creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

박사학위논문

해산어류 사료 내 가소화단백질/에너지 비 평가 및 지질 이용성에 관한 연구

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

제주대학교 대학원

해양생명과학과

오 대 한

2015년 2월

해산어류 사료 내 가소화단백질/에너지 비 평가 및 지질 이용성에 관한 연구

지도교수 이 경 준

오 대 한

이 논문을 이학 박사학위 논문으로 제출함

2015년 2월

제주대학교 중앙도서관

오대한의 이학 박사학위 논문을 인준함

심사위원장 최광식 인

위 원 박상율 인

위 원 정석근 인

위 원 김강웅 인

위 원 이경준 인

제주대학교 대학원

2015년 2월

목 차

List of tables ····· ⅰ

List of figures ····· ⅱ

Abstract ····· ⅳ

제1장. 서론 ····· **1**

제2장. 참돔 사료 내 단백질과 지방 함량에 따른 가소화단백질/에너지 비 평가 ·····4

2.1. 재료 및 방법 ·····4

2.1.1. 실험사료 ·····4

2.1.2. 실험어 및 사육관리 ·····7

2.1.3. 샘플수집 및 분석 ·····7

2.1.4. 통계학적 분석 ····· 9

2.2. 결과 및 고찰 ····· 10

제3장. 사료내 유화제 첨가가 참돔의 성장, 사료효율 및 비특이적 면역에 미치는 영향 ·····15

3.1. 재료 및 방법 ····· 15

3.1.1. 실험사료 ····· 15

3.1.2. 실험어 및 사육관리 ····· 15

3.1.3. 샘플수집 및 분석 ····· 16

3.1.4. 통계학적 분석 ····· 19

3.2. 결과 및 고찰 ····· 21

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

제4장. 넙치사료 내 어유대체원으로서 diglycerol의 이용가능성 평가 ····· 29

4.1. 재료 및 방법 ····· 29

4.1.1. 실험사료 ····· 29

4.1.2. 실험어 및 사육관리 ····· 29

4.1.3. 샘플수집 및 분석 ····· 30

4.1.4. 통계학적 분석 ····· 33

4.2. 결과 및 고찰 ····· 36

제5장. 넙치사료 내 diglycerol의 상업적 적용 가능성 평가 ····· 44

5.1. 재료 및 방법 ····· 44

5.1.1. 실험사료 ····· 44

5.1.2. 실험어 및 사육관리 ····· 44

5.1.3. 샘플수집 및 분석 ····· 45

5.1.4. 통계학적 분석 ····· 47

5.2. 결과 및 고찰 ····· 51

요약문 ····· 59

참고문헌 ····· 63

감사의 글 ····· 68

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

LIST OF TABLES

Table 1. Formulation of the experimental diets for red seabream (*Pagrus major)*.

Table 2. Growth performance of red seabream (*Pagrus major*, initial body weight, 7.66±0.03 g) fed the nine experimental diets for 10 weeks.

Table 3. Innate immune responses of red seabream (*Pagrus major)* fed the nine experimental diets for 10 weeks.

Table 4. Formulation of the experimental diets for red seabream (*Pagrus major)*.

Table 5. Growth performance of red seabream (Pagrus major, initial body weight, 30.0±0.3 g) fed the five experimental diets for 12 weeks.

Table 6. Blood parameters of red seabream (*Pagrus major*) fed the five experimental diets for 12 weeks.

Table 7. Non-specific immune responses of red seabream (*Pagrus major*) fed the five experimental diets for 12 weeks.

Table 8. Formulation of the experimental diets for olive flounder (*Paralichthys olivaceus)*.

Table 9. Fatty acid composition (% total fatty acids) of the experimental diets.

Table 10. Growth performance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*, mean initial body weight 13.4±0.1 g) fed the six experimental diets for 12 weeks.

Table 11. Blood parameters of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed the six experimental diets for 12 weeks.

Table 12. Non-specific immune responses of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed the six experimental diets for 12 weeks.

Table 13. Whole body fatty acid composition (% total fatty acids).

Table 14. Formulation of the experimental diets for olive flounder (*Paralichthys*

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

olivaceus).

Table 15. Fatty acid composition (% total fatty acids) of the experimental diets.

Table 16. Growth performance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*, mean initial body weight 6.8±0.1 g) fed the six experimental diets for 8 weeks.

Table 17. Blood parameters of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed the six experimental diets for 8 weeks.

Table 18. Non-specific immune responses of olive flounder (*Paralichthys olivaceus)* fed the six experimental diets for 8 weeks.

Table 19. Whole body fatty acid composition (% total fatty acids).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Final body weight and weight gain of red seabream (*Pagrus major*) fed the five experimental diets for 12 weeks.

Fig. 2. Specific growth rate and feed intake of red seabream (*Pagrus major*) fed the five experimental diets for 12 weeks.

Fig. 3. Feed conversion ratio and protein efficiency ratio of red seabream (*Pagrus major*) fed the five experimental diets for 12 weeks.

Fig. 4. Final body weight and weight gain of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed the six experimental diets for 12 weeks.

Fig. 5. Specific growth rate and feed intake of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed the six experimental diets for 12 weeks.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 6. Feed conversion ratio and protein efficiency ratio of olive flounder (Paralichthys olivaceus) fed the six experimental diets for 12 weeks.

Fig. 7. Final body weight and weight gain of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed the six experimental diets for 8 weeks.

Fig. 8. Specific growth rate and feed intake of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed the six experimental diets for 8 weeks.

Fig. 9. Feed conversion ratio and protein efficiency ratio of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed the six experimental diets for 8 weeks.

Abstract

Effect of dietary protein and lipid levels on growth, feed utilization and innate immunity of red seabream (*Pagrus major)*

A 3 × 3 factorial study was conducted to investigate the effect of dietary protein and lipid levels on growth, feed utilization and innate immunity of red seabream. Nine diets containing three protein levels (42, 46 and 50% crude protein) and three lipid levels (10, 12 and 18% crude lipid) were formulated. Triplicate groups of red seabream were fed the experimental diets to apparent satiation (5-6 times a day, from 08:00 to 18:00 h with 2 h intervals) for 10 weeks. At the end of feeding trial, weight gain and specific growth rate of fish fed P46L14 (46%CP+14%CL), P50L10 (50%CP+10%CL) and P50L14 (50%CP+14%CL) were significantly ($P<0.05$) higher than those of the fish fed the P42L18 (42%CP+18%CL). Myeloperoxidase activity in the group fed the P50L14 (50%CP+14%CL) was significantly higher than the groups fed the P42L10 (42%CP+10%CL) and P50L18 (50%CP+18%CL). The fish fed P46L14 (46%CP+14%CL) and P46L18 (46%CP+18%CL) showed significantly higher SOD activity than the fish fed P46L10 (46%CP+10%CL), P50L10 (50%CP+10%CL) and P50L18 (50%CP+18%CL). The results of this study showed that the red seabream grows well when fed diets containing 46% dietary protein with 14% lipid at dietary DP/E ratio 27.4 g/MJ.

Effects of dietary supplementation of emulsifiers on growth performance, feed utilization and innate immunity of red seabream (*Pagrus major)*

Five experimental diets were formulated to contain HE(hydrophilic emulsifier) and LE(lipophilic emulsifier) at two different levels of 0.15 and 0.3%. Triplicate groups of red seabream were fed the experimental diets to apparent satiation (twice daily, 08:00 and 18:00 h) for 10 weeks. At the end of the feeding trials, weight gain, specific growth rate, feed

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

conversion ratio, protein efficiency ratio, feed intake and survival of fish were not significantly affected by the supplementation of HE and LE. Lysozyme activity was significantly increased when the fish were fed HE 0.3% diet in comparison that of fish fed another diet. No beneficial effects were found on growth performances and feed utilization by the supplementation of HE or LE in diets for red seabream while 0.3% HE can improvenon-specific immune response.

Use of diglycerides to replace fish oil in diets for olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Six experimental diets were formulated to replace 50% or 100% fish oil by different diglycerol (low purity 1,3-lauryl glycerol, DGLL; high purity 1,3-lauryl glycerol, DGLH; low purity 1,3-palmityl glycerol, DGPL; high purity 1,3-palmityl glycerol DGPH; 50% low purity 1,3-lauryl glycerol + 50% low purity 1,3-palmityl glycerol, DGLP) at 50% and 100%. Triplicate groups of olive flounder were fed the experimental diets to apparent satiation (twice daily, 08:00 and 18:00 h) for 12 weeks. No significant difference was observed in growth performance and feed utilization between the control and replacement groups. Replacement of dietary fish oil up to 100% by DGLP is possible in olive flounder with no reduction in growth performance and feed utilization.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Effect of replacement of dietary fish oil by diglycerides on growth, feed utilization and fatty acid composition in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Six experimental diets were formulated to replace fish oil by two different diglycerol (LPP(2) and LPP(3)) at 0.5%, 1.0% and 1.5% (designated as LPP(2)0.5, LPP(2)1.0, LPP(2)1.5 and LPP(3)1.0) Triplicate groups of olive flounder were fed the experimental diets to apparent satiation (twice daily, 08:00 and 18:00 h) for 8 weeks. No significant difference was observed in growth performance and feed utilization between the control and

replacement groups. Over 30% replacement of fish oil by LPP seems to be possible in olive flounder.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

제 1 장 서론

전세계 수산양식 산업은 수산물 소비량이 증가함에 따라 꾸준히 발전해 왔다. 세계 수산양식 생산량은 지난 10년간 연간 10%의 증가 추세를 보여왔으며 이와 함께 세계 배합사료 시장 역시 확대되었다(Ozsahinoglu et al., 2013). . 수산양식 경영에 있어서 사료비는 다른 요인들에 비해 높은 비중을 차지하는 중요한 요소이다(Choi et al., 2004). 국내의 경우 수산양식 총 배합사료의 생산량 중 해산어용 배합사료 생산량은 일정부분의 증가를 가져왔지만 지난 10년간 해산어용 배합사료에 대한 시장 확대는 기대에 미치지 못하였다. 현재 우리나라 대부분의 양식장에서는 배합사료(EP, expended pellet)보다 생사료(MP, moist pellet)를 선호하는 편이다. 2013년 기준 어류양식 사료 급이량을 살펴보면 생사료 425,149톤, 배합사료 60,812톤으로 생사료의 급이 비율이 전체의 87.5%를 차지하고 있으며 이는 2012년도 보다 0.6% 증가한 결과를 보이고 있다(통계청 2013). 우리나라는 1990년 이후부터 해산어에 대한 양식기술 개발로 인해 어종별 기초 영양소요구량 연구가 본격적으로 이루어졌으며 최근까지 배합사료 품질향상을 위해 어분 및 어유대체, 외관상소화율, 성장촉진 및 면역활성, 배합사료급이체계에 대한 연구가 지속적으로 수행되고 있다. 이러한 노력에도 불구하고 생사료에 치중된 사료사용 실태를 보이는 것은 배합사료가 생사료에 비해 낮은 성장을 보인다는 불신에서 비롯된다. 무분별한 생사료 사용은 연안 생태환경 악화, 어족자원고갈 문제를 야기시킬 수 있다. 이러한 이유로 정부에서는 2016년부터 배합사료 사용을 의무화할 예정이다. 따라서 원활한 양식어민들 인식제고와 원활한 배합사료로의 전환을 위해서는 보다 값싸고 품질 좋은 사료를 개발하기 위한 연구가 절실히 필요하다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

양식 어종에 적합한 배합사료를 개발하기 위해서는 우선적으로 대상어종의 필수영양소에 대한 요구량이 조사되어야 하며, 각각의 대상어종에 적합한 배합사료의 가소화단백질/에너지 비율(DP/E ratio)에 대한 연구가 이루어져야 한다. 단백질과 지방은 생체구성과 에너지 대사에 필수적 요소이며, 동물의 성장과 사료가격을 결정짓는 중요한 역할을 한다(Lee and Kim 2005). 단백질 이용효율은 지방 탄수화물과 같은 비단백질성 물질의 이용성 및 사료내 단백질 수준과 밀접한 관련이 있다(Wang et al., 2013). 최근 여러 어종의 배합사료 내에 지방함량을 증가시키고 있는 추세이며, 충분한 지방함량은 사료단백질을 절약하는 단백질절약효과가 있다는 것이 증명되고 있다(Ogata and Shearer, 2000). 지방함량의 증가는 단백질 절약효과(Cho and Kaushik, 1985; Sargent et al., 2002)뿐만 아니라 사료효율 및 성장을 증가(Hillestad and Johnsen, 1994; Einen and Roem, 1997)시키는 것으로 보고되고 있다. 고지방 사료의 효과는 환경적인 요인과 어종, 어류의 크기, 사료 내 단백질 함량, 사료공급률 등 여러 요인들에 의해 다르게 나타난다(Kim et al., 2006). Maris & Kissil (1979)은 Gilthead seabream을 대상으로 한 연구에서 사료내 단백질 함량이 44%일 때 지방 9%가 최대성장에 필요한 함량이라고 보고하였다. 이 함량은 참돔 사료내 최적의 지방함량이 8~10%라고 보고한 값과 유사하다(Yone et al., 1971). 하지만 Takeuchi et al. (1991)은 참돔 치어의 배합사료 내 최적의 단백질 및 지방함량은 각각 52%와 15%로 보고하였다. 또한 Vergara et al. (1996)은 Gilthead seabream 사료 내 지방함량이 15%일 때가 9%보다 유의적으로 높은 성장률을 보인다고 서술하였다. 이와 같이 어종 및 성장단계별 단백질과 지방 수준에 따른 DP/E ratio 설정은 효율적인 배합사료 설계에 있어 매우 중요하다. 어류 사료 내 지방성분은 단백질과 더불어 주 에너지 공급원 중 하나이다(Sarudant et al., 1999). 지방은 체내에서 lipase에 의해 유리 지방산과 monoglyceride 형태로 분해된 후 흡수된다. 이

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

과정에서 lipase가 지방을 보다 효율적으로 분해하기 위해 지방성분을 유화시키는 과정을 거치게 되는데 여기에 관여하는 물질을 유화제라 한다(Tocher et al., 2008). 일반적으로 양어사료 내에는 유화제로서 lecithin을 주로 첨가한다. lecithin은 친유성 유화제로서 물을 매개로 하는 체내 소화기관의 특성에 다소 맞지 않아 효율성이 떨어질 수 있다. 즉 물에 잘 분산될 수 있는 친수성 유화제를 사용하는 것이 보다 효과적이라 할 수 있다. 지금까지 친유성 유화제인 lecithin을 대체한 친수성 유화제의 사료 내 첨가효과에 대한 연구는 매우 드물다. 어유는 양어사료의 지질원 중 가장 널리 이용되고 있는 사료원료이다. 어유는 값비싼 단백질을 대체하기 위한 에너지원으로 사용되며, 특히 DHA, EPA와 같은 지방산은 해산어류의 성장과 사료효율에 직접적으로 영향을 미치는 필수지방산으로서 면역기능 증강과 생리활성을 조절하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(NRC 1993). 하지만 최근 환경오염과 기후변화에 의한 어획량 감소로 인해 어분과 함께 어유의 생산과 공급이 불안정하고 가격이 빠르게 상승하고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 여러 식물성 유지를 이용하여 어유를 대체하기 위한 많은 연구들이 진행되고 있다. 대두유의 경우 어종에 따라 다르지만 일반적으로 해산어류의 사료 내 어유를 약 50% 대체할 수 있는 것으로 보고되고 있다(Llorens et al., 2007; Piedecausa er al., 2007; Peng et al., 2008). 식물성 유지를 이용한 어유 대체는 부분적으로 성공적이지만, 식물성 유지의 가격 또한 상승하고 있어 어유 대체를 위한 근본적인 해결책 마련이 시급하다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

따라서 이 연구는 국내 주요양식 해산어종의 지방 이용성 증진을 위해 참돔치어 사료 내 지방수준에 따른 적정 가소화단백질/에너지 비를 도출하고 유화제 첨가에 따른 지방이용성을 조사하였다. 또한 우리나라 최대 양식어종인 넙치를 대상으로 신규원료(diglyceride)의 어유대체 가능성을 평가하기 위해 수행되었다.

제 2 장 참돔 사료 내 단백질과 지방 함량에 따른 가소화단백질/에너지 비 평가

2.1. 재료 및 방법

2.1.1. 실험사료

실용 사료원을 기초로 총 9 개의 실험사료를 제작하였다(Table 1). 실험사료 디자인은 3 x 3 factorial design 으로 세 단계의 조단백질(CP; 42%, 46% and 50%)과 세 단계의 조지방 함량(CL; 10, 14, and 18%)의 조합으로 제작되었다: P42L10, 42%CP+10%CL; P42L14, 42%CP+14%CL; P42L18, 42%CP+18%CL; P46L10, 46%CP+10%CL; P46L14, 46%CP+14%CL; P46L18, 46%CP+18%CL; P50L10, 50%CP+10%CL; P50L14, 50%CP+14%CL; P50L18, 50%CP+18%CL. 실험구간에 적정 DP/E ratio 규명을 위해 동일어종의 각 사료원 소화율을 참고(NRC. 2011)하여 실험사료의 가소화단백질/에너지 비율을 설정하였다. 실험사료는 우선 사료원들을 혼합기에 넣어 완전히 섞은 다음, 어유를 첨가한 뒤 사료원 총 중량의 30%에 해당하는 증류수를 첨가하여 사료 혼합기로 혼합, 반죽하였다. 혼합반죽물은 소형초파기(SMC-12, Kuposlice, Busan, Korea)를 이용하여 알맞은 크기로 뽑아내었다. 실험사료는 동결건조기로 24 시간 건조시켜 사료공급 전까지 -20℃ 에 보관하면서 사용하였다.

