

선인장 발효물을 이용한
양식넙치 사료첨가제 기술개발에 관한 연구

Technical development of feed additives using
fermented cactus products for olive flounder,
Paralichthys olivaceus

2005. 2.

주관연구기관 제주도해양수산자원연구소
협동연구기관 제 주 대 학 교
참 여 기 업 우 진 수 산

해 양 수 산 부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “선인장 발효물을 이용한 양식넙치 사료첨가제 기술개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 2 월

주관연구기관명 : 제주도해양수산자원연구소

총괄연구책임자 : 고 경 민

연구 원 : 김 문 관, 강 봉 조

오 성 립, 고 형 범

이 종 철, 김 보 영

협동연구기관명 : 제 주 대 학 교

협동연구책임자 : 오 덕 철

협동연구책임자 : 신 태 군

연구 원 : 이 동 헌, 허 승 답

김 택, 안 미 정

오 유 성, 정 경 속

박 철 남, 박 달 수

여 백

요 약 문

I. 과제명

선인장 발효물을 이용한 양식넙치의 사료첨가제 기술개발

II. 선인장 발효기법 및 제품공정 확립

1. 발효 미생물 탐색 및 발효특성

본 연구에서는 손바닥 선인장 열매즙을 원료로하여 *Lactobacillus plantarum* 11060, *Lactobacillus brevis* 10110, *Pediococcus dextrinicus* KCTC 3506 그리고 *Leuconostoc mesenteroides* 10146등 유산균과 복합유용미생물(EM)을 이용하여 발효특성을 살펴보았다.

발효과정 중 당도의 변화는 균주간에 따라 큰 차이를 보이지 않았으며, pH 및 산도는 원액과 희석액에서 발효가 진행될 수록 pH는 감소하고 산도는 증가하였다. 원액인 경우 *Lactobacillus plantarum* 11060과 EM인 경우 배양 1일째부터 낮아졌으며, 발효 종결시 pH 3.64와 3.9로 감소하였으며, 희석액인 경우 각 균주에서 발효기간이 경과함에 따라 낮아져서 산성의 pH를 나타냈으며, *Lactobacillus plantarum* 11060에서 pH의 감소가 가장 커서 발효전의 pH6.6에서 발효 일 경과 10일 경과시에는 4.0로 낮아졌다. 산도는 희석액과 원액에서 *Lactobacillus plantarum* 11060인 경우 산을 빠른 속도로 생성하였고 발효 말기에 산도는 0.77%와 1.89%로 나타났다. 각 균주의 접종량 6.1~6.9 Log CFU/mL으로 발효기간에 따른 균주의 생육특성을 살펴보면 희석액인 경우 각각의 균주가 배양 1일째 큰 폭으로 증가하여 8.8 ~ 9.1 Log CFU/mL에 도달하였으며, *Lactobacillus plantarum* 11060균주가 생육능이 우수하였다. 발효 기간에 따른 당의 함량은 발효초기부터 발효가 진행됨에 따라 감소하였고 주로 자당을 이용하였다. 유기산의 함량은 발효전에는 주로 구연산이 함유되어 있어지만 발효가 진행될수록 젖산과 초산이 점차적으로 증가하였다. 이상의 결과로 선인장 열매 착즙원액과 희석액에서 *Lactobacillus plantarum* 11060균주가 상대적으로 발효능이 우수하며, 많은 젖산을 생성하는 것을 알 수 있었다.

2. 선인장 열매에서 분리한 유산균(*Lactobacillus plantarum*)

동정 및 발효특성

자연적으로 숙성된 선인장 열매로부터 순수 분리한 균주 중 발효능이 우수하다고 판단되는 균주 CNU001과 CNU010을 생화학적 특성과 16S rDNA 염기서열분석으로 조사결과 CNU001 균주는 *Lactobacillus plantarum*으로, CNU010 균주는 *Lactobacillus brevis*로 동정하였다. 그리고 각각 *Lactobacillus plantarum* CNU001과 *Lactobacillus brevis* CNU010 균주로 명명하였다.

분리 균주의 발효 특성을 조사한 결과 배양기간중의 당도 변화는 *L. plantarum* CNU001과 *L. brevis* CNU010인 경우 약간의 변화가 있을 뿐 큰 변화는 확인되지 않았다. 발효가 진행중 pH의 변화는 대부분의 처리구에서 배양 1일째부터 급격히 감소 하였으며 발효 종결시 pH의 변화는 *L. plantarum* CNU001인 경우 pH 3.50, *L. brevis* CNU010인 경우 pH 3.84로 나타났다. 적정 산도의 변화는 *Lactobacillus plantarum* CNU001인 경우 발효가 진행됨에 따라 빠른 속도로 산이 생성하였고 발효 말기에 산도는 0.85%로 나타났으며, *Lactobacillus brevis* CNU010인 경우 1일째까지 산이 급격히 생성되었으나 1일째부터 발효 말기까지 완만하게 증가하였다. 각 균주의 생육특성을 살펴보면 *Lactobacillus plantarum* CNU001인 경우 배양 1일째 큰 폭으로 증가하여 8.4 Log CFU/mL에 도달하였으며 2일째부터 발효말기까지 비슷한 수준을 유지하였다. *Lactobacillus brevis* CNU010에서는 배양 3일까지 완만하게 증가하였으며 3일째부터 발효말기까지 큰 변화가 없었다.

유리당의 함량은 *Lactobacillus plantarum* CNU001인 경우 포도당과 과당 함량은 발효가 진행되면서 감소하였고 자당 함량은 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. *Lactobacillus brevis* CNU010인 경우 당 함량은 과당과 포도당 함량이 급격히 감소하는 경향을 보이며 우선 과당으로부터 이용하는 것으로 나타났다. 유기산 함량은 주로 구연산, 사과산, 젖산, 초산 등이 분리되었다. 구연산은 *L. plantarum* CNU001인 경우 거의 변화가 없으나, *L. brevis* CNU010인 경우 2일째까지 급격히 감소하였다. 젖산은 발효전에는 검출이 되지 않았으나 발효가 진행됨에 따라 증가하였다. 특히 *Lactobacillus plantarum* CNU001에서 3.87mg/mL 함량이 젖산이 검출되었다. 초산은 *Lactobacillus brevis* CNU010가 *Lactobacillus plantarum* CNU001보다 많은 양을 생성하였다.

3. 선인장 유산균 발효 분말의 제품공정 및 저장특성

4℃ 냉장 저장기간 동안 5일 간격으로 총균수를 측정하여 비교한 결과 모든 구에서 발효 종결후 총 균수는 8.64~8.83 Log CFU/mL으로 나타났으며 저장 5일째는 8.08~7.15 Log CFU/mL로 약 10~20% 감소하였으며 처리구 C와 D에서는 5일에서 15일까지 거의 변화가 없는 반면 처리구 A와 B에서는 총 균수가 감소하였다. 발효 후 동결 상태와 동결건조한 다음 생균수를 측정한 결과, 처리구별 동결전의 균수는 8.67~8.99 Log CFU/mL로 존재하며 동결 후와 동결건조 후의 생균수는 8.0~8.32 Log CFU/mL과 7.7~7.98 Log CFU/mL로 감소하였으며, 처리구별 차이는 거의 없는 것으로 나타났다.

Ⅲ. 선인장 발효물이 양식넙치 성장에 미치는 영향

1. 선인장 발효액이 양식넙치 성장에 미치는 영향(I)

본 연구는 제주도 자생식물인 손바닥선인장을 어류에게 간편하게 투여하기 위해 손바닥선인장 열매를 유용미생물로 발효시킨 후 이를 넙치를 대상으로 사료에 첨가하여 공급하였을 때 성장에 미치는 영향과 첨가하는 손바닥선인장의 적정농도에 관하여 알아보고자 하였다. 손바닥선인장 발효액의 첨가농도별(0%, 1%, 5%, 10%) 넙치의 성장, 생존율, 사료계수, 일일성장율 및 섭이율, 그리고 비만도에 미치는 효과를 2001년 2월1일부터 9월 26일까지 비교한 결과, 성장에 있어서는 1%첨가군에서 대조군에 비해 9.8 ~11.2% 유의하게 높은 값($P<0.05$)을 보여 선인장발효물이 넙치의 성장에 크게 기여함을 알 수 있었다.

생존율면에서는 1%첨가군에서 가장 높은 생존율을 보였으나 대조군에 비해 큰 차이는 없었다. 사료계수는 대조군에 비해 1%첨가군에서 약 7% 더 낮아 사료효율이 향상됨을 보였다. 일일성장율은 대조군에 비해 1%첨가군에서 약 3% 더 좋은 결과를 보였고, 일일섭이율은 상대적으로 1%첨가군에서 대조군에 비해 약 10% 낮아 사료효율이 좋은 것으로 나타났다. 비만도는 실험군간에 뚜렷한 차이를 보이고 있지 않았다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 손바닥선인장 발효액 첨가는 넙치의 성장과 사료효율성에 효과가 있는 것으로 나타났고 적정 첨가농도는 1.0%였다.

2. 선인장 발효액이 양식넙치 성장에 미치는 영향(II)

본 연구는 제주도 자생식물인 손바닥선인장을 어류에게 간편하게 투여하기 위해 손바닥선인장 열매를 유용미생물로 발효시킨 후 변화된 성분조성에 대하여 살펴 보았으며 이 발효액을 넙치를 대상으로 사료에 첨가하여 공급하였을 때 성장에 미치는 영향과 첨가하는 손바닥선인장의 적정농도에 관하여 알아보려고 하였다. 손바닥선인장 발효액의 첨가농도별(0%, 0.2%, 0.5%, 1.0%) 넙치의 성장, 생존율, 사료계수, 일일성장을 및 섭이율, 그리고 비만도에 미치는 효과를 2001년 10월 25일부터 2002년 2월 7일까지 비교한 결과, 성장에 있어서는 0.5%, 1%첨가군에서 대조군에 비해 4.9~27.3%의 유의하게 높은 값($P < 0.05$)을 보여 선인장발효물이 넙치의 성장에 크게 기여함을 알 수 있었다.

생존율면에서는 0.2%와 0.5%첨가군에서 가장 높은 생존율을 보였다. 사료계수는 대조군에 비해 1%첨가군에서 약 20% 더 낮아 가장 사료효율이 향상된 것으로 나타났다. 일일성장율은 대조군에 비해 0.5%, 1.0%, 0.2%첨가군으로 좋은 결과를 보였고, 일일섭이율은 0.2%와 0.5% 첨가군에서 대조군에 비해 낮게 나타났다. 비만도는 대조군에 비해 모든 첨가군에서 높게 나타나고 있었다. 넙치 성장에 미치는 발효차이를 보기 위해 발효액1%와 발효하지 않은 손바닥선인장 1%첨가군의 효과를 비교한 결과 서로 상이한 결과를 보여 발효하지 않은 1%첨가군에서는 대조군보다 오히려 성장이 더딘 것으로 나타났다. 발효과정을 통해 손바닥선인장의 유용물질들의 조성비가 달라졌다. 발효 후 특히 조섬유(crude fiber)의 큰 감소와 Aspartic acid, Valine, Isoleucine, Lysine등의 아미노산 성분치의 증가 및 Myristic acid, Magaoleic acid, Stearic acid, Oleic acid, Linoleic acid, EPA, DPA등의 지방산들의 증가가 넙치 성장에 직·간접적으로 영향을 끼치고 있다고 생각된다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 손바닥선인장 발효액 첨가는 넙치의 성장과 사료효율성에 효과가 큰 것으로 나타났고 양식현장에서 손바닥선인장 발효액은 좋은 천연 사료첨가제로서 이용될 수 있으리라 생각된다. 성장에 미치는 손바닥선인장발효액의 적정 첨가농도는 0.2%에서 1.0%미만의 수준이나 사료효율성등을 감안 할 때 권장 첨가농도는 1%에서가 바람직하다고 판단된다.

3. 선인장 발효분말이 양식넙치 성장에 미치는 영향

본 연구는 제주도 자생식물인 손바닥선인장 열매를 유산균으로 발효시킨 뒤 동결건조된 분말을 가지고 넙치를 대상으로 사료에 첨가하여 공급하였을 때 성장에

미치는 영향과 첨가하는 손바닥선인장 발효분말의 적정농도에 관하여 알아보고자 2003년 5월 27일부터 2004년 1월 27일까지 비교하였다. MP(Moist Pellet)사료에 손바닥선인장 발효분말 0.08%를 첨가한 경우 넙치의 성장, 사료효율 및 비만도에 효과가 큰 것으로 나타났으며 또한 체성분 조성에서 조지방이 증가하는 것으로 나타났다.

4. 선인장에 함유된 프라보노이드 성분이 양식넙치에 미치는 영향 (I)

본 연구는 제주도 자생식물인 손바닥선인장 열매의 구성성분중 항산화물질로 알려진 프라보노이드계 성분중 quercetin 성분이 양식넙치의 성장에 미치는 영향과 첨가하는 농도에 관하여 알아보고자 2003년 12월 23일부터 2004년 3월 24일까지 비교하였다. quercetin 성분은 양식넙치의 성장과는 별 차이를 보이지 않았지만 생존율면에서는 유의성 있는 차이를 보이고 있었다. 혈액수치면에서도 간기능지수인 지오티(GOT)와 지피티(GPT)값이 유의적인 차이를 나타내어 프라보노이드 성분이 양식넙치의 면역계에 비특이적으로 작용하여 면역기능을 향상시키는 것으로 추측되며 첨가농도는 사료량 대비 10ppm정도가 바람직 한 것으로 조사되었다.

5. 선인장에 함유된 프라보노이드 성분이 양식넙치에 미치는 영향 (II)

본 연구는 제주도 자생식물인 손바닥선인장 열매의 구성성분중 항산화물질로 알려진 프라보노이드계 성분중 isorhamnetin과 kaempferol 성분이 양식넙치의 성장에 미치는 영향에 관하여 알아보고자 2004년 5월 21일부터 2004년 8월 18일까지 비교하였다. isorhamnetin과 kaempferol 성분은 양식넙치의 성장과는 별 차이를 보이지 않았지만 생존율 면에서는 차이를 보이고 있었으며 특히 isorhamnetin 첨가군에서 유의적인 차이를 나타내고 있었다. 혈액수치면에서도 간기능지수인 지오티(GOT)와 지피티(GPT)값이 유의적인 차이를 나타내어 프라보노이드 성분이 양식넙치의 면역계에 비특이적으로 작용하여 면역기능을 향상시키는 것으로 조사되었다.

6. 유산균(*Lactobacillus plantarum* CNU001)이 양식넙치에 미치는 영향

본 연구는 제주도 자생식물인 손바닥선인장 열매로부터 순수 분리, 배양한 유산균(*Lactobacillus plantarum* CNU001)자체가 양식넙치에 어떠한 영향을 끼치는 지 알아보기 위하여 수행되었다. 유산균은 넙치성장에 비해 생존율면에서 다소간 효

과를 보이고 있었다. 또한 유산균의 첨가 농도가 높을 수록 사료계수가 낮아지고 있었다. 따라서 유산균 자체만으로도 넙치 성장과 면역계에 다소간 긍정적 작용을 하고 있는 것으로 사료된다.

7. 아미노산, 당(Sugar) 성분이 양식넙치 성장에 미치는 영향

본 연구는 넙치 성장에 미치는 아미노산과 당의 효과를 검색하기 위해 이루어 졌다. 넙치 성장과 관계하여 라이신(Lysine), 메티오닌(Methionine), 트립토판(Tryptophan), 발린(Valine)등의 필수아미노산과 타우린(Taurine)등이 영향을 끼치고 당(Sugar)성분도 성장에는 영향을 끼치고 있었다.

8. 타 시판 사료첨가제와의 비교 가치

미생물을 이용하여 혐기 배양시켜 만든 제주도 자생식물인 손바닥선인장 발효액을 양식넙치 사료첨가제로서의 개발가능성을 알아보려고 최근 양식현장에서 면역증강제 및 성장촉진제로 널리 이용되고 있는 키토산제제, 베타글루칸제제 그리고 한방제제인 어보산을 대상으로 성장, 생존율, 사료효율 및 비만도 등을 대조구와 함께 비교 실험하였다. 2002년 5월 19일에서 8월 13일까지 85일간 비교한 결과, 성장 및 생존율에 있어서는 손바닥선인장 발효액을 비롯한 모든 첨가제에서 대조군에 비해 유의적인 높은 값을 보였고 특히 손바닥선인장 발효액에서 가장 두드러진 효과를 나타냈다. 사료효율에서는 베타글루칸첨가제가 가장 양호하게 나타났으며 일일성장율은 베타글루칸과 선인장 발효액에서 대체로 높게 나타났다. 비만도에 있어서는 키토산첨가제가 가장 높은 값을 보였다. 이상의 결과로부터 제주도 자생식물인 손바닥선인장을 이용한 발효액은 현재 양식장에서 사용되는 타 사료첨가제들과 같이 넙치를 대상으로 긍정적으로 사용될 수 있으리라 판단된다.

9. 양식현장에서의 실증 시험

손바닥선인장 열매를 유산균(*Lactobacillus plantarum* CNU001)을 이용하여 발효시킨 후, 이를 이용하여 넙치양식 현장에서의 생산성을 확인하고자 하였다. 종묘입식 후 7개월간의 실험기간동안 EP사료에는 발효액(사료량대비 1.0%)을, MP사료에 발효분말(사료량대비 0.08%)을 첨가한 경우에 넙치의 성장률, 사료효율, 증체

을 및 비만도에 매우 좋은 효과를 나타내었다. 어류에 있어 간기능 검사의 지표로 활용되어지는 GOT와 GPT값은 발효물 첨가군에서 현저한 감소를 보이고 있어 항병력에 긍정적인 영향을 나타낼 수 있으리라 생각된다.

10. 관능평가

선인장 발효물을 급이한 넙치의 육질에 대한 일반인들의 관능평가 결과, 육질의 선명도나 탄력성, 기름기, 뒤끝맛(맛의 여운)등의 검사항목에서 대체로 선인장 발효물을 급이한 쪽에서 높게 나타나고 있으며, 특히 뒤끝맛(맛의 여운)에서의 뚜렷한 차이는 향후 양식넙치를 대상으로 맛의 차별성을 가져다 줄 것으로 기대된다.

IV. 선인장 발효물이 양식넙치에 미치는 면역기능

1. 렉틴(Lectin)을 이용한 양식넙치 조직에서의 조직화학 성상

렉틴은 carbohydrate 구조물에 부착하는 glycoproteins이다. 이 연구에서 6가지 렉틴의 부착(DBA, SBA, isolectin B4, WGA, PNA, UEA)는 넙치의 아가미, 간, 장, 신장 심장 비장에서 이루어졌다. DBA는 장의 점액세포, 아가미의 상피세포에서 염색되었다. 신세뇨관 상피와 담관의 상피에 약하게 염색되었다. SBA는 장의 club cell, 담관과 신세뇨관의 상피세포에서 강하게 염색되었다. isolectin B4는 아가미의 점액세포와 상피세포에서 강한 양성반응을 보였다. 또한 장과 담관의 상피세포에 강하게 염색되었다. WGA는 아가미 점액세포, sinusoid, 신세뇨관상피, 장상피에서 강하게 발현되었고, UEA는 아가미 상피, 점액세포, 담관상피, 신세뇨관상피에 나타났다. 또한 galectin-3가 비브리오균을 접종한 후, 선인장 발효물을 투여한 넙치의 장에서 발현이 증가되었다.

이것으로 보아 6가지 렉틴과 galectin-3는 여러장기의 상피에 위치하며 특히 감염되기 쉬운 내부 표면부위에서 생체방어역할을 할 것으로 여겨진다.

2. 선인장 발효액을 섭취한 양식넙치 장내 세균상 변화

Lactobacillus plantrarum CNU001 균주를 이용하여 발효한 선인장 발효물을 연속 투여한 다음 넙치의 장내 세균상의 변화를 생균수로 측정된 결과 대조구는 일

반적인 장내세균만 주류를 이루었으나 발효물을 투여한 시험군은 장내세균수가 대조구보다 약 23.6% 감소한 반면 투여구에서 유산균이 장 1g당 3.3 Log CFU/mL이 존재하였다. 이는 유산균을 이용한 선인장 발효물이 probiotics 또는 prebiotics로서 효과가 있는 것으로 보임으로서 넙치의 장내에 유익한 세균 총을 형성하여 병원성 세균의 증식을 억제하고 성장촉진 효과를 증대시킬 것으로 판단된다.

3. 선인장 발효물의 항균효과

손바닥선인장 추출물은 항염증 제제로 민간에서 널리 이용되어 왔다. 이 연구의 목적은 양식넙치에서 손바닥선인장 발효물의 항균효과를 입증하고자 하였다. 손바닥선인장의 발효물의 준비는 선인장 열매에 산업적으로 이용되고 있는 EM을 혼합하여 2주동안 발효 후, 동결건조한 분말을 이용하였다. In vitro상에서 연쇄구균, 에드워드균, 비브리오균을 분리한 후, 이 균을 배지에 접종한 후, 선인장 발효물로 항균효과를 실험하였다. 그 결과 연쇄구균, 에드워드균, 비브리오균 모두 억제하였고, 특히 연쇄구균은 24시간까지 유의성있게 그 균의 성장을 억제하였다. 또한 In vivo상에서는 분리한 각각의 균주를 넙치의 복강내로 감염시킨 후, 선인장 분말을 넙치 사료의 1%를 첨가하여 1개월 동안 급여하였다. 그 결과 대조군에 비해 폐사율이 현저하게 감소되었다. 이러한 결과 선인장 발효물의 급여는 양식넙치에서 효과적인 항균효과가 있다고 사료된다.

4. 선인장에 함유된 플라보노이드 성분의 항균효과

손바닥선인장 플라보노이드 성분 중 quercetin은 항바이러스, 항균효과 등 여러 가지 약리작용을 갖는데, quercetin이 고밀도 사육 양식을 하고 있는 넙치에서 연쇄구균증, 에드워드균증, 비브리오균증에 항균 실험을 하였다. 시험관내 시험결과 연쇄구균, 에드워드균, 그리고 비브리오균 각각 초기 12시간까지 증식억제 효과를 관찰할 수 있었으나 24시간에는 경미한 증식억제 효과를 보였다. 또한 In vivo상에서는 분리한 각각의 균주를 넙치의 복강내로 감염시킨 후, quercetin을 넙치 사료의 1%를 첨가하여 3개월 동안 급여하였다. 실험 결과 연쇄구균과 비브리오균에 대한 효과는 대조군보다는 실험군의 폐사율이 낮게 나왔으며, 에드워드균에서는 연쇄구균보다 효과가 떨어졌다. 결론적으로 볼 때 손바닥선인장 플라보노이드 성분 중 하나인 quercetin이 연쇄구균, 에드워드균, 비브리오균의 증식을 억제하는 기능을 가지며, 이러한 quercetin이 손바닥선인장 항균 효능의 구성 성분 중 하나라고 여겨진다.

5. 유산균(*Lactobacillus plantarum* CNU001)의 항균효과

유산균은 면역강화로 널리 이용되어 왔다. 이 연구의 목적은 양식넙치에서 유산균의 항균효과를 입증하고자 하였다. 유산균의 준비는 제주대학교 생명과학과로부터 재료를 받아 사용하였다. In vitro 상에서 연쇄구균, 에드워드균, 비브리오팀균을 분리한 후, 이 균을 배지에 접종한 후, 유산균으로 항균효과를 실험하였다. 그 결과 연쇄구균, 에드워드균, 비브리오팀균이 모두 억제되었고, 특히 연쇄구균은 24시간까지 유의성 있게 그 균의 성장을 억제하였다. 또한 In vivo 상에서는 분리한 각각의 균주를 넙치의 복강내로 감염시킨 후, 유산균을 넙치 사료의 1%를 첨가하여 3개월 동안 급여하였다. 그 결과 대조군에 비해 폐사율이 경미하게 감소되었다. 이러한 결과 유산균의 급여는 양식넙치에서 항균효과가 있다고 사료된다.

6. 항바이러스효과

선인장 발효물의 항바이러스 효과를 알아보기 위하여 IPNV, IHNV, MABV, iridovirus 등의 4종류 바이러스를 대상으로 조사한 결과, IPNV, Iridovirus, MABV 등의 3종류 바이러스들에 대하여는 항바이러스 효과가 관찰되지 않았으나, IHNV의 경우 초기증식을 억제하는 효과를 보였다.

7. 항산화효과

유산균을 이용한 선인장 발효물의 항산화 활성을 조사하였다. *L. plantarum* 균주로 발효한 발효물에서 대조구보다 3배 항산화 활성이 높은 것으로 나타났다. 그 다음으로 *L. brevis* 10110, EM순으로 항산화 활성이 대조구에 비해 높게 나타났다. 이는 선인장 열매의 원재료에 없었던 새로운 생리활성 물질이 발효에 의해 생성될 수 있고, 이들 중에 항산화물질도 포함되어 있을 것으로 판단된다.

여 백

Summary

I. Title of Project

Technical development of feed additives using fermented cactus products for olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

II. The establishment of fermentation technique and product process of cactus fruit fermentation

1. The searching for fermentation microbes and fermentation characteristics.

In this work, we studied the fermentation characteristics of cactus(*Opuntia ficus-indica*) fruit juice by lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum* 11060, *L. brevis* 10110, *Pediococcus dextrinicus* KCTC3506, and *Leuconostoc mesenteroides* 10146, and also by effective microorganism complex(EM). No significant changes of Brix degree were observed by the different bacterial species through where fermentation process, and pH and total acidity were decreased and increased respectively both in nondiluted and diluted juice in process of fermentation. The final pH of diluted juice, which was adjusted to pH 6.6, fermented for 10days by *L. plantarum* was 4.0. Total acidities of diluted and nondiluted juice were 0.77% and 1.89% after fermentation with *L. plantarum*. The bacterial number in diluted juice was increased to 8.8~9.1 Log CFU/mL from 6.1~6.9 Log CFU/mL after 1 day fermentation by other bacteria. The sugar content was decreased from early fermentation stage and sucrose was consumed most rapidly than other sugars. In terms of organic acids change, the citric acid, the most abundant acid in non fermented juice, was decreased, instead, lactic and acetic acid were increased gradually according to the proceeding of fermentation. As a result, It was shown that *L. plantarum* 11060 have most powerful

fermentation ability and lactic acid productivity with cactus juice than other lactic acid bacteria or EM.

2. The identification of lactic acid bacteria isolated from cactus fruit and fermentation characteristics of cactus fruit juice with isolated lactic acid bacteria.

Two strains of lactic acid bacteria, designated CNU001 and CNU010, were isolated from slightly fermented cactus (*Opuntia ficus-indica*) fruit. The 16S rDNA sequence of strain CNU001 showed the highest homology to those of *Lactobacillus plantarum* WCFS1(99%) and *Lactobacillus plantarum* R07(99%), and that of strain CNU010 showed the highest homology to *Lactobacillus brevis* L63(97%) and R066(97%). The biochemical characterization of two strains using API 50CHL kit indicated that CNU001 and CNU010 are *L. plantarum* and *L. brevis*, respectively. As a result, strains CNU001 and CNU010 were identified putatively as *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis*, respectively. Some results were obtained from the fermentation experiments of cactus fruit juice inoculated with two isolates. After 7 days incubation at 30°C, the final pH, total acidity and viable cell counts of fermented cactus juice with *L. plantarum* CNU001 were 3.5, 0.89%, and 8.4 Log CFU/mL, and those with *L. brevis* CNU010 were 3.84, 0.59%, and 8.6 Log CFU/mL. The contents of glucose and fructose were decreased according to the proceeding of fermentation and fructose was consumed most rapidly than other sugars. The organic acid of fermented cactus juice with *L. plantarum* CNU001 and *L. brevis* CNU010 contained citric acid, Lactic acid, acetic acid. Among them, lactic acid content increased with the progression of fermentation. fermented cactus juice with *L. plantarum* CNU001 showed 3.87 mg/mL lactic acid, respectively. That with *L. brevis* CNU010 produced a lot more acetic acid than that with *L. plantarum* CNU001.

3. The product process and storage characteristic of fermented products(liquid and freeze drying powder) of cactus fruit juice with

lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum* CNU001.

The viable cell counts of lactic acid bacteria in the fermented cactus fruit juice were measured every 5 days during cold storage at 4°C. The results, the viable cell counts of all experimental group showed 8.64~8.83 Log CFU/mL after fermentation and that showed 8.08~7.15 Log CFU/mL for the 5th day and was decreased about 10~20%. The viable cell counts of experimental group C and D were almost no change to 15 days from 5 days, in contrast, those of experimental group A and B decreased. The viable cell counts of lactic acid bacteria in freezing and freeze drying state were measured. The results, The viable cell counts of each experimental group showed 8.67~8.99 Log CFU/mL before freezing and those decreased 8.0~8.32 Log CFU/mL and 7.7~7.98 Log CFU/mL after freezing and freeze drying state. No significant change of viable cell counts were observed according to the different experimental group.

III. Effect of fermented cactus(*opuntia ficus indica*) as Feed Additive on the Growth of Flatfish *Paralichthys olivaceus*

1. The Effect of fermented cactus fluid on the growth of flatfish *Paralichthys olivaceus* (I).

The aim of this study is to find the proper concentrate for opuntia cactus feed so that fish growth is maximized to the flatfish *paralichthys olivaceus* after the fruits are fermented with favorable micro-organism to easily feed the fish with mixture of cactus, native plant in Jeju.

As a result of research comparing flatfish growth, their survival rate, feed coefficient, daily growth rate, breeding rate and condition factor by the 0%, 1%, 5%, 10% fermented opuntia cactus concentrate were examined from February 1 through September 26, 2001. the growth rate showed the highest value ($P < 0.05$) with a significant range of 9.8-11.2% in the population with the 1% concentrate, compared with the contrast population and thus could be seen with the opuntia cactus additive greatly contributing to the flatfish

growth.

As for the survival rate, the population with 1% concentrate showed the highest value but not so significantly, compared with the contrast population. The feed coefficient showed a feed efficiency as it was 7% lower in the population with the 1% concentrate, compared with the contrast population. Daily growth rate showed about 3% higher value in the population with the 1% concentrate, compared with the contrast population and daily feeding rate showed a good efficiency, 10% lower in the population with the 1% concentrate than the contrast population. Condition factor level didn't show any significant difference among the experiment populations. Consolidating all of the above results, the additive of fermented opuntia cactus fluid as an additive showed a positive effect on paralithys flatfish growth and feed efficiency. The optimal concentrate level was 1%.

2. The Effect of fermented cactus fluid on the growth of flatfish *Paralichthys olivaceus* (II).

This research examined varied constituent formation after fermenting the cactus fruits, native plant in Jeju by microorganism to apply it to the fish conveniently, proper concentrate and its effect on the growth, when applied it to the flatfish. This fermented fluid mixed with the feed concentrate of the 0%, 0.2%, 0.5 %, and 1.0% were applied to the feed as additive, compared each on the flatfish growth, survival rate, feed efficiency, daily growth rate, feeding rate and effect for condition factor from October 25, 2001 through February 7, 2002, which resulted in the population with the 0.5% and the 1% concentrate showing a significantly high value ($P < 0.05$) with 4.9%-27.3%, in the growth, compare with the contrast, so the fermented cactus fluid could be seen as a contributing factor to the flatfish growth.

In the survival rate, the highest rates were shown in the populations with the 0.2% and 0.5% additive. Feed coefficient was shown with the better feed efficiency, lower about 20 % in the population with 1% additive, compared with the contrast population. Daily growth rate showed the higher values of 0.5%, 1.0%, 0.2% concentrate in the order, daily feeding rate showed the low

value in the populations with the 0.2% and 0.5% concentrate, compared with the contrast population. Condition factor showed the high value in all the populations with additive concentrate, compared with the contrast population. In order to see fermenting difference to affect on the flatfish growth, the population with the 1% fermented additive was compared with the effect in the population with the non-additive ferment, which showed a different result that the flatfish growth in the population with the non-additive was rather slower than that in the contrast population. Fermenting process resulted in a different constituent of useful substance. After fermenting process, especially greater reduction of crude fiber, the increase of amino acid constituent like Aspartic acid, Valine, Isoleucine, Lysine, and the increase of fatty acid like Myristic acid, Magaoleic acid, Stearic acid, Oleic acid, Linoleic acid, EPA, DPA and so on are thought to affect direct and indirect effect on the flatfish growth.

Consolidating the above results, fermented cactus additive showed a great effect on the flatfish growth and feed efficiency, and in the breeding spot, the fermented cactus fluid is considered as a naturally efficient additive. The proper additive concentrate of fermented cactus affecting on the growth is a level in the range of 0.2% and 1.0%, but considering the feed efficiency, a recommendable level of concentrate is thought preferable to be 1 % level.

3. Effect of cactus fermentation powder on the growth of flatfish *Paralichthys olivaceus*.

This study was performed from May 27, 2003 to January 27, 2004 to check the proper density of fermented cactus powder and the influence on the growth of a flatfish, when the freeze-dried powder after ferment with lactic-acid bacteria was added to the feed and supplied for the flatfish. When MP(Moist Pellet) feed was accompanied with palm cactus fermentation powder(0.08%), the effect appeared in growth of a flatfish, the feed efficiency and condition factor by being large. Also, fat composition in body composition of flatfish appeared by being increased.

4. Effect of flavonoid, *quercetin* in cactus on the growth of flatfish *Paralithys olivaceus* (I).

To check the influence that quercetin known as anti-oxidation on the flatfish growth of a flatfish and additive density, this study was performed from Dec.23, 2003 to Mar. 24, 2004. The quercetin did not display a particular difference in the growth of a flatfish but display a clear difference in the survival rate. GOT and a GPT showed a clear difference in blood.

Flavonoid component works on an immunity of a flatfish with non-specifically, and it is guessed that it improves the immunity function. Addition density was checked approximately 10ppm in the contrast with amount of feed.

5. Effect of flavonoids, *isorhamnetin* and *kaempferol* in cactus on the growth of flatfish *Paralithys olivaceus* (II).

This study was performed from May 21, 2004 to August 18, 2004 to confirm the influence on the growth of a flatfish by isorhamnetin and kaempferol, which is known as anti-oxidation material of cactus. The isorhamnetin and kaempferol did not display a particular difference with growth of a flatfish but display a clear difference in a survival rate.

It was showing a large margin in the population with isorhamnetin additive in particular. GOT and a GPT showed a clear difference in blood. Flavonoid component works on an immunity of a flatfish with non-specifically, and it is guessed that it improve the immunity function.

6. Effect of Lactic acid(*Lactobacillus plantarum* CNU001) on the growth of flatfish *Paralithys olivaceus*.

This study was made to check how lactic-acid bacteria(*Lactobacillus plantarum* CNU001), which is separated and cultivated purely from the cactus,

affects on the influence on the growth of a flatfish.

The lactic-acid bacteria(*Lactobacillus plantarum* CNU001) was a little effect in the survival rate plane comparing the growth of a flatfish. Also, the higher the addition density of lactic-acid bacteria was, the lower the feed was. Therefore, it is considered that even lactic-acid bacteria itself works positively a little in flatfish growth and a flatfish immunity.

7. Effects of amino acid and sugar on the growth of flatfish *Paralithys olivaceus*.

This study aimed to check the effect of amino acid and sugar components on the growth of a flatfish. Lysine, methionine, tryptophan, valine which were necessary amino acids and taurine were influencing the flatfish growth. Sugar component was influencing the flatfish growth, too.

8. Comparison value with other commercial feed additives.

This research aimed to see any prospect of development as an additive constituent of the fermented cactus, naturally growing in Jeju and being cultivated according to the anaerobic process using micro-organism and, with the contrast population, experimented comparing the factors of growth rate, survival rate, feed efficiency and condition factor on the Chitosan additive, β -Glucan and Obosan, herbal product widely used as immune strength and growth facilitating product in the breeding spot.

As a result of comparing for 85 days from May 19 through August 13, 2002, all the populations with the fermented cactus additive, and the other additive populations showed a significant high value, compared to the contrast in growth and survival rate, especially the most significant effect in the fermented cactus fluid. In the feed survival, the β -Glucan, additive showed the highest value, and daily growth rate showed generally higher value in the β -Glucan, additive and the fermented cactus fluid. In the condition factor, the Chitosan additive population showed the highest value.

From the above result, the fermented additive using the ficus cactus which is native plant in Jeju is definitely inferred as an efficient additive with other feed additive now used in real aquaculture in.

9. Effect of fermented cactus(*opuntia ficus-indica*) on the growth of flatfish in fish farming.

This study aimed to confirm the flatfish productivity in a breeding spot using the fermented cactus fluid and powder with lactic acid bacteria(*Lactobacillus plantarum* CNU001) in fish farming. In the experiment for seven months since flatfish larvae entered in fish farming, it showed a very good effect on the growth rate of a flatfish, the feed efficiency, weight gain rate and an condition factor when it accompanied EP feed with fermented fluid(1.0%) and MP feed with fermentation powder(0.08%).

GOT and GPT in blood showed clear reduction in fish fed fermented cactus fluid and powder compared with those of non-fed controls.

10. A sensuality evaluation

As a result of the sensuality evaluation on the flesh, the flatfish which ate fermented cactus appears a little higher result in color, flexibility, fattiness and after taste than those which didn't eat fermented cactus. Particularly aftertaste among sensuality evaluation lists was clearly high, so that it is expected to bring the distinction of the taste.

IV. Effect of fermented cactus on the immune system of flatfish *Paralichthys olivaceus*

1. Histochemistry of Lectins in the Tissues of the Flat Fish *Paralichthys olivaceus*

Lectins are glycoproteins that specifically bind carbohydrate structures and may participate in the biodefense mechanisms of fish. In this study, the binding of three lectins, Dolichos biflorus agglutinin (DBA), soybean agglutinin (SBA) and Bandeiraea simplicifolia BS-1 (isolectin B4), were studied in the gill, liver, intestine, kidney, heart and spleen of the flat fish *Paralichthys olivaceus*. DBA was detected in intestinal mucous cells, as well as in gill epithelial and mucous cells. It was weakly detected in renal tubule epithelial cells and in the bile duct. Strong SBA staining was seen in the intestinal club cells, and in bile duct and renal tubule epithelial cells. There were intense positive reactions for isolectin B4 in gill epithelial and mucous cells, and strong isolectin B4 staining was seen in epithelial cells of the bile duct and intestine. These results suggest that the three lectins examined were localized in the covering epithelia of the various organs of flat fish, and that they may participate in the biodefense mechanism of the intra body surface, an area that is exposed to various antigens.

2. Bacteria flora in inner intestine of flatfish *Paralichthys olivaceus*

The oral administration of fermentation product of cactus fruit juice fermented with *Lactobacillus plantarum* CNU001 continously to farm-raised flounders (*Paralichthys olivaceus*) reduced the number of enteric bacteria in the gastero-intestine about 23.6% compared to control. The bacterial flora of control group showed predominantly the general enteric bacteria, in contrast that of experimental group showed lactic acid bacteria of about 3.3 Log CFU/g intestine wet weight. This result looks like to show the effects of probiotics or prebiotics of *L. plantarum* to farm-raised flounders (*Paralichthys olivaceus*) for the inhibition of the growth of pahogenic enteric bacteria, and the promotion of healthy growth of flat fish.

3. Anti-bacterial effect of fermented cactus

The cactus (*Opuntia ficus-indica*) extract has been claimed to have several biological activities including anti-inflammation in oriental medicine. The objective of this study was to determine the antibacterial activity of cactus fruit fermentation in cultured olive flounder. Fermentation of cactus fruit was prepared by mixing cactus fruit and commercially available effective microorganisms for 2 weeks in room temperature. We have tested in vitro antibacterial effect of fermented cactus on fish pathogen, *Streptococcus sp.*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio sp.* which was originated from the cultured fish (*Paralichthys olivaceus*). To see the effect of fermented cactus fruit on cultured fish, the fish was fed an experimental diet supplemented with 1.0% of cactus fruit fermentation for 3 months, and infected intraperitoneally with *Streptococcus sp.* In vitro test, it was found that fermented cactus fruit effectively inhibited growth of *Streptococcus sp.* In the pathogenicity test, there was less mortality rates in the cultured fish fed fermented cactus fruit compared with those of non-fed controls. These results suggest that fermented cactus fruit is one of potential antibacterial property in cultured olive flounder.

4. Anti-bacterial effect of Flavonoid

One of cactus flavonoids, quercetin, has been claimed to have several biological activities including anti-inflammation in several studies. The objective of this study was to determine the antibacterial activity of quercetin. We have tested in vitro antibacterial effect of quercetin on fish pathogen, *Streptococcus sp.*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio sp.* which was originated from the cultured fish (*Paralichthys olivaceus*). To see the effect of quercetin on cultured fish, the fish was fed an experimental diet supplemented with 1.0% of quercetin for 3 months, and infected intraperitoneally with *Streptococcus sp.*, *Edwardsiella tarda* or *Vibrio sp.* In vitro test, it was found that fermented quercetin effectively inhibited growth of *Streptococcus sp.*, *Edwardsiella tarda* and *Vibrio sp.* In the pathogenicity test, there was less mortality rates in the cultured fish fed fermented quercetin compared with those of non-fed controls. These results

suggest that fermented quercetin is one of potential antibacterial property in cactus.

5. Anti-bacterial effect of *Lactobacillus plantarum* CNU001

Lactobacillus plantarum has been claimed to have several biological activities including anti-inflammation in several studies. The objective of this study was to determine the antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum*. We have tested in vitro antibacterial effect of *Lactobacillus plantarum* on fish pathogen, *Streptococcus* sp., *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* sp. which was originated from the cultured fish (*Paralichthys olivaceus*). To see the effect of *Lactobacillus plantarum* on cultured fish, the fish was fed an experimental diet supplemented with 1.0% of *Lactobacillus plantarum* for 3 months, and infected intraperitoneally with *Streptococcus* sp., *Edwardsiella tarda* or *Vibrio* sp.. In vitro test, it was found that fermented *Lactobacillus plantarum* slightly inhibited growth of *Streptococcus* sp., *Edwardsiella tarda* and *Vibrio* sp. In the pathogenicity test, there was slightly less mortality rates in the cultured fish fed fermented quercetin compared with those of non-fed controls. These results suggest that fermented *Lactobacillus plantarum* is one of potential antibacterial property in cactus.

6. Anti-viral effect of fermented cactus

Four kinds of viruses of an IPNV, IHNV, MABV, iridovirus were inquired into with the object in order to recognize a cactus fermentation for viral effect. Anti-viral effect was not observed on three kinds of viruses of an IPNV, Iridovirus, MABV, but showed an effect to suppress initial increase in case of IHNV.

7. Anti-oxidation effect of fermented cactus

The antioxidant activity was determined fermentation product of cactus

fruit juice fermented with lactic acid bacteria. The anti-oxidant activity of the fermentation product with *L. plantarum* showed tree times more than that of nonfermented juice. Those with *L. brevis* 10110 and EM showed more or less activities than that with *L. plantarum*. This result shows the possibility of new production of anti-oxidant substance in fermentation products with lactic acid bacteria or EM.

