



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](#)

수산학박사 학위논문

무지개송어 사료 내 어유 대체제로써
미세조류 *Schizochytrium* sp. 의
적용가능성 평가



2020년 2월

부경대학교 대학원

수산생물학과

박철오

수산학박사 학위논문

무지개송어 사료 내 어유 대체제로써
미세조류 *Schizochytrium* sp. 의
적용가능성 평가

The logo of Pukyong National University is a circular emblem. It features a central stylized design with a blue and grey color scheme, possibly representing a compass or a traditional Korean motif. The text "PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY" is written in a light blue font around the top inner edge of the circle, and "부경대학교" is written in a grey font around the bottom inner edge.

지도교수 배 승 철

이 논문을 수산학박사 학위논문으로 제출함

2020년 2월

부경대학교 대학원

수산생물학과

박철오

박철오의 수산학박사 학위논문을 인준함

2020년 2월 21일

주 심

농학박사

김창훈



위 원

이학박사

김종명



위 원

이학박사

백혜자



위 원

수산학박사

손맹현



위 원

영양학박사

배승철



목 차

ABSTRACT	ii
ACKNOLEDGMENTS.....	vii
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES.....	x
제 1 장. 연구배경.....	1
참고문헌	6
제 2 장. 사료 내 미세조류 <i>Schizochytrium</i> sp. 의 첨가수준이 무지개송어의 성장 및 면역력에 미치는 영향	
I. 서론.....	10
II. 재료 및 방법.....	15
III. 결과 및 고찰.....	29
IV. 결론.....	44
참고문헌	45
제 3 장. 사료원 <i>Schizochytrium</i> sp., 어분, 대두박 및 가금부산물의 소화율 분석	
I. 서론.....	51
II. 재료 및 방법.....	52
III. 결과 및 고찰.....	57
IV. 결론.....	63
참고문헌	64
제 4 장. 부록.....	66

Evaluation of dietary micro-algae *Schizochytrium* sp. as a fish oil replacer in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*

Cheol-Oh Park

Department of Fisheries Biology, Graduate School, Pukyong National University

Abstract

The present experiments were conducted to evaluate the dietary micro-algae, *schizochytrium* sp. as a fish oil (FO) replacer in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.

Exp.1: Seven diets were formulated to replace FO at 0% (CON), 20% (T20), 40% (T40), 60% (T60), 80% (T80) and 100% (T100) by using *schizochytrium* sp., and 38% of commercial *schizochytrium* sp. (DSM). Triplicate groups of 20 fish averaging 3 ± 0.4 g (mean \pm SD) were fed one of seven experimental diets. After the 8 weeks of feeding trial, weight gain (WG), specific growth rate (SGR), feed efficiency (FE), and protein efficiency ratio (PER) of fish fed T20 diet were significantly higher than those of fish fed the other diets ($P<0.05$). Fish fed CON had higher WG, SGR, FE, PER than those of fish fed T100 and DSM diets. However, there were no significant differences in WG, SGR, FE, and PER of fish fed CON, T40, T60 and T80 diets. Superoxide dismutase (SOD) activity of fish fed T20 and T40 diets were significantly higher than those of fish fed CON diet. Lysozyme activity of fish fed T20 diet were significantly higher than those of fish fed the other diets ($P<0.05$). However, there were no significant differences in SOD and lysozyme activities among fish fed diets CON, T80, T100 and DSM ($P>0.05$). For 10-days challenge test with pathogenic bacteria (*Lactococcus garvieae* 1×10^8 CFU/ml), cumulative survival rate of fish fed T20 diet were significantly higher than those of fish fed CON, T80, T100 and DSM diets. However there were no significant differences among fish fed T40 and T60 diets. Survival rate, whole-body proximate composition and hematological parameters were not significantly affected by the experimental diets. These results indicated that 20% replacement of FO with *schizochytrium* sp.

could improve growth, non-specific immune responses, and disease resistance in rainbow trout. Also *Schizochytrium* sp. can replace FO up to 80% on growth and non-specific immune responses in rainbow trout.

Exp.2. Apparent digestibility coefficients (ADCs) of dry matter, crude protein and crude lipid in various feed ingredients including *schizochytrium* sp. were determined for rainbow trout. The ingredients consisted of fishmeal, soybean meal, poultry by-product meal, *schizochytrium* sp. produced by CJ Inc. and *schizochytrium* sp. produced by DSM Inc. A reference diet with 0.1% Cr₂O₃ as the inert marker was mixed with test ingredients in a 70:30 ratio to produce a series of test diets. Fish were fed their respective diets and fecal samples were collected by stripping. ADC of ingredients of protein and lipid for rainbow trout ranged from 86.7–98.0% and 24.61–55.3%, respectively. ADC of fishmeal was significantly higher than that of *schizochytrium* sp. for protein ($P<0.05$). However, *schizochytrium* sp. had significant higher ADC of protein than other ingredients ($P<0.05$). ADC of *schizochytrium* sp. for lipid was significantly higher than other ingredients ($P<0.05$). These results indicated that *schizochytrium* sp. can be feed ingredient as lipid source for rainbow trout.

Therefore, it could be concluded that *Schizochytrium* sp. can replace FO up to 80% without any negatively influence on growth, non-specific immune responses and in rainbow trout.

무지개송어 사료 내 어유 대체제로써 미세조류

Schizochytrium sp. 의 적용가능성 평가

박철오

부경대학교 대학원 수산생물학과

요약

본 논문은 무지개송어 사료 내 어유 대체제(Fish oil with Essential fatty acids, FE)로써 미세조류(*Schizochytrium* sp. SC)의 적용가능성을 평가하기 위해 수행되었다. 실험 1은 평균무게 $3.0 \pm 0.4\text{g}$ (mean \pm SD)인 무지개송어 치어를 대상으로 8주간 사육실험을 실시하였다. 실험사료는 상기 미세조류의 어유대체 효과를 검증하기 위해 어유, 미세조류 혼합비율을 FE100%+SC0% (대조구, T₀), FE80%+SC20% (T₂₀), FE60%+SC40% (T₄₀), FE40%+SC60% (T₆₀), FE20%+SC80 (T₈₀), FE0%+SC100% (T₁₀₀)로 설정하였고, 기존 상업용 미세조류 (DSM) 첨가구를 추가하여 총 7가지의 실험사료를 제조하였다. 무지개송어의 성장 및 사료효율에 있어서는 T₁₀₀ 실험구와 DSM실험구가 대조구에 비해 유의적으로 낮은 결과를 나타내었으나($P < 0.05$), 위 두 실험구를 제외한 다른 실험구들 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았으며, T₂₀ 실험구의 경우에는 다른 모든 실험구에 비해 유의적으로 높은 결과를 나타내었다($P < 0.05$). Superoxide dismutase (SOD) 활성 분석 결과에 있어서는 대조구와 T₆₀, T₈₀, T₁₀₀ 및 DSM실험구간에 유의적인 차이를 보이지 않았으나, T₂₀, T₄₀ 실험구에 비해 유의적으로 낮은 결과를 나타내었다($P < 0.05$). Lysozyme 활성 분석 결과

대조구와 T₈₀, T₁₀₀ 및 DSM 실험구는 유의적인 차이를 보이지 않았으나, T₂₀, T₄₀ 및 T₆₀ 실험구에 비해 유의적으로 낮은 결과를 나타 내었다 ($P<0.05$). *Lactococcus garvieae*균을 이용한 공격실험 결과 10일째 누적생존율에 있어서 대조구와 T₆₀, T₈₀, T₁₀₀ 및 DSM 실험구는 유의적인 차이를 보이지 않았으나, T₂₀ 실험구에 비해 유의적으로 낮은 결과를 나타내었다($P<0.05$). 전어체, 혈액분석 결과는 전 실험구간에서 유의적인 차이를 보이지 않았다($P>0.05$). 성장, 비특이적 면역반응, 세균 공격실험 결과는 무지개송어 사료 내 어유를 미세조류로 80%까지 대체 가능한 것으로 나타났다.

실험 2는 상기 어유대체 실험에서 사용되었던 원료인 미세조류의 소화율을 다른 원료들과 비교 평가하기 위해 실시하였다. 사육실험은 평균무게 $95.6 \pm 2.1\text{g}$ (mean \pm SD) 인 무지개송어를 대상으로 6주간 실시하였다. 실험사료는 표준사료(Ref), 어분(FM), 대두박(SBM), 가금부산물(PBM), 미세조류(SC), 기존 상업용 미세조류(DSM) 실험구를 제작하여 각 원료의 영양소 소화율 분석을 실시하였다. 원료 단백질 소화율은 SC 실험구가 FM 실험구보다 유의적으로 낮은 값을 나타내었지만, FM실험구를 제외한 다른 실험구에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내었다 ($P<0.05$). 원료 지방 소화율의 경우 SC실험구 및 DSM 실험구가 다른 실험구에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내었다 ($P<0.05$). 이상의 결과로부터 미세조류, *Schizochytrium* sp. 단백질 소화율은 어분보다 유의적으로 낮았으나 지질 소화율은 어분에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내었다. 따라서 사료 내 지질원인 어유를 대체하기 위한 원료로 이용 가능할 것으로 판단된다. 이러한 결과를 종합해 보면 본 논문에 사용된

미세조류 *Schizochytrium sp.*는 무지개송어 사료 내 어유 함유량 중에서 80%까지 대체가 가능한 것으로 나타났고, 지질소화율에서도 다른 모든 실험구보다 높은 소화율을 보였다. 따라서 미세조류인 *Schizochytrium sp.*는 무지개송어 사료 내 어유대체제로 사용이 가능할 것으로 판단된다.



ACKNOWLEDGMENTS

저의 박사학위 논문이 있기까지 학문적 도움을 주시고 멘토역할을 해주신 배승철 교수님께 진심으로 감사를 드립니다.

아울러, 부족한 저에게 열과 성을 다해 가르침을 주시고 배려해 주신 김창훈 교수님, 김종명 교수님, 백혜자 교수님, 손맹현 박사를 비롯한 해양바이오신소재학과 김동수 교수님, 남윤권 교수님, 공승표 교수님, 박정환 교수님, 최윤희 교수님께도 감사를 드립니다.

실험어 운반 중 고수온으로 무지개송어가 전부 폐사되어 마음고생을 많이 하고 자기일로 바쁜 와중에도 실험을 도와준 최원석군에게도 감사한 마음을 전하고, 실험실 실장으로 모든 일에 바쁘면서도 항상 웃으면서 도와준 배진호, 전임 실장이면서 실험실 리더로써 도움을 많이 준 원성훈 박사, 박사 입학할 때부터 실험논문 가이드에 많은 도움을 준 이승한 박사, 실험어 먹이공급과 실험을 도와준 장의현, 옥장민, 정주현 학생을 비롯한 4학년 학부생들께도 고마운 마음을 전합니다.

제가 8살 때 아버님이 돌아가신 후 오늘의 제가 있도록 물심양면으로 도와주신 밀양에 계신 큰형님, 2019년 6월 갑자기 고인이 되신 우리집안의 대들보 역할을 하신 둘째형님, 그리고 셋째형님, 큰누나, 작은누나, 형수님들께도 감사를 드립니다.

또한, 제 옆에서 공직생활의 마무리와 학위 취득에 큰 힘이 될 수 있도록 항상 묵묵히 헌신해 온 사랑하는 부인 연규선씨, 사랑하는 아들 진봉, 진영, 며느리 소영이와 병상에 누워계신 장모님과 함께 이 작은 결실의 영광을 함께 나누고자 합니다.

살아계셨다면 그 누구보다도 기쁘하셨을 아버님과 어머니님 영전에 이
논문을 바칩니다.

박철오



List of Tables

Table 1-1. 양어사료 원료로 평가된 다양한 미세조류의 단백질, 지방조성	5
Table 2-1. 어종별 필수지방산 요구량.....	13
Table 2-2. 어유, 식물성 지질, 동물성 지질의 지방산 조성	14
Table 2-3. Composition of the experimental diets	18
Table 2-4. Fatty acids composition of experimental diets	20
Table 2-5. Growth performance of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks	35
Table 2-6. Whole-body proximate composition (%) of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks.....	40
Table 2-7. Hematological analysis of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks.....	40
Table 2-8. Non-specific immune responses of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks	41
Table 3-1. Composition of the experimental diets in rainbow trout.....	54
Table 3-2. Apparent digestibility coefficients (% ADC) for crude protein of juvenile rainbow trout fed experimental diets	60
Table 3-3. Apparent digestibility of ingredients (% ADI) of juvenile rainbow trout fed experimental diets.....	60

List of Figures

Figure 2-1. 무지개송어 사육수조.....	16
Figure 2-2. 실험사료 제조과정.....	17
Figure 2-3. 실험사료 및 전어체 일반성분 분석장비	21
Figure 2-4. 실험어 무게측정 및 해부과정.....	23
Figure 2-5. 실험어 채혈과정 및 전혈샘플.....	25
Figure 2-6. 혈액 분석기	26
Figure 2-7. Weight gain (%) of juvenile rainbow trout experimental diets for 8 weeks	36
Figure 2-8. Specific growth rate (%/day) juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks	36
Figure 2-9. Feed efficiency(%) of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks	37
Figure 2-10. Protein efficiency ratio of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks.....	37
Figure 2-11. Survival rate (%) of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks	38
Figure 2-12. Hematosomatic index (%) of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks	38
Figure 2-13. Visceralsomatic index (%) of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks	39

Figure 2-14. Condition factor of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks	39
Figure 2-15. Superoxide dismutase (%inhibition) of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks	42
Figure 2-16. Lysozyme activity (U/ml) of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks	42
Figure 2-17. Cumulative survival (%) by the challenge of <i>Lactococcus garvieae</i> in juvenile rainbow trout fed experimental diets	43
Figure 3-1. 무지개송어 사육수조.....	53
Figure 3-2. 무지개송어 분 수집	56
Figure 3-3. Apparent digestibility coefficients (%) for crude protein of juvenile rainbow trout fed experimental diets.....	61
Figure 3-4. Apparent digestibility coefficients (%) for crude lipid of juvenile rainbow trout fed experimental diets.....	61
Figure 3-5. Apparent digestibility of ingredients (%) for crude protein of juvenile rainbow trout fed experimental diets.....	62
Figure 3-6. Apparent digestibility of ingredients (%) for crude lipid of juvenile rainbow trout fed experimental diets.....	62

제 1장 연구배경

최근 양식산업은 급속히 발전하는 수산업의 한 분야이며, 미래 식량 자원으로서의 그 중요성이 충분히 인식되고 있으므로 경제적인 가치 또한 증가하고 있는 추세이다. 전 세계적으로 양식산업은 최근 20년간 연평균 20% 이상 고도 성장을 하고 있다. 세계 양식 생산량은 1950년에 63만톤을 시작으로 2016년에는 수산물 전체 생산량(1.7억톤) 중 약 47%인 약 8,000만톤을 양식수산물이 차지하고 있으며, 이러한 증가 추세는 지속될 것으로 전망하고 있다. 반면, 세계 어업생산량은 2004년에 9,416만톤을 기록한 이래 2017년에 9,090만톤을 생산하여 10년 이상 정체 내지는 감소 추세에 있다(FAO, 2018). 이러한 어업생산량의 정체 현상과 함께 세계인구의 증가와 고급 수산물 소비의 증가를 충족시키기 위한 대안으로 양식산업 전반에 걸쳐 급진적 발전을 요구하고 있다. 이러한 미래 양식산업의 성패를 좌우할 수 있는 가장 중요한 분야가 양식사료 분야이며, 특히, 양식생산 비용에 있어 사료비가 차지하는 비중은 어종별로 차이가 있지만 어류 양식생산 비용의 약 50~60%를 차지하고 있다(Gatlin et al., 2007). 또한, 양식사료 제조 비용 중에서 사료원료의 비용이 대부분을 차지하고 있으며, 어종에 따라 필요한 영양소와 기호성이 달라질 수 있기 때문에 어종의 특성에 따라 사료 원료는 신중하게 선택되어야 한다(Gatlin et al., 2007).

