



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0012954
(43) 공개일자 2017년02월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23K 1/14 (2006.01) A23K 1/00 (2006.01)
A23K 1/10 (2006.01) A23K 1/16 (2006.01)
A23K 1/175 (2006.01) A23K 1/18 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23K 10/30 (2016.05)
A23K 10/12 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2015-0105655
(22) 출원일자 2015년07월27일
심사청구일자 2015년07월27일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
강석중
경상남도 통영시 용남면 대곡길 12 (통영청구하이츠아파트) 103동 1503호
정우철
경상남도 통영시 용남면 대곡길 12 (통영청구하이츠아파트) 107동 801호
류충호
경상남도 진주시 가좌안골길21번길 5, 101동 903호 (가좌동, 제일풍경채아파트)
(74) 대리인
한윤호

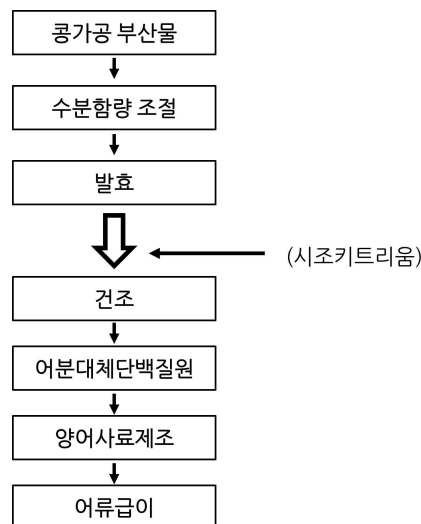
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 어분대체 단백질원 제조방법 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 DHA 고도불포화지방산을 함유하는 어분대체단백질원과 그 제조 방법에 관한 것이다. 상기의 본 발명은 콩가공 부산물에 DHA 고도불포화지방산을 다량 함유하는 *Schizochytrium* sp.(K12487BP) 균주를 접종하여 발효시킨 단백질원을 제조할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23K 10/16 (2016.05)
A23K 10/22 (2016.05)
A23K 20/163 (2016.05)
A23K 20/174 (2016.05)
A23K 20/20 (2016.05)
A23K 50/80 (2016.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013-0739
부처명	해양수산부
연구관리전문기관	농림수산식품기술기획평가원
연구사업명	유용미생물을 이용한 해수 순환여과양식시스템(RAS) 배출수 고형오물 재처리 기술개발
연구과제명	육상순환양식시스템에서 배출된 고형오물의 해삼사료 자원화
기 여 율	1/2
주관기관	경상대학교
연구기간	2014.06.21 ~ 2015.06.20이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2013-0740
부처명	해양수산부
연구관리전문기관	농림수산식품기술기획평가원
연구사업명	유용미생물을 이용한 해수 순환여과양식시스템(RAS) 배출수 고형오물 재처리 기술개발
연구과제명	육상순환양식시스템에서 배출된 고형오물의 해삼사료 자원화
기 여 율	2/2
주관기관	경상대학교
연구기간	2014.06.21 ~ 2015.06.20

명세서

청구범위

청구항 1

어분 2 내지 6 중량부, 발효 탈지대두박 1.5 내지 6 중량부 및 사료첨가제 2.5 내지 3.5 중량부를 포함하는 양어용 사료 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 발효 탈지대두박은 탈지대두박에 탄소원을 첨가한 후 DHA 함량이 높은 균을 접종하여 발효시킴으로써 제조되는 총지방산 중 DHA 함량이 적어도 12% 이상인, 양어용 사료 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 DHA 함량이 높은 균은 해양식물성 플랑크톤, *Entomoph thorales*, *Mucoreles*속 균, *Ascomycetes*속 균 또는 *Schizochytrium* sp. (KCCM11381P)인, 양어용 사료조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 사료첨가제는 전분, 셀룰로오스, 유지, 미네랄 혼합물, 비타민 혼합물 및 콜린 클로라이드를 포함하는, 양어용 사료조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 미네랄 혼합물은 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, KCl, 구연산철, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 락트산칼슘, $CuCl_2$, $AlCl_3$, KI, $Na_2Se_2O_3$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, 및 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 를 포함하는, 양어용 사료조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 비타민 혼합물은, 아스코르브산(ascorbic acid), 초산알파토코페릴(α -tocopheryl acetate), 티아민(thiamine), 리보플라빈(riboflavin), 피리독신(pyridoxine), 니신(nicin), Ca-D-판토텐산(Ca-D-pantothenate), 미오-이노시톨(myo-inositol), D-비오틴(D-biotin), 폴산(folic acid), p-아미노 벤조산(p-amino benzoic acid), 콜린 클로라이드, 및 시아노코발라민을 포함하는, 양어용 사료조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 어분대체 단백질원 제조방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 DHA 함유 어분대체 단백질원 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 오늘날 양어사료는 어류 생산 경비의 50-70%를 차지하고 있기 때문에 양식 산업의 생산성 및 경제성 향상에 중요한 열쇠가 되고 있다. 양어사료의 단백질원으로는 어분, 혈분, 우모분, 육분, 육골분, 피혁분 등의 동물성 단백질원과 대두박, 콘글루텐, 면실박, 채종박 등의 식물성 단백질원이 이용된다(NRC, National Research

