

碩 士 學 位 論 文

양어장 배출물 발효물의 사료첨가가
넙치, *Paralichthys olivaceus*의
성장에 미치는 영향



姜 智 雄

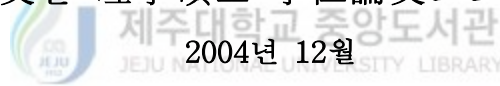
2004年 12月

양어장 배출물 발효물의 사료첨가가
넙치, *Paralichthys olivaceus*의
성장에 미치는 영향

指導教授 李 榮 敦

姜 智 雄

이 論文을 理學碩士 學位論文으로 提出함



2004년 12월

姜智雄의 理學碩士 論文을 認准함

審査委員長 최 광 식 인)

委 員 이 경 준 인)

委 員 이 영 돈 인)

濟州大學校 大學院

2004年 12月

Effects of fermented product from sludge
in land-based seawater fish farm on
growth performance of olive flounder,
Paralichthys olivaceus

Ji Ung Kang

(Supervised by Professor Young Don Lee)



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

DEPARTMENT OF MARINE BIOLOGY GRADUATE
SCHOOL CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

Dec. 2004

목 차

Abstract	i
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 배출물의 발효와 조성	3
1) 발효조건	3
2) 배출물과 발효물 성분분석	5
2. 어류사육실험	5
1) 실험어 및 사육실험	6
2) 사료제작 및 공급	6
3) 성장	7
3. 배상세포 분석	8
4. 혈액성상과 혈청분석	8
5. 통계처리	9
III. 결 과	10
1. 발효조건 탐색 및 발효물의 물리화학적 특성	10
1) 발효조건 탐색	10

2) 배출물의 물리화학적 특성	12
3) 병원균 검사	18
2. 어류 사육실험	20
1) 1차 사육실험	20
2) 2차 사육실험	23
3. 배상세포 분포	26
4. 혈액성상과 혈청성분	29
1) 혈액성상	29
2) 혈청성분	31
IV. 고 찰	34
V. 요 약	39
VI. 참 고 문 헌	40
감사의 글	

Abstract

There are 300 fish farms in Jeju Island, and the major aquaculture fish species is olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. This study was investigated to examine the effect of oral administration with fermented sludge product on growth performance of olive flounder and availability of the product as an additive in diets for fish. Fish were distributed into five groups; control, solution of fermented diluted sludge added with concentrated citrus juice (FDSC), solution of fermented sludge added with concentrated citrus juice (FSS), concentrates of FDSC (CFDSC) and solution of fermented sludge (FS). Fish were fed the experimental diets for 63 days

Concentration of free amino acids in EM-fermented product was relatively higher than that in the effluent sludge. The concentrations of harmful inorganic (Cr, Hg) were reduced after fermentation of the sludge.

Growth of olive flounder fed diets containing FSC and CFDSC was higher than that of the control ($P < 0.05$). The weight gain of fish fed CFDSC diet was significantly higher compared to that of fish fed the control diet. Feed coefficient value was lower in FSC, CFDSC, and FS than in the control diet.

In haematological characteristics, RBC contents of FDSC and CFDSC groups were higher than that of the control group ($P < 0.05$). Hemoglobin (Hb) concentration in fish fed FDSC and FSC diets were significantly higher compared to that of fish fed the control group ($P < 0.05$). Fish fed the diets containing CFDSC had the highest total protein among all groups ($P < 0.05$). Blood glucose level of fish fed the diets containing FDSC and FS was significantly lower than that of fish fed the control diet ($P < 0.05$). A lower blood LDH was observed in fish fed FSC diet compared to the control group ($P < 0.05$). No significant differences were found in GOT and GPT values

among treatment groups ($P>0.05$).

EM-fermented product of fish farm sludge with concentrated citrus juice might be used as an additive of flounder diet.



I. 서 론

현재 제주도에는 약 300여개의 육상 어류양식장이 연안을 따라 분포하고 있으며 주요 양식어종으로 넙치, *Paralichthys olivaceus*를 사육하고 있다. 제주도내 넙치 양식장에서는 치어기를 제외하고 육성 단계에서 주로 MP (Moist pellet)를 사용하여 공급하고 있다. MP 제작에 사용되고 있는 생사료는 양식대상 어종의 주요 단백질 공급원이지만 현재 연안 자원 감소로 인해 사료원가 상승 등의 문제점이 발생하고 있다. 이와 같은 문제점을 보완하기 위해 어류 사료 단백질원으로 면실박 (Lee and Yoo, 1996), 대두박 (Boonyaratpalin et al., 1998; Kikuchi, 1999; Kim et al., 2000a), yellow lupin kernel meal (Glencross et al., 2004), corn gluten meal (Regost et al., 1999; Gomez-Requeni, 2004) 등 식물성 단백질을 이용한 양어 사료 개발이 활발하게 시도되고 있다.

최근 어류 사료의 기능성을 향상시키기 위해 해조류와 육상식물 등에서 생리활성이 높은 물질을 추출하여 사료에 첨가하는 연구들이 수행되고 있다. Chlorella 및 미역, 갈파래 등과 같은 해조류에서 추출한 추출물은 어류사료에 첨가하여 공급하였을 때, 은어, *Pelcoglossus altivelis*와 참돔, *Pagrus major*, 넙치의 성장과 생리활성 증진에 도움을 주었다 (Nakagawa and Kasahara, 1986; Nematipour et al., 1988). 해조류를 이용한 어류사료 첨가제들은 어류의 생리적 기능의 개선뿐만 아니라 우수한 성장과 사료효율향상에 효과가 있다 (Yone et al., 1986). 육상식물 중 감초에서 분리한 glycyrrhizin을 어류 사료에 첨가하여 공급했을 때, 성장과 질병 저항성 향상에 효과가 있고 (Jang et al., 1992), 몇몇 한약재를 혼합한 상업용 한방제를 이용하여 어류의 성장 향상 및 생리적 활성 증강, 육질 개선 등을 이루었다 (Kim et al., 1998; Lee et al., 1998; Kim et al., 2000b).

MP는 사료제조 시 생사료를 갈아서 배합사료와 혼합하여 pellet 형태로 만들기 때문에 물에 녹아 흩어지는 성질이 있어 많은 양의 배출물이 발생하고 있다. 제주도 육상양식장에서 배출되는 배출물 양에 대한 정확한 산출은 양어장 마다 어류 사육밀도와 사양관리가 각각 다르기 때문에 매우 어렵다. 양어장 수면적 3,000

m²를 기준으로 배출물 수거결과 하루 6 kg정도가 배출되었고, 배출되는 배출물은 대부분이 양식어류가 섭취하고 남은 잔류 사료로 단백질 함량이 높은 것이 특징이다 (Moon et al., 2002). 그러나 어류 양식장에서 배출되는 배출물 재활용 방안은 아직까지 확립되어 있지 않다.

육상에서 가축사육에 따른 배출물은 유용미생물 (Effective Microorganisms, EM)과 광합성세균을 사용하여 부패취를 현저하게 줄이고 (Ryu et al., 1998), 농업용 비료로 이용하고 있다(Koh et al., 1997). 그리고 유용미생물을 이용한 감귤 발효 추출액은 넙치의 건강과 성장 향상에 도움을 주고 (Song, 2002), 젖산균 (lactic acid bacteria), 효모 (yeast) 등은 어류의 장 활성화 및 성장, 건강도 향상에 영향을 준다 (Gildberg and Mikkelsen, 1998; Lee et al., 2000; Tovar et al., 2002)

이 연구는 넙치양식장에서 발생하는 배출물을 재활용하기 위한 방안으로 배출물의 산업적 이용가치를 탐색하였다. 양어장에서 배출되는 배출물을 기질로하여 유용미생물로 발효시킨 발효물을 넙치사료에 첨가하여 공급하였을 때, 배출물 발효물의 사료 첨가제로서 안전성과 적정 농도, 넙치의 성장, 장상피조직의 변화, 혈액학적 변화 등을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 배출물의 발효와 조성

1) 발효조건

실험에 사용된 양어장 배출물은 북제주군 소재 육상 넙치 양식장에서 경사식 screen filter로 수거하여 발효전까지 -20°C 에서 보관하였다. 발효에 사용된 미생물의 에너지원으로 당밀과 제주도 지방 개발공사에서 시판되는 감귤농축액을 구입하여 사용하였다. 수거된 양어장 배출물은 분쇄기로 분쇄한 후, 당밀 또는 감귤농축액과 혼합하여 발효하였다 (Fig. 1).

발효에 이용한 미생물 균주는 제주대학교 지역기술혁신센터 (TIC)에서 공급받아 사용하였다. 발효과정에 따른 미생물 균수의 변화를 알아보기 위해 발효 개시일에서 종료일까지 매일 발효시료를 채집하였다. 채집된 시료는 멸균생리식염수를 이용 $10^2\sim 10^7$ 배로 희석하여 선택배지에서 배양한 후, 발생된 콜로니수를 측정하여 균체수를 조사하였다.

젖산균 *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014)은 GYP 액체배지로 30°C 의 항온기 내에서 정치배양하였으며, 균수변화는 24시간마다 MRS 한천배지를 이용하여 30°C 의 항온기 내에서 24~48시간 배양한 후 출현한 균체수를 희석평판법으로 측정하였다.

효모 *Saccaromyces cerevisiae* (IFO 0203)는 YM 액체배지로 25°C 의 항온기 내에서 정치배양하였다. 효모 균수변화는 24시간마다 YM 한천배지를 이용하여 25°C 의 항온기 내에서 5~7일간 배양한 후 출현한 균체수를 희석평판법으로 측정하였다.

