(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2025 년 1 월 9 일 (09.01.2025)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2025/009883 A1

(51) 국제특허분류:
A23K 10/16 (2016.01) *A23K 50/80* (2016.01)
A23K 20/20 (2016.01) *A01K 61/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2024/009391

(22) 국제출원일: 2024 년 7 월 3 일 (03.07.2024)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2023-0086717 2023 년 7 월 4 일 (04.07.2023) KR

(71) 출원인: 씨제이제일제당 (주) (**CJ CHEILJEDANG CORPORATION**) [KR/KR]; 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR).

(72) 발명자: 이영미 (**LEE, Young Mi**); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 조국진 (**CHO, Kookjin**); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 임유진 (**LIM, Eu Gene**); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 서상현 (**SEO, Sang Hyun**); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 김지영 (**KIM, Ji Young**); 04560 서울특별시 중구 동호로 330, Seoul (KR). 안준철 (**AHN, Jun Cheul**); 34020 대전광역시 유성구 배울2로 61, 1013동 2202호, Daejeon (KR). 정병철 (**JEONG, Byung-Chul**); 61038 광주광역시 북구 일곡택지로 50, 102동 1507호, Gwangju (KR). 백성준 (**BACK, Sung-Jun**); 56143 전북특별자치도 정읍시 정우면 내기길 31, Jeonbuk-do (KR).

(74) 대리인: 유미특허법인 (**YOU ME PATENT AND LAW FIRM**); 06134 서울특별시 강남구 테헤란로 115, Seoul (KR).

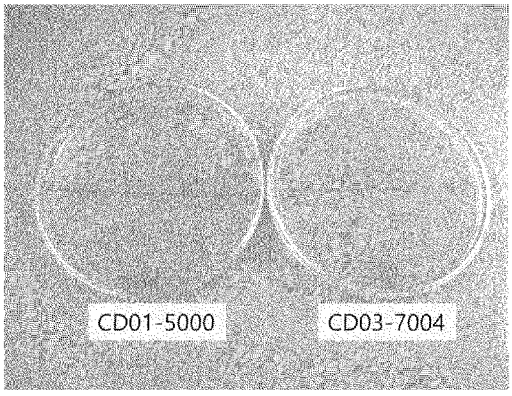
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
— 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) **Title:** FEED FOR EEL USING SCHIZOCHYTRIUM SP. MICROALGAE AND MANUFACTURING METHOD THEREFOR

(54) **발명의 명칭:** 스키조키트리움 속 미세조류를 활용한 장어용 사료 및 이의 제조 방법



(57) **Abstract:** The present invention relates to a feed composition for eels, the composition comprising *Schizochytrium* sp. microalgae-derived biomass, and a method for culturing eels using same. When the eel feed composition containing the *Schizochytrium* sp. microalgae-derived biomass is supplied to the eel, growth of the eel is promoted, and thus the biomass can be advantageously used as a feed composition or a feed additive for eels.

(57) **요약서:** 본 발명은 스키조키트리움 속 (*Schizochytrium* sp.) 미세조류 유래 바이오매스를 포함하는 장어용 사료 조성물, 이를 이용한 장어의 양식방법에 관한 것이다. 본 발명의 스키조키트리움 속 (*Schizochytrium* sp.) 미세조류 유래 바이오매스를 포함하는 장어용 사료 조성물을 장어에 급이하는 경우, 장어의 성장이 촉진되므로, 장어용 사료 조성물 또는 사료 첨가제로서 유용하게 활용될 수 있다.

WO 2025/009883 A1

명세서

발명의 명칭: 스키조키트리움 속 미세조류를 활용한 장어용 사료 및 이의 제조 방법

기술분야

[1] 관련 출원(들)과의 상호 인용

[2] 본 개시는 2023년 7월 4일자 대한민국 특허출원 제10-2023-0086717호에 기초한 우선권의 이익을 주장하며, 해당 대한민국 특허출원의 문헌에 개시된 모든 내용은 본 개시의 일부로서 포함된다.

[3] 본 개시 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 개시에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[4] 본 출원은 스키조키트리움 속 미세조류를 활용한 장어용 사료 조성물 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

[5]

배경기술

[6] 전 세계적인 인구 증가와 곡물 및 어업 생산량의 정체와 지속적인 감소에 따라, 미래의 식량 안보에 대한 우려는 계속되고 있으며, 양식산업은 이러한 식량 문제를 해결할 유일한 잠재력을 가지고 있는 것으로 많은 과학자들이 추정하고 있다. 세계 양식어 생산량은 반세기 전에 240만 톤을 시작으로 2020년에는 87.5백만 톤으로 수산물 전체 생산의 49%를 양식어가 차지하고 있으며, 이들 양식어 중 해산어, 갑각류의 사료 섭취가 고성장하고 있으며 (FAO 2022), 이러한 증가 추세는 지속될 것으로 전망하고 있다. 오늘날 양어사료 영양분야는 양식 산업 성공의 중요한 몇 가지 열쇠 중의 하나이다. 양식 산업에 있어 우선 양식 가능한 중요 어종을 선택하여 종묘생산기술이 개발되면, 질 좋은 사료에 의한 사육관리가 뒷받침되어야 하는 것은 잘 알려진 사실이다. 특히 사료비가 어종별로 차이는 있지만 양식 생산단가의 30~60%를 차지하는 것을 보아서도 사료 영양의 중요성을 알 수 있다.

[7] 사료 이용율은 단백질 원료에 따라 차이를 나타내며, 어분(fish meal)은 생선으로부터 어유를 짜고 남은 어박이나 생선 부스러기 등을 건조시켜 가루로 만든 것으로 높은 단백질 함량과 우수한 아미노산 조성 및 높은 기호성으로 오랫동안 양어사료의 주 단백질원으로 사용되어 왔다. 하지만 최근 그 생산량이 급격히 저하됨에 따라 공급이 불안정하고 가격이 치솟아 사료원료 구입비용에서 가장 큰 부분을 차지한다, 어분을 만드는 여러 잡어들의 어획생산량이 남획과 해양환경 문제로 급격히 줄어들고 있으며 향후 2030년도까지 그 생산량이 계속적으로 감소

할 것으로 예측되고 있다. 이러한 이유로 양어용 배합사료에서 어분을 대체할 수 있는 값싸고 질 좋은 대체단백질원을 찾기 위해 많은 연구가 진행되고 있다.

[8]

[9] [선행기술문헌]

[10] [특허문헌]

[11] (특허문헌 01) 대한민국 공개특허 제10-2011-0026232호

[12]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[13] 본 발명자들은 미세조류를 활용한 어류 양식 사료를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 스키조키트리움 속 (*Schizochytrium* sp.) 미세조류 유래 바이오매스를 포함하는 사료 조성물이 장어의 성장을 촉진함을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[14] 따라서, 본 출원의 목적은 스키조키트리움 속 (*Schizochytrium* sp.) 미세조류 유래 바이오매스를 포함하는 장어용 사료 조성물을 제공하는 것이다.

[15] 본 출원의 또 다른 목적은 상술한 스키조키트리움 속 미세조류 유래 바이오매스를 포함하는 장어용 사료 조성물을 장어에 급이하는 단계를 포함하는 장어의 양식방법, 및/또는 장어의 성장 촉진 방법을 제공하는 것이다.

[16]

과제 해결 수단

[17] 본 출원의 일 양태에 따르면, 본 출원은 스키조키트리움 속 (*Schizochytrium* sp.) 미세조류 유래 바이오매스를 포함하는 장어용 사료 조성물; 및/또는 상기 미세조류 유래 바이오매스 및/또는 상기 장어용 사료 조성물의 장어 성장 촉진 용도를 제공한다.

[18]

[19] 스키조키트리움 속 (*Schizochytrium* sp.) 미세조류

[20] 본 명세서에서, 용어 “미세조류(microalgae)"는 식물 중 육안으로 쉽게 볼 수 없어 현미경을 통해 볼 수 있으며 물 속에서 자유로이 부유하여 살아가는 생물을 의미하며, 식물플랑크톤(Phytoplankton)이라고도 한다. 상기 미세조류에는 다양한 종류가 있으며, 광합성이 불가능하여 종속영양으로만 생장하는 균주까지 포함한다. 상기 용어 "미세조류(microalgae)"는 본 명세서에서“균주”와 혼용될 수 있다.

[21] 본 명세서에서, 용어 “스키조키트리움 속(*Schizochytrium* sp.)"은 트라우스토키트리알레스(Thraustochytriales) 목의 트라우스토키트리아세애(Thraustochytriaceae) 과에 속하는 속명 중 하나로, 용어 "스키조키트리움 속(genus *Schizochytrium*)"과 혼용될 수 있다.

[22] 본 명세서에서, 스키조키트리움 속 미세조류 (microalgae of genus Schizochytrium)는 트라우스토키트리아세과 (family of Thraustochytriaceae)에 속하는 미생물로 스키조키트리움 아그레가툼 (*Schizochytrium aggregatum*), 스키조키트리움 리마시눔 (*Schizochytrium limacinum*) 및 스키조키트리움 미누툼 (*Schizochytrium minutum*)으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[23] 일 예에서 상기 스키조키트리움 속 미세조류는 스키조키트리움 리마시눔일 수 있다.

[24] 일 예에서 상기 스키조키트리움 속 미세조류는 스키조키트리움 아그레가툼일 수 있다.

[25] 일 예에서 상기 스키조키트리움 속 미세조류는 스키조키트리움 미누툼일 수 있다.

[26] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 스키조키트리움 속 균주는 CD03-7004 균주(기탁번호 KCTC15006BP)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[27] 본 발명자들은 야생형 스키조키트리움 속 CD01-5000 균주(기탁번호 KCTC 14344BP)에 감마선을 조사하여 돌연변이를 발생시키고, 상기 돌연변이 균주 중 항산화 색소 생산능이 있는 균주를 선별하여, 이를 스키조키트리움 속 (*Schizochytrium* sp.) CD03-7004로 명명하였고, 2022년 6월 20일자로 부다페스트 조약 하의 국제 기탁 기관인 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures: KCTC)에 기탁하여 수탁번호 KCTC15006BP를 부여받았다.

[28]

[29] <u>스키조키트리움 속 (*Schizochytrium* sp.) 미세조류 유래 바이오매스(biomass)</u>

[30] 본 명세서에서, 용어 "바이오매스(biomass)"는 화학적 에너지로 사용 가능한 식물, 동물, 미생물 등의 생물체, 즉 바이오에너지의 에너지원을 의미하며, 생태학적으로 단위 시간 및 공간 내에 존재하는 특정 생물체의 중량 또는 에너지량을 의미하기도 한다. 또한, 상기 바이오매스는 세포에 의해 분비되는 화합물을 포함하지만 이에 한정되지 않고, 세포외 물질뿐만 아니라 세포 및/또는 세포 내 내용물을 함유하는 것일 수 있다.

[31] 본 명세서에서, 미세조류 유래 바이오매스는 미세조류 그 자체, 이의 배양물, 이의 발효물, 이의 건조물, 이의 파쇄물, 또는 상기 미세조류를 배양하거나 발효하여 생산된 산물을 포함할 수 있으며, 또는 상기 바이오매스의 농축물 또는 건조물을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 구현예에 있어서, 상기 미세조류 유래 바이오매스는 미세조류, 상기 미세조류의 배양물, 상기 배양물의 건조물, 및 상기 건조물의 파쇄물로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다. 건조는 분무건조, 열풍건조, 동결건조, 자연건조, 진공건조에 의하여 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[32] 상기 미세조류의 "배양물"은 상기 미세조류를 배양하여 생성된 산물을 지칭하는 것으로, 구체적으로 미세조류를 포함하는 배양액 또는 상기 배양액에서 미세조류가 제거된 배양여액일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 미세조류 배양물의 "건조물"은 상기 미세조류 배양물에서 수분이 제거된 것으로, 예를 들어 상기 미세조류의 건조 균체 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 건조물의 "파쇄물"은 상기 미세조류 배양물에서 수분이 제거된 건조물을 파쇄한 결과물을 총칭하는 것으로, 예를 들어 건조 균체 분말일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 미세조류의 배양물은 미세조류 배양 배지에 상기 미세조류를 접종하고, 당업계에 공지된 배양 방법에 따라 제조될 수 있고, 상기 배양물의 건조물 및 이의 파쇄물 역시 당업계에 공지된 미세조류 또는 배양액의 처리 또는 건조 방법에 따라 제조될 수 있다.