Council)). 그러나 지금까지 해산어용 배합사료의 단백질원으로는 어분을 주로 사용하고 있으나, 어분 생산량은 점차 감소하고 수요는 증가함에 따라, 가격이 급격히 상승하고 물량도 부족한 추세이다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 어분 대체품의 개발이나 어분 대체원으로서 동물성 및 식물성 단백질원들의 효과에 대한 연구가 어종별로 활발히 수행되고 있다. 어종에 따라 차이는 있지만, 양어사료에 사용되는 어분의 30-50%를 식물성 단백질원으로 대체가 가능하다고 알려져 있다. 그리고 많은 연구자들에 의해 어분의 대체 단백질원으로써 대두박이 가장 적합한 단백질원으로 보고가 되어 지고 있다. 대두박은 높은 단백질가, 일정한 구성성분, 낮은 가격과 공급의 안정성에서는 적절한 단백질원이지만 어분에 비해 필수아미노산인 메치오닌(methionine) 함량이 낮고, 소화가 잘되지 않는 탄수화물이 약 30%를 차지하고 있으며, 피틱산(phytic acid)이 많이 포함되어 있어 필수미네랄 이용성의 저하 및 단백질 흡수 저하와 같은 비영양적 작용을 하는 것으로 보고되고 있다. 또한 대두박은 필수지방산인 n-3 HUFA를 전혀 함유하고 있지 않기 때문에 추가로 공급이 되어야만 하는 문제점을 가지고 있다. 사료 중의 지질은 필수지방산의 공급원으로 뿐만 아니라 에너지원으로서도 중요한 영양소이다. 일반적으로 해산어류의 필수지방산은 n-3 계 고도불포화 지방산(n-3 highly unsaturated fatty acid, n-3 HUFA)이고, 어류의 정상적인 성장을 위해서는 그 어종이 요구하는 종류와 양이 사료에 첨가되어야 한다. n-3 고도불포화지방산이 다량 함유된 어분, 어유, 간유 등은 저장 중이나 사료 제조 후 산화되기 쉬우므로 어류의 건강에 나쁜 영향을 줄 수도 있다. 또한 어유나 간유는 다른 동물성 및 식물성 지질보다 가격이 비싸므로 n-3 고도불포화지방산을 함유하는 대체유를 개발하는 것 또한 시급한 문제로 대두되고 있다. 대한민국 특허공개공보 제10-2010-0052666호에 속성 다단계 발효법으로 제조된 콩 발효물 및 이의 제조방법에서 개시되어 있는 바, 상기 발명에서는 속성 다단계 발효법으로 제조된 콩 발효물 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 자세하게는 대두에 유산균을 접종하고 황국균을 접종한 후 1차 발효시키는 단계 및 상기 1차 발효물에 고초균을 접종한 후 2차 발효시키는 단계를 포함하는 콩 발효물의 제조방법, 이렇게 제조된 콩 발효물에 관한 것이다. 상기 발명의 콩 발효물은 충분한 영양분을 보유하면서도, 이의 제조에 소요되는 시간과 에너지를 종래에 비해 단축시킬 수 있는 장점을 갖는다. 대한민국 특허공개공보 제10-2001-0022903호에 가금류의 고기에 대한 오메가-3 고도 불포화 지방산의 첨가 효율을 높이기 위한 방법이 개시되어 있다. 상기 발명은 가금류의 고기에 대한 오메가-3 HUFA의 첨가 효율을 높이기 위한 사료 공급 방법에 관한 것이다. 특히, 가금류의 생산 기간의 초기보다 후기에 더 많은 양의 오메가-3 HUFA를 가금류에 공급하는 것을 특징으로 한다.

[0003] 그러나 양어사료의 주 단백질원으로 사용되는 어분을 대체하고자 사용되어지는 식물성단백질은 대두박에 국한되어져 있으며, 이러한 여러 문제점으로 인하여 한계점을 내포하고 있다. 그래서 이에 본 발명자들은 대두박, 탈지대두박, 콩비지 등의 콩 가공 부산물을 이용하여 유용미생물을 이용하여 발효과정을 통하여 n-3 고도불포화지방산을 함유하고, 양어사료에 필요한 필수아미노산 조성이 높은 형태의 식물성 단백질원을 제조하여 어분을 대체하여 사용하고자 한다.

[0004] 본 발명은 DHA 고도불포화지방산을 함유하는 어분대체단백질원을 제조하는 방법으로서 유용미생물을 이용하여 식물성단백질을 DHA 고도불포화지방산을 함유하는 단백질원으로 제조함과 동시에 발효과정을 통하여 용존 유기물, 입자성유기물, 황 화합물 및 암모니아성 질소를 효율적으로 처리할 뿐만 아니라 아미노산 조성의 변화시킴으로서 소화흡수율을 높여 양어사료에 사용되는 어분단백질원을 효과적으로 대체하고자 하는 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 보다 효율적인 양어사료의 주 단백질원으로 사용되는 어분을 대체한 식물성 단백질원을 포함하는 양어용 사료조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 일 관점에 따르면, 어분 2 내지 6 중량 부, 발효 탈지대두박 1.5 내지 6 중량 부 및 사료첨가제 2.5 내지 3.5 중량 부를 포함하는 양어용 사료조성물이 제공된다.

[0007] 상기 양어용 사료조성물에 있어서, 상기 발효 탈지대두박은 탈지대두박에 탄소원을 첨가한 후 DHA 함량이 높은 균을 접종하여 발효시킴으로써 제조되는 총지방산 중 DHA 함량이 적어도 12% 이상인 것일 수 있다.

[0008] 상기 양어용 사료조성물에 있어서, 상기 DHA 함량이 높은 균은 진시키는 발현균주는 *Entomoph thorales*, *Mucoreles* 속 균, *Ascomycetes* 속 균 또는 *Schizochytrium* sp.(KCTC12487BP)일 수 있고, 더 바람직하게는

Schizochytrium sp. (KCTC12487BP)일 수 있다.

