(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0015173
(43) 공개일자 2020년02월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23K 10/18 (2017.01) *A01K 61/95* (2017.01)
A23K 50/80 (2016.01) *C12N 1/20* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23K 10/18 (2016.05)
A01K 61/95 (2017.01)
(21) 출원번호 10-2018-0090632
(22) 출원일자 2018년08월03일
심사청구일자 2018년08월03일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
배승철
부산광역시 해운대구 좌동순환로99번길 6, 304동 1501호(좌동, 대림3차아파트)
(74) 대리인
위병갑

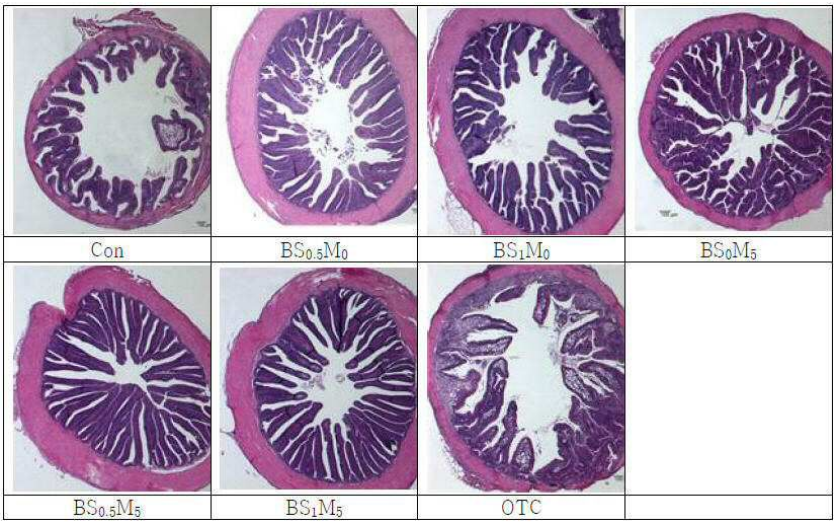
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **뱀장어 사료내 항생제 대체를 위한 신바이오틱스 개발**

(57) 요 약

본 발명은 바실러스 균주(*Bacillus*) 및 MOS(mannan oligosaccharide)를 유효성분으로 포함하는 양식어류용 사료 첨가제 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 사료 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23K 50/80 (2016.05)
C12N 1/20 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 CD20160751
부처명 교육부
연구관리전문기관 연구재단
연구사업명 이공학개인기초연구지원사업-지역대학우수과학자지원사업
연구과제명 뱀장어 사료내 항생제 대체를 위한 토착 probiotics 및 적정 prebiotics 선별과 synbiotics 개발
기 여 율 1/1
주관기관 부경대학교
연구기간 2015.06.01 ~ 2018.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

바실러스 균주(*Bacillus*) 및 MOS(mannan oligosaccharide)를 유효성분으로 포함하는 양식어류용 사료 첨가제 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 바실러스 균주는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 바실러스 균주의 농도는 0.5 내지 1×10^{7} CFU/g 인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 MOS의 농도는 1 내지 10 g/kg 인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 MOS의 농도는 5 g/kg 인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 사료 첨가제는 병원성 세균의 체내 증식을 억제하는 것을 특징으로 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 어류는 뱀장어, 민물장어, 바다장어, 방어, 참돔, 넙치, 가자미 및 우럭으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 1 항의 사료 첨가제 조성물을 포함하는 양식어류용 사료 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 사료 첨가제는 전체 사료 조성물의 100 중량부 기준으로 0.01 내지 10 중량부의 양으로 포함되는 것을 특징으로 조성물.

청구항 10

제 8 항에 있어서,

상기 어류는 뱀장어, 민물장어, 바다장어, 방어, 참돔, 넙치, 가자미 및 우럭으로 이루어진 군에서 선택되는 어

느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제 1 항의 사료 첨가제 조성물 또는 제 8 항의 사료 조성물을 양식어류에 급이하는 단계를 포함하는 양식어류의 사육 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 어류는 뱀장어, 민물장어, 바다장어, 방어, 참돔, 넙치, 가자미 및 우럭으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 1 항의 사료 첨가제 조성물 또는 제 8 항의 사료 조성물을 양식어류에 급이하여 어류 병원성 세균에 대한 면역력을 증가시키는 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

상기 어류 병원성 세균은 에드워드시엘라 타르다 (Edwardsiella tarda), 스트렙토코커스 이니애 (Streptococcus iniae), 비브리오 앙귈라리움 (Vibrio anguillarium), 비브리오 캄프벨리 (Vibrio campbellii), 비브리오 할베이 (Vibrio harveyi), 비브리오 퍼니시 (Vibrio furnisii) 및 스트렙토코커스 파라우베리스 (Streptococcus parauberis)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 바실러스 균주(*Bacillus*) 및 MOS(mannan oligosaccharide)를 유효성분으로 포함하는 양식어류용 사료 첨가제 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 사료 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 뱀장어는 국내 담수 양식생산 1위(11,067톤/3000억원, 수산정보포털)인 대표적 담수 어종이다. 2017년도에는 꾸준한 수요증가와 실뱀장어 입식량 증가로 인해서 작년 대비 약 12% 증가한 11,067톤이 생산되었으며, 뱀장어 종묘생산 기술개발, 배합사료 개발, 사육기술개발에 관한 연구들이 활발히 진행됨에 따라 지속적으로 생산량이 증가할 것으로 예상된다. 하지만, 대부분의 뱀장어 양식장에서는 고밀도양식에 따른 스트레스, 먹이 경쟁 및 사육수의 오염으로 인해 질병 등 부작용이 나타나고 있다.

