creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

碩士學位論文

양식장 부산물 유래 발효어분 및 키토산 코팅 습사료가 양식 해산어 사육에 미치는 영향

濟州大學校 大學院

海洋生物工學科

車 善 姬

2007年 2月

양식장 부산물 유래 발효어분 및 키토산 코팅 습사료가 양식 해산어 사육에 미치는 영향

指導敎授 全 裕 珍

車 善 姬

이 論文을 碩士學位 論文으로 提出함

2007年 2月

車善姬의 碩士學位 論文으로 認准함

審査委員長 송 춘 복 (인)
委 員 이 경 준 (인)
委 員 전 유 진 (인)

濟州大學校 大學院

2007年 2月

Effects of Fermented Fish Meal from By-products Derived in Fish Farms and Chitosan Coating Moist pellet on Culturing Fish

Seon-Heui Cha
(Supervised by Professor You-Jin Jeon)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement of the degree of
Master of Science

Department of Marine Biotechnology
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2007. 2

목 차

Abstract ····· v
List of Figures ····· vii
List of Tables ····· xii
서 론 ····· 1

제 1 장 양식장 부산물 유래 발효 어분을 첨가한 사료를 급이한 양식어의 성장 및 면역 반응에 대한 효과

Ⅰ. 재료 및 방법 ····· 9
1. 양식장 부산물 및 감귤박 수거 ····· 9
2. 일반성분 분석 ····· 9
3. 제주 양식넙치의 주요 어병 세균에 대한 사멸조건 실험 ····· 10
4. 양식장 부산물 유래 발효어분 제조용 발효기 및 발효제 ····· 11
5. 고속 발효건조기에서 양식장 부산물로부터 발효어분 제조를 위한 최적 조건 규명 ····· 11
6. 양식장 부산물 유래 발효어분의 기능적 극대화 ····· 13
가. 발효 어분의 추출물 제조 ····· 13
나. DPPH free radical 소거활성 ····· 13
다. Hydrogen peroxide 소거활성 ····· 13
라. Comet assay를 이용한 DNA damage 측정 ····· 14
7. 양식장 부산물 유래 어분의 대체원의 품질 안전성 ····· 14
8. 실험사료 ····· 17
가. 넙치 ····· 17
나. 돌돔 ····· 17
9. 실험어 및 사육관리 ····· 19
가. 넙치 ····· 19

나. 돌돔 ·····19
10. 혈액성분 분석 ·····20
11. 어류 식세포의 respiratory burst 활성 측정 ·····20
12. 혈청의 lysozyme활성 조사 ·····21
13. 통계처리 ·····21

Ⅱ. 결과 및 고찰

1. 양식장 부산물, 감귤박 수거 및 성분 분석 ·····22
2. 주요 어병세균 사멸조건 규명 ·····22
3. 고속 발효건조기에서 양식장부산물로부터 발효어분 제조를 위한 최적발효 조건 규명 및 제조된 어분의 일반성분 함량 ·····25
4. 양식장 부산물 유래 발효어분의 기능성 ·····22
가. DPPH free radical 소거활성 ·····35
나. Hydrogen peroxide 소거활성 ·····35
다. 감귤박 첨가한 발효 어분의 DNA damage 보호 효과 ·····37
5. 양식장 부산물 유래 어분의 대체원의 품질 안정성 ·····46
6. 대체 발효 어분의 양식 넙치에 대한 효과 ·····54
가. 성장률 ·····54
나. 혈액분석 ·····54
다. NBT reduction 활성 ·····61
라. 혈청의 lysozyme 활성 ·····64
7. 대체 발효 어분의 돌돔에 대한 효과 ·····68
가. 성장률 ·····68
나. 혈액분석 ·····71
다. NBT (nitroblue tetrazolium) reduction 활성 ·····76
라. 혈청의 lysozyme 활성 ·····78

제 2 장 키토산 코팅한 사료가 양식 어류의 산화 및 면역 반응에 미치는 효과

Ⅰ. 재료 및 방법 ·····81
1. 실험사료 ·····81
가. 넙치 ·····81
나. 돌돔 ·····81
2. 실험어 및 사육관리 ·····83
가. 넙치 ·····83
나. 돌돔 ·····83
3. 전어체 일반성분 분석 ·····85
4. 혈액성분 분석 ·····85
5. Head kidney의 분리 및 정제 ·····86
6. Respiratory burst activity 측정을 위한 Flow cytometry ·····86
7. NBT (nitroblue tetrazolium) reduction 활성 측정·····87
8. 혈청 및 점액의 lysozyme 활성 측정 ·····87
9. Myeloperoxidase (MPO) 활성 측정 ·····88
10. Comet assay를 이용한 DNA damage 측정 ·····88
11. 통계처리 ·····89

Ⅱ. 결과 및 고찰

1. 키토산 코팅한 사료의 양식 넙치에 대한 효과 ·····90
가. 성장률 ·····90
나. 전어체 일반성분 분석 결과 ·····93

다. 혈액성분 분석 결과 ·····93
라. NBT (nitroblue tetrazolium) reduction 활성 ·····99
마. Flow cytometry ·····101
바. Lysozyme 활성 ·····101
사. Myeloperoxidase (MPO) 활성 ·····107
아. DNA damage 보호효과 ·····107
2. 키토산 코팅한 사료의 돌돔에 대한 효과 ·····112
가. 성장률 ·····112
나. 혈액성분 분석 결과 ·····112
다. NBT (nitroblue tetrazolium) reduction 활성 ·····119
라. 혈청의 lysozyme 활성 ·····119

요 약 ·····122
참고문헌 ·····124
감사의 글

Abstract

In every year, about 15% of culturing fish has been killed in commercial-scale aquaculture farms. The dead fish ratio ranged from 20 to 30% in 2005 year, especially in this year (2006) dead fish ratio was around 34% in Jeju. This results in a big economical loss and induce a considerable damage to the environment because farmers burry the dead fish under ground near their farm illegally. We can regard the dead fish as a by-product, when we use the dead fish to prepare fish meal. In this study, we tried to find out optimal condition to produce fish meals from the dead fish in a fermenter in which by-products such as fish or vegetables are dried with a high speed and cultured parrot fish and Olive flounder fish with a mixture pellet and moist pellet (MP) including the fermented fish meal (FFM). Four experimental diets were formulated to provide 50% protein and 11% dietary lipid (dry matter basis) with the FFM protein source replacing fish meal at 0, 10, 20 and 30% FFM (named 0FFM, 10FFM, 20FFM and 30FFM, respectively) for parrot fish dietary protein, and two experimental diets for Olive flounder, one a raw fish MP diet and another a mixture MP diet containing 7% FFM in commercial-scale aquaculture. The fish feeds including FFM enhanced the growth rate of both Olive flounder and parrot fish. In the growth experiment of parrot fish, the highest weight gaining (WG), specific growth rate (SGR) and feed intake (FI) were observed in the fish group fed with 10FFM, however, the more increased FFM contents rather led to decreasing in those growth factors. In the growth of Olive flounder, dietary supplementation of FFM and non-supplemented control diets showed almost same growth tendency. Analyses regarding physiological activities and immune responses were conducted in parrot fish and Oliver flounder fed with FFM. Fish fed

with FFM had higher lysozyme activity and NBT reduction. And, the resultant of this study, FFM showed remarkable protecting effects against H_2O_2-mediated DNA damage.

Most aquacultural farms have been using moist pellet (MP) feeds for growing cultured fish. However, the weak bind capacity and rapid collapse of formation in salt water of MP feed aggravate feed loss and thereby reduce water quality which lead pathogenic invasion. In order to avoid those problems, therefore, in the previous our study we have developed chitosan-based biopolymer coating material for environmental-friendly improvement of fish MP feeds in aquacultural farms. Growing fish fed with the chitosan-coated MP feeds improved water quality in aquacultural farm tanks. In the growth experiment of Oliver flounder fish, the chitosan-coated MP diet was observed no significant differences in final body weight and total mortality ratio. However, there was clear trend that the immune response of fish fed with chitosan-coated MP feeds positively increased. Citosan-coated MP diet significantly stimulated the myeloperoxidae (MPO) and skin mucus lysozyme activity ($p<0.05$), comparing to non-coated MP diets. On the other hand, there was no significant of NBT reduction ($p>0.05$). In addition, a strong protective effect of chitosan-coated MP diets was shown against H_2O_2-induced DNA damage in lymphocyte from fish. A similar trend was observed in the growth experiment of parrot fish. These results indicated that the chitosan-coated MP diets induced enhance of immune response and antioxidative ability as well as improvement of water quality in tanks of aquaculture farms.

List of Figures

Fig. 1-1. Biofeeder BF-30 model as a high speed fermenter to prepare fish meal from by-products in fish farms. The left is the outside and the right is the inside of the fermenter (left; outside. light; inside).

Fig. 1-2. The heat treatment against pathogen was monitored at 40, 50, 60, 70, 80 and 90° C for 10 h. MTT assay was used to assess the viability of the bacterial cells (*Streptococcus iniae* (A), *Streptococcus parauberis* (B), *Edwardsiella tarda* (C), *Flexibasler maritimus* (D), *Vibrio alginolyticus* (E) and *Vibrio anguillarum* (F)).

Fig. 1-3. The production rate of fish meals according to the added rice bran amount in the Biofeeder BF-30 fermentor.

Fig. 1-4. The production rate of fish meals according to the added citrus meal amount in the Biofeeder BF-30 fermentor.

Fig. 1-5. The production rate of fish meals according to the added zymogen amount in the Biofeeder BF-30 fermentor.

Fig. 1-6. DPPH free radical scavenging effects of aqueous and methanol extracts from the fermented fish meals. The left is the results by the both extracts from the fermented fish meal prepared with moist citrus meal, and the right is with dried citrus meal.

Fig. 1-7. Hydrogen peroxide (H_2O_2) scavenging effects of aqueous and methanol extracts from the fermented fish meals. The left is the results by the both extracts from the fermented fish meal prepared with moist citrus meal, and the right is with dried citrus meal.

Fig. 1-8. The effect of supplementation *in vitro* with different concentrations of FFM (fermented fish meal) prepared with citrus peel extracts on

DNA damage of H_2O_2-induced U937 cell. Values are means with standard error of duplicate experiments (bar represented % Fluorescence in tail and leaner represented Inhibitory effect of cell damage).

Fig. 1-9. The effect of supplementation *in vitro* with different concentrations of FFM (fermented fish meal) prepared without citrus peel extracts on DNA damage of H_2O_2-induced U937 cell. Values are means with standard errors of duplicate experiments (bar represented % Fluorescence in tail and leaner represented Inhibitory effect of cell damage).

Fig. 1-10. Comet images of U937 cells: (a) Negative control, (b) Positive control (50 uM H_2O_2), (c, f) Treated sample (10 μg/ml), (d, g) Treated sample (50 μg/ml), (e, h) Treated sample (100 μg/ml), (c, d, f) citrus peel, (f, g, h) no citrus peel.

Fig. 1-11. The effect of supplementation *in vitro* with different concentrations of FFM (fermented fish meal) prepared with citrus peel extracts on DNA damage of H_2O_2-induced flounder lymphocyte cell. Values are means with standard errors of duplicate experiments (bar represented % Fluorescence in tail and leaner represented inhibitory effect of cell damage).

Fig. 1-12 The effect of supplementation in vitro with different concentrations of FFM (fermented fish meal) prepared without citrus peel extracts on DNA damage of H_2O_2-induced flounder lymphocyte cell. Values are meals with standard errors of duplicate experiments (bar represented % Fluorescence in tail and leaner represented inhibitory effect of cell damage).

Fig. 1-13. Comet images of flounder lymphocyte: (a) Negative control, (b) Positi-ve control (50 μM H_2O_2), (c, f) Treated sample (10 μg/ml),

(d, g) Treated sample (50 μg/ml), (e, h) Treated sample (100 μg/ml), (c, d, f) citrus peel, (f, g, h) no citrus peel.

Fig. 1-14. PCR results of the isolated bacteria strains Lane 1, DNA marker(100 bp); lane 2, *S. parauberis* (718 bp) ; lane 3, *S. iniae* (870 bp) ; lane 4, *F. maritimus* (686 bp) ; lane 5, *E. tarda* (786 bp) ; lane 6, DNA marker (100 bp)

Fig. 1-15. PCR results for the identification of the respective infectious bacteria from the fermented fish meals. A-lane 1, size marker (100 bp); A-lane 2, sample 1; A-lane 3, sample 2; A-lane 4, sample 3; A-lane 5, sample 4; A-lane 6, *S. parauberis* (718 bp); A-lane 7, *S. iniae* (870 bp) [sample 1 and 2, *S. parauberis* infectious dead fishes; sample 3 and 4, *S. iniae* infectious dead fishes]; B-lane 1, size marker (100 bp); B-lane 2, sample 1; B-lane 3, sample 2; B-lane 4, sample 3; B-lane 5, sample 4; B-lane 6, *E. tarda* (686 bp) [sample 1,2,3 and 4, *E. tarda* infectious dead fishes], C-lane 1, size marker (100 bp); C-lane 2, sample 1; C-lane 3, sample 2; C-lane 4, sample 3; C-lane 5, sample 4; C-lane 6, *F. maritimus* (786 bp) [sample 1,2,3 and 4, *F. maritimus* infectious dead fishes]

Fig. 1-16. The bacteria growth characteristics of the fermented fish meal. The left photos are the original extract solution and the right 1000-fold dilution. The upper two petri dishes contained PCA meida and the down two ones MA.

Fig. 1-17. PCR result of the fermented fish meal from fish culturing by-products which were infected factitiously with the respective four fish disease bacteria to induce some stronger infections of the sample fishes. The bacteria were added with around 5×10^7 cfu/g dead fish. The lame 1 is DNA marker and the lane 2~4 means triplicate.

Fig. 1-18. Growth rate of Olive flounder fed by FFM and non-supplemented

control diet for 12 weeks (started with body weight: 140±10 g).

Fig. 1-19. Growth rate of Olive flounder fed by FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks (started with body weight: 230±15 g).

Fig. 1-20. Dead fish number of Olive flounder fed by FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks (started with body weight: 140±10 g).

Fig. 1-21. Dead fish number of Olive flounder fed by FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks (started with body weight: 230±15 g).

Fig. 1-22. Total mortality ratio (%, down) of Olive flounder fed by FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks (started with body weight: 140±10 g).

Fig. 1-23. Total mortality ratio (%, down) of Olive flounder fed by FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks (started with body weight: 230±15 g).

Fig. 1-24. Respiratory burst activity of neutrophils from Olive flounder that was fed by FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks.

Fig. 1-25. Serum lysozyme activity of Olive flounder that fed FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks.

Fig. 1-26. Growth rate of Olive flounder fed by FFM and non-supplemented control diet for 8 weeks (.—▲— 0FFM; non-supplementation, —●— 10FFM; 10% fermented fish meal included, —■— 20FFM; 20% fermented fish meal included, —▬— 30FFM; 30% fermented fish meal included).

Fig. 1-27. Respiratory burst activity of neutrophils from parrot fish that was fed by FFM and non-supplemented control diet for 8 weeks (.0FFM; non-supplementation, 10FFM; 10% fermented fish meal

included, 20FFM; 20% fermented fish meal included, 30FFM; 30% fermented fish meal included)

Fig. 1-28. Lysozyme activity of serum from parrot fish that was fed by FFM and non-supplemented control diet for 8 weeks.

Fig. 2-1. Coating MP (moist pellet) feeds with chitosan solution by sprayer adapted with three way spay module.

Fig. 2-2. Weight and growth ratio (%) of Olive flounder that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks and weighed every 2 weeks. Data represented as mean±S.D.

Fig. 2-3. Total mortality ratio (%, down) of Olive flounder that was fed with chitosan-coated and non-챔ted control diet for 12 weeks and weighed every 2 weeks.

Fig. 2-4. NBT reduction of Olive flounder that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks.

Fig. 2-5. Flowcytometry analysis for respiratory burst of olive flounder that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks (Left: control, 11.09% of M1 content; Right: chitosan-coated, 70.25% of M1 content).

Fig. 2-6. Lysozyme activity in serum of Olive flounder that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks.

Fig. 2-7. Total lysozyme activity in mucus of Olive flounder that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks.

Fig 2-8. Skin mucus protein contents of Olive flounder that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks.

Fig. 2-9. Myeloperoxidase (MPO) activity of Olive flounder that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks.

Fig 2-10. DNA damage of H_2O_2-induced Olive flounder lymphocyte.

Fig. 2-11. Comet imaging of Olive flounder lymphocyte (Upper layer:

lymphocytes of control group, down layer: lymphocytes of chitosan-coated group, A: Negative control (no-treated with H_2O_2), B: 500 uM H_2O_2-treated, C: 1000 uM H_2O_2-treated)

Fig. 2-12. Weight gain of parrot fish that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 8 weeks and weighed every 2 weeks.

Fig. 2-13. NBT reduction of parrot fish that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks.

Fig.. 2-14. Lysozyme activity in serum of parrot fish that was fed chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks.

JEJU NATIONAL UNIVERSITY · SINCE 1952 · 제주대

List of Tables

Table 1-1. Bacterial target species assayed and primer sequences used for m-PCR amplification and the amplicon sizes

Table 1-2. Formulation of experimental diets for Parrot fish (% dry matter)

Table 1-3. Approximate chemical compositions of dead flounder fish and citrus meal

Table 1-4. Approximate chemical compositions of fermented fish meals from dead flounder fishes as a function of the added rice bran amount.

Table 1-5. Approximate chemical compositions of fermented fish meals from dead flounder fishes as a function of the added citrus meal amount.

Table 1-6. Approximate chemical compositions of fermented fish meals from dead flounder fishes as a function of the increased zymogen amount.

Table 1-7. Biochemical characteristics of the isolated bacteria strains

Table 1-8. The number of colony from the fermented fish meals

Table 1-9. Growth parameter of parrot fish

Table 1-10. The physiological and chemical analysis in blood for 4 weeks of parrot fish.

Table 1-11. The physiological and chemical analysis in blood for 8 weeks of parrot fish.

Table 2-1. Formulation of experimental diets for Parrot fish culturing (% dry matter)

Table 2-2. Water environment, Olive flounder that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks

Table 2-3. Proximate chemical composition of Olive flounder that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks (%)

Table 2-4. Serum analysis of Olive flounder that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks
Table 2-5. Growth parameter of parrot fish
Table 2-6. The physiological and chemical analysis in blood for 4 weeks of parrot fish.
Table 2-7. The physiological and chemical analysis in blood for 8 weeks of parrot fish.

JEJU NATIONAL UNIVERSITY · SINCE 1952 · 제주대

Ⅰ. 서 론

이미 2000년에 60억을 넘어선 세계 인구는 2050년에 90억 이상으로 증가할 것으로 예측되고 있으며, 이에 따른 세계의 식량난이 21세기에 불어 닥칠 것으로 예상 되고 있다 (Brown, 1997). 인류의 가장 중요한 단백질 식량자원은 농·축산업과 수산업 분야에서 생산되어 왔으나, 현재 농·축산업에 의한 식량자원의 증가는 기술개발 및 토지이용의 제한 등으로 인해 정체상태에 있기 때문에 인구증가와 환경문제 등을 고려할 때 지속적으로 증가하는 인류의 단백질 수요의 많은 부분을 수산업에서 충당해야 할 것으로 생각되어진다. 통계에 의하면 2001년에 식량자원의 공급은 육상가축동물이 232백만 톤, 해조류를 제외한 수산 어패류가 38백만 톤, 치즈 등의 기타 74백만 톤으로 전체 344백만 톤이 공급되고 있으며, 이중 수산물의 비중은 현재 약 11%를 차지하고 있었다.

2002년 세계 수산물 생산량은 어업에서 94.6백만 톤, 양식에서 51.4백만 톤이 생산되었으며, 어업생산량은 지난 10년 동안 86~94백만 톤으로 2000년 이후에 더 이상의 증가가 나타나지 않은 반면에, 양식생산량은 1992년 21.2 백만 톤에 비해 약 250%의 증가를 보이고 있다 (FAO, 2004). 어업생산량의 정체 또는 감소현상은 환경오염과 어자원의 남획에 따른 것이기 때문에 현 수준 이상의 증가는 기대하기 어려운 실정임에도 불구하고, 양식생산량의 증가는 국가별 소득수준의 향상에 따라 저지방 고단백 건강 수산식품에 대한 수요의 증가와 생산성 기술이 향상함에 따라 매년 급증하고 있는 추세이다. 세계적으로 1인당 1년 동안 수산식품의 소비량은 1992년에 13.5 kg이었지만, 2002년에 16.0 kg으로 10년간 약 19% 증가하였으며, 2010년에는 18.4 kg으로 증가할 것으로 예상된다 (FAO, 2004). New (1997)는 1992년 수산식품의 소비수준인 13.5 kg/명/년을 기준으로 하여 인구증가에 따른 양식에서 공급해야 할 수산 식품량을 2025년에 52백만 톤으로 예상하였는데, 2002년에 이미 이 수치를 넘어섰으며 2015년경에는 양식생산량이 1억 톤 이상 될 것으로 추정되며, 이것은 어업에 의한 수산식품 생산량의 두 배에 달하는 수치이다.

국내의 어류 양식 산업은 크게 성장하고 있으나, 양식 도중 발생하는 어류의 질병이 양식 산업의 발전에 결정적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 양식 업계에서는 가장 큰 문제로 대두되고 있다. 일반적으로 육상 수조식 양식의 경우 단위 면적당 생산량을 극대화시키기 위해 고밀도 사육을 하고 있는데, 이러한 고밀도 사육은 증체율 저하 및 각종 질병 발생의 직접적인 원인을 제공한다. 최근 양식 분야의 연구는 특정 수산생물의 대량생산을 목적으로 이루어져 왔다. 그렇기 때문에 많은 종류의 항생제와 화학약품을 사용하였으며 이러한 양식조건은 사육중인 어류의 최적 성장을 방해하며 (Wardle, 1981), 주변 환경에 의해 체내 대사와 생리적 상태가 부정적 변화를 가져오게 하여 커다란 문제를 낳고 있다. 이러한 예로서, 종묘생산 및 양성과정에 있어서 에너지 대사와 성장률 저하 및 사망 후 육질의 변성 등을 유발하여 궁극적으로는 양식 생산량의 감소를 가져온다. 또한, 어류의 면역기능을 억압함으로써 질병에 대한 감수성을 증가시키며 낮은 성장률을 유발하는데 직접적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Pickering, 1992). 그러나 수질환경 오염 및 어병 세균의 급속한 돌연변이의 등장으로 항생제 및 화학약품의 사용은 필수 불가결한 대안이 되었다. 그러나, 치료를 위해 사용되는 값비싼 항생물질은 양식 어업인들에게 경제적 부담이 되고 있으며, 그동안 양식현장에서 사용된 항생물질의 오용과 남용 때문에 내성균이 출현되어 점차 치료효과가 경감되고 있는 추세이다. 육상양식장의 사육수는 대부분 자연환경수에 직접적으로 연결되어 있어 어체 내 흡수되지 않은 약제가 함유되어 해양으로 직접 배출되기 때문에 주변수역에 대한 오염의 유발 요인이 될 수도 있으며, 항생물질의 어체 내 잔류성에 대한 의혹 때문에 양식 어류의 소비둔화를 초래할 여지도 앉겨 준다.

앞서 언급했듯이 백신은 어류 양식에 있어서 병원균을 제거하는데 중요한 역할을 하고 있지만, 지속적인 사용으로 인한 잔존 그리고 자어 및 치어에 있어서 독성을 지니기 때문에 그 사용에 한계가 있다. 이러한 문제의 대안으로 주목받고 있는 것이 식이면역조절제 (diet immunostimulants)를 이용한 방법으로 이러한 면역조절제는 전염성이 없는 미생물의 형태로 만든 부산물이다. 이러한 부산물로 젖산균, 베타글루칸, LPS, 단백질가수분해물 등이 그 예이며, 대부분의 식이면역조절제는 어류양식에서 선천면역을 증가시키는 것으로 알려져 있다.

넙치 양식중 발생하는 어병은 주로 버나바이러스병 (*Birna virus*), 랍도바이러스병 (*Rhabdo virus*), 림포시스티스병 (*Lymphocysis virus*), 표피상피증생증 (*Herpes virus*), 비브리오병 (*Vibrio* sp.), 연쇄구균증 (*Streptococcus* sp.), 에드워드병 (*Edwardsiella* sp.), 활주세균증 (*Flexiblbacter* sp.), 장관백탁증 (*Bacterial enteritis*), 스쿠티카 (*Scutica* sp.) 등과 같은 다양한 종류가 있다. 일반적으로 어병은 병원체 등의 전염원이 많이 존재하고 있어 감염의 기회가 큰 경우, 양식어가 병원체에 대하여 면역력이 낮아지는 경우, 과밀 양식에 의한 스트레스나 저품질 습사료 및 변질사료 섭취에 따른 소화기관 장애 및 외부상처 같은 양식조건의 악화 등이 주원인이 되고 있다.

또한, 국내의 대부분의 양식장에서는 생사료 (moist pellet: MP)를 넙치 양식에 사용하고 있으나, 이 사료는 결착력이 약하고 잘부숴지며, 넙치는 생리적으로 부유하는 먹이만 섭취를 하기 때문에 넙치가 사료를 식이하기전에 생사료가 붕괴하게 되면 수조 바닥에 침전할 뿐만 아니라 이 생사료 자체가 유기물 덩어리기 때문에 직접적으로 해양으로 배출되어 수질 오염을 가중 시키고 있다.

이러한 이유 등으로 질병으로 인한 폐사율은 전체 사육량의 12% 전후로 매년 증가하는 추세에 있으며, 2006년 해양수산부의 통계에 의하면 제주지역의 경우 양식어류의 폐사율은 36%를 기록하고 있었다. 게다가, 사면이 바다라는 제주의 지리적인 여건이 최근 기상이변으로 인한 잦은 태풍으로 양식 어류의 폐사량 증가를 더욱 가속화 시키고 있다. 또한, 양식 어류의 소비 증가에 따른 어분 가격이 거의 두배 이상 인상되었으며, 중국에서도 양식에 박차를 가하고 있어 머지않아 어분 품귀 현상이 일어날 것으로 예측된다. 더욱이 국내에서는 양식 어류를 위한 어분 생산이 거의 이루어지고 있지 않아 어분 대체원은 국가의 경제적인 면에서도 필요하다.

어류 양식에 있어 사료는 어류의 성장과 체내 대사에 영향을 미치는 주요한 요인일 뿐 아니라 (Smith, 1935; Brown, 1957), 어류 생산단가에 영향을 미치는 요인으로 가격이 싸고 품질이 좋은 사료의 안정적인 공급이 양식의 성패를 좌우한다. 양식 산업에 있어서 우선 양식 가능한 중요 어종을 선택하여 종묘 생산 기술이 개발되면 질 좋은 배합 사료에 대한 사육관리가 뒷받침되어야 하는 사실은 잘 알려진 바 이며, 특히 사료가 양식종의 생산 단가 중 어종별로 차이는 있지만

30~60%를 차지하는 것을 보아서도 양식 산업의 경제적인 측면에서의 배합사료의 중요성을 알 수 있다 (NRC, 1993). 앞서 언급하였지만 현재 해산어 양식은 약 50%를 차지하는 매우 중요한 양식대상종이다. 이와 같이 해산어류 양식이 차지하는 비율은 매우 빠른 증가 추세를 보이는 반면에 사료영양연구의 미비로 인하여 양어가들이 선호하는 배합사료 개발이 미진한 상태이다. 배합사료가 개발되었더라도 그 어종에 적합한가를 충분한 검토 없이 개발되는 경우가 많아 영양성분의 불균형으로 어류의 성장 및 사료 효율 측면에서 생사료에 비해 크게 개선되어 있지 않거나 가격면에서도 비싸기 때문에 양식 사양가로부터 외면당하고 있는 실정이다. 아울러, 시대적인 흐름으로 인하여 양어사료의 비율이 점차적으로 증진할 것으로 사료되어 진다 (New, 1999).

넙치는 국내에서 1970년대 말 종묘 생산기술이 개발되어 보급된 이 후 최근까지 양식 생산량이나 가치의 면에서 해산어 양식 대표종으로 인식되어져 왔으며, 2005년 국내 넙치 양식 생산량은 약 40,059톤으로 당년도 어류 양식 총 생산량 (약 80,000톤)의 49% 이상을 차지하며, 또한 그 가치는 약 35백억 원으로서 양식 생산된 어류 총 금액 (약 72백억 원)의 48% 이상을 차지하고 있는 것으로 나타났다 (KNSO, 2006). 또한, 넙치 연구는 많은 영양학자들에 의해 사료원료 이용성, 단백질 요구량, 단백질/에너지비, 아미노산요구량, 지질 및 지방산 요구량, 탄수화물영양연구, 미량영양소 요구량 등 많은 양어사료의 영양학적 기초연구들이 수행되어져 왔으며 (Kikuchi 등, 1997; Kim 등, 2002; Alam 등, 2002; Kim 등, 2004; Kim 등, 2005a), 아울러 완전 배합사료에 대한 연구도 활발히 수행되어지고 있다 (Cho 등, 2005; Kim 등, 2005b; Seo 등, 2005). 또한 넙치의 효율적인 생산을 위하여 사료내 영양염 요구량, 첨가제 효과, 어분대체 단백질원 효과, 적정 사료 공급 횟수 및 넙치의 양성 관리 기술 개발 등에 대한 많은 연구가 수행된 바 있으며, 특히 어보산 (Obosan)을 사료 내 첨가 하였을 경우 넙치의 성장이 개선될 뿐만 아니라 근육의 품질이 개선되며, 혈청 콜레스테롤 함량을 낮추는 효과가 있는 것으로 보고 된 바 있으며, 어보산은 상용화되어 양식산업 현장에서 널리 이용되고 있다.

키토산은 오늘날 각종 공업부분에서 응집제로 폭넓게 활용되고 있으며, 최근에는 농축산업, 식품, 생명과학, 환경 및 의료제제 등 다양한 분야에서 응용 가능

성이 높아지고 있다. 그러나 키틴, 키토산 기초 및 응용 연구가 농축산 분야에서는 미미한 가운데 키토산의 항균성을 이용한 식품 보존제, 유기성 식품 신소재 혹은 가축 질병 예방 물질로 활용하려는 노력이 증대되고 있다.