Contents

Chapter 1. Introduction	31
1. Research goal	31
2. Necessity of the project	32
Chapter 2. Technical status of domestic and foreign status	36
Chapter 3. Contents and results of the project	36
Section 1. The establishment of fermentation technique and product process of cactus fruit fermentation	39
1. The searching for fermentation microbes and fermentation characteristics	39
2. The identification of lactic acid bacteria isolated from cactus fruit and fermentation characteristics of cactus fruit juice with isolated lactic acid bacteria	56
3. The product process and storage characteristic of fermented products(liquid and freeze drying powder) of cactus fruit juice with lactic acid bacterium, <i>Lactobacillus plantarum</i> CNU001	68
4. References	73
Section 2. Effect of fermented cactus(<i>Opuntia ficus indica</i>) as feed additive on the growth of flatfish <i>Paralichthys olivaceus</i>	77
1. The Effect of fermented cactus fluid on the Growth of Flatfish <i>Paralichthys Olivaceus</i> (I)	77

2. The Effect of fermented cactus fluid on the Growth of Flatfish <i>Paralichthys Olivaceus</i> (II)	85
3. Effect of cactus fermentation powder on the growth of flatfish <i>Paralichthys olivaceus</i>	95
4. Effect of flavonoid, <i>quercetin</i> , in cactus on the growth of flatfish <i>Paralithys olivaceus</i> (I)	104
5. Effect of flavonoids, <i>isorhamnetin</i> and <i>kaempferol</i> , in cactus on the growth of flatfish <i>Paralithys olivaceus</i> (II)	111
6. Effect of <i>Lactobacillus plantarum</i> the growth of flatfish <i>Paralithys olivaceus</i>	118
7. Effect of amino acid and sugar on the growth of flatfish <i>Paralithys olivaceus</i>	124
8. Comparison value with other commercial feed additives	131
9. Effect of fermented cactus on the growth of flatfish <i>Paralithys olivaceus</i> in fish farming	138
10. A sensuality evaluation	155
11. An economy evaluation	159
12. References	160
Section 3. Effect of fermented cactus on the immune system of flatfish <i>Paralichthys olivaceus</i>	
1. Histochemistry of Lectins in the Tissues of the Flat Fish <i>Paralichthys olivaceus</i>	168

2. Bacteria flora in inner intestine of flatfish <i>Paralichthys olivaceus</i>	180
3. Anti-bacterial effect of fermented cactus	182
4. Anti-bacterial effect of Flavonoid	193
5. Anti-bacterial effect of <i>Lactobacillus plantarum</i> CNU001	203
6. Anti-viral effect of fermented cactus	212
7. Anti-oxidation effect of fermented cactus	217
8. References	219
Chapter 4. Achievement and contribution of the project	226
Chapter 5. Application plans of the results	230

여 백

목 차

요 약 문	1
목 차	29
제 1 장. 연구개발과제의 개요	31
1. 연구개발의 목적	31
2. 연구개발의 필요성	32
제 2 장. 국내외 기술개발 현황	36
제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과	39
제 1 절. 선인장 발효기법 및 제품공정 확립	39
1. 발효 미생물 탐색 및 발효특성	39
2. 선인장 열매에서 분리한 유산균(<i>Lactobacillus plantarum</i> CNU001) 동정 및 발효특성	56
3. 선인장 유산균 발효 분말의 제품공정 및 저장특성	68
4. 참고문헌	73
제 2 절. 선인장 발효물이 사료첨가제로서 양식넙치 성장에 미치는 영향	77
1. 선인장 발효액이 양식넙치 성장에 미치는 영향(I)	77
2. 선인장 발효액이 양식넙치 성장에 미치는 영향(II)	85
3. 선인장 발효분말이 양식넙치 성장에 미치는 영향	95
4. 선인장에 함유된 프라보노이드 성분이 양식넙치에 미치는 영향(I)	104
5. 선인장에 함유된 프라보노이드 성분이 양식넙치에 미치는 영향(II)	111
6. 유산균(<i>Lactobacillus plantarum</i> CNU001)이	

양식넙치에 미치는 영향	118
7. 아미노산, 당(Sugar) 성분이 양식넙치 성장에 미치는 영향	124
8. 타 시판 사료첨가제와의 비교 가치	131
9. 양식현장에서의 실증 시험	138
10. 관능평가	155
11. 경제성평가	159
12. 참고문헌	160
제 3 절. 선인장 발효물이 양식넙치에 미치는 면역기능	168
1. 렉틴(Lectin)을 이용한 양식넙치 조직에서의 조직화학 성상	168
2. 선인장발효액을 섭취한 양식넙치 장내 세균상 변화	180
3. 선인장발효물의 항균효과	182
4. 선인장에 함유된 프라보노이드 성분의 항균효과	193
5. 유산균(<i>Lactobacillus plantarum</i> CNU001)의 항균효과	203
6. 선인장 발효물의 항바이러스효과	212
7. 선인장 발효물의 항산화효과	217
8. 참고문헌	219
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	226
제 5 장. 연구개발결과의 활용도	230

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적

선인장(*Opuntia ficus indica*)은 선인장과(Cactaceae)에 속하는 열대성 식물로 우리나라의 제주도, 거제도, 남해완도 해안지방 등지에 자생하고 있는 귀하 식물이며⁸ 특히 제주도에서는 제주도기념물 34호로 지정될 만큼 가치를 지닌 다년초이다.

제주에서 특용작물로 재배되는 선인장은 다양한 형태의 기호식품으로 개발되어 시판되고 있으며 성분분석 결과 식이섬유, 비타민 및 프라보노이드 성분 등이 다량 함유되어 있다^{7,9,10}. 일반적으로 식물체가 가지고 있는 프라보노이드 성분은 항염증작용⁴ 뿐만 아니라 반응성 질소화합물을 제거하는 역할을 하는 것으로 알려져 있고^{11,12} 면역계세포의 활성화에도 직접 관여 하는 것으로 보고되고 있다^{1,6}. 즉 선인장 추출물은 림프구를 증가 시켜 면역에 직접관여 할 수 있을 뿐만 아니라 대식세포를 자극하여 종양괴사인자의 분비를 촉진 시킴으로써 항 종양작용에 관여될 수 있음을 시사하고 있다¹⁵. 동시에 이들은 혈당 강하 및 항산화 작용을 가질 수도 있는 것으로 추정되고 있다^{13,14,16}.

현재까지 선인장의 생리활성능에 대한 연구는 주로 포유동물 또는 시험관내의 연구였으며 이와같은 긍정적 효과는 다른 척추동물에도 충분히 같은 작용을 할 수 있을 것으로 추정하고 있다. 그리고 선인장을 동물체에게 투여하기 위해 간편하게 이를 가공하는 것이 가장 큰 난제로 되어왔다.

본 연구에서는 제주도 지역경제에 크게 기여하고 있는 양식업체를 대상으로 선인장의 추출물이 이들 어종의 질병 예방 및 생산성에 미치는 영향을 밝혀내고자 (1) 먼저 선인장을 동물체가 먹기 좋게 가공하는 기술을 개발하고 (2) 둘째로 이들을 양식어류에 투여할 경우 나타날 수 있는 성장과 면역체계등의 메카니즘을 종합적으로 증명하여 저비용, 고품질의 사료첨가제로 개발하고자 한다.

양식산업은 4면이 바다인 제주도에서 주요한 기간 산업이고 현재 제주양식의 주 어종은 넙치로 이에 대한 양식 기술은 많이 축적되어 왔다. 그러나 여전히 자연적인 성장과 달리 양식 수조에서 자라는 넙치는 여러 형태의 질병에 노출되기 쉽고 한 번 감염되는 경우 수조 하나가 모두 폐기될 만큼 심각성도 내포하고 있다. 따라서 질병의 예방 및 생산성 향상은 넙치양식에 있어서 그 어느 부분 보다 중요한 비중을 차지하고 있다. 이에 따라 양식에 이용되는 사료에는 질병을 예방 하기 위한 부단한 노력으로 다양한 사료 첨가제가 이용되고 있으나 그 효능은 명확하지 않고 일부 물질은 오히려

축적됨에 따라 부작용도 우려 되고 있다.

따라서 본 연구에서는 단계적으로 양식넙치에 선인장 추출물을 투여한 후 체중의 변화, 장내 미생물변화, 면역 관여 세포의 변화 등을 다각적으로 분석하여 선인장추출물이 양식어류의 생체에 어떤 영향을 미칠 수 있는지를 평가하고자 한다. 동시에 제주의 주요 생산물인 순바다 선인장의 소비활로를 개척하고 더 나아가 저가의 사료첨가제를 개발하여 어민의 소득증대에 기여하고자 한다.

2. 연구개발의 필요성

1) 기술적 측면

최근 양식분야에서 생산성 향상을 위해 미생물을 양식산업에 응용하려는 노력들이 행하여지고 있다. 이와 더불어 양식생물의 질병관리차원에서 인체에 유용한 생약재를 양식산업에 이용하려는 노력들도 이루어지고 있는 실정이다.

현재 현장에서 이용되는 것으로 알려져 있는 미생물들로는 광합성세균³, 효모, 유산균등이며 생약재로는 구기자², 녹차⁵ 등이 사용되는 것으로 알려져 있다.

생약재나 미생물제제들이 현재의 이용방법은 대부분 생약재인 경우는 물리적인 가공처리가 대부분이고, 미생물제제인 경우도 생균이 직접 투여되는 실정으로 어류의 소화기관 특성과 관련하여 불 때 효율적인 흡수가 이루어지기 위해서는 저분자 물질로 변환된 상태가 어류에 흡수가 용이 할 것이므로 물리적으로 가공된 생약재를 미생물의 대사과정중 하나인 발효에 의한 대사산물로 투여되는 것이 좀 더 효과적일 것으로 사료된다.

현재까지 선인장의 생리활성능에 대한 연구는 주로 포유동물 또는 시험관내의 연구였으며 선인장을 동물체에게 투여하기 위해 간편하게 이를 가공하는 것이 가장 큰 난제로 되어왔다.

2) 경제·산업적 측면

제주도 수산물생산에서 차지하고 있는 넙치양식은 '03년 기준으로 생산량은 약 1만6천톤에 육박하였고 조수익면에서 약 1,700억원으로 갑골산업에 이어 가장 비중있는 1차산업으로 급성장하고 있다.

현재와 같은 양식조건에서는 밀식이 성행됨에 따라 환경이 악화되어 각종 스트레스 요인과 질병이 발생, 양식어가에 적지않은 부담을 안겨주고 있으며, 특히 넙치양식에 있어 생산량의 증가와 더불어 경영비의 절반을 차지하고 있는 사료비는 생산원가를 상승시키는 요인으로 작용하고 있다.

이에 사료효율을 극대화시켜 사료비를 절감하고 환경오염을 줄이며 우수한 성장을 유도할 수 있는 효율적인 사료의 개발이 시급한 실정이다.

가장 이상적인 방법으로 질병의 예방 및 생산성 향상은 넙치양식에 있어서 그 어느 부분 보다 중요한 비중을 차지하고 있다. 이에 따라 양식에 이용되는 사료에는 질병을 예방 하기 위한 부단한 노력으로 다양한 사료 첨가제가 이용되고 있으나 그 효능은 명확하지 않고 일부 물질은 오히려 축적됨에 따라 부작용도 우려되고 있다.

3) 사회·문화적 측면

제주도의 주요 생산물인 선인장은 한때 특산품으로 개발되면서 기능성 식품으로 각광을 받아 왔으나 현재 가공기술이 뒷받침 되지 못하여 사양일로를 걷고 있다. 그러나 선인장이 함유한 주요 구성성분은 여러 연구자에게 좋은 소재이다.

이를 개발하여 실제 산업에 적용할 수 있는 방안은 농산물의 품질 향상에 가장 이상적인 활로 개척이다. 더구나 이를 양식산업에 적용하여 가능성이 보임에 따라 제주의 특산인 선인장과 양식 넙치의 고유 브랜드로의 개발을 지향하고자 한다.

3. 참고문헌

1. 김종면, 최민순, 조정근, 정영미, 박태욱, 1994. 화살나무 및 느릅나무 추출물이 면역계세포의 활성화에 미치는 영향. 대한수의학회지. 34, 307-314.
2. 권문경, 김이청, 손영찬, 박수일, 1999. 구기자 투여가 나일틸라피아, *Oreochromis niloticus*의 *Edwardsiella tarda* 백신 처리에 미치는 영향. 한국어병학회지. 12(2), 73-81.
3. 김만수, 김해영, 허성범, 2000. Rotifer, *Brachionus plicatilis*, 성장을 위한 광합성 세균의 첨가효과와 넙치, *Paralichthys olivaceus*, 자어에 대한 먹이 효율. 한수지. 33(2), 164-170.
4. 박은희, 황성은, 강자훈, 1998. 손바닥선인장의 합염증활성. 약학회지. 42, 621
5. 박선미, 박수일, 허민도, 홍용기, 1999. 녹차 추출물을 이용한 어병세균의 collagen 분해효소 및 생육억제. 한국어병학회지. 12(2), 83-88.
6. 조정근, 김종면, 1994. 시호추출물이 면역계세포의 활성화에 미치는 영향. 대한수의학회지 34, 769-780.
7. 정세준, 전기용, 강태현, 고웅배, 김윤철, 1999. 손바닥선인장 열매의 Flavonoid 성분. 한국 생약학회지. 30(1), 84-97.
8. 이취재, 1964. 한국식물도감(화훼류 I). 문교부. p113.
9. 이영철, 황금희, 한동휴, 김성대, 1997. 손바닥선인장 성분분석. 한국식품과학회지. 29(5), 847-853.
10. 이영철, 김홍만, 김영언, 황금희, 안채경, 1997. 선인장의 성분분석 및 가공식품의 품질개선 시험. 한국식품개발연구원보고서.

11. Haenen, G. R. and Paqueay, J. B., 1997. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Comm.*, 236, 591-593.
12. Hollman, P. C., van Trijp, J. M., Buysman, M. N., van der Gaag, M. S., Mengelers, M. J., de Vries, J. H. and Katan, M. B. 1997. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett* 418, 152-156.
13. Kim, I. H., Kim, M. H., Kim, H. M. and Kim, Y. E., 1995. Effects of antioxidants on the thermostability of red pigment in prickly pear. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27(2), 1013-1016.
14. Paik, S. M., Kim, H., Yang, S., Song, C., Shin, T. K. and Han, S, 1999. The effects of *Opuntia ficus-indica* fruit powder on anti-oxidant parameters in senescence-accelerated mouse(SAM). *Korean J. of Gerontology*, 9, 70-77.
15. Shin, T. K, Kim, S. J, Lee, S. J, 1998. Effects of opuntia ficus-indica extract on the activation of immune cells with special reference to autoimmune disease models. *Korean J. of Vet. Pathology*, 2, 31-35.
16. Shin, T. K, Kim, S. J, Moon, C. J, Wie, M, and Hyun, B., 1999. *Opuntia ficus-indica* ethanol extract ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia in rats. *Korean J. of Gerontology*, 9(1), 78-83.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

현재까지 선인장의 연구는 선인장 추출물이 바이러스 복제를 억제한다고 보고되었으며⁵ streptozotocin 등으로 고혈당을 유발시킨 실험동물에서 혈당치를 낮추고⁷ 당뇨병 환자를 대상으로 한 실험에서는 혈당 및 콜레스테롤 수치를 감소시키며 혈액내 저밀도 단백질 함량을 낮추는 효과가 있다는⁶ 등의 약리작용에 관한 연구가 국외에서 보고되었다.

국내에서는 선인장 열매의 적색색소의 열안정성에 미치는 항산화제의 효과에 대한 연구⁸, 선인장 열매의 프라보노이드 성분², 손바닥선인장의 성분특성연구^{3,4}, 선인장의 항염작용에 대한 연구¹, 선인장 에탄올 추출물의 HCL-ethanol 유발 위염에서 위점막 보호작용 등이 보고되었다.

그러나 민간에서 구전되어져 오고있는 선인장의 변비치료, 이뇨효과, 장운동의 활성화 및 식욕증진등에 대한 연구는 부분적으로 포유류 및 시험관내 연구를 중심으로 진행되었을 뿐 수산양식에 적용한 연구는 국내외적으로 전무한 실정이다.

생약재와 어병과의 관계에서 볼 때 녹차추출물이 어병세균의 collagen 분해효소 및 생육을 억제한다는 보고가 있으며 구기자 투여가 어병세균에 대한 방어력 증가가 인정된다는 보고등이 있다.

양식산업과 관련한 미생물이나 생약재의 투여에 관한 대부분의 보고들이 양식산업의 직접적인 효과 즉 성장률이나 생존율에 초점을 맞추고 있어 미생물의 생리적인 작용에 대한 효과나 원인등에 대한 규명은 미흡하다고 판단된다.

따라서 기초적인 원인규명 차원에서 유용물질 투여구와 비투여구의 장내 세균상등에 대한 비교 분석도 필요하리라 판단된다.

선인장이 갖는 긍정적 약리효과가 수산양식분야에도 도입시 충분히 같은 작용을 할 수 있을 것으로 추정된다.

1. 참고문헌

1. 박은희, 황성은, 강자훈, 1998. 손바닥선인장의 함엽중활성. 약학회지. 42, 621
2. 정세준, 전기용, 강태현, 고응배, 김윤철, 1999. 손바닥선인장 열매의 Flavonoid 성분. 한국 생약학회지. 30(1),84-97.
3. 이영철, 황금희, 한동휴, 김성대, 1997. 손바닥선인장 성분분석. 한국식품과학회지. 29(5):847-853.
4. 이영철, 김홍만, 김영언, 황금희, 안채경, 1997. 선인장의 성분분석 및 가공식품의 품질개선 시험. 한국식품개발연구원보고서.
5. Ahmad, A., Davies, J., Randall, S. and Skinner, G. R., 1996. Antiviral properties of extract of *Opuntia streptacantha*. Antiviral Res., 30, 75-85.
6. Fernabdez, M., Lin, L., Emme, C. K., Trejio, A. and Mcnamara, D. J., 1992. Prickly pear(*Opuntia* sp.) pectin reverses low density lipoprotein receptor wuppression induced by a hypercholesterolemic diet in guinea pigs. *J. Nutrition*. 122, 2330.
7. Ibanez-Camacho, R. and Roman-Ramos, R., 1979. Hypoglycemic effect of *Opuntia cactus*. *Arch. Invest. Med(Mex)*. 10, 223.
8. Kim, I. H., Kim, M. H., Kim, H. M. and Kim, Y. E., 1995. Effects of antioxidants on the thermostablity of red pigment in prickly pear. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27(2), 1013-1016.
9. Paik, S. M., Kim, H., Yang, S., Song, C., Shin, T. K. and Han, S., 1999. The effects of *Opuntia ficus-indica* fruit powder on anti-oxidant parameters in senescence-accelerated mouse(SAM). *Korean J. of*

Gerontology, 9, 70-77.

10. Shin, T. K, Kim, S. J and Lee, S. J, 1998. Effects of opuntia ficus-indica extract on the activation of immune cells with special reference to autoimmune disease models. Korean J. of Vet. Pathology, 2, 31-35.
11. Shin, T. K, Kim, S. J, Moon, C. J, Wie, M. and Hyun, B., 1999. Opuntia ficus-indica ethanol extract ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia in rats. Korean J. of Gerontology, 9(1), 78-83.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 선인장 발효기법 및 제품공정 확립

1. 발효미생물탐색 및 발효특성

가. 서론

손바닥 선인장(*Opuntia ficus indica* var. *saboten*)은 제주도에서 경작 또는 자생되는 선인장 중에 *Opuntia*속에 속하는 열대성 다년생식물로서 열매를 먹을 수 있으며, 열매와 줄기를 공복에 갈아 마시면 변비치료, 이뇨효과, 장운동의 활성화 및 식욕증진에 효능이 있다는 것이 알려져 있다³¹. 또한 한방에서는 신경성 통증을 치료하고 견위, 자양강장제, 해열진정제, 소염해독, 급성 유선염, 이질을 치료하는데 이용하며, 피를 맑게 하고 하혈을 치료하는 목적으로 이용되는 것으로 알려져 있다^{8,24}. 이²⁸ 등은 다양한 약리효과를 갖는 선인장 열매의 성분을 알로에와 비교하였으며, 이²⁷는 위에 대한 항궤양 효과를 검증하였다. 그 외에도 선인장 열매의 적색색소의 열안정성에 미치는 항산화제의 효과에 대한 연구²³, 손바닥 선인장 열매의 적색색소의 안정성에 대한 연구¹⁴, 손바닥 선인장의 항산화 및 항균특성¹⁵, 손바닥 선인장 열매를 이용한 전통주 개발³ 등이 보고 되어 있을 뿐, 선인장 열매를 이용한 발효 연구는 거의 없는 실정이다.

유산균에 의한 식물체의 발효는 당을 주요 기질로 하여 일어나는 젖산발효가 대부분이며, 일반적으로 여러 가지 식물 원료에 당을 첨가하거나 유산균 등의 미생물을 첨가하여 발효시킨다. 식물체에는 여러 가지의 효소가 함유되어 있으며 식물추출액을 발효시키면 많은 효소들이 활성화되어 여러 가지 생화학반응을 일으킴으로써 식물체의 영양성분이 소화, 흡수되기 쉬운 형태로 변환될 수 있으며, 효소작용으로 생성된 성분들에 의해 새로운 생리조절기능을 발현할 수 있다. 또한 효소자체를 섭취함으로써 체내에서 신진대사 기능을 촉진하게 된다. 곡물과 채소류의 발효는 원료 중에 함유되어 있는 미생물의 종류, 당의 종류와 농도, 발효조건 등이 최종제품의 품질에 크게 영향을 준다고 알려져 있다¹⁹. 과채의 발효 및 숙성기간 중에 유산균과 같은 통성혐기성세균은 발효가 진행됨에 따라 그 수가 계속 증가하나 호기성 세균은 감소하다가 숙성말

기에 다시 증가한다고 보고 되어 있다¹⁹. Stamer³³ 등은 온도에 따른 sauerkraut의 발효양상을 연구, 보고하였고, 여³⁷는 당근, 토마토, 오이, 당근잎의 혼합야채를 온도를 달리하여 발효시 25℃에서 초기 당 농도에 관계없이 목적인 산도를 얻을 수 있었다고 하였다. 김치 및 과채를 저온에서 발효시키면 중온 또는 고온에서 발효시킬 때보다 숙성에 소요되는 시간은 훨씬 오래 걸리지만 휘발산, 탄산, 알코올 등의 성분들의 양이 많아져 발효식품의 풍미가 좋아진다고 보고 되어 있다^{12,13,16,22}.

따라서 본 연구는 손바닥 선인장의 응용범위를 다양화하기 위한 일환으로 손바닥 선인장 열매를 이용하여 발효제품을 개발할 목적으로 유산균을 이용하여 선인장 열매 착즙액의 젖산발효 이용성을 검토하고자 하였다.

나. 연구 내용 및 방법

1) 발효용 선인장 열매즙 제조

수세한 선인장 열매 20kg에 증류수 2L넣어 90℃에서 쪄 후 착즙을 하여 고형물을 제거하여 발효용 열매즙을 제조하였다.

2) 공시균주와 배양조건

선인장 열매즙의 발효에 사용된 균주는 *Lactobacillus plantarum* IMSNU 11060, *Lactobacillus brevis* IMSNU10110, *Leuconostoc mesenteroides* IMSNU10146, *Pediococcus dextrinicus* KCTC3506 등 유산균 4균주는 한국생명공학연구원 유전자원센터 유전자은행과 서울대학교 미생물연구소 미생물균주센터에서 분양 받았고, 복합유용 미생물 EM(Effective Microorganism)은 시중에서 시판되고 있는 것을 사용하였다. 유산균은 멸균한 MRS broth 100mL에 1mL씩 접종하여 25℃에서 20시간 배양하였다. 유산균 배양액과 EM을 선인장 열매즙에 0.2%씩 접종하여 2L 배양병에 분주하고 밀봉하여 25℃에서 10일간 배양하면서 발효기간별로 pH, 당도, 적정산도, 총 유산균 수 등을 비교 분석하였다.

3) 당도

손바닥 선인장 열매 발효액의 당도는 굴절당도계(Hand refractometer, No. 507-1, NOW, Japan)를 사용하여 측정 하였다.

4) pH 및 적정 산도 측정

발효액의 pH는 시료를 일정량 취하여 pH meter로 측정하였다. 그리고 총 산도는 발효액 50mL에 멸균수 50mL를 가한 후 0.1N NaOH 용액으로 pH 8.3까지 적정하였다. 이때 이용된 0.1N NaOH 용액의 소모량(mL)을 lactic acid 함량으로 환산하여 총 산도를 다음과 같은 식으로 계산하였다

$$\text{Total acidity(\%)} = \frac{0.1\text{N NaOH 소비량(mL)} \times F \times 0.009}{\text{시료부피(mL)}} \times 100$$

5) 유산균수 측정

발효액 0.5mL를 0.9% NaCl 용액 4.5mL에 현탁하고 이를 10배 단위로 희석한 후 0.5% CaCO₃가 함유된 Lactobacilli MRS agar를 사용하여 pour plating방법으로 30°C에서 3일간 배양하여 colony가 선명하고 상대적으로 clear zone이 형성된 것을 계수하였고 동일한 실험을 3번 반복하여 평균치를 산출하였다.

6) 유리당과 유기산 분석

냉동 보관된 발효액을 원심분리한 후 침전물을 제거한 다음 상정액을 0.2 μm millipore membrane filter로 여과하여 HPLC를 이용하여 glucose, fructose, sucrose의 당류를 분석하고 정량하였다. 이때 HPLC의 조건은 Waters carbohydrate column을 사용하였으며 detector는 ELSD2000, eluent는 acetonitrile : H₂O (75:25), flow rate는 1.0 mL/min, injection volume은 10 μL로 하였다.

유기산 분석은 SupelcogelTMC-610H column을 사용하였으며 detector UV(210nm), eluent 0.1% phosphoric acid, flow rate는 0.5mL/min, injection volumn은 5μL로 하였다.

7) 일반성분 분석

선인장 발효액의 무기질은 ICP-AES 이용하여 분석하였고, 아미노산은 Pico-tag 방법에 따라 시료를 처리한 후 amino acid analyser로 측정하였다.

다. 연구 결과

1) 당도(Sugar Content)의 변화

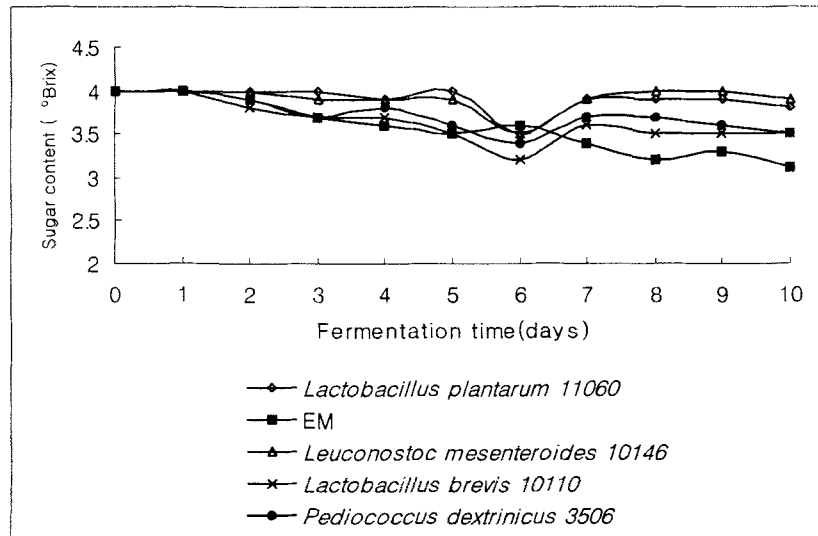
발효 기간 중의 당도변화는 *Lactobacillus plantarum* IMSNU11060, *Leuconostoc mesenteroides* IMSNU10146, *Lactobacillus brevis* IMSNU10110, *Pediococcus dextrinicus* IMSNU3506 균주의 처리구에서는 원액인 경우 당도 8.0 °Brix에서 발효 종결시 당도가 7.0~7.5 °Brix로, 희석액인 경우 4.0 °Brix에서 발효 종결시 당도가 3.4~3.8 °Brix로 다소 낮아지는 경향을 보이고 있으며, 그리고 각 균주에 따라 큰 차이를 보이지 않았으나 EM균주를 이용한 발효에서는 원액인 경우 8.0 °Brix에서 배양 10일째 6.2 °Brix로 감소되었고, 2배 희석액인 경우 4.0 °Brix에서 3.1 °Brix로 감소되었다(Fig. 1).

2) pH 및 총 산도의 변화

선인장 열매 착즙액의 발효전 pH, 총 산도의 변화는 Fig. 2와 Fig. 3에서 보는바와 같이 원액과 희석액에서 발효가 진행될 수록 pH는 감소하고 산도는 증가하였다. 원액인 경우 *L. plantarum* 과 EM인 경우 배양 1일째부터 낮아졌으며, 발효 종결시 pH 3.64와 3.9로 감소하였으며, 희석액인 경우 각 균주에서 발효기간이 경과함에 따라 낮아져서 산성의 pH를 나타냈으며, *L. plantarum* 에서 pH의 감소가 가장 커서 발효전의 pH 6.6에서 발효 10일 경과시에는 4.0로 낮아졌다.

총 산도는 희석액과 원액에서 *L. plantarum* 인 경우 산을 빠른 속도로 생성하였고 발효 말기에 산도는 0.77%와 1.89%로 나타났으며, EM과 *L. mesenteroides* 인 경우 산생성은 발효가 진행될수록 증가함을 알 수 있었으나, *L. brevis* , *P. dextrinicus* 3506에서는 산도가 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. *L. plantarum* IMSNU, EM, *L. mesenteroides* 균주는 선인장 열매 착즙액 내에 있는 당만으로도 유산균이 생육하기에 충분한 것으로 판단된다.

(A)



(B)

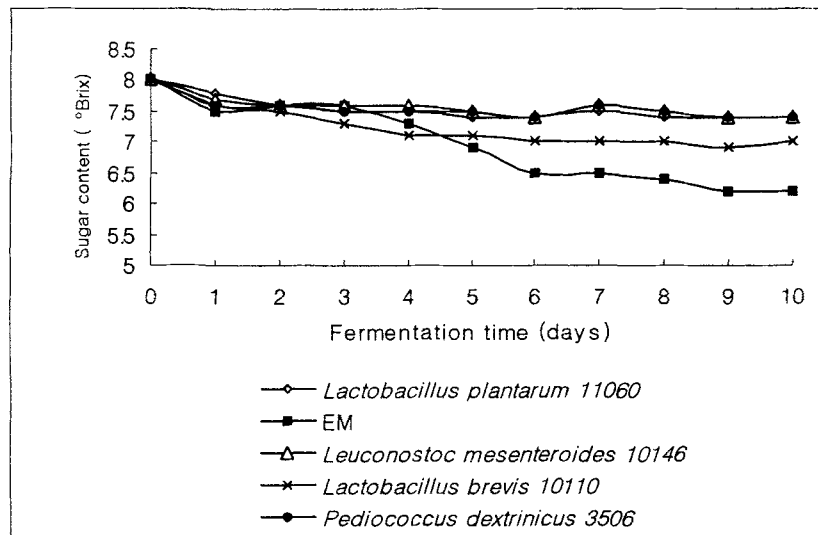
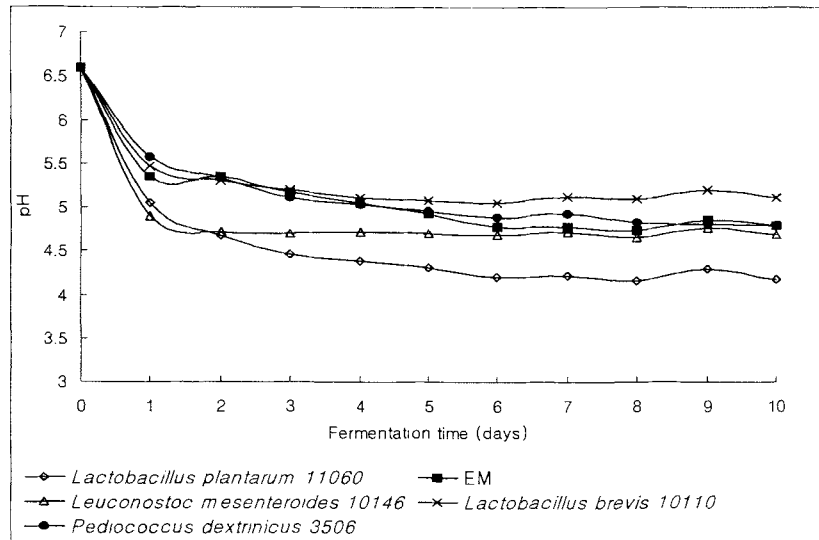


Fig.1. Changes of Sugar content during fermentation of diluted cactus fruit juice(A) and Cactus fruit juice(B).

(A)



(B)

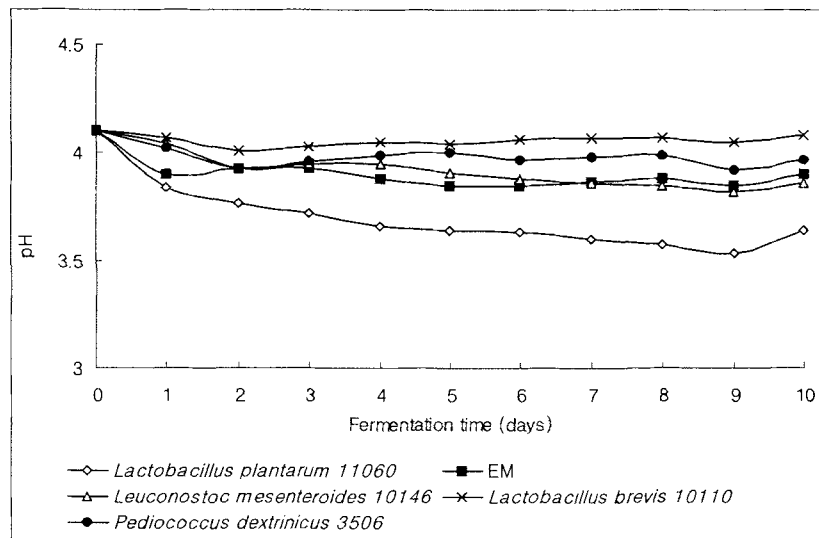
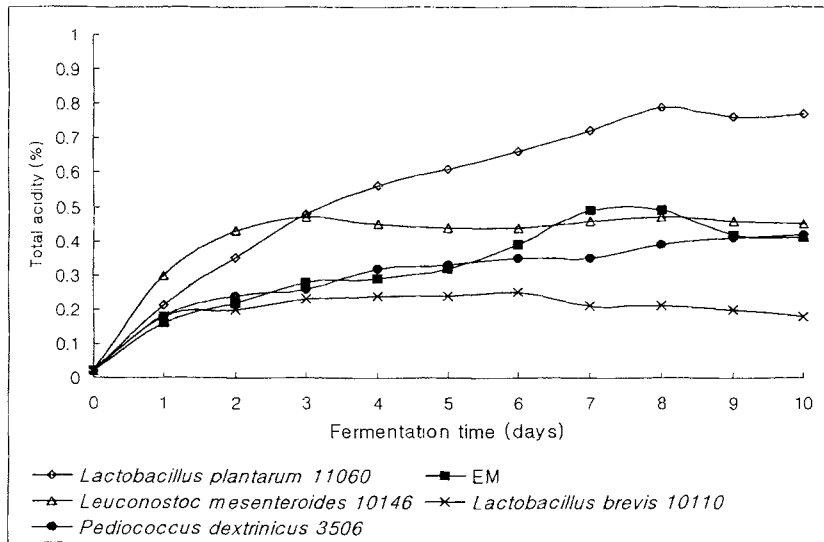


Fig.2. Changes of pH during fermentation of diluted cactus fruit juice(A) and cactus fruit juice(B).

(A)



(B)

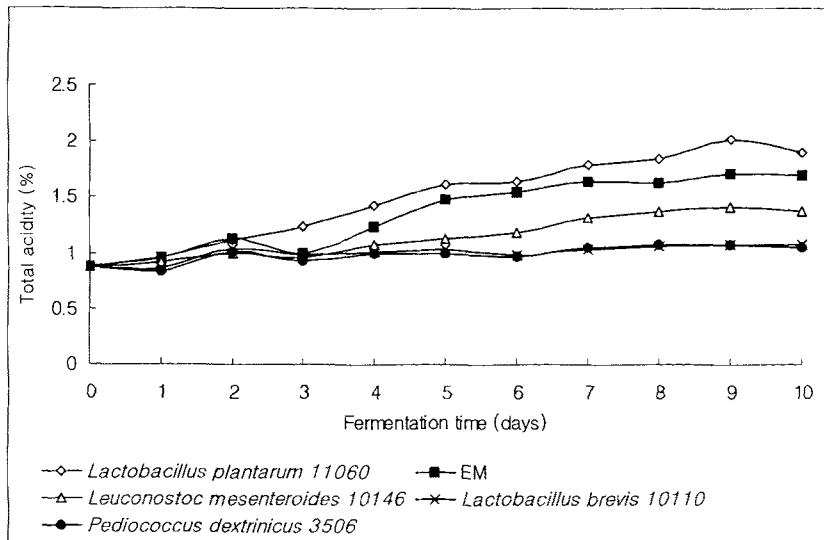
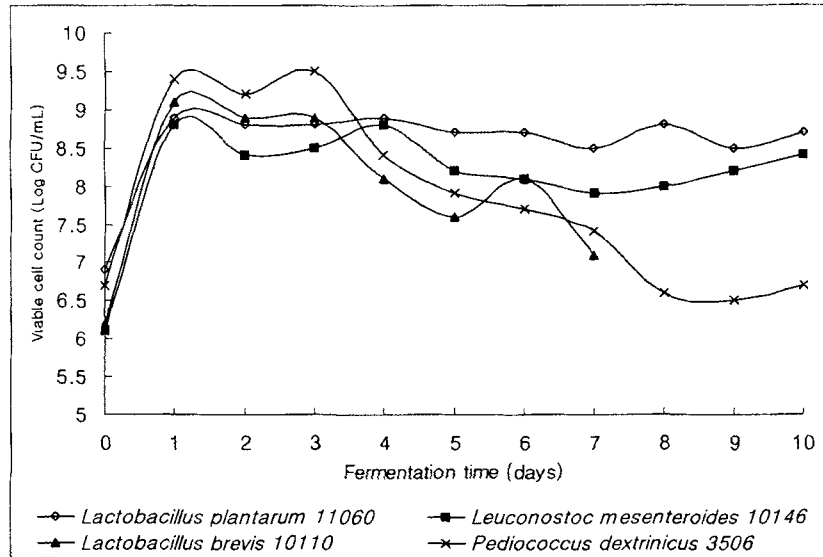


Fig. 3. Changes of total acidity during fermentation of diluted cactus fruit juice(A) and cactus fruit juice(B).

3) 총 유산균 수의 변화

각각의 균주를 선인장열매 착즙액에 접종하여 25℃에서 발효시키면서 유산균수의 변화를 Log값으로 측정한 결과는 Fig.4에 나타내었다. 각 균주의 접종량 6.1~6.9 Log CFU/mL으로 발효기간에 따른 균주의 생육특성을 살펴보면 희석액인 경우 각각의 균주가 배양 1일만 큰 폭으로 증가하여 8.8 ~ 9.1 Log CFU/mL에 도달하였으며, 균주별 생육특성을 보면 희석액인 경우 *L. plantarum* 와 *L. mesenteroides* 균주는 2일째부터 발효말기까지 비슷한 수준을 유지하였고, *L. brevis*와 *P. dextrinicus* 균주는 4일부터 급격히 감소하였다(Fig.4A). 원액인 경우 *L. plantarum* 과 *Leuconostoc mesenteroides* 10146에서는 배양 1일만에 큰 폭으로 증가하였으며 2일째부터 발효말기까지 큰 변화가 없었다(Fig.4B). 이러한 결과는 1~2일 후에 급격한 증가를 보이다가 그 이후로는 완만하게 변화하는 경향은 유산균이 발효초기에 급격히 증가하였다가 거의 변화를 보이지 않다는 보고와 일치하였다. 또한 급격한 증가를 보이는 시기는 접종 균주에 관계 없이 pH와 산도가 유지되는 발효기간과 일치하는 경향을 보여주었고, 발효가 1~2일에서 종료되는 채소류의 경우와 비슷하게 나타났다^{1, 5, 20, 21}.

(A)



(B)

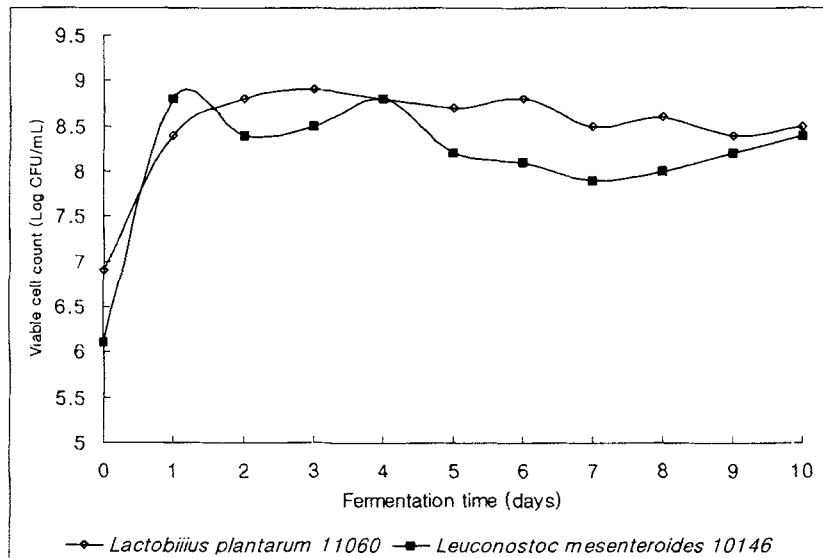


Fig. 4. Changes of viable cell counts during fermentation of diluted cactus fruit juice(A) and cactus fruit juice(B).

4) 유리당 함량의 변화

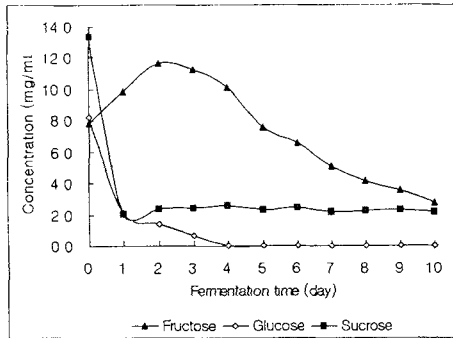
발효기간에 따른 유리당의 함량을 분석한 결과는 Fig. 5와 같다. 희석액과 원액에서

각각 균주에서 발효 1일째 포도당과 자당 함량이 급격히 감소되었다. 과당은 희석액인 경우 발효 2일째까지 증가하다가 발효가 진행되면서 서서히 감소하는 경향을 보였다. 초기 당 함량은 2배 희석액인 경우 과당은 7.8 mg/mL, 포도당은 8.2 mg/mL, 자당은 13.3 mg/mL으로, 원액인 경우 과당은 10.5 mg/mL, 포도당은 11.6 mg/mL, 자당은 7.29 mg/mL로 나타났으며 발효말기에는 과당은 0 ~ 1.8 mg/mL, 포도당은 0 ~ 1.7 mg/mL, 자당은 0 ~ 0.5 mg/mL로 거의 모든 균주가 주로 자당을 사용하고 있음을 알 수 있었다.

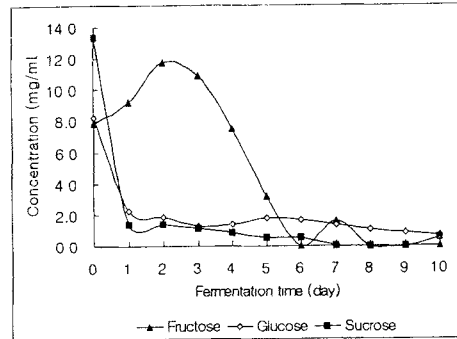
5) 유기산 함량의 변화

발효전과 발효 후의 유기산 조성변화를 Fig. 6에서 보는 바와 같이 발효 전에는 원액과 희석액에서 유기산으로 구연산이 주로 함유되어 있었으며 발효 후에는 주로 젖산, 초산, 구연산, 옥살산 등의 유기산이 함유되어 있었다. 구연산의 경우 발효 전에는 원액과 희석액에서 12.0 mg/mL과 5.4 mg/mL이었다가 발효가 진행됨에 따라 원액인 경우 EM과 *L. brevis*에서는 급격히 감소하였고, *L. plantarum*과 *P. dextrinicus*에서는 3일째까지 감소하다가 발효 4일째부터 증가하는 경향을 보였다.

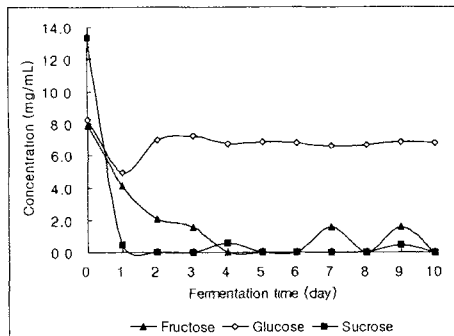
젖산의 경우 발효 전에는 원액과 희석액에서 0.3 mg/mL, 0.21 mg/mL 아주 소량으로 검출되었다가 발효가 진행됨에 따라 증가하는 경향을 보였으며, *L. plantarum*과 EM, *L. brevis*균주인 경우 원액과 희석액에서 lactic acid 함량이 다른 균주에 비해 함량이 2~3배이 증가하였다. 초산의 경우 발효 전에는 검출이 되지 않았다가 발효가 진행됨에 따라 서서히 증가되었다. EM과 *L. brevis*균주에서 많은 양의 초산이 생성되었다. 이는 pH와 산도의 변화, 유산균의 생육속도와 일치하는 것으로 나타났다.