[0003] 최근까지, 이 같은 고밀도양식의 문제를 해결하기 위해 강력한 항생제들이 사용 되어왔지만, 양식 어패류 내의 잔류항생제 문제, 생사료 사용과 고밀도 양식으로 인한 빈번한 질병발생 그리고 양식 수산물의 안정성 문제 등으로 국내에서는 2011년 7월 1일부터 양어사료를 포함한 모든 동물사료에 수의사와 수산질병관리사의 치료를 위한 처방이외의 목적에는 항생제를 사용하지 못하도록 법으로 규제하였다. 하지만, 많은 양식장에서 아직도 항생제를 무분별하게 사용하는 것이 현실이다.

[0004] 따라서, 항생제를 대체 할 수 있는 사료 첨가제의 개발이 매우 시급한 실정이다. 이에 항생제를 대체하기 위하여 본 발명에서는 국내 최초 뱀장어 장 내 토착 균 스크리닝을 통한 프로바이오틱스(probiotics)를 설정하였고, 그 활성을 증진시키는 프리바이오틱스(prebiotics)를 선택하여 뱀장어의 성장, 사료효율을 증대시키킬 뿐 아니라 내병성 증대 및 장 기능향상에 좋은 효과를 가지며 항생제를 대체할 수 있는 신바이오틱스(synbiotics)를 개발하였다.

[0005] 프로바이오틱스(probiotics)는 장내 유해균의 번식 억제, 소화 흡수율 증가, 면역력 증가 효과를 가지며 증체율을 향상시킨다. 뿐만 아니라 비특이적 면역기능 강화, 항산화작용 및 장내 독소 제거 등을 통해 다양한 어류와 육상동물에 있어서도 많은 효과를 보이고 있다. 프리바이오틱스(prebiotics)는 당의 일종으로 장내 프리바이오

틱스(prebiotics)의 생존과 성장에 도움을 주는 영양원이다. 이전 실험을 통하여 선정된 프로바이오틱스(probiotics)와 프리바이오틱스(prebiotics)의 유용한 농도를 확립하여 신바이오틱스(synbiotics)를 개발함으로써 항생제를 대체 할 수 있는 양어용 사료첨가제로 크게 기여할 것으로 판단된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 1. 한국등록특허 제10-1536901호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 바실러스 균주(*Bacillus*) 및 MOS(mannan oligosaccharide)를 유효성분으로 포함하는 양식어류용 사료 첨가제 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 사료 첨가제 조성물을 포함하는 양식어류용 사료 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 사료 첨가제 조성물 또는 상기 사료 조성물을 양식어류에 급이하는 단계를 포함하는 양식어류의 사육 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 사료 첨가제 조성물 또는 상기 사료 조성물을 양식어류에 급이하여 어류 병원성 세균에 대한 면역력을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 바실러스 균주(*Bacillus*) 및 MOS(mannan oligosaccharide)를 유효성분으로 포함하는 양식어류용 사료 첨가제 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 바실러스 균주는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 인 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 바실러스 균주의 농도는 0.5 내지 1×10^{7} CFU/g 인 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 MOS의 농도는 1 내지 10 g/kg 인 것일 수 있고, 바람직하게는 5 g/kg 인 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 사료 첨가제는 병원성 세균의 체내 증식을 억제하는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 어류는 뱀장어, 민물장어, 바다장어, 방어, 참돔, 넙치, 가자미 및 우럭으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 사료 첨가제 조성물을 포함하는 양식어류용 사료 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 사료 첨가제는 전체 사료 조성물의 100 중량부 기준으로 0.01 내지 10 중량부의 양으로 포함되는 것일 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 사료 첨가제 조성물 또는 상기 사료 조성물을 양식어류에 급이하는 단계를 포함하는 양식어류의 사육 방법을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 사료 첨가제 조성물 또는 상기 사료 조성물을 양식어류에 급이하여 어류 병원성 세균에 대한 면역력을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 어류 병원성 세균은 에드워드시엘라 타르다 (Edwardsiella tarda), 스트렙토코커스 이니애 (Streptococcus iniae), 비브리오 앙귈라리움 (Vibrio anguillarium), 비브리오 캄프벨리

(Vibrio campbellii), 비브리오 할베이 (Vibrio harveyi), 비브리오 퍼니시 (Vibrio furnisii) 및 스트렙토코커스 파라우베리스 (Streptococcus parauberis)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

발명의 효과

[0025] 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물은 바실러스 균주의 농도가 0.5 내지 1×10^{7} CFU/g 으로 포함되고, MOS의 농도가 1 내지 10 g/kg 으로 포함됨으로써, 어류의 사료효율이 증가하여 성장이 개선되고, 병원성 세균의 체내 증식 억제 및 어류 병원성 세균에 대한 면역력 증가의 효과에 의하여 양식어류의 사육에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 실험구별 뱀장어의 장 조직을 H&E 염색한 결과를 나타낸 것이다(scale bar: 100 ㎛; original magnifiation ×40).

