



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년07월13일  
(11) 등록번호 10-2276217  
(24) 등록일자 2021년07월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A23K 50/80 (2016.01) A23K 10/16 (2017.01)  
A23K 10/26 (2016.01) A23K 10/30 (2016.01)  
A23K 20/147 (2016.01) A23K 20/174 (2016.01)  
A23K 20/26 (2016.01) A23K 30/20 (2016.01)  
A23K 40/00 (2016.01)  
(52) CPC특허분류  
A23K 50/80 (2016.05)  
A23K 10/16 (2016.05)  
(21) 출원번호 10-2018-0074340  
(22) 출원일자 2018년06월27일  
심사청구일자 2018년06월27일  
(65) 공개번호 10-2020-0001408  
(43) 공개일자 2020년01월06일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020060125455 A\*  
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자  
경상국립대학교 산학협력단  
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)  
(72) 발명자  
강석중  
경상남도 토영시 용남면 대곡길 12, 103동 1503호  
정우철  
경상남도 창원시 마산합포구 월영남12길 12, 104동 1904호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
한윤호

전체 청구항 수 : 총 2 항

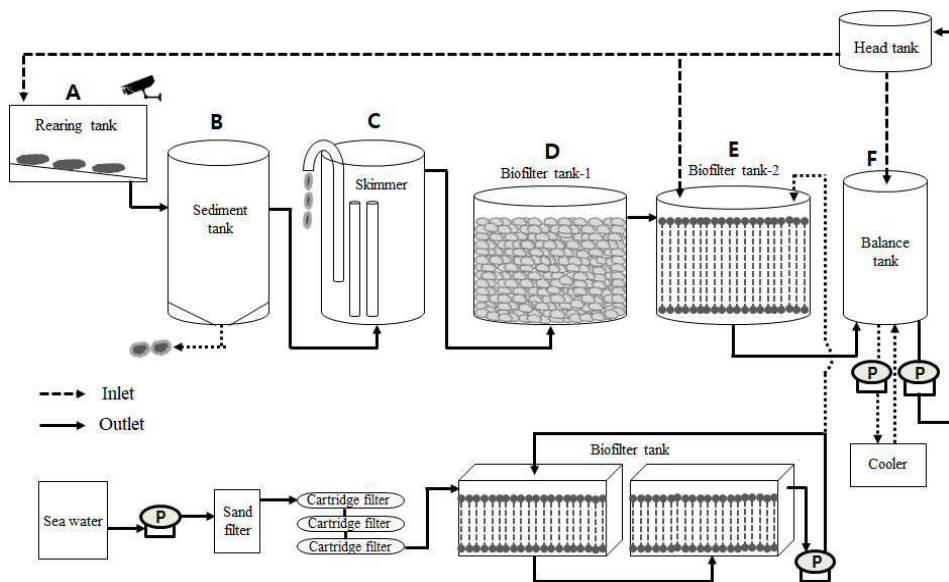
심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 천식 개선물질을 포함하는 해삼사료 조성물 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 해삼양식 사료용 조성물에 관한 것으로서, 더 상세하게는 천식 개선 효과가 강화된 해양 미세조류 분말을 유효성분으로 포함하는 해삼(*Apostichopus japonicus*) 양식 사료용 조성물 및 그 제조방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

- A23K 10/26 (2016.05)
- A23K 10/30 (2016.05)
- A23K 20/147 (2016.05)
- A23K 20/174 (2016.05)
- A23K 20/26 (2016.05)
- A23K 30/20 (2016.05)
- A23K 40/00 (2016.05)

(72) 발명자

**아니수자만 엡디**

경상남도 통영시 통영해안로 2, 309호 (경상대학교  
해양과학대학 해양생물교육연구센터)

**김봉**

경상남도 통영시 통영해안로 2, 309호 (경상대학교  
해양과학대학 해양생물교육연구센터)

(56) 선행기술조사문헌

- KR1020140113769 A\*
- KR1020180047631 A\*
- KR1020150108067 A\*
- CN103844076 A
- KR101444131 B1
- KR101710301 B1
- KR1020130009425 A
- KR1020140026985 A
- KR1020150066227 A
- KR1020170021462 A
- KR1020180047632 A
- KR1019980025445 A
- KR1020130094630 A

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20150297
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	한국해양과학기술진흥원
연구사업명	수산실용화기술개발사업
연구과제명	천식개선물질을 함유하는 해삼생산을 위한 사료개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상대학교 산학협력단
연구기간	2015.06.08 ~ 2018.06.07
공지예외적용	: 있음

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

갈파래 및 나노클롭시스 속(*Nannochloropsis* sp.)으로 구성되는 균으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상의 조류의 분말 10 내지 20 중량부, 지층이(*Sargassum thunbergii*) 10 내지 20 중량부, 대두박(soybean meal) 5 내지 10 중량부, 조개분말(shell fish powder) 5 내지 10 중량부, 패각분말(Shell powder) 1 내지 3 중량부, 인산칼슘(calcium phosphate) 1 내지 3 중량부, 효모 추출물(yeast extract) 3 내지 8 중량부, 콩 레시틴(soyabean lecithin) 2 내지 6 중량부, 미네랄(mineral) 0.2 내지 0.7 중량부, 비타민(vitamin) 0.2 내지 0.7 중량부, 및 바다 진흙(sea mud) 20 내지 60 중량부를 포함하는, 천식 개선 효과가 강화된 해삼의 생산을 위한 해삼 양식 사료조성물.

**청구항 2**

갈파래 및 나노클롭시스 속(*Nannochloropsis* sp.)으로 구성되는 균으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상 조류의 분말 10 내지 20 중량부, 지층이(*Sargassum thunbergii*) 10 내지 20 중량부, 대두박(soybean meal) 5 내지 10 중량부, 조개분말(shell fish powder) 5 내지 10 중량부, 패각분말(Shell powder) 1 내지 3 중량부, 인산칼슘(calcium phosphate) 1 내지 3 중량부, 효모 추출물(yeast extract) 3 내지 8 중량부, 콩 레시틴(soyabean lecithin) 2 내지 6 중량부, 미네랄(mineral) 0.2 내지 0.7 중량부, 비타민(vitamin) 0.2 내지 0.7 중량부, 및 바다 진흙(sea mud) 20 내지 60 중량부를 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; 및