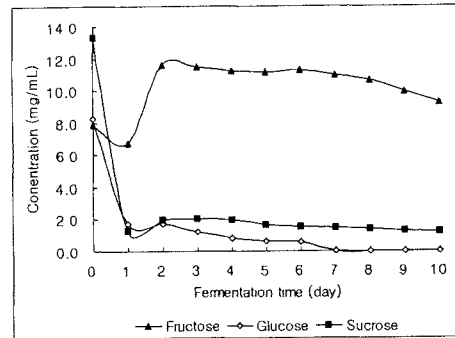
Lactobacillus plantarum



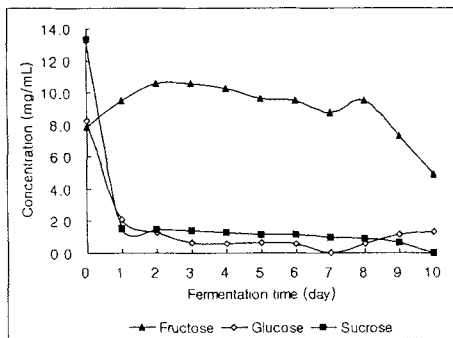
EM



Leuconostoc mesenteroides



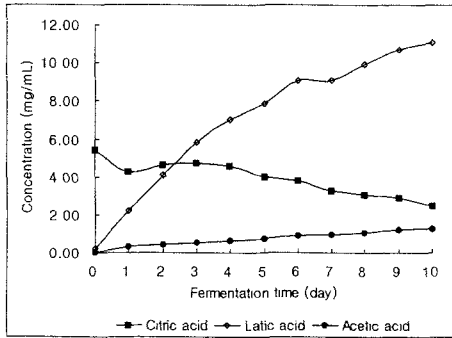
Lactobacillus brevis



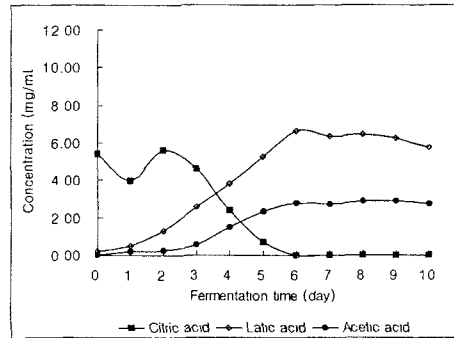
Pediococcus dextrinicus

Fig. 5. Changes of sugar content during fermentation of diluted cactus fruit juice.

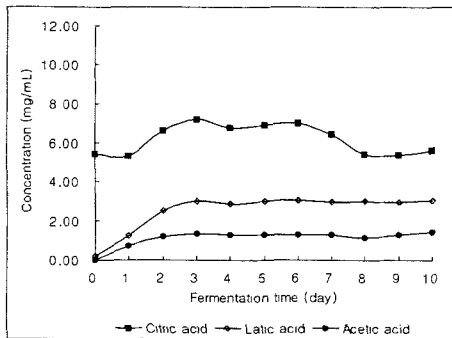
(A)



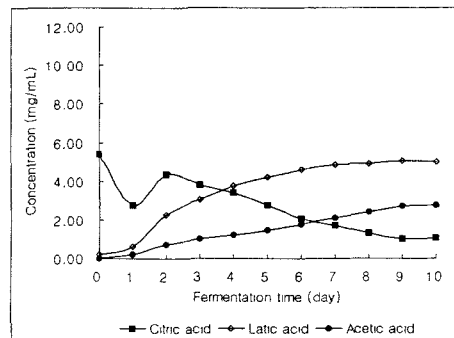
Lactobacillus plantarum



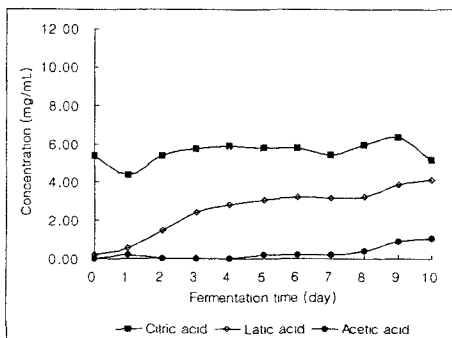
EM



Leuconostoc mesenteroides



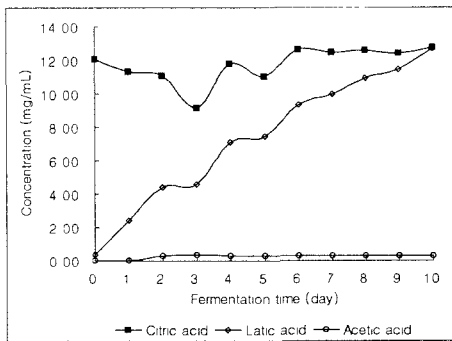
Lactobacillus brevis



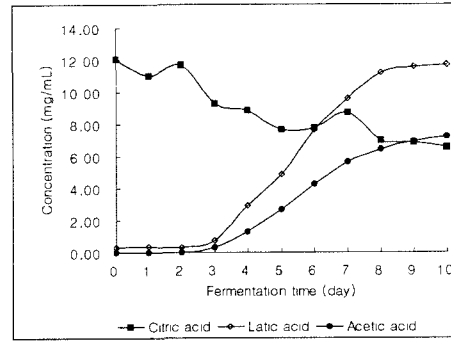
Pediococcus dextrinicus

Fig. 6. Changes of organic acid content during fermentation of diluted cactus fruit juice(A) and Cactus fruit juice(B).

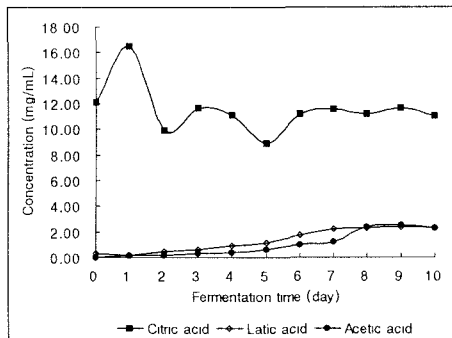
(B)



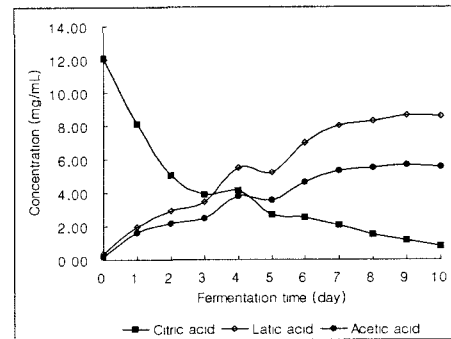
Lactobacillus plantarum



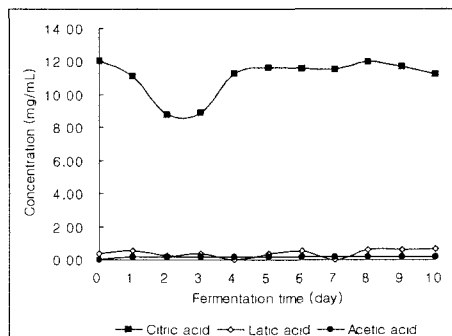
EM



Leuconostoc mesenteroides



Lactobacillus brevis



Pediococcus dextrinicus

continued

6) 일반성분

발효전 성분분석결과 선인장 열매 착즙액의 93.18%이상이 대부분 수분이었으며 약 0.11%의 섬유질(fiber), protein과 lipid가 각각 약 0.07% 와 0.15%를 함유하는 것으로 나타내었다. EM인 경우 발효전과 발효 후의 성분분석결과를 보면 섬유질 성분의 발효 전 0.11%이던 것이 발효 후에는 0.07%로 나타났고, 4.45 ppm의 vitamin C 함량이 발효 후에는 0.79 ppm으로 거의 대부분 소비된 것으로 분석되었으며, 0.04 ppm의 carotenoid는 발효후 0.03 ppm으로 나타났다. *L. plantarum* 균주인 경우는 섬유질 성분이 0.04 %로 나타났고, vitamin C 함량은 전부 소비된 것으로 분석되었다. 그리고 carotenoid는 0.06 ppm으로 소량 증가하였다(Table 1). 또한 아미노산성분 중 glutamic acid는 발효 전에 74.14 ppm이던 것이 EM 발효 후에는 102.13ppm으로 증가하는 것으로 분석되었으며, proline은 발효전에는 24.44 ppm이던 것이 *L. plantarum* 균주로 발효한 후에는 94.35 ppm으로 증가되었다(Table 2.), 지방산 중 myristic acid는 발효 전 0.2 g/100g 이던 것이 EM 발효후에는 0.53 g/100g로 증가한 것으로 분석되었으며, Capric acid는 발효전 0.07 g/100g이던 것이 EM과 *L. plantarum* 균주로 발효한 후에 각각 0.27 g/100g와 0.28 g/100g로 증가한 것으로 나타내었다(Table 3).

Table. 1. A component analysis of cactus and fermented cactus with *Lactobacillus plantarum* and EM.

Analysis list	Cactus	Fermented Cactus with EM	Fermented Cactus with <i>L. plantarum</i>
Moisture (%)	93.18	97.59	96.86
Crude protein (%)	0.07	0.18	0.07
Crude lipid (%)	0.15	0.03	0.08
Crude fiber (%)	0.11	0.07	0.04
Crude ash (%)	0.53	0.48	0.49
Ca (ppm)	236.03	161.11	188.02
P (ppm)	52.45	35.02	35.53
Vitamin C (ppm)	4.45	0.79	-
Carotinoid (ppm)	0.04	0.03	0.06
Flavonoid (ppm)	70.24	51.00	37.20
VitaminE (ppm)	2.31	0.64	0.74

Table 2. Amino acid component of Cactus and fermented Cactus with *Lactobacillus plantarum* and EM

(unit : ppm)

Analysis list	Cactus	Fermented Cactus with EM	Fermented Cactus with <i>L. plantarum</i>
Aspartic acid	39.64	49.69	26.00
Threonine	10.11	14.97	6.63
Serine	28.01	33.62	17.21
Glutamic Acid	74.14	102.13	67.41
Proline	24.44	24.85	94.35
Glycine	25.02	30.41	13.38
Alanine	15.18	22.30	14.91
Valine	15.06	26.70	18.25
Isoleucine	14.66	17.42	23.57
Leucine	13.19	24.61	3.90
Tyrosine	110.81	158.96	37.10
Phenylalanine	2.66	7.31	20.95
Histidine	87.45	116.64	78.28
Lysine	10.90	13.91	21.11
Arginine	9.53	11.28	5.03
Cystine	121.23	188.08	139.68
Methionine	22.11	25.23	31.20
Tryptophan	13.40	69.96	12.28

Table 3. A fattic acid component of Cactus and fermented Cactus using *Lactobacillus plantarum* and EM

(unit : g/100g)

Analisis list	Cactus	Fermented Cactus with EM	Fermented Cactus with <i>L. plantarum</i>
Myristic acid C _{14:0}	0.20	0.53	0.21
Myristoleic acid C _{14:1}	0.03	-	-
Pentadecanoic acid C _{15:0}	0.10	0.11	-
Palmitic acid C _{16:0}	14.03	14.64	13.21
Palmitoleic acid C _{16:1}	0.87	1.52	0.93
Tridecanoic acid C _{13:0}	0.03	-	-
Magaric acid C _{17:0}	0.12	0.15	0.13
Magaoleic acid C _{17:1}	0.08	0.24	0.10
Stearic acid C _{18:0}	4.36	4.92	4.71
Oleic acid C _{18:1}	13.43	14.26	12.56
Linoleic acid C _{18:2n6}	59.75	55.73	60.79
Linolenic acid C _{18:3n3}	1.50	0.48	0.68
Stearidonic acid C _{18:4n3}	-	-	0.14
Arachidic acid C _{20:0}	0.78	0.55	0.84
Eicosenoic acid C _{20:1}	0.48	0.55	0.67
Ecosadienoic acid C _{20:2}	0.35	0.17	0.29
Arachidonic acid C _{20:4n6}	0.21	0.27	-
EPA C _{20:5n3}	-	-	-
Behenic acid C _{22:0}	0.52	0.34	0.52
Docosatetraenoic acid C _{22:4n6}	-	-	-
DPA C _{22:5n3}	0.56	-	0.57
DHA C _{22:6n3}	0.30	-	0.14
Capric acid C _{10:0}	0.07	0.35	0.28
Caprylic acid C _{8:0}	-	0.27	0.12
Nonadecanoic acid C _{19:0}	-	-	-
Lauric acid C _{12:0}	0.07	0.16	-
Eicosatrienoic acid C _{20:3n6}	0.05	-	-
Erucic acid C _{22:1}	0.37	0.42	0.17
Unknown	1.82	4.34	2.94

2. 선인장 열매에서 분리한 유산균동정 및 발효특성

가. 서론

유산균은 자연계에 널리 분포하고 있을 뿐만 아니라 인간, 동물의 장, 발효식품등에서도 존재하는 세균으로서 인간이 이용할 수 있는 가장 유익한 미생물 중의 한 종류이다. 유산균은 비병원성 균으로 인간의 장내에 서식하면서 정균작용을 할 수 있고, 당류를 발효해서 다량의 젖산을 생성하고, 낮은 pH 및 혐기적 조건하에서도 잘 생육하며 여러 가지 영양물질을 요구하는 등의 특징을 가지고 있다¹⁷. 유산균에 의한 식물체의 발효는 당을 주요 기질로 하여 일어나는 젖산발효가 대부분이며, 일반적으로 여러 가지 식물 원료에 당을 첨가하거나 유산균 등의 미생물을 첨가하여 발효시킨다. 식물체에는 여러 가지의 효소가 함유되어 있으며 식물추출액을 발효시키면 많은 효소들이 활성화되어 여러 가지 생화학반응을 일으킴으로써 식물체의 영양성분이 소화, 흡수되기 쉬운 형태로 변환될 수 있으며, 효소작용으로 생성된 성분들에 의해 새로운 생리조절기능을 발현할 수 있다. 또한 효소자체를 섭취함으로써 체내에서 신진대사 기능을 촉진하게 된다. 채소류의 발효에서는 원료 중에 함유되어 있는 발효성 당의 형태와 농도, 관여 미생물의 종류, 발효조건 등이 젖산발효에 크게 영향을 준다고 보고되어 있다. 그리고 젖산발효가 되면 독특한 향과 맛을 내게 되어 관능적 특성이 향상된다¹⁹.

손바닥 선인장(*opuntia ficus indica* var. *saboten*)은 제주도에서 경작 또는 자생되는 선인장 중에 *opuntia*속에 속하는 열대성 다년생식물로서 식용, 약용 및 관상용으로 이용되고 있다. 손바닥 선인장의 열매와 줄기는 오래전부터 한방에서 임상효능이 있는 것으로 알려져 있으며, 현재 기능성 식품으로 인정받고 있어 잼, 젤리, 주스와 같은 가공 식품 개발이 활발히 이루고 있다.

본 연구는 선인장 열매를 이용하여 기능성 제품을 개발 목적으로 선인장 열매로부터 유산균을 분리, 동정하고 분리균을 이용하여 발효 특성을 조사하였다.

나. 연구내용 및 방법

1) 선인장 열매로부터 유산균 분리

자연적으로 숙성된 선인장 열매를 무균적으로 균질화하여 착즙한 다음 멸균된 생리 식염수(0.9%NaCl)로 단계 희석하여 0.5%의 CaCO₃를 첨가한 MRS배지에 도말하여 30℃에서 3일간 배양하여 균체 주변에 투명한이 형성된 균주를 선발하여 여러 번의 세대 배

양을 통해 단일 콜로니를 분리하였다.

2) 분리 균주의 동정

분리된 산균의 생화학적 성상은 API 50CHL(Biomerieux, France) system을 이용하여 제조 회사의 방법에 따라 당 발효 특성을 조사하였다.

16S rDNA 염기서열분석은 분리된 균주를 Lactobacilli MRS broth(Difco, USA)에 접종하여 30°C에서 18시간 배양한 후 10,000 x g로 10분간 원심분리하여 균체를 수확한 후 NucleoSpin Tissue Kit(ClonTech, Lab. Inc.)를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 genomic DNA를 분리하였다. 분리된 total DNA에서 16S rDNA를 증폭하기 위하여 27f와 1522r primer를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성시킨 후 95°C-1분, 55°C-1분, 72°C-1분의 주기로 33번 순환한 후 최종적으로 72°C에서 10분간 더 반응 시켰다. 증폭된 PCR산물은 1% agarose 젤에서 전기영동하여 확인하였다. 확인된 PCR 산물은 QIAEXRII Gel Extraction kit를 사용하여 회수 정제하여 pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, Wis.)에 ligation한 후 *E.coli* JM109에 형질전환을 실시한 다음 40ug/mL의 X-gal과 IPTG 및 50ug/mL의 ampicillin이 첨가된 LB agar 배지를 이용하여 37°C에서 18시간 배양한 후 흰색 콜로니를 선별한 다음 M13-40와 M13 reverse primer를 이용하여 유전자 서열을 분석하였다. 유전자 서열분석은 Big-Dye Cycle Sequencing kit(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)와 ABI Prims 310 automatic sequencer(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)에 의해 수행하였다. 밝혀진 염기 서열의 분석은 DNASTAR program과 GeneBank의 blast search의 database를 이용하였다. 염기의 계통학적 관계를 밝히기 위하여 Lasergene의 Megalign program을 이용하여 분석하였으며, 이 때 Clustal method에 의해 수행하였다.

3) 분리 균주의 발효특성 조사

(가) 당도 측정

당도는 발효액을 굴절당도계(Hand refractometer, No. 507-1, NOW, Japan)를 사용하여 당도를 측정 하였다.

(나) pH 및 총 산도 측정

pH는 시료를 일정량을 취하여 pH meter로 측정하였다. 그리고 총 산도는 발효액 50mL에 멸균수 50mL를 가한 후 0.1N NaOH 용액으로 pH 8.3까지 적정하였다. 이때 이용된 0.1N NaOH 용액의 소모량(mL)을 lactic acid 함량으로 환산하여 총 산도를 다음과

같은 식으로 계산하였다

$$\text{Total acidity(\%)} = \frac{0.1\text{N NaOH 소비량(mL)} \times F \times 0.009}{\text{시료부피(mL)}} \times 100$$

(다) 유산균수 측정

유산균수 측정은 발효액 0.5mL를 0.9% NaCl 용액 4.5mL에 현탁하고 이를 10배 단위로 희석한 후 0.5% CaCO₃가 함유된 *Lactobacilli* MRS agar를 사용하여 pour plating 방법으로 30℃에서 3일간 배양하여 colony가 선명하고 상대적으로 clear zone이 형성한 것을 계수하였고 동일한 실험을 3번 반복하여 평균치를 산출하였다.

(라) 유리당과 유기산 분석

유리당과 유기산 분석은 냉동 보관된 발효액을 원심분리한 후 침전물을 제거한 다음 상정액을 0.2 μm millipore membrane filter로 여과하여 HPLC를 이용하여 glucose, fructose, sucrose의 당류를 분석하고 정량하였다. 이때 HPLC의 조건은 Waters carbohydrate column을 사용하였으며 detector는 ELSD2000, eluent는 acetonitrile : H₂O (75:25), flow rate는 1.0mL/min, injection volume은 10μL로 하였다. 유기산 분석은 SupelcogelTMC-610H column을 사용하였으며 detector UV(210nm), eluent 0.1% phosphoric acid, flow rate는 0.5mL/min, injection volume은 5μL로 하였다.

다. 연구결과 및 고찰

1) 분리 균주의 동정

자연적으로 숙성된 선인장 열매로부터 순수 분리한 균주중 발효능이 우수하다고 판단되는 균주 CNU001과 CNU010을 API 50CHL kit를 이용하여 생화학적 특성을 조사한 결과 CNU001 균주는 *Lactobacillus plantarum*과 99.9%의 동질성을 갖는 것으로 나타났으며, CNU010 균주는 *Lactobacillus brevis*와 97%의 동질성을 갖는 것으로 동정되었다 (Table 4). 보다 더 확실하게 동정하기위해 16S rDNA 염기서열분석을 통해 동정한 결과 CNU001균주는 *Lactobacillus plantarum* R07과 99%, CNU010 균주는 *Lactobacillus brevis* R066과 97%의 동질성을 갖는 것으로 나타났다(Fig. 7). 이상의 생화학적 특성과 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과로부터 CNU001 균주를 *Lactobacillus plantarum* CNU001로, CNU010 균주를 *Lactobacillus brevis* CNU010 균주로 명명하였다.

Table 4. Carbohydrate fermentation patterns of *L. plantarum* CNU001,
L. brevis CNU010 and *L. plantarum* ATCC14917

	CNU 001	CNU 010	ATCC 14917		CNU 001	CNU 010	ATCC 14917
Glycerol	-	-	-	Esculin	+	+	+
Erythritol	-	-	-	Salicin	+	+	+
D-arabinose	-	-	-	Cellobiose	+	+	
L-arabinose	+	+	+	Maltose	+	+	+
Ribose	+	+	+	Lactose	+	+	+
D-xylose	-	+	-	Melibiose	+	+	+
L-xylose	-	-	-	Sucrose	+	+	+
Adonitol	-	-	-	Trehalose	+	-	+
β -methyl-D-xyloside	-	+	-	Inulin	-	-	-
Galactose	+	+	+	Melezitose	+	+	+
Glucose	+	+	+	Raffinose	+	-	+
Fructose	+	+	+	Starch	-	-	-
Mannose	+	+	+	Glycogen	-	-	-
Sorbose	-	-	-	Xylitol	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	Gentibiose			-
Dulcitol	-	-	-	D-turanose	+	+	+
Inositol	-	-	-	D-lyxose	-	-	-
Mannitol	+	-	+	D-tagatose	-	-	-
Sorbitol	+	-	+	D-fucose	-	-	-
α -methyl-D-mannoside	+	-	+	L-fucose	-	-	-
α -methyl-D-glucoside	-	+	-	D-arabitol	-	-	
N-acetyl-glucosamine	+		+	L-arabitol	-	-	-
Amygdalin	+	+	+	Gluconate			
Arbutin	+	-	+	2-keto-gluconate	-	-	-
				5-keto-gluconate	-		

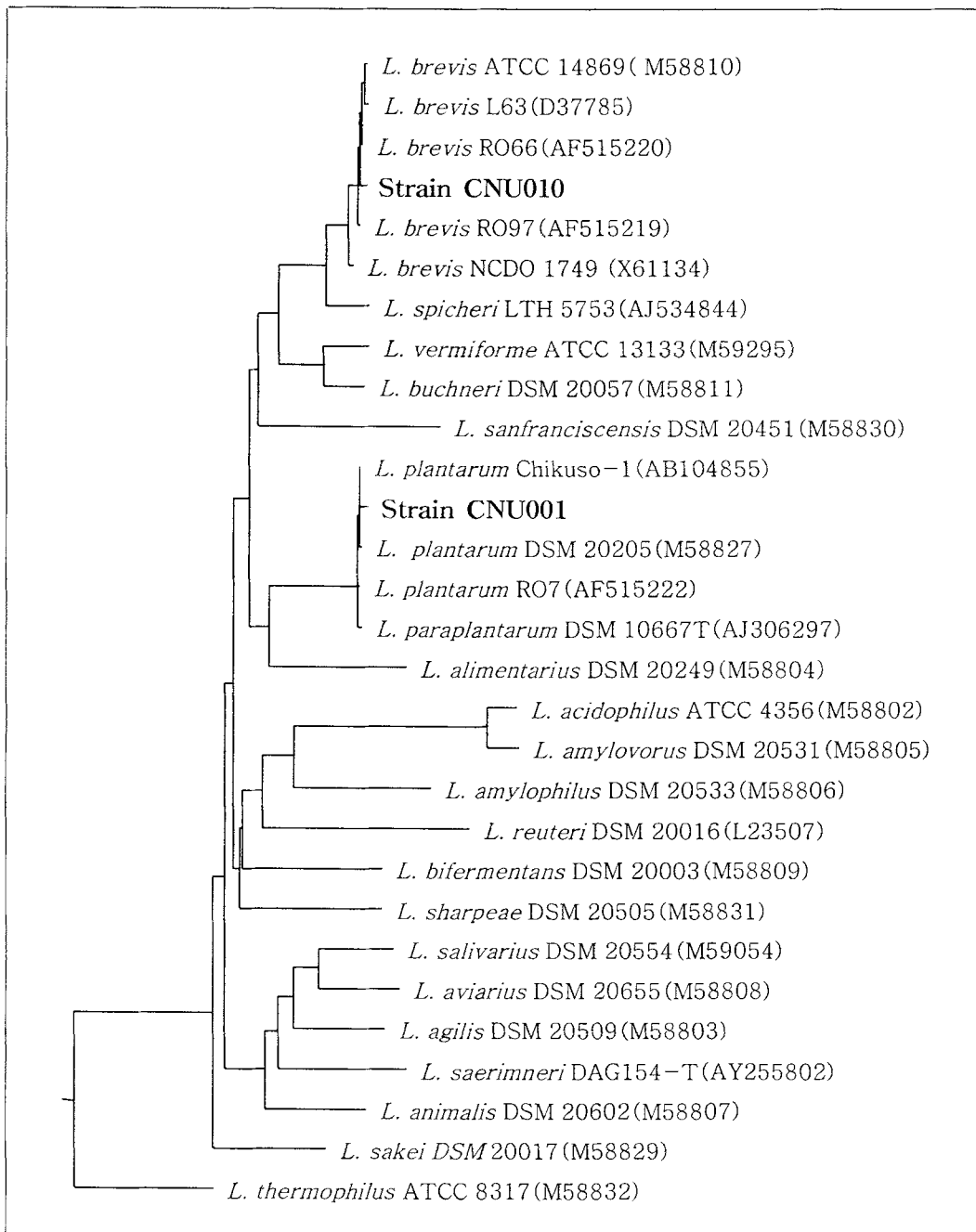


Fig. 7. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the position of strain CNU001, CNU010 and some other lactobacilli.

2) 선인장 열매에서 분리된 유산균의 발효특성 조사

(가) 당도의 변화

선인장 열매 착즙액 발효과정 중 당도 변화는 *Lactobacillus plantarum* CNU001을 처리한 구인 경우 초기 4.0 °Brix에서 3일까지 지속적으로 감소하여 3.4 °Brix였고 이후 거의 변화가 일어나지 않았다. 그리고 *Lactobacillus brevis* CNU010 처리 구에서는 4.0 °Brix에서 4일까지 3.2 °Brix로에서 지속적으로 감소하는 경향을 나타내었고, 5일째부터 거의 변화가 일어나지 않았다(Fig. 3).

(나) pH와 총 산도의 변화

발효가 진행중 pH의 변화는 *Lactobacillus plantarum* CNU001 처리구인 경우 초기 pH 6.6에서 배양 1일째부터 급격히 감소하여 pH 4.6으로 나타내었으며, 이후 발효 종결 시까지 지속적으로 감소하여 pH 3.5로 나타났었다. *Lactobacillus brevis* CNU010인 경우 초기 pH 6.6에서 발효 종결 시까지 지속적으로 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 9). 한편 적정 산도의 변화는 *Lactobacillus plantarum* CNU001인 경우 발효가 진행됨에 따라 빠른 속도로 산이 생성하였고 발효 말기의 적정 산도는 0.85%로 나타내었으며, *Lactobacillus brevis* CNU010인 경우 1일째까지 산이 급격히 생성되었으나 1일째부터 발효 말기(0.62%)까지 지속적으로 증가하였다(Fig. 10). 이러한 결과는 김치 중에 존재하는 산은 약산으로 해리상수가 적기 때문에 pH가 3.0이하로 내려가지 않는다는 보고와 일치한다⁶. 발효에 따른 적정 산도는 발효 조건, 유산균의 종류에 따라 총 산도가 차이는 있지만 다른 과채류보다는 높게 나타내었으며⁶, 배추김치의 산도 0.6 ~ 0.8 적정산도와 유사하게 나타내었다⁷.

(다) 총 유산균 수

분리된 균주를 선인장 열매 착즙액에 접종하여 25°C에서 발효시키면서 유산균수의 변화를 Log값으로 측정한 결과는 Fig. 11에 나타내었다. 각 접종량 5.7~5.9 Log CFU/mL으로 발효기간에 따른 각 균주의 생육특성을 살펴보면 *Lactobacillus plantarum* CNU001인 경우 배양 1일만 큰 폭으로 증가하여 8.4 Log CFU/mL에 도달하였으며, 2일째는 8.9 Log CFU/mL로 발효말기까지 비슷한 수준을 유지하였다.

Lactobacillus brevis CNU010에서는 배양 3일까지 완만하게 증가하여 8.8 Log CFU/mL에 도달하였으며, 3일째부터 발효말기까지 큰 변화가 없었다.

발효 제품의 유산균 수를 7~8 Log CFU/mL이상으로 규정하고 있는데 본 실험의 결과

선인장 열매 발효액에서 생균수가 그 이상 보였으며, 당과 각종 첨가물 없이 선인장 열매 착즙액에 자체만으로 효과적으로 산 생성이 이루어졌다. 특히 선인장 열매에서 분리된 *L. plantarum* CNU001이 선인장 열매 발효에서 높은 생균수와 산 생성능력을 나타냄으로 발효능이 우수한 것으로 나타내었다.

식물성 재료로 유산균 발효제품을 만드는데 유산균의 생육에 의해 적정한 산도를 형성시키는 것이 중요하다. 유산균은 주로 단당류나 이당류를 이용하여 에너지를 얻고 젖산을 생산하는데, 채소의 경우에는 전체적인 당 함량이 적어 발효에 의해 충분한 산이 생성될 수 없고²⁹, 곡류의 경우에는 전분과 같은 다당류가 주성분이어서 가수분해시키지 않으면 발효에 이용되지 못하여 산생성이 낮다고 알려져 있다³⁴. 본 연구 결과 선인장 열매 착즙액에 각종 당류나 다당류 가수분해 효소를 전혀 없이 선인장 열매 내 성분만으로 발효가 진행되었으며, 산 생성능력이 우수하게 나타내었다.

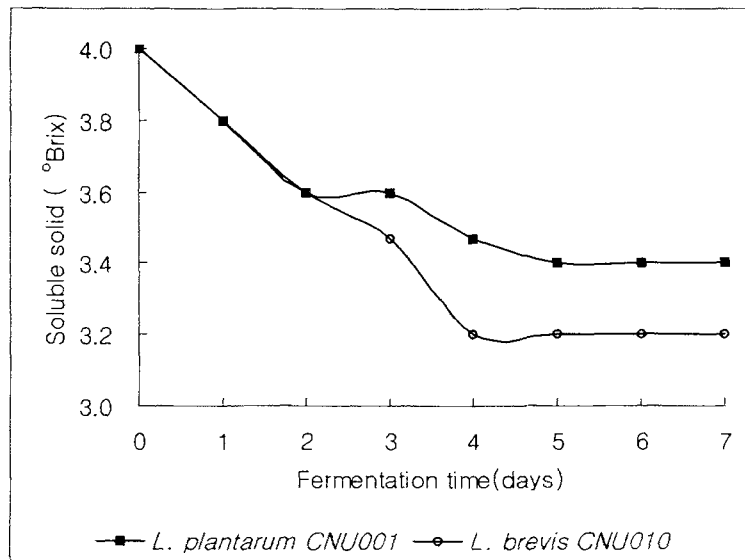


Fig. 8. Changes of sugar content during fermentation of cactus fruit juice with *L. plantarum* CNU001 and *L. brevis* CNU010.

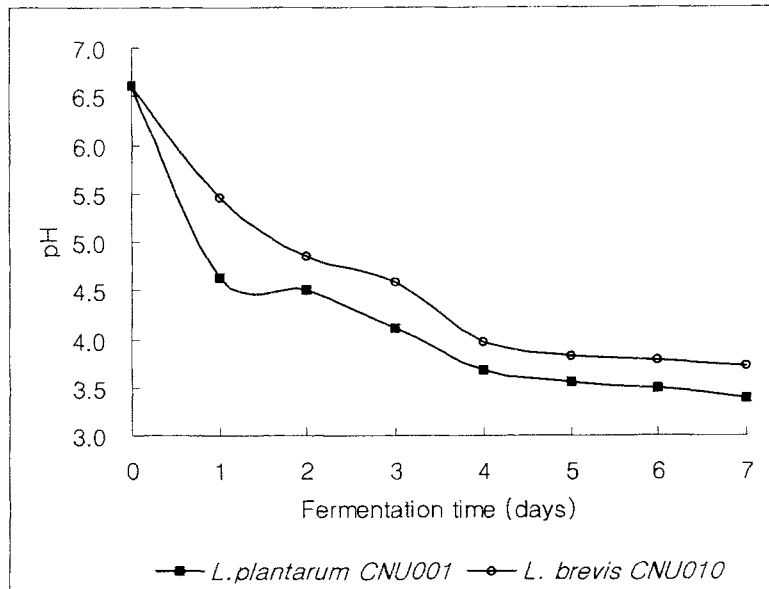


Fig. 9. Changes of pH during fermentation of cactus fruit juice with *L. plantarum* CNU001 and *L. brevis* CNU010.

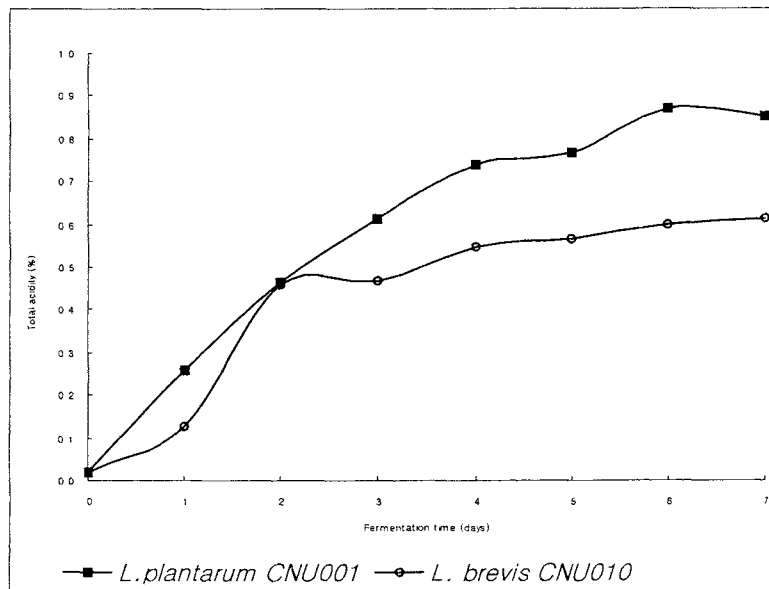


Fig. 10. Changes of total acidity during fermentation of cactus fruit juice with *L. plantarum* CNU001 and *L. brevis* CNU010.

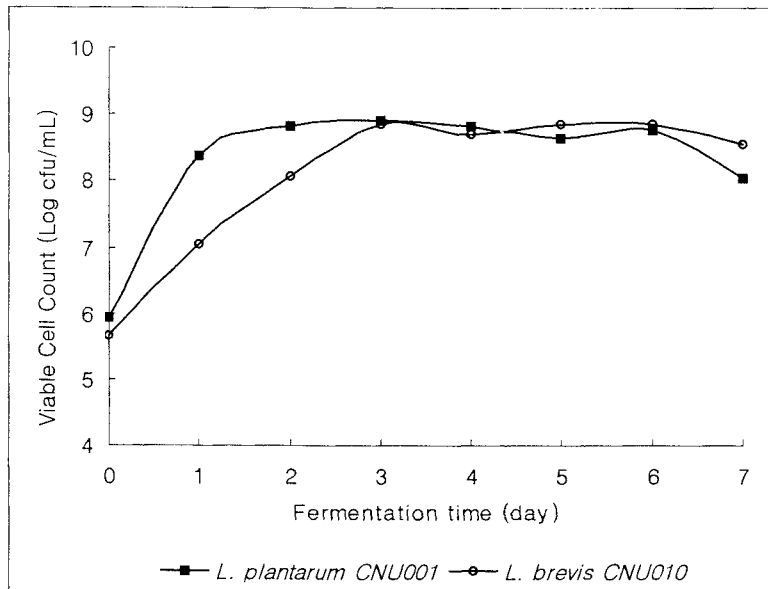


Fig. 11. Changes of viable cell counts during fermentation of cactus fruit juice with *L. plantarum* CNU001 and *L. brevis* CNU010.

(라) 유리당 함량의 변화

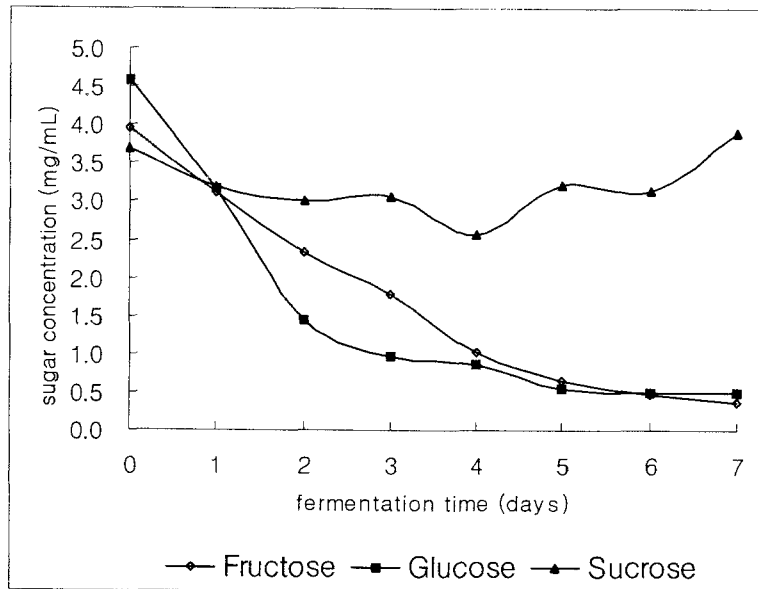
발효기간에 따른 총 당의 함량을 분석한 결과는 Fig. 6와 같다. *Lactobacillus plantarum* CNU001인 경우 발효 3일째 까지 포도당 함량이 발효 전 4.6 mg/mL에서 2일째 1.0 mg/mL로 급격히 감소되었으며 3일째부터 완만하게 감소하였다. 과당은 발효가 진행되면서 서서히 감소하는 경향을 보였다. 그리고 자당 함량은 4일째까지 약간 감소하는 경향을 보이다가 발효 5일째부터 증가하는 경향을 나타냈다. 그리고 *Lactobacillus brevis* CNU010인 경우 당 함량은 과당은 지속적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 포도당 함량은 3일째까지 급격히 감소하다가 4일째부터 지속적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 자당 함량은 1일째에 증가하다가 3일째까지 급격히 감소하다가 4일째부터 발효가 진행되는 동안 지속적으로 감소하는 경향을 나타내었다. *L. brevis* CNU010균주는 우선 과당으로부터 이용하는 것으로 나타내었다. 이는 유산균이 분비하는 효소 등에 의해 불용성 고형물이 분해되어 소모되는 양을 보충하는 것으로 생각된다.

(마) 유기산 함량의 변화

Lactobacillus plantarum CNU001과 *Lactobacillus brevis* CNU010에 의해 발효된 선

인장 열매 착즙액에서 유기산 함량변화는 Fig. 7과 같이 주로 구연산, 사과산, 젖산, 초산 등이 분리되었다. 구연산은 발효전에는 약 1.8 mg/mL에서 발효가 진행되면서 *Lactobacillus planarum* CNU001인 경우 거의 변화가 없으나, *Lactobacillus brevis* CNU010인 경우 2일째까지 급격히 감소하다가 3일째에 거의 이용하였다. 사과산은 두 균주에서 발효전에는 소량이 검출되었으나 발효가 진행되면서 전부 이용하였고 젖산은 발효전에는 검출이 되지 않았으나 발효가 진행됨에 따라 증가하였다. 특히 *Lactobacillus plantarum* CNU001에서 3.87mg/mL 함량이 젖산이 검출되었다. 초산은 *Lactobacillus brevis* CNU010가 *Lactobacillus plantarum* CNU001보다 많은 양을 생성하였다.

(A)



(B)

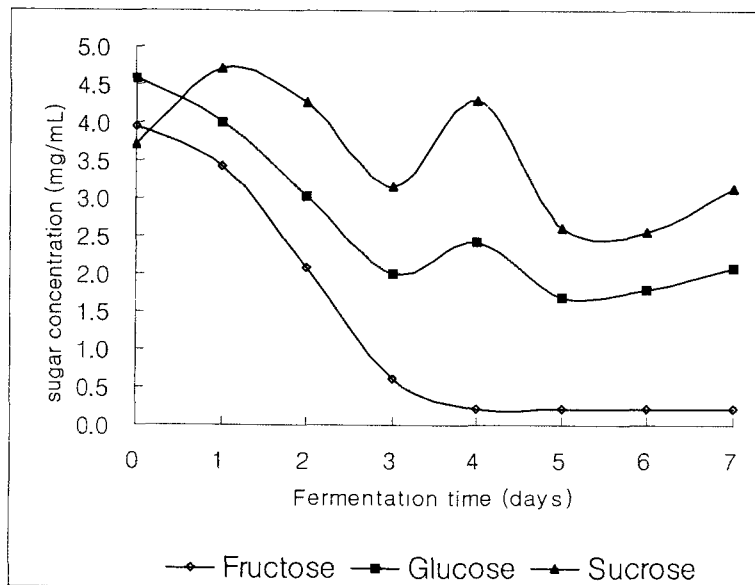
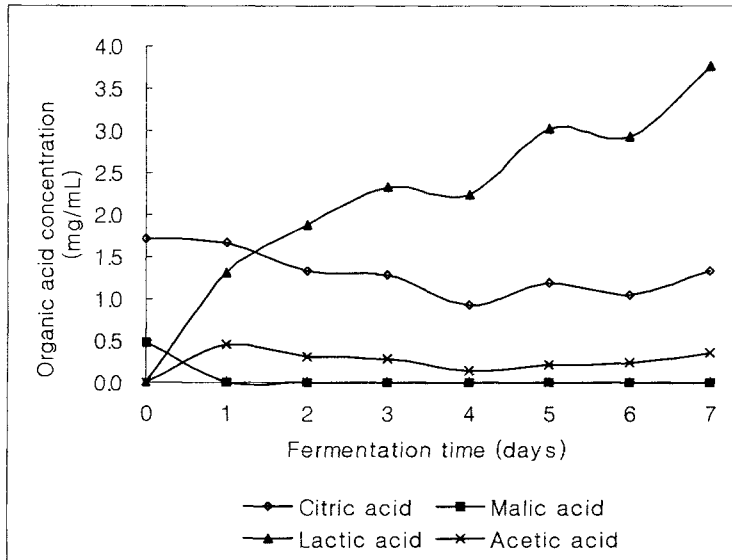


Fig. 12. Changes of fructose, glucose, sucrose content during fermentation of Cactus fruit juice with *L. plantarum* CNU001 (A) and *L. brevis* CNU010 (B).

(A)



(B)

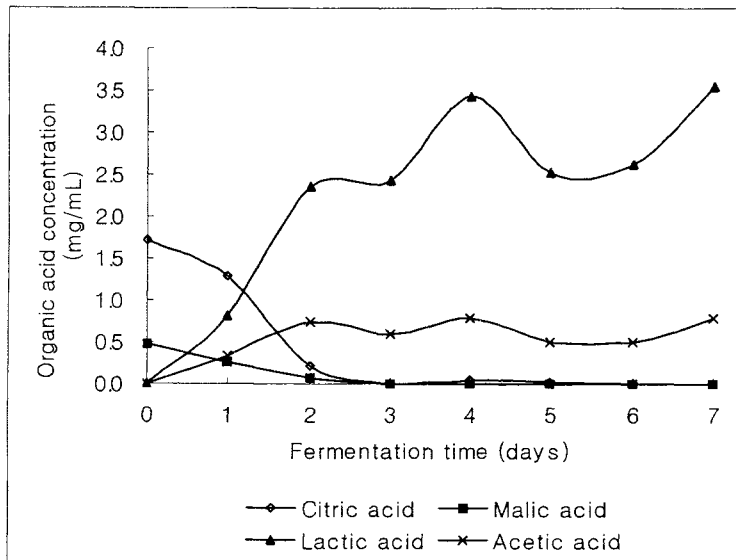


Fig. 13. Changes of organic acid content during fermentation of cactus fruit juice with *L. plantarum* CNU001 (A) and *L. brevis* CNU010 (B).

3. 선인장 열매 발효물의 제품공정 및 저장성

가. 서론

유산균은 발효유제조, 건강 및 기능성 식품, 정장제 의약품 및 동물 약품에 널리 이용되고 있는 매우 중요한 산업용 균주이다. 유산균을 이용한 젖산 발효제품을 냉장저장 중에도 유산균의 계속된 증식으로 산미가 증가하여 기호성이 저하된다고 알려져 있다. 액상이나 유체상의 발효제품은 부패하기 쉬우며 저장성이 저조하여 분말, 고체 또는 과립 상태의 젖산발효제품을 제조하면 저장기간을 상당히 연장할 수 있으며, 다른 제품과 혼합하여 용이하게 사용이 가능할 것이다. 그러나 젖산발효제품을 냉동건조 및 분무건조하면 유산균의 생존율이 감소한다²⁵. 유산균들은 주로 발효산물을 이용하는 다른 산업용 균주와는 달리 viability를 갖는 생균체를 직접 이용하는 경우가 더 많기 때문에 이들 균주의 보존성은 생산성과 직접적인 관련을 갖게 된다. 유산균의 동결 건조방법에 대해서 많은 연구가 되고 있고 대부분 동결 건조 과정 중 발생하는 동결손상을 막고 보존 중 균의 생존율을 장기간 유지할 수 있는 여러 가지 조건들이 보고 되었다². 과즙과 우유 혼합 기질을 *L. acidophilus*로 발효하여 만든 젖산발효제품을 냉동 건조하여 조사한 결과 냉동건조 후의 생존율이 10.0~21.1%로 감소하고 특히 과즙의 종류와 과즙-우유의 혼합비율에 따라 차이가 있다고 보고하였다²⁶.

따라서 본 연구는 유산균 발효액을 이용한 양식 넙치의 사료 첨가제를 제조하기 위해 액상 발효물과 발효물을 분말화하여 저장기간 동안 생균수를 측정 조사하였다.