키토산은 면역력을 강화하는 것 (Dautremepuits 등, 2004; Esteban 등, 2001; Cuesta 등, 2003; Gopalakannan과 Arul, 2006)으로 알려져 있고, 그 메카니즘을 살펴보면 소장, 대장의 림프구를 증식시키며, 키토산이 소장, 대장에 접촉하면 파이엘판내의 림프구가 증식되어 백혈구가 증식되며 활발한 면역반응을 유도한다. 또한, 키토산은 체내의 혈관에 유입되면 독성없는 이물질로 인식되나, 장내 미생물에 의해서 극히 일부 분해된 키토산이 흡수되어 혈관 내로 들어가면 면역세포들은 키토산을 이물질로 인식하게 된다. 면역체계는 혈관 내로 유입된 키토산 이물질에 대해 이물 반응을 하여 면역 관련 세포 (T-cell, B-cell Marcrophage, White Blood Cell)가 활성화된다. 그러나, 키토산은 생체친화성이 높기 때문에 이물질에 대한 면역반응만을 일으킬 뿐, 다른 독성반응은 없는 것으로 알려져 있다. 또한, 키토산은 정상적인 백혈구 수치를 유지하도록 하고, 이물질에 대한 면역반응의 결과로 각종 면역세포들이 활성화되면, 백혈구 숫자가 증가하는 등 암치료로 인하여 생겨나는 부작용인 백혈구의 감소를 막아줄 수 있다. 그래서 키토산 섭취로 항상 일정한 백혈구 숫자를 유지할 수 있기 때문에 계속적인 암치료를 받을 수 있는 것이다. 또한, 키토산을 계속해서 복용하면 암치료에 나타나는 식욕부진, 탈모, 면역기능 약화 등을 확실히 막아줄 수 있다. 면역세포를 만들고 훈련시키는 기관인 골수와 흉선과 같은 면역기관을 튼튼히 해줄 뿐만 아니라, 불필요한 영양분을 흡착·배설하고 영양 밸런스를 맞추어 골수와 흉선, 림프구, 편도선 맹장 등의 세포를 활성화시키며, 세포간의 신호 전달을 원활하게 해준다. 키토산은 대식세포의 기능을 강화시켜, 각종 유해세균과 혈액 폐기물, 노화세포, 지방 등을 삼키는 대식세포의 능력을 강화시킨다. 또한 불필요하게 혈관에 흡수된 저분자의 키토산을 인식하여 면역기능이 활성화가 된다. 또한, 자연살해세포 (NK Cell)의 활성화를 강화함으로써, 각종 암 세포를 특이적으로 죽이는 이 NK cell을 증식시키게 된다 (Suzuki 등, 1984; Anderson, 1992; Siwicki와 Dunier, 1994, Siwicki 등, 1994).

돌돔은 남해안과 여름 기간동안 서해안의 해상가두리에서 주로 양식이 행해

지고 있는데 돌돔은 아열대성 어류여서 우리나라 수온조건에서는 성장 기간이 6개월 정도로 짧고, 겨울철의 낮은 수온으로 인해 월동이 어려워 양성하는데 어려움이 있다. (Kang 등, 1998). 그러나 현재 돌돔의 종묘수급 불안정, 월동전 판매부진 및 개체간의 성장 차이에 따른 문제점으로 효율적인 양식 경영을 위해서는 일부 종묘의 월동 사육은 불가피한 실정이다.

제주도는 경도 33°06′~34°00′에 위치하여 아열대성 기후 조건을 가지고 있어 돌돔 양식에 있어 유리한 지리적 위치에 있다. 이러한 이유로 넙치양식과 더불어 점차 양식어종으로서 자리를 잡아가고 있다. 그러나 돌돔은 이리도바이러스에 한번 노출되면 단기간에 대량폐사가 일어나 아직까지는 양식 어종 선정에 있어 꺼리는 경향도 없지 않다. 더욱이 엘리뇨에 의한 기상이변으로 인한 급격한 수온변화에 의한 스트레스로 면역력이 약화되어 양식 농가를 더욱더 곤경에 처하게 한다.

면역반응이란 물리화학적인 자극이나 외부로부터 침입해온 병원체에 대항하여 체내에서 반응을 일으키는 작용이다. 병원체가 체내로 유입이 되면 가장 먼저 일어나는 반응이 호흡급증 활성 (respiratory burst activity)으로, 이것은 병원균에 의해 생성된 염증부위로 식균작용을 하는 대식세포들이 ROS (reactive oxygen species)를 생성 하면서 이동하여 병원체를 제거하는 활성을 말한다. 이 반응과정 중 체내에 병원균의 잔존률이 크게 되면 ROS 및 RNS (reactive nitrogen species)가 과다 발생되어 정상세포에도 손상을 입히게 된다. 그리고 비특이적 (non-specific) 면역조절 능력을 저하시키고 병원균으로부터 감염을 일으키게 된다. 척추동물에 있어 비특이적 방어는 병원균의 감염 시 첫 번째 방어선으로 알려져 있으며, 선천적 면역시스템 (innate immune system)의 활성에 의해 병원균으로부터 저항할 수 있는 능력이 강화될 수 있음이 보고되고 있다 (Anderson과 Siwicki, 1994). 따라서, 최근 많은 연구자들에 의해 성장촉진 및 사료효율을 개선하거나 어류의 비특이적 면역반응 및 항산화 능력을 증가시켜 생산성 향상 및 양식어류의 질병을 예방할 수 있는 사료첨가제를 개발하기 위한 많은 연구들이 진행되고 있으며, 특히, 어류에 효과적으로 작용하는 면역증강 및 성장촉진 물질은 성장호르몬, 박테리아구성소, 다당류, 동·식물 추출물 및 영양성 요인 등으로 알려져 있다 (Sakai 등, 1993, 2999).

따라서 본 실험은 크게 두 가지 목적을 위해 수행하였다. 첫째는 양식장 부산물과 감귤가공 부산물을 고온발효하여 양식용 어분 대체원을 첨가한 사료를 섭취한 양식 어류의 성장 및 면역활성을 평가하였고, 둘째는 키토산코팅을 이용한 MP (moist pellet)사료 개선 효과 및 성장, 면역반응이 양식 어류에 미치는 영향을 평가하기 위하여 실시하였다.

JEJU NATIONAL UNIVERSITY · SINCE 1952 · 제주대

제 1장

양식장 부산물 유래 발효 어분 첨가 사료를 급이한 양식어의 성장 및 면역반응에 대한 효과

제 1 장

양식장 부산물 유래 발효 어분 첨가 사료를 급이한 해산 양식어의 성장 및 면역반응에 대한 효과

Ⅰ. 재료 및 방법

1. 양식장 부산물 및 감귤박 수거

양식장 부산물은 제주도 서귀포시 구좌읍 한동리 인근 양식장과 표선면 신천리 인근 양식장에서 어병이나 기타 사유로 인하여 폐사된 양식넙치를 수거하여 사용하였다. 넙치 사육시 부산물이 발생하는 즉시 회수하여 -20℃ 이하의 냉동고에 보관하였으며 이들 부산물은 일일 수거하여 실험실로 옮긴 후 -40℃에서 보관하면서 발효어분의 제조에 사용하였다. 감귤박은 제주도 서귀포시 남원읍 한남리 소재의 감귤가공공장에서 수거하여 실험실로 운반하였으며, 수거한 감귤박은 2±1℃의 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 양식장 부산물로부터 발효 어분 제조시 미생물의 발효를 최적화 하기위하여 수분조정제로 미강 (米糠)을 사용하였으며, 본 실험에서 사용한 미강은 건조분말 형태인 것을 구입하여 사용하였다.

2. 일반 성분 분석

수거한 양식장 부산물에 대한 일반성분 분석은 수분 (moist), 조단백질 (crude protein), 조탄수화물 (crude carbohydrate), 조지방 (crud lipid), 조회분 (ash) 등이며 감귤박에 대한 성분분석은 수분, 조단백질, 조탄수화물, 조섬유, 조지방, 비타민 C 등이었다. 일반성분 분석방법은 AOAC법 (2002)에 따라서 수분은 105℃ 상압건조법

으로, 조단백질은 킬달자동분석장치 (Kjeltec^{TM}2300, Foss Co. Ltd., Denmark)를 사용하여 분석하였으며, 조지방은 에테르를 이용한 Sohxlet법 (Sohxlet system 1046, TacatorAB, Sweden)으로, 조회분은 550℃ 회화로에서 12시간 이상 태운 후 정량하였다. 조섬유는 자동 조섬유 분석장치를 이용하였으며, 비타민 C함량은 Indophenol 적정법으로 분석하였다. 탄수화물은 전체 성분 함량을 100%로 하여 수분, 조단백질, 조지방 및 조회분의 함량에 대한 차이 값으로 나타내었다.

3. 제주 양식넙치의 주요 어병 세균에 대한 사멸조건 실험

넙치의 주요 어병 세균의 사멸조건을 알아보기 위하여 제주 양식넙치의 세균성 질병으로 보고된 연쇄구균증, 에드워드증, 비브리오증, 활주세균증에 감염된 것으로 추정되는 넙치를 대상하여 제주수산자원연구소에서 다음과 같이 실시하였다. 즉, 연쇄구균증 원인균인 *Streptococcus iniae, Streptococcus parauberis,* 에드워드증 원인균인 *Edwardsiella tarda,* 활주세균증 원인균으로 보고된 *Flexibacter maritimus*를 어체에서 분리하였고, 비브리오균인 *Vibrio alginolyticus*와 *V. anguillarium*은 세포주은행에서 분양받아 이 세균들에 대한 사멸조건을 검토하였다. 즉, 분리한 어병 원인균을 BHI (brain heart infusion) 등의 증균용 배지을 이용하여 배양하고 이들을 새로운 증균용 배지에 1 ml 당 1 x 10^{6}~10^{9}개로 접종한 후 40~90℃까지 온도별 및 0~10시간대 별로 시료를 채취하여 멸균된 생리식염수 혹은 PBS (phosphate buffer saline, pH 7.0)와 혼합하여 충분히 교반한 후 MTT 방법으로 세균의 생존율을 조사하여 사멸효과를 다음과 같이 검토하였다. 배양된 균액 40 μl를 취하여 10 μl MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylte-trazolium bromide, Sigma) 시약과 혼합한 후 37℃에서 2시간 배양하였다. 이것을 6,000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 제거한 후 200 μl의 DMSO를 첨가한 후 590 nm에서 흡광도를 측정하여 세균의 생존률을 계산하여 어병균의 사멸률로 환산하였다. 또한 100% 사멸된 것으로 나타난 결과는 BHI agar 등의 배지에 도말하여 25~30℃에서 24~72시간 배양한 후 형성된 콜로니의 형태 파악 및 계수를 병행하여 세균의 사멸을 재확인하였다.

4. 양식장 부산물 유래 발효어분 제조용 발효기 및 발효제

양식장 부산물로부터 발효어분의 제조에 사용된 고속발효 건조장치는 음식물 쓰레기로부터 유기질 비료 생산에 사용하고 있는 장치로서, 일본 나가사끼현의 미쯔비시전기에서 개발한 제품으로 Biofeeder 제품의 BF-30 모델을 사용하였다 (Fig. 1-1). 크기는 가로 1,200 mm, 세로 800 mm, 높이 1,170 mm이며, 본체 중량은 500 kg이다. 처리 용량은 1회에 30~50 kg이며 가열 방식은 전기 히터식으로 5 kW이며, 1.5 kW의 교반모터를 채택하고 있다.

한편, 고속발효 건조기에서 양식장 부산물 유래 발효어분을 제조하는데 사용한 발효균은 일본 Seiwa 사에서 구입한 *Bacillus*에 속하는 복수종의 호기성 고온균으로 식품 발효에 주로 이용하는 것을 사용하였다. 또한, 본 실험에서 사용한 균의 특성은 내열성이 강한 미생물제재로서 고속발효 건조 장치의 내부온도인 80~90℃에서 주로 동식물의 유기물 재료를 분해할 수 있는 능력을 가지고 있어 본 연구에서 사용 하였다.

5. 고속발효건조기에서 양식장부산물로부터 발효어분 제조를 위한 최적조건 규명

각 양식장으로부터 수거한 냉동 양식장 부산물 24 kg을 기준으로 하여 수분조정제인 미강을 5~20 kg 첨가하였다. 그리고 감귤박을 0~10 kg까지 첨가한 후 일본 Seiwa 회사로부터 공급받은 발효균을 전체 기질량에 비하여 10,000:0.5~10,000:4의 비율로 하여 첨가한 후 발효기의 외부 스팀 온도를 250~300℃로 조절하여 10~30분간 대기한 후 발효기 내부의 온도를 90±5℃가 될 때 어분제조를 위한 발효공정을 시작하였다. 발효시간은 발효가 끝난 후 제조된 어분의 함수량이 5% 미만일 때 자동으로 종료하게 되며 이때의 총 발효공정 시간을 측정하였다. 그리고 제조된 양식장 부산물 유래 어분의 함량을 측정하여 생산률을 계산하였다. 한편, 부산물의 발효과정에서 수분조정제로 사용되고 있는 미강을 대신하여 건조 감귤박 분말을 첨가하여 발효어분을 제조하여 비교 분석하였다.

Fig. 1-1. Biofeeder BF-30 model as a high speed fermenter to prepare fish meal from by-products in fish farms. The left is the outside and the right is the inside of the fermenter (left; outside. light; inside).

6. 양식장 부산물 유래 발효 어분의 기능적 극대화

가. 발효 어분 추출물의 제조

감귤박이 첨가된 사료와 미 첨가된 사료를 앞에서 언급한 조건으로 고온건조 발효를 시켰다. 이렇게 생산한 발효건조 어분 10 g을 증류수와 메탄올 100 ml에 각각 혼합하여 24시간 동안 상온에서 추출하여 30분 동안 4,000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 수거해 발효 어분의 기능성을 확인하였다.

나. DPPH free radical 소거 활성

Free radical 소거활성도는 Blois (1958)의 방법을 변형하여 전자공여능(Electron donating ability, EDA)으로 측정하였다. 4.0×10^{-4} M DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma) 용액 2.9 ml에 각 해조류 추출액 0.1 ml를 넣고 교반한 후 30분간 상온 암실에서 반응시킨 후 516 nm에서 흡광도를 측정하여 대조구에 대한 흡광도의 감소 비율로서 전자공여능을 나타내었다.

다. Hydrogen peroxide 소거 활성

Hydrogen peroxide 소거활성은 Müller 등 (1985)의 방법에 따라 수행하였다. 즉, 0.1 M phosphate buffer (pH 5.0) 100 μl와 sample를 96 microwell plate에서 혼합시킨 후 다시 20 μl의 hydrogen peroxide를 첨가하고 37℃에서 5분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 1.25 mM 2,2′-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS, Sigma)와 peroxidase (1 unit/ml, Sigma)를 각각 30 μl첨가하여 최종적으로 37℃에서 10분간 반응시켜 ELISA reader (Sunrise, Tecan^{TM}, Austria)를 사용해 405 nm에서 활성도를 측정하였다.

라. Comet assay를 이용한 DNA damage 측정

넙치의 미부정맥으로부터 얻은 전혈을 2,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 실험에 사용하였다. 알칼린 코멧 에세이 (alkaline comet assay)는 Heo (2005) 등의 방법으로 수행하였다. 혈장은 20 μl의 0.5% LMPA (low melting point agarose, Invitrogen)와 섞은 후, 1% NMPA (normal melting point agarose, Sigma)로 미리 코팅한 슬라이드에 분산시켰다. 겔이 굳은 후 그 위에 다시 0.5% LMPA 100 μl를 슬라이드 위에 떨어뜨리고 커버글라스를 덮고, lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% N-Lauroylsarcosine sodium salt, 1% Triton X-100)에 슬라이드를 담가 4℃에서 1시간동안 lysis시켰다. 이 lysis시킨 슬라이드를 300 mM NaOH와 10 mM Na_2EDTA (pH 13.0)가 들어있는 glass chamber에서 20분 동안 unwinding을 시켰다. DNA 전기영동은 25 V/300 mA의 전압으로 20분 동안 실시하였으며 전기영동이 끝난 슬라이드를 중화완충용액 (neutralizing buffer; 0.4 M Tris, pH 7.5)에 5분씩 3회 반복 세척해 주었고 에탄올로 5분간 고정시킨 후, 2~20 μg/ml 농도의 EtBr (ethidium bromide, Sigma) 45 μl로 DNA를 염색하였다. 측정은 이미지 분석기 (kinetic Imaging Komet 5.0, UK)와 reflected light fluorescence attachment microscope (BX-FLA, Olympus optical Co., Ltd, Japan)로 수행하였고, DNA 손상정도는 핵으로부터 이동한 DNA fragmentation의 거리 또는 테일 (tail) 길이에 tail 내 함유된 DNA%를 곱해준 테일 순간 값을 측정하여 나타내었으며 각 대상자 당 2개의 slide를 만들어 각각 50개씩 총 100개의 lymphocyte에서 DNA 손상정도를 측정하였다.

7. 양식장 부산물 유래 어분 대체원의 품질 안전성

양식장 부산물 유래 발효어분으로부터 어병 세균의 잔존 여부를 분석하여 품질 안전성을 검토하였다. 즉, 각 양식장으로부터 수거하여 온 부산물로부터 폐사원인이 된 어병 세균을 분리·동정한 후 최적발효조건에서 발효어분을 제조하였다. 제조된 발효어분으로부터 세균배양과 함께 DNA를 분리하여 multiplex-PCR로 어병세균의 동정을 실시하였다.

외부소견 상 넙치의 주요 세균성 질병으로 보고된 연쇄구균증, 에드워드증, 비브리오증, 활주세균 증에 감염된 것으로 추정되는 넙치시료를 대상으로 실시하였다. 즉 연쇄구균증 원인균인 *Streptococcus iniae, Streptococcus parauberis,* 에드워드증 원인균인 *Edwardsiella tarda,* 활주세균증 원인균으로 보고된 *Flexibacter maritimus*를 분리대상으로 실시하였다. 먼저 *S. iniae, S. parauberis, E. tarda*의 분리는 넙치를 무균적으로 해부한 후 신장 및 간 조직액을 2.5% NaCl-BHIA (Difco, USA), 2.5% NaCl-SS agar (Difco, USA), 혈액한천배지 평판에 도말하여 30±0.5℃, 24~48시간 배양 후 분리하였다. 분리균주의 동정은 각각의 평판에서 자란 colony를 대상으로 gram stain, oxidase test, catalase test등의 생화학적 성상시험을 거쳐 *Streptococcus* spp. *Edwardsiella* spp.로 간이동정 후 multiplex PCR방법을 이용해 *S. iniae, S. parauberis, E. tarda*로 각각 동정하였다. *Flexibacer mritimus*의 분리 및 동정은 어류의 체표궤양환부를 현미경검경을 실시하여 활주운동성 세균을 확인 후 Hsu-Shotts medium에 도말 배양 후 담황색 colony를 분리하여 생화학 성상 시험 및 PCR 수행을 통해 동정하였다. m-PCR을 이용한 분리균주의 동정은 Table 1-1에 나타낸 primer set 및 조건을 이용하였다 (Mata 등, 2004) 이 때 m-PCR에 사용할 DNA의 추출은 MFX6100 (TOYOBO, Japan)을 이용하였다.

각 양식장 부산물로부터 원인세균의 분리 및 동정이 끝난 후 양식장 부산물의 균수를 확인하고 각각의 최적 발효조건으로 발효과정을 거쳐 제조된 발효어분의 어병 세균의 사멸을 확인하였다. 어병 세균의 사멸 확인은 발효어분 분말시료를 멸균생리 식염수를 이용하여 희석 및 membrane을 이용하여 여과 후 total DNA를 추출하여 Table 1-1에 나타낸 primer set을 이용한 m-PCR법으로 공시균주의 검출유무를 확인하였다. 그리고 제조어분에 대해 일반세균의 오염정도 확인을 위해 시료의 생균수 측정을 실시하였다. 생균수 측정은 pour plate method를 이용하였다. 즉 제조어분을 멸균 생리식염수를 이용하여 단계적으로 현탁 희석된 시료 각 1ml에 Plate Count Agar (PCA) (Difco, USA) 및 Marine agar 2216 medium (Difco, USA)를 주입하여 30±0.5℃, 24±2시간 배양 후 생균수를 측정하였다.

Table 1-1. Bacterial target species assayed and primer sequences used for m-PCR amplification and the amplicon sizes

Fish pathogen	Primer	Size (bps)	PCR condition
Streptococcus iniae	AAGGGGAAATCGCAAGTGCC ATATCTGATTGGGCCGTCTAA	870	92℃(1min), 55℃ (1min), 72℃(1.5min) for 25cycle
Streptococcus parauberis	TTTCGTCTGAGGCAATGTTG GCTTCATATATCGCTATACT	718	92℃(1min), 55℃ (1min), 72℃(1.5min) for 25cycle
Edwardsiella tarda	CGGTAGCAGGGAGAAGGC GTCTTCGTCCAGGAGGCC	686	94℃(1min), 55℃ (1min), 72℃(1.5min) for 35cycle
Flexibacter maritimus	CGGTAGAAGATGACTATGCG CTAGCCCTGTCATTCCACAT	786	94℃(1min), 55℃ (1min), 72℃(1.5min) for 35cycle

8. 실험사료

가. 넙치

넙치 사육실험을 위하여 일반적으로 양식장에서 가장 많이 사용하고 있는 생사료 (MP: mooisture pellet)와 생사료에 발효어분 함유한 배합사료를 제조하여 공급하였다. 배합 사료는 생사료의 7% 상당의 발효어분을 첨가 하여 제조하였다.

나. 돌돔

돌돔 사육실험을 위하여 4개의 다른 사료를 제조하여 공급하였다. 실험 사료는 50%의 조단백질 함량을 갖도록 동일하게 조성하였고, 기초사료 조성표는 Table 1-2에 나타내었다. 실험사료는 기초사료를 이용한 대조구 (0FFM)와 기초사료에 제조한 양식장부산물 발효어분을 단백질원으로 10, 20, 30%를 대체하여 10% FFM (10FFM), 20% FFM (20FFM), 30% FFM (30FFM)을 제조하였다. 실험사료 제조는 모든 사료 조성원을 분쇄기를 이용하여 분말 형태로 일정하게 만든 후 각 사료원들을 사료 조성표에 따라 무게를 측정하여 잘 섞은 후 사료원 총량의 30~40%에 해당하는 증류수를 첨가하여 사료혼합기 (NVM-14-2P, Korea)로 혼합·반죽하였다. 혼합 반죽물은 소형쵸파기 (SMC-12, Korea)를 이용하여 직경 3mm 크기로 성형하였다. 앞에서 얻어진 사료를 동결건조하여 sieve를 이용하여 적당한 크기로 사료를 pellet 형태로 가공하여, -20℃에 보관하면서 공급하였다.

Table 1-2. Formulation of experimental diets for Parrot fish (% dry matter)

Ingredients	0FFM[1]	20FFM[2]	20FFM[2]	30FFM[2]
White FM	51.00	45.90	40.80	35.70
Fermented fish protein (FFM)	0.00	10.05	20.10	30.15
Soybean meal	6.00	6.00	6.00	6.00
Corn gluten meal	6.00	6.00	6.00	6.00
Starch	22.00	18.55	15.10	11.65
Yeast	2.00	2.00	2.00	2.00
Mineral Mixture[3]	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin Mixture[4]	1.00	1.00	1.00	1.00
Squid liver oil	11.00	9.50	8.00	6.50

[1]0FFM; without FFM

[2]10, 20, 30FFM; 10, 20, 30% included FFM, repectively

[3]Mineral Mixture (g/kg): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 80; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 370; KCl, 130; Ferric citrate, 40; $ZuSO_4 \cdot 7H_2O$, 20; Ca-lactate, 356.5; CuCl, 0.2; $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.15; $Na_2Se_2O_3$, 0.01; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2.0; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 1.0

[4]Vitamin Mixture (g/kg): L-ascorbic acid, 121.2; DL-α tocopheryl acetate, 18.8; thiamine hydrochlorade, 2.7; riboflavin, 9.1; pyridoxine hydrochloride, 1.8; niacinm 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; cholecalficerol, 0.003; cyanocobalamin, 0.003

9. 실험어 및 사육관리

가. 넙치

본 실험은 제주도 서귀포에 위치한 양식장에서 수행하였고, 실험 시작 전에 사용한 넙치는 실험 환경에 적응시키기 위해 약 3주 동안 시판사료를 공급하여 순치시켰다. 실험 시작 전 실험어의 평균 체중은 230±15 g 및 140±10 g 이었으며 두 개의 서로 다른 어체중을 가진 실험어를 대상으로 실시하였다. 사육 수조는 10 (W)×10 (L)×1 (H) (m)인 콩크리트 사각수조를 사용하였고 각 수조당 2,000마리 정도 수용하였고, 실험구는 어체중 별로 두 그룹으로, 동일한 실험을 수행하였으며 각 실험구당 2반복으로 실시하였다. 사육수량은 1일 18회 환수 시켰으며, 충분한 산소 공급을 위하여 통기하였다. 실험 기간 중의 수온, 용존산소 (dissolved oxygen, DO), pH, 염분을 매일 측정하였으며, DO는 DO meter, pH는 pH meter를 사용하였다. 실험기간 중 사육 수온은 18~20℃로 최저 수온이 18℃, 최고 수온이 20℃였다. 사육수는 35±5%의 지하수가 함유된 해수를 사용하였고, 사육수의 DO는 7.0±0.5 mg/l, pH는 7.5±0.5였다. 사료는 하루 두 번 (오전 7시와 오후 5시) 공급 하였으며, 실험 사육은 12주 동안 수행하였으며, 성장도는 4, 8, 12주째에 각각 측정하였다.

나. 돌돔

본 실험에 사용된 돌돔 치어는 제주도내 양식장에서 구입하여 제주대학교 소재 해양과환경연구소로 수송하였으며, 실험 환경에 적응시키기 위해 3주 동안 순치시켰다. 순치시키는 동안의 먹이 공급은 분양받은 양식장에서 공급하던 것과 동일한 시판 사료를 사용하였다. 예비사육 후 평균 어체중이 12~13 g의 돌돔을 150 l 원형수조에 각 수조당 35마리씩 무작위 배치하였다. 사료 공급실험은 3반복으로 수행하였으며, 사육수는 여과해수를 사용하여 1~2 l/min의 유수량이 공급되도록 조절하였고, 모든 실험 수조에 용존산소 유지와 원활한 사육수 순환을 위하여 에어스톤을 설치하였다. 실험 기간 중의 수온은 25.0±3.0℃, 용존산소는

4.3±0.2 mg/ml이었다. 실험 사료는 어체중의 4%를 공급하였으며, 하루 두 번 오전 8시와 오후 5시에 급이 하였고 사료공급실험은 총 8주간 수행하였다. 실험 어체의 증체율은 실험사료를 급여한 후 2주 간격으로 실험어의 전체 무게를 측정하여 증중량을 구하였다.

10. 혈액성분 분석

혈액학적 성분 분석은 넙치는 실험이 종료되는 12주째에, 돌돔은 4주와 8주째에 각각 측정하였다. 증체율 조사와 함께 혈액성분 분석을 위하여 실험어를 채혈하기 전까지 약 24시간 동안 절식시켜 무작위 선발하여 미부정맥에서 혈액을 채혈하여, micro-hematocrit 방법 (Brown, 1980)에 의해 헤마토크리트 (hematocrit, PCV)를 측정하고, 동시에 자동 혈액 분석 장치 (Ch 100 plus, Daewang metitecq. Korea)로 헤모글로빈 (hemoglobin, Hb)을 측정 하였다. 혈청성분의 분석을 위하여 채혈한 혈액을 항응고제가 처리되지 않은 원심분리관에 넣고 실온에 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 냉장보관하면서 16시간 이내에 분석하였다. 혈청성분은 자동 혈액분석기를 사용하여 총단백질 (total protein), 당 (glucose), 인 (phosphorus), 총콜레스테롤 (Total cholesterol), 중성지방 (triglyeride; TG), HDL-C (high density cholesterol), LDL-C (low density cholesterol), 및 간지수인 AST (aspeartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase)를 분석 하였다.

11. 어류식세포의 respiratory burst 활성 측정

라디칼에 의한 식세포 작용을 알아보기 위하여 respiratory burst activity를 Secombes (1990) 방법에 따라 분석하였다. Ependoff tube에 전혈 (whole blood)과 0.2% NBT 시약을 1:1 비율로 섞은 후 30분 동안 상온에서 반응시켜 1 ml dimetyl formamide를 첨가하였다. 이 반응물을 200 μl씩 micro well plate에 분주한 후 최종적으로 OD 560 nm에서 micro-reader (Sunrise, Tecan^{TM}, Austria)로 측정하여 실험어의 respiratory burst activity를 분석하였다.

12. 혈청의 lysozyme 활성 조사

체액성 면역 반응에 관여하는 인자로 라이소자임은 세균벽의 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglyglucosamine사이의 베타-1,4결합을 분리하여 세균을 사멸시키는 효소로 그람양성균에 대한 항체 및 보체 활성을 증가 시켜주고, 식세포의 식작용을 증가시킨다. 실험 방법은 Kumari와 Sahoo (2005)에 따라 *Micrococcus lysodeikticus*를 0.02 M sodium citrate buffer (pH 5.5)에 0.2 mg/ml가 되게하여 *M. lysodeikticus* solution을 만든다. Serum을 각각 15 µl씩 96 well plate에 분주한 후 즉시 *M. lysodeikticus* solution을 150 µl넣고 450 nm에서 흡광도를 측정한 후 24℃에서 0.5, 1시간 반응 후 동일한 파장에서 흡광도 값을 얻어 lysis 전 후 흡광도 값 차이를 구한다. Lysozyme의 활성 단위는 분당 0.001의 흡광도 감소를 나타내는 효소의 양으로 정의하였다.

13. 통계처리

양식장에서 사육한 넙치의 성장 및 분석 결과의 통계처리는 SPSS (SPSS Inc., Version 12.0) program을 이용하여 독립 검정을 실시하여 *t*-test ($P<0.05$)로 평균간의 유의성을 검정하였다. 한편, 돌돔의 실험사료의 배치는 완전확률계획법 (completely randomized design)을 실시하였고, 성장 및 분석 결과의 통계처리는 SPSS (SPSS Inc., Version 12.0) program을 이용하여 One-way ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test ($P<0.05$)로 평균 간의 유의성을 검정하였다. 결과 값은 평균값±표준편차 (mean±S.D)로 나타내었고 백분율 값은 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계분석 하였다.

Ⅱ. 결과 및 고찰

1. 양식장 부산물, 감귤박 수거 및 성분분석

제주도 소재 각 양식장으로부터 수거한 양시장 부산물 (dead fish)와 제주도개발공사로부터 수거한 감귤박의 일반성분을 분석하여 Table 1-3에 나타내었다. 양식장 부산물의 경우 수분 함량이 약 73.3%였으며 조단백질의 함량은 18.2%로서 이것은 건조중량을 기준으로 하였을 경우 약 68%에 상당하는 단백질 함량이다. 감귤박의 경우 수분함량은 92.5%로서 대부분이 수분이었으며 조섬유를 포함하는 조탄수화물의 함량이 5.7%로서 건조중량 기준으로 76%였다. 감귤박의 비타민 C 함량은 습중량 100 g 중 약 985 mg을 차지하였다.

