



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

치어기 대서양 참다랑어
(*Thunnus thynnus*) 사료 내 틸라피아
가수분해물과 아미노산의 이용성에
관한 연구

제주대학교 대학원

해양생명과학과

임종호

2022년 2월



치어기 대서양 참다랑어
(*Thunnus thynnus*) 사료 내 틸라피아
가수분해물과 아미노유의 이용성에
관한 연구

지도교수 이경준

임종호

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2021년 12월

임종호의 이학 석사학위 논문으로 인준함

심사위원장 지승철 

위 원 조정현 

위 원 이경준 

제주대학교 대학원

2021년 12월

ABSTRACT	ii
LIST OF FIGURES	iii
LIST OF TABLES	iv
Chapter 1. Utilization of tilapia hydrolysate powder and linseed oil in Diets for Juvenile Atlantic Bluefin Tuna <i>Thunnus thynnus</i>	1
2.1 서론	1
2.2 재료 및 방법	3
2.3 결과	22
Chapter 2 Dietary evaluation of sardine fish meal and cod liver oil in bluefin tuna (<i>Thunnus thynnus</i>)	42
3.1 서론	42
3.2 재료 및 방법	46
3.3 결과	61
고찰	87
참고문헌	90
감사의 글	93

ABSTRACT

In Chapter 1, study was conducted to evaluate the supplemental effects of tilapia hydrolysate powder (THP) and linseed oil (LO) in diet for Atlantic bluefin tuna. A control diet was formulated to contain 65% of an enzyme-treated fish meal (EFM) and 3% of DHA oil. The THP diet was formulated to replace whole 65% of EFM with THP. The LO diet was formulated to contain 1% linseed oil and 2% DHA oil instead of 3% DHA oil. In the feeding trial, juvenile bluefin tuna (body weight 1.15 g) were randomly stocked into three experimental tanks (70 tons) and fed the diets for 13 days. Weight gain was the highest in the tuna fed LO diet (519%) followed by EFM (444%) and THP (228%) diets. Survival rate and protein digestibility were similar between EFM and LO groups, but lower in the THP group. Thus, this result indicates that LO can be a good candidate for the replacement of approximately 33% DHA oil, however, THP is not suitable to replace EFM in diets for juvenile bluefin tuna.

In Chapter 2, study was conducted to evaluate the appropriate content of sardine fish meal and cod liver oil instead of enzyme-treated fish meal and DHA oil in the diet of Atlantic bluefin tuna. A control diet was formulated as EFM diet same as chapter 1. The FM diet was formulated to replace 50% of enzyme treated fishmeal and 100% of DHA oil and linseed oil. There was no significant difference in growth performance, feed utilization, biological assessment of digestive organs and condition factor. As a result of whole-body proximate composition, there was no difference. However, in fatty acid analysis the content of arachidonic acid, EPA, and DHA in the FM group was significantly higher. Thus, it was confirmed that it is possible to use sardine fish meal and cod liver oil in bluefin tuna diet.

LIST OF FIGURES

Figure 1. Three lipid sources (cod liver oil, DHA oil, linseed oil) for experimental diets	3
Figure 2. Preparation of experimental diet for Atlantic bluefin tuna	4
Figure 3. Feeding of the experimental diets (left) for experimental fish and preparation of diets (right)	13
Figure 4. Experimental tanks (water capacity: 70 tons) for juvenile Atlantic bluefin tuna	14
Figure 5. Installation of cage for catching the juvenile Atlantic bluefin tuna	15
Figure 6. Measurement of the experimental fish body weight (g) after feeding trial	16
Figure 7. Dissection of fish organ and analysis of digestive enzyme activities.....	17
Figure 8. The amino acid (AA) analyzer (SyKam Amino Acid Analyzer S433) (left) and measurement of sample weight for AA analysis (right).....	18
Figure 9. Sample (left) and standard for analysis of fatty acid composition (right)	19
Figure 10. Fish carcass fed the experimental diets after freeze-drying.....	19
Figure 11. Measurement of water temperature and dissolved oxygen in experimental tanks	20
Figure 12. Feces in tuna digestive organ and fecal of juvenile Atlantic bluefin tuna	22
Figure 13. Growth performance, feed utilization and survival of juvenile Atlantic bluefin tuna fed the experimental diets for 13 days	35
Figure 14. Proximate composition of juvenile Atlantic bluefin tuna fed the experimental diets for 13 days	36
Figure 15. Biological assessment of digestive organs and condition factor of juvenile bluefin tuna fed the experimental diets	37
Figure 16. The digestive enzyme activities of juvenile bluefin tuna fed the experimental diets for 13 days	38

Figure 17. Essential amino acid composition of Atlantic bluefin tuna carcass fed the experimental diets for 13 days	39
Figure 18. Omega-3 fatty acid contents of Atlantic bluefin tuna carcass fed the experimental diets for 13 days (DHA; docosahexaenoic acid, EPA; eicosapentaenoic acid, LNA; linolenic acid)	40
Figure 19. Apparent digestibility coefficients (ADC) of protein (left) and dry matter (right) in the experimental diets for juvenile Atlantic bluefin tuna by dissection fecal collection method (% of ADC)	41
Figure 20. The global regulation of tuna catches by five commissions and the total annual wild-caught of tuna in 2014	43
Figure 21. The sand lance as main feed in tuna aquaculture	44
Figure 22. Fatty acid composition of the experimental diets	53
Figure 23. Fatty acid composition of main protein source	54
Figure 24. Feeding of the experimental diets for experimental fish (left) and injecting a microchip for Atlantic bluefin tuna (right)	56
Figure 25. Blood analysis for Atlantic bluefin tuna	58
Figure 26. Collecting digestive feces of Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i>	59
Figure 27. The process of hematoxylin & eosin stain	61
Figure 28. Growth performance, feed utilization and survival of juvenile Atlantic bluefin tuna fed the experimental diets for 67 days	71
Figure 29. Proximate composition of juvenile Atlantic bluefin tuna fed the experimental diets for 67 days	72
Figure 30. Biological assessment of digestive organs and condition factor of juvenile bluefin tuna fed the experimental diets for 67 days	73

Figure 31. Feed intake and total feed intake of Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 49 days (Exp-1) and 18 days (Exp-2)	74
Figure 32. Daily water temperature and dissolved oxygen	75
Figure 33. Blood analysis of Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 67 days	76
Figure 34. Fatty acid composition of Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> carcass fed the experimental diets for 67 days	77
Figure 35. Liver tissue of Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the EFM diets for 67 days (x40)	78
Figure 36. Liver tissue of Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the EFM diets for 67 days (x100)	79
Figure 37. Liver tissue of Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the EFM diets for 67 days (x200)	80
Figure 38. Liver tissue of Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the EFM diets for 67 days (x400)	81
Figure 39. Liver tissue of Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the FM diets for 67 days (x40)	82
Figure 40. Liver tissue of Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the FM diets for 67 days (x200)	83
Figure 41. Liver tissue of Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the FM diets for 67 days (x200)	83
Figure 42. Liver tissue of Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the FM diets for 67 days (x400)	83
Figure 43. Hepatocyte and hepatocyte lipid droplet degree length of Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i>	86

LIST TABLES

Table 1. Information of protein sources for experimental diets (% of dry matter basis)	5
Table 2. Amino acid composition of the experimental diets for juvenile Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> (% of protein)	6
Table 3. Fatty acid composition of protein and lipid sources in the experimental diets for juvenile Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> (% of lipid)	7
Table 4. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets for juvenile Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> (% of dry matter)	8
Table 5. Amino acid composition of the experimental diets for juvenile Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> (% of protein)	9
Table 6. Fatty acid composition of the experimental diets for juvenile Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> (% of lipid)	10
Table 7. The vitamin requirements of fishes, and vitamin mixture formulation for bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i>	11
Table 8. The mineral requirements of fishes and mineral mixture formulation for bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i>	13
Table 9. Growth performance, feed utilization and survival of juvenile Atlantic bluefin tuna (initial mean body weight: 1.15 g) fed the experimental diets for 13 days	25
Table 10. Proximate composition of experimental fish carcass fed the experimental diets for 13 days (% of wet basis)	26
Table 11. Biological assessment of digestive organs and condition factor of Atlantic bluefin tuna fed the experimental diets for 13 days	27
Table 12. Digestive enzyme activities of juvenile Atlantic bluefin tuna fed the experimental diets for 13 days (U/mg protein)	28
Table 13. Feed consumption rate of juvenile Atlantic bluefin tuna fed the experimental diets for 13 days (%)	29

Table 14. Feed consumption rate of juvenile Atlantic bluefin tuna fed the LO experimental diets for 13 days	30
Table 15. Amino acid composition of juvenile Atlantic bluefin tuna carcass fed the experimental diets for 13 days (% of protein)	31
Table 16. Fatty acid composition of juvenile bluefin tuna carcass fed the experimental diets for 13 days (% of lipid)	32
Table 17. Dietary formulation of juvenile Atlantic bluefin tuna for investigation of digestibility (% of dry matter)	33
Table 18. Apparent digestibility coefficients (ADC) of the experimental diets for juvenile Atlantic bluefin tuna by dissection fecal collection method (% of ADC)	34
Table 19. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets for juvenile Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> (% of dry matter)	48
Table 20. Fatty acid composition of the experimental diets	49
Table 21. Fatty acid composition of main protein source	50
Table 22. The price of experimental diets (won/kg)	51
Table 23. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets for juvenile Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> (% of dry matter)	52
Table 24. Fatty acid composition of the experimental diets	53
Table 25. Fatty acid composition of main protein source	54
Table 26. Growth performance, feed utilization and survival of juvenile Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 67 days	64
Table 27. Proximate composition of juvenile Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 67 days (% of wet basis)	65
Table 28. Biological assessment of digestive organs and condition factor of Atlantic bluefin <i>Thunnus thynnus</i> tuna fed the experimental diets	66
Table 29. Hematological parameters and innate immune responses of juvenile Atlantic bluefin tuna	

<i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 67 days	67
Table 30. Feed intake of Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> fed the experimental diets for 49 days (Exp-1) and 18 days (Exp-2)	68
Table 31. Fatty acid composition of Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i> carcass fed the experimental diets for 67 days	69
Table 32. Hepatocyte and hepatocyte lipid droplet degree length of Atlantic bluefin tuna <i>Thunnus thynnus</i>	70

CHAPTER 1

Utilization of tilapia hydrolysate powder and linseed oil in Diets for Juvenile Atlantic Bluefin Tuna *Thunnus thynnus*

2.1 서론

참다랑어는 전장이 3 m, 체중은 500 kg까지 성장하는 대형종으로, 성장이 빠르고 맛이 좋아 상품가치가 매우 높다. 약 10조원 규모인 세계 참다랑어 양식 시장은 대표적인 미래 블루오션으로 각광받고 있으며, 앞으로 그 규모는 계속해서 증가할 것으로 예상된다. 참다랑어를 비롯한 다랑어류는 영양소요구량을 비롯한 배합사료에 관한 연구가 미흡한 관계로 생사료에 의존하여 양성되고 있다. 현재 참다랑어 양식에는 주로 고등어, 까나리, 오징어와 같은 고가의 생사료가 급이되고 있다. 우리나라의 경우 생사료 사용을 줄이고 양식 산업의 경쟁력 강화를 위한 배합사료 직불제를 실시하고 있으며, 양식어가를 대상으로 배합사료의 사용을 적극 권장하고 있는 실정이다. 참다랑어용 배합사료의 개발은 사육의 효율성을 높임으로써 참다랑어 생산 단가를 줄일 수 있을 것이다. 또한, 종묘생산 및 양성과정에서의 생산성 향상으로 이어져 궁극적으로 참다랑어 양식경쟁력을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다. 참다랑어는 배합사료에 대한 기호성이 낮고, 어분에 대한 소화력이 현저히 낮아 실용 배합사료개발에 많은 어려움을 겪고 있다. 참다랑어가 사료 내 일반어분에 대한 이용률이 낮은 원인으로서는 어분제조 시 열처리 과정에서 발생하는 단백질의 구조적 변성으로 인한 낮은 소화율 때문인 것으로 보고되었다. 따라서 열처리 과정을 최소화하여 제조된 어분이나 동물단백질원을 찾는 것이 시급한 실정이다.

치어기 참다랑어 사료 내 적정 단백질원을 탐색하는 연구는 단계적으로 진행되었다.

1회차 연구에서는 총 4가지 사료 후보군(효소처리어분 2종, 오징어분, 저온처리어분) 중 영양소함량과 수급안정성을 고려하여 최종적으로 효소처리어분(CPSP)을 선정하였다. 효소처리어분의 사육효능을 검증하고자 참다랑어 치어를 대상으로 2회의 사육실험을 진행하였다. 사육실험 결과, 효소처리어분은 생사료와 일반어분을 주 단백질원으로 사용한 실험사료와 비교하여 효율적이고 우수한 성장을 보여 주 단백질원으로서의 사용 가능성을 확인하였다. 2회차 연구에서는 ‘사료의 경제성 향상과 현장적용’에 초점을 두고 진행되었다. 효소처리어분(4,000원/kg)은 일반어분(2,350원/kg) 보다 비싼 가격에 거래되는 원료이다. 이와 더불어 선행연구에서 참다랑어의 DHA 요구량을 충족시켜 주기위해 사용된 DHA유(300,000원/L)의 가격 또한 일반어유(3000원/L) 대비 약 100배 높다. 1년차 과제에 경제성 분석에 따르면 DHA유는 실험사료 가격의 70%를 차지하는 것으로 조사되었다. 사료의 경제성을 향상시키기 위해, 사료 내 효소처리어분과 DHA유의 적정 사용함량을 조사하였다. 사육실험과 소화율 평가를 통해 배합비 내 효소처리어분과 DHA유의 함량을 각각 10%, 1% 감소시켰다. 2년차 연구를 통해 사료의 단가를 20% 절감시켜, 사료의 경제성을 향상시켰다. 본 연구의 목표는 치어기 참다랑어 사료 내 주 단백질인 효소처리정어리어분(CPSP) 외의 효소처리어분인 ‘틸라피아 가수분해물(tilapia hydrolysate powder)’과 고가의 지질원인 DHA유의 대체원으로 ‘아마인유(linseed oil)’의 이용성을 평가하여 참다랑어 배합사료의 경제성 향상 그리고 기존 배합비의 현장적용 평가에 있다.

2.2 재료 및 방법

2.1.1 실험사료

사료 내 DHA유 대체원과 CPSP (효소처리정어리어분)외의 효소처리어분의 이용가능성을 조사하고자 치어기 참다랑어를 대상으로 사육실험이 진행되었다. 틸라피아 가수분해물은 EFM에 비해 가격이 저렴하고, 펩타이드의 평균 분자량이 낮아 실험사료 원료로 선정되었다(Table 1). 아마인유는 linolenic acid의 함량(55%)이 높아(Table 3), 실험사료 내 부족한 요구량을 충족시키고자 사용되었다. 실험사료는 선행연구를 통해 사육효능이 검증된 효소처리어분구(EFM, 효소처리정어리어분)와 해당 효소처리어분을 틸라피아 가수분해물(tilapia hydrolysate powder)으로 대체한 실험구(THP), 사료 내 DHA유를 아마인유(linseed oil)로 33% 대체한 실험구(LO)로 조성되었다(Table 4, Fig. 1). 실험사료의 영양소 함량은 참다

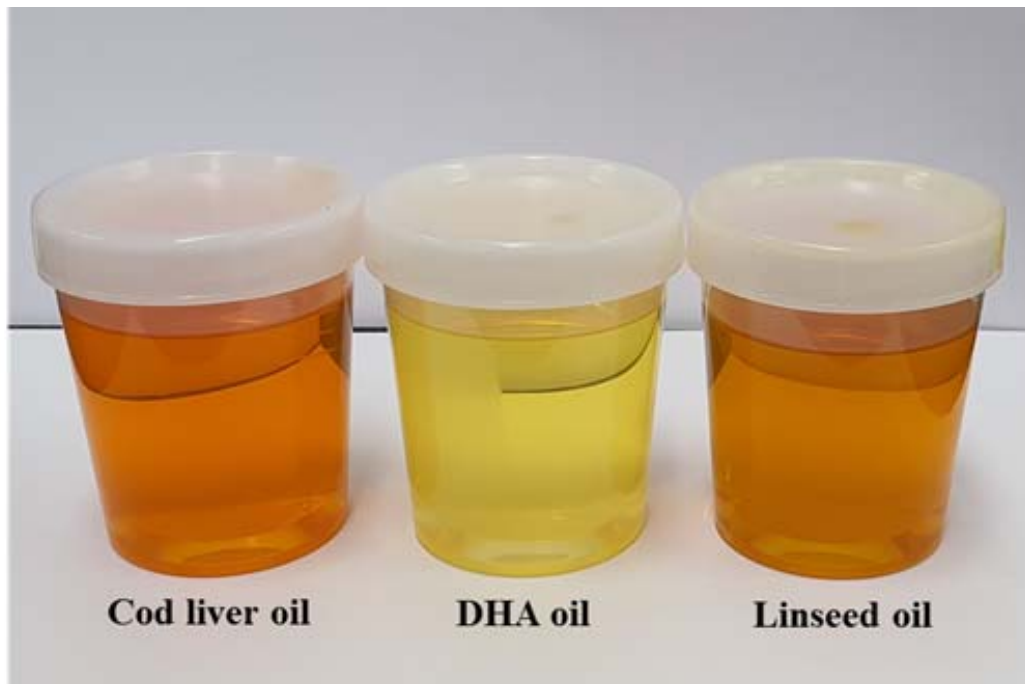


Figure 1. Three lipid sources (cod liver oil, DHA oil, linseed oil) for experimental diets

랑어를 대상으로 진행된 문헌((Biswas et al., 2009), 조단백질: 62%, 조지질: 18%))을 기준으로 설정하였다. Vitamin과 mineral premixture는 참다랑어를 대상으로 한 선행연구의 부재료

인해 방어 등 해산어류의 요구량을 기준으로 자체 제작하여 사용되었다(Table 7, 8). 사료는 사료조성표에 따라 각 원료를 측량하여 혼합 후, 3 가지 크기(직경 1, 1.5, 2 mm)로 성형되었다(Fig. 2). 실험사료의 아미노산, 지방산 함량은 Table 5, 6에 각각 나타내었다. 총 3 가지 실험사료에 대한 참다랑어 치어의 소화율을 조사하기 위해 실험사료를 제조하였다. 지시제를 제외한 사료의 조성은 기존 실험사료와 동일하였다. 소화율 분석을 위해 지시제(indicator)로 산화크롬(chromium oxide, Cr_2O_3 , DaeJung)이 사용되었고, 사료 내 1%가 첨가 되도록 설계하였다(Table 17). 혼합물은 사료제작기(SP-50, Gungang Engineering, Daegu, Korea)를 이용하여 직경 2 mm로 성형되었다. 모든 실험사료는 $-30^{\circ}C$ 냉동고에 보관 후, 실험에 사용되었다.



Figure 2. Preparation of experimental diet for Atlantic bluefin tuna.

Table 1. Information of protein sources for experimental diets (% of dry matter basis)

Ingredients	Crude protein	Crude lipid	Ash	Moisture	Price (kg/won)	AMW¹ (Da)
EFM	70.2	12.0	8.50	2.30	4,500	3,000
THP	68.5	11.8	5.80	3.25	3,500	1,000

¹Average molecular weight, EFM: enzyme treated fish meal, THP: tilapia hydrolysate powder

Table 2. Amino acid composition of the experimental diets for juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* (% of protein)

Amino acid	EFM	THP
<i>Essential amino acid</i>		
Arginine	4.44	4.50
Histidine	2.00	2.06
Isoleucine	2.94	3.09
Leucine	4.71	5.17
Lysine	4.96	5.16
Phenylalanine	2.60	2.96
Threonine	2.76	2.67
Valine	3.35	3.45
<i>Nonessential amino acid</i>		
Alanine	4.33	5.62
Aspartic acid	6.46	7.50
Glycine	5.72	7.39
Glutamic acid	9.27	10.5
Proline	3.85	4.90
Serine	2.78	2.65
Tyrosine	1.76	1.87

EFM: enzyme treated fish meal, THP: tilapia hydrolysate powder

Table 3. Fatty acid composition of protein and lipid sources in the experimental diets for juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* (% of lipid)

Fatty acid	EFM	THP	DHA oil	Cod liver oil	Linseed oil
12:0	0.20	0.50	-	0.10	-
14:0	10.4	5.30	-	5.00	-
14:1	-	-	-	-	-
15:0	0.90	0.40	-	0.20	-
16:0	33.5	30.5	0.20	28.9	5.43
16:1	3.70	2.20	-	2.30	-
17:0	0.70	0.40	-	0.20	-
17:1	0.10	0.10	-	-	-
18:0	8.40	12.1	0.10	10.5	3.78
18:1n9(OA)	15.6	18.5	0.10	13.2	20.1
18:2n6(LA)	6.00	14.2	0.10	22.9	15.3
18:3n3(LNA)	2.70	7.70	-	8.60	55.4
18:3n6	0.10	0.10	-	0.30	-
20:0	0.60	0.60	-	0.60	-
20:1	4.50	1.70	-	1.60	-
20:3n6	0.10	0.40	-	-	-
20:3n3	0.20	0.60	-	0.10	-
20:4n6(AA)	0.50	0.30	0.60	0.10	-
20:5n3(EPA)	4.70	1.80	4.40	3.10	-
22:0	0.20	0.30	-	0.40	-
22:1n9	0.80	0.20	-	0.30	-
22:6n3(DHA)	5.40	2.00	94.5	1.40	-
DHA/EPA	1.15	1.20	21.5	0.45	0.00
$\sum n-3^1$	5.74	11.5	98.9	13.2	55.4
$\sum n-6^2$	7.18	14.4	0.70	31.6	70.7
n-3/n-6	2.00	0.80	141	0.42	0.78

¹ $\sum n-3$: 18:3n3, 20:3n3, 20:5n3, 22:6n3

² $\sum n-6$: 18:2n6, 18:3n6, 20n:3n6; 20:4n6

EFM: enzyme treated fish meal, THP: tilapia hydrolysate powder

Table 4. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets for juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* (% of dry matter)

Ingredients	EFM	THP	LO
Enzyme treated fish meal ¹	65.0	-	65.0
Tilapia hydrolysate powder ²	-	65.0	-
Fish meal, sardine ³	10.0	10.0	10.0
Soy protein concentrate ⁴	8.00	8.00	8.00
DHA oil ⁵	3.00	3.00	2.00
Linseed oil ⁶	-	-	1.00
Cod liver oil ⁷	5.00	5.00	5.00
Mineral premix ⁸	1.00	1.00	1.00
Vitamin premix ⁹	1.00	1.00	1.00
Taurine	1.50	1.50	1.50
Wheat flour	4.50	4.50	4.50
Lecithin	1.00	1.00	1.00
<i>* Proximate composition</i>			
Crude Protein	63.2	62.7	63.3
Crude Lipid	20.7	21.1	19.7
Ash	6.49	6.52	7.21
Moisture	5.81	5.06	6.47
<i>* Fatty acid composition</i>			
DHA (22:6n3)	5.00	5.74	3.92
EPA (20:5n3)	1.57	1.30	1.53
Oleic acid (18:1n9)	4.44	3.56	4.64
Linoleic acid (18:2n6)	1.71	2.32	1.88
Linolenic acid (18:3n3)	0.53	0.31	1.17

¹CPSP, Sopropeche, France, ²Aquativ, France, ³Orizon S. A, Chile, ⁴Soyco-meal, Corp. Korea flavor, Korea, ⁵DHA Concentrate oil, corp. Comport, Korea, ⁶Alligga™, Canada, ⁷corp. E-wha oil & fat Ind, Korea, EFM: enzyme treated fish meal, THP: tilapia hydrolysate powder, LO: linseed oil

Table 5. Amino acid composition of the experimental diets for juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* (% of protein)

Amino acid	EFM	THP	LO
<i>Essential amino acid</i>			
Arginine	4.21	4.03	4.33
Histidine	1.93	1.69	1.94
Isoleucine	2.46	2.69	2.70
Leucine	4.47	4.61	4.65
Lysine	4.77	4.57	4.83
Phenylalanine	2.60	2.68	2.69
Threonine	2.41	2.43	2.48
Valine	3.11	3.03	3.10
<i>Nonessential amino acid</i>			
Alanine	4.29	4.57	4.59
Aspartic acid	6.62	6.38	6.86
Glycine	5.55	5.68	5.47
Glutamic acid	9.81	9.75	10.0
Proline	3.61	3.98	3.66
Serine	2.79	2.34	2.90
Tyrosine	1.74	1.75	1.85

EFM: enzyme treated fish meal, THP: tilapia hydrolysate powder, LO: linseed oil

Table 6. Fatty acid composition of the experimental diets for juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* (% of lipid)

Fatty acid	EFM	THP	LO
12:0	-	-	-
14:0	3.51	3.17	3.50
14:1	-	-	-
15:0	-	-	-
16:0	13.8	15.7	14.0
16:1	5.40	4.79	5.40
17:0	-	-	-
17:1	-	-	-
18:0	3.41	4.29	3.59
18:1n9(OA)	22.2	17.8	23.2
18:2n6(LA)	8.55	11.6	9.42
18:3n3(LNA)	2.65	1.53	5.86
18:3n6	-	-	-
20:0	-	-	-
20:1	4.76	3.20	4.82
20:3n6	-	-	-
20:3n3	-	-	-
20:4n6(AA)	0.81	1.10	0.77
20:5n3(EPA)	7.87	6.52	7.65
22:0	-	-	-
22:1n9	0.79	0.55	0.79
22:6n3(DHA)	25.0	28.7	19.6
DHA/EPA	3.18	4.40	2.56
Σ n-3 ¹	35.5	36.8	33.1
Σ n-6 ²	12.0	14.2	16.1
n-3/n-6	2.96	2.58	2.06

¹ Σ n-3: 18:3n3, 20:3n3, 20:5n3, 22:6n3

² Σ n-6: 18:2n6, 18:3n6, 20n:3n6; 20:4n6

EFM: enzyme treated fish meal, THP: tilapia hydrollysate powder, LO: linseed oil

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

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

¹Shimeno (1991) from Yellow tail, ²Halver (1972) from Pacific salmon, ³Barnett et al (1982) from Rainbow trout, ⁴Krossoy et al (2009) from Atlantic salmon

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

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

2.2.2 실험어 및 사육관리

실험에 사용된 대서양 참다랑어(부화 후 35일)는 제주도 서귀포시 남원읍에 위치한 국립수산물과학원 제주수산연구소에서 생산되었다. 사양실험은 연구소 내 참다랑어 전용 사육시설에서 진행되었다. 실험어는 2일간 생사료와 배합사료를 공급하여 실험환경에 적응할 수 있도록 순치시킨 후 사육실험에 이용되었다. 예비사육 후 참다랑어(초기평균무게: 1.15 g)는 총 3개의 사육 수조(70 tons)에 각 150마리씩 무작위로 배치되었다(Fig. 3). 사육수조 내 용존산소를 유지하기 위해, 산소발생기와 액화산소 주입기를 설치하였다. 평균사육수온은 26.7 °C, 용존산소(DO; dissolved oxygen)는 10.6 mg/L로 유지되었다. 실험사료는 1일 4회(08:00, 11:00, 14:00, 17:00 h)에 나누어 13일간 반복공급 되었다. 하루 중 참다랑어의 시간에 따른 사료섭이량(%)을 계산하기 위해 매 공급시간 마다 섭이량을 기록하였다. 실험종료 1일 전, 자체 제작한 siphon을 이용하여 사육수조 바닥의 이물질을 제거하였다.



