

碩士學位論文

산화된 사료에 첨가한 감귤발효 추출액이 넙치,
*Paralichthys olivaceus*의 건강과
성장에 미치는 영향



濟州大學校 大學院

海 洋 學 科

姜 志 亨

2001年 12月

碩士學位論文

산화된 사료에 첨가한 감귤발효 추출액이 넙치,
*Paralichthys olivaceus*의 건강과
성장에 미치는 영향



濟州大學校 大學院

海 洋 學 科

姜 志 亨

2001年 12月

산화된 사료에 첨가한 감귤발효 추출액이
넙치, *Paralichthys olivaceus*의
건강과 성장에 미치는 영향

指導教授 高 有 峰

姜 志 亨

이 論文을 理學碩士 學位論文으로 提出함



姜 志 亨의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 李 竣 佰 (印)

委 員 高 有 峰 (印)

委 員 李 榮 敦 (印)

濟州大學校 大學院

2001年 12月

Effect of crude extracts from fermented orange
added in oxidized pellet on the health and
growth of olive flounder,
Paralichthys olivaceus

Ji-Hyung Kang

(Supervised by Professor You Bong, Go)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF OCEANOGRAPHY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

Dec. 2001

목 차

List of Figures	i
List of Tables	ii
Summary	iii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 감귤발효 추출액의 제조 및 항산화 활성의 측정	3
1) 감귤발효 추출액의 제조	3
2) 항산화 활성의 측정	3
3) 사료의 제조 및 공급	3
2. 실험어 및 사육환경	5
3. 성장	7
4. 조직학적 관찰	8
5. 혈액분석	9

Ⅲ. 결 과	10
1. 감귤발효 추출액의 항산화 활성	10
2. 사육환경	10
3. 성장	10
4. 조직학적 관찰	18
1) 간(Liver)	18
2) 장(Intestine)	19
3) 비장(Spleen)	25
5. 혈액분석	28
Ⅳ. 고 찰	31
Ⅴ. 요 약	36
Ⅵ. 참고문헌	38



List of Figures

Fig. 1. Comparison of superoxide radical scavenging activities between crude extracts from orange and naringenine, vitamin E and BHA (tert-butylhydroxyanisole).	12
Fig. 2. Monthly variations of body length of <i>Paralichthys olivaceus</i> fed the oxidized oil.	13
Fig. 3. Monthly variations of body weight of <i>Paralichthys olivaceus</i> fed the oxidized oil	14
Fig. 4. Change of the liver cell size of the fish fed experimental diets for 12 weeks in <i>Paralichthys olivaceus</i>	21
Fig. 5. Change of the goblet cells (number of goblet cells per a mucosal fold) in intestine of the fish fed experimental diets for 12 weeks in <i>Paralichthys olivaceus</i>	22
Fig. 6. Microphotographs of liver tissue for H·E stain in <i>Paralichthys olivaceus</i>	23
Fig. 7. Microphotographs of anterior intestine for H·E stain in <i>Paralichthys olivaceus</i>	24
Fig. 8. Microphotographs of spleen tissue for H·E stain in <i>Paralichthys olivaceus</i>	27

List of Tables

Table 1. Proximate composition of the extrude pellet used in this study	6
Table 2. Composition of the each experimental diets for the test of the effects of Crude Extracts from Fermented Orange supplement to diet in <i>Paralichthys olivaceus</i>	6
Table 3. Monthly variation of total length (TL), body weight (BW) and survival rate of the fish fed experimental diets for 16weeks in <i>Paralichthys olivaceus</i>	15
Table 4. Comparison of growth, survival rate, total weight gain and feed coefficient in each experimental group for 16weeks in <i>Paralichthys olivaceus</i>	17
Table 5. Change of the liver cell size the fish fed experimental diets for 12 weeks in <i>Paralichthys olivaceus</i>	20
Table 6. Change of goblet cells (number of goblet cells per a mucosal fold) in <i>Paralichthys olivaceus</i>	20
Table 7. Relative comparison of ceroidosis in spleen of the fish fed experimental diets for 12 weeks among experimental group in <i>Paralichthys olivaceus</i>	26
Table 8. Comparison of serum constituents in each experimental group fed the experimental diets for 16weeks in <i>Paralichthys olivaceus</i>	30

Summary

The antioxidative effects for crude extracts from fermented orange against oxidized feed oil attachment diet were examined in term of growth and health and for microscopic observation and haematological analysis of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

Crude extracts from fermented orange were administrated with feed at the following concentrations; control, 0.10%, 0.05%, 0.01% and 0% of total feed.

The antioxidant activity of crude extracts from fermented orange was equivalent to about 88.5% of that vitamin E used by the superoxide radical scavenging activity method.

The growth of fish on group of supplementation crude extracts from fermented orange 0.01%, was markedly increased compared with the group fed on the oxidized pellet. In addition, mean weight of fish was highest in the recovery group ($P<0.05$).

Histologically, the widest liver cell size was observed in group without the supplemented crude extracts from fermented orange. On the other hand, liver cell size was lower in groups supplemented with crude extracts from fermented orange of 0.01%, 0.05%, respectively ($P<0.05$). In order to examine the digestive activity, we counted the number of goblet cells per mucosal fold in the intestine of digestive tract. The number of goblet cells were generally more in the mid intestine than in the anterior intestine. In control group and all groups which were supplemented with varying concentrations of crude extracts from fermented orange, goblet cells were markedly increased compared with the group which was fed oxidized pellet. Extensive ceroid accumulation was observed in the spleen of the olive flounder which was only fed oxidized pellet.

In haematological analysis, levels of GOT, GPT, glucose and total cholesterol were much lower in groups treated with crude extracts from fermented orange than in the control group.

These results suggest that the crude extracts from fermented orange contributed to the rapid and healthy growth of the olive flounder.

I. 서 론

해산어류의 양식은 1990년대 이후 양식 대상종의 다양화 및 사육 기술의 발달로 급속한 성장을 하고 있다. 특히 넙치, *Paralichthys olivaceus* 양식은 경제적인 측면에서 타 어종에 비하여 고소득 품종으로 각광받고 있어 생산량의 증가와 더불어 사료 소비량은 증가되고 있다. 국내 넙치양식의 경우 1986년부터 종묘생산 기술개발을 계기로 육상양식이 활성화되기 시작하여 최근에는 양식업체의 수가 급격히 증가하였고 시설 규모 또한 소규모에서 대규모로 전환되고 있는 실정이다. 그러나 사료의 수요증가에 따른 수급의 불균형에 기인하는 사료의 질적 저하 그리고 고밀도 사육에 의한 각종 질병이 발생하고 있다(오 등, 1998). 최근에는 양식어류의 생산성 향상, 질병예방 및 사료의 질적 향상을 위하여 천연물질의 이용에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 감귤 발효액(송, 2000), 알로에(김 등, 2000), 한방사료첨가제(Kim et al., 2000; 정 등, 1999), 파래의 효모발효물(조 등, 2000), 키토산(이 등, 2000), 식물성 생약제(김 등, 1999) 등의 연구들을 통해, 사료내 천연물질의 첨가에 따른 유의한 효과들이 보고되고 있다.

양식장에서는 양식어의 성장과 사료효율을 증가시키기 위하여 사료에 feed oil을 첨가하여 사용하고 있다(이, 1993a). 이러한 feed oil 내에는 특히 n-3 고도불포화지방산의 함량이 높아 혈전, 동맥경화, 염증반응, 면역기능 및 노화 등에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있지만 그 구조적 특성으로 인하여 산화속도가 대단히 빠르며 이때 생성되는 과산화지질들은 생체 내에서 유독한 작용을 한다(Silas et al., 1981; Blazer et al., 1983; Moccia et al., 1984; Cho et al., 1988; Takeshi et al., 1988; Byun et al., 1994). 경우에 따라서는 체내의 축적된 지질 산화물이 단백질과 결합하여 용해되지 않는 ceroid가 형성되어 장, 간, 비장, 신장 등에 축적되게 되며 어류의 생리적 장애와 면역기관의 손상으로 면역 능력이 저하되어 여러 질병 발생의 원인이 되기도 한다(Jang et al., 1992; Chun, 1992; 이, 1993b).

현재까지 양어용 사료 혹은 feed oil의 산화에 의한 양식어의 각종 질병에 관한 연구는 잉어, *Cyprinus carpio*, (Yoshiro et al., 1966; Min and Chun, 1990), 방어,

Serola quinqueradiata, (Hiromi et al., 1969; Takeshi et al., 1988; Tomohiro et al., 1991; Tomoyoshi et al., 1991), 무지개송어, *Salmo gairdneri*, (Silas et al., 1981; Moccia et al., 1984), 참돔, *Pagrus major*, (Hiromi et al., 1979a), 넙치, *P. olivaceus*, (이, 1993a), 틸라피아, *Oreochromis niloticus*, (Jo and Chun, 1990)등에서 이루어져 왔다. 그리고 이를 예방 및 치료하기 위한 각종 항산화제의 첨가 효과 및 개발에 관한 연구도 활발히 진행되고 있는데 이 중 vitamin C (Jo and Chun, 1990; 이, 1993c), vitamin E (Yoshiro et al., 1966; Hiromi et al., 1969; Silas et al., 1981; Moccia et al., 1984; Tomohiro et al., 1991; Jo and Chun, 1990; 이, 1993c), glutathione (Takeshi et al., 1988; Min and Chun, 1990; Lee et al., 1991), glycyrrhizin (Tomoyoshi et al., 1991; Jang et al., 1992) 등을 사료에 첨가하여 공급하였을 때 그 효과가 입증된 바 있다.

어류의 소화관은 타 척추동물과 마찬가지로 섭식을 통한 체성장과 발달에 필요한 영양분의 소화·흡수라는 측면에서 아주 중요한 기능을 담당하고 있다(이와 진, 1995; 진 등 1998). 특히 소화관 내의 배상세포(goblet cell)는 점액질을 분비하여 소화관의 점막표면에 대한 윤활제로서 물리적 작용 외에 각종 화학물질, 병 독소로 인한 자극, 기계적인 자극 및 각종 유해효소의 침해로부터 소화관 점막을 보호하는 역할을 하지만(Byeon and Jo, 1985), 경우에 따라서는 각종 질병시에 생산되는 독성물질에 민감하게 반응하여 정상과는 상이한 성상을 보임으로써 장관내의 병리적 상태를 추측할 수 있다(Jo et al., 1996). 또한 자극물질의 종류에 따라 점액분비가 증감되고 점액물질의 조직화학적 성상에 변화가 일어난다(Jo and Kim, 1987). 그러나 산화물질이 장에 미치는 조직학적 변화에 관한 연구는 매우 드문 실정이다.

제주에서 생산되는 감귤은 구연산, 플라보노이드, 리모노이드류, 카로티노이드, 비타민 C 등의 각종 기능성 물질을 함유하고 있다(최, 1999). 감귤 발효액(Fermented Orange)을 넙치에 공급하였을 때 넙치의 간과 장의 기능 향상 및 성장에 효과가 있었으며(송, 2000) 또한 Moon et al.(2000)은 감귤 발효액을 원료로 항산화 활성에 관하여 보고하였다.

이 연구에서는 감귤 발효액을 원료로 한 감귤발효 추출액(Crude extracts from Fermented Orange)의 항산화 효과를 알아보기 위하여 산화된 사료와 함께 감귤발효 추출액을 일정기간 동안 넙치에게 공급하였을 때 어체의 성장과 건강에 미치는 영향을 조사하여 기능성 사료 첨가제로서 감귤발효 추출액의 이용가능성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 감귤발효 추출액의 제조 및 항산화활성의 측정

1) 감귤발효 추출액의 제조

감귤발효액을 0.2 μm filter로 여과하여 고형물질과 액상으로 분리한 다음 고형물질을 아세톤, 메틸알콜, 물(7 : 2 : 1) 혼합액으로 추출하고 감압 농축한 후 이 추출액에 에틸아세테이트(1:3)를 첨가하여 잘 혼합한 후 에틸아세테이트 층을 얻었다. 에틸아세테이트를 상온에서 건조시킨 후, 알콜에 용해되는 것만을 원심분리(10,000 rpm, 15 min)하여 사용하였다.

2) 항산화 활성의 측정

감귤발효 추출액의 항산화 활성 측정은 Superoxide radical 소거활성법(김과 유, 1996)을 이용하였고, 시료는 감귤발효 추출액(Crude Extracts from Fermented Orange), Naringenine, Vitamin E, BHA (tert-butylhydroxyanisole)을 사용하였다. 우선, spectrophotometer cell (3 ml)에 xanthine 용액 0.2 ml, buffer 1 ml, NBT 0.2 ml 및 시료를 각각 0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 1.0 mg/ml씩을 넣은 후 xanthine oxidase 20 μl 를 넣어 혼합하였다. 다음 spectrophotometer로 530 nm에서 시간에 따른 광흡수도 변화를 측정하여 이를 시료를 첨가하지 않은 대조구와 비교하였다.