- [0009] 상기 양어용 사료조성물에 있어서, 상기 사료첨가제는 전분, 셀룰로오스, 유지, 미네랄 혼합물, 비타민 혼합물 및 콜린 클로라이드를 포함할 수 있고, 더 바람직하게는 전분 7 내지 9 중량 부, 셀룰로오스 7 내지 15 중량 부, 유지 3 내지 7 중량 부, 미네랄 혼합물 1 내지 3 중량 부, 비타민 혼합물 0.5 내지 1.5 중량 부 및 콜린 클로라이드 0.3 내지 0.7 중량부로 구성될 수 있다.
- [0010] 이때, 상기 미네랄 혼합물은 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, KCl , 구연산철, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 락트산칼슘, $CuCl_2$, $AlCl_3$, KI , $Na_2Se_2O_3$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, 및 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 를 포함할 수 있고, 상기 비타민 혼합물은 아스코르브산(ascorbic acid), 초산 알파토코페롤(α -tocopheryl acetate), 티아민(thiamine), 리보플라빈(riboflavin), 피리독신(pyridoxine), 나이신(nicin), Ca-D-판토텐산(Ca-D-pantothenate), 미오-이노시톨(myo-inositol), D-비오틴(D-biotin), 폴산(folic acid), p-아미노벤조산(p-amino benzoic acid), 콜린 클로라이드, 및 시아노코발라민을 포함할 수 있는데, 상기 미네랄 혼합물의 배합비율은 사료첨가제 특히 양어용 사료첨가제에 사용되는 그 어떠한 공지의 배합비율도 사용이 가능하다. 예컨대, NRC(National Research Council). 1993. Nutrient requirements of fish. National Academic Press Washington, DC, USA. 114pp) 에 기재된 조성을 사용할 수 있다.
- [0011] 상기 양어용 사료조성물의 단백질원으로서 어분 대신 식물성 단백질을 사용하고자 하는 시도가 있어 왔다. 아울러 바실러스 균주 등의 미생물을 이용한 발효 과정을 통해서 제조되는 발효 탈지대두박 등의 효용성을 더욱 커지고 있는 것도 사실이다. 그러나, 양어사료의 경우 어분을 대체할 단백질원으로는 기존의 다양한 식물성 단백질원과 발효시킨 대두박을 이용하여 어분을 대체하는 데는 한계점을 나타내고 있다.
- [0012] 본 발명의 일 관점에 따르면, 상기 단백질원은 DHA 고도불포화 지방산을 함유하는 단백질원이다. 기존의 대두박 등 식물성 단백질원을 사용한 것보다 효율성을 높인 발효 탈지대두박 등이 제시되고 있지만 담수어류 및 해산어류에 필수지방사인 DHA 고도불포화 지방산을 함유하는 단백질원은 전무하다. 이에 해양성 원시균주인 시조키트리움을 이용하여 발효과정을 거친 쿡가공부산물인 경우 DHA 고도 불포화지방산을 함유하는 단백질원으로서 사용이 가능하다.
- [0013] 본 발명의 일실시예에 따라서 제조된 양어용 사료조성물은 시조키트리움 균주의 활발한 증식으로 인하여 양질의 단백질인 균체단백질이 생산되므로 단백질의 절대량이 증가되는 동시에 쿡 가공 부산물에 함유된 탄수화물이 미생물 생육에 필요한 에너지원으로 소비됨으로써 상대적인 단백질 함량이 증가되는 등 단백질 사료로서의 가치가 더욱 상승하게 된다.
- [0014] 본 발명의 일실시예에 따라서 제조된 양어용 사료조성물은 발효과정에서 시조키트리움 균주의 활발한 증식으로 인하여 상대적인 단백질 함량의 증가와 더불어 양질의 지질 함량이 증가된다. 이는 양어사료 제조 시 단백질 에너지가 4.5 kcal/g 보다 높은 9 kcal/g 를 나타내어 양어사료 원료로서 같은 량 대비 지질함량이 높을 경우 에너지가가 높아져 양어사료로서 가치가 더욱 상승하게 된다.
- [0015] 또한, 본 발명의 일실시예에 따라서 제조된 양어용 사료 조성물은 유통과정 중에도 지질의 산패되는 현상이 없다. 이는 기존의 양어사료 제조 시 사용되는 어분의 경우 어체에 함유된 어유(fish oil)가 산패되는 현상이 발생되기도 하며 어분대체 단백질원의 경우도 필수지방산을 공급하기 위해서 어유를 첨가하는 경우가 일반적이다. 이 또한 지방산이 산패되는 현상이 발생되어 산패억제를 방지하는 물질을 첨가하는 경우도 있다. 그러나 DHA 고도불포화지방산 함유한 쿡가공부산물을 이용하여 제조된 양어사료는 세포벽이 있는 코팅된 형태의 균주 형태로 제조되어 지질의 산패 현상이 거의 없기 때문에 산패억제제를 부수적으로 첨가하지 않아도 된다.
- [0016] 아울러, 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 양어용 사료조성물은 특히, 해산 어류계 필요한 필수지방산을 다량 함유하고 있다. 해산어류의 경우 리놀렌산($18:3n-3$)를 공급해 주더라도 EPA($20:5n-3$), DHA($22:6n-3$)으로 생합성 전환되지 않기 때문에 필수적으로 사료로서 공급되어야하는 단점이 있다. 그래서 필수적으로 사료로서 이러한 DHA 고도불포화지방산을 반드시 공급되어야만 하기에 DHA 고도불포화지방산 함유한 쿡가공부산물을 이용한 양어사료가 절실히 필요하다. 물론, 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0017] 상기한 바와 같이 양어사료로 우수한 단백질원을 제공하는 것으로, 효율성을 높인 발효 탈지대두박으로부터 DHA 고도불포화지방산을 함유하는 단백질원을 제공하며 유통 시에 산패현상이 발생하지 않는 단백질원으로써 산업