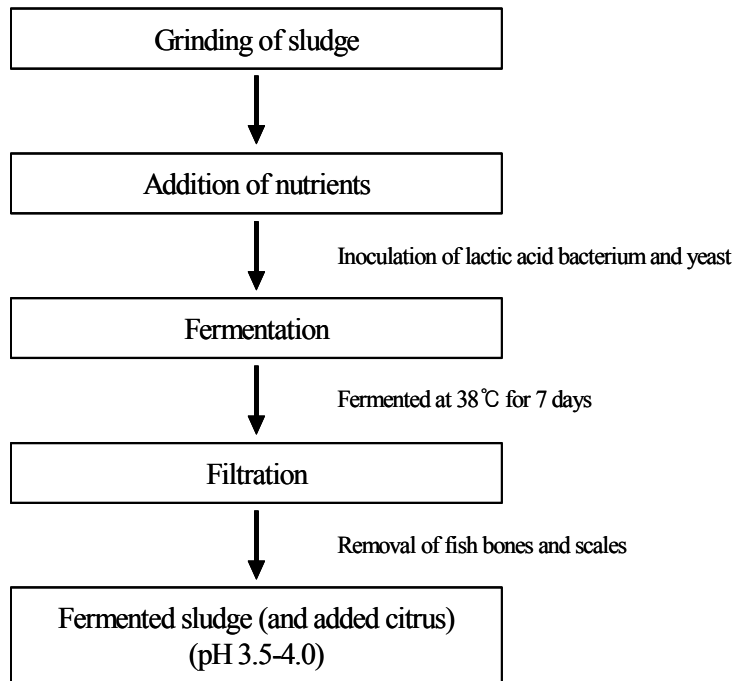


Fig. 1. Fermentation process of sludge by lactic acid bacterium and yeast.



2) 배출물과 발효물 성분분석

제주도 육상어류양식장에서 생사료를 사용하여 제조한 MP와 사료공급 후 배출되는 배출물 그리고 배출물 발효물의 일반성분은 Kjeltac Auto 1030 Analyzer, Soxtec System 1046, 회화로, 항온건조기 등을 이용하여 측정하였다. 아미노산 함량은 SRI 8610C Gas Chromatograph을 이용하여 측정하였다. 유해 무기물분석은 원자흡광광도계를 이용하여 측정하였다. 양어장 배출물 시료의 모든 성분 분석은 부경대학교 사료영양연구소에 의뢰하여 분석하였다.

발효물을 사료첨가제로 이용시 안전성을 검토하기 위해 병원균 검사를 실시하였다. 병원균 검사는 발효 전·후 배출물과 배출물을 100℃에서 20분 살균한 시료를 대상으로 검사하였다. 배출물을 발효했을 때 발효물의 병원균 검사는 발효 2~10일까지 2일 간격으로 발효시료를 sampling하여 조사하였다. 병원균 검출은 양어장에서 발병율이 높은 에드워드균, 비브리오팀균, 연쇄구균을 대상으로 조사하였다. 검출은 발효 시료를 희석하여 각 희석액을 선택배지 (Salmonella-Shigella agar, SS agar; Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar, TCBS agar; Brain Heart Infusion agar, BHI agar)에 도말 접종하였다. 병원균의 판정은 25℃, 호기 조건에서 약 24시간 배양 후 미생물 형태, 배지상에서 콜로니 특성, 기타 선택배지를 이용한 배양특성 등을 통해 판정하였다.

2. 어류사육실험

사육실험은 1차와 2차 실험으로 나누어 실시하였다. 1차 실험에서는 양어장 배출물을 당밀로 발효시킨 발효물을 사료에 첨가했을 때 영향을 조사하였다. 2차 실험에서는 양어장 배출물에 발효과정 중 당밀을 대신 감귤농축액을 사용하여 발효시킨 발효물을 사료에 첨가했을 때, 성장 및 건강도에 미치는 영향을 조사하였다.

1) 실험어 및 사육환경

1차 실험에 이용된 실험어는 북제주군 동북리 소재 육상종묘장에서 구입한 넙치를 2003년 4월 28일부터 2003년 7월 18일까지 총 12주 동안 사육하였다. 실험 시작시 실험어 평균 전장은 7.13 ± 0.02 cm, 체중은 4.24 ± 0.05 g이었다. 실험어는 10개의 수조에 각각 150마리씩 수용하여 실험하였다. 양어장 배출물 발효물을 농도별로 처리한 1차 실험에서는 실험기간 중 수온, 염분, DO, pH 변화를 조사하였다. 사육 수온은 실험기간 중 $15.2 \sim 24.8^\circ\text{C}$ 의 범위로, 최저수온은 실험 첫 주에 15.2°C 이었고, 최고수온은 실험 9주에 24.8°C 이었다. 염분은 $34.0 \sim 36.0$ ‰의 범위였다. 사육수의 DO는 $7.2 \sim 8.7$ mg/L이었고, pH는 $7.5 \sim 8.4$ 범위였다.

2차 실험에 이용된 실험어는 북제주군 북촌리 소재 육상종묘장에서 생산한 넙치를 2004년 5월 29일부터 8월 3일까지 총 9주간 사육하였다. 실험 시작시 실험어 평균 전장 12.35 ± 0.68 cm, 평균 체중 19.79 ± 3.45 g이었고, 10개의 수조에 각각 50마리씩 수용하여 실험하였다. 2차 실험에서 사육 수온은 실험기간 중 $15.8 \sim 28.0^\circ\text{C}$ 범위였다. 염분은 $30.0 \sim 35.0$ ‰ 범위였다. 사육수의 DO는 $6.5 \sim 8.7$ mg/L의 범위였으며, pH는 $7.8 \sim 9.1$ 범위였다.

모든 실험에서 실험어는 1~2주간 사육 순치시킨 후, 1 ton FRP 원형수조 (\emptyset 150 cm \times 100 cm, 0.7 ton)에서 수용하였고, 실험은 2반복으로 실시하였다.

2) 사료제작 및 공급

1차 실험구는 양어장 배출물 발효물을 사료량의 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0% 처리 실험구와 대조구로 하였다.

2차 실험에서 실험구는 대조구와 회석발효액 (Solution of fermented diluted sludge added with concentrated citrus juice, FDSC), 혼합발효액 (Solution of fermented sludge added with concentrated citrus juice, FSC), 농축액 (Concentrates of FDSC, CFDSC), 배출물 발효액 (Solution of fermented sludge, FS) 실험구 등 다섯 개의 실험구로 설정하였다. 회석발효액 (FDSC) 실험구는 배

출물 (5.0%)과 감귤농축액 (5.0%)을 물 (90.0%)에 희석하여 발효시킨 발효물을 첨가하였고, 혼합발효액 (FSC) 실험구는 배출물 (70.0%)에 감귤농축액 (30.0%)을 첨가하여 발효시킨 발효물을 사료에 첨가하였다. 농축액 (CFDSC) 실험구는 희석 발효액을 10배 농축하였고, 배출물 (FS) 발효액 실험구는 배출물을 당밀로 발효시켜 사료에 첨가하였다. 첨가 농도는 발효액의 경우 사료량의 1.0%의 농도로, 농축액은 0.1%의 농도로 침적하여 흡착시킨 후 공급하였다.

모든 실험의 실험사료는 고압팽창사료(extruded pellet, LE GOUESSANT AQUACULTURE)를 사용하였다. 사료의 첨가 방법은 액상 사료를 농도에 따라 물에 희석하여 총 사료량의 10.0%로 만들어 사료에 흡착시켰고, 대조구는 물만 사용하였다. 사료의 크기는 성장함에 따라 바꾸어 주었고, 사료 공급은 1일 2회 충분히 공급하였다.

3) 성장

실험어 어체 측정은 4-3주 간격으로 전장과 체중을 전수 측정하였고, 측정 전날 및 당일엔 절식하였다. 전장은 자체 제작한 측정판으로 1 mm까지 측정하였으며, 체중은 전자저울 (Sartorius, BP 3100S)로 0.1 g까지 측정하였다.

어체 측정 후에는 모든 실험구의 실험어를 50 ppm HCl-Oxytetracycline으로 1시간 약욕하였다.

사육 중 사망한 개체는 매일 수시로 제거하였으며, 어체 측정시 마다 생존한 개체에 대한 백분율로 생존율을 나타내었다. 증중량 (weight gain), 성장률 (daily growth rate), 사료계수 (feed coefficient)를 계산하여 각 실험구간의 값을 비교하였다.

$$\text{Total weight gain (TWG)} = \text{FW} - \text{IW}$$

$$\text{Daily growth rate (DGR)} = [(\text{In final weight} - \text{In initial weight}) \times 100] / \text{days}$$

$$\text{Daily feeding rate (DFR)} = (\text{TF} \times 100) / \{(\text{IW} + \text{FW}) \times \text{day fed} / 2\}$$

$$\text{Feed coefficient (FC)} = \text{TF} / \text{WG}$$

FW : final weight IW : initial weight TF: total feed
WG : weight gain

3. 배상세포 분포

2차 실험어를 대상으로 배출물 공급에 따른 어류 소화관내 장상피조직상의 변화를 조사하였다. 실험어는 각 실험구별로 5마리씩 표본 추출하여 각각의 소화관을 Bouin's solution에 고정하여, paraffin 절편법에 의해 5 μ m 두께로 절편을 제작하였다. Hansen's hematoxylin과 0.5% eosin의 비교염색 후 광학 현미경으로 검경하였다. 장 조직의 관찰은 장 (intestine)의 전장 (anterior intestine)과 중장 (mid intestine)의 점막주름에 나타나는 배상세포 (goblet cell) 분포 수를 검경하였다.



4. 혈액성상과 혈청성분 분석

2차 실험에 사용된 실험어를 대상으로 발효물 첨가했을 때 실험어 건강도를 조사하기 위하여 혈액성상과 혈청성분을 조사하였다. 채혈은 실험 종료시 각각의 실험구의 실험어를 대상으로 어류를 2-phenoxy ethanol (Sigma, USA)로 마취시킨 후, 1회용 주사기를 이용하여 미부혈관 (caudal vein)에서 채혈하였다.

혈액성상 조사는 채혈 시 heparin-Na (25,000 IU, 중외제약)을 처리한 혈액을 대상으로 채혈 직후 적혈구 (Red Blood Cell, RBC)수, 혈색소 (hemoglobin, Hb) 농도, 혈색소지수 (Hematocrit, Ht)를 조사하였다.

적혈구수는 hendrick's diluting solution으로 혈액을 1:200으로 희석한 후에 hemo-cytometer (Improved Neubauer, Germany)를 이용하여 광학 현미경하에서 계수 하였다. 혈색소농도는 시판되고 있는 임상용 kit (Asan Pharm. Co. Ltd.)를

사용하여 cyan-methemoglobin법으로 측정하였다. 혈색소지수는 글라스모세관을 이용하여 혈액을 흡인한 후 양쪽 끝을 봉한 다음, Mrcro-heamatocrit관에서 11,000~12,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 측정하였다.

혈청성분 조사는 채혈된 혈액을 1시간 동안 실온에 방치한 후, 4℃에서 2시간 동안 보관한 다음, 원심 분리 (5분, 6,000 rpm)하였다. 분리된 혈청은 실험에 이용하기 전까지 -70 ℃에서 보관하였다. 혈청성분은 microplate spectrophotometer (Zenyth 200, Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria)를 이용하여 분석하였다.