[33] 일 구현예에 있어서, 상술한 미세조류 유래 바이오매스는 단백질(조단백질, crude protein)을 40 중량% 내지 95 중량%로 포함할 수 있고, 보다 구체적으로, 40 중량% 내지 95 중량%, 40 중량% 내지 90 중량%, 40 중량% 내지 85 중량%, 40 중량% 내지 82.5 중량%, 40 중량% 내지 81.5 중량%, 40 중량% 내지 80.5 중량%, 50 중량% 내지 95 중량%, 50 중량% 내지 90 중량%, 50 중량% 내지 85 중량%, 50 중량% 내지 82.5 중량%, 50 중량% 내지 81.5 중량%, 50 중량% 내지 80.5 중량%, 60 중량% 내지 95 중량%, 60 중량% 내지 90 중량%, 60 중량% 내지 85 중량%, 60 중량% 내지 82.5 중량%, 60 중량% 내지 81.5 중량%, 60 중량% 내지 80.5 중량%, 70 중량% 내지 95 중량%, 70 중량% 내지 90 중량%, 70 중량% 내지 85 중량%, 70 중량% 내지 82.5 중량%, 70 중량% 내지 81.5 중량%, 70 중량% 내지 80.5 중량%, 75 중량% 내지 95 중량%, 75 중량% 내지 90 중량%, 75 중량% 내지 85 중량%, 75 중량% 내지 82.5 중량%, 75 중량% 내지 81.5 중량%, 75 중량% 내지 80.5 중량%, 77.5 중량% 내지 95 중량%, 77.5 중량% 내지 90 중량%, 77.5 중량% 내지 85 중량%, 77.5 중량% 내지 82.5 중량%, 77.5 중량% 내지 81.5 중량%, 77.5 중량% 내지 80.5 중량%, 79.5 중량% 내지 95 중량%, 79.5 중량% 내지 90 중량%, 79.5 중량% 내지 85 중량%, 79.5 중량% 내지 82.5 중량%, 79.5 중량% 내지 81.5 중량%, 또는 79.5 중량% 내지 80.5 중량%로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[34] 일 구현예에 있어서, 상술한 미세조류 유래 바이오매스는 지방(조지방, crude lipids)을 3 중량% 내지 30 중량%로 포함할 수 있고, 보다 구체적으로, 3 중량% 내지 30 중량%, 3 중량% 내지 20 중량%, 3 중량% 내지 15 중량%, 3 중량% 내지 13 중량%, 3 중량% 내지 12 중량%, 6 중량% 내지 30 중량%, 6 중량% 내지 20 중량%, 6 중량% 내지 15 중량%, 6 중량% 내지 16 중량%, 6 중량% 내지 12 중량%, 9 중량% 내지 30 중량%, 9 중량% 내지 20 중량%, 9 중량% 내지 15 중량%, 9 중량% 내지 16 중량%, 9 중량% 내지 12 중량%, 10 중량% 내지 30 중량%, 10 중량% 내지 20 중량%, 10 중량% 내지 15 중량%, 10 중량% 내지 16 중량%, 10 중량% 내지 12 중량%, 11 중량% 내지 30 중량%, 11 중량% 내지 20 중량%, 11 중량% 내지 15

중량%, 11 중량% 내지 16 중량%, 또는 11 중량% 내지 12 중량%로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[35] 일 구현예에 있어서, 상술한 미세조류 유래 바이오매스는 수분(moisture)을 0.05 중량% 내지 5 중량%로 포함할 수 있고, 보다 구체적으로, 0.05 중량% 내지 5 중량%, 0.05 중량% 내지 3 중량%, 0.05 중량% 내지 1.75 중량%, 0.05 중량% 내지 1.5 중량%, 0.05 중량% 내지 1 중량%, 0.05 중량% 내지 0.7 중량%, 0.1 중량% 내지 5 중량%, 0.1 중량% 내지 3 중량%, 0.1 중량% 내지 1.75 중량%, 0.1 중량% 내지 1.5 중량%, 0.1 중량% 내지 1 중량%, 0.1 중량% 내지 0.7 중량%, 0.5 중량% 내지 5 중량%, 0.5 중량% 내지 3 중량%, 0.5 중량% 내지 1.75 중량%, 0.5 중량% 내지 1.5 중량%, 0.5 중량% 내지 1 중량%, 0.5 중량% 내지 0.7 중량%, 0.6 중량% 내지 5 중량%, 0.6 중량% 내지 3 중량%, 0.6 중량% 내지 1.75 중량%, 0.6 중량% 내지 1.5 중량%, 0.6 중량% 내지 1 중량%, 0.6 중량% 내지 0.7 중량%로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[36] 본 명세서에서 회분은 시료를 태워 생기는 재 또는 시료에 포함된 무기질의 총합을 의미할 수 있다. 회분은 미네랄, 무기질, 무기염류, 광물질 등의 용어와 혼용되어 사용될 수 있으며, 칼슘, 인, 칼륨, 황, 나트륨, 염소, 마그네슘, 철, 구리, 망간, 요오드, 코발트, 아연, 몰리브덴, 셀레늄, 크로뮴, 플루오르, 붕소, 비소, 주석, 규소, 바나듐, 및 니켈 등으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 무기원소를 포함할 수 있다.

[37] 일 구현예에 있어서, 상술한 미세조류 유래 바이오매스는 회분(ash)을 2.5 중량% 내지 20 중량%로 포함할 수 있고, 보다 구체적으로, 2.5 중량% 내지 20 중량%, 2.5 중량% 내지 15 중량%, 2.5 중량% 내지 13.5 중량%, 2.5 중량% 내지 12.5 중량%, 2.5 중량% 내지 10 중량%, 2.5 중량% 내지 8 중량%, 2.5 중량% 내지 7.5 중량%, 5 중량% 내지 20 중량%, 5 중량% 내지 15 중량%, 5 중량% 내지 13.5 중량%, 5 중량% 내지 12.5 중량%, 5 중량% 내지 10 중량%, 5 중량% 내지 8 중량%, 5 중량% 내지 7.5 중량%, 7 중량% 내지 20 중량%, 7 중량% 내지 15 중량%, 7 중량% 내지 13.5 중량%, 7 중량% 내지 12.5 중량%, 7 중량% 내지 10 중량%, 7 중량% 내지 8 중량%, 또는 7 중량% 내지 7.5 중량%로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[38] 일 구현예에 있어서, 상술한 미세조류 유래 바이오매스는, 총 아미노산 100 중량부를 기준으로, 글루탐산(glutamic acid)을 30 중량부 내지 70 중량부로 포함할 수 있고, 보다 구체적으로, 30 중량부 내지 70 중량부, 30 중량부 내지 60 중량부, 30 중량부 내지 57 중량부, 30 중량부 내지 54 중량부, 45 중량부 내지 70 중량부, 45 중량부 내지 60 중량부, 45 중량부 내지 57 중량부, 45 중량부 내지 54 중량부, 50 중량부 내지 70 중량부, 50 중량부 내지 60 중량부, 50 중량부 내지 57 중량부, 50 중량부 내지 54 중량부, 53 중량부 내지 70 중량부, 53 중량부 내지 60 중량부, 53 중량부 내지 57 중량부, 또는 53 중량부 내지 54 중량부로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[39] 일 구현예에 있어서, 상술한 미세조류 유래 바이오매스는, 총 아미노산 100 중량부를 기준으로, 아르기닌(arginine)을 7 중량부 내지 25 중량부로 포함할 수 있고, 보다 구체적으로, 7 중량부 내지 25 중량부, 7 중량부 내지 20 중량부, 7 중량부 내지 15 중량부, 7 중량부 내지 13 중량부, 10 중량부 내지 25 중량부, 10 중량부 내지 20 중량부, 10 중량부 내지 15 중량부, 10 중량부 내지 13 중량부, 12 중량부 내지 25 중량부, 12 중량부 내지 20 중량부, 12 중량부 내지 15 중량부, 또는 12 중량부 내지 13 중량부로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[40] 일 구현예에 있어서, 상술한 미세조류 유래 바이오매스는, 총 지방산 100 중량부를 기준으로, 팔미트산(palmitic acid)을 20 중량부 내지 50 중량부로 포함할 수 있고, 보다 구체적으로, 20 중량부 내지 50 중량부, 20 중량부 내지 40 중량부, 20 중량부 내지 37 중량부, 30 중량부 내지 50 중량부, 30 중량부 내지 40 중량부, 30 중량부 내지 37 중량부, 36 중량부 내지 50 중량부, 36 중량부 내지 40 중량부, 또는 36 중량부 내지 37 중량부로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[41] 본 명세서에서, 용어 “팔미트산(palmitic acid)”은 $CH_3(CH_2)_{14}COOH$의 화학식을 갖는 포화지방산 중 하나로, 헥사데칸산(hexadecanoic acid)이라고도 불리며, 약칭으로 C16:0 으로도 표기될 수 있다.

[42] 일 구현예에 있어서, 상술한 미세조류 유래 바이오매스는, 총 지방산 100 중량부를 기준으로, 도코사헥사엔산(docosahexaenoic acid, (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-Docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoic acid, DHA)을 30 중량부 내지 60 중량부로 포함할 수 있고, 보다 구체적으로, 30 중량부 내지 60 중량부, 30 중량부 내지 50 중량부, 30 중량부 내지 46 중량부, 40 중량부 내지 60 중량부, 40 중량부 내지 50 중량부, 40 중량부 내지 46 중량부, 45 중량부 내지 60 중량부, 45 중량부 내지 50 중량부, 또는 45 중량부 내지 46 중량부로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[43] 본 명세서에서, 용어 “도코사헥사엔산(docosahexaenoic acid, (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-Docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoic acid, DHA)”은 $C_{22}H_{32}O_2$의 화학식을 갖는 다중불포화지방산 중 하나로, 알파-리놀렌산(α-linolenic acid: ALA) 및 에이코사펜타엔산(eicosapentaenoic acid: EPA)과 함께 오메가-3 지방산에 해당하며, 관용명은 세르본산(cervonic acid)이고, 약칭으로 C22:6n3으로도 표기될 수 있다. 도코사헥사엔산은 어류 체내에서 생산할 수 없기 때문에 먹이를 통해 섭취해야 하며, 어류의 신진대사와 세포 기능에 중요한 역할을 하는 필수 지방산으로 알려져 있다.

[44]

[45] 사료 조성물

[46] 본 명세서에서, 용어 "사료 조성물"은 동물 (동물성 플랑크톤, 가축, 어류 등의 단세포 또는 다세포 종속영양 생물을 포함한다)에 영양이 되거나 그 건강유지 또는 성장에 필요한 것을 의미할 수 있다. 상기 사료 조성물은 단미사료, 배합사료, 또는 보조사료일 수 있다. 상기 단미사료는 식물성, 동물성 또는 광물성 물질로

서 사료로 직접 사용되거나 배합사료의 원료로 사용되는 것을 의미할 수 있다. 상기 보조사료는 사료의 품질저하 방지 또는 사료의 효용을 높이기 위하여 사료에 첨가하는 것을 의미할 수 있다. 상기 배합사료는 단미사료, 보조사료 등을 적정한 비율로 배합 또는 가공한 것일 수 있다.

[47] 상기 사료 조성물은 동물의 생명을 유지, 또는 고기, 젖 등을 생산하는데 필요한 유기 또는 무기 영양소를 공급하는 물질을 의미할 수 있다. 상기 사료 조성물은 동물의 생명 유지, 또는 고기, 젖 등을 생산하는 필요한 영양성분을 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 사료 조성물은 당업계의 공지된 다양한 형태의 사료로 제조 가능하며, 구체적으로는 농후사료, 조사료 및/또는 특수사료가 포함될 수 있다. 또는 상기 사료 조성물은 배합사료 (Extruded pellet, EP사료, 건사료) 또는 생사료 (Moist pellet, MP사료, 습사료), 반죽사료 등의 형태로 제조할 수 있다.

[48] 본 명세서에서 사료 첨가제는 영양소 보충 및 체중감소 예방, 사료 내 섬유소의 소화 이용성 증진, 유질 개선, 번식장애 예방 및 수태율 향상, 하절기 고온 스트레스 예방 등 다양한 효과를 목적으로 사료에 첨가하는 물질을 포함할 수 있다. 상기 사료 첨가제는 사료관리법상의 보조사료를 의미할 수 있으며, 탄산수소나트륨, 벤토나이트(bentonite), 산화마그네슘, 복합광물질 등의 광물질제제, 아연, 구리, 코발트, 셀레늄 등의 미량 광물질인 미네랄제제, 케로틴, 비타민 E, 비타민 A, D, E, 니코틴산, 비타민 B 복합체 등의 비타민제, 메티오닌, 리신 등의 보호아미노산제, 지방산 칼슘염 등의 보호지방산제, 생균제(유산균제), 효모배양물, 곰팡이 발효물 등의 생균, 효모제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[49] 본 명세서에서, 용어 “사료 조성물”은 “사료 첨가제”를 포괄하는 의미로 해석될 수 있다.

[50] 상기 사료 조성물은 곡물, 예를 들면 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀; 식물성 단백질 사료, 예를 들면 콩 및 해바라기를 주성분으로 하는 사료; 동물성 단백질 사료, 예를 들면 어분, 혈분, 육분 및/또는 골분; 당분 및 유제품, 예를 들면 각종 분유 및 유장 분말로 이루어지는 건조 성분 등을 더 포함할 수 있으며, 이외에도 영양 보충제, 소화 및 흡수 향상제, 성장 촉진제 등을 더 포함할 수 있다.

[51] 상기 사료 조성물은 동물에게 단독으로 투여하거나 식용 담체 중에서 다른 사료 첨가제와 조합하여 투여할 수도 있다. 또한, 상기 사료 조성물은 탑 드레싱으로서 또는 이들을 사료에 직접 혼합하거나 또는 사료와 별도의 경구 제형으로 용이하게 동물에게 투여할 수 있다. 상기 조성물을 사료와 별도로 투여할 경우, 당해 기술분야에 잘 알려진 바와 같이 사료 분야에서 허용 가능한 식용 담체와 조합하여, 즉시 방출 또는 서방성 제형으로 제조할 수 있다. 상기 식용 담체는 고체 또는 액체, 예를 들어 옥수수 전분, 락토오스, 수크로오스, 콩 플레이크, 땅콩유, 올리브유, 참깨유 및 프로필렌글리콜일 수 있다. 고체 담체가 사용될 경우, 상기 사료 조성물은 정제, 캡슐제, 산제, 트로키제 또는 함당정제 또는 미분산성 형태

의 탑 드레싱일 수 있다. 액체 담체가 사용될 경우, 상기 사료 조성물은 젤라틴 연질 캡슐제, 또는 시럽제나 현탁액, 에멀젼제, 또는 용액제의 제형일 수 있다.

[52] 상기 사료 조성물은, 예를 들어, 보존제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 동결보호제, 또는 부형제 등을 포함할 수 있다. 상기 동결보호제는, 글리세롤, 트레할로스, 말토덱스트린, 탈지분유 및 전분으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 상기 보존제, 안정화제, 또는 부형제는 상기 사료 조성물에 포함되는 미세조류의 저하(deterioration)를 감소시키는데 충분한 유효량으로 조성물에 포함되는 것일 수 있다. 또한, 상기 동결보호제는 상기 조성물이 건조된 상태일 때 조성물에 포함되는 상기 미세조류의 저하를 감소시키는데 충분한 유효량으로 조성물에 포함되는 것일 수 있다.

