(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0124999
(43) 공개일자 2020년11월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23K 10/18 (2017.01) *A23K 30/12* (2016.01)
A23K 40/10 (2016.01) *A23K 50/80* (2016.01)
C12N 1/20 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23K 10/18 (2016.05)
A23K 30/12 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2019-0048584
(22) 출원일자 2019년04월25일
심사청구일자 2019년04월25일
기술이전 희망 : 기술양도

전체 청구항 수 : 총 14 항

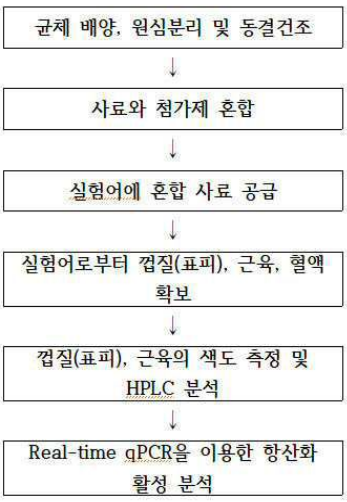
(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
김군도
부산광역시 남구 분포로 113, 225동 704호(용호동, 엘지메트로시티)
서용배
부산광역시 남구 용호로269번길 29, 101동 104호 (용호동, 오륙도 뜨란채)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

(54) 발명의 명칭 **파라코커스 속 균주를 이용한 사료첨가제**

(57) 요 약

본 발명은 파라코커스 속 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 양식어류용 사료첨가제; 이를 포함하는 양식어류용 사료 조성물; 및 양식어류용 사료첨가제의 제조방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23K 40/10 (2016.05)
A23K 50/80 (2016.05)
C12N 1/20 (2013.01)

(72) 발명자
임한규
광주광역시 남구 제석로80번길 5, 102동 502호(봉선동, 제일풍경채 ELITE PARK)

최성석
부산광역시 연제구 시청로 12, 201동 703호(연산동, 부산 더샵 시티애비뉴2차)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20160028
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	수산실용화기술개발사업
연구과제명	한국 고유 색소 생산 해양미생물을 이용한 양식 생물의 생리활성 및 체색 향상 제품 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	부경대학교
연구기간	2018.04.26 ~ 2019.04.25

명 세 서

청구범위

청구항 1

파라코커스 속 균주(*Paracoccus* sp.) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 양식어류의 체색 개선용 사료첨가제.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 파라코커스 속 균주는 파라코커스 해운댄시스(*Paracoccus haeundaensis*) 또는 파라코커스 마쿠시(*Paracoccus marcusii*)인 것을 특징으로 하는 사료첨가제.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 사료첨가제는 양식어류 표피 및 근육에 아스타잔틴을 축적시키는 것을 특징으로 하는 사료첨가제.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 사료첨가제는 양식어류 표피의 체색을 개선시키는 것을 특징으로 하는 사료첨가제.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 어류는 참돔, 붉바리, 방어, 넙치, 가자미, 우럭, 뱀장어, 민물장어 및 바다장어로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 사료첨가제.

청구항 6

제 1 항의 사료첨가제를 포함하는 양식어류의 체색 개선용 사료 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

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

청구항 8

제 6 항에 있어서,

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

청구항 9

(a) 파라코커스 속 균주를 배양하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계의 균주가 포함된 배양액을 원심분리하여 펠릿을 얻는 단계; 및

(c) 상기 펠릿을 동결건조하는 단계;를 포함하는 양식어류의 체색 개선용 사료첨가제의 제조방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 파라코커스 속 균주는 파라코커스 해운댄시스(*Paracoccus haeundaensis*) 또는 파라코커스 마쿠시(*Paracoccus marcusii*)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 9 항에 있어서,

상기 파라코커스 속 균주는 트립톤(tryptone), 효모추출물(yeast extract), 염화나트륨(NaCl), 폴리펩톤(Polypeptone), 박토 소이톤(Bacto soytone) 및 프로테아제 펩톤(Protease peptone)이 포함된 배지에서 배양되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 배지에서 트립톤(tryptone)은 1~2 중량부, 효모추출물(yeast extract)은 0.5~2 중량부, 염화나트륨(NaCl)은 1~3 중량부, 폴리펩톤(Polypeptone)은 0.01~0.05 중량부, 박토 소이톤(Bacto soytone)은 0.1~0.5 중량부, 프로테아제 펩톤(Protease peptone)은 0.1~0.5 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 9 항에 있어서,

상기 어류는 참돔, 붉바리, 방어, 넙치, 가자미, 우럭, 뱀장어, 민물장어 및 바다장어로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 1 항의 사료첨가제 또는 제 6 항의 사료 조성물을 양식어류에 급이하는 단계를 포함하는 양식어류의 체색을 개선시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 파라코커스 속 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 양식어류용 사료첨가제; 이를 포함하는 양식어류용 사료 조성물; 및 양식어류용 사료첨가제의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 카로티노이드(carotenoid)는 이소프레노이드 화합물(isoprenoid compounds)로 자연계에 널리 존재하는 붉은색 또는 노랑색의 색소군이며, 현재까지 약 600 여종이 밝혀져 있다. 이들 카로티노이드 중에서 아스타잔틴(astaxanthin; 3, 3'-dihydroxy-β, β-carotene-4, 4'-dione)은 C40 계열의 색소로 비타민 A 전구체, 항산화, 항암, 항염증 활성 등의 기능성이 밝혀졌다.