3) 사료의 제조 및 공급

실험에 사용한 사료는 고압팽창사료(extruded pellet, EP)로서 사료 성분표는 Table 1에 나타내었으며, 산화사료의 제조는 다음과 같은 방법으로 제조하였다.

먼저 신선한 어유(feed oil)를 상온에서 약 7일간 교반하면서 공기 중에 방치하여 산화를 유도한 후 사료에 흡착시켰으며, 이때 산화시킨 어유의 최종 과산화물가는 224.0 meq/kg 이었다. 어유의 과산화물가 측정은 金田 等(1988)의 과산화지질 실험법

에 준하였다. 우선, 환저플라스크에 시료 5 ml와 클로로포름 10 ml와 아세트산 15 ml를 넣은 다음 즉시 포화요오드칼륨 1 ml를 다시 넣고 마개를 잘 막은 후 1분간 골고루 흔들어 주었다. 이것들을 5분간 어두운 곳에서 방치한 후 증류수 75 ml를 첨가시켜 1% 전분용액 1 ml를 넣으면 어두운 보라색으로 변색되는데 이 때 N/100-티오황산나트륨 표준용액으로 적정하여 보라색에서 밝은 백색이 될 때를 종점으로 하였다.

$$\text{과산화물가} = (A \times F / B) \times 10$$

A : N/100 티오황산나트륨 표준액 소비량 (ml)

F : N/100 티오황산나트륨 역가

B : 추출된 시료의 무게량 (g)



실험군은 총 6개로 대조군은 정상 feed oil (POV = 16.9 meq/kg)만을 사료량의 5% 첨가하였다. 감귤발효 추출액의 항산화 효과 및 적정 첨가량을 조사하기 위한 실험군 1, 2, 3, 4는 산화시킨 feed oil (POV = 224.0 meq/kg)을 사료량의 5% 첨가한 사료를 기본으로 하여 감귤발효 추출액을 각각 사료량의 0.01%, 0.05%, 0.1% 그리고 0% 순으로 첨가하였다. 또한 산화 사료만을 섭취한 실험군 4의 실험어에 대한 감귤발효 추출액의 효과를 살펴보기 위하여 실험군 5는 실험개시 약 8주 후부터는 정상 feed oil을 첨가한 사료에 0.05%의 감귤발효 추출액을 첨가하여 공급하였다(Table 2). 사료는 1일 2~3회 충분히 섭취할 때까지 공급하였다.

2. 실험어 및 사육환경

이 실험에 이용한 넙치는 전장 10 cm 내외의 인공종묘로서 제주대학교 해양연구소에서 2001년 6월 12일부터 10월 12일까지 16주 동안 사육하였다. 실험 시작시 넙치의 평균 전장은 10.09 ± 0.23 cm, 평균체중은 8.85 ± 0.71 g이었다.

사육수조는 원뿔형 중앙배수 장치를 한 FRP 원형수조(지름 150 cm×100 cm) 12개를 사용하여 각 수조에 30미씩 2반복으로 사육하였다. 사육수량은 1일 20~24회 환수시켰으며, 충분한 산소공급을 위하여 통기하였다.

실험기간 중의 수온, 용존산소, pH 및 염분을 매일 측정하였으며, DO는 DO meter (DO-14P), pH는 pH meter (HM-12P) 그리고 염분은 광학염분계(S/Mill-E, ATAGO)를 사용하여 측정하였다.



Table 1. Proximate composition of the extrude pellet used in this study

(unit : percent)

Components	Extruded pellet
Crude protein	53.0
Crude fat	5.0
Crude fiber	4.0
Ash	17.0
Ca	1.0
P	2.7

Table 2. Composition of the each experimental diet for the test of the effects of Crude extracts from Fermented Orange supplement to diet in *Paralichthys olivaceus*

Experimental group	Sources	Concentration of additive C. E.*(ml/100g diet)
Control	Basal diet plus Fresh oil**	0
1	Basal diet plus oxidized oil***	0.01
2	"	0.05
3	"	0.1
4	"	0
5	Basal diet plus Fresh oil	0.05

*Crude extracts from Fermented Orange

**Peroxidation Value (POV) : 16.9 meq/kg

***Peroxidation Value (POV) : 224.0 meq/kg

Concentration of additive Feed oil: 5 ml/100 g diet

3. 성장

실험어의 측정은 4주마다 모든 개체에 대해 전장과 체중을 측정하였으며, 측정 전날 및 당일은 절식시켰다. 전장은 자체 제작한 측정판으로 0.1 cm까지 측정하였고 체중은 전자저울(Sartorius, BP 3100S)로 0.01 g까지 측정하였다. 측정이 끝난 후에는 모든 수조내의 실험어를 HCl-Oxytetracycline 20 ppm으로 약 1시간 동안 약욕하였다.

사육기간 중 사망한 개체는 매일 수시로 제거하였으며, 어체 측정 후 생존 개체에 대해서는 백분율로 생존율을 표시하였다. 총 증중량(Total weight gain) 및 사료계수(Feed coefficient)는 다음의 식으로 계산하여 각 실험군간의 값을 비교하였다.

$$\text{Total weight gain (TWG)} = \text{IW} - \text{FW}$$
$$\text{Feed coefficient (FC)} = \text{TF}/\text{WG}$$

IW: Initial weight

FW: Final weight

TF: Total feed

WG: Weight gain

4. 조직학적 관찰

산화시킨 feed oil을 흡착시킨 사료에 감귤발효 추출액 첨가에 따른 실험어의 간, 비장 및 소화관의 조직학적 관찰을 하기 위하여, 실험 시작시 및 4주, 8주 12후에 어체 측정 후 실험어의 간, 비장 및 장을 적출하여 Bouin's solution에 고정한 후 paraffin 절편법에 의해 5 μm 두께로 절편하였다.

간과 비장의 조직상 및 ceroid 발생여부를 관찰하기 위하여 H·E 비교 염색 및 PAS reaction을 실시하였다. 간세포 크기는 digital camera로 촬영 후 Image Scope 2.3 (Image Line. Inc)를 이용하여 측정하였으며, 비장 내에 출현하는 ceroid의 침착 정도를 관찰하였다. 장의 조직상 및 배상세포의 분포를 관찰하기 위하여 H·E 비교 염색 및 AB-PAS reaction을 실시한 후, 전장(anterior intestine)과 중장(mid intestine)의 점막주름에 나타나는 배상세포(goblet cell)의 분포 수를 광학현미경으로 검경하였다.



5. 혈액분석

혈액분석을 위해, 실험 종료시 각 수조별로 5마리씩 무작위 추출하여 실험어의 미부 동맥에서 1회용 주사기를 이용하여 채혈하였다. 채혈한 혈액은 상온에서 약 30분간 방치한 후, 3000rpm으로 약 15분간 혈장을 원심분리하였다. 분리된 혈장 내의 Total protein, GOT (glutamic oxaloacetic transaminase), GPT (glutamic pyruvatic transaminase)의 활성 및 Glucose, Total cholesterol을 Dry Chemistry Analyzer (DT-II System)로 분석하였다.

모든 자료의 통계 분석은 SAS 통계처리 소프트웨어를 이용하였으며, ANOVA-test를 실시한 후 Duncan's multiple range test로 평균간의 유의성을 검정하였다.



Ⅲ. 결 과

1. 감귤발효 추출액의 항산화 활성

감귤발효 추출액의 항산화 활성은 Fig.1과 같다. 이 추출물의 항산화 활성 정도를 naringenine, vitamin E, BHA와 비교하였다. 먼저 감귤발효 추출액의 항산화 활성은 각 농도별(0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 1.0 mg/ml)로 40%, 72%, 84%로 vitamin E의 48%, 76%, 96%에 비해 다소 낮은 경향을 나타냈지만, naringenine의 32%, 36%, 48%와 BHA의 16%, 16%, 20%를 비교했을 때 높은 항산화 활성을 보였다.

2. 사육환경



실험기간 중 사육수조내의 수온과 염분은 각각 18.0~28.9 °C(평균수온 23°C), 30.0~35.0 ‰였고, 사육수의 DO는 4.74~7.31 mg/l, pH는 7.91~8.28의 범위를 보였다.

3. 성장

실험어에 정상 어유를 첨가한 대조군과 산화된 어유를 기본으로 하여 각 농도별로 감귤발효 추출액을 첨가한 실험군에서의 성장을 조사한 결과는 Fig.2와 Fig.3과 같다.

실험 시작시 전장은 10.10 ± 0.23 cm이었으며, 실험 개시 12주까지는 실험군간에 유의한 차이를 볼 수 없었다. 그러나 실험 종료시 대조군에서 평균 전장은 20.65 ± 2.09 cm로 성장하였고, 실험군 1, 2, 3, 4 에서 각각 21.02 ± 2.43 cm, 20.67 ± 2.18 cm, 20.49

± 3.08 cm, 19.95 ± 2.13 cm로 성장하여 대조군과 감귤발효 추출액 0.01%, 0.05%, 0.10% 첨가한 실험군 1, 2, 3간에는 유의차가 없었으나 산화 사료만을 공급한 실험군 4와는 유의한 성장 차이가 인정되었다(Table 3, $P < 0.05$). 또한 산화 사료 공급 8주 후에 정상사료에 감귤발효 추출액 0.05%를 첨가한 실험군 5의 경우 전장은 21.77 ± 1.55 cm으로 대조군과 실험군 1, 2, 3과는 유의차는 없었으나, 실험군 4와 유의한 차이가 있었다(Table 3, $P < 0.05$).

실험 시작시 체중은 8.85 ± 0.71 g이었고, 실험 개시 4주 후에는 대조군의 경우 26.44 ± 5.35 g으로 감귤발효 추출액 0% 첨가군인 실험군 4의 23.89 ± 6.20 g과 유의한 성장차이를 나타내었다(Table 3, $P < 0.05$). 12주 후에는 대조군 및 감귤발효 추출액 0.01% 첨가한 실험군 1의 경우 72.12 ± 13.20 g, 71.65 ± 18.20 g을 나타내어 가장 높은 성장을 보였지만 실험 종료시에는 대조군의 평균 체중은 105.03 ± 24.40 g였고, 감귤발효 추출액 첨가군인 실험군 1, 2, 3에서는 각각 107.64 ± 29.66 g, 104.31 ± 28.70 g, 99.32 ± 42.60 g의 성장을 보였다. 또한 총 16주 동안 산화 사료만을 공급한 실험군 4는 93.11 ± 26.05 g으로 실험군 1, 2, 3과 대조군에 비해 유의한 차이를 보이며 가장 낮은 성장을 나타내었다(Table 3, $P < 0.05$). 산화된 사료를 공급한 실험군에 실험 개시 8주 후부터 feed oil을 흡착시킨 사료에 감귤발효 추출액 0.05%를 첨가하여 공급한 실험군 5의 경우, 체중이 119.74 ± 24.11 g으로 가장 양호한 성장을 보였다(Table 3, $P < 0.05$).

각 실험군의 생존율(survival rate)을 4주 간격으로 조사한 결과 최종 생존율은 대조군에서 92.5%이었고, 실험군 1, 2, 3, 4에서 각각 85.0%, 75.0%, 80.0%, 62.2%을 기록하여 산화 사료만을 공급한 실험군 4에서 매우 낮은 생존율을 기록하였으며 실험군 5의 경우는 91.6%로 양호한 생존율을 보였다(Table 4).

사료계수(Feed Coefficient)는 대조군에서 0.76이었고 실험군 1, 2, 3에서는 각각 0.73, 0.64, 0.68을 보여 실험군 4의 0.81에 비하여 비교적 낮은 값이었고, 실험군 5에서 0.52로 가장 낮은 값을 보여주었다(Table 4).

이상의 결과로부터, 생존율과 증중률에서 산화사료에 감귤발효 추출액 0.01%를 첨가하여 공급한 실험군 1에서 대조군과 비슷한 값을 보였으며 또한 산화 사료만을 8주간 공급한 후 정상사료에 감귤발효 추출액 0.05%를 첨가하여 공급한 실험군 5의 경우 산화 사료 공급군에 비해 양호한 값을 보이고 있음을 알 수 있었다.