나. 연구내용 및 방법

1) 액상 발효액과 분말용 제품 공정

선인장 열매를 이용한 젖산발효 제품을 제조하기 위해 선인장 열매 착즙액을 발효전에 pH 6.6으로 보정하여 유산균을 접종한 후 3~4일간 발효를 진행시켰다. 발효액에 엿당을 10% 농도가 되게 넣은 후 균질화하였다. 발효액에 동결보호제로 Skim Milk를 10%농도로 첨가한 다음 혼합하여 균질화한 후 -70℃ 로 3일간 동결시킨 다음 동결건조기에서 건조하였다. 건조된 시료는 분쇄하여 분말화 하였다. 분말화된 발효물에 부형제를 첨가하여 1kg 단위로 포장하였다.

2) 선인장 열매 발효물의 저장성

선인장 열매 착즙액을 발효전에 pH 6.6으로 보정한 후 다음과 같이 4개의 실험구로 설정하여 액상 발효액의 저장기간동안 생균수를 5일 간격으로 측정하였다.

A 실험구 : 발효후 pH 7.0으로 보정

B 실험구 : 대조구

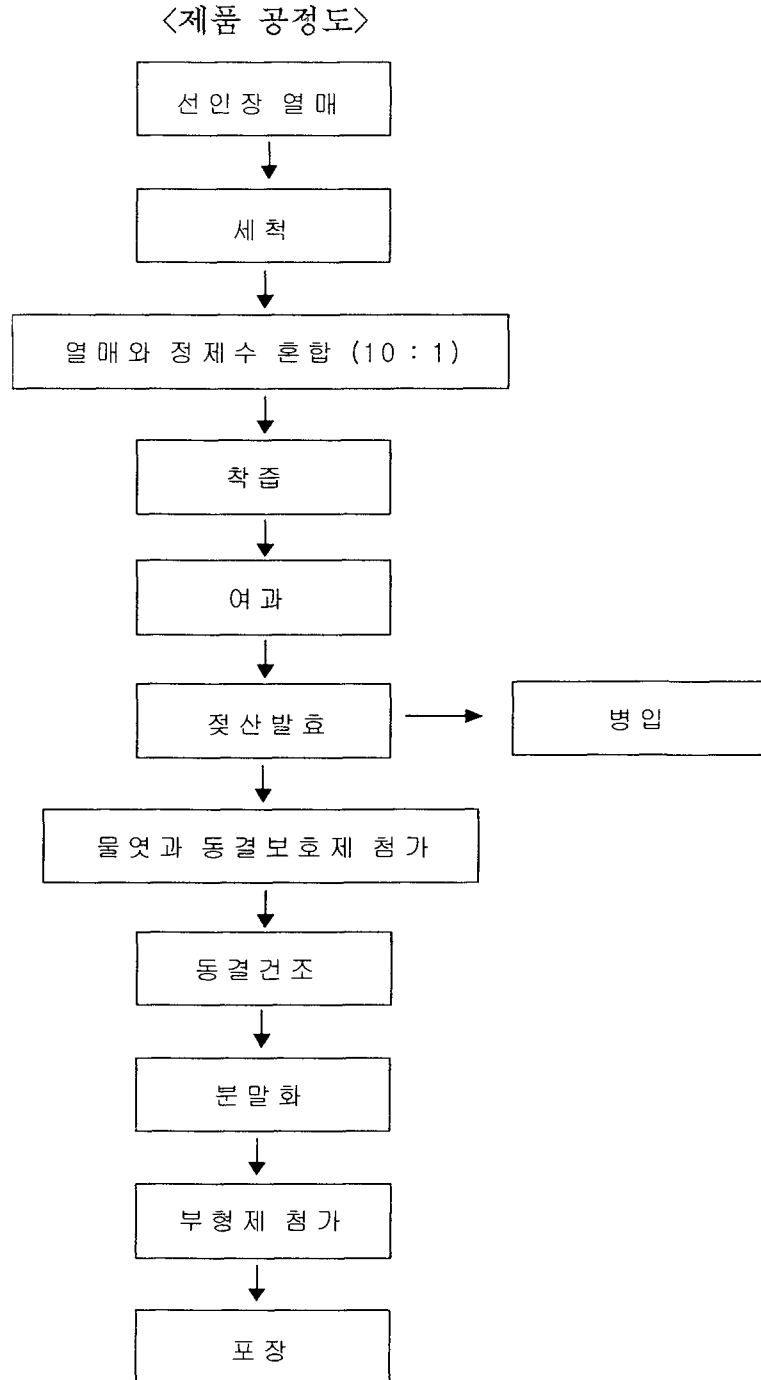
C 실험구 : CaCO₃ 첨가 + 발효후 pH 7.0으로 보정

D 실험구 : CaCO₃ 첨가

동결보호제로 Skim Milk를 10%농도로 첨가한 다음 혼합하여 균질화 한 후 -70℃ 로 3일간 동결시킨 다음 동결건조기에서 건조하였다. 건조된 시료는 분쇄하여 분말화한 다음 멸균 생리식염수에 단계 희석하여 0.5% CaCO₃가 첨가된 MRS 배지에 도말한 후 25℃에서 3일간 배양한 다음 생균수를 측정하여 발효 후, 동결 후와 동결건조 후의 생존율을 측정하였다.

다. 연구결과 및 고찰

1) 선인장 열매 발효물의 제품 공정



2) 액상 발효액의 저장기간 동안 총 유산균 수의 변화

유산균들은 발효과정에서 발효산물로 젖산, 초산 등 다양한 유기산을 생성하여 이런 유기산들은 균의 생존력에 심한 영향을 주므로 일정한 수준의 pH를 유지할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 각 처리구를 5일동안 발효한 후 생균수와 4℃ 냉장 저장기간 동안 5일 간격으로 총균수를 측정하여 비교한 결과 Fig. 17. 와 같이 모든 구에서 발효 종결후 총 균수는 8.64~8.83 Log CFU/mL으로 나타났으며 저장 5일째는 8.08~7.15 Log CFU/mL로 약 10~20% 감소하였으며 처리구 C와 D에서는 5일에서 15일까지 거의 변화가 없는 반면 처리구 A와 B에서는 총 균수가 감소하였다. 이러한 결과는 CaCO₃ 나 KH₂PO₄ 같은 buffering agent의 첨가나 최종 배양액의 pH를 중성 범위로 보정하면 균의 생존력을 크게 향상 시키는 보고와 유사하게 나타났다².

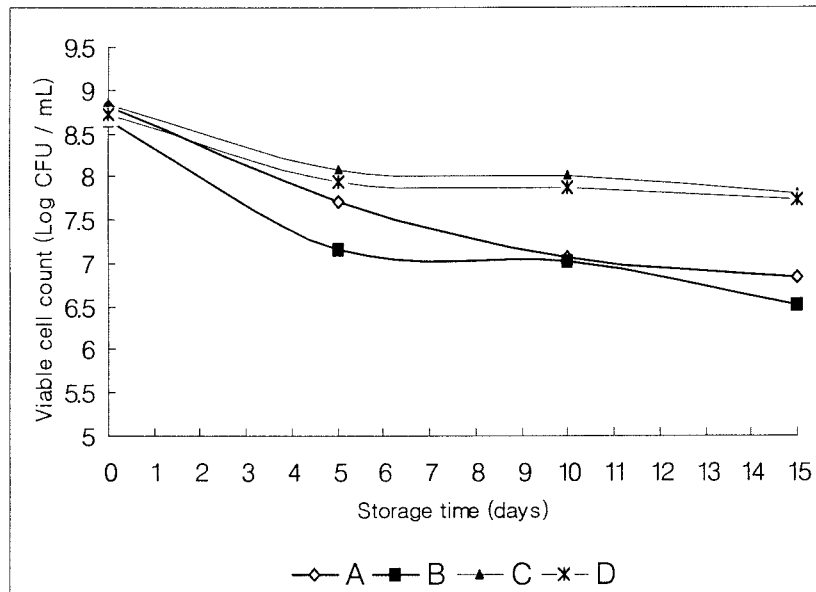


Fig. 17. Changes of viable cell count of fermented cactus fruit juice during storage time.

- A: pH was adjusted to 7.0 with 10N NaOH after fermentation
- B: control
- C: pH was adjusted to 7.0 with 10N NaOH after fermentation with CaCO₃
- D: Fermentation which added CaCO₃

3) 분말용 제품의 동결 및 동결건조에 따른 총 유산균 수의 변화

발효후 동결 상태와 동결건조한 다음 생균수를 측정한 결과 Fig. 10에서 나타나듯이 처리구별 동결전의 균수는 8.67~8.99 Log CFU/mL로 존재하며 동결 후와 동결건조 후

의 생균수는 8.0~8.32 Log CFU/mL과 7.7~7.98 Log CFU/mL로 약 11~13 % 감소하여 처리구별 차이는 거의 없는 것으로 나타났다. 동결건조한 균체의 생존력과 보존성에 가장 크게 영향을 미치는 요인은 동결건조시 사용되는 분산매와 동결건조 보호제이다. 유산균에 사용되는 일반적인 분산매는 lactose, starch 등의 당류와 skim milk로 알려져 있다. 본 연구에서도 균의 생존율과 보존성이 유지되었다.

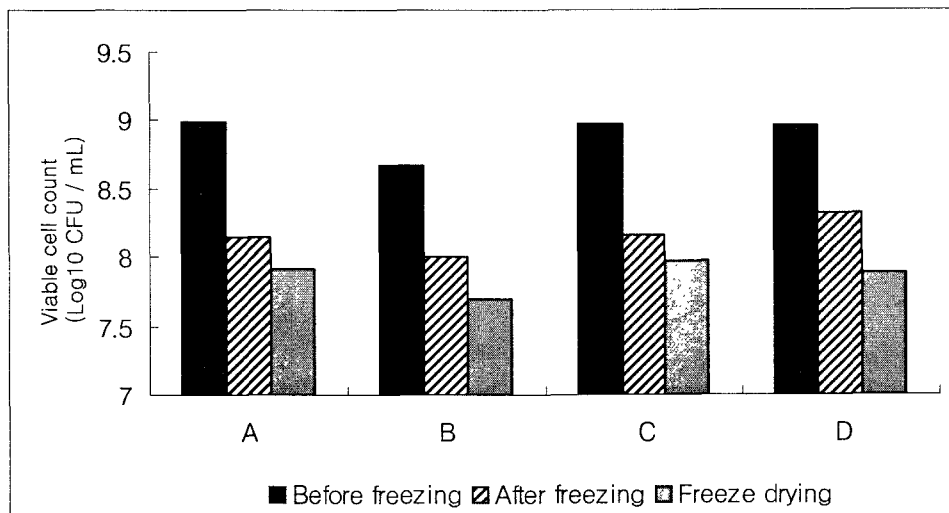


Fig. 10. Changes of viable cell counts of different situations of fermentation product.

- A: pH was adjusted to 7.0 with 10N NaOH after fermentation
- B: control
- C: pH was adjusted to 7.0 with 10N NaOH after fermentation which added CaCO_3
- D: Fermentation which added CaCO_3

4. 참고문헌

1. 김정희, 김종일, 1999. 무 주스 제조를 위한 stater로써 동치미에서 분리한 유산균의 동정 및 발효 특성. 한국미생물학회지. 35, 307-314.
2. 김태한, 1991. 냉동건조 조건에 따른 Lactobacillus와 Bifidobacterium속 균주의 보존성, 한국산업미생물학회, 91년도 춘계학술발표대회.
3. 배인영, 윤은주, 우정민, 김주신, 이현규, 양차범, 2002. 손바닥 선인장 열매를 이용한 전통주 개발-I. 전통주 제조기법을 이용한 발효주 및 증류주의 특성. J.Kor.Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 45, 11-17.
4. 백남수, 임유범, 김영만, 2001. Probiotics에 의한 해수양식어의 성장촉진 및 항균효과. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29, 56-61.
5. 안순철, 김태강, 이현주, 오윤정, 이정숙, 강대육, 오원근, 민태익, 안종석, 2001. 배추김치와 배추김치 발효양상. 한국미생물학회. 37, 234-238.
6. 안승요, 1970. 김치제조에 관한 연구(제1보)-조미료 첨가가 김치발효에 미치는 효과. 국립공원연구소 연구보고서. 20. 61
7. 지옥화, 1987. 염도를 달리한 무 김치(동치미, 짠지)의 숙성기간에 따른 비휘발성 유기산의 변화. 충남대학교 석사학위논문.
8. Ahn, D. K., 1998. Illustrated book of Korean Medicinal herb. Kyohaksa, p. 497.
9. Ahotupa, M., Saxelin, M., and Korpela, R., 1996. Antioxidative properties of Lactobacillus GG. Nutr. Today (Suppl.) 31, 51S-52S.
10. Blois, M. S., 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1200.

11. Byun, J. W., Park, S. C., Beno, Y. and Oh, T. K., 1997. Probiotics effects of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*). J. Gen. Appl. Microbiol., 43, 305-308.
12. Cho, Y. and Rhee, H. S., 1991. Effect of lactic acid bacteria and temperature on Kimchi fermentation (I). Kor. J. Soc. Food Sci., 7, 15-25.
13. Cho, Y. and Rhee, H. S., 1991. Effect of lactic acid bacteria and temperature on Kimchi fermentation (II). Kor. J. Soc. Food Sci., 7, 89-95.
14. Chung, M. S. and Kim, K. H., 1996. Stability of betanine extracted from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. Kor. J. Soc. Food Sci., 12, 506-510.
15. Chung, M. S., 2000. Antioxidantive and antimicrobial activities of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. Kor. J. Soc. Food Sci., 12, 506-510.
16. Chyun, J. H. and Rhee, H. S., 1976. Studies on the volatile fatty acids and carbon dioxide produced in different Kimchi. Kor. J. Food Sci. Technol., 7, 74-81.
17. Collins, M. D. and Gibson, G. R., 1999. Probiotics, prebiotics and synbiotics : approaches for modulating the microbial ecology of the gut. Am. J. Clin. Nutr. 69, 1052-1057.
18. Davidon, P. M. and Parish, M. E., 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobial. Food Technol., 1, 148.
19. Fleming, H. P., 1982. Vegetable Fermentations. In: Economic Microbiology, Vol. 7, Academic Press, London, England.

20. Gardner, N. J., Savard, T., Obermeier, P., Caldwell, G. and Champagne, C. P., 2001. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *Int. J. Food Microbiol.*, 64, 261-275.
21. Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N. and Jalaudin, S., 1998. Growth performance, intestinal microbial populations and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. *Poult. Sci.*, 77, 1259-1265.
22. Kim, H. O. and Rhee, H. S., 1975. Studies on the nonorganic acid in Kimchis fermented at different temperature. *Kor. J. Food. Sci. Technol.*, 7, 1975.
23. Kim, I. H., Kim, M. H., Kim, H. M., and Kim, Y. E., 1995. Effect of antioxidants on the thermostability of red pigment in prickly pear. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 27, 1013-1016.
24. Kim, T. J., 1996. Korean source of plants II. Seoul National University Publishing Dept., p. 266.
25. Ko, Y. T., and Kang, J. H., 2000. Effects of freeze drying protectant on Quality of lactic acid bacteria fermented food prepared from milk or egg white power. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 32, 881-888.
26. Ko, Y. T., and Oh, M. H., 1998. Freeze drying of fermented milk and fruit juices. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 30, 1448-1455.
27. Lee, H. J., 1997. A study on antiulcer effects of *Opuntia Dillenii* Haw. on stomach ulcer induced by water-immersion stress in rats. M.S. Thesis, Seoul National University, Seoul, Korea.

28. Lee, Y. C., Hwang, K. H., Han, D. H. and Kim, S. D., 1997. Composition of *Opuntia ficus-indica*. Kor. J. Food. Sci. Technol., 29, 847-853.
29. Park, S. Y., Ko, Y. T., Lee, J. Y., Mok, C. K., Park, J. H. and Ji, G. E., 1997. Fermentation of carrot juice by *Bifidobacterium*. Kor. J. Food. Sci. Technol., 29, 627-631.
30. Pelletier, C., Bouley, C., Cayuela, C., Bouttier, S., Bourlious, P., and Bellom-Fontanie, M. N., 1997. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. Appl. Environ. Microbiol., 63, 1725-1731.
31. Pyunghumsa., 1989. Useful plants of the world. Tokyo, p. 53.
32. Simic, M. G., 1988. Mechanism of inhibition of free radical processed in mutagenesis and carcinogenesis. Mutat. Res., 202, 377-386.
33. Stamer, J. R., Stoyla, B. O. and Dunckel, B. A., 1971. Growth rates and bacteria associated with the sauerkraut fermentation. J. Milk Food Technol., 34, 521.
34. Tominaga, M. and Sato, K., 1996. Lactic acid fermentation of saccharified solution from rice flour. J. Food. Technol., 61, 627-631.
35. Van Der Sluis A. A., Dekker, M. and Jongen, W. M. F., 1997. Flavonoids as bioactive components in apple products. Cancer Letter. 114, 107-108.
36. Wang, H., Gao, G. and Prior, R. L., 1996. Total antioxidant capacity of fruits. J. Agric. Food. Chem., 44, 701-705.
37. Yeo, I. H., 1992. Studies on the microbial changes of vegetable fermentation broth. M. S. thesis, Yonsei Univ., Seoul.

제 2 절 선인장 발효물이 양식넙치 성장에 미치는 영향

1. 선인장 발효액이 양식넙치 성장에 미치는 영향(I)

가. 서론

최근 넙치(*Paralichthys olivaceus*)양식은 종묘생산과 양식기술의 보편화로 단위면적당 생산량이 증가하고 있고 대부분이 대량 양산체제로 경영되고 있다. 넙치양식에서 사용되는 사료는 생산원가의 40%이상을 차지하고 있어 양식어가에 가장 큰 부담이 되고 있다. 아울러 사료의 질에 따라 영양성의 다양한 질병이 발생하고 있는 실정이다. 따라서 국내외적으로 사료의 효율을 높이고 생산성 향상을 위하여 다시마⁴⁷, 파래^{56,65,18}, 미역^{63,64}, 알로에^{39,3}, 녹차⁵³, 감귤발효액⁶¹ 등 천연식물을 소재로 한 사료첨가제 연구가 수행되어 오고 있다. 또한 최근에는 한방에서 치료제 및 보약재료로 이용되는 여러 식물성 생약제를 양식생물에 직접 투여함으로써 면역능력, 항병력, 성장 및 육질개선 등의 다양한 효과들이 보고되고 있다^{25,31}.

손바닥선인장(*opuntia ficus indica, saboten*)은 제주자생식물로서 소화기능의 향상, 창상치유 효과 및 류마치스관절염의 증상완화 효능이 있는 것으로 알려져 있어 민간 요법에 일부 활용되어 오면서 관상용뿐만 아니라 기능성 식물로 재조명되고 있다⁷. 최근 Paik 등⁵⁴은 선인장열매 분말을 이용하여 항산화작용을 확인하였고 Lee 등⁴²은 선인장에 의한 항궤양 작용을 증명한 바 있다. 그 밖에 항 종양작용⁵⁸, 혈당강하⁵⁹, 바이러스복제 억제효과¹³ 등 다양한 효능이 보고되어 있다. 그러나 민간에서 구전되어 내려오는 선인장의 변비치료, 이뇨효과, 장운동의 활성화 및 식욕증진 등에 대한 연구는 부분적으로 포유류 및 시험관내 연구를 중심으로 진행되었을 뿐 수산양식에 적용한 연구는 국내외적으로 전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 점액질을 갖고 있는 손바닥선인장을 어류에게 간편하게 투여하기 위해 손바닥선인장 열매를 유용미생물로 발효시킨 후 발효액을 넙치 치어를 대상으로 사료에 첨가하여 공급하였을 때 성장에 미치는 영향과 첨가하는 손바닥선인장의 적정 농도에 관하여 넓은 농도 범위에서 조사하였다.

나. 재료 및 방법

1) 실험어 및 사육환경

이 연구에 이용된 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 치어는 전장 8cm내외의 인공종묘로 실험기간은 2001년 2월 부터 2001년 9월까지 총 8개월 동안이었고 실험시작시 실험어의 평균 전장은 8.47 ± 0.55 cm, 체중은 6.59 ± 1.34 g 이었다. 사육수조는 원통형 중앙 배수 장치를 한 원형수조(지름 1.2m×높이 1.0m, polypropylene) 12개를 이용하였고, 각 수조당 넙치 치어 100마리씩 수용, 3반복하였다. 사육 수량은 1.0톤으로 1일 20~25회 환수시켰으며, 충분한 산소 공급을 위하여 air stone을 설치하였다. 실험어의 어체 측정은 한 달 간격으로 전장과 체중을 측정하였으며, 측정 당일 날은 절식시켰다. 체중은 전자저울로 0.01g 까지 측정하였으며, 전장은 1mm까지 측정하였다. 어체 측정 후에는 모든 실험어를 HCL-Oxytetracline 100 ppm으로 1시간동안 약욕하였다.

사육 중 사망한 개체는 매일 수시로 제거하였으며, 매 한달 후 어체 측정시 마다 생존한 개체에 대한 백분율로 생존율을 나타내었다. 증중율(weight gain rate), 일간성장율(daily growth rate), 일간섭이율(daily feeding rate), 사료계수(feed coefficient) 및 비만도(condition factor)를 다음과 같은 공식으로 계산하여 각 실험구간의 값을 비교하였다.

$$\text{weight gain rate} = (\text{FW} - \text{IW}) \times 100 / \text{IW}$$

$$\text{daily growth rate} = \{(\ln \text{FW} - \ln \text{IW}) / t\} \times 100$$

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

$$\text{feed coefficient} = \text{TF} / \text{TWG}$$

$$\text{condition factor} = (\text{BW} / \text{TL}^3) \times 10^3$$

※ BW : body weight, IW : initial weight, FW : final weight,

TF : total feed, TL : total length,

t : rearing time(day), TWG : total weight gain

실험수조의 기초환경은 YSI(YSI556 multiprobe system)를 이용하여 수온, DO(dissolved oxygen), pH, 비중을 측정하였다.

2) 손바닥선인장 발효액 제조

연구에 사용된 손바닥선인장은 일반적으로 시중에서 유통되는 제주산 손바닥선인장의 열매를 이용하였다. 발효미생물로는 한국 EMRO(EM Research Organization)에서 시

판되고 있는 EM(effective microorganisms)을 이용하였으며, 제조방법은 손바닥선인장 열매를 마쇄한 후 물엿(선인장열매의 10%)과 EM(선인장열매의 5%)을 혼합한 다음 2주 동안 혐기배양한 배양액을 여과하여 실험에 이용하였다.

3) 사료공급

손바닥선인장 발효액의 적정 첨가량을 조사하기 위하여 사료량의 1%, 5%, 10%를 첨가한 처리군과, 손바닥선인장 발효액을 첨가하지 않고 사료만을 공급한 것을 대조군으로 하였다. 손바닥선인장 발효액의 첨가방법은 배합사료에 각각의 농도별로 조절한 액즙을 침적하여 흡착시킨 후 일일 2회(오전, 오후) 공급하였다.

4) 통계처리

결과의 통계처리는 ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)로 평균간의 유의성을 통계프로그램 SPSS(SPSS Inc., ver.10.07)를 이용하여 검정하였다.

다. 결과

1) 사육환경

실험기간동안 실험구의 환경요인 중 수온, 비중, DO, pH의 결과는 다음과 같다(Fig.1, 2). 사육수온은 15.2~22.4℃의 범위에서 변화하였으며, 9월말에 가장 높았고, 2월말에 가장 낮아 일반적인 계절변화를 보였다. 비중은 1.0225~1.0260의 범위에서 변화하였으며, 2월말에 가장 높았고, 8월초에 가장 낮았는데 이는 여름철 장마에 기인한 결과로 보인다. 사육수의 DO는 6.22~8.24 mg/ℓ 이었고, pH는 7.59~8.09의 범위에서 변화하였다.

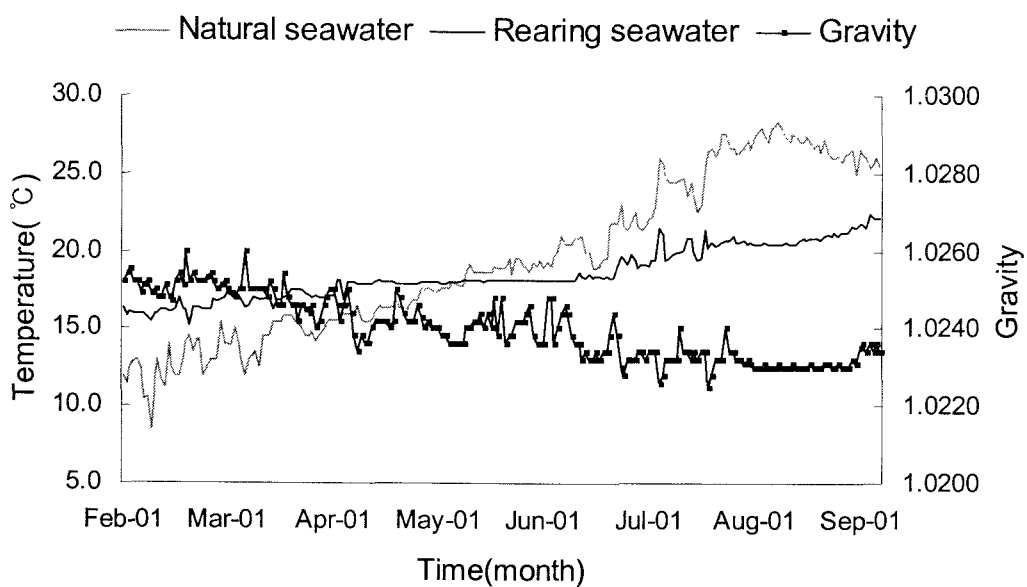


Fig. 1. Changes of water temperature and gravity of sea water in the rearing tank during the study.

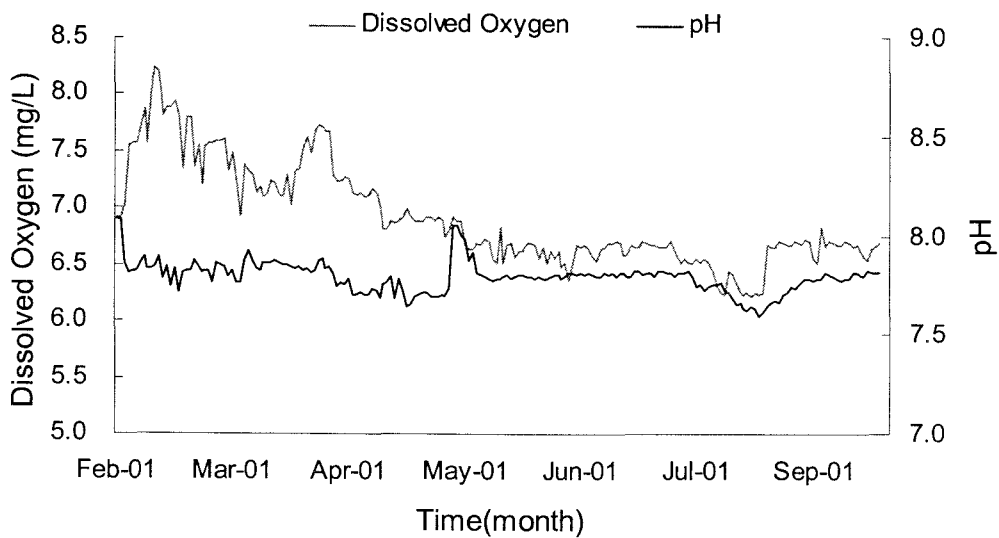


Fig. 2. Changes of dissolved oxygen and pH of sea water in the rearing tank during the study.

2) 성장 및 생존율

대조군과 각 농도별로 손바닥선인장 발효액을 첨가한 실험군에서의 성장을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 실험시작시 평균 전장은 8.47 ± 0.59 cm이었으며, 실험종료시 대조군에서 평균 전장은 29.71 ± 1.62 cm로 성장하였고, 손바닥선인장 발효액 1%, 5%, 10% 처리구에서는 각각 30.73 ± 1.80 cm, 29.75 ± 2.12 cm, 29.61 ± 1.69 cm로 성장하여, 대조구에 비해 손바닥선인장 발효액 1% 처리구에만 유의한 성장차이 ($P < 0.05$)가 있었다.

실험시작시 체중은 6.59 ± 1.40 g이었으며, 실험개시 8개월 후에는 1% 첨가구에서 다른 실험군에 비해 유의한 성장차이 ($P < 0.05$)가 인정되었다. 실험종료시 대조군에서 302.17 ± 57.21 g로 성장하였고, 손바닥선인장 발효액 1%, 5%, 10% 처리구에서 각각 335.68 ± 62.90 g, 302.37 ± 65.91 g, 299.70 ± 56.90 g으로 성장하여, 손바닥선인장 발효액 1% 처리구에서 타 실험군과 비교하여 유의한 성장을 나타냈다.

각 실험구별 최종 생존율(survival rate)은 대조군에서 92.67%이었고, 손바닥선인장 발효액 1%, 5%, 10% 처리군에서 각각 94.67%, 92.00%, 88.00%로 손바닥선인장 발효액 1% 처리군에서 가장 높은 생존율을 보였으나 5%, 10% 처리군에서는 대조군보다 상대적으로 낮은 값을 보이고 있다.

증중율(weight gain(%))은 실험종료시 손바닥선인장 발효액 1% 처리군에서 5009.28%로 가장 체중증가가 많이 되었으며 다음으로는 대조군에서 4492.25%로 나타났고, 5%, 10% 선인장발효액 처리군에서는 각각 4419.73%, 4510.77%로 대조군의 증중량율과 별 차이를 보이지 않았다.

Table 1. Total length, body weight and survival rate of *Paralichthys olivaceus* by fermented cactus at different concentration

Feeding period: Feb. 1, 2001 through Sep. 26, 2001

Group	Initial			Final				Survival rate(%)
	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	W. gain g(%)	
Control	300	8.47 ± 0.15	6.58 ± 0.31	278	29.72 ± 0.30^b	302.17 ± 8.81^b	4492.25	92.67
1 %	300	8.44 ± 0.08	6.57 ± 0.23	284	30.73 ± 0.27^a	335.68 ± 12.65^a	5009.28	94.67
5 %	300	8.51 ± 0.13	6.69 ± 0.29	276	29.75 ± 0.07^b	302.37 ± 8.36^b	4419.73	92.00
10 %	300	8.47 ± 0.06	6.50 ± 0.19	264	29.61 ± 0.43^b	299.70 ± 10.34^b	4510.77	88.00

Values (mean \pm SD of three replication) in the same column not sharing a common superscript are significantly different ($P < 0.05$)

3) 사료계수, 일간섭이율 및 성장률

실험기간동안의 사료계수(feed coefficient), 일간성장율(daily growth rate) 및 일간섭이율(daily feeding rate)에 대한 결과는 Table 2와 같다.

사료계수(feed coefficient)는 손바닥선인장 발효액 1% 처리군에서 0.49 ± 0.02 로 사료계수가 가장 양호하였고, 대조군에서 0.53 ± 0.02 , 5%, 10% 처리군에서 각각 0.54 ± 0.07 , 0.56 ± 0.01 으로 나타났다.

일간성장율(daily growth rate)은 손바닥선인장 발효액 1% 처리군에서 1.66 ± 0.03 으로 대조군의 일간성장율 1.61 ± 0.02 에 비해 유의한 값을 보였으며 5%, 10% 처리군에서는 각각 1.61 ± 0.02 , 1.62 ± 0.03 으로 대조군에 비해 차이를 보이지 않았다.

일간섭이율(daily feeding rate)은 손바닥선인장 발효액 1% 처리군에서 1.46 ± 0.08 로 일간성장율과 마찬가지로 대조구와 5%, 10% 처리구에 비해 유의한 값을 나타내고 있어 사료섭이율면에서는 낮은 값을 보이거나 성장율면에서는 가장 높은 값을 보이고 있어 전반적으로 사료효율면에 있어서는 1% 처리구가 가장 좋은 것으로 나타났다.

Table 2. Feed coefficient, daily feeding rate and daily growth rate of *Paralichthys olivaceus* fed with different levels of fermented cactus

Feeding period: Feb. 1, 2001 through Sep. 26, 2001

Experimental group	Feed coefficient	Daily growth rate (%)	Daily feeding rate (%)
Control	0.53 ± 0.02	1.61 ± 0.02^b	1.65 ± 0.10^a
1 %	0.49 ± 0.02	1.66 ± 0.03^a	1.46 ± 0.08^b
5 %	0.54 ± 0.07	1.61 ± 0.02^b	1.66 ± 0.08^a
10 %	0.56 ± 0.01	1.62 ± 0.03^b	1.73 ± 0.13^a

4) 비만도

손바닥선인장 발효액이 넙치의 비만도에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 모든 실험군에서 비만도는 성장함에 따라 증가되었으며, 실험종료시에 대조구의 비만도는 11.40 ± 0.28 이었고, 손바닥선인장 발효액 1%와 10% 처리군에서 각각 11.47 ± 0.33 , 11.49 ± 0.40 으로 대조구보다 높았다. 5% 처리군에서는 11.35 ± 0.07 으로 대조구보다 낮은 값을 나타냈다.

Table 3. Condition factor of *Paralichthys olivaceus* by fermented cactus at different concentration

Feeding period: Feb. 1, 2001 through Sep. 26, 2001

Experimental period	Concentration of Cactus (%)			
	Control	1%	5%	10%
Initial	10.70±0.06	10.90±0.19	10.72±0.11	10.60±0.14
Final	11.40±0.28	11.47±0.33	11.35±0.07	11.49±0.40

라. 고찰

양어사료에 식물자원의 유용물질을 첨가하여 사료의 질적 향상을 꾀하고자 하는 연구가 최근 수행되어 오고 있다. 본 실험에서는 손바닥선인장 발효액 첨가는 넙치의 성장과 사료효율성에 유의적인 효과가 있는 것으로 나타났고 적정 첨가농도는 1.0%였다. 김 등³은 넙치 치어를 대상으로 사료내 알로에 분말을 첨가함으로써 성장에 효과를 가져온다고 보고하였으며 이때의 적정 첨가농도는 약 0.5% 수준이었다. 또한 송 등⁶¹에 의하면 넙치에 감귤발효액(Fermented Orange)을 사료량의 0.1~0.2% 첨가하였을 때 약 16주 후에는 대조군에 비해 유의한 성장차이를 보였다. 황 등²⁵은 나일틸라피아 (*Oreochromis niloticus*)를 대상으로 12주간 생약제인 인삼, 하수오, 구기자, 오미자 등을 사료량대비 2~3%로 첨가하여 급이하였을 때 구기자 3% 첨가군에서만 대조군에 비해 유의적인 성장차이를 나타냈다. 그러나 오미자 2% 첨가군에서는 대조군에 비해 오히려 낮은 수치를 나타내어 생약제별 첨가농도에 따라서는 성장에 오히려 저해되는 경향을 보였다. 본 실험에서도 손바닥선인장 발효액 5%와 10% 첨가군에서는 대조군에 비해 오히려 성장이 더디게 나타나 과도한 첨가는 오히려 체중의 감소를 초래하고 있다. 이러한 원인은 손바닥선인장의 특정 성분뿐만 아니라 발효에 따른 미생물에 의한 영향으로 생각되며 이 부분에 대한 보다 자세한 연구가 수행될 필요가 있다고 본다.

해조류 첨가물 연구 결과에 있어서는 이스라엘 잉어를 대상으로 한 파래첨가사료³⁶와 조피볼락에 적용한 미역첨가사료⁶⁵의 효과적인 첨가농도는 5%로 다소 높은 첨가농도에서 성장에 효과를 보이는 것으로 보고하고 있으며, 해조류인 경우는 성장보다는 생리활성에 보다 효과를 두고 있다. 이렇듯 성장과 사료효율성은 어종, 일령, 혼합정도 및 투여기간 등에 따라 차이가 있으며^{65, 46} 특히 생약제인 경우는 장기간 투여가 효과적이다²⁵.

본 실험에서의 최종 생존율(survival rate)은 크게 차이는 없었으나 손바닥선인장 발효액 1% 첨가군에서 가장 높게 나타났고, 5%, 10% 첨가군에서는 대조군에 비해 오

히려 낮게 나타났다. 이는 손바닥선인장 발효액 5% 와 10% 첨가군에서가 실험과정에서 폐사율이 높았던 결과로 해석된다.

사료계수, 일간섭이율 및 성장률등 사료효율성 면에서도 손바닥선인장 발효액 1%첨가농도군에서 가장 효과가 좋게 나타났다. 본 실험에서의 사료계수는 1미만의 값을 보인데 반해 김 등³⁸은 한방사료 첨가제인 어보산의 사료계수를 1이상으로 보고하고 있다. 이는 실험사료로 제공된 사료의 성분조성차이와 실험시기의 차이로 생각된다.

비만도의 경우 손바닥선인장 발효액 1% 첨가군에서 비교적 높게 나타났으나 실험군간에 큰 차이는 보이지 않았다. 이는 식물첨가사료를 먹인 양식어류의 비만도는 비첨가어류의 비만도와 비교하여 큰 차이가 없거나 오히려 떨어진다는 여러 연구결과와도 일치하고 있다^{45,46,48,49}. 그러나 비만도의 증가는 어체의 지질대사와 깊은 관계가 있을 것으로 추정되므로³⁸ 앞으로 어종과 첨가제간의 지질대사 등의 상호작용에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 판단된다.

이상의 결과 사료첨가제로서의 육상식물자원인 손바닥선인장 발효액은 넙치의 성장 및 사료효율에 효과적인 영향을 나타내어 실제 양식에 이용할 수 있으리라 기대되며 본 연구결과 최적 첨가농도는 1% 로 나타났으나 향후 이 농도를 전후해서 더욱 세분하여 조사할 필요가 있다고 보아진다.

2. 선인장 발효액이 양식넙치 성장에 미치는 영향(II)

가. 서론

본 연구는 점액질을 갖고 있는 손바닥선인장을 어류에게 간편하게 투여하기 위해 손바닥선인장 열매를 유용미생물로 발효시킨 후 유용성분들을 분석하였다. 그리고 발효액을 넙치 치어를 대상으로 사료에 첨가하여 공급하였을 때 넙치 성장에 미치는 최적 농도를 조사하고 또한 발효효과를 알아보기 위하여 발효액과 선인장 원액과의 차이에 대하여 조사하였다.

나. 재료 및 방법

1) 실험어 및 사육환경

이 연구에 이용된 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 치어는 전장 8cm급의 인공종묘로 실험기간은 2001년 10월 25일부터 2002년 2월 7일까지 총 13주 동안이었고 실험시작 시 실험어의 평균 전장은 8.58 ± 0.23 cm, 체중은 5.07 ± 0.72 g 이었다. 사육수조는 원통형 중앙 배수 장치를 한 원형수조(지름 1.2m×높이 1.0m, polypropylene) 15개를 이용하였고, 각 수조당 넙치 치어 200마리씩 수용, 3반복하였다. 사육 수량은 1.0톤으로 1일 10~15회 환수시켰으며, 충분한 산소 공급을 위하여 air stone을 설치하였다. 실험어의 어체 측정은 한달 간격으로 전장과 체중을 측정하였으며, 측정 당일 낚은 절식시켰다. 체중은 전자저울로 0.01g 까지 측정하였으며, 전장은 1mm까지 측정하였다. 어체 측정 후에는 모든 실험어를 HCL-Oxytetracline 100 ppm으로 1시간동안 약욕하였다. 사육 중 사망한 개체는 매일 수시로 제거하였으며, 매 한달 후 어체 측정시 마다 생존한 개체에 대한 백분율로 생존율을 나타내었다. 증중율(weight gain rate), 일간성장율(daily growth rate), 일간섭이율(daily feeding rate), 사료계수(feed coefficient) 및 비만도(condition factor)를 다음과 같은 공식으로 계산하여 각 실험구간의 값을 비교하였다.

$$\text{weight gain rate} = (\text{FW} - \text{IW}) \times 100 / \text{IW}$$

$$\text{daily growth rate} = \{(\ln \text{FW} - \ln \text{IW}) / t\} \times 100$$

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

$$\text{feed coefficient} = \text{TF} / \text{TWG}$$

condition factor = (BW/TL³) × 103

※ BW : body weight, IW : initial weight, FW : final weight,
TF : total feed, TL : total length, t : rearing time(day),
TWG : total weight gain

실험수조의 기초환경은 YSI(YSI556 multiprobe system)를 이용하여 수온, DO(dissolved oxygen), pH, 비중을 측정하였다.

2) 손바닥선인장 발효액 제조 및 성분분석

이 연구에 사용된 손바닥선인장은 일반적으로 시중에서 유통되는 제주산 손바닥선인장의 열매를 이용하였다. 발효미생물로는 한국 EMRO(EM Research Organization)에서 시판되고 있는 EM(effective microorganisms)을 이용하였으며, 제조방법은 손바닥선인장 열매를 마쇄한 후 물엿(선인장열매의 10%)과 EM(선인장열매의 5%)을 혼합하였다. 그 후 2주간 혐기 배양한 후 배양액을 여과하여 실험에 이용하였다. 이 실험에 이용된 손바닥선인장 발효액의 일반성분, 유리 아미노산, 지방산, 비타민 C, 비타민 E, 그리고 면역계에 작용하는 카로티노이드, 베타글루칸, 프라보노이드 성분들을 조사하였다 (Table 1, 2, 3, 4).

3) 사료공급 및 성분분석

실험에 사용한 배합사료는 일본산 고압팽창사료(extruded pellet, EP)였으며, 일반성분을 포함한 사료 성분표는 Table 1, 2, 3과 같다. 손바닥선인장 발효액의 적정 첨가량을 조사하기 위하여 사료량의 0.2%, 0.5%, 1%를 첨가한 처리군과, 손바닥선인장 발효액을 첨가하지 않고 사료만을 공급한 것을 대조군으로 하였다. 또한 성장에 미치는 손바닥선인장의 발효효과를 비교하기 위하여 발효하지 않은 손바닥선인장 1% 첨가군을 설정하였다. 손바닥선인장 발효액의 첨가방법은 배합사료에 각각의 농도별로 조절된 액즙을 침적하여 흡착시킨 후 2회(오전, 오후)/day 반복, 공급하였다.

4) 통계처리

결과의 통계처리는 ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)로 평균간의 유의성을 통계프로그램 SPSS(SPSS Inc., ver.10.07)를 이용하여 검정하였다.

Table 1. A component analysis of feed, cactus and fermented cactus solution.

Analysis list	Analysis results		
	Feed	Cactus	Fermented cactus
Moisture	3.36 %	83.53 %	85.59 %
Crude protein	52.00 %	1.08 %	1.08 %
Crude lipid	12.62 %	0.54 %	0.60 %
Crude fiber	1.86 %	2.51 %	0.67 %
Crude ash	12.00 %	1.28 %	1.34 %
Ca	2.56 %	0.24 %	0.12 ppm
P	1.90 %	244.89 ppm	156.63 ppm
Vitamin C	61.05 ppm	93.36 ppm	9.17 ppm
Vitamin E (α -Tocopherol)	617.69 ppm	9.28 ppm	5.89 ppm

Table 2. A amino acid analysis of feed, cactus and fermented cactus solution.

Analysis list	Analysis results (ppm)		
	Feed	Cactus	Fermented cactus
Aspartic acid	4.84	763.35(ppm)	1,280.66(ppm)
Threonine	2.27	307.02	306.81
Serine	2.18	405.41	368.94
Glutamic acid	8.16	1746.32	1328.05
Proline	2.53	707.54	550.40
Glycine	3.46	645.17	508.11
Alanine	3.48	450.73	450.53
Valine	2.59	341.95	348.21
Isoleucine	2.19	270.25	271.24
Leucine	4.07	569.49	534.39
Tyrosine	1.74	425.89	302.00
Phenylalanine	2.27	351.14	339.57
Histidine	1.89	346.93	288.85
Lysine	4.22	356.15	433.38
Arginine	2.97	881.68	629.42
Cystine	0.48	175.54	132.79
Methionine	1.26	129.22	73.57
Tryptophan	0.48	110.27	108.22

Table 3. A fatty acid analysis of feed, pre-fermented and post-fermented cactus solution.

