



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0077104
(43) 공개일자 2019년07월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23K 20/147 (2016.01) A23J 1/00 (2006.01)
A23J 3/26 (2006.01) A23J 3/34 (2006.01)
A23K 10/30 (2016.01) A23K 20/142 (2016.01)
A23K 20/163 (2016.01) A23K 50/80 (2016.01)
- (52) CPC특허분류
A23K 20/147 (2016.05)
A23J 1/006 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7017418(분할)
(22) 출원일자(국제) 2012년12월02일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2014-7018132
원출원일자(국제) 2012년12월02일
심사청구일자 2017년09월21일
(85) 번역문제출일자 2019년06월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/067508
(87) 국제공개번호 WO 2013/082574
국제공개일자 2013년06월06일
(30) 우선권주장
61/566,557 2011년12월02일 미국(US)
61/566,487 2011년12월02일 미국(US)
- (71) 출원인
프레리 아쿠아 테크
미국, 사우스다코타 57006, 브룩킹스, 809 32엔디
애버뉴
(72) 발명자
기본스, 윌리엄, 알
미국, 사우스다코타 57006, 브루킹스, 1709 더달
드리야브
브라운, 마이클, 엘
미국, 사우스다코타 57071, 볼가, 311 카산 애비
뉴
(74) 대리인
허용록

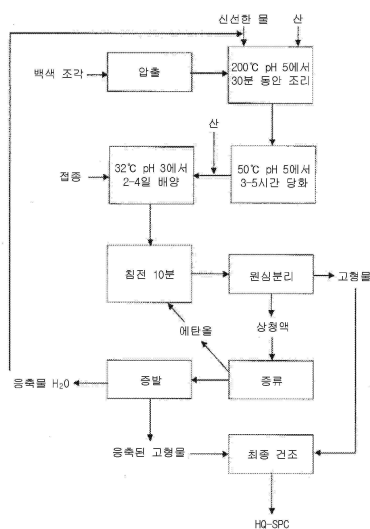
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 고 품질의 단백질 농축물을 위한 미생물 기반의 공정

(57) 요약

본 발명은 호기성 배양을 통해 식물계 셀룰로오스를 생체이용 단백질로 전환함으로써 고 품질 단백질 농축물(HQPC)를 제조하기 위한 생-기반 공정을 설명하며, 이렇게 제조된 HQPC의 용도를 제공하며, 양식 식이에서 어분 대체물로서의 용도를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23J 3/26 (2013.01)

A23J 3/346 (2013.01)

A23K 10/30 (2016.05)

A23K 20/142 (2016.05)

A23K 20/163 (2016.05)

A23K 50/80 (2016.05)

명세서

청구범위

청구항 1

비-동물계 단백질 농축물 및 엑소폴리사카라이드를 포함하는 조성물로서,

상기 조성물은 건조물 기준으로 60% 이상의 단백질 함량 및 0.24% 미만의 검출가능한 스타키오스(stachyose)를 함유하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 비-동물계 단백질 농축물은 대두, 땅콩, 유채씨 (Rapeseeds), 카놀라(canola), 참깨, 면화씨(cottonseeds), 팜 커널(palm kernels), 보리(barley), 포도씨(grape seeds), 올리브, 홍화(safflowers), 해바라기, 코프라(copra), 옥수수, 코코넛, 아마씨(linseed), 헤즐넛(hazelnuts), 밀, 쌀, 감자, 카사바(cassavas), 콩류(legumes), 카멜리나 씨(camelina seeds), 겨자씨(mustard seeds), 배아박(germ meal), 옥수수글루텐박(corn gluten meal), 증류/양조 부산물(distillery/brewery by-products), 및 조합으로 구성된 군으로부터 유래된 식물 재료로부터 단리된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 조성물의 단백질 함량은:

- 메쉬를 형성하기 위해, 실온보다 높은 온도에서 식물 재료를 압출하는 단계;
- 당을 메쉬로 방출하기 위해, 하나 이상의 셀룰로오스-분해 효소를 첨가하는 단계;
- 방출된 당을 단백질 및 엑소폴리사카라이드로 전환하는 하나 이상의 미생물을 효소 처리된 메쉬에 접종하는 단계;
- 결과물 단백질, 미생물 및 엑소폴리사카라이드를 에탄올 또는 응집제(flocculent)를 사용하여 침전시키는 단계;
- 침전된 재료를 유체역학적 힘(hydrodynamic force)을 통해 회수하는 단계; 및
- 상기 침전된 재료를 건조하는 단계

를 포함하는 공정에 의해 제조된 건조물 기준 상에서 60% 내지 90%인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 하나 이상의 미생물은 아우레오바시디움 플루란스 (*Aureobasidium pullulans*), 스크레로티움 글루카니쿰(*Sclerotium glaucum*), 스피노모나스 파우시모빌리스(*Sphingomonas paucimobilis*), 랄스토니아 유트로파 (*Ralstonia eutropha*), 로도스피릴룸 루부름(*Rhodospirillum rubrum*), 클루이베로미세스 spp.(*Kluyveromyces spp.*), 피키아 spp.(*Pichia spp.*), 트리코테르마 레세이 (*Trichoderma reesei*), 플레우로투스 오스트레아투스(*Pleurotus ostreatus*), 리조푸스 spp.(*Rhizopus spp.*), 및 그의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 식물 재료는 콩 조각 또는 콩가루의 형태로 대두로부터 유래된 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 6

제 3항에 있어서, 상기 식물 재료는 종유로부터 유래된 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 7

제 3항에 있어서, 상기 식물 재료는 옥수수주정박(DDGS)로부터 유래된 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 단백질 농축물은 100 g의 농축물 중에 0.1 g 이상의 히드록시리신을 포함하거나, 100 g의 농축물 중에 1.26 g 이상의 지질을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 1항의 조성물을 포함하는 동물 사료에 있어서, 상기 조성물은 상기 동물 사료의 적어도 35 중량% 내지 45 중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는, 동물 사료.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 조성물은 어류 사료에서 동물계 어분에 대한 완전 대체물인 것을 특징으로 하는, 동물 사료.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 어류 사료는 시베리아 철갑상어(Siberian sturgeon), 스텔렛 철갑상어(Sterlet sturgeon), 별모양 철갑상어(Starry sturgeon), 백색 철갑상어(White sturgeon), 아라파이마(Arapaima), 일본산 뱀장어 (Japanese eel), 미국산 뱀장어(American eel), 짧은-지느러미 뱀장어(Short-finned eel), 긴-지느러미 뱀장어(Long-finned eel), 유럽산 뱀장어(European eel), 사비히(Chanos chanos), 젓빛고기(Milkfish), 블루길 개복치(Bluegill sunfish), 푸른 개복치(Green sunfish), 백색 크래피(White crappie), 검은색 크래피(Black crappie), 살무사(Asp), 카틀라(Catla), 금붕어(Goldfish), 붕어(Crucian carp), 진흙에 붕어(Mud carp), 프리갈 붕어(Mrigal carp), 초어(Grass carp), 잉어(Common carp), 백련어(Silver carp), 대두어(Bighead carp), 오렌지핀 라베오 (Orangefin labeo), 로호 라베오(Roho labeo), 호벤 카프(Hoven's carp), 우창 브림(Wuchang bream), 청어(Black carp), 골든 샤이너(Golden shiner), 닐람 잉어 (Nilem carp), 백색 마우르 도미(White amur bream), 태국 은색 바브(Thai silver barb), 자바(Java), 로치(Roach), 텐치(Tench), 연못 미꾸라지(Pond loach), 보카치코(Bocachico), 도라다(Dorada), 피라냐(Cachama), 피라냐 블란카(Cachama Blanca), 파코(Paco), 눈동자개(Black bullhead), 얼룩메기(Channel catfish), 동자개(Bagrid catfish), 푸른 왕메기(Blue catfish), 웰스 메기(Wels catfish), 흑점메기(Pangasius (Swai, Tra, Basa) catfish), 쓸종개(Striped catfish), 미꾸라지(Mudfish), 필리핀 메기(Philippine catfish), 홍콩 메기(Hong Kong catfish), 북아프리카 메기(North African catfish), 대두메기(Bighead catfish), 삼파 (Sampa), 남아메리카 메기(South American catfish), 아티파(Atipa), 노던 파이크 (Northern pike), 아유 은어(Ayu sweetfish), 흰송어(Vendace), 뱀어(Whitefish), 핑사연어(Pink salmon), 백 연어(Chum salmon), 은연어(Coho salmon), 참송어(Masu salmon), 무지개 송어(Rainbow trout), 홍연어(Sockeye salmon), 왕연어(Chinook salmon), 대서양 연어(Atlantic salmon), 바다 송어(Sea trout), 북극 곤돌매기(Arctic char), 민물송어(Brook trout), 호수 송어(Lake trout), 대서양대구 (Atlantic cod), 페레레이(Pejerrey), 레이(Lai), 농어(Common snook), 배러먼디/아시아 농어(Barramundi/Asian sea bass), 나일 농어(Nile perch), 호주 농어 (Murray cod), 금빛 농어(Golden perch), 줄무늬 우럭(Striped bass), 백색 우럭 (White bass), 유럽 농어(European seabass), 홍콩 불바리(Hong Kong grouper), 대문바리(Areolate grouper), 그리지 그루퍼(Greasy grouper), 스폿 코랄그루퍼(Spotted coral grouper), 은빛 농어(Silver perch), 백색 농어(White perch), 재드 농어(Jade perch), 큰입 우럭(Largemouth bass), 작은입 우럭(Smallmouth bass), 유럽 농어(European perch), 잔더(파이크-농어)(Zander (Pike-perch)), 황색 농어 (Yellow Perch), 소거(Sauger), 월아이(Walleye), 게르치(Bluefish), 그레이터 앰버잭(Greater amberjack), 일본산 앰버잭(Japanese amberjack), 농어목 전갱이류 (Snubnose pompano), 플로리다 폼파노(Florida pompano), 팔로메타 폼파노 (Palometa pompano), 전갱이(Japanese jack mackerel), 날새기(Cobia), 망그로브 홍돔(Mangrove red snapper), 황색 스내퍼(Yellowtail snapper), 어두운색의 참돔 (Dark seabream), 백색 참돔(White seabream), 붉돔(Crimson seabream), 도미(Red seabream), 참돔(Red porgy), 청돔(Goldlined seabream), 먹도미류(Gilthead seabream), 홍민어(Red drum), 그린 테러(Green terror), 블랙벨트 씨클리드 (Blackbelt cichlid), 재규어 구아포트(Jaguar guapote), 멕시코 모자라(Mexican mojarra), 펄스팟(Pearlspot), 세점 역돔(Three spotted tilapia), 푸른 역돔(Blue tilapia), 긴 지느러미 역돔(Longfin tilapia), 역돔(Mozambique tilapia), 나일 역돔(Nile tilapia), 역돔(Tilapia), 와미 역돔(Wami tilapia), 블랙친 역돔 (Blackchin tilapia), 레드브레스트 역돔(Redbreast tilapia), 레드벨리 역돔 (Redbelly tilapia),

골든 그레이 멀릿(Golden grey mullet), 라지스케일 멀릿 (Largescale mullet), 골드-스팟 멀릿(Gold-spot mullet), 씬립 그레이 멀릿 (Thinlip grey mullet), 리핑 멀릿(Leaping mullet), 테이드 멀릿(Tade mullet), 플랫헤드 그레이 멀릿(Flathead grey mullet), 백색 멀릿(White mullet), 레브란케 멀릿(Lebranche mullet), 퍼시픽 팻 슬리퍼(Pacific fat sleeper), 마블 고비 (Marble goby), 백색-점 스파인풋(White-spotted spinefoot), 골드라인 스파인풋 (Goldlined spinefoot), 마블드 스파인풋(Marbled spinefoot), 남쪽의 참다랑어 (Southern bluefin tuna), 북쪽의 참다랑어(Northern bluefin tuna), 등목어 (Climbing perch), 스네이크스킨 구라미(Snakeskin gourami), 키싱 구라미(Kissing gourami), 자이언트 구라미(Giant gourami), 가물치 (Snakehead), 인도네시아 가물치(Indonesian snakehead), 점박이 가물치(Spotted snakehead), 스트립드 가물치 (Striped snakehead), 터버트(Turbot), 넙치(Bastard halibut), 서머 넙치(Summer Flounder), 남쪽 넙치 (Southern flounder), 윈터 넙치(Winter flounder), 대서양 가자미(Atlantic Halibut), 그린백 넙치(Greenback flounder), 노바에질란가자미 (Common sole), 및 그의 조합로 구성된 군으로부터 선택된 어류를 위해 제형화된 것을 특징으로 하는, 동물 사료.

청구항 12

제 10항에 있어서, 상기 어류 사료는, 동물계 어분 또는 콩 단백질 농축물을 포함하는 등가물의 어류 사료와 비교할 때, 성장률, 체중 증가, 단백질 효율비, 사료 요구율, 총 소비율, 생존률, 폴튼 조건 인자(Fulton's condition factor)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 능력 양태에서 더 우수한 능력을 가져오는 것을 특징으로 하는, 동물 사료.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 어류 사료는, 동물계 어분 또는 콩 단백질 농축물을 포함하는 등가의 어류 사료의 단백질 함량보다 적은 조질 단백질 함량에서 상기 능력 양태를 가져오는 것을 특징으로 하는, 동물 사료.

청구항 14

제 9항에 있어서, 상기 동물 사료는 리신 및 메티오닌으로 보강된 것을 특징으로 하는, 동물 사료.

청구항 15

비-동물계 단백질 농축물을 제조하는 방법에 있어서, 상기 방법은:

- 식물 재료를 실온보다 높은 온도에서 압출하여 메쉬를 형성한 다음, 상기 메쉬를 생물 반응 장치(bioreactor)로 이동시키는 단계;
- 하나 이상의 셀룰로오스-분해 효소를 첨가하여 생물 반응 장치 내 메쉬 안으로 당을 방출하는 단계;
- 방출된 당을 단백질 및 폴루란으로 전환하는 하나 이상의 미생물로 효소 처리된 메쉬를 접종하는 단계;
- 결과물 단백질, 미생물 및 폴루란을 에탄올, 응집제 또는 그의 조합을 사용하여 침전시키는 단계;
- 침전된 재료를 유체역학적 힘(hydrodynamic force)을 통해 회수하는 단계; 및
- 상기 침전된 재료를 건조하는 단계

를 포함하는, 비-동물계 단백질 농축물을 제조하는 방법.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 압출은 50℃ 내지 170℃ 사이에서, 3:1의 압축비로, 그리고 압출 통의 양측 상에 리지형 채널(ridged channels)에 대하여 전단 효과를 제공하기에 충분한 스크류 속도에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 비-동물계 단백질 농축물을 제조하는 방법.

청구항 17

제 15항에 있어서, 생물 반응 장치에서 5% 이상의 고체 부하율을 달성하기 위하여, 압출된 재료들과 물을 혼합하는 단계; 및

임의적으로, 회석된 압출 재료들을 고압살균(autoclaving) 및 냉각하는 단계를 더 포함하며,

상기 하나 이상의 셀룰로오스-분해 효소는 엔도-자일라나아제 및 베타-자일로시다아제, 글리코시드 히드롤라아제, β -글루코시다아제, 헤미셀룰라아제 활성, 및 그의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 비-동물계 단백질 농축물을 제조하는 방법.

청구항 18

제 15항에 있어서,

효소 처리된 메쉬의 온도를 30℃ 내지 37℃ 사이의 온도로 감소시키는 단계;

하나 이상의 미생물의 24시간 배양균의 2% (v/v)를 냉각된 메쉬에 접종하는 단계로, 상기 하나 이상의 미생물은 아우레오바시디움 풀루란스(*Aureobasidium pullulans*), 스크레로티움 글루카니쿰(*Sclerotium gluconicum*), 스펜고모나스 파우시모빌리스(*Sphingomonas paucimobilis*), 랄스토니아 유티트로파(*Ralstonia eutropha*), 로도스피릴룸 루부룸(*Rhodospirillum rubrum*), 클루이베로미세스 spp.(*Kluyveromyces spp.*), 피키아 spp.(*Pichia spp.*), 트리코데르마 레세이 (*Trichoderma reesei*), 플레우로투스 오스트레아투스(*Pleurotus ostreatus*), 리조푸스 spp.(*Rhizopus spp.*) 및 그의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되며;

접종된 메쉬를 0.05L/L분에서 임의적으로 통기시키는 단계; 및

i) 당의 사용이 중단되는 때 또는 ii) 하나 이상의 미생물과의 96 내지 120 시간 배양 후 까지 배양하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 비-동물계 단백질 농축물을 제조하는 방법.

청구항 19

제 15항에 있어서,

메쉬의 0.6L 에탄올/L를 첨가하는 단계;

에탄올 처리된 메쉬를 원심분리하는 단계; 및

임의적으로 하기 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 비-동물계 단백질 농축물을 제조하는 방법:

상청액으로부터 에탄올을 회수하는 단계;

상기 상청액에 현탁된 미세 입자들을 회수하는 단계,

회수된 미세 입자들을 건조하는 단계; 및

회수된 미세 입자를 건조되고 침전된 재료와 혼합하는 단계.

청구항 20

NRRL No. 50792, NRRL No. 50793, NRRL No. 50794, 및 NRRL No. 50795로 구성된 군으로부터 선택된 아우레오바시디움 풀루란 균주의 생물학적으로 순수한 배양균.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 작업은 계약 DBI-1005068 하에서 국립 과학 재단으로부터 국가적 지원을 받아 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대해 특정한 권리를 갖는다.

[0002] 본원은 2011년 12월 2일에 출원된 미국 가출원번호 61/566,487 및 2011년 12월 2일에 출원된 미국 가출원번호 61/566,577에 대해 35 U.S.C. § 119(e)에 따른 우선권의 이익을 향유하며, 각각은 본원에 참조로서 그 전체가 포함된다.

[0003] 본 발명은 일반적으로 배양 공정에 관한 것이고, 구체적으로 고 품질의 단백질 농축물을 제조하기 위한 미생물-기반의 호기성 배양 공정, 그로부터 제조된 생성물, 및 영양분 사료(nutrient feeds)의 제형에서 이러한 생산품의 사용에 관한 것이다.

배경 기술

- [0004] 2008년에, 세계 야생의 바다의 어류 자원 중 약 28%가 과도하게 개발되었고, 52%는 완전히 개발되었으며, 일인당 어류 및 갑각류 생산품 소비량의 요구가 인구의 증가와 함께 증가되었다. 야생 어류 자원의 감소에 따라, 이러한 증가된 요구를 충족하기 위한 노력에서, 상업적 양식 생산은 현격하게 증가해왔다. 그러나, 양식을 위한 식이 제제의 일차적 구성성분들 중 하나인 어분 단백질(fish meal protein)은 또한 야생의 낚시 어업(wild capture fisheries)으로부터 유래된다. 2012년에 상업적 양식 생산을 지원하기 위하여 적어도 약 6.7 mmt의 어분이 필요할 것으로 예측된다. 이는 명백히 지속 불가능한 추세이다.
- [0005] 단백질의 더 저렴하고, 더 지속 가능한 식물-유래 공급원은 양식 식이에서 일부 어분을 대체하여 사용되어왔다. 지방이 제거된 콩가루(SBM, 42~48% 단백질)는 몇몇 종들에 대하여 육성용 식이에서 총 단백질의 최대 20%를 대체하기 위하여 일반적으로 사용되어 왔으며, 대두 단백질 농축물(SPC, 65% 단백질)은 더 높은 총 단백질 대체 수준에서 성공적으로 시험 되어 왔으며, 이는 종들의 영양상태에 의해 크게 좌우된다. 이러한 대두 생산품은 고 단백질 및 상대적으로 좋은 아미노산 프로파일을 제공하지만, 여전히 육식성 바다의 어류들에 의해 요구되는 일부 중요한 아미노산(예, 타우린)의 결핍이 있다. SPC는 콩가루에 비해 더 높은 수준으로 사용될 수 있는데, 이는 SPC를 제조하기 위해 사용된 용매 추출 공정이 주로 항-영양분 인자들(예, 올리고당)을 제거하고, 이에 의해 단백질 생체이용률이 증가하기 때문이다. 게다가, 열 단계(thermal step)는 열-불안정 항원 인자들을 비활성화하기 위해 사용되어 왔다. 현재의 용매 추출 공정의 일차적 제한은 그의 비용, 공정에서 제거된 올리고당에 대한 용도의 결핍, 및 식이내에 총 단백질의 50% 정도로 포함하도록 자주 한정되는 것에 대한 품질 논쟁이다. 나아가, 대두 재료를 콩가루 또는 콩 단백질 농축물로 가공하는 것은 환경적으로 문제가 될 수 있다(예, 헥산-추출과 관련된 화학 폐기물의 처분에 관한 문제).
- [0006] 곡물 부산물들, 옥수수주정박(DDGS)도 양식 식이에서 최대 20%의 어분 대체 수준으로 평가되어왔다. DDGS는 저 단백질(28-32%) 및 콩 생산품들보다 더 많은 섬유질을 가지지만, 일반적으로 지방이 제거된 콩가루의 값의 약 50%의 가격이다. 일부 에탄올 식물들은 건조 분별법 공정을 포함하여 전환 공정 이전에 섬유질 및 오일의 일부를 제거하며, 그 결과 최대 42% 단백질의 건조-분별된 DDGS가 얻어진다. 이런 생산품이 양식 사료 중 어분의 20~40%를 대체하는데에 사용되어 왔지만, 더 높은 단백질, 더 소화가 잘되는 DDGS 양식 사료 생산품에 대한 필요가 여전히 존재한다. 이러한 생산품은, 단백질 성분이 타우린, 리신, 메티오닌 및 시스테인과 같은 중요한 아미노산들의 높은 수준을 갖는다면 특히 매력적일 것이다.
- [0007] 따라서, 비용-효율적, "친환경(green)", 그리고 양식 식이에서 어분의 대부분을 완전히 또는 실질적으로 대체하기에 충분히 높은 품질인, 식물-유래 단백질 공급원이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본원은 식물 재료를, 미생물 검(엑소폴리사카라이드) 바인더도 함유하는 고도로 소화가 잘되는 농축된 단백질 공급원으로 전환하기 위한, 유기 미생물-기반 시스템에 관한 것으로, 이러한 농축된 공급원은 인간 소비에 사용된 동물들에 대한사료로서 사용되기에 적합하다.
- [0009] 실시예에서, 비-동물계 단백질 농축물을 함유하는 조성물이 개시되며, 상기 조성물은 건조물 기준으로 적어도 55% 단백질 함량, 검출가능하지 않은 스타키오스(stachyose) 또는 라피노오스(raffinose)를 함유한다. 일 양태에서, 상기 조성물은 균주 NRRL No. 50792, NRRL No. 50793, NRRL No. 50794, NRRL No. 50795, 또는 그의 조합으로 기탁된 아우레오바시디움 플루란스(*aureobasidium pullulans*)를 함유한다.
- [0010] 일 양태에서, 비-동물계 단백질 농축물은 대두, 땅콩, 유채씨(Rapeseeds), 카놀라(canola), 참깨, 보리(barley), 면화씨(cottonseeds), 팜 커널(palm kernels), 포도씨(grape seeds), 올리브, 홍화(safflowers), 해바라기, 코프라(copra), 옥수수, 코코넛, 아마씨(linseed), 헤즐넛(hazelnuts), 밀, 쌀, 감자, 카사바(cassavas), 콩류(legumes), 카멜리나 씨(camelina seeds), 겨자씨(mustard seeds), 배아박(germ meal), 옥수수글루텐박(corn gluten meal), 증류/양조 부산물(distillery/brewery by-products), 그의 일부 및 조합들을 포함하지만 이에 제한되지 않은 곡물 및 종유(oil seed) 식물 재료로부터 단리된다.
- [0011] 다른 양태에서, 조성물의 단백질 함량은 공정에 의해 제조된 건조물 기준으로 약 56% 내지 약 90%의 범위이며, 이때 상기 공정은, 메쉬(mash)를 형성하도록 식물 재료를 실온보다 높은 온도에서 압출하는 단계; 당류를 메쉬안으로 방출하도록 하나 이상의 셀룰로오스-분해 효소를 첨가하는 단계; 효소-처리된 메쉬를 하나 이상의 미생물로 접종하는 단계로, 상기 미생물은 방출된 당을 단백질 및 엑소폴리사카라이드로 전환하며; 에탄올 또는 응

집제(flocculent)를 사용하여 결과 단백질, 미생물 및 엑소폴리사카라이드를 침전시키는 단계; 침전된 재료를 유체역학적 힘(hydrodynamic force)을 통해 회수하는 단계; 및 상기 침전된 재료를 건조하는 단계를 포함한다.

