

폐사어와 감귤가공 부산물의 고온발효에 의한
양식용 어분 대체원의 개발

2006. 12

연구기관: 제주대학교

참여기업: (주)남경수산

해양수산부

농림수산식품자료실



0014746

00

50733

7 표 □

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “폐사어와 감글 가공부산물의 고온발효에 의한 양식용 어분 대체원의 개발”에 관한 연구의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 12월 일

주관연구기관명: 제주대학교
총괄연구책임자: 전 유 진
연 구 원: 여 인 규
연 구 원: 차 선 희
연 구 원: 로한사만다
참 여 기 업: (주)남경수산

요 약 문

I. 제 목

폐사어와 감귤 가공부산물의 고온발효에 의한 양식용 어분 대체원의 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성.

본 연구는 제주에서 매년 다량으로 발생되고 있는 넙치 양식장에서의 양식장 부산물인 폐사어 (년간 3천톤~5천톤 발생)와 감귤가공 부산물인 감귤박의 건조 분말 형태 (이하 건조 감귤박, 연간 3만톤~5만톤)를 혼합하고 발효균을 원료 대비 10,000:1의 비율만 첨가함으로써 양질의 기능성 발효어분이 생산될 수 있다는 것으로 확인하였다. 제조된 기능성 발효어분은 단백질 함량이 30~40%이어서 다소 적은 경향이 있으나, 유해 세균의 잔존은 절대적으로 불가능하고 또한 감귤박을 혼합함으로써 기능성 발효어분으로서 사용이 가능할 것으로 판단된다. 제주 지역에서 매년 다량으로 발생되고 있는 농수산 부산물 혹은 폐기물만을 이용하여 기능성 발효어분을 생산함으로써 최근까지 대부분 수입에 의존하고 있는 어분을 대체할 수 있는 새로운 가능성이 있을 것으로 판단된다. 따라서, 양식장 부산물을 이용하여 병원성세균의 오염이 없는 안전성이 확보된 양질의 어분 대체원을 개발한다

III. 연구개발 내용 및 범위

- (1) 양식장 부산물 및 감귤박 수거 및 성분분석
- (2) 주요 어병세균 사멸조건 규명
- (3) 고속발효건조기에서 폐사어로부터 발효어분 제조를 위한 최적발효 조건 규명
- (4) 양식장 부산물 유래 어분 대체원 성분분석
- (5) 양식장 부산물 유래 어분 대체원의 품질 안전성
- (6) 양식장 부산물 유래 어분을 이용한 어류 양식
- (7) 양식장 부산물 유래 어분으로 양식한 어류의 성장률 확인
- (8) 양식장 부산물 유래 어분을 섭취한 어류의 혈액성분 분석 및 면역활성 확인

IV. 연구개발 결과

- (1) 양식장 부산물 및 감귤박 수거 및 분석 완료
- (2) 어병세균 사멸조건 규명 완료
- (3) 양식장 부산물 발효용 미생물 1종 선별
- (4) 어분 제조를 위한 최적조건 규명 완료
- (5) 어분의 성분분석 완료
- (6) 양식장 부산물 유래 어분의 극대화를 위하여 건조 감귤박 분말을 혼합

- (7) 양식장 부산물 유래 어분의 품질 안전성 완료
- (8) 어류 성장 실험 완료
- (9) 어류의 혈액학적 성분 분석 및 면역활성 검증 완료

V. 연구개발 결과의 활용계획

어류 성장 실험 결과 본 연구를 통해 생산한 양식장 부산물 유래 발효어분을 생사료와 배합하여 식이한 실험구와 생사료만 섭취한 실험구 모두 유사한 성장 경향을 보여주었고, 돌돔의 경우 10% 정도를 양식장 부산물에서 유래한 발효 어분을 섭취한 실험구에서 성장률 및 사료 효율이 약간 높게 나타났을 뿐만 아니라, 면역면역활성은 발효 어분을 섭취한 실험구에서 높게 나타나 수입에 의존하고 있는 어분 단백질원을 국내에서 공급할 수 있는 가능성을 제시해 주고 있다. 따라서 본 연구 결과물인 양식장 부산물 유래 어분 단백질을 실제 양식에 활용하여 경제적인 가치를 높일 수 있을 것이다.

S U M M A R Y

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.

C O N T E N T S

| | |
|-------------------------------|---|
| Chapter 1. Introduction | 9 |
|-------------------------------|---|

Chapter 2. Materials and Methods

| | |
|--|----|
| 1. An assay safety for source as a replacement for fish meal in diet using a fermented fish meal | |
| 1-1. Collecting dead fish and citrus meal | 12 |
| 1-2. Analysis of material`s composition | 12 |
| 1-3. Extinction condition of main pathogen in Jeju flounder | 12 |
| 1-4. Fermenter or bacteria for manufacturing fermented fish meal | 13 |
| 1-5. Analysis of fermented fish meal from dead fish composition | 13 |
| 1-6. Functional evaluation of fermented fish meal from dead fish | 14 |
| 1-7. Quality safety of fermented fish meal from dead fish | 15 |
| 1-8. Analysis of quality standard of fermented fish meal from dead fish .. | 16 |
| 2. Application manufactured fermented fish meal from dead fish on flounder farming | |
| 2-1. Experiment diet | 18 |
| 2-2. Fish and experimental design | 18 |
| 2-3. Analysis of serum | 18 |
| 2-4. Respiratory burst activity in fish phagocyte | 19 |
| 2-5. Lysozyme activity assay in serum | 19 |
| 2-6. Statistic analysis | 19 |
| 3. Application manufactured fermented fish meal from dead fish on parrot fish farming | |
| 3-1. Experiment diet | 20 |
| 3-2. Fish and experimental design | 21 |
| 3-3. Growth rate..... | 21 |
| 3-4. Analysis of serum..... | 21 |
| 3-5. Respiratory burst activity in fish phagocyte..... | 22 |
| 3-6. Lysozyme activity assay in serum | 22 |
| 3-7. Statistic analysis..... | 22 |

Chapter 3. Results and discussion

1. An assay safety for source as a replacement for fish meal in diet using a fermented fish meal

| | |
|---|----|
| 1-1. Collecting dead fish/pectin and composition analysis | 23 |
| 1-2. Examination of extinction condition of main pathogen | 23 |
| 1-3. Examination of searching for optimal condition of fermented fish meal from dead fish in high-speed fermentation dryer or manufactured fish meal composition analysis | 25 |
| 1-4. Functionality of fermented fish meal from dead fish | 30 |
| 1-5. Quality safety of fermented fish meal from dead fish | 37 |
| 1-6. Analysis of quality standard of fermented fish meal from dead fish .. | 41 |

2. Application manufactured fermented fish meal from dead fish on flounder farming

| | |
|--|----|
| 2-1. Growth rate..... | 44 |
| 2-2. Analysis of serum..... | 47 |
| 2-3. Respiratory burst activity in fish phagocyte..... | 48 |
| 2-4. Lysozyme activity assay in serum | 49 |

3. Application manufactured fermented fish meal from dead fish on parrot fish farming

| | |
|--|----|
| 3-1. Growth rate..... | 52 |
| 3-2. Analysis of serum..... | 54 |
| 3-3. Respiratory burst activity in fish phagocyte..... | 56 |
| 3-4. Lysozyme activity assay in serum | 57 |

Chapter 4. References

59

목 차

제 1장 서론9

제 2장 연구 내용 및 방법

제 1절 양식장부산물과 감귤가공 부산물의 고온발효에 의한 양식용 어분 안정성 평가

1. 양식장부산물, 감귤박 수거12
2. 원료 성분 분석12
3. 제주 양식 넙치의 주요 어병 세균에 대한 사멸 조건 실험12
4. 양식장부산물유래 발효어분 제조용 발효기 및 발효제13
5. 양식장부산물 유래 발효어분의 성분분석13
6. 양식장부산물 유래 발효어분의 기능적 극대화14
7. 양식장부산물 유래 어분의 대체원의 품질 안정성15
8. 양식장 부산물 유래 어분 대체원의 품질 규격 검사 16

제 2절 양식장부산물과 감귤가공 부산물의 고온발효에 의한 양식용 어분의 양식넙치에의 적용

1. 실험사료17
2. 실험어 및 사육관리17
3. 혈액성분분석17
4. 어류 식세포의 활성산소 측정18
5. 혈청의 Lysozyme활성 조사18
6. 통계처리18

제 3절 양식장부산물과 감귤가공 부산물의 고온발효에 의한 양식용 어분의 돌돔에의 적용

1. 실험사료19
2. 실험어 및 사육관리20
3. 성장도20
4. 혈액성분분석20
5. 어류 식세포의 활성산소 측정21

| | |
|----------------------------|----|
| 6. 혈청의 Lysozyme활성 조사 | 21 |
| 7. 통계처리 | 21 |

제 3장 연구 수행 결과

제 1절 양식장부산물과 감귤가공 부산물의 고온발효에 의한 양식용 어분 안정성 평가

| | |
|---|----|
| 1. 양식장부산물, 감귤박 수거 및 성분분석 | 22 |
| 2. 주요 어병세균 사멸조건 규명 | 22 |
| 3. 고속발효건조기에서 양식장부산물로부터 발효어분 제조를 위한 최적발효 조건 규명 및 제조된 어분의 일반 성분 함량 | 24 |
| 4. 양식장부산물 유래 발효어분의 기능성 | 29 |
| 5. 양식장부산물 유래 발효어분의 품질 안전성 | 36 |
| 6. 양식장 부산물 유래 어분 대체원의 품질 규격 검사 | 40 |

제 2절 양식장부산물과 감귤가공 부산물의 고온발효에 의한 양식용 어분의 양식넙치에의 적용

| | |
|---------------------------|----|
| 1. 성장률 | 44 |
| 2. 혈액분석 | 47 |
| 3. NBT reduction 활성 | 48 |
| 4. 혈청의 lysozyme 활성 | 49 |

제 3절 양식장부산물과 감귤가공 부산물의 고온발효에 의한 양식용 어분의 돌돔에의 적용

| | |
|---------------------------|----|
| 1. 성장률 | 52 |
| 2. 혈액분석 | 54 |
| 3. NBT reduction 활성 | 56 |
| 4. 혈청의 lysozyme 활성 | 57 |

제 4장 참고문헌

제 1장 연구배경 및 필요성

최근 양식 분야의 연구는 특정 수산생물의 대량생산을 목적으로 이루어져 왔다. 그렇게 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 문제로 대두되고 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 수환경 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 어체내 흡수되지 않은 약제가 함유된 사육수의 배출은 주변수역에 대한 오염의 유발 요인이 될 수도 있으며, 항생물질의 어체내 잔류성에 대한 의혹 때문에 양식어류의 소비둔화를 초래할 여지도 남아 있다.

백신은 어류 양식에 있어서 병원균을 제거하는데 중요한 역할을 하고 있지만, 지속적인 사용으로 인한 잔존 및 자치어에 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 젯산균, 베타글루칸, LPS, 단백질가수분해물 등이 그 예이다. 대부분의 식이면역조절제는 어류양식에서 선천면역을 증가시키는 것으로 알려져 있다.

인류의 식생활에 해양 동물의 자리가 넓혀지기 시작하여, 수요가 증가함에 따라 어류 양식의 규모 및 종도 다양하게 되었으며, 이미 2000년에 60억을 넘어선 세계 인구는 2050년에 90억 이상으로 인구가 증가될 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 인구 증가와 환경문제 등을 고려할 때 계속해서 증가하는 인류의 단백질 수요를 앞으로 많은 부분 수산업에서 충당해야 할 것으로 보인다. FAO (2004)의 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 있다.

질병으로 인한 폐사율은 전체 사육량의 12% 전후로 매년 증가하는 추세에 있으며, 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 두배이상 인상되었으며, 중국에서도 양식에 박차를 가하고 있어 조만간 어분 품귀 현상이 일어날 것으로 예측된다. 더욱이 국내에서는 양식 어류를 위한 어분 생산이 전혀 이루어지고 있지 않아 어분 대체원은 국가의 경제적인 면에서도 필요하다.

