요하다.

일반적으로 충란을 획득하는 시간이 정해져 있으므로, 유충 시스템에서 충란의 살포에 일정을 맞추어 운영하며, 기타 작업은 충란 살포 시간대를 피해서 연계적으로 작업하는 것으로 두 시스템의 충돌을 방지하며 어려움없이 통합 시스템을 운영할 수 있다.

나. 결론

연구실에서 시행되었던 추출 프로세스를 기반으로 유충 10톤을 처리할 수 있는 대형 추출 프로세스를 유추하여 분석하였다. 또한 유충 사육에 있어서 환기 시스템에 대한 분석과 용량을 산출하였다. 그동안의 경험을 기간으로 해서 본 과제를 시작하였기 때문에 전반적인 시스템 구축에 어려움은 없었으나, 유충이 살아있는 동물이기 때문에, 이에 수반된 예상치 못한 변수가 실제 대형 시스템을 설계하고 운용하는데 발생할 수 있다. 이에 대해서는 현재까지 에이타가 축적되어 있지 않은 관계로, 설계에 안전율을 충분히 주어 오차 범위 내에 위치하도록 설계하도록 한다. 이 부분을 고려한다면, 지금까지 분석하고 설계한 부분이 크게 벗어나지 않을 것으로 판단되며, 이를 근거로 유충의 대량 사육 및 대량의 유충 추출물을 확보하여 산업화가 가능하다고 판단된다.

제 3 절 파리유충 추출물로부터 항생 펩타이드의 구조구명 (협동과제 2)

다양한 실험을 통하여 구더기 추출물로부터 항생물질 성분을 분리하는데 성공하였다. 그동안 수행했던 내용을 아래와 같이 6항목으로 분류하여 기술하였다.

1. 시험 1

동결한 Housefly (*Muscadomestica*) Larvae 10g을 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}(2:1)$ 용액에 현탁 후 여과와 건조의 과정을 3번 반복하였다. Preparation buffer (50 mM ammonium acetate buffer containing 35 ug/ml PMSF, 0.1 mg/ml EDTA, 0.2 % 2-ME, pH 5) 에서 mixer를 이용하여 10분간 저온에서 분쇄하였다. 분쇄된 액을 12,000 x g, 4 °C에서 30분간 원심분리 후 상층 액을 동결 건조하였다. 건조된 분말을 물 5ml에 녹인 후 최소억제농도 (MIC, minimum inhibitory concentration) test를 실시하였다. 그램 음성 균인 *E. coli* (ATCC 25922) 와 *S. dysenteriae*(ATCC9752)에서 실제적인 항균활성을 나타냈다.

2. 시험 2

동결한 Larvae 10g을 Preparation buffer 에서 mixer를 이용하여 10분간 저온에서 분쇄하였다. 그리고 분쇄된 액을 12,000 x g, 4 °C에서 30분간 원심분리 하였다. 원심분리된 上清液 에 동일한 부피의 n-Hexane을 첨가하고, 30分間 shaker로 懸濁하고, 12,000 x g, 4 °C에서 1시간 30분간 원심 분리해서 n-Hexane 부분 및 沈殿物을 제거하였다. 이러한 脱脂處理를 二回 반복했다 °水溶性 画分을 동결 건조한 후 물 5ml에 녹여 MIC test를 실시하였다. 그램 음성 균인 *E. coli*, *S. dysenteriae*, *S. typhimurium* (ATCC14028) 및 *K. pneumoniae*(ATCC10031)에서 실제적인 항균활성을 나타냈다.

3. 시험 3

동결한 Larvae 100g 을 시험 2와 같은 방법으로 추출하고 추출액을 Gel filtration column (Superdex75 10/300 GL)을 이용 20 mM Na-Phosphate buffer (pH 6)을 이동상으로 하여 분리하였다 (Fig. 1). 추출액 5ml을 10회로 나누어 Gel filtration Chromatography를 행하고 용출액은 시간별로 분리했다(4ml씩 5분) 시간별로 분리된 것을 동결건조 후 물 0.5 ml에 녹여 MIC test를 실시하였다. 23~27ml에 나온 분획이 그램 양성 균인 *B. subtilis* (ATCC 6633), *M. luteus* (ATCC10240)와 그램 음성 균인 *S. dysenteriae*에서 실제적인 항균활성을 보였다 (Fig. 2).