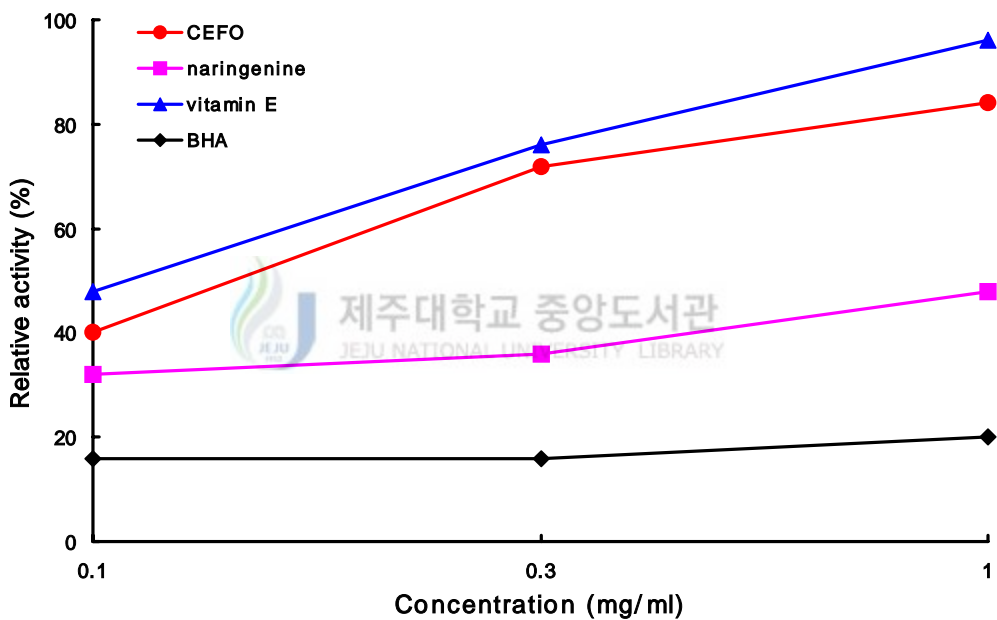


Fig. 1. Comparison of superoxide radical scavenging activities between crude extracts from orange and naringenine, vitamin E and BHA (tert-butylhydroxyanisole).

CEFO: crude extracts from fermented orange

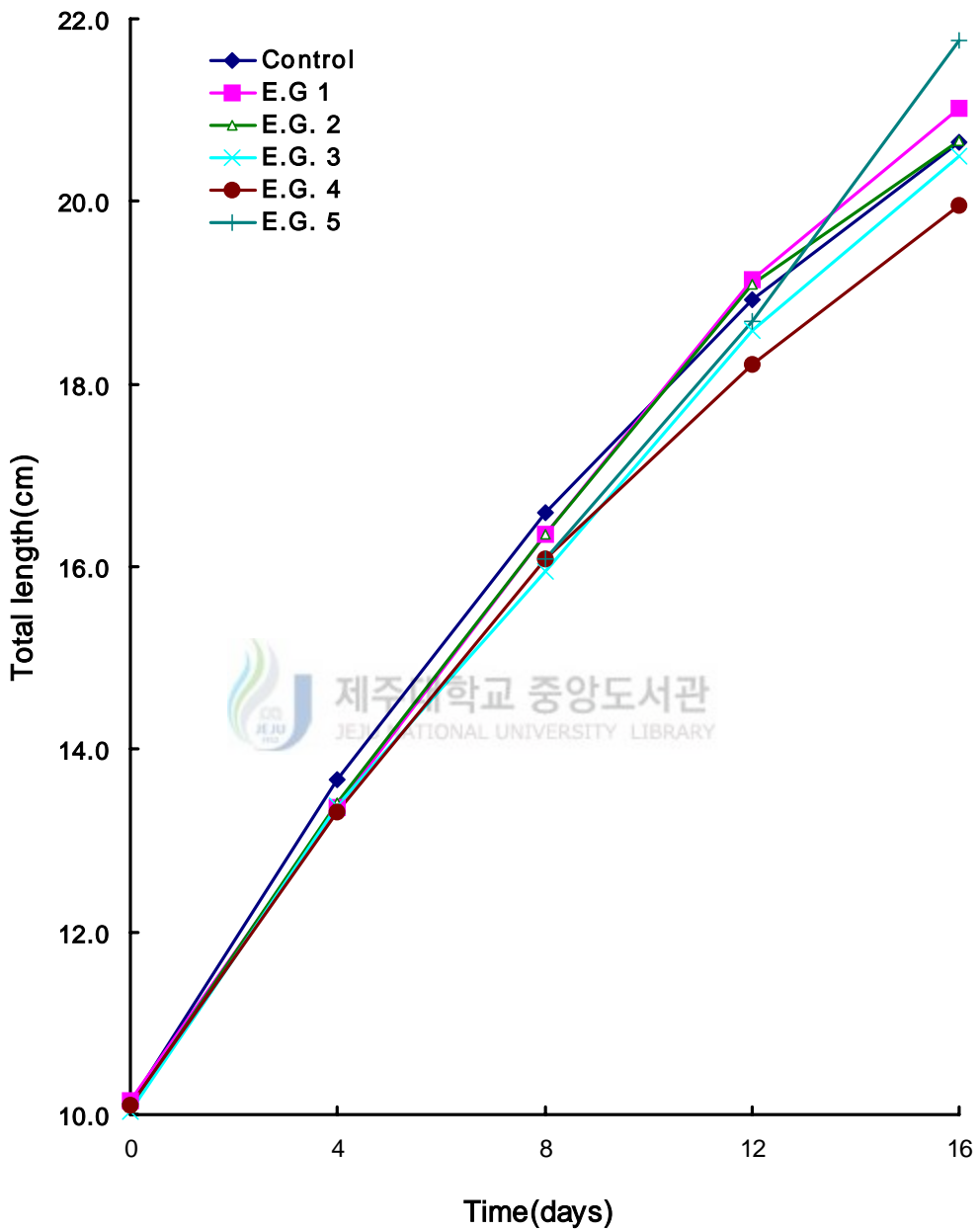


Fig. 2. The variations of body length of *Paralichthys olivaceus* fed the oxidized oil. Compositions of the diet in each experimental group is shown in the Table 2. E.G.: experiment group

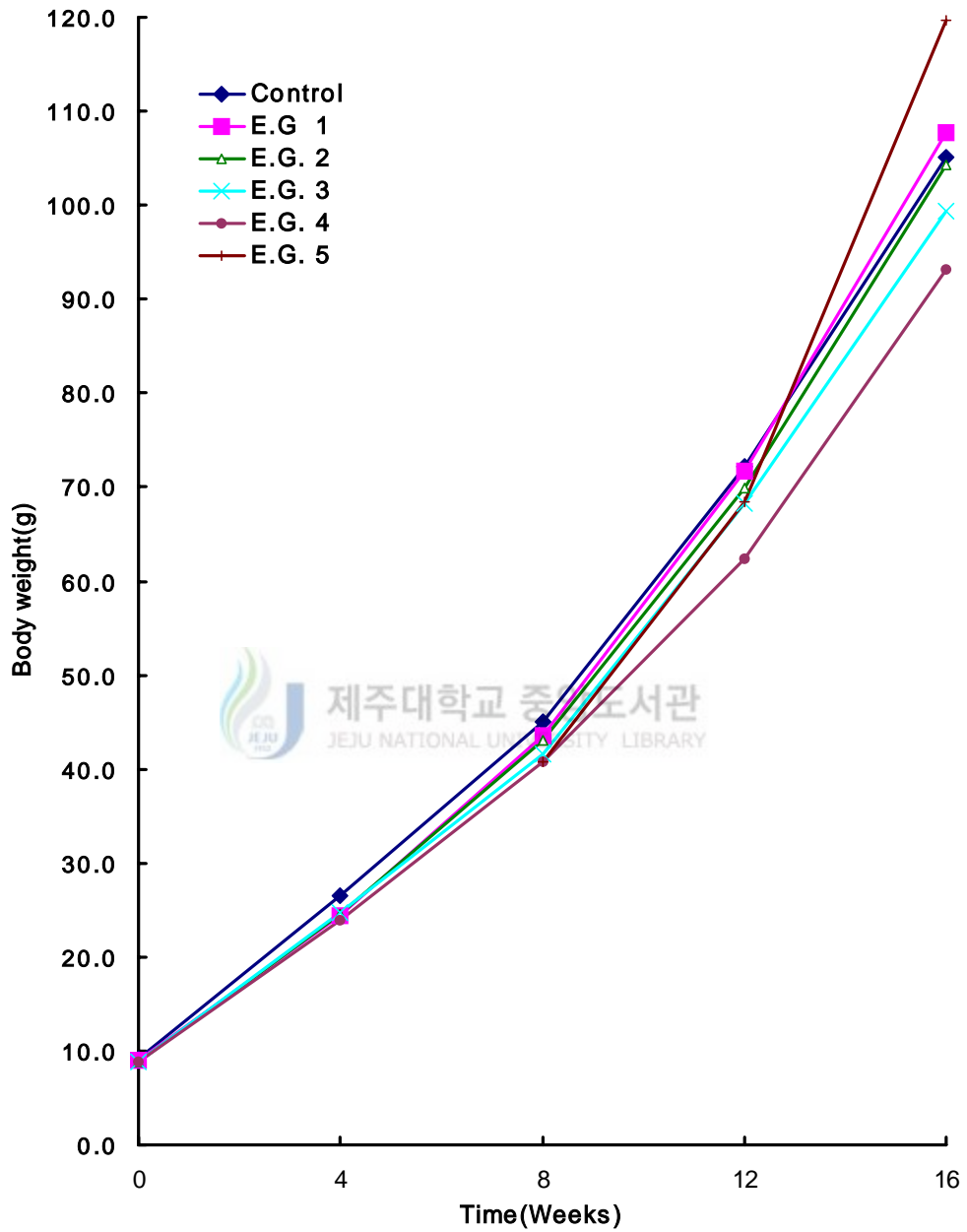


Fig. 3. The variations of body weight of *Paralichthys olivaceus* fed the oxidized oil. Compositions of the diet in each experimental group is shown in the Table 2. E.G.: experiment group

Table 3. Monthly variation of total length (TL), body weight (BW) and survival rate of the fish fed experimental diets for 16weeks in *Paralichthys olivaceus*

Feeding period: Jun. 12 through Jul. 9, 2001

Experimental group	Values on Jun. 12			Values on Jul. 9			Weight gain (g)	Survival rate (%)
	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	Number of fish	TL (cm)	BW (g)		
Control	60	10.13±0.61	9.15±1.58	60	13.66±0.94	26.44±5.35 ^a	17.29	100
OFAD + CEFO 0.01%	60	10.16±0.66	8.96±1.82	60	13.37±1.02	24.38±6.21 ^{ab}	15.16	100
OFAD + CEFO 0.05%	60	10.09±0.51	8.77±1.46	58	13.42±1.05	24.62±5.4 ^{ab}	15.85	96.7
OFAD + CEFO 0.1%	60	10.04±0.61	8.77±1.39	59	13.38±1.01	24.72±6.1 ^{ab}	15.95	98.3
OFAD	120	10.10±0.57	8.81±1.57	108	13.31±0.98	23.89±6.2 ^b	15.08	90

Feeding period: Jul. 9, through Agu. 13, 2001

Experimental group	Values on Jul. 9			Values on Aug. 13			Weight gain (g)	Survival rate (%)
	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	Number of fish	TL (cm)	BW (g)		
Control	50	13.66±0.94	26.44±5.35 ^a	50	16.59±1.24	45.10±9.66	18.66	100
OFAD + CEFO 0.01%	50	13.37±1.02	24.38±6.21 ^{ab}	48	16.35±1.44	43.48±11.70	19.10	96
OFAD + CEFO 0.05%	48	13.42±1.05	24.62±5.40 ^{ab}	45	16.36±1.48	43.04±11.60	18.42	93.8
OFAD + CEFO 0.1%	49	13.38±1.01	24.72±6.11 ^{ab}	44	15.95±1.88	41.62±13.70	16.90	89.8
OFAD	88	13.31±0.98	23.89±6.20 ^b	79	16.09±1.36	40.76±10.00	16.87	89.8

OFAD: Oxidized Feed oil Attachment Diet.

CEFO: Crude Extract from Fermented Orange.

Means with different superscripts show significant difference between experimental group (P<0.05).

