

동애등에 발효물의 문치가자미 치어 성장 및 장내 유익균 증진 효과

조현솔¹, 박무억², 홍선미^{1*}

¹환동해산업연구원, ²경상북도민물고기연구소

Effect Fermented Black Soldier Fly on the Growth and Gut Microbiome of Juvenile Marbled Flounder (*Pleuronectes yokohamae*)

Hyun Sol Jo¹, Moo Eog Park², Sun Mee Hong^{1*}

¹Marine Industry Research institute for East sea rim (MIRE)

²Gyeongbuk Research Center Freshwater Fish

요약 본 연구는 동애등에 유산균 발효물이 어류 치어 성장과 장내 미생물 변화에 미치는 효과를 조사하였다. 동애등에 분말(*H. illucens*: 5%)과 어류 병원체(비브리오균, 연쇄상구균)에 대한 항균성을 가지는 2종의 유산균(LAB: *L. plantarum*, *L. lactis*)으로 바이오공정 한 동애등에 발효물(Hi_LpL)을 문치가자미(*Pleuronectes yokohamae*) 치어 사료첨가물(4.5%)로 제조하고 그 효능을 분석하였다. 사료 실증실험을 위해 총 600마리의 문치가자미 치어(약 5~6 g)를 공시하여 100마리씩 수조 6개에 임의 배치한 후 각 3수조씩 대조군과 실험군으로 분류하여 10주 간 평균 체장과 체중, 증체율, 일간성장률 및 장내 미생물을 분석하였다. 10주 후에 대조군의 평균 체장은 11.68 cm, 실험군은 12.20 cm이며, 대조군의 평균 체중은 28.06 g, 실험군은 31.01 g으로 Hi_LpL 첨가에 있어 성장 효과가 있었다. 증체율은 대조군 214.4%, 실험군 219.3%로 실험군이 4.9%p 더 높았으며, 일간성장률도 대조군 3.1%/일, 실험군 3.4%/일로 실험군이 0.3%p 더 높았으나 유의성($p < 0.05$)은 인정되지 않았다. 다음으로, 식품의약품안전처에 고시된 19종 유익균 대상으로 10주차의 문치가자미 장내 미생물 분포 조사 결과, 대조군에서는 유익균 19종이 56.52%, 실험군에서는 발효에 사용된 *L. lactis*가 96.88% *L. plantarum*이 2.72%, 그 외 유산균 9종으로 전체 99.88%로 확인되었다. 결과적으로 10주간의 문치가자미 치어사료로서 동애등에 발효물(Hi_LpL)의 4.5% 첨가 실험에 있어 대조군 대비 실험군의 높은 증체율과 성장률은 유의성($p < 0.05$)은 적으나 장내 유익균 증가에 유효한 것이 확인되었으며 이는 어류 외의 가축, 반려동물 등의 사료첨가물로서의 동애등에 활용을 위한 기초자료로 활용될 것이다.

Abstract This study examines the growth and distribution of intestinal microbes of juvenile fish raised on a diet supplemented with fermented BSF (*H. illucens*; Hi_LpL). Hi_LpL was obtained through a bioprocess using BSF (5%) and *L. plantarum* and *L. lactis*, and having antibacterial activity against fish pathogens. The efficacy as a feed additive (replacement 4.5% of total feed) was evaluated using the marbled flounder (*P. yokohamae*; Pv). A total of 600 juvenile Pv (5-6 g) were randomly placed in six tanks (100 fish each) for 10 weeks, and classified as control (Cont) and experimental (Exp) groups. After 10 weeks, the average lengths obtained for Cont and Exp fish were 11.68 and 12.20 cm, respectively, and the average weights were 28.06 and 31.01 g, respectively. The IBR and SGR of the Cont and Exp groups showed a difference of 4.9% and 0.3%/day, respectively, but were not significant ($p < 0.05$). Furthermore, 99.88% LAB (19 strains announced by MFDS) were determined in the intestine of the Exp group, including *L. lactis* (96.88%) and *L. plantarum* (2.72%), whereas the distribution in the Cont group was 56.25%. These results indicate that supplementation with 4.5% Hi_LpL is less effective in promoting juvenile Pv growth but is effective in increasing the beneficial intestinal bacteria.

Keywords : Black Soldier Fly, Lactic Acid Bacteria, Microbiome, Fish Feed, Antibacterial

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 유용농생명자원산업화기술개발사업(121047-2)과 기술사업화지원사업(122055-03)의 지원을 받아 연구된 것임.

*Corresponding Author : Sun-Mee Hong(Marine Industry Research institute for East sea-rim, MIRE)

email: hongsunmee@mire.re.kr

Received September 5, 2022

Revised October 5, 2022

Accepted December 7, 2022

Published December 31, 2022

1. 서론

양식업에서 사료 생산은 금액의 50% 이상을 차지하고 있고, 이것은 값비싼 어분(fish meal)과 어유(fish oil)가 원인이다. 최근에 어분을 대체할 적당한 단백질원으로 식물(oilseed, grains etc), 동물 부산물(by-product), 곤충(edible insect etc) 등에 관련한 연구가 진행되고 있으나 불충분한 영양성분과 오염의 문제가 제기되고 있다[1-3]. 최근, 동애등에(Black soldier fly ; *Hermetia illucens*)는 축산분뇨와 음식물쓰레기를 먹이로 하는 환경정화 곤충뿐만 아니라[4] 40% 이상의 단백질과 30% 이상의 지질 성분으로 인해, 어류를 포함한 가축의 단백질 대체 원료로 가치가 인정되었다[5,6].