4. 시험 4

동결한 Larvae 100g을 Preparation buffer 에서 mixer를 이용하여 10분간 저온에서 분쇄하였다. 그리고, 분쇄된 액을 12,000 x g, 4 °C에서 30분간 원심분리 하였다. 원심분리 상清액을 12,000 x g, 4 °C에서 30분간 원심분리 하였다. 상清液과 동일한 부피의 n-Hexane을 첨가하고, 30분간 shaker로懸濁하고, 12,000 x g, 4 °C에서 1시간 30분간 원심 분리해서 n-Hexane부분 및 沈殿物을 제거하였다. 이러한 脱脂处理를二回 반복하고 水溶性画分을 동결건조 하였다. 그후 이것을 水5ml로懸濁하고 Gel filtration column (Superdex75 10/300 GL)을 이용해 25 mM Na-Phosphate buffer (pH 5.3, 35 ug/ml PMSF) 를 移動相으로 사용해 분리하였다. 추출액 5ml을 10회로 나누어 Gel filtration Chromatography를 행하고 용출액은 시간별로 분리했다(2ml씩 9분 Fig. 3) 분리된 부분을 동결건조 후 물0.5 ml에 녹여 MIC test를 실시하였다. 23~27ml에 나온 분획(fraction no. 8, 9)이 그램 양성 균인 *B. subtilis* (Fig. 4), *S. aureus* 와 그램 음성 균인 *E. coli*, *S. dysenteriae* 에서 실제적인 항균활성을 나타냈다. 그후 활성을 確認한 분획 溶液을 逆相 HPLC Column (C18 Polymeric Reversed-Phase 218TP510, GRACE VYDAC)을 이용해 分離를 시도했다(Fig. 5) 용출 peak를 포함하는 fraction에 대해 MIC test를 행하였다 Elution 3,4 에서는 활성이 보이지 않았으나 Elution 1,2 에서는 그램 양성 균인 *B. subtilis* 와 그램 음성 균인 *E. coli* 에 대해 실제적인 항균활성을 나타냈다(Fig. 6) 또한 다른 逆相HPLC column (Hypercarb, Thermo Fisher Scientific 및 Luna 5u CN 100A, Phenomenex)을 이용해 分離를 시도해본 결과(Fig. 7, 8) C18 column 과 마찬가지로 column 에 吸着하지 않았던 Elution 5, 6 에 있어 활성이 確認되었다. 활성成分은 사용한 어떤 逆相 column에도 吸着하지않았다. 매우 水溶性이 높은 펩타이드 혹은 化合物이라고 推測된다.

5. 시험 5

溶菌活性을 나타낼수도 있는 EDTA가 Preparation buffer에 포함되어 있다는 것을 고려하고 EDTA를 제거한 Preparation buffer (20 mM ammonium acetate buffer containing 35 ug/ml PMSF, pH 5)를 이용해 Larvae 100g을 시험과 동일한 방법으로 추출 脱脂处理를 행하였다. 더욱이 Gel filtration column (Superdex75 10/300 GL)

을 利用해 25 mM Na-Phosphate buffer (pH 5.3, 35 ug/ml PMSF) 를 移動相으로서 分離(Fig. 9) 26-35 mL 의 Fraction을 分取했다 °동결건조 후 더우기 逆相HPLC column(C18)을 이용해 column에 吸着시키지 않고 溶出한 fraction을 分取했다 (Fig. 10) °동결건조 후 MIC test를 실시하였다. 그램 양성 균인 *B. subtilis*, *S.aureus*,*M.luteus*와 그램 음성 균인 *E. coli*, *S.dysentariae*에서 실제적인 항균활성을 나타냈다.(Fig. 11) °또한 GFC-HPLC column (Bio Sep SEC-2000, Phenomenex) 를 利用하여 더욱이 分離를 시도했다 (Fig. 12) °Preparation buffer를 移動相으로서 이용했다 °溶出液은 時間別로 分離하고 동결건조 후 MIC test를 실시하였다 (그램 양성 균인 *B. subtilis* 와 *S. aureus*). 22-25 mL의 Fraction에서 실제적인 항균활성을 나타냈다 (Fig. 13).

6. 시험 6

Larvae 300g을 시험와4와 同様の 方法으로 抽出 脱脂處理를 행하였다 °Na의 混入을 가능한 防止하기 위해 Na-Phosphate buffer가 아니라 Preparation buffer (20 mM ammonium acetate buffer containing 35 ug/ml PMSF, pH 5)를 移動相으로 하여 Gel filtration column 에 의한 分離 더우기 HPLC 사용한 分離를 繼續하였다. 活性을 나타낸 fraction 溶液의 Mass spectrum測定을 시도했다 °Matrix에 Glycerol를 이용한 FAB-MS測定을 行하였더니 分子量500 Da程度範圍에서 peak가 檢出되었다 (Fig. 14) °그러나 sample의 純度가 낮다는 사실과 sodium이 混入되어 있었기 때문에 정확한 分子量的 확인은 어려웠다 °