Analysis list	Analysis results (g/100g)		
	Feed	Cactus	Fermented cactus
Myristic acid C _{14:0}	6.43	1.09(g/100g)	0.11(g/100g)
Pentadecanoic acid C _{15:0}	0.47	0.32	
Palmitic acid C _{16:0}	19.63	27.09	11.43
Palmitoleic acid C _{16:1}	6.76	0.59	0.52
Tridecanoic acid C _{13:0}		0.84	
Magaric acid C _{17:0}	0.77	0.63	
Magaoleic acid C _{17:0}		0.34	11.57
Stearic acid C _{18:0}	3.92	3.13	4.66
Oleic acid C _{18:1}	16.52	11.47	11.57
Linoleic acid C _{18:2n6}	3.51	25.75	67.97
Linolenic acid C _{18:4n3}	0.76	14.47	1.22
Stearidonic acid C _{18:4n3}	2.06		
Arachidic acid C _{20:0}	0.35	1.05	0.48
Eicosenoic acid C _{20:1}	3.52	0.58	0.40
Arachidonic acid C _{20:4n6}	1.02	1.02	
EPA C _{20:5n3}	12.59		0.27
Behenic acid C _{22:0}	3.72	2.26	
Docosatetraenoic acid C _{22:4n6}	0.23	2.56	
DPA C _{22:5n3}	1.56		0.21
DHA C _{22:6n3}	12.59	3.92	0.08
Unknown	3.59	0.36	0.75
Capric acid C _{10:0}		0.30	
Nonadecanoic acid C _{19:0}		0.06	
Lauric acid C _{12:0}		0.76	0.05
Eicosatrienoic acid C _{20:3n6}		0.33	0.13
Erucic acid C _{22:1}		0.79	0.15

Table 4. A immune-component analysis of cactus and fermented cactus solution.

Analysis list	Analysis results	
	Cactus	Fermented cactus
Carotenoid	2.84mg %	1.06mg %
β-Glucan	0.42 %	0.45 %
Flavonoid	163.72ppm	95.33ppm

다. 결과

1) 사육환경

실험기간 동안 실험구의 환경요인중 수온, 비중, DO, pH 의 결과는 다음과 같다 (Fig.1,2). 사육 수온은 17.2~20.8℃의 범위에서 변화하였으며, 실험 개시시기인 10월에 가장 높았고, 2월에 가장 낮아 일반적인 계절변화를 보였다. 비중은 1.0230~1.0250의 범위에서 변화하였으며, 10월에 가장 낮았고, 2월에 가장 높았는데 이는 여름철 강우에 의한 저비중에서 겨울철로 감에 따라 고비중으로 옮겨가는 일반적인 해수의 성질을 띄고 있다. 사육수의 DO는 6.72~7.32 mg/l 였고, pH는 7.30~8.09의 범위에서 변화하였다.

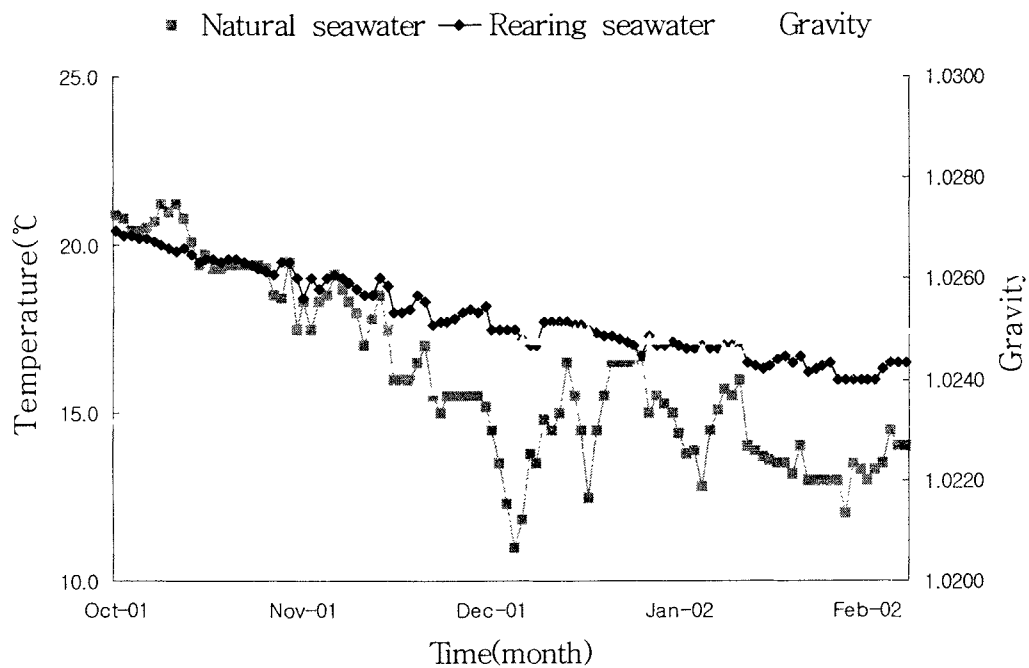


Fig. 1. Changes of water temperature and gravity of sea water in the rearing tank during the study.

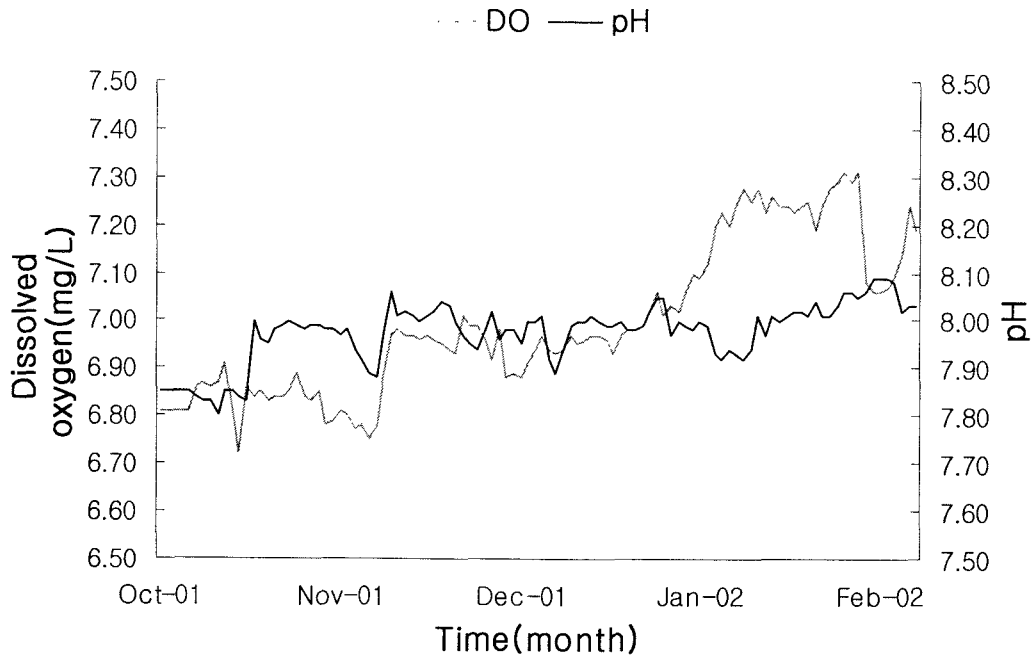


Fig. 2. Changes of dissolved oxygen and pH of sea water in the rearing tank during the study.

2) 성장 및 생존율

대조군과 각 농도별로 손바닥선인장 발효액을 첨가한 실험군에서의 성장을 조사한 결과는 Table 5와 같다. 실험 시작시 평균 전장은 8.58 ± 0.23 cm이었으며, 실험 종료시 대조군에서 평균 전장은 19.67 ± 0.19 cm로 성장하였고, 손바닥선인장 발효액 0.2%, 0.5%, 1% 처리군에서 각각 19.89 ± 0.37 , 20.04 ± 0.14 , 20.13 ± 0.44 cm로 성장하여, 대조군에 비해 손바닥선인장 발효액 1% 처리구에만 유의한 성장 차이가 있었다($P < 0.05$). 반면, 발효하지 않은 손바닥선인장 1% 첨가군(Cactus 1%)은 19.39 ± 0.42 cm로 대조군에 비해 오히려 성장이 낮은 것으로 나타났으며 발효액 1%와는 대조적인 값을 나타냈다.

실험 시작시 체중은 5.07 ± 0.72 g이었으며, 실험종료시에는 1% 첨가군에서 다른 실험군에 비해 유의한 성장차이가 인정되었다($P < 0.05$). 그 외 발효액 0.2%, 0.5% 처리군에서 각각 92.40 ± 4.44 , 93.32 ± 4.38 g으로 성장하여 대조군의 87.15 ± 0.98 g에 비해 발효액 첨가군 모두에서 성장이 빨랐다. 그러나 발효하지 않은 1% 첨가군(Cactus 1%)에서는 대조군에 비해 어체중면에서도 상대적으로 낮은 값을 나타내고 있었다.

각 실험구별 최종 생존율(survival rate)은 대조군에서 90.0%이었고, 손바닥선인장

발효액 0.2%, 0.5%, 1% 첨가군에서 각각 93.33%, 93.33%, 82.33%를 나타냈으며, 발효하지 않은 1% 첨가군(Cactus 1%)은 89.50%로 나타났다.

증중율은(weight gain rate)은 실험 종료시 손바닥선인장 발효액 0.2%, 0.5%와 1.0% 첨가군 모두에서 대조구에 비해 증체가 많이 되었으며, 발효하지 않은 1% 첨가군(Cactus 1%)에서는 대조구에 비해 가장 낮은 값인 1475.87%를 보였다.

Table 5. Total length, body weight and survival rate of *Paralichthys olivaceus* by fermented cactus at different concentration

Feeding period: Oct. 25, 2001 through Feb. 7, 2002

Group	Initial			Final				Survival rate(%)
	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	W. gain g(%)	
Control	600	8.72±0.19	5.28±0.27	540	19.67±0.19 ^{ab}	87.15±0.98 ^{ab}	1550.57	90.00
Cactus1%	600	8.69±0.10	5.38±0.54	537	19.39±0.42 ^a	84.78±5.68 ^a	1475.84	89.50
0.2%	600	8.58±0.05	5.01±0.17	560	19.89±0.37 ^{ab}	92.40±4.44 ^{bc}	1744.31	93.33
0.5%	600	8.43±0.14	4.72±0.21	560	20.04±0.14 ^{ab}	93.32±4.38 ^{bc}	1877.11	93.33
1%	600	8.49±0.25	4.96±0.63	494	20.13±0.44 ^b	94.95±2.13 ^c	1814.31	82.33

Values (mean±SD of three replication) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05)

Cactus 1% ; not fermented cactus fruit concentration

3) 사료계수, 일간섭이율 및 성장률

실험기간동안의 사료계수(feed coefficient), 일간성장율(daily growth rate) 및 일간섭이율(daily feeding rate)에 대한 결과는 Table 6과 같다.

사료계수(feed coefficient)는 대조군의 0.62±0.04에 비해 모든 첨가군에서 낮은 값을 보였고 이 중 1% 첨가군에서 0.53±0.27로 가장 양호하였다. 그 외 0.2%, 0.5%, 발효하지 않은 1% 첨가군(Cactus 1%) 순으로 나타났다.

일간성장율(daily growth rate)은 손바닥선인장 발효액 0.5%, 1%, 0.2%, 대조군순으로 나타났으며, 이 중 1% 첨가군과 발효하지 않은 선인장원액 1%(Cactus 1%)에 비해 유의하게 차이를 보여 급격한 대조를 보이고 있었다.

일간섭이율(daily feeding rate)은 손바닥선인장 발효액 0.2%와 0.5%에서 가장 양호하였고 발효하지 않은 1% 첨가군(Cactus 1%)에서가 가장 저조한 것으로 나타났다.

Table 6. Feed coefficient, daily feeding rate and daily growth rate of *Paralichthys olivaceus* fed with different levels of fermented Cactus

Feeding period: Oct. 25, 2001 through Feb. 7, 2002

Experimental group	Feed coefficient	Daily growth rate (%)	Daily feeding rate (%)
Control	0.62±0.04	2.67±0.05 ^{ab}	1.20±0.06
Cactus1%	0.59±0.02	2.63±0.13 ^a	1.28±0.08
0.2%	0.52±0.07	2.78±0.05 ^{ab}	1.14±0.06
0.5%	0.55±0.07	2.84±0.09 ^b	1.14±0.06
1%	0.53±0.27	2.81±0.10 ^b	1.23±0.27

Values (mean±SD of three replication) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05)

Cactus 1% : not fermented cactus fruit concentration

4) 비만도

손바닥선인장 발효액이 넙치의 비만도에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 7과 같다. 모든 실험군에서 비만도는 성장함에 따라 증가되었으며, 실험 종료 시에는 대조군의 비만도는 11.42±0.35, 손바닥선인장 발효액 0.2%, 0.5%, 1% 처리군에서 각각 11.72±0.32, 11.54±0.31로 대조군보다 높았다. 발효하지 않은 1% 첨가군(Cactus 1%)에서도 11.61±0.10으로 대조군보다 높은 값을 나타냈다.

Table 7. Effect of different concentrations of dietary fermented Cactus on condition factor (CF) of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Feeding period: Oct. 25, 2001 through Feb. 7, 2002

	Concentration of Cactus (%)				
	Control	Cactus1%	0.2%	0.5%	1%
Initial	7.90±0.44	8.12±0.68	7.88±0.33	7.78±0.05	7.96±0.28
Final	11.42±0.35	11.61±0.10	11.72±0.32	11.54±0.31	11.66±0.61

라. 고찰

미생물을 이용하여 혐기 배양시켜 만든 제주도 자생식물인 손바닥선인장 발효액을

사용하여 넙치양식에 있어 생산성을 증가시키기 위한 본 연구목적에서 사료에 손바닥 선인장 발효액을 첨가한 경우 넙치의 성장, 생존율, 사료효율 및 비만도에 효과가 큰 것으로 나타났으며 적정 첨가농도는 0.2%에서 1.0%미만의 수준이나 사료효율성등을 감안 할 때 권장 첨가농도는 1%에서가 바람직하다고 판단된다. 선인장과(科)에 속하는 다육식물인 알로에를 대상으로 한 연구에서 Kim 등^{4,39}은 알로에 분말을 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 치어와 조피볼락(*Sebastes schlegelii*) 치어를 대상으로 사료내에 약 0.5%수준으로 첨가할 때 성장효과와 비특이적 면역능(nonspecific immune responses), 그리고 병원성세균인 *Edwardsiella tarda* 와 *Vibrio alginolyticus* 에 저항성효과를 가져온다고 보고하였다. 황 등²⁵은 나일틸라피아(Nile-tilapia) 치어에 구기자 열매분말을 사료내 3%수준으로 첨가시 실험 12주후에 유의적인 성장효과를 보였다. 이들은 분말상태에서의 첨가농도로서 수분을 함유한 액상상태인 경우로 하였을 때는 본 연구의 적정 첨가농도보다도 훨씬 높을 것으로 생각된다. 미생물발효를 이용한 감귤발효액(Fermented Orange)을 넙치 치어에게 공급시 약 16 주후에는 무첨가군에 비해 유의한 성장차를 보였으며 이때의 첨가농도는 0.2%였다⁶¹. 이렇듯 어류성장과 사료효율성은 어종, 일령, 혼합정도 및 투여기간 등에 따라 차이가 있으며^{46,65} 특히 생약제인 경우는 장기간 투여가 효과적²⁵으로 본 천연식물인 손바닥선인장 발효액도 장기간 투여시 보다 효과가 크리라고 생각된다.

손바닥선인장 발효액의 일반성분분석결과(Table 1) 수분, 조지방, 조회분은 발효전에 비해 발효후가 다소 상승하였다. 조단백은 변화가 없었으며 조섬유는 2.51%에서 0.67%로 4배가까이 크게 감소하였다. 그 외 칼슘과 인 그리고 비타민 C와 E값도 발효과정을 통해 감소하였다. 아미노산의 경우는(Table 2) Aspartic acid, Valine, Isoleucine, Lysine등이 발효후 증가된 수치를 보였는데 특히 Aspartic acid가 급증하였다. 지방산의 변화를 보면(Table 3) 25개 분석된 항목중 Myristic acid, Magaoleic acid, Stearic acid, Oleic acid, Linoleic acid, EPA, DPA등이 발효후 증가된 값을 보였으며 이중 손바닥선인장 열매에서는 분석되지 않았던 EPA와 DPA성분이 검출되었다. 이들 결과들을 종합하여 볼 때 미생물을 이용한 발효과정에서 손바닥선인장 고유의 유용성분들의 변화가 일어났으며 특히 손바닥선인장을 양식현장에서 이용하기 어렵게 만드는 원인이었던 식이섬유의 감소는 발효과정에서 고분자상태의 물질이 미생물에 의해 저분자상태로 되어지는 결과로 생각된다. 어류에 있어서 섭취촉진물질들은 분자량이 1,000미만인 수용성 물질로서 이온 흡착기능을 가진 성분으로 알려져 있으며¹⁶, 대부분 아미노산, 핵산관련 화합물, 유기산 및 당류등이 이에 속한다. 따라서 본 실험에서 나타난 손바닥선인장 열매를 발효시키지 않은 1% 첨가군과 발효한 1% 첨가군의 결과가 서로 상이한 차이를 보여 발효하지 않은 1% 첨가군은 오히려 대조군에 비해 성

장이 더디게 나타나고 있는 것과 연관지어 볼 때 넙치의 성장을 촉진시키는 요인으로 발효과정을 통한 저분자의 수용성 물질들이 작용하고 있다고 생각된다. 이러한 사료섭취촉진물질로써 여러 저분자의 아미노산들이 효과를 보이는데 어종과 아미노산의 종류에 따라 서로 다르게 작용한다^{19, 21, 29, 33}. 따라서 이번 실험과정을 통해 나타난 넙치성장 과 아미노산 종류와의 관계는 앞으로 보다 자세한 연구를 통해 밝힐 필요가 있다.

최근에는 질병예방 및 사료의 질적향상을 피하기 위하여 사료 내에 tert-butylhydroxytoluene (BHT)와 같은 합성 항산화제나 glutathione, vitamin E와 같은 일부 천연 항산화제를 첨가하기도 한다¹⁷. 그러나 이들 항산화제는 독성, 저활성 및 용도의 한계성 등의 여러 가지 문제로 인하여 사용에 제한을 받고 있어 안전하면서도 강한 항산화 활성물질을 천연물 또는 미생물 대사산물로부터 탐색하는 연구가 활발히 수행되고 있다². 손바닥선인장은 제주도 자생식물로 김 등³⁴은 손바닥선인장 열매에서 뛰어난 항산화 효과를 밝히고 있다. 손바닥선인장 발효액의 성분분석결과 항산화물질인 비타민 C, E, 프라보노이드성분들이 검출되었고 비특이적 면역계에 작용하는 것으로 알려진 베타글루칸, 카로티노이드등 여러 성분들이 검출되었다. 따라서 손바닥선인장은 천연 항산화제로 어류에서도 좋은 효과를 나타내리라 여겨진다. 또한 어류성장과 사료효율을 높일 수 있는 사료첨가제로서 활용가치가 높은 소재라고 생각되며 넙치 성장에 효과적인 첨가농도는 1%가 적정하리라고 보여진다.

3. 선인장 발효분말이 양식넙치 성장에 미치는 영향

가. 서론

본 연구는 점액질을 갖고 있는 손바닥선인장을 어류에게 간편하게 투여하기 위해 손바닥선인장 열매에서 분리, 배양한 유산균으로 손바닥선인장 열매를 발효시킨 후 동결 건조시켜 분말화 하였다. 양식현장에서는 종묘입식 후 한두달을 제외하고는 생사료를 주사료로 하여 MP(Moist Pellet)형태로 사료공급이 이루어지기 때문에 양식현장에서 용이하게 사용되도록 분말화하였다. 그리고 분말화한 발효분말을 넙치를 대상으로 사료에 첨가하여 공급하였을 때 넙치성장에 미치는 영향과 발효분말의 최적 농도를 조사하였다.

나. 재료 및 방법

1) 실험어 및 사육환경

이 연구에 이용된 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 전장 32cm급, 전장 400g전후로 민간양식장으로부터 구입하여 출하시점이 되는 1kg정도가 될 때까지를 기준으로 실험어로 사용하였다. 실험은 2003년 5월 27일부터 2004년 1월 28일까지 약 8개월간에 걸쳐 이루어졌다. 사육수조는 원통형 중앙 배수 장치를 한 원형수조(지름 1.2m×높이 1.0m, polypropylene) 15개를 이용하였고, 각 수조당 넙치 20마리씩 수용, 3반복하였다. 사육 수량은 1.0톤으로 1일 20~25회 환수시켰으며, 충분한 산소 공급을 위하여 air stone을 설치하였다. 실험어의 어체 측정은 한달 간격으로 전장과 체중을 측정하였으며, 측정 당일 날은 절식시켰다. 체중은 전자저울로 0.01g 까지 측정하였으며, 전장은 1mm까지 측정하였다. 어체 측정 후에는 모든 실험어를 HCL-Oxytetracline 100 ppm으로 1시간동안 약욕하였다. 사육 중 사망한 개체는 매일 수시로 제거하였으며, 매한달 후 어체 측정시 마다 생존한 개체에 대한 백분율로 생존율을 나타내었다. 증중율(weight gain rate), 일간성장율(daily growth rate), 일간섭이율(daily feeding rate), 사료계수(feed coefficient) 및 비만도(condition factor)를 다음과 같은 공식으로 계산하여 각 실험구간의 값을 비교하였다.

$$\text{weight gain rate} = (\text{FW} - \text{IW}) \times 100 / \text{IW}$$

$$\text{daily growth rate} = \{(\ln \text{FW} - \ln \text{IW}) / t\} \times 100$$

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

feed coefficient = TF / TWG

condition factor = $(BW / TL^3) \times 103$

※ BW : body weight, IW : initial weight, FW : final weight,

TF : total feed, TL : total length, t : rearing time(day),

TWG : total weight gain

실험수조의 기초환경은 YSI(YSI556 multiprobe system)를 이용하여 수온, DO(dissolved oxygen), pH, 비중을 측정하였다.

2) 손바닥선인장 발효분말 제조 및 성분분석

이 연구에 사용된 손바닥선인장은 일반적으로 시중에서 유통되는 제주산 손바닥 선인장의 열매를 이용하였다. 선인장 열매 착즙액을 발효전에 pH 6.6으로 보정하여 열매에서 분리, 배양한 유산균을 접종한 후 3~4일간 발효를 진행시켰다. 발효액에 엿당을 10% 농도가 되게 넣은 후 균질화하였다. 발효액에 동결보호제로 Skim Milk를 10%농도로 첨가한 다음 혼합하여 균질화 한 후 -70℃ 로 3일간 동결시킨 다음 동결건조기에서 건조하였다. 건조된 시료는 분쇄하여 분말화 하였다. 그리고 발효분말의 일반성분, 유리 아미노산, 지방산, 비타민 C, 비타민 E, 그리고 면역계에 작용하는 카로티노이드, 베타글루칸, 프라보노이드 성분들을 조사하였다(Table 1, 2, 3, 4).

3) 사료공급 및 성분분석

실험에 사용한 MP(Moists Pellet)사료는 국산 전갱이와 일반 배합사료를 9대 1로 섞어 만들었으며 일반 사료 성분표는 Table 5와 같다. 그리고 실험종료시에 실험어에 대한 일반 성분들을 분석하였다. 손바닥선인장 발효분말의 적정 첨가량을 조사하기 위하여 실험사료중에 선인장발효분말을 0.02%, 0.04%, 0.08%, 0.16%로 세분화하여 첨가한 처리군과, 손바닥선인장 발효분말을 첨가하지 않고 사료만을 공급한 것을 대조군으로 하였다. 실험은 1일 2회(오전, 오후) 반복, 공급하였다.

4) 통계처리

결과의 통계처리는 ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)로 평균간의 유의성을 통계프로그램 SPSS(SPSS Inc., ver.10.07)를 이용하여 검정하였다.

Table 1. A component analysis of fermented cactus powder.

Analysis list	Analysis results
Moisture	14.02 %
Crude protein	6.02 %
Crude lipid	1.32 %
Crude fiber	7.61%
Crude ash	10.85 %
Ca	1.85 %
P	0.02 %
Vitamin C	22.34 ppm
Vitamin E (α -Tocopherol)	101.11 ppm

Table 2. A amino acid analysis of fermented cactus powder.

Analysis list	Analysis results (g/100g)
Aspartic acid	0.40
Threonine	0.17
Serine	0.18
Glutamic acid	0.63
Proline	0.42
Glycine	0.30
Alanine	0.28
Valine	0.21
Isoleucine	0.12
Leucine	0.22
Tyrosine	0.18
Phenylalanine	0.14
Histidine	0.21
Lysine	0.17
Arginine	0.21
Cystine	0.15
Methionine	0.06
Tryptophan	0.04

Table 3. A fatty acid analysis of fermented cactus powder.

Analysis list	Analysis results (g/100g)
Myristic acid C _{14:0}	1.90
Myristoleic acid C _{14:1}	0.86
Palmitic acid C _{16:0}	17.89
Palmitoleic acid C _{16:1}	2.35
Stearic acid C _{18:0}	3.63
Oleic acid C _{18:1}	13.43
Linoleic acid C _{18:2n6}	49.47
Linolenic acid C _{18:4n3}	7.02
Lauric acid C _{12:0}	0.69
Arachidic acid C _{20:0}	0.65
Eicosenoic acid C _{20:1}	0.46
Behenic acid C _{22:0}	0.71
DPA C _{22:5n3}	0.93
Unknown	0.01

Table 4. A immune-component analysis of cactus and fermented cactus solution.

Analysis list	Analysis results
Carotenoid	17.89ppm
Flavonoid	712.80ppm

Table 5. Feed Composition in this study.

	Water	Crude Ash	Crude Protein	Crude Fat
Feed(M, P)	74.09±0.35%	4.37±0.80%	15.96±0.17%	4.22±0.03%

다. 결과

1) 사육환경

실험기간 동안 실험구의 환경요인중 수온, DO, pH 의 결과는 다음과 같다(Fig.1,2). 사육 수온은 18.2~22.8℃의 범위에서 변화하였으며, 지하해수와 자연해수를 혼합하여 사육수로 사용하였다. 사육수의 DO는 4.62~9.42 mg/ℓ였고, pH는 7.20~8.62의 범위에서 변화하였다.

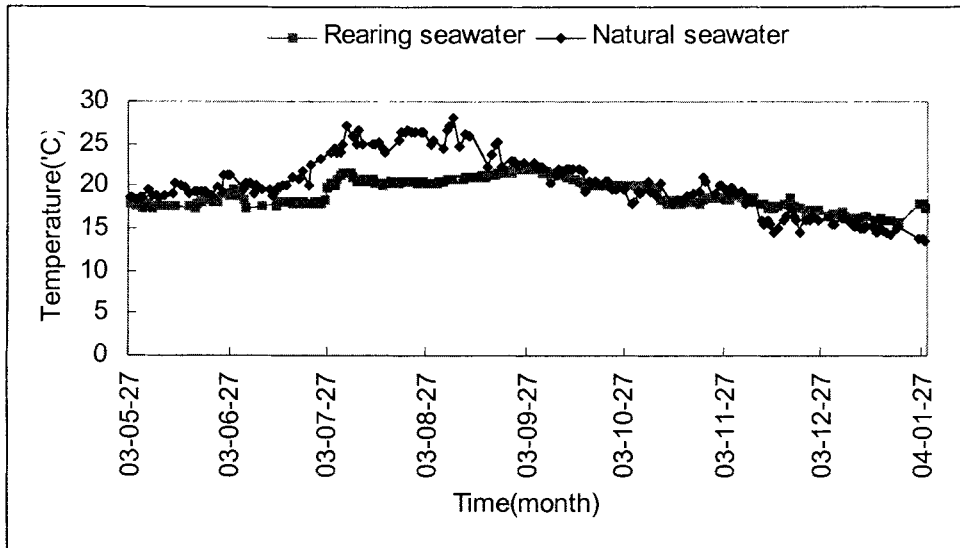


Fig. 1. Changes of water temperature and gravity of sea water in the rearing tank during the study.

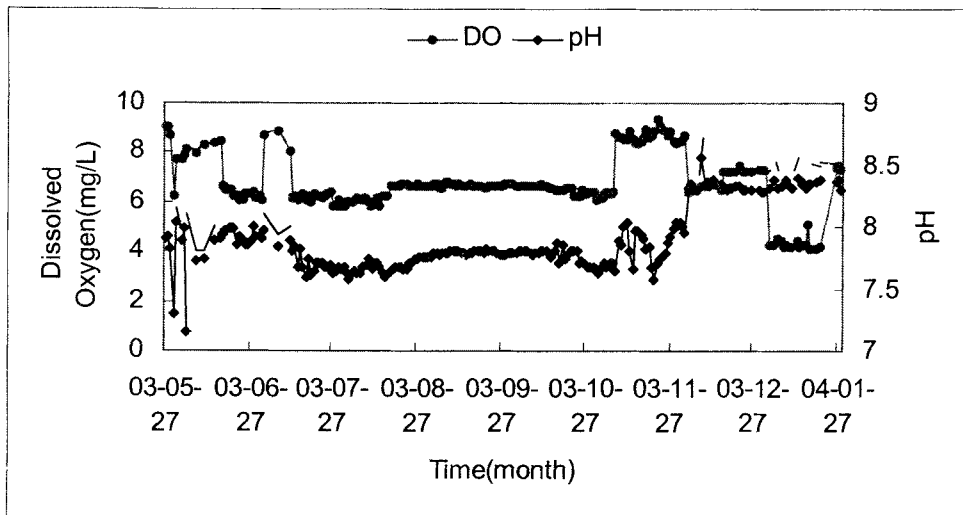


Fig. 2. Changes of dissolved oxygen and pH of sea water in the rearing tank during the study.

2) 성장 및 생존율

대조군과 각 농도별로 손바닥선인장 발효분말을 첨가한 실험군에서의 성장을 조사한 결과는 Table 6과 같다.

실험 종료시 대조군에서 평균 전장은 40.42 ± 0.85 cm로 성장한 반면, 손바닥선인장 발효분말 0.02%, 0.04%, 0.08%, 0.16% 처리군에서 각각 40.76 ± 0.86 , 40.77 ± 0.66 , 42.03 ± 0.67 및 40.92 ± 0.87 cm로 성장하였다. 대조군에 비해 손바닥선인장 발효분말 0.08% 처리구에만 유의한 성장 차이가 있었다($P < 0.05$). 체중 역시 실험종료시에 0.08%첨가군에서 다른 실험군에 비해 유의한 성장차이가 인정되었다($P < 0.05$). 0.08% 첨가농도를 중심으로 이하에서는 대조군에 비해 체중은 증가경향을 보였으나 0.08% 이상인 0.16%에서는 0.08%의 값보다 낮은 값을 보였다.

각 실험구별 최종 생존율(survival rate)은 대조군에서 91.67%이었고, 손바닥선인장 발효분말 0.02%, 0.04%, 0.08%, 0.16% 첨가군에서 각각 95.00%, 96.67%, 88.33% 및 98.33%를 나타냈으며, 0.16% 첨가구에서 가장 높은 생존율을 보였다.

증중율은(weight gain rate)은 실험 종료시 손바닥선인장 발효분말 0.02%, 0.04%, 0.08%, 0.16% 첨가군 모두에서 대조군에 비해 증체가 많이 되었으며, 특히 0.08% 첨가군에서 다른 첨가구에 비해 두드러진 값을 보였다.

Table 6. Total length, body weight and survival rate of *Paralichthys olivaceus* by fermented cactus powder at different concentration

Feeding period: May. 27, 2003 through Jan. 28, 2004

Group	Initial			Final				Survival rate(%)
	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	W. gain g(%)	
Control	60	32.40±0.08	394.52±8.03	55	40.42±0.85 ^a	825.62±65.60 ^a	109.27	91.67 ^{ab}
0.02 %	60	32.45±0.35	400.94±10.73	57	40.76±0.86 ^{ab}	843.47±56.68 ^a	110.37	95.00 ^{ab}
0.04 %	60	32.20±0.22	393.76±3.33	58	40.77±0.66 ^{ab}	856.40±52.11 ^a	117.49	96.67 ^{ab}
0.08 %	60	32.07±0.13	391.64±6.46	53	42.03±0.67 ^b	968.60±40.48 ^b	147.32	88.33 ^a
0.16 %	60	32.32±0.21	399.70±11.10	59	40.92±0.87 ^{ab}	857.57±70.35 ^a	114.55	98.33 ^b

Values (mean±SD of three replication) in the same column not sharing a common superscript are significantly different ($P < 0.05$)

3) 사료계수, 일간섭이율 및 성장률

실험기간동안의 사료계수(feed coefficient), 일간성장율(daily growth rate) 및 일간섭이율(daily feeding rate)에 대한 결과는 Table 7과 같다.

사료계수(feed coefficient)는 대조군의 3.86±0.58에 비해 모든 첨가군에서에서 낮은 값을 보였고 이중 0.08%첨가군에서 3.55±0.11으로 가장 양호하였다.

일간성장율(daily growth rate)은 손바닥선인장 발효분말 0.08%에서가 다른 첨가구에 비해 가장 빠른 성장을 보이고 있었으며 일간섭이율(daily feeding rate)은 0.08%에서가 가장 낮은 값을 보여 이 첨가농도에서 가장 사료효율이 좋은 것으로 나타났다.

Table 7. Feed coefficient, daily feeding rate and daily growth rate of *Paralichthys olivaceus* fed with different levels of fermented cactus powder.

Feeding period: May. 27, 2003 through Jan. 28, 2004

Experimental group	Feed coefficient	Daily growth rate (%)	Daily feeding rate (%)
Control	3.86±0.58	0.30±0.03 ^a	2.09±0.18
0.02 %	3.60±0.42	0.30±0.02 ^a	2.01±0.13
0.04 %	3.57±0.33	0.32±0.02 ^a	1.99±0.08
0.08 %	3.55±0.11	0.37±0.02 ^b	1.90±0.07
0.16 %	3.70±0.17	0.31±0.03 ^a	1.97±0.10

4) 비만도

손바닥선인장 발효분말이 넙치의 비만도에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 8과 같다. 모든 실험군에서 비만도는 성장함에 따라 증가되었으며, 실험 종료 시에는 대조군의 비만도는 12.15±0.08였으며, 손바닥선인장 발효분말 0.02%, 0.04%, 0.08% 그리고 0.16% 처리군에서 각각 12.08±0.16, 12.24±0.21, 12.75±0.05, 12.18±0.35로 나타났으며 이중 0.08% 첨가군에서 다른 첨가구에 비해 유의적으로 높은 값을 나타냈다 (P<0.05).

Table 8. Effect of different concentrations of dietary fermented Cactus on condition factor (CF) of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Feeding period: May. 27, 2003 through Jan. 28, 2004

Experimental period	Concentration of Cactus (%)				
	Control	0.02 %	0.04 %	0.08 %	0.16 %
Initial	11.59±0.20	11.74±0.21	11.79±0.13	11.87±0.08	11.85±0.09
Final	12.15±0.08 ^a	12.08±0.16 ^a	12.24±0.21 ^a	12.75±0.05 ^b	12.18±0.35 ^a

5) 일반 어체성분

손바닥선인장 발효분말이 넙치의 체조성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 9와 같다. 수분함유량은 70% 이상이었으며 조단백질, 조회분량은 발효분말 농도와외의 관계에서 별 차이를 보이지 않았으나 조지방면에서는 대조구에 비해 첨가구 모두에서 높게 나타나고 있었으며 그 중 0.08% 첨가구에서 가장 높게 나타났다($P < 0.05$).

Table 9. A component analysis of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed fermented cactus powder.

	Water(%)	Crude Fat(%)	Crude Protein(%)	Crude Ash(%)
Control	75.59±1.02	2.81±1.04 ^a	18.16±0.83	2.12±0.70
0.02 %	74.73±1.15	3.07±0.87 ^a	18.66±0.58	2.23±0.81
0.04 %	76.11±1.67	3.14±0.82 ^a	18.58±1.62	1.85±0.17
0.08 %	73.88±2.58	4.91±1.73 ^b	18.17±0.41	2.18±0.39
0.16%	74.90±0.57	3.92±0.85 ^{ab}	18.66±0.74	2.24±0.56

라. 고찰

제주도 자생식물인 손바닥선인장 열매를 대상으로 열매에서 분리한 유산균 (*Lactobacillus plantarum* CNU001) 을 이용하여 혐기 배양시켜 만든 손바닥선인장 발효액을 동결과정을 거쳐 분말화시키고 이 분말을 실험에 이용하였다. 본 연구에서 사료에 손바닥선인장 발효분말을 첨가한 경우 넙치의 성장, 사료효율 및 비만도에 효과가 큰 것으로 나타났으며 또한 체성분 조성에서 조지방이 증가하는 것으로 나타났다.

그리고 MP(Moist Pellet)사료에 가장 적당한 첨가농도는 0.08%에서가 바람직한 것으로 나타났다. 선인장과(科)에 속하는 다육식물인 알로에를 대상으로 한 연구에서 Kim 등³⁹은 알로에 분말을 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 치어와 조피볼락(*Sebastes schlegeli*) 치어를 대상으로 사료내에 약 0.5%수준으로 첨가할 때 성장효과를 보인다고 보고하였는데 이는 본 연구에서는 나타난 0.08% 농도와는 큰 차이를 보이고 있다. 이러한 차이를 보이는 원인으로는 발효미생물로 사용한 유산균 자체의 효과인지 아니면 선인장열매를 기질로 한 유산균 발효대사산물의 영향을 생각해 볼 수 있지만 이 부분은 향후 자세한 연구가 있어야 될 것으로 생각된다.

나일틸라피아(Nile-tilapia)에 적용한 구기자 열매분말을 사용한 연구²⁵에서는 사료내 3% 첨가 농도를 권장하고 있다. 이러한 첨가농도의 양은 특히 생약제인 경우는 장

기간 투여가 효과적²⁵임을 감안 할 때 경제적인 면에서 충분히 고려해야 될 사항으로 여겨진다. 최근 국내외적으로 사료의 영양불균형을 개선하여 사료효율을 높이고 양식 생산성 향상을 위하여 여러 식물성 생약제를 양식생물에 직접 투여함으로써 면역능력, 항병력, 성장 및 육질개선등의 다양한 효과들이 보고되고 있고^{25,31,38} 각종 mineral, 비타민제제등의 첨가도 적극 권장되고 있으나^{24,44,57,60} 경제성을 갖추고 양식현장에서 이용되기란 그리 쉽지만은 않은 현실이다. 발효분말의 수분함유율이 14.02%(Table 1)로 나타났고 일반적으로 손바닥선인장의 수분함유율이 85%정도임을 감안한다면 발효분말의 0.08%는 액체상태로 1~2% 정도에 해당하는 것으로 이전의 발효액상을 대상으로 한 연구결과와도 틀리지 않는다고 볼 수 있다. 따라서 손바닥선인장을 유산균을 이용하여 발효 시켜 만든 발효분말은 양식 넙치 성장과 사료효율을 높일 수 있는 사료첨가제로서 활용가치가 높다고 생각되며 넙치성장에 효과적인 발효분말 첨가농도는 0.08%가 적정하리라고 보여진다.

4. 선인장에 함유된 프라보노이드 성분이 양식넙치에 미치는 영향(I)

가. 서론

제주도에서 경작 또는 자생되고 있는 선인장 중에 Opuntia속에 속하는 손바닥선인장 (*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*)은 선인장과(Cactaceae)에 속하는 귀화식물이다¹. 한방에서는 이질, 치질, 해수, 인후통, 폐옹, 유옹, 정창, 화상등의 치료에 이용되고 있으며⁶ 선인장의 열매는 최근 민간에서 건강보조식품으로 보급, 유통되고 있는 실정이다. 지금까지 Opuntia sp. 으로부터 보고되어진 성분은 당류외에 flavonoid계 성분으로 quercetin, isorhamnetin, kaempferol 등이 보고되고 있다⁵. 이러한 성분 중 quercetin은 항바이러스²², 항균효과¹⁴등 여러 가지 약리작용을 갖는다. 따라서 본 연구는 선인장열매 성분 중 quercetin성분을 넙치를 대상으로 사료에 첨가하여 공급하였을 때 넙치성장애 미치는 영향에 대하여 조사하였다.

나. 재료 및 방법

1) 실험어 및 사육환경

이 연구에 이용된 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 는 전장 5cm급으로 민간종묘장으로부터 구입하여 실험어로 사용하였다. 실험은 2003년 12월 23일부터 2004년 3월 24일까지 약 3개월간에 걸쳐 이루어졌다. 사육수조는 원통형 중앙 배수 장치를 한 원형수조(지름 1.6m×높이 0.7m, polypropylene) 12개를 이용하였고, 각 수조당 넙치 50마리씩 수용, 3반복하였다. 사육 수량은 0.4톤으로 1일 10~15회 환수시켰으며, 충분한 산소공급을 위하여 air stone을 설치하였다. 실험어의 어체 측정은 한달 간격으로 전장과 체중을 측정하였으며, 측정 당일 날은 절식시켰다. 체중은 전자저울로 0.01g 까지 측정하였으며, 전장은 1mm까지 측정하였다. 어체 측정 후에는 모든 실험어를 HCL-Oxytetracline 100 ppm으로 1시간동안 약욕하였다. 사육 중 사망한 개체는 매일 수시로 제거하였으며, 매 한달 후 어체 측정시 마다 생존한 개체에 대한 백분율로 생존율을 나타내었다. 증중율(weight gain rate), 일간성장율(daily growth rate), 일간섭이율(daily feeding rate), 사료계수(feed coefficient) 및 비만도(condition factor)를 다음과 같은 공식으로 계산하여 각 실험구간의 값을 비교하였다.

$$\text{weight gain rate} = (\text{FW} - \text{IW}) \times 100 / \text{IW}$$

$$\text{daily growth rate} = \{(\ln \text{FW} - \ln \text{IW}) / t\} \times 100$$

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

$$\text{feed coefficient} = \text{TF} / \text{TWG}$$

$$\text{condition factor} = (\text{BW} / \text{TL}^3) \times 10^3$$

※ BW : body weight, IW : initial weight, FW : final weight,

TF : total feed, TL : total length, t : rearing time(day),

TWG : total weight gain

실험수조의 기초환경은 YSI(YSI556 multiprobe system)를 이용하여 수온과 비중을 측정하였다.

2) 사료공급 및 혈액분석

실험에 사용한 EP(Extruded Pellet)사료는 일본산을 사용하였으며 일반 성분표는 Table 1과 같다. 실험에 사용한 quercetin은 시판 시약용(sigma co.)을 사용하였으며 사료량에 대하여 이를 각각 1ppm, 10ppm, 100ppm단위로 세분화하여 흡착시켜 사용하였다. 실험은 1일 2회(오전, 오후) 반복, 공급하였다. 그리고 실험종료시 그룹간 5마리씩을 대상으로 채혈하여 혈청을 분리한 후 혈액성상을 조사하였다.

Table 1. A component analysis of EP-feed

Analysis list	Feed
Moisture	3.36 %
Crude protein	52.00 %
Crude lipid	12.62 %
Crude fiber	1.86 %
Crude ash	12.00 %
Ca	2.56 %
P	1.90 %
Vitamin C	61.05 ppm
Vitamin E (a-Tocopherol)	617.69 ppm

3) 통계처리

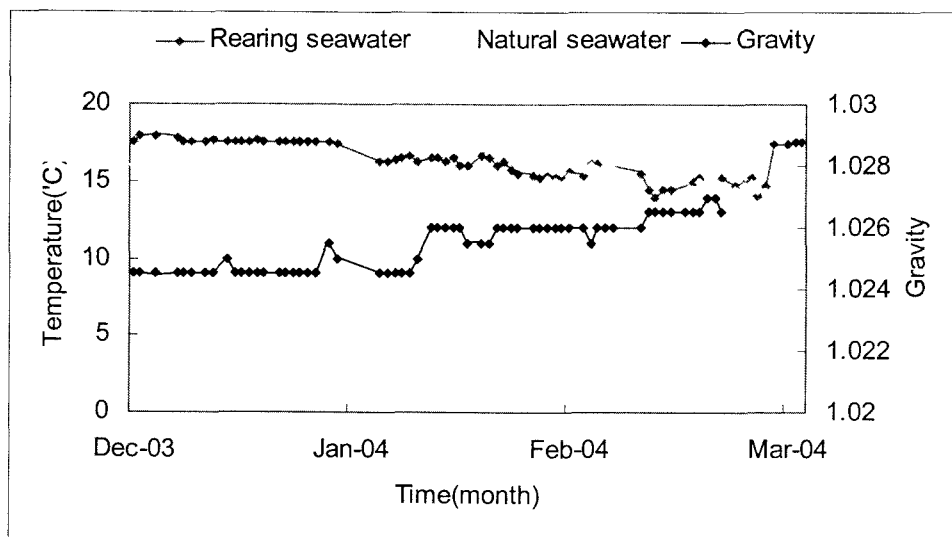
결과의 통계처리는 ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)로 평균간의 유의성을 통계프로그램 SPSS(SPSS Inc., ver.10.07)를 이용하여 검정하였다.

다. 결과

1) 사육환경

실험기간 동안 실험구의 환경요인중 수온과 비중의 결과는 다음과 같다(Fig.1). 사육 수온은 14.8~18.6°C의 범위에서 변화하였으며, 지하해수와 자연해수를 혼합하여 사육수로 사용하였다. 실험이 겨울철에 이루어 졌기 때문에 사육수의 수온은 자연수에 비해 높게 유지하고 있었다. 사육수의 비중은 1.024~1.027사이의 범위에서 이루어 졌으며 12월에서 3월로 접어들면서 비중이 높아지는 전형적인 모습을 보이고 있었다.

Fig. 1. Changes of water temperature and gravity of sea water in the rearing tank during the study.