총 단백질량 (total protein)은 혈청에 알칼리성으로 구리이온을 작용시키면, 단백질은 착염되어 청자색을 나타내는데, 이 청자색을 파장 540 nm에서 측정하였다. 혈당량 (glucose)은 GOD/POD법으로 (Werner et al., 1970) 파장 500 nm에서 측정하였다.

효소활성은 GOT (Glutamic oxalate transaminase), GPT (Glutamic pyruvate transaminase), LDH (Lactate dehydrogenase)에 대하여 측정하였다. GOT와 GPT는 reitman-frankel법, LDH는 젓산기질법으로 측정하였다.

5. 통계처리

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

Ⅲ. 결 과

1. 발효조건 탐색 및 발효물의 물리화학적 특성

1) 발효조건 탐색

양어장 배출물을 기질로한 발효 미생물의 발효과정 중 시간 경과에 따른 균수변화를 측정한 결과 *L. plantarum*은 배양개시 후 급속한 성장을 나타내 2일째에 최대 개체수 1.4×10^8 cfu/mL를 나타냈으며, 3일째부터 안정기에 접어들어 이후 배양종료 시까지 완만한 개체수의 감소가 나타났다.

*S. cerevisiae*는 배양개시 후 2일째까지 지속적으로 개체수가 증가하여 3일째부터 배양종료 시까지 개체수의 빠른 증가는 없었다. 최대 개체수는 배양 6일째에 6.0×10^7 cfu/mL 였다 (Fig. 2).

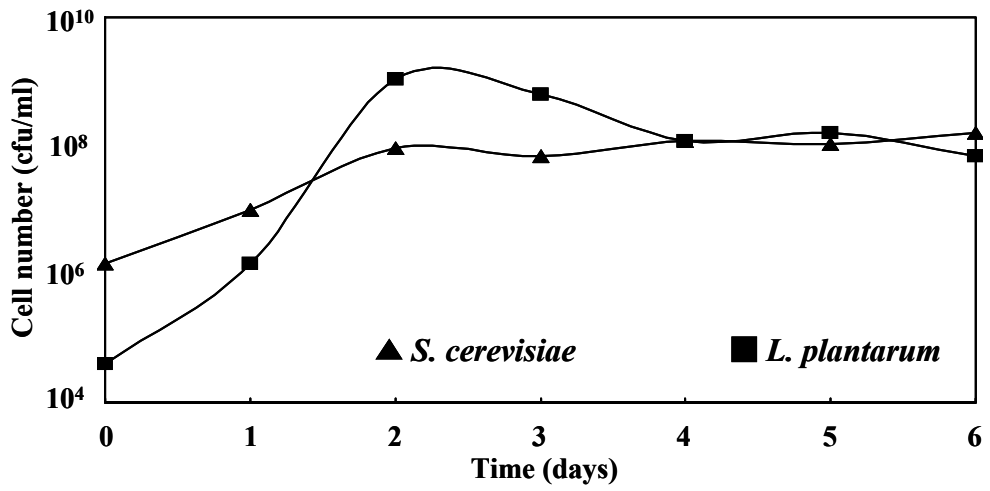


Fig. 2. Growth of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* on fermented product at 38°C.

2) 배출물의 물리화학적 특성

어류의 사료로 공급되는 MP와 배출물 그리고 배출물을 발효한 발효물 3종류 시료의 일반성분 분석결과 수분은 배출물에서 84.8%였지만, 배출물을 발효한 발효물에서는 87.7%로 3.0%정도 증가하였다. 조단백은 MP와 배출물에서 7.7%와 6.9%로 유사하였으나, 발효물에서 3.9%로 가장 낮았다. 조지방은 각 시료에서 1.6%, 1.9%, 1.9%로 서로 유사한 조성을 보였다. 회분조성은 MP와 배출물 그리고 발효물에서 각각 4.9%, 6.2% , 3.0%의 조성을 보였다 (Table 1).

각 시료의 무기물 조성은 시료마다 비슷한 농도였으나, Ca과 P은 발효물에서 0.328%와 0.114%로 배출물의 0.930%와 0.341% 보다 낮았다 (Table 2).

유해무기물 (중금속) 분석결과 Cd는 배출물에서 0.06 ppm이 검출되었지만, MP와 발효물에서는 검출되지 않았다. 그리고 Cr은 배출물에서 8.53 ppm으로 높았으나, MP와 발효물에서는 0.70 ppm과 0.63 ppm으로 낮았다. Hg는 MP에서 12.60 ppb로 높은 값을 보였고, 배출물에서는 8.33 ppb, 배출물 발효물에서는 1.18 ppb로 낮은 값을 나타내었다. Se은 MP에서는 검출이 되지 않았으나, 배출물과 발효물에서 각각 0.32 ppm과 0.36 ppm의 농도로 검출되었다 (Table 3).

구성아미노산 분석결과 각 시료별 상대적인 아미노산 함량 차이는 없었으나, 배출물에서 MP와 발효물보다 약 2배 가량 높은 아미노산 함량을 보였다. 그리고 asparagin, glutamic acid, glycine, alanine, leucine, arginine 등의 아미노산이 전체 함량의 60 %이상을 차지하였다 (Table 4).

총 33종의 유리아미노산 분석결과 MP에서 20종, 배출물에서 22종이 검출된 반면 배출물 발효물에서는 30종이 검출되었다. 유리아미노산의 농도는 MP나 배출물 시료에 비해 배출물 발효물 시료에서 높은 조성을 보였고, 각 시료마다 상대적인 함량 차이가 있었다 (Table 5).

Table 1. Proximate composition of moist pellet, sludge from effluent and fermented sludge

Sample (%)	Moist pellet	Sludge from effluent	Fermented sludge
Moisture	86.5±0.46	84.8±0.13	87.7±1.17
Crude ash	4.3±0.17	6.2±0.96	3.0±0.07
Crude protein	7.7±0.10	6.9±0.49	3.9±0.01
Crude fat	1.6±0.01	1.9±0.01	1.9±0.05

Table 2. Inorganic Concentrations in moist pellet, sludge from effluent and fermented sludge

	Moist pellet	Sludge	Fermented sludge
Ca	0.633	0.930	0.328
P	0.321	0.341	0.114
K	0.105	0.101	0.162
Mg	0.105	0.148	0.094
Fe	0.004	0.021	0.005
Zn	0.001	0.001	0.001

Table 3. Harmful inorganic Concentrations in moist pellet, sludge from effluent and fermented sludge

	Moist pellet	Sludge	Fermented sludge
Pb	ND ¹	ND	ND
Cd	ND	0.06	ND
Cr	0.70	8.53	0.63
Se	ND	0.32	0.36
Hg (ppb)	12.60	8.33	1.18
As	0.85	0.52	0.29

ND¹ : Not detected

Table 4. Total amino acids composition of moist pellet, sludge from effluent and fermented sludge

	Moist pellet	Sludge	Fermented sludge
Asp	2.18	4.31	2.54
Thr	1.21	1.83	1.19
Ser	1.24	2.00	1.01
Glu	4.51	7.55	2.92
Pro	1.63	2.39	1.95
Gly	2.53	4.44	2.89
Ala	2.01	3.32	2.46
Val	1.44	2.06	1.32
Ile	1.35	2.00	1.26
Leu	2.29	3.54	1.75
Tyr	0.91	1.44	0.63
Phe	1.27	1.85	0.42
His	0.93	1.56	2.33
Lys	2.35	3.39	1.79
Arg	1.92	3.09	0.52
Total	28.41	44.79	24.94

Table 5. Free amino acids composition of moist pellet, sludge from effluent and fermented sludge

	Moist pellet	Sludge from effluent	Fermented sludge
Phosphoserine	0.005	0.006	0.130
Taurine	0.061	0.012	0.092
Phosphoethanolamine	ND ¹	ND	0.103
L-Aspartic acid	0.009	0.004	0.103
L-Threonine	0.046	0.011	0.064
L-Serine	0.016	0.032	0.061
L-Glutamic acid	0.039	0.191	0.074
L- α -Aminoadipic acid	ND	ND	0.099
L-Glycine	0.020	0.046	0.047
L-Alanine	0.063	0.190	0.069
L-Citrulline	ND	ND	0.080
L- α -Aminobutyric acid	ND	0.016	0.048
L-Valine	0.037	0.083	0.075
L-Cystine.	ND	ND	0.075
L-Methionine	0.003	0.021	0.076
L-Isoleucine	0.037	0.086	0.065
L-Leucine	0.081	0.169	0.073
L-Tyrosine	0.046	0.014	0.087
L-Phenylalanine	0.067	0.039	0.076
DL- β -Aminoisobutyric acid	ND	0.076	0.037
γ -Aminobutyric acid	ND	0.024	0.061
L-Ornithine	0.193	0.446	0.103
L-Lysine	ND	0.047	0.077
1-Methyl-L-Histidine	0.074	0.023	0.092
L-Histidine	0.004	ND	0.070
3-Methyl-L-Histidine	0.095	0.011	0.083
L-Carnosine	ND	ND	0.099
L-Arginine	0.064	0.009	0.067
Total	0.960	1.554	2.241

3) 병원균 검사

살균처리와 발효를 하지 않은 양식장 배출물에서는 모든 선택배지에서 여러 종의 미생물 콜로니가 발생되었다. 특히, SS 한천배지에서는 H_2S 생성으로 검은색 집락을 형성한 미생물이 검출되었는데, 이 종은 넙치의 에드워드증 유발 가능성이 높은 미생물과 콜로니 형태가 유사하였다. BHI한천배지에서는 형태적으로 연쇄구균과 비슷한 형태의 미생물이 검출되었다 (Fig. 3A).

100℃에서 20분간 살균한 시료에서는 24시간 배양 후 어떠한 콜로니도 발생되지 않았다. 발효시료는 배양개시 후 2일째부터 배양종료일까지 SS 한천배지, TCBS 한천배지에서 어떠한 콜로니도 형성되지 않았다. 연쇄구균 검출을 목적으로 배양한 BHI 한천배지에서는 구균과 간균이 각 1종씩 발생되었지만, 연쇄구균의 형태를 갖는 미생물은 발생하지 않았다 (Fig. 3B, C).



