

보안 과제( ), 일반 과제(○) / 공개(○), 비공개( ), 발간등록번호(○)

발간등록번호

11-1543000-003589-01

# 생물적 발효과정을 이용한 곤충 키틴발효 사료첨가제 생산기술개발 및 산업화 최종보고서

2021. 6. 18.

주관연구기관 / 농업회사법인(주)한국유용곤충연구소  
협동연구기관 / 가천대학교  
협동연구기관 / 전남대학교

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “생물적 발효과정을 이용한 곤충 키틴발효 사료첨가제 생산기술개발 및 산업화”(개발기간 : 2019. 05. ~ 2021. 01.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 6. 18.

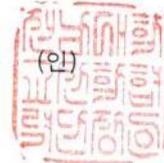
주관연구기관명 : 농업회사법인(주)한국유용곤충연구소 (대표자) 양영철 (인)



협동연구기관명 : 가천대학교 산학협력단 (대표자) 황보택 (인)



협동연구기관명 : 전남대학교 산학협력단 (대표자) 민정준 (인)



주관연구책임자 : 박 영 규

협동연구책임자 : 박 제 권

협동연구책임자 : 이 봉 주

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	농식품연구성과후속지원사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)				연구개발과제번호		819031-02	
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB0306	40%	2순위 LA0903	30%	3순위 LB0606	30%
	농림식품 과학기술분류	1순위 RA0306	40%	2순위 RA0305	30%	3순위 AB0299	30%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명	생물적 발효과정을 이용한 곤충 키틴발효 사료첨가제 생산기술개발 및 산업화						
전체 연구개발기간	2019. 05. 10 - 2021. 01. 09( 1년 8개월)						
총 연구개발비	총 345,000천원 (정부지원연구개발비: 262,000천원, 기관부담연구개발비 : 83,000천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
연구개발단계	기초[ ] 응용[ ] 개발[ <input checked="" type="checkbox"/> ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]			기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준( 3 ) 종료시점 목표( 9 )	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		선행과제로 개발된 아메리카동애등에 닭사료 첨가제의 키틴을 분해하여 대상 가축이 효과적으로 활용할 수 있는 곤충 키틴발효 사료첨가제의 개발 및 산업화를 목표로 한다.				
	전체 내용		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 사료용곤충의 난분해성 키틴을 분해시킬 활성미생물의 선발 및 배양조건 규명</li> <li>○ 저분자 키틴 분해물 함유 곤충 키틴발효 사료첨가제의 면역, 항병력 효과 검증</li> <li>○ 곤충키틴 발효 미생물을 활용한 곤충 키틴발효 사료첨가제 대량생산 및 산업화</li> </ul>				
	1단계 (해당 시 작성)	목표					
		내용					
n단계 (해당 시 작성)	목표						
	내용						
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 키틴분해를 위한 사료용곤충의 대량생산 및 제형화(유용곤충) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 아메리카동애등에 대량사육 및 생물학적 키틴분해를 위한 전처리 기술 개발</li> </ul> </li> <li>○ 사료용곤충의 난분해성키틴을 분해시킬 활성미생물의 탐색 및 선발(가천대) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 키틴분해 미생물 분리 및 동정</li> <li>- 곤충키틴 발효 산물의 생물, 생화학적 특성 규명 및 세포독성 확인</li> <li>- 곤충키틴 분해산물 생산을 위한 대량 반응 조건 확인</li> </ul> </li> <li>○ 곤충 키틴발효 사료첨가제의 기능성 효과 검증(전남대) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 가금류 육계에서의 생산성적 및 도체 육질 특성 효과검증</li> <li>- 육계에서의 면역, 항병력 효과 검증</li> </ul> </li> <li>○ 곤충키틴 발효 미생물을 활용한 기능성 가축 사료첨가제 제작(유용곤충) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 키틴발효미생물 배양조 구축중(1차 액상배양, 2차 고상발효 균주 선발완료)</li> </ul> </li> </ul>						

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 곤충키틴 발효 최적조건 규명을 통한 발효조 및 가공 장비 구축중</li> <li>- 곤충 키틴발효 사료첨가제 시제품개발(1), 기술실시(2), 매출(9건), 고용창출(1명) 및 상표(2), 특허(1) 출원 완료</li> </ul>
--	---

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 개발된 곤충 발효 사료첨가제는 가금류(육계)의 면역증강을 위한 사료첨가제 시제품으로 개발하여 농가 판매에 활용 계획임 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 가금류: 발효라바피드 상표출원 및 시제품 개발완료</li> </ul> </li> <li>○ 제품화: 개발된 곤충 키틴발효 사료첨가제는 키틴분해 및 곤충발효산물 함량을 달리한 다양한 첨가 사료로 응용하여 제품화 할 계획임 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 대상 가축 축종별(양돈, 양어 등)로 확대 적용할 계획임</li> <li>- 반려동물 및 애완동물용 사료첨가제로 제품화할 계획임</li> </ul> </li> <li>○ 미래 원천기술 확보: 개발된 곤충키틴 분해미생물과 발효미생물을 활용한 대량 배양 기술은 현재 산업 곤충인 식용, 약용, 사료용 곤충에 모두 적용할 수 있는 원천기술로 활용할 계획임</li> <li>○ 신산업창출: 개발된 곤충키틴발효 사료첨가제는 다양한 곤충의 수요확대를 통해 산업곤충시장의 확대에 기여할 계획임 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 반려동물 및 관상어류, 관상 조류의 기능성 사료첨가제로 활용할 계획임</li> <li>- 양식어류(민물, 해수) 및 기능성어종에 대한 질병예방과 면역력 증가를 위한 안전하고 효율적인 단백질 먹이원으로 활용할 계획임</li> </ul> </li> </ul>
---------------------	--

연구개발성과의 비공개여부 및 사유

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
2		1										
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	사료곤충		키틴		미생물		발효		산업화			
영문핵심어 (5개 이내)	Feed additive insects		Chitin		Microorganisms		Fermentation		Industrialization			

## 〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	5
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용	15
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	23
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)	143
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	144
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	145

별첨자료 (참고 문헌 등)

# 1. 연구개발과제의 개요

## ■ 연구개발 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

2014년부터 2016년 까지 농림축산식품부 농생명산업기술개발사업을 통해 개발된 아메리카동애등에 닭사료첨가제를 사업화하였으나 최근까지 소비자의 선호도가 높지 않아 산업화가 미흡하였다.

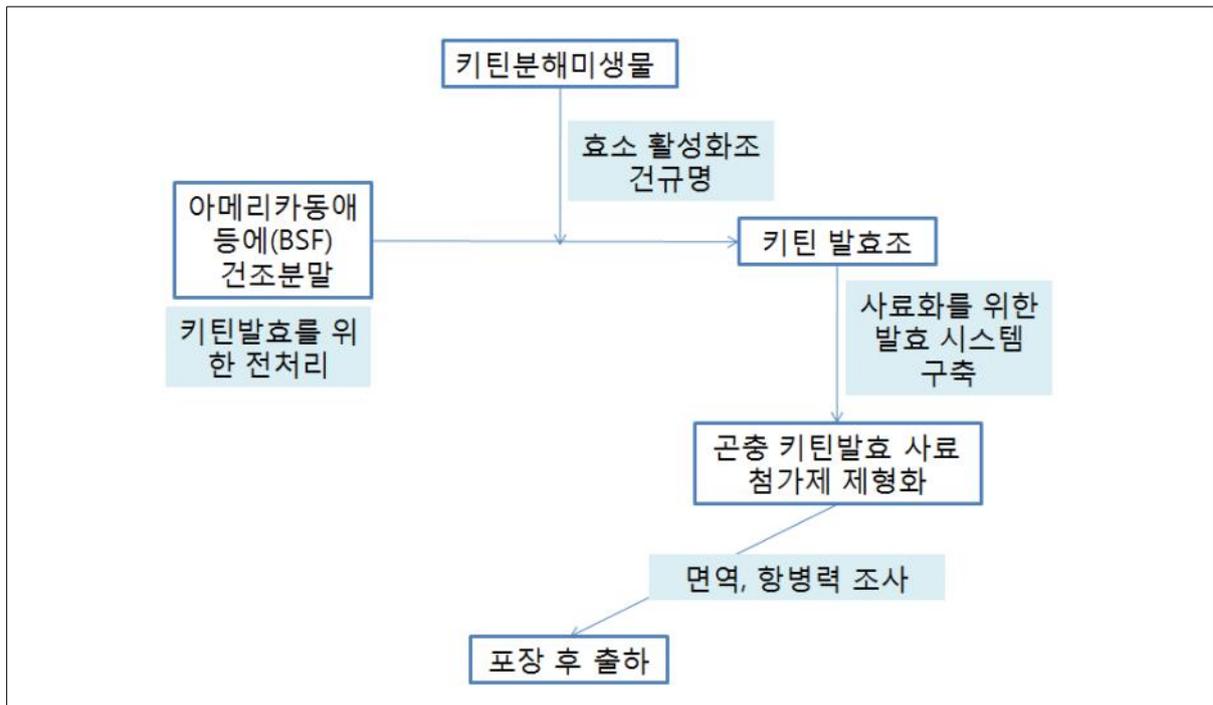
그 이유는 기 개발된 사료곤충의 키틴이 난분해성으로 곤충사료의 효과를 높이기 위해서는 키틴을 저분자로 분해시켜 가축이 효과적으로 흡수하며 면역과 관련된 키틴분해산물의 기능성이 필요하다는 것을 확인하였다.

이에 따라 본 과제는 기 개발된 곤충유래 닭사료 첨가제의 완성도를 높이는 제품개발을 위해 키틴을 분해(효소 소화)하는 미생물을 이용하여 분해하고 생성된 생성물을 사료첨가제로 개발하여 산업화하기 위한 기술개발을 목적으로 한다.

가. 최종목표: 아메리카동애등에 유충을 이용한 닭사료 첨가제의 키틴 발효를 통해 면역, 항병력을 향상시킨 기능성 곤충 키틴발효 사료첨가제 개발 및 산업화

### 나. 주관기관(한국유용곤충연구소)의 목표

- (1) 아메리카동애등에의 대량생산 및 키틴분해를 위한 전처리 기술개발
- (2) 곤충 키틴발효 시스템 구축 및 이를 이용한 곤충 키틴발효 사료첨가제 대량생산 및 산업화



### 다. 제1협동(가천대)기관의 목표

- (1) 곤충 유래 키틴질의 유효 사료화를 위해 기질 특이적 효소 생산 위한 미생물

분리 및 동정을 통해 미생물 소재 확보는 고가의 효소를 구입하지 않고 직접 생산하여 적용하여 곤충 유래 단백질, 지질 및 고분자 다당체인 키틴을 탄소원으로 활용하여 기능성 사료 제조 및 대상 동물들에 적용.

(2) 키틴의 생물효소학적 분해 메커니즘에 대한 기본 지식을 바탕으로 효소의 적용 및 활성 기반 키틴질의 저분자 최적화를 확립하고 대사산물의 세포독성을 확인하여 대상 동물들의 사료 첨가제로 사용함으로써 소화율 및 대사량 증대를 도모함.

(3) 곤충 유래 키틴의 저분자화에 따른 항산화 및 대상 동물들의 장내 세균 밸런스를 확인하고 사료 첨가에 따른 생리학적 영향을 확인.

#### 라. 제2협동(전남대)기관의 목표

(1) 곤충 키틴발효 사료첨가제의 육계 생산 성적 평가

(2) 곤충 키틴발효 사료첨가제의 육질 및 도체특성 평가

(3) 곤충 키틴발효 사료첨가제의 면역증강 효과 평가

(4) 곤충 키틴발효 사료첨가제의 살모넬라 인공감염에 대한 항병력 효과 평가

## 2. 연구개발의 필요성

### 2-1. 연구개발의 필요성 및 핵심기술

#### 가. 연구개발의 필요성

(1) 최근 사료곤충자원에 대한 관심이 급증함에 따라 다양한 사료곤충이 출시되고 있다. 그러나 주관기관에서 개발한 “라바피드”를 비롯하여 곤충유래 가축 사료는 키틴의 활용도가 낮아 가축사료 시장개척에 어려움이 있다. 따라서 이러한 문제점의 근본적인 해결이 필요하다.

(2) 그동안 연구되어온 곤충키틴의 분해 및 발효는 일부 식용곤충을 이용한 장류개발 및 해충방제용 키틴분해 미생물의 활용에 국한되어 있다. 따라서 키틴분해 미생물을 통한 곤충 키틴발효산물을 사료 첨가제로 산업화하기 위해서는 경제성 있는 효소반응 최적화 조건의 배양 시스템을 구축하여 연중 대량생산한 후 산업화할 필요성이 있다.

(3) 가금류 사육에서 가장 문제되는 조류독감(AI) 등 질병의 예방을 위한 면역력 향상이 가능한 기능성 사료첨가제의 필요성이 매우 크다.

(4) 사료용 곤충이 가금류농장에 판매되어지고 있으나 면역력 향상 등에 대한 검증할 수 있는 자료가 부족하여 소비자의 만족도를 충족시킬 수 있는 곤충 키틴발효 사료첨가제의 효과 검증이 필요하다.

#### 나. 연구개발의 핵심기술

(1) 아메리카동애등에의 대량생산 및 키틴분해를 위한 제형화 기술

① 대상 사료용 곤충의 연중사육이 가능한 양산시스템 가동 기술

② 효율적인 키틴분해를 위한 아메리카동애등에 전처리(건조, 탈지, 분쇄) 기술

(2) 산업화를 위한 키틴 발효 시스템 구축 및 이를 이용한 사료곤충 상품화

① 대량의 키틴분해를 위한 경제적인 키틴발효 시스템 구축 기술

② 최종 생산된 곤충 키틴발효 사료첨가제의 제형화 및 상품화 기술

(3) 곤충키틴을 분해할 수 있는 미생물의 탐색 및 선발

- ① 키틴분해 미생물의 분리 및 동정 기술
- ② 선발된 미생물을 통한 곤충 키틴분해산물의 생물, 생화학적 특성 및 세포독성 확인 기술
- ③ 곤충 키틴 분해산물 생산을 위한 대량 반응 조건 확립 기술

(4) 가금류(육계)를 대상으로 곤충 키틴발효 사료 첨가제의 면역기능 향상 효과 검증

- ① 곤충 키틴발효 사료 첨가제를 급여한 육계의 면역증강 효과 조사
- ② 곤충 키틴발효 사료 첨가제를 급여한 육계의 항병력 효과 조사

■ 연구개발 대상의 국내외 현황

1. 국내 기술 수준 및 시장 현황

가. 기술현황

- (1) 국내에서 생물학적(미생물이용 효소분해)으로 곤충의 키틴을 분해하여 활용하는 기술은 해충방제용이나 유기농비료의 목적으로 연구되어 사용된바 있으나 가축 사료용으로는 아직 연구되거나 상용화되어지지 않았다.
- (2) 화장품소재 및 식용곤충에 대해 일부 화학적 방법으로 곤충키틴을 분해한 연구 및 기술은 있으나 분해 과정이 어렵고 비용이 고가여서 가축사료로서 산업화가 어렵다. 또한 화학물질을 사용함으로써 가축의 먹이로 직접 활용할 수 없는 문제도 발생한다.
- (3) 최근 곤충을 발효시켜 식품소재(장류, 소스류 등)로 개발하려는 연구들이 진행 중에 있으나 이는 곤충의 단백질 분해효소를 주로 활용하는 것으로 아직 표준화된 기술로 발전되지 못하였다. 그리고 곤충소재의 발효를 위한 전처리 과정 및 미생물의 적용 방식 등이 사료용으로 대량생산하여 산업화하기위한 본 연구와는 다르다.

나 시장현황

- (1) 국내 사료곤충시장은 2017년부터 본격적으로 생겨나기 시작하였으며 일부 생산업체(주식회사씨아이이에프, 한국유용곤충연구소 등)에서 대량생산 및 가공의 기술적인 문제를 극복하여 어분과의 가격경쟁력을 좁히고 있어 시장이 점차 확대되고 있다.
- (2) 곤충키틴의 분해를 통한 발효산물의 시장은 곤충의 단백질 사료 첨가제로서의 가치를 보다 높여 양식어류 및 축산업에서 가축의 천연 항생제 및 면역증강제로서의 기능을 기대 할 수 있어 그 시장이 매우 크다.
- (3) 곤충 발효사료 및 키틴발효 사료첨가제의 활용은 단백질을 필요로 하는 다양한 종류의 양어, 가금류 등의 사료뿐 아니라 반려동물, 애완동물 및 관상어류, 관상조류 등의 시장을 개척 할 수 있다.

다. 경쟁기관현황

- (1) 국내 최대 사료곤충생산업체인 (주)씨아이이에프는 주관기관과 기술협약을 맺은 상호우호적인 관계의 기업으로서 현재 사료곤충을 일일생산량 5~15톤 규모로 연중 생산하여 전국 축산농가 및 양어농가에 판매하고 있다. 앞으로 사료곤충을 활용한 다양한 상품화에 함께 기술적으로 협업관계가 형성될 수 있어 경쟁기관이라 할 수 없다.
- (2) 국내 최대 사료곤충생산업체인 (주)씨아이이에프는 주관기관과 기술협약을 맺은 상호- 국내 사료곤충 생산업체 중 아메리카동애등애를 사업화하는 경쟁업체 및 농가는 동애등애를 사육하는 장치를 판매, 분양하는 곳이 대부분이며 일부 산업곤충 사육농가 등에서 여름철만 직접 사육하여 활용하는 수준이다. 이러한 경우 연중 대량사육이 필요한 사료첨가제 시장에 진출하기는 어려워 본사와 경쟁기관이라 보기 어렵다. (청계농장(경남), 엔토모(충북), 그린테코(충남) 등).

라. 지식재산권현황

- (1) 국내 키틴분해에 관련된 특허는 화학적인 키틴의 분해 및 활용에 관한 것이며 생물학적으로 키틴을 분해하여 활용하는 것들은 병해충방제용, 작물보호용 유기질 발효비료의 제조법(소멸특허, KR19980710364A) 등이 있다.
- (2) 2017년 국내에 공개된 국제 특허 출원된 기술로서 키틴, 가수분해물, 및 효소가수분해에 의해 곤충으로부터 하나 이상의 관심 생성물을 생산하는 방법이 공개중이다.

\* 회피방안 및 차별화: 본 과제는 곤충으로부터 생성물을 생산함을 목적으로 하는 것이라기보다는 생물학적으로 안전한 방법으로 키틴을 분해하고 그 과정에서 곤충의 유용성분인 단백질 및 무기질 등을 유지 또는 일부 소화흡수가 유리하게 발효시키는 과정을 거친 후 남은 산물을 화학적 후처리 또는 분리 정제과정 없이 건조 및 제형화하여 사료첨가제로 직접 활용하는 것으로 차별화된다. 또한 본 과제 수행 중 상기 특허와 다른 새로운 미생물과 이 미생물이 생성하는 효소의 차별화가 있으며 대상곤충에 대한 시료 전처리 과정 및 발효조건 규명을 통해 차별화된 공정을 구축하여 사료첨가제를 개발하는 것으로서 회피할 수 있는 방안 마련 중임.

번호	발명의 명칭	권리현황
KR19980710364A	키틴비드, 키토산비드, 이들비드의 제조방법 및 이들비드로 이루어지는 담체 및 미포자충포자의 제조법 {CHITIN BEADS, CHITOSAN BEADS, PROCESSES FOR PRODUCING THESE BEADS, CARRIERS MADE OF THESE BEADS AND PROCESSES FOR PRODUCING MICROSPRODIDIAN SPORES}	일본에서 출원한 국제 특허로 현재 권리 소멸됨
KR20000021742A	고분자 키틴, 키토산을 이용한 감귤 병충해 방제방법 {Method for Prevention of Damages of a	거절특허

	Tangerine by Blight and Harmful Insects Using Chitin, Chitosan):	
KR20120075343A	곤충 키틴-결합 도메인이 부착된 백강균 재조합 키티나제 및 이의 용도{Beauveria bassiana recombinant chitinase with attached insect chitin-binding domain and uses thereof}	거절특허
KR20177020949A	키틴, 가수분해물, 및 효소 가수분해에 의해 곤충으로부터 하나 이상의 관심 생성물을 생산하는 방법	프랑스에서 출원한 국제특허로 현재 공개중

### (3) 표준화현황

표준화 대상	국내 표준화 현황
키틴분해를 통한 키토산의 생산	화학적, 물리적 방법을 통한 키틴의 분해에 대한 표준화된 방법은 연구결과 및 특허들이 있다. 또한 유전자재조합 미생물을 활용하여 생성된 키틴분해효소를 이용한 방법 등도 연구되어지고 있다.
키틴분해 미생물을 이용한 곤충키틴분해	키틴분해 미생물을 이용한 표준화 방법은 단백질의 제거한 후 키틴분해 효소를 활용하는 방법을 활용함

### (4) 기타현황

분야	국내전문가(소속기관 및 연구내용)
아메리카동애 등에 사료화기술 및 산업화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 씨아이이에프(음식물건조사료를 이용한 동애등에 대량사육 및 상품화)</li> <li>- 한국유용곤충연구소(음식물건조사료를 이용한 동애등에 대량사육 및 닭사료첨가제 개발 및 상품화)</li> <li>- 농촌진흥청(아메리카동애등에 계대사육 및 실내 실험)</li> <li>- 엔토모(남은음식물을 이용한 아메리카동애등에 사육 장치)</li> <li>- 그린테크(남은음식물을 이용한 아메리카동애등에 사육 장치)</li> <li>- 그 외 비연속적 사육을 통한 직접 활용 농가 등</li> </ul>
키틴분해 미생물	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 전남대학교(해충방제용 키틴분해미생물)</li> <li>- 전남대학교(갈색거저리 키틴, 키토산 제작 및 수율조사)</li> <li>- 가천대학교 등</li> </ul>
사료곤충 활용 및 효과 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 강원대학교(사료용곤충 활용 사료첨가제 개발)</li> <li>- 전남대학교(아메리카동애등에 급여 육계의 항병력, 면역증강효과 규명)</li> </ul>

## 2. 국외 기술 수준 및 시장 현황

### 가. 기술현황

- (1) 세계적으로 2010년을 전후하여 사료곤충인 아메리카동애등에를 대량 사육하여 산업화하는 기업들이 생겨나고 있으며 각 기업은 독자적인 기술을 확보하고 있다.
- (2) 사료곤충의 활용은 동물성단백질원이 필요한 양식어류를 대상으로 어분을 대체하는 방향과 가금류 및 대가축 그리고 애완동물 등에 주로 적용되고 있으며 가장 활발한 활동을 하는 곳은 북미 유럽을 포함하여 중국, 한국, 동남아 등이다.
- (3) 세계적으로 곤충의 키틴을 분해하여 사료로 활용하는 기술은 아직 연구되거나 상용화되어지지 않았다.

나. 시장현황

세계적인 사료곤충의 시장은 해마다 어분가격의 상승 및 양식어업의 증가로 인해 매우 유망한 산업으로 확대되고 있다. 이에 따라 국내에서도 사료곤충을 연중 대량사육하는 기업이 생겨나 시장을 개척하고 있으며 국내 유명 사료회사에서도 많은 관심을 갖고 있다.

다. 경쟁기관현황

국제적인 경쟁현황으로서는 사료곤충의 가격적인부분에서 중국에서 생산되는 제품이 수입될 경우 일부 발생할 수 있으나 생산기술의 자동화 시스템 구축을 통해 가격경쟁력은 극복할 수 있을 것으로 보인다.

표. 아메리카동애등에의 사료화 업체 및 국가(2016)

Protix Biosystems - Netherlands
Jagran - Netherlands
Blacksoldierfly.nl - Netherlands
Hermetia - Germany
Ynsect - France
Vjur - Iceland
BioFlyTech - Spain
R&D & Production, Entomotech S.L. - Spain
Entologics - Spain/brazil
Pupa Planet - Spain
Agriprotein - South Africa
The Biocycle - Agriprotein side venture
Enviroflight - Ohio
Organic Value Recovery Solutions - Georgia
Green Waste Technologies - New Jersey
ESR International - Texas
Enterra Feed - British Columbia
Urban feed company - Jamaica
Co-Prot - Phnom Penh

출처: <http://www.blacksoldierflyfarming.com/forum/4-black-soldier-fly-discussions/1162-bsf-commercial-companies-industrial-agricultural>

라. 지식재산권현황

- 최근 곤충의 키틴분해에 대한 국제 특허 들이 아래와 같이 출원되었으며 북미 유럽과 함께 중국에서 다양한 특허들이 출원되고 있다.

- 일반적으로 키틴은 갑각류로부터 추출하여 키틴, 키토산으로서 화장품조성물, 의학용 소재(제약조성물, 화상치료, 생체물질, 각막 드레싱, 봉합물질 등), 식품 영양학 및 식품 가공, 공업적 활용 등에 널리 활용되고 있다.
- 대부분의 키틴은 갑각류를 포함한 키틴을 많이 함유하고 있는 생물로부터 화학적으로 추출된다. 따라서 화학시약의 환경오염 및 독성으로 인한 부작용이 발생할 수 있다.
- 따라서 생물학적인 방법인 효소분해를 이용하기도하나 이러한 생물학적 분해는 순수한 키틴을 얻기 위한 정제과정이 필요하며 유전자재조합미생물을 활용할 경우 미생물의 순수분리 및 정제에 높은 수준의 기술과 막대한 비용이 소요된다. 따라서 이러한 방법으로 추출된 키틴분해산물은 가격이 비싸 가축 및 동물의 사료로 활용할 수 없어 그러한 연구 및 특허는 세계적으로 없는 실정이다.

표. 특허분석자료(2018년, 한국특허전략개발원 IP-R&D 전략지원사업 분석결과)

번호	발명의 명칭
WO90014071A2	COSMETIC PREPARATIONS
WO98051711A1	CHITIN BEADS, CHITOSAN BEADS, PROCESS FOR PREPARING THESE BEADS, CARRIER COMPRISING SAID BEADS, AND PROCESS FOR PREPARING MICROSPORIDIAN SPORE
WO98051712A1	CHITIN BEADS, CHITOSAN BEADS, PROCESSES FOR PRODUCING THESE BEADS, CARRIERS MADE OF THESE BEADS AND PROCESSES FOR PRODUCING MICROSPORIDIAN SPORES
WO08053192A2	METHODS OF PRODUCING MICROPARTICLES
WO10086754A2	COSMETIC OR DERMATOLOGICAL PREPARATION COMPRISING COLLAGEN, CHITOSAN, GLYCOSYLAMINOGLYCAN AND CELL GROWTH PROMOTING PEPTIDE AND/OR CELLULAR COMPLEX
WO12175738A1	PROCESS FOR MAKING CHITIN DERIVATIVES
WO16108035A1	CHITIN, HYDROLYSATE AND PRODUCTION OF AT LEAST ONE DESIRED PRODUCT FROM INSECTS BY MEANS OF ENZYMATIC HYDROLYSIS, COMPRISING A COMBINATION OF STEPS PERFORMED PRIOR TO THE ENZYMATIC HYDROLYSIS
WO16108033A1	CHITIN, HYDROLYSATE AND METHOD FOR THE PRODUCTION OF ONE OR MORE DESIRED PRODUCTS FROM INSECTS BY MEANS OF ENZYMATIC HYDROLYSIS
WO16108034A1	CHITIN, HYDROLYSATE AND METHOD FOR THE PRODUCTION OF ONE OR MORE DESIRED PRODUCTS BY MEANS OF ENZYMATIC HYDROLYSIS, INCLUDING PRE-TREATMENT WITH AN OXIDISING AGENT
US5053113	Method of chitin production from chitin containing raw materials
US6156330	Chitin beads, chitosan beads, process for preparing these beads, carrier comprising said beads, and process for preparing microsporidian spore
US20050249691A1	Cosmetic or dermatological preparation comprising a nutrient medium phase
US20050004057A1	Chitosan oligosaccharides and uses thereof
US8518422	Cosmetic or dermatological preparation comprising a nutrient medium phase
US20070167400A1	Chitosan oligosaccharides and uses thereof
US20090099347A1	CHITOSAN PRODUCTION

US9066885	Advanced functional biocompatible polymeric matrix containing nano-compartments
US2010022138 2A1	CELL WALL DERIVATIVES, THEIR PREPARATION PROCESS, AND USE THEREOF
US2012032913 5A1	Process for Making Chitin Derivatives
US2014010036 1A1	EXTRACTION OF CHITINS IN A SINGLE STEP BY ENZYMATIC HYDROLYSIS IN AN ACID MEDIUM
US9708634	Process for making chitin derivatives
US2018001635 7A1	CHITIN, HYDROLYSATE AND METHOD FOR THE PRODUCTION OF ONE OR MORE DESIRED PRODUCTS FROM INSECTS BY MEANS OF ENZYMATIC HYDROLYSIS
US2018000245 2A1	CHITIN, HYDROLYSATE AND METHOD FOR THE PRODUCTION OF ONE OR MORE DESIRED PRODUCTS BY MEANS OF ENZYMATIC HYDROLYSIS, INCLUDING PRE-TREATMENT WITH AN OXIDISING AGENT
US9982393	Chitosan as a biobased barrier coating for functional paperboard products
KR1996003027 8A	키틴 또는 키토산 소재를 이용한 사과원의 병해충 방제법{METHOD OF PREVENTING HARMFUL INSECTS OF APPLE FARM USING CHITIN OR CHITOSAN}
JPH01-187076 A	반찬류의 제조법
JPH03-228888 A	유기질발효 비료의 제조법
JP3368323B9	키틴 비드, 키토산 비드, 이것들 비드의 제조 방법 및 이것들 비드로부터 이루어지는 담체 및 미포자벌레포자의 제조법
JP2003-183296 A	글루코사민 또는 (및) 키토산 저중합체 조성물의 제조법
JP2010-511417 T	미립자를 제조하는 방법
JP2012-516841 T	콜라겐, 키토산, 【구리코시루아미노구리칸】 및 세포 증식 촉진 펩티드 및 / 또는 세포복합체 로 된, 화장품 또는 피부과학적 조제물
JP2014-522240 T	산성매질중에서의 효소가수분해를 이용한 단일공정에서의 키틴 추출
JP2018-502203 T	키틴, 가수분해물 및 곤충을 효소 가수분해해서 1개이상의 원하는 산물을 생산하는 방법
EP00913407B1	CHITIN BEADS, CHITOSAN BEADS, PROCESSES FOR PRODUCING THESE BEADS, CARRIERS MADE OF THESE BEADS AND PROCESSES FOR PRODUCING MICROSPORIDIAN SPORES
EP01455802B1	USES OF CHITOSAN OLIGOSACCHARIDES
EP02340856B2	Cosmetic or dermatologic formulation comprising a nutrient medium phase
EP02340856B1	Cosmetic or dermatologic formulation comprising a nutrient medium phase
EP02723879A1	PROCESS FOR MAKING CHITIN DERIVATIVES
EP03240904A1	CHITIN, HYDROLYSATE AND PRODUCTION OF AT LEAST ONE DESIRED PRODUCT FROM INSECTS BY MEANS OF ENZYMATIC HYDROLYSIS, COMPRISING A COMBINATION OF STEPS PERFORMED PRIOR TO THE ENZYMATIC HYDROLYSIS
EP03240903A1	CHITIN, HYDROLYSATE AND METHOD FOR THE PRODUCTION OF ONE OR MORE DESIRED PRODUCTS BY MEANS OF ENZYMATIC HYDROLYSIS, INCLUDING PRE-TREATMENT WITH AN OXIDISING AGENT
CN1044748A	Preparation and usage of seed-treating agent using chitin as raw material

CN1085675C	Method for extracting and preparing chitin and chitosan
CN1176949C	Chitin beads, chitosan beads, process for preparing these beads, carrier comprising said beads, and process ofr preparing microsporidian spore
CN1406589A	Insect health-care products for liver and stomach and preparation thereof
CN1184237C	Preparation of crust oligosaccharide and use
CN1559227A	Method for producing yield increaser
CN1293259C	Chitosan antibacterial knitted wool face fabric
CN1664225A	Chitosan antibacterial finishing agent
CN101117359B	Edible insect chitosan and production method and use thereof
CN101144097B	Method for preparing chitin and its chitosan and chitosan oligosaccharide
CN101565470B	Method for preparing chitin and chitosan from dendrolimus punctatus larvae
CN102050883B	Method for extracting chitosan from yellow mealworm shell
CN101624427A	Arginine-chitosan with high degree of substitution, preparation method and application thereof
CN102558387A	Method for extracting chitin and antibacterial peptide from fly larvae
CN101869185B	Feed additive for improving flavor of livestock meat and prolonging shelf life of livestock meat
CN102276758B	Method for comprehensively utilizing insect Chinese medicine dregs
CN103857799A	Process for making chitin derivatives
CN102898544A	Method for extracting chitosan from environment-friendly insects
CN103005211A	Application of calcium-chitosan organic calcium supplement to animal feed
CN103880519B	Walnut late frost antifreeze
CN103875672B	Walnut early frost antifreeze
CN106832052A	Method for preparing fly maggot chitosan
CN104961844A	Method for preparing chitosan from low-age insect larvae at normal temperature
CN104878057A	Large-scale production method for tenebrio molitor chitosan
CN107428849A	CHITIN, HYDROLYSATE AND METHOD FOR THE PRODUCTION OF ONE OR MORE DESIRED PRODUCTS FROM INSECTS BY MEANS OF ENZYMATIc HYDROLYSIS
CN107257860A	Chitin, hydrolysate and method for the production of one or more desired products by means of enzymatic hydrolysis, including pre-treatment with an oxidising agent
CN106279727A	Preparation method of chitosan microspheres
CN106333906A	Repairing emulsion
CN106421886A	Hydrogel dressing for repairing wounds and preparation method of hydrogel dressing
CN106243245A	Chitosan preparation method
CN106832054A	Chitosan extraction and preparation method
CN108220361A	A Sow bugs chitosan extraction method and its application
CN108239182A	A aspongopus chitosan extraction method and its application

\* 회피방안: 국내외 특허 중 미생물을 이용한, 효소 가수분해에 의해 곤충으로부터 생성물을 생산하는 방법에 대한 특허 등에서의 전처리 및 효소 가수분해 과정과 유사할 수 있으나 본 과제에서는 순수한 키틴을 분리하고 생성물을 생산하기위한

목적이 아닌 사료곤충의 키틴성분을 일정량 발효하여 가축이 소화 흡수하기 유리하도록 제형화하기 위한 것이다. 따라서 분류 동정된 새로운 키틴분해 미생물을 활용하고 시료 전처리 및 발효과정을 거쳐 후처리 과정 없이 직접 활용 할 수 있는 사료첨가제를 개발하는 것으로서 차별화될 수 있음.

마. 표준화현황

국외 곤충의 키틴을 분해하는 표준화된 연구는 화학적인 방법과 물리적인 방법을 병행하는 분해가 대부분이며 2017년 공개된 특허에서 단백질 분해효소와 키틴분해 효소를 이용한 곤충의 생성물에 대한 표준화된 방법이 소개되어있다. 하지만 이러한 특허 및 연구들은 모두 식용, 약용으로 순수한 키틴을 얻기 위한 것이다.

바. 기타현황

국외 동태 등에 및 사료곤충 기업체 현황

**Table 1. Representative Companies in 2016 Regarding Commercial Production of Black Soldier Fly (BSF) Larvae**

Company	Founded	Comments
Agriprotein <sup>1</sup>	2010	Working with The Biocycle Grow Out Facility, a support affiliate, the company claims at a feed rate of about 700 to 800 Kg per day to be producing 1 ton BSF per week.
BioFly Tech <sup>2</sup>	2012	The company's website suggests its primary focus is on R&D and consulting services generally related to diptera.
Enviroflight <sup>3</sup>	2009	The company claimed it had achieved "commercial scale production" in 2012, and its CEO claims the company's technology can presently produce 40 lbs larvae every 10 days per 7 sq. ft. space, and estimates it can produce 300 tons larvae/yr/3600 sq ft. The company claims to be economically viable with 17 employees on its payroll.
Enterrafeed <sup>4</sup>	2007	The company claims to support 24 full-time jobs at its Langley, BC, farm facility while processing 100 tons preconsumer food waste per day (36,000 tons/yr) and harvesting 20 tons larvae per day (5,400 tons/yr/hectare) on a 14 day feeding cycle.
JM Green <sup>5</sup>	2012	The company claims in a YouTube video that its technology can produce from 100 tons of food waste per day 20 tons of larvae per day and 40 tons of fertilizer.
Oversol <sup>6</sup>	2010	The company claims to have developed a unique "OVERSol process" in commercial scale production of BSF.
Protix Biosystems <sup>7</sup>	2009	Hypothetical and potential benefits emphasized on the company's website, but specifics are lacking on its actual production output and scale up of BSF operations.
Ynsect <sup>8</sup>	2011	The company website does not provide sufficient information or data to ascertain how far along the company is in operating a scaled up commercial BSF processing facility.

<sup>1</sup>www.agriprotein.com/; <sup>2</sup>www.bioflytech.com/en; <sup>3</sup>www.enviroflight.net/; <sup>4</sup>www.enterrafeed.com/; <sup>5</sup>www.jmgreen.cn/; <sup>6</sup>www.organicvaluerecovery.com/; <sup>7</sup>www.protix.eu/; <sup>8</sup>www.ynsect.com/

출처: <http://www.dipterra.com/blog.html?entry=commercial-black-soldier-fly-bsf>

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### ■ 연구개발의 목표 및 수행내용

#### 가. 최종목표

아메리카동애등에의 키틴을 분해하여 키틴발효 사료첨가제를 개발하여 산업화

- (1) 아메리카동애등에의 대량생산 및 키틴분해를 위한 제형화
- (2) 키틴분해미생물 분류 동정
- (3) 곤충 키토산 발효를 통한 키틴 산물의 생물, 생화학적 특성 규명 및 세포독성 확인
- (4) 곤충 키토산 사료 급여 육계의 면역, 항병력 규명
- (5) 곤충 키틴발효 사료첨가제 대량생산 및 산업화

#### 나. 세부목표

(1) 아메리카동애등에의 대량생산 및 키틴분해를 위한 제형화

- ① 키틴분해를 위한 사료용곤충 대량사육시스템 가동
- ② 건조-탈지-분쇄 과정을 거쳐 키틴분해에 적합한 제형 개발

(2) 곤충키틴을 분해하는 미생물의 분류 및 동정

- ① 곤충 유래 키틴의 분리 및 함량 확인
- ② 키틴질 분해성 우수한 신규 미생물 분리 위한 콜로이달 키틴 제조

(3) 키틴분해 미생물을 활용한 곤충 키틴의 분해 공정 규명 및 대량 발효 시스템구축을 위한 최적 생산기술개발

- ① 16S rDNA 염기서열 기반 활성 미생물의 동정
- ② 분해효소 생산을 위한 배양 최적화 및 효소동력학적 특성 규명

(4) 가금류(육계)를 대상으로 키틴 분해 곤충사료의 면역, 항병력 향상 효과 검증

- ① 곤충 키틴발효 사료첨가제의 세포면역 증강효과 규명
- ② 곤충 키틴발효 사료첨가제의 항병력 효과 규명

(5) 산업화를 위한 키틴 발효 시스템 구축 및 이를 이용한 사료첨가제 상품화

- ① 키틴분해 미생물의 혼합 - 발효조에서 키틴분해 실시
- ② 상품제작을 위한 경제성 있는 키틴분해(발효)시스템 구축
- ③ 최종산물의 건조 - 파쇄 - 제형화 - 포장(곤충 키틴발효 사료첨가제로 완성)

#### 다. 연차별 개발목표 및 내용

<1차년도>

- (1) 연구개발 목표

(가) 주관연구기관(한국유용곤충연구소) :

- ① 키틴분해를 위한 아메리카동애등에 대량사육
- ② 대량생산된 사료곤충의 키틴분해를 위한 전처리(제형화) 기술개발

(나) 협동연구기관(가천대학교) :

- ① 곤충 유래 키틴의 분리 및 함량 확인
- ② 키틴질 분해성 우수한 신규 미생물 분리 위한 콜로이달 키틴 제조
- ③ 16S rDNA 염기서열 기반 활성 미생물의 동정
- ④ 분해효소 생산을 위한 배양 최적화 및 효소동력학적 특성 규명
- ⑤ 미생물 및 대사산물로 얻은 분해산물의 기초 면역 활성 및 세포독성 확인

(2) 개발 내용 및 범위 (시스템 구성도, 구조 등을 그림으로 구체적 표현)

(가) 주관연구기관(한국유용곤충연구소)

- ① 아메리카동애등에의 키틴분해를 위한 제형화(전처리) 기술개발
  - 대량생산된 곤충의 분리, 건조
  - 키틴분해에 효과적인 수분함량 선정
  - 연속형 마이크로웨이브 방식의 건조시스템 구축
  - 탈지: 착유율(%), 키틴분해 및 제형화에 효과적인 지방함유율 설정
  - 분쇄: 키틴분해에 적합한 입자로 분쇄하기위한 분쇄기 선발



[사료곤충의 키틴분해를 위한 전처리 제형화 생산 공정도]

(나) 협동연구기관(가천대학교) :

- ① 곤충 유래 키틴의 분리 및 함량 확인 - 동애등에의 탈각피나 내장 단백질을 제거한 상태의 껍질에는 대략 3% 정도의 키틴질이 포함되어 있는 것으로 파

악되어 있으나 사육 환경에 따라 차이를 나타낼 수 있을 것으로 사료됨. 따라서 발육 최적 조건에서 생육된 곤충을 분말화 한 상태에서 키틴질 분리를 위하여 일반적으로 게나 새우 유래 키틴 제조방법을 적용하여 키틴질 생산 최적 조건 확립. 또한 수율 확인을 위해 연구실에서 이미 확립 또는 사용하고 있는 총탄수화물 정량법을 기반으로 수율을 계산.

② 키틴질 분해성 우수한 신규 미생물 분리 위한 콜로이달 키틴 제조 - 효소의 기질 특이성을 높혀 효소활성이 우수한 미생물 분리 및 효소 활성 확인을 위해 가장 중요한 기질이 바로 콜로이달 키틴으로 매우 중요한 준비 사항. 이를 위해 상기 기술한 바와 같이 키틴질 분리에 이어 일반적으로 사용되고 있는 게 껍질 유래 키틴을 활용한 콜로이달 키틴 제조법을 적용, 키틴 분해효소인 키틴아제 (chitinase) 생산 미생물 생육에 이용, 다양한 환경 조건에 생육하는 키틴질 분해 미생물 분리가 가능. 이를 위해 필요한 기질로서 상기 기술한 바와 같이 곤충 유래 키틴을 활용한 콜로이달 키틴 제조 및 이에 대한 기질 특이성을 바탕으로 다양한 종의 활성 미생물 활성 미생물의 분리 동정. 효소 활성에 따른 생물자원의 확보는 연구/산업/경제에 미치는 영향이 높아 매우 중요함.

③ 16S rDNA 염기서열 기반 활성 미생물의 동정 - 새로 분리한 키틴 분해 활성 미생물의 동정을 위해 16S rDNA 염기서열을 결정하고, 이를 기반으로 계통학적 분류를 수행, 계통수 확보 및 미생물 종의 다양성에 대한 중요한 정보 확보. 분해효소의 활성을 바탕으로 미생물 종 간의 환경생태학적 특성으로 고려하여 배양 및 효소 생산 최적화 확립. 새로운 종의 미생물 자원 확보와 이를 활용한 효소의 생산 시스템 구축으로 본 연구에서 추구하는 곤충 유래 키틴질 분해와 이를 활용한 기능성 사료개발이 가능할 것으로 크게 기대됨. 또한, 여러 효소학적 특성을 규명하기 위해 유사한 미생물 자원 확보를 위해 chitinase 유전자 정보를 바탕으로 primers 제조, PCR 또는 RT-PCR을 수행하여 최소 5 종 이상의 유용 미생물 확보를 목표로 하며 각 미생물의 대사 산물에 대한 기초 면역활성과 세포 독성을 확인함으로써 제2협동 연구기관의 유연한 연구 대응에 도움을 제공.

