

## 육성기 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 사료 내 어분 대체를 위한 식물성 원료 평가

임현운 · 김민기 · 신재형 · 신재범 · 허상우<sup>1</sup> · 이봉주<sup>1</sup> · 이경준<sup>2\*</sup>

제주대학교 해양생명과학과, <sup>1</sup>국립수산과학원 사료연구센터, <sup>2</sup>제주대학교 해양과학연구소

### Evaluation of Three Plant Proteins for Fish Meal Replacement in Diet for Growing Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*

Hyunwoon Lim, Min-Gi Kim, Jaehyeong Shin, Jaebeom Shin, Sang-Woo Hur<sup>1</sup>, Bong-Joo Lee<sup>1</sup> and Kyeong-Jun Lee<sup>2\*</sup>

Department of Marine Life Science, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

<sup>1</sup>Aquafeed Research Center, National Institute of Fisheries Science, Pohang 37517, Korea

<sup>2</sup>Marine Science Institute, Jeju National University, Jeju 63333, Korea

This study was conducted to replace fish meal (FM) with three plant proteins (soybean meal, soy protein concentrate, and wheat gluten) in diets for growing olive flounder *Paralichthys olivaceus*. The control diet was formulated to contain 65% sardine FM and four other replacement diets were formulated to replace FM with the plant proteins by 25, 30, 35 and 40% (designated FM25, FM30, FM35 and FM40, respectively). The replacement diets were added with three essential amino acids (lysine, methionine and threonine) to meet their requirements for the fish. Olive flounder (initial average weight, 96.8±0.2 g) were randomly distributed into 20 tanks (425 L each) at a density of 25 fish per tank. Four replicate groups of fish were fed one of the diets two times daily for 15 weeks. At the end of the feeding trial, no significant differences were found among all the fish groups in growth performance, feed utilization, non-specific immune responses and hematological health parameters. Thus, this result indicates that the plant proteins with the three limiting amino acids could replace FM up to 40% in diets for growing olive flounder.

Keywords: Olive flounder *Paralichthys olivaceus*, Fish meal, Plant protein, Replacement, Growth

## 서론

넙치는 국내 양식산업의 대표 어종으로 2018년 생산량은 37,240톤이며 전체 어류양식 생산량의 약 46%를 차지하고 있다(KOSIS, 2019). 넙치는 단백질 이용성이 높은 육식성 어류로 사료를 통한 단백질의 공급은 아미노산과 에너지를 충족시키기 위해 매우 중요하다(NRC, 2011; Kim et al., 2017). 어분(fish meal, FM)은 단백질 함량(60-70%)이 높고, 필수아미노산과 지방산, 미네랄 등이 풍부하며, 미지성장인자(unknown growth factors)를 함유하고 있어, 넙치 사료 내 최적의 단백질 원료로 알려져 있다(Males and Chapman, 2006; Kim et al., 2019a). 그러나, 어분의 가격은 어획량의 감소와 수요의 증가에 따른 수급

불안정으로 인해 지난 수 십년간 상승세를 유지하고 있다. 어분 가격의 급격한 상승뿐만 아니라 지속 가능한 양식 산업으로의 전환을 위해서는 넙치사료에 과다하게 사용되고 있는 어분을 줄여야만 한다(Yang et al., 2011; Kim et al., 2019a).

대두박(soybean meal)은 단백질의 함량이 높고 섬유소의 함량이 낮을 뿐만 아니라 가격이 저렴하여 양어사료 내 어분을 효율적으로 대체할 수 있다고 보고되었다(Gatlin et al., 2007; Lin and Luo, 2011). 하지만 대두박은 원료의 소화·흡수를 저해하는 항영양인자(protease inhibitors, lectin, phytic acid, soya-saponin, non-starch polysaccharides)를 함유하고 있어, 양어사료에 다량으로 사용할 경우 성장저하 등의 문제가 발생한다(Francis et al., 2001). 이러한 문제를 해결하기 위해 대두박을 2차적

\*Corresponding author: Tel: +82. 64. 754. 3423 Fax: +82. 64. 756. 3493

E-mail address: kjlee@jeju.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0464>

Korean J Fish Aquat Sci 53(3), 464-470, June 2020

Received 27 March 2020; Revised 24 April 2020; Accepted 15 May 2020

저자 직위: 임현운(대학원생), 김민기(대학원생), 신재형(대학원생), 신재범(대학원생), 허상우(연구사), 이봉주(연구사), 이경준(교수)

으로 가공처리하여 어분대체율을 높이기 위한 연구가 수행되고 있다. 농축대두단백(soy protein concentrate, SPC), 분리대두단백(soy protein isolate, SPI) 등이 어분을 대체할 수 있는 대두가공품으로 주목 받고 있다(Chou et al., 2004; Glencross et al., 2005). Biswas et al. (2019)은 SPC를 사용하여 참돔 사료 내 어분을 70%까지 성공적으로 대체하였다. 밀글루텐(wheat gluten)은 타 식물성 단백질원료에 비해 항영양인자의 함량이 비교적 낮은 것으로 알려져 있다(Krogdahl, 1989). Jalili et al. (2013)은 무지개 송어(*Oncorhynchus mykiss*)에서 밀글루텐, 콘글루텐밀(corn gluten meal), 대두박 혼합물(3:1:3)로 사료 내 어분을 40%까지 대체 가능하다고 보고하였다.

어분대체 연구에서 단일 원료만을 이용하여 어분을 대체할 경우, 제한아미노산, 항영양인자 등으로 인해 어류의 성장과 사료효율이 감소하는 것으로 보고되었다(Krogdahl et al., 2010; Enterria et al., 2011). Kim et al. (2019b)은 치어기 넙치에서 대두박, 밀글루텐, SPC를 혼합 사용하여 사료 내 어분을 30%까지 대체하는데 성공하였다. 그러나 넙치를 대상으로 한 어분대체 연구는 주로 치어기 넙치를 이용하여 수행되어왔으며, 육성기 넙치를 대상으로 진행된 장기간의 사육실험 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 후속 연구로써 육성기 넙치(96.8 g)를 대상으로 15주간의 사육실험을 통해 3가지 식물성 단백질원료(대두박, SPC, 밀글루텐)의 사료 내 어분대체율을 평가하고자 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 실험사료

실험사료의 조성표는 Table 1에 나타내었다. 실험사료는 주 단백질원으로 정어리어분(sardine FM)을 사용하였으며, 대조 사료(Con) 내 어분 함량은 65%로 설정하였다. 나머지 4종의 실험사료는 식물성원료 혼합물(대두박, SPC, 밀글루텐)을 사용하여 대조사료 내 어분을 각각 25, 30, 35, 40% 대체하였다(FM25, FM30, FM35, FM40). 필수아미노산의 함량을 동일하게 하기 위해 lysine, methionine, threonine 을 첨가하였다. Taurine은 어분대체 실험어에 대한 실험사료의 기호성을 증진시키기 위해 첨가하였다. 실험사료는 모든 사료원료들을 혼합한 후 어유와 증류수를 첨가하였고, 사료제작기(SP-50, Gungang engineering, Daegu, Korea)를 이용하여 5 mm 크기로 제작하였다. 실험사료는 건조(25°C, 12시간) 후 사용 전까지 냉동보관(-20°C)하였다.

### 실험어 및 사육관리

실험에 사용된 넙치는 제주도 내 넙치 양식장에서 구입하였으며, 사육실험은 제주대학교 해양과학연구소에서 실시하였다. 예비사육 후, 육성기 넙치(96.8±0.2 g)는 총 20개의 실험수조(4 반복, 425 L 원형 polypropylene)에 각각 25마리씩 무작위로 배

Table 1. Dietary formulation of the experimental diets for growing olive flounder *Paralichthys olivaceus* (% of dry matter basis)

Ingredients	Experimental diets				
	Con	FM25	FM30	FM35	FM40
Fish meal, sardine <sup>1</sup>	65.00	48.75	45.50	42.25	39.00
Soybean meal <sup>2</sup>	5.00	11.50	12.80	14.10	15.40
SPC <sup>3</sup>	-	4.875	5.85	6.825	7.80
Wheat gluten <sup>4</sup>	-	4.875	5.85	6.825	7.80
Wheat flour	21.50	17.80	17.40	17.10	16.60
Corn gluten meal <sup>2</sup>	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Fish oil <sup>5</sup>	3.00	4.40	4.60	4.90	5.20
Lysine <sup>6</sup>	-	0.42	0.50	0.50	0.50
Threonine <sup>6</sup>	-	0.20	0.30	0.30	0.30
Methionine <sup>7</sup>	-	0.20	0.20	0.20	0.30
Taurine	-	0.50	0.50	0.50	0.50
Lecithin	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Mono-calcium phosphate	-	1.00	1.00	1.00	1.00
Mineral Mixture <sup>8</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin Mixture <sup>9</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Proximate composition					
Moisture	5.40	5.44	5.63	5.92	5.49
Crude protein	56.7	55.5	55.3	55.0	54.8
Crude lipid	9.70	10.6	10.7	10.9	11.0
Crude ash	9.80	9.30	9.00	8.60	8.30
Lysine	3.64	3.62	3.64	3.56	3.58
Methionine	1.34	1.34	1.30	1.26	1.32
Threonine	2.03	1.99	2.05	2.00	1.96

<sup>1</sup>Orizon S.A. CO., Ltd., Chile. <sup>2</sup>Sajodaerim Co., Ltd., Seoul, Korea. <sup>3</sup>Soy protein concentrate, Corp. Korea flavor., Korea. <sup>4</sup>CJ CheilJedang Co., Ltd., Korea. <sup>5</sup>E-wha oil Co., Ltd., Busan, Korea. <sup>6</sup>Shanghai Ajinomoto amino acid Co., Ltd., China. <sup>7</sup>Evonik rexim pharmaceutical Co., Ltd., China. <sup>8</sup>Mineral mixture contained the following ingredients (g/kg, mixture): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 80.0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 370.0; KCl, 130.0; Ferric citrate, 40.0; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 20.0; Ca-lactate, 356.5; CuCl, 0.2; AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.15; Na<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0.01; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2.0; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.0. <sup>9</sup>Vitamin mixture contained the following amount which were diluted in cellulose (g/ kg, mixture): L-ascorbic acid, 121.2; DL-α tocopheryl acetate, 18.8; thiamin hydrochloride, 2.7; riboflavin, 9.1; pyridoxine hydrochloride, 1.8; niacin, 36.4; Ca-D-pantothenate, 12.7; myo-inositol, 181.8; D-biotin, 0.27; folic acid, 0.68; p-aminobenzoic acid, 18.2; menadione, 1.8; retinyl acetate, 0.73; cholecalciferol, 0.003; cyanocobalamin, 0.003. Con, contain the fish meal 65% in diet; FM25, 25% fish meal was replaced with mixture of plant protein sources in diet; FM30, 30% fish meal was replaced with mixture of plant protein sources in diet; FM35, 35% fish meal was replaced with mixture of plant protein sources in diet; FM40, 40% fish meal was replaced with mixture of plant protein sources in diet.

치되었다. 실험사료는 1일 2회(08:00, 18:00 h), 15주간 반복 공급하였다. 환수는 사료공급 30분 후에 진행하였다. 모래 여과된 사육수가 사용되었고, 유수량은 2-3 L/min으로 유지하였다. 수조 내 충분한 용존산소(dissolved oxygen)를 유지하기 위해 공기발생기(aeration)를 설치하여 사용하였다. 수조 내 수온은 자연수온( $18.0 \pm 2.50^\circ\text{C}$ )에 의존하였고, 1일 2회(09:00, 16:00 h) 측정하였다.

### 일반성분 분석

실험사료와 전어체의 일반성분 분석은 AOAC (2000) 방법에 따라 분석하였다. 수분은 상압가열건조법( $125^\circ\text{C}$ , 3시간), 조회분은 직접회화법( $550^\circ\text{C}$ , 4시간), 조단백질은 조단백분석기(Kjeltec™ 2300, FOSS analytical, Hilleroed, Denmark)를 사용하였다. 조지방은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 분석하였다.

### 어체측정

사육실험 후, 성장률, 사료효율, 생존율을 측정하기 위해 실험어를 24시간 절식 시킨 후 실험어류의 수와 무게를 측정하였다. 무게 측정 후 성장률(weight gain, %), 일간성장률(specific growth rate, %), 사료섭취량(feed intake, g/fish), 사료전환효율(feed conversion ratio), 단백질이용효율(protein efficiency ratio), 생존율(survival, %)을 조사하였다.

### 혈액 분석

최종무게 측정 후, 실험어를 각 수조마다 3마리를 무작위로 선별하여 2- phenoxyethanol 용액(100 ppm)으로 마취시켰다. 일회용 주사기로 마취된 어류의 미부동맥에서 채혈하였다. 채취된 혈액에 헤파린을 처리한 후 hematocrit과 hemoglobin을 측정하였다. Hematocrit은 micro hematocrit 방법으로 측정하였다. 15분간 원심분리(5,000 rpm)하여 혈장을 분리한 후 alanine

aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total protein, glucose 를 분석하였다. Hemoglobin, AST, ALT, total protein, glucose 분석은 각각의 시판 kit시약과 반응시킨 후 혈액생화학분석기(ch 100<sup>plus</sup>, RADIM company, Firenze, Italy)를 이용하여 분석하였다. 혈청 내 lysozyme 활성은 Mohammed et al. (2018)의 방법으로 분석하였다. 혈청 내 myeloperoxidase (MPO)활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 방법으로 분석하였다.

### 장조직 분석

전장(foregut) 조직은 Bouin's solution으로 고정되었으며, 분석 시까지 70% ethyl alcohol에 보관되었다. 고정된 장 조직은 적절한 크기로 절단되어 tissue processor (TP1020, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany)에서 단계별 탈수 과정을 거쳐 조직 절편을 파라핀(paraffin)에 포매한 후 alcian blue and periodic acid-schiff (AB-PAS) 염색을 하였다

### 통계학적 분석

실험 사료의 배치는 완전확률계획법(completely randomized design)으로 실시하였다. 성장률, 사료효율, 생존율 및 모든 분석 결과들은 SPSS (version 18.0) 프로그램을 이용하여 one-way ANOVA로 통계 분석하였다. Tukey's HSD로 데이터 평균 간의 유의성( $P < 0.05$ )을 비교하였다. 데이터는 평균값 $\pm$ 표준편차(mean $\pm$ SD)로 나타내었으며, 모든 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석하였다.

### 결과 및 고찰

15 주간의 성장률, 일간성장률, 사료섭취량, 사료전환효율, 단백질이용효율, 생존율은 모든 실험구 사이에 유의한 차이가 없었다( $P > 0.05$ , Table 2). 여러 단백질원료를 혼합하여 어분을 대

Table 2. Growth performance and feed utilization of growing olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 15 weeks<sup>1</sup>

Dietary treatment	IBW <sup>2</sup>	FBW <sup>3</sup>	WG <sup>4</sup>	SGR <sup>5</sup>	FI <sup>6</sup>	FCR <sup>7</sup>	PER <sup>8</sup>	Survival (%)
Con	97.1 $\pm$ 0.58	309 $\pm$ 33	319 $\pm$ 34	1.15 $\pm$ 0.11	179 $\pm$ 16	0.85 $\pm$ 0.08	2.11 $\pm$ 0.20	80.0 $\pm$ 8.0
FM25	97.1 $\pm$ 0.51	330 $\pm$ 26	340 $\pm$ 28	1.22 $\pm$ 0.08	186 $\pm$ 19	0.80 $\pm$ 0.03	2.23 $\pm$ 0.08	84.0 $\pm$ 8.0
FM30	96.6 $\pm$ 0.70	338 $\pm$ 12	350 $\pm$ 10	1.25 $\pm$ 0.03	194 $\pm$ 5	0.80 $\pm$ 0.03	2.22 $\pm$ 0.08	83.0 $\pm$ 6.0
FM35	96.7 $\pm$ 0.27	319 $\pm$ 25	330 $\pm$ 26	1.19 $\pm$ 0.08	179 $\pm$ 22	0.80 $\pm$ 0.06	2.23 $\pm$ 0.15	82.0 $\pm$ 2.3
FM40	96.8 $\pm$ 0.40	307 $\pm$ 17	318 $\pm$ 17	1.15 $\pm$ 0.06	167 $\pm$ 6	0.79 $\pm$ 0.05	2.26 $\pm$ 0.14	84.0 $\pm$ 8.6

<sup>1</sup>Values are mean of quadruplicates and presented as mean $\pm$ SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments. <sup>2</sup>IBW (initial mean body weight, g/fish). <sup>3</sup>FBW (final mean body weight, g/fish). <sup>4</sup>WG (weight gain, %)=(final weight-initial weight) $\times$ 100/initial weight. <sup>5</sup>SGR (Specific growth rate, %/day)=[(log final weight-log initial weight)/days]. <sup>6</sup>FI (feed intake, g/fish)=dry feed consumed (g)/fish. <sup>7</sup>FCR (feed conversion ratio)=dry feed intake/wet weight gain. <sup>8</sup>PER (protein efficiency ratio)=wet weight gain/protein intake. Con, contain the fish meal 65% in diet; FM25, 25% fish meal was replaced with mixture of plant protein sources in diet; FM30, 30% fish meal was replaced with mixture of plant protein sources in diet; FM35, 35% fish meal was replaced with mixture of plant protein sources in diet; FM40, 40% fish meal was replaced with mixture of plant protein sources in diet.

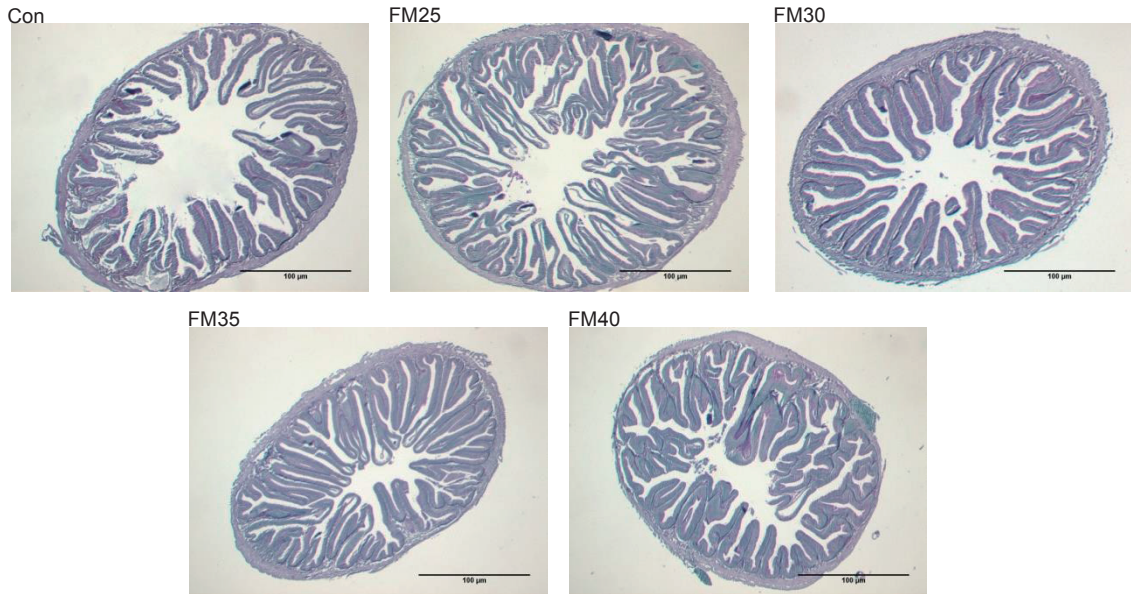


Figure 1. Intestinal structure of growing olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed experimental diets for 15 weeks. Con, contain the fish meal 65% in diet; FM25, 25% fish meal was replaced with mixture of plant protein sources in diet; FM30, 30% fish meal was replaced with mixture of plant protein sources in diet; FM35, 35% fish meal was replaced with mixture of plant protein sources in diet; FM40, 40% fish meal was replaced with mixture of plant protein sources in diet. Bar=100 µm.

체할 경우, 부족한 영양소를 상호 보완할 수 있어 한 가지 원료를 사용할 경우 보다 어분대체율을 증가시킬 수 있다고 보고되었다(Kim et al., 2019b). 단일 원료를 이용하여 넙치 사료의 어분을 대체한 연구는 일부 진행되었고, 대체율이 본 연구 결과(40%)에 비해 낮았다(17-25%). 넙치(13.2±0.02 g) 사료의 어분을 대두박으로 17% 이상 대체할 경우, 넙치의 성장률, 사료전환효율, 단백질이용효율이 대조구에 비해 감소하는 것으로 나타났다(Ye et al., 2011). Kim et al. (2008)은 치어기 넙치 (3.2 g) 사료에 어분을 대두박으로 대체하여 장기간 현장실험 (42 weeks)을 진행한 결과, 대두박의 적정 어분대체율은 30% 라고 보고하였다. SPC를 이용하여 넙치 사료에 어분을 대체한 연구에서는 대체로 대체율(25% 이하)이 낮은 것으로 보고되었다(Deng et al., 2006). 밀글루텐은 Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* 사료에 어분을 20%까지 대체할 수 있다고 보고되었다(Helland and Grisdale-Helland, 2006). 양어사료의 어분을 식물성 원료를 이용하여 다량으로 대체할 경우, 일부 아미노산이 결핍되어 아미노산을 추가로 첨가해 줄 필요가 있다(Ahmed et al., 2019). Choi et al. (2004)은 넙치(5.0±0.04 g) 사료의 대두박은 필수아미노산을 첨가할 경우 어분대체비율(30%)이 첨가하지 않은 경우(20%)에 비해 증가한다고 보고하였다. 본 연구에서는 3종의 식물성 단백질원료(대두박, SPC, 밀글루텐)를 혼합하여 사용하였고, 3종의 필수아미노산(lysine, methionine, threonine)을 첨가하여 사료 내 어분을 40%까지 대체할 수 있었던 것으로 판단된다.

장의 조직분석 결과, 모든 실험구 사이에 특이한 차이점이 관찰되지 않았다(Fig. 1). 일반적으로 육식성 어종은 사료에 식물성 단백질원료를 다량으로 사용하면 항영양인자로 인해 장의 염증반응이 나타나 소화율과 성장률이 저하된다고 알려져 있다 (Krogdahl et al., 2010; Martínez-Llorens et al., 2012). 특히, 대두박은 무지개송어, 잉어(*Common carp*)의 전장에서 염증반응

Table 3. Proximate contents of growing olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 15 weeks (% of wet basis)<sup>1</sup>

Dietary treatment	Moisture	Protein	Lipid	Ash
Con	73.0±0.8	21.2±1.6	3.07±0.72	2.77±0.75
FM25	72.8±0.4	22.4±2.7	3.14±0.51	2.60±0.53
FM30	72.2±1.2	20.2±0.9	2.80±0.36	2.96±0.45
FM35	73.0±0.8	19.5±0.0	2.80±0.24	3.02±0.44
FM40	73.6±1.1	20.2±0.2	2.74±0.05	2.41±0.17

<sup>1</sup>Values are mean of quadruplicates and presented as mean±SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different (P<0.05). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments. Con, contain the fish meal 65% in diet; FM25, 25% fish meal was replaced with mixture of plant protein sources in diet; FM30, 30% fish meal was replaced with mixture of plant protein sources in diet; FM35, 35% fish meal was replaced with mixture of plant protein sources in diet; FM40, 40% fish meal was replaced with mixture of plant protein sources in diet.

Table 4. Non-specific immune responses and hematological parameters of growing olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 15 weeks<sup>1</sup>

Dietary treatment	Lysozyme (µg/mL)	Myeloperoxidase (absorbance)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	AST <sup>2</sup> (U/L)	ALT <sup>3</sup> (U/L)	Total protein (g/dL)	Glucose (mg/dL)
Con	49.5±8.8	1.02±0.05	5.24±0.20	26.3±1.2	16.5±5.1	3.37±0.31	8.24±0.55	52.0±3.7
FM25	55.8±13	0.99±0.04	4.80±0.27	24.9±1.7	17.3±2.7	4.06±1.35	8.61±0.33	54.4±1.6
FM30	44.3±6.9	1.16±0.25	4.67±0.49	25.6±2.4	15.8±2.3	4.09±2.35	8.53±0.45	48.0±5.3
FM35	52.2±2.6	1.13±0.15	4.88±0.51	25.3±1.1	15.7±2.2	3.34±0.37	8.66±0.49	52.6±11
FM40	42.3±8.8	1.12±0.13	4.61±0.81	25.1±2.4	15.8±1.6	5.94±1.76	8.10±0.55	43.6±4.4

<sup>1</sup>Values are mean of quadruplicates and presented as mean±SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments. <sup>2</sup>Aspartate aminotransferase, <sup>3</sup>Alanine aminotransferase. Con, contain the fish meal 65% in diet; FM25, 25% fish meal was replaced with mixture of plant protein sources in diet; FM30, 30% fish meal was replaced with mixture of plant protein sources in diet; FM35, 35% fish meal was replaced with mixture of plant protein sources in diet. FM40; 40% fish meal was replaced with mixture of plant protein sources in diet.

을 일으키는 것으로 보고되었다(Urán et al., 2008; Yamamoto et al., 2008). 항영양인자는 열처리나 용매추출 또는 발효와 같은 생물학적 가공처리를 통해 함량을 낮추거나 불활성화 시킬 수 있다고 보고되었다(Buttle et al., 2001; Refstie et al., 2005). SPC는 대두박을 2차 가공하여 제조된 원료로 양어사료 내 이용성이 대두박에 비해 높은 것으로 보고되었다(Anderson and wolf, 1995; Ao, 2011). 따라서, 항영양인자의 함량이 비교적 적은 SPC와 밀글루텐을 대두박과 혼합하여 사용하면 사료 내 어분을 40%까지 대체하더라도 육성기 넙치의 장내 염증반응을 일으키지 않는 것으로 판단된다.

전어체 수분, 조단백질, 조지방, 조회분 함량은 모든 실험구 사이에 유의한 차이가 없었다( $P > 0.05$ , Table 3). 어체의 일반성분 조성은 사료의 배합비, 사료공급, 크기, 수온에 영향을 받는다고 알려져 있다(Zeitler et al., 1984). 본 연구에서 대두박, SPC, 밀글루텐(2:1:1)을 적절히 혼합하여 사용하게 되면 기존의 넙치 사료 내 어분사용량(65%)의 40%까지 대체하더라도 육성기 넙치의 전어체 일반성분조성에는 큰 영향을 주지 않을 것으로 판단된다.

실험어 혈액의 비특이적 면역능과 혈액성분의 결과는 Table 4에 나타내었다. Lysozyme, MPO, hemoglobin, hematocrit, AST, ALT, total protein, glucose는 모든 실험구 사이에 유의한 차이가 없었다( $P > 0.05$ ). Lysozyme은 세균의 세포벽인 peptidoglycan의  $\beta$ -1,4-glucoside 결합을 가수분해하여 파괴하는 기능을 하며, MPO는 과산화효소로써 hypochlorous acid를 만들어 병원체를 사멸시키는 기능을 한다(Kim et al., 2011). Hematocrit과 hemoglobin은 일반적으로 어류 사육실험에 있어서 건강지표를 측정하는데 사용되는 분석항목이다. AST와 ALT는 주로 여러 조직에 분포하며 어류에서 아미노산의 대사에 관여하는 효소이다. 어류의 간과 신장이 물리적 혹은 병리적인 손상을 입을 경우에 증가하는 것으로 알려져 있어 어류의 건강도와 스트레스를 조사하는 지표로 사용된다(Kristofferson et al., 1974). Glucose는 어류의 체내 대사가 원활할 때 수치가 감소

하고(Gordon, 1968), 스트레스를 받으면 증가하기 때문에 스트레스의 지표로도 활용된다. 혈액 내 단백질은 호르몬과 결합하여 세포의 항상성을 유지하거나 면역반응에 중요한 역할을 하기 때문에 어류에서 대사나 면역력에 문제가 생기면 그 수치가 감소하는 것으로 보고되었다(Kumar et al., 2005). Kim et al. (2018)은 넙치(8.69, 10.4 g) 사료 내 어분을 돈모분(pig bristle meal)으로 대체할 경우, 혈액의 hematocrit, hemoglobin, AST, ALT 농도는 실험구 사이에 유의한 차이가 없었다고 보고하였다. Kim et al. (2019b)은 사료 내 어분을 식물성 단백질원료(대두박, SPC, 밀글루텐)로 대체했을 때 넙치(6.76±0.03 g, 32.5±0.1 g)의 hemoglobin과 hematocrit에는 전혀 영향이 없었다고 보고하였다. 따라서, 3가지 식물성 단백질원료를 적절히 혼합하여 어분을 대체하더라도 육성기 넙치의 비특이적 면역력과 건강도에는 특별한 문제가 없을 것으로 판단된다.

결론적으로, 3가지 식물성 단백질원료(대두박, SPC, 밀글루텐)는 제한아미노산(lysine, methionine, threonine)을 첨가할 경우, 육성기 넙치사료 내 어분을 약 40%까지 대체할 수 있을 것으로 판단된다. 그러나, 위 3가지 식물성 단백질원료 혼합물의 최대 어분대체비율은 본 연구에서 확인할 수 없었기 때문에 이에 대한 후속 연구가 요구된다.

## 사 사

본 연구는 국립수산물과학원(R2020014) 및 해양수산부의 지원으로 수행된 연구이며 연구비 지원에 감사드립니다.

## References

- Anderson RL and Wolf WJ. 1995. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J Nutr* 125, 581S-588S. [https://doi.org/10.1093/jn/125.suppl\\_3.581S](https://doi.org/10.1093/jn/125.suppl_3.581S).
- Ahmed M, Liang H, Kasiya HC, Ji K, Ge X, Ren M, Liu B, Zhu

- X and Sun A. 2019. Complete replacement of fish meal by plant protein ingredients with dietary essential amino acids supplementation for juvenile blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*. *Aquac Nutr* 25, 205-214. <https://doi.org/10.1111/anu.12844>.
- Ao T. 2011. Using exogenous enzymes to increase the nutritional value of soybean meal in poultry diet. In: El-Shemy H, Ed. *Soybean and Nutrition*. In Tech, New York, NY, U.S.A., 201-214.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2000. *Official methods of analysis of AOAC International* (17th, Edn.). AOAC, Gaithersburg MD, U.S.A.
- Biswas A, Araki H, Sakata T, Nakamori T and Takii K. 2019. Optimum fish meal replacement by soy protein concentrate from soymilk and phytase supplementation in diet of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 506, 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.023>.
- Buttle LG, Burrells AC, Good JE, Williams PD, Southgate PJ and Burrells C. 2001. The binding of soybean agglutinin (SBA) to the intestinal epithelium of Atlantic salmon, *Salmo salar* and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed high levels of soybean meal. *Vet Immunol Immunopathol* 80, 237-244. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(01\)00269-0](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(01)00269-0).
- Choi SM, Wang X, Park GJ, Lim SR, Kim KW, Bai SC and Shin IS. 2004. Dietary dehulled soybean meal as a replacement for fish meal in fingerling and growing olive flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquac Res* 35, 410-418. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01046.x>.
- Chou RL, Her BY, Su MS, Hwang G, Wu YH and Chen HY. 2004. Substituting fish meal with soybean meal in diets of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* 229, 325-333. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00395-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00395-8).
- Deng J, Mai K, Ai Q, Zhang W, Wang X, Xu W and Liufu Z. 2006. Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate on feed intake and growth of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 258, 503-513. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.004>.
- Enterria A, Slocum M, Bengtson DA, Karayannakidis PD and Lee CM. 2011. Partial replacement of fish meal with plant protein sources singly and in combination in diets for summer flounder, *Paralichthys dentatus*. *J World Aquac Soc* 42, 753-765. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00533.x>.
- Folch J, Lees M and Sloane-Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497-509.
- Francis G, Makkar HPS and Becker K. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 197-227. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00526-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00526-9).
- Gatlin III DM, Barrows FT, Brown P, Dabrowski K, Gaylord TG, Hardy RW, Herman E, Hu G, Krogdahl A, Nelson R, Overturf K, Rust M, Sealey W, Skongberg D, Souza EJ, Stone D, Wilson R and Wurtele E. 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquac Res* 38, 551-579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x>.
- Glencross B, Evans D, Dods K, McCafferty P, Hawkins W, Maas R and Sipsas S. 2005. Evaluation of the digestible value of lupin and soybean protein concentrates and isolates when fed to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using either stripping or settlement faecal collection methods. *Aquaculture* 245, 211-220. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.11.033>.
- Gordon RB. 1968. Distribution of transaminase (Aminotransferases) in the tissues of the Pacific salmon *Oncorhynchus*, with emphasis on the properties and diagnostic use of glutamic oxaloacetic transaminase. *Can J Fish Aquat Sci* 25, 1247-1268.
- Hellend SJ and Grisdale-Helland B. 2006. Replacement of fish meal with wheat gluten in diets for Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: Effect on whole-body amino acid concentrations. *Aquaculture* 261, 1363-1370. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.025>.
- Jalili R, Tukmechi A, Agh N, Noori F, Ghasemi A. 2013. Replacement of dietary fish meal with plant protein sources in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*; effect on growth performance, immune responses, blood indices and disease resistance. *Iran J Fish Sci* 12, 577-591.
- Kim KW, Kim SS, Jeong JB, Jeon YJ, Kim KD, An CM and Lee KJ. 2011. Effects of dietary fluid on growth performance, immune responses, blood components, and disease resistance against *Edwardsiella tarda* and *Streptococcus iniae* in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Korean J Fish Aquat Sci* 44, 644-652. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2011.0644>.
- Kim KW, Kim KD, Han HS, Won SM, Moniruzzaman M, Lee JH, Choi YH and Bai SC. 2017. Evaluation of the dietary protein requirement of a selectively bred (F-5 generation) strain of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Turk J Fish Aquatic Sci* 17, 1009-1016. [https://doi.org/10.4194/1303-2712-v17\\_5\\_16](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v17_5_16).
- Kim MG, Lee CR, Shin JH, Lee BJ, Kim KW and Lee KJ. 2019a. Effects of fish meal replacement in extruded pellet diet on growth, feed utilization and digestibility in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Korean J Fish Aquat Sci* 52, 149-158. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0149>.
- Kim MG, Shin JH, Lee CR, Lee BJ, Hur SW, Lim SG and Lee KJ. 2019b. Evaluation of a mixture of plant protein source as a partial fish meal replacement in diets for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Korean J Fish Aquat Sci* 52, 374-381. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0374>.
- Kim YC, Yoo GY, Wang X, Lee SH, Shin SH and Bai SC. 2008. Long term feeding effects of dietary dehulled soybean meal as a fish meal replacer in growing olive flounder *Paralich-*

- thys olivaceus*. Asian-Australasian J Anim Sci 21, 868-872. <https://doi.org/10.5713/ajas.2008.70496>.
- Kim YJ, Shin JH, Kwon HW, Lee SY, Kim JM, Kim MG, Kim JD and Lee KJ. 2018. Evaluation of a hydrolyzed pig bristle meal as a partial fish meal replacer in diets for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Korean J Fish Aquat Sci 51, 148-156. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0148>.
- KOSIS (Korean Statistical Information Service). 2019. Expenditure per aquaculture. Retrieved from [http://kosis.kr/statisticsList/statisticsListIndex.do?menuId=M\\_01\\_01&vwcd=MT\\_ZTITLE&parmTabId=M\\_01\\_01#SelectStatsBoxDiv](http://kosis.kr/statisticsList/statisticsListIndex.do?menuId=M_01_01&vwcd=MT_ZTITLE&parmTabId=M_01_01#SelectStatsBoxDiv) on Mar 25, 2020.
- Kristofferson R, Broberg S, Oskari A and Pekkarinen M. 1974. Effect of a sublethal concentration of phenol on some blood plasma enzyme activities in the pike (*Esox lucius* L.) in brackish water. Ann Zool Fennici 11, 220-223. <https://doi.org/10.1007/bf00677929>.
- Krogdahl Å. 1989. Alternative protein sources from plants contain antinutrients affecting digestion in salmonids. In: The current status of fish nutrition in aquaculture (Ed, by M. Takeda and T. Watanabe). Proceedings of the 3rd international symposium on feeding and nutrition in fish, Toba, Japan. August 28 - September 1. 1989. Tokyo University of Fisheries, Tokyo, Japan, 253-262.
- Krogdahl Å, Penn M, Thorsen J, Resfstie S and Bakke AM. 2010. Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. Aquac Nutr 41, 333-344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02426.x>.
- Kumar S, Sahu NP, Pal AK, Choudhury D, Yengkokpam S and Mukherjee SC. 2005. Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory burst activity and histological changes in *L. rohita* juveniles. Fish Shellfish Immunol 19, 331-344. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.03.001>.
- 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>.
- Lin S and Luo L. 2011. Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fish meal on growth, digestive enzymes and transaminase activities in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. Anim Feed Sci Technol 168, 80-87.
- Males R and Chapman F. 2006. Standard manual of olive flounder culture. National Institute of Fisheries Science, Busan, Korea.
- Martínez-Llorens S, Baeza-Ariño R, Nogales-Mérida S, Jover-Cerdá M and Tomás-Vidal A. 2012. Carob seed germ meal as a partial substitute in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: Amino acid retention, digestibility, gut and liver histology. Aquaculture 338, 124-133. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.01.029>.
- Mohammed HH, Brown TL, Beck BH, Yildirim-Aksoy M, El-jack 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 App Aquaculture 31, 193-209. <https://doi.org/10.1080/10454438.2018.1499576>.
- NRC (National Research Council). 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. The national academy press, Washington DC, U.S.A.
- Refstie S, Sahlström S, Bråthen E, Baeverfjord G and Krogedal P. 2005. Lactic acid fermentation eliminates indigestible carbohydrates and antinutritional factors in soybean meal for Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture 246, 331-345. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.001>.
- Urán PA, Gonçalves A, Taverne-Thiele JJ, Schrama JW, Verreth JAJ and Rombout JHWM. 2008. Soybean meal induced enteritis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and the gene expression of inflammatory mediators in intestinal leukocytes. Fish Shellfish Immunol. 25, 751-760. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.02.013>.
- Yamamoto T, Goto T, Kine Y, Endo Y, Kitaoka Y, Sugita T, Furuita H, Iwashita Y and Suzuki N. 2008. Effect of an alcohol extract from a defatted soybean meal supplemented with a casein-based semi-purified diet on the biliary bile status and intestinal conditions in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquac Res 39, 986-994. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01969.x>.
- Yang YH, Wang YY, Lu Y and Li QZ. 2011. Effect of replacing fish meal with soybean meal on growth, feed utilization and nitrogen and phosphorus excretion on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquac Int 19, 405-419. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9359-y>.
- Ye J, Liu X, Wang Z and Wang K. 2011. Effect of partial fish meal replacement by soybean meal on the growth performance and biochemical indices of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquac Int 19, 143-153. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9348-1>.
- Zeitler MH, Kirchgessner M and Schwarz FJ. 1984. Effects of different protein and energy supplies on carcass composition of carp *Cyprinus carpio*. Aquaculture 36, 37-48. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90052-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90052-8).