상기 혼합물을 건조시켜 고형화하는 단계를 포함하는 천식 개선 효과가 강화된 해삼 생산을 위한 해삼 양식용 사료조성물의 제조방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 천식 개선물질을 포함하는 해삼사료 조성물에 관한 것으로서, 더 상세하게는 천식 개선물질을 포함하는 해삼사료 조성물 및 그 제조방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 해삼(*Apostichopus japonicus*)은 중국에서 고가의 식품이지만, 최근 해양오염과 연안매립으로 인한 서식지 파괴 때문에 중국내 생산량이 부족하여 수요를 충족시키기 위하여 한국, 일본 및 동남아 지역에서 대량수입에 의존하고 있다. 그래서 우리나라에서도 수산물 수출 10대 전략품종의 하나로 지정하여 해삼종자생산기술개발, 가공기술개발과 함께 해삼클러스터조성사업 등 해삼양식에 박차를 가하고 있다. 특히 해삼은 중국에서 예로부터 관절염, 고혈압, 상처치유 및 외과수술 후 건강회복에 사용해 왔으며, 천식질환 개선에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 최근 해삼의 부가가치를 높이기 위하여 양식해삼을 단순 가공하여 수출하는 형태에서 벗어나 가능성을 갖는 고부가의 해삼생산이 요구되고 있다.

[0003] 한편 천식(asthma)은 알레르기성 호흡기 질환의 일종으로 세계적으로 약 3억 명 인구가 고통을 겪고 있으며, 이로 인한 사망자는 연간 약 25만 명으로 그 숫자는 계속 증가하고 있다. 또한 천식은 간접흡연, 미세먼지, 황사, 식습관 및 어린이 면역체계 약화 등 요인으로 발병연령이 점차 낮아지는 양상을 나타내어 세계보건기구(WHO)의 관심이 증대되고 있는 질환중의 하나이다. 이와 관련하여 대한민국 공개특허 제2013-0009425호는 친환경 소재를 이용한 해삼 사료용 조성물 및 이의 제조방법에 대해 개시하고 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0004] 그러나 상기 선행기술은 해조류를 이용하여 고형화 형태의 해삼 사료를 제조하는 것으로 단순히 급여에 의한 양적증가만을 고려할 뿐 건강식품으로서 가능성을 나타내는 양식 해삼 생산을 위한 사료용 조성물이 아니다.

[0005] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 종래 해삼 양식방법과 비교하여 성장이 우수하고 천식 개선물질을 다량 포함하는 해삼을 생산하기 위한 사료 조성물 및 그 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

**과제의 해결 수단**

[0006] 본 발명의 일 관점에 따르면, 갈파래, 다시마 및 나노클롭시스 속(*Nannochloropsis* sp.)으로 구성되는 균으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상 조류의 분말 10 내지 20 중량부, 지충이(*Sargassum thunbergii*) 10 내지 20 중량부, 대두박(soybean meal) 5 내지 10 중량부, 조개분말(shell fish powder) 5 내지 10 중량부, 패각분말(Shell powder) 1 내지 3 중량부, 인산칼슘(calcium phosphate) 1 내지 3 중량부, 효모 추출물(yeast extract) 3 내지 8 중량부, 콩 레시틴(soyabean lecithin) 2 내지 6 중량부, 미네랄(mineral) 0.2 내지 0.7 중량부, 비타민(vitamin) 0.2 내지 0.7 중량부, 및 바다 진흙(sea mud) 20 내지 60 중량부를 포함하는, 천식 개선 효과가 강화된 해삼의 생산을 위한 해삼 양식용 사료조성물이 제공된다.

[0007] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 갈파래, 다시마 및 나노클롭시스 속(*Nannochloropsis* sp.)으로 구성되는 균으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상 조류의 분말 10 내지 20 중량부, 지충이(*Sargassum thunbergii*) 10 내지 20 중량부, 대두박(soybean meal) 5 내지 10 중량부, 조개분말(shell fish powder) 5 내지 10 중량부, 패각분말(Shell powder) 1 내지 3 중량부, 인산칼슘(calcium phosphate) 1 내지 3 중량부, 효모 추출물(yeast extract) 3 내지 8 중량부, 콩 레시틴(soyabean lecithin) 2 내지 6 중량부, 미네랄(mineral) 0.2 내지 0.7 중량부, 비타민(vitamin) 0.2 내지 0.7 중량부, 및 바다 진흙(sea mud) 20 내지 60 중량부를 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; 및 상기 혼합물을 건조시켜 고형화하는 단계를 포함하는 천식 개선 효과가 강화된 해삼 양식용 사료조성물의 제조방법이 제공된다.

**발명의 효과**

[0008] 상기한 바와 같이 본 발명의 천식 개선물질을 포함하는 해삼사료 조성물 및 그 제조방법은 당지질 포함량이 높은 갈조류분을 주원료로 사용하여 자연산 해삼에 비해서 천식개선 효능이 낮거나 거의 없는 것으로 알려진 양식 해삼에 급여하여 천식 개선물질을 다량 포함하는 해삼을 생산하는 효과를 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

**도면의 간단한 설명**

[0009] 도 1은 본 발명의 실험 사료를 이용한 해삼 사육실험을 위해 설계된 순환여과시스템(RAS)의 개요도이다.  
 도 2는 본 발명의 실험 사료를 이용한 해삼 사육실험을 위해 설계된 순환여과시스템(RAS)의 사진이다.  
 도 3은 본 발명의 실험 사료를 급여한 해삼의 비성장속도(SGR)를 분석한 그래프이다. 알파벳 소문자는 같은 처리군 간에 유의한 차이 ( $P < 0.05$ )를 나타내며 막대는 표준 오차를 나타낸다.  
 도 4는 본 발명의 실험 사료를 급여한 해삼의 섭취율(IR)을 분석한 그래프이다. 알파벳 소문자는 같은 처리군 간에 유의한 차이 ( $P < 0.05$ )를 나타내며 막대는 표준 오차를 나타낸다.  
 도 5는 본 발명의 실험 사료를 급여한 해삼의 배설물 생산율(FPR)을 분석한 그래프이다. 알파벳 소문자는 같은 처리군 간에 유의한 차이 ( $P < 0.05$ )를 나타내며 막대는 표준 오차를 나타낸다.  
 도 6은 본 발명의 실험 사료를 급여한 해삼의 식이 전환 효율(FCE)을 분석한 그래프이다. 알파벳 소문자는 같은 처리군 간에 유의한 차이 ( $P < 0.05$ )를 나타내며 막대는 표준 오차를 나타낸다.  
 도 7은 본 발명의 실험 사료를 급여한 해삼의 추출물의 투여 후 알레르기성 호흡기 질환 유도 마우스 모델 제조 과정을 나타내는 사진이다.  
 도 8은 본 발명의 실험 사료를 급여한 해삼의 추출물을 마우스 모델에 투여에 따른 항 염증성 사이토카인인 IL-10 유전자 발현 수준을 분석한 그래프이다. 알파벳 소문자는 같은 처리군 간에 유의한 차이( $P < 0.05$ )를 나타내며 막대는 표준 오차를 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0010] 용어의 정의:

- [0011] 본 문서에서 사용되는 용어 "해삼(*Apostichopus japonicus*)"은 돌기해삼이라고 불리고 있으며 생물학적 분류 체계에 따르면 극피동물문(Echinodermata), 해삼강(Holothuroidea), 해삼과(Stichopodidae) 여자삼속(*Apostichopus*)에 속한다. 건강 기능성물질인 사포닌과 콘드로이친을 다량 포함하고 있으므로 예로부터 바다의 인삼이라 부른다.
- [0012] 본 문서에서 사용되는 용어 "Interleukin 10(IL-10)"은 인간 사이토카인 합성 억제 인자(CSIF)로도 알려져 있으며 항 염증성 사이토카인으로 IL-10 유전자에 의해 암호화된다. IL-10은 2개의 IL-10 수용체-1과 2개의 IL-10 수용체-2 단백질로 구성된 수용체 복합체를 통해 신호를 보낸다.
- [0013] **발명의 상세한 설명:**
- [0014] 본 발명의 일 관점에 따르면, 갈파래, 다시마 및 나노클롭시스 속(*Nannochloropsis* sp.)으로 구성되는 균으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상 조류의 분말 10 내지 20 중량부, 지충이(*Sargassum thunbergii*) 10 내지 20 중량부, 대두박(soybean meal) 5 내지 10 중량부, 조개분말(shell fish powder) 5 내지 10 중량부, 패각분말(Shell powder) 1 내지 3 중량부, 인산칼슘(calcium phosphate) 1 내지 3 중량부, 효모 추출물(yeast extract) 3 내지 8 중량부, 콩 레시틴(soyabean lecithin) 2 내지 6 중량부, 미네랄(mineral) 0.2 내지 0.7 중량부, 비타민(vitamin) 0.2 내지 0.7 중량부, 및 바다 진흙(sea mud) 20 내지 60 중량부를 포함하는, 천식 개선 효과가 강화된 해삼의 생산을 위한 해삼 양식용 사료조성물이 제공된다.
- [0015] 상기 해삼 양식용 사료조성물은 더 바람직하게는 갈파래, 다시마 및 나노클롭시스 속(*Nannochloropsis* sp.)으로 구성되는 균으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상 조류의 분말 13 내지 17 중량부, 지충이 13 내지 17 중량부, 대두박 6 내지 9 중량부, 조개분말 6 내지 9 중량부, 패각 분말 1.5 내지 2.5 중량부, 인산칼슘 1.5 내지 2.5 중량부, 효모추출물 4 내지 7 중량부, 콩 레시틴 3 내지 5 중량부, 미네랄 0.3 내지 0.6 중량부, 비타민 0.3 내지 0.6 중량부, 및 바다 진흙 30 내지 50 중량부를 포함할 수 있다.
- [0016] 상기 해삼 양식용 사료조성물은 가장 바람직하게는 다시마 및 나노클롭시스 속(*Nannochloropsis* sp.)으로 구성되는 균으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상 조류의 분말 14 내지 16 중량%, 지충이 14 내지 16 중량%, 대두박 7 내지 9 중량%, 조개분말 7 내지 9 중량%, 패각 분말 1.5 내지 2.5 중량%, 인산칼슘 1.5 내지 2.5 중량%, 효모 추출물 4 내지 6 중량%, 콩 레시틴 3 내지 5 중량%, 미네랄 0.4 내지 0.6 중량%, 비타민 0.4 내지 0.6 중량%, 및 잔부의 바다 진흙으로 구성될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 갈파래, 다시마 및 나노클롭시스 속(*Nannochloropsis* sp.)으로 구성되는 균 으로부터 선택되는 하나 또는 둘 이상 조류의 분말 10 내지 20 중량부, 지충이(*Sargassum thunbergii*) 10 내지 20 중량부, 대두박(soybean meal) 5 내지 10 중량부, 조개분말(shell fish powder) 5 내지 10 중량부, 패각분말(Shell powder) 1 내지 3 중량부, 인산칼슘(calcium phosphate) 1 내지 3 중량부, 효모 추출물(yeast extract) 3 내지 8 중량부, 콩 레시틴(soyabean lecithin) 2 내지 6 중량부, 미네랄(mineral) 0.2 내지 0.7 중량부, 비타민(vitamin) 0.2 내지 0.7 중량부, 및 바다 진흙(sea mud) 20 내지 60 중량부를 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; 및 상기 혼합물을 건조시켜 고형화하는 단계를 포함하는 천식 개선 효과가 강화된 해삼 양식용 사료조성물의 제조방법이 제공된다.
- [0018] 대부분의 해삼은 침전물을 유기 물질로 섭취하는 퇴적물 섭식자(deposit feeders)이다. 전 세계적으로 해삼양식 생산량이 증가함에 따라 해삼양식은 배합사료 급여에 의한 양적증가에만 치중되어 있으며, 건강식품으로의 질적인 측면에서의 생산이 무시되고 있다. 또한 양식해삼은 자연산 해삼에 비해서 천식개선 효능이 낮거나 거의 없는 것으로 나타나고 있다. 이에 본 발명자들은 양식 해삼에서 천식을 개선할 수 있는 물질을 포함한 해삼을 생산하기 위해 예의노력한 결과 기존 상용의 해조분말 지충이 대신에 당지질 포함량이 높은 갈조류분(미역, 다시마) 또는 오메가-3 지방산(EPA)을 포함하는 해수 클로렐라(*Nannochloropsis*)를 주원료로서 제공함으로써 종래 해삼 양식방법과 비교하여 성장이 우수하고 천식 개선물질을 다량 포함하는 해삼을 생산하기 위한 사료조성물 및 그 제조방법을 개발하여 본 발명을 완성하였다.
- [0019] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.
- [0020] **실시예 1: 실험 사료(feed stuff)**
- [0021] 본 발명자들은 천식 개선물질을 포함하는 해삼사료 조성물을 제조를 위해 기본사료 또는 천식개선 후보물질을