[53] 상기 사료 조성물은 침주, 분무 또는 혼합하여 동물의 사료에 첨가하여 이용될 수 있다.

[54] 상기 사료 조성물은 포유류, 조류, 어류, 갑각류, 두족류, 파충류 및 양서류를 포함하는 다수의 동물 식이에 적용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기 포유류는 돼지, 소, 양, 염소, 실험용 설치 동물, 또는 애완 동물 등을 포함할 수 있고, 상기 조류는 가금류를 포함할 수 있고, 상기 가금류는 닭, 칠면조, 오리, 거위, 꿩, 또는 메추라기 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 갑각류는 새우, 따개비 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 사료 조성물은 동물성 플랑크톤, 예컨대 로티퍼(rotifer), 알테미아(artemia), 물벼룩(daphnia pulex) 등의 식이에도 적용될 수 있다. 또한, 상기 어류는 담수어류, 해수어류, 상업적 축양 어류 및 이의 치어류, 관상어 등을 포함할 수 있다.

[55]

[56] 장어용 사료 조성물

[57] 본 출원의 일 예는 상술한 스키조키트리움 속 (*Schizochytrium* sp.) 미세조류 유래 바이오매스를 포함하는, 장어용 사료 조성물을 제공한다.

[58] 상기 스키조키트리움 속 (*Schizochytrium* sp.) 미세조류, 상기 미세조류 유래 바이오매스 및 사료 조성물은 앞서 설명한 바와 같다.

[59] 본 명세서에서, 용어 "장어"는 장어과 장어속에 속하는 어류를 의미하며, "민물장어" 또는 "뱀장어"와 혼용되어 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 장어는 일본장어(*Anguilla japonica*), 큰장어(*Anguilla marmorata*), 유럽장어(*Anguilla anguilla*), 미국장어(*Anguilla rostrata*) 및 비콜라장어(*Anguilla bicolor*)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 보다 구체적으로 일본장어(*Anguilla japonica*)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[60] 후술할 실시예에서 입증된 바와 같이, 상술한 미세조류 바이오매스를 포함하는 사료 조성물은 장어의 성장을 촉진할 수 있다.

[61] 일 구현예에서, 본 출원의 장어용 사료 조성물은 상술한 미세조류 유래 바이오매스를 2.25 중량% 내지 45 중량%으로 포함할 수 있고, 보다 구체적으로, 2.25 중량% 내지 45 중량%, 2.25 중량% 내지 30 중량%, 2.25 중량% 내지 25 중량%,

2.25 중량% 내지 22.5 중량%, 2.25 중량% 내지 20 중량%, 2.25 중량% 내지 17.5 중량%, 2.25 중량% 내지 15 중량%, 2.25 중량% 내지 13.3 중량%, 2.25 중량% 내지 12 중량%, 2.25 중량% 내지 10 중량%, 2.25 중량% 내지 8 중량%, 2.25 중량% 내지 7.5 중량%, 2.25 중량% 내지 7 중량%, 2.25 중량% 내지 6.6 중량%, 2.25 중량% 내지 6.5 중량%, 2.25 중량% 내지 6 중량%, 2.25 중량% 내지 5 중량%, 2.25 중량% 내지 4 중량%, 2.25 중량% 내지 3.3 중량%, 3 중량% 내지 45 중량%, 3 중량% 내지 30 중량%, 3 중량% 내지 25 중량%, 3 중량% 내지 22.5 중량%, 3 중량% 내지 20 중량%, 3 중량% 내지 17.5 중량%, 3 중량% 내지 15 중량%, 3 중량% 내지 13.3 중량%, 3 중량% 내지 12 중량%, 3 중량% 내지 10 중량%, 3 중량% 내지 8 중량%, 3 중량% 내지 7.5 중량%, 3 중량% 내지 7 중량%, 3 중량% 내지 6.6 중량%, 3 중량% 내지 6.5 중량%, 3 중량% 내지 6 중량%, 3 중량% 내지 5 중량%, 3 중량% 내지 4 중량%, 3 중량% 내지 3.3 중량%, 4 중량% 내지 45 중량%, 4 중량% 내지 30 중량%, 4 중량% 내지 25 중량%, 4 중량% 내지 22.5 중량%, 4 중량% 내지 20 중량%, 4 중량% 내지 17.5 중량%, 4 중량% 내지 15 중량%, 4 중량% 내지 13.3 중량%, 4 중량% 내지 12 중량%, 4 중량% 내지 10 중량%, 4 중량% 내지 8 중량%, 4 중량% 내지 7.5 중량%, 4 중량% 내지 7 중량%, 4 중량% 내지 6.6 중량%, 4 중량% 내지 6.5 중량%, 4 중량% 내지 6 중량%, 4 중량% 내지 5 중량%, 5 중량% 내지 45 중량%, 5 중량% 내지 30 중량%, 5 중량% 내지 25 중량%, 5 중량% 내지 22.5 중량%, 5 중량% 내지 20 중량%, 5 중량% 내지 17.5 중량%, 5 중량% 내지 15 중량%, 5 중량% 내지 13.3 중량%, 5 중량% 내지 12 중량%, 5 중량% 내지 10 중량%, 5 중량% 내지 8 중량%, 5 중량% 내지 7.5 중량%, 5 중량% 내지 7 중량%, 5 중량% 내지 6.6 중량%, 5 중량% 내지 6.5 중량%, 5 중량% 내지 6 중량%, 6 중량% 내지 45 중량%, 6 중량% 내지 30 중량%, 6 중량% 내지 25 중량%, 6 중량% 내지 22.5 중량%, 6 중량% 내지 20 중량%, 6 중량% 내지 17.5 중량%, 6 중량% 내지 15 중량%, 6 중량% 내지 13.3 중량%, 6 중량% 내지 12 중량%, 6 중량% 내지 10 중량%, 6 중량% 내지 8 중량%, 6 중량% 내지 7.5 중량%, 6 중량% 내지 7 중량%, 6 중량% 내지 6.6 중량%, 6 중량% 내지 6.5 중량%, 6.5 중량% 내지 45 중량%, 6.5 중량% 내지 30 중량%, 6.5 중량% 내지 25 중량%, 6.5 중량% 내지 22.5 중량%, 6.5 중량% 내지 20 중량%, 6.5 중량% 내지 17.5 중량%, 6.5 중량% 내지 15 중량%, 6.5 중량% 내지 13.3 중량%, 6.5 중량% 내지 12 중량%, 6.5 중량% 내지 10 중량%, 6.5 중량% 내지 8 중량%, 6.5 중량% 내지 7.5 중량%, 6.5 중량% 내지 7 중량%, 6.5 중량% 내지 6.6 중량%, 6.6 중량% 내지 45 중량%, 6.6 중량% 내지 30 중량%, 6.6 중량% 내지 25 중량%, 6.6 중량% 내지 22.5 중량%, 6.6 중량% 내지 20 중량%, 6.6 중량% 내지 17.5 중량%, 6.6 중량% 내지 15 중량%, 6.6 중량% 내지 13.3 중량%, 6.6 중량% 내지 12 중량%, 6.6 중량% 내지 10 중량%, 6.6 중량% 내지 8 중량%, 6.6 중량% 내지 7.5 중량%, 6.6 중량% 내지 7 중량%, 7 중량% 내지 45 중량%, 7 중량% 내지 30 중량%, 7 중량% 내지 25 중량%, 7 중량% 내지 22.5 중량%, 7 중량% 내지 20 중량%, 7 중량% 내지 17.5 중량%, 7 중량% 내지 15 중량%, 7 중량% 내지

13.3 중량%, 7 중량% 내지 12 중량%, 7 중량% 내지 10 중량%, 7 중량% 내지 8 중량%, 7 중량% 내지 7.5 중량%, 7.5 중량% 내지 45 중량%, 7.5 중량% 내지 30 중량%, 7.5 중량% 내지 25 중량%, 7.5 중량% 내지 22.5 중량%, 7.5 중량% 내지 20 중량%, 7.5 중량% 내지 17.5 중량%, 7.5 중량% 내지 15 중량%, 7.5 중량% 내지 13.3 중량%, 7.5 중량% 내지 12 중량%, 7.5 중량% 내지 10 중량%, 7.5 중량% 내지 8 중량%, 8 중량% 내지 45 중량%, 8 중량% 내지 30 중량%, 8 중량% 내지 25 중량%, 8 중량% 내지 22.5 중량%, 8 중량% 내지 20 중량%, 8 중량% 내지 17.5 중량%, 8 중량% 내지 15 중량%, 8 중량% 내지 13.3 중량%, 8 중량% 내지 12 중량%, 8 중량% 내지 10 중량%, 10 중량% 내지 45 중량%, 10 중량% 내지 30 중량%, 10 중량% 내지 25 중량%, 10 중량% 내지 22.5 중량%, 10 중량% 내지 20 중량%, 10 중량% 내지 17.5 중량%, 10 중량% 내지 15 중량%, 10 중량% 내지 13.3 중량%, 10 중량% 내지 12 중량%, 12 중량% 내지 45 중량%, 12 중량% 내지 30 중량%, 12 중량% 내지 25 중량%, 12 중량% 내지 22.5 중량%, 12 중량% 내지 20 중량%, 12 중량% 내지 17.5 중량%, 12 중량% 내지 15 중량%, 12 중량% 내지 13.3 중량%, 13.3 중량% 내지 45 중량%, 13.3 중량% 내지 30 중량%, 13.3 중량% 내지 25 중량%, 13.3 중량% 내지 22.5 중량%, 13.3 중량% 내지 20 중량%, 13.3 중량% 내지 17.5 중량%, 13.3 중량% 내지 15 중량%, 15 중량% 내지 45 중량%, 15 중량% 내지 30 중량%, 15 중량% 내지 25 중량%, 15 중량% 내지 22.5 중량%, 15 중량% 내지 20 중량%, 15 중량% 내지 17.5 중량%, 17.5 중량% 내지 45 중량%, 17.5 중량% 내지 30 중량%, 17.5 중량% 내지 25 중량%, 17.5 중량% 내지 22.5 중량%, 17.5 중량% 내지 20 중량%, 20 중량% 내지 45 중량%, 20 중량% 내지 30 중량%, 20 중량% 내지 25 중량%, 또는 20 중량% 내지 22.5 중량%로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[62] 일 구현예에 있어서, 상기 장어용 사료 조성물은, 총 지방산 100 중량부를 기준으로, 팔미트산(palmitic acid)을 21 중량부 내지 30 중량부로 포함할 수 있고, 보다 구체적으로, 21 중량부 내지 30 중량부, 21 중량부 내지 25 중량부, 21 중량부 내지 23.75 중량부, 21 중량부 내지 22.5 중량부, 21 중량부 내지 21.25 중량부, 21.25 중량부 내지 30 중량부, 21.25 중량부 내지 25 중량부, 21.25 중량부 내지 23.75 중량부, 21.25 중량부 내지 22.5 중량부, 22.5 중량부 내지 30 중량부, 22.5 중량부 내지 25 중량부, 22.5 중량부 내지 23.75 중량부, 23.75 중량부 내지 30 중량부, 23.75 중량부 내지 25 중량부, 25 중량부 내지 30 중량부로 포함할 수 있다.

[63] 일 구현예에 있어서, 상기 장어용 사료 조성물에 포함되는 미세조류 유래 바이오매스의 함량이 증가할수록, 상기 장어용 사료 조성물에 포함되는 팔미트산의 함량이 증가할 수 있다.

[64] 일 구현예에 있어서, 상기 장어용 사료 조성물은, 총 지방산 100 중량부를 기준으로, 도코사헥사엔산(docosahexaenoic acid, (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-Docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoic acid, DHA)을 15 중량부 내지 27 중량부, 보다 구체적으로, 15 중량부 내지 27 중량부, 15 중량부 내지 23 중량부, 15 중량부 내지

20.25 중량부, 15 중량부 내지 18 중량부, 15 중량부 내지 16.25 중량부, 16.25 중량부 내지 27 중량부, 16.25 중량부 내지 23 중량부, 16.25 중량부 내지 20.25 중량부, 16.25 중량부 내지 18 중량부, 18 중량부 내지 27 중량부, 18 중량부 내지 23 중량부, 18 중량부 내지 20.25 중량부, 20.25 중량부 내지 27 중량부, 20.25 중량부 내지 23 중량부, 또는 23 중량부 내지 27 중량부로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[65] 일 구현예에 있어서, 상기 장어용 사료 조성물에 포함되는 미세조류 유래 바이오매스의 함량이 증가할수록, 상기 장어용 사료 조성물에 포함되는 도코사헥사엔산의 함량이 증가할 수 있다.

[66] 본 출원의 일 예에 따른 장어용 사료 조성물은 단백질, 탄수화물, 지방 등을 더 포함할 수 있다. 이스트, 녹말, 셀룰로오스, 비타민

[67] 일 구현예에서, 본 출원의 장어용 사료 조성물은 어분을 추가적으로 포함할 수 있다.

[68] 일 구현예에 있어서, 본 출원의 장어용 사료 조성물은 효모(예컨대 효모배양물, 곰팡이 발효물 등의 생균, 효모제), 비타민(예컨대 케로틴, 비타민 E, 비타민 A, D, E, 니코틴산, 비타민 B 복합체 등의 비타민제), 미네랄(예컨대 탄산수소나트륨, 벤토나이트(bentonite), 산화마그네슘, 복합광물질 등의 광물질제제, 아연, 구리, 코발트, 셀레늄 등의 미량 광물질인 미네랄 제제) 및 전분으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상을 추가적으로 포함할 수 있다.