Fig.1

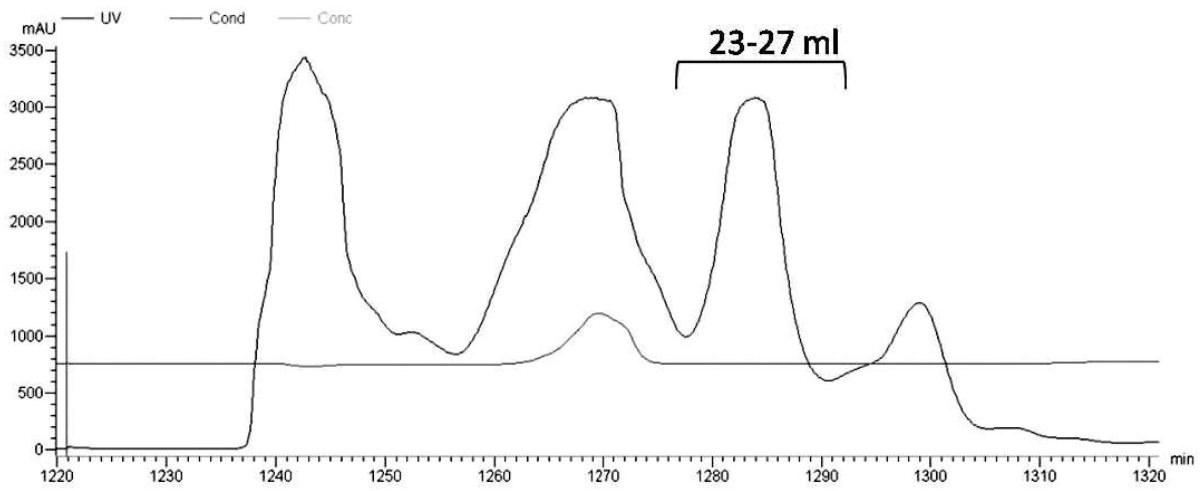


Fig. 2

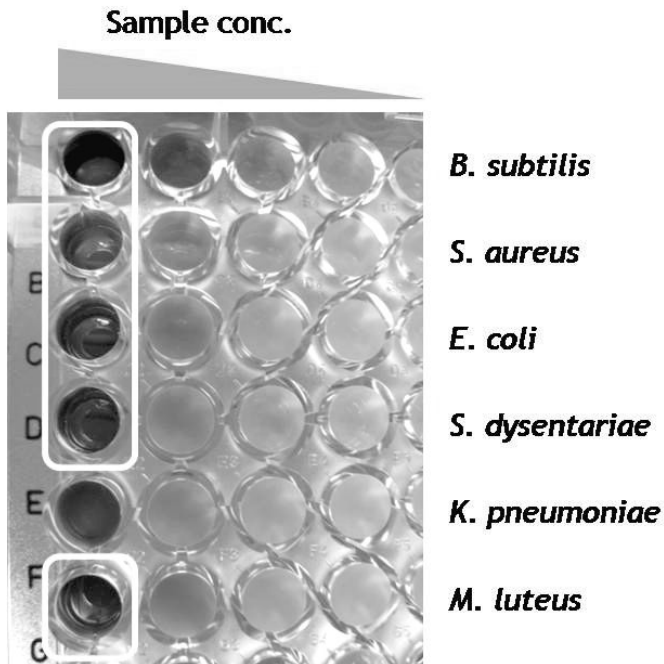


Fig. 3

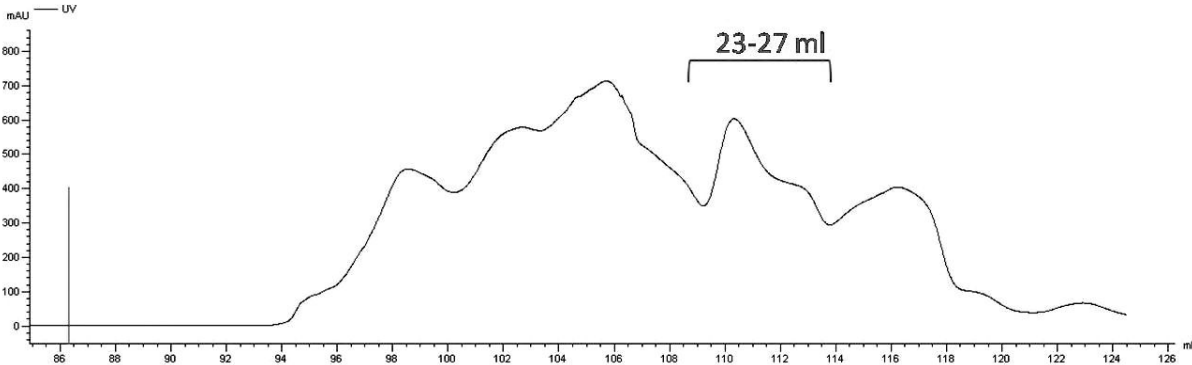


Fig. 4

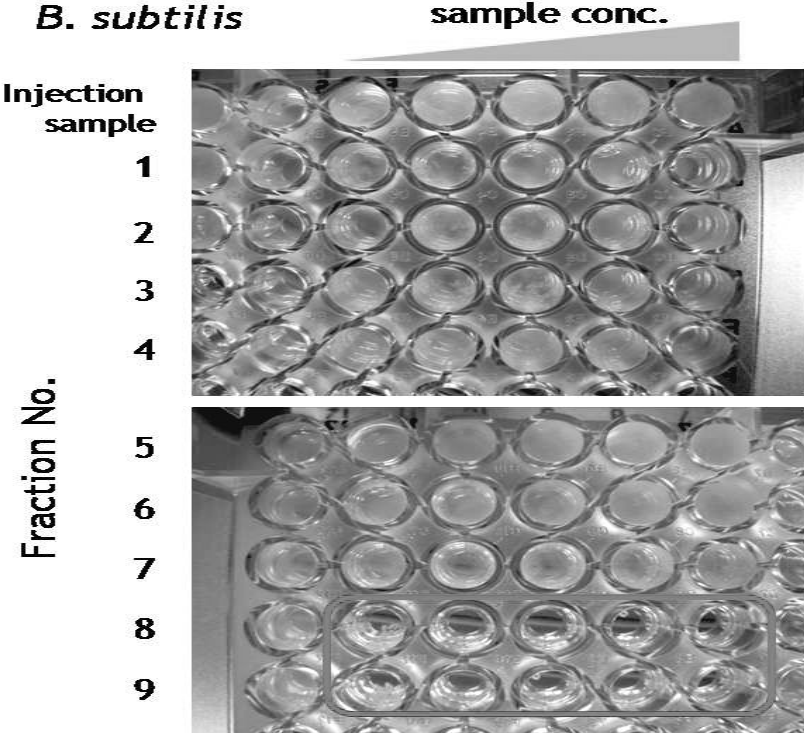


Fig. 5

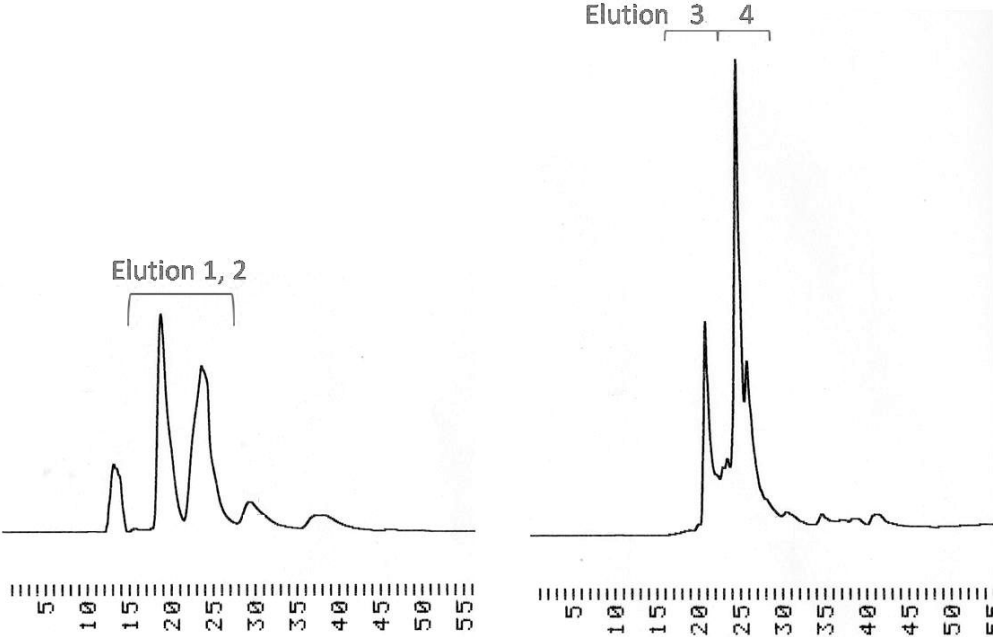