Table 3. continued

Feeding period: Aug. 13, through Sep. 9, 2001

Experimental group	Values on Aug. 13			Values on Sep. 9			Weight gain (g)	Survival rate (%)
	Number	TL	BW	Number of	TL	BW		
	of fish	(cm)	(g)	fish	(cm)	(g)		
Control	45	16.59±1.24	45.10±9.66	44	18.93±1.6	72.12±13.20 ^a	27.02	97.8
OFAD + CEFO 0.01%	43	16.35±1.44	43.48±11.70	42	19.14±1.8	71.65±18.20 ^a	28.17	97.7
OFAD + CEFO 0.05%	40	16.36±1.48	43.04±11.60	38	19.09±1.7	69.97±16.50 ^{ab}	26.93	95
OFAD + CEFO 0.1%	21	15.95±1.88	41.62±13.70	19	18.58±2	68.25±18.50 ^{ab}	26.63	90.5
OFAD	40	16.09±1.36	40.76±10.00	35	18.21±1.6	62.36±16.10 ^b	21.60	87.5

Feeding period: Sep. 9, through Oct. 12, 2001

Experimental group	Values on Sep. 9			Values on Oct. 12			Weight gain (g)	Survival rate (%)
	Number	TL	BW	Number	TL	BW		
	of fish	(cm)	(g)	of fish	(cm)	(g)		
Control	39	18.93±1.6	72.12±13.20 ^a	37	20.65±2.09 ^{ab}	105.03±24.40 ^{abc}	32.91	94.9
OFAD + CEFO 0.01%	17	19.14±1.8	71.65±18.20 ^a	17	21.02±2.43 ^{ab}	107.64±29.66 ^{abc}	35.99	100
OFAD + CEFO 0.05%	33	19.09±1.7	69.97±16.50 ^{ab}	30	20.67±2.18 ^{ab}	104.31±28.70 ^{abc}	34.34	90.9
OFAD + CEFO 0.1%	12	18.58±2.0	68.25±18.50 ^{ab}	12	20.49±3.08 ^{ab}	99.32±42.60 ^{bc}	31.07	100
OFAD	30	18.21±1.6	62.36±16.10 ^b	28	19.95±2.13 ^c	93.11±26.05 ^c	30.75	93.3
Recovery	23	18.69±2.1	68.39±13.60 ^{ab}	21	21.77±1.55 ^a	119.74±24.11 ^a	51.35	95.7

Recovery: Basal diet + fresh feed oil + CEFO(0.05%).

Means with different superscripts show significant difference between experimental group (P<0.05).

Table 4. Comparison of growth, survival rate, total weight gain and feed coefficient in each experimental group for 16weeks in *Paralichthys olivaceus*

Feeding period: Jun. 12, through Oct. 12, 2001

experimental group	Initial(Jun. 12)		Final(Oct. 12)		Survival rate (%)	Total W. gain (g)	Feed Coefficient
	TL (cm)	BW (g)	TL (cm)	BW (g)			
Control	10.13±0.61	9.15±1.58	20.72±2.09 ^{ab}	105.03±24.40 ^{abc}	92.5	95.88	0.76
OFAD + CEFO 0.01%	10.16±0.66	8.96±1.82	20.91±2.40 ^{ab}	107.64±29.66 ^{abc}	85.0	98.68	0.73
OFAD + CEFO 0.05%	10.09±0.51	8.77±1.46	20.67±2.18 ^{ab}	104.31±28.70 ^{abc}	75.0	95.54	0.64
OFAD + CEFO 0.1%	10.04±0.61	8.77±1.39	20.88±1.87 ^{ab}	99.32±42.60 ^{bc}	80.0	90.55	0.68
OFAD	10.10±0.57	8.81±1.57	19.98±2.13 ^c	93.11±26.05 ^c	62.2	84.3	0.81
Recovery	16.09±1.36	40.76±10.00	21.66±1.55 ^a	119.74±24.11 ^a	91.6	78.98	0.52

OFAD: Oxidized Feed oil Attachment Diet.

CEFO: Crude Extract from Fermented Orange.

Recovery: Basal diet + fresh feed oil + CEFO(0.05%).

Means with different superscripts show significant difference between experimental group (P<0.05).

4. 조직학적 관찰

1) 간(Liver)

간 조직의 세포 활성 변화를 관찰하기 위하여 매 4주 간격으로 대조군 및 실험군의 간세포 면적을 측정된 결과는 다음과 같다.

실험 개시 4주까지의 간세포 크기의 변화는 대조군의 경우 $1.65 \pm 0.86 \mu\text{m}^2$ 를 나타내었고, 실험군 1, 2, 3 은 각각 $1.85 \pm 1.06 \mu\text{m}^2$, $2.15 \pm 0.85 \mu\text{m}^2$, $1.80 \pm 1.10 \mu\text{m}^2$ 였고 실험군 4는 $2.55 \pm 1.43 \mu\text{m}^2$ 를 나타내어 대조군 및 실험군 3과 실험군 4간의 유의한 차이가 인정되었다(Fig.4, Table 5, $P < 0.05$).

실험 개시 8주까지는 대조군은 $3.08 \pm 1.19 \mu\text{m}^2$ 로 실험군 4의 $3.74 \pm 1.18 \mu\text{m}^2$ 와 유의한 차이를 보였으며 실험군 1, 2, 3 에서는 각각 $3.15 \pm 1.43 \mu\text{m}^2$, $3.31 \pm 1.42 \mu\text{m}^2$, $2.79 \pm 1.44 \mu\text{m}^2$ 로 산화 사료만을 공급한 실험군 4와 유의한 차이를 보였다. 더욱이 감귤발효 추출액 0.1% 첨가군인 실험군 3의 경우 0.01% 및 0.05% 첨가한 실험군 1과 실험군 2에 비해 낮은 값을 보였다.

실험 개시 12주까지의 간세포의 크기 변화를 살펴보면 사료내에 감귤발효 추출액을 첨가하지 않은 대조군과 실험군 4의 경우만 각각 $3.15 \pm 1.67 \mu\text{m}^2$, $3.81 \pm 1.82 \mu\text{m}^2$ 를 나타내어 계속 증가하는 경향을 보인 반면 나머지 실험군 1, 2, 3의 경우는 각각 $2.55 \pm 1.29 \mu\text{m}^2$, $2.93 \pm 1.63 \mu\text{m}^2$, $2.95 \pm 1.61 \mu\text{m}^2$ 로 대조군과 실험군 4와 유의한 차이를 보이며 감소하고 있었다(Fig. 4, Table 5, $P < 0.05$). 특히 산화 사료 첨가군인 실험군 4의 간 조직상을 살펴보면 부분적인 간 실질세포의 비대(hypertropic) 및 공포화(vacuolation) 현상이 관찰되었다(Fig.6C). 또한 실험군 5의 경우 $2.93 \pm 1.47 \mu\text{m}^2$ 를 나타내어 대조군 및 실험군 4에 비하여 유의한 차이를 보이며 감소하고 있음을 알 수 있었다(Fig.4, Table 5, $P < 0.05$).

이상의 결과로부터, 간세포의 크기는 산화 사료만을 공급한 실험군에서 가장 컸으며 감귤발효 추출액 0.01% 첨가한 실험군에서 가장 낮은 값을 보여 간세포의 활성이 양호함을 알 수 있었다.

2) 장(Intestine)

소화기관의 조직학적 관찰은 전장(anterior intestine)과 중장(mid intestine)부분을 중심으로 점막 주름에 존재하는 배상세포(goblet cell)의 분포를 관찰하였다(Fig.5, Fig.7). 배상세포의 분포는 대조군을 포함한 모든 실험군에서 전장보다 중장으로 갈수록 많이 분포하는 경향을 보였다(Table 6).

전장의 경우, 배상세포의 출현수는 대조군에서 53.64 ± 17.3 개였고, 산화시킨 feed oil을 흡착시킨 사료에 감귤발효 추출액을 농도별로 첨가한 실험군 1, 2, 3에서 각각 47.0 ± 18.9 개, 57.4 ± 19.2 개, 50.6 ± 13.9 개로 산화 사료만을 공급한 실험군 4의 36.8 ± 12.1 개보다 많이 분포하였다. 또한 실험 개시 8주 후부터 정상사료에 감귤발효 추출액 0.05%를 첨가하여 공급한 실험군 5에서도 43.5 ± 15.1 개로 산화사료 첨가군보다 많이 분포하고 있었다(Fig.5, Table 6).

중장의 경우 전장과 마찬가지로 대조군에서 76.8 ± 17.8 개로 가장 많이 분포하였고 실험군 1, 2, 3에서 각각 68.8 ± 17.2 개, 62.6 ± 19.1 개, 71.7 ± 23.1 개로 비슷한 값을 보인 반면 산화 사료 첨가군인 실험군 4에서는 54.8 ± 17.5 개로 가장 낮은 값을 보였다. 또한 실험군 5에서는 65.8 ± 19.9 개로 산화 사료 첨가군보다는 증가하였다(Fig.5, Table 6).

이상의 결과로부터, 배상세포의 분포수는 대조군 및 감귤발효 추출액 첨가군이 산화사료 공급군에 비해 많은 것으로 나타나서 장 활성이 양호함을 알 수 있었다.

Table 5. Change of the liver cell size of the fish fed experimental diets for 12 weeks in *Paralichthys olivaceus*

(unit: μm^2)

Experimental group	Time (weeks)		
	4	8	12
Control	1.65±0.86 ^b	3.08±1.19 ^{bc}	3.15±1.67 ^b
OFAD + CEFO 0.01 %	1.85±1.06 ^{ab}	3.15±1.43 ^{bc}	2.55±1.29 ^c
OFAD + CEFO 0.05 %	2.15±0.85 ^{ab}	3.31±1.42 ^b	2.93±1.63 ^{bc}
OFAD + CEFO 0.10 %	1.80±1.10 ^b	2.79±1.44 ^c	2.95±1.61 ^{bc}
OFAD	2.55±1.43 ^a	3.74±1.18 ^a	3.81±1.82 ^a
Recovery	"	"	2.93±1.47 ^{bc}

OFAD: oxidized feed oil attachment diet.

CEFO: crude extracts from fermented orange.

Recovery: basal diet + fresh feed oil + CEFO(0.05%).

Means with different superscripts show significant difference between experimental group ($P < 0.05$).



Table 6. Change of the goblet cells (number of goblet cells per a mucosal fold) in intestine of the fish fed experimental diets for 12 weeks in *Paralichthys olivaceus*

Experimental group	A. intestine	M. intestine
Control	53.6±17.3	76.8±17.8
OFAD + CEFO 0.01 %	47.0±18.9	68.8±17.2
OFAD + CEFO 0.05 %	57.4±19.2	62.6±19.1
OFAD + CEFO 0.10 %	50.6±13.9	71.7±23.1
OFAD	36.8±12.1	54.8±17.5
Recovery	43.5±15.1	65.8±19.9

OFAD: oxidized feed oil attachment diet.

CEFO: crude extracts from fermented orange.

Recovery: basal diet + fresh feed oil + CEFO(0.05%).

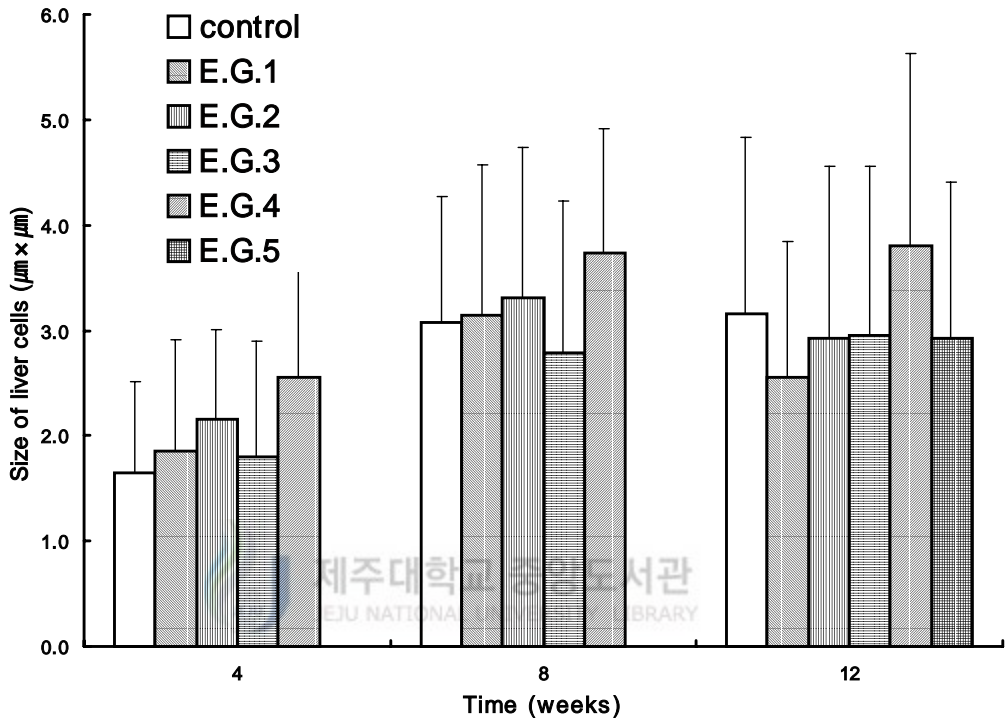


Fig. 4. Change of the liver cell size of the fish fed experimental diets for 12 weeks in *Paralichthys olivaceus*.

Compositions of the diet in each experimental group is shown in the Table 2.

E.G.: experiment group

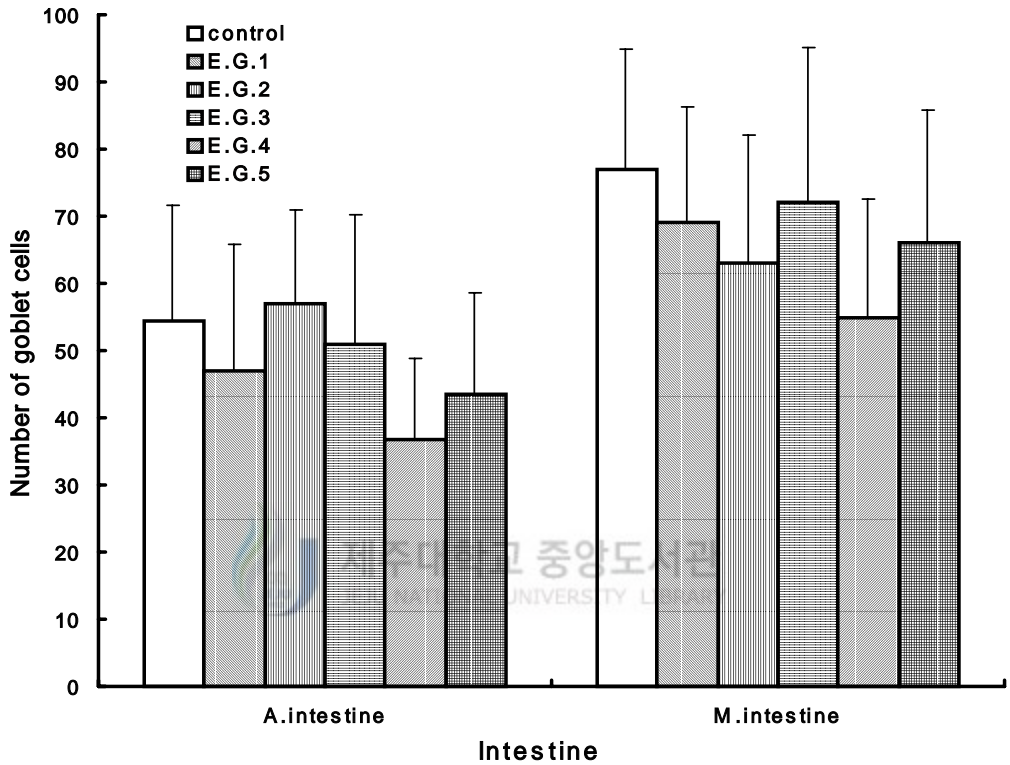


Fig. 5. Change of the goblet cells (number of goblet cells per a mucosal fold) in intestine of the fish fed experimental diets for 12 weeks in *Paralichthys olivaceus*.

Compositions of the diet in each experimental group is shown in the Table 2.

E.G.: experiment group

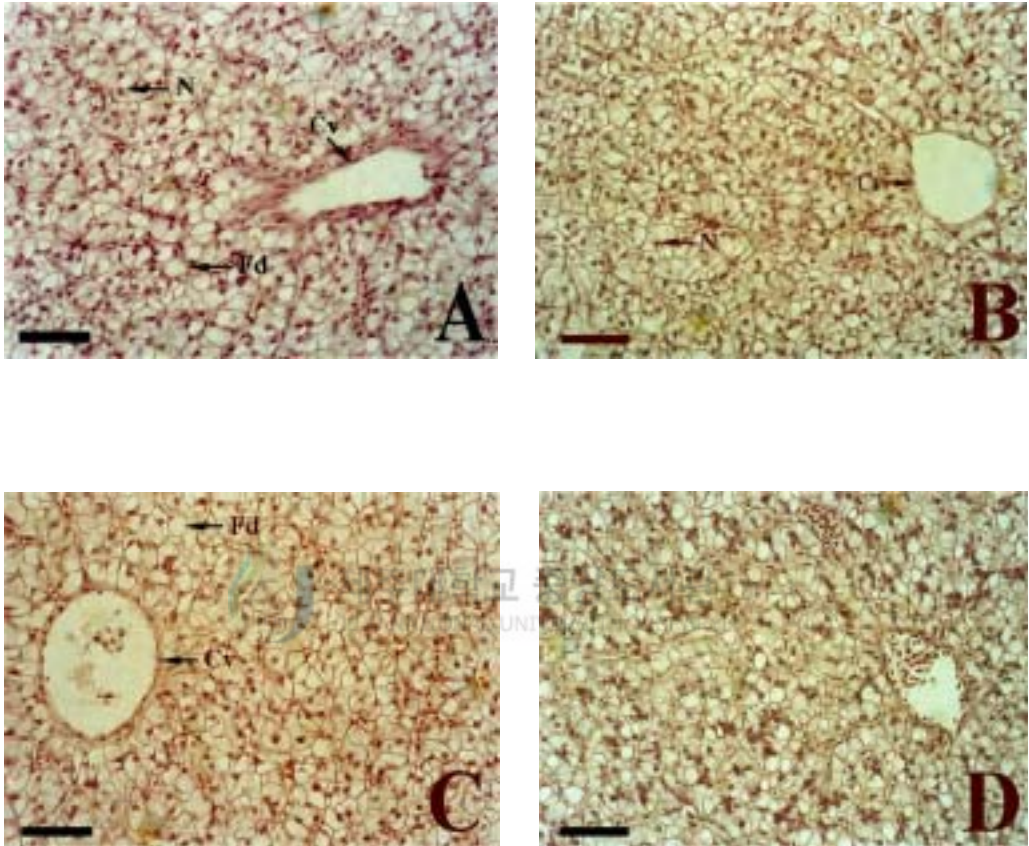


Fig. 6. Microphotographs of liver tissue for H-E stain in *Paralichthys olivaceus*.

(A) Control Group.

(B) Experiment group 2, fed additive CEFO(0.05%) in OFAD.

(C) Experiment group 4, fed OFAD.

(D) Experiment group 5, fed additive CEFO(0.05%) in FFAD.

Cv: central vein, **Fd:** fat drop, **N:** nucleus

CEFO: crude extracts from fermented orange.

OFAD: oxidized feed oil attachment diet.

FFAD: fresh feed oil attachment diet. Bar scale = 2.5 μm

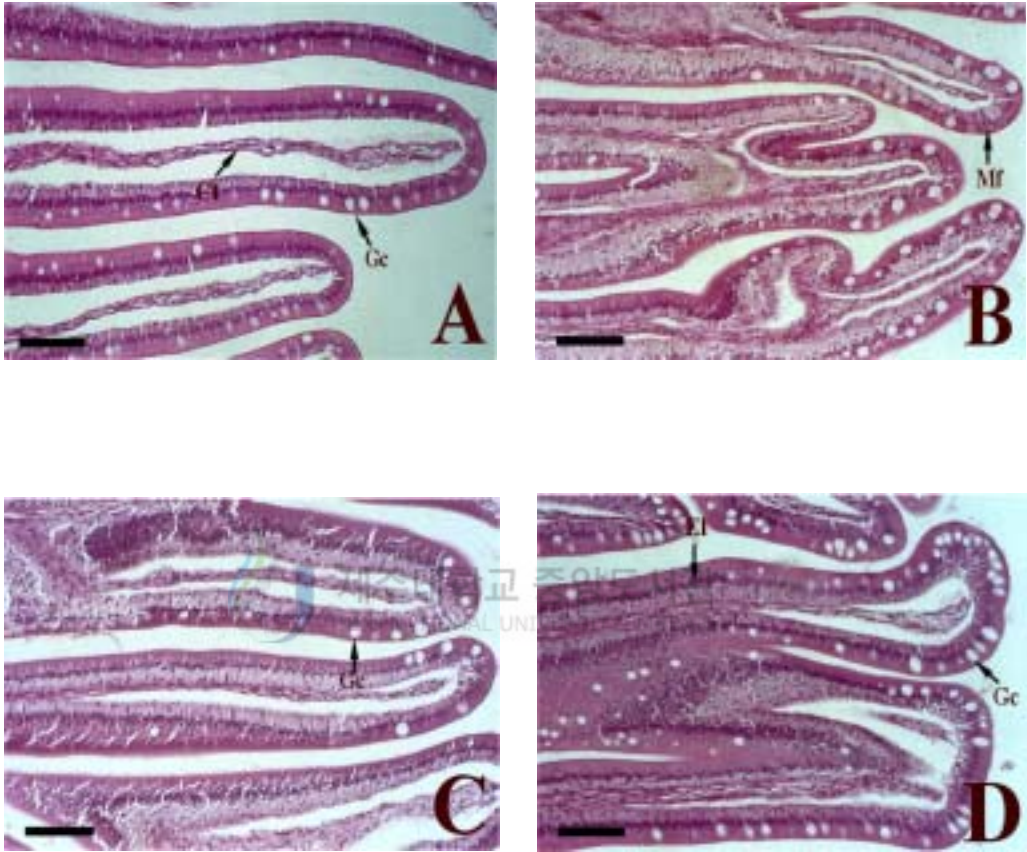


Fig. 7. Microphotographs of goblet cell and mucosal fold of anterior intestine for H-E stain in *Paralichthys olivaceus*.

(A) Control Group.

(B) Experiment group 2, fed additive CEFO(0.05%) in OFAD.

(C) Experiment group 4, fed OFAD.

(D) Experiment group 5, fed additive CEFO(0.05%) in FFAD.

Ct: connective tissue, Gc: goblet cell, Mf: mucosal fold, El: epithelial layer

Bar scale = 5 μ m

3) 비장(Spleen)

비장 조직내의 ceroid의 침착 정도를 조사하기 위하여 매 4주 간격으로 대조군 및 실험군의 비장 조직을 관찰하였다, 모든 실험군의 비장 조직에서 ceroid 침착을 관찰할 수 있었으며(Fig.9), ceroid의 침착정도를 실험군 별로 비교하여 Table 7에 나타내었다.

실험 개시 4주까지 ceroid의 침착 정도는 산화 사료에 감귤발효 추출액 0.1%을 첨가하여 공급한 실험군 3을 제외한 모든 실험군에서 비슷하게 나타났다(Table 7).

실험 개시 8까지는 대조군을 포함한 모든 실험군에서 ceroid의 침착 정도는 증가하고 있었으며 산화 산료 공급군인 실험군 5에서 가장 많이 관찰되었다.

실험 개시 12주까지 ceroid의 침착은 대조군 및 실험군 1, 3과 실험군5의 경우 8주째와 비슷한 정도를 나타내었으나, 실험군 3에서는 감소하는 경향을 보였다. 그러나 실험군 4의 경우, ceroid의 침착정도는 타 실험군과 비교했을 때 가장 많았다.

이상의 결과를 요약하면, 비장에서의 ceroid 침착 정도는 산화사료 만을 공급한 실험군에서 가장 많고 감귤 발효 추출액 0.05% 첨가한 실험군에서 가장 적었다, 또한 회복 실험군의 경우 산화사료 공급군에 비해 ceroid의 침착이 감소하고 있어서 이는 감귤발효 추출액이 ceroid의 침착을 억제시키고 있음을 보여주는 결과라 하겠다.

Table 7. Relative comparison of ceroidosis in spleen of the fish fed experimental diets for 12 weeks among experimental group in *Paralichthys olivaceus*

Experimental group	Time (weeks)		
	4	8	12
Control	++	+++	+++
OFAD + CEFO 0.01 %	++	+++	+++
OFAD + CEFO 0.05 %	++	+++	++
OFAD + CEFO 0.10 %	+	+++	+++
OFAD	++	++++	+++++
Recovery			++++

OFAD: oxidized feed oil attachment diet.

CEFO: crude extracts from fermented orange.

Recovery: basal diet + fresh feed oil + CEFO(0.05%).

+: very slight ++: slight +++: moderate ++++: extensive +++++: very extensive



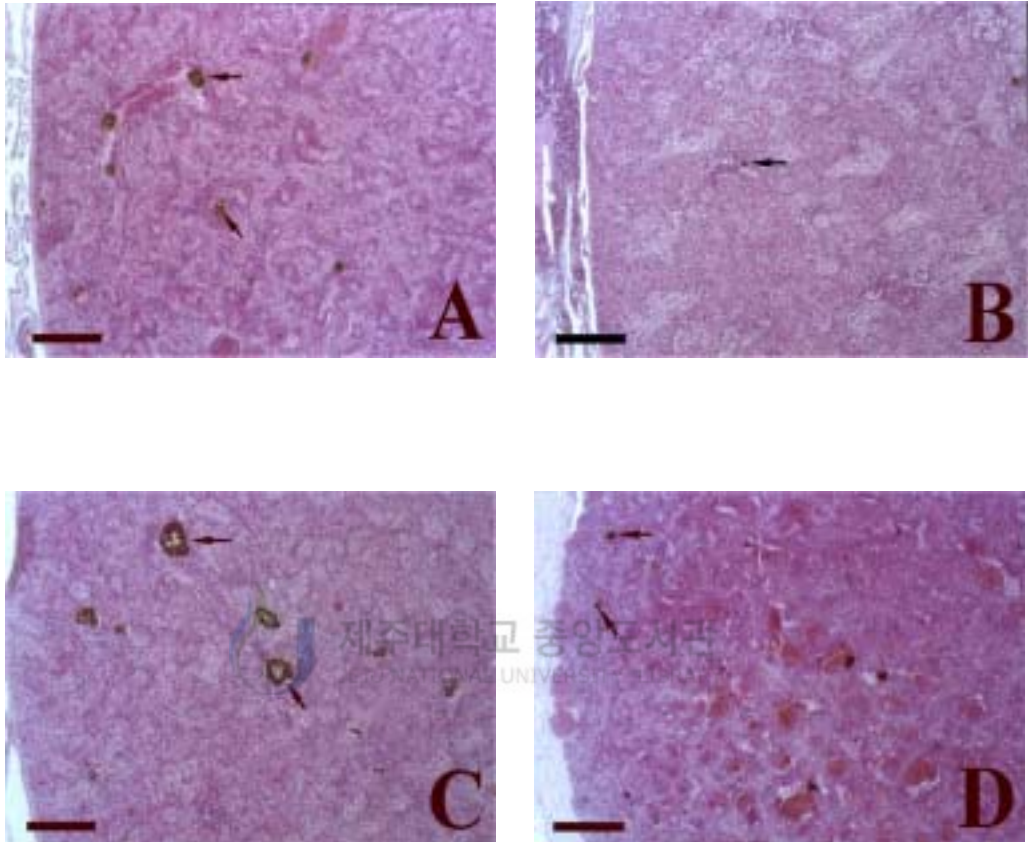


Fig. 9. Microphotographs of spleen tissue for H·E stain in *Paralichthys olivaceus*.

(A) Control Group.

(B) Experiment group 2, fed additive CEFO(0.05%) in OFAD.

(C) Experiment group 4, fed OFAD.

(D) Experiment group 5, fed additive CEFO(0.05%) in FFAD.

CEFO: crude extracts from fermented orange.

OFAD: oxidized feed oil attachment diet.

FFAD: fresh feed oil attachment diet.

*** Arrow shows Ceroidosis.**

Bar scale = 10 μ m

5. 혈액분석

실험어의 혈액분석 분석 결과는 Table 8과 같다. Total protein의 경우 대조군에서 4.0 ± 0.50 g/dl을 나타내었고, 산화시킨 feed oil을 흡착시킨 사료에 감귤발효 추출액을 농도별로 첨가한 실험군 1, 2, 3에서 각각 3.8 ± 0.16 g/dl, 3.6 ± 0.37 g/dl, 4.9 ± 0.39 g/dl을 나타내었다. 특히 산화 사료만을 공급한 실험군 5에서는 4.1 ± 0.50 g/dl을 나타내어 감귤발효 추출액 0.1% 첨가한 실험군 3과 유의한 차이를 보였으며 실험 개시 8주 후부터 정상사료에 감귤발효 추출액 0.05%를 첨가하여 공급한 실험군 5의 경우 4.6 ± 0.39 g/dl을 나타내어 실험군 1, 2, 4 및 대조군과 유의한 차이가 인정되었다 ($P < 0.05$).

GOT의 경우 대조군 및 감귤발효 추출액 0.05% 첨가한 실험군 2에서 34.8 ± 10.53 IU/l, 34.5 ± 9.47 IU/l를 보여, 감귤발효 추출액 0.1% 및 0.01% 첨가한 실험군 1, 3과 첨가하지 않은 실험군 4의 51.8 ± 13.05 IU/l, 60.0 ± 4.76 IU/l 그리고 69.4 ± 15.52 IU/l와 유의한 차이를 보였다($P < 0.05$). 실험군 5의 경우 GOT는 44.0 ± 8.19 IU/l로 감귤발효 추출액 무첨가군인 실험군 4에 비하여 유의한 차이를 보였다($P < 0.05$).

GPT의 경우 대조군에서 4.4 ± 1.67 IU/l이었고, 실험군 1, 2, 3, 4에서 각각 6.4 ± 1.52 IU/l, 3.6 ± 2.51 IU/l, 5.8 ± 1.50 IU/l, 5.8 ± 0.96 IU/l을 나타내어 실험군 2에서 유의성이 인정되는 낮은 값을 보였다($P < 0.05$). 또한 실험군 5의 경우 4.8 ± 1.92 IU/l로 감귤발효 추출액을 첨가하지 않은 실험군 4에 비해 낮은 값을 보였지만 유의차는 인정되지 않았다($P < 0.05$).

Glucose는 대조군의 경우 43.8 ± 11.61 mg/dl이었고, 실험군 1, 2, 3, 4 및 실험군 5에서 각각 90.3 ± 31.98 mg/dl, 66.8 ± 20.35 mg/dl, 92.8 ± 42.70 mg/dl, 147.6 ± 67.00 mg/dl 및 92.8 ± 31.81 mg/dl를 나타내어 산화 사료만을 공급한 실험군 4에서 유의하게 높은 값을 보였다($P < 0.05$).

Total cholesterol은 대조군의 경우 189.8 ± 61.17 mg/dl을 보였고, 실험군 1, 2, 3, 4에서 각각 182.2 ± 27.94 mg/dl, 152.4 ± 29.20 mg/dl, 230.2 ± 32.53 mg/dl, 235.6 ± 30.05 mg/dl을 나타내어 실험군 1, 2와 실험군 4간에 유의한 차이가 인정되었다.

또한 실험군 5의 경우 204.4 ± 24.60 mg/dℓ으로 산화 사료만을 공급한 실험군 4보다는 낮은 수치를 보였지만 유의차는 인정되지 않았다($P < 0.05$).

이상의 결과로부터, 감귤발효 추출액 0.05%를 첨가하여 공급한 실험군에서 GOT, GPT, Glucose 그리고 Total cholesterol 항목에서 대조군과 큰 차이를 보이지 않았지만, 산화 사료만을 공급한 실험군에 비해 유의한 차이를 보이고 있어서 감귤발효 추출액이 넙치의 건강과 성장에 양호한 작용을 하고 있음을 알 수 있었다($P < 0.05$).



Table 8. Comparison of serum constituents in each experimental group fed the experimental diets for 16weeks in *Paralichthys olivaceus*

Experimental group	Total protein(g/dl)	GOT(IU/L)	GPT(IU/L)	Glucose(mg/dl)	Total cholesterol(mg/dl)
Control	4.0±0.50 ^c	34.8±10.53 ^d	4.4±1.67 ^{abc}	43.8±1.67 ^b	189.8±61.17 ^{abc}
OFAD + CEFO 0.01%	3.8±0.10 ^c	51.8±13.05 ^{bc}	6.4±1.52 ^{ab}	90.3±31.98 ^b	182.2±27.94 ^{bc}
OFAD + CEFO 0.05%	3.6±0.37 ^c	34.5±9.47 ^d	3.6±2.51 ^{bc}	66.8±20.35 ^b	152.4±29.20 ^c
OFAD + CEFO 0.1%	4.9±0.39 ^a	60.0±4.76 ^{ab}	5.8±1.50 ^{ab}	92.8±1.50 ^b	230.2±32.53 ^{ab}
OFAD	4.1±0.50 ^{bc}	69.4±15.52 ^a	5.8±0.96 ^a	147.6±67.00 ^a	235.6±30.05 ^a
Recovery	4.6±0.46 ^{ab}	44.0±8.19 ^{cd}	4.8±1.92 ^{abc}	92.8±31.81 ^b	204.4±24.60 ^{ab}

GOT: glutamic oxaloacetic transaminase

GPT: glutamic pyruvic transaminase

OFAD: Oxidized Feed oil Attachment Diet.

CEFO: Crude Extract from Fermented Orange.

Recovery: Basal diet + fresh feed oil + CEFO(0.05%).

Means with different superscripts show significant difference between experimental group (P<0.05).

IV. 고찰

양식 어류 중 특히 넙치 사육에서 공급되는 사료는 생산원가를 상승시키는 주된 요인으로 작용할 뿐만 아니라 사료의 질에 따라 다양한 영양성질병 발생으로 양식어가에 많은 애로를 안겨주고 있다(이 등, 2000). 또한 사료의 장기간 보관 및 보관상의 잘못으로 인한 부패 혹은 산화된 사료의 장기간 급이로 인한 어체의 성장저하(Hiromi et al., 1979; Silas et al., 1981; Tomohiro et al., 1991; Tomoyoshi et al., 1991), 체장조직의 변성, 빈혈, 간장 장애(Yoshiro et al., 1966), 근육의 변성(Hiromi et al., 1979b), 각종 장기 조직내의 ceroid 침착(Blazer et al., 1983; Moccia et al., 1984)등의 증상이 있다.

최근에는 질병예방 및 사료의 질적 향상을 피하기 위하여 시판되는 사료 내에 tert-butylhydroxytoluene (BHT), tert-butylhydroxyanisol (BHA)와 같은 합성 항산화제나 glutathione, vitamin E와 같은 일부 천연 항산화제를 첨가하기도 한다(Chun, 1992). 그러나 이들 항산화제는 독성, 저활성 및 용도의 한계성 등의 여러 가지 문제로 인하여 사용에 제한을 받고 있어 안전하면서도 강한 항산화 활성 물질을 천연물 또는 미생물 대사산물로부터 탐색하는 연구가 활발히 수행되고 있다(김과 유, 1996). 또한 양어사료에 식물자원의 유용 물질을 첨가하여 사료의 질적 향상을 피하고자 하는 연구도 이루어져 왔다(Kim et al., 2000). 송(2000)에 의하면 넙치에 감귤발효액(Fermented Orange)을 사료량의 0.1~0.2% 첨가하였을 때 약 16주 후에는 무첨가군에 비해 유의한 성장 차이를 보였고 혈액 성상에 있어서도 GOT, GPT 및 Total cholesterol이 현저히 저하되었다.

이번 실험에서 감귤발효액(Fermented Orange)을 원료로 하여 이 중 항산화 활성물질만을 추출하여 탐색한 결과, vitamin E의 약 90%정도로 비교적 높은 활성을 보이는 것으로 나타났다(Fig.1).

전장의 경우 대조군을 포함한 모든 실험군에서 실험 12주 쯤까지는 대조군 및 감귤발효 추출액 0.01%, 0.05% 첨가한 실험군 1, 2에서 양호한 성장을 보였으며, 실험 개시 8주 후부터 산화 사료에 대한 감귤발효 추출액의 효과를 살펴보기 위하여 정상

feed oil을 흡착시킨 사료에 감귤발효 추출액을 사료량의 0.05% 첨가한 실험군 5의 경우는 산화 사료만을 공급한 실험군 4에 비하여 높은 성장을 보였다. 실험 종료시에는 실험군 5에서 21.77 ± 1.55 cm로 가장 높은 성장을 보였으며, 실험군 4의 19.95 ± 2.13 cm과 유의한 성장 차이를 보였다(Table 3, $P < 0.05$). 체중의 경우 전장과 마찬가지로 실험군 5에서 119.74 ± 24.11 g으로 가장 높은 성장을 보였으며, 감귤발효 추출액 무첨가군인 실험군 4의 93.11 ± 26.05 g에 비해 유의한 성장 차이가 인정되고 있었다(Table 3, $P < 0.05$). 이는 감초로부터 추출한 glycyrrhizin을 산화된 사료에 첨가하여 공급하였을 때 실험어의 성장이 약 7주 후에 산화사료만을 공급한 실험어에 비해 양호한 성장을 보였다는 Jang et al.(1992)의 연구 결과와 유사한 결과라고 사료된다.

최종 생존율의 경우 대조군과 비교하여 감귤발효 추출액 첨가군인 실험군 1, 2, 3에서 낮은 생존율을 보였으며 산화 사료 첨가군인 실험군 4에서 가장 낮은 생존율을 나타내어 이의 결과가 산화시킨 feed oil의 첨가에 의한 것인지에 대해서는 앞으로 자세한 연구가 필요하다고 본다.

간세포의 크기는 실험 개시 8주까지는 모든 실험군에서 전반적으로 증가하였지만, 감귤발효 추출액 첨가군(실험군 1, 2, 3)의 경우 실험 12주 쯤부터 감소하는 현상을 보였으며 이 중 감귤발효 추출액 0.01% 첨가군에서 $2.55 \pm 1.29 \mu\text{m}^2$ 로 가장 낮은 값을 보였으며 실험군 5의 경우 산화 사료만을 공급한 실험군 4에 비하여 간세포의 크기가 현저히 감소하고 있었다(Table 5, $P < 0.05$). 간세포의 크기는 어류의 건강상태를 파악할 수 있는 중요한 인자로서 작용하는데 이러한 간세포의 확장은 난소의 성숙, estrogen의 공급, 간 중양, glycogen축적, 지방의 침착 등 다양한 원인에 의해 일어난다(Mikio, 1976). 이번 실험 결과 감귤발효 추출액 첨가군의 간조직의 경우 실질세포의 대부분이 PAS 양성 반응을 보인 반면 사료 첨가군의 경우 PAS염색에 음성적인 반응을 보여 이는 glycogen이 아닌 지방인 것으로 사료되며 간세포의 비대(hypertropic)는 이러한 지방의 침착에 의한 것으로 생각된다. Hiromi and Akira (1979c)에 의하면 과산화물가가 1550 meq/kg 인 산화유를 참돔에 공급한 결과 약 72 시간 후에는 정상 feed oil을 섭취한 실험어에 비해 간세포내의 glycogen양이 현저히 감소되었지만 이와는 반대로 지방의 침착은 증가한다고 보고한 바 있다.

사료내 독성물질이 소화관에 미치는 영향에 관한 연구는 주로 흰쥐와 같은 포유류를 대상으로 유기인제제 농약, 제초제의 일종인 gramoxone, ricine을 투여하였을 때

장 상피의 배상세포 출현수 및 활성 변화에 미치는 영향에 관한 연구(Byeon et al., 1985; Jo et al., 1994; Lee, 1979; Jo and Kim, 1987; Jo et al., 1996)등이 보고된 바 있다. 이번 실험결과 배상세포의 출현수는 전장 및 중장에서 대조군과 감귤발효 추출액 공급군인 실험군 1, 2, 3에서 산화 사료만을 공급한 실험군 4에 비해 많이 분포하고 있었다(Fig.5, tabl 6). 또한 실험군 5의 경우 감귤발효 추출액 0.05%를 약 8주간 공급한 결과 산화 사료 공급군인 실험군 4와 비교하였을 때 배상세포의 출현수가 증가하여 이러한 결과는 감귤발효 추출액의 첨가에 의한 것으로 사료된다.

어류의 육질 혹은 feed oil 내의 지질성분은 산화되기 쉬운 고도 불포화지방산을 다량 포함하고 있으며, 산화된 지질은 과산화물을 형성하게 되며 이러한 지질 산화물이 각 장기에 축적되면 체내의 단백질과 결합하여 불용성의 ceroid가 형성된다(Chun, 1992). 또한 vitamin E와 같은 항산화제가 결핍된 사료를 공급한 경우에도 간과 비장 조직에 ceroid가 침착된다(Moccia et al., 1984). 그러나 이러한 ceroid 자체는 해가 없는 색소이며, 경미한 침착은 크게 문제 삼을 필요는 없으나 실질조직의 많은 부분에 침착되면 장기의 기능에 손상을 입혀 어체 고유의 방어능력을 저하시키고 2차적인 각종 질병에 노출되기도 한다(이, 1993c). 이번 실험결과, 간에서는 ceroid 침착을 관찰할 수 없었지만 비장에서는 대조군을 포함한 모든 실험군에서 ceroid 침착을 관찰할 수 있었다(Fig.8). 그러나 그 침착 정도는 모든 실험군에서 실험 개시 8주 쯤까지는 증가하다가 실험 개시 12주 쯤부터는 실험군 1 및 산화 사료 첨가군인 실험군 4를 제외한 실험군 2, 3에서는 현저히 감소하는 경향을 보였다. 또한 실험군 5의 경우도 실험군 4에 비해 감소하는 경향을 보이고 있었다(Table 7). 이는 산화사료에 glutathione과 vitamin C, E를 첨가하였을 때 각 비장내에 침착되어 있던 ceroid가 분해되었다는 보고(Jo and Chun, 1990; Jang et al., 1992; 이, 1993b, c)와 같은 맥락으로 감귤발효 추출액이 어체의 장기내에 침착되어 있는 ceroid의 분해에 기여하고 있는 것으로 사료된다.

최근 어류 양식이 성행하면서 이들의 영양과 병리 상태를 파악하는데 어류의 혈액 성분의 농도나 효소활성을 조사하는 연구가 적극적으로 이루어지고 있다(Jeon et al., 1995b). 산화 지방에 의한 혈액 성상의 변동에 관해서는 GOT 및 GPT의 상승, 혈당치의 상승 등이 보고되고 있다(Hiromi et al., 1979b; Takeshi et al., 1988; Lee et al., 1991; Tomoyoshi et al., 1991; Min and Chun, 1990; Jang et al., 1992). 이번 실험에

서 넙치의 혈액분석 결과, Total protein의 경우는 대조군 및 실험군간에 큰 차이가 없었는데, 이는 Takeshi et al. (1988)의 방어 치어를 대상으로 산화된 사료를 공급한 결과 Total protein은 glutathione 첨가군과 비교했을 때 차이가 없었다는 보고와도 유사한 결과라 생각된다.

GOT와 GPT는 생체 내에서 중요한 당, 지질, 단백질 대사에 관여하는 효소로서 이들의 활성은 대체적으로 GOT가 GPT보다 높은 경향을 보인다(Jeon et al., 1995). 일반적으로 어체 상태가 좋지 않을수록 특히 간의 장애에 의해서 체내 GOT와 GPT는 증가하며(김 등, 2000), 이는 산화 지방을 섭취한 실험어의 간과 신장의 조직상에 차이가 있음을 의미한다(Hiromi et al., 1979b). GOT의 경우 대조군 및 감귤발효 추출액 0.05% 첨가한 실험군 2에서 각각 $34.8 \pm 10.53 \text{ IU}/\ell$, $34.5 \pm 9.47 \text{ IU}/\ell$ 로서 산화 사료만을 공급한 실험군 4의 $69.4 \pm 15.52 \text{ IU}/\ell$ 에 비해 유의한 차이를 보이며 낮은 값을 나타냈다(Table 8, $P < 0.05$). 특히 실험군 5의 GOT 또한 $44.0 \pm 8.19 \text{ IU}/\ell$ 로 실험군 3, 4에 비해 낮은 값을 나타냈다. GPT의 경우도 실험군 2에서 $3.6 \pm 2.51 \text{ IU}/\ell$ 로 가장 낮은 값을 보였고, 실험군 4에서 $5.8 \pm 0.96 \text{ IU}/\ell$ 로 비교적 높은 값을 보여 감귤발효 추출액 0.05% 첨가군의 경우 간 활성이 산화 사료 첨가군에 비해 양호한 것으로 나타났다.

Glucose의 경우 산화 사료만을 공급한 실험군 4에서 $147.6 \pm 67.00 \text{ mg}/\text{dl}$ 을 나타내어 대조군 및 타 실험군에 비해 큰 차이를 보이며 증가된 값을 보였다(Table 8, $P < 0.05$). 그러나 실험군 5의 경우 약 8주간의 회복 실험결과 산화 사료 투여군에 비해 $92.8 \pm 31.81 \text{ mg}/\text{dl}$ 로 낮은 값을 보였다. 또한 Total cholesterol은 감귤발효 추출액 0.01%, 0.05% 첨가군인 실험군 1, 2에서 각각 $182.2 \pm 27.94 \text{ mg}/\text{dl}$, $152.4 \pm 29.20 \text{ mg}/\text{dl}$ 로 산화 사료 투여군의 $235.6 \pm 30.05 \text{ mg}/\text{dl}$ 에 비해 유의하게 낮은 값을 보였으며 실험군 5의 경우 $204. \pm 24.60 \text{ mg}/\text{dl}$ 로 역시 낮은 값을 나타냈지만 유의차는 인정되지 않았다(Table 8, $P < 0.05$).

혈청 중의 cholesterol의 농도는 수온, 성별, 크기, 생식주기 등에 따라 변하며(Garcia et al., 1990) 또한 섭취한 사료 내의 지질 함량에 따라 변하기도 한다(Lie et al., 1988). 이번 실험에서 나타난 대조군 및 각 실험군 간의 농도 차이는 동일한 환경 내에서 사육하였기 때문에 이러한 차이는 사료중의 지질 함량에 기인한 것으로 생각되며, 더욱이 산화된 feed oil에 의한 것으로 여겨진다. 감귤발효액 첨가군들의

혈청 중의 GOT, GPT, glucose 및 Total cholesterol 농도가 산화 사료만을 공급한 실험어에 비해 낮게 나타나는 경향을 보였는데 이는 곧 감귤발효 추출액의 항산화 효과에 의한 생리 기능의 개선 효과라고 사료되며 실험 결과 성장에 양호하게 작용한 것으로 보인다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 감귤발효 추출액은 산화사료의 독성에 대하여 간기능 장애, 비장내의 ceroid 침착, 그리고 장 활성화에 대한 효과적인 역할을 수행하는 것으로 생각되며 사료의 질적 향상을 위한 기능성 첨가제로서의 이용가능성이 기대된다. 그러나 혈액 분석 결과 감귤발효 추출액 0.1% 첨가군의 경우 타 첨가군에 비해 GOT 및 Total cholesterol에서 다소 높은 수치를 보여 향후 이에 대한 정확한 원인을 밝혀내기 위해 혈청 생화학적 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.



V. 요약

감귤 발효액을 원료로 한 감귤발효 추출액(Crude extracts from Fermented Orange)의 항산화 효과를 알아보기 위하여 산화된 사료와 함께 감귤발효 추출액을 일정기간 동안 넙치에게 공급하였을 때 어체의 성장과 건강에 미치는 영향을 탐색하기 위하여 간과 장 그리고 비장의 조직학적 변화와 혈액성상을 조사하여 기능성 사료 첨가제로서 감귤발효 추출액의 이용가능성을 조사하였다.

실험어는 대조군 (POV = 16.9meq/kg)과 산패 Feed oil (POV = 224.0meq/kg) 흡착 사료에 감귤 발효 추출액을 각각 0%, 0.01%, 0.05%, 0.1% 첨가한 실험군을 2반복으로 하여 16주간 사육하였다.

감귤발효 추출액의 항산화 활성은 시료량이 각각 0.1mg/ml, 0.3mg/ml, 1.0mg/ml 일 때 vitamin E의 약 83.3%, 94.7%, 87.5%를 나타내었다.

16주간의 사육 실험결과 감귤발효 추출액을 첨가한 실험군(실험군 1, 5)에서 성장이 대조군에 비해 양호하였으며 산화 사료 투여군에서 가장 낮은 성장을 보였다($P < 0.05$). 생존율, 사료계수 그리고 증중률에서 실험군5에서 산화 사료 공급군에 비해 향상된 결과를 보였다.

간세포의 크기는 산화 사료만을 공급한 실험군에서 세포질의 공포화로 인하여 가장 컸고 감귤발효 추출액 0.01% 첨가한 실험군에서 가장 낮은 값을 보였다($P < 0.05$).

장내의 소화 활성도를 알아보기 위한 간접적인 지표로서 장내의 배상세포의 출현수를 개수하였다. 그 결과 모든 실험어에서 배상세포는 전장(anterior intestine)보다 중장(mid intestine)에서 그 출현수가 많았으며 대조군 및 감귤발효 추출액 첨가군에서 산화사료 공급군에 비해 많은 출현수를 보였다.

비장에서의 ceroid 침착 정도는 산화사료 만을 공급한 실험군에서 가장 많았으며 감귤 발효 추출액 0.05% 첨가한 실험군에서 대조군에 비해 적었다. 또한 약 8주간 산화사료만을 공급한 후 정상사료에 감귤발효 추출액 0.05%를 첨가하여 공급한 실험군 5의 경우 산화사료 공급군에 비해 ceroid의 침착이 감소하였다.

혈액 분석 결과 GOT, GPT, Gulcose 및 Total cholesterol에서 감귤발효 추출액 0.05% 첨가한 실험군에서 산화 사료 공급군에 비해 상대적으로 낮았다($P<0.05$). 또한 8주간 산화 사료만을 공급한 후에, 정상 사료에 감귤발효 추출액 0.05%를 첨가하여 공급한 실험군의 경우 GOT, Glucose에서 산화 사료 공급군에 비해 유의하게 낮았다($P<0.05$).

감귤발효 추출액은 산화사료의 독성에 따른 간기능 장애와 비장내의 ceroid 침착을 저감시키고 장 상피의 배상세포 수를 증가시켜, 넙치의 건강에 기여하는 기능성 첨가제로서 이용가치가 높다고 사려된다.



VI. 참고문헌

- Blazer, V. S. and R. E. Wolke. 1983. Ceroid deposition, retinal degeneration and renal calcium oxalate crystals in cultured clownfish, *Amphiprion ocellaris*. J. Fish Disease, 6, 365~376.
- Byun, D. S., M. N. Kwon, J. H. Hong and D. Y. Jeong, 1994. Effects of Flavonoids and α -Tocopherol on the Oxidation of n-3 Polyunsaturated fatty Acids. Bull. Korean Fish. Soc., 27(2), 166~172.
- Byeon, K. A. and U. B. Jo. 1985. Histochemical properties on mucosubstances of Intestine in *Sparus swinhonis*, *Erosa erosa* and *Sebastes inermis*. J. science, Pusan national University, Pusan Korea, 40, 251~269.
- Cho, S. Y., A. Miura, K. Fujimoto and M. Inai. 1988. Improvement in Oxidative Stability of Fish Meal by Addition of Glucose via Accelerated Maillard Reaction. Nippon Suisan Gakkaishi, 54(6), 1017~1022.
- Chun, S. K., 1992. Nutritional Disease induced by Oxidation of Lipids in the Fish Meal. J. Fish Pathol., 2(2): 109~114.
- Garcia, G. L., C. R. Munoz and A. V. de Andres. 1990. Serum cholesterol and triglycerides levels in *Scyliorhinus canicula* (L.) during sexual maturation. J. Fish Biol., 36, 499~509
- Hiroimi, S. and A. Hamaguchi, 1979. Physiological Studies on Cultured Red Sea Bream - I Saesonal Variaion of Chemical Constituents in Plasma, hepatopancreas and Other Viscera. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 45(4), 443~448.
- Hiroimi, S. and A. Hamaguchi, 1979. Physiological Studies on Cultured Red Sea Bream - II Effect of Oxidized Oil on the Chemical constituents in Plasma, Hepatopancreas and Muscle. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 45(4), 449~453.
- Hiroimi, S. and A. Hamaguchi, 1979. Physiological Studies on Cultured Red Sea

- Bream -III Digestibility and Changes of Chemical Constituents in Plasma and Hepatopancreas after Feeding of Oxidized Oil. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 45(4), 545~548.
- Hiroimi, S. and A. Hamaguchi, 1969. Influence of Oxidized Oil and Vitamin E on the Cultured of Yellowetail. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 35(12), 1207~1214.
- Jang, S. I., J. Y. Jo and J. S. Lee, 1992. Effects of Vitamins and Glycyrrhizin Added to Oxidized Diets on the Growth and on the Resistance to *Edwardsiella* Infection of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. J. Aquacult., 5(2): 143~155.
- Jeon, J. K., P. K. Kim, Y. J. Park and H. T. Huh. 1995. Study of Serum Constituents in Several Species of Cultured Fish. J. Korean Fish. Soc., 28(2), 123~130.
- Jo, M. K. and S. K. Chun, 1990. Ceroidosis of Tilapia, *Oreochromis niloticus*, due to the Oxidized Pellet and the Preventive Effect of Vitamin E and C Addition. J. Fish Pathol., 3(2): 69~79.
- Jo, U. B., B. T. Choi, J. Kang, G. J. Jo, J. H. Kim and H. Y. Jang, 1996. Mucosubstances Histochemistry on the Toxicity of Ricin in the Rat Duodenum. The Korean J. Anatomy, 29(3): 221~227.
- Jo, U. B., S. R. Kim and B. T. Choi. 1994. Alleviating effects of Vitamin C on the Gramoxone Toxicity in the Mucosubstances of Rat Duodenum. J. Korean Soc. Food Nutr. 23(3), 387~395.
- Jo, U. B. and B. S. Kim, 1987. Histochemical Study on the Effect of the Pyridine Herbicide, Gramoxone, on the Mucosubstances of the Goblet Cells in the Rat Small Intestine. The Korean J. Anatomy, 20(2): 299~317.
- Kim, J. H., Y. B. Moon, C. H. Jeong and D. S. Kim, 2000. Utilization of Dietary Herb Obosan. III Growth of Juvenile olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Aquacult., 13(3) : 231~238.

- Lee, C. H., D. S. Ha, S. K. Chun and D. L. Choi. 1991. Treatment of Ceroidosis for Cultured Flounder, *Paralichthys olivaceus* - Hematological characteristic of flounder with glutathione supplemented diets. J. Fish Pathology, 4(2), 59~70.
- Lee. M. K., 1979. Histochemical Studies on the Effect of Organophosphorus Pesticides on the Mucosubstances in the Duodenal Glands and Goblet Cells of the Duodenal Mucosa in the Rat. The Korean J. Anatomy, 12(2): 111~127.
- Lie, O., R. Waagboe and K. Sandnes. 1988. Growth and chemical composition of adult Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed dry and silage-based diets. Aquaculture, 69, 343~353.
- Moon, S. W., Y. D. Lee, J. B. Lee and Y. B. Go, 2000. Antioxidant Characteristics of EM-Fermented Orange as an Additive in Fish Feed. Bull. Mar. Res. Inst. Cheju Nat. Univ., 24: 49~54.
- Mikio, O. 1976. On the Enlarged Liver in "Cobalt" Variant of Rainbow Trout. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 42(8), 823~830.
- Min, E. S. and S. K. Chun. 1990. Effect of Glutathione on the Histological changes Caused by Oxidized Diets in the Carp, *Cyprinus carpio*. J. Fish pathology 3(2), 81~95.
- Moccia, R. D., S. S. Hung, S. J. Slinger and H. W. Ferguson. 1984. Effect of Oxodized fish oil, vitamin E and ethoxyquin on the histopathology and haematology of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Disease, 7,269~282.
- Silas S. O., C. Y. Hung and J. S. Slinger, 1981. Effect of Oxidized Fish Oil, DL- α -Tocopherol Acetate and Ethoxyquin Supplementation on the Vitamin E Nutrition of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Fed Practical Diets. J. Nutri., 111, 648~657.
- Takeshi, M., T. Akiyama, H. Ogata and T. Suzuki, 1988. Interaction of Dietary Oxidized Fish oil and Glutathione on Fingering Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Nippon suisan Gakkaishi, 54(1), 145~149.

- Tomohiro, S., H. Murata, T. Sakai, K. Yamaguchi, K. Yamashita, M. Ugawa, M. Kanai and M. Shimada, 1991. An Attempt to Control lipid Peroxidation in the Tissues of Yellowtails and to Enhance their Biological Ability by Feeding High α -Tocopherol Brown Meals. *Nippon suisan Gakkaishi*, 57(2), 287~292.
- Tomoyoshi, E., M. Hamaguchi and R. Kusuda. 1991. Suppressive Effect of Glycyrrhizin Against Streptococcal Infection Promoted by Feeding Oxidized Lipids to Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Suisanzoshoku*, 39(1), 21~27.
- Yoshiro, H., Okaichi, T. Watanabe, A. Furukawa and T. Umezu. 1966. Muscle Dystrophy of Carp due to Oxidized Oil and the Preventive Effect of Vitamin E. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 22(1), 64~69.
- 金全尙志・植田仲未. 1983. 過酸化脂質實驗法. pp 58~59.
- 김강웅, 구자완, 김기홍, 배승철, 2000. 사료내 알로에 첨가가 치어기 넙치의 성장과 면역반응에 미치는 영향. 춘계수산관련 공동학술대회, 302~303.
- 김이청, 이배익, 황미혜, 권문경, 박수일, 1999. 식물성 생약제 투여가 나일 틸라피아 (*Oreochromis niloticus*)의 성장과 생리 기능에 미치는 영향. 춘계수산관련 공동학술대회, 309~310.
- 김종평・유익동, 1996. 항산화제 탐색, In 「신물질 탐색」. 김창진, 이형규, 김영호, 김시관, 서영배, 이현선, 윤봉선(편저), 자유아카데미, 서울. pp. 325~349.
- 송영보, 2000. EM-fermented orange가 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 성장에 미치는 영향. 제주대학교 석사학위 논문, pp14~33.
- 오상필, 김대환, 이정재, 이창훈, 1998. 제주도 양식넙치의 세균성질병 발생상황(1991년~1997년). *한국어병학회지*, 11(1): 23~27.
- 이영돈, 송영보, 문순주, 박승림, 문영배, 2000. 키토산 올리고당을 투여한 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 성장 효과. 춘계수산관련 공동학술대회, 290~291.
- 이정식, 진 평, 1995. 망상어, *Ditrema temmincki* 소화관의 형태・조직화학적 특징, *한국어류학회지*. 7(2), 140~149.

- 이창훈, 1993a. 양식넙치의 Ceroid증 발생에 대하여. 한국어병학회지, 6(2), 142~161.
- 이창훈, 1993b. 양식넙치의 Ceroid증 치료효과에 대하여. 한국어병학회지, 6(2), 163~175.
- 이창훈, 1993c. 양식넙치의 Ceroid증 예방에 대하여. 한국어병학회지, 6(2), 177~189.
- 정관식, 주용석, 지승철, 강종순. 1999. 넙치용 습사료의 한약 당재 부산물 첨가 효과. 춘계수산관련 공동학술대회, 255~256.
- 조영철, 이영재, 김현주, 강동수, 배태진, 2000. 파래 및 효모발효물 첨가사료에 의한 조피볼락의 성장효과. 춘계수산관련 공동학술대회, 227~228.
- 진 평, 이정식, 신윤경, 김학균. 1998. 조피볼락, *Sebastes schlegeli*의 초기생활사 동안 생존율 향상을 위한 생물학적 연구 III. 성체 소화관의 미세구조. 한국어류학회지, 10(1), 115~127.
- 최영훈, 2001. 제주감귤 가공산업 전망 및 기능성 성분에 대해. 감귤 원예지, 3, 4호, 53~66.



감사의 글

이 논문이 완성되기까지 세심한 지도와 한결같은 마음으로 너무나도 부족한 저를 지도해 주신 고유봉 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 그리고 바쁘신 중에도 저의 논문을 정성껏 다듬어 주신 이준백 교수님을 비롯하여 윤정수 교수님, 방익찬 교수님, 최영찬 교수님과 윤석훈 교수님께도 감사의 마음을 전합니다. 항상 지도 교수님 이상으로 많은 질책과 조언을 아끼지 않으셨던 증식학과 이영돈 교수님께도 머리 숙여 감사 드립니다.

이 연구를 수행함에 있어 너무도 미숙했던 저에게 많은 조언을 아끼지 않으셨던 제주대학교 TIC 센터의 문상욱 선배님, 증식학과와 송영보 선배님과 나오수 선배님께도 감사의 마음을 전하며 혈액분석에 있어 많은 도움을 주신 한마음 병원 임상병리과의 김정훈 선생님께도 감사를 드립니다.

언제나 따뜻한 격려로 저에게 힘이 되어주신 최중헌 선배님께도 감사의 마음을 전하며 학기 내내 늘 옆에서 친형처럼 큰 힘이 되어준 이승중 선배님, 강경표 선배님, 윤충환 선배님, 고진필 선배님 그리고 생태학 실험실 학부생인 보경, 현민, 희진, 경실, 봉수, 준, 상현, 유진, 현지에게 고마움을 전합니다. 아울러 바쁜 시간을 쪼개어 실험기간 동안 많은 도움을 준 해양연구소 발생학 실험실의 치훈, 진완, 창범과 그 외 학부생들에게도 다시 한번 고마운 마음을 전합니다. 또한 지치고 힘들 때마다 늘 옆에서 용기를 준 정현, 영재, 창남, 희철, 성남 그리고 소진에게도 진심으로 고마움을 전합니다.

끝으로 오늘의 제가 있기까지 언제나 한결같은 사랑과 믿음으로 보살펴 주신 부모님과 늘 곁에서 성원을 아끼지 않으셨던 형님, 형수님 그리고 사랑하는 조카 소연, 병준, 유준에게 오늘의 이 작은 결실을 바칩니다.

이 연구는 제주대학교 해양연구소의 시설과 기자재를 이용하여 수행하였고, 연구수행에 큰 도움을 주신 해양연구소의 직원 여러분들께 진심으로 사의를 표합니다.