포함하는 총 6종의 실험 사료를 제조하였다. 구체적으로 기본사료 100%로 제조한 사료는 대조군으로 사용하였고 (control) 기본사료 85%에 갈파래분(*Ulva lactuca powder*) 15%를 첨가한 실험군(Diet 1), 기본사료 85%에 미역 분(*Undaria pinnatifida powder*) 15%를 첨가한 실험군(Diet 2), 기본사료 85%에 다시마분(*Laminaria japonica powder*) 15%를 첨가한 실험군(Diet 3), 기본사료 85%에 미세조류분(*Schizochytrium powder*) 15%를 첨가한 실험군(Diet 4), 및 기본사료 85%에 해수클로렐라분(*Nannochloropsis powder*) 15%를 첨가한 실험군(Diet 5)을 제조하였다. 상기 실험군의 해조류 중 갈파래, 미역, 다시마는 시중에 판매되고 있는 건조된 원료를 구입하여 200- $\mu$ m mesh의 미세 분말로 갈아서 사료에 첨가하였고 시조키트리움과 해수클로렐라는 양식용 사료 판매처로부터 구입하여 동결건조과정을 거쳐 분말화 후 -20°C 냉동 보관하여 사용하였으며 경상대학교의 해양생물 및 양식학 실험실에서 9주 동안 상기 제조한 실험 사료를 이용하여 실험동물 및 사료 성능 실험을 수행하였다

**표 1**

기본사료 또는 천식개선 후보물질을 포함하는 총 6종의 실험 사료의 조성

성분	대조군	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4	Diet 5
<i>Ulva lactuca powder</i>	0	15	0	0	0	0
<i>Undaria pinnatifida powder</i>	0	0	15	0	0	0
<i>Laminaria japonica powder</i>	0	0	0	15	0	0
<i>Schizochytrium powder</i>	0	0	0	0	15	0
<i>Nannochloropsis powder</i>	0	0	0	0	0	15
Wheat flour	15	0	0	0	0	0
기본 성분						
<i>Sargassum thunbergii powder</i>	15	15	15	15	15	15
Soybean meal	8	8	8	8	8	8
Shellfish powder	8	8	8	8	8	8
Shell powder	2	2	2	2	2	2
Calcium phosphate	2	2	2	2	2	2
Yeast extract	5	5	5	5	5	5
Soyabean lecithin	4	4	4	4	4	4
Mineral	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Vitamin	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Sea mud	40	40	40	40	40	40

**실시예 2: 일반성분 분석**

본 발명자들은 상기에서 제조된 비교예 및 실시예 1 내지 5의 해삼사료에 대해 일반성분 분석을 수행하였다. 구체적으로, 일반성분 분석은 AOAC(Association of Official Analytical Chemists, Washington DC., AOAC. *Official method of analysis. 16th ed. U.S.A.*, 1-43, 1995)방법, 조단백질은 Kjeldahl법으로 분석하였으며, 조지방은 클로로포름(choloroform)과 메탄올(methanol)을 2:1 비율로 혼합한 용액을 용매로 한 Bligh and Dyer 추출법(1959)에 준하였다. 수분은 상압가열 건조법으로 105°C의 드라이오븐(dry oven)에서 6시간 동안 건조 후 측정하였고, 조회분은 직접회화법(Dry ashing)으로 600°C 회화로에서 4시간 동안 태운 후 정량하였다.

그 결과, 대조군의 경우 수분을 제외한 조단백질은 17.7%, 지질 3.4%, 조회분 41.2%로 나타났고, Diet 1의 해삼 사료는 조단백질 17%, 조지질 3.7%, 조회분 44.8%로 나타났으며, Diet 2의 해삼사료는 조단백질 17.5%, 조지질 3.1%, 조회분 45.5%로 나타났다. 또한, Diet 3의 해삼사료는 조단백질 17.1%, 조지질 3.1%, 조회분 45.8%로 실험군 중 가장 높은 조회분 함량을 나타내었고 Diet 4의 해삼사료는 조단백질 17.6%, 조지질 7.4%, 조회분 41.5%로 실험군 중 가장 높은 조지질 함량을 나타내었으며 Diet 5의 해삼사료은 조단백질 19.6%, 조지질 5.6%, 조회분 42.1%로 실험군 중 가장 높은 조단백질 함량을 나타내었다. 상기 일반성분 분석 결과를 하기 표 2에 요약하였다.

**표 2**

총 6종의 실험 사료의 일반성분 분석

일반 조성(%)	대조군	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4	Diet 5
조단백질	17.74	17.03	17.48	16.87	17.59	19.64
조지질	3.39	3.72	3.11	3.32	7.44	5.64

조회분	41.20	44.80	45.55	45.85	41.5	42.10
-----	-------	-------	-------	-------	------	-------

[0027] **실시예 3: 해삼 사육실험**

[0028] 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 제조한 총 6종의 실험사료를 이용하여 해삼 사육실험을 수행하였다. 구체적으로, 본 발명에 사용한 돌기해삼(*Apostichopus japonicus*)은 평균체중 3.0g으로 1,000마리를 경남 통영시 산양면의 증묘생산업체에서 분양받아 실험실로 운반하여 1,000 L 수조에 입식한 후, 실험환경에 적응할 수 있도록 17℃, 32 psu의 해수에서 기초사료를 공급하면서 5주간 예비사육을 실시하였고 죽은 개체는 폐기처분한 후, 평균체중 3.0±0.1 g인 건강한 해삼 480마리를 선발하여 96 L의 4각 수조에 각각 20개체씩 수용하고 해삼사육을 위하여 설계한 순환여과시스템(RAS)에서 각 실험군당 사육실험을 4회 반복하였다(수조당 20마리씩x 4반복 x6개 사료구 = 480마리). 각 실험수조의 사육수 순환율은 20 주기/일로 조절하였고 실험기간동안의 사육환경은 수온 18℃, 염분 32 psu, pH 7.7~8.3, 용존산소 5.0~7.0 mg/L 및 총 암모니아 0.25ppm 이하의 범위로 유지하였으며 1일 사료공급량은 해삼체중의 5%를 1일 1회(17:00) 충분하게 공급하면서 9주간 사육을 실시하였다(도 1 및 2).

[0029] **실시예 4: 샘플 수집**

[0030] 본 발명자들은 실험을 시작하기 전에 초기 샘플로 24마리의 해삼을 수집하였고 실험 기간 동안 해삼에게 1일 1회(약 1700 시간) 사료를 급여하였다. 먹지 않는 사료(uneaten feed)는 24시간 후에 사이펀(siphon)으로 수집하였고 65℃에서 일정한 무게로 건조하였다. 해삼 배설물도 1일 1회(1600 시간) 사이펀으로 수집하였고 상기 배설물을 65℃에서 일정한 무게로 건조시킨 후 추가 분석을 위해 각 수조의 배설물을 수거하였다. 9주간의 실험이 끝날 때 모든 실험용 해삼은 내장 제거를 위해 2일 동안 사료 급여를 중단하였고 무게를 측정 한 다음 일정한 무게가 될 때까지 65℃에서 건조하였다.