어류 양식에 있어 사료는 어류의 성장과 체내 대사에 영향을 미치는 주요한 요인일 뿐 아니라, 어류 생산단가에 영향을 미치는 요인으로 가격이 싸고 품질이 좋은 사료의 안정적인 공급이 양식의 성패를 좌우 한다. 양식산업에 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 양식 종의 생산 단가 중 어종별로 차이는 있지만 30 ~ 60%를 차지하는 것을 보아서도 양식산업의 경제적인 측면에서의 배합사료의 중요성을 알 수 있다 (NRC, 1993). 앞서 언급하였지만 현재 해산어 양식이 약 50%를 차지하는 매우 중요한 양식대상종이다. 이와 같이 해산어류 양식이 차지하는 비율은 매우 빠른 증가 추세를 보이는 반면에 사료영양연구의 미비로 인하여 양어인들이 선호하는 배합사료 개발이 미진한 상태이다. 배합사료가 개발되었다고 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 외면 당하고 있는 실정이다. 아울러, 시대적인 흐름으로 인하여 양어사료의 비율이 점차적으로 증진할 것으로 보이며 (New, 1999), 특히 해산어 사료의 경우 생사료의 수급 불안정과 가격 폭등, 생사료 사용시 수반되는 냉동창고 운영 및 MP 기계 설비와 전기료 및 인건비의 비중이 높아 배합사료로의 전환이 점진적으로 이루어지고 있다. 만일, 생사료 사용량의 전부를 배합사료로 전환된다고 가정하면 배합사료는 해수어용 사료만 200,000톤 이상을 상회 할 전망으로 배합사료의 성장과 증가 역시 고무적인 상황으로 여겨진다.

질병으로 인한 폐사율은 전체 사육량의 12% 전후로 매년 증가하는 추세에 있으며, 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 두 배 이상 인상되었으며, 중국에서도 양식에 박차를 가하고 있어 조만간 어분 품귀 현상이 일어날 것으로 예측된다. 더욱이 국내에서는 양식 어류를 위한 어분 생산이 전혀 이루어지고 있지 않아 어분 대체원은 국가의 경제적인 면에서도 필요하다.

넓치는 국내에서 1970년대 말 중요 생산기술이 개발되어 보급된 이 후 최근까지 양식 생산량이나 가치의 면에서 해산어 양식 대표종으로 인식되어져 왔으며, 2005년 국내 넓치 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). 따라서 지금까지 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 있다. 특히 어보산 (Obosan)을 사료내 첨가 하였을 경우 넙치의 성장이 개선될 뿐만 아니라 근육의 품질이 개선되며, 혈청 콜레스테롤 함량을 낮추는 효과가 있는 것으로 보고 된 바 있으며, 어보산은 상용화 되어 양식산업 현장에서 널리 상용되고 있다.

돌돔은 남해안과 여름 기간동안 서해안의 해상가두리에서 주로 양식이 행해지고 있는데 돌돔은 아열대성 어류여서 우리나라 수온조건에서는 성장 기간이 6개월 정도로 짧고, 겨울철의 낮은 수온으로 인해 월동이 어려워 양성하는데 어려움이 있다. (Kang et al., 1998). 그러나 현재 돌돔의 종묘수급 불안정, 월동전 판매 부진 및 개체간의 성장 차이에 따른 문제점으로 효율적인 양식 경영을 위해서는 일부 종묘의 월동 사육은 불가피한 실정이다. 더욱이 최근 남해안 일원의 돌돔 양식장에서 발생하는 겨울철 폐사에 의해 양식어가의 피해가 증가하고 있으나, 지금까지 피해 현상에 대한 현황 파악에만 그쳐 안정적인 월동 사육 방안의 제시가 구체화되지 못하고 있다. 따라서 돌돔 양식의 생산성 향상을 위해서는 우선 겨울철 생존률을 높이기 위해서는 우선 겨울철 생존률을 높일수 있는 양식 방법과 성장 및 사료 효율을 높일 수 있는 사료 개발이 필요하다.

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 엘니뇨에 의한 기상이변으로 인한 급격한 수온변화에 의한 스트레스로 면역력이 약화되어 양식 농가를 더욱더 곤경에 처하게 한다.

따라서 본 실험은 국내 주요 양식 대상종인 넙치 폐사어와 감귤가공 부산물의 고온발효에 의한 양식용 어분 대체원을 첨가한 사료를 섭취한 넙치 및 돌돔의 성장 및 면역활성을 평가하고자 실시하였다.

제 2장 연구수행 내용 및 방법

제 1절 양식장 부산물과 감귤가공 부산물의 고온발효에 의한 양식용 어분

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°C 이하의 냉동고에 보관하였으며 이들 부산물은 일일 수거하여 실험실로 옮긴 후 -40°C 에서 보관하면서 발효어분의 제조에 사용하였다. 감귤박은 제주도 서귀포시 남원읍 한남리 소재의 감귤가공공장에서 수거하여 실험실로 운반하였으며, 수거한 감귤박은 $2\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 양식장 부산물로부터 발효 어분 제조시 미생물의 발효를 최적화 하기 위하여 수분조정제로 미강(米糠)을 사용하였으며, 본 실험에서 사용한 미강은 건조 분말 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°C 상압건조법으로, 조단백질은 킬달자동분석장치 (KjeltecTM2300, Foss Co. Ltd., Denmark)를 사용하여 분석하였으며, 조지방은 에테르를 이용한 Soxhlet법 (Soxhlet system 1046, TacatorAB, Sweden)으로, 조회분은 550°C 회화로에서 12시간 이상 태운 후 정량하였다. 조섬유는 자동 조섬유 분석장치를 이용하였으며, 비타민 C 함량은 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 대상으로 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. anguillarum*은 세포주은행에서 분양받아 이 세균들에 대한 사멸조건을 검토하였다. 즉, 분리한 어병 원인균을 BHI

(brain heart infusion) 등의 증균용 배지를 이용하여 배양하고 이들을 새로운 증균용 배지에 1 ml 당 $1 \times 10^6 \sim 10^9$ 개로 접종한 후 40~90°C까지 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 μ l를 취하여 10

μ l MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) 시약과 혼합한 후 37°C에서 2시간 배양하였다. 이것을 6,000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 제거한 후 200 μ l의 DMSO를 첨가한 후 590 nm에서 흡광도를 측정하여 세균의 생존율을 계산하여 어병균의 사멸률로 환산하였다. 또한 100% 사멸된 것으로 나타난 결과는 BHI agar 등의 배지에 도말하여 25~30°C에서 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). 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 Seiwa사에서 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°C에서 주로 동식물의 유기물 재료를 분해할 수 있는 능력을 가지고 있어 본 연구에서 사용하였다.

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°C로 조절하여 10~30분간 대기한 후 발효기 내부의 온도를 $90 \pm 5^\circ\text{C}$ 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. 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 μ l와 sample를 96 microwell plate에서 혼합시킨 후 다시 20 μ l의 hydrogen peroxide를 첨가하고 37°C에서 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 μ l첨가하여 최종적으로 37°C에서 10분간 반응시켜 ELISA reader (Sunrise,

Tecan™, 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 μ l의 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 μ l를 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°C에서 1시간동안 lysis시켰다. 이 lysis시킨 슬라이드를 300 mM NaOH와 10 mM Na₂EDTA (pH 13.0)가 들어있는 glass chamber에서 20분 동안 unwinding을 시켰다. DNA 전기영동은 25 V/300 mA의 전압으로 20분 동안 실시하였으며 전기영동이 끝난 슬라이드를 중화 완충용액 (neutralizing buffer; 0.4 M Tris, pH 7.5)에 5분씩 3회 반복 세척해 주었고 에탄올로 5분간 고정시킨 후, 2~20 μ g/ml 농도의 EtBr (ethidium bromide, Sigma) 45 μ l로 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, 비브리오팀증, 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°C, 24~48시간 배양 후 분리하였다. 분리균주의 동정은 각각의 평판에서 자란 colony를 대상으로 gram stain, oxidase test, catalase test 등의 생화학적 성

상시험을 거쳐 *Streptococcus* spp. *Edwardsiella* spp.로 간이동정 후 multiplex PCR방법을 이용해 *S. iniae*, *S. parauberis*, *E. tarda*로 각각 동정하였다. *Flexibacter maritimus*의 분리 및 동정은 어류의 체표괴양환부를 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 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 멸균 생리 식염수를 이용하여 희석 및 membrane을 이용하여 여과 후 total DNA를 추출하여 Table 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. Bacterial target species assayed and primer sequences used for m-PCR amplification and the amplicon sizes

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

8. 양식장 부산물 유래 어분 대체원의 품질 규격 검사

최종적으로 생산한 어분의 품질규격은 한국사료협회 사료기술연구소에 의뢰하였

다. 측정항목은 사료성분인 조단백질, 조지방, 조섬유, 산가 (A.V; Acid Value), 염산 불용물질(sand), 비단백태질소화합물(Urea) 및 휘발성염기태질소(VBN)와 유해물질인 살모넬라, 수은(Hg), 납(Pb), 카드뮴(Cd) 및 크롬(Cr) 함량을 측정하였다. 또한 양식을 통해 사용한 항생제의 잔류 여부를 확인하기 위하여 테트라사이클린계 항생제인 클로르테트라사이클린(Chlortetracycline, CTC) 및 옥시테트라사이클린(Oxytetracycline, OTC)과 설펜아미드계 항생제인 설파치아졸(Sulfathiazole), 설파메라진(Sulfamerazine) 및 설파메타진(Sulfamethazine)의 함량을 분석하였다.

제 2절 양식장부산물과 감귤가공 부산물의 고온발효에 의한 양식용 어분의 양식넙치에의 적용

1. 실험사료

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

2. 실험어 및 사육관리

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 콘크리트 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 ± 0.5 였다. 사료는 하루 두 번 (오전 7시와 오후 5시) 공급 하였으며, 실험 사육은 12주 동안 수행하였으며, 성장도는 4, 8, 12주째에 각각 측정하였다.

3. 혈액 성분분석

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 (triglyceride; TG), HDL-C (high density cholesterol), LDL-C (low density cholesterol), 및 간지수인 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase)를 분석 하였다.

4. 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 dimethyl formamide를 첨가하였다. 이 반응물을 200 μ l씩 micro well plate에 분주한 후 최종적으로 OD 560 nm에서 micro-reader (Sunrise, TecanTM, Austria)로 측정하여 실험어의 respiratory burst activity를 분석하였다.

5. 혈청의 lysozyme 활성 조사

체액성 면역 반응에 관여하는 인자로 라이소자임은 세균벽의 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglucosamine사이의 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 lysodeikticus를 0.02 M sodium citrate buffer (pH 5.5)에 0.2 mg/ml가 되게하여 M. lysodeikticus solution을 만든다. Serum을 각각 15 μ l씩 96 well plate에 분주한 후 즉시 M. lysodeikticus solution을 150 μ l넣고 450 nm에서 흡광도를 측정한 후 24 $^{\circ}$ C에서 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.

6. 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 실시하였다.

제 3절 양식장부산물과 감귤가공 부산물의 고온발효에 의한 양식용 어분의 돌돔에의 적용

1. 실험사료

돌돔 사육실험을 위하여 4개의 다른 사료를 제조하여 공급하였다. 실험 사료는

50%의 조단백질 함량을 갖도록 동일하게 조성하였고, 기초사료 조성표는 Table 2에 나타내었다. 실험사료는 기초사료를 이용한 대조구 (OFFM)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 소형효과기 (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 2. Formulation of experimental diets for Parrot fish (% dry matter)

| Ingredients | 0FFM ¹ | 10FFM 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 |

¹OFFM: without FFM

²10, 20, 30FFM; 10, 20, 30% included FFM, respectively

³Mineral Mixture (g/kg): MgSO₄·7H₂O, 80; NaH₂PO₄·2H₂O, 370; KCl, 130; Ferric citrate, 40; ZnSO₄·7H₂O, 20; Ca-lactate, 356.5; CuCl, 0.2; AlCl₃·6H₂O, 0.15; Na₂Se₂O₃, 0.01; MnSO₄·H₂O, 2.0; CoCl₂·6H₂O, 1.0

⁴Vitamin Mixture (g/kg): L-ascorbic acid, 121.2; DL- α tocopheryl acetate, 18.8; thiamine hydrochloride, 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; cholecalciferol, 0.003; cyanocobalamin, 0.003

2. 실험어 및 사육관리

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 $25.0 \pm 3.0^\circ\text{C}$, 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.

3. 성장도

실험용 어체에 실험사료를 급여한 후 2주 간격으로 실험어의 전체 무게를 측정하여 증중량을 구하였다.