[0012] 관련 양태에서, 적어도 하나의 미생물은 아우레오바시디움 풀루란스(*Aureobasidium pullulans*), 스크레로티움 글루카니쿰(*Sclerotium glucanicum*), 스피노모나스 파우시모빌리스(*Sphingomonas paucimobilis*), 랄스토니아 유트로파(*Ralstonia eutropha*), 로도스피릴룸 루부룸(*Rhodospirillum rubrum*), 클루이베로미세스 spp.(*Kluyveromyces spp.*), 피키아 spp.(*Pichia spp.*), 트리코테르마 레세이(*Trichoderma reesei*), 플레우로투스 오스트레아투스(*Pleurotus ostreatus*), 리조푸스 spp.(*Rhizopus spp.*), 및 그의 조합들을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0013] 일 양태에서, 식물 재료는 지방이 제거된 콩 조각 또는 콩가루의 형태로 대두로부터 유래된 것이다. 또 다른 양태에서, 식물 재료는 종유 또는 그의 오일이 제거된 박(meals)로부터 유래된 것이다. 또 다른 양태에서, 식물 재료는 옥수수주정박(DDGS)로부터 유래된 것이다.

[0014] 일 양태에서, 단백질 농축물은 적어도 0.1 g 히드록시리신/100 g의 농축물을 포함한다.

[0015] 일 실시예에서, 비-동물계 단백질 농축물을 포함하는 동물 사료가 개시되며, 조성물은 적어도 약 1.25 g 지질/100 g 조성물을 포함하며, 상기 조성물은 검출가능하지 않은 스타키오스 또는 라피노오스를 함유하고, 건조물 기준으로 적어도 55% 단백질 함량을 함유하고, 상기 조성물은 상기 동물 사료 중량의 적어도 35%로 포함한다.

[0016] 관련 양태에서, 조성물은 어류 사료에서 동물계 어분에 대한 완전 대체물이다. 더 관련된 양태에서, 어류 사료는 시베리아 철갑상어(Siberian sturgeon), 스텔렛 철갑상어(Sterlet sturgeon), 별모양 철갑상어(Starry sturgeon), 백색 철갑상어(White sturgeon), 아라파이마(Arapaima), 일본산 뱀장어(Japanese eel), 미국산 뱀장어(American eel), 짧은-지느러미 뱀장어(Short-finned eel), 긴-지느러미 뱀장어(Long-finned eel), 유럽산 뱀장어(European eel), 사비히(Chanos chanos), 젖빛고기(Milkfish), 블루길 개복치(Bluegill sunfish), 푸른 개복치(Green sunfish), 백색 크래피(White crappie), 검은색 크래피(Black crappie), 살무사(Asp), 카틀라(Catla), 금붕어(Goldfish), 붕어(Crucian carp), 진흙에 붕어(Mud carp), 프리갈 붕어(Mrigal carp), 초어(Grass carp), 잉어(Common carp), 백련어(Silver carp), 대두어(Bighead carp), 오렌지핀 라베오(Orangefin labeo), 로호 라베오(Roho labeo), 호벤 카프(Hoven's carp), 우창 브림(Wuchang bream), 청어(Black carp), 골든 샤이너(Golden shiner), 닐람 잉어(Nilem carp), 백색 마우르 도미(White amur bream), 태국 은색 바브(Thai silver barb), 자바(Java), 로치(Roach), 텐치(Tench), 연못 미꾸라지(Pond loach), 보카치코(Bocachico), 도라다(Dorada), 피라냐(Cachama), 피라냐 블란카(Cachama Blanca), 파코(Paco), 눈동자개(Black bullhead), 얼룩메기(Channel catfish), 동자개(Bagrid catfish), 푸른 왕메기(Blue catfish), 웰스 메기(Wels catfish), 흑점메기(Pangasius (Swai, Tra, Basa) catfish), 쓸종개(Striped catfish), 미꾸라지(Mudfish), 필리핀 메기(Philippine catfish), 홍콩 메기(Hong Kong catfish), 북아프리카 메기(North African catfish), 대두메기(Bighead catfish), 삼파(Sampa), 남아메리카 메기(South American catfish), 아티파(Atipa), 노던 파이크(Northern pike), 아유 은어(Ayu sweetfish), 흰송어(Vendace), 뱀어(Whitefish), 곱사연어(Pink salmon), 백 연어(Chum salmon), 은연어(Coho salmon), 참송어(Masu salmon), 무지개 송어(Rainbow trout), 홍연어(Sockeye salmon), 왕연어(Chinook salmon), 대서양 연어(Atlantic salmon), 바다 송어(Sea trout), 북극 곤돌메기(Arctic char), 민물송어(Brook trout), 호수 송어(Lake trout), 대서양대구(Atlantic cod), 페레레이(Pejerrey), 레이(Lai), 농어(Common snook), 배러먼디/아시아 농어(Barramundi/Asian sea bass), 나일 농어(Nile perch), 호주 농어(Murray cod), 금빛 농어(Golden perch), 줄무늬 우럭(Striped bass), 백색 우럭(White bass), 유럽 농어(European seabass), 홍콩 불바리(Hong Kong grouper), 대문바리(Areolate grouper), 그리지 그루퍼(Greasy grouper), 스폿 코랄그루퍼(Spotted coral grouper), 은빛 농어(Silver perch), 백색 농어(White perch), 재드 농어(Jade perch), 큰입 우럭(Largemouth bass), 작은입 우럭(Smallmouth bass), 유럽 농어(European perch), 잔더(파이크-농어)(Zander (Pike-perch)), 황색 농어(Yellow Perch), 소거(Sauger), 월아이(Walleye), 게르치(Bluefish), 그레이터 앰버잭(Greater amberjack), 일본산 앰버잭(Japanese amberjack), 농어목 전갱이류(Snubnose pompano), 플로리다 폼파노(Florida pompano), 팔로메타 폼파노(Palometa pompano), 전갱이(Japanese jack mackerel), 날새기(Cobia), 망그로브 홍돔(Mangrove red snapper), 황색 스내퍼(Yellowtail snapper), 어두운색의 참돔(Dark seabream), 백색 참돔(White seabream), 붉돔(Crimson seabream), 도미(Red seabream), 참돔(Red porgy), 청돔(Goldlined seabream), 먹도미류(Gilthead seabream), 홍민어(Red drum), 그린 테러(Green terror), 블랙벨트 씨클리드(Blackbelt cichlid), 재규어 구아포트(Jaguar guapote), 멕시코 모자라(Mexican mojarra), 펄스팟

(Pearlspot), 세점 역돔(Three spotted tilapia), 푸른 역돔(Blue tilapia), 긴 지느러미 역돔(Longfin tilapia), 역돔(Mozambique tilapia), 나일 역돔(Nile tilapia), 역돔(Tilapia), 와미 역돔(Wami tilapia), 블랙친 역돔 (Blackchin tilapia), 레드브레스트 역돔(Redbreast tilapia), 레드벨리 역돔 (Redbelly tilapia), 골든 그레이 멀릿(Golden grey mullet), 라지스케일 멀릿 (Largescale mullet), 골드-스팟 멀릿(Gold-spot mullet), 씬립 그레이 멀릿 (Thinlip grey mullet), 리핑 멀릿(Leaping mullet), 테이드 멀릿(Tade mullet), 플랫헤드 그레이 멀릿(Flathead grey mullet), 백색 멀릿(White mullet), 레브란케 멀릿(Lebranche mullet), 퍼시픽 팻 슬리퍼(Pacific fat sleeper), 마블 고비 (Marble goby), 백색-점 스파인풋(White-spotted spinefoot), 골드라인 스파인풋 (Goldlined spinefoot), 마블드 스파인풋(Marbled spinefoot), 남쪽의 참다랑어 (Southern bluefin tuna), 북쪽의 참다랑어(Northern bluefin tuna), 등목어 (Climbing perch), 스네이크스킨 구라미(Snakeskin gourami), 키싱 구라미(Kissing gourami), 자이언트 구라미(Giant gourami), 가물치 (Snakehead), 인도네시아 가물치(Indonesian snakehead), 점박이 가물치(Spotted snakehead), 스트립드 가물치 (Striped snakehead), 터버트(Turbot), 넵치(일본 넵치)(Bastard halibut (Japanese flounder)), 서머 넵치 (Summer Flounder), 남쪽 넵치(Southern flounder), 윈터 넵치(Winter flounder), 대서양 가자미(Atlantic Halibut), 그린백 넵치(Greenback flounder), 노바에질란가자미(Common sole), 및 그의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않은 어류를 위해 제조된다.

- [0017] 일 양태에서, 어류 사료는 동물계 어분 또는 콩 단백질 농축물을 포함하는 등가물의 어류 사료에 비하여 성장, 체중 증가, 단백질 이용률, 사료 요구율, 총 소비량, 생존, 및 폴튼 조건 인자(Fulton's condition factor)를 포함하지만 이에 제한되지 않은 하나 이상의 능력 양태에서 더 우수한 능력을 가져온다.
- [0018] 또 다른 양태에서, 어류 사료는, 동물계 어분 또는 콩 단백질 농축물을 포함하는 등가물의 어류 사료의 단백질 함량 이하의 조질 단백질 함량에서 상기 능력 양태를 가져온다.
- [0019] 일 양태에서, 동물 사료는 리신, 메티오닌, 지질, 비오틴, 콜린, 니아신, 아스코브산, 이노시톨, 판토텐산, 엽산, 피리독신, 리보플라빈, 티아민, 비타민 A, 비타민 B12, 비타민 D, 비타민 E, 비타민 K, 칼슘, 인, 칼륨, 나트륨, 마그네슘, 망간, 알루미늄, 요오드, 코발트, 아연, 철, 셀레늄 또는 그의 조합으로 보충된다.
- [0020] 또 다른 실시예에서, 비-동물계 단백질 농축물을 제조하는 방법이 개시되며, 상기 방법은 메쉬를 형성하기 위하여 식물 재료를 실온보다 높은 온도에서 압출하는 단계 및 상기 메쉬를 생물 반응 장치(bioreactor)로 이동시키는 단계; 생물 반응 장치에서 당을 메쉬 안으로 방출하기 위하여 하나 이상의 셀룰로오스-분해 효소를 첨가하는 단계; 효소 처리된 메쉬를 하나 이상의 미생물로 접종하는 단계로, 상기 미생물은 방출된 당을 단백질 및 엑소폴리사카라이드로 전환하며; 에탄올, 응집제 또는 그의 조합을 사용하여 결과 단백질, 미생물 및 엑소폴리사카라이드를 침전시키는 단계; 침전된 재료를 유체역학적 힘(hydrodynamic force)을 통해 회수하는 단계; 및 상기 침전된 재료를 건조하는 단계를 포함한다.
- [0021] 관련 양태에서, 압출은 약 50℃ 내지 약 170℃ 사이에서, 약 3:1의 압축비로, 그리고 압출 통의 양측 상에 리지형 채널(ridged channels)에 대하여 전단 효과를 제공하기에 충분한 스크류 속도에서 수행된다.
- [0022] 또 다른 관련 양태에서, 상기 방법은 생물 반응 장치에서 적어도 5%의 고체 부하율을 달성하도록 압출된 재료들과 물을 혼합하는 단계; 및 임의적으로, 희석된 압출 재료들을 고압살균(autoclaving) 및 냉각하는 단계를 포함하되, 하나 이상의 셀룰로오스-분해 효소는 엔도-자일라나아제 및 베타-자일로시다아제, 글리코시드 히드롤라아제, β-글루코시다아제, 헤미셀룰라아제 활성, 및 그의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0023] 일 관련 양태에서, 상기 방법은 효소 처리된 메쉬의 온도를 약 30℃ 내지 약 37℃ 사이의 온도로 감소시키는 단계; 하나 이상의 미생물의 24시간 배양균의 2% (v/v)를 냉각된 메쉬에 접종하는 단계로, 상기 적어도 하나의 미생물은 *아우레오바시디움 폴루란스*(*Aureobasidium pullulans*), *스클레로티움 글루카니쿰*(*Sclerotium glaucum*), *스핀고모나스 파우시모빌리스*(*Sphingomonas paucimobilis*), *랄스토니아 유티로파*(*Ralstonia eutropha*), *로도스피릴룸 루부름*(*Rhodospirillum rubrum*), *클루이베로미세스 spp.*(*Kluyveromyces spp.*), *피키아 spp.*(*Pichia spp.*), *트리코데르마 레세이*(*Trichoderma reesei*), *플레우로투스 오스트레아투스*(*Pleurotus ostreatus*), *리조푸스 spp.*(*Rhizopus spp.*) 및 그의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않으며; 임의적으로 접종된 메쉬를 약 0.05L/L분으로 통기시키는 단계; 및 당의 사용이 중단되는 때 또는 하나 이상의 미생물의 존재 하에서 약 96 내지 120 시간 배양 후에 배양하는 단계를 포함한다.
- [0024] 일 양태에서, 상기 방법은 메쉬의 약 0.6L 에탄올/L를 첨가하는 단계; 에탄올 처리된 메쉬를 원심분리하는 단계; 에탄올을 회수하는 단계; 임의적으로 미세 현탁 입자들을 회수하고, 원심분리된 고형물을 회수하는 단계;

및 회수된 원심분리 고형물을 건조하는 단계를 포함한다. 또 다른 양태에서, 상청액은 건조될 수 있고, 건조된 고형물이 회수되고, 그 후 원심분리된 고형물과 혼합된다.

[0025] 일 실시예에서, NRRL No. 50792, NRRL No. 50793, NRRL No. 50794, 및 NRRL No. 5079로 구성된 군으로부터 선택된 아우레오바시디움 폴루란 균주의 생물학적으로 순수한 배양균이 개시된다.

과제의 해결 수단

[0026] 본 조성물, 방법 및 방법론이 설명되기 이전에, 본 발명은 설명된 특정 조성물, 방법 및 실험 조건에 한정되는 것이 아니고, 이러한 조성물, 방법 및 조건들은 변화될 수 있는 것으로 이해되어야만 할 것이다. 본원에서 사용된 용어는 특정 실시예들을 설명하기 위한 목적일 뿐이고, 본 발명은 첨부된 청구항에서만 한정될 것인 바, 한정할 것을 의도하지 않는다고 이해되어야 할 것이다.

[0027] 본원 명세서 및 첨부된 청구항에서 사용된 바와 같은, 단수형 "a", "an" 및 "the"는 명백하게 다른 식으로 구술되지 않는 한 복수의 의미를 포함한다. 따라서, 예를 들어, "핵산(nucleic acid)"은 하나 이상의 핵산들을 포함하며, 및/또는 본원에서 설명된 유형의 조성물들은 본원 명세서를 읽음으로써 통상의 기술자에게 자명해질 것이다.

[0028] 특별히 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술용어들 및 과학용어들은 본 발명이 속하는 분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 수정 및 변형은 본원의 사상 및 범위 내에 포함되는 것으로 이해될 것이기 때문에, 본원에서 설명된 것과 유사하거나 등가의 임의의 방법 및 재료들은 본 발명의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있다.

[0029] 본원에서 사용된 바와 같은, "약", "대략", "실질적으로" 및 "현저하게"는 당해 분야의 통상의 기술자에 의해 이해될 것이고, 그들이 사용된 문맥에 따라서 어느정도 변형될 것이다. 만일 그것이 사용된 문맥을 고려해 볼 때 통상의 기술자에게 명확하지 않은 용어가 사용되면, "약" 및 "대략"은 특정 용어의 플러스 또는 마이너스 <10%를 의미할 것이고, "실질적으로" 및 "현저하게"는 특정 용어의 플러스 또는 마이너스 >10%를 의미할 것이다.

[0030] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "동물"은 동물계에 속하는 임의의 유기체를 의미하고, 인간, 조류(예, 가금류), 포유류(예, 소, 돼지, (goat), 양, 고양이, 개, 쥐 및 말), 어류(예, 송어, 연어, 농어), 연체동물(mollusks)(예, 조개) 및 갑각류(예, 바닷가재 및 새우)와 같은 양식 유기체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 용어 "어류"의 사용은 경골어류 또는 연골어류일 수 있는 모든 척추 어류를 포함한다.

[0032] 본원에서 사용된 "비-동물계 단백질"은 단백질 농축물이 적어도 0.81 g의 조질 섬유질/100 g의 조성물(건조물 기준)을 포함하는 것을 의미하되, 상기 조질 섬유질은 주로 셀룰로오스 및 야채 물질의 화학적 분석에서 잔류물로서 얻어진 리그닌 재료이다.

[0033] 본원에서 사용된 바와 같이, "배양 공정"은 세균 또는 세포의 생육을 위한 적절한 조건의 공급을 의미하며, 여기서 상기 세균 또는 세포는 다양한 공급 원료들을 대사하기 위한 생합성 경로를 사용한다. 실시예에서, 배양 공정은 예를 들어 호기성 조건 하에서 수행될 수 있다. 다른 실시예에서, 배양 공정은 발효를 포함할 수 있다.

[0034] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "배양 생성물"은 배양 공정/반응으로부터 직접적으로 기인한 임의의 잔류 물질을 의미한다. 일부 예에서, 배양 생성물은 미생물을 함유하여서, 이러한 미생물이 걸쭉된 배양 생성물과 비교할 때 영양분 함량이 증가된다. 배양 생성물은 배양액(incubation broth)으로부터 적절한 구성성분(들)을 함유할 수 있다. 예를 들어, 배양 생성물은 배양액으로부터 용해된 및/또는 현탁된 구성성분들을 포함할 수 있다. 현탁된 구성성분들은 비용해된 가용성 구성성분들(예, 용액이 하나 이상의 성분들로 과포화됨) 및/또는 배양액에 존재하는 비가용성 재료들을 포함할 수 있다. 배양 생성물은 배양(배양액 및 배양에 의해 제조된 바이오매스를 분무 건조함)의 종료 시에 존재하는 실질적으로 모든 건조 고형물을 포함할 수 있거나, 그의 일부를 포함할 수 있다. 배양 생성물은 배양으로부터의 원료를 포함할 수 있는데, 여기서 미생물은 재료의 영양분 함량을 증가시키기 위하여 분별 및/또는 부분적으로 정제될 수 있다.