[69] 일 구현예에 있어서, 상기 장어용 사료 조성물은 장어의 성장을 촉진시키는 것일 수 있다. 상기 장어의 성장을 촉진시키는 것은, 장어의 증체율(WGR, Weight Gain Rate), 사료효율(FE, Feed Efficiency), 및/또는 일성장률(SGR, Specific Growth Rate)을 증가시키는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 장어용 사료 조성물을 장어에 급이하는 경우, 미세조류 유래 바이오매스를 포함하지 않는 사료용 조성물을 급이하는 경우 대비 장어의 증체율(WGR, Weight Gain Rate), 사료효율(FE, Feed Efficiency), 및/또는 일성장률(SGR, Specific Growth Rate)이 증가할 수 있다.

[70] 후술할 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 미세조류 유래 바이오매스를 포함하는 장어용 사료 조성물을 섭취한 장어의 경우, 증체율(WGR, Weight Gain Rate), 사료효율(FE, Feed Efficiency), 및/또는 일성장률(SGR, Specific Growth Rate)이 증가되어, 본 출원의 장어용 사료 조성물이 장어의 성장을 촉진시키는 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.

[71] 상술한 본 출원의 사료 조성물은 장어의 성장을 촉진시켜, 장어용 사료 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[72]

[73] 장어의 양식방법

[74] 본 출원의 다른 양태에 따르면, 본 출원은 상술한 스키조키트리움 속 미세조류 유래 바이오매스를 포함하는 장어용 사료 조성물을 장어에 급이하는 단계를 포함하는 장어의 양식방법을 제공한다.

[75] 상기 방법에 있어서, 상기 급이하는 단계 이전에, 상술한 스키조키트리움 속 미세조류 유래 바이오매스를 포함하는 장어용 사료 조성물을 준비하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[76] 상기 방법에 있어서, 상기 급이하는 단계는 장어에 먹이를 제공하는 모든 방법에 의하여 수행될 수 있으며, 예를 들어, 상술한 스키조키트리움 속 미세조류 유래 바이오매스를 포함하는 장어용 사료 조성물을 장어(상기 장어가 포함된 수생환경을 포함하는 것으로 해석될 수 있음)에 공급 또는 첨가하는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[77] 상기 방법에 있어서, 상술한 스키조키트리움 속 미세조류 유래 바이오매스를 포함하는 장어용 사료 조성물의 급이량은 급이 대상 장어의 종류, 크기, 상태, 급이 목적 등에 따라서 적절히 결정될 수 있다. 일 구체예에서, 상기 스키조키트리움 속 미세조류 유래 바이오매스를 포함하는 장어용 사료 조성물의 급이량은 장어 체중을 기준으로 1%(w/w) 내지 15%(w/w), 보다 구체적으로 1%(w/w) 내지 15%(w/w), 1%(w/w) 내지 10%(w/w), 1%(w/w) 내지 8%(w/w), 1%(w/w) 내지 7%(w/w), 2%(w/w) 내지 15%(w/w), 2%(w/w) 내지 10%(w/w), 2%(w/w) 내지 8%(w/w), 2%(w/w) 내지 7%(w/w), 3%(w/w) 내지 15%(w/w), 3%(w/w) 내지 10%(w/w), 3%(w/w) 내지 8%(w/w), 또는 3%(w/w) 내지 7%(w/w)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[78] 상기 스키조키트리움 속 미세조류 유래 바이오매스, 장어용 사료 조성물, 및 장어의 성장 촉진은 앞서 설명한 바와 같다.

[79]

[80] 본 출원의 다른 양태에 따르면, 본 출원은 상술한 스키조키트리움 속 미세조류 유래 바이오매스를 포함하는 장어용 사료 조성물을 장어에 급이하는 단계를 포함하는, 장어의 성장 촉진 방법을 제공한다.

[81] 본 출원의 다른 양태에 따르면, 본 출원은 상술한 스키조키트리움 속 미세조류 유래 바이오매스 및/또는 스키조키트리움 속 미세조류 유래 바이오매스를 포함하는 장어용 사료 조성물의 장어 성장 촉진 용도를 제공한다.

[82] 상기 스키조키트리움 속 미세조류 유래 바이오매스, 장어용 사료 조성물, 및 장어의 성장 촉진은 앞서 설명한 바와 같다.

[83]

발명의 효과

[84] 본 발명은 스키조키트리움 속 (*Schizochytrium* sp.) 미세조류 유래 바이오매스를 포함하는 장어용 사료 조성물, 이를 이용한 장어의 양식방법에 관한 것이다. 본 발명의 스키조키트리움 속 (*Schizochytrium* sp.) 미세조류 유래 바이오매스를 포함하는 장어용 사료 조성물을 장어에 급이하는 경우, 장어의 성장이 촉진되므로, 장어용 사료 조성물 또는 사료 첨가제로서 유용하게 활용될 수 있다.

[85]

도면의 간단한 설명

[86] 도 1은 스키조키트리움 속 (*Schizochytrium* sp.) CD03-7004 변이균주와 야생형 스키조키트리움 속(*Schizochytrium* sp.) 균주 CD01-5000의 순수 분리 배양 결과, 색깔의 차이를 나타낸 도이다.

[87] 도 2는 야생형 CD01-5000 균주 대비 돌연변이 CD03-7004 균주에서 추가된 15 bp의 염기서열을 포함하는 DNA 단편을 증폭하는 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행한 후, 야생형 CD01-5000 균주와 돌연변이 CD03-7004 균주의 증폭된 DNA 단편의 크기를 확인한 도이다.

[88]

발명의 실시를 위한 형태

[89] 이하, 실시예를 통하여 본 출원을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 출원을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 출원의 요지에 따라 본 출원의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[90]

[91] 실시예

[92]

[93] (본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.)

[94]

[95] **실시예 1: 연구재료 및 방법**

[96] **1-1. 시험어 및 사육 관리**

[97] 수조는 1 톤 사각수조 (working vol 60L)를 사용하며, 사육수조 3기와 여과조 2기로 1 set로 구성하였다. 시험방법은 현재 (주)코팩스 중앙연구소에서 사육 관리중인 시험어인 육성기 장어(민물장어, *Anguilla Japonica*) (약 20 g size)를 각 시험수조에 25마리씩 이식한 다음. 1주간의 순치양식 후 제조된 시험사료를 체중 (body weight)의 3-7%(w/w)로, 1일 2회 (07:30, 14:30) 공급하여 8주간 사육하였다. 시험사료 공급 20-30분 후 잔여사료는 회수하여 동결건조하여 무게 측정한 다음 매회 사료공급 량에서 제외하였다. 각 시험구 수조는 온도는 29℃, D.O.는 6.5, pH 5.8 ±0.5로 관리하였다. NH_3, NO_2는 각 시험수조 여과조에서 1회/1일 채수하여 화학적 분석방법으로 측정하였다.

[98] 사육시험 종료 후 모든 수조의 장어 개체는 전수 무게를 측정하였으며, 이를 토대로 성장 성과(growth performance)를 다음과 같이 평가하였다.

[99] 초기무게 (IW) (g), Initial Weight (g/fish)

[100] 최종무게 (FW) (g), Final Weight (g/fish)

[101] 증체량 (WG) (g), Weight Gain = final weight - initial weight

[102] 총사료섭이량 (DFI) (g), Total Dry Feed Intake

[103] 사료효율 (FE) (%), Feed Efficiency = (wet weight gain/dry feed intake) x 100

[104] 증체율 (WGR) (%), Weight Gain Rate = (final weight - initial weight) x 100/initial weight

[105] 일성장률 (SGR) (%), Specific Growth Rate (%/day) = (log final weight - log initial weight)/days x 100

[106] 생존율 (SR) (%), Survival Rate = (No. of fish at end of experiment/No. of fish at start of experiment) x 100

[107]

[108] **1-2. 신규 스키조키트리움 속(*Schizochytrium* sp.) CD03-7004 변이균주의 준비**

[109] **1-2-1. 감마선 조사 방법을 통한 신규 스키조키트리움 속(*Schizochytrium* sp.) CD03-7004 변이균주의 개발**

[110] 순수 분리된 야생형 스키조키트리움 속(*Schizochytrium* sp.) CD01-5000 균주(기탁번호 KCTC 14344BP)를 글루코스 30 g/L를 포함하는 modified-GYEP(글루코스 10 g/L, 효모 추출물 1 g/L, 펩톤 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g/L, H_3BO_3 5.0 mg/L, $MnCl_2$ 3.0 mg/L, $CuSO_4$ 0.2 mg/L, $NaMo_4 \cdot 2H_2O$ 0.05 mg/L, $CoSO_4$ 0.05 mg/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.7 mg/L) 배지에 약 24시간 이상 배양하여 초기 대수기(Early Exponential phase) 단계에 이르도록 한 후, 배양액 샘플을 원심분리하여 균체를 수확하였다. 수확된 균체는 세포수가 약 10^9 cells/mL가 되도록 NaCl 1.0%를 포함하는 0.1M Phosphate Buffer Solution에 현탁하여 감마선 조사에 활용하였다.

[111] 감마선 조사 실험은 한국원자력연구원 첨단방사선연구소에서 진행하였으며, 2000~5000 GY 선량의 감마선을 조사하였다. 감마선이 조사된 미세조류 배양액 샘플은 암실에서 O/N 동안 Recovery 과정을 거친 후, 한천(Agar) 20 g/L를 포함한 GYEP 배지에 도말하여 30℃에서 약 5일간 배양한 후 생육 콜로니 수를 계수하여 감마선량 별 사멸율을 측정하였다.

[112] [계산식 1]

[113] 사멸률(%) = [{(무처리구의 콜로니 수) - (처리구의 콜로니 수)}/(무처리구의 콜로니 수)] X 100

[114] [표1]

감마선 선량 (kGY)	생육 콜로니 수 (EA)	사멸률 (%)
2.0	≥ 250	-
3.0	≥ 23	90.8
4.0	≥ 7	98.2
4.5	0	100
5.0	0	100
방사선 무처리구	≥ 250	0

[115] 그 결과, 표 1에 나타낸 바와 같이, 감마선 조사선량에 따른 생육 콜로니 수, 생균수의 CFU값이 95% 이상 감소되는 적정 선량을 확인하였다. 구체적으로, 2.0, 3.0, 4.0, 4.5, 5.0 kGY의 감마선 조사선량에서 각각 0%, 90.8%, 98.2%, 100%, 100%가 사멸되는 결과를 나타냈다. 4.5 GY 이상의 감마선 선량 조사 조건에서는 모두 사멸되어 미세조류 콜로니를 확보할 수 없었으며, 98.2%의 사멸률을 나타내는 4.0 kGY의 감마선 선량 조건을 선택하였다.

[116] 동일한 방법으로 신규 미세조류 균주 CD01-5000에 4.0 kGY 선량의 감마선을 조사한 후 GYEP 배지에서 배양하였다. 배양 중에 생육이 가능한 콜로니를 선별하여, 동일한 배지 및 배양 환경 조건에서 계대를 진행하였다. 계대 간 형태적으로 붉은색을 띄는 콜로니를 선별하여 단일 세포주로 순수 분리 배양한 후, 이를 촬영한 결과를 도 1에 나타내었다. 상기 스키조키트리움 속 균주를 스키조키트리움 속 (*Schizochytrium* sp.) CD03-7004 균주로 명명하고, 2022년 6월 20일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures: KCTC)에 기탁하여 수탁번호 KCTC15006BP를 부여받았다.

[117]

[118] **1-2-2. CD03-7004 돌연변이 균주와 야생형 CD01-5000 균주의 구별 마커 도출**

[119] 야생형 스키조키트리움 속(*Schizochytrium* sp.) CD01-5000 균주와 돌연변이 스키조키트리움 속(*Schizochytrium* sp.) CD03-7004 균주의 전체 게놈 서열(whole genome sequence)를 비교하여 CD03-7004에서 변이된 서열을 찾아 PCR 마커(marker)를 제작하였다.

[120] 구체적으로, 돌연변이 CD03-7004 균주는 게놈 상에서 야생형 CD01-5000 균주의 게놈과 비교하였을 때, 15 base pairs의 추가된 부분(하기 서열번호 1의 서열에서 굵은 글씨 부분, 서열번호 5)이 있음을 확인하였다.

[121]

[122] [돌연변이 CD03-7004 균주의 증폭 대상 DNA 단편 서열(서열번호 1)]

[123] tttcagactgctttttgctttttgcttgcttgctttt**tgcttgcttgctttt**ggcttgctttctttttgcttcttcctgcttgatccggtgaagaagaacggagcgaactaaaagaaaagagtcaatccgaagagag

[124]

[125] [야생형 CD01-5000 균주의 증폭 대상 DNA 단편 서열(서열번호 2)]

[126] tttcagactgctttttgctttttgcttgcttgctttggcttgctttctttttgcttcttcctgcttgatccggtgaagaagaacggagcgaactaaaagaaaagagtcaatccgaagagag

[127]

[128] 이 부분을 증폭하는 프라이머 A: 5'-TTTCAGACTGCTTTTTGCTTTTTG-3'(서열번호 3), 프라이머 B: 5'-CTCTCTTCGGATTGACTCTTTTCT-3'(서열번호 4)를 선정하였고, 이를 이용하여 PCR 증폭 반응을 진행하였다. PCR 반응은 taq polymerase를 함유하는 반응용액을 활용하여 95℃에서 5분간 변성 후, 95℃ 10초 변성, 50℃ 10초 어닐링, 72℃ 15초 중합을 35회 반복한 후, 72℃에서 5분간 중합

반응을 수행하였다. PCR 과정을 통하여 증폭된 반응액은 1.7% 아가로즈겔에 전기영동하여 증폭된 DNA 크기를 확인하여 도 2에 나타내었다.