2. 주요 어병세균 사멸조건 규명

제주 양식넙치의 세균성 질병으로 가장 빈번하게 보고되고 있는 연쇄구균증 원인균인 *Streptococcus iniae*과 *Streptococcus parauberis,* 에드워드증 원인균인 *Edwardsiella tarda,* 활주세균증 원인균으로 보고된 *Flexibacter maritimus*를, 그리고 비브리오균인 *Vibrio alginolyticus*와 *V. anguillarium*에 대하여 40~90℃의 온도에서 0~10시간 동안 가열하였을 때의 생존률을 측정하여 Fig. 1-2에 나타내었다.

연쇄구균증 원인균인 *Streptococcus iniae*의 경우 40℃의 온도에서 6시간까지 가온하였을 때 약 60% 생존하였으며 10시간까지 가온하였을 때에도 약 80% 이상 생존하였다. 하지만 50℃에서 가온하였을 경우에는 가온 2시간에서 약 10% 이하로 생존률이 감소했으며 4시간 가온 처리하였을 경우 완전히 사멸하였다. 60℃로 가온처리하였을 경우에는 가온 2시간에 완전 사멸되었다. 따라서 *S. iniae*의 경우 50℃에서 4시간 이상 처리하였을 경우 완전히 사멸되었고 60℃ 이상 가온 처리하여 2시간 이상 경과하였을 경우에는 100% 사멸하였음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 1-2A). 또 다른 연쇄구균증 원인균인 *Streptococcus parauberis*의 경우에는 *Streptoco-*

Table 1-3. Approximate chemical compositions of dead flounder fish and citrus meal

	Moisture	Crude protein	Crude lipid	Crude ash	Crude carbohydrate	Vitamin C (mg/100g)
Dead fish	73.3±4.9	18.2±2.1	1.9±0.2	4.1±0.8	2.5±0.6	-
Citrus meal	92.5±6.4	0.8±0.1	0.6±0.1	0.4±0.1	5.7±1.7	985

*ccus iniae*보다 열에 좀 더 민감함을 보였다. 즉 40℃에서 2시간 이상 가온 처리하였을 경우 생존률이 50% 미만으로 나타났으며 10시간 가온처리하였을 경우 생존률이 약 25%에 불과하였다. 50℃ 이상의 가온처리하였을 경우에는 *S. iniae*에서의 결과와 거의 유사함을 알수 있었다 (Fig. 1-2B).

에드워드구균증의 원인균인 *Edwarsiella tarda*의 경우에는 본 연구에서 검토된 6개의 양식 넙치 어병세균들 중 열에 가장 강한 것으로 나타났다 (Fig. 1-2C). 즉, 40℃의 가온 조건에서는 10시간 동안 처리하여도 전혀 사멸되지 않고 100% 생존하였다. 하지만 50℃로 온도를 높였을 경우에는 급격하게 사멸되기 시작하여 가온 2시간 처리에서 10% 미만의 생존율을 보였지만 10시간 이상 처리하여도 완전히 사멸되지는 않았다. 한편, 60℃에서는 50℃의 가온처리 결과와 마찬가지로 2시간 동안 열을 가했을 때 약 10% 이하의 생존률을 보였지만 가온처리 6시간에서는 완전히 사멸한 것을 확인 할 수 있었다. 그리고 70℃ 이상에서 열처리하였을 때는 2시간 이내에 완전히 사멸한 것을 확인 할 수 있었다.

한편, 활주세균인 *Flexibasler maritimus*의 경우에는 연쇄구균보다는 열에 강하였지만 에드워드균보다 상대적으로 열에 약함을 나타내었다 (Fig. 1-2D). 즉, 40℃ 가온 처리 4시간 째에는 약 80% 이상 생존하였으며, 10시간 처리하여도 약 70% 이상의 상대적으로 높은 생존률을 보여주었다. 하지만 50℃에서는 2시간 처리 하였을 때 약 10%의 생존률을 보였으며 10시간까지 처리하였을 경우에도 완전 사멸되지는 않았다. 가온 처리조건을 60℃로 올렸을 경우에 6시간 처리에서 100%의 사멸률을 보였고, 70℃ 조건에서는 처리 2시간 때부터 100%의 사멸률을 나타내었다.

비브리오균의 경우 2종류 중 *Vibrio alginolyticus*가 *V. anguillaru*m보다 훨씬 열에 안정함을 알 수 있었다 (Fig. 1-2E,F). 즉, *V. alginolyticu*s의 경우에는 40℃의 가온조건에서는 6시간 열처리할 때까지 100% 생존하였으며 그 이후 사멸하기 시작하여 10시간 처리하였을 경우에 약 30%의 생존률을 기록하였다. 50℃의 가온조건에서도 2시간 처리하였을 경우에 약 30%의 생존률을 보였으며 10시간 처리하였을 경우에도 100% 사멸되지는 않았다. 60℃ 가온 처리하였을 경우에는 가온처리 10시간에 비로서 100%의 사멸을 보였으며, 70℃ 이상의 고열처리에

서는 처리 2시간에서 100%의 사멸률을 나타내었다 (Fig. 1-2E). 한편, *V. anguillarum*의 경우에는 40℃의 가온처리 조건에서 2시간 처리하였을 경우에 80%, 4시간 처리하였을 경우에 70%, 6시간 처리 하였을 때 약 40%, 그리고 10시간 처리하였을 경우에 약 20%의 생존률을 보였다. 하지만 50℃ 이상에서 열처리 2시간 이내에 100%의 사멸률을 보여 *V. alginolyticus*보다 훨씬 열에 약하다는 사실을 보였다.

양식 넙치의 가온 처리에 따른 사멸효과는 대부분 50℃의 가온처리 조건에서 급격한 사멸률을 나타내었으며 60~70℃의 다소 높은 열처리 조건에서는 대부분 처리 2시간 이내에 100% 사멸하는 것을 보여 양식장 부산물의 어분 제조를 위한 고온발효처리시 내부 온도가 90℃로 유지될 경우 발효공정 2시간 이내에 모든 어병세균들이 100% 사멸될 것으로 판단된다.

3. 고속발효 건조기에서 양식장 부산물로부터 발효어분 제조를 위한 최적발효 조건 규명 및 제조된 어분의 일반성분 함량

고속발효 건조기에서 폐사어로부터 발효어분의 제조를 위한 최적발효 조건의 검토에서 먼저 양식장 부산물 24 kg과 감귤박 (citrus peel) 2.5 kg을 혼합한 후 수분조정제인 미강을 5, 10, 15, 20 kg을 각각 혼합하였을 때 생산량과 고속발효 건조장치의 작업시간을 측정하여 Fig. 3에 나타내었다. 이때 사용한 고온 발효균은 양식장 부산물, 감귤박 및 미강을 혼합한 총 투입량에 10,000:1의 비율로 첨가하였다. 미강의 첨가량이 증가할 수록 생산률은 비례적인 증가를 보였다. 즉, 미강 5 kg을 첨가하였을 때는 약 35%의 생산량을 보이던 것이 20 kg을 첨가하였을 때에는 약 47%로 증가하여 12%의 생산량 증가를 보였다. 그리고 고온발효 건조장치의 작업시간도 미강 5 kg 투입하였을 때 약 9시간 이상 걸리던 것이 미강 10 kg 이상 투입하였을 때에는 5시간 정도의 작업시간을 보여 작업시간을 약 4시간 절약할 수 있었다. 고온발효 건조공정에서 양식장 부산물 24 kg과 감귤박 2.5 kg을 혼합하여 어분을 제조할 경우에 수분조정제로 작용하는 미강이 최소한 10 kg 이상 혼합하여야만 효과적이라는 사실을 알아내었다.

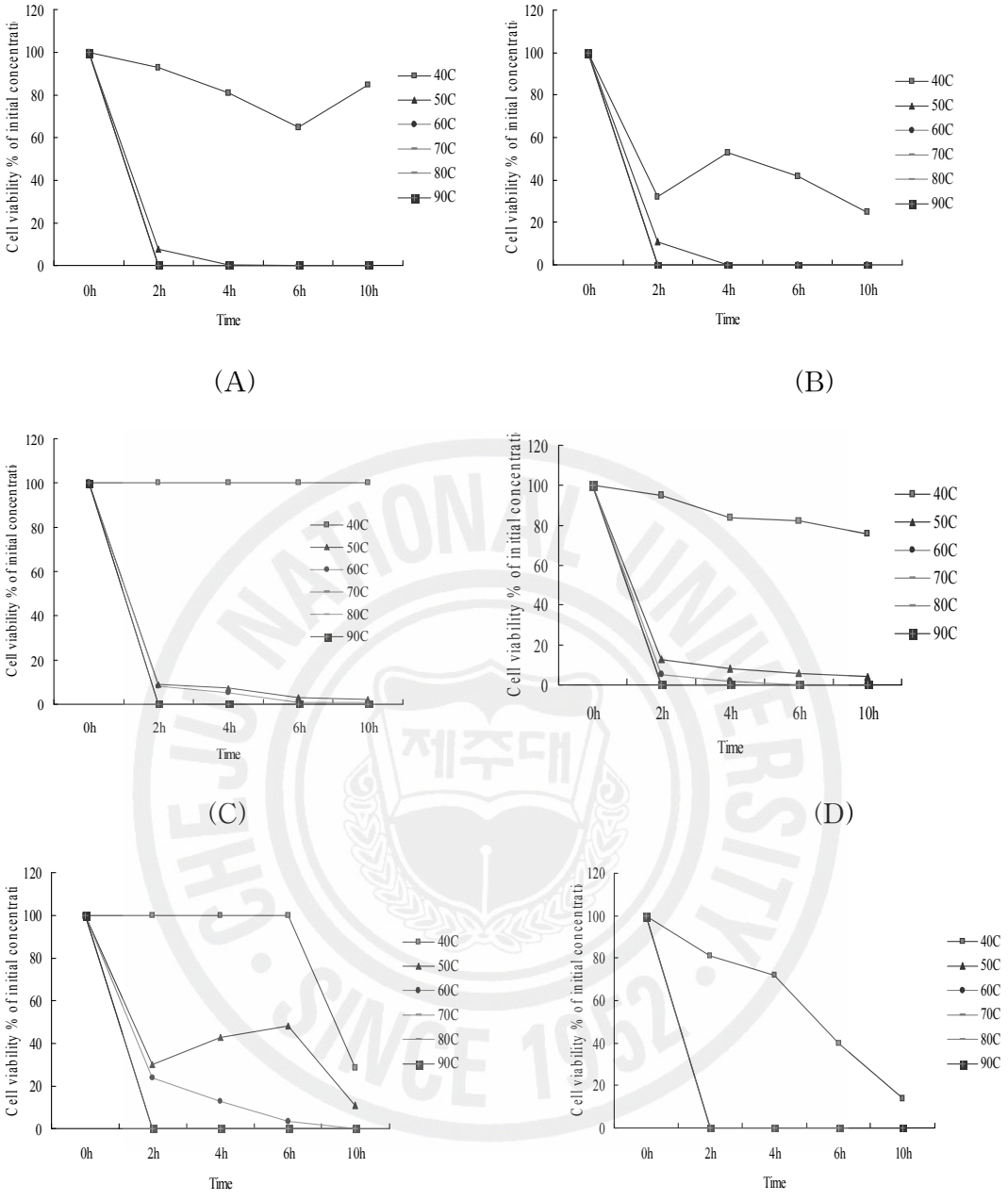


Fig. 1-2. The heat treatment against pathogen was monitored at 40, 50, 60, 70, 80 and 90℃ for 10 h. MTT assay was used to assess the viability of the bacterial cells (*Streptococcus iniae* (A), *Streptococcus parauberis* (B), *Edwardsiella tarda* (C), *Flexibasler maritimus* (D), *Vibrio alginolyticus* (E) and *Vibrio anguillarum* (F)).

양식장 부산물 유래 발효어분의 제조 시 수분조정제로 사용된 미강의 첨가량에 따라 달리 제조되었을 때의 일반성분의 함량을 분석하여 Table 1-4에 나타내었다. 발효어분의 수분함량은 대체적으로 5% 미만으로 함수량이 매우 낮다는 것을 알 수 있었다. 또한 어분의 가장 중요한 성분인 조단백질 함량은 미강의 첨가량이 증가할 수록 감소하였다. 즉, 양식장 부산물 24 kg에 수분조정제인 미강을 5 kg 첨가하였을 경우에 조단백질 함량은 약 42.2%로 가장 높게 나타났으며, 미강의 첨가량이 20 kg 일 때에는 조단백질 함량이 27%로 가장 낮았다. 그 이유는 수분조정제로 사용된 미강의 주 성분은 대부분 탄수화물이기 때문에 미강의 첨가량이 증가할 수록 단백질의 함량은 감소하고 반면에 탄수화물의 함량은 증가한 것이다. 전체적으로 단백질의 함량은 어분으로 사용하기에는 다소 낮은 것으로 판단되며 어분으로서의 이용을 위해서는 대두박과 같은 단백질원의 혼합이 이루어지거나, 수분 함량을 더욱 고려하여 발효 어분 자체의 단백질 함량을 높이는 일이 앞으로의 숙제이다. 그리고 지질의 함량은 대체적으로 20~25% 내외로 비교적 높은 것으로 나타났다. 앞의 결과 Table 1-3에서 볼 수 있듯이 양식장 부산물인 넙치의 지질 함량은 건조중량으로 5% 미만인 것으로 나타났다. 이와 같은 지질의 함량이 매우 낮은 넙치를 발효 가공함으로써 지질의 함량이 높아진 것은 차후 검토해 보아야 할 것으로 판단된다.

고속발효 건조창치에서 양식장 부산물 유래 발효어분 제조시 어분의 기능성을 향상시키기 위하여 첨가한 감귤박의 양을 증가시킴으로서 발효어분의 생산량과 총 작업시간을 검토하여 Fig. 1-4에 나타내었다. 감귤박 첨가량은 양식장 부산물 24 kg과 미강 15 kg 혼합 기질에 0, 1.0, 2.5, 5.0 및 10.0 kg이었다. Fig. 4에서 보는 것과 같이 감귤박을 첨가하지 않았을 경우에 생산효율이 약 45%이었으나 감귤박을 첨가하게 되면 생산량은 약 40%로 약 5% 정도 감소하였다. 그리고 감귤박의 첨가량이 증가하여도 생산량은 크게 차이가 나지 않았으며 다만 발효공정의 작업시간은 증가하였다. 발효공정의 시간이 길어진 것은 감귤박이 수분을 약 90% 이상 함유하고 있기 때문에 전체적으로 함수량이 증가하게 되어 발효공정을 완료하여 건조된 발효어분을 생산하는데 시간이 좀 더 오래 걸리게 된 것이다.

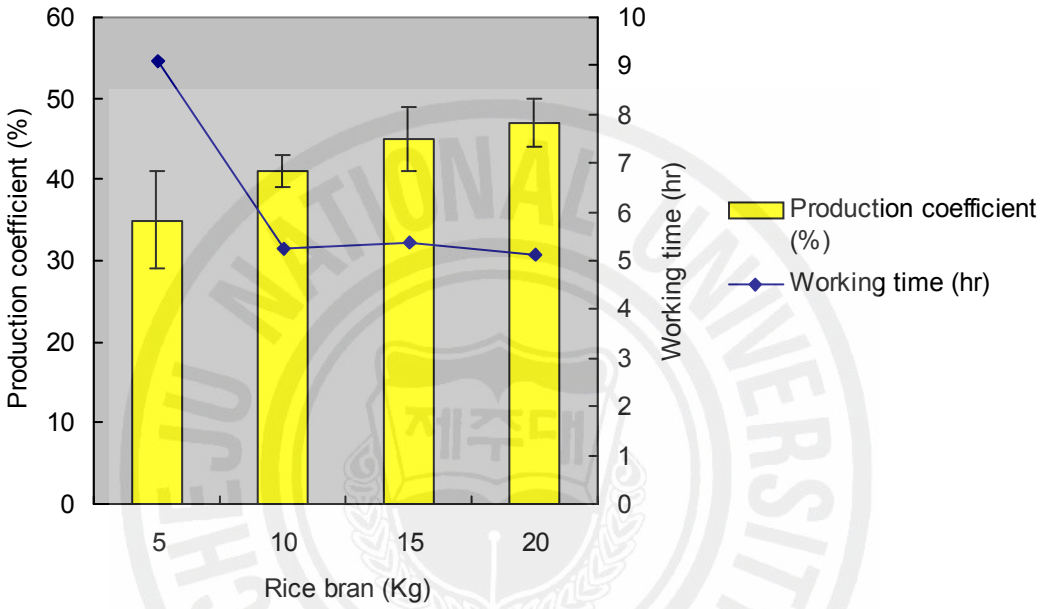


Fig. 1-3. The production rate of fish meals according to the added rice bran amount in the Biofeeder BF-30 fermentor.

Table 1-4. Approximate chemical compositions of fermented fish meals from dead flounder fishes as a function of the added rice bran amount.

Added Rice bran amount	Moisture	Crude protein	Crude lipid	Crude ash	Crude carbohydrate
5	3.0	42.2	21.5	7.8	25.5
10	4.6	34.0	24.0	8.5	28.9
15	4.3	30.3	22.5	8.7	34.1
20	2.7	27.0	21.5	9.1	39.7

JEJU NATIONAL UNIVERSITY · SINCE 1952 · 제주대

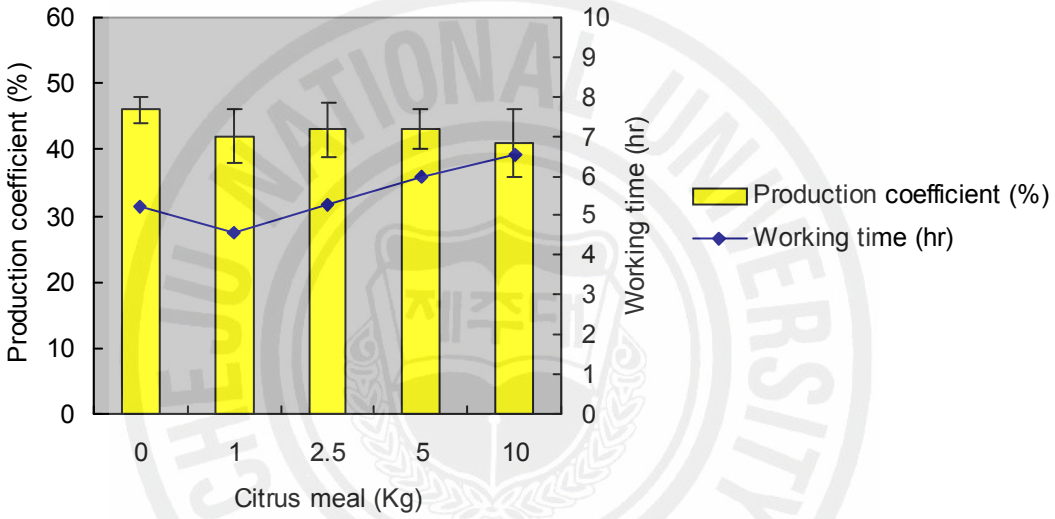


Fig. 1-4. The production rate of fish meals according to the added citrus meal amount in the Biofeeder BF-30 fermentor.

감귤박의 첨가량에 따른 발효어분의 일반성분의 변화를 검토하여 Table 1-5에 나타내었다. 발효어분의 일반성분은 감귤박의 첨가량에 따라 차이는 유의적으로 나타나지 않았다. 즉, 수분의 함량은 2.3~2.9%, 조단백질의 함량은 약 30% 내외, 그리고 조회분의 함량도 약 9% 정도로 거의 유사한 결과를 나타내었다. 다만 지질의 함량은 감귤박을 10.0% 첨가하였을 때 약 5% 정도 낮게 나타났고, 대신 조탄수화물의 함량은 약 7% 높게 나타났다. Table 1-3에 나타난 것처럼 감귤박의 전체 함량 중 수분이 차지하는 것이 90% 이상이기 때문에 발효어분에 대한 특별한 성분 변화 차이는 없을 것으로 판단되며 다만 감귤박의 껍질 부분은 대부분 펙틴 (pectin)이라는 탄수화물이기 때문에 발효어분의 조탄수화물의 함량은 첨가량이 가장 높은 10.0% 일때 약간 높게 나타났다.

양식장 부산물로부터 발효어분의 제조시 사용되는 생균 발효제를 양식장 부산물과 미강 및 감귤박을 혼합하였을 때의 총 투여량에 10,000:0.5, 10,000:1, 10,000:2 및 10,000:4의 비율로 각각 혼합하였을 때 생산량과 발효 공정시간을 검토하여 Fig. 5에 나타내었다. 생산량은 10,000:0.5의 비율로 발효균을 첨가하였을 때가 가장 낮은 약 40% 정도였으며, 생균제의 첨가량이 증가할 수록 생산량은 비례적으로 증가를 보여 10,000:4의 비율일 때가 약 49%로 가장 높은 생산량을 보였다. 본 실험의 결과로 보면 발효균의 첨가량을 증가시켰을 때 생산량의 증가를 보이는 것은 명확하지만 유의적으로 큰 차이는 없었으며, 발효어분의 제조에 소요되는 총 발효공정 작업시간에도 큰 변화가 없었다. 따라서 양식장 부산물 24 kg, 미강 15 kg, 그리고 감귤박 2.5 kg을 혼합하여 발효어분을 제조할 때 사용되는 발효균의 첨가량은 10,000:1 혹은 2, 즉 4.15 g 혹은 8.3 g 정도가 알맞은 것을 알 수 있다. 이러한 경우에 일반성분의 함량을 분석하여 Table 1-6에 나타내었다. Table 1-6의 결과에 따르면 모든 일반성분의 함량은 발효균의 첨가량에 따른 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. 따라서 발효균의 첨가량은 양식장 부산물로부터 발효어분의 제조에서는 큰 차이를 나타내지 않았으며, 다만 생산량에서만 첨가된 발효균의 양이 증가할수록 약간 증가하는 것을 알 수 있었다.

Table 1-5. Approximate chemical compositions of fermented fish meals from dead flounder fishes as a function of the added citrus meal amount.

Added citrus meal amount	Moisture	Crude protein	Crude lipid	Crude ash	Crude carbohydrate
0	2.5	30.9	23.0	8.6	34.9
1.0	2.9	31.1	22.5	9.0	34.5
2.5	2.5	30.2	23.5	9.2	34.6
5.0	2.1	30.7	23.0	9.0	35.3
10.0	2.3	29.6	17.1	8.8	42.3

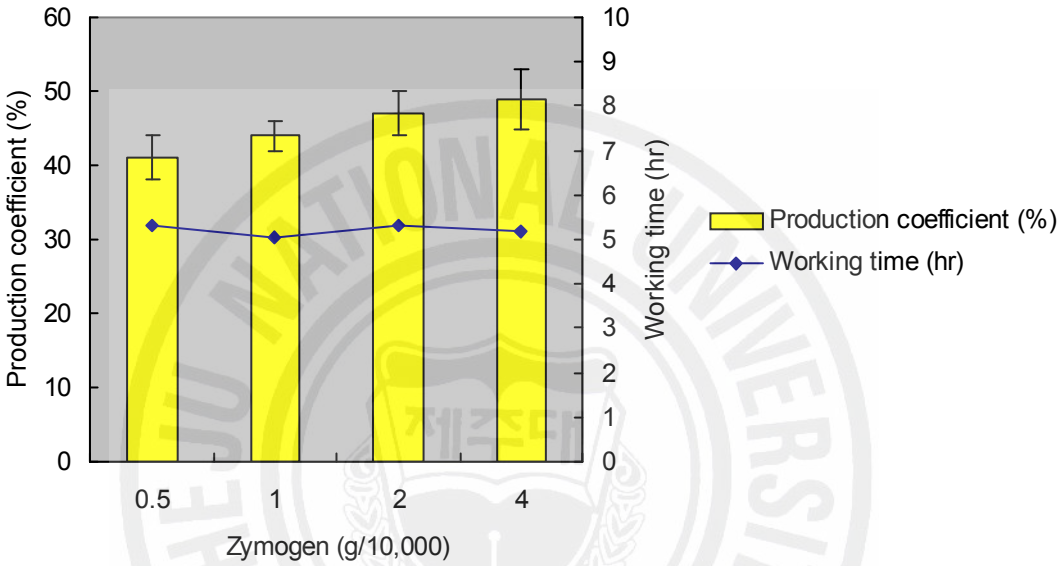


Fig. 1-5. The production rate of fish meals according to the added zymogen amount in the Biofeeder BF-30 fermentor.

Table 1-6. Approximate chemical compositions of fermented fish meals from dead flounder fishes as a function of the increased zymogen amount.

Added zymogen amount (g/10,000)	Moisture	Crude protein	Crude lipid	Crude ash	Crude carbohydrate
0.5	1.1	31.4	20.5	8.9	38.2
1.0	1.5	30.7	19.3	8.9	39.6
2.0	2.5	32.2	17.3	8.7	39.2
4.0	2.7	30.8	19.5	9.0	38.0

4. 양식장 부산물 유래 발효어분의 기능성

양식장 부산물 유래 발효어분은 기본적으로 양식장 부산물과 발효균의 활성화를 위한 수분조정제로서 미강을 이용하여 제조할 수 있다. 본 실험에서는 제주도에서 매년 다량으로 생산되고 있는 감귤쥬스 부산물인 감귤박을 첨가하여 발효어분의 기능을 강화시켰다. 또한 감귤박을 건조시켜 만든 감귤박 건조물을 미강을 대신하여 발효어분 제조시 수분조정제로서의 역할 뿐만 아니라 어분의 기능성을 강화할 목적으로 이용하였다. 즉, 양식장 부산물과 건조 감귤박을 발효시켜 만든 발효어분 (FFM with dried citrus meal)을 제조하여 발효어분에 대하여 항산화 활성 중 DPPH 자유 라디칼 소거활성 및 활성 산소종인 hydrogen peroxide (H_2O_2)의 소거활성을 감귤박이 함유되지 않은 발효어분 (FFM without citrus meal)과 비교하여 검증하였다. 어분의 항산화 활성의 측정을 위해 수용성 추출물 및 메탄올 추출물을 각각 제조하여 검토하였다.

가. DPPH free radical 소거활성

Fig. 1-6은 감귤박을 첨가한 발효어분의 DPPH free radical 소거활성을 나타낸 결과이다. 전반적으로 MeOH 추출물이 수용성 추출물보다 라디칼 소거활성이 높게 나타났으며 추출물의 농도가 2 mg/ml 이상일 때는 두 추출물 모두 50% 이상의 소거율을 보였으며, 추출물의 농도가 4 mg/ml 일 때는 수용성과 메탄올 추출물에서 각각 약 80%와 90%의 소거율을 나타내었다. 한편, 감귤박을 첨가하지 않고 동일한 조건으로 공정한 발효어분에서는 DPPH free radical 소거활성이 전 농도에서 8% 미만으로 나타나 그림에는 나타내지 않았다.

나. Hydrogen peroxide 소거활성

Hydrogen peroxide 소거활성에서도 DPPH free radical 소거활성과 마찬가지로 메탄올 추출물의 활성이 수용성 추출물보다 높게 나타났으며 시료의 농도가 증가할 수록 소거율도 증가하였다. 특히, 시료의 농도가 4 mg/ml 일 때 약 80% 이상의

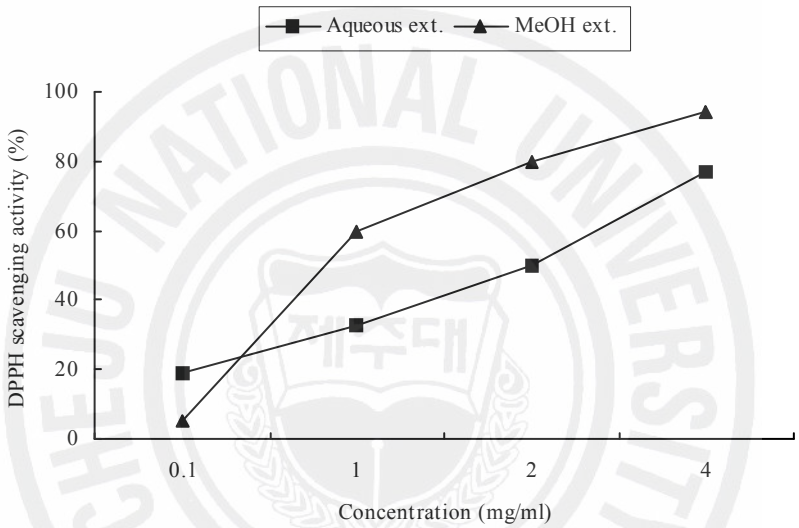


Fig. 1-6. DPPH free radical scavenging effects of aqueous and methanol extracts from the fermented fish meals with citrus.

높은 소거활성을 나타내었다. Hydrogen peroxide 소거활성도 감귤박을 첨가하지 않고 동일한 조건으로 공정한 발효어분에서 소거활성을 거의 보이지 않아 그림에는 나타내지 않았다 (Fig. 1-7). 이와 같은 결과는, 수분조정제인 미강 대신에 감귤박만을 이용하여 발효어분을 제조할 경우 감귤박에 함유되어 있는 기능성 물질의 함유량이 비교적 높을 수가 있으며 특히 항산화 활성이 높은 것으로 알려진 Vitamin C나 flavonoid 화합물에 의한 영향으로 사료된다.

다. 감귤박 첨가한 발효어분의 DNA damage 보호 효과

생리활성을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있는데, 유전 독성 억제 효과를 알아보는 방법으로 세포 DNA의 손상을 측정하는 방법이 최근 널리 쓰이고 있다. 체내에서 자유유리기 (free radical)와 항산화물질 (antioxidant)간의 균형이 깨져 free radical 생성이 antioxidant보다 많아지면 신체는 산화적 stress를 받게 되고, 그 결과 DNA와 같은 민감한 biomolecule이 손상되어 결국은 퇴행성 만성질환으로 발전될 가능성이 높아진다. 특히, 활성 산화 물질 (ROS)이 과도하게 존재할 때 이들은 더욱 파괴적이고 비가역적인 DNA 손상을 일으키며, 이것이 원인이 되어 mutagenesis를 초래하고 나아가 암으로까지 발전할 수 있게 된다. 따라서 본 실험에서는 세포의 DNA 손상을 측정하는 방법으로 comet assay를 이용하여 발효어분 추출물이 갖는 DNA 손상 억제활성을 분석하였다. 이 방법의 이론은 근본적으로 분자량에 따라 그 이동속도가 반비례되는 전기영동의 원리에 기초하고 있다. 즉 DNA 손상을 입은 세포를 lysis시켜 핵만 남긴 후 전기영동을 하게되면 DNA 분자량의 크기가 작을 수록 핵으로부터 멀리 이동되므로 손상되어 잘려진 DNA 가닥이 많을수록 혜성 꼬리처럼 긴 모양이 생긴다.