제주대학교 중앙도서관

Table 1. Formulation of the experimental diet for red seabream (*Pagrus major)*.

Ingredients (% DM)	**P42L10**	**P42L14**	**P42L18**	**P46L10**	**P46L14**	**P46L18**	**P50L10**	**P50L14**	**P50L18**
DP/E ratio (g CP/MJ)	**27.4**	**25.3**	**23.5**	**29.6**	**27.4**	**25.5**	**32.1**	**29.7**	**27.6**
Fish meal	44.0	44.0	44.0	46.0	46.0	46.0	48.0	48.0	48.0
Soybean meal	6.0	6.0	6.0	8.0	8.0	8.0	10.0	10.0	10.0
Corn gluten meal	6.0	6.0	6.0	8.0	8.0	8.0	10.0	10.0	10.0
Wheat flour	15.5	15.5	15.5	15.5	15.5	15.5	15.5	15.5	15.5
Dextrin	12.0	10.0	8.0	8.0	6.0	4.0	4.5	2.5	0.5
Cellulose	8.0	6.0	4.0	6.0	4.0	2.0	4.0	2.0	0.0
Fish oil	5.5	9.5	13.5	5.5	9.5	13.5	5.0	9.0	13.0
Mineral mix[1]	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Vitamin mix[2]	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
CMC	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Proximate composition									
Protein (%)	42.0	42.0	42.1	45.3	45.2	45.3	50.4	50.2	50.2
Lipid (%)	10.6	14.3	17.8	10.2	13.8	18.3	10.1	14.2	18.4
Ash (%)	8.8	9.2	9.2	9.6	9.8	9.5	10.2	10.2	9.9
Fiber (%)[3]	10.51	8.51	6.51	8.73	6.73	4.73	6.95	4.95	2.95
Carbohydrate (%)[4]	38.6	34.5	30.9	34.9	31.2	26.9	29.3	25.4	21.5
Energy (MJ/kg)[5]	15.4	16.5	17.7	15.7	16.8	18.0	15.8	17.0	18.2

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

[1] $MgSO_4.7H_2O$, 80.0; $NaH_2PO_4.2H_2O$, 370.0; KCl, 130.0; Ferric citrate, 40.0; $ZnSO_4.7H_2O$, 20.0; Ca-lactate, 356.5; CuCl, 0.2; $AlCl_3.6H_2O$, 0.15; $Na_2Se_2O_3$, 0.01; $MnSO_4.H_2O$, 2.0; $CoCl_2.6H_2O$, 1.0.

[2] L-ascorbic acid, 121.2; DL-α tocopheryl acetate, 18.8; thiamin hydrochloride, 2.7; riboflavin, 9.1; pyridoxine hydrochloride, 1.8; niacin, 36.4; Ca-$_D$-pantothenate, 12.7; myo-inositol,

181.8; $_{D}$-biotin, 0.27; folic acid, 0.68; p-aminobezoic acid, 18.2; menadione, 1.8; retinyl acetate, 0.73; cholecalficerol, 0.003; cyanocobalamin, 0.003.

[3]Calculated based on the fiber content of ingredients.

[4]Calculated, 100-(protein+ lipid+fiber+ash).

[5]Calculated based on 4 kcal/g protein, 9 kcal/g lipid, 4 kcal/g carbohydrate.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2.1.2. 실험어 및 사육관리

실험에 사용된 참돔치어는 경상남도 고성군에 위치한 종묘배양장에서 구입하여 제주대학교 소속 해양과학환경연구소로 이송하였다. 실험어류는 2 주 동안 시판 배합사료를 공급하면서 실험환경에 적응할 수 있도록 순치하였다. 예비사육 후 참돔치어(초기평균무게: 7.66±0.03)는 총 27 개의 150 L 원형 플라스틱 수조에 각 수조 당 30 마리씩 무작위로 선택하여 배치하였다. 사육수는 모래여과해수를 사용하여 2-3 L/min 의 유수량이 공급되도록 조절하였고 모든 실험수조에 용존산소 유지를 위하여 에어스톤을 설치하였다. 사육수온은 자연수온(21-27℃)에 의존하였으며 광주기는 형광등을 이용하여 12L:12D 로 유지되었다. 실험사료 공급은 1 일 5-6 회(08:00 hr 에서 18:00 hr 까지)에 걸쳐 만복공급 하였으며, 실험은 총 10 주간 진행되었다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2.1.3. 샘플수집 및 분석

실험어의 무게는 3주마다 측정하였으며, 측정 24시간 전에 실험어류의 스트레스를 줄이기 위해 모든 실험어류를 절식시켰다. 성장률과 사료효율 관련 조사항목은 다음과 같다. Weight gain (WG, %)=100×(final mean body weight–initial mean body weight)/initial mean body weight; Feed conversion ratio (FCR)=dry feed fed/wet weight gain; Protein efficiency ratio (PER)=wet weight gain/total protein given; specific growth rate (SGR, %)=[($\log_e$ final body weight – $\log_e$ initial body weight)/days]×100; Feed intake (FI, g)=dry feed fed/fish.

최종 무게측정 후 수조당 6 마리의 어류를 무작위로 선별하여 2-phenoxyethanol (200 ppm)용액으로 마취시킨 후 주사기를 이용하여 꼬리 미병부에서 채혈을 하였다. 채혈된 전혈은 상온에서 60 분간 방치시킨 후

원심분리기로(5,000 × g) 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 비특이적 면역분석에 사용되었다.

실험사료의 일반성분 분석은 AOAC (1995) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125℃, 3 hr), 조회분은 직접회화법(550℃, 6 hr), 단백질은 자동조단백질분석기(Kejltec system 2300, Sweden)로 분석하였으며, 지방은 Folch et al. (1959)의 방법에 따라 Soxhlet 추출장치(Soxhlet heater system C-SH6, Korea)를 이용하여 분석하였다.

혈청 내 myeloperoxidase (MPO) 활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 방법을 기초로 분석하였다. 먼저 HBSS (Hanks balanced salt solution)를 96-well plates에 80 ㎕씩 분주한 후 혈청 20 ㎕을 넣는다. 20 mM TMB (3,3'5,5'-tetramethyllbenzidine hydrochloride) 용액과 5 mM H_2O_2 용액을 넣는다. 2분간 반응시킨 후 4 M H_2SO_4용액을 35 ㎕ 첨가한 후 microplate reader (Thermo, USA) 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

혈청 내 lysozyme 분석은 Sankaran and Shanto (1972)의 분석방법으로 분석하였다. Sodium citrate buffer (0.02M, pH 5.52)에 동결 건조된 Micrococcus lysodeikticus (Sigma, USA)를 첨가하여 0.2 mg/ml 농도의 현탁액을 제조하였다. 현탁액과 혈청을 10:1의 비율로 혼합 시킨 후, 최초 450 nm에서 흡광도 값을 측정하고 24℃에서 한 시간 반응시킨 후 최종 흡광도 값을 측정하였다. Lyophilized hen egg white lysozyme (sigma, USA)를 이용하여 standard curve을 구하고 ug/ml로 표시하였다.

혈청 내 Superoxide dismutase (SOD) 활성은 superoxide dismutase assay kit (Sigma, USA)를 이용하여 분석되었다.

2.1.4. 통계학적 분석

실험사료의 배치는 완전확률계획법(Completely randomized design)을 실시하였으며, 분석결과는 SPSS (Version 12.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석되었으며 데이터 값의 유의차는 Duncan's multiple test ($P \leq 0.05$)로 비교되었다. 실험사료의 단백질과 지방 수준에 따른 상호관계는 Two-way ANOVA로 분석하였다. 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2.2. 결과 및 고찰

10 주간 실시된 사료공급실험 성장결과는 Table 2 에 나타내었다. One-way ANOVA 분석결과 증체율의 경우 P46L14, P50L10, P50L14 실험구가 P42L18 실험구보다 유의적으로 높은 값을 나타내었다. 단백질 함량이 동일한 실험구내에서 비교해 볼 때 지방이 14% 함유된 실험구의 증체율이 다른 실험구에 비해 다소 높은 경향을 나타내었으며, 18%의 고지방 첨가 실험구는 감소되는 경향을 보였다. 사료전환효율의 경우 P46L18 실험구의 결과값이 다른 실험구보다 유의적으로 낮은 경향을 나타내었으며, 지방 함량이 증가함에 따라 사료전환효율이 떨어지는 경향이 관찰되었다. 단백질이용효율도 사료전환효율과 유사한 경향을 나타내었다. 생존율은 P50L10 실험구가 다른 실험구에 비해 유의적으로 낮은 값을 보였으나 단백질과 지방 수준에 따른 경향은 관찰되지 않았다. 본 연구에서 참돔치어의 성장이 사료내 14% 지방수준까지 증가하다 18%에서 감소되었다. 이로 미루어볼 때 치어기 참돔(7.7g)의 지방 요구량은 14% 인 것으로 사료된다. 이는 참돔 사료내 최적의 지방함량이 8~10%라고 보고된 결과와 다르다(Yone et al., 1971). 지방요구량은 수온, 지방의 형태, 사료내 단백질 및 에너지 수준에 따라 다르게 나타날 수 있으며(Wang et al., 2013) 적정 요구량에 비해 높은 수준의 지방 첨가는 단백질과 아미노산 같은 필수 영양소의 결핍으로 인한 성장률 감소를 야기시킬 수 있다(Daniels and Robinson 1986; Mohanta et al. 2009). 지방이 10% 첨가된 실험구의 증체율은 단백질이 50%까지 증가할수록 높아지는 경향을 보였으나 지방이 14%, 18% 첨가된 실험구의 증체율은 단백질 46%까지 높아지다 50% 수준에서는 정체되는 경향을 보였다. 이러한 결과는 치어기 참돔 사료내 단백질이 46%일 때 14-18% 수준의 지방 첨가가 단백질절약효과를 가져올 수 있는 것으로 판단된다. 지방 함량 증가에 따른

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

단백질절약효과는 red tilapia (De Silva et al., 1991), gilthead sea bream (Vergara et al., 1996), rockfish (Lee et al., 2002)과 같은 육식성 어류에서 보고된 바 있다. 단백질절약효과는 사료내 단백질, 지방, 탄수화물 함량 차이에 따른 상호작용에 의해 다르게 나타날 수 있다(Lim et al., 2013).

비특이적 면역관련 분석결과는 Table 3 에 나타내었다. MPO 활성 분석결과 P50L10 과 P50L14 실험구가 P42L10 실험구보다 유의적으로 높은 값을 보였으며 P50L14 실험구는 P50L18 실험구에 비해서도 유의적으로 높은 값을 나타내었다. SOD 활성 분석결과의 경우 P46L14 와 P46L18 실험구가 P46L10, P50L10, P50L18 실험구에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내었다. Lysozyme 활성 분석결과는 모든 실험구에서 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다. Rawles et al. (2011)은 sunshine bass (*Morone* × *M. Saxatilis*) 사료 내 단백질 함량이 47.3-34.7%까지 감소함에 따라 비특이적면역 반응 또한 감소되는 추세를 보이며 단백질과 지방 함량은 어류의 비특이적 면역력에 영향을 줄 수 있다고 서술하였다. 또한 Wang et al. (2014)은 사료 내 높은 수준의 지방첨가는 산화적 스트레스에 의한 면역력 저하를 야기할 수 있으며, yellow catfish 의 정상적인 생리활성을 위한 적정 지방 수준은 6-8% 범위라고 서술하고 있다. 본 연구의 경우 단백질과 지방 수준에 따른 면역력 변화에 대한 명확한 차이를 보이지 않으나 전체적인 경향을 살펴볼 때 단백질 함량이 동일한 실험구내에서 지방이 14% 함유된 실험구들과 단백질이 46% 함유된 실험구들의 면역활성이 다소 높은 경향을 보였다. 이는 성장결과에서 보여지듯이 각각의 단백질 및 지방 수준이 치어기 참돔의 요구량 범위와 일치하기 때문으로 사료된다. 결론적으로 모든 결과를 종합해 볼 때 치어기 참돔(7.7 g) 사료내 최적의 가소화단백질에 대한

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

에너지 비는 27.4 g/MJ 이며, 단백질과 지방함량은 각각 46%와 14% 일 때 가장 효율적일 것으로 사료된다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 2. Growth performance of red seabream (*Pagrus major,* initial body weight, 7.66±0.03 g) fed the nine experimental diets for 10 weeks.

Diets	FMB (g)	WG (%)[1]	FCR[2]	PER[3]	SGR (%)[4]	FI (g)[5]	Survival (%)
P42L10	35.3±3.7	360±49^{ab}	1.18±0.05^{a}	2.02±0.08^{bc}	2.18±0.15^{ab}	46.1±4.6	86.7±5.8^{b}
P42L14	36.7±1.7	382±28^{ab}	1.15±0.06^{a}	2.08±0.12^{bc}	2.24±0.08^{ab}	46.9±0.6	85.6±1.9^{b}
P42L18	33.8±1.2	341±15^{a}	1.13±0.01^{a}	2.11±0.01^{c}	2.12±0.05^{a}	43.6±3.5	92.5±5.1^{b}
P46L10	36.7±0.3	377±2^{ab}	1.10±0.02^{a}	1.98±0.04^{bc}	2.23±0.01^{ab}	45.4±2.7	90.0±3.3^{b}
P46L14	37.9±1.9	395±26^{b}	1.13±0.23^{a}	1.98±0.36^{bc}	2.28±0.08^{b}	48.0±4.7	87.8±8.4^{b}
P46L18	36.7±1.8	382±22^{ab}	1.45±0.24^{b}	1.52±0.23^{a}	2.22±0.07^{ab}	50.0±1.1	76.7±9.4^{a}
P50L10	38.4±1.4	403±23^{b}	1.00±0.05^{a}	1.99±0.09^{bc}	2.31±0.06^{b}	45.4±1.6	87.8±6.9^{b}
P50L14	38.3±2.9	399±40^{b}	1.05±0.12^{a}	1.93±0.23^{bc}	2.29±0.11^{b}	49.3±2.9	84.4±3.8^{b}
P50L18	35.7±1.2	366±20^{ab}	1.22±0.24^{ab}	1.69±0.35^{ab}	2.20±0.06^{ab}	46.9±7.3	77.8±13.9^{ab}
Two-way ANOVA							
Protein	0.066	0.090	0.177	0.055	0.078	0.470	0.437
Lipid	0.080	0.113	0.039	0.056	0.112	0.430	0.424
Protein×Lipid	0.782	0.711	0.191	0.204	0.697	0.628	0.197

Mean values of triplicate groups, values are presented as mean ± SD. Values in the same row having different superscript letters are significantly different (P< 0.05).

[1]Weight gain (%) = 100 × (final mean body weight – initial mean body weight)/initial mean body weight

[2]Feed conversion ratio = dry feed fed/wet weight gain

[3]Protein efficiency ratio = wet weight gain/total protein given

[4]Specific growth rate (%) = [(ln final body weight – ln initial body weight)/days] × 100

[5]Feed intake (g) = dry feed fed/fish

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 3. Innate immune responses of red seabream (*Pagrus major)* fed the nine experimental diets for 10 weeks.

Diets	MPO (absorbance)	Lysozyme (ug/ml)	SOD (% inhibition)
P42L10	0.95±0.07^{a}	0.65±0.06	32.6±2.5^{bc}
P42L14	1.07±0.10^{abc}	0.55±0.07	30.9±1.6^{abc}
P42L18	1.07±0.11^{abc}	0.67±0.38	32.1±2.2^{bc}
P46L10	1.09±0.08^{abc}	0.63±0.26	24.2±0.4^{a}
P46L14	1.07±0.06^{abc}	0.66±0.19	34.5±2.1^{c}
P46L18	1.10±0.05^{abc}	0.58±0.20	33.8±0.6^{c}
P50L10	1.14±0.14^{bc}	0.51±0.15	24.8±8.1^{a}
P50L14	1.20±0.08^{c}	0.45±0.15	29.0±6.3^{abc}
P50L18	1.01±0.02^{ab}	0.45±0.18	26.1±2.6^{ab}
Two-way ANOVA			
Protein	0.111	0.204	0.022
Lipid	0.306	0.896	0.066
Protein×Lipid	0.082	0.942	0.088

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Mean values of triplicate groups, values are presented as mean ± SD. Values in the same row having different superscript letters are significantly different (P< 0.05)

제 3 장. 사료내 유화제 첨가가 참돔의 성장, 사료효율 및 비특이적 면역에 미치는 영향

3.1. 재료 및 방법

3.1.1. 실험사료

실험사료는 총 5 개로 유화제가 첨가되지 않은 기초사료(46% 단백질, 14% 지방)에 친수성 유화제인 HE 와 친유성 유화제인 LE 를 각각 0.15%와 0.3%로 단계별로 첨가하여 제작되었다(Con, HE0.15, HE0.3, LE0.15, LE0.3). 실험사료제작에 사용된 사료조성표는 Table 4 에 나타내었다. 실험사료는 우선 사료원들을 혼합기에 넣어 완전히 섞은 다음, 어유를 첨가한 뒤 사료원 총량의 30%에 해당하는 증류수를 첨가하여 사료혼합기로 혼합, 반죽하였다. 혼합반죽물은 소형초파기(SMC-12, Kuposlice, Busan, Korea)를 이용하여 알맞은 크기로 뽑아내었다. 실험사료는 24h 동안 자연건조시켜 사료 공급 전까지 -20℃ 에 보관하면서 사용하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3.1.2 실험어 및 사육관리

실험에 사용된 참돔치어는 경상남도 고성군에 위치한 종묘배양장에서 구입하여 제주대학교 소속 해양과환경연구소로 이송하였다. 실험어류는 2 주 동안 시판 배합사료를 공급하면서 실험환경에 적응할 수 있도록 순치되었다. 예비사육 후 참돔치어(초기평균무게: 30.0±0.3)는 총 18 개의 150 L 원형 플라스틱 수조에 각 수조 당 25 마리씩 무작위로 선택하여 배치되였다. 사육수는 모래여과해수를 사용하여 2-3 L/min 의 유수량이 공급되도록 조절하였고 모든 실험수조에 용존산소 유지와 원활한 사육수순환을 위하여 에어스톤을

설치하였다. 사육수온은 자연수온(23-25℃)에 의존하였으며 광주기는 형광등을 이용하여 12L:12D 로 유지되었다. 실험사료 공급은 1 일 2 회(08:00 hr 와 18:00 hr) 만복공급을 하였으며 실험은 총 12 주간 진행되었다.