도 2는 실험구별 뱀장어의 혈액 내에서의 비특이적 면역 반응을 알아보기 위하여 Lysozyme 활성 및 MPO 활성을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 실험구별 뱀장어의 장 조직 내에서의 면역 유전자의 발현 여부를 알아보기 위하여 IgM_H 및 Hsp70 유전자의 mRNA 발현량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 실험구별 뱀장어가 Vibrio 균의 공격에 다른 누적생존율을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본 발명의 용어, 프로바이오틱스(probiotics)는 적당량을 섭취했을 때 인체에 이로움을 주는 살아있는 미생물을 총칭하는 말로 우리 몸에 유익을 주는 균을 말한다. 현재까지 알려진 대부분의 프로바이오틱스는 유산균이다. 프로바이오틱스인 유산균이나 이로운 세균들은 몸 안의 위산과 담즙산에서 살아남아서 소장까지 도달하여 장에서 증식하고 정착한다. 정착한 장 안에서 건강에 이로운 효과를 나타내며, 이러한 프로바이오틱스는 독성이 없고 비병원성이어야 한다.

[0029] 본 발명의 용어, 프리바이오틱스(prebiotics)는 장내 유익한 박테리아의 생장을 돕는 난소화성 성분으로써 프로바이오틱스의 영양원이 되어 장내 환경을 개선하는 데 도움을 주는 물질을 말한다. 프리바이오틱스는 올리고당과 같이 탄수화물로 이루어져 있는 경우가 많고, 대부분이 식이섬유의 형태로 존재한다.

[0030] 본 발명의 용어, 신바이오틱스(synbiotics)는 프로바이오틱스와 프리바이오틱스가 상승작용(synergism) 형태로 결합된 식품 성분 또는 식이보충제를 말한다.

[0031] 본 발명에서는 프로바이오틱스로서 바실러스 균주(*Bacillus*)를 포함하고, 프리바이오틱스로서 MOS(mannan oligosaccharide)를 포함하는 신바이오틱스를 유효성분으로 포함하는 양식어류용 사료 첨가제 조성물에 관한 것이다.

[0032] 본 발명의 사료 첨가제 조성물에서는 아미노산, 무기염류, 비타민, 항생물질, 항균물질, 항산화, 항곰팡이 효소, 다른 생균 형태의 미생물 제제 등과 같은 보조제 성분; 곡물, 예를 들면 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀; 식물성 단백질 사료, 예를 들면 평지, 콩 및 해바라기를 주성분으로 하는 것; 동물성 단백질 사료, 예를 들면 혈분, 육분, 골분 및 생선분; 당분 및 유제품, 예를 들면 각종 분유 및 유장 분말로 이루어지는 건조성분; 지질, 예를 들면 가열에 의해 임의로 액화시킨 동물성 지방 및 식물성 지방 등과 같은 주성분; 영양보충제, 소화 및 흡수향상제, 성장촉진제, 질병 예방제와 같은 첨가제가 추가로 포함될 수 있다.

[0033] 본 발명의 사료 첨가제 조성물은 분말 또는 액체 상태의 제제 형태일 수 있으며, 사료 첨가용 부형제를 포함할 수 있다. 사료 첨가용 부형제로는 예를 들어, 탄산칼슘, 말분, 제올라이트, 옥분 또는 미강 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 본 발명의 사료 첨가제 조성물의 제조에 사용되는 미생물 균주는 공지의 발효기술에 의해 액체 배지 또는 고체

배지에서 배양될 수 있다. 배지로는 천연배지, 반합성배지 및 합성배지와 같은 각종 배지가 제한없이 사용될 수 있다. 탄소원으로는 포도당, 수크로스, 전분, 몰라세, 물엿, 맥아당 등이 사용될 수 있다. 질소원으로는 펩톤, 육류 추출물, 효모 추출물, 건조된 효모, 대두분, 암모늄염, 나이트레이트염 및 기타 유기 또는 무기 질소-함유 화합물이 사용될 수 있다. 무기염으로는 마그네슘, 망간, 포타슘, 칼슘, 철 등의 포스페이트, 카보네이트, 클로라이드 등이 사용될 수 있다. 그러나, 탄소원, 질소원 및 무기염은 반드시 상기 성분들에만 한정되는 것은 아니며, 그 외에도 아미노산, 비타민, 핵산 및 그와 관련된 화합물들이 배지에 첨가될 수 있다.

[0035] 상기 균주는 공지의 발효 기술에 따라 적당한 온도에서 적당한 기간 동안 배양되며, 바람직하게는 20℃~50℃에서 10시간 내지 5일 동안 배양되는 것일 수 있고, 40℃~50℃에서 1 내지 5일 동안 배양되는 것일 수 있다. 본 발명에 따라 수득된 미생물 배양액은 원심분리 후 세척 또는 농축에 의해 분리된 세포와 함께 또는 배양액 단독으로 사용될 수 있으며, 바람직하게는 유효성분이 포함된 전체 배양액을 첨가제를 가하거나 가하지 않은 채로 동결건조 또는 분무건조되어 제제화될 수 있다. 이렇게 수득된 제제는 본 발명의 사료 첨가제 또는 사료로 사용될 수 있다.

[0036] 본 발명의 사료 첨가제 조성물은 어류에게 단독으로 투여되거나 식용 담체 중에서 다른 사료 첨가제와 조합되어 투여될 수 있다. 또한, 상기 사료 첨가제 조성물에는 탑 드레싱으로서 또는 이들을 사료에 직접 혼합하거나 또는 사료와 별도로, 별도의 경구 제형으로, 또는 다른 성분과 조합하여 쉽게 투여할 수 있다 통상적으로, 당업계에 잘 알려진 바와 같이 단독 일일 섭취량 또는 분할 일일 섭취량을 사용할 수 있다.