[129] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 돌연변이 CD03-7004 균주에서 증폭된 DNA 단편은 약 140 bp 크기로 나타나, 약 120 bp 크기의 DNA 단편이 증폭된 야생형 CD01-5000 균주와 차이가 있음을 확인하였다.

[130] 따라서, 상기 결과를 통해, 돌연변이 CD03-7004 균주를 선별하기 위해 프라이머 A: 5'-TTTCAGACTGCTTTTTGCTTTTTG-3'(서열번호 3)와 프라이머 B: 5'-CTCTCTTCGGATTGACTCTTTTCT-3'(서열번호 4)를 활용할 수 있음을 알 수 있다.

[131]

[132] **1-2-3. 미세조류 바이오매스 건조분말(*Schizochytrium sp.* 분)의 제조**

[133] 실험에서 사용할 미세조류 바이오매스 건조분말은 스키조키트리움 속(*Schizochytrium* sp.) CD03-7004 균주(KCTC15006BP)를 이용하여 다음과 같은 방법으로 제조하였다.

[134] 30 L scale의 본 배양에 앞선 예비 배양을 위해, 500 ml 플라스크에서 작업량(working volume) 50 ml 및 글루코스 30 g/L를 포함하는 GYEP 배지에 각 균주를 접종하고, 진탕 인큐베이터(Shaking incubator)에서 30℃, 180 rpm으로 약 20시간 동안 배양하였다. 예비 배양물은 동일한 조건의 배지를 포함한 30 L 발효조에 접종하여 총 작업량(working volume) 20 L에서 발효 배양하였다. 30℃, 500 rpm, 0.5-1 vvm, pH 5-7 조건에서 작업량(working volume)의 20%에 해당하는 글루코스를 연속 투입하여 세포 배양에 활용하고, 이때의 글루코스 농도는 20 g/L 수준에서 유지되도록 주입하였다. 공급한 탄소원인 글루코스가 모두 소모되면 배양을 종료하였다. 배양이 끝난 배양액은 건조기를 활용하여 수분 함량이 약 5~8%가 되도록 건조하였다.

[135]

[136] **1-3. 시험사료 제조**

[137] 시험사료 제조는 단백원으로 코팩스 사료제조 어분(Glumar Co., Chille))과 상기 실시예 1-2-3.에서 제조된 *Schizochytrium sp.* 분 (CJ Co., Korea)을 사용하였으며, 효모 (Biolife Co., Brazil). 비타민 (Seoul vet Pharm Co., Korea), 미네랄 (Seoul vet Pharm Co., Korea), 전분 (Asai Co., Thailand)을 사용하였으며, 단백원으로 어분 100%인 대조사료 (CTL)와, 어분의 5%, 10%, 15%, 20%, 및 30%를 각각 *Schizochytrium sp.* 분으로 대체한 시험사료(대체사료) T1, T2, T3, T4, 및 T5를 제조하였다. 한편, 단백원은 모두 (주)코팩스 연구소 보유 분쇄기를 통하여 약 100 mesh 크기로 분쇄하여 사용하였다. 대조사료 및 시험사료의 조성은 하기 표 8에 후술하였다.

[138]

[139] **1-4. 생물(간중량) 지수 평가**

[140] 실험 종료 후 각 시험군에서 10 마리를 무작위 선별하여 간중량지수 (hepatosomatic index, HSI)와 장중량지수 (intestinosomatic index, ISI)를 측정하였다. 체중과 해부 후 적출된 간과 장의 무게를 전자저울을 사용하여 조사하였고 간중량지수 [(간 무게/체중)×100]와 장중량지수 [(간 무게/체중)×100]를 계산하였다.

[141]

[142] **1-5. 연구재료 및 어체 기본성분 분석**

[143] 연구재료 및 어체의 수분, 지방, 단백질 및 회분 분석을 수행하였다. 연구재료는 어분(Glumar Co., Chille))및 상기 *Schizochytrium sp.* 분을 사용하였으며, 어체의 경우 각 시험구당 유사한 중량의 장어 5마리씩을 무작위로 채포하여 세절기에 곱게 분쇄한 후 수분, 지방, 단백질 및 회분 분석을 수행하였다. 분석방법은 식품공전방법에 따라서 수행되었으며, 조지방 분석은 *Schizochytrium sp.* 분의 특성을 감안하여 산 분해법에 의하여 수행되었다.

[144]

[145] **1-6. 아미노산, 지방산 분석 및 Ca, P 분석**

[146] 연구재료인 어분 및 상기 *Schizochytrium sp.* 분, 어체의 아미노산, 지방산 및 Ca. P 함량평가를 수행하였다. 어체의 경우, 각 시험구에서 무작위 채포된 5마리의 분쇄육의 동결건조 분을 이용하여 아미노산, 지방산 및 Ca. P 함량평가를 수행하였다. 분석은 충남대 농업과학연구소 사료검정인정센터 (https:/agro.cnu.ac.kr/agro/index.do) 에 의뢰하였다.

[147]

[148] **1-6-1. 아미노산 분석 방법**

[149] 구성 아미노산 함량 분석은 AOAC 법 (2005)을 변형하여 이온 교환 크로마토그래피법를 이용한 ninhydrin post column 반응법으로 18 성분을 분석하였다. 구성 아미노산 16 성분의 경우 시료 0.2 g을 분해관에 넣고 6N HCl 10 ㎖를 가하고 질소가스를 주입한 후 110 ℃에서 24 시간 가수분해 시켰다. 여액을 감압농축기로 농축 후 0.2 M sodium citrate buffer로 50 ㎖로 정용한 후, 0.20 μm의 Cellulose acetate syringe filter로 여과한 여액을 분석시료로 사용하였다. 황함유 계열인 메티오닌(methionine)과 시스테인(cysteine)은 performic acid 산화법, tryptophan은 알칼리 가수분해법을 이용하였다. 분석조건은 표 2 및 표 3에 나타냈다.

[150] [표2]

총 아미노산에 대한 아미노산 자동 분석기의 분석 조건

Items	Conditions
Instrument	Hitachi, L-8900
Column	Ion exchange column (#2622PH column) 4.6 × 60 ㎜

Mobile phase	Buffer set (PH-SET KANTO)
Detector	UV/Vis (440, 570 ㎚)
Flow rate	Ninhydrin ; 0.30 ㎖/min Buffer ; 0.35 ㎖/min
Injection volume	20 μL

[151] [표3]

트립토판의 HPLC 분석 조건

Items	Conditions
Instrument	Waters Isocratic 600 pump, 486 UV/VIS detector
Column	CAPCELL PAK C18 (4.6 x 250 ㎜)
Mobile phase	0.0085M Sodium acetate : methanol = 95 : 5
Detector	UV 280 ㎚
Flow rate	1.0 ㎖/min
Injection volume	20 ㎕

[152]

[153] **1-6-2. 지방산 조성 분석 방법**

[154] 지방산 조성은 분쇄한 시료 약 10g에 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 클로로폼과 메탄올 혼합액(2:1) 약 100㎖를 가하여 상온에서 24시간 추출한 후 감압 농축하여 추출물을 제조하였다. 14% BF3-MeOH (Sigma, St Louis, Mo, USA) 용액으로 메틸에스테르화 시킨 후. Gas Chromatograph(HP 6890, Heslett Packard Ltd.,USA)로 분석하였다. Column은 HP-88 (100 m×0.25 mm i.d., film thickness 0.20 μm, Agilent, USA)을 사용하였으며, 컬럼오븐의 온도는 140℃에서 5분간 유지 후, 1분당 4℃씩 승온하여 240℃로 20분간 유지하였다. 주입구의 온도는 260℃로, 검출기 FID의 온도는270℃로 하였으며 운반기체는 N_2를 1㎖/min으로 사용하였으며 split ratio을1/50으로 조정하였다. Gas chromatography의 분석조건은 하기 표 4에서와 같은 조건으로 분석을 행하였고 각 지방산의 peak들은 표준지방산의 methyl ester의 머무름 시간과 비교하여 확인하였다. 지방산조성은 동정된 각 peak의 면적을 구한 뒤 각각의 면적비를 백분율로 나타내었다.

[155] [표4]

지방산에 대한 기체 크로마토그래피 분석 조건

Items	Conditions
Instrument	HEWLETT PACKARD 6890
Column	HP-88(100 m × 0.25 mm, 0.2 μm)

Injection port	260℃
Detection port	270℃
Column oven	140℃(5min), 4℃/min, 240℃(20min)
Detector	FID
Carrier gas	N_2
Injection volumn	1㎕
Split ratio	50:1

[156]

[157] **1-6-3. 무기질 분석 방법**

[158] 무기질 함량은 건식회화법으로 회화한 후의 잔사를 염산용액(1:1, v/v)에 녹여 시료용액을 조제한 후 칼슘(calcium, Ca)은 원자흡광분광광도계(GBC Scientific Equipment, SavantAA, Australia)로 측정하였으며, 인(P)은 몰리브덴청 비색법에 따라서 분광광도계(UV-2450, Shimadzu Co., Japan)로 470 ㎚에서 측정하였다. 모든 시약과 증류수는 무기질 분석용을 사용하였다.

[159]

[160] **1-7. 혈액 화학요소 분석**

[161] 실험 종료 후 각 시험구에서 10마리를 무작위 채포하여 미부 정맥에서 혈액 분석을 위한 plasma는 일회용 주사기로 heparin tube에 채혈하여 원심분리(2000 rpm, 15 min, 4 ℃) 후 획득하였고, Glutamate oxaloacetate transaminase(GOT), 콜레스테롤(cholesterol, CHO), 중성지방(triglyceride, TG), alkaline phosphatase (ALP), 및 총단백질 (total protein, TP)의 측정에는 혈액 분석기(NX500i, FUJI FILM, JAPAN)를 사용하였다.

[162]

[163] **1-8. 비특이적 면역분석**

[164] 라이소자임 활성도(Lysozyme activity) 측정을 위해 실험종료 후 각각의 시험구별 10마리의 장어 미부정맥에서 분리한 혈청 50 ul와 0.05M sodium phosphate buffer(Sigma, USA, pH 6.2)에 Micrococcus lysodeikticus(0.2 mg/ml)를 부유시킨 solution 1ml을 96-well plate에 혼합하였다. 반응은 20℃ 조건에서 분광광도계(Molecular Device, USA)의 흡광도 530 nm에서 0.5분과 5분에 측정하였다. Lysozyme의 활성 단위는 분당 0.001의 흡광도 감소를 나타내는 효소양으로 정의하였다.

[165] 중성백혈구의 식세포 활성도(phagocyte activity) 측정을 위해 실험종료 후 각각의 시험구별 10마리의 장어 미부정맥에서 분리한 혈청과 NBT solution (Sigma, USA)을 1:1의 비율로 각각 50 μL씩 혼합한 후, 25 ℃에서 30분 동안 반응시킨 반응물을 50 μL씩 유리튜브에 옮긴 후, formazan 생성을 감소시키기 위해 dimethyl formamide(Sigma, USA)를 1 mL씩 넣었다. 이후 2,000 ×g에서 5분 동안 원심분리

하여 상층액을 취한 후, 분광광도계(Molecular Device, USA)를 이용하여 540 nm에서 NBT의 감소 범위를 측정하였다. Blank는 dimethyl formamide(Sigma, USA)를 사용하였다.

[166]

[167] **1-9. 콜레시스토키닌 및 슈퍼옥사이드 디스뮤테이스 분석**

[168] 소화효소인 콜레시스토키닌(Cholecystokinin)와 항산화효소인 슈퍼옥사이드 디스뮤테이스(Superoxide dismutase, SOD)의 활성 분석을 위해 시험구별 10마리의 장어에서 혈액을 채취하여 4°C에서 2,000×g로 10분동안 원심분리기로 혈청을 분리한 후 -70°C에 보관하였다. 혈청을 이용한 ELISA 분석은 어류용 Cholecystokinin (CUSABIO, USA), SOD(CUSABIO, USA)를 측정할 수 있는 Kit를 사용하였으며, 제조사의 protocol에 따라 well당 50 μL의 혈장을 사용하여 3반복 진행하였다. 활성정도는 분광광도계(Molecular Device, USA)를 이용하여 450 nm의 흡광도에서 측정하였고, 결과값은 standard curve를 기준으로 ng/ml(SOD) 또는 pg/mL(Cholecystokinin)단위로 산정하였다.

[169]

[170] **실시예 2: 연구재료(어분 및 스키조키트리움 속 미세조류 분말) 분석**

[171] **2-1. 일반성분 (Proximate components)**

[172] 본 연구에 사용된 단백원인 어분(Fishmeal powder)과 스키조키트리움 속 미세조류 분말 (*Schizochytrium sp.* 분)의 일반성분을 평가하고, 하기 표 5에 나타냈다.

[173] [표5]

일반성분 (Proximate components) (%)	어분 분말 (Fishmeal powder; FP)	*Schizochytrium sp.* 분 (*Schizochytrium sp.* powder; SP)
수분 (Moisture)	1.76	0.63
조단백질 (Crude protein)	74.25	80.31
조지방 (Crude lipids)	9.91	11.36
회분 (Ash)	13.65	7.25
조섬유 (Crude fiber)	0.4	0.45
칼로리 (Calorie) (cal/100g)	447.25	493.08

[174] 표 5에 나타난 바와 같이, *Schizochytrium sp.* 분은 어분에 비하여 낮은 수분, 회분 함량을 갖고, 어분에 비하여 높은 조단백질 및 조지방 함량을 가짐을 확인할 수 있었다.

[175]

[176] **2-2. 아미노산 (Amino acids)**

[177] 본 연구에 사용한 두 가지 단백분인 어분과 *Schyzochytrium sp.* 분의 구성 아미노산 조성을 평가하고, g/총 아미노산100g 로 표시하여 표 6에 나타냈다.