상 이용 가능성이 큰 효과를 기대할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따라 탈지대두박에 당밀(brix 45%) 5%를 첨가하여 DHA를 다량 함유하는 *Schizochytrium* sp.(KCTC12487BP) 균주를 접종하여 72시간 동안 발효하는 과정을 설명하는 도식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 첨부된 실시예 및 실험예를 참조하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예 및 실험예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0020] 실시예 1: DHA가 함유된 발효 탈지대두박 제조

[0021] 사료제조용 원료인 탈지대두박의 탈지 대두박에 당밀(brix 45%) 5%를 첨가하여 DHA를 다량 함유하는 *Schizochytrium* sp.(KCTC12487BP) 균주를 접종하여 72시간 동안 발효하였다. 본 발명의 상기 제조방법은 도 1에 나타내었다.

[0022] 실험예 1: 발효 탈지대두박 성분분석

[0023] 1-1: 일반성분 분석

[0024] 실험에 사용된 발효 탈지대두박 일반성분 분석에서 수분은 상압가열 건조법, 조단백질은 Kjeldahl법(AOAC, 1995), 조 지방은 Chloroform과 Methanol을 2:1 비율로 혼합한 용액을 용매로 한 Bligh와 Dyer추출법(*Can. J. Biochem. Physio.*, 37: 922-917, 1959), 조섬유는 Automatic analyzer(Fibertec, Tecator)를 이용하였고, 조회분은 직접 회화법으로 분석하였으며(Bligh and Dyer, *Can. J. Biochem. Physio.*, 37: 922-917, 1959), 가용성 무질소물은 100에서 위 성분의 합계를 뺀 값으로 계산하였다(Bligh and Dyer, *Can. J. Biochem. Physio.*, 37: 922-917, 1959).

[0025] 해양미생물을 이용하여 발효과정을 거친 발효 탈지대두박의 일반 성분 분석 결과는 표 1에서 나타낸 바와 같이 조단백질은 47.07%에서 49.58%로, 조지방은 1.86%에서 3.76%로 증가되었으며, 조 회분은 7.37%에서 9.26%로 증가되었다. 조섬유의 경우는 발효과정을 통해 4.19%에서 2.69%로 낮아졌다.

표 1

[0026] 식용 단백질원의 화학조성

조성	단백질원(단위: %)					
	어분		탈지대두박		발효 탈지대두박	
조단백질	63.80	±0.18	47.07	±0.20	49.58	±0.26
조지방	5.70	±0.03	1.86	±0.07	3.76	±0.08
조회분	18.37	±0.05	7.37	±0.08	9.26	±0.11
조섬유	1.60	±0.08	4.19	±0.06	2.69	±0.04
수분	7.65	±0.01	8.27	±0.13	7.87	±0.08

[0027] 대두박은 다른 식물성 박 류에 비하여 단백질과 에너지 수준은 높고, 조섬유와 조 회분 함량은 낮아서 특히, 단 위동물 사료원료로서 적합하다. 대두단백질은 식물성 단백질 공급원 가운데 가장 아미노산 조성이 우수한 것 중 하나에 속한다. 일반적으로 대두유 가공시 부산물인 탈지대두박은 원료 대두에서 지방을 제거하고, 단백질 약 50%, 탄수화물 25-30%로 대부분의 영양소가 소실되지 않아, 식품 및 영양학적 관점에서 중요한 소재로서 사용되 어지고 있다.

[0028] 1-2: 아미노산 분석

[0029] 총 아미노산의 분석을 위한 시료는 고형물의 경우 시료 2.0g에 6 N HCl 5 mL를 넣고, 액상의 경우는 시료 5 mL 에 HCl 5mL 각각 가하고, 밀봉하여 heating block(HF-21, Yamato Scientific Co., Ltd. Japan)에서 가수분해 (110℃, 24시간)한 후, glass filter로 여과, 감압 농축 및 sodium citrate buffer(pH 2.2)로 정용하여 제조하 였다. 아미노산의 분석은 전처리 시료의 일정량을 아미노산 자동분석계(Pharmacia Biotech Biochrom 30,

England)로 실시하였다.