[0035] 본원에서 사용된 바와 같이, "전환 배양균"은 미생물들의 성장에 충분한 재료, 예를 들어 물 및 영양분을 포함하는 배지 내에 함유되는 미생물의 배양균을 의미한다. 용어 "영양분"은 영양가가 있는 임의의 물질을 의미한다. 이것은 동물 사료의 일부 또는 동물용 식품 보충제일 수 있다. 예시적인 영양분은 단백질, 펩티드,

지방, 지방산, 지질, 수용성 비타민 및 지용성 비타민, 필수 아미노산, 탄수화물, 스테롤, 효소, 및 인, 철, 구리, 아연, 망간, 마그네슘, 코발트, 요오드, 셀레늄, 몰리브데늄, 니켈, 불소, 바나듐, 주석 및 실리콘과 같은 미량 무기물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

- [0036] 전환은 대두 재료와 같은 단백질/탄수화물/폴리사카라이드 재료들을 고-품질의 단백질 농축물로 전환하기에 적합한 조건 하에서 전환 배양균에서 미생물을 배양하는 공정이다. 충분한 전환은 90% 이상의 특정 탄화수소를 사용하여 미생물 세포량 및/또는 엑소폴리사카라이드를 제조한 것을 의미한다. 실시예에서, 전환은 호기성 또는 혐기성일 수 있다.
- [0037] 본원에서 사용된 바와 같은, "응집제" 또는 "청정제(clearing agent)"는 콜로이드를 조성하여 현탁물에서 응집물로 석출되게 하는 화학물질이며, 다원자가 이온 및 폴리머를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 실시예에서, 이러한 응집제/청정제는 엑소폴리사카라이드와 같은 생응집제(biofloculents)를 포함할 수 있다.
- [0038] 다수의 식물 단백질 공급원은 전환을 위한 공급원료로서 본원과 관련하여 사용될 수 있다. 사료 산업에서 식물 단백질을 사용하는 주이유는 동물 단백질 공급원과 같이 값비싼 단백질을 대체하기 위한 것이다. 또 다른 중요한 요인은 동일종 또는 관련종의 동물들에게 동물 단백질을 공급하는 것을 통해서 질병이 전달될 수 있는 위험성이다. 식물 단백질 공급원에 대한 예는 대두 및 땅콩과 같은 콩과 식물로부터의 단백질, 카놀라, 목화씨와 같은 십자화과(Brassicaceae) 식물로부터의 단백질, 해바라기를 제한하지 않고 포함하는 국화과 식물로부터의 단백질, 및 코프라(copra)를 포함하는 종려과(arecaceae) 식물로부터의 단백질을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 종유 단백질로도 일반적으로 정의되는, 이러한 단백질 공급원은 전체로 공급될 수 있지만, 그들은 오일이 제거된 후 부산물로서 더 흔히 공급될 수 있다. 다른 식물 단백질 공급원은, 씨리얼(cereals) 및 곡물(grains)과 같은 벼과(Gramineae)로도 알려진 벼과 식물(Poaceae)로부터, 특히 옥수수, 밀 및 쌀, 또는 감자, 카사바 및 콩류(완두콩 및 콩), 배아박 또는 옥수수글루텐박, 또는 증류/양조 부산물(distillery/brewery by-products)를 포함하는 약간의 분쇄 부산물과 같은 다른 주된 곡물로부터 유래된 식물 단백질 공급원을 포함한다. 실시예에서, 단백질에 대한 공급 원료는 대두, 땅콩, 평지씨(Rapeseeds), 보리, 카놀라, 참깨, 목화씨, 팜 커널, 포도씨, 올리브, 홍화, 해바라기, 코프라, 옥수수, 코코넛, 아마씨, 헤즐넛, 밀, 쌀, 감자, 카사바, 콩류, 카멜리나 씨, 겨자씨, 배아박, 옥수수글루텐박, 증류/양조 부산물, 및 그의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 양식장 산업에서, 사용된 바 있는 식물 유래로 대체된 주요한 어분은 콩가루 (SBM), 메이즈글루텐박(maize gluten meal), 평지씨/카놀라(배추속 식물) 박, 루핀 (루피너스 속)(예, 탈피 백색(루피너스 알버스(Lupinus albus)), 향기로운(엘. 안구스티폴리우스(L. angustifolius)), 및 황색(엘. 루테우스(L. luteus))의 커널박(kernel meals)에서의 단백질들, 해바라기(헬리안투스 애누스(Helianthus annus)) 씨박(seed meal), 결정체의 아미노산; 완두콩박(pea meal)(피숨 사티븀(Pisum sativum)), 목화씨(고시피움 속) 박, 낙화생(Peanut)(땅콩(groundnut); 아라키스 히포게(Arachis hypogaea)) 박 및 깻묵(oil cake), 대두 단백질 농축물, 옥수수(지 메이(Zea mays)) 글루텐박 및 밀(트리티쿰 애스티븀(Triticum aestivum)) 글루텐, 감자(솔라눔 투베로숨 엘.(Solanum tuberosum L.)) 단백질 농축물, 모링가(Moringa)(모링가 올레이페라 엘레이엠(Moringa oleifera Lam.) 잎과 같은 다른 식물 사료, 다양한 농도 및 조합의 모든 것들을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0040] 단백질 공급원은 비-처리된 식물 재료 및 처리되고/처리되거나 추출된 식물 단백질의 형태일 수 있다. 예로서, 열 처리된 콩제품들은 더 높은 단백질 소화율을 가진다.
- [0041] 단백질 재료는 임의의 유형의 단백질 펩티드를 포함한다. 실시예에서, 대두 재료들은 전지대두(whole soybean)와 같은 것으로 사용될 수 있다. 전지대두는 표준 상품 대두; 어떤 방식으로 유전자 조작된(GM) 대두; 또는 비-GM 동일성이 보존된 대두일 수 있다. 예시적인 GM 대두는 예를 들어 스타키오스 및 라피노오스 외에 탄수화물을 제조하도록 조작된 대두를 포함한다. 예시적인 비-GM 대두는 예를 들어 저유(low oil), 저 탄수화물, 및 저 트립신 억제제를 위해 동종 이계로 교배되는 실링어 변종(Shillinger varieties)을 포함한다.
- [0042] 대두 재료의 다른 유형은 콩 단백질 가루, 콩 단백질 농축물, 콩가루 및 콩 단백질 단리체, 또는 그의 혼합물을 포함한다. 콩 단백질 가루, 콩 단백질 농축물, 콩가루 및 콩 단백질 단리체와 같은 콩 단백질의 다른 형태로의 전지대두의 전통적인 가공법은, 이후에 제거되는 콩 조각 및 껍질을 제조하기 위하여, 세척된 가공하지 않은 전지대두를 몇몇 조각, 일반적으로 6 내지 8조각으로 분해(cracking)하는 단계를 포함한다. 콩 조각은 약 60℃로 조절된 후 약 0.25 mm 두께로 조각난다. 결과로 얻은 조각들은 탄화수소 용매, 일반적으로 헥산과 같은 비활성 용매를 사용하여 여러 종류의 역류 추출 시스템에서 추출되어 대두유가 제거된다. 콩 단백질 가루, 콩 단백질 농축물, 및 콩 단백질 단리체에 대하여, 수용성 콩 단백질의 고함량을 보존하기 위하여 콩 단백질의 요리 또는

토스팅의 양을 최소화하는 방식으로 조각들을 탈용매화하는 것이 중요하다. 이는 증기 탈용매화제 또는 플래시 탈용매화제(flash desolventizers)를 사용하여 일반적으로 달성된다. 이 공정으로부터 얻은 조각들은 "식용 탈지방 조각들: 또는 "백색콩(대두) 조각들"로서 일반적으로 지칭된다.

[0043] 콩 단백질 가루, 콩 단백질 농축물 및 콩 단백질 단리체에 대한 시작물질인 백색대두 조각들은 대략 50%의 단백질 함량을 가진다. 백색 대두 조각들은 이후에 보통 개방-회로 분쇄 시스템에서 해머밀(hammer mill), 클래시퍼 이어밀(classifier mill), 롤러밀(roller mill) 또는 임팩트 핀 밀(impact pin mill)에 의해 우선 그릿(grits)로 분쇄되고, 추가적인 분쇄작업으로 원하는 입자 크기를 갖는 콩 가루로 분쇄된다. 체질(screening)은 생성물의 크기를 균일한 입자 크기 범위로 만들기 위해 일반적으로 사용되고, 셰이커 체(shaker screens) 또는 원통형의 원심성 체(cylindrical centrifugal screeners)를 사용하여 달성될 수 있다. 다른 종류는 유사한 방식으로 가공될 수 있다.

[0044] 실시예에서, 건조곡물주정박(DDGS)는 사용될 수 있다. DDGS는 옥수수 에탄올 산업에 의해 현재 제조된다. 전통의 DDGS는 건조 분쇄 시설로부터 얻으며, 여기서 전체 옥수수 커널은 분쇄되고 가공된다. 이러한 시설에서 DDGS는 28~32% 단백질을 일반적으로 함유한다.

[0045] 단백질 공급원은 비-처리된 식물 재료들, 및 처리되고/처리되거나 식물 단백질의 형태일 수 있다. 예로서, 열처리된 콩 제품은 고 단백질 소화율을 가진다. 그럼에도 불구하고, 육식성 어류를 위한 식이에 포함된 전지(full fat) 또는 탈지 콩박(soy meal)에 대한 상한치 함유 수준은, 열 불안정한 항영양분(antinutrients)이 제거됨에도 불구하고, 20 내지 30%의 함유 수준 사이이다. 어류에서, 대두 단백질은, 30%를 초과하는 단백질 농도 함유 수준으로 어류에게 제공하는 경우에 장내 손상을 유발하고, 일반적으로 다양한 어류 종들에서 성장 능력을 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 실은, 대부분의 양어가(fish farmers)는 이러한 결과 때문에 총 식이에서 식물 단백질을 10%를 초과하여 사용하기를 꺼린다.

[0046] 본 발명은 이런 문제를 해결하고, 사육되는 동물 중, 식물 단백질 공급원의 기원, 상이한 식물 단백질 공급원의 비율, 단백질 농도 및 양, 글루칸 및/또는 만난의 기원, 분자 구조 및 농도와 같은 다른 요인들에 따라 최대 40%의 식물 단백질 함유 수준 또는 50%의 식물 단백질 함유 수준도 가능하게 한다. 실시예에서, 식물 단백질 함유 수준은 최대 40%, 바람직하게는 최대 20 또는 30%이다. 일반적으로, 식이에 존재하는 식물 단백질은 5 내지 40%이며, 바람직하게는 10 또는 15 내지 30%이다. 이러한 퍼센트 비율은 동물 사료 또는 식이에서의 총 식물 단백질 공급원의 퍼센트 양을 정의하며, 이는 지방, 회분 등을 포함한다. 실시예에서, 순수한 단백질 수준은 최대 50%, 일반적으로 최대 45%, 실시예에서 5~95%이다.

[0047] 총 사료 또는 식이에서 식물 단백질 대 다른 단백질의 비율은 5:95 내지 95:5, 15:85 내지 50:50, 또는 25:75 내지 45:55일 수 있다.

[0049] 미생물

[0050] 개시된 미생물은 전환 배양균에서 탄수화물과 다른 영양성분을 고-품질 단백질 농축물로 전환할 수 있어야만 한다. 실시예에서, 미생물은 효모-유사 균류이다. 효모-유사 균류의 예는 아우로바시디움 풀루란스(Aurobasidium pullulans)이다. 다른 예시의 미생물은 클루이베로미세스 및 피키아 종(Kluyveromyces and Pichia spp), 젖산균(Lactic acid bacteria), 트레코더마 레세이(Trichoderma reesei), 플레우로투스 오스트레아투스(Pleurotus ostreatus), 리조푸스 종(Rhizopus spp), 및 리그노셀룰로오스 분해 미생물의 많은 유형들과 같은 효모균을 포함한다. 일반적으로, 예시적인 미생물은 스타키오스, 라피노오스, 자일로오스 및 다른 당류를 대사할 수 있는 미생물을 포함한다. 그러나, 과도한 실험 없이 개시된 방법에 기초하여 다른 적절한 미생물을 선택하는 것은 통상의 기술자의 능력 내에 있다.

[0051] 실시예에서, 본 공정에서 사용될 수 있는 미생물 유기체는 아우로바시디움 풀루란스(Aurobasidium pullulans), 스클레로티움 글루카니쿰(Sclerotium gluconicum), 스피노모나스 파우시모빌리스(Sphingomonas paucimobilis), 랄스토니아 유트로파(Ralstonia eutropha), 로도스피릴룸 루브룸(Rhodospirillum rubrum), 클루이베로미세스 및 피키아 종(Kluyveromyces and Pichia spp), 트리코더마 레세이(Trichoderma reesei), 플레우로투스 오스트레아투스(Pleurotus ostreatus), 리조푸스 종(Rhizopus spp), 및 그의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 실시예에서, 미생물은 아우레오바시디움 풀루란스(Aureobasidium pullulans)이다.

[0052] 실시예에서, 아우로바시디움 풀루란스(A. pullulans)는 전환 중에 맞닥뜨리는 다양한 환경/스트레스 요인에 적합하다. 실시예에서, 2012년 11월 30일자로 부다페스트 조약에 따라 페오리아 111(peoria 111)로 농업미생물자

원센터에 기탁되고, NRRL 기탁번호 50793으로 표시된 아우로바시디움 폴루란스 균주는 낮은 검 생산을 보이고, DDGS에 적합하다. 실시예에서, 2012년 11월 30일 자로 부다페스트 조약에 따라 페오리아 111(peoria 111)로 농업미생물자원센터에 기탁되고, NRRL 기탁번호 50792로 표시된 아우로바시디움 폴루란스 균주는 항생제 테트라시클린의 높은 수준(예, 약 75 µg/ml 테트라시클린 내지 약 200 µg/ml 테트라시클린)에 적합하다. 실시예에서, 2012년 11월 30일 자로 부다페스트 조약에 따라 페오리아 111(peoria 111)로 농업미생물자원센터(NRRL)에 기탁되고, NRRL 기탁번호 50794로 표시된 아우로바시디움 폴루란스 균주는 항생제 LACTROL®의 높은 수준(예, 약 2 µg/ml 버지니아마이신 내지 약 6 µg/ml 버지니아마이신)에 적합하다. 실시예에서, 2012년 11월 30일 자로 부다페스트 조약에 따라 페오리아 111(peoria 111)로 농업미생물자원센터(NRRL)에 기탁되고, NRRL 기탁번호 50795로 표시된 아우로바시디움 폴루란스 균주는 응결된 옥수수 용해물에 순응한다.

[0054]

전환 배양균

[0055]

예시적 실시예에서, 기처치(pretreatment) 후, 단백질 재료(예, 압출된 콩 백색 조각들)는 적어도 5%의 고형물 부하율에서, pH를 4.5~5.5로 조정하면서 물과 블렌딩될 수 있다. 이후, 적절한 가수분해 효소의 투여량이 첨가되고 슬러리가 150-250 rpm에서 50℃에서 3~24 시간 동안 교반하면서 배양될 수 있다. 35℃로 냉각된 후, 아우로바시디움 폴루란스의 접종은 첨가될 수 있고, 배양균은 추가적인 72~120 시간 동안 배양될 수 있거나, 또는 탄수화물이 소비될 때까지 배양될 수 있다. 배양 중에, 멸균된 공기는 0.5~1 L/L/h의 비율로 반응기 안으로 뿌려질 수 있다. 실시예에서, 전환 배양균은 약 96 시간 미만 동안 대두 재료와 함께 배양하는 것에 의해 전환을 겪는다. 실시예에서, 전환 배양균은 약 96 시간 내지 약 120 시간 동안 배양될 것이다. 실시예에서, 전환 배양균은 약 120 시간 초과하는 동안 배양될 수 있다. 전환 배양균은 약 35℃에서 배양될 수 있다.

[0056]

실시예에서, 전환을 겪는 동안, 전환 배양균의 pH는 약 4.5 내지 약 5.5일 수 있다. 실시예에서, 전환 배양균의 pH는 4.5 미만(예, pH 3)일 수 있다. 실시예에서, 전환 배양균은 문헌[Deshpande et al., *Aureobasidium pullulans in applied microbiology: A status report*, *Enzyme and Microbial Technology* (1992), 14(7):514]에 개시된 바와 같이 활발히 통기될 수 있다.

[0057]

폴루란 및 사이드로포어(siderophores) 뿐만 아니라, 고-품질 단백질 농축물(HQPC)은 임의적인 알콜 침전 및 원심분리에 의한 전환 공정 후에 전환 배양균으로부터 회수될 수 있다. 통상의 기술자는 다른 알콜들도 동일하게 기능할 것으로 이해할 것이지만, 예시의 알콜은 에탄올이다. 실시예에서, 염은 침전을 위해 사용될 수도 있다. 예시적인 염은 염화칼륨, 염화나트륨 및 염화마그네슘의 염일 수 있다. 실시예에서, 폴리머 또는 다가 이온은 단독으로 사용되거나 알콜과 함께 사용될 수 있다.

[0058]

실시예에서, 최종 단백질 농축 고형물 회수는 배양 횟수의 변화에 의해 조절될 수 있다. 예를 들어, 약 75% 단백질은 14일 배양으로 달성될 수 있으며, 고형물 회수는 약 16~20%이다. 실시예에서, 2~2.5일 동안의 배양은 고형물 회수를 약 60~64%까지 증가시키고, HQPC에서 58~60%의 단백질 수준으로 증가시킨다. 실시예에서, 4~5일 배양은 단백질 함량(예, 약 70% 초과, 이에 제한되지 않음) 및 고형물 회수(예, 약 60% 초과, 이에 제한되지 않음) 모두를 최대화할 수 있다. 이러한 수는 공급 원료에 따라 커지거나 작아질 수 있다. 실시예에서, 단백질 농축물(즉, HQSPC 또는 HP-DDGS)은 예를 들어, 약 0.010:1 내지 약 0.03:1, 약 0.020:1 내지 약 0.025:1 또는 약 0.021:1 내지 약 0.023:1의 특정 지질:단백질 비율을 가질 수 있다.

[0059]

실시예에서, 공급 원료는 원통 길이 대 스크류 직경이 1:20이고 압축 비가 3:1인 단일 스크류 압출기(screw extruder)(예, BRABENDER PLASTI-CORDER EXTRUDER Model PL2000, Hackensack, NJ)에서 압출될 수 있으며, 다른 형상 및 비율이 사용될 수 있다. 공급 원료는 약 10% 내지 약 15% 수분, 약 15%, 또는 약 25% 수분으로 조절될 수 있다. 압출기의 공급부, 원통부 및 배출부의 온도는 약 40℃ 내지 약 50℃ 또는 약 50℃ 내지 약 100℃, 약 100℃ 내지 약 150℃, 약 150℃ 내지 약 170℃ 사이에서 유지될 수 있고, 스크류 속도는 약 50 rpm 내지 약 75 rpm, 또는 약 75 rpm 내지 약 100 rpm, 또는 약 100 rpm 내지 약 200 rpm 내지 약 250 rpm로 세팅될 수 있다. 실시예에서, 스크류 속도는 원통의 양 측 상에서 리지형 채널(ridged channels)에 대하여 전단 효과를 제공하기에 충분하다. 실시예에서, 스크류 속도는 당 방출을 최대화하도록 선택된다.

[0060]

실시예에서, 압출된 공급 원료 재료(예, 식물 단백질 또는 DDGS)는 물과 혼합되어 반응기에서 적어도 5%의 고형물 부하율을 달성할 수 있다(예, 5 L NEW BRUNSWICK BIOFLO 3 BIOREACTOR; 3-4 L 작업 부피). 슬러리는 고압살균되고, 냉각된 후, 효소들의 혼합제를 사용하는 효소 가수분해를 겪도록하여 당화될 수 있으며, 이때 효소들은 엔도-자일라나아제 및 베타-자일로시다아제, 글리코시드 히드롤라아제, β-글루코시다아제, 헤미셀룰라아제 환

성을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일 양태에서, 효소들의 혼합제는 NOVOZYME® 효소를 포함한다. 투여량은 6% CELLICTEK® (글루칸 gm 당), 0.3% CELLICHTK® (총 고형물 gm 당), 및 0.15% NOVOZYME 960® (총 고형물 gm 당)를 포함할 수 있다. 당화 작용은 약 12 시간 내지 약 24시간 동안, 약 40℃ 내지 약 50℃, 및 약 150 rpm 내지 약 200 rpm에서 수행되어 섬유질 및 올리고사카라이드를 간단한 당으로 가용화할 수 있다. 온도는 이후에 약 30℃ 내지 약 37℃ 사이로 감소될 수 있으며, 실시예에서는 약 35℃로 감소되고, 슬러리는 미생물의 24시간 배양균의 2%(v/v)가 접종되었다. 슬러리는 0.5 L/L/분으로 통기될 수 있고, 배양은 당 사용이 중단될 때까지 또는 약 96시간 내지 약 120시간 연속될 수 있다. 페드-배치(fed-batch) 전환에서, 더 압출된 공급 원료는 당화 및/또는 미생물 전환 단계 중에 첨가될 수 있다.

[0061] 실시예에서, 공급 원료 및/또는 압출물은, 예를 들어, 원치 않는 세균 균주에 의한 오염을 피하기 위하여 전환 미생물을 접종하기 이전에 하나 이상의 항생제 (테트라시클린, 페니실린, 에리트로마이신, 티로신, 버지니아마이신, 및 그의 조합들, 이에 제한되지 않음)로 처리될 수 있다.

[0062] 배양 중에, 샘플들은 6-12 시간 간격으로 제거될 수 있다. HPLC 분석을 위한 샘플들은 가열되고, 원심분리되고, 여과되고(0.22 μm 필터를 이용함), 오토샘플러 (autosampler) 유리병에 넣고, 분석되 때까지 냉동될 수 있다. 실시예에서, 샘플들은 다른 HPLC 시스템이 사용될 수 있지만 WATERS HPLC 시스템을 사용하여 탄수화물 및 유기 용매에 대해 분석될 수 있다. 샘플들은 미생물 개체군을 평가하기 위해 플레이트 또는 혈구계산기 (hemocytometer) 계산을 거칠 수 있다. 샘플들은 국립 신재생에너지 연구소 방법을 사용하여 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 및 펙틴의 수준에 대해서도 분석될 수 있다.

[0064] 식이 제형

[0065] 예시적인 실시예에서, 전환을 겪는 전환 배양균으로부터 회수된 고-품질 단백질 농축물은 식이 제형에서 사용된다. 실시예에서, 회수된 고-품질 단백질 농축물(HQPC)은 식이 제형에서 일차 단백질 공급원일 것이다. 식이 제형에서 단백질 공급원 비율은 제한되지 않고, 25 내지 80% 단백질을 포함할 수 있다. 실시예에서, 고-품질 단백질 농축물(HQPC)는 총 식이 제형 단백질 공급원의 약 50%를 초과, 약 60%를 초과, 또는 약 70%를 초과할 것이다. 회수된 HQPC는 어분, 콩가루, 밀, 옥수수 가루 및 글루텐 및 농축물과 같은 단백질 공급원, 및 혈분, 가금분(poultry meal) 및 우모분(feather meal)과 같은 동물의 부산물을 대체할 수 있다. 회수된 HQPC를 사용하는 식이 제형은 미네랄 및 비타민과 같은 보충제 기혼합물(premixes)을 포함하여 타당한 잔류 영양소 요구량을 만족할 수 있다.

[0066] 특정 실시예에서, 고-품질 콩 단백질 농축물(HQSPC) 또는 고-품질 DDGS(HP-DDGS)와 같은 HQPC의 성능은 어분과 같은 동물성 사료 식이 대조군 제형에 대해 고-품질 단백질 농축 식이 제형에서의 동물의 성장, 사료 요구율, 단백질 효율 및 생존율을 비교함으로써 측정될 수 있다. 실시예에서, 시험 제형들은 일관된 단백질, 지질 및 에너지 함량을 함유한다. 예를 들어, 동물이 어류인 경우에, 내장(지방 축적) 및 장기(간 및 비장) 특징, 드레스-아웃 퍼센트(dress-out percentage), 및 살코기 성분 분석(fillet proximate analysis), 뿐만 아니라 장내 조직학(장염)은 식이 반응을 평가하기 위해 측정될 수 있다.