[0031] **실시예 5: 데이터 계산**

[0032] 본 발명의 일 실시예에 따라 상기 제조한 해삼사료의 급여에 따른 실험군의 생존율(survival rate, SR), 비성장속도(specific growth rate, SGR), 섭취율(ingestion rate, IR), 배설물 생산율(feces production rate, FPR), 및 식이 전환 효율(food conversion efficiency, FCE)은 하기 공식으로 계산하였다.

[0033] 생존률(SR):

[0034]  $SR(\%) = 100 \times (N_2/N_1)$

[0035] 상기 식에서  $N_2$ 는 최종 생존개체수,  $N_1$ 은 최초 개체수를 나타낸다.

[0036] 비성장속도(SGR):

[0037]  $SGR(\%d^{-1}) = 100 \times [\ln W_2 - \ln W_1] / T$

[0038] 상기 식에서  $W_1$ 은 최초무게,  $W_2$ 는 최종무게,  $I$ 는 섭취한 사료량 및  $T$ 는 사육기간을 나타낸다.

[0039] 섭취율(IR):

[0040]  $IR(gg^{-1}d^{-1}) = I / [T(W_2 + W_1) / 2]$

[0041] 상기 식에서  $I$ 는 섭취한 총 사료의 건조 중량을 나타낸다.

[0042] 배설물 생산율(FPR):

[0043]  $FPR(gg^{-1}d^{-1}) = F / [T(W_2 + W_1) / 2]$

[0044] 상기 식에서  $F$ 는 배설물의 건조 중량을 나타낸다.

[0045] 식이 전환 효율(FCE):

[0046]  $FCE(\%) = 100(W_2 - W_1) / I$

[0047] 상기 식에서  $W_1$ 은 최초무게,  $W_2$ 는 최종무게를 나타낸다.

[0048] 모든 통계분석은 SPSS 16.0 프로그램을 사용하여 One-way ANOVA test를 실시한 후 Duncan smultiple rang

test(Duncan, 1995)로 평균 간의 유의성(P<0.05)을 검정하였다.

[0049] **실시예 6: 해삼 추출물의 준비**

[0050] 해삼 추출물을 제조하기 위해 상기 실험 해삼을 세척 후 내장 기관을 제거하였고 작은 조각으로 자르고 균질화 하였다. 그 후 시료 150 g을 증류수 300 ml에서 20분간 끓여 주었다. 물에서 고체 물질을 제거한 후, 혼합물이 50% 감소될 때까지 전자레인지(microwave)를 사용하여 상기 끓인 물을 증발시켰고 추출물을 500 x g에서 10분간 원심분리한 후 5배량의 100% 에틸 알코올을 상등액에 첨가하였으며 20 °C에서 24시간 배양한 후 상기 상등액을 제거하였다. 상기 추출 펠릿을 70% 에틸 알코올로 세척하였고 상기와 동일한 조건으로 원심분리하였으며 상등액을 제거하고 펠릿을 진공하에 증발시킨 후 최종 추출물은 20 ml의 증류수에 펠릿을 재현탁시켜 제조하였다(Lee et al., Am J Chin Med. 44:1663-74. 2016).

[0051] **실시예 7: IL-10 유전자 발현 분석**

[0052] 본 발명자들은 IL-10 유전자 발현을 분석하기 위해, 실험용 사료-급여 해삼 추출물 10 µg/ml를 이용하여 2시간 동안 마우스의 비장 세포(splenocyte)에 자극하였다. 그 후 총 RNA를 제조사의 지침에 따라 Qiazol 시약(Qiagen Science, USA)으로 분리하였고 제조사의 지침에 따라, 총 RNA의 2 µg을 M-MLV 역전사 효소(Promega, USA)를 사용하여 전사시켰고 IL-10 mRNA 발현 수준은 iCycler™(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 사용하여 실시간 PCR로 합성하였다. 또한 GAPDH를 참조 유전자(reference gene)로 사용하였다. 상기 실시간 PCR로에 사용한 프라이머 정보를 하기 표 3에 요약하였다.

**표 3**

IL-10 및 GAPDH 프라이머 서열

프라이머	염기서열(5'-->3')	서열번호
GAPDH F	TAC CCC CAA TGT GTC CGT C	1
GAPDH R	AAG AGT GGG AGT TGC TGT TGA AG	2
IL-10 F	GCT ATG CTG CCT GGT CTT ACT G	3
IL-10 R	TCC AGC TGG TCC TTT GTT TG	4

[0054] **실험예 1: 생존과 성장 분석**

[0055] 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한 총 6종의 사료를 급여한 후 상기 사료의 성능을 분석하였다. 본 발명의 모든 해삼은 9주간의 급여 기간이 끝날 때까지 살아 있었고 해삼의 성장 능력은 사료의 종류의 따라 크게 차이가 났다. 해삼의 최종 건습 중량은 Diet 1 실험군에서 가장 높았고 대조군에서 가장 낮게 나타났다(표 4 참조)(P <0.05).

[0056] 또한, 상기 Diet 1 사료를 급여한 해삼에서 가장 높은 비성장속도(SGR, 1.58 % d<sup>-1</sup>)를 관찰하였으나 대조군은 Diet 1 및 Diet 3 보다 유의적으로 낮게 나타났고(P <0.05) Diet 5는 Diet 4와 비교하여 유의한 차이를 나타내지 않았다(P > 0.05)(도 3). 상기 해삼에 급여한 사료에 따른 습식 및 건식 중량을 하기 표 4에 요약하였다.