미세조류(Microalgae)는 식물플랑크톤이라고도 하며, 뿌리, 줄기, 잎이 체계적으로 분화되지 않은 하등식물 중에서 엽록소를 하는 식물이다. 최근 미세조류를 이용하여 지속가능하고 재생 가능한 고부가 가치의 물질들을 생산하려는 연구가 활발하다. 미세조류는 다른 광합성

생물에 비하여 이산화탄소를 포집하는 속도와 세포가 성장하는 속도가 빠르며 인공적인 배양이 손쉽기 때문에 대규모 생물공정을 통하여 대량으로 생산될 수 있다(Hemaiswarya et al., 2011). 미세조류는 바이오 연료의 자원뿐만 아니라 다른 유용한 물질들을 생산할 수 있는 바이오 공장으로 여겨지기 때문에 그 상용화 가능성이 높게 평가되고 있다 (Priyadarshani and Rath, 2012). 식품으로 이용되는 미세조류의 시장규모는 대표적으로 건강식품, 식품첨가제로 사용되는 클로렐라(chlorella)와 스피룰리나(spilulina)의 경우 세계시장이 380억\$ 이상, DHA 생산용 *schizochytrium*은 100억\$ 이상, 또한 다양한 종류의 미세조류가 생산하는 카로테노이드(carotenoid)의 시장 규모도 각각 수억\$에 이른다(Vigani et al., 2015). 양식산업에 있어서의 미세조류는 어류, 갑각류, 이매패류의 유생과 초기 먹이생물 및 동물성 플라크톤의 먹이로서 중요한 역할을 한다(Brown et al., 1997). 미세조류는 다른 식물성 사료 원료에 비해 비교적 높은 단백질과 지질을 함유하면서, 필수 아미노산과 필수 지방산이 풍부한 것으로 알려져 있다 (Brown et al., 1997). 따라서 2000년대 후반부터 양어사료 내 다양한 사료 원료로서 미세조류의 첨가효과가 평가되었으며 어류에서 수많은 연구가 이루어졌다(Table 1-1).

현재까지 해양 미세조류 중 *Thraustochytrid*속, *Mucoreles*속 그리고 *ascomycetes*속은 불포화지방산인 DHA를 생산할 수 있다고 알려져 있다 (Bajpai et al., 1991; Sharma et al., 1994; Carter et al., 2003; Ratridge, 2005). *Thraustochytrids*는 대규모 생산이 가능하며 다른 미세조류에 비해 상대적으로 높은 건물중량을 가지기 때문에 양어사료

원료로써 적합하다고 보고하고 있다(Yokochi et al., 1998; Lewis et al., 1999). 특히 *Thraustochytrid*에 속하는 *Schizochytrium*은 미세조류 중에서도 DHA 함량이 매우 높으며, 성장 조건을 최적화하면 더 높은 DHA(최대 60%까지 농축), 낮은 오메가-6(특히 docosapentaenoic acid, 22:6n-3), 그리고 높은 오메가-3/오메가-6 비율과 같은 특정 영양원을 가진 지질원을 제공할 수 있다(Nichols et al., 2004). 따라서 지금까지 *Schizochytrium*은 다양한 형태로써 차널메기 (Li et al., 2009), 귀족도미(Ganuza et al., 2008) 및 대서양 연어(Cater et al., 2003, Miller et al., 2007; Sprague et al., 2015)의 사료 내 어유대체제로써 효과가 입증되었다. 그러나 지금까지 사료 내 높은 지질을 요구하는 무지개송어 사료 내 *Schizochytrium* sp.를 이용한 어유대체제에 관한 연구는 결과는 없다.

본 연구의 실험 대상종인 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss*는 연어과 어류로서 성장이 빠르고, 환경내성 및 질병저항성이 강해 양식생산성이 높으며 식품으로서의 가치도 높아 전세계적으로 인기 있는 양식어종 중 하나이다. 무지개송어는 주로 양식으로 생산되고 있으며, 전세계 생산량은 2017년에 811,590톤이고(FAO, 2019, 국내 생산량은 2018년에 3,179톤으로 뱀장어와 메기에 뒤이어 생산량이 3위를 차지하고 있는 산업적으로 중요한 어종이며, 배합사료를 주로 공급하고 있는 어종으로 사료비의 절감이 양식경쟁력 강화에 있어 매우 중요하다(KOSAT, 2019).

따라서, 본 연구는 사료 내 미세조류, *Schizochytrium* sp.의 첨가 수준에 따른 무지개송어의 성장, 면역 및 소화율 평가를 통해 미세조류의

어유 대체제 가능성을 비교 평가 하였다.



Table 1-1. 양어사료 원료로 평가된 다양한 미세조류의 단백질, 지방조성 (% dry matter)

Species	Protein	Lipid	Reference
<i>Nannochloropsis oceanica</i>	45.3	8.0	Skrede et al. (2011)
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	52.5	15.5	Teuling et al. (2017)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	47.5	7.2	Skrede et al. (2011)
<i>Isochrysis galbana</i>	17.8	14.4	Skrede et al. (2011)
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	40.7	8.1	Yangyang et al. (2019)
<i>Nanofrustulum</i> sp.	11.9	3.1	Kiron et al. (2012)
<i>Tetraselmis</i> sp.	27.9	3.8	Kiron et al. (2012)
<i>Tetraselmis suecica</i>	45.8	7.5	Cardinaletti et al. (2018)
<i>Tisochrysis lutea</i>	41.7	23.4	Cardinaletti et al. (2018)
<i>Spirulina</i> sp.	61.3	5.5	Sarker et al. (2016)
<i>Spirulina pacifica</i>	55.3	6.8	Kim et al. (2013)
<i>Chlorella</i> sp.	54.5	9.4	Shi et al. (2017)
<i>Chlorella</i> sp.	56.2	8.5	Wei et al. (2014)
<i>Schizochytrium</i> sp.	12.0	57.6	Sprague et al. (2015)
<i>Schizochytrium</i> sp.	11.9	54.1	Sarker et al. (2016)
<i>Schizochytrium</i> sp.	13.2	61.4	Kousoulaki et al. (2016)

참 고 문 헌

- Bajpai, P., Bajpai, P. K., & Ward, O. P. (1991). Production of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium aureum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35(6)
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., & Dunstan, G. A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151(1–4), 315–331.
- Cardinaletti, G., Messina, M., Bruno, M., Tulli, F., Poli, B. M., Giorgi, G., ... Tibaldi, E. (2018). Effects of graded levels of a blend of *Tisochrysis lutea* and *Tetraselmis suecica* dried biomass on growth and muscle tissue composition of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets low in fish meal and oil. *Aquaculture*, 485(November 2017), 173–182.
- Carter, C. G., Bransden, M. P., Lewis, T. E., & Nichols, P. D. (2003). Potential of *Thraustochytrids* to Partially Replace Fish Oil in Atlantic Salmon Feeds. *Marine Biotechnology*, 5(5), 480–492.
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., & Florou-Paneria, P. (2013). Functional properties of carotenoids originating from algae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(1), 5–11.
- FAO. (2018). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018* □ Meeting the sustainable development goals.
- Ganuza, E., Benítez-Santana, T., Atalah, E., Vega-Orellana, O., Ganga, R., & Izquierdo, M. S. (2008). *Cryptocodinium cohnii* and *Schizochytrium* sp. as potential substitutes to fisheries-derived oils from seabream (*Sparus aurata*) microdiets. *Aquaculture*, 277(1–2), 109–116.
- Gatlin, D. M., Barrows, F. T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T. G., Hardy,

- R. W., ... Wurtele, E. (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: A review. *Aquaculture Research*, 38(6), 551–579.
- Gong, Y., Bandara, T., Huntley, M., Johnson, Z. I., Dias, J., Dahle, D., ... Kiron, V. (2019). Microalgae *Scenedesmus* sp. as a potential ingredient in low fishmeal diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 501(November 2018), 455–464.
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Kumar, R. R., Ganesan, V., & Anbazhagan, C. (2011). Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8), 1737-1746.
- Kalogeropoulos, N., Alexis, M. N., & Henderson, R. J. (1992). Effects of dietary soybean and cod-liver oil levels on growth and body composition of gilthead bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 104(3–4), 293–308.
- Kim, S. S., Rahimnejad, S., Kim, K. W., & Lee, K. J. (2013). Partial replacement of fish meal with *Spirulina pacifica* in diets for parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13(2), 197-204.
- Kiron, V., Phromkunthong, W., Huntley, M., Archibald, I., & De Scheemaker, G. (2012). Marine microalgae from biorefinery as a potential feed protein source for Atlantic salmon, common carp and whiteleg shrimp. *Aquaculture Nutrition*, 18(5), 521–531.
- KOSTAT (Statistics Korea). 2019. Agriculture & Fishery, Fishery Products.
- Kousoulaki, K., Mørkøre, T., Nengas, I., Berge, R. K., & Sweetman, J. (2016). Microalgae and organic minerals enhance lipid retention efficiency and fillet quality in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 451, 47–57.
- Lewis, T. E., Nichols, P. D., & McMeekin, T. A. (1999). The biotechnological potential of thraustochytrids. *Marine Biotechnology*, 1(6), 580–587.
- Li, M. H., Robinson, E. H., Tucker, C. S., Manning, B. B., & Khoo, L. (2009).

- Effects of dried algae *Schizochytrium* sp., a rich source of docosahexaenoic acid, on growth, fatty acid composition, and sensory quality of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 292(3–4), 232–236.
- Miller, M. R., Nichols, P. D., & Carter, C. G. (2007). Replacement of fish oil with thraustochytrid *Schizochytrium* sp. L oil in Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L) diets. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 148(2), 382–392.
- Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae—A review. *J algal biomass utln*, 3(4), 89-100.
- Ratlidge, C. (2010). Single cell oils for the 21st century. In *Single cell oils* (pp. 3-26). AOCS Press.
- Ruyter B, Rosjo C, Einen O and Thomassen MS. 2000. Essential fatty acids in Atlantic salmon: Effects of increasing dietary doses of n-3 and n-6 fatty acids on growth, survival and fatty acid composition of liver, blood and carcass. *Aquacult Nutr* 6, 119-127.
- Sarker, P. K., Kapuscinski, A. R., Lanois, A. J., Livesey, E. D., Bernhard, K. P., & Coley, M. L. (2016). Towards sustainable aquafeeds: Complete substitution of fish oil with marine microalga *Schizochytrium* sp. improves growth and fatty acid deposition in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PLoS ONE*, 11(6), 1–17.
- Sharma, S., Raghukumar, C., Raghukumar, S., Sathe-pathak, V., & Chandramohan, D. (1994). Thraustochytrid and fungal component of marine detritus II. Laboratory studies on decomposition of the brown alga *Sargassum cinereum* J. Ag. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 175(2), 227–242.
- Skrede, A., Mydland, L. T., Ahlstrom, O., Reitan, K. I., Gislered, H. R., &

- Overland, M. (2011). Evaluation of microalgae as sources of digestible nutrients for monogastric animals. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 20(1), 131–142.
- Sprague, M., Walton, J., Campbell, P. J., Strachan, F., Dick, J. R., & Bell, J. G. (2015). Replacement of fish oil with a DHA-rich algal meal derived from *Schizochytrium* sp. on the fatty acid and persistent organic pollutant levels in diets and flesh of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) post-smolts. *Food Chemistry*, 185, 413–421.
- Teuling, E., Schrama, J. W., Gruppen, H., & Wierenga, P. A. (2017). Effect of cell wall characteristics on algae nutrient digestibility in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African catfish (*Clarus gariepinus*). *Aquaculture*, 479(June), 490–500.
- Vigani, M., Parisi, C., Rodríguez-Cerezo, E., Barbosa, M. J., Sijtsma, L., Ploeg, M., & Enzing, C. (2015). Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU. *Trends in Food Science & Technology*, 42(1), 81-92.
- Xu, W., Gao, Z., Qi, Z., Qiu, M., Peng, J. Q., & Shao, R. (2014). Effect of dietary *Chlorella* on the growth performance and physiological parameters of gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14(1), 53-57.
- Yokochi, T., Honda, D., Higashihara, T., & Nakahara, T. (1998). Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(1), 72–76.

제 2 장. 사료 내 미세조류, *Schizochytrium* sp. 의 첨가수준이 무지개송어의 성장 및 면역력에 미치는 영향

제 1 절 서론

지질은 어류의 정상적인 성장과 발달에 필요한 필수 지방산 (EFA : Essential fatty acid)과 에너지원으로서 매우 중요한 성분이며, 특히 에너지가(energy)가 높아 값비싼 사료 단백질을 절감시킬 수 있는 중요한 영양소이다 (Lee and Kim, 2009). 어류의 정상적인 성장과 생존을 위해 사료 내 필수적으로 첨가해 주어야 하는 지방산을 필수지방산이라 하는데, 어종 및 서식 환경에 따라 필수지방산의 종류 및 요구량이 다른 것으로 알려져 있다 (Sargent et al., 2002; Higgs and Dong 2000; Ruyter et al., 2000) (Table 2-1). 일반적으로 담수어류는 linoleic acid(18:2n-6)와 α -linolenic acid(18:3n-3)을 필수적으로 요구하며, 해산어류와 무지개송어는 n-3 고도불포화지방산(n-3 highly unsaturated fatty acids, n-3HUFA)인 EPA (eicosapentaenoic acid, 20:5n-3) 또는 DHA (docosahexaenoic acid, 22:6n-3)를 요구한다(Webster and Lovell, 1990; Ruyter et al., 2000; Lee et al., 2003; Fonseca-Madrigal et al., 2005; Kim et al, 2002; Mourente et al., 2005). 양어사료 내 지질원으로는 주로 어유가 사용되며, 이는 사료 내 지질원 중에서 약 87%를 차지한다 (Tacon et al., 2006). 양어사료에서 총 어유 사용량 중 연어, 무지개송어 사료가 66.4%로 대부분을 차지했고, 다음으로는 기타 해산어류(13.8%), 새우(7.3%),

잉어(5.5%), 틸라피아(2.0%), 뱀장어(1.4%)가 뒤를 이었다(Turchini et al., 2009).

어분이나 어유는 어류의 가공을 통해 얻게되는 2차 생산물질로, 일반적으로 100 kg의 어류를 정제하게 되면, 20kg의 어분과 5kg의 어유를 각각 생산할 수 있다. 최근 수십년간 평균 2,500만톤의 어류가 어획을 통해 생산되었으며, 이중 25%는 양식어류의 사료 원료인 어분과 어유를 생산하기 위해 사용된다(Turchini et al., 2010). 따라서 1kg의 참돔을 생산하기 위해서 사료(어분 40% 이상, 어유 10% 이상, 사료계수 2.0)를 공급하는 것은 2kg 이상의 어류를 사용하는 것 (fish-in/fish-out > 2.0)이므로, 비효율적이고 환경 비친화적인 방법이라고 할수있다.

세계 어유 생산량은 환경오염과 기후변화에 의한 어획량 감소로 최근 10년에 걸쳐 크게 변동했다(Table 2-1). 약 160만톤에 달하는 최고 생산량은 1987년과 1990년에 있었으며, 2005년 이후 어유 생산량은 꾸준히 감소해 현재는 100만톤에도 미치지 못하고 있다(Tacon and Metian, 2015). 어유의 공급이 제한적인 반면에 양식 생산량의 꾸준한 증가로 인해 어류의 수요가 증가함에 따라 어유의 가격 상승은 불가피하다. 따라서 지속가능한 어유 대체 원료의 탐색은 양식산업 발전에 중요한 요인으로 작용한다(Tacon and Metian, 2015). 양어사료 내 어유를 대체하기 위한 연구는 꾸준히 진행되어 왔으며, 식물성 지질원인 카놀라유(Bell et al., 2001), 해바라기유(Bransden et al., 2003) 대두유(Figueiredo-Silva et al., 2005), 아마인유(Nayak et al., 2017), 동물성 지질원으로는 계유(Bowyer et al., 2012), 우지(Pérez et al., 2014), 돈지(Zhu et al., 2015)등이 평가되었다. 식물성 지질원과

동물 부산물을 이용한 지질원은 어유에 비해 가격이 저렴한 반면, 상대적으로 DHA, EPA 함량이 부족하여 어분 사용량에 따라 이러한 원료들의 대체율이 제한되는 한계점을 가지므로(Turchini et al., 2009) (Table 2-2), 어유보다 저렴하면서도 n-3 고도불포화지방산 함량이 풍부한 대체 지질원으로 개발하는 것이 필요하다.

따라서, 본 연구는 사료 내 어유 대체제로써 미세조류, *Schizochytrium* sp. 의 첨가수준이 무지개송어의 성장, 면역력 및 장조직 발달에 미치는 효과를 확인하기 위해 수행되었다.