[0067] 이해되기로는, 회수된 HQPC를 함유하는 각각의 식이 제형은 다양한 유형의 동물들에 대해 최적화될 수 있다. 실시예에서, 동물들은 상업적 양식에서 성장된 물고기이다. 식이 제형의 최적화를 위한 방법은 잘 알려져 있고 과도한 실험 없이 통상의 기술자에 의해 손쉽게 확인될 수 있다.

[0068] 모든 육성용 식이는 다양한 동물 종들에 대해 알려진 영양소 요구량에 따라 HQPC를 사용하여 제형화될 수 있다. 실시예에서, 제형은 황색 농어(yellow perch)에 대해 사용될 수 있다(예, 42% 단백질, 8% 지질). 실시예에서, 제형은 무지개 송어에 대해 사용될 수 있다(예, 45% 단백질, 16% 지질). 실시예에서, 제형은 앞서 설명된 동물들 중 어느 하나에 대해 사용될 수 있다.

[0069] 식물계 식이를 위한 기초 미네랄 및 비타민 기혼합물은 미량 영양소 요구량을 충족시키도록 사용될 수 있다. 임의의 보충제(분석에 의해 필요하다고 간주되는 것)는 보충제를 포함하지 않는 동일한 제형과 비교하여 평가될 수 있으며; 따라서, 사육 실험(feeding trial)은 보충제 효과를 설명하기 위해 요인 시험(factorial design)에서 이루어질 수 있다. 실시예에서, 사육 실험은 어분계 대조군 식이 및 ESPC- 및 LSPC계 기준 식단을 포함할 수 있다[전통적인 SPC(TSPC)는 가용성 탄수화물을 제거하기 위하여 콩 조각을 세척하는 용매로부터 제조되며; 조직 SPC(ESPC)는 수분, 고온 하에서 TSPC를 추출하여 제조되며; 그리고 저-항원 SPC(LSPC)는 공정 중에 용매 세척 및 온도를 변화시켜서 TSPC로부터 제조된다]. 사육 실험을 위한 펠렛은 실험실-규모의 단일 스크류 압출기(예,

BRABENDER PLASTI-CORDER EXTRUDER Model PL2000)를 사용하여 제조될 수 있다.

- [0071] 사육 실험
- [0072] 실시예에서, 처치(즉, 각각의 실험 및 대조군 식이 블렌드) 당 4번의 실험 단위의 복제는 사용될 수 있다(예, 약 60 내지 120일씩). 시험은 원심 펌프에 의해 구동되며, 고형물 통(ump), 및 생물 반응 장치, 필터들(100 μ m 백(bag), 탄소 및 자외선)로 구성되는 폐쇄-루프 재순환 시스템에 직렬로 연결된 110-L 원형 탱크(20 어류/탱크)에서 수행될 수 있다. 열 펌프는 중-특유 성장을 위한 최적 온도를 유지하기 위해 필요에 따라 사용될 수 있다. 물 품질(예, 용존 산소, pH, 온도, 암모니아 및 아질산염)은 모든 시스템에서 모니터링될 수 있다.
- [0073] 실시예에서, 실험용 식이는 어류 크기에 따라 전달될 수 있고, 2개 내지 5개의 일일 사료로 분리될 수 있다. 성장 능력은 1~4 주 동안 섭취한 총 질량 측정에 의해 결정되며(어류 크기 및 시험 기간에 따름); 배급량은 포만 섭식을 허용하고 낭비 스트림을 감소시키도록 체중의 증가에 따라 조절될 수 있다. 섭취는 각각의 탱크로부터 섭취되지 않은 사료의 수집으로부터 격주로 평가될 수 있다. 섭취하지 않은 사료는 항온에서 건조되고, 냉각된 후, 사료 전환 효율을 추정하기 위해 무게를 잰다. 단백질 및 에너지 소화율은 각각의 실험의 중간지점 중에 손으로 해체한 배설물로부터 또는 사육 실험의 종료시에 하부 장관(lower intestinal tract)으로부터 검사를 통해 결정될 수 있다. 생존률, 체중 증가, 성장율, 건강 지표, 사료 요구율, 단백질 및 에너지 소화율은 치료군들 중에서 비교될 수 있다. 검시된 어류들의 성분 분석은 식이 처치들 중에서 살코기의 조성물을 비교하기 위해 수행될 수 있다. 아미노산 및 지방산의 분석은, 사육 실험 목적에 따라, 살코기 구성 성분들에 대해 필요한 만큼 이루어질 수 있다. 식이 처치의 사양 분석 반응은 HQPC 식이의 능력이 대조군 반응과 일치되거나 초과하는지를 확인하기 위해 대조군(예, 어분) 식이 반응과 비교될 수 있다.
- [0074] 식이 및 사육 실험 반응의 통계학적 분석은 선험적 $\alpha=0.05$ 로 완료될 수 있다. 처치들 중에서 능력 파라미터의 분석은 분산 또는 공분산의 적절한 분석(Proc Mixed) 및 필요한 만큼의 포스트 혹 다중 비교(post hoc multiple comparisons)를 이용하여 수행될 수 있다. 어류 행동 및 조직 반응의 분석은 비선형 모델에 의해 평가될 수 있다.
- [0075] 실시예에서, 본원은 안전-상태(Gras-status) 미생물을 사용하여 콩 조각/가루 또는 DDGS 중의 섬유질 및 다른 탄수화물을 추가적인 단백질로 전환하기 위한 목적이다. 미생물의 엑소폴리사카라이드(즉, 겜)도 제조될 수 있으며, 이는 바인더에 대한 필요를 없게 하는 압출된 사료 펠렛 형태를 용이하게 할 수 있다. 이런 미생물의 겜은, 스트레스 요인으로부터 유발되는 일반 병원균으로부터 어류를 보호하는 선천적인 방어 기작을 활성화하기 위해 면역자극 활성을 제공할 수 있다. β -글루칸, 세균의 생성물, 및 식물 구성성분과 같은 면역예방 성분들은 감염성 질병에 의한 경제적 손실을 감소시키고 항생제 사용을 최소화하기 위하여 상업적 사료에서 점점 더 사용된다. 본원의 미생물은 옥수수 단백질 소화율 및 대사 중 흡수율을 증가시켜서 높은 사료 효율 및 수율을 제공하는 세포외 펩티다아제를 생산한다. 본원에 개시된 바와 같이, 미생물 배양 공정은 SPC 및 어분에 비해 단백질의 단위 당 가격이 덜 비싸고, 가치있고, 지속 가능한 양식용 사료를 제공한다.
- [0076] 개시된 바와 같이, 본 미생물은 콩 조각/가루 또는 DDGS 내의 개개의 탄수화물을 대사하여, 세포량(단백질) 및 미생물의 겜을 생산할 수 있다. 이러한 미생물의 다양한 균주는 섬유질 분해도 강화할 수 있다. 본 발명의 미생물은 또한 콩 및 옥수수 단백질을 더 소화하기 쉬운 펩티드 및 아미노산으로 전환할 수 있다. 실시예에서, 하기 조치가 수행될 수 있다: 1) 기처치된 콩 단백질, 종유 단백질, DDGS 등을 전환하여 적어도 45%의 단백질 농도를 갖는 고-품질 단백질 농축물(HQPC)를 획득하기 위하여 본원의 선택 미생물을 사용하는 것의 효율을 결정하는 것, 및 2) 어분을 대체한 HQPC의 효과를 평가하는 것. 실시예에서, 콩, 종유, 및 DDGS 기처리 및 전환 조건을 최적화하는 것은, 미생물의 능력 및 강건성을 개선하기 위해, 상업적으로 중요한 어류에 대하여 결과물 육성용 사료를 시험하기 위해, 공정 비용 및 에너지 요구량을 입증하기 위해, 그리고 규모 확대 및 상업화를 위한 단계를 마무리 하기 위하여 수행될 수 있다. 실시예에서, 본원의 HQPC는 증가된 성장률 및 전환 효율을 제공하면서 어분의 적어도 50%를 대체할 수 있다. 제조 비용은 상업적 콩 단백질 농축물(SPC) 보다 적고, 어분(수확물 포함)에 비해 실질적으로 적다.
- [0077] 도 1 및 2는 식물계 생산품의 기처리에서 본원의 접근법을 보여주며, 당을 세포량(단백질) 및 겜으로 전환하고, HQSPC를 회수하고 양식용 사료를 생성한 뒤, 결과물 양식용 사료를 어류 사육 실험에서 시험하는 것을 보여준다.
- [0078] 압출 기처리 후에, 셀룰로오스-분해 효소는 당을 만들어내기 위해 평가될 수 있으며, 본원의 미생물은 단백질

및 검으로 전환될 수 있다. 실시예에서, 이러한 효소의 순차적인 누락 및 셀룰로오스 미생물과의 공-배양의 평가가 사용될 수 있다. 에탄올은 검을 침전시키기 위해 그리고 HQPC의 원심 회수를 개선하기 위해 평가될 수 있다. 건조 후에, HQPC는 실질적인 식이 제형 안으로 포함될 수 있다. 실시예에서, 시험 육성용 식이는 제형화될 수 있고(미네랄 및 비타민 기혼합물을 포함함), 상업적으로 중요한 어류, 예를 들어 황색 농어(perch) 또는 무지개 송어에게 사육 실험에서 어분 대조군 및 상업적 SPC(SPC는 콩가루와 명확히 상이한데, 그 이유는 SPC가 올리고폴리사카라이드 및 항원 성분인 글리시닌 및 b-콘글리시닌의 트레이스(traces)를 함유하기 때문이다) 식이에 대한 비교는 수행될 수 있다. 능력(예, 성장, 사료 전환율, 단백질 효율), 내장 특징, 및 장내 조직학은 어류 반응을 평가하기 위해 시험될 수 있다.

[0079] 다른 실시예에서, 공정 주입물을 최소화하고, 미생물의 능력 및 강인성을 개선하고, 상업적으로 중요한 어류에 대해 결과물 육성용 사료를 시험하고, 공정 비용 및 에너지 요구량을 검사하고, 그리고 규모확장 및 상업화에 대한 초기 단계를 완료하면서, 최적화 기저치 및 전환 조건을 결정함으로써 HQPC 제조 공정을 최적화하는 것은 수행될 수 있다.

[0080] 지난 몇 년동안, 한중의 시설은 에탄올 제조 공정 이전에 옥수수 겉껍질 및 배아를 제거하는 건조 밀 능력을 설치했다. 이런 건조 분별 공정은 최대 42% 단백질을 포함하는 DDGS(이하, 건조 분별 DDGS)를 수율한다. 실시예에서, 농어 사육 실험에서 사용하기 위한 고 단백질 DDGS(HP-DDGS)의 충분한 양을 신속하게 만들어내기 위해 이전에 결정된 조건 하에서 종래의 그리고 건조 분별 DDGS는 비교될 수 있다. 실시예에서, 이런 전환의 능력의 조심스런 모니터링은 (화학적 조성물 변화를 통해) 수행되고, HP-DDGS 품질 상에 가장 큰 영향을 갖는 파라미터를 식별했다. 일부 실시예에서, 저 오일 DDGS는 전환을 위한 기질로서 사용될 수 있으며, 여기서 이러한 저 오일 DDGS는 종래의 DDGS에 비해 더 높은 단백질 수준을 가진다. 관련 양태에서, 저 오일 DDGS는 종래의 DDGS에 비해 아우로바시디움 폴루란스의 성장률을 증가시킨다.

[0081] 몇몇 군들은 콩가루 및 DDGS와 같은 식물 유래 단백질로의 어분의 부분적 대체를 평가한다. 그러나, 더 낮은 단백질 함량, 불충분한 아미노산 균형, 및 항-영양분 요소의 존재는 20~40%로 대체 수준을 제한한다. 예비 성장 실험은, 현재의 DDGS 또는 SPC계 식이가 어분 대조군 식이와 유사한 능력을 제공하지 않는다는 것을 지시한다. 몇몇 결핍은 상업적으로 제조된 DDGS 및 SPC 중에서 식별되며, 주로 단백질 및 아미노산 조성물에서 식별되며, 이들은 성장 능력 및 어류 조성물에 가변성을 준다. 그러나, 영양제를 함유하는 본원에 개시된 HP-DDGS 및 HQSPC 식이(모든 요구를 충족하거나 초과하도록 제형화됨)는 어분 대조군과 유사하거나 초과하는 성장결과를 제공했다. 따라서, 본원에 개시된 공정 및 그로부터 개발된 생산품은 더 높은 품질의(영양 요구량에 관하여) HQSPC 또는 HP-DDGS를 제공하고, 어분을 함유하는 식이와 동등하거나 그 보다 좋은 성장 능력을 지지한다.

[0082] 본원의 어류 사료 조성물을 제공할 수 있는 어류는 시베리아 철갑상어 (Siberian sturgeon), 스텔렛 철갑상어 (Sterlet sturgeon), 별모양 철갑상어 (Starry sturgeon), 백색 철갑상어(White sturgeon), 아라파이마 (Arapaima), 일본산 뱀장어(Japanese eel), 미국산 뱀장어(American eel), 짧은-지느러미 뱀장어 (Short-finned eel), 긴-지느러미 뱀장어(Long-finned eel), 유럽산 뱀장어 (European eel), 사비히(Chanos chanos), 젓빛고기(Milkfish), 블루길 개복치 (Bluegill sunfish), 푸른 개복치(Green sunfish), 백색 크래피(White crappie), 검은색 크래피(Black crappie), 살무사(Asp), 카탈라(Catla), 금붕어(Goldfish), 붕어(Crucian carp), 진흙에 붕어(Mud carp), 프리갈 붕어(Mrigal carp), 초어 (Grass carp), 잉어(Common carp), 백련어 (Silver carp), 대두어(Bighead carp), 오렌지핀 라베오(Orangefin labeo), 로호 라베오(Roho labeo), 호벤 카프(Hoven's carp), 우창 브림(Wuchang bream), 청어(Black carp), 골든 샤이너(Golden shiner), 닐렘 잉어 (Nilem carp), 백색 마우르 도미(White amur bream), 태국 은색 바브(Thai silver barb), 자바(Java), 로치 (Roach), 텐치(Tench), 연못 미꾸라지 (Pond loach), 보카치코(Bocachico), 도라다(Dorada), 피라냐(Cachama), 피라냐 블란카(Cachama Blanca), 파코(Paco), 눈동자개(Black bullhead), 얼룩메기(Channel catfish), 동자개 (Bagrid catfish), 푸른 왕메기(Blue catfish), 웰스 메기(Wels catfish), 흑점메기(Pangasius (Swai, Tra, Basa) catfish), 줄줄개(Striped catfish), 미꾸라지(Mudfish), 필리핀 메기(Philippine catfish), 홍콩 메기 (Hong Kong catfish), 북아프리카 메기(North African catfish), 대두메기(Bighead catfish), 삼파(Sampa), 남아메리카 메기(South American catfish), 아티파 (Atipa), 노던 파이크(Northern pike), 아유 은어(Ayu sweetfish), 흰송어 (Vendace), 뱀어(Whitefish), 핑사연어(Pink salmon), 백 연어(Chum salmon), 은연어(Coho salmon), 참송어(Masu salmon), 무지개 송어(Rainbow trout), 홍연어 (Sockeye salmon), 왕연어(Chinook salmon), 대서양 연어(Atlantic salmon), 바다 송어(Sea trout), 북극 곤들매기(Arctic char), 민물송어(Brook trout), 호수 송어 (Lake trout), 대서양대구(Atlantic cod), 페레레이(Pejerrey), 레이(Lai), 농어 (Common snook), 배러먼디/아시아 농어(Barramundi/Asian sea bass), 나일 농어 (Nile perch), 호주 농어(Murray cod),

금빛 농어(Golden perch), 줄무늬 우럭 (Striped bass), 백색 우럭(White bass), 유럽 농어(European seabass), 홍콩 붉바리(Hong Kong grouper), 대문바리(Areolate grouper), 그리지 그루퍼(Greasy grouper), 스폿 코랄그루퍼(Spotted coral grouper), 은빛 농어(Silver perch), 백색 농어(White perch), 재드 농어(Jade perch), 큰입 우럭(Largemouth bass), 작은입 우럭(Smallmouth bass), 유럽 농어(European perch), 잔더(파이크-농어)(Zander (Pike-perch)), 황색 농어(Yellow Perch), 소거(Sauger), 월아이(Walleye), 게르치(Bluefish), 그레이터 앰버잭(Greater amberjack), 일본산 앰버잭(Japanese amberjack), 농어목 전갱이류(Snubnose pompano), 플로리다 폼파노(Florida pompano), 팔로메타 폼파노(Palometa pompano), 전갱이(Japanese jack mackerel), 날새기(Cobia), 망그로브 홍돔(Mangrove red snapper), 황색 스내퍼(Yellowtail snapper), 어두운색의 참돔(Dark seabream), 백색 참돔(White seabream), 붉돔 (Crimson seabream), 도미(Red seabream), 참돔(Red porgy), 청돔(Goldlined seabream), 먹도미류(Gilthead seabream), 홍민어(Red drum), 그린 테러(Green terror), 블랙벨트 씨클리드(Blackbelt cichlid), 재규어 구아포트(Jaguar guapote), 멕시코 모자라(Mexican mojarra), 펄스팟(Pearlspot), 세점 역돔(Three spotted tilapia), 푸른 역돔(Blue tilapia), 긴 지느러미 역돔(Longfin tilapia), 역돔(Mozambique tilapia), 나일 역돔(Nile tilapia), 역돔(Tilapia), 와미 역돔 (Wami tilapia), 블랙친 역돔(Blackchin tilapia), 레드브레스트 역돔(Redbreast tilapia), 레드벨리 역돔(Redbelly tilapia), 골든 그레이 멀릿(Golden grey mullet), 라지스케일 멀릿(Largescale mullet), 골드-스팟 멀릿(Gold-spot mullet), 씬립 그레이 멀릿(Thinlip grey mullet), 리핑 멀릿(Leaping mullet), 테이드 멀릿(Tade mullet), 플랫헤드 그레이 멀릿(Flathead grey mullet), 백색 멀릿 (White mullet), 레브란케 멀릿(Lebranche mullet), 퍼시픽 팻 슬리퍼(Pacific fat sleeper), 마블 고비(Marble goby), 백색-점 스파인풋(White-spotted spinefoot), 골드라인 스파인풋(Goldlined spinefoot), 마블드 스파인풋(Marbled spinefoot), 남쪽의 참다랑어(Southern bluefin tuna), 북쪽의 참다랑어(Northern bluefin tuna), 등목어(Climbing perch), 스네이크스킨 구라미(Snakeskin gourami), 키싱 구라미(Kissing gourami), 자이언트 구라미(Giant gourami), 가물치(Snakehead), 인도네시아 가물치(Indonesian snakehead), 점박이 가물치(Spotted snakehead), 스트립드 가물치(Striped snakehead), 터버트(Turbot), 넵치(일본 넵치)(Bastard halibut (Japanese flounder)), 서머 넵치(Summer Flounder), 남쪽 넵치(Southern flounder), 윈터 넵치(Winter flounder), 대서양 가자미(Atlantic Halibut), 그린백 넵치(Greenback flounder), 노바에질란가자미(Common sole), 및 그의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0083] 본원의 어류 사료 조성물이 약학적으로 활성인 성분에 대한 간편한 담체로서 사용될 수 있다고 통상의 기술자에 의해 인정될 것이며, 여기서 상기 약학적으로 활성인 성분은 세균, 바이러스성 감염원, 및 그의 임의의 조합에 대항하는 백신을 포함하는 항미생물제 및 면역학적 활성 성분과 같은 것이다.

[0084] 본원에 따른 어류 사료 조성물은 액체, 부을 수 있는 에멀전, 또는 페이스트의 형태, 또는 건조 형태, 예를 들어 과립 또는 펠렛, 파우더, 또는 조각으로 제공될 수 있다. 어류 사료 조성물이 에멀전, 수중지질 에멀전으로 제공되는 경우에, 이것은 상대적으로 농축된 형태일 수 있다. 이러한 농축된 에멀전 형태는 예비-에멀전으로 지칭될 수도 있는데, 그 이유는 이것이 수성 매질에 한 두 단계에 걸쳐 희석되어 유기체를 위한 최종 농축 배지를 제공할 수 있기 때문이다.

[0085] 실시예에서, 개시된 바와 같은, 미생물계 공정을 위한 셀룰로오스-함유 시작 물질은 옥수수이다. 옥수수는 발효 및 증류 공정 중에 에탄올 및 이산화탄소로 전환되는 약 2/3의 전분으로 구성된다. 잔류 영양분 또는 발효 생산물은, 사료 생산물에서 사용될 수 있는 DDGS와 같은 응축된 알코올 박즙(condensed distiller's solubles) 또는 주모(distiller's grains)를 낳는다. 일반적으로, 공정은 옥수수의 건조 밀링 또는 분쇄의 초기 제조 단계를 수반한다. 가공된 옥수수는 이후에 가수분해를 겪고, 효소는 당화 단계에서 주된 전분 성분을 분해하기 위해 첨가된다. 이후 발효 단계는, 이산화탄소와 같은 기체의 생성물을 제조하기 위해 본원의 실시예에 따라 제공된 미생물(예, 효모)을 첨가할 수 있도록 한다. 발효는 발효 브로스로부터 증류될 수 있는 에탄올의 제조를 위해 수행된다. 발효 배지의 나머지는 이후에 DDGS를 포함하는 발효 생산물을 제조하기 위해 증발될 수 있다. 이 단계는 원심 분리에 의한 고체/액체 분리 공정을 보통 포함하며, 이때 고형물 상 성분은 수집될 수 있다. 여과 및 분무 건조 기술을 포함하는 다른 방법이 사용되어서 이러한 분리 결과를 가져올 수 있다. 액체상 성분은 추가적인 이후 증발 단계를 겪을 수 있는데, 증발 단계는 당, 글리세롤 및 아미노산과 같은 가용성 부산물을 시럽 또는 응결된 옥수수 용해물(CCS)로 불리는 재료로 농축할 수 있다. CCS는 이후에 배양 생성물(DDGS)로서 건조된 고형물 상 성분과 함께 재혼합될 수 있다. 본 조성물은 새로운 또는 이미 존재하는 에탄올 식물에 건조 밀링에 기초하여 적용되어서, 증가된 값을 갖는 발효 생성물을 만들어내는 통합된 에탄올 제조 공정을 제공한다.