Fig. 6

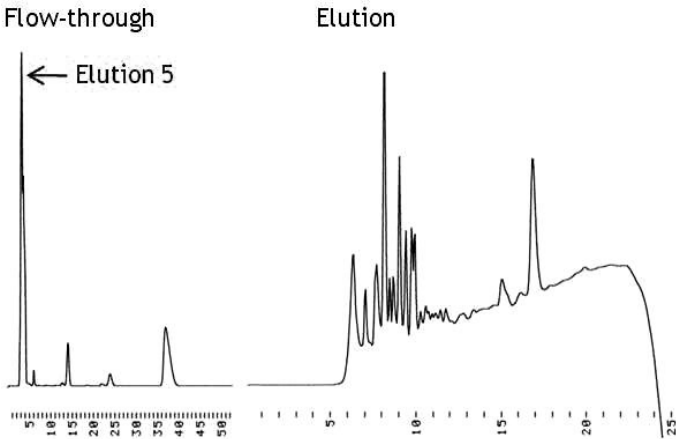


Fig. 7

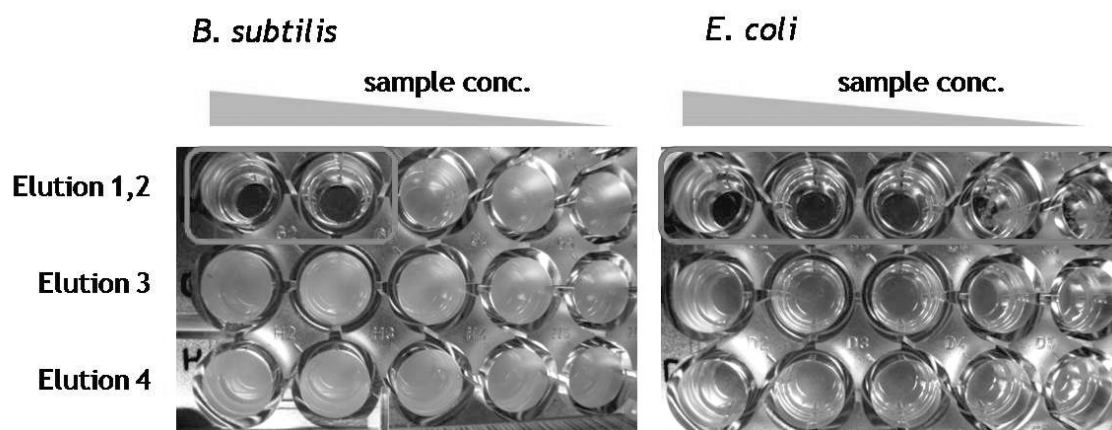


Fig. 8

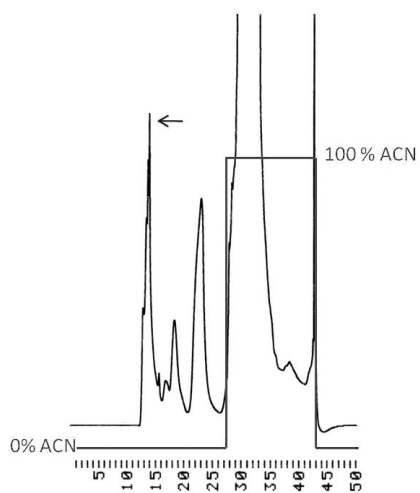


Fig. 9

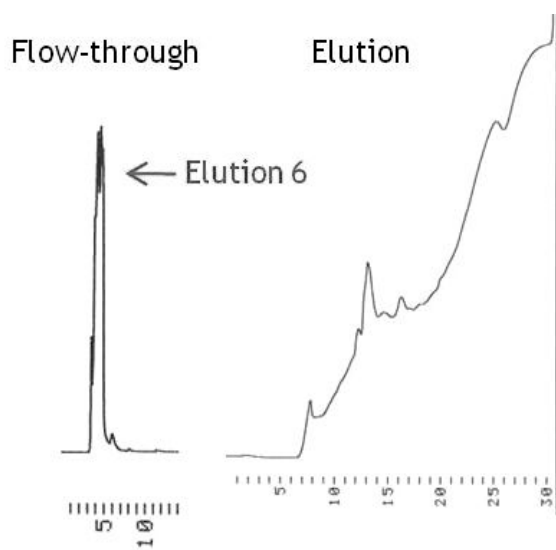


Fig. 10