3.1.3. 샘플수집 및 분석

어류무게측정은 3 주마다 측정하였으며 측정 24 시간 전에 실험어류의 스트레스를 줄이기 위해 모든 실험어류를 절식시켰다. 최종 무게측정 후 수조당 8 마리의 어류를 무작위로 선별하여 2-phenoxyethanol (200ppm)용액으로 마취 시킨 후 8 마리 중 4 마리는 헤파린 처리된 주사기를 이용하여 꼬리 미병부에서 채혈을 하였다. 채혈된 전혈은 hematocrit, hemoglobin 및 대식세포활성(NBT; nitroblue-tetrazolium) 분석에 이용되었다. 나머지 4 마리 어류의 혈액은 헤파린이 처리되지 않은 주사기를 이용하여 채혈하였으며 채혈된 전혈은 상온에서 60 분 방치시킨 후 원심분리기로(5,000 × g) 혈청을 분리하여 비특이적면역 관련분석에 이용되었다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

성장률과 사료효율 관련 조사항목은 다음과 같다. Weight gain (WG, %)=100×(final mean body weight−initial mean body weight)/initial mean body weight; Feed conversion ratio (FCR)=dry feed fed/wet weight gain; Protein efficiency ratio (PER)=wet weight gain/total protein given; specific growth rate (SGR, %)=[($\log_e$ final body weight − $\log_e$ initial body weight)/days]×100; Feed intake (FI, g)=dry feed fed/fish.

실험사료의 일반성분 분석은 AOAC (1995) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법 (125℃, 3 hr), 조회분은 직접회화법(550℃, 6 hr), 단백질은 자동조단백질분석기(Kejltec system 2300, Sweden)로 분석하였으며, 지방은 Folch et

al. (1959)의 방법에 따라 Soxhlet 추출장치(Soxhlet heater system C-SH6, Korea)를 이용하여 분석하였다.

실험어류의 일반적인 건강도를 측정하기 위해 hematocrit 과 hemoglobin 분석을 실시하였다. Hematocrit 은 microhematocrit technique 방법으로 분석하였으며, hemoglobin 함량은 자동 생화학 분석기(Express plus system, Bayer, USA)를 이용하여 측정하였다.

대식세포는 체내에 침입한 병원체에 결합하여 포식작용을 수행하는 포식세포로서 선천면역과 적응면역 양쪽에 관여한다. 대식세포 기능을 강화시키는 것을 대식세포활성화라고 하며, 이러한 활성화로 인해 포획된 병원체의 가수분해를 촉진시킴과 동시에 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)의 생산을 증가시킨다. 따라서 ROS 의 측정을 통해 간접적으로 대식세포활성 즉, 선천적면역 반응을 확인할 수 있다. 대식세포활성 분석은 다음과 같이 분석되었다(Kumari and Sahoo, 2005). 우선 혈액과 NBT solution(0.2%)을 각각 50ul 씩 섞은 후 25℃ 에서 30 분 동안 반응시켰다. 반응물 50ul 를 glass tube 에 옮긴 후 Dimethyl formamide 를 1ml 씩 넣었다. 그 후 2000rpm 으로 5 분 동안 원심분리한 후 상층액을 분광광도계(Genesys, Series 10 UV, Rochester, NY, USA)를 이용하여 540nm 에서 흡광도를 분석하였다. 이때 blank 는 Dimethyl formamide 로 하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Myeloperoxidase (MPO)는 호중구와 호염기구, 호산구에 존재하는 항균작용을 지닌 과산화효소이다. MPO 는 호흡폭발 (respiratory burst) 과정에서 생성되는 hydrogen peroxide 과 chloride anion 을 통해 세포독성을 지닌 hypochlorous acid 과 tyrosyl radical 을 생성하여 병원체를 사멸하게 된다. 따라서 생체 내 높은 함량의 MPO 는 항균효과 증폭을 통해 비특이적 면역반응을 증가시키게 된다. 혈청 내

MPO 활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 방법을 기초로 분석하였다. 먼저 HBSS (Hanks balanced salt solution)를 96-well plates 에 80 ㎕씩 분주한 다음 혈청 20 ㎕를 넣는다. 그 후 20 mM TMB (3,3'5,5'-tetramethyllbenzidine hydrochloride) 용액과 5 mM H2O2 용액을 넣는다. 2 분간 반응시킨 후 4 M H2SO4 용액을 35 ㎕ 첨가한 후 microplate reader (Thermo, USA) 450nm 에서 흡광도를 측정한다.

Lysozyme 은 면역 반응에 관여하는 항균효소의 하나로 특정세균에 대한 특이적인 항균작용이 아닌 비특이적으로 다양한 균에 대한 항균작용을 나타내는 효소이다. 병원균에 대한 항균 메커니즘은 세균 세포벽의 구성성분인 peptidoglycan 의 N-acetylmuramic acid 과 N-acetyl-D-glucosamine 잔기들 사이의 β-1,4-glucoside 결합을 가수분해 하여 세균의 세포벽을 파괴함으로써 항균작용을 나타낸다. 혈청 내 lysozyme 분석은 Sankaran and Shanto (1972)의 분석방법으로 분석하였다. Sodium citrate buffer (0.02M, pH 5.52)에 동결 건조된 Micrococcus lysodeikticus (Sigma, USA)를 첨가하여 0.2 mg/ml 농도의 현탁액을 제조한 후, 현탁액과 혈청을 10:1 의 비율로 혼합 시킨 후, 450 nm 에서 흡광도 값을 측정하였다. 24℃에서 한 시간 반응시킨 후 최종 흡광도 값을 측정하였다. Lyophilized hen egg white lysozyme (HEWL; sigma, USA)를 이용하여 standard curve 을 구하고 ug/ml 로 표시하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Superoxide dismutase (SOD)는 과산화이온을 산소와 과산화수소로 바꿔주는 반응을 촉매하는 대표적인 항산화효소이다. 생체 내 활성산소가 증가하였을 때 SOD 수치도 함께 증가하여 호기성 대사과정에서 발생하는 유리독성기를 제거하므로 숙주생물의 면역력을 향상시킨다. 혈청 내 SOD (Superoxide dismutase) 활성은 superoxide dismutase assay kit (Sigma, 19160)를 이용하여 분석되었다. 96-well plates 에 20 ul radical detector 를 첨가한 후 실험어의 혈청을 10 ul 씩 넣는다. 그 후

20 ul xanthine oxidase 를 첨가하여 20 분간 반응시킨 후, microplate reader (Themo, USA)를 이용하여 450 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

3.1.4. 통계학적 분석

실험사료의 배치는 완전확률계획법(Completely randomized design)을 실시하고, 성장 및 분석결과는 SPSS (Version 12.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA 로 통계 분석된다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's multiple test ($P \leq 0.05$)로 비교되었다 데이터는 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 백분율 데이터는 arcsine 변형값으로 계산하여 통계 분석하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 4. Formulation of the experimental diets for red seabream (*Pagrus major)*.

Ingredients (% DM)	Con	HE0.15	HE0.3	LE0.15	LE0.3
Fish meal	48.0	48.0	48.0	48.0	48.0
Soybean meal	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8
Corn gluten meal	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Wheat flour	19.7	19.7	19.7	19.7	19.7
Dextrin	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Cellulose	3.0	0.15	0.0	0.15	0.0
HE	0.0	0.15	0.3	0.0	0.0
LE	0.0	0.0	0.0	0.15	0.3
Fish oil	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2
Mineral mix [1]	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Vitamin mix [2]	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
CMC	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

[1] $MgSO_4.7H_2O$, 80.0; $NaH_2PO_4.2H_2O$, 370.0; KCl, 130.0; Ferric citrate, 40.0; $ZnSO_4.7H_2O$, 20.0; Ca-lactate, 356.5; CuCl, 0.2; $AlCl_3$. $6H_2O$, 0.15; $Na_2Se_2O_3$, 0.01; $MnSO_4.H_2O$, 2.0; $CoCl_2.6H_2O$, 1.0.

[2] L-ascorbic acid, 121.2; DL-α tocopheryl acetate, 18.8; thiamin hydrochloride, 2.7; riboflavin, 9.1; pyridoxine hydrochloride, 1.8; niacin, 36.4; Ca-$_D$-pantothenate, 12.7; myo-inositol, 181.8; $_D$-biotin, 0.27; folic acid, 0.68; p-aminobezoic acid, 18.2; menadione, 1.8; retinyl acetate, 0.73; cholecalficerol, 0.003; cyanocobalamin, 0.003.

3.2. 결과 및 고찰

유화제 첨가에 따른 성장결과는 Table 5 에 나타내었다. 증체율 측정결과 모든 실험구에서 유의적인 차이를 관찰할 수 없었으나 LE0.3 실험구의 경우 대조구에 비해 다소 높은 값을 보였다. 사료효율과 단백질이용효율의 경우 증체율과 마찬가지로 모든 실험구에서 유의적인 차이가 없었다. 하지만 HE0.3 과 LE0.3 실험구가 대조구에 비해 다소 높은 효율을 나타내었다. HE 와 LE 가 첨가된 실험구내에서 비교해볼 때 0.15% 보다 0.3% 농도로 첨가된 실험구의 성장률이 비교적 높게 나타났다 Kanazawa (1993)는 넙치 치어의 성장증진을 위해서는 사료내 1.6−3.8%의 lecithin 첨가가 요구된다 서술하고 있으며 Kim et al., (2006)은 사료내 1.2% lecithin 의 첨가는 넙치 치어의 성장에 유의적인 영향을 주지 않는다고 서술하고 있다. 본 연구에서 또한 0.3%의 유화제 첨가가 참돔의 성장에 유의적인 영향을 미치지 않았다. 이는 유화제의 첨가 수준이 참돔의 성장에 영향을 줄 수 있는 범위에 미치지 못한 것으로 판단된다. 혈액분석 결과는 Table 6 에 나타내었다. Hematocrit 과 hemoglobin 분석결과 모든 실험구에서 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다. 면역분석 결과는 Table 7 에 나타내었다. 대식세포활성 분석결과 유화제가 첨가된 실험구의 결과 값이 대조구에 비해 다소 높은 값을 보였다. MPO 분석결과를 살펴보면 대조구가 유화제가 첨가된 실험구에 비해 다소 높은 값을 나타내었다. 대식세포활성 분석은 대식세포 활성화과정에서 생산되는 superoxide anion, hydrogen peroxide 와 같은 활성산소종의 측정을 통해 간접적으로 활성도를 측정하게 된다. MPO (myeloperoxidase) 는 hydrogen peroxide 로부터 세포독성을 지닌 hypochlorous acid 를 생산하여 면역반응에 관여하게 된다. 따라서 대식세포활성과 MPO 분석의 상반된 결과는 대식세포활성에 비해 상대적으로 높은 MPO 활성으로 인해 hydrogen peroxide 와

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

같은 활성산소종이 감소되었기 때문이라 판단된다. Lysozyme 활성은 HE0.3 실험구가 다른 실험구에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내었다. SOD 활성분석의 경우 모든 실험구에서 유의적인 차이를 확인할 수 없었다. 모든 결과를 종합해볼 때 유화제 종류에 따른 차이는 미비한 것으로 나타났으며 성장 및 사료효율 향상을 위한 참돔 사료 내 유화제 적정 첨가 농도는 0.3% 이상일 것으로 사료된다. 또한 0.3% HE 첨가는 참돔의 면역활성을 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 5. Growth performance of red seabream (*Pagrus major,* initial body weight, 30.0±0.3 g) fed the five experimental diets for 12 weeks.

	Con	HE0.15	HE0.3	LE0.15	LE0.3
FBM (g)	78.7±6.7	76.7±0.9	79.1±5.4	79.3±2.4	81.6±4.7
WG (%)[1]	162±20	153±8	161±16	163±8	173±20
FCR[2]	1.39±0.04	1.37±0.13	1.26±0.14	1.38±0.08	1.34±0.10
PER[3]	1.53±0.04	1.56±0.15	1.70±0.20	1.55±0.09	1.60±0.12
SGR (%)[4]	1.14±0.09	1.11±0.04	1.14±0.07	1.15±0.03	1.19±0.09
FI (g)[5]	64.2±4.7	63.4±5.3	60.6±2.0	64.7±2.2	65.2±3.3
Survival (%)	82.7±2.3	94.7±9.2	97.3±4.6	90.7±2.3	88.0±4.0

Values in the same row having different superscript letters are significantly different ($P< 0.05$).

[1]Weight gain (%) = 100 × (final mean body weight – initial mean body weight)/initial mean body weight

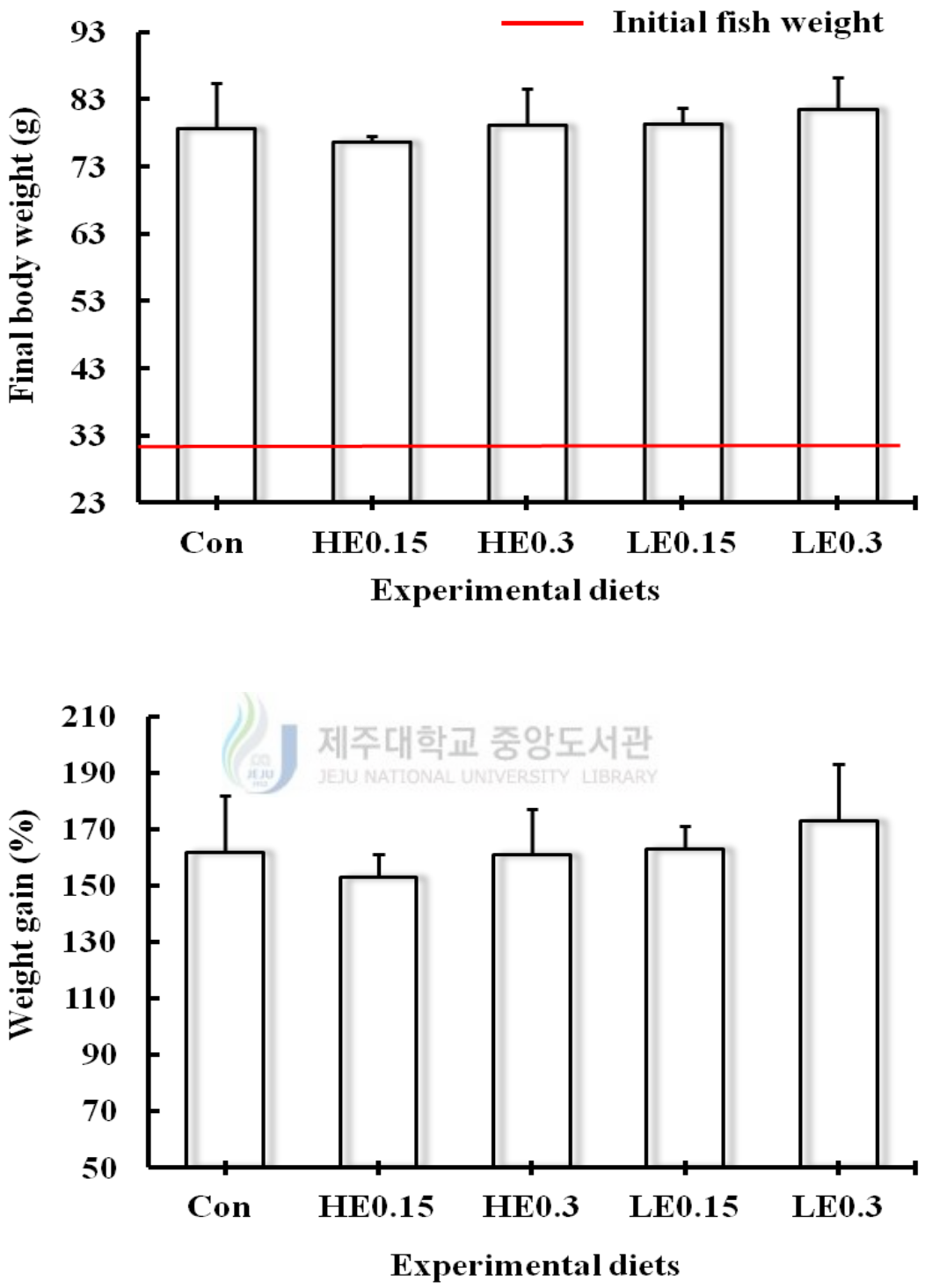
[2]Feed conversion ratio = dry feed fed/wet weight gain

[3]Protein efficiency ratio = wet weight gain/total protein given

[4]Specific growth rate (%) = [($\log_e$ final body weight – $\log_e$ initial body weight)/days] × 100