2) 성장 및 생존율

대조군과 각 농도별로 quercetin을 첨가한 실험군에서의 성장을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 실험 종료시 대조군에서 평균 전장은 13.83 ± 0.55 cm로 성장한 반면, quercetin 1ppm, 10ppm, 100ppm 처리군에서 각각 14.10 ± 0.31 , 13.87 ± 0.66 , 14.28 ± 0.69 cm로 대조군에 비해 다소 높은 성장값을 보이고 있었다. 체중 역시 실험종료시에 대조군의 27.52 ± 3.24 g에 비해 quercetin의 모든 첨가군에서 다소 높게 나타났다.

각 실험구별 최종 생존율(survival rate)은 대조군에서 51.33%이었고, quercetin 1ppm, 10ppm, 100ppm 첨가군에서 각각 75.33%, 78.67% 및 70.67%를 나타내어 대조군에 비해 quercetin 첨가군 모두에서 유의성있게 높은 생존율을 나타내었다($p < 0.05$).

증중율은(weight gain rate)은 실험 종료시 quercetin 첨가군에서가 대조군에 비해 다소 높은 증중율을 보이고 있었다.

Table 2. Total length, body weight and survival rate of *Paralichthys olivaceus* by flavonoid, quercetin at different concentrations.

Feeding period: Dec. 23, 2003 through Mar. 24, 2004

Group	Initial			Final				Survival rate(%)
	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	W. gain g(%)	
Control	150	5.45 ± 0.08	1.32 ± 0.05	77	13.83 ± 0.55	27.52 ± 3.24	1984.85	51.33 ^a
1 ppm	150	5.56 ± 0.06	1.38 ± 0.05	113	14.10 ± 0.31	29.65 ± 2.36	2048.55	75.33 ^b
10 ppm	150	5.53 ± 0.06	1.37 ± 0.05	118	13.87 ± 0.66	28.06 ± 3.77	1948.18	78.67 ^b
100 ppm	150	5.50 ± 0.03	1.35 ± 0.07	106	14.28 ± 0.69	31.04 ± 4.30	2199.26	70.67 ^b

Values (mean \pm SD of three replication) in the same column not sharing a common superscript are significantly different ($P < 0.05$)

3) 사료계수

실험기간동안의 사료계수(feed coefficient)에 대한 결과는 Table 3과 같다. 사료계수(feed coefficient)는 대조군의 0.80 ± 0.5 에 비해 모든 첨가군에서 낮은 값을 보였고 이중 quercetin 1ppm, 10ppm에서 대조군에 비해 유의차를 보이고 있었다($p < 0.05$).

Table 3. Feed coefficient of *Paralichthys olivaceus* fed with different concentrations of flavonoid, *quercetin*.

Feeding period: Dec. 23, 2003 through Mar. 24, 2004

Experimental group	Feed coefficient
Control	0.80±0.05 ^b
1 ppm	0.70±0.03 ^a
10 ppm	0.68±0.02 ^a
100 ppm	0.75±0.04 ^{ab}

4) 비만도

quercetin 성분이 넙치의 비만도에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 모든 실험군에서 비만도는 성장함에 따라 증가되었으며, 실험 종료시에는 대조군의 비만도는 10.14±0.32였으며, *quercetin* 1ppm, 10ppm, 100ppm 처리군에서 각각 10.40±0.11, 10.29±0.30, 그리고 10.41±0.52로 나타났다.

Table 4. Effect of different concentrations of dietary Flavonoid, *quercetin* on condition factor (CF) of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Feeding period: Dec. 23, 2003 through Mar. 24, 2004

Experimental period	Concentration of Flavonoid, <i>quercetin</i>			
	Control	1 ppm	10 ppm	100 ppm
Initial	8.11±0.06	7.97±0.35	8.11±0.43	9.23±2.37
Final	10.14±0.32	10.40±0.11	10.29±0.30	10.41±0.25

5) 혈액분석

실험종료후 실험군과 대조군의 혈액성상을 검사한 결과는 다음과 같다(Table 5). 알부민(ALB), A/G, 총단백질(TP) 및 총콜레스테롤(T-CHO)은 대조군과 첨가군 사이에 유의성 차이를 볼 수 없었다. 지오티(GOT)와 지피티(GPT)의 경우는 대조군에 비해 첨가군에서 모두 낮은 값을 보이고 있었으며 첨가 농도가 높을 수록 이들 수치는 떨어지고 있었다. 특히 지오티(GOT)의 경우 이러한 경향이 분명하게 나타나고 있으며 대조군에 비해 *quercetin* 10ppm과 100ppm에서 유의성 있게 차이를 보이고 있었다($p < 0.05$).

Table 5. Effect of different concentrations of Flavonoid, *quercetin* on blood analysis of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Feeding period: Dec. 23, 2003 through Mar. 24, 2004

List	Concentration of Flavonoid, <i>quercetin</i>			
	Control	1 ppm	10 ppm	100 ppm
Length(cm)	18.78 ± 1.33	18.82 ± 1.20	18.10 ± 0.67	18.48 ± 0.30
Weight(g)	74.66 ± 13.91	70.90 ± 18.75	65.07 ± 7.17	67.49 ± 4.06
ALB	1.54 ± 0.54	1.34 ± 0.11	1.39 ± 0.12	1.46 ± 0.10
A/G	0.54 ± 0.16	0.46 ± 0.02	0.46 ± 0.03	0.48 ± 0.03
TP	4.36 ± 1.28	4.20 ± 0.28	4.41 ± 0.25	4.51 ± 0.28
GOT	285.60 ± 129.37 ^b	174.00 ± 98.75 ^{ab}	130.20 ± 57.49 ^a	112.00 ± 80.03 ^a
GPT	30.80 ± 21.86	19.00 ± 9.43	16.60 ± 5.59	14.20 ± 8.70
T-CHO	251.00 ± 59.45	343.80 ± 57.05	287.60 ± 114.06	292.80 ± 77.74

라. 고찰

양식산업이 대규모로 산업화되고 밀식사육으로 인한 경제적 손실이 늘면서 항생제의 개발과 화학치료제의 사용으로 생산성이 향상되는 성과를 이루었지만, 항생제의 잔류로 인한 잠재적 위험성이 제기되면서 항생제의 사용을 줄이고 이를 대체할 물질 개발에 대한 요구가 커지고 있다. 본 실험에서는 손바닥선인장 열매의 플라보노이드계 성분 중 quercetin이 양식넙치의 성장에 어떠한 영향을 미치는가에 대해 목적을 두고 조사하였다. 플라보노이드류는 현재까지 약 4,000종 이상이 알려져 있으며, 손바닥선인장에는 대표적으로 quercetin, isorhamnetin, kaempferol 등이 보고되었다¹⁵. 이러한 성분 중 quercetin은 항바이러스효과²²와 항균효과¹⁴ 등이 알려져 있으나 어류에 대한 연구는 전무한 실정이다. 양식넙치의 성장에 미치는 quercetin의 영향을 조사한 결과 대조군에 비해 뚜렷한 증체 효과는 보이지 않았으나 생존율면에서는 첨가군에서가 뚜렷하게 유의적인 생존율 차이를 보이고 있었다. 이는 quercetin성분이 넙치의 비특이 면역계에 관여하여 항병력을 향상시키는 것으로 추측된다. 혈액치를 조사한 결과 간기능지수인 지오티(GOT)와 지피티(GPT)에서 첨가군이 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내고 있고 또한 첨가농도가 증가할 수록 이 수치는 떨어지는 경향을 보임으로써

프라보노이드 성분이 양식넙치의 면역기능을 향상시키는데 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다. 첨가농도의 경우는 1ppm, 10ppm, 100ppm에서 생존율면에 뚜렷한 농도별 차이는 보이지 않았으나 혈액조사와 사료계수 등을 고려 할 때 10ppm정도가 적당 할 것으로 사료된다.

5. 선인장에 함유된 프라보노이드 성분이 양식넙치에 미치는 영향(II)

가. 서론

3-2-4에서 손바닥선인장 열매 성분 중 quercetin성분을 넙치를 대상으로 사료에 첨가하여 공급하였을 때 넙치성장에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 이 결과를 바탕으로 *Opuntia* sp.으로부터 보고 되어진 quercetin 성분외에 flavonoid계 성분으로 isorhamnetin과 kaempferol등을 대상으로 재차 이들이 양식넙치 성장에 미치는 영향에 대하여 조사하였다.

나. 재료 및 방법

1) 실험어 및 사육환경

이 연구에 이용된 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 전장 12cm급으로 민간종묘장으로부터 구입하여 실험어로 사용하였다. 실험은 2004년 5월 21일부터 2004년 8월 18일까지 약 3개월간에 걸쳐 이루어졌다. 사육수조는 원통형 중앙 배수 장치를 한 원형수조(지름 1.6m×높이 0.7m, polypropylene) 9개를 이용하였고, 각 수조당 넙치 40마리씩 수용, 3반복하였다. 사육 수량은 0.4톤으로 1일 10~15회 환수시켰으며, 충분한 산소 공급을 위하여 air stone을 설치하였다. 실험어의 어체 측정은 한달 간격으로 전장과 체중을 측정하였으며, 측정 당일 낚은 절식시켰다. 체중은 전자저울로 0.01g 까지 측정하였으며, 전장은 1mm까지 측정하였다. 어체 측정 후에는 모든 실험어를 HCL-Oxytetracycline 100 ppm으로 1시간동안 약육하였다. 사육 중 사망한 개체는 매일 수시로 제거하였으며, 매 한달 후 어체 측정시 마다 생존한 개체에 대한 백분율로 생존율을 나타내었다. 증중율(weight gain rate), 일간성장율(daily growth rate), 일간섭이율(daily feeding rate), 사료계수(feed coefficient) 및 비만도(condition factor)를 다음과 같은 공식으로 계산하여 각 실험구간의 값을 비교하였다.

$$\text{weight gain rate} = (\text{FW}-\text{IW}) \times 100 / \text{IW}$$

$$\text{daily growth rate} = \{(\ln \text{FW} - \ln \text{IW})/t\} \times 100$$

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

$$\text{feed coefficient} = \text{TF}/\text{TWG}$$

$$\text{condition factor} = (\text{BW}/\text{TL}^3) \times 10^3$$

※ BW : body weight, IW : initial weight, FW : final weight,
TF : total feed, TL : total length,
t : rearing time(day), TWG : total weight gain

실험수조의 기초환경은 YSI(YSI556 multiprobe system)를 이용하여 수온, DO(dissolved oxygen), 염분을 측정하였다.

2) 사료공급 및 혈액분석

실험에 사용한 EP(Extruded Pellet)사료는 3-2-4에서 사용한 일본산을 사용하였다. 실험에 사용한 isorhamnetin과 kaempferol은 시판 시약용(sigma co.)을 사용하였으며 사료량에 대하여 각각 10ppm의 양으로 사료에 혼합시켜 사용하였다. 실험은 1일 2회(오전, 오후) 반복, 공급하였다. 그리고 실험 종료시 그룹간 5마리씩을 대상으로 채혈하여 혈청을 분리한 후 혈액성상을 조사하였다.

3) 통계처리

결과의 통계처리는 ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)로 평균간의 유의성을 통계프로그램 SPSS(SPSS Inc., ver.10.07)를 이용하여 검정하였다.

다. 결과

1) 사육환경

실험기간 동안 실험구의 환경요인중 수온과 염분의 결과는 다음과 같다(Fig.1). 사육 수온은 17℃이상에서 변화를 보였으며 여름철로 갈수록 수온이 상하고 있었다. 사육수는 지하해수와 자연해수를 혼합하여 사육수로 사용하였다. 사육수의 염분은 31~34%사이의 범위에서 이루어졌으며 용존산소는 대체적으로 5~7사이를 보이고 있었다.

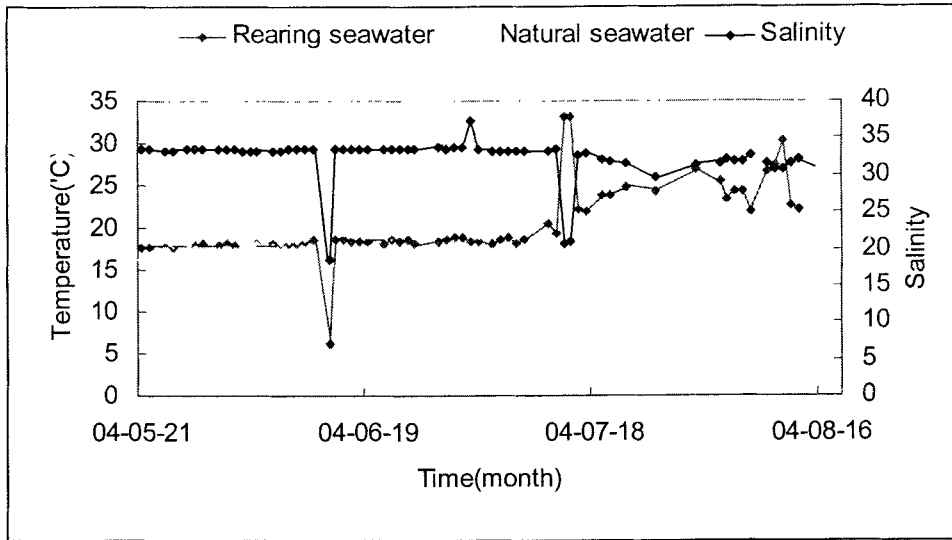


Fig. 1. Changes of water temperature and salinity of sea water in the rearing tank during the study.

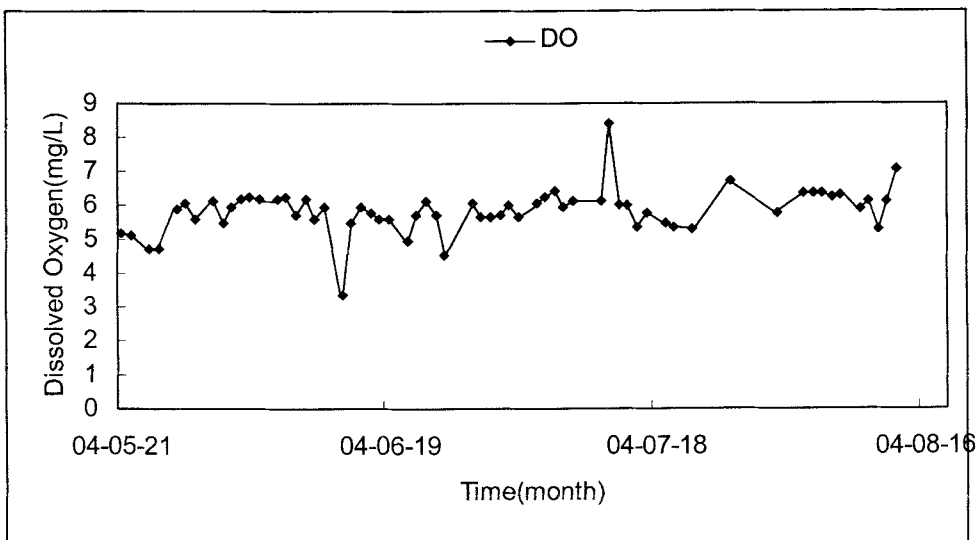


Fig. 2. Changes of dissolved oxygen of sea water in the rearing tank during the study.

2) 성장 및 생존율

실험어에 대조군과 실험군에서의 성장을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 실험 종료시 대조군에서 평균 전장은 18.62 ± 0.63 cm로 성장한 반면, isorhamnetin과 kaempferol에서 각각 19.35 ± 0.95 , 18.87 ± 0.94 cm로 대조군에 비해 높은 성장 값을 보이고 있었다.

체중은 실험종료시에 대조군의 66.16±6.82g에 비해 isorhamnetin 첨가군에서 큰 차이를 보였으나 kaempferol에서는 별 차이를 보이지 않았다. 각 실험구별 최종 생존율 (survival rate)은 대조군에서 51.67%이었고, isorhamnetin과 kaempferol 첨가군에서 각각 70.83%, 59.17%를 나타내었으며 대조군에 비해 isorhamnetin 첨가군에서 유의성 있게 높은 생존율을 나타내었다(p<0.05).

증중율은(weight gain rate)은 실험 종료시 isorhamnetin 첨가군에서가 가장 높게 나타났으며 kaempferol과 대조군은 별 차이를 보이지 않았다.

Table 1. Total length, body weight and survival rate of *Paralichthys olivaceus* by flavonoid, *isorhamnetin* and *kempferol* at different concentrations.

Feeding period: May. 21, 2004 through Aug. 18, 2004

Group	Initial			Final				Survival rate(%)
	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	W. gain g(%)	
Control	120	12.46±0.14	19.44±0.38	65	18.62±0.63	66.16±6.82	240.33	51.67 ^a
Isorhamnetin	120	12.54±0.04	19.46±0.38	85	19.35±0.95	75.71±15.03	289.05	70.83 ^b
Kaempferol	120	12.49±0.13	19.42±0.53	71	18.87±0.94	69.88±10.26	259.84	59.17 ^a

Values (mean±SD of three replication) in the same colume not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05)

3) 사료계수, 일간섭이율 및 성장률

실험기간동안의 사료계수(feed coefficient), 일간성장율(daily growth rate) 및 일간섭이율(daily feeding rate)에 대한 결과는 Table 2와 같다. 사료계수(feed coefficient)는 대조군의 0.90±0.06에 비해 isorhamnetin과 kaempferol 첨가군에서 낮은 값을 보이고 있었다.

일간성장율(daily growth rate)역시 대조군에 비해 isorhamnetin과 kaempferol 첨가군에서 높은 값을 보이고 있었다. 일간섭이율(daily feeding rate)은 isorhamnetin첨가군에서가 가장 높은 값을 보이고 있었다.

Table 2. Feed coefficient, daily feeding rate and daily growth rate of *Paralichthys olivaceus* fed with different concentrations of flavonoid, *quercetin* and *kaempferol*.

Feeding period: May. 21, 2004 through Aug. 18, 2004

Experimental group	Feed coefficient	Daily growth rate (%)	Daily feeding rate (%)
Control	0.90±0.06	1.33±0.11	8.76±0.98
Isorhamnetin	0.86±0.06	1.46±0.20	9.33±1.73
Kaempferol	0.84±0.06	1.38±0.17	8.68±1.27

4) 비만도

프라보노이드, isorhamnetin 과 kaempferol 성분이 넙치의 비만도에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 모든 실험군에서 비만도는 성장함에 따라 증가되었으며, 실험 종료 시에는 대조군의 비만도는 10.00±0.14였으며, isorhamnetin과 kaempferol 첨가군에서 각각 10.13±0.53과 10.13±0.20으로 나타났다.

Table 3. Effect of different concentrations of dietary Flavonoid, *quercetin* and *kaempferol* on condition factor (CF) of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

Feeding period: May. 21, 2004 through Aug. 18, 2004

Experimental period	Control	Isorhamnetin	Kaempferol
Initial	9.97±0.11	9.84±0.06	9.88±0.05
Final	10.00±0.14	10.13±0.53	10.13±0.20

5) 혈액분석

실험종료후 실험군과 대조군의 혈액성상을 검사한 결과는 다음과 같다(Table 4). 실험항목 모두에서 대조구에 비해 isorhamnetin과 kaempferol 첨가군 사이에 유의성 차이를 나타내고 있었으나 그 중 알부민(ALB), A/G, 총단백질(TP) 및 총콜레스테롤(T-CHO)은 대조군과 비교하여 isorhamnetin과 kaempferol 두종류의 특징적인 변화양상은 보이지 않았다. 그러나 지오티(GOT)와 지피티(GPT)의 경우는 대조군에 비해 첨가군에서 모두 낮은 값을 보이고 특징을 나타내고 있었다.

Table 4. Effect of different concentrations of Flavonoid, *quercetin* and *kaempferol* on blood analysis of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Feeding period: May. 21. 2004 through Aug. 18. 2004

List	Control	<i>quercetin</i>	<i>kaempferol</i>
ALB	1.10± 0.09 ^b	1.30± 0.19 ^c	1.07± 0.08 ^a
A/G	0.43± 0.06 ^b	0.44± 0.03 ^c	0.40± 0.02 ^a
TP	3.66± 0.14 ^a	4.19± 0.47 ^c	3.71± 0.20 ^b
GOT	125.60± 105.99 ^c	89.20± 35.69 ^b	80.40± 29.74 ^a
GPT	28.40± 16.49 ^c	22.80± 14.15 ^a	26.20± 14.52 ^b
T-CHO	183.20± 90.08 ^a	229.80± 83.27 ^c	195.40± 38.30 ^b

라. 고찰

선인장의 주요 구성성분중 색소성분인 프라보노이드^{5,8}는 과일껍질, 채소의 잎, 줄기, 뿌리, 씨앗, 꽃 등 여러식물에서 다양한 구조로 존재하고 있으며 현재까지 약 4,000종 이상이 알려져 있으며, 손바닥선인장에는 이중 대표적으로 *quercetin*, *isorhamnetin*, *kaempferol*등이 보고 되었다¹⁵. 특히 프라보노이드는 염증의 시작에 중요한 혈구의 이동 및 침윤에 결정적 역할을 하는 세포접착분자를 억제하는 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라⁹, 항산화능³⁵과 peroxynitrite의 제거²³에도 관여한다고 한다. 그러나 이들의 효능에 대한 연구는 포유류를 대상으로 한 실험실내 실험결과들이며 어류를 대상으로 한 연구는 전무한 실정이다. 이 등⁸은 손바닥선인장 열매와 줄기를 대상으로 80% MeOH을 가하고 실온에서 2일간 방치하여 냉침추출 하였을 때 총 프라보노이드양은 1.590mg/g와 1.290mg/g 으로 열매에서가 줄기에 비하여 다소 많은 양이 검출된다고 보고 하였다. 따라서 본 실험에서는 손바닥선인장 열매의 프라보노이드계 성분중 *isorhamnetin*과 *kaempferol*이 양식넙치를 대상으로 어떠한 영향을 미치는 가에 대해 목적을 두고 조사하였다.

양식넙치의 성장에 미치는 *isorhamnetin*과 *kaempferol*의 영향을 조사한 결과 대조군에 비해 뚜렷한 증체 효과는 보이지 않았으나 생존율면에서는 첨가군에서가 뚜렷하게 유의적인 생존율 차이를 보였는데 특히 *isorhamnetin* 성분쪽에서가 더욱 뚜렷한 차이를 보이고 있었다.

혈액치를 조사한 결과 알부민, A/G, 총단백질, 총콜레스테롤 항목에서는 대조구에 비해 isorhamnetin과 kaempferol 각각의 분석수치에는 차이가 있었으나 대조구와 프라보노이드 성분과의 차별성은 보이지 않았다. 그러나 간기능지수인 지오티(GOT)와 지피티(GPT)에서의 경우, isorhamnetin과 kaempferol 두 첨가군이 대조군에 비해 뚜렷한 차이를 보이고 있어 앞에서 밝힌 또다른 프라보노이드 성분인 quercetin의 결과와도 일치하여 전반적으로 손바닥선인장 열매의 주요 구성성분인 3종류의 프라보노이드 성분(quercetin, isorhamnetin, kaempferol) 모두가 녀치의 비특이 면역계에 관여하여 항병력을 향상시키는 것으로 추측된다. 본 실험에서는 특히 isorhamnetin 성분이 kaempferol성분에 비해 양식녀치의 면역기능을 향상시키는데 도움을 주고 있다고 보여진다.

6. 유산균(*Lactobacillus plantarum* CNU001)이 양식넙치에 미치는 영향

가. 서론

본 연구는 손바닥선인장 열매를 기질로 하여 발효미생물로 이용된 유산균 (*Lactobacillus plantarum* CNU010) 자체가 양식넙치에 미치는 영향을 알아보기로 수행하였다.

나. 재료 및 방법

1) 실험어 및 사육환경

이 연구에 이용된 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 전장 5cm급으로 민간종묘장으로부터 구입하여 실험어로 사용하였다. 실험은 2003년 12월 23일부터 2004년 3월 24일까지 약 3개월간에 걸쳐 이루어졌다. 사육수조는 원통형 중앙 배수 장치를 한 원형수조(지름 0.56m×높이 0.5m, polypropylene) 12개를 이용하였고, 각 수조당 넙치 30마리씩 수용, 3반복하였다. 사육 수량은 0.1톤으로 1일 20~25회 환수시켰으며, 충분한 산소 공급을 위하여 air stone을 설치하였다. 실험어의 어체 측정은 한달 간격으로 전장과 체중을 측정하였으며, 측정 당일 낚은 절식시켰다. 체중은 전자저울로 0.01g 까지 측정하였으며, 전장은 1mm까지 측정하였다. 어체 측정 후에는 모든 실험어를 HCL-Oxytetracycline 100 ppm으로 1시간동안 약욕하였다. 사육 중 사망한 개체는 매일 수시로 제거하였으며, 매 한달 후 어체 측정시 마다 생존한 개체에 대한 백분율로 생존율을 나타내었다. 증중율(weight gain rate), 일간성장율(daily growth rate), 일간섭이율(daily feeding rate), 사료계수(feed coefficient) 및 비만도(condition factor)를 다음과 같은 공식으로 계산하여 각 실험구간의 값을 비교하였다.

$$\text{weight gain rate} = (\text{FW}-\text{IW}) \times 100 / \text{IW}$$

$$\text{daily growth rate} = \{(\ln \text{FW} - \ln \text{IW})/t\} \times 100$$

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

$$\text{feed coefficient} = \text{TF}/\text{TWG}$$

$$\text{condition factor} = (\text{BW}/\text{TL}^3) \times 10^3$$

※ BW : body weight, IW : inital weight, FW : final weight,

TF : total feed, TL : total length,

t : rearing time(day), TWG : total weight gain

실험수조의 기초환경은 YSI(YSI556 multiprobe system)를 이용하여 수온과 비중을 측정하였다.

2) 사료공급

실험에 사용한 EP(Extruded Pellet)사료는 일본산을 사용하였으며 일반 성분표는 Table 1과 같다. 실험에 사용한 유산균은 손바닥선인장 열매에서 분리, 배양한 것을 사용하였으며 사료량에 대하여 이를 각각 1%, 5%, 10% 단위로 세분화하여 흡착시켜 사용하였다. 실험은 1일 2회(오전, 오후) 반복, 공급하였다.

3) 통계처리

결과의 통계처리는 ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)로 평균간의 유의성을 통계프로그램 SPSS(SPSS Inc., ver.10.07)를 이용하여 검정하였다.

Table 1. A component analysis of EP-feed

Analysis list	Feed
Moisture	3.36 %
Crude protein	52.00 %
Crude lipid	12.62 %
Crude fiber	1.86 %
Crude ash	12.00 %
Ca	2.56 %
P	1.90 %
Vitamin C	61.05 ppm
Vitamin E (α -Tocopherol)	617.69 ppm

다. 결과

1) 사육환경

실험기간 동안 실험구의 환경요인중 수온과 비중의 변화는 다음과 같다(Fig.1). 사육 수온은 14.1~18.5℃의 범위에서 변화하였으며, 지하해수와 자연해수를 혼합하여 사육수로 사용하였다. 사육수의 비중은 1.024~1.027의 범위안에서 변화하였다.

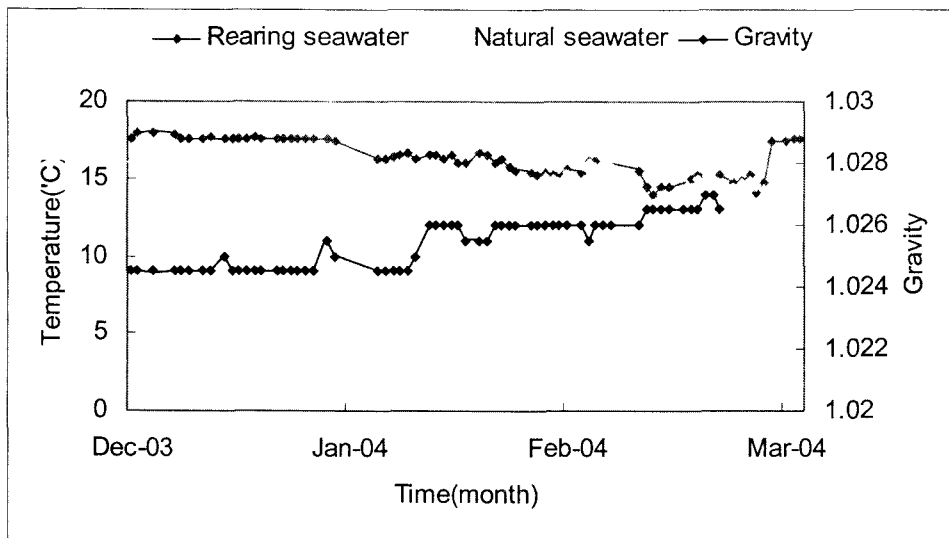


Fig. 1. Changes of water temperature and gravity of sea water in the rearing tank during the study.

2) 성장 및 생존율

대조군과 각 농도별로 유산균을 첨가한 실험군에서의 성장을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 실험 종료시 대조군에서 평균 전장은 15.63 ± 0.42 cm로 성장한 것에 비해 유산균을 첨가한 실험군에서는 대조군에 비해 별 차이를 보이지 않았다. 체중은 대조군이 37.98 ± 1.35 g으로 성장한 것에 비해 유산균 첨가군 모두에서 비교적 빠른 성장값을 나타내고 있었다. 또한 유산균의 농도가 높을 수록 체중증가가 늘어나고 있음을 보여주고 있었다. 각 실험구별 최종 생존율(survival rate)은 대조군에서 96.67% 였던 것에 반해 실험군에서 비교적 높은 생존율을 나타내고 있었다.

증중율은(weight gain rate)은 실험 종료시 유산균 첨가군 농도가 높아 질수록 대조군에 비해 높게 나타났다.

Table 2. Total length, body weight and survival rate of *Paralichthys olivaceus* by *lactobacillus plantarum* at different concentration

Feeding period: Dec. 23, 2003 through Mar. 24, 2004

Group	Initial			Final				Survival rate(%)
	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	W. gain g(%)	
Control	90	5.82±0.08 ^{ab}	1.75±0.10	87	15.63±0.42	37.98±1.35	2070.29	96.67
1 %	90	5.93±0.07 ^b	1.80±0.06	89	15.49±0.21	38.86±1.16	2058.89	98.89
5 %	90	5.80±0.06 ^a	1.76±0.07	87	15.71±0.17	39.97±0.73	2171.02	96.67
10 %	90	5.80±0.04 ^a	1.73±0.00	89	15.62±0.41	40.16±2.56	2221.39	98.89

Values (mean±SD of three replication) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05)

3) 사료계수, 일간섭이율 및 성장률

실험기간동안의 사료계수(feed coefficient), 일간성장율(daily growth rate) 및 일간섭이율(daily feeding rate)에 대한 결과는 Table 3과 같다.

사료계수(feed coefficient)는 대조군의 0.79±0.01에 비해 모든 첨가군에서 유의성 있게 낮은 값을 보였고 유산균 농도가 높아질수록 사료계수는 낮아지는 특징을 나타냈다(p<0.05).

일간성장율(daily growth rate)역시 대조군에 비해 높은 성장률을 보였으며 유산균의 농도가 높아질수록 높은 값을 보였다. 일간섭이율(daily feeding rate)은 대조군에 비해 유산균 첨가군에서 비교적 낮은 값들을 보이고 있었으나 별다른 특징은 없었다.

Table 3. Feed coefficient, daily feeding rate and daily growth rate of *Paralichthys olivaceus* fed with different levels of *lactobacillus plantarum*.

Feeding period: Dec. 23, 2003 through Mar. 24, 2004

Experimental group	Feed coefficient	Daily growth rate (%)	Daily feeding rate (%)
Control	0.79±0.01 ^c	3.27±0.04	16.13±0.79
1 %	0.75±0.01 ^b	3.27±0.07	15.50±0.28
5 %	0.74±0.01 ^{ab}	3.33±0.02	15.23±0.38
10 %	0.71±0.03 ^a	3.34±0.07	15.14±1.04

4)비만도

손바닥선인장 발효분말이 넙치의 비만도에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 8과 같다. 모든 실험군에서 비만도는 성장함에 따라 증가되었으며, 실험 종료 시에는 대조군의 비만도는 10.27 ± 0.40 에 비해 유산균 첨가군사이에 별 다른 특징을 보이고 있지 않았다.

Table 4. Effect of different concentrations of *Lactobacillus plantarum* on condition factor (CF) of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Feeding period: Dec. 23, 2003 through Mar. 24, 2004

Experimental period	Concentration of <i>Lactobacillus plantarum</i> (%)			
	Control	1 %	5 %	10 %
Initial	5.82 ± 0.08	5.93 ± 0.07	5.80 ± 0.06	5.80 ± 0.04
Final	10.27 ± 0.40	10.48 ± 0.19	10.16 ± 0.17	10.32 ± 0.33

라. 고찰

제주도에서 경작 또는 자생되는 손바닥선인장(*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*)을 발효기질로 사용한 연구로는 선인장 열매를 이용한 전통주개발 연구⁴가 보고되었을 뿐, 선인장 열매를 이용한 발효 연구는 거의 없는 실정이다.

본 연구는 손바닥선인장 열매를 대상으로 발효미생물로 이용된 유산균 자체가 양식 넙치를 대상으로 갖는 효과에 대하여 알아보고자 하였다. 유산균은 손바닥선인장에서 분리, 배양한 것을 사용하였으며 생화학적 동정 및 특성을 규명하여 *Lactobacillus plantarum* CNU001으로 명명하였다.

유산균은 광합성세균, 효모균으로부터 받은 당류등을 기질로 하여 유산(Lactic acid)를 만들어 낸다. 유산에는 강한 정균력이 있으며^{12,37} 주로 일상에서 김치, 치즈, 요구르트등에서 많이 알려져 있다. 또한 균핵균의 번식과 활동을 억제하기 때문에 포유류의 경우, 창자속에 많이 서식하고 있으며 잡균에 의한 이상발효를 방지하는 중요한 세균이다.

또한 여러 발효산물들에 의한 항암효과 및 면역증강작용이 알려져 있다^{28,32}. 앞의 연구결과에서 이들 유산균을 이용한 손바닥선인장 발효물을 이용한 넙치 성장실험에서는 성장에 두드러진 효과를 나타내고 있었다. 따라서 이는 발효미생물로 사용한 유산균 자체의 효과인지 아니면 선인장열매를 기질로 한 유산균 발효대사산물의 영향을 생각

해 볼 수 있지만 이번 실험을 통해서는 유산균자체만으로는 넙치성장에 크게 영향은 끼치고 있지 않았으며 기존에 알려진 정상작용에 의한 면역능 향상으로 다소간 생존율 면에서 효과를 보이고 있다고 보아진다. 그러나 발효 대사산물의 구체적 효능에 대해서는 향후 자세한 연구가 있어야 될 것으로 생각된다. 유산균의 첨가 농도가 높을 수록 사료계수가 낮아지고 있었다. 따라서 유산균을 이용한 손바닥선인장 발효물에서도 사료계수가 낮아지고 있음을 감안한다면 유산균 자체도 넙치 성장과 면역계에 다소간 긍정적 작용을 하고 있는 것으로 사료된다.

7. 아미노산, 당(Sugar) 성분이 양식넙치 성장에 미치는 영향

가. 서론

최근 넙치양식은 종묘생산과 양식기술의 보편화로 단위면적당 생산량이 증가하고 있고 대부분이 대량양산체제로 경영되고 있어 밀식에 따른 환경악화, 각종 스트레스, 질병 발생의 문제를 안고 있다. 특히 넙치양식에서 사용되는 사료는 생산량의 증가와 더불어 생산원가의 절반이상을 차지하고 있어 양식어가에 가장 큰 부담이 되고 있다⁴¹. 이에 사료효율을 극대화시켜 사료비를 절감하고 환경오염을 줄이며 우수한 성장을 유도할 수 있는 효율적인 사료의 개발이 시급한 실정이다³⁸. 그러나, 종묘생산 및 양성 과정에 있어서 낮은 사료 섭취로 인한 성장저하 및 사료유실로 인한 수질오염등 커다란 문제로 대두되고 있다⁴⁰. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 양식어류의 성장을 촉진시킴과 동시에 사료유실을 최소화하기 위한 섭취촉진 물질에 대한 연구가 활발히 진행되어져야 한다. 따라서 본 연구는 섭취촉진 물질로 알려져 있는 아미노산 성분과 당성분이 양식넙치에 있어 성장에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 실시하였다.

나. 재료 및 방법

1) 실험어 및 사육환경

이 연구에 이용된 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 전장 10cm급으로 민간종묘장으로 부터 구입하여 실험어로 사용하였다. 실험은 2003년 11월 11일부터 2004년 2월 16일까지 약 3개월간에 걸쳐 이루어졌다. 사육수조는 원통형 중앙 배수 장치를 한 원형수조(지름 1.2m×높이 1.0m, polypropylene) 26개를 이용하였고, 각 수조당 넙치 20마리씩 수용, 2반복하였다. 사육 수량은 1.0톤으로 1일 20~25회 환수시켰으며, 충분한 산소 공급을 위하여 air stone을 설치하였다. 실험어의 어체 측정은 한달 간격으로 전장과 체중을 측정하였으며, 측정 당일 날은 절식시켰다. 체중은 전자저울로 0.01g 까지 측정하였으며, 전장은 1mm까지 측정하였다. 어체 측정 후에는 모든 실험어를 HCL-Oxytetracycline 100 ppm으로 1시간동안 약욕하였다. 사육 중 사망한 개체는 매일 수시로 제거하였으며, 매 한달 후 어체 측정시 마다 생존한 개체에 대한 백분율로 생존율을 나타내었다. 증중율(weight gain rate), 일간성장율(daily growth rate), 일간섭이율(daily feeding rate), 사료계수(feed coefficient) 및 비만도(condition factor)를 다음과 같은 공식으로 계산하여 각 실험구간의 값을 비교하였다.

weight gain rate = $(FW - IW) \times 100 / IW$

daily growth rate = $\{(\ln FW - \ln IW) / t\} \times 100$

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

feed coefficient = TF / TWG

condition factor = $(BW / TL^3) \times 103$

※ BW : body weight, IW : initial weight, FW : final weight,

TF : total feed, TL : total length,

t : rearing time(day), TWG : total weight gain

실험수조의 기초환경은 YSI(YSI556 multiprobe system)를 이용하여 수온, DO(dissolved oxygen), pH, 비중을 측정하였다.

2) 사료공급

실험에 사용한 EP(Extruded Pellet)사료는 3-2-4에서 사용한 일본산을 사용하였다. 아미노산과 당성분의 섭취촉진효과를 조사하기 위하여 시약용(sigma co.) 아르기닌(Arginine)등 필수아미노산 10종류와 타우린, 그리고 당(sugar)을 실험사료 중에 각각 0.3%로 첨가하여 넙치에 공급하였다. 실험은 1일 2회(오전, 오후) 반복, 공급하였다.

3) 통계처리

결과의 통계처리는 ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)로 평균간의 유의성을 통계프로그램 SPSS(SPSS Inc., ver. 10.07)를 이용하여 검정하였다.

다. 결과

1) 사육환경

실험기간 동안 실험구의 환경요인중 수온, DO, pH 의 결과는 다음과 같다(Fig.1,2). 사육 수온은 16.2~21.6℃의 범위에서 변화하였으며, 지하해수와 자연해수를 혼합하여 사육수로 사용하였다. 사육수의 DO는 4.12~8.02 mg/ℓ 였고, pH는 8.02~8.42의 범위에서 변화하였다.

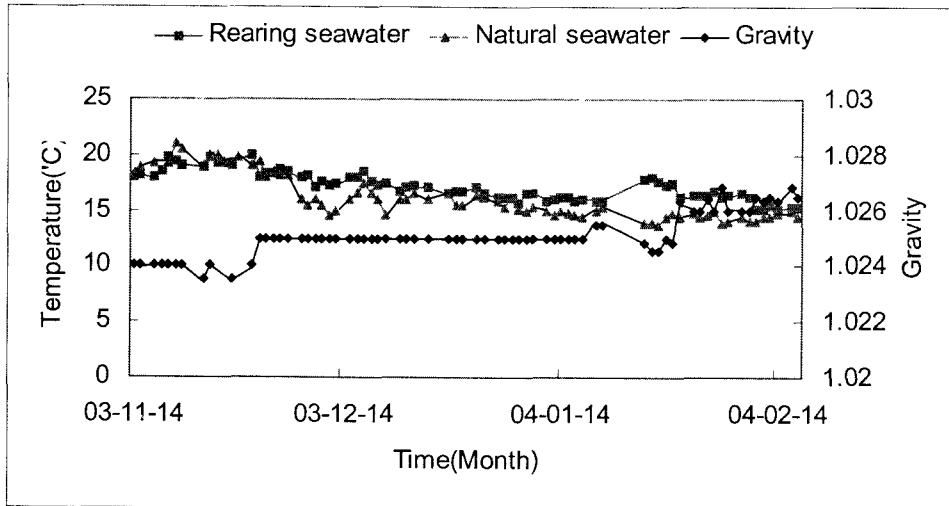


Fig. 1. Changes of water temperature and gravity of sea water in the rearing tank during the study.

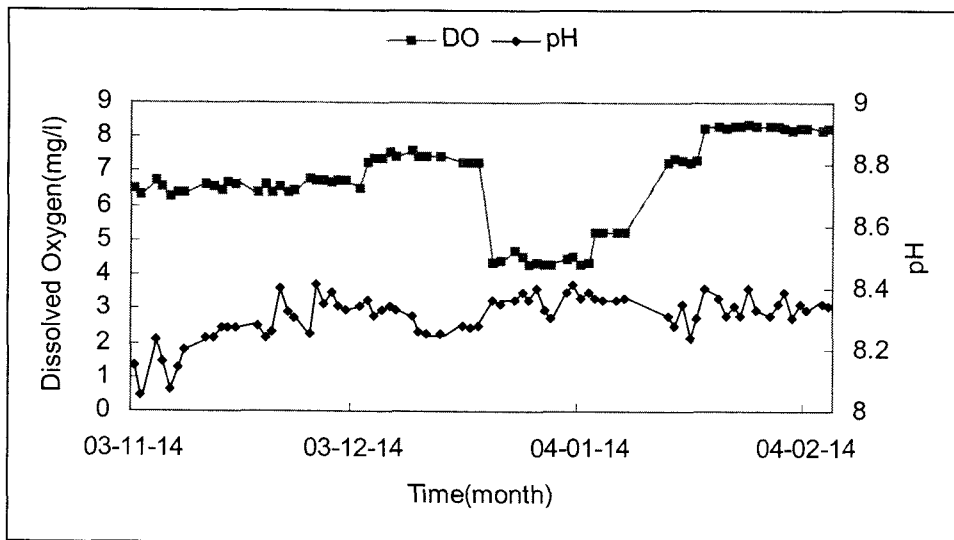


Fig. 2. Changes of dissolved oxygen and pH of sea water in the rearing tank during the study.

2) 성장 및 생존율

대조군과 첨가한 실험군에서의 성장을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 실험 종료시 대조군에서 평균 전장은 19.66 ± 0.59 cm로 성장한 반면, 라이신(Lysine), 메티오닌(Methionine), 트립토판(Tryptophan), 타우린(Taurine) 등이 각각 20.67 ± 0.21 , 20.56 ± 0.66 , 20.46 ± 0.62 , 20.41 ± 0.10 순으로 나타났으며 그 밖에 발린(Valine), 트레

오닌(Threonine), 페닐알라닌(Phenylalanine), 당(sugar)성분이 대조군에 비해 다소 빠른 성장을 나타내고 있었다. 체중은 실험종료시에 대조군이 81.65±9.21g을 나타낸 것에 반해 라이신(Lysine)성분을 첨가한 군이 가장 높은 성장값을 보여 95.71±0.2g로 나타났다. 그 뒤를 이어 발린(Valine), 트립토판(Tryptophan)등이 대조군에 비해 두드러진 성장차를 보이고 있었으며 타우린(Taurine)과 당(sugar)성분도 대조군에 비해서는 빠른 성장을 보였다.

각 실험구별 최종 생존율(survival rate)은 대조군에서 85%였으며 대조군에 비해 루신(Leucine)을 제외한 모든 실험군에서 높게 나타났으며 특히 아르기닌(Arginine), 트립토판(Tryptophan), 발린(Valine)등이 실험종료시까지 100% 생존율을 보이고 있었다.