Table 2-1. 어종별 필수지방산 요구량

Common name	Scientific name	EFA requirement (% dry diet)			
		18:2n-6	18:3n-3	n-3 HUFA	n-6 HUFA
Grass carp	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	1.0	0.5		
Common carp	<i>Cyprinus carpio</i>	1.0	0.5-1.0		
Channel catfish	<i>Ictalurus punctatus</i>	0.5	1.0-2.0	0.5-0.75	
Nile Tilapia	<i>Oreochromis niloticus</i>	0.5			
Chum salmon	<i>Chanos chanos</i>	1.0	1.0		
Japanese eel	<i>Anguilla japonica</i>	0.5	0.5		
European sea bass	<i>Dicentrarchus labrax</i>			1.0	
Coho salmon	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	1.0	1.0		
Barramundi	<i>Lates calcarifer</i>			1.0	
Rainbow trout	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	0.8-1.6	0.7-1.0	0.2-1.0	
Atlantic salmon	<i>Salmo salar</i>		0.5-1.0	0.5-1.0	
Turbot	<i>Psetta maxima</i>			0.6-1.3	0.3
Gilthead sea bream	<i>Sparus aurata</i>			0.5-1.9	
Red drum	<i>Sciaenops ocellatus</i>			0.5-1.0	
Red sea bream	<i>Pagrus major</i>			0.5-1.0	
Korean rockfish	<i>Sebastes schlegeli</i>			1.0	

Table 2-2. 어유, 식물성 지질, 동물성 지질의 지방산 조성 (% total fatty acids of oil/fat)

Oil/fats	SFA	MUFA	LA	AA	ALA	EPA	DHA	n-6 PUFA	n-3 PUFA	n-3/n-6 ratio
Fish oil										
Anchovy oil	28.8	24.9	1.2	0.1	0.8	17.0	8.8	1.3	31.2	24.0
Capelin oil	20.0	61.7	1.7	0.1	0.4	4.6	3.0	1.8	12.2	6.8
Menhaden oil	30.5	24.8	1.3	0.2	0.3	11.0	9.1	1.5	25.1	16.7
Herring oil	20.0	56.4	1.1	0.6	0.6	8.4	4.9	1.4	17.8	12.7
Cod liver oil	19.4	46.0	1.4	1.6	0.6	11.2	12.6	3.0	27.0	9.0
Vegetable oils										
Crude palm oil	48.8	37.0	9.1	-	0.2	-	-	9.1	0.2	0.0
Soybean oil	14.2	23.2	51.0	-	6.8	-	-	51.0	6.8	0.1
Canola / rapeseed oil	4.6	62.3	20.2	-	12.0	-	-	20.2	12.0	0.6
Sunflower oil	10.4	19.5	65.7	-	-	-	-	65.7	0.0	0.0
Cottonseed oil	45.3	17.8	51.5	-	0.2	-	-	51.5	0.2	0.0
Groundnut oil	11.8	46.2	32.0	-	-	-	-	32.0	0.0	0.0
Corn oil	12.7	24.2	58.0	-	0.7	-	-	58.0	0.7	0.0
Linseed oil	9.4	20.2	12.7	-	53.3	-	-	12.7	53.3	4.2
Animal fats										
Beef tallow	47.5	40.5	3.1	0.4	0.6	-	-	3.1	0.6	0.2
Pork lard	38.6	44.0	10.2	-	1.0	-	-	10.2	1.0	0.1
Poultry fat	28.5	43.1	19.5	-	1.0	-	-	19.5	1.0	0.0

* AA, arachidonic acid, 20:4 n-6; ALA, a-linolenic acid, 18:3 n-3; DHA, docosahexaenoic acid, 22:6 n-3; EPA, eicosapentaenoic acid, 20:5 n-3; LA, linoleic acid, 18:2 n-6; MUFA, monounsaturated fatty acids; n-3 PUFA, polyunsaturated fatty acids; n-6 PUFA, polyunsaturated fatty acids; SFA, saturated fatty acids.

제 2 절 재료 및 방법

1) 실험어 및 사육관리

사육실험용 무지개송어는 이화정 양식장(경상북도 상주시)으로부터 부경대학교 영양대사학 연구실로 운반하였다. 실험에 들어가기에 앞서 250L 수조에 2주간 기초 사료를 공급하면서, 예비 사육을 하였으며 사육 실험은 8주간 실시하였다. 예비 사육 후, 평균무게 $3.0 \pm 0.4\text{g}$ 의 치어기 무지개송어를 40 l 사각수조에 각각 20마리씩 수용하여 각 실험구당 3반복으로 무작위 배치하였다(Figure 2-1). 각 실험 수조는 반순환여과식으로 유수량은 0.8 l/min, 산소 공급량은 6ppm을 동일하게 유지시켜 주었다. 모든 실험수조에 충분한 산소공급을 위해서 에어스톤을 설치하였으며, 수온은 $13 \pm 1^\circ\text{C}$ (mean \pm SD)로 유지하였다.

사료 공급량은 실험기간 동안 어체중의 4~7%로 1일 2회(9:00, 18:00) 공급하였으며, 사료 공급 후 환수하여 배설물과 찌꺼기를 제거하였다.

2) 실험 사료 및 실험 설계

CJ제일제당에서 개발된 미세조류의 어유대체 효과를 검증하기 위해 어유(Fish oil with Essential fatty acids), 미세조류 (*Schizochytrium* sp.) 혼합비율을 FE100%+SC0% (대조구, T₀), FE80%+SC20%(T₂₀), FE60%+SC40%(T₄₀), FE40%+SC60%(T₆₀), FE20%+SC80(T₈₀), FE0%+SC100%(T₁₀₀)로 설정하였고, 기존 상업용 미세조류 (DSM) 첨가구를 추가하여 총 7가지의 실험 사료를 제조하였다. 실험 사료의 단백질원으로는 어분, 대두박, 가금부산물, 혈분, 육골분, 밀글루텐을

사용하였고, 탄수화물원으로는 밀가루를 사용하였으며, 지질원으로는 어유, 대두유, 미세조류를 사용하였다. 또한 모든 실험사료의 조단백질과 조지방 함량은 최대한 동일하게 조절하였다. 실험사료의 구성성분은 Table 2-3에 나타내었고, 사료원의 제조과정은 Figure 2-2에 나타내었다. 사료원을 골고루 섞은 뒤 펠렛제조기로 압출·성형하여 환풍이 잘 되는 곳에서 자연 건조시킨 다음 실험어의 크기에 맞도록 입자 크기를 고르게 친 후, 밀봉하여 -20°C 에 냉동 보관하여 사용하였다.



Figure 2-1. 무지개송어 사육수조 배치 모습.



Figure 2-2. 실험사료 제조과정.

Table 2-3. Composition of the experimental diets in Rainbow trout(% of DM basis)

Ingredients	Diets(%)						
	CON	T20	T40	T60	T80	T100	DSM
Fish oil	6.80	5.43	4.07	2.71	1.36	0.00	2.60
		1.00	-	-	-	-	0.00
		-	2.01	-	-	-	0.00
Micro algae		-	-	3.01	-	-	0.00
		-	-	-	4.02	-	0.00
		-	-	-	-	5.01	0.00
Fish meal (Chile)	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
Soybean meal	19.00	18.55	18.20	17.80	17.20	16.90	17.10
Poultry byproduct	16.12	16.12	16.12	16.12	16.12	16.12	16.12
Blood meal	5.70	5.70	5.70	5.70	5.70	5.70	5.70
Meat and bone meal	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00
Wheat gluten meal	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Wheat flour	12.90	12.87	12.73	12.56	12.76	12.58	10.00
Soybean oil	0.00	0.82	1.63	2.52	3.24	4.06	1.20
Methionine	0.43	0.44	0.44	0.44	0.45	0.45	0.44
Lysine	0.51	0.53	0.56	0.59	0.61	0.64	0.59
DSM	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.70
*Etc	4.54	4.54	4.54	4.55	4.54	4.54	4.55
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Moisture	9.36	8.50	8.81	9.05	8.71	8.54	9.28
Ash	11.18	11.17	11.16	11.41	11.14	11.02	11.57
Crude Protein	50.46	49.57	49.69	48.71	49.81	49.84	49.29
Crude Lipid	12.00	11.92	11.54	12.6	12.72	12.16	12.49

*Etc: Vitamin premix, Mineral premix, Choline, Lecithin

3) 실험 사료 및 어체의 일반성분 분석

실험에 이용된 사료를 각각 AOAC(Association of Official Analytical Chemists, 2000) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법 (135° C, 2시간), 조단백질은 Kjeldahl 질소정량법($N \times 6.25$), 조회분은 직접회화법으로 분석하였으며, 조지방은 Folch 법을 이용하여 분석하였다. 일반성분 분석 기기는 Figure 2-3에 나타내었다.

4) 실험 사료의 지방산 분석

지방산 분석은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 클로로포름과 메탄올 혼합액(2:1)으로 총 지질을 추출하여 14% BF₃-methanol (Sigma, USA) 용액으로 지방산을 methylation 시킨 후, capillary column (SPTM-2560, 100 m × 0.25 mm i. d., film thickness 0.20 um, USA)이 장착된 gas chromatography (PerkinElmer, Clarus 600, USA)로 지방산을 분석하였다. Carrier gas는 헬륨을 사용하였으며, Oven 온도는 최초 140°C에서 240°C까지 4°C/min 증가시켰다. 이때, injector 온도는 250°C, detector (FID) 온도는 260°C로 각각 설정하였으며, 표준 지방산으로 37개 지방산 혼합물(PUFA 37 Component FAME Mix, USA)을 사용하였다. 실험사료 지방산 분석결과는 Table 2-4에 나타내었다.

Table 2-4. Fatty acids composition of experimental diets (% in total fatty acid)

Ingredients	Diets(%)						
	CON	T20	T40	T60	T80	T100	DSM
14:0	6.43	6.31	6.01	5.66	5.19	5.10	9.57
16:0	33.4	34.3	35.0	37.3	37.5	36.7	34.35
18:0	15.4	15.3	14.7	14.3	13.3	13.1	13.0
18:1n-9	17.0	16.4	15.8	15.8	15.4	14.9	14.5
18:2n-6 LA	4.24	4.27	4.60	4.52	6.90	7.73	5.77
20:1	1.24	1.11	0.85	0.68	0.49	0.28	0.66
18:3n-3 ALA	0.18	0.17	0.25	0.16	0.31	0.39	0.30
22:0	0.41	0.45	0.42	0.45	0.42	0.43	0.36
20:5n-3 EPA	9.49	7.36	6.53	4.48	2.96	1.42	4.39
22:6n-3 DHA	6.45	8.65	10.5	11.9	13.4	16.1	12.2
EPA+DHA	15.9	16.0	17.0	16.4	16.3	17.5	16.6
DHA:EPA	0.68	1.18	1.61	2.65	4.52	11.3	2.79



Figure 2-3. 사료 및 전어체 일반성분 분석장비.



5) 어체 측정

어체 측정은 실험시작 8주 후에 실시하였으며, 성장률을 조사하기 위하여 24시간 절식 후에 각 수조의 실험어 전중량을 측정하였다(Figure 2-4). 실험 종료 후, 증체율(Weight gain, %), 일간성장률(Specific growth rate, %/day), 사료효율(Feed efficiency, %), 단백질 전환효율(Protein efficiency ratio) 및 생존율 (Survival rate, %)을 조사하였다. 상기 측정 항목들의 계산식은 다음과 같다.

$$\text{Weight gain (WG, \%)} = (\text{final wt.} - \text{initial wt.}) \times 100 / \text{initial wt}$$

$$\text{Feed Efficiency (FE, \%)} = (\text{wet weight gain} / \text{dry feed intake}) \times 100$$

$$\text{Specific growth rate (SGR, \%/\text{day})} = (\ln \text{ mean final wt.} - \ln \text{ initial wt.}) \\ \times 100 / \text{days}$$

$$\text{Protein efficiency Ratio (PER)} = (\text{wet weight gain} / \text{protein intake})$$

$$\text{Survival rate (\%)} = (\text{total fish} - \text{dead fish}) \times 100 / \text{total fish}$$

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

$$\text{Visceralsomatic Index (VSI)} = (\text{Visceral Weight} / \text{body weight}) \times 100$$

$$\text{Condition factor} = [\text{fish wt. (g)} / \text{fish length (cm)}^3] \times 100$$



Figure 2-4. 실험어 측정 및 해부장면.

6) 혈액성분 분석

실험 종료 후, 증체를 조사와 함께 혈액성분 분석을 위하여 실험어를 채혈하기 전까지 약 24시간 동안 절식시킨 후 각 수조 당 3마리씩 무작위 추출하여 MS-222(100 ppm)로 마취시켰다. 실험어의 미부정맥에서 혈액을 채혈하였으며(Figure 2-5), 혈청 성분의 분석을 위하여 채혈한 혈액(Figure 2-5)을 항응고제가 처리되지 않는 원심분리관에 넣고 실온에 30분간 방치한 후 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 냉장보관하며 24시간 이내에 분석하였다. Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamate pyruvate transaminase (GPT), total protein과 glucose는 분석 전용 kit를 이용해 DRI-CHEM 4000i (Minato-ku, Tokyo, Japan)으로 분석하였다(Figure 2-6).

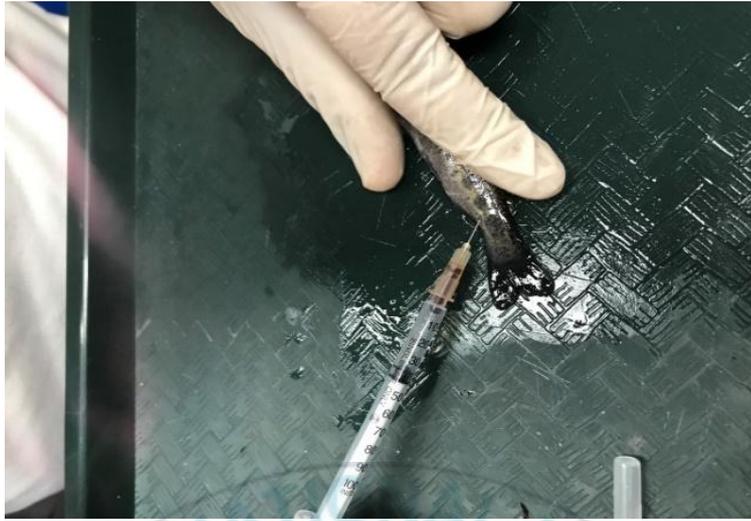


Figure 2-5. 무지개송어 채혈과정

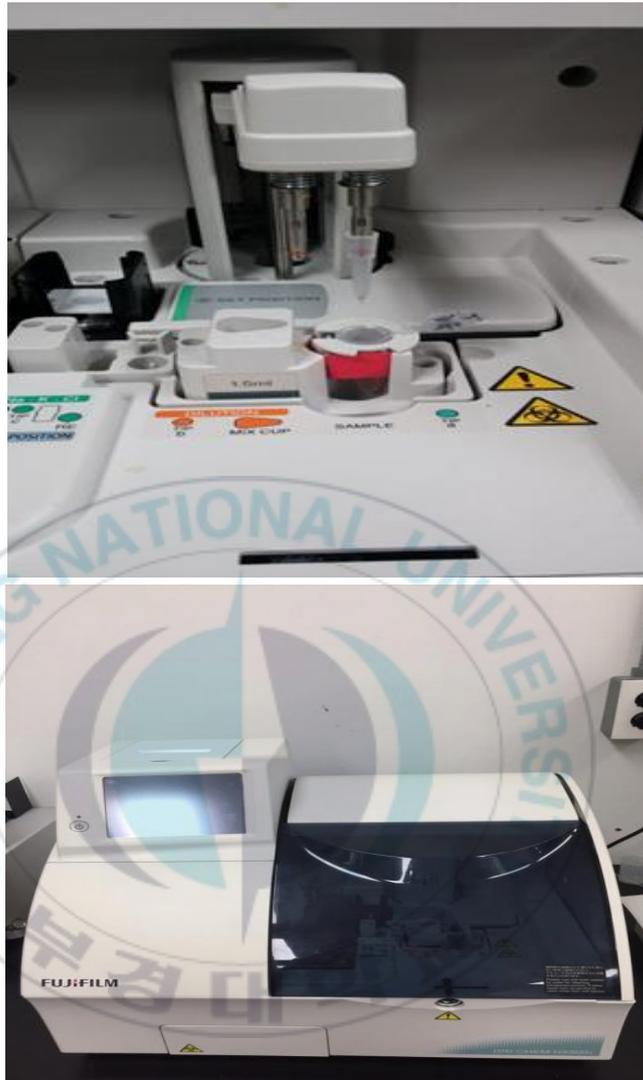


Figure 2-6. 혈액 분석기.