[0037] 본 발명의 사료 첨가제가 사용될 수 있는 동물은 뱀장어, 민물장어, 바다장어, 방어, 참돔, 넙치, 가자미 및 우럭 등의 어류일 수 있고, 바람직하게는 뱀장어일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 상기 사료첨가제는 전체 사료 조성물의 100 중량부 기준으로 0.01 내지 10 중량부의 양으로 배합될 수 있으며, 바람직하게는 0.1 내지 1 중량부의 양으로 배합될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0039] 또한, 본 발명은 상기 사료를 어류에 급이하여 어류 병원성 세균에 대한 면역력을 증가시키는 방법을 제공한다. 본 발명의 사료를 어류에 급이하면 사료 내 포함된 유효성분들의 생체 이용율이 증대되어 어류의 증체량이 증가되고, 항균 물질이 포함되어 있어 어류 병원성 세균에 대한 면역력이 증가될 수 있다. 특히, 뱀장어 등의 어류를 위해 사용됨으로서 성장률 및 생존율 등을 향상시킬 수 있다.

[0040] 상기 어류 병원성 세균은 에드워드시엘라 타르다 (Edwardsiella tarda), 스트렙토코커스 이니애 (Streptococcus iniae), 비브리오 앙귈라리움 (Vibrio anguillarium), 비브리오 캄프벨리 (Vibrio campbellii), 비브리오 할베이 (Vibrio harveyi), 비브리오 퍼니시 (Vibrio furnisii) 및 스트렙토코커스 파라우베리스 (Streptococcus parauberis)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이를 제한되지 않는다.

[0042] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0044] **실시예 1. 실험방법**

[0045] **1.1. 실험어 및 사육관리**

[0046] 실험어는 부경대학교 사료영양연구소로 운반하여 평균 어체중 9.0 ± 0.11g 인 치어기 뱀장어를 각 실험구별 20마리 씩 3반복으로 무작위 배치하여 8주간 사육실험을 진행 하였다. 각 수조당 충분한 산소공급을 위해서 에어스톤을 설치하여 산소를 공급하였으며, 평균수온은 27.6 ± 0.5℃를 유지하였다. 사료공급은 1일 2회, 어체중의 2-3%로 공급하였다.

[0048] **1.2. 실험사료 및 실험설계**

[0049] 실험사료의 단백질원으로는 어분(Fish meal), 밀 글루텐(Wheat gluten meal)을 사용하였으며, 탄수화물원으로는 옥수수 전분(Corn starch)을, 지질원으로는 어유(Fish oil)와 대두유(Soybean oil)를 사용하였다. 치어기 프로바이오틱스(probiotics) 뱀장어의 사료 내 신바이오틱스(synbiotics)의 첨가비율을 확인하기 위하여 바실러스 서브틸리스 균주(*Bacillus subtilis*)를 0 (BS_0), 0.5×10^7 CFU/g diet ($BS_{0.5}$) 또는 1×10^7 CFU/g diet (BS_1)로

첨가하고, MOS(mannan oligosaccharide)를 0 (M_0) 또는 5 g/kg diet (M_5)로 기초사료 내에 첨가하여, 사료는 총 7개(BS_0M_0(CON), BS_0M_5, $BS_{0.5}M_0$, $BS_{0.5}M_5$, BS_1M_0, BS_1M_5)를 제작하였다. 모든 사료원을 골고루 섞은 뒤 펠렛 제조기로 압출 성형 하며, 실온에 이틀 건조 후 sieve를 이용해 입자크기를 고르게 한 후, 밀봉하여 -20℃에 냉동 보관하여 사용하였다.

[0051] **1.3. 어체 측정**

[0052] 어체 측정은 실험 종료 후, 성장률을 측정하기 위하여 24시간 절식시킨 후 전체무게를 측정하여 증체율(weight gain, %), 사료효율(feed efficiency, %), 일간성장률(specific growth rate, %/day), 단백질전환효율(protein efficiency ratio), 생존율(survival rate, %)을 조사하였다. 상기 측정 항목들의 계산식은 다음과 같다.

[0054] 증체율(weight gain, %) = [(final wt. - initial wt.) × 100] / initial wt.

[0055] 사료효율(feed efficiency, %) = (wet weight gain / dry feed intake) × 100

[0056] 일간성장률(specific growth rate, %/day) = [($\log_e$finalwt.-$\log_e$initialwt.)×100] / days

[0057] 단백질전환효율(protein efficiency ratio) = (wet weight gain / protein intake)

[0058] 생존율(survival rate, %) = [(total fish - dead fish) × 100] / total fish

[0060] **1.4. 장 조직학적 분석**

[0061] 어체에서 고정 포매한 후, Bouin's solution에 일정시간 동안 고정하고, 수세와 탈수과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 4~6 ㎛ 두께로 연속 절편하여 조직표본을 만들었으며, 광학현미경으로 관찰하기 위하여 파라핀 포매법을 이용하여 표본을 제작한 후, Mayer Hematoxylin & Eosin 염색을 실시하였다.

[0063] **1.5. 비특이적 면역 분석**

[0064] **1.5.1. Lysozyme의 활성**

[0065] 각각의 실험구별 어류에서 분리한 혈청 0.1 ml과 0.05M sodium phosphate buffer(pH 6.2)에 Micrococcus lysodeikticus(0.2 mg/ml)를 부유시킨 suspension 2 ml과 혼합하였다. 반응은 20℃ 조건에서 분광 흡광도계의 흡광도 530 nm에서 0.5분과 4.5분에 측정하였다. Lysozyme의 활성 단위는 분당 0.001의 흡광도 감소를 나타내는 효소양으로 정의하였다.