Table 1. Total length, body weight and survival rate of *Paralichthys olivaceus* by amino acid and sugar

Feeding period: Nov. 11, 2003 through Feb. 16, 2004

Group	Initial			Final				Survival rate(%)
	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	W. gain g(%)	
Control	40	11.00±0.16	12.67±0.59	34	19.66±0.59 ^{abc}	81.65±9.21 ^{ab}	544.44	85
Arginine	40	11.03±0.06	12.49±0.36	40	19.37±0.28 ^{ab}	78.65±3.46 ^{ab}	529.70	100
Histidine	40	10.89±0.15	12.16±0.13	39	20.07±0.18 ^{abc}	85.74±3.34 ^{ab}	605.10	97.5
Isoleucine	40	11.01±0.14	12.38±0.60	37	19.88±0.35 ^{abc}	80.94±2.89 ^{ab}	553.80	92.54
Leucine	40	10.93±0.04	12.45±0.20	28	19.17±0.58 ^a	73.44±9.63 ^a	489.88	70
Lysine	40	11.03±0.08	12.74±0.23	38	20.67±0.21 ^c	95.71±0.21 ^b	651.26	95
Methionine	40	11.10±0.05	12.99±0.01	39	20.56±0.66 ^{bc}	94.06±7.91 ^b	624.10	97.5
Phenylalanine	40	10.98±0.05	12.42±0.08	39	20.10±1.20 ^{abc}	89.06±17.88 ^{ab}	617.07	97.5
Threonine	40	10.89±0.20	12.29±0.54	39	20.28±0.11 ^{abc}	91.70±0.21 ^{ab}	646.14	97.5
Tryptophan	40	11.01±0.19	12.74±0.62	40	20.46±0.62 ^{bc}	94.15±11.38 ^b	639.01	100
Valine	40	11.06±0.08	12.75±0.45	40	20.33±0.13 ^{abc}	94.68±8.59 ^b	642.59	100
Taurine	40	10.92±0.08	12.05±0.21	38	20.41±0.10 ^{abc}	91.31±0.35 ^{ab}	657.76	95
Sugar	40	10.98±0.11	12.58±0.18	39	19.90±0.31 ^{abc}	87.03±5.54 ^{ab}	591.81	97.5

Values (mean±SD of double replication) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05)

3) 사료계수, 일간섭이율 및 성장률

실험기간동안의 사료계수(feed coefficient), 일간성장율(daily growth rate) 및 일간섭이율(daily feeding rate)에 대한 결과는 Table 2와 같다.

사료계수(feed coefficient)는 대조군의 0.85±0.09에 비해 트립토판(Tryptophan), 발린(Valine)등에서 비교적 낮은 값을 보였다. 반면에 루신(Leucine)은 가장 높은 사료계수 값을 보였다.

일간성장율(daily growth rate)은 대조군에 비해 타우린(Taurine), 라이신(Lysine), 트레오닌(Threonine)등에서 두드러진 일간성장율을 보였고 당(sugar) 성분도 대조군에 비해 일간성장율이 높게 나타나고 있었다. 일간섭이율(daily feeding rate)은 대조군에 비해 아이소루신(Isoleucine)성분을 제외한 모든 첨가군에서 낮은 섭이율을 보였다.

Table 2. Feed coefficient, daily feeding rate and daily growth rate of *Paralichthys olivaceus* fed of amino acid and sugar

Feeding period: Nov. 11, 2003 through Feb. 16, 2004

Experimental group	Feed coefficient	Daily growth rate (%)	Daily feeding rate (%)
Control	0.85±0.09 ^{ab}	1.96±0.17	10.63±1.05 ^{ab}
Arginine	0.82±0.01 ^{ab}	1.94±0.08	10.43±0.35 ^{ab}
Histidine	0.80±0.04 ^{ab}	2.06±0.03	9.88±0.57 ^{ab}
Isoleucine	0.87±0.04 ^{ab}	1.98±0.09	10.70±0.44 ^{ab}
Leucine	0.97±0.21 ^b	1.87±0.12	12.21±2.80 ^b
Lysine	0.83±0.00 ^{ab}	2.12±0.01	8.92±0.20 ^a
Methionine	0.81±0.06 ^{ab}	2.08±0.08	9.05±0.87 ^a
Phenylalanine	0.82±0.16 ^{ab}	2.07±0.21	9.68±1.92 ^{ab}
Threonine	0.80±0.01 ^{ab}	2.12±0.05	9.27±0.21 ^a
Tryptophan	0.73±0.00 ^a	2.11±0.18	8.94±0.90 ^a
Valine	0.78±0.06 ^{ab}	2.11±0.13	8.87±0.67 ^a
Taurine	0.80±0.05 ^{ab}	2.14±0.02	9.45±0.37 ^a
Sugar	0.86±0.01 ^{ab}	2.04±0.05	9.70±0.74 ^{ab}

4) 비만도

필수아미노산과 타우린, 그리고 당성분이 넙치의 비만도에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 모든 실험군에서 비만도는 성장함에 따라 증가되었으며, 실험 종료 시에는 대조군의 비만도 값 10.59±0.39에 비해 발린(Valine)성분에서가 가장 높은 비만도값을 나타내었으며 히스티딘(Histidine), 아이소루신(Isoleucine), 루신(leucine)등에서는 대조군에 비해 오히려 낮은 비만도 값을 보였다.

Table 3. Effect of amino acid and sugar on condition factor (CF) of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Feeding period: Nov. 11, 2003 through Feb. 16, 2004

	Experimental period	
	Initial	Final
Control	9.51±0.04 ^b	10.59±0.39 ^{ab}
Arginine	9.39±0.06 ^{ab}	10.66±0.14 ^{ab}
Histidine	9.40±0.28 ^{ab}	10.50±0.16 ^{ab}
Isoleucine	9.24±0.09 ^a	10.21±0.12 ^a
Leucine	9.53±0.06 ^b	10.24±0.48 ^a
Lysine	9.46±0.06 ^{ab}	10.74±0.40 ^{ab}
Methionine	9.48±0.03 ^{ab}	10.70±0.08 ^{ab}
Phenylalanine	9.36±0.05 ^{ab}	10.73±0.34 ^{ab}
Threonine	9.52±0.11 ^b	10.93±0.08 ^{ab}
Tryptophan	9.54±0.05 ^b	10.87±0.40 ^{ab}
Valine	9.23±0.05 ^a	11.08±0.66 ^b
Taurine	9.38±0.20 ^{ab}	10.65±0.11 ^{ab}
Sugar	9.57±0.04 ^b	10.84±0.03 ^{ab}

라. 고찰

사료영양학적인 측면에 있어서 섭취촉진물질은 부득이 정제된 사료원을 사용해야 하는 비타민, 무기질등의 요구량 실험에서 기호성을 증가시킬 뿐만 아니라 양어용 배합 사료의 제작에 매우 중요한 의미를 갖는다⁶². 어류에 있어서 섭취촉진물질들은 분자량이 1,000미만인 수용성 물질로서 이온 흡착기능을 가진 성분으로 알려져 있으며¹⁶, 대부분 아미노산, 핵산관련 화합물, 유기산 및 당류등이 이에 속한다. 따라서 필수아미노산 10종류와 타우린, 당이 넙치 섭취촉진 물질로 이용되어지는 것을 확인하기 위하여 실험사료에 0.3%의 첨가농도로 첨가한 후 행한 실험결과, 넙치성장과는 라이신(Lysine), 메티오닌(Methionine), 트립토판(Tryptophan), 발린(Valine)등의 필수아미노산과 타우린(Taurine)등이 영향을 끼치고 당(Sugar)성분도 성장에는 영향을 끼치고 있었다. 이는 조피볼락의 사료섭취 촉진물질로서 아미노산을 검색한 결과 사료에 각각 0.3% 첨가시 트레오닌(Threonine)과 메티오닌(Methionine)의 필수 아미노산이 사료섭취 효과가 있는 것으로 나타나 첨가농도에 유사한 경향을 보이고 있다⁴⁰. 그러나 앞으로 보다 넙치의 정확한 사료섭취촉진물질을 검색하기 위해서는 아미노산 외에 사료섭취촉진물질로 알려져 있는 핵산관련 물질도 검색되어 져야 하며 적정 첨가범위등에 대한 연구도 보다 필요하다고 보아진다. 무지개송어의 경우, L-형의 아미노산이 섭취자극물

질로 작용하고¹¹ 방어에 있어서는 메티오닌(Methionine)성분이 섭취력을 좌우한다고 하였다⁵⁵. Jack mackerel에 있어서는 20여종의 아미노산중 트립토판(Tryptophan)이 섭취촉진효과를 가지는 것으로 보고되었다²⁷. 참돔의 경우에도 아미노산이 높은 사료섭취촉진효과를 보이고 있다²⁰. 이와 같이 아미노산의 섭취촉진효과에 관한 연구에는 여러 연구자들에 의해 수행되었으며, 사료섭취촉진물질로서 여러 아미노산들이 효과가 있을 뿐만 아니라 어종과 아미노산의 종류에 따라 다르게 작용하고 있는 것을 알 수 있다^{19,29}. 유산균을 이용하여 손바닥선인장 열매를 발효할 경우, 발효후 아미노산의 경우는 Valine, Isoleucine, Lysine등의 필수 아미노산이 증가된 수치를 보인다(고, 미발표). 따라서 손바닥선인장 열매의 발효물은 넙치의 성장에 적어도 이들 아미노산이 긍정적 역할을 하고 있으며 그 밖의 발효과정에서 사용되어지는 당(Sugar)성분도 넙치성장에는 효과적인 것으로 사료된다.

8. 타 시판 사료첨가제와의 비교 가치

가. 서론

손바닥선인장(*Opuntia ficus indica*, *saboten*)은 선인장과(Cactaceae)에 속하는 열대성 식물로 우리나라의 제주도 등지에서 자생하고 있는 귀화식물로 최근 포유류 및 시험관내 연구를 중심으로 손바닥선인장의 항산화효과⁵⁴, 항궤양효과⁴², 항종양작용⁵⁸, 혈당강하⁵⁹ 그리고 바이러스복제 억제효과¹³ 등 다양한 효능 등이 보고되고 있다. 따라서 본 연구는 이러한 여러 유용효능 등이 알려진 손바닥선인장을 넘치치어를 대상으로 한 사료첨가제로서의 개발하고자 우선 점액질을 갖고 있는 손바닥선인장을 어류에게 간편하게 투여하기 위해 손바닥선인장 열매를 유용미생물로 발효시킨 후 발효액을 사료에 첨가하여 공급하였다. 손바닥선인장 발효액이 넘치성장애 미치는 효과를 조사하고 현재 양식현장에서 많이 이용되고 있는 사료첨가제인 키토산(Chitosan), 베타글루칸(β -Glucan), 어보산(Obosan)과 비교하여 양식현장에서의 이용가능성을 알아보하고자 하였다.

나. 재료 및 방법

1) 실험어 및 사육환경

이 연구에 이용된 넘치(*Paralichthys olivaceus*) 치어는 전장 7cm급의 인공종묘로 실험기간은 2002년 5월부터 2002년 8월까지 총 3개월 동안이었고 실험시작시 실험어의 평균 전장은 8.47 ± 0.55 cm, 체중은 6.59 ± 1.34 g 이었다. 사육수조는 원통형 중앙 배수장치를 한 원형수조(지름 1.2m×높이 1.0m, polypropylene) 15개를 이용하였고, 각 수조당 넘치 치어 40마리씩 수용, 3반복하였다. 사육 수량은 1.0톤으로 1일 10~15회 환수시켰으며, 충분한 산소 공급을 위하여 air stone을 설치하였다. 실험어의 어체 측정 은 한달 간격으로 전장과 체중을 측정하였으며, 측정 당일 낚은 절식시켰다. 체중은 전자저울로 0.01g 까지 측정하였으며, 전장은 1mm까지 측정하였다. 어체 측정 후에는 모든 실험어를 HCL-Oxytetracycline 100 ppm으로 1시간동안 약욕하였다.

사육 중 사망한 개체는 매일 수시로 제거하였으며, 매 한달 후 어체 측정시 마다 생존한 개체에 대한 백분율로 생존율을 나타내었다. 증중율(weight gain rate), 일간성장율(daily growth rate), 일간섭이율(daily feeding rate), 사료계수(feed coefficient) 및 비만도(condition factor)를 다음과 같은 공식으로 계산하여 각 실험구간의 값을 비교하였다.

$$\text{weight gain rate} = (\text{FW} - \text{IW}) \times 100 / \text{IW}$$

$$\text{daily growth rate} = \{(\ln \text{FW} - \ln \text{IW}) / t\} \times 100$$

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

$$\text{feed coefficient} = \text{TF} / \text{TWG}$$

$$\text{condition factor} = (\text{BW} / \text{TL}^3) \times 103$$

※ BW : body weight, IW : initial weight, FW : final weight,

TF : total feed, TL : total length,

t : rearing time(day), TWG : total weight gain

실험수조의 기초환경은 YSI(YSI556 multiprobe system)를 이용하여 수온, DO(dissolved oxygen), pH, 비중을 측정하였다.

2) 손바닥선인장 발효액 제조

이 연구에 사용된 손바닥선인장은 일반적으로 시중에서 유통되는 제주산 손바닥 선인장의 열매를 이용하였다. 발효미생물로는 한국 EMRO(EM Research Organization)에서 시판되고 있는 EM(effective microorganisms)을 이용하였으며, 제조방법은 손바닥선인장 열매를 마쇄한 후 물엿(선인장열매의 10%)과 EM(선인장열매의 5%)을 혼합하였다. 그 후 2주간 혐기 배양한 후 배양액을 여과하여 실험에 이용하였다.

3) 사료공급

실험에 사용한 배합사료는 일본산 고압팽창사료(extruded pellet, EP)였으며, 실험 사료첨가제들의 성장효과를 조사하기 위하여 손바닥선인장 발효액은 사료대비 1%의 첨가가능도로 하였으며 기타 어보산, 키토산, 베타글루칸등은 각 제품별 권장용법으로 조제하여 배합사료에 흡착시킨 후 2회(오전, 오후)/day 반복, 공급하였다. 사료만을 공급한 것을 대조군으로 하였다.

4) 통계처리

결과의 통계처리는 ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)로 평균간의 유의성을 통계프로그램 SPSS(SPSS Inc., ver. 10.07)를 이용하여 검정하였다.

다. 결과

1) 사육환경

실험기간 동안 실험구의 환경요인중 수온, 비중, DO, pH 의 결과는 다음과 같다 (Fig.1,2). 수온은 자연해수가 16.2℃~24.9℃의 범위로 변동하였으나 실험해수는 지하해수와 혼합하여 17.4℃~21.6℃로 수온변동이 자연해수와 비교하여 작게 나타났다 (Fig 1). 수온변화는 여름으로 갈수록 상승하였고, 이에 반하여 용존산소와 pH는 낮아지는 경향을 나타내어 전형적인 계절변화 양상을 나타내었다(Fig 2).

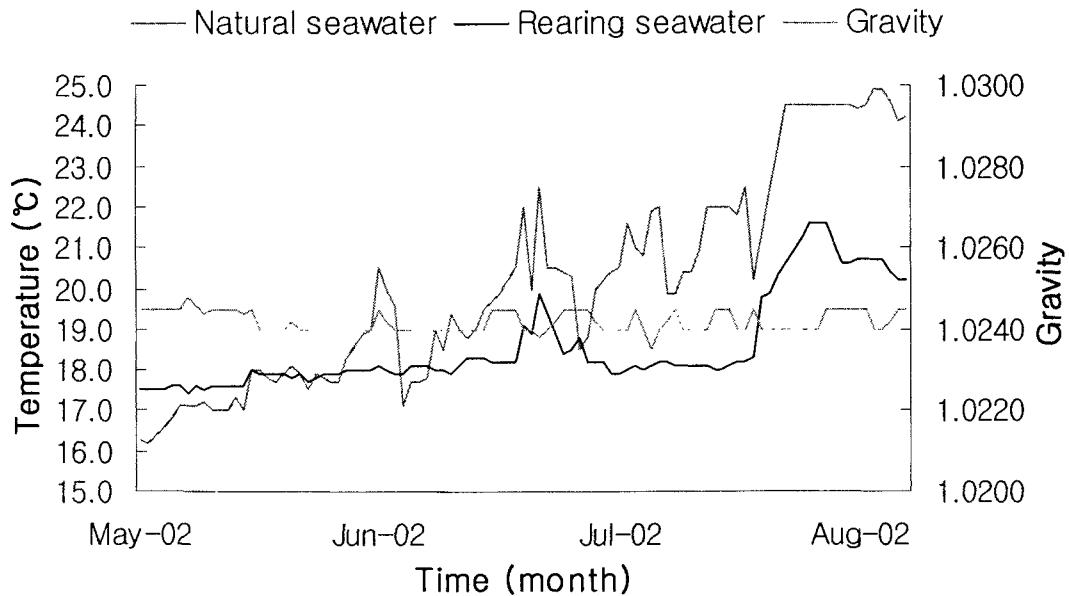


Fig. 1. Changes of water temperature and gravity of sea water in the rearing tank during the study.

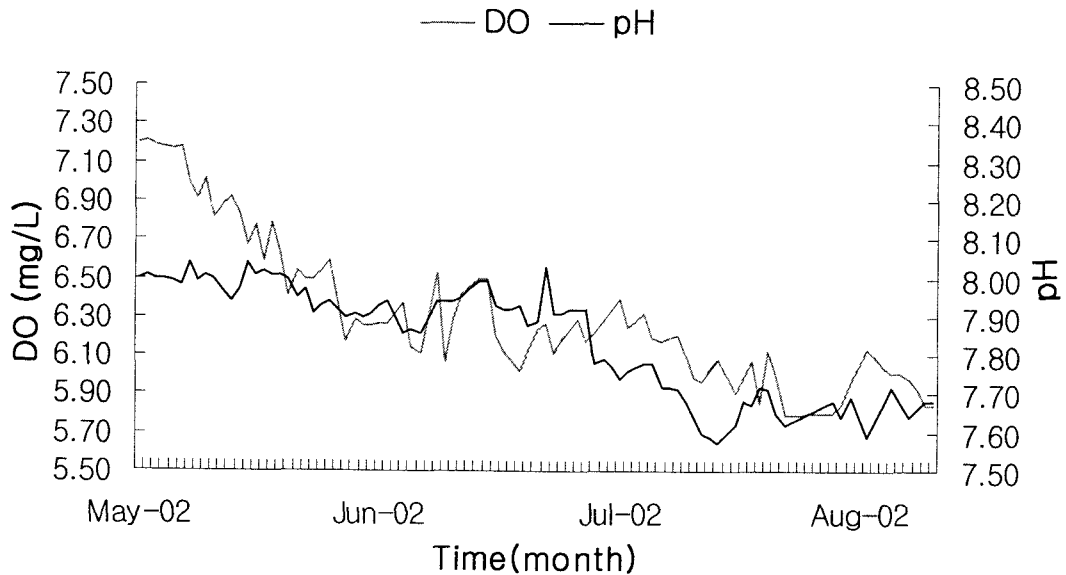


Fig. 2. Changes of dissolved oxygen and pH of sea water in the rearing tank during the study.

2) 성장 및 생존율

대조군과 손바닥선인장 발효액과 키토산, 베타글루칸, 어보산을 첨가한 실험군에서의 성장을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 실험 시작시 평균 전장은 6.71 ± 0.35 cm이었으며, 실험종료시 평균 전장은 대조군이 13.58 ± 0.52 cm인데 반해 손바닥선인장 발효액(Cactus)은 15.02 ± 0.09 으로 크게 성장하였다. 키토산(Chitosan), 베타글루칸(β Glucan), 어보산(Obosan)등이 각각 14.43 ± 0.80 , 14.74 ± 0.40 , 14.57 ± 0.38 cm로 성장하여, 대조군에 비해 손바닥선인장 발효액과 함께 성장 차이를 나타냈으며 특히 베타글루칸, 선인장발효액, 어보산등이 대조군과 키토산에 비해 성장차를 보이고 있었다. 체중은 실험시작시 2.56 ± 0.62 g이었으며, 실험종료시에는 대조군에 비해 손바닥선인장발효액, 베타글루칸실험군에서 대조군 27.36 ± 4.22 g에 비해 각각 35.90 ± 1.34 g과 34.02 ± 2.66 g으로 유의한 성장차이가 인정되었다($P < 0.05$).

각 실험구별 최종 생존율(survival rate)은 실험군에서 손바닥선인장 발효액, 어보산, 베타글루칸, 키토산순으로 생존율이 높게 나타나 각각 71.50%, 65.83%, 62.50%, 57.50% 였으며 모든 첨가제에서 대조군(50.83%)에 비해 최종 생존율이 높게 나타났다.

증중율(weight gain rate)은 실험 종료시 베타글루칸과 손바닥선인장 발효액에서 1392.11과 1302.34로 많은 증체율을 보였으며 어보산, 베타글루칸, 키토산은 대조군에 비해 별 차이를 보이지 않았다.

Table 1. Total length, body weight and survival rate of *Paralichthys olivaceus* by chitosan, β Glucan, Obosan and fermented cactus.

Feeding period: May. 9, 2002 through Aug. 13, 2002

Group	Initial			Final				Survival rate(%)
	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	W. gain g(%)	
Control	120	6.60±0.22	2.36±0.32	61	13.58±0.52 ^a	27.36±4.22 ^a	1059.32	50.83
Chitosan	120	6.85±0.40	2.80±0.79	69	14.43±0.80 ^{ab}	32.35±3.40 ^{ab}	1055.36	57.50
β -Glucan	120	6.70±0.11	2.28±0.21	75	14.74±0.40 ^b	34.02±2.66 ^b	1392.11	62.50
Cactus	120	6.53±0.18	2.56±0.17	87	15.02±0.09 ^b	35.90±1.34 ^b	1302.34	71.50
Obosan	120	6.88±0.33	2.84±0.55	79	14.57±0.38 ^b	32.53±2.65 ^{ab}	1045.42	65.83

Values (mean±SD of three replication) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05)

3) 사료계수, 일간섭이율 및 성장률

실험기간동안의 사료계수(feed coefficient), 일간성장율(daily growth rate) 및 일간섭이율(daily feeding rate)에 대한 결과는 Table 2와 같다.

사료계수(feed coefficient)는 대조군에 비해 베타글루칸첨가군에서 0.67±0.10으로 가장 양호하였고, 그 외 손바닥선인장발효액과 키토산 첨가군에서가 대조군에 비해 양호한 사료계수를 보였으나 어보산 첨가군에서는 대조군과 비슷한 값을 보였다.

일간성장율(daily growth rate)은 베타글루칸과 손바닥선인장 발효액 첨가군에서 대조군에 비해 빠르게 나타났고 그 외의 키토산과 어보산 첨가군은 대조군에 비해 별 차이를 나타내고 있지 않았다.

일간섭이율(daily feeding rate)은 대조군에 비해 모든 첨가군에서 낮은 값을 보이고 있었는데 특히 손바닥선인장발효액에서가 가장 낮은 값을 보였다(P<0.05).

Table 2. Feed coefficient, daily feeding rate and daily growth rate of *Paralichthys olivaceus* fed of chitosan, β -Glucan, Obosan and fermented cactus.

Feeding period: May. 9, 2002 through Aug. 13, 2002

Experimental group	Feed coefficient	Daily growth rate (%)	Daily feeding rate (%)
Control	0.83±0.14	2.47±0.19	23.56±1.49 ^b
Chitosan	0.79±0.05	2.50±0.23	20.08±4.40 ^{ab}
β -Glucan	0.67±0.10	2.73±0.13	19.83±6.08 ^{ab}
Cactus	0.74±0.13	2.67±0.04	14.79±0.41 ^a
Obosan	0.85±0.01	2.47±0.13	17.21±1.23 ^{ab}

4) 비만도

손바닥선인장 발효액이 넙치의 비만도에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 모든 실험군에서 비만도는 성장함에 따라 증가되었으며, 실험 종료 시에는 대조군의 비만도는 10.52±0.36였으며 손바닥선인장 발효액이 10.52±0.38, 키토산 10.59±0.62, 베타글루칸 10.43±0.03, 어보산 10.40±0.10으로 나타나 이중 키토산 첨가군에서가 가장 높은 값을 나타내고 있었다.

Table 3. Effect of different concentrations of dietary fermented Cactus on condition factor (CF) of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Feeding period: May. 9, 2002 through Aug. 13, 2002

Experimental period	Control	Chitosan	β Glucan	Cactus	Obosan
Initial	8.06±0.31 ^{ab}	8.25±0.88 ^{ab}	7.41±0.23 ^a	8.81±0.64 ^b	8.23±0.39 ^{ab}
Final	10.52±0.36	10.59±0.62	10.43±0.03	10.52±0.38	10.40±0.10

라. 고찰

본 실험에서는 손바닥선인장 발효액, 키토산, 베타글루칸, 어보산 첨가군 모두에서 대조군에 비해 넙치의 성장에 유의적인 효과를 나타냈고 생존율면에서도 대조군에 비해 높게 나타났다. 특히 이들 중 손바닥선인장발효액 첨가군이 가장 두드러진 성장 및 생존율을 나타내고 있었다. 김 등³⁸은 28가지의 복합한약제로 만들어진 한방사료인 어보산을 사료에 0.3%정도 첨가할 경우 대조군에 비해 넙치의 생존율, 성장, 사료효율 및 비만도에 매우 좋은 효과를 보이고 있다고 보고하였다. 그리고 어보산을 장기간 투여시 넙치의 생리활성을 증가시켜 높은 생존율을 보인다고 하였다. 그러나 본 실험에서는 어보산인 경우 대조군에 비해 성장이나 생존율면에서는 높은 값을 보였으나 사료효율이나 비만도등에서 오히려 낮은 값을 보여 위의 보고와는 일치된 경향은 보이지 않았다. 이 등¹⁰은 계의 껍질을 효소분해하여 추출된 D-glucosamine을 주원료로 한 키토산올리고당(Chitosan oligosaccharide, COS)을 넙치사료에 0.5%정도 첨가할 경우 성장에 효과가 있다고 하였다. 본 실험에서 나타난 키토산은 넙치의 성장과 생존율 그리고 사료효율성과 비만도등에서 모두 대조군에 비해 양호한 효과를 보이고 있었다.

비특이적 면역계를 활성화시킨다고 알려진 베타글루칸은 양식현장에서 면역증강제로 널리 사용되어지며, 비특이적 면역반응뿐만 아니라 특이적 면역반응계를 활성화시켜⁵⁰ 세균성 질병의 예방적인 효과면에서 유용한 것으로 생각되고 있다. 박 등^{51,52}은 한국산 메기(*Silurus asotus*)와 조피볼락(*Sebastes schlegeli*) 그리고 넙치를 대상으로 베타글루칸의 세균성 질병에 대한 저항성을 입증하였다. 본 실험에서는 베타글루칸을 급이시 성장과 생존율 그리고 사료효율면에서 대조군에 비해 양호한 결과를 보였으며 특히 사료효율면에서는 다른 첨가제들과 비교하여 가장 양호한 것으로 나타났다. 그러나 비만도의 경우는 대조군보다도 낮은 값을 보였다.

이상의 결과를 볼 때 손바닥선인장 발효액은 넙치 성장에 긍정적인 역할을 하고 있으며 손바닥선인장 발효액에 함유된 베타글루칸과 여러 유용성분(고, 미발효)등이 넙치 면역계를 활성화 시켜 질병으로부터의 높은 생존율을 보이고 있다고 생각된다. 따라서 제주도 자생식물인 손바닥선인장을 이용한 발효액은 넙치의 사료첨가제로서 양식현장에서 널리 이용될 수 있는 좋은 천연소재라고 판단된다.

9. 양식현장에서의 실증 시험

가. 서론

넙치(*Paralichthys olivaceus*)양식은 80년대 후반에 인공종묘생산 기술이 개발되고⁴³ 제주도와 남해안 등지에서 육상 양식시설이 들어서면서부터 급신장하였다. 이러한 넙치 양식은 90년에 1천여톤에 불과했으나 지난 2001년에는 약 4만톤이상으로 40배 이상의 급신장세를 보임으로써 양식산업종으로 정착됐다고 볼 수 있다⁴⁵. 최근 넙치양식은 종묘생산과 양식기술의 보편화로 단위면적당 생산량이 증가하고 있고 대부분이 대량 양산체제로 경영되고 있어 밀식에 따른 환경악화, 각종 스트레스, 질병 발생의 문제를 안고 있다. 특히 넙치양식에서 사용되는 사료는 생산량의 증가와 더불어 생산원가의 절반이상을 차지하고 있어 양식어가에 가장 큰 부담이 되고 있다⁴¹. 이에 사료효율을 극대화시켜 사료비를 절감하고 환경오염을 줄이며 우수한 성장을 유도할 수 있는 효율적인 사료의 개발이 시급한 실정이다³⁸. 최근까지 양어사료는 주로 단기간 내 상품어 출하를 위해서 성장위주의 기초 영양사료 공급에 주안점을 두고 개발되어져 왔다³⁶. 그러나 기초 영양사료를 어류에게 과다하게 공급할 경우 육질의 경도가 낮아 맛과 고유한 풍미 소실로 인한 상품가치의 저하뿐만 아니라, 각종 질병의 감수성 증가로 인한 대량폐사의 유발가능성이 높기 때문에 양식산업에 있어서 사료의 영양불균형의 개선책은 매우 시급한 문제로 지적되고 있다^{30,36,48,60,65}. 따라서 국내외적으로 사료의 영양불균형을 개선하여 사료효율을 높이고 양식생산성 향상을 위하여 여러 식물성 생약제를 양식생물에 직접 투여함으로써 면역능력, 항병력, 성장 및 육질개선 등의 다양한 효과들이 보고되고 있고^{25,31,38} 각종 mineral, 비타민제제등의 첨가도 적극 권장되고 있다^{24,30,56}.

손바닥선인장(*Opuntia ficus indica* var. *saboten*)은 선인장과에 속하는 다년초로서 열대지방이 원산지이고 우리나라에서는 제주도에 재배되어 식용, 약용 및 관상용으로 많이 이용되고 있다⁷.

손바닥선인장의 열매와 줄기는 예로부터 당뇨, 변비, 고혈압, 식욕증진 및 기관지 천식에도 효과가 있어 민간약제로 전해져 내려오고 있다. 그러나 손바닥선인장의 국내 연구는 손바닥선인장의 성분특성연구⁸, 레드를 중심으로 항궤양작용에 관한 연구⁷, 혈당강화효과⁵⁹등 주로 포유류를 중심으로 한 실험실내 연구가 단편적으로 이루어져 오고 있을 뿐 선인장이 갖는 점액질의 특성으로 실험재료로 많이 이용되어 지지는 않고 있다. 특히 양식어류를 대상으로 손바닥선인장의 일반적 효능에 대해 적용한 연구는

전무한 실정이다. 따라서 본 연구는 점액질을 갖고 있는 손바닥선인장을 어류에게 간편하게 투여하기 위해 손바닥선인장 열매에서 분리, 배양한 유산균으로 손바닥선인장 열매를 발효시킨 발효액과 이를 동결건조한 발효분말을 넙치 양식현장에서 장기간 사용시 손바닥선인장 발효물이 양식넙치 성장에 미치는 영향에 대해 조사하였다.

나. 재료 및 방법

1) 실험어 및 사육환경

이 연구에 이용된 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 전장 7cm급 전후의 넙치종묘를 실험어로 하였으며 종묘입식에서부터 전장 30cm급, 체중 350g급까지 제주도 표선면 소재 W수산(참여업체)에서 이루어졌다. 실험은 2004년 1월 14일부터 2004년 8월 13일까지 약 7개월간에 걸쳐 이루어졌다. 종묘는 전북 고창산으로 38만마리를 중앙 배수 장치를 한 사각 콘크리트 수조(10m×10m) 9개에 나눠 입식하였다. 이 중 4개 수조를 임의로 하여 실험구로 2개 수조를, 그리고 대조구로 2개 수조를 설정하였다. 실험구와 대조구 각각의 수조는 분조시 다시 전장의 크기에 따라 선두 그룹인 대(large)그룹과 중(middle) 그룹으로 나눠 실험 종료시까지 계속해서 양식장에서 일반적으로 행해지는 방법에 따라 성장을 추적해 나갔다. 수조당 입식마리수는 양식현장에서의 특성으로 처음부터 확인이 안 되었으며 종묘입식후 한달이 지난 시점에 전체 계측을 실시하였다(W수산의 경우 이 시점에 기준치 이상의 넙치를 정확히 계수한 후 종묘대를 지불한다). 사육 수량은 60톤으로 1일 10~15회 환수시켰으며, 충분한 산소 공급을 위하여 산소발생기를 설치하였다. 실험어의 어체 측정은 한달 간격으로 전장과 체중을 측정하였으며, 측정미수는 무작위로 수조당 100마리 내외를 측정하였다. 체중은 전자저울로 0.01g 까지 측정하였으며, 전장은 1mm까지 측정하였다. 사육 중 사망한 개체는 매일 아침 제거하였으며, 매 한달 후 어체 측정시 마다 생존한 개체에 대한 백분율로 생존율을 나타내었다. 증중율(weight gain rate), 일간성장율(daily growth rate), 일간섭이율(daily feeding rate), 사료계수(feed coefficient) 및 비만도(condition factor)를 다음과 같은 공식으로 계산하여 각 실험구간의 값을 비교하였다.

$$\text{weight gain rate} = (FW - IW) \times 100 / IW$$

$$\text{daily growth rate} = \{(\ln FW - \ln IW) / t\} \times 100$$

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

$$\text{feed coefficient} = TF / TWG$$

$$\text{condition factor} = (BW / TL^3) \times 103$$

※ BW : body weight, IW : initial weight, FW : final weight,
TF : total feed, TL : total length,
t : rearing time(day), TWG : total weight gain

실험수조의 기초환경은 YSI(YSI556 multiprobe system)를 이용하여 수온, DO(dissolved oxygen), 염분을 측정하였다.

2) 사료제조 및 공급

실험에 사용한 원사료는 2종류로 종묘입식 후 일정기간동안은 일본산 EP(Extruded Pellet)사료를 사용하였으며 이후 양식장 현장에서 직접 만든 MP(Moists Pellet)사료는 고등어, 까나리, 청어 등의 생사료와 일반 배합사료를 9대 1로 섞어 만들었으며 각각의 일반 사료 성분표는 Table 1과 2와 같다. 여기에 선인장발효물의 효과를 알아보기 위하여 EP사료 사용시기에는 EP사료 급이량 대비 1%의 양으로 그리고 MP사료 사용시기에는 MP제조시에 발효분말 0.08%를 넣어 만든 실험사료를 가지고 사용하였다. 손바닥선인장 발효물을 첨가하지 않고 사료만을 공급한 것을 대조구 일반사료로 사용하였다. 급이는 1일 3회(06:00, 13:00, 18:00)에 걸쳐 이루어졌다.

3) 혈액성분검사

EP사료와 MP사료 급이실험 종료시 실험어에 대한 일반 성분들을 분석하였다. 그리고 실험종료시 그룹간 10마리씩을 대상으로 채혈하여 혈청을 분리한 후 혈액성상을 조사하였다.

4) 통계처리

결과의 통계처리는 ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)로 유의성을 통계프로그램 SPSS(SPSS Inc., ver.10.07)를 이용하여 검정하였다.

Table 1. A component analysis of EP-feed

Analysis list	Feed
Moisture	3.36 %
Crude protein	52.00 %
Crude lipid	12.62 %
Crude fiber	1.86 %
Crude ash	12.00 %
Ca	2.56 %
P	1.90 %
Vitamin C	61.05 ppm
Vitamin E (α-Tocopherol)	617.69 ppm

Table 2. Feed composition with fermented cactus powder

	Water	Crude Ash	Crude Protein	Crude Fat
Feed(MP)	6.50±0.16%	9.48±0.02%	53.19±0.01%	11.57±0.03%

다. 결과

1) 사육환경

실험기간 동안 실험구의 환경요인중 수온, DO, 염분의 결과는 다음과 같다 (Fig.1,2). 사육 수온은 15.7~19.7℃의 범위에서 변화하였으며, 지하해수와 자연해수를 혼합하여 사육수로 사용하였다. 사육수의 DO는 4.7~11.5 mg/l 였고, 염분은 27.20~32.04‰의 범위에서 변화하였다.

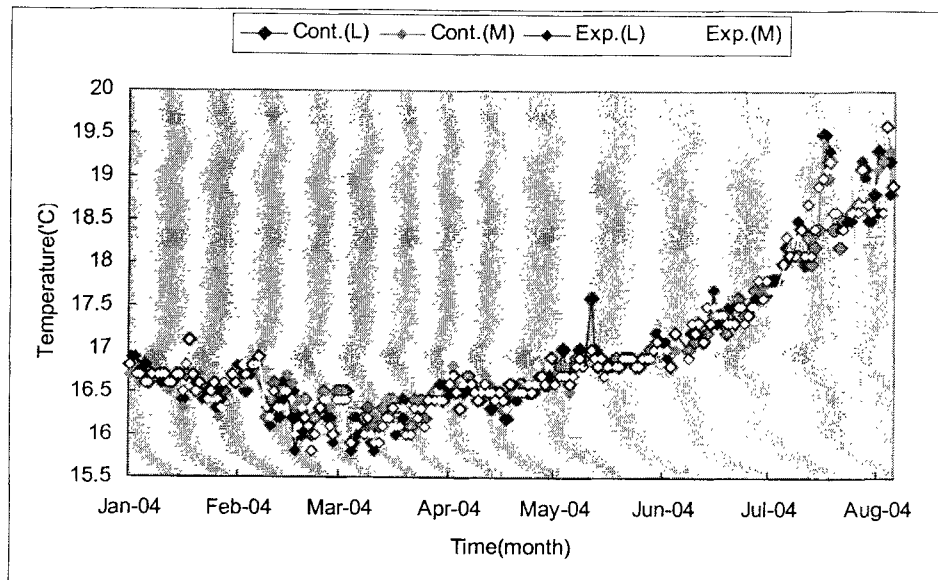


Fig. 1. Changes of water temperature and gravity of sea water in the rearing tank during the study.

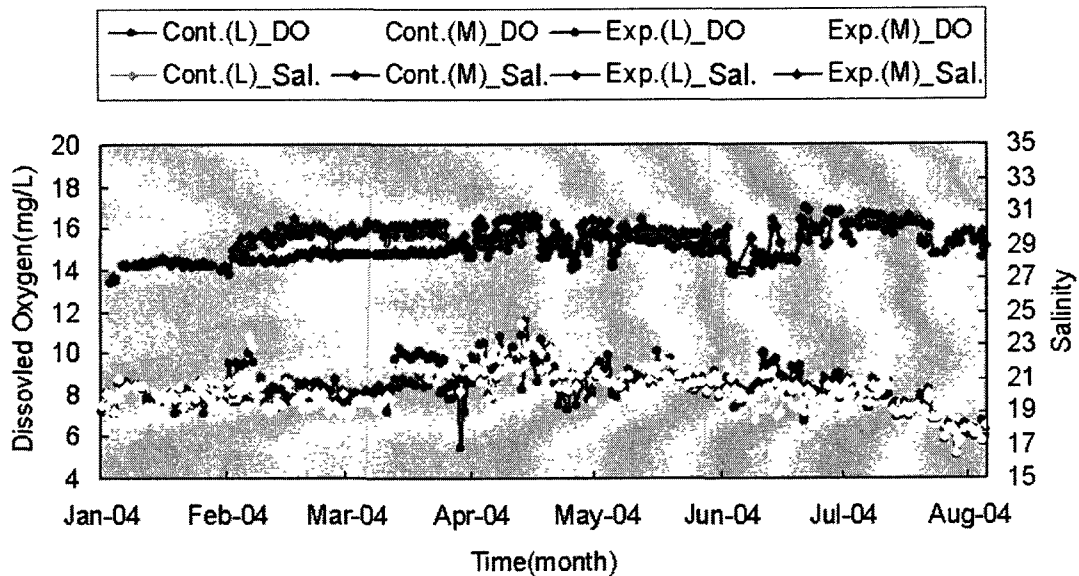


Fig. 2. Changes of dissolved oxygen and pH of sea water in the rearing tank during the study.

라. 선인장 발효액을 사용한 현장실험

1) 1차 결과

(가) 성장 및 생존율

종묘입식후 1개월 까지의 성장을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 실험시작시 대조구 대(L)수조내의 평균 넙치 전장은 7.53 ± 0.51 cm, 중(M)수조내의 평균 넙치 전장은 7.03 ± 0.35 cm를 나타냈다. 반면에 실험구 대(L)수조내의 평균 넙치 전장은 7.14 ± 0.31 cm, 중(M)수조내의 평균 넙치 전장은 6.87 ± 0.40 cm를 나타내어 실험시작시 대조구와 실험구간의 성장차이는 유의적으로 대조구 대(L)에서 높게 나타났다($P < 0.05$). 이후 한달 뒤의 평균 전장은 대조구 대(M)가 10.79 ± 0.68 cm로 성장하였고, 대조구 중(M)이 9.58 ± 0.87 cm로 성장하였다. 실험구에 있어서는 실험구 대(M)가 10.44 ± 0.84 cm, 실험구 중(M)이 9.80 ± 0.68 cm로 성장하여 입식후 한달뒤의 전장에 대한 결과는 대조구 대(L)와 실험구(L) 그룹과 대조구(M)과 실험구(M)그룹으로 나뉘어 졌으며 특히 실험구 중(M)에서는 대조구 중(M)의 값을 앞지르고 있었다.

체중의 경우도 전장의 경우도 마찬가지로 실험시작시 대조구 대(L)수조 내의 넘치가 다른 수조와 비교해 가장 높은 값을 보이고 있었다(P<0.05). 한달 이후의 체중 값은 대조구 대(L)가 14.31±2.97g으로 가장 두드러진 성장을 보이고 있었으며(P<0.05) 이어 실험구 대(L)와 실험구 중(M), 대조구(M)순으로 성장하였다.

각 실험구별 최종 생존율(survival rate)은 처음 입식시기의 마리수는 달랐으나 입식후 한달 후의 값을 비교해 본다면 대조군(L,M)과 실험군(L,M)간에는 차이를 보이지 않고 있었다. 증중율(weight gain(%))은 실험종료시 대조군(L,M)에 비해 실험군(L,M)에서가 높은 증중율을 나타내고 있었으며 대조구 대(L)에 비해 실험구 대(L)에서가 대조구 중(M)에 비해 실험구 중(M)에서가 높게 나타나고 있었다.

Table 3. Total length, body weight and survival rate of *Paralichthys olivaceus* by fermented cactus fluid.

Feeding period: Jan. 14, 2004 through Feb. 13, 2004

Group	Initial			Number of fish	Final			Survival rate(%)
	Number of fish	TL (cm)	BW (g)		TL (cm)	BW (g)	W. gain g(%)	
Cont.(L)	41932	7.53±0.51 ^b	4.08±0.75 ^b	41595	10.79±0.68 ^b	14.31±2.97 ^c	250.74	99.20
Exp.(L)	42639	7.14±0.31 ^a	3.38±0.43 ^a	42261	10.44±0.84 ^b	12.21±3.30 ^b	261.24	99.11
Cont(M)	58603	7.03±0.35 ^a	3.15±0.34 ^a	58172	9.58±0.87 ^a	9.44±2.08 ^a	199.68	99.26
Exp.(M)	45619	6.87±0.40 ^a	3.12±0.54 ^a	45164	9.80±0.68 ^a	10.30±1.94 ^a	230.13	99.00

Values (mean±SD) in the same columne not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05)

(나) 사료계수, 일간섭이율 및 성장률

실험기간동안의 사료계수(feed coefficient), 일간성장율(daily growth rate) 및 일간섭이율(daily feeding rate)에 대한 결과는 Table 4와 같다.

사료계수(feed coefficient)는 실험구 대(L)이 1.09로 가장 낮은 값을 나타냈고 그 뒤를 대조구 대(L)가 1.14로 나타나고 있었다. 중간그룹의 비교실험에서는 실험구 중(M)이 1.26으로 대조구 중(M)의 1.32에 비해 상대적으로 낮은 값을 보이고 있었다.

일간성장율(daily growth rate)도 사료계수의 경향과 같이 순바닥선인장 발효액 1% 처리군에서 보다 빠른 성장률을 보이고 있었다.

일간섭이율(daily feeding rate)은 전체적으로 차이를 보이지 않았다. 따라서 순바닥선인장 발효액 1% 처리군에서 대조군에 비해 사료효율이 상대적으로 좋은 것으로 나타났다.

Table 4. Feed coefficient, daily feeding rate and daily growth rate of *Paralichthys olivaceus* fed with fermented cactus fluid.

Feeding period: Jan. 14, 2004 through Feb. 13, 2004

Experimental group	Feed coefficient	Daily growth rate (%)	Daily feeding rate (%)
Cont. (L)	1.14	3.92	0.01
Exp. (L)	1.09	4.01	0.01
Cont. (M)	1.32	3.43	0.01
Exp. (M)	1.26	3.73	0.01

(다) 비만도

손바닥선인장 발효액이 넙치의 비만도에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 5와 같다. 모든 실험군에서 비만도는 성장함에 따라 증가되었으며, 실험종료 시에 대조구 대(L)의 비만도가 11.26±1.04로 유의적으로 높게 나타났다(P<0.05). 중간그룹(M)간에는 실험구 중(M)의 비만도가 상대적으로 높게 나타났다.

Table 5. Effect of different concentrations of dietary fermented cactus fluid on condition factor (CF) of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Feeding period: Jan. 14, 2004 through Feb. 13, 2004

	Exp. Group			
	Cont. (L)	Exp. (L)	Cont. (M)	Exp. (M)
Initial	9.50±1.04	9.31±1.05	9.12±0.92	9.65±1.74
Final	11.26±1.04 ^b	10.45±0.99 ^a	10.72±2.06 ^{ab}	10.83±0.67 ^{ab}

2) 2차 결과

종묘입식 1개월 후 분조를 통해 대(L) 크기와 중(M) 크기로 나누어 입식미수를 통일하여 수조에 입시하여 계속해서 선인장 발효액의 효과실험을 행하였다.

