

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0057316

(43) 공개일자 2025년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23K 10/16 (2017.01) A23K 10/22 (2016.01)
A23K 10/26 (2016.01) A23K 10/30 (2016.01)
A23K 20/142 (2016.01) A23K 20/147 (2016.01)
A23K 20/158 (2016.01) A23K 20/163 (2016.01)
A23K 20/174 (2016.01) A23K 20/20 (2016.01)
A23K 50/80 (2016.01)

(52) CPC특허분류

A23K 10/16 (2016.05)
A23K 10/22 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2023-0140980

(22) 출원일자 2023년10월20일

심사청구일자 2023년10월20일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이은열

서울특별시 강남구 광평로34길 55, 104동 802호
(수서동, 강남대시앙포레)

이옥경

경기도 수원시 영통구 봉영로1517번길 27, 906동
203호 (영통동, 벽적골9단지 주공아파트)

이승형

부산광역시 해운대구 대천로67번길 18, 404동 10
2호 (좌동, LH뜨란채아파트)

(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 메탄자화균을 유효성분으로 포함하는 양어용 사료 조성물

(57) 요약

본 발명은 메탄자화균을 유효성분으로 포함하는 양어용 사료 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 본 발명의 메탄자화균을 유효성분으로 포함하는 양어용 사료 조성물은 고가의 어분 함유량을 줄여 전체 사료의 원가를 감소시키며, 높은 어분 함유 사료 조성물과 비슷한 수준의 성장률, 영양성분 조성, 면역 및 항산화효소 관련 인자, 성장 및 영양소 관련 대사 유전자 발현 효과를 가진다. 따라서, 본 발명에 따른 메탄자화균은 어분대체제로서 양어 사료의 단가 절감 및 안정적인 보급이 가능한 사료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23K 10/26 (2016.05)
A23K 10/30 (2016.05)
A23K 20/142 (2016.05)
A23K 20/147 (2016.05)
A23K 20/158 (2016.05)
A23K 20/163 (2016.05)
A23K 20/174 (2016.05)
A23K 20/20 (2021.08)
A23K 50/80 (2016.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711157126
과제번호	2015M3D3A1A01064882
부처명	기획재정부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	C1가스리파이너리사업
연구과제명	메탄-메탄올 전환 플랫폼 균주 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간	2023.01.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

메탄자화균을 유효성분으로 포함하는, 양어용 사료 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 메탄자화균은 어분을 대체하는 것을 특징으로 하는, 양어용 사료 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 메탄자화균은 어분 100 중량부 대비 0.1 내지 50 중량부를 대체하는 것을 특징으로 하는, 양어용 사료 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 메탄자화균은 메틸로시스티스 속(*Methylocystis*) 균주인 것을 특징으로 하는, 양어용 사료 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 사료 조성물은 단백질원, 탄수화물원 및 지질원을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 양어용 사료 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 단백질원은 어분, 대두박, 가금부산물, 수지박, 대두농축단백질, 글루텐 및 카제인으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질원인 것을 특징으로 하는, 양어용 사료 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 탄수화물원은 밀가루, 감자전분, 옥수수 전분, 고구마 전분, 텍스트린, 소맥분 및 수크로오스로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 탄수화물원인 것을 특징으로 하는, 양어용 사료 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 지질원은 어유, 식용유, 채종유, 옥수수유, 명태간유 및 오징어간유로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 지질원인 것을 특징으로 하는, 양어용 사료 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 사료 조성물은 미네랄 믹스, 비타민 믹스 및 기타 첨가제로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하며,

상기 기타 첨가제는 콜린(Choline), 레시틴(Lecithin), 라이신(Lysine), 타우린(Taurine) 및 베타인(Betaine)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 양어용 사료 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 메탄자화균은 전체 사료 조성물 100 중량부 대비 5 내지 30 중량부로 첨가되는 것을 특징으로 하는, 양어용 사료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 메탄자화균을 유효성분으로 포함하는 양어용 사료 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)는 전 세계 어류 양식량의 15위(1.6%)를 차지하는 주요 양식어종이다. 무지개송어는 미국 서부 태평양 연안의 강 하구역이 원산지이고, 중앙아시아 및 남아메리카에서 인기 있는 어종이다. 우리나라에서도 1965년 미국에서 도입 후로 양식이 지속적으로 이루어지고 있다. 무지개송어는 다른 어류에 비하여 비교적 사육 관리가 쉽고 성장이 빠르며 우리나라의 추운 겨울을 날 수 있는 냉수성 어종이라는 특성상 오랫동안 지속가능한 어종이다. 또한, 연어류 수입 대체 품목으로서의 가능성이 높아 산업적인 가치가 매우 높은 어종이다.

[0004] 인구가 증가하면서 수산물 소비량은 증가하고, 세계 양식 생산량 또한 꾸준히 증가하는 추세를 보인다. 어류 양식에서 사료는 어류의 성장을 좌우하는 핵심적인 요소로서 사료비는 양식 비용 중에서 큰 비중을 차지한다. 양어용 사료는 생사료와 배합사료로 나뉘는데, 생사료의 경우 수산자원 고갈, 어장환경 악화, 어병 발생 및 항생제 과다 사용 등의 문제를 야기하고 있어서 정부에서는 배합사료의 사용 확대 정책을 추진하고 있다. 양어용 배합 사료는 어분이 주 단백질원이 된다. 어류는 대부분 동물성 단백질을 섭취하므로 양어용 사료는 축산용에 비해 어분 함량이 높고 고품질 어분이 사용된다. 배합사료의 주요 단백질 원료인 어분은 이용가치가 낮은 어류로부터 생산되어 높은 단백질 소화율, 균형있는 아미노산 및 필수 지방산 조성과 어류의 높은 기호성 때문에 양식 사료의 단백질 원료로 주로 사용되어왔다. 우리나라는 양어용 배합사료에 이용되는 어분의 상당량을 수입에 의존하고 있어, 어분의 수요 증가 및 가격 상승에 따른 지속적이고 안정적인 공급이 가능한 어분 대체 물질의 개발이 요구되는 실정이다.

[0005] 미생물 바이오매스(Microbial biomass)는 다양한 미생물에서 생산되며, 다양한 미생물 그룹 중에서 박테리아, 효모 및 미세조류는 일반적으로 양식 사료에 대한 잠재력이 높은 것으로 간주된다. 미생물 바이오매스 중 하나인 메탄자화균은 메탄가스를 탄소원으로 사용할 수 있는 미생물로, 어분을 대체할 수 있는 어분대체원료로 주목받고 있다. 박테리아 단백질은 기후조건에 대한 의존도를 최소화하고 운송이 저렴하며 공급이 풍부하다는 장점

이 있다. 또한, 성장이 빠르며 높은 단백질 함량을 가지고 있어 잠재적인 미래 영양소 공급원이다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 메탄자화균을 어분대체원으로 사용하기 위하여 연구를 거듭한 결과, 메탄자화균을 유효성분으로 포함하는 양어용 사료 조성물이 양어 성장 및 화학적 활성화에 긍정적인 영향을 미친다는 점을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-1920075호(2018.11.13.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 메탄자화균을 유효성분으로 포함하는 양어용 사료 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 메탄자화균을 유효성분으로 포함하는 양어용 사료 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 메탄자화균을 유효성분으로 포함하는 양어용 사료 조성물은 고가의 어분 함유량을 줄여 전체 사료의 원가를 감소시키며, 높은 어분 함유 사료 조성물과 비슷한 수준의 성장률, 영양성분 조성, 면역 및 항산화효소 관련 인자, 성장 및 영양소 관련 대사 유전자 발현 효과를 가진다. 따라서, 본 발명에 따른 메탄자화균은 어분 대체제로서 양어 사료의 단가 절감 및 안정적인 보급이 가능한 사료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 무지개송어의 사육수조를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 무지개송어의 사료 공급을 위한 사료 제작 과정을 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 실험사료를 공급한 무지개송어의 비만도를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 실험사료를 공급한 무지개송어의 간중량지수를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 실험사료를 공급한 무지개송어의 총콜레스테롤 농도를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 실험사료를 공급한 무지개송어의 혈장 내 리소자임 농도를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 실험사료를 공급한 무지개송어의 장 조직 특성 분석 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현 예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본