표 2

[0030]

식용 단백질원의 총아미노산 구성(건조량%)

아미노산	단백질원		
	어분	탈지대두박	발효 탈지대두박
Aspartic acid	9.29	17.57	17.00
Threonine	5.45	4.96	4.74
Serine	6.60	7.08	7.21
Glutamic acid	11.92	14.20	15.12
Proline	4.59	5.23	4.78
Glycine	10.84	7.12	8.02
Alanine	7.93	5.87	6.76
Cystine	1.00	1.23	1.20
Valine	5.39	5.44	5.38
Methionine	2.38	1.27	1.64
Isoleucine	3.48	3.37	3.27
Leucine	7.74	9.08	9.04
Tyrosine	2.80	2.06	2.06
Phenylalanine	3.94	2.24	1.99
Histidine	2.29	1.53	1.48
Lysine	7.30	6.79	6.38
Tryptophan	0.96	0.57	0.66
Arginine	6.11	4.39	3.29

값은 세 번 반복한 그룹의 평균임. 값은 평균±S.D. (n=3)

[0031]

탈지대두박과 발효 탈지대두박의 아미노산 분석결과는 표 2에 나타난 바와 같이 발효과정(Lee and Lee, *J. Korean Fish Soc.*, 29: 464-473, 1996)을 통해 발효된 대두박의 Lysine 함량은 6.79%에서 6.38%로 낮아졌으며, Methionine 함량은 1.27%에서 1.64%로 높아지는 것으로 나타났다. Tryptophan은 0.57%에서 0.66%로 높아지는 것으로 나타났으며, Threonine은 4.96%에서 4.74%로 낮아지는 것으로 나타났다. Isoleucine 함량은 3.37%에서 3.27%로 나타났으며, Valine은 5.44%에서 5.38%로 나타났다. 대두박은 다른 박류에 비하여 아미노산 함량이 높고, 아미노산 조성이 우수한 편이지만 비율 면에서 필수아미노산 중 Lysine 함량이 높은 반면, methionine과 cystine함량이 낮은 편이다. 그러나 발효과정을 통해 필수아미노산인 methionine과 tryptophan등이 높아짐으로써 발효 탈지대두박의 단백질 가치가 대두박에 비해 높다는 것을 의미한다.

[0032]

단백질은 양어사료 배합에 있어 사료가격뿐 아니라 어류의 성장에 가장 큰 영향을 미치는 영양소이다. 그러나 단백질 그 자체로서의 중요정보는 필수아미노산의 공급측면이 더 중요한 것이기 때문에 단백질원의 선택 시 필수아미노산의 균형이 잘 이루어져 있는가를 고려하여야 한다.

[0033]

지난 40여 년간의 연구에도 불구하고 필수아미노산의 양적 요구량이 성장실험을 통하여 완전히 밝혀진 어종은 단지 9종에 불과하다. 그러나 이들 요구량 조차도 성장이 빠른 초기단계에 국한되어 있으며, 사료섭취량이 증가하는 육성 및 성어단계의 요구량은 여전히 경험적인 추정에 의거하여 사료배합에 임하고 있는 실정이다.

[0034]

아미노산 요구량 설정 시 많은 시간과 경비가 소요되기 때문에 상대적으로 간편한 체조직 내 아미노산의 증가량에 의한 방법이나 이상적인 단백질 균형법에 의거하여 요구량을 설정하고 있지만, 이렇게 설정된 요구량을 관행의 사료배합에 응용 하는데는 신중을 기할 필요가 있다. 양질의 어분 생산량은 수요에 미치지 못하고 있기 때문에, 어분 대체원을 이용한 사료 배합 시 설정된 아미노산 요구량 수치의 이용에는 더욱 주의를 기울여야 할 것이다. 특히, 설정된 라이신 요구량과 체조직 A/E(동화/에너지) 비율을 고려한 요구량의 추정은 사료 내 아미노산 불균형의 문제를 야기할 수도 있기 때문에 신중을 기해야 할 것이다.

[0035]

1-3: 지방산 분석

[0036]

총 지질 추출은 Bligh and Dyer(1959) 방법에 준하였다. 즉, 시료를 비커에 취하여 균질기(Nihonseiki Kaisha Ltd. Japan)에 15,000 rpm으로 5분간 갈게 부순 다음, 클로로포름과 메탄올을 2:1로 혼합한 용액을 이용하여 총 지질을 추출하였다. 추출된 시료를 일정량 취하고, 0.5N NaOH-메탄올 용액을 이용하여 검화 하였으며 BF₃-메탄

을 사용하여 메틸화하였다. 그런 다음, 이소-옥탄(iso-octane)을 이용하여 추출된 시료를 지방산 메틸 에스터의 시료로 사용하였다.

[0037] 지방산 분석에 사용하는 GLC(gas-liquid chromatography)는 Omegawax™-320(결합폴리글리콜상) 모세관 컬럼(30mx0.32mmx0.25um, I.D., SUPELCO, SupelcoPark, PA, 미국)를 장착한 Autosystem XL(Perkin elmer, 미국)를 이용하였다.

표 3

[0038] 식용 단백질원의 총지방산조성(총지방산 중 중량%)

