



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](#)

석사학위논문

치어기 참다랑어 사료 내 효소처리어분의
이용성에 관한 연구

제주대학교 대학원

해양생명과학과

신재형

2018년 2월

치어기 참다랑어 사료 내 효소처리어분의

이용성에 관한 연구

지도교수 이 경 준

신 재 형

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2017년 12월

신재형의 이학석사 학위논문을 인준함

심사위원장 지 승 철 ㉠

위 원 김 기 영 ㉠

위 원 이 경 준 ㉠

제주대학교 대학원

2017년 12월

A DISSERTATION FOR THE DEGREE OF MASTER

Study on the utilization of enzyme-treated fish meal in
diets for juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus*

Jaehyeong Shin

(Supervised by professor Kyeong-Jun Lee)

Department of Marine Life Science

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2018

목 차

ABSTRACT	iii
LIST OF FIGURES	v
LIST OF TABLES	viii
CHAPTER 1. 서론	1
1.1 적정 단백질원	4
1.2 효소처리어분	10
1.3 참다랑어 영양소 요구량	10
1.4 DHA	13
1.5 비타민·미네랄 혼합물	13
CHAPTER 2. Dietary utilization of enzyme-treated fish meal in diets for juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i>	
2.1 재료 및 방법	17
2.2 결과	26

**CHAPTER 3. Optimum dietary DHA oil level and replacement
enzyme-treated fish meal by sardine fish meal in diets
for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus***

3.1 재료 및 방법	41
3.2 결과	48

**CHAPTER 4. Apparent digestibility of diets and protein sources in
juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus*: *in vivo* and *in
vitro* digestibility and digestive enzyme activities**

4.1 재료 및 방법.....	59
4.2 결과	67

결론	78
----------	----

요 약 문	84
-------------	----

참고문헌	86
------------	----

감사의 글	97
-------------	----

ABSTRACT

In Chapter 2, study was conducted to estimate effects of dietary enzyme treated fish meal (EFM) as a major protein source on growth, feed utilization and digestibility of bluefin tuna *Thunnus thynnus*. In the first experiment (trial 1), juvenile bluefin tuna (initial body weight 0.68 g) were randomly stocked into two experimental tanks and fed two experimental diets for 15 days. The two diets are EFM based diet (75 %) and sand lance (SL) as a raw fish feed. At the end of feeding trial, weight gain was not significantly different between fish fed EFM or SL. Feed intake was higher in fish fed SL diet than fish fed EFM. Feed conversion ratio was higher in fish fed SL than fish fed EFM. The survival was higher in EFM group than SL group. The pepsin and lipase activities were significantly higher in fish fed SL than fish fed EFM. The contents of omega 3 and 6 of fish carcass were higher in fish fed EFM than fish fed SL. In the second experiment (trial 2), juvenile bluefin tuna were randomly stocked into two experimental tanks and fed two experimental diets for 14 days. The two diets are EFM based diet (75 %) and sardine fish meal based diet (FM) (75 %). At the end of feeding trial, weight gain was higher in fish fed EFM than fish fed SL. Feed intake was higher in fish fed FM than fish fed EFM. Feed conversion ratio was higher in fish fed FM than fish fed EFM. The pepsin activity was higher in fish fed EFM than fish fed FM.

Study in the chapter 3 was conducted to estimate optimum dietary DHA oil level and replacement level of EFM by sardine fish meal for juvenile bluefin. The four diets are 1) EFM75 in which 75 % EFM and 4 % DHA oil were applied, 2) EFM60 in which 60 % EFM and 15 % sardine fish meal were included, 3) DHA 2 in which 2 % of DHA oil was included, and 4) SL as a raw fish feed. In a feeding trial, juvenile bluefin tuna (initial body weight 31.0 g) were randomly stocked into four experimental tanks (water capacity: 57 tons) and fed the experimental diets for 13 days. At the end of feeding trial, weight gain was higher in fish fed EFM75 and SL groups than fish fed DHA2 and EFM60 groups. Feed conversion ratio was

lower in fish fed EFM75 and DHA2 groups than EFM60 and SL groups. Survival was higher in fish fed the formulated diet groups (EFM75, EFM60 and DHA2) than fish fed SL. The trypsin and amylase activities were higher in fish fed the formulated diets than fish fed SL. Pepsin and lipase activities were significantly higher in fish fed SL than those fed other diets.

In Chapter 4, digestibility of the four diets in Chapter 3 were determined. Tuna feces were collected by both methods (cage and dissection). In the cage methods, protein digestibility was higher in fish fed SL than those of other groups, and the lowest protein digestibility was observed in FM75. In the dissection methods, the protein digestibility was higher in EFM75 than those of other groups, and the lowest was observed in EFM60. Protein and dry matter of digestibility were higher in feces collected by cage than feces collected by dissection. *In vitro* digestibility of pepsin was compared among nine protein sources for screening of the major protein sources in tuna feed. In the protein digestibility, high values were observed in EFM (92 %) followed by wheat gluten (90 %), and low values were observed in sardine fish meal (57 %) followed by poultry meal (55 %) and soybean meal (43 %).

In summary, the studies clearly indicate that (1) dietary EFM can effectively increase growth and digestive enzyme activity (2) dietary sardine fish meal can be used up to 10 % in diets and (3) optimum dietary DHA oil level would be approximately 3% in diets for juvenile bluefin tuna. All the results in the studies indicated that EFM is an excellent protein source that can be used for juvenile bluefin tuna.

LIST OF FIGURES

Figure 1. Protein sources (fish meal, enzyme-treated fish meal-1 & 2, low temperature fish meal and squid meal: from top left to bottom right) for the main protein source in diet for juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i>	5
Figure 2. An enzymatic hydrolysis of fish protein to make enzyme-treated fish meal (Kristinsson et al., 2000)	11
Figure 3. Rearing tank (water capacity; 57 tons) for juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i>	21
Figure 4. Growth performance of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 15 days (Trial 1)	35
Figure 5. Growth performance of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 14 days (Trial 2)	36
Figure 6. Digestive enzyme activities of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 15 days (Trial 1)	37
Figure 7. Digestive enzyme activities of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 14 days (Trial 2)	38
Figure 8. Biological assessment of digestive organs and condition factor for juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 15 days (Trial 1)	39
Figure 9. Biological assessment of digestive organs and condition factor for juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 14 days (Trial 2)	40
Figure 10. Rearing tank (water capacity; 57 tons) for juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i>	45
Figure 11. Installation of cage for catching the juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i>	46

Figure 12. Measurement of fish weight (g) (top left) and total length (cm) (top right), and dissection of the experimental fish (bottom left and right)	47
Figure 13. Growth performance of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 13 days	56
Figure 14. Biological assessment of digestive organs and condition factor for juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets	57
Figure 15. Digestive enzyme activities for digestive organ of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 13 days	58
Figure 16. Feces in tuna intestine, and fecal collection for juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> by dissection	62
Figure 17. The cage in rearing tank for fecal collection from juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> (left) and feces sample (right)	63
Figure 18. The feeds residues in the stomach of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed EFM75 and SL (% of dry matter)	74
Figure 19. The feeds residues in the intestine of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed EFM75 and SL (% of dry matter)	75
Figure 20. Apparent digestibility coefficients (ADC) of protein and dry matter in experimental diets for juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> by dissection fecal collection method (% of ADC)	76
Figure 21. Apparent digestibility coefficients (ADC) of protein and dry matter experimental diets for juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> by dissection fecal collection method (% of ADC)	76
Figure 22. The <i>in vitro</i> pepsin digestibility of nine protein (EFM: enzyme treated fish meal, FM: sardine fish meal, LT: low temperature fish meal, MM: meat meal, FE: feather meal, PM: poultry meal, SM: soybean meal, SPC: soyprotein	

concentrate, WG: wheat gluten) sources in diets for juvenile bluefin tuna
Thunnus thynnus (% of pepsin digestibility) 77

LIST OF TABLES

Table 1. Proximate composition of EFM (enzyme treated fish meal), LT (low temperature fish meal) and SM (squid meal) for juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> (% , dry matter)	6
Table 2. Ingredient information of EFM (enzyme treated fish meal), LT (low temperature fish meal) and SM (squid meal) for juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i>	7
Table 3. Essential and non-essential amino acid composition of EFM (enzyme treated fish meal), LT (low temperature fish meal) and SM (squid meal) for bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i>	8
Table 4. Fatty acid compositions of EFM (enzyme treated fish meal), LT (low temperature fish meal) and SM (squid meal) for bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i>	9
Table 5. Molecular weight distribution of enzyme-treated fish meal (% of peptide) (CPSP 90, sopropeche, France)	12
Table 6. Fatty acid composition of three lipid sources (% , in lipid)	14
Table 7. The vitamin requirements of fishes, and vitamin mixture formulation for bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i>	15
Table 8. The mineral requirements of fishes and mineral mixture formulation for bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i>	16
Table 9. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets for juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i>	18
Table 10. Essential and non-essential amino acid composition of the experimental diets for juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> (% of protein)	19
Table 11. Fatty acid composition of experimental diets for juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> (% in lipid)	20

Table 12. Growth performance of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 15 (Trial 1) and 14 days (Trial 2)	29
Table 13. Proximate composition of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 15 (Trial 1) and 14 days (Trial 2) (% in carcass)	30
Table 14. Biological assessment of digestive organs of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 15 (Trial 1) and 14 days (Trial 2)	31
Table 15. Digestive enzyme activities of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 15 (Trial 1) and 14 days (Trial 2) (U/mg protein)	32
Table 16. Essential and non-essential amino acid composition of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 15 (Trial 1) and 14 days (Trial 2) (% of protein)	33
Table 17. Fatty acid composition of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 15 (Trial 1) and 14 days (Trial 2) (% in lipid)	34
Table 18. Formulation and proximate composition of the experimental diets for juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i>	42
Table 19. Essential and non-essential amino acid composition of the experimental diets for juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i>	43
Table 20. Fatty acid composition of the experimental diets for juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i>	44
Table 21. Growth performance of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> (initial mean body weight: 31.0 ± 12.5 g) fed the experimental diets for 13 days	50
Table 22. Proximate composition of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 13 days	51
Table 23. Biological assessment of digestive organs of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 13 days	52

Table 24. Digestive enzyme activities of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 13 days (U/mg protein)	53
Table 25. Essential and non-essential amino acid composition of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 13 days	54
Table 26. Fatty acid composition of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 13 days	55
Table 27. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets for juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> (% , dry matter)	60
Table 28. Proximate composition of feed ingredients for <i>in vitro</i> pepsin digestibility of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> (% , dry matter)	66
Table 29. The feeds residues in the stomach and intestine of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> (% of dry matter)	69
Table 30. Apparent digestibility coefficients (ADC) of the experimental diets for juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> by cage fecal collection method (% , ADC)	70
Table 31. Apparent digestibility coefficients (ADC) of experimental diets for juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> by dissection fecal collection method (% , ADC)	71
Table 32. <i>In vitro</i> digestibility of protein ingredients for juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> (% of digestibility)	72
Table 33. Digestive enzyme activities of juvenile bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed EFM75 (U/mg protein)	73

CHAPTER 1. 서론

참다랑어(*Thunnus thynnus*)는 대표적인 회유성 어종으로 체중은 최대 500 kg까지 성장하는 고부가가치 어종이다(Collette and Nauen, 1983). 참다랑어는 주로 어획을 통해 공급되는데 어족자원 보호를 위해 ICCAT (International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas), IOTC (Indian Ocean Tuna Commission), WCPFC (Western and Central Pacific Fisheries Commission), IATTC (Inter-American Tropical Tuna Commission)에서 연간 어획량을 규제하고 있다(FAO, 2011). 참다랑어를 안정적으로 공급하고자 양식에 대한 필요성이 대두되었다. 그 중 참다랑어의 최대 소비국인 일본에서 활발한 연구가 진행되었다. 일본의 참다랑어 양식에 관한 연구는 1970년도에 시작되어 1979년도에는 자연산 친어로부터 채란에 성공함으로써 본격적인 양식이 시작되었다(Miyashita et al., 2002). 이후 산란유도와 종묘생산기술을 통해 2002년도부터는 완전양식이 가능하게 되었다(Sawada et al., 2005). 한국은 일본에 이어 세계에서 두 번째로 참다랑어 완전양식에 성공하였다(NFRDI, 2015). 그러나, 전 세계적으로 참다랑어 배합사료와 관련된 영양학적 연구는 조단백질과 조지질(Biswas et al., 2009a), 탄수화물(Biswas et al., 2009b), vitamin C 요구량(Biswas et al., 2013) 외에는 미흡한 실정이다.

어분은 조단백질함량이 60 - 75 %로 높고 필수아미노산과 DHA (Docosahexaenoic Acid), EPA (Eicosapentaenoic Acid)를 비롯한 필수지방산이 풍부하며 미지성장인자(unknown growth factors)로 인해 어류 사료 내 주 단백질원으로 사용된다(Miles and Chapman, 2015). 다랑어류는 어분에 대한 소화율이 낮은 것으로 알려져 있다(Carter et al., 1999). 치어기 참다랑어를 대상으로 진행된 연구에서 어분이 사료 내 53 % 사용된 배합사료를 급이한

실험구의 성장률은 생사료(까나리)구 보다 유의적으로 낮았는데 그 이유는 어분의 가공과정에서 발생하는 단백질의 변성으로 인한 소화율 저하가 원인이었던 것으로 보고되었다(Takii et al., 2007a).

효소처리어분(Enzyme-treated Fish Meal; EFM)은 어류를 가공하는 과정에서 발생하는 부산물을 papain, pepsin, trypsin 등의 천연소화효소와 반응시켜 제조된다(Je et al., 2009; Hsu, 2010; Ngo et al., 2010). 효소처리어분은 저분자 단백질의 함량이 높아 어류 사료 내 높은 이용효율을 보이는 것으로 알려져 있다(Neklyudov et al., 2000; Chalamaiah et al., 2012). Ji et al. (2008)은 치어기 참다랑어를 대상으로 효소처리어분을 주 단백질원으로 사용하여 제작한 사료와 생사료의 사육효능을 비교한 연구에서 효소처리어분구가 우수한 효율을 보여 참다랑어 사료 내 주 단백질원으로써 효소처리어분의 우수성을 보고하였다.

본 연구는 치어기 참다랑어 배합사료 개발을 위한 기초연구의 일환으로 Chapter 2, 3에서 참다랑어 사료 내 효소처리어분의 이용가능성을 재확인하고 더 나아가 일반어분의 효소처리어분 부분대체 가능성에 대해 조사하였다.

DHA는 해산어의 필수지방산으로 어류의 성장과 생존율에 중요한 요소로 알려져 있다(Bell et al., 1986; Watanabe et al., 1989; Takeuchi et al., 1990; Teshima et al., 1992). 참다랑어의 체내 DHA함량은 다른 어종에 비해 비교적 높은 것으로 보고되었다(Hepburn et al., 1986; Aubourg et al., 1990; Sawada et al., 1993; Saito et al., 1995). 참다랑어의 정확한 DHA 요구량은 규명되지 않았으나 일반적으로 참다랑어용 배합사료에는 DHA 함량이 높은 고가의 연어난유(salmon egg oil)와 가다랑어유(bonito oil)가 지질원으로 사용된다(Ji et al., 2008). 참다랑어의 생리적 특성을 고려하여 Chapter 2와 3의 실험사료 내 지질원으로 DHA유가 사용되었다. DHA유는 DHA를 90 % 이상 함유하고 있는 고농도 농축유다. 명태간유와

비교하여 약 100배 정도 비싼 가격에 거래되는 고가의 원료로써 실험사료 단가의 약 70 %를 차지하는 것으로 조사되었다. Chapter 3에서는 사료의 경제성을 고려하여 치어기 참다랑어 사료 내 DHA유의 적정 첨가비율을 조사하였다.

원료 소화율 평가는 양어사료원료 개발에 있어서 가장 기초적이고 중요한 요소로 알려져 있다(Allan et al., 2000). 각 원료에 대한 소화율을 토대로 제조된 배합사료는 해당 어류의 원활한 성장을 기대 할 수 있을 뿐만 아니라 불필요한 원료의 사용을 절감하여 사료의 경제성을 증가 시킬 수 있다(Lee, 2002). 그러나 참다랑어를 대상으로 진행된 소화율연구는 매우 미흡한 실정이다. Chapter 4는 치어기 참다랑어를 대상으로 한 사료의 소화율을 조사하고자 *in vivo* 소화율과 9가지 단백질원에 대한 *in vitro* pepsin 소화율, 부화 후 경과일에 따른 소화효소 활성을 조사하였다.

1.1 적정 단백질원

참다랑어 사료 내 적정 단백질원료를 찾기 위해 4가지 원료(효소처리어분 2종, 저온처리어분, 오징어분)를 예비 후보군으로 선정하고 영양소 함량을 분석하였다 (Fig. 1).

1) 효소처리어분 2종

: 선행연구를 통해 참다랑어 사료 내 주 단백질원으로 사용 가능성이 보고되었다. 효소처리어분은 종류에 따라 이용률이 다른 것으로 보고되어 2가지 종류의 원료를 선정하였다.

2) 저온처리어분(Low Temperature fish meal; LT)

: 저온처리어분은 비교적 낮은 온도(60 – 70 °C)에서 제조된 원료로 일반어분(100 °C 이상에서 제조)에 대한 낮은 이용률을 보이는 참다랑어의 생리적 특성을 고려하여 선정하였다.

3) 오징어분(Squid Meal; SM)

: 오징어는 참다랑어의 주요 먹이로 기호도가 매우 높은 것으로 알려져 있다.

위 4가지 단백질원과 정어리 어분의 일반성분함량, 제조방법 및 아미노산 함량 정보는 Table 1, Table 2, Table 3에 각각 나타내었다. 조단백질 함량은 SM이 88 %로 가장 높았고, 조지질 함량은 EFM 2가 12.6 %로 가장 높았다. 필수아미노산의 함량은 LT의 isoleucine, leucine, lysine, valine 함량이 다른 원료와 비교하여 더 높았다. SM의 arginine과 histidine 함량은 타 원료보다 더 높았다. 5가지 원료의 지방산 조성은 Table 4에 나타내었다. DHA의 함량은 EFM 2가 가장 높았으며, EFM 1, FM, LT, SM 순으로 나타났다. Omega-3 지방산의 함량은 SM이 26.5 %로 가장 높았다. Omega-6 지방산의 함량은 EFM 2가 14.4 %로 가장 높은 값을 보였다.



Figure 1. Protein sources (fish meal, enzyme-treated fish meal-1 & 2, low temperature fish meal and squid meal: from top left to bottom right) for the main protein source in diet for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus*

Table 1. Proximate composition of EFM (enzyme treated fish meal), LT (low temperature fish meal) and SM (squid meal) for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* (% , dry matter)

Ingredients	Crude protein	Crude lipid	Ash	Moisture
EFM 1	70.2	12.0	8.50	2.30
EFM 2	78.8	12.6	7.00	7.40
LT	78.0	9.60	13.7	9.30
SM	87.7	5.40	5.70	9.00

Table 2. Ingredient information of EFM (enzyme treated fish meal), LT (low temperature fish meal) and SM (squid meal) for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus*

Ingredients	Treatment type	Origin of country	Price (kg/won)	Fish species
EFM 1	Hydrolysis	Chile	4,500	Sardine
EFM 2	Hydrolysis	Peru	6,000	Salmon
LT	Heating (60 - 70 °C)	Denmark	4,000	Sardine
SM	Heating (100 °C)	France	4,500	Squid

Table 3. Essential and non-essential amino acid composition of EFM (enzyme treated fish meal), LT (low temperature fish meal) and SM (squid meal) for bluefin tuna *Thunus thynnus*

AAs	Protein sources				
	EFM 1	EFM 2	LT	SM	FM
EAA ¹					
Arginine	4.44	4.74	4.91	5.66	3.67
Histidine	2.00	2.35	2.25	3.63	2.82
Isoleucine	2.94	3.12	3.66	3.51	2.59
Leucine	4.71	5.08	5.89	5.76	4.27
Lysine	4.96	5.48	6.74	5.08	4.45
Phenylalanine	2.60	2.82	3.21	3.20	2.37
Threonine	2.76	3.18	3.34	3.48	2.51
Valine	3.35	3.88	4.07	3.42	3.09
NEAA ²					
Alanine	4.33	4.85	4.83	4.49	3.92
Aspartic acid	6.46	7.10	7.94	8.56	6.11
Glycine	5.72	6.86	4.73	6.20	4.52
Glutamic acid	9.27	9.82	10.9	10.5	7.57
Proline	3.85	4.07	3.52	4.74	3.09
Serine	2.78	3.03	3.05	3.33	2.35
Tyrosine	1.76	1.75	2.29	2.69	1.63
<i>Total crude protein (%)</i>	<i>70.2</i>	<i>78.8</i>	<i>78.0</i>	<i>87.7</i>	<i>73.0</i>

¹Essential amino acid

²Non-essential amino acid

Table 4. Fatty acid compositions of EFM (enzyme treated fish meal), LT (low temperature fish meal) and SM (squid meal) for bluefin tuna *Thunnus thynnus*

Fatty acids	Protein sources				
	EFM 1	EFM 2	LT	SM	FM
12:0	0.20	0.50	0.10	0.10	0.10
14:0	10.4	5.30	13.7	2.10	14.0
14:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15:0	0.90	0.40	1.20	0.70	1.00
16:0	33.5	30.5	38.7	40.6	40.3
16:1	3.70	2.20	3.40	0.40	4.80
17:0	0.70	0.40	0.70	2.10	0.90
17:1	0.10	0.10	0.10	0.00	0.00
18:0	8.40	12.1	6.60	17.4	10.9
18:1n9(OA)	15.6	18.5	8.90	1.20	4.50
18:2n6(LA)	6.00	14.2	1.50	0.20	0.30
18:3n3(LNA)	2.70	7.70	1.30	0.00	0.30
18:3n6	0.10	0.10	0.10	0.00	0.10
20:0	0.60	0.60	0.40	0.10	0.30
20:1	4.50	1.70	4.60	5.70	0.30
20:3n3	0.10	0.40	0.00	0.00	0.10
20:3n6	0.20	0.60	0.10	0.80	0.00
20:4n6(AA)	0.50	0.30	0.40	1.70	1.00
20:5n3(EPA)	4.70	1.80	6.30	8.30	12.2
22:0	0.20	0.30	0.10	0.00	0.10
22:1n9	0.80	0.20	1.20	0.00	0.00
22:6n3(DHA)	5.40	2.00	9.60	18.2	7.90
DHA/EPA	1.10	1.20	1.50	2.20	0.60
$\sum n-3^1$	12.9	11.5	17.3	26.5	20.4
$\sum n-6^2$	6.50	14.4	1.90	1.90	1.30
n-3/n-6	2.00	0.80	9.10	13.8	15.4
<i>Total crude lipid (%)</i>	<i>12.0</i>	<i>12.6</i>	<i>9.60</i>	<i>5.40</i>	<i>7.60</i>

¹Omega-3 fatty acid: 18:3n3, 20:5n3, 22:6n3

²Omega-6 fatty acid: 18:2n6, 20:4n

1.2 효소처리어분

효소처리어분은 어류 가공 공정에서 발생하는 부산물에 천연 소화효소를 첨가하여 제조된다(Je et al., 2009; Hsu, 2010; Ngo et al., 2010) (Fig. 2). 효소처리어분은 저분자 단백질을 다량 함유하고 있으며(Table 5), 양어사료 내 단백질원으로 각광받고 있다(Neklyudov et al., 2000; Chalamaiah et al., 2012;). 효소처리어분은 일반어분과 비교하여 높은 가격에 거래되기 때문에 섭이촉진제(feeding stimulants)로 소량 첨가되어 사용된다. 여러 어류를 대상으로 한 실험에서 효소처리어분은 높은 소화율을 보이는 것으로 보고되었으며, 참다랑어 사료 내 주단백질원으로써의 가능성도 보고되었다.