발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

- [0017] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0018] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는(w/w) %, 고체/액체는(w/v) %, 그리고 액체/액체는(v/v) %이다.
- [0020] 일 측면에서, 본 발명은 메탄자화균을 유효성분으로 포함하는 양어용, 바람직하게는 송어용, 더 바람직하게는 무지개송어용 사료 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명에서 사용되는 용어 ‘양어’는 인공적으로 길러 번식하게 하는 양식어류를 의미한다.
- [0022] 본 발명에서 사용되는 용어 ‘메탄자화균(methanotroph)’은 메탄 순환에 관여하는 미생물 중 대표적인 것으로, 메탄을 산화시켜 탄소원과 에너지원으로 이용하는 세균이다. 메탄자화균은 메탄 이용균으로도 불리며, 메탄이 만들어지는 환경에 많고, 환경 내의 메탄을 감소시키는 역할을 한다.
- [0023] 본 발명에서 사용되는 용어 ‘어분(fishmeal)’은 생선 전체 또는 일부를 증기로 찌고 압착하여 액즙을 제거하고 고형부분을 건조하여 분쇄한 것이다. 붉은살 생선으로부터 만든 것을 브라운 밀(brown meal), 흰살 생선으로부터의 것을 화이트밀(white meal)이라 한다. 어분은 가축이나 양식어에게 주는 배합사료의 원료가 된다.
- [0024] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 메탄자화균은 어분을 대체하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 메탄자화균은 어분 100 중량부 대비 0.1 내지 50 중량부, 바람직하게는 12.5 내지 50 중량부를 대체하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 메탄자화균은 메틸로시스티스 속(*Methylocystis*) 균주, 바람직하게는 메틸로시스티스 헤이에리(*Methylocystis heyeri*), 메틸로시스티스 이오아오니스(*Methylocystis iwaonis*), 메틸로시스티스 브리오필라(*Methylocystis bryophila*), 메틸로시스티스 파르부스(*Methylocystis parvus*), 메틸로시스티스 히르수타(*Methylocystis hirsuta*), 메틸로시스티스 실비테라(*Methylocystis silviterrae*), 메틸로시스티스 에키노이데스(*Methylocystis echinoides*), 더 바람직하게는 *Methylocystis* sp. MJC1(수탁번호: KCTC 14362BP)인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 사료 조성물은 단백질원, 탄수화물원 및 지질원을 더 포함하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 단백질원은 어분, 대두박, 가금부산물, 수지박, 대두농축단백질, 글루텐 및 카제인으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질원, 바람직하게는 어분, 대두박, 가금부산물, 수지박 및 대두농축단백질인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 어분은 전체 사료 조성물 100 중량부 대비 25 내지 50 중량부로 포함되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 대두박은 전체 사료 조성물 100 중량부 대비 5 내지 10 중량부, 바람직하게는 6 내지 9 중량부, 더 바람직하게는 7.2 중량부로 포함되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 가금부산물은 전체 사료 조성물 100 중량부 대비 0 내지 2 중량부로 포함되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 수지박은 전체 사료 조성물 100 중량부 대비 0 내지 2 중량부로 포함되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 대두농축단백질은 전체 사료 조성물 100 중량부 대비 2 내지 12 중량부, 바람직하게는 4 내지 8 중량부, 더 바람직하게는 5 중량부로 포함되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아

니다.

- [0034] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 탄수화물원은 밀가루, 감자전분, 옥수수 전분, 고구마 전분, 텍스트린, 소맥분 및 수크로오스로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 탄수화물원, 바람직하게는 밀가루인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 밀가루는 전체 사료 조성물 100 중량부 대비 10 내지 30 중량부, 바람직하게는 12 내지 28 중량부, 더 바람직하게는 14.5 내지 22.5 중량부로 포함되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 지질원은 어유, 식용유, 채종유, 옥수수유, 명태간유 및 오징어간유로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 지질원, 바람직하게는 어유 및 식용유인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 어유는 전체 사료 조성물 100 중량부 대비 1 내지 10 중량부, 바람직하게는 3 내지 8 중량부, 더 바람직하게는 5 내지 7 중량부로 포함되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 식용유는 전체 사료 조성물 100 중량부 대비 1 내지 10 중량부, 바람직하게는 3 내지 8 중량부, 더 바람직하게는 5 중량부로 포함되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 사료 조성물은 미네랄 믹스, 비타민 믹스 및 기타 첨가제로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하며, 상기 기타 첨가제는 콜린(Choline), 레시틴(Lecithin), 라이신(Lysine), 타우린(Taurine) 및 베타인(Betaine)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 미네랄 믹스는 푸마르산철, 요오드산칼슘, 황산망간, 황산아연, 황산코발트, 황산구리, 황산마그네슘 및 수산화알루미늄으로 이루어진 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 비타민 믹스는 비타민 E, 비타민 K3, 비타민 C, 비타민 B1, 비타민 B2, 비타민 B6, 폴산 2,500, 비타민 H, 비타민 B12, 이노시톨, 니코틴산 및 판토텐산칼슘(비타민 A 및 D3 제외)으로 이루어진 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 콜린은 전체 사료 조성물 100 중량부 대비 0.1 내지 5 중량부, 바람직하게는 0.5 내지 1 중량부, 더 바람직하게는 0.6 중량부로 포함되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 레시틴은 전체 사료 조성물 100 중량부 대비 0.1 내지 5 중량부, 바람직하게는 0.5 내지 3 중량부, 더 바람직하게는 1 내지 2 중량부로 포함되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 라이신은 전체 사료 조성물 100 중량부 대비 0.1 내지 5 중량부, 바람직하게는 0.3 내지 3 중량부, 더 바람직하게는 0.5 중량부로 포함되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 타우린은 전체 사료 조성물 100 중량부 대비 0 내지 5 중량부, 바람직하게는 0 내지 1 중량부, 더 바람직하게는 0 내지 0.5 중량부로 포함되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 베타인은 전체 사료 조성물 100 중량부 대비 0 내지 5 중량부, 바람직하게는 0 내지 1 중량부, 더 바람직하게는 0 내지 0.5 중량부로 포함되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 메탄자화균은 전체 사료 100 중량부 대비 5 내지 30 중량부, 바람직하게는 6 내지 27 중량부, 더 바람직하게는 6.25 내지 25 중량부로 첨가되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0048] 본 발명의 사료 조성물의 메탄자화균은 기존의 어분의 일정 비율을 대체하고, 양어의 성장도, 영양성분 조성, 면역 및 항산화효소 관련 인자, 특정 병원성 세균을 이용한 공격실험, 성장 및 영양소 대사 관련 유전자 발현 등을 종합적으로 분석하여 메탄자화균의 어분대체제로서의 대체 가능성을 증명하였다. 본 발명의 사료 조성물은 발효사료, 배합사료, 펠렛 형태 및 사일리지 등의 형태로 제조될 수 있다. 상기 발효사료는 본 발명의 메탄자화

균 이외의 여러 가지 미생물군 또는 효소들을 첨가함으로써 유기물을 발효시켜 제조할 수 있으며, 배합사료는 여러 종류의 일반사료와 본 발명의 메탄자화균을 혼합하여 제조할 수 있다. 펠렛 형태의 사료는 상기 배합사료 등을 펠렛기에서 열과 압력을 가하여 제조할 수 있으며, 사일레지는 청예 사료를 본 발명에 따른 미생물로 발효 시킴으로써 제조할 수 있다. 습식발효사료는 음식물 쓰레기 등과 같은 유기물을 수집 및 운반하여 살균과정과 수분조절을 위한 부형제를 일정비율로 혼합한 후, 발효에 적당한 온도에서 24시간 이상 발효하여, 수분함량이 약 70%으로 포함되도록 조절하여 제조할 수 있다. 발효건조사료는 습식 발효 사료를 건조과정을 추가로 거쳐 수분함량이 30% 내지 40% 정도 함유되도록 조절하여 제조할 수 있다.