지방산	단백질원					
	어분		탈지대두박		발효 탈지대두박	
14:0	3.91	±0.21	0.00	±0.00	1.12	±0.14
15:0	0.50	±0.03	0.00	±0.00	0.58	±0.26
16:0	20.75	±0.61	17.34	±0.68	21.36	±0.55
17:0	0.46	±0.04	0.00	±0.00	0.40	±0.03
18:0	5.92	±0.09	4.36	±0.44	5.93	±0.31
20:0	0.00	±0.00	0.00	±0.00	1.52	±0.12
Σ 포화지방산	31.54		21.7		30.91	
16:1n-9	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.25	±0.03
16:1n-7	4.83	±0.11	0.00	±0.00	0.16	±0.02
18:1n-9	19.32	±0.37	14.83	±1.44	14.33	±0.38
18:1n-7	3.47	±0.20	1.45	±0.14	2.23	±0.17
20:1n-11	1.63	±0.03	0.00	±0.00	0.00	±0.00
20:1n-9	2.63	±0.01	0.00	±0.00	0.86	±0.05
22:1n-9	2.49	±0.10	0.00	±0.00	0.00	±0.00
Σ 단일불포화	34.37		16.28		17.83	
18:2n-6	11.75	±0.23	55.30	±1.30	28.67	±0.71
18:3n-3	1.46	±0.05	6.73	±0.44	2.63	±0.16
18:4n-3	0.74	±0.02	0.00	±0.00	0.00	±0.00
20:4n-6	1.02	±0.01	0.00	±0.00	0.00	±0.00
20:5n-3	5.77	±0.23	0.00	±0.00	2.03	±0.08
22:5n-6	0.00	±0.00	0.00	±0.00	2.39	±0.20
22:5n-3	1.93	±0.08	0.00	±0.00	0.00	±0.00
22:6n-3	11.43	±0.61	0.00	±0.00	15.54	±0.28
Σ 다중불포화	34.10		62.03		51.26	
Σ n-3 HUFA ¹	21.32		6.73		20.20	
Σ n-6 HUFA	12.76		55.30		31.06	
EPA	5.77		0.00		2.03	
DHA	11.43		0.00		15.54	
값은 세 번 반복한 그룹의 평균이고 다른 위치자를 가진 같은 열에 있는 값은 유의하게 다르다 (p<0.05).						
¹ HUFA: 고불포화지방산.						

[0039] 탈지대두박과 발효 탈지대두박의 지방산조성은 상기 표 3에서 나타난 바와 같이 대두박은 특징적으로 많이 함유하고 있는 18:2n-6 지방산이 55.30%였고, 20:5n-3(EPA)와 22:6n-3(DHA)가 전혀 없었지만, 발효과정을 통해 18:2n-6는 28.67%로 감소하였고, EPA와 DHA는 각각 2.03%와 15.54%로 나타났다. n-3 HUFA는 6.73%에서 20.20%로 증가되었으며, n-6 HUFA는 55.30%에서 31.06%로 감소되었다. 또한 발효 탈지대두박을 어분과 비교 하였을 때 n-3 HUFA의 경우 비슷한 함량을 나타내었으며, 해산어류의 필수지방산인 DHA는 어분보다 더 높은 함량을 나타내었다. 육상 동물의 정상적인 성장을 위해 필수적으로 요구되는 지방산은 리놀레산(linoleic acid: 18:2n-6)인 반면 어류는 리놀레산(18:2n-6), 리놀렌산(18:3n-3), 아라키돈산(20:4n-6), EPA(20:5n-3) 및 DHA(22:6n-3)와 같은 다양한 종류의 필수지방산을 필요로 한다. 어분의 경우 EPA 5.77%와 DHA 11.43%를 포함하고 있지만, 대두박의 경우 전혀 포함하고 있지 않아 단순 대두박을 대체할 경우 필수지방산으로 인한 성장 저해요인이 될 수도 있다.

[0040] 어류에 있어 필수지방산은 성장과 생존현상 유지뿐 아니라 번식생리에도 상당한 영향을 미친다는 것은 널리 알려진 사실이다. 타 동물과 마찬가지로 어류 또한 그들의 체내 세포의 기능유지를 위해 필연적으로 어떤 지방산을 요구하게 되는데, 이러한 지방산은 체내에서 자체적으로 합성될 수 없어 사료로서 공급해 주지 않으면 정상적인 성장과 생존을 이룰 수 없게 된다. 육상가축에 있어 필수지방산은 n-3계열의 리놀렌산(18:3n-3)과 n-6계열의 리놀레산(18:2n-6) 및 아라키도닉산(20:4n-6)이나, 18:3n-3와 20:4n-6 두 지방산은 18:2n-6 지방산으로부터 육상가축의 체내 전변이 이루어질 수 있다는 것이 밝혀진 이래, 리놀레산(18:2n-6)만이 필수지방산으로 분류되고 있다. 그러나 먹이연쇄에서 유래한 진화과정의 결과로 어류는 그들 환경 내 염분의 유무에 따라 필수지방산의 질적 요구량이 달라진다. 또한 어류의 필수지방산은 어종에 따라 특이성을 나타내는데, n-3계열의 지방산 또는 n-6계열의 지방산만을 요구하는 어종이 있는 반면 이들 두 계열의 지방산을 동시에 요구하는 어종도 존재한다.

[0041] **실시예 2: 발효 탈지대두박을 이용한 사료의 제조**

[0042] 실험 사료의 조성 표는 표 4에 나타난 바와 같이 단백질원으로 어분(fish meal)만을 사용한 구를 대조구로 하고, 대체 단백질원으로 발효 탈지대두박을 이용하여 어분의 20, 40, 60, 80 그리고 100%를 대체하는 사료를 제작하여 실험을 하였다.

표 4

[0043] 실험용식이의 성분조성(건조량의 % 기준)