④ 분해효소 생산 위한 배양 최적화 및 효소동력학적 특성 규명 - 콜로이달 키틴을 유일한 탄소원으로 하여 배양, 온도, pH, 반응시간 등 효소 생산의 최적화를 바탕으로 곤충 분말을 기질로 하여 분리 동정한 미생물들을 배양, 적응 단계를 거쳐 곤충분말을 부분적으로 분해시켜 사료화를 추구 할 수 있는 방안 모색. 또한, 콜로이달 키틴이나 곤충 분말을 활용하여 배양하고, 여기서 생산된 효소를 곤충 분말에 직접 적용하는 방법으로 효소 활성 정도를 규명. 온도, pH, 이온 등의 영향을 고려한 효소 반응 최적화 조건하에서 효소의 기질에 대한 동력학적 특성 규명을 위해 기질의 농도와 활성반응속도 확인에 따른 Km/Vmax 값을 구하고, 이러한 효소학적 특성을 기반으로 특허, 논문, 그리고 기능성 사료 개발을 통해 고부가가치 및 지역 경제 활성화에 총력을 다함.

<2차년도>

(1) 연구개발 목표

(가) 주관연구기관(한국유용곤충연구소)

- ① 곤충 키틴 발효 시스템 구축 및 이를 이용한 키틴발효 사료첨가제 상품 양산 및 산업화

(나) 협동연구기관(전남대학교)

- ① 가금류(육계)를 대상으로 곤충 키틴발효 사료첨가제의 면역, 항병력 효과 검증

(2) 개발 내용 및 범위

(가) 주관연구기관(한국유용곤충연구소) :

- ① 대량사육된 사료곤충을 키틴발효용으로 전처리 후 배합기에 투입
- ② 키틴분해 미생물의 혼합 및 발효(효소 소화): 발효에 도움이되는 영양분 등 공급
  - 발효조에서 일정기간 발효를 통한 키틴분해(효소반응 최적화 조건 적용)
- ③ 최종산물의 건조 - 파쇄 - 제형화 - 포장(곤충 키틴발효 사료첨가제로 완성)



사료곤충

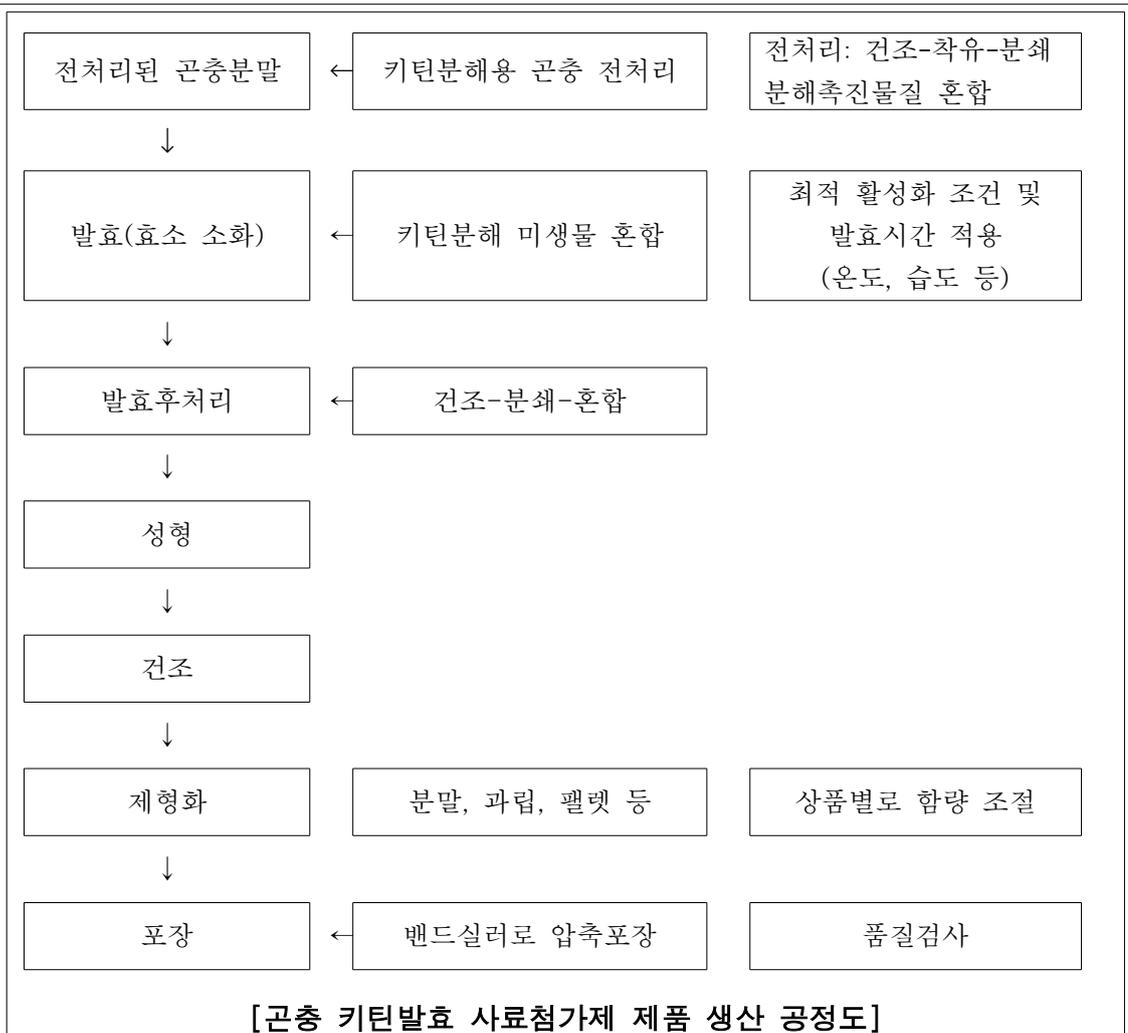
연속형 자동건조기

착유

분쇄 발효

발효후처리  
제형화  
포장

[시제품 생산 공정도]



(나) 협동연구기관(전남대학교)

**① 곤충키틴분해 사료첨가제의 육계 생산 성적에 미치는 영향 규명**

**▶ 실험동물 군 분리**

1일령 Ross 육계를 5개의 군으로 나누어 농도별로 곤충키틴분해 사료첨가제를 급여하여 그에 대한 효과를 평가한다.

- Control군 : 일반사료 급여군
- 1% 군 : 곤충키틴분해 사료첨가제 1% 급여군
- 2% 군 : 곤충키틴분해 사료첨가제 2% 급여군
- 4% 군 : 곤충키틴분해 사료첨가제 4% 급여군
- 8% 군 : 곤충키틴분해 사료첨가제 8% 급여군

**▶ 평균체중 측정**

- 체중은 실험 시작 당일로부터 실험 종료 시까지, 1주일 간격으로 처리군별로 닭의 체중을 측정한다. 측정된 군의 총 무게를 사육두수로 나누어 평균 체중을 산출하여 대조군과 처리군 간의 차이가 있는지 확인한다.

▶ **평균증체량과 평균사료섭취량 평가**

- 육계의 증체율과 사료섭취량의 변화를 확인하기 위해 1주일 간격으로 처리군별로 닭의 체중 및 사료의 잔량을 측정한 후, 평균증체량과 평균사료섭취량을 확인한다.

▶ **사료효율성(Feed efficiency) 평가 : 사료요구율 (Feed conversion ratio, FCR )**

- 사료요구율은 매주 사료섭취량을 증체율로 나누어 계산한다.

② **곤충키틴분해 사료첨가제의 도체특성 및 육질에 미치는 영향 규명**

▶ **닭고기의 일반성분 분석**

- 닭고기의 일반성분 분석은 사양시험종료 후 닭의 가슴살부위를 적출하여 분쇄하여 수분, 지방, 단백질, 회분등을 분석한다.

▶ **닭고기의 가열감량 분석**

- 가열감량 측정은 시료를 원형의 일정한 모양으로 정형 (250± 50g)하여 polyethylene bag에 넣어 80℃ Water bath에 넣고 물 속에 완전히 잠기도록 한 후 40분간 가열한 후, 20분간 수냉하여 시료의 표면 물기를 닦아내고 전자저울로 시료의 무게를 측정하여 구한다.

▶ **닭고기의 전단력 분석**

- 전단력 측정은 가열감량을 측정한 후 근섬유 방향과 평행하게 직경 0.5 inch의 코아로 시료를 채취한 다음 전단력 측정기 (warner-Bratzler shear meter)로 전단력을 측정한다.

▶ **닭고기의 보수성 분석**

- 보수성 측정은 시료 300mg의 육을 취해서 여과지 위에 놓은 후 두개의 조임 나사가 달린 plexi-glass판 위로 일정한 힘으로 윗판 나사를 조여서 육에 압력을 가하고, 정확히 5분후 나사를 풀어서 고기로부터 나온 수분의 면적(T)과 육의 면적(M)을 planimeter를 이용하여 구하고 보수성 공식에 따라 보수성을 측정한다.

$$\text{보수성(\%)} = \text{육의 면적(M)}/\text{수분의 면적(T:총면적)}$$

▶ **닭고기의 pH 분석**

- pH 측정은 세절육 10 g에 증류수 90mL을 가하고, homogenizer (NS-50, Japan)로 10,000 rpm에서 1분간 균질한 후, pH meter (ATI 370, Orion Research Inc, USA)기를 이용하여 측정한다.

### ③ 곤충키틴분해 사료첨가제의 비특이 면역증강 효과 규명

#### ▶ 곤충키틴분해 사료첨가제의 급여에 의한 대식세포 활성화 측정

##### - Lysozyme activity 측정

96-well microtiter plate의 각 well에 200ul씩의 *M. lysodeikticus*-용액을 넣는다. *M. lysodeikticus*-용액이 첨가된 각 well에 미리 농도 별로 준비한 standard lysozyme 또는 각 시료를 20ul씩 첨가한다. 41°C에서 1시간동안 배양하며 15분 간격으로 흡광도를 측정 한 후 (540nm). Standard curve에 시료의 시간에 따른 흡광도의 변화를 대입하여 구한 다음, 혈청 lysozyme 농도를 비교 측정함으로써 대식 세포의 활성을 평가한다.

#### ▶ 곤충키틴분해 사료첨가제의 급여에 의한 림프구증식강화효과 확인

##### - 세포증식능 측정

48시간 동안 배양된 세포 각 well에 MTT solution을 20ul씩을 첨가 후, 4시간동안 더 배양한다. 배양 후, 원심분리 (3000xg, 20min, 4°C)를 실시한다. 상층액을 모두 제거하고 DMSO 200ul 씩을 각 well에 첨가하여 모든 세포가 녹을 때까지 10분간 흔들어 준다. 최종적으로 540nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 증식정도를 측정한다.

#### ▶ 면역 사이토카인 발현 정도에 있어 곤충키틴분해 사료첨가제의 급여가 미치는 영향

- 비장 림프구로부터 Real-time PCR을 이용한 상대적 사이토카인 발현 측정 cDNA를 template로 하여 MyiQ™ real-time PCR detection system (Bio-165 Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 Interleukin (IL)-1β, IL-4, IL-2, IL-12, Interferon-gamma, Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α)의 상대적 발현도를 측정한다.

#### ▶ 곤충키틴분해 사료첨가제의 급여에 따른 면역세포 분포 분석

##### - 림프구와 세포 표면 항원 마크와의 반응

림프구를 FITC-conjugated anti-chicken CD4 (BD Biosciences)와 PE-conjugated anti-chicken CD8 (BD Biosciences)으로 1시간동안 4°C에서 반응시킨다. 반응이후, PBS로 2회 세척하고 FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences)를 이용하여 림프구의 분포를 분석한다.

#### ▶ 곤충키틴분해 사료첨가제의 급여가 혈액조성에 미치는 영향

- 혈액성상변화에 사료첨가제 급여가 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위하여, 투여 후 혈액을 채취하여 혈액내의 백혈구수와 적혈구수 및 혈소판 수치 등을 조사한다. 혈구의 측정은 Multi-species Blood cell Analyzer (HEAVET 850, CDC, USA)을 이용하여 측정한다.

④ 닭에서 곤충키틴분해 사료첨가제의 항병력 효과 규명

▶ 병원성 *Salmonella*에 대한 인공감염 실험

- 인공감염 실험 전에 실험에 사용할 각 축종 별 분변에서 XLD agar를 이용하여 살모넬라균을 분리 배양하고, 혈청을 분리하여 살모넬라균에 대한 항체보유여부를 ELISA 방법을 이용하여 확인하여 살모넬라 감염여부를 확인한다.
- 공격접종균주로 *Salmonella Gallinarum*을 사용하며, nutrient broth (Difco)에서 37C에서 over night 배양하여  $1 \times 10^9$ cfu/ml의 농도로 조정하여 경구 접종을 실시한다.

▶ *S. gallinarum* 공격 접종 이후 육계에서의 생존을 및 임상증상 발현 확인

- 공격접종 후 매일 닭의 건강상태를 측정하여 침울정도, 체온, 분변의 상태, 체중 등을 측정한다.
- 선행연구에 의해 접종후 3일차부터 폐사가 발생하는 상황을 주시하고 매일 생존율을 조사한다.

▶ 공격 접종후 세균수조사 : 분변, 간, 장, 장간막림프절내(부검 후) *Salmonella* 균수

- 분변, 장, 장간막림프절 1g을 취하여 멸균된 PBS 9 ml 에 넣고 vortexing한 다음 적정 농도까지 계단희석을 한다. 살모넬라 선택배지에 희석액 0.1ml를 접종하여 37C에서 1-2일간 배양 후 집락을 계수한다. 집락수는 확산 집락이 없고 30-300개의 집락이 있는 평판을 선택하여 계수한다.

▶ 병리해부학적 검사 : 육안적 소화기계 병변 검사와 조직학적 변화 조사

- 각 공시축을 부검하여 육안적인 병변(장점막 충혈 등)을 조사한다.
- 조직학적 변화 조사 : 간, 비장 및 맹장의 조직을 채취하여 10% 중성 포르말린에 고정시킨다. 고정된 조직은 파라핀에 봉입한 후, 4 $\mu$ m 두께의 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin 염색을 실시한 후 광학현미경하에서 조직학적 변화와 병변의 분포를 조사한다.

▶ 면역능 변화검사

- 세포성 면역 : 공격 접종 후 혈액 및 비장의 면역 세포(T cell 과 B cell)를 분리하여 유세포분석기를 이용하여 CD4 T cells, CD8 T cells 및 B cells 등의 분포율을 비교분석 한다.

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

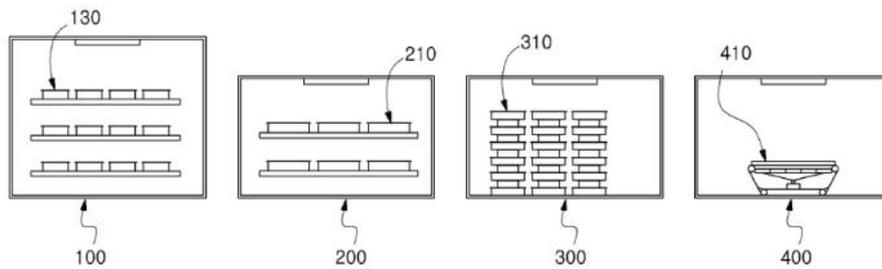
#### ■ 1차년 연구개발 결과 및 성과

제1세부과제: 한국유용곤충연구소

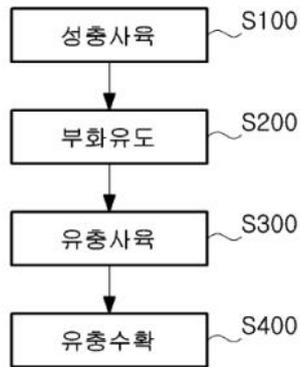
#### 1. 사료용곤충 대량사육 및 키틴분해를 위한 제형화(전처리)

가. 동애등에 대량사육시스템

: 선행과제 결과로 도출된 특허내용을 활용한 동애등에 대량사육시스템 구축



도면2



나. 아메리카동애등에 대량사육 및 가공시스템

(1) 국내 아메리카동애등에 대량생산 및 가공 시스템







연속형 마이크로방식 및 기본형 마이크로웨이브 건조방식

라. 착유시스템: 동애 등에 지방분리를 위한 다양한 착유기술 및 기계 점검

- (1) 키틴발효를 효율적으로 진행하기 위해 지방의 함량을 가장 많이 추출할 수 있는 착유기술 점검
- (2) 현재 진행중인 사업을 통해(농림부 사료곤충산업화 지원사업 진행중) 구축
- (3) 대용량 고효율 착유시스템을 적용하여 지방 함량 10% 이내로 유지할 수 있는 장치 도입 계획

① 국내에서 활용중인 착유시스템



비가열식 식용곤충 착유기  
(10~15kg/h)



가열식 식용곤충 착유기

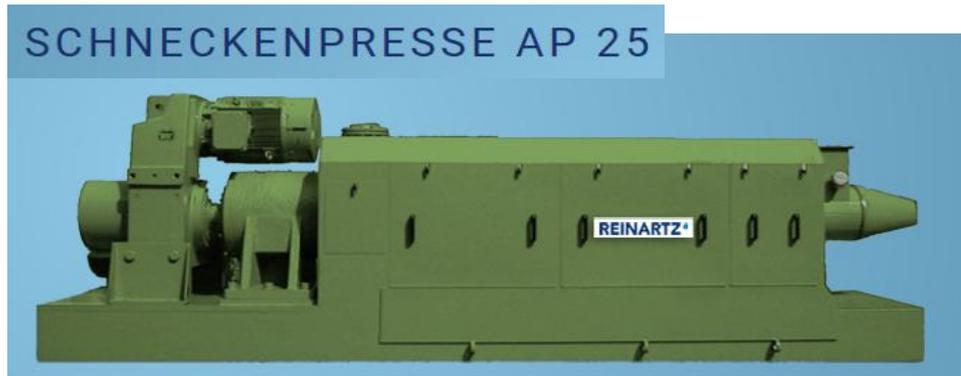
경남진주 곤충산업화지원센터

② 대용량 고효율 착유기(식용 곡류 oil 추출용, 식용, 사료용 곤충 oil 추출용, made in Germany): 착유용량 : 30kg~1,500kg/h



TECHNISCHE DATEN

Länge	1.800 mm	VERARBEITUNGSKAPAZITÄT	VERARBEITUNGSKAPAZITÄT
Breite	500 mm	FÜR RAPS:	FÜR ANDERE ÖLSAATEN:
Höhe	800 mm	Stundendurchsatz	Stundendurchsatz
Nettogewicht	400 kg	Jahresdurchsatz	Jahresdurchsatz
Leistung	4 kW	(ca. 8.000 h / Jahr)	(ca. 8.000 h / Jahr)
		320 t	240 t



TECHNISCHE DATEN

Länge	6.000 mm	VERARBEITUNGSKAPAZITÄT	VERARBEITUNGSKAPAZITÄT
Breite	1.500 mm	FÜR RAPS:	FÜR ANDERE ÖLSAATEN:
Höhe	2.300 mm	Stundendurchsatz	Stundendurchsatz
Nettogewicht	21.500 kg	Jahresdurchsatz	Jahresdurchsatz
Leistung	90/110 kW	(ca. 8.000 h / Jahr)	(ca. 8.000 h / Jahr)
		14.400 t	12.000 t



기존 착유시스템(지방 20% 내외)      신규 착유시스템(지방 10%이내)  
고성능 착유기로 착유한 후 분쇄한 동애등에분말 비교

마. 분쇄시스템: 동애 등에 착유분말을 초미분으로 분쇄하기 위한 다양한 분쇄기술 및 기계 점검

(1) 키틴발효를 효율적으로 진행하기 위해 입자를 최대한 작게 분쇄할 수 있는 분쇄기술 점검

(2) 현재 진행중인 사업을 통해(농림부 사료곤충산업화 지원사업 진행중) 구축 가능성 검토

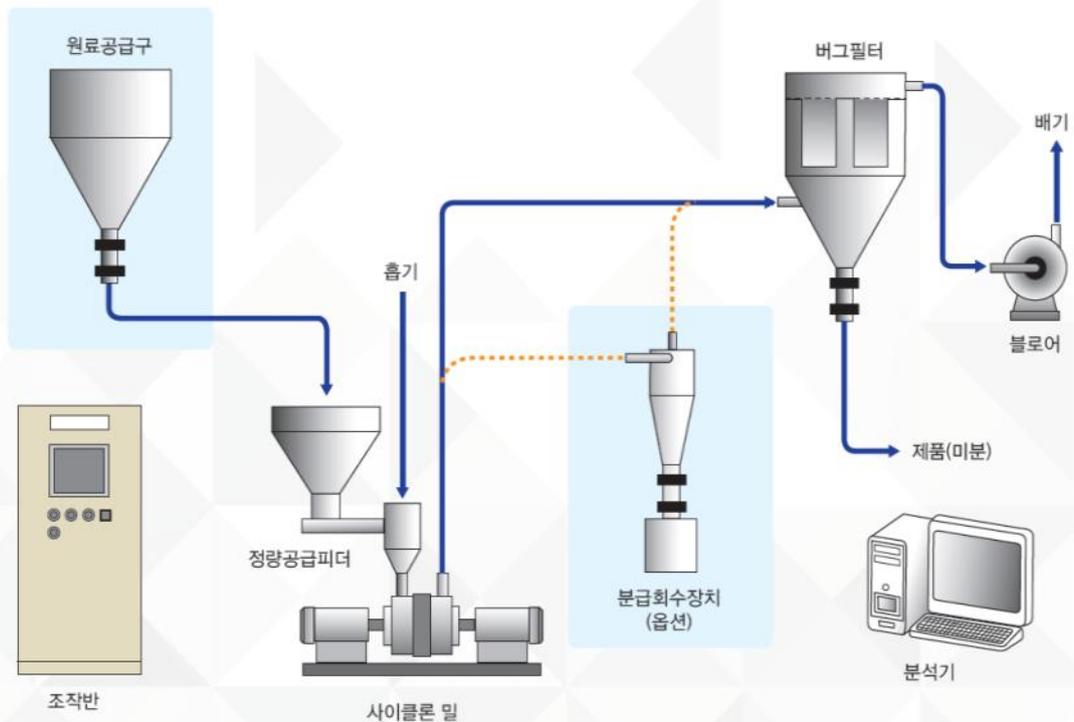


사이클론밀 400SS형

주요제원	성능 및 사양
임펠러 직경	400mm
임펠러 날 수	8개
임펠러 재질	스테인레스·그외
회전수	2,000~4,000rpm
분쇄입도	150 $\mu$ m~
처리능력	350~500kg/h
본체모터용량	200V 22kw
배풍모터용량	200V 7.5kw
기본모델치수(본체)	(폭)750mmX(길이)900mmX(높이)1,850mm
기본모델중량	본체 3,500kg

\*기계를 작동시키기 위해서는 컴프레서, 수돗물, 전기가 필요합니다.  
\*처리능력은 원료·입도·분쇄목적에 따라 다릅니다.

### 시스템 구조





초미립자분체기술(한국분체기술)

바. 발효시스템: 동애등에 착유분말을 키틴분해 미생물과 혼합하여 발효하는 기술 및 기계 점검

- (1) 발효를 효율적으로 진행하기위해 교반, 숙성, 건조, 제형화가 가능한 기술 점검
- (2) 현재 진행중인 사업을 통해(농림부 사료곤충산업화 지원사업 진행중) 구축 검토

**발효기**

원발효 미생물발효기는 별도의 전기 공급없이 기본전력만으로도 발효가 가능하며 설계되어 사양가의 부담을 대폭 줄였으며 부산물의 특성에 맞게 원하는 대로 교반기능을 자동설정 할 수 있어 축산 농가의 사용이 더욱 편리해 졌으며, 기존의 발효 기능뿐만 아니라 수분이 많은 부산물도 신속히 건조시킬 수 있는 다양한 기능을 업그레이드 했.

유기성부산물을 이용하여 발효사료를 만들어 급여하였을 사료비 30~50% 절감이 가능하다.

대한대동테크 DAEDONGTECH

DDK-825F

Fermentation Mixer DDK-825F

미생물발효사료제형기 DDK-825F

최대 교반 속도 1500rpm

최대 건조 온도 100°C

최대 건조 시간 30~60분 (가변)

사료비 절감 시스템

순천시 고품유용미생물 생산시설

목적: 생산된 고품유용미생물을 농장마다에 판매하여 축산농가 소득 증대 및 축산농가의 생산성 향상을 위한 사업

장점: 고품유용미생물 생산시설

생산공정: 1. 배양기, 2. 발효기, 3. 건조기, 4. 포장기, 5. 포장기, 6. 포장기

기타: 부대시설, 시공자

공정별 미생물 발효 생산 시설 시스템 구축

최대 교반 속도 1500rpm, 최대 건조 온도 100°C, 최대 건조 시간 30~60분 (가변), 사료비 절감 시스템

1. 배양기, 2. 발효기, 3. 건조기, 4. 포장기, 5. 포장기, 6. 포장기

## 2. 발효 실증시험

가. 1차(2019. 6. 17)

: 예비실험 샘플용기이용(고초균, 유산균)

(1) 예비실험을 위해 분양받은 미생물을 이용하여 동애등에 50g에 물과 유산균, 당밀 총합을 50ml을 넣어 약 50~60% 수분함량을 맞춘후 샘플플라스틱 밀폐용기에 넣고 발효과정을 관찰하였음.

		
종균분양(곡성군농업기술센터) : 고초균, 유산균	동애등에분말 계량	수분함량설정을 위한 예비실험 : 50%수분함량
		
동애등에 건조유충+ 미생물	먹바퀴사체+ 미생물처리	다양한 조건별 예비실험실시

(2) 동애등에 분말에 수분이 60%이상이면 성상이 적합하지 않은 것으로 판단되어 추후실험부터는 수분함량을 50%내외로 유지할 수 있도록 함량을 조절하였다.

아메리카동애등에 탈지분말 (지방15~19%)	1	2	3	4	5	6	7
물	50g	50g	50g	50g	50g	50g	50g
당밀	50ml	40ml	30ml	30ml	30ml	30ml	0
고초균 ( <i>Bacillus subtilis</i> )	1ml	1ml	1ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml
유산균 ( <i>Lactobacillus sp.</i> )	20ml	10ml	5ml	0.5ml	0	0.5ml	0
	0	0	0	0	0.5ml	0.5ml	30ml

날짜	1	2	3	4	5	6	7
	수분 많음	수분조 금 많 음	수분적 당함	권장혼 합비율	권장혼 합비율	혼합균	유산균 만
<b>08월 14일</b> (발효시작)	28~30℃						
08월 16일 (발효 2일차)	29.3℃	28.4℃	28.5℃	28.5℃	28.7℃	28.6℃	28.7℃
	팽창, 넘침, 악취,발 생	냄새없 음	냄새없 음	냄새없 음	냄새없 음	냄새없 음	냄새없 음
<b>08월 19일</b> (발효 5일차)	가스발 생으로 팽창	발효냄 새	발효냄 새	발효냄 새	발효냄 새	발효냄 새	발효냄 새

나. 2차(2019. 8. 14)

: 사각 밀폐용기 실험(고초균, 유산균)

- (1) 동애등에 분말 발효 실험을 위해 곡성군농업기술센터에서 분양받은 미생물 2종을 이용하여 동애등에 3kg에 물과 발효균, 당밀을 넣어 약 50% 수분함량을 맞춘 후 플라스틱 밀폐용기에 넣고 발효과정을 관찰하였음.
- (2) 발효를 위해 각각의 밀폐용기를 37℃ 배양기에 넣고 3주간 발효과정을 유지하였음.
- (3) 1주일 간격으로 발효 후 샘플(100g)을 수거하여 제1협동기관에 성분분석을 의뢰하여 성상변화를 조사함.



그림. 사각 밀폐용기에서 발효중인 동애등에분말(고초균, 유산균)

(4) 실험방법

- ① 동애등에탈지분말(3kg)+물(2L)+ 발효균(*Bacillus subtilis*)(1L)+당밀(30ml)
- ② 동애등에탈지분말(3kg)+물(2L)+ 유산균(*Lactobacillus sp.*)(1L)+당밀

(30ml)

(4) 실험결과

- ① 실험결과 발효산물의 악취가 심하여 상품화하기 어려움
- ② 실험 과정 중 다른 균에 오염이 된 것으로 판단되었다.
  - 동애등에 착유분말의 멸균과정없이 발효할 수 있는 방법 필요

다. 3차(2019. 9. 26)

: 대형 원형 배양통을 이용한 혐기발효

- 동애등에 분말 발효 실험을 위해 곡성군농업기술센터에서 분양받은 미생물 2종을 이용하여 동애등에 15kg에 물과 발효균, 당밀을 넣어 약 50% 수분함량을 맞춘 후 60L 플라스틱 밀폐발효용기에 넣고 발효과정을 관찰하였음.
- 발효를 위해 각각의 밀폐용기를 37℃ 배양기에 넣고 1주일간 발효과정을 유지하였음.
- 1주일발효 후 수거하여 건조기로 건조한 후 제1협동기관에 성분분석을 의뢰하여 성상변화를 조사함.
- 발효 후 건조과정중 심한 악취 발생



그림. 원형 배양통(60L)내 발효중인 동애등에분말

라. 4차(2019. 10. 16)

: 방선균, 유산균, 광합성균 3종을 이용한 실험(호기발효실험)

- 동애등에 분말 발효 실험을 위해 기술자문위원인 원천바이오 김남천소장님이 보유하고 있는 종균을 이용한 발효 방식으로 동애등에와 건조비지, 밀기울, 미강, 물과 발효균, 올리고당을 넣어 약 40~45% 수분함량을 맞춘 후 교반기, 나무상자용기에 넣고 발효과정을 관찰하였음.

- 발효를 위해 각각의 배지를 따듯한 곳에 놓고 3주간 발효과정을 유지하였음.
- 발효가 끝난 후 샘플(100g)을 수거하여 제1협동기관에 성분분석을 의뢰하여 성장변화를 조사함.
- 발효 결과물에 대해 가천대학교에 분석 의뢰함



그림. 방선균, 유산균, 광합성균 3종을 이용한 호기발효 교반기 및 발효산물

마. 5차(2019년 11월)

: 키틴분해 미생물을 이용한 발효실험

성분명	실험1	실험2	실험3	실험4	실험5	실험6
동애등에분말	5kg	5kg	5kg	5kg	5kg	
곤충키틴분말 (탈피각)	-	-	-	-	-	5kg
건조비지	3kg	3kg	1kg	1kg	1kg	-
밀기울	2kg	-		1kg		
미강	-	2kg	1kg		1kg	1kg
발효균 (원천바이오)	1kg	1kg	-	-	-	-
발효균 (3종)	-	-	50ml (1.6g)	-	-	-
발효균 (가천대 선발균)	-	-	-	50ml (1.6g)	50ml (1.6g)	50ml (1.6g)
올리고당	50ml	50ml	100ml	100ml	100ml	100ml
총수분량	45~50%	45~50%	45~50%	45~50%	45~50%	45~50%

- 실험결과

날짜	번호	실내온도	배지온도(°C)		냄새유무	중량(kg)	특이사항
			오전	오후			
11월 14일	1	27	34.3			7.45+7.1	
	2	15	44.1		약간발생		
	3	27	33			10.7	
	4	27	37.7			6+6.6	
	5	27	38.7			7+5.9	
	6	27	34			5.9+6.4	

날짜	번호	실내온도	오전	오후	냄새유무	중량(kg)	특이사항
11월 15일	1	27	34.3		냄새 아주약간발생		
	2	15	44.1	43	냄새, 가스 약간발생		뭉쳐짐
	3	27	33		냄새 아주약간발생		
	4	27	37.7		냄새 아주약간발생		
	5	27	38.7		냄새 아주약간발생		
	6	27	34		냄새 아주약간발생		

날짜	번호	실내온도	오전	오후	냄새, 가스유무	중량(kg)	특이사항
11월 16일	1	27	34.3	34.2	냄새 아주약간발생		
	2	15	50?	50?	냄새, 가스, 수증기 약간 발생		뭉쳐짐
	3	27	33	34.3	냄새 아주약간발생		
	4	27	39.8	39.5	냄새 아주약간발생		
	5	27	40.4	41	냄새 아주약간발생		
	6	27	34	34.7	냄새 아주약간발생		

날짜	번호	실내온도	오전	오후	냄새유무	중량(kg)	특이사항
11월 17일	1	27	34	33.9	냄새 아주약간발생		
	2	15	55.6	54.7	가스, 수증기 대량발생		뭉쳐짐이 적음
	3	27	33	32.7	냄새 아주약간발생		
	4	27	37.4	37.4	냄새 아주약간발생		
	5	27	39.5	39.3	냄새 아주약간발생		
	6	27	34.7	34.7	냄새 아주약간발생		

날짜	번호	실내온도	오전	오후	냄새유무	중량(kg)	특이사항
11월 18일	1	27	34	35	냄새 아주약간발생	7.35+7.0 5	
	2	11	47.2	49.2	냄새, 가스, 수증기 약간 발생		17일보다 수분함량이 감소한 상태로 뭉쳐지지 않음
	3	27	32.7	31.6	냄새 아주약간발생	10.7	
	4	27	37.2	33	냄새 아주약간발생	6+6.6	무는 수분이 빠진 상태로

	5	27	39.7	34.9	냄새 아주약간발생	6.85+5.8	존재함 무는 수분이 빠진 상태로 존재함
	6	27	35.6	33.9	냄새 아주약간발생	5.9+6.4	
전체적으로 가스 및 냄새는 유사하며 4,5번의 경우 수분이 좀 더 많아서인지 온도가 높고 수분기가 더 있으며 나머지는 부스러질 정도로 수분이 없는 상태임							
<b>날짜</b>	<b>번호</b>	<b>실내온도</b>	<b>오전</b>	<b>오후</b>	<b>냄새유무</b>	<b>중량(kg)</b>	<b>특이사항</b>
11월 19일	1	27	38.2	38	냄새 아주약간발생		
	2	12	45.9	46.8	가스발생		
	3	27	32.9	33	냄새 아주약간발생		
	4	27	34.6	34.9	냄새 아주약간발생		
	5	27	38	38	냄새 아주약간발생		
	6	27	34	34.1	냄새 아주약간발생		
<b>날짜</b>	<b>번호</b>	<b>실내온도</b>	<b>오전</b>	<b>오후</b>	<b>냄새유무</b>	<b>중량(kg)</b>	<b>특이사항</b>
11월 20일	1	27	36.7	37			
	2	10	43.1		수증기, 가스발생은 많이 감소하였으며 수분 함량은 물 혼합전과 유사함		
	3	27	32.4	32.2			
	4	27	34	34.2			
	5	27	36.7	37			
	6	27	32.7	33			
<b>날짜</b>	<b>번호</b>	<b>실내온도</b>	<b>오전</b>	<b>오후</b>	<b>냄새유무</b>	<b>중량(kg)</b>	<b>특이사항</b>
11월 21일	1	27	36.9	36.9			
	2	10	43.1	40.3	교반기에서 꺼내어 건조		
	3	27	31.8	31.8			
	4	27	34.1	34.1			
	5	27	37	37			
	6	27	32.9	32.9			
<b>날짜</b>	<b>번호</b>	<b>실내온도</b>	<b>오전</b>	<b>오후</b>	<b>냄새유무</b>	<b>중량(kg)</b>	<b>특이사항</b>
11월 25일	1	27	가스 약간, 냄새는 양호함, 손으로 쥐면 뭉쳐지는 정도로 수분함유			7.25+6.9 5	
	3	27	가스 약간, 냄새는 양호함, 손으로 쥐면 뭉쳐지는 정도로 수분함유			10.7	
	4	27	샘플중 5번 이후로 가스 및 냄새가 가장 심하며 함수량도 유지중임(약 절반정도 감소하여 30% 내외로 생각됨), 무는 일부만 남고 없어져보임			5.9+6.5	
	5	27	샘플중 가스 및 냄새가 가장 심하며 함수량도 유지중임(약 절반정도 감소하여 31% 내외로 생각됨), 무는 일부만 남고 없어져보임			6.7+5.7	

	6	27	가스 없음, 냄새는 구수하여 양호함, 손으로 쥐면 뭉쳐지지 않는 정도로 함수량 적음			5.75+6.35	
<b>날짜</b>	<b>번호</b>	<b>실내온도</b>	<b>오전</b>	<b>오후</b>	<b>냄새유무</b>	<b>중량(kg)</b>	<b>특이사항</b>
12월 02일	1	27	가스 약간, 냄새는 양호함, 손으로 쥐면 뭉쳐지는 정도로 수분함유			7.2+6.8	
	3	27	가스 약간, 냄새는 양호함, 손으로 쥐면 뭉쳐지는 정도로 수분함유			6+5	
	4	27	샘플중 가스 및 냄새가 가장 심하며 함수량도 유지중임(약 절반정도 감소하여 30%내외로 생각됨), 무는 일부만 남고 없어져 보임			5.8+6.25	
	5	27	4번보다는 가스, 냄새가 적음 함수량도 유지중임(약 절반정도 감소하여 30%내외로 생각됨), 무는 일부만 남고 없어져 보임			6.5+5.6	
	6	27	가스 없음, 냄새는 구수하여 양호함, 손으로 쥐면 뭉쳐지지 않는 정도로 함수량 적음			5.7+6.25	

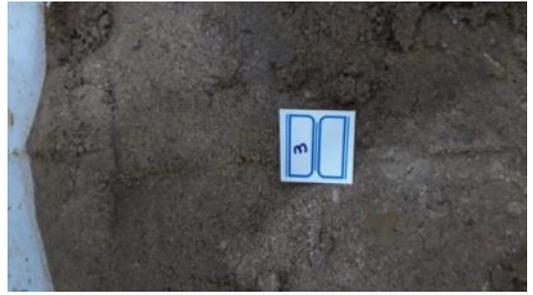
표. 처리별 균주 및 발효방법

	동애 등에 분말(kg)	부형제(kg)	균주
실험 1	5	6	3종균(광합성균, 방선균, 유산균)
실험 2	5	6	3종균(광합성균, 방선균, 유산균)
실험 3	5	4	3종균(광합성균, 방선균, 유산균)
실험 4	5	5	3종균(광합성균, 방선균, 유산균)
실험 5	5	5	3종균(광합성균, 방선균, 유산균)+유산균 3종
실험 6	5	5	유산균 3종

발효조건:

- 11월 14일~15일에 각시료를 혼합하여 발효함
- 1, 3, 4, 5, 6번은 혐기발효: 지퍼백에 넣고 27도 사육실에 보관
- 2번은 50도 가온 소형 교반기에서 15일~25일까지 교반하며 발효함





2번 통기발효(교반하면서 발효함)



그림. 동애등에 분말 발효 실험 중 온도측정

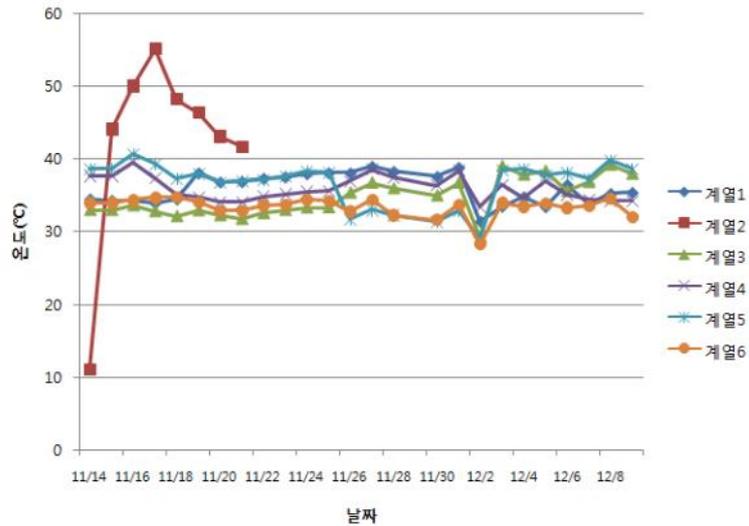


그림. 발효과정중 배지의 온도변화

발효조건: 1, 3, 4, 5, 6번은 혐기발효: 지퍼백에 넣고 27도 사육실에 보관  
2번은 45°C 가온 교반기에서 계속 교반하면서 발효함(통기발효)

바. 6차(2019년 12월)

: 가천대 선발 키틴분해 미생물을 이용한 발효실험

동애등에분말 (kg)	밀기울 (kg)	미강 (kg)	균주	올리고당 (ml)	키토산 (ml)	물 (ml)	총중량 (kg)
5	2	3	가천균 (sy02, 03)	100	100	8.55 L	10kg

실험결과:

- 12월 23일 세팅하여 30일 수거: 색상이 짙어지고 가스발생 및 악취발생
- 12월 30일 원천균 1kg + 물 1.8L를 혼합하여 1주일간 추가 발효 실시
- 1월 6일 수거하여 가천대에 분석 및 실험 의뢰  
: 발효전, 1주일후, 2주일후(3종균추가)
- 종료후 총중량 8.1kg, 15L

결과분석: 균주의 총량이 적어서 발효가 진행되지 않은 것으로 생각됨

사. 2020년 가천대 선발 균주를 전배양하여 재 실험함

실험일	동애등에 분말(kg)	밀기울 (kg)	미강 (kg)	균주	올리고당 (ml)	키토산 (ml)	물(L)	초기함수율 (%)	초기 온도 (°C)
3/27	5	2	3	가천균 sy02, sy04 각 200ml	100	100	8.35L	52~56 % (33.47 +22.5)	42.5
	함수율	온도 (°C)	발효상태				중량 (kg)		
3/28	55.92								

		42.5		
3/30	54.34	45.4	가스발생 없음, 냄새도 없음, 수증기 량 거의 없음(지난 발효와 비교하여 현저하게 발생량 적음)	
3/31	52.95	46.0	가스발생 없음, 냄새 없음, 수증기 발 생 없음	
4/1	52.29	45.6	가스, 냄새, 수증기 발생 조금 증가, 예전 12월 실험에 비하면 10%내외발 생	
4/2	52.4	45.4	가스, 냄새, 수증기 발생 거의 없음 전 시험대비 5%이하	
4/3	52.79	45	가스, 냄새, 수증기 발생 거의 없음 전 시험대비 5%이하	효소제 1kg투입
4/4	46.55			
4/5				
4/6		44.6		
4/7	43.2	30.8		실험종료

실험결과:

- 곤충에 직접 키틴분해미생물을 적용한 결과 키틴 발효 효과를 검증하기 어려웠음
- 다양한 실험결과에서 곤충분말에 직접 키틴발효 미생물을 적용하여
- 곤충분말에는 약 3~5%의 키틴이 함유되어있고 기타 다양한 영양물질로 구성되어있음
- 여러 차례의 실험에서 선발된 미생물이 키틴 외 다른 영양성분을 활용하여 증식하고 대사산물을 생성하였을 것으로 판단함
- 전문가 자문결과 키틴발효를 위해서는 액상 혐기 발효가 유리할 것으로 판단함
- 곤충분말을 액상으로 제작하여 발효하기 어려우며 액상은 제형화하기 위한 경제성이 부족하였음
- 액체사료 및 음용수의 개발이 가능하나 시장성 및 경제성을 판단하기 어려움
- 따라서 곤충의 키틴을 이용한 액상발효과정을 통해 키틴을 분해하는 것이 효율적이라고 판단함
- 키틴발효 미생물의 액상배양시 먹이가 되는 키틴성분을 곤충의 탈피각으로 제공함
- 발효후 배양된 배양액으로 곤충탈지분말을 2차 발효 할 수 있음
- 키틴발효와 2차 단백질발효를 통해 기능성이 향상된 사료첨가제를 생산하기 위해 효율적인 2차 발효균을 선발이 필요함(단백질 분해 및 유산균 등)
- 유용 균주를 선발하기위해 전남대학교, 친환경농생명연구센터, 김치연구소 전문가 자문을 진행함
- 곤충 키틴분해 미생물의 적용방법의 변경을 고려함



그림. 건조된 최종 산물

아. 2차 발효의 필요성 및 유용균주 선발

- 곤충 단백질 발효를 통한 소화 흡수력 증가
- 유산균 추가를 통한 사료첨가제의 면역력증가

자. 가천대 선발 균주와 친환경농생명연구센터의 키틴분해균을 비교실험 후 우수종 선발

- 실험결과: 가천대 선발균주 sy03을 선발함
- 후보균주로 각종 유산균과 전남대 분양균주 12종, 김치연구소의 김치 유산균에 대한 키틴분해 활력을 조사함

### 3. 상업화를 위한 미생물 균주 활용 방안

가. 미생물(1차 키틴배양과 2차 후발효에 활용할 미생물을 확보)

- ① 전라남도농업기술원 곤충잡업연구소의 식용곤충 키틴분해 미생물 *Bacillus subtilis* 균주를 분양받아 상업적으로 활용할 수 있음을 확인함(연구종료 후 기술이전 추진중)
- ② 친환경농생명연구센터의 단백질, 키틴 분해미생물인 *Bacillus licheniformis* 를 배양하여 활용(경제성분석을 위한 견적서 첨부)
- ③ 효소제로 판매중인 원천바이오의 원천효소제를 구매하여 활용(경제성분석을 위한 견적서 첨부)
- ④ 첨가유산균의 자체 배양을 통해 경제성 확보필요
- ⑤ 추후 신규 우수 균주를 분양받아 지속적으로 제품의 품질을 향상시킬 수 있는 시스템 구축

나. 곤충원료 확보

- ① 키틴배양액 제조를 위한 파리번데기 탈피각 확보  
: 파리 탈피각을 활용(천적제품 생산시 부산물인 집파리 번데기 탈피각)
- ② 1차 액체배양: 키틴분해미생물 배양을 위해 곤충 탈피각을 원료로 활용함(친환경농생명연구센터 위탁 생산 및 본사 직접배양방법 모색중)(경제성분석을 위한 위탁생산 비용 견적서 첨부)
- ③ 2차 통기발효: 일반 사료발효기를 활용하여 통기발효  
- 발효시설 및 장비 구축을 통한 경제성 있는 생산 방안 모색중

다. 산업화 전략

- ① 2년차 전남대 실증실험 결과 발효 사료첨가제의 우수성을 검증
- ② 특허출원 1건 완료를 통해 지적 재산권 확보추진
- ③ 상표출원 2건 완료
- ④ 홍보를 통한 영업 마케팅 전략수립(지자체의 가축사양관리 개선 지원사업 활용)
- ⑤ 생산 농가육성(동애등에 사육농가 육성을 통한 안정적인 생산 시스템 구축)
- ⑥ 과제 종료 후 판매계획 수립

## 2. 제 1협동과제: 가천대학교

### 1. 곤충 유래 키틴질의 유효 사료화를 위해 기질 특이적 효소 생산 위한 미생물 분리 위한 키틴 제조 및 콜로이드 키틴 제조

가. 게껍질이나 다른 어떠한 갑각류와 곤충 유래 키틴은 불용성으로 천연고분자로서의 유용성에 대한 연구보고는 많지만 사실 매우 응용연구 소재로 이용하기 힘들다. 따라서 이들 키틴질을 용해시킬 수 있는 새로운 용매들이나 그 시스템을 개발하고 있는 실정이다. 하지만, 현실적으로 경제성이나 효율적인 측면을 고려한 방법으로는 아직 고농도 염산을 사용하는 방법이 최우선으로 알고 있다.