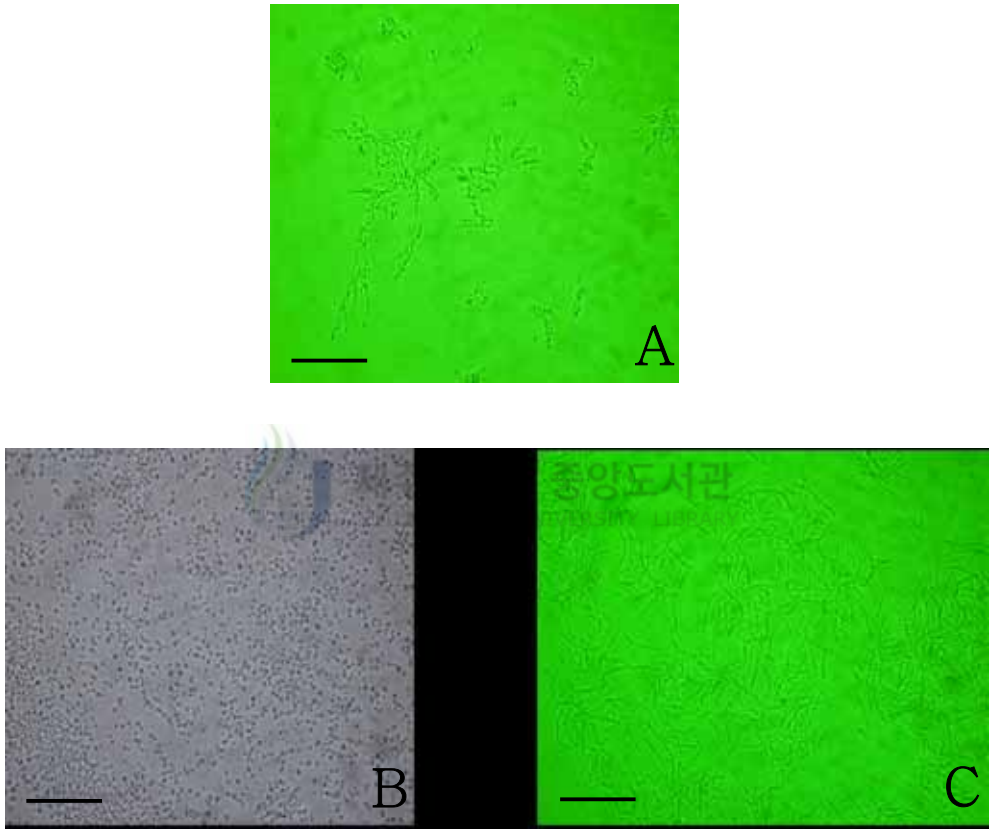


Fig. 3. Microphotograph of bacterium from the effluented sludge (A), sterilized sludge (B) and fermented sludge (C) grown on BHI agar medium., Scale bar = 500 μ m.

2. 어류 사육실험

1) 1차 사육실험

실험 시작시 실험어 전장은 7.13 ± 0.02 cm이었다. 실험종료시 실험어 전장은 대조구에서 14.35 ± 0.09 cm로 성장하였고, 양어장 배출물 발효시료 0.1%, 0.5%, 1.0% 그리고 2.0% 처리실험구에서 각각 14.70 ± 0.09 cm, 14.70 ± 0.10 cm, 14.62 ± 0.10 cm, 14.42 ± 0.09 cm로 성장하여 대조구를 비롯한 모든 실험구에서 유의차는 없었다 (Table 6, $P > 0.05$).

실험시작시 실험어 체중은 4.24 ± 0.05 g이었다. 실험종료시 실험어 체중은 대조구에서 32.61 ± 0.61 g으로 성장하였고, 양어장 배출물 발효시료 0.1%, 0.5%, 1.0% 그리고 2.0% 처리 실험구에서 각각 32.16 ± 0.65 g, 34.50 ± 0.61 g, 33.67 ± 0.62 g, 33.77 ± 0.64 g으로 성장하여 대조구와 유의차는 없었다 ($P > 0.05$). 그러나 0.5% 처리 실험구는 0.1% 처리 실험구보다 높은 성장을 하였다 (Table 6, $P < 0.05$). 증중량은 27.90~30.24 g 범위로 대조구를 비롯한 모든 실험구에서 유의차는 없었다 (Table 6, $P > 0.05$). 실험구별 생존율은 대조구에서 91.7%이었고, 양어장 배출물 0.1%, 0.5% 1.0% 그리고 2.0% 공급구에서 각각 93.3%, 93.3%, 93.0%, 84.3%이었다 (Table 7, $P > 0.05$). 사료계수는 대조구에서 0.81이었고, 양어장 배출물 발효시료 0.1%, 0.5% 1.0% 그리고 2.0% 공급구에서 각각 0.84, 0.79, 0.81, 0.87 이었다 (Table 7, $P > 0.05$).

일간성장률은 2.03~2.08% 범위였고, 일간섭이율은 1.64~1.79% 범위로 대조구를 비롯한 모든 실험구간에 유의차는 없었다 (Table 7, $P > 0.05$).

Table 6. Total length, body weight and weight gain of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed with different levels of fermented sludge from land-based seawater fish farm

Experimental group	Initial		Final		
	TL ¹⁾ (cm, mean±S.E. ⁴⁾)	BW ²⁾ (g, mean±S.E.)	TL (cm, mean±S.E.)	BW (g, mean±S.E.)	W. gain ³⁾ (g, mean±S.E.)
Control	7.13±0.02	4.15±0.04	14.42±0.09 ^{ab}	32.61±0.61 ^{ab}	28.46±0.06
0.1%	7.15±0.02	4.26±0.04	14.35±0.09 ^b	32.16±0.65 ^b	27.90±1.89
0.5%	7.10±0.02	4.28±0.04	14.70±0.09 ^a	34.50±0.61 ^a	30.24±0.05
1.0%	7.12±0.02	4.26±0.04	14.70±0.10 ^a	33.67±0.62 ^{ab}	29.15±1.29
2.0%	7.16±0.02	4.25±0.04	14.62±0.10 ^{ab}	33.77±0.64 ^{ab}	29.32±1.90

Values in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05). ¹⁾TL, Total length; ²⁾BW, Body weight; ³⁾W. gain, Weight gain; ⁴⁾S.E., Standard error of means.

Table 7. Feed coefficient, daily feeding rate, daily growth rate and survival rate of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed with different levels of fermented sludge from land-based seawater fish farm

Experimental group	Feed coefficient (mean±S.E. ¹⁾)	Daily growth rate (%) (mean±S.E. ¹⁾)	Daily feeding rate (%) (mean±S.E. ¹⁾)	Survival rate (%) (mean±S.E. ¹⁾)
Control	0.81±0.01	2.06±0.01	1.68±0.03	91.7±1.0
0.1%	0.84±0.04	2.04±0.03	1.70±0.07	93.3±0.1
0.5%	0.79±0.01	2.08±0.01	1.64±0.03	93.3±2.0
1.0%	0.81±0.01	2.03±0.02	1.64±0.02	93.0±3.0
2.0%	0.87±0.11	2.07±0.04	1.79±0.19	84.3±9.7

¹⁾S.E.: Standard error of means.

2) 2차 사육실험

실험 시작 시 실험어의 평균전장은 12.3 cm 내외였으나, 실험종료시 전장은 대조구에서 18.6 ± 0.13 cm로 성장하였다. 희석발효액 (FDSC), 혼합발효액 (FSC), 농축액 (CFDSC), 배출물 발효액 (FS) 실험구는 각각 18.9 ± 0.15 cm, 19.0 ± 0.13 cm, 19.1 ± 0.13 cm, 18.9 ± 0.14 cm로 성장하여 혼합발효액 (FSC)과 농축액 (CFDSC) 실험구에서 대조구보다 높은 성장을 하였다 (Table 8, $P < 0.05$).

실험시작시 실험어의 체중은 19.70 g이었다. 실험종료시 체중은 대조구에서 61.88 ± 1.17 g으로 성장하였고, 희석발효액 (FDSC), 혼합발효액 (FSC), 농축액 (CFDSC), 배출물 발효액 (FS) 실험구에서 각각 65.20 ± 1.55 g, 67.19 ± 1.32 g, 68.44 ± 1.30 g, 65.62 ± 1.39 g으로 성장하여, 혼합발효액 (FSC)과 농축액 (CFDSC) 실험구에서 높은 성장을 하였다 (Table 8, $P < 0.05$). 증중량은 대조구에서 42.36 ± 1.61 g이었고, 희석발효액 (FDSC), 혼합발효액 (FSC), 농축액 (CFDSC), 배출물 발효액 (FS) 실험구에서 각각 45.78 ± 1.08 g, 46.88 ± 0.74 g, 48.18 ± 0.20 g, 45.64 ± 1.95 g으로 농축액 (CFDSC) 실험구에서 가장 높은 증중량을 보였다 (Table 8, $P < 0.05$). 생존율은 모든 실험구에서 96.0~99.0% 범위였다 (Table 8, $P > 0.05$).

사료계수는 대조구에서 1.04로 가장 높았고, 희석발효액 (FDSC)의 1.03과 비슷하였다. 그러나 혼합발효액 (FSC), 농축액 (CFDSC), 배출물 발효액 (FS) 실험구에서 각각 0.97~1.00 범위로 대조구보다 낮았으며, 농축액 (CFDSC) 실험구에서 0.97로 가장 낮았다. 일간성장률은 1.74~1.81% 범위였고 일간섭이율은 1.76~1.85% 범위로 대조구를 비롯한 모든 실험구간의 유의차는 없었다 (Table 9).

Table 8. Total length, body weight and weight gain olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed with different levels of fermented product

Experimental group	Initial		Final		
	TL ¹⁾ (cm, mean±S.E. ⁴⁾	BW ²⁾ (g, mean±S.E.)	TL (cm, mean±S.E.)	BW (g, mean±S.E.)	W. gain ³⁾ (g, mean±S.E.)
Control	12.32±0.06	19.50±0.34	18.60±0.13 ^b	61.88±1.17 ^b	42.36±1.61 ^b
FDSC ⁵⁾	12.36±0.07	19.46±0.34	18.85±0.15 ^{ab}	65.20±1.55 ^{ab}	45.78±1.08 ^{ab}
FSC ⁶⁾	12.46±0.07	20.32±0.36	19.00±0.13 ^{ab}	67.19±1.32 ^a	46.88±0.74 ^{ab}
CFDSC ⁷⁾	12.33±0.06	19.84±0.35	19.11±0.13 ^a	68.44±1.30 ^a	48.18±0.20 ^a
FS ⁸⁾	12.39±0.07	20.03±0.35	18.85±0.14 ^{ab}	65.62±1.39 ^{ab}	45.64±1.95 ^{ab}

Values in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05). ¹⁾TL, Total length; ²⁾BW, Body weight; ³⁾W. gain, Weight gain; ⁴⁾S.E., Standard error of means; ⁵⁾FDSC, Solution of fermented diluted sludge added with concentrated citrus juice; ⁶⁾FSC, Solution of fermented sludge added with concentrated citrus juice; ⁷⁾CFDSC, Concentrates of FDSC; ⁸⁾FS, Solution of fermented sludge.