1.3 참다랑어 영양소 요구량

사양실험의 배합비 설정을 위해 참다랑어를 대상으로 진행된 유일한 선행연구에서는 참다랑어 사료 내 적정 조단백질(crude protein)과 조지질(crude lipid)의 요구량이 각각 61.9 %와 17.9 % 이며, vitamin C는 1.2 %, 탄수화물(carbohydrate)은 12.8 %로 조사되었다(Biswas et al., 2009a; 2009b; 2013).

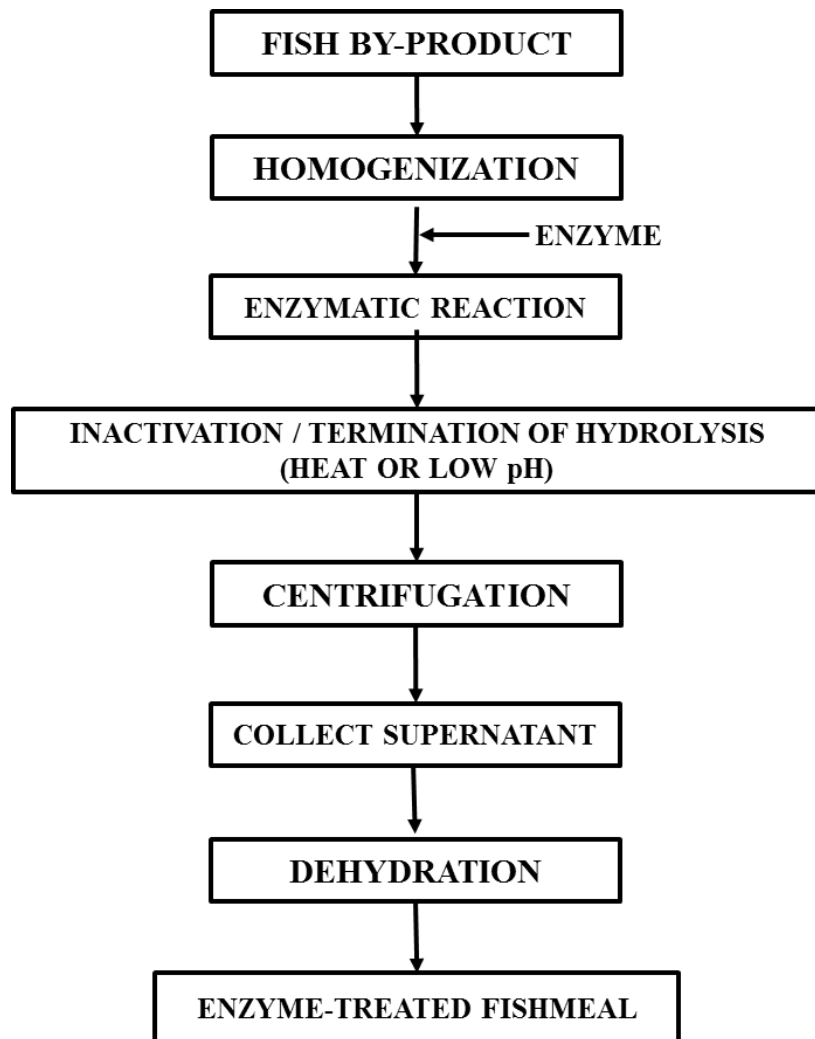


Figure 2. An enzymatic hydrolysis of fish protein to make enzyme-treated fish meal (Kristinsson et al., 2000)

Table 5. Molecular weight distribution of enzyme-treated fish meal (% of peptide)
(CPSP 90, sopropeche, France)

Molecular weight	%
< 500 Da	25.9
< 2000 Da	66.0
< 6000 Da	96.6
> 6000 Da	3.4
<i>Average molecular weight</i>	3000 Da

1.4 DHA

DHA는 해산어의 필수지방산으로 어류의 성장과 생존율에 중요한 요소로 알려져 있다(Bell et al., 1986; Watanabe et al., 1989; Takeuchi et al., 1990; Theshima et al., 1992). 참다랑어의 체내 DHA 함량은 다른 어종과 비교하여 높다고 보고되었다(Hepburn et al., 1986; Aubourg et al., 1990; Sawada et al., 1993; Saito et al., 1995). 참다랑어의 정확한 DHA 요구량은 규명되지 않았으나 참다랑어용 배합사료에는 DHA 함량이 높은 고가의 연어난유(salmon egg oil)와 가다랑어유(bonito oil)가 지질원으로 사용된다(Ji et al., 2008).

1.5 비타민·미네랄 혼합물

사료 내 비타민·미네랄혼합물은 참다랑어의 정확한 요구량이 밝혀지지 않아 방어(yellow tail) 등 타 어종의 요구량을 토대로 제작되었다.

Table 6. Fatty acid composition of three lipid sources (% , in lipid)

Fatty acids	Protein sources		
	Cod liver oil	Mixed oil ¹	DHA oil
12:0	0.10	0.00	0.00
14:0	5.00	2.90	0.00
14:1	0.00	0.00	0.00
15:0	0.20	1.10	0.00
16:0	28.9	18.1	0.20
16:1	2.30	1.40	0.00
17:0	0.20	0.10	0.00
17:1	0.00	0.00	0.00
18:0	10.5	6.00	0.10
18:1n9(OA)	13.2	8.50	0.10
18:2n6(LA)	22.9	15.8	0.10
18:3n3(LNA)	8.60	5.20	0.00
18:3n6	0.30	0.20	0.00
20:0	0.60	0.30	0.00
20:1	1.60	0.80	0.00
20:3n3	0.00	0.00	0.00
20:3n6	0.10	0.00	0.00
20:4n6(AA)	0.10	0.30	0.60
20:5n3(EPA)	3.10	3.30	4.40
22:0	0.40	0.20	0.00
22:1n9	0.30	0.10	0.00
22:6n3(DHA)	1.40	36.6	94.5
DHA/EPA	0.40	11.2	21.5
$\sum n-3^2$	13.1	45.1	98.9
$\sum n-6^3$	22.9	16.1	0.70
n-3/n-6	0.60	2.80	135.2
<i>Total crude lipid (%)</i>	<i>99.0</i>	<i>99.0</i>	<i>99.0</i>

¹Mixed cod liver oil and DHA oil same ratio (1:1)²Omega-3 fatty acid: 18:3n3, 20:5n3, 22:6n3³Omega-6 fatty acid: 18:2n6, 20:4n6

Table 7. The vitamin requirements of fishes, and vitamin mixture formulation for bluefin tuna *Thunnus thynnus*

Vitamins	Requirement					Mixture		
	Shimeno (1991) ¹	Halver (1972) ²	Barnett (1982) ³	Krossoy (2009) ⁴	Average	Modification	1% in diet	2% in diet
	<i>g/kg</i>	<i>g/kg</i>	<i>g/kg</i>	<i>g/kg</i>	<i>g/kg</i>	<i>g/kg</i>	<i>g/kg</i>	<i>g/kg</i>
A	0.00568	NR	NR	NR	0.00568	0.01704	1.704	0.852
B1	0.01120	0.01300	NR	NR	0.01210	0.03630	3.630	1.815
B2	0.01100	0.02300	NR	NR	0.01700	0.05100	5.100	2.550
B3	0.01200	0.17500	NR	NR	0.09350	0.28050	28.05	14.03
B5	0.03590	0.04500	NR	NR	0.04045	0.12135	12.14	6.068
B6	0.01170	0.01500	NR	NR	0.01335	0.04005	4.005	2.003
B12	0.00005	0.00002	NR	NR	0.00004	0.00011	0.011	0.006
C	0.12200	0.10000	NR	NR	0.11100	1.11000	222.0	111.0
D	NR	NR	0.05000	NR	0.05000	0.05000	5.000	2.500
E	0.11900	0.04500	NR	NR	0.08200	0.57400	114.8	57.40
K	NR	NR	NR	0.00500	0.00500	0.01500	1.500	0.750
Biotin	0.00670	0.00113	NR	NR	0.00391	0.00391	0.391	0.196
Folic acid (Folate)	0.00120	0.00800	NR	NR	0.00460	0.01380	1.380	0.690
Myoinositol	0.42300	0.35000	NR	NR	0.38650	1.15950	116.0	57.98
Choline	2.92000	0.70000	NR	NR	1.81000	5.43000	5.430	2.715
Cellulose	-	-	-	-	-	-	484.3	742.2
<i>Total</i>							1000	1000

¹Shimeno (1991) from Yellow tail

²Halver (1972) from Pacific salmon

³Barnett et al (1982) from Rainbow trout

⁴ Krossoy et al (2009) from Atlantic salmon

Table 8. The mineral requirements of fishes and mineral mixture formulation for bluefin tuna *Thunnus thynnus*

Minerals	Requirement				Mixture	
	<i>g/kg</i>	<i>Fish species</i>	<i>reference</i>	Modification	1% in diet	2% in diet
Magnesium (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0.60000	Rainbow trout	Shearer (1989)	0.60000	60.00	30.00
Phosphoric acid (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O)	6.00000	Atlantic salmon	Ketola (1975)	6.00000	390.0	195.0
Potassium (KCl)	2.50000	Hybrid tilapia	Shiau and Hsieh (2001)	2.50000	207.5	103.8
Iron (Ferric citrate)	0.19900	Red sea bream	Sakamoto and Yone (1987)	0.19900	19.90	9.950
Zinc (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	0.03000	Rainbow trout	Satoh et al (1987)	0.03000	3.000	1.500
Calcium (Ca-lactate)	6.50000	Blue tilapia	Robinson et al (1984)	6.50000	318.5	159.3
Copper (CuCl)	0.00350	Rainbow trout	Julshamn et al (1988)	0.00350	0.333	0.166
Iodine (KI)	0.00085	Chinook salmon	Roche et al (1966)	0.00085	0.085	0.043
Selenium (Na ₂ Se ₂ O ₃)	0.00027	Rainbow trout	Hilton et al (1980)	0.00027	0.027	0.013
Manganese (MnSO ₄ .H ₂ O)	0.01300	Rainbow trout	Ogino and Yang (1980)	0.01300	1.300	0.650
Cobalt (CoCl ₂ .6H ₂ O)	0.00053		Takeshi et al (1997)	0.00053	0.056	0.026
Cellulose				0.00000	0.000	500.3
<i>Total</i>					1000	1000

CHAPTER 2.

Dietary utilization of enzyme-treated fish meal in diets for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus*

2.1 재료 및 방법

2.1.1 실험사료

실험사료는 효소처리어분(EFM)과 일반어분(FM)을 각각 75 %씩 넣어 제조하였고, 사육효능을 비교하기 위해 참다랑어 양식에 주로 사용되는 까나리(sand lance: SL)가 대조구로 사용되었다(Table 9). 지질원으로 DHA 유(DHA concentrate oil, Comport, Korea)와 명태간유(cod liver oil, E-wha oil, Korea)를 각각 4 %씩 혼합하여 사용하였다. 비타민과 미네랄 혼합물은 자체 제작하여 사용하였다. 실험사료의 영양소 함량은 선행연구결과인 참다랑어의 조단백질과 조지질 요구량을 기초로 작성하였다. 실험사료의 제조는 파쇄기를 이용하여 모든 사료원을 미세한 분말로 만든 후, 각 사료조성표에 따라 측량하여 혼합하였다. 사료제작기(SP-50, Korea)를 이용하여 3 가지 크기(1, 1.5, 2mm)로 성형하였다. 제작된 실험사료는 건조대(24 h, 20 °C)에서 건조시킨 다음, 사료 공급 전까지 -20 °C 냉동고에 보관 후 실험에 사용되었다. 실험사료에 대한 아미노산과 지방산 조성은 Table 10 와 Table 11 에 각각 나타내었다.

Table 9. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus*

Ingredients	Experimental diets		
	EFM	FM	SL ¹
Enzyme treated fish meal ²	75.0	-	-
Fish meal (sardine) ³	-	75.0	-
Soy protein concentrate ⁴	8.00	8.00	-
Fish oil ⁵	8.00	8.00	-
Vitamin premixture ⁶	1.00	1.00	-
Mineral premixture ⁷	1.00	1.00	-
Taurine	1.50	1.50	-
Starch	4.50	4.50	-
Lecithin	1.00	1.00	-
* Proximate composition (% of dry matter)			
Crude protein	58.5	58.4	65.2
Crude lipid	17.2	17.5	10.3
Ash	5.04	8.30	7.53
Moisture	5.17	4.58	77.9

¹Sand lance, China

²CPSP, Sopropeche, France

³Orizon S.A, Chile

⁴Corp. Korea flavor, Korea

⁵Mixed by DHA concentrate oil (corp. Comport, Korea) and cod liver oil (corp. E-wha oil & fat Ind ,Korea)

⁶Vitamin premix (g kg⁻¹ of mixture): dry vitamin A acetate, 1.704; thiamine hydrochloride, 3.630; riboflavin 5'-phosphatate sodium, 5.100; niacinamide, 28.05; calcium D-pantothenate, 12.14; pyridixine hydrochloride, 4.005, vitamin B12 crystalline N, 0.011; ascorbic acid crystal, 222; dry vitamin D3, 5.000; dl-a-tocopherol, 114; Dry vitamin k1, 1.500; biotin-d, 0.391; folic acid, 1.380; myoinositol, 115; cellulose, 484

⁷Mineral premix (g kg⁻¹ of mixture): MgSO₄.7H₂O, 60.0; NaH₂PO₄.2H₂O, 390; KCl, 207.5; Ferric citrate, 19.9; ZnSO₄.7H₂O, 3.00; Ca-lactate, 318.5; CuCl, 0.333; KI, 0.085; Na₂Se₂O₃, 0.27; MnSO₄.H₂O, 1.300; CoCl₂.6H₂O, 0.056

Table 10. Essential and non-essential amino acid composition of the experimental diets for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* (% of protein)

AAs	Experimental diets		
	EFM	FM	SL
EAA ¹			
Arginine	3.19	4.01	4.01
Histidine	2.26	1.42	2.51
Isoleucine	2.53	2.54	2.93
Leucine	4.14	3.86	4.92
Lysine	4.48	3.75	5.26
Phenylalanine	2.22	1.57	2.75
Threonine	2.41	0.62	2.82
Valine	2.93	2.82	3.32
NEAA ²			
Alanine	3.41	3.02	3.87
Aspartic acid	5.49	3.09	6.88
Glycine	3.20	2.42	3.76
Glutamic acid	7.54	3.96	9.24
Proline	2.82	0.72	2.78
Serine	2.21	0.58	2.68
Tyrosine	1.57	0.42	1.91

¹Essential amino acid

²Non-essential amino acid

Table 11. Fatty acid composition of experimental diets for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* (% in lipid)

Fatty acids	Experimental diets		
	EFM	FM	SL
12:0	0.10	0.10	0.20
14:0	7.30	8.25	10.6
14:1	-	-	-
15:0	0.40	0.70	1.70
16:0	27.5	27.2	40.8
16:1	2.60	4.15	5.50
17:0	0.30	0.35	0.90
17:1	-	-	0.10
18:0	7.90	5.85	7.40
18:1n9(OA)	7.40	17.0	5.60
18:2n6(LA)	10.9	5.40	0.90
18:3n3(LNA)	3.10	2.15	0.90
18:3n6	0.10	0.10	0.10
20:0	0.30	0.30	0.20
20:1	1.00	5.01	1.80
20:3n3	-	-	-
20:3n6	-	0.19	0.10
20:4n6(AA)	0.30	0.40	0.30
20:5n3(EPA)	6.20	4.50	10.8
22:0	0.20	0.10	-
22:1n9	0.20	0.75	0.50
22:6n3(DHA)	23.7	15.9	10.9
DHA/EPA	3.80	3.53	1.00
$\sum n-3^1$	33.0	22.6	22.6
$\sum n-6^2$	11.2	5.80	1.20
n-3/n-6	2.90	3.90	19.0

¹Omega-3 fatty acid: 18:3n3, 20:5n3, 22:6n3

²Omega-6 fatty acid: 18:2n6, 20:4n6

2.1.2 실험어

실험 1 (trial 1)에 사용된 참다랑어(부화 후 47 일)는 제주도 서귀포시 남원읍에 위치한 제주수산연구소에서 실험에 사용하였으며, 사양실험은 연구소 내 참다랑어 전용 시설에서 진행되었다. 실험어는 2 주 동안 생사료와 배합사료를 공급하여 시험환경에 적응 할 수 있도록 순치시킨 후 사양시험에 이용되었다. 예비사육 후 참다랑어(초기평균무게: 0.68 g)는 총 2 개의 사육 수조(57 tons)에 각 50 마리씩 무작위로 선택하여 배치되었다(Fig. 3). 수조 내 용존산소 유지하기 위해 산소발생기와 액화산소 주입기를 설치하였고, 시험기간 동안 평균사육수온은 27.8 °C, 용존산소(dissolved oxygen)는 10.4 mg/L 으로 유지되었다. 사료는 1 일 7 회(06:00, 08:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00, 18:00 h)에 나누어 15 일간 반복공급 되었다. 실험 기간 중 2 일 1 회 자체 제작한 siphon 을 이용하여 사육수조 바닥의 이물질을 제거하였다.



Figure 3. Rearing tank (water capacity; 57 tons) for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus*

실험 2 (trial 2)에 사용된 참다랑어는 총 2 개의 사육수조(57 tons)에 15 마리씩 무작위로 선택하여 배치되었다. 시험기간 동안 평균사육수온은 25.6 °C, 용존산소는 9.76 mg/L 으로 유지 되었다. 사료는 14 일간 1 일 7 회(06:00, 08:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00, 18:00 h) 공급되었다.

2.1.3 실험어 무게측정

실험어의 무게측정은 사육실험 종료 후 실시하였고, 소화기관의 음식물을 제거하기 위해 측정 17 시간 전부터 절식시켰다. 최종무게 측정 후 5 마리의 참다랑어를 무작위로 선별하여 얼음물에 마취 시킨 후, 소화기관을 적출하였다. 적출된 소화기관은 증류수와 혼합하여 분쇄 한 후 원심분리를 거쳐 소화효소 활성분석에 사용되었다. 소화기관 적출 후 남은 어체(carass)는 일반성분분석에 사용되었다. 실험어의 성장률과 사료효율 관련 조사항목과 계산식은 다음과 같다.

성장률(WG; weight gain, %) = $100 \times (\text{final mean body weight} - \text{initial mean body weight}) / \text{initial mean body weight}$; 일간성장률(SGR; specific growth rate, %) = $[(\log_e \text{ final body weight} - \log_e \text{ initial body weight}) / \text{days}] \times 100$; 사료전환효율(FCR; feed conversion ratio) = $\text{dry feed fed} / \text{wet weight gain}$; 단백질이용효율(PER; protein efficiency ratio) = $\text{wet weight gain} / \text{total protein given}$; 사료섭이량(FI; feed intake, g) = $\text{dry feed fed} / \text{fish}$.

2.1.4 일반성분분석

사료원, 실험사료, 전어체에 대한 일반성분분석은 AOAC (1995) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125 °C, 3 h), 조회분은 직접회화로법(550 °C, 6 h), 단백질은 자동 조단백분석기 (Kjeltec System 2300, Sweden)로 분석되었으며, 지방은 Folch et

al. (1957)의 방법에 따라 Soxhlet 추출장치(Soxhlet Heater System C-SH6, Korea)를 이용하여 분석하였다.

2.1.5 간, 위, 장중량 및 비만도

실험어의 간, 위, 장을 각각 분리하여 체질량 대비 지수를 계산하였고, 체중과 전장을 이용해 비만도를 계산하였다. 조사항목의 계산식은 다음과 같다.

간중량지수(HSI; hepatosomatic indexes) = (liver weight * 100)/fish body weight;
위중량지수(SSI; stomasomatic indexes) = (stomach weight * 100)/fish body weight;
장중량지수(ISI; intestinesomatic indexes) = (intestine weight * 100)/fish body weight;
비만도(CF; condition factor, %) = (fish body weight / fish body length³) x 100

2.1.6 효소활성

실험어의 소화기관 내 총 5 가지 효소활성(pepsin, trypsin, chymotrysin, amylase, lipase)을 분석되었다. 소화기관의 수집을 위해 실험어는 24 시간 절식 후, 얼음물에 넣어 마취시켰다. 마취된 실험어의 복부를 절개하여 위, 장, 간을 적출하였다. 적출된 장기는 증류수와 혼합하여 조직균질기(tissue grinder)를 이용해 분쇄하였다. 분쇄된 샘플은 원심분리(4 °C, 10,000 G, 15 min)하여 상층액(supernatant)을 분리하여 분석에 사용되었다. 효소활성 분석에 앞서 샘플의 단백질 총량(total protein)을 Bradford, (1976)의 방법에 따라 분석되었다. Pepsin 활성은 Worthington (1991)의 방법에 따라 100 ul 샘플에 0.01N HCl 와 500 ul 반응액(2 % haemoglobin, 0.06 N HCl)을 넣어 반응(37 °C, 10 min) 시킨 후, 5 % TCA 1 ml 를 넣어 5 분간 반응시켰다. 원심분리(12,000 G, 5 min)후 UV spectrometer (280 nm)를 이용하여 활성을 측정하였다. Trypsin 활성은 Erlanger et al. (1961)의 방법에

따라 25 ul 샘플에 1.25 ml BAPNA solution (BAPNA 43.5 mg, DMSO 1 ml, 0.05M Tris-HCl)을 10 분간(37 °C) 반응시킨 후, 30 % acetic acid 1 ml 넣어 UV spectrometer (410 nm)를 이용하여 활성을 측정하였다. Chymotrypsin 활성은 Erlanger et al. (1961)의 방법에 따라 0.59 ml 반응액(0.1 mM SAPNA, 50 mM Tris-HCl, 20 mM CaCl₂)에 10 ul 샘플을 넣고 반응(25 °C)시킨 후 UV spectrometer (410 nm)를 이용하여 활성을 측정하였다. Amylase 활성은 Worthington (1991)의 방법에 따라 0.5 ml 샘플에 0.5 ml 반응액(1 % starch solution, 20 mM sodium phosphate, 6.0 mM NaCl)을 넣어 3 분간 반응시킨 후, 0.5 ml dinitrosalicylic acid 를 넣고 5 분간 반응시켜 UV spectrometer (540 nm)를 이용하여 활성을 측정하였다. Lipase 활성은 1.0 ml 의 샘플에 1.5 ml emulsion olive oil 와 1.5 ml 0.1 M tris-HCl buffer 를 넣고 6 시간(37 °C) 반응 시킨 후, 95 % ethyl alcohol 을 3 ml 넣었다. 0.01 N NaOH 을 적정(titration)하여 활성을 측정하였다.

2.1.7 아미노산

전처리하는 시료를 0.5 mm 이하로 분쇄하고 6N HCl 15 ml 를 첨가 후 dry oven (110 °C, 24 h)에서 반응시켰다. 분해된 시료는 water bath (55 °C)를 이용하여 2 회 감압농축 시킨 후, 25 ml volumetric flask 에 정용 하였다. 0.45 ul membrane filter 로 여과 후 희석하여 아미노산 분석기(Sykam amino acid analyzer S433, Germany)를 이용하였다.

2.1.8 지방산

추출된 지방 25 mg 을 0.5N NaOH methanol 1.5 ml 를 넣고 질소 충전 후, heating block (100 °C, 30 min)을 사용하여 가열하였다. 30 – 40 °C 로 식힌 후 hexane 1 ml 을

넣고 질소 충전 후, 30 초간 혼합기를 이용하여 혼합하였다. 포화생리식염수를 넣고 hexane 층의 지방산을 피펫으로 추출하였다. 무수황산나트륨을 추출한 hexane 층과 혼합 후 질소 충전하여 gas chromatography (Gas Agilent 6800GC, Agilent, U.S.A.)를 이용하였다.

2.1.9 사육수

사육실험 기간 동안 사양시험 수조에 대한 수온, 용존산소(dissolved oxygen: DO)와 수소이온지수(pH)를 1 일 2 회 측정하였다. 측정은 매 회 실험수조의 동일한 위치에서 진행되었으며, DO 와 pH 는 YSI 600QS (YSI)를 이용하여 측정하였다.

2.1.10 통계학적 분석

분석결과는 SPSS (Version 12.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA 로 통계 분석 하였다. 데이터 값의 유의차는 T-Test 를 사용하여 평균간의 유의성($P < 0.05$)을 비교하였다. 데이터는 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석하였다.

2.2 결과

[Trial 1]

15 일간 사양시험 결과는 Table 12 에 나타내었다. EFM 구와 SL 구의 최종평균무게, 성장률, 일간성장률은 큰 차이를 보이지 않았다. 사료전환효율은 EFM 가 0.77 로 SL 구(1.44) 보다 낮았다. 단백질이용효율은 EFM 가 2.24 로 SL 구(1.10) 보다 높았다. 사료섭이량은 SL 구(17.2 g)가 EFM 구(8.87 g) 보다 높았다. 생존율은 EFM 구가 56 %로 SL 구(46 %) 보다 높았다(Fig. 4). 전어체 분석결과는 Table 13 에 나타내었다. 전어체의 조단백질, 조지질, 회분함량은 두 실험구간 차이를 보이지 않았다. 장기 체질량 대비 지수와 비만도 측정 결과는 Table 14 에 나타내었다. 간중량지수는 EFM 구(3.16)가 SL 구(1.95)보다 유의적으로 높았다. 위, 장중량지수와 비만도는 두 실험구간 유의적인 차이를 보이지 않았다. 소화기관의 효소활성 분석 결과는 Table 15 에 나타내었다. Pepsin 과 lipase 활성은 SL 구가 EFM 구와 비교하여 유의적으로 높은 값을 나타내었다(Fig. 6). 전어체의 아미노산조성에 대한 분석 결과는 Table 16 에 나타내었다. 모든 항목에서 두 실험구간 유의적인 차이를 보이지 않았다. 전어체의 지방산조성에 대한 분석 결과는 Table 17 에 나타내었다. SL 구의 palmitic acid (C16:0)와 palmitoleic acid (C16:1)는 EFM 구와 비교하여 유의적으로 높은 값을 보였다. EFM 구의 myristic acid (C14:0), oleic acid (C18:1n9), EPA (C18:2n6), erucic acid (C22:1n9), DHA (C22:6n3)는 SL 구와 비교하여 유의적으로 높은 값을 나타냈다. Omega-3 와 Omega-6 지방산함량은 EFM 구가 SL 구와 비교하여 유의적으로 높은 값을 나타냈다.

[Trial 2]

14 일간 사양시험 결과는 Table 12 에 나타내었다. 흥미롭게도 최종평균무게는 EFM 구(28.5)가 FM 구(20.1) 보다 크게 높았고, 성장률 또한 EFM 구가 165 %로 FM 구(90 %) 보다 높았다. 사료전환효율은 EFM 구(1.21)가 SL 구(2.85)와 비교하여 낮았다. 단백질이용효율은 EFM 구가 1.42 로 SL 구(0.60)보다 높았다. 사료섭이량은 FM 구가 33.9 g 로 EFM 구(26.9 g)보다 높았다. 생존율은 EFM 구가 87 %로 FM 구(73 %)보다 높았다(Fig. 5). 일반성분조성에 대한 분석 결과는 Table 13 에 나타내었다. 전어체의 조단백질, 조지질, 회분함량은 두 실험구간 차이를 보이지 않았다. 장기 체질량 대비 지수와 비만도 결과는 Table 14 에 나타내었다. 간중량 지수는 FM 구가 EFM 구와 비교하여 유의적으로 높았다. 위, 장중량지수는 두 실험구간 유의적인 차이를 보이지 않았다. 비만도는 두 실험구간 큰 차이를 보이지 않았다. 소화기관의 효소활성 분석 결과는 Table 15 에 나타내었다. Pepsin 활성은 EFM 구가 FM 구와 비교 하여 유의적으로 높았다. Trypsin, chymotrypsin, amylase 활성은 두 실험구간 큰 차이를 보이지 않았다. Lipase 활성은 EFM 구가 FM 구와 비교 하여 높은 경향을 보였다(Fig. 7). 전어체의 아미노산 함량 분석결과는 Table 16 에 나타내었다. FM 구의 histidine 함량은 EFM 구와 비교하여 유의적으로 높았다. EFM 구의 아미노산 함량은 FM 구와 비교하여 전체적으로 높은 경향을 보였다. 전어체의 지방산 함량 분석결과는 Table 17 에 나타내었다. FM 구는 decanoic acid (C17:0), erucic acid (C18:0), linolenic acid (C18:3n3), erucic acid (C22:1n9)에서 유의적으로 높은 값을 보였다. EFM 구는 palmitic acid (C16:0), linoleic acid (C18:1n9), linoleic acid (C18:2n6)에서 유의적으로 높은 값을 보였다. Omega-3 지방산의 총 함량은 두 실험구간 큰

차이를 보이지 않았다. Omega-6 지방산의 총 함량은 EFM 구가 유의적으로 높은 값을 보였다.

Table 12. Growth performance of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 15 (Trial 1) and 14 days (Trial 2)

Dietary treatment	FBW ¹	WG ²	SGR ³	FCR ⁴	PER ⁵	FI ⁶	Survival (%)
<i>Trial 1</i>							
SL	12.7±4.70	1760	19.5	1.44	1.10	17.2	46.0
EFM	12.2±3.75	1691	19.2	0.77	2.24	8.87	56.0
<i>Trial 2</i>							
FM	20.1±6.50	89.7	4.27	2.85	0.60	33.9	73.3
EFM	28.5±8.02	165.1	6.52	1.21	1.42	26.9	86.7

¹Final mean body weight (g)

²Weight gain (%)

³Specific growth rate (%)

⁴Feed conversion ratio

⁵Protein efficiency ratio

⁶Feed intake (g)

Table 13. Proximate composition of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 15 (Trial 1) and 14 days (Trial 2) (% in carcass)

Dietary treatment	Crude protein	Crude lipid	Ash	Moisture
<i>Trial 1</i>				
SL	72.6±2.99	14.2±2.77	21.4±3.79	75.5±5.74
EFM	71.3±2.35	14.3±4.12	18.5±2.93	72.6±4.88
<i>Trial 2</i>				
FM	69.3±1.40	14.8±1.03	14.4±1.03	75.0±1.46
EFM	72.2±2.37	15.2±0.17	15.2±0.17	75.9±2.98

Table 14. Biological assessment of digestive organs of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 15 (Trial 1) and 14 days (Trial 2)

Dietary treatment	HSI ¹	SSI ²	ISI ³	CF ⁴
<i>Trial 1</i>				
SL	1.95±0.33 ^b	4.59±2.03	1.44±0.97	9.88±0.53
EFM	3.16±0.83 ^a	6.45±0.69	1.19±0.39	10.7±0.86
<i>Trial 2</i>				
FM	8.00±1.57 ^a	1.38±0.20	1.19±0.14	10.2±2.13
EFM	6.01±0.94 ^b	1.03±0.36	1.04±0.25	12.0±1.08

Values are presented as mean ±SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$)

¹Hepatosomatic index = (liver weight x 100) / fish body weight

²Stomachsomatic index = (stomach weight x 100) / fish body weight

³Intestinesomatic index = (intestine weight x 100) / fish body weight

⁴Condition factor = (fish body weight / fish body length³) x 100

Table 15. Digestive enzyme activities of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 15 (Trial 1) and 14 days (Trial 2) (U/mg protein)

Dietary treatment	Pepsin	Trypsin	Chymotrypsin	Amylase	Lipase
<i>Trial 1</i>					
SL	1.72±0.14 ^a	0.77±0.47	0.22±0.11	1.24±0.42	18.4±1.27 ^a
EFM	1.14±0.24 ^b	1.11±0.42	0.28±0.09	2.28±0.84	15.7±1.15 ^b
<i>Trial 2</i>					
FM	2.46±1.20 ^b	3.19±1.53	0.68±0.27	0.33±0.18	23.9±6.17
EFM	5.70±0.85 ^a	2.22±0.40	0.42±0.09	0.26±0.09	26.0±5.35

Values are presented as mean ±SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$)

Table 16. Essential and non-essential amino acid composition of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 15 (Trial 1) and 14 days (Trial 2) (% of protein)

AAs	Trial 1		Trial 2	
	SL	EFM	FM	EFM
EAA ¹				
Arginine	4.62	4.63	4.40	4.52
Histidine	3.55	3.12	4.14 ^a	3.62 ^b
Isoleucine	3.14	3.02	3.10	3.22
Leucine	5.05	4.89	4.98	5.32
Lysine	5.70	5.53	5.57	5.96
Phenylalanine	2.72	2.64	2.67	2.82
Threonine	3.04	2.95	2.94	3.25
Valine	3.61	3.52	3.54	3.73
NEAA ²				
Alanine	4.15	4.08	4.03	4.06
Aspartic acid	6.82	6.59	6.71	7.39
Glycine	4.31	4.25	4.21	4.67
Glutamic acid	9.47	9.06	9.16	9.92
Proline	3.15	3.00	2.91	3.13
Serine	2.76	2.68	2.62	2.94
Tyrosine	1.94	1.91	1.85	2.06

¹Essential amino acid

²Non-essential amino acid

Table 17. Fatty acid composition of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 15 (Trial 1) and 14 days (Trial 2) (% in lipid)

Fatty acids	Trial 1		Trial 2	
	SL	EFM	FM	EFM
12:0	0.20	0.10	-	0.21
14:0	3.42 ^b	4.35 ^a	4.59	4.21
14:1	0.60	0.52	0.40	0.49
15:0	0.34	0.32	0.63	0.38
16:0	24.7 ^a	17.2 ^b	15.8 ^b	17.6 ^a
16:1	8.25 ^a	5.96 ^b	4.68	5.09
17:0	2.02	1.02	1.52 ^a	1.15 ^b
17:1	1.28	1.08	0.98	1.02
18:0	6.05	5.25	6.18 ^a	5.15 ^b
18:1n9(OA)	10.3 ^b	17.2 ^a	15.8 ^b	17.5 ^a
18:2n6(LA)	1.00 ^b	6.24 ^a	5.02 ^b	6.08 ^a
18:3n3(LNA)	2.12	1.05	2.15 ^a	1.58 ^b
18:3n6	1.02	1.08	0.98	0.85
20:0	0.20	0.32	0.60	0.52
20:1	0.92	1.06	1.21	1.12
20:3n3	0.31	0.10	0.21	0.23
20:3n6	0.23	0.12	0.23	0.12
20:4n6(AA)	0.80	0.97	0.38	0.58
20:5n3(EPA)	3.08 ^b	5.18 ^a	4.89	5.09
22:0	0.22	0.13	0.22	0.12
22:1n9	1.68 ^b	5.06 ^a	7.25 ^a	5.89 ^b
22:6n3(DHA)	14.2 ^b	19.1 ^a	21.0	20.5
DHA/EPA	4.61	3.68	4.89	5.09
∑n-3 ¹	19.4 ^b	25.3 ^a	28.0	27.2
∑n-6 ²	3.60 ^b	7.21 ^a	5.40 ^b	6.66 ^a
n-3/n-6	5.39 ^a	3.50 ^b	5.19 ^a	4.08 ^b

¹Omega-3 fatty acid: 18:3n3, 20:5n3, 22:6n3

²Omega-6 fatty acid: 18:2n6, 20:4n6

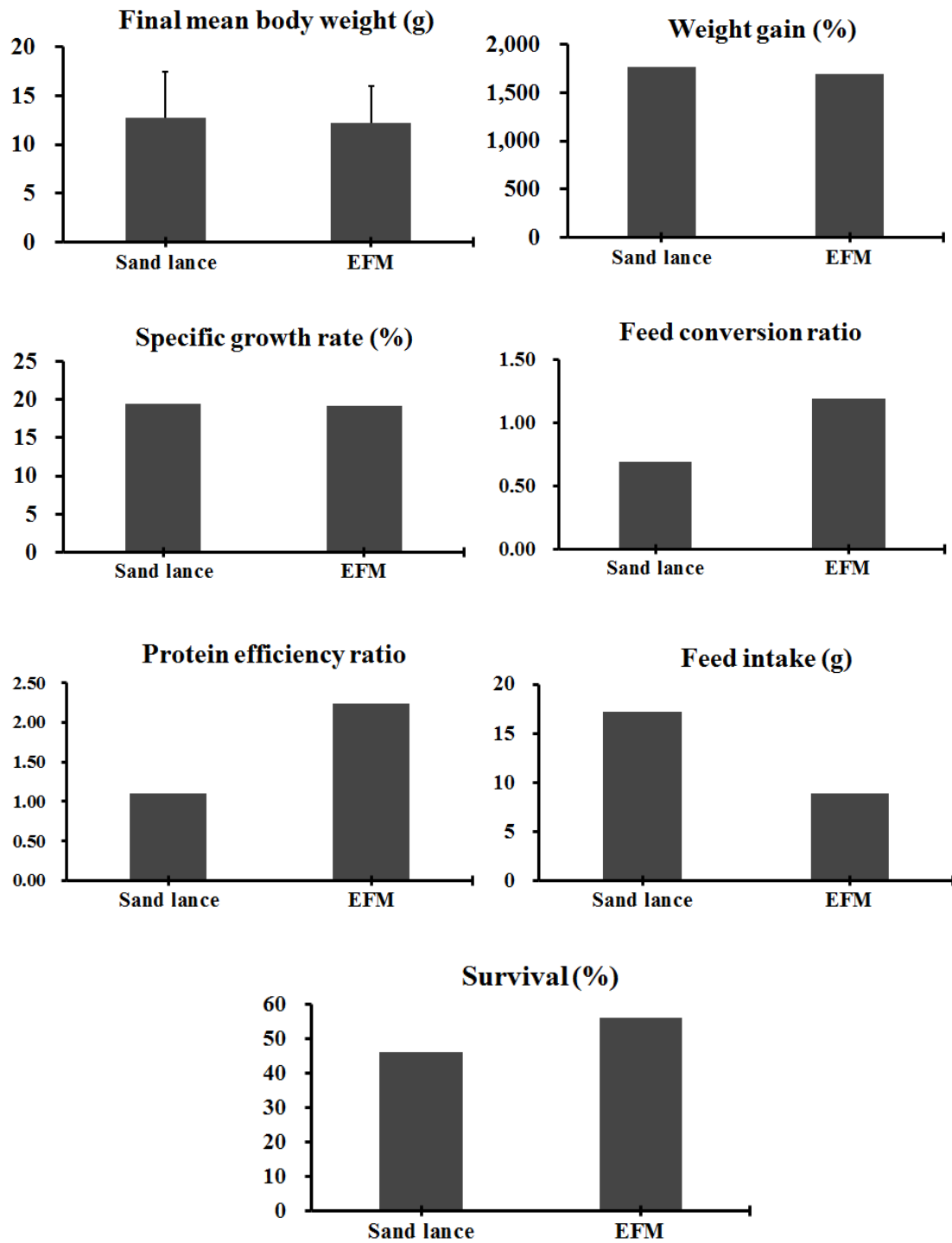


Figure 4. Growth performance of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 15 days (Trial 1)

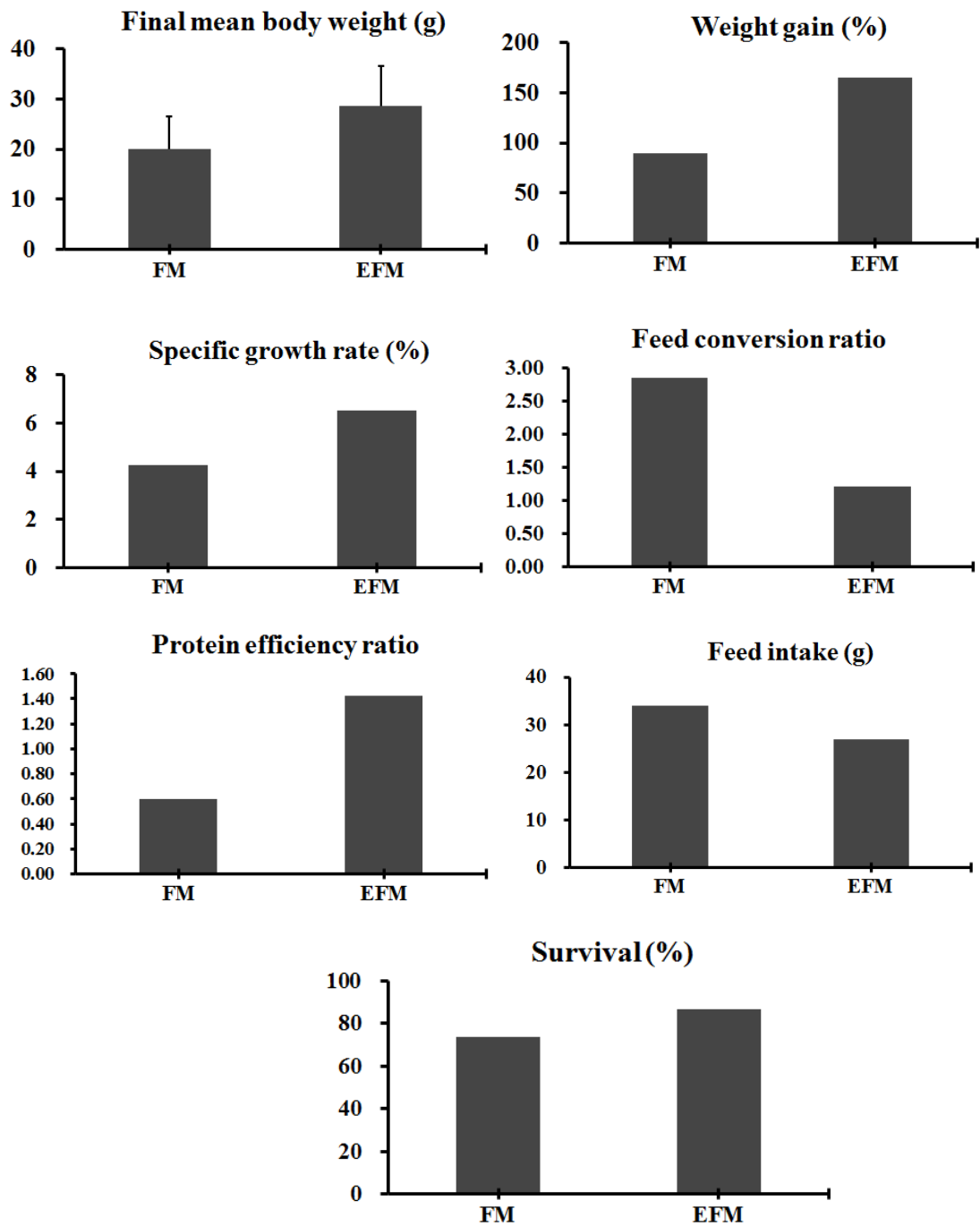


Figure 5. Growth performance of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 14 days (Trial 2)

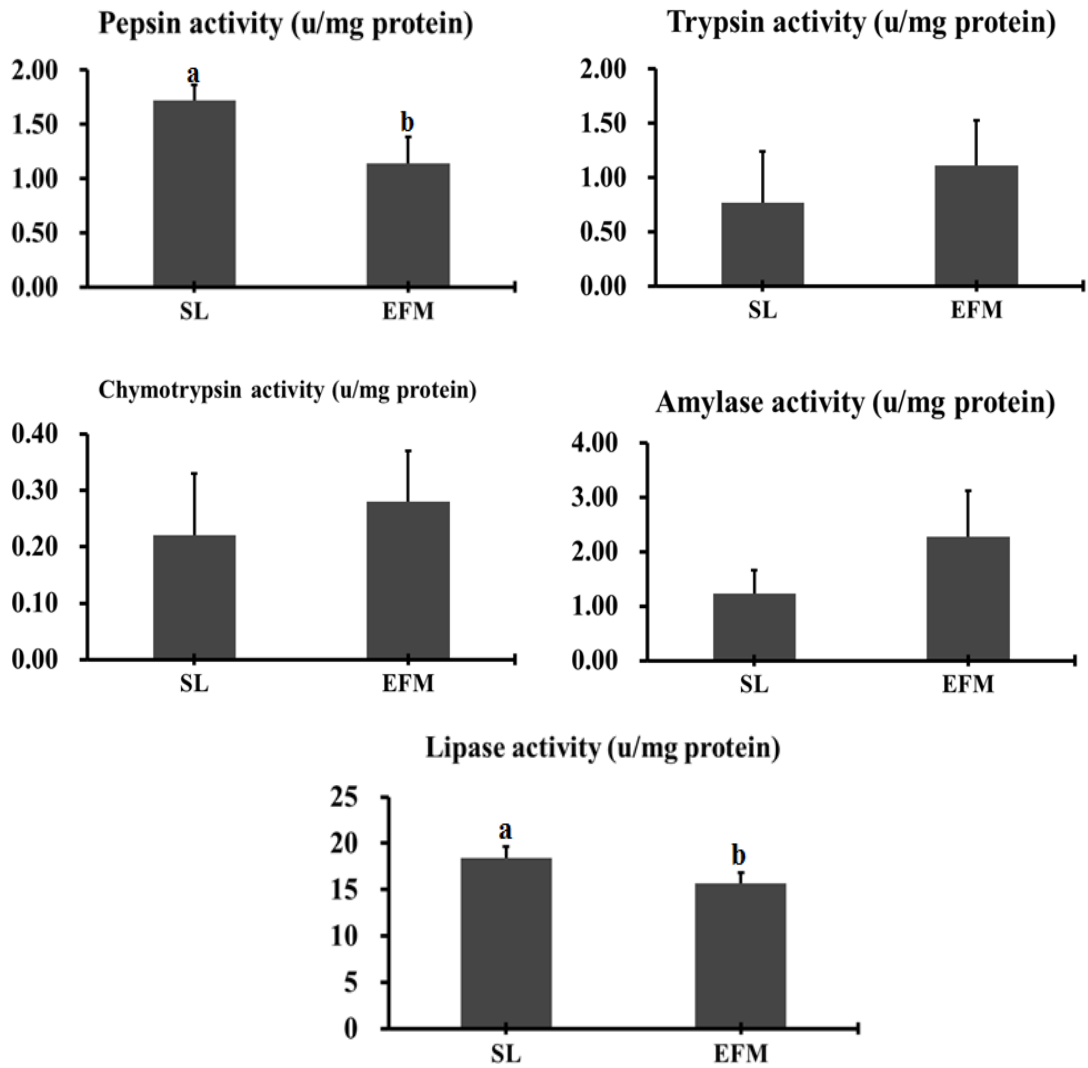


Figure 6. Digestive enzyme activities of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 15 days (Trial 1)

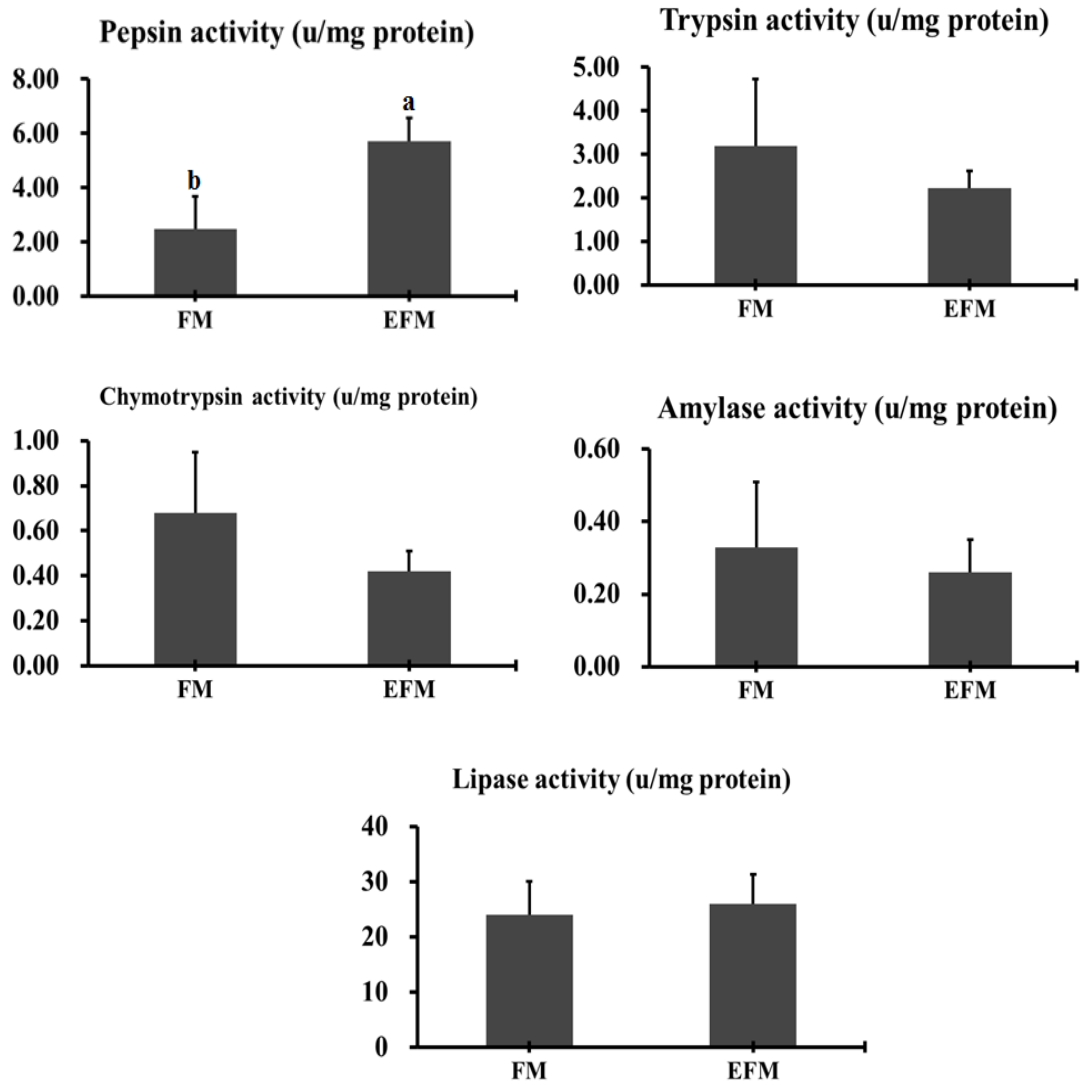


Figure 7. Digestive enzyme activities of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 14 days (Trial 2)

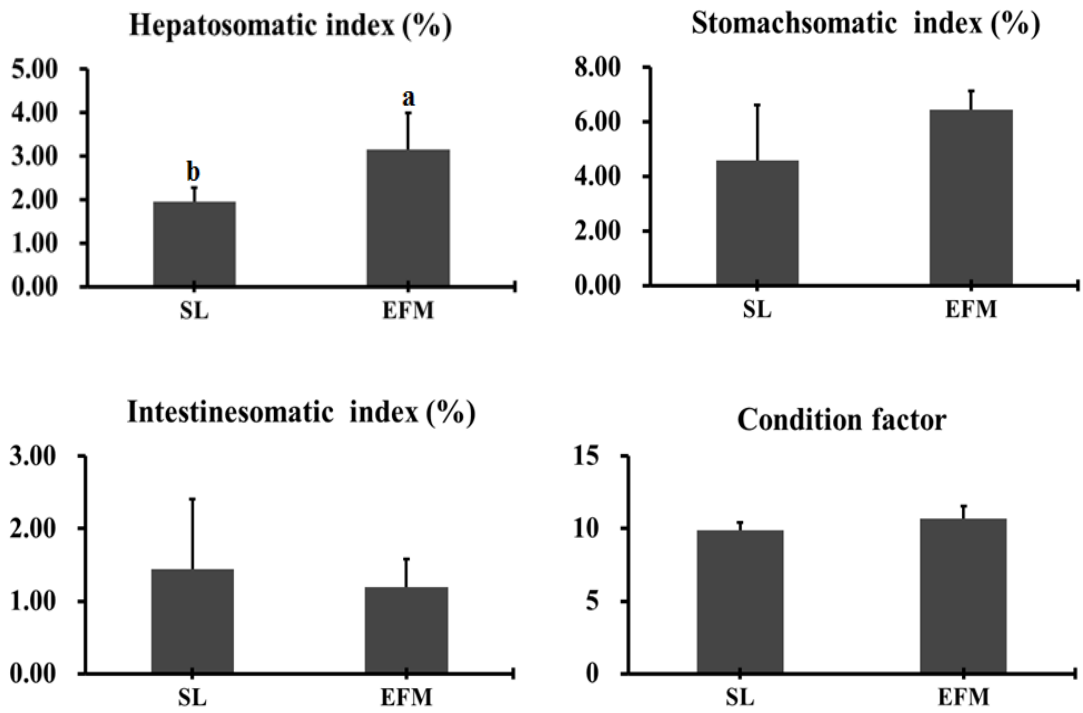


Figure 8. Biological assessment of digestive organs and condition factor for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 15 days (Trial 1)

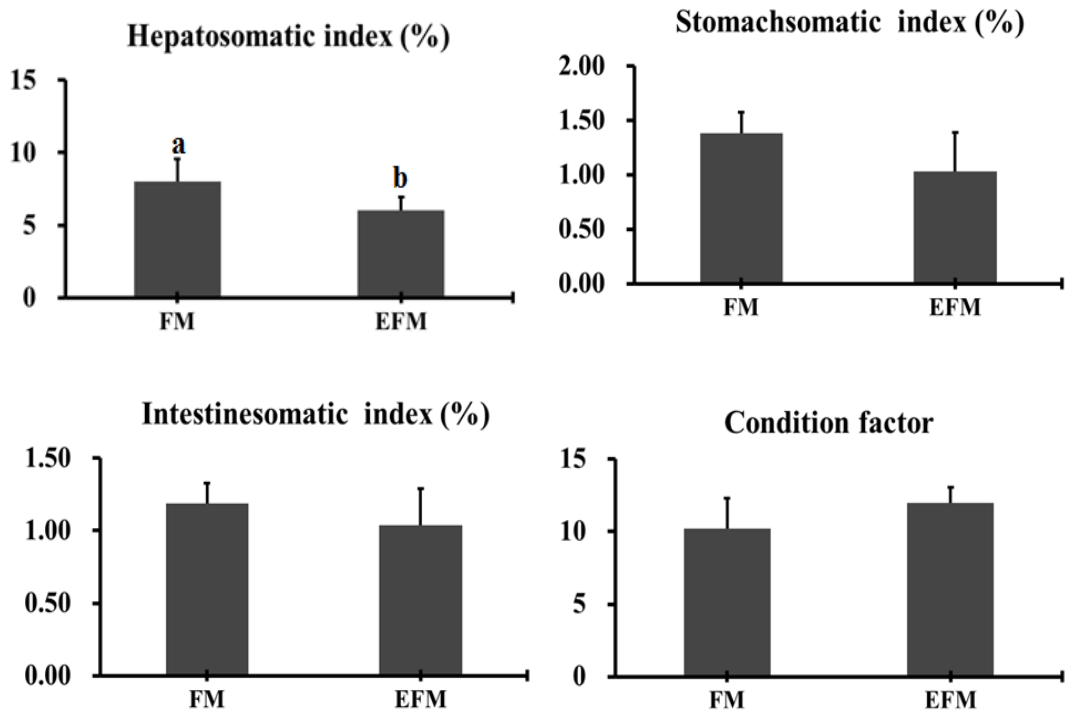


Figure 9. Biological assessment of digestive organs and condition factor for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 14 days (Trial 2)

CHAPTER 3.

Optimum dietary DHA oil level and replacement enzyme-treated fish meal by sardine fish meal in diets for juvenile

bluefin tuna *Thunnus thynnus*

3.1 재료 및 방법

3.1.1 실험사료

실험사료는 효소처리어분이 75 % 포함된 사료(EFM75)와 효소처리어분을 일반어분으로 20 % (사료 내 15 %) 대체한 사료(EFM60), DHA 유를 기존의 4 %에서 2 %로 감소시킨 사료(DHA2)와 대조구로 생사료인 까나리(SL; sand lance)가 사용되었다(Table 18). 비타민과 미네랄 혼합물은 선행논문을 기초로 하여 자체 제작하여 사용하였다. 실험사료의 영양소 함량은 참다랑어의 조단백질과 조지질 요구량을 기초로 작성하였다. 실험사료의 제조는 파쇄기를 이용하여 사료원을 분말화하여, 사료조성표에 따라 측량하여 혼합하였다. 사료성형은 사료제작기(SP-50, Korea)를 이용하여 2 가지 크기(2, 3 mm)로 제작하였다. 제작된 실험사료는 건조대(24 h, 20 °C)에서 건조 후, 사료 공급 전까지 - 20 °C 냉동고에 보관하였다. 실험사료의 아미노산과 지방산 함량은 Table 19 과 20 에 각각 나타내었다.

Table 18. Formulation and proximate composition of the experimental diets for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus*

Ingredients	Experimental diets			
	EFM75	EFM60	DHA2	SL ¹
Enzyme treated fish meal ²	75.0	60.0	75.0	-
Fish meal ³	0.00	15.0	-	-
Soy protein concentrate ⁴	8.00	8.00	8.00	-
DHA oil ⁵	4.00	4.00	2.00	-
Cod liver oil	4.00	4.00	6.00	-
Vitamin premixture ⁶	1.00	1.00	1.00	-
Mineral premixture ⁷	1.00	1.00	1.00	-
Taurine	1.00	1.00	1.00	-
Starch	1.50	1.50	1.50	-
Lecithin	4.50	4.50	4.50	-
<i>* Proximate composition (% of dry matter)</i>				
Docosahexaenoic acid	2.18	3.10	2.00	1.36
Crude protein	57.7	58.9	57.7	65.2
Crude lipid	17.1	17.3	17.1	10.3
Ash	8.17	7.87	8.17	7.53
Moisture	4.94	5.15	3.95	77.9

¹Sand lance, China

²CPSP, Sopropeche, France

³Orizon S.A, Chile

⁴Corp. Korea flavor, Korea

⁵DHA concentrate oil (corp. Comport, Korea)

⁶Vitamin premix (g kg⁻¹ of mixture): dry vitamin A acetate, 1.704; thiamine hydrochloride, 3.630; riboflavin 5'-phosphatate sodium, 5.100; niacinamide, 28.05; calcium D-pantothenate, 12.14; pyridixine hydrochloride, 4.005; vitamin B12 crystalline N, 0.011; ascorbic acid crystal, 222; dry vitamin D3, 5.000; dl-a-tocopherol, 114; Dry vitamin k1, 1.500; biotin-d, 0.391; folic acid, 1.380; myoinositol, 115; cellulose, 484

⁷Mineral premix (g kg⁻¹ of mixture): MgSO₄·7H₂O, 60.0; NaH₂PO₄·2H₂O, 390; KCl, 207.5; Ferric citrate, 19.9; ZnSO₄·7H₂O, 3.00; Ca-lactate, 318.5; CuCl, 0.333; KI, 0.085; Na₂Se₂O₃, 0.27; MnSO₄·H₂O, 1.300; CoCl₂·6H₂O, 0.056

Table 19. Essential and non-essential amino acid composition of the experimental diets for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus*

AAs	EFM75	EFM60	DHA2	SL
EAA¹				
Arginine	3.99	4.13	3.89	4.12
Histidine	1.66	1.80	1.62	2.31
Isoleucine	2.26	2.46	2.24	2.83
Leucine	3.80	4.13	3.75	4.72
Lysine	4.17	4.46	4.08	5.16
Phenylalanine	2.11	2.29	2.08	2.65
Threonine	2.42	2.57	2.35	2.92
Valine	2.62	2.84	2.57	3.12
NEAA²				
Alanine	3.67	3.84	3.62	3.77
Aspartic acid	5.37	5.67	5.21	6.68
Glycine	5.18	5.12	5.10	3.66
Glutamic acid	8.26	8.68	8.09	9.34
Proline	3.03	3.21	3.09	2.88
Serine	2.63	2.73	2.57	2.88
Tyrosine	1.38	1.52	1.40	1.73

¹Essential amino acid

²Non-essential amino acid

Table 20. Fatty acid composition of the experimental diets for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus*

Fatty acids	EFM75	EFM60	DHA2	SL
12:0	0.10	0.10	0.10	0.10
14:0	8.26	8.76	9.14	7.10
14:1	0.10	0.10	0.10	0.00
15:0	0.70	0.60	0.70	0.30
16:0	27.3	27.4	28.5	26.3
16:1	4.16	4.24	4.65	2.30
17:0	0.40	0.40	0.40	0.20
17:1	0.10	0.10	0.10	0.00
18:0	5.97	5.79	6.27	7.70
18:1n9(OA)	17.2	15.4	16.7	10.0
18:2n6(LA)	5.45	4.75	5.20	1.15
18:3n3(LNA)	2.09	1.81	2.05	2.09
18:3n6	0.10	0.10	0.10	1.03
20:0	0.36	0.35	0.39	0.22
20:1	5.02	4.62	5.39	0.89
20:3n3	0.08	0.08	0.09	0.32
20:3n6	0.19	0.17	0.20	0.19
20:4n6(AA)	0.38	0.45	0.44	0.75
20:5n3(EPA)	4.80	5.57	5.68	3.02
22:0	0.14	0.12	0.13	0.19
22:1n9	0.75	0.72	0.87	1.12
22:6n3(DHA)	15.9	17.9	12.3	13.2
DHA/EPA	3.31	3.21	2.17	4.37
$\sum n-3^1$	22.8	25.5	20.2	15.5
$\sum n-6^2$	12.0	10.8	11.7	3.25
n-3/n-6	1.90	2.36	1.73	4.76

¹Omega-3 fatty acid: 18:3n3, 20:5n3, 22:6n3

²Omega-6 fatty acid: 18:2n6, 20:4n6

3.1.2 실험어

실험에 사용된 참다랑어(부화 후 60 일)는 제주도 서귀포시 남원읍에 위치한 제주수산연구소에서 실험에 사용하였으며, 사양실험은 연구소 내 참다랑어 전용 시설에서 진행되었다. 실험어는 3 일간 생사료와 배합사료를 공급하여 시험환경에 적응 할 수 있도록 순치시킨 후 사육시험에 이용되었다. 예비사육 후 참다랑어(초기평균무게: 30.1 ± 15.3 g)는 총 4 개의 사육 수조(57 tons)에 각 30 마리씩 무작위로 선택하여 배치되었다(Fig. 10). 수조 내 용존산소 유지하기 위해 산소발생기와 액화산소 주입기를 설치하였고, 시험기간 동안 평균사육수온은 24.7 °C, 용존산소(dissolved oxygen)는 10.4 mg/L 로 유지 되었다. 사료는 1 일 4 회(08:00, 11:00, 14:00, 17:00 h)에 나누어 13 일간 반복공급 되었다. 실험 기간 중 4 일 1 회 자체 제작한 siphon 을 이용하여 사육수조 바닥의 이물질을 제거하였다.



Figure 10. Rearing tank (water capacity; 57 tons) for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus*

3.1.3 실험어 무게측정

실험어의 무게측정은 사육실험 종료 후 실시하였고(Fig. 11), 소화기관의 음식물을 제거하기 위해 측정 17 시간 전부터 절식시켰다. 최종무게 측정 후 10 마리의 참다랑어를 무작위로 선별하여 얼음물에 마취 시킨 후, 소화기관을 적출하였다(Fig. 12). 적출된 소화기관은 증류수와 혼합하여 분쇄 한 후 원심분리를 거쳐 소화효소 활성분석에 사용되었다. 소화기관 적출 후 남은 어체(carass)는 일반성분분석에 사용되었다. 실험어의 성장률과 사료효율 관련 조사항목과 계산식은 다음과 같다.

성장률(WG; weight gain, %) = $100 \times (\text{final mean body weight} - \text{initial mean body weight}) / \text{initial mean body weight}$; 일간성장률(SGR; specific growth rate, %) = $[(\log_e \text{ final body weight} - \log_e \text{ initial body weight}) / \text{days}] \times 100$; 사료전환효율(FCR; feed conversion ratio) = $\text{dry feed fed} / \text{wet weight gain}$; 단백질이용효율(PER; protein efficiency ratio) = $\text{wet weight gain} / \text{total protein given}$; 사료섭이량(FI; feed intake, g) = $\text{dry feed fed} / \text{fish}$.



Figure 11. Installation of cage for catching the juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus*



Figure 12. Measurement of fish weight (g) (top left) and total length (cm) (top right), and dissection of the experimental fish (bottom left and right)

3.1.4 일반성분분석

Chapter 2 와 동일하게 진행되었다.

3.1.5 간, 위, 장중량 및 비만도

Chapter 2 와 동일하게 진행되었다.

3.1.6 효소활성

Chapter 2 와 동일하게 진행되었다.

3.1.7 아미노산

Chapter 2 와 동일하게 진행되었다.

3.1.8 지방산

Chapter 2 와 동일하게 진행되었다.

3.1.9 사육수

Chapter 2 와 동일하게 진행되었다.

3.1.10 통계학적 분석

분석결과는 SPSS (Version 12.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA 로 통계 분석 하였다. 데이터 값의 유의차는 T-Test 를 사용하여 평균간의 유의성($P < 0.05$)을 비교하였다. 데이터는 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석하였다.

3.2 결과

13일간 실험사료를 급이한 참다랑어 성장결과는 Table 21에 나타내었다. 최종평균무게(FBW)는 EFM75가 103 g으로 가장 높았고, SL (sand lance)가 101 g, DHA2 (85.9 g), EFM60 (71.3 g) 순으로 낮았다. 증체율(WG)은 EFM75 가 234 %로 가장 높았고, SL (202 %), DHA2 (177 %), EFM60 (130 %) 순으로 낮았다. 일간성장률(SGR)은 EFM75 가 8.04 %로 가장 높았고, SL (7.89 %), DHA2 (6.79 %), EFM60 (5.55 %) 순으로 낮았다. 사료전환효율(FCR)은 EFM75가 0.69로 가장 낮았고, DHA2 (0.98), EFM60 (1.19), SL (1.21) 순으로 높았다.

단백질전환효율(PER)은 EFM75가 2.29로 높았고, DHA2 (1.68), EFM60 (1.34), SL (1.31)로 낮았다. 사료섭이량(FI)은 85.3 g으로 가장 높았고, DHA2 (53.9 g), EFM75 (50.3 g), EFM60 (47.8 g) 순으로 낮았다. 생존율(survival)은 EFM75와 DHA2가 52 %로 가장 높았고, EFM60 (48 %), SL구가 36 %로 가장 낮았다(Fig. 13). 실험사료 종류에 따른 실험어체(carass)의 일반성분조성은 Table 22에 나타내었다. 조단백질 함량은 18.3 - 19.0 %로 나타났고, 실험구간 큰 차이를 보이지 않았다. 조지질 함량(3.50 - 3.62 %)과 회분(4.95 - 5.20 %)은 실험구간 유의적인 차이를 보이지 않았다. 장기 체질량 대비 지수와 비만도는 Table 23에 나타내었다. 간중량지수(HSI)는 SL과 DHA2 가 2.44 %로 유사하였고, EFM60 (2.04 %), EFM75 (1.77 %) 순으로 낮은 경향을 보였다. 위중량지수(SSI), 장중량지수(ISI), 건강도(CF)는 4개 실험구간 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 14). 실험어 소화기관의 효소활성은 Table 24에 나타내었다. 흥미롭게도 pepsin 활성은 배합사료구(EFM75, EFM60, DHA2)가 SL과 비교하여 유의적으로 낮았다. Trypsin, amylase 활성은 배합사료구가 SL 보다 유의적으로 높았다. Lipase 활성은 SL구가 배합사료구와 비교하여 유의적으로 높았다(Fig. 15). 실험어체의 아미노산 조성은 Table 25에 나타내었다. EFM75가 다른 실험구와 비교하여 높은 경향을 나타내었고, SL은 상대적으로 낮은 경향을 보였다. 실험어체의 지방산 조성은 Table 26에 나타내었다. DHA 함량은 EFM60구가 19.5 %로 가장 높았고, EFM75 (18.9 %), DHA2 (16.5 %), SL (13.2 %) 순으로 낮았다.

Table 21. Growth performance of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* (initial mean body weight: 31.0 ± 12.5 g) fed the experimental diets for 13 days

Dietary treatment	FBW ¹	WG ²	SGR ³	FCR ⁴	PER ⁵	FI ⁶	Survival (%)
EFM75	103±13.9	233	8.04	0.69	2.29	50.3	52.0
EFM60	71.3±15.3	130	5.55	1.19	1.34	47.8	48.0
DHA2	85.9±9.55	177	6.79	0.98	1.62	53.9	52.0
SL	101±20.9	226	7.89	1.21	1.31	85.3	36.0

¹Final mean body weight (g)

²Weight gain (%)

³Specific growth rate (%)

⁴Feed conversion ratio

⁵Protein efficiency ratio

⁶Feed intake (g)

Table 22. Proximate composition of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 13 days

Dietary treatment	Crude protein	Crude lipid	Ash	Moisture
EFM75	18.9±0.45	3.60±0.93	5.09±0.60	72.2±3.99
EFM60	19.0±0.75	3.62±0.39	5.20±0.35	73.4±4.35
DHA2	18.5±0.32	3.56±0.51	4.95±0.71	72.5±2.48
SL	18.3±0.63	3.50±0.42	5.03±0.83	73.5±5.10

Values are presented as mean ±SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$)

Table 23. Biological assessment of digestive organs of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 13 days

Dietary treatment	HSI ¹	SSI ²	ISI ³	CF ⁴
EFM75	1.77±0.40	1.37±0.10	0.64±0.04	1.36±0.09
EFM60	2.04±0.56	1.38±0.16	0.58±0.22	1.29±0.14
DHA2	2.44±0.55	1.37±0.24	0.47±0.16	1.28±0.16
SL	2.44±0.40	1.27±0.13	0.56±0.18	1.29±0.12

Values are presented as mean ±SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$)

¹Hepatosomatic index = (liver weight x 100) / fish body weight

²Stomachsomatic index = (stomach weight x 100) / fish body weight

³Intestinesomatic index = (intestine weight x 100) / fish body weight

⁴Condition factor = (fish body weight / fish body length³) x 100

Table 24. Digestive enzyme activities of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 13 days (U/mg protein)

Dietary treatment	Pepsin	Trypsin	Chymotrypsin	Amylase	Lipase
EFM75	28.5±2.32 ^b	12.1±1.52 ^a	6.30±1.68	3.92±0.39 ^a	130±4.25 ^b
EFM60	26.2±1.08 ^b	13.1±2.02 ^a	5.98±0.59	4.17±0.57 ^a	120±6.05 ^b
DHA2	27.2±2.02 ^b	12.5±0.28 ^a	5.53±0.23	4.09±0.55 ^a	128±3.08 ^b
SL	35.7±1.62 ^a	9.15±1.46 ^b	7.32±1.25	1.49±0.48 ^b	149±7.48 ^a

Values are presented as mean ±SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$)

Table 25. Essential and non-essential amino acid composition of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 13 days

AAs	EFM75	EFM60	DHA2	SL
EAA¹				
Arginine	4.41	4.11	4.01	4.02
Histidine	4.12	3.55	3.50	3.40
Isoleucine	3.11	2.82	2.93	2.84
Leucine	4.94	4.49	4.55	4.39
Lysine	5.87	5.09	5.22	5.03
Phenylalanine	2.33	2.41	2.46	2.35
Threonine	3.11	2.81	2.79	2.69
Valine	3.60	3.27	3.39	3.28
NEAA²				
Alanine	4.06	3.79	3.75	3.60
Aspartic acid	6.26	5.73	5.74	5.55
Glycine	4.18	3.97	3.78	3.60
Glutamic acid	9.31	8.54	8.50	8.26
Proline	3.10	3.06	2.94	3.00
Serine	2.65	2.42	2.33	2.23
Tyrosine	1.89	1.70	1.72	1.62

¹Essential amino acid

²Non-essential amino acid

Table 26. Fatty acid composition of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 13 days

Fatty acids	EFM75	EFM60	DHA2	SL
12:0	0.10	0.10	0.10	0.10
14:0	4.35	4.01	4.12	7.10
14:1	0.52	0.21	0.53	0.00
15:0	0.32	0.15	0.25	0.30
16:0	17.2	16.2	16.7	26.3
16:1	5.96	5.02	4.95	2.30
17:0	1.02	0.92	1.52	0.20
17:1	1.08	1.12	0.98	0.00
18:0	5.25	5.05	4.25	7.70
18:1n9(OA)	17.0	15.7	15.0	10.0
18:2n6(LA)	6.10	5.00	4.92	1.15
18:3n3(LNA)	1.00	2.02	1.50	2.09
18:3n6	1.08	0.85	1.02	1.03
20:0	0.18	0.75	0.68	0.22
20:1	1.12	1.10	1.52	0.89
20:3n3	0.00	0.30	0.70	0.32
20:3n6	0.15	0.25	0.15	0.19
20:4n6(AA)	1.00	0.41	0.50	0.75
20:5n3(EPA)	5.02	4.12	4.58	3.02
22:0	0.20	0.21	0.12	0.19
22:1n9	5.12	7.12	5.18	1.12
22:6n3(DHA)	18.9	19.5	16.5	13.2
DHA/EPA	3.76	4.73	3.82	4.37
$\sum n-3^1$	20.0	21.7	16.8	15.5
$\sum n-6^2$	8.18	6.56	7.14	3.25
n-3/n-6	2.45	3.32	2.36	4.76

¹Omega-3 fatty acid: 18:3n3, 20:5n3, 22:6n3

²Omega-6 fatty acid: 18:2n6, 20:4n6

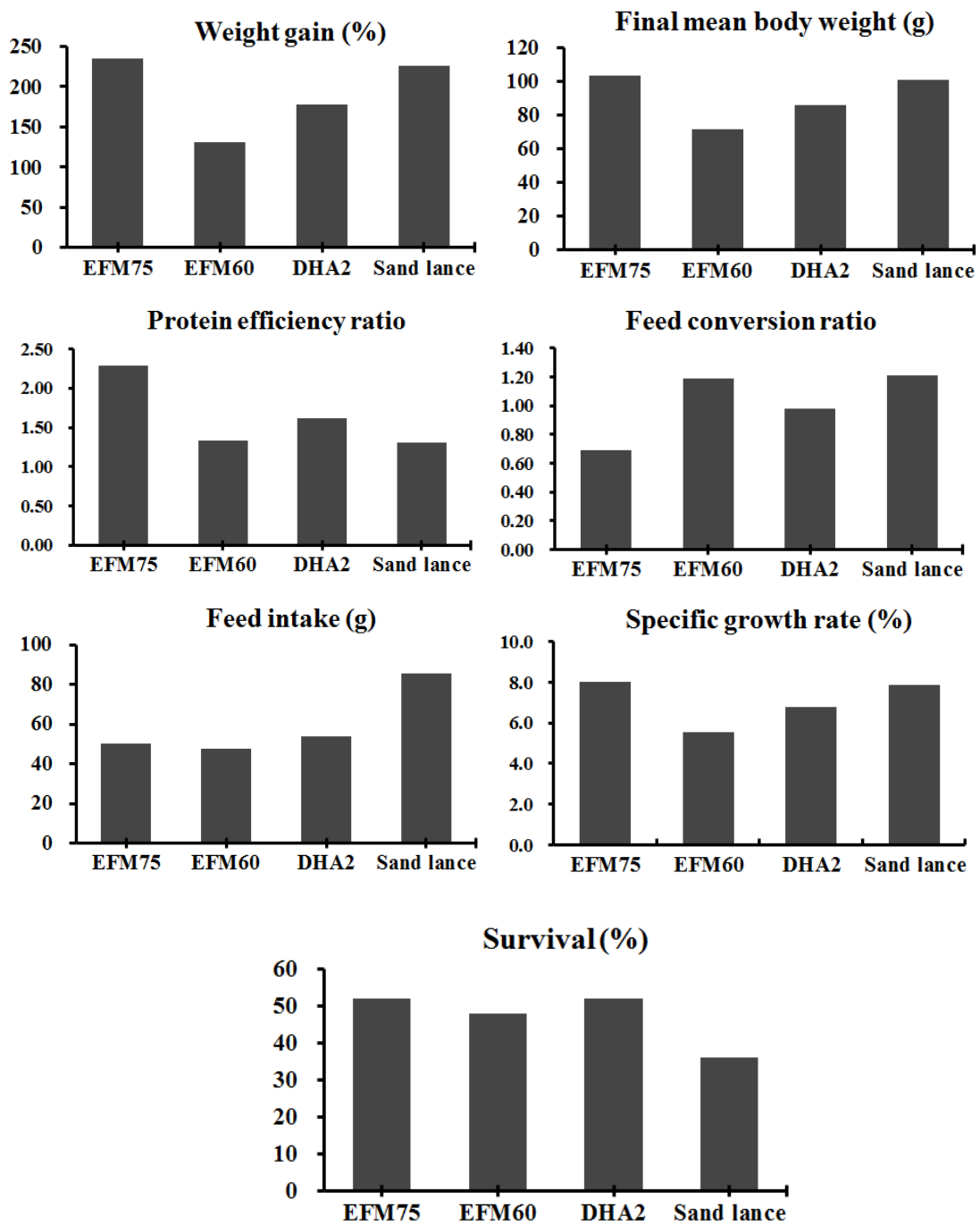


Figure 13. Growth performance of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 13 days

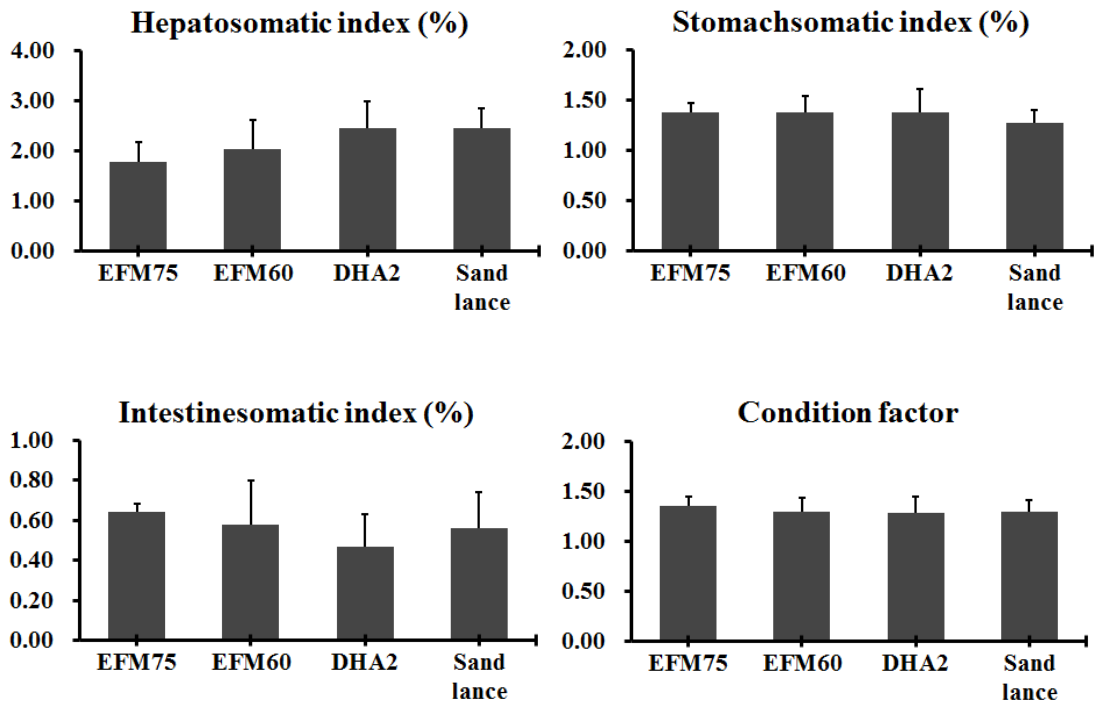


Figure 14. Biological assessment of digestive organs and condition factor for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets

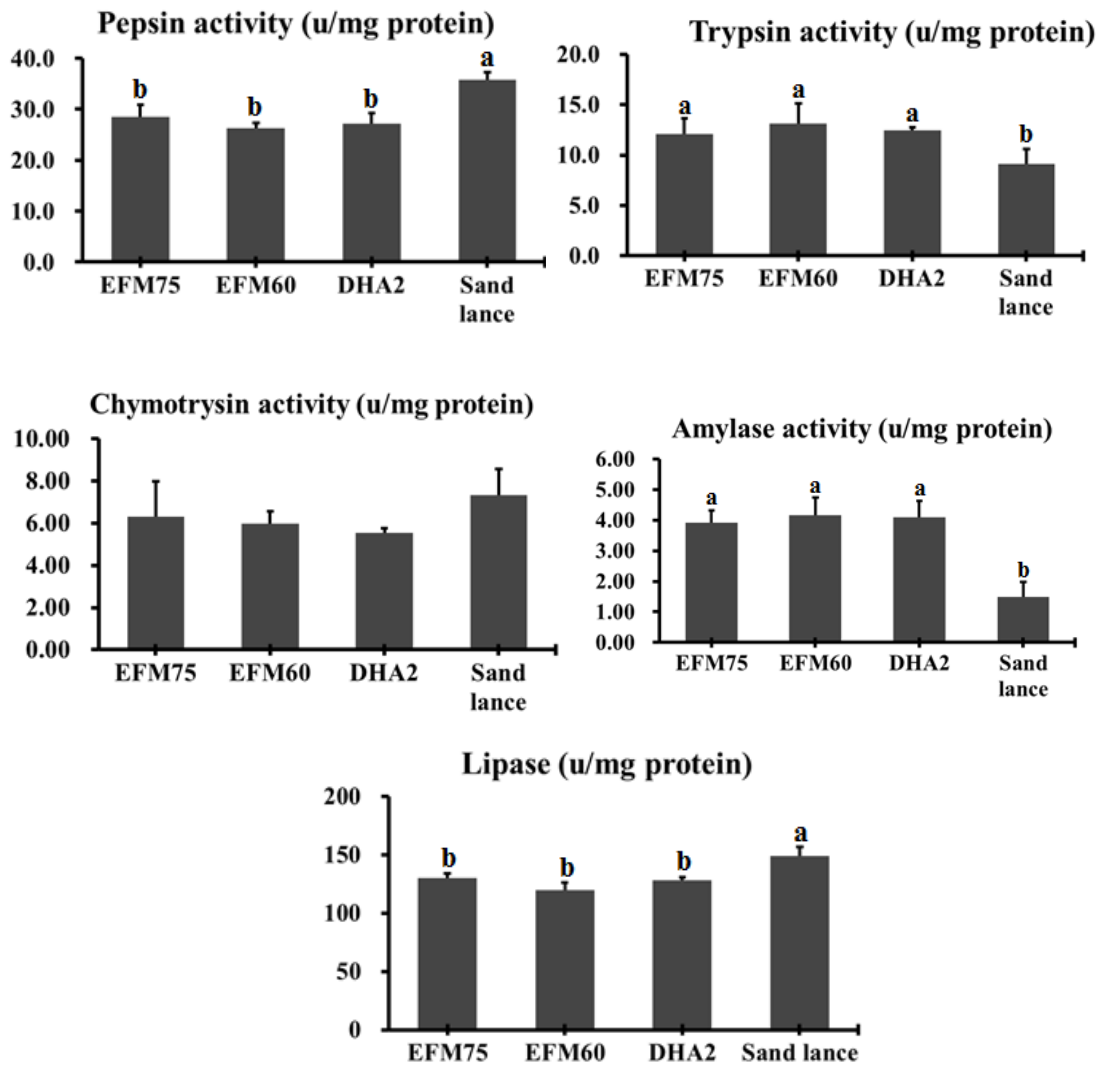


Figure 15. Digestive enzyme activities for digestive organ of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 13 days

CHAPTER 4.

Apparent digestibility of diets and protein sources in juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus*: *in vivo* and *in vitro* digestibility and digestive enzyme activities

4.1 재료 및 방법

4.1.1 실험사료

총 5 가지 사료에 대한 참다랑어 치어의 소화율을 조사하기 위해 실험사료를 제조하였다. 실험사료는 각 단백질과 지질원료에 따른 소화율을 검증하고자 효소 처리어분이 사료 내 75 % (EFM75), 60 % (EFM60), DHA유 2 % (DHA2), 정어리어분을 75 % (FM75) 넣어 조성하였고, 생사료에 대한 소화율 측정을 위해 까나리(sand lance, China)를 사용하였다(Table 27). 소화율을 분석하기 위한 지시제(indicator)로 chromium oxide (Cr_2O_3 , DaeJung)를 사용하였으며, 실험사료에 1.0 %가 포함되도록 설계하였다. 실험사료의 영양소 함량은 참다랑어의 영양소 요구량(조단백질: 사료 내 62 %, 조지질: 18 %)을 토대로 작성하였다. Mineral 과 vitamin premix는 각 물질의 요구량을 기초로 자체 제작하여 사용하였다. 사료의 제조는 사료원을 파쇄하여 분말형태로 만든 후, 사료조성표에 따라 측량하여 혼합하였다. 사료제작기(SP-50, Gungang Engineering, Daegu, Korea)를 이용하여 성형(직경 2 mm) 하였다. 까나리는 어분 15 %와 지시제 1 %를 혼합하여 pellet 형태로 성형하였다. 모든 실험사료는 $-30\text{ }^\circ\text{C}$ 냉동고에 보관 후 실험에 사용 하였다.

Table 27. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* (% , dry matter)

Ingredients	Experimental diets				
	EFM75	EFM60	FM75	DHA2	SL ¹
Enzyme treated fish meal ²	75.0	60.0	0.00	75.0	-
Fish meal ³	0.00	15.0	75.0	0.00	15.0
Soy protein concentrate ⁴	8.00	8.00	8.00	8.00	-
DHA oil ⁵	4.00	4.00	4.00	2.00	-
Cod liver oil	4.00	4.00	4.00	6.00	-
Vitamin premix ⁶	1.00	1.00	1.00	1.00	-
Mineral premix ⁷	1.00	1.00	1.00	1.00	-
Taurine	1.00	1.00	1.00	1.00	-
Starch	1.50	1.50	1.50	1.50	-
Lecithin	4.50	4.50	4.50	4.50	-
Chromium oxide	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
<i>* Proximate composition (% of dry matter)</i>					
Crude protein	57.7	58.9	57.7	58.3	65.2
Crude lipid	17.1	17.3	17.1	16.9	10.3
Ash	8.17	7.87	8.17	8.30	7.53
Moisture	4.94	5.15	3.95	4.38	77.9

¹Sand lance, China

²CPSP, Sopropeche, France

³Orizon S.A, Chile

⁴Corp. Korea flavor, Korea

⁵DHA concentrate oil (corp. Comport, Korea)

⁶Vitamin premix (g kg⁻¹ of mixture): dry vitamin A acetate, 1.704; thiamine hydrochloride, 3.630; riboflavin 5'-phosphatate sodium, 5.100; niacinamide, 28.05; calcium D-pantothenate, 12.14; pyridixine hydrochloride, 4.005, vitamin B12 crystalline N, 0.011; ascorbic acid crystal, 222; dry vitamin D3, 5.000; dl-a-tocopherol, 114; Dry vitamin k1, 1.500; biotin-d, 0.391; folic acid, 1.380; myoinositol, 115; cellulose, 484

⁷Mineral premix (g kg⁻¹ of mixture): MgSO₄.7H₂O, 60.0; NaH₂PO₄.2H₂O, 390; KCl, 207.5; Ferric citrate, 19.9; ZnSO₄.7H₂O, 3.00; Ca-lactate, 318.5; CuCl, 0.333; KI, 0.085; Na₂Se₂O₃, 0.27; MnSO₄.H₂O, 1.300; CoCl₂.6H₂O, 0.056

4.1.2 실험어

실험에 사용된 참다랑어는 제주도 서귀포시 남원읍에 위치한 제주수산연구소에서 실험에 사용하였으며, 사양실험은 연구소 내 참다랑어 전용 시설에서 진행되었다. 실험어는 3일간 생사료와 배합사료를 공급하여 시험환경에 적응 할 수 있도록 순치시킨 후 사육시험에 이용되었다.

4.1.3 소화시간 관찰

분수집에 앞서 치어기 참다랑어의 소화시간을 조사하였다. 배합사료(EFM75)와 생사료(SL)를 각각 급이 한 후 2시간 간격으로 2마리의 참다랑어를 얼음물에 넣어 기절 시킨 후 위(stomach)와 장(intestine) 내 잔존하는 음식물의 양을 측정하였다(Fig. 16).

위 내 잔존물 = (stomach contents weight / body weight)*100; 장 내 잔존물 = (intestine contents weight / body weight)*100

4.1.4 분수집

A. Dissection (해부법)

분수집을 위해 실험사료는 분수집 5시간 전인 오전 8시에 만복급이 한 후 오후 1시에 실험수조(57 tons)에 수용된 실험어를 얼음물에 넣어 기절시킨 후 장(항문 끝에서부터 전체 장 길이의 2/3 부위, Fig. 18)을 절개하여 전장에서 항문 방향으로 눌러 분을 수집하였다. 분 샘플은 - 40 °C 저온 냉동고에 보관 후 동결 건조 하였다.

B. Cage (가두리식)

분 수집을 위해 실험사료는 분 수집 6시간 전에 반복공급 하였다. 반복공급 후, 뜰채(net)와 사이펀(siphon)을 이용하여 가두리 바닥면에 남은 사료 및 이물질을 제거하였다. 사료공급 5시간 후 가두리 바닥의 분을 수집하였다. 총 6일간 분을 수집하였고, 수집된 분 샘플은 종이필터를 이용하여 해수를 제거하고 동결건조하여 분석에 사용하였다(Fig. 17).

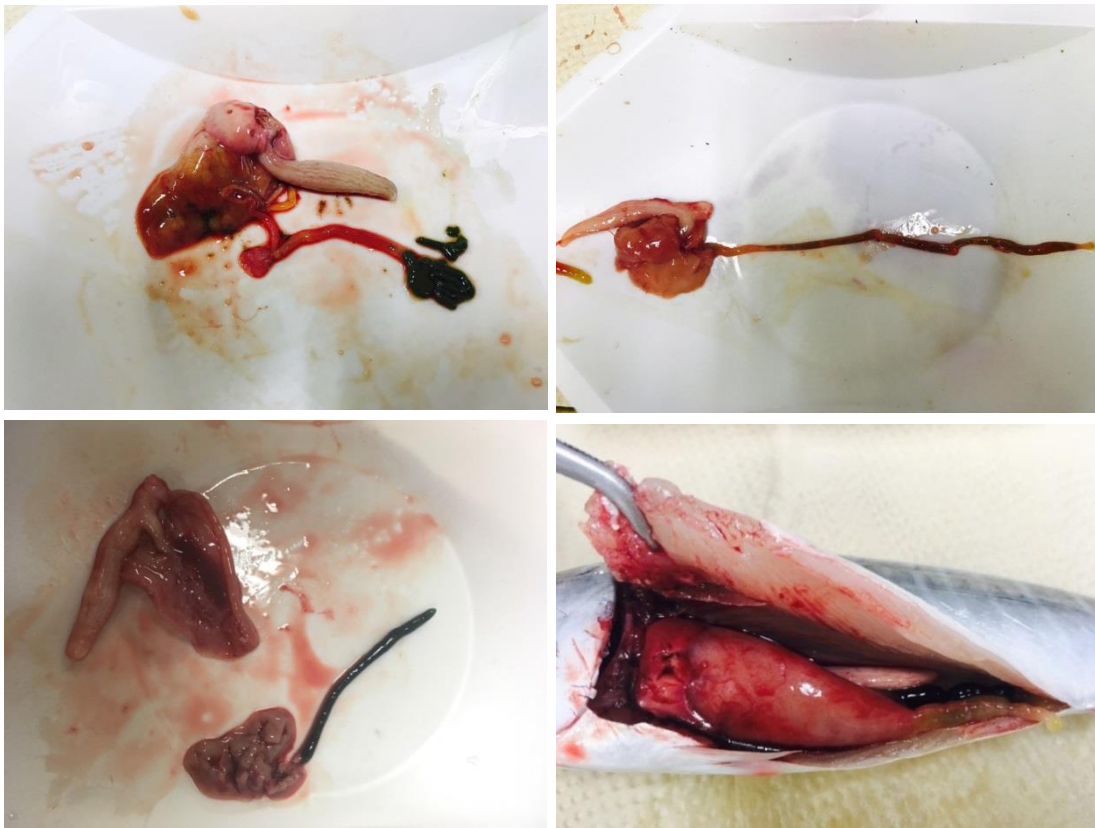


Figure 16. Feces in tuna intestine, and fecal collection for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* by dissection

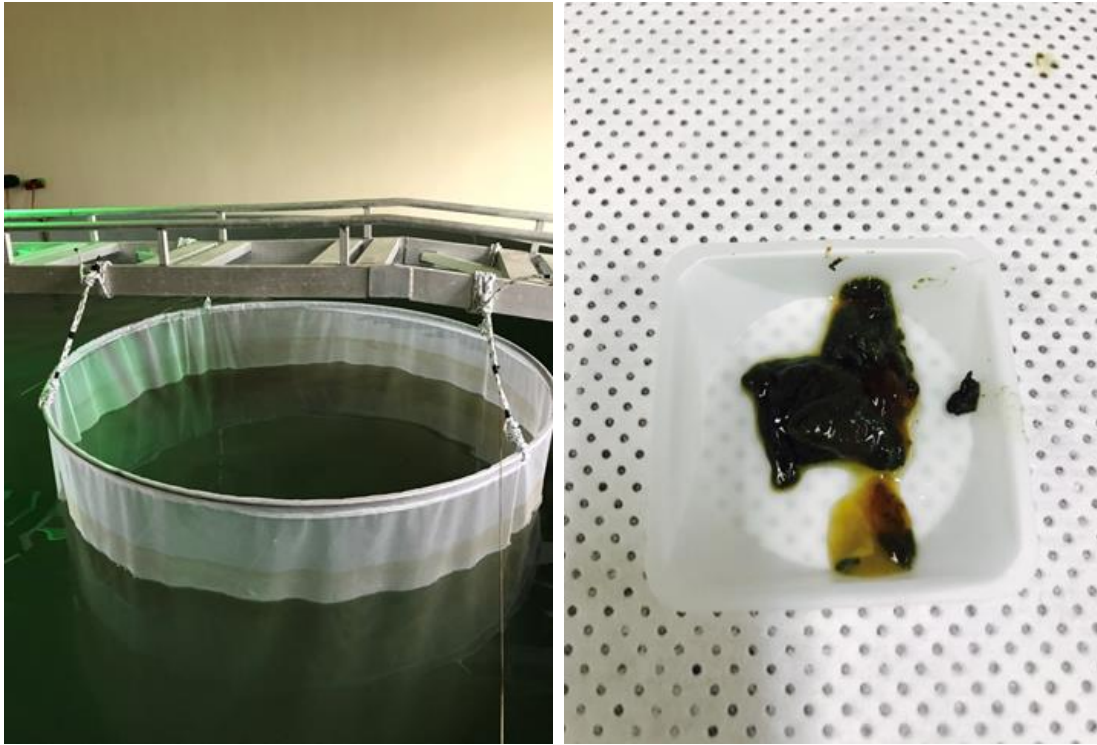


Figure 17. The cage in rearing tank for fecal collection from juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* (left) and feces sample (right)

4.1.5 소화율 측정

실험사료와 분에서의 지시제로 사용된 chromium oxide 함량은 Divakaran et al. (2002)의 방법을 토대로 제주대학교 양어사료영양학 연구실에서 분석되었다. 실험사료 및 분 샘플을 회화로(550 °C)에서 3시간 동안 회화시킨 후 얻어진 시료를 분석에 사용하였다. 먼저 chromium oxide를 mono-chromate 형태로 산화시키기 위해 샘플 5 - 10 mg을 측정하여 glass test tube에 옮긴다. 시료가 담긴 glass test tube에 perchloric reagent (HClO₄) 4 ml를 첨가한다. Perchloric reagent는 100 ml의 증류수에 200 ml의 질산을 혼합한 후, 냉각시킨 다음 70 % perchloric acid 200 ml을 혼합하여 만든다. 시료와 perchloric reagent가 첨가된 glass test tube를

가열판에 넣고 300 °C 에서 20분간 가열한 후 실온에서 방냉시킨다. 전처리가 끝난 샘플은 50 ml 유리플라스크에 옮긴 후 3차 증류수로 25 mL가 되도록 정량한다. 그 후 분광광도계(Beckman DU-730, USA)를 이용하여 350 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정한 흡광도는 시료분석과 같이 전처리 준비된 standard 용액으로 만들어진 standard 방정식을 이용하여 시료의 chromium oxide 함량을 계산하였다. 영양소 및 원료에 대한 소화율 계산식은 다음과 같다.

영양소 소화율 계산식: ADCs of nutrients in reference and test diets (%) = $100 \times [1 - (\% \text{ indicator in diet} / \% \text{ indicator in feces}) \times (\text{nutrient concentration in feces} / \text{nutrient concentration in diet})]$

4.1.6 효소 활성분석

Chapter 2와 동일하게 진행되었다.

4.1.7 *In vitro* 소화율분석

9 가지 단백질사료원에 대한 *in vitro* 소화율 실험은 Carter et al. (1999)의 방법에 따라 분석하였다. 각 원료의 영양소 함량은 Table 28 에 나타내었다. 참다랑어의 효소를 추출하기 위해 24 시간 절식시킨 실험어의 장기기관을 적출하였다. 적출된 장기는 증류수(1 g / 5 ml)와 혼합 후 원심분리 하여(4 °C, 10,000 G, 15 min) 상층액을 분리하였다. 적출된 장기는 증류수와 혼합하여 조직균질기(tissue grinder)를 이용해 분쇄하였다. 분쇄된 샘플은 원심분리(4 °C, 10,000 G, 15 min)하여 상층액(supernatant)을 분리하여 분석에 사용되었다. 효소활성 분석에 앞서 샘플의 단백질 총량(total protein)을 Bradford, (1976)의 방법에 따라 분석되었다. 각 샘플의 pepsin 활성을 Worthington (1991)의 방법에 따라 분석하였고, 반응액을 이용하여 활성을 동일한 수준으로 희석하였다. 각 단백질원료를 건조(70 °C) 후 조단백질

함량을 분석하였다. 100 ml conical flask 에 원료 20 ml 의 반응액을 넣고 water bath 에서 12 시간(25 °C) 반응 시킨 후, 14 % sulphosalicylic acid 를 첨가하여 20 분간 반응시켰다. 샘플은 원심분리(20,000G, 4 °C, 5 min) 후 상층액을 제거하였고, 증류수 30 ml 을 넣고 다시 원심분리 후 상층액을 버리는 과정을 총 4 회 반복하였다. 샘플을 millipore filter (0.7 ul)를 이용하여 여과 후 건조시켜 잔존물질의 단백질 함량을 분석하였다. *In vitro* 소화율 결과는 다음과 같은 식으로 계산되었다.

$$\text{In vitro digestibility} = \frac{\text{protein in diet (g)} - \text{undigested protein (g)}}{\text{protein in diet (g)}} * 100$$

4.1.8 일반성분분석

Chapter 2와 동일하게 진행되었다.

4.1.9 통계학적 분석

분석결과는 SPSS (Version 12.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석 하였다. 데이터 값의 유의차는 Tukey HSD로 평균간의 유의성(P<0.05)을 비교하였다. 데이터는 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석하였다.

Table 28. Proximate composition of feed ingredients for *in vitro* pepsin digestibility of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* (% , dry matter)

Ingredients	Crude protein	Crude lipid	Ash	Moisture
EFM (enzyme treated fish meal)	70.2	12.0	8.50	2.31
FM (sardine, fish meal)	68.0	8.60	17.1	9.01
LT (low temperature fish meal)	78.0	9.62	13.7	9.32
MM (meat meal)	80.3	12.9	6.82	2.72
FE (feather meal)	74.5	10.3	2.55	5.79
PM (poultry meal)	63.2	12.4	12.5	5.92
SM (soybean meal)	47.3	1.80	8.31	10.1
SPC (soy protein concentrate)	67.6	1.02	6.92	6.73
WG (wheat gluten)	65.7	2.40	1.03	12.5

4.2 결과

참다랑어 치어의 사료에 따른 소화시간은 Table 29에 나타내었다. 배합사료는 사료급이 10 시간 후 어체 내에서 소화되어 배설되었고, 생사료는 사료급이 4 시간 후 배설되는 것으로 나타났다(Fig. 18 & 19). 해부법을 통해 수집한 분의 가소화율은 Table 30에 나타내었다. 단백질 가소화율은 SL이 배합사료구와 비교하여 유의적으로 높았다. 흥미롭게도 사료 내 어분의 함량이 증가할수록 단백질 가소화율은 감소하였다. 건물소화율도 SL구가 배합사료구와 비교하여 유의적으로 높았고, 사료 내 어분의 함량이 증가할수록 감소하였다. 가두리식을 통해 수집한 분의 가소화율은 Table 31에 나타내었다. 단백질 가소화율은 EFM75가 유의적으로 가장 높았고, SL (73.2 %), DHA2 (67.2 %), EFM60 (64.2 %) 순으로 유의적으로 낮았다(Fig. 20). 건물 가소화율은 EFM75가 유의적으로 가장 높았고, SL (61.0 %), DHA2 (58.3 %), EFM60 (55.4 %) 순으로 낮았다(Fig. 21). 총 9가지 단백질원료에 대한 참다랑어 치어 소화기관 내 pepsin의 *in vitro* 소화율은 Table 32에 나타내었다. 단백질 소화율은 효소처리어분(92 %)과 밀글루텐(wheat gluten, 91 %)이 높은 값을 보였고, 그 뒤를 저온처리어분(low temperature fish meal, 72 %), 육분(meat meal, 65 %), 농축대두단백(soy protein concentrate, 62 %), 우모분(feather meal, 60 %), 정어리어분(57 %), 가금부산물분(poultry meal, 55 %), 대두박(soybean meal, 43 %) 순으로 나타났다. 성장 단계별 참다랑어 치어의 소화기관 내 소화효소활성은 Table 33에 나타내었다. Pepsin 활성(u / mg protein)은 부화 후 30일에 1.52, 60일에 17.4, 90일에 28.5, 120일에 40.2로 나타났다. 부화 후 30일에서 60일 사이에 약 11배 증가해 총 기간 중 가장 높은 증가폭을 보였다. Trypsin 활성은 부화 후 30일에 1.11, 60일에 6.27, 90일에 12.1, 120일에 25.5로 나타났다. 부화 후 30일에서 60일 사이에 약 5.6 배 증가하여 기간 중 가장 높은 증가폭을 보였다. Chymotrypsin 활성은 부화 후

30일에 0.31, 60일에 2.17, 90일에 6.30, 120일에 15로 나타났다. 부화 후 30일과 60일 사이에 약 7배 증가하여 전 기간 중 가장 높은 증가폭을 보였다. Amylase 활성은 부화 후 30일에 1.29, 60일에 3.27, 90일에 3.92, 120일에 7.25로 나타났고, 30일과 60일 사이에 약 2.5배 증가하였고, 60일과 90일 사이에는 큰 차이를 보이지 않았다. 마지막으로 lipase의 활성은 부화 후 30일에 19.0, 60일에 48.8, 90일에 59.2, 120일에 67.1로 나타났고, 30일과 60일 사이에 약 2.5배 증가하였다.

Table 29. The feeds residues in the stomach and intestine of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* (% of dry matter)

Time after feeding	EFM75		SL	
	Stomach	Intestine	Stomach	Intestine
2h	2.52	-	2.17	1.50
4h	2.02	-	0.92	2.71
6h	1.29	0.30	-	0.75
8h	0.90	2.10	-	-
10h	0.87	1.02	-	-
12h	-	-	-	-

Table 30. Apparent digestibility coefficients (ADC) of the experimental diets for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* by cage fecal collection method (% of ADC)

Dietary treatment	Crude protein	Dry matter
EFM75	82.5±1.90 ^b	72.5±1.68 ^b
EFM60	76.5±2.15 ^c	64.2±0.82 ^c
FM75	57.2±0.27 ^d	53.3±0.89 ^d
DHA2	83.8±2.10 ^b	70.1±1.09 ^b
SL	89.2±1.12 ^a	80.2±0.58 ^a

Values are presented as mean ±SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$)

Table 31. Apparent digestibility coefficients (ADC) of experimental diets for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* by dissection fecal collection method (% of ADC)

Dietary treatment	Crude protein	Dry matter
EFM75	75.2±1.82 ^a	63.2±0.25 ^a
EFM60	64.2±0.48 ^d	55.4±0.68 ^d
DHA2	67.2±0.15 ^c	58.3±1.67 ^c
SL	70.2±0.61 ^b	61.0±0.89 ^b

Values are presented as mean ±SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$)

Table 32. *In vitro* digestibility of protein ingredients for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* (% of digestibility)

Ingredients	Pepsin digestibility (%)
EFM (enzyme treated fish meal) ¹	92.0±0.56
FM (sardine, fish meal) ²	56.7±1.56
LT (low temperature fish meal) ³	72.1±2.10
MM (meat meal)	65.1±0.58
FE (feather meal)	60.2±2.58
PM (poultry meal)	55.2±1.25
SM (soybean meal)	43.0±1.25
SPC (soy protein concentrate) ⁴	61.9±2.01
WG (wheat gluten)	90.5±1.02

¹CPSP, Sopropêche, France

²Orizon S. A, Chile

³Skagen, Denmark

⁴Corp. Korea flavor, Korea

Table 33. Digestive enzyme activities of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed EFM75

(U/mg protein)

DAH¹	Weight (g)	Pepsin	Trypsin	Chymo- trypsin	Amylase	Lipase
30	2.00	1.52±0.25	1.11±0.39	0.31±0.08	1.29±0.31	19.0±1.25
60	35.0	17.4±2.42	6.27±0.28	2.17±0.87	3.27±0.59	48.8±5.21
90	160	28.5±2.31	12.1±1.52	6.30±1.68	3.92±0.39	59.2±4.25
120	600	40.2±1.52	25.5±2.62	15.0±0.85	7.25±0.25	67.1±4.05

¹Day after hatch

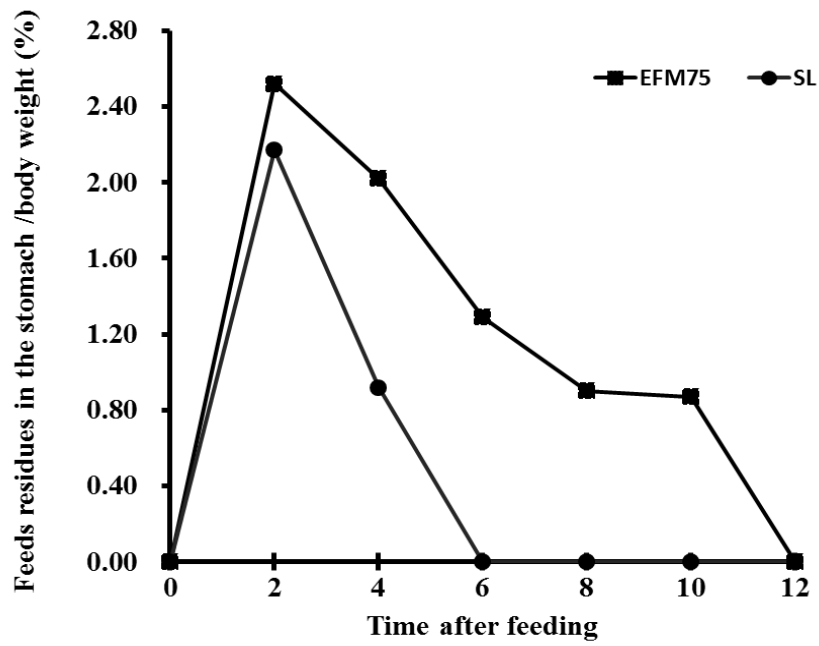


Figure 18. The feeds residues in the stomach of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed EFM75 and SL (% of dry matter)

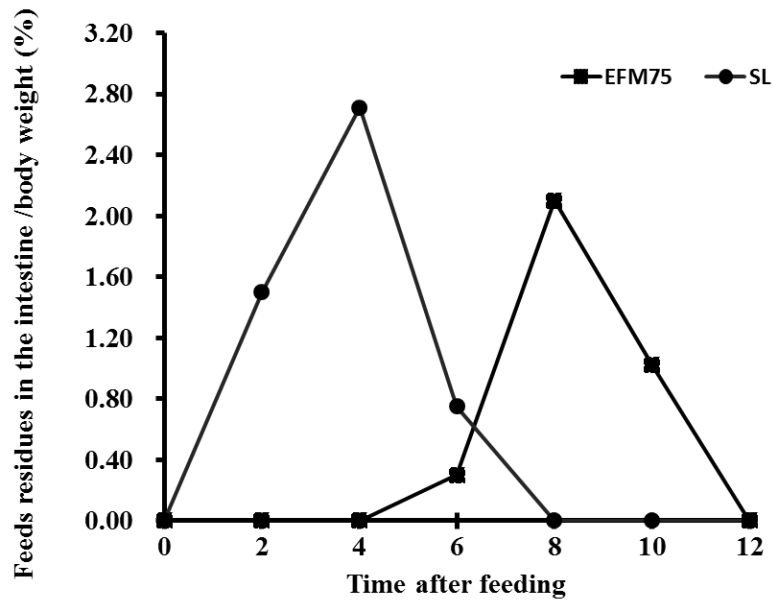


Figure 19. The feeds residues in the intestine of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed EFM75 and SL (% of dry matter)

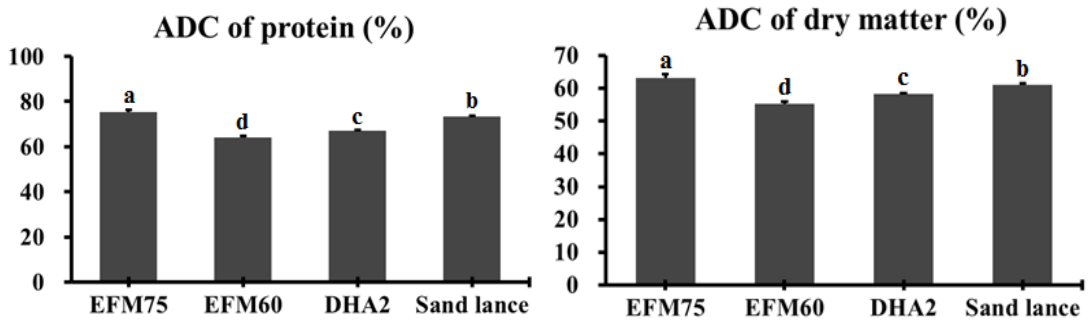


Figure 20. Apparent digestibility coefficients (ADC) of protein and dry matter of experimental diets for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* by dissection fecal collection method (% of ADC)

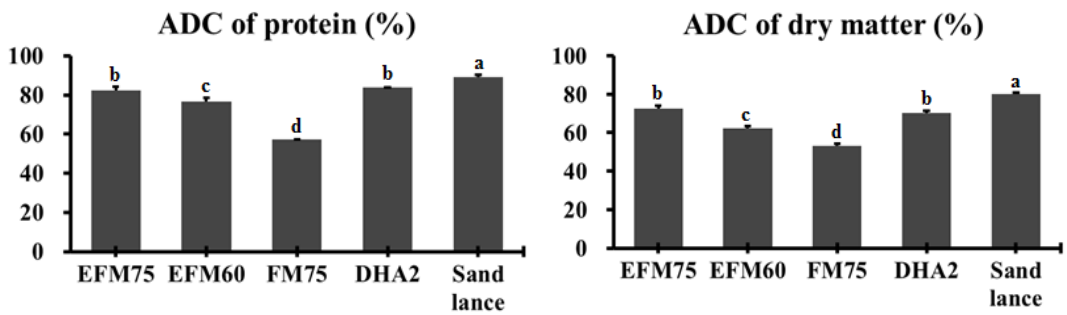


Figure 21. Apparent digestibility coefficients (ADC) of protein and dry matter of experimental diets for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* by dissection fecal collection method (% of ADC)

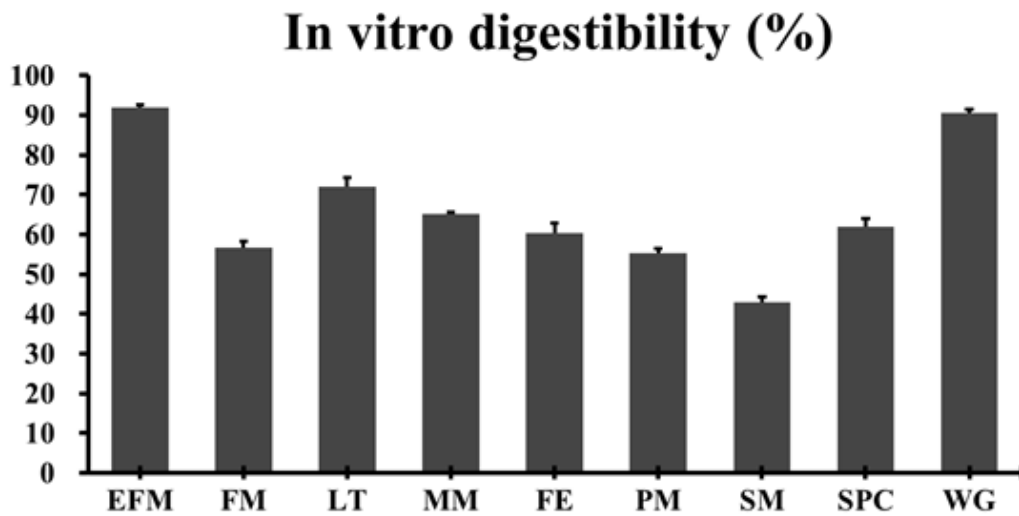


Figure 22. The *in vitro* pepsin digestibility of nine protein (EFM: enzyme treated fish meal, FM: sardine fish meal, LT: low temperature fish meal, MM: meat meal, FE: feather meal, PM: poultry meal, SM: soybean meal, SPC: soyprotein concentrate, WG: wheat gluten) sources in diets for juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* (% of pepsin digestibility)

결론

Utilization of enzyme-treated fish meal

본 연구는 효소처리어분이 참다랑어 배합사료 내 주 단백질원으로 사용 가능하다는 것을 밝혔다. Ji et al. (2008)은 치어기 참다랑어를 대상으로 한 연구에서 사료 내 효소처리어분은 생사료 대비 높은 이용효율을 보여 주 단백질원으로서의 이용가능성을 보고하였다. 본 연구결과는 참다랑어 사료 내 효소처리어분의 이용가능성을 재확인했을 뿐만 아니라 사료 내 적정 사용비율을 입증한 의미있는 결과라 사료된다. 효소처리어분은 저분자 단백질의 함량이 일반어분에 비해 높은 것으로 알려져 있다(Aguila et al., 2007). 본 연구에서의 효소처리어분의 사용에 따른 참다랑어 치어의 높은 성장률은 효소처리어분 내에 존재하는 다량의 저분자 단백질 때문인 것으로 사료된다. 또한 본 실험에서 사용된 효소처리어분(CPSP)은 참다랑어 외에도 농어(*Dicentrarchus labrax*), 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*), 대서양연어(*Salmo salar*) 사료에서도 이용효율이 높은 것으로 알려져 있다(Langar, 1992; Gomes et al., 1995; Berge and Storebakken, 1996). 결과적으로 본 연구의 성장결과를 고려하였을 때, 효소처리어분은 치어기 참다랑어 사료 내 최적의 단백질원으로 사용 가능성이 확인되었다. 효소처리어분의 종류는 처리공정과 사용되는 어종에 따라 매우 다양하다(Kristinsson et al., 2000). Ji et al. (2008)은 참다랑어를 대상으로 효소처리전갱이어분과 효소처리멸치어분의 참다랑어 사료 내 주 단백질원으로서의 이용가능성을 평가한 결과, 효소처리전갱이어분이 효소처리멸치어분에 비해 높은 이용효율을 보인다고 보고하였다. 두 가지 효소처리어분을 구성하는 단백질의 평균분자량은 효소처리전갱이어분(100 - 500 Da)이 효소처리멸치어분(5000Da)에 비해 낮았다. 원료를 구성하는 단백질의 평균분자량은 낮을수록 어체

내에서 쉽게 소화된다. 본 연구에서 사용된 효소처리어분의 평균분자량은 3000 Da이었다. 선행연구결과와 본 연구결과를 미루어 보았을 때, 효소처리어분 내 단백질의 평균분자량은 치어기 참다랑어의 성장에 영향을 주는 것으로 판단된다.

Utilization of fish meal

Chapter 2에서 나타난 일반어분구의 낮은 성장률은 어분이 참다랑어 사료 내 주 단백질원으로 적합하지 않음을 증명하는 결과라 사료된다. 참다랑어는 어분에 대해 매우 낮은 이용효율을 보이는 것으로 알려져 있다(Takii et al., 2007a; 2007b) Carter et al. (1999)은 치어기 참다랑어를 대상으로 *in vitro* 소화율을 분석한 결과, 참다랑어는 대서양연어보다 어분에 대한 소화율이 낮다고 보고하였다. 이와 같이 참다랑어는 다른 어종에 비해 어분의 소화율이 낮은 것으로 알려져 있다. 회유성 어종인 방어(yellow tail)도 어분에 대한 이용률이 낮은 것으로 보고되었다(Takii et al., 1998). 이와 더불어 Chapter 2에서 나타난 일반어분구의 효소처리어분구 대비 유의적으로 높은 간중량은 일반어분에 대한 소화가 원활하지 않아 나타난 결과라 사료된다. 참다랑어를 대상으로 일반어분의 이용성평가를 위해 실시된 선행연구에서도 일반어분구는 생사료 대비 유의적으로 높은 간중량을 나타냈다(Biswas et al., 2009). 어류는 소화하기 어려운 사료를 장기간 섭취할 경우 어체 내 간중량을 증가시킨다. 간중량이 증가하면 소화기관 내 효소분비량이 늘어나 소화율이 증가한다(Takii et al., 2007b). Chapter 2에서 일반어분구는 생사료구 대비 낮은 성장률을 보였기 때문에 일반어분은 치어기 참다랑어 사료 내 주 단백질원으로는 사용하기 어려울 것으로 판단된다. 다만, Chapter 3의 결과를 통해 일반어분은 효소처리어분을 사용한 배합사료 내 소량(10% 이내) 사용 가능 할 것으로 판단된다.

Efficiency of formulated feed

Chapter 2와 3의 결과, 사료섭이량은 생사료구가 높았으나 사료의 효율적인 측면(사료전환효율, 단백질이용효율)은 배합사료가 치어기 참다랑어 사육에 보다 효과적인 것으로 나타났다. 넙치와 참돔을 대상으로 배합사료와 생사료의 사육효능을 비교한 연구에서도 배합사료는 생사료 대비 높은 사육효능을 보였다(Cho et al., 2005; Lee et al., 2005). 연어과 어류에서 생사료의 유실량은 배합사료 대비 약 3배 많다고 보고되었다(Hardy et al., 1993). 생사료의 급이는 원료 수급 불안정에 따른 가격변동, 보관 경비의 과다 소요, 질병발생 및 환경오염 증가 등의 많은 문제를 야기한다(Kim et al., 2008). 특히, 생사료는 사육수의 용존산소를 배합사료보다 빠르게 감소시킨다고 보고되었으며(Kim et al., 2014), 생사료의 공급은 사육수 내 부유물질, 질소, 인의 함량을 배합사료 보다 2 - 5배 더 증가시킨다고 보고되었다(Kim et al., 2012). 이처럼 사료의 효율적인 측면을 고려하였을 때 배합사료는 생사료 보다 치어기 참다랑어 사육에 효과적일 것으로 사료된다.

Utilization of DHA oil

Chapter 2에서 DHA 유가 주 지질원으로 사용된 배합사료는 높은 사육효능을 보여 치어기 참다랑어 사료 내 이용가능성을 확인하였다. 본 연구에서 사용된 DHA 유의 순도는 96 % 이상으로 선행연구에서 주로 사용되었던 연어난유와 가다랑어유(70 %) 비교하여 높아 치어기 참다랑어 사료에 보다 효율적으로 사용가능 할 것으로 판단된다. Chapter 3의 사육실험을 통해 사료 내 DHA 유의 첨가 비율 감소에 따라 참다랑어의 성장이 저하되는 것을 확인하였다. 사료 내 DHA 유를 4 % 첨가한 실험구(사료 내 DHA 함량 2.1 %)는 DHA 유를 2 % 첨가한

실험구(사료 내 DHA 함량 2.0 %)보다 높은 성장을 보인것으로 미루어 보았을 때, 최적의 성장을 위한 치어기 참다랑어 사료 내 DHA 의 적정 함량은 2.1 % 이상인 것으로 사료된다. 회유성 어종인 방어의 사료 내 DHA 요구량은 1.4 - 2.6 %로 보고되었고(Furuita et al., 1996a), 그 외 해산어인 참돔(*Pagrus major*)이 1.0 - 1.6 % (Furuita et al., 1996b), 흑점줄전갱이(*Pseudocaranx dentex*)가 1.6 - 2.2 %로 보고되었다(Takeuchi et al., 1996). 정확한 참다랑어의 DHA 요구량 규명을 위해서는 추가실험이 요구된다.

Survival

참다랑어는 외부자극에 민감하게 반응하여 다른 어종에 비해 비교적 낮은 생존율을 보이는 것으로 알려져 있다(Miyashita, 2002). 흥미롭게도 본 연구의 사육실험 생존율은 배합사료구가 생사료구 보다 높았다. 일반적으로 참다랑어 치어 사육 시에는 사료가 충분히 공급되지 못하거나 공복 상태가 되면 서로 공격하여 죽이는 행동인 공식(cannibalism)현상이 자주 발생한다. 방어농어(*Dicentrarchus labrax*), 대구(*Gadus morhua*), 메기(*Clarias gariepinus*), 뱀장어(*Anguilla anguilla*)를 대상으로 한 연구에서도 사료 공급 후 공복시간 증가에 따라 공격적 행동(chasing behavior)과 공식현상이 증가한다고 보고되었다(Degani and Levanon., 1983; Hecht and Appelbaum., 1988; Katavic et al., 1989; Folkvord., 1991; Sakakura and Tsukamoto., 1998). 생사료는 배합사료보다 빠르게 소화되기 때문에 배합사료를 공급한 참다랑어 치어에 비해 빠른 시간 안에 공복감을 불러일으켜 공식현상의 빈도를 증가시키는 것으로 판단된다. Kondo et al. (2016)은 참다랑어를 대상으로 배합사료와 생사료의 체내 소화시간을 연구한 결과, 생사료가 배합사료보다 빠르게 소화된다고 보고하였다. 본 연구의

소화시간분석 결과(Table 29)에서도 생사료는 배합사료 보다 약 2.5 배 빠르게 소화되는 것으로 나타났다. 본 연구에서 실험어의 예상 공복시간은 소화시간을 고려 하였을 때 생사료구(5 - 8 h)가 배합사료구(2 - 5 h)보다 길었고 폐사는 주로 공복시간(20:00 - 07:00 h)에 발생하였다. 이처럼 공복에 의한 공식현상과 공격적 행동이 생사료구의 낮은 생존율에 영향을 주었을 것으로 판단된다. 추후 배합사료와 생사료의 급이가 치어기 참다랑어 생존율에 미치는 영향에 대한 연구를 통해 사료의 형태에 따른 참다랑어의 생존율에 대한 정확한 규명이 요구된다.

Digestive enzyme activities

Pepsin, trypsin, chymotrypsin 등의 소화효소는 경구를 통해 섭취한 음식물의 분해를 돕기 때문에 효소의 활성이 어류의 소화에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Simpson, 2000). 농어(*Dicentrarchus labrax*), 역돔(*Oreochromis niloticus*), 잉어(*Cyprinus carpio*)의 소화 기관 내 protease 활성의 증가는 성장률을 증가시킨다고 보고되었고(Manjappa et al., 2002; Tibaldi et al., 2006; Lin and Lou., 2011;), 어류의 소화율은 소화기관 내 효소활성에 큰 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Li et al., 2014; Deng et al., 2015). 일반적으로 참다랑어와 같은 대형어류는 체온조절과 움직임 등에 필요한 기초대사에너지가 높아 소화에 사용되는 에너지가 다른 어종에 비해 낮은 것으로 보고되었다(Takii et al., 2007a). 이러한 이유로 참다랑어는 열에 의해 변성된 단백질을 함유한 어분을 체내 효소가 원활하게 작용하지 못해 비교적 낮은 소화율을 보이는 것으로 판단된다. Parra et al. (2007)은 성장단계에 따른 치어기 참다랑어의 소화효소활성을 분석한 결과, 성장함에 따라 효소활성이 계속해서 증가한다고 보고하였다. 본 연구결과에서도

참다랑어 소화기관 내 효소활성은 부화일수 경과에 따라 계속해서 증가하는 것을 확인하였다. 황다랑어(*Thunnus albacares*), 청돔(*Sparus aurata*)을 대상으로 한 연구에서도 소화 기관 내 효소활성은 어체중의 증가와 더불어 증가한다고 보고되었다(Moyano et al., 1996; Buentello et al., 2011). 이처럼 어류의 효소활성은 크기와 비례하여 증가하는 경향을 보임으로 육성기 참다랑어를 대상으로 한 배합사료의 조성은 기존의 효소처리어분을 일정량 어분 혹은 식물성원료로 대체 하더라도 성장에 큰 영향을 주지 않을 것으로 생각된다. 향후 연구는 성장 단계에 따른 배합비를 설정하고 이에 따른 참다랑어의 사육효능 검증을 통해 성장단계별 맞춤형 배합사료 개발이 요구된다.