앞에서 제조한 양식장 부산물 유래 발효 어분 추출물을 가지고 human lukemia 세포인 U937과 넙치의 lymphocyte에 대한 DNA 손상 보호 효과를 Fig. 1-8~1-13에 나타내었다. U937 cell에서는 citrus meal을 첨가한 발효어분 추출물을 처리한 실험구에서는 농도가 증가 할수록 DNA 손상 보호효과가 증가하였고 H_2O_2를 처리한 대조구 (positive control)의 세포는 tail movement가 약 41% 정도 일어났으나, citrus meal을 첨가한 발효어분 추출물을 10 μg/ml을 처리하였

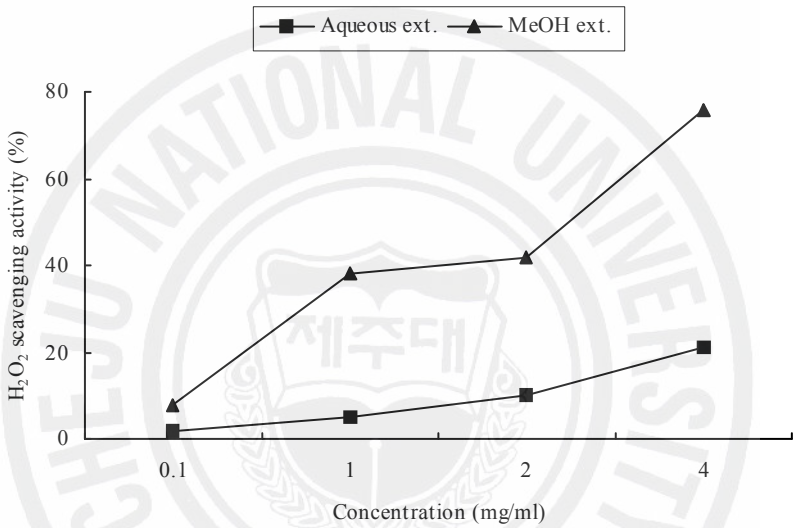


Fig. 1-7. Hydrogen peroxide (H_2O_2) scavenging effects of aqueous and methanol extracts from the fermented fish meals. The left is the results by the both extracts from the fermented fish meal prepared with moist citrus meal, and the right is with dried citrus meal.

을 때는 tail movement 값이 약 30%로 감소한 것을 확인 할 수 있었다. 또한 100 μg/ml 농도의 추출물을 처리하였을 때는 80%의 DNA 보호효과를 확인 할 수 있었다 (Fig. 1-8). 그러나, citrus meal이 첨가되지 않은 발효 어분 추출물을 처리한 세포에서는 DNA 손상 보호 효과가 거의 나타나지 않았다 (Fig. 1-9).

한편, Citrus peel을 첨가한 발효 어분 추출물을 처리한 넙치의 lymphocyte에서는 10 μg/ml 과 50 μg/ml의 농도를 처리 했을 때는 보호효과가 나타나지 않았으나 추출물의 농도가 100 μg/ml의 농도에서는 약 60%의 DNA 보호 효과 (Fig. 1-11)를 나타 낸 반면, citrus peel이 첨가되지 않은 발효어분의 추출물을 처리한 어류의 lymphocyte는 추출물의 농도와 상관없이 DNA 손상이 80% 이상 일어나 (Fig. 1-12), 넙치의 lymphocyte에서도 human lukemia cell과 유사한 결과를 나타내었다 (Fig. 1-11, Fig. 1-12). Fig. 1-10과 Fig. 1-13은 이러한 결과를 한눈에 볼 수 있는 사진으로, 아무 손상도 받지 않은 A에 비해 과산화수소에 의해 손상을 받은 B에서는 대부분의 DNA가 손상되어 형태가 흐트러진 것을 확인 할 수 있다. 그러나 감귤박을 첨가한 발효 어분 추출물을 농도별로 처리해 주었을 때는 농도에 의존적으로 DNA의 손상이 억제되는 것을 확인할 수 있었고, 본 실험은 발효 어분을 추출하여 사용한 것으로 그 안에 존재하는 bio active compounds를 완전하게 용출되지는 않았다고 생각되며, 이는 직접 본 연구를 통해 제조된 발효 어분을 직접 섭취하면 더 긍적적인 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과에서 양식장 부산물로부터 발효어분의 제조시 감귤박을 사용하게 되면 제주지역에 매년 약 3만~5만톤 가량 생산되고 있는 감귤박 이용한 기능성 어분의 생산이 가능할 것으로 판단되며, 특히 감귤박을 건조시켜 미강 대신에 수분조정제로 이용할 경우 오로지 양식장 부산물과 건조 감귤박 만을 사용하기 때문에 제조 공정이 간단할 뿐만 아니라 제조단가도 낮출 수 있으며, 어분의 기능 또한 매우 우수할 것으로 판단되어 양식장 부산물 혹은 수산가공부산물로부터 기능성 발효어분의 제조가 충분히 가능할 것으로 사료된다.

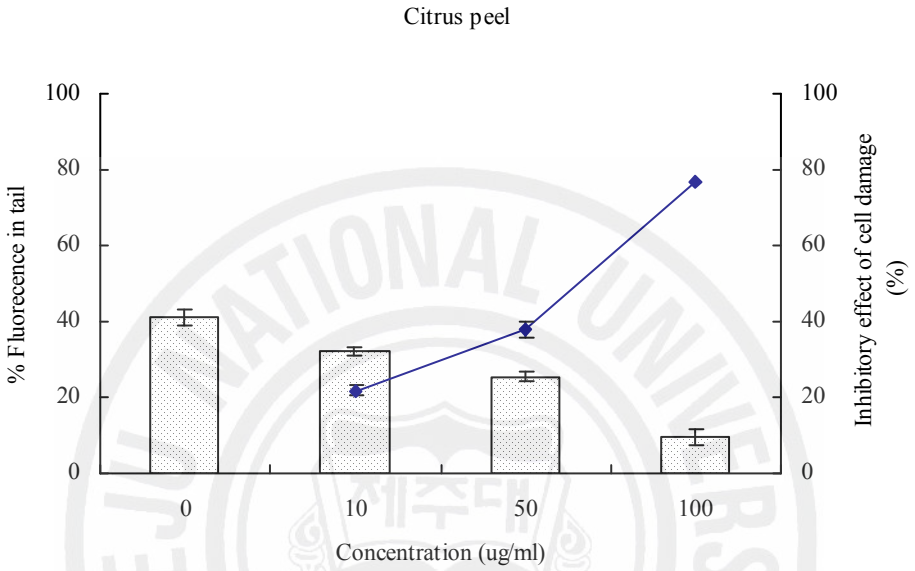


Fig. 1-8. The effect of supplementation *in vitro* with different concentrations of FFM (fermented fish meal) prepared with citrus peel extracts on DNA damage of H_2O_2-induced U937 cell. Values are means with standard error of duplicate experiments (bar represented % Fluorescence in tail and leaner represented Inhibitory effect of cell damage).

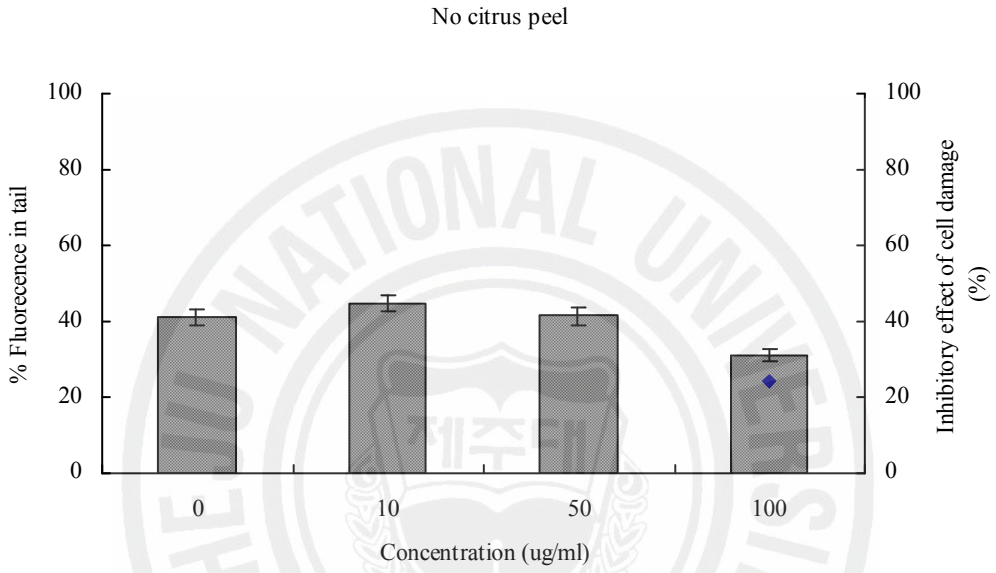


Fig. 1-9. The effect of supplementation *in vitro* with different concentrations of FFM (fermented fish meal) prepared without citrus peel extracts on DNA damage of H_2O_2-induced U937 cell. Values are means with standard errors of duplicate experiments (bar represented % Fluorescence in tail and leaner represented Inhibitory effect of cell damage).

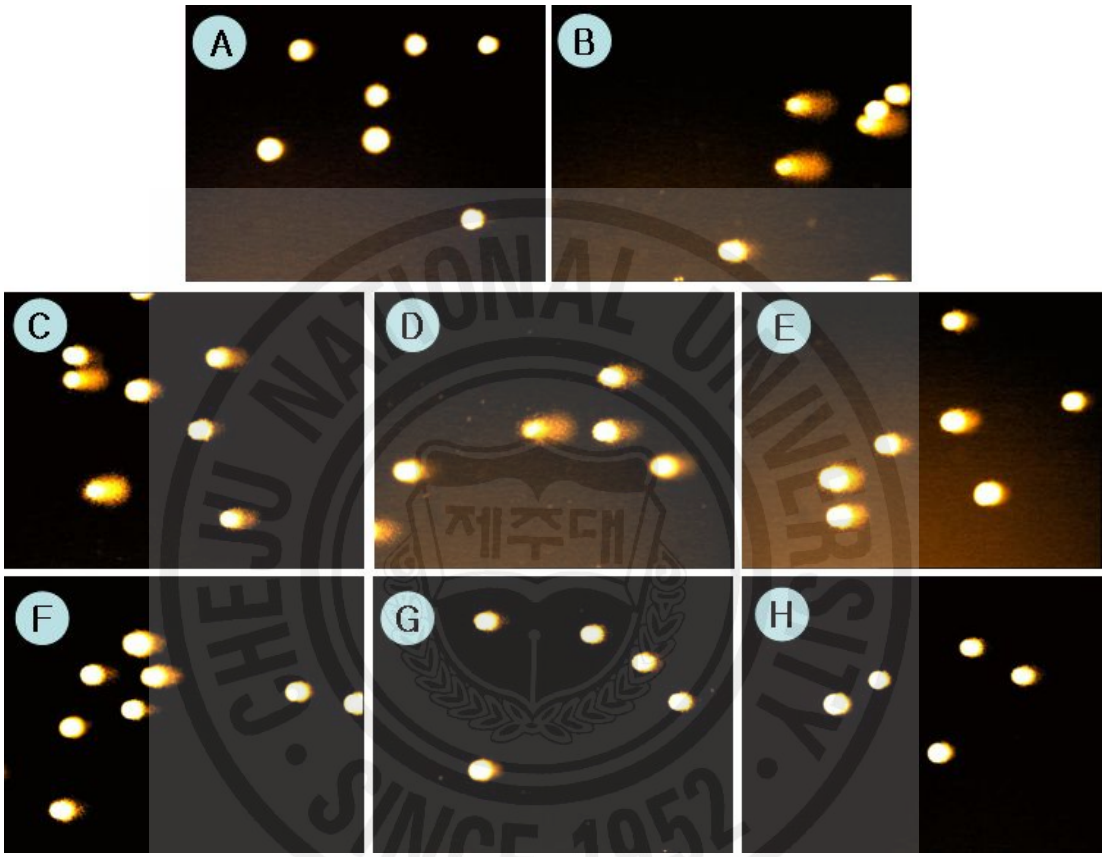


Fig. 1-10. Comet images of U937 cells: (a) Negative control, (b) Positive control (50 uM H_2O_2), (c, f) Treated sample (10 μg/ml), (d, g) Treated sample (50 μg/ml), (e, h) Treated sample (100 μg/ml), (c, d, f) citrus peel, (f, g, h) no citrus peel.

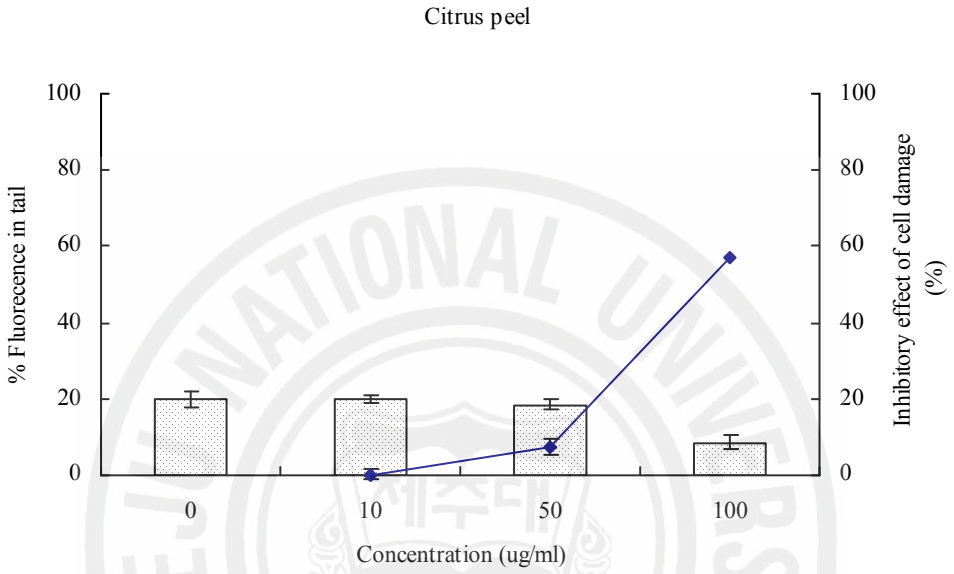


Fig. 1-11. The effect of supplementation *in vitro* with different concentrations of FFM (fermented fish meal) prepared with citrus peel extracts on DNA damage of H_2O_2-induced flounder lymphocyte cell. Values are means with standard errors of duplicate experiments (bar represented % Fluorescence in tail and leaner represented inhibitory effect of cell damage).

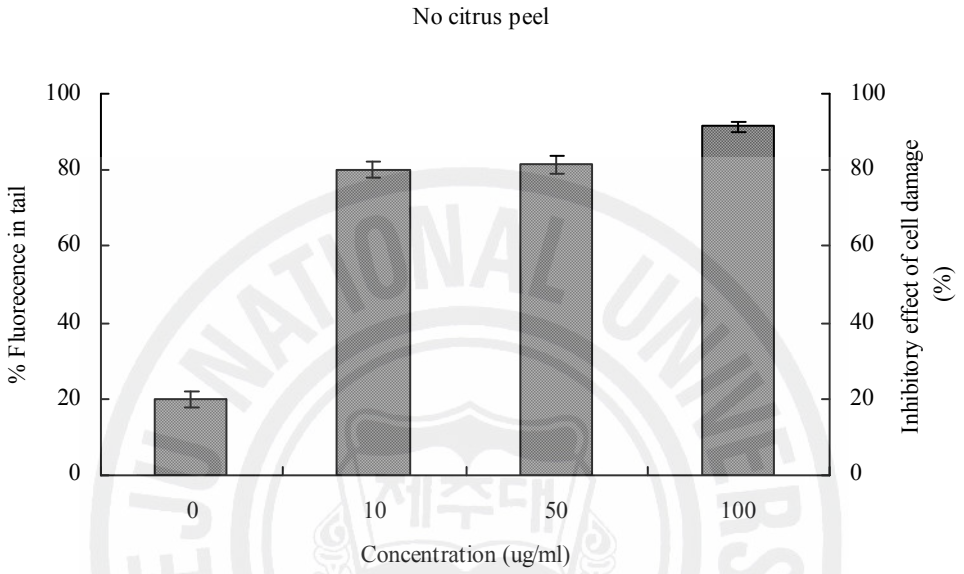


Fig. 1-12 The effect of supplementation in vitro with different concentrations of FFM (fermented fish meal) prepared without citrus peel extracts on DNA damage of H_2O_2-induced flounder lymphocyte cell. Values are meals with standard errors of duplicate experiments (bar represented % Fluorescence in tail and leaner represented inhibitory effect of cell damage).

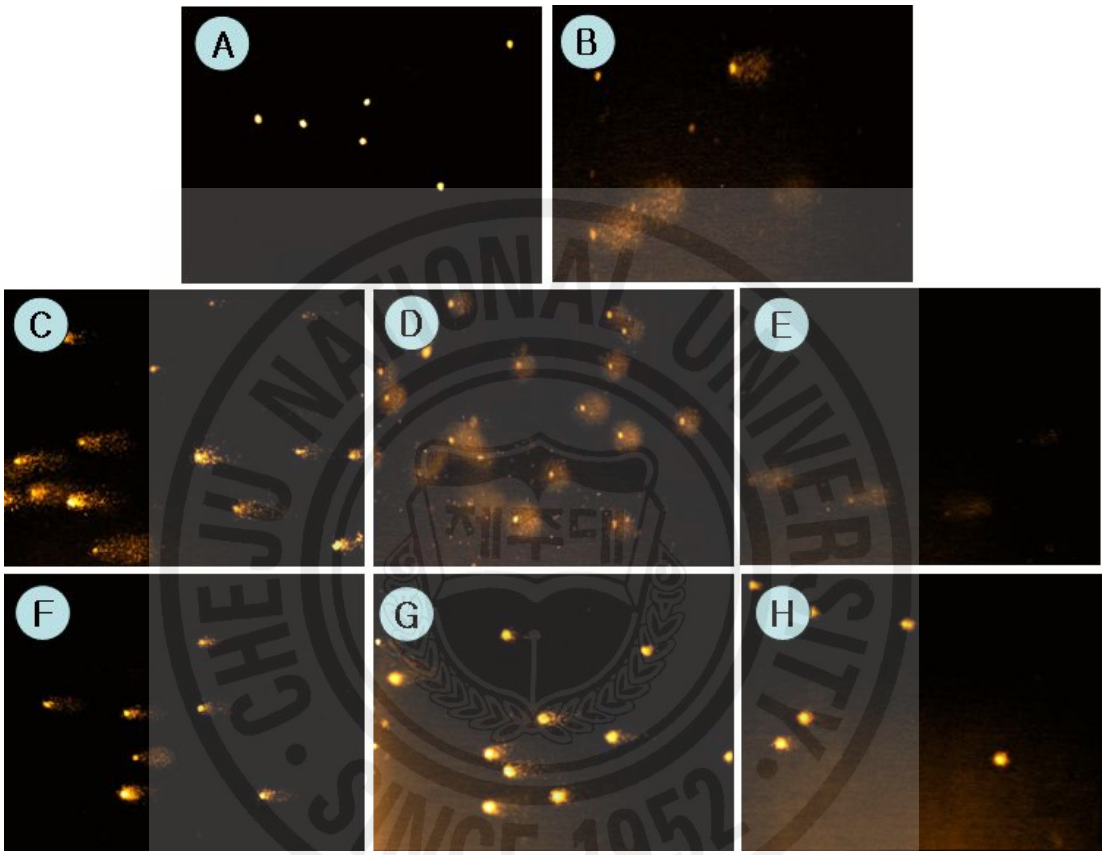


Fig. 1-13. Comet images of flounder lymphocyte: (a) Negative control, (b) Positi-ve control (50 μM H_2O_2), (c, f) Treated sample (10 μg/ml), (d, g) Treated sample (50 μg/ml), (e, h) Treated sample (100 μg/ml), (c, d, f) citrus peel, (f, g, h) no citrus peel.

5. 양식장 부산물 유래 발효어분의 품질 안전성

양식장 부산물로부터 분리한 *Streptococcus iniae, Streptococcus parauberis, Edwardsiella tarda* 및 *Flexibacter maritimus* 등의 각 균주에 대하여 Table 1-7에 나타낸 것과 마찬가지로 생화학적 성상을 통화여 동정하여 확인하였다.

그리고 각 분리균주의 동정을 위한 m-PCR 수행 결과를 Fig. 1-14에 나타내었다. PCR 방법을 이용한 분리균주의 분자생물학적 동정결과 각각 *S. iniae, S. parauberis, E. tarda, F. maritimus*로 각각 동정하였다

양식장 부산물로부터 각각의 어병 원인세균을 분리하여 확인한 후 발효어분의 제조를 위한 시료로 사용하기 위해 발효어분을 제조하기 전에 양식장 부산물로부터 어병세균의 감염 생균수를 확인하였다. 즉, 양식장 부산물 시료 1 g 당 *S. iniae*는 8.3×10^{7} cfu, *S. parauberis*는 4×10^{7} cfu, *E. tarda*는 2.4×10^{5} cfu 및 *F. maritimus*는 1.1×10^{6} cfu이었다. 각각의 어병 세균에 의해 감염된 양식장 부산물로부터 어병세균 감염수를 확인한 후 발효어분의 제조를 위한 시료를 사용하여 발효어분을 제조한 후 m-PCR을 통하여 세균의 잔존 여부를 확인하여 Fig. 1-15에 나타내었다. Fig. 1-15에서의 m-PCR 결과 어병세균으로 감염된 양식장 부산물로부터 제조된 발효어분에서는 각각의 어병 원인 세균에 대한 유전자증폭은 이루어지지 않아 발효공정 과정을 거치는 동안에 어병 세균은 완전히 사멸된 것으로 판단되어 진다.

Table 1-7. Biochemical characteristics of the isolated from bacteria strains

Characteristics	Isolated strains			
	S. iniae	*S. parauberis*	*E. tarda*	*F. maritimus*
Gram stain	+	+	−	−
Oxidase test	−	−	−	+
Catalase test	−	−	+	+
Growth at BHIA	+	+	+	NT
Growth at SS	−	−	+, H_2S	NT
Growth at TCBS	−	−	−	NT
Hsu-Shotts medium	NT	NT	NT	+, yellow pigment

1 2 3 4 5 6

Fig. 1-14. PCR results of the isolated bacteria strains Lane 1, DNA marker(100 bp); lane 2, *S. parauberis* (718 bp) ; lane 3, *S. iniae* (870 bp) ; lane 4, *F. maritimus* (686 bp) ; lane 5, *E. tarda* (786 bp) ; lane 6, DNA marker (100 bp)

양식장 부산물 (dead fish) 4종의 어병세균 (*S. iniae, S. parauberis, E. tarda* 및 *F. maritimus*)을 각각 분리 배양하여 인위적으로 약 5×10^7 cfu/g을 첨가하여 1시간 방치한 후 고속발효 건조장치에서 발효어분의 제조하여 어병의 감염여부를 콜로니 카운터법으로 검토하여 Table 1-8에 나타내었다. Table 1-8에 나타난 결과에서 보면 제조된 양식장 부산물 유래 발효어분으로부터 일정량의 시료를 채취하여 추출 (1%되도록)한 후 10배 및 1000배로 희석하였을 때는 전혀 세균이 성장하지 않은 것을 알 수 있었다. 그러나 추출한 원액을 희석하지 않고 한천평판배지에 배양하였을 때는 약간의 세균의 성장이 나타났다. 이것은 Fig. 1-16에서 보는 것과 같이 추출물 원액을 여과하였을 때 일부 콜로니가 성장하고 있음을 보여주었다. Fig. 1-16의 왼쪽 그림에서 보는 것과 같이 추출물 원액을 배양한 petri dish에서 DNA를 추출하여 PCR법으로 인위적으로 감염된 세균인지를 확인하여 Fig. 1-17에 나타내었다. PCR 결과 원액을 배양하였을 때 발견된 세균은 인위적으로 첨가한 4종의 어병 세균들이 아니라 제조과정에서 일부 혼입된 다른 세균이라는 것을 확인 할 수 있었다. 비록 양식장 부산물 유래 발효어분의 추출물 원액으로부터 일부의 세균이 발견되었지만 이것은 어병 세균은 아닌 것으로 확인되어 본 연구에서 고온발효 건조 장치를 이용하여 제조한 양식장 부산물 유래 발효어분은 어병 세균의 감염이 없는 매우 안전한 제품 (safety product)이라는 것이 확인 할 수 있었으며, 공정과정에서의 세균 유입을 억제만 하면 완전한 제품을 생산할 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 종합적인 결과로 볼 때, 고속발효 건조장치를 이용항 어병세균의 감염으로부터 죽은 양식장 부산물을 이용하여 수분조정제로 미강과 기능성 어분의 제조를 위한 첨가제로서 감귤박을 혼합하여 발효어분의 제조가 가능하며 제조된 발효어분은 free radical, H_2O_2의 소거활성 등의 우수한 항산화 효과를 보였으며, 어류 lymphocyte 및 human cell 모두에서 우수한 DNA 보호효과를 나타내었다. 또한 제조된 발효어분은 어병 세균의 감염이 전혀 없는 제품이라고 할 수 있다.

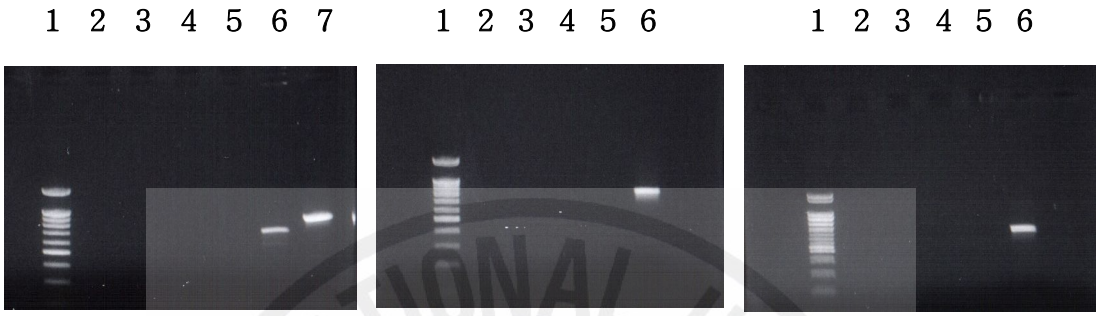


Fig. 1-15. PCR results for the identification of the respective infectious bacteria from the fermented fish meals. A-lane 1, size marker (100 bp); A-lane 2, sample 1; A-lane 3, sample 2; A-lane 4, sample 3; A-lane 5, sample 4; A-lane 6, *S. parauberis* (718 bp); A-lane 7, *S. iniae* (870 bp) [sample 1 and 2, *S. parauberis* infectious dead fishes; sample 3 and 4, *S. iniae* infectious dead fishes]; B-lane 1, size marker (100 bp); B-lane 2, sample 1; B-lane 3, sample 2; B-lane 4, sample 3; B-lane 5, sample 4; B-lane 6, *E. tarda* (686 bp) [sample 1,2,3 and 4, *E. tarda* infectious dead fishes], C-lane 1, size marker (100 bp); C-lane 2, sample 1; C-lane 3, sample 2; C-lane 4, sample 3; C-lane 5, sample 4; C-lane 6, *F. maritimus* (786 bp) [sample 1,2,3 and 4, *F. maritimus* infectious dead fishes]

Table 1-8. The number of colony from the fermented fish meals

Dilution folds	NO. of colony in each medium					
	PCA			MA		
1	10	16	12	8	12	ND
10^1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10^3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SUM.	76.7 CFU/g			67.7 CFU/g		

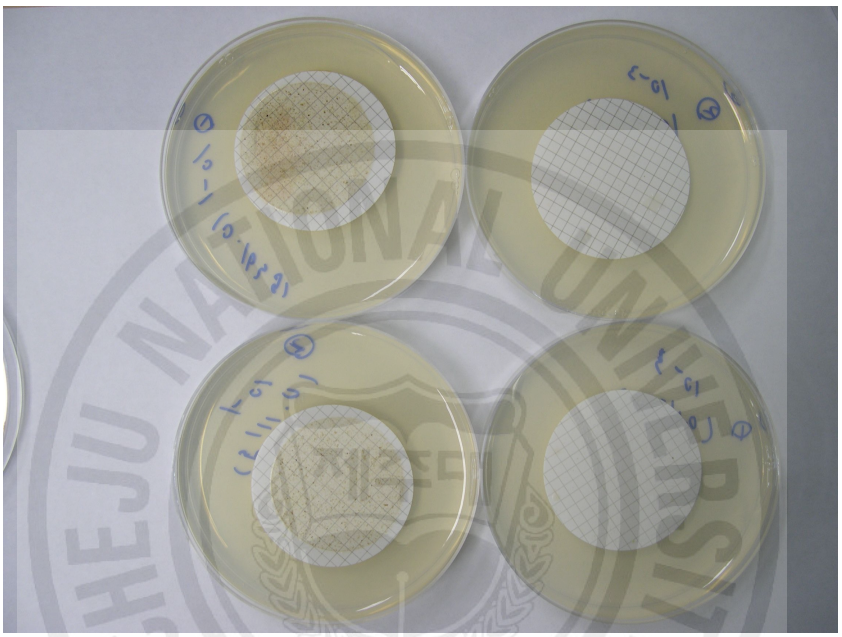


Fig. 1-16. The bacteria growth characteristics of the fermented fish meal. The left photos are the original extract solution and the right 1000-fold dilution. The upper two petri dishes contained PCA meida and the down two ones MA.

1 2 3 4

Fig. 1-17. PCR result of the fermented fish meal from fish culturing by-products which were infected factitiously with the respective four fish disease bacteria to induce some stronger infections of the sample fishes. The bacteria were added with around 5×10^{7} cfu/g dead fish. The lame 1 is DNA marker and the lane 2~4 means triplicate.

6. 대체 발효어분의 넙치에 대한 효과

가. 성장률

넙치는 고밀도 양식으로 인한 여러 질병의 발생으로 경제적 손실을 비롯하여 대량 양식장 부산물 (dead fish)의 처치 곤란 등 많은 어려움이 있다. 이러한 문제점을 해결하고자 본 실험에서는 양식장 부산물인 폐사넙치를 발효하여 어분단백질원으로 대체한 사료를 공급하였을 때, 넙치의 생리활성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 성장도, 혈액 성분 및 면역학적 활성을 측정하였다.

대조구 (control)와 발효어분을 첨가한 실험구 (FFM) 모두 성장은 좋았으며, 초기 어체중이 230 g이었던 실험구에서는 대조구가 발효어분 배합사료 섭취한 실험구보다 성장률 (Fig. 1-19)이 약간 높은 경향을 보인반면, 140 g인 실험구에서는 발효어분 배합사료를 섭취한 실험구가 약간 높은 성장률 (Fig. 1-18)을 나타내었으나 유의성은 없었다 ($p>0.05$).