나. 키틴을 분해하는 효소원을 탐색하는 연구는 아주 오래전부터 수행되어 왔다. 본 연구자들 역시 이러한 미생물 분리와 효소학적 특성 연구에 대한 많은 결과물들을 제시하여왔으며, 이를 위해 우선 곤충 유래 키틴과 게껍질 유래 키틴의 생화학적 특성 비교를 위해 곤충 유래 키틴을 제조하여 이를 이용한 콜로이드 키틴 제조와 미생물 분리를 목적으로 진행하였다. 따라서 실험은 하기와 같이 수행하였다.

#### 다. 실험내용 및 방법

(1) 실험은 동애등에 유래 키틴의 제조(이하 동애등에 키틴), 동애등에 키틴의 효소학적 분해와 이에 대한 환원당 정량 실험, 헥사플루오르-2-프로판올에 의한 동애등에 키틴의 용해와 이에 따른 콜로이드 키틴의 획득 및 분석 등의 실험이 진행되었으며 키틴 외에도 동애등에 추출 기름을 이용한 항산화 실험 등이 진행되었다.

(2) 곤충 (동애등에) 유래 키틴의 제조: 동애등에 유래 키틴의 제조 과정은 다음과 같다.

- ① 건조된 동애등에를 막자사발을 통해 분쇄한 뒤 속시렛 추출장비와 n-Hexane을 이용하여 기름을 추출한다 (\*추출한 기름의 활용에 대한 내용도 추가적으로 수행함)
- ② 탈지된 동애등에를 2N 염산에 넣어 탈탄산시킨다.
- ③ 탈지, 탈탄산이 완료된 동애등에를 증류수를 이용하여 중성이 되도록 세척한다.
- ④ 세척된 동애등에를 50% 수산화 나트륨과 함께 반응기에 넣고 1시간 가열 (약 섭씨90~110도)하여 탈단백시킨다.
- ⑤ ④의 과정이 완료되면 중성이 되도록 세척 후 햇빛에 두어 완전히 건조시킨다.

#### 라. 실험결과

- 결과물: 약 30% (중량비)의 키틴을 얻었다.



## 2. 동애등에 유래 키틴의 효소학적 분해

가. 키틴분해 효소를 통한 동애등에 키틴의 분해 여부 확인을 위한 실험으로 실험 후 환원당 정량법을 사용하여 키틴의 분해 여부를 확인하였다. 이 때 사용된 키틴은 두 종류로, 본 연구실에서 직접 제조한 키틴과 푸디웜 사에서 제조한 키틴 두 종류를 사용하였다.

### 나. 실험 방법

- ① 각각의 두 동애등에 키틴 0.1g PBS용액 3 ml와 chitinase 50 ul (0.5 U)를 첨가한다.
- ② 섭씨 37도의 온도에 보관하며 1일 주기로 총 9 일간 sample 200 ul씩 취한다. 이 때 채취한 sample은 냉장 보관한다.
- ③ 각 sample용액에 400 ul의 PABAH + 0.5 M NaOH용액을 첨가하여 환원당을 정량한다. 이 때 standard로는 10 mM의 glucose를 사용하였다.

### 다. 결과

(1) 유의성 없는 효소활성을 확인하였다. 이때 사용한 효소는 시판되는 상업용 효소로 일반적으로 수용성 또는 여러 pH 범위의 buffer에 잘 녹는 glycol chitin 이나 콜로이달 키틴에 적용될 때 그 효소활성이 유의적으로 나타나는 경향이 있어서 본 연구에서 진행한 제조한 키틴에 직접 적용한 상태여서 사실상 유의적 효소활성을 기대하기 매우 어려웠다. 따라서 필요시 콜로이달 키틴의 제조 및 효소활성 측정에 대한 후속적인 연구가 수행되어야 한다고 판단된다.

## 3. Hexafluoro - 2 - propanol을 사용한 키틴의 용해

가. 해당 실험은 Hexafluoro - 2 - propanol를 사용하여 키틴의 용해 유무를 확인한 실험으로 각각 본 연구실에서 제조한 동애등에 유래 키틴과 키토산, 푸디웜에서 제조한 키틴을 사용하였다.

### 나. 실험 방법

- ① 각 3종류의 키틴/키토산 0.5g에 Hexafluoro - 2 - propanol 용액을 5ml를 첨가한다.
- ② 첨가된 튜브를 봉한 뒤 shaker에 두고 용해 정도를 관찰한다.
- ③ 용해도 평가를 위한 TLC-dot blot

다. 상기 방법 1,2 과정에서 실시한 동애등에 키틴/키토산의 당 함유 여부 확인을 위한 dot blot 실험으로 실험 과정은 다음과 같다.

- ① Hexafluoro - 2 - propanol에 용해된 동애등에 키틴/키토산 용액을 2ul 씩 취하여 TLC판에 5회 점적한다.
- ② 점적 후 건조가 완료되면 당 검출 용액에 충분히 적신 후 건조시킨다.
- ③ 건조가 완료된 TLC판을 교반기를 이용하여 섭씨 190도의 온도에서 가열한다.
- ④ Dot blot이 완료된 후의 사진.

구분 : A 푸디웜 제조 동애등에 키틴  
B 연구실 제조 동애등에 키틴  
C 연구실 제조 동애등에 키토산

(\*C: 이후 키틴을 탈 아세틸화하여 키토산 제조 및 활용에 대한 추가적인 연구도 진행 함)



라. 결과

- ① 키틴을 녹일 수 있는 새롭게 알려진 용매 Hexafluoro - 2 - propanol 을 사용하여 용해성을 확인하였다. 50 ml 튜브에 키틴을 넣고 용해한 결과, 사진에서 볼 수 있듯이 용해성은 비교를 위해 타 회사로부터 제공받아 사용한 키틴과 기존의 잘 알려진 방법에 따라 직접 제조한 키틴의 용해성을 비교한 것으로 직접 제조한 키틴 샘플의 용해성이 타 회사 제공 샘플 보다 현저히 낮음을 볼 수 있었다.
- ② 이를 TLC-dot blot으로 확인하여 본 결과, 그 역시 당검출 특정 시약에서의 발색된 양이 낮은 것으로 보아 용해된 키틴의 함량이 크게 비교됨을 확인하였다.
- ③ 이러한 결과를 통해, 본 연구실에서 제조한 곤충 키틴의 경우 처리 온도나 알카리 농도 등 타 회사 제조 방법과 다소 차이가 나타날 수 있음을 알 수 있었다.

#### 4. Hexafluoro - 2 - propanol에 용해된 동애등에 키틴/키토산으로부터 colloidal chitin.의 제조

가. 본 실험은 Hexafluoro - 2 - propanol에 용해된 동애등에 키틴/키토산을 이용하여 colloidal chitin을 얻고자 하기 위함이다.

나. 실험 방법

- ① Hexafluoro - 2 - propanol에 용해된 동애등에 키틴/키토산 용액 3종을 각각 250 ul씩 취해 증류수를 이용하여 4배 희석한다.
- ② ①의 결과를 원심분리한 뒤 상층액 400 ul를 취하여 이를 에탄올을 이용하여 2.5배 희석한다.
- ③ ②의 결과를 섭씨 60도의 온도에서 휘발시키고 잔류물의 생성 여부와 무게를 통한 수율을 측정한다.

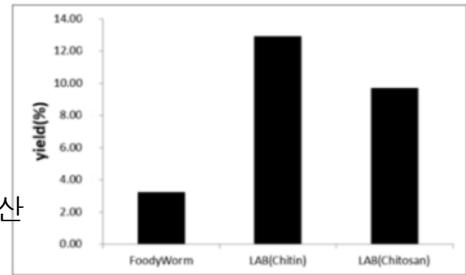
④ 동애등에 유래 키틴/키틴산의 colloidal 키틴의 수율

구분 :

FoodyWorm : 푸디웜 제조 동애등에 키틴산

LAB(chitin) : 연구실 제조 동애등에 키틴

LAB(chitosan) : 연구실 제조 동애등에 키틴산



다. 결과

- ① 본 연구를 통해 제조한 곤충 키틴은 Hexafluoro - 2 - propanol에 용해되는 정도는 낮았으나, 상기 그림에서 나타난 것처럼 오히려 콜로이드 키틴 제조 시 물에 의한 빠른 비용해성 증가로 인해 침전된 양이 많아 그 수율이 높은 것으로 판단된다.
- ② 이를 이용한 미생물 분리용 배지 제조와 미생물 분리 등 후속적인 연구에 활용이 기대되는바, 곤충 유래 키틴을 분해하는 미생물 분리화 효소학적 연구의 기초과정으로 유의적 성과라 판단된다.

5. 동애등에 유래 기름의 항산화능 연구 (\* 추가연구)

가. 본 실험은 -1에서 시행한 동애등으로부터의 탈지 과정에서 얻어진 산물인 동애등에 유래 기름에 대한 연구이다

나. 실험 방법

(1) ABTS

- ① 0.1%의 Ascorbic acid 용액 50ul를 튜브에 넣는다
- ② 동애등에 추출 기름을 50ul를 넣는다. 이 때 사용한 기름은 n-Hexane으로 추출한 기름으로, 추출된 기름의 농도는 100%, 50%, 25%, 12.5%의 농도를 사용하였다. 또한 대조군을 위하여 추출에 사용한 용매 역시 50ul를 사용하였다.
- ③ 위 과정에서 얻어진 튜브에 ABTS용액 500ul를 넣은 뒤 암실에서 6분간 보관한다.
- ④ 이후 734nm의 파장에서 흡광도를 측정한다.

(2) 동애등에 추출 기름 항산화 측정 (ABTS)

구분 :

100 : 100% 동애등에 추출 기름

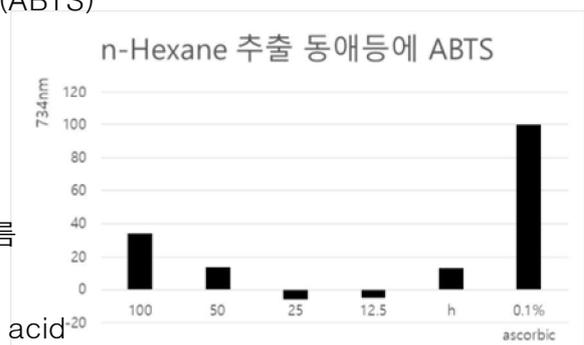
50 : 50% 동애등에 추출 기름

25 : 25% 동애등에 추출 기름

12.5 : 12.5% 동애등에 추출 기름

h : n-Hexane

0.1% ascorbic : 0.1% ascorbic acid

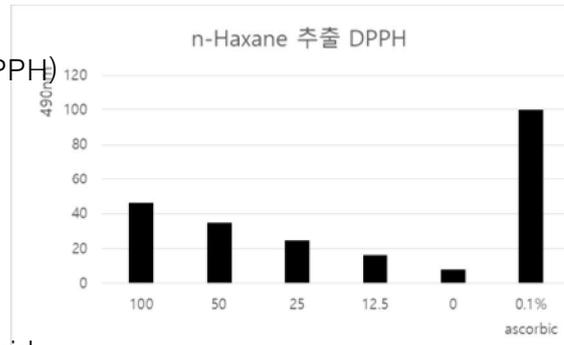


(3) DPPH

- ① 0.1% ascorbic acid 200ul와 동애등에 추출 기름 200ul, n-Hexane 200ul를 각각튜브에 넣는다. 이 때 사용한 동애등에 추출 기름의 농도는 ABTS와 동일하게 사용 하였다.
- ② DPPH 용액 600ul를 각각 1,의 과정에 넣은 뒤 20분 간 암실에 보관한다.
- ③ 20분이 지난 뒤 원심분리하여 침전물을 가라앉힌 뒤 490nm의 파장에서 흡광도를 조사한다.

④ 동애등에 추출 기름 항산화 측정 (DPPH)

- 100 : 100% 동애등에 추출 기름
- 50 : 50% 동애등에 추출 기름
- 25 : 25% 동애등에 추출 기름
- 12.5 : 12.5% 동애등에 추출 기름
- h : n-Hexane
- 0.1% ascorbic : 0.1% ascorbic acid



다. 결과

- ① 정량적 해석이 수반되어야 실제적인 상대활성 비교가 가능하지만, 곤충의 키틴질 활용에 앞서 키틴질 추출 단계에 반드시 필요한 과정을 지속적으로 연구하는 단계에서 본 연구에 사용하는 곤충인 동애등에의 경우 성장하면서 매우 많은 량의 (약 35% 지질 함유) 지질을 포함하는 것으로 알려져 있어서 이를 제거하지 않은 상태에서 키틴 제조와 제거 후 키틴 제조는 시간이나 약품 처리 농도 등 매우 고려할 사항이 많아진다는 것을 사전 연구를 통해 확인하였다.
- ② 전체 중량의 약 35%에 해당하는 지질 또한 결국 대량 발효나 미생물 처리과정에서 분해되거나 함유물로 존재하여 최종 목적인 비료나 사료에의 적용에 있어서 어떠한 영향을 미칠지 알려진 바 없어서 전처리 및 후속처리에 대한 고려를 하지 않을 수 없었다.
- ③ 따라서, 속시렛을 이용한 지질 추출과 추출된 지질의 생물학적 특성을 파악하기 위해 우선 항산화 활성 능력을 확인하여 보았다. 그 결과, 상기 그림에서 나타난 바와 같이 추출한 상태의 지질을 100%로 하고 0.1% ascorbic acid와의 상대 활성을 비교했을 때 약 40% 정도의 유의적 활성이 있음을 확인하였다. 사실, 토코페놀이나 다른 지용성의 물질들과 비교하여 결과를 도출 할 필요가 있으나, 이후 미생물 발효나 분해에 따른 포함된 지질의 어떤 기능성에 대한 내용을 확인하고자 하였기에 유의적 항산화 활성을 갖는 것을 확인하는 단계에서도 충분히 사용가능성이나 가치를 인정할 수 있어 추후 필요시 정량적 비교를 수행하고자 한다.

5. 키틴 분해 미생물 분리

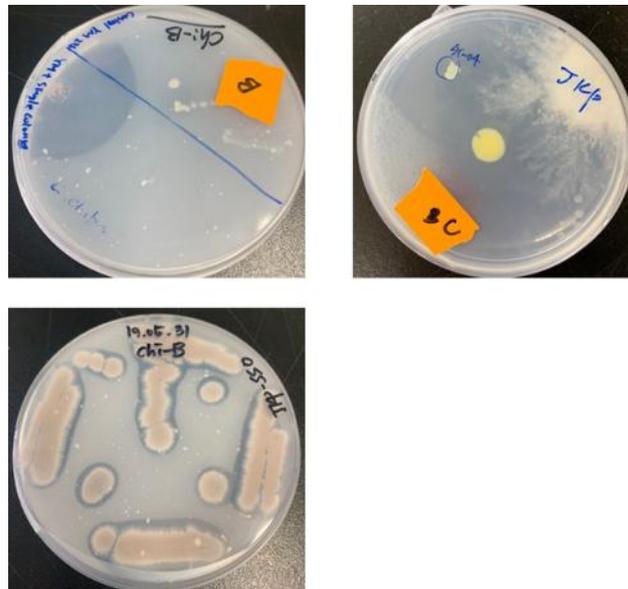
가. 경기도 성남시 소재 대학 주변의 토양 샘플로부터 여러 단계의 미생물 분리과정을 거쳐 콜로이달 키틴 plate 상에서 clear zone을 형성 하는 여러 후

보 미생물을 분리, 최종적으로 하나의 균주를 선택하여 Chi-B를 생산하는 SY-03로 명명하고 생물학적 특성을 밝히고자 하였다.

나. 콜로이달 키틴 plate 상에서 clear zone을 형성 하는 여러 후보 미생물 중에는 곰팡이도 유효한 활성으로 키틴을 분해하는 모습을 관찰하였으나, 후보 미생물 군에서 제외하였다. 이유로는 액체 배양상의 문제점으로 제공하는 키틴질과의 엉김, 배양조건 유지나 배양시간이 세균에 비해 길다는 점과 발생 단계에서의 포자의 동물에 미치는 영향 등을 고려하였기 때문이다.

다. 선택적으로 분리된 미생물의 동정은 향후 필요시 16S rDNA 염기서열 분석과 계통학적 분류에 따라 동정될 수 있으나, 현 시점에서는 그에 앞서 곤충 유래 키틴 혹은 곤충 자체를 영양원으로 발효 또는 분해과정을 통해 유효한 활성을 갖는 대사/분해산물 제조 및 효능 평가가 선행되어야 하기에 분해산물에 대한 항산화 활성을 평가하였다.

라. 콜로이달 키틴 분해 미생물

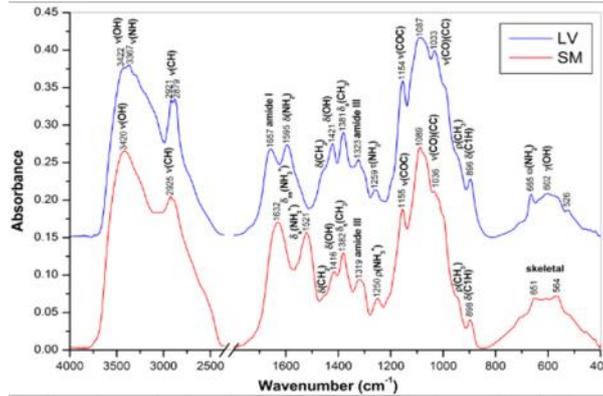


## 6. 동애등에 유충 유래 키토산 관련실험 (\* 추가 관련 연구)

가. 본 연구를 통해 동애등에 유충을 통해 키토산을 얻었다. 이를 동애등에 유래 키토산이라고 칭하고 다른 키토산과 생화학적, 생리적으로 같은 역할을 할 수 있는지에 관한 실험을 진행하였다.

나. 중요한 이유로는, 연구 목표에 기술되어 있지 않으나, 키틴은 효소학적으로 탈아세틸화되어 키토산으로 전환될 수 있으며 또한 분해된 키틴 저분자 올리고당 역시 동일한 효소에 의해 키토산 올리고당으로 전환, 여러 다양하고 유의적인 생리활성을 나타내는바 매우 중요한 검토 항목이라 하겠다. 또한, 미생물에 의한 키틴의 분해는 catabolic cascade에 연관된 여러 효소들에 의해 최종 분해되는 단계에서도 탈아세틸화가 이뤄져 생체 내 여러 변화를 거치는 것이 밝혀져 있어 키틴분해와 키토산 분해 상관성을 다양하게 관찰하는 것이 바람직하며, 이러한 변화에 따라 전환되는 키틴 유래 유도체들의 생리활성이나 생체내 거동 등에 대한 연구는 매우 중요하기 때문이다.

다. FT-IR 결과



라. 게 껍질 유래 키토산과 거의 동일한 패턴을 확인함.

마. 첫 번째로 생화학적인 정량을 통해 동애등에 유래 키토산을 분석해보았다. 우선 동애등에 키토산을 6.5% Acetic acid에 2%가 되도록 키토산 용액을 만들어서 샘플로 사용했다. 대조군으로 사용한 다른 키토산들도 같은 조건으로 만들어서 실험했다.

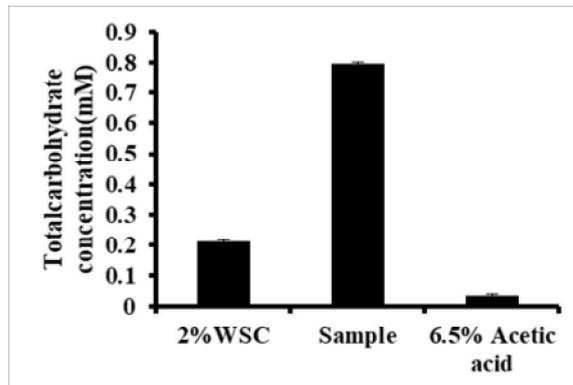


Fig. 1. Total carbohydrate concentration analysis

바. Fig.1은 총 탄수화물 정량 결과로 WSC는 수용성 키토산, sample은 동애등에 유래 키토산이다. 수용성 키토산과 비교했을 때 동애등에 유래 키토산에는 탄수화물의 함량이 약 4배 높게 보인다.(6.5% Acetic Acid 자체의 탄수화물은 0에 가깝기 때문에 키토산 자체에 포함되어있는 탄수화물로 볼수 있다.) mM단위를 환산해보면 2% WSC에는 7.63ug/L, Sample에는 28.70ug/L의 총 탄수화물이 포함되어있음을 알 수 있다.

사. 동애등에 유래 키토산의 단백질, 환원당 정량 결과 모두 확인되지 않았다.

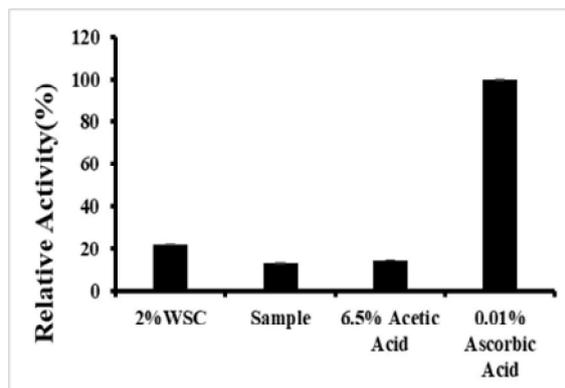


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity

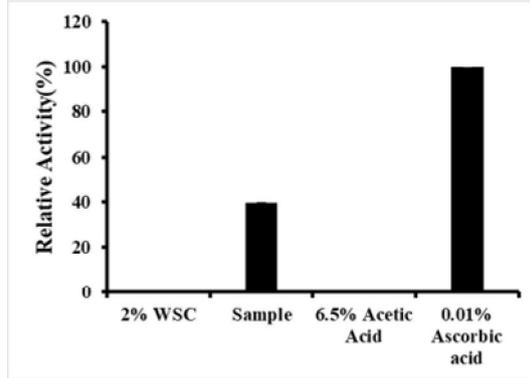


Fig. 3. FRAP(Ferric reducing antioxidant power) activity

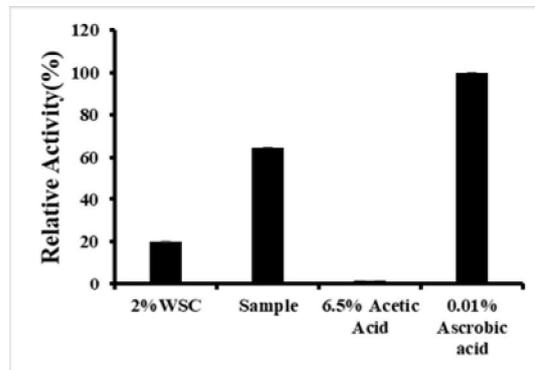


Fig. 4. ABTS radical scavenging activity

아. Fig. 2부터 Fig. 4까지는 샘플의 항산화 활성을 0.01% Ascorbic Acid를 기준으로 상대활성을 나타낸 것이다. 동애등에 유래 키토산은 DPPH를 제외한 다른 실험에서 수용성 키토산에 비해 높은 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

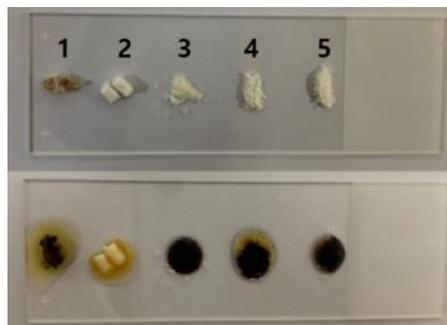


Fig. 5. Lugol's solution 반응 전/후

자. 키토산은 Logol's solution과 만나면 진한 갈색으로 색이 변하는 특성을 가지고 동애등에 유래 키토산과 다른 종류의 키토산들을 동시에 Logol's solution에 반응시켜 색깔변화를 관찰했다. Fig5사진에서 1번부터 5번까지 차례로 동애등에 유래 키토산, 알긴산, 고분자 키토산, 수용성키토산, 저점도

키토산 알긴산을 제외한 모든 샘플이 동일하게 색변화가 나타났으며 이를 통해 동애등에 유래키토산임을 확인할 수 있었다.

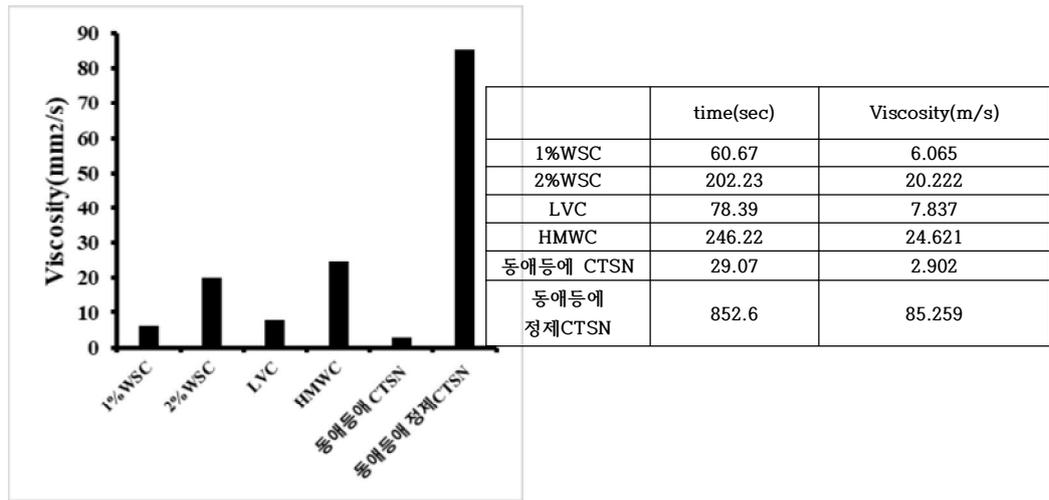


Fig. 6. 점도 측정 결과

차. Fig. 6와 표 는 점도측정결과로 1% 수용성키토산(WSC)을 제외한 나머지는 모두 6.5% Acetic acid에 2%가 되도록 만들어진 키토산 용액들이다. LVC는 저점도키토산, HMWC는 고분자 키토산을 뜻한다. 점도는 정제된 키토산에서 가장 높게 나타났다.

카. 다음으로 키토산을 가수분해시켜 생화학적인 정량과 항산화 활성 정도를 측정해 보았다. 가수분해는 2% Acetic acid에 키토산이 1%되도록 하였으며 일 정량의 Chitosanase를 처리해주어 37도에서 일주일동안 반응시켜 주었다. 모든 샘플의 점도가 육안으로 관찰 가능할 정도로 낮아졌고 각 샘플마다 반응 완료시간은 달랐다.

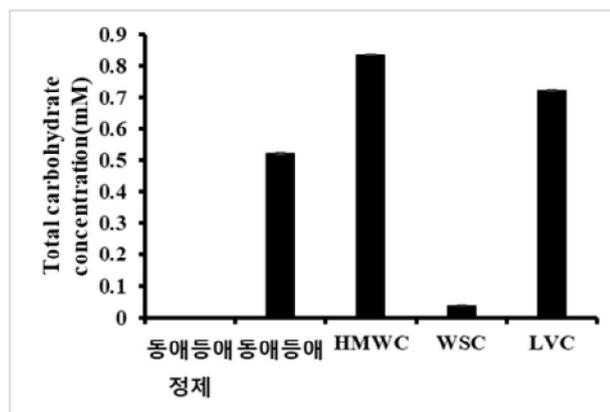


Fig. 7. Total carbohydrate concentration analysis

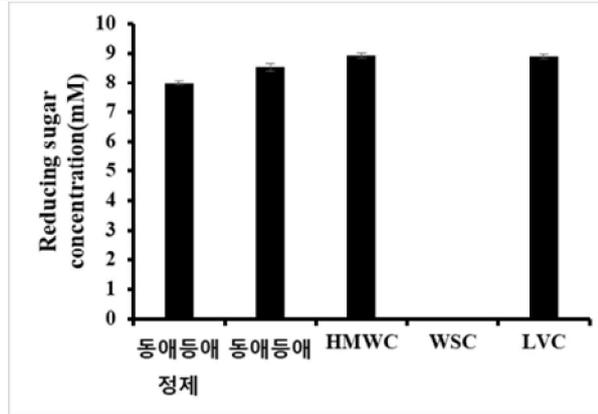


Fig. 8. Reducing sugar concentration analysis

타. Fig. 7과 Fig. 8은 가수분해된 샘플들의 총탄수화물과 환원당을 정량한 결과로 단백질은 확인되지 않았다. 환원당의 함량은 비교적 모두 높았으며 수용성 키토산은 총탄수화물, 환원당, 단백질 모두 검출 되지 않았다.

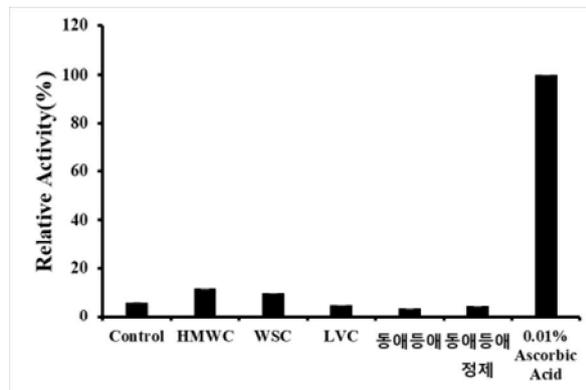


Fig9. DPPH radical scavenging activity

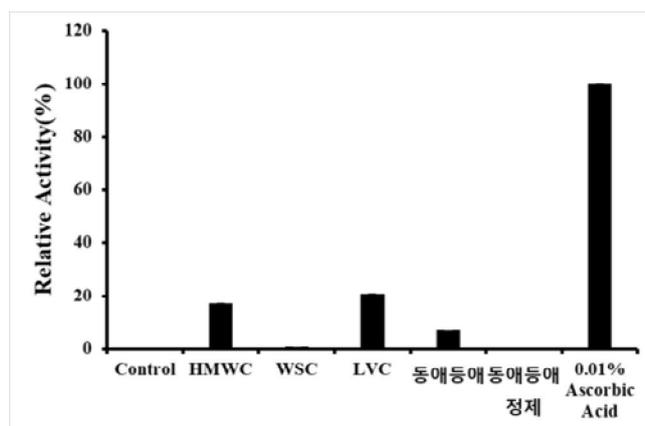


Fig10. FRAP(Ferric reducing antioxidant power) activity

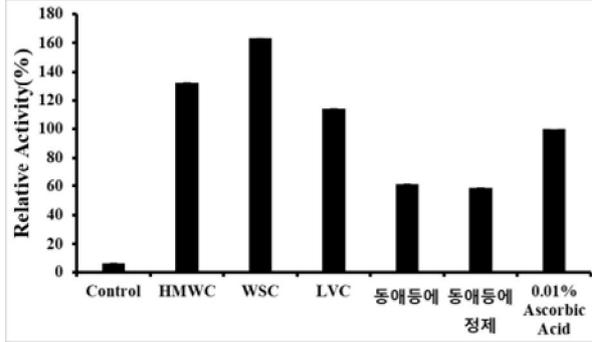


Fig11. ABTS radical scavenging activity

파. Fig9 부터 Fig11까지는 모두 항산화 활성을 측정한 실험결과이다. Control 은 2% Acetic Acid에 샘플과 같은 양의 Chitosanase를 처리한 것이다.

하. DPPH와 FRAP에서는 특이적인 활성이 나타나진 않았지만 ABTS활성 측정 결과 가수분해전과 비교하여 봤을 때 높은 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이는 추후에 Tyrosinase저해 활성을 확인해 볼 필요가 있어 보인다.

○ 종합 평가표

	동애등애 정제 CTSN	동애등애 CTSN	HMWC	WSC	LVC
TC(mg/L)	0	0.019	0.030	0.001	0.026
RS(mg/L)	0.288	0.307	0.322	0	0.320

	Control	HMWC	WSC	LVC	동애등애 CTSN	동애등애 정제 CTSN	0.01% Ascorbic Acid
DPPH(%)	5.789	11.499	9.663	4.804	3.378	4.36937 3	100
FRAP(%)	0	17.200	0.732	20.951	7.00254 6	0.4018	100
ABTS(%)	6.248	132.906	163.320	114.163	61.3961 1	58.7761 1	100

가. 상기 표는 해당되는 생화학적 지표들에 대한 종합적 결과를 나타냄. 이러한 결과를 통해, 곤충 유래 지질이나 키틴을 탈 아세틸화하여 얻은 키토산의 효소처리에 따른 가수분해 산물의 항산화 활성이 유의적임을 확인하였기에 향후 대량 발효나 키틴 분해 미생물에 의한 곤충 분해산물에 포함될 수 있는 곤충 고유의 지질과 키틴 유도체나 변화체인 키토산의 유용성을 살펴볼 수 있었기에 향후 사료나 비료에의 적용에 있어서 매우 고무적이라 하겠다.

나. HMWC : high molecular chitosan, WSC: water-soluble chitosan (염산염), LVC: low viscose chitosan

○ 곤충발효 샘플의 생화학적 특성 연구

주관기관으로부터 제공받은 여러 곤충 미생물 발효 샘플에 새로이 분리한 미생물 유래 조효소를 처리, 분해 또는 발효과정을 거쳐 생성된 부산물의 여러 생화학적 특성을 검토해 보았으며, 본 연구를 통해 새로이 분리한 키틴 분해 미생물 유래 효소처리에 따른 가장 중요한 생화학적 지표활성으로 평가 대상인 향산화 활성을 측정하였다.

1. 발효 샘플 중에 포함된 환원당 함량 측정 결과

그림에서 보이는 것처럼, 성충, 탈피각 그리고 분말 샘플을 발효한 시료에 포함된 환원당 함량이 다른 여러 샘플에 비해 매우 유의적으로 높은 결과를 확인하였다. 이로서, 동애등에 유래 다당체인 키틴질의 발효과정을 통한 생물학적 분해가 유의적으로 진행되었음을 확인할 수 있었다.

2. 발효 샘플 중에 포함된 총 탄수화물 함량 측정 결과

- 총 탄수화물의 함량 차이는 일반적으로 환원당의 수치가 높을수록 분자량 크기가 작다는 것을 의미하며, 환원당 함량의 수치가 낮고 총 탄수화물 농도가

## Result and Discussion

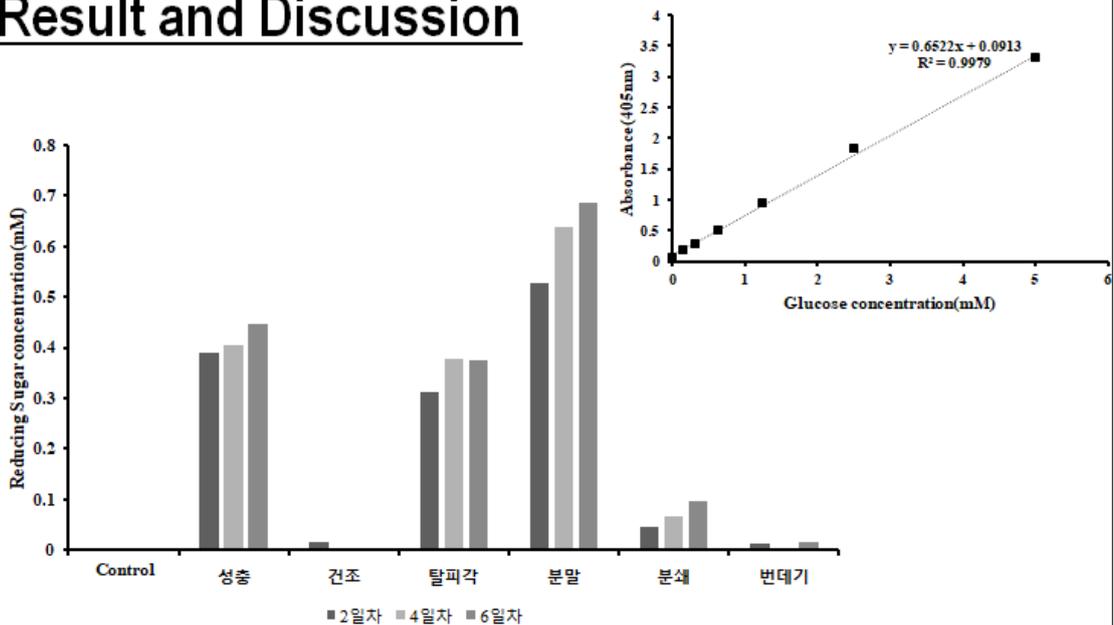


Fig1. Reducing sugar concentration analysis

Inset: Standard curve of 10mM glucose

Outlet: Reducing sugar concentration of samples

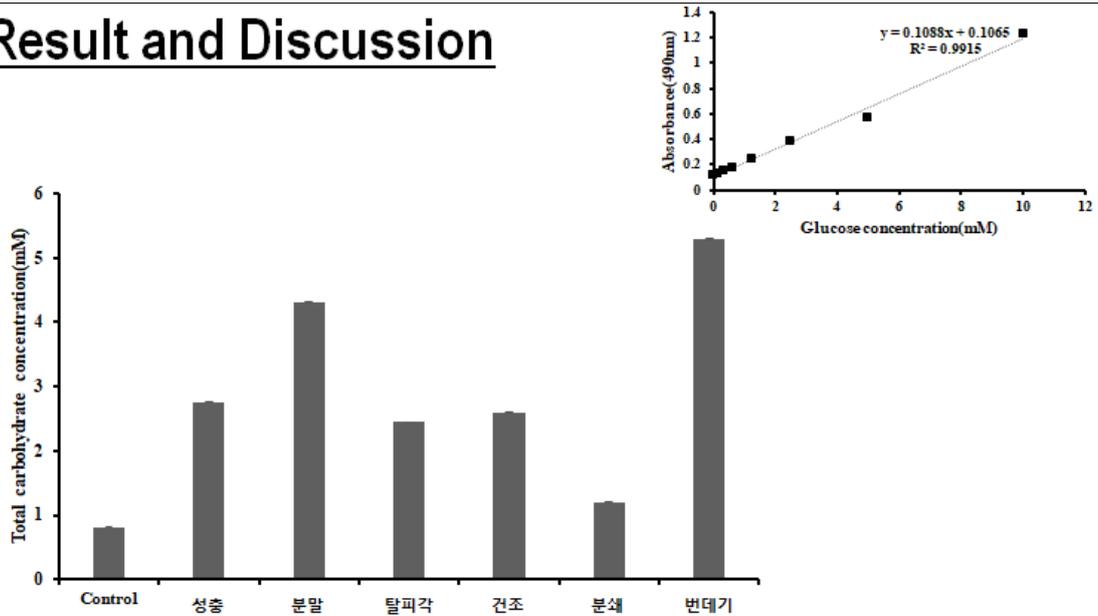
\*각각의 샘플은 SY-04 crude enzyme에 1%가 되도록 처리해서 2,4,6일차에 샘플링후에 실험함.

\*Control: Crude enzyme from SY-04

높을수록 미생물 효소에 의해 분해가 잘 일어나지 않은 고분자 상태의 탄수화물이 많다는 것을 의미한다.

- 따라서, 사용한 곤충 동애등애를 구성하는 주요 구성물로서 탄수화물 (키틴)의 경우 약 5-10%로 분리, 포함되어 있음을 확인하였는데, 분말, 탈피각, 성충, 번데기 의 샘플은 미생물 배양 및 효소작용에 의해 유의적으로 분해되어 단백질, 지질 등의 유기성분을 사용하고 탄수화물 (키틴질)로 추측되는 성분이 약 3-5.5 mM 농도로 측정되었다. 이를 환산하면, 대략 측정 시료 부피 0.2 mL 기준으로 하여 약 1.8g/100 mL에 해당된다.