성분(%)	실험사료					
	대조군	FSM20	FSM40	FSM60	FSM80	FSM100
생선사료	65.0	52.0	39.0	26.0	13.0	0.0
발효 탈지대두박	0.0	16.7	33.5	50.2	66.9	83.6
α-감자전분	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
알파셀룰로오스	16.4	13.6	10.7	8.0	5.2	2.4
대두유	7.1	6.2	5.3	4.3	3.4	2.5
혼합무기질 ²	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
혼합비타민 ³	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
콜린클로라이드	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
조성 (%)						
조단백질	41.5	41.5	41.5	41.5	41.5	41.5
조지질	10.8	9.8	8.7	7.6	6.5	5.5
회분	19.9	19.2	18.4	17.6	16.9	16.1
탄수화물 ⁴	10.3	14.8	19.2	23.7	28.1	32.6
가용에너지 ⁵	440	440	440	440	440	440
(kcal/100 g)						
¹ FSM: 발효 탈지대두박 포함 사료(수치는 전체 단백질원 대비 발효 탈지대두박의 중량%임). ² MgSO ₄ · 7H ₂ O 80.0, NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O 370.0, KCl 130.0, 구연산철 40.0, ZnSO ₄ · 7H ₂ O 20.0, 락트산칼슘 365.5, CuCl ₂ 0.2, AlCl ₃ · 6H ₂ O 0.15, KI 0.15, Na ₂ Se ₂ O ₃ 0.01, MnSO ₄ · H ₂ O 2.0, 및 CoCl ₂ · 6H ₂ O 1.0(단위는 모두 mg/kg 사료임) ³ 아스코르브산(ascorbic acid) 92.7, 초산알파토코페릴(α-tocopheryl acetate) 14.5, 티아민(thiamine) 2.1, 리보플라빈(riboflavin) 7.0, 피리독신(pyridoxine) 1.4, 니신(nicin), Ca-D-판토텐산(Ca-D-pantothenate) 27.8, 미오-이노시톨(myo-inositol) 9.7, D-비오틴(D-biotin) 4.2, 폴산(folic acid) 0.5, p-아미노 벤조산(p-amino benzoic acid) 13.9, 콜린 클로라이드 278.3, 및 시아노코발라민 0.003(단위는 모두 mg/kg 사료임) ⁴ 무-질소 추출물에 의한 계산=100-(단백질+지질+회분+섬유). ⁵ 소화에너지:4.5kcal/g 단백질, 9kcal/g 지질, 3 kcal/g 무질소추출물에 근거(from Lee and Lee 1996).						

[0044] 모든 실험구의 사료는 단백질 함량 41.5%로 제조하였으며, 지질원으로는 Soybean oil을 사용하여 가용에너지가 440 kcal/100 g이 되도록 조절하였다. 이 때 가용에너지는 사료의 단백질, 지질 및 가용성 탄수화물을 각각 4.5, 9.0 및 3.0 kcal/g으로 계산하였다(Lee and Lee, J. Korean Fish Soc., 29: 464-473, 1996).

[0045] **실험예 2: 어분대체 발효 탈지대두박 함유 사료를 이용한 돌돔 시험사육**

[0046] 실험 어는 국립경상대학교 해양과학대학 해양생물 사료공학연구실에서 사육중인 돌돔을 사용하였다. 실험 시작 전 1주일 동안 실험수조에서 예비 사육을 실시한 후, 실험 시작 시 평균 체중 4.0g 되는 돌돔 치어를 80 L 수조에 각각 3반복으로 25마리씩 수용하여 8주간 사육실험을 하였다. 사료 공급은 1일 3회 공급하였다. 성장은 2주마다 측정하였으며 측정하기 전 24시간 동안 절식시킨 후, Aquis-10(100 ppm)으로 마취시켜 전 어체 무게를 측정하여 증중량률(Weight gain, %), 사료효율(Feed efficiency, %), 일일 사료 섭취율(Daily feed intake, %), 비성장률(Specific growth rate, %/day), 그리고 생존율(Survival rate, %)을 조사하였다.

[0047] 실험에 사용한 사육 장치는 유수 식을 겸한 순환 여과식 사육 장치로서 순환수의 첨가에 의해서 배설물이 즉시 사육 수조 밖으로 배출될 수 있도록 사이펀 장치를 부착하였으며, 사육수조의 크기는 60 x 45 x 30 cm의 사각아크릴 수조에 수량은 80 L, 주수량의 보충에 의한 순환 물은 20 회전/일 시켰다. 이 때 주수량은 3.0 L/min 였다. 사육 기간 중 전 사육수조에는 에어스톤을 설치하여 용존산소량은 5 ml/L를 유지하였으며, 사육수온은 24.3 ± 0.8℃ 였으며, 염분농도는 33 ± 0.5 psu 를 유지하였다.

[0048] 모든 자료는 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하여 Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)로 평균 간의 유의성($P<0.05$)을 검정하였다.

[0049] 상기와 같이 돌돔을 대상으로 한 시험사육 결과, 발효 탈지대두박 대체 비율에 따른 실험 결과는 표 5에 나타낸 바와 같이 증체율은 발효 탈지대두박 대체비율이 0%, 20% 와 40% 구에서는 각각 239.1%, 244.1%와 234.6%로 유의한 차이는 없었으며($P<0.05$), 발효 탈지대두박 대체비율이 60%, 80%, 100% 대체 구에서는 각각 212.6%, 188.2% 및 159.2%로 발효 탈지대두박 비율이 높아짐에 따라 증체율이 낮아지는 것으로 나타났다($P<0.05$).