폐사율에 있어서는 대조구는 어체중이 다른 두 실험구 모두에서 4주째에 가장 높은 폐사율을 나타내었고, 발효어분을 첨가한 사료를 식이한 실험구에서는 8주째에 가장 높은 폐사율을 나타내었다. 그러나 두 실험구 모두 발효어분을 첨가한 사료를 식이한 실험구가 대조구 (발효어분 비첨가 실험구)보다 낮은 것을 확인 할 수 있었다. 이 결과는 발효어분이 어류의 생리 기능을 향상시킴으로서 폐사율을 낮춰준 것으로 생각되며 Fig. 1-20과 Fig. 1-21에 나타내었다.

나. 혈액분석

어류의 혈액성분은 영양, 건강상태 및 스트레스 해석의 차원으로 사용이 가능하며, 사료의 필수영양소의 결핍이나 그 어종이 처해있는 서식환경 및 성장에 따라서도 변화된다고 보고되었다 (Garrido et al., 1990; Siddiqui, 1977).

본 실험의 혈액 성분 분석값은 Table 1-8에 나타내었다. 총콜레스테롤, HDL 및 LDL의 분석값은 실험구간에서 유의적인 차이가 나타나지는 않았으나 FFM을 첨가한 사료를 섭치한 실험구에서 약간 높게 나타났다. 그러나 간지수 지표인

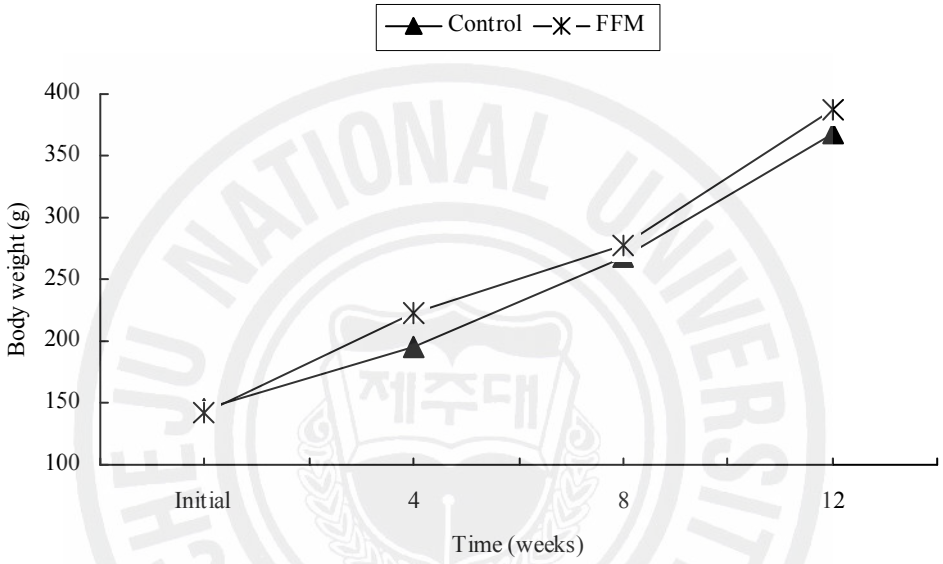


Fig. 1-18. Growth rate of Olive flounder fed by FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks (started with body weight: 140±10 g).

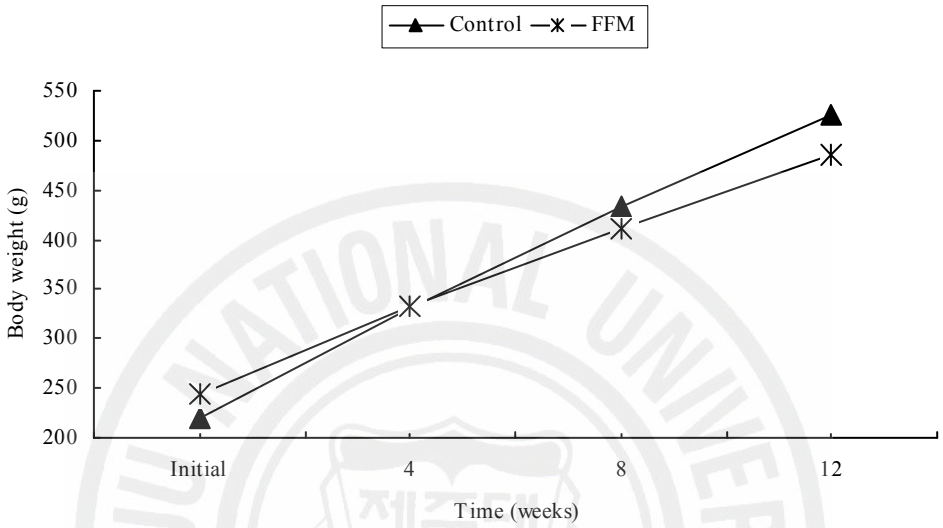


Fig. 1-19. Growth rate of Olive flounder fed by FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks (started with body weight: 230±15 g).

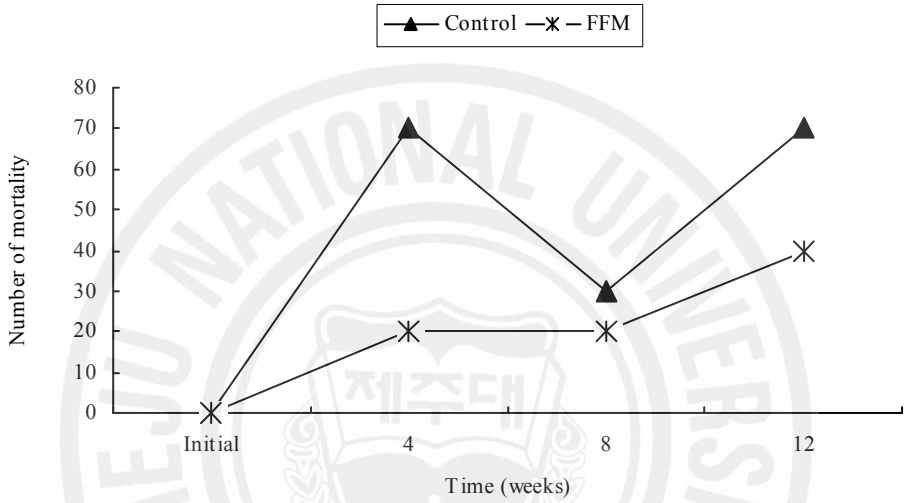


Fig. 1-20. Dead fish number of Olive flounder fed by FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks (started with body weight: 140±10 g).

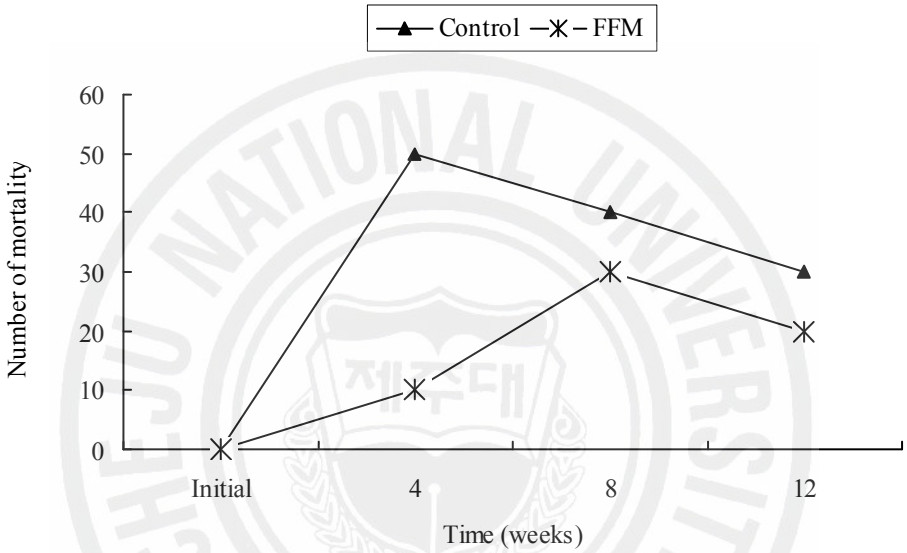


Fig. 1-21. Dead fish number of Olive flounder fed by FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks (started with body weight: 230±15 g).

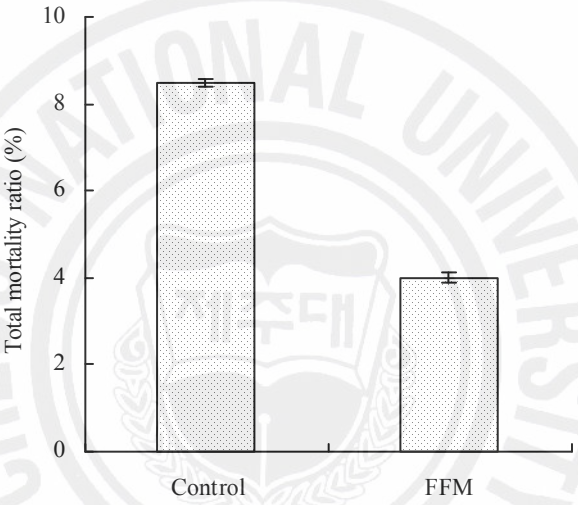


Fig. 1-22. Total mortality ratio (%, down) of Olive flounder fed by FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks (started with body weight: 140±10 g).

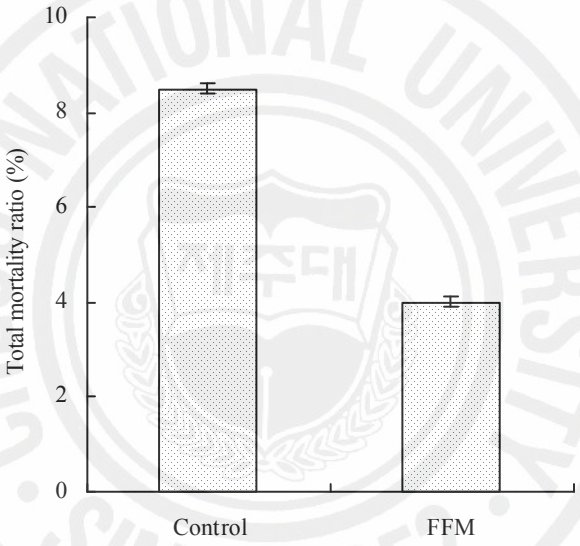


Fig. 1-23. Total mortality ratio (%, down) of Olive flounder fed by FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks (started with body weight: 230±15 g).

Serum ALT, AST, 총단백질량, 글루코스, 중성지방 및 헤모글로빈양은 각 실험구간에 유의성을 나타내었다.

총단백질 함량은 발효어분 섭취구에서가 대조구보다 약 2배정도 높게 나타났다. 인(Phosphorus)은 체내의 에너지 대사에 꼭 필요한 물질이며 신체 구성 성분으로서 중요한 물질로 본 실험에서는 발효어분을 식이한 실험구가 대조구에 비하여 3배 이상 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 중성지방 (triglyceride)의 경우는 신체 내 각종 지방 조직 주성분으로 체내의 에너지 저장과 관계가 있고 식생활과 관계가 깊다. 본 실험의 결과 또한 발효어분을 식이한 실험구에서 대조구보다 1.5배 이상 높음을 확인 할 수 있었다. 헤모글로빈은 적혈구 속에 들어 있는 혈색소로 산소를 운반하는 역할을 하며 헤마토크리트 값으로 나타낼 수 있으며 그 결과 발효어분을 섭취한 실험구가 대조실험구보다 3배정도 높은 것을 확인할 수 있었다. 한편, AST (GOT)는 주로 심장과 간에 존재하는 효소로 신장, 골격근육에도 소량 존재하고 이 조직들이 각종 질병에 의해 파괴되면 혈액으로 유출되어 증가하게 된다. 급·만성 염증, 간암, 담낭남, 간경화가 있을 시에는 증가하고, ALT (GPT)는 AST와 유사 기능을 하는 간지수는 실험구간 유의성은 있었으나, 값의 차는 거의 나타나지 않았다.

다. NBT reduction 활성

어류에 있어 비특이적 면역반응이 얼마나 증대 되었는지를 가장 잘 반영할 수 있는 필수적인 척도로서 식세포활성 (phagocyte activity) 측정이 많이 사용된다. Professional phagocytes (granulocytes, monocytes, macrophage)의 호흡급증은 $\cdot O_2^-$의 감소를 의미한다. 혈장과 phagosomal membranes에 있는 NADPH oxidase에 의해 O_2가 $\cdot O_2^-$로 변한다. 이 후에 superoxide는 자연유발적인 효소로 hydrogen peroxide (H_2O_2), hypochlorous acid (HOCl), hydroxyl radical ($\cdot OH$), singlet oxygen ($^1O_2$)등의 다른 종류의 ROS로 전환된다. 표유동물에서는 숙주방어에 있어 respiratory burst의 중요한 점은 NADPH oxidase의 결점에 의해 만성육아종을 앓는 사람은 NADPH 산화 효소가 없기 때문에 respiratory burst를 일으킬 수 없는 것으로 알려져 있다.

Table 1-8. The physiological and chemical analysis in blood.

Diet	AST (U/L)	ALT (U/L)	Total protein (g/dL)	Glucose (mg/dL)	Phosphorus (mg/dL)	PCV (%)
CON	13.67±3.09	4.67±0.47	3.67±0.33	9.67±1.36	4.97±0.87	24.33±3.3
FFM	12.00±3.39	5.20±0.84	4.26±0.75	7.00±0.67	5.42±0.72	28.20±4.6

Table 1-8. continued

Diet	T-chol (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL/T-chol (U/L)
CON	169.67±9.12	101.33±8.77	10.50±1.12	1.00±0.04	0.60
FFM	183.00±11.00	121.40±5.59	43.60±2.03	1.60±0.1	0.66

AST; Serum Glutamic-Oxalocetic Transaminase - SGOT (aspartate aminotransferase)
ALT; Serum Glutamic-Pyruvic Transaminase - SGPT
PCV (%); packed cell volume (Hematocrit)
T-chol; total cholesterol
HDL-C; high density lipoprotein
LDL-C; low density lipoprotein
TG; Tryglyceride

어류 식세포도 respiratory burst 반응을 할 수 있는 NADPH 산화효소의 활동결과가 포유동물과 유사하게 나타났으며, respiratory burst은 어류 건강상태를 확인 할 수 있는 bioindicator중 하나이다. 현재까지 식세포의 활성을 측정하기 위해 사용되어진 방법은 식균율의 변화, 화학주성 변화 및 호흡폭발의 변화 등이다. Respiratory burst이란 식세포가 식작용 동안 혹은 다른 물질들에 의해서 자극받았을 때 산소 소비량이 증가함과 동시에 O_2^-, OH^-, H_2O_2와 같은 산소라디칼(reactive oxygen intermediates, ROIs)을 다량으로 방출하는 현상을 말하며, 이러한 ROIs는 병원체를 죽이는데 매우 중요한 역할을 한다 (Siwicki, 1994). 이러한 호흡폭발을 측정하는 방법으로 NBT법이 많이 사용되어져 왔으며, 최근 chemiluminescence (CL)법이 일부 사용되고 있다.

본 실험에서는 NBT법을 사용하였으며, 발효어분을 첨가한 사료를 공급한 실험구의 NBT 활성이 대조구에 비해 2배 이상 높게 나타낸 것을 화인 할 수 있었다 ($P<0.05$, Fig. 1-24), Respiratory burst 활성에 가장 많이 관여하는 호중구(neutrophil)는 조혈기관 (bone marrow)에서 형성되어 혈액순환계를 따라 이동함으로써 respiratory burst활성에서 주된 역할을 수행 한다. 호중구는 식작용(phagocytosis)이 가장 왕성하며, 하루에 1,000억 개를 생산하고 세균이 침입 시에는 골수는 세균독에 자극을 받아서 2~3시간 내에 막대한 수효의 혈구를 생산하여 혈중으로 유입시켜 외부에서 침입해온 pathogen과 싸우게 된다. 따라서, 본 실험 결과 FFM을 첨가한 사료를 섭취한 어류가 생사료만을 섭취했을 때 보다 식균작용을 더 잘 일으켜 외부 물질에 대한 잠재적인 저항성이 더 높을 것으로 사료된다.

라. 혈정의 lysozyme 활성

아가미, 피부, 소화계, 생식 이뇨관은 박테리아, 곰팡이, 바이러스 및 원생미생물에 대한 어류 감염의 초기 단계에서 방어를 한다. 이러한 표면들은 물리학적인 장벽이면서 항미생물 물질을 함유하고 배출한다. 점액과 배상세포에 있는 점액은 세 가지 방어 기작을 가지는 것으로 알려져 있다. 첫째는 점액은 미생물의 껍질을 지속적으로 벗겨 미생물의 생성을 저지한다. 둘째, 미생물이 생성되었을 시

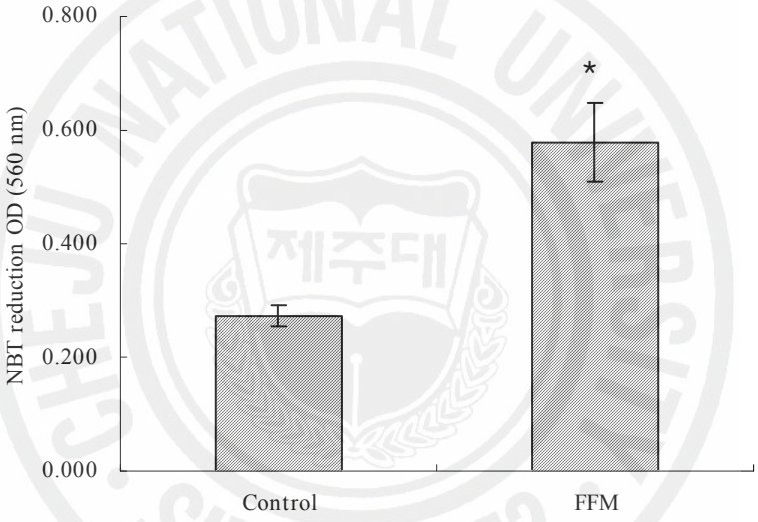


Fig. 1-24. Respiratory burst activity of neutrophils from Olive flounder that was fed by FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks.

점액은 교차하여 장벽을 생성한다. 마지막으로 피부의 점액 및 다른 표면점막에는 항미생물 성질을 지니는 다양한 체액 요인이 함유되어 있다. 이런 것의 예로 lysozyme, complement, lectins, proteolytic enzyme 등이 있으며 최근에는 어류 점막에서 여러 가지 추가적인 방어 기작이 알려지고 있다. 아가미에 의한 NO 생성과 피부 단백질의 항미생물 펩타이드가 그 예이다.

라이소자임은 세균벽의 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglucosamine 사이의 β-1,4 결합을 분해하여 세균을 사멸시키는 효소로 그람 양성균의 세포벽에는 직접작용하고, 그람음성균에 대해서는 항체와 보체의 작용을 증가시켜준 후에 펩티도 글리칸 층을 분해시킨다. 본 실험 결과 혈청의 lysozyme 활성에 있어서도 각 실험구간에 유의성은 없었지만 ($P>0.05$), 발효어분 사료를 식이한 실험구가 대조구에 비하여 다소 높은 라이소자임활성을 나타내었다 (Fig. 1-25).

본 실험의 결과로 볼 때 발효어분 (FFM)을 첨가하여 급이한 넙치가 일반 생사료만을 급이한 넙치보다 면역체계가 증가하여 잠재적인 질병에 대항할 수 있는 능력이 다소 증가 한 것으로 사료된다.

Jairo 등 (2006)에 따르면, 현재 시판되고 있는 어류 발효 단백질 (Seacure)에 대한 쥐의 대식세포에 대한 식균작용을 측정한 결과 식균작용이 증가되었다고 보고한 바도 있어 본 연구에서 생산한 발효어분에 대한 잠재적인 활성을 뒷받침해 주고 있다. 이러한 결과는 앞으로 급속한 양식업의 팽창과 더불어 고밀도 사육으로 인한 많은 어병 발생요인들에 대한 저항성을 향상 시킬 수 있을 뿐만 아니라 전적으로 수입에 의존하고 있는 어분 단백질원에 대한 해결 방안을 모색할 수 있어 경제적 손실도 줄일 수 있을 것으로 예상되며, 아울러 대량 폐사로 인한 어류 사체 처치 곤란 난을 해결 해 주는 등의 수산 농가에 많이 이점을 안겨 줄 것으로 사료된다.

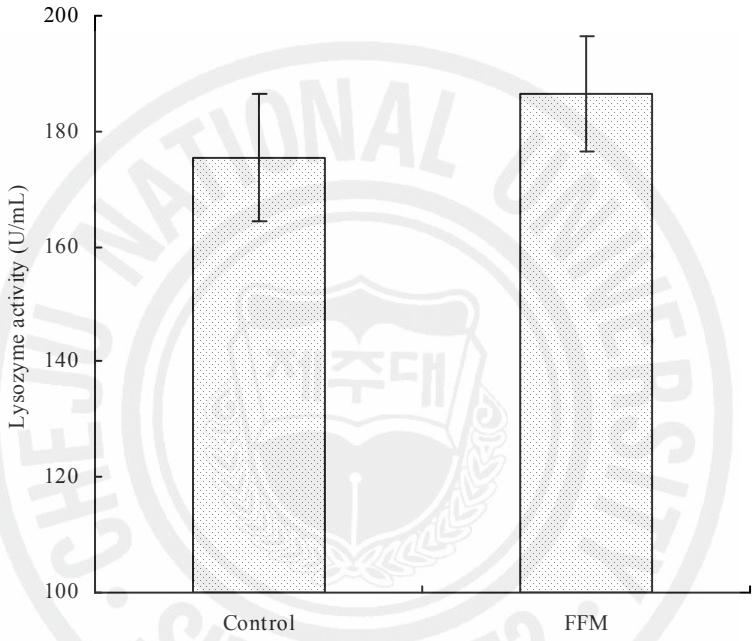


Fig. 1-25. Serum lysozyme activity of Olive flounder that fed FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks.

7. 대체 발효어분의 돌돔에 대한 효과

가. 성장률

본 실험에서는 단백질원으로 넙치 발효어분을 대체한 사료를 급이한 실험구와 대조구간의 혈액내 성분의 변화, 성장 및 면역반응에 미치는 영향을 평가하기 위하여 실시하였다.

여름철 고수온기 8주간 사료 공급 실험 후 사료내 단백질원을 양식장 부산물 유래 발효어분으로 부분적으로 대체하여 첨가한 사료를 섭취한 돌돔의 성장률 (WG, Fig. 1-26), 일간성장율 (SGR), 사료섭취율 (FI), 사료전환효율 (FCR) 및 생존률 (SUV)은 모든 실험구별로 유의적인 차이를 보였으며 그 결과는 Table 1-9에 나타내었다. 어체중은 10% 발효어분을 첨가한 실험구 (10FFM)에서 8주 동안 가장 많이 (약 260%) 성장 한 것을 확인 할 수 있었고, 이것은 대조 실험구보다 약 15%가 더 증가한 한편, 발효어분 함량이 증가 할수록 성장률은 오히려 감소하는 경향을 보였다. 일간 성장률 (specific growth rate, SGR)은 대조구 (0FFM)과 10FFM이 비슷한 결과를 나타내었으며, 일간 성장률 역시 발효어분 함량이 증가 할수록 일간 성장률은 오히려 감소하는 경향을 보였다. 한편, 2주 간격으로 측정한 성장률을 Fig. 1-26에 나타내었다. 2, 4주째 측정 결과 성장에 유의적인 차이를 보이지 않았으나 6주와 8주째에는 각 실험구간에 유의적인 차이를 보였다 ($p<0.05$). 6주 때에는 10FFM > 20FFM > 0FFM > 30FFM 순으로 높은 성장률을 보였고, 8주 때에는 10FFM > 0FFM > 20 FFM > 30FFM 순이였다. 사료섭취량에 대한 한 어체당 사료 공급량을 사료전환효율 (feed conversion ratio, FCR)이라 하는데 이 값 역시 0FFM과 10FFM에서 가장 높은 효율을 나타내었고, 발효어분 함량이 증가 할수록 사료전환효율은 감소하였다.

Table 1-9. Growth parameter of parrot fish[1]

Diet	WG (%)[2]	SGR (%)[3]	FCR [4]	FI[5]	SUV (%)[6]
0FFM[7]	251.86±16.46	0.98±0.04	1.04±0.07	33.46±2.84	100
10FFM[8]	264.67±18.74	1.00±0.04	1.04±0.03	34.84±2.16	100
20FFM[8]	239.97±0.03	0.93±0.01	1.08±0.03	32.79±0.49	100
30FFM[8]	214.91±9.57	0.89±0.02	1.18±0.04	32.57±2.67	100

[1]The value represented three different experiments and represented mean±S.D ($P<0.05$).
[2]WG (%)=100×(final body weight-initial body weight)/initial body weight
[3]SGR (%)=[(loge final body weigh-loge initial body weight)/days]×100
[4]FCR=dried feed weight/moist feed weight
[5]FI (g/g body weight)=diet dry weight (g)/ body weight(g)
[6]SUV (%)=survival rate
[7]CON=control
[8]Partial replacement with 10, 20 and 30% FFM (fermented fish meal), respectively.

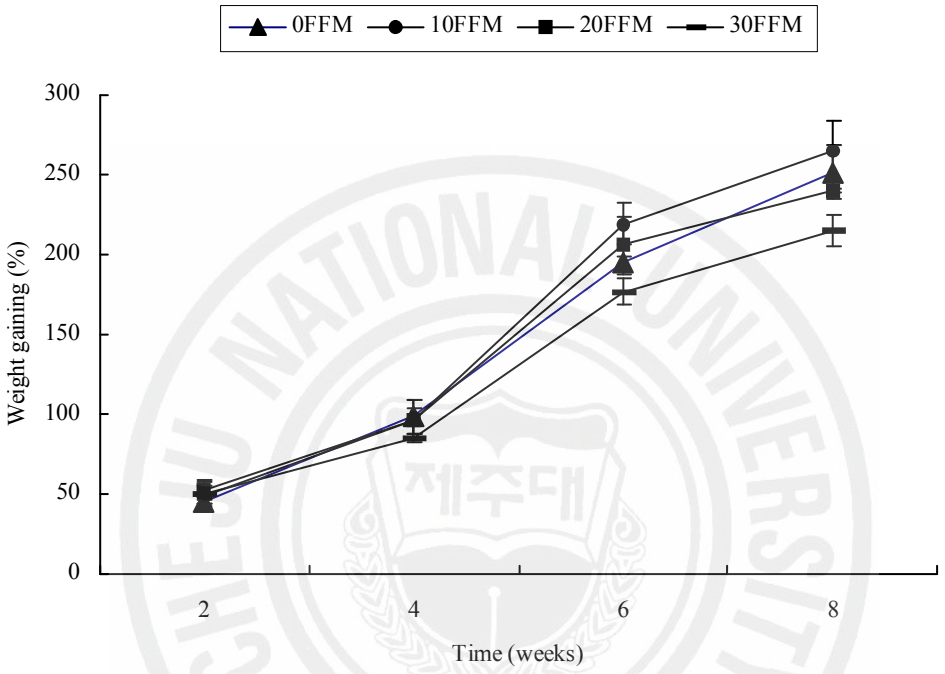


Fig. 1-26. Growth rate of Olive flounder fed by FFM and non-supplemented control diet for 8 weeks (.—▲— 0FFM; non-supplementation, —●— 10FFM; 10% fermented fish meal included, —■— 20FFM; 20% fermented fish meal included, —▬— 30FFM; 30% fermented fish meal included).

나. 혈액분석

어류의 혈액성분은 영양, 건강상태 및 스트레스 해석의 차원으로 사용이 가능하고, 사료의 필수영양소의 결핍이나 그 어종이 처해있는 서식환경 및 성장에 따라서도 변화된다고 보고되었다 (Garrido et al., 1990; Siddiqui, 1977).

총단백질은 혈청 내 존재하는 단백질을 의미하는 것으로. 영양부족, 만성 감염, 간경화, 신증후군, 만성 염증이 있으면 단백질량이 감소한다. 단백질 함량은 모든 실험구에서 비슷한 값을 나타내었다. AST (GOT)는 주로 심장과 간에 존재하는 효소로 신장, 골격근육에도 소량 존재하고 이 조직들이 각종 질병에 의해 파괴되면 혈액으로 유출되어 증가하게 된다. 급·만성 염증, 간암, 담낭남, 간경화가 있을 시에는 증가하고, ALT (GPT)는 AST와 유사 기능을 한다. 이결과는 Table 1-10과 Table 1-11에 나타내었으며, 사육 4주째에는 10FFM과 20FFM에서 가장 낮은 값을 보였고 (Table 1-10), 사육 8주째에는 발효어분이 첨가된 모든 실험구가 대조구보다 낮은 값을 나타내었다 (Table 1-11). 이것은 발효어분이 간손상을 줄이는 역할을 하는 것으로 사료된다.

적혈구량은 사육 4주째에는 대조실험구가 발효어분 대체한 실험구보다 10% 높았으나, 8주째에는 발효어분을 첨가한 실험구가 10% 이상 높은 값을 가졌다. 콜레스테롤은 중성 지방과 함께 지방 성분으로 식생활과 관계가 깊고 드물기는 하지만 유전적인 지질 대사 이상 때문에 혈중 콜레스테롤이 높을 수 있다. 영양부족, 만성 간질환, 감상선 항증진 등이 있으면 감소하고, 고혈압, 동맥경화, 당뇨병, 간기능 장애, 갑상선 기능장애 등이 일어나면 증가한다. 중성 지방의 경우는 신체 내 각종 지방 조직 주성분으로 체내의 에너지 저장과 관계가 있고 식생활과 관계가 깊고 오히려 콜레스테롤 보다 동맥경화의 원인으로 중요시 되며 상동맥경화증이 있으면 증가 한다. HDL 콜레스테롤은 실험 4주째에는 실험구간에 큰 차의를 보이지 않았으나 8주 째에는 10FFM이 대조구보다 7% 정도 높은 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 총콜레스테롤 함량은 8주째에 4주째 보다 감소하였다.

Table 1-10. The physiological and chemical analysis in blood for 4 weeks of parrot fish.

Diet	AST (U/L)	ALT (U/L)	Total protein (g/dL)	Glucose (mg/dL)	Phosphorus (mg/dL)	PCV (%)
0FFM	70.67±3.15	13.67±1.15	3.50±0.17	221.00±16.27	15.90±1.42	30.00±2.65
10FFM	64.17±8.22	10.33±1.15	3.33±0.15	216.00±15.76	15.77±1.96	20.33±3.57
20FFM	63.83±14.00	8.00±1.05	4.20±0.87	216.00±23.58	17.03±2.49	21.67±4.93
30FFM	71.67±2.70	11.00±0.01	3.50±0.26	156.67±26.63	16.57±1.27	21.33±8.02

Table 1-10. continued.