[178] [표6]

Amino acids (g/총 아미노산100g)	어분 분말 (Fishmeal powder; FP)	*Schizochytrium sp.* powder (SP)
Aspartic acid	9.99	4.65
Threonine*	4.62	2.14
Serine	4.39	2.23
Glutamic acid	14.41	53.56
Proline	4.62	1.40
Glycine	6.73	2.53
Alanine	6.77	3.00
Cysteine	0.21	0.11
Valine*	5.22	3.01
Methionine*	3.24	1.51
Isoleucine*	4.29	1.96
Leucine*	7.85	3.45
Tyrosine	3.32	1.49
Phenylalanine*	4.08	1.93
Histidine*	4.67	1.18
Lysine*	8.83	3.65
Arginine*	6.76	12.18

[179] * 필수 아미노산

[180]

[181] 표 6에 나타난 바와 같이, 대부분의 아미노산 함량은 어분에서 높았으나, 글루탐산(glutamic acid) 함량은 어분에 비교하여 *Schyzochytrium sp.* 분 내에서 4배 정도에 이르렀으며, 필수아미노산인 아르기닌(arginine)은 역시 어분에서보다 *Schyzochytrium sp.* 분에서 높은 함량을 보였다.

[182]

[183] **2-3. 지방산 (Fatty acids)**

[184] 본 연구에 사용한 두 가지 단백분에 포함된 지방의 지방산 조성을 평가하고, g/총 지방산100g로 표시하여 표 7에 나타냈다.

[185] [표7]

지방산 (g/총 지방산100g)		약칭	어분 분말 (Fish meal powder; FP)	*Schizochytrium sp.* powder (SP)
포화 지방산	Caproic acid	C6:0	0.04	0.04
	Caprylic acid	C8:0	0.02	0.02
	Capric acid	C10:0	0.03	0.03
	Lauric acid	C12:0	0.06	0.05
	Myristic acid	C14:0	5.60	1.70
	Pentadecanoic acid	C15:0	0.52	0.12
	Palmitic acid	C16:0	19.96	36.70
	Magaric acid	C17:0	0.68	0.07
	Stearic acid	C18:0	6.68	1.51
	Arachidic acid	C20:0	0.07	0.21
	Heneicosylic acid	C21:0	0.90	0.00
	Behenic acid	C22:0	0.24	0.00
	Lignoceric acid	C24:0	1.58	1.67
불포화 지방산	Myristoleic acid	C14:1	0.17	0.11
	Pentadecenoic acid	C15:1	0.25	0.00
	Palmitoleic acid	C16:1	5.99	0.11
	Magaoleic acid	C7:1	0.83	0.04
	Oleic acid	C18:1n9	18.87	0.51
	Linoleic acid	C18:2n6	2.37	0.37
	γ-linoleic acid	C18:3n6	0.26	0.23
	Linolenic acid	C18:3n3	0.64	0.25
	Eicosenoic acid	C20:1n9	1.89	0.01
	Eicosadienoic acid	C20:2n6	0.16	0.00
	Dihomo-δ-Linoleicacid	C20:3n6	0.07	0.00
	Eicosatrienoic acid	C20:3n3	0.31	0.00
	Arachidonic acid	C20:4n6	2.84	0.12
	EPA (eicosapentaenoic acid)	C20:5n3	9.63	0.72

	Erucic aicd	C22:1n9	0.29	0.24
	Docosadienoic acid	C22:2n6	0.68	0.66
	Nervonic acid	C24:1n9	3.25	0.40
	DHA (docosahexaenoic acid)	C22:6n3	15.09	45.12

[186] 두 단백원 소재 간 일부 지방산의 함량비는 매우 큰 차이를 보였다. 주요 차이를 보이는 지방산은 미리스트산 (Myristic acid) (C14:0, FP, 5.60; SP, 1.70), 팔미트산 (palmitic acid) (C16:0, FP, 19.96; SP, 36.70), 스테아르산 (stearic acid) (C18:0, FP, 6.68; SP, 1.51), 팔미톨레산 (palmitoleic acid) (C16:1, FP, 5.99; SP, 0.11), 올레산 (oleic acid) (C18:1n9, FP, 18.87; SP, 0.51), 리놀레산 (linoleic acid) (C18:2n6, FP, 2.37; SP, 0.37), 리놀렌산 (linolenic acid) (C18:3n3, FP, 0.64; SP, 0.25), 이코사디엔산 (eicosadienoic acid) (C20:1n9, FP, 1.89; SP, 0.01), 아라키돈산 (arachidonic acid) (C20:4n6, FP, 2.84; SP, 0.12), EPA (이코사펜타에노산, eicosapentaenoic acid) (C16:0, FP, 9.63; SP, 0.72), 네르본산 (Nervonic acid) (C24:1n9, FP, 3.25; SP, 0.40) 및 DHA (도코사헥사엔산, docosahexanoic acid) (C22:6n3), FP, 15.09; SP, 45.12)가 있었다. *Schizochytrium sp.* 분에서는 많은 지방산이 어분보다 낮은 경향이었지만, 반면에 팔미트산 및 DHA의 조성비는 어분에 비교하여 *Schizochytrium sp.* 분에서 매우 높았다.

[187]

[188] **2-4. 대조사료 및 시험사료의 제조**

[189] 단백원으로 어분 100%인 대조사료 (control, CTL)와, 어분의 5%, 10%, 15%, 20%, 및 30%를 각각 *Schizochytrium sp.* 분으로 대체한 시험사료(대체사료) T1, T2, T3, T4, 및 T5를 하기 표 8에 나타낸 조성으로 제조하였다.

[190] [표8]

Components (%)	**CTL**	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**	**T5**
Brown Fish meal (Jack mackerel)[a]	72	68.4	64.8	61.2	57.6	50.4
Schizochytrium sp. powder[b]	0	3.3	6.6	10	13.3	20
Brewer's Yeast[c]	3	3	3	3	3	3
Starch[d]	23	23	23	23	23	23
Cellulose[e]	0	0.3	0.6	0.8	1.1	1.6

Vitamin[f]	1	1	1	1	1	1
Mineral[f]	1	1	1	1	1	1
Total	100	100	100	100	100	100

[191] a, Glumar Co., Chille

[192] b, CJ Co., Korea

[193] c, Biolife Co., Brazil

[194] d, Asai Co., Thailand

[195] e, Nelson-Jameson, Inc., USA

[196] f, Seoul vet Pharma Co., Korea

[197]

[198] **2-5. 시험사료 일반성분**

[199] 본 실험에 사용한 대조사료 (CTL)와 시험사료(대체사료) T1 내지 T5의 기본 성분을 평가하여 표 9에 나타냈다.

[200] [표9]

일반성분 (Proximate components) (%)	**CTL**	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**	**T5**
수분 (Moisture)	3.36	3.84	3.84	3.36	3.68	3.49
조단백질 (Crude protein)	43.66	43.52	45.20	44.86	44.93	45.45
조지방 (Crude lipids)	6.93	7.24	6.79	6.83	6.39	6.11
조탄수화물 (Crude carbohydrates)	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00	24.00
회분 (Ash)	22.05 ±1.65	21.4 ±1.83	20.17 ±0.56	20.95 ±0.70	21.0 ±0.38	20.95 ±1.65
칼로리 (Calorie) (cal/100g)	353.80	356.96	358.28	357.40	352.40	351.12

[201] 표 9에 나타난 바와 같이, 수분, 조단백질 함량, 조지방 함량 및 회분 등에서 차이가 없었으며, 조탄수화물 함량도 동일하게 평가되었고, 칼로리 역시 사료 간의 차이가 거의 없었음을 확인할 수 있었다.

[202]

[203] **2-6. 시험사료 지방산 분석**

[204] 본 실험에 사용한 대조사료 (CTL)와 시험사료(대체사료) T1 내지 T5의 지방산 조성비(profile)를 평가하고, g/총 지방산100g 로 표시하여 표 10에 나타냈다.

[205] [표10]

지방산 (g/총 지방산100g)		약칭	CTL	T1	T2	T3	T4	T5
포화 지방산	Caproic acid	C6:0	0.04	0.05	0.05	0.07	0.13	0.05
	Caprylic acid	C8:0	0.03	0.03	0.02	0.03	0.07	0.08
	Capric acid	C10:0	0.10	0.12	0.10	0.03	0.12	0.07
	Lauric acid	C12:0	0.10	0.09	0.10	0.11	0.10	0.10
	Myristic acid	C14:0	5.77	5.50	5.40	5.11	5.05	4.66
	Pentadecanoic acid	C15:0	0.82	0.77	0.62	0.51	0.54	0.43
	Palmitic acid	C16:0	20.67	21.12	21.36	23.47	24.10	26.16
	Magaric acid	C17:0	0.84	0.54	0.50	0.52	0.48	0.51
	Stearic acid	C18:0	6.86	6.29	6.35	6.54	6.11	5.79
	Arachidic acid	C20:0	0.08	0.04	0.06	0.05	0.05	0.05
	Heneicosylic acid	C21:0	0.92	0.86	0.83	0.80	0.76	0.70
	Behenic acid	C22:0	0.23	0.20	0.19	0.17	0.17	0.15
	Lignoceric acid	C24:0	1.47	1.41	1.37	1.34	1.25	1.08
불포화 지방산	Myristoleic acid	C14:1	0.16	0.16	0.15	0.14	0.14	0.11
	Pentadecenoic acid	C15:1	0.21	0.21	0.20	0.20	0.21	0.13
	Palmitoleic acid	C16:1	6.11	5.89	5.64	5.19	5.20	4.54
	Magaoleic acid	C7:1	0.75	1.01	0.73	0.69	0.63	0.61
	Oleic acid	C18:1n9	18.36	18.89	17.89	16.12	15.70	13.23
	Linoleic acid	C18:2n6	2.27	2.22	2.12	2.02	1.99	1.76
	γ-linoleicacid	C18:3n6	0.27	0.29	0.28	0.28	0.26	0.27
	Linolenic acid	C18:3n3	0.66	0.63	0.62	0.63	0.60	0.60
	Eicosenoic acid	C20:1n9	2.08	1.77	1.69	1.70	1.47	1.29
	Eicosadienoic acid	C20:2n6	0.18	0.14	0.14	0.16	0.12	0.11
	Dihomo-δ-Linoleic acid	C20:3n6	0.05	0.03	0.03	0.05	0.06	0.03
	Eicosatrienoic acid	C20:3n3	0.32	0.35	0.33	0.30	0.30	0.25
	Arachidonic acid	C20:4n6	2.64	2.36	2.27	2.36	2.02	1.75

	EPA	C20:5n3	9.40	8.89	8.54	8.08	7.71	7.01
	Erucic aicd	C22:1n9	0.29	0.28	0.29	0.32	0.29	0.28
	Docosadienoic acid	C22:2n6	0.67	0.63	0.67	0.68	0.64	0.65
	Nervonic acid	C24:1n9	3.18	3.08	2.98	2.80	2.72	2.44
	DHA	C22:6n3	14.47	16.14	16.57	19.53	21.01	25.11

[206] 상기 표 10에 나타난 바와 같이, 어분과 *Schizochytrium sp.* 분을 일정비율로 혼합한 시험사료에서는 혼합비에 비례하여 지방산 조성에서의 차이가 확인되었다. *Schizochytrium sp.* 분의 혼합비가 증가할수록, 팔미트산 및 DHA의 함량이 증가함을 확인할 수 있었다.

[207]

[208] **실시예 3: 성장 성과(Growth performance) 평가**

[209] 육성기 민물장어 (*A. japonica*, 약 20g size)를 대상으로 대조사료 및 시험사료 T1 내지 T5를 각 8 주간 1일 2회 공급하여 성장 성과(Growth performance)를 평가하고, 하기 표 11에 나타냈다.

[210] [표11]

	CTL	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**	**T5**
IW[a] (g)	255.00±0.00	225.67±0.58	255.5±0.71	255.33±0.58	225.00±0.50	225.33±0.58
FW[b] (g)	649.33±10.89	638.33±10.77	668.00±28.28	635.59±8.53	622.17±18.11	621.87±14.18
WG[c] (g)	424.33±10.89	412.67±10.75	422.5±28.99	410.25±9.08	397.17±18.32	396.53±14.76
DFI[d] (g)	487.22±0.42	482.34±4.87	487.01±0.26	485.31±0.75	487.04±1.37	486.81±0.36
FE[e] (%)	87.09±2.16	85.55±1.52	90.86±5.0	84.53±1.89	81.54±3.54	81.45±2.97
WGR[f] (%)	188.59±4.84	182.87±4.77	196.25±13.47	182.07±4.47	176.52±8.32	175.99±6.99
SGR[g] (%/day)	1.89±0.03	1.86±0.03	1.94±0.08	1.85±0.03	1.82±0.05	1.81±0.05
SR[h] (%)	100±0.00	100±0.00	100±0.00	97.78±3.85	100±0.00	97.78±3.85

[211] [a]IW (g), 초기무게, Initial Weight (g/fish)

[212] [b]FW (g), 최종무게, Final Weight (g/fish)

[213] [c]WG (g), 증체량, Weight Gain = final weight - initial weight

[214] [d]DFI (g), 총사료섭이량, Total Dry Feed Intake

[215] [e]FE (%), 사료효율, Feed Efficiency = (wet weight gain/dry feed intake) x 100

[216] [f]WGR (%), 증체율, Weight Gain Rate = (final weight - initial weight) x 100/initial weight

[217] [g]SGR (%), 일성장률, Specific Growth Rate (%/day) = (log final weight - log initial weight)/days x 100

[218] [h]SR (%), 생존율, Survival Rate = (No. of fish at end of experiment/No. of fish at start of experiment) x 100

[219]

[220] 상기 표 11에 나타난 바와 같이, 증체율 (WGR)은 T2 (196.25±13.47) > 대조사료 (188.59±4.84) > T1(182.87±4.77) > T3 (182.07±4.47) > T4 (176.52±8.32 > T5 (175.99±6.99) 순이었고, 사료효율 (FE)은 T2 (90.86±5.0) > 대조사료 (87.09±2.16) > T1 (85.55±1.52) > T3 (84.53±1.89) > T4 (81.54±3.54) > T5 (81.45±2.97) 순이었으며, 일성장률 (SGR) 역시 T2 (1.94±0.08) > 대조사료 (1.89±0.03[n]) > T1 (1.86±0.03) > T3 (1.85±0.03) > T4 (1.82±0.05) > T5(1.81±0.05) 순으로, 시험사료 T2에서 가장 우수한 증체율, 사료효율 및 일성장률을 보였음을 확인할 수 있었다. 생존율(SR)은 시험구간 97.72%~100% 사이로 유의한 차이를 보이지 않았다.