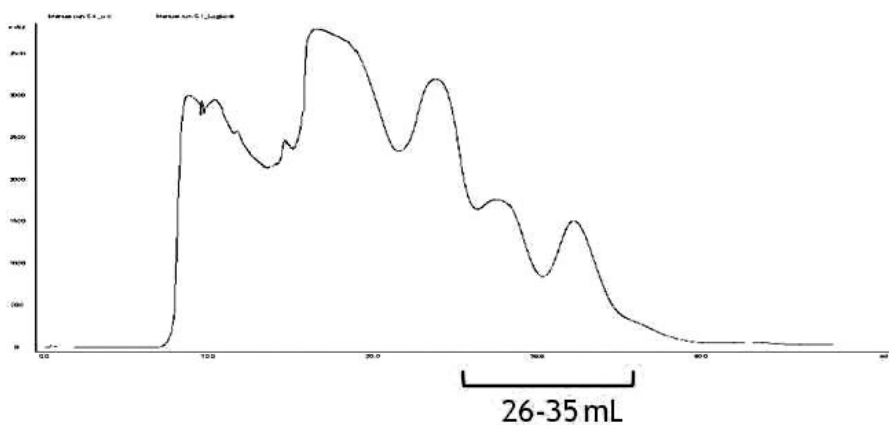


Fig. 11

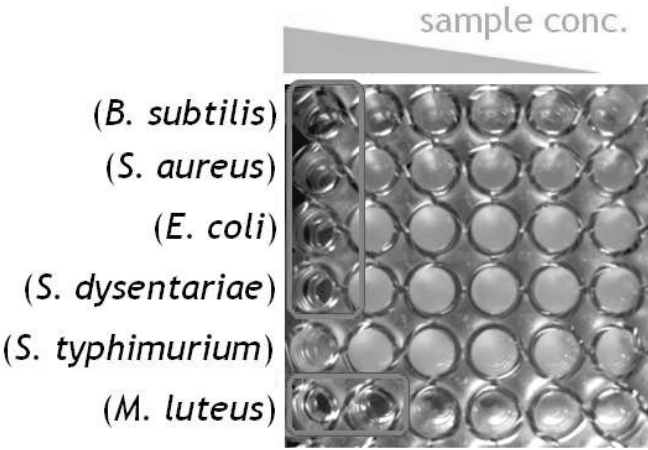


Fig. 12

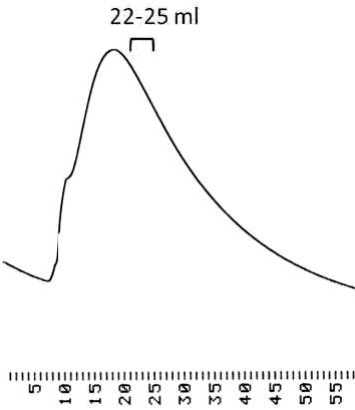


Fig. 13

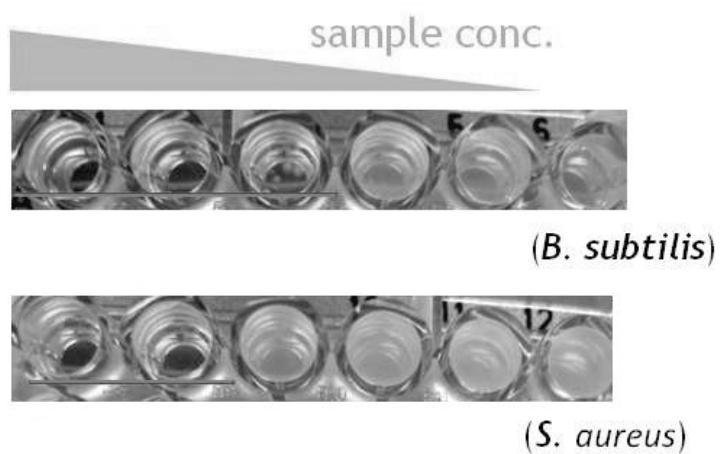
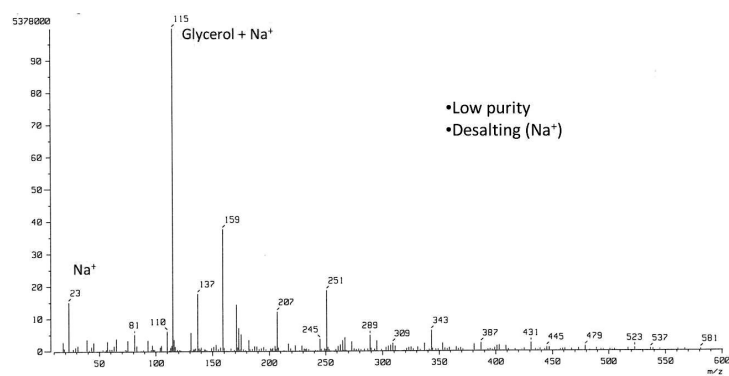