Diet	T-chol (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL/T-chol (mg/dL)
0FFM	149.67±14.22	62.67±10.79	17.67±0.58	7.00±1.00	0.45
10FFM	138.33±22.37	59.00±3.61	18.67±0.58	6.33±0.58	0.43
20FFM	158.67±12.66	55.00±4.58	15.00±3.61	6.67±1.53	0.35
30FFM	165.00±49.73	58.33±0.58	17.33±1.53	8.00±2.00	0.35

AST; Serum Glutamic-Oxalocetic Transaminase - SGOT (aspartate aminotransferase)
ALT; Serum Glutamic-Pyruvic Transaminase - SGPT
Hb; Hemoglobin
PCV (%); packed cell volume (Hematocrit)
T-chol; total cholesterol
HDL-C; high density lipoprotein
LDL-C; low density lipoprotein
TG; Tryglyceride

Table 1-11. The physiological and chemical analysis in blood for 8 weeks of parrot fish.

Diet	AST (U/L)	ALT (U/L)	Total protein (g/dL)	Glucose (mg/dL)	Phosphorus (mg/dL)	PCV (%)
0FFM	39.00±8.85	7.67±1.08	4.08±0.38	104.83±15.76	18.98±5.19	18.97±4.30
10FFM	34.17±9.61	7.33±1.02	3.88±0.03	66.83±6.60	15.17±1.93	32.25±5.00
20FFM	29.33±5.86	6.50±0.50	3.82±0.25	44.50±5.07	13.53±2.35	29.67±7.23
30FFM	32.83±3.33	6.67±1.31	3.67±0.16	63.67±12.17	12.22±1.68	29.33±9.07

Table 1-11. continued.

Diet	T-chol (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL/T-chol (mg/dL)
0FFM	71.00±2.76	33.47±0.33	10.87±0.77	4.67±0.76	0.46
10FFM	94.33±2.52	40.23±1.78	13.00±2.11	3.67±0.29	0.43
20FFM	74.00±9.00	30.97±3.72	9.33±0.99	4.83±1.04	0.42
30FFM	74.00±5.55	35.77±4.00	11.38±1.17	3.83±1.26	0.47

AST; Serum Glutamic-Oxalocetic Transaminase - SGOT (aspartate aminotransferase)
ALT; Serum Glutamic-Pyruvic Transaminase - SGPT
Hb; Hemoglobin
PCV (%); packed cell volume (Hematocrit)
T-chol; total cholesterol
HDL-C; high density lipoprotein
LDL-C; low density lipoprotein
TG; Tryglyceride

다. NBT reduction 활성

어류에 있어 비특이적 면역반응이 얼마나 증대 되었는지를 가장 잘 반영할 수 있는 필수적인 척도로서 식세포활성 (phagocyte activity) 측정이 많이 사용된다. Professional phagocytes (granulocytes, monocytes, macrophage)의 호흡급증은 $\cdot O_2^-$의 감소를 의미한다. 혈장과 phagosomal membranes에 있는 NADPH oxidase에 의해 O_2가 $\cdot O_2^-$로 변한다. 이 후에 superoxide는 자연유발적인 효소로 hydrogen peroxide (H_2O_2), hypochlorous acid (HOCl), hydroxyl radical ($\cdot$OH), singlet oxygen ($^1O_2$)등의 다른 종류의 ROS로 전환된다. 표유동물에서는 숙주방어에 있어 respiratory burst의 중요한 점은 NADPH oxidase의 결점에 의해 만성육아종을 앓는 사람은 NADPH 산화 효소가 없기 때문에 respiratory burst를 일으킬 수 없는 것으로 알려져 있다.

어류 식세포도 respiratory burst 반응을 할 수 있는 NADPH 산화효소의 활동결과가 포유동물과 유사하게 나타났으며, respiratory burst은 어류 건강상태를 확인 할 수 있는 bioindicator중 하나이다. 현재까지 식세포의 활성을 측정하기 위해 사용되어진 방법은 식균율의 변화, 화학주성 변화 및 호흡폭발의 변화 등이다. Respiratory burst이란 식세포가 식작용 동안 혹은 다른 물질들에 의해서 자극받았을 때 산소 소비량이 증가함과 동시에 O_2^-, OH^-, H_2O_2와 같은 산소라디칼 (reactive oxygen intermediates, ROIs)을 다량으로 방출하는 현상을 말하며, 이러한 ROIs는 병원체를 죽이는데 매우 중요한 역할을 한다 (Siwicki, 1994). 이러한 호흡폭발을 측정하는 방법으로 NBT법이 많이 사용되어져 왔으며, 최근 chemiluminescence (CL)법이 일부 사용되고 있다.

본 실험에서는 NBT법을 사용하였으며, 10FFM과 20FFM 실험구에서만 유의성 ($P<0.05$)을 보였으며 나머지 실험구에서는 유의성이 나타나지 않았다. NBT 활성은 4주 때보다 8주째에 증가한 것을 확인 할 수 있었고, 사육 4주 째에는 미미하지만 발효어분 함량이 증가할수록 NBT 활성이 증가한 반면 8주째에는 20FFM과 30FFM에서는 대조구와 10FFM보다 NBT 활성이 감소하였다 (Fig. 1-27).

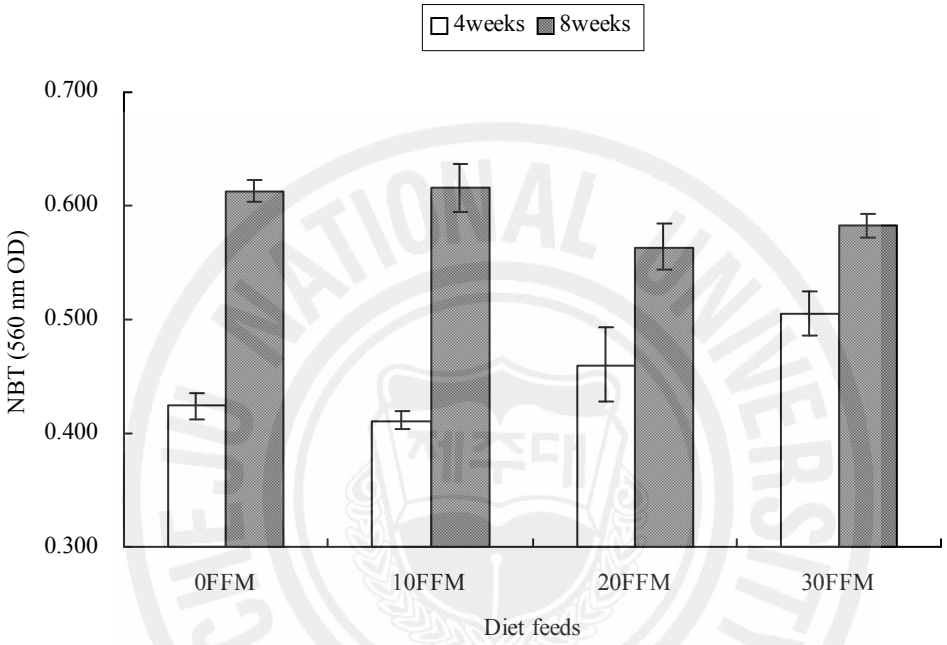


Fig. 1-27. Respiratory burst activity of neutrophils from parrot fish that was fed by FFM and non-supplemented control diet for 8 weeks (.0FFM; non-supplementation, 10FFM; 10% fermented fish meal included, 20FFM; 20% fermented fish meal included, 30FFM; 30% fermented fish meal included)

라. 혈청 lysozyme 활성

Respiratory burst 활성은 어류 건강상태를 확인 할 수 있는 bioindicator중 하나로 사용된다. 그 외 혈청내 lysozyme 활성 및 보체의 활성 등이 사용되고 있으며, 병원성 세균을 실제로 어류에 접균하여 저항성을 평가하기도 한다. 아가미, 피부, 소화계, 생식 이뇨관은 박테리아, 곰팡이, 바이러스 및 원생미생물에 대한 어류 감염의 초기 단계에서 방어를 한다. 이러한 표면들은 물리학적인 장벽이면서 항미생물 물질을 함유하고 배출한다. 이런 것의 예로 lysozyme, complement, lectins, proteolytic enzyme 등이 있으며 최근에는 어류 점막에서 여러 가지 추가적인 방어 기작이 알려지고 있다. Lysozyme은 세균벽의 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglucosamine 사이의 β-1,4 결합을 분해하여 세균을 사멸시키는 효소이다. 라이소자임은 그람 양성균의 세포벽에는 직접작용하고, 그람음성균에 대해서는 항체와 보체의 작용을 증가시켜준 후에 펩티도글리칸 층을 분해시킨다.

본 실험 결과 30FFM을 제외한 모든 실험구에서 유의성을 나타내었다 ($P<0.05$). 혈청의 lysozyme 활성에 있어서도 발효어분을 대체한 사료를 식이한 실험구에서 유의적으로 높게 나타났으며 Fig. 1-28에 나타내었다. 실험 4주, 8주째 모두 대조구보다 실험구에서가 라이소자임 활성이 높게 나타났고, 8주째는 4주째보다 10FFM에서는 두 배 이상, 20FFM에서는 4배 이상 높은 활성을 나타내었다. 이 결과는 발효어분 식이량이 지속되면 라이소자임 활성은 더 증가할 것으로 사료된다.

앞서 넙치 사육실험에서도 이와 유사한 결과들을 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 앞으로 급속한 양식업의 팽창과 더불어 고밀도 사육으로 인한 많은 어병 발생요인들에 대한 저항성을 향상 시킬 수 있을 뿐만 아니라 전적으로 수입에 의존하고 있는 어분 단백질원에 대한 해결 방안을 모색할 수 있어 경제적 손실도 줄일 수 있을 것으로 예상되며, 아울러 대량 폐사로 인한 어류 사체 처치 곤란난을 해결 해 주는 등의 수산 농가에 많이 이점을 안겨 줄 것으로 사료된다.

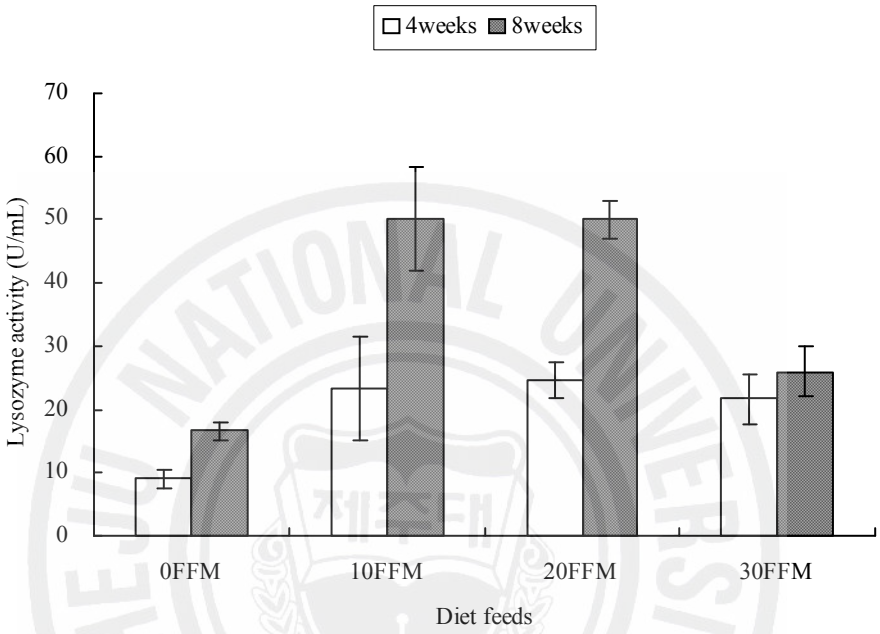


Fig. 1-28. Lysozyme activity of serum from parrot fish that was fed by FFM and non-supplemented control diet for 8 weeks. (0FFM; non-supplementation, 10FFM; 10% included of fermented fish meal, 20FFM; 20% included of fermented fish meal, 30FFM; 30% included of fermented fish meal).

제 2장

키토산 코팅 습사료 (moist pellet, MP)가 해산 양식 어류의 항산화 및 면역 반응에 미치는 효과

제 2 장
키토산 코팅 습사료 (moist pellet, MP)가 해산 양식 어류의 항산화 및 면역 반응에 미치는 효과

Ⅰ. 재료 및 방법

1. 실험사료

가. 넙치

사육실험을 위하여 크기는 직경 1.0 cm, 길이 4.13±0.13 cm, 무게 3.47±0.23 g 정의 생사료 (MP: mooisture pellet)에 키토산을 주 원료로 하여 제조한 코팅액 (키토산 코팅액)으로 MP 사료의 외부표면을 분사하여 코팅 처리하였다.

나. 돌돔

사육실험을 위하여 5개의 다른 사료를 제조하여 공급하였다. 실험 사료는 50%의 조단백질 함량을 갖도록 동일하게 조성하였고, 기초사료 조성표는 Table 2-1에 나타내었다. 총 5개의 실험사료는 기초사료를 이용한 제조하였다. 실험사료 제조는 모든 사료 조성원을 분쇄기를 이용하여 분말 형태로 일정하게 만든 후 각 사료원들을 사료조성표에 따라 무게를 측정하여 잘 섞은 후 사료원 총량의 30～40%에 해당하는 증류수를 첨가하여 사료혼합기 (NVM-14-2P, Korea)로 혼합・반죽하였다. 혼합 반죽물은 소형쵸파기 (SMC-12, Korea)를 이용하여 직경 3mm 크기로 성형하였다. 제조한 사료를 두개의 동일한 양으로 나누어 한쪽은 대조구 (non-coated)로 다른 한 쪽은 키토산 용액으로 코팅하였다. 앞에서 얻어진 사료를 동결건조하여 Sieve를 이용하여 적당한 크기로 사료를 pellet 형태

Table 2-1. Formulation of experimental diets for Parot fish (% dry matter)

Ingredients	Non-coated[1]	Chitosan-coated[2]
White FM	51.00	51.00
Soybean meal	6.00	6.00
Corn gluten meal	6.00	6.00
Starch	22.00	22.00
Yeast	2.00	2.00
Mineral Mixture[3]	1.00	1.00
Vitamin Mixture[4]	1.00	1.00
Squid liver oil	11.00	11.00

[3]Mineral Mixture (g/kg): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 80; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 370; KCl, 130; Ferric citrate, 40; $ZuSO_4 \cdot 7H_2O$, 20; Ca-lactate, 356.5; CuCl, 0.2; $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.15; $Na_2Se_2O_3$, 0.01; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2.0; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 1.0

[4]Vitamin Mixture (g/kg): L-ascorbic acid, 121.2; DL-α tocopheryl acetate, 18.8; thiamine hydrochlorade, 2.7; riboflavin, 9.1; pyridoxine hydrochloride, 1.8; niacinm 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; cholecalficerol, 0.003; cyanocobalamin, 0.003

로 가공하여, -20℃에 보관하면서 공급하였다.

2. 실험어 및 사육관리

가. 넙치

키토산 코팅용액을 이용하여 MP (moist pellets) 사료의 현장 코팅은 제주도 남제주군 표선리에 위치한 S수산에서 수행하였으며, 수조크기는 6 (L)×6 (W)×1 (H) m인 콘크리트 사각수조에 평균 어체중이 180 g인 넙치를 각 수조당 1,200마리 씩 수용하였다. 사육 온도는 18±2℃, 해수 교환은 1일 4회 환수 시켰다. 키토산을 주 원료로 하여 제조한 키토산 코팅제는 키토산 1%, 검 다당류 1%, Vitamin C 0.5%, 글루코사민황산염 (glucosamin sulfate) 0.3%, 키토산올리고당 (chitooligossacharide) 0.1% 그리고 asthaxanthin (비타민 E 대체제) 0.5% 등을 각각 첨가하여 혼합한 후 코팅액을 제조하였으며, 2~5℃의 저온에서 보관하면서 사용하였다.

앞의 방법으로 제조한 키토산 코팅액의 MP 사료 코팅은 자체 제작한 MP 사료코팅 분무기를 통하여 수행하였으며 (Fig 2-1), 자체적으로 디자인하고 제작한 스프레이 분무기는 코팅액이 세 방향에서 분사될 수 있도록 three-way spray coating 방식을 채택하였다. 먼저 키토산 코팅액을 스프레이 분무기의 저장통에 약 20 l 정도를 넣어서 Fig. 2-1에서처럼 분무하여 MP 사료를 코팅하였다. 스프레이를 통하여 나오는 코팅액의 유출속도는 분당 1 l이며, 코팅된 MP 사료는 -20℃ 냉동고에서 12~24시간 저장시킨 후 넙치 사육실험을 위하여 공급되었다. 사료 공급은 아침 7시와 저녁 5시, 하루 2회 어체중의 약 7%를 급이 하였다.

나. 돌돔

본 실험에 사용된 돌돔 치어는 제주도내 양식장에서 구입하여 제주대학교 소재 해양과환경연구소로 수송하였으며, 실험 환경에 적응시키기 위해 3주 동안 순치시켰다. 순치시키는 동안의 먹이 공급은 분양받은 양식장에서 공급하던 것과

Fig. 2-1. Coating MP (moist pellet) feeds with chitosan solution by sprayer adapted with three way spay module.

동일한 시판 사료를 사용하였다. 예비사육 후 평균 어체중이 12~13 g의 돌돔을 150 l 원형수조에 각 수조당 35마리씩 무작위 배치하였다. 사료 공급실험은 3반복으로 수행하였으며, 사육수는 여과해수를 사용하여 1~2 l/min의 유수량이 공급되도록 조절하였고, 모든 실험 수조에 용존산소 유지와 원활한 사육수 순환을 위하여 에어스톤을 설치하였다. 실험 기간 중의 수온은 25.0±3.0 ℃, 용존산소는 4.3±0.2 mg/ml,이었다. 실험 사료는 어체중의 4%를 공급하였으며, 하루 두 번 오전 8시와 오후 5시에 급이 하였고 사료공급실험은 총 8주간 수행하였다. 실험 어체의 증체율은 실험사료를 급여한 후 2주 간격으로 실험어의 전체 무게를 측정하여 증중량을 구하였다.

3. 전어체 일반 성분분석

전어체의 일반성분은 각 수조별로 3마리씩 무작위로 추출하여 분쇄한 전어체를 분석였으며, AOAC (2002)방법에 따라 수분은 상압가열건조법 (125℃, 3시간), 조단백질은 킬달 자동 분석장치 (Kjeltec^{TM}2300, Foss Co. Ltd., Denmark), 조회분은 직접회화법으로 분석하였다. 조지방은 Sohxlet system 1046 (Tacator AB, Sweden)을 사용하여 soxhlet 추출법으로 분석하였다.

4. 혈액성분 분석

각각의 실험종료 후, 증체율 조사와 함께 혈액성분 분석을 위하여 실험어를 채혈하기 전까지 약 24시간 동안 절식시켜 실험어를 각 수조당 3마리씩 무작위로 선별하여 미부정맥에서 채혈한 후, micro-hematocrit 방법 (Brown, 1980)에 의해 헤마토크리트 (hematocrit, PCV)를 측정하고, 동시에 자동 혈액 분석 장지 (Ch 100 plus, Deawang meditecq., Korea)로 헤모글로빈 (hemoglobin, Hb)을 측정 하였다. 혈청성분의 분석을 위하여 채혈한 혈액을 항응고제가 처리되지 않은 원심분리관에 넣고 실온에 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 냉장보관하면서 16시간 이내에 분석하였다. 혈청성분은 자동 혈액분석기를 사용하여 총단백질 (total protein), 당 (glucose), 인 (phosphorus), 총콜레스테롤

(Total cholesterol), 중성지방 (triglyeride), HDL-C (high density cholesterol), LDL-C (low density cholesterol), 간지수인 AST (aspeartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase)를 분석 하였다.

5. Head kidney의 분리 및 정제

성장실험 종료후, MS222 (3-aminobenzoic acid ethyl ester, Sigma)로 마취시킨 넙치로부터 두신 (head kidney)을 무균적으로 분리한 후 4℃로 냉장한 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma)에 넣어 가는 망사를 이용하여 세포들을 분리해 내었다. 분리된 두신 세포는 다시 51%의 Percoll (Sigma) density gradient를 이용하여, 4℃에서 400 rpm으로 30분간 원심 분리한 다음 percoll gradient와 PBS 중간층에 수집된 세포층을 가는 파스퇴르 피펫을 이용하여 분리하였다. 최종적으로 분리된 세포는 HBSS로 400 g에서 5분간 2번 세척하였다. 세포의 생존유무는 trypan blue stain (0.4% in PBS, Sigma)을 이용하여 분석하였으며, 모든 실험구에서 분리된 세포들의 생존율은 90% 이상이었다. 실험에 사용한 식세포의 세포수는 1×10^6 cells/ml HBSS로 조절하였다.

6. Respiratory burst activity측정을 위한 Flow cytometry

Respiratory burst 활성 측정을 위한 flow cytomerty는 Serada 등 (2005)과 Moritomo *et al.* (2003)의 방법을 다소 변형하여 측정하였다. 두신에서 분리한 neutrophil을 1×10^6 cells/mL 세포수가 되도록 HBSS 용액에 맞춘 배양액을 450 µl 취한 후 100 ng/ml PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma, St. Louis, MO, USA) 50 µl를 넣고 1시간 동안 상온에서 배양한다. 배양이 끝난 후 한 후 10 mg/ml dihydrorhodamine123 (DHR123) 염색약을 50 µl넣고 10분 동안 상온에서 반응 시킨 후 FACScan을 측정하였다.

7. NBT (nitroblue tetrazolium) reduction 활성 측정

Nitroblue tetrazolium은 황색 결정을 띠는 시약으로 특히 호중구 및 단백질과 결합하면 환원하여 청색을 띠게 되는데 이러한 환원된 시약의 OD (optical density)로 respiratory burst activity (RBA)를 측정하는 방법으로 Anderson과 Siwicki (1996) 실험법에 따라 분석하였다. 1.5 ml 마이크로튜브에 전혈과 0.2% NBT (Nitroblue tetrazolium, Sigma)를 1:1로 30분간 상온에서 반응시킨 후 50 µl를 취하여 96-well culture plate에 분주하고, 1 ml dimethyl formamide를 넣고 반응을 정지시킨다. 그런 다음 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후 상층액을 수거해 최종적으로 540 nm에서 micro-reader (Packard Spectrocount^{TM})로 OD 값을 측정한다. Blank로 dimethyl formamide를 사용하고, NBT 감소량 계산은 다음과 같이 한다.

$$Activity\ (\%) = (\frac{1 - OD\ Blank}{OD\ blank}) \times 100$$

8. 혈청 및 점액의 lysozyme 활성 측정

체액성 면역 반응에 관여하는 인자로 라이소자임은 세균벽의 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglyglucosamine사이의 베타-1,4결합을 분리하여 세균을 사멸시키는 효소로 그람양성균에 대한 항체 및 보체 활성을 증가 시켜주고, 식세포의 식작용을 증가시킨다. 실험 방법은 Kumari와 Sahoo (2005) 방법에 따라 *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma)를 0.02 M sodium citrate buffer (pH 5.5)에 0.2 mg/ml가 되게하여 *M. lysodeikticus* solution을 만든다. 체표 점액을 채취하여 이 시료의 5배 되는 PBS에 넣고 균질화한다음 12,000 × g에서 20분간 4℃에서 원심분리 후 상층액을 측정 시료로 사용하였다. 점액과 serum을 각각 15 µl씩 96 well plate에 분주한 후 즉시 *M. lysodeikticus* solution을 150 µl넣고 450 nm에서 흡광도를 측정한 후 24℃에서 5분 간격으로 흡광도를 측정하여 흡광도 값이 감소하기 직전의 값을 lysate time으로 정하여 흡광도 값을

얻어, Lysozyme의 활성 단위를 분당 0.001의 흡광도 감소를 나타내는 효소의 양으로 정의하였다.

9. Myeloperoxidase (MPO) 활성 측정

Myeloperoxidase가 활성화 되면 식세포의 액포에서 반응성산소매개체를 생성하는 과산화수소 분해효소로 hypochlorite radical을 생성해 병원균을 죽임으로써 면역반응을 증가시킨다. Quade와 Roth (1997)법을 이용하여 본 실험울 수행하였으며 방법은 다음과 같다. 15 µl혈청을 96 well plate에 분주한 후 135 µl의 HBSS (Hank's balanced salt solution; background), 0.02% CTAB (cetyltrimethylammonium bromid; lysed) 및 50 nM PMA (phorbol myristate acetate in DMSO; stimulated)를 넣고 20 mM TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine hydrochloride)와 5 mM H_2O_2 45 µl씩 넣고 2분간 상온에서 반응시킨 후 4 M H_2SO_4 53 µl를 넣어 반응을 정지 시킨 후 450 nm에서 ELISA reader (Packard Spectrocount^{TM})로 흡광도 값을 얻어 활성값을 계산하고, 계산은 다음과 같이 한다.

$$\%\ release = \frac{OD\ stimulated - OD\ background}{OD\ lysed - OD\ background} \times 100$$

10. Comet assay를 이용한 DNA damage 측정

넙치의 미부정맥으로부터 얻은 전혈을 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상층액을 취하여 실험에 사용하였다.

알칼린 코멧 에세이(Alkaline comet assay)는 Singh (1999) 등의 방법에 Heo 등 (2005)의 방법을 다소 보완하여 수행하였다. 혈장은 20 µl의 0.5% LMPA (low melting point agarose, Invitrogen)와 섞은 후, 1% NMPA (normal melting point agarose, Sigma)로 미리 코팅한 슬라이드에 분산시켰다. 겔이 굳으면 그 위에 다시 0.5% LMPA 100 µl를 슬라이드 위에 떨어뜨린 후 커버글라스를 덮고,

lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, and 1% N-Lauroylsarcosine sodium salt, Sigma, 1% Triton X-100)에 슬라이드를 담가 4℃에서 1시간동안 lysis시켜준다. 이 lysis시킨 슬라이드를 300 mM NaOH와 10 mM Na_2EDTA (pH 13.0)가 들어있는 glass chamber에서 20분 동안 unwiunding을 시켰다. DNA 전기영동은 25 V/300 mA의 전압으로 20분 동안 실시하였으며 전기영동이 끝난 슬라이드를 중화버퍼 (neutralizing buffer; 0.4 M Tris, pH 7.5)에 5분씩 담궈 3회 반복 세척해주었고 에탄올로 5분간 세척하여 고정시킨 후, 2~20 μg/mL 농도의 EtBr (ethidium bromide, Sigma) 45 μL로 DNA를 염색하였다. 측정은 이미지 분석기 (kinetic Imaging Komet 5.0, UK)와 reflected light fluorescence attachment microscope (BX-FLA, Olympus optical Co., Ltd, Japan)으로 수행하였고, DNA 손상정도는 핵으로부터 이동한 DNA fragmentation의 거리 또는 테일 (tail) 길이에 tail 내 함유된 DNA%를 곱해준 테일 순간값을 측정하여 나타내었으며 각 대상자 당 2개의 slide를 만들어 각각 50개씩 총 100개의 lymphocyte에서 DNA 손상정도를 측정하였다.

11. 통계처리

모든 자료의 통계처리는 Computer Program Statistix 3.1 (Analytical Software, St. Paul MN. USA)로 분산분석(ANOVA test)을 실시하여 최소유의차검정 (LSD : Least Significant Difference)으로 평균간의 유의성 ($P<0.05$)을 검정하였다.

Ⅱ. 결과 및 고찰

1. 키토산 코팅한 사료의 넙치에 대한 효과

가. 성장율

양식 넙치의 성장률 결과를 보면, 키토산 용액으로 코팅한 사료와 비코팅 사료를 급이한 사육군의 성장률은 거의 차이가 없이 사육 8주 동안 비례적으로 성장하였다. 하지만 마지막 8주 성장 실험 후 최종 어체의 평균무게를 측정한 결과 비코팅 MP 사료로 급이한 대조군보다 약 9% 정도 높게 나타났다 (Fig 2-2). 이와 같은 결과는 MP 사료를 코팅하여 급이할 경우 수중 유실이 감소하고 해수 수면 중 부상하여 넙치가 충분히 먹이를 섭취할 수 있다는 사실을 짐작할 수 있다.

Fig. 2-3.에서는 키토산 코팅액 처리 MP 사료로 사육한 양식 넙치에서의 폐사율을 측정하여 나타내었다. 코팅제를 처리하지 않은 대조실험구보다 코팅액을 처리한 사료를 급이한 실험구에서 폐사율이 낮게 나타난 것을 확인 할 수 있었다. Kim 등 (2005)에 의하면 넙치 양식 7개월 동안 키토산 첨가제 처리구는 5.7%, 대조구는 8.6%의 폐사율을 보여 전체적인 폐사량은 대조구와의 비교시 키토산첨가제 처리구가 약 34% 감소했고, 본 연구와 유사한 결과를 보고하였다.

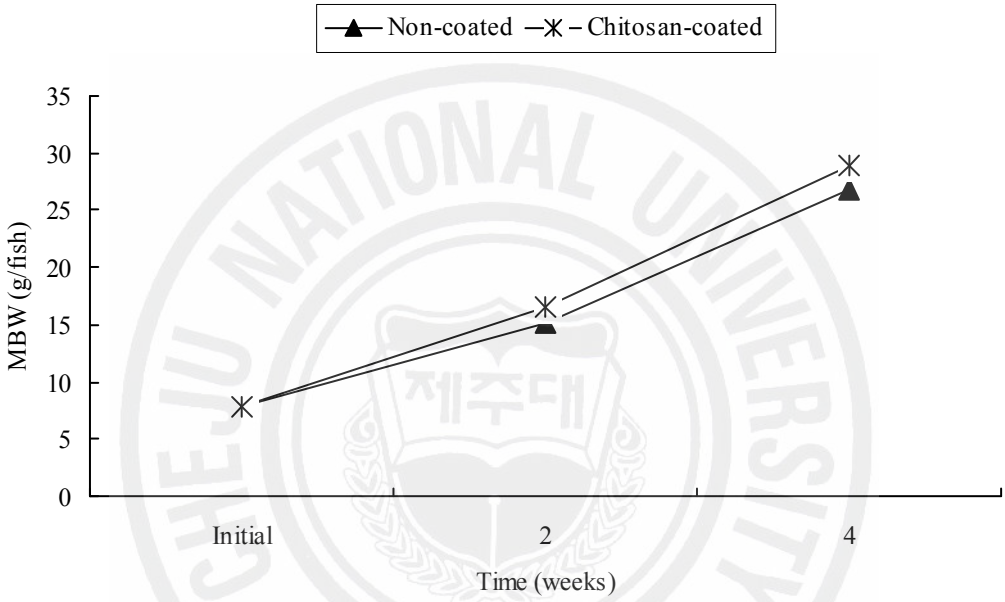


Fig. 2-2. Weight and growth ratio (%) of Olive flounder that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks and weighed every 2 weeks. Data represented as mean±S.D.