[0050] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0052] <준비예 1> 무지개송어 사육

[0053] 본 발명에서 사용된 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)는 양식장(이화정, 경상북도 상주 소재)에서 확보하여, 부경대학교 사료영양학 연구실로 운송하였으며, 실험어를 사육실험 수조 환경에 적응시키기 위하여 3주 동안 대조구 시료를 공급하여 예비 사육을 실시하였다. 예비사육 후, 유사한 크기의 무지개송어 치어를 선별하게 15개의 사각수조에 15마리씩 수용하여 각 실험구당 3반복으로 무작위 배치하였으며(도 1 참조), 평균 무게는 33.3 ± 0.2 g이었다. 각 실험수조는 반순환여과식으로 유수량은 0.8 L/min이며, 산소를 충분히 공급하기 위하여 에어스톤을 설치하였다. 또한, 수온은 15 ± 1 °C로 유지하였다. 사료는 어체중의 2.1~2.2%로, 1일 2회(9시, 17시), 총 8주 동안 공급하였다. 사료 공급 후, 사이펀 및 환수를 통하여 배설물 및 찌꺼기를 제거하여 수질 관리를 하여 어류의 정상적인 성장과 생리활성을 위한 수질 환경을 제공하였다.

[0055] <준비예 2> 메탄자화균 배양

[0056] 본 발명에서 사용된 메탄자화균인 *Methylocystis* sp. MJC1(수탁번호: KCTC 14362BP)은 NMS배지에서 배양하여 수확한 후 동결건조하여 냉장 보관하여 사용하였다.

[0058] <실시예 1> 무지개송어 사료 제작

[0059] 메탄자화균의 어분(참치부산물) 대체 정정 수준 및 사용 가능성을 평가하기 위하여, 메탄자화균을 첨가하지 않은 대조구(CON)와 어분을 일정 수준별 대체한 실험구 4종을 포함한 총 5종의 실험사료를 제작하여 하기 표 1에 나타내었다. 실험사료에 사용된 모든 원료는 The Feed Best에서 구매하여 사용하였다.

표 1

재료	실험사료 배합비(%, w/w)				
	CON	RP12.5	RP25	RP37.5	RP50
어분	50.000	43.750	37.500	31.250	25.000
메탄자화균	0.000	6.250	12.500	18.750	25.000
밀가루	22.500	20.500	18.500	16.500	14.500
대두박	7.200	7.200	7.200	7.200	7.200
가금부산물	0.000	0.500	1.000	1.500	2.000
수지박	0.000	0.500	1.000	1.500	2.000
대두농축단백질	5.000	5.000	5.000	5.000	5.000

어유	5.000	5.500	6.000	6.500	7.000
식용유	5.000	5.000	5.000	5.000	5.000
모노칼슘인산염	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
미네랄 믹스	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
비타민 믹스	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
비타민C	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
콜린	0.600	0.600	0.600	0.600	0.600
레시틴	1.000	1.250	1.500	1.750	2.000
라이신	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
타우린	0.000	0.125	0.250	0.375	0.500
베타인	0.000	0.125	0.250	0.375	0.500
합계	100	100	100	100	100
조단백질 (% of DM basis)	42.3	42.4	42.5	42.6	42.7
조지방 (% of DM basis)	19.4	19.2	19.0	18.9	18.7

[0062] 미네랄 믹스(mg/kg): 푸마르산철 12.5, 요오드산칼슘 0.75, 황산망간 11.3, 황산아연 13.8, 황산코발트 0.75, 황산구리 1.25, 황산마그네슘 80.2, 수산화알루미늄 0.75

[0063] 비타민 믹스 (mg/kg, 단 비타민 A 및 D3 제외): 비타민 A 5,000,000 IU, 비타민 D3 1,000,000 IU, 비타민 E 37,500, 비타민 K3 2,500, 비타민 C 6,400, 비타민 B1 5,000, 비타민 B2 10,000, 비타민 B6 5,000, 폴산 2,500, 비타민 H 50, 비타민 B12 25, 이노시톨 75,000, 니코틴산 37,500, 판토텐산칼슘 17,500

[0065] 상기 표 1에서 보듯이, 실험사료의 단백질원으로는 어분, 메탄자화균, 대두박, 가금부산물, 수지박 및 대두농축 단백질을 사용하였으며, 탄수화물원으로는 밀가루를 사용하였으며, 지질원으로는 어유 및 식용유를 사용하였다. 대조구(CON)에서 어분의 함량은 전체 실험사료의 50%로 하였으며, 이를 기준으로 메탄자화균을 이용하여 어분의 12.5, 25, 37.5 및 50%를 대체하기 위하여 메탄자화균을 전체 실험사료 대비 6.25, 12.5, 18.75 및 25%를 첨가하였다. 어분을 대체하여 메탄자화균을 첨가한 실험사료는 어분 대비 메탄자화균의 낮은 조단백질 및 조지방 함량으로 인해 실험사료 4종의 불균등한 영양소 함량을 균등하게 하기 위하여, 기타 단백질원 및 지질원의 함량을 조절하여 모든 실험사료의 영양소 함량을 유사하게 설정하였다.

[0066] 상기 표 1의 배합비율에 따라 정량한 사료원을 배합기에 넣어 10분 동안 혼합한 후, 30%의 물을 첨가하여 10분 동안 혼합하였다. 그 후, 어유 및 식용유를 첨가하여 10분 동안 혼합한 후, 사료 반죽을 펠렛터에 넣어 2 mm 구경으로 성형하여 40 °C의 건조기에서 14시간 동안 건조시켰다(도 2 참조). 건조된 사료는 -18 °C에서 보관하여 사용하였다.

[0068] <실험예 1> 수질 측정

[0069] 사료 공급 후, 사이펀 및 환수를 통하여 배설물 및 찌꺼기를 제거하였으며, 이러한 수질이 실험어의 정상적인 성장 및 생리활동에 영향을 미치는지 확인하기 위하여, 수질의 용존산소, pH, 암모니아, 아질산염 및 질산염을 측정하였다. 수질 측정은 1일 2회 실시하였다.

[0070] 용존산소는 DO 측정기(YSI ProSolo ODO Optical Dissolved Oxygen Meter, YSI incorporated, Yellow Springs, USA)로 측정하였으며, pH, 암모니아, 아질산염 및 질산염은 테스트 키트(Freshwater master test kit, Mars Fishcare North America, Inc., USA)를 사용하여 측정하였다.

[0071] 측정 결과, 용존산소는 8.15 ± 0.05 mg/dL, pH는 6.79 ± 0.02 , 암모니아는 0.44 ± 0.05 mg/dL, 아질산염은 0.33 ± 0.03 mg/dL, 질산염은 5.10 ± 0.33 mg/dL로 나타났다.

[0072] 이러한 수치는 실험어의 정상적인 성장 및 생리활동에 부정적인 영향을 미치지 않는 수준인 것을 확인하였다.

[0074] <실험예 2> 어류의 성장도 분석

[0075] *Methylocystis* sp. MJC1으로 어분을 대체하여 제작한 사료를 무지개송어에 공급 시, 어류의 성장도를 분석하기 위하여, 증체율, 일간 성장률, 사료효율 및 생존율을 측정하였다.

[0076] 상기 준비예 1에서 사육한 무지개송어에 상기 실시예 1에서 제작한 실험사료 5종을 8주 동안 각각 공급하여 사육을 진행하였다. 사육 후, 대조구를 공급한 실험어와 메탄자화균이 첨가된 실험사료(RP12.5, RP25, RP37.5, RP50)를 공급한 실험어의 성장도 변화를 비교하기 위하여, 실험어를 24시간 동안 절식시킨 후, 실험어 전체 무게를 측정하였다.

[0077] 어류의 성장도를 측정하는 대표적인 항목인 증체율(weight gain; WG, %), 일간 성장률(specific growth rate; SGR, %/day), 사료효율(feed efficiency; FE, %), 생존율(survival rate; SR, %)을 측정하였으며, 이를 측정하기 위한 수학적식 하기 수학적식 1 내지 4에 나타내었다.