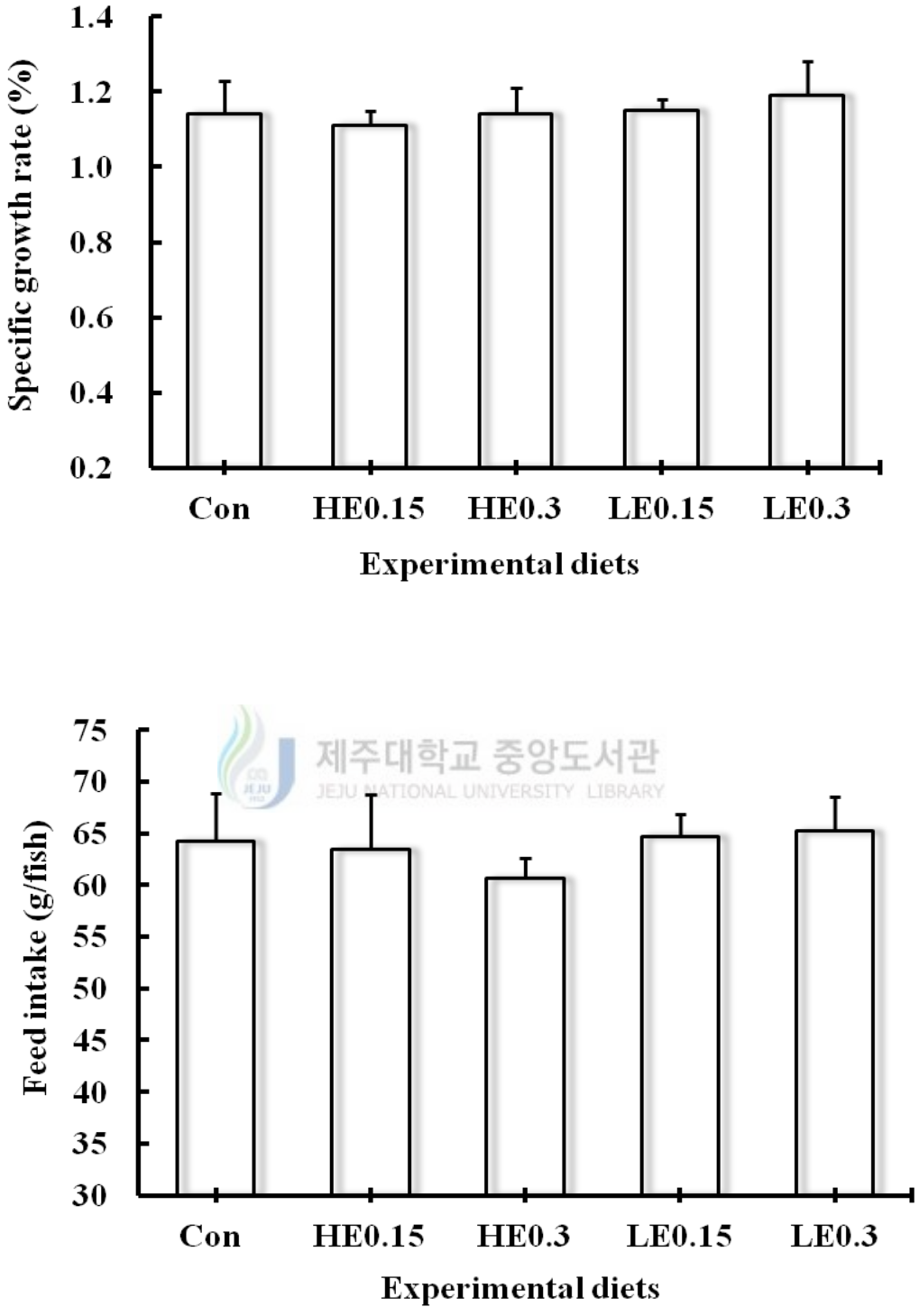
[5]Feed intake (g) = dry feed fed/fish

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY



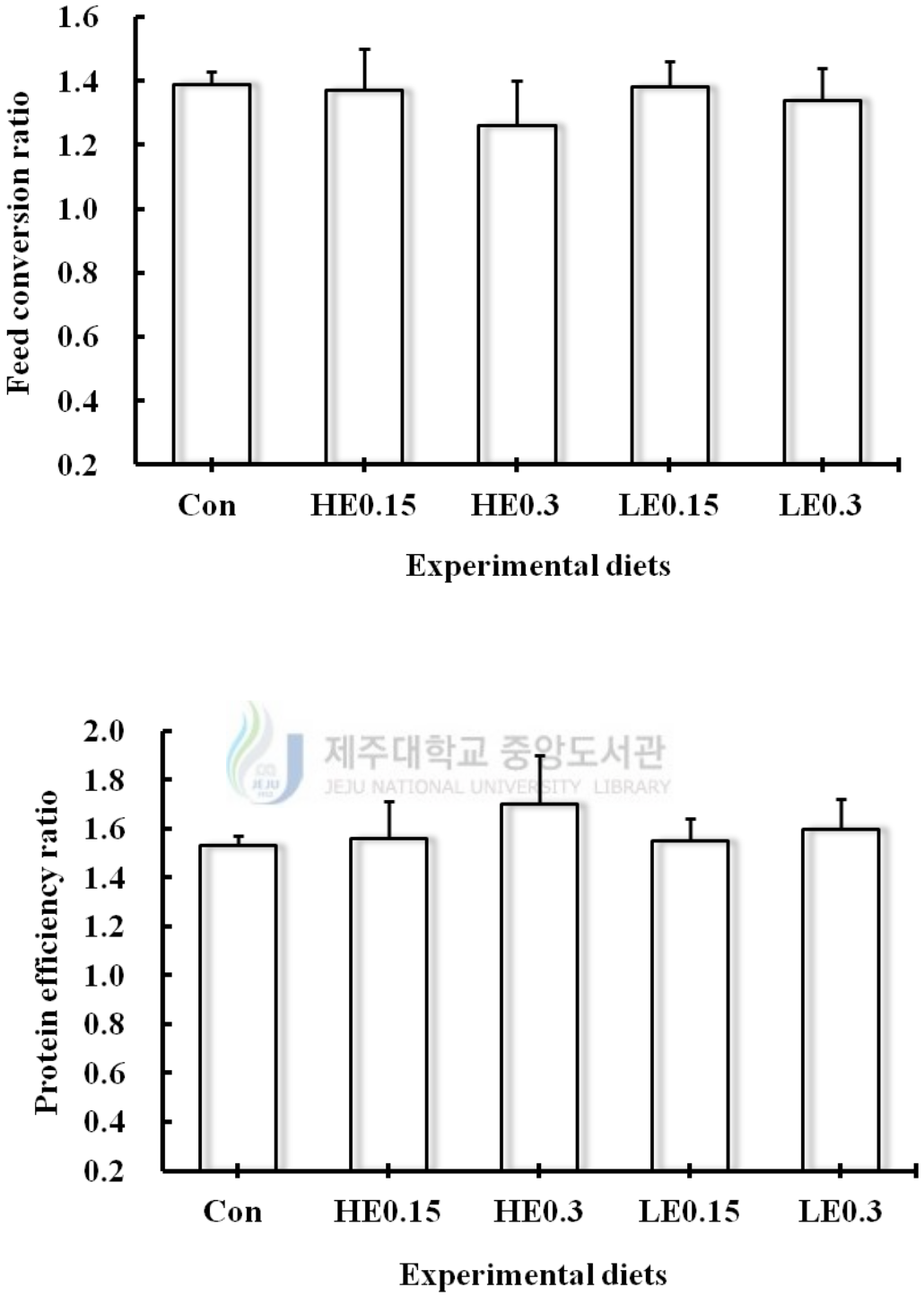
제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 1. Final body weight and weight gain of red seabream (*Pagrus major)* fed the five experimental diets for 12 weeks.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 2. Specific growth rate and feed intake of red seabream (*Pagrus major)* fed the five experimental diets for 12 weeks.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 3. Feed conversion ratio and protein efficiency ratio of red seabream (*Pagrus major)* fed the five experimental diets for 12 weeks.

Table 6. Blood parameters of red seabream (*Pagrus major*) fed the five experimental diets for 12 weeks.

	Con	HE0.15	HE0.3	LE0.15	LE0.3
Hematocrit (%)	45.7±2.9	43.0±1.4	43.7±2.2	42.5±2.2	43.9±2.3
Hemoglobin (g/dL)	6.97±0.85	7.64±0.75	7.61±0.25	7.52±0.21	7.63±0.60

Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P< 0.05$).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 7. Non-specific immune responses of red seabream (*Pagrus major*) fed the five experimental diets for 12 weeks.

	Con	HE0.15	HE0.3	LE0.15	LE0.3
NBT (absorbance)	1.03±0.04	1.07±0.04	1.10±0.01	1.08±0.02	1.09±0.03
MPO (absorbance)	1.23±0.16	1.17±0.14	1.13±0.07	1.20±0.09	1.16±0.08
Lysozyme (ug/ml)	29.2±4.7^{a}	29.9±9.3^{a}	42.0±5.8^{b}	26.9±6.0^{a}	29.8±4.3^{a}
SOD (% inhibition)	29.6±5.3	26.5±6.1	22.1±6.4	26.8±4.4	24.4±3.7

Mean values of triplicate groups, values are presented as mean ± SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different (P< 0.05).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

제 4 장. 넙치사료 내 어유대체원으로서 diglycerol 의 이용가능성 평가

4.1. 재료 및 방법

4.1.1. 실험사료

실험은 총 4 종류의 diglycerol (DGLL, 저순도 1,3-lauryl glycerol; DGLH, 고순도 1,3-lauryl glycerol; DGPL, 저순도 1,3-palmityl glycerol; DGPH, 고순도 1,3-palmityl glycerol)을 사용하여 진행하였다. 실험 디자인은 어유가 첨가된 대조구(CON)와 4 종류의 diglycerol 로 대조구의 어유를 각각 50% 대체한 4 개의 실험구(DGLL, DGLH, DGPL, DGPH) 그리고 DGLL 과 DGPL 을 1:1 로 혼합하여 대조구의 어유를 100% 대체한 1 개의 실험구(DGLP)로 총 6 가지가 설정되었다. 실험사료제작에 사용된 사료조성표와 실험사료의 지방산조성을 Table 8, 9 에 각각 나타내었다. 실험사료는 우선 사료원들을 혼합기에 넣어 완전히 섞은 다음, 어유와 diglycerol 을 첨가하였다. 고체상태의 diglycerol 은 비커에 옮겨 약 60℃ 의 증류수를 이용하여 액체형태로 만들어 첨가하였다. 그 후 사료원 총량의 30%에 해당하는 증류수를 첨가하여 사료혼합기로 혼합, 반죽하였다. 혼합반죽물은 소형초파기(SMC-12, Kuposlice, Busan, Korea)를 이용하여 알맞은 크기로 뽑아내었다. 실험사료는 12 h 동안 건조기에서 건조시켜 사료공급 전까지 -20℃ 에 보관하면서 사용하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

4.1.2. 실험어 및 사육관리

실험에 사용된 넙치치어는 제주도내에 위치한 종묘배양장(한라수산)에서 구입하여 제주대학교 소속 해양과학환경연구소로 운송하였다. 실험어류는 2 주 동안 시판 배합사료를 공급하면서 실험환경에 적응할 수 있도록 순치되었다.

예비사육 후 넙치(초기평균무게: 13.4±0.1 g)는 총 18 개의 150 L 원형 플라스틱 수조에 각 수조 당 40 마리씩 무작위로 선택하여 배치되었다. 사육수는 모래여과해수를 사용하여 2-3 L/min 의 유수량이 공급되도록 조절하였고 모든 실험수조에 용존산소 유지를 위하여 에어스톤을 설치하였다. 사육수온은 자연수온(15-21℃)에 의존하였으며 광주기는 형광등을 이용하여 12-h light/12-h dark 로 유지되었다. 실험사료 공급은 1 일 2 회(08:00 시 와 18:00 시) 만복공급을 하였으며 실험은 총 12 주간 진행되었다.

4.1.3. 샘플수집 및 분석

어류무게측정은 2 주마다 실시하였으며 측정 24 시간 전에 실험어류의 스트레스를 줄이기 위해 모든 실험어류를 절식시켰다. 최종 무게측정 후 수조당 6 마리의 어류를 무작위로 선별하여 2-phenoxyethanol (200ppm)용액으로 마취 시킨 후 6 마리 중 3 마리는 헤파린 처리된 주사기를 이용하여 꼬리 미병부에서 채혈을 하였다. 채혈된 전혈은 hematocrit, hemoglobin 및 대식세포활성(NBT; nitroblue-tetrazolium) 분석에 이용되었다. 나머지 3 마리 어류의 혈액은 헤파린이 처리되지 않은 주사기를 이용하여 채혈하였으며 채혈된 전혈은 상온에서 60 분 방치시킨 후 원심분리기로(5,000 × g) 혈청을 분리하여 면역관련분석에 이용되었다. 성장률과 사료효율 관련 조사항목은 다음과 같다. 증체율(WG, %) = 100 × (final mean body weight – initial mean body weight)/initial mean body weight; 사료효율(FCR) = dry feed fed/wet weight gain; 단백질이용효율(PER) = wet weight gain/total protein given; 일간성장률(SGR, %) = [(loge final body weight – loge initial body weight)/days] × 100; 사료섭이량(FI, g) = dry feed fed/fish.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

일반성분 분석은 AOAC (1995) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법 (125℃, 3 hr), 조회분은 직접회화법(550℃, 6 hr), 단백질은 자동조단백질분석기(Kejltec system 2300, Sweden)로 분석하였으며, 지방은 Folch et al. (1959)의 방법에 따라 Soxhlet 추출장치(Soxhlet heater system C-SH6, Korea)를 이용하여 분석하였다.

실험사료와 전어체에서의 지방산 분석은 다음과 같이 실시하였다. 먼저 Folch et al. (1959)의 방법에 따라 지방을 추출한다. 추출된 지방을 Metcalfe and Schmitz (1961) 방법으로 methylation 한 후 Gas chromatography (Agilent technologies, 6890N, USA)를 이용하여 분석하였다.

실험어류의 일반적인 건강도를 측정하기 위해 hematocrit 과 hemoglobin 분석을 실시하였다. Hematocrit 은 microhematocrit technique 방법으로 분석하였으며, hemoglobin 함량은 자동 생화학 분석기(Express plus system, Bayer, USA)를 이용하여 측정하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

대식세포는 체내에 침입한 병원체에 결합하여 포식작용을 수행하는 포식세포로서 선천면역과 적응면역 양쪽에 관여한다. 대식세포 기능을 강화시키는 것을 대식세포활성화라고 하며, 이러한 활성화로 인해 포획된 병원체의 가수분해를 촉진시킴과 동시에 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)의 생산을 증가시킨다. 따라서 ROS 의 측정을 통해 간접적으로 대식세포활성 즉, 선천적면역 반응을 확인할 수 있다. 대식세포활성 분석은 다음과 같이 분석되었다(Kumari and Sahoo, 2005). 우선 혈액과 NBT solution(0.2%)을 각각 50ul 씩 섞은 후 25℃ 에서 30 분 동안 반응시켰다. 반응물 50ul 를 glass tube 에 옮긴 후 Dimethyl formamide 를 1ml 씩 넣었다. 그 후 2000rpm 으로 5 분 동안 원심분리한 후 상층액을 분광광도계(Genesys, Series 10 UV,

Rochester, NY, USA)를 이용하여 540nm 에서 흡광도를 분석하였다. 이때 blank 는 Dimethyl formamide 로 하였다.

Myeloperoxidase (MPO)는 호중구와 호염기구, 호산구에 존재하는 항균작용을 지닌 과산화효소이다. MPO 는 호흡폭발 (respiratory burst) 과정에서 생성되는 hydrogen peroxide 과 chloride anion 을 통해 세포독성을 지닌 hypochlorous acid 과 tyrosyl radical 을 생성하여 병원체를 사멸하게 된다. 따라서 생체 내 높은 함량의 MPO 는 항균효과 증폭을 통해 비특이적 면역반응을 증가시키게 된다. 혈청 내 MPO 활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 방법을 기초로 분석하였다. 먼저 HBSS (Hanks balanced salt solution)를 96-well plates 에 80 ㎕씩 분주한 다음 혈청 20 ㎕를 넣는다. 그 후 20 mM TMB (3,3'5,5'-tetramethyllbenzidine hydrochloride) 용액과 5 mM H2O2 용액을 넣는다. 2 분간 반응시킨 후 4 M H2SO4 용액을 35 ㎕ 첨가한 후 microplate reader (Thermo, USA) 450nm 에서 흡광도를 측정한다.

제주대학교 중앙도서관

Lysozyme 은 면역 반응에 관여하는 항균효소의 하나로 특정세균에 대한 특이적인 항균작용이 아닌 비특이적으로 다양한 균에 대한 항균작용을 나타내는 효소이다. 병원균에 대한 항균 메커니즘은 세균 세포벽의 구성성분인 peptidoglycan 의 N-acetylmuramic acid 과 N-acetyl-D-glucosamine 잔기들 사이의 β-1,4-glucoside 결합을 가수분해하여 세균의 세포벽을 파괴함으로써 항균작용을 나타낸다. 혈청 내 lysozyme 분석은 (Swain et al., 2007)의 분석방법으로 분석하였다. Sodium citrate buffer (0.02M, pH 5.52)에 동결 건조된 Micrococcus lysodeikticus (Sigma, USA)를 첨가하여 0.2 mg/ml 농도의 현탁액을 제조한 후, 현탁액과 혈청을 10:1 의 비율로 혼합 시킨 후, 450 nm 에서 흡광도 값을 측정하였다. 24℃에서 한 시간 반응시킨 후 최종 흡광도 값을 측정하였다.

Lyophilized hen egg white lysozyme (HEWL; sigma, USA)를 이용하여 standard curve 을 구하고 ug/ml 로 표시하였다.

4.1.4. 통계학적 분석

실험사료의 배치는 완전확률계획법(Completely randomized design)을 실시하고, 성장 및 분석결과는 SPSS (Version 12.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA 로 통계 분석된다. 데이터 값의 유의차는 Tukey's test (P≤0.05)로 비교되었다 데이터는 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 8. Formulation of the experimental diets for olive flounder (*Paralichthys olivaceus)*.