Fig. 14



제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

(1) 연구개발의 최종목표

파리유충으로부터 사료용 항생제대체물질을 추출하여 무항생제 안전축산식품 생산기술을 개발

- 브로일러 및 돼지에서 항생제 대체제로서 파리유충 추출물의 적정 첨가수준 결정
- 파리유충 대량 사육생산 및 추출시스템 개발
- 집파리 유충으로부터 사료용 항생제 대체 물질의 개발 (파리 유충 추출물의 항균 효과를 지닌 단백질, 펩타이드의 순수 분리)

(2) 연차별 연구개발 목표 및 내용

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> - 브로일러에 대한 파리유충 추출물 (MEP)의 첨가수준 결정 및 살모넬라 감염질병 예방효과 조사 - 대량 사육용 환경시스템 설계 및 층란과 유충 생산 시스템 설계, 제작 - 파리 유충 추출물의 항균 효과를 지닌 단백질, 펩타이드의 순수분리 	<ul style="list-style-type: none"> - 브로일러사료 내 항균성 파리유충추출물의 적정 첨가수준 결정시험 및 닭의 생산성, 닭고기 품질평가, in vivo 항균활성 기작조사,브로일러에 대한 Salmonella challenge trials, 생산현장 적용시험을 실시 - 층란이 습도가 높은 사료에 접하지 않도록 유충 생산 시스템을 설계 및 제작. 유충의 탈출을 억제하도록 설계 - 파리 유충 추출물 분리. Reverse Phase HPLC, 이온 교환수지 컬럼을 이용하여 성분 분획 및 항생 물질의 분리
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> - 돼지에 대한 MEP의 첨가수준 결정 - 대량 사육용 환경시스템 설계 및 층란과 유충생산 시스템 설계, 제작 - 파리 유충 추출물의 항균효과를 지닌 단백질, 펩타이드의 구조 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 돼지 배합사료 내 MEP 첨가수준 결정, 자돈의 설사, SCFA, 프리바이오틱스 효과, 육성비육돈의 생산성 및 돈육 품질평가, 생산현장 적용, 경제성 평가 - 층란시스템과 유충시스템의 연계 생산성 공 - 항생 펩타이드의 서열 분석 및 CD, NMR spectroscopy를 이용한 펩타이드의 구조 규명

(3) 계획대비 달성도

번호	세부연구목표	달성내용	달성도(%)
1	브로일러와 돼지에 대한 항균성 파리유충 추출물의 적정 첨가수준 결정 및 생산성 시험	- 브로일러와 돼지사료 내 항균성 파리유충 추출물(MEP)의 적정 첨가수준은 각각 10%, 15%로 결정 - 브로일러와 자돈의 성장능력, 돼지 생산성 향상 및 고품질 무항생제 안전 식육 생산기술 개발	100
2	파리유충 추출물 분리, HPLC column을 이용한 성분 분획	Larvae 100 gram 을 mixer를 이용해 homogenize 한후 원심기로 상등액을 분리하여 이것에 Hexan을 가하였다. 수용액 층 부분을 gel filtration column을 이용하여 성분을 분획	100
3	분획된 성분에서 항생물질 분리	분획된 부분의 항생능력을 Test 하여 항생능력을 나타내는 분획만을 취해 역상 HPLC를 이용하여 강한 활성을 나타내는 항생물질을 확보하는데 성공	100
4	파리유충 대량생산을 위한 환경 및 증란과 유충 생산 시스템 개선으로 일일 10톤이상 생산기술 개발	증란시스템과 유충시스템의 연계하여 일일 10톤 이상의 파리유충 생산성공	100

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

(1) 실용화·산업화 계획 (기술실시 등)

산업체에 기술전수를 계획하고 있음. 사업화하기 위한 초기 설비비용은 1억 정도로 예상되며, 파리유충의 대량사육이 어려울 경우 중국으로부터 수입할 수 있고, 사료첨가제로서 신고 후 동물약품 회사와 연계하여 마케팅을 실행하면 사업화에 큰 도움이 될 것으로 판단됨.

(2) 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

기술전수 업체와 협의하여 양축농가를 대상으로 교육, 지도, 홍보 및 기술확산을 고려.

(3) 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획

- 특허등록(10-1025810, 2011. 3. 23), “곤충을 이용한 항생제 대체용 비분해성 사료첨가제 및 이의 제조방법”)
- SCI (J. Anim. Vet. Adv) 및 한국학술진흥재단 등재 저널에 논문게재 예정

(4) 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

- 무항생제 한우, 낙농, 양어생산을 위한 기술의 활용을 검토
- 펩타이드 엔지니어링을 통한 펩타이드성 약물 개발에의 활용 : 펩타이드성 약물을 개발하기 위해서는 그 크기를 줄이는 것이 필수적이다.(경구제로 사용 가능하기 위해서는 펩타이드의

크기가 작아야 한다. 또한 펩타이드의 크기가 반으로 줄면 생산 단가는 4분의 1로 줄어듬). 본 연구를 통해서 얻은 파리 유충 추출 항생 펩타이드를 펩타이드 엔지니어링을 통해 특정 아미노산 잔기를 도입함으로써, 추가 연구를 통해서 활성은 유지하면서 크기가 대폭 줄어든 항생펩타이드 유도체를 개발할 수 있다. 이러한 펩타이드 신약개발을 위한 독자적인 기반기술을 확립함으로써 국내기술로 세계시장을 석권할 수 있는 독창적인 펩타이드 신약후보물질을 개발하여 항생제 수입 대체 뿐 아니라 항생제 의약품 수출에 따른 수익을 예상할 수 있다.