수학적식 1

$$\text{증체율(\%)} = \left(\frac{\text{final weight} - \text{initial weight}}{\text{initial weight}} \right) \times 100$$

[0079]

수학적식 2

$$\text{일간 성장률(\%)} = \left(\frac{\ln \text{final weight} - \ln \text{initial weight}}{\text{days}} \right) \times 100$$

[0081]

수학적식 3

$$\text{사료효율(\%)} = \left(\frac{\text{wet weight gain}}{\text{dry feed intake}} \right) \times 100$$

[0083]

수학적식 4

$$\text{생존율(\%)} = \left(\frac{\text{number of fish at the beginning} - \text{number of dead fish}}{\text{number of fish at the beginning}} \right) \times 100$$

[0085]

[0087] 상기 수학적식 1 내지 4를 이용하여 계산한 최종무게(FBW), 증체율(WG), 일간 성장률(SGR), 사료효율(FE) 및 생존율(SR)을 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0089]

	실험사료					P-value
	CON	RP12.5	RP25	RP37.5	RP50	
FBW(g)	71.1±2.9	69.1±2.9	72.2±2.3	67.7±2.9	70.2±1.2	0.7033
WG(%)	112±9	106±10	119±4	106±3	109±4	0.6017
SGR(%/day)	1.34±0.08	1.29±0.08	1.40±0.03	1.29±0.02	1.32±0.03	0.6098
FE(%)	71.1±5.4	66.2±4.7	71.0±2.9	67.0±0.9	68.1±1.9	0.8097
SR(%)	88.3±1.7	83.3±1.7	90.0±2.9	86.7±3.3	95.0±2.9	0.8720

[0091]

상기 표 2에서 보듯이, 최종무게, 증체율, 인간 성장률, 사료효율, 생존율에 있어서 모든 실험구 간 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

[0092]

이를 통해, 메탄자화균을 이용하여 치어기 무지개송어 사료 내 어분을 최대 50%까지 대체하여도 생존, 성장 및 사료 이용 효율에 부정적인 영향을 미치지 않았음을 확인하였으며, 이는 메탄자화균을 어분대체원으로 사용 가능함을 의미한다.

[0094]

<실험예 3> 어류의 형태학적 변화 분석

[0095]

Methylocystis sp. MJC1으로 어분을 대체하여 제작한 사료를 무지개송어에 공급 시, 어류의 형태학적 변화를 분석하기 위하여, 비만도, 간중량지수 및 내장중량지수를 측정하였다.

[0096]

상기 준비예 1에서 사육한 무지개송어에 상기 실시예 1에서 제작한 실험사료 5종을 8주 동안 각각 공급하여 사육을 진행하였다. 사육 후, 대조구를 공급한 실험어와 메탄자화균이 첨가된 실험사료(RP12.5, RP25, RP37.5, RP50)를 공급한 실험어의 형태학적 변화를 비교하기 위하여, 3마리의 무지개송어를 무작위로 선택하여 마취제를 이용하여 안락사 시킨 후, 개체별 무게, 전장, 간 및 내장의 무게를 측정하였다.

[0097]

어류의 성장은 어체 분위별 영양소 축적과 연결되며, 형태학적 변화 조사를 통해 이를 이해할 수 있다. 대표적 인 항목인 비만도(condition factor; CF), 간중량지수(hepatosomatic index; HSI, %), 내장중량지수(visceralsomatic index; VSI, %)를 측정하였으며, 이를 측정하기 위한 수학적식 하기 수학적식 5 내지 7에 나타 내었다.

수학적식 5

$$\text{비만도} = \left(\frac{\text{wet weight}}{\text{total length}^3} \right) \times 100$$

[0099]

수학적식 6

$$\text{간중량지수}(\%) = \left(\frac{\text{liver weight}}{\text{body weight}} \right) \times 100$$

[0101]

수학식 7

$$\text{내장중량지수}(\%) = \left(\frac{\text{viscera weight}}{\text{body weight}} \right) \times 100$$

상기 수학식 5 내지 7을 이용하여 계산한 비만도(CF), 간중량지수(HSI) 및 내장중량지수(VSI)을 하기 표 3, 도 3 및 도 4에 나타내었다.

표 3

	실험사료					ANOVA
	CON	RP12.5	RP25	RP37.5	RP50	
CF	1.22±0.02	1.29±0.00	1.25±0.01	1.25±0.01	1.26±0.01	0.0330
HSI(%)	1.3±0.04	1.28±0.05	1.21±0.08	1.35±0.07	1.59±0.02	0.0070
VSI(%)	11.5±0.3	11.7±0.5	11.2±0.4	12.5±0.3	12.1±0.4	0.2061

표 3 및 도 3에서 보듯이, RP12.5 실험구가 대조구에 비하여 유의적으로 높은 비만도 결과값을 보였으나, 다른 실험구들간의 유의적인 결과를 나타내진 않았다.

표 3 및 도 4에서 보듯이, RP50 실험구가 대조구, RP12.5 및 RP25 실험구보다 유의적으로 높은 간중량지수 결과값을 보였다. 다만, 내장중량지수는 모든 실험구들간의 유의적인 관계가 관찰되지 않았다.

어류의 체중 증가는 중 조직별 영양소 축적에 기인한 것이며, 어류의 비만도, 간중량지수 및 내장중량지수 결과를 통해 어느 조직에 영양소가 주로 축적되어 있는지 추론할 수 있다.

이를 통해, 메탄자화균을 이용하여 치어기 무지개송어 사료 내 어분을 최대 50%까지 대체하여도 무지개송어 내 영양소 축적에 유의한 영향을 미치지 않았음을 확인하였으며, 이는 메탄자화균을 어분대체원으로 사용 가능성을 의미한다.

<실험예 4> 메탄자화균, 실험사료 및 어류의 영양성분 분석

4-1. 시료 채취

Methylocystis sp. MJC1로 어분 대체 시, 어류의 혈액 내 대사체, 면역 및 항산화효소 인자 변화를 분석하기 위하여, 수조 별로 6마리의 무지개송어를 무작위로 선별하여 phenoxylethanol 100 ppm으로 마취시켰다. 그 후, 개체별 무게와 전장을 측정하고, 미부정맥에서 EDTA 처리된 주사기를 사용하여 채혈하였다. 6마리의 혈액을 1.5 mL tube에 분주하여 원심분리기(CF-10, DAIHAN Scientific Co., Ltd., Korea)에 15,000 rpm조건에서 5분 동안 원심분리시켜 plasma를 확보하였다. Plasma는 8개의 1.5 mL tube에 200 μ l씩 분주하고 액체질소에 급속 냉동시킨 후 -80 °C에 보관하였다.

혈액 채취 후 실험어 3마리는 일반성분 분석을 위하여 -20 °C에 보관하였으며, 나머지 3마리에서 뇌(brain)와 간(liver)을 채취하여 액체 질소에 급속 냉동시킨 후 -80 °C에 보관하였다.

4-2. 메탄자화균의 일반성분, 구성아미노산 및 지방산 분석

일반성분은 AOAC(2000) 분석법에 따라 분석하였으며, 수분은 상압가열건조법(125 °C, 3시간), 조회분은 직접회화법(550 °C, 4시간), 조단백질은 kjeldahl 질소 정량법(N×6.25)으로 분석하였다. 조지질 샘플은 12시간 동안 동결 건조한 후, soxtec system 1046(Tacator AB, Sweden)을 사용하여 soxhlet 추출법으로 분석하였다. 구성아

미노산은 아미노산 자동 분석기로 분석하였고, 지방산은 gas chromatography로 분석하였다.

[0121]

실험사료에 첨가한 *Methylocystis* sp. MJC1의 일반성분 분석 결과를 하기 표 4에 나타내었으며, 아미노산 분석 결과를 표 5에 나타내었으며, 지방산 분석 결과를 표 6에 나타내었다.