[0086] 실시예에서, 본원에 따라 제조된 배양 생성물은 종래의 발효 생성물에 비해 높은 상업적 가치를 갖는다. 예를

들어, 배양 생성물은 개선된 아미노산 및 미량 영양소를 갖는 증가된 건조 고형물을 포함할 수 있다. 따라서, "금빛" 생성물이 제공되는데, 이는 어두운 색의 HQSP에 비해 일반적으로 더 높은 아미노산 소화율을 지시한다. 예를 들어, 열은 색의 HQSP는, 일반적으로 더 적은 영양분 값을 갖는 상대적으로 어두운 색의 생성물에 비해, 본원 실시예에 따른 증가된 리신 농도를 갖도록 제조된 것이다. 생성물의 색은 중요한 요소이거나, 발효 생성물 또는 HQSP의 품질 및 영양분 소화율을 평가하기 위한 지표일 수 있다. 색은 캐러멜화(caramelization)를 유발하는 건조 및 일부 아미노산의 품질을 감소시키는 자유 아미노기와 당의 마이야르 반응(Maillard reactions) 중에 과도한 열에 대한 노출의 지표로서 사용된다.

[0087] 건조 밀 또는 분쇄 에탄올 제정 공정에서 기본적인 단계는 다음과 같이 설명될 수 있다: 옥수수 또는 다른 곡류 제품의 밀링 또는 분쇄, 당화, 발효, 및 증류. 예를 들어, 선택된 미가공의 커널(whole corn kernel)은 보통 해머 밀 또는 롤러 밀 중 어느 하나로 밀링되거나 분쇄될 수 있다. 입자 크기는 증자(cooking) 수화 및 차후의 효소 전환에 영향을 미칠 수 있다. 밀링되거나 분쇄된 옥수수는 이후에 물과 혼합되어, 증자되고 냉각되는 메쉬를 이룬다. 젤라틴화 전분의 점도를 감소시키기 위하여, 이런 전환의 초기 단계 중에 효소를 포함하는 것은 유용할 수 있다. 이후에, 혼합물은 140℃와 같은 온도로 선택되어 유지되는 당화 반응기로 옮겨지며, 여기서 전분은 당화 효소의 첨가에 의해 글루코오스 또는 말토오스와 같은 발효가능한 당으로 전환된다. 전환된 메쉬는 84°F와 같은 소정의 온도로 냉각될 수 있고, 발효 장치로 공급되며, 여기서 발효가능한 당은 본원에 따라 제공된 미생물 중 선택된 균주의 사용에 의해 이산화탄소로 전환되며, 상기 균주는 사카로마이세스 효모와 같은 더 전통적인 성분에 비해 더 영양상의 발효 생성물을 낳는다. 결과 생성물은 이산화탄소를 분리하기 위하여 불빛이 비춰질 수 있고, 결과 액체는 증류 컬럼 및 스트립 컬럼(stripping column)으로 구성된 회수 시스템에 공급될 수 있다. 에탄올 스트립은 분자 여과기로 향할 수 있으며, 여기서 잔류 물은 흡착 기술을 사용하여 제거된다. 소량의 가솔린으로 변질된 정제된 에탄올은 연료 등급 에탄올을 제조할 수 있다. 또 다른 생성물은, 불순물을 제거하기 위하여 초기 증류액 에탄올을 더 정제하여 제조될 수 있으며, 이에 의해 비-연료 용도의 약 99.95% 에탄올을 얻었다.

[0088] 전 증류 폐액(whole stillage)는 증류기의 바닥으로부터 추출되고 원심분리되어, 습고형주정박(DWG) 및 물은 증류 폐액(thin stillage)(액체)를 제조할 수 있다. DWG는 55~65% 수분함량으로 원심분리기를 떠날 수 있고, 소사료로서 습식으로 판매되거나, 본원에 따라 제공된 강화 발효 생산품으로서 건조될 수 있다. 이러한 생산품은, 건고형주정박(DDG)로서 본원에서 언급될 수 있는 강화 최종 생산품을 포함한다. 증발기를 사용하여, 물은 증류 폐액(액체)은 농축되어 주정박(distiller's solubles)을 형성할 수 있으며, 이는 다시 주모(distiller's grains) 공정 스트림에 첨가되어 혼합된 뒤, 건조될 수 있다. 본원의 실시예에 따른, 이런 혼합된 생산물은 아미노산 및 미량 영양소 함량이 증대된 강화 발효 생산품으로서 판매될 수 있다. 본원의 다양한 개념들이 본원에 예시된 것 외에도 동 분야에 알려진 다른 발효 공정에 적용될 수 있을 것으로 이해될 것이다.

[0089] 본 발명의 다른 양태는 영양분의 증대된 농도를 갖는 완전한 어분 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 영양분의 증대된 농도로 특징지어지는 미생물을 포함하며, 이때 상기 영양분은 지방, 지방산, 인지질과 같은 지질, 비타민, 필수 아미노산, 펩티드, 단백질, 탄수화물, 스테롤, 효소, 및 철, 구리, 아연, 망간, 코발트, 요오드, 셀레늄, 몰리브데늄, 니켈, 불소, 바나듐, 주석, 실리콘과 같은 미량 무기물 및 그의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0090] 본원의 배양 공정에서, 탄소 공급원은 미생물에 의해 그의 구성성분인 당으로 가수분해되어, 알콜 및 다른 기체의 생성물을 제조할 수 있다. 기체의 생성물은 이산화탄소를 포함하고 알콜은 에탄올을 포함한다. 배양 공정 후에 얻어진 배양 생성물은 보통 높은 상업적 가치를 가진다. 실시예에서, 배양 생성물은 미생물이 결핍된 생성물에서 보다 증대된 영양분 함유물을 갖는 미생물을 함유한다. 미생물들은 배양 시스템, 배양 브로스 및/또는 배양 바이오매스에 존재할 수 있다. 배양 브로스 및/또는 바이오매스는 건조되어(예, 분무-건조), 증대된 영양분 함유물을 갖는 배양 생성물을 제조할 수 있다.

[0091] 예를 들어, 배양 공정 후에 회수된 사용된 건조 고형물은 본원에 따라 증대된다. 이러한 배양 생성물은 일반적으로 비-독성이고, 생분해성이고, 구입 가능하며, 값싸고 영양분이 풍부하다. 미생물 및 배양 조건의 선택은 사료 또는 영양제로서 사용하기 위한 저 독성 또는 비-독성 배양 생성물을 제조하기 위해 중요하다. 글루코오스는 곡물에서 전분의 가수분해로부터 제조된 주요한 당이지만, 이것은 일반적으로 탄수화물에서만 제조된 당은 아니다. 종래의 건조 밀 에탄올 생성 공정으로부터 제조된, 다량의 비-전분 탄수화물(예, 셀룰로오스 및 아라비노스)의 35% 정도 - 건조 중량에서 중성세제불용성성분으로서 측정됨)을 함유하는 SPC 또는 DDG와 다르게, 비-전분 탄수화물의 효소 가수분해에 의해 제조된 본 영양분 풍부 배양 생성물은 비반추 동물에게 더 맛있고 소화가 잘

된다.

[0092] 본원의 영양분 풍부 배양 생성물은 적어도 약 1 중량% 내지 약 95 중량%의 영양 성분 함량을 가질 수 있다. 영양 성분 함량은 적어도 약 10중량%~20중량%, 약 20중량%~30중량%, 약 30중량%~40중량%, 약 40중량%~50중량%, 약 50중량%~60중량%, 약 60중량%~70중량%, 및 약 70중량%~80중량%인 것이 바람직하다. 사용가능한 영양 성분 함량은 먹이가 공급되는 동물 및 식이의 잔여물 정도, 및 동물 생활 주기의 단계에 의존한다. 예를 들어, 육우는 젖소에 비해 적은 히스티딘을 요구한다. 사육 동물에 대한 적합한 영양 성분 함량의 선택은 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다.

[0093] 배양 생성물은 분무-건조 바이오매스 생성물로서 제조될 수 있다. 선택적으로, 바이오매스는 알려진 방법에 의해 분리될 수 있는데, 이러한 방법으로는 원심 분리, 여과, 분리, 상층분리(decanting), 분리 및 상층분리의 조합, 환외여과 또는 미세여과가 있다. 바이오매스 배양 생성물은 반추위(rumen)이 우회(bypass)로 가능하도록 더 처리될 수 있다. 실시예에서, 바이오매스 생성물은 배양 배지로부터 분리되고, 분무-건조되고, 반추위를 우회로 조절하도록 선택적으로 처리될 수 있고, 영양 성분 공급원으로서 공급하기 위해 첨가될 수 있다. 미생물을 함유하는 배양 공정에서 영양적으로 풍부한 배양 생성물을 제조하는 것에 더하여, 상기 영양적으로 풍부한 배양 생성물은 형질전환식물계에서도 제조될 수 있다. 형질전환식물계를 제조하는 방법은 당에 분야에 알려져 있다. 대안으로, 미생물 숙주가 영양 성분 함유물을 배설하는 경우에, 영양적으로-풍부한 브로스는 배양에 의해 제조된 바이오매스로부터 분리될 수 있고, 정제된 브로스는 동물 사료 원료로서, 예를 들어 액체 형태 또는 분무 건조 형태 중 어느 하나로서 사용될 수 있다.

[0094] 미생물을 사용하는 배양 공정 후에 얻은 배양 생성물은 동물 사료로서 또는 인간용 보조 식품으로서 사용될 수 있다. 배양 생성물은 비-인간 공급원(예, 세균, 효모, 및/또는 식물)으로부터 유래되는 증대된 영양 성분 함유물을 가지는 적어도 하나의 구성요소를 포함한다. 특히, 배양 생성물은 지방, 지방산, 인지질과 같은 지질, 비타민, 필수 아미노산, 펩티드, 단백질, 탄수화물, 스테롤, 효소, 및 철, 구리, 아연, 망간, 코발트, 요오드, 셀레늄, 몰리브데늄, 니켈, 불소, 바나듐, 주석, 실리콘과 같은 미량 무기물 중 적어도 하나 이상이 풍부하다. 실시예에서, 펩티드는 적어도 하나의 필수 아미노산을 함유한다. 다른 실시예에서, 필수 아미노산은 배양 반응에서 사용된 대상(subject) 개질된 미생물 안에 캡슐화된다. 실시예에서, 필수 아미노산은 미생물에 의해 발현된 이종 폴리펩티드에 함유된다. 필요한 경우에, 이종 폴리펩티드는 적절한 미생물(예, 균류)의 봉입체에서 발현되고 저장된다.

[0095] 실시예에서, 배양 생성물은 높은 영양 성분 함량을 가진다. 그 결과, 배양 생성물의 높은 비율은 완전 동물 사료에서 사용될 수 있다. 실시예에서, 사료 조성물은 적어도 약 15 중량%의 배양 생성물을 포함한다. 완전 사료, 또는 식이에서, 이런 재료는 다른 재료들과 함께 공급될 것이다. 다른 재료들의 영양 성분 함량, 및/또는 사료가 제공되는 동물의 영양요구량에 따라서, 개질된 배양 생성물은 사료의 15% 내지 사료의 100%일 수 있다. 실시예에서, 대상 배양 생성물은 높은 영양 성분 함량에 의해 낮은 비율의 블렌딩을 제공할 수 있다. 다른 실시예에서, 대상 배양 생성물은 매우 높은 비율 공급(예, 75% 초과)을 제공할 수 있다. 적합한 실시예에서, 사료 조성물은 대상 배양 생성물의 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 75%를 포함한다. 일반적으로, 사료 조성물은 배양 생성물의 적어도 약 20 주알%를 포함한다. 더 일반적으로, 사료 조성물은 배양 생성물의 적어도 약 15-25중량%, 25-20중량%, 20-25중량%, 30중량%-40중량%, 40중량%-50중량%, 50중량%-60중량%, 또는 60중량%-70중량%를 포함한다. 필요한 경우에, 대상 배양 생성물은 사료의 유일한 공급원으로서 사용될 수 있다.

[0096] 완전 어분 조성물은 다양한 목적, 예를 들어 체중 증가 및 동물 건강의 전반적인 향상을 위하여 하나 이상의 필수 아미노산과 관련하여 증대된 아미노산 함량을 가질 수 있다. 완전 어분 조성물은, 배양 생성물 내에 자유 아미노산의 존재 및/또는 필수 아미노산을 포함하는 단백질 또는 펩티드의 존재 때문에, 증대된 아미노산 함량을 가질 수 있다. 필수 아미노산은 아르기닌, 시스테인, 히스티딘, 이소류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트레오닌, 타우린, 트립토판, 및/또는 발린을 포함할 수 있으며, 이들은 자유 아미노산으로서 또는 선택된 아미노산에 풍부한 단백질 또는 펩티드의 일부로서 완전 동물 사료에 존재할 수 있다. 적어도 하나의 필수 아미노산-풍부 펩티드 또는 단백질은 펩티드 또는 단백질의 총 아미노산 잔기들 당 적어도 1% 필수 아미노산 잔기, 펩티드 또는 단백질의 총 아미노산 잔기들 당 적어도 5% 필수 아미노산 잔기, 또는 펩티드 또는 단백질의 총 아미노산 잔기들 당 적어도 10% 필수 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 영양 성분이 균형잡힌 식이를 동물들에게 공급함으로써, 최대 사용이 영양 성분 함량으로 구성되며, 배설물에 존재하는 영양 성분의 감소 또는 우유 제조, 또는 비슷한 성장률을 달성하여 낭비의 생부담(bioburden)을 감소시키기 위해 더 적은 사료가 요구된다.

- [0097] 필수 아미노산의 증대된 함량을 갖는 완전 어분 조성물은 조질 단백질 및 총 아미노산 함량의 증량에 대해 적어도 2.0 증량%의 필수 아미노산 함량을 가질 수 있고, 더 바람직하게는 조질 단백질 및 총 아미노산 함량의 증량에 대해 적어도 5.0 증량%의 필수 아미노산 함량을 가질 수 있다. 완전 어분 조성물은 미생물로부터 유래된 다른 영양 성분을 포함하는데, 이러한 영양 성분은 지방, 지방산, 인지질과 같은 지질, 비타민, 탄수화물, 스테롤, 효소 및 미량 무기물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0098] 완전 어분 조성물은 완전 사료 형태 조성물, 조성물로부터의 농축물, 블렌딩 형태 조성물, 및 기본 형태 조성물을 포함할 수 있다. 만일 조성물이 완전 사료의 형태이면, 영양 성분이 배양 생성물에서 미생물로부터 얻어지는 경우에, 퍼센트 영양 성분 수준은 약 10 내지 약 25 퍼센트, 더 바람직하게는 약 14 내지 약 24 퍼센트일 수 있으며; 반면에, 만일 조성물인 농축물의 형태이면, 영양 성분 수준은 약 30 내지 약 50 퍼센트, 더 바람직하게는 약 32 내지 약 48 퍼센트일 수 있다. 만일 조성물이 블렌딩의 형태이면, 조성물에서 영양성분 수준은 약 20 내지 약 30 퍼센트일 수 있으며, 바람직하게는 약 24 내지 약 26 퍼센트 일 수 있고; 만일 조성물이 기본 혼합물의 형태이면, 조성물에서 영양 성분 수준은 약 55 내지 약 65 퍼센트일 수 있다. 본원에서 다르게 제시되지 않는 한, 퍼센트는 중량 퍼센트를 의미한다. 만일 HQPC가 단일 영양 성분, 예를 들어 Lys가 높으면, 이것은 저 비율로 보충제로서 사용될 것이며; 만일 이것이 아미노산 및 비타민, 예를 들어 비타민 A 및 E가 균형잡혔다면, 이것은 더욱 완전 사료일 것이고 고 비율로 공급될 것이고 저 단백질, 옥수수대(corn stover)와 같은 저 영양 성분 공급 원료로 보충될 것이다.
- [0099] 어분 조성물은 적어도 약 2%의 필수 아미노산 함량을 갖는 배양 생성물에 존재하는 펩티드 또는 조질 단백질 분획을 포함할 수 있다. 실시예에서, 펩티드 또는 조질 단백질 분획은 적어도 약 3%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%의 필수 아미노산 함량을 가질 수 있고, 실시예에서 적어도 약 50%의 필수 아미노산 함량을 가질 수 있다. 실시예에서, 펩티드는 100% 필수 아미노산일 수 있다. 일반적으로, 어분 조성물은 최대 약 10%의 필수 아미노산 함량을 갖는 배양 생성물에 존재하는 펩티드 또는 조질 단백질 분획을 포함할 수 있다. 더 일반적으로, 어분 조성물은 약 2-10%, 3.0-8.0%, 또는 4.0-6.0%의 필수 아미노산 함량을 갖는 배양 생성물에 존재하는 펩티드 또는 조질 단백질을 포함할 수 있다.
- [0100] 어분 조성물은 적어도 약 2%의 리신 함량을 갖는 배양 생성물에 존재하는 펩티드 또는 조질 단백질 분획을 포함할 수 있다. 실시예에서, 펩티드 또는 조질 단백질 분획은 적어도 약 3%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%의 리신 함량을 가질 수 있고, 실시예에서, 적어도 약 50%의 리신 함량을 가질 수 있다. 일반적으로, 어분 조성물은 최대 약 10%의 리신 함량을 갖는 펩티드 또는 조질 단백질 분획을 포함할 수 있다. 필요한 경우에, 어분 조성물은 약 2-10%, 3.0-8.0%, 또는 4.0-6.0%의 리신 함량을 갖는 펩티드 또는 조질 단백질 분획을 포함할 수 있다.
- [0101] 어분 조성물은 배양 생성물 내에 약 1 g/kg 건조 고형물 내지 900 g/kg 건조 고형물의 영양 성분을 포함할 수 있다. 실시예에서, 어분 조성물 내에 영양 성분은 적어도 약 2 g/kg 건조 고형물, 5 g/kg 건조 고형물, 10 g/kg 건조 고형물, 50 g/kg 건조 고형물, 100 g/kg 건조 고형물, 200g/kg 건조 고형물, 및 약 300 g/kg 건조 고형물로 존재할 수 있다. 실시예에서, 영양 성분은 적어도 약 400 g/kg 건조 고형물, 적어도 약 500 g/kg 건조 고형물, 적어도 약 600 g/kg 건조 고형물, 적어도 약 700 g/kg 건조 고형물, 적어도 약 800 g/kg 건조 고형물, 및/또는 적어도 약 900g/kg 건조 고형물로 존재할 수 있다.
- [0102] 어분 조성물은 필수 아미노산 또는 약 1 g/kg 건조 고형물 내지 900 g/kg 건조 고형물의 함량을 갖는 배양 생성물에 존재하는 적어도 하나의 필수 아미노산을 함유하는 펩티드를 포함할 수 있다. 실시예에서, 필수 아미노산 또는 어분 조성물 내에 적어도 하나의 필수 아미노산을 함유하는 펩티드는 적어도 약 2 g/kg 건조 고형물, 5 g/kg 건조 고형물, 10 g/kg 건조 고형물, 50 g/kg 건조 고형물, 100 g/kg 건조 고형물, 200g/kg 건조 고형물, 및 약 300 g/kg 건조 고형물로 존재할 수 있다. 실시예에서, 필수 아미노산 또는 적어도 하나의 필수 아미노산을 함유하는 펩티드는 적어도 약 400 g/kg 건조 고형물, 적어도 약 500 g/kg 건조 고형물, 적어도 약 600 g/kg 건조 고형물, 적어도 약 700 g/kg 건조 고형물, 적어도 약 800 g/kg 건조 고형물, 및/또는 적어도 약 900g/kg 건조 고형물로 존재할 수 있다.
- [0103] 완전 어분 조성물은, 배양 과정에서 형성된 바이오매스의 형태의 영양 성분 풍부 배양 생성물 및 적어도 하나의 추가적인 영양 성분 구성요소를 함유할 수 있다. 또 다른 예에서, 어분 조성물은 배양 과정에서 형성된 배양 브로스로부터 용해되고 현탁되는 영양 성분 풍부 배양 생성물 및 적어도 하나의 추가적인 영양 성분 구성요소를 함유한다. 추가적인 실시예에서, 어분 조성물은 적어도 하나의 필수 아미노산-풍부 단백질을 포함하는 조질 단백질 분획을 가진다. 어분 조성물은 필수 아미노산의 개선된 균형상태를 전달하도록 제형화될 수 있다.