## Result and Discussion



**Fig2. Total carbohydrate concentration analysis**

Inset: Standard curve of 10mM glucose

Outset: Total carbohydrate concentration of samples

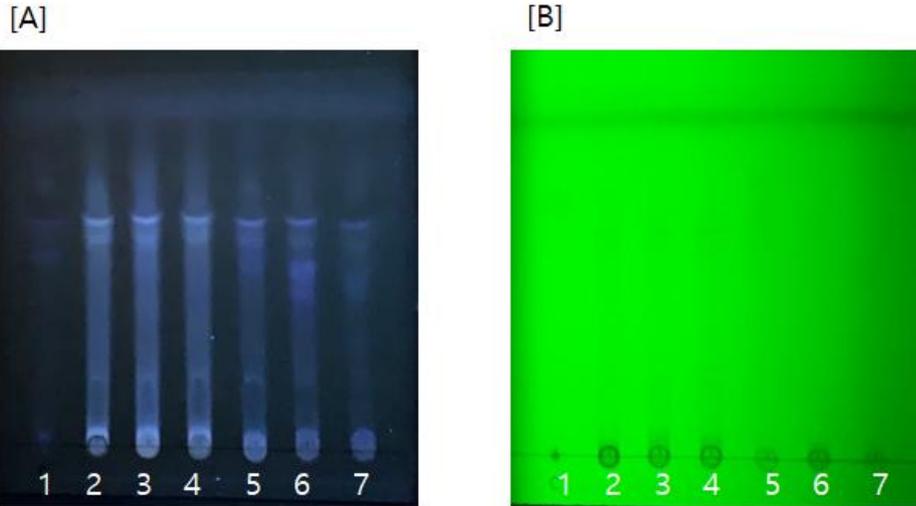
\*Control: Crude enzyme from SY-04

\*각각의 샘플은 SY-04 crude enzyme에 1%가 되도록 처리해서 일주일후에 샘플링하여 실험함.

- > 번데기의 경우, 환원당 수치는 거의 무의미한 정도의 값이었으나, 총 탄수화물 농도는 상기 계산된 값에 해당되어 전체 약 5-10%의 키틴질의 량과 비교하면 약 20% 정도 잔류 되고 나머지는 미생물 생육과정에서 분해, 대사되었을 것으로 사료된다. 하지만 번데기의 경우 키틴질의 함량은 성충에 비해 매우 단위 중량비율로 상당히 낮을 것으로 보아 수율 계산에 이르기까지 보다 정밀한 연구와 계산이 수반되어야 할 것이다.
- > 효소활성이 중요한 항목인 경우, 효소의 량과 반응 시간 등을 고려한 비특이활성(specific activity)을 계산할 필요가 있겠으나, preliminary test 로 진행한 결과값으로 보다 다양한 접근 및 해석이 필요하다고 사료된다. 즉, 효소활성의 차이에 따른 기질의 분해속도는 효소의 동력학적 특성 (kinetics) 연구에 있어서 중요하겠으나, 부산물을 활용한 동물사료나 식물 영양제로의 활용 등 응용연구에 있어서는 어떠한 부산물이 생리적으로 중요한 활성을 나타내는지에 따라 상기 기술한 비특이활성(specific activity)이라는 개념의 변화로 초래할 수 있어 다각적 접근과 해석을 달리할 필요가 있다.

### 3. 주요 구성성분의 TLC 분석

- > 각각의 샘플을 미생물 SY-04를 사전 배양 후 제조한 조효소액에 중량비로 1%되도록 넣어 섭씨 37도에서 일주일동안 효소 반응을 시킨 후 샘플을 TLC 로 전개, 자외선 조사로 원료인 기질의 차이와 분해정도를 확인하는 연구를 수행한 결과를 나타내었다.



**Fig5. Screening images of TLC plate**

A: 325nm, B:260nm

- \* 1: Control (crude enzyme)
- 2: 성충
- 3: 분말
- 4: 탈피각
- 5: 건조
- 6: 분쇄
- 7: 번데기

\*각각의 샘플은 SY-04 crude enzyme에 1%가 되도록 처리해서 일주일후에 샘플링하여 실험함.

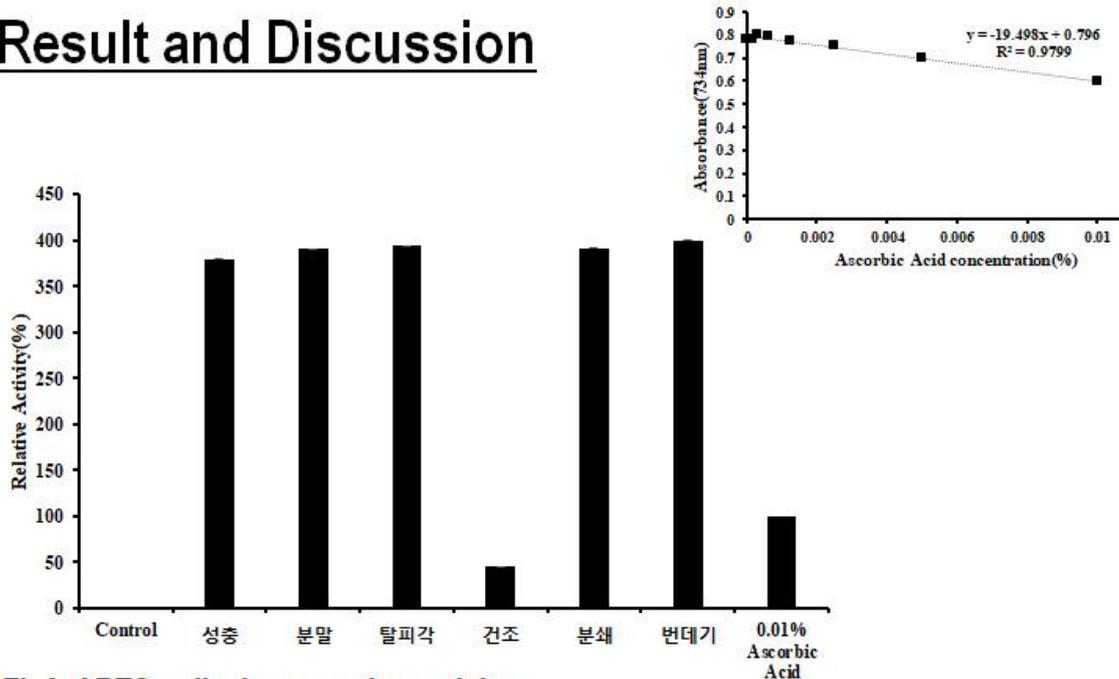
-> 자외선 325nm에서 확인된 결과를 바탕으로 곤충 샘플 제조과정이나 효소반응에 따라 유리된 지방 혹은 지방산이 많음을 간접적으로 확인할 수 있었으며, 따라서 미생물 SY-04의 경우 콜로이달 키틴을 기질로 배양하여 만든 조효소에는 지방을 분해하는 효소가 거의 포함되어 있지 않을 가능성이 매우 높음을 알 수 있었고, 더 낮은 260 nm에서의 경우 출발선상에서만 감지될 정도의 분자들이 확인되어 포화지방/산의 함량은 상대적으로 낮음을 알 수 있었다. 일반적으로 지방산은 클로로폼 : 메탄올을 1:2비율로 제조한 용매로 추출, Capillary gas GC를 이용해서 정밀 분석을 수행하지만, 고가의 표준물질을 필요로 하는 단점도 있어 현재의 연구 단계에서는 정밀 분석을 요하지 않는, 또한 키틴질의 활용에 연구 초점을 맞추고 있어서 TLC를 통한 대략적인 결과를 해석하고자 하였다.

특히 건조, 분쇄, 번데기의 경우 다른 샘플들의 조성과 다른 양상을 보여 효소에 노출이 용이했거나 함량의 차이로 볼 수 있는데, 지방 (포화/불포화)/산은 생체를 구성하는 4대 거대분자의 하나이다. 지방산은 생체내에서 단독으로 존재하지 않고 일반적으로 트라이글리세라이드, 인지질, 콜레스테릴 에스터의 3 가지 주요 부류의 에스터의 형태로 존재한다. 이러한 에스터 형태에서 지방산은 동물에서 중요한 에너지원이며, 세포에서 중요한 구조적 구성 성분이다. 하지만, 지방/산의 함량이 매우 높은 곤충을 원료로 사용하여 비료나 사료 등의 제품을 제조할 경우 산소와의 작용에 따른 산패가 유의 시 되므로 빠른 제조와 소비 혹은 낮은 온도에서의 보관이 필요함을 보여주는 좋은 예시가 될 것으로 사료된다.

#### 4. 미생물 효소 처리 부산물의 항산화 활성

#### 4-1. ABTS 자유라디칼 제거 능력

## Result and Discussion



**Fig3. ABTS radical scavenging activity**

Inset: Standard curve of 0.01% Ascorbic acid  
 Outset: ABTS analysis of samples

\*각각의 샘플은 SY-04 crude enzyme에 1%가 되도록 처리해서 일주일후에 샘플링하여 실험함.

\*Control: Crude enzyme from SY-04

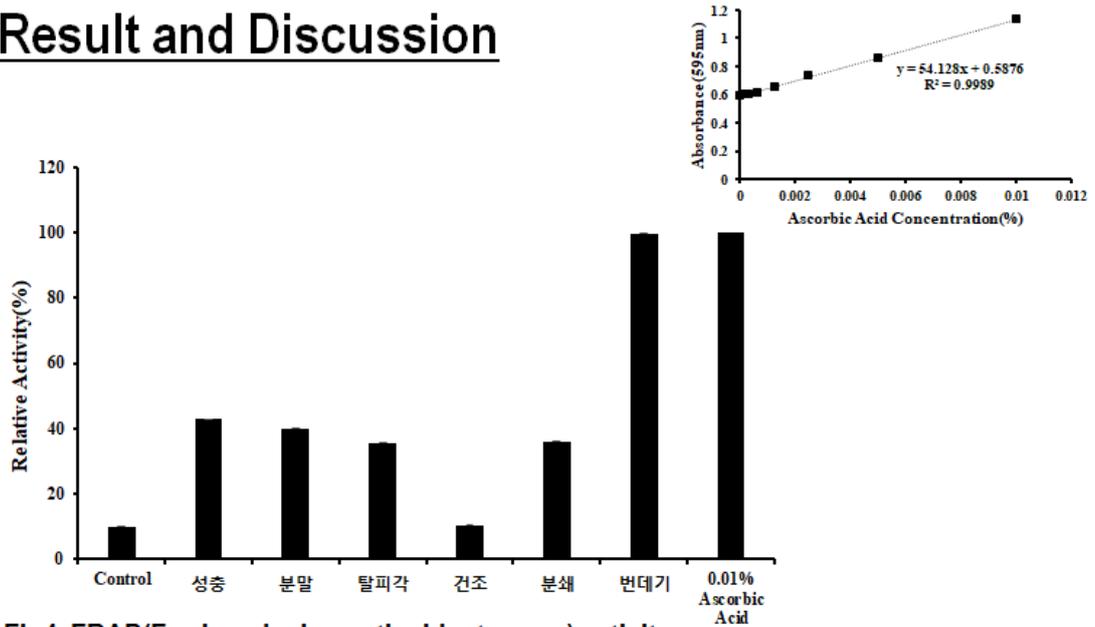
-> 대조군 비타민 C의 한 종류인 ascorbic acid 0.01% 기준으로 상대 활성을 비교한 결과, 건조 샘플 효소 처리군을 제외한 거의 모든 샘플에서 매우 유의적이고 높은 항산화 활성이 확인되었다. 특히 ABTS자유 라디칼 제거 능력은 여러 생물학적 기능과 밀접한 관계를 갖는데, 그중 하나가 tyrosinase 효소 활성 저해에 따른 생체 내 멜라닌 합성 저해에 영향을 미치는 중요한 작용으로 알려져 있다. 아마도 곤충의 외피에 포함된 멜라닌 성분 함량 조절에 중요한 자가 조절 물질로 생각되는데, 화장품의 미백작용제로 사용되고 있어 다양한 응용연구가 기대된다.

#### 4-2. FRAP 라디칼 제거능력

-> 생체내의 미량의 금속이온 역시 생리작용이나 생명력 유지에 매우 중요한 역할을 수행한다. 예를 들어 철이온 (Fe<sup>2+</sup>)은 산소 운반에 있어서 너무도 중요한 혈액 내 헤모글로빈 중심에서 구조 유지와 활성을 유지하는 중요역할을 수행한다. 이러한 미량의 금속이온들의 산화를 방지하는 중요한 역할 또한 항산화제들의 기능일 것이다.

-> 다양한 곤충 샘플들의 미생물 효소 처리군들의 항산화 활성이 유의적으로 나타나고 있음을 볼 때, 곤충 유래 키틴질 뿐 만 아니라 미생물 발효나 효소처리에 따른 부산물 전체를 사료나 비료 성분으로 첨가하여 사용한다면 많은 유용한 사례로 평가 받을 수 있을 것으로 사료된다.

## Result and Discussion



**Fig4. FRAP(Ferric reducing antioxidant power) activity**

Inset: Standard curve of 0.01% Ascorbic Acid

Outset : FRAP analysis of samples

\*Control : Crude enzyme from SY-04

\*각각의 샘플은 SY-04 crude enzyme에 1%가 되도록 처리해서 일주일후에 샘플링하여 실험함.

- > 식용 곤충에 대한 인식과 미래의 식량난 해소에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대되어 다각적인 연구와 새로운 품종 개발/개량 등의 연구가 진행되는 것으로 알려지면서 더욱 많은 사람들의 관심을 받고 있는 실정이기에 이러한 생화학적 기초연구 결과의 중요성은 향후 더욱 주목 받을 것으로 사료된다. 따라서 향후, 이와 연관된 후속/동반 연구로서 이러한 미생물 효소처리에 의해 제조한 부산물의 영양학적 평가, 독성학적 평가 등의 연구가 진행되어 결과를 도출 할 수 있다면 보다 다양한 결과제시를 통해 식용곤충 산업의 발전을 위한 초석 마련이 가능해 질 것으로 사료된다.
- > 현재 연구 진행 방향과 설정에 있어서, 상기 기술한 연구결과를 기반으로 곤충 유래 키틴, 지방산, 그리고 키틴의 탈 아세틸화 과정을 거쳐 유도된 키토산의 효소학적 분해와 그에 따른 부산물들의 항산화 및 항균 활성을 기반으로 기초면역 관련된 생화학적 분석을 진행 중에 있으며 소재의 세포독성을 비롯하여 생리활성에 대한보다 다양한 결과를 제시 할 수 있을 것으로 사료된다.
- > 특히, 재현성 실험과 중요성을 기술해야하는 만큼 본 연차실적계획서에는 이 부분에 대한 내용 언급을 피하고 소재의 대량 생산, 발효공정 체계 구축, 2차년도 후속 연구에 초석 마련을 위한 연구를 진행하고 있다.

5. 연구개발성과

가. 논문게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Synergistic Antimicrobial Activity of Chitosan Hydrolysates derived from the Hydrolysis of High Molecular Weight Chitosan using Immobilized Enzyme	Journal of Chitin and Chitosa n	박제권	24 (4)	대한민국	한국키티 키토산학 회	비SCI (학진등재지 )	2019. 12.31	ISSN : 1229 -416 0
2	Characterization of Bioactive Components isolated from the Degradation of Black Soldier Flies Hermetia illucens by A Chitin-degradable Microorganism	Journal of Chitin and Chitosa n	박제권	25 (2)	대한민국	한국키티 키토산학 회	비SCI (학진등재지 )	2020. 06.30	ISSN : 1229 -416 0

나. 학술발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	해양바이오학회	박제권	2019.11.08	강릉 세인트존스 호텔	대한민국

■ 2차년 연구수행 내용 및 결과

1. 제1세부과제: 주관연구기관(한국유용곤충연구소)곤충 키틴 발효 시스템 구축 및 이를 이용한 키틴발효 사료첨가제 상품 양산 및 산업화

1. 대량사육된 사료곤충을 키틴발효용으로 전처리단계 시스템 구축  
 - 아메리카동애등에 종충사육장 건립(2층 구조)



가공센터(왼), 종충생산센터(오른)



종충생산센터(2층)



가공센터(단층)



유충 사육실(종충생산센터 1층)



성충 채란실(종충생산센터 2층)



성충 채란실 천창

2. 키틴분해 미생물의 혼합 및 발효(효소 소화): 발효에 도움이 되는 영양분 등

공급

- 발효조에서 일정기간 발효를 통한 키틴분해(효소반응 최적화 조건 적용)

가. 1차배양(발효): 키틴분해미생물의 액체배양(곤충 탈피각을 이용한 배양실시)

① 대상곤충 탈피각(파리번데기 탈피각 등)

\* 대상곤충탈피각은 파리류외에 기타 곤충의 순수한 탈피각을 활용할 수 있으며 입자가 작을수록 분해효율을 높을 것으로 판단되어 미세분말제형화를 위한 장비를 활용할 필요가 있음.

② 1차배양에 사용하는 균주(*Bacillus subtilis* 등 Bacillus속 미생물) 확보전략

\* 최근 연구개발중인 식용곤충 갈색거저리 키틴분해 미생물 등 다양한 미생물을 활용할 수 있음

③ 배양조건: 액상 혐기발효(통기발효)

\* 배양조건이 고온성일 경우 일반적인 액상배양조에서 생산이 가능하여 경제적인 것으로 판단됨.

나. 2차배양(발효): 동애등에탈지분말에 키틴배양액을 넣어 함수율 50%로 1주일간 발효실시(고상발효)

① 2차배양에 사용하는 균주(단백질 분해미생물 *Bacillus licheniformis* 등 Bacillus속 미생물 및 유산균을 포함한 효소제 등) 확보

② 배양조건 실험 (Bacillus 균주, 효소제의 균주에 유산균첨가)

3. 최종 생산 발효 산물의 함수율을 10%이하로 건조

4. 최종산물의 건조 - 파쇄 - 제형화 - 포장(곤충 키틴발효 사료첨가제로 완성)



사료곤충

연속형 자동건조기

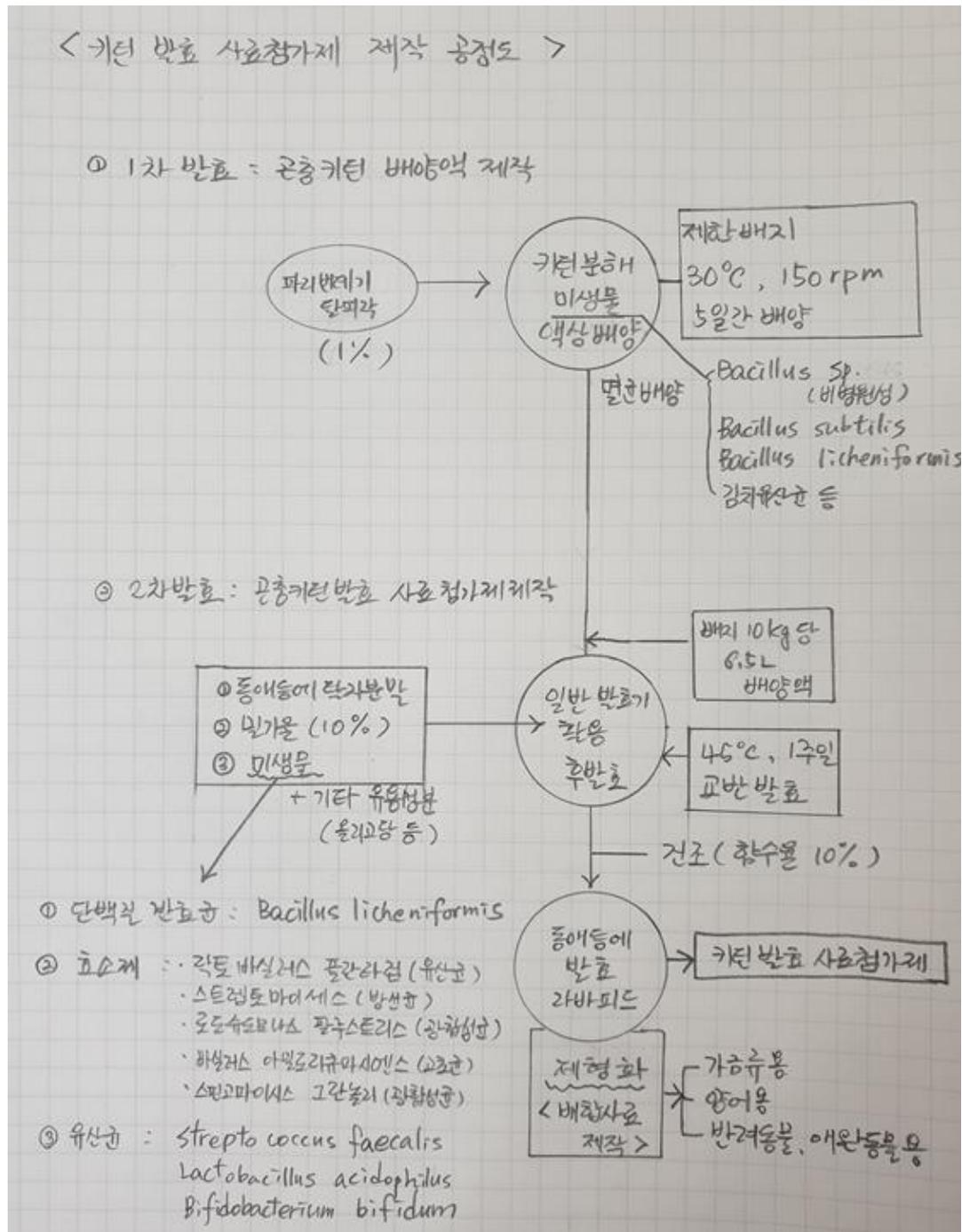
탈지

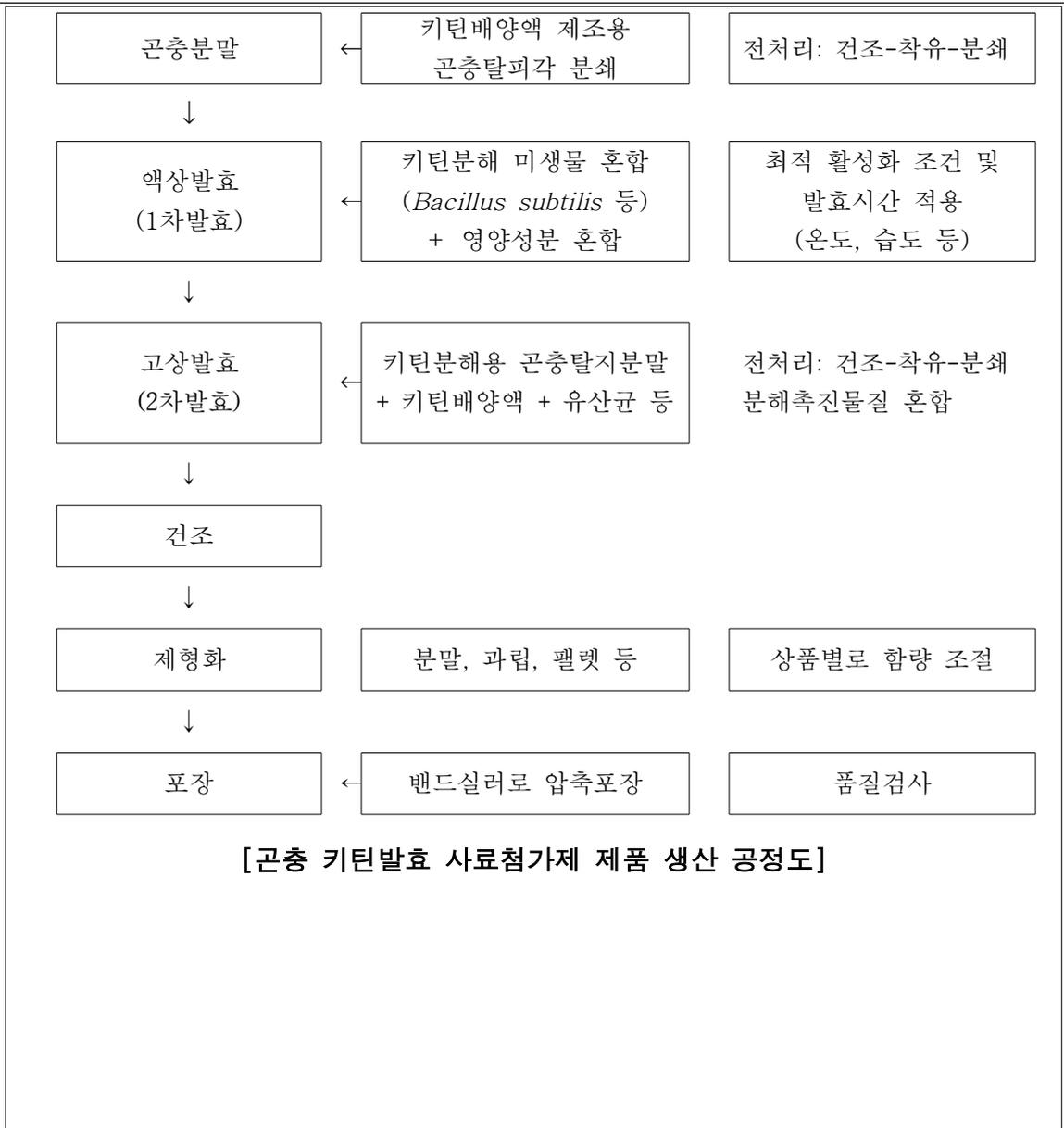
분쇄

키틴 배양액활용  
고상발효

[시제품 생산 공정도]

그림. 곤충 키틴 및 단백질 발효공정도







로타리건조기와 착유기 설치



착유기와 분쇄기 설치



동에 등에 가동 및 제형화 장비(2020년 12월 구축 완료)

○ 가천대에서 선발한 키틴분해 선발 미생물 동정결과



E20007A



시험 성적서				
신청인	성명	양희철	업체명	농업회사법인 ㈜한국유용근종연구소
	주소	전남 곡성군 옥곡면 소룡길 289-38		
	전화	061-362-8205	FAX	
공시품	명칭			
	형태	plate colony 상터		
검사항목	미생물 분석	미생물동정		
용도	참고용			
시험책임자	남송 (인)	시험담당자	양주 (인)	
시험 결과				
미생물동정		<i>Bacillus cereus</i>		
<p>2020년 07월 10일</p> <p>(재)전남생물산업진흥원 친환경농생명연구센터장</p> 				

E20007A

## 농업회사법인(주)한국유용곤충연구소

# 미생물 동정 검사 성적서

### 1. 시험의뢰자 및 시험연구기관 정보

#### 1) 시험의뢰자 관련 정보

- 회사명 : 농업회사법인(주)한국유용곤충연구소
- 대표자 : 양 철
- 사업자등록번호 : 125-81-
- 회사주소지 : 전남 곡성군 옥곡면 소룡길 289-38
- 회사 전화 : 061) 362-8205

#### 2) 시험연구기관 정보

- 시험연구기관 : [재]전남생물산업진흥원 생물방제연구센터
- 시험책임자 : 생물활성연구원 남 승 원 장
- 시험수행자 : 생물활성연구원 양 주 연구원

### 2. 시험분석 항목

- 미생물 동정 검사

### 3. 미생물 동정 검사

#### 1) 미생물 유전자 염기서열 분석

- 미생물의 Genomic DNA를 추출하여 16s ribosomal RNA 유전자의 염기서열을 분석한다. (염기서열 분석은 유출전도에 의뢰하여 실시)

#### 4. 시험분석시료로부터 분리한 미생물에 대한 유전자분석

GCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGT  
AACACGTGGSTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGAAACCGGGGCTAATACCG  
GATAACATTTTGAACCGCATGGTTCCGAAATTGAAAGGCGCTTCGGCTGTCACCTTATGGA  
TGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAADGATGCGTA  
GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGG  
AGGCAGCAGTAGGSAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGCGTAG  
TGATGAAGGCTTTCCGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAAT  
AAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACACGTGCCAGCACCCG  
CGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGCCGTAAAGGCGCGCCAGGTG  
GTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGG  
AGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTACCCGTGAAATGCCTAGAGAT  
ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGGGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGGCGGAA  
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACCGCGTAAACGATGAGTGCT  
AAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTATGTGCTGAAGTTAACCCATTAAGCACTCCGCCCTGG  
GGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA  
GCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAADCCTTACCAGGCTTTGACATCCTCTGAAA  
ACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGTC  
AGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTT  
GCCATCATTAAAGTTGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGG  
ATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTAGACADGTGCTACAATGGACGGT  
ACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCCGGAT  
TGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCC  
GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAGGAGAGTTTGTAAAC  
ACCCGAAGTCCGTGGGGTAACC-TTTTGGAGCCAGCCGCCTAA

*Bacillus cereus* strain ATCC 14579 16S ribosomal rRNA gene, partial sequence  
Sequence ID: NR\_074540.1 Length: 1512 Number of Matches: 1  
Score = 2621bits(1419), Expect = 0.0, **Identities = 1422/1423(99%)**, Gaps = 1/1423(0%)  
Strand = Plus/Plus

```

Query 1      GCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGT 60
             |||
Sbjct 57      GCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGT 116

Query 61      AACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGAAACCGGGGCTAATAACCG 120
             |||
Sbjct 117      AACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGAAACCGGGGCTAATAACCG 176

Query 121     GATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAWTTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGA 180
             |||
Sbjct 177     GATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAWTTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGA 236

Query 181     TGGACCCGGGTGCGATTAGCTAGTGTGGTGAAGTAACGGCTCACCAGGCAACGATGCGTA 240
             |||
Sbjct 237     TGGACCCGGGTGCGATTAGCTAGTGTGGTGAAGTAACGGCTCACCAGGCAACGATGCGTA 296

Query 241     GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGG 300
             |||
Sbjct 297     GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGG 356

Query 301     AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCGCGTGAG 360
             |||
Sbjct 357     AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCGCGTGAG 416

Query 361     TGATGAAGGCTTTCCGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAGAACAAAGTGCTAGTTGAAT 420
             |||
Sbjct 417     TGATGAAGGCTTTCCGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAGAACAAAGTGCTAGTTGAAT 476
    
```



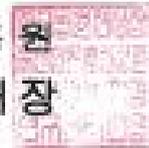


Query 1381 ACCCGAAGTCGGTGGGTAACC-TTTTGGAGCCAGCCGGCTAA 1422  
|||||  
Subject 1437 ACCCGAAGTCGGTGGGTAACCCTTTTGGAGCCAGCCGGCTAA 1479

- 최종검사 결과 : 미생물의 유전자 염기서열 분석결과, *Bacillus cereus* strain ATCC 14579 균주와 99% 상동성을 나타내어 *Bacillus cereus*로 동정되었음.

- \* 상기내용은 접수된 시료에 대한 결과로서 시정된 결과를 유사 대한 시료에 적용할 수 없습니다.
- \* 본 결과는 시료의뢰 목적 이외의 광고, 언론을 상업적인 용도나 법적인 목적의 용도로 사용될 수 없습니다.

**(재) 전남 생물 산업 진흥 원**  
**친 환경 농 생 명 연구 센터 장**



- ① 키틴분해 미생물의 종 동정결과 *Bacillus cereus*로 동정되어 가축의 사료로서 활용가능성에 대해 검증결과 다양한 논문(Ter and Terje, 1997; Bjarne and Miels, 2000)에서 독성을 유발할 수 있는 위험성을 확인하였다.
- ② *B. cereus*종의 strain이 독성이 없어 사료로 활용 가능한 균주(*B. cereus toyoi*)도 있음을 확인하였으나(Ulrike *et. al.*, 2008; Vesa and Kristina, 1998) 선발균주의 추가 실험으로 독성생성 여부를 확인하지 못하였음.

TABLE 1. *Bacillus* strains used in this study and comparison of the different methods for detecting *B. cereus* enterotoxin

Strain <sup>a</sup>	Presence of enterotoxin as determined by:			
	PCR <sup>b</sup>	Oxoid BCET-RPLA <sup>c</sup>	BDE <sup>d</sup>	BHEMO-RFLP <sup>e</sup>
<i>B. amyloliquefaciens</i> ATCC 23842	-	ND	ND	
<i>B.adius</i> DSM 23	-	ND	ND	
<i>B. brevis</i> DSM 30	-	ND	ND	
<i>B. brevis</i> ATCC 10027	-	ND	ND	
<i>B. cereus</i> PHLS F837/76*	+	64	ND	I
<i>B. cereus</i> B-4ac*	+	64	4	I
<i>B. cereus</i> DSM 2301*	+	64	3	I
<i>B. cereus</i> DSM 4282*	+	64	3	I
<i>B. cereus</i> DSM 31	+	64	ND	I
<i>B. cereus</i> ATCC 7064	+	64	ND	I
<i>B. cereus</i> B 922 (TP)	+	4	2	I
<i>B. cereus</i> ATCC 12826	-	-	ND	
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	-	-	ND	
<i>B. cereus</i> NCFB 721	-	-	ND	

<sup>a</sup> Abbreviations: An asterisk indicates that the strain was found to be enterotoxic in a previous study. ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Md.; DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany; NCFB = National Collection of Food Bacteria, AFRC Institute of Food Research, Reading, United Kingdom; PHLS = Food Hygiene Laboratory, Central Public Health Laboratory, London, United Kingdom; SMR = Swedish Dairies' Association, Lund, Sweden; KTL = National Public Health Institute, Helsinki, Finland; TP = strains used in Pirttijärvi *et al.* (30).

<sup>b</sup> PCR was done with HblA primers.

<sup>c</sup> The results are recorded according to the manufacturer's instructions. The numbers refer to the strength of the reaction, e.g., "4" is a weak reaction, and "64" is a strong reaction. ND, Not determined.

<sup>d</sup> The results are recorded according to the manufacturer's instructions. The numbers refer to the strength of the reaction. ND, Not determined.

<sup>e</sup> Hemolysin PCR-RFLP types: type I cuts like model *hblA* sequence of *B. cereus* F837/76, in type II the restriction pattern is different with *RsaI* and *TaqI* restriction enzymes, and in type III the restriction pattern is different with *TaqI*.

- ③ 하지만 안전성을 고려하여 *Bacillus subtilis* 또는 *Bacillus licheniformis* 균주를 확보하여 제품화할 때 키틴분해용으로 활용하기로 함. 최근 식용곤충 갈색거저리의 키틴분해 균주를 연구하고 있는 곤충잠업연구소에서 효과적인 *B. subtilis* 균주를 분양받기로 하였음.

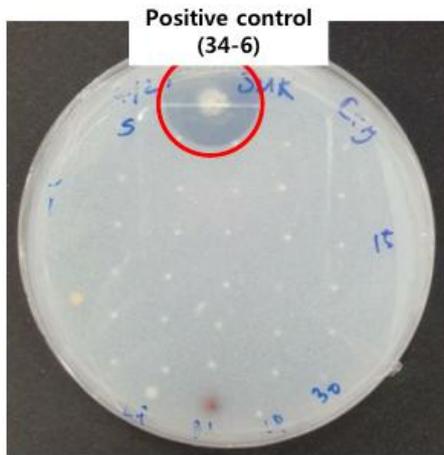
## 1. 유산균으로부터 키틴분해미생물 분리

### 1) 2가지 소스로부터 유산균 분리

: - MRS 배지에  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  으로 희석하여 도말 후 30℃에서 48시간 배양

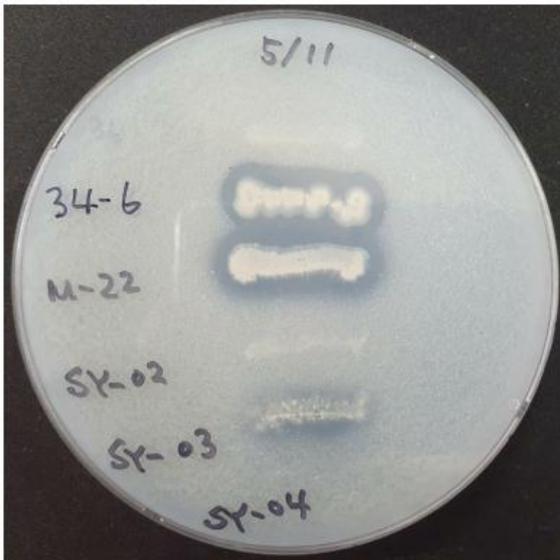
- chitinase 생산 균주 분리를 위해 colloidal chitin 이 함유된 배지에 선별접종

- 확인 결과 키틴분해능이 보이는 유산균이 분리되지 않음.

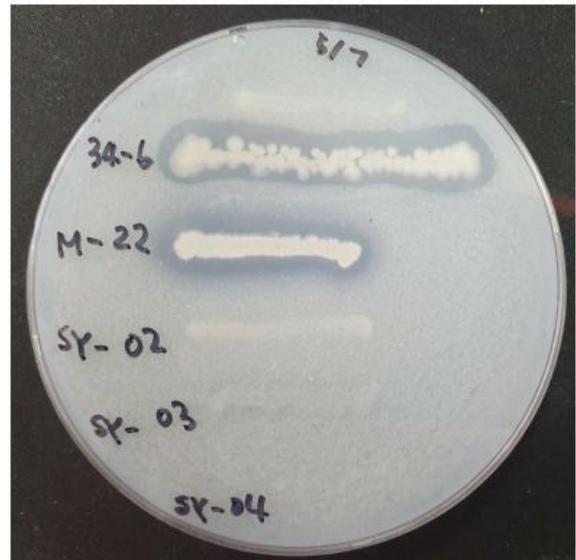


유산균이 잘 자라지 않아서 활성이 없는 것일수 있어서 MRS 배지에 키틴을 첨가하여 다시 확인 하였으나, 균이 성장은 하지만 활성은 보이지 않음.

### 2) 기 보유 키틴분해 미생물 및 토양 분리 균주, 제공된 균주의 키틴분해 활성능 확인



37°C에서 7일 배양



30°C에서 7일 배양

2) 액상 배지로부터 키틴분해 확인(앞 페이지의 5균주 + negative control)

- 키틴을 탄소원으로 한 액상배지에서 키틴분해 확인

a. 탄소원으로 colloidal chitin

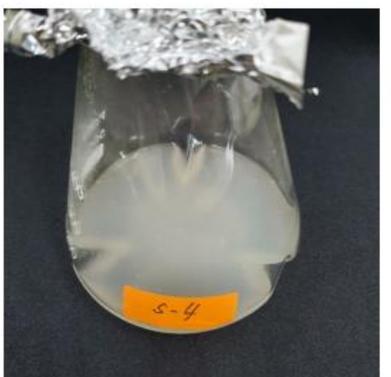
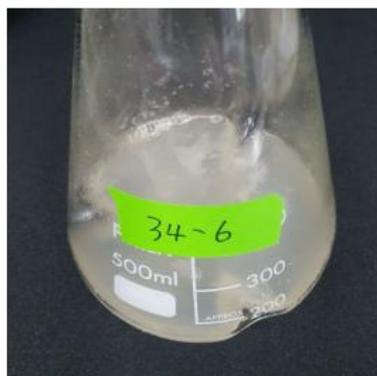
b. 곤충유래 chitin 사용

(%)

	colloidal chitin	곤충유래 chitin
colloidal chitin	0.5	-
곤충유래 chitin	-	2
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.03	0.03
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.07	0.07
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	0.05
$\text{FeSO}_4$	0.01	0.01
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01	0.01
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.01	0.01

- 30°C , 150rpm , 5day 배양

배양 결과



## 배양 결과



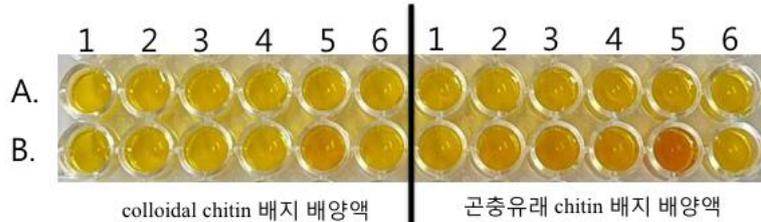
## 배양전,후 상등액



A. 배양 전 상등액  
 B. 배양 후 상등액  
 \* 12000rpm 5min 원심분리

1 : *Bacillus velezensis* (negative control)  
 2 : *Paenibacillus elgii*  
 3 : M-22  
 4 : SY-02  
 5 : SY-03  
 6 : SY-04

## 배양전,후 상등액 chitinase 활성



A. 배양 전 상등액 chitinase 활성  
 B. 배양 후 상등액 chitinase 활성  
 \*37 °C에서 30분 반응 후 DNS 방법으로 측정  
 (갈색일수록 활성이 높음)

### 3) 키틴분해 미생물 대량배양(20L)

- 배지 조성

(%)

곤충유래 chitin	1
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.03
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.07
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{FeSO}_4$	0.01
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.01



○ *Bacillus subtilis* 균주를 활용한 누에의 발효실험 및 갈색거저리의 고상발효에서 함수율을 40% 상태로 발효하여 단기간에 발효시키는 결과 등을 분석하여 검토한 결과 키틴발효 후 곤충의 분말을 고상 발효 할 수 있는 균주를 활용한 2차 발효를 실시함(Manirul Islam, 2015; 차 등, 2008).

Table 1. Microbial concentration, nutrient composition, trace minerals and pH (Mean  $\pm$  S.E) of dry mealworm and dry mealworm larvae probiotics

Item	DML <sup>1</sup>	DMLP <sup>2</sup>
Microbial stains (log <sub>10</sub> cfu/g)		
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3099		1.87±0.06
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC 7928		1.18±0.15
<i>Bacillus</i> spp.	0.48±0.05	1.36±0.17
Yeast and mold	2.53±0.12	1.60±0.26
<i>Escherichia coli</i>	0.78±0.04	-
<i>Salmonella</i> spp.	-	-
Chemical composition		
Moisture (% dry matter)	6.12±0.02	12.91±0.02
Crude Protein (% dry matter)	47.73±0.03	27.95±0.09
Crude Fat (% dry matter)	23.28±0.10	5.35±0.08
Crude Fiber (% dry matter)	6.82±0.08	7.38±0.08
Crude Ash (% dry matter)	3.26±0.08	4.15±0.04
NFE (% dry matter)	12.79±0.10	42.27±0.07
Calcium (mg/100g)	7.15±0.66	3.78±1.60
Iron (mg/100g)	11.81±0.66	11.95±0.99
Sodium (mg/100g)	1.25±0.09	2.04±0.11
Magnesium (mg/100g)	1.81±0.20	1.88±0.43
pH	7.35±0.01	4.81±0.34

<sup>1</sup>DML = Dry mealworm larvae

<sup>2</sup>DMLP = Dry mealworm larvae probiotics.

\*NFE: 가용무질소(Nitrogen free extract) 전체 건물에서 조단백질, 조지방, 조섬유, 조회분을 제외한 나머지 성분으로 NFE가 높으면 소화가 잘됨

Table 4. Fatty acid compositions of freeze-drying silkworm powder (FDSW) and heating-drying silkworm powder (HDSW) and fermented silkworm powders (% for area of total fatty acids)

Fatty acid	Myristic acid (14:0)	Palmitic acid (16:0)	Palmitoleic acid (16:1)	Stearic acid (18:0)	Oleic acid (18:1 n=9)	Linoleic acid (18:2 n=6)	Linolenic acid (18:3 n=3)	Arachidinic acid (20:0)	Lignoceric acid (24:0)	Others
FDSW	0.13	20.78	0.45	9.01	26.91	7.56	32.72	0.07	0.48	1.89
HDSW	0.12	18.09	0.36	8.08	23.31	5.71	34.87	0.44	0.00	1.09
FDSW+Lh1	0.12	22.54	0.48	8.37	32.65	7.47	31.95	0.39	0.00	2.82
FDSW+Lh5	0.14	20.37	0.51	8.54	26.17	7.54	32.63	0.47	0.00	3.63
FDSW+Ba1	0.10	21.75	0.44	8.99	26.13	7.34	31.09	0.49	0.00	3.66
FDSW+Ba5	0.11	22.55	0.49	8.56	26.00	7.60	32.22	0.41	0.00	2.06
HDSW+Lh1	0.00	21.91	0.37	11.68	25.58	5.20	28.59	0.47	0.00	6.21
DSW+Lh5	0.11	19.79	0.39	8.76	24.58	6.06	36.24	0.44	0.31	3.33
HDSW+Ba1	0.10	20.41	0.38	8.34	25.44	6.03	35.98	0.43	0.00	2.90
HDSW+Ba5	0.11	20.78	0.36	8.75	25.07	5.95	36.09	0.42	0.08	2.39

Abbreviations are the same in table 1.