표 4

[0123]

Proximate composition (% of DM basis)	메탄산화균
수분	2.08 ± 0.02
조단백질	52.7 ± 0.50
조지질	0.74 ± 0.02
조회분	11.2 ± 0.17

표 5

[0125]

Amino acids (% of DM basis)	메탄산화균
Aspartic acid	0.05
Threonine	0.10
Serine	0.00
Glutamic acid	0.07
Proline	0.90
Glycine	0.77
Alanine	2.46
Valine	1.51
Isoleucine	1.01
Leucine	1.54
Tyrosine	0.82
Phenylalanine	1.36
Histidine	1.02
Lysine	1.13
Arginine	1.46
Total	14.2

표 6

[0127]

Fatty acids (% of DM basis)	메탄산화균
C4:0(Butyric acid)	0.000
C6:0(Caproic acid)	0.252
C8:0(Caprylic acid)	0.257
C10:0(Capric acid)	0.453
C11:0(Undecanoic acid)	0.000
C12:0(Lauric acid)	9.553
C13:0(Tridecanoic acid)	0.000
C14:0(Myristic acid)	4.564
C14:1(Myristoleic acid)	0.00

C15:0(Pentadecanoic acid)	0.344
C15:1(cis-10-Pentadecenoic acid)	0.000
C16:0(Palmitic acid)	23.947
C16:1(Palmitoleic acid)	0.950
C17:0(decanoic acid)	0.399
C17:1(cis-10-Heptadecenoic acid)	0.000
C18:0(Stearic acid)	8.842
C18:1n9t(Elaidic acid)	1.112
C18:1n9c(Oleic acid)	48.480
C18:2n6t(Linolelaidic acid)	0.000
C18:2n6c(Linoleic acid)	0.625
C20:0(Arachidic acid)	0.222
C18:3n6(γ-Linolenic acid)	0.000
C20:1(cis-11-Eicosenoic acid)	0.000
C18:3n3(Linolenic acid)	0.000
C21:0(Heneicosanoic acid)	0.000
C20:2(cis-11,14-Eicosadienoic acid)	0.000
C22:0(Behenic acid)	0.000
C20:3n6(cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid)	0.000
C22:1n9(Erucic acid)	0.000
C20:3n3(cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid)	0.000
C23:0(Tricosanoic acid)	0.000
C20:4n6(Arachidonic acid)	0.000
C22:2(cis-13,16-Docosadienoic acid)	0.000
C24:0(Lignoceric acid)	0.000
C20:5n3(EPA)	0.000
C24:1(Nervonic acid)	0.000
C22:6n3(DHA)	0.000
Total	100

[0129] 상기 표 4에서 보듯이, *Methylocystis* sp. MJC1 일반성분 분석 결과 조단백과 조지질은 각각 건물(Dry Matter; DM) 기준 52.7% 및 0.74%로 나타났다.

[0130] 상기 표 5에서 보듯이, 구성아미노산의 총 함량(methionine, cysteine, tryptophan 제외)은 건물 기준 14.2%로 나왔으며, 이 중 alanine의 함량이 2.46%로 가장 많았으며, leucine 1.54%, valine 1.51%로 많았다. 일반적인 사료원료의 구성아미노산 분석값은 조단백질 함량과 유사한 수준(80~90%)으로 나타나는 반면, 메탄자화균의 경우는 그렇지 않다. 아미노산이 유리 형태로 존재하거나 아미노산 외 다른 질소화합물의 비율이 높은 것으로 추정된다.

[0131] 상기 표 6에서 보듯이, 지방산은 oleic acid 가 48.48%, palmitic acid 는 23.95%이며, 어류에 필수지방산으로 알려져 있는 ω-3 지방산(linolenic acid, EPA, DHA)은 검출되지 않았다.

[0133] 4-3. 실험사료 5종의 일반성분, 구성아미노산 및 지방산 분석

[0134] 일반성분, 구성아미노산 및 지방산 분석 방법은 상기 실험예 4-2와 동일하게 수행하였다.

[0135] 실험사료 5종의 일반성분 분석 결과를 하기 표 7에 나타내었으며, 아미노산 분석 결과를 표 8에 나타내었으며, 지방산 분석 결과를 표 9에 나타내었다.

표 7

[0137]

Proximate composition (% of DM basis)	실험사료				
	CON	RP12.5	RP25	RP37.5	RP50
수분	10.0±0.06	9.75±0.13	9.74±0.09	9.39±0.07	9.44±0.10
조단백질	39.0±0.12	39.4±0.10	39.5±0.25	39.5±0.28	41.5±0.38
조지질	18.0±0.37	17.8±0.28	17.8±0.37	17.8±0.11	17.8±0.28
조회분	13.0±0.07	11.7±0.15	11.1±0.04	10.0±0.07	9.52±0.11

표 8

[0139]

Amino acids (% of DM basis)	실험사료				
	CON	RP12.5	RP25	RP37.5	RP50
Aspartic acid	2.86	2.89	3.05	3.01	2.98
Threonine	0.84	0.85	0.95	1.10	1.03
Serine	0.48	0.45	0.55	0.63	0.67
Glutamic acid	5.02	4.87	5.10	5.16	4.82
Proline	1.60	1.67	1.46	1.45	1.41
Glycine	1.99	2.08	2.17	2.14	2.19
Alanine	1.84	1.90	2.07	2.08	2.22
Valine	1.67	1.68	1.80	1.79	1.92
Isoleucine	1.38	1.41	1.49	1.46	1.49
Leucine	2.25	2.30	2.43	2.37	2.43
Tyrosine	0.64	0.57	0.65	0.79	1.14
Phenylalanine	1.49	1.56	1.64	1.62	1.66
Histidine	1.42	1.51	1.51	1.42	1.33
Lysine	2.40	2.39	2.50	2.35	2.37
Arginine	2.03	2.11	2.22	2.22	2.35
Total	27.91	28.24	29.59	29.59	30.01

표 9

[0141]

Fatty acids(% of DM basis)	실험사료				
	CON	RP12.5	RP25	RP37.5	RP50
C4:0(Butyric acid)	0.053	0.152	0.169	0.18	0.252
C6:0(Caproic acid)	0	0.082	0.075	0.051	0.077
C8:0(Caprylic acid)	0	0.044	0	0	0.051
C10:0(Capric acid)	0	0	0	0	0
C11:0(Undecanoic acid)	0	0	0	0	0
C12:0(Lauric acid)	0.088	0.115	0.144	0.07	0.18
C13:0(Tridecanoic acid)	0	0	0	0	0
C14:0(Myristic acid)	2.587	2.86	3.09	3.574	3.794
C14:1(Myristoleic acid)	0	0	0	0	0
C15:0(Pentadecanoic acid)	0.465	0.523	0.585	0.742	0.829
C15:1(cis-10-Pentadecenoic acid)	0	0	0	0	0
C16:0(Palmitic acid)	38.168	34.638	35.351	35.827	37.238
C16:1(Palmitoleic acid)	1.204	1.22	1.27	1.412	1.529

C17:0(decanoic acid)	0.775	0.767	0.792	0.976	1.099
C17:1(cis-10-Heptadecenoic acid)	0.082	0.089	0.085	0.107	0.121
C18:0(Stearic acid)	1.347	10.931	10.953	11.426	11.569
C18:1n9t(Elaidic acid)	0.195	0.12	0.067	0.078	0
C18:1n9c(Oleic acid)	20.511	16.751	15.787	14.242	13.265
C18:2n6t(Linolelaidic acid)	0	0	0	0	0
C18:2n6c(Linoleic acid)	26.113	23.310	23.211	21.577	20.494
C20:0(Arachidic acid)	0.764	0.579	0.568	0.617	0.655
C18:3n6(γ -Linolenic acid)	0.097	0.078	0.085	0.085	0.085
C20:1(cis-11-Eicosenoic acid)	0.639	0.518	0.451	0.511	0.529
C18:3n3(Linolenic acid)	3.479	3.312	3.137	3.113	2.824
C21:0(Heneicosanoic acid)	0.063	0.054	0.054	0.056	0.062
C20:2(cis-11,14-Eicosadienoic acid)	0	0.172	0.133	0.189	0.183
C22:0(Behenic acid)	0.659	0.459	0.425	0.484	0.476
C20:3n6(cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid)	0	0	0	0	0
C22:1n9(Erucic acid)	0	0	0	0	0
C20:3n3(cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid)	0	0	0	0.034	0
C23:0(Tricosanoic acid)	0.073	0.05	0	0.057	0.059
C20:4n6(Arachidonic acid)	0.155	0.184	0.195	0.281	0.281
C22:2(cis-13,16-Docosadienoic acid)	0	0	0	0	0
C24:0(Lignoceric acid)	0.222	0.143	0.142	0.169	0.174
C20:5n3(EPA)	0.717	0.83	0.902	1.025	1.042
C24:1(Nervonic acid)	0.076	0.057	0.071	0.078	0.089
C22:6n3(DHA)	1.468	1.962	2.258	3.039	3.043
Total	100	100	100	100	100

[0143] 상기 표 7에서 보듯이, 실험사료 일반성분 분석 결과, 실험사료 5종의 조단백질 및 조지방 함량은 유사하게 나타났다.

[0144] 상기 표 8에서 보듯이, 실험사료 구성아미노산 분석 결과, 실험사료 간 아미노산 함량은 유사하게 나타났다.