[221] 이와 같이, 시험사료 T2의 혼합비로 어분을 *Schizochytrium sp.* 분으로 대체하는 경우, 장어의 성장이 촉진되어 장어용 사료 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

[222]

[223] **실시예 4: 생물지수 평가**

[224] 생물학적 특성인 간중량지수(HSI)와 장중량지수(ISI)는 일반적으로 어류의 사료영양상태나 서식환경조건 및 스트레스 등에 따라 차이를 보이는 것으로 알려져 있다. 대조사료 및 시험사료 T1 내지 T5를 급이한 장어군의 간중량지수 및 장중량지수를 평가한 결과를 하기 표 12에 나타냈다.

[225] [표12]

	CTL	T1	T2	T3	T4	T5
간중량지수[a](HSI)	1.86±0.37	2.02±059	1.91±0.22	1.86±0.24	2.15±0.45	1.99±0.22
장중량지수[b](VSI)	5.34±1.03	5.34±1.43	5.11±0.59	5.52±0.73	5.97±1.25	5.40±0.61

[226] [a] Liver weight(g)/Body weight(g) x 100[b] Intestine weight(g)/Body weight(g) x 100

[227]

[228] 표 12에 나타난 바와 같이, 대조사료 및 시험사료(T1 내지 T5) 공급 장어군 간 간중량지수와 장중량지수에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 이에 따라 시험사료의 함량비 범위로 어분을 *Schizochytrium sp.* 분으로 안전하게 대체할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[229]

[230] **실시예 5: 혈액 화학요소 분석**

[231] 어류 혈액의 화학적 검사는 다양한 질병의 진단 혹은 장기의 손상여부 및 스트레스의 정도 등의 생리학적 상태변화를 진단할 수 있어 오래전부터 건강진단의 지표로 활용되고 있다. 8주간의 대조사료 및 시험사료를 공급한 시험어 각 10마리를 무작위 채포하여 혈장 내 Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), 중성지방(triglyceride, TG), 콜레스테롤(cholesterol, CHO), alkaline phosphatase (ALP), 및 총단백질 (total protein, TP)를 측정하고, 표 13에 나타냈다.

[232] [표13]

	CTL	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**	**T5**
GOT	107.2±37.1	118.2±34.2	103.4±27.5	93.8±19.6	111.6±33.5	181.8±126.9
TG	1324.0±721.5	1192±360.7	1048.8±574.4	1023.2±260.5	980.8±381.9	746.4±274.7
CHO	363.8±59.0	356.8±128.8	346.8±59.0	345.3±38.2	354±68.2	311.4±57.5
ALP	1326.4±585.4	888.2±375.2	1061.2±459.3	1166.6±380.8	1168.4±459.2	1155.6±394.0
TP	4.5±0.3	4.62±0.6	4.36±0.4	4.2±0.1	4.34±0.5	4.86±1.3

[233] 표 13에 나타난 바와 같이, 대조사료 공급 장어군과 시험사료 (T1~T5) 공급군 모두 혈중 간 손상지수인 GOT(GOT는 aspartate aminotransferase(AST)로도 알려져 있다), 콜레스테롤 (CHO), 간의 주요 효소인 Alkaline phosphatase (ALP), 총 단백질 (TP)의 혈중 농도에 있어 유사한 수치를 보였다. 혈중 중성지방 (TG)은 시험사료 T1 내지 T5에서, 어분 대체 비율이 증가함에 따라 대조사료 공급 장어군에 비교하여 감소하는 경향을 보였으나, 유의한 차이는 나타나지 않았다.

[234] 이에 따라, 시험사료의 함량비 범위로 어분을 *Schizochytrium sp.* 분으로 안전하게 대체할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[235]

[236] **실시예 6: 비특이적 면역, 콜레시스토키닌 및 슈퍼옥사이드 디스뮤테이스 분석**

[237] 척추동물인 어류 역시 면역은 비특이적 면역과 특이적 면역에 의한 방어체계를 갖고 있으며, 면역활성은 먹이환경과 수질환경 등의 변화에 민감하게 반응한다고 알려져 있다. 체액성 면역인자인 라이소자임(lysozyme)의 활성과 세포성 면역요소인 중성백혈구의 식세포 활성(phagocytic activity)을 평가함으로써 대조사료

(CTL) 공급 장어군과 시험사료 T1 내지 T5 공급 장어군 사이의 비특이적 면역에 미치는 효과를 평가하였다(표 14).

[238] 아울러, 담낭의 수축과 췌장의 효소분비 촉진호르몬인 콜레시스토키닌(choesystokinin)의 평가를 통한 소화기능을 평가하였고, 혈액 내 항산화 효소인 슈퍼옥사이드 디스뮤테이스(Superoxide dismutase, SOD) 활성을 평가하여 혈중 항산화 활성을 비교하였다(표 14).

[239] [표14]

	CTL	T1	T2	T3	T4	T5
Lysozyme activity	23.27±3.90^{ns}	22.69±5.07	24.52±4.96	22.77±3.21	22.89±4.10	22.74±3.40
Phagocytic activity	140.99±65.35^{ns}	108.04±53.14	166.45±10.328	124.25±47.28	128.61±81.61	122.32±36.48
Cholecystokinin activity	1827.00±1266.53^{ns}	727.40 ±682.68	2645.5 ±1141.55	1494.20 ±596.29	2601.40 ±990.34	2189.70 ±1132.49
Superoxide dismutase activity	21.21±0.83^{ns}	21.17±1.29	20.33±3.10	21.68±0.21	21.74±0.35	21.03±1.12

[240] 표 14에 나타난 바와 같이, 라이소자임 활성(Lysozyme activity), 식세포 활성(Phagocytic activity), 콜레시스토키닌 활성(Cholecystokinin activity), 슈퍼옥사이드 디스뮤테이스 활성(Superoxide dismutase activity)은 모두 대체사료 및 시험사료 공급 장어군 간 유사한 수준을 보여, 시험사료의 함량비 범위로 어분을 *Schizochytrium sp.* 분으로 안전하게 대체할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[241]

[242] **실시예 7: 전어체 분석**

[243] **7-1. 기본성분**

[244] 전어체 5마리를 마쇄 혼합한 후 수분함량을 측정하였으며, 건조 마쇄분을 대상으로는 기본성분 (조단백, 조지방, 회분)과 Ca, P 함량을 측정하고, 그 결과를 표 15에 나타냈다.

[245] [표15]

일반성분 (Proximate components) (%)	CTL	T1	T2	T3	T4	T5
수분 (Moisture)	66.16	65.73	68.13	66.61	67.35	68.64

조단백질 (Crude protein)	14.79	14.69	13.43	14.06	13.57	14.16
조지방 (Crude lipids)	13.09	14.15	12.52	13.33	13.27	12.10
회분 (Ash)	5.96	5.43	5.92	6.00	5.81	5.10
Ca	1.05	1.00	1.10	1.14	1.08	1.00
P	1.17	1.05	1.14	1.12	1.13	1.07

[246] 표 15에 나타난 바와 같이, 전어체의 수분함량, 조단백질, 조지방, 회분, Ca, P의 함량에서 대조사료 (CTL) 공급 장어군과 시험사료 (T1~T5) 공급 장어군 간 유사한 수준을 보여, 시험사료의 함량비 범위로 어분을 *Schizochytrium sp.* 분으로 안전하게 대체할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[247]

[248] **7-2. 구성 아미노산**

[249] 대조사료 (CTL) 공급 장어군과 시험사료 (T1~T5) 공급 장어군의 아미노산 조성을 평가한 결과를 하기 표 16에 나타냈다.

[250] [표16]

Amino acids (g/100g) 총 아미노산	CTL (%)	T1 (%)	T2 (%)	T3 (%)	T4 (%)	T5 (%)
Aspartic acid	4.24(9.3)	4.07(9.4)	4.29(9.3)	4.29(9.3)	4.49(9.3)	4.53(9.3)
Threonine*	2.03(4.5)	1.94(4.5)	2.07(4.5)	2.04(4.4)	2.14(4.5)	2.16(4.4)
Serine	2.02(4.4)	1.89(4.4)	2.07(4.5)	2.02(4.4)	2.12(4.4)	2.12(4.4)
Glutamic acid	6.02(13.2)	5.77(13.4)	6.17(13.3)	6.17(13.3)	6.52(13.6)	6.53(13.4)
Proline	2.72(6.0)	2.38(5.5)	2.81(6.1)	2.79(6.0)	2.86(6.0)	2.84(5.8)
Glycine	4.51(9.9)	3.82(8.9)	4.67(10.1)	4.56(9.9)	4.69(9.8)	4.59(9.4)
Alanine	3.34(7.3)	3.04(7.0)	3.41(7.4)	3.37(7.3)	3.49(7.3)	3.50(7.2)
Valine*	2.01(4.4)	1.98(4.6)	2.00(4.3)	2.00(4.3)	2.10(4.4)	2.17(4.5)
Isoleucine*	1.70(3.7)	1.70(3.9)	1.68(3.6)	1.71(3.7)	1.81(3.8)	1.87(3.8)
Leucine*	3.27(7.2)	3.20(7.4)	3.27(7.1)	3.30(7.1)	3.46(7.2)	3.53(7.3)
Tyrosine	1.26(2.8)	1.28(3.0)	1.29(2.8)	1.32(2.9)	1.38(2.9)	1.36(2.8)
Phenylalanine*	1.75(3.8)	1.69(3.9)	1.76(3.8)	1.76(3.8)	1.84(3.8)	1.88(3.9)
Histidine*	1.75(3.8)	1.73(4.0)	1.78(3.8)	1.80(3.9)	1.86(3.9)	1.97(4.1)
Lysine*	3.74(8.2)	3.69(8.5)	3.76(8.1)	3.80(8.2)	3.96(8.2)	4.04(8.3)

Arginine*	3.08(6.8)	2.89(6.7)	3.14(6.8)	3.19(6.9)	3.28(6.9)	3.29(6.8)
Cysteine	0.48(1.1)	0.51(1.2)	0.53(1.1)	0.52(1.1)	0.51(1.1)	0.55(1.1)
Methionine*	1.47(3.2)	1.54(3.6)	1.56(3.4)	1.53(3.3)	1.49(3.1)	1.64(3.4)
Tryptophan*	0.15(0.3)	0.08(0.2)	0.13(0.3)	0.11(0.2)	0.11(0.2)	0.12(0.3)
Total	45.54	43.20	46.39	46.28	48.11	48.69

[251] * 필수 아미노산

[252]

[253] 표 16에 나타난 바와 같이, 전어체의 구성 아미노산 조성에서 대조사료 (CTL) 공급 장어군과 시험사료 (T1~T5) 공급 장어군 간 유사한 수준을 보였다. 이와 같이, 어분과 *Schizochytrium sp.* 분 사이에는 필수아미노산을 포함하여 아미노산 조성비에서 큰 차이를 보였지만(표 6), 표 16에 나타난 바와 같이 어분을 *Schizochytrium sp.* 분으로 대체한 시험사료를 급이한 장어 전어체의 구성 단백질에 미치는 영향은 거의 없는 것으로 판단되어, 시험사료의 함량비 범위로 어분을 *Schizochytrium sp.* 분으로 안전하게 대체할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[254]

[255] **7-3. 지방산**

[256] 대조사료 (CTL) 공급 장어군과 시험사료 (T1~T5) 공급 장어군의 지방산 조성을 평가한 결과를 하기 표 17에 나타냈다.