7) 비특이적 면역반응

Superoxide dismutase (SOD)의 활성

각각의 실험구별 어류에서 분리한 혈청으로 SOD assay kit (Sigma-Aldrich, 191600)을 사용하여 제조사의 지시를 따라 WST-1 (Water soluble tetrazolium dye)와 xanthine oxidase으로 효소의 저해율을 백분위로 계산하였다. 각각의 샘플은 37° C Incubator에서 20분간 반응시켜 평행시간에 도달하였을 때, 450nm파장 (WST-1과 활성산소가 반응하여 나타난 유색을 측정하기 위한 파장의 흡광도)에서 흡광도를 측정했다. 저해율은 mg protein당 SOD 활성 단위로 나타냈다.

Lysozyme의 활성

각각의 실험구별 어류에서 분리한 혈청 0.1 ml과 0.05M sodium phosphate buffer (pH 6.2)에 *Micrococcus lysodeikticus* (0.2 mg/ml) 2 ml과 혼합하였다. 반응은 20° C 조건에서 분광 흡광도계의 흡광도 530 nm에서 0.5분과 4.5분에 측정하였다. lysozyme의 활성 단위는 분당 0.001의 흡광도 감소를 나타내는 효소량으로 정의하였다.

8) *Lactococcus garvieae*균을 이용한 공격 실험

공격 실험에 사용된 *Lactococcus garvieae*균은 BHI broth 배지에서 27°C로, 24~48시간 배양하여 멸균 증류수에 1×10^7 CFU/ml로 현탁하였다. 각 수조별로 무작위로 5마리씩 선별한 실험어에 현탁액을 0.1ml씩 복강 주사한 후 사료공급 없이 시간경과에 따른 무지개송어의 생존율을 조사하여 실험군과 대조군을 비교 분석하였다.

9) 통계학적 분석

실험 수조의 배치는 완전 무작위로 실시하고, 성장 및 분석결과는 SAS (Version 9.4) 프로그램을 이용하여 one-way ANOVA로 통계 분석을 실시하였다. 데이터 값은 최소 유의차 (LSD) 검정 ($P < 0.05$)으로 비교하였다. 데이터는 평균값과 pooled SEM ($= SD / \sqrt{n}$)으로 나타냈다.

제 3 절 결과 및 고찰

1) 무지개송어의 성장

사료 내 필수지방산의 함량은 어류의 성장 및 생존에 영향을 미치게 되며, 무지개송어의 경우 EPA와 DHA를 충분히 합성하지 못하므로 사료의 성분을 배합하여 제조할 때 반드시 고려해야 할 사항 중 하나이다(NRC, 2011). 무지개송어의 EPA, DHA를 포함한 총 n-3 HUFA 요구량은 사료 내 0.2-1.0% 이다(NRC, 2011). 8주간의 사육실험 후, 치어기 무지개송어의 성장에 미치는 효과는 Table 2-5와 Figure 2-7~14에 나타내었다. 증체율(weight gain, WG), 일간성장률(specific growth rate, SGR), 사료효율(feed efficiency, FE)과 단백질전환효율(protein efficiency ratio)에 있어서 T20실험구는 타 실험구에 비해 유의적으로 높은 결과를 나타내었고($P<0.05$), 대조구는 T40, T60과 T80 실험구와 유의적인 차이를 보이지 않았으나($P>0.05$), T100 및 DSM 실험구에 비해서 유의적으로 높은 결과를 나타내었다($P<0.05$). 생존율에 있어서는 모든 실험 구간에서 유의적인 차이를 보이지 않았다($P>0.05$). 이는 모든 대조구 사료 내 EPA+DHA 함량인 15.9%(in total fatty acids)에 비해 어유 대체 실험사료 EPA+DHA와 비슷하거나 높은 함량(16.0-17.5% in total fatty acids)때문인 것으로 판단된다. 또한 T20 실험구의 높은 증체율, 일간성장률, 사료효율 그리고 단백질 전환효율은, 미세조류에 함유된 여러가지 유용성 물질, 특히 높은함량의 리놀렌산, 지용성 carotenoids 또는 지용성 비타민 등의 영양학적 요인의 개선에서 기인한

것으로 판단된다.

식물성 또는 동물성 유지는 어유 대체 연구를 위해 많이 사용되어 왔으며, 사료 내 일정 비율 이상의 어분과 함께 적정 첨가 비율을 탐색하여 어유를 대체할 경우, 어류의 성장에 영향을 주지 않는 것으로 보고되어 왔다 (Dosanjh et al., 1984, 1998; Thomassen and Rosjo, 1989; Greene and Selivonchick, 1990; Guillou et al., 1995). 무지개송어를 이용한 연구에 따르면 (Caballero et al., 2002), 사료 내 어분을 30% 사용하고 어유를 대두유, 유채씨유, 올리브유 및 야자오일로 대체 시, 성장 결과에 있어서도 대조구와 각 실험구간에는 유의적인 차이가 없었지만 ($P>0.05$), 대서양 연어를 비롯한 타 연어과 사료 내 식물성 원료를 이용한 어유 대체 실험과도 유사한 결과를 나타내었다 (Rosenlund et al., 2000; Richard et al., 2006). 하지만 이들의 연구는 어유의 높은 함량의 n-3 HUFA를 대체하기 위해서 사료 내 어분 비율이 높게 유지되어야 하는 한계를 가지고 있었다. 반면에, 무어분 무지개송어 사료 내 식물성 지질원에 DHA를 추가로 첨가하여 어유 대체한 결과, DHA를 추가로 첨가한 실험구가 DHA를 첨가하지 않은 실험구 비해 유의적으로 높은 성장을 나타내었다 (Rincharde et al., 2007; Betiku et al., 2016). 또한, DHA를 다량 함유하고 있는 *Schizochytrium* sp.를 이용한 어유대체 실험결과, 대조구와 100% 대체 실험구 사이에 유의한 차이를 나타내지 않았으며 (Spraguer et al., 2015; Martin et al., 2018), 특히 홍민어에 있어서는 본 실험과 유사하게 50%대체구가 대조구에 비해 높은 성장률을 나타내었다 (Martin et al.,

2018). 위 결과는 무지개송어용 배합사료 내 *Schizochytrium* sp. 첨가에 따른 무지개송어의 성장 개선 효과는 이들 미세조류에 함유된 여러가지 유용성 물질, 특히 필수지방산이나 지용성 carotenoids 또는 지용성 비타민 등의 영양학적 요인의 개선에서 기인한 것으로 판단된다.

2) 전어체 일반성분 분석

전어체 일반성분 분석 결과는 Table 2-6에 나타내었다. 전어체 일반성분 분석 결과, 수분, 조단백, 조지방 및 조회분(moisture, crude protein, crude lipid and crude ash)에 있어 전 실험구간에는 유의적인 차이는 나타나지 않았다($P>0.05$). 따라서, 어유 내 DHA를 대체하기 위하여 사용된 미세조류는 전어체의 일반성분 조성에 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

3) 혈액학적 분석

혈액분석 결과는 Table 2-7에 나타내었다. Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamate pyruvate transaminase (GPT), Total protein (TP)과 glucose (GLU)에 있어 전 실험구간 유의적인 차이를 보이지 않았다. 어류의 혈액성분은 영양, 건강상태 및 스트레스 지표로 사용이 가능하고, 사료내 필수 영양소의 결핍이나 어종의 서식환경 및 성장에 따라서도 변화된다고 보고된 바 있다(Siddiqui 1977; Garcia & Garrido et al. 1990). 본 연구에서 혈청 성분의 변화를 조사한 결과, GOT, GPT, TP 와 Glu에 있어 전 구간 유의적인 차이를 나타내지 않은 것으로 보아 어유 대체를 위해 사용된 미세조류는 어류의 생리적

기능 및 스트레스에 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

4) 비특이적 면역반응

비특이적 면역반응분석 결과는 Table 2-8, Figure 2-15, 16에 나타내었다. Superoxide dismutase (SOD) 분석 결과, T20과 T40 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높게 나타났으나($P < 0.05$), T20, T40, T60, T80과 T100 실험구간에는 유의적인 차이를 나타내지 않았다($P > 0.05$). 또한, 대조구, T60, T80, T100과 DSM 실험구간에는 유의적인 차이를 나타내지 않았다($P > 0.05$). Lysozyme의 분석 결과, T20과 T40은 다른 모든 실험구에 비해 유의적으로 높은 결과를 나타내었다($P < 0.05$), 특히 T20 실험구는 T40과 T60 실험구에 비해 유의적으로 높게 나타났다($P < 0.05$). 반면, 대조구, T80, T100과 DSM 실험구간에는 유의적인 차이를 나타내지 않았다($P > 0.05$). 혈청 SOD activity 는 단백질, 핵산, 지질 등의 생분자들을 공격하여 분해시키거나 그 기능을 저해하게 하는 활성산소종 (reactive oxygen species: ROS)을 제어하는 방어 메커니즘으로써 체내에 침입한 병원체를 제거하는 역할을 하는 대표적인 항산화 효소이다 (Fridovich, 1969). Lysozyme은 어류의 점액 및 기타 체액에 존재하며(Hikima, 2001), 어류의 피부 표면과 아가미에 주로 존재하는 점액 lysozyme은 세균 침입에 대한 초기방어 역할을 수행한다고 알려져 있으며, 수온, 독성물질 노출 및 스트레스 정도에 따라 lysozyme 활성이 다양하게 나타난다(Saurabh and Sahoo, 2008). Adel et al.(2016)에 따르면

great sturgeon 사료 내 미세조류인 *Spirulina platensis*를 10% 첨가했을 경우 lysozyme activity를 포함한 면역 반응 지표가 증가하는 것을 볼 수 있으며, 이는 *S. platensis* 가 과산화 음이온 생성에 의해 결정되는 백혈구의 기능을 활성화 시킬 뿐만 아니라, 세포 내에 지닌 항산화효소로 인해 면역반응이 증가된 것으로 판단된다. 또한 잉어 사료 내 *chlorella* sp.를 2% 첨가한 실험에서도 비특이적 면역반응 지표인 SOD와 lysozyme 활성 결과가 본 실험과 유사한 경향을 나타내었다(Xu et al., 2014). 이는 사료 내 미세조류가 SOD와 lysozyme과 같은 어류의 면역 활성물질을 증가시킬 수 있다는 가능성을 보여주었으며, 향후 추가적인 연구가 진행되어야 될 것으로 사료된다.

5) *Lactococcus garvieae*균을 이용한 공격 실험

공격 실험 결과는 Figure 2-17에 나타내었다. *Lactococcus garvieae* 박테리아의 1×10^7 농도로 공격 실험을 실시한 결과, 주사 후 10일째의 누적 생존율에 있어서 T20 실험구는 대조구, T80, T100, DSM실험구에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내었으며, T40, T60 실험구와는 유의적인 차이를 보이지 않았다. Watanuki et al. (2006)에 따르면, 어류 혈청 내의 면역지표가 높을수록 병원균에 대한 저항 능력이 높은 것을 확인할 수 있었다. 이는 사료 내 미세조류 첨가 시 비특이적 면역반응의 증가로 인해, 외부에서 유입되는 병원균의 감염을 억제할 뿐만 아니라 항산화효과 및 백혈구 기능을 증가시킨다는 연구결과와

비슷하다(Duncan et al., 1996; abdel-Tawwab and Ahmad 2009).

따라서 본 실험에서는 사료 내 미세조류 첨가 시 외부 병원균에 대한 저항성이 높은 것을 확인할 수 있었으며, 무지개송어 사료내 어유를 미세조류, *Schizochytrium* sp.로 20%까지 대체한 실험구가 가장 효과적인 것으로 판단된다.



Table 2-5. Growth performance of juvenile Rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks¹

	CON	T20	T40	T60	T80	T100	DSM	Pooled SEM
IBW ²	3.15 ^{ns}	3.17	3.15	3.15	3.15	3.17	3.15	0.02
FBW ³	9.1 ^b	10.9 ^a	9.01 ^{bc}	8.70 ^{bc}	8.42 ^{bc}	7.28 ^d	8.1 ^{cd}	0.50
WG (%) ⁴	191 ^b	246 ^a	186 ^{bc}	176 ^{bc}	167 ^{bc}	130 ^d	155 ^{cd}	13.6
SGR (%/day) ⁵	1.94 ^b	2.25 ^a	1.91 ^b	1.85 ^{bc}	1.79 ^{bc}	1.51 ^d	1.70 ^{cd}	0.09
FE (%) ⁶	110 ^b	139 ^a	105 ^b	98.8 ^{bc}	94.7 ^{bc}	73.6 ^d	89.2 ^c	7.70
PER ⁷	2.16 ^b	2.73 ^a	2.11 ^{bc}	1.98 ^{bc}	1.93 ^{bc}	1.50 ^d	1.78 ^{cd}	0.14
Survival (%) ⁸	93.3 ^{ns}	96.7	93.3	98.3	96.7	98.3	98.3	0.85
HSI (%) ⁹	1.49 ^{ns}	1.40	1.55	1.47	1.50	1.12	1.43	0.05
VSI (%) ¹⁰	4.31 ^{ns}	4.66	4.95	4.40	4.78	4.32	4.94	0.11
CF ¹¹	1.06 ^{ns}	1.03	1.08	0.96	1.02	1.02	1.04	0.01

¹Values are means from triplicate groups of fish where the values in each row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$)

²Initial weight (IW g/fish)

³Final weight (FW g/fish)

⁴Weight gain (WG, %) = (final wt. - initial wt.) × 100 / initial wt

⁵Specific growth rate (SGR, %/day) = (ln final wt. - ln initial wt.) × 100 / days

⁶Feed Efficiency (FE, %) = (wet weight gain / dry feed intake) × 100

⁷Protein efficiency ratio (PER) = (wet weight gain / protein intake)

⁸Survival rate (%) = (total fish - dead fish) × 100 / total fish

⁹Hematosomal index (HSI, %) = liver wt. × 100 / body wt.

¹⁰Visceralsomatic index (VSI, %) = viscera wt. × 100 / body wt.

¹¹Condition factor = (wet weight / total length³) × 100

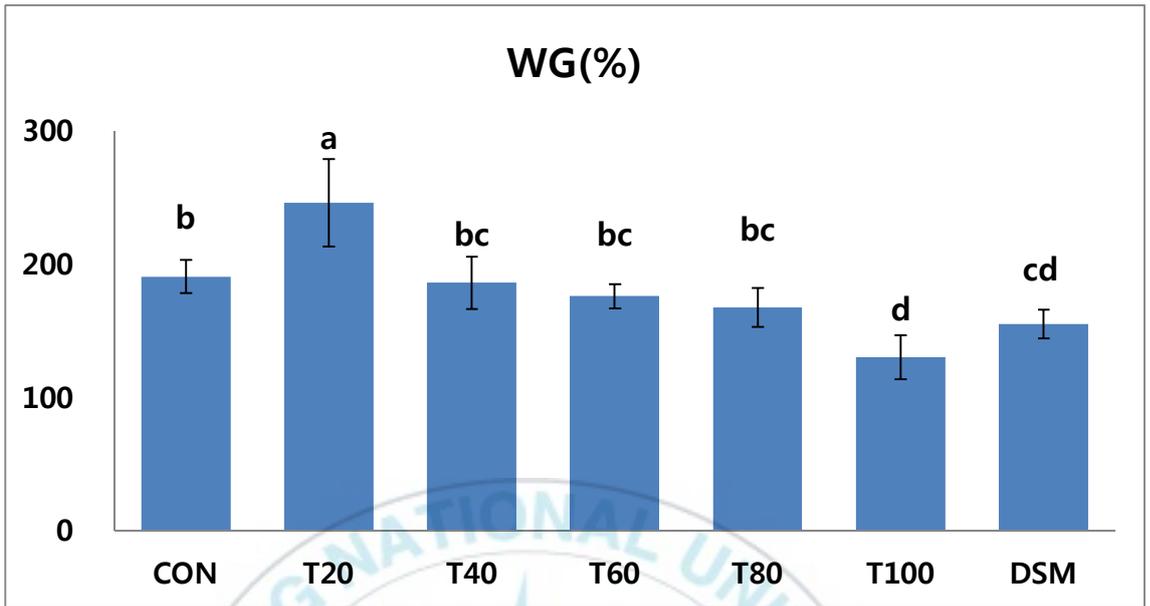


Figure 2-7. Weight gain (%) of juvenile rainbow trout experimental diets for 8 weeks.

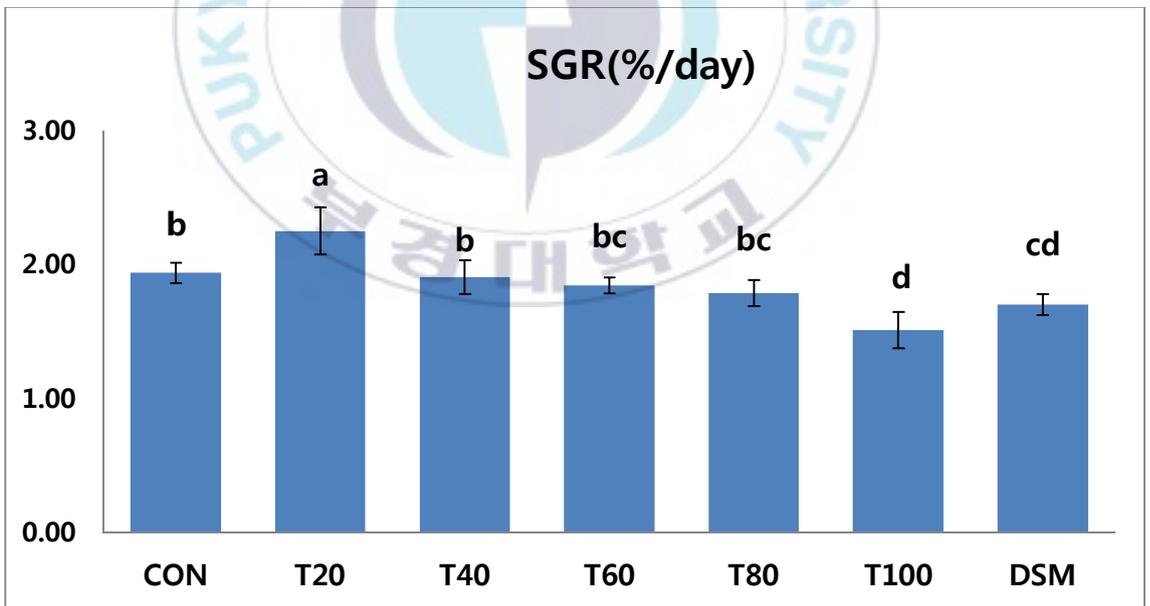


Figure 2-8. Specific growth rate (%/day) juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks.

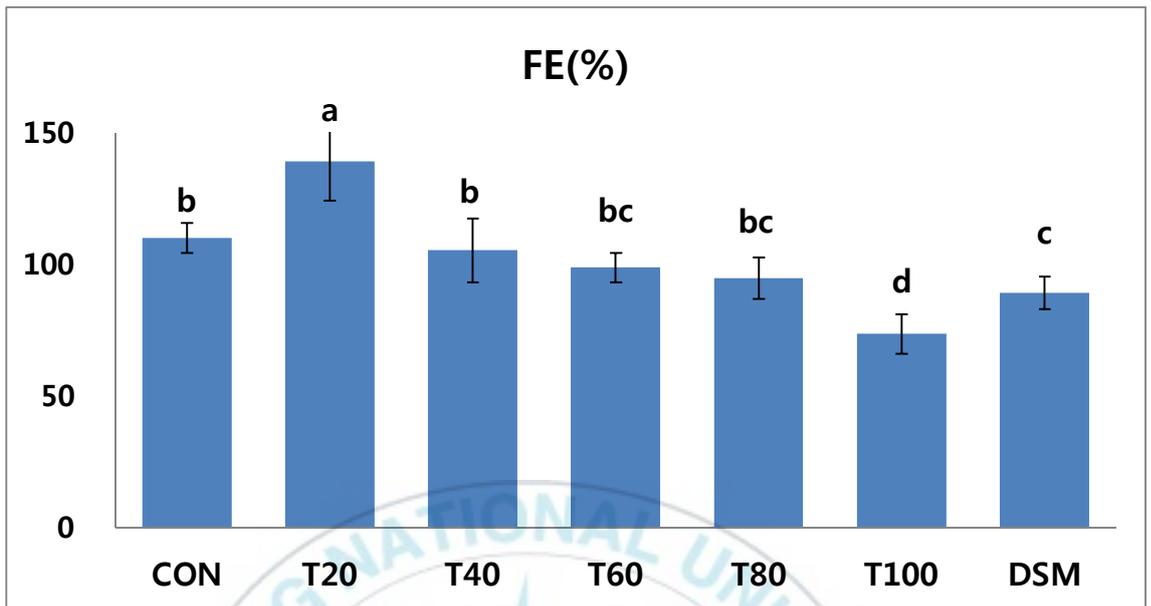


Figure 2-9. Feed efficiency(%) of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks.

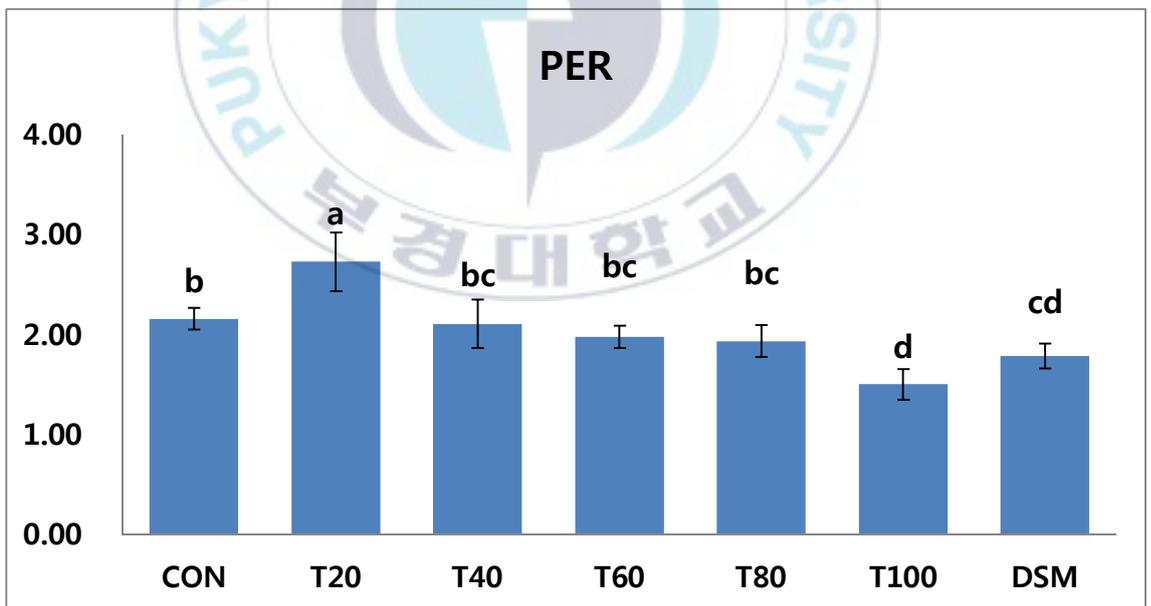


Figure 2-10. Protein efficiency ratio of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks.

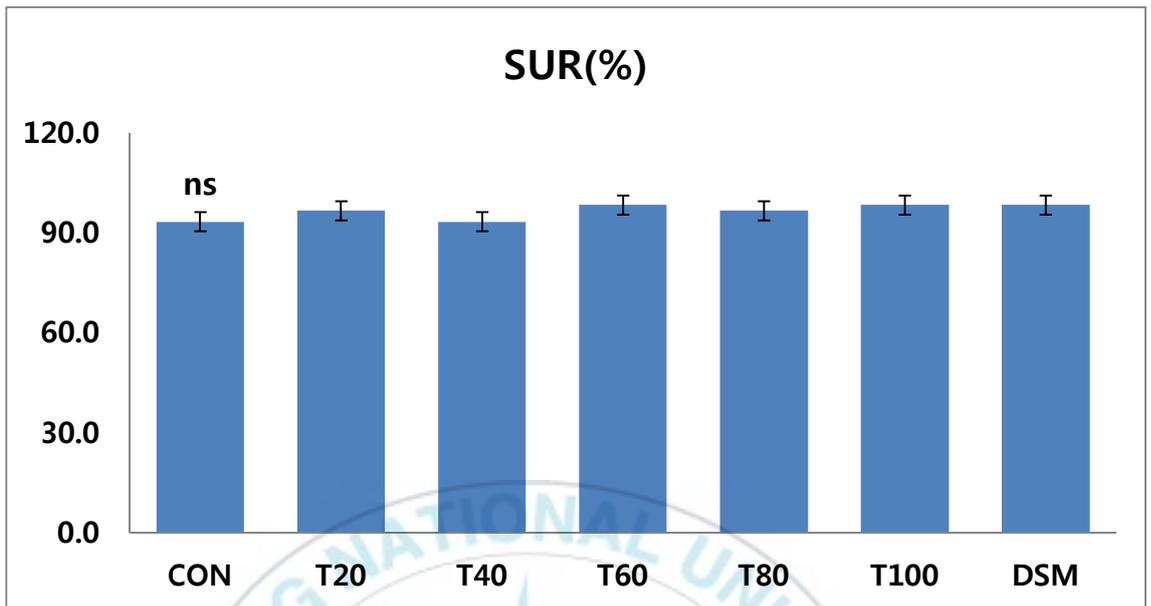


Figure 2-11. Survival rate (%) of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks.

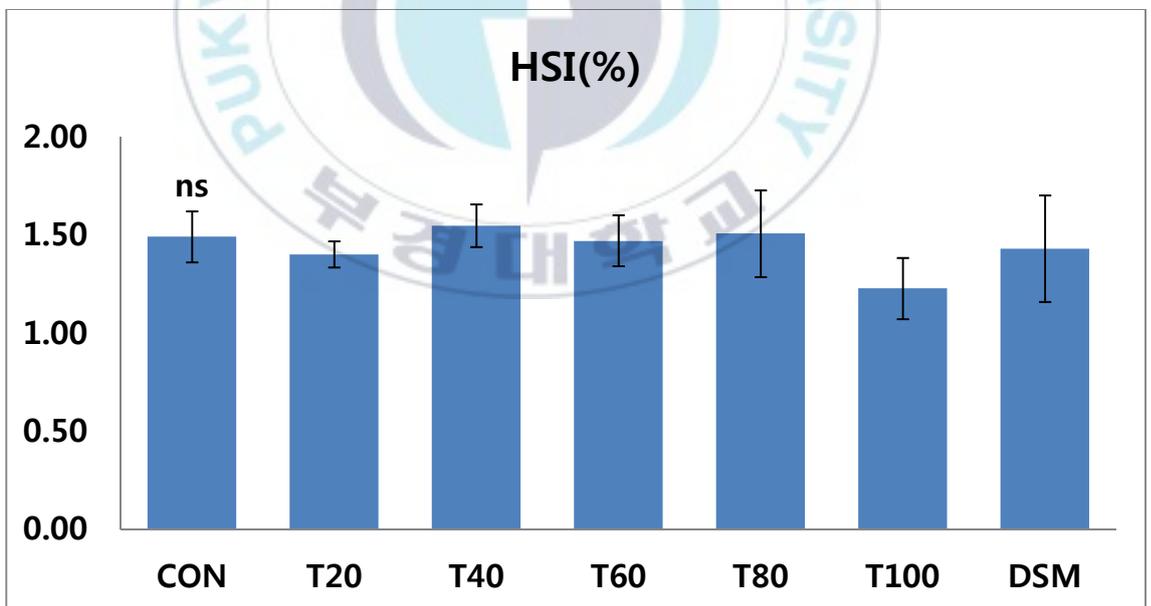


Figure 2-12. Hematosomatic index (%) of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks.

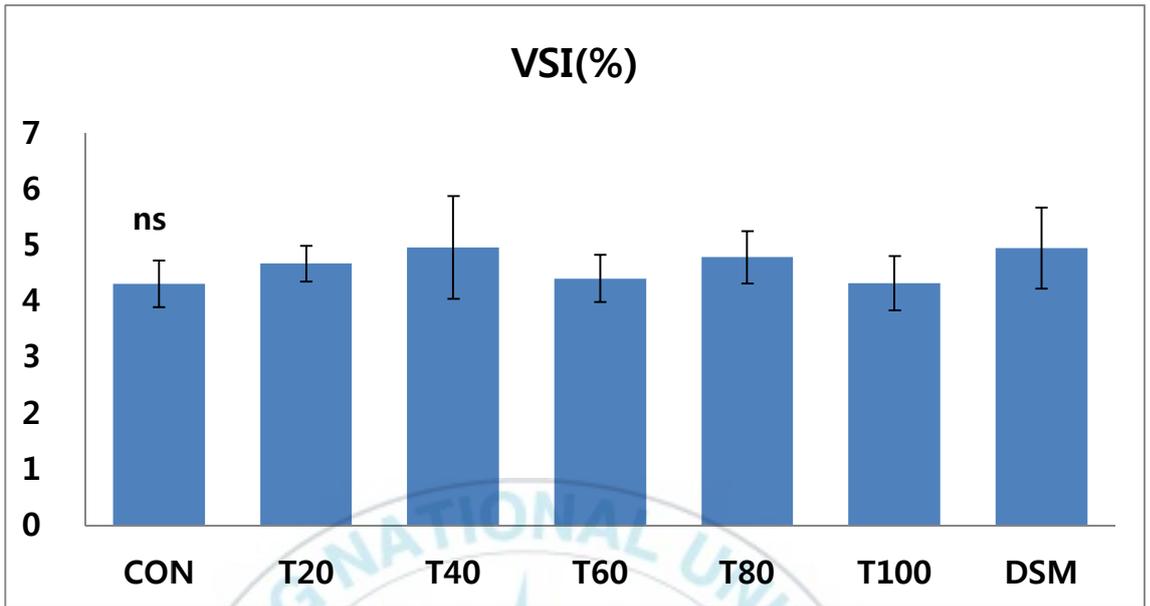


Figure 2-13. Visceralsomatic index (%) of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks.

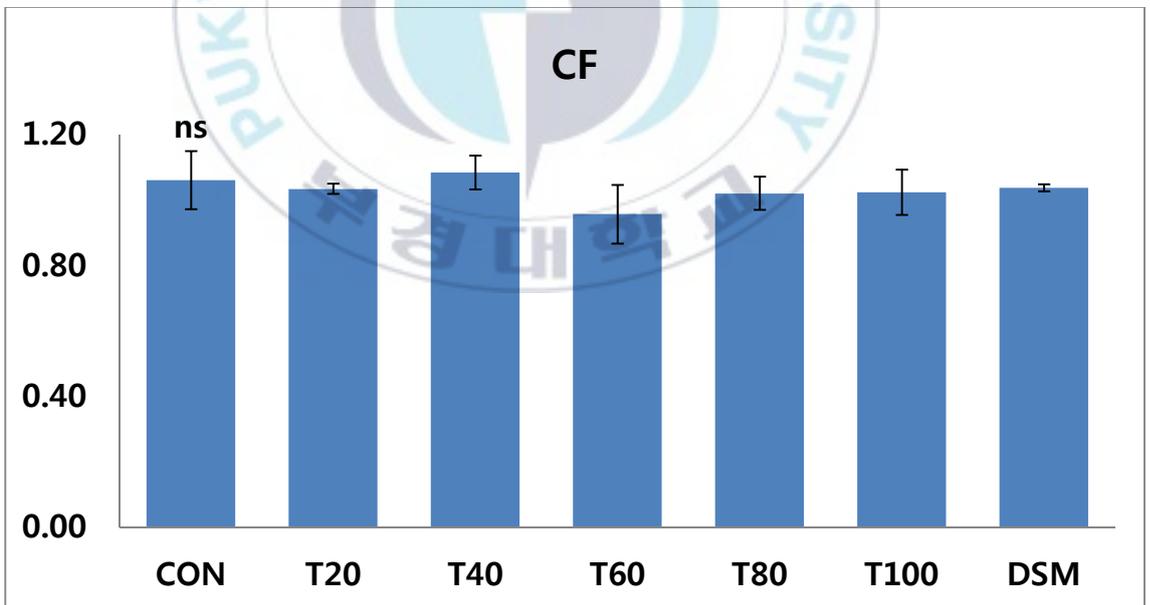


Figure 2-14. Condition factor of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks.