표 5

[0050] 대두사료로 대체한 급식실험결과(8주)

성분	실험 사료					
	대조군	FSM20	FSM40	FSM60	FSM80	FSM100
초기총량(g)	102.0	102.3	102.3	102.0	102.3	102.0
말기총량(g)	332.2	340.7	330.2	328.4	300.7	262.3
증량(%) ²	255.7 ^a	233.2 ^a	223.0 ^a	222.0 ^b	194.0 ^c	157.2 ^c
급식효율(%) ³	72.2 ^{ab}	72.8 ^a	70.3 ^{ab}	72.6 ^a	69.2 ^b	60.2 ^d
일일섭식량(%) ⁴	4.6 ^c	4.6 ^c	4.7 ^c	4.6 ^b	4.8 ^b	5.5 ^a
SGR(%) ⁵	1.968 ^a	2.006 ^a	1.954 ^{ab}	1.949 ^b	1.798 ^c	1.574 ^d
생존률(%)	96.0	97.3	96.0	97.3	94.7	96.0
¹ FSM: 발효대두사료. ² 증량(%)=(말기생선무게-초기생선무게)x100/초기생선무게. ³ 급식효율(%)=(습식증량/건식급식량)x100. ⁴ 일일섭식량(%)=섭식량x100/[말기생선무게+사체생선무게]-초기생선무게]x급식일수/2. ⁵ 비성장율(%일)=[(로그 말기생선무게-로그 초기생선무게)/일수]x100. 1값은 다른 위치자를 가진 같은 열에 있는 값은 유의하게 다르다(p<0.05).						

[0051] 사료효율은 발효 탈지대두박 대체비율이 0%, 20% 및 40% 구에서는 각각 70.4%, 72.5% 및 68.0%로 유의한 차이는 없었으며($P<0.05$), 발효 탈지대두박 첨가비율이 60%, 80% 그리고 100% 대체구에서는 각각 65.5%, 62.7% 와 54.0%로 발효 탈지대두박 비율이 높아짐에 따라 낮아지는 것으로 나타났다($P<0.05$).

[0052] 비성장율은 발효 탈지대두박 대체비율이 0%, 20% 및 40% 구에서는 각각 2.035%, 2.059% 와 2.013%로 유의적인 차이는 없었으며($P<0.05$), 발효 탈지대두박 첨가비율이 60%, 80% 그리고 100% 대체구에서는 각각 1.884%, 1.729% 와 1.559%로 낮게 나타났다($P<0.05$).

[0053] 이러한 결과를 볼 때, 발효 탈지대두박을 어분 대체 단백질원으로서 40%까지 대체하여도 성장에는 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났으며($P<0.05$), 발효 탈지대두박을 60% 이상에서 대체할 경우 성장저하를 가지는 것으로 나타났다($P<0.05$). 그러나, 60% 대체시 성장저하 정도는 그렇게 심하지 않기 때문에 적어도 60~70%까지는 어분을 발효 탈지대두박으로 대체하더라도 큰 영향은 없을 것으로 판단된다. 이러한 결과는 발효 탈지대두박의 어분

대체단백질원으로서 활용할 수 있는 가능성이 높다고 하겠다. 대부분의 해산어류는 담수어류와 달리 육식성이 강하고, 단백질 요구량이 높아 사료원료 중 단백질 원료의 비중이 높다. 특히, 육식성 어류는 잡식성이나 초식성 어류처럼 식물성 단백질의 이용성이 높지 않기 때문에 배합사료에 항상 어분이 주 단백질 원료로 사용되고 있어 해산어류에 사용되는 사료의 어분 첨가비율은 매우 중요한 고려요인이다. 어분은 단백질함량이 높고, 필수아미노산 및 필수지방산이 고루 갖춰져 있을 뿐만 아니라 어류에 대한 기호도가 높은 양질의 원료이나, 가격이 비싸고, 어획량 변동이 심해 공급이 불안정한 실정이다. 양식생산량이 급격히 늘어나는 추세에서 양어사료에 사용되는 어분 또한 수요가 급격히 증가하고 있다. 따라서 경제적인 사료의 안정적 공급을 위해서는 사료 중의 어분 첨가비율을 줄이는 것이 중요하며, 이를 위해서는 어분을 대신할 수 있는 값싸고 공급이 안정적인 단백질 원료를 개발하는 것이 시급하다. 어분 대체 단백질 원료로 가장 많이 사용되고 있는 것이 대두박이다. 대두박을 사료원료로 사용하는데 고려하여야 할 것 중의 하나는 필수아미노산 조성이다. 종래 연구결과에 따르면, 대두박에 부족한 필수아미노산 보충이 조피볼락의 성장을 개선시키지 못했다는 보고가 있다(Lee and Lee, *J. Korean Fish Soc.*, 29: 464-473, 1996). 또한 해수어류인 조피볼락 사료에 Methionine을 보충한 대두박을 첨가한 결과는 성장, 사료효율, 단백질 축적을 등에 유의적인 차이가 없어 아미노산 보충효과가 전혀 없었다는 보고도 있다(Lee and Lee, *J. Korean Fish Soc.*, 29: 464-473, 1996). 이는 방어를 대상으로 대두박 첨가사료에 제한아미노산 첨가가 성장을 개선시키지 못했다는 연구결과(Lee et al., *Bull. Nat. Fish Res. Dev. Agency*, 45: 247-257, 1991)와 일치하는 것이다.

[0054] 본 발명의 실험결과에서도 대두박에 필수아미노산인 methionine과 cystein 함량이 상대적으로 낮고 필수지방산인 DHA는 전혀 나타나지 않았지만 대두박을 발효시킨 발효 탈지대두박에서는 어분에 비해 상대적으로는 적었기는 하지만 필수아미노산인 methionine과 cystein 함량 증가되는 것으로 나타났으며, 필수지방산인 DHA는 어분보다 높은 것으로 나타났다. 이와 같은 결과를 볼 때 단순 대두박 대체보다는 발효 탈지대두박을 이용할 경우 보다 어분 대체원으로 훨씬 유리할 것으로 판단된다.

[0055] 본 발명은 상술한 실시예 및 실험예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예 및 실험예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

[0056] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[0057] 수탁번호 : KCTC12487BP

[0058] 수탁일자 : 20130910

도면

도면1