- 항생제 내성 극복 : 지금까지 개발된 항생제는 주로 fungi나 bacteria 등에서 유래한 저분자 항생물질이었으나 이제는 그 범위를 파리유충 유래 펩타이드로 넓힘으로써 기존의 항생제가 가지는 다제내성(MDR, Multidrug Resistance) 등의 문제점을 극복하면서도, 효과는 더욱 극대화된 항생제의 개발이 가능할 것으로 보인다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 영국 워릭의과대학 임상연구소 빅터교수 연구팀에서 파리유충을 이용한 화상 및 욕창환자를 대상으로 한 생체치료기술 개발 및 파리유충 분비액으로부터 항생제 대체를 위한 항균펩타이드 개발연구를 진행하고 있으나 가축사료용 항생제 대체물질 활용에 관한 연구는 거의 전무한 상태로 사료됨.

제 7 장 참고문헌

- Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, VA
- Berri, C., J. Besnard, and C. Relandeau. 2008. Increasing dietary lysine increases final pH and decreases drip loss of broiler breast meat. *Poult. Sci.* 87:480-484.
- Bexfield, A., Y. Nigam, S. Thomas and N. A. Ratcliffe. 2004. Detection and partial characterisation of characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbes Infect.* 6:1297-1304.
- Bienenstock, J., J. Gauldie and D. Y. E. Perey. 1973. Synthesis of IgG, IgA, IgM by chicken tissues: Immunofluorescent and ¹⁴C amino acid incorporation studies. *The Journal of Immunology.* 111: 1112-1118.
- Burge, J. A., and J. D. Aust. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52:302-308.
- Chunju, A., L. Desen and D. Rongqian. 2004. Analysis of antibacterial-relative proteins and peptides in housefly larvae. *J. Hygiene Res.* 33:86-88.
- Close, B., K. Banister, V. Baumans, E. M. Bernoth, N. Bromage, J. Bunyan, W. Erhardt, P. Flecknell, N. Gregory, H. Hackbarth, D. Morton, and C. Warwick. 1997. Recommendations for euthanasia of experimental animals, Part 2., Laboratory animals. 31:1-32.
- Commission Regulation 2277. 2003. Amending annexes I and II to council regulation (EEC) 2092/91 on organic production of agricultural products and indications referring there to agricultural products and foodstuffs. *Official J. Eur. Union.* L336. 46:68-74.
- Constantinoiu, C. C., Molloy, J. B., Jorgensen, W. K and G.T. Coleman. 2007. Development and validation of an ELISA for detecting antibodies to *Eimeria tenella* in chickens. *Veterinary Parasitology.* 150:306-313.
- Cosgrove, S. E., Y. Qi, K. S. Kaye, S. Harbarth, A. W. Karchmer and Y. Carmeli. 2005. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes:mortality, length of stay, and hospital charges. *Infect Control Hosp. Epidemiol.* 26:166-174.
- Dareish, R. M., T. Aburjai., S. Al-Khalil, and A. Mahafzah., 2002. Screening of antibiotic resistance inhibitors from local plant materials against two different strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacology.*, 79: 359-364.
- Devaraj, S., S. Vega-Lopez., N. Kaul., F. Schonlau., P. Rohdewald and I. Jialal.