[0145] 상기 표 9에서 보듯이, 실험사료 지방산 분석 결과, EPA 및 DHA 함량이 메탄자화균 첨가 비율이 높아질수록 증가하는 것을 확인하였다. 이는 사료 내 어분 비율이 감소함에 따라 부족한 필수지방산을 보충하기 위해 어유 첨가량이 늘어남으로써 나타난 결과이다. 필수미량 영양소는 요구량보다 부족 시 성장 저하 및 생리활성에 부정적인 영향을 미치며, 실험사료 내 필수지방산 함량은 요구량 이상으로 첨가되었다.

[0147] 4-4. 무지개송어의 일반성분 분석

[0148] 일반성분 분석 방법은 상기 실험예 4-2와 동일하게 수행하였으며, 상기 실험예 4-1에서 보관한 실험어 3마리를 이용하여 실험을 진행하였다.

[0149] 실험 시작 시 무지개송어 치어의 전어체 일반성분 분석 결과는 수분 $72.9 \pm 0.7\%$, 조단백질 $16.3 \pm 0.4\%$, 조지질 $8.07 \pm 0.24\%$ 및 조회분 $2.67 \pm 0.09\%$ 으로 나타났다. 8주간 사육 실험 종료 후, 무지개송어의 일반성분 분석 결과를 하기 표 10에 나타내었다.

표 10

Proximate composition (% of DM basis)	실험사료					P-value
	CON	RP12.5	RP25	RP37.5	RP50	
수분	69.9 ± 0.6	69.2 ± 0.3	69.1 ± 0.5	70.6 ± 0.6	68.6 ± 0.4	0.1345

조단백질	16.2±0.2	17.4±0.7	17.0±0.4	16.0±0.2	16.8±0.6	0.2728
조지질	11.1±0.6	10.8±0.5	11.4±0.3	10.6±0.4	12.0±0.7	0.4152
조회분	2.57±0.08	2.38±0.05	2.35±0.04	2.42±0.03	2.54±0.06	0.0607

[0153] 상기 표 10에서 보듯이, 8주간 사육 실험을 진행한 무지개송어의 전어체 일반성분 분석 결과, 실험구 간의 유의적인 차이가 보이지 않았다.

[0154] 따라서, 어류의 무게 성장은 영양소 축적과 상관관계가 있으며, 실험구 간의 조단백질 및 조지방 함량의 차이가 관찰되지 않은 것과 어류의 성장도 결과에서 차이가 나타나지 않은 것은 관련성이 있다는 것을 확인하였다.

[0156] <실험예 5> 혈장 내 대사체 분석

[0157] 실험예 4-1에서 채취한 시료를 이용하여 혈장 내 대사체를 분석하였다.

[0158] 혈액분석기(DRI-CHEM NX500i, Fuji Film, Japan)를 사용하여 혈장 내 대사체를 분석하였으며, 분석 항목은 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT), glutamic pyruvate transaminase(GPT), glucose(GLU), total cholesterol(TCHO), triglyceride(TG), total protein(TP)로 총 6가지였다. FUJI DRI-CHEM SLIDE(Fuji Film, Japan)를 사용하여 혈장 내 대사체 분석을 실시하였다.

[0159] 8주간 실험사료 공급 후, 무지개송어의 혈장 내 대사체 분석 결과를 하기 표 11 및 도 5에 나타내었다.

표 11

	실험사료					P-value
	CON	RP12.5	RP25	RP37.5	RP50	
GOT (U/L)	98.3±14.8	75.7±14.2	83.7±15.0	164.3±67.6	84.7±8.4	0.3561
GPT (U/L)	17±0.0	20.7±2.9	23.0±2.0	18.3±0.3	18.0±0.6	0.1335
GLU (mg/dL)	91.0±4.0	83.7±8.1	87.3±7.3	90.0±14.7	80.0±7.2	0.8982
TCHO (mg/dL)	305±5 ^a	244±11 ^b	223±8 ^b	241±16 ^b	221±8 ^b	0.0011
TP (g/dL)	3.27±0.09	3.17±0.18	3.17±0.09	3.17±0.2	3.1±0	0.9312
TG (mg/dL)	271±9	222±7	215±5	296±44	230±23	0.1278

[0163] 상기 표 11 및 도 5에서 보듯이, 사료 내 메탄자화균이 첨가된 실험구에서 대조구에 비하여 유의하게 낮은 농도의 TCHO(총콜레스테롤)가 나타났다. TCHO 외 GOT, GPT, GLU, TCHO, TP 및 TG에서는 실험구들 간의 유의적인 차이가 보이지 않았다.

[0164] 이를 통해, 사료 내 메탄자화균을 사용하여 어분을 대체하여도 단백질, 지질 및 탄수화물 대사에 부정적인 영향을 미치지 않은 것을 확인하였으며, 이는 메탄자화균을 어분대체원으로 사용 가능함을 의미한다. 또한, 메탄자화균으로 어분을 대체한 실험구에서 TCHO 값이 대조구에 비해 유의하게 낮게 나타난 결과는 메탄자화균 내 특정 대사물질이 존재하여 콜레스테롤 체내 축적을 저하시키는 기능이 있음을 알려주는 것으로 판단된다.

[0166] <실험예 6> 면역 및 항산화효소 인자 분석

[0167] 실험예 4-1에서 채취한 시료와 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) kit(Cusabio, China)를 사용하여 면역 및 항산화효소 반응 인자(interleukin 1β (IL- 1β), lysozyme(LZM), heat shock protein 70(HSP70), superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx))를 분석하였다.

[0168] 8주간 실험사료 공급 후, 무지개송어의 혈장 내 면역 및 항산화효소 인자 분석 결과를 하기 표 12 및 도 6에 나타내었다.

표 12

[0170]

	실험사료					P-value
	CON	RP12.5	RP25	RP37.5	RP50	
LZM ($\mu\text{g/mL}$)	6.2 ± 0.38	5.95 ± 0.51	5.26 ± 0.22	7.16 ± 0.68	4.81 ± 0.22	0.0288
IL- 1β (pg/mL)	0.41 ± 0.52	1.26 ± 0.94	2.60 ± 0.97	0.73 ± 0.44	0.93 ± 0.37	0.3584
SOD ($\mu\text{g/mL}$)	1.8 ± 0.45	1.25 ± 0.46	0.65 ± 0.23	1.68 ± 0.56	0.58 ± 0.02	0.1603
GPx (mU/mL)	210 ± 23	187 ± 9	234 ± 35	249 ± 16	214 ± 23	0.4240
HSP70 (pg/mL)	8.34 ± 0.79	6.14 ± 0.26	6.02 ± 0.14	6.6 ± 1.14	6.86 ± 0.38	0.1698

[0172] 상기 표 12 및 도 6에서 보듯이, RP50 실험구가 RP37.5 실험구에 비해 유의적으로 낮은 LZM 농도를 나타내었으나, 그 외 실험구간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 특이적 면역 반응 인자 중 하나인 IL- 1β , 항산화효소 중 SOD 및 GPx, 분자 샤페론(molecular chaperon) 중 하나인 HSP70 측정값에서는 실험구간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

[0173] 이를 통해, 어류의 정상적인 성장과 생리활동에 필요한 필수영양소들이 풍부한 어분을 메탄자화균으로 대체하여도 면역 및 항산화효소 반응에 부정적인 영향을 미치지 않았음을 확인하였으며, 이는 메탄자화균을 어분대체원으로 사용 가능함을 의미한다.

[0175] <실험예 7> 장 조직 특성 분석

[0176] *Methylocystis* sp. MJC1으로 어분을 대체하여 제작한 사료를 무지개송어에 공급 시, 무지개송어의 영양소 흡수에 어떠한 영향을 미치는지 조사하기 위하여, 장 조직 특성을 분석하였다. 장 조직의 특성을 분석함으로써 어분 대체원인 메탄자화균이 영양소의 흡수에 미치는 영향을 분석할 수 있다. 소장 점막 조직에서는 다양한 영양소의 흡수가 일어나고 있으며, 어분대체원 내 항영양인자 존재 시 이러한 점막 조직에 부정적인 영향을 미치게 되어, 점막 조직에 염증이 일어나거나 융털 길이, 두께 및 창자샘세포 깊이에 영향을 미칠 수 있다.