Table 2-6. Whole-body proximate composition (%) of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks¹

	CON	T20	T40	T60	T80	T100	DSM	Pooled SEM
Crude Protein	74.5 ^{ns}	75.1	74.8	74.7	74.4	77.0	76.1	0.4
Crude Lipid	12.6 ^{ns}	11.6	13.7	13.4	14.1	11.9	12.7	0.6
Crude Ash	12.6 ^{ns}	12.8	13.0	12.5	13.4	13.4	13.4	0.1
Moisture	76.4 ^{ns}	78.4	76.3	78.5	78.7	78.7	79.0	0.5

¹Values are means from triplicate groups of fish where the values in each row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

Table 2-7. Hematological analysis of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks¹

	CON	T20	T40	T60	T80	T100	DSM	Pooled SEM
GOT ²	30.9 ^{ns}	38.3	32.7	34.8	38.8	39.4	39.5	1.39
GPT ³	9.00 ^{ns}	11.7	10.3	10.7	11.0	11.7	12.3	0.45
GLU ⁴	81.7 ^{ns}	80.3	82.0	87.0	88.3	87.3	84.7	1.11
TP ⁵	3.37 ^{ns}	3.50	3.37	3.33	3.67	3.57	3.27	0.04

¹Values are means from triplicate groups of fish where the values in each row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

²Glutamic oxaloacetic transaminase (U/l)

³Glutamic oxaloacetic transaminase (U/l)

⁴Glucose (mg/dl)

⁵Total protein (g/dl)

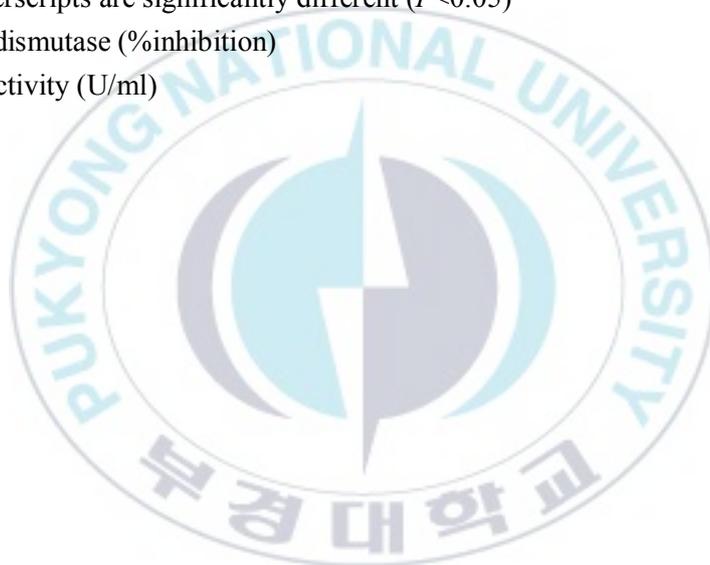
Table 2-8. Non-specific immune responses of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks¹

	CON	T20	T40	T60	T80	T100	DSM	Pooled SEM
SOD ² (% inhibition)	84.8 ^c	94.8 ^{ab}	96.0 ^a	91.1 ^{abc}	92.8 ^{abc}	88.9 ^{abc}	86.7 ^{bc}	1.57
Lysozyme ³ (U/ml)	0.33 ^c	1.04 ^a	0.77 ^b	0.76 ^b	0.23 ^c	0.30 ^c	0.22 ^c	0.12

¹Values are means from triplicate groups of fish where the values in each row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$)

²Superoxide dismutase (%inhibition)

³Lysozyme activity (U/ml)



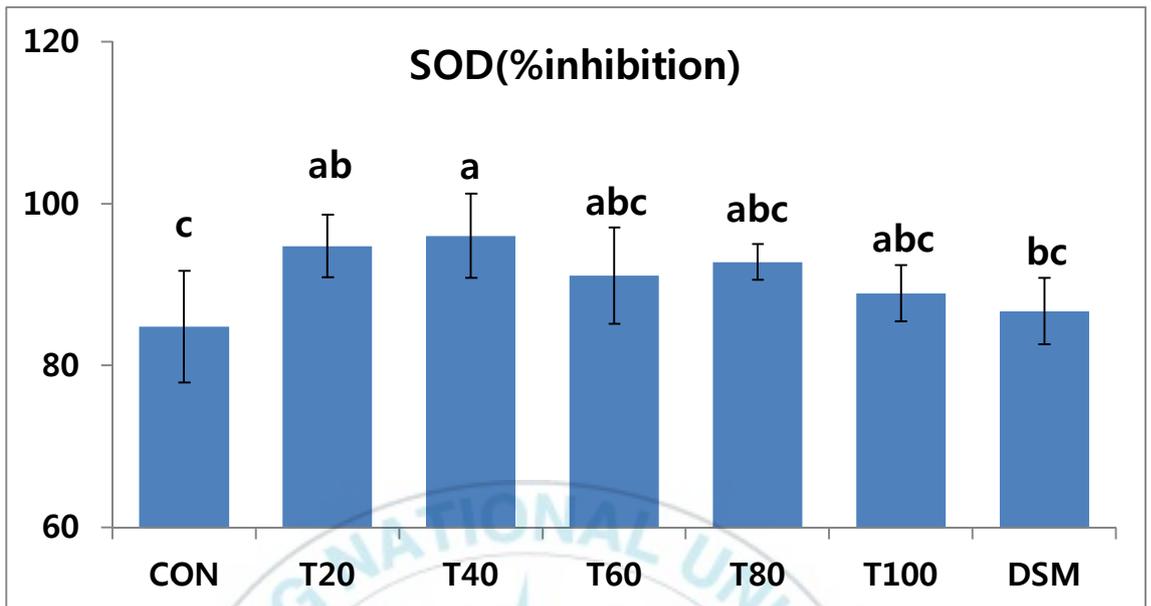


Figure 2-15. Superoxide dismutase (%inhibition) of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks.

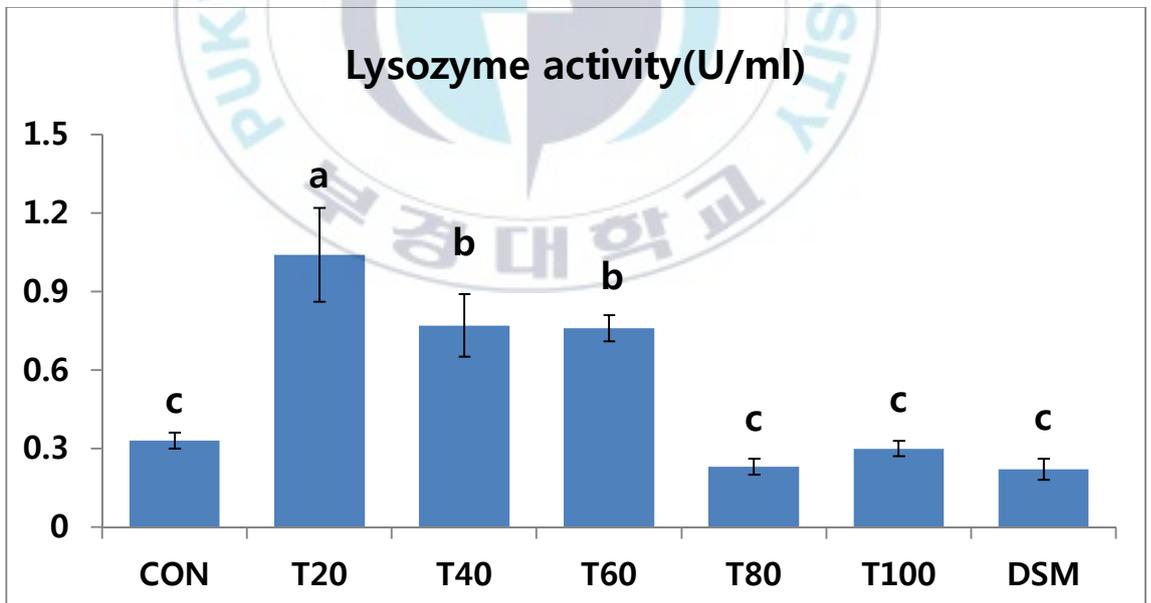


Figure 2-16. Lysozyme activity (U/ml) of juvenile rainbow trout fed experimental diets for 8 weeks.

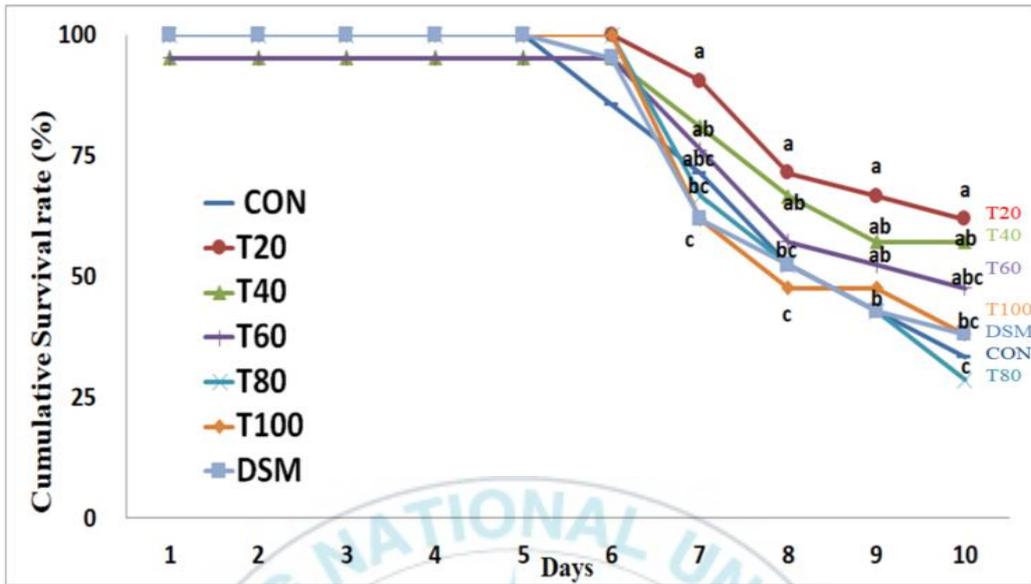


Figure 2-17. Cumulative survival (%) by the challenge of *Lactococcus garvieae* in juvenile rainbow trout fed experimental diets.

제 4 절 결론

무지개송어 사료내 어분 대체제로서 미세조류를 이용한 성장 평가, 비특이적 면역반응 평가, *Lactococcus garvieae* 공격실험의 실험결과로부터 미세조류인 *Schizochytrium* sp.는 무지개송어 내 어유를 80%까지 대체가능한 것으로 판단되었으며, 특히 20% 대체 실험구에서는 *Schizochytrium* sp.의 첨가효과로 인하여 대조구에 비해 높은 성장, 비특이적 면역반응, 공격실험에 대한 내병성을 보여주었다. 전어체의 혈액분석 결과는 미세조류의 대체율에 따른 전 실험구간에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 이상의 결과를 종합하면 미세조류인 *Schizochytrium* sp.는 무지개송어 사료 내 어유 함유량 중에서 80%가 대체 가능하다고 판단된다.

참 고 문 헌

- Abdel-Tawwab, M., & Ahmad, M. H. (2009). Live *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 40(9), 1037-1046.
- Adel, M., Yeganeh, S., Dadar, M., Sakai, M., & Dawood, M. A. (2016). Effects of dietary *Spirulina platensis* on growth performance, humoral and mucosal immune responses and disease resistance in juvenile great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1754). *Fish & shellfish immunology*, 56, 436-444.
- Bell, J. G., McEvoy, J., Tocher, D. R., McGhee, F., Campbell, P. J., & Sargent, J. R. (2001). Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *The Journal of nutrition*, 131(5), 1535-1543.
- Betiku, O. C., Barrows, F. T., Ross, C., & Sealey, W. M. (2016). The effect of total replacement of fish oil with DHA-Gold® and plant oils on growth and fillet quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a plant-based diet. *Aquaculture nutrition*, 22(1), 158-169.
- Bowyer, J. N., Qin, J. G., Smullen, R. P., & Stone, D. A. J. (2012). Replacement of fish oil by poultry oil and canola oil in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) at optimal and suboptimal temperatures. *Aquaculture*, 356, 211-222.
- Brandsen, M. P., Carter, C. G., & Nichols, P. D. (2003). Replacement of fish oil with sunflower oil in feeds for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): effect on growth performance, tissue fatty acid composition and disease resistance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 135(4), 611-625.
- Caballero, M.J., Obach, A., Rosenlund, G., Montero, D., Gisvold, M. & Izquierdo,

- M.S. (2002) Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 214, 253–271.
- Dosanjh et al., 1984 B.S Dosanjh, D.A Higgs, M.D Plotnikoff, J.R McBride, J.R Markert, J.T Buckley Efficacy of canola oil, pork lard and marine oil singly and in combination as supplemental dietary lipid sources for juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) *Aquaculture*, 36 (1984), pp. 333-345
- Dosanjh et al., 1998 B.S Dosanjh, D.A Higgs, D.J McKenzie, D.J Randall, J.G Eales, N Rowshandeli, M Rowshandeli, G Deacon Influence of dietary blends of menhaden oil and canola oil on growth, muscle lipid composition, and thyroidal status of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in sea water
- Duncan, P. L., & Klesius, P. H. (1996). Effects of feeding *Spirulina* on specific and nonspecific immune responses of channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 8(4), 308-313.
- Figueiredo□Silva, A., Rocha, E., Dias, J., Silva, P., Rema, P., Gomes, E., & Valente, L. M. P. (2005). Partial replacement of fish oil by soybean oil on lipid distribution and liver histology in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 11(2), 147-155.
- Fonseca-Madrigal, J., Karalazos, V., Campbell, P. J., Bell, J. G., & Tocher, D. R. (2005). Influence of dietary palm oil on growth, tissue fatty acid compositions, and fatty acid metabolism in liver and intestine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*, 11(4), 241–250.
- Garcia□Garrido, L., Muñoz□Chapuli, R., & De Andres, A. V. (1990). Serum cholesterol and triglyceride levels in *Scyliorhinus canicula* (L.) during sexual maturation. *Journal of fish Biology*, 36(4), 499-509.

- Greene and Selivonchick, 1990 D.H.S Greene, D.P Selivonchick Effects of dietary vegetable, animal and marine lipids on muscle lipid and hematology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Aquaculture*, 89 (1990), pp. 165-182
- Guillou et al., 1995 A Guillou, P Soucy, M Khalil, L Adambounou Effects of dietary vegetable and marine lipid on growth, muscle fatty acid composition and organoleptic quality of flesh of brook charr (*Salvelinus fontinalis*) *Aquaculture*, 136 (1995), pp. 351-362
- Higgs DA, Dong FM (2000) Lipids and fatty acids. In: Stickney RR (ed.) *Encyclopedia of Aquaculture*, pp. 476–496. John Wiley & Sons, New York.
- Hikima, J. I., Minagawa, S., Hirono, I., & Aoki, T. (2001). Molecular cloning, expression and evolution of the Japanese flounder goose-type lysozyme gene, and the lytic activity of its recombinant protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1520(1), 35-44.
- Kim, K. D., Lee, S. M., Park, H. G., Bai, S. C., & Lee, Y. H. (2002). Essentiality of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 33(4), 432–440.
- Lee, S. M., & Kim, K. D. (2009). Effects of dietary carbohydrate to lipid ratios on growth and body composition of juvenile and grower rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Aquaculture Research*, 40(16), 1830–1837.
- Lee, S. M., Lee, J. H., & Kim, K. D. (2003). Effect of dietary essential fatty acids on growth, body composition and blood chemistry of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Aquaculture*, 225(1–4), 269–281.
- Mourente, G., Dick, J. R., Bell, J. G., & Tocher, D. R. (2005). Effect of partial substitution of dietary fish oil by vegetable oils on desaturation and β -oxidation of [1-14C]18:3n-3 (LNA) and [1-14C]20:5n-3 (EPA) in hepatocytes

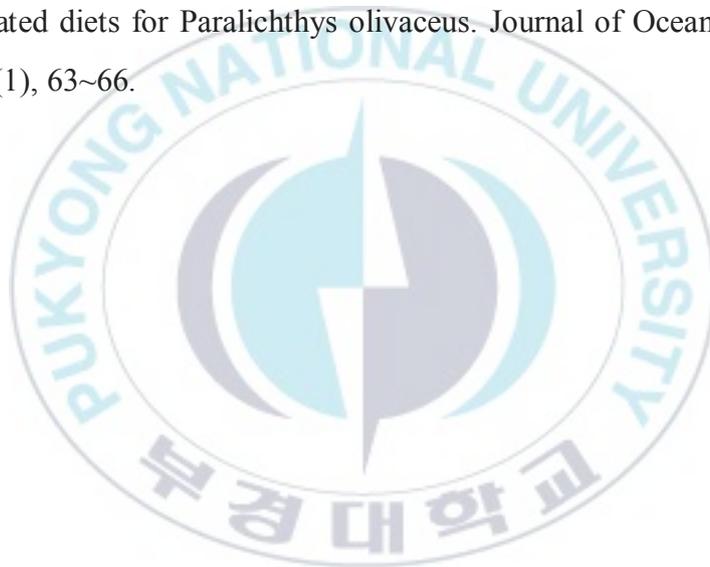
- and enterocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 248(1–4), 173–186.
- Nayak, M., Saha, A., Pradhan, A., Samanta, M., & Giri, S. S. (2017). Dietary fish oil replacement by linseed oil: Effect on growth, nutrient utilization, tissue fatty acid composition and desaturase gene expression in silver barb (*Puntius gonionotus*) fingerlings. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 205, 1-12.
- Pérez, J. A., Rodríguez, C., Bolaños, A., Cejas, J. R., & Lorenzo, A. (2014). Beef tallow as an alternative to fish oil in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles: Effects on fish performance, tissue fatty acid composition, health and flesh nutritional value. *European journal of lipid science and technology*, 116(5), 571-583.
- Richard, N., Kaushik, S., Larroquet, L., Panserat, S. & Corraze, G. (2006) Replacing dietary fish oil by vegetable oils has little effect on lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.*, 96, 299–309.
- Rinchart, J., Czesny, S. & Dabrowski, K. (2007) Influence of lipid class and fatty acid deficiency on survival, growth, and fatty acid composition in rainbow trout juveniles. *Aquaculture*, 264, 363–371.
- Rosenlund, G., Obach, A., Sandberg, M. G., Standal, H., & Tveit, K. (2001). Effect of alternative lipid sources on long-term growth performance and quality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research*, 32, 323-328.
- Ruyter B, Røsjø C, Einen O, Thomassen MS (2000) Essential fatty acids in Atlantic salmon: effects of increasing dietary doses of n-6 and n-3 fatty acids on growth, survival and fatty acid composition of liver, blood and carcass.