Ingredients	**CON**	**DGLL**	**DGLH**	**DGPL**	**DGPH**	**DGLP**
Fish meal	55.0	55.0	55.0	55.0	55.0	55.0
Soybean meal	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Corn gluten meal	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Wheat flour	26.5	26.5	26.5	26.5	26.5	26.5
Mineral mix[1]	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Vitamin mix[2]	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline chloride	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Fish oil	**6.0**	**3.0**	**3.0**	**3.0**	**3.0**	-
DGLL[3]	-	**3.0**	-	-	-	-
DGLH[4]	-	-	**3.0**	-	-	-
DGPL[5]	-	-	-	**3.0**	-	-
DGPH[6]	-	-	-	-	**3.0**	-
DGLP[7]	-	-	-	-	-	**6.0**

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

[1] $MgSO_4.7H_2O$, 80.0; $NaH_2PO_4.2H_2O$, 370.0; KCl, 130.0; Ferric citrate, 40.0; $ZnSO_4.7H_2O$, 20.0; Ca-lactate, 356.5; CuCl, 0.2; $AlCl_3$. $6H_2O$, 0.15; $Na_2Se_2O_3$, 0.01; $MnSO_4.H_2O$, 2.0; $CoCl_2.6H_2O$, 1.0.

[2] L-ascorbic acid, 121.2; DL-α tocopheryl acetate, 18.8; thiamin hydrochloride, 2.7; riboflavin, 9.1; pyridoxine hydrochloride, 1.8; niacin, 36.4; Ca-$_D$-pantothenate, 12.7; myo-inositol, 181.8; $_D$-biotin, 0.27; folic acid, 0.68; p-aminobezoic acid, 18.2; menadione, 1.8; retinyl acetate, 0.73; cholecalficerol, 0.003; cyanocobalamin, 0.003.

[3]DGLL: low purity 1,3-lauryl glycerol.

[4]DGLH: high purity 1,3-lauryl glycerol.

[5]DGPL: low purity 1,3-palmityl glycerol.

[6]DGPH: high purity 1,3-palmityl glycerol.

[7]DGLP: 50% low purity 1,3-lauryl glycerol + 50% low purity 1,3-palmityl glycerol.

Table 9. Fatty acid composition (% total fatty acids) of the experimental diets.

Fatty acid	CON	DGLL	DGLH	DGPL	DGPH	DGLP
C4:0	0.17	0.09	0.05	0.09	0.06	0.04
C6:0	0.21	0.25	0.20	0.06	0.43	0.81
C8:0	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.04
C10:0	0.00	0.77	0.45	0.00	0.00	0.68
C11:0	0.00	0.75	0.59	0.00	0.00	0.69
C12:0	**0.08**	**10.63**	**11.06**	**0.09**	**0.10**	**10.55**
C14:0	4.45	6.85	7.50	3.38	3.29	5.83
C14:1	0.34	0.20	0.21	0.22	0.21	0.07
C16:0	**18.57**	**16.78**	**17.04**	**25.13**	**25.34**	**22.88**
C16:1	5.61	3.69	3.75	3.75	1.84	2.04
C17:0	0.41	0.14	0.23	0.16	0.23	0.00
C17:1	0.86	0.55	0.57	0.58	0.56	0.30
C18:0	5.04	5.14	4.01	5.00	5.03	5.00
C18:1n9t	25.93	23.20	23.46	29.04	30.83	26.55
C18:1n9c	1.01	0.59	0.61	0.56	0.57	0.20
C18:2n6t	13.63	11.65	11.50	13.40	13.37	11.34
C18:2n6c	0.29	0.17	0.18	0.17	0.17	0.00
C20:0	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C18:3n6	0.25	0.08	0.13	0.09	0.12	0.00
C20:1	2.12	1.58	1.59	1.63	1.60	1.08
C18:3n3	1.57	1.16	1.16	1.16	1.15	0.83
C21:0	0.93	0.63	0.65	0.65	0.63	0.35
C20:2	0.42	0.29	0.30	0.30	0.28	0.18
C20:3n6	0.42	0.28	0.29	0.28	0.27	0.17
C22:1n9	0.20	0.08	0.12	0.04	0.06	0.00
C23:0	0.62	0.42	0.41	0.43	0.41	0.29
C20:5n3	**6.38**	**4.91**	**4.92**	**4.89**	**4.75**	**3.41**
C24:1	0.76	0.53	0.54	0.49	0.51	0.13
C22:5	1.46	1.63	1.64	1.61	1.57	1.11
C22:6n3	**7.63**	**6.51**	**6.45**	**6.41**	**6.23**	**5.19**

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

4.2. 결과 및 고찰

실험 종료 후 조사된 성장 결과를 Table 10 에 나타내었다. 분석결과 diglycerol 로 어유를 50% 대체한 모든 실험구(DGLL, DGLH, DGPL, DGPH)가 대조구와 유의적인 차이를 보이지 않았으며 어유를 100% 대체한 DGLP 또한 대조구와 유의적인 차이가 없었다. 생존율은 모든 실험구에서 유의적인 차이가 없었다. 혈액학적 분석결과와 면역분석 결과를 Table 11, 12 에 나타내었다. 분석결과 성장결과와 마찬가지로 모든 분석에서 실험구간에 유의적인 차이가 없었다. 전어체에서의 지방산분석 결과는 Table 13 에 나타내었다. 분석결과 DGLL, DGLH, DGLP 실험구에서만 lauric acid 가 축척된 것을 확인할 수 있었다. 이는 실험사료의 lauric acid 가 어체로 전이된 것으로 사료된다. Palmitic acid 함량은 모든 실험구에서 유의적인 차이가 없었다. DHA 와 EPA 함량은 모든 실험구에서 유의적인 차이가 없었으나 DGLP 실험구의 DHA 함량이 대조구에 비해 다소 감소되는 경향을 보였다. 분석된 성장 결과로 미루어 볼 때 diglycerol 은 넙치 배합사료 내 어유를 100%까지 대체 할 수 있을 것으로 사료된다. 이러한 대체수준은 넙치의 일반적인 건강도, 면역활성 및 필수 지방산 (DHA, EPA) 대사에 악 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 10. Growth performance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*, mean initial body weight 13.4±0.1 g) fed the six experimental diets for 12 weeks.

	CON	DGLL	DGLH	DGPL	DGPH	DGLP
FBM (g)[1]	47.4±0.2	48.0±3.1	48.7±5.3	47.1±1.4	45.6±1.7	48.4±2.6
WG (%)[2]	256±3	254±25	265±41	252±13	242±13	258±20
SGR (%)[3]	1.49±0.01	1.49±0.08	1.52±0.13	1.48±0.04	1.45±0.05	1.50±0.07
FCR[4]	1.23±0.07	1.17±0.04	1.19±0.16	1.19±0.07	1.28±0.08	1.12±0.07
PER[5]	1.68±0.09	1.77±0.06	1.75±0.24	1.76±0.10	1.63±0.10	1.86±0.12
FI (g)[6]	41.8±2.3	40.1±2.5	41.5±0.6	39.9±0.6	41.1±0.5	39.1±0.5
Survival (%)	89.2±9.0	88.2±7.8	87.3±6.8	97.1±2.9	87.3±12.2	96.1±3.4

Mean values of triplicate groups, values are presented as mean ± SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P< 0.05$).

[1]Final mean body weight (g)

[2]Weight gain (%) = (final body weight - initial body weight)/initial body weight × 100

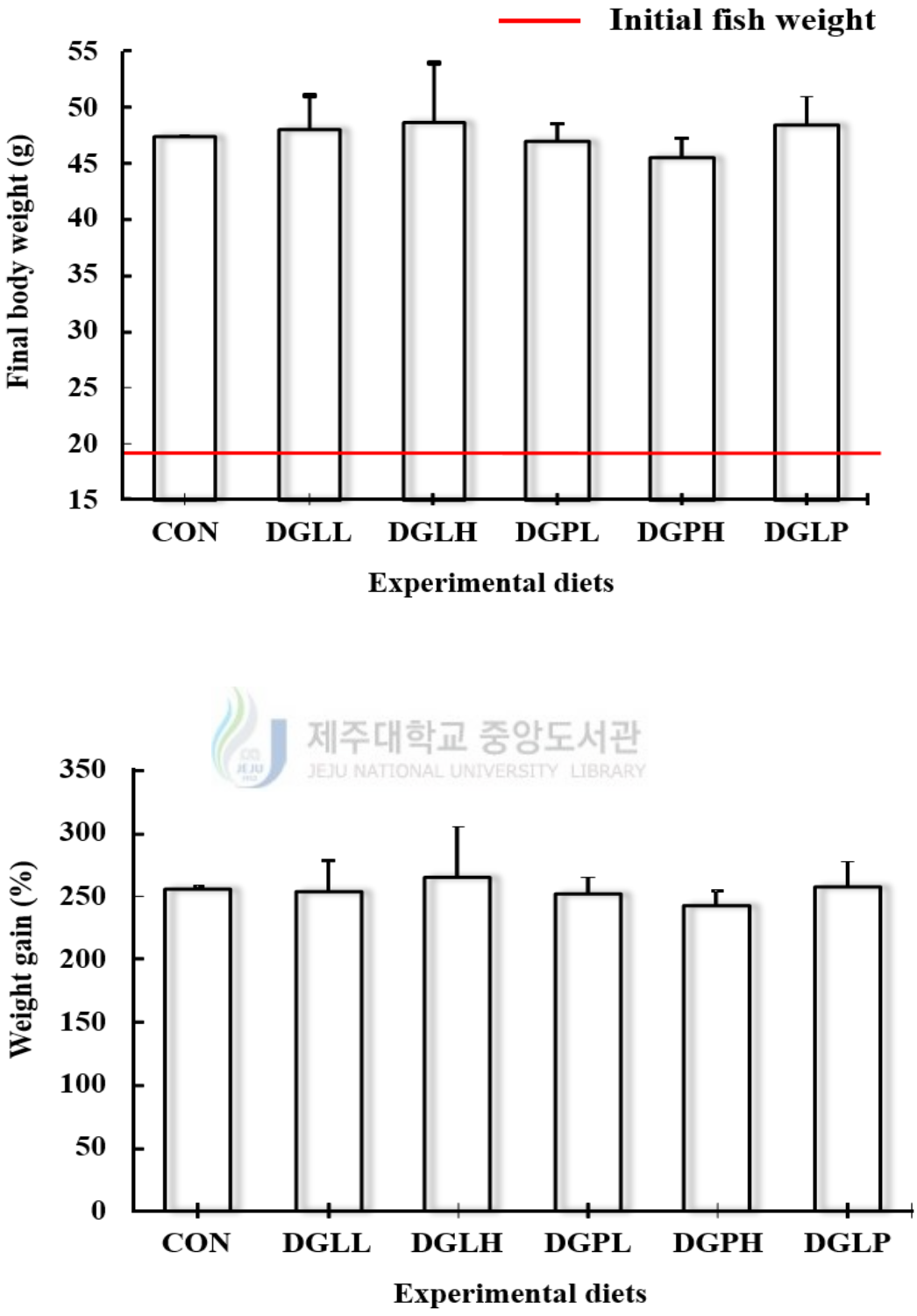
[3]Specific growth rate (%) = [(loge final body weight – loge initial body weight)/days] × 100

[4]Feed conversion ratio = dry feed fed/wet weight gain

[5]Protein efficiency ratio = wet weight gain/total protein given

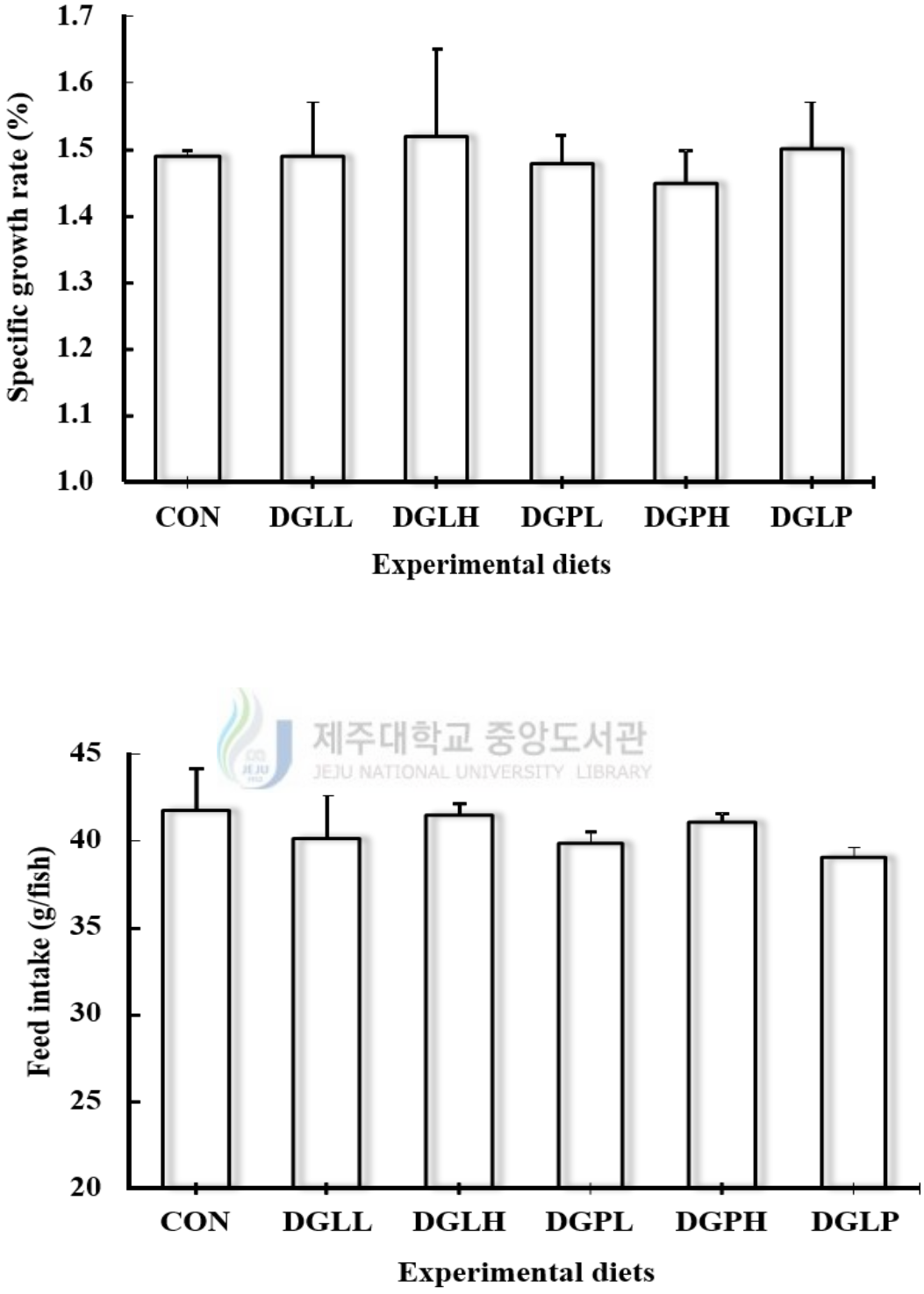
[6]Feed intake (g) = dry feed fed/fish

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY



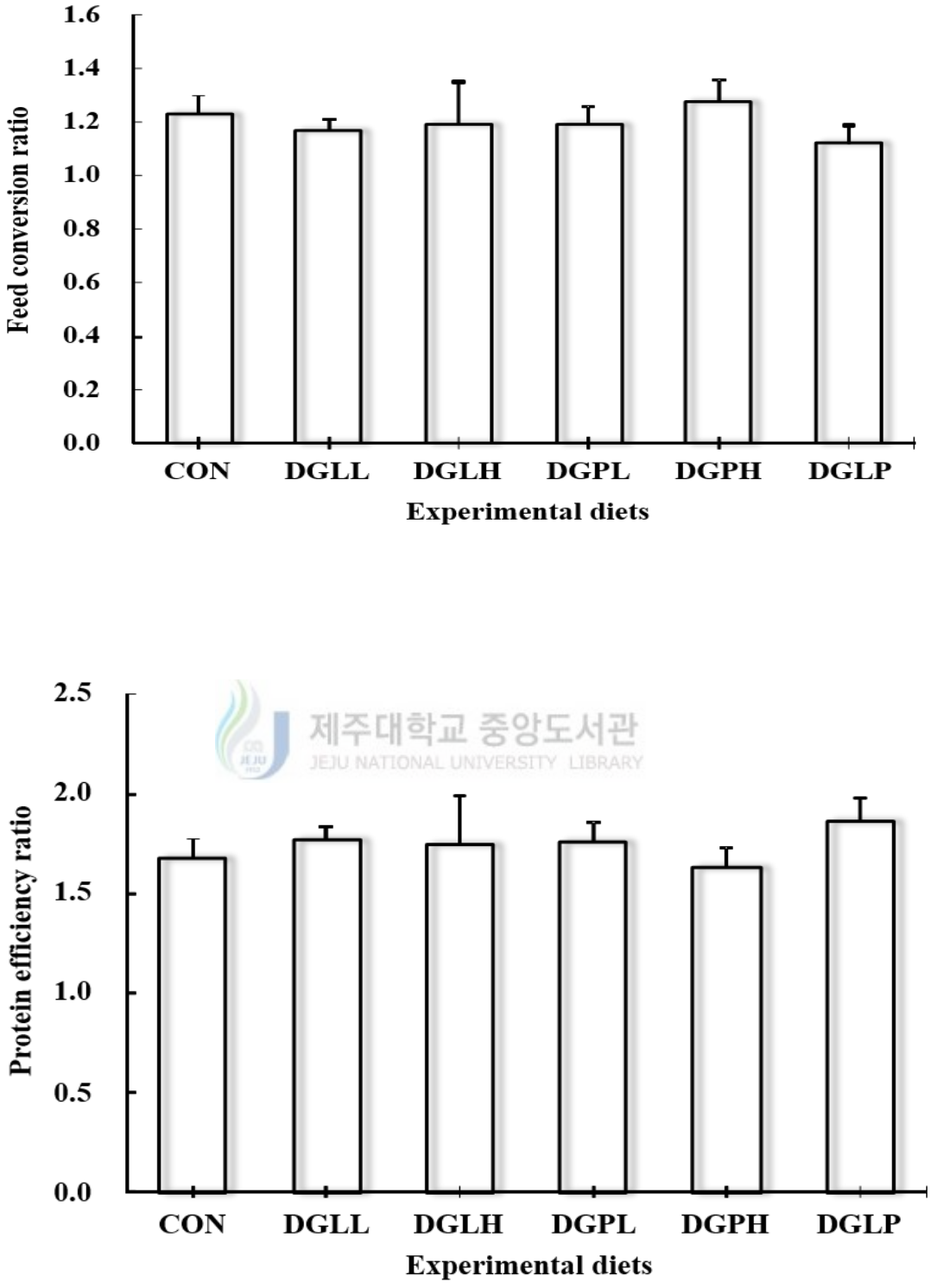
제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 4. Final body weight and weight gain of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed the six experimental diets for 12 weeks.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 5. Specific growth rate and feed intake of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed the six experimental diets for 12 weeks.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 6. Feed conversion ratio and protein efficiency ratio of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed the six experimental diets for 12 weeks.