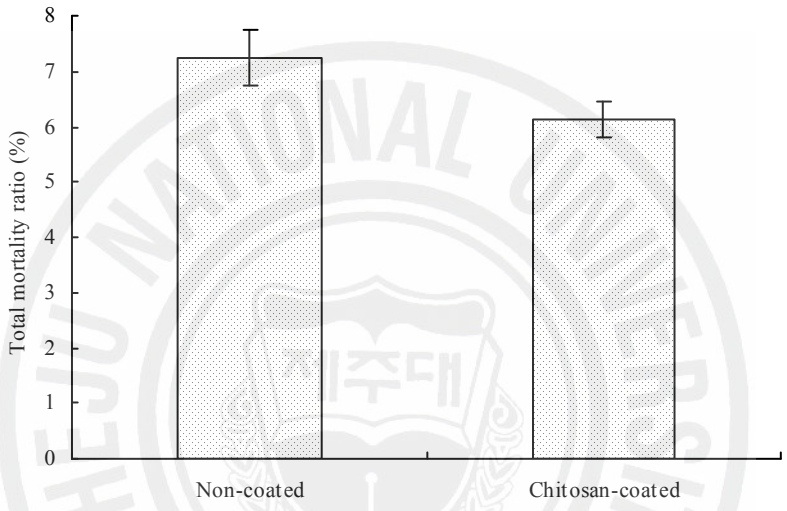


Fig. 2-3. Total mortality ratio (%, down) of Olive flounder that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks and weighed every 2 weeks.

키토산 코팅제 처리한 MP 사료를 급이 하였을 때 각 수조의 수질 오염도를 측정하여 수질 분석을 실시하여 나타낸 결과를 Table 2-2에 나타내었다. 전체적으로 사료 급이량이 적은 코팅제처리구에서 수질오염도는 낮게 나타났다. 특히 양식장 수질오염의 가장 중요한 지표인 COD (chemical oxygen demand)와 SS (suspended solid) 지표를 살펴보면, 먼저 COD 항목에서 대조실험구가 9.6 ppm 인데 비하여 코팅제처리구에서는 7.2 ppm으로 다소 낮은 경향을 보였다. 그리고 SS 항목에서는 대조실험구가 33.2 ppm 인데 비하여 코팅제처리구에서는 각각 24. 3 ppm을 기록하였다. 그 외 질소 (NH_3-N, NO_3-N, NO_2-N)나 인 (PO_4-P)의 함량은 모든 실험구에서 차이가 크지 않아 유의성은 없는 것으로 나타났다 ($p>0.05$). 이와 같은 결과를 종합하여 보면, 키토산 코팅제 처리구가 대조구에 비하여 사료의 부유 시간을 증가시켜 사료 유실을 감소시켜 수조의 수질 오염을 낮추고 이로 인하여 어병에 의한 폐사율도 낮은 것으로 사료된다.

나. 전어체 일반 성분분석 결과

본 실험에서는 MP사료에 키토산을 분사하여 급이한 실험구와 대조구간의 어체 성분의 변화가 있었는지 알아보기 위하여 AOAC 방법에 따라 어체의 일반 성분 분석을 한 결과 유의적인 차이가 나타나지 않을 것을 확인 할 수 있었고 Table 2-3에 나타내었다.

다. 혈액성분 분석 결과

어류의 혈액성분은 영양, 건강상태 및 스트레스 해석의 차원으로 사용이 가능하고, 사료의 필수영양소의 결핍이나 그 어종이 처해있는 서식환경 및 성장에 따라서도 변화된다고 보고되었다 (Garrido 등, 1990; Siddiqui, 1977).
총단백질은 혈청 내 존재하는 단백질을 의미하는 것으로. 영양부족, 만성 감염, 간경화, 신증후군, 만성 염증이 있으면 단백질량이 감소한다. AST (GOT)는 주로 심장과 간에 존재하는 효소로 신장, 골격근육에도 소량 존재하고 이 조직들이 각종 질병에 의해 파괴되면 혈액으로 유출되어 증가하게 된다. 급·만성 염증, 간암, 담낭남, 간경화가 있을 시에는 증가하고, ALT (GPT)는 AST와 유사 기능

Table 2-2. Water environment, Olive flounder that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks

	Water environment items (ppm)						
	pH	COD	SS[1]	NH_3-N	NO_3-N	NO_2-N	PO_4-P
Non-coated	8.04±0.04	9.60±0.60	34.20±6.50	0.21±0.03	0.17±0.03	0.01±0.01	0.49±0.03
Chitosan-coated	8.19±0.07	7.20±0.40	24.30±1.90	0.22±0.06	0.11±0.01	0.02±0.01	0.50±0.03

을 한다. 혈당 (glucose)은 생체의 에너지원으로 가장 중요한 물질로 식사나 당분 섭취 후에는 상당량 증가 후 2시간 이후에는 정상으로 돌아오며 당뇨가 있으면 증가한다. 콜레스테롤은 중성 지방과 함께 지방 성분으로 식생활과 관계가 깊고 드물기는 하지만 유전적인 지질 대사 이상 때문에 혈중 콜레스테롤이 높을 수 있다. 영양부족, 만성 간질환, 감상선 항증진 등이 있으면 감소하고, 고혈압, 동맥경화, 당뇨병, 간기능 장애, 갑상선 기능장애 등이 일어나면 증가한다. 중성지방의 경우는 신체 내 각종 지방 조직 주성분으로 체내의 에너지 저장과 관계가 있고 식생활과 관계가 깊고 오히려 콜레스테롤 보다 동맥경화의 원인으로 중요시 되며 상동맥경화증이 있으면 증가 한다. 인(Phosphorus)은 체내의 에너지 대사에 꼭 필요한 물질이며 신체 구성 성분으로써도 중요한 물질이다. 부갑상선 기능저하증이 나타나면 감소하고, 부갑상선기능항진증, 신부전증, 비타민 D 과다증이 있으면 증가한다. 헤모글로빈은 적혈구 속에 들어 있는 혈색소로 산소를 운반하는 역할로 헤모글로빈양이 부족하면 빈혈 등을 유발할 수 있다.

본 실험의 혈액 및 혈청 성분 변화는 Table 2-4에 나타내었다. 간독성을 나타내는 지표인 ALT 및 단백질, 당, 인, 중성지방 및 총콜레스테롤 함량은 실험구간에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 그러나 AST 및 LDL에 있어서는 키토산을 코팅하여 공급한 실험구가 대조구에 비하여 유의적으로 낮게 나타($P<0.05$)났다. 한편, 총콜레스테롤 ($p>0.05$)과 HDL ($P<0.05$)의 경우는 증가하였으며, 총콜레스테롤에 대한 HDL의 함량비율은 키토산을 코팅한실험구에서가 더 높게 나타난 것을 확인 할 수 있었다. 또한 헤모글로빈 (HGB)의 량은 키토산을 처리한 실험구에서 약 2배 이상의 높은 값이 측정되었다. 이는 키토산을 처리한 실험구가 대조구보다 독성에 대한 해독능력이 다소 높을 것으로 사료 된다. 본 연구 결과는 키토산 처리구의 혈액이 건강함을 암시해 주고 있다. 또한 키토산 처리구에서 총콜레스테롤 함량이 증가한 반면, LDL콜레스테롤은 키토산 미처리구보다 현저히 낮고 HDL콜레스테롤은 높은 것을 확인 할 수 있었고 또한, 총콜레스테롤에 대한 HDL 함량이 다소 증가한 것을 확인 할 수 있었는데 이는 키토산 처리구가 생리적으로 건강해 진 것을 잠정적으로 시사해주고 있다.

Table 2-3. Proximate chemical composition of Olive flounder that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks (%)

	Crude Protein	Crude Lipid	Moisture	Ash
Control	69.49±0.23	9.91±0.65	77.58±0.15	1.40±0.45
Chitosan-coated	69.48±1.16	10.99±0.62	77.48±0.33	1.41±0.33

Table 2-4. Serum analysis of Olive flounder that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks

	AST (U/L)	ALT (U/L)	Total protein (g/dL)	Glucose (mg/dL)	Phosphorus (mg/dL)	HGB (g/dL)
Non-coated	28.50±2.02	7.19±0.94	2.05±0.71	19.06±6.45	3.18±1.16	12.28±12.11
Chitosan-coated	11.64±4.64*	6.14±1.95	3.35±0.64	16.22±5.65	3.60±0.83	34.00±6.37*

Table 2-4. Continued.

	T-chole. (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL/T-chol (mg/dL)
Non-coated	145.59±53.02	78.00±5.69	28.50±0.12	1.50±0.29	0.54
Chitosan-coated	164.33±92.25	108.75±7.75*	5.50±0.08**	2.29±0.25	0.66

라. NBT (nitroblue tetrazolium) reduction 활성

Respiratory burst란 식세포 (phagocyte)가 식작용 (phagocytosis) 동안 혹은 다른 물질들에 의해서 자극받았을 때 산소 소비량이 증가함과 동시에 O_2^-, OH^-, H_2O_2 등과 같은 산소라디칼 (reactive oxygen intermediates, ROIs)을 다량으로 방출하는 현상을 말하며, 이러한 ROIs는 병원체를 죽이는데 매우 중요한 역할을 한다 (Siwicki, 1994). 이러한 respiratory burst를 측정하는 방법으로 NBT법 (Kumari 등, 2005; Castro 등, 2004)이 많이 사용되어져 왔으며, 최근 chemiluminescence (CL, Marquela 등., 2005; Lu 등, 2006; Seo 등, 2004; Kim 등, 2002)법이 일부 사용되고 있다. 본 실험에서는 NBT법을 사용하였으며, NBT 활성에 대한 유의성은 없었으나 키토산을 처리한 실험구가 대조구에 비하여 약간 높게 나타났다 ($p>0.05$) (Fig. 2-4).

어류에 있어 비특이적 면역반응이 얼마나 증대 되었는지를 가장 잘 반영할 수 있는 필수적인 척도로서 식세포활성 (phagocyte activity) 측정이 많이 사용된다. Professional phagocytes (granulocytes, monocytes, macrophage)의 respiratory burst은 $\cdot O_2^-$의 감소를 의미한다. 혈장과 phagosomal membranes에 있는 NADPH oxidase에 의해 O_2가 $\cdot O_2^-$로 변한다. 이 후에 superoxide는 자연 유발적인 효소로 hydrogen peroxide (H_2O_2), hypochlorous acid (HOCl), hydroxyl radical ($\cdot OH$), singlet oxygen ($^1O_2$) 등의 다른 종류의 ROS로 전환된다. 거기에 respiratory burst이 일어나는 동안 생성되는 ROS는 잠재적인 미생물 agent이다. 숙주방어이 있어 respiratory burst의 중요한 점은 NADPH oxidase의 결점에 의해 만성육아종을 앓는 사람은 NADPH 산화 효소가 없기 때문에 respiratory burst을 일으킬 수 없다. 어류 식세포도 호흡기파열 반응을 할 수 있는 NADPH 산화효소의 활동결과가 포유동물과 유사하게 나타났다. Respiratory burst은 어류 건강상태를 확인 할 수 있는 bioindicator이다. 그 외 혈청내 lysozyme 활성 및 보체의 활성 등이 사용되고 있으며, 병원성 세균을 실제로 어류에 접균하여 저항성을 평가하기도 한다. 현재까지 식세포의 활성을 측정하기 위해 사용되어진 방법은 식균률의 변화, 화학주성 변화 및 respiratory burst의 변화 등이다.

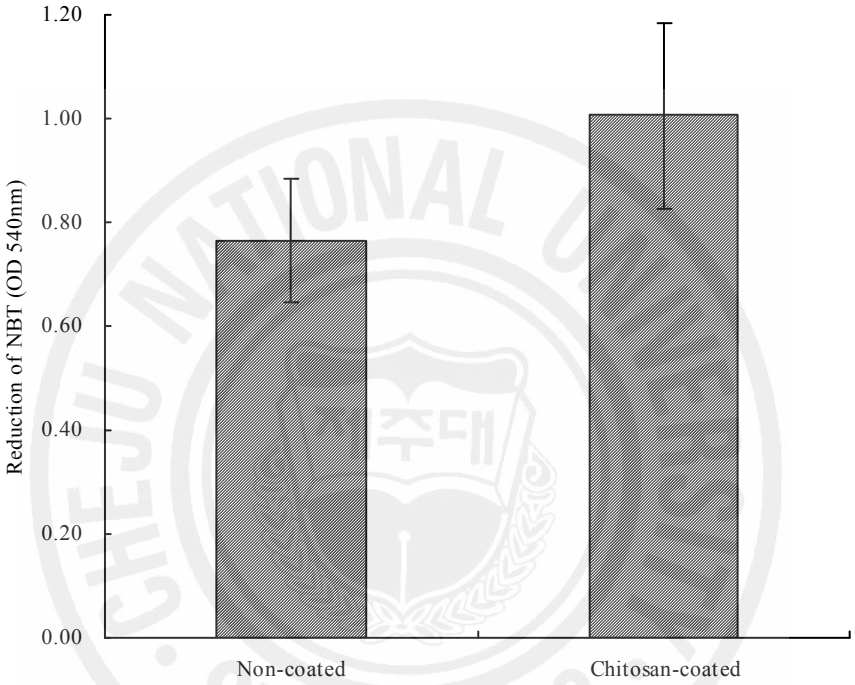


Fig. 2-4. NBT reduction of Olive flounder that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks.

마. Flow cytometry

호중구 (neutrophils)는 조혈기관에서 형성되고 혈액순환계를 따라 이동함으로써 respiratory burst activity (RBA)에서 주된 역할을 한다. 호중구는 식작용이 가장 왕성하며, 하루에 1,000억 개를 생산하고 세균이 침입 시에는 골수는 세균독에 자극을 받아서 2~3시간 내에 막대한 수효의 혈구를 생산하여 혈중으로 유입시킨다. 이러한 호중구의 잠재적인 이동능력을 알아보기 위하여 넙치의 두신세포에서 flowcytometry를 이용하여 측정하였다. 그 결과 두신세포에서는 키토산 코팅한 사료를 식이한 실험구에서는 migration이 일어난 호중구의 비율이 약 70%인 반면, 대조구에서는 약 7%로 대략 10배정도 키토산처리구의 호중구 이동력이 높은 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 2-5).

바. Lysozyme 활성

아가미, 피부, 소화계, 생식 이뇨관 등은 박테리아, 곰팡이, 바이러스 및 원생미생물에 대한 어류 감염의 초기 단계에서 방어를 한다. 이러한 표면들은 물리학적인 장벽이면서 항미생물 물질을 함유하고 배출한다. 점액과 배상세포에 있는 점액은 세 가지 방어 기작을 가진다. 첫째는 점액은 미생물의 껍질을 지속적으로 벗겨 미생물의 생성을 저지한다. 둘째, 미생물이 생성되었을 시 점액은 교차하여 장벽을 생성한다. 마지막으로 피부의 점액 및 다른 표면점막에는 항미생물 성질을 지니는 다양한 체액 요인이 함유되어 있다. 이런 것의 예로 lysozyme, complement, lectins, proteolytic enzyme 등이 있으며 최근에는 어류 점막에서 여러 가지 추가적인 방어 기작이 알려지고 있다. 아가미에 의한 NO 생성과 피부 단백질의 항미생물 펩타이드가 그 예이다.

라이소자임은 세균벽의 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglucosamine 사이의 β-1,4 결합을 분해하여 세균을 사멸시키는 효소이다. 라이소자임은 그람 양성균의 세포벽에는 직접작용하고, 그람음성균에 대해서는 항체와 보체의 작용을 증가시켜준 후에 펩티도 글리칸 층을 분해시킨다. 본 실험 결과 혈청의 lysozyme 활성에 있어서도 유의성은 없었으나 키토산 코팅한 사료를 식이한 실험구가 대조

구보다 더 높게 나타났다 ($p>0.05$) (Fig. 2-6). 체표 점막 (skin mucuc)의 라이소자임활성은 키토산 코팅한 사료를 식이한 실험구가 대조구에 비하여 유의적으로 높았고 ($P<0.05$) (Fig. 2-7), 체표 점막의 단백질 함량도 키토산 코팅한 사료를 식이한 실험구가 대조구에 비하여 약 4배정도 더 많이 함유하고 있음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 2-8).

JEJU NATIONAL UNIVERSITY · SINCE 1952 · 제주대

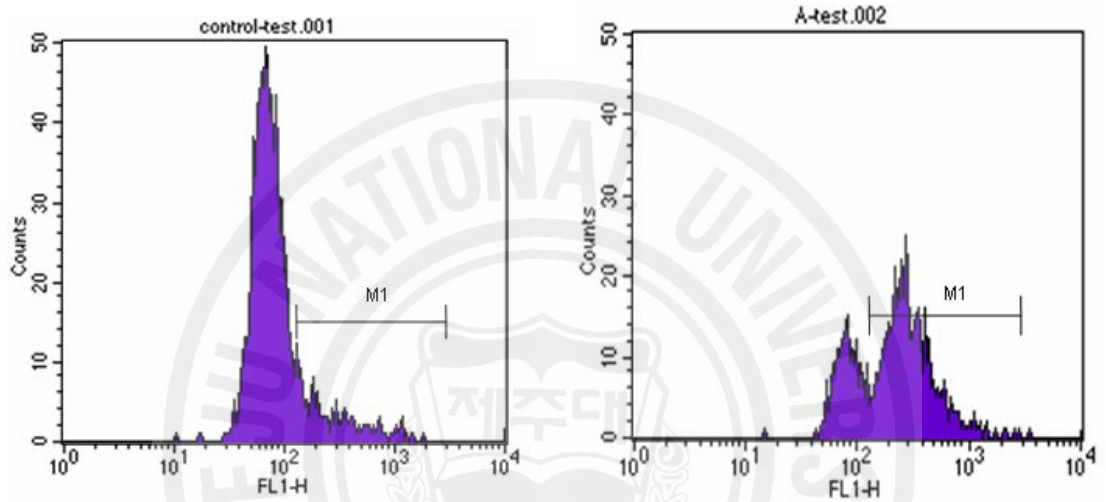


Fig. 2-5. Flowcytometry analysis for respiratory burst of Olive flounder that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks (Left: control, 11.09% of M1 content; Right: chitosan-coated, 70.25% of M1 content).

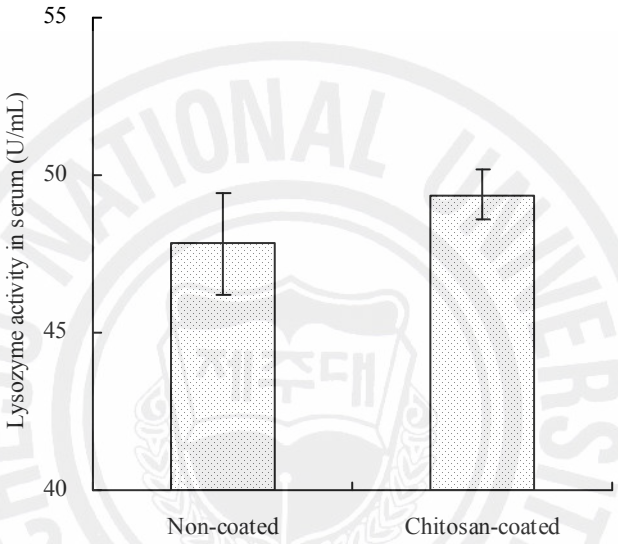
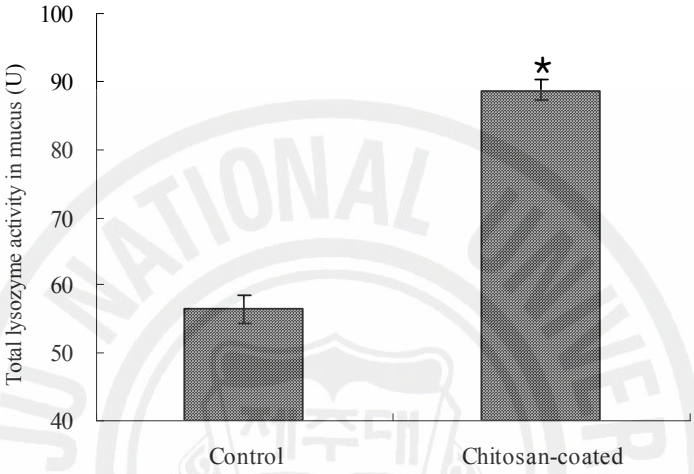


Fig. 2-6. Lysozyme activity in serum of Olive flounder that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks.



	Non-coated	Chitosan-coated
Total mucus amount (mL)	1.50	2.00
Lysozyme activity (U/mL)	37.65	44.32
Total lysozyme activity (U)	56.48	88.65

Fig. 2-7. Total lysozyme activity in mucus of Olive flounder that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks.

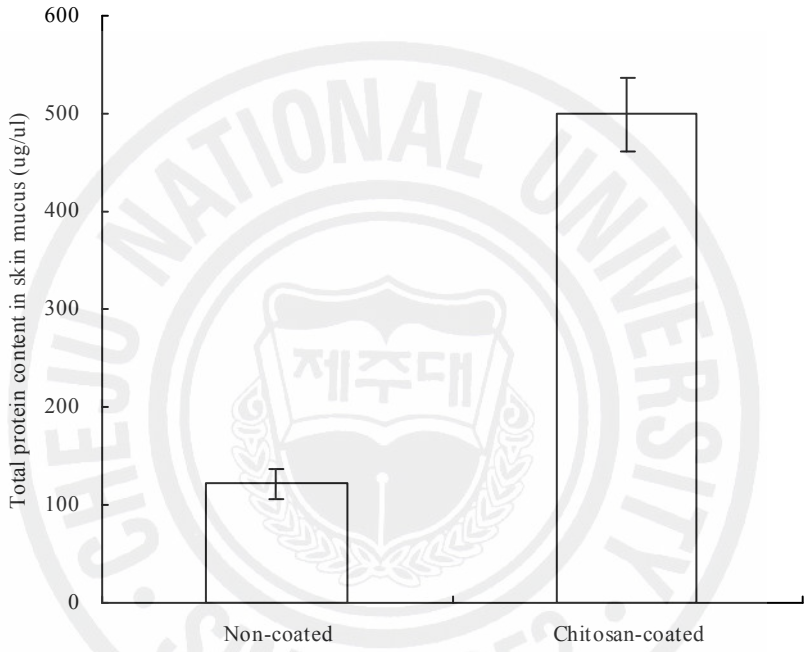


Fig 2-8. Skin mucus protein contents of Olive flounder that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks.

사. Myeloperoxidase 활성

어류의 호중구는 cytoplasmic granules에 myeloperoxidase를 포함하고 있는데 (Afonso et al., 1997), 주로 halide ions과 H_2O_2 형태로 존재하여 박테리아가 생생 될 때 할로겐화 (halogenation)하여 박테리아를 사멸 시키는 것 (Klebanoff & Clark, 1978)으로 알려져 있다. Fig. 2-9는 myeloperoxidase (MPO) 활성을 나타낸 것으로 MPO는 호중구에 존재하는 감염과 염증의 중심에서 작용을 하는 효소로, MPO는 H_2O_2를 HClO로 전환시켜 감염된 숙주에 독성을 주어 면역반응을 하는 역할을 한다. 본 실험 결과 키토산 코팅한 사료를 식이한 실험구가 대조구에 비하여 MPO 활성이 유의적으로 높은 ($P<0.05$)것을 확인 할 수 있었다.

아. DNA damage 보호 효과

유전 독성 억제 효과를 알아보는 방법으로 세포 DNA의 손상을 측정하는 방법이 최근 널리 쓰이고 있다. 체내에서 자유유리기 (free radical) 와 항산화물질 (antioxidant)간의 균형이 깨져 free radical 생성이 antioxidant보다 많아지면 신체는 산화적 stress를 받게 되고, 그 결과 DNA와 같은 민감한 biomolecule이 손상되어 결국은 퇴행성 만성질환으로 발전될 가능성이 높아진다. 특히, 활성 산화물질 (ROS)이 과도하게 존재할 때 이들은 더욱 파괴적이고 비가역적인 DNA 손상을 일으키며, 이것이 원인이 되어 mutagenesis를 초래하고 나아가 암으로까지 발전할 수 있게 된다. 따라서 본 실험에서는 세포의 DNA 손상을 측정하는 방법으로 comet assay를 이용하여 화학약품 (H_2O_2)의 농도에 따른 DNA 손상 정도를 측정하였다. 이 방법의 이론은 근본적으로 분자량에 따라 그 이동속도가 반비례되는 전기영동의 원리에 기초하고 있다. 즉 DNA 손상을 입은 세포를 lysis시켜 핵만 남긴 후 전기영동을 하게되면 DNA 분자량의 크기가 작을수록 핵으로부터 멀리 이동되므로 손상되어 잘려진 DNA 가닥이 많을수록 혜성 꼬리처럼 긴 모양이 생긴다. 이러한 tail movement를 측정하여 얻은 결과가 Fig. 2-10과 Fig. 2-11이다. 키토산을 식이한 실험구가 대조구에 비하여 손상되는 DNA량이 유의적으로 낮았다 ($P<0.05$).

본 실험의 결과를 통해 키토산 코팅한 사료를 식이한 넙치의 비특이적 면역반응을 증가 시킨다는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 MP사료를 코팅함으로써 사료의 부유시간을 증가 시켜 넙치의 사료 식이율이 향상됨과 동시에 무코다당류인 키토산을 식이함으로 넙치의 면역체계가 증가한 것으로 사료된다. 또한, 식이율의 증가와 MP사료의 퍼짐 현상 감소로 인해 사료 손실량이 감소하고, 양식 수환경이 상대적으로 깨끗해 진 것으로 사료된다. 앞으로 급속한 양식업의 팽창과 더불어 고밀도 사육으로 인한 많은 어병 발생요인들에 대한 저항성을 향상 시킬 수 있을 것으로 판단된다.

JEJU NATIONAL UNIVERSITY · SINCE 1952 · 제주대

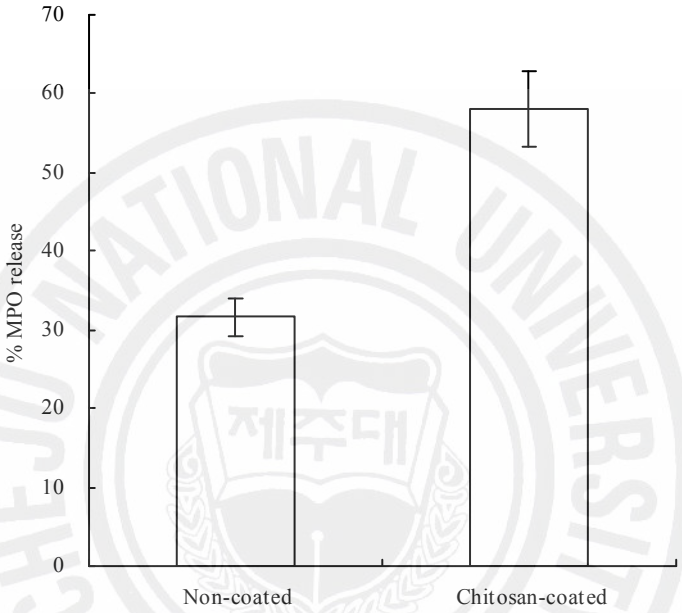


Fig. 2-9. Myeloperoxidase (MPO) activity of Olive flounder that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks.

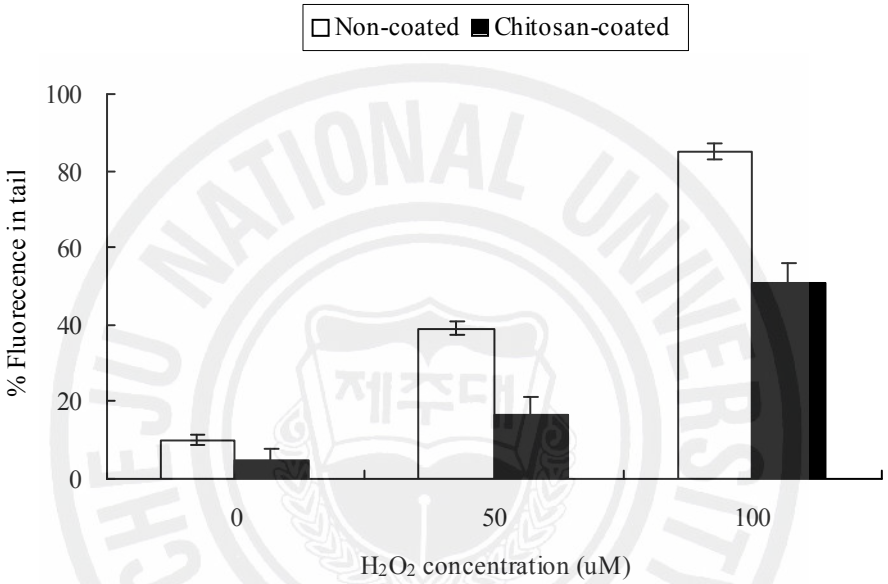


Fig 2-10. DNA damage of H_2O_2-induced Olive flounder lymphocyte.

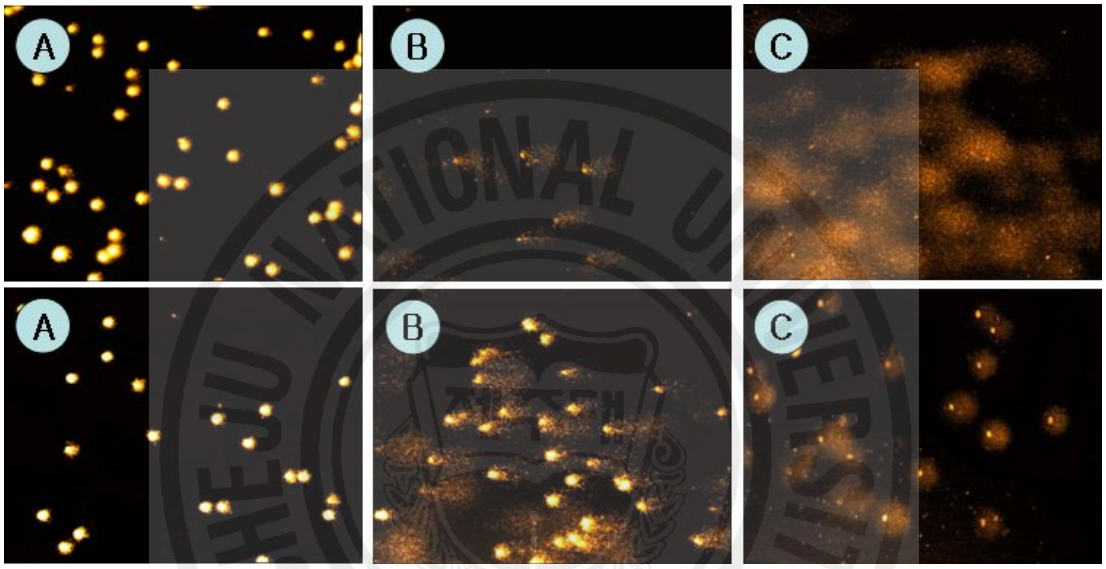


Fig. 2-11. Comet imaging of Olive flounder lymphocyte (Upper layer: lymphocytes of control group, down layer: lymphocytes of chitosan-coated group, A: Negative control (no-treated with H_2O_2), B: 500 uM H_2O_2-treated, C: 1000 uM H_2O_2-treated)

2. 키토산 코팅한 사료의 돌돔에 대한 효과

가. 성장률

본 실험에서는 단백질원으로 넙치 발효어분을 대체한 사료를 급이한 실험구와 대조구간의 혈액내 성분의 변화, 성장 및 면역반응에 미치는 영향을 평가하기 위하여 실시하였다.