[0067] **1.5.2. MPO(Myeloperoxidase) 활성**

[0068] MPO 활성은 Quade and Roth(1997)에 따라 측정하였다. 20㎕ 세럼을 Ca^{2+}나 Mg^{2+} 없이 HBSS와 함께 96셀에 희석한 후 TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine hydrochloride, 20mM, Sigma-Aldrich, USA) 와 H_2O_2 (5mM) 35㎕를 추가하였다. 색 변화 반응은 2분 후에 35㎕의 4M sulfuric acid를 첨가함으로써 중지되었으며, 마지막으로 microplate reader에서 450nm로 흡광도를 계측하였다.

[0070] **1.6. 면역 유전자 발현도 분석**

[0071] 실험어의 면역 유전자 발현 여부를 측정하기 위하여, TRIzol Reagent (Invitrogen,USA)를 이용하여 Invitrogen 사의 protocol에 따라 간 조직에서 Total RNA를 분리하였다. 이후, Total RNA를 Firststrand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Roche, USA)을 이용하여 mRNA에서 cDNA로 합성한 후, Hsp70(heat shock protein 70), IgM_H(immunoglobulin heavy chain)에 대한 프라이머를 사용하여 유전자 발현 여부를 확인하였고, GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)로 normalization 하였다. 사용된 프라이머의 서열은 하기

표 1과 같다.

표 1

[0073]

	방향	프라이머 서열
HSP 70	forward	5'-CCA TCC TGA CCA TCG AAG AC-3'
	reverse	5'-GTT CTC TTG GCC CTC TCA CA-3'
IgMH	forward	5'-CGG TTC TTC TGA CAA TCG-3'
	reverse	5'-TCG GGC ACA GTA ATA CAC-3'
GAPDH	forward	5'-GTC TGG AGA AAC CTG CTA-3'
	reverse	5'-ACC TGG TGT TCT GTG TAT C-3'

[0075] **1.7. 공격실험**

[0076] Vibrio 균에 의한 공격실험은 *V. anguillarum* KCCM 40293을 TSB(Tryptic Soy Broth)에서 26℃로 24시간 동안 배양하여 멸균증류수에 5×10^7 CFU/ml로 현탁하였다. 각 수조별로 무작위로 5마리씩 선별한 실험어에 현탁액을 0.1ml씩 복강 주사한 후 폐사를 기록하였다. 폐사어의 폐사원인을 확인하기 위해 매일 폐사된 어체로부터 신장을 채취하여 TSA(tryptic soy agar)에 배양하여 Vibrio 균의 존재를 확인하였다.

[0078] **1.8. 통계처리**

[0079] 모든 자료는 SAS 프로그램으로 ANOVA(analysis of variance) 테스트를 실시하여 최소유의차검정(LSD: Least Significant Difference)으로 평균간의 유의차($P < 0.05$)를 검정하였다.

[0081] **실시예 2. 바실러스 균주(프로바이오틱스) 및 MOS(프리바이오틱스)의 복합 처리에 따른 뱀장어의 성장 및 사료효율에 대한 증가 효과**

[0082] 기존 선행연구에서 뱀장어의 장을 16S rRNA sequence analysis로 스크리닝 하여 장내 토착균을 선별하였으며 *in vitro*에서 항균활성을 가지는 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*) 균주와 바실러스 플란타룸(*L. plantarum*) 균주 중 성장 증진 효과를 보였던 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*) 균주를 프로바이오틱스로 선정하였고, 본 발명에서는 뱀장어 사료에 추가될 상기 바실러스 서브틸리스 균주에 대한 유효한 농도를 확인하고자 하였다(Lee et al., 2017, Comparative evaluation of dietary probiotics *Bacillus subtilis* WB60 and *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 on the growth performance, immunological parameters, gut morphology and disease resistance in Japanese eel, *Anguilla japonica*, Fish & Shellfish Immunology, 61, 201-210). 또한, 프리바이오틱스로서 MOS(mannan oligosaccharide)를 첨가하여 뱀장어 사료에 대한 유효한 농도를 확인하는 실험을 수행하였다.

[0083] 우선, 본 발명자들은 바실러스 서브틸리스 균주를 0 (BS_0), 0.5×10^7 CFU/g diet ($BS_{0.5}$) 또는 1×10^7 CFU/g diet (BS_1)로 첨가하고, MOS(mannan oligosaccharide)를 0 (M_0) 또는 5 g/kg diet (M_5)로 복합 첨가하여, 뱀장어의 성장 및 사료효율에 대한 효과를 조사하였다. 양식장에서 가장 일반적으로 사용하는 항생제 OTC 처리구와 비교평가를 위하여 평균 어체중 9 ± 0.11g 인 치어기 뱀장어를 각 실험구별 20마리 씩 3반복으로 무작위 배치하여 8주간 사육실험을 수행하였다.

[0084] 그 결과, 뱀장어의 성장 및 사료 효율에 있어서, 0.5×10^7 CFU/g 또는 1.0×10^7 CFU/g의 바실러스 서브틸리스 균주 및 5 g/kg의 MOS를 복합 첨가한 실험구에서는 아무것도 처리하지 않은 대조군(CON)에 비해 증체율(WG, weight gain), 사료효율(FE, feed efficiency), 일간성장률(SGR, specific growth rate) 및 단백질전환효율(PER, protein efficiency ratio)이 모두 현저히 높아짐을 확인하였다(표 2: 실험구별 뱀장어 성장 결과). 더욱이, 바실러스 서브틸리스 균주 및 MOS를 복합 첨가한 실험구는 바실러스 서브틸리스 균주만을 처리하거나 MOS만을 처리한 실험구에 비해 더 높은 증체율, 사료효율, 일간성장률 및 단백질전환효율을 나타냄을 확인하였다

(표 2).

[0085] 따라서, 프로바이오틱스인 바실러스 서브틸리스 균주를 0.5×10^7 CFU/g 내지 1.0×10^7 CFU/g 으로 사료에 첨가하고, 프리바이오틱스인 MOS를 5 g/kg 으로 사료에 복합 첨가한 경우 뱀장어 성장에 현저한 효과가 있음을 확인하였다.

표 2

[0087]

	Diets						
	CON	$BS_{0.5}M_0$	BS_1M_0	BS_0M_5	$BS_{0.5}M_5$	BS_1M_5	OTC
IBW(g)[2]	8.88±0.15	8.97±0.09	9.09±0.08	9.14±0.12	8.99±0.09	8.92±0.11	9.06±0.13
FBW(g)[3]	17.4±0.42^{c}	17.8±0.50^{bc}	18.4±0.11^{b}	18.2±0.42^{bc}	18.7±0.14^{a}	18.5±0.39^{a}	18.1±0.51^{bc}
WG(%)[4]	95.9±2.11^{c}	97.8±4.46^{bc}	102±1.18^{b}	99.4±2.90^{bc}	**108±2.12**^{a}	**108±2.36**^{a}	100±2.98^{bc}
FE(%)[5]	79.9±2.00^{c}	81.5±3.72^{bc}	85.3±0.98^{b}	82.9±3.30^{bc}	**89.9±1.77**^{a}	**89.9±1.97**^{a}	83.4±2.48^{bc}
SGR (%/day)[6]	1.40±0.02^{c}	1.42±0.05^{bc}	1.47±0.01^{b}	1.44±0.03^{bc}	**1.52±0.02**^{a}	**1.52±0.02**^{a}	1.54±0.03^{bc}
PER[7]	1.60±0.04^{c}	1.63±0.07^{bc}	1.71±0.02^{b}	1.66±0.05^{bc}	**1.80±0.04**^{a}	**1.80±0.04**^{a}	1.67±0.05^{bc}

[0088] [1] Values are means from triplicate groups of fish where the values in each row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

[0089] [2] Initial body weight(IBW)

[0090] [3] Final body weight(FBW)

[0091] [4] Weight gain(WG, %) = [(final wt. - initial wt.) × 100] / initial wt.

[0092] [5] Feed efficiency ratio(FE, %) = (wet weight gain / dry feed intake) × 100

[0093] [6] Specific growth rate(SGR, %) = [($\log_e$finalwt.-$\log_e$initialwt.)×100] / days

[0094] [7] Protein efficiency ratio(PER) = (wet weight gain / protein intake)

[0096] **실시예 3. 바실러스 균주(프로바이오틱스) 및 MOS(프리바이오틱스)의 복합 처리에 따른 장 기능 개선 효과**

[0097] 본 발명자들은 바실러스 서브틸리스 균주를 0 (BS_0), 0.5×10^7 CFU/g diet ($BS_{0.5}$) 또는 1×10^7 CFU/g diet (BS_1)로 첨가하고, MOS(mannan oligosaccharide)를 0 (M_0) 또는 5 g/kg diet (M_5)로 복합 첨가하여 장 기능 개선에 대한 효과가 있는지 확인하는 실험을 수행하였다. 장 기능의 개선 여부에 대한 효과는 장의 발달을 대표할 수 미세 융털 길이(villi length)와 장벽 두께(muscular layer thickness)의 측정을 통해 확인하였다.

[0098] 그 결과, 0.5×10^7 CFU/g 또는 1.0×10^7 CFU/g의 바실러스 서브틸리스 균주 및 5 g/kg의 MOS를 복합 첨가한 실험구($BS_{0.5}M_5$, BS_1M_5)에서는 아무것도 처리하지 않은 대조군(CON)에 비해 미세 융털 길이가 길고, 장벽 두께가 두꺼움으로써 장 기능이 현저히 개선되는 효과가 있음을 확인하였다(도 1 및 표 3).

[0099] 또한, 바실러스 서브틸리스 균주만을 처리하거나 MOS만을 처리한 실험구($BS_{0.5}M_0$, BS_1M_0 및 BS_0M_5)에서도 대조군(CON)에 비해서는 미세 융털 길이 및 장벽 두께가 증가되는 효과가 있었으나, 이는 OTC를 처리한 양성 대조군과 유사한 정도이고, 바실러스 서브틸리스 균주 및 MOS를 복합 첨가한 실험구($BS_{0.5}M_5$, BS_1M_5)에 비해서는 낮은 수준

이었다. 즉, 바실러스 서브틸리스 균주 및 MOS를 복합 첨가한 실험구($BS_{0.5}M_5$, BS_1M_5)에서는 바실러스 서브틸리스 균주만을 처리하거나 MOS만을 처리한 실험구에 비해 장 기능이 현저히 개선되는 효과가 있음을 확인하였다(도 1 및 표 3).

[0100] 따라서, 프로바이오틱스인 바실러스 서브틸리스 균주를 0.5×10^7 CFU/g 내지 1.0×10^7 CFU/g 으로 사료에 첨가하고, 프리바이오틱스인 MOS를 5 g/kg 으로 사료에 복합 첨가한 경우 뱀장어의 장 기능을 개선하는 효과가 있음을 확인하였다.

표 3

[0102]

	Diets						
	CON	$BS_{0.5}M_0$	BS_1M_0	BS_0M_5	$BS_{0.5}M_5$	BS_1M_5	OTC
Villi length (㎛)	507±61.4^{c}	640±62.0^{b}	712±64.2^{ab}	697±77.9^{b}	**825±86.2^{a}**	**835±45.0^{a}**	670±101^{b}
Muscular layer thickness (㎛)	151±32.5^{c}	292±9.75^{a}	304±10.8^{a}	222±8.29^{b}	**327±42.6^{a}**	**332±30.3^{a}**	205±11.2^{b}

[0104] **실시예 4. 바실러스 균주(프로바이오틱스) 및 MOS(프리바이오틱스)의 복합 처리에 따른 내병성 개선 효과**

[0105] 본 발명자들은 바실러스 서브틸리스 균주를 0 (BS_0), 0.5×10^7 CFU/g diet ($BS_{0.5}$) 또는 1×10^7 CFU/g diet (BS_1)로 첨가하고, MOS(mannan oligosaccharide)를 0 (M_0) 또는 5 g/kg diet (M_5)로 복합 첨가한 후, 뱀장어의 혈액 내의 Lysozyme 활성 및 MPO(Myeloperoxidase) 활성 분석을 내병성(disease resistance)의 개선 효과 여부를 확인하는 실험을 수행하였다.

[0106] 그 결과, 0.5×10^7 CFU/g 또는 1.0×10^7 CFU/g의 바실러스 서브틸리스 균주 및 5 g/kg의 MOS를 복합 첨가한 실험구($BS_{0.5}M_5$, BS_1M_5)에서는 아무것도 처리하지 않은 대조군(CON)에 비해 Lysozyme 활성 및 MPO 활성이 현저히 증가됨을 확인하였다(도 2).

[0107] 또한, 바실러스 서브틸리스 균주만을 처리하거나 MOS만을 처리한 실험구($BS_{0.5}M_0$, BS_1M_0 및 BS_0M_5)의 경우 대조군(CON)에 비해서는 Lysozyme 활성 및 MPO 활성이 증가되는 경향을 보였으나, 바실러스 서브틸리스 균주 및 MOS를 복합 첨가한 실험구($BS_{0.5}M_5$, BS_1M_5)에 비해서는 낮은 수준이었다. 특히, MPO 활성에 있어서, 바실러스 서브틸리스 균주 및 MOS를 복합 첨가한 실험구($BS_{0.5}M_5$, BS_1M_5)에서는 바실러스 서브틸리스 균주만을 처리하거나 MOS만을 처리한 실험구에 비해 확연히 증가되었다(도 2).

[0108] 또한, 본 발명자들은 뱀장어의 장 조직 내에서의 면역 유전자의 발현량을 분석하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 0.5×10^7 CFU/g 또는 1.0×10^7 CFU/g의 바실러스 서브틸리스 균주 및 5 g/kg의 MOS를 복합 첨가한 실험구($BS_{0.5}M_5$, BS_1M_5)에서는 아무것도 처리하지 않은 대조군(CON)에 비해 Hsp70(heat shock protein 70) 및 IgM_H(immunoglobulin heavy chain)의 발현량이 증가됨을 확인하였다(도 3). 특히, IgM_H의 발현량은 대조군(CON)에 비해 약 2.2배 증가되었고, 바실러스 균주만을 처리하거나 MOS만을 처리한 실험구에 비해 약 1.4배 내지 1.7배 증가되었다(도 3).

[0109] 따라서, 프로바이오틱스인 바실러스 서브틸리스 균주를 0.5×10^7 CFU/g 내지 1.0×10^7 CFU/g 으로 사료에 첨가하고, 프리바이오틱스인 MOS를 5 g/kg 으로 사료에 복합 첨가한 경우 뱀장어의 내병성을 개선하는 효과가 있음을 확인하였다.

[0111] **실시예 5. 바실러스 균주(프로바이오틱스) 및 MOS(프리바이오틱스)의 복합 처리에 따른 Vibrio 균의 공격으로부터 생존 증가 효과**

[0112] 본 발명자들은 바실러스 서브틸리스 균주를 0 (BS_0), 0.5×10^7 CFU/g diet ($BS_{0.5}$) 또는 1×10^7 CFU/g diet (BS_1)로 첨가하고, MOS(mannan oligosaccharide)를 0 (M_0) 또는 5 g/kg diet (M_5)로 복합 첨가한 후, Vibrio 균에 의한 공격으로부터 뱀장어의 생존 여부를 확인하는 실험을 수행하였다.

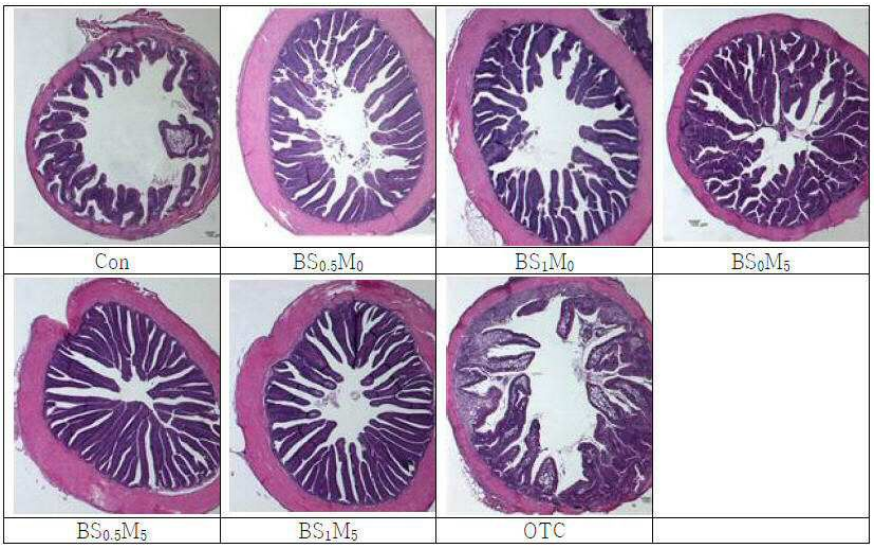
[0113] 그 결과, 0.5×10^7 CFU/g 또는 1.0×10^7 CFU/g의 바실러스 서브틸리스 균주 및 5 g/kg의 MOS를 복합 첨가한 실험구($BS_{0.5}M_5$, BS_1M_5)에서는 아무것도 처리하지 않은 대조군(CON)에 비해 생존율이 약 2.5 배 증가됨을 확인하였다(도 2).