Table 11. Blood parameters of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed the six experimental diets for 12 weeks.

	CON	DGLL	DGLH	DGPL	DGPH	DGLP
Hematocrit (%)	23.7±0.3	22.7±1.7	22.3±3.5	25.4±1.8	21.6±2.6	24.3±2.7
Hemoglobin (g/dL)	2.06±0.46	1.72±0.40	1.62±0.36	1.76±0.31	1.44±0.07	1.86±0.11

Mean values of triplicate groups, values are presented as mean ± SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P< 0.05$).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 12. Non-specific immune responses of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed the six experimental diets for 12 weeks.

	CON	DGLL	DGLH	DGPL	DGPH	DGLP
NBT (absorbance)	0.68±0.06	0.62±0.03	0.67±0.16	0.69±0.09	0.60±0.12	0.65±0.11
MPO (absorbance)	1.07±0.14	1.47±0.20	1.16±0.13	1.25±0.12	1.13±0.28	1.23±0.17
Lysozyme (ug/ml)	57.6±12.2	54.7±5.9	66.1±4.4	62.1±4.5	70.1±14.3	72.0±5.8

Mean values of triplicate groups, values are presented as mean ± SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P< 0.05$).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 13. Whole body fatty acid composition (% total fatty acids).

Fatty acid	Con	DGLL	DGLH	DGPL	DGPH	DGLP
C12:0	**0.00**	**3.90**	**4.42**	**0.00**	**0.00**	**3.96**
C14:0	4.89	5.83	6.14	3.93	3.58	5.32
C15:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.12
C16:0	**18.67**	**19.66**	**17.73**	**20.34**	**19.92**	**19.58**
C16:1	6.43	4.64	5.30	5.34	5.28	4.72
C17:0	0.94	0.80	0.76	0.81	0.78	0.63
C17:1	0.41	0.42	0.32	0.24	0.27	0.24
C18:0	4.32	4.61	4.50	4.40	4.27	4.50
C18:1n9t	3.92	0.00	0.00	4.79	0.00	0.00
C18:1n9c	22.00	25.98	25.55	23.29	29.32	26.91
C18:2n6c	12.56	10.77	12.27	13.24	13.56	12.64
C20:0	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C18:3n6	2.17	1.70	1.60	1.56	1.59	1.41
C20:1	1.04	0.95	0.83	0.90	0.93	0.72
C18:3n3	1.79	1.50	1.75	1.80	1.73	1.65
C21:0	0.58	0.78	0.68	0.60	0.67	0.59
C20:2	0.00	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00
C22:0	0.08	0.16	0.00	0.00	0.00	0.06
C20:3n6	1.24	0.98	1.11	1.12	1.15	1.02
C22:1n9	0.54	1.70	0.61	0.57	0.46	0.38
C20:3n3	0.09	0.07	0.23	0.26	0.00	0.25
C20:4n6	6.58	4.25	5.26	5.50	5.55	4.81
C20:5n3	**2.61**	**2.02**	**2.36**	**2.46**	**2.33**	**2.16**
C22:6n3	**9.08**	**9.04**	**8.58**	**8.85**	**8.63**	**8.35**

Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P< 0.05$).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

제 5 장. 넙치사료 내 diglycerol의 상업적 적용 가능성 평가

5.1. 재료 및 방법

5.1.1. 실험사료

실험은 2 종류의 diglycerol powder (LPP2, LPP3)를 이용하여 진행하였다. 실험 디자인은 고가어유와 저가어유가 각각 첨가된 2 개의 대조구(HFO, LFO)와 저가어유가 첨가된 대조구(LFO)의 어유를 LPP2 로 단계별로 대체한 3 개의 실험구(LPP(2)0.5, LPP(2)1.0, LPP(2)1.5) 그리고 LPP3 로 대조구(LFO)의 어유를 대체한 1 개의 실험구(LPP(3)1.0)로 총 6 가지가 설정되었다. 실험사료제작에 사용된 사료조성표와 실험사료의 지방산조성을 Table 14, 15 에 나타내었다. 실험사료는 우선 사료원들을 혼합기에 넣어 완전히 섞은 다음, 어유를 첨가하였다. 그 후 사료원 총량의 30%에 해당하는 증류수를 첨가하여 사료혼합기로 혼합, 반죽하였다. 혼합반죽물은 소형초파기(SMC-12, Kuposlice, Busan, Korea)를 이용하여 알맞은 크기로 뽑아내었다. 실험사료는 12h 동안 건조기에서 건조시켜 사료공급 전까지 -20℃ 에 보관하면서 사용하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

5.1.2. 실험어 및 사육관리

실험에 사용된 넙치치어는 제주도내에 위치한 종묘배양장(한라수산)에서 구입하여 제주대학교 소속 해양과학환경연구소로 운송하였다. 실험어류는 2 주 동안 시판 배합사료를 공급하면서 실험환경에 적응할 수 있도록 순치되었다. 예비사육 후 넙치(초기평균무게: 6.8±0.1 g)는 총 18 개의 150 L 원형 플라스틱 수조에 각 수조 당 50 마리씩 무작위로 선택하여 배치되었다. 사육수는 모래여과해수를 사용하여 2-3 L/min 의 유수량이 공급되도록 조절하였고 모든 실험수조에 용존산소 유지를 위하여 에어스톤을 설치하였다. 사육수온은

자연수온(23-28℃)에 의존하였으며 광주기는 형광등을 이용하여 12-h light/12-h dark 로 유지되었다. 실험사료 공급은 1 일 2 회(08:00 시 와 18:00 시) 만복공급을 하였으며 실험은 총 8 주간 진행되었다.

5.1.3. 샘플수집 및 분석

어류무게측정은 2 주마다 실시하였으며 측정 24 시간 전에 실험어류의 스트레스를 줄이기 위해 모든 실험어류를 절식시켰다. 최종 무게측정 후 수조당 6 마리의 어류를 무작위로 선별하여 2-phenoxyethanol (200ppm)용액으로 마취 시킨 후 6 마리 중 3 마리는 헤파린 처리된 주사기를 이용하여 꼬리 미병부에서 채혈을 하였다. 채혈된 전혈은 hematocrit, hemoglobin 및 대식세포활성(NBT; nitroblue-tetrazolium) 분석에 이용되었다. 나머지 3 마리 어류의 혈액은 헤파린이 처리되지 않은 주사기를 이용하여 채혈하였으며 채혈된 전혈은 상온에서 60 분 방치시킨 후 원심분리기로(5,000 × g) 혈청을 분리하여 면역관련분석에 이용되었다. 성장률과 사료효율 관련 조사항목은 다음과 같다. 증체율(WG, %) = 100 × (final mean body weight – initial mean body weight)/initial mean body weight; 사료효율(FCR) = dry feed fed/wet weight gain; 단백질이용효율(PER) = wet weight gain/total protein given; 일간성장률(SGR, %) = [(loge final body weight – loge initial body weight)/days] × 100; 사료섭이량(FI, g) = dry feed fed/fish.

일반성분 분석은 AOAC (1995) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법 (125℃, 3 hr), 조회분은 직접회화법(550℃, 6 hr), 단백질은 자동조단백질분석기(Kejltec system 2300, Sweden)로 분석하였으며, 지방은 Folch et al. (1959)의 방법에 따라 Soxhlet 추출장치(Soxhlet heater system C-SH6, Korea)를 이용하여 분석하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

실험사료와 전어체에서의 지방산 분석은 다음과 같이 실시하였다. 먼저 Folch et al. (1959)의 방법에 따라 지방을 추출한다. 추출된 지방을 Metcalfe and Schmitz (1961) 방법으로 methylation 한 후 Gas chromatography (Agilent technologies, 6890N, USA)를 이용하여 분석하였다.

실험어류의 일반적인 건강도를 측정하기 위해 hematocrit 과 hemoglobin 분석을 실시하였다. Hematocrit 은 microhematocrit technique 방법으로 분석하였으며, hemoglobin 함량은 자동 생화학 분석기(Express plus system, Bayer, USA)를 이용하여 측정하였다.

대식세포는 체내에 침입한 병원체에 결합하여 포식작용을 수행하는 포식세포로서 선천면역과 적응면역 양쪽에 관여한다. 대식세포 기능을 강화시키는 것을 대식세포활성화라고 하며, 이러한 활성화로 인해 포획된 병원체의 가수분해를 촉진시킴과 동시에 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)의 생산을 증가시킨다. 따라서 ROS 의 측정을 통해 간접적으로 대식세포활성 즉, 선천적면역 반응을 확인할 수 있다. 대식세포활성 분석은 다음과 같이 분석되었다(Kumari and Sahoo, 2005). 우선 혈액과 NBT solution(0.2%)을 각각 50ul 씩 섞은 후 25℃ 에서 30 분 동안 반응시켰다. 반응물 50ul 를 glass tube 에 옮긴 후 Dimethyl formamide 를 1ml 씩 넣었다. 그 후 2000rpm 으로 5 분 동안 원심분리한 후 상층액을 분광광도계(Genesys, Series 10 UV, Rochester, NY, USA)를 이용하여 540nm 에서 흡광도를 분석하였다. 이때 blank 는 Dimethyl formamide 로 하였다.

Myeloperoxidase (MPO)는 호중구와 호염기구, 호산구에 존재하는 항균작용을 지닌 과산화효소이다. MPO 는 호흡폭발 (respiratory burst) 과정에서 생성되는 hydrogen peroxide 과 chloride anion 을 통해 세포독성을 지닌 hypochlorous acid 과

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

tyrosyl radical 을 생성하여 병원체를 사멸하게 된다. 따라서 생체 내 높은 함량의 MPO 는 항균효과 증폭을 통해 비특이적 면역반응을 증가시키게 된다. 혈청 내 MPO 활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 방법을 기초로 분석하였다. 먼저 HBSS (Hanks balanced salt solution)를 96-well plates 에 80 ㎕씩 분주한 다음 혈청 20 ㎕를 넣는다. 그 후 20 mM TMB (3,3'5,5'-tetramethyllbenzidine hydrochloride) 용액과 5 mM H2O2 용액을 넣는다. 2 분간 반응시킨 후 4 M H2SO4 용액을 35 ㎕ 첨가한 후 microplate reader (Thermo, USA) 450nm 에서 흡광도를 측정한다.

Lysozyme 은 면역 반응에 관여하는 항균효소의 하나로 특정세균에 대한 특이적인 항균작용이 아닌 비특이적으로 다양한 균에 대한 항균작용을 나타내는 효소이다. 병원균에 대한 항균 메커니즘은 세균 세포벽의 구성성분인 peptidoglycan 의 N-acetylmuramic acid 과 N-acetyl-D-glucosamine 잔기들 사이의 β-1,4-glucoside 결합을 가수분해하여 세균의 세포벽을 파괴함으로써 항균작용을 나타낸다. 혈청 내 lysozyme 분석은 (Swain et al., 2007)의 분석방법으로 분석하였다. Sodium citrate buffer (0.02M, pH 5.52)에 동결 건조된 Micrococcus lysodeikticus (Sigma, USA)를 첨가하여 0.2 mg/ml 농도의 현탁액을 제조한 후, 현탁액과 혈청을 10:1 의 비율로 혼합 시킨 후, 450 nm 에서 흡광도 값을 측정하였다. 24℃에서 한 시간 반응시킨 후 최종 흡광도 값을 측정하였다. Lyophilized hen egg white lysozyme (HEWL; sigma, USA)를 이용하여 standard curve 을 구하고 ug/ml 로 표시하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

5.1.4. 통계학적 분석

실험사료의 배치는 완전확률계획법(Completely randomized design)을 실시하고, 성장 및 분석결과는 SPSS (Version 12.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA 로

통계 분석된다. 데이터 값의 유의차는 Tukey's test (P≤0.05)로 비교되었다 데이터는 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 14. Formulation of the experimental diets for olive flounder (*Paralichthys olivaceus)*.

Ingredients	**HFO**	**LFO**	**LPP(2)0.5**	**LPP(2)1.0**	**LPP(2)1.5**	**LPP(3)1.0**
Fish meal	55.0	55.0	55.0	55.0	55.0	55.0
Soybean meal	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Corn gluten meal	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Wheat flour	26.5	26.5	26.5	26.5	26.5	26.5
Mineral mix[1]	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Vitamin mix[2]	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline chloride	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Fish oil (High)	**6.0**	-	-	-	-	-
Fish oil (Low)	-	**6.0**	**4.0**	**4.0**	**4.0**	**4.0**
Starch	-	-	**1.5**	**1.0**	**0.5**	**1.0**
LPP2	-	-	**0.5**	**1.0**	**1.5**	-
LPP3	-	-	-	-	-	**1.0**

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

[1] $MgSO_4.7H_2O$, 80.0; $NaH_2PO_4.2H_2O$, 370.0; KCl, 130.0; Ferric citrate, 40.0; $ZnSO_4.7H_2O$, 20.0; Ca-lactate, 356.5; CuCl, 0.2; $AlCl_3$. $6H_2O$, 0.15; $Na_2Se_2O_3$, 0.01; $MnSO_4.H_2O$, 2.0; $CoCl_2.6H_2O$, 1.0.

[2] L-ascorbic acid, 121.2; DL-α tocopheryl acetate, 18.8; thiamin hydrochloride, 2.7; riboflavin, 9.1; pyridoxine hydrochloride, 1.8; niacin, 36.4; Ca-$_D$-pantothenate, 12.7; myo-inositol, 181.8; $_D$-biotin, 0.27; folic acid, 0.68; p-aminobezoic acid, 18.2; menadione, 1.8; retinyl acetate, 0.73; cholecalficerol, 0.003; cyanocobalamin, 0.003.

Table 15. Fatty acid composition (% total fatty acids) of the experimental diets.

Fatty acid	HFO	LFO	LPP(2)0.5	LPP(2)1.0	LPP(2)1.5	LPP(3)1.0
C8:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00
C10:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.21	0.06
C12:0	**0.00**	**0.00**	**0.00**	**1.66**	**2.50**	**1.86**
C14:0	4.07	5.13	4.22	4.30	4.81	4.54
C14:1	0.29	0.33	0.38	0.24	0.35	0.33
C15:0	0.25	0.44	0.25	0.24	0.26	0.27
C16:0	**15.77**	**19.56**	**16.05**	**14.94**	**16.10**	**16.05**
C16:1	8.61	8.46	8.55	8.32	8.22	8.74
C17:0	2.31	1.84	2.23	2.13	2.10	2.18
C17:1	0.40	0.58	0.32	0.26	0.33	0.36
C18:0	3.26	4.43	3.37	3.25	3.49	3.69
C18:1n9c	18.06	17.92	17.62	17.87	21.70	24.11
C18:2n6t	6.31	5.75	7.40	6.87	2.18	0.00
C18:2n6c	5.24	8.32	6.12	5.91	5.73	5.78
C20:0	0.23	0.30	0.07	0.06	0.18	0.17
C18:3n6	0.68	1.32	0.79	0.74	0.66	0.65
C20:1	1.52	1.48	1.48	1.49	1.40	1.36
C18:3n3	8.25	3.59	7.72	7.84	7.34	7.38
C21:0	0.20	0.27	0.07	0.15	0.14	0.18
C22:0	0.09	0.18	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:3n6	0.39	0.91	0.53	0.52	0.52	0.52
C22:1n9	0.31	1.27	4.25	4.40	2.80	3.97
C20:4n6	3.65	8.88	10.61	10.81	10.05	10.20
C23:0	7.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C24:0	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:5n3	**5.70**	**1.34**	**1.08**	**1.04**	**1.02**	**1.00**
C24:1	0.82	1.07	0.77	0.80	0.74	0.76
C22:6n3	**6.56**	**6.09**	**6.12**	**6.17**	**5.81**	**5.84**

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

5.2. 결과 및 고찰

실험 종료 후 조사된 성장 결과를 Table 16에 나타내었다. 분석결과 모든 실험구의 성장 및 사료효율이 대조구(LFO)와 유의적인 차이를 보이지 않았으며 고가어유가 첨가된 HFO와도 유의적인 차이가 없었다. 생존율은 모든 실험구에서 유의적인 차이가 없었다. 혈액학적 분석결과와 면역분석결과를 Table 17, 18에 나타내었다. 분석결과 성장결과와 마찬가지로 모든 분석에서 실험구간에 유의적인 차이가 없었다. 전어체에서의 지방산분석 결과는 Table 19 에 나타내었다. 분석결과 LPP(2)의 첨가 수준에 따라 lauric acid가 유의적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다. Palmitic acid 와 DHA, EPA 함량은 모든 실험구에서 유의적인 차이가 없었다. 이 실험에서는 diglycerol powder와 starch를 함께 사용하여 어유를 대체하였다. 분석된 모든 결과로 미루어 볼 때 사료 내 diglycerol powder 의 0.5-1.5% 첨가(starch 0.5-1.5%)로 넙치의 일반적인 건강도 및 면역활성에 지장 없이 저가어유를 약 33%(사료 내 2%)까지 대체할 수 있을 것으로 판단된다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 16. Growth performance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*, mean initial body weight 6.8±0.1 g) fed the six experimental diets for 8 weeks.