Table 9. Feed coefficient, daily feeding rate, daily growth rate and survival rate of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed with different levels of fermented product

Experimental group	Feed coefficient (mean±S.E. ¹⁾)	Daily growth rate (%) (mean±S.E.)	Daily feeding rate (%) (mean±S.E.)	Survival rate (%) (mean±S.E.)
Control	1.04±0.01 ^c	1.74±0.06	1.81±0.04	99.0±1.0
FDSC ²⁾	1.03±0.01 ^{bc}	1.80±0.01	1.85±0.01	96.0±2.0
FSC ³⁾	1.00±0.02 ^{ab}	1.79±0.01	1.79±0.04	97.0±1.0
CFDSC ⁴⁾	0.97±0.01 ^a	1.81±0.01	1.76±0.01	97.0±1.0
FS ⁵⁾	0.99±0.01 ^a	1.77±0.02	1.76±0.02	98.0±2.0

¹⁾S.E.: Standard error of means., ²⁾FDSC, Solution of fermented diluted sludge added with concentrated citrus juice; ³⁾FSC, Solution of fermented sludge added with concentrated citrus juice; ⁴⁾CFDSC, Concentrates of FDSC; ⁵⁾FS, Solution of fermented sludge.

3. 배상세포 분포

어류 소화기관 중에 장 점막주름에 분포하는 배상세포 수 변화를 관찰한 결과 전장에서는 대조구가 37.12 ± 3.16 이었고, 회석발효액 (FDSC), 혼합발효액 (FSC), 농축액 (CFDSC), 배출물 발효액 (FS) 실험구에서 각각 37.32 ± 2.78 , 33.92 ± 2.40 , 33.32 ± 2.80 , 28.16 ± 2.63 개로 대조구와 유사하였다 (Fig. 9, $P > 0.05$).

중장에서 배상세포 분포는 대조구에서 49.56 ± 3.33 이었고, 회석발효액 (FDSC), 혼합발효액 (FSC), 농축액 (CFDSC), 배출물 발효액 (FS) 실험구에서 각각 43.88 ± 2.91 , 54.25 ± 2.98 , 46.88 ± 2.13 , 44.50 ± 2.94 로 대조구와 유사하였다 (Fig. 8 and 9, $P > 0.05$).



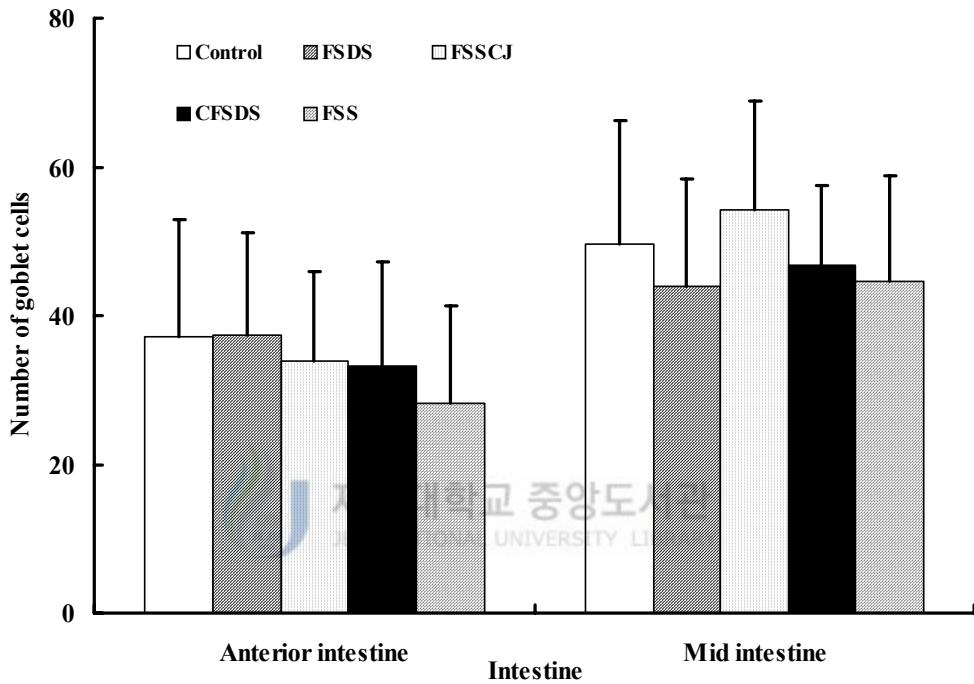


Fig. 4. Change of the goblet cell (number of goblet cells per a mucosal fold) of intestine in *Paralichthys olivaceus* fed with different levels of fermented product. FDSC, Solution of fermented diluted sludge added with concentrated citrus juice; FSC, Solution of fermented sludge added with concentrated citrus juice; CFSDS, Concentrates of FDSC; FS, Solution of fermented sludge.

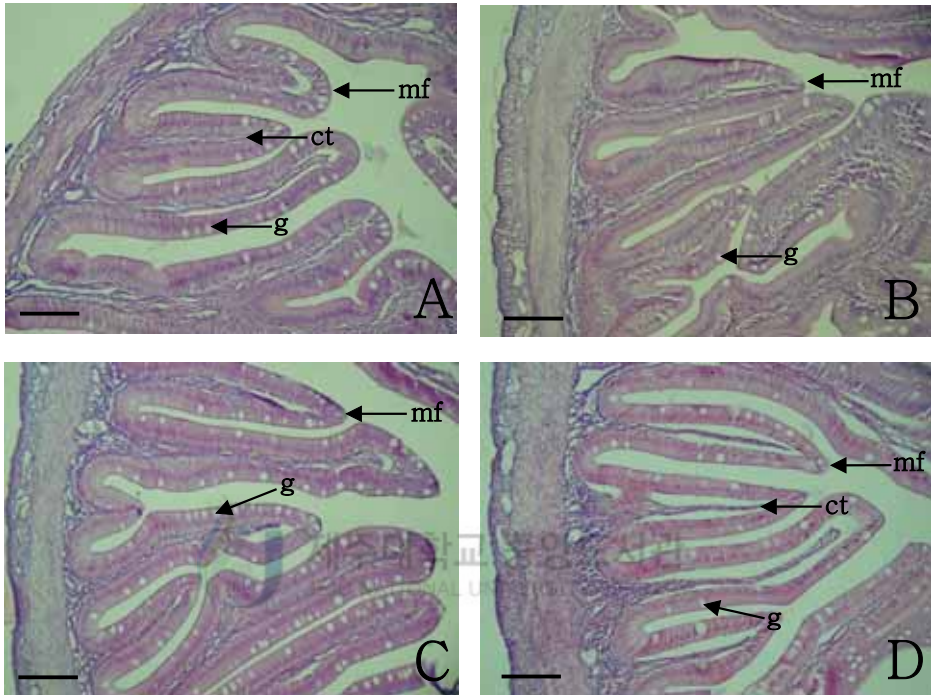


Fig. 5. Photomicrographs on goblet cell and epithelial element of intestine of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*., A: anterior intestine of control group, B: anterior intestine of treatment group, C: mid intestine of control group, D: mid intestine of treatment group, ct, connective tissue; g, goblet cell; mf, mucosal fold, H · E stain, Scale bar = 50 μ m.

4. 혈액성상과 혈청성분

1) 혈액성상

발효물의 섭이에 따른 적혈구 수는 대조구의 경우 274.6×10^4 cell/mm³이었고, 혼합 발효액 (FSC), 배출물 발효액 (FS) 실험구에서 각각 303.2×10^4 cell/mm³, 297.0×10^4 cell/mm³로 대조구와 유사하였다 (Table 10, $P > 0.05$). 희석발효액 (FDSC)과 농축액 (CFDSC) 실험구에서는 316.2×10^4 cell/mm³와 314.2×10^4 cell/mm³로 대조구보다 높았다 (Table 10, $P < 0.05$).

혈색소 (Hb)농도는 대조구에서 3.8 ± 0.3 g/dL이었고, 농축액 (CFDSC)과 배출물 발효액 (FS) 실험구에서 4.2 ± 0.3 g/dL과 4.0 ± 0.2 g/dL로 대조구와 유사하였다 ($P > 0.05$). 희석발효액 (FDSC)과 혼합발효 (FSC)액 실험구에서 각각 4.8 ± 0.2 g/dL와 4.8 ± 0.4 g/dL로 대조구보다 높았다 (Table 10, $P < 0.05$).

혈색소지수 (Ht)는 대조구가 24.8%였고, 희석발효액 (FDSC)과 혼합발효액 (FSC) 실험구에서 27.3%와 27.1%로 대조구보다 높게 나타났다 ($P < 0.05$). 농축액 (CFDSC) 실험구는 24.6%으로 대조구와 유사하였으나 ($P > 0.05$), 배출물 발효액 (FS) 실험구는 21.9%로 가장 낮았다 (Table 10, $P < 0.05$).

Table 10. Erythrocyte count, hemoglobin concentration and hematocrit level of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed with different levels of fermented product

Experimental Group	Erythrocyte count (10^4 cell/mm ³ , mean±S.E. ¹⁾)	Hemoglobin concentration (g/dL, mean±S.E. ¹⁾)	Hematocrit (%, mean±S.E. ¹⁾)
Control	274.6±8.9 ^b	3.8±0.3 ^b	24.8±1.1 ^{ab}
FDSC ²⁾	316.2±13.3 ^a	4.8±0.2 ^a	27.3±1.5 ^a
FSC ³⁾	303.2±16.0 ^{ab}	4.8±0.4 ^a	27.1±1.1 ^a
CFDSC ⁴⁾	314.2±11.2 ^a	4.2±0.3 ^{ab}	24.7±0.9 ^{ab}
FS ⁵⁾	297.0±12.3 ^{ab}	4.0±0.2 ^{ab}	21.9±1.4 ^b

¹⁾S.E.: Standard error of means., ²⁾FDSC, Solution of fermented diluted sludge added with concentrated citrus juice; ³⁾FSC, Solution of fermented sludge added with concentrated citrus juice; ⁴⁾CFDSC, Concentrates of FDSC; ⁵⁾FS, Solution of fermented sludge.