- Aquaculture Nutrition 6: 119–127.
- Sargent JR, Tocher DR, Bell JG (2002) The lipids. In: Halver JE, Hardy RW (eds) Fish Nutrition, pp. 181–257. Academic Press, Elsevier, San Diego.
- Saurabh, S., & Sahoo, P. K. (2008). Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 39(3), 223-239.
- Siddiqui, A. Q. Reproductive biology, length–weight relationship and relative condition of *Tilapia leucosticta* (Trewavas) in Lake Naivasha, Kenya. *Journal of Fish Biology*, 10(3), (1977). 251-260.
- Sprague, M., Walton, J., Campbell, P. J., Strachan, F., Dick, J. R., & Bell, J. G. (2015). Replacement of fish oil with a DHA-rich algal meal derived from *Schizochytrium* sp. on the fatty acid and persistent organic pollutant levels in diets and flesh of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) post-smolts. *Food Chemistry*, 185, 413–421.
- Tacon AGJ, Hasan MR, Subasinghe RP (2006) Use of fishery resources as feed inputs to aquaculture development: trends and policy implications. FAO Fisheries Circular No. 1018.
- Tacon, A. G., & Metian, M. (2015). Feed matters: satisfying the feed demand of aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 23(1), 1-10.
- Thomassen and Rosjo, 1989 M.S Thomassen, C Rosjo Different fats in feed for salmon: influence on sensory parameters, growth rate and fatty acids in muscle and heart *Aquaculture*, 79 (1989), pp. 129-135
- Turchini, G. M., Ng, W. K., & Tocher, D. R. (2010). Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds. CRC Press.
- Turchini, G. M., Torstensen, B. E., & Ng, W. K. (2009). Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, 1(1), 10–57.
- Webster, C. D., & Lovell, R. T. (1990). Response of striped bass larvae fed brine

shrimp from different sources containing different fatty acid compositions. *Aquaculture*, 90(1), 49–61.

Xu, W., Gao, Z., Qi, Z., Qiu, M., Peng, J. Q., & Shao, R. (2014). Effect of dietary *Chlorella* on the growth performance and physiological parameters of gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14(1), 53-57.

Zhu W, Mai KS, Zhang BG, Hu YJ, and Yu Y (2006). A study on the meat and bone meal or poultry by-product meal as protein substitutes of fishmeal in concentrated diets for *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Ocean University of China*, 5(1), 63~66.



제 3 장 사료원, *Schizochytrium* sp., 어분, 대두박 및 가금부산물물의 소화율 분석

제 1 절 서론

사료 원료의 소화율 측정은 원료의 사용에 앞서 필수적으로 수행되어야 할 단계이다(Storebakken et al, 1998; Jafri and Hassan, 1999). 사료에 사용될 원료의 영양소 조성은 성분 분석을 통해 알 수 있지만, 어류가 섭취한 원료의 영양소가 소화되지 못하고, 흡수되지 않으면 원료의 영양소는 실제로는 영양 가치를 갖지 못하게 된다(Kim et al., 2010). 따라서 사료 원료가 가지고 있는 영양소 분석 외에도, 실제로 어류가 사용할 수 있는지에 대한 소화율을 측정해야 사료 원료의 영양 가치를 보다 정확하게 평가할 수 있다. 수십년간 양어사료에 사용된 다양한 동물성 원료(정어리 어분, 참치 어분, 멸치어분, 혈분, 우모분, 육골분, 가금부산물 등) 및 식물성원료(대두박, 면식박, 옥수수 주정박, 카놀라박 등)의 소화율을 무지개송어를 비롯한 연어과에서 평가하였다(Gomes et al., 1995; Sugiura et al., 1998; Bureau et al., 1999; Cheng and Hardy, 2003; Gaylord et al., 2008; Burr et al., 2011). 무지개송어의 사료원료로써 *Schizochytrium* sp.의 가치를 평가하기 위해서는 영양소 소화율을 규명하는 것이 필수적이다.

따라서 본 연구는 양어사료의 주원료인 어분, 대두박, 가금부산물과 함께 *Schizochytrium* sp. 의 소화율을 비교 분석하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1) 실험어 및 사육관리

사육실험용 90g 내외의 무지개송어는 이화정 양식장(경상북도 상주시)으로부터 부경대학교 영양대사학연구실로 운반하였다. 실험에 들어가기에 앞서 250L 수조에 2주간 기초사료를 공급하면서, 예비사육을 하였으며 사육실험은 4주간 실시하였다. 예비 사육 후, $95.6 \pm 2.1\text{g}$ 으로 250L 사각수조에 각각 11마리씩 수용하여 각 실험구당 4반복으로 무작위 배치하였다(Figure 3-1). 각 실험수조는 반순환여과식으로 첫번째 실험과 동일한 조건으로 실험을 진행하였다.

2) 실험사료 및 실험설계

실험사료는 표준사료(Ref), 미세조류(SC), 기존 상업용 미세조류(DSM), 어분(FM), 대두박(SBM), 가금부산물(PBM) 실험사료로 제조하여 각 원료의 영양소 소화율 분석을 실시하였다. 사료의 단백질원으로 어분, 대두박, 가금부산물, 혈분, 육골분, 밀글루텐밀을 사용하였으며, 탄수화물원으로는 밀가루, 지질원으로는 어유를 사용하였다. 소화율 분석을 위한 사료 제조 시 Chromic oxide를 첨가하였으며, 모든 사료원을 골고루 섞은 뒤 펠렛제조기로 압출·성형하여 환풍이 잘 되는 곳에서 자연 건조시킨 다음 실험어의 크기에 맞도록 입자 크기를 고르게 친 후, 밀봉하여 -20°C 에 냉동보관하여 사용하였다. 실험사료 조성 및 성분 분석결과는 table 3-1에 나타내었다.



Figure 3-1. 무지개송어 사육수조.



Table 3-1. Composition of the experimental diets in rainbow trout (% of DM basis)

Ingredients	Diets(%)					
	Ref	MAG	DSM	FM	SBM	PBM
Fish meal (Chile)	20	13.94	13.94	13.94	13.94	13.94
Soybean meal	19	13.24	13.24	13.24	13.24	13.24
Poultry by product	16.12	11.24	11.24	11.24	11.24	11.24
Blood meal	5.70	3.97	3.97	3.97	3.97	3.97
Meat and bone meal	9.00	6.27	6.27	6.27	6.27	6.27
Wheat gluten meal	5.00	3.49	3.49	3.49	3.49	3.49
Wheat flour	11.9	8.29	8.29	8.29	8.29	8.29
Soybean oil	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Fish oil	6.80	4.74	4.74	4.74	4.74	4.74
Methionine	0.43	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Lysine	0.51	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36
Choline	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
Lecithin	0.5	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
Vitamin premix	2.00	1.39	1.39	1.39	1.39	1.39
Mineral premix	2.00	1.39	1.39	1.39	1.39	1.39
Cr ₂ O ₃	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Micro-algae		30				
DSM			30			
Fish meal(Chile)				30		
Soybean meal					30	
Poultry by product						30
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Moisture	9.71	6.03	7.73	8.94	8.84	10.1
Ash	12.4	10.6	11.4	11.1	11.2	11.3
Crude Protein	44.4	40.8	38.1	46.2	47.9	51.9

3) 소화율 분석

실험사료와 분에서의 지시제로 사용된 chromium oxide 함량은 Divakaran et al. (2002)의 방법을 토대로 분석하였다(Figure 3-2). 실험사료 및 분 샘플은 회화로(550℃)에서 3시간 동안 회화한 후 얻어진 시료를 분석에 사용하였다. Chromium oxide를 mono-chromate 형태로 산화시키기 위해 샘플 5-10 mg을 측정하여 glass test tube에 옮긴 후, perchloric reagent (HClO₄) 4 ml를 첨가 한 후, 시료와 perchloric reagent가 첨가된 tube를 가열판에 넣고 300℃에서 20분간 가열한 후 유리플라스크에 옮겨 3차 증류수를 이용하여 25 ml가 되도록 정량하였다. 그 후 분광광도계(Beckman DU-730, USA)를 이용하여 350 nm에서 흡광도를 측정하여 시료의 chromium oxide 함량을 계산하였다. 영양소 소화율 및 원료 소화율은 다음과 같은 식에 의해 계산하였다.

사료 소화율, ADCs of nutrients in test diets (%)

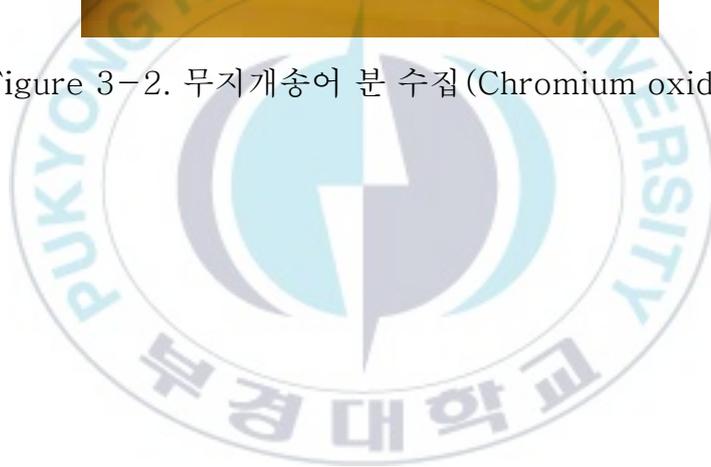
$$= 100 \times [100 - (\% \text{ marker in diet} / \% \text{ marker in feces}) \times (\text{nutrient in feces} / \text{nutrient in diet})]$$

원료 소화율, ADC Ing. (%)

$$= \text{ADC Feed} + [(\text{ADC Feed} - \text{ADC ref.diet}) \times (0.7 \times \text{Protein in Ref} / 0.3 \times \text{Protein in Ing})]$$



Figure 3-2. 무지개송어 분 수집 (Chromium oxide).



4) 통계학적 분석

실험수조의 배치는 완전 무작위 계획법을 실시하고, 성장 및 분석결과는 SAS (Version 9.4) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석을 실시하였다. 데이터 값은 최소 유의차(LSD) 검정 ($P < 0.05$)으로 비교하였다. 데이터는 평균값과 pooled SEM($=SD/\sqrt{n}$)으로 나타냈다.

제 3 절 결과 및 고찰

1) 사료 및 원료 소화율

무지개송어에 있어 사료 단백질과 지질소화율은 Table 3-2 및 Figure 3-4, 5 에 나타내었다. 조단백질 소화율은 FM 실험구가 94.2%로 가장 높은 값을 나타냈으며, MAG 실험구가 FM 실험구를 제외한 다른 실험구에 비하여 유의적으로 높은 값을 나타내었고($P > 0.05$), FM, SBM, MAG 실험구가 Ref, DSM 실험구에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내었다($P > 0.05$). 조지방 소화율에 있어, MAG, DSM 실험구가 FM, SBM, PBM 실험구에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내었으나, MAG와 DSM 실험구 사이에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($P < 0.05$).

원료 소화율은 Table 3-3와 Figure 3-6, 7에 나타내었다. 원료 단백질 소화율 분석결과 FM 실험구가 다른실험구에 비해 98%로 가장 높은 값을 나타냈으며, MAG 실험구가 SBM, PBM, DSM 실험구에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내었다($P > 0.05$). 원료 지질 소화율 분석결과

MAG와 DSM 실험구가 다른 실험구에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내었다($P>0.05$).

일반적으로 무지개송어 사료 내 식물성 원료의 단백질 소화율은 76~88%로 본 실험에 비해 낮게 나타났으나(Gomes et al., 1995; Cheng et al., 2004; Glencross et al., 2004, Gaylord et al., 2008), Gomes et al. (1995)는 어분의 조단백질 소화율은 86.6~92.3%, 대두박의 조단백질의 경우 87%의 단백질 소화율을 보고한 바 있다. 또한, Chang et al.(2000)는 각종 동물 부산물의 단백질 소화율은 57~85%까지 보고한 바 있다. 본 실험에서의 어분 단백질 소화율은 98.0%, 대두박 소화율은 92.8%, 그리고 가금부산물은 88.4%로 기존의 실험에 비해 높은 값을 나타내었으나, 이는 각 실험에 사용된 원료의 단백질 함량 차이로 보이며, 이는 본 실험에서 어분 단백질 소화율이 94%, 대두박 소화율이 89.6%, 가금부산물의 소화율이 88.0%로 최근 무지개송어를 이용한 Gaylord et al.(2008)의 실험과 유사한 결과를 보이고 있다. 또한 본 실험에 사용된 미세조류의 조단백질 소화율은 95.8%로 어분보다 낮은 소화율을 보이는데 이러한 소화기능의 감소는 biomass 내 파괴할 수 있는 세포벽 구성 요소의 농도 증가로 설명 될 수 있다. 이는 연어를 이용한 다양한 미세조류와 같은 단세포 생물에 함유된 영양소의 소화기능과 생체 이용성이 단단한 세포벽에 의해 영향을 받을 수 있음을 보여준다(Skrede et al., 2011). 무지개송어의 대두박 조지방 소화율은 평균적으로 86%, 가금류는 80%, 어분은 84%로 보고되고 있다(Cheng et al., 2004). 본 실험에서 어분, 대두박, 가금부산물, *Schizochytrium* sp.의 조지방 소화율은 24.6~55.3%로 무지개송어에서

보고된 조지방 소화율에 비해 낮은 경향을 보였다. 이는 소화율 실험에 사용되는 표준사료의 조성 차이, 원료의 생산지역과 환경에 따라 조금씩 차이가 날 수 있다(Gaylord et al., 2008). 대서양 연어를 대상으로 미세조류의 소화율을 평가한 연구에서는, 높은 DHA 함량을 가진 미세조류가 다른 미세조류에 비해 높은 지질 소화율을 나타내었다(Kiron, V et al., 2016). 이는 본 실험과 유사한 경향을 나타내며, DHA 함량이 높은 미세조류를 사료에 첨가하였을 때 DHA 함량이 낮은 미세조류에 비해 소화 효소가 더욱 활성화되는 것을 확인 하였으며, 향후 추가적인 소화 효소 관련 연구가 진행되어야 될 것으로 사료된다.