[0177] 무지개송어를 해부하여 장 조직 내 세포들의 형태 및 특징을 파악하기 위하여, 일반적인 조직처리과정(tissue processing)을 거쳐 일반 염색을 통해 광학현미경에 의한 조직학적 관찰을 진행하였다. 10% neutral buffered formalin solution(Sigma, USA)으로 24시간 동안 침적 고정하였으며, 70% 에탄올부터 100% 에탄올까지 농도를 높여가며 탈수 과정을 거쳐 투명화를 한 후, 통상적인 방법에 따라 파라핀을 침투시켜 파라핀 블록(paraffin block)을 만들었다. 각각의 블록을 회전식 박절기(HM340E, Microm Co., Germany)를 이용하여 $5\mu\text{m}$ 두께로 박절한 후, 조직 절편을 3-aminopropyl triethoxysilane(Sigma, USA)으로 코팅된 슬라이드 글라스에 부착하였다. 부착된 조직 절편을 자일렌(xylene)과 단계적 농도의 에탄올을 사용하여 탈파라핀 및 투명화 처리한 후, Hematoxylin-Eosin(H&E) 염색을 실시하였다. 염색을 마친 조직절편은 탈수 및 투명화 과정을 마친 후 합성 봉입제(DPX, USA)를 이용하여 봉입하였다. 염색을 마친 조직절편을 광학현미경(Olympus BX41, Tokyo, Japan)으로

관찰하였으며 디지털카메라(DIXI Optics, Daejeon, Korea)를 이용하여 사진을 촬영 후 융모의 길이(Villus height; VH)와 장벽 두께(Muscle thickness; MT)를 측정하였다.

[0178] 8주간 실험사료 공급 후, 무지개송어의 장 조직 특성 분석 결과를 표 13 및 도 7에 나타내었다.

표 13

	실험사료					P-value
	CON	RP12.5	RP25	RP37.5	RP50	
VH(μ m)	518 $\pm$ 12	565 $\pm$ 15	565 $\pm$ 15	539 $\pm$ 12	599 $\pm$ 14	0.1004
MT(μ m)	0.41 $\pm$ 0.52	63.3 $\pm$ 2.7	72.1 $\pm$ 2.6	66.7 $\pm$ 2.5	68.4 $\pm$ 2.1	0.6602

[0182] 표 13 및 도 7에서 보듯이, 융털 길이(VH)와 장벽 두께(MT)에서 모든 실험구간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

[0183] 이를 통해, 어분의 최대 50%까지 메탄자화균으로 대체하여도 무지개송어 치어의 점막 조직에 부정적인 영향을 미치지 않았음을 확인하였으며, 이는 메탄자화균을 어분대체원으로 사용 가능성을 의미한다.

[0185] <실험예 8> 유전자 발현 분석

[0186] *Methylocystis* sp. MJC1으로 어분을 대체하여 제작한 사료를 무지개송어에 공급 시, 무지개송어의 뇌(whole brain)와 간에서 성장 및 영양소 대사와 관련된 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 유전자 발현 분석을 실시하였다.

[0187] 상기 실험예 4-1에서 채취한 무지개송어의 뇌와 간에서 RNA를 분리하여 수행하였으며, RNA 분리는 RiboEx(GeneAll, Korea)용액을 사용하여 추출하였다. cDNA 합성은 PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit(TAKARA, Japan)를 이용하여 합성하였으며, real-time PCR은 TB Green Premix Ex TaqTM II Kit(TAKARA, Japan)와 real-time PCR장비(StepOneTM, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 Ct값을 측정하여 Δ Ct, $\Delta\Delta$ Ct 및 Fold gene expression을 계산하였으며, 이를 계산하기 위한 수학적식 하기 수학적식 8 내지 10에 나타내었다.

수학적식 8

[0189] $\Delta Ct = Ct(\text{gene of interest}) - Ct(\text{housekeeping gene})$

수학적식 9

[0191] $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Sample}) - \Delta Ct(\text{Control average})$

수학적식 10

[0193] $\text{Fold gene expression} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$

[0195] 무지개송어의 뇌와 간에 공통적으로 사용되는 housekeeping gene은 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(*gapdh*)를 사용하였으며, 뇌의 성장 관련 유전자인 growth hormone 1&2(*gh1*, *gh2*)를 분석하였으며, 간의 성장 관련 유전자인 growth hormone receptor 1(*ghr1*), 탄수화물 대사 관련 유전자인 α -amylase(*amy*), 아미노산 대사 관련 유전자인 glutamate dehydrogenase(*gdh*), 지방 대사 관련 유전자인 fatty acid desaturase-6(*fads6*), fatty acid elongase-5a(*elvol5a*)를 분석하였다. 상기 유전자의 primer를 하기 표 14에 나타내었다.

표 14

유전자 이름	5 '-3' forward	5' -3' reverse
<i>gapdh</i>	ATGTCAGACCTCTGTGTGG	TCCTCGATGCCGAAGTTGTCG
<i>gh1</i>	GGTTCGGTTTCCCAGATACAGA	TGAAAAGCATGTTCAATGGAGAA
<i>gh2</i>	GGAGCGGAGCAGCAAGAG	TGCAGGGAAAGGTCTCATCTG
<i>ghr1</i>	CCTGACCTACTGGCAACAT	CTCAGGCACTGAATCCCAT
<i>amy</i>	ACCGTGGCTTCATTGTCTTC	GTCGGTGTGCTGATCTTGA
<i>gdh</i>	ATCAAGCCCTGCAACCACGTCCT	TCTTCACTGTAACGGATCCCCCTTT
<i>fads6</i>	CATCTGATTCTGATTCCATTCC	CTCTGCTCCACTCACACC
<i>elvol5a</i>	GACACCCACGGAACCATAC	CTCTCCTAGCGACATTACATACAG

[0199] 8주간 실험사료 공급 후, 무지개송어의 뇌와 간에서 성장 및 영양소 대사와 관련된 유전자의 발현 결과를 하기 표 15에 나타내었다.

표 15

유전자 이름	실험사료					P-value
	CON	RP12.5	RP25	RP37.5	RP50	
<i>gh1</i>	1.00±0.00	1.75±0.51	0.49±0.01	0.77±0.13	5.84±3.47	0.2775
<i>gh2</i>	1.00±0.00	1.59±0.15	0.35±0.11	0.70±0.07	7.12±3.62	0.1458
<i>ghr1</i>	1.00±0.00	0.87±0.06	1.25±0.33	2.29±0.23	1.87±0.81	0.1391
<i>amy</i>	1.00±0.00	0.88±0.33	0.58±0.08	0.94±0.27	0.34±0.06	0.1623
<i>gdh</i>	1.00±0.00	0.40±0.24	0.72±0.31	1.16±0.61	0.32±0.14	0.3647
<i>fads6</i>	1.00±0.00	1.32±0.68	0.82±0.24	1.21±0.22	1.06±0.22	0.8739
<i>elvol5a</i>	1.00±0.00	0.65±0.11	0.49±0.06	1.44±0.4	0.77±0.16	0.0516

[0203] 상기 표 15에서 보듯이, 뇌에서 분비되는 growth hormone 1&2(*gh1*, *gh2*)의 유전자 발현량과 간 조직에서 분비되는 growth hormone receptor 1(*ghr1*)의 유전자 발현량은 실험구간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 또한, 간 조직에서 영양소 대사 관련 유전자인 glutamate dehydrogenase(*gdh*), α -amylase(*amy*), fatty acid desaturase-6(*fads6*) 및 fatty acid elongase-5a(*elvol5a*) 발현은 실험구간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

[0204] 이를 통해, 어분을 메탄자화균으로 대체하여도 무지개송어 치어의 성장 호르몬에 유의미한 영향을 미치지 않았음을 확인하였으며, 주요 영양소의 대사에서도 메탄자화균에 기인한 영양소와 미지의 인자들이 부정적인 영향을 미치지 않았음을 확인하였다. 이는 메탄자화균을 어분대체원으로 사용 가능함을 의미한다.