2002. Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. *Lipids*. 37: 931-934.
- Dibner, J. J. and J. D. Richards. 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. *Poultry Sci.* 84: 634-643.
- European Union Commission. 2005. Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect. 1. Regulation 1831/2003/EC on additives for use in animal nutrition, replacing Directive 70/524/EEC on additives in feed-stuffs, Brussels, 22 December.
- Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H. (1957) A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Bio. Chem.* 226, 497-507.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
- Higgins, D. A. 1975. Physical and chemical properties of fowl immunoglobulins. *The Vet. Bull.* 45: 139-154.
- Higgins, J. P., S. E. Higgins., J. L. Vicente., A. D. Wolfenden., G. Tellez and B. M. Hargis. 2007. Temporal effects of lactic acid bacteria probiotic culture on *Salmonella* in neonatal broilers. *Poultry Science*. 86:1662-1666.
- Hofmann, K., Hamm, R. and Bluchel, E. 1982. New information on the determination of water binding in meat by the filter paper press method. *Fleischwirtsch.* 62:87-94.
- Hong, B. J., J. S. Oh., B. W. Kim and B. S. Park. 2008. Effect of feeding dietary pitamin as a organic livestock feed additives in laying hens. *Korean Association of Organic Agriculture*. 16: 205-218.
- Horobin, A. J., K. M. Shakeshef and D. I. Pritchard. 2005. Maggots and wound healing: an investigation of the effects of secretions from *Lucilia sericata* larvae upon the migration of human dermal fibroblast over a fibronectin coated surface. *Wound Rep. Reg.* 13:422-433.
- Jaklic, D., A. Lapanje, K. Zupani, D. Smrke and N. Gunde-Cimerman. 2008. Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria. *J. Med. Microbiol.* 57:617-625.
- Jang, A., C. R. Cho, B. S. Park and K. J. Yoon. 2007. Separation of antibacterial low molecular peptides from *Musca domestica* maggot against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin resistant enterococcus (VRE). 2007 International Symposium and Annual Meeting. The Korean Society of Food Science and Nutrition., October 17-19. p 275.
- Jones, T. F., M. E. Kellum., S. S. Porter., M. Bell and W. Schaffner. 2002. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus*. Emerg. Infect Dis. 8:82-84.
- Lerch, K., H. J. Linde, N. Lehn and J. Grifka. 2003. Bacteria ingestion by blowfly larvae: an in vitro study. *Dermatology*. 207:362-366.
- Liang, Y., J. Wang., X. Zhao., X. Du and J. Xue. 2005. Molecular cloning and characterization of cecropin from the housefly (*Musca domestica*), and its expression in *Escherichia coli*. *Dev. Comp. Immunol.*30:249-257.
- Matyar, F., S. Dincer, A. Kaya and O. Colak. 2004. Prevalence and resistance to antibiotics in Gram negative bacteria isolated from retail fish in Turkey. *Ann. Microbiol.* 54:151-160.
- Morrison, W. R., and L. M. Smith. 1967. Preparation of fatty acid methylesters and dimethylacetals from lipid with boron fluoride methanol. *J. Lipid Res.* 5:600-608.
- Munoa, F. J., and R. Pares. 1988. Selective medium for isolation and enumeration of bifidobacterium SPP., *Applied and Environmental Microbiology*. 54:1715-1718.
- Naeemi, E. D., N. Ahmid, T. K. Al-Sharrah, and M. Behbahani. 1995. Rapid and simple method for determination of cholesterol in processed food. *Journal of AOAC Int.*78:1522-1525.
- National Research Council. 1994. Nutrients requirements of poultry. 9th rev. National Academy Press, Washington DC. USA.
- Patterson, J. A. and K. M. Burkholder, 2003. Application of prebiotics in poultry production. *Poult. Sci.* 82: 627-631.
- Perl, T. M. 1999. The threat of vancomycin resistance. *Am. J. Med.* 106(5A):6S-37S.
- Raharjo S, Sofos JN. 1993. Methodology of measuring malonylaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: a review. *Meat Sci* 35:145-169.
- SAS. 2004. SAS/STAT User's Guide: Statistics. Version 9.1. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina. USA.
- Scot PIL training manual. 1994. Glasgow Univ. UK.
- Shakibaie, M. R., K. A. Jalilzadeh and S.M. Yamakanamardi. 2009. Horizontal transfer of antibiotic resistance gene among gram negative bacteria in sewage and lake water and influence of some physico-chemical parameters of water on conjugation process. *J. Environ. Biol.* 30:45-49.
- Sherman, R. A., M. J. R. Hall and S. Thomas. 2000. Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annu. Rev. Entomol.* 45:55-81.
- Tako, E., R. P. Glahn., R. M. Welch., X. Lei., K. Yasuda and D. D. Miller. 2008. Dietary inulin affects the expression of intestinal enterocyte iron transporters, receptors and storage protein and alters the microbiota in the pig intestine. *Brit. J. Nutr.* 99: 472-480.

- Tian G, Yu B. 2001. Recent advances in flavour of chicken quality. *Chin Sichuan Anim Sci Vet Med* 28: 54-55.
- Tizard, B. 2002. The avian antibody response. *Seminars in avian and exotic pet medicine*.11:2-14.
- Toroglu, S., E. Toroglu, S. Dincer, C. Kara and M. Kertmen. 2009. Resistances of antibiotics and heavy metals in *Enterobacteriaceae* spp. isolated from gills and intestines of *Acanthobrama marmid* (Heckel, 1843) from Sir Dam lake Turkey. *J. Environ. Biol.* 30:23-31.
- Toroglu, S., S. Dincer and H. Korkmaz. 2005. Antibiotic resistance in gram negative bacteria isolated from Aksu river in (Kahramanmaras) Turkey. *Ann. Microbiol.* 55:229-233.
- Turnidge, J. 2004. Antibiotic use in animals—prejudices, perceptions and realities. *J. Antimicrob.Chemother.* 53: 26-27.
- Vistnes, L. M., R. Lee and G. A. Ksander. 1981. Proteolytic activity of blowfly larvae secretions in experimental burns. *Surgery.* 90:835-841.
- Walker, W. A. and L. C. Duffy, 1998. Diet and bacterial colonization: Role of prebiotics and probiotics. *Nutr. Biochem.* 9: 668-675.
- Wang, Y. C. and D. X. Sun. 1997. The assay of composition and physicochemical characteristics of antibacterial matters from housefly larvae. *Acta. Microbiol. Sinica.* 37:148-153.
- Yoon, K. J., B. S. Park, A. Jang, C. R. Cho, S. K. Lee, M. H. Lee, K. S. Kim and H. T. Kim. 2008. Separation methods of low molecular sizds eptide and ethanol extract aith anti-MRSA activity from *Musca domestica*. Korea Patent. 10-0823298.
- Young J. F., J. Stasted., S. K. Jensen., A. H. Karlsson and P. Henckel. 2003. Ascorbic acid, α -tocopherol, and oregano supplements reduce stress-induced deterioration of chicken meat quality. *Poultry Sci* 82: 1343-1351.
- Zhang, W. F., D. F. Li., W. Q. Lu and G. F. Yi. 2003. Effects of isomalto-oligosaccharides on broiler performance and intestinal microflora. *Poultry Science.* 82:657-663.