Table 3-2. Apparent digestibility coefficients (% ADC) for crude protein of juvenile rainbow trout fed experimental diets¹

	Ref ²	MAG	DSM	FM	SBM	PBM	Pooled SEM
Crude protein	88.2 ^d	91.4 ^b	87.8 ^d	94.2 ^a	89.6 ^c	88.3 ^d	1.02
Crude Lipid	87.6 ^a	79.4 ^b	78.6 ^b	75.5 ^c	70.1 ^d	69.7 ^d	2.98

¹Values are means from triplicate groups of fish where the values in each row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

²Reference diet

Table 3-3. Apparent digestibility of ingredients (% ADI) of juvenile rainbow trout fed experimental diets¹

	MAG	DSM	FM	SBM	PBM	Pooled SEM
Crude protein	95.8 ^b	86.7 ^d	98.0 ^a	92.8 ^c	88.4 ^d	1.82
Crude Lipid	55.3 ^a	54.7 ^a	44.6 ^b	25.8 ^c	24.6 ^c	6.73

¹Values are means from triplicate groups of fish where the values in each row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

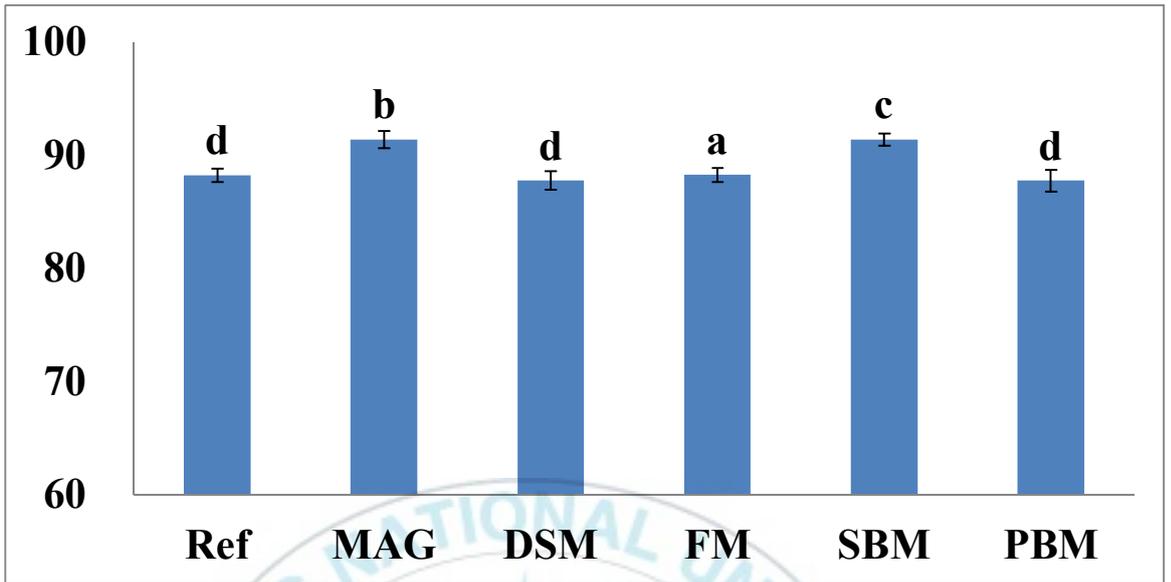


Figure 3-3. Apparent digestibility coefficients (%) for crude protein of juvenile rainbow trout fed experimental diets.

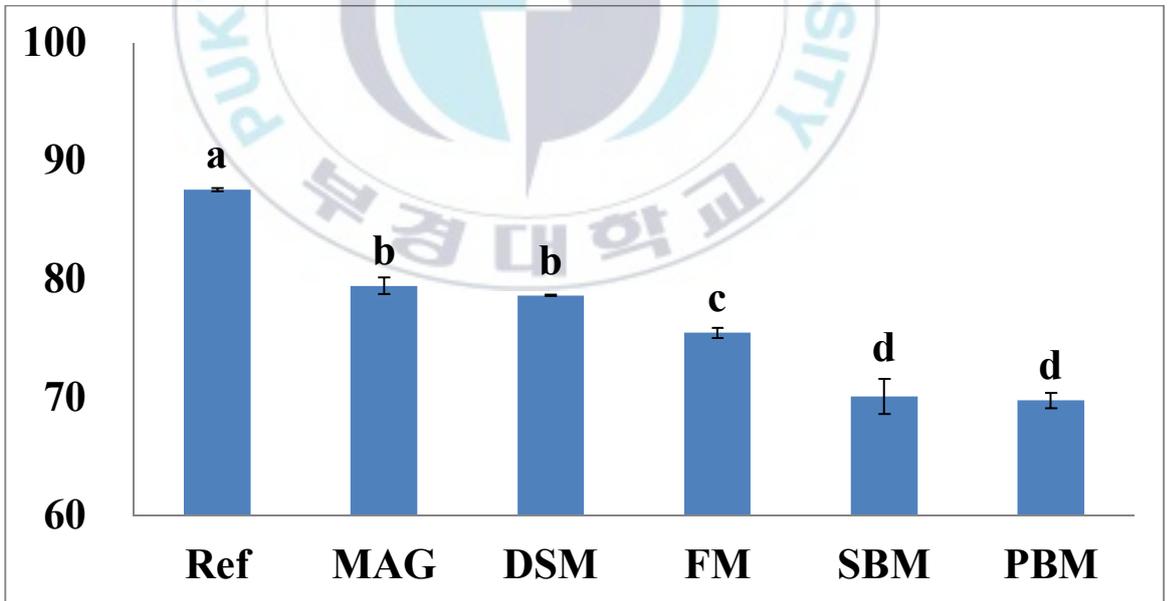


Figure 3-4. Apparent digestibility coefficients (%) for crude lipid of juvenile rainbow trout fed experimental diets.

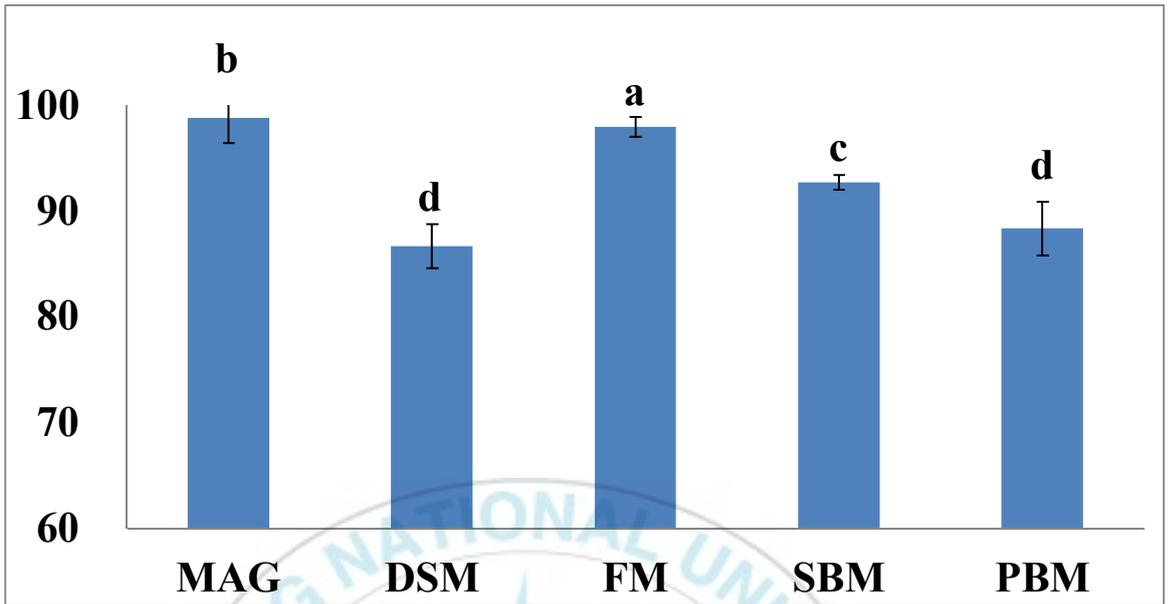


Figure 3-5. Apparent digestibility of ingredients (%) for crude protein of juvenile rainbow trout fed experimental diets.

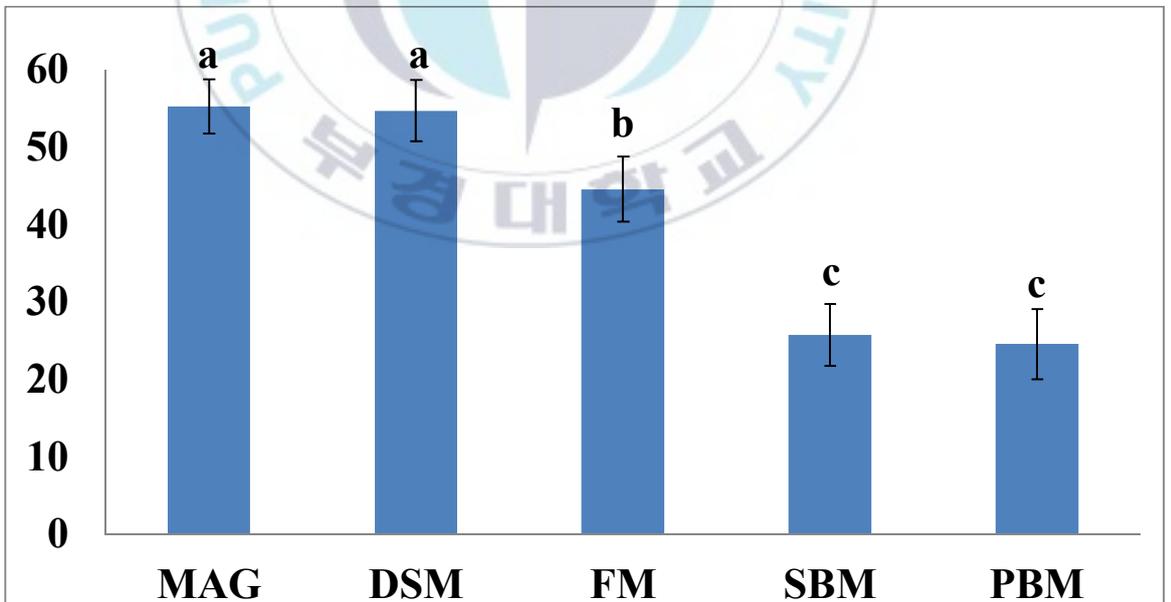


Figure 3-6. Apparent digestibility of ingredients (%) for crude lipid of juvenile rainbow trout fed experimental diets.

제 4 절 결론

무지개송어 사료 내 어분 대체제로서 미세조류인 *Schizochytrium* sp. 및 주요원료인 어분, 대두박 및 가금부산물의 소화율 평가 결과, *Schizochytrium* sp.가 어분에 비해 다소 낮은 단백질 소화율을 보여주었으나, 지질 소화율의 경우 어분에 비해 높은 값을 나타내었다. 또한 *Schizochytrium* sp.는 대두박, 가금 부산물에 비해 높은 단백질소화율과 지질소화율을 나타내었다. 따라서 이상의 결과를 종합하면 미세조류, *Schizochytrium* sp.는 무지개송어 사료 내 단백질 및 지질원으로서 사용 가능하다고 판단된다.



참 고 문 헌

- Bureau, D. P., Harris, A. M., & Cho, C. Y. (1999). Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 180(3-4), 345-358.
- Burr, G. S., Barrows, F. T., Gaylord, G., & Wolters, W. R. (2011). Apparent digestibility of macro-nutrients and phosphorus in plant-derived ingredients for Atlantic salmon, *Salmo salar* and Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Aquaculture Nutrition*, 17(5), 570-577.
- Cheng, Z. J., & Hardy, R. W. (2003). Effects of extrusion processing of feed ingredients on apparent digestibility coefficients of nutrients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture nutrition*, 9(2), 77-83.
- Cheng, Z. J., Hardy, R. W., & Huige, N. J. (2004). Apparent digestibility coefficients of nutrients in brewer's and rendered animal by-products for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)). *Aquaculture Research*, 35(1), 1-9.
- Gaylord, T. G., Barrows, F. T., & Rawles, S. D. (2008). Apparent digestibility of gross nutrients from feedstuffs in extruded feeds for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 39(6), 827-834.
- Glencross, B., & Hawkins, W. (2004). A comparison of the digestibility of lupin (*Lupinus sp.*) kernel meals as dietary protein resources when fed to either, rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* or red seabream, *Pagrus auratus*. *Aquaculture nutrition*, 10(2), 65-73.
- Gomes, E. F., Rema, P., & Kaushik, S. J. (1995). Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): digestibility and growth performance. *Aquaculture*, 130(2-3), 177-186.
- Jafri, A. K., & Hassan, M. A. (1999). Energy Digestibility Coefficients of Commonly Used Feedstuffs in Different Size-Classes of Indian Major Carps, *Labeo rohita*

- (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Asian Fisheries Science*, 12(2), 155-163.
- Kim, K. D., Kim, D. G., Kim, S. K., Kim, K. W., Son, M. H., & Lee, S. M. (2010). Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43(4), 325-330.
- Kiron, V., Sørensen, M., Huntley, M., Vasanth, G. K., Gong, Y., Dahle, D., & Paliwadana, A. M. (2016). Defatted biomass of the microalga, *Desmodesmus* sp., can replace fishmeal in the feeds for Atlantic salmon. *Frontiers in Marine Science*, 3, 67.
- Skrede, A., Mydland, L. T., Ahlstrøm, Ø., Reitan, K., Gislerød, H., & Øverland, M. (2011). Evaluation of microalgae as sources of digestible nutrients for monogastric animals. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 20, 131–142.
- Storebakken, T., Kvien, I. S., Shearer, K. D., Grisdale-Helland, B., Helland, S. J., & Berge, G. M. (1998). The apparent digestibility of diets containing fish meal, soybean meal or bacterial meal fed to Atlantic salmon (*Salmo salar*): evaluation of different faecal collection methods. *Aquaculture*, 169(3-4), 195-210.
- Sugiura, S. H., Dong, F. M., Rathbone, C. K., & Hardy, R. W. (1998). Apparent protein digestibility and mineral availabilities in various feed ingredients for salmonid feeds. *Aquaculture*, 159(3-4), 177-202.
- Zhang, J. X., Guo, L. Y., Feng, L., Jiang, W. D., Kuang, S. Y., Liu, Y., ... & Zhou, X. Q. (2013). Soybean β -conglycinin induces inflammation and oxidation and causes dysfunction of intestinal digestion and absorption in fish. *PloS one*, 8(3), e58115.

제 4장. 부록

Exp. 1. Growth performance of rainbow trout fed the experimental diets for 8 weeks

Diets	Rep	IW (g)	FW (g)	WG (%)	SGR (%/d)	FE (%)	PER	Survival (%)
CON	1	3.20	8.84	176.3	1.85	104.12	2.04	95
	2	3.05	9.11	198.5	1.99	115.32	2.26	95
	3	3.20	9.50	196.9	1.98	110.72	2.17	90
T20	1	3.20	11.42	256.9	2.31	143.34	2.81	95
	2	3.20	9.90	209.4	2.05	122.56	2.40	100
	3	3.10	11.53	271.8	2.39	151.65	2.97	95
T40	1	3.10	9.00	190.3	1.94	109.31	2.19	95
	2	3.15	9.56	203.4	2.02	114.93	2.30	90
	3	3.20	8.47	164.8	1.77	91.69	1.83	95
T60	1	3.10	8.60	177.4	1.86	101.68	2.03	100
	2	3.20	9.10	184.4	1.90	102.36	2.05	100
	3	3.15	8.39	166.3	1.78	92.33	1.85	95
T80	1	3.20	8.68	171.4	1.82	98.52	2.01	95
	2	3.05	8.53	179.6	1.87	99.99	2.04	95
	3	3.20	8.05	151.6	1.68	85.74	1.75	100
T100	1	3.10	7.40	138.7	1.58	77.36	1.58	95
	2	3.20	6.75	110.9	1.36	64.92	1.32	100
	3	3.20	7.70	140.6	1.60	78.43	1.60	100
DSM	1	3.10	7.55	143.5	1.62	82.09	1.64	100
	2	3.15	8.10	157.1	1.72	92.86	1.86	100
	3	3.20	8.47	164.8	1.77	92.75	1.86	95

Exp. 2. Initial body weight of rainbow trout for the digestibility trial

Diets	Rep	Fish no.	Total weight	Weight per fish
Ref.	1	11	1073	97.5
	2	11	1101	100.1
	3	11	968	88.0
	4	11	1056	96.0
FM	1	11	962	87.5
	2	11	1111	101.0
	3	11	1190	108.2
	4	11	1012	92.0
SBM	1	11	1056	96.0
	2	11	1122	102.0
	3	11	1078	98.0
	4	11	1001	91.0
PBM	1	11	985	89.5
	2	11	1072	97.5
	3	11	1078	98.0
	4	11	1132	102.9
MAG	1	11	965	87.7
	2	11	976	88.7
	3	11	1099	99.9
	4	11	1043	94.8
DSM	1	11	1127	102.5
	2	11	1018	92.5
	3	10	1044	104.4
	4	10	893	89.3