	HFO	LFO	LPP(2)0.5	LPP(2)1.0	LPP(2)1.5	LPP(3)1.0
FBM (g)[1]	50.8±3.4	45.2±3.3	48.1±1.9	46.0±2.5	47.5±0.5	45.5±3.6
WG (%)[2]	650±48	567±63	615±29	569±31	598±3	565±54
SGR (%)[3]	3.53±0.11	3.32±0.17	3.45±0.07	3.33±0.08	3.41±0.01	3.32±0.14
FCR[4]	0.92±0.09	0.93±0.11	0.95±0.04	0.93±0.04	0.93±0.01	0.92±0.04
PER[5]	2.26±0.22	2.25±0.25	2.18±0.08	2.24±0.11	2.21±0.03	2.22±0.09
FI (g)[6]	40.2±1.0	35.4±1.3	39.2±1.8	36.3±3.3	37.7±0.8	35.6±1.9
Survival (%)	94.7±9.2	98.0±3.5	96.7±5.8	96.7±5.8	95.3±5.0	100±0.0

Mean values of triplicate groups, values are presented as mean ± SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P< 0.05$).

[1]Final mean body weight (g)

[2]Weight gain (%) = (final body weight - initial body weight)/initial body weight × 100

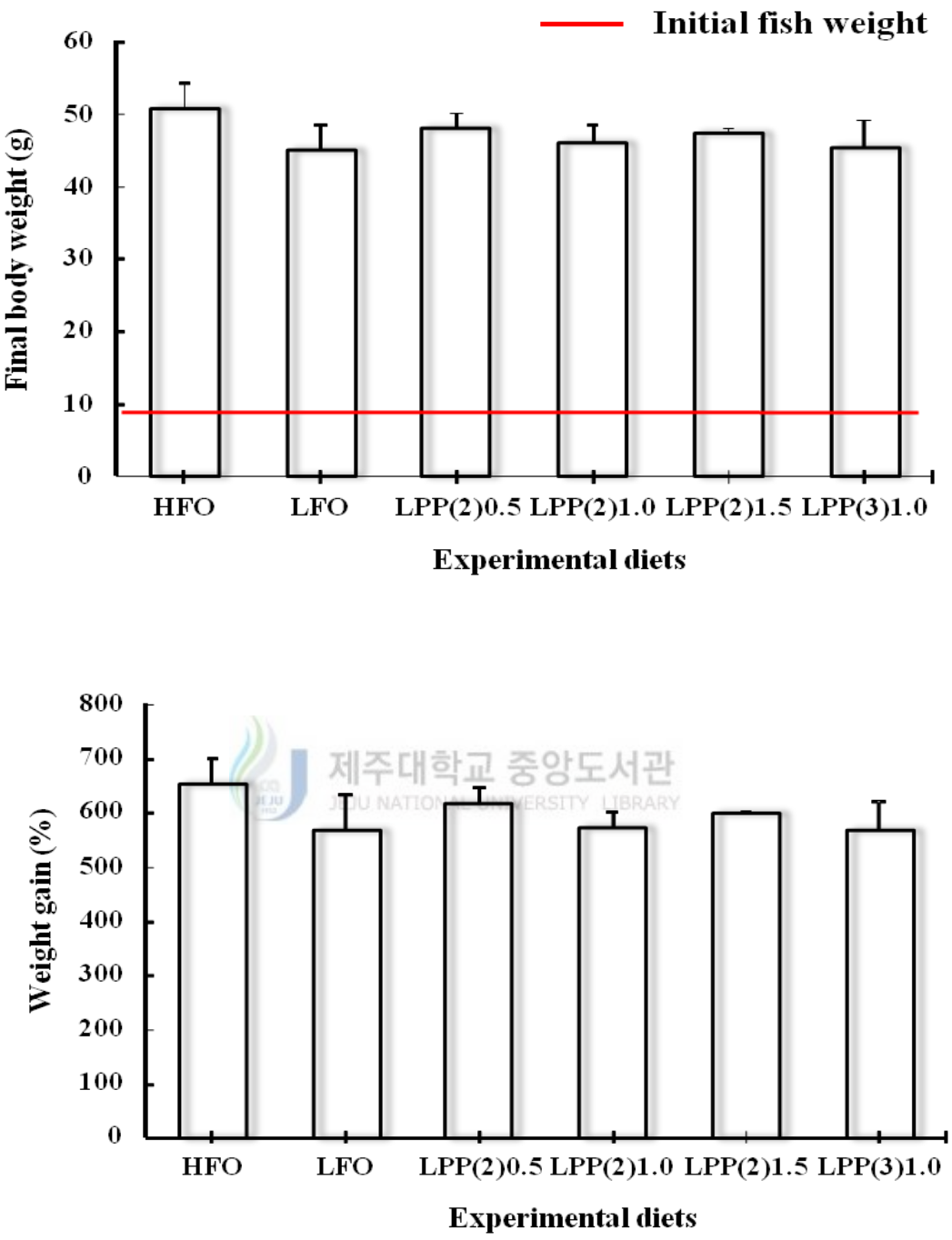
[3]Specific growth rate (%) = [(loge final body weight – loge initial body weight)/days] × 100

[4]Feed conversion ratio = dry feed fed/wet weight gain

[5]Protein efficiency ratio = wet weight gain/total protein given

[6]Feed intake (g) = dry feed fed/fish

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 7. Final body weight and weight gain of olive flounder (*Paralichthys olivaceus)* fed the six experimental diets for 8 weeks.

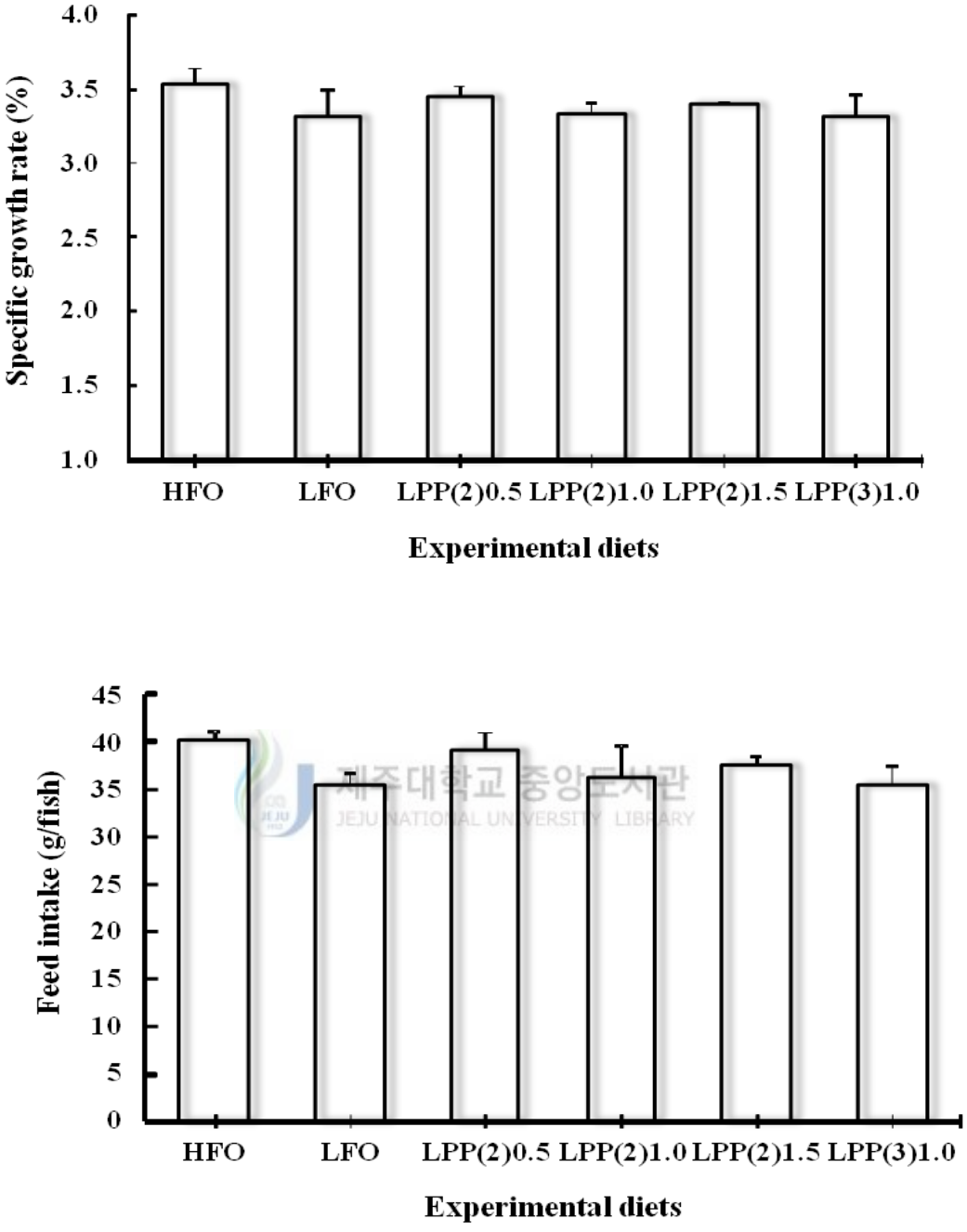
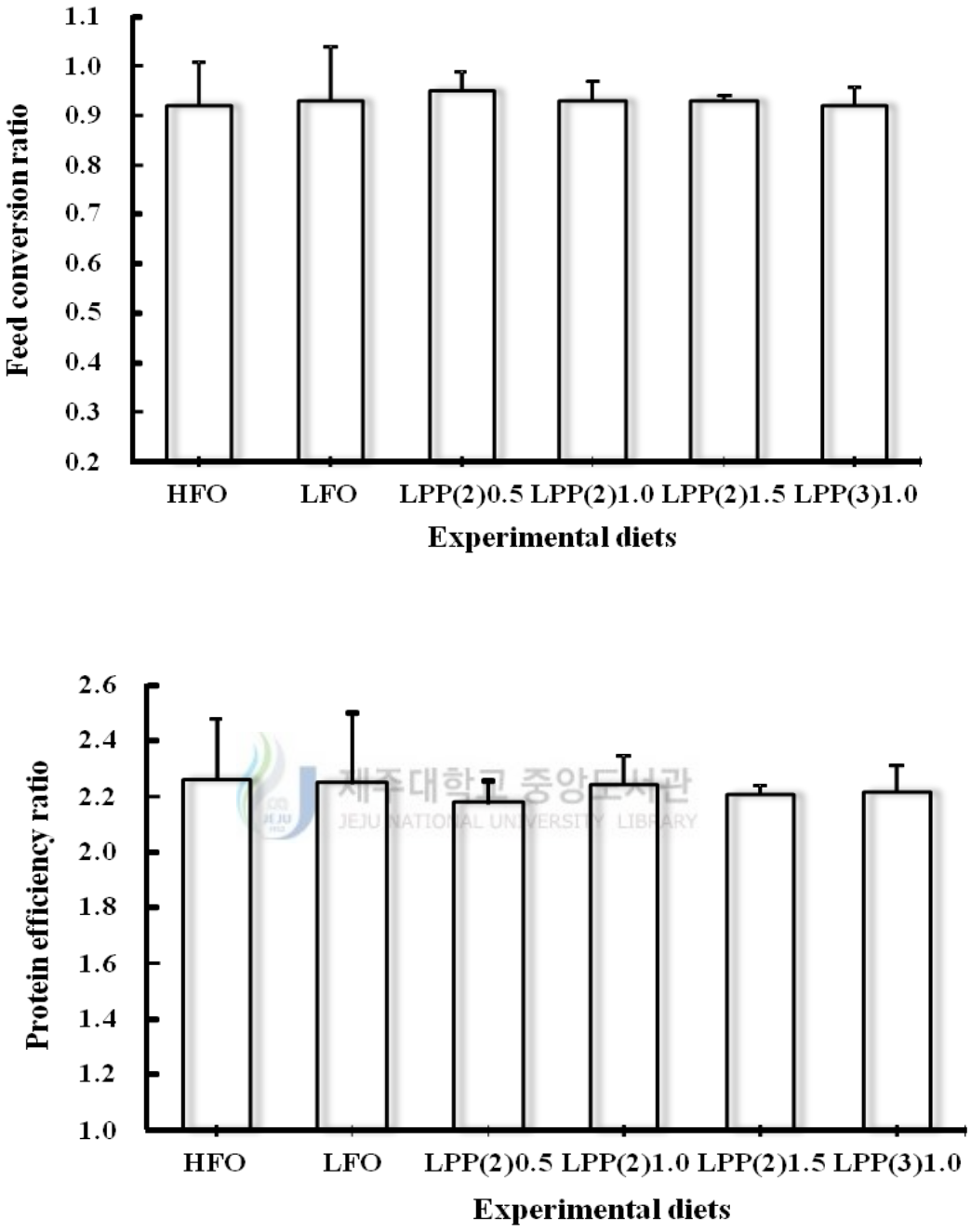


Fig. 8. Specific growth rate and feed intake of olive flounder (*Paralichthys olivaceus)* fed the six experimental diets for 8 weeks.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 9. Feed conversion ratio and protein efficiency ratio of olive flounder (*Paralichthys olivaceus)* fed the six experimental diets for 8 weeks.

Table 17. Blood parameters of olive flounder (*Paralichthys olivaceus)* fed the six experimental diets for 8 weeks.

	HFO	LFO	LPP(2)0.5	LPP(2)1.0	LPP(2)1.5	LPP(3)1.0
Hematocrit (%)	18.1±5.7	19.0±2.6	18.3±3.4	22.7±4.1	17.3±0.7	22.9±1.2
Hemoglobin (g/dL)	2.55±0.45	3.16±0.24	2.76±0.51	3.27±0.72	2.82±0.62	2.94±0.69

Mean values of triplicate groups, values are presented as mean ± SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P< 0.05$).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 18. Non-specific immune responses of olive flounder (*Paralichthys olivaceus)* fed the six experimental diets for 8 weeks.

	HFO	LFO	LPP(2)0.5	LPP(2)1.0	LPP(2)1.5	LPP(3)1.0
NBT (absorbance)	0.53±0.06	0.63±0.04	0.60±0.06	0.57±0.05	0.56±0.11	0.60±0.09
MPO (absorbance)	1.68±0.59	1.60±0.50	1.57±0.20	1.76±0.53	1.87±0.88	1.46±0.27
Lysozyme (ug/ml)	89.4±8.0	72.4±6.0	76.8±19.8	69.9±10.3	68.7±12.5	74.5±11.3

Mean values of triplicate groups, values are presented as mean ± SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P< 0.05$).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 19. Whole body fatty acid composition (% total fatty acids).

Fatty acid	HFO	LFO	LPP(2)0.5	LPP(2)1.0	LPP(2)1.5	LPP(3)1.0
C12:0	**0.00**	**0.00**	**0.19[a]**	**4.28[ab]**	**5.42[b]**	**2.89[ab]**
C14:0	4.36	5.49	3.86	6.14	6.43	5.22
C15:0	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C16:0	**19.67**	**21.91**	**20.40**	**18.39**	**20.34**	**20.49**
C16:1	6.66	5.37	5.66	5.85	4.73	5.54
C17:0	0.86	0.83	0.74	0.50	0.55	0.62
C17:1	0.10	0.30	0.13	0.00	0.21	0.00
C18:0	2.22	1.14	2.10	0.00	0.00	0.00
C18:1n9t	0.00	4.69	0.00	1.04	0.00	0.00
C18:1n9c	26.32	22.61	30.54	27.93	28.07	28.09
C18:2n6c	13.07	13.62	13.56	13.20	12.80	13.61
C18:3n6	2.62	1.68	2.06	1.77	1.49	1.64
C20:1	1.12	0.86	1.00	1.01	0.77	1.00
C18:3n3	1.75	1.92	1.27	0.91	1.69	1.86
C21:0	0.54	0.35	0.27	0.37	0.63	0.75
C22:0	0.00	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:3n6	1.25	1.16	1.12	1.11	1.04	1.07
C22:1n9	0.34	0.30	0.00	0.15	0.00	0.29
C20:4n6	7.48	5.73	5.98	5.79	4.93	5.42
C20:5n3	**2.68**	**2.53**	**2.43**	**2.53**	**2.18**	**2.36**
C22:6n3	**8.87**	**9.37**	**8.71**	**9.04**	**8.72**	**9.16**

Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P< 0.05$).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

요 약 문

참돔 사료내 단백질과 지방 함량에 따른 가소화단백질/에너지 비 평가

실용 사료원을 기초로 총 9개의 실험사료를 제작하였다. 실험사료 디자인은 3 x 3 factorial design으로 세 단계의 조단백질(CP; 42%, 46% and 50%)과 세 단계의 조지방 함량(CL; 10, 14, and 18%)의 조합으로 제작되었다: P42L10, 42%CP+10%CL; P42L14, 42%CP+14%CL; P42L18, 42%CP+18%CL; P46L10, 46%CP+10%CL; P46L14, 46%CP+14%CL; P46L18, 46%CP+18%CL; P50L10, 50%CP+10%CL; P50L14, 50%CP+14%CL; P50L18, 50%CP+18%CL. 실험구간에 적정 DP/E ratio 규명을 위해 동일어종의 각 사료원 소화율을 참고(NRC. 2011)하여 실험사료의 가소화단백질/에너지 비율을 설정하였다. 실험사료 공급은 1일 5-6회(08:00 hr 에서 18:00 hr까지)에 걸쳐 만복공급 하였으며, 실험은 총 10주간 진행되었다. 증체율의 경우 P46L14, P50L10, P50L14 실험구가 P42L18 실험구보다 유의적으로 높은 값을 나타내었다. 단백질 함량이 동일한 실험구내에서 비교해 볼 때 지방이 14% 함유된 실험구의 증체율이 다른 실험구에 비해 다소 높은 경향을 나타내었으며, 18%의 고지방 첨가 실험구는 감소되는 경향을 보였다. 사료전환효율의 경우 P46L18 실험구의 결과값이 다른 실험구보다 유의적으로 낮은 경향을 나타내었으며, 지방 함량이 증가함에 따라 사료전환효율이 떨어지는 경향이 관찰되었다. 단백질이용효율도 사료전환효율과 유사한 경향을 나타내었다. MPO활성 분석결과 P50L10과 P50L14 실험구가 P42L10 실험구보다 유의적으로 높은 값을 보였으며 P50L14 실험구는 P50L18 실험구에 비해서도 유의적으로 높은 값을 나타내었다. SOD활성 분석결과의 경우 P46L14와 P46L18 실험구가 P46L10, P50L10, P50L18 실험구에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내었다. Lysozyme 활성 분석결과는 모든 실험구에서 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

모든 결과를 종합해 볼 때 치어기 참돔(7.7 g) 사료내 최적의 가소화단백질에 대한 에너지 비는 27.4 g/MJ이며, 단백질과 지방함량은 각각 46%와 14% 일 때 가장 효율적일 것으로 사료된다.