최근 사료 내 성장촉진용 항생제 사용이 제한(2011년)됨에 따라 식물성 물질[7-11]과 GRAS(Generally Recognized as Safe) 균주인 유산균(probiotics)을 활용한 사료 연구가 활발히 보고되고 있다[12]. 유산균과 유산균의 먹이(Prebiotics)와 유산균의 2차 대사물(Postbiotics)의 연구는 인간뿐만 아니라 가축, 어류의 장내 세균총 개선과 면역증대, 항산화, 성장촉진 등에 대한 효과가 있음을 제시하였다[13]. 동애등에의 일반성분은 식물과 달리 필수아미노산이 풍부하여 질소원(nitrogen) 또는 탄소원(carbon)의 원료로 유산균의 기본 성장 배지로 사용할 수 있어[7-11], 이들의 조합은 어류 장내 환경 개선과 기타 기능성 대사체 생산에 활용될 수 있다[14]. 포유류처럼 어류의 장내 미생물은 대사(metabolism), 영양, 면역, 질병 제어, 성장 등에 중요한 기능을 담당한다[15].

문치가자미(*Pleuronectes yokohamae*; marbled flounder)는 우리나라 전 연해에 분포하며 주로 도다리로 알려져 있다. 경북수산자원연구원(영덕)은 문치가자미 치어를 양식하여 8~9월에 동해안에 방류함으로써 건강 문치가자미를 보존·육종한다.

문치가자미(도다리)의 사료첨가제 개발을 위해 프리바이오틱스로 사용한 동애등에는 이미 이전 연구에서 안전성과 영양학적으로 입증되어 붕어, 무지개송어, 육계 등의 사료 대체원으로 사용되고 있다[16-18]. 유기물의 고부가가치화와 기능성 증강으로 제안되는 하나의 방법은 리사이클링(recycling) 또는 바이오공정(bioconversion)이 있으며[19], 유산균을 이용한 바이오공정을 통해 사료의 영양 증강, 소화율 향상, 성장 보조 및 어류 장내 유익균과 유효 물질에 대한 연구가 보고 되고 있다[20,21].

본 연구에서는 단백질 대체원으로 동애등에[16-18]의

사료첨가물의 기능과 효과를 높이기 위하여 경상북도 동해안 해수에서 분리한 항어병 유산균 2종으로 바이오 공정한 동애등에 발효물(4.5%) 제조와 이를 첨가함으로써 어류의 평균 체장과 체중, 증체율, 일간성장률 및 장내 미생물 분포 등에 미치는 영향을 분석하고, 사료 첨가물로서 유효성과 이를 통한 어류 장내 환경 변화를 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 동애등에 발효물 및 사료 제조

동애등에(*Hermetia illucens*; Hi)는 마이크로웨이브로 건조된 분말을 시그널케어(경상북도, 청도군)에서 2021년 4월에 구입하여 멸균 증류수에 5%(w/v) 측량해 121 °C에서 15분간 멸균하여 준비하였다.

또한, 유산균은 환동해산업연구원(경상북도, 울진군)에서 분리하여 한국미생물보존센터에 기탁된 *Lactobacillus plantarum*(Lp; KCCM12758P)과 *Lactococcus lactis*(Ll; KCCM12759P) 2종을 사용하였다. 선발된 Lp와 Ll 균주의 동애등에 추출물에서의 생균수는 확인하였으며(data not shown), 확인된 각 균주를 혼합하여 1×10^8 cfu/ml 농도로 1% 공점종하고 30 ± 1 °C에서 24시간 동안 공배양하여 동애등에 발효물(Hi_LpLl)을 제조하고 액상 또는 동결건조하여 사료첨가물로 사용하였다. 이때 탄소원으로 2% dextrose, galactose, mannose, sucrose, glucose와 1% starch를, 질소원으로 0.5% yeast extract를 멸균하여 사용하였다(Sigma, USA).

제조된 추출물과 발효물은 한국미생물보존센터에서 분양받은 비브리오균(*Listonella anguillarum* KCTC 2711), 연쇄구균 2종(*Streptococcus parauberis* KCTC 3651, *Streptococcus iniae* KCTC 3657)의 총 3종에 대해 agar well disc diffusion 법으로 Eq. (1)에 따라 항균활성을 측정하였다[22].

$$\text{Inhibition zone (mm)} = (\text{Clear circle diameter} - \text{Disc diameter}) \div 2 \quad (1)$$

2.2 시험어류 및 설계

실험어는 경상북도 수산자원연구원(영덕)에서 사육하는 문치가자미(*Pleuronectes yokohamae*; marbled flounder) 치어(평균 약 2 ~ 3 g) 600마리를 사용하였

다. 문치가자미 각 100마리는 대형 원형 수조(1.5 ton) 6개에서 해수를 공급하는 순환여과식 시스템으로 평균 수온은 20~21 °C 이고, 공기발생기(aeration)를 설치하여 충분한 용존산소를 유지하며 광주기는 형광등을 이용하여 12L:12D 조건으로 유지되었다. 앞서 제조한 대조와 실험 사료는 각 3개 수조에(300마리; 100마리/수조) 각각 하루에 두 번 10주 간(2020.08.03.~ 2020.10.10.) 공급하였다.