4. 혈액 성분분석

혈액학적 성분 분석은 4주와 8주째에 각각 측정하였다. 4주째 증체율 조사와 함께 혈액성분 분석을 위하여 실험어를 채혈하기 전까지 약 24시간 동안 절식시킨 실험어를 각 수조당 10마리씩 증체율 유의차를 고려하여 실험어를 추출한 후 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. Seoul)로 헤모글로빈 (hemoglobin, Hb)을 측정 하였다. 혈청성분의 분석을 위하여 채혈한 혈액을 항응고제가 처리되지 않은 원심분리관에 넣고 실온에 30분간 방치한 후 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 냉장보관하면서 16시간 이내에 분석하였다. 혈청성분은 자동 혈액분석기를 사용하여 총단백질 (total protein), 글루코스 (glucose), phosphorous, 총콜레스테롤, 고밀도리포단백질 (HDL; high density cholesterol), 저밀도리포단백질 (LDL; low density cholesterol), 중성지방 (triglyceride), 간지수인 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase)를 분석 하였다.

5. 어류식세포의 활성산소 측정

라디칼에 의한 식세포 작용을 알아보기 위하여 Respiratory burst activity를 Secombes (1990) 방법에 따라 분석하였다. ependoff tube에 전혈 과 0.2% NBT 시약을 1:1 비율로 섞은후 30분동안 상온에서 반응시킨 후 1ml dimetyl formamide를 첨가하였다. 이 반응물을 200 μl 씩 micro well plate에 분주한 후 최종적으로 그 plate를 OD 560 nm에서 micro-reader (TecanTM)로 측정하여 실험어의 respiratory burst activity를 분석하였다.

6. 혈청의 Lysozyme 활성 조사

체액성 면역 반응에 관여하는 인자로 라이소자임은 세균벽의 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglucosamine사이의 베타-1,4결합을 분리하여 세균을 사멸시키는 효소로 그람양성균에 대한 항체 및 보체 활성을 증가 시켜주고, 식세포의 식작용을 증가시킨다. 실험 방법은 Jaya와 Sahoo 방법에 따라 *Micrococcus lysodeikticus*를 0.02M sodium citrate buffer (pH 5.5)에 0.2mg/ml가 되게하여 M. lysodeikticus solution을 만든다. sera를 각각 15 μ l씩 96well plate에 분주한 후 즉시 M. lysodeikticus solution을 150 μ l넣고 450nm에서 흡광도를 측정한 후 24 $^{\circ}$ C에서 0.5, 1 시간 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.

7. 통계처리

실험자료의 배치는 완전확률계획법 (Completely randomized design)을 실시 하였고, 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 평균간의 유의성을 검정하였다. 결과 값은 평균값 \pm 표준편차 (mean \pm S.D)로 나타내었고 백분율 값은 arcsine 변형값으로 계산하여 통계분석 하였다.

제 3장 연구수행 내용 및 결과

제 1절 양식장부산물과 감귤가공 부산물의 고온발효에 의한 양식용 어분

1. 양식장 부산물, 감귤박 수거 및 성분분석

제주도 소재 각 양식장으로부터 수거한 양식장 부산물 (dead fish)와 제주도개발공사로부터 수거한 감귤박의 일반성분을 분석하여 Table 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 수분 함량은 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*, 에드워드스증 원인균인 *Edwardsiella tarda*, 활주세균증 원인균으로 보고된 *Flexibacter maritimus*를, 그리고 비브리오균인 *Vibrio alginolyticus*와 *V. anguillarum*에 대하여 40~90°C의 온도에서 0~10시간 동안 가열하였을 때의 생존률을 측정하여 Fig. 2에 나타내었다.

연쇄구균증 원인균인 *Streptococcus iniae*의 경우 40°C의 온도에서 6시간까지 가온하였을 때 약 60% 생존하였으며 10시간까지 가온하였을 때에도 약 80% 이상 생존하였다. 하지만 50°C에서 가온하였을 경우에는 가온 2시간에서 약 10% 이하로 생존률이 감소했으며 4시간 가온 처리하였을 경우 완전히 사멸하였다. 60°C로 가온 처리하였을 경우에는 가온 2시간에 완전 사멸되었다. 따라서 *S. iniae*의 경우 50°C에서 4시간 이상 처리하였을 경우 완전히 사멸되었고 60°C 이상 가온 처리하여 2시간 이상 경과하였을 경우에는 100% 사멸하였음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 2A). 또 다른 연쇄구균증 원인균인 *Streptococcus parauberis*의 경우에는 *Streptococcus iniae*보다 열에 좀 더 민감함을 보였다. 즉 40°C에서 2시간 이상 가온 처리하였을 경우 생존률이 50% 미만으로 나타났으며 10시간 가온처리하였을 경우 생존률이 약 25%에 불과하였다. 50°C 이상의 가온처리하였을 경우에는 *S. iniae*에서의 결과와 거의 유사함을 알수 있었다 (Fig. 2B). 에드워드스구균증의 원인균인 *Edwardsiella tarda*의 경우에는 본 연구에서 검토된 6개의 양식 넙치 어병세균들 중 열에 가장 강한 것으로 나타났다 (Fig. 1-2C). 즉, 40°C의 가온 조건에서

Table 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 |

는 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 열처리 하였을 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. 2D). 즉, 40℃ 가온처리 4시간 쯤에는 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. anguillarum*보다 훨씬 열에 안정함을 알 수 있었다 (Fig. 2E,F). 즉, *V. alginolyticus*의 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 고열처리에서는 처리 2시간에서 100%의 사멸률을 나타내었다 (Fig. 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.

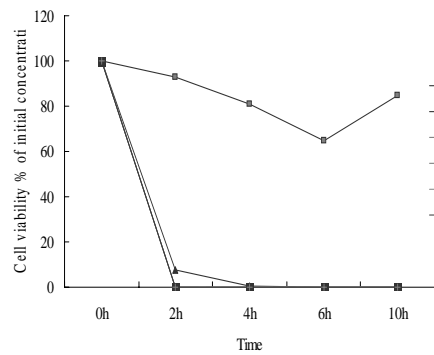
양식 넙치의 가온 처리에 따른 사멸효과는 대부분 50℃의 가온처리 조건에서 급격한 사멸률을 나타내었으며 60~70℃의 다소 높은 열처리 조건에서는 대부분 처리 2시간 이내에 100% 사멸하는 것을 보여 양식장 부산물의 어분 제조를 위한 고온발효처

리시 내부 온도가 90℃로 유지될 경우 발효공정 2시간 이내에 모든 어병세균들이 100% 사멸될 것으로 판단된다.

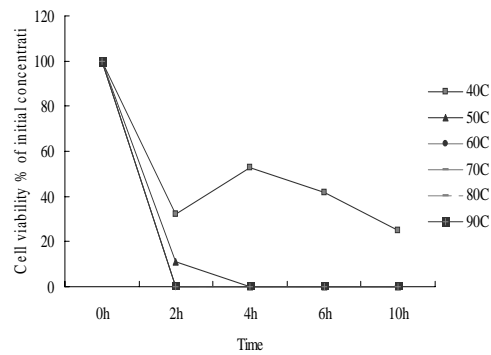
3. 고속발효 건조기에서 양식장 부산물로부터 발효어분 제조를 위한 최적발효 조건 규명 및 제조된 어분의 일반성분 함량

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 증가 할수록 생산량은 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.

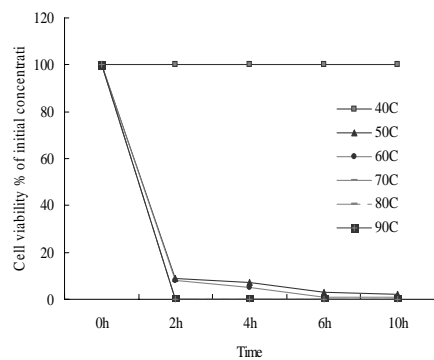
양식장 부산물 유래 발효어분의 제조 시 수분조정제로 사용된 미강의 첨가량에 따라 달리 제조되었을 때의 일반성분의 함량을 분석하여 Table 4에 나타내었다. 발효어분의 수분함량은 대체적으로 5% 미만으로 함수량이 매우 낮다는 것을 알 수 있었다. 또한 어분의 가장 중요한 성분인 조단백질 함량은 미강의 첨가량이 증가할 수록 감소하였다. 즉, 양식장 부산물 24 kg에 수분조정제인 미강을 5 kg 첨가하였을 경우에 조단백질 함량은 약 42.2%로 가장 높게 나타났으며, 미강의 첨가량이 20 kg 일 때에는 조단백질 함량이 27%로 가장 낮았다. 그 이유는 수분조정제로 사용된 미강의 주 성분은 대부분 탄수화물이기 때문에 미강의 첨가량이 증가 할수록 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 3에서 볼 수 있듯이 양식장 부산물인 넙치의 지질 함량은 건



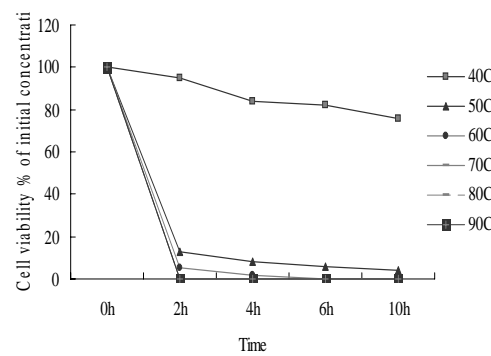
(A)



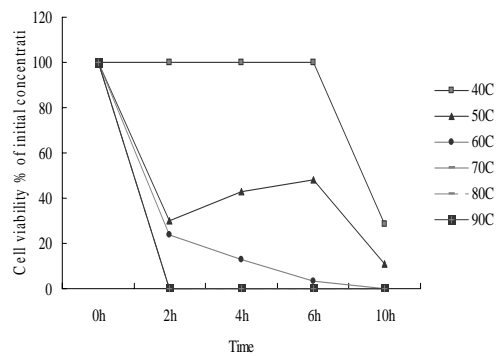
(B)



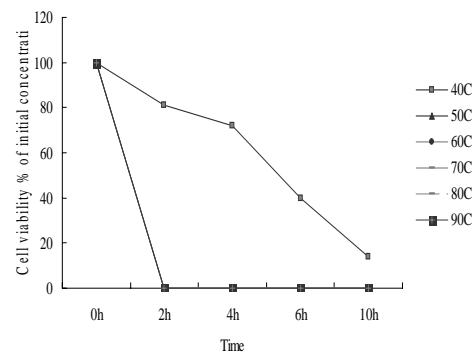
(C)



(D)



(E)



(F)

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), *Flexibacter maritimus* (D), *Vibrio alginolyticus* (E) and *Vibrio anguillarum* (F)).

조 중량으로 5% 미만인 것으로 나타났다. 이와 같은 지질의 함량이 매우 낮은 넙치를 발효 가공함으로써 지질의 함량이 높아진 것은 차후 검토해 보아야 할 것으로 판단

된다.

고속발효 건조장치에서 양식장 부산물 유래 발효어분 제조시 어분의 기능성을 향상시키기 위하여 첨가한 감귤박의 양을 증가시킴으로서 발효어분의 생산량과 총 작업 시간을 검토하여 Fig. 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 전체 적으로 함수량이 증가하게 되어 발효공정을 완료하여 건조된 발효어분을 생산하는데 시간이 좀 더 오래 걸리게 된 것이다.

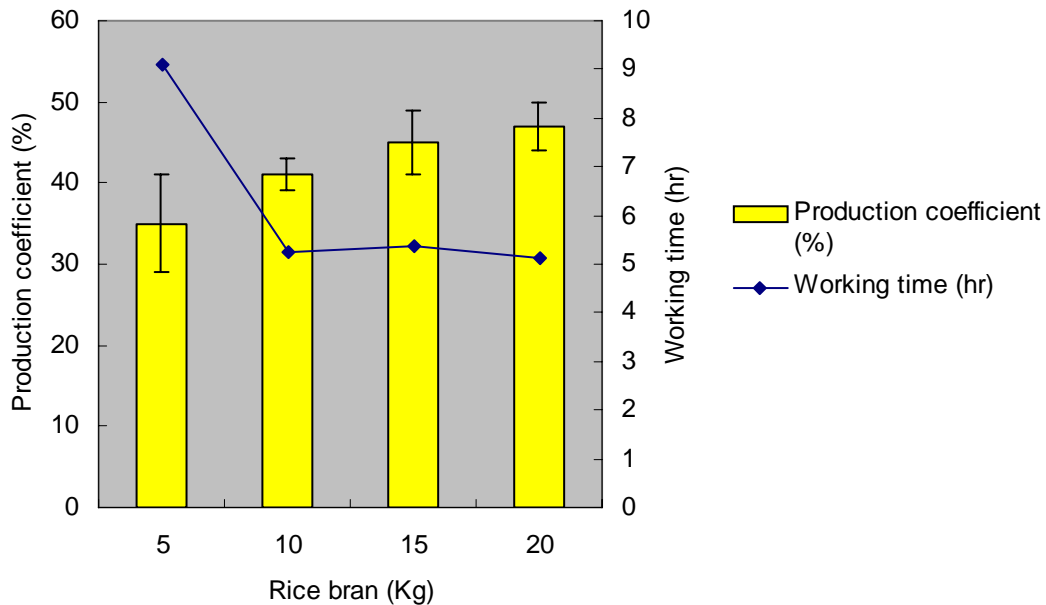


Fig. 3. The production rate of fish meals according to the added rice bran amount in the Biofeeder BF-30 fermentor.

Table 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 |

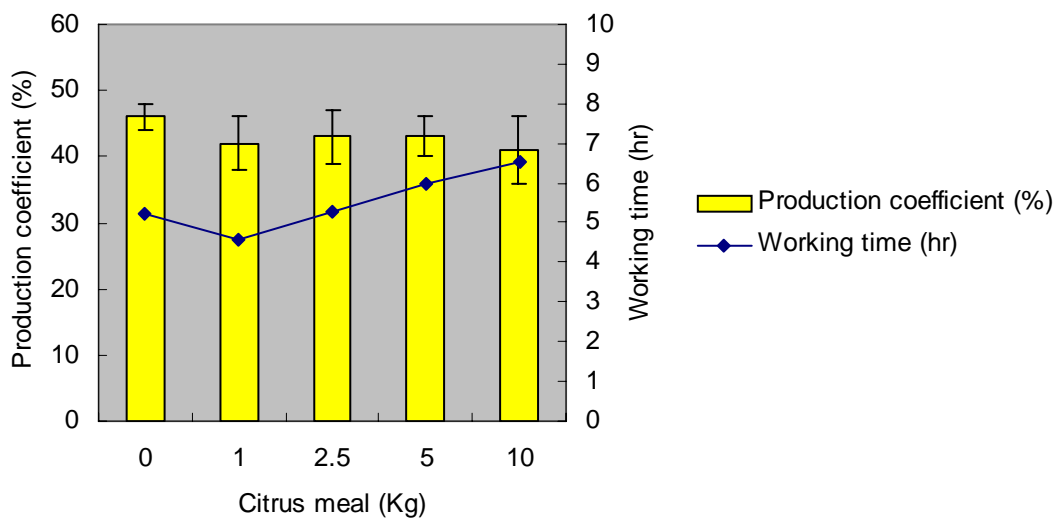


Fig. 4. The production rate of fish meals according to the added citrus meal amount in the Biofeeder BF-30 fermentor.

감귤박의 첨가량에 따른 발효어분의 일반성분의 변화를 검토하여 Table 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 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 투입량에 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 증가 할수록 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 6에 나타내었다. Table 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 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 |

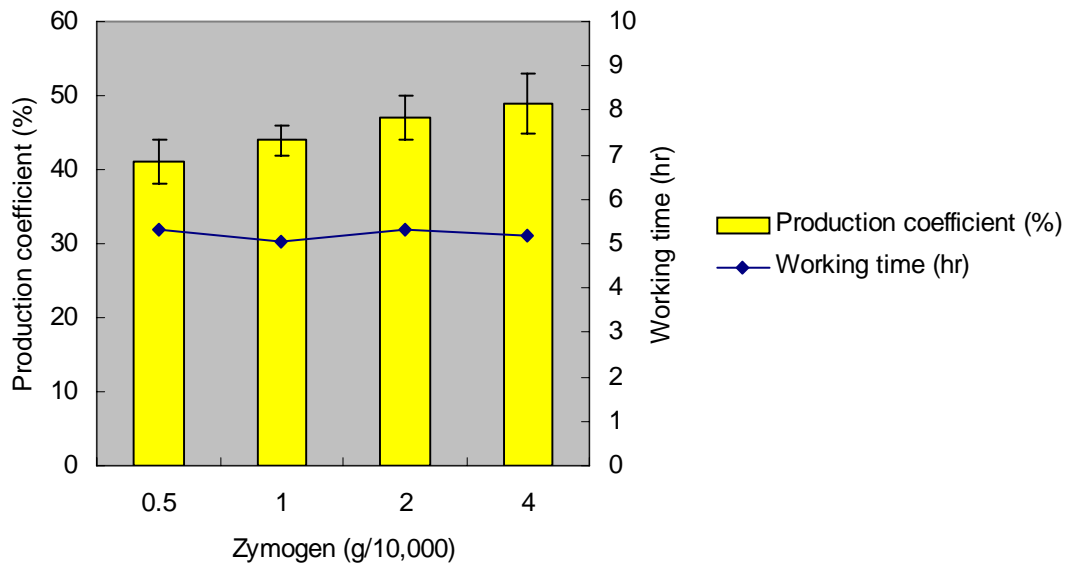


Fig. 5. The production rate of fish meals according to the added zymogen amount in the Biofeeder BF-30 fermentor.

Table 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 감귤주스 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 소거 활성 및 활성 산소종인 hydrogen peroxide (H₂O₂)의 소거활성을 감귤박이 함유되지

많은 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. 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 증가 할수록 소거율도 증가하였다. 특히, 시료의 농도가 4 mg/ml 일 때 약 80% 이상의 높은 소거활성을 나타내었다. Hydrogen peroxide 소거활성도 감귤박을 첨가하지 않고 동일한 조건으로 공정한 발효어분에서 소거활성을 거의 보이지 않아 그림에는 나타내지 않았다 (Fig. 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 받게되고, 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

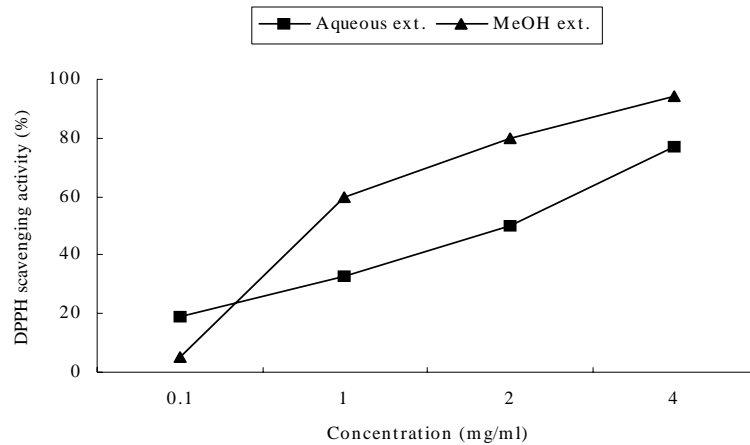


Fig. 6. DPPH free radical scavenging effects of aqueous and methanol extracts from the fermented fish meals with citrus.

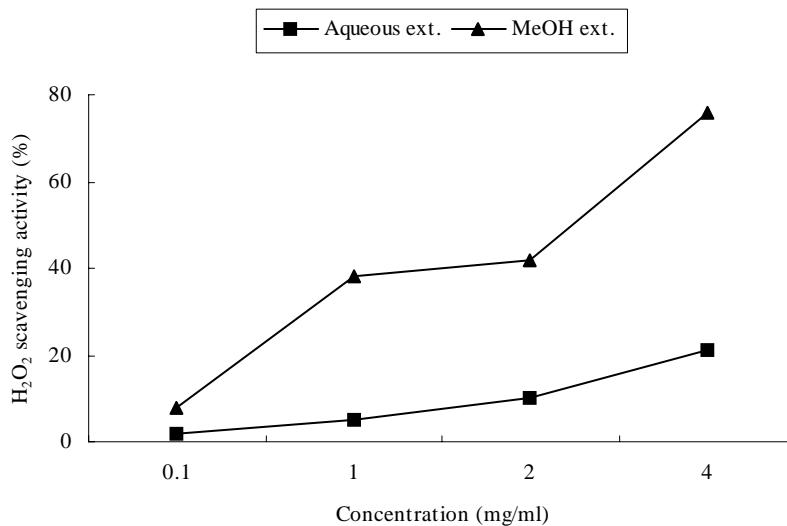


Fig. 7. Hydrogen peroxide (H₂O₂) scavenging effects of aqueous and methanol extracts from the fermented fish meals. The left is the results by the both extracts from the fermented fish meal prepared with moist citrus meal, and the right is with dried citrus meal.

본 실험에서는 세포의 DNA 손상을 측정하는 방법으로 comet assay를 이용하여 발효 어분 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 leukemia 세포인 U937과 넙치의 lymphocyte에 대한 DNA 손상 보호 효과를 Fig. 8~13에 나타내었다. U937 cell에서는 citrus meal을 첨가한 발효어분 추출물을 처리한 실험구에서는 농도가 증가 할수록 DNA 손상 보호효과가 증가하였고 H₂O₂를 처리한 대조구(positive control)의 세포는 tail movement가 약 41%정도 일어났으나, citrus meal을 첨가한 발효어분 추출물을 10 µg/ml을 처리하였을 때는 tail movement 값이 약 30%로 감소한 것을 확인 할 수 있었다. 또한 100 µg/ml 농도의 추출물을 처리하였을 때는 약 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. 9). 한편, Citrus peel을 첨가한 발효 어분 추출물을 처리한 넙치의 lymphocyte에서는 10 µg/ml 과 50 µg/ml의 농도를 처리 했을 때 각각 약 70%와 80%의 보호효과가 나타났으며, 추출물의 농도가 100 µg/ml의 농도에서는 약 90%의 DNA 보호 효과를 나타 낸 반면, 건조 감귤박을 첨가하지 않고 미강을 첨가한 발효어분의 추출물을 처리한 어류의 림프구는 추출물의 농도와 상관없이 DNA 손상이 80% 이상 일어났다(Fig. 12). Fig. 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 기능성 발효 어분 추출물을 농도별로 처리해 주었을 때는 농도에 의존적으로 DNA의 손상이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

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.

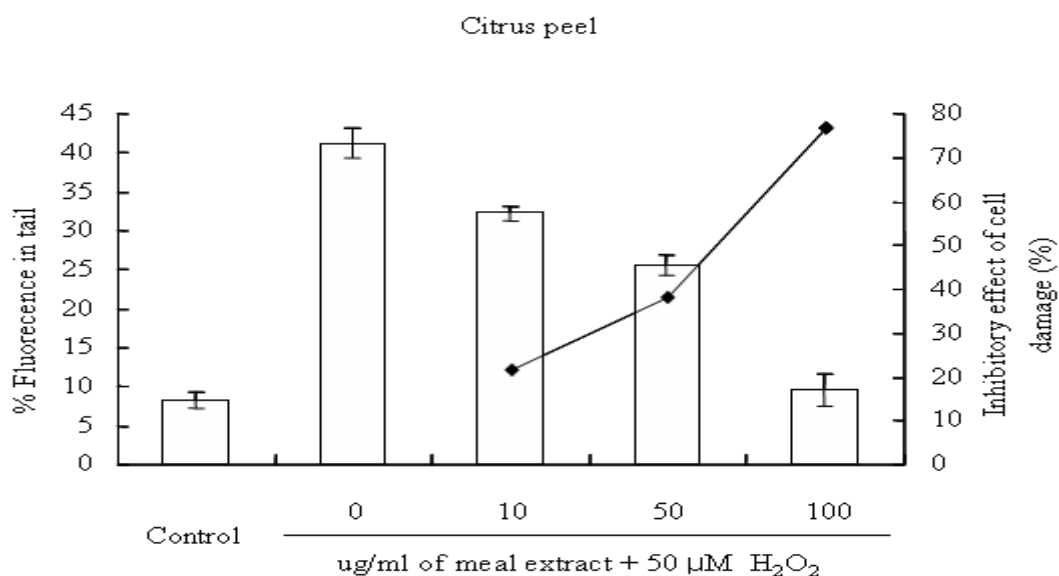


Fig. 8. The effect of supplementation in vitro with different concentrations of FFM (fermented fish meal) prepared with citrus peel extracts on DNA damage of H_2O_2 -induced U937 cell. Values are means with standard error of duplicate experiments (bar represented % Fluorescence in tail and leaner represented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

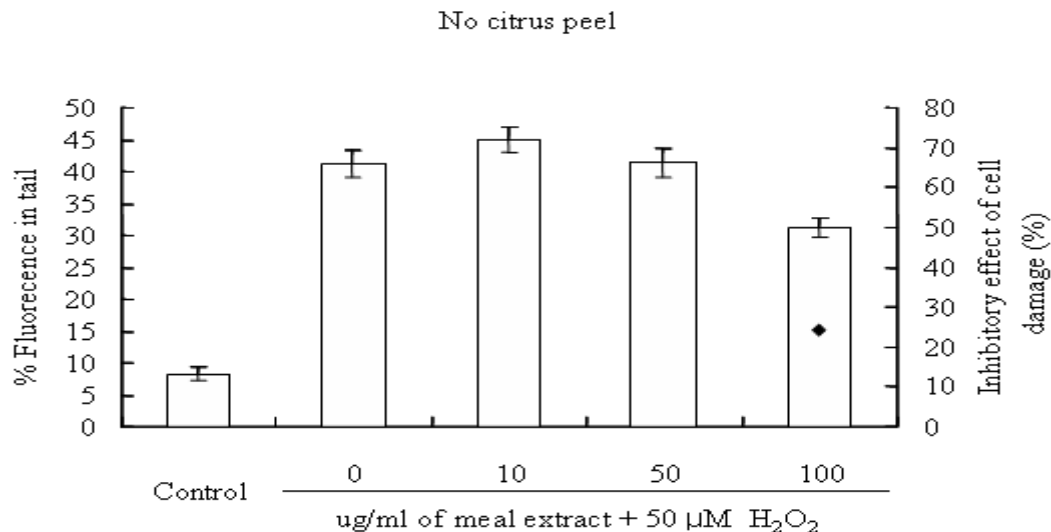


Fig. 19. The effect of supplementation in vitro with different concentrations of FFM (fermented fish meal) prepared without citrus peel extracts on DNA damage of H_2O_2 -induced U937 cell. Values are means with standard errors of duplicate experiments (bar represented % Fluorescence in tail and leaner represented Inhibitory effect of cell damage).

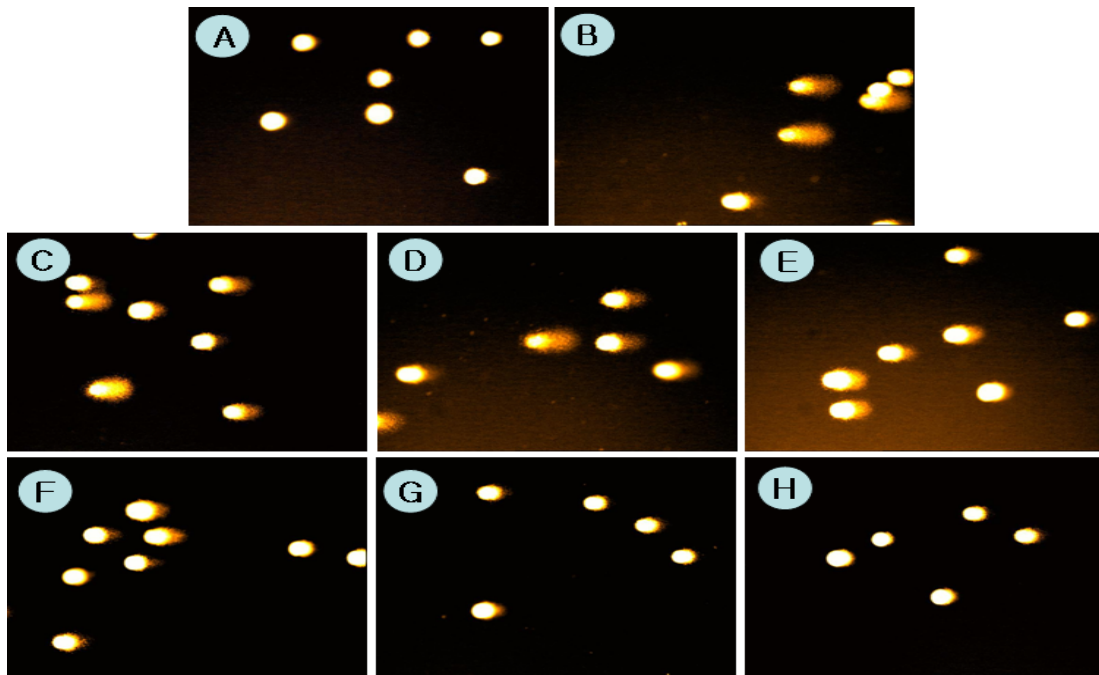


Fig. 10. Comet images of U937 cells: (a) Negative control, (b) Positive control (50 μM H_2O_2), (c, f) Treated sample (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), (d, g) Treated sample (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), (e, h) Treated sample (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), (c, d, f) citrus peel, (f, g, h) no citrus peel.

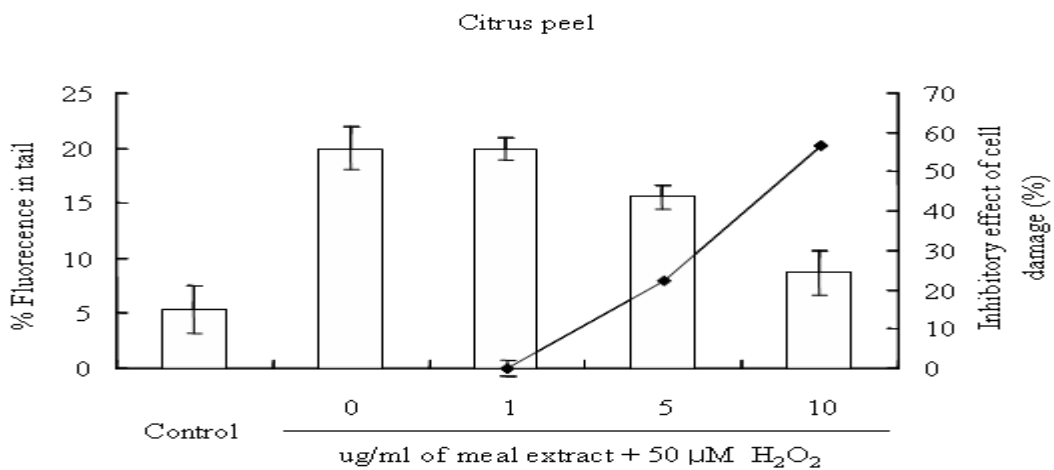


Fig. 11. The effect of supplementation in vitro with different concentrations of FFM (fermented fish meal) prepared with citrus peel extracts on DNA damage of H_2O_2 -induced flounder lymphocyte cell. Values are means with standard errors of duplicate experiments (bar represented % Fluorescence in tail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

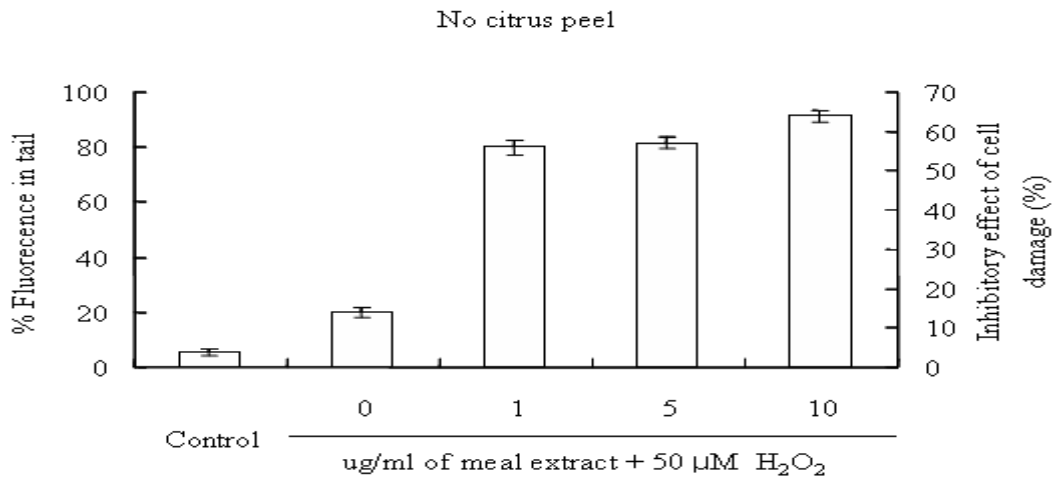


Fig. 12 The effect of supplementation in vitro with different concentrations of FFM (fermented fish meal) prepared without citrus peel extracts on DNA damage of H₂O₂-induced flounder lymphocyte cell. Values are means with standard errors of duplicate experiments (bar represented % Fluorescence in tail and lineer represented inhibitory effect of cell damage).

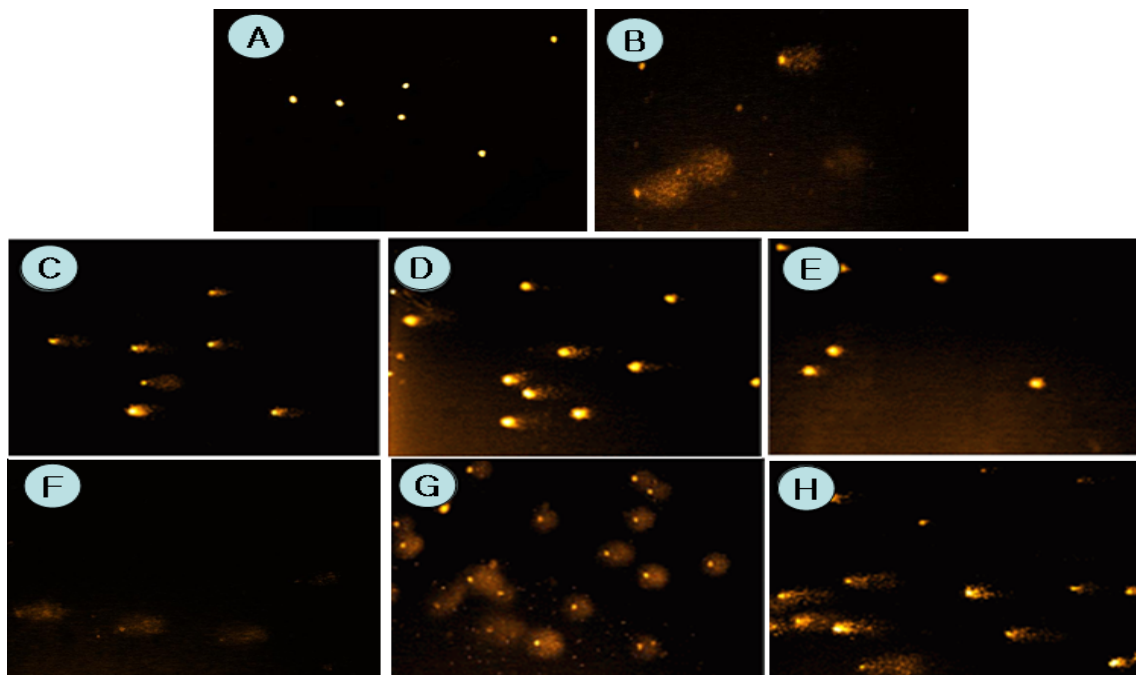


Fig. 13. Comet images of flounder lymphocyte: (a) Negative control, (b) Positive control (50 μM H₂O₂), (c, f) Treated sample (10 μg/ml), (d, g) Treated sample (50 μg/ml), (e, h) Treated sample (100 μg/ml), (c, d, f) citrus peel, (f, g, h) no citrus peel.

5. 양식장 부산물 유래 발효어분의 품질 안전성

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

그리고 각 분리균주의 동정을 위한 m-PCR 수행 결과를 Fig. 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. 15에 나타내었다. Fig. 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 7. Biochemical characteristics of the isolated from bacteria strains

| Characteristics | Isolated strains | | | |
|-------------------|------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| | <i>S. iniae</i> | <i>S. parauberis</i> | <i>E. tarda</i> | <i>F. maritimus</i> |
| Gram stain | + | + | - | - |
| Oxidase test | - | - | - | + |
| Catalase test | - | - | + | + |
| Growth at BHIA | + | + | + | NT |
| Growth at SS | - | - | +, H ₂ S | NT |
| Growth at TCBS | - | - | - | NT |
| Hsu-Shotts medium | NT | NT | NT | +, yellow pigment |

1 2 3 4 5 6

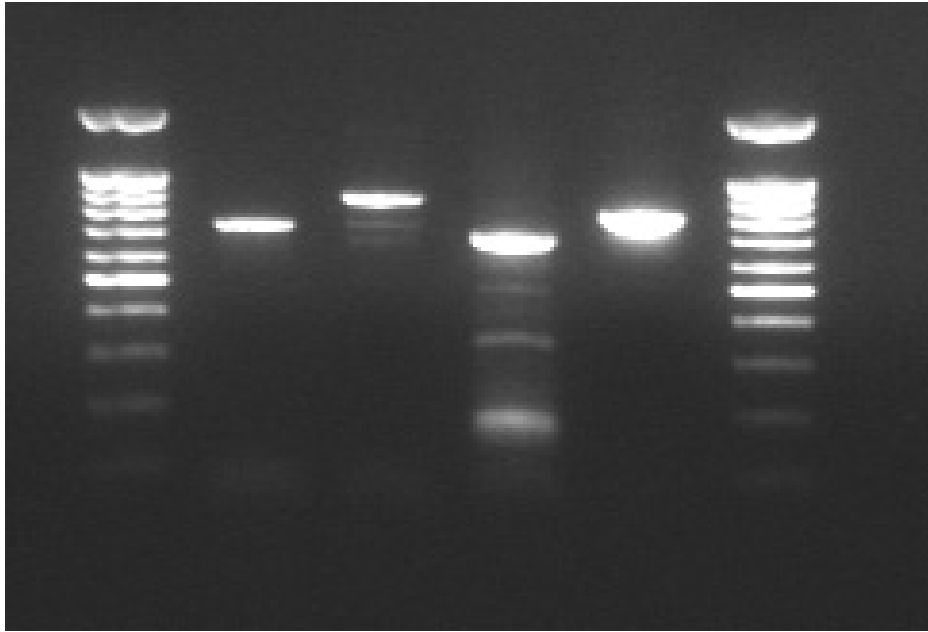


Fig. 14. PCR results of the isolated bacteria strains Lane 1, DNA marker(100 bp); lane 2, *S. parauberis* (718 bp) ; lane 3, *S. iniae* (870 bp) ; lane 4, *F. maritimus* (686 bp) ; lane 5, *E. tarda* (786 bp) ; lane 6, DNA marker (100 bp)

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 8에 나타내었다. Table 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. 16에서 보는 것과 같이 추출물 원액을 여과하였을 때 일부 콜로니가 성장하고 있음을 보여주었다. Fig. 16의 왼쪽 그림에서 보는 것과 같이 추출물 원액을 배양한 petri dish에서 DNA를 추출하여 PCR법으로 인위적으로 감염된 세균인지를 확인하여 Fig. 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, H₂O₂의 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.

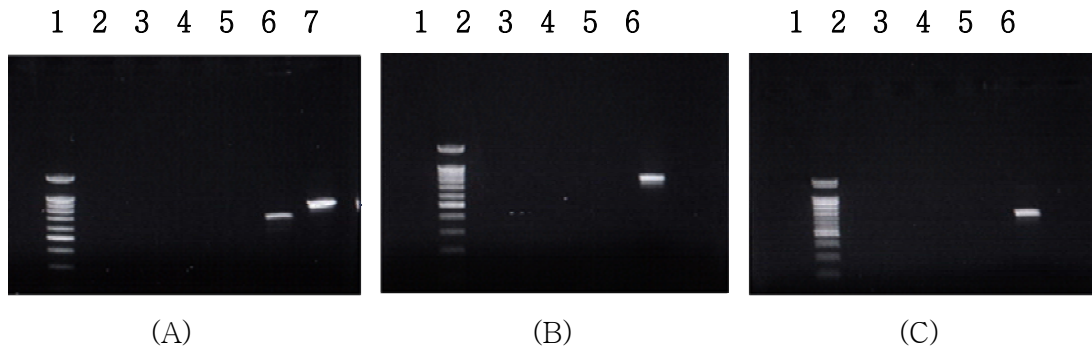


Fig. 15. PCR results for the identification of the respective infectious bacteria from the fermented fish meals. A-lane 1, size marker (100 bp); A-lane 2, sample 1; A-lane 3, sample 2; A-lane 4, sample 3; A-lane 5, sample 4; A-lane 6, *S. parauberis* (718 bp); A-lane 7, *S. iniae* (870 bp) [sample 1 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 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 | |

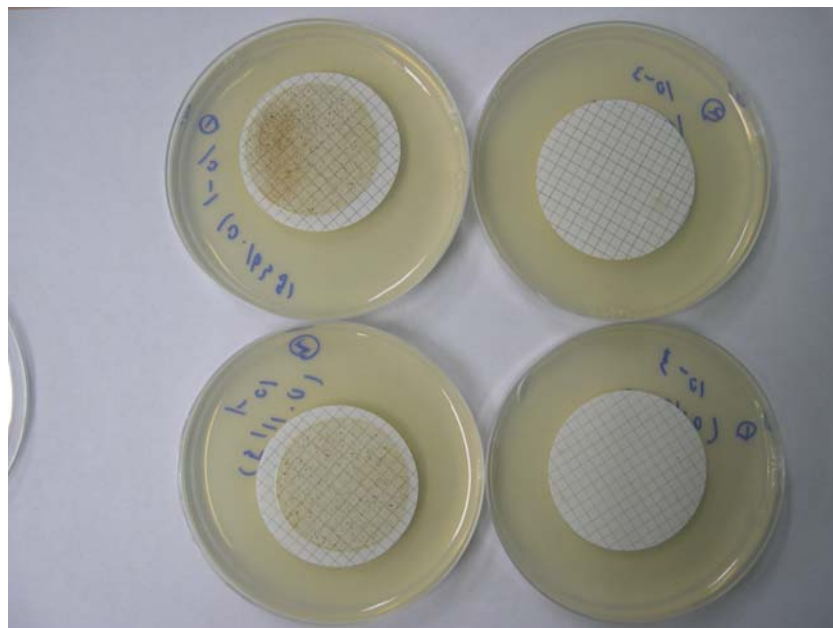


Fig. 16. The bacteria growth characteristics of the fermented fish meal. The left photos are the original extract solution and the right 1000-fold dilution. The upper two petri dishes contained PCA media and the down two ones MA.

1 2 3 4

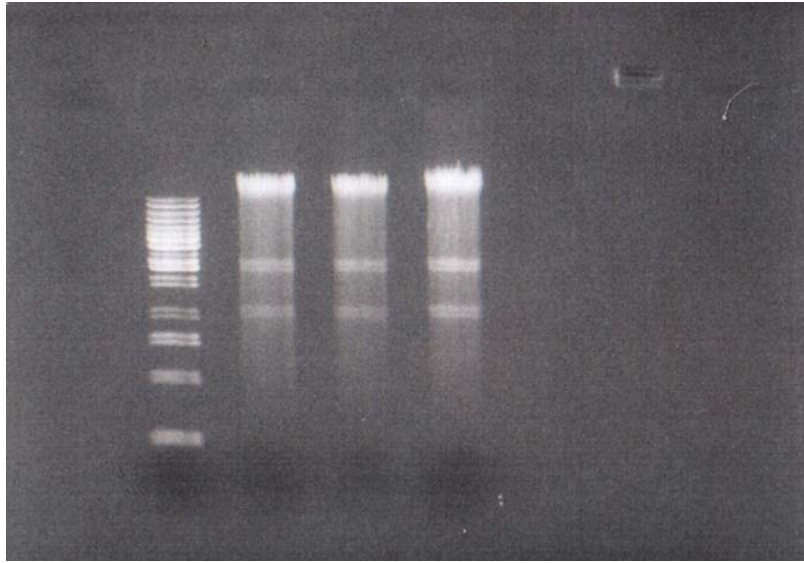


Fig. 17. PCR result of the fermented fish meal from fish culturing by-products which were infected factitiously with the respective four fish disease bacteria to induce some stronger infections of the sample fishes. The bacteria were added with around 5×10^7 cfu/g dead fish. The lane 1 is DNA marker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

6. 양식장 부산물 유래 발효어분의 품질 규격 검사

본 연구결과의 최종 산물인 양식장 부산물과 감귤박을 이용하여 제조한 발효어분이 사료용 어분으로 사용이 가능한지 알아보기 위하여 사료 성분 및 유해 물질의 함량을 분석하였다. 어류가공 부산물을 이용한 사료용 어분의 품질 기준과 본 연구 결과 발효 어분의 품질기준에 준하는 성분 분석결과는 Table 9에 나타내었다. 일반적으로 어분은 약 60% 내외의 단백질 함량을 가지는데 본 연구 결과 발효어분의 단백질 함량은 약 59%로 어분으로서의 기본기를 가진 것을 확인하였으며, 조지방 및 조섬유 함량은 각각 16.43% 및 2.35%의 비율을 함유하고 있는 것을 확인 하였다. 본 연구 결과물의 지방내 함유된 유리 지방산 및 산성물질의 양을 나타내기 위해 산가(A.V; Acid Value)를 측정한 결과 22.95로 기준치인 30보다 낮은 값을 나타내었으며, 염산 불용물질(sand)도 기준치 이하나 나타났다. 비단백태질소화합물(Urea) 및 휘발성염기태질소(VBN)는 본 연구 결과물에 검출되지 않았다. 또한 사료 유해 물질은 살모넬라는 검출되지 않았으며, 수은, 납, 카드뮴 및 크롬 등의 함량은 각각의 기준치 보다 낮게 검출되었다. 양식장부산물을 이용하여 제조한 발효어분 내의 항생제(Antibiotics)의 잔존 여부를 측정한 결과 옥시테트라사이클린(OTC), 클로르테트라사이클린(CTC), 설파치아졸, 설파메타진 및 설파메라진은 전혀 검출되지 않아 항생제에 대한 안전성도 검증되었다. 따라서 본 연구를 통해 생산한 발효어분의 사료용 어분으로서의 가치를 충분히 가지고 있음이 입증되었으며 최종적으로 양식장부산물유래 기능성 어분 (Fig. 18)을 생산하였다.

Table 9. Compositions analyses of fermented fish meal

| | Items | Standard value | Analysed value |
|---------------------|--------------------------|----------------|----------------|
| Meal Ingredients | Crude protein(%) | - | 58.97 |
| | Crude lipid(%) | - | 16.43 |
| | Crude fiber(%) | - | 2.35 |
| | Acid value | < 30 | 22.95 |
| | VBN(%) | N.D. | N.D. |
| | Urea(%) | N.D. | N.D. |
| | Sand(%) | < 2 | 0.70 |
| Harmfulness matters | Salmonella | N.D. | N.D. |
| | Hg(mg/kg) | < 0.5 | 0.12 |
| | Pb(mg/kg) | < 10 | 0.38 |
| | Cd(mg/kg) | < 2.5 | 0.08 |
| | Cr(mg/kg) | < 100 | 2.61 |
| Antibiotics | OTC(mg/kg) ¹⁾ | < 0.2 | N.D. |
| | CTC(mg/kg) ²⁾ | - | N.D. |
| | Sulfathiazole(mg/kg) | - | N.D. |
| | Sulfamethazine(mg/kg) | - | N.D. |
| | Sulfamerazine(mg/kg) | - | N.D. |

N.D.; No detected

¹⁾Oxytetracycline²⁾Chlrotetracycline



Fig. 18. Fermented fish meal product prepared from dead fish

제 2절 양식장부산물과 감귤가공 부산물의 고온발효에 의한

양식용 어분의 양식넙치에의 적용

1. 성장률

넙치는 고밀도 양식으로 인한 여러 질병의 발생으로 경제적 손실을 비롯하여 대량 양식장 부산물 (dead fish)의 처리 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. 20)이 약간 높은 경향을 보인 반면, 140 g인 실험구에서는 발효어분 배합사료를 섭취한 실험구가 약간 높은 성장률 (Fig. 19)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 향상시킴으로써 폐사율을 낮춰준 것으로 생각되며 Fig. 21과 Fig. 22에 나타내었다.

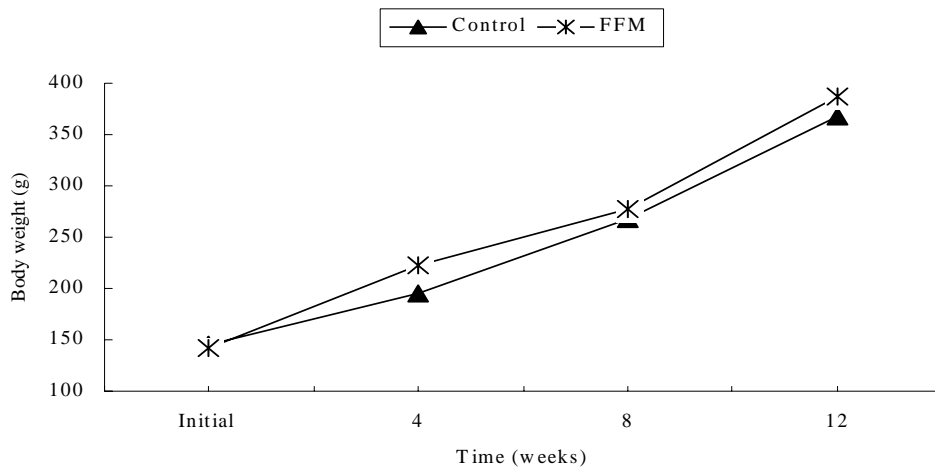


Fig. 19. Growth rate of olive flounder fed by FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks (started with body weight: 140 ± 10 g).

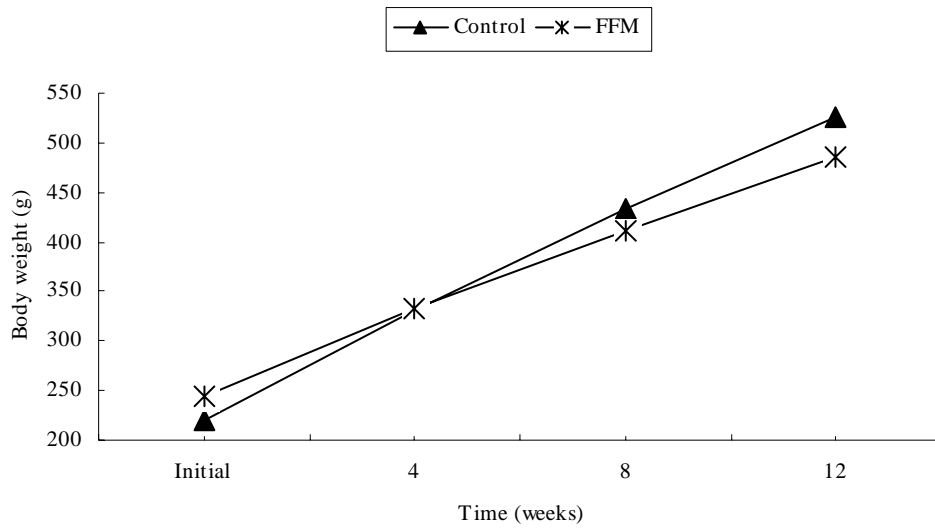


Fig. 20. Growth rate of olive flounder fed by FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks (started with body weight: 230 ± 15 g).

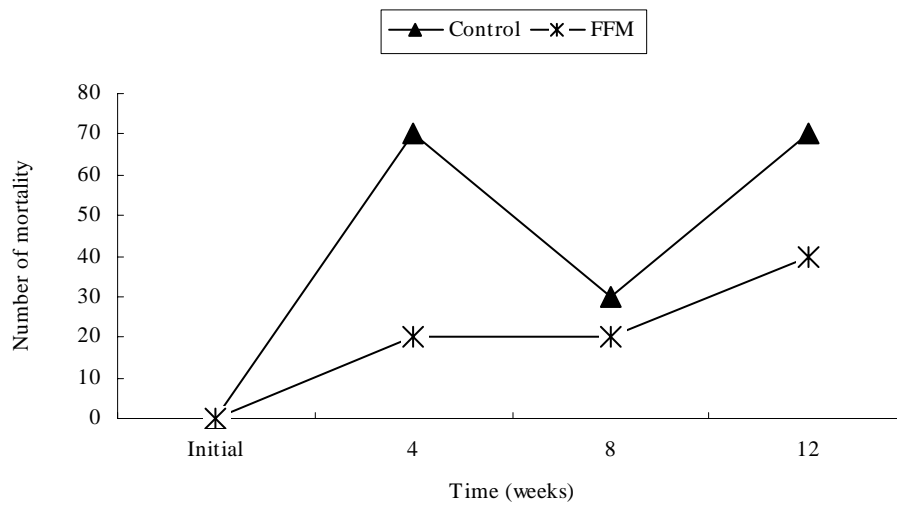


Fig. 21. Dead fish number of olive flounder fed by FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks (started with body weight: 140 ± 10 g).

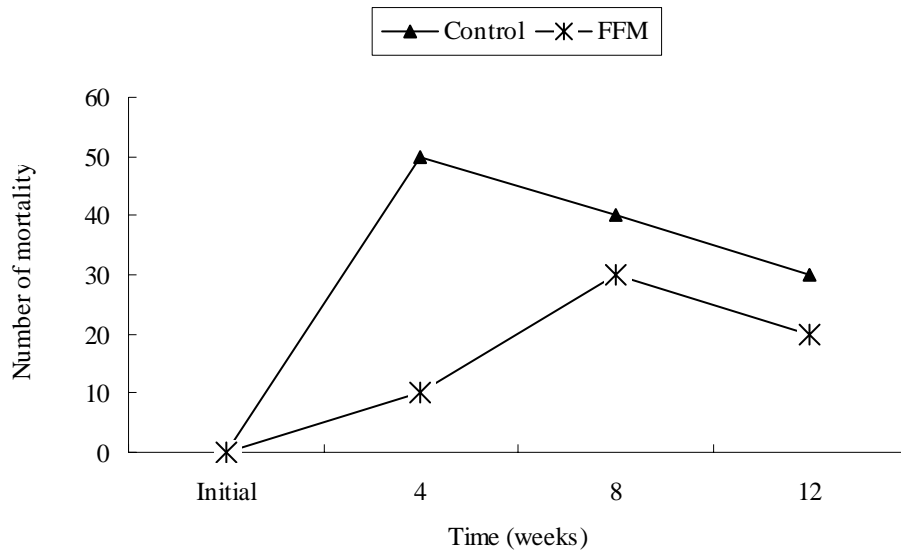


Fig. 22. Dead fish number of olive flounder fed by FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks (started with body weight: 230 ± 15 g).

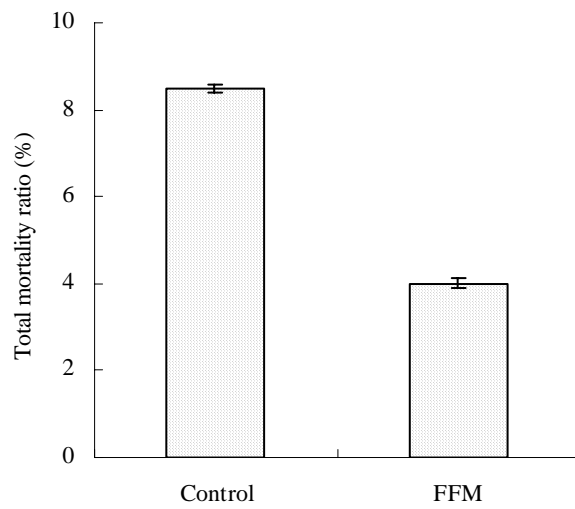


Fig. 23. Total mortality ratio (%; down) of olive flounder fed by FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks (started with body weight: 140 ± 10 g).

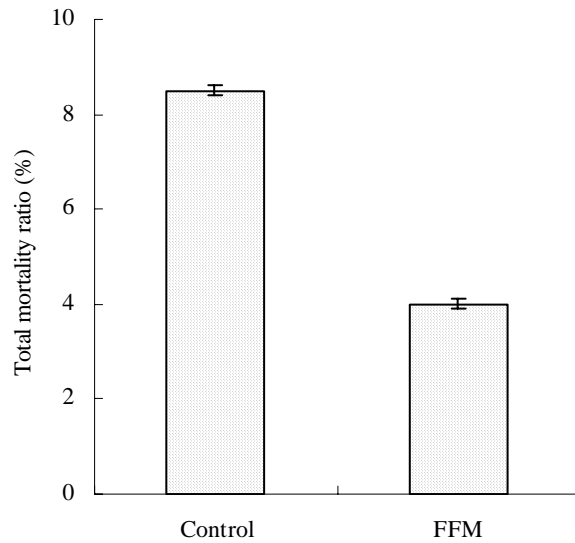


Fig. 24. Total mortality ratio (%; down) of olive flounder fed by FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks (started with body weight: 230 ± 15 g).

2. 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 10에 나타내었다. 총콜레스테롤, HDL 및 LDL의 분석값은 실험구간에서 유의적인 차이가 나타나지는 않았으나 FFM을 첨가한 사료를 섭취한 실험구에서 약간 높게 나타났다. 그러나 간지수 지표인 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 확인할 수 있었다. 헤모글로빈은 적혈구 속에 들어 있는 혈액소로 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 염

중, 간염, 담낭염, 간경화가 있을 시에는 증가하고, ALT (GPT)는 AST와 유사 기능을 하는 간지수는 실험구간 유의성은 있었으나, 값의 차는 거의 나타나지 않았다.

3. 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_2 가 $\cdot O_2^-$ 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. 포유동물에서는 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 10. 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 10. 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 burst는 어류 건강상태를 확인할 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_2 와 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 확인 할 수 있었다 ($P < 0.05$, Fig. 25), 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 실험결과 FFM을 첨가한 사료를 섭취한 어류가 생사료만을 섭취했을 때 보다 식균작용을 더 잘 일으켜 외부 물질에 대한 잠재적인 저항성이 더 높을 것으로 사료된다.

4. 혈정의 lysozyme 활성

아가미, 피부, 소화계, 생식 이노관은 박테리아, 곰팡이, 바이러스 및 원생미생물에 대한 어류 감염의 초기 단계에서 방어를 한다. 이러한 표면들은 물리화적인 장벽이면서 항미생물 물질을 함유하고 배출한다. 점액과 배상세포에 있는 점액은 세가지 방어 기작을 가지는 것으로 알려져 있다. 첫째는 점액은 미생물의 껍질을 지속적으로 벗겨 미생물의 생성을 저지한다. 둘째, 미생물이 생성되었을 시 점액은 교차하여 장벽을 생성한다. 마지막으로 피부의 점액 및 다른 표면점막에

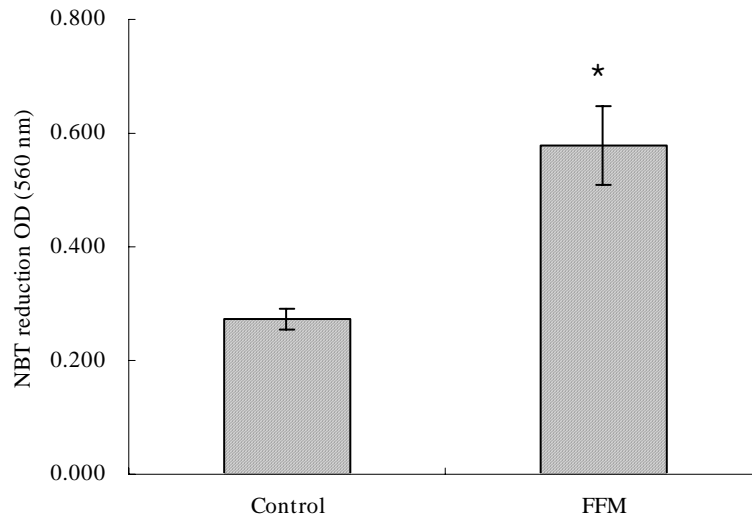


Fig. 25. Respiratory burst activity of neutrophils from Olive flounder that was fed by FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks.

는 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 직접 작용하고, 그람음성균에 대해서는 항체와 보체의 작용을 증가시켜준 후에 펩티도글리칸 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. 26).

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 처리 곤란 난을 해결 해 주는 등의 수산 농가에 많이 이점을 안겨 줄 것으로 사료된다.

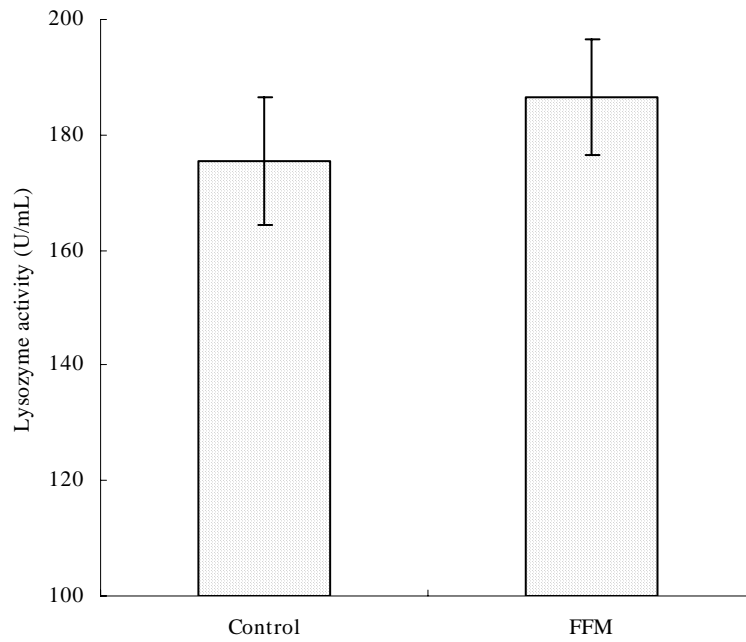


Fig. 26. Serum lysozyme activity of olive flounder that fed FFM and non-supplemented control diet for 12 weeks.

제 3절 양식장부산물과 감귤가공 부산물의 고온발효에 의한 양식용 어분의 들뜸에의 적용

1. 성장률

본 실험에서는 단백질원으로 낱치 발효어분을 대체한 사료를 급이한 실험구와 대

조구간의 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. 26), 일간성장율 (SGR), 사료섭취율 (FI), 사료전환효율 (FCR) 및 생존률 (SUV)은 모든 실험구별로 유의적인 차이를 보였으며 그 결과는 Table 11에 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(OFFM)과 10FFM이 비슷한 결과를 나타내었으며, 일간 성장률 역시 발효어분 함량이 증가 할수록 일간 성장률은 오히려 감소하는 경향을 보였다. 한편, 2주 간격으로 측정된 성장률을 Fig. 27에 나타내었다. 2, 4주째 측정 결과 성장에 유의적인 차이를 보이지 않았으나 6주와 8주째에는 각 실험구간에 유의적인 차이를 보였다 ($p < 0.05$). 6주 때에는 10FFM > 20FFM > OFFM > 30FFM 순으로 높은 성장률을 보였고, 8주 때에는 10FFM > OFFM > 20 FFM > 30FFM 순 이었다. 사료섭취량에 대한 한 어체당 사료 공급량을 사료전환효율 (feed conversion ratio, FCR)이라 하는데 이 값 역시 OFFM과 10FFM에서 가장 높은 효율을 나타내었고, 발효어분 함량이 증가 할수록 사료전환효율은 감소하였다.

Table 11. Growth parameter of parrot fish¹

| Diet | WG (%) ² | SGR (%) ³ | FCR ⁴ | FI ⁵ | SUV (%) ⁶ |
|--------|---------------------|----------------------|------------------|-----------------|----------------------|
| OFFM7 | 251.86±16.46 | 0.98±0.04 | 1.04±0.07 | 33.46±2.84 | 100 |
| 10FFM8 | 264.67±18.74 | 1.00±0.04 | 1.04±0.03 | 34.84±2.16 | 100 |
| 20FFM8 | 239.97±0.03 | 0.93±0.01 | 1.08±0.03 | 32.79±0.49 | 100 |
| 30FFM8 | 214.91±9.57 | 0.89±0.02 | 1.18±0.04 | 32.57±2.67 | 100 |

¹The value represented three different experiments and represented mean±S.D (P<0.05).

²WG (%)=100×(final body weight-initial body weight)/initial body weight

³SGR (%)=[(loge final body weigh-loge initial body weight)/days]×100

⁴FCR=dried feed weight/moist feed weight

⁵FI (g/g body weight)=diet dry weight (g)/ body weight(g)

⁶SUV (%)=survival rate

⁷CON=control

⁸Partial replacement with 10, 20 and 30% FFM (fermented fish meal), respectively.

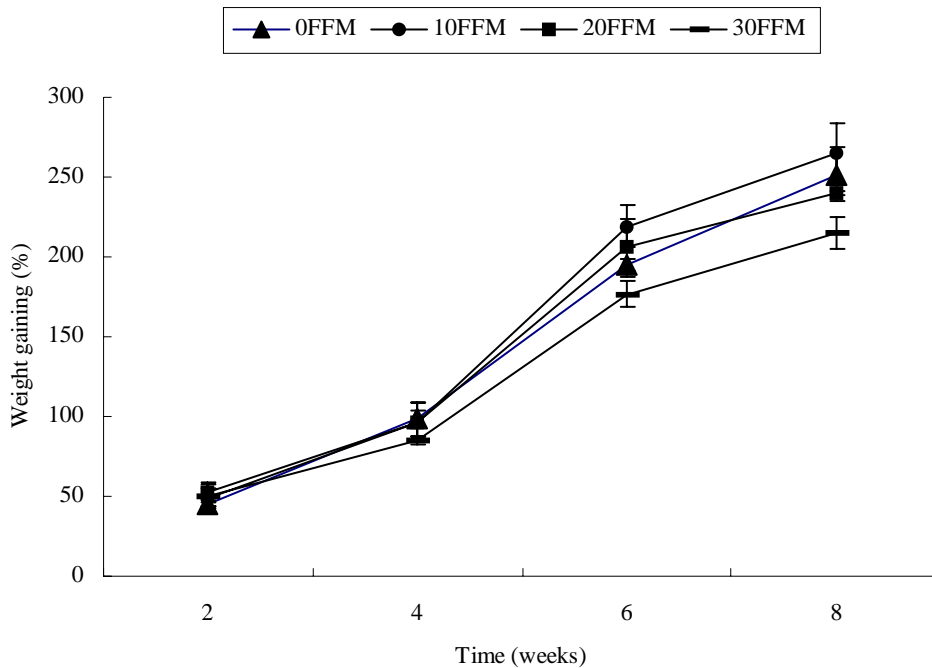


Fig. 27. Growth rate of olive flounder fed by FFM and non-supplemented control diet for 8 weeks (—▲— 0FFM; non-supplementation, —●— 10FFM; 10% fermented fish meal included, —■— 20FFM; 20% fermented fish meal included, —■— 30FFM; 30% fermented fish meal included).

2. 혈액분석

어류의 혈액성분은 영양, 건강상태 및 스트레스 해석의 차원으로 사용이 가능하고, 사료의 필수영양소의 결핍이나 그 어종이 처해있는 서식환경 및 성장에 따라 서로 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, 담낭염, 간경화가 있을 시에는

증가하고, ALT (GPT)는 AST와 유사 기능을 한다. 이결과는 Table 13과 Table 14에 나타내었으며, 사육 4주째에는 10FFM과 20FFM에서 가장 낮은 값을 보였고 (Table 12), 사육 8주째에는 발효어분이 첨가된 모든 실험구가 대조구보다 낮은 값을 나타내었다 (Table 13). 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 간 질환, 갑상선 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 증가한다. HDL 콜레스테롤은 실험 4주째에는 실험구간에 큰 차이를 보이지 않았으나 8주째에는 10FFM이 대조구보다 7% 정도 높은 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 총 콜레스테롤 함량은 8주째에 4주째 보다 감소하였다.

Table 12. 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 12. 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 13. 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 13. 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

3. 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_2 가 $\cdot O_2^-$ 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. 포유동물에서는 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 burst는 어류 건강상태를 확인할 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_2 와 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. 28).

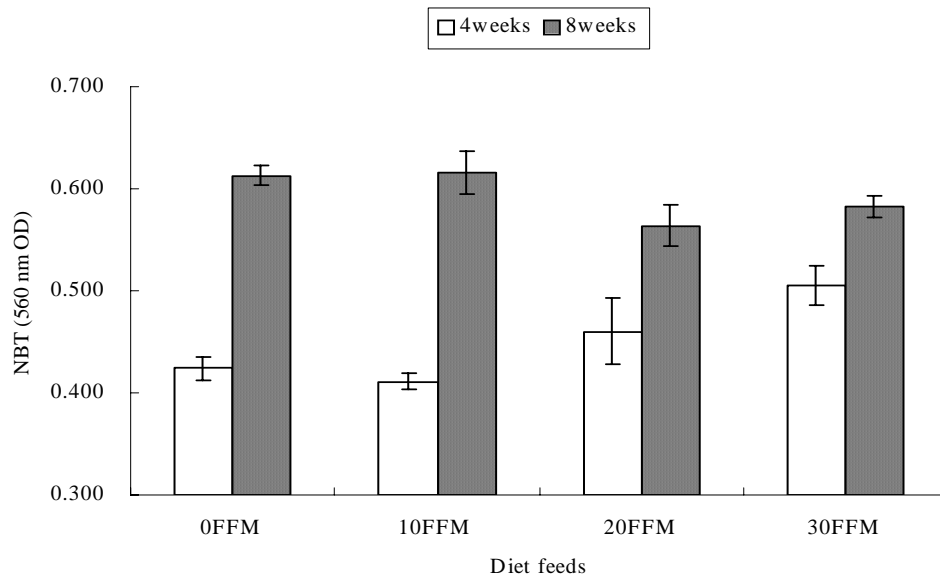


Fig. 28. Respiratory burst activity of neutrophils from parrot fish that was fed by FFM and non-supplemented control diet for 8 weeks (OFFM; non-supplementation, 10FFM; 10% fermented fish meal included, 20FFM; 20% fermented fish meal included, 30FFM; 30% fermented fish meal included)

4. 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 접종하여 저항성을 평가하기도 한다. 아가미, 피부, 소화계, 생식 이노관은 박테리아, 곰팡이, 바이러스 및 원생미생물에 대한 어류 감염의 초기 단계에서 방어를 한다. 이러한 표면들은 물리화적인 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. 29에 나타내었다. 실험 4주, 8주째 모두 대조구보다 실험구에서가 라이소자임 활성이 높게 나타났고, 8주째는 4주째보다 10FFM에서는 두 배 이상, 20FFM에서는 4배 이상 높은 활성을 나타내었다. 이 결

과는 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 처리 곤란 난을 해결 해 주는 등의 수산 농가에 많이 이점을 안겨 줄 것으로 사료된다.

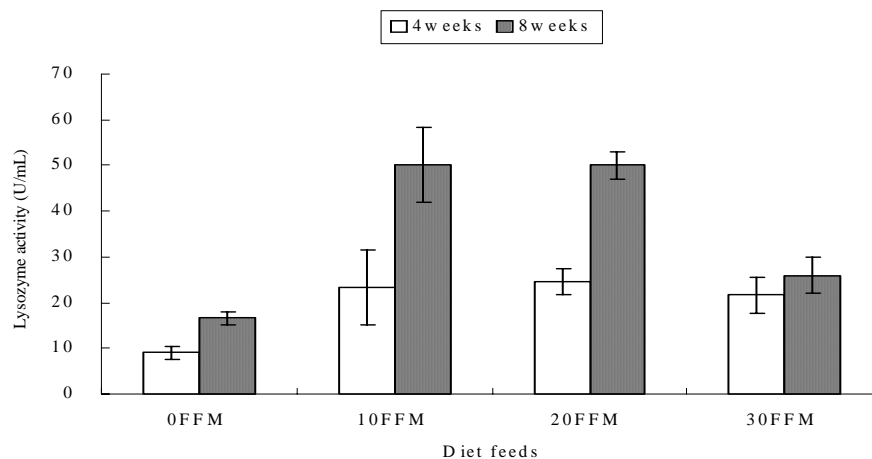


Fig. 29. Lysozyme activity of serum from parrot fish that was fed by FFM and non-supplemented control diet for 8 weeks. (OFFFM; non-supplementation, 10FFM; 10% included of fermented fish meal, 20FFM; 20% included of fermented fish meal, 30FFM; 30% included of fermented fish meal).

제 4장 참고문헌

- Alam MS, Terushima 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 gilthead 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 gilthead 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 scavenging using ESR and H₂O₂-induced DNA damage. *Food Science and Biotechnology*. 14(5): 614-620
- Jairo D, Gabriel 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 cultured Olive flounder, *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 flounder, *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. Domínguez, and J. F. Fernández-Gatrayzábal 2004. Multiplex 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 for 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 of 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.
- Smith HW. 1935. Metabolism of the rainbow 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.