Figure 3. Feeding of the experimental diets (left) for experimental fish and preparation of diets (right)

2.2.3 실험어 무게측정

실험어의 무게는 사육실험 종료 후 측정되었다(Fig. 5 & 6). 실험어의 배설물(feces)을 수집하기 위해, 최종무게 측정 5시간 전에 실험사료를 공급하였다. 소화시간은 2017년도(참다랑어 배합사료 개발) 연구결과를 바탕으로 예상되었다. 실험어의 소화기관은 10마리

의 참다랑어를 무작위로 선별하여 얼음물에 마취 후, 적출되었다. 소화기관 적출 후, 남은 어체(carass)는 일반성분분석에 사용되었다. 실험어의 성장률과 사료효율 관련 조사항목과 계산식은 다음과 같다. 성장률(WG; weight gain, %) = $100 \times (\text{final mean body weight} - \text{initial mean body weight}) / \text{initial mean body weight}$; 일간성장률(SGR; specific growth rate, %) = $[(\log_e \text{ final body weight} - \log_e \text{ initial body weight}) / \text{days}] \times 100$; 사료전환효율(FCR; feed conversion ratio) = $\text{dry feed fed} / \text{wet weight gain}$; 단백질이용효율(PER; protein efficiency ratio) = $\text{wet weight gain} / \text{total protein given}$; 사료섭이량(FI; feed intake, g) = $\text{dry feed fed} / \text{fish}$



Figure 4. Experimental tanks (water capacity: 70 tons) for juvenile Atlantic bluefin tuna

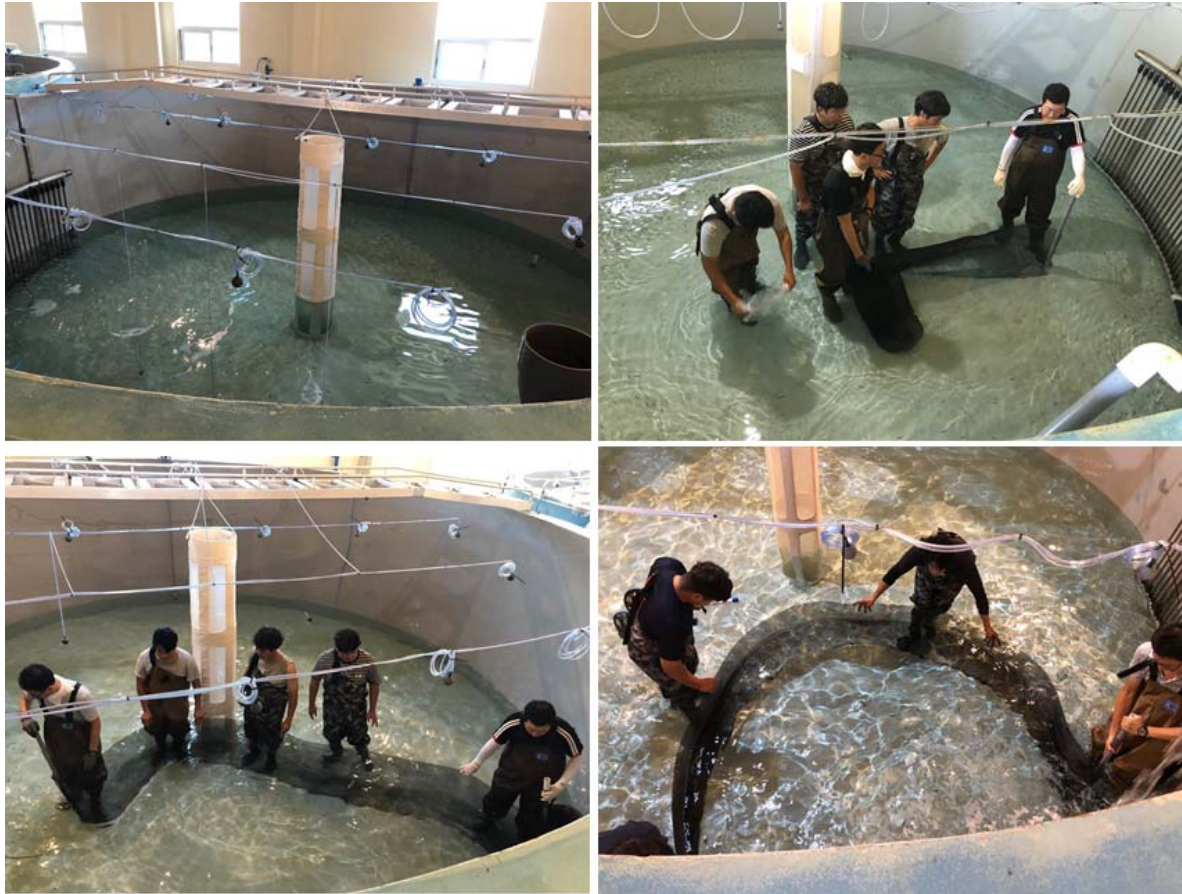


Figure 5. Installation of cage for catching the juvenile Atlantic bluefin tuna

2.2.4 일반성분

실험사료의 일반성분은 AOAC (2005) 방법에 따라 분석되었다. 수분은 상압가열건조법 (125°C, 3h), 조회분은 직접회화로법(550°C, 6h), 단백질은 자동 조단백분석기 (Kjeltec System 2300, Sweden)로 분석되었다. 지방은 Folch et al. (1959)의 방법에 따라 Soxhlet 추출 장치(Soxhlet Heater System C-SH6, Korea)를 이용하였다.

2.2.5 간, 위, 장중량 및 비만도

실험어의 간, 위, 장을 각각 분리하여 체질량 대비 지수를 계산하였고, 체중과 전장을 이용해 비만도를 계산하였다(Fig. 6). 조사항목의 계산식은 다음과 같다.

간중량지수(HSI; hepato-somatic indexes) = (liver weight * 100) / fish body weight; 위중량지수(SSI; stomach-somatic indexes) = (stomach weight * 100) / fish body weight; 장중량지수(ISI; intestine-somatic indexes) = (intestine weight * 100) / fish body weight; 비만도(CF; condition factor, %) = (fish body weight / fish body length³) x100



Figure 6. Measurement of the experimental fish body weight (g) after feeding trial

2.2.6 효소활성

실험어의 소화기관 내 총 5가지 효소활성(pepsin, trypsin, chymotrypsin, amylase, lipase)이 분석되었다. 실험어는 7시간 절식 후, 얼음물에 넣어 마취되었다. 마취된 실험어의 복부를 절개하여 간, 위, 장을 적출하였다(Fig. 7). 적출된 장기는 증류수와 혼합 후, 조직균질기(tissue grinder)를 이용하여 분쇄되었다. 분쇄된 샘플은 원심분리(4 °C, 10,000 G, 15 min)후, 상층액(supernatant)을 분리하여 분석에 사용되었다. 각 샘플의 단백질 총량(total protein)은 Bradford, (1976)의 방법에 따라 분석되었다.

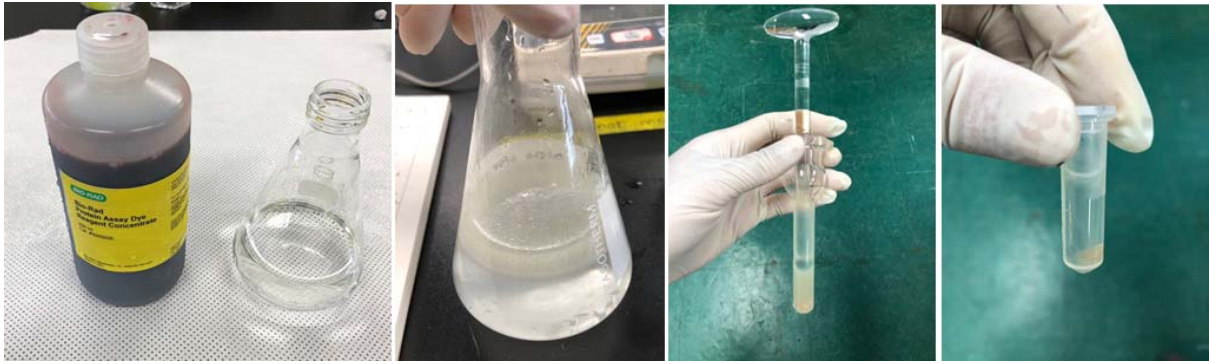


Figure 7. Dissection of fish organ and analysis of digestive enzyme activities

Pepsin 활성은 Worthington (1991)의 방법에 따라 100 μ l 샘플에 0.01N HCl와 500 μ l 반응액(2 % haemoglobin, 0.06 N HCl)을 넣어 반응(37 $^{\circ}$ C, 10 min) 시킨 후, 5 % TCA 1 ml를 넣어 5분간 반응시켰다. 원심분리(12,000 G, 5 min)후 UV spectrometer (280 nm)를 이용하여 활성을 측정하였다. Trypsin 활성은 Erlanger et al. (1961)의 방법에 따라 25 μ l 샘플에 1.25 ml BAPNA solution (BAPNA 43.5 mg, DMSO 1 ml, 0.05M Tris-HCl)을 10분간(37 $^{\circ}$ C) 반응시킨 후, 30 % acetic acid 1 ml 넣어 UV spectrometer (410 nm)를 이용하여 활성을 측정하였다. Chymotrypsin 활성은 Erlanger et al. (1961)의 방법에 따라 0.59 ml 반응액(0.1 mM SAPNA, 50 mM Tris-HCl, 20 mM CaCl_2)에 10 μ l 샘플을 넣고 반응(25 $^{\circ}$ C)시킨 후 UV spectrometer (410 nm)를 이용하여 활성을 측정하였다. Amylase 활성은 Worthington (1991)의 방법에 따라 0.5 ml 샘플에 0.5 ml 반응액(1 % starch solution, 20 mM sodium phosphate, 6.0 mM NaCl)을 넣어 3분간 반응시킨 후, 0.5 ml dinitrosalicylic acid를 넣고 5분간 반응시켜 UV spectrometer (540 nm)를 이용하여 활성을 측정하였다. Lipase 활성은 1.0 ml의 샘플에 1.5 ml emulsion olive oil와 1.5 ml 0.1 M tris-HCl buffer를 넣고 6시간(37 $^{\circ}$ C) 반응 후, 95 % ethyl alcohol을 3 ml 넣었다. 0.01 N NaOH을 적정 (titration)하여 활성을 측정하였다.

2.2.7 아미노산

전처리된 시료를 0.5 mm 이하로 분쇄한 후, 6N HCl 15 ml를 첨가하여 dry oven (110 $^{\circ}$ C, 24

h)에서 반응시켰다. 분해된 시료는 중탕기(water bath) (55 °C)를 이용하여 2회 감압농축 시킨 후, 25 ml volumetric flask에 정용 하

였다. 0.45 ul membrane filter로 여과 후 희석하여 아미노산 분석기(SyKam amino acid analyzer S433, Germany)를 이용해 분석되었다(Fig. 8).



Figure 8. The amino acid (AA) analyzer (SyKam Amino Acid Analyzer S433) (left) and measurement of sample weight for AA analysis (right)

2.2.8 지방산

실험시료에 대한 지방산 조성 분석은 GC (Gas Chromatography)를 이용하여 분석되었다. 추출된 지방 25 mg을 0.5N NaOH methanol 1.5 ml를 넣고 질소 충전 후, heating block (100°C, 6 min)가열하였다. 14 % BF₃ methanol 2 ml을 넣고 질소 충전 후, heating block (100°C, 30 min)가열하였다. 30 - 40°C로 식힌 후 hexane 1 ml을 넣고 질소 충전 후, 30초간 볼텍스 하여 혼합하였다. 포화생리식염수를 넣고 hexane층의 지방산을 파스테르 피펫을 이용하여 추출하였다. 무수황산 나트륨을 추출한 hexane층과 혼합 후 질소 충전하여 GC (Gas Agilent

6890GC, Agilent, U.S.A.)를 이용하여 분석되었다(Fig. 9).

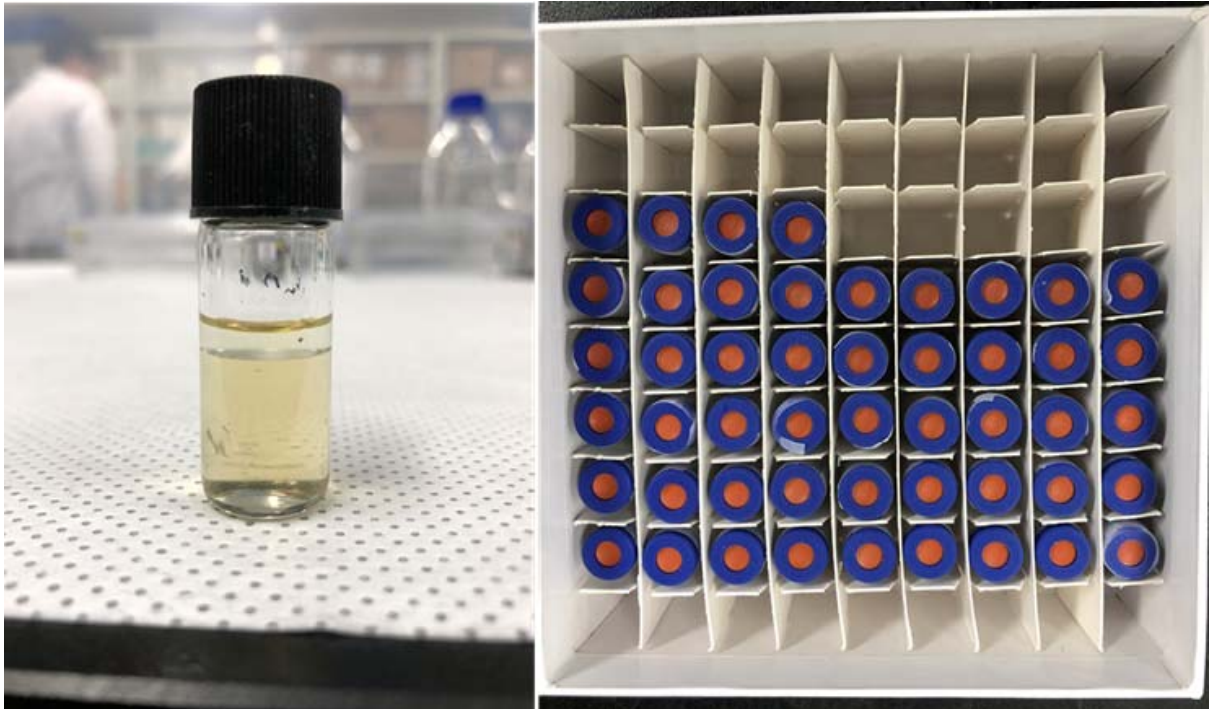


Figure 9. Sample (left) and standard for analysis of fatty acid composition (right)



Figure10. Fish carcass fed the experimental diets after freeze-drying

2.2.9 수질측정

실험기간 동안 사양실험 수조에 대한 수온, 용존산소와 수소이온지수(pH)를 1일 2회 측정하였다. 측정은 각 실험 수조마다 같은 위치에서 진행되었으며, 용존산소와 수소이온지수 측정은 YSI 600QS(YSI)를 이용하였고(Fig. 11), 수온은 수온 온도계를 이용하여 측정되었다.



Figure 11. Measurement of water temperature and dissolved oxygen in experimental tanks

2.2.10 분수집

분수집을 위해 실험사료는 분수집 5시간 전 만복급이 후, 실험수조(70 tons)에 수용된 실험어를 얼음물에 넣어 기절시킨 후 장(항문 끝에서부터 전체 장 길이의 2/3 부위, Fig. 12)을 절개하여 전장에서 항문 방향으로 눌러 분을 수집하였다. 분 샘플은 저온냉동고(-40°C)에 보관 후 동결건조 하였다.

2.2.11 소화율 측정

실험사료와 분에서의 지시제로 사용된 chromium oxide 함량은 Divakaran et al. (2002)의 방

법을 토대로 제주대학교 양어사료영양학 연구실에서 분석되었다. 실험사료 및 분 샘플을 회화로(550°C)에서 3시간 동안 회화시킨 후 얻어진 시료를 분석에 사용하였다. 먼저 chromium oxide를 mono-chromate 형태로 산화시키기 위해 샘플 5-10mg을 측정하여 glass test tube에 옮긴다. 시료가 담긴 glass test tube에 perchloric reagent (HClO₄) 4ml를 첨가한다. Perchloric reagent는 100ml의 증류수에 200ml의 질산을 혼합한 후, 냉각시킨 다음 70% perchloric acid 200ml을 혼합하여 만든다. 시료와 perchloric reagent가 첨가된 glass test tube를 가열판에 넣고 300°C에서 20분간 가열한 후 실온에서 방냉시킨다. 전처리가 끝난 샘플은 50ml 유리플라스크에 옮긴 후 3차 증류수로 25 mL가 되도록 정량한다. 그 후 분광광도계 (Beckman DU-730, USA)를 이용하여 350 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정한 흡광도는 시료분석과 같이 전처리 준비된 standard 용액으로 만들어진 standard 방정식을 이용하여 시료의 chromium oxide 함량을 계산하였다. 영양소 및 원료에 대한 소화율 계산식은 다음과 같다.

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



Figure 12. Feces in tuna digestive organ and fecal of juvenile Atlantic bluefin tuna

2.2.12 통계학적 분석

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

2.3 결과

13일간 진행된 사육실험의 결과는 Table 9와 Fig. 13에 나타내었다. 실험어의 최종평균무게는 LO구가 7.12g으로 가장 높았고, EFM구가 6.25g, THP구가 3.77g로 나타났다. 성장률과 일간성장률 또한 LO구가 가장 높게 나타났고, EFM구, LO구 순으로 낮았다. 사료전환효율은 LO구와 EFM구가 0.49로 낮았고, THP구가 0.73로 높게 나타났다. 단백질이용효율

은 EFM구가 3.25로 가장 높았고, LO구(3.21), THP구(2.19)순으로 낮았다. 사료섭이량은 LO구가 2.95g으로 가장 높았고, EFM구가 2.49g, THP구가 1.90g으로 나타났다. 생존율은 EFM구와 LO구가 63-64%로 높았고, THP구가 37%로 낮았다. 실험어 조지질의 함량은 THP구가 0.34%로, 다른 실험구(1.59-3.66%)에 비해 유의적으로 낮았다(Table 10, Fig. 14). 그 외 조단백질, 조회분, 수분 함량은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 실험어 내 전체 내장의 무게는 EFM구(6.51%)가 THP구(4.38%)와 비교하여 유의적으로 높았다(Table 11, Fig. 15). 장의 무게는 EFM구(1.76%)가 다른 실험구(0.58-0.92%)에 비해 유의적으로 높았다. 간무게는 유의적 차이를 보이지 않았으나, THP구(1.44%)가 다른 실험구에(2.21-2.35%)에 비해 낮은 경향을 보였다. 실험어의 비만도(condition factor)는 THP구(0.85)가 다른 실험구(1.00-1.01)에 비해 유의적으로 낮았다. 실험어 소화기간 내 효소활성은 모든 실험구간 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Table 12, Fig. 16). 참다랑어 치어의 사료섭이는 첫 번째 급이시간(08:00)에 하루 섭이량 중 37.3%, 두 번째 시간(11:00)에 22.7%, 세 번째 시간(14:00)에 17.5%, 네 번째 시간(17:00)에 22.5%로 조사되었다(Table 13). 참다랑어 치어의 어체중 대비 섭이량(%)은 Table 14에 나타내었다. 섭이량은 1.15g에서 15.2%, 2.46g에서 11.2%, 7.12g에서 6.25%로, 실험어의 체중 증가와 함께 계속해서 감소하는 경향을 나타냈다. 실험어의 아미노산 조성은 실험구 사이에 유의적 차이를 보이지 않았다(Table 15, Fig. 17). 실험어의 DHA 함량은 LO구(6.6%), EFM구(6.12%), THP구(6.08%) 순으로 낮았다(Table 16, Fig. 18). EPA 함량은 EFM구가 1.49%로 가장 높았고, LO구(1.02%), THP구(0.7%)순으로 나타났다. Linolenic acid의 경우, LO구(1.32%)에서만 검출되었다. 오메가-3 지방산의 함량은 LO구가 8.94%로 가장 높았고, EFM구(7.61%), THP구(6.78%)순으로 낮았다. 반면, 오메가-6 지방산 함량은 THP구가 8.36%로 가장 높았고, LO구(7.74%), EFM구(5.17%)순으로 나타났다. 사육 실험 결과, LO구의 성장이 EFM구와 유사한 것으로 보아, 참다랑어 사료 내 이용이 가능할 것으로 판단된다. 킬라피아 가수분해물의 경우, 치어기 참다랑어의 성장을 저하시켜, 사료 내 주요 단백질원료로 사용하기에 어려울 것으로 생각된다.

3가지 실험사료에 대한 대서양 참다랑어의 소화율은 Table 18, Fig 19에 나타내었다. 단백질 소화율은 EFM구가 83.2%로 높았고, LO구가 80.1%, THP구가 68.1%로 낮게 나타났다. 건물소화율은 EFM구(68.3%)와 LO구(66.1%)가 THP구(57.3%)와 비교하여 유의적으로 높았다. 킬라피아 가수분해물은 단백질 소화율이 낮아, THP구의 성장이 다른 실험구에 비해 낮게 나타난 것으로 판단된다.

Table 9. Growth performance, feed utilization and survival of juvenile Atlantic bluefin tuna (initial mean body weight: 1.15 g) fed the experimental diets for 13 days

Treatment	EFM	THP	LO
FBW¹ (g)	6.25	3.77	7.12
WG² (%)	444	228	519
SGR³ (%)	11.3	7.92	12.2
FCR⁴	0.49	0.73	0.49
PER⁵	3.25	2.19	3.21
FI⁶	2.49	1.90	2.95
Survival (%)	64.3	36.7	62.7

¹Final mean body weight

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

³Specific growth rate = 100 x [ln(final body weight) – ln(initial body weight)] / days

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

⁵Protein efficiency ratio = fish weight gain (g) / protein

⁶Feed Intake (g / fish) = dry feed consumed (g) / fish

EFM: enzyme treated fish meal, THP: tilapia hydrolysate powder, LO: linseed oil

Table 10. Proximate composition of experimental fish carcass fed the experimental diets for 13 days (% of wet basis)

Treatment	EFM	THP	LO
Crude protein	14.2±0.32	14.6±1.27	13.6±2.57
Crude lipid	1.59±0.47 ^a	0.34±0.11 ^b	3.66±0.80 ^a
Crude ash	1.40±0.40	1.84±0.36	1.33±0.12
Moisture	80.2±0.24	81.2±0.37	80.6±1.03

EFM: enzyme treated fish meal, THP: tilapia hydrolysate powder, LO: linseed oil

Table 11. Biological assessment of digestive organs and condition factor of Atlantic bluefin tuna fed the experimental diets for 13 days

Treatment	EFM	THP	LO
VSI¹(%)	6.51±1.53 ^a	4.38±0.79 ^b	5.10±1.18 ^{ab}
HSI²(%)	2.35±0.99	1.44±.58	2.21±0.90
SSI³(%)	2.13±0.74	2.37±.54	1.97±0.43
ISI⁴(%)	1.76±0.78 ^a	0.58±.44 ^b	0.92±0.60 ^b
CF⁵	1.01±0.10 ^a	0.85±0.06 ^b	1.00±0.08 ^a

¹Viscerasomatic index = (viscera weight x 100) / fish body weight, ²Hepatosomatic index = (liver weight x 100) / fish body weight, ³Stomachsomatic index = (stomach weight x 100) / fish body weight, ⁴Intestinesomatic index = (intestine weight x 100) / fish body weight
⁵Condition factor = (fish body weight / fish body length³) x100, EFM: enzyme treated fish meal, THP: tilapia hydrolysate powder, LO: linseed oil

Table 12. Digestive enzyme activities of juvenile Atlantic bluefin tuna fed the experimental diets for 13 days (U/mg protein)

Treatment	EFM	THP	LO
Pepsin	0.78±0.15	0.76±0.15	0.71±0.09
Trypsin	1.37±0.14	1.04±0.23	1.03±0.29
Chymotrypsin	0.24±0.08	0.27±0.02	0.28±0.06
Amylase	1.06±0.04	0.86±0.10	0.85±0.12
Lipase	8.93±1.08	8.40±1.35	8.33±0.91

EFM: enzyme treated fish meal, THP: tilapia hydrolysate powder, LO: linseed oil

Table 13. Feed consumption rate of juvenile Atlantic bluefin tuna fed the experimental diets for 13 days (%)

Treatment	EFM	THP	LO	<i>Average</i>
08:00	38.1	39.8	33.9	<i>37.3</i>
11:00	21.1	22.7	24.4	<i>22.7</i>
14:00	19.1	15.0	18.4	<i>17.5</i>
17:00	21.6	22.6	23.3	<i>22.5</i>

EFM: enzyme treated fish meal, THP: tilapia hydrolysate powder, LO: linseed oil

Table 14. Feed consumption rate of juvenile Atlantic bluefin tuna fed the LO experimental diets for 13 days

Days	Body weight (g)	Feed intake¹ (%)
1	1.15	15.2
2	1.34	14.8
3	1.56	11.9
4	1.81	13.1
5	2.11	11.6
6	2.46	11.2
7	2.86	10.3
8	3.33	7.91
9	3.88	9.11
10	4.51	7.22
11	5.26	6.45
12	6.12	6.28
13	7.12	6.25

¹feed intake (%) = (feed intake (g) / body weight (g))*100

Table 15. Amino acid composition of juvenile Atlantic bluefin tuna carcass fed the experimental diets for 13 days (% of protein)

Amino acid	EFM	THP	LO
<i>Essential amino acid</i>			
Arginine	4.76	4.80	4.84
Histidine	3.77	3.28	3.52
Isoleucine	3.21	3.28	3.31
Leucine	5.56	5.56	5.60
Lysine	5.83	5.78	5.89
Phenylalanine	3.09	3.10	3.10
Threonine	2.97	2.88	2.89
Valine	3.79	3.78	3.87
<i>Nonessential amino acid</i>			
Alanine	4.68	4.47	4.59
Aspartic acid	7.37	7.33	7.44
Glycine	4.65	4.45	4.38
Glutamic acid	10.3	10.4	10.5
Proline	3.45	3.29	3.31
Serine	2.92	2.78	2.79
Tyrosine	2.34	2.36	2.26

EFM: enzyme treated fish meal, THP: tilapia hydrolysate powder, LO: linseed oil

Table 16. Fatty acid composition of juvenile bluefin tuna carcass fed the experimental diets for 13 days (% of lipid)

Fatty acid	EFM	THP	LO
12:0	-	-	-
14:0	3.45	2.15	3.29
14:1	-	-	-
15:0	-	-	-
16:0	27.6	27.5	26.3
16:1	6.04	5.76	5.87
17:0	-	-	-
17:1	-	-	-
18:0	10.4	12.9	10.0
18:1n9(OA)	31.4	28.5	30.4
18:2n6(LA)	5.17	7.06	5.90
18:3n3(LNA)	-	-	1.32
18:3n6	-	-	-
20:0	-	-	-
20:1	5.20	4.90	4.99
20:3n6	-	-	-
20:3n3	-	-	-
20:4n6(AA)	-	1.30	0.52
20:5n3(EPA)	1.49	0.70	1.02
22:0	-	-	-
22:1n9	1.06	0.70	1.02
22:6n3(DHA)	6.12	6.08	6.60
DHA/EPA	4.11	8.68	6.47
Σ n-3 ¹	7.61	6.78	8.94
Σ n-6 ²	5.17	8.36	7.74
n-3/n-6	1.47	0.81	1.16

¹ Σ n-3: 18:3n-3, 20:3n-3, 20:5n-3, 22:6n-3

² Σ n-6: 18:2n-6, 18:3n6, 20n:3n-6; 20:4n-6

EFM: enzyme treated fish meal, THP: tilapia hydrolysate powder, LO: linseed oil

Table 17. Dietary formulation of juvenile Atlantic bluefin tuna for investigation of digestibility
(% of dry matter)

Ingredients	EFM	THP	LO
Enzyme treated fish meal ¹	65.0	-	65.0
Tilapia hydrolysate powder ²	-	65.0	-
Fish meal, sardine ³	10.0	10.0	10.0
Soy protein concentrate ⁴	8.00	8.00	8.00
DHA oil ⁵	3.00	3.00	2.00
Linseed oil ⁶	-	-	1.00
Cod liver oil ⁷	5.00	5.00	5.00
Mineral premix ⁸	1.00	1.00	1.00
Vitamin premix ⁹	1.00	1.00	1.00
Taurine	1.50	1.50	1.50
Wheat flour	4.50	4.50	4.50
Lecithin	1.00	1.00	1.00
Chromium oxide. Cr2O3	1.00	1.00	1.00
Crude Protein	63.2	62.7	63.3
Crude Lipid	20.7	21.1	19.7
Ash	6.49	6.52	7.21
Moisture	5.81	5.06	6.47

¹CPSP, Sopropeche, France; ²Aquativ, France; ³Orizon S. A, Chile; ⁴Soyco-meal, Corp. Korea flavor, Korea; ⁵DHA Concentrate oil, corp. Comport, Korea; ⁶Alligga™, Canada; ⁷corp. E-wha oil & fat Ind, Korea; ⁸Mineral premixture (g/kg of mixture): MgSo4.7H2O, 60; NaH2PO4.2H2O, 600; KCL, 250; ferric citrate, 19.90; ZnSo4.7H2O, 3.00; Ca-lactate, 650; CuCl, 0.350; KI, 0.085; Na2Se2O3, 0.0265; MnSO4.H2O, 1.300; CoCl2.6H2O, 0.0525; ⁹Vitamin premixture (g/kg of mixture): dry vitamin A acetate 325 SWS/A, 1.704; thiamine hydrochloride, 3.630; riboflavin 5'-phosphahate sodium, 5.100; niacinamide, 28.05; calcium D-pantothenate, 12.14; pyridixine hydrochloride, 4.005, vitamin B12 crystalline N, 0.011; ascorbic acid crystal, 222; dry vitamin D3, 5.000; dl-a-tocopherol, 114; Dry vitamin k1 5% SD, 1.500; biotin-d, 0.391; folic acid, 1.380; myoinositol, 115; cellulose, 484 EFM: enzyme treated fish meal, THP: tilapia hydrolysate powder, LO: linseed oil

Table 18. Apparent digestibility coefficients (ADC) of the experimental diets for juvenile Atlantic bluefin tuna by dissection fecal collection method (% of ADC)

Treatments	EFM	THP	LO
Protein	83.2±0.91 ^a	68.1±3.23 ^c	80.1±0.07 ^b
Dry matter	68.3±2.13 ^a	57.3±3.72 ^b	66.1±0.52 ^a

EFM: enzyme treated fish meal, THP: tilapia hydrolysate powder, LO: linseed oil

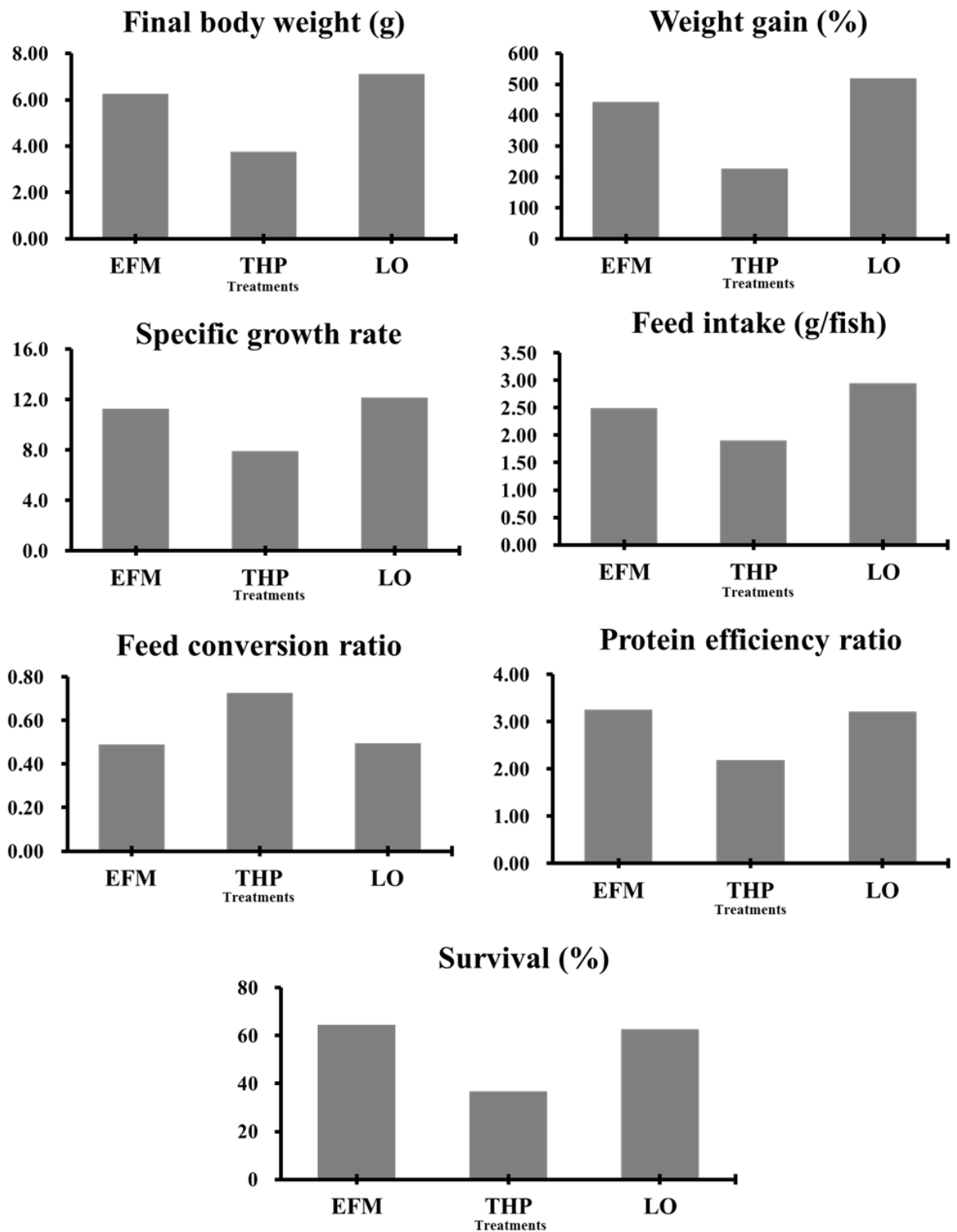


Figure 13. Growth performance, feed utilization and survival of juvenile Atlantic bluefin tuna fed the experimental diets for 13 days

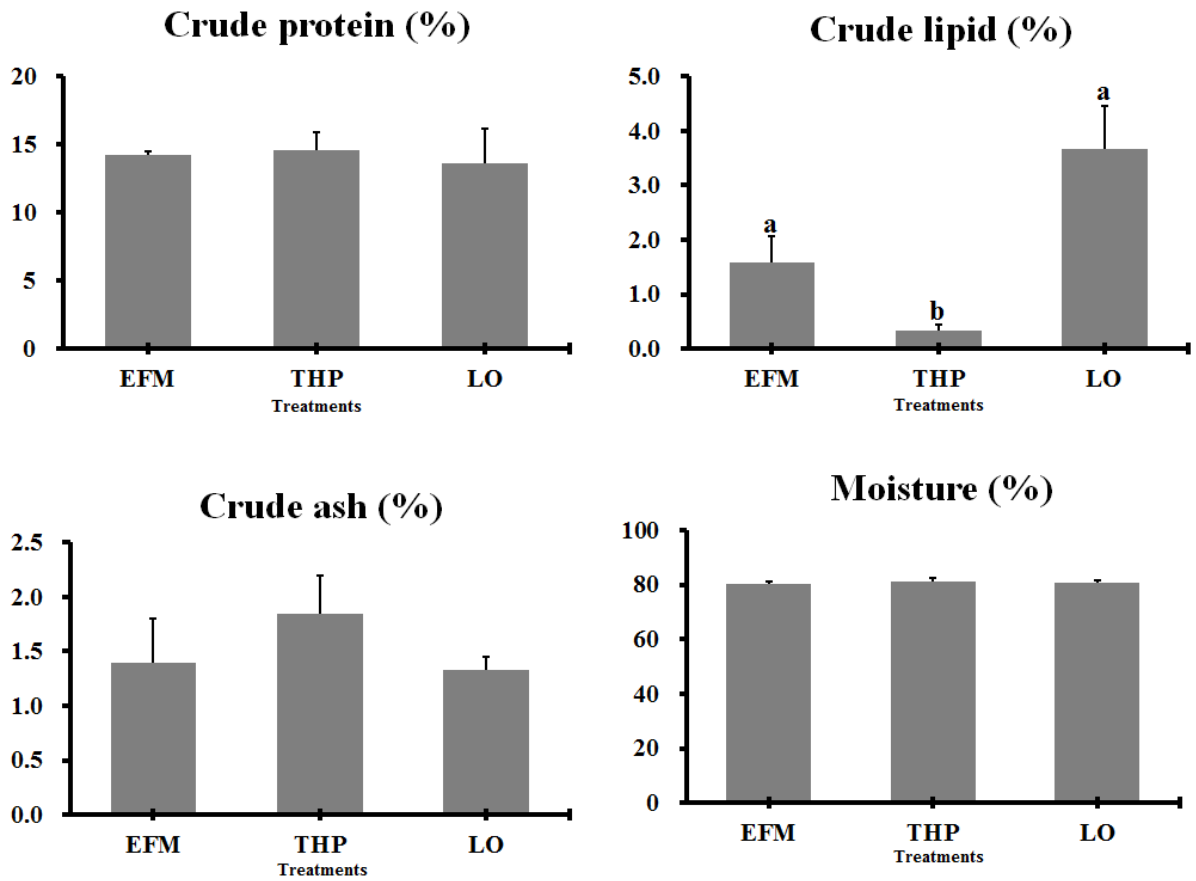


Figure 14. Proximate composition of juvenile Atlantic bluefin tuna fed the experimental diets for 13 days

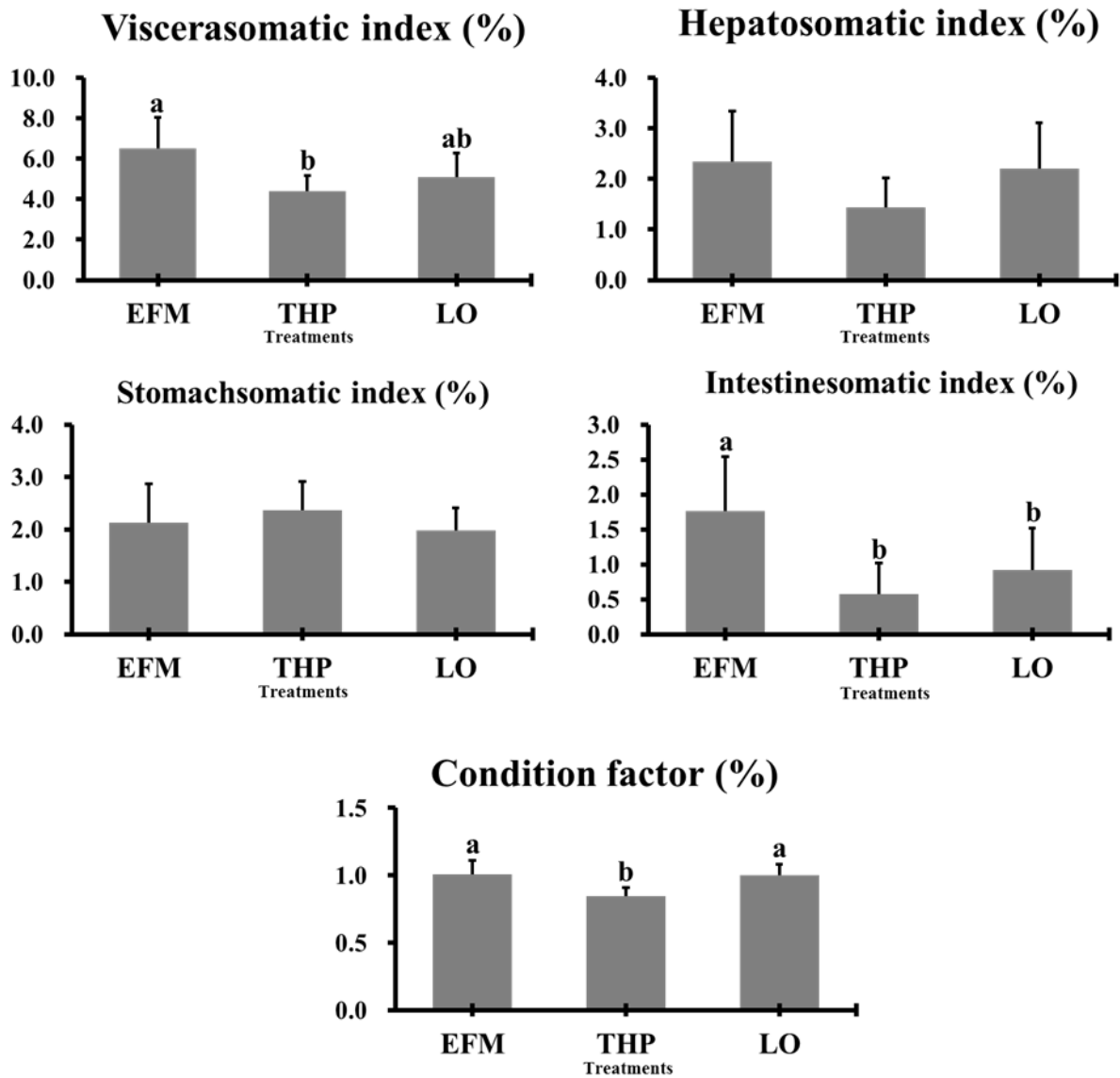


Figure 15. Biological assessment of digestive organs and condition factor of juvenile bluefin tuna fed the experimental diets

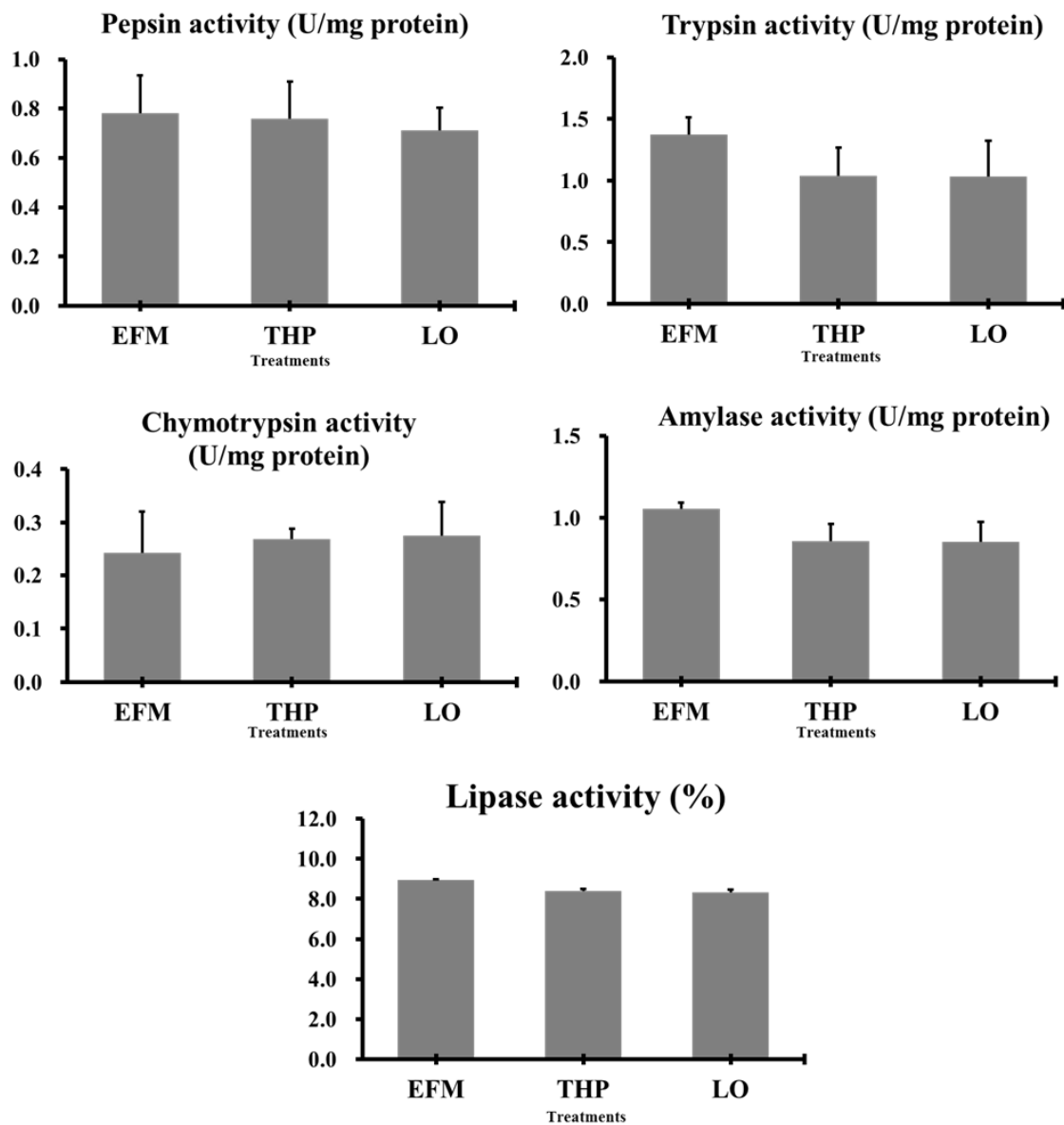


Figure 16. The digestive enzyme activities of juvenile bluefin tuna fed the experimental diets for 13 days

Essential amino acid (% in protein)

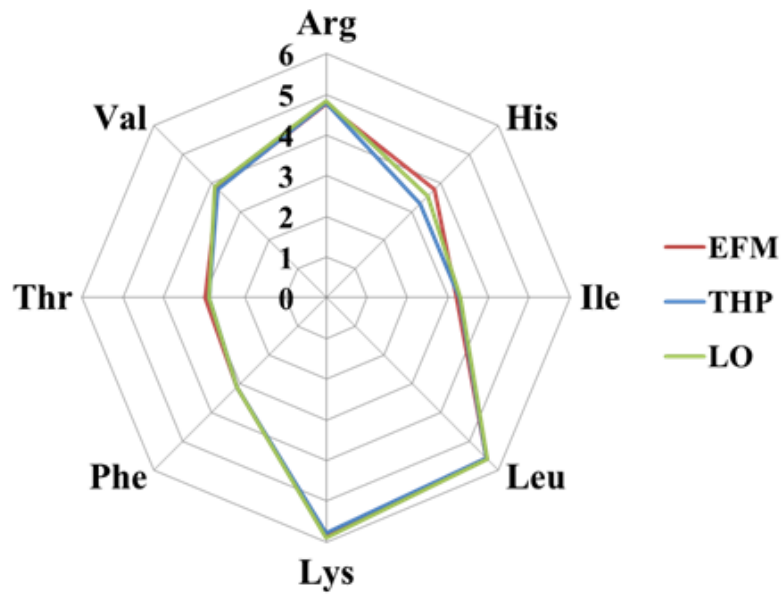


Figure 17. Essential amino acid composition of Atlantic bluefin tuna carcass fed the experimental diets for 13 days

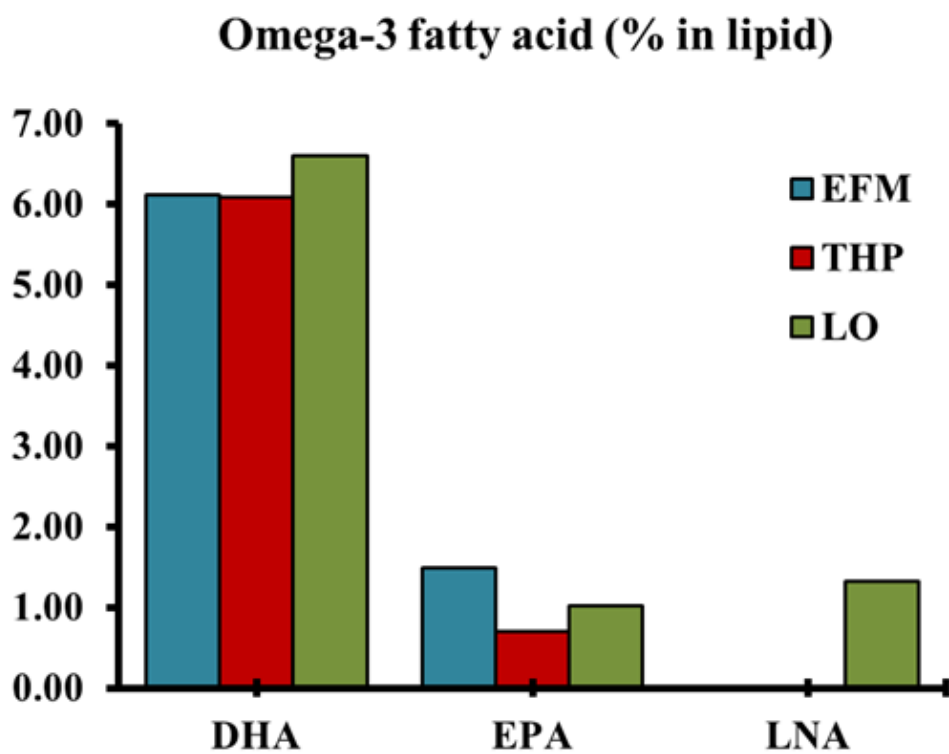


Figure 18. Omega-3 fatty acid contents of Atlantic bluefin tuna carcass fed the experimental diets for 13 days (DHA; docosahexaenoic acid, EPA; eicosapentaenoic acid, LNA; linolenic acid)

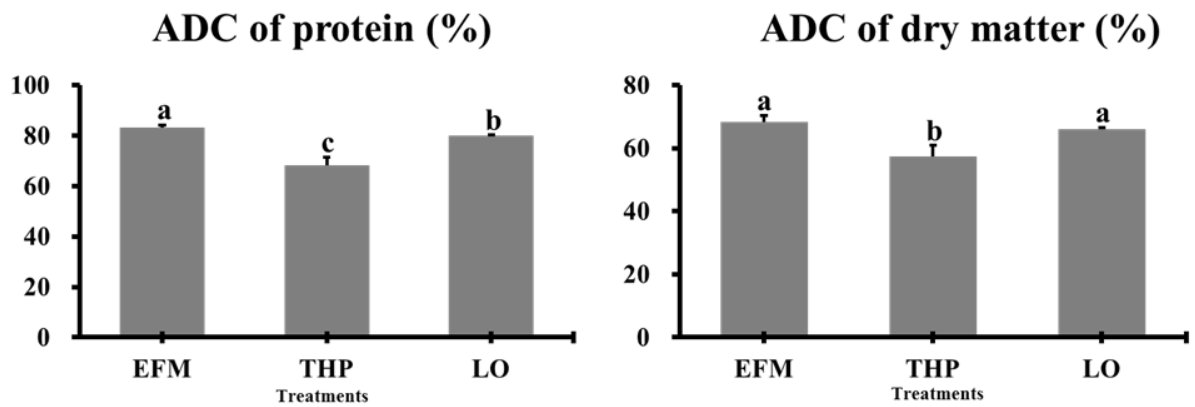


Figure 19. Apparent digestibility coefficients (ADC) of protein (left) and dry matter (right) in the experimental diets for juvenile Atlantic bluefin tuna by dissection fecal collection method (% of ADC)

CHAPTER 3

Dietary evaluation of sardine fish meal and cod liver oil in bluefin tuna (*Thunnus thynnus*)

3.1 서론

참다랑어는 대표적인 회유성 어종으로 최대 500 kg까지 성장하는 고부가가치 어종이다. 약 10조원 규모인 세계 참다랑어 양식시장은 대표적인 미래 블루오션으로 각광받고 있으며, 앞으로 그 규모는 계속해서 증가할 것으로 예상되고 있다. 우리나라의 연간 총 참다랑어 소비량은 약 2000톤으로, 대부분 수입에 의존하고 있는 실정이다. 참다랑어는 주로 어획을 통해 공급되는데 과도한 어획으로 인해 참다랑어의 개체수가 크게 감소하였다. 참다랑어의 과도한 어획을 막고 개체수를 보호하기 위해 대서양 참다랑어는 ICCAT (International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas), 태평양 참다랑어는 WCPFC (Western and Central Pacific Fisheries Commission), 남방 참다랑어는 CCSBT(Commission for the Conservation of Southern Bluefin Tuna)에서 참다랑어의 어획량을 규제하고 있다(Fig. 20).



Figure 20. The global regulation of tuna catches by five commissions and the total annual wild-caught of tuna in 2014

참다랑어의 어획량은 계속해서 감소하는 추세다. 참다랑어를 안정적으로 공급하고자 양식에 대한 연구가 활발하게 진행되었다. 일본은 참다랑어를 가장 많이 소비하는 국가로, 1970년도에 참다랑어 양식을 연구하기 시작하여 1979년도에 자 연산 친어로부터 채란에 성공함으로써 본격적인 양식이 시작되었다. 이후 산란유 도와 종묘생산기술을 통해 2002년부터 완전양식이 가능하게 되었다. 우리나라는 국립수산과학원의 주도하에 수년간 참다랑어 양식을 연구한 결과, 2015년도에 세 계에서 두 번째로 참다랑어 완전양식에 성공하였다. 이처럼 참다랑어 양식기술은 다년간의 연구를 통해 확보하였으나, 배합사료에 관한 연구는 걸음마 단계이다. 배합사료는 어류의 성장과 직결되기 때문에 어류양식에 있어 매우 중요한 요소이 다. 그러나 참다랑어를 비롯한 다랑어류에서는 영양소 요구량을 비롯해 사료전반 에 관한 연구가 미흡한 관계로 참다랑어용 배합사료가 완전히 개발되지 않아 생 사료가 주로 사용되고 있다. 일본의 경우, 긴키대학에서는 참다랑어용 배합사료를

자체적으로 개발하여 사용하고 있지만, 아직 배합사료가 대량으로 사용되고 있지는 않다. 참다랑어 양식에는 주로 까나리, 고등어, 오징어와 같은 생사료가 주로 사용되고 있다(Fig. 21).



Figure 21. The sand lance as main feed in tuna aquaculture

우리나라 어류양식 산업의 경우, 전체 양식어가 중 생사료의 사용률이 80%에 달한다. 그러나 생사료의 사용은 환경오염을 야기할 뿐만 아니라 다양한 종류의 질병에 쉽게 노출되는 문제점을 안고 있어 하루빨리 금지되어야 한다. 우리나라는 어류양식의 경쟁력을 강화시키기 위해 전면 배합사료 사용으로의 전환을 적극적으로 권장하고 있다. 양식선진국들은 생사료에서 배합사료로 전환한 지 오래이며, 중국 또한 "생사료 사용금지 법령"에 강화된 "배출수 처리규정" 등의 친환경 양식생산으로의 전환을 서두르고 있다. 양식에서의 배합사료 개발은 효율적인 사육기술의 확립과 사료비의 절감뿐만 아니라 향후 "21세기의 지속가능한 양식"을 위해서는 우선적으로 이루어져야 되는 요소이다. 양식어류에 있어 모든 영양소의 요구량을 충족시키고 높은 효율의 사료를 생산하기 위해서는 우선적으로 주단백질원으로 사용될 원료에 대한 특성을 정확히 파악해야 한다.

참다랑어는 배합사료에 대한 기호성과 어분에 대한 소화율이 다른 어종에 비해 현저히 낮아 실용 배합사료를 개발하는데 큰 어려움이 있다. 참다랑어가 어분

에 대해 낮은 이용률을 보이는 이유는 어분이 참다랑어 소화기관 내에서 쉽게 소화되지 못하기 때문인 것으로 알려져 있다. 어분은 고온의 환경에서 가공을 거쳐 제조되는데, 이 과정에서 어분단백질의 변성이 일어나 참다랑어의 소화효소가 원활하게 작용하지 못하기 때문인 것으로 알려져 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 참다랑어를 대상으로 다양한 단백질원의 이용가능성을 평가하는 연구가 진행되었다. 그 중 효소처리어분은 참다랑어 사료 내 주 단백질원으로써의 우수함이 보고되었다. 효소처리어분은 어류를 가공하는 과정에서 발생하는 부산물을 papain, pepsin, trypsin 등의 소화효소와 반응시켜 제조된 단백질원료이다. 효소처리어분은 저분자 단백질의 함량이 높아 어류 사료 내 높은 이용효율을 보이는 것으로 알려져 있다.

3.2 재료 및 방법

3.2.1 실험사료

3.2.2 실험사료

사료 내 효소처리어분과 DHA농축유 대체원으로써 일반어분과 어유의 이용성을 평가하고자 참다랑어를 대상으로 사육실험을 실시하였다. 실험사료는 선행연구를 통해 사육효능이 검증된 효소처리어분구(EFM, 정어리)를 대조구로 설정하였다. 실험구(FM)는 대조구 사료 내 효소처리어분을 일반어분으로 50% 대체하였고, DHA농축유와 아미노유를 모두 명태간유(cod liver oil)로 대체하여 설계하였다(Table 19). 실험사료의 영양소 함량은 참다랑어의 조단백질(62%)과 조지질(18%)의 요구량을 충족시키도록 조성하였다(Biswas et al., 2009). Vitamin과 mineral premixture는 참다랑어를 대상으로 한 선행연구의 부재로 인해 방어 등 해산어류의 요구량을 기준으로 자체 제작하여 사용하였다. 실험사료는 사료 조성표에 따라 각 원료를 정량 후, 혼합하여 10mm 크기로 성형되었으며 완성된 실험사료는 냉동보관(-30°C) 후, 실험에 사용하였다. 제작된 실험사료의 지방산 조성은 Table 20, Fig 22, 실험사료에 사용된 주 단백질 원료의 지방산 조성은 Table 21, Figure 23에 나타내었으며 실험사료의 단가(kg/원)는 Table 22에 나타내었다.

사육실험 중 대조구가 실험구보다 사료섭이량이 더 높게 나타났다(Table 30. Fig 31). 사료섭이량의 차이가 나타나는 원인을 탐색하기 위해 2가지 가설을 정하였다. 첫 번째는 효소처리어분의 함량에 따른 사료유인효과이며, 두 번째는 DHA농축유

의 함량에 따른 지질 조성의 차이로 가정하였다. 사료 내 함량이 비교적 적고, 사료 제작비용의 약 61%를 차지하는 DHA농축유를 제거한 EFM-1 사료를 제작하여 18일(실험 50-67일차) 동안 급여하였다(Table 19).

2종의 실험사료에 대한 참다랑어의 소화율을 조사하기 위해 실험사료를 제작하였다(Table 23). 소화율 분석을 위해 지시제(indicator)로 산화 크롬(chromium oxide, Cr_2O_3 , DaeJung, siheung, Korea)이 사용되었고, 사료 내 1%가 첨가되도록 설계하였다. 사료혼합물은 사료제작기(SP-50, Gumgang Engineering, Daegu, Korea)를 이용하여 직경 10mm로 제작되었다. 완성된 실험사료는 냉동보관(-30°C) 후, 실험에 사용하였다.

Table 19. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets for juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* (% of dry matter)

Ingredients	EFM	EFM-1	FM
Enzyme treated fish meal, sardine ¹	65.0	65.0	37.5
Fish meal, sardine ²	10.0	10.0	37.5
Soy protein concentrate ³	8.00	8.00	5.00
Wheat gluten	0.00	0.00	3.00
DHA oil ⁴	2.00	0.00	0.00
Linseed oil ⁵	1.00	1.00	0.00
Cod liver oil ⁶	5.00	7.00	8.00
Mineral premix ⁷	1.00	1.00	1.00
Vitamin premix ⁸	1.00	1.00	1.00
Taurine	1.50	1.50	1.50
Wheat flour	4.50	4.50	4.50
Lecithin	1.00	1.00	1.00
<i>* Proximate composition</i>			
Crude Protein	64.4	64.4	64.3
Crude Lipid	23.2	23.2	21.5
Ash	6.36	6.36	8.06

¹CPSP, Sopropêche, France, ²Orizon S.A. CO., Ltd., Chile, ³SCP, Corp. Korea flavor, seoul, Korea, ⁴DHA Concentrate oil, corp. Chemport, jeonnam, Korea, ⁵Textron, espana, spain, ⁶E-wha oil Co., Ltd., Busan, Korea, ⁷Mineral premixture (g/kg of mixture): MgSo4.7H2O, 60; NaH2PO4.2H2O, 600; KCL, 250; ferric citrate, 19.90; ZnSo4.7H2O, 3.00; Ca-lactate, 650; CuCl, 0.350; KI, 0.085; Na2Se2O3, 0.0265; MnSO4.H2O, 1.300; CoCl2.6H2O, 0.0525, ⁸Vitamin premixture (g/kg of mixture): dry vitamin A acetate 325 SWS/A, 1.704; thiamine hydrochloride, 3.630; riboflavin 5'-phosphatate sodium, 5.100; niacinamide, 28.05; calcium D-pantothenate, 12.14; pyridixine hydrochloride, 4.005, vitamin B12 crystalline N, 0.011; ascorbic acid crystal, 222; dry vitamin D3, 5.000; dl-a-tocopherol, 114; Dry vitamin k1 5% SD, 1.500; biotin-d, 0.391; folic acid, 1.380; myoinositol, 115; cellulose, 484, EFM: enzyme treated fish meal, FM: fish meal

Table 20. Fatty acid composition of the experimental diets.

Ingredients	EFM	EFM-1	FM
C14	4.51	4.64	3.83
C16	15.0	18.6	16.1
C16:1	5.03	5.27	4.65
C18	4.36	4.27	1.31
C18:1n9(OA)	19.6	20.6	30.3
C18:2n6(LA)	8.50	8.85	9.87
C18:3n3(LNA)	9.65	9.72	6.05
C20:4n6(ARA)	11.1	11.5	11.3
C20:5n3(EPA)	8.41	9.41	7.02
C22:6n3(DHA)	13.8	7.11	6.57

EFM: enzyme treated fish meal, FM: fish meal

Table 21. Fatty acid composition of main protein source

Ingredients	EFM	FM
C14	3.82	5.67
C16	16.3	28.6
C16:1	5.69	6.42
C18	4.58	8.15
C18:1n9(OA)	28.8	14.7
C18:2n6(LA)	8.22	3.64
C18:3n3(LNA)	12.2	5.47
C20:4n6(ARA)	8.16	2.81
C20:5n3(EPA)	4.91	12.7
C22:6n3(DHA)	7.27	11.8

EFM: enzyme treated fish meal, FM: fish meal

Table 22. The price of experimental diets (won/kg)

Ingredients	Price (won/kg)	EFM		FM	
		%	Price (won/kg)	%	Price (won/kg)
Enzyme treated fish meal	4,500	65.0	2,925	37.5	1,688
Fish meal	2,350	10.0	235	37.5	881
Soy protein concentrate	2,500	8.00	200	5.00	125
Wheat gluten	2,400	0.00	0	3.00	72
DHA oil	300,000	2.00	6,000	0.00	0
Linseed oil	5,500	1.00	55	0.00	0
Cod liver oil	3,000	5.00	150	8.00	240
Mineral premix	1,020	1.00	10	1.00	10
Vitamin premix	659	1.00	6.6	1.00	6.6
Taurine	5,200	1.50	78	1.50	78
Wheat flour	450	4.50	20	4.50	20
Lecithin	7,000	1.00	70	1.00	70
<i>Total price</i>			9,750		3,191

Table 23. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets for juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* (% of dry matter)

Ingredients	EFM	FM
Enzyme treated fish meal, sardine ¹	65.0	37.5
Fish meal, sardine ²	10.0	37.5
Soy protein concentrate ³	8.00	5.00
Wheat gluten	0.00	3.00
DHA oil ⁴	0.00	0.00
Linseed oil ⁵	1.00	0.00
Cod liver oil ⁶	7.00	8.00
Mineral premix ⁷	1.00	1.00
Vitamin premix ⁸	1.00	1.00
Taurine	1.50	1.50
Wheat flour	4.50	4.50
Lecithin	1.00	1.00
Chromium oxide. Cr ₂ O ₃	1.00	1.00
<i>* Proximate composition</i>		
Crude protein	63.5	62.7
Crude lipid	20.8	19.8
Crude Ash	7.51	9.19

¹CPSP, Sopropêche, France, ²Orizon S.A. CO., Ltd., Chile, ³SCP, Corp. Korea flavor, Seoul, Korea, ⁴DHA Concentrate oil, corp. Chemport, Jeonnam, Korea, ⁵Textron, Espana, Spain, ⁶E-wha oil Co., Ltd., Busan, Korea

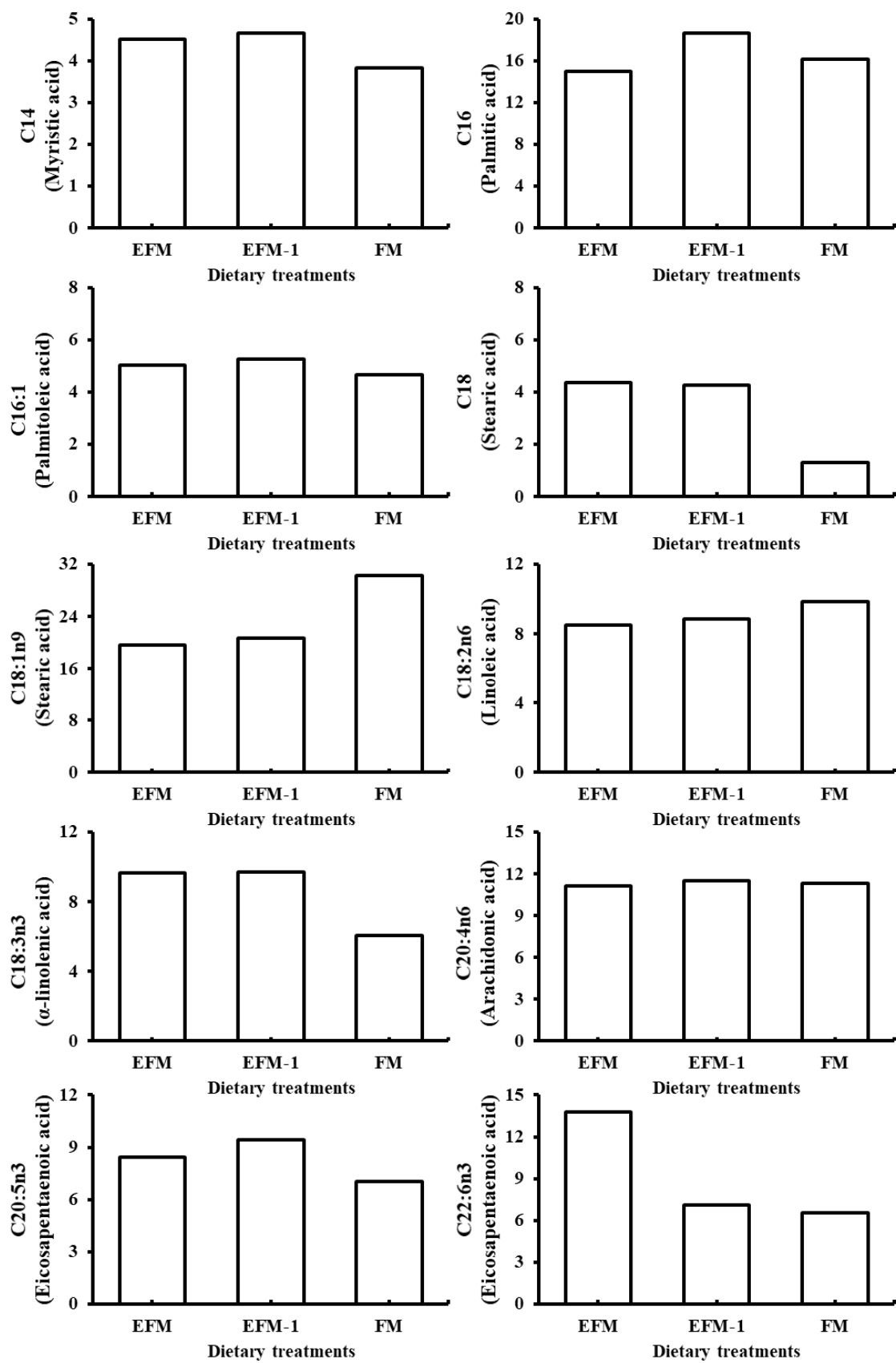


Figure 22. Fatty acid composition of the experimental diets

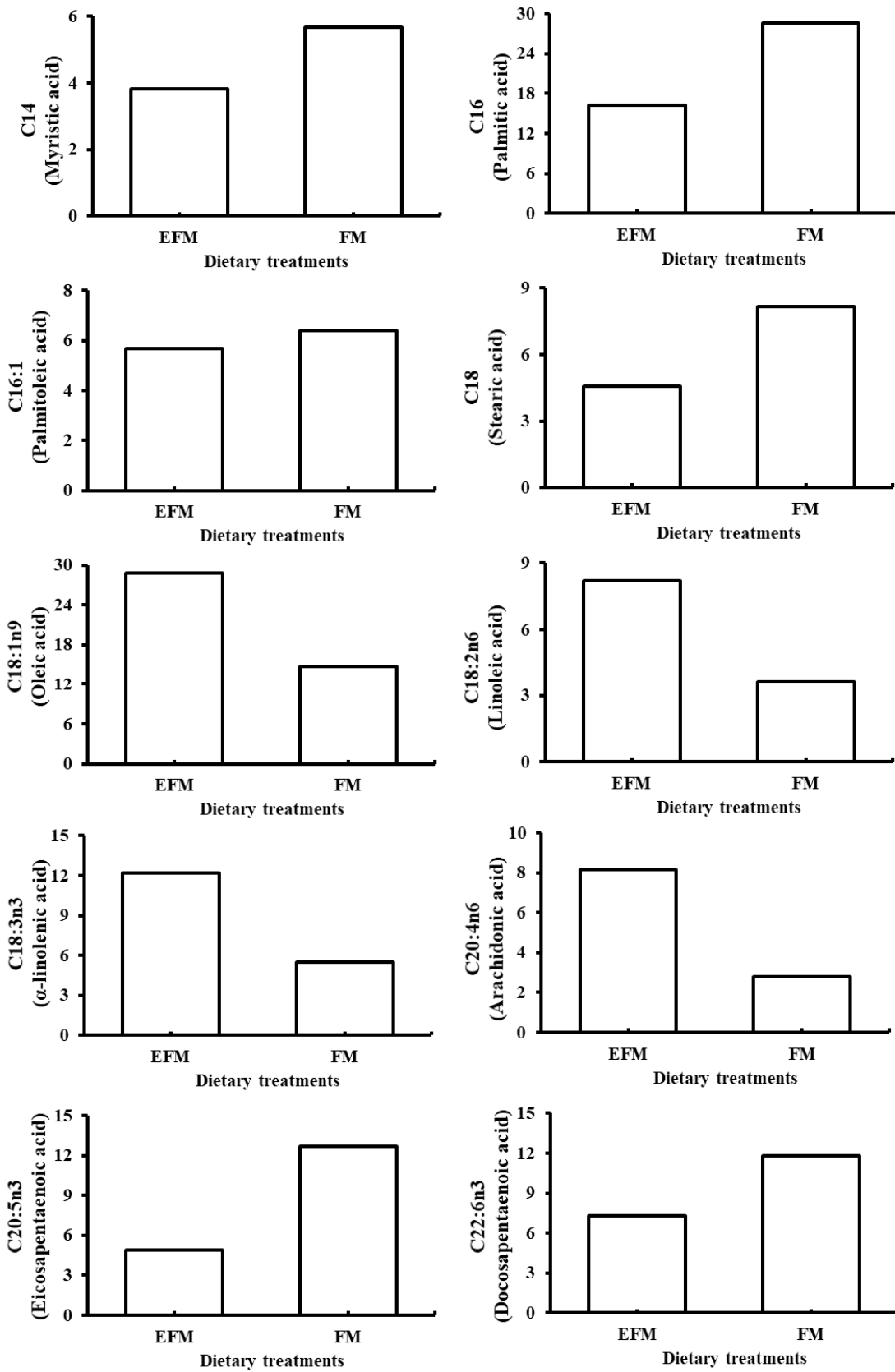


Figure 23. Fatty acid composition of main protein source

3.2.2 실험어 및 사육관리

대서양 참다랑어는 제주도 서귀포시 남원읍에 위치한 국립수산물과학원 제주수산연구소에서 생산된 개체를 실험에 이용하였다. 사육실험은 연구소 내 참다랑어 전용 사육시설에서 진행되었다. 실험어는 원형수조(지름 15 m, 500 ton)에서 생사료(까나리)를 급이하며 사육된 참다랑어(1.2-1.5 kg)를 이용하였다. 총 25마리 중에 12마리는 낚시로 포획하여 각 개체의 전장과 무게를 측정하고, 또 다른 원형 수조(FM구, 지름 20m, 1000 ton)에 입식하였다. 수조 당 5마리를 무작위로 선별하여 생체칩(PET guarder, tae chang, chungnam, korea)을 아가미 뒤 가슴지느러미 상부에 이식하였다. 그 후 수조에 남아있던 개체 중 5마리를 포획하여 전장, 어체의 무게를 측정하였고, 생체칩을 주입하여 수조에 순치시켰다. 실험어를 사육환경에 적응시키기 위해 3일 동안 생사료를 공급하였고, 이후 5일동안 동일한 배합사료를 공급하였다. 사육실험은 67일 동안 진행되었다. 사육수조 내 용존산소농도를 유지하기 위해 액화산소 주입기를 설치하였다. 평균 사육수온은 $20.1^{\circ}\text{C} \pm 1.62$ 였고, 용존산소(DO; dissolved oxygen)는 9.6 mg/L로 유지되었다. 실험사료는 1일 2회 (09:30, 16:30 h)에 나누어 반복공급 되었다. 실험어의 사료섭이량을 측정하기 위해 매 공급시간마다 섭이량을 측정하였다(Fig. 24). 사료의 유실량은 수조에 급여한 사료의 개수와 실험어가 섭이하지 못하고 바닥으로 떨어진 사료의 개수를 육안으로 관찰하여 계산하였다. 계산식은 다음과 같다. 사료유실량 = 사료공급량*(유실사료 개수/공급사료 개수)



Figure 24. Feeding of the experimental diets for experimental fish (left) and injecting a microchip for Atlantic bluefin tuna (right)

3.2.3 실험어 무게측정

사육실험 종료 후 실험어의 무게를 측정하였다. 각 실험사료에 대한 참다랑어의 소화율을 조사하고자, 실험어의 배설물을 수집하였다. 해부(dissection)를 통해 실험어의 배설물을 수집하였다. 실험사료는 참다랑어의 소화시간을 고려하여, 무게 측정 6시간 전에 공급되었다. 실험어는 포획 후 2-phenoxyethanol 용액(200 ppm)으로 마취시켰다. 혈액 채취 및 무게 측정 이후 소화기관이 적출되었다. 소화기관 적출 후, 남은 어체(carass)는 일반성분분석에 사용되었다. 실험어의 성장률과 사료효율 관련 조사항목과 계산식은 다음과 같다. 성장률(WG; weight gain, %) = $100 \times (\text{final mean body weight} - \text{initial mean body weight}) / \text{initial mean body weight}$; 일간성장률

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

3.2.4 일반성분

Chapter 1과 동일하게 진행되었다.

3.2.5 간·위·장중량과 비만도

Chapter 1과 동일하게 진행되었다.

3.2.6 생화학적 분석

Hematocrit은 모세혈관 채혈튜브(micro-hematocrit capillary tubes)에 혈액을 채운 후, 혈액진단원심분리기(Micro Hematocrit VS-12000, Vision Scientific, Korea)를 이용하여 원심분리 후(10분) 그 값을 측정하였다. Hemoglobin은 시판되고 있는 시약과 반응시킨 후, 자동혈액분석기(Fuji DRI-CHEM 7000i, Fujifilm, Japan)를 이용하여 분석하였다. Glucose, cholesterol, total protein, triglyceride 분석은 시판되고 있는 kit와 혈액생화학분석기(Express plus system, Bayer, USA)를 이용하여 분석되었다. 혈청 내 lysozyme 활성은 Mohammed et al. (2018)의 방법으로 분석하였다. Myeloperoxidase 활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 방법으로 분석하였다. Total immunoglobulin 함량은 Siwicki and Anderson (1993)의 방법으로 분석하였다(Fig. 25).



Figure 25. Blood analysis for Atlantic bluefin tuna

3.2.7 분수집

실험사료는 분 수집 6시간 전에 반복공급 하였고, 실험수조에 수용되어있던 실험어를 가두리에 가두어 포획한 후 2-phenoxyethanol 용액(200 ppm)으로 마취시켰다. 적출된 소화기관에서 중장부터 후장까지의 분을 수집하였다. 분 샘플은 초저온냉동고(-70°C)에 보관 후 동결건조하였다(Fig. 26).

3.2.7 수질측정

Chapter 1과 동일하게 진행되었다.



Figure 26. Collecting digestive feces of Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus*

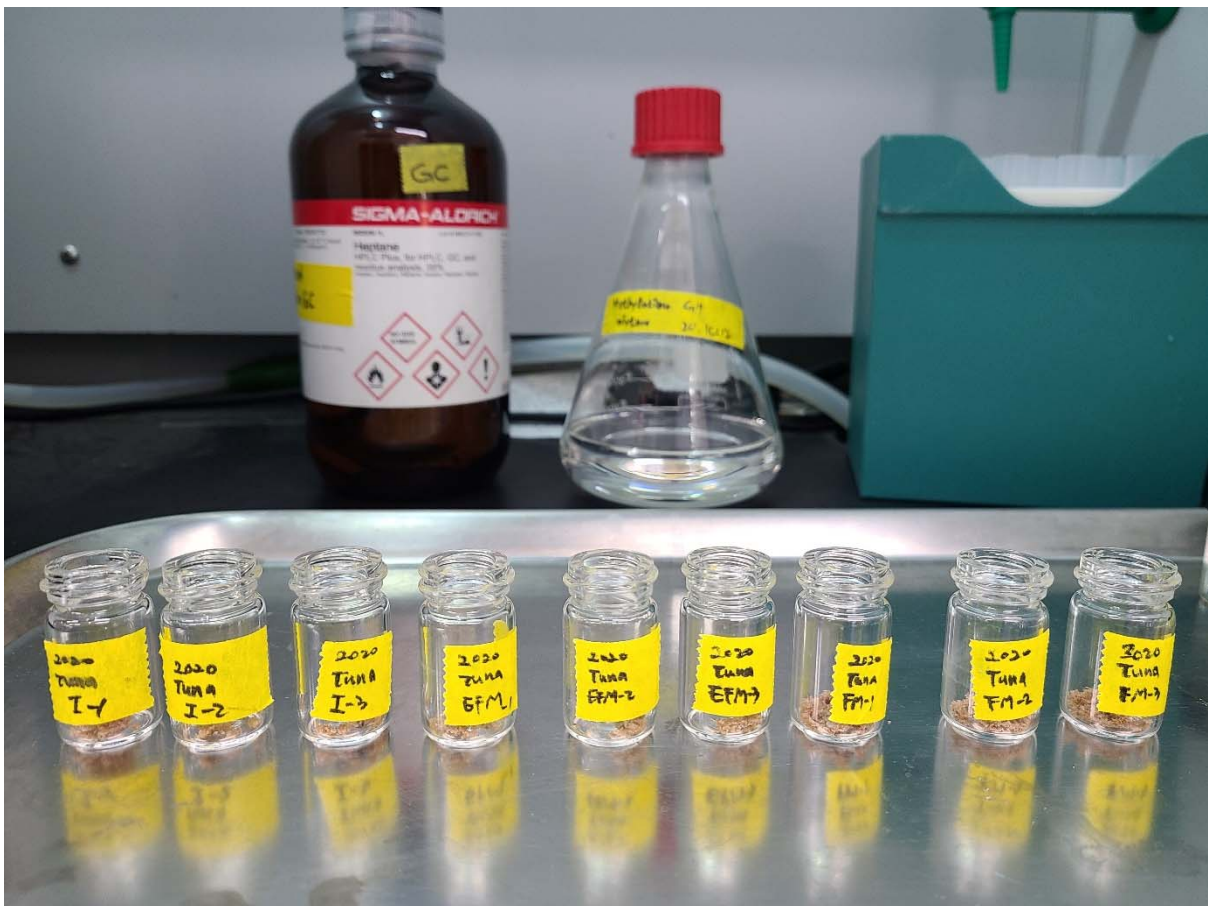


Figure 27. Sample for analysis of fatty acid composition

3.2.8 지방산

Chapter 1과 동일하게 진행되었다(Fig. 27).

3.2.9 조직 관찰

간 조직을 bouin's solution (Sigma Aldrich, MO, USA)에 24 시간 침지한 후 70% ethanol 에서 보관하였다. Paraffin block 제작은 70% ethanol 에 보관된 조직을 embedding 용 카세트에 담아 준비하였다. Paraffin block 을 제작하기 전 각 조직에 paraffin (Sigma Aldrich, MO, USA)을 침투시키기 위해 embedding 과정을 진행하였다. 조직이 담긴 카세트를 70%-100% ethanol 순서로 각 1 시간씩 침지하고, xylene 을 2 단계로 각 1 시간씩 침지하였다. 미리 가열하여 녹은 paraffin 을 2 단계로 각 1 시간씩 침지한 다음 paraffin block 을 제작하였다. 조직염색 전 제작된 paraffin block 을 microtome 을 이용하여 5 μ m 두께로 잘라 슬라이드에 부착하였다. Xylene 에 슬라이드를 침지시켜 탈파라핀 과정을 진행하였고, 100-70% ethanol 에 침지하여 흡수과정을 진행하였다. Hematoxyline (Dako, CA, USA) 염색은 조직에 따라 90-110 초간 염색하였고, 흐르는 물에 수세 후 eosin (Sigma Aldrich, MO, USA)에 5 초간 염색하였다. 이후 70-100% ethanol 에 침지하여 탈수과정을

진행하였고, xylene 을 이용한 투명화 과정 후 canada balsam (Junsei, Tokyo, Japan)을 사용하여 봉입하였다(Figure 27).

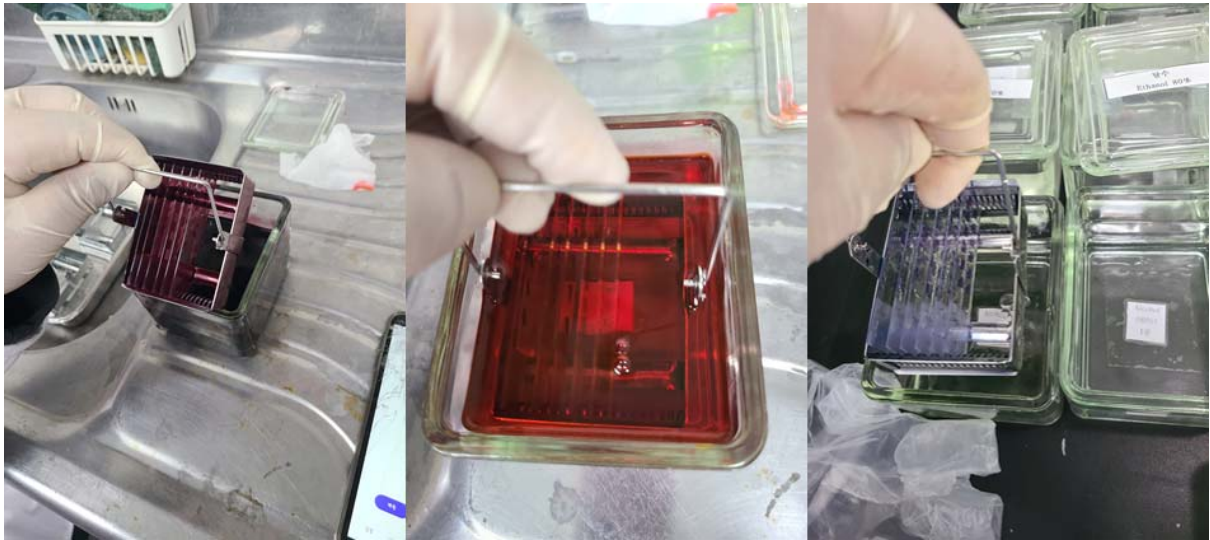


Figure 27. The process of hematoxylin & eosin stain

3.2.10 통계학적 분석

분석결과는 SPSS (Version 24.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석된다. 데이터 값의 유의차는 T-test를 사용하여 평균간의 유의성($P < 0.05$)을 비교하였다. 데이터는 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석하였

3.3 결과

67일간 진행된 사육실험의 결과, 실험어의 성장률은 실험구(56.1%)가 대조구(56.5%)와 유사하였다. 일간성장률은 대조구가 0.67%로, 실험구(0.66%)와 유사하였다. 사료전환효율은 실험구(1.62)가 대조구(2.06) 보다 21% 높았다. 사료섭이량은 실

험구(1331 g)가 대조구(1551 g)보다 14% 낮았다. 단백질이용효율은 실험구가 0.96으로 대조구(0.67)보다 30% 높았다. 생존율은 실험구(66.7%)가 대조구(38.5%)에 비해 높았다(Table 26, Fig28).

49일(실험 1-49일차) 동안의 사료섭이량은 대조구(823 g)가 실험구(682 g) 대비 18% 많이 섭취하였다. 18일(실험 50-67일차)의 사료섭이량은 대조구(684 g)가 실험구(648 g) 대비 6% 차이가 나타났다(Table 30, Fig 28).

실험어의 일반성분(조지질, 조단백질, 조회분, 수분) 조성은 대조구와 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다(Table 27, Fig 29). 지방산 함량 분석결과, oleic acid의 함량은 대조구(28.7%)가 실험구(25.4%)에 비해 유의적으로 높았다. Arachidonic acid, EPA, DHA의 함량은 실험구(6.85%, 6.41%, 12.4%)가 대조구(5.56%, 5.18%, 9.98%)보다 유의적으로 높았다(Table 31, Fig 34).

실험어의 내장중량지수는 실험구(5.87%)가 대조구(6.5%)에 비해 9.7% 높았다(Table 28, Fig. 30). 실험어의 간중량지수는 실험구(4.40%)와 대조구(4.27%)사이에 유의적인 차이가 없었다. 실험어의 위중량지수는 FM구가 대조구에 비해 유의적으로 낮았다. 실험어의 장중량지수와 비만도는 대조구와 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다.

간 조직 관찰결과 간세포와 세포 내 지방 축적량을 비교한 결과 대조구와 실험구 사이에 유의적인 차이는 없었다(Table 32, Fig 35-43).

실험어 혈액 내 hematocrit (%)은 실험구가 29.9%로 대조구(25.5%)에 비해 다소 높은 경향을 보였다(Table 29, Fig. 33). Hemoglobin (g/dL)의 농도는 대조구(10.3)와 실험구(10.4)의 결과가 유사하였다. Glucose (g/dL)의 농도는 실험구(100.1)가 대조구

(106.3)에 비해 5.8% 높았다. Cholesterol (g/dL)의 농도는 대조구(200.6)와 실험구(194.9)로 대조구가 5.7 높았다. Total protein (g/dL)의 농도는 대조구가 4.68로, 실험구(4.75)와 유사하였다. Triglyceride (mg/dL)의 농도는 대조구(240.2), 실험구(244.5)으로 실험구가 4.3 높았다. Lysozyme ($\mu\text{g/mL}$)의 활성은 실험구가 74.1로, 대조구(65.1)와 비교하여 12% 높았다. Total immunoglobulin (mg/mL)의 활성은 FM구가 대조구(98.2)에 비해 유의적으로 높았다.

Table 26. Growth performance, feed utilization and survival of juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 67 days

Treatment	EFM	FM
FBW¹ (g)	2032	2283
WG² (%)	56.5	56.1
SGR³ (%)	0.67	0.66
FCR⁴	2.06	1.62
PER⁵	0.76	0.96
FI⁶ (g)	1508	1331
Survival (%)	38.5	66.7

¹Final body weight

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

³Specific growth rate = 100 x [ln(final body weight) – ln(initial body weight)] / days

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

⁵Protein efficiency ratio = fish weight gain (g) / protein

⁶Feed Intake (g / fish) = dry feed consumed (g) / fish

EFM: enzyme treated fish meal, FM: fish meal

Table 27. Proximate composition of juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 67 days (% of wet basis)

Treatment	EFM	FM
Crude protein	18.4±0.47	19.0±0.11
Crude lipid	10.2±0.39	10.4±0.47
Crude ash	2.24±0.15	2.46±0.39
Moisture	68.1±0.35	67.7±0.27

Values are mean of duplicate groups and presented as mean ± SD. Values in the same column having different letters are significantly different (T-test; P < 0.05). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

EFM: enzyme treated fish meal, FM: fish meal

Table 28. Biological assessment of digestive organs and condition factor of Atlantic bluefin *Thunnus thynnus* tuna fed the experimental diets

Treatment	EFM	FM
VSI ¹ (%)	6.50±1.72	5.87±0.63
HSI ² (%)	4.27±0.91	4.40±0.49
SSI ³ (%)	1.63±0.83 ^a	0.83±0.15 ^b
ISI ⁴ (%)	0.43±0.12	0.43±0.11
CF ⁵	1.51±0.16	1.41±0.08

Values are mean of duplicate groups and presented as mean ± SD. Values in the same column having different letters are significantly different (T-test; P < 0.05). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

¹Viscerasomatic index = (viscera weight x 100) / fish body weight

²Hepatosomatic index = (liver weight x 100) / fish body weight

³Stomachsomatic index = (stomach weight x 100) / fish body weight

⁴Intestinesomatic index = (intestine weight x 100) / fish body weight

⁵Condition factor = (fish body weight / fish body length³)x100

EFM: enzyme treated fish meal, FM: fish meal

Table 29. Hematological parameters and innate immune responses of juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 67 days

Treatment	EFM	FM
Hematocrit (%)	25.5±0.71	29.9±4.56
Hemoglobin (g/dL)	10.3±1.10	10.4±3.55
Glucose (mg/dL)	106±23.9	100±20.5
Cholesterol (mg/dL)	201±46.3	195±22.2
Total protein (g/dL)	4.68±0.99	4.75±0.80
Triglyceride (mg/dL)	240±78.3	245±91.9
Lysozyme (µg/mL)	65.1±12.0	74.1±23.7
Total immunoglobulin (mg/mL)	98.2±16.0 ^b	126±23.1 ^a
Myeloperoxidase (absorbance)	1.65±0.00	1.65±0.01

Values are mean of duplicate groups and presented as mean ± SD. Values in the same column having different letters are significantly different (T-test; P < 0.05). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

EFM: enzyme treated fish meal, FM: fish meal

Table 30. Feed intake of Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 49 days (Exp-1) and 18 days (Exp-2)

Treatment	EFM	FM
FI¹ of 49 days (g)	823	682
FI of 18 days (g)	684	648

EFM: enzyme treated fish meal, FM: fish meal
¹Feed intake

Table 31. Fatty acid composition of Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* carcass fed the experimental diets for 67 days

Ingredients	EFM	FM
C14	2.65±0.04	2.84±0.09
C16	16.7±0.16	16.1±0.19
C16:1	5.06±0.06	5.65±0.01
C18	6.64±0.49	5.58±0.13
C18:1n9(OA)	28.7±0.06 ^a	25.4±0.14 ^b
C18:2n6(LA)	9.40±0.36 ^a	7.86±0.04 ^b
C18:3n3(LNA)	10.1±0.02	10.9±0.15
C20:4n6(ARA)	5.56±0.13 ^b	6.85±0.08 ^a
C20:5n3(EPA)	5.18±0.07 ^b	6.41±0.07 ^a
C22:6n3(DHA)	9.98±0.36 ^b	12.4±0.14 ^a

EFM: enzyme treated fish meal, FM: fish meal

Table 32. Hepatocyte and hepatocyte lipid droplet degree length of Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus*

Treatment	EFM	FM
Hepatocyte (μm)	4.245 \pm 0.378	4.110 \pm 0.438
Hepatocyte lipid droplet (μm)	7.125 \pm 0.182	7.438 \pm 1.007

EFM: enzyme treated fish meal, FM: fish meal

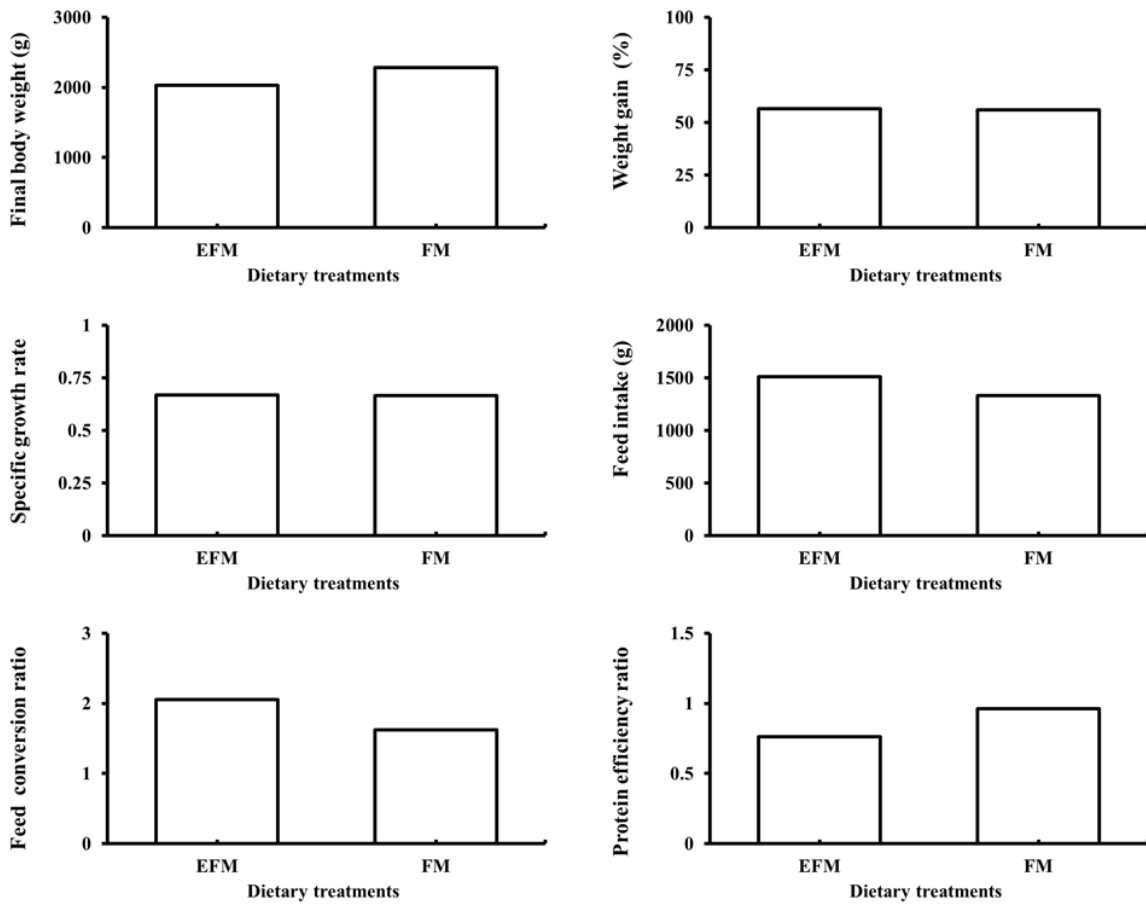


Figure 28. Growth performance, feed utilization and survival of juvenile Atlantic bluefin tuna fed the experimental diets for 67 days

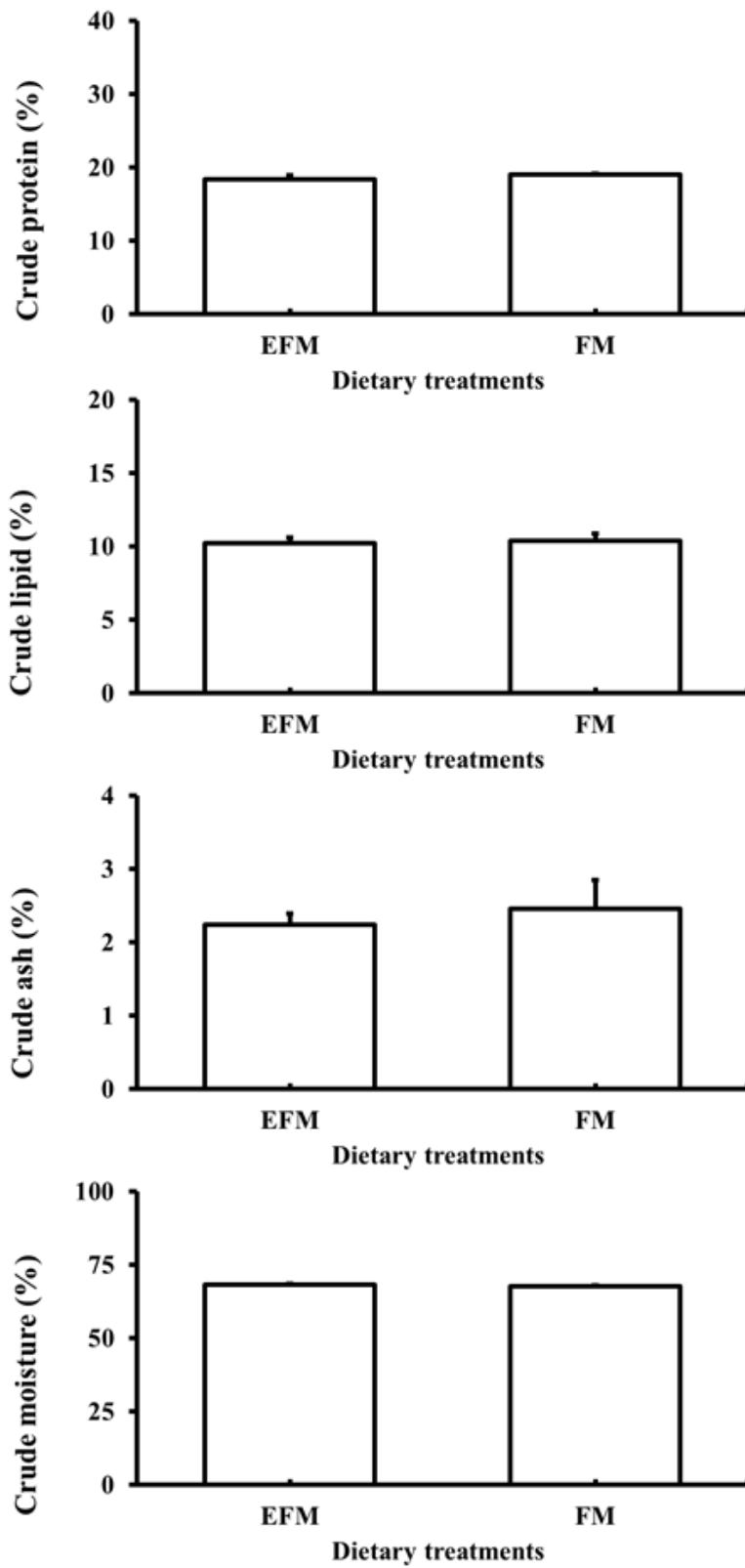


Figure 29. Proximate composition of juvenile Atlantic bluefin tuna fed the experimental diets for 67 days

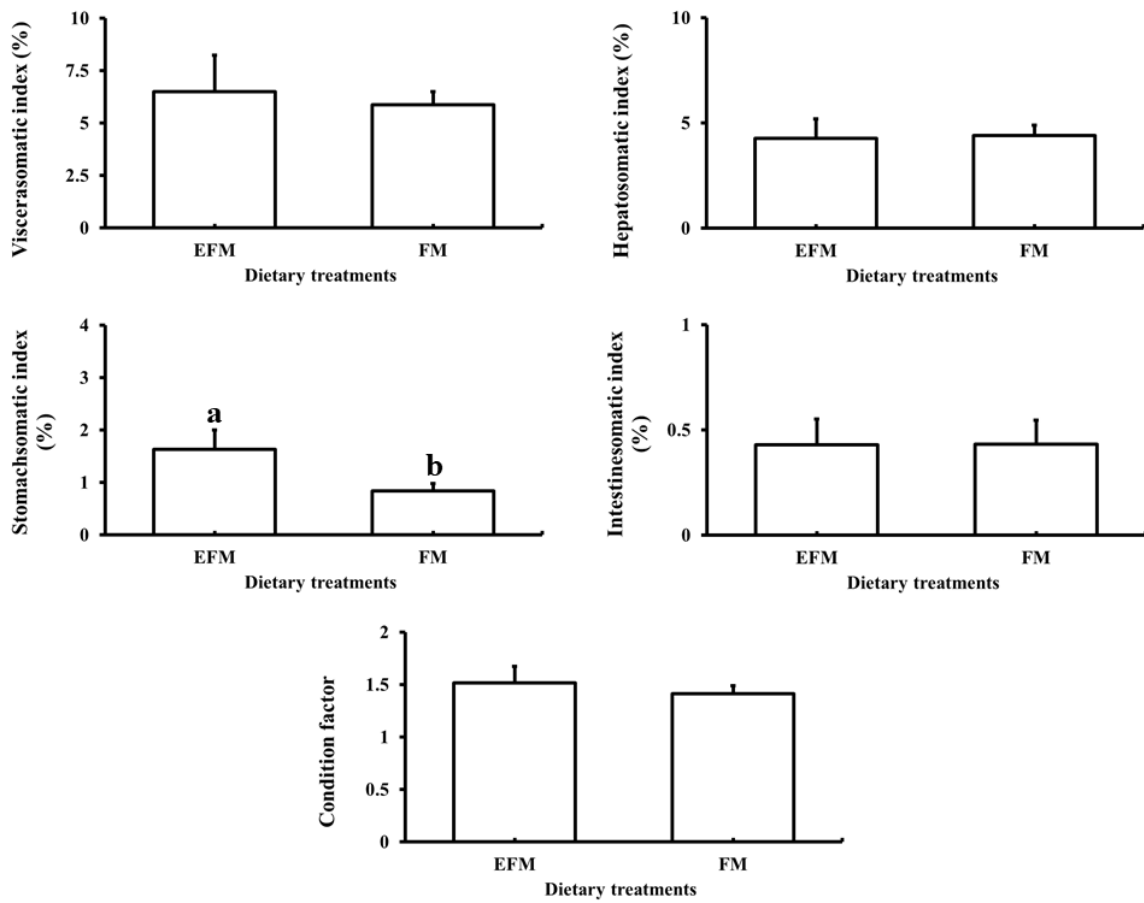


Figure 30. Biological assessment of digestive organs and condition factor of juvenile bluefin tuna fed the experimental diets for 67 days

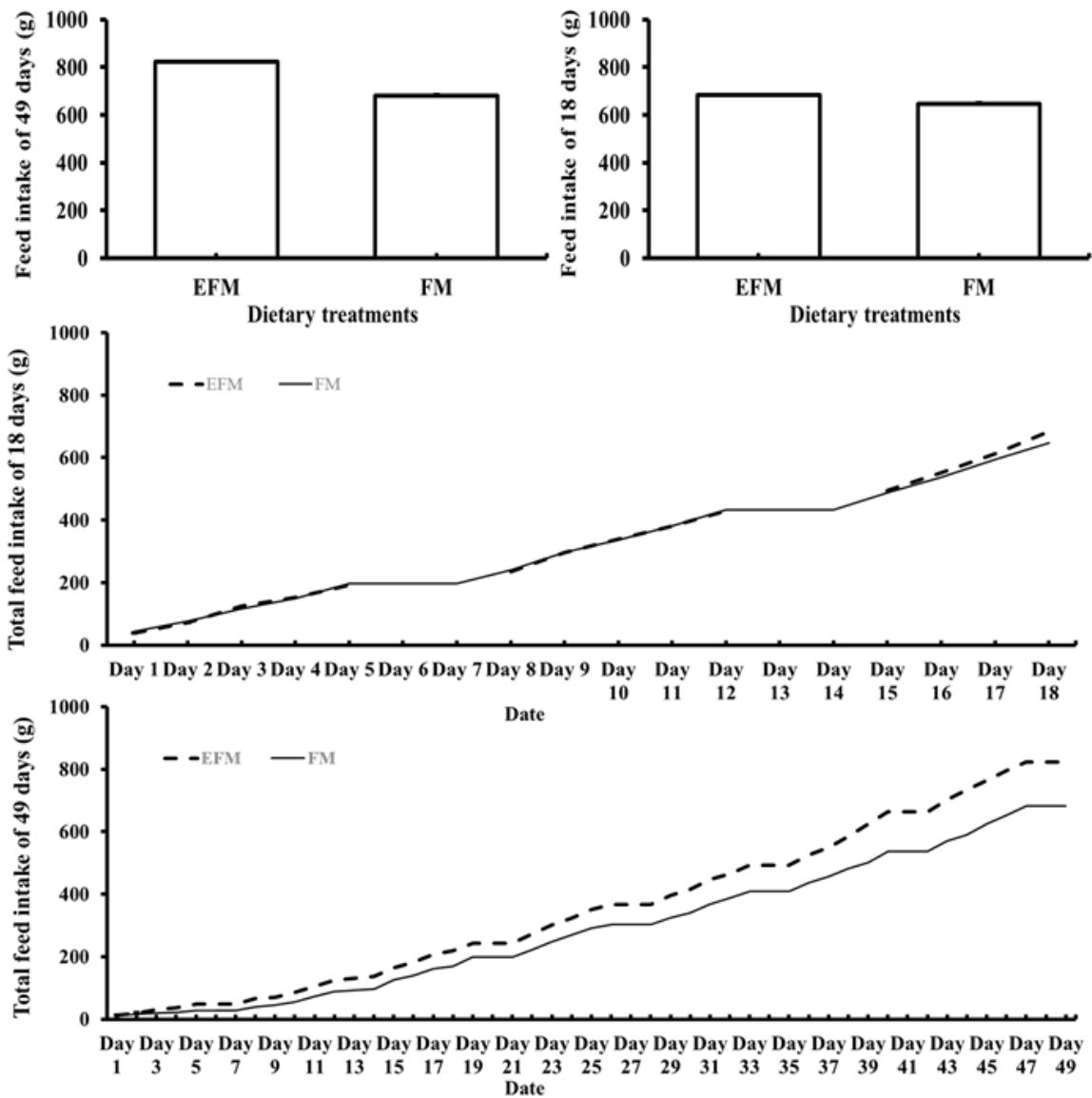


Figure 31. Feed intake and total feed intake of Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 49 days (Exp-1) and 18 days (Exp-2)

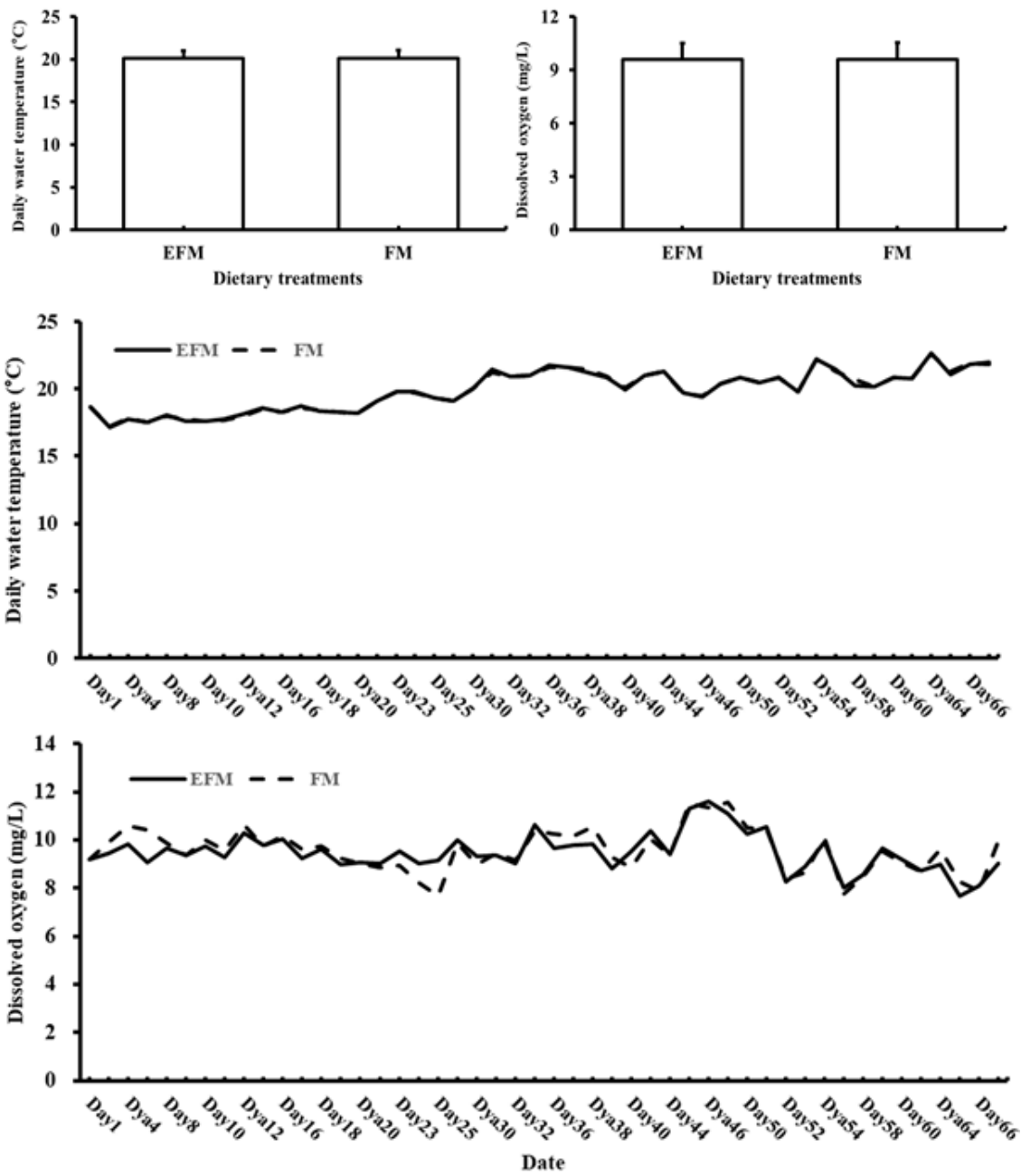


Figure 32. Daily water temperature and dissolved oxygen

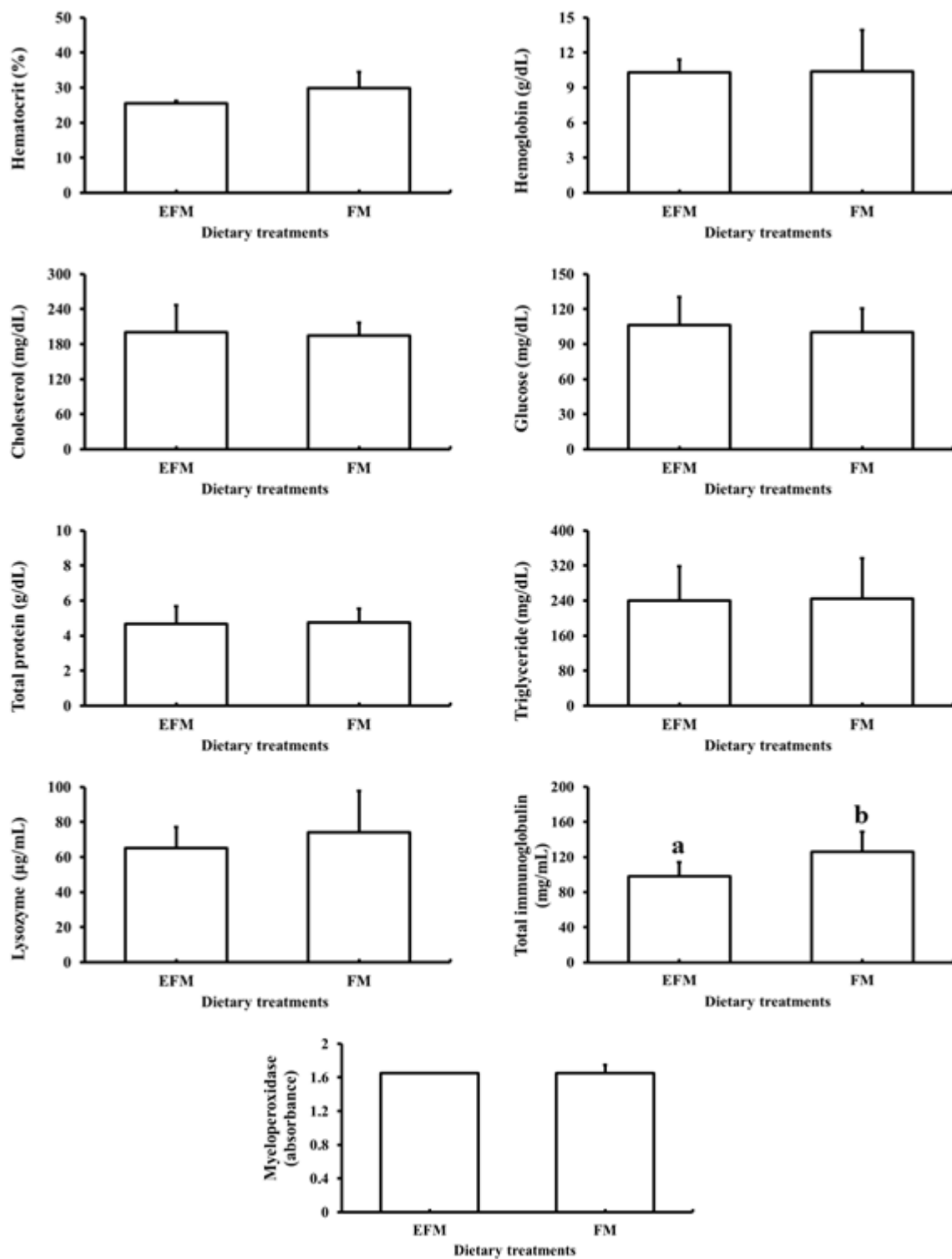


Figure 33. Blood analysis of Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 67 days

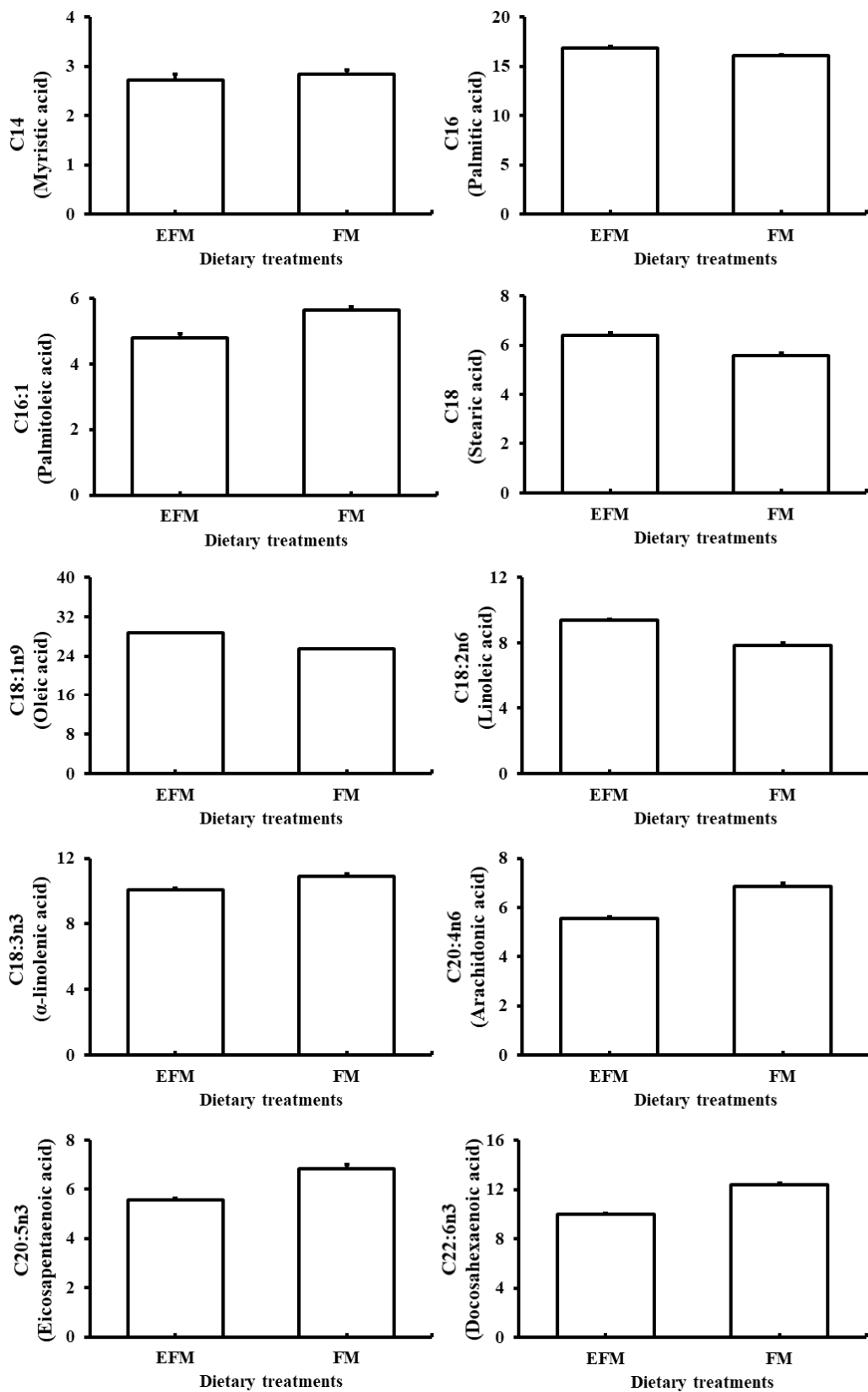


Figure 34. Fatty acid composition of Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* carcass fed the experimental diets for 67 days

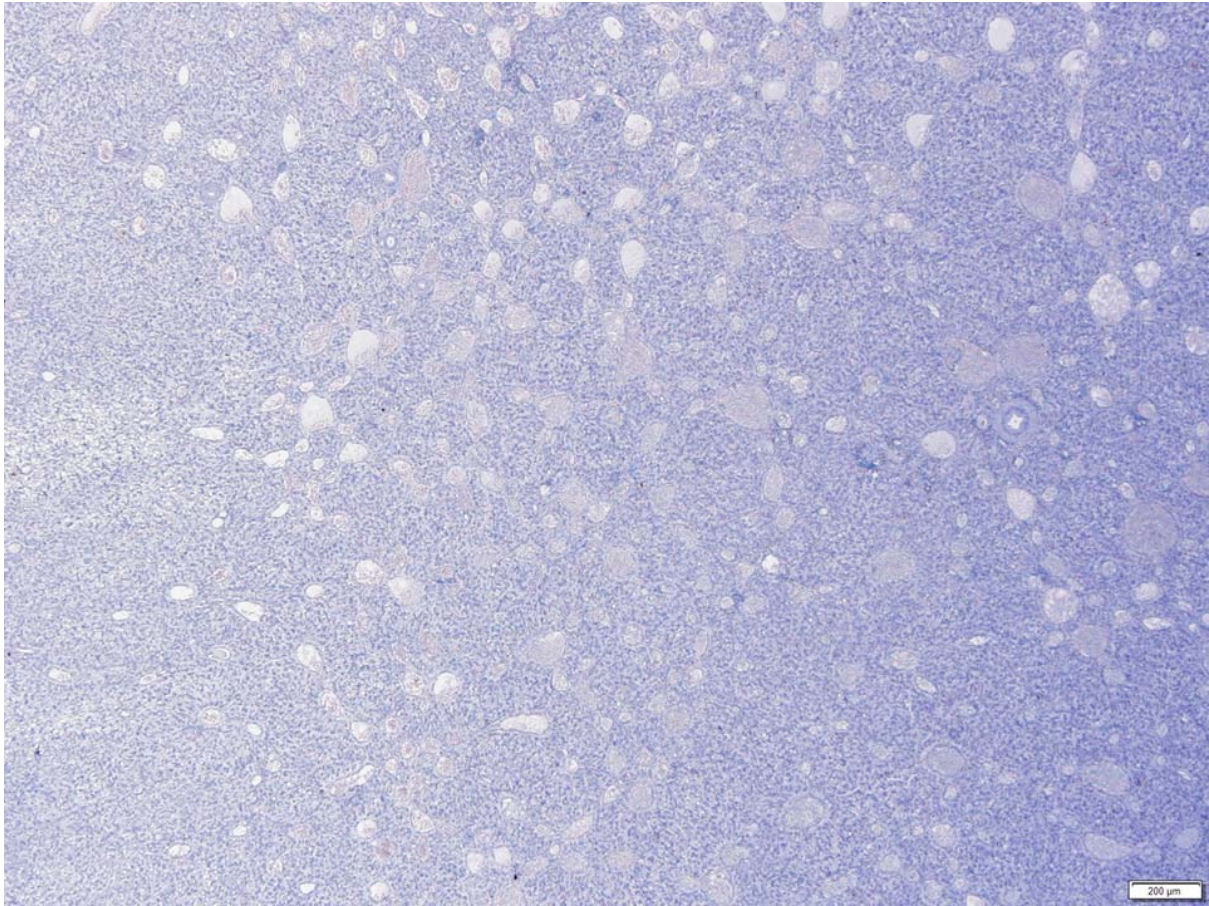


Figure 35. Liver tissue of Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the EFM diets for 67 days
(x40)

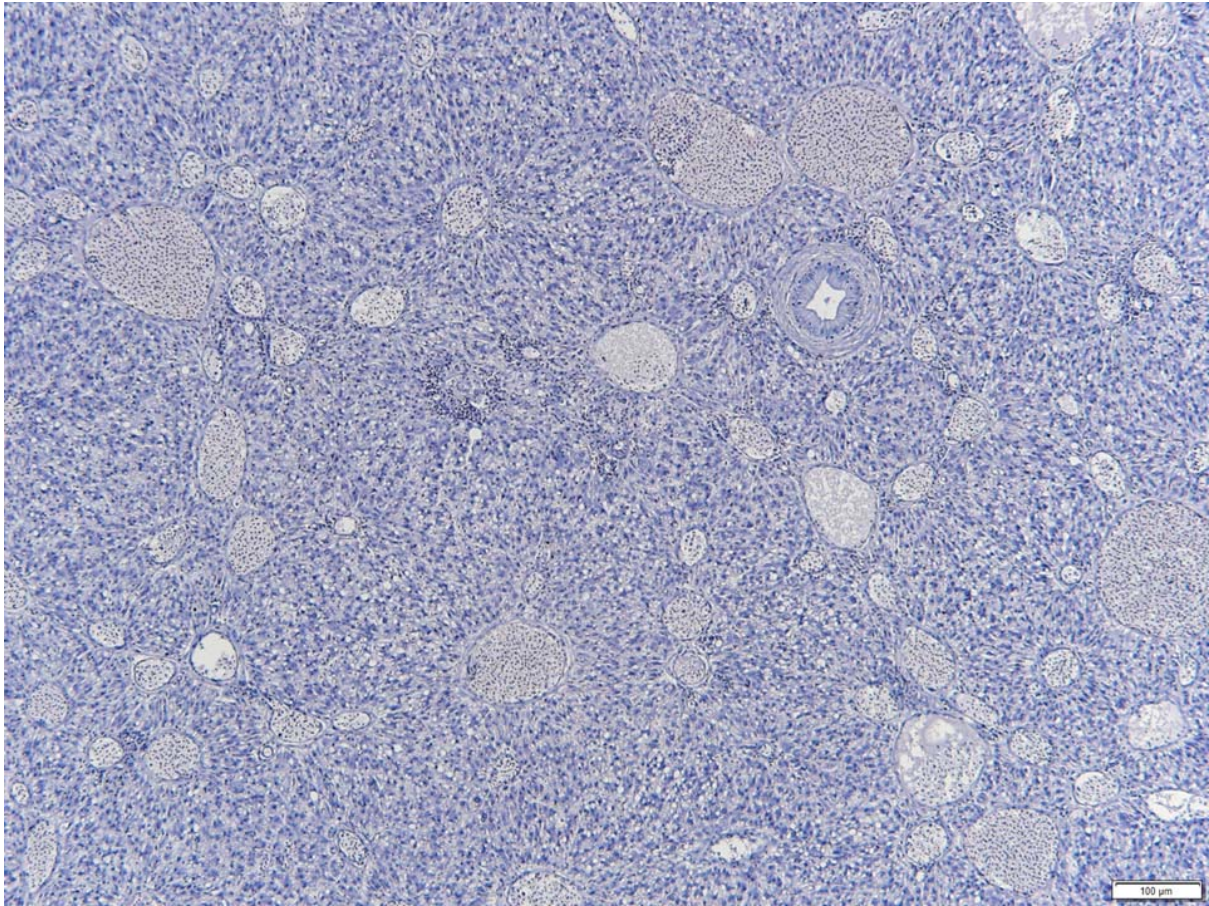
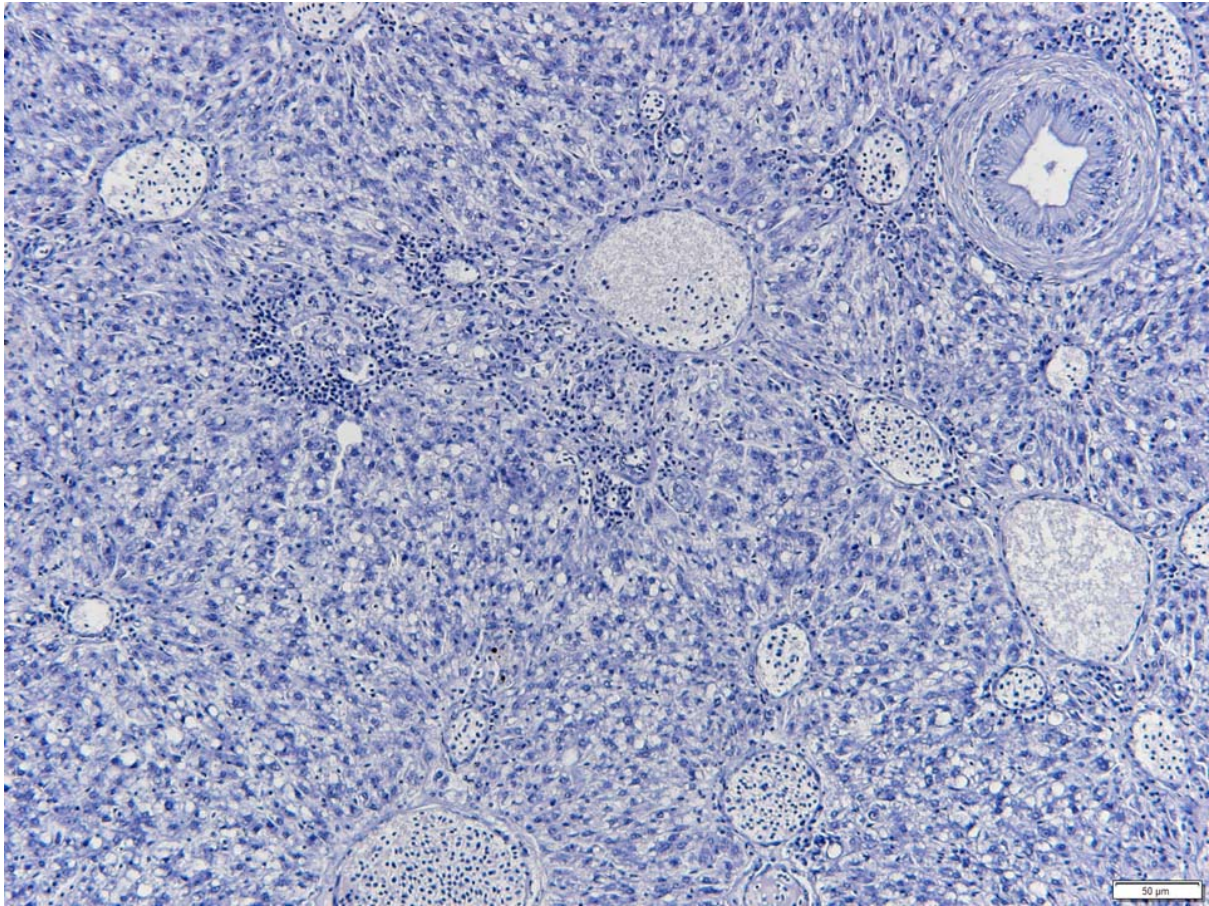


Figure 36. Liver tissue of Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the EFM diets for 67 days
(x100)



Figur 37. Liver tissue of Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the EFM diets for 67 days (x200)

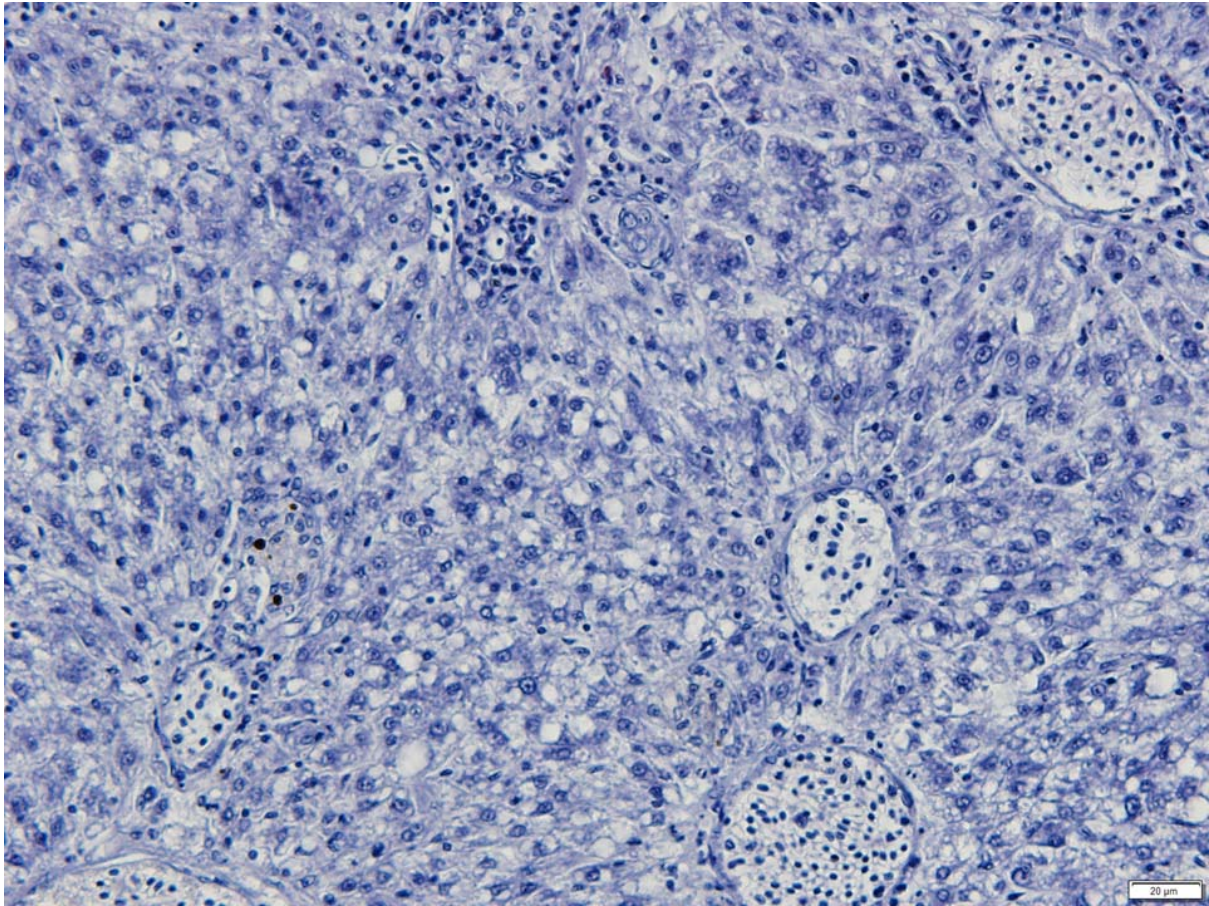


Figure 38. Liver tissue of Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the EFM diets for 67 days
(x400)

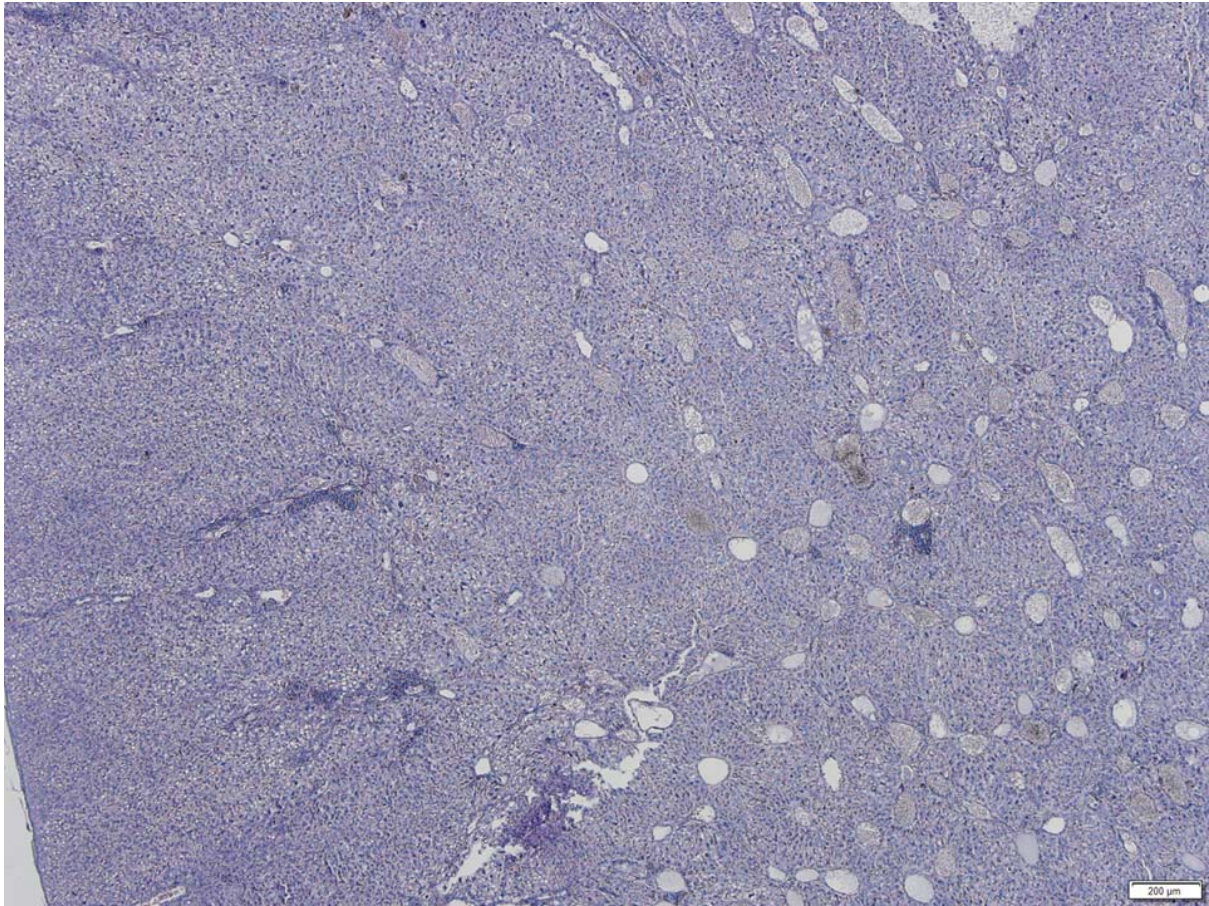


Figure 39. Liver tissue of Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the FM diets for 67 days
(x40)

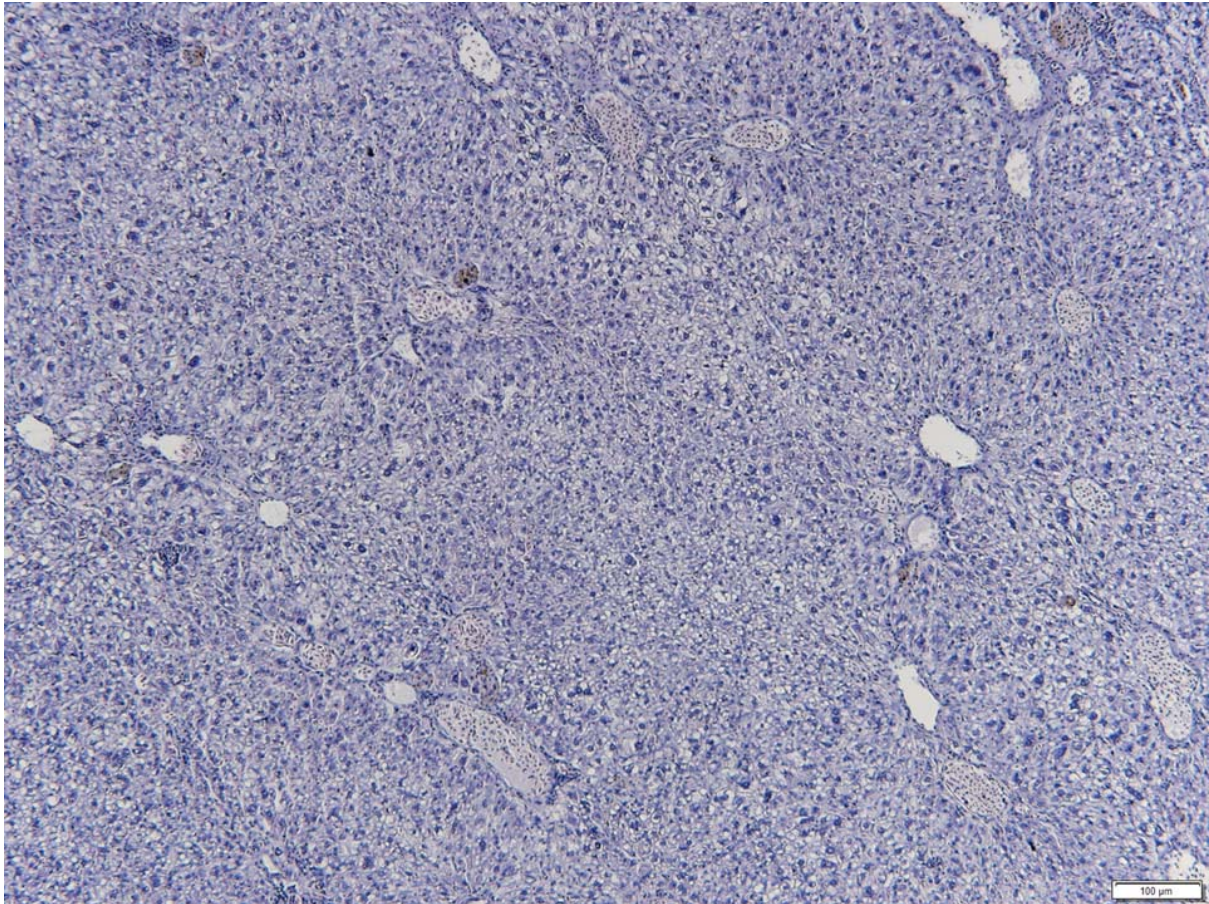


Figure 40. Liver tissue of Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the FM diets for 67 days (x200)

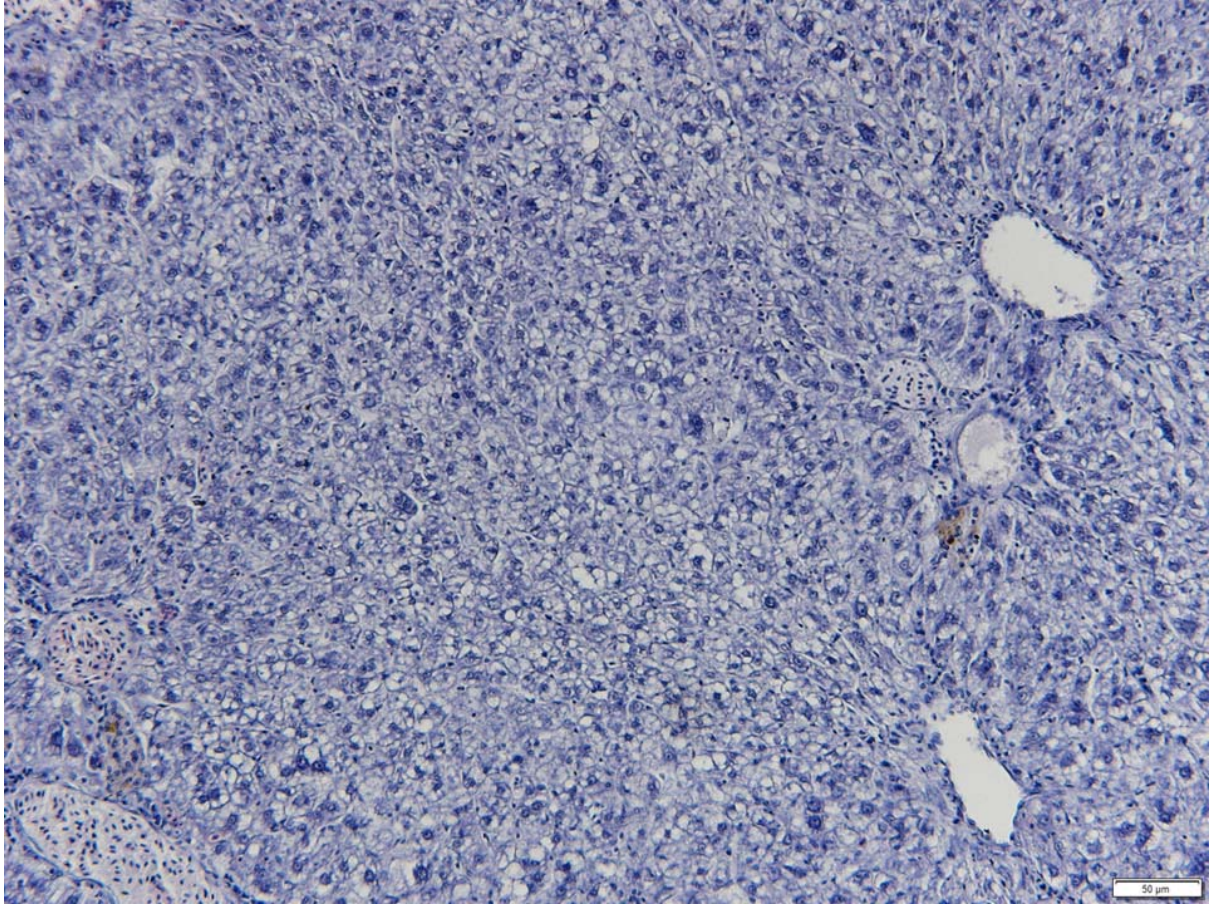


Figure 41. Liver tissue of Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the FM diets for 67 days (x200)

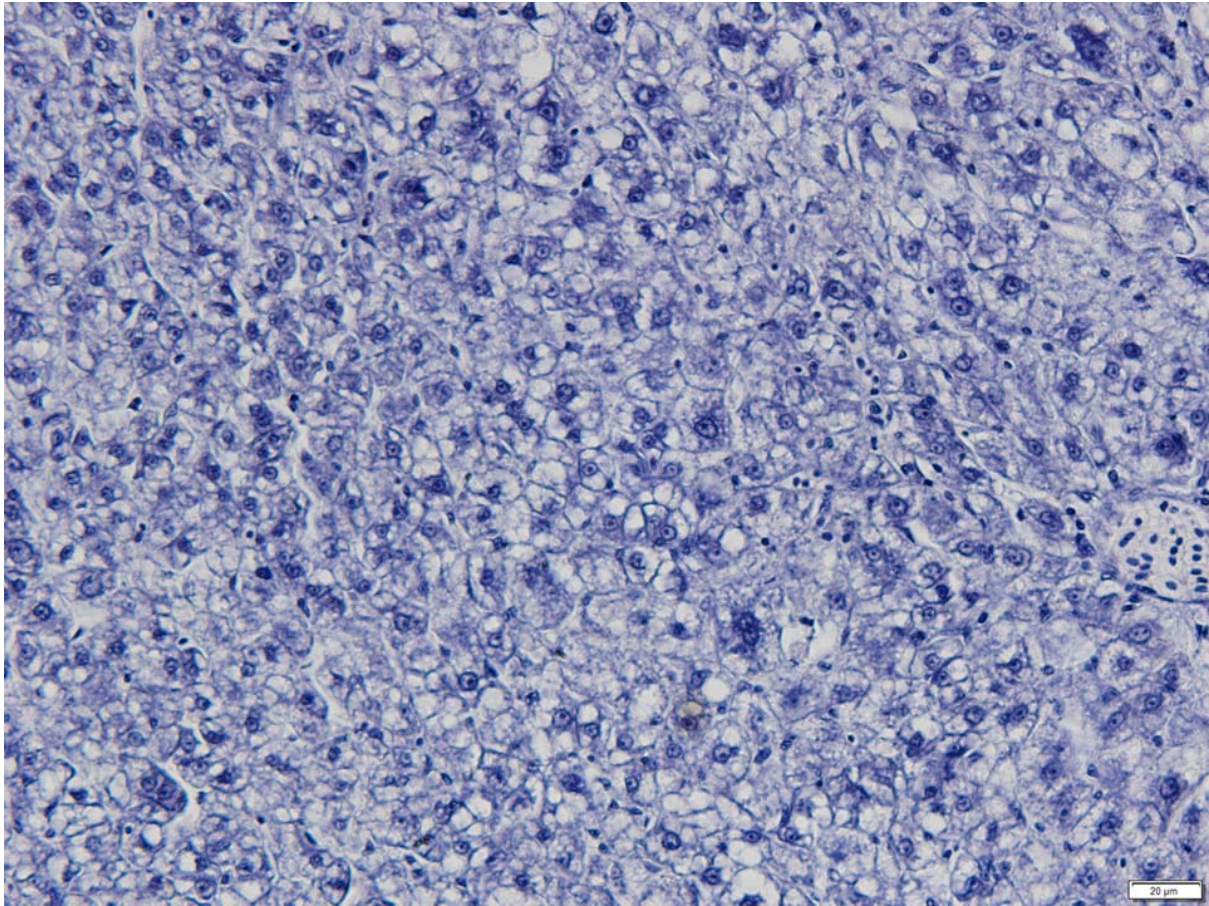


Figure 42. Liver tissue of Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the FM diets for 67 days (x400)

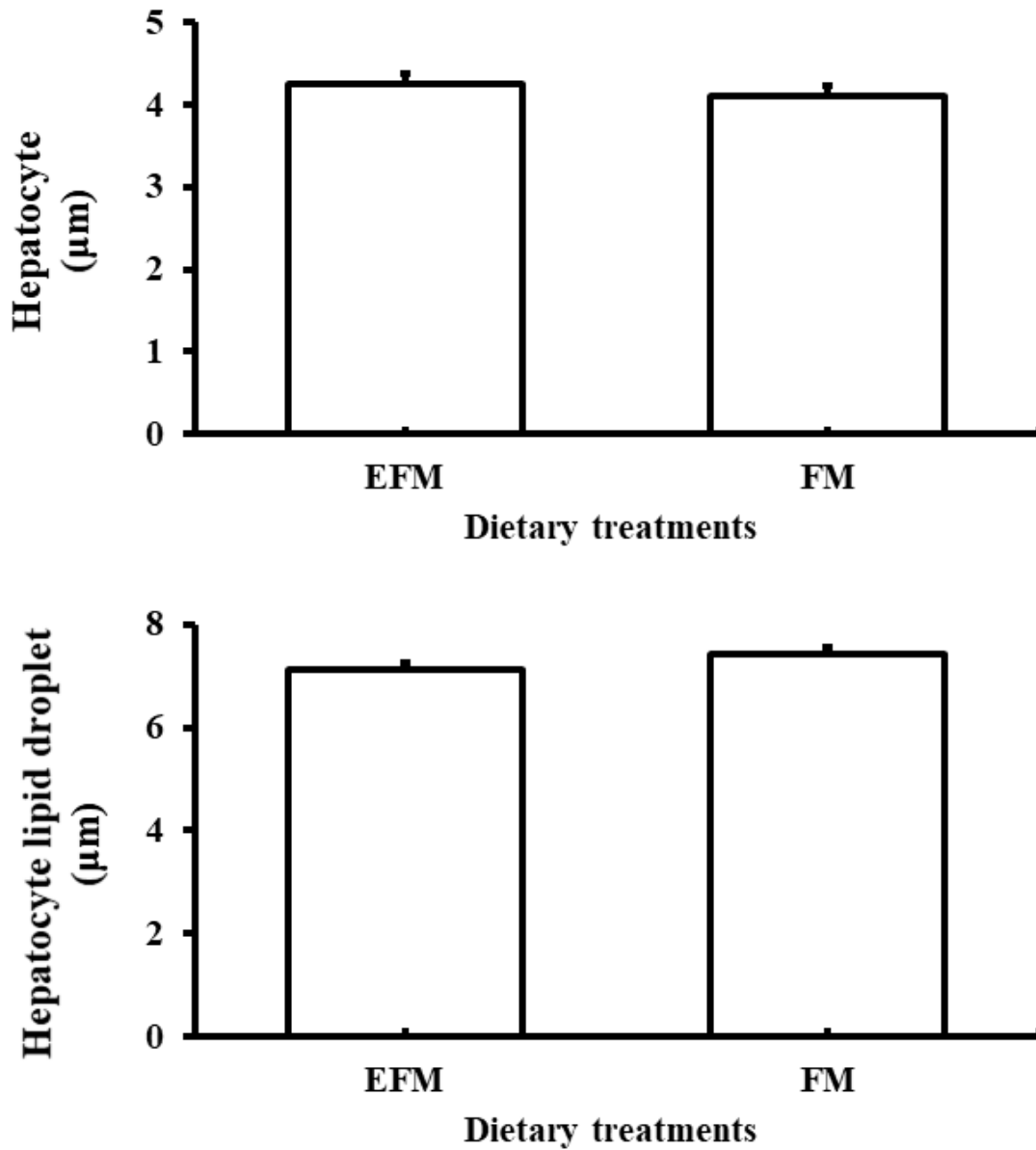


Figure 43. Hepatocyte and hepatocyte lipid droplet degree length of Atlantic bluefin tuna

Thunnus thynnus

고찰

참다랑어는 빛, 진동 등의 외부자극에 민감해 사육실험의 생존율이 다른 어류에 비해 낮게 나타난다(Miyashita, 2002). 과거 진행된 참다랑어를 대상으로한 연구에서 실험초기 3일 이내에 실험어의 14-19%의 어류가 실험어를 실험용 수조로 옮기는 동안에 발생하는 스트레스로 인하여 폐사하였다고 보고되었다(Biswas et al., 2016). 또한 참다랑어는 유영속도의 빠른 발달로 인해 수조에 충돌하여 폐사가 발생한다고 보고되었다(Ishibashi et al., 2009).

Chapter 1과 Chapter 2의 참다랑어 생존율(37-64%)은 낮았지만, 이전의 참다랑어 연구에서도 낮은 생존율을 보여 사육실험에는 특별한 문제가 없었던 것으로 판단된다(Ji et al., 2019; 2020).

참다랑어 사료 내 효소처리어분의 이용가능성을 평가한 연구는 일부 진행되었다(Ji et al., 2019; 2020). 효소처리어분은 저분자 단백질의 함량이 일반어분에 비해 높은 것으로 알려져 있다(Aguila et al., 2007). 본 연구에서 이용성이 검증된 효소처리정어리어분을 대신하여 분자량이 낮은 킬라피아 가수분해물을 사용한 사육실험 결과, 킬라피아 가수분해물은 효소처리정어리어분에 비해 이용효율이 현저히 낮은 것으로 나타났다. 분자량이 낮은 킬라피아 가수분해물의 이용성이 낮은 이유는 아미노산 및 지방산 조성에 의한 것으로 예상된다. 또한 본 실험에 사용된 효소처리어분(CPSP, France)은 농어(*Dicentrarchus labrax*), 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*), 대서양연어(*Salmo salar*) 사료에서도 이용효율이 높은 것으로 보고되었다(Langar, 1992; Gomes et al., 1995; Berge and Storebakken, 1996). 효소처리어분의 종류는 가공공정과 사용되는 어종에 따라 다양하다(Kristinsson and Rasco, 2000). Ji et al. (2008)은 참다랑어 치어를 대상으로 한 연구에서 효소처리전갱이어분이 효소처리멸치어분에 비해 전반적으로 이용효율이 높았다고 보고하였다. 단백질의 평균 분자량에서는 효소처리전갱이어분(100-500 Da)이 효소처리멸치어분(5000 Da)에 비해 낮았다. 원료를 구성

하는 단백질의 평균 분자량이 낮을수록 어류 체내에서의 이용효율이 높다고 알려져 있다 (NRC, 2011). Ji et al. (2020)은 치어기 참다랑어 사료 내 효소처리어분의 이용성은 저분자 펩타이드(dipeptides and oligopeptides)의 함량이 일반어분에 비해 높기 때문에 성장에 긍정적인 영향을 준다고 보고하였다. 하지만 킬라피아 가수분해물은 펩타이드의 평균분자량이 효소처리정어리어분에 비해 낮음에도 불구하고, 사료 내 주요 단백질원으로 사용할 경우 치어기 참다랑어의 성장과 소화율을 저하시키는 것으로 나타났다. 이것을 통해 펩타이드의 평균 분자량이 낮더라도, 가공처리 방법 및 아미노산조성 등에 따라 사료 내 이용효율이 다르다는 것을 확인하였다.

DHA 는 해산어의 필수지방산으로 어류의 성장과 생존율에 매우 중요하다. 본 연구의 실험사료 내 DHA 유 첨가량은 EFM, THP 구가 3%, LO 구는 DHA 유 2%와 Linseed oil 이 1% 첨가되었다. 실험결과 LO 구의 성장에서는 EFM 구와 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 실험어가 실제로 섭취한 DHA 의 양은 3.09 g (EFM), 2.91 g (THP), 2.74 g (LO)으로, 다른 실험구에 비해 LO 구에서 낮은 함량이 나타났지만, EFM 구와 LO 구의 성장에 유의적인 차이가 없었고 LO 구가 EFM 구 보다 성장이 더 높은 경향을 나타낼 수 있었던 이유는 Linseed oil 에 함유된 Linolenic acid (55%)가 EPA, DHA 로 전환되어 부족한 요구량을 채워주었기 때문이라고 판단된다. 따라서, 치어기 참다랑어(1.15-7.12g) 사료 내 DHA 유(순도: 80%)의 33%는 Linseed oil 로 대체가 가능함을 확인하였다.

참다랑어의 소화효소 활성은 사료의 형태(생사료, 배합사료)에 영향을 받으며, 치어기 참다랑어의 경우 생사료를 급이할 경우 pepsin 과 lipase 의 활성이 배합사료를 공급한 실험구보다 높았다고 보고되었다(Ji et al., 2019). Ji et al. (2020)은 실험구간에 소화효소 활성에 차이가 나타났으나, 생사료구와 배합사료구의 성장률이 유사하여 성장에 필요한 최소한의 효소활성은 모두 충족되었다고 보고하였다. 본 연구에서는 실험구간 소화효소 활성도는 유의적인 차이가 없었다. 따라서, 킬라피아 가수분해물과 Linseed oil 은 배합사료를 사용함에 있어 소화효소 활성도에 영향이 없다고 판단된다.

Chapter 2에서는 대서양 참다랑어(1.2-1.5kg)를 대상으로 사육실험을 진행한결과, Chapter 1을 통해 제시한 배합비의 아미노산과 DHA 유 100%를 일반어유인 명태간유로 대체하여도 전혀 문제가 없음을 확인하였다. 하지만 DHA 유를 명태간유로 대체할 경우, 사료섭이량이 조금 떨어질 수 있을 것으로 보인다. 사료 내 적절한 함량의 DHA 유 첨가는 참다랑어의 사료섭이량 증진에 도움을 줄 수 있다고 생각되며 후속연구를 통해 자세한 규명이 필요하다고 사료된다. 참다랑어 사료 내 효소처리어분의 50%까지 일반어분(정어리)로 대체하여도 소화효소 활성과 소화율의 저하가 전혀 나타나지 않았다. 대서양 참다랑어(1.2-1.5kg)의 소화효소의 발현이 충분하였기 때문에 일반어분을 사용하여도 전혀 문제가 없었던 것으로 판단된다. 흥미롭게도 일반어분(정어리)과 일반어유의 사용은 참다랑어의 건강도와 비특이적 면역력 증진에 간접적으로 도움을 줄 수 있다고 사료된다.

대서양 참다랑어 배합사료는 필수로 요구되는 DHA (docohexaenoic acid)를 충족하기 위해 DHA 유를 추가로 첨가해준다. 지방산 분석결과 일반어분(정어리)의 EPA, DHA 함량은 효소처리어분보다 월등히 높은 것으로 나타났다. 사료 내 효소처리어분을 일반어분으로 대체할 경우, 부족한 DHA 를 간접적으로 보충할 수 있기 때문에 일반어분의 사용은 향후 긍정적인 것으로 판단된다.

대서양 참다랑어는 실험어의 확보와 실험어를 사육할 수 있는 적합한 환경의 사육시설을 확보하는데 많은 어려움이 있다. 따라서 반복구의 확보에 어려움이 있었으나, 본 연구에서는 이러한 부분을 보완하기 위해 실험어의 체내에 생체칩을 접종하여 개체별 세부 데이터를 확보하였다. 이러한 방식의 연구는 국내에서는 거의 최초로 진행되었다. 향후 진행되는 연구에서 생체칩을 통한 개체 별 데이터의 확보는 연구의 신뢰도를 상승시키는 중요한 자료가 될 것으로 사료된다.

참고 문헌

- Association of Official analytical chemists (AOAC). 2000. Official methods of analysis. 17th edition. Washington, DC, USA.
- Barnett BJ, Cho CY and Slinger SJ. 1982. Relative biopotency of dietary ergocalciferol and cholecalciferol and the role of and requirement for vitamin D in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). The Journal of nutrition, 112(11), 2011-2019.
- Biswas A, Nakajima M, Nakao T, Takaoka O and Takii K. 2016. Determination of suitable protein and lipid levels in diets for Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* at grow-out stage. Aquaculture Science, 64(3), 281-288.
- Biswas, BK, Ji, SC, Biswas, AK, Seoka, M, Kim, YS, Kawasaki, KI and Takii, K. 2009. Dietary protein and lipid requirements for the bluefin tuna *Thunnus orientalis* juvenile. Aquaculture, 288(1), 114-119.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Carter CG, Bransden MP, Van Barneveld RJ and Clarke SM. 1999. Alternative methods for nutrition research on the southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*: in vitro digestibility. Aquaculture, 179, 57-70.
- Divakaran S, Obaldo, LG and Forster IP. 2002. Note on the methods for determination of chromic oxide in shrimp feeds. Journal of agricultural and food chemistry, 50(3), 464-467.
- Erlanger B, Kokowsky N, Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophys. 95: 271-278.
- Folch, J, Lee, M and Sloane-Stanley, GH. 1959. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem 226, 497-509.
- Halver JE. 1972. The vitamins. Pp. 29-103 in Fish Nutrition, J. E. Halver, ed New York: Academic

Press.

Hilton JW, Hodson PV and Slinger SJ. 1980. The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). The Journal of nutrition, 110(12), 2527-2535.

Ji SC, Takaoka O, Biswas AK, Seoka M, Ozaki K, Kohbara J and Takii K. 2008. Dietary utility of enzyme-treated fish meal for juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. Fisheries science, 74, 54-61.

Julshamn K, Andersen KJ, Ringdal O and Brenna J. 1988. Effect of dietary copper on the hepatic concentration and subcellular distribution of copper and zinc in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Aquaculture, 73(1-4), 143-155.

Ketola HG. 1975. Requirement of Atlantic salmon for dietary phosphorus. Transactions of the American Fisheries Society, 104(3), 548-551.

Krossøy C, Waagbø R, FJELLDAL PG, Wargelius A, Lock EJ, Graff IE and Ørnsrud R. 2009. Dietary menadione nicotinamide bisulphite (vitamin K3) does not affect growth or bone health in first-feeding fry of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture nutrition, 15(6), 638-649.

Kumari J and Sahoo PK. 2005. Effects of cyclophosphamide on the immune system and disease resistance of asian catfish *Clarias batrachus*. Fish Shellfish Immunol 19, 307-316. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.01.008>.

La Roche G, Johnson CL and Woodall AN. 1966. Iodine metabolism in young chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*, Walbaum): I. Thyroidal impairment with the use of ¹³¹I. General and comparative endocrinology, 7(3), 512-524.

Mohammed HH, Brown TL, Beck BH, Yildirim-Aksoy M, Eljack RM and Peatman E. 2018. The effects of dietary inclusion of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product in a commercial catfish ration on growth, immune readiness, and columnaris disease susceptibility. J Appl Aquac 31(3), 193-209. <https://doi.org/10.1080/10454438.2018.1499576>.

Ogino C and Yang GY. 1980. Requirements of carp and rainbow trout for dietary manganese and copper. Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries, 46(4), 455-458.

Robinson EH, Rawles SD, Yette HE and Greene LW. 1984. An estimate of the dietary calcium

- requirement of fingerling *Tilapia aurea* reared in calcium-free water. *Aquaculture*, 41(4), 389-393.
- Sakamoto S and Yone Y. 1978. Requirement of red sea bream for dietary iron-II. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 44, 223-225.
- Satoh S, Tabata K, Izume K, Takeuchi T and Watanabe T. 1987. Effect of dietary tricalcium phosphate on availability of zinc to rainbow trout [*Salmo gairdnerii*]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*.
- Shearer KD. 1989. Whole body magnesium concentration as an indicator of magnesium status in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 77(2-3), 201-210.
- Shiau SY and Hsieh JF. 2001. Quantifying the dietary potassium requirement of juvenile hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *British Journal of Nutrition*, 85(2), 213-218.
- Shimeno S. Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Pp. 181-191 in *Handbook of Nutrition Requirements of Finfish (1991)*, R. P. Wilson, ed. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Siwicki AK and Anderson DP. 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum. *Fish Disease Diagnosis and Prevention Methods*. Wydawnictwo Instytutu Rybactwa Strodładowego, Olsztyn, Poland 105–112.
- Takii, K, Seoka, M, Ohara, N, Nasu, T, Oda, S, Miyashita, S and Hosokawa, H. 2007. Dietary utility of Chilean fish meal and pollack liver oil for juvenile bluefin tuna. *Aquaculture Science (Japan)*.
- Worthington, CC. 1991. *Worthington enzyme manual related Biochemical*. 3rd Edition. Freehold. New Jersey, pp. 38-42.

감사의 글

2년간의 석사기간을 지내며, 스스로의 인생에서 가장 많은 경험을 하고 앞으로의 인생에서 가장 중요한 배움의 과정을 지냈습니다. 이 모든 경험과 가르침의 기회를 주신 이경준 교수님께 감사의 인사를 드립니다. 심사를 위해 시간을 내주신 지승철 박사님, 조정현 박사님께 머리 숙여 감사의 인사를 드립니다.

연구를 진행하는 동안 많은 도움을 주신 김재훈 박사님, 강윤정 선생님께 감사의 인사를 드리며 항상 본인의 연구만큼 최선을 다해서 도와준 연지, 한세에게 감사의 인사를 드립니다.

학부시절부터 함께하며 지치지 않게 도와준 대현이와 세희 그리고 항상 누구보다 조언을 아끼지 않았던 견호야 정말 고맙다. 보이지 않는 곳에서 항상 열심히 도와주는 수혁이와 단비에게 감사의 인사를 드립니다. 재범이형과 현운이형에게 감사의 인사를 남깁니다. 그리고 누구보다 많이 가르쳐주고 도움을 준 재형이형에게 진심이 담긴 감사인사를 드립니다.

마지막으로 저를 위해 항상 대가 없는 사랑과 지원을 아끼지 않은 아버지 어머니 감사드리고 사랑합니다. 저를 도와주신 여러분께 다시한번 감사의 인사를 드립니다.

2022년 01월 06일

임종호 올림.