2) 혈청성분

혈청 유기성분 중 혈청 총 단백질 (Total protein)은 농축액 (CFDSC) 실험구를 제외한 모든 실험구에서 3.3 ~3.7 g/dL 범위로 대조구의 3.2g g/dL와 유사하였지만 ($P>0.05$), 농축액 (CFDSC) 실험구에서는 4.0 g/dL로 대조구보다 높았다 (Table 11, $P<0.05$). Triglyceride는 대조구를 비롯한 모든 실험구에서 유의차는 없었다 (Table 11, $P>0.05$).

혈당 (Glucose)은 희석발효액 (FDSC)과 배출물 발효액 (FS) 실험구에서 30.1 mg/dL과 33.8 mg/dL로 대조구보다 낮았고 ($P<0.05$), 대조구는 45.4 mg/dL로 가장 높았다 ($P<0.05$). 그 외 다른 실험구는 대조구와 유사하였다 ($P<0.05$). 콜레스테롤 (Total cholesterol) 수치는 대조구에서 183.9 mg/dL이었고, 희석 발효액 (FDSC), 혼합 발효액 (FSC), 그리고 농축액 (CFDSC) 실험구에서 각각 212.1 mg/dL, 211.4 mg/dL, 217.3 mg/dL로 대조구와 유사하였다 ($P>0.05$). 배출물 발효액 (FS) 실험구는 236.5 mg/dL로 대조구보다 높았다 (Table 11, $P<0.05$).

혈청 내 GOT는 대조구에서 51.1 unit였고, 희석발효액 (FDSC), 혼합발효액 (FSC), 농축액 (CFDSC), 배출물 발효액 (FS) 실험구에서 각각 42.2~44.1 unit 범위로 비교적 낮았으나 실험구간 유의한 차이는 없었다 ($P>0.05$). LDH의 경우 대조구에서 395.2 unit이었고, 혼합 발효액 (FSC) 실험구는 338.0 unit으로 가장 낮았다 ($P<0.05$). 희석발효액(FDSC) 실험구는 450.0 unit으로 증가하였다 ($P<0.05$). 혈청 내 GPT는 21.0~22.9 unit 범위로 모든 실험구간 유의차는 없었다 (Table 12, $P>0.05$).

Table 11. Total protein, albumin, glucose, triglyceride and total cholesterol concentration in serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed with different levels of fermented product

Experimental Group	Total protein (g/dL, mean±S.E. ¹⁾)	Glucose (mg/dL, mean±S.E.)	Triglyceride (mg/dL, mean±S.E.)	Total cholesterol (mg/dL, mean±S.E.)
Control	3.2±0.17 ^a	45.5±5.46 ^a	225.7±9.97	183.9±10.43 ^b
FDSC ²⁾	3.8±0.11 ^{ab}	30.1±0.92 ^b	247.8±14.51	212.1±13.43 ^{ab}
FSC ³⁾	3.7±0.15 ^{ab}	36.9±1.59 ^{ab}	254.4±15.54	211.4±5.84 ^{ab}
CFDSC ⁴⁾	4.0±0.10 ^b	38.3±3.35 ^{ab}	228.1±19.57	217.3±10.95 ^{ab}
FS ⁵⁾	3.3±0.33 ^a	33.7±3.46 ^b	267.0±12.33	236.5±19.67 ^a

Values in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05). ¹⁾S.E., Standard error of means; ²⁾FDSC, Solution of fermented diluted sludge added with concentrated citrus juice; ³⁾FSC, Solution of fermented sludge added with concentrated citrus juice; ⁴⁾CFDSC, Concentrates of FDSC; ⁵⁾FS, Solution of fermented sludge.

Table 12. GOT, GPT, and LDH activities of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed with different levels of fermented product

Experimental Group	GOT (Karmen unit, mean±S.E. ¹⁾)	GPT (Karmen unit, mean±S.E. ¹⁾)	LDH (W.U., mean±S.E. ¹⁾)
Control	51.1±3.06	22.9±2.07	395.2±20.66 ^b
FDSC ²⁾	42.2±1.11	23.9±2.88	450.0±22.30 ^c
FSC ³⁾	42.8±4.53	21.1±2.83	338.0±12.98 ^a
CFDSC ⁴⁾	42.9±3.89	22.0±2.34	360.8±9.02 ^{ab}
FS ⁵⁾	44.1±4.51	21.0±1.37	381.2±24.91 ^{ab}

¹⁾S.E.: Standard error of means., ²⁾FDSC, Solution of fermented diluted sludge added with concentrated citrus juice; ³⁾FSC, Solution of fermented sludge added with concentrated citrus juice; ⁴⁾CFDSC, Concentrates of FDSC; ⁵⁾FS, Solution of fermented sludge.

IV. 고찰

어류 사료에 있어 단백질은 어류의 성장 및 건강을 유지하기 위한 에너지원으로 많이 사용되고 있다. 현재 우리나라 어류양식장에서 공급되는 사료는 생사료와 배합사료를 이용하여 제조한 MP를 주로 사용하고 있다. 특히 MP는 양식어류에 요구되는 높은 단백질을 갖추고 있기 때문에 어류의 양성에 있어 가장 이상적인 먹이로 인식되어지고 있다. MP는 물에서 금방 녹아 흩어지는 성질 때문에 MP를 공급한 후 배출수와 함께 많은 양의 사료 찌꺼기 등이 배출되게 된다. MP 공급에 따른 문제점으로 많은 사료 유실이 발생하여 수질악화의 원인이 되기도 한다.

이 연구에서 육상 수조식 양식장에서 배출되는 배출물의 단백질 함량을 조사한 결과 6.94%로 MP 단백질 함량 7.67%와 비슷한 조성을 보였으나, 배출물을 발효한 후 단백질 함량은 3.92%로 감소하였다. 아미노산 함량은 배출물에서 44.8%였던 것이 발효 후, 24.9%로 감소하였으나, 유리아미노산의 경우는 배출물에서 1.6%였던 함량이 발효한 후에는 2.2%로 증가하였다. 이러한 결과는 발효하는 과정에서 미생물의 증식과 분해 등의 작용으로 수분 함량의 증가와 많은 양의 아미노산들이 유리 아미노산으로 전환한 것으로 생각된다.

양어장 배출물의 무기성분 중 배출물에서 높은 함량을 보였던 Cr과 Hg는 배출물을 발효한 후 검출 되지 않았거나 1.18 ppb로 현저하게 낮아졌다. MP에서는 검출되지 않았던 Se은 배출물 발효물에서 0.36 ppm이 검출되었다. Se는 면역력을 높여 항암효과에 탁월한 가능성을 발휘한다.

병원균 검사를 실시한 결과 양어장 배출물을 SS 한천배지에서 H₂S 생성으로 검은색 집락을 형성한 미생물이 검출되었다. BHI 한천배지에서 배양한 실험구에서도 연쇄구균 형태를 갖는 미생물이 검출되었다. 양어장 배출물을 발효한 실험구에서는 어떠한 병원균도 발견되지 않았는데, 발효과정에서 접종된 젖산균과 효모의 우선 증식으로 상대적으로 수가 적은 병원균의 성장을 억제하여 결국 소멸되었을 것이라 생각된다. 생균제를 이용한 어류의 질병억제 및 건강도 향상에 관한 연구로써 젖산균을 대서양 대구의 사료에 첨가하여 공급하였을 때 젖산균이 장내에서 우선적으로

콜로니를 형성하게 되면 다른 유해 미생물의 증식을 억제하는 결과 (Gildberg and Mikkelsen, 1998)와 유사하였다. 광합성세균 (photosynthetic bacteria) 등 EM 미생물은 증식특성이 매우 다양하여 호기적 암조건 (aerobic dark), 혐기적 명조건 (anaerobic light), 미호기적 조건 (microaerobic) 등 여러 조건에서 유기물을 이용, 증식이 가능하므로 양식 및 축산사료의 첨가제, 유기질 비료의 기능개선제, 수소생산 및 폐수처리등에 광범위하게 이용되고 있으며 (Kobayashi, 1972), 폐수처리에 이용할 경우 고농도 폐수 및 유해물질의 처리가 가능하다는 장점을 갖고 있다 (Sasaki et al., 1985). 이와 같은 결과들은 배출물을 유용미생물을 이용하여 발효했을 때, 발효물의 안전성을 확인할 수 있는 중요한 지표로 사용될 수 있을 것이라 생각된다.

제주도에서 생산되는 감귤은 각종 유기산, 비타민, 베타카로틴, 플라보노이드 등 기능성이 높은 영양물질을 함유하고 있다. 감귤에 함유된 플라보노이드와 비타민 E 등은 항산화 활성을 높이는데 효과적으로 작용하였다 (Moon et al., 2000; Kim et al., 2001; Kim and Kim, 2003). 2차 실험에서는 발효시 미생물의 생장에 필요한 에너지원으로 당밀을 대신하여 감귤농축액을 사용하였다. 실험어 전장은 대조구에서 18.6 ± 0.13 cm로 성장하였고, 혼합발효액 (FSC)과 농축액 (CFDSC) 실험구에서 각각 19.0 ± 0.13 cm, 19.1 ± 0.13 cm로 대조구에 비해 유의한 성장을 하였다 ($P < 0.05$). 체중은 혼합발효액 (FSC)과 농축액 (CFDSC) 실험구에서 각각 67.19 ± 1.17 , 68.44 ± 1.30 g으로 대조구보다 높은 성장을 하였다 ($P < 0.05$). 증중량은 농축액 (CFDSC) 실험구에서 48.18 g으로 대조구의 42.36 g보다 12.08%의 성장 효과를 보였다.

이와 같은 결과는 감귤발효액을 낱치 사료에 첨가하여 공급하였을 때 성장을 향상시킨 결과 (Song et al., 2002)와 유사하였다. 배출물 발효를 통한 단백질 등 영양적 성분들과 감귤이 함유하고 있는 유기산, 비타민, 카로티노이드 등 기능성 물질들과 젖산균, 효모 등 유용미생물을 어류가 복합적으로 이용하였기 때문이라 생각된다.