여름철 고수온기 8주간 사료 공급 실험 후 사료내 단백질원을 양식장 부산물 유래 발효어분으로 부분적으로 대체하여 첨가한 사료를 섭취한 돌돔의 성장률 (WG, Fig. 2-12), 일간성장율 (SGR), 사료섭취율 (FI), 사료전환효율 (FCR) 및 생존률 (SUV)의 결과는 Table 2-5에 나타내었다. 어체중은 키토산을 코팅한 사료를 식이한 실험구와 비코팅 사료를 식이한 실험구의 성장률은 유사하였다. 일간 성장률 (specific growth rate, SGR), FCR 및 FI도 두 실험구에서 유사한 결과를 나타내었다.

나. 혈액분석

어류의 혈액성분은 영양, 건강상태 및 스트레스 해석의 차원으로 사용이 가능하고, 사료의 필수영양소의 결핍이나 그 어종이 처해있는 서식환경 및 성장에 따라서도 변화된다고 보고되었다 (Garrido et al., 1990; Siddiqui, 1977).

본 실험 결과 사육 4주째에는 키토산을 코팅한 사료를 식이한 실험구가 대조구보다 간독성을 나타내는 지표인 AST값이 약 2배정도 감소한 것을 확인 할 수 있었으나 다른 혈액학적 성분은 대조구와 키토산코팅 처리구 모두 유사한 결과를 나타내었다. 한편, 사육 8주째에도 두실험구에서 유사한 결과를 나타내었으나, 저혈구량을 나타내는 PCV (packed cell volume, %)값은 키토산처리구에서 2배 이상 높은 것을 확인 할 수 있었다.

Table 2-5. Growth parameter of parrot fish[1]

Diet	WG (%)[2]	SGR (%)[3]	FCR [4]	FI[5]	SUV (%)[6]
Non-coated	251.86±16.46	0.98±0.04	1.04±0.07	33.46±2.84	100
Chitosan-coated	244.83±12.95	0.96±0.10	1.09±0.06	37.00±0.96	100

[1]The value represented three different experiments and represented mean±S.D ($P<0.05$).
[2]WG (%)=100×(final body weight-initial body weight)/initial body weight
[3]SGR (%)=[(loge final body weigh-loge initial body weight)/days]×100
[4]FCR=dried feed weight/moist feed weight
[5]FI (g/g body weight)=diet dry weight (g)/ body weight(g)
[6]SUV (%)=survival rate

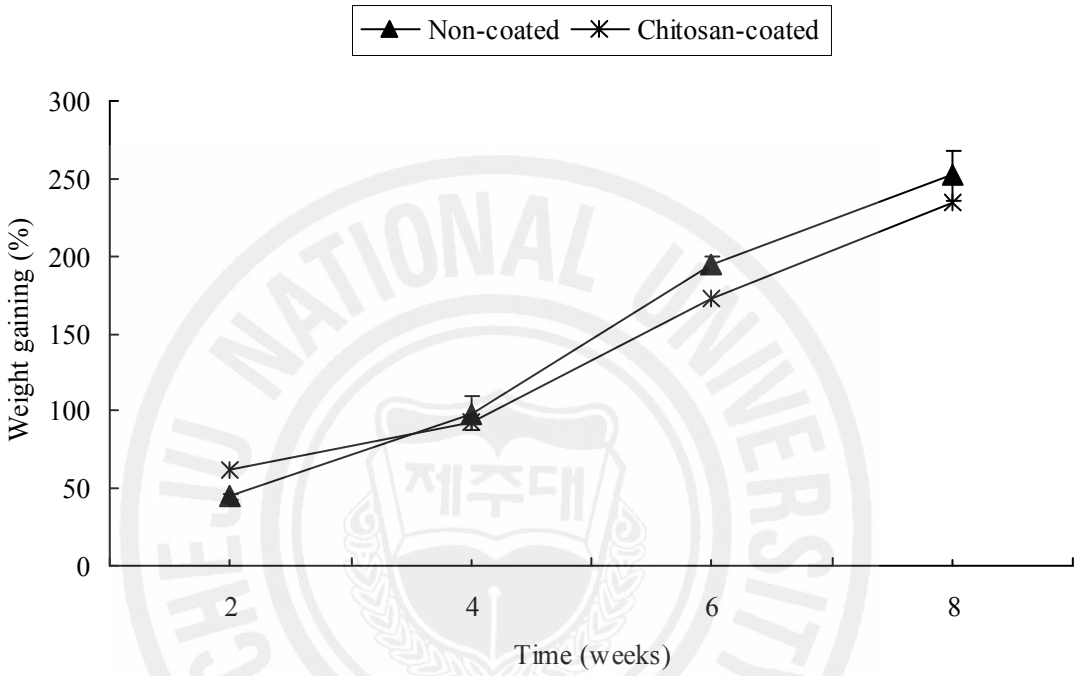


Fig. 2-12. Weight gaining of parrot fish that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 8 weeks and weighed every 2 weeks.

Table 2-6. The physiological and chemical analysis in blood for 4 weeks of parrot fish.

Diet	AST (U/L)	ALT (U/L)	Total protein (g/dL)	Glucose (mg/dL)	Phosphorus (mg/dL)	PCV (%)
Non-coated	70.67±3.15	13.67±1.15	3.50±0.17	221.00±16.27	15.90±1.42	30.00±2.65
Chitosan-coated	116.00±11.43	15.67±3.21	3.83±0.75	208.00±64.71	18.00±0.82	25.33±6.81

Table 2-6. continued.

Diet	T-chol (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL/T-chol (mg/dL)
Non-coated	149.67±14.22	62.67±10.79	17.67±0.58	7.00±1.00	0.45
Chitosan-coated	120.67±17.47	47.33±10.26	17.00±1.00	9.50±1.31	0.40

AST; Serum Glutamic-Oxalocetic Transaminase - SGOT (aspartate aminotransferase)
ALT; Serum Glutamic-Pyruvic Transaminase - SGPT
Hb; Hemoglobin
PCV (%); packed cell volume (Hematocrit)
T-chol; total cholesterol
HDL-C; high density lipoprotein
LDL-C; low density lipoprotein
TG; Tryglyceride

Table 2-7. The physiological and chemical analysis in blood for 8 weeks of parrot fish.

Diet	AST (U/L)	ALT (U/L)	Total protein (g/dL)	Glucose (mg/dL)	Phosphorus (mg/dL)	PCV (%)
Non-coated	39.00±8.85	7.67±1.08	4.08±0.38	104.83±15.76	18.98±5.19	18.97±4.30
Chitosan-coated	29.00±2.74	7.00±2.29	4.42±0.19	79.00±7.37	15.77±2.03	39.25±5.64

Table 2-7. continued.

Diet	T-chol (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL/T-chol (mg/dL)
Non-coated	71.00±2.76	33.47±0.33	10.87±0.77	4.67±0.76	0.46
Chitosan-coated	66.01±4.11	32.00±1.33	10.01±2.09	5.00±1.18	0.50

AST; Serum Glutamic-Oxalocetic Transaminase - SGOT (aspartate aminotransferase)
ALT; Serum Glutamic-Pyruvic Transaminase - SGPT
Hb; Hemoglobin
PCV (%); packed cell volume (Hematocrit)
T-chol; total cholesterol
HDL-C; high density lipoprotein
LDL-C; low density lipoprotein
TG; Tryglyceride

다. Respiratory burst 활성

Respiratory burst 활성은 Fig. 2-13에 나타내었으며, 비코팅 처리구와 키토산 코팅 처리구 모두 8주째에 4주째 보다 2배 이상 활성이 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 두 실험구간에 유의성은 없었지만 ($p>0.05$) 비코팅 사료를 급이한 대조구보다 코팅 사료를 급이한 실험구에서 respiratory burst 활성이 다소 높게 측정되었다.

라. 혈청의 lysozyme 활성

돌돔의 혈청의 세균 사멸 능력을 알아보기 위하여 라이소자임 활성을 측정하여 Fig. 2-14에 나타내었다. 사육 후 4주째에는 코팅제 처리구가 비코팅제 처리구 보다 5배 이상 높은 활성을 나타내었고, 사육 후 8주째에도 키토산 코팅제 처리구에서 4배 이상 높은 활성이 나타났다.

돌돔 사육 실험 결과 비록 respiratory burst 활성은 키토산 코팅제 처리구와 비처리구 사이에서 그다지 큰 차이를 보이지 않았지만 라이소자임활성에서는 크게 나타났다.

일반적으로 선천성 면역 (innate immunity)은 획득면역 (adaptive immunity)에 비해 특이성이 약하며, 체계적인 면에서도 차이가 나는 것으로 알려져 있다. 그러나 수산 동물의 생체 방어적인 측면에서 볼 때 선천성 면역은 다양한 병원생물의 침입에 대한 숙주의 첫 번째 방어선으로서 매우 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 본 연구 결과 키토산 코팅한 사료를 식이한 돌돔의 비특이적 면역 기전 중 혈청 내 라이소자임의 활성이 증가 한 것을 확인 할 수 있었다.

이는 EP (extruded pellet)사료를 코팅하여 무코다당류인 키토산을 식이함으로 넙치의 면역체계가 증가한 것으로 사료되며, 앞으로 급속한 양식업의 팽창과 더불어 고밀도 사육으로 인한 많은 어병 발생요인들에 대한 저항성을 향상 시킬 수 있을 것으로 판단된다.

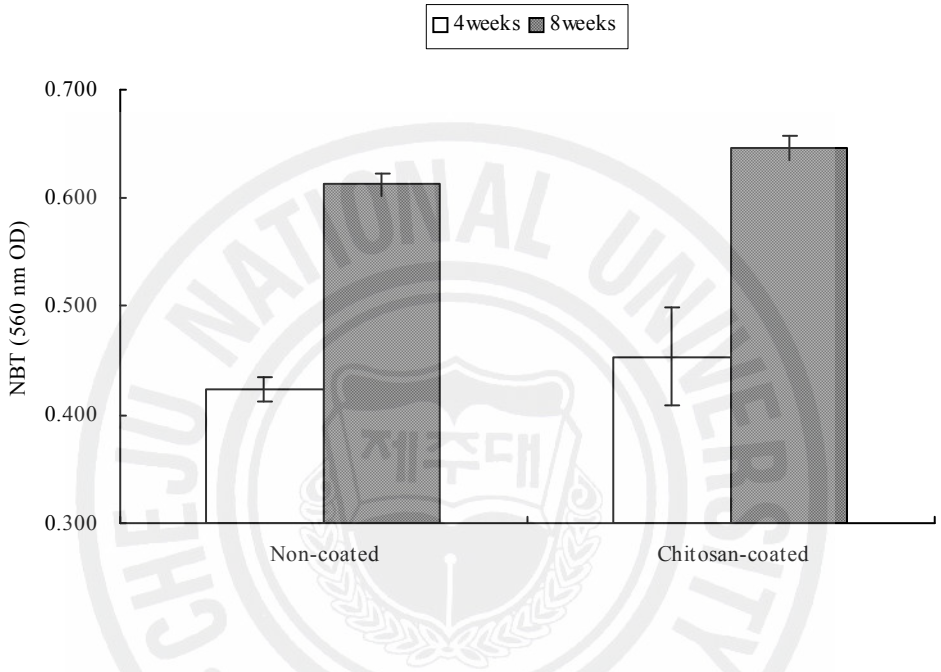


Fig. 2-13. NBT reduction of parrot fish that was fed with chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks.

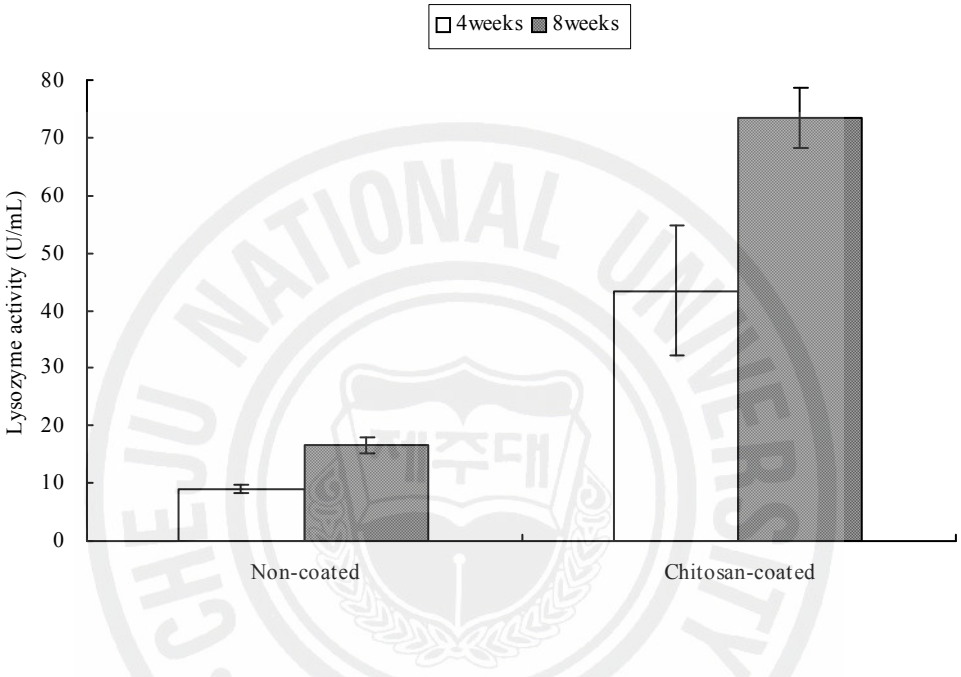


Fig.. 2-14. Lysozyme activity in serum of Parrot fish that was fed chitosan-coated and non-coated control diet for 12 weeks.

요 약

2006년 해양수산부 통계에 따르면 국내 양식 비율은 전남이 43.3%, 경남 31.85%, 충남 10.9% 그리고 제주 7.1% 비율로 양식이 행해지고 있으며, 양식어의 판매익은 제주에서 생산한 것이 25.5%를 차지하고 있다. 제주 지역의 어종별 양식현황을 살펴보면 넙치가 94%이상을 차지하고 있다. 2005년 제주 양식 어류의 폐사율은 20~30% 정도였고, 금년 (2006년)에는 34%로 나타났다. 지구 온난화 등에 의한 수환경의 잦은 변화로 양식어의 폐사량은 매해 증가 하고 있으며, 앞으로 더욱 가속화 될 전망이다. 이렇게 발생한 양식장 부산물인 폐사어는 양식어민 농가에 경제적인 손해를 안겨 줄 뿐만 아니라 그 양도 많아 처리난도 하나의 큰 사회 문제로 대두 되고 있다. 일부 양식장에서는 수지 타산의 문제 때문에 불법적으로 매립을 하기도 하여 양식장 부산물 처리문제를 더욱 대두시키고 있다. 따라서 본 연구를 통하여 다량으로 발생하고 있는 양식장 부산물을 효율적으로 이용하고자 무균 발효 어분을 제조하였다. 본 어분을 생사료에 함유시켜 해산어류를 양식 하였을 때, 생사료만을 식이 했을 때보다 성장률 및 면역 활성이 증가 한 것을 확인 할 수 있었다. 또한, 본 연구 결과의 생산물인 발효 어분에 수분 조정제로서 감귤박을 첨가함으로서 기능성에 대한 변화를 살펴 본 결과 화학약품 (H_2O_2)에 대하여 human cell 및 어류의 lymphocyte에서 우수한 보호 효과를 확인 할 수 있었다.

또한, 어류 양식 비용에 있어 어분이 차지하는 비율이 어종에 따라 다르긴 하나 30~60%인 점을 감안할 때, 양식장 부산물 유래 발효 어분 생산에 대한 긍정적인 관점을 더해 주고 있다. 따라서 양식장 부산물 유래 발효 어분을 사용하게 되면 건강한 어류를 생산 할 수 있을 뿐 아니라, 어분 수입량을 절감 할 수 있어 외화 낭비를 줄일 수 있을 것이다.

우리나라에서는 해산어 양식에 사용되고 있는 배합사료와 생사료의 사용량이 2004년 기준 총 47만톤으로 증가되고 있으나, 아직까지 양어 사료가들의 배합사료에 대한 불신으로 인해 양식현장에서는 넙치의 육성용 먹이로 메가리와 전갱

이 같은 생사료를 주로 사용하는 실정이며, 그 사용량이 전체 사용량의 약 80%에 이르고 있다. 생사료는 성장도에 비하여 가공, 유통 및 보관 등에 많은 문제점들이 잠재되어 있을 뿐만 아니라 사료 유실로 발생하는 수질 오염은 심각한 환경적 문제를 유발 할 수 있으므로 지속적으로 공급할 경우, 많은 불이익을 초래 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 생사료의 유실을 감소시키기 위해 기능성 생리 활성을 지니는 biopolymer인 키토산을 이용하여 코팅제를 제조하였다. 코팅제의 주 원료로 사용된 키토산은 이미 다양한 생리 활성 기능이 밝혀져 본 연구에서도 양식 어류의 성장과 더불어 병원균에 대한 저항성을 알아보기 위하여 산화적 스트레스에 대한 적응과 면역 반응에 대해서도 연구를 수행 하였다. 연구결과 키토산으로 코팅한 MP 사료를 급이한 수조의 수환경이 대조구에 비하여 생물화학적 산소요구량 (COD)과 부유물질 (SS)량이 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다. 넙치 성장률에 있어서도 키토산을 코팅한 사료를 식이한 실험구의 어류의 성장이 대조구보다 약간 높게 나타났으나 유의적으로 성장을 증가시키지는 않았다. 하지만 lymphocyte의 화학약품에 대한 감수성을 comet assay를 통하여 살펴본 결과, 키토산을 코팅한 사료를 섭취한 넙치의 lymphocyte가 대조구보다 H_2O_2에 대한 감수성이 낮게 나타났으며, NBT reduction 및 체표 점액 라이소자임 활성 등의 면역학적인 반응도 키토산 코팅한 사료를 섭취한 실험구에서 더 높게 나타나 면역 활성이 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 돌돔의 성장실험에서는 키토산 코팅 처리한 EP 사료를 처리한 것이 그렇지 않은 실험구에 비하여 성장률에서는 유의적인 차이가 없었으나 면역증강효과에서는 유의적인 차이를 확인할 수 있었다.

따라서 본 연구를 통해 제조한 양식장 부산물 유래 발효 어분 전적으로 수입에 의존하고 있는 어분 단백질원에 대한 해결 방안을 모색할 수 있어 경제적 손실도 줄일 수 있을 것으로 예상되며, 아울러 대량 폐사로 인한 어류 사체 처치 곤란 난을 해결 해 주는 등의 수산 농가에 많이 이점을 안겨 줄 것으로 사료된다. 또한 생사료 코팅제인 키토산 코팅 용액의 사용은 사료의 부유력 및 결착력을 증가시켜 양식어의 사료 손실량을 줄임과 동시에 양식수조 환경 오염도 감소시켜 앞으로 급속한 양식업의 팽창과 더불어 고밀도 사육으로 인한 많은 어병 발생요인들에 대한 저항성을 향상 시킬 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

Alam MS, Tershima SI, Koshiho S, Ishikawa M. 2002. Arginine requirement of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* estimated by growth and biochemical parameters. *Aquaculture*. 205, 127-140.

Anderson D.P. 1992. Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: application to aquaculture, Annual Review of Fish Diseases 2 281-307.

Anderson, D.P. and Siwicki, A.K. 1994. Duration of protection against Aeromonas salmonicida in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion, Progressive Fish-Culturist 56, 258-261

Bols N. C., Brubacher, J. L., Ganassin, R. C., Lee, L. E., 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. Dev. Comp. Immunol. 25, 853-873.

Brown E. D. 1997. Dispute settlement and the law of the sea: The UN convention regime. Marine Policy, 21, 17-43.

Brown M.E., 1957. Experimental studies on growth, (in) M.E. Brown (ed.), The physiology of fishes. Vol. Ⅰ. Academic press New York, pp. 361-400.

Castro R., Zarra I., Lamas J. 2004. Water-soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes. Aquaculture. 229, 67-78.

Cho SH, Lee SM, Lee JH. 2005. Effects of extruded pellets and raw fish-based moist pellet on growth and body composition of flounder, *Paralichthys olivaceus* for 10 months. Journal of aquaculture. 18, 60-65.

Cuesta A. Esteban M.A. and Meseguer J. 2003. *In vitro* effect of chitin particles on the innate cellular immune system of gilhead seabream (*Sparus aurata* L.), Fish and Shellfish Immunology 15. 1-11.

Dautremepuits C., Paris-Palacios S., Betoulle S. and Vernet, G. 2004. Modulation in hepatic and head kidney parameters of carp (*Cyprinus*

carpio L) induced by copper and chitosan, Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology Toxicology & Endocrinology 137, 325-333.

Esteban, M.A. Cuesta, A. Ortuno J. and Meseguer J. 2001. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin in gilhead seabream (Sparus aurata L.) innate immune response, Fish and Shellfish Immunology 11 303-315.

FAO: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2004. Cites FishBase; cites FishBase as an example of an open source software. World Wide Web electronic publication, 27

Heo SJ, Park PJ, Park EJ, Cho SK, Kim SK and Jeon YJ, 2005. Antioxidative effect of proteolytic hydrolysates from *Ecklonia cava* on radical scavening using ESR and H_2O_2-induced DNA damage. Food Science and Biotechnology. 14(5): 614-620

Jairo D, Gabrial V, Barry., Gabriela P, Chantal M. 2006. Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation. Immunology. 211, 341-350.

Kang YJ, Lee SM, Hwang HK and Bai SC. 1998. Optimum dietary protein and lipid levels on growth in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). Journal of aquaculture. 11, 1-10.

Kikuchi K, Furuta T, Honda H. 1997. Use of meat and bone meal as a protein source in the diet of Juvenile Japanese flounder. Fisheries science. 63, 29-32.

Kim KD, Lee SM. 2004. Requirement of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids for juvenile flounder *Paralichthys olivaceus* . Aquaculture. 229, 315-323.

Kim KH, Hwang YJ, Kim KW, Bai SC, Kim DS. 2002. Effects of dietary aloe on chemiluminescent responses of peripheral blood phagocytes and resistance against *Edwardsiella tarda* Ewing and McWhorter. 1965 in the cultureed Olive founder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel).

Aquaculture research. 33, 147-150.

Kim KW, Kang YJ, Choi SM, Wang XY, Choi SH, Bai SC, Jo JY, Lee JY.. 2005a. Optimum dietary protein levels and protein to energy ratios in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Journal of World aquaculture research. 36, 165-178.

Kim KW, Kang YJ, Kim KM, Lee HY, Kim KD, Bai SC. 2005b. Long-term evaluation of extruded pellet diets compared to raw fish moist pellet diet for growing flounder, *Paralichthys olivaceus*. Journal of aquaculture. 18, 225-230.

Kim KW, Wang XJ, Bai SC. 2002. Reevaluation of the dietary protein requirement of Japanese flounde, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture research. 35, 250-255.

Kumari J. and Sahoo PK. 2005. Effects of cyclophosphamide on the immune system and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus*. Fish and shellfish immunology. 19, 307-316.

Kumari J. and Sahoo PK., Swain T., Sahoo SK., Sahu AK. and Mohanty BR. 2006. Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asian catfish *Clarias batrachus*. Aquaculture. 252, 121-127.

KNSO (Korea National Statistical Office). 2006. KOSIS statistical DB, DeaJeon, Korea.

Lu C., Song G., Lin JM. 2006. Reactive oxygen species and their chemiluminescence-detection methods. Trends in analytical chemistry. 25, 985-995.

Marquele FD., Mambro VMD., Georgelli SR., Casagrande R., Valim YML, Fonseca MJV. 2005. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 39, 455-462.

Mata AI., A. Gibello A. Casamayor MM. Blanco L. Domínguiz, and J. F. Fernández-Gatrayzábal 2004. Mutiplex PCR assay for detection of

bacteria pathogens associated with warm-water *streptococcus* in fish. Applied and Environmental Microbiology. 70, 3183-3187.

Natural Research Council (NRC), 1993. Nutritional requirements fo fish, 144. National academic press, Washington. DC. USA.

New M. B. 1999. Global aquaculture: Current trends and challenges for the 21st Century. Aquaculture. 30, 8-13.

Pickering A.D., 1992. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. Aquaculture. 100, 125-139.

Quade MJ., Roth JA. 1997. A rapid, direct assay to measure deregulation of bovine neutrophil primary granules. Ver. Immunology and immunopathology. 58, 239-248.

Sakai M., Otubo T, Atsuta S., Kobayashi M. 1993. Enhancement of resistance to bacterial infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by oral administration of bovine lactoferrin. J. Fish Dis., 16, 239-247.

Sakai M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture, 172, 63-92.

Secombes, C.J., 1990. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., van Muiswinkel, W.B. (Eds.), Techniques in Fish Immunology. SOS Publications, New Jersey, USA, pp. 137 154.

Seo JY, Lee JH, Kim GU, Lee SM. 2005. Effect of extruded and moist pellets at different feeding rate on growth and body composition of juvenile flounder, *Paralichthys olivaceus*. Journal of Aquaculture. 18, 26-30.

Seo SJ, Jung SJ, Lee SH, Kim NY, Eom HK, Huh MD, Jung HD Chung JK. 2004. Effects fo chloramphenicol on chemiluminescence response of leukocytes isolated from Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Journal of fisheries and pathology. 17, 217-222.

Siwicki, A.K. and Dunier, M. 1994. In vitro restoration of antibody-secreting cells and lymphocyte proliferation activity by nitrogranulogen after in vivo

immunosuppression due to lindane in rainbow trout Oncorhynchus mykiss, Ecotoxicology and Environmental Safety. 27, 316-323

Siwicki, A.K. Anderson D.P. and Rumsey, G.L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis, Veterinary Immunology and Immunopathology. 41, 125-139.

Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey, G.L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against urunculosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 41, 125-139.15.

Smith HW. 1935. Methabolizm of the rung fish. Ⅱ. Effects of feeding on meat on the metabolic rate. Journal of Cell. Comparative Physiology. 6, 335-339.

Suzuki K., Okawa Y, Hashimoto K. Suzuki S. and Suzuki M., 1984. Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis, Microbiology and Immunology. 28, 903-912.

감사의 글

누군가에게 감사와 존경의 마음을 전하는 것은 당연한 일이면서도 항상 쑥스러운 일 같습니다. 또 이런 낱장에 마음을 글로 표현하는 것은 더욱 어려운 일 같습니다. 그러나 지난 2년의 석사과정을 포함하여 학부 생활에 대해 도움을 주신 분들에게 따로 감사의 길을 전할 길이 없어 식상 하지만 이렇게 몇 자 적어 봅니다. 항상 부족 하지한 제게 웃음과 격려를 잃지 않으시고 본 논문이 있기까지 세심한 가르침으로 이끌어주신 전유진 교수님께 머리 숙여 진심으로 감사드립니다. 또한 바쁘신 중에도 본 논문이 좀 더 나은 방향으로 나아 갈 수 있게 심사해 주시고 관심을 보여주신 송춘복 교수님과 이경준 교수님, 항상 곁에서 많은 관심과 조언을 아끼지 않으셨던 이기완 교수님, 이제희 교수님, 허문수 교수님, 여인규 교수님께도 깊이 감사의 마음을 전합니다. 또 먼발치에서 무언의 조언으로 웃음을 보내주신 노섬 교수님, 이영돈 교수님, 최광식 교수님, 김기영 교수님께도 감사의 마음을 전합니다. 그리고 연구에 전념 할 수 있도록 많은 도움을 주신 김수현 교수님, 하진환 교수님, 김소미 교수님 그리고 이영재 교수님께도 감사의 마음을 전합니다.

학교생활을 하는 동안 항상 옆에서 힘이 되 주었던 우리 실험실의 큰 오빠이자 저의 정신적 지주 역할을 해준 허수진 선배님, 무심한 듯하나 항상 관심을 쏟아준 김길남 선배님, 어리지만 선배처럼 잘 대해주신 이승홍 선배님, 동료이자 사랑하는 친구들인 강성명, 고석천, 안긴내, 이지혁, 그리고 제 잔소리에도 변함없이 밑에서 옆에서 후원해 준 김대승, 김아름다슬, 조은산후배님께도 항상 고마운 마음을 전합니다. 또한 멀리서 삼촌처럼 좋은 말씀 많이 해주신 김원석 본부장님과 양현필 차장님께도 감사의 마음을 전하며, 대학원 생활하면서 많은 도움을 준 선배님, 동기들 그리고 후배들께도 고개 숙여 감사의 마음을 드립니다. 또한 인생선배로서 많은 조언을 해주신 강봉조 박사님, 강도형 박사님, 박경일 박사님, 정원교 박사님께도 감사의 말씀을 드립니다. 또한 좋은 논문을 쓸수 있게 소스를 주신 아쿠아그린텍(주)에 제종선 전무님과 이정석 박사님과 사육실험을 도와주신 송영보 박사님께 감사의 말씀을 전하며, 아울러 사료를 제조해주신 양

어사료영양학연구실원과 사육실험을 도와주신 해양과환경연구소 어류생리생태연구실원께도 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로 항상 저를 믿어주신 엄마, 맏이로 자라 항상 굳은 일을 도맡아 했던 우리 언니, 어느덧 꼬마에서 어른으로 잘 따라 와준 우리 동생에게 사랑의 마음을 전합니다. 그리고 형부, 제부 저희 가족 곁에 와주셔서 감사하고, 귀여운 조카 가은이와 하진이 이 세상에 태어나서 축하하고 건강하게 자라나길 바랍니다. 그리고 항상 제 곁에서 든든한 버팀목이 되어 준 이봉주 선배님께 감사의 마음과 함께 이 논문을 바칩니다.

JEJU NATIONAL UNIVERSITY · SINCE 1952 · 제주대