[0003] 아스타잔틴은 산업적으로 건강 보조 식품, 사료 첨가제용 천연 색소 등 다양한 분야에서 이용되고 있으며, 전 세계 주요 국가에서는 아스타잔틴을 생산 방법을 연구하고 있다. 현재 많이 이용되고 있는 아스타잔틴 생산법으로는 화학 합성법, 갑각류 껍질로부터의 추출법, 미생물에 의한 생산법 등이 있다. 이들 방법 중에서 미생물로부터 아스타잔틴 생산하기 위해 다양한 미생물들이 분리되어 보고되어 있으며, 이들 미생물 중에서 파피아 로도지마(*Phaffia rthodozyma*), 헤마토코커스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)가 산업적으로 많이 사용되고 있다.

[0004] 카로티노이드계 색소는 어류의 체색(Body coloration, 體色) 개선에 도움을 주는 것으로 알려져 있으며, 어류는 카로티노이드계 색소를 체내에서 합성할 수 없기 때문에 식물과 미생물에 의해 합성된 먹이를 섭취하여 체내에 축적한다. 특히, 아스타잔틴은 어류의 체색 개선제로 양식 산업에서 사료 첨가물로 많이 활용되고 있으며, 이에 따라 체내 아스타잔틴 함량을 높이는 연구가 많이 진행되어 왔다.

[0005] 또한, 아스타잔틴은 다른 카로티노이드와 비교하여 10배 이상, 비타민E 보다 100~500배 이상의 항산화 활성이 있다고 보고되었다. 산화 스트레스 (oxidative stress) 세포가 산소를 이용한 호흡 시에 발생하는 활성 산소를 포함하여 자유 라디칼이나 과산화물에 의해 발생하며, 세포의 단백질이나 지질, DNA 등 생체 고분자 물질에 손상을 주게 되는데, 항산화 물질인 아스타잔틴은 활성산소 및 자유 라디칼을 제거하여 생체 고분자 물질의 손상을 방지하는 것으로 알려져 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0431359호

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1468802호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 파라코커스 속 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 양식어류의 체색 개선용 사료첨가제를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 사료첨가제를 포함하는 양식어류의 체색 개선용 사료 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 파라코커스 속 균주를 배양하는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 균주가 포함된 배양액을 원심분리하여 펠릿을 얻는 단계; 및 (c) 상기 펠릿을 동결건조하는 단계;를 포함하는 양식어류의 체색 개선용 사료첨가제의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 사료첨가제 또는 상기 사료 조성물을 양식어류에 급이하는 단계를 포함하는 양식어류의 체색을 개선시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 파라코커스 속 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 양식어류의 체색 개선용 사료첨가제를 제공한다.

[0014] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 파라코커스 속 균주는 파라코커스 해운댄시스(*Paracoccus haeundaensis*) 또는 파라코커스 마쿠시(*Paracoccus marcusii*)인 것일 수 있고, 바람직하게는 파라코커스 해운댄시스(*Paracoccus haeundaensis*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 사료첨가제는 양식어류 표피 및 근육에 아스타잔틴을 축적시키는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 사료첨가제는 양식어류 표피의 체색을 개선시키는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 어류는 참돔, 붉바리, 방어, 넙치, 가자미, 우럭, 뱀장어, 민물장어 및 바다장어로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있고, 바람직하게는 참돔 또는 붉바리인 것일 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 사료첨가제를 포함하는 양식어류의 체색 개선용 사료 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 사료첨가제는 전체 사료 조성물의 100 중량부 기준으로 0.01 내지 10 중량부의 양으로 포함되는 것일 수 있고, 바람직하게는 0.1 내지 10 중량부의 양으로 포함되는 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 1 내지 10 중량부의 양으로 포함되는 것일 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 (a) 파라코커스 속 균주를 배양하는 단계; (b) 상기 (a) 단계의 균주가 포함된 배양액을 원심

분리하여 펠릿을 얻는 단계; 및 (c) 상기 펠릿을 동결건조하는 단계;를 포함하는 양식어류의 체색 개선용 사료첨가제의 제조방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 파라코커스 속 균주는 파라코커스 해운댄시스(*Paracoccus haeundaensis*) 또는 파라코커스 마쿠시(*Paracoccus marcusii*)인 것일 수 있고, 바람직하게는 파라코커스 해운댄시스(*Paracoccus haeundaensis*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 파라코커스 속 균주는 트립톤(tryptone), 효모추출물(yeast extract), 염화나트륨(NaCl), 폴리펩톤(Polypeptone), 박토 소이톤(Bacto soytone) 및 프로테아제 펩톤(Protease peptone)이 포함된 배지에서 배양되는 것일 수 있고, 상기 배지에서 트립톤(tryptone)은 1~2 중량부, 효모추출물(yeast extract)은 0.5~2 중량부, 염화나트륨(NaCl)은 1~3 중량부, 폴리펩톤(Polypeptone)은 0.01~0.05 중량부, 박토 소이톤(Bacto soytone)은 0.1~0.5 중량부, 프로테아제 펩톤(Protease peptone)은 0.1~0.5 중량부로 포함되는 것일 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 사료첨가제 또는 상기 사료 조성물을 양식어류에 급이하는 단계를 포함하는 양식어류의 체색을 개선시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0025] 본 발명에 따른 사료첨가제를 양식어류에 급이할 경우 표피 및 근육에 아스타잔틴이 축적되어 어류의 체색을 개선시키고 산화 스트레스를 낮춰주는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 파라코커스 해운댄시스 균주를 이용한 사료첨가제 개발 방법을 나타낸 모식도이다.