[257] [표17]

지방산 (g/총 지방산100g)		약칭	CTL	T1	T2	T3	T4	T5
포화 지방산	Caproic acid	C6:0	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02
	Caprylic acid	C8:0	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02
	Capric acid	C10:0	0.02	0.02	0.02	0.04	0.06	0.01
	Lauric acid	C12:0	0.07	0.06	0.07	0.08	0.08	0.07
	Myristic acid	C14:0	4.14	3.77	4.04	3.80	3.78	3.59
	Pentadecanoic acid	C15:0	0.25	0.23	0.27	0.23	0.23	0.22
	Palmitic acid	C16:0	22.62	20.89	21.13	21.67	21.53	21.70
	Magaric acid	C17:0	0.32	0.33	0.34	0.28	0.29	0.29
	Stearic acid	C18:0	3.56	3.60	3.28	3.77	3.57	3.57
	Arachidic acid	C20:0	0.15	0.13	0.15	0.15	0.14	0.14
	Heneicosylic acid	C21:0	0.15	0.14	0.09	0.09	0.14	0.13
	Behenic acid	C22:0	0.11	0.11	0.10	0.12	0.12	0.12
	Lignoceric acid	C24:0	0.39	0.37	0.40	0.37	0.36	0.34

불포화 지방산	Myristoleic acid	C14:1	0.17	0.14	0.19	0.19	0.18	0.16
	Pentadecenoic acid	C15:1	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03
	Palmitoleic acid	C16:1	8.87	9.02	9.34	8.61	8.55	8.68
	Magaoleic acid	C7:1	0.46	0.43	0.48	0.44	0.44	0.39
	Oleic acid	C18:1n9	43.88	45.79	44.53	44.62	43.84	43.92
	Linoleic acid	C18:2n6	1.12	1.16	1.05	0.91	0.96	0.92
	γ-linoleicacid	C18:3n6	0.17	0.15	0.14	0.15	0.14	0.14
	Linolenic acid	C18:3n3	0.23	0.21	0.23	0.23	0.22	0.22
	Eicosenoic acid	C20:1n9	1.56	1.42	1.47	1.40	1.39	1.48
	Eicosadienoic acid	C20:2n6	0.43	0.41	0.44	0.37	0.4	0.4
	Dihomo-δ-Linoleica cid	C20:3n6	0.21	0.2	0.21	0.19	0.24	0.21
	Eicosatrienoic acid	C20:3n3	0.02	0.03	0.02	0	0.02	0.02
	Arachidonic acid	C20:4n6	0.73	0.65	0.66	0.63	0.64	0.63
	EPA (eicosapentaeno ic acid)	C20:5n3	2.05	2.01	2	1.82	1.76	1.55
	Erucic aicd	C22:1n9	0.11	0.12	0.11	0.11	0.11	0.11
	Docosadienoic acid	C22:2n6	0.49	0.54	0.57	0.52	0.55	0.52
	Nervonic acid	C24:1n9	2.29	2.27	2.27	2.28	2.23	2.11
	DHA (docosahexaen oic acid)	C22:6n3	5.36	5.75	6.33	6.82	7.95	8.27

[258] 표 17에 나타난 바와 같이, 일부 고도불포화지방산, 예컨대 리놀레산(Linoleic acid) (CTL, 1.12 > T1, 1.16 > T2, 1.05 > T3, 0.91 > T4, 0.96 > T5, 0.92), EPA (CTL, 2.05 > T1, 2.01 > T2, 2.00 > T3, 1.82 > T4, 1.76 > T5, 1.55), DHA (CTL, 5.36 < T1, 5.75 < T2, 6.33 < T3, 6.82 < T4, 7.95 < T5, 8.27)등은 *Schizochytrium sp.* 분의 대체 비율에 비례한 함량차이를 나타낸 것을 확인할 수 있었다. 이는, 시험평가에 사용된 어분과 *Schizochytrium sp.* 분의 지방산 조성비 중 일부 지방산은 구성비는 두 원료 간 큰 차이(표 7)를 보인 바 있으며, 대조사료 (CTL)와 시험사료 T1 내지 T5에서도 *Schizochytrium sp.* 분의 혼합비에 따른 차이(표 10)를 보인 바 있었던 결과와 일관된 것이다. 이와 같이, 어분과 *Schizochytrium sp.* 분의 지방산 조성은 큰 차이를 보였으며, 이 중 일부 필수 고도 불포화 지방산의 조성 차이는 사료 공급 후 어체 지방산 조성의 차이에도 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

[259]

[260] [수탁번호]

[261] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터 (KCTC)

[262] 수탁번호 : KCTC15006BP

[263] 수탁일자 : 20220620

[264]

(번 역 문)

특허절차를 위한 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약

국제양식

원기탁의 수탁증

수 신: 씨제이 제일제당 주식회사
대한민국 서울시 중구 동호로 330
씨제이 제일제당 센터
(우) 100-400

Ⅰ. 미생물의 명칭	
기탁자에 의해 주어진 명칭: *Schizochytrium* sp. CD03-7004	국제기탁기관이 부여한 수탁번호: KCTC15006BP
Ⅱ. 과학적 성질 및/또는 분류학상 위치	
상기 Ⅰ에 표시된 미생물에 다음을 첨부하였다. [ ] 과학적 성질 [ ] 분류학상 위치	
Ⅲ. 수령 및 수탁	
본 국제기탁기관은 상기 Ⅰ.에 표시된 미생물을 수탁받고 2022 년 6 월 20 일 수령하였다.	
Ⅳ. 이송에 대한 수탁증	
상기Ⅰ.에 표시된 미생물은 본 국제기탁기관에 의하여 수령하고 원기탁을 부다페스트 조약하의 기탁기관으로의 이송 요구를 받았다.	
Ⅴ. 국제기탁기관	
명 칭: 생물자원센터 주 소: (56212) 전라북도 정읍시 입신길 181 (신정동) 한국생명공학연구원 전북분원 생물자원센터	기탁기관 날인: 2022 년 6 월 20 일

위 번역문 원본과 상위없음

청구범위

[청구항 1] 스키조키트리움 속 (*Schizochytrium* sp.) 미세조류 유래 바이오매스를 2.25 중량% 내지 45 중량%로 포함하는 장어용 사료 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 미세조류 유래 바이오매스는 미세조류, 상기 미세조류의 배양물, 상기 배양물의 건조물, 및 상기 건조물의 파쇄물로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하는 것인, 장어용 사료 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 미세조류 유래 바이오매스를 4 중량% 내지 8 중량%로 포함하는 것인, 장어용 사료 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 미세조류 유래 바이오매스는 단백질을 40 중량% 내지 95 중량%로 포함하는 것인, 장어용 사료 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 미세조류 유래 바이오매스는 지방을 3 중량% 내지 30 중량%로 포함하는 것인, 장어용 사료 조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 스키조키트리움 속 미세조류는 스키조키트리움 아그레가툼 (*Schizochytrium aggregatum*), 스키조키트리움 리마시눔 (*Schizochytrium limacinum*) 및 스키조키트리움 미누툼 (*Schizochytrium minutum*)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 장어용 사료 조성물.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 장어는 일본장어(*Anguilla japonica*), 큰장어(*Anguilla marmorata*), 유럽장어(*Anguilla anguilla*), 미국장어(*Anguilla rostrata*) 및 비콜라장어(*Anguilla bicolor*)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 장어용 사료 조성물.

[청구항 8] 제1항에 있어서, 장어의 성장을 촉진하는 것인, 장어용 사료 조성물.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 장어의 성장을 촉진하는 것은 장어의 증체율(WGR, Weight Gain Rate)을 증가시키는 것인, 장어용 사료 조성물.

[청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 장어의 성장을 촉진하는 것은 장어의 사료효율(FE, Feed Efficiency)을 증가시키는 것인, 장어용 사료 조성물.

[청구항 11] 제8항에 있어서, 상기 장어의 성장을 촉진하는 것은 장어의 일성장률 (SGR, Specific Growth Rate)을 증가시키는 것인, 장어용 사료 조성물.

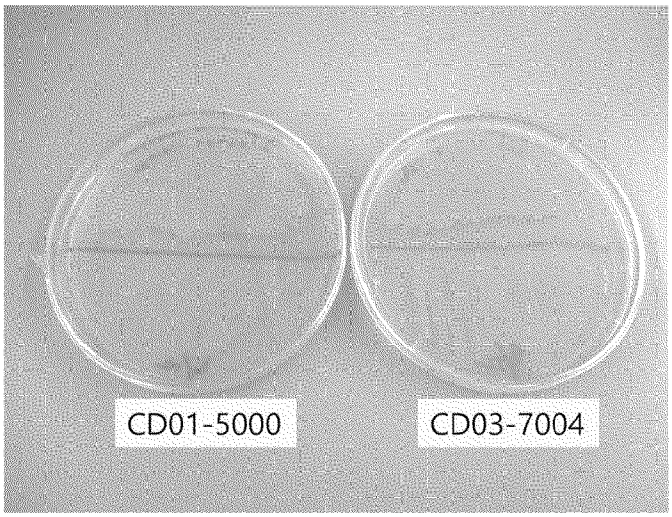
[청구항 12] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 장어용 사료 조성물을 장어에 급이하는 단계를 포함하는, 장어의 양식방법.

[청구항 13] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 장어용 사료 조성물을 장어에 급이하는 단계를 포함하는, 장어의 성장 촉진 방법.

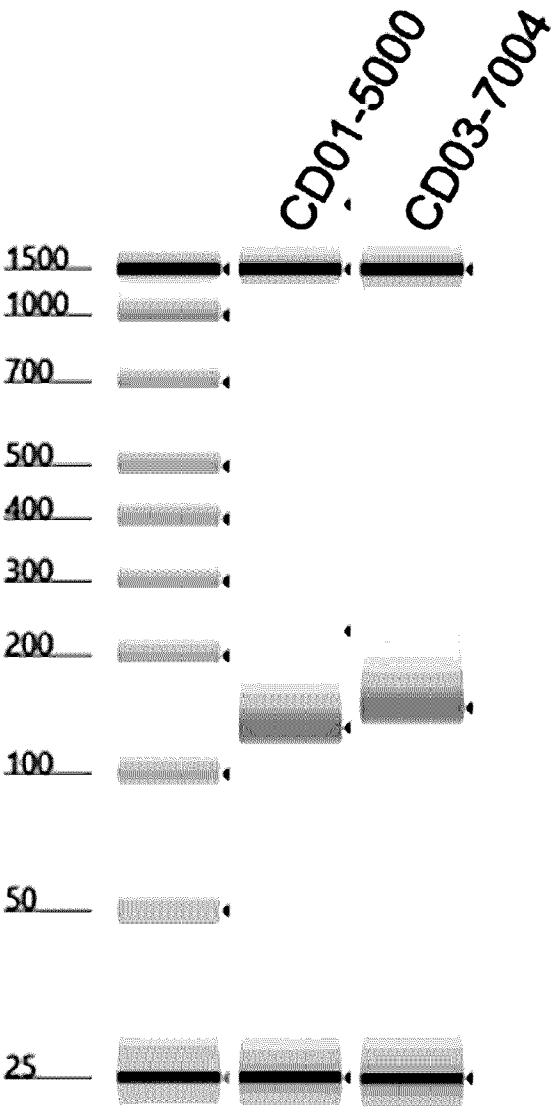
[청구항 14] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 장어용 사료 조성물의 장어 성장 촉진 용도.

WO 2025/009883 PCT/KR2024/009391

[도1]



[도2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/009391

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23K 10/16(2016.01)i; **A23K 20/20**(2016.01)i; **A23K 50/80**(2016.01)i; **A01K 61/00**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23K 10/16(2016.01); A01K 61/00(2006.01); A23K 1/18(2006.01); A23K 10/37(2016.01); A23K 50/80(2016.01); C12P 7/64(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 스키조키트리움 속(schizochytrium sp.), 미세조류(microalgae), 바이오매스(biomass), 장어(eel), 도코사헥사엔산(docosahexaenoic acid, DHA)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2019-0060026 A (INDUSTRIAL COOPERATION FOUNDATION JEONBUK NATIONAL UNIVERSITY et al.) 03 June 2019 (2019-06-03) See claims 1-8; paragraphs [0019]-[0037]; and tables 1-3.	1-14
Y	RATUCOREH, C. Y. et al. The growth and histology structure of Indonesian eel (Anguilla bicolor bicolor McClelland, 1844) fed with microalgae. AIP Conference Proceedings. 2018, vol. 2002, no. 1, document no. 020009, pp. 1-8. See abstract; pages 2-7; and tables 1-2.	1-14
A	KR 10-2022-0080593 A (CJ CHEILJEDANG CORPORATION) 14 June 2022 (2022-06-14) See claims 1-17.	1-14
A	KR 10-1611139 B1 (KYONGSANGNAM-DO) 08 April 2016 (2016-04-08) See claims 1-3.	1-14
A	JP 2015-107085 A (NAGAURA, Yoshiaki) 11 June 2015 (2015-06-11) See claims 1-4.	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
07 October 2024	**07 October 2024**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2024/009391

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2019-0060026 A	03 June 2019	None	
KR 10-2022-0080593 A	14 June 2022	CN 116490616 A	25 July 2023
		EP 4257699 A1	11 October 2023
		JP 2023-547184 A	09 November 2023
		KR 10-2614551 B1	15 December 2023
		US 2023-0392108 A1	07 December 2023
		WO 2022-124482 A1	16 June 2022
KR 10-1611139 B1	08 April 2016	None	
JP 2015-107085 A	11 June 2015	None	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/009391

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A23K 10/16(2016.01)i; **A23K 20/20**(2016.01)i; **A23K 50/80**(2016.01)i; **A01K 61/00**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A23K 10/16(2016.01); A01K 61/00(2006.01); A23K 1/18(2006.01); A23K 10/37(2016.01); A23K 50/80(2016.01); C12P 7/64(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 스키조키트리움 속(schizochytrium sp.), 미세조류(microalgae), 바이오매스(biomass), 장어(eel), 도코사헥사엔산(docosahexaenoic acid, DHA)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2019-0060026 A (전북대학교산학협력단 등) 2019.06.03 청구항 1-8; 단락 [0019]-[0037]; 표 1-3	1-14
Y	RATUCOREH, C. Y. 등, "The growth and histology structure of Indonesian eel (Anguilla bicolor bicolor McClelland, 1844) fed with microalgae." AIP Conference Proceedings, 2018, 제2002권, 제1호, 문서번호 020009, 페이지 1-8 초록; 페이지 2-7; 표 1-2	1-14
A	KR 10-2022-0080593 A (씨제이제일제당 (주)) 2022.06.14 청구항 1-17	1-14
A	KR 10-1611139 B1 (경상남도) 2016.04.08 청구항 1-3	1-14
A	JP 2015-107085 A (NAGAURA, YOSHIAKI) 2015.06.11 청구항 1-4	1-14

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2024년10월07일(07.10.2024)	**2024년10월07일(07.10.2024)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2024/009391

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2019-0060026 A	2019/06/03	없음	
KR 10-2022-0080593 A	2022/06/14	CN 116490616 A	2023/07/25
		EP 4257699 A1	2023/10/11
		JP 2023-547184 A	2023/11/09
		KR 10-2614551 B1	2023/12/15
		US 2023-0392108 A1	2023/12/07
		WO 2022-124482 A1	2022/06/16
KR 10-1611139 B1	2016/04/08	없음	
JP 2015-107085 A	2015/06/11	없음	