2.3 동애등에 발효물의 가바 분석

동애등에 발효물의 GABA 성분을 확인하기 위해 얇은 막 크로마토그래피(Thin layer chromatography, TLC) 분석을 수행하였다. 0.5% yeast extract가 첨가된 동애등에 추출물에 2% dextrose, galactose, mannose, sucrose가 첨가된 발효물, 1% GABA(w/v), 0.5% MSG(w/v)를 Merck TLC silica gel(USA)에 각 3 uL씩 점적하였다. 전개 용매로 n-부탄올: 아세트산: 물을 5:2:2 (v/v/v) 비율로 혼합하여 사용하였으며, 2시간 동안 전개하여 건조 시킨 후 0.2% ninhydrin 용액으로 발색시켜 발효물의 GABA spot을 확인하였다.

2.4 문치가자미 성장

문치가자미는 실험 전에 전장(full-length)과 체중(weight)을 측정하였고, 실험기간 중에는 2주 간격으로 10주 동안 측정하였다. 체중은 전자저울을 이용하여 소수 셋째 자리 단위까지 측정하였다. 측정 시, 0.05% (v/v) 2-phenoxyethanol(Sigma, USA) 수용액에서 마취시키고 공기 노출 시간도 최소화하여 어류의 스트레스를 최소화하였다. 증가된 체장과 체중을 이용하여 아래 Eq. (2), Eq. (3)에 따라 증체율(Incremental Body Rate; %)과 일간 성장률(Specific growth rate, SGR; %)을 계산하였다.

$$IBR (\%) = \{(final\ fish\ weight\ (g) - initial\ fish\ weight\ (g)) \div initial\ fish\ weight\ (g)\} \times 100 \quad (2)$$

$$SGR (\%/day) = \{(\ln\ final\ fish\ average\ weight\ (g) - \ln\ initial\ fish\ average\ weight\ (g)) \div experimental\ period\ (day)\} \times 100 \quad (3)$$

2.5 문치가자미 장내 미생물 분포 분석

사료 급이 10주차의 문치가자미는 대조군과 실험군

수조에서 각 12마리(수조당 4마리) 임의로 선택한 후, 장 배설물과 내용물을 제거하고 점액만을 모아 MRS broth(Gibco, USA)에서 2일간 37 °C 배양 후, 원심분리로 세균을 농축하였다. 농축된 박테리아 genomic DNA를 추출하고(QIAamp DNA mini Kit; Qiagen USA), 5 ng/ul 으로 정량 후 16s metagenomic sequencing library preparation (Illumina Inc, USA)로 라이브러리를 제작했다. 세균의 16s rDNA를 Bakt_341F(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')와 Bakt_805R(5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')로 PCR(2x KAPA Hifi Hotstart ready Mix, KAPA Bio, UK)을 수행하여 V10V2(340-370 bp), V3-V4(440-460 bp) 사이즈에 따라 구분하고 Illumina MiSeq를 사용해 한국식품의약품안전처(<https://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/>)에 고시된 유익 유산균주 19종을 대상으로 조사하였다.

2.6 통계분석

수집된 데이터는 IBM SPSS Statistics software(ver. 28, IBM CO. NY USA)를 이용하였다. 대조군과 실험군의 두 사료 급이에 따른 체중, 체장, 증체율과 성장률의 차이는 T-검정으로 분석 하였으며, 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 동애등에 발효물의 특성

비브리오균 1종과 연쇄구균 2종에 대한 항균기능을 가지는 유산균 선발을 위해, 80종의 유산균에 대해 페이퍼 디스크법으로 스크리닝하여(data not shown), 항균 활성이 높은 *Lactobacillus plantarum*_MIRE TS90 (Lp; KCCM12758P)과 *Lactococcus lactis*_MIRE TS95(LI; KCCM12759P) 2종을 선발하였다. 동애등에 추출물의 유산균 배양 최적 조건을 확인하기 위해, 5% 동애등에 분말을 첨가한 추출물에 Lp와 LI를 1×10^8 cfu/mL; $1.0E+08$)를 접종하여 30 °C, 24시간 동안 배양하였을 때, 각각 3×10^{11} cfu/mL($3.0E+11$)와 4×10^8 cfu/mL($4.0E+08$) 이상의 생균수가 관찰되었다. 이는 5% 동애등에 추출물이 유산균 성장에 필요한 질소원(nitrogen)과 탄소원(carbon)으로 적합한 배지임을 확인하였다. 동애등에는 40~43% 조단백질, 30~35% 조

지방, 8~9% 조탄수화물의 고영양성 곤충으로 어류, 가축과 반려동물 등의 사료로서의 활용 가치가 높아[4,5], 일반적으로 건조 분말 10%의 사료 첨가물로 사용되고 있다[20]. 동애등에의 어분 대체분 아니라 항균성과 기능성 물질 증강을 위한 유산균 생물공정 조건을 검토하였다.

먼저 유산균 성장의 효과를 높이기 위해 질소원으로 0.5% yeast extract만을 넣어 생균수를 조사한 결과, 유의성 있는 성장 효과는 없었다(data not shown). 다음으로 탄소원으로 단당류인 2% dextrose, galactose, mannose, sucrose와 이당류인 1% starch를 넣어 유산균 성장을 조사하였다(Fig. 1). Lp는 MRS와 동애등에 추출물 배지에서 생균수는 같았으나, dextrose와 sucrose 첨가 배지에서 생균수가 증가하였다. L는 galactose, mannose, sucrose, glucose 첨가 배지에서 생균수가 증가하였다(Fig. 1). 두 종 모두 이당류인 starch 첨가에서는 감소하는 경향이 있어 단당류 첨가가 유산균 성장에 유의한 것으로 생각된다.

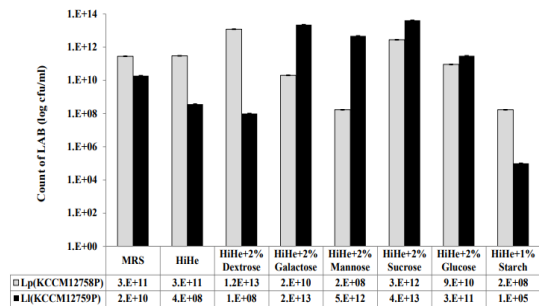


Fig. 1. Count of viable cells *L. plantarum* (KCCM12758P) and *L. lactis*(KCCM12759P) by adding dextrose, galactose, mannose, sucrose, glucose and starch in *H.illucens*

동애등에 발효물에 단당류 5종과 이당류 1종의 첨가에 따른 어병균 3종에 대한 항균성 실험의 결과, 탄소원의 첨가는 무첨가보다 항균성이 높았고 특히 galactose, mannose, sucrose를 첨가하였을 때 가장 높았다(data not shown). 탄소원 무첨가 동애등에 발효물은 MRS 일반 배지보다도 항균성이 현저히 낮아지는 경향을 보였으나 탄소원 첨가로 회복 경향을 보였다. 여기에 0.5% yeast extract의 부가는 항균성을 더 높여주었으며, 특히 2% galactose에서 비브리오균인 *L. anguillarum*과 연쇄구균인 *S. parauberis*, *S. iniae* 3종의 어병균에 대해 높은 항균성이 확인되었다(Table 1). 동애등에 추출물 배지에서 유산균의 항균 기능 증강을 위해서는 yeast

extract와 galactose의 첨가가 필수적이라 생각된다.

Table 1. Inhibition clear zone of antibacterial by adding 2% galactose in *H. illucens* against pathogen, *Listonella anguillarum*(La; KCTC 2711), *Streptococcus parauberis* (Sp; KCTC 3651), *Streptococcus iniae*(Si; KCTC 3657).

Media	MRS			<i>H.illucens</i>					
	-			-			2% Galactose		
	La	Sp	Si	La	Sp	Si	La	Sp	Si
Lp (KCCM12758P)	0.2	0.4	0.4	0.05	0.02	0.02	0.3	0.4	0.1
L (KCCM12759P)	0.2	0.2	0.3	0.05	0.02	0.02	0.3	0.2	0.1
LpLl	0.3	0.3	0.3	0.05	0.02	0.02	0.3	0.3	0.1
LpLl +0.5% Yeast extract	-	-	-	0.05	0.02	0.02	0.6	0.4	0.3

*MRS, control media; *H. illucens*, 5% BSF water extract; unit, mm.

고단백질 동애등에는 아미노산 중 5.85% 글루탐산 (Glutamic acid)을 포함하고 이는 미생물 발효 공정 중 탈탄산 효소(GAD; glutamate decarboxylase)를 이용하여 가바(GABA; γ -aminobutyric acid)로 전환되는 것으로 알려져 있다[16]. 비단백질성 아미노산인 GABA는 항암, 신경안정, 식욕 증진 외에 성장호르몬에 영향을 주는 것으로 알려져 있다[23,24]. 동애등에의 발효에 따른 가바의 생성 여부를 확인한 결과, dextrose, galactose, mannose, sucrose 첨가에 따라 생성되며, 특히 galactose 첨가는 가바 생산을 더 촉진하였다(Fig. 2). 아직 어류의 성장과 생육에 가바의 영향을 연구한 결과는 없지만 포유류에서의 효능으로 어류의 영향도 유의할 것으로 생각된다.

유산균 성장, 어병 항균성과 가바 생산 촉진에 대한 결과를 종합하여, 5% 동애등에 추출물에 0.5% yeast extract, 2% galactose를 더하여 121 °C에서 15분간 멸균한 추출물에 Lp와 L (1x10⁸ cfu/mL; 1.E+08)를 각 0.5%(전체 1%)를 공접종한 후 30 °C에서 24시간 동안 배양한 배양물(Hi_LpLl)을 문치가자미 사료 첨가물로 준비하였다. 사료 제조 전에 Hi_LpLl은 건조필름법(3M petrifilm, USA)을 이용하여 유해 기타 미생물의 존재를 확인하였으며, 유산균 이외는 검출되지 않았다(data not shown).

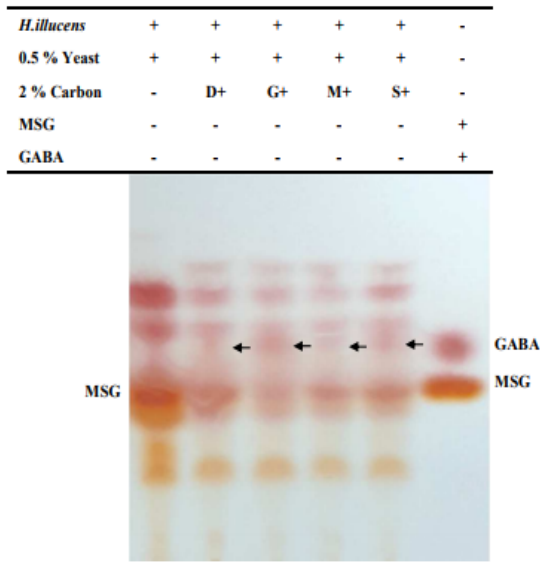


Fig. 2. Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by adding 2% Dextrose (D+), Galactose (G+), Mannose (M+), Sucrose (S+) in *H. illucens*.

3.2 문치가자미 사료 제조 및 성장 효능

문치가자미 치어 사료는 국립수산과학원 사료연구센터(경상북도, 포항)에서 대조 사료(4.5% 대두분 함유)와 실험 사료(4.5% Hi_LpLl 함유)를 제조하였다(Table 2). 제조된 사료의 기타 유해 미생물에 대한 안전성은 건조 필름법(3M petrifilm, USA)으로 확인되었으며, 실험 사료에서는 접종된 *L. plantarum*과 *L. lactis*의 존재를 16s DNA 시퀀스로 확인하였으며, *L. plantarum*이 우점종임을 확인하였다(90%; data not shown).

Table 2. Feed composition for juvenile Marbled Flounder (*Pleuronectes yokohamae*) used this study.

CONTENTS	CONT	EXP
Chilean fishmeal(Blumar)	65.00	65.00
Soybean meal	4.50	0.00
Hi_LpLl	0.00	4.50
Starch	7.00	7.00
Wheat flour	9.50	9.50
Wheat gluten	9.00	9.00
Fish oil	1.00	1.00
Mineral Mix	1.00	1.00
Vitamin Mix	1.00	1.00
Mono calcium phosphate	0.50	0.50
Choline	0.50	0.50
Carboxymethylcellulose	1.00	1.00
Total	100.00	100.00

* CONT, control feed; EXP, experimental feed.

제조한 대조군과 실험군 사료는 10주 간 급이하고, 급이 시작(0주) 후 6주, 8주, 10주 차에 문치가자미 치어 각 300마리에 대한 평균 체장과 체중의 측정값은 Table 3에 제시하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 사료 급여 직전(0주 차)의 문치가자미 치어의 대조군 300마리의 평균 체장은 5.90 ± 0.48 cm, 실험군 300마리의 표준 체장은 5.86 ± 0.49 cm로 실험군의 체장이 대조군에 비해 근소하게 작은 것으로 나타났다. 각 사료 급여 시작으로 6주, 8주, 10주 경과 후, 대조군 치어의 평균 체장은 각 10.14 ± 0.77 cm, 10.96 ± 0.89 cm, 11.68 ± 0.88 cm, 실험군은 10.42 ± 1.16 cm, 11.26 ± 0.81 cm, 12.20 ± 0.89 cm로 실험군 그룹의 평균 체장이 길게 증가되었다(Table 3).

평균 체중에 있어서도 실험 시작 시점(0주 차)의 문치가자미 치어의 대조군 300마리의 평균 체중은 2.92 ± 0.93 g, 실험군 300마리의 평균 체중은 2.91 ± 0.90 g으로 두 군의 체중은 비슷하게 측정되었다. 각 사료의 급여 시작 6주, 8주 경과 후, 대조군의 평균 체중은 각 17.72 ± 4.53 g, 21.72 ± 5.41 g, 실험군의 평균 체중은 6주 18.47 ± 4.93 g, 8주 24.63 ± 6.14 g로 동애 등에 발효물 첨가 사료를 급여한 실험군의 평균 체중이 대조군에 비해 더 증가함을 확인하였다. 사료 급여급이 10주 후의 대조군 평균 체중은 28.06 ± 7.20 g, 실험군은 31.01 ± 8.12 g으로 나타나, 대조군보다 동애등에 발효물(Hi_LpLl)이 첨가된 사료를 급여한 실험군의 문치가자미 치어 체중이 더 증가하였다(Table 3).

Table 3. The length, weight, and incremental body rate (IBR, %) for juvenile Marbled Flounder (*Pleuronectes yokohamae*) fed diets during 10 weeks.

Item	Length (cm)		Weight (g)		IBR (%)	
	CONT	EXP	CONT	EXP	CONT	EXP
Fish Age						
0 weeks	5.90 ± 0.48	5.86 ± 0.49	2.92 ± 0.93	2.91 ± 0.90	-	-
6 weeks	10.14 ± 0.77	10.42 ± 1.16	17.72 ± 4.53	18.47 ± 4.93	229.5	259.5
8 weeks	10.96 ± 0.89	11.26 ± 0.81	21.80 ± 5.41	24.63 ± 6.14	139.7	211.7
10 weeks	11.68 ± 0.88	12.20 ± 0.89	28.06 ± 7.20	31.01 ± 8.12	214.4	219.3

* CONT, control feed; EXP, experimental feed.

증체율에 있어서는 대조군에서 급여 시작 후 6주째에는 229.5%의 증체율을 보였고, 실험군에서는 급여 시작

후 6주째에 259.5%로 나타나 실험군에서의 증체율이 더 높았으며, 급이 마지막 10주 후에도 대조군에서의 증체율은 214.4%, 실험군의 증체율은 219.3%로 실험군에서의 증체율이 대조군에서보다 4.9%p 정도 더 높았으나 (Table 3), 통계적 유의확률($p < 0.05$)이 높아 유의성이 없는 것으로 판단된다. 최 등[18]의 6%의 동애등에를 첨가한 육계의 5주간 사료 실험은 체중, 증체율, 사료계수 등이 모두 대조군과 실험군이 같거나 실험군이 낮게 측정된 것에 비해 본 실험 결과에서는 체장, 체중과 증체율 모두 실험군에서 높아 급이 기간을 장기화한다면 효율성이 있을 것으로 생각된다.

Table 4. The specific growth rate (SGR, %/day) for juvenile Marbled Flounder (*Pleuronectes yokohamae*) fed diets during 10 weeks.

Item	SGR (%/day)	
	CONT	EXP
Fish Age		
0~6 weeks	4.2	4.4
0~8 weeks	3.6	3.8
0~10 weeks	3.1	3.4

* CONT, control feed; EXP, experimental feed.

Table 4에서 보는 바와 같이 일간 성장률(%/일)은 0주 차에서 6주째에 대조군은 4.2%/1일, 실험군은 4.4%/1일로, 실험군이 대조군보다 1일에 약 0.2%p 정도가 더 성장하였으며, 0주 차에서 8주 차 사이의 일간 성장률은 대조군이 3.6%/1일, 실험군이 3.8%/1일로 나타났다. 실험이 수행된 10주 간(0일 차 내지 10주 차) 평균 일간 성장률은 대조군은 3.1%/일, 실험군은 3.4%/일로, 양 그룹의 일간 성장률 격차는 약 0.3%p 정도로 높게 확인되었으나 유의성($p < 0.05$)은 없었다(Table 4). Stadlander 등[17]의 어분 대체로 50% 동애등에를 첨가한 무지개송어의 사료 급이 7주간 실험은 어분 대체로의 가능성을 인정되었지만 성장률은 0.02%/1일로 조사된 것에 비해 본 결과는 높게 확인되었으나 통계적 유의성은($p < 0.05$)은 없었다. 동애등에 발효물 첨가물 급이에 대한 문치가자미 성장에 유의성은 10주 이상 또는 전 사육 기간 동안의 지속적 급이 시에 바이오공정에 의한 가바 등의 유효물질의 영향이 미칠것으로 생각된다.

3.3 문치가자미 장내 미생물의 확인

문치가자미 치어 대조 사료와 실험 사료 급이 10주 차에 문치가자미 치어의 장내 미생물 분포를 식품의약품안

전처에서 고시한 유익균 균주 19종을 대상으로 조사한 결과, 장내 미생물 분포 총합이 100%가 되지 않았다 (Table 5). 급이 10주 차의 대조군 문치가자미 장내 미생물은 19종의 균주 모두 분포하였고, 특히 *Streptococcus thermophilus*(13.98%; 발효 진균)과 *Lactobacillus salivarius*(13.72%; 장내 유산균)이 가장 많았고, 다음으로 *Lactobacillus plantarum*(7.73%), *Enterococcus faecium*(6.8%), *Lactobacillus reuteri*(4.83%), *Enterococcus faecalis*(3.62%), *Lactobacillus fermentum*(2.26%)의 순이었다. 나머지 12종은 0.02 ~ 0.62% 내외로 대조군에서 확인된 장내 미생물은 전체 56.52% 이었다.

Table 5. Distribution of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Intestin of juvenile Marbled Flounder (*Pleuronectes yokohamae*) fed diets after 10 weeks.

Item	Intestinal Bacteria (%)	
	CONT	EXP
LAB strain		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0.370	-
<i>Lactobacillus casei</i>	0.030	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	0.020	0.001
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0.500	-
<i>Lactobacillus helveticus</i>	0.330	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	2.260	0.001
<i>Lactobacillus paracasei</i>	0.100	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	7.730	2.720
<i>Lactobacillus reuteri</i>	4.830	0.001
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0.040	-
<i>Lactobacillus salivarius</i>	13.720	0.050
<i>Lactococcus lactis</i>	0.920	96.880
<i>Enterococcus faecium</i>	6.800	0.110
<i>Enterococcus faecalis</i>	3.620	0.090
<i>Streptococcus thermophilus</i>	13.980	0.020
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	0.620	-
<i>Bifidobacterium breve</i>	0.040	0.001
<i>Bifidobacterium longum</i>	0.610	0.001
<i>Bifidobacterium animalis</i>	0.070	-
TOTAL (%)	56.590	99.875

* CONT, control feed; EXP, experimental feed.

실험군의 문치가자미 장내 미생물은 19종 중 11종의 분포가 확인되었다(Table 5). 특히 Hi_LpL1에 사용된 *Lactococcus lactis*는 96.860%로 우점종으로 존재하였고, *Lactobacillus plantarum*은 2.72%로 두 번째로 많아 2종의 총합이 99.58%였다. 나머지 9종은 0.001 ~

0.11% 내외로 적은 수로 존재하였고 전체 99.875%로 확인되었다. 유익균의 분포가 대조군의 56.590%에 비해 실험군이 99.875%로 증가하는 것을 통해 동애등에 발효물(Hi_LpL)의 4.5% 첨가로 장내 유익균 증진 효과가 있는 것을 확인하였다. 식물성 대부분이 첨가된 대조군에 대한 문치가자미의 미생물 분포에 비해 실험군의 동애등에 발효물에 의한 장내 유익균 증가는 첨가된 유산균에 의한 증가로 예상되지만, 본 연구의 항어병과 가바 생산 효능을 가진 유산균이 문치가자미 장내 분포가 높은 것은 이를 지속적 섭취 시, 어류의 활동, 성장과 장내 유효물질 생산 등에 유효할 것으로 판단된다.

4. 결론

본 연구는 동애등에와 해양에서 분리한 항어병 유산균인 *L. plantarum*_MIRE TS90과 *L. lactis*_MIRE TS95를 이용하여 어병 항균기능 증강과 GABA를 생산하는 바이오공정법을 제시하였다. 또한, 동애등에 발효물(Hi_LpL)이 첨가된 문치가자미 치어 사료는 어류의 체장, 체중과 일간성장률을 높여 치어 성장에 영향을 미치는 것으로 확인되었으나 유의성($p < 0.05$)은 낮았다. 10주 급이 후의 문치가자미 치어 장내 미생물은 Hi_LpL 섭취 시, 장내 유익균이 대조군(56.590%)에 비해 실험군은 99.875%로 관찰되어, 어류 장내 환경 개선 기능에 효과를 확인하였다. 종합하면 일반 어류 사료에 비해 동애등에 발효물이 4.5% 첨가된 사료는 성장, 사료효율의 유의성($p < 0.05$)은 낮았지만 이전의 동애등에 분말 사료 첨가 육계와 송어 실험의 낮은 성장에 비해 발효물 첨가 급이가 증체율과 성장률 증가에 가능성을 확인하였고, 어류 장내의 유익균 환경 조성에 유효함을 확인하였다. 이에 단백질 대체원인 동애등에 사료첨가물의 다양한 기능, 효능 및 활용을 위하여 본 연구의 발효물 사료의 기타 어종, 가족과 반려동물 등에 장기 급이에 대한 이후 연구가 필요할 것으로 생각된다.

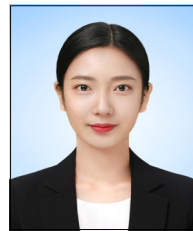
References

- [1] D. M. Gatlin, F. T. Barrows, K. Dabrowski, T. G. Gaylord, R. W. Hardy. "Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review", *Aquaculture Research*, Vol.38, pp.551-579, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x>
- [2] D. Badillo, S. Z. Herzka, M. T. Viana. "Protein retention assessment of four levels of poultry by-product substitution of fishmeal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets using stable isotopes of nitrogen as natural tracers", *PLOS ONE*, Vol.9 No.9, pp.107-523, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107523>
- [3] T. H. Jang, S. M. Jung, E. Kim, Y. S. Lee, S. M. Lee, "Nutritional value and digestibility of *Tenebrio molitor* as a feed ingredient for rockfish (*Sebastes schlegelii*)", *Journal of Fisheries and Marine Sciences Education*, Vol.29, No.3, pp.888-898, 2017. DOI: <https://doi.org/10.13000/JFMSE.2017.29.3.888>
- [4] J. G. Kim, Y. C. Choi, J. Y. Choi, W. T. Kim, G. S. Jeong, K. H. Park, S. J. Hwang. "Ecology of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Statmyidae) in Korea", *Korea Journal Applied Entomology*, Vol.47, pp.337-343, 2008. DOI: <https://doi.org/10.5656/KSAE.2008.47.4.337>
- [5] S. StHilaire, C. Sheppard, J. K. Tomberlin, S. Irving, L. Newton, M. A. Mcguire. "Fly prepupae as a feedstuff for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*", *Journal of the World Aquaculture Society*, Vol.38 No.1, pp.59-67, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2006.00073.x>
- [6] S. Diener, C. Zurbrugg, K. Tockner. "Conversion of organic material by black soldier fly larvae: establishing optimal feeding rates", *Waste Management & Research*, Vol.27, pp. 603-610, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1177/0734242X09103838>
- [7] A. Biswas, H. Araki, T. Sakata, T. Nakamori, K. Takii. "Optimum fish meal replacement by soy protein concentrate from soymilk and phytase supplementation in diet of red sea bream, *Pagrus major*", *Aquaculture*, Vol.506, pp.51-59, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.023>
- [8] C. M. A Caipang, J. Mabuhay-Omar, M. M. Gonzales Plasus, "Plant and fruit waste products as phytogetic feed additives in aquaculture", *AACL Bioflux* Vol.12, No.1 pp.261-268, 2019. <http://www.bioflux.com.ro/docs/2019.261-268>
- [9] F. Norambuena, K. Hermon, V. Skrzypczyk, J. A. Emery, Y. Sharon, A. Beard, G. M. Turchini, "Algae in fish feed: performances and fatty acid metabolism in juvenile atlantic salmon", *PLOS ONE*, Vol.10, No.4 pp.1-17, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124042>
- [10] H. Nakagawa, "Usefulness of waste algae as a feed additive for fish culture", *Developments in Food Science*, Vol.42, pp.243-252, 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-4501\(04\)80026-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4501(04)80026-8)
- [11] G. Mustafa, S. Wakamatsu, T. A. Takeda, T. Umino, "Effects of algae meal as feed additive on growth feed efficiency and body composition in red sea bream", *Fisheries Science*, Vol.61, No.1 pp.25-28, 1995. DOI: <https://doi.org/10.2331/fishsci.61.25>
- [12] K. Wanka, T. Damerau, B. Costas, A. Krueger, S. Wuertz, "Isolation and characterization of native

- probiotics for fish farming”, *BMC Microbiology* Vol.18, No.119, pp.1260-1262, 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1260-2>
- [13] M. Moradi, S. A. Kousheh, H. Almasi, A. Alizadeh, A. Lotfi, “Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol.19, No.6 pp.3390-3415, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12613>
- [14] N. Akhter, B. Wu, A. M. Memon, M. Mohsin, “Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review”, *Fish & Shellfish Immunology* Vol.45, No. 2 pp.733-741, 2015.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.038>
- [15] M. S. Llewellyn, S. Boutin, S. H. Hoseinifa, N. Derome, “Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries”, *Frontiers in Microbiology*, Vol.5, pp.207, 2014.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00207>
- [16] K. H. Park, Y. C. Choi, S. H. Nam, S. H. Kim, S. Y. Kim, Y. J. Ma, S. K. Nho. “Nutritional value of black fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) as a feed supplement for fish”, *Journal of Sericultur and Entomological Science*. Vol.51, No.2 pp.95-98, 2013.
DOI: <https://doi.org/10.7852/jses.2013.51.2.95>
- [17] T. Stadlander, A. Stamer, A. Buser, J. Wohlfahrt, F. Leiber, C. Sandrock. “*Hermetia illucens* meal as fish meal replacement for rainbow trout on farm”, *Journal of Insects as Food and Feed*. Vol.3, No.3 pp.165-175, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.3920/jiff2016.0056>
- [18] Y. C. Choi, K. H. Park, S. H. Nam, B. G. Jang, J. H. Kim, D. W. Kim, D. J. Yu. “The effect on growth performance of chicken meat in broiler chicks by dietary supplementation of black soldier fly larvae, *Hermetia illucens*”, *Journal of Sericultur and Entomological Science*. Vol.51, No.1, pp.30-35, 2013.
DOI: <https://doi.org/10.7852/jses.2013.51.1.30>
- [19] A. Heni, H. M. Era, S. Koesnoto, H. Nenny, A. Zelvy “Levels of protein and fat produced by black soldier fly (*Hementia illucens*) larvae in the bioconversion of organic waste”, *E3S Web of Conferences*, Vol.151, pp.01041, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202015101041>
- [20] K. Jhon, M. C. Kim, Y. H. Kim, M. S. Heo, “Effects of the culture broth of lactic acid bacteria cultured in herb extracts on growth promotion and nonspecific immune responses of aquacultured fish”, *Journal of Life Science*, Vol.19, No.1, pp.87-93, 2009.
DOI: <https://dx.doi.org/10.5352/JLS.2009.19.1.087>
- [21] S. H. Hoseinifar, M. A. Esteban, A. Cuesta, Y. Z. Sun, “Prebiotics and fish immune response: A review of current knowledge and future perspectives”, *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, Vol.23, No.4 pp.315-328, 2015.
DOI: <https://doi.org/10.1080/23308249.2015.1052365>
- [22] H. S. Jo, M. E. Park, S. M. Hong, “Effect of Dietary supplementation of fermented mealworm on the growth of juvenile stone flounder”, *Journal of the Korean Academia industrial cooperation Society*, Vol.22, No.4 pp.312-320, 2021.
DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2021.22.4.312>
- [23] H. Watanabe, A. Suzuki, M. Goto, D. Lubahn, T. Iguchi, “Tissue-specific estrogenic and non-estrogenic effects of a xenoestrogen, nonylphenol”, *Journal of Molecular Endocrinology*, Vol.33, No.1 pp.243-252, 2004.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1677/jme.0.0330243>
- [24] R. Dhakal, V. Bajpai, K. Baek, “Production of GABA(γ-aminobutyric acid) by microorganisms: a review”, *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol.43, No.4, pp.1230-1241, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000400001>

조 현 슬(Hyun Sol Jo)

[정회원]



- 2019년 9월 ~ 2020년 9월 : 환동해산업연구원 연구원
- 2020년 2월 : 영남대학교 미생물생명공학과 (이학석사)
- 2020년 10월 ~ 현재 : 환동해산업연구원 원급연구원

<관심분야>

미생물생명공학, 포스트바이오틱스, 산업곤충

박 무 역(Moo Eog Park)

[정회원]



- 1994년 2월 : 제주대학교 대학원 수산생물학과 (이학석사)
- 2000년 8월 : 제주대학교 대학원 수산생물학과 (이학박사)
- 1998년 10월 ~ 2016년 1월 : 경북 수산자원연구원 지방해양수산 연구사
- 2016년 1월 ~ 2021년 1월 : 경북수산자원연구원 생산과장 (연구관)
- 2021년 1월 ~ 현재 : 경북 수산자원연구원 민물고기연구센터 소장

<관심분야>

수산양식

홍 선 미(Sun Mee Hong)

[정회원]



- 1999년 2월 : 경북대학교 농업생명과학대학 (농학석사)
- 2005년 2월 : 경북대학교 농업생명과학대학 (농학박사)
- 2002년 3월 ~ 2005년 2월 : 농촌진흥청 국립농업과학원 연구원
- 2005년 3월 ~ 2006년 11월 : 농촌진흥청 국립농업과학원 PostDoc
- 2006년 12월 ~ 2009년 12월 : 일본 규슈대학교 농생명과학대학원 PostDoc
- 2010년 1월 ~ 현재 : 환동해산업연구원 책임연구원

<관심분야>

재조합단백질, 생물공학, 해양유산균, 산업곤충