- [0104] DDGS를 포함하는 조성물에 있어서, 완전 조성물 형태는 밀 미들링(wheat middlings)("밀 미드"), 옥수수, 콩가루, 옥수수글루텐박, 주모 또는 옥수수주정박, 엽, 주요무기물(macro-minerals), 미량무기물 및 비타민과 같은 하나 이상의 성분들을 함유할 수 있다. 다른 가능한 성분들은 보통 해바라기박(sunflower meal), 맥아 및 콩깻질을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 블렌딩 형태 조성물은 밀 미들링, 옥수수글루텐박, 주모 또는 옥수수주정박, 엽, 주요무기물, 미량무기물 및 비타민을 함유할 수 있다. 대안의 성분들은 보통 옥수수, 콩가루, 해바라기박, 목하씨박, 맥아 및 콩깻질을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 기본 형태 조성물은 밀 미들링, 옥수수글루텐박, 및 주모 또는 옥수수주정박을 함유할 수 있다. 대안의 성분들은 콩가루, 해바라기박, 맥아, 주요무기물, 미량무기물 및 비타민을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0105] 산화 조건에 노출된 미생물에서 고도로 불포화된 지방산(HUFAs)은 덜 바람직한 불포화 지방산 또는 포화 지방산으로 전환될 수 있다. 그러나, 오메가-3 HUFAs의 포화는, 합성 항산화제 또는 베타-카로틴, 비타민 E 및 비타민 C와 같은 천연-발생 항산화제를 사료 안으로 도입함으로써 감소되거나 방지될 수 있다. BHT, BHA, TBHQ 또는 에톡시퀸(ethoxyquin)과 같은 합성 항산화제, 또는 토코페롤과 같은 천연 항산화제는 그들을 생성물 안으로 첨가함으로써 식품 또는 사료 생성물안으로 포함될 수 있거나, 그들은 적합한 유기체에서 인 사이투(in situ) 생산에 의해 포함될 수 있다. 이런 방식으로 포함된 항산화제의 양은, 예를 들어 생성물 제형, 포장 방법, 및 요구되는 유통기한과 같은 이후의 사용 요구에 의존한다.
- [0106] 배양 생성물 또는 본원의 배양 생성물을 함유하는 완전 어분은, 만일 공정이 인간 등급 주입 재료로 시작한다면, 인간의 소비를 위한 영양제로서 사용될 수도 있고, 인간 식품 품질 표준은 공정 도처에서 관찰된다. 배양 생성물 또는 본원에 개시된 완전 사료는 높은 영양 성분 함량을 가진다. 단백질 및 식이섬유와 같은 영양 성분은 균형식과 연관된다. 증자법은 식품에서 본원의 완전 사료 또는 배양 생성물을 활용하도록 발전될 수 있으며, 상기 식품은 시리얼, 크래커, 파이, 쿠키, 케이크, 피자 크러스트, 서머 소시지, 미트볼, 셰이크 및 섭취가능한 음식의 모든 형태이다. 또 다른 선택은, 분배하기 편리하고 먹기 쉬울 수 있는 그레놀라 바(granola bar)와 유사하게, 본원의 완전 사료 또는 배양 생성물을 스낵 또는 스낵 바로 개발하기 위한 것일 수 있다. 스낵 바는 곡물로부터의 단백질, 섬유질, 씨눈(germ), 비타민, 미네랄을 포함할 수 있을 뿐만 아니라, 글루코사민, HUFAs과 같은 영양제, 또는 비타민 Q-10과 같은 공동 인자(co-factor)도 포함할 수 있다.
- [0107] 본 배양 생성물을 포함하는 어분은 풍미제가 더 보충될 수 있다. 특정 풍미제의 선택은 사료가 공급되는 동물에 의존할 것이다. 천연 및 합성 모두의 풍미제 및 아로마는 사료를 더 만족스럽고 맛 좋게 만드는데 사용될 수 있다. 이러한 보충제는 모든 성분들과 잘 블렌딩될 수 있고, 액체 또는 건조 생성물 형태로서 이용할 수 있을 것이다. 동물 사료에 보충될 적합한 풍미제, 유인제(attractants), 및 아로마는 어류 페로몬(fish pheromones), 호로파(fenugreek), 바나나, 체리, 로즈마리, 쿠민(cumin), 당근, 페퍼민트 오레가노(peppermint oregano), 바닐라, 아니스(anise), 플러스 럼(plus rum), 단풍나무(maple), 캐러멜, 감귤유(citrus oils), 에틸부티레이트, 멘톨, 사과, 시나몬, 그의 임의의 천연 또는 합성 조합들을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 풍미제 및 아로마는 상이한 동물들 사이에서 교환될 수 있다. 유사하게, 다양한 합성 또는 천연 과일 풍미제는 인간의 소비를 위한 본 배양 생성물을 포함하는 영양제에 첨가될 수 있다.
- [0108] 본 발명의 배양 생성물 또는 완전 사료의 유통기한은 미생물이 결합된 배양 생성물의 유통기한에 비해 일반적으로 더 길 수 있다. 유통기한은 생성물의 수분 함량, 사료 덩어리에 공기가 얼마나 통과할 수 있는지, 주변환경 조건, 및 보존제의 사용과 같은 요인에 의존할 수 있다. 보존제는 완전 사료에 첨가되어 유통기한을 몇주 또는 몇달 늘릴 수 있다. 유통기한을 늘리기 위한 다른 방법은 다른 사료와 혼합하고 포장하는 것과 같은 사일리지(silage) 관리와 유사한 관리, 플라스틱으로 덮는 것 또는 자루에 넣는 방법을 포함한다. 차가운 조건, 보존제, 및 사료 덩어리로부터 공기를 제거하는 것 모두는 습윤 부산물의 유통기한을 연장한다. 완전 사료는 병커 또는 실로 백(silo bag)에 저장될 수 있다. 습윤 배양 생성물 또는 완전 사료를 건조하는 것도 생성물의 유통기한을 늘릴 수 있고, 일관성 및 품질을 개선할 수 있다.
- [0109] 본원의 완전 사료는 장시간 동안 저장될 수 있다. 유통기한은 사일로 저장(ensiling), 유기 산과 같은 보존제의 첨가, 또는 콩 껍질과 같은 다른 사료와 함께 혼합하는 것에 의해 연장될 수 있다. 상품 쓰레기통 또는 산물 저장 가장치장(bulk storage sheds)는 완전 사료를 저장하는데에 사용될 수 있다.
- [0110] 본원에서 사용된 바와 같이, "실온"은 표준 기압 하에서 약 25°C이다.

도면의 간단한 설명

- [0111] 도 1은 HQSPC 전환 공정에 대한 흐름도를 보여준다.

도 2는 양식 사료에 대한 HQSPC 전환 공정에 대한 흐름도를 보여준다.

도 3은 HQSPC 조성물 및 수율을 평가하기 위한 벤치 스케일의 연장된 배양 시험을 보여준다.

도 4는 양식 사료에 대한 HP-DDGS 전환 공정에 대한 흐름도를 보여준다.

도 5는 100℃에서 HP-DDGS의 압출 후에 글루코오스 회수에서 수분 함량 및 압축 속도가 미치는 영향을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

하기의 실시예는 실례가 되고, 개시된 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 의도가 아니다.

실시예

실시예 1. 고 품질 콩 단백질 농축물(HQSPC)

도 1은 백색 조각을 기차치하고, 당을 세포량(단백질) 및 검으로 전환하고, HQSPC를 회수하고 양식사료를 생성하고(도 2), 어류 사육 실험에서 결과로 얻은 양식사료를 시험하는 것에 대한 전반적인 접근 방법을 보여준다. 우선 15% 수분 함량, 50℃, 그리고 구조를 분열시키기 위해 75 rpm에서 백색 조각을 압출 기차리(BRABENDER PLASTI-CORDER SINGLE SCREW EXTRUDER Model PL2000, Hackensack, NJ)하여, 이후 당화 중에 가수분해성 효소의 증가된 개입을 가능하게 했다. 이러한 조건들은 원통의 양 측 상에서 리지형 채널(ridged channels)에 대하여 전단 효과를 제공했고, 효소에 의한 가수분해 후 50-70% 초과인 당 방출을 가져오는지 사전에 관찰했다. 압출된 백색 조각은 이후에 3 mm 헤머밀 체로 분쇄했고, 물과 블렌딩하여 10% 고체 부하율을 달성했고, pH를 5로 조정했다. 메쉬를 저온 살균 또는 멸균하기 위해 가열한 후, 메쉬를 약 50℃로 냉각했고, 셀룰로오스 및 올리고사카라이드-분해 효소(15 ml 총/백색 조각의 kg)를 첨가하여 폴리머를 간단한 당으로 가수분해했다(4-24시간 가수분해). 포함된 특정 투여량은 6% CELLIC CTEK (글루칸 gm 당), 0.3% CELLIC HTEK (총 고형물 gm 당), 0.015% NOVOZYME 960 (고형물 gm 당)였다. 다음으로, 결과로 얻은 메쉬를 30℃에서 냉각하고, pH를 3-5로 조절하고, 아우로바시디움 풀루란스(A. pullulans)로 접종하고(1% v/v), 50 내지 200 rpm 혼합 속도 및 0.5 L/L/분 통기율에서 4-5일 동안 배양하여, 당을 단백질 및 검으로 전환했다. 배양 중에, 샘플들은 주기적으로 제거하고, 당, 세포수 및 검 생산에 대하여 분석했다. 배양 후, pH를 6.5로 증가시키고, 에탄올(0.6 L/L 브로스)을 첨가하여, 검을 침전시켰다. 단백질, 풀루란 및 미생물 덩어리(HQSPC)를 원심분리 및 건조하여 회수했고, 이와 동시에 상청액을 증류하여 에탄올을 회수했고, 잔류 액체는 공정의 시작에서 미래에 재사용하기 위하여 화학적으로 분석했다. 다음으로, HQSPC를 황색 농어, 지방 시장에서 중요한 어류에 대하여 사육 실험으로 시험했다. 시험 육성용 식이를 HQSPC로 제형화하고, 어분, 경쟁 식물계 성분과 비교했다. 능력(예, 성장, 사료요구, 단백질 효율), 내장 특징, 및 장내 조직학을 검사하여, 어류 반응을 평가했다.

콩 백색 조각을 사용하는 HQSPC 및 아우로바시디움 풀루란스(A. pullulans)를 사용한 미생물의 전환, HQSPC의 제조를 위한 중간 시험 규모 시스템.

시스템은 675 L 생물 반응 장치, 가변성 속도 증진 공동 펌프(variable speed progressive cavity pump), 연속 흐름 원심분리기, 및 1 x 4 미터 건조 테이블을 함유했다. 675 L 생물 반응 장치에서 사용하기 위한 접종물을 두 개 준비했다, 5L NEW BRUNSWICK BIOFLO 3 BIOREACTORS. 각각의 실험에 대해, 접종물의 8-10L 양을 설명된 바와 같이 풀루란을 2-3일 동안 성장시켜서 제조했다. 이런 재료를 675 L 생물 반응 장치에서 제조된 압출되고 당화된 백색 조각의 다량을 접종하는데에 사용했다. 배양 후에, 에탄올을 첨가했고, 메쉬를 원심분리하여 습윤 고형물을 회수하였는데, 이런 습윤 고형물은 이후에 건조되고 어류 사육 실험에서 사용된다. 전환 공정의 능력을 모니터링함으로써, HQSPC의 수율 및 조성, 몇몇 파라미터를 관찰했으며, 고형물 회수에 현저한 영향을 미쳤다. 대규모의 실험에서, 표 1에서 보는 바와 같이 파라미터들은 달라졌다.

표 1

표 1. 사전-대규모 실험 변수 및 핵심 능력 파라미터						
파라미터	실험 1	실험 2	실험 3	실험 4	실험 5	실험 6
압출	예	예	아니오	아니오	아니오	예
당화 시간(h)	3	3.5	4	7	5	5
배양 pH	4.2	5.1	4.3	4.6	3.05	3.15

배양 온도(℃)	29-30	29-30	29-30	26-27	29-30	29-30
통기율(L/L/분)	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5
배양 시간(일)	16	15	3.5	4.5	2	2.5
고형물 회수(%)	20	16	48	48	60	64
고형물 % 단백질	75.18	75.04	63.93	61.5	61.61	56.86
트립신 억제제	0	0	NA	NA	16,750	6,538
상청액 % 고형물	2.5	5	21	3.89	2.39	3.4
상청액 % 단백질	78.16	80	71.66	61.47	NA	NA

- [0120] HQSPC 수율 및 단백질 수준으로부터, 하기를 알았다: 1) 높은 통기율과 함께 배양 pH 3-3.5 및 온도 30℃-32℃는 아우로바시디움 폴루란스(A. pullulans)의 성장을 최대화하고 폴루란 생산을 최소화했다, 2) 4-5일의 배양 시간은 단백질 함량 및 고형물 회수에 대해 최적이다, 3) 더 긴 배양 시간은 단백질 함량을 증가시켰지만, 고형물 회수를 실질적으로 감소시켰다, 4) 짧은 배양 시간은 높은 고형물 회수를 유지시켰지만, 단백질 함량을 제한했다, 및 5) 최종 생성물에서 스타키오스 및 라피노오스의 결핍에 의해, 압출 및/또는 감소된(생략된) 효소 당화가 가능할 것이다.
- [0121] 공정 조건을 최적화하기 위하여, 5L 생물 반응 장치에서 예비 작업대 규모의 실험을 수행했다. 10% 고형물 부하율의 압출된 백색 조각을 사용했고, 24시간 동안 당화한 후, 이어서 아우로바시디움 폴루란스(A. pullulans)를 접종하고, pH 5, 0.5 L/L/분 통기율, 200 rpm 교반에서 10일 동안 배양했다. 고형물 회수 비율 및 고형물 내의 단백질 함량 모두를 최대화 하기 위한 최적의 수확 기회를 확립하기 위하여 연장된 배양 시간 동안 시험했다. 샘플(100 ml)를 매일 제거했고, 격일로 하기를 수행했다:
- [0122] 모든 고형물을 에탄올로 침전시켰고, 고형물을 원심분리하고 건조하고, 상청액 내의 잔류 고형물을 측정했다.
- [0123] 고형물을 회수하기 위해 먼저 브로스를 원심분리하고, 고형물을 건조하고, 상청액으로부터 폴루란을 침전시키고 건조했다.
- [0124] 에탄올 침전 우선 방법은 실험실 원심분리기(10,000g)를 사용하여 약 97%의 고형물(대두 고형물, 세포 및 검)을 회수했고, 유체상에 약 3%의 고형물이 남아있었다. 원심분리 우선 방법은 약 81.7%의 고형물(대두 고형물 및 세포)을 회수했고, 상청액의 에탄올 침전법으로 약 14.8% 고형물(엑소폴리사카라이드)을 회수했고, 유체 내에 약 3.5% 고형물이 남아있었다.
- [0125] 이러한 작업대 규모 실험을 통해, 매일 회수될 수 있는 단백질, 폴루란 및 총 고형물의 수준을 측정했다. 배양이 진행되면서, 단백질 및 폴루란 수준은 증가될 것으로 예측되지만, 총 고형물 회수율은 일부 영양 성분이 물 및 CO₂로 이화되기 때문에 감소될 것이다. 세 개의 복제물로부터의 고형물의 평균 단백질 수준은 도 3에서 보여진다. 3-5일째에 단백질 수준은 70%를 도달했으며, 총 고형물 회수율은 5-6일째에 떨어지기 시작했다. 따라서, 4-5일 배양 시간이 최적일 수 있다고 보인다.
- [0127] 농어에서 어분 대체물로서 HQSPC의 능력 평가
- [0128] 주로 성장 능력에 가변성을 제공하는 단백질 및 아미노산 조성물 및 항-영양 성분 특성, 및 어류 조성물에서 상업적으로 구입가능한 SPC 중에 몇몇 차이점을 사전에 식별했다. 이러한 실험은 어분을 함유하는 식이와 동등하거나 더 좋은 성장 능력을 지지할 수 있는 고 품질 SPC 생성물을 개발에 대한 필요를 정당화했다. 상업적 SPC 및 청어 어분 대조군과 비교할 때 두 개의 HQSPC 콩 생성물(발효 실험 5 및 6)의 평가를 제공하기 위해서 황색 농어를 사용하여 사육 실험을 수행했다.
- [0129] 사료 제제 : 7개의 식이가 다음과 같이 제형화되었다:
- [0130] 식이 1 = 어분 대조군
- [0131] 식이 2 = 상업적 SPC
- [0132] 식이 3 = 상업적 SPC (리신 + 메티오닌으로 보충됨)
- [0133] 식이 4 = HQSPC 실험 5
- [0134] 식이 5 = HQSPC 실험 5(리신 + 메티오닌으로 보충됨)

[0135] 식이 6 = HQSPC 실험 6

[0136] 식이 7 = HQSPC 실험 7(리신 + 메티오닌으로 보충됨)

[0137] 대략 12 kg의 각각의 식이를 제조했으며, 식이는 소화율 결정을 위해 1g/100g 산화크롬을 함유하는 2kg을 포함했다. 42:10의 적절한 단백질:지질 목표를 갖는 동등한 SPC 양을 함유하도록 실험 식이를 제형화했다. 최소 단백질 함량이 69%인 콩 단백질 농축물(SPC, 예, Netzcon Ltd. Rehovot, Israel로부터 얻음)은 지방이 제거된 토스트 되지 않은(non-toasted) 백색 조각의 수성 알콜 추출물에 의해 만들어진다. SPC는 콩가루와 현저히 다른데, 그 이유는 SPC가 올리고폴리사카라이드 및 항원 성분인 글리신 및 b-콘글리시닌의 트레이스를 함유하기 때문이다.

[0138] 건조 블렌딩 이전에 0.51mm 체를 구비한 피츠패트릭 분쇄기(Fitzpatrick comminutator)를 사용하여 큰 입자 성분들을 분쇄했다. 인텐시파이어 발 (intensifier bar)를 구비한 VI-10 혼합기(Vanguard Pharmaceutical Machinery, Inc., Spring, TX)를 사용하여 20분 동안 건조 성분을 블렌딩 했다. 다음으로, 건조 블렌딩된 사료를 Hobart HL200 혼합기(Troy, OH)로 옮겼으며, 여기서 오일 및 물이 첨가되고 약 5분 동안 블렌딩된다. 다음으로, 3/16" 다이(die)를 구비한 Hobart 4146 분쇄기를 사용하여 사료들을 나사 압착했고, 냉각 강제 공기(cool forced-air) 하에서 건조했다. 건조 후, 식품 가공기(food processor)를 사용하여 사료를 펠렛으로 밀링하고, 일정한 펠렛 크기를 얻기 위해 체질했고, -20℃에서 냉동 저장장치 안에 놓았다. 일차 단백질 공급원의 화학적 분석은 표 2에서 보여질 수 있다.

표 2

[0139]

표 2. 황색 농어 실험 식이에 포함된 일차 단백질 공급원의 조성물(g/100g 건조물 기준(dmb))				
단백질 공급원	청어 식이	상업적 SPC	HQSPC 실험 5	HQSPC 실험 6
일반 구성요소				
단백질	66.77	78.18	61.61	56.86
수분*	7.62	9.73	5.14	7.89
지질	5.21	0.00	1.70	1.26
조질 섬유질	0.18	10.08	0.81	4.86
회분	25.33	7.10	8.82	5.21
아미노산				
알라닌	3.97	3.03	2.71	2.66
아르기닌	3.69	5.30	2.44	3.65
아스파르트산	5.47	8.08	6.72	6.45
시트틴	0.48	0.97	0.87	0.88
글루탐산	7.73	12.51	8.70	8.85
글리신	4.81	2.96	2.67	2.51
히스티딘	1.26	1.84	1.41	1.40
히드록시리신	0.27	0.04	0.81	0.10
히드록시프롤린	1.19	0.08	0.10	0.07
이소류신	2.73	3.30	2.89	2.92
란티오닌	0.00	0.02	0.00	0.00
류신	4.47	5.61	4.64	4.87
리신	4.58	4.56	3.47	3.41
메티오닌	1.72	1.00	0.83	0.90
오르니틴	0.14	0.04	0.14	0.04
페닐알라닌	2.51	3.62	2.89	3.08
프롤린	3.31	3.65	3.17	2.92
세린	1.85	3.07	2.28	2.73
타우린	0.42	0.08	0.09	0.10
트레오닌	2.32	2.80	2.36	2.31
트립토판	0.58	1.00	0.79	0.82
티로신	2.01	2.57	1.98	2.25
발린	3.10	2.51	3.13	3.10
올리고사카라이드				
라피노오스	--	0.00	0.00	0.00

스타키오스	--	0.24	0.00	0.00
피트산 (phytic acid)	--	0.23	0.39	0.18

[0140] *모든 성분들은 수분이 제거된 건조물 기준으로 표시된다.

[0141] 조질 단백질(AOAC 2006, 방법 990.03), 조질 지방(AOAC 2006, 방법 9903), 조질 섬유질(AOAC 2006, 방법 978.10), 수분(AOAC 2006, 방법 934.01), 크롬 산화물(AOAC 2006, 방법 990.08), 회분(AOAC 2006, 방법 942.05), 및 아미노산(AOAC 2006, 방법 982.30 E(a,b,c))에 대해 분석했다.

[0143] 펠렛 특성

[0144] 수분(%), 수분 활성(aw), 단위 밀도(kg/m³), 펠렛 내구성 지표(%), 물 안정성(분), 및 색(L, a, b)에 대해 각각의 식이의 샘플들을 3회 분석했고; 압축 강도 (g) 및 직경(mm)을 n=10 복제물에서 확인했다. 표중 방법 2.2.2.5(NFTA, 2001)를 사용하여 수분(%)을 얻었다. Lab Touch aw 분석기(Nocasina, Lachen SZ, Switzerland)를 사용하여 2g 펠렛 샘플의 수분 활성(aw)을 측정했다. Hunter L (밝음/어둠), Hunter a (적색/녹색) 및 Hunter b (황색/청색)로서 분광기(LabScan XE, HunterLab, Reston, VA)를 사용하여 세 개의 색 변화를 분석했다. 100 ml의 펠렛을 무게재고 0.0001 m³로 질량(kg)을 나누어서 단위 밀도(UD)를 추산했다. 표중 방법 S269.4(ASAE 2003)에 따라 펠렛 내구성 표지(PDI)를 결정했다. PDI는 다음과 같이 계산되었다: PDI(%) = (Ma/Mb) x 100, Ma는 텀블링 후의 질량(g)이고 Mb는 텀블링 전의 질량(g)이다. 펠렛이 소비 될때까지 탱크 내에 침출되는 펠렛을 모방하기 위해서, 정적(Wstatic) 방법(Ferouz et al., Cereal Chem (2011) 88: 179-188)을 사용하여 펠렛 안정성(분)을 결정했다. 침출/초기 샘플의 건조 중량으로부터 중량의 손실로서 안정성을 계산했다. 종래의 캘리퍼스를 사용하여 펠렛 직경을 측정했다. TA.XT Plus Texture Analyzer(Scarsdale, NY)를 사용하여 압축 강도에 대하여 펠렛을 시험했다.

[0146] 사육 실험

[0147] 폐쇄-루프 채순환 양식 시스템(RAS)에 직렬로 연결된 28개의 원형 탱크(110 리터) 안으로, 탱크 당 21 마리의 황색 농어(2.95g ± 0.05 SE)를 무작위로 비축했다. 이중 고정물 섭 탱크(dual solids sup tanks), 생물 반응 장치, 비드 필터 (bead filter), UV 필터, 및 열 펌프로 구성된 원심분리 펌프를 사용하여 RAS 수류 (water flow) 및 질을 유지했다. 시스템 물은 탈염소되고 15,200 L 탱크에 저장되는 생활수 였다. 각각의 처치의 4회 반복을 탱크에서 무작위로 가했다. 수류를 ~1.5 L/분/탱크로 유지했다. 온도를 22°C ± 1° 로 유지했다. YSI Pro Plus(ellow Springs Instrument Company, Yellow Springs, OH)를 사용하여 온도 및 용존 산소를 측정했다. Hach DR 3900 분광광도계(Hach Company, Loveland, CO)를 사용하여 암모니아-질소, 아질산염-질소, 질산염-질소, 알칼리성(CaCO₃), 및 자유 염소를 시험했다.