[0114] 또한, 바실러스 서브틸리스 균주만을 처리하거나 MOS만을 처리한 실험구($BS_{0.5}M_0$, BS_1M_0 및 BS_0M_5)의 경우 대조군(CON)에 비해서는 생존율이 증가되는 경향을 보였으나, 바실러스 서브틸리스 균주 및 MOS를 복합 첨가한 실험구($BS_{0.5}M_5$, BS_1M_5)에 비해서는 낮았다. 즉, 바실러스 서브틸리스 균주 및 MOS를 복합 첨가한 실험구($BS_{0.5}M_5$, BS_1M_5)에서는 바실러스 서브틸리스 균주만을 처리하거나 MOS만을 처리한 실험구에 비해 Vibrio 균에 대한 공격으로부터 생존이 증가되는 효과가 있음을 확인하였다

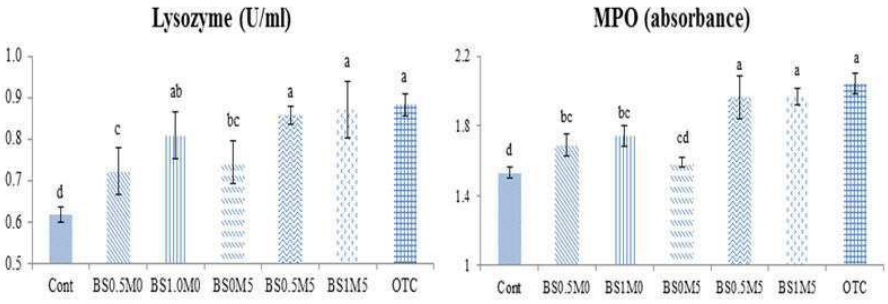
[0115] 따라서, 프로바이오틱스인 바실러스 서브틸리스 균주를 0.5×10^7 CFU/g 내지 1.0×10^7 CFU/g 으로 사료에 첨가하고, 프리바이오틱스인 MOS를 5 g/kg 으로 사료에 복합 첨가한 경우 Vibrio 균에 의한 공격에 대항하여 뱀장어의 생존을 증가시키는 효과가 있음을 확인하였다.

도면

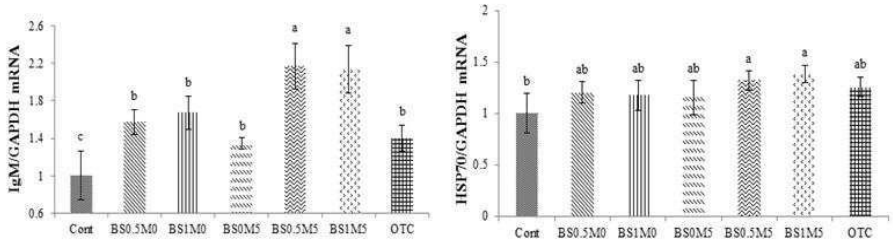
도면1



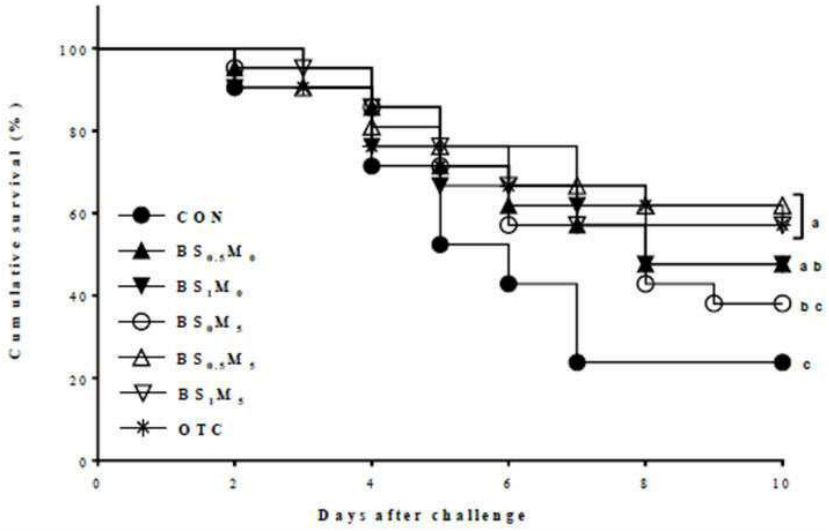
도면2


Lysozyme (U/ml)
MPO (absorbance)
Cont
BS0.5M0
BS1.0M0
BS1M0
BS0M5
BS0.5M5
BS1M5
OTC

도면3


IgM/GAPDH mRNA
HSP70/GAPDH mRNA
Cont
BS0.5M0
BS1M0
BS0M5
BS0.5M5
BS1M5
OTC

도면4


Cumulative survival (%)
Days after challenge
CON
BS0.5M0
BS1M0
BS0M5
BS0.5M5
BS1M5
OTC
a
ab
bc
c