사료내 유화제 첨가가 참돔의 성장, 사료효율, 비특이적 면역에 미치는 영향

실험사료는 총 5 개로 유화제가 첨가되지 않은 기초사료(46%CP+14%CL)에 친수성 유화제인 HE 와 친유성 유화제인 LE 를 각각 0.15%와 0.3%로 단계별로 첨가하여 제작되었다(Con, HE0.15, HE0.3, LE0.15, LE0.3). 실험사료 공급은 1 일 2 회(08:00 hr 와 18:00 hr) 만복공급을 하였으며 실험은 총 12 주간 진행되었다. 증체율 측정결과 모든 실험구에서 유의적인 차이를 관찰할 수 없었으나 LE0.3 실험구의 경우 대조구에 비해 다소 높은 값을 보였다. 사료효율과 단백질이용효율의 경우 증체율과 마찬가지로 모든실험구에서 유의적인 차이가 없었다. 하지만 HE0.3 과 LE0.3 실험구가 대조구에 비해 다소 높은 효율을 나타내었다. HE 와 LE 가 첨가된 실험구내에서 비교해볼 때 0.15% 보다 0.3% 농도로 첨가된 실험구의 성장률이 비교적 높게 나타났다. Lysozyme 활성은 HE0.3 실험구가 다른 실험구에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내었다. SOD, MPO, NBT 활성은 모든 실험구에서 유의적인 차이가 없었다. 모든 결과를 종합해볼 때 유화제 종류에 따른 차이는 미비한 것으로 나타났으며 성장 및 사료효율 향상을 위한 참돔 사료 내 유화제 적정 첨가 농도는 0.3% 이상일 것으로 사료된다. 또한 0.3% HE 첨가는 참돔의 면역활성을 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다.

제주대학교 중앙도서관

넙치사료 내 어유대체원으로서 diglycerol 의 이용가능성 평가

총 4 종류의 diglycerol (DGLL, 저순도 1,3-lauryl glycerol; DGLH, 고순도 1,3-lauryl glycerol; DGPL, 저순도 1,3-palmityl glycerol; DGPH, 고순도 1,3-palmityl glycerol)을 사용하여 진행하였다. 실험 디자인은 어유가 첨가된 대조구(CON)와 4 종류의 diglycerol 로 대조구의 어유를 각각 50% 대체한 4 개의 실험구(DGLL, DGLH, DGPL, DGPH) 그리고 DGLL 과 DGPL 을 1:1 로 혼합하여 대조구의 어유를 100% 대체한 1 개의 실험구(DGLP)로 총 6 가지가 설정되었다. 실험사료 공급은 1 일 2 회(08:00 시 와 18:00 시) 만복공급을 하였으며 실험은 총 12 주간 진행되었다. Diglycerol 로 어유를 50% 대체한 모든 실험구(DGLL, DGLH, DGPL, DGPH)가 대조구와 유의적인 차이를 보이지 않았으며 어유를 100% 대체한 DGLP 또한 대조구와 유의적인 차이가 없었다. 분석결과 DGLL, DGLH, DGLP 실험구에서만 lauric acid 가 축적된 것을 확인할 수 있었다. Palmitic acid 함량은 모든 실험구에서 유의적인 차이가 없었다. DHA 와 EPA 함량은 모든 실험구에서 유의적인 차이가 없었으나 DGLP 실험구의 DHA 함량이 대조구에 비해 다소 감소되는 경향을 보였다. 분석된 성장 결과로 미루어 볼 때 diglycerol 은 넙치 배합사료 내 어유를 100%까지 대체 할 수 있을 것으로 사료된다. 이러한 대체수준은 넙치의 일반적인 건강도, 면역활성 및 필수 지방산(DHA, EPA) 대사에 악 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

넙치사료 내 diglycerol 의 상업적 적용 가능성 평가

2 종류의 diglycerol powder (LPP2, LPP3)를 이용하여 진행하였다. 실험 디자인은 고가어유와 저가어유가 각각 첨가된 2 개의 대조구(HFO, LFO)와 저가어유가 첨가된 대조구(LFO)의 어유를 LPP2 로 단계별로 대체한 3 개의 실험구(LPP(2)0.5, LPP(2)1.0, LPP(2)1.5) 그리고 LPP3 로 대조구(LFO)의 어유를 대체한 1 개의 실험구(LPP(3)1.0)로 총 6 가지가 설정되었다. 실험사료 공급은 1 일 2 회(08:00 시 와 18:00 시) 만복공급을 하였으며 실험은 총 8 주간 진행되었다. 분석결과 모든 실험구의 성장 및 사료효율이 대조구(LFO)와 유의적인 차이를 보이지 않았으며 고가어유가 첨가된 HFO 와도 유의적인 차이가 없었다. 생존율은 모든 실험구에서 유의적인 차이가 없었다. 혈액학적 분석결과와 면역분석결과 성장결과와 마찬가지로 모든 분석에서 실험구간에 유의적인 차이가 없었다. 전어체에서의 지방산 분석결과 LPP(2)의 첨가 수준에 따라 lauric acid 가 유의적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다. Palmitic acid 와 DHA, EPA 함량은 모든 실험구에서 유의적인 차이가 없었다. 이 실험에서는 diglycerol powder 와 starch 를 함께 사용하여 어유를 대체하였다. 분석된 모든 결과로 미루어 볼 때 사료 내 diglycerol powder 의 0.5-1.5% 첨가(starch 0.5-1.5%)로 넙치의 일반적인 건강도 및 면역활성에 지장 없이 저가어유를 약 33%(사료 내 2%)까지 대체할 수 있을 것으로 판단된다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

참고문헌

AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 1995. Official Methods of Analysis. 16th edn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia.

Cho, C. Y and Kaushik, S. J. 1985. Effects of protein intake on metabolizable and net energy values of fish diets. In: Cowey, C. B., Mackie, A. M., Bell, J. G. (Eds.), Nutrition and feeding in fish. Academic Press, London, pp. 95-117.

Cho, C.Y. and Kaushik, S.J. 1985. Effects of protein intake on metabolizable and net energy values of fish diets. In: Cowey, C.B., Mackie, A.M., Bell, J.G. (Eds.), Nutrition and Feeding in Fish, Proceeding of the International Symposium on Fish Feeding and Nutrition, Aberdeen, UK, pp. 95–117.

Company, R., Calduch-Giner, J. A., Kaushik, S. and Perez-Sanchez, J. 1999. Growth performance and adiposity in gilthead seabream (*Sparus aurata*): risks and benefits of high fat diets. Aquaculture 171, 279-292.

Daniels, W.H. and Robinson, E.H. 1986. Protein and energy requirements of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). Aquaculture 53, 243–252.

De Silva, S.S., Gunasekera, R.M. and Shim, K.F. 1991. Interactions of varying dietary protein and lipid levels in young red tilapia: evidence of protein sparing. Aquaculture 95, 305– 318.

Einen, O and Roem, A.J. 1997. Dietary protein energy ratios for Atlantic salmon in relation to fish size: growth, feed utilization and slaughter quality. Aquacult Nutr 3, 115–126.

Einen, O and Skrede, G.G. 1998. Quality characteristics in raw and smoked fillets of Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed high-energy diets. Aquacult Nutr 4, 99–108.

Ellis, A.E. 1990. Serum antiprotease in fish. In: Techniques in Fish Immunology, (ed. by J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, W.B. Roberson & W.B. Van Muiswinkel), pp. 95–99. SOS Publication, Fair Haven, U.S.A.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Folch, J., Lee, M. and Sloane-Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem 226, 497–509.

Helland, S.J and Grisdale-Helland. 1998. Growth, feed utilization and body composition of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed diets differing in the ratio between the macronutrients. Aquaculture 166, 49-56.

Hillestad, M. and Johnsen, F. 1994. High-energy/low-protein diets for Atlantic salmon: effects on growth, nutrient retention and slaughter quality. Aquaculture 124, 109–116.

Kanazawa, A., 1993. Essential phospholipids of fish and crustaceans. In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), Fish Nutrition in Practice INRA. Paris, France, pp. 519– 530.

Kim, K.D., Kim, K.M., Kim, K.W., Kang, Y.J. and Lee, S.M. 2006. Influence of lipid level and supplemental lecithin in diet on growth, feed utilization and body composition of juvenile flounder (*Paralichthys olivaceus)* in suboptimal water temperatures. Aquaculture 251, 484-490.

제주대학교 중앙도서관

Kumari, J. and Sahoo, P.K. 2005. Effects of cyclophosphamide on the immune system and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus*. Fish Shellfish Immunol 19, 307–16.

Lee, S.M. and Kim, K.D. 2005. Effect of various levels of lipid exchanged with dextrin at different protein level in diet on growth and body composition of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquacult Nutr 11, 435–442.

Lee, S.M., Jeon, I.G. and Lee, J.Y. 2002. Effects of digestible protein and lipid levels in practical diets on growth, protein utilization and body composition of juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*). Aquaculture 211, 227–239.

Lim, S.G., Han, H.K., Bang, I.C., Choi, J. and Lee, S.M. 2013. Effect of dietary protein and lipid levels on the growth and body composition of juvenile long snout bullhead *Leiocassis longirostris* Gunther. Kor J Fish Auat Sci 46, 377-383.

Llorens, S.M., Vidal, A.T., Monino, A.V., Torres, M.P., Cerda, M.J., 2007. Effects of dietary soybean oil concentration on growth, nutrient utilization and muscle fatty acid composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata L.*). Aquac. Res. 38, 76–81.

Marais and Kissil. 1979 The influence of energy level on the feed intake, growth, food conversion and body composition of *Sparus aurata*. Aquaculture 17, 203–219.

Metcalfe, L.D., Schmitz, A.A., 1961. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. Anal. Chem. 33, 363-364.

Mohanta, K.N., Mohanty, S.N., Jena, J. and Sahuz, N.P. 2009. A dietary energy level of 14.6 MJ/kg and protein-to-energy ratio of 20.2g MJ results in best growth performance and nutrient accretion in silver barb *Puntius gonionotus* fingerlings. Aquacult Nutr 15, 627–637.

NRC (National Research Council), 1993. Nutritional Requirements of Fish. National Academy Press, Washington, DC, USA.

제주대학교 중앙도서관

Ogata, H. Y. and Shearer, K. D. 2000. Influence of dietary fat and adiposity on feed intake of juvenile red sea bream *Pagrus major*. Aquaculture 189, 237-249.

Ozsahinoglu, I., Eroldogan, T., Mumogullarinda, P., Dikel, S., Engin, K., Yilmaz, A.H., Arslan, M and Sirkecioglu, A.N. 2013. Partial replacement of fish oil with vegetable oil in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*): Effects on growth performance and fatty acids profile. Turkish J Fish Aquatic Sci 13, 819-825.

Peng, S., Chen, L., Qin, J.G., Yu, N., Long, Z., Te, J and Sun X., 2008. Effects of replacement of dietary fish oil by soybean oil on growth performance and liver biochemical composition in juvenile black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*

Piedecausa, M.A., Mazón, M.J., García, B.G., Hernández, M.D., 2007. Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils in the diets of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). Aquaculture 263, 211–219.

Rawles S.D., Thompson, K.R., Brady, Y.J., Metts, L.S and Aksoy, M.Y. 2011. Effects of replacing fish meal with poultry by-product meal and soybean meal and reduced protein

level on the performance and immune status of pond-grown sunshine bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*). 2011. Aquacult Nutr 17, 708–721.

Sankaran, K. and Shanto, G. 1972. On the variation in catalytic activity of lysozyme in fishes. Indian J. Biochem Biophys 91, 162– 165.

Sargent, J.R., Tocher, D.R. and Bell, J.G. 2002. The lipids, In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), Fish Nutrition, 3rd edition. Academic Press, San Diego California, pp. 181–257.

Shearer, K.D., Silverestein, J.T. and Plisetskaya, E.M. 1997. The role of adiposity in food intake control of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. Comp. Physiol. Biochem. 118A, 1209–1215.

Silverstein, J.T., Shearer, K.S., Dickhoff, W.W. and Plisetskaya, E.M. 1999. Regulation of nutrient intake and energy balances in salmon. Aquaculture 177, 161–169.

Siwicki, A.K., Anderson, DP., 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish: II. potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum. Fish Disease Diagnosis and Prevention Methods 105-112. Olsztyn, Poland.

Swain, P., Dash, S., Sahoo, P.K., Routray, P., Sahoo, S.K., Gupta, S.D., Meher, P.K., Sarangi, N. 2007. Non-specific immune parameters of brood Indian major carp Labeo rohita and their seasonal variations. Fish and Shellfish Immunology 22,38–43.

Takeuchi, T., Shiina, Y. and Watanabe, T. 1991. Suitable protein and lipid levels in diet for ® ngerlings of red sea bream *Pagrus major*. 20 Nipp. Suis. Gakk., 55(2), 521-527.

Vergara, J.M., Robaina, L., Izquierdo, M. and De La Higuera, M. 1996. Protein sparing effect of lipids in diets for fingerlings of gilthead sea bream. Fish Sci 62, 620– 623.

Wang, L.N., Liu, W.B., Zhang, C.N., Li, X.F., Xu, W.N., Cai, D.S. and Tian, H.Y. 2014. Effects of dietary non-protein energy sources on growth, physiology and biochemistry of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). J. Nanjing Agric. Univ. 37, 108–114.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Wang, Y.Y., MA G.J., Shi, Y., Liu, D.S., Guo, X.J., Yang, Y.H and Chen, C.D. 2013. Effects of dietary protein and lipid levels on growth, feed utilization and body composition in *Pseudobagrus ussuriensis* fingerlings. Aquacult Nutr 19, 390–398.

Yone, Y., Furuichi, M. and Sakamoto, S. 1971. Studies on nutrition of red sea bream. III. Nutritive value of optimum content of lipids in diet. Rep. Fish. Res. Lab. Kyushu Univ., 1, 49-60.

통계청(KOSTAT). 2013. 어류양식동향조사결과. 사회통계국농어업생산통계과.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

감사의 글

2005 년 10 월 시작된 양어사료영양학 연구실에서의 생활. 저에게는 지금 무엇과도 바꿀 수 없는 소중한 인연으로 남아있습니다. 연구실 생활을 하면서 무언가에 몰두하는 법을 배웠고 성취하는 기쁨이 무엇인지 알게 되었습니다. 먼저 이러한 가르침을 주신 저의 지도교수님 이경준 교수님께 존경과 감사의 인사를 드립니다. 바쁘신 와중에도 제 박사학위 논문심사를 해주신 최광식 교수님, 박상율 교수님, 정석근 교수님 그리고 포항 사료연구센터에서 먼 걸음 해주신 김강웅 박사님께도 진심으로 감사의 말씀 전합니다.

연구실 생활을 돌이켜 보면 많은 분들의 도움이 있었습니다. 항상 연구실의 큰형님 역할을 해주신 장계환 선배님, 모자란 저에게 따뜻하고 진심 어린 충고를 해주신 박영준 선배님, 이제는 친형이나 다름없는 세진형, 봉주형, 성삼형, 지훈형 그리고 동생 진우, 바쁜 연구실 생활속에서 묵묵히 도와준 착한 민기, 초롱이, 유정이 이러한 분들이 있었기에 지금 이 시간이 저에게 있는 것 같습니다. 끝으로 늦은 나이에 공부하는 저를 항상 격려해주신 어머니 지금은 먼 곳에서 보고 계시지만 누구보다 자랑스러워하실 아버지 그리고 제 일이라면 늘 먼저 나서주시는 이모와 삼촌께 감사드립니다. 이러한 고마운 분들의 마음에 누가되지 않도록 지금 일하고 있는 CJ 제일제당 생물자원연구소에서도 마지막까지 소신껏 최선을 다겠습니다.

제주대학교중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY