



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](#)

박사학위논문

단백질 원료 혼합에 의한 저어분  
넙치 사료 연구

제주대학교대학원

해양생명과학과

김민기

2020년 02월



# 단백질 원료 혼합에 의한 저어분 넙치 사료 연구

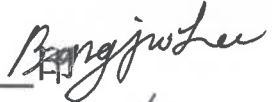


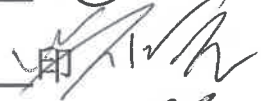

지도교수 이 경 준

김 민 기

이 논문을 이학 박사학위 논문으로 제출함

2019년 12월

김민기의 이학박사 학위논문을 인준함

심사위원장	이 봉 주	
위	원 이 승 형	
위	원 송 진 우	
위	원 박 상 릉	
위	원 이 경 준	

제주대학교 대학원

2019년 12월

# 목 차

**LIST OF FIGURES** .....iv

**LIST OF TABLES** .....vi

**Abstracts** .....viii

## CHAPTER 1. 서론

1.1. 어분대체의 필요성 ..... 1

1.2. 식물성 단백질원 ..... 2

1.3. 동물성 단백질원 ..... 4

1.4. 동·식물성 단백질 원료 혼합 ..... 5

1.5. 어분대체 첨가제 ..... 5

## CHAPTER 2. 식물성 단백질 혼합물을 이용한 넙치(*Paralichthys olivaceus*)

### 사료 내 어분대체 가능성 평가

2.1. 재료 및 방법 ..... 7

2.1.1. 실험사료 ..... 7

2.1.2. 실험어 및 사육관리 ..... 13

2.1.3. 어체측정 ..... 13

2.1.4. 샘플수집 ..... 14

2.1.5. 일반성분 분석 ..... 14

2.1.6. 생화학적 분석 ..... 15

2.1.7. 통계 분석.....	15
2.2. 결과.....	16
2.3. 고찰.....	19

**CHAPTER 3. 동·식물성 단백질 혼합물을 이용한 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 사료 내 어분대체 가능성 평가**

3.1. 재료 및 방법.....	23
3.1.1. 실험사료.....	23
3.1.2. 실험어 및 사육관리.....	29
3.1.3. 어체측정.....	30
3.1.4. 샘플수집.....	31
3.1.5. 일반성분 분석.....	31
3.1.6. 생화학적 분석.....	32
3.1.7. 소화율 분석.....	32
3.1.8. 조직학적 분석.....	34
3.1.9. 통계 분석.....	35
3.2. 결과.....	36
3.3. 고찰.....	52

**CHAPTER 4. 단백질 원료 혼합물을 이용한 무어분(fish meal-free) 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 사료 개발을 위한 연구**

4.1. 재료 및 방법.....	64
-------------------	----

4.1.1. 실험사료.....	57
4.1.2. 실험어 및 사육관리 .....	60
4.1.3. 어체측정.....	60
4.1.4. 샘플수집.....	61
4.1.5. 일반성분 분석 .....	62
4.1.6. 생화학적 분석 .....	62
4.1.7. 소화율 분석 .....	62
4.1.8. 조직학적 분석 .....	63
4.1.9. 통계 분석.....	64
4.2. 결과.....	65
4.3. 고찰.....	73
요 약 문 .....	77
참 고 문 헌.....	81
감사의 글.....	99

## LIST OF FIGURES

Figure 1. The diagram of Guelph system. ....	34
Figure 2. Changes in mean body weight of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> (initial mean body weight: 5.41±0.01g) fed the experimental diets for 15 weeks (trial 3-1). ....	41
Figure 3. Changes in mean body weight of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> (initial body weight: 196±2g) fed the experimental diets for 6 months (trial 3-2). ....	42
Figure 4. Changes in mean body weight of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> (initial body weight: 60.9±0.3g) fed the experimental diets for 5 months (trial 3-3). ....	43
Figure 5. Changes in mean body weight of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> (initial body weight: 247±4g) fed the experimental diets for 6 months (trial 3-4). ....	44
Figure 6. Histological change of the anterior intestine of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> fed the experimental diets for trial 3-2 (5 months). ....	47
Figure 7. Villus heights of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> fed the experimental diets for trial 3-2 (5 months). ....	48
Figure 8. Histological change of the anterior intestine of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> fed the experimental diets (trial 3-4). ....	49
Figure 9. Apparent digestibility coefficient of dry matter and protein in the experimental diet (trial 3-2). ....	50
Figure 10. Apparent digestibility coefficient of dry matter and protein in the experimental diet (trial 3-4). ....	51
Figure 11. Experimental diets for trial 4 .....	59
Figure 12. Changes in mean body weight of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> (initial body weight: 150±3g) fed the experimental diets for trial 4 (5 months). ....	67
Figure 13. Histological change of the anterior intestine of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> fed the experimental diets (trial 4). ....	70

Figure 14. Apparent digestibility coefficient of dry matter and protein in the experimental diet (trial 4). ..... 71



## LIST OF TABLES

Table 1. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets in trial 2-1 (% of dry matter basis). .....	9
Table 2. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets in trial 2-2 (% of dry matter basis).....	11
Table 3. Growth performance of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> fed experimental diets for trial 2-1 (7 weeks) and trial 2-2 (9 weeks) <sup>1</sup> .....	17
Table 4. Hematological parameters of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> fed experimental diets for trial 2-1 (7 weeks) and trial 2-2 (9 weeks) <sup>1</sup> . .....	18
Table 5. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets in trial 3-1 and 3-2 (% of dry matter basis).....	25
Table 6. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets in trial 3-3 and 3-4 (% of dry matter basis).....	27
Table 7. Growth performance and morphological indexes of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> fed experimental diets for trial 3-1 (15 weeks), trial 3-2 (6 months), trial 3-3 (5 months) and trial 3-4 (6 months). .....	39
Table 8. Hematological parameters of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> fed the experimental diets for trial 3-1 (15 weeks), trial 3-2 (6 months), trial 3-3 (5 months) and trial 3-4 (6 months). .....	45
Table 9. Whole-body composition (% of wet weight) of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> fed the experimental diets for trial 3-1 (15 weeks), trial 3-2 (6 months), trial 3-3 (5 months) and trial 3-4 (6 months) <sup>1</sup> .....	46
Table 10. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets in trial 4 (% of dry matter basis).....	57
Table 11. Growth performance and morphological indexes of olive flounder <i>Paralichthys</i>	

<i>olivaceus</i> fed the experimental diets for trial 5 (20 weeks). .....	65
Table 12. Hematological parameters of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> fed the experimental diets for trial 4 (5 months) <sup>1</sup> . .....	68
Table 13. Muscle composition (% of wet basis) of olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> fed the experimental diets for trial 4 (5 months) <sup>1</sup> . .....	69

## Abstract

### **Evaluation of a mixture of plant protein source as a partial fish meal replacement in diets for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus***

This study was conducted to examine a mixture of plant protein sources (soybean meal, wheat gluten and soy protein concentrate) as a fish meal (FM) substitute. In trial 2-1, the basal diets were formulated to contain 65% FM (FM65). Five other diets were formulated to contain 59%, 55%, 52%, 49% and 46% FM, respectively (FM59, FM55, FM52, FM49 and FM46). In trial 2-2, the basal diet was formulated to contain 60% FM (FM60). Five other experimental diets were formulated to contain 54%, 51%, 48%, 45% and 42% FM, respectively (FM54, FM51, FM48, FM45 and FM42). Three synthetic amino acids (lysine, threonine and methionine) were added to the experimental diets. Groups of fish in trial 2-1 ( $6.76 \pm 0.03$  g) and trial 2-2 ( $32.5 \pm 0.1$  g) were fed one of the experimental diets for 7 and 9 weeks, respectively. Each experiment was carried out in triplicates. There were no significant differences among groups in terms of growth performance, feed utilization, survival or hematological parameters in both experiments. The results indicated that a mixture of soybean meal, wheat gluten and soy protein concentrate, supplemented with three synthetic amino acids, can be used to reduce FM up to 42-46% in diets for juvenile olive flounder.

## **Effects of fish meal replacement in extruded pellet diet on growth, feed utilization and digestibility in olive flounder *Paralichthys olivaceus***

Trial 3-1 and 3-2 were investigated to examine effects of replacing fish meal (FM) with a mixture of four protein sources (wheat gluten, soy protein concentrate, tankage meal, and poultry by-product meal) in an extruded pellet (EP) diet for olive flounder *Paralichthys olivaceus*. The basal diets were formulated to contain 65% FM (FM65). Four other experimental diets were formulated to contain 52%, 46%, 39% and 33% FM, respectively (FM52, FM46, FM39 and FM33). Trial 3-3 and 3-4 were performed to reduce the cost of trial 3-1 and 3-2 diets. Two experimental diets were formulated contain 46% and 39% FM, respectively (FM46 and FM39). One experimental diet was formulated to contain 39% FM with different ratio of the protein sources (FM39\_2). Taurine and betaine were added as attractants in the diets. Groups of fish in trial 3-1 ( $5.41 \pm 0.01$  g), 3-2 ( $196 \pm 2$  g), 3-3 ( $60.9 \pm 0.3$  g) and 3-4 ( $247 \pm 4$  g) were fed one of the respective experimental diets for 15 weeks, 6 months, 5 months and 6 months, respectively. Each experiment was carried out in triplicates. There were no significant differences among groups in terms of growth performance, feed utilization, survival, hematological parameters or histological parameters in the experiments. In trial 3-2, dry matter and protein digestibility of FM 33 were significantly lower than those of the FM65 at water temperatures below  $18.5^{\circ}\text{C}$  at 4th and 6th month. In trial 3-2, protein digestibility of FM46 and FM39 were significantly higher than those of the FM65. It shows that a proper mixture of protein sources (wheat gluten, soy protein concentrate, tankage meal, and poultry by-product meal) with taurine and betaine can be used to reduce FM up to 33% level in diets. It also shows that up to 39% of fish meal could be safely used in EP diets during periods of low water temperature.

**Development of fish meal-free extruded pellet diet for olive flounder *Paralichthys olivaceus* for olive flounder using a mixture of protein sources.**

This study was investigated to examine the effects of replacing FM with a mixture of five protein sources (wheat gluten, soy protein concentrate, tankage meal, poultry by-product meal and tuna by-product meal) in an extruded pellet (EP) diet for olive flounder *Paralichthys olivaceus*. The basal diets were formulated to contain 70% FM (FM70). Five other experimental diets were formulated to contain 45%, 40%, 35%, 20% and 0% FM, respectively (FM45, FM40, FM35, FM20 and FM0). Taurine, betaine and methionine were added to the experimental diets. Triplicate groups of fish ( $150 \pm 1$ ) were fed the diets to apparent satiation. After 5 months of the feeding trial, no significantly differences were found in the groups for survival, hematological parameters and histological parameters. Over the course of a 3-month feeding trial, there were no significantly differences between the groups for growth performance and feed utilization. However, the final results showed that FM free diet (FM0) would have problems in growth performance, feed utilization or digestibility compared to FM70. It shows that a proper mixture of the five protein sources (wheat gluten, soy protein concentrate, tankage meal, poultry by-product meal and tuna by-product meal) with taurine and betaine supplementation will allow a low FM diets, up to 20% FM level, for olive flounder.

# CHAPTER 1

## 서 론

### 1.1. 어분대체의 필요성

넙치는 세계적인 고급 해산 양식 어종으로, 성장이 빠르고 맛이 좋은 수산양식물로 인식되면서 식용으로 각광받아 왔다. 국내 넙치 양식은 1980년대 들어 인공종묘 생산기술이 개발된 이후 지속적으로 발전하고 있다 (Son et al., 2006). 국내 넙치 양식생산량은 1990년 1,037톤에서 2018년 37,238톤으로 30여년간 35배 이상 증가되었다(Pham et al., 2005; KOSIS, 2019). 하지만 양식산업이 발전함에도 몇 가지 문제점은 남아있는 실정이다. 일반적으로 양식어류 1kg 생산 시 1.9kg의 자연산 어류가 필요하며, 육식성 어류의 경우 5kg의 자연산 어류가 사용된다(Naylor et al., 2000). Hardy (2010)는 양식 생산과정에 투입된 어족자원이 양식 생산량보다 더 많이 소모되고 있는 현상을 두고 “지속 가능한 양식의 모순”이라 말하였다. 어족자원 보호와 양식의 지속가능한 발전을 위해서는 사료 내 어분을 대체하기 위한 노력이 필요하다.

사료 내 어분 대체는 경제적인 부분에 있어서도 중요한 요소이다. 성공적인 양식산업 경영을 위해서는 사료, 양식 환경, 어병 등 다양한 요인을 고려해야 한다. 사료비는 어류 양식 생산원가의 약 50%를 차지하는 매우 중요한 요인이다(Kim et al., 2019a). 하지만, 어획량 감소와 생산국의 어분 소비 증가로 인해 수급이 불안정하여 어분의 가격이 점차 상승하고 있다(Ha and Kim, 2018). 넙치는 단백질 이용성이 높고(Kim et al., 2000), 탄수화물의 이용 능력이 낮다(Shin and Kim, 2002). 그렇기 때문에 사료 내 단백질의 공급은 영양소 요구량을 충족

시키는데 매우 중요하다(Moon and Gatlin, 1991; Kim et al., 2000; Kikuchi and Takeuchi, 2002; NRC, 2011). 넙치 사료 내 적정 단백질 요구량은 46.4-51.2%이며, 57.7%에서 최대 성장이 나타난다(Kim et al., 2002). 이는 Korean rockfish *Sebastes schlegeli*와 같은 타 어종과 비교하여 높은 편이다(Lee et al., 1993a). 높은 단백질 요구량을 충족시키기 위해 넙치 사료에는 많은 양의 어분이 사용되고 있다. Kim et al. (2011)은 넙치 사료 내 어분 사용량이 40-60%라고 보고하였으며, 배합사료 회사에서는 사료 내 어분을 65% 이상 사용하기도 한다(Kim et al., 2019b). 어분 사용량이 증가할수록 사료의 가격은 상승할 수 밖에 없으며, 이는 곧 양식산업 경영에 있어 큰 부담으로 작용한다.

## 1.2. 식물성 단백질 원료

사료 내 어분을 줄이기 위한 다양한 연구가 되어왔고, 대체원료로써 식물성 단백질 원료가 주로 사용되었다. 식물성 단백질 원료의 사용은 경제적이며, 지속가능한 양식을 위한 요소 중 하나이다(Gisbert et al., 2016). Hardy, (2010)는 어분의 수요가 공급량을 넘어설 것이기 때문에 지속가능한 양식을 위해서는 식물성 단백질 원료를 이용한 어분의 대체가 필요하다고 제안하였다.

식물성 단백질 원료의 대표적인 형태는 종실의 기름을 짜고 남은 찌꺼기를 이용한 유박류(oilseed meal)이다. 유박류의 종류에는 대두박(soybean meal), 면실박(cottonseed meal), 채종박(rapeseed meal), 아마인박(linseed meal), 루핀박(lupin meal), 해바라기박(sunflower meal) 등이 있다. 유박류의 단백질 함량은 원료의 종류, 가공방법에 따라 차이가 있지만 30-52%로 나타난다(NRC, 2011). 유박류의 가격은 어분(1,700-2,350원/kg)에 비해 저렴한 215-395원/kg 에 불과하다(USDA Dec 23, 2019). 식물성 단백질 농축물(plant protein concentrate)은 가공과정을 통해

유박류의 단백질 함량을 높인 원료를 말한다. 콘글루텐밀(corn gluten meal), 밀글루텐(wheat gluten), 대두농축단백(soy protein concentrate), 완두농축단백(pea protein concentrate), 감자농축단백(potato protein concentrate)이 대표적인 식물성 단백질 농축물에 속한다. 식물성 단백질 농축물은 단백질 함량(crude protein: 60~80%)이 매우 높아 양어사료 내 어분 대체원료로써의 가치가 높은 것으로 알려졌다.

많은 장점에도 불구하고 넙치 사료 내 식물성 원료의 사용은 제한적인 상황이다. 대부분의 식물성 단백질 원료에는 protease inhibitors, lectin, non-starch oligosaccharide, saponin 등의 다양한 항영양인자(anti-nutritional factors)가 포함되어 있다(Korgdahl et al., 2010). 항영양인자는 어체의 성장과 사료효율의 감소를 야기시킨다(Lim et al., 2010). 특히, 항영양인자가 함유된 사료를 어류에게 장기간 공급할 경우 장내 염증반응을 일으켜 장내 조직형태학적 변화를 야기시키고, 소화율을 감소시킨다고 보고되었다(Gu et al., 2016). 식물성 단백질 농축물의 경우가공과정을 통해 원료 내 항영양인자가 제거 또는 감소되기도 한다. 하지만 원료가공에 따른 비용이 발생하여, 몇몇 식물성 단백질 원료의 경우 어분만큼 가격이 비싸 어분대체를 위해 사료 내 많은 양을 사용하기 어려운 실정이다(Oliva-Teles et al., 2015).

식물성 단백질 원료를 이용하여 어분을 대체할 경우 생기는 또 한가지 문제는 필수아미노산의 결핍이다. 대부분의 식물성 원료는 한가지 또는 그 이상의 필수아미노산이 부족하며, 이를 제한아미노산이라고 한다. 이전 어분대체 연구에서는 식물성 단백질 원료를 다량 사용할 경우 제한아미노산으로 인한 부작용이 발생된다고 보고되었다(Kim et al., 2013; Kim et al., 2014a). 제한아미노산에 의한 부작용 예방을 위해서는 사료 내 유리 아미노산을 첨가하거나 여러 원료를



혼합하여 제한아미노산을 보충해야 한다. 실제로 많은 연구에서 사료 내 식물성 단백질 원료로 어분을 대체할 경우 아미노산의 결핍을 예방하기 위해 사료 내 아미노산을 첨가하거나 원료를 혼합하여 사용하였다(Kaushik et al., 2004; Lee et al., 2006; Lim and Lee, 2009).

### 1.3. 동물성 단백질 원료

동물성 단백질 원료는 단백질 함량이 높고(50-80%), 식물성 단백질에 비해 아미노산 조성이 우수하다(NRC, 2011). 또한, 비타민, 미네랄, 타우린 등이 다량 함유되어 있어 영양적으로 우수한 가치를 지닌다. 우수한 기호성을 지니며, 항영양인자가 없다는 것 또한 장점 중 하나이다. 특히, 어분에 비해 가격이 저렴하여 어분을 대체하는데 있어 높은 잠재력을 가지고 있다.

하지만 동물성 단백질 원료는 식물성 단백질 원료에 비해 변질되기 쉬우며 미생물에 의한 오염이 쉽게 일어날 수 있다. 또한, 항생제 등의 잔류물질, 원료 원물의 질병 안정성, 생물 농축에 의한 중금속 축적과 같은 문제가 제기되기도 한다. 유럽연합(European Union)의 경우 광우병, 조류독감과 같은 질병에 대한 우려 때문에 동물성 단백질 원료의 사용을 규제하고 있다(Klinger and Naylor, 2012). 우리나라에서는 참치부산물 기반의 사료를 공급한 넙치에서 수은 함량이 안전 임계 값(0.6-0.8 mg/kg)을 초과하여 정부에 의해 리콜(recall)되기도 하였다(Kim et al., 2019c).

영양적인 부분에 있어서도 몇 가지 문제가 제기되고 있다. 아미노산 조성이 식물성 단백질 원료에 비해 우수하다고는 하나 어분에 비해서는 불균형적이다. 혈분(blood meal)은 isoleucine, methionine이 부족하고, 가수분해 우모분(hydrolysed feather meal)은 methionine, lysine 부족하며, 육분(meat meal)과 육골분(meat and bone

meal)은 methionine, tyrosine 이 부족하다고 보고되었다(Tacon et al., 2009). 원료에 함유된 포화지방도 문제점으로 지적된다. 포화지방은 어류에 축적되는 경향이 있어 어류 품질에 영향을 미친다고 보고되었다(Oliva-Teles et al., 2015).

#### 1.4. 동·식물성 단백질 원료 혼합

사료 내 어분을 대체하기 위한 다양한 연구가 진행되어왔으나, 한 종류의 단백질 원료만을 이용하여 어분을 대체할 경우, 대체가능성의 한계를 보였다(Chen et al., 2010; Dawood et al., 2015). 특히, 단일 원료만으로 어분을 대체할 시, 제한아미노산과 항영양인자로 인한 소화율 저하 등의 문제가 발생하였다(Kim et al., 2000; Krogdahl et al., 2010). 다양한 단백질 원료를 혼합하여 사용할 경우, 제한아미노산과 부족한 영양소를 서로 보완할 수 있어 한 가지 단백질 원료를 사용하는 것 보다 효과적으로 어분을 대체할 수 있다고 보고되었다(Lee et al., 1996). 특히, 동·식물성 단백질 원료의 혼합은 다량의 어분을 대체할 수 있는 최적의 방법으로 보고되고 있다(Kissinger et al., 2016; Scerra et al., 2016).

#### 1.5. 어분대체 첨가제

타우린은 대부분의 동물조직에 고농도로 함유되어 있으며 식물조직에는 거의 존재하지 않는 황함유 아미노산의 일종이다. 세포막의 안정화와 항산화 효과 및 삼투압 조절에 타우린이 중요한 역할을 하기 때문에 어류는 사료로부터 충분한 타우린이 공급되어야 한다. 타우린은 어분과 동물성 원료에 다량 함유되어 있으나, 식물성 원료에는 거의 없어 식물성 원료를 이용한 어분대체 연구 시 타우린의 첨가가 반드시 필요하다(Lunger et al., 2007; Lim et al., 2013).

넙치사료 내 타우린을 첨가할 경우 성장률, 사료효율이 유의적으로 향상된다고 보고되었다(Park et al., 2002; Kim et al., 2005). 특히, 사료에 식물성 단백질 원료가 다량 함유되면 타우린이 반드시 첨가되어야만 하는 조건부 필수영양소로 알려져 있다(Lim et al., 2013). 넙치사료 내 타우린의 요구량은 red seabream (*Pagrus major*, 0.5%, Matsunari et al., 2008), European seabass (0.2%, Martinez et al., 2004), parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*, 0.88%, Lim et al., 2013)에 비해 매우 높은 1.5-2.0%로 보고되었다(Park et al., 2001).

베테인은 메틸기 공여체로써 methionine 과 비교하여 약 3.75배의 메틸기를 함유하며, methionine, carnitine, phosphatidyl, choline, creatine의 합성에 사용될 수 있다고 보고되었다(Remus et al., 1995; Adjoumani et al., 2017). 또한 사료 내 베테인의 첨가는 어류의 사료 기호성을 높여주고, 스트레스로부터 세포를 보호하며, 삼투압의 조절에 도움을 줄 뿐만 아니라 장내 염증에 대한 저항성을 증가시킨다고 보고되었다(Craig, 2004; Tiril et al., 2008; Sun et al., 2020). 이 외에도 사료 내 베테인이 포함된 섭이촉진제를 사용할 경우 넙치의 성장과 소화율을 향상시킬 수 있다고 보고되었다(Choi et al., 2004). 다른 어종에서도 베테인이 첨가된 사료를 공급한 경우 어류의 성장률, 사료효율, 생존율이 증가하였다고 보고되었다(Shankar et al., 2008; Gosh et al., 2019). 위와 같은 이유로 어분대체 연구 또는 식물성원료가 많은 사료에서 베테인이 첨가제로 사용된다(Iwashita et al., 2008; Tiril et al., 2008).

## CHAPTER 2

### 식물성 단백질 혼합물을 이용한 넙치(*Paralichthys olivaceus*)

#### 사료 내 어분대체 가능성 평가

##### 2.1. 재료 및 방법

###### 2.1.1. 실험사료

실험 2-1에 사용된 실험사료 배합비는 Table 1에 나타내었다. 실험사료에 사용된 어분은 일반적으로 사용되는 갈색어분(brown fish meal)이 사용되었다. 실험 2-1은 대조사료 내 어분의 함량이 65%로 설정되었다(FM65). 5종의 실험사료는 대조사료 내 어분이 대두박, 밀글루텐, 대두농축단백 혼합물로 대체되었다. 실험 사료 내 어분 함량이 각각 58.50%, 55.25%, 52.00%, 48.75%, 45.50%가 되도록 설정되었다(FM59, FM55, FM52, FM49, FM46). 대체실험 사료 간의 동일한 조단백(52%), 조지질(10.0%), 인(1.5%) 조성을 위해 밀가루, 어유, 일인산칼슘이 사용되었다. 동일한 필수 아미노산 조성을 위해 유리 아미노산 3종(lysine, threonine, methionine)을 첨가하였다.

실험 2-2에 사용된 실험사료 배합비는 Table 2에 나타내었다. 실험 2-2는 대조사료 내 어분의 함량이 60%로 설정되었다(FM60). 5종의 실험사료는 대조사료 내 어분이 대두박, 밀글루텐, 대두농축단백 혼합물로 대체되었다. 실험 사료 내 어분 함량이 54%, 51%, 48%, 45%, 42%가 되도록 설정되었다(FM54, FM51, FM48, FM45, FM42). 대체실험사료 간의 동일한 조단백(49%), 조지질(10.5%),

인(1.4%) 조성을 위해 밀가루, 어유, 일인산칼슘이 사용되었다. 동일한 필수 아미노산 조성을 위해 유리 아미노산 3종(lysine, threonine, methionine)이 첨가하였다.

실험사료에 사용되는 사료원들 중 분말형태의 사료원들은 사료혼합기를 이용하여 완전히 섞은 후, 어유를 첨가하였다. 이 후 사료원 총 중량의 15%에 해당하는 증류수를 첨가하여 사료혼합기에서 혼합·반죽 하였다. 혼합반죽물은 펠렛성형기(SP-50, Gungang ENG, Korea)를 이용하여 각각 2 mm, 3 mm 크기의 펠렛 사료 형태로 제작되었다. 제작된 실험사료는 건조기를 이용하여 25°C에서 24시간 건조시켜 사료공급 전까지 -20°C 에 보관하였다.

**Table 1. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets in trial 2-1 (% of dry matter basis).**

Trial 2-1	Diets					
	FM65	FM59	FM55	FM52	FM49	FM46
Brown fish meal <sup>1</sup>	65.00	58.50	55.25	52.00	48.75	45.50
Soybean meal <sup>2</sup>	5.00	7.60	8.90	10.20	11.50	12.80
Wheat gluten <sup>3</sup>	0.00	1.95	2.925	3.90	4.875	5.85
Soy protein concentrate <sup>4</sup>	0.00	1.95	2.925	3.90	4.875	5.85
Corn gluten meal <sup>5</sup>	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Wheat flour	19.00	17.50	16.70	16.10	15.40	14.80
Fish oil <sup>6</sup>	3.00	3.60	3.90	4.10	4.40	4.70
Lysine <sup>7</sup>	0.00	0.20	0.30	0.40	0.50	0.50
Threonine <sup>7</sup>	0.00	0.10	0.20	0.20	0.30	0.30
Methionine <sup>7</sup>	0.00	0.10	0.20	0.20	0.20	0.30
Lecithin	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Mono calcium phosphate	0.00	0.50	0.70	1.00	1.20	1.40
Mineral Mixture	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin Mixture	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Choline	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
<i>Proximate composition (% of dry matter)</i>						
Moisture	6.76	8.06	7.94	7.85	8.60	7.69
Crude protein	52.4	52.2	52.0	51.8	51.9	51.7
Crude lipid	10.8	10.9	10.7	11.0	10.5	10.8
Crude ash	11.9	11.4	11.0	10.7	10.7	10.5

<sup>1</sup>Brown fish meal (crude protein 68.0%, crude lipid 8.6%, crude ash 17.1%)

<sup>2</sup>Soybean meal (crude protein 52.7%, crude lipid 1.8%, crude ash 6.8%)

<sup>3</sup>Wheat gluten (crude protein 83.2%, crude lipid 3.49%, crude ash 1.3%)

<sup>4</sup>Soy protein concentrate (crude protein 68.9%, crude lipid 0.5%, crude ash 7.1%)

<sup>5</sup>Corn gluten meal (crude protein 64.1%, crude lipid 3.5%, crude ash 0.6)

<sup>6</sup>Fish oil was by E-wha oil Co., Ltd., Busan, Korea.

<sup>7</sup>Lysine, threonine and methionine were by Vixxol Co., Ltd., Gyeonggi, Korea.

**Table 2. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets in trial 2-2 (% of dry matter basis).**

Trial 2-2	Diets					
	FM65	FM59	FM55	FM52	FM49	FM46
Brown fish meal <sup>1</sup>	60.00	54.00	51.00	48.00	45.00	42.00
Soybean meal <sup>2</sup>	5.00	7.40	8.60	9.80	11.00	12.20
Wheat gluten <sup>3</sup>	0.00	1.80	2.70	3.60	4.50	5.40
Soy protein concentrate <sup>4</sup>	0.00	1.80	2.70	3.60	4.50	5.40
Corn gluten meal <sup>5</sup>	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Wheat flour	23.50	22.20	21.70	21.00	20.40	19.90
Fish oil <sup>6</sup>	3.50	4.00	4.20	4.50	4.70	5.00
Lysine <sup>7</sup>	0.00	0.10	0.20	0.30	0.40	0.40
Threonine <sup>7</sup>	0.00	0.10	0.10	0.10	0.20	0.20
Methionine <sup>7</sup>	0.00	0.10	0.10	0.20	0.20	0.20
Lecithin	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Mono calcium phosphate	0.00	0.50	0.70	0.90	1.10	1.30
Mineral Mixture	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin Mixture	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Choline	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
<i>Proximate composition (% of dry matter)</i>						
Moisture	5.97	5.67	6.26	5.39	5.33	5.18
Crude protein	49.3	49.4	49.3	49.5	49.7	49.6
Crude lipid	10.8	10.8	10.9	10.0	10.1	10.0
Crude ash	11.7	11.2	11.1	10.8	10.6	10.6



<sup>1</sup>Brown fish meal (crude protein 68.0%, crude lipid 8.6%, crude ash 17.1%)

<sup>2</sup>Soybean meal (crude protein 52.7%, crude lipid 1.8%, crude ash 6.8%)

<sup>3</sup>Wheat gluten (crude protein 83.2%, crude lipid 3.49%, crude ash 1.3%)

<sup>4</sup>Soy protein concentrate (crude protein 68.9%, crude lipid 0.5%, crude ash 7.1%)

<sup>5</sup>Corn gluten meal (crude protein 64.1%, crude lipid 3.5%, crude ash 0.6)

<sup>6</sup>Fish oil was by E-wha oil Co., Ltd., Busan, Korea.

<sup>7</sup>Lysine, threonine and methionine were by Vixxol Co., Ltd., Gyeonggi, Korea.

### 2.1.2. 실험어 및 사육관리

실험 2-1에 사용된 실험어는 제주도 서귀포시 성산읍 신산리에 위치한 대형수산에서 구입되었다. 실험환경에 대한 적응을 위해 시판되는 넙치용 배합사료를 공급하며 순치하였다. 평균무게  $6.76 \pm 0.03\text{g}$ 의 넙치를 18개 150 L 원형 propylene (PP) 수조에 55마리씩 각 실험구당 3반복으로 배치하였다. 사육실험은 7주간 진행되었다. 실험사료는 1일 3회(08:00, 13:00, 18:00) 반복 공급되었다. 사료 공급 30분 후 환수를 진행하였다. 사육수는 모래여과해수를 사용하여 4-5 L/min의 유수량이 되도록 조절되었다. 실험 2-1의 사육수온은 16.5-22.3°C 였으며, 평균수온은  $19.5 \pm 1.5^\circ\text{C}$ 로 측정되었다.

실험 2-2에 사용된 실험어는 제주도 서귀포시 성산읍 신산리에 위치한 대형수산에서 구입되었다. 실험환경에 대한 적응을 위해 시판되는 넙치용 배합사료를 공급하며 순치하였다. 평균무게  $32.5 \pm 0.1\text{g}$ 의 넙치를 18개 150 L 원형 PP 수조에 30마리씩 각 실험구당 3반복으로 배치하였다. 사육실험은 9주간 진행되었다. 실험사료는 1일 3회(8:00, 13:00, 18:00) 반복 공급되었다. 사료 공급 30분 후 수조 용량의 80% 만큼 환수를 진행하였다. 사육수는 모래여과해수를 사용하여 4-5 L/min의 유수량이 되도록 조절하였다. 각 실험수조 내 사육수 순환과 용존산소 유지를 위하여 에어스톤을 설치하였다. 사육수온은 자연수준에 의존하였다. 실험 2-2의 사육수온은 19.6-30.5°C 였으며, 평균수온은  $23.9 \pm 2.3^\circ\text{C}$ 로 측정되었다.

### 2.1.3. 어체측정

사료 공급 실험 후, 성장률과 사료효율 그리고 생존율의 측정을 위해 실험어를 24시간 절식 시킨 후 실험어류의 수와 무게를 측정하였다. 무게 측정

후 증체율(weight gain, %), 일간성장률(specific growth rate, %), 사료섭취량(feed intake, g/fish), 사료전환효율(feed conversion ratio), 단백질이용효율(protein efficiency ratio), 생존율(survival, %)을 조사하였다. 계산식은 다음과 같다.

- Weight gain (%) =  $100 \times (\text{final mean body weight} - \text{initial mean body weight}) / \text{initial mean body weight}$

- Specific growth rate (%) =  $[(\log_e \text{ final body weight} - \log_e \text{ initial body weight}) / \text{days}] \times 100$

- Feed conversion ratio =  $\text{dry feed fed} / \text{wet weight gain}$

- Protein efficiency ratio =  $\text{wet weight gain} / \text{total protein given}$

- Feed intake (g/fish) =  $\text{dry feed consumed (g)} / \text{fish}$

- Survival (%) =  $\text{number of fish at end of feeding trial} / \text{number of fish stocked} \times 100$

#### 2.1.4. 샘플수집

어체측정 후, 각각의 수조에서 8마리의 어류를 무작위로 선별하였다. 선별된 실험어는 2-phenoxyethanol 용액(100 ppm)을 이용하여 마취시켰으며, 주사기를 이용하여 미부동맥에서 채혈을 실시하였다. 혈액은 헤파린이 20  $\mu\text{L}$ 씩 처리된 1.5mL eppendorf tube 에 넣어 hematocrit, hemoglobin 및 nitroblue tetrazolium (NBT) activity 측정에 사용되었다.

#### 2.1.5. 일반성분 분석

AOAC (2000) 분석법에 따라 실험사료에 대한 일반성분 분석을 진행하였다. 수분은 상압가열건조법(125°C, 3시간), 조회분은 직접회화법(550°C, 4시간)으로

분석되었다. 지방은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 분석되었다. 단백질은 자동조단백질 분석기(Kejltec system 2300, Sweden)로 분석되었다

#### 2.1.6. 생화학적 분석

Hematocrit은 모세혈관 채혈튜브(micro-hematocrit capillary tubes)에 혈액을 채운 후, 혈액 진단원심분리기(Micro Hematocrit VS-12000, Vision Scientific, Korea)에서 10분간 원심분리하여 값이 측정되었다. Hemoglobin 분석은 시판되고 있는 kit시약과 반응시킨 후 혈액 생화학분석기(Express plus system, Bayer, USA)를 이용하여 end point 방법으로 분석되었다. 혈액내의 대식세포 활성(NBT activity)은 Kumari and Sahoo (2006)의 분석방법을 바탕으로 respiratory burst동안 호중구(neutrophils)에 의한 산화 라디칼의 생성량이 측정되었다.

#### 2.1.7. 통계 분석

실험사료의 배치는 완전확률계획법(completely randomized design)을 실시하였고, 성장률, 사료효율, 생존율 및 분석결과들은 SPSS (version 12.0) 프로그램을 이용하여 one-way ANOVA로 통계 분석되었다. 데이터 값의 유의차는 Tukey's HSD 로 평균 간의 유의성( $P \leq 0.05$ )을 비교하였다. 데이터는 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었으며, 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석 되었다.

## 2.2. 결과

### [실험 2-1]

7주간의 사육실험 결과는 Table 3에 나타내었다. FM59 실험구가 FM52, FM49, FM46 실험구에 비해 성장률이 높았으나 유의적인 차이는 없었다. FM52 실험구와 FM49 실험구가 다른 실험구에 비해 사료섭이량이 낮았으나 유의적인 차이는 없었다. FM59 실험구가 사료효율이 가장 높았으나 실험구 사이에 유의적인 차이는 없었다. 생화학적 분석 결과는 Table 4에 나타내었다. FM46 실험구가 다른 실험구에 비해 경향적으로 hemoglobin, hematocrit, NBT 수치가 낮았으나 유의적인 차이는 없었다.

### [실험 2-2]

9주간의 사육실험 결과는 Table 3에 나타내었다. FM60 실험구가 FM54, FM45 실험구에 비해 성장률이 높았으나 유의적인 차이는 없었다. FM54, FM45 실험구가 다른 실험구에 비해 사료섭이량이 높았으나 유의적인 차이는 없었다. FM54, FM45 실험구가 다른 실험구에 비해 사료효율이 낮았으나 유의적인 차이는 없었다. 생화학적 분석 결과는 Table 4에 나타내었다. FM42 실험구가 다른 실험구에 비해 hemoglobin, hematocrit 수치가 낮았으나, 유의적인 차이는 없었다.

**Table 3. Growth performance of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed experimental diets for trial 2-1 (7 weeks) and trial 2-2 (9 weeks)<sup>1</sup>.**

<b>Dietary treatment</b>	<b>FBW<sup>2</sup></b>	<b>WG<sup>3</sup></b>	<b>SGR<sup>4</sup></b>	<b>FI<sup>5</sup></b>	<b>FCR<sup>6</sup></b>	<b>PER<sup>7</sup></b>	<b>Survival</b>
<b><i>Trial 2-1</i></b>							
FM65	27.0±0.5	298±6	2.09±0.02	24.6±3.5	1.22±0.16	1.59±0.21	76.4±4.8
FM59	29.7±1.3	340±20	2.24±0.07	24.7±3.7	1.07±0.10	1.80±0.17	71.5±10.0
FM55	27.3±4.0	303±58	2.10±0.22	25.8±4.6	1.27±0.19	1.53±0.22	80.0±16.7
FM52	24.8±2.3	265±36	1.96±0.15	20.7±2.2	1.17±0.25	1.68±0.36	81.8±4.8
FM49	25.1±2.2	274±33	1.99±0.14	20.0±1.8	1.10±0.17	1.77±0.26	80.6±6.9
FM46	25.1±0.8	272±12	1.99±0.05	24.5±0.1	1.33±0.06	1.44±0.07	87.8±1.0
<b><i>Trial 2-2</i></b>							
FM60	155±2	378±8	2.48±0.02	131±25	1.06±0.21	1.96±0.34	62.2±8.4
FM54	141±5	332±15	2.32±0.06	140±19	1.35±0.27	1.55±0.30	42.2±12.6
FM51	152±14	366±42	2.44±0.14	132±20	1.12±0.28	1.88±0.43	66.7±17.3
FM48	152±5	367±15	2.45±0.05	126±22	1.05±0.20	1.99±0.43	62.2±5.1
FM45	146±5	349±17	2.38±0.06	143±24	1.26±0.20	1.64±0.25	57.8±18.4
FM42	152±5	367±14	2.45±0.05	133±28	1.11±0.19	1.88±0.34	55.6±9.6

<sup>1</sup>Values are mean of triplicates and presented as mean ± SD. The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

<sup>2</sup>Final body weight (g)

<sup>3</sup>Weight gain (%)

<sup>4</sup>Specific growth rate (%)

<sup>5</sup>Feed intake (g/fish)

<sup>6</sup>Feed conversion ratio

<sup>7</sup>Protein efficiency ratio

**Table 4. Hematological parameters of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed experimental diets for trial 2-1 (7 weeks) and trial 2-2 (9 weeks)<sup>1</sup>.**

<b>Dietary treatment</b>	<b>Hb<sup>2</sup></b>	<b>Ht<sup>3</sup></b>	<b>NBT<sup>4</sup></b>
<i>Trial 2-1</i>			
FM65	3.59±0.41	29.6±5.7	0.96±0.10
FM59	3.98±0.43	29.8±0.4	1.02±0.08
FM55	3.64±0.88	29.2±2.7	0.90±0.04
FM52	3.63±0.20	30.6±3.6	0.92±0.08
FM49	4.01±0.64	29.0±1.5	0.91±0.01
FM46	3.30±0.19	25.2±4.4	0.85±0.08
<i>Trial 2-2</i>			
FM60	4.75±0.15	31.1±2.8	0.85±0.04
FM54	3.92±0.33	29.0±1.2	0.76±0.08
FM51	5.07±1.33	30.2±2.0	0.90±0.07
FM48	4.12±0.26	29.3±1.5	0.87±0.07
FM45	4.41±0.19	29.9±2.0	0.97±0.02
FM42	3.76±0.34	25.7±2.4	0.89±0.13

<sup>1</sup>Values are mean of triplicates and presented as mean ± SD. The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

<sup>2</sup>Hemoglobin (g/dL).

<sup>3</sup>Hematocrit (%).

<sup>4</sup>Nitro blue tetrazolium activity (absorbance).

### 2.3. 고찰

사료에 식물성 단백질 원료를 이용하여 어분을 대체하는 연구에서 성장률, 사료효율 등에 부작용이 발생한다고 보고되었다(Kim et al., 2000; Deng et al., 2006). 대두박으로 넙치 사료 내 어분을 대체한 연구에서 18.4% 이상 대체할 경우 증체율이 감소하였고, 27.6% 대체할 경우 사료효율이 감소하였다(Kim et al., 2000). 대두농축단백으로 어분을 25% 이상 대체할 경우 성장률, 사료섭취량, 사료효율이 유의적으로 감소하였다(Deng et al., 2006). 산 가수분해 농축대두박으로 어분을 40% 대체하여도 성장률에 차이는 없었으나 30% 이상 대체할 경우 사료효율이 감소하였다(Kim et al., 2014a). Turbot (*Scophthalmus maximus*) 사료 내 어분을 대두농축단백으로 대체한 경우에도 25%까지 대체 가능하다고 보고되었으며, 그 이상 대체할 경우 성장률 및 사료효율이 감소하였다(Day and Plascencia González, 2000). 식물성 단백질 원료는 어분에 비해 아미노산 조성이 불균형적이기 때문에 어분을 식물성 단백질 원료로 대체할 경우 아미노산의 첨가가 필요하다(Gatlin et al., 2007). 이전 연구에서 대두박으로 어분을 20%만 대체할 수 있었으나, 필수아미노산을 첨가 할 경우 30% 까지 어분을 대체할 수 있었다(Choi et al., 2004). 대두농축단백으로 어분을 대체한 연구에서도 아미노산을 첨가하면 어분대체에 따른 성장저하를 다소 완화시켰다(Deng et al., 2006). Senegalese sole (*Solea senegalensis*) 사료 내 대두농축단백, 콘글루텐밀, 밀글루텐 혼합물과 아미노산을 혼합하여 사용 할 경우 어분을 100% 대체 할 수 있다고 보고되었다(Silva et al., 2009). 본 연구에서도 필수아미노산 3종을 추가하여 필수아미노산을 충족시켰기 때문에 어분 대체할 경우 성장률과 사료효율의 감소를 보완해 준 것으로 판단된다.

식물성 단백질 원료의 필수아미노산 균형을 맞추고 추가적인 아미노산



보충을 최소화 하기 위해서는 단백질 원료의 합리적인 혼합이 필요하다고 보고하였다 (Cabral et al, 2011). 또한 Kim et al. (2000)은 여러가지 원료의 적절한 혼합이 원료의 부족한 영양소를 보완하여 성장효과를 개선하고 나아가 높은 비율의 어분대체를 실현할 수 있을 것이라 보고하였다. Kikuchi (1999)는 대두박, 진주 담치, 혈분 또는 콘글루텐밀을 혼합하여 넙치 사료 내 어분을 40%까지 감소시킬 수 있다고 보고하였다. 타 어종에서도 식물성 원료의 혼합을 통해 높은 비율의 어분대체가 이루어 졌다고 보고되었다. Turbot (*Psetta maxima*) 사료 내 콘글루텐밀, 밀글루텐, 루핀을 혼합하여 어분을 50% 대체할 수 있었다(Fournier et al., 2004). Atlantic salmon 사료와 rainbow trout 사료 내 밀글루텐, 콘글루텐 혼합물과 스피룰리나(spirulina), 대두박을 혼합하여 어분을 100% 대체할 수 있었다(Espe et al., 2006; Flores et al., 2012). 본 연구에서도 어분대체를 위해 대두박, 밀글루텐, 대두농축단백 혼합을 통해 단일 원료 사용시 부족할 수 있는 영양소를 서로 보완해 주었기 때문에 어분을 30% 대체했음에도 성장과 사료효율에 문제가 없었던 것으로 판단된다.

혈액학적 분석은 어류 건강을 평가하는데 있어 중요한 기준으로 간주된다(de Pedro et al., 2005). 혈장의 성분은 사료의 영양소의 차이, 사육환경 등에 따라 차이가 난다(Murai et al., 1982; Lee et al., 1993b; Park et al., 1999). 넙치 사료 내 어분을 대체 할 경우에도 혈장의 성분이 변화된다고 보고되었다. 산 가수분해 농축대두박을 이용하여 어분을 대체한 연구에서 어분함량이 감소할수록 hemoglobin과 hematocrit 수치가 감소하였으며, 50% 이상 대체할 경우 대조구와 유의적으로 차이가 났다(Kim et al., 2014a). 대두박과 면실박을 혼합하여 어분을 대체한 연구에서도 어분대체율이 증가할수록 hemoglobin과 hematocrit 수치가 유의적으로 감소하였다. 타 어종을 대상으로 한 연구에서 어분대체 시 혈장

성분의 유의적인 변화가 관찰되었다(Lim et al., 2011; Shin et al., 2019). 하지만 돈모분(pig bristle meal)을 이용한 어분대체 연구에서는 hemoglobin, hematocrit, NBT의 유의적인 차이가 없었다(Kim et al., 2018). 본 연구에서도 혈액학적 분석결과 hemoglobin, hematocrit, NBT 에서 모든 실험구가 control 그룹과 비교하였을 때, 유의적인 차이를 보이지 않았다. 결론적으로 대두박, 밀글루텐, 대두농축단백 혼합하여 어분을 30% 대체하여도 넙치의 건강에 유해한 영향을 끼치지 않을 것으로 판단된다.

본 연구에서 실험 2-2의 생존율은 다소 낮았다. 실험 2-2에서의 평균 수온은 23.9℃였으나 최고 수온은 30.5℃까지 상승하였다. 넙치의 적정 수온은 21-24℃이다(Oh et al., 2014). 미성어기 넙치를 대상으로 고수온에서 4주간 실험한 결과, 생존율은 최저 68%로 보고된바 있다(Kim et al., 2015a). 수온은 어류의 섭식욕구에 영향을 미치며, 과도한 수온상승은 먹이 섭식활동을 저하시켜 어류의 영양상태에 악영향을 끼칠 수 있다(Kim et al., 2015b). 또한 수온상승은 어류의 스트레스를 일으키는 주요 요인으로 면역력 감소와 폐사율을 증가시킨다(Choi et al., 2009). 따라서 실험 2-2에서 넙치 생존율이 낮은 이유는 과도한 수온 상승이 어류의 영양상태, 생리적 기능, 면역계에 악영향을 끼쳤기 때문으로 판단된다.

실험 2-1과 실험 2-2의 연구 결과, 넙치 사료 내 아미노산(lysine, threonine, methionine)을 첨가하여 식물성단백질 혼합물을 사용할 경우 사료 내 사료 내 어분을 30%(FM46, FM42)까지 대체하여도 무방할 것으로 판단된다. 하지만 식물성단백질 혼합물을 이용한 최대 어분대체 비율은 본 연구에서 밝힐 수 없었기 때문에 향후 추가적인 연구를 통해 밝혀나가야 할 것으로 판단된다. 또한, 식물성단백질을 사용하여 어분대체 비율이 높아질수록 어류 장 내 염증반응이 발생하는 등 어분 대체 시 발생하는 문제점들에 대한 연구가 보고되고 있다(Gu

et al., 2016). 향후 조직학적 분석 및 PCR 분석과 같은 추가적인 연구를 통해 식물성단백질 혼합물의 이용성에 관하여 더욱 자세히 밝혀야 할 것으로 판단된다.

## CHAPTER 3

### 동·식물성 단백질 혼합물을 이용한 넙치(*Paralichthys olivaceus*)

#### 사료 내 어분대체 가능성 평가

##### 3.1. 재료 및 방법

###### 3.1.1. 실험사료

실험 3-1과 실험 3-2에 사용된 실험사료 배합비는 Table 5에 나타내었다. 실험사료에는 2 종류의 어분(정어리, 멸치)이 사용되었다. 대조사료 내 어분함량은 65%로 설정되었다(FM65). 5종의 실험사료 내 어분은 밀글루텐, 대두농축단백, 수지박, 가금부산물분의 혼합물을 이용하여 어분 함량이 각각 52.0%, 45.5%, 39.0%, 32.5%가 되도록 설정되었다(FM52, FM46, FM39, FM33). 대체실험 사료 간의 동일한 조단백, 조지질, 인 조성을 위해 밀가루, 어유, 일인산칼슘이 사용되었다. 어분대체 사료의 기호성 향상을 위해 베테인과 타우린이 첨가되었다. 실험사료는 압출성형기(ATX-2, Fesco, Korea)를 이용하여 EP 형태로 제작되었다.

실험 3-3과 실험 3-4에 사용된 실험사료 배합비는 Table 6에 나타내었다. 대조사료 내 어분함량은 65%로 설정되었다(FM65). 2종의 실험사료 내 어분은 밀글루텐, 대두농축단백, 수지박, 가금부산물분의 혼합물을 이용하여 각각 30%, 40% 대체되어 어분함량이 45.5%, 39.0%가 되도록 설정되었다(FM46, FM39). 1종의 실험사료는 FM39의 가격경쟁력을 고려하여 사료 내 단가가 높은 원료(밀글루텐,

베타인, vitamin C, vitamin E)의 함량을 감소시키고, 단가가 낮은 원료(수지박, 가금부산물분)의 함량을 증가시켰다(FM39\_2). 단백질 함량 조절을 위해 대두박을 감소시키고 맥주효모가 추가되었다. 사료 내 동일한 조단백질, 조지질 조성을 위하여 밀가루와 어유가 사용되었다. 어분대체 사료의 기호성 향상을 위해 베타인과 타우린이 첨가되었다. 실험사료는 압출성형기(ATX-2, Fesco, Korea)를 이용하여 EP 형태로 제작되었다.

**Table 5. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets in trial 3-1 and 3-2 (% of dry matter basis).**

Trial 3-1 & 3-2	Diets				
	FM65	FM52	FM46	FM39	FM33
Fish meal, sardine <sup>1</sup>	32.50	26.00	22.75	19.50	16.25
Fish meal, anchovy <sup>2</sup>	32.50	26.00	22.75	19.50	16.25
Soybean meal <sup>3</sup>	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
Wheat gluten <sup>4</sup>	1.00	3.50	4.50	5.50	6.50
Soy protein concentrate <sup>5</sup>	0.00	3.50	5.25	7.00	8.75
Tankage meal <sup>6</sup>	0.00	3.50	6.25	9.00	11.75
Poultry by-product meal <sup>7</sup>	0.00	3.50	4.00	4.50	5.00
Wheat flour	14.85	12.85	12.95	12.55	12.55
Fish oil <sup>8</sup>	3.40	4.00	4.30	5.10	5.50
Mono calcium phosphate	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Mineral mixture	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin mixture	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Vitamin C	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Vitamin E	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Betaine	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Taurine	0.00	0.40	0.50	0.60	0.70
Choline	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Lecithin	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Anti-fungal agent	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
<i>Proximate composition (% of dry matter)</i>					
Moisture	6.47	5.98	4.62	5.93	4.70
Crude protein	58.8	60.1	59.5	59.9	60.1
Crude lipid	13.2	13.1	12.8	13.5	13.4
Crude ash	13.0	11.7	10.9	10.5	9.7

- <sup>1</sup>Fish meal, sardine (crude protein 68.0%, crude lipid 8.6%, crude ash 17.1%)
- <sup>2</sup>Fish meal, anchovy (crude protein 69.4%, crude lipid 8.3%, crude ash 17.8%)
- <sup>3</sup>Soybean meal (crude protein 52.7%, crude lipid 1.8%, crude ash 6.8%)
- <sup>4</sup>Wheat gluten (crude protein 83.2%, crude lipid 3.49%, crude ash 1.3%)
- <sup>5</sup>Soy protein concentrate (crude protein 68.9%, crude lipid 0.5%, crude ash 7.1%)
- <sup>6</sup>Tankage meal (Crude protein 83.2%, crude lipid 3.69%, crude ash 7.5%)
- <sup>7</sup>Poultry by-product meal (Crude protein 71.6%, crude lipid 13.5%, crude ash 10.5%)
- <sup>8</sup>Fish oil was by E-wha oil Co., Ltd., Busan, Korea.

**Table 6. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets in trial 3-3 and 3-4 (% of dry matter basis).**

Trial 3-3 & 3-4	Diets			
	FM65	FM46	FM39	FM39_2
Fish meal, anchovy <sup>1</sup>	32.50	22.75	19.50	19.50
Fish meal, sardine <sup>2</sup>	32.50	22.75	19.50	19.50
Soybean meal <sup>3</sup>	12.00	12.00	12.00	5.00
Wheat gluten <sup>4</sup>	1.00	4.50	5.50	3.00
Soy protein concentrate <sup>5</sup>	0.00	5.25	7.00	7.00
Tankage meal <sup>6</sup>	0.00	6.25	9.00	13.00
Poultry by-product meal <sup>7</sup>	0.00	4.00	4.50	5.00
Brewer's yeast <sup>8</sup>	0.00	0.00	0.00	1.00
Wheat flour	14.90	13.00	12.60	17.70
Fish oil <sup>9</sup>	3.40	4.30	5.10	4.60
Mono calcium phosphate	0.50	0.50	0.50	0.50
Mineral mixture	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin mixture	0.80	0.80	0.80	1.00
Vitamin C	0.30	0.30	0.30	0.10
Vitamin E	0.30	0.30	0.30	0.10
Betaine	0.00	1.00	1.00	0.60
Taurine	0.00	0.50	0.60	0.60
Choline	0.30	0.30	0.30	0.30
Lecithin	0.50	0.50	0.50	0.50
<i>Proximate composition (% of dry matter)</i>				
Moisture	5.30	5.91	6.00	6.76
Crude protein	57.8	59.3	59.6	58.9
Crude lipid	10.1	10.6	11.3	11.2
Crude ash	12.8	10.9	10.3	10.3



- <sup>1</sup>Fish meal, sardine (crude protein 68.0%, crude lipid 8.6%, crude ash 17.1%)
- <sup>2</sup>Fish meal, anchovy (crude protein 69.4%, crude lipid 8.3%, crude ash 17.8%)
- <sup>3</sup>Soybean meal (crude protein 52.7%, crude lipid 1.8%, crude ash 6.8%)
- <sup>4</sup>Wheat gluten (crude protein 83.2%, crude lipid 3.49%, crude ash 1.3%)
- <sup>5</sup>Soy protein concentrate (crude protein 68.9%, crude lipid 0.5%, crude ash 7.1%)
- <sup>6</sup>Tankage meal (Crude protein 83.2%, crude lipid 3.69%, crude ash 7.5%)
- <sup>7</sup>Poultry by-product meal (Crude protein 71.6%, crude lipid 13.5%, crude ash 10.5%)
- <sup>8</sup>Fish oil was by E-wha oil Co., Ltd., Busan, Korea.

### 3.1.2. 실험어 및 사육관리

실험 3-1에 사용된 실험어는 제주도 서귀포시에 위치한 대형수산에서 구입되었다. 실험환경에 대한 적응을 위해 시판되는 넙치용 배합사료를 공급하며 순치되었다. 평균무게  $5.41 \pm 0.01$  g의 넙치를 15개 210L 사각 PP 수조에 각 실험구당 30마리씩 3 반복으로 배치되었다. 사육실험은 15주간 진행되었다. 사육수는 모래여과해수를 사용하여 4-5 L/min의 유수량이 되도록 조절되었다. 각 실험 수조 내 사육수 순환과 용존산소 유지를 위하여 에어스톤이 설치되었다. 사육수온은 매일 오전과 오후 2회 측정되었다.

실험 3-2에 사용된 실험어는 제주도 서귀포시에 위치한 대형수산에서 구입되었다. 실험환경에 대한 적응을 위해 시판되는 넙치용 배합사료를 공급하며 순치되었다. 평균무게  $196 \pm 2$  g의 넙치는 15개 2000 L 원형 FRP 수조에 65마리씩 각 실험구당 3반복으로 배치되었다. 사육실험은 6개월 동안 진행되었다. 실험사료는 1일 2회(08:00, 18:00) 반복 공급되었다. 사육수는 모래여과해수를 사용하여 25-30 L/min의 유수량이 되도록 조절되었다. 어병 방지를 위해 주수파이프에 UV 살균기가 설치되었다. 각 실험수조 내 사육수 순환과 용존산소 유지를 위하여 에어스톤이 설치되었다. 사육수온은 매일 오전과 오후 2회 측정되었다.

실험 3-3에 사용된 실험어는 제주도 서귀포시에 위치한 원양수산에서 구입되었다. 실험환경에 대한 적응을 위해 시판되는 넙치용 배합사료를 공급하며 순치되었다. 평균무게  $60.9 \pm 0.3$  g의 넙치를 총 18개 300L 원형 PP 수조에 30마리씩 3반복으로 배치하였다. 10주 후, 어체의 성장을 고려하여 실험어를 425L 원형 PP 수조로 이동시켰다. 사육실험은 5개월 동안 진행되었다. 실험사료는 1일 2회(08:30, 17:30) 반복 공급되었다. 사육수는 모래여과해수를 사용하여 6-8 L/min

의 유수량이 되도록 조절되었다. 각 실험수조 내 사육수 순환과 용존산소 유지를 위하여 에어스톤이 설치되었다. 사육수온은 매일 오전과 오후 2회 측정되었다.

실험 3-4에 사용된 실험어는 제주도 서귀포시에 위치한 원양수산에서 구입되었다. 실험환경에 대한 적응을 위해 시판되는 넙치용 배합사료를 공급하며 순치되었다. 평균무게  $247 \pm 4$  g 의 넙치를 총 12개 2000L 원형 FRP 수조에 30마리씩 3반복으로 배치하였다. 사육실험은 6개월 동안 진행되었다. 실험사료는 1일 2회(08:30, 17:30) 반복 공급되었다. 사육수는 모래여과해수를 사용하여 25-30 L/min 의 유수량이 되도록 조절되었다. 어병 방지를 위해 주수파이프에 UV 살균기가 설치되었다. 각 실험수조 내 사육수 순환과 용존산소 유지를 위하여 에어스톤이 설치되었다. 사육수온은 매일 오전과 오후 2회 측정되었다.

### 3.1.3. 어체측정

사료 공급 실험 후, 성장률과 사료효율 그리고 생존율의 측정을 위해 실험어를 24시간 절식 시킨 후 실험어류의 수와 무게를 측정하였다. 무게 측정 후 증체율(weight gain, %), 일간성장률(specific growth rate, %), 사료섭취량(feed intake, g/fish), 사료전환효율(feed conversion ratio), 단백질이용효율(protein efficiency ratio), 생존율(survival, %), 비만도(condition factor), 간 중량 지수(hepatosomatic index, %), 장 중량 지수(viscerosomatic index, %) 를 조사하였다. 계산식은 다음과 같다.

- Weight gain (%) =  $100 \times (\text{final mean body weight} - \text{initial mean body weight}) / \text{initial mean body weight}$

- Specific growth rate (%) =  $[(\log_e \text{ final body weight} - \log_e \text{ initial body weight}) / \text{days}]$

× 100

- Feed conversion ratio = dry feed fed / wet weight gain
- Protein efficiency ratio = wet weight gain / total protein given
- Feed intake (g / fish) = dry feed consumed (g) / fish
- Survival (%) = number of fish at end of feeding trial / number of fish stocked × 100
- Condition factor = fish weight × 100 / total body length<sup>3</sup>
- Hepatosomatic index (%) = 100 × (liver weight / body weight)
- Viscerosomatic index (%) = 100 × (visceral weight / body weight)

#### 3.1.4. 샘플수집

어체측정 후, 각각의 수조에서 8마리의 어류를 무작위로 선별하였다. 선별된 실험어는 2-phenoxyethanol 용액(200 ppm)을 이용하여 마취시켰으며, 주사기를 이용하여 미부동맥에서 채혈을 실시하였다. 채혈된 혈액은 헤파린이 20 μL씩 처리된 1.5mL eppendorf tube에 넣어 hematocrit, hemoglobin 및 nitroblue tetrazolium (NBT) activity 측정에 사용되었다.

실험 3-2와 3-4의 실험어를 대상으로 어류의 장 조직 관찰을 위해 유문수와 장의 접점을 기준으로 1 cm 떨어진 전장(anterior intestine)을 자르고, Bouin's solution 에 고정하여 장 조직을 수집하였다.

#### 3.1.5. 일반성분 분석

AOAC (2000) 분석법에 따라 실험사료에 대한 일반성분 분석을 진행하였다. 수분은 상압가열건조법(125°C, 3시간), 조회분은 직접회화법(550°C, 4시간)으로 분석되었다. 지방은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 분석되었다. 단백질은

자동조단백질 분석기(Kejltec system 2300, Sweden)로 분석되었다

### 3.1.6. 생화학적 분석

Hematocrit은 모세혈관 채혈튜브(micro-hematocrit capillary tubes)에 혈액을 채운 다음 고무판(wax plates)에 세운 후, 혈액 진단원심분리기(Micro Hematocrit VS-12000, Vision Scientific, Korea)에서 10분간 원심분리하여 값이 측정되었다. Hemoglobin 분석은 시판되고 있는 kit시약과 반응시킨 후 혈액 생화학분석기(Express plus system, Bayer, USA)를 이용하여 end point 방법으로 분석되었다. 혈액내의 대식세포 활성(NBT activity)은 Kumari and Sahoo (2006)의 분석방법을 바탕으로 respiratory burst동안 호중구(neutrophils)에 의한 산화 라디칼의 생성량이 측정되었다.

### 3.1.7. 소화율 분석

각 실험에 사용된 실험어는 1 주 동안 실험수조에 소화율 사료가 공급되면서 실험환경에 대한 적응과 장내에 일반사료가 남아있지 않도록 순치된 후 소화율 실험에 사용되었다. 본 실험에서 사용된 실험수조 및 외관상 소화율 측정을 위한 분 수집장치(Guelph system)와 Guelph system 의 모식도는 아래 Figure 1에 나타내었다.

예비사육 후 실험어로 사용된 넙치는 400L Guelph system (분 수집 장치 수조)에 배치되었다. 사육수는 1차적으로 모래 여과된 해수를 카트리지 필터가 장착된 하우징을 통해 2차 여과기를 통과시키면서 1L/min 의 매우 적은 유수량이 되도록 조절되었다.

소화율 실험사료 제작을 위해 각 실험에 사용된 실험사료를 펠렛성형기(Geumgang ENG, SP-50)와 믹서기를 이용하여 2회에 걸쳐 분쇄하였다. 지시제로(indicator)로 chromium oxide ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , DaeJung)가 사용되었다. 분쇄된 실험사료(99%)와 지시제(1%)를 혼합기에 넣어 완전히 섞은 후, 사료원 총 중량의 25%에 해당하는 증류수를 첨가하여 사료혼합기로 혼합·반죽하였다. 혼합반죽물은 펠렛성형기를 이용하여 펠렛 사료 형태로 제작되었으며, 실험사료의 크기는 각 실험어에 맞게 5-7mm 로 제작되었다. 제작된 실험사료는 건조기를 사용하여 25°C 에서 24시간 건조되었으며, -20°C 에서 보관되면서 사용되었다.

분 수집을 위해 소화율 사료는 분 수집 16시간 전에 반복 공급되었다. 분 수집을 위한 시간 설정은 어종 및 사육 환경에 따라 변할 수 있다. 위에 설정된 수집시간은 실험개시 전 여러 번의 사전 실험을 거쳐 실험어류와 실험환경에 가장 알맞은 시간으로 설정되었다. 반복공급 후, 수조에 남은 사료 및 이물질을 깨끗이 청소하고 새로 환수하였다. 그 후, 카트리지 필터를 교체하여 다시 한 번 환수를 하고, 각 수조에 분 수집관을 설치하여 익일 오전(09:00) 분을 수집하는 방식으로 2주간 분이 수집되었다. 수집된 분 샘플은 여과지를 이용하여 해수를 제거한 후 -50°C 저온냉동고에 보관되었다. 모든 분 수집이 끝난 후 동결냉동건조기(freezerdryer)를 이용하여 동결건조 시킨 후 분석에 사용되었다. 실험사료와 분에서의 chromium oxide 함량은 Divakaran et al. (2002)의 방법을 토대로 분석되었다.

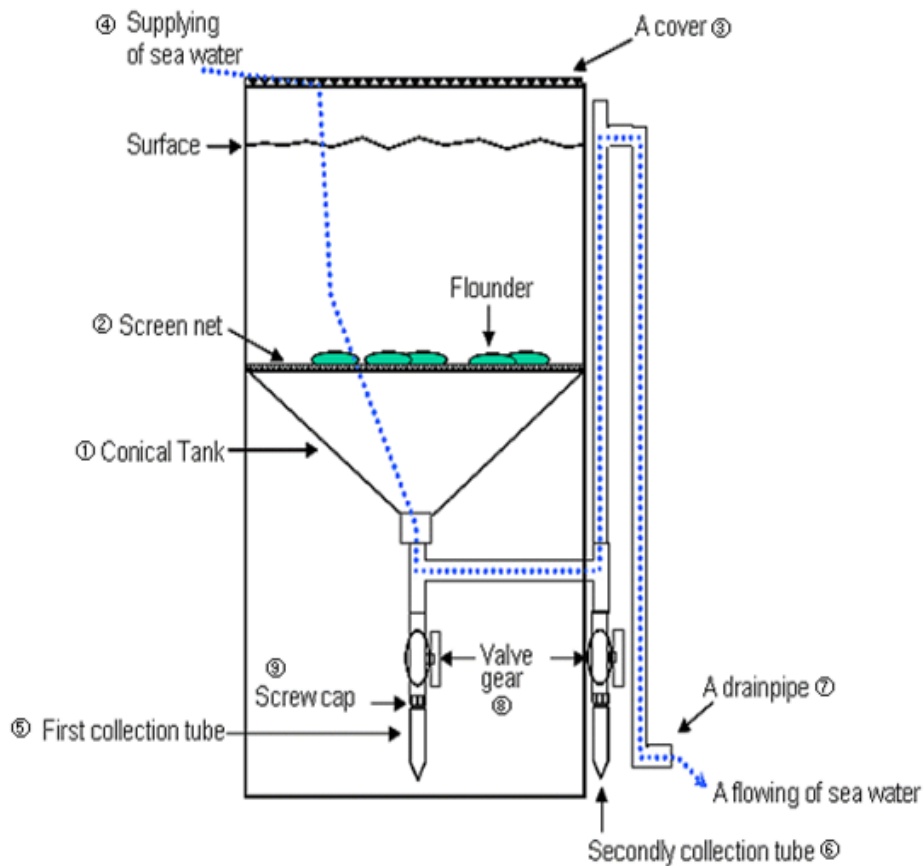


Figure 1. The diagram of Guelph system.

### 3.1.8. 조직학적 분석

실험 3-2와 3-4에서 Bouin's solution으로 고정된 전장 조직은 24시간 동안 고정 된 후 70% 에탄올에 탈수 및 보관 되었다. 이 후 적절한 크기로 잘라 조직분석용 카세트에 넣고 티슈 프로세서에서 단계별 탈수과정을 거친 후 파라핀(paraffin)을 침투시켰다. 18시간 후 파라핀으로 포매 되었으며, 절편법에 따라 7  $\mu\text{m}$ 의 두께의 조직표본으로 제작되었다. 조직표본은 조직학적 관찰을 위해 harris hematoxylin, 0.5% eosin, alcian blue (pH 2.5), periodic acid Schiff로 염색되었다. 조직의 형태학적 변화는 ZEN, 2012 를 이용하여 측정되었다.

### 3.1.9. 통계분석

실험사료의 배치는 완전확률계획법(completely randomized design)을 실시하였고, 성장률, 사료효율, 생존율 및 분석결과들은 SPSS (version 12.0) 프로그램을 이용하여 one-way ANOVA로 통계 분석되었다. 데이터 값의 유의차는 Tukey's HSD 로 평균 간의 유의성( $P \leq 0.05$ )을 비교하였다. 데이터는 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었으며, 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석 되었다.



### 3.2. 결과

#### [실험 3-1]

15주간의 사육실험 결과는 Table 7에 나타내었다. FM52 실험구와 FM46 실험구가 FM65 실험구에 비해 성장률이 높았으나 유의적인 차이는 없었다. 사료효율에 있어서도 FM65 실험구가 다른 모든 실험구에 비해 낮았으나 유의적인 차이는 없었다. 3주 간격으로 조사한 어체 평균무게 변화는 Figure 2에 나타내었다. FM46 실험구가 다른 실험구에 비해 지속적으로 성장률이 높았으나 유의적인 차이는 없었다. 12주, 15주차 조사에서 FM39 실험구가 다른 실험구에 비해 성장률이 낮았으나 유의적인 차이는 없었다.

생화학적 분석 결과는 Table 8에 나타내었다. 모든 항목에서 사료공급실험에 따른 유의적인 차이는 없었다.

전어체 일반성분 분석 결과는 Table 9에 나타내었다. 모든 항목에서 사료공급실험에 따른 유의적인 차이는 없었다.

#### [실험3-2]

6개월 동안의 사육실험 결과는 Table 7에 나타내었다. 모든 항목에 대해 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다. 실험 3-1과 마찬가지로 FM52과 FM46 실험구가 FM65에 비해 성장률과 사료효율이 높았으나 유의적인 차이는 없었다. 1개월 간격으로 조사한 평균무게 변화는 Figure 3에 나타내었다. 매달 각 실험구 사이에 유의적인 차이는 없었다..

생화학적분석 결과는 Table 8에 나타내었다. 모든 항목에서 사료공급실험에 따른 유의적인 차이는 없었다.

전어체 일반성분 분석 결과는 Table 9에 나타내었다. 모든 항목에서

사료공급실험에 따른 유의적인 차이는 없었다.

조직학적 분석 결과는 Figure 6와 Figure 7에 나타내었다. 실험사료 공급에 따른 조직 형태학적인 변화 관찰이 되지 않았으며, 장 내 용모길이 또한 유의적인 차이가 없었다.

소화율 분석 결과는 Figure 9에 나타내었다. 건물소화율은 3개월째에 FM20 실험구가 FM50 실험구에 비해 유의적으로 높았다. 4개월차 조사에서는 FM50 실험구가 다른 모든 실험구에 비해 유의적으로 낮았다. 2, 5, 6개월차 조사에서는 모든 실험구에서 유의적인 차이가 없었다. 단백질소화율은 4개월차 조사에서 FM50 실험구가 다른 모든 실험구에 비해 유의적으로 낮았다. 6개월차 조사에서는 FM30 실험구가 FM40, FM50 실험구에 비해 유의적으로 높았다. FM50 실험구의 단백질 소화율은 다른 실험구에 비해 유의적으로 낮았다.

### [실험 3-3]

5개월의 사육실험 결과는 Table 7에 나타내었다. FM39\_2 실험구가 다른 실험구에 비해 성장률과 사료효율이 낮았으나 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다. 형태학적 분석결과 어분함량이 감소함에 따라 간중량지수와 장중량지수가 감소하는 경향을 보였으나 사료공급 실험에 따른 각 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다. 1 개월 간격으로 조사한 평균무게 변화는 Figure 4에 나타내었다. 매달 각 실험구 사이에 유의적인 차이는 없었다.

생화학적 분석결과는 Table 8에 나타내었다. 모든 항목에서 사료공급실험에 따른 유의적인 차이는 없었다.

전어체 일반성분 분석 결과는 Table 12에 나타내었다. 모든 항목에서 사료공급실험에 따른 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다.

[실험 3-4]

6개월의 사육실험 결과는 Table 7에 나타내었다. FM46, FM39 실험구가 FM 65, FM39\_2 실험구에 비해 성장률과 사료효율이 높았으나 유의적인 차이는 없었다. 형태학적 분석결과에서도 사료공급실험에 따른 각 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다. 1 개월 간격으로 조사한 평균무게 변화는 Figure 5에 나타내었다. 4개월부터 FM46 실험구가 다른 실험구에 비해 평균무게가 다소 높았다. 5개월부터는 FM39 실험구 또한 FM65와, FM39\_2 실험구에 비해 평균무게가 높았다. 하지만 매달 각 실험구 사이에 유의적인 차이는 없었다.

생화학적 분석결과는 Table 8에 나타내었다. FM46 실험구가 다른 실험구에 비해 AST와 ALT 수치가 낮았으나 유의적인 차이는 없었다. 다른 모든 항목에서도 유의적인 차이는 없었다.

전어체 일반성분 분석 결과는 Table 9에 나타내었다. 모든 항목에서 사료공급실험에 따른 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다.

조직분석결과는 Figure 8에 나타내었다. 실험사료 공급에 따른 조직 형태학적인 변화 관찰이 되지 않았으며, 장 내 용모길이 또한 유의적인 차이가 없었다.

소화율 분석 결과는 Figure 10에 나타내었다. 건물 소화율은 모든 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다. 단백질 소화율은 FM46, FM39 실험구에 비해 유의적으로 높았다.

**Table 7. Growth performance and morphological indexes of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed experimental diets for trial 3-1 (15 weeks), trial 3-2 (6 months), trial 3-3 (5 months) and trial 3-4 (6 months).**

Dietary treatment	FBW <sup>2</sup>	WG <sup>3</sup>	SGR <sup>4</sup>	FI <sup>5</sup>	FCR <sup>6</sup>	PER <sup>7</sup>	Survival	CF <sup>8</sup>	HSI <sup>9</sup>	VSI <sup>10</sup>
<i>Trial 3-1</i>										
FM65	61.5±7.6	1135±134	2.35±0.11	45.6±1.4	0.82±0.13	2.10±0.34	88.0±0.0	-	-	-
FM52	66.2±5.9	1214±114	2.42±0.09	44.0±3.7	0.73±0.13	2.31±0.42	88.0±17.0	-	-	-
FM46	70.2±5.5	1300±109	2.49±0.08	43.8±2.3	0.68±0.05	2.49±0.18	98.7±2.3	-	-	-
FM39	58.9±2.2	1090±41	2.32±0.04	36.9±3.0	0.69±0.04	2.42±0.15	94.7±6.1	-	-	-
FM33	62.9±4.2	1164±71	2.38±0.06	37.8±6.2	0.66±0.09	2.56±0.39	93.3±6.1	-	-	-
<i>Trial 3-2</i>										
FM65	976±29	393±18	0.83±0.02	723±80	0.93±0.06	1.84±0.12	64.2±12.8	1.20±0.16	2.37±0.47	4.74±1.11
FM52	991±11	399±12	0.83±0.01	639±60	0.81±0.07	2.07±0.16	78.3±5.8	1.36±0.18	2.36±0.30	5.72±0.37
FM46	984±40	407±26	0.84±0.03	642±133	0.81±0.18	2.14±0.53	75.8±1.4	1.21±0.06	2.86±0.67	5.36±0.31
FM39	944±42	383±23	0.82±0.02	706±60	0.94±0.03	1.77±0.05	78.3±8.0	1.19±0.00	2.31±0.59	5.04±0.40
FM33	938±95	386±47	0.82±0.05	661±11	0.90±0.13	1.88±0.26	67.5±2.5	1.20±0.06	2.42±0.83	5.33±1.24
<i>Trial 3-3</i>										
FM65	520±24	754±38	1.45±0.03	485±18	1.06±0.10	1.67±0.15	78.9±5.1	0.99±0.06	1.45±0.49	3.54±0.83
FM46	522±1	760±21	1.45±0.02	470±13	1.02±0.02	1.68±0.03	78.9±8.4	1.08±0.17	1.38±0.12	3.03±0.01
FM39	522±18	757±25	1.45±0.02	460±34	1.00±0.08	1.73±0.13	77.8±8.4	0.99±0.04	1.30±0.13	2.74±0.08
FM39_2	507±18	730±7	1.43±0.02	485±19	1.09±0.02	1.57±0.03	82.2±3.8	1.01±0.04	1.30±0.20	2.66±0.03
<i>Trial 3-4</i>										
FM65	1130±20	356±9	0.74±0.01	941±24	1.07±0.05	1.58±0.08	73.3±14.1	1.16±0.05	2.51±1.29	4.93±1.46
FM46	1244±110	406±46	0.79±0.05	931±12	0.94±0.12	1.74±0.22	65.0±7.1	1.17±0.07	2.23±0.40	4.28±0.22
FM39	1175±117	382±55	0.76±0.03	903±84	0.97±0.02	1.68±0.04	71.7±7.1	1.11±0.06	1.77±0.51	4.06±0.82
FM39_2	1105±33	339±1	0.73±0.02	930±34	1.09±0.08	1.54±0.12	66.7±0.0	1.11±0.07	1.81±0.29	4.09±0.30

<sup>1</sup>Values are mean of triplicates and presented as mean  $\pm$  SD. The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

<sup>2</sup>Final body weight (g)

<sup>3</sup>Weight gain (%)

<sup>4</sup>Specific growth rate (%)

<sup>5</sup>Feed intake (g/fish)

<sup>6</sup>Feed conversion ratio

<sup>7</sup>Protein efficiency ratio

<sup>8</sup>Condition factor

<sup>9</sup>Hepatosomatic index (%)

<sup>10</sup>Viscerosomatic index (%)

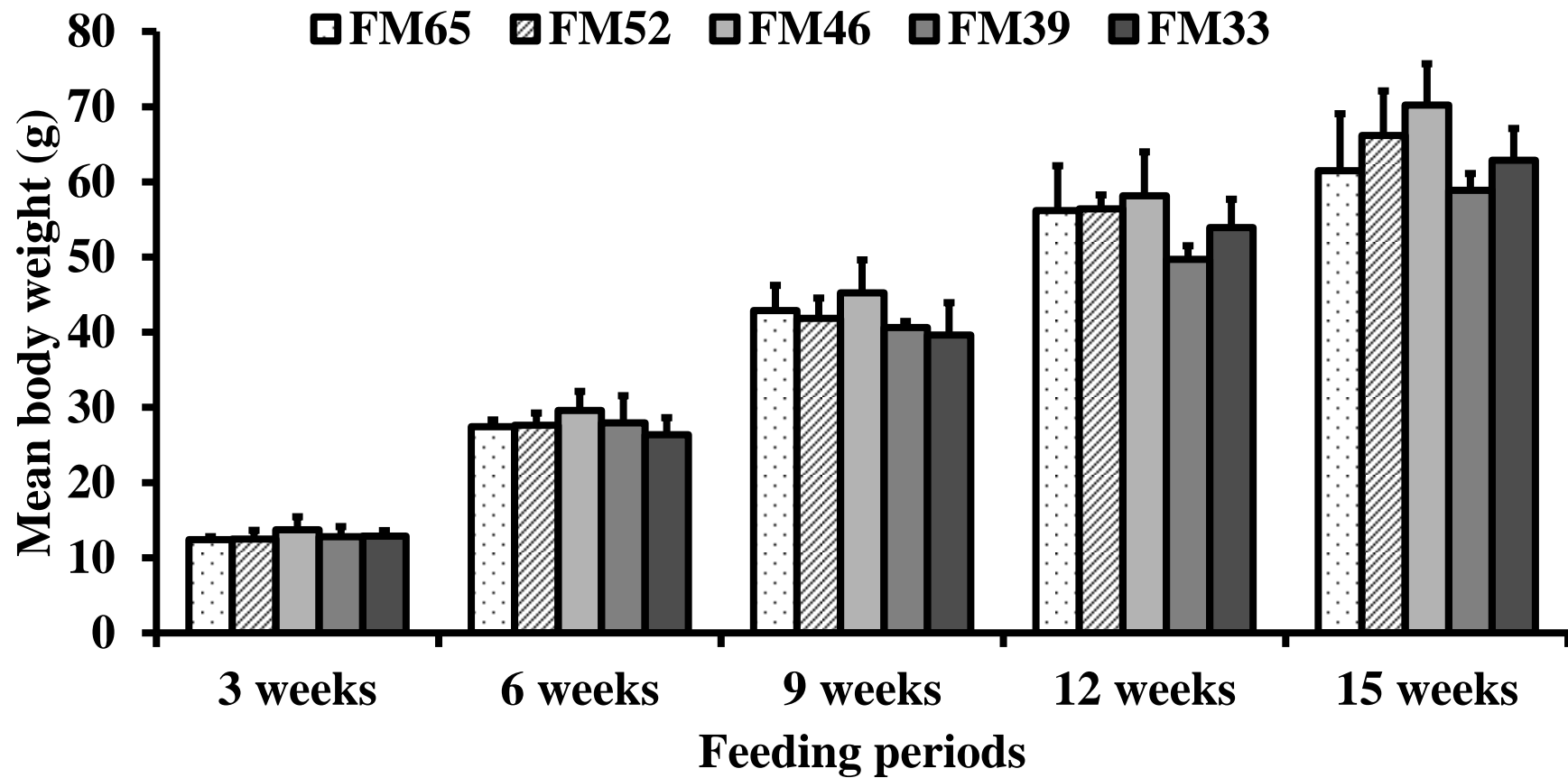


Figure 2. Changes in mean body weight of olive flounder *Paralichthys olivaceus* (initial mean body weight:  $5.41 \pm 0.01$ g) fed the experimental diets for 15 weeks (trial 3-1).

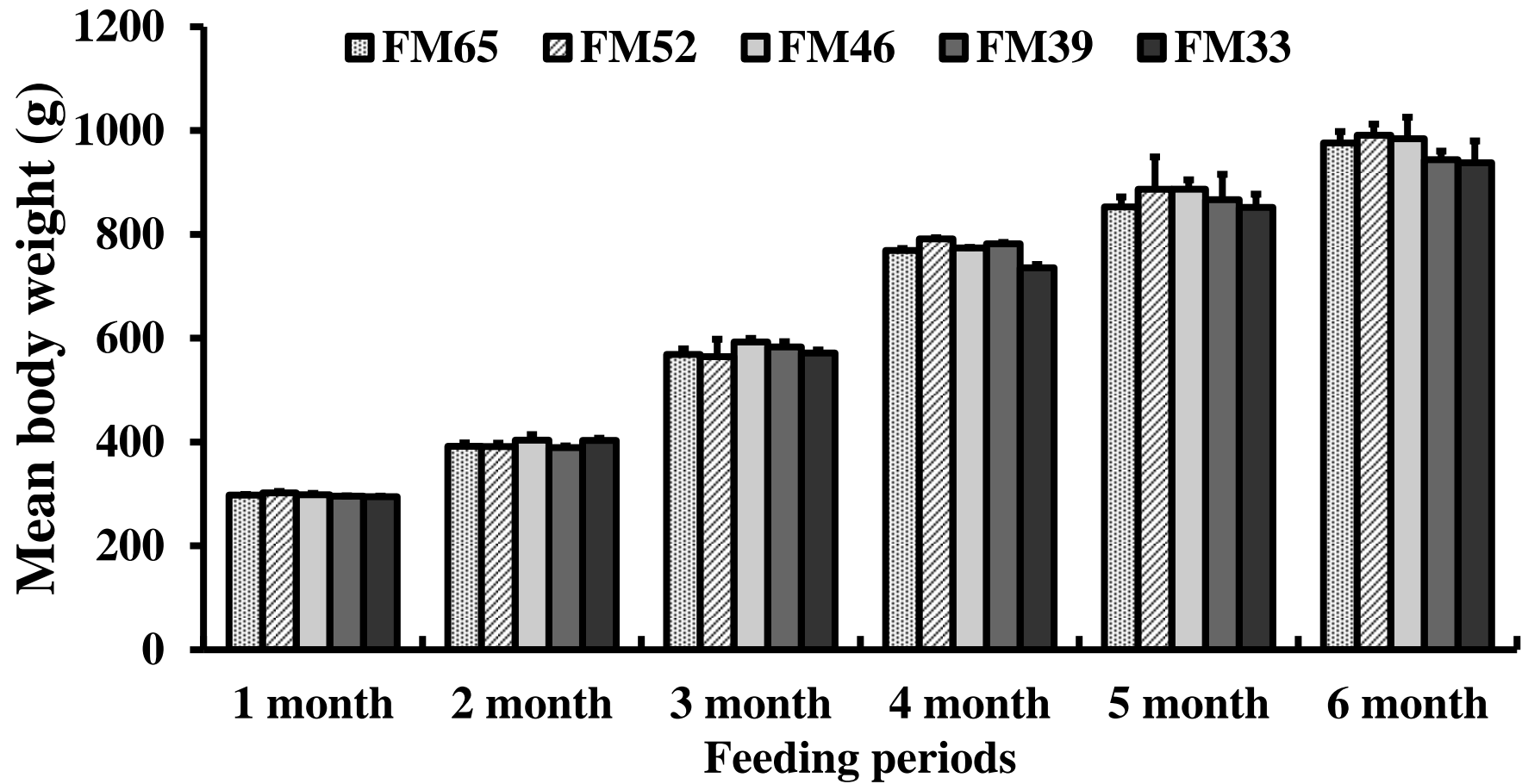


Figure 3. Changes in mean body weight of olive flounder *Paralichthys olivaceus* (initial body weight:  $196 \pm 2$ g) fed the experimental diets for 6 months (trial 3-2).

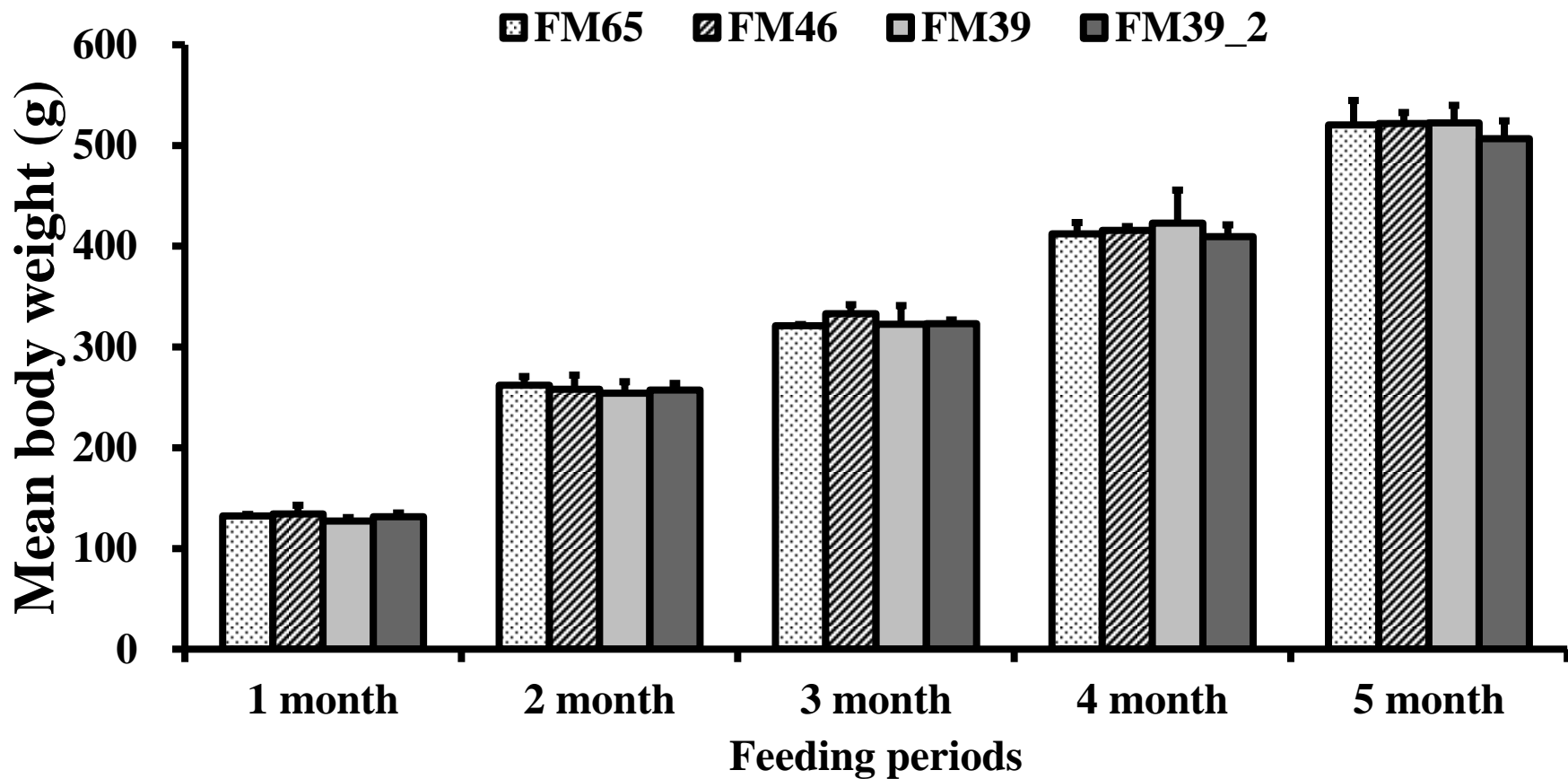


Figure 4. Changes in mean body weight of olive flounder *Paralichthys olivaceus* (initial body weight:  $60.9 \pm 0.3$ g) fed the experimental diets for 5 months (trial 3-3).



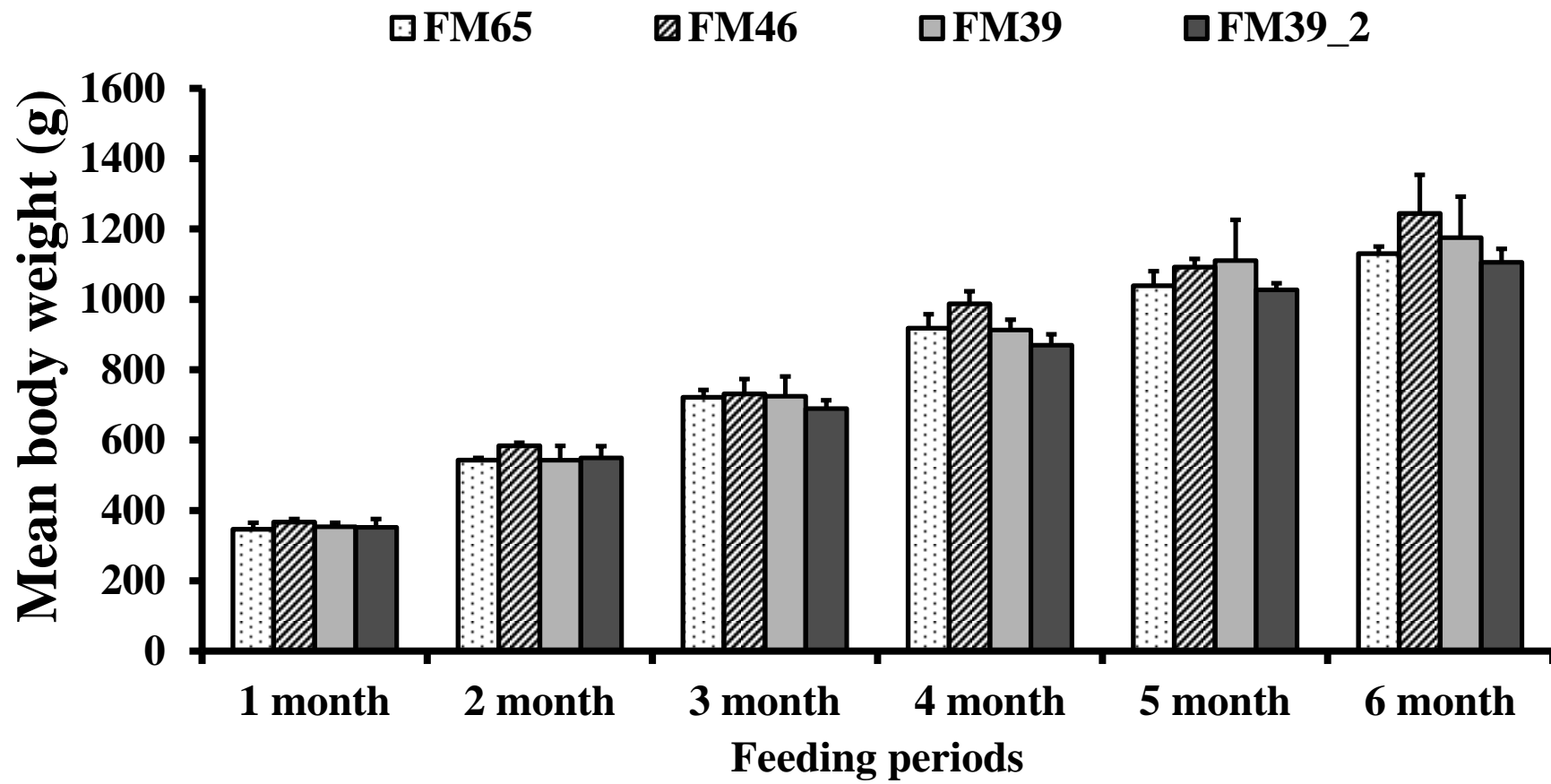


Figure 5. Changes in mean body weight of olive flounder *Paralichthys olivaceus* (initial body weight: 247±4g) fed the experimental diets for 6 months (trial 3-4).

**Table 8. Hematological parameters of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for trial 3-1 (15 weeks), trial 3-2 (6 months), trial 3-3 (5 months) and trial 3-4 (6 months).**

Dietary treatment	Hb <sup>2</sup>	Ht <sup>3</sup>	AST <sup>4</sup>	ALT <sup>5</sup>	TP <sup>6</sup>	Glucose <sup>7</sup>
<b><i>Trial 3-1</i></b>						
FM65	4.55±0.50	20.8±0.9	16.6±2.9	4.48±1.17	7.83±0.31	41.3±1.2
FM52	4.63±1.02	20.8±0.3	12.6±1.6	4.96±1.18	7.62±0.13	43.2±0.8
FM45	4.23±0.31	19.9±2.2	14.1±2.1	3.53±0.57	7.66±0.47	41.2±0.8
FM38	4.17±0.23	20.5±2.4	15.6±2.7	3.49±1.38	7.61±0.34	41.5±0.9
FM32	4.27±0.38	20.9±0.2	15.0±3.0	4.65±0.82	8.33±0.24	43.6±1.2
<b><i>Trial 3-2</i></b>						
FM65	5.76±0.17	34.5±2.1	15.4±4.4	6.14±0.45	8.82±0.96	30.6±0.3
FM52	5.57±1.44	30.0±2.8	18.3±7.5	6.30±3.75	8.45±0.58	37.2±4.5
FM45	6.02±0.31	29.7±0.6	13.4±2.2	6.36±0.68	9.30±0.05	31.9±1.2
FM38	6.75±1.21	31.3±9.9	11.2±3.6	5.56±1.17	8.97±0.64	33.7±4.0
FM32	5.53±0.08	28.3±1.5	14.8±8.3	5.06±0.09	9.60±0.61	32.6±2.7
<b><i>Trial 3-3</i></b>						
FM65	5.27±0.39	29.9±2.5	33.9±13.1	6.67±1.53	0.79±0.11	38.6±0.4
FM46	5.86±0.79	29.8±2.4	32.1±12.5	5.84±2.32	0.86±0.06	37.3±2.9
FM39	5.64±0.58	32.6±3.1	40.8±9.1	8.84±0.83	0.80±0.09	39.0±3.8
FM39_2	6.16±0.40	32.1±3.6	37.3±6.1	6.28±3.56	0.81±0.13	37.1±7.0
<b><i>Trial 3-4</i></b>						
FM65	5.51±0.96	28.3±5.3	12.5±2.3	7.26±2.49	1.02±0.09	19.9±2.7
FM46	5.48±0.92	28.8±5.4	8.7±0.3	6.44±0.11	1.03±0.01	21.7±1.6
FM39	5.39±1.29	27.0±3.5	13.3±4.3	8.53±0.04	0.93±0.21	22.2±2.9
FM39_2	5.38±0.30	31.0±1.7	12.2±0.9	9.70±1.70	1.01±0.15	21.7±4.7

<sup>1</sup>Values are mean of triplicates and presented as mean ± SD. The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

<sup>2</sup>Hemoglobin (g/dL).

<sup>3</sup>Hematocrit (%).

<sup>4</sup>Aspartate aminotransferase (U/L)

<sup>5</sup>Alanine aminotransferase (U/L)

<sup>6</sup>Total protein (g/dL)

<sup>7</sup>Glucose (mg/dL)

**Table 9.** Whole-body composition (% of wet weight) of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for trial 3-1 (15 weeks), trial 3-2 (6 months), trial 3-3 (5 months) and trial 3-4 (6 months)<sup>1</sup>.

Dietary treatment	Moisture	Crude protein	Crude lipid	Crude ash
<b><i>Trial 3-1</i></b>				
FM65	74.4±0.8	18.7±0.7	2.76±0.35	3.34±0.35
FM52	75.0±1.0	18.5±1.5	2.76±0.62	3.10±0.15
FM46	74.5±0.3	18.7±0.8	2.35±0.05	3.00±0.22
FM39	75.0±1.3	18.7±0.2	2.63±0.78	3.07±0.31
FM33	74.3±0.1	18.9±0.7	2.82±0.10	3.46±0.16
<b><i>Trial 3-2</i></b>				
FM65	71.7±0.5	20.8±3.0	3.22±0.62	11.0±0.5
FM52	70.5±0.3	20.9±1.9	4.70±0.10	10.5±1.7
FM46	70.5±0.1	22.0±0.6	3.93±0.25	8.8±0.0
FM39	71.3±0.4	20.7±1.9	3.48±0.48	10.6±1.3
FM33	70.8±0.4	19.8±0.2	3.93±0.25	9.3±1.7
<b><i>Trial 3-3</i></b>				
FM65	68.8±0.1	21.9±0.5	5.17±0.13	3.31±0.47
FM46	71.5±0.6	22.3±0.6	5.57±0.22	2.81±0.20
FM39	71.6±0.8	21.4±0.3	5.63±0.23	3.06±0.48
FM39_2	71.8±1.1	21.3±0.3	5.25±0.48	3.19±0.43
<b><i>Trial 3-4</i></b>				
FM65	71.2±0.8	21.5±0.4	4.89±0.30	3.47±0.16
FM46	70.1±0.5	21.1±1.9	5.33±1.18	3.65±0.42
FM39	68.4±0.7	21.4±0.5	5.56±0.87	3.97±0.04
FM39_2	70.6±1.3	20.8±0.7	5.02±0.16	3.33±0.60

<sup>1</sup>Values are mean of triplicates and presented as mean ± SD. The lack of superscript letter

indicates no significant differences among treatments.

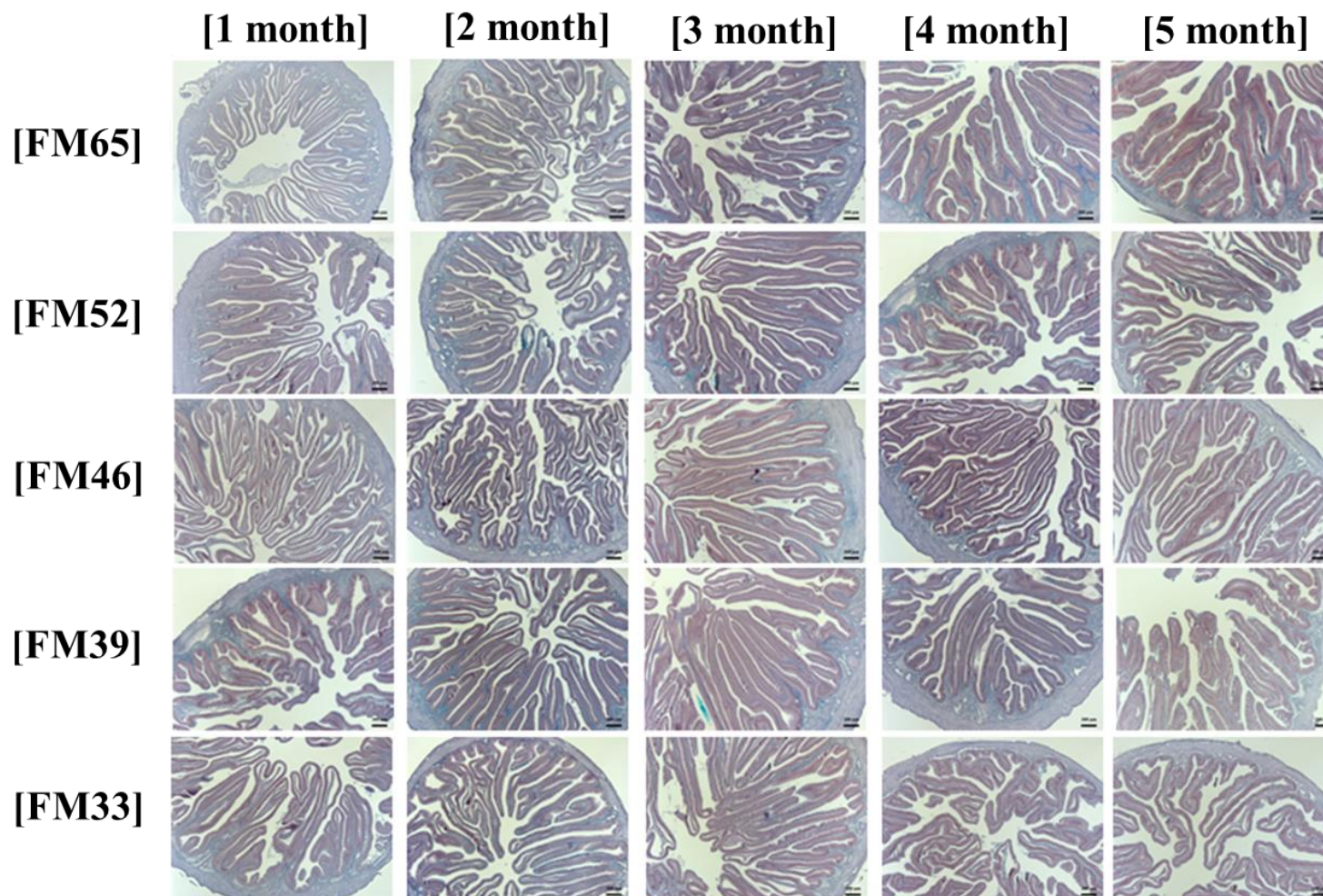


Figure 6. Histological change of the anterior intestine of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for trial 3-2 (5 months).

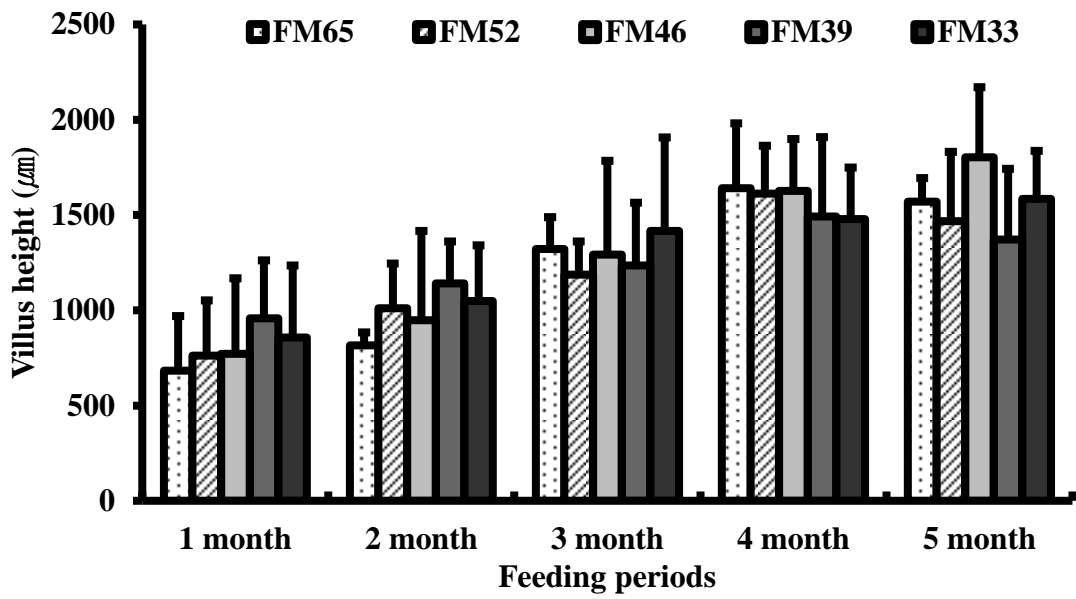
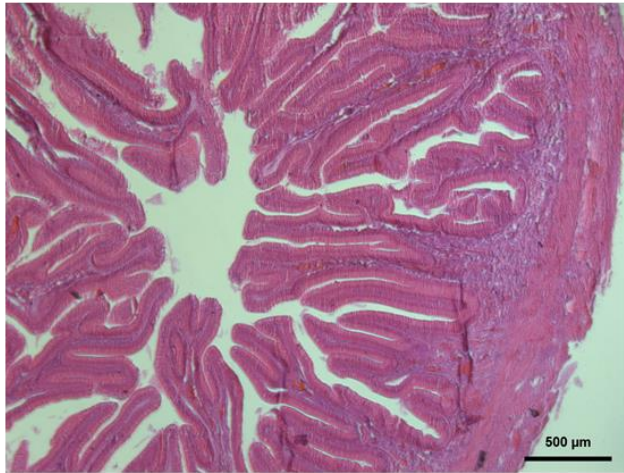


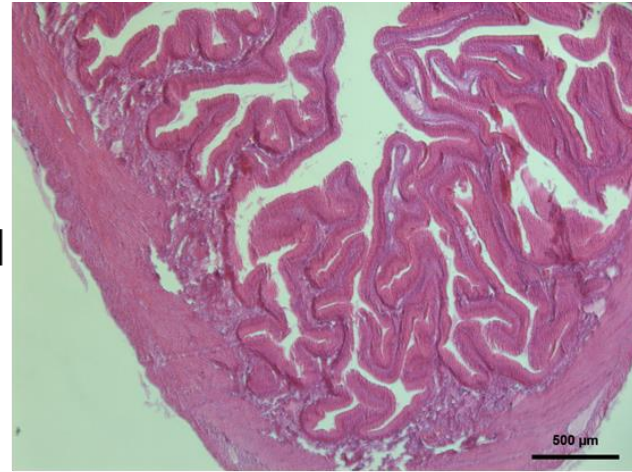
Figure 7. Villus heights of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for trial 3-2 (5 months).



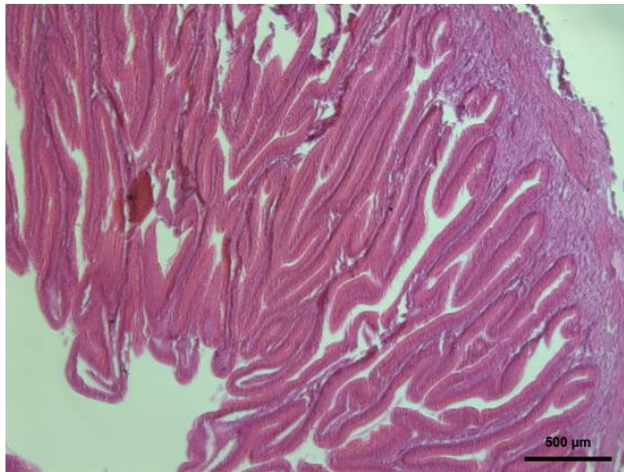
[FM65]



[FM46]



[FM39]



[FM39\_2]

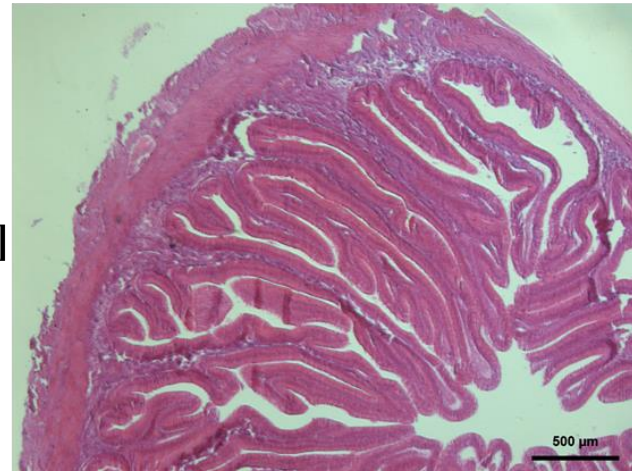


Figure 8. Histological change of the anterior intestine of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets (trial 3-4).

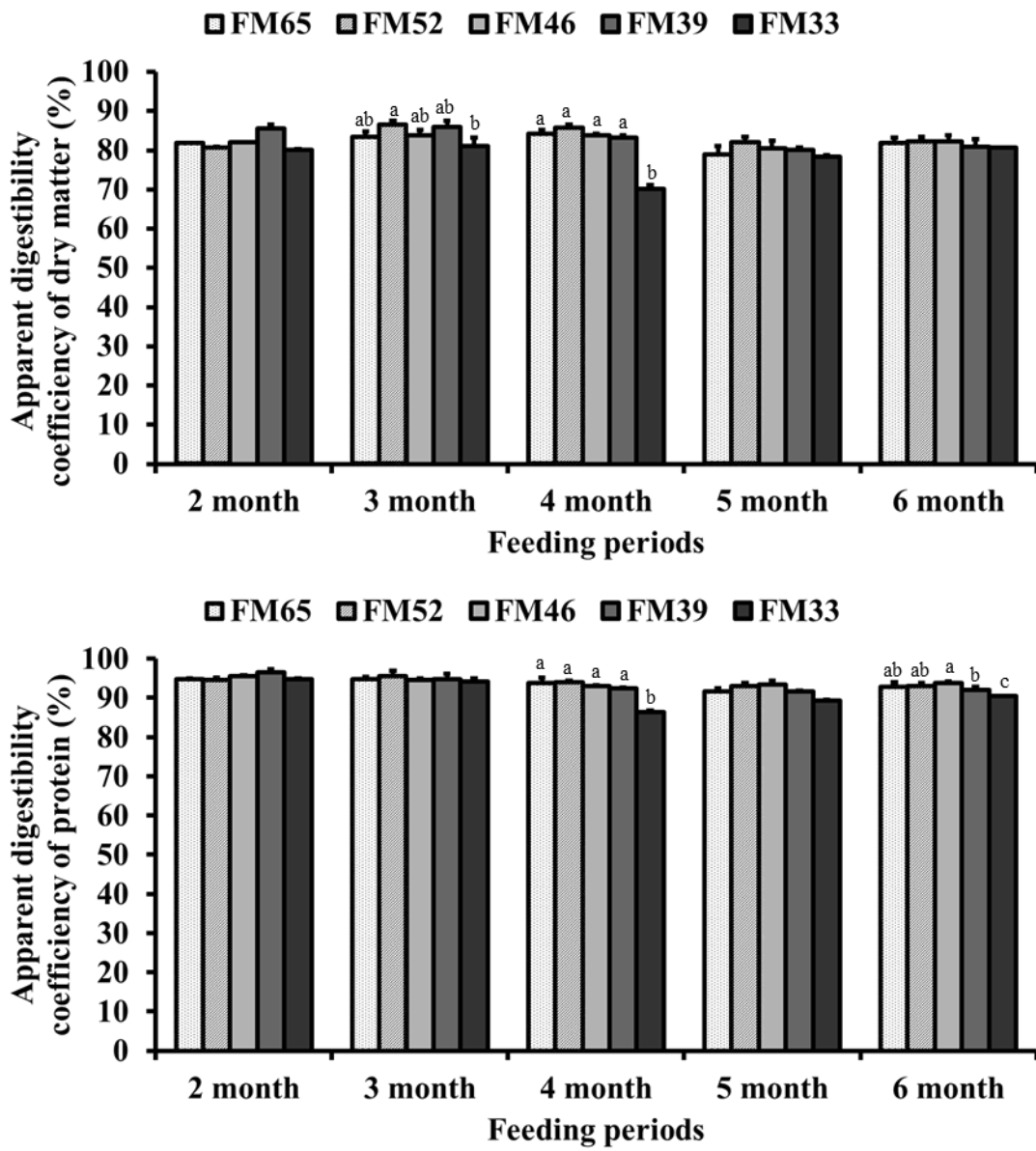


Figure 9. Apparent digestibility coefficient of dry matter and protein in the experimental diet (trial 3-2).

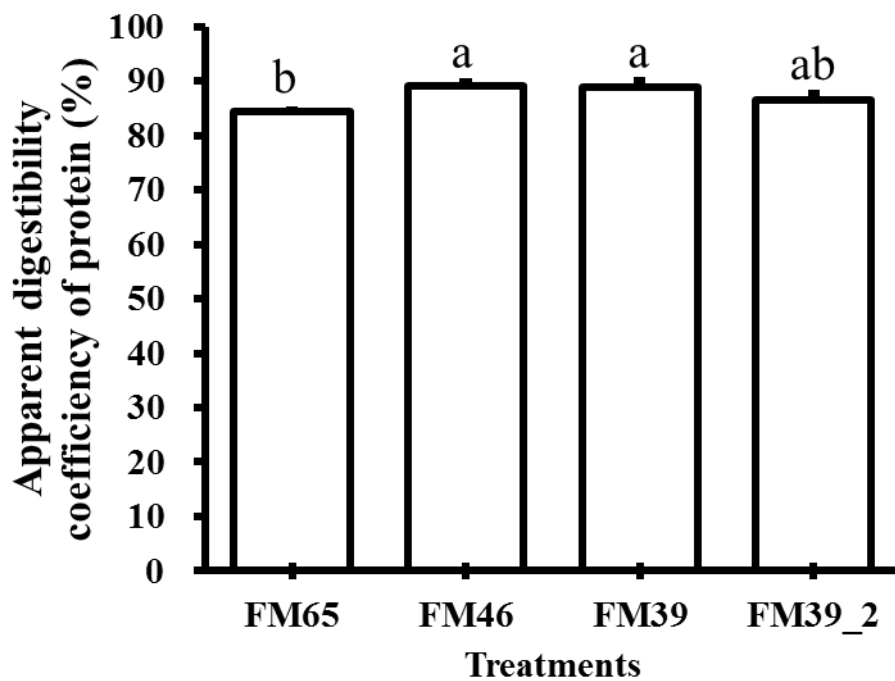
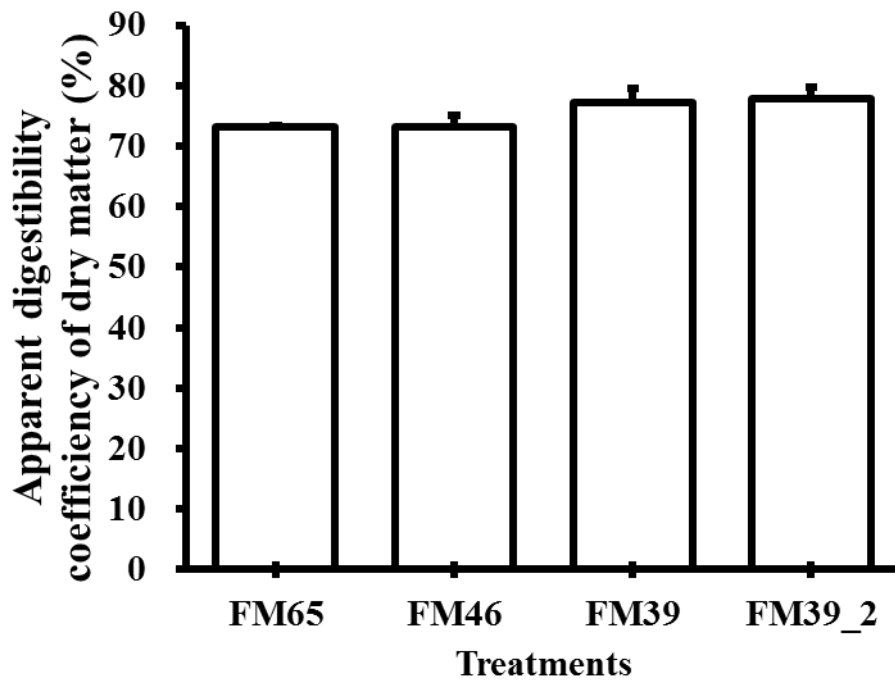


Figure 10. Apparent digestibility coefficient of dry matter and protein in the experimental diet (trial 3-4).



### 3.3. 고찰

단백질 원료를 이용한 넙치 사료 내 어분대체율은 대두박 17~30%, 주정박 18.5%, 우모분 18.8~26%, 돈모분 7.5~30%, 참치부산물 20~30%, 옥골분 10~20%로 보고되었다(Kikuchi et al., 1994; Kim et al., 2008; Ye et al., 2011; Lee et al., 2012; Kim et al., 2014b; Bae et al., 2015; Kim et al., 2018). 위의 연구결과 다양한 원료에서 7-30%의 어분대체 가능성이 보고되었는데, 모두 단일 단백질 원료로 어분을 대체한 연구이다. 반면, 대두박, 건조 홍합살, 혈분, 콘글루텐밀을 혼합하였을 경우, 넙치사료 내 어분을 46%까지 대체 가능하다고 보고되었다(Kikuchi, 1999). 유럽농어(*Dicentrarchus labrax*)를 대상으로 진행된 연구에서 녹두박, 우모분, 혈분을 혼합하여 사료 내 어분을 50%까지 대체 가능하다고 보고되었으며(Scerra et al., 2016), 혈분, 대두농축단백, 콘글루텐밀, 밀글루텐, 채종박 혼합물로는 82%까지 대체 가능하다고 보고되었다(Torrecillas et al., 2017). 본 연구에서도 4가지 단백질 원료(wheat gluten, soy protein concentrate, tankage meal and poultry by-product meal)의 조합을 통해 단일 원료 사용시에 부족하게 되는 영양소를 서로 보완해 줄 수 있었기 때문에 어분을 40-50%(FM39, FM39\_2, FM33)까지 대체함에도 성장과 사료효율에 문제가 없었던 것으로 판단된다.

타우린은 어분과 동물성 원료에 다량 함유되어 있으나, 식물성 원료에는 함량이 적기 때문에 식물성 원료로 어분을 대체할 경우 타우린의 첨가가 필요하다(Lunger et al., 2007; Lim et al., 2013). 특히, 넙치사료 내 타우린의 요구량은 타 어종에 비해 매우 높은 1.5-2.0%로 보고되었다 (Park et al., 2001). 어분을 대체함에 따른 타우린의 결핍을 막기 위해서는 반드시 추가적인 타우린 첨가가 필요하다 또한, 넙치사료 내 타우린을 첨가할 경우 성장률, 사료효율이 유의적으로 향상된다고 보고되었다(Park et al., 2002; Kim et al., 2005). Choi et al.

(2004)는 베테인을 어분대체 사료에 첨가하면 넙치의 성장과 소화율을 향상시킬 수 있다고 보고하였다. 본 연구에서는 대조구를 제외한 모든 실험구에 타우린과 베테인을 첨가하였으며, 어분대체율이 10% 증가할수록 타우린을 0.1%씩 추가적으로 첨가하였다. 그 결과, 넙치의 성장률과 사료효율에 긍정적인 영향을 주어 어분대체 가능성을 향상시킨 것으로 판단된다.

육식성 어종의 경우 식물성 단백질 원료 내 다양한 항영양인자가 소화기관에 피해를 끼친다고 보고되었다(Martínez-Llorens et al., 2012). Sea bass (*Lates calcarifer*), Atlantic salmon (*Salmo salar*), turbot을 대상으로 식물성 단백질 원료가 사용된 사료를 공급하였을 때, 장세포 공포화, 흡수성 공포 수 감소, 점막고유층과 점막하 조직의 넓이 및 세포침윤 증가와 같은 장변화가 관찰되었다(Boonyaratpalin et al., 1998; Øverland et al., 2009; Gu et al., 2016). 특히, 용모의 길이는 사포닌과 같은 항영양인자로 발생된 염증에 의해 감소된다(Zhang et al., 2018). 넙치사료 내 대두농축단백을 22% 이상 사용하면 용모길이의 감소가 나타났다(Khosravi et al., 2018). 반면, Tusche et al (2012)는 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*) 사료 내 밀글루텐을 이용하여 어분을 대체할 시 항영양물질의 작용이 관찰되지 않는다고 보고하였다. 대서양연어를 대상으로 한 연구에서는 사료 단백질의 35%까지 밀글루텐을 사용해도 장 변화가 발생하지 않았다(Storebakken et al., 2000). 본 연구에서 용모 길이의 변화와 같은 장조직 변화가 관찰되지 않은 이유는 대두농축단백의 함량이 최대 7.00-8.75%에 불과하고, 항영양인자가 거의 없는 밀글루텐을 사용하였기 때문이라고 판단된다.

어분을 식물성 단백질 원료로 대체할 경우 사료 내 섬유소와 항영양인자 함량이 증가할 수 있다(Gatlin et al., 2007). 대부분의 육식성 어류는 섬유소를 소화할 수 있는 능력이 부족하여 식물성 사료원료 사용시 소화율이

낮아진다(Apper-Bossard et al., 2013). 식물성 단백질 원료 내 항영양인자에 의한 소화율 감소도 보고되었다(Krogdahl et al., 2010). 이전 연구에서 넙치사료 내 탈피대두박을 이용하여 어분을 30% 대체할 경우 건물소화율과 단백질소화율이 감소하였다(Choi et al., 2004). 대두농축단백을 이용하여 어분을 25% 이상 대체할 경우 건물, 단백질, 아미노산소화율이 유의적으로 감소하였다(Deng et al., 2006). 반면, 본 연구에서 사용된 식물성 단백질 원료 중 밀글루텐은 섬유소 함량이 낮고, 사료 내 사용시 항영양인자에 의한 부작용이 관찰되지 않는 식물성 단백질 원료이다(NRC, 2011; Tusche et al., 2012). Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), rainbow trout, gilt head bream (*Saparus aurata*), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), Atlantic cod (*Gadus morhua*)를 대상으로 원료소화율을 측정한 결과 밀글루텐이 어분에 비해 높은 단백질 소화율을 보였다(Sugiura et al., 1997; Kissil and Lupatsch, 2004; Schneider et al., 2004; Tibbetts et al., 2006). Storebakken et al. (2000)은 Atlantic salmon 사료 내 어분을 밀글루텐으로 대체할 시 소화율이 향상된다고 보고하였다. Hernández et al. (2010)는 가금부산물분(CP: 64.9%)을 사용하여 Nile tilapia 사료 내 어분을 100% 대체한 연구에서 소화율이 감소하지 않았다고 보고하였다. 실험 3-2에서는 4개월차, 6개월차 소화율 측정을 제외하면 어분을 50% 대체(FM33)했음에도 소화율에 있어 대조구와 타 실험구 사이에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 실험 3-4에서는 FM46, FM39 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 소화율이 높았다. 어분 대체 원료로 밀글루텐과 가금부산물분을 사용하였기 때문에 어분을 대체했음에도 소화율의 저하가 발생하지 않았고, 경우에 따라서는 오히려 소화율이 높았던 것으로 판단된다.

선행 연구에서 대두박을 이용하여 사료 내 어분을 30% 대체한 경우 소화율이 감소하였으나, 베테인이 포함된 섭이촉진제를 첨가할 경우 대조구와 소화율에서 차이가 없었으며, 어분을 20% 대체한 사료 내 첨가할 경우 대조구에

비해 소화율이 증가되었다(Choi et al., 2004). *Cobia (Rachycentron canadum)* 자어를 대상으로 한 연구에서는 사료 내 타우린을 첨가할 경우에 amylase, lipase, trypsin, pepsin 과 같은 소화효소의 활성이 증가하였다(Salze et al., 2012). 본 연구에서도 대조구를 제외한 모든 실험사료 내 베테인과 타우린이 첨가되었으며, 어분대체에 따른 소화율 감소를 보완 혹은 향상 시켜준 것으로 사료된다.

어류의 소화율은 사육수온과 같은 환경조건 등에 영향을 받을 수 있으며(Sullivan and Reigh, 1995), 항상 일정한 수준으로 유지되지 않는다(McGoogan and Reigh, 1996). 넙치의 최적사육 수온은 21~24℃이다(Son et al., 2006). 실험 3-2에서 6개월 간의 수온측정 결과, 4개월차에 최적사육 수온 보다 낮은 평균수온을 나타내었으며, 15.4℃까지 수온이 내려간 것으로 나타났다. 6개월차 평균수온은 13.7℃, 최저수온 11.4℃까지 내려갔다. 이전 연구에서, 어분대체 사료의 소화율을 조사하였을 때, 수온이 감소하게 될 경우 어분대체율이 높은 사료의 소화율이 더욱 크게 감소하였다(Bowyer et al., 2013). 실험 3-2 에서도 FM50 실험구가 4, 6개월차에 대조구에 비해 소화율이 감소한 이유는 수온저하에 민감하게 반응하였기 때문으로 판단된다.

따라서, 적정수온에서 넙치사료 내 타우린과 베테인을 첨가하면 밀글루텐, 대두농축단백, 수지박, 가금부산물분을 혼합하여 사료 내 어분의 50%(FM33)까지 대체가 가능할 것으로 판단된다. 소화율 결과를 고려하였을 때, 저수온(18.5℃ 이하)에서는 40%(FM39)까지 어분대체가 가능할 것으로 판단된다. 또한 원료 비용이 절감된 배합비를 이용하여서도 사료 내 어분을 40%(FM\_39)까지 대체할 수 있을 것으로 판단된다.

## CHAPTER 4

### 단백질 원료 혼합물을 이용한 무어분(fish meal-free)

### 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 사료 개발을 위한 연구

#### 4.1. 재료 및 방법

##### 4.1.1 실험사료

실험 4에 사용된 실험사료 배합비는 Table 10에 나타내었다. 대조사료 내 어분함량은 70%로 설정되었다(FM70). 실험사료 5종은 사료 내 어분함량을 각각 45%, 40%, 35%, 20%, 0%로 설정하고(FM45, FM40, FM35, FM20, FM0), 밀글루텐, 대두농축단백, 수지박, 가금부산물분, 참치부산물을 혼합하여 어분을 대체하였다. 어분대체에 따른 methionine 결핍을 예방하기 위해 FM40, FM35, FM30, FM20, FM0 실험사료 내 methionine 을 첨가하였다. 실험사료간의 동일한 조지질 및 인 조성을 위해 밀가루, 어유, 일인산칼슘이 사용되었다. 어분대체 사료의 기호성 향상을 위해 베테인과 타우린이 첨가되었다. 어분대체율이 증가함에 따라 사료 이용성향상을 위해 콜린과 레시틴이 추가되었다. 실험사료는 압출성형기(ATX-2, Fesco, Korea)를 이용하여 EP 형태로 제작되었다.

**Table 10. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets in trial 4 (% of dry matter basis).**

Trial 4	Diets					
	FM70	FM45	FM40	FM35	FM20	FM0
Fish meal, sardine <sup>1</sup>	35.00	22.50	20.00	17.50	10.00	0.00
Fish meal, anchovy <sup>2</sup>	35.00	22.50	20.00	17.50	10.00	0.00
Soybean meal <sup>3</sup>	12.00	12.00	12.00	12.00	14.50	16.00
Wheat gluten <sup>4</sup>	0.00	4.50	4.50	4.50	4.90	5.30
Soy protein concentrate <sup>5</sup>	0.00	5.50	6.50	8.00	9.00	10.50
Tankage meal <sup>6</sup>	0.00	8.00	10.00	11.50	18.00	26.50
Poultry by-product meal <sup>7</sup>	0.00	4.50	5.00	5.50	6.50	8.50
Tuna by-product meal <sup>8</sup>	0.00	0.00	1.00	2.00	5.00	10.00
Starch	4.00	3.80	3.50	3.25	2.40	1.90
Wheat flour	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
Fish oil <sup>9</sup>	3.30	4.30	4.40	4.60	4.90	5.20
Methionine <sup>10</sup>	0.00	0.00	0.10	0.15	0.20	0.30
Mono calcium phosphate	0.50	0.70	0.90	1.10	1.40	1.70
Mineral Mixture	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin Mixture	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin C	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamin E	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Betaine	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Taurine	0.00	0.50	0.70	0.80	1.10	1.40
Choline	0.50	0.50	0.60	0.70	0.90	1.10
Lecithin	0.50	0.50	0.60	0.70	1.00	1.40
<i>Proximate composition (% of dry matter)</i>						
Moisture	3.67	3.65	2.39	3.24	6.91	6.55
Crude protein	57.7	58.0	58.3	58.1	55.8	56.0
Crude lipid	10.2	10.2	10.0	10.1	11.8	11.7
Crude ash	15.6	12.9	12.6	12.4	11.0	9.46

- <sup>1</sup>Fish meal, sardine (crude protein 68.0%, crude lipid 8.6%, crude ash 17.1%)
- <sup>2</sup>Fish meal, anchovy (crude protein 69.4%, crude lipid 8.3%, crude ash 17.8%)
- <sup>3</sup>Soybean meal (crude protein 52.7%, crude lipid 1.8%, crude ash 6.8%)
- <sup>4</sup>Wheat gluten (crude protein 83.2%, crude lipid 3.49%, crude ash 1.3%)
- <sup>5</sup>Soy protein concentrate (crude protein 68.9%, crude lipid 0.5%, crude ash 7.1%)
- <sup>6</sup>Tankage meal (Crude protein 83.2%, crude lipid 3.69%, crude ash 7.5%)
- <sup>7</sup>Poultry by-product meal (Crude protein 71.6%, crude lipid 13.5%, crude ash 10.5%)
- <sup>8</sup>Tuna by-product meal (Crude protein 60.2%, crude lipid 7.01%, crude ash 18.8)
- <sup>9</sup>Fish oil was by E-wha oil Co., Ltd., Busan, Korea.
- <sup>10</sup>Methionine was by Vixxol Co., Ltd., Gyeonggi, Korea.



**Figure 11. Experimental diets for trial 4**

#### 4.1.2. 실험어 및 사육관리

실험 4에 사용된 실험어는 제주도 서귀포시에 위치한 원양수산에서 구입되었다. 실험환경에 대한 적응을 위해 시판되는 넙치용 배합사료를 공급하며 순치되었다. 평균무게  $150 \pm 1g$ 의 넙치를 총 18개 2000L 원형 FRP 수조에 50마리씩 3반복으로 배치하였다. 사육실험은 5개월 동안 진행되었다. 실험사료는 1일 2회(08:30, 17:30) 반복 공급되었다. 사육수는 모래여과해수를 사용하여 25-30 L/min의 유수량이 되도록 조절되었다. 어병 방지를 위해 주수파이프에 UV 살균기가 설치되었다. 각 실험수조 내 사육수 순환과 용존산소 유지를 위하여 에어스톤이 설치되었다. 사육수온은 매일 오전과 오후 2회 측정되었다.

#### 4.1.3. 어체측정

사료 공급 실험 후, 성장률과 사료효율 그리고 생존율의 측정을 위해 실험어를 24시간 절식 시킨 후 실험어류의 수와 무게를 측정하였다. 무게 측정 후 증체율(weight gain, %), 일간성장률(specific growth rate, %), 사료섭취량(feed intake, g/fish), 사료전환효율(feed conversion ratio), 단백질이용효율(protein efficiency ratio), 생존율(survival, %), 비만도(condition factor), 간 중량 지수(hepatosomatic index, %), 장 중량 지수(viscerosomatic index, %)를 조사하였다. 계산식은 다음과



같다.

- Weight gain (%) =  $100 \times (\text{final mean body weight} - \text{initial mean body weight}) / \text{initial mean body weight}$

- Specific growth rate (%) =  $[(\log_e \text{ final body weight} - \log_e \text{ initial body weight}) / \text{days}] \times 100$

- Feed conversion ratio =  $\text{dry feed fed} / \text{wet weight gain}$

- Protein efficiency ratio =  $\text{wet weight gain} / \text{total protein given}$

- Feed intake (g / fish) =  $\text{dry feed consumed (g)} / \text{fish}$

- Survival (%) =  $\text{number of fish at end of feeding trial} / \text{number of fish stocked} \times 100$

- Condition factor =  $\text{fish weight} \times 100 / \text{total body length}^3$

- Hepatosomatic index (%) =  $100 \times (\text{liver weight} / \text{body weight})$

- Viscerosomatic index (%) =  $100 \times (\text{visceral weight} / \text{body weight})$

#### 4.1.4. 샘플수집

어체측정 후, 각각의 수조에서 8마리의 어류를 무작위로 선별하였다. 선별된 실험어는 2-phenoxyethanol 용액(200 ppm)을 이용하여 마취시켰으며, 주사기를 이용하여 미부동맥에서 채혈을 실시하였다. 채혈된 혈액은 헤파린이 20  $\mu\text{L}$ 씩 처리된 1.5mL eppendorf tube에 넣어 hematocrit, hemoglobin 측정에 사용되었다. 혈장(plasma)은 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), glucose, total protein 분석을 위해 에서 원심분리(4°C, 5,000 rpm, 10min; Micro 17TR, Hanil Science) 되어 냉동보관(-70°C) 되었다. 실험어체의 등근육에 대한 일반성분 분석을 위해 척추를 기준으로 세로 2cm, 가로 8cm 의 등근육을 수집하여 냉동보관(-50°C) 되었다.

#### 4.1.5. 일반성분 분석

AOAC (2000) 분석법에 따라 실험사료와 어체 등근육에 대한 일반성분 분석을 진행하였다. 수분은 상압가열건조법(125°C, 3시간), 조회분은 직접회화법(550°C, 4시간)으로 분석되었다. 지방은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 분석되었다. 단백질은 자동조단백질 분석기(Kejltac system 2300, Sweden)로 분석되었다.

#### 4.1.6. 생화학적 분석

Hematocrit은 모세혈관 채혈튜브(micro-hematocrit capillary tubes)에 혈액을 채운 후, 혈액 진단원심분리기(Micro Hematocrit VS-12000, Vision Scientific, Korea)에서 10분간 원심분리하여 값이 측정되었다. Hemoglobin, AST, ALT, total protein, glucose 분석은 시판되고 있는 kit시약과 반응시킨 후 혈액 생화학분석기(Express plus system, Bayer, USA)를 이용하여 분석되었다.

#### 4.1.7. 소화율 분석

각 실험에 사용된 실험어는 1 주 동안 실험수조에 소화율 사료가 공급되면서 실험환경에 대한 적응과 장내에 일반사료가 남아있지 않도록 순치된 후 소화율 실험에 사용되었다. 예비사육 후 실험어로 사용된 넙치는 400L Guelph system 에 배치되었다. 사육수는 1차적으로 모래 여과된 해수를 카트리지가 필터가 장착된 하우징을 통해 2차 여과기를 통과시키면서 1L/min 의 매우 적은

유수량이 되도록 조절되었다.

소화율 실험사료 제작을 위해 각 실험에 사용된 실험사료를 펠렛성형기(Geumgang ENG, SP-50)와 믹서기를 이용하여 2회에 걸쳐 분쇄하였다. 지시제로(indicator)로 chromium oxide ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , DaeJung)가 사용되었다. 분쇄된 실험사료(99%)와 지시제(1%)를 혼합기에 넣어 완전히 섞은 후, 사료원 총 중량의 25%에 해당하는 증류수를 첨가하여 사료혼합기로 혼합·반죽하였다. 혼합반죽물은 펠렛성형기를 이용하여 펠렛 사료 형태로 제작되었으며, 실험사료의 크기는 7mm로 제작되었다. 제작된 실험사료는 건조기를 사용하여 25°C 에서 24시간 건조되었으며, -20°C 에서 보관되면서 사용되었다.

분 수집을 위해 소화율 사료는 분 수집 16시간 전에 반복 공급되었다. 분 수집을 위한 시간 설정은 어종 및 사육 환경에 따라 변할 수 있다. 위에 설정된 수집시간은 실험개시 전 여러 번의 사전 실험을 거쳐 실험어류와 실험환경에 가장 알맞은 시간으로 설정되었다. 반복공급 후, 수조에 남은 사료 및 이물질을 깨끗이 청소하고 새로 환수하였다. 그 후, 카트리지 필터를 교체하여 다시 한 번 환수를 하고, 각 수조에 분 수집관을 설치하여 익일 오전(09:00) 분을 수집하는 방식으로 1회에 2주간 분이 수집되었다. 수집된 분 샘플은 여과지를 이용하여 해수를 제거한 후 -50°C 저온냉동고에 보관되었다. 모든 분 수집이 끝난 후 동결냉동건조기(freezerdryer)를 이용하여 동결건조 시킨 후 분석에 사용되었다. 실험사료와 분에서의 chromium oxide 함량은 Divakaran et al. (2002)의 방법을 토대로 분석되었다.

#### 4.1.8. 조직학적 분석

Bouin's solution으로 고정된 전장 조직은 24시간 동안 고정 된 후 70%

에탄올에 탈수 및 보관 되었다. 이 후 적절한 크기로 잘라 조직분석용 카세트에 넣고 티슈 프로세서에서 단계별 탈수과정을 거친 후 파라핀(paraffin)을 침투시켰다. 18시간 후 파라핀으로 포매 되었으며, 절편법에 따라 7  $\mu\text{m}$ 의 두께의 조직표본으로 제작되었다. 조직표본은 조직학적 관찰을 위해 H&E 방법으로 염색되었다. 조직의 형태학적 변화는 ZEN, 2012 를 이용하여 측정되었다.

#### 4.1.9. 통계분석

실험사료의 배치는 완전확률계획법(completely randomized design)을 실시하였고, 성장률, 사료효율, 생존율 및 분석결과들은 SPSS (version 12.0) 프로그램을 이용하여 one-way ANOVA로 통계 분석되었다. 데이터 값의 유의차는 Tukey's HSD 로 평균 간의 유의성( $P \leq 0.05$ )을 비교하였다. 데이터는 평균값 $\pm$ 표준편차(mean $\pm$ SD)로 나타내었으며, 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석 되었다.

## 4.2. 결과

### [실험 4]

5개월의 사육실험 결과는 Table 11에 나타내었다. 성장률과 사료효율은 FM70 실험구에 비해 FM0 실험구가 유의적으로 낮았다. 반면, FM45 실험구는 유의적이지는 않지만 FM70 실험구에 비해 높은 성장률을 보였다. 형태학적 분석 결과 실험구 사이에 유의적인 차이는 없었다. 1개월 간격으로 조사한 평균무게 변화는 Figure 12에 나타내었다. 3개월차까지는 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다. 4개월, 5개월 차에는 FM0 실험구가 FM70 실험구에 비해 유의적으로 평균무게가 낮았다. 또한 시간이 지남에 따라 평균무게의 차이가 더욱 벌어지는 것이 관찰되었다.

생화학적 분석결과는 Table 12에 나타내었다. 모든 항목에서 사료공급 실험에 따른 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다.

어체 등근육 일반성분 분석 결과는 Table 13에 나타내었다. 모든 항목에서 사료공급 실험에 따른 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다.

조직학적 분석 결과는 Figure 13에 나타내었다. 모든 실험구에서 실험사료 공급에 따른 조직 형태학적인 변화가 관찰 되지 않았다.

소화율 분석 결과는 Figure 14에 나타내었다. 건물 소화율과 단백질 소화율에서 FM0을 제외한 모든 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다. 건물 소화율은 FM0 실험구가 FM70, FM45, FM40 실험구에 비해 유의적으로 낮았다. 단백질 소화율은 FM0 실험구가 FM70, FM45, FM40, FM35 실험구에 비해 유의적으로 낮았다.

**Table 11. Growth performance and morphological indexes of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for trial 5 (20 weeks).**

<b>Dietary treatment</b>	<b>FBW<sup>2</sup></b>	<b>WG<sup>3</sup></b>	<b>SGR<sup>4</sup></b>	<b>FI<sup>5</sup></b>	<b>FCR<sup>6</sup></b>	<b>PER<sup>7</sup></b>	<b>Survival</b>	<b>CF<sup>8</sup></b>	<b>HSI<sup>9</sup></b>	<b>VSI<sup>10</sup></b>
<i>Trial 4</i>										
FM70	782±27 <sup>ab</sup>	417±21 <sup>ab</sup>	0.96±0.04 <sup>a</sup>	599±9	0.95±0.03 <sup>ab</sup>	1.81±0.06 <sup>ab</sup>	92.7±5.0	1.16±0.03	1.68±0.23	3.57±0.11
FM45	830±39 <sup>a</sup>	450±30 <sup>a</sup>	0.99±0.03 <sup>a</sup>	618±19	0.91±0.03 <sup>a</sup>	1.96±0.05 <sup>a</sup>	82.7±4.2	1.24±0.01	2.25±0.24	4.18±0.29
FM40	754±4 <sup>b</sup>	405±2 <sup>ab</sup>	0.95±0.01 <sup>a</sup>	584±13	0.97±0.02 <sup>ab</sup>	1.83±0.04 <sup>ab</sup>	84.0±7.2	1.18±0.01	1.94±0.24	4.15±0.44
FM35	764±27 <sup>ab</sup>	409±14 <sup>ab</sup>	0.95±0.00 <sup>a</sup>	566±58	0.92±0.06 <sup>a</sup>	1.91±0.13 <sup>a</sup>	89.3±6.4	1.19±0.07	1.82±0.15	3.89±0.22
FM20	728±2 <sup>bc</sup>	384±2 <sup>bc</sup>	0.93±0.00 <sup>ab</sup>	597±18	1.03±0.04 <sup>bc</sup>	1.69±0.06 <sup>bc</sup>	80.0±25.5	1.23±0.04	1.90±0.35	4.14±0.33
FM0	657±19 <sup>c</sup>	337±12 <sup>c</sup>	0.87±0.02 <sup>b</sup>	561±21	1.11±0.04 <sup>c</sup>	1.60±0.06 <sup>c</sup>	98.0±2.0	1.17±0.11	1.93±0.48	4.16±0.40

<sup>1</sup>Values are mean of triplicates and presented as mean  $\pm$  SD. Values with different superscripts in the same row are significantly different ( $P < 0.05$ ). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

<sup>2</sup>Final body weight (g)

<sup>3</sup>Weight gain (%)

<sup>4</sup>Specific growth rate (%)

<sup>5</sup>Feed intake (g/fish)

<sup>6</sup>Feed conversion ratio

<sup>7</sup>Protein efficiency ratio

<sup>8</sup>Condition factor

<sup>9</sup>Hepatosomatic index (%)

<sup>10</sup>Viscerosomatic index (%)

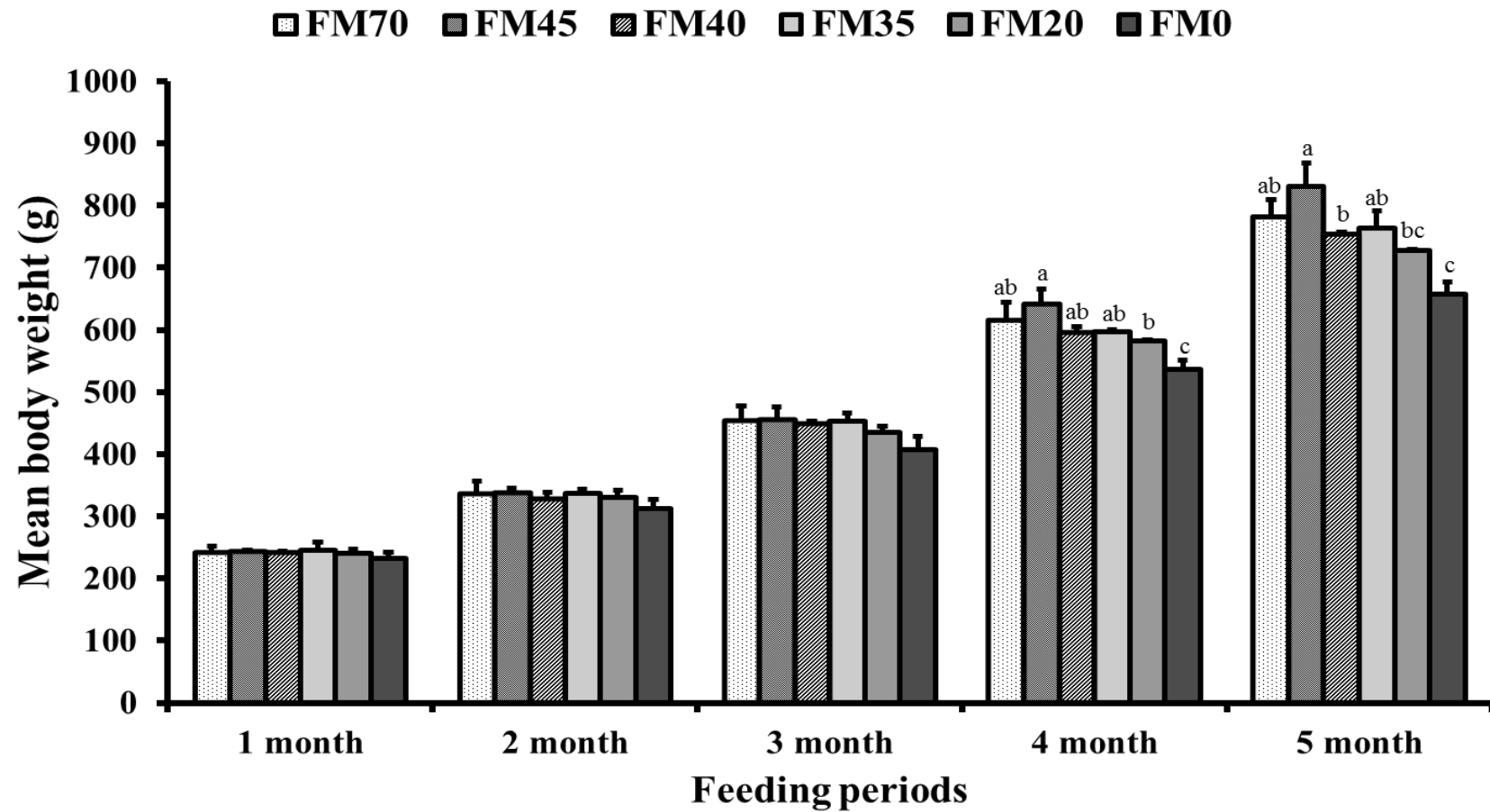


Figure 12. Changes in mean body weight of olive flounder *Paralichthys olivaceus* (initial body weight: 150±3g) fed the experimental diets for trial 4 (5 months).



**Table 12. Hematological parameters of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for trial 4 (5 months)<sup>1</sup>.**

<b>Dietary treatment</b>	<b>Hb<sup>2</sup></b>	<b>Ht<sup>3</sup></b>	<b>AST<sup>4</sup></b>	<b>ALT<sup>5</sup></b>	<b>TP<sup>6</sup></b>	<b>Glucose<sup>7</sup></b>
<i>Trial 4</i>						
FM70	5.45±0.48	33.8±5.0	11.8±0.4	4.17±1.70	4.71±0.53	26.7±6.4
FM45	6.24±0.35	36.2±3.7	9.70±1.07	2.71±0.71	4.64±0.79	26.5±2.5
FM40	5.54±0.86	31.9±7.2	10.7±1.3	3.15±0.96	5.00±0.22	30.5±9.1
FM35	5.96±0.65	34.7±5.8	10.6±1.6	3.48±0.76	4.89±0.33	23.9±5.6
FM20	5.70±0.36	34.7±3.0	10.2±1.0	3.85±1.38	5.49±0.35	30.8±13.5
FM0	5.60±0.10	35.0±5.3	11.7±2.6	3.71±1.62	4.63±0.59	35.1±11.5

<sup>1</sup>Values are mean of triplicates and presented as mean ± SD. The lack of superscript letter

indicates no significant differences among treatments.

<sup>2</sup>Hemoglobin (g/dL).

<sup>3</sup>Hematocrit (%).

<sup>4</sup>Aspartate aminotransferase (U/L).

<sup>5</sup>Alanine aminotransferase (U/L).

<sup>6</sup>Total protein (g/dL).

<sup>7</sup>Glucose (mg/dL).

**Table 13. Muscle composition (% of wet basis) of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for trial 4 (5 months)<sup>1</sup>.**

<b>Dietary treatment</b>	<b>Moisture</b>	<b>Crude protein</b>	<b>Crude lipid</b>	<b>Crude ash</b>
<i>Trial 4</i>				
FM70	75.2±1.8	21.6±1.4	0.88±0.20	1.05±0.33
FM45	74.8±0.5	22.7±0.8	0.82±0.28	1.13±0.10
FM40	74.7±0.9	23.1±0.6	0.78±0.24	1.21±0.06
FM35	74.4±0.6	21.9±1.1	0.86±0.09	1.28±0.13
FM20	74.4±1.7	22.7±0.2	0.88±0.15	1.04±0.19
FM0	75.2±0.2	22.4±1.7	0.80±0.42	1.11±0.22

<sup>1</sup>Values are mean of triplicates and presented as mean ± SD. The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

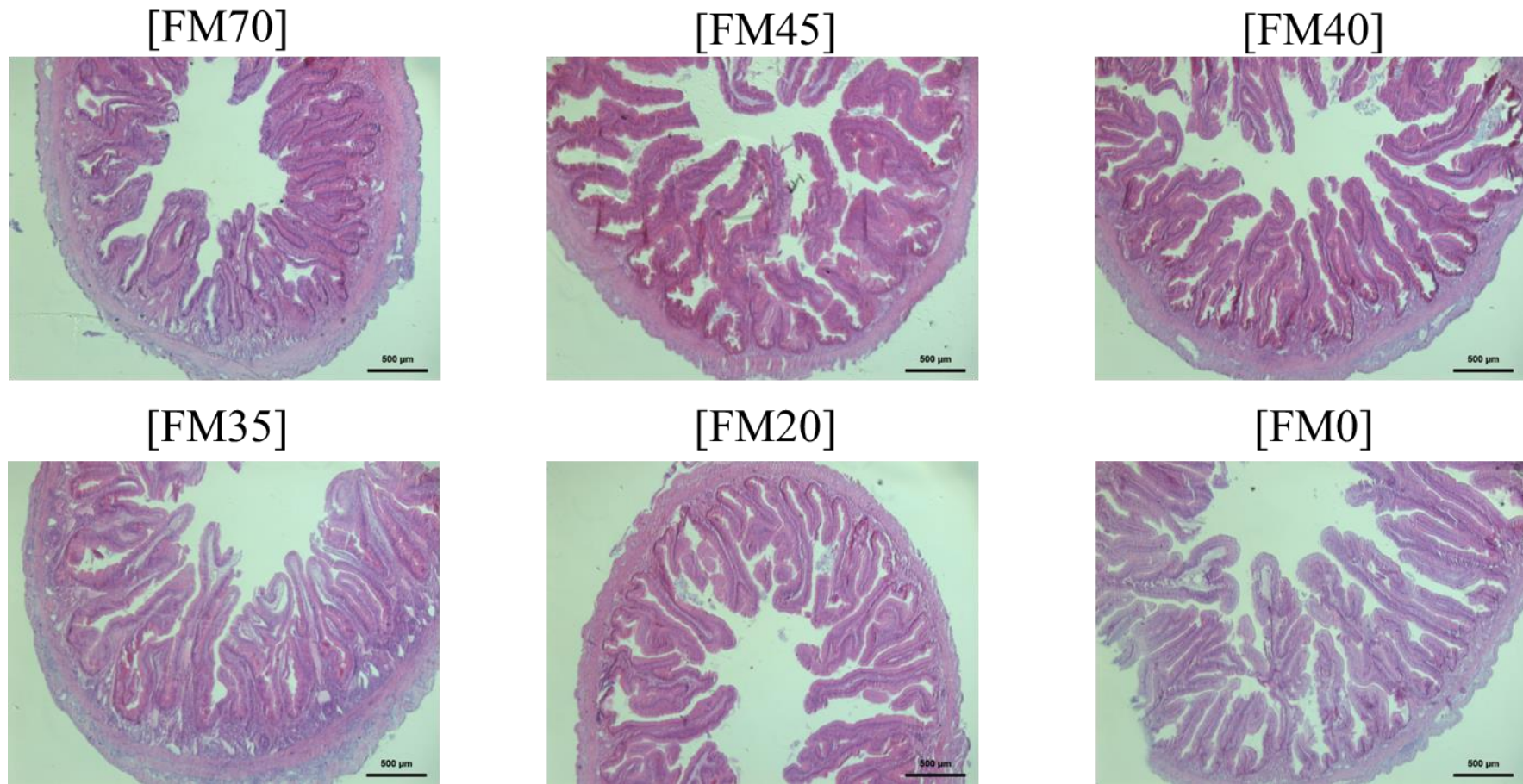


Figure 13. Histological change of the anterior intestine of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets (trial 4).

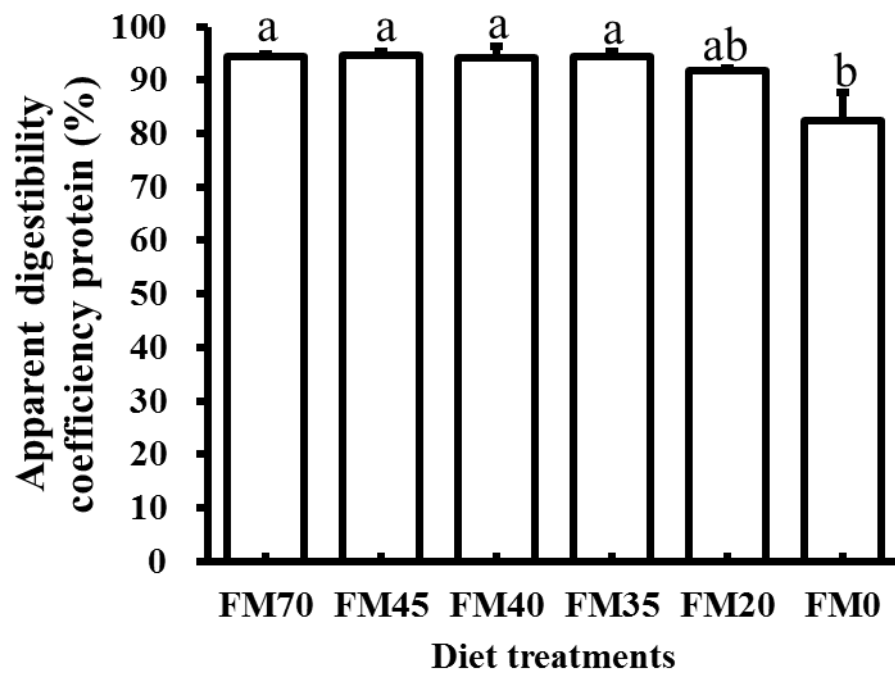
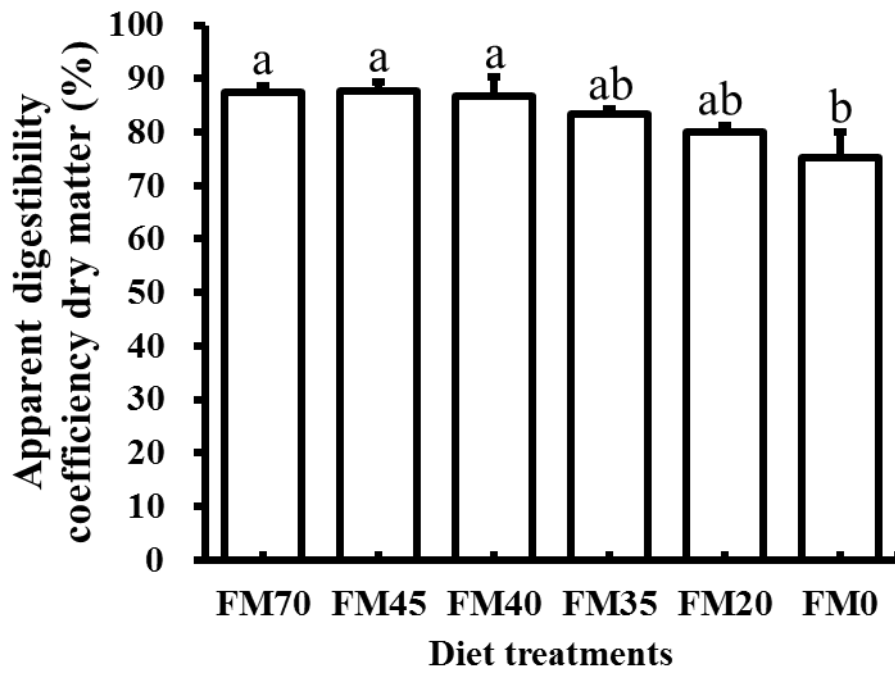


Figure 14. Apparent digestibility coefficient of dry matter and protein in the experimental diet (trial 4).

### 4.3. 고찰

본 연구에서 실험사료는 extruder 를 이용하여 부상사료(EP, extruded pellet)로 제작되었다. 사료 제조과정에서 적절한 성형 효과를 얻는 것은 사료의 품질향상 측면에서 매우 중요하다(Kim et al., 1995). 양어사료 제조에서 원료의 조성은 사료의 물성에 영향을 미친다(Ryu, 1994). 밀글루텐은 단백질 함량이 매우 높고, 항영양인자가 거의 없으며, 소화율이 높아 좋은 단백질원으로 여겨진다(Storebakken et al., 2010; Tusche et al., 2012). 하지만 강한 점결력을 지니고 있어 사료의 압출성형에 문제를 야기시킨다(Gaylord et al., 2010). 대두박, 대두농축단백 등 식물성 단백질 원료 내 포함되어 있는 전분 또한 사료성형에 영향을 줄 수 있다. 본 연구에서는 밀글루텐을 비롯한 식물성 단백질 원료의 함량이 증가할수록 전분의 함량을 줄여 밀글루텐 점결력에 의한 사료성형문제를 예방하였다. 결론적으로 상업적 이용을 위해 본 연구에서 제시된 배합비를 사용하더라도 사료 성형에 전혀 문제가 없을 것으로 판단된다.

넙치를 대상으로 한 대부분의 연구는 단일 원료를 이용하여 어분을 대체하였으며, 사료 내 어분함량이 35% 이하인 경우 성장률 및 사료효율이 감소하였다(Kim et al., 2000; Kim et al., 2011; Kader et al., 2012; Kim et al., 2014). Sato and Kikuchi, (1997)는 육분을 이용하여 사료 내 어분을 16%까지 감소시킬 수 있다고 보고하였지만 실험 기간이 8주에 불과하여 저어분 사료 장기간 공급에 따른 영향을 판단하기에는 부족하였다. 실험 4에서는 FM20 실험사료를 5개월 동안 공급하여도 성장률, 사료효율, 소화율에서 FM70과 유의적인 차이가 없었다. 또한 FM0 실험사료를 3개월 동안 공급한 경우에도 FM70과 유의적인 차이가 없었다. Cabral et al, (2011)은 필수아미노산의 균형을 맞추고 추가적인 아미노산 보충을 최소화하기 위해 다른 단백질 공급원의 합리적인 혼합이 필요하다고

보고하였다. Nile tilapia 사료 내 어분을 옥수수 주정박, 대두박, 가금부산물분과 유리아미노산을 혼합하여 어분을 100% 대체할 수 있다고 보고되었다(Herath et al., 2016). Red seabream 사료에서는 발효대두박+오징어간분 혼합물, 발효대두박+가리비분말 혼합물, 어즙, 크릴밀, 대두박을 혼합하여 어분을 80%까지 대체하더라도 성장률과 사료효율에 영향이 없었다(Kader and Koshio, 2012). 본 연구에서도 단백질 원료 혼합을 통해 필수아미노산의 균형을 맞추었기 때문에 어분함량을 20%까지 감소시켜도 성장률과 사료효율의 유의적인 감소가 없는 것으로 판단된다.

단백질 함량이 낮은 대체원료를 사용하여 어분을 대체하려면 사료의 단백질 함량을 맞추어 주기 위해 많은 양을 사용해야 한다. 반면, 단백질 함량이 높은 대체원료를 사용하여 어분을 대체할 경우 적은 양을 사용하더라도 사료의 단백질 함량을 맞추어 줄 수 있다. 사료의 어분을 대체하기 위해 사용되는 단백질 원료의 함량의 비율을 어분대체량:단백질 원료 사용량으로 나타낸다면, 이전 연구에서 단백질 함량이 낮은 대두박과 발효대두박을 사용할 경우 사용 비율은 각각 1:1.67, 1:1.24 이었다(Kim et al., 2000; Kim et al., 2013). 단백질 함량이 높은 감자농축단백과 밀글루텐을 사용한 경우 1:0.96 이었다(Tusche et al., 2012). 본 연구에서도 어분대체량 대비 단백질 원료 사용량의 비율은 1:0.93으로 어분대체량 보다 어분대체에 사용되는 단백질 원료의 사용량이 적었다. 식물성 단백질을 적게 사용한 만큼 사료 내 항영양인자의 양이 감소하게 된다. 하지만 단백질 함량이 높은 식물성 단백질 원료의 경우 별도의 가공과정을 거치기 때문에 가격이 기존 식물성 원료에 비해 비싸다(Oliva-Teles et al., 2015). 원료를 적절히 혼합하여 사용한다면 항영양인자 감소에 따른 어분대체를 증가와 사료 가격의 절감을 기대할 수 있을 것이라 판단된다.

대두박 또는 대두농축단백에는 protease inhibitor, haemagglutinin, saponin, phytase, glucosinolate, lectin, phytoestrogen 과 같은 항영양인자가 있어 다량 사용시 어체의 성장률과 사료효율 감소를 야기시킬 수 있다고 보고되었다(Oliva-Teles et al., 2015). 이전 연구에서 대두박 또는 대두농축단백의 함량이 각각 20%, 15.9% 이상일 때 성장률 감소가 나타났다(Kim et al., 2000; Deng et al., 2006). Turbot 사료에서 대두박을 26% 이상 사용한 경우 성장률, 사료기호성, 사료효율, 소화효소 활성이 감소되었으며, 염증반응에 의한 장조직의 변화가 관찰되었다(Gu et al., 2016). 실험 4에서 FM20과 FM0 사료 내 대두박과 대두농축단백의 총 함량은 각각 23.5%, 26.5% 이다. 실험 4에서 FM20과, FM0의 성장률, 사료효율, 소화율이 감소한 이유는 대두박과 대두농축단백 내 항영양인자에 의한 것으로 판단된다. 반면, 조직학적 분석결과 장조직 내 염증반응에 의한 변화는 관찰되지 않았다. Sun et al. (2020)은 베테인이 어류의 장 내에 발생하는 염증에 대한 저항성을 증가시킨다고 보고하였다. FM20과 FM0 실험사료 내 항영양인자는 어체의 성장, 사료효율, 소화율에는 영향을 미치지만 염증반응과 장조직의 변화를 일으킬 정도의 양은 아니거나, 베테인에 의해 장 내 염증반응이 완화되었기 때문으로 판단된다. 하지만 실험 4에서는 사료 내 항영양인자의 함량을 조사하지 못하였기 때문에 추가적인 연구를 통해 정확한 항영양인자의 양을 조사해야 할 것으로 판단된다.

혈액학적 분석은 어류의 생리활성과 건강상태를 조사하는데 이용된다(Song and Lee, 2013). 이전 연구에서 넙치 사료 내 어분을 대체할 때 Ht, AST, ALT 등에서 혈액성상의 변화가 발생되었다고 보고되었다(Kim et al., 2008; Kim et al., 2009). Ht는 영양소 결핍에 따라 수치가 감소된다(Song and Lee, 2013). AST와 ALT는 어류의 간 또는 신장이 손상되는 경우 혈액으로 방출되게 되는데, 필수아미노산이 결핍될 때에도 AST와 ALT의 수치가 증가되는 것으로



보고되었다(Cheng et al., 2010; Biswas et al., 2019). 실험 4에서는 혈액성상의 차이가 없었다. 따라서 어분대체에 따른 영양소 결핍에 의한 부작용이나 어류의 건강상태에 이상이 없는 것으로 판단된다.

타우린은 어류에서 필수아미노산이 아니라 여겨졌지만 몇몇 연구에서는 타우린이 조건부 필수아미노산이라고 보고되었다(Kim et al., 2005; Lim et al., 2013). 타우린의 첨가는 어류의 생리조절에 도움을 주며 성장, 사료효율, 소화율, 사료기호성을 향상시킬 수 있다(Kim et al., 2005; Biswas et al., 2019; de Moura et al., 2019; Dehghani et al., 2020). 특히, 식물성 원료를 이용하여 어분을 대체할 경우 경우 타우린을 반드시 첨가해야 한다고 보고되었다(Velasquez et al., 2015). Takagi et al. (2008)는 무어분 사료의 경우 타우린은 필수영양소의 하나라고 보고하기도 하였다. 이전 연구에서는 어분대체 사료 내 타우린을 첨가할 경우 성장률, 사료효율, 소화율이 증가된다고 보고되었다(Koven et al., 2016). 어분대체 사료 내 베테인의 첨가는 사료 기호성 저하를 보완할 수 있다고 보고되었다(Xue and Cui, 2001). 또한 베테인 또는 베테인이 포함된 첨가제를 첨가할 경우 넙치의 성장, 사료효율, 소화율을 향상시킬 수 있다고 보고되었다(Choi et al., 2004; Gosh et al., 2019). 실험 4에서는 모든 어분대체 실험구에 1%의 베테인을 첨가하였으며, 어분함량이 감소함에 따라 타우린의 함량을 증가시켰다. 실험 4에서 어분의 함량을 20%까지 줄이더라도 성장률, 사료효율, 소화율이 감소하지 않은 이유는 타우린과 베테인의 첨가가 어분대체에 따른 부작용을 보완해 주었기 때문으로 판단된다.

실험 4의 연구결과, 넙치사료 내 타우린, 베테인, methionine 을 첨가하고, 5종의 단백질 원료(밀글루텐, 대두농축단백, 수지박, 가금부산물분, 참치부산물분)혼합물을 사용할 경우 사료 내 어분을 20%까지 감소시킬 수 있을



것이라 판단된다. 또한 무어분 사료를 공급했음에도 불구하고 3개월 간 성장 차이가 없다는 결과를 바탕으로 다양한 사료공급 방법을 모색하여 무어분 사료의 활용방안을 마련할 수 있을 것으로 판단된다.

## 요 약 문

어분은 높은 단백질 함량과 어류에 필요한 필수 영양소를 고루 갖추고 있어 양어사료에서 주 단백질 원료로 사용되고 있다. 하지만 환경적, 경제적인 측면에서 어분을 대체해야 한다는 목소리가 높아지고 있다. 이전까지 많은 연구들을 통해 어분을 대체하기 위해 노력해왔으나 단일 원료만을 이용하여 어분을 대체하였기 때문에 그 한계가 명확하였다. 따라서 본 연구에서는 다양한 단백질 원료를 혼합하여 어분을 대체한 저어분 넙치 사료를 개발하고자 총 7번의 사육실험이 수행되었다.

실험 2-1과 실험 2-2는 식물성 원료 3종(대두박, 밀글루텐, 대두농축단백) 혼합물과 아미노산 3종(lysine, threonine, methionine)을 첨가하여 저어분 사료의 가능성을 평가하였다. 실험 2-1은 7주간 수행되었으며, 대조사료의 어분함량이 65%로 설정되었다. 실험사료의 어분 함량은 59%, 55%, 52%, 49%, 46%로 설정되었다(FM65, FM59, FM55, FM52, FM49, FM46). 실험 2-2는 9주간 수행되었으며, 대조사료의 어분함량이 60%로 설정되었다. 실험사료의 어분함량은 54%, 51%, 48%, 45%, 42%로 설정되었다(FM60, FM54, FM51, FM48, FM45, FM42). 실험 2-1과 2-2 결과에서 어분을 대체하였음에도 성장률, 사료효율, 생존율, 혈액학적분석 모두 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다. 이 결과는 단일 식물성 단백질 원료를 이용하여 어분을 대체하였을 때 넙치의 성장 및 사료효율 저하가 나타난 이전 연구와는 상반된 결과이다. 결론적으로 식물성원료 혼합물과 아미노산 첨가를 통해 넙치 사료 내 어분을 42-46%까지 감소시킬 수 있을 것이라 판단된다.

실험 3-1과 3-2는 식물성 원료 2종(밀글루텐, 대두농축단백), 동물성 원료 2종(수지박, 가금부산물분) 혼합물과 타우린, 베테인을 첨가하여 어분대체가 이루어진 저어분 사료가 평가되었다. 실험 3-1은 치어기 넙치를 대상으로 15주간 수행되었다. 실험 3-2는 육성기 넙치를 대상으로 6개월 동안 수행되었다. 대조사료의 어분함량은 65%로 설정되었고, 실험사료의 어분함량은 각각 52%, 46%, 39%, 33%로 설정되었다(FM65, FM52, FM46, FM39, FM33). 사육실험결과 성장률, 사료효율, 생존율, 혈액학적분석, 전어체 일반성분, 조직학적분석에서 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다. 특히, 실험 3-2의 경우 semi-pilot 규모에서 200g 내외의 넙치를 6개월 동안 저어분 EP 사료를 공급하며 약 1kg까지 성장 시켰다. 이 결과는 저어분 사료의 상업적 이용가능성을 확인시켜주었다. 하지만 실험 3-2에서 FM33 실험사료를 장기간 공급한 경우 소화율이 유의적으로 감소하는 모습을 보였다. 결론적으로 FM39까지 저어분 사료로 사용이 가능할 것이라 판단된다.

실험 3-3과 3-4는 실험 3-1과 실험 3-2에서 사용된 저어분 사료의 비용절감을 위해 수행되었다. 가격이 비싼 밀글루텐, 베테인, vitamin C, vitamin E의 함량을 낮추고, 가격이 저렴한 수지박의 함량을 늘린 저어분 사료가 평가되었다. 실험 3-3은 치어기 넙치를 대상으로 5개월 동안 수행되었다. 실험 3-4는 육성기 넙치를 대상으로 6개월 동안 수행되었다. 대조사료의 어분함량은 65%로 설정되었고, 실험사료의 어분함량은 각각 46%, 39%로 설정되었다(FM65, FM46, FM39). FM39의 사료가격 절감을 위해 배합비를 조정한 실험사료 1종이 설정되었다(FM39\_2). 실험 3-3과 실험 3-4의 결과, 성장률, 사료효율, 생존율, 혈액학적분석, 전어체 일반성분에서 모든 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다. 특히, 실험 3-4는 6개월 동안 공급하여 250g의 넙치를 1.2kg까지 성장시켜 저어분 사료를 장기간

공급하여도 문제가 없음을 확인하였다. 또한, FM46과 FM39 실험구는 FM65 실험구에 비해 유의적으로 소화율이 증가하였다. 이와 같은 결과를 바탕으로 FM39까지 저어분 사료로 사용가능 할 것이라 판단되며, 가격을 절감한 FM39\_2 또한 저어분 사료로 사용이 가능할 것이라 판단된다.

실험 4는 식물성 원료 2종(밀글루텐, 대두농축단백), 동물성 원료 3종(수지박, 가금부산물분, 참치부산물분) 혼합물과 타우린, 베타인, methionine을 첨가하여 어분대체가 이루어진 저어분 사료가 평가되었다. 실험 4는 육성기 넙치를 대상으로 5개월 동안 수행되었다. 대조사료의 어분함량은 70%로 설정되었고, 실험사료의 어분함량은 각각 45%, 40%, 35%, 20%, 0%로 설정되었다(FM70, FM45, FM40, FM35, FM20, FM0). 실험 4의 결과, FM70 실험구와 비교하여 FM0 실험구를 제외한 모든 실험구 사이에 성장률, 사료효율, 생존율, 혈액학적분석, 근육 일반성분 결과에서 유의적인 차이가 없었다. 또한 FM0 실험구의 경우 3개월까지는 성장률에서 모든 실험구와 유의적인 차이가 없었으며, 4개월 차부터 FM70 실험구에 비해 유의적으로 성장률과 사료효율이 감소하였다. 이러한 결과를 바탕으로 FM20까지 저어분 사료로 사용가능 할 것으로 판단된다. 또한, FM0 공급했음에도 불구하고 3개월 간 성장 차이가 없다는 결과를 바탕으로 다양한 사료공급 방법을 모색하여 무어분 사료의 활용방안을 마련할 수 있을 것으로 판단된다.

위 결과들을 종합해 볼 때, 넙치 사료 내 타우린, 베타인, 아미노산을 첨가하고, 단백질 원료를 혼합하여 사용할 경우 사료 내 어분을 대폭 감소시킬 수 있을 것이라 판단된다. 또한, 본 연구 중 실험 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 4는 EP 사료를 사용하여 실험을 진행하였으며, 제작 및 사용에 있어 문제가 없었기 때문에 상업적으로 저어분 사료를 생산하는데 있어 문제가 없을 것으로 판단된다.

마지막으로, 사료 배합비를 보완하고, 활용방안을 마련한다면 넉치에서 무어분 사료의 사용도 가능할 것이라 판단된다.

## 참 고 문 헌

- Adjoumani JJY, Wang K, Zhou M, Liu W and Zhang D. 2017. Effect of dietary betaine on growth performance, antioxidant capacity and lipid metabolism in blunt snout bream fed a high-fat diet. *Fish Physio Biochem* 43, 1733-1745. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0405-9>.
- AOAC (Association of Official Analytical chemists). 2000. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists Inc, Arlington, VA, U.S.A.
- Apper-Bossard E, Feneuil A, Wagner A and Respondek F. 2013. Use of vital wheat gluten in aquaculture feeds. *Aquat Biosyst* 2013, 9-21. <https://doi/10.1186/2046-9063-9-21>.
- Bae KM, Kim KW and Lee SM. 2015. Evaluation of rice distillers dried grain as a partial replacement for fish meal in the practical diet of the juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Korean Fish Aquat Sci*, 18, 151-158. <http://dx.doi.org/10.5657/FAS.2015.0151>.
- Berge GM, Grisdale-Helland B and Helland SJ. 1999. Soy protein concentrate in diets for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 178, 139-148. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00127-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00127-1).
- Biswas A, Araki H, Sakata T, Nakamori T and Takii K. 2019. Optimum fish meal replacement by soy protein concentrate from soymilk and phyase supplementation in diet of red sea bream, *Pagrus major*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.023>.
- Boonyaratpalin M, Suraneiranat P and Tunpibal T. 1998. Replacement of fish meal with various types of soybean products in diets for the Asian seabass, *Lates calcarifer*. *Aquaculture* 161, 67-78. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00257-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00257-3).

- Bowyer JN, Qin JG, Sumllen RP, Adams LR, Thomson MJS and Stone DAJ. 2013. The use of a soy product in juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) feeds at different water temperatures: 1. Solvent extracted soybean meal. *Aquaculture* 384-387, 35-45. <https://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.12.005>.
- Bui HTD, Khosravi S, Fournier V, Herault M and Lee KJ. 2014. Growth performance, feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red seabream (*Pagrus major*) fed diets supplemented with protein hydrolysates. *Aquaculture*, 418, 11-16. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.046>.
- Chen Z, Ai Q, Mai K, Xu W, Ma H, Li Y and Zhang J. 2010. Effects of dietary canola meal on growth performance, digestion and metabolism of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture* 305, 102-108. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.03.031>.
- Cheng Z, Ai Q, Mai K, Xu W, Ma H, Li Y and Zhang J. 2010. Effect of dietary canola meal on growth performance digestion and metabolism of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture* 305, 102-108. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.03.031>.
- Choi HS, Myoung JI, Park MA and Cho MY. 2009. A study on the summer mortality of Korean rockfish *Sebastes schlegeli* in Korea. *J Fish Pathol* 22, 155-162.
- Choi SM, Wang X, Park GJ, Lim SR, Kim KW, Bai SC and Shin IS. 2004. Dietary dehulled soybean meal as a replacement for fish meal in fingerling and growing olive flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquac Res* 35, 410-418. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01046.x>.
- Dawood MAO, Koshio S, Ishikawa M and Yokoyama S. 2015. Effects of Partial substitution of Fish Meal by Soybean Meal with or without Heat-Killed *Latobacillus plantarum* (LP20) on Growth Performance, Digestibility, and Immune Response of Amberjack, *Seriola dumerili* Juveniles. *Biomed Res Int.* 2015, 132-135.

<http://dx.doi.org/10.1155/2015/514196>.

Day OJ and Plascencia González HG. 2000. Soybean protein concentrate as a protein source for tubot *Scopthalmus maximus* L. *Aquac Nutr* 6, 221-228. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2000.00147.x>.

Dehghani R, Oujifard A, Mozanzadeh T, Morshedi V and Bagheri D. 2020. Effects of dietary taurine on growth performance, antioxidant status, digestive enzymes activities and skin mucosal immune responses in yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus*. *Aquaculture* 517, 734795. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734795>.

de Moura LB, Diógenes AF, Campelo DAV, de Almeida FLA, Pousão-Ferreira PM, Furuya WM, Peres H and Oliva-Teles A. 2019. Nutrient digestibility, digestive enzymes activity, bile drainage alterations and plasma metabolites of meagre (*Argyrosomus regius*) fed high plant protein diets supplemented with taurine and methionine. *Aquaculture* 511, 734231. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734231>.

Deng J, Mai K, Ai Q, Zhang W, Wang X, Xu W and Liufu Z. 2006. Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate on feed intake and growth of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 258, 503-513. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.004>.

de Pedro N, Guijarro AI, López-Patiño MA, Martínez-Álvarez R and Delgado MJ. 2005. Daily and seasonal variations in haematological and blood biochemical parameters in the tench, *Tinca tinca* Linnaeus, 1758. *Aquac Res* 36, 1185-1196. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01338.x>.

Divakaran S, Obaldo LG and Forster IP. 2002. Note on the methods for determination of chromic oxide in shrimp feeds. *J Agric Food Chem* 50, 464-467.



- Draganovic V, van der Goot AJ, Boom R and Jonkers J. 2011. Assessment of the effects of fish meal, wheat gluten, soy protein concentrate and feed moisture on extruder system parameters and the technical quality of fish feed. *Animal feed science and technology* 165, 238-250. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.03.004>.
- Espe M, Lemme A, Petri A and El-Mowafi A. 2006. Can Atlantic salmon (*Salmo salar*) grow on diets devoid of fish meal?. *Aquaculture* 255, 255-262. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.12.030>.
- Flores GH, Hernández LHH, Araiza MAF and López OA. 2012. Effects of Total Replacement of Fishmeal with *Spirulina* Powder and Soybean meal on Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Isr J Aquac* 64, 41-48. <http://hdl.handle.net/10524/31828>.
- Folch J, Lees 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.
- Fournier V, Huelvan C and Desbruyeres E. 2004. Incorporation of a mixture of plant feedstuffs as substitute for fish meal in diets of juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 236, 451-465. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.035>.
- Gatlin III DM, Barrows FT, Brown P, Dabrowski K, Gaylord TG, Hardy RW, Herman E, Hu G, Krogdahl A, Nelson R, Overturf K, Rust M, Sealey W, Skongberg D, Souza EJ, Stone D, Wilson R and Wurtele E. 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aqua Res* 38, 551-579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x>.
- Gaylord GT, Barrows FT, Overturf KE, Liu K and Hu G. An overview of progress toward developing an all plant-based diet for rainbow trout. 2010. *Bull Fish Res Agen* 31, 9-14.

- Gisbert E, Mozanzadeh MT, Kotzamanis Y and Estévez A. 2016. Weaning wild flathead grey mullet (*Mugil cephalus*) fry with diets with different levels of fish meal substitution. *Aquaculture*, 462, 92-100. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.035>.
- Gómez-Requeni P, Mingarro M, Calduch-Giner JA, Médale F, Martin SAM, Houlihan DF and Pérez-Sánchez J. 2004. Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232, 493-510. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00532-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00532-5).
- Gosh TK, Chauhan YH and Mandl RN. 2019. Growth performance of *Labeo bata* (Hamilton, 1822) in freshwater and its acclimatization in brackish water with betaine as feed additive. *Aquaculture* 501, 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.020>.
- Gu M, Bai N, Zhang Y and Krogdahl Å. 2016. Soybean meal induces enteritis in turbot *Scophthalmus maximus* at high supplementation levels. *Aquaculture* 464, 286-295. <https://dx.doi.org/10.11016/j.aquaculture.2016.06.035>.
- Ha SS and Kim KJ. 2018. A Study on climate variability and its impact on anchoveta landing, correlation of fishmeal production and price in Peru. *Latin American and Caribbean Studies* 37, 161-210. <http://dx.doi.org/10.1017855/jlas.2018.5.37.3.161>.
- Hansen AC, Rosenlund G, Karlsen Ø, Koppe W and Hemre GI. 2007. Total replacement of fish meal with plant proteins in diets for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) I—Effects on growth and protein retention. *Aquaculture* 272, 599-611. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.08.034>.
- Hardy RW. 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aqu Res* 41, 770-776. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02349.x>.

- Herath SS, Haga Y and Satoh S. 2016. Effects of long-term feeding of corn co-product-based diets on growth, fillet color, and fatty acid and amino acid composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 464, 205-212. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.032>.
- Hernández C, Olvera-Novoa MA, Hardy RW, Hermosillo A, Reyes C and González B. 2010. Complete replacement of fish meal by porcine and poultry by-product meals in practical diets for fingerling Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: digestibility and growth performance. *Aquac Nutr* 16, 44-53. <https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00639.x>.
- Iwashita Y, Suzuki N, Yamamoto T, Shibata JI, Isokawa K, Soon AH, Ikehata Y, Furuita H, Sugita T and Goto T. Supplemental effect of cholytaurine and soybean lecithin to a soybean meal-based fish meal-free diet on hepatic and intestinal morphology of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Sci* 74, 1083-1095. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2008.01628.x>.
- Jang MS, Park HY, Nam KH, Han HS, Kim KW, Kim KD and Lee BJ. 2013. Effect of extruded pellets containing fermented soybean meal as a partial substitute for fish meal on growth performance and muscle quality of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J Agric Life Sci* 47, 203-215.
- Kader Ma and Koshio S. 2012. Effect of composite mixture of seafood by-products and soybean proteins in replacement of fishmeal on the performance of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 368-369, 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.09.014>.
- Kader MA, Koshio S, Ishikawa M, Yokoyama S, Bulbul M, Nguyen BT, Gao J and Laining A. 2012. Can fermented soybean meal and squid by-product blend be used as fishmeal replacements for Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)? *Aquac Res* 43, 1427-1438.

[https:// dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02945.x](https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02945.x)

- Kaushik SJ, Cravedi JP, Lalles JP, Sumpter J, Fauconneau B and Laroche M. 1995. Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 133, 257-274. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00403-B](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00403-B).
- Kaushik SJ, Coves D, Dutto G and Blanc D. 2004. Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 230, 391-404. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00422-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00422-8).
- Khosravi S, Bui HTD, Herault M, Fournier V, Kim KD, Lee BJ, Kim KW and Lee KJ. 2018. Supplementation of protein hydrolysates to a low-fishmeal diet improves growth and health status of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J World Aquac Soc* 49, 897-911. <https://doi.org/10.1111/jwas.12436>.
- Kikuchi K. 1999. Use of defatted soybean meal as a substitute for fish meal in diets of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 179, 3-11. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00147-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00147-7).
- Kikuchi K, Furuta T and Honda H. 1994. Utilization of feather meal as a protein source in the diet of juvenile Japanese flounder. *Fish Sci* 60, 203-206. <http://doi.org/10.2331/fishsci.60.203>.
- Kikuchi K and Takeuchi T. 2002. Pp. 113-120. *In*: Webster CD and Lim C (Eds.) *Nutrient requirements and feeding of fin-fish for aquaculture*. CABI Publishing, Alabama, USA.
- Kim DY, Kim SK, Kim YJ and Oh SJ. 1995. Effect of binder addition on pellet quality of

several feeds. *Annals of Animal Resources Science* 6, 51-60.

Kim HS, Jung WG, Myung SH, Cho SH and Kim DS. 2014b. Substitution effects of fishmeal with tuna byproduct meal in the diet on growth, body composition, plasma chemistry and amino acid profiles of juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 431, 92-98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.025>.

Kim K, Park Y, Je HW, Seong M, Damusaru JH, Kim S, Jun JY, Bai SC. 2019c. Tuna byproducts as a fish-meal in tilapia aquaculture. *Ecotoxicol Environ Saf* 172, 364-372. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.107>.

Kim KW, Kim KD, Lee BJ, Lee JH, Han HS, Koo JW, Choi YH and Bai SC. 2013. Dietary fermented soybean meal as a replacement for fish meal in juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Kor J Aquat Sci* 46, 769-776. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2013.0769>.

Kim KW, Kim KD, Son MH and Ahn CM. 2011. Evaluation of Squid Liver Powder as a Dietary Protein Source Replacing Fish Meal in Juvenile flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Jour Fish Mar Edu* 23, 461-467.

Kim KW, Wang XJ, and Bai SC. 2002. Optimum dietary protein level for maximum growth of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquac Res* 33, 673-679. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2002.00704.x>.

Kim SK, Takeuchi T, Yokoyama M, Murata Y, Kaneniwa M and Sakakura Y. 2005. Effect of dietary taurine levels on growth and feeding behavior of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 250, 765-774. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.073>.

Kim SS, Kim KW, Kim KD, Lee BJ, Han HS and Lee KJ. 2015a. Optimum feeding rates for

- growing and sub-adult olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed practical extruded pellets at high water temperature. Kor J Fish Aquat Sci 48, 681-687. <https://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2015.0681>.
- Kim SS, Oh DH, Cho SJ, Seo SH, Han HS and Lee KJ. 2014a. Evaluation of acid-concentrated soybean meal as a fishmeal replacement and its digestibility in diets for juvenile olive Flounder *Paralichthys olivaceus*. Kor J Fish Aquat Sci 47, 824-831. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0824>.
- Kim YC, Bae SS, Lee JH, Park GH, Lee JY and Bai SC. 2009. Dietary squid liver powder (SLP) with dehulled soybean meal (DHSM) as a fish meal (FM) substitute for olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Kor J Fish Aquat Sci 42, 243-249. <https://doi.org/10.5657/kfas.2009.42.3.243>.
- Kim YC, Yoo GY, Wang X, Lee SH, Shin IS and Bai SC. 2008. Long term feeding effects of dietary dehulled soybean meal as a fish meal replacer in growing olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Asian-Australas J Anim Sci 21, 868-872. <https://doi.org/10.5713/ajas.2008.70496>.
- Kim YJ, Shin JH, Kwon HW, Lee SY, Kim JM, Kim MG, Kim JD and Lee KJ. 2018. Evaluation of a Hydrolyzed Pig Bristle Meal as a Partial Fish meal Replacer in Diets for Juvenile Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*. Korean Fish Aquatic Sci 51, 148-156. <http://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0148>.
- Kim YS, Kim BS, Moon TS and Lee SM. 2000. Utilization of defatted soybean meal as a substitute for fish meal in the diet of juvenile flounder (*Paralichthys olivaceus*). Korean Fish Aquatic Sci, 33, 469-474.
- Kissil GW and Lupatsch I. 2004. Successful replacement of fishmeal by plant proteins in diets for the gilthead seabream, *Sparus aurata* L. Isr J Aquac 56, 188-199.

<http://hdl.handle.net/19114>.

Kissinger KR, García-Ortega A and Trushenski JT. 2016. Partial fish meal replacement by soy protein concentrate, squid and algal meals in low fish-oil diets containing *Schizochytrium limacinum* for longfin yellowtail *Seriola rivoliana*. *Aquaculture* 452, 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.022>.

KOSIS (Korean Statistical Information Service). 2017a. Survey on the status of fish culture. Retrieved from <http://kosis.kr/publication/publicationThema.do?pubcode=JL> on Jan 7, 2019.

KOSIS (Korean Statistical Information Service). 2017b. Expenditure per aquaculture. Retrieved from [http://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=307&tblId=TX\\_30702\\_A018&conn\\_path=I2](http://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=307&tblId=TX_30702_A018&conn_path=I2) on Jan 7, 2019.

Koven W, Peduel A, Gada M, Nixon O and Ucko M. 2016. Taurine improves the performance of white grouper juveniles (*Epinephelus Aeneus*) fed a reduced fish meal diet. *Aquaculture* 460, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.004>.

Krogdahl A, Penn M, Thorsen J, Resfstie S and Bakke AM. 2010. Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquac Nutr* 41, 333-344. <https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02426.x>.

Kumari J and Sahoo PK. 2006. Dietary  $\beta$ -1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.). *J Fish Dis* 29, 95-101. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00691.x>. Lee JY, Kang YJ, Lee SM and Kim IB. 1993a. Protein requirements of the Korean rockfish *Sebastes schlegeli*. *J Aquaculture* 6, 13-27.

- Lee HY, Choi SM and Ji HS. 2012. Effect of Partial Replacement of fish meal by new squid *Sepia esculenta* liver powders on the growth and body composition of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Korean Fish Aquatic Sci 45, 132-138. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2012.0132>.
- Lee KJ, Rinchar J, Dabrowski K, Babiak I, Ottobre JS and Christensen JE. 2006. Long-term effects of dietary cottonseed meal on growth and reproductive performance of rainbow trout: Three-year study. Anim Feed Sci Technol 126, 93-106.
- Lee SM, Jeon IG, Lee JY, Park SR, Kang YJ and Jeong KS. 1996. Substitution of plant and animal proteins for fish meal in the growing Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*) Feeds. Korean Fish Aquatic Sci 29, 651-662.
- Lee SM, Lee JY, Kang YJ and Hur SB. 1993. Effects of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on growth and biochemical changes in the Korean rockfish *Sebastes schlegeli* II. Changes of Blood Chemistry and Properties of Liver Cells. J Aquaculture 6, 107-123.
- Lim SJ and Lee KJ. 2009. Partial replacement of fish meal by cottonseed meal and soybean meal with iron and phytase supplementation for parrot fish *Oplegnathus fasciatus*. Aquaculture 290, 283-289. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.018>.
- Lim SJ, Kim SS, Ko GY, Song JW, Oh DH, Kim JD, Kim JU and Lee KJ. 2011. Fish meal replacement by soybean meal in diets for tiger puffer, *Takifugu rubripes*. Aquaculture 313, 165-170. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.01.007>.
- Lim SJ, Kim SS, Pham MA, Song JW, Cha JH, Kim JD, Kim JU and Lee KJ. 2010. Effects of fermented cottonseed and soybean meal with phytase supplementation on gossypol degradation, phosphorous availability, and growth performance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish Aqua Sci 13, 284-293.



- Lim SJ, Oh DH, Khosravi S, Cha JH, Park SH, Kim KW and Lee KJ. 2013. Taurine is an essential nutrient for juvenile parrot fish *Oplegnathus fasciatus*. *Aquaculture* 414, 274-279. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.013>.
- Lunger AN, McLean E, Gaylord TG, Kuhn D and Craig SR. 2007. Taurine supplementation to alternative dietary proteins used in fish meal replacement enhances growth of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 271, 401-410. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.006>.
- Martinez JB, Chatzifotis S, Divanach P and Takeuchi T. 2004. Effect of dietary taurine supplementation on growth performance and feed selection of sea bass *Dicentrarchus labrax* fry fed with demand feeders. *Fish sci* 70, 74-79. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2003.00773.x>.
- Martínez-Llorens S, Baeza-Ariño R, Nogales-Mérida S, Jover-Cerdá M and Tomás-Vidal A. 2012. Carob seed germ meal as a partial substitute in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: Amino acid retention, digestibility, gut and liver histology. *Aquaculture* 338, 124-133. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.01.029>.
- Matsunari H, Furuita H, Yamamoto T, Kim SK, Sakakura Y and Takeuchi T. 2008. Effect of dietary taurine and cysteine on growth performance of juvenile red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture*, 274, 142-147. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.002>.
- McGoogan BB and Reigh RC. 1996. Apparent digestibility of selected ingredients in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. *Aquaculture* 141, 233-244. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01217-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01217-6).
- Moon HY and Gatlin III DM. 1991. Total sulfur amino acid requirement of juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture* 95, 97-106. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90076-J](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90076-J).

- Murai T, Ogata H and Nose T. 1982. Methionine coated with various materials supplemented to soybean meal diet for fingerling carp *Cyprinus carpio* and channel catfish *Ictalurus punctatus*. Bull Jpn Soc Sci Fish 48, 85-88.
- Naylor RL, Goldbug RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MCM, Clay J, Folke C, Lubchenco J, Mooney H and Troell M. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. Nature 405, 1017-1024. <https://doi.org/10.1038/35016500>.
- NRC (National Research Council). 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. The National Academy Press, Washington DC, U.S.A.
- Oh DH, Kim SS, Kim KW, Kim KD, Lee BJ, Han HS, Kim JW, Okorie OE, Bai SC and Lee KJ. 2014. Optimum feeding rate for growing olive flounder (317g) *Paralichthys olivaceus* fed practical extruded pellets at optimum water temperature (21-24°C). Kor J Fish Aquat Sci 47, 399-405. <https://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0399>.
- Oliva-Teles, A., Enes, P., Peres, H., 2015. Replacing fishmeal and fish oil in industrial aquafeeds for carnivorous species. In: Davies, A. (Ed.), Feed and feeding practices in aquaculture. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Elsevier Ltd., pp.203-222. doi: 10.1016/B978-0-08-100506-4.00008-8.
- Øverland M, Sørensen M, Storebakken T, Penn M, Krogdahl Å and Skrede A. 2009. Pea protein concentrate substituting fish meal or soybean meal in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*)-Effect on growth performance, nutrient digestibility, carcass composition, gut health, and physical feed quality. Aquaculture 288, 305-311. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.12.012>.
- Park GS, Takeuchi T, Seikai T and Yokoyama M. 2001. The effects of dietary taurine on growth and taurine levels in whole body of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Nippon Suisan Gakkaishi 67, 238-243. <http://doi.org/10.2331/suisan.67.238>.

- Park GS, Takeuchi T, Yokoyama M and Seikai T. 2002. Optimal dietary taurine level for growth juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Sci 68, 824-829.
- Park MR, Chang YJ and Kang DY. 1999. Physiological response of the cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) to the sharp changes of water temperature. J. Aquacult 12, 221-228.
- Pham MA, Lee KJ, Lim SJ and Park KH. 2007. Evaluation of cottonseed and soybean meal as partial replacement for fishmeal in diets for juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Sci 73, 760-769. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01394.x>.
- Remus J, Virtanen E, Rosi L and McNaughton J. 1995. Effect of betaine on nutrient utilization of 21-day-old broilers during coccidiosis. In Proceedings of the 10th European Symposium on Poultry Nutrition (Vol. 1519, p. 371372). World's Poultry Science Association, Turkish Branch.
- Ryu GH, 1994. Role of feed ingredients in extruded aquatic feed. Annals of Animal Resources Science 5, 73-79.
- Salze G, McLean E and Craig SR. 2012. Dietary taurine enhances growth and digestive enzyme activities in larval cobia. Aquaculture 362-363, 44-49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.07.021>.
- Sato T and Kikuchi K, 1997. Meat meal as a protein source in the diet of juvenile Japanese flounder. Fish Sci 63, 877-880.
- Scerra M, Foti F, Caparra P, Cilione C, Lutra B, Lamanna P and Chies L. 2016. Influence of partial substitution of dietary marine origin feed stuffs by a mixture of extruded pea seed meal and animal origin feedstuffs on fatty acid composition of fillet in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Ital J Anim Sci 15, 696-700.

<http://dx.doi.org/10.1080/1828051X.2016.1229586>.

Schneider O, Amirkolaie AK, Vera-Cartas J, Eding EH, Schrama JW and Verreth JAJ. 2004.

Digestibility, faeces recovery, and related carbon, nitrogen and phosphorus balances of five feed ingredients evaluated as fishmeal alternatives in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquacult Res* 35, 1370-1379. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01179.x>.

Shankar R, Murthy HS, Pavadi P and Thanuja K. 2008. Effect of betaine as a feed attractant

on growth, survival, and feed utilization in fingerlings of the Indian major carp, *Labeo rohita*. *Isr J Aquac* 60, 95-99. <http://hdl.handle.net/10524/19250>.

Shin SJ, Lee TK, Lee OH, Lim SR, Yang IC, Kim SS, Choi JW, Kim JS and Kim JD. 2019.

Effect of dietary fish meal replacement by a blend of plant and animal ingredients on the growth and blood chemistry of starry flounder *Platichthys stellatus*. *Kor J Fish Aquat Sci* 52, 134-140. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0134>.

Shin SH and Kim JD. 2002. Growth and feed utilization of growing olive flounder

(*Paralichthys olivaceus*) fed extruded pellet (EP), moist pellet (MP) and single moist pellet (SMP) (Laboratory scale experiment using FRP tank). *Ann Anim Resour Sci* 13, 112-122.

Son MH, Park MW, Kim EO, Lim HK, Kim DJ, An CM, Eom KH, Kim SG, Cho YC, Lee

CH, Hwang HK, Youn SJ, Han SJ, Choi NJ, Park YB, Eh YY. 2006. Standard manual of olive flounder culture, National Fisheries Research and Development Institute (NFRDI), Busan, South Korea.

Song JW and Lee KJ. 2013. Effects of dietary nucleotide supplementation on the growth

performance, feed utilization, hematological parameters and innate immunity in red seabream *Pagrus major*. *Kor J Fish Aquat Sci* 46, 785-792.

<https://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2013.0785>.

Storebakken T, Shearer Kd, Baeverfjord G, Nielsen BG, Åsgård T, Scott T and De Laporte A. 2000. Digestibility of macronutrients, energy and amino acids, absorption of elements and absence of intestinal enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with wheat gluten. *Aquaculture* 184, 115-132. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)0031-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)0031-6).

Sugiura SH, Dong FM, Rathbon CK and Hardy RW. 1997. Apparent protein digestibility and mineral availabilities in various feed ingredients for salmonid feeds. *Aquaculture* 159, 177-202. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00177-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00177-4).

Sullivan JA and Reigh RC. 1995. Apparent digestibility of selected feedstuffs in diets for hybrid striped bass (*Morone saxatilis* ♀ X *Morone chrysops* ♂). *Aquaculture* 138, 313-322. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01071-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01071-8).

Sun H, Jiang WD, Wu P, Liu Y, Jiang J, Yang QH, Kuang SY, Tang L, Zhou XQ and Feng L. 2020. Betaine supplementations enhance the intestinal immunity of on-growing grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): Partly related to TOR and NF-κB signaling pathways. *Aquaculture* 518, 734846. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734846>.

Tacon AGJ and Metian M, 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* 285, 146-158. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.015>.

Tacon AGJ, Metian M and Hasan MR. 2009. Feed ingredients and fertilizers for farmed aquatic animals. FAO.

Takagi S, Murata H, Goto T, Endo T, Yamashita H and Ukawa M. Taurine is an essential

- nutrient for yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed no-fish meal diets based on soy protein concentrate. *Aquaculture* 280, 198-205. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.05.012>.
- Tibbetts SM, Milley JE and Lall SP. 2006. Apparent protein and energy digestibility of common and alternative feed ingredients by Atlantic cod, *Gadus morhua* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture* 261, 1314-1327. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.08.052>.
- Tiril SU, Alagil F, Yagci FB and Aral O. 2008. Effects of betaine supplementation in plant protein based diets on feed intake and growth performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Isr J Aquac* 60, 57-64. <http://hdl.handle.net/10524/19244>.
- Torrecillas S, Mompel D, Caballero MJ, Montero D, Merrifield D, Rodiles A, Robaina L, Zamorano MJ, Karalazos V, Kaushik S and Izquierdo M. 2017. Effect of fishmeal and fish oil replacement by vegetable meals and oils on gut health of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 468, 386-398.
- Tusche K, Arning S, Wuertz S, Susenbeth A and Schulz C. 2012. Wheat gluten and potato protein concentrate Promising protein sources for organic farming of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 344, 120-125. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.03.009>.
- USDS (United States Department of Agriculture, Agricultural Marketing Service) “National Weekly Feedstuff Wholesale Prices” last modified Dec 23, 2019, accessed Dec 23 [https://www.ams.usda.gov/mnreports/ms\\_gr852.txt](https://www.ams.usda.gov/mnreports/ms_gr852.txt).
- Velasquez A, Pohlenz C, Barrows FT, Gaylord TG and Gatlin III DM. 2015. Assessment of taurine bioavailability in pelleted and extruded diets with red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture* 449, 2-7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.03.034>.

- Xue and Cui, 2001. Effect of several feeding stimulants on diet preference by juvenile gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), fed diets with or without partial replacement of fish meal by meat and bone meal. *Aquaculture* 198, 281-292. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00602-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00602-5).
- Ye J, Liu X, Wang Z and Wang K. 2011. Effect of partial fish meal replacement by soybean meal on the growth performance and biochemical indices of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquacult Int* 19, 143-153. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9348-1>.
- Yigit M, Erdem M, Koshio S, Ergün S, Türker A and Karaali B. 2006. Substituting fish meal with poultry by-product meal in diets for black Sea turbot *Psetta Maeotica*. *Aquacult Nut* 12, 340-347. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2006.00409.x>.
- Zhang C, Rahimnejad S, Wang YR, Lu K, Song K, Wang L and Mai K. 2018. Substituting fish meal with soybean meal in diets for Japanese seabass (*Lateolabrax japonicas*): Effects on growth, digestive enzymes activity, gut histology, and expression of gut inflammatory and transporter genes. *Aquaculture* 483, 173-182. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.10.029>.

## 감사의 글

2009 년부터 시작된 연구실 생활이 2020 년이 되어 마무리 단계에 이르렀습니다. 그 동안 정말 많은 일들이 있었습니다. 힘들고 어려웠던 일들도 많았지만 행복하고 즐거웠던 기억이 더 많았던 것 같습니다. 지나간 일들은 어느새 추억이 되었고, 많은 추억들 속에는 항상 제 곁에서 도움을 주시던 분들이 함께 있었습니다. 감사함을 말로 표현하기 어렵지만 이 짧은 글을 통해 대신하고자 합니다.

우선 모자란 저를 지도해주시고 가르침을 주신 이경준 교수님께 존경과 감사의 인사를 드립니다. 교수님 덕분에 아무것도 모르던 제가 여기까지 올 수 있었다 생각합니다. 교수님의 가르침 하나하나를 소중히 간직하며 나아가도록 하겠습니다. 또한 학위논문 심사를 해주시고 좋은 발전 방향을 말씀해주신 박상률 교수님께도 감사 드립니다. 그리고 바쁘신 와중에도 학위논문 심사를 위해 멀리서 찾아와주신 국립수산과학원 이봉주 박사님, 이승형 박사님에게 진심으로 감사 드립니다. 학부 시절부터 지금까지 많은 가르침과 관심을 가져주신 송춘복 교수님, 최광식 교수님, 김기영 교수님, 정석근 교수님, 이제희 교수님, 정준범 교수님, 이승현 교수님께 감사 드립니다.

양식사료영양학연구실원들의 도움 덕분에 제가 박사과정을 무사히 마칠 수 있었다고 생각합니다. 함께한 시간은 짧았지만 사회에 나가서도 많은 도움을 주신 임세진 박사님과 김성삼 박사님, 항상 웃음으로 반겨준 차지훈 박사님, 점잖고 잘 챙겨주시는 오대한 박사님, 속마음이 누구보다 따뜻한 송진우 박사님, 항상 고맙고 미안한 초롱이, 누구보다 자신감 넘치고 부지런한 재형이, 언제나



곳은일도 마다 하지 않고 도움을 주었던 재범, 현운, 종호, 대현, 세희, 건호 그리고 연구실 생활을 함께 한 모든 이들 덕분에 제가 포기하지 않고, 여기까지 올 수 있었습니다.

지금까지 제가 학업에 전념할 수 있도록 항상 믿고 응원해주시며, 저를 사랑해주신 아버지, 어머니 너무나 감사하고 사랑합니다. 막냇동생을 챙겨준다고 아낌없이 지원해주신 영옥이 누나, 영주 누나, 민경이 누나 그리고 매형들께도 감사 드립니다. 그리고 제가 힘들어 할 때 마다 옆에서 토닥여주고 투정을 받아주며 이해해준 친구들에게도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

마지막으로 저의 옆에서 함께해 준 모든 이들에게 다시 한번 감사의 말을 전하며 이 글을 마칩니다.