[0206]

이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예, 실험예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구 범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

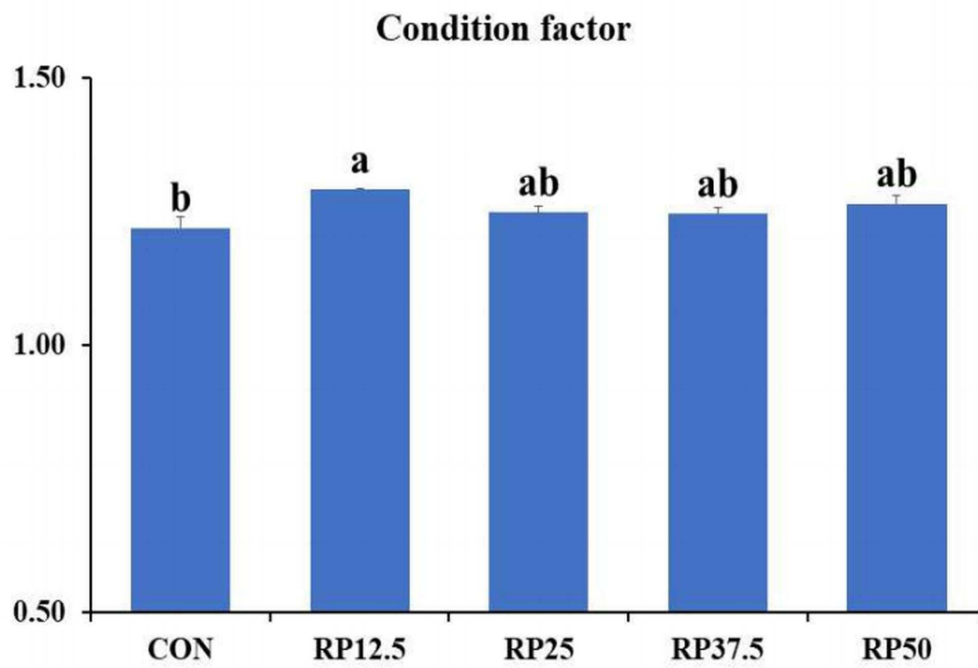
도면1



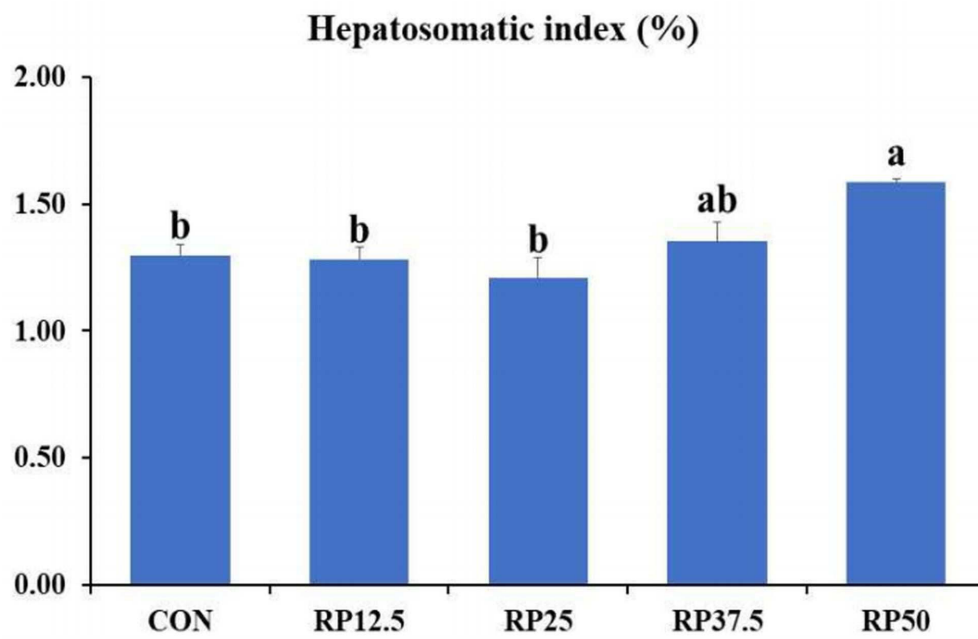
도면2



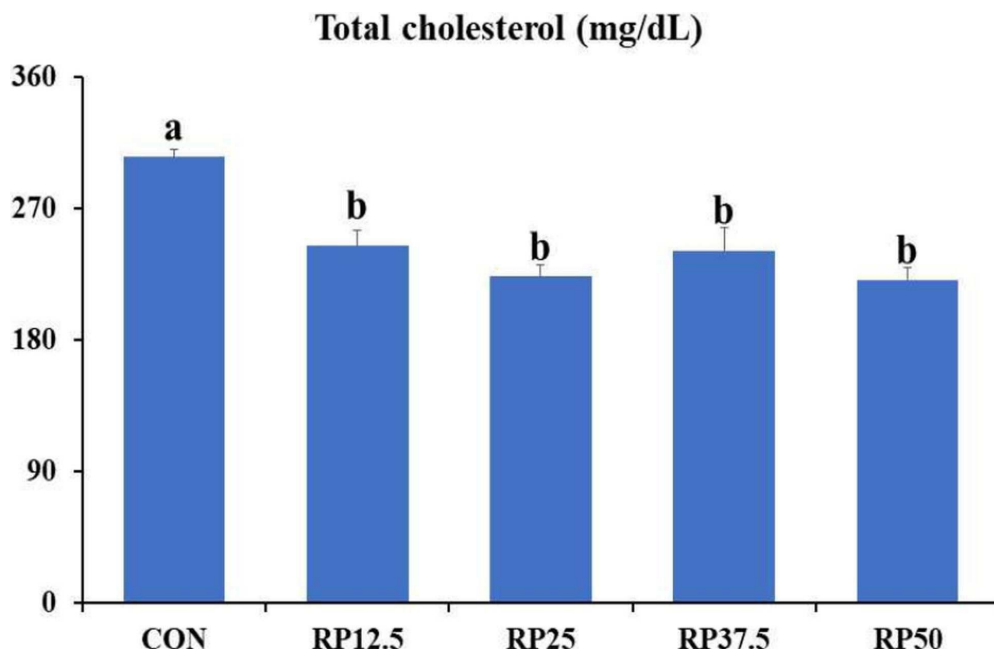
도면3



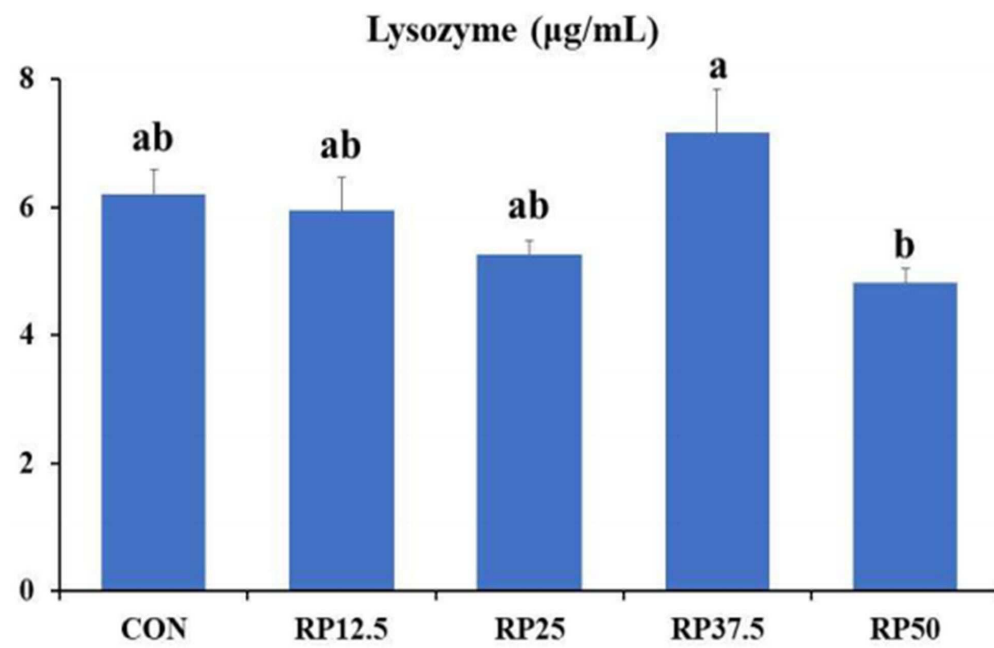
도면4



도면5



도면6



도면7