**표 4**

해삼사료의 급여에 따른 성능분석 결과

항목	초기 Wet Weight(g)	초기 Dry Weight(g)	최종 Wet Weight(g)	최종 Dry Weight(g)
대조군	3.04±0.09	0.28	5.07±0.92	0.47
Diet 1	2.93±0.12	0.27	7.65±0.85	0.71
Diet 2	2.94±0.11	0.27	5.94±0.62	0.55
Diet 3	3.03±0.07	0.28	7.27±0.45	0.67
Diet 4	2.92±0.10	0.27	6.16±0.15	0.57
Diet 5	3.02±0.06	0.28	7.05±0.18	0.65

[0058] **실험예 2: 섭취율(IR), 배설물 생산율(FPR) 및 식이 전환 효율(FCE)**

[0059] 본 발명자들은 실험 사료를 해삼에게 급여 후 섭취율, 배설물 생산율 및 식이 전환 효율을 분석하였다. 실험군

중에서 Diet 3 및 Diet 1는 다른 사료를 급여한 해삼보다 유의하게 높은 섭취율(각각 0.62 및 0.59 g g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) 및 배설물 생산율(각각 0.53 및 0.52 g g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)을 나타내었다(P<0.05). 한편 대조군의 해삼은 모든 실험군 중에서 가장 낮은 섭취율(0.32 g g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>)(P <0.05)과 배설물 생산율(0.26 g g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) (P <0.05)을 나타내었다(도 4 및 5). 또한 Diet 2를 급여한 해삼은 가장 낮은 식이 전환 효율을 나타내었으나(2.21%) Diet 5를 급여한 해삼은 다른 실험 사료를 급여한 해삼과 비교하여 현저히 높은 식이 전환 효율(3.74%)을 나타내었다(도 6)(P <0.05).

[0060] **실험예 3: IL-10 유전자 발현 수준**

[0061] 본 발명자들은 천식 개선물질을 포함하는 해삼 급여 사료에 적합한 해조류를 선정하기 위해 항 염증성 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)인 IL-10 유전자 발현 수준을 분석하였다.

[0062] 구체적으로 알레르기성 호흡기 질환 유도 마우스 모델을 이용하여 천식을 유도하기 전에 본 발명의 실험 사료 6종을 급여한 해삼의 추출물(100 mg/ml)을 마우스당 200 μl씩 2일 간격으로 7번 경구투여 하였고 1일 경과 후, 75 μg 난알부민(ovalbumin, OVA)과 2 μg의 백반(alum)을 1일 1회씩 2일 동안 복강 내 주사하였으며 6일 뒤 다시 1일 1회씩 2일 동안 상기와 동량의 난알부민과 백반을 복강 내 주사하였다. 그 후 6일 경과시점에서 50 μg의 난알부민을 비강 내 1일 1회씩 2일 동안 투여하였고 6일 뒤 다시 동량의 난알부민을 비강 내 1일 1회씩 2일 동안 투여하여 천식을 유도하였다. 그 후, 천식 유도 여부를 확인하기 위해, 메타콜린(methacholine)을 이용하여 기도 저항성을 측정하였고, 마우스를 희생시킨 후 비장세포(splenocytes)를 적출하여 천식 개선 물질인 IL-10 유전자 발현을 측정하였다(도 7).

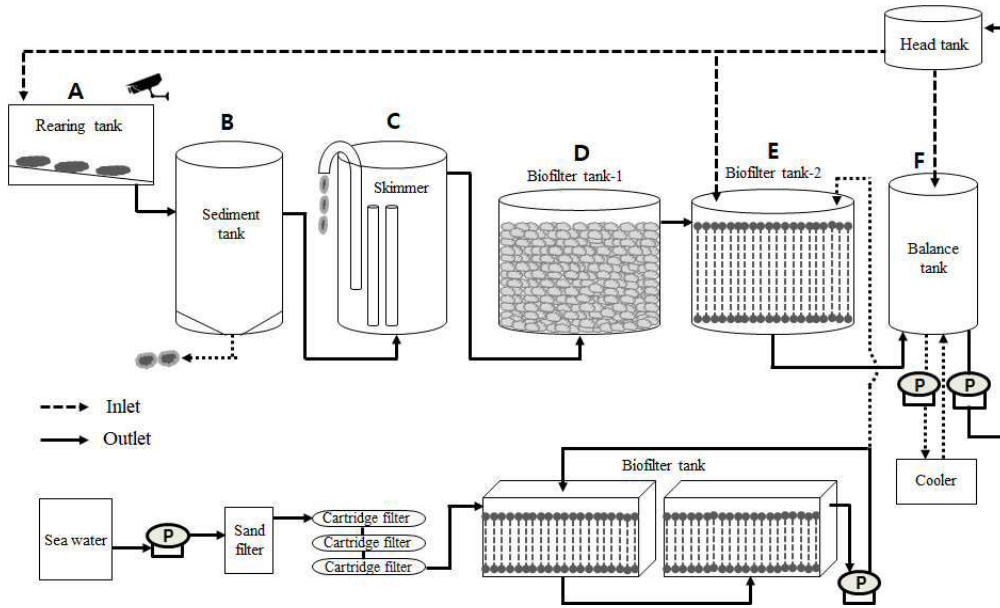
[0063] 그 결과, 천식 개선 물질인 IL-10 유전자 발현 수준은 Diet 1, Diet 3와 및 Diet 5 실험군에서 유의하게 증가하였고 Diet 1 즉 갈파래(*Ulva lactuca*)를 급여하였을 때 가장 높게 나타났다. 그러나 대조군, Diet 2 및 Diet 4 실험군의 경우는 증가하지 않았고 유의한 차이를 나타내지 않았다(도 8). 상기 결과는 본 발명의 해삼 사료인 Diet 1(갈파래), Diet 3(다시마) 및 Diet 5(클로렐라)에 포함된 해조류가 IL-10 유전자 발현을 상향 조절할 수 있음을 시사한다.

[0064] 결론적으로 본 발명의 천식 개선물질(IL-10)을 포함하는 해삼사료 조성물 및 그 제조방법은 천식 개선물질을 거의 포함하지 않은 종래 해삼 양식방법과 비교하여 해삼의 성장이 향상되고 천식 개선물질도 다량 포함하고 있으므로 해삼을 비롯한 다양한 수산생물 양식의 급여사료로 활용될 수 있다.

[0065] 본 발명은 상술한 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

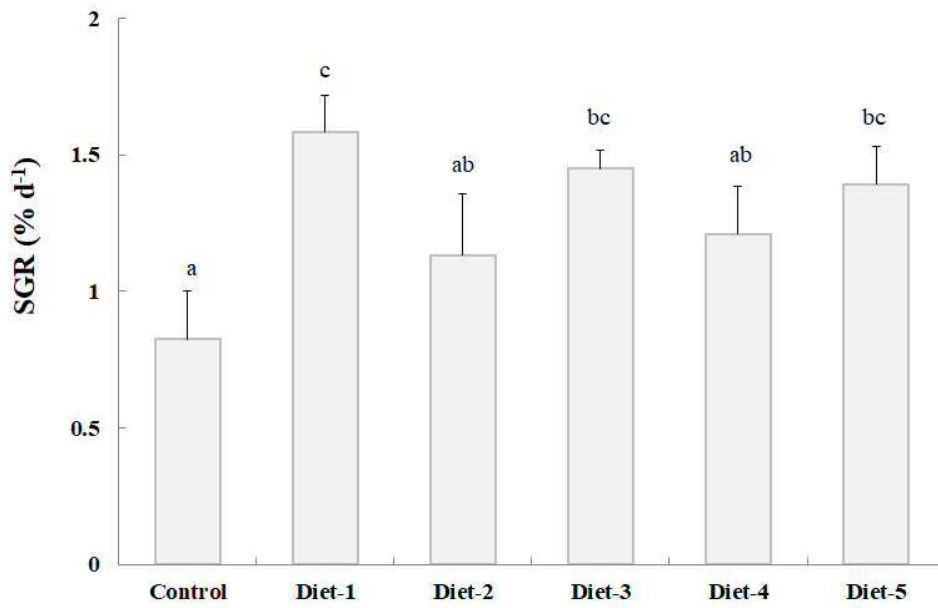
도면1



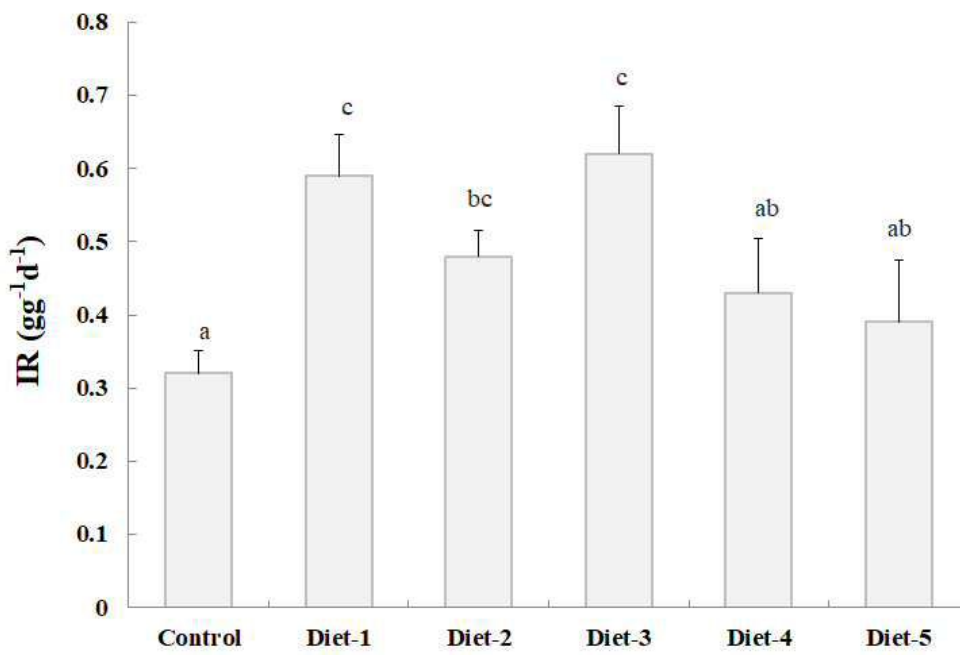
도면2



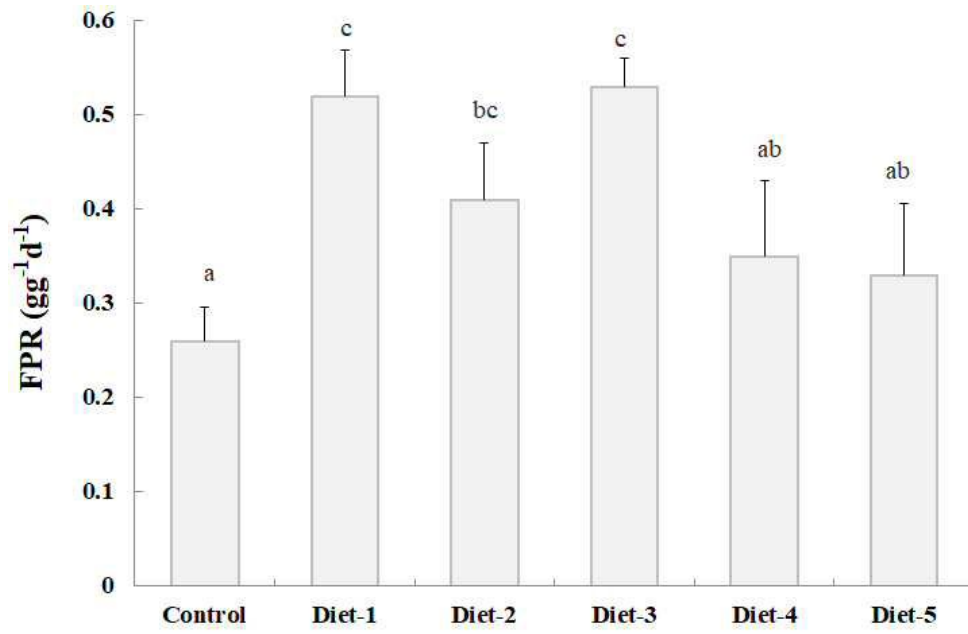
도면3



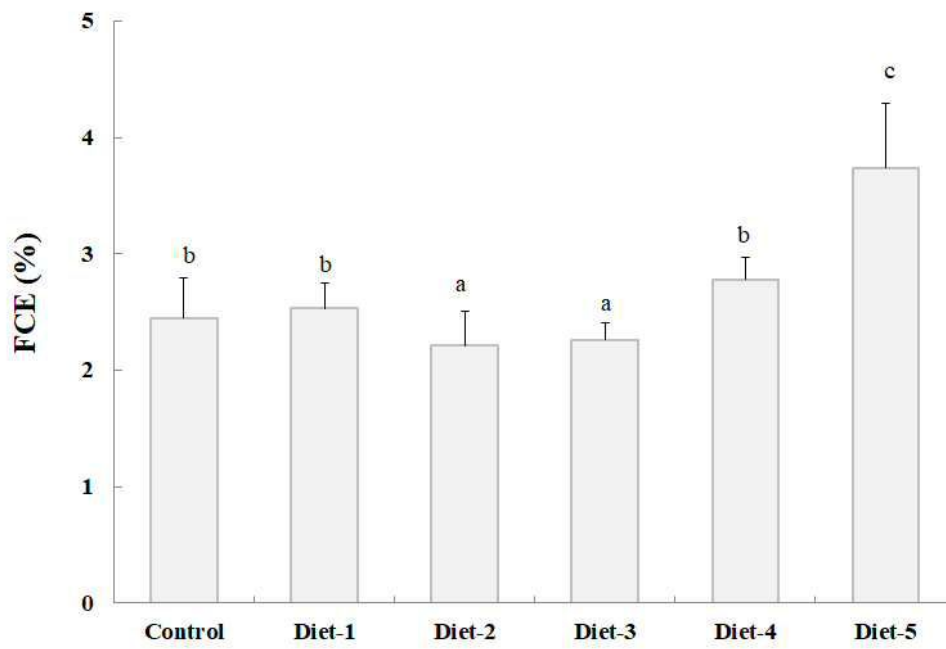
도면4



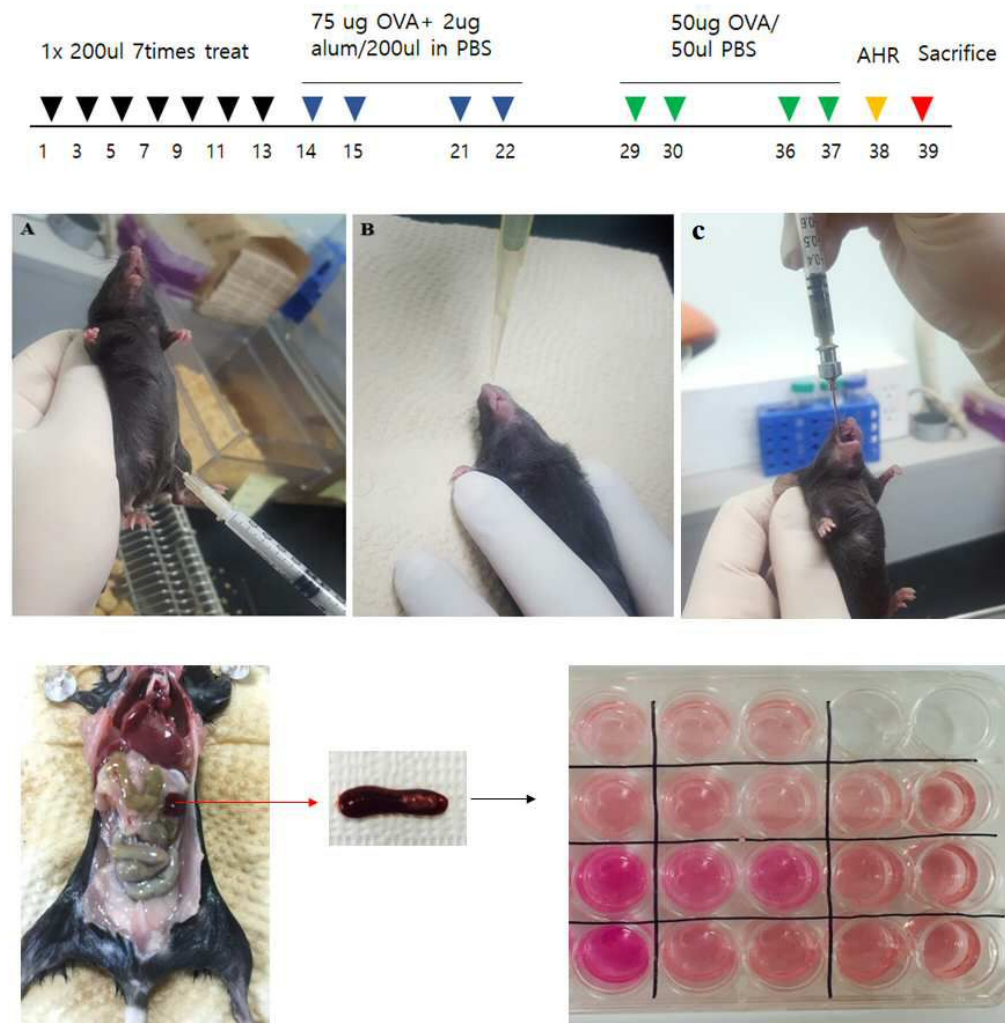
도면5



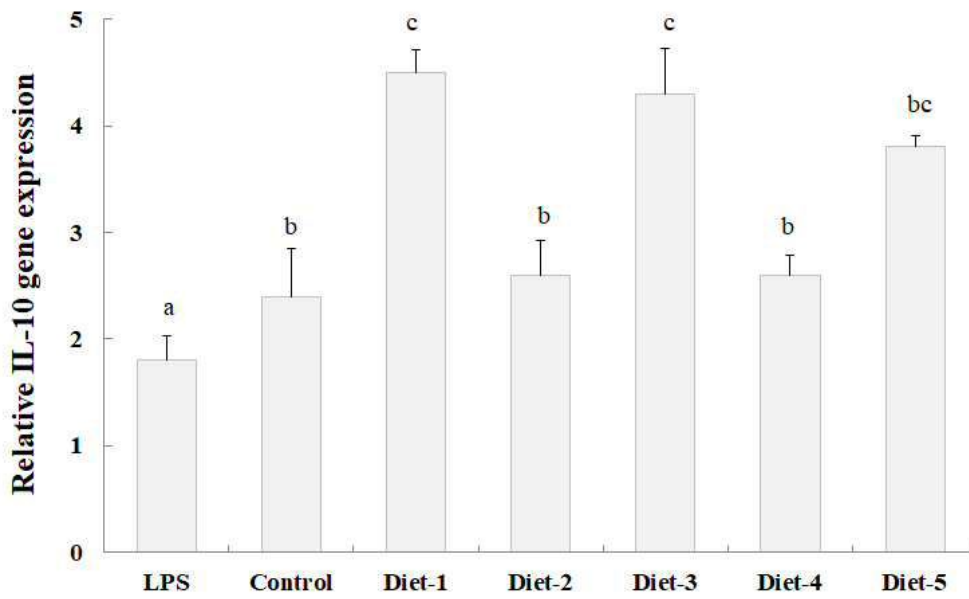
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Composition of feed stuff for sea cucumber containing asthma  
improving substance and manufacturing method thereof

<130> PD18-5660

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH F

<400> 1

tacccccaat gtgtccgtc

19

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH R

<400> 2

aagagtggga gttgctgttg aag	23
<210> 3	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IL-10 F	
<400> 3	
gctatgctgc ctggtcttac tg	22
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IL-10 R	
<400> 4	
tccagctggg cctttgtttg	20