어류의 성장을 위한 사료 첨가제에 대한 연구들로는 은어 자어의 미립자 사료에 효모, *Kluyveromyces fragills*을 5% 첨가하여 실험 7주 후 은어의 성장과 생존률 그리고 증중률에서 대조구에 비하여 유의한 차이를 보였고 (Lee et al., 2000), 지질 및 한방제 첨가가 돌돔의 성장을 향상시켰던 결과 (Kim et al., 2003)는 이 연구의

2차 실험과 유사한 경향을 보였다. 그리고 사료효율 및 어류의 건강을 향상시키기 위한 사료첨가제로써 한약재 및 키토산, 미역, 클로렐라 등을 각각 넙치와 참돔, *Pagrus major* 등의 사료에 첨가하여 공급하였을 때 성장 및 사료효율을 향상시키는 연구 (Nakagawa and Kasahara, 1986; Yone et al., 1986; Nematipour et al., 1988)들이 활발히 진행되고 있다.

어류의 배상세포는 종에 따라 식도에서부터 후장의 말단부까지 분포하고 있다 (Tibbetts, 1997). 배상세포는 소화관의 점막주름에 분포하며 점액을 분비하는데, 점액세포에서 분비된 점액은 어류의 사료와 같은 미립자와 흡착, 미립자를 운반하며 동시에 물을 수용하는 역할을 한다 (Hafez, 1977). 또한 점액은 소화관 표면에 윤택 작용을 하여 음식물을 식도에서 위로 그리고 장으로의 이동을 용이하게 하며 외막을 보호하고 소화시에 일어날 수 있는 화학적인 손상과 소화효소에 의한 장관벽의 손상 그리고 방대한 양의 음식물을 받아들여 소화관으로 원활하게 소통할 수 있게 해준다 (Reifel and Travill, 1979; Jo et al., 1984; Allen et al., 1986). 물질공급에 따른 장내 배상세포의 변화에 관한 연구로 흰쥐 장내 배상세포에 미치는 영향 (Jo et al., 1994)과 흰쥐 십이지장 점액질에 미치는 gramoxone 독성 및 비타민 C의 완화 효과를 조사하였을 때 독성물질 단독 처리 실험구에서는 배상세포 수가 줄어들었으나, 비타민 C와 혼합처리한 실험구에서는 배상세포 수의 감소를 완화 시켰다 (Jo et al., 1994). 그리고 감귤을 이용한 넙치실험에서 감귤발효액을 섭취한 넙치의 전장과 중장에 존재하는 배상세포를 관찰한 결과 배상세포 수가 대조구보다 유의하게 증가하였다 (Song et al., 2002). 이 연구에서 배상세포 수는 전장과 중장 모두에서 유사하게 분포하였다. 배상세포의 분포는 모든 실험구에서 전장보다 중장으로 갈수록 점차 많아지는 경향을 보였고, 이것은 점막주름이 발달과 관련이 있다 (Kim et al., 2004). 넙치는 전장에서보다 중장에서 점막주름이 잘 발달되어 중장에서 높은 효율의 소화 작용을 하는 것으로 사료된다.

어류의 혈액은 어류의 건강을 간접적으로 확인할 수 있는 중요한 요소로 활용되고 있다. 어류가 스트레스를 받으면 혈액 구성이 변동된다. 그러므로 스트레스에 인한 어류의 혈액학적인 변수 (haematological parameters)에 대한 연구는 어류의 성장과 생리적 안정성 등에 밀접한 관련이 있다 (Chandraseker and Jayabalan, 1993).

급격한 수온변화 스트레스에 관한 생리학적 연구에서 수온을 30℃, 25℃, 15℃로 급격하게 낮추었을 때, RBC와 Ht의 수치가 현저하게 감소하는데, 이와 같은 결과는 환경적 스트레스가 어류의 생리적 변화에 영향을 주기 때문이다 (Yang and Yeo, 2004). 양어장 배출물 발효물의 사료첨가 실험에서 발효물을 농도별로 처리하였을 때, 실험구와 대조구 간 혈액성상의 차이는 없었다 (Kang et al., 2004). 이 연구의 2차 실험에서 혈액성상을 관찰한 결과 적혈구 수는 대조구의 경우 274.6×10^4 cell/mm³였고 회석발효액 (FDSC)과 농축액 (CFDSC) 실험구에서는 각각 316.2 ± 13.3^4 cell/mm³과 314.2 ± 11.2^4 cell/mm³로 대조구와 비교하여 유의하게 높았다 (P<0.05).

혈색소 (Hb) 농도는 회석발효액 (FDSC) 및 혼합발효액 (FSC) 실험구에서 4.8 ± 0.2 g/dL와 4.8 ± 0.4 g/dL로 대조구의 3.8 ± 0.3 g/dL 보다 유의하게 높았다 (P<0.05). 혈색소지수 (Ht)는 대조구와 모든 실험구에서 유사한 경향을 보였다. RBC, Hb 농도, Ht 수치가 낮아지면 산소 등 가스의 운반이 감소하기 때문에 빈혈 증과 영양분의 결핍으로 어류의 건강을 악화시킬 수 있다. 이 실험에서 어류사료 첨가제로 사용된 발효물을 첨가하게 되면 어류의 생리적 변화와 건강도 향상에 기여 할 것으로 생각된다.

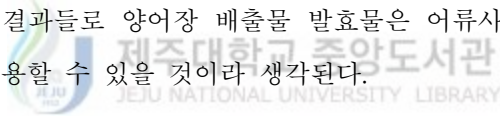
어류의 total protein은 스트레스 등으로 어류내 조직이 손상되게 되면 농도가 감소하며, 그 원인중의 하나는 장관 손상에 따른 흡수장애를 들 수 있다 (Mayer, 1985; Yamawaki et al., 1986; Khattak and Hafeez, 1996). 이 연구에서는 대조구에서 3.2 g/dL로 낮았고, 농축액 (CFDSC) 실험구에서 4.0 g/dL로 높은 값을 보임으로써 보다 높은 효율의 단백질 대사가 이루어졌다고 생각된다.

Glucose는 외인성 화합물질과 같은 외부 환경요인 (독성물질)에 의하여 증가하는 경향을 나타내는데, 이것은 아드레날린 과분비에 의한 과혈당 조건을 유발할 수 있으며 체내 glycogen을 분해하여 혈장 glucose가 증가하게 된다 (Gupta, 1974). 이 연구에서 glucose는 대조구에서 45.5 mg/dL로 가장 높았고, 회석발효액 (FDSC)과 배출물 발효액 (FS) 실험구에서는 30.1 mg/dL과 33.7 mg/dL로 가장 낮았다.

어류의 혈청 효소활성 중 혈장 전이효소인 GOT 및 GPT 활성은 스트레스와 급격한 운동에 의한 간, 심장 및 근육 등의 조직 손상의 지표로 사용되기 때문에 어

류의 환경성 질병 진단에 이용되고 있다 (Sakamoto and Yone, 1978; Shich, 1978; Smith and Ramos, 1980). 일반적으로 스트레스 등에 의해 증가하는 경향을 나타낸다 (Casillas and Ames, 1985; Rao et al., 1990). 혈청 GOT 효소활성은 대조구에서 51.1 unit, 발효물 첨가 실험구에서는 42.2~48.1 unit으로 비교적 낮았으나 유의한 차이는 없었다. LDH의 경우 혼합발효액 (FSC) 실험구에서 대조구보다 감소하였으며, 희석발효액 (FDSC) 실험구에서는 유의하게 증가하였다 ($P < 0.05$). GPT 효소는 서로 다른 발효물 첨가는 넵치 혈청 효소 변화에 영향을 주지 않았다. 이와같이 배출물 발효물을 어류사료에 첨가하여 공급하였을 때, 성장과 건강도 향상에 도움을 주었다고 생각된다.

이 연구에서는 양어장에서 배출되는 배출물은 발효함으로써 배출물의 물리화학적 성분 변화와 젖산균과 효모 등 미생물의 배양기질로 이용이 가능하였다. 발효물의 어류사료 첨가제로 이용하기 위한 안전성 검사로 실시한 어병균검사서 발효물은 병원성 미생물의 증식을 억제하였고, 어류에 공급하여 성장과 건강도 향상에 도움을 주었다. 이러한 결과들로 양어장 배출물 발효물은 어류사료 첨가제로 활용함에 있어 안정적으로 사용할 수 있을 것이라 생각된다.



V. 요약

제주도에는 약 300곳의 어류양식장이 분포하고 있고, 주요 양식대상어종으로 넙치를 사육하고 있다. 이 연구는 어류양식장에서 발생하는 배출물을 유용미생물로 발효시켜 넙치사료에 공급하여 사료로써의 안전성과 넙치의 성장 등을 조사하였다. 넙치의 성장과 사료 안전성에 있어서 배출물 발효물의 영향을 조사하기 위해 다음과 같은 5개의 실험구로 구분하여 63일간 실험사료를 공급하였다.

양어장 배출물 발효물의 유리아미노산은 배출물 보다 발효물에서 상대적으로 높은 함량이 검출되었고, 유해무기물 (Cr, Hg)은 감소하였다. 혼합발효액 (FSC)과 농축액 (CFDSC) 실험구에서 대조구보다 높은 성장하였다 ($P < 0.05$). 사료계수는 혼합발효액 (FSC), 농축액 (CFDSC), 배출물 발효액 (FS) 실험구에서 대조구보다 낮았고, 증중량은 농축액 (CFDSC) 실험구에서 대조구보다 높은 성장효과를 보였다 ($P < 0.05$). 혈액정상 조사결과 적혈구수 (RBC)는 희석발효액 (FDSC)과 농축액 (CFDSC) 실험구에서 높게 조사되었고 ($P < 0.05$), 혈색소농도 (Hb)는 희석발효액 (FDSC)과 혼합발효액 (FSC) 실험구에서 대조구보다 높은 농도로 조사되었다 ($P < 0.05$). 총 단백질은 농축액 (CFDSC) 실험구에서 가장 높게 조사되었고 ($P < 0.05$), 혈당량은 희석발효액 (FDSC)과 배출물 발효액 (FS) 실험구에서 대조구보다 낮게 조사되었다 ($P < 0.05$). LDH는 혼합발효액 (FSC) 실험구에서 낮게 조사되었고 ($P < 0.05$), GOT, GPT 분석결과는 대조구를 비롯한 모든 실험구에서 유사한 결과를 보였다 ($P > 0.05$).