[0148] 매일 2회씩 손으로 어류를 포화할때까지 먹이를 주었고, 먹이주는 비율을 탱크 무게, 관찰된 성장률, 및 사료 소비 평가에 따라 변경했다. 공급한 펠렛의 알려진 수와 공급 후 30분에 섭취하지 않은 펠렛의 수를 세어서 소비(%)를 추산했다. 섭취하지 않은 사료의 수거와 그의 건조 중량도 소비를 추산하기 위해 사용했다. 주간 탱크 소비 추산치를 주간 배급량과 곱해서 주간 소비(g)를 얻었다. 사료의 소비 양 또는 거부에 의해 처치의 기호성을 결정했다. 공급량을 조절하고 능력 지표를 계산하기 위하여 격주로 탱크 질량(+0.01g)을 측정했다. 각각의 처치에서 4마리의 무작위 샘플 어류 상에서 격주로 개개의 길이(mm) 및 중량(+0.01g)도 측정했다.

[0149] 사료요구율(FCR)을 하기와 같이 계산했다:

$$FCR = \frac{\text{소비된 사료의 질량(건조, g)}}{\text{성장(습윤, g)}}$$

[0150]

[0151] 단백질 전환율을 하기와 같이 계산했다:

$$PER = \frac{\text{성장(습윤, g)}}{\text{소비된 단백질 질량(건조, g)}}$$

[0152]

[0153] 폴턴-유형 조건 인자(Fulton-type condition factor)(K)를 하기와 같이 계산했다:

$$K = \frac{\text{중량(g)}}{[\text{길이(mm)}]^3} \times 10,000$$

[0154]

[0155] 특정 성장율(SGR)을 하기와 같이 계산했다.

$$SGR = \frac{[\ln(\text{최종 중량(g)}) - \ln(\text{시작 중량(g)})] \times 100}{n(\text{일})}$$

[0156]

[0157] 변화량의 분석(ANOVA, 선험적 $\alpha=0.05$)과 함께 식이 및 사육 실험 반응의 통계학적 분석을 수행했다. 유의성 F 검정은 처리 수단을 분리하기 위하여 포스트 hoc 터키 검정(post hoc Tukey's test) 후에 이어졌다.

[0159] 펠렛 및 공급 결과

[0160] 사료 제형은 실험 3(표 1)으로부터의 HQSPC 영양 성분 분석에 기초하였으며, 모든 콩 단백질 농축물은 실험 식이에서 45%(100%) 어분 대체물로 동등하게 포함되었다. 예정된 사육 실험 시작 날 후에 실험 5 및 6의 분석을 완료했으며(표 2), 일반적으로 유사한 결과를 얻었지만, 동질소(isonitrogenous) 식이에서는 그렇지 않았다. 식이는 7.91 내지 7.94 (kcal/g)의 에너지 대 단백질(E:P) 비율을 갖도록 42% 단백질 및 10% 지질을 함유하도록 제형화될 수 있다. 최근 분석은, 조질 단백질(dmb)이 44.9%(식이 1), 43.2%(식이 2 및 3), 36.8%(식이 4 및 5), 및 37.5%(식이 6 및 7)이었다고 보여줬다. 조질 지질은 모든 식이에 대하여 대략 10%였다. 사료의 아미노산 분석은, 황색 농어 필요 조건(표 3)과 비교할 때, 보충되지 않은 식이들 중에서 어떠한 잠재적 결핍도 드러내지 않았다.

표 3

[0161]

표 3. 실험 디자인, 식이 제형, 및 농어 사육 실험을 위한 조성물							
식이 #							
성분(g/100g, dmb)	1	2	3	4	5	6	7
청어 어분 ^a	50.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
상업적 SPC	0.0	45.0	45.0	0.0	0.0	0.0	0.0
HQSPC 실험 5	0.0	0.0	0.0	45.0	45.0	0.0	0.0
HQSPC 실험 6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	45.0	45.0
황색 옥수수글루텐 ^b	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
밀가루 ^c	18.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0	21.0
밀글루텐 ^b	6.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
CMC ^d	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Celufil ^d	3.7	3.6	3.6	3.5	3.0	3.5	3.0
청어유 ^e	4.59	8.19	8.19	8.37	8.37	8.37	8.37
아마유 ^e (flax oil)	0.51	0.91	0.91	0.93	0.93	0.93	0.93

비타민 기혼합물 ^g	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
비타민 기혼합물 ^h	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
비타민 C ⁱ	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
콜린 ^j	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
피타아제 ^k	0.037	0.037	0.037	0.037	0.037	0.037	0.037
맥주 효모 ^l	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
L-리신 ^j	0.0	0.0	0.3	0.0	0.3	0.0	0.3
L-베타인 ^j	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
L-메티오닌 ^j	0.0	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2
염화나트륨 ^m	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
염화칼륨 ^m	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
산화마그네슘 ^m	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
인산칼슘 ^m	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
예상된 일반 조성물							
단백질(%)	42.1	42.2	42.7	42.0	42.5	42.0	42.5
지질(%)	10.06	10.01	10.01	10.03	10.03	10.03	10.03
회분(%)	4.46	3.46	3.46	3.46	3.46	3.46	3.46
총 에너지(kcal)	334.3	334.3	337.1	333.5	336.3	333.5	336.3
E:P(kcal/g)	7.94	7.93	7.94	7.91	7.94	7.94	7.91

[0162] ^a Special Select, Omega Protein, Houston, TX; ^b Consumers Supply Distribution, Sioux City, IA; ^c Bob's Red Mill Natural Foods, Milwaukie, OR; ^d USB Corporation, Cleveland, OH; ^e Virginia Prime Gold, Omega Protein, Houston TX; ^f Thomas Laboratories, Tolleson, AZ; ^g ARS 702 Premix, Nelson and Sons, Murray, UT; ^h SS #3 Trace Mix, Nelson and Sons, Murray, UT; ⁱ U.S. Nutrition, Bohemia, NY; ^j Pure Bulk, Roseburg, OR; ^k DSM Nutritional Products, Parsippany, NJ; ^l Diamond V Mills, Cedar Rapids, IA; ^m Fisher Scientific, Pittsburg, PA.

[0164] 펠렛 사료는 직경을 제외한 처리들 중에서 측정값에 현저한 차이를 보였다(표 4).

표 4

[0165]

표 4. 사료 압출물의 물리적 특성							
식이 #							
특성	1	2	3	4	5	6	7
MC(%db)	8.5±0.2 ^a	11.0±0.3 ^b	11.0±0.1 ^b	14.1±0.1 ^c	9.9±0.1 ^d	10.1±0.1 ^d	12.2±0.1 ^e
a _w (-)	0.58±0.02 ^a	0.67±0.00 ^b	0.69±0.00 ^c	0.68±0.00 ^b c	0.68±0.00 ^b c	0.68±0.00 ^b c	0.74±0.01 ^d
BD(kg/m ³)	634.8±3.0 ^a	648.6±3.2 ^b	659.4±2.4 ^b c	675.4±0.5 ^d	688.9±0.6 ^e	669.3±2.8 ^c d	695.9±2.2 ^e
CS(g)	24.4±0.7 ^a	56.1±1.8 ^b	42.9±2.3 ^c	44.9±3.8 ^{bc}	54.8±2.3 ^b	67.0±2.2 ^b	60.1±3.9 ^b
PDI(%)	98.1±0.4 ^a	98.1±0.8 ^a	98.1±0.7 ^a	98.3±0.3 ^a	99.3±0.3 ^b	99.5±0.2 ^b	99.5±0.3 ^b

WSI _{still} (%)	10.2±0.0 ^{ab}	11.9±0.0 ^a	9.1±0.0 ^{ab}	8.9±0.0 ^{ab}	9.1±0.0 ^{ab}	8.2±0.0 ^{ab}	6.7±0.0 ^b
L(-)	47.9±0.2 ^a	58.5±0.1 ^b	68.5±0.5 ^c	59.9±0.3 ^{bd}	53.7±0.2 ^e	60.6±0.3 ^d	63.8±0.4 ^f
a(-)	5.2±0.0 ^a	2.8±0.0 ^b	3.2±0.1 ^c	4.3±0.0 ^d	4.4±0.0 ^d	2.9±0.0 ^b	2.9±0.0 ^b
b(-)	22.8±0.1 ^a	18.1±0.1 ^b	20.2±0.1 ^c	22.8±0.1 ^a	21.4±0.1 ^d	20.3±0.0 ^{ce}	20.7±0.1 ^e
Dia.(mm)	2.2±0.0 ^a	2.1±0.1 ^a	2.1±0.0 ^a	2.0±0.0 ^a	2.0±0.0 ^a	2.0±0.0 ^a	2.0±0.0 ^a

[0166] 주어진 값들은 처리 수단과 연관된 평균(±SE)이다. 현저히 다르지 않은 값들(P>0.05)은 주어진 열 내에서 동일한 문자로 표시했다. MC(%db)=수분 함량; a_w(-)=수분 활성; BD(kg/m³)=단위 밀도; CS(g)=압축 강도; PDI(%)=펠렛 내구성 지표; WSI_{still}(%)=생수에서의 수용성 지표; L(-)=Hunter 밝기; a(-)=Hunter 황색; b(-)=Hunter 붉은색; Dia.(mm)=직경.

[0168] 수분 함량(MC)는 약 8.49%(식이 1) 내지 약 14.07%(식이 4)의 범위이다. MC는 PDI, 압축 강도 및 색과 같은 다른 특징에 미치는 영향에 기여한다. MC 및 다른 변수들 간의 뚜렷한 관련성이 식별되지 않았다.

[0169] 수분 활성(펠렛에서 결합되지 않은 물의 측정 값)은 높았고(약 0.58 내지 약 0.74), 식이 1(어분)에서는 현저히 낮았고(약 0.58), 식이 7에서는 모든 다른 처리에 비해 현저히 높았다(약 0.74). 0.6을 초과하는 값들은 낮은 저장 안정성을 지시하고, 미생물 성장을 급증하게 할 수 있다. -20℃에서 냉동기에 사료들을 저장했다.

[0170] 단위 밀도(BD)(단위 부피 당 사료 중량의 측정 값)는 약 634.87 내지 약 695.9 범위이다. 식이 1(어분)은 낮은 DB를 갖고, 이론에 속박되지 않지만, 이는 어유 및 어분의 낮은 함유량 때문인 것 같다. 콩 단백질 농축물 식이는 높은 BD를 갖는데, 그 이유는 그들이 더 많은 오일을 함유하여 지질 요구를 수정하기 때문이다.

[0171] 압축 강도(CS)는 수직축 방향으로부터의 응력-변형 곡선의 피크 파괴력으로서 계산되었다. CS는 약 24.36 내지 약 67.03으로 현저하게 변화했다. 식이 1(어분)은 가장 낮은 압축 강도(약 24.36)를 보였다. 이론에 속박되지 않지만, 이는 펠렛의 이질성에 가장 기여하는 것으로 보이며, 이런 이질성은 펠렛화 공정(예, 압출되기 보다는 나사 압착)의 결과이다. 압출은 수분, 압력, 온도 및 기계적 전단과 함께 사료를 증자한다. 이 공정은 CS를 실질적으로 증가시킬 수 있는 전분을 젤라틴화한다.

[0172] 펠렛 내구성 지표(PDI)는 모든 식이에서 매우 높으며(약 98.04% 내지 약 99.48%), 처리들 사이에 유의한 차이가 없다. 이러한 높은 PDI 값은 높은 MC 뿐만 아니라 카복시메틸셀룰로오스(CMC) 바인더 첨가의 결과일 수 있다.

[0173] 수용해성 지표(WSI)는 모든 식이에서 낮았으며(약 9.65 내지 약 14.43), 식이 4는 가장 높은 값을 보이며, 약 9.65로 가장 낮은 식이 7와 유의한 차이를 보였다. 압출된 사료에 비해 나사-압착된 사료의 성질 때문에, WSI는 낮을 것으로 예측된다. 압출된 사료는 수분 침투를 감소시키는 전분의 젤라틴화 때문에 더 물에서 안정하다.

[0174] Hunter 색 파라미터(L, a, b)는 성장 능력과 유사성을 보였다. Hunter a(적색)는 식이 1에서 가장 높았고(5.15), 식이 2에서 가장 낮았고(2.80), Hunter b(황색)는 식이 4(22.81)에 및 식이 1(22.76)에서 가장 높았고, 식이 2에서 가장 낮았다(18.07). Hunter L(밝음)은 식이 3에서 가장 높았고(68.48), 식이 1에서 가장 낮았다(47.91). 열은 색의 사료는, 어두운 사료에 비해 리신의 더 높은 농도를 함유하고 더 큰 이용율을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0176] 어류 능력(fish performance)

[0177] 식이 6은 성장 능력에서 식이 1(어분)에 대해 가장 비교되는 결과를 제공했다. 성장 능력은 모든 카테고리에서 처리들 간에 유의한 차이를 보였다(표 5).

표 5

[0178]

표 5: 능력 양태							
식이	WG	SGR	S	TC	FCR	PER	K

1	102.1±8.0 ^a	1.66±0.1 ^a	100.0±0.0 ^a	450.2±5.8 ^a	1.27±0.05 ^a	1.76±0.06 ^a	1.06±0.01 ^a b
2	12.6±6.4 ^b	0.55±0.12 ^b	82.3±0.6 ^b	140.9±4.7 ^b	2.59±0.49 ^b	0.98±0.17 ^b	1.01±0.02 ^a
3	23.7±1.3 ^{bc}	0.59±0.04 ^b c	96.4±0.3 ^a	181.6±2.5 ^b c	2.0±0.09 ^{ab}	1.17±0.06 ^b	1.02±0.03 ^a b
4	46.6±8.3 ^{cd}	1.06±0.12 ^c	94.1±0.5 ^{abc}	283.4±8.9 ^b c	1.6±0.04 ^a	1.7±0.04 ^a	1.11±0.04 ^a b
5	49.1±11.0 ^c d	1.10±0.14 ^d	92.9±0.3 ^{abc}	306.3±11.2 ^{ac}	1.73±0.10 ^a b	1.59±0.10 ^a	1.14±0.03 ^b
6	84.4±2.4 ^{ae} d	1.48±0.05 ^a d	98.8±0.3 ^{ac}	451.5±13.4 ^a	1.43±0.04 ^a	1.87±0.05 ^a	1.07±0.03 ^a b
7	61.8±4.8 ^{de} d	1.28±0.12 ^a d	94.1±0.6 ^{abc}	338.1±10.8 ^{ac}	1.58±0.03 ^a	1.69±0.03 ^a	1.06±0.02 ^a b

[0179] 실험 식이가 공급된 농어에 대한 평균 중량 증가(WG, %), 특정 성장율(SGR), 생존률(S, %), 총 소비량(TC, g), 식품 전환율(FCR), 단백질 효율비(PER), 및 폴턴-유형 조건 인자(K)(Fulton-type condition factor) 값. 주어진 값들은 처치 수단과 연관된 평균(±SE)이다. 유의하게 다르지 않은 값(P>0.005)은 주어진 컬럼에서 동일한 문자를 가진다.

[0181] 식이 6 및 7을 제외하고, 보강된 식이(식이 3 및 5)는 비-보강된 것보다 약간 나왔다. 식이 6은 모든 면에서 식이 7을 능가했다. 이론에 구속되지 않지만, 이는 결정형의 아미노산 보충제의 생체이용률과 연관된 시기 문제의 결과일 수 있다.

[0182] 중량 증가(WG)는 식이 1에 대해 가장 높고(102.1%에서의 어분), 그 다음으로 식이 6 및 7이 높다(각각 84.4% 및 61.8%). 식이 2 및 3(상업적 SPC)은 가장 낮은 WG를 보였다(각각 12.62% 및 23.69%). 특정 성장율(SGR)은 WG 결과와 매우 유사하다. SGR은 식이 1에서 가장 높았고(1.66) 식이 2에서 가장 낮았다(0.55).

[0183] 단백질 효율비(PER)는 식이 6에서 가장 높았고(1.87), 그 다음으로 식이 1 (1.76) 및 식이 4(1.70)순으로 높았다. 식이 2 및 3은 가장 낮은 PER, 0.98 및 1.17을 각각 가졌다. PER은 보강된 식이 5 및 7에 비해 비-보강된 식이 4 및 6에서 더 좋았다.

[0184] 사료 요구율(FCR)은 유사한 패턴을 따랐으며, 식이 1 및 식이 6이 가장 낮았다(각각, 1.39 및 1.59). 이러한 FCR 값은 매우 높은 영양 성분 사료 품질을 나타낸다. 식이 2 및 3은 가장 높은 FCR을 가졌다(각각, 2.91 및 2.24).

[0185] 총 소비(dmb)는 식이 6(451.5 g) 및 식이 1(450.20 g)에서 가장 높았고, 식이 2(140.91 g) 및 식이 3(181.60 g)에서 가장 낮았다. 모든 식이는 포만하도록 공급되었다. 식이 소비는 기호성의 표시로 여겨졌으며, 이는 식이 2 상의 어류의 현저히 낮은 생존율(82.29%)에 대한 이유이기도 하다. 식이 1에 대한 생존율은 100%이고, 식이 6에 대해서는 98.81%이다.

[0186] 폴턴 조건 인자(K)는 식이 5에서 가장 높았고(1.14), 식이 2에서 가장 낮았다(1.01). 모든 HQSPC 식이는 이런 특정 능력 파라미터에 대하여 어분 대조군과 동일하거나 이를 초과했다. 상업적 SPC 식이는 모든 다른 식이에 비해 낮았다.

[0188] 다른 분석

[0189] 실험 분석의 말기에는, 검시를 통해 영양 성분 결핍에 대한 최종 성장, FCR, PER, 소비, 및 시험을 포함할 수

있다. 혈장 분석은 표준 방법을 사용하여 리신 및 메티오닌에 대해 완료될 수 있다. 개개의 어류는 근육 비율, 간 중량 지수 (hepatosomatic index), 내장체성 지수(viscerosomatic index), 필릿 조성물 (fillet composition), 및 후장 조직학(hind gut histology)(장 염증 점수)을 정량하기 위해 경부의 탈구에 의해 안락 사시킬 수 있다. 실험 식이의 단백질 및 에너지 이용률은 사료 및 배설물 재료 내에서 크롬 산화물(CrO₃) 표지를 사용하여 추정될 수 있다. 배설물 재료는 하부 장관으로부터 검사를 통해 수집될 수 있다.

[0190] 시험 식이 내의 영양 성분에 대한 뚜렷한 소화율 계수(ADC)는 하기 식을 사용하여 계산될 수 있다:

$$ADC_{\text{시험 성분}} = ADC_{\text{시험 식이}} + \left[(ADC_{\text{시험 식이}} - ADC_{\text{기준 식이}}) \times \left(\frac{0.7 \times D_{\text{기준}}}{0.3 \times D_{\text{성분}}} \right) \right]$$

[0191]

[0192] $D_{\text{기준}}$ =기준 식이 메쉬의 영양 성분(kJ/g 총 에너지)% 및 $D_{\text{성분}}$ =시험 성분의 영양 성분(kJ/g 총 에너지)%.

[0194] 요약

[0195] 황색 농어에 대한 나사-압착된 화합물 사료는 두 개의 HQSPC 식이, 대조군 어분, 및 상업적 콩 단백질 농축물 (SPC)를 사용하여 예시되었다. HQSPC-계 식이는 어분에 대해 비견할만한 능력을 가지며, 상업적 SPC를 증가한다. 성장 및 전환 능력은 예상을 뛰어넘으며, HQSPC 식이에서 주어진 조질 단백질 함량은 어분 대조군 보다 적은 대략 7%이고, 상업적 SPC에 비해 적은 6%이다. 따라서, HQSPC 식이는 어분에 대한 완전 대체물로서 역할할 수 있다.

[0197] 무지개 송어에서 어분 대체물로서 HQSPC의 능력 평가

[0198] 상기 황색 농어 결과 이외에, 90일 사육 실험은 양식 무지개 송어 계통(Shasta)을 사용하여 수행되었다. 표 6 은 어류 종 및 크기에 의해 단백질 대상들을 요약한다. 이러한 식이 단백질 대상 또는 수준(%)은 이러한 상업 적으로 중요한 물고기를 위한 실험 식이의 제형으로 사용될 수 있다.

표 6

[0199]

표 6. 다양한 물고기에 대한 중량 범위에 따른 단백질 대상					
	중량 범위(g)				
종	<20	20-200	200-600	600-1,500	>1,500
대서양 연어	48	44	40	38	34
태평양 연어	55	45	40	38	38
무지개 송어	48	40	38	38	36
얼룩메기	44	36	32	32	28
역돔	40	34	30	28	26

[0200] 송어에게 대조군 어분 식이 또는 어분(식이 2 - 35% 포함)의 70%가 HQSPC 생성물(실험 6)로 교체된 식이를 공급 했다(표 7 참조).

표 7

[0201]

표 7. 무지개 송어 사육 실험에서 사용된 시험 식이 제형		
성분(g)	식이 1	식이 2
오메가 프라임 스페셜 셀렉트(omega prime special select)	40	15
HQSPC	0	35
황색 옥수수글루텐	20	16
밀가루	15	11
카복시메틸셀룰로오스	6.7	3
비타민 기혼합물	1.5	1.5

미량무기물 기혼합물	1.5	1.5
스테이-C(Stay-C)	0.5	0.5
DVAqua	0.1	0.1
메티오닌	0	0.2
염화나트륨	0.5	0.5
염화칼륨	0.5	0.5
마그네슘 산화물	0	0
인산칼슘	0	0.5
청어유	13.7	14.7
일반 구성요소		
단백질	42.87	42.89
지방	16.37	16.38
섬유질	0.61	2.14
회분	12.31	8.15
Kcal	398.54	398.68
E:P	9.30	9.29

[0202] 35% 함유 수준은 Selecta SPC60과 같은 다른 콩 단백질 농축물에 대해 권장된 30% 함유를 초과하도록 사용되었다. 등열량, 등질소의 식이를 사용하는 이런 실험은 제공된 대조군과 시험 식이 사이의 동등한 능력을 증명했다.

[0203] 표 8은 90일 사육 실험 도중에 관찰된 무지개 송어 능력 특징을 요약한다. HQSPC를 함유하는 식이 2는 중량 증가 또는 사료요구량/효율에 감소를 보이지 않았고, 치사율이 없었다(100% 생존). 이러한 관찰은 황색 농어 실험에서 관찰된 결과를 반복 검증한다.