Feeding stimulants

효소처리어분은 어류에 대한 사료유인효과가 높아 양어사료 내 섭이촉진제로 소량 첨가되어 사용된다(Kristinsson et al., 2000; Liaset et al., 2000). 사료 내 효소처리어분의 첨가는 대서양연어의 사료섭이량을 증가시킨다고 보고되었다(Gildberg et al., 1996; Refstie et al., 2004). 참다랑어는 배합사료에 대한 기호성이 낮아 사료 내 섭이촉진제가 별도로 첨가된다(Ji et al., 2008; Biswas et al., 20011). 섭이촉진제는 다양한 유리아미노산을 혼합하여 사용하기 때문에 사료가격의 증가를 야기한다. 본 연구의 실험사료에는 효소처리어분 고유의 사료유인효과를 고려하여 섭이촉진제가 첨가되지 않았다. 배합사료 실험구의 사료섭이량은 생사료구에 비해 절반가량 낮았으나 성장률은 유사하여 보다 효율적이었다. 이러한 결과를 토대로 직접 비교를 하지 못했으나 치어기 참다랑어 사료 내 효소처리어분을 주 단백질원으로 사용된 사료에는 섭이촉진제를 첨가하지 않아도 원활한 성장을 기대 할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약 문

본 연구는 치어기 참다랑어 사료 내 효소처리어분(Enzyme-treated Fish Meal, EFM)의 영양학적 우수성을 입증하여 경제적이고 기능적인 양어용 배합사료 개발의 기초자료를 제시하였다.

1 차 실험(Chapter 2)에서는 치어기 참다랑어를 대상으로 사료 내 효소처리어분을 주 단백질원으로 사용된 배합사료에 대한 사육효능 확인하고자 2 차례의 사육실험을 진행하였다. 사육실험 1(trial 1)은 대조구로 생사료(SL; sand lance)를 사용하였고, 평균무게 0.68 g 내외의 치어기 참다랑어를 총 2 개 수조(수조용량: 57 t)에 각 50 마리씩 무작위로 배치하여 15 일간 진행되었다. 최종평균무게는 두 실험구간 큰 차이를 보이지 않았다. 사육실험 2(trial 2)에서는 대조구로 일반어분을 주 단백질원으로 사용된 배합사료(Fish Meal, FM)를 대조구로 사용하였다. 사양실험은 평균무게 10.7 g 내외의 치어기 참다랑어를 총 2 개 수조(수조용량: 57 tons)에 각 15 마리씩 무작위로 배치하여 14 일간 진행되었다. 최종평균무게는 효소처리어분구가 일반어분구 대비 높은 성장을 보였다. 2 차례의 사육실험을 통해 효소처리어분은 치어기 참다랑어 사료 내 주 단백질원으로 사용가능함이 확인되었고, 일반어분을 다량(10 % 이상) 사용하는 것은 어려울 것으로 판단된다.

2 차 실험(Chapter 3)은 치어기 참다랑어를 대상으로 사료 내 일반어분의 첨가와 DHA 유의 사용 비율에 따른 사육효능을 확인하고자 사육실험을 진행하였다. 실험사료는 효소처리어분이 75 % 포함된 사료(EFM75)와 효소처리어분을 일반어분으로 20 %(사료 내 15 %) 대체한 사료(EFM60), DHA 유를 기존의 4 %에서 2 %로 감소시킨 사료(DHA2)와 대조구로 생사료인 까나리(Sand Lance; SL)를 사용하였다. 사양실험은 평균무게 31 g 내외의 치어기

참다랑어를 총 4 개 수조(수조용량: 57 tons)에 각 50 마리씩 무작위로 배치하여 13 일간 사육실험을 진행되었다. 어체의 최종평균무게는 EFM75 구(103 g)와 SL 구(101 g)가 유사하였고, DHA2 (85.9 g), EFM60 (71.3 g) 순으로 낮았다. 사료전환효율은 모든 실험구 중 EFM75 구(0.69)가 가장 낮았고, DHA2 (0.98), EFM60 (1.19), SL (1.21)순으로 높았다. 생존율은 배합사료실험구가 48 - 52 %로 SL 구 (36 %)와 비교하여 높은 경향을 보였다. 치어기 참다랑어 사료 내 적정 DHA 유의 첨가 비율은 성장률을 고려하여 3 % 이상으로 생각된다.

3 차 실험(Chapter 4)은 치어기 참다랑어를 대상으로 사료 내 일반어분과 DHA 유의 첨가 비율에 따른 소화율을 조사하기 위해 2 가지 방법(cage, dissection)을 이용하여 배설물을 수집하였다. 해부(dissection)를 통해 수집한 분의 단백질 가소화율은 SL 구가 가장 높았고, DHA2, EFM75, EFM60, FM75 순으로 낮았다. 배합사료 내에서는 사료 내 일반어분의 비율이 증가 할수록 단백질 가소화율은 낮아지는 경향을 보였다. 가두리(cage)를 이용하여 수집한 분의 단백질 가소화율은 EFM75 가 가장 높았고, SL (73 %), DHA2 (67 %), EFM60 (64 %) 순으로 나타났다. 단백질원료에 대한 *in vitro* pepsin 소화율은 효소처리어분(92 %)과 밀글루텐(90 %)이 높았고, 정어리어분(57 %)과 대두박(43 %)이 낮은 경향을 보였다.

참다랑어의 부화 후 경과일수에 따른 소화기관 내 효소활성을 조사하고자 5가지 소화효소 활성(pepsin, trypsin, chymotrypsin, amylase, lipase)에 대해 분석하였다. 실험어는 부화 후 경과일수(DAH; day after hatch)에 따라 총 5회(DAH 30, 60, 90, 120, 150) 소화기관을 적출하였다. 5가지 소화효소 활성은 부화일수 경과에 따라 계속해서 증가하는 경향을 보였다. 밀글루텐 등의 식물성 원료는 높은 소화율을 보여 향후 효소처리어분과 함께 부분적으로 사용 가능할 것이라 사료된다.

참고문헌

- Aguila J, Cuzon G, Pascual C, Domingues PM, Gaxiola G, Sánchez A and Rosas C. 2007. The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (Voss and Solis) diet: digestive enzyme activity, blood metabolites, and energy balance. *Aquaculture*, 273(4), 641-655.
- Allan GL, Parkinson S, Booth MA, Stone DA, J. Rowland SJ, Frances J and Warner-Smith R. 2000. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: I. Digestibility of alternative ingredients. *Aquaculture* 186, 293– 310.
- AOAC (Association of official analytical chemists). 2000. Official methods of analysis. 17th edition. Washington, DC, U.S.A.
- Aubourg SP, Sotelo CG and Gallardo JM. 1990. Changes in flesh lipids and fill oils of albacore (*Thunnus alalunga*) during canning and storage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 38(3), 809-812.
- Barnett BJ, Cho CY and Slinger SJ. 1982. Relative biopotency of dietary ergocalciferol and cholecalciferol and the role of and requirement for vitamin D in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *The Journal of nutrition*, 112(11), 2011-2019.
- Bell MV, Henderson RJ, Sargent JR. 1986. The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comp Biochem Physiol* 83B 711–719.
- Berge GM and Storebakken T. 1996. Fish protein hydrolyzate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. *Aquaculture*, 145(1), 205-212.

- Biswas A, Biswas BK, Ito J, Takaoka O, Yagi N, Itoh S and Takii K. 2011. Soybean meal can partially replace enzyme-treated fish meal in the diet of juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fisheries Science*, 77, 615-621.
- Biswas BK, Biswas A, Junichi I, Kim YS and Takii K. 2013. The optimal dietary level of ascorbic acid for juvenile Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *Aquaculture International*, 21, 327-336.
- Biswas BK, Ji SC, Biswas AK, Seoka M, Kim YS and Takii K. 2009b. A suitable dietary sugar level for juvenile Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *Aquaculture Science*.
- Biswas BK, Ji SC, Biswas AK, Seoka M, Kim YS, Kawasaki KI and Takii K. 2009a. Dietary protein and lipid requirements for the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* juvenile. *Aquaculture*, 288, 114-119.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Buentello JA, Pohlenz C, Margulies D, Scholey VP, Wexler JB, Tovar-Ramírez D and Gatlin DM. 2011. A preliminary study of digestive enzyme activities and amino acid composition of early juvenile yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Aquaculture*, 312(1), 205-211.
- Carter CG, Bransden MP, Van Barneveld RJ and Clarke SM. 1999. Alternative methods for nutrition research on the southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*: in vitro digestibility. *Aquaculture*, 179, 57-70.

- Chalamaiah M, Hemalatha R and Jyothirmayi T. 2012. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food Chemistry*, 135, 3020-3038.
- Cho SH, Lee SM and Lee JH. 2005. Effects of the extruded pellets and raw fish-based moist pellet on growth and body composition of flounder *Paralichthys olivaceus* L. for 10 months. *J. Aquacult*, 18, 60-65.
- Collette BB and Nauen CE. 1983. FAO species catalogue. Vol 2: Scombrids of the world. FAO Fish. Synopsis 125, 90-92.
- Degani G and Levanon D. 1983. The influence of low density on food adaptation, cannibalism and growth of eels (*Anguilla anguilla*(L.)). *Bamidgeh*, 35, 53-60.
- Deng J, Mai K, Chen L, Mi H and Zhang L. 2015. Effects of replacing soybean meal with rubber seed meal on growth, antioxidant capacity, non-specific immune response, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *Fish & shellfish immunology*, 44(2), 436-444.
- Divakaran S, Obaldo, LG and Forster IP. 2002. Note on the methods for determination of chromic oxide in shrimp feeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(3), 464-467.
- Erlanger B, Kokowsky N, Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95: 271-278.
- FAO (Food and agriculture organization of the united nations). 2011. Review of the state of world marine fishery resources. Fisheries and aquaculture technical paper. 569.

- Folch J, Lee M and Sloane-Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497–509.
- Folkvord A. 1991. Growth, survival and cannibalism of cod juveniles (*Gadus morhua*): effects of feed type, starvation and fish size. *Aquaculture*, 97, 41~59.
- Furuita H, Takeuchi T, Toyota M and Watanabe T. 1996. EPA and DHA requirements in early juvenile red sea bream using HUFA enriched *Artemia* nauplii. *Fisheries science*, 62(2), 246-251.
- Furuita H, Takeuchi T, Watanabe T, Fujimoto H, Sekiya S and Imaizumi K. 1996a. Requirements of larval yellowtail for eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, and n-3 highly unsaturated fatty acid. *Fisheries science*, 62(3), 372-379.
- Gildberg A, Bøgwald J, Johansen A and Stenberg E. 1996. Isolation of acid peptide fractions from a fish protein hydrolysate with strong stimulatory effect on Atlantic salmon (*Salmo salar*) head kidney leucocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 114, 97-101.
- Gomes EF, Rema P, Gouveia A and Oliva-Teles A. 1995. Replacement of fish meal by plant proteins in diets for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: effect of the quality of the fishmeal based control diets on digestibility and nutrient balances. *Water. Sci. Technol.* 31, 205–211.
- Halver JE. 1972. The vitamins. Pp. 29-103 in *Fish Nutrition*, J. E. Halver, ed New York: Academic Press.
- Hardy RW, Fairgrieve WT and Scott TM. 1993. Periodic feeding of low-phosphorus diet and phosphorus retention in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish nutrition in practice*, 424-271991403412.

- Hecht T and Pienaar AG. 1993. A review of cannibalism and its implications in fish larvae culture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24, 246~261.
- Hepburn FN, Exler J, Weihrauch JL. 1986. Provisional tables on the content of omega-3 fatty acids and other fat components of selected foods. *J Am Diet Assoc* 86 788–793.
- Hilton JW, Hodson PV and Slinger SJ. 1980. The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *The Journal of nutrition*, 110(12), 2527-2535.
- Hsu KC. 2010. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chemistry*, 122, 42-48.
- Je JY, Lee KH., Lee MH and Ahn CB. 2009. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 42, 1266-1272.
- Ji SC, Takaoka O, Biswas AK, Seoka M, Ozaki K, Kohbara J and Takii K. 2008. Dietary utility of enzyme-treated fish meal for juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fisheries science*, 74, 54-61.
- Julshamn K, Andersen KJ, Ringdal O and Brenna J. 1988. Effect of dietary copper on the hepatic concentration and subcellular distribution of copper and zinc in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 73(1-4), 143-155.
- Katavić I, Jug-Dujaković J and Glamuzina B. 1989. Cannibalism as a factor affecting the survival of intensively cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fingerlings. *Aquaculture*, 77, 135~143.
- Ketola HG. 1975. Requirement of Atlantic salmon for dietary phosphorus. *Transactions of the American Fisheries Society*, 104(3), 548-551.

- Kim KD, Kang YJ, Lee JY, Nam MM, Kim KW, Jang MS and Lee SM. 2008. Evaluation of extruded pellets and raw fish-based moist pellet for growth of sub-adult flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Aquaculture*, 21, 102-106.
- Kim KW, Kim KD, An CM, Son MH, Lee BJ and Han HS. 2012. Effects of a commercial extruded pellet on growth performance and water quality in growing olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *J Fish Mar Sci Edu* 24, 602-608.
- Kim SS, Kim KW, Kim KD, Lee BJ, Lee JH, Han HS and Lee KJ. 2014. Comparison of extruded and moist pellets for growth performance, water quality and histology of olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Jeju fish farm. *Journal of Fisheries and Marine Sciences Education*, 26(3), 667-675.
- Kondo F, Iwai T, Miura C, Sakata J, Ohta T, Ido A and Miura T. 2016. Analysis of feeding effects of EP on growth and digestion in cultured bluefin tuna. *Nippon suisan gakkaiishi*, 82, 923-933.
- Kristinsson HG and Rasco BA. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 40, 43-81.
- Krossøy C, Waagbø R, FJELLDAL PG, Wargelius A, Lock EJ, Graff IE and Ørnsrud R. 2009. Dietary menadione nicotinamide bisulphite (vitamin K3) does not affect growth or bone health in first-feeding fry of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Aquaculture nutrition*, 15(6), 638-649.
- La Roche G, Johnson CL and Woodall AN. 1966. Iodine metabolism in young chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*, Walbaum): I. Thyroidal impairment with the use of ¹³¹I. *General and comparative endocrinology*, 7(3), 512-524.
- Langar H. 1992. Effects physiologiques et metaboliques de la qualite nutritionnelle des

- proteines chez le jeune alevin de bas *Dicentrarchus labrax*. The'se de Doctorat, Universite' de Bretagne Occidentale, 136 pp.
- Lee SM, Seo JY, Lee YW, Kim KD, Lee JH and Jang HS. 2005. Evaluation of experimental extruded pellet, commercial pellet and raw fish-based moist pellet for growing flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Aquaculture*, 18, 287-292.
- Lee SM. 2002. Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for juvenile and grower rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture* 207, 79-95.
- Li Y, Ai Q, Mai K, Xu W, Deng J and Cheng Z. 2014. Comparison of high-protein soybean meal and commercial soybean meal partly replacing fish meal on the activities of digestive enzymes and aminotransferases in juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvier, 1828). *Aquaculture Research*, 45(6), 1051-1060.
- Liaset B, Lied E and Espe M. 2000. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 581-589.
- Lin S and Luo L. 2011. Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fish meal on growth, digestive enzymes and transaminase activities in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Animal Feed Science and Technology*, 168(1), 80-87.
- Manjappa K, Keshavanath P and Gangadhara B. 2002. Growth performance of common carp, *Cyprinus carpio* fed varying lipid levels through low protein diet, with a note on carcass composition and digestive enzyme activity.
- Miles RD and Chapman. 2015. University of Florida-Fish meal is recognized by nutritionists as a high-quality, very digestible feed ingredient that is favored for addition to the diet

- of most farm animals, especially fish and shrimp. Retrieved from <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- Miyashita S. 2002. Studies on the seedling production of the Pacific bluefin tuna, *Thunnus thynnus orientalis*. Bull. Fish. Lab. Kinki Univ, 8, 1-171.
- Moyano FJ, Diaz M, Alarcon FJ and Sarasquete MC. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Fish Physiology and Biochemistry, 15(2), 121-130.
- Neklyudov AD, Ivankin and Berdutina AV. 2000. Properties and uses of protein hydrolysates. Applied Biochemistry and Microbiology, 36, 452-459.
- NFRDI (National institute of fisheries science). 2015. Best of 10 performances at 2015, Retrieved from http://www.nifs.go.kr/page?id=10bestlist_2015_01.
- Ngo DH, Qian ZJ, Ryu B, Park JW and Kim SK. 2010. In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. Journal of Functional Foods, 2, 107-117.
- Ogino C and Yang GY. 1980. Requirements of carp and rainbow trout for dietary manganese and copper. Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries, 46(4), 455-458.
- Parra AM, Rosas A, Lazo JP and Viana MT. 2007. Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. Fish physiology and biochemistry, 33(3), 223-231.
- Refstie S, Olli JJ and Standal H. 2004. Feed intake, growth, and protein utilisation by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. Aquaculture, 239, 331-349.

- Robinson EH, Rawles SD, Yette HE and Greene LW. 1984. An estimate of the dietary calcium requirement of fingerling *Tilapia aurea* reared in calcium-free water. *Aquaculture*, 41(4), 389-393.
- Saito H, Watanabe T and Murase T. 1995. The fatty acid composition characteristic of a highly migratory fish, with seasonal variation of docosahexaenoic acid content in lipid of bonito (*Euthynnus pelamis*). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(11), 2186-2188.
- Sakakura Y and Tsukamoto K. 1998. Effects of density, starvation and size difference on aggressive behaviour in juvenile yellowtails (*Seriola quinquevadiata*). *Journal of Applied Ichthyology*, 14(1-2), 9-13.
- Sakamoto S and Yone Y. 1978. Requirement of red sea bream for dietary iron-II. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 44, 223-225.
- Satoh S, Tabata K, Izume K, Takeuchi T and Watanabe T. 1987. Effect of dietary tricalcium phosphate on availability of zinc to rainbow trout [*Salmo gairdnerii*]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*.
- Sawada T, Takahashi K and Hatano M. 1993. Triglyceride composition of tuna and bonito orbital fats. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*.
- Shearer KD. 1989. Whole body magnesium concentration as an indicator of magnesium status in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 77(2-3), 201-210.
- Shiau SY and Hsieh JF. 2001. Quantifying the dietary potassium requirement of juvenile hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *British Journal of Nutrition*, 85(2), 213-218.

- Shimeno S. Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Pp. 181-191 in Handbbok of Nutrition Requirements of Finfish, R. P. Wilson, ed. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Takeuchi T, Masuda R, Ishizaki Y, Watanabe T, Kanematsu, M, Imaizumi K and Tsukamoto K. 1996. Determination of the requirement of larval striped jack for eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid using enriched *Artemia* nauplii. *Fisheries science*, 62(5), 760-765.
- Takeuchi T, Toyota M, Satoh S and Watanabe T. 1990. Requirement of juvenile red seabream *Pagrus major* for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56 1263–1269.
- Takii K, Seoka M, Izumi M, Hosokawa H, Shimeno S, Ukawa M and Kohbara J. 2007a. Apparent digestibility coefficient and energy partition of juvenile Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* and chub mackerel, *Scomber japonicus*. *Aquaculture Science*, 55, 571-577.
- Takii K, Seoka M, Ohara N, Nasu T, Oda S, Miyashita S and Hosokawa H. 2007b. Dietary utility of Chilean fish meal and pollack liver oil for juvenile Pacific bluefin tuna. *Aquaculture Science*.
- Teshima S, Kanazawa A and Koshio S. 1992. Ability for bioconversion of n-3 fatty acids in fish and crustaceans. *Océanis* 18 67–75.
- Tibaldi E, Hakim Y, Uni Z, Tulli F, de Francesco M, Luzzana U and Harpaz S. 2006. Effects of the partial substitution of dietary fish meal by differently processed soybean meals on growth performance, nutrient digestibility and activity of intestinal brush border enzymes in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 261(1), 182-193.

- Watanabe T, Arakawa T, Takeuchi T and Sato S. 1989. Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficiency in juvenile striped jack *Pseudocaranx dentex*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55 1989–1995
- Worthington CC. 1991. *Worthington enzyme manual related Biochemical*. 3rd Edition. Freehold. New Jersey, pp.38-42.

감사의 글

석사과정 동안 너무나 많은 분들께 도움을 받았습니다. 짧은 글로 고마움을 모두 표현할 수 없지만 대신하고자 합니다. 저를 학문의 길로 이끌어 주신 이경준 교수님께 감사의 인사를 드립니다. 심사를 위해 시간을 내어주신 김기영 교수님, 학사뿐만 아니라 석사과정 동안 많은 가르침을 주신 송춘복 교수님, 이제희 교수님, 허문수 교수님, 여인규 교수님, 전유진 교수님, 정준범교수님, 정석근 교수님, 이승현 교수님께도 감사드립니다.

연구실의 기둥이자 힘든 일이 있을 때 항상 도움을 준 민기형과 초롱누나를 비롯하여, 산업전선에서 열심히 일하고 있는 세진이형, 봉주형, 성삼이형, 항상 칭찬과 격려로 힘을 실어주었던 대한이형, 진우형, 지훈이형, 선배들이 시키는 일 다하는 학부생 후배들 지혁, 재범, 현운, 대현이에게 너무나 고맙습니다.

그리고 항상 만날 때 많은 조언과 격려를 아끼지 않은 제주수산연구소의 지승철박사님을 비롯하여, 실험에 많은 도움을 주신 강운정 선생님, 이기표 선생님께 머리 숙여 깊이 감사드립니다.

마지막으로 지금까지 제가 공부에 매진할 수 있도록 곁에서 응원해 주신 아버지와 어머니 정말 사랑하고 존경합니다. 힘들 때 옆에서 많은 위로를 해준 소윤누나, 유정누나, 보경누나, 가족들, 그리고 항상 저를 이해해준 유정이에게 이 논문을 바칩니다. 논문을 마무리하며 많은 아쉬움이 남습니다. 부족한 부분은 앞으로 채워나가도록 노력하겠습니다. 저에게 주신 고마움은 평생 잊지 않고 간직하며 살겠습니다. 다시 한번 모든 분들께 감사드립니다.

2018년 01월 05일

신재형 올림.