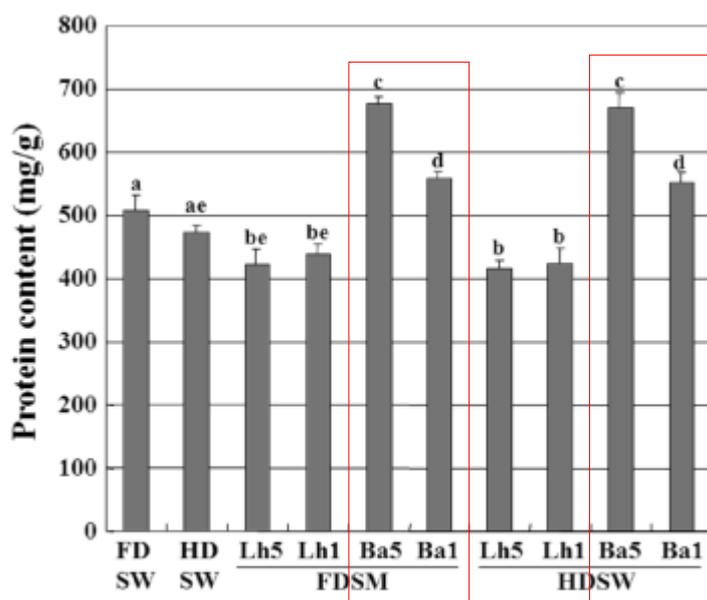


Fig. 1. Protein concentrations of freeze-drying silkworm powder (FDSW), heating-drying silkworm powder (HDSW) and fermented silkworm powders. Abbreviations are the same in table 1.



○ 최종산물(키틴발효 사료첨가제)의 아미노산조성비 비교

## 시험 성적서

<b>KFRI 한국식품연구원</b> (우)55365 전북 완주군 이서면 농생명로 245 Tel: (063)219-9292, Fax: (063)219-9290	성적서 번호 : A02020-07-21-305-001	
--	----------------------------------	---

- 1.업 체 명 : 농업회사법인(주)한국유용곤충연구소
- 2.주 소 : (57507)전남 곡성군 옥과면 소룡길 289-38
- 3.시 료 명 : BSF
- 4.의뢰일자 : 2020년 07월 02일
- 5.용 도 : 제품개발용
- 6.시험결과 :

분석 항목	결과	단위	시험 방법
0-phosphoserine	30.8	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
Taurine	114.4	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
0-Phosphoethanolamine	590.4	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
Urea	불검출	-	아미노산 자동분석기 측정법
L-Aspartic acid	32.9	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Hydroxyproline	145.8	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Threonine	32.4	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Serine	20.9	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Glutamic acid	123.7	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
Sarcosine	46.4	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-2-Aminoadipic acid	0.8	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L(-)-Proline	202.1	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
Glycine	35.7	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Alanine	90.0	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Citrulline	5.4	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
DL-2-Aminobutyric acid	불검출	-	아미노산 자동분석기 측정법
L-Valine	48.6	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L(-)-Cystine	불검출	-	아미노산 자동분석기 측정법
L-Methionine	7.6	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Cystathionine	7.3	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Isoleucine	18.0	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Leucine	29.0	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법

이 성적서의 일부 또는 전부를 법적 소송 및 상품선전 등 기타 목적으로 사용할 수 없습니다. 분석한 결과는 제시된 시료에 대한 것이며 생산되는 모든 제품의 품질을 대표하는 것은 아닙니다.  
 성적서의 재발급은 승인을 받아야 하며 진위여부는 063-219-9292에서 확인 가능합니다.  
 이 성적서는 KOLAS 인증과 관련이 없습니다.

2020. 07. 21

한국식품연구원장 (인)



KFRI-QPF-15-04(01)

페이지 ( 1 ) / ( 총 2 )

# 시험 성적서

<b>KFRI</b> 한국식품연구원 (우)55365 전북 완주군 이서면 농생명로 245 Tel: (063)219-9292, Fax: (063)219-9290	성적서 번호 : A02020-07-21-305-001	
--	----------------------------------	---

- 1.업 체 명 : 농업회사법인(주)한국유용곤충연구소
- 2.주 소 : (57507)전남 곡성군 옥과면 소룡길 289-38
- 3.시 료 명 : BSF
- 4.의뢰일자 : 2020 년 07 월 02 일
- 5.용 도 : 제품개발용
- 6.시험결과 :

분석 항목	결과	단위	시험 방법
L-Tyrosine	154.0	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Phenylalanine	14.0	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
β-Alanine	불검출	-	아미노산 자동분석기 측정법
DL-3-Aminoisobutyric acid	10.8	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
4-Aminobutyric acid	2.4	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
2-Aminoethanol	9.1	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
DL-plus allo-δ-Hydroxylysine	6.9	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Ornithine	2.2	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Lysine	25.8	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-1-Methylhistidine	10.8	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Histidine	39.4	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-3-Methylhistidine	2.0	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Anserine	불검출	-	아미노산 자동분석기 측정법
L-Carnosine	10.2	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Arginine	179.9	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법

- \* Urea : LOD: 1.202 mg/100g
- \* DL-2-Aminobutyric acid : LOD: 0.002 mg/100g
- \* L(-)-Cystine : LOD: 0.024 mg/100g
- \* β-Alanine : LOD: 0.022 mg/100g
- \* L-Anserine : LOD: 0.300 mg/100g

이 성적서의 일부 또는 전부를 법적 소송 및 상품선전 등 기타 목적으로 사용할 수 없습니다. 분석한 결과는 제시된 시료에 대한 것이며 생산되는 모든 제품의 품질을 대표하는 것은 아닙니다.  
 성적서의 재발급은 승인을 받아야 하며 진위여부는 063-219-9292에서 확인 가능합니다.  
 이 성적서는 KOLAS 인정과 관련이 없습니다.

2020. 07. 21

한국식품연구원장 (인)



# 시험 성적서

<b>KFRI</b> 한국식품연구원 (우)55365 전북 완주군 이서면 농생명로 245 Tel: (063)219-9292, Fax: (063)219-9290	성적서 번호 : A02020-07-21-305-002	
--	----------------------------------	---

- 1.업 체 명 : 농업회사법인(주)한국유용곤충연구소
- 2.주 소 : (57507)전남 곡성군 옥과면 소룡길 289-38
- 3.시 료 명 : BSF-W
- 4.의뢰일자 : 2020년 07월 02일
- 5.용 도 : 제품개발용
- 6.시험결과 :

분석 항목	결과	단위	시험 방법
O-phosphoserine	29.6	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
Taurine	14.5	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
O-Phosphoethanolamine	208.1	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
Urea	불검출	-	아미노산 자동분석기 측정법
L-Aspartic acid	2.8	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Hydroxyproline	96.5	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Threonine	1.3	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Serine	1.4	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Glutamic acid	2.6	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
Sarcosine	불검출	-	아미노산 자동분석기 측정법
L-2-Aminoadipic acid	0.6	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L(-)-Proline	불검출	-	아미노산 자동분석기 측정법
Glycine	3.4	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Alanine	4.5	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Citrulline	2.1	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
DL-2-Aminobutyric acid	불검출	-	아미노산 자동분석기 측정법
L-Valine	6.1	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L(-)-Cystine	22.8	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Methionine	불검출	-	아미노산 자동분석기 측정법
L-Cystathionine	5.3	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Isoleucine	6.0	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Leucine	4.5	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법

이 성적서의 일부 또는 전부를 법적 소송 및 상품선전 등 기타 목적으로 사용할 수 없습니다. 분석한 결과는 제시된 시료에 대한 것이며 생산되는 모든 제품의 품질을 대표하는 것은 아닙니다.  
 성적서의 재발급은 승인을 받아야 하며 진위여부는 063-219-9292에서 확인 가능합니다.  
 이 성적서는 KOLAS 인정과 관련이 없습니다.

2020. 07. 21

한국식품연구원장 (인)



# 시험 성적서

<b>KFRI</b> 한국식품연구원 (우)55365 전북 완주군 이서면 농생명로 245 Tel: (063)219-9292, Fax: (063)219-9280	성적서 번호 : A02020-07-21-305-002	
--	----------------------------------	---

- 1.업 체 명 : 농업회사법인(주)한국유용곤충연구소
- 2.주 소 : (57507)전남 곡성군 옥과면 소룡길 289-38
- 3.시 료 명 : BSF-W
- 4.의뢰일자 : 2020년 07월 02일
- 5.용 도 : 제품개발용
- 6.시험결과 :

분석 항목	결과	단위	시험 방법
L-Tyrosine	3.6	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Phenylalanine	4.1	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
β-Alanine	2.7	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
DL-3-Aminoisobutyric acid	불검출	-	아미노산 자동분석기 측정법
4-Aminobutyric acid	11.5	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
2-Aminoethanol	42.8	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
DL-plus allo-δ-Hydroxylysine	2.8	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Ornithine	0.3	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Lysine	1.4	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-1-Methylhistidine	불검출	-	아미노산 자동분석기 측정법
L-Histidine	1.2	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-3-Methylhistidine	불검출	-	아미노산 자동분석기 측정법
L-Anserine	불검출	-	아미노산 자동분석기 측정법
L-Carnosine	4.4	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Arginine	2.1	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법

- \* Urea : LOD: 1.202 mg/100g
- \* Sarcosine : LOD: 0.223 mg/100g
- \* L(-)-Proline : LOD: 0.115 mg/100g
- \* D(-)-Aspartic acid : LOD: 0.002 mg/100g
- \* L-Methionine : LOD: 0.015 mg/100g
- \* D-3-Methylbutyric acid : LOD: 0.004 mg/100g
- \* L-1-Methylhistidine : LOD: 0.007 mg/100g
- \* L-3-Methylhistidine : LOD: 0.007 mg/100g
- \* L-Anserine : LOD: 0.300 mg/100g

이 성적서의 일부 또는 전부를 법적 소송 및 상품선전 등 기타 목적으로 사용할 수 없습니다. 분석한 결과는 제시된 시료에 대한 것이며 생산되는 모든 제품의 품질을 대표하는 것은 아닙니다.  
 성적서의 재발급은 승인을 받아야 하며 진위여부는 063-219-9292에서 확인 가능합니다.  
 이 성적서는 KOLAS 인정과 관련이 없습니다.

2020. 07. 21

한국식품연구원장 (함봉) 

KFRI-QPF-15-04(01)

페이지 ( 2 ) / ( 총 2 )

# 시험 성적서

<b>KFRI</b> 한국식품연구원 (우)55365 전북 완주군 이서면 농생명로 245 Tel : (063)219-9292, Fax : (063)219-9280	성적서 번호 : A02020-07-21-305-003	

- 1.업 체 명 : 농업회사법인(주)한국유용곤충연구소
- 2.주 소 : (57507)전남 곡성군 옥과면 소룡길 289-38
- 3.시 료 명 : BSF-B
- 4.의뢰일자 : 2020 년 07 월 02 일
- 5.용 도 : 제품개발용
- 6.시험결과 :

분석 항목	결과	단위	시험 방법
O-phosphoserine	47.1	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
Taurine	50.9	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
O-Phosphoethanolamine	321.0	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
Urea	불검출	-	아미노산 자동분석기 측정법
L-Aspartic acid	51.1	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Hydroxyproline	190.0	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Threonine	4.3	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Serine	4.0	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Glutamic acid	15.8	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
Sarcosine	불검출	-	아미노산 자동분석기 측정법
L-2-Aminoadipic acid	불검출	-	아미노산 자동분석기 측정법
L(-)-Proline	59.3	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
Glycine	7.6	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Alanine	16.3	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Citrulline	5.5	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
DL-2-Aminobutyric acid	불검출	-	아미노산 자동분석기 측정법
L-Valine	110.2	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L(-)-Cystine	36.8	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Methionine	불검출	-	아미노산 자동분석기 측정법
L-Cystathionine	38.0	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Isoleucine	33.9	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Leucine	45.6	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법

이 성적서의 일부 또는 전부를 법적 소송 및 상품선전 등 기타 목적으로 사용할 수 없습니다. 분석한 결과는 제시된 시료에 대한 것이며 생산되는 모든 제품의 품질을 대표하는 것은 아닙니다.  
 성적서의 재발급은 승인을 받아야 하며 진위여부는 063-219-9292에서 확인 가능합니다.  
 이 성적서는 KOLAS 인정과 관련이 없습니다.

2020. 07. 21

한국식품연구원장 (함)



KFRI-QPF-15-04(01)

페이지 ( 1 ) / ( 총 2 )

# 시험 성적서

<b>KFRI</b> 한국식품연구원 (우)55365 전북 완주군 이서면 농생명로 245 Tel : (063)219-9292, Fax : (063)219-9280	성적서 번호 : A02020-07-21-305-003	
--	----------------------------------	---

- 1.업 체 명 : 농업회사법인(주)한국유용곤충연구소
- 2.주 소 : (57507)전남 곡성군 옥과면 소룡길 289-38
- 3.시 료 명 : BSF-B
- 4.의뢰일자 : 2020년 07월 02일
- 5.용 도 : 제품개발용
- 6.시험결과 :

분석 항목	결과	단위	시험 방법
L-Tyrosine	9.3	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Phenylalanine	10.1	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
β-Alanine	4.0	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
DL-3-Aminoisobutyric acid	불검출	-	아미노산 자동분석기 측정법
4-Aminobutyric acid	6.4	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
2-Aminoethanol	23.8	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
DL-plus allo-δ-Hydroxy lysine	3.7	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Ornithine	4.0	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Lysine	8.1	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-1-Methylhistidine	불검출	-	아미노산 자동분석기 측정법
L-Histidine	3.3	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-3-Methylhistidine	불검출	-	아미노산 자동분석기 측정법
L-Anserine	18.4	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Carnosine	4.4	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법
L-Arginine	4.4	mg/100g	아미노산 자동분석기 측정법

* Urea	: LOD: 1.202 mg/100g
* Sarcosine	: LOD: 0.223 mg/100g
* L-2-Aminobutyric acid	: LOD: 0.003 mg/100g
* DL-2-Aminobutyric acid	: LOD: 0.002 mg/100g
* L-Methionine	: LOD: 0.015 mg/100g
* DL-3-Methylcrotonic acid	: LOD: 0.004 mg/100g
* L-1-Methylhistidine	: LOD: 0.007 mg/100g
* L-3-Methylhistidine	: LOD: 0.007 mg/100g

이 성적서의 일부 또는 전부를 법적 소송 및 상품선전 등 기타 목적으로 사용할 수 없습니다. 분석한 결과는 제시된 시료에 대한 것이며 생산되는 모든 제품의 품질을 대표하는 것은 아닙니다.  
 성적서의 재발급은 승인을 받아야 하며 진위여부는 063-219-9292에서 확인 가능합니다.  
 이 성적서는 KOLAS 인정과 관련이 없습니다.

2020. 07. 21

한국식품연구원장 (인)



○ 발효전, 후 아미노산성분 비교

5. 용도 : 제품개발용  
6. 시험결과 :

분석 항목	B	W	결과	단위
L-Tyrosine	8.3	3.6	154.0	mg/100g
L-Phenylalanine	10.1	4.1	14.0	mg/100g
β-Alanine	4.0	2.7	불검출	-
DL-3-Aminoisobutyric acid	-	-	10.8	mg/100g
4-Aminobutyric acid	6.4	11.5	2.4	mg/100g
2-Aminoethanol	23.8	42.8	9.1	mg/100g
DL-plus allo-δ-Hydroxylysine	3.7	2.8	6.9	mg/100g
L-Ornithine	4.0	0.3	2.2	mg/100g
L-Lysine	8.1	1.4	25.8	mg/100g
L-1-Methylhistidine	-	-	10.8	mg/100g
L-Histidine	3.3	1.2	39.4	mg/100g
L-3-Methylhistidine	-	-	2.0	mg/100g
L-Anserine	18.4	-	불검출	-
L-Carnosine	4.4	6.4	10.2	mg/100g
L-Arginine	4.4	2.1	179.9	mg/100g

\* Urea : LOD: 1.202 mg/100g  
 \* DL-2-Aminobutyric acid : LOD: 0.002 mg/100g  
 \* L(-)-Cystine : LOD: 0.024 mg/100g  
 \* β-Alanine : LOD: 0.022 mg/100g  
 \* L-Anserine : LOD: 0.300 mg/100g

\* 결과(아메리카동애 등에 탈지분말)

\* B: *Bacillus licheniformis*로 발효

\* W: 효소제를 넣어 발효

대표 미생물균주로는

1. 락토바실러스 플란타럼(유산균, 실험성적서 참조)
2. 스트렙토마이세스(방선균)
3. 로도슈도모나스 팔루스트리스(광합성균)
4. 바실러스 마일로리큐파시멘스(고초균, 실험성적서 참조)
5. 스피노과피미시스 그란놀리(광합성균?, 실험성적서 참조) 등의 복합미생물을 사용하고 있습니다.

○ 본 연구결과는 선행 연구된 다른 곤충발효 산물의 아미노산 분석 자료와 비교하였을 때 유리아미노산 성분의 변화에 대해 추가적인 실험을 통해 검증할 필요가 있을 것으로 판단되었다(농촌진흥청 보도자료, 2020년)

① 농촌진흥청은 식용곤충 발효에 적합한 미생물을 선발하여 발효에 적용하였다. 그 결과 쌍별귀뚜라미를 발효시켜 식용곤충 원료의 냄새를 개선하였고 필수아미노산중 트레오닌, 리신 등이 약 3배가량 증가하는 결과를 얻었다(최 등, 2019).

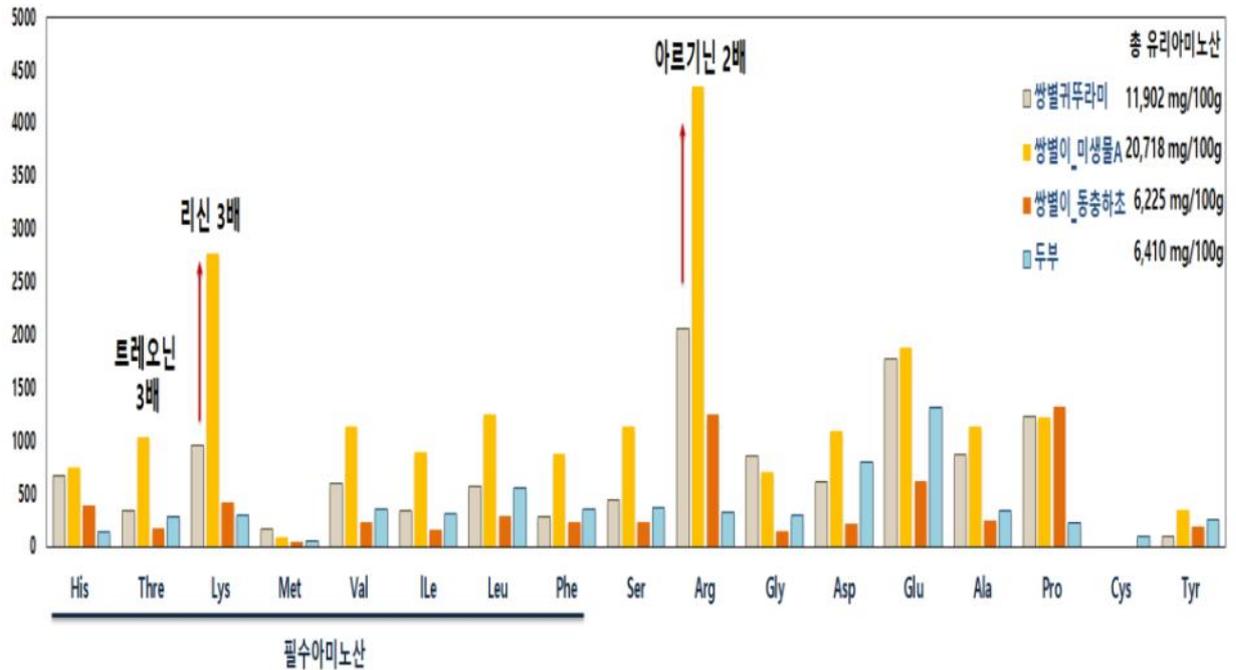


그림. 쌍별귀뚜라미 미생물 발효물의 유리아미노산 함량

② 갈색거저리 동충하초의 유산균 발효에 따른 아미노산의 변화를 살펴본 실험(김 등, 2018)에서도 발효 전후의 유리아미노산 변화에 대하여 확인할 수 있었다.

**Table 3. Contents of free amino acids according to lactic acid bacteria fermentation of *C. militaris* grown upon *T. molitor***

(mg%)				
Components	NP <sup>1)</sup>	FP	T-value	P-value
Aspartic acid	1,205.16±5.84 <sup>2)</sup>	1,047.82±3.07	41.305 <sup>****5)</sup>	0.000
Serine	761.78±0.77	662.34±5.35	31.865 <sup>****</sup>	0.000
Taurine	169.63±1.12	152.05±1.74	0.581 <sup>****</sup>	0.000
Glutamic acid	2,059.97±1.00	1,922.64±0.99	0.989 <sup>****</sup>	0.000
Glycine	243.31±0.14	248.74±0.08	0.498 <sup>****</sup>	0.000
Histidine	215.64±0.15	228.63±0.47	0.264 <sup>****</sup>	0.000
Arginine	447.23±0.44	349.37±0.04	0.144 <sup>****</sup>	0.000
Threonine	644.04±0.24	608.06±0.19	0.760 <sup>****</sup>	0.000
Alanine	1,140.99±1.33	1,069.98±0.71	0.457 <sup>****</sup>	0.000
Proline	410.81±0.51	430.37±0.01	0.121 <sup>****</sup>	0.000
Tyrosine	356.42±0.01	145.44±0.03	0.275 <sup>****</sup>	0.000
Cystine	49.10±0.80	61.66±0.10	0.157 <sup>****</sup>	0.000
Valine	596.22±0.25	568.30±1.70	0.167 <sup>****</sup>	0.000
Methionine	124.33±0.97	108.06±3.88	0.219 <sup>****</sup>	0.002
Lysine	613.27±1.51	621.15±0.80	0.453 <sup>****</sup>	0.001
Isoleucine	247.22±3.02	236.39±0.44	0.166 <sup>****</sup>	0.004
Leucine	406.63±0.11	393.00±3.40	0.125 <sup>****</sup>	0.002
Tryptophane	199.14±0.07	321.39±0.04	0.498 <sup>****</sup>	0.000
Phenylalanine	330.15±0.01	283.30±1.03	0.119 <sup>****</sup>	0.000
TAA <sup>3)</sup>	10,221.02	9,458.66		
EAA <sup>4)</sup>	2,714.64	2,581.85		

<sup>1)</sup>NP, non-fermented product; FP, fermented product.

<sup>2)</sup>All values are mean±SD.

<sup>3)</sup>Total free amino acid.

<sup>4)</sup>Essential amino acid(Thr+Val+Met+Ile+Leu+Phe+Lys+Typ).

<sup>5)</sup>\*\*\*\*p<0.005.

○ 효과적인 키틴배양액 제작에 활용할 수 있는 미생물 선발  
 식물병방제에 활용되고 있는 키틴분해 미생물의 활용(김 등, 2017)에 대한 논문에서  
*Bacillus licheniformis* 균주는 가축의 사료로 활용 가능할 것으로 판단되었다.

**Table 1.** List of the chitinase-producing biocontrol bacteria reported to reduce plant diseases and nematode damage

Strain	Source	Target pest(s) for biological control	Reference
Gram negative bacteria		Plant pathogens	
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	Soil	<i>Rhizoctonia bataticola</i> , <i>Fusarium</i> spp.	Vaidya et al., 2001
<i>Aeromonas hydrophila</i> SBK1	-	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	Halder et al., 2013
<i>Chromobacterium</i> strain C-61	Soil	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Phytophthora capsici</i> , <i>Pythium ultimum</i>	Park et al., 1995
<i>Lysobacter enzymogenes</i> LE429	Soil	<i>P. capsici</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>R. solani</i>	Han et al., 2010
<i>L. enzymogenes</i> 3.1T8	Rhizosphere	<i>P. aphanidermatum</i>	Folman et al., 2003
<i>L. enzymogenes</i> C3	Phylloplane	<i>R. solani</i>	Giesler and Yuen, 1998
		<i>Fusarium graminearum</i>	Jochum et al., 2006 Yuen et al., 2003
		<i>P. ultimum</i>	Kobayashi et al., 2005
		<i>Magnaporthe poae</i>	Kobayashi and Yuen, 2005
		<i>Uromyces appendiculatus</i>	Yuen et al., 2001
		<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Zhang and Yuen, 1999
<i>Pseudomonas fluorescens</i> PB27	Soil	<i>A. flavus</i>	Akocak et al., 2015
<i>Serratia marcescens</i> B2	Phylloplane	<i>R. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	Akutsu et al., 1993 Someya et al., 2000 Someya et al., 2001 Someya et al., 2005
<i>S. marcescens</i> GPS	Phylloplane	<i>Phaeoisariopsis personata</i>	Kishore et al., 2005b
<i>S. marcescens</i> JPP1	Phyllosphere	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Wang et al., 2013
<i>S. plymuthica</i> MP44	Rhizosphere	<i>R. solani</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Alternaria alternata</i>	Jankiewicz and Brzezinska, 2015 Kamensky et al., 2003
<i>S. plymuthica</i> IC14	Soil	<i>B. cinerea</i> , <i>S. sclerotiorum</i>	Kamensky et al., 2003
<i>S. plymuthica</i> HRO-C48	Rhizosphere	<i>Verticillium dahlia</i> , <i>Phytophthora cactorum</i>	Kurze et al., 2001
Gram positive bacteria		Plant pathogens	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SAHA 12.07	Soil	<i>Ganoderma boninense</i>	Azizah et al., 2015
<i>B. atropheus</i>	Rhizosphere	<i>F. oxysporum</i>	Shanmugam et al., 2013
<i>B. cereus</i> IO8	Soil	<i>B. cinerea</i>	Hammami et al., 2013
<i>B. licheniformis</i> S213	Soil	<i>Phoma medicaginis</i>	Slimene et al., 2015
<i>B. pumilus</i> strain SG2	Soil	<i>R. solani</i> , <i>Verticillium</i> sp., <i>Nigrospora</i> sp., <i>Stemphyllium botryosum</i> , <i>Bipolaris</i> sp.	Ghasemi et al., 2010
<i>B. subtilis</i>	Rhizosphere	<i>Alternaria</i> spp., <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>P. capsici</i> , <i>R. solani</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Verticillium theobromae</i>	Narasimhan and Shivakumar, 2012
<i>B. thuringiensis</i>	-	<i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> sp.	Reyes-Ramírez, et al., 2004
<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	Soil	<i>R. solani</i> , <i>F. solani</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i>	Subbanna et al., 2016
<i>P. kribbensis</i>	Soil	<i>B. cinerea</i> , <i>Colletotrichum acutatum</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> , <i>Magnaporthe oryzae</i> , <i>P. capsici</i> , <i>R. solani</i> , <i>Sclerotium cepivorum</i>	Xu et al., 2014

**Table 1.** Continued

Strain	Source	Target pest(s) for biological control	Reference
Gram negative bacteria		Nematodes	
<i>Chromobacterium</i> sp.	Soil	<i>Globodera rostochiensis</i>	Cronin et al., 1997
<i>Lysobacter enzymogenes</i>			
<i>L. enzymogenes</i> C3	Phylloplane	<i>Caenorhabditis elegans</i> , <i>Heterodera schachtii</i> , <i>Meloidogyne javanica</i> , <i>Pratylenchus penetrans</i> , <i>Aphelenchoides fragariae</i>	Chen et al., 2006
<i>L. enzymogenes</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.,	Rizoplane	<i>Trichodorus primitivus</i>	Insunza et al., 2002
<i>L. capsici</i> YS1215	Soil	<i>Meloidogyne</i> sp.	Lee et al., 2013
<i>P. chitinolytica</i>	Soil	<i>M. javanica</i>	Spiegel et al., 1991
<i>Serratia plymuthica</i>	Soil	<i>Meloidogyne ethiopica</i>	Aballay et al., 2013
Gram positive bacteria		Nematodes	
<i>Bacillus licheniformis</i> MH48	Soil	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	Jeong et al., 2015
<i>B. pumilus</i> L1	Soil	<i>Meloidogyne arenaria</i>	Lee and Kim, 2016
<i>Paenibacillus ehimensis</i> RS820	Soil	<i>M. incognita</i>	Hong et al., 2013
<i>P. elgii</i> HOA73	Soil	<i>M. incognita</i>	Nguyen et al., 2013
<i>P. illinoisensis</i> KJA-424	Soil	<i>M. incognita</i>	Jung et al., 2002
<i>P. polymyxa</i> GBR-1	Rhizoplane	<i>M. incognita</i>	Khan et al., 2008

○ 키틴배양액 제작을 위한 경제성분석

: 키틴발효 사료첨가제의 산업화를 위해서는 배양액 및 2차 발효용 균주를 직접 생산하거나 기존의 판매중인 생균제를 활용하여 직접 발효시스템을 거쳐 발효 및 제품화하는 것이 경제성있을 것으로 판단되었다.

1. 키틴배양액 제작을 위한 발효 비용(*Bacillus subtilis* 균주 사용)

합 계 금 액 : 일금		이십만오천사백팔십 원정		₩205,480		(VAT 포함)	
No	품 명	규 격	단위	수량	단 가	금 액	
1	고압멸균기	3시간		2	7,291	₩	14,582
2	진탕배양기	1일		3	10,856	₩	32,568
3	저온저장고	1일		3	10,122	₩	30,366
4	배양기	1일		3	9,324	₩	27,972
5	기술료					₩	100,000
합 계 금 액 : 일금		칠십삼만팔백 원정		₩730,800		(VAT 포함)	
No	품 명	규 격	단위	수량	단 가	금 액	
1	제품 배양			1	580,800	₩	580,800
2	미생물동정			1	150,000	₩	150,000

NO	구분	품명	규격	단위	수량	견적금액		비고(사용 예정일)
						단가	합계	
1	발효장비 라인	50L Fermenter		일	2	254,000	508,000	
2		500L Fermenter		일	0	291,000	-	
3		5000L Fermenter		일	0	834,000	-	
4		2.5ton 고체발효기		일	0	680,000	-	
5	회수장비 라인	관형연속원심분리기		일	0	98,000	-	
6		Ceramic_filter_system		일	0	381,000	-	
7	저장탱크	5ton 저장탱크		일	0	75,000	-	
8	포장 라인	액상자동포장기		일	0	206,000	-	
9		분말자동포장기		일	0	104,000	-	
10	건조 라인	20kg 동결건조기		일	0	109,000	-	
11		300kg 동결건조기		일	0	382,000	-	
12		유동층퍼펄건조기		일	0	239,000	-	
13		일통건조기		일	0	217,000	-	
14	제형 라인	드럼혼합기		일	0	90,000	-	
15		리본혼합기		일	0	94,000	-	
16		필립분쇄기		일	0	89,000	-	
17		제트밀분쇄기		일	0	113,000	-	
18	부가 비용 1.	주간 인건비		일	0	150,000	-	
19		야간 인건비		일	0	350,000	-	
20	부가 비용 2.	원료비		일	0	100,000	-	
21				일	0		-	
22				일	0		-	
23		기타 (물류, 소모품)		일	1	20,000	20,000	1L병 포장

○ 2차 단백질발효(*B. licheniformis*)용 균주 배양을 위한 비용

NO	구분	품명	규격	단위	수량	견적금액		비고(사용 예정일)
						단가	합계	
1	발효장비 라인	50L Fermenter		입	0	254,000	-	
2		500L Fermenter		입	2	291,000	582,000	
3		5000L Fermenter		입	0	834,000	-	
4		2.5ton 교체발효기		입	0	680,000	-	
5	회수장비 라인	관형연속침실분리기		입	1	98,000	98,000	
6		Ceramic_filter_system		입	0	381,000	-	
7	저장탱크	5ton 저장탱크		입	0	75,000	-	
8	포장 라인	역상자동포장기		입	0	206,000	-	
9		분말자동포장기		입	0	104,000	-	
10	건조 라인	20kg 동결건조기		입	4	109,000	436,000	
11		300kg 동결건조기		입	0	382,000	-	
12		유동층과립건조기		입	0	239,000	-	
13		열풍건조기		입	0	217,000	-	
14	제형 라인	드럼혼합기		입	0	90,000	-	
15		리본혼합기		입	0	94,000	-	
16		필립분쇄기		입	0	89,000	-	
17		제트밀분쇄기		입	0	113,000	-	
18	부가 비용 1.	주간 인건비		입	3	150,000	450,000	
19		야간 인건비		입	2	350,000	700,000	
20	부가 비용 2.	원료비		입	3	100,000	300,000	
21				달	0		-	
22				입	0		-	
23			기타 (물류, 소모품)		입	1	20,000	20,000
24	품목명				규격 항목			
	<i>B. licheniformis</i>		생균수(cfu/g,ml)		생산량			
		1 x 10 <sup>10</sup> cfu/g		3 ~ 4kg				

---

○ 교육컨설팅

: 2019년 동해등에 대량사육을 위한 계열화농가 선발을 위한 협의회 및 교육 실시  
(2019. 11. 6)



○ 사료용곤충산업화 보조사업 추진 결과

(1) 종충생산센터와 사료가공실의 신축

- 위 치 : 전남 곡성군 옥괴면 소룡리 784-1 외 1개소(한국유용곤충연구소 내)
- 면 적 : 종충센터 682.24㎡, 사료가공센터 297.36㎡
- 소유주 : 농업회사법인(주)한국유용곤충연구소
- 지 목 : 계획관리지역

(가) 종충생산센터

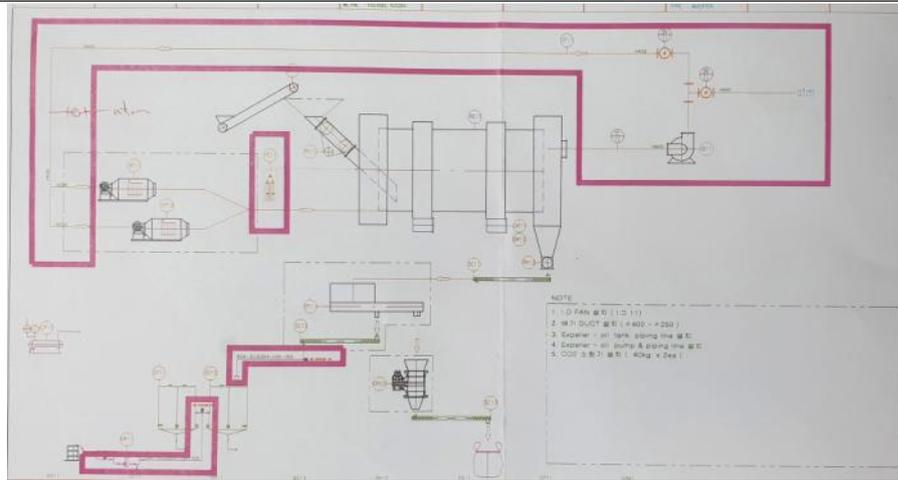
기 능	세부내용(종충 생산센터)	총면적	비고
산 란 실	- 부분적 채광형 지붕 - 부화유도실(50 ㎡) - 본사 내 기존 산란실(400 ㎡와 함께 이용)	341.12 ㎡	2층
유충사육실	- 먹이 교반실 - 유충 분리실 - 유충 상자(59×38×15 cm, 플라스틱)	341.12 ㎡	1층

(나) 사료가공실

기 능	세부내용(사료 가공실)	총면적	비고
자재창고	- 포장지 등 자재 보관	297.36㎡	1층
가 공 실	- Rotary Dryer(100kg/hr) 1기 - 착유기(익스펠라형) 1기 - 분쇄기(80kg/hr) 1기		

(2) 사료 가공장비 구축

품 명	규 격	수량	금액(부가세포함)
곤충 착유기 Expeller	150kg/hr	1대	154,000,000원
분쇄기	2H	1대	20,900,000원
경사 벨트 콘베어 및 Rotary Dryer	300kg/hr	4대, 1대	129,881,500원
Screw CON' V	11KW	1대	17,600,000원
총 계			322,381,500원



사료가공실 설계도면

(가) 로타리드라이어



(나) 익스펠러(착유기)



(다) 분쇄기



(라) 컨베이어벨트 등



○ 인력양성 및 농가 교육

(가) 농가 선발

지자체에서 이미 곤충 사육시설 지원사업에 선발되어 시설을 갖추고 있거나 곤충사육에 이용 가능한 시설을 보유하고 있는 농가로서 사료용 곤충 동애등에 사육에 참여 의사를 보이고, 동애등에 사육장소로서 적합한 김\*\* 농가와 오\*\* 농가를 선발함.



(나) 교육

선발된 농가는 2020년 5월부터 11월까지 한국유용곤충연구소 내 교육실과 동애등에 사육현장에서 동애등에의 생활사 및 습성, 성장단계별 특징과 사육조건, 유충의 먹이 조건과 시기, 공급 횟수, 동애등에 유충의 수확 시기 및 방법, 수확 후 가공 전 관리, 분변토의 처리 그리고 사육실 환경의 유지조건 및 관리방법 등을 이론과 실무 위주의 교육을 실시함.



## 2. 제 1협동과제: 협동연구기관(전남대학교)

가금류(육계)를 대상으로 곤충 키틴발효 사료첨가제의 면역, 항병력 효과 검증

### 2-1. 곤충키틴발효 사료첨가제의 면역, 항병력 효과 검증

#### 1. 연구목표

- 가. 곤충키틴발효사료첨가제의 생산성 증가 효과 규명
- 나. 곤충키틴발효사료첨가제의 세포성 면역 증강 효과 규명
- 다. 곤충키틴발효사료첨가제의 항병력 효과 규명

#### 2. 곤충키틴발효사료첨가제 급여에 의한 생산성 증가 효과 규명

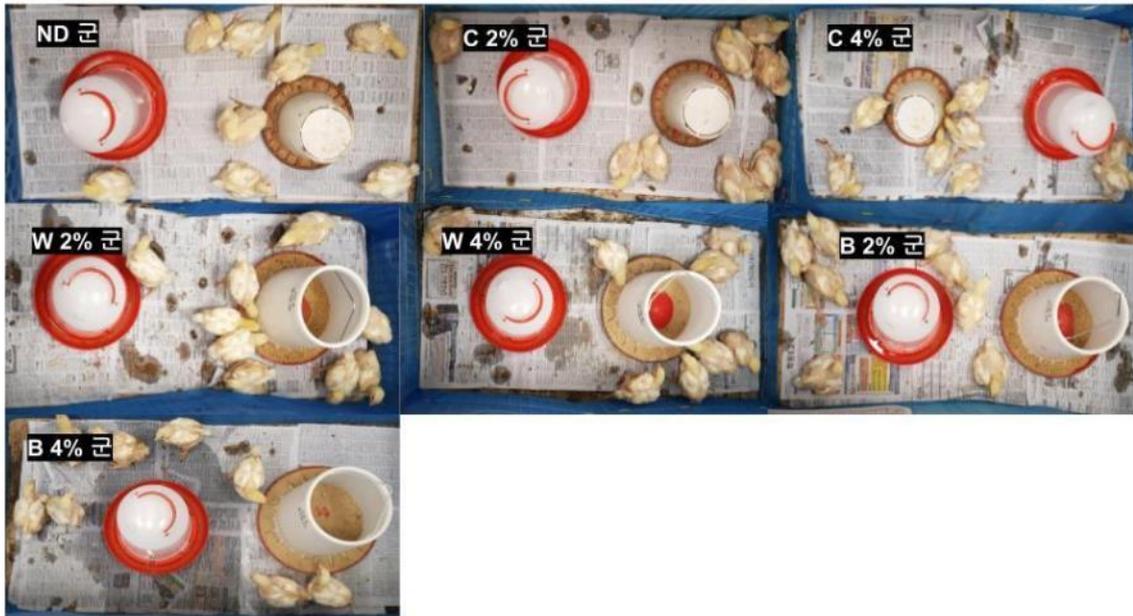
- 가. 곤충키틴발효사료첨가제 급여에 따른 육계에서의 생산성 증가 효과 규명

##### (1) 실험동물 및 군 분리

- 실험동물 입사 일주일 전에 사육사를 포르말린으로 완전 훈증 소독 후, 후드를 이용하여 완전 환기를 실시하였고, 소독 후 1일령의 육계 (Ross broiler) 병아리 70수를 전남대학교 수의과대학 실험동물 사육사로 입식하였음. 사육장 내 온도와 습도는 각각 28 ~ 30℃와 45 ~ 55%의 조건으로 유지시켰으며, 외부공기의 유입을 차단할 위해 후드를 통해서만 환기를 실시하였음. 병아리 입사 후에는 사료와 물에 자유롭게 접근할 수 있도록 해주었음.

- 1일령 Ross 육계 70마리를 7개의 군으로 나누어 농도별로 곤충키틴사료첨가제(C)와 곤충키틴발효사료첨가제(W, B)를 급여하여 그에 대한 효과를 평가하였음.

- ▶ ND 군 : 일반사료 급여군
- ▶ C 2% 군 : 곤충키틴사료첨가제 2% 급여군
- ▶ C 4% 군 : 곤충키틴사료첨가제 4% 급여군
- ▶ W 2% 군 : 곤충키틴발효사료첨가제 W 2% 급여군
- ▶ W 4% 군 : 곤충키틴발효사료첨가제 W 4% 급여군
- ▶ B 2% 군 : 곤충키틴발효사료첨가제 B 2% 급여군
- ▶ B 4% 군 : 곤충키틴발효사료첨가제 B 4% 급여군



[그림 1.] 사육장 및 군 분리 사진

(2) 곤충키틴사료첨가제 및 곤충키틴발효사료첨가제 급여 용량 설정

- 한국유용곤충연구소에서 시제품으로 생산한 곤충키틴사료첨가제(C) 및 곤충키틴발효사료첨가제 (W 와 B)를 그룹 별로 2%와 4%의 용량으로 일반 육계 사료에 혼합하여 육계에 급여하였음.
- 급여 후 매일 사료섭취량을 측정하였으며, 7일에 한 번씩, 급여 21일까지 체중 측정을 실시하였음.

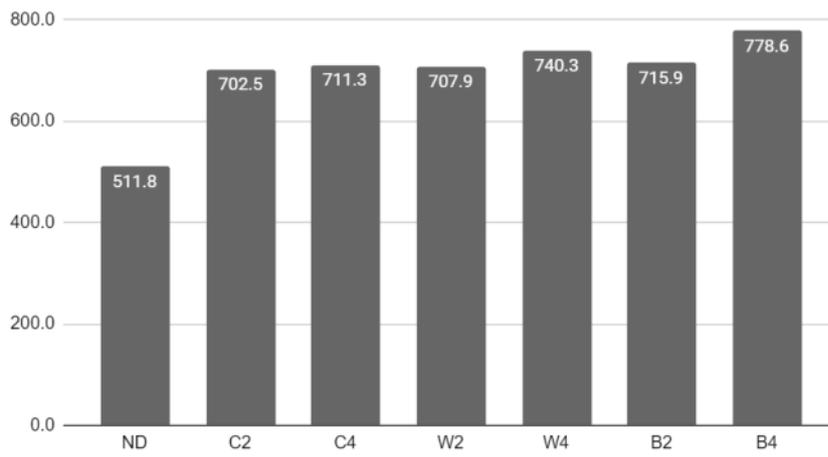
(3) 곤충키틴사료첨가제 및 곤충키틴발효사료첨가제 급여에 따른 생산성 증가 효과 확인

- 육계의 체중 및 사료섭취량을 측정한 후, 평균증체량과 생산지수를 확인하였으며, 이를 통해 사료요구율을 계산하였음. 이 때 사용한 계산식은 아래와 같음.

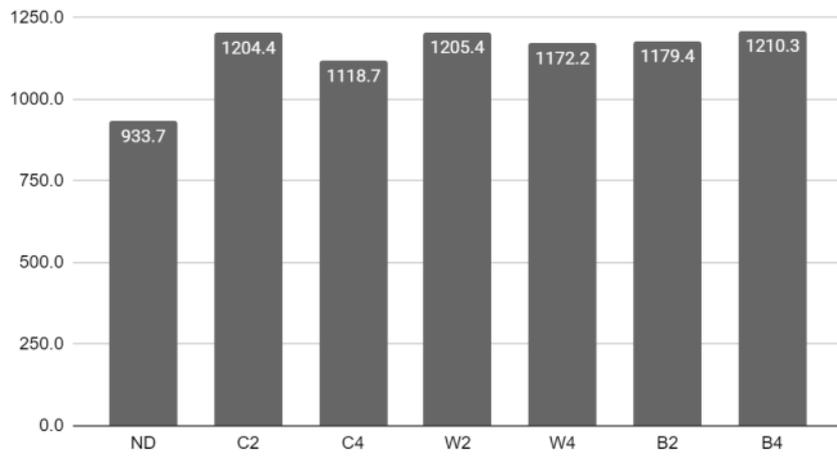
$$\begin{aligned} \text{사료요구율} &= \text{평균사료섭취량(kg)} / \text{평균출하중량(kg)} \\ \text{생산지수} &= \text{육성율(\%)} \times \text{평균출하체중(kg)} / \text{사료요구율} \\ * \text{육성율} &= \text{출하수수} / \text{입추수수} \end{aligned}$$

- ND 군에 비해 곤충키틴사료첨가제(C 그룹) 및 곤충키틴발효사료첨가제(W 와 B 그룹) 급여군에서 평균 증체량의 증가를 확인.
- ND군에 비해 곤충키틴사료첨가제 (C 그룹) 및 곤충키틴발효사료첨가제 (W 와 B 그룹) 급여군에서 사료요구율의 감소를 보임.
- ND군에 비해 곤충키틴사료첨가제 (C 그룹) 및 곤충키틴발효사료첨가제 (W 와 B 그룹) 급여군에서 생산지수의 증가를 보임. 이는 고농도의 사료첨가제일수록 증가량이 큼.

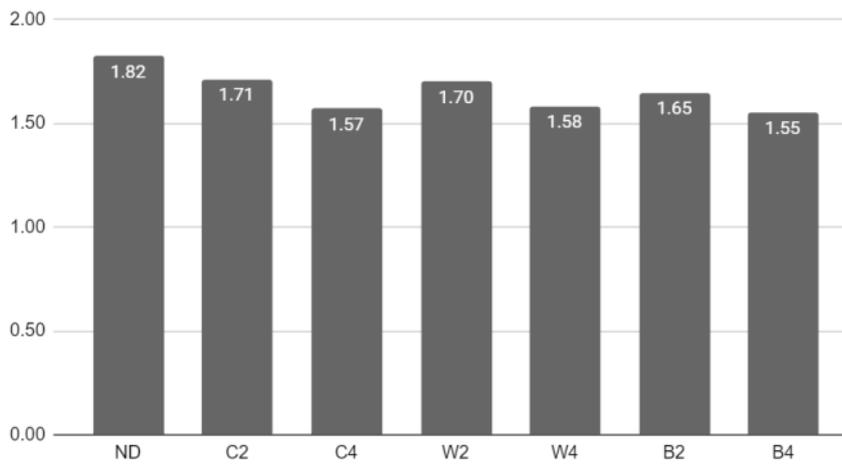
평균 증체량

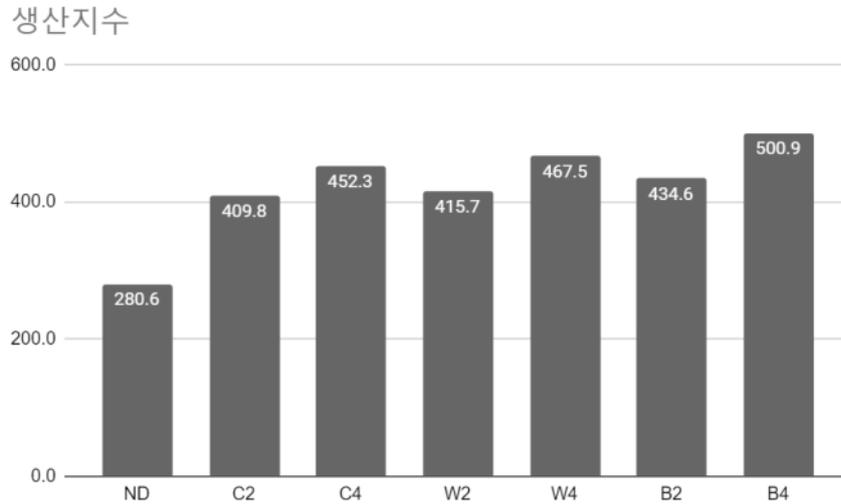


평균 섭취량



사료요구율





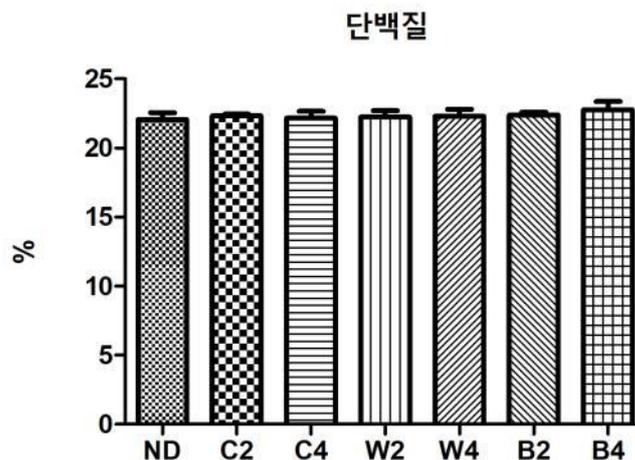
[그림 2.] 육계의 평균증체량, 사료요구율 및 생산지수.

(4) 곤충키틴사료첨가제 및 곤충키틴발효사료첨가제 급여 후 도체특성 및 육질에 미치는

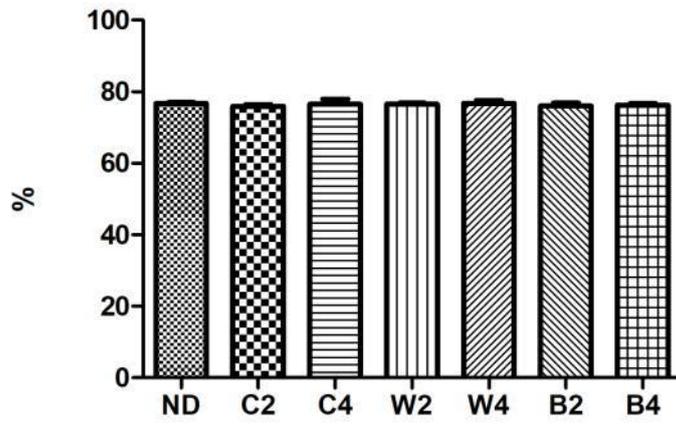
영향 규명

(가) 닭고기의 일반성분 분석

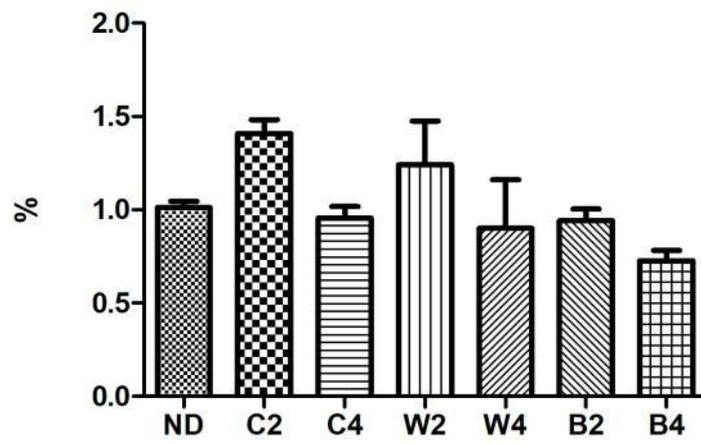
- 사양시험 종료 후 닭의 가슴살 부위를 적출하여 단백질, 수분, 지방, 회분 및 pH 등을 분석하였음. 닭고기의 일반성분 분석은 농업기술실용화재단 종합분석 서비스센터에서 실시되었음.
- 그 결과, 단백질과 수분 그리고 pH에서는 그룹 간 유의적인 차이는 없었음.
- 지방의 경우 ND 군에 비해 C4, W4, B2, B4 군에서 감소하는 경향을 보였음.
- 회분의 경우 ND 군에 비해 W2, W4, B4 군에서 감소하는 경향을 보였고 B4 군은 유의적인 감소를(\* $p < 0.05$ )를 보였음.



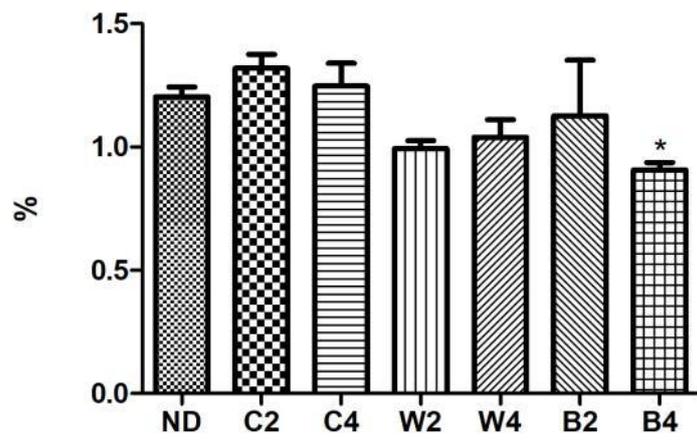
수분

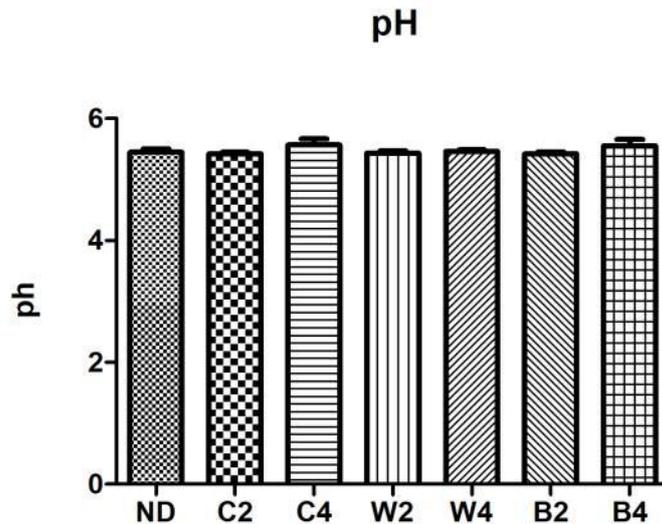


지방



회분



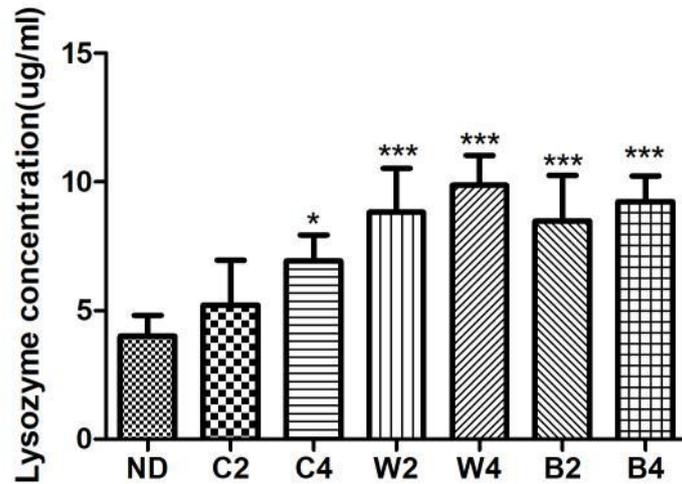


[그림 3.] 곤충키틴사료첨가제 및 곤충키틴발효사료첨가제 급여후 도체의 육질 분석

(5) 곤충키틴사료첨가제 및 곤충키틴발효사료첨가제의 비특이 면역증강 효과 규명

(가) 곤충키틴사료첨가제 및 곤충키틴발효사료첨가제의 급여에 의한 대식세포 활성화 측정

- Lysozyme activity 측정
- Lysozyme은 항균성 효소로 그람양성균의 세포벽을 파괴해 세균을 죽여 선천면역을 구성하는 요소임. 곤충키틴사료첨가제 및 곤충키틴발효사료첨가제의 급여에 의한 대식세포 활성화 정도의 확인은 혈청을 이용한 lysozyme activity assay를 통해 실시하였음.
- 이를 위해 분리한 혈청을 *Micrococcus lysodeikticus*와 반응시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하였으며, 최종적으로 측정한 흡광도를 이용해 lysozyme activity 정도를 확인하였음.
- 그 결과 ND 군과 비교해 C4, W2, W4, B2, B4 군에서는 유의적인 Lysozyme activity 의 증가효과를 보였음(\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).
- 따라서, 곤충키틴사료첨가제 및 곤충키틴발효사료첨가제의 급여는 대식세포를 활성화하여 육계의 선천면역성을 증가시키는 효과를 보임.

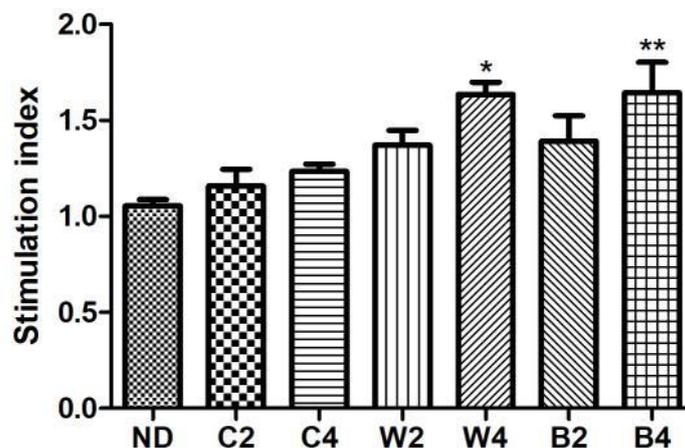


[그림 5.] 곤충키틴사료첨가제 및 곤충키틴발효사료첨가제 급여 21일 후의 Lysozyme activity의 확인. C4, W2, W4, B2, B4 군에서 유의적인 증가를 보임.

(나) 곤충키틴사료첨가제 및 곤충키틴발효사료첨가제의 급여에 의한 림프구 증식능 효과 확인

- 닭의 비장림프구를  $1 \times 10^6$  cells 용량으로 96 well plate에 seeding 한 후, T cell mitogen인 concanavalin a (ConA)를 처리하여 36시간 배양을 실시하였음. 배양 후에는 Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)를 넣고 다시 4시간 배양을 실시하였으며, 최종적으로 540nm에서 흡광도 측정을 실시하였음.
- 그 결과 림프구 증식능은 곤충키틴사료첨가제 및 곤충키틴발효사료첨가제 급여 군에서 증가 하는 경향성을 보였음.
- ND 그룹에 비교하여 W4 그룹(\* $p < 0.05$ ).과 B4 그룹(\*\* $p < 0.01$ )에서는 유의적인 증가를 보였음
- 따라서, 곤충키틴발효사료첨가제의 급여는 림프구의 증식강화효과를 보임

### MTT assay

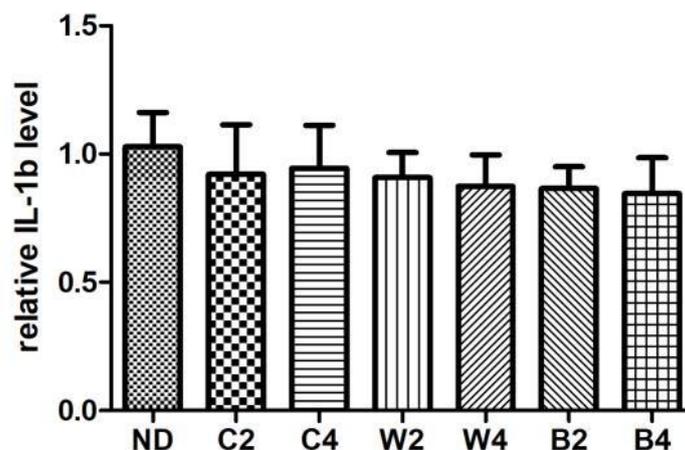


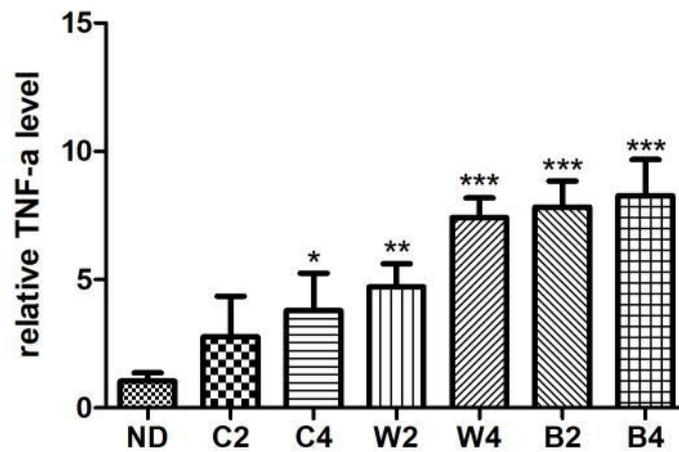
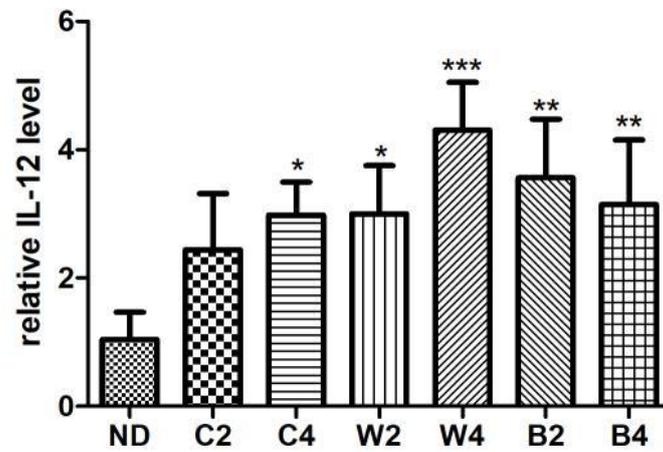
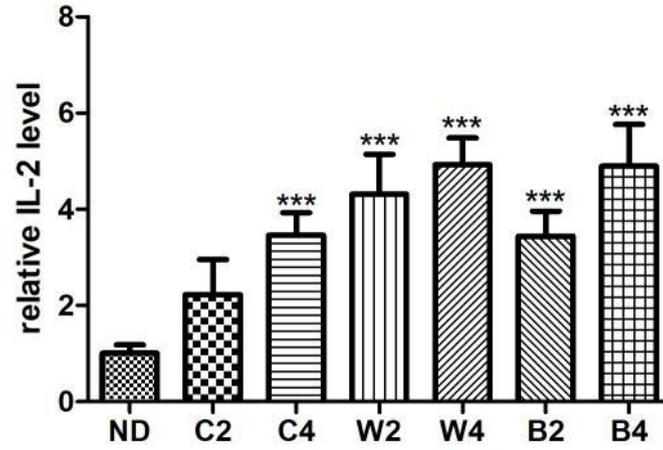
[그림 6.] 곤충키틴사료첨가제 및 곤충키틴발효 사료첨가제 급여 21일 후의 비장세포의 MTT assay 확인. ND 군에 비교하여 W4와 B4 군에서 유의적인 증가를

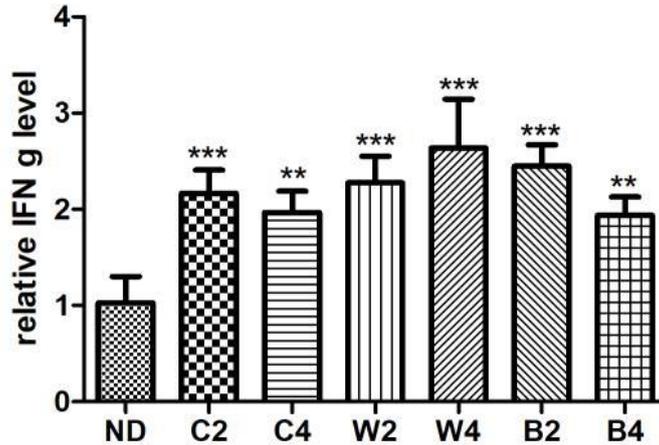
보임.

(다) 곤충키틴사료첨가제 및 곤충키틴발효사료첨가제의 급여에 의한 면역 사이토카인 발현 변화 평가

- 비장림프구에서 mRNA cytokine expression level 확인을 위해 분리한 비장림프구를  $1 \times 10^6$  cells 용량으로 12 well plate에 seeding 한 후, T cell mitogen인 concanavalin a (ConA)를 처리하여 36시간 배양을 실시하였음. 배양 후에는 다시 cell을 수거하여 RNA extraction kit를 이용한 RNA 분리를 실시하였음. 최종적으로 분리한 RNA는 cDNA 합성 후 Real-time PCR에 사용하였음.
- cDNA를 template로 하여 MyiQTM real-time PCR detection system (Bio-165 Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-12, TNF-a, IFN-gamma를 측정하였음.
- 그 결과 IL-2의 경우 ND 군에 비해 C4, W2, W4, B2, B4 군에서 고도의 유의적인 증가(\*\*p<0.001)를 보임.
- IL-12의 경우 ND 군에 비해 C4와 W2 군에서 유의적인 증가(\*p<0.05), W4, B2, B4 군에서 고도의 유의적인 증가(\*\*p<0.001)를 보임.
- TNF-a의 경우 ND 군에 비해 C4와 W2 군에서 유의적인 증가(\*p<0.05,\*\*p<0.01), W4, B2, B4 군에서는 고도의 유의적인 증가(\*\*p<0.001)를 보임.
- IFN-gamma에서 ND 군에 비해 C4와 B4 군은 유의적인 증가(\*\*p<0.01)를, C2, W2, W4, B2 군에서 고도의 유의적인 증가(\*\*p<0.001)를 보임.
- 따라서, 곤충키틴사료첨가제 및 곤충키틴발효사료첨가제의 급여는 육계의 면역반응 사이토카인의 분비량을 증가시켜 면역성을 향상시키는 효능을 보임.







[그림 7.] 육계의 비장림프구의 면역 사이토카인 측정. 곤충키틴사료첨가제 및 곤충키틴발효사료첨가제 그룹에서 유의적인 증가를 보임.

## 2-2. 닭에서 곤충키틴사료첨가제 및 곤충키틴발효사료첨가제의 항병력 효과 규명

### 가. 실험동물

- 실험동물 입사 일주일 전에 사육사는 포르말린으로 완전 훈증 소독 후, 후드를 이용하여 완전 환기를 실시하였고, 소독 후 1일령의 육계 (Ross broiler) 병아리 70수를 전남대학교 수의과대학 실험동물 사육사로 입식하였음. 사육장 내 온도와 습도는 각각 28 ~ 30℃와 45 ~ 55%의 조건으로 유지시켰으며, 외부공기의 유입을 차단할 위해 후드를 통해서만 환기를 실시하였음. 병아리 입사 후에는 사료와 물에 자유롭게 접근할 수 있도록 해주었음.
- 입식한 병아리 60수는 완전 임의로 구성된 7개의 군으로 나누어 농도별로 곤충키틴사료첨가제와 곤충키틴발효사료첨가제를 급여하여 그에 대한 살모넬라 공격접종에 의한 항병력효과를 평가하였음.

### 나. 병원성 *Salmonella*에 대한 인공감염 실험

- 급여 후 21일 차에 *Salmonella gallinarum*의 인공 감염을 실시하였음. 인공 감염에 사용한 *S. gallinarum*의 strain은 SG3001이며, nutrient broth 에 37℃에서 over night으로 배양하여  $1 \times 10^9$ cfu/ml의 농도로 마리당 5ml씩 경구 접종하였음.
- *S. gallinarum* 공격 접종 이후에는 매일 임상증상 평가 및 생존율 확인을 실시하였으며, 공격 접종 14일 이후에 부검을 실시하여 병리학적 병변확인을 실시하였음.

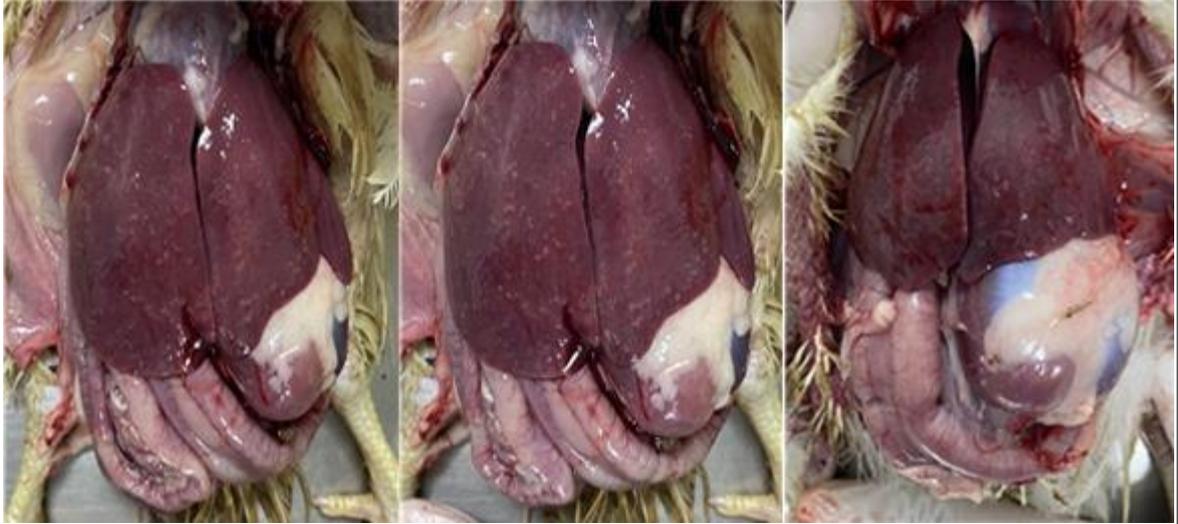


[그림 8.] *S. gallinarum*을 구강으로 인공감염 시키는 모습.

다. *S. gallinarum* 공격 접종 이후 육계에서의 임상증상 발현 확인

- 살모넬라 접종 후 14일차에 살아남은 닭을 모두 안락사하여 부검을 실시하였음. 대부분의 감염된 닭의 간에서 살모넬라 감염증에 의한 전형적인 증상 중에 하나인 'white spot'을 관찰할 수 있었고, 비장의 비대와 맹장 부위에서의 충혈 증상 또한 관찰 할 수 있었음.
- 부검을 통한 육안적 소견을 확인한 결과, ND 군에서는 닭의 간에는 살모넬라 감염시에 특이적으로 관찰되는 회백색 반점이 간 전체에서 관찰되었지만, 사료첨가제를 투여한 그룹 (C, W, B그룹)의 간에서는 회백색 반점이 ND 군에 비해 더 육안적으로 비교 가능할 정도로 적은 수로 관찰되었으며, 살모넬라 감염에 대한 병변의 정도가 현저히 감소하는 경향을 나타내는 것을 확인할 수 있었음.
- 따라서, 부검후 육안소견으로 곤충키틴발효사료첨가제의 급여는 육계에서 살모넬라 감염에 대한 저항성을 증가시키는 효과를 보였음.

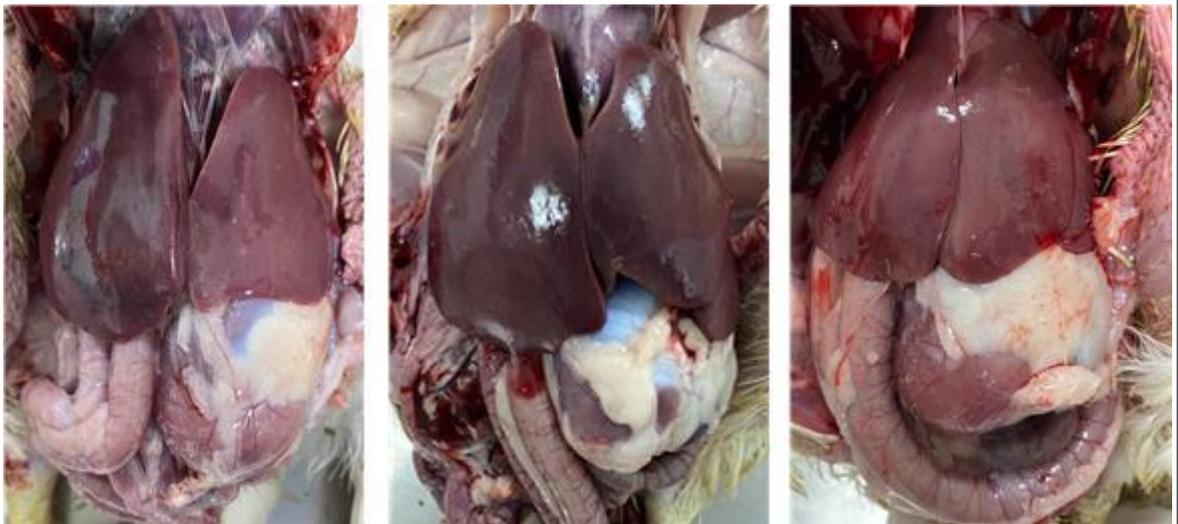
ND



C2



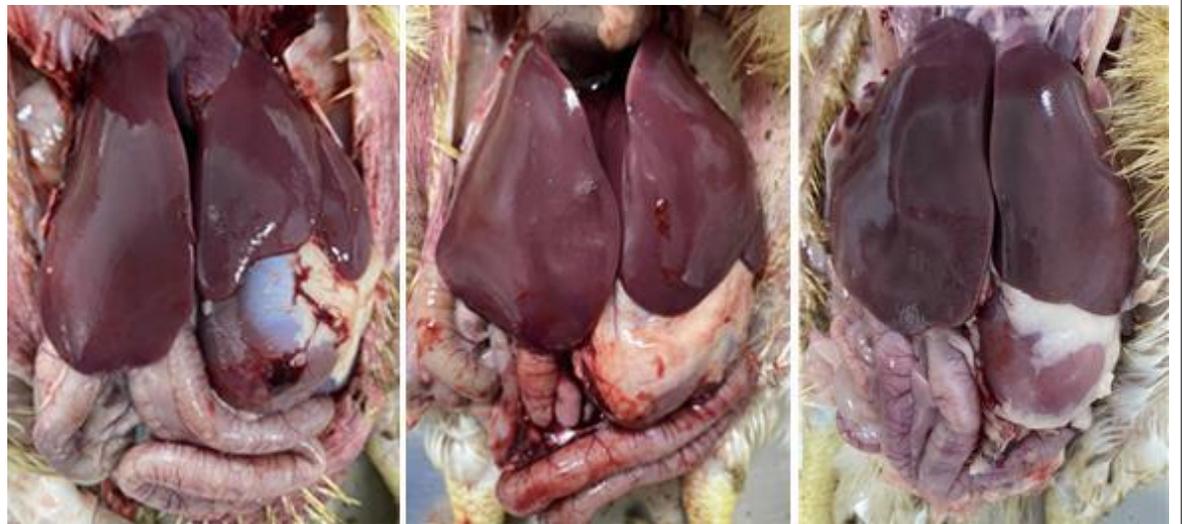
C4



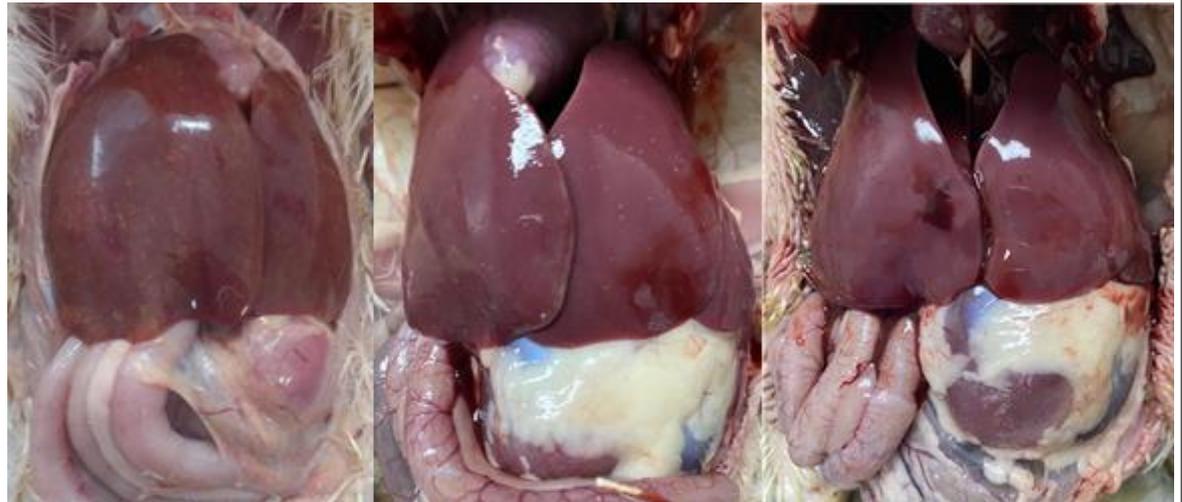
W2



W4



B2



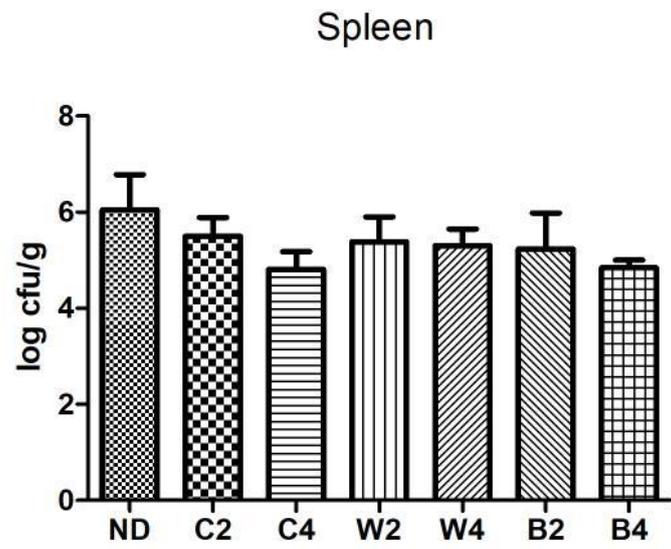
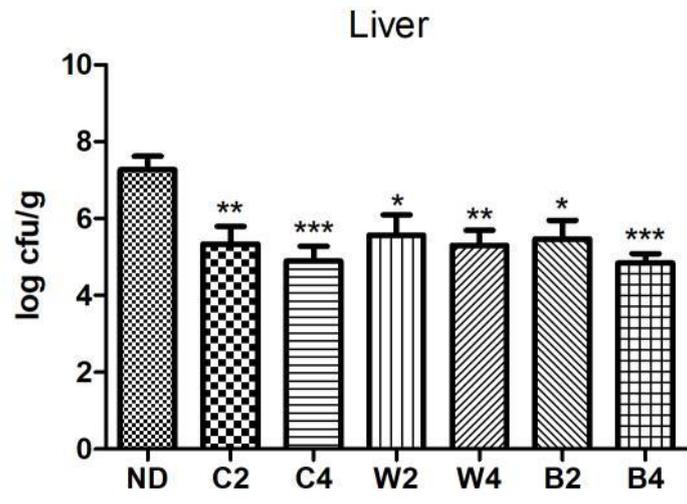
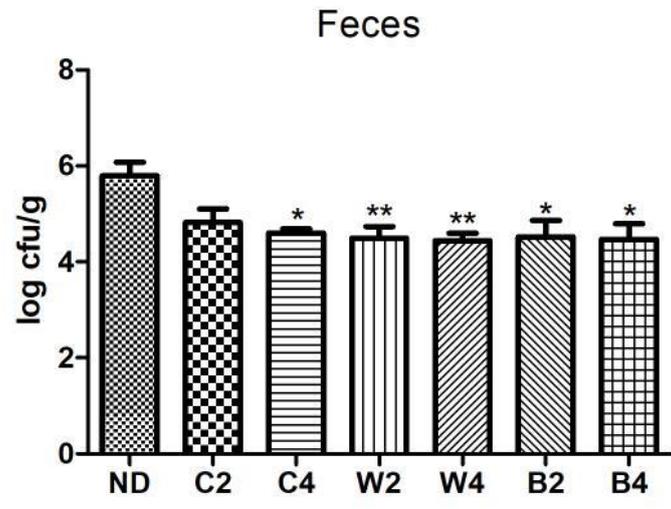
B4

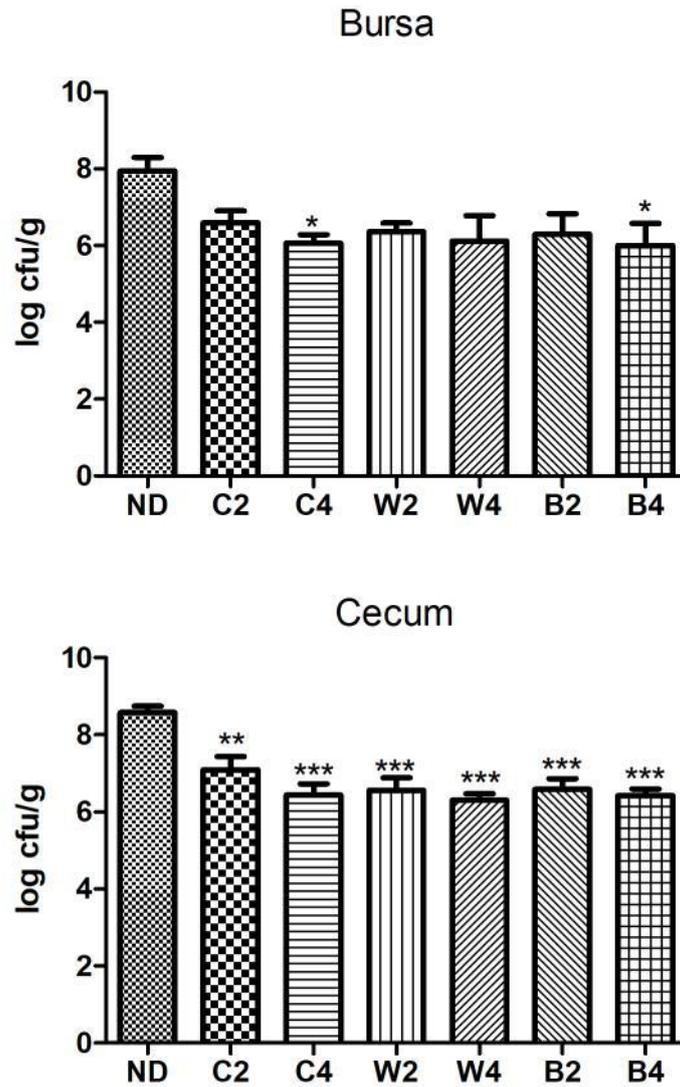


[그림 9.] Salmonella 공격접종 14일후 부검을 통한 육안적 소견의 확인. 대조군에 비해 곤충키틴사료첨가제 및 곤충키틴발효사료첨가제 급여 군에서 병변증세가 경감됨을 확인할 수 있었음.

다. 공격 접종후 재분리되는 살모넬라 세균 수 조사 : 분변, 간, 결장, Bursa에서 재분리되는 *Salmonella* 균수

- *S. gallinarum* 공격접종 이후 14일째에 모든 육계를 안락사한 후 부검을 실시하여 살모넬라의 대표적인 표적 장기인 간, 맹장, bursa 그리고 분변에서의 *S. gallinarum*의 수를 측정하였음.
- 샘플 1g을 취하여 멸균된 PBS 9 ml 에 넣고 vortexing한 다음 적정 농도까지 계단희석 후 Macconkey plate에 희석액 0.1ml를 접종하여 37C에서 1-2일간 배양 후 집락을 계수함. 집락 수는 확산 집락이 없고 30-300개의 집락이 있는 평판을 선택하여 계수하였음.
- 닭의 분변 속 살모넬라의 그룹 간의 차이는 ND 군과 비교하여 C4, W2, W4, B2, B4 군에서 유의적으로 감소했음(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).
- 닭의 간 조직에서 살모넬라 검출량은 ND 군에 비해 C2, C4, W2, W4, B2, B4 군에서 유의적으로 감소하였음(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).
- 닭의 비장 조직에서 살모넬라 검출량은 그룹 간 유의적인 차이가 보이지 않았음.
- 닭의 Bursa 조직에서 살모넬라 검출량은 ND 군에 비해 C4, B4 군에서 유의적으로 감소하였음(\* $p < 0.05$ ).
- 닭의 맹장 조직에서 살모넬라 검출량은 ND 군에 비해 C2, C4, W2, W4, B2, B4 군에서 유의적으로 감소하였음(\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).
- 따라서, 곤충키틴사료첨가제 및 곤충키틴발효사료첨가제의 급여는 육계에서의 간, 비장, 맹장, 분변 및 Bursa 조직에서 살모넬라의 재분리율이 감소하였음을 확인하였으며, 이는 이러한 첨가제의 급여는 살모넬라 감염에 대한 항병력을 증가시키는 효능을 보임. 특히 이런 현상은 고농도의 사료첨가제 급여군에서 고도의 유의성을 나타내었음.





[그림 10.] Salmonella 공격접종 1주 후 부검을 실시하여 표적 장기에서 *S. Gallinarum* 세균수 확인을 실시. 대조군에 비해 곤충키틴사료첨가제 및 곤충키틴발효사료첨가제 급여 군에서 살모넬라 세균수가 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었음.

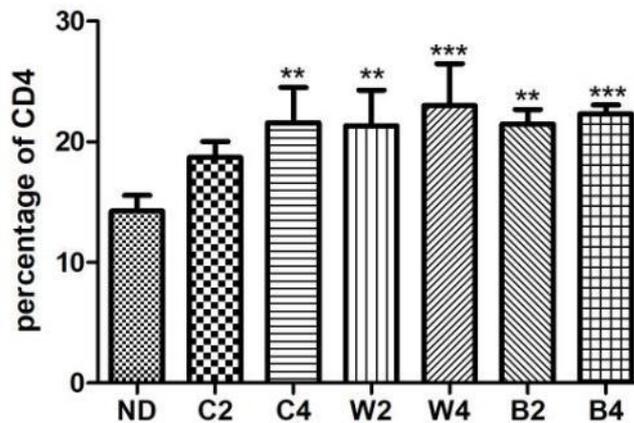
라. *S. gallinarum* 공격 접종 이후 육계에서 lymphocyte subpopulation의 확인

- *S. gallinarum* 공격접종 이후 14일째에 부검을 실시하여 비장을 채취한 후, 비장림프구 분리 및 이를 이용한 lymphocyte subpopulation의 확인을 실시하였음.
- 비장림프구에서 CD3+CD4+CD8-, CD3+CD4-CD8+ lymphocyte의 비율 측정을 위해  $1 \times 10^6$  용량으로 희석된 비장림프구를 PE/Cy7 anti-chicken CD3 (T cell marker), FITC anti-chicken CD4 (help T cell marker)와 PE anti-chicken CD8 (cytotoxic T cell marker)의 항체로 암실에서 30분간 반응시켜 염색하였음. 반응 후에 2회 원심 세척하고 PBS 1ml를 분주하여 유세포분석기 (BD Accuri Flow Cytometry, BD Biosciences, USA)를 이용하여 CD3+CD4+CD8-, CD3+CD4-CD8+ lymphocyte의 비율을

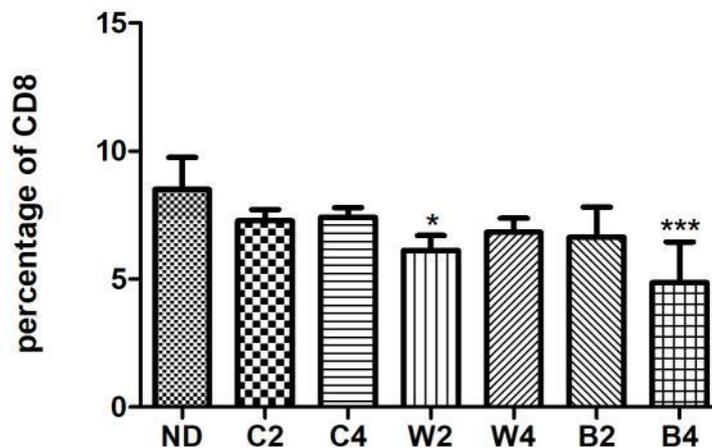
측정하였음.

- 그 결과, helper T cell(CD4)의 경우 ND군은 14.25%, C2군은 18.72%, C4군은 21.59%, W2군은 21.34%, W4군은 23.01%, B2군은 21.49%, B4군은 22.35%를 나타냈으며, cytotoxic T cell(CD8)의 경우 ND군은 8.51%, C2군은 7.28%, C4군은 7.42%, W2군은 6.14%, W4군은 6.83%, B2군은 6.64%, B4군은 4.87%를 나타내었음.
- 따라서 ND 군에 비해 비장세포의 CD4와 CD8의 ratio는 C4, W2, W4, B2, B4 군에서 통계적으로 유의적으로 유의성있게 그 수치가 증가함을 확인할 수 있었음(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).
- 이상의 결과를 종합해보면, 살모넬라에 공격접종후에 C4, W2, W4, B2, B4 군에서 T cell의 CD4/CD8의 비율이 증가함을 보였음. 일반적으로 T cell의 CD4/CD8의 비율이 증가한 경우는 면역력이 증강되었다는 것을 의미 함. 이는 사료 첨가제 급여 그룹의 닭이 면역 활성 증가했다는 것을 의미하며, 이로 인해서 살모넬라의 증상이 약하게 나타났으며, 각 장기에서 살모넬라 재분리율이 감소하였을 것으로 생각됨.

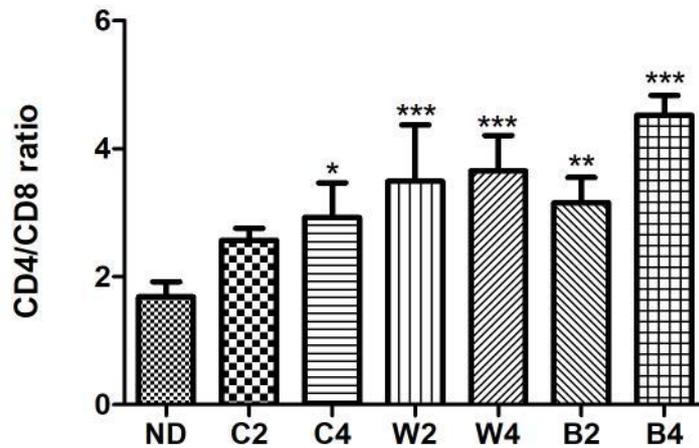
### CD4



### CD8



### CD4/CD8 ratio



[그림 11.] Salmonella 공격접종 1주 후 부검을 실시하여 비장림프구에서 T cell의 CD4/CD8의 비율을 측정함. 사료 첨가제를 급여한 그룹에서 CD4/CD8의 비율이 증가하였음을 확인함.

### 3. 종합 결론

본 연구에서는 육계에 곤충키틴발효사료첨가제 급여 후 생산성 증가효과, 비 특이 면역 증강효과, 살모넬라에 대한 항병력 효과를 검증하고자 닭 사양실험을 진행하였음.

- 곤충키틴사료첨가제와 곤충키틴발효사료첨가제를 급여 한 후 사료요구율은 감소하였으며 증체량은 증가하는것 확인하여 결론적으로 생산성 증가하는 것은 확인하였음.
- 닭고기의 성분분석에서는 단백질과 수분, pH에서 큰 차이를 보이지 않았으나 지방과 회분 검사에서 고농도로 곤충키틴사료첨가제와 곤충키틴발효사료첨가제를 투여한 그룹에서 감소하는 경향성을 보임.
- 세포성 면역 증강 효과를 확인하기 ConA 유도 림프구증식능 평가, lysozyme activity 확인을 통한 대식세포 활성화 평가, 면역 cytokine mRNA expression level의 확인을 실시한 결과 ND 그룹에 비해 곤충키틴사료첨가제와 곤충키틴발효사료첨가제를 급여 한 그룹에서 모든 비특이적인 세포성 면역이 증가되는 것을 확인하였음.
- 항병력 효과를 확인하기 위해 육계에 살모넬라균을 이용하여 공격 접종 실험을 실시하였음. 공격접종 후 14일 후에 부검을 실시한 결과 곤충키틴사료첨가제와 곤충키틴발효사료첨가제를 급여 급여군에서 육안적 병변의 감소, 살모넬라 표적장기에서 세균 수 감소를 확인할 수 있었으며, CD4/CD8의 비율이 증가하는 것을 확인할 수 있었음.
- 이상의 결과를 종합해 보면 곤충키틴사료첨가제와 곤충키틴발효사료첨가제의 급여는 육계의 생산성증가와 비 특이적인 면역력 증강에 도움을 주고 이를 통해 세균의 감염시에 항병력이 증가하는 것으로 사료됨.

- 본 연구에서 곤충키틴발효사료첨가제를 2% 급여군과 4% 급여군 그룹으로 나누어 효능을 분석한 결과 2% 보다는 4% 급여군에서 조금 더 효능을 보이지만 2% 급여군에서도 충분한 효과를 보임. 또한, 곤충키틴발효사료첨가제를 많이 첨가하면 효과는 더 좋겠지만, 비용면에서 경제성이 맞지 않는 이유로 곤충키틴발효사료첨가제의 적정 첨가수준은 2% 첨가하는 것이 적정할 것으로 생각 됨.

**(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)**

1. 특허출원: 1건
2. 기술실시: 2건
3. 제품화: 1건
4. 매출액: 24,6000천원
5. 고용창출: 1명
6. 논문: 비SCI 2건
7. 학술발표: 1건
8. 교육지도: 1건

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도		2020-2021		계	가중치 (%)	
전담기관 등록·기탁 지표 <sup>1)</sup>	논문	목표(단계별)	1		1		
		실적(누적)	2		2		
	특허	목표(단계별)	1		1		
		실적(누적)	1		1		
	상표	목표(단계별)	0		0		
		실적(누적)	2		2		
	학술발표	목표(단계별)	2		2		
		실적(누적)	1		1		
	연구개발과제 특성 반영 지표 <sup>2)</sup>	기술실시	목표(단계별)	0		0	
			실적(누적)	1		1	
제품화		목표(단계별)	1		1		
		실적(누적)	1		1		
매출액		목표(단계별)	20,000		20,000		
		실적(누적)	24,600		24,600		
고용창출		목표(단계별)	1		1		
		실적(누적)	1		1		
교육지도		목표(단계별)	0		0		
		실적(누적)	1		1		
계	목표(단계별)						
	실적(누적)						

\* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아이 Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신물질 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

\* 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 실제 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다  
(연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Synergistic Antimicrobial Activity of Chitosan Hydrolysates derived from the Hydrolysis of High Molecular Weight Chitosan using Immobilized Enzyme	Journal of Chitin and Chitosan	박제권	24 (4)	대한민국	한국키티ن 키토산학회	비SCI (학진등재지)	2019. 12.31	I S S N : 1229-4160	50
2	Characterization of Bioactive Components isolated from the Degradation of Black Soldier Flies <i>Hermetia illucens</i> by A Chitin-degradable Microorganism	Journal of Chitin and Chitosan	박제권	25 (2)	대한민국	한국키티ن 키토산학회	비SCI (학진등재지)	2020. 06.30	I S S N : 1229-4160	100

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	대한민국	해양바이오학회	박제권	2019.11.08	강릉 세인트존스 호텔

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도



### Synergistic Antimicrobial Activity of Chitosan Hydrolysates derived from the Hydrolysis of High Molecular Weight Chitosan using Immobilized Enzyme

Yong Hyun Lee<sup>1</sup>, Seung Hoon Yum<sup>1</sup>, So Yeon Park<sup>2</sup>, Hee Soo Hwang<sup>3</sup>, You Jin Hwang<sup>1</sup>, and Jae Kweon Park<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Engineering, College of Health Science, Gachon University, Incheon 21936, Korea

<sup>2</sup>Department of Life Sciences, Colleges of Bio-nano, Gachon University, Seongnamdaero 1342, Seongnam-si, Gyeonggi-do 461-701, Republic of Korea

<sup>3</sup>Division of Biological Science and Technology, 1 Yonseidae-gil, Wonju, Gangwon-do, 26493, Republic of Korea

#### ABSTRACT

The features of antibacterial activity of chitosan with different molecular weight and with antibiotics are discussed in this study. Depolymerization of high molecular weight chitosan(HMWC) mediated by enzymatic effects was observed in the concentration of enzyme immobilized onto a matrix and time dependent manner. Antibacterial activity of chitosan hydrolysates CTSN-P8 and CTSN-B3 in the presence or absence of antibiotics was investigated. Synergistic antibacterial activity of CTSN-P8 with Kanamycin against *Staphylococcus aureus* and *E. coli* was observed based on the dependence of molecular weight of chitosan. On the other hand, significant antifungal activity of CTSN-B3 was observed in morphological changes of *Penicillium italicum*. Our data demonstrate the critical importance of microbial species and the size of chitosan that can provide some potent biological activity without significant depressive activity of antibiotics.

**Keywords:** Chitosan, Antibiotics, Molecular weight, Antimicrobial activity, *Staphylococcus aureus*, *Penicillium italicum*

#### Acknowledgments

This work was supported by the Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through the Agri-Food Research Achievement Support Program, funded by the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (819031-02-1-SB010).



### Characterization of Bioactive Components isolated from the Degradation of Black Soldier Flies *Hermetia illucens* by A Chitin-degradable Microorganism

So Yeon Park<sup>1</sup>, Young Kyu Park<sup>2</sup>, Dae Young Jeong<sup>1</sup>, Seung Nyun Kim<sup>1</sup>, Byung Ok Jung<sup>3</sup>, Sang Hun Jung<sup>1</sup>, Jung In Lee<sup>1</sup>, and Jae Kweon Park<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Life Sciences, Gachon University, Seongnamdaero 1342, Seongnam-si, Gyeonggi-do 461-701, Republic of Korea

<sup>2</sup>Korea Beneficial Insects Lab. co., ltd, 289-38, Soryong-gil, Okgwa-myeon, Gokseong-gun, Jeollanam-do, 57570, Korea

<sup>3</sup>SB-Plaza, 194-25 Osongsaengmyeong 1-ro, Osong-eup, Heundeok-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do, Republic of Korea

#### ABSTRACT

Antioxidant activities of the constituents of Black Soldier Flies (BSF) *Hermetia illucens* were determined based on the preparation of hydrolysates by enzymatic hydrolysis. One of the strongest chitinolytic bacteria called to SY-02 was isolated and subjected to the hydrolysis of BSF provided as a powder. Upon reaction performed for 2 weeks, the contents of total carbohydrates, reducing sugar, and protein in the culture supernatant were estimated to be approximately 1.942 g/L, 0.804 g/L and 219.1 g/L. However non-detectable amount of lipid in the culture supernatant was observed. Those biomolecules in the culture supernatant were further subjected to determine the antioxidant activities that showed significant free radical scavenging activities toward DPPH and ABTS, and FRAP, respectively. Our data suggest that bioactive substances derived from the hydrolysis of BSF in the culture supernatant could be utilized as an additive for animal feeds and developing other relative foods.

**Keywords:** Chitin, Insect, Black Soldier Flies, Biological activities, Antioxidant

#### Acknowledgement

This work was supported by the Technology Development Program of MSS(S2660881) funded by the Ministry of SMEs and Startups(MSS, Korea), and was partially supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries(IPET) through Agri-food Research Achievement Support Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs(MAFRA) (819031-02-1-SB010).

## 2. 학술발표



# Primary structure analysis and antioxidant activity of chitosan isolated from *Hermetia illucens*

Dae Young Jung, Yong Hyun Lee, So Yeon Park, Jung In Lee, Seung Nyeon Kim, You An Hwang and Joo Kwon Park\*

Department of Life Science, Gachon University, Seongnam 461-701, Korea

\*To whom all correspondence should be addressed.  
Tel. & fax: +82-31-759-4762; E-mail: jkpark@gachon.ac.kr

Received 2018 05 29; Accepted 11 27 18

---

### Abstract

The aim of this study is to elucidate the biochemical properties of reactive substances including lipids and chitosan isolated from larvae of black soldier flies (BSF) *Hermetia illucens*. Efficient chemical conversion of chitin isolated from BSF to chitosan designated to Hi-C-TSN was observed with the yield of approximately 55% under optimal conditions after removing lipids. Hi-C-TSN from BSF has much lower higher viscosity than that of chitosan prepared from mussel-shell chitin at the same concentration. Primary structure of Hi-C-TSN was identified by FT-IR analysis. The results demonstrated that Hi-C-TSN is an alpha-form of chitosan, generally which can be isolated from insects. Compared to other chitosan originated from mussel-shell with different molecular weight, Hi-C-TSN purified from BSF has shown approximately 2.5-fold free radical scavenging activity derived from DPPH, FRAP or ABTS molecules, respectively. To the best of our knowledge, this is the first report on the isolation, primary structural analysis and antioxidant activity of chitosan isolated and purified from BSF, *H. illucens*.

---

### Introduction

In recent, not only for the production of insectaria but also utilization of large quantities of larvae were considered as a new potential bio-material. However, there is some limitation to use the biomass of larvae for animal feed because of the relatively high content of chitinous materials in their shells. Instead, we are interested in the elucidation of their chitinous materials to elucidate new biological properties after converting to chitosan that can open provide some potential possibilities for many applications. Instead of using chitin as it, a lot of reports on applications of chitosan derived from the decetylation of chitin were introduced with a variety of chemical modifications. The literature, however, offers no reports on the isolation, purification and characterization of chitosan converted from chitin isolated from larvae of *H. illucens*. To the best of our knowledge, this study reports first about the primary chemical structure and properties of chitosan purified from larvae of BSF, *H. illucens*.

---

### Results

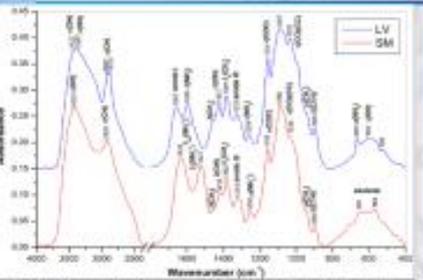


Samples	Viscosity
FWCIS	45.47
FWCIS	301.13
WC	35.10
FWWC	301.13
Hi-C-TSN	202.7
Purified Hi-C-TSN	812.6

**Fig. 1.** Measurement of viscosity of the purified Hi-C-TSN. Viscosity analysis of several chitosan samples were performed by using an Ostwald Viscometer (Ostwald instrument GmbH, Germany) by following the instructor's comments. Relative molecular weight of chitosan can be estimated by the values obtained from the samples with known molecular weight.



**Fig. 2.** Lager reaction for amine groups. Left panel: before staining, right panel: after staining. Samples from: 1) Hi-C-TSN provided from Freshly larvae, 2) Purified Hi-C-TSN provided from Freshly larvae, 3) Isolated Hi-C-TSN in this study, 4) Alginate, 5) Low Viscosity Chitosan, 6) High Molecular Weight Chitosan, 7) Water Soluble Chitosan.



**Fig. 3.** FT-IR analysis of chitosan. FT-IR is utilized to identify the functional groups of WSCs hydrolyzed over 600 h of time period. This analysis was performed through FT-IR spectra (4000-400 cm<sup>-1</sup>) with a Nicolet 870 FTIR spectrophotometer (Nicolet analytical instrument, USA) using Zedco-ScanSoft. In detail the high resolution, detailed spectrum of chitosan, SM (top) and Hi-C-TSN, respectively.

---

### Conclusion

High molecular weight chitosan called Hi-C-TSN was prepared and purified from larvae of black soldier flies (*H. illucens*). Since we are to analyze and characterize the biological activity of chitosan from unique biomass, it is a fact that several types of chitosan with different molecular weight or functionality can be prepared from the raw BSF. Upon testing various conditions for preparing chitosan, we found that not easy to define the significant different optimal chitosan under tested conditions according to the general methods for preparing chitosan for shell. Our data suggest that chitosan Hi-C-TSN can be used as a potent antioxidant agent for functional food products including various health additives for the developing various applications.

## Acknowledgments

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Agri-food Research Achievement Support Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs(MAFRA) (819031-02-1-SB010), and the Technology development Program of MSS (S2660881) funded by the Ministry of SMEs and Startups (MSS, Korea).

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	발효된 곤충키틴을 포함하는 사료첨가제의 제조방법 및 그에 따라 제조된 사료첨가제	대한민국	농업회사 법인(주) 한국유용 곤충연구 소	2021.01 .13	10-2021 -000435 4					100	기술실 시
2	상표출원 1	대한민국	농업회사 법인(주) 한국유용 곤충연구 소	2020. 12. 11	40-2020 -022693 8					100	제품화
3	상표출원 2	대한민국	농업회사 법인(주) 한국유용 곤충연구 소	2020. 12. 16	40-2020 -023050 7					100	제품화

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
	√		√		√					

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 <sup>1)</sup>	인증여부 <sup>2)</sup>	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 <sup>3)</sup>	제안/인증일자

\* 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제표준

번호	표준화단계구분 <sup>1)</sup>	표준명	표준기구명 <sup>2)</sup>	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 <sup>3)</sup>	제안자	표준화 번호	제안일자

\* 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.

\* 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

**[경제적 성과]**

**□ 시제품 제작**

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	라바피드	2020. 12. 22	한국유용곤충 연구소	한국유용곤충 연구소	가금류 사료첨가제	2년		

**□ 기술 실시(이전)**

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	특허기술	키티네양액과 미생물을 이용한 동애등에 발효기술	한국유용곤충 연구소	2021. 02. 19	-	-
2	노하우	키티네양액과 미생물을 이용한 동애등에 발효기술	한국유용곤충 연구소	2021. 02. 19	-	-

\* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

**□ 사업화 투자실적**

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*
1	동애등에 중충사육시설 및 가공센터 구축	970,000,000원	-	970,000,000원	사업화를 위한 보조사업 수주

**□ 사업화 현황**

번호	사업화 방식 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	신제품개발	국내	곤충 키티발효 사료첨가제	곤충 발효 사료첨가제	한국유용곤충 연구소	24,600		2020	

\* 1) 기술이전 또는 자기실시

\* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등

\* 3) 국내 또는 국외

**□ 매출 실적(누적)**

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
곤충 키티발효 사료첨가제	2020	24,600		24,600	세금계산서
합계		24,600		24,600	

**□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과**

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
	시장 점유율	국내			
		국외			
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2019년	2020년	
1	곤충 키틴발효 사료첨가제	한국유용곤충연구소	1		1
합계			1		1

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	3
		생산인력	2
	개발 후	연구인력	4
		생산인력	3

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황																		
			학위별				성별		지역별												
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타								

산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

\* 「과학기술기본법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

관련증빙자료

□ 지식재산권(특허): 1건

관인생략

## 출원번호통지서

출원일자 2021.01.13  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(9747)  
출원번호 10-2021-0004354 (접수번호 1-1-2021-0042301-29)  
(DAS접근코드 04AF)  
출원인명칭 농업회사법인(주)한국유용곤충연구소(1-2003-012743-9)  
대리인성명 특허법인 총현(9-2010-100021-9)  
발명자성명 양영철 박영규 오기석 강승호  
발명의명칭 발효된 곤충키틴을 포함하는 사료첨가제의 제조방법 및 그에 따라 제조된 사료첨가제

## 특 허 청 장

**【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】**

**【과제고유번호】** 1545021041  
**【과제번호】** 819031022SB010  
**【부처명】** 농림축산식품부  
**【과제관리(전문)기관명】** 농림식품기술기획평가원  
**【연구사업명】** 농식품연구성과후속지원사업  
**【연구과제명】** 생물적 발효과정을 이용한 곤충 키틴발효 사료첨가제 생산  
기술개발 및 산업화  
**【기여율】** 1/1  
**【과제수행기관명】** 농업회사법인(주)한국유용곤충연구소  
**【연구기간】** 2019.05.10 ~ 2021.01.09  
**【취지】** 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 특허법인 총현 (서명 또는 인)

## 【요약서】

### 【요약】

본 발명은 (a) 건조된 곤충을 착유하여 지방을 제거한 후 분쇄하여 곤충탈지분말을 제조하는 곤충재료 전처리 단계; (b) 곤충 번데기의 탈피각이 첨가된 배지에서 키틴 분해 미생물을 배양하여 키틴 분해 미생물 배양액을 제조하는 1차 발효 단계; 및 (c) 상기 곤충탈지분말을 포함하는 배지에 상기 키틴 분해 미생물 배양액 및 발효균을 혼합하여 배양하는 2차 발효단계를 포함하는 발효된 곤충키틴을 포함하는 사료첨가제의 제조방법 및 그에 따라 제조된 사료첨가제에 관한 것이다. 이에 의하여 사육하는 동물의 면역과 항병력을 강화할 수 있다.

## 【발명의 설명】

### 【발명의 명칭】

발효된 곤충키틴을 포함하는 사료첨가제의 제조방법 및 그에 따라 제조된 사료첨가제(Method for preparing feed additive comprising fermented insect chitin and feed additive prepared by the same)

### 【기술분야】

【0001】 본 발명은 사료첨가제의 제조방법 및 그에 따라 제조된 사료첨가제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 곤충 재료를 이용하여 발효된 곤충키틴을 포함하는 사료첨가제의 제조방법 및 그에 따라 제조된 사료첨가제에 관한 것이다.

### 【발명의 배경이 되는 기술】

【0002】 과거 관상용이나 학습용으로 주로 키우던 곤충이 최근 들어 가축 사료 원료와 사람이 섭취하는 단백질원 등으로 주목 받으면서 국내 곤충 시장이 빠르게 성장하고 있다.

【0003】 한 연구보고서에 따르면 굼벵이로 불리는 ‘흰점박이꽃무지’ 애벌레를 비롯해 ‘갈색거저리’, ‘귀뚜라미’ 등 사람이 먹을 수 있는 식용곤충의 경우 2011년까지만 해도 시장조차 형성되지 않았지만 2018년 시장 규모가 430억원으로 성장했다. 2020년에는 508억원에 달하였다. 또한 갈색거저리, 귀뚜라미, 동애등에 등 사료용 곤충 시장은 2011년 25억원에서 2018년 170억원으로 성장했고, 2020년에는 220억원 이상으로 확대되었다.

【0004】 최근 식용 곤충 리스트에 새로 포함된 아메리카왕거저리를 비롯해

메뚜기, 누에번데기, 백강잠, 갈색거저리유충(고소애), 쌍별귀뚜라미(쌍별이), 흰점박이꽃무지 유충(꽃뽕이), 장수풍뎡이 유충(장수애) 등은 40 내지 70%가 양질의 단백질로 구성될 정도로 우수한 식품원료다. 혐오스러운 생김새와 달리 맛도 우수하다. 대표적인 곤충이 ‘고소애’로 알려진 갈색거저리다. 갈색거저리는 새우와 같은 ‘고소한 맛’이 특징이다. 감칠맛을 내기 위해 사용하는 소고기, 다시마, 멸치, 새우 등과 비교해도 결코 뒤지지 않을 정도다. 일반적으로 곤충 단백질에는 20가지 아미노산이 골고루 들어 있는데 이들 아미노산 중 고소한 맛을 내는 글루탐산(Glutamic acid)이 가장 많기 때문이다.

【0005】 한편, 곤충은 가축이나 물고기 사료 원료로 경제성이 우수하고 친환경적이다. 유엔식량농업기구(FAO)가 2013년부터 10년 동안 진행한 세계 식용·사료 곤충에 대한 연구·조사결과를 보면 1kg의 단백질을 얻기 위해 소는 10kg의 사료를 먹어야 하지만 곤충은 1.7kg의 사료만 먹어도 될 정도로 생산성이 우수하다. 또한 소와 곤충의 온실가스 배출량과 물 사용량 비율도 각각 2850:1과 1500:1일 정도로 친환경적이다. 세계 경작지의 33%가 가축 사료용 작물 생산에 이용되고, 사료용 작물 경작지 확대를 위해 매년 브라질 아마존과 같은 크기의 산림이 파괴된다는 점을 고려하면 곤충 단백질의 유용성을 판단할 수 있다. 이밖에 식용 및 사료로 사용되는 곤충의 경우 곡물의 껍질이나 찌꺼기를 주요 먹이로 하기 때문에 인간과 먹이 경쟁을 하지 않는다는 점도 매력적이다.

【0006】 곤충사육전문기업인 CIEF는 최근 국립수산물과학원과 동애등애를 원료로 일반 배합사료보다 영양가가 많고, 기능성이 우수한 양식 넙치(광어)용 친환경

곤충배합사료를 개발했다. CIEF는 하루 4톤(t)쯤의 동애등을 생산할 수 있는데 가공 처리한 음식물 잔반을 이용해 생산비가 적게 들고, 면역물질인 라우릭산을 다량 함유한 것이 특징이다.

**【0007】** 실제 국립수산물과학원이 곤충배합사료와 일반 배합사료를 비교 분석한 결과, 곤충배합사료를 먹인 넙치는 배합사료를 먹인 넙치보다 중량은 17%, 생존율은 20% 높은 것으로 나타났다. 육질 분석 결과에서도 기억력 향상에 도움이 되는 DHA 등이 곤충 배합사료를 먹인 넙치에 더 많았다. 해외에서도 곤충 단백질을 물고기 사료용 원료로 활용하려는 움직임이 일고 있다. 프랑스 엔섹트와 네덜란드 '프로티스(Protix)'가 대표적인 기업이다. 엔섹트는 곤충 단백질 엔밀과 곤충 오일 엔오일을 개발한 뒤 현재 다양한 양식장에서 테스트를 진행 중이다.

**【0008】** 한편, 키틴은 N-아세틸-D-글루코사민(GlcNAc)가  $\beta$ -1,4 결합한 직쇄상 다당류로서 셀룰로오스와 아주 비슷한 화학구조와 결정구조를 가진 무코 다당류이다. 키틴은 생체 내 소화성, 생체적합성, 표피세포 성장촉진인자의 자극작용 등을 가진 저 독성 물질임에도 불구하고 거의 이용되지 못하고 오로지 키토산 중간물질로서 위치를 유지하고 있는 것은 일반 용매에는 녹지 않아 성형가공이 어렵기 때문이다. 따라서 키틴질을 용해시킬 수 있는 새로운 용매들이나 그 시스템을 개발하고 있는 실정이다.

#### **【선행기술문헌】**

#### **【특허문헌】**

**【0009】 (특허문헌 0001)** 한국공개특허공보 제10-2019-0135740호

□ 지식재산권(상표): 2건

KeapsP1.2 2020-12-11



1200301274394011101000005600000000

**상표등록출원서**

**【출원구분】** 상표등록출원

**【권리구분】** 상표

**【출원인】**

**【성명】** 농업회사법인(주)한국유용곤충연구소

**【특허고객번호】** 1-2003-012743-9

**【등록대상 입력방법】** 고시 명칭만 입력

**【등록대상】**

**【상품류】** 제31류

**【지정 상품】**

가금용 사료,가축사료,단미사료,가축용 사료,금붕어사료,닭사료,  
동물용 사료,돼지사료,물고기사료,수족관 어류용 사료,애견용  
간식,애완동물용 먹이,애완동물용 사료,애완동물용 특식,양어사료,  
해양동물용 사료,배합사료,햄스터사료

**【상표유형】** 일반상표

위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

출원인 농업회사법인(주)한국유

용곤충연구소

(서명 또는 인)

**【수수료】**

**【출원료】** 1 개류 56,000 원

**【우선권주장료】** 0 건 0 원

**【합계】** 56,000원

1 / 2



【상표견본】



2 / 2





1200301274394011101000005600000000

### 상표등록출원서

【출원구분】 상표등록출원

【권리구분】 상표

【출원인】

【성명】 농업회사법인(주)한국유용곤충연구소

【특허고객번호】 1-2003-012743-9

【등록대상 입력방법】 고시 명칭만 입력

【등록대상】

【상품류】 제31류

【지정 상품】

가금용 사료,가축용 사료,금붕어사료,단미사료,발효사료,새먹이,수  
족관 어류용 사료,혼합동물사료,해양동물용 사료

【상표유형】 일반상표

위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

출원인 농업회사법인(주)한국유

용곤충연구소

(서명 또는 인)

【수수료】

【출원료】 1 개류 56,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【합계】 56,000원



【상표견본】



2 / 2



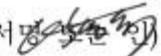
□ 시제품 제작: 1건

<첨부3>

### 농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과제명	생물적 발효과정을 이용한 곤충 기턴발효 사료첨가제 생산기술개발 및 산업화			
주관연구기관	농업회사법인(주)한국유용곤충연구 구소	참여기관	전남대학교	
연구책임자	박 영 규	연구기간	2019년 5월 ~ 2021년 1월(총 2년)	
총 정부출연금	262,000,000원			
<b>해당 기술의 제품출시 유형</b>				
시제품(제품출시 예정)	( ○ )	기존 제품 공정개선	( )	
신제품(제품출시 완료)	( )	기 타	( )	
<b>제품 출시 실적</b>				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
동애등애발효 사료첨가제		가금류 사료첨가제	2020. 12. 22	100%
<p>* 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등)          **식품R&amp;D는 품목제조보고서 제출 필수</p> <p style="text-align: center;"><b>상기와 같이 R&amp;D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</b></p>				

2020년 12월 22일

연구책임자 : 박 영 규 (서명 )

□ 기술 실시(이전) : 2건

[별지 13의2]

## 기술실시보고서

(단위 : 원)

연구개발과제 현황	사업명	농식품연구성과후속지원사업		연구과제번호	819031-02	
	연구과제명	생물적 발효과정을 이용한 곤충 키틴발효 사료첨가제 생산기술개발 및 산업화				
	연구기관명	농업회사법인(주)한국 유용곤충연구소	연구책임자	박영규	참여기업명	한국유용곤충연구소
	연구협약일	2019. 05. 10	연구기간	2019. 05. 10 ~ 2021. 01. 09		
	연구개발비	정부출연금	기업부담금	기타 ( )	계	
262,000,000원		83,000,000원	-	345,000,000원		
기술실시계약 및 성과활용 현황	계약(활용)명	키틴배양액과 미생물을 이용한 동애등에 발효 기술				
	계약(활용)일	2020. 12. 23	실시(활용)기간	2020. 12. 23~ 2025. 12. 22		
	지재권 종류	노하우		실시권 유형	직접실시	
	* 지재권이 특허(출원,등록) 인 경우	명 칭				
		번호				
	실시(활용)기관	기관명	농업회사법인(주)한국유용곤충연구소	기관유형	농업회사법인	
		주 소	전남 곡성군 옥과면 소룡길 289-38	대 표 자	양 영 철	
사업자번호		125-81-45116	전화번호	061-362-8205		
부서(담당자)		기업부설IPM연구소(박영규)	e-mail	@kbil.co.kr		
기술료산정내역	정부출연금 262,000천원 * 0%(농어업경영체) = 0원					
기 술 료	정액기술료		경상기술료		기타 조건	
	정수(납부)예정일	정수(납부)금액	착수기본료	정수(납부)예정일 정수(납부)금액		
	-	-	매출에 따른 기술료	-		-
	-	-		정수(납부)시작일		결산월
	-	-		정수(납부)종료일		정수율
	계	-		-		매출액의 ( )%
기타특기사항	-					

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제22조 제2항에 따라 위와 같이 기술실시계약이 체결되었음을 보고합니다.

- 붙임 1. 기술실시계약서 사본 1부(타기관으로 기술이전시).  
 2. 지식재산권을 포함하는 기술이전인 경우 해당 증빙자료(특허 등록증, 출원증 등) 1부 (타기관으로 기술이전시).  
 3. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).

2021년 2월 19일

주관연구기관 농업회사법인(주)한국유용곤충연구소 양영철  직인

농림식품기술기획평가원장 귀하

## 기술실시보고서

(단위 : 원)

연구개발과제 현황	사업명	농식품연구성과후속지원사업		연구과제번호	819031-02		
	연구과제명	생물적 발효과정을 이용한 곤충 키틴발효 사료첨가제 생산기술개발 및 산업화					
	연구기관명	농업회사법인(주)한국 유용곤충연구소	연구책임자	박영규	참여기업명	한국유용곤충연구소	
	연구협약일	2019. 05. 10	연구기간	2019. 05. 10 ~ 2021. 01. 09			
	연구개발비	정부출연금 262,000,000원	기업부담금 83,000,000원	기타 ( )	계 345,000,000원		
기술실시계약 및 성과활용 현황	계약(활용)명	키틴배양액과 미생물을 이용한 동애등에 발효 기술					
	계약(활용)일	2020. 12. 23	실시(활용)기간	2020. 12. 23~ 2025. 12. 22			
	지재권 종류	특허기술	실시권 유형	직접실시			
	* 지재권이 특허(출원,등록) 인 경우	명 칭	발효된 곤충키틴을 포함하는 사료첨가제의 제조방법 및 그에 따라 제조된 사료첨가제				
		번호	10-2021-0004354	일 자	2021. 01. 13		
	실시(활용)기관	기관명	농업회사법인(주)한국유용곤충연구소		기관유형	농업회사법인	
		주 소	전남 곡성군 옥과면 소룡길 289-38		대 표 자	양 영 철	
사업자번호		125-81-45116		전화번호	061-362-8205		
부서(담당자)		기업부설IPM연구소(박영규)		e-mail	@kbil.co.kr		
기술료산정내역	정부출연금 262,000천원 * 0%(농어업경영체) = 0원						
기 술 료	정액기술료		경상기술료		기타 조건		
	정수(납부)예정일	정수(납부)금액	착수기분료	정수(납부)예정일			정수(납부)금액
	-	-	매출에 따른 기술료	-	-	-	
	-	-		정수(납부)시작일	결산월		
	-	-		정수(납부)종료일	정수율		
계	-	-		매출액의 (%)			
기타특기사항	-						

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제22조 제2항에 따라 위와 같이 기술실시계약이 체결되었음을 보고합니다.

- 붙임 1. 기술실시계약서 사본 1부(타기관으로 기술이전시).  
 2. 지식재산권을 포함하는 기술이전인 경우 해당 증빙자료(특허 등록증, 출원증 등) 1부 (타기관으로 기술이전시).  
 3. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).

2021년 2월 19일

주관연구기관 농업회사법인(주)한국유용곤충연구소 양영철 [직인]

농림식품기술기획평가원장 귀하



## 국고보조금 사업수행확인서

(신용카드사 보조금 전용카드 업무 지원용)

보조사업 현황			
보조사업명	사료곤충 산업화 지원		
보조금액	보조금 총액	970,000,000원	
	국고보조금	291,000,000원	
	지방비부담금	388,000,000원	
	자기부담금	291,000,000원	
사업목적	남은 음식물을 처리하고 축산, 양어용 사료 및 비료로 활용이 가능한 사료용 곤충 산업화 지원 - 곤충 종자생산, 사육, 가공시설 등		
사업기간	2019-01-01 ~ 2023-12-31		
사업내용	곤충 생산자단체 및 사육농가에 사료용곤충 산란장, 사육장, 가공설비 등 지원 - 거점농가(생산자단체)는 동태등에 알을 농가에 공급, - 협력농가는 사육 후 거점농가를 통해 가공 및 부가가치 창출		
상위보조사업자 및 보조사업자 현황			
중앙관서 현황	중앙관서명	농림축산식품부	
	내역사업명	사료곤충산업화지원	
발급자 (상위보조 사업자)	기관명	전라남도 곡성군	
	담당부서명	전라남도 곡성군	
	담당자명	정 빛	연락처 (핸드폰)

보조 사업자	기관명	농업회사법인(주)한국유용곤충연구소		
	대표자명	양영철	사업자 (주민)번호	125-81-45116
	연락처 (핸드폰)	061-362-8205		
	주소	(우 57507) 전라남도 곡성군 옥과면 소룡길 289-38 한국유용곤충연구소		

※ 보조금(e나라도움) 전용카드 발급과 한도 상향은 보조사업자의 신용도, 결제능력 등에 따라 카드사의 심사(사업수행확인서 반영)를 통해 결정됨을 알려드립니다.

상기와 같이 보조 사업을 수행함을 증명합니다.

2020년 01월 08일

전라남도 곡성군

직인

□ 사업화 현황

<첨부4>

### 농림축산식품 연구개발과제 매출 확인서

과제명	생물적 발효과정을 이용한 곤충 키틴발효 사료첨가제 생산기술개발 및 산업화		
주관연구기관	농업회사법인(주)한국유용곤충연구소	참여기관	
연구책임자	박영규	연구기간	2019년 05월 ~ 2021년 1월(총 2년)
기업 정보	기업 매출 총액 : 896,134,719원		
관련 실적	특허( ○ ), 품종(    ), 소프트웨어(    ), 디자인(    ), 상표( ○ ), 기타(    )		
	발효된 곤충키틴을 포함하는 사료첨가제의 제조방법 및 그에 따라 제조된 사료첨가제(특허출원 10-2021-0004354)		
	기술실시 명칭 : 키틴배양액과 미생물을 이용한 동애등에 발효기술		

#### 해당제품의 매출 실적

제품명	제품사진	매출액(원)	해당 과제의 매출액 기여율(%)
라바피드		국내 24,600,000원	100%
		국외	

\* 첨부 : 당해연도 매출액을 확인할 수 있는 자료(매출전표, 세금계산서, 매출원장, 수출계약 등)

상기와 같이 R&D 기술을 사업화하여 발생한 매출액을 보고합니다.

2021년 3월 15일

연구책임자 : 박영규 (인)

첨부 세금계산서

영세율전자세금계산서				승인번호	20201229-10000000-13285808			
공급자	등록번호	125-81-45116	회사명칭	영명철	공급받는자	등록번호		
	상호 (법인명)	농업회사법인 (주) 한국 유용농산물구조사	성명	양영철		상호 (법인명)		
	사업장 주소	전라남도 곡성군 옥곡면 소룡길 289-38				사업장 주소		
	업태	축산	종목	천적및곤충류사육		업태	종목	
이메일	kb2@kb2.co.kr			이메일		이메일		
작성일자	공급가액	세액	수정사유	비고				
2020-12-29	400,000	0	해당없음					
월	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고
12	29	리버피드	kg	40	10,000	400,000	0	
합계금액		현금	수표	어음	외상미수금	이 금액을 (청구) 함		
400,000								

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 '조회/발급'전자세금계산서> 제3차 발급사실 조회'를 이용하시기 바랍니다.

영세율전자세금계산서				승인번호	20201229-10000000-13285810			
공급자	등록번호	125-81-45116	회사명칭	영명철	공급받는자	등록번호		
	상호 (법인명)	농업회사법인 (주) 한국 유용농산물구조사	성명	양영철		상호 (법인명)		
	사업장 주소	전라남도 곡성군 옥곡면 소룡길 289-38				사업장 주소		
	업태	축산	종목	천적및곤충류사육		업태	종목	
이메일	kb2@kb2.co.kr			이메일		이메일		
작성일자	공급가액	세액	수정사유	비고				
2020-12-29	1,400,000	0	해당없음					
월	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고
12	29	리버피드	kg	140	10,000	1,400,000	0	
합계금액		현금	수표	어음	외상미수금	이 금액을 (청구) 함		
1,400,000								

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 '조회/발급'전자세금계산서> 제3차 발급사실 조회'를 이용하시기 바랍니다.

영세율전자세금계산서					승인번호	20201229-10000000-13285815			
공 급 자	등록번호	125-81-45116	통사업장 번호		공 급 받 는 자	등록번호			
	상호 (법인명)	농업회사법인 (주) 한국 유봉군농협주조	성명	양영훈		상호 (법인명)			
	사업장 주소	전라남도 곡성군 옥곡면 소룡길 289-38				사업장 주소			
	업태	축산	종목	천적및군축류사육		업태			
이메일	k2e@k2e.co.kr			이메일					
작성일자	공급가액	세액		수령사유	비고				
2020-12-29	1,400,000	0		해당없음					
월	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고	
12	29	라바피드	kg	140	10,000	1,400,000	0		
합계금액		현금	수표	어음	외상미수금	이 금액을 (청구) 함			
1,400,000									

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 \*조회/발급>전자세금계산서> 제3자 발급사실 조회 \*를 이용하시기 바랍니다.

영세율전자세금계산서					승인번호	20201229-10000000-13285812			
공 급 자	등록번호	125-81-45116	통사업장 번호		공 급 받 는 자	등록번호			
	상호 (법인명)	농업회사법인 (주) 한국 유봉군농협주조	성명	양영훈		상호 (법인명)			
	사업장 주소	전라남도 곡성군 옥곡면 소룡길 289-38				사업장 주소			
	업태	축산	종목	천적및군축류사육		업태			
이메일	k2e@k2e.co.kr			이메일					
작성일자	공급가액	세액		수령사유	비고				
2020-12-29	1,400,000	0		해당없음					
월	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고	
12	29	라바피드	kg	140	10,000	1,400,000	0		
합계금액		현금	수표	어음	외상미수금	이 금액을 (청구) 함			
1,400,000									

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 \*조회/발급>전자세금계산서> 제3자 발급사실 조회 \*를 이용하시기 바랍니다.

영세율전자세금계산서					승인번호	20201229-10000000-13285806			
공 급 자	등록번호	125-81-45116		중사업장번호	공 급 받 는 자	등록번호			
	상호(법인명)	영일회사법인 (주) 한국 귀농귀촌연구소		성명		양영철			
	사업장주소	전라남도 곡성군 옥곡면 소룡길 289-38							
	업태	축산	종목	전직및군충류사육					
	이메일	kb@kbil.co.kr							
작성일자	공급가액	세액	수량	단가	공급가액	세액	비고		
2020-12-29	600,000	0	해당없음						
월	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고	
12	29	라바피드	kg	60	10,000	600,000	0		
합계금액		현금	수표	어음	외상미수금	이 금액을 (청구) 함			
600,000									

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 <조회/발급>전자세금계산서> 제3자 발급사실 조회 \*를 이용하시기 바랍니다.

영세율전자세금계산서					승인번호	20201229-10000000-13285814			
공 급 자	등록번호	125-81-45116		중사업장번호	공 급 받 는 자	등록번호			
	상호(법인명)	영일회사법인 (주) 한국 귀농귀촌연구소		성명		양영철			
	사업장주소	전라남도 곡성군 옥곡면 소룡길 289-38							
	업태	축산	종목	전직및군충류사육					
	이메일	kb@kbil.co.kr							
작성일자	공급가액	세액	수량	단가	공급가액	세액	비고		
2020-12-29	1,400,000	0	해당없음						
월	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고	
12	29	라바피드	kg	140	10,000	1,400,000	0		
합계금액		현금	수표	어음	외상미수금	이 금액을 (청구) 함			
1,400,000									

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 <조회/발급>전자세금계산서> 제3자 발급사실 조회 \*를 이용하시기 바랍니다.

영세율전자세금계산서				승인번호	20201027-10000000-51987730			
공급자	등록번호	125-81-45116		종사업장번호				
	상호(법인명)	주요인화사법인(주) 한국유형인종연구소		성명	양영철			
	사업장주소	전라남도 곡성군 옥곡면 소룡길 289-38						
	업태	축산	종목	천적및곤충류사육				
	이메일	kbil@kbil.co.kr						
작성일자	공급가액	세액	수정사유	비고				
2020-10-27	5,000,000	0	해당없음					
월	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고
10	27	동예동예유승분말(라바피드)	kg	500	10,000	5,000,000	0	
합계금액		현금	수표	어음	외상미수금	이 금액을 (청구) 함		
5,000,000								

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 "조회/발급>전자세금계산서" 제3자 발급사실 조회"를 이용하시기 바랍니다.

영세율전자세금계산서				승인번호	20201027-10000000-51778871			
공급자	등록번호	125-81-45116		종사업장번호				
	상호(법인명)	주요인화사법인(주) 한국유형인종연구소		성명	양영철			
	사업장주소	전라남도 곡성군 옥곡면 소룡길 289-38						
	업태	축산	종목	천적및곤충류사육				
	이메일	kbil@kbil.co.kr						
작성일자	공급가액	세액	수정사유	비고				
2020-10-27	4,000,000	0	해당없음					
월	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고
10	27	동예동예유승분말(라바피드)	kg	400	10,000	4,000,000	0	
합계금액		현금	수표	어음	외상미수금	이 금액을 (청구) 함		
4,000,000								

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
 발급사실 확인은 상기 홈페이지의 "조회/발급>전자세금계산서" 제3자 발급사실 조회"를 이용하시기 바랍니다.

영세율전자세금계산서				승인번호	20200824-10000000-92701160			
영 세 율 자	전화번호	125-81-45116		중사업장 번호				
	상호 (법인명)	케이엘비(주) 한국		성명	양영길			
	사업장 주소	경기도 고양시 일산구 불광동 280-38						
	업태	총상	종목	건축및금융류사용				
	이메일	kbi@kbi.co.kr						
작성일자	공급가액	세액		수령사유	비고			
2020-08-24	8,000,000	0		허당연봉				
일	일	품목	규격	수량	단가	공급가액	세액	비고
08	24	종아틀어류순분말(라바피프)	kg	800	10,000	8,000,000	0	
합계금액		현금	수표	어음	외상미수금	이 금액을 (원구) 함		
8,000,000								

본 인쇄물은 국세청 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 발급 또는 전송 입력된 전자(세금)계산서입니다.  
발급사실 확인은 상기 홈페이지의 <조회/발급>전자세금계산서> 제3자 발급사실 조회 \*를 이용하시기 바랍니다.

□ 고용 창출

출력일시 : 2019.07.08 11:12

### 4대 사회보험 사업장 가입자 명부

발급번호	20190708812040	발급일시	2019-07-08 11:11	사업장 관리번호	12581451160
구분	국민연금	건강보험	산재보험	고용보험	
사업자등록번호	125-81-45116	125-81-45116	125-81-45116	125-81-45116	
사업장 명칭	농업회사법인 (주)한국류 용근출연연구소	농업회사법인 (주)한국류 용근출연연구소	농업회사법인 (주)한국류 용근출연연구소	농업회사법인 (주)한국류 용근출연연구소	

■ 가입 내역(발급일자 현재기준)

1 / 2

연번	주민(외국인) 등록번호	성명	자격 취득 일			
			국민연금	건강보험	산재보험	고용보험
1	*****	오	미가입	2016.11.01	2016.11.01	미가입
2	*****	최	미가입	2016.05.02	2016.05.02	미가입
3	*****	이	미가입	2018.04.02	2018.04.02	미가입
4	*****	방	2018.04.02	2018.04.02	2018.04.02	미가입
5	*****	양	2008.03.03	2008.03.03	미가입	미가입
6	*****	오	2003.07.01	2003.07.16	미가입	미가입
7	*****	박	2003.07.01	2003.07.16	미가입	미가입
8	*****	박	2013.05.31	2013.05.31	미가입	미가입
9	*****	한	2013.05.31	2013.05.31	미가입	미가입
10	*****	이	2018.01.02	2018.01.02	2018.01.02	2018.01.02
11	*****	이	2008.04.25	2008.04.25	2009.01.02	2009.01.02
12	*****	이	2010.08.01	2010.08.01	미가입	미가입
13	*****	정	2014.10.01	2014.10.01	미가입	미가입
14	*****	박	2016.12.19	2016.12.19	미가입	미가입
15	*****	박상우	2019.03.04	2019.03.04	미가입	미가입

▷ 위 사업장 가입자 명부는 4대사회보험 정보연계시스템이 국민연금공단, 국민건강보험공단, 근로복지공단의 가입자 정보를 실시간 연계받아 제공하는 것이며, 발급사실 여부는 발급일로부터 90일까지 4대사회보험 포털사이트(www.4insure.or.kr)의 [발급사실확인] 메뉴에서 확인 가능합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

---

교육컨설팅(2019. 11. 6)

: 2019년 동해등에 대량사육을 위한 계열화농가 선발을 위한 협의회 및 교육 실시



(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

---

- 기술실시 및 교육지도는 계획하지 않은 성과를 달성하였음

---

## 2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
① 사료용곤충 대량사육 및 키틴분해를 위한 제형화(전처리) 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 사료용곤충 대량사육을 위한 종충사육센터 및 사료가공센터 구축 및 비가열식 고성능 착유를 통한 발효 효과증진 가능</li> <li>- 발효 기술개발: 1차발효(곤충탈피각을 이용한 키틴배양액 생산), 2차발효(동애등에 탈지분말의 고상발효)</li> </ul>	100
② 곤충키틴분해 미생물 탐색, 선발 및 배양배양조건 규명 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 키틴분해 미생물 1종 선발</li> <li>- 대상 미생물의 키틴발효 조건 확인</li> <li>- 배양과정중 부산물의 항산화활성 등 확인</li> </ul>	100
③ 곤충키틴 발효 사료의 면역증강 및 항병력 효과 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 실험구에서 사료요구율이 감소하고 증체량이 증가함</li> <li>- 대식세포가 활성화되어 선천면역성을 증가시킴</li> <li>- 림프구의 증식 강화 효과를 보임</li> <li>- 면역반응 사이토카인의 분비량을 증가</li> <li>- 살모넬라 감염에 대한 저항성을 증가시킴</li> </ul>	100
④ 곤충키틴발효 사료첨가제의 대량생산 및 산업화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 키틴발효미생물 배양조 구축중(1차 액상배양, 2차 고상배양 균주(<i>B. licheniformis</i> 선발완료)</li> <li>- 효과적인 곤충 키틴분해 미생물(<i>Bacillus subtilis</i> 확보 및 활용 계획 수립)</li> <li>- 곤충키틴 발효 최적조건 규명을 통한 발효조 및 가공 장비 구축중</li> <li>- 산업화를 위한 시제품출시(1건), 매출(6건), 기술실시(1건), 고용창출(1명) 및 상표(2건), 특허(1건) 출원완료</li> </ul>	100

## 4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

코로나19 사태로 인해 학회참석을 하지 못하여 학술발표 1건을 달성하지 못했습니다.

### 2) 자체 보완활동

2021년도에 학술발표 성과를 달성할 계획입니다.

### 3) 연구개발 과정의 성실성

---

본 연구과제의 산업화를 적극적으로 달성하기 위해 농림부의 “사료용곤충 산업화 지원사업”을 통해 종충사육센터 및 곤충사료가공센터를 구축하였음. 또한 계열화 농가를 육성하여 지자체 육성 산업으로 확대할 수 있는 산업화의 기초를 다졌으며 현재 제품 판매를 위해 지자체의 사료곤충 농가 보조사업에 적극적으로 참여하고 있음

---

## 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

---

본 연구개발 결과를 통해 사료곤충인 아메리카동애등에를 발효한 사료첨가제는 육계에서 생산성 증가, 면역능 증가, 살모넬라에 대한 항병력 증가효과를 보였으며, 이러한 결과를 활용하여 육계, 산란계, 오리 농가에 판매할 수 있을 것으로 기대됩니다. 또한 사료곤충을 산업화할 수 있도록 종충을 생산하여 농가에 보급하는 계열화 농가 육성방식을 도입하여 산업화 및 대중화를 가능하게 하였습니다. 생산물의 로타리드라이어 건조방식 및 비가열식 오일 추출방식 등 최신시설을 활용하여 대량 가공의 문제점을 개선하였습니다.

개발된 곤충키틴 분해미생물과 발효 미생물을 활용한 대량 배양 기술은 현재 산업 곤충인 식용, 약용, 사료용 곤충에 모두 적용할 수 있는 원천기술로 확대하여 활용할 수 있을 것으로 기대됨.

개발된 곤충키틴발효 사료첨가제를 다양한 축종 및 양식어류 등에 적용하여 곤충의 수요확대를 통해 산업곤충시장의 확대에 기여할 것으로 기대되어 향후 아래와 같은 후속 연구를 진행할 수 있을 것으로 기대됨.

가. 반려동물 및 관상어류, 관상 조류의 기능성 사료첨가제로 활용할 것으로 기대됨

나. 양식어류(민물, 해수) 및 기능성어종에 대한 질병예방과 면역력 증가를 위한 안전하고 효율적인 단백질 먹이원으로 활용할 것으로 기대됨

---

## 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

### ■ 인력양성 및 교육

#### 1. 동애등에 사육농가 선발

2021년 동애등에 사육에 관심이 있는 곡성군 소재 농민을 대상으로 계열농가 8호를 추가로 선발할 계획임. 선발된 농가는 한국유용곤충연구소 내 교육실과 기 선발된 동애등에 계열화 농가 사육현장에서 동애등에의 생활사 및 습성, 성장단계별 특징과 사육조건, 유충의 먹이 조건과 시기, 공급 횟수, 동애등에 유충의 수확 시기 및 방법, 수확 후 가공 전 관리, 분변토의 처리 그리고 사육실 환경의 유지조건 및 관리방법 등을 이론과 실무 위주의 교육을 통하여 사료용 곤충 동애등에의 생산 전문가로 양성한다.

#### 2. 사료곤충 동애등에의 농가 계열화 대량생산

가. 준비된 농가의 역량에 맞춰 매일 부화 유도된 5~7일령 동애등에 유충과 먹이(남은 음식물 건조분말과 기타 유기성 폐기물 등 저가형 먹이)를 한국유용곤충연구소에서 공급하고 약 10일 후 성장이 완료된 유충은 농가에서 유충분리기를 통해 선별해 놓으면 이를 매일 수집하여 가공

나. 동애등에 유충 사육상자(59.0×38.5×15.0cm)를 농가당 650개씩 배치

다. 계열화 농가는 매일 유충 사육상자 50~60개씩 접종

라. 10일 동안 계속적으로 연속적으로 접종하고 11일째부터 수확

마. 1개 사육상자당 약 800~1,000 g 정도 유충 생산

바. 농가당 50~60개/일 수확, 1일 생산량은 40~60 kg 예상

항목 \ 년도	2021	2022	2023	2024
농가당 1일 생산량 (kg)	50	65	80	100
농가당 월 생산량 (kg)	1,250	1,625	2,000	2,500
농가당 년 생산량 (kg)	15,000	19,500	24,000	30,000
년 소득 (만원)	1,000~ 1,200	1,300~ 1,560	1,600~ 1,920	2,000~ 2,400

### ■ 사업화 계획

#### 1. 동애등에 유충의 사료가공 계획

##### 가. 생산곤충의 수집

(1) 계열화 농가는 매일 말령기 유충을 유충분리기로 분리하여 수집 통에 준비함.

(2) 농가는 수확한 유충을 가지고 매일 한국유용곤충연구소에 방문하여 수확한 유충의 무게를 측정하여 기록하고, 유충의 먹이와 당일 접종할 부화약충을 공급받음

(3) 생산된 동애등에 유충은 사료 품질관리를 위해 순수분리가 잘 되도록 하며, 무게는 공정하게 재고 기록하여 향후 농가의 소득지급의 자료로 활용됨.

(4) 동애등에 유충이 먹었던 먹이가 분변으로 제거되도록 충분한 시점까지 생체로 보존하여 준비함.

나. 단미사료 원료 가공

(1) 준비된 동애등에 유충은 Rotary Dryer 방식으로 건조함.

: Rotary Dryer는 장비의 고장이나 유지비용이 적게 든다는 장점이 있으므로 Microwaves 건조방식을 변경하였으며, 독일에서 동애등에 건조방식으로 사용하고 있다는 사실을 알게되어 사료곤충 건조방식을 변경함.

(2) 건조된 동애등에 유충은 지방을 약 27~30% 정도 함유하고 있으므로 익스펠라형 착유과정을 통해 최대한 지방을 22~25% 정도 추출함으로써 분말 가공 시 입자를 100~120 mesh 정도 미세하게 가공할 수 있음.

: 추출된 지방은 별도의 용기에 담아 보관하고 향후 bio 소재연구개발의 재료로 활용하거나 배합사료 가공 시 원료배합에 일부 활용함.

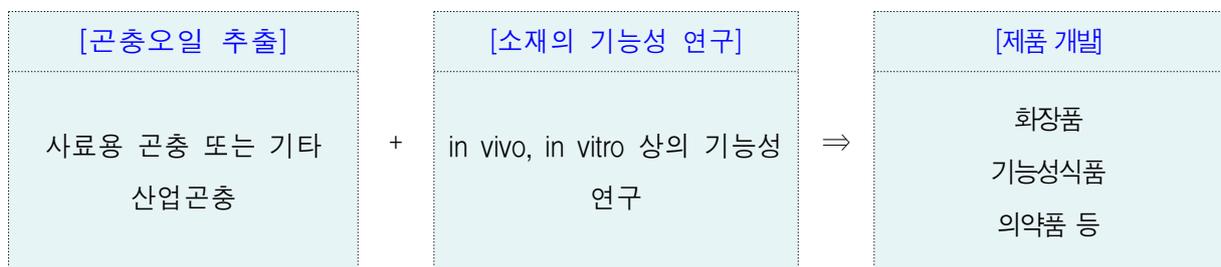
(3) 지방을 일부 제거한 곤충박은 분쇄과정을 통해 100~120 mesh 정도로 분쇄하여 단미사료 곤충분말을 생산함.

(4) 생산된 곤충분말은 제품포장기를 통해 10kg과 20kg 단위로 포장하여 생산함.

2. 기능성 사료 가공 및 Bio-소재 연구

가. 동애등에 유충에는 약 3.5~3.8%의 키틴을 함유하고 있으므로 키틴을 저분자 형태로 분해-가공 처리하여 사료원료로 공급할 계획임.

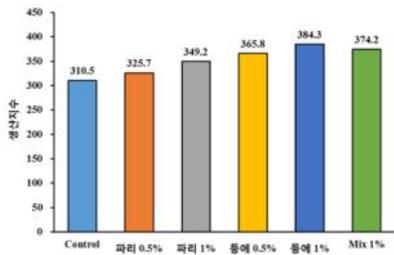
나. 키틴은 고분자로서 지금까지는 화학적 분해과정이 일반화되어 있을 뿐 안전하고 친환경적인 생물학 분해에 관해서는 만족스러운 연구가 부족한 실정이므로 한국유용곤충연구소는 농기평 연구과제를 통해 유기산 미생물 또는 발효미생물(Chitinase 생산 미생물)을 이용하여 고분자 키틴을 중저분자 당으로 처리하는 연구를 진행하고 있으며, 2020년에는 전남대 수의학과에서 급여 시 면역효과 증가 등의 연구개발을 통해 향후 제품화에 이용할 계획임.



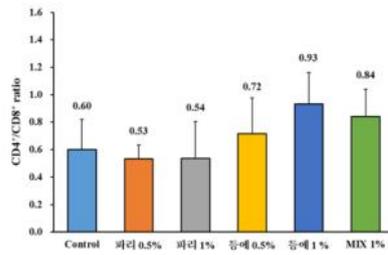
3. 곤충사료의 판매계획

가. 홍보

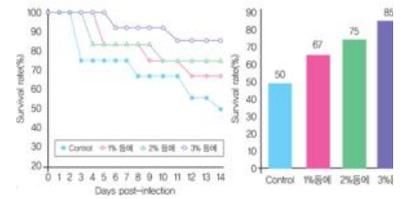
(1) “동애등에 유충을 이용한 닭사료 첨가제 개발 및 상품화”(2014~2016, 한국유용곤충연구소, 전남대 수의과대학) 연구결과를 근거하여 농가 및 조합원 또는 양계협회를 통해 홍보할 계획임.



<생산지수 향상>

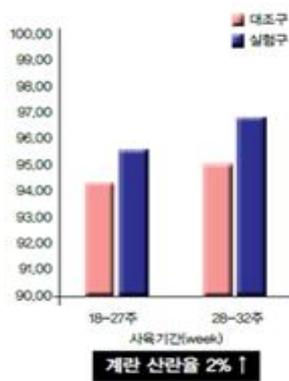


<면역력 증가>

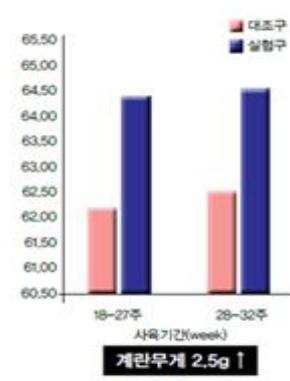


<살모넬라균의 대항력 증가>

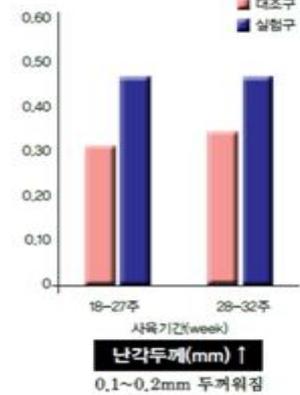
(2) 농촌진흥청의 “동애등에 유충의 산란계 급여효과”에 대한 연구결과를 근거하여 장점을 홍보



<산란율 향상>



<달걀 무게 증가>



<난각두께(mm) 증가>

(3) 기타 필수아미노산의 다양성, 사료요구율의 감소 등 다양한 연구 자료를 바탕으로 홍보전략 계획수립

(4) 넓치 치어에 곤충추출물을 급여한 연구결과를 바탕으로 급여한 그룹의 치어 치사율이 10% 이내인 반면 급여하지 않은 그룹의 치어 치사율이 80% 이상으로 양식어류 연구에서도 기대할만한 효과가 있음을 적극적으로 홍보함.

(5) 곤충기린 및 단백질을 생물적 분해 가공기술을 통한 향후 “곤충사료의 기능성 향상 연구” 등을 기반으로 다양한 자료를 수집하여 홍보할 계획임.

(6) 기존 사료와 곤충사료의 경제적 가치분석을 통한 소비자의 성곤충기린 및 단백질을 생물적 분해 가공기술을 통한 향후 “곤충사료의 기능성 향상 연구” 등을 기반으로 다양한 자료를 수집하여 홍보할 계획임.

나. 유통-판매

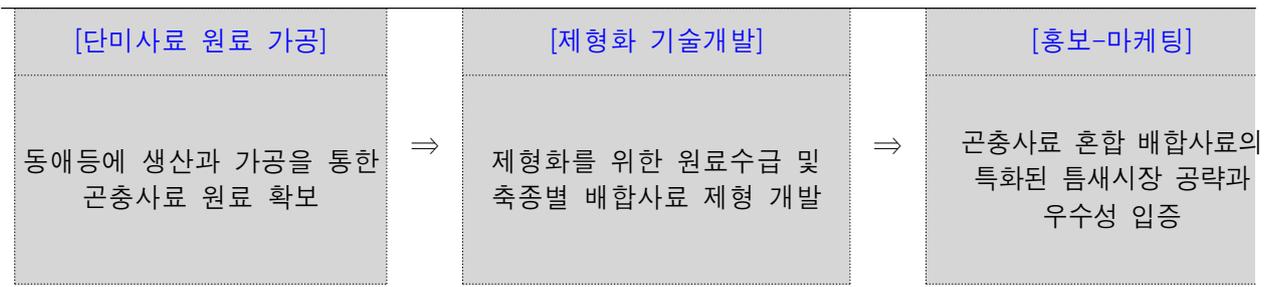
(1) 어류양식(민물, 해양), 관상어, 가금류, 기타 가축사료 틈새시장 창출 및 공략

(2) 사료전문가 자문을 통한 단미사료, 사료첨가제, 기능성사료 와 축종에 맞는 배합사료 가공-판매 촉진

(3) 산학연 네트워크 연구협력을 통한 곤충사료의 우수성 입증

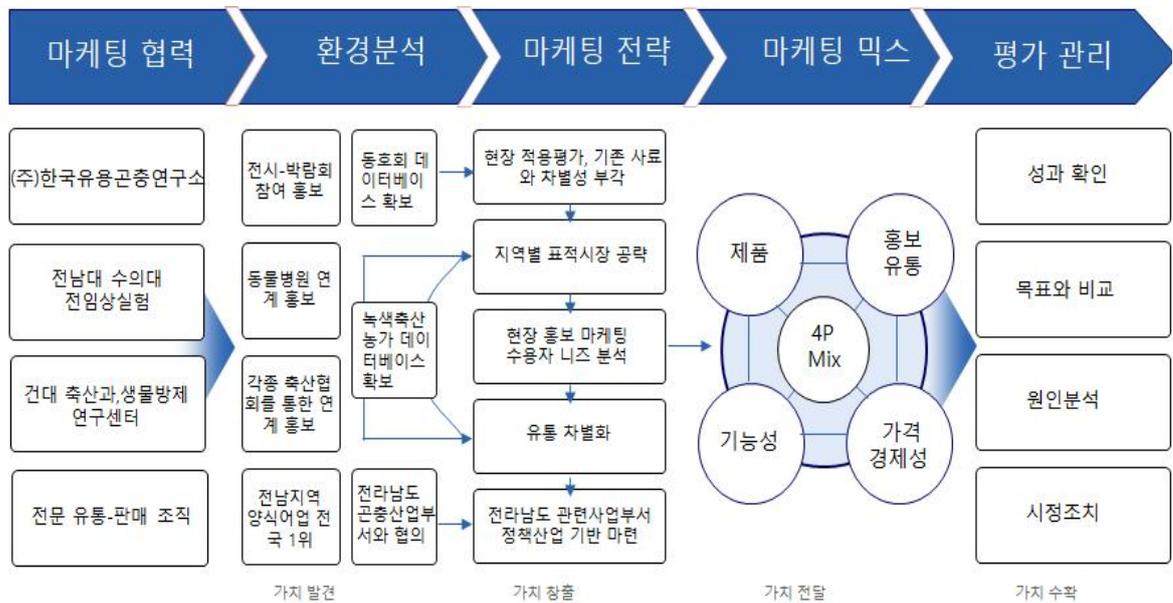
(4) 사료 산업분야별 맞춤형 사료 제형화 기술개발로 곤충사료의 차별화 된 제품을 적극적으로 구성하여 틈새시장 공략

(민물양식, 해양양식, 관상어, 가금류, 중-대가축 등)



(5) 사료분야별 전문 유통·판매회사 영입을 통한 마케팅

- ① 전문 유통·판매회사의 한국유용곤충연구소 주주로 영입
- ② 곤충사료의 효율성을 제고한 사료가공기술 연구개발로 틈새시장 공략 (기존 제품과의 차별화)



[ 사료용 곤충산업의 4P 분석을 통한 마케팅 전략 ]

**< 연구개발성과 활용계획표 >**

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	1	
	비SCIE		
	계	1	
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내	1	
	국외		
	계	1	
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시		
	기술이전		
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
2.	1)
	2)

**별첨자료 (참고 문헌)**

○ 보고서

농촌진흥청 국립농업과학원. 2016. 국내외 곤충산업별 연구동향 분석 보고서.

농촌진흥청. 2017. 식용곤충사육시설표준설계도.

농림축산식품부. 2017. 가수분해 곤충단백질을 이용한 반려동물 사료 및 기능성 첨가제 사업화 기획 보고서.

곤충자원의 식품소재화 기술 개발. 경기농산물 신수요 창출을 위한 6차 산업화 기술 개발 2018 시험연구보고서.

○ 특허자료

동애등에 분말을 포함하는 가축 사료용 조성물 및 이의 제조방법. 대한민국특허. 2019.

가축사육용 고상 발효사료 및 그 제조방법. 대한민국 특허. 2009.

동애등에 유충을 이용한 사료. 대한민국 특허. 2010

○ 논문자료

김영철, 강범용, 김용환, 박서기. 2017. 키틴분해세균의 현장 대량 배양방법을 이용한 효과적인 식물병의 생물적 방제 전략. Res. Plant Dis. 23(1), 19-34.

장현욱, 최지호, 작신영, 박보람. 209 고초균 및 버섯균사체를 이용하여 발효한 쌍별귀뚜라미 발효물의 단백질 및 무기질 성분변화. 한국식생활문화학회지. 34(6), 785-792.

차재영, 김용순, 안희영, 엄경은, 박보경, 전방실, 조영수. 2009. 발효누에분말의 생리활성. J. Life Sci. 19(10), 1468-1477.

Bjarne M.H. and Niels B.H., 2000. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strain by PCR analysis. Appl. Environ. Microbiol. 67(1): 158–189.

Manirul Islam. 2015. 육계와 양돈에서 갈색거저리 유충 생균제를 이용한 기능성 사료첨가제 개발. 순천대학교 대학원 박사학위논문. pp 76–116.

Park KH, Choi YC, Nam SH, Kim SH, Kim SY, Ma YJ, No SK (2013) Nutritional value of black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) as a feed supplement for fish. J Seric Entomol Sci 51(2), 95–98

Park KH (2013) Ecology of the Black Soldier Fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratmyidae). Ph.D. dissertation, Kyungpook National Univ press, korea.

Per E. G. and Terje L. 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol. Lett. 157, 223–228.

Ulrike L., Lorenz B.M., Weyrauch K.D, Martens H., 2008. Effect of *Bacillus cereus* var. *toyoi* as probiotic feed supplement on intestinal transport and barrier function in piglets. Archives Anim. Nutri. 62(2), 87–106.

Vesa M. and Kristina L. 1998. A rapid PCR-based test for enterotoxic *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. 64(5): 1634–1639.

## 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 생물적 발효과정을 이용한 곤충 키틴발효 사료첨가제 생산기술개발 및 산업화 (영문) Industrialization of fermented feed additive insects chitin by microorganisms				
주 관 연구 기관	한국유용곤충연구소	주 관 연 구	(소속) 기업부설IPM연구소		
참 여 기 업	상동	책 임 자	(성명) 박 영 규		
총연구개발비 (345,000천원)	계	345,000,000원	총 연구 기간	2019. 05. ~ 2021 . 01.( 1년 8월)	
	정부출연 연구개발비	262,000,000원	총 참 여 연구 원 수	총 인원	15
	기업부담금	83,000,000원		내부인원	15
	연구기관부담 금	-		외부인원	0

○ 연구개발 목표 및 성과

1. 연구개발 목표: 선형과제로 개발된 아메리카동애등에 닭사료 첨가제의 키틴을 분해하여 대상 가축이 효과적으로 활용할 수 있는 곤충 키틴발효 사료첨가제의 개발 및 산업화를 목표로 한다.

- ① 사료용곤충의 난분해성 키틴을 분해시킬 활성미생물의 선발 및 배양조건 규명
- ② 저분자 키틴 분해물 함유 곤충 키틴발효 사료첨가제의 면역, 항병력 효과 검증
- ③ 곤충키틴 발효 미생물을 활용한 곤충 키틴발효 사료첨가제 대량생산 및 산업화

2. 연구개발 성과

- ① 키틴분해를 위한 사료용곤충의 대량생산 및 제형화(유용곤충)
  - 아메리카동애등에 대량사육 및 생물학적 키틴분해를 위한 전처리 기술 개발
- ② 사료용곤충의 난분해성키틴을 분해시킬 활성미생물의 탐색 및 선발(가천대)
  - 키틴분해 미생물 분리 및 동정
  - 곤충키틴 발효 산물의 생물, 생화학적 특성 규명 및 세포독성 확인
  - 곤충키틴 분해산물 생산을 위한 대량 반응 조건 확인
- ③ 곤충 키틴발효 사료첨가제의 기능성 효과 검증(전남대)
  - 가금류 육계에서의 생산성적 및 도체 육질 특성 효과검증
  - 육계에서의 면역, 항병력 효과 검증
- ④ 곤충키틴 발효 미생물을 활용한 기능성 가축 사료첨가제 제작(유용곤충)
  - 키틴발효미생물 배양조 구축중(1차 액상배양, 2차 고상배양 균주 선발완료)
  - 곤충키틴 발효 최적조건 규명을 통한 발효조 및 가공 장비 구축중
  - 시제품출시(1건), 기술실시(2건), 매출(9건), 고용창출(1명), 상표(2건) 및 특허(1건) 출원 완료

○ 연구내용 및 결과

- ① 키틴분해를 위한 사료용곤충의 대량생산 및 제형화(유용곤충)
  - 아메리카동애등에 대량사육 및 생물학적 키틴분해를 위한 전처리 기술 개발
  - 대량사육-선별-건조-착유-분쇄 시스템 구축

- 1차 액상발효(곤충 탈피각을 활용한 키틴발효 조건 규명)
- 2차 고상발효(탈지 동애등에 분말의 단백질 발효 조건 규명) - 건조 - 제형화
- ② 사료용곤충의 난분해성키틴을 분해시킬 활성미생물의 탐색 및 선발(가천대)
  - 키틴분해 미생물 분리 및 동정(3종 중 *Bacillus* 속 균주 선발함)
  - 곤충키틴 발효 산물의 생물, 생화학적 특성 규명 및 세포독성 확인
  - 곤충키틴 분해산물 생산을 위한 대량 반응 조건 확인
- ③ 곤충 키틴발효 사료첨가제의 기능성 효과 검증(전남대):
  - 가금류 육계에서의 생산성적 및 도체 육질 특성 효과검증결과 실험구에서 사료요구율이 감소하고 증체량이 증가하여 생산성이 증가하며 지방과 회분 감소경향보임
  - 육계에서의 면역, 항병력 효과 검증결과 대식세포가 활성화되어 선천면역성을 증가, 림프구의 증식 강화, 면역반응 사이토카인의 분비량을 증가, 살모넬라 감염에 대한 저항성을 증가시켜 비특이적 면역력 증강에 도움이되어 항병력이 증가함
- ④ 곤충키틴 발효 미생물을 활용한 기능성 가축 사료첨가제 제작 및 산업화(유용곤충)
  - 키틴발효미생물 배양조 구축중(1차 액상배양, 2차 고상배양 균주(*B. licheniformis* 선발완료)
  - 효과적인 곤충 키틴분해 미생물(*Bacillus subtilis* 확보 및 활용 계획 수립)
  - 곤충키틴 발효 최적조건 규명을 통한 발효조 및 가공 장비 구축중
  - 산업화를 위한 시제품출시(1건), 매출(9건), 기술실시(2건), 고용창출(1명) 및 상표(2건), 특허(1건) 출원완료

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- ① 산업화를 통한 현장적용: 개발된 곤충키틴키토산 사료는 가금류(육계)의 면역증강을 위한 사료첨가제 시제품으로 개발하여 2020년 9농가에 판매하였으며 앞으로 확대 판매할 계획임
  - 상표출원 2건: 라바피드, 발효라바피드
  - 특허출원 1건: 발효된 곤충키틴을 포함하는 사료첨가제의 제조방법 및 그에 따라 제조된 사료첨가제
  - 기술실시 2건, 제품 출시 1건, 판매 9건
  - 고용창출 1명
  - 논문 2편, 학술발표 1건 등
- ② 제품화: 개발된 곤충 키틴발효 사료첨가제는 키틴분해 및 곤충발효산물 함량을 달리한 다양한 첨가 사료로 응용하여 제품화 할 계획임
  - 대상 가축 축종별(양돈, 양어 등)로 확대 적용할 계획임
  - 반려동물 및 애완동물용 사료첨가제로 제품화할 계획임
- ③ 미래 원천기술 확보: 개발된 곤충키틴 분해미생물을 활용한 대량 배양 기술은 현재 산업 곤충인 식용, 약용, 사료용 곤충에 모두 적용할 수 있는 원천기술로 활용할 계획임
- ④ 신산업창출: 개발된 곤충키틴발효 사료첨가제는 다양한 곤충의 수요확대를 통해 산업곤충 시장의 확대에 기여할 계획임
  - 반려동물 및 관상어류, 관상 조류의 기능성 사료첨가제로 활용할 계획임
  - 양식어류(민물, 해수) 및 기능성어종에 대한 질병예방 및 면역력 증가를 위한 안전하고 효율적인 단백질 먹이원으로 활용할 계획임

# 자체평가의견서

## 1. 과제현황

		과제번호		819031-02	
사업구분	농식품연구성과 후속지원사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	농식품연구성과 후속지원사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	생물적 발효과정을 이용한 곤충 키틴발효 사료첨가제 생산기술개발 및 산업화			과제유형	(기초, 응용, 개발)
연구개발기관	농업회사법인(주)한국유용곤충연구소			연구책임자	박영규
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2019. 05~ 2020. 01	112,000	33,000	145,000
	2차년도	2020. 01~2021. 01	150,000	50,000	155,000
	계	2019. 05~ 2021. 01	262,000	83,000	345,000
참여기업	농업회사법인(주)한국유용곤충연구소				
상대국				상대국연구개발기관	

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2021년 2월 9일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
기업부설IPM연구소	책임연구원	박영규

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	박영규
----	-----

## I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

아메리카동애등에를 대량사육하여 선별, 건조, 착유 및 분쇄할 수 있는 사료화 시스템을 구축하였으며 생산된 동애등에 탈지분말에 키틴배양액을 혼합하여 발효한 사료첨가제를 개발하여 대상 가축이 효과적으로 활용할 수 있는 곤충 키틴발효 사료첨가제를 제품화하였다. 개발한 사료첨가제는 육계에 대해 생산성적, 면역, 항병력 효과를 검증하여 산업화할 수 있는 검증자료를 확보하였다.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

개발된 곤충키틴 발효 사료는 가금류(육계)의 면역증강을 위한 사료첨가제 시제품으로 개발하여 농가에 판매할 계획이며 곤충발효산물 함량을 달리한 다양한 첨가 사료로 응용하여 제품화 할 계획임.

- 대상 가축 축종별(양돈, 양어 등)로 확대 적용할 수 있어 파급효과를 기대
- 반려동물 및 애완동물용 사료첨가제로 제품화할 수 있어 파급효과를 기대

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

개발된 곤충키틴발효 사료첨가제는 아메리카동애등에 뿐 아니라 다양한 곤충에 응용할 수 있을 것으로 생각되어 수요확대를 통해 산업곤충시장의 확대에 기여할 계획임

- 반려동물 및 관상어류, 관상 조류의 기능성 사료첨가제로 활용할 계획임
- 양식어류(민물, 해수) 및 기능성어종에 대한 질병예방과 면역력 증가를 위한 안전하고 효율적인 단백질 먹이원으로 활용할 수 있을 것으로 기대됨

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

본 연구과제의 산업화를 적극적으로 달성하기 위해 농림부의 “사료용곤충 산업화 지원사업”을 통해 종충사육센터 및 곤충사료가공센터를 구축하였음. 또한 계열화 농가를 육성하여 지자체 육성 산업으로 확대할 수 있는 산업화의 기초를 다졌으며 현재 제품 판매를 위해 지자체의 사료곤충 농가 보조사업에 적극적으로 참여하고 있음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

연구개발된 기술을 바탕으로 특허 1건을 출원하였으며 상표 출원 2건의 성과를 얻었음. 논문 2건 및 학술발표 1건을 달성하였음

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
① 사료용곤충 대량사육 및 키틴분해를 위한 제형화(전처리) 기술개발	20	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 사료곤충 대량사육을 위한 종충사육센터 및 사료가공센터 구축 및 비가열식 고성능 착유를 통한 발효 효과증진 가능</li> <li>- 발효 기술개발: 1차발효(곤충탈피각을 이용한 키틴배양액 생산), 2차발효(동애 등에 탈지분말의 고상발효)</li> </ul>
② 곤충키틴분해 미생물 탐색, 선발 및 배양배양조건 규명 기술	20	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 키틴분해 미생물 1종 선발</li> <li>- 대상 미생물의 키틴발효 조건 확인</li> <li>- 배양과정중 부산물의 항산화활성 등 확인</li> </ul>
③ 곤충키틴 발효 사료의 면역증강 및 항병력 효과 검증	30	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 실험구에서 사료요구율이 감소하고 증체량이 증가함</li> <li>- 대식세포가 활성화되어 선천면역성을 증가시킴</li> <li>- 림프구의 증식 강화 효과를 보임</li> <li>- 면역반응 사이토카인의 분비량을 증가</li> <li>- 살모넬라 감염에 대한 저항성을 증가시킴</li> </ul>
④ 곤충키틴발효 사료첨가제의 대량생산 및 산업화	30	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 키틴발효미생물 배양조 구축중(1차 액상배양, 2차 고상배양 균주(<i>B. licheniformis</i> 선발완료)</li> <li>- 효과적인 곤충 키틴분해 미생물(<i>Bacillus subtilis</i> 확보 및 활용 계획 수립)</li> <li>- 곤충키틴 발효 최적조건 규명을 통한 발효조 및 가공 장비 구축중</li> <li>- 산업화를 위한 시제품출시(1건), 매출(9건), 기술실시(1건), 고용창출(1명) 및 상표(2건), 특허(1건) 출원완료</li> </ul>
합계	100점	100	

### III. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구개발 결과를 통해 사료곤충인 아메리카동애등에를 발효한 사료첨가제는 육계에서 생산성 증가, 면역능 증가, 살모넬라에 대한 항병력 증가효과를 보였으며, 이러한 결과를 활용하여 육계, 산란계, 오리 농가에 판매할 수 있을 것으로 기대됩니다. 또한 사료곤충을 산업화할 수 있도록 종충을 생산하여 농가에 보급하는 계열화 농가 육성방식을 도입하여 산업화 및 대중화를 가능하게 하였습니다. 생산물의 로타리드라이어 건조방식 및 비가열식 오일 추출방식 등 최신시설을 활용하여 대량 가공의 문제점을 개선하였습니다.

개발된 곤충키틴 분해미생물과 발효 미생물을 활용한 대량 배양 기술은 현재 산업 곤충인 식용, 약용, 사료용 곤충에 모두 적용할 수 있는 원천기술로 확대하여 활용할 수 있을 것으로 기대됩니다.

#### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본과제의 최종목표인 시제품개발 및 상품화뿐만 아니라 연구주체가 지속적으로 연구개발 결과를 보완 발전할 수 있는 준비가 되어있는지에 대한 고려가 필요할 것으로 생각됩니다. 주관기관인 산업체는 연계 사업(사료용곤충 산업화사업, 사료곤충 농가 계열화 사업 등)을 통해 지속적으로 매출이 발생할 수 있는 체계를 유지 가동하고 있으며 구축된 동애등에 종충생산센터 및 사료가공센터를 주축으로 다양한 사료첨가제 및 배합사료 개발을 통해 산업화를 달성하려는 노력이 있음을 고려해야 할 것으로 생각됩니다.

#### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

개발된 곤충키틴발효 사료첨가제를 다양한 축종 및 양식어류 등에 적용하여 곤충의 수요확대를 통해 산업곤충시장의 확대에 활용할 계획입니다. 향후 아래와 같은 후속연구를 진행할 계획입니다.

- 반려동물 및 관상어류, 관상 조류의 기능성 사료첨가제로 활용할 계획임
- 양식어류(민물, 해수) 및 기능성어종에 대한 질병예방과 면역력 증가를 위한 안전하고 효율적인 단백질 먹이원으로 활용할 계획임

#### IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구개발기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

--

##### 2. 연구개발기관 자체의 검토결과

--

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	농식품기술개발사업	
연구과제명	생물적 발효과정을 이용한 곤충 키틴발효 사료첨가제 생산기술개발 및 산업화			
주관연구개발기관	농업회사법인(주)한국유용곤충연구소	주관연구책임자	박영규	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	262,000,000원	83,000,000원		345,000,000원
연구개발기간	2019. 05. 10 ~ 2021. 01. 09			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(                      ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:                      )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 사료용곤충 대량사육 및 키틴분해를 위한 제형화(전처리) 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 동애등에 분리, 건조, 착유, 분쇄를 위한 가공 시스템 구축 완료</li> <li>- 키틴발효에 효율적인 비가열식 고성능 착유기 및 분쇄기 구축</li> <li>- 발효를 위한 전처리 단계의 실증시험실시 : 1차발효, 곤충탈피각을 이용한 키틴배양액 생산</li> <li style="padding-left: 20px;">2차발효, 동애등에 탈지분말의 고상발효</li> </ul>
② 곤충키틴분해 미생물 탐색, 선발 및 대량배양 조건 규명 기술	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 키틴분해 미생물 탐색을 위한 콜라이달키틴 제조 및 3종의 키틴분해 미생물 확보</li> <li>- 선발 균주중 곤충탈피각에 효율적인 sy03균주 선발</li> <li>- 중동정(<i>Bacillus</i> 속) 및 키틴분해에 효과적인 추가 균주 확인 실험 실시</li> <li>- 배양과정중 부산물의 항산화활성 등 확인</li> <li>- 대상 미생물의 키틴발효 조건 확인</li> </ul>
③ 곤충키틴 발효 사료의 면역증강 및 항병력 효과 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 실험구에서 사료요구율이 감소하고 증체량이 증가하여 생산성이 증가함</li> <li>- 닭고기 일반성분 분석결과 지방과 회분 감소 경향보임</li> <li>- 대식세포가 활성화되어 선천면역성을 증가시킴</li> <li>- 림프구의 증식 강화 효과를 보임</li> <li>- 면역반응 사이토카인의 분비량을 증가</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 살모넬라 감염에 대한 저항성을 증가시킴</li> <li>- 비특이적 면역력 증강에 도움이되어 항병력이 증가함</li> </ul>
④ 곤충키틴발효 사료첨가제의 대량생산 및 산업화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 키틴발효미생물 배양조 구축중(1차 액상배양, 2차 고상배양 균주(<i>B. licheniformis</i> 선발완료)</li> <li>- 효과적인 곤충 키틴분해 미생물(<i>Bacillus subtilis</i> 확보 및 활용 계획 수립)</li> <li>- 곤충키틴 발효 최적조건 규명을 통한 발효조 및 가공 장비 구축중</li> <li>- 산업화를 위한 시제품출시(1건), 매출(9건), 기술실시(1건), 고용창출(1명) 및 상표(2건), 특허(1건) 출원완료</li> </ul>

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구 활용등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T 평 균 등 급	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논문				학 술 발 표	정 책 활 용	
											S C I		비 S C I	논 문 평 균 I F					
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건		
가중치	20						30	30		20									
최종 목표	1	1					1	120		1		1	2		2				
당해 년도	목표	1					1	20		1			1		2				
	실적	1				2	1	24.6		1			2		1	1			
달성률 (%)	100						100	100		100			200		50				

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	사료용곤충 대량사육 및 키틴분해를 위한 제형화(전처리) 기술
②	곤충키틴분해 미생물 탐색, 선발 및 대량배양조건 규명 기술
③	곤충키틴 발효 사료의 면역증강 및 항병력 효과 검증
④	곤충키틴발효 사료첨가제의 대량생산 및 산업화

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화흡수	외국기술 개선개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술				v		v				
②의 기술				v				v		
③의 기술		v				v				
④의 기술					v	v	v			

\* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	사료용곤충 대량사육 및 키틴분해를 위한 제형화(전처리) 기술을 통해 안정적인 산업화를 기대 - 곤충 탈피각을 활용한 키틴발효액 생산에 활용 - 곤충 탈지분말의 고품질 발효를 통한 사료첨가제 생산에 활용
②의 기술	곤충키틴분해 미생물 탐색, 선발 및 대량배양조건 규명 기술을 통해 유망 균주 활용 - 제1협동기관의 선발 미생물 활용 - 타 연구기관의 유용 미생물을 적극적으로 활용
③의 기술	곤충키틴 발효 사료의 면역증강 및 항병력 효과 검증 결과를 활용하여 특허출원자료 및 마케팅 홍보자료로 활용 기대
④의 기술	곤충키틴발효 사료첨가제 발효라바피드의 대량생산을 통한 농가 보급에 활용 - 기존의 사료첨가제 시장의 확대 기대

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허 출원	특허 등록	품 종 등 록	S M A R T 평 균 등 급	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논문				학 술 발 표	정 책 활 용	
											SCI		비 SCI	논 문 평 균 I F					
단위	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치		50					50												
최종목표	1	1				1	120		1			1	2		2				



### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품연구성과 후속지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품연구성과 후속지원사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.