도 2는 파라코커스 해운댄시스 균주를 사료첨가제로 공급한 후, 실험어의 생존률을 확인한 결과이다.

도 3은 파라코커스 해운댄시스 균주를 사료첨가제로 공급한 후, 참돔 및 붉바리에서 표피 및 근육 색도를 측정한 결과이다.

도 4는 파라코커스 해운댄시스 균주를 사료첨가제로 공급한 후, 아스타잔틴의 농도를 분석한 결과이다.

도 5는 참돔에서 β-actin (house keeping gene)과 항산화 지표 유전자인 CAT, SOD, GPx의 standard curve를 나타낸 결과이다.

도 6은 붉바리에서 β-actin (house keeping gene)과 항산화 지표 유전자인 CAT, SOD의 standard curve를 나타낸 결과이다.

도 7은 참돔에서 파라코커스 해운댄시스 균주를 사료첨가제로 공급한 후, 항산화 지표 유전자인 CAT, SOD, GPx의 발현량을 측정한 결과이다.

도 8은 붉바리에서 파라코커스 해운댄시스 균주를 사료첨가제로 공급한 후, 항산화 지표 유전자인 CAT, SOD의 발현량을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본 발명은 파라코커스 속 균주(*Paracoccus* sp.) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 양식어류의 체색 개선용 사료첨가제를 제공한다.

[0029] 본 발명에서 "체색(body coloration) 개선용" 또는 "색택 개선용"은 어류의 표피 또는 껍질의 색이 개선되는 효과를 말한다.

[0030] 본 발명의 사료첨가제는 아미노산, 무기염류, 비타민, 항생물질, 항균물질, 항산화, 항곰팡이 효소, 다른 생균형태의 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.

[0031] 본 발명의 사료첨가제는 분말 또는 액체 상태의 제제 형태일 수 있으며, 사료첨가용 부형제를 포함할 수 있다. 사료첨가용 부형제로는 예를 들어, 탄산칼슘, 말분, 제올라이트, 옥분 또는 미강 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 본 발명의 사료첨가제의 제조에 사용되는 미생물 균주는 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.

[0033] 상기 균주는 적당한 온도에서 적당한 기간 동안 배양되며, 바람직하게는 20℃~50℃에서 10시간 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 사료첨가제 또는 사료로 사용될 수 있다.

[0034] 본 발명의 사료첨가제는 어류에게 단독으로 투여되거나 식용 담체 중에서 다른 사료첨가제와 조합되어 투여될 수 있다. 또한, 상기 사료첨가제에는 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.

[0035] 본 발명의 사료첨가제가 사용될 수 있는 동물은 참돔, 붉바리, 방어, 넙치, 가자미, 우럭, 뱀장어, 민물장어 및 바다장어 등의 어류일 수 있고, 바람직하게는 참돔 또는 붉바리일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0036] 상기 사료첨가제는 전체 사료 조성물의 100 중량부 기준으로 0.01 내지 10 중량부의 양으로 배합될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 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.

[0040] **실시예 1. 파라코커스 속 균주를 이용한 사료첨가제 개발 방법**

[0041] 본 발명에 따른 파라코커스 속 균주를 이용한 사료첨가제 개발 방법은 균체 배양, 원심분리 및 동결건조 단계(A); 사료와 첨가제 혼합 단계(B); 상기 (B)단계에서 생산된 혼합 사료를 실험어인 참돔 및 붉바리에 공급하는 단계(C); 상기 (C)단계의 실험어의 양식이 끝난 후 해부를 통한 실험어의 껍질, 근육, 혈액을 확보하는 단계(D); 상기 (D)단계에서 확보한 실험의 껍질과 근육의 색도를 측정하고, HPLC를 이용하여 껍질과 근육에 축적된 아스타잔틴을 분석하는 단계(E); 상기 (D) 단계에서 확보한 혈액 샘플의 혈구로부터 RNA를 추출하여 Real-time qPCR을 분석 후 산화 스트레스 분석 단계(F)로 이루어진다 (도 1).

[0043] **실시예 2. 균체 배양, 원심분리 및 동결건조단계(A)**

[0044] 본 발명에서 사용할 수 있는 균주로는 아스타잔틴을 생산하는 미생물이 사용될 수 있으나, 바람직하게는 파라코커스 속에 포함된 파라코커스 해운댄시스(*Paracoccus haeundaensis*), 파라코커스 마쿠시(*Paracoccus marcusii*)가 사용될 수 있고, 더욱 바람직하게는 파라코커스 해운댄시스가 사용될 수 있다.

[0045] 상기 균주를 배양하기 위한 배지 조성은 LB broth를 modify한 것으로서 기본 LB 배지에서 영양원을 다양화한 배지이다. 구체적으로 배지 조성은 Tryptone 1~2%, Yeast extract 0.5~2%, NaCl 1~3%를 기본배지로 하고, 그 외 배지 조성으로 Polypeptone 0.01~0.05%, Bacto soytone 0.1~0.5%, Protease peptone 0.1~0.5% 등을 추가하여

배지를 제조할 수 있다.

[0046] 배지는 상기의 배지 조성에 따라 제조하고 멸균하여 Seed culture, pre-culture 및 본 배양의 배지로 사용하였으며, 배양온도는 25~27℃ (바람직하게는 25℃), 교반속도는 150~200 rpm(바람직하게는 160 rpm), aeration은 0.05 vvm의 조건으로 배양하였으며, 전 배양액은 1~10%로 조절하여 본 배양 배지에 접종하고 48~72 시간동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 원심분리하여 펠릿(pellet)를 회수하였으며, 이후 동결건조하였다. 동결건조한 시료 중 0.1 g을 90% acetone 으로 카로티노이드를 추출하였으며, 추출 후 HPLC를 이용하여 분석하였다.

[0047] HPLC 분석은 Bio-rad (Hercules, CA, USA)사의 automated biologic HR system (#750-0047)을 이용하였다. Column은 Nova-Pak HR 6U C18 column (3.9 × 300 mm)이며, 40℃에서 분석하였다. 사용된 buffer의 조성은 다음과 같다: 14% 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 84% acetonitrile, 2% methanol (0~15 min), 68% methanol 및 32% ethyl acetate (15~20 min). Post-running은 10분간 이루어졌으며, Column 내 유속은 분당 1 ml이 되게 하였다. 분리된 아스타잔틴은 470 nm에서 측정하여 표준물질과 비교 분석하였으며, 아스타잔핀 표준물질(astaxanthin standard)은 Sigma-Aldrich사에서 구입하였다.

[0049] **실시예 3. 사료와 첨가제의 혼합(B)**

[0050] 본 발명의 사료와 첨가제의 혼합 단계(B)는 상기 (A)단계에서 생산된 균체를 사료첨가제로 하여 사료에 배합하는 단계이다. 실험에 사용할 사료는 시판용 배합사료를 기본으로 하여, 대조구에 사용할 사료에는 상기 균체를 첨가하지 않았고, 실험구에 사용할 사료에는 사료양의 10% 정도의 해수에 동결건조한 균체를 풀어 최종농도가 100 ppm이 되도록 혼합하였다.

[0052] **실시예 4. 실험어에 혼합 사료 공급(C)**

[0053] 본 발명의 실험어에 혼합 사료 공급 단계(C)는 상기 (B)단계에서 제작된 사료를 어류에 직접 공급하는 단계이다.

[0054] 실험에 사용된 참돔은 전장 20 cm 이상인 것을 사용하였으며, 참돔 대조구는 평균 전장 26.5±0.5 cm, 중량 299.8±13.6 g, 파라코커스 해운댄시스 균체를 첨가한 실험구는 평균 전장 20.8±0.2 cm, 중량 149.2±5.6 g인 것을 사용하였다. 실험 수조는 수용량 250L의 타원형 PE수조(가로 100 cm, 세로 70 cm, 높이 34cm)를 사용하였다. 한 수조에 참돔을 10마리씩 수용하였으며, 실험구별로 3반복으로 실시하였다. 각 실험구의 먹이는 1일 2회 공급하였다. 사육수온은 실험기간동안 평균 22.5℃로 유지하여 주었으며, 총 60일간 먹이를 공급하여 최종 측정하였다. 사육수는 매일 7회 환수하였으며, 배설물 및 사료찌꺼기는 사이펀을 통해 제거해 주었다.

[0055] 실험에 사용된 붉바리는 전장 25 cm 이상인 것을 사용하였으며, 실험에 사용 된 대조구의 붉바리는 평균 전장 28.1±0.5 cm, 중량 370.4±18.5 g 이었고, 파라코커스 해운댄시스 균체를 첨가한 실험구의 붉바리는 평균 전장 28.1±0.4 cm, 중량 366.3±19.3 g 이었다. 실험 수조는 수용량 2t의 사각형 FRP 수조(가로 270 cm, 세로 110 cm, 높이 60 cm)를 사용하였고, 각 수조 당 50×50×50 cm 정사각형 가두리 3개씩 설치하였다. 한 가두리에 붉바리를 10마리씩 수용해 실험구별로 3반복으로 실시하였으며, 먹이는 1일 2회 공급하였다. 사육수온은 실험기간동안 평균 20℃로 유지하여 주었으며, 총 60일간 먹이를 공급하여 최종 측정하였다. 사육수는 매일 7회 환수하였으며, 배설물 및 사료찌꺼기는 사이펀을 통해 제거해 주었다.

[0056] 실험 종료 후 실험어의 생존률을 측정한 결과 모든 실험구에서 실험어의 생존률이 100%인 것으로 확인되었으며, 실험 중 실험어에서 질병이나 이상행동 증상이 나타나지 않았다 (도 2).

[0058] **실시예 5. 실험어로부터 껍질, 근육, 혈액 확보(D)**

[0059] 본 발명의 실험어로부터 껍질, 근육, 혈액 확보단계(D)는 상기 (C)단계의 실험어들의 실험 종료 후 바로 실시하였다. 실험구별로 30마리씩 무작위로 실험어들을 채집하여 150 ppm의 3-aminobenzoic acid ethyl ester (Sigma-Aldrich, USA)로 1분간 마취한 후 바로 해부하였다. 실험어로부터 혈액을 채취하고, 껍질(표피)과 근육을 분리하여 드라이아이스 조건하에 실험실로 운반하였다.

[0061] **실시예 6. 껍질(표피), 근육 색도 측정 및 HPLC 분석(E)**

[0062] 본 발명의 껍질, 근육 색도 측정 및 HPLC 분석단계(E)는 상기 (D)단계의 실험어의 껍질, 근육 색도를 측정하여 껍질과 근육의 체색 개선이 이루어졌는지 확인하고, HPLC 분석을 통해 껍질과 근육에 아스타잔틴의 축적이 있는지를 분석하는 단계이다.

[0063] 붉바리와 참돔의 경우 표피(껍질)의 붉은색이 선명할수록 상품의 가치가 올라가므로, 표피의 붉은 색소의 착색이 이루어져 체색 개선이 일어났는지는 중요한 요소이다. 표피 및 근육의 색도측정을 위해, 실험 종료 후 실험구별 30마리를 무작위로 채집하여 마취 후 색차계(CR-200, Minolta Co, Osaka, Japan)를 사용하여 hunter scale에 의한 L*값(명도, Lightness), a*값(+a는 빨강, -a는 초록 방향), b*값(+b는 노랑, -b는 파랑 방향)을 표피 색도로 측정하였고, 근육조직은 근육을 절개하여 색도를 측정하였다.

[0064] 참돔의 표피 색도를 측정한 결과, L*값은 대조구에서 78.51±1.60 으로 나타났고, 이는 파라코커스 해운댄시스를 첨가한 실험구의 55.06±3.07 보다 유의하게 높은 값을 보였다. a*값은 파라코커스 해운댄시스를 첨가한 실험구에서 11.45±0.83 으로서, 대조구의 1.92±0.24 보다 유의하게 높은 값를 보였다. 다만, b*값은 실험구간에 유의한 차이를 보이지 않았다. 근육 색도의 측정 결과, L*값은 대조구에서 43.05±0.65 로서 파라코커스 해운댄시스를 첨가한 실험구의 39.19±0.67 보다 유의하게 높은 값을 보였다. 다만, a*값과 b*값은 실험구간에 유의한 차이를 보이지 않았다.

[0065] 붉바리 중간육성의 표피 색도를 측정한 결과, L*값은 대조구에서 33.03±0.84 로서 파라코커스 해운댄시스를 첨가한 실험구의 29.11±0.64 보다 유의하게 높은 값을 보였다. 그러나, a*값은 파라코커스 해운댄시스를 첨가한 실험구에서 7.68±0.26 로서 대조구의 6.14±0.23 보다 유의하게 높은 값을 보였다. 다만, 근육 색도의 측정 결과에서는 L*값, a*, b*값 모두 유의한 차이를 보이지 않았다 (도 3).

[0066] 또한, 본 발명자들은 HPLC 분석을 위하여, 상기 (D)단계의 실험어의 껍질, 근육 시료 중 1 g을 chloroform : methanol (6 : 4)의 혼합용매로 하루 동안 카로티노이드를 추출하였다. HPLC 분석은 Bio-rad (Hercules, CA, USA)사의 automated biologic HR system (#750-0047)을 이용하였다. Column은 Nova-Pak HR 6U C18 column (3.9 × 300 mm)이며, 40℃에서 분석하였다. 사용된 buffer의 조성은 다음과 같다: 14% 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 84% acetonitrile, 2% methanol (0~15 min), 68% methanol 및 32% ethyl acetate (15~20 min). Post-running은 10분간 이루어졌으며, Column 내 유속은 분당 1 ml이 되게 하였다.

[0067] HPLC 분석 결과, 파라코커스 해운댄시스를 첨가하지 않은 참돔과 붉바리의 대조구에서는 아스타잔틴이 검출되지 않았다 (도 4). 그러나, 파라코커스 해운댄시스를 첨가한 참돔의 실험구에서는 껍질에서 0.070±0.006 ㎍/g, 근육에서 0.063±0.003 ㎍/g의 아스타잔틴이 검출되었고, 붉바리의 실험구에서는 껍질에서 0.068±0.004 ㎍/g, 근육에서 0.055±0.004 ㎍/g의 아스타잔틴이 검출되었다 (도 4).

[0068] 상기 결과로부터, 파라코커스 해운댄시스가 사료첨가제로서 배합된 사료를 섭취한 참돔과 붉바리의 경우 대조구에 비해 표피의 체색이 개선되었고, 표피(껍질)에 아스타잔틴이 축적되었음을 확인하였다.

[0070] **실시예 7. Real-time qPCR을 이용한 항산화 활성 분석(F)**

[0071] 본 발명의 Real-time qPCR을 이용한 항산화 활성 분석단계(F)는 상기 (D)단계의 실험어의 혈액으로부터 혈구세포를 분리한 후, 혈구 세포의 항산화 지표 유전자의 RNA 발현량을 분석하여 파라코커스 해운댄시스의 항산화능을 분석하는 단계이다.

[0072] 실험어의 혈구 세포에서 RNeasy® Plus Mini kit (Qiagen)을 이용하여 제조자의 프로토콜에 따라 RNA를 추출한 후 ReverTra Ace® qPCR RT Kit (Toyobo)을 이용하여 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 이용하여 β-actin, CAT (catalase), SOD (superoxide dismutase), GPx (glutathione peroxidase) 유전자를 증폭하였다. 회수한 DNA의 농도는 Nanodrop을 이용하여 농도를 측정하였다. 각각의 DNA의 농도가 100, 10, 1, 0.1, 0.01 pg/ml이 되도록 희석한 후, 이를 template DNA로 하여 real-time qPCR을 수행하였으며, real-time qPCR에서 사용한 primer는 표 1에 나타내었다.

[0073] 상기 결과를 바탕으로 참돔의 항산화 지표 유전자의 standard curve (도 5) 와 붉바리의 항산화 지표 유전자의 standard curve (도 6)를 작성하였다.

표 1

[0075]

primer name	primer sequence (5' -> 3')	비고
fish_β-Actin_F	CAC TGC TGC CTC CTC CTC CTC	참돔, 붉바리
fish_β-Actin_R	GAT TCC GCA GGA CTC CAT ACC	
fish_CAT_F	GCT CCA AAC TAC TAT CCC AAC AGC TT	
fish_CAT_R	GTT TTT GGA TGA AGA GCT GGG CTC	
Pm_SOD_F	CAT GGT TTC CAT GTC CAT GC	참돔
Pm_SOD_R	CCA ATG ACT CCA CAG GCC	
Pm_GPx_F	CTT CTA ACC AGT TTG GGA ACC AGG A	
Pm_GPx_R	CAT CCA GGG GTC CGT ATC TCT TC	
Ea_SOD_F	GGT GAG CAT GGT TTC CAA GTC CA	붉바리
Ea_SOD_R	GAG ATG CCA ATG ACA CCA CAG GC	

[0077] 참돔에서 분리된 RNA로부터 real-time qPCR을 수행하여 분석한 각 유전자의 발현량은 표 2와 같다. 상기 결과로부터 각 유전자의 발현량을 house keeping gene 인 β-actin의 발현량으로 표준화하여 상대적인 발현량을 비교하였다. 그 결과, 항산화 지표 유전자인 CAT, SOD 및 GPx 유전자의 발현량은 파라코커스 해운댄시스를 첨가한 실험구에서 대조구에 비해 현저하게 감소되었음을 확인하였다 (도 7).

표 2

[0079]

Sample	β-actin	CAT	SOD	GPx
control	0.333±0.006	0.203±0.004	0.148±0.001	0.196±0.006
파라코커스 해운댄시스 첨가한 실험군	0.659±0.005	0.125±0.002	0.065±0.001	0.064±0.001

[0081] 또한, 붉바리에서 분리된 RNA로부터 real-time qPCR을 수행하여 분석한 각 유전자의 발현량은 표 3와 같다. 상기 결과로부터 각 유전자의 발현량을 house keeping gene 인 β-actin의 발현량으로 표준화하여 상대적인 발현량을 비교하였다. 그 결과, 항산화 지표 유전자인 CAT 및 SOD 유전자의 발현량은 파라코커스 해운댄시스를 첨가한 실험구에서 대조구에 비해 현저하게 감소되었음을 확인하였다 (도 8).

표 3

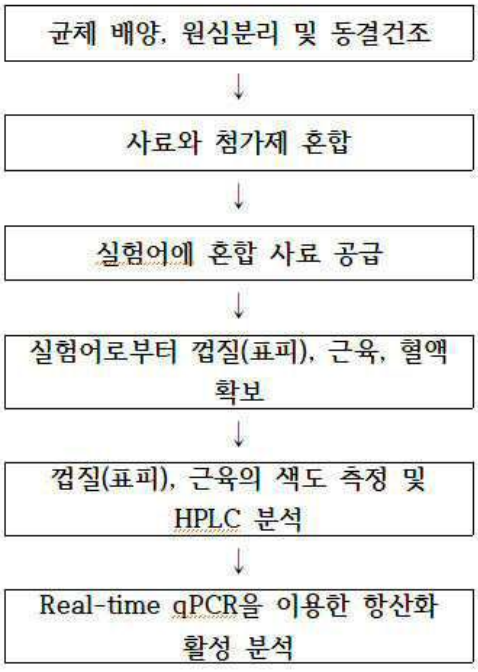
[0083]

Sample	β-actin	CAT	SOD
control	0.161±0.001	0.014±0.001	0.023±0.001
파라코커스 해운댄시스 첨가한 실험군	0.380±0.010	0.015±0.001	0.013±0.001

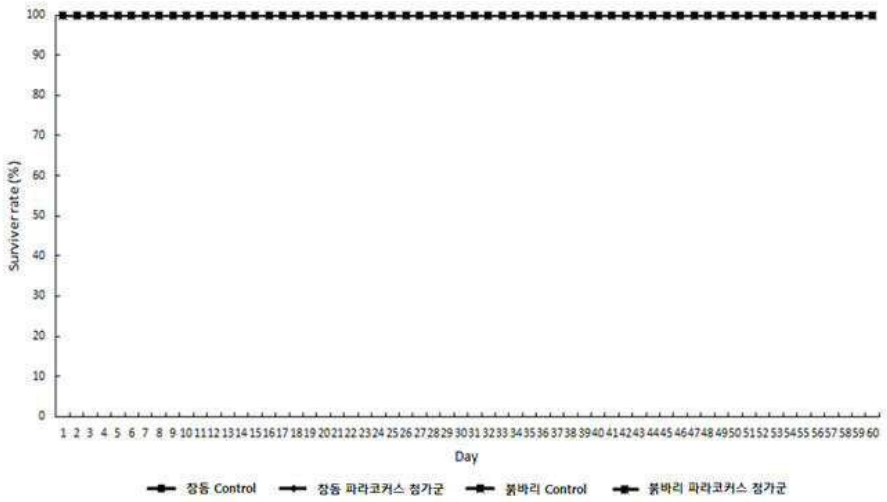
[0085] 상기 결과로부터, 파라코커스 해운댄시스가 사료첨가제로서 배합된 사료를 섭취한 경우 양식어류인 참돔과 붉바리에서 산화 스트레스를 낮춰주는 효과가 있는 것을 확인하였다.

도면

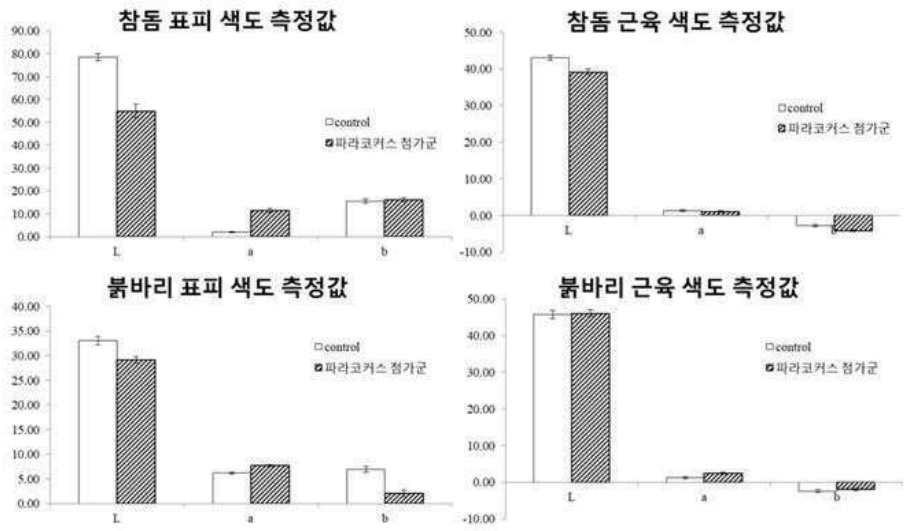
도면1


균체 배양, 원심분리 및 동결건조
사료와 첨가제 혼합
실험어에 혼합 사료 공급
실험어로부터 껍질(표피), 근육, 혈액 확보
껍질(표피), 근육의 색도 측정 및 HPLC 분석
Real-time qPCR을 이용한 항산화 활성 분석

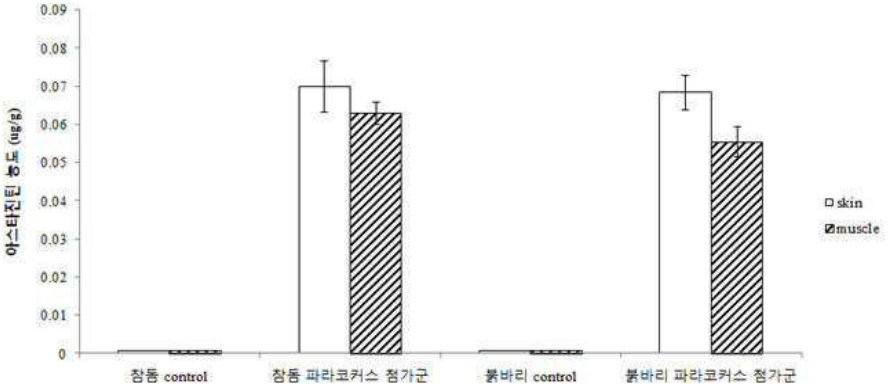
도면2


Survivor rate (%)
Day
참돔 Control
참돔 파라코커스 첨가군
붉바리 Control
붉바리 파라코커스 첨가군

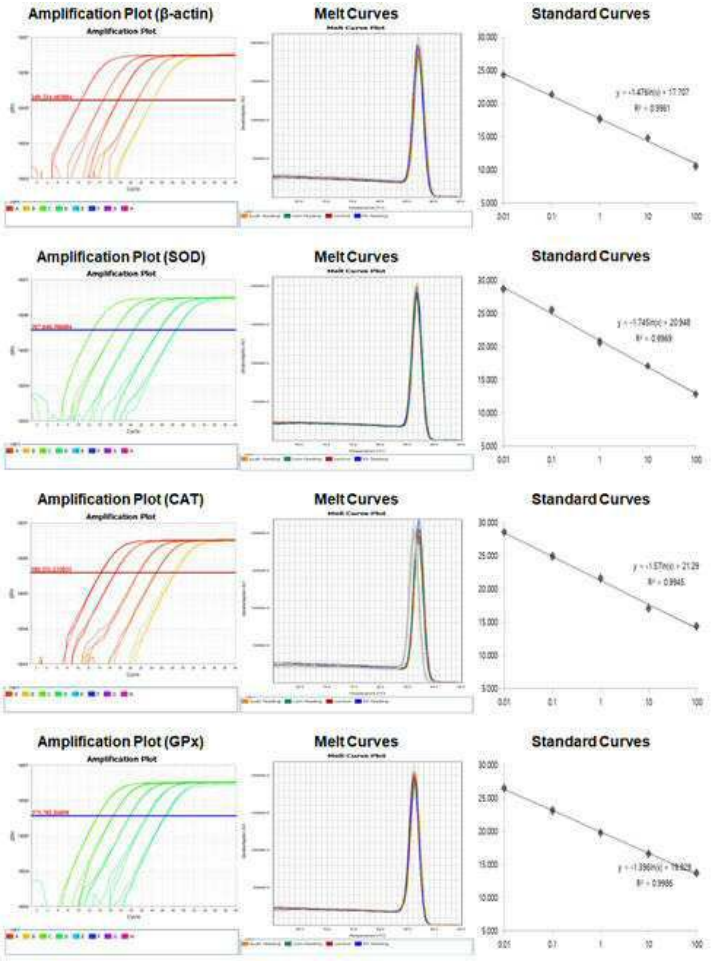
도면3


참돔 표피 색도 측정값
control
파라코커스 첨가군
L
a
b
참돔 근육 색도 측정값
control
파라코커스 첨가군
L
a
붉바리 표피 색도 측정값
control
파라코커스 첨가군
L
a
b
붉바리 근육 색도 측정값
control
파라코커스 첨가군
L
a
b

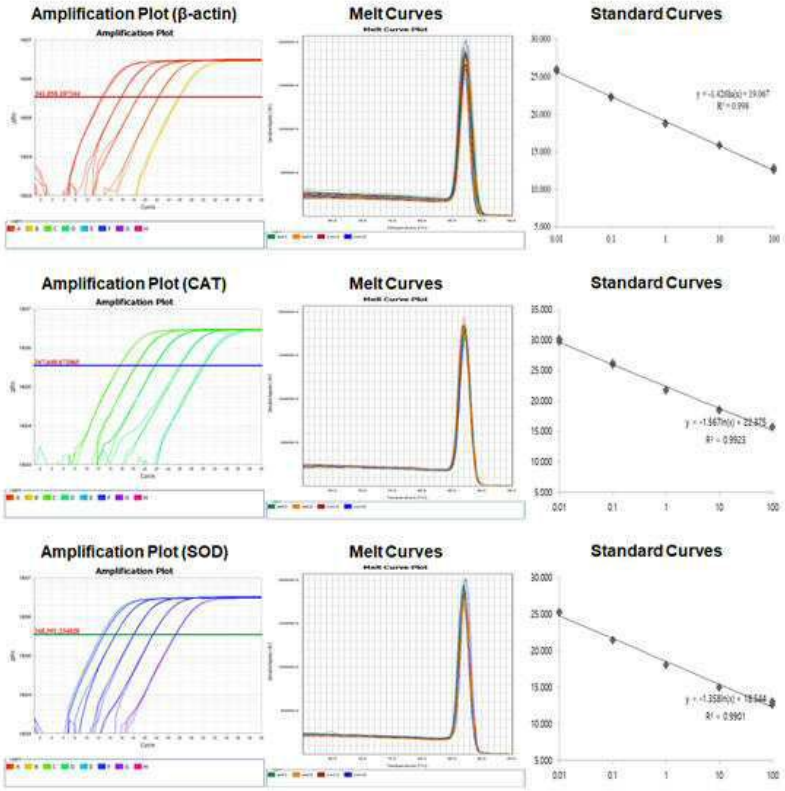
도면4


아스타잔틴 농도 (ug/g)
skin
muscle
참돔 control
참돔 파라코커스 첨가군
붉바리 control
붉바리 파라코커스 첨가군

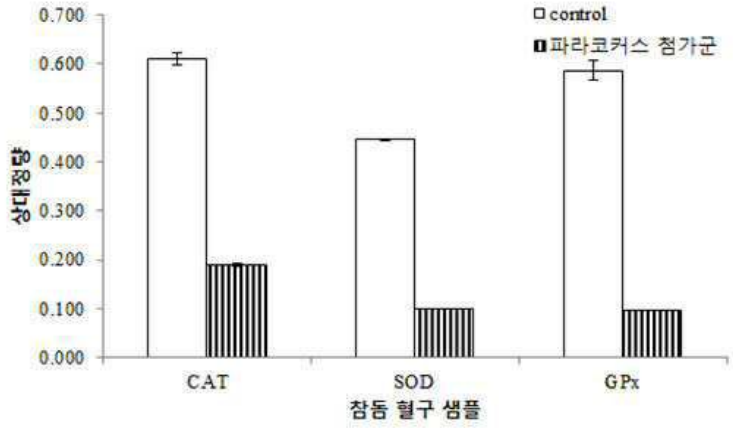
도면5


Amplification Plot (β-actin)
Melt Curves
Standard Curves
Amplification Plot (SOD)
Melt Curves
Standard Curves
Amplification Plot (CAT)
Melt Curves
Standard Curves
Amplification Plot (GPx)
Melt Curves
Standard Curves

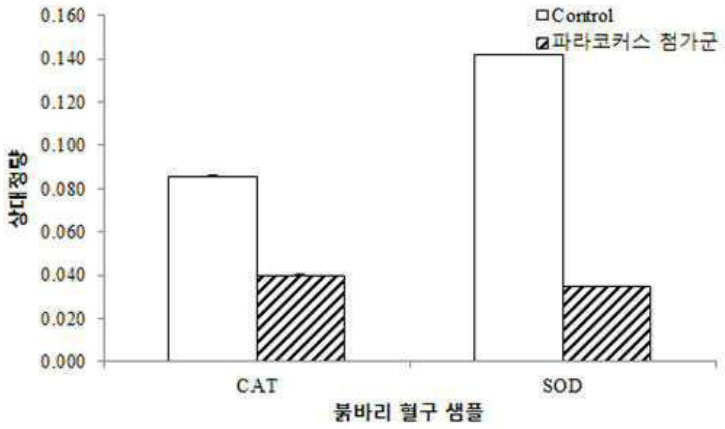
도면6


Amplification Plot (β-actin)
Melt Curves
Standard Curves
Amplification Plot (CAT)
Melt Curves
Standard Curves
Amplification Plot (SOD)
Melt Curves
Standard Curves

도면7


0.700
0.600
0.500
0.400
0.300
0.200
0.100
0.000
상대정량
control
파라코커스 첨가군
CAT
SOD
GPx
참돔 혈구 샘플

도면8


0.160
0.140
0.120
0.100
0.080
0.060
0.040
0.020
0.000
상대정량
Control
파라코커스 첨가군
CAT
SOD
붉바리 혈구 샘플