표 8

[0204]

표 8. HQSPC를 사용하는 무지개 송어에 대한 능력 실험		
FM:HQSPC(%)	식이 1(40:0)	식이 2(15:35)
시작 중량(g)	795±67	882±44
종료 중량(g)	3,400±216	3,706±172
증가분(g)	2,605±149ab	2,824±133a
증가율(%)	327.7	320.2
공급된 사료량(g)	3,608±189	3,880±68
FCR	1.39±0.06a	1.38±0.07a
치사율(%)	0.0±0.0	0.0±0.0

[0205] 주어진 값들은 처리 수단과 연관된 평균(±SE)이다.

[0207] 요약

[0208] 무지개 송어를 위한 나사-압착된 화합물 사료는 HQSPC 식이 및 대조군 어분을 사용하여 예시되었다. 이 실험에서, HQSPC-계 식이는 어분에 대해 비견할만한 능력을 가졌다. 또한, 이러한 데이터는 HQSPC 식이가 SPC를 사용하는 예상된 결과를 초과했다는 것을 보여주고(예, HQSPC는 30% 함유 수준보다 큰 농도로 사용될 수 있다), 어분에 대한 효과적인 대체물로서 역할할 수 있다는 것을 보여준다.

[0210] 실시예 2. 미생물 전환을 이용하는 HP-DDGS의 제조

[0211] 원통 길이 대 나사 직경이 1:20이고 압축비가 3:1인 단일 나사 압출기 (BRABENDER PLASTI-CORDER EXTRUDER Model PL2000, Hackensack, NJ)를 사용하여 DDGS의 당화를 개선하는데에 압출이 미치는 효과를 연구했다(도 4 및 5). 25% DDGS 수분 함량, 100℃ 내지 160℃의 온도, 및 200 rpm의 나사 속도가 옥수수 섬유질로부터 36% 당 회수를 가져온다고 알아냈다(도 5). 다양한 NOVOZYME 리그노셀룰로오스 분해 효소의 능력은 별도로 평가되었고, 6% CELLIC CTEK2(글루칸 gm 당) 및 0.3% CELLIC HTEK2 (총 고형물 gm 당)은 최대 70%의 당 회수율을 가져왔다.

이러한 기체치 및 당화 조건은 HP-DDGS를 생성시키는데에 사용될 수 있다. 첨가된 효소에 대한 필요를 감소시키기 위해 셀룰라아제-생산자와 공-배양하는 것과 같은 다음 옵션이 수행될 수 있을 뿐만 아니라, 공정 비용을 감소시키기 위해 페드-배치 생물 반응 장치가 사용될 수 있다.

[0212] 콩가루에서 발견된 탄수화물 상에서 미생물의 성장 및 검 생산을 평가하는 것이 수행될 수 있고, 단백질 함량은 본원에 개시된 접근법을 사용하여 42%로부터 적어도 60%로 증가될 수 있다. 이는, 미생물(예, 아우로바시디움 폴루란스)이 올리고사카라이드를 세포량(즉, 단백질) 및 미생물 검으로 대사하기 많은 어려움을 효율적으로 전환할 수 있다고 보여졌다. 콩가루에서의 이러한 노력은, 전 증류 폐액, 묽은 폐액, 및 응결된 옥수수 용해물과 같은 옥수수 가공 부산물로부터 미생물 검(엑소폴리사카라이드)들의 생산을 평가했던 이전 연구에서부터 시작되었다. 이러한 작업을 통해서, 다양한 미생물 균주들은 축적되고, 다양한 옥수수 가공 부산물 상에서 효율적으로 성장하고 가용성 당으로부터 세포량 및 검의 높은 수준을 생산한다. 핵심 조작 파라미터 및 저-비용 검 회수 방법은 확인되고 개발되어왔다. 이런 많은 양의 작업, 및 미생물의 균주가 광범위한 가수분해 효소를 생산한다는 지식에 기초하여, DDGS를 HP-DDGS(예, 아우로바시디움 폴루란스 균주 NRRL No. 50793)으로 효율적으로 전환하게 하는 확고한 공정이 확인되었다.

[0213] 기체치에 대하여, 종래의 건조분별된 및/또는 저 오일 DDGS는 원통 길이 대 나사 직경이 1:20이고 압축비가 3:1 인 단일 나사 압출기(BRABENDER PLASTI-CORDER EXTRUDER Model PL2000, Hackensack, NJ)에서 압출된다. DDGS 샘플(25% 수분으로 조절됨), 사료, 원통, 및 압출기의 배출부의 온도는 100℃ 내지 160℃로 유지되고, 나사 속도는 200rpm으로 세팅되어, 원통의 양측 상에서 리지형 채널(ridged channels)에 대하여 전단 효과를 제공한다. 이러한 선택된 수준의 온도, 나사 속도 및 수분은, DDGS 매트릭스의 붕괴에 의한 옥수수 섬유질로부터 36%의 당 방출을 야기했던 이전 결과에서 정의된 최적화 조건에 기초했다.

[0214] 압출된 종래의 그리고 건조분별된 DDGS는 물과 혼합되어, 5L NEW BRUNSWICK BIOFLO 3 BIOREACTOR(3-4 L 작업 부피)에서 pH 5.8에서 적어도 5%의 고체 부하율을 달성했다. 고압살균하고 냉각한 후에, 슬러리는 NOVOZYME 효소의 혼합제를 사용하여 당화되고, 이를 위해 예비 데이터는 사전에 수집되었다. 초기 실험에서 사용될 투여량은 6% CELLIC CTEK2 (글루칸 gm 당) 및 0.3% CELLIC HTEK2 (총 고형물 gm 당)를 포함한다. 당화는 50℃ 및 150 rpm에서 24시간 동안 수행되어, 섬유질 및 올리고사카라이드를 간단한 당으로 용해했다. 다음으로, 온도는 35℃로 감소되며, pH는 4.0으로 조절되고(세포 성장을 최적화함), 그리고 슬러리는 미생물의 24시간 배양 조직의 2% (v/v)로 접종된다. 슬러리는 0.5 L/L분으로 통기되고, 배양은 당 사용 중단시까지(96-120 시간 기대됨) 지속된다. 다음으로, 하기 파라미터는 평가된다:

[0215] 1) 미생물과 공동 배양되는 셀룰라아제 생산 미생물로 셀룰라아제 효소의 대체;

[0216] 2) 초기 고체 부하율을 최대화; 및

[0217] 당화 및/또는 미생물 전환 상(즉, 페드-배치 공정) 중 어느 하나의 과정 중에 더 압출된 기질을 첨가하여, 실질 효소 투여량을 최소화하고, 단백질 및 검 농도를 최대화하고, 생성물 회수 비용을 최소화하는 것.

[0218] 배양 과정 중에, 샘플을 6-12 시간 간격으로 제거했다. HPCL 분석을 위한 샘플을 가열하고(효수를 비활성화하기 위함), 원심분리하고, 0.22 μm 필터를 통해 여과하고, 오토 샘플러 유리병에 넣고, 분석할 때까지 냉동시켰다. WATERS HPLC 시스템을 사용하여 이러한 샘플들을 탄수화물 및 유기 용매에 대해 분석했다. 샘플은 미생물 모집단을 평가하기 위해 미생물 수를 받았다. 샘플은 국립 재생에너지 실험실 과정(National Renewable Energy Laboratory procedures)을 사용하여 셀룰로오스 및 헤미셀룰로오스의 수준에 대해서도 샘플을 분석했다.

[0219] 다음으로, 잔류 배양액으로부터 단백질, 미생물 검 및 미생물 바이오매스(HP-DDGS)를 분리하기 위하여, 전환된 슬러리를 에탄올 침전 및 원심분리 하였다. 이론에 구속되지 않지만, 침전 검의 존재는 현탁 고형물의 회수를 위한 원심분리의 효율을 개선한다. 다음으로, HP-DDGS의 조성물은 결정되고, 어류 사육 실험에서 사용된다. 에탄올은 증류를 통해 액체 스트림으로부터 회수되고, 잔류 액체는 가능한 용도들(예, HP-DDGS 또는 생물가스 생산에 포함됨)을 평가하기 위해 화학적으로 분석된다.

[0220] 이렇게 제조된 HP-DDGS는 결합제 및 잠재적으로 면역자극제로서 역할하기 위해 미생물 검을 함유한다. 미생물에 의해 분비된 다른 가수분해 효소는 펩티드, 아미노산, 및 임의의 잔류 지질을 방출할 것이며, 이에 의해 어류 사육 실험에서 사료 섭취량, 성장 능력, 및 영양 성분 사용은 증가했다.

[0222] 농어 사료에서 어분 대체물로서 HP-DDGS의 능력의 평가

- [0223] 종래의 그리고 건조분별된 HP-DDGS는 대상 종의 요구를 고려하여, 특히 황색 농어에 초점을 맞추어서 영양 성분 역량(nutritional competencies)에 대해 분석된다. 샘플들은 화학적 분석을 겪을 것이다: 일반적인 분석, Van Soest 섬유질, 불용성 탄수화물, 아미노산, 지방산, 및 미네랄. 이는 영양 성분 기준이 만족되는 것을 보장한다. HP-DDGS의 임의의 항-영양 성분 특성(예, 피트산 함량)은 현재의 DDGS와 비교되고, 추가적인 공정 변형을 위한 기준을 제공한다.
- [0224] 완전 실습용 식이는 황색 농어에 대한 알려진 영양 성분 요구(예, 42% 단백질, 8% 지질)에 따른 종래의 그리고 건조분별된 HP-DDGS를 사용하여 제형화된다. 식물계 식이에 대한 기준 미네랄 및 비타민 예비혼합물은 미량-영양 성분 요구가 충족되도록 사용된다. 임의의 보충제(분석에 의해 필요한 것으로 여겨진 것들)는 보충제를 포함하지 않은 동일한 제형에 대해 비교함으로써 평가된다; 따라서, 사육 실험은 보충제 효과를 설명하기 위한 요인 시험에서 이루어진다. 모든 사육 실험은 어분계 대조군 식이 및 등급별 HP-DDGS를 함유하는 식이를 포함한다. 사육 실험을 위한 펠렛은 실험실-규모의 단일 나사 압출기(BRABENDER PLASTI-CORDER EXTRUDER Model PL2000)를 사용하여 제조된다.
- [0225] 처치 당 4개의 실험 단위의 반복은 모든 사육 실험(각각에 대해 60 내지 120일)에서 사용된다. 실험은 원심 펌프에 의해 구동되며, 고품질 통(sump), 및 생물 반응 장치, 필터들(100 μ m 백(bag), 탄소 및 자외선)로 구성되는 폐쇄-루프 재순환 시스템에 직렬로 연결된 110-L 원형 탱크(20 어류/탱크)에서 수행될 수 있다. 열 펌프는 종-특유 성장을 위한 최적 온도를 유지하기 위해 필요에 따라 사용될 수 있다. 물 품질(예, 용존 산소, pH, 온도, 암모니아 및 아질산염)은 모든 시스템에서 모니터링될 수 있다.
- [0226] 실험용 식이는 어류 크기에 따라 2 내지 5개의 식이 사료로 분리되어 전달된다. 성장 능력은 1 내지 4주에서 섭취된 총 질량 측정에 의해 결정되며(어류 크기 및 실험 기간에 따름); 배급량은 포식하여 체중이 증가하고 낭비 스트림이 감소되도록 조절된다. 소비는 개개의 탱크로부터 섭취되지 않은 사료의 수집으로부터 격주로 평가된다. 섭취되지 않은 사료는 항온에서 건조되고, 냉각되고, 전환 효율을 추산하기 위해 무게를 잰다. 단백질, 에너지 및 인 소화율은, 각각의 실험의 중간지점 중에 손으로 분리한 대변으로부터 또는 사육 실험의 종료 시점에서 하부 장관으로부터 검사를 통해 결정된다. 생존률, 체중 증가, 성장율, 건강 지표, 사료 요구율, 단백질 및 에너지 소화율, 단백질 효율 및 인 활용은 처치 그룹들 중에서 비교된다. 검시된 어류의 일반적인 분석은 식이 처치들 중에서 살코기의 조성물을 비교하기 위해 이루어진다. 아미노산 및 지방산의 분석은 사육 분석 목적에 따라 살코기 성분에 대해 필요에 따라 이루어진다.
- [0227] 식이 및 사육 실험 반응의 통계적 분석은 선형적 $\alpha=0.05$ 로 완료된다. 처치들 중에서 능력 파라미터의 분석은 분산 또는 공분산의 적절한 분석(Proc Mixed) 및 필요한 만큼의 포스트 혹 다중 비교(post hoc multiple comparisons)를 이용하여 수행될 수 있다. 어류 행동 및 조직 반응의 분석은 비선형 모델에 의해 평가될 수 있다.
- [0229] 예비 질량 균형, 에너지 요구, 및 비용을 결정.
- [0230] 종래의 그리고 건조분별된 HP-DDGS 전환 공정의 주입량 및 배출량은 모니터링되고, 공정 질량 균형을 밝히기 위하여 사용된다. 유사하게, 공정에 대한 에너지 요구는 총 에너지 사용을 계산하기 위하여 측정되고/측정되거나 산출된다. 더불어, 이러한 주입량은 예비 비용을 평가하기 위해 사용되며, 이는 종래의 그리고 건조분별된 HP-DDGS 값과 비교된다.
- [0231] 본원에 인용된 모든 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 포함된다.
- [0232] 상기 논의로부터, 통상의 기술자는 본 발명의 필수적인 특징을 알아낼 수 있고, 본 발명의 사상 및 범위로부터 벗어나지 않고, 통상의 기술자는 다양한 사용 및 조건에 적합하도록 실시예의 다양한 변화 및 변형을 이룰 수 있다. 따라서, 본원에 보여지고 설명된 것 외에, 실시예의 다양한 변형은 진술한 기재로부터 통상의 기술자에게 자명할 것이다. 또한, 이러한 변형은 첨부된 청구항의 범위 내에 속하는 것으로 사료된다.

수탁번호

- [0233] 기탁기관명 : Agricultural Research Culture Collection
수탁번호 : NRRL50792

수탁일자 : 20121130

기탁기관명 : Agricultural Research Culture Collection

수탁번호 : NRRL50793

수탁일자 : 20121130

기탁기관명 : Agricultural Research Culture Collection

수탁번호 : NRRL50794

수탁일자 : 20121130

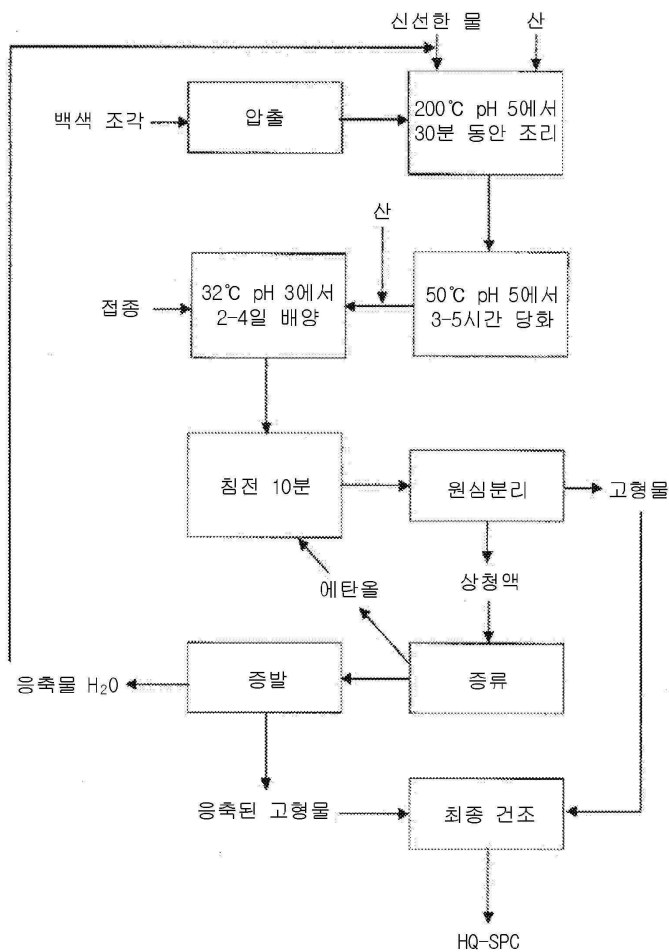
기탁기관명 : Agricultural Research Culture Collection

수탁번호 : NRRL50795

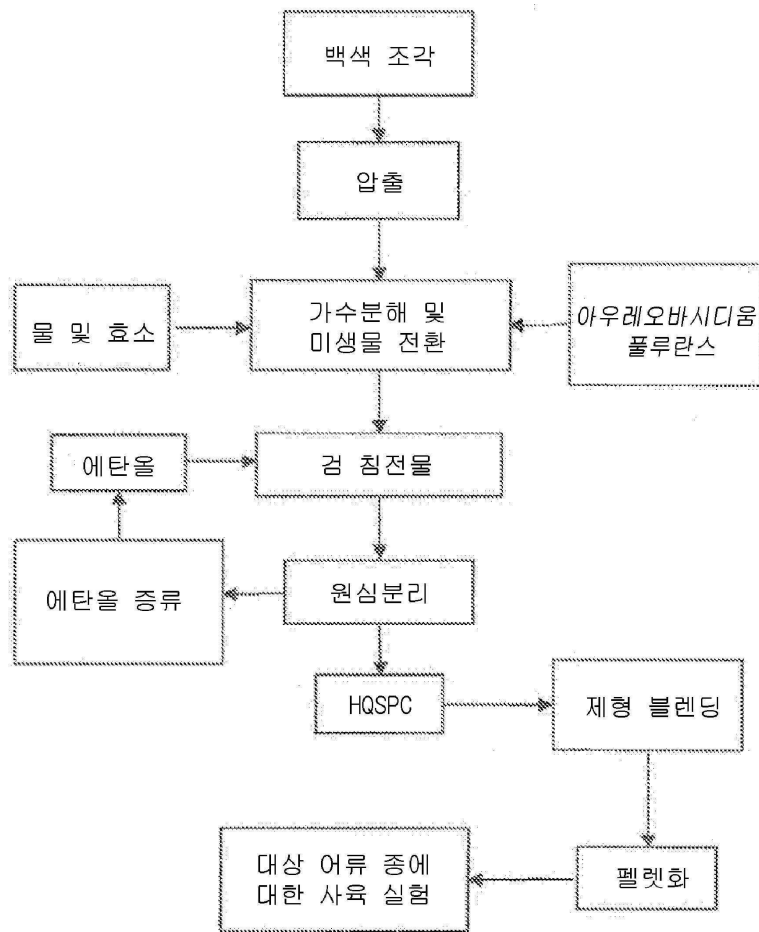
수탁일자 : 20121130

도면

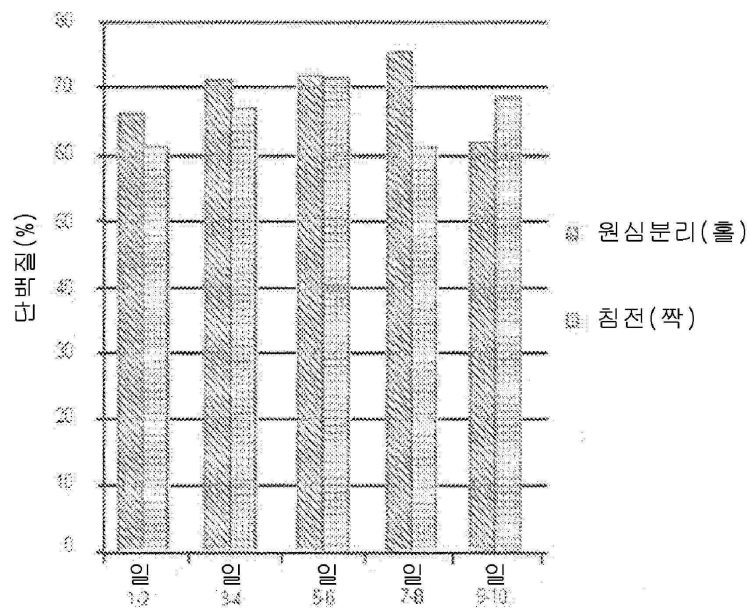
도면1



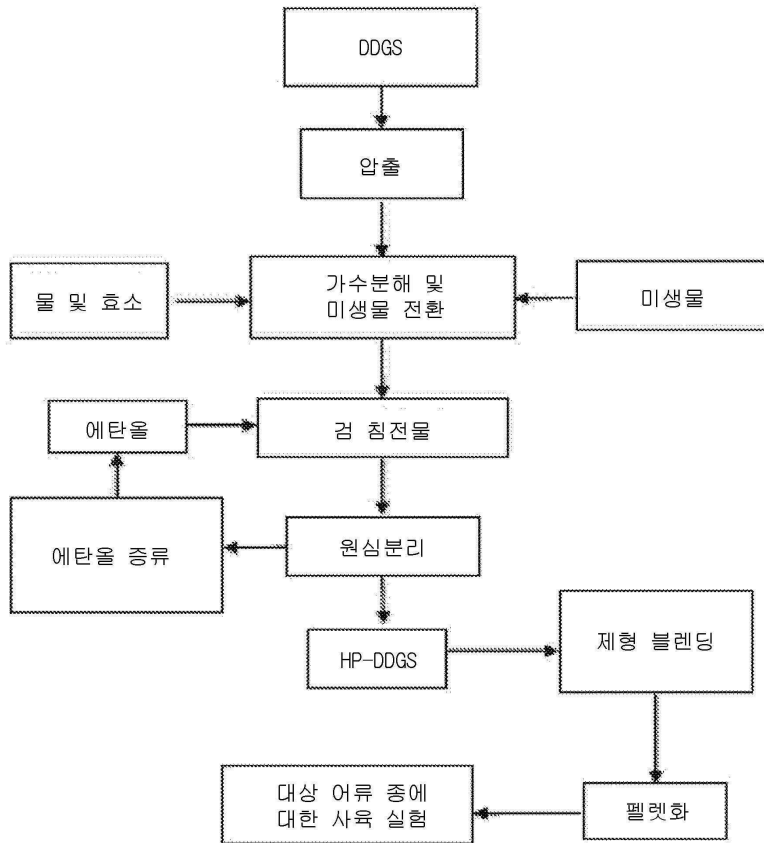
도면2



도면3



도면4



도면5