이 연구에서 양어장 배출물을 감귤농축액과 혼합하여 발효한 발효물은 넙치사료에 첨가제로써 이용이 가능할 것이라 생각된다.

VI. 참고문헌

- Allen, A., D. A. Hutton, A. J. Leonard, J. P. Pearson and L. A. Sellers. 1986. The role of mucus in the protection of the gastroduodenal mucosa. *Scand J. Gastroenterol*, 21(suppl. 125) : 7~77.
- Boonyaratpalin M., P. Suraneiranat and T. Tunpibal. 1998. Replacement of fish meal with various types of soybean products in diets for the Asian seabass, *Lates calcarifer*. *Aquaculture*, 161 : 67~78.
- Casillas, E. and W. Ames. 1985. Serum chemistry of diseased English sole, *Parophrys vetulus* Girard, from polluted areas of Puget Sound, Washington. *J. Fish Dis.*, 8 : 437~449
- Chandrasekar, S. and N. Jayabalan. 1993. Hematological responses of the common carp, *Cyprinus carpio* L. exposed to the pesticide endosulfan. *Asian Fish. Sci.*, 6(3) : 331~340.
- Gildberg, A. and H. Mikkelsen. 1998. Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with *vibrio anguillarum*. *Aquaculture*, 167 : 103~113.
- Glencross, B., D. Evans, W. Hawkins and B. Jones. 2004. Evaluation of dietary inclusion of yellow lupin (*Lupinus luteus*) kernel meal on the growth, feed utilisation and tissue histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 235 : 411~422.
- Gómez-Requeni, P., M. Mingarro, J. A. Caldach-Giner, F. Médale, S. A. M. Martin, D. F. Houlihan, S. Kaushik and J. Pérez-Sánchez. 2004. Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 232 : 493~510.

- Gupta, P. K. 1974. Malathion induced biochemical changes in rats. *Acta Pharmac. Tox.*, 35 : 191~194.
- Hafez, E. S. E. 1977. Functional anatomy of mucus secreting cell. In *mucus in health and disease* (Elstein, M. and Parke, D. V., eds), pp. 19~38. New York : Plenum Press.
- Jang, S. I., J. Y. Jo and J. S. Lee. 1992. Effects of vitamins and glycyrrhizin added to oxidized diets on the growth and on the resistance to *Edwardsiella* infection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, *J. Aquaculture*, 5 : 143~155.
- Jo, U. B., B. S. Kim, I. J. Chai, S. Y. Back and I. S. Shin. 1984. Histochemical properties of mucosubstances on the intestinal mucose cell in the teleosts. *J. Sci.*, Pusan National Uni., 37 : 317~327. (in Korean)
- Jo, U. B., S. R. Kim and B. T. Choi. 1994. Alleviating effects of Vitamin C on the Gramoxone Toxicity in the mucosubstance of rat duodenum. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 23(3) : 387~395. (in Korean)
- Kang, J. C., J. H. Jee, S. Y. Song, S. W. Moon, J. W. Kang, Y. D. Lee and S. J. Kim. 2004. Effects of oral administration with fermented product from sewage in land-based seawater fish farm on haematological factors of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.*, 17(1) : 57~66. (in Korean)
- Khattak, I. U. D. and Hafeez, M. A. 1996. Effect of malathion on blood parameters of the fish, *Cyprinion watsoni*. *Pak. J. Zool.*, 28 : 45-49,
- Kikuchi K. 1999. Use of defatted soybean meal as a substitute for fish meal in diets of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 179 : 3~11.
- Kim, D. S., J. H. Kim, C. H. Jeong, S. Y. Lee, S. M. Lee and Y. B. Moon. 1998. Optimun dietary protein and lipid levels on growth in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *J. Aquacult.*, 11 : 1~10. (in Korean)

- Kim, J. H. and M. K. Kim. 2003. Effect of different part mandarin intake on antioxidative capacity in 15-month-old rats. Korean Nutr. Soc., 36(6) : 559~569. (in Korean)
- Kim, J. H., S. M. Lee, J. M. Baek, J. K. Cho and D. S. Kim. 2003. Effect of dietary lipid level and herb mixture on growth of parrot fish, *Oplegnathus fasciatus*. J. Kor. Fish. Soc., 36(2) : 113~119. (in Korean)
- Kim, J. H., Y. B. Moon, C. H. Jeong and D. S. Kim. 2000b. Utilization of dietary herb Obosan III. Growth of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Aquaculture, 13 : 231~238. (in Korean)
- Kim, J. W., S. M. Choi, H. J. Baek and S. C. Bai. 2004. The morphological structure and histochemical features of the alimentary tract in parrot fish, *Oplegnathus fasciatus*. J. of Aquaculture., 17(3) : 215~220. (in Korean)
- Kim, S. M., Y. S. Cho and S. K. Sung. 2001. The antioxidant and nitrite scavenging ability of waste resource (crab shell, sesame meal, Korean tangrin peel) extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 30(4) : 589~593. (in Korean)
- Kim, Y. S., B. S. Kim, T. S. Moon and S. M. Lee. 2000a. Utilization of defatted soybean meal as a substitute for fish meal in the diet of juvenile flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Korean Fish. Soc., 33(5) : 469~474. (in Korean)
- Kobayashi, M. 1972. Utilization of photosynthetic bacteria. Proc. IV. Internal. Ferment. Sympo., 527~531.
- Koh, S. C., Y. C. Song and I. S. Kim. 1997. Efficient treatment of food wastes by EM (Effective Microorganisms) and their recycling. J. Korea Solid Wastes Engineering Society, 14(7) : 729~740. (in Korean)
- Lee, K. H., Y. S. Lee, J. H. Kim and D. S. Kim. 1998. Utilization of Obosan (dietary herbs) II. Muscle quality of olive flounder, *Paralichthys*

- olivaceus* fed with diet containing Obosan. J. Aquacult., 11 : 319~325.
(in Korean)
- Lee, S. M., D. J. Kim, K. D. Kim, J. K. Kim and J. H. Lee. 2000. Growth and body composition of larval ayu (*Plecoglossus altivelis*) fed the micro-diets containing *Kluyveromyces fragilis* and *Candida utilis*. J. Korean Fish. Soc., 33(1) : 20~24. (in Korean)
- Lee, S. M. and J. H. Yoo. 1996. Evaluation of cotton seed meal or rapeseed meal as a partial substitute for meal in formulated diets for Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*). Kor. J. Anim. Nutr. Feed., 20(2) : 128~135.
(in Korean)
- Mayer, K. S., F. L. Mayer and A. Witt 1985. Waste transformer oil and PCB toxicity to rainbow trout. Am. Fish. Soc., 114 : 869~886.
- Moon, S. W., J. B. Lee, Y. D. Lee, S. J. Kim, B. J. Kang and Y. B. Go. 2002. Recycling marine fish farm effluent by microorganisms. J. of Aquaculture, 15(4) : 261~266. (in Korean)
- Moon, S. W., Y. D. Lee, J. B. Lee and Y. B. Go. 2000. Antioxidant characteristics of EM-Fermented orange as an additive in fish feed. Bull. Mar. Res. Inst. Cheju Nat. Univ., 24 : 49~54. (in Korean)
- Nakagawa, H. and S. Kasahara. 1986. Effect of Ulva-meal supplement to diet on the lipid metabolism of red sea bream. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 52 : 1887~1893.
- Nematipour, G. R., H. Nakagawa, S. Kasahara and S. Ohya. 1988. Effect of dietary lipid level and Chlorella-extract on ayu. Nippon Suisan Gakkaishi, 54 : 1395~1400.
- Rao, P. P., K. V. Joseph and K. J. Rao 1990. Histopathological and biochemical changes in the liver of a fresh water fish exposed to heptachlor. J. Nat. Conserv., 2 : 133-137.
- Regost, C., J. Arzel and S. J. Kaushik. 1999. Partial or total replacement of

- fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*).
Aquaculture, 180 : 99~177.
- Reifel C. W. and A. A. Travill. 1979. Structure and carbohydrate
histochemistry of the intestine in ten teleostean species. J. Morph., 162 :
343~360.
- Ryu, J. S., J. K. Leem and J. Y. Lee. 1998. The swine wastewater treatment
by a phototrophic bacterium "*Phodopseudomonas capsulata*". J. of
Environ. Sci., 12 : 29~42. (in Korean)
- Sakamoto, S. and Y. Yone. 1978. Effect of starvation on hematological
characteristics, and contents of chemical components and activities of
enzymes in blood serum of red sea bream. J. Fac. Agric. Kyushu Univ.,
23 : 63~69.
- Sasaki, K., M. E. Hurtado, Y. Nishizawa and S. Nagai. 1985.
Aerobic-heterotrophic and photoheterotrophic growth in microaerobic light
chemostat cultures of *Rhodopseudomonas sphaeroides* S. H. J. Ferment
Technol., 63 : 377~381.
- Shich, M.S. 1978. Changes of blood enzymes in brook trout induced by
infection with *Aeromonas salmonicida*. J. Fish Biol., 11 : 13~18.
- Smith, A.C. and F. Ramos. 1980. Automated chemical analysis in fish health
assessment. Journal of Fish Biol., 17 : 445~450.
- Song, Y. B., S. M. Moon, S. J. Kim and Y. D. Lee. 2002. Effect of
EM-fermented orange in commercial diet on growth of juvenile flounder,
Paralichthys olivaceus. J. of Aquaculture, 15(2) : 103~110. (in Korean)
- Tibbetts, I. R. 1997. The distribution and function of mucous cells and their
secretions in the alimentary tract of *Arrhmphus sclerolepis krefftii*.
Journal of Fish Biology, 50 : 809~820.
- Tovar, D., J. Zambonino, C. Cahu, F. J. Gatesoupe, R. Vázquez-Juárez and R.
Lésel. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on

- digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 204 : 113~123.
- Yang, J. H. and I. K. Yeo. 2004. Physiological studies on acute water-temperature stress of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Korean J. Ichthyol.*, 16(1) : 19~26. (in Korean)
- Yamawaki, K., W. Hashimoto, K. Fujii, J. Koyama, Y. Ikeda and H. Ozaki. 1986. Hemochemical changes in carp exposed to low cadmium concentrations. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 52 : 459~466.
- Yone, Y., M. Frichi and K. Urano. 1986. Effects of dietary wakame *Undaria Pinnatifida* and *Ascophyllum nodosum* supplements on absorption of dietary nutrients, and blood sugar and plasma free amino-N levels of red seabream. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 52(10) : 1817~1819.