(가) 성장 및 생존율

1차 분조후 2개월 후까지의 성장을 조사한 결과는 Table 6과 같다. 분조직후의 대조구 대(L)수조내 평균 넙치 전장은 11.52±0.71cm로 실험구 대(L)의 11.14±0.56cm에

비해 큰 차이를 나타냈다. 대조구 중(M)도 10.90±0.57cm로 실험구 중(M)의 10.38±0.59 cm에 비해 상대적으로 차이를 보였다. 체중면에서도 이러한 차이를 나타내고 있었다. 이는 1차 분조시 전장면에서 큰 것을 기준으로 입식하였기 때문에 나타난 결과에 기인하였다. 1개월 후의 측정결과에서 전장과 체중면에서 크게 달라진 경향은 보이지 않았으나 중간그룹(M)에 있어서는 실험구 중(M)이 대조구 중(M)에 비해 통계적으로 별 차이를 보이지 않았다.

각 실험구별 최종 생존율(survival rate)은 실험군(L,M)에서 대조군(L,M)에 비해 상대적으로 높은 값을 보였다. 증중율(weight gain(%))은 실험종료시 실험군 중(M)이 가장 높은 증체량을 나타내고 있었다.

Table 6. Total length, body weight and survival rate of *Paralichthys olivaceus* by fermented cactus fluid.
Feeding period: Feb. 18, 2004 through Apr. 11, 2004

Group	Initial			Final				Survival rate(%)
	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	W. gain g(%)	
Cont.(L)	14243	11.52±0.71 ^c	16.84±2.68 ^d	13815	16.43±1.21 ^c	52.08±11.71 ^b	209.26	97.00
Exp.(L)	14243	11.14±0.56 ^b	15.25±2.65 ^c	14083	15.84±0.75 ^b	46.04±6.90 ^a	201.90	98.88
Cont.(M)	17100	10.90±0.57 ^b	13.64±2.00 ^b	16452	15.68±1.34 ^{ab}	44.98±11.09 ^a	229.77	96.21
Exp.(M)	17100	10.38±0.59 ^a	12.18±1.49 ^a	16699	15.34±1.21 ^a	42.61±10.40 ^a	249.84	97.65

Values (mean±SD) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05)

(나) 사료계수, 일간섭이율 및 성장률

이 시기의 사료계수(feed coefficient), 일간성장율(daily growth rate) 및 일간섭이율(daily feeding rate)에 대한 결과는 Table 7과 같다.

사료계수(feed coefficient)는 실험군(L,M)이 대조군(L,M)에 비해 낮은 값을 나타냈고 특히 실험구 중(M)에서가 가장 낮은 값인 1.20을 보이고 있었다.

일간성장율(daily growth rate)도 실험구 중(M)에서가 가장 빠른 성장을 보이고 있었다. 일간섭이율(daily feeding rate)은 전체적으로 차이를 보이지 않았다. 따라서 손바닥선인장 발효액 1% 처리군에서 대조군에 비해 사료효율이 상대적으로 좋은 것으로 나타났다.

Table 7. Feed coefficient, daily feeding rate and daily growth rate of *Paralichthys olivaceus* fed with fermented cactus fluid.

Feeding period: Feb. 18, 2004 through Apr. 11, 2004

Experimental group	Feed coefficient	Daily growth rate (%)	Daily feeding rate (%)
Cont. (L)	1.44	1.95	0.01
Exp. (L)	1.41	1.91	0.01
Cont. (M)	1.22	2.06	0.01
Exp. (M)	1.20	2.16	0.01

(다) 비만도

비만도 값은 Table 8과 같다. 모든 실험군에서 비만도는 성장함에 따라 증가되었으며, 이 시기에 비만도 값은 실험구 중(M)가 가장 높은 값을 보이고 있었다. 그 뒤를 대조구 대(L), 실험구 대(L)와 대조구 중(M)순으로 나타냈다.

Table 8. Effect of different concentrations of dietary fermented cactus fluid on condition factor (CF) of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Feeding period: Feb. 18, 2004 through Apr. 11, 2004

	Exp. Group			
	Cont.(L)	Exp.(L)	Cont.(M)	Exp.(M)
Initial	10.93±0.66	10.95±1.04	10.50±0.72	10.90±1.07
Final	11.59±0.92	11.51±0.70	11.44±0.65	11.60±0.86

(라) 혈액분석

실험종료후 실험군과 대조군의 혈액성상을 검사한 결과는 다음과 같다(Table 9). 알부민(ALB), A/G, 총 단백질(TP) 및 총 콜레스테롤(T-CHO)은 대조군과 첨가군 사이에 차이를 나타내는 경향은 볼 수 없었다. 지오티(GOT)와 지피티(GPT)의 경우는 대조군에 비해 첨가군에서 모두 낮은 값을 보이고 있었으며 특히 지오티(GOT)의 경우 이러한 경향이 분명하게 나타나고 있었다($P < 0.05$).

Table 9. Blood analysis of each group of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

	Exp. Group			
	Cont. (L)	Exp. (L)	Cont. (M)	Exp. (M)
Length(cm)	18.86±0.42d	18.60±1.49c	17.34±0.81b	16.62±0.64a
Weight(g)	67.06±9.00d	63.71±8.53c	55.18±5.52b	40.36±6.62a
ALB	1.50±0.18b	1.61±0.23c	1.60±0.31c	1.46±0.23a
A/G	0.47±0.03a	0.53±0.06c	0.51±0.06b	0.48±0.04a
TP	4.63±0.45b	4.65±0.45b	4.74±0.97c	4.50±0.62a
GOT	222.60±146.79bc	178.80±170.11a	235.80±191.11c	211.40±193.15b
GPT	50.00±70.80c	18.40±10.16a	22.60±8.79b	17.80±10.13a
T-CHO	273.80±92.64d	230.60±49.07b	195.80±84.68a	250.80±95.18c

Values (mean±SD) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05)

마. 선인장 발효분말을 사용한 현장실험

1) 3차 결과

2차 분조를 통해 대(L) 크기와 중(M) 크기로 나누어 입식미수를 통일하여 수조에 입식하여 계속해서 선인장 발효분말의 효과실험을 행하였다.

(가) 성장 및 생존율

2차 분조후 2개월 후까지의 성장을 조사한 결과는 Table 10과 같다. 분조직후의 평균 넙치 전장은 대조구 대(L) 17.56±0.82cm, 실험구 대(L) 16.87±0.75cm, 대조구 중(M) 16.42±0.80cm, 실험구 중(M) 15.88±0.79cm 순으로 나타났으며 각각의 그룹은 통계상 독립된 값을 갖고 있었다. 체중면에서도 이러한 차이를 나타내고 있었다. 이는 2차 분조시도 전장면에서 큰 것을 기준으로 입식하였기 때문에 나타난 결과에 기인하였다. 2개월 후의 측정결과에서 전장과 체중면에서 대조구와 실험구 간의 그룹별 차이는 거의 차이를 보이지 않아 대조구 대(L)와 실험구 대(L)는 전장과 체중면에서 비슷한 값을 보였으며 대조구 중(M)과 실험구 중(M)도 비슷하게 성장치를 보이고 있었다.

각 실험구별 최종 생존율(survival rate)은 대조군 대(L)와 실험군 대(L)에서는 대

조군 대(L)에서 다소 높은 생존율을, 대조군 중(M)과 실험구 중(M)의 비교에서는 실험구 중(M)에서 높은 생존율을 보이고 있었다. 증중율(weight gain(%))은 실험종료시 실험구 대(L), 실험구 중(M), 대조구 대(L), 대조구 중(M)순으로 선인장 발효분말 실험군에서가 높은 증체량을 나타내고 있었다.

Table 10. Total length, body weight and survival rate of *Paralichthys olivaceus* by fermented cactus powder

Feeding period: Apr. 16, 2004 through Jun.17, 2004

Group	Initial			Final				Survival rate(%)
	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	W. gain g(%)	
Cont. (L)	10000	17.56±0.82 ^d	63.68±11.46 ^d	9224	22.98±1.20 ^b	144.56±30.80 ^b	127.01	92.24
Exp. (L)	10000	16.87±0.75 ^c	56.11±7.87 ^c	9087	22.77±1.06 ^b	141.22±22.49 ^b	151.68	90.87
Cont. (M)	12000	16.42±0.80 ^b	50.86±7.66 ^b	10548	21.30±1.25 ^a	113.56±20.21 ^a	123.28	87.90
Exp. (M)	12000	15.88±0.79 ^a	46.43±7.55 ^a	10606	21.22±1.16 ^a	111.96±20.43 ^a	141.14	88.38

Values (mean±SD) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05)

(나) 사료계수, 일간섭이율 및 성장률

이 시기의 사료계수(feed coefficient), 일간성장율(daily growth rate) 및 일간섭이율(daily feeding rate)에 대한 결과는 Table 11과 같다.

사료계수(feed coefficient)는 실험군(L,M)이 대조군(L,M)에 비해 낮은 값을 나타냈고 특히 실험구 대(L)에서가 가장 낮은 값인 1.81을 보이고 있었다.

일간성장율(daily growth rate)도 실험구 중(M)에서가 가장 빠른 성장을 보이고 있었다. 일간섭이율(daily feeding rate)은 전체적으로 차이를 보이지 않았다. 따라서 손바닥선인장 발효분말 0.08% 처리군에서 대조군에 비해 사료효율이 상대적으로 좋은 것으로 나타났다.

Table 11. Feed coefficient, daily feeding rate and daily growth rate of *Paralichthys olivaceus* fed with fermented cactus powder.

Feeding period: Apr. 16, 2004 through Jun.17, 2004

Experimental group	Feed coefficient	Daily growth rate (%)	Daily feeding rate (%)
Cont. (L)	1.86	1.28	0.01
Exp. (L)	1.81	1.43	0.01
Cont. (M)	2.01	1.38	0.01
Exp. (M)	1.99	1.44	0.01

(다) 비만도

비만도 값은 Table 12와 같다. 모든 실험군에서 비만도는 성장함에 따라 증가되었으며, 이 시기에 비만도 값은 실험군에서 대조군에 비해 높은 값을 보이고 있었다. 가장 높은 비만도 값을 보인 그룹은 실험구 대(L) 수조로 11.87 ± 0.81 로 나타났다.

Table 12. Effect of different concentrations of dietary fermented cactus powder on condition factor (CF) of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

Feeding period: Apr. 16, 2004 through Jun.17, 2004

	Exp. Group			
	Cont. (L)	Exp. (L)	Cont. (M)	Exp. (M)
Initial	11.64 ± 1.01	11.66 ± 1.04	11.48 ± 1.23	11.52 ± 0.85
Final	11.76 ± 1.30	11.87 ± 0.81	11.60 ± 0.81	11.65 ± 0.91

2) 4차 결과

3차 분조를 통해 대(L) 크기와 중(M)크기로 나누어 입식미수를 통일하여 수조에 입식하여 계속해서 선인장 발효분말의 효과실험을 행하였다.

1) 성장 및 생존율

3차 분조후 2개월 후 실험종료시 까지의 성장을 조사한 결과는 Table 13과 같다.

분조직후의 평균 넙치 전장은 대조구 대(L) 25.17 ± 0.82 cm, 실험구 대(L)

24.11±0.81cm, 대조구 중(M) 23.34±0.85cm, 실험구 중(M) 22.73±0.81cm 순으로 나타났으며 각각의 그룹은 통계상 독립된 값을 갖고 있었다. 체중면에서도 이러한 차이를 나타내고 있었다. 이는 3차 분조시도 전장면에서 큰 것을 기준으로 입식하였기 때문에 나타난 결과에 기인하였다. 2개월 후 실험종료시의 측정결과에서 전장과 체중의 변화를 보면 대조구 대(L)에 비해 실험구 대(L)가 전장과 체중면에서 가장 높은 성장을 보여 최종 성장치는 전장 30.90±1.15cm, 체중 340.73±43.61g의 값으로 나타났다. 실험구 중(M)도 대조구 중(M)과 차이를 나타내지 않고 있었다.

이 시기별 각 실험구별 최종 생존율(survival rate)은 실험구 대(L)가 97.88%로 가장 높은 생존율을 보이고 있었다. 증중율(weight gain(%))은 실험종료시 실험구 중(M), 실험구 대(L), 대조구 중(M), 대조구 대(L) 순으로 선인장 발효분말 실험군에서 일반 대조구 수조에 비해 높은 증체량을 나타내고 있었다.

Table 13. Total length, body weight and survival rate of *Paralichthys olivaceus* by fermented cactus powder.

Feeding period: Jun. 22, 2004 through Aug. 20, 2004

Group	Initial			Final				Survival rate(%)
	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	W. gain g(%)	
Cont. (L)	5000	25.17±0.82 ^d	186.95±20.69 ^d	4849	30.49±1.34 ^b	328.34±46.03 ^b	75.63	96.98
Exp. (L)	5000	24.11±0.81 ^c	160.50±15.92 ^c	4894	30.90±1.15 ^b	340.73±43.61 ^b	112.29	97.88
Cont. (M)	6000	23.34±0.85 ^b	148.00±21.22 ^b	5795	29.21±1.42 ^a	286.71±47.19 ^a	93.72	96.62
Exp. (M)	6000	22.73±0.81 ^a	131.15±14.32 ^a	5758	28.95±0.94 ^a	284.21±34.09 ^a	116.71	95.97

Values (mean±SD) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05)

2) 사료계수, 일간섭이율 및 성장률

이 시기의 사료계수(feed coefficient), 일간성장율(daily growth rate) 및 일간섭이율(daily feeding rate)에 대한 결과는 Table 14와 같다.

사료계수(feed coefficient)는 실험군(L,M)이 대조군(L,M)에 비해 낮은 값을 나타냈다. 일간성장율(daily growth rate)도 실험구 중(M), 실험구 대(L), 대조구 중(M), 대조구 대(L) 순으로 나타나 선인장 발효분말 첨가구에서 빠른 성장을 보이고 있었다.

일간섭이율(daily feeding rate)은 전체적으로 차이를 보이지 않았다. 따라서 선인장 발효분말 0.08% 처리군에서 대조군에 비해 사료효율이 상대적으로 좋은 것으로 나타났다.

Table 14. Feed coefficient, daily feeding rate and daily growth rate of *Paralichthys olivaceus* fed with fermented cactus powder.

Feeding period: Jun. 22, 2004 through Aug. 20, 2004

Experimental group	Feed coefficient	Daily growth rate (%)	Daily feeding rate (%)
Cont. (L)	2.94	0.92	0.01
Exp. (L)	2.28	1.23	0.01
Cont. (M)	2.53	1.08	0.01
Exp. (M)	2.27	1.27	0.01

3) 비만도

비만도 값은 Table 15와 같다. 모든 실험군에서 비만도는 성장함에 따라 증가되었으며, 가장 높은 비만도 값을 보인 그룹은 실험구 중(M) 수조로 11.67±0.52로 나타났다.

Table 15. Effect of different concentrations of dietary fermented cactus powder on condition factor (CF) of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

Feeding period: Jun. 22, 2004 through Aug. 20, 2004

	Exp. Group			
	Cont. (L)	Exp. (L)	Cont. (M)	Exp. (M)
Initial	11.69±0.50 ^b	11.43±0.60 ^{ab}	11.59±0.82 ^b	11.15±0.57 ^a
Final	11.52±0.68	11.50±0.57	11.40±0.60	11.67±0.52

4) 혈액분석

실험종료후 실험군과 대조군의 혈액성상을 검사한 결과는 다음과 같다(Table 16). 알부민(ALB), A/G, 총단백질(TP) 및 총콜레스테롤(T-CHO)은 대조군과 첨가군 사이에 차이를 나타내는 경향은 볼 수 없었다. 지오티(GOT)와 지피티(GPT)의 경우는 대조군에 비해 첨가군에서 모두 뚜렷이 낮은 값을 보이고 있었다(P<0.05).

Table 16. Blood analysis of each group of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

	Exp. Group			
	Cont. (L)	Exp. (L)	Cont. (M)	Exp. (M)
Length(cm)	31.24±2.00d	30.82±1.45c	29.66±1.08b	28.96±1.01a
Weight(g)	336.00±71.72d	312.80±29.52c	287.40±19.37b	276.00±39.20a
ALB	1.52±0.14a	1.55±0.18b	1.65±0.14c	1.53±0.12a
A/G	0.44±0.02b	0.44±0.02b	0.42±0.03a	0.45±0.03c
TP	4.90±0.38b	5.02±0.45c	5.52±0.16d	4.85±0.26a
GOT	67.00±35.36d	44.26±37.68a	53.00±13.88c	48.25±26.22b
GPT	20.50±20.22b	15.00±9.20a	23.80±12.09c	14.60±12.20a
T-CHO	360.40±53.87a	406.20±44.82c	459.60±61.99d	371.40±68.00b

Values (mean±SD) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.9)

바. 고찰

손바닥선인장 열매를 유산균(*Lactobacillus plantarum* CNU001)을 이용하여 발효시킨 발효액과 이를 동결건조한 발효분말을 사용하여 넙치양식 현장에서의 생산성을 확인하기 위한 본 연구에서, 사료에 손바닥선인장 발효액(사료량대비 1.0%)과 발효분말(사료량대비 0.08%)을 첨가한 경우 넙치의 성장률, 증체율, 사료효율 및 비만도에 매우 좋은 효과를 나타내었다. 생존율면에서도 실험구에서 대조구(선인장 발효물 무 첨가구)에 비해 다소 높은 효과를 보이고 있었으나 전반적으로 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이는 양식현장에서의 종묘관리가 철저히 이루어진 결과에서 기인하였다고 생각된다. 본 연구에서 입식초기의 성장차를 극복하고 최종 성장률은 손바닥선인장 발효물을 섭취한 그룹에서 앞선 것으로 나타나 연구실에서 소규모로 행하였던 실험결과(고, 미 발표)를 분명히 입증하였다. 특히 양식장에서는 넙치 성장에 따라 분조가 이루어지고 있고, 분조시 가장 큰 개체들로 실험구와 대조구로 나누어 실험을 이어 갔기 때문에 실험초기의 유의성 있는 성장차를 극복하기란 여간 어렵지 않았다. 양식현장에서 대규모로 행해지는 양식방법상 초기에 성장이 고른 종묘들을 사용하여 실험이 이루어지지 못하여 초기부터 유의적인 성장차가 나는 집단을 가지고 실험에 임하였다. 실험 개시 후 7개월간의 실험기간에 양식현장에서의 손바닥선인장 발효물의 성장효과를 입증하였으나 실험초기 종묘입식부터 성장이 균일한 개체들을 실험어로 사용하였다면 보다 빠른 시기에 효과를 입증할 수 있었다고 사료된다.

Youn et al.^{63,64}은 미역 5% 첨가사료를 먹인 연구에서 참돔의 성장은 2주 후부터,

조피볼락의 경우에는 80일부터 차이를 보인다고 보고하고 있고, 황²⁵은 구기자 3%를 이용한 나일틸라피아 성장효과 실험에서 실험 8주째부터 체중이 대조군보다 더 증가되었다고 한다. 따라서 양식어류의 성장에 대한 식물자원의 효과는 단기의 급성효과보다는 일정기간이 지난 후 점진적으로 나타나는 만성효과인 것으로 보인다³⁸.

넙치를 대상으로 식물자원의 유용물질을 첨가하여 사료의 질적 향상을 피하고자 하는 연구가 최근 수행되어 오고 있다. 김 등³⁶은 넙치의 사료에 사람의 건강증진을 위해 사용하는 한방 생약제재 0.3%를 첨가하여 넙치 성장과 사료계수의 개선에 효과가 있다고 보고하였고 Kim et al.³은 넙치 치어를 대상으로 사료내 알로에 분말을 사료에 0.5%를 첨가함으로써 성장에 효과를 가져온다고 보고하였다. 이 밖에 감귤발효액을 이용한 연구⁶¹에서는 0.2%를 첨가하였을 때 성장차이를 보였다. 이들의 결과와 본 연구의 결과를 볼 때 발효 방법 및 미생물 균주는 다르지만 발효축이 첨가 농도면에서 매우 낮은 값을 보이고 있는 것으로 생각된다. 이러한 첨가농도의 차이는 양식현장에서 사용시 경제적으로 고려되어 저야 될 가장 중요한 요인이므로 중요하다고 할 수 있다. 따라서 각각의 유용 식물자원들의 특정성분효과 외에 발효의 특성을 더한다면 보다 좋은 결과로 나타날 수 있을 거라 생각된다.

ALB, A/G, TP, GOT, GPT, T-CHO는 어류에 있어 간기능 검사의 지표로 활용되어지는데 ALB, A/G, TP, T-CHO 수치는 실험군과 대조군간에 차이있는 경향은 보이지 않았다. 그러나 GOT와 GPT값은 실험군에서 확실한 차이로 감소를 하고 있었다. 이러한 경향은 손바닥선인장 열매가 갖고 있는 프라보노이드성분⁸을 이용한 넙치성장실험(고, 미발효)에서의 혈액학적 성분변화양상과 일치하여 아마도 손바닥선인장 열매를 주재료로 한 본 연구 결과와도 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다. 신 등(미발효)은 연쇄구균, 에드워드, 비브리오팀을 대상으로 손바닥선인장 발효물이 넙치 항병력에 효과가 있음을 입증하였는데 특히 손바닥선인장 발효물이 그람 양성균인 연쇄구균에 효과가 큰 것으로 나타나고 있었다²⁶. 이는 본 첨가제가 비특이적으로 넙치의 면역계에 반응하여 질병의 저항력을 강화시켜 줄 수 있음을 시사하고 있다. 따라서 손바닥선인장열매의 발효물을 이용한 본 첨가제가 양식넙치의 성장에 효과적이며 또한 사료계수값을 낮추고 비만도를 향상시키는 효과외에 항병력에 긍정적인 영향을 끼쳐 넙치 생산성향상에 많은 도움을 줄 수 있으리라 생각된다.

10. 관능평가

가. 목적

선인장 발효물을 급이한 넙치의 육질에 대한 맛의 차별성을 조사하여 “선인장 넙치”의 개발 가능성을 알아보기 위하여 비전문가인 패널을 대상으로 조사표(붙임자료)를 나눠 주고 각 항목을 기록하게 하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 제3장 2절 1항의 실험이 종료된 후 300g급의 넙치를 대상으로 하였으며 평가 그룹은 선인장 비첨가군(대조구)과 발효액 1%, 10%의 첨가구 그룹(실험구)과 민간양식장에서 300g을 구입하여 3개 그룹을 대상으로 비전문가 60명의 패널을 통해 나누어 준 작성표에 의해 이루어 졌다. 그 결과는 각 항목당 평균치로 나타냈다.

(2) 제3장 2절 3항의 실험이 종료된 후 900g급의 넙치를 대상으로 하였으며 평가 그룹은 선인장 비첨가군(대조구)와 발효분말 0.08%(실험구)의 첨가구 그룹을 대상으로 비전문가 70명의 패널을 통해 나누어준 작성표에 의해 이루어 졌다. 그 결과는 각 항목당 평균치로 나타냈다.

다. 결과

1) 발효액을 급이한 넙치를 대상으로 한 관능평가 (Fig.1)

가) 육질의 색깔 (선명도)

일반양식장의 넙치에서 가장 높은 선명도 값을 나타내고 있었으며 실험구에서는 대조구에 비해 선인장발효액 1% 첨가구가 상대적으로 좋은 점수를 받았으며 10%첨가구는 대조구에 비해 오히려 낮은 점수를 받았다.

나) 육질의 탄력성 (쫄깃쫄깃 정도)

육질의 탄력성(쫄깃쫄깃 정도)는 그룹간 별 차이가 없었다.

다) 육질의 기름기

양식장에서의 넙치가 가장 기름기가 많은 것으로 평가되었으며 실험군에서는 1%첨가군이 가장 높게 나타나고 있었다. 이러한 기름기의 차이는 양식현장에서 사용하는 사료 차이로 해석된다.

라) 육질의 뒤끝맛 (맛의 여운)

1%첨가군의 넙치가 가장 육질의 뒤끝맛(맛의 여운)이 높게 나타났으며 다음으로 양식산, 대조군, 10% 첨가군 순으로 나타났다.

2) 발효분말을 급이한 넙치를 대상으로 한 관능평가(Fig. 2)

가) 육질의 색깔 (선명도)

발효분말을 급이한 실험구에서 대조구에 비해 선명도면에서 좋게 나타났다.

나) 육질의 탄력성 (쫄깃쫄깃 정도)

육질의 탄력성 면에서도 선인장 급이구(실험구)에서 뚜렷한 차이를 보이고 있었다.

다) 육질의 기름기

대조구에서 상대적으로 미미하게 차이를 보이고 있었다.

라) 육질의 뒤끝맛 (맛의 여운)

실험구에서가 대조구에 비해 비전문가 집단에서는 육질의 뒤끝맛(맛의 여운)이 좋은 것으로 나타났다.

마. 고찰

발효액을 급이한 넙치의 경우는 성장면에서 가장 좋은 효과를 보였던 1%첨가구에서 양식장에서 구매된 넙치의 경우를 제외하고는 모든 항목에서 가장 높은 점수를 보이고 있었다. 양식장에서의 넙치인 경우는 생사료로 만든 MP사료로 급이한 것으로 지방에 의한 기름기가 상대적으로 EP사료로 실험한 넙치에 비해 높게 나타나고 있었다. 또한 색채(선명도)면에서도 양식산에 주로 익숙해진 패널들의 시각 차이로 보아진다. 발효분말을 급이한 그룹과 대조구의 비교에서도 액상 급이구 1%

그룹과 마찬가지로 특히, 비전문가가 느끼기에 육질의 브랜드화로 가장 중요시하게 생각되는 육질의 뒤끝맛(맛의 여운)에서 가장 좋은 점수를 나타내고 있었다. 이러한 맛의 차이는 주로 육질의 지방산에서 오는 차이로 생각되어지지만 폐닐들의 평가는 의외로 납치가 갖는 비릿한 맛을 줄여 준다고 하는 점에서 분명한 차이를 보이고 있었다.

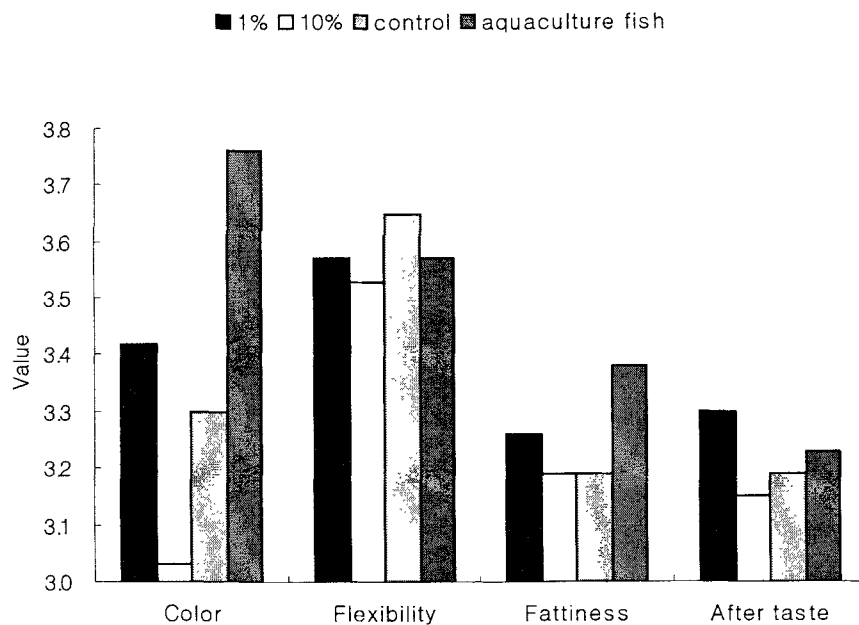


Fig. 1. A sensuality check of the flatfish which ate cactus fermentation fluid.

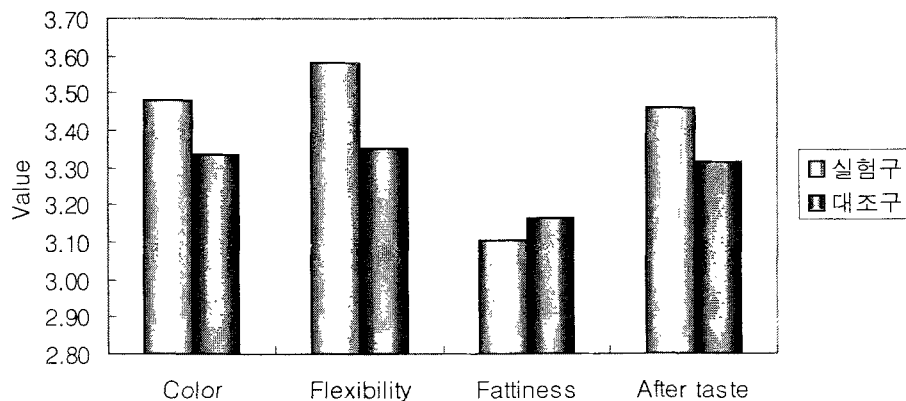


Fig.2. A sensuality check of the flatfish which ate cactus fermentation powder.

넙치육질 관능검사

0000년 0월 0일

* 감기를 앓고 계시는 분은 검사요원에서 제외됩니다

관능검사항목	A	B
육질의 색깔 (선명도)	① ② ③ ④ ⑤	① ② ③ ④ ⑤
육질의 탄력성 (졸깃졸깃 정도)	① ② ③ ④ ⑤	① ② ③ ④ ⑤
육질의 기름기	① ② ③ ④ ⑤	① ② ③ ④ ⑤
육질의 뒤끝맛 (맛의 여운)	① ② ③ ④ ⑤	① ② ③ ④ ⑤

◎ 평가기준 (5단계)

- 5 - 아주 좋음
- 4 - 좋 음
- 3 - 보 통
- 2 - 다소 미흡
- 1 - 미 흡

◎ 관능검사 요령

시료의 맛을 천천히 음미한 후 물로 입을 헹구고 다음 시료의 맛을 음미한다.

※ 관능검사에 협조해 주셔서 대단히 감사합니다. 즐거운 하루 되십시오.

제주도해양수산자원연구소

11. 경제성평가

가. 선인장 재배농가에 미치는 영향

- 약 16억원 판매효과 (현재 선인장 생산량(3,000톤)의 약 27% 처리난 해소)
 - ⇒ 도내 연간 넙치양식 사료량(약 8만톤)×1%(선인장 소비효율)
 - = 800톤(선인장 소비량) × 2,000원 (kg당 판매가) = 16억원

나. 제주도 양식어가에 미치는 영향

- 약 156억원
 - 넙치양식 생산원가 절감(10%생산비절감) : 약 149억원
 - ※ 넙치1kg 생산원가(9,670원, 국립수산과학원),
도내 넙치 총생산량(15,351톤/2003년)
 - 폐사율 감소(약5%) : 약 7억원
 - ※ 연간 제주도내 어병피해 추정액 : 140억원

다. 맛의 차별화로 양식넙치의 품질 브랜드화 ⇒ '선인장넙치'

라. 손바닥선인장의 생산 추이

연 도 \ 구 분	재배면적(ha)	재배농가	생산량(톤)
96년도	106	120	1300
99년도	317	639	6000
01년도	200	350	3200
03년도	199	350	3000

- 북제주군 농업기술센터 자료

마. 연도별 제주도 양식넙치 사료 사용실태

(단위, 톤)

구 분 \ 연 도	2000	2001	2002	2003
계	50,050	58,215	59,980	76,755
생사료	46,046	53,557	55,181	70,614
배합사료	4,004	4,658	4,799	6,141

- 해수어류양식수협 자료

12. 참고문헌

1. 고경식, 1984. 광속 식물 분류학. 314-316. 세문사. 서울.
2. 김종평 · 유익동, 1996. 향산화제 탐색, (in) 신물질탐색. 자유아카데미, 서울. pp. 325-349.
3. 김강웅 · 구자완 · 김기홍 · 배승철. 2000. 사료내 알로에 첨가가 치어기 넙치의 성장과 면역반응에 미치는 영향. 춘계수산관련 공동학술대회. 302-303.
4. 배인영 · 윤은주 · 우정민 · 김주신 · 이현규 · 양차범. 2002. 손바닥 선인장 열매를 이용한 전통주 개발 -I. 전통주 제조기법을 이용한 발효주 및 증류주의 특성. J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol. 45,11-17.
5. 정세준 · 전기용 · 강태현 · 고응배 · 김윤철, 1999. 손바닥선인장 열매의 Flavonoid 성분. 한국 생약학회지. 30(1),84-97.
6. 상해과학기술출판사 소학관편, 1985 중약대사전. 1532-1533. 소학관. 동경.
7. 송주택 · 정현철 · 김병무 · 태희성, 1989. 한국식물대도감. 한국자원식물연구원, 제일출판사, 684-685.
8. 이영철 · 황금희 · 한동휴 · 김성대 1997. 손바닥선인장 성분분석. 한국식품과학회지. 29(5):847-853.
9. 이후장, 1997. 렛드의 스트레스성 위궤양에 대한 선인장의 항궤양작용에 관한 연구. 서울대학교 보건대학원 석사학위논문.
10. 이영돈 · 송영보 · 문순주 · 박승림 · 문영배. 2000. 키토산올리고당을 투여한 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 성장 효과, 춘계수산관련학회 공동학술 대회. 290-291.

11. Adron, J. W. and Mackie, A. M., 1978. Studies on the chemical nature of feeding stimulants for rainbow trout. *J. Fish Biol.*, 12, 303-310.
12. Apella, M. C., Gonzalez, S. N., Nader de Macias, M. E., Romero, N. and Oliver, G., 1992. In vitro studies on the inhibition of the growth of shigella sonnei by Lactobacillus casei and Lact. acidophilus. *J. Appl. Bacteriol.*, 73, 480-483.
13. Ahmad, A., Davies, J., Randall, S. and Skinner, G. R. 1996. Antiviral properties of extract of Opuntia streptacantha. *Antiviral Res.*, 30, 75-85.
14. Arima, H., Ashida, H., Danno, G., 2002. Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against Bacillus cereus and Salmonella enteritidis. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 66(5), 1009-1014.
15. Burrer, F., Lebreton, P. H. and Voirin, B., 1982. Les aglycones flavoniques de catees : distribution, signification. *J. Nat. Prod.*, 45, 687-693.
16. Carr, W. E. S., 1982. Chemical stimulation of feeding behaviour. pp. 259-273. (in) *Chemoreception in Fishes.* (ed.) Hara, T. J., Amsterdam, Elsevier.
17. Chun, S. K., 1992. Nutritional disease induced by oxidation of lipids in the fish meal. *J. Fish Biol.*, 36, 499-509.
18. Choi, M. S., Park, K. H., Choi, S. H., Kim, J. Y., Kim, J. M., Choi, J. G. and Jang, S. I., 1995. Effect of Enteromorpha compressa on the physiological activities in carp, Cyprinus carpio. *J. Fish Pathol.*, 8(2), 149-156.
19. Elias, P. and Joesph, H. S., 1999. Identification of feeding stimulants

- for striped bass, *Morone saxatilis*. *Aquaculture*, 185, 339-352.
20. Fuke, S., Konosu, S. and Ina, K., 1981. Identification of feeding stimulants for striped bass, *Morone saxatilis*. *Aquaculture*, 185, 339-352.
21. Fukuda, K., Kohbara, J., Zeng, C. and Hidaka, I., 1989. The feeding stimulatory effects of squid muscle extracts on the young yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 55(5), 791-797.
22. Formica, J.V., Regelson, W., 1995. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.*, 33(12), 1061-1080.
23. Haenen, G. R. and Paqueay, J. B., 1997. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Comm.*, 236, 591-593.
24. Hilton, J. W., 1989. The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish. *Aquaculture*, 79, 223-244.
25. Hwang, M. H., Park, S. I. and Kim, Y. C., 1999. Effect of Dietary Herb Medical Stuff on the Non-specific Immune Response of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Fish Pathol.*, 12(1), 7-15.
26. Heo, S. D., Park, D. S., Go, G. M., Kim, M. K., Son, W. G., Lee, D. S. and Shin, T. K., 2003. Antibacterial Effect of *Opuntia ficus-indica* Fermentation in Cultured Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.*, 27(3), 143-147.
27. Ikeda, I., Hosokawa, H., Shimeno, S. and Takeda, M., 1988. Identification of feeding stimulant in the krill extract for jack mackerel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54(2), 235-238.
28. Itoh, K., 1999. Lactic acid bacteria and intestinal microflora. The 11th

- internatinal symposium on Lactic acid bacteria and human health. Seoul, Korea. 23-25.
29. Iwao, H., Hun, K., Toshiyoshi, A., Tatsuo, M., Toshiaki, M., Shigeki, S. and Isao, K., 2000. Identification of feeding stimulants from a jack mackerel muscle extract for young yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture*, 181(1-2), 115-126.
30. Jo, M. G. and Jeon, S. K., 1990. Ceroid by Oxidized pellet and its Prevention Effective of Vitamin E and C, Korea Fish disease Society, 3, 69-79.
31. Jung, S. H., Lee, J. S., Han, H. K., Jun, C. Y. and Lee, H. Y., 2002. Effects of Medicinal Herb Extract on Non-specific Immune Responses, Hematology and Disease Resistance on Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.*, 15(1), 25-35.
32. Kroger, M., Kurmann, J. A. 1989. Fermented milk-past present and future. *Food Technol.*, 43, 92-99.
33. Kohbara, J., Fukuda, K. and Hidaka, I., 1989. The feeding stimulatory effects of jack mackerel muscle extracts on the young yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 55(8), 1343-1347.
34. Kim, I. H., Kim, M. H., Kim, H. M. and Kim, Y. E., 1995. Effects of antioxidants on the thermostability of red pigment in prickly pear. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27(2), 1013-1016.
35. Kunizane, H. and Ueda, H., 1995. Screening of phagocyte activators in plants : enhancement of TNF production by flavonoids. *Yakugaku Zasshi* 115, 749-755.
36. Kim, J. Y. and Choi, M. S., 1996. Effects of Dietary Enteromorpha

- compressa on Growth and Blood Properties in Israeli Strain of Common carp, *Cyprinus carpio*. *J. of Aquaculture*, 9(2), 151-157.
37. Kim, S. H., Kim, Y. K. and Gilliland, S. E. 1997. Screening and partial purification of bacteriocins by strains of *Lactobacillus acidophilus* isolated from human origin. *Kor. Dairy Technol.*, 15(1), 21-26.
38. Kim, D. S., Kim, J. H., Jeong, C. H., Lee, S. Y., Lee, S. M. and Moon, Y. B., 1998. Utilization of Obosan(Dietary Herbs) I. Effects on Survival, Growth, Feed Conversion ratio and Condition factor in Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. of Aquaculture*, 11(2), 21, 3-221.
39. Kim, K. H., Hwang, Y. J. and Bai, S. C., 1999. Resistance to *Vibrio alginolyticus* in juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli*. fed diets containing different doses of aloe. *Aquaculture*, 180, 13-21.
40. Kim, K. W., Park, G. J., Ok, I. H., Bai, S. C., Choi, Y. J. and Shin, I. S., 2002. Effects of Dietary Synthetic Amino Acid Supplementation in Korean Rockfish Fry *Sebastes schlegeli*. *J. of Aquaculture*, 15(3), 157-163.
41. Lee, J. Y., Lee, S. M. and Jeon, I. G. 1995. Effects of a practical Korean rockfish(*Sebastes schlegeli*) diet : Comparison with raw fish and moist pellet diet. *J. Aquaculture*, 8, 261-269.
42. Lee, H. J., Lee, Y. W. and Kim, J. H., 1998. A study on Antiulcer Effects of *Opuntia dillenii* Haw. on Stomach Ulcer Induced by Water-immersion Stress in rats. *J. Food Hyg Safety*, 13, 53-61.
43. Min, B. S., 1988. Maturation and spawning of flounder(*Paralichthys olivaceus*) under captive conditions. *J. Aquaculture*, 1, 25-39.
44. Minoso, M. G. G., Borlongan, I. G. and Satoch, S., 1999. Essentiality of

- Phosphorus, Magnesium, Iron, Zinc, and Manganese in Milkfish Diet. Fisheries Science. 65(5), 721-725.
45. Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, 2002. Statistical Yearly Book of Maritime Affairs and Fisheries pp. 1000-1054.
46. Nakagawa, H., Kasahara, S., Tsujimura, A. and Akira, K., 1984. Changes of body composition during starvation in chlorella-extract fed Ayu. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 50(4), 665- 671.
47. Nakagawa, H., Kumai, H., Nakamura, M. and Kasahara, S., 1985. Effect of algae diet on serum and body constituents of cultured yellowtail. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 51(2), 279-286.
48. Nakagawa, H. and Kasahara, S., 1986. Effect of Ulva-meal supplement to diet on the lipid metabolism of red sea bream. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 52(11), 1887-1893.
49. Nematipour, G. R., Nakagawa, H., Nanba, K., Kasahara, S., Tsujimura, A. and Akira, K., 1987. Effects of Chlorella-extract supplement to diet on lipid accumulation of ayu. Nippon Suisan Gakkaishi. 53(9), 1687-1692.
50. Nikl, L., Evelyn, T. P. T. and Albright, L. J., 1993. Trials with an orally and immersion-administered β -glucan as an immunoprophylactic against *Aeromonas salmonicida* in juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. Dis. Aqua. Organ., 17, 191-196.
51. Park, S. W. and Kim, Y. G., 1996a. Enhancement of the resistance of Korean catfish (*Silurus asotus*) to experimental *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila* infection by β -glucan administration. J. Fish Pathol., 9(1), 79-85.

52. Park, S. W., Kim, Y. G. and Choi, D. L., 1996b. Increase in phagocytic activity of peripheal neutrophil and lysozyme activity of blood serum in Korea catfish(*Silurus asotus*) intraperitoneally injected with β -glucan. *J. Fish Pathol.*, 9(1), 87-93.
53. Park, S. M., Park, S. I., Huh, M. D. and Hong, Y. K., 1999. Inhibitory effect of Green Tea extract on collagenase activity and growth of fish pathogenic bacteria. *J. Fish Pathol.*, 12(2), 83-88.
54. Paik, S. M., Kim, H., Yang, S., Song, C., Shin, T. K. and Han, S. 1999. The effects of *Opuntia ficus-indica* fruit powder on anti-oxidant parameters in senescence-accelerated mouse(SAM). *Korean J. of Gerontology*, 9. 70-77.
55. Ruchimat, T., Masumoto, T., Hosokawa, H. and Shimeno, S., 1997. Quantitative methionine requirement of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture*, 150(1-2), 113-122.
56. Satoh, K., Nakagawa, H., and Kasahara, S., 1987. Effect of *Ulva* meal supplementation on disease resistance of red seabream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53(7), 1115~1120.
57. Satoh, S., Ishida, R., Takeuchi, T., Watanabe, T. and T. Seikai, 1998. Necessity of Mineral Supplement to Fish Meal Based Red Sea Bream Feed, *Suisanzoshoku*. 46(4), 535-540.
58. Shin, T. K., Kim, S. J., Lee, S. J., 1998. Effects of *opuntia ficus-indica* extract on the activation of immune cells with special reference to autoimmune disease models. *Korean J. of Vet. Pathology*, 2, 31-35.
59. Shin, T. K., Kim, S. J., Moon, C. J., Wie, M. and Hyun, B. 1999. *Opuntia ficus-indica* ethanol extract ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia in rats. *Korean J. of Gerontology*, 9(1), 78-83.

60. Satoh, S., Ishida, R., Takeuchi, T., Watanabe, T., Mitsuhashi, N., Imaizumi, K. and Seikai, T., 2001. Necessity of Mineral Supplement to Fish Meal Based Feed for Yellowtail and Japanese flounder, *Suisanzoshoku*, 49(2), 191-197.
61. Song, Y. B., Moon, S. W., Kim, S. J. and Lee, Y. D., 2002. Effect of EM-fermented orange in commercial diet on growth of juvenile flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. of Aquaculture*, 15(2), 103-110.
62. Teshima, S. I., Kanazawa, A., Koshio, S. and Itoh, S., 1993. L-ascorbyl-2-phosphate-mg as vitamin C source for the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish nutrition in practice.*, Institut national de la recherche agronomique, Paris(France), pp. 157-166.
63. Yone, Y., Furuichi, M. and Urano, K., 1986a. Effects of wakame *Undaria pinnatifida* and *Ascophyllum nodosum* supplements on growth, feed efficiency and proximate composition of liver and muscle of red seabream. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 52(8), 1465-1468.
64. Yone, Y., Furuichi, M. and Urano, K., 1986b. Effects of 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.
65. Yi, Y. H. and Chang, Y. J., 1994. Physiological Effects of Seamustard Supplement Diet on the Growth and Body Composition of Young Rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Bull. Korean Fish. Soc.* 27(1), 69-82.

제 3 절 선인장 발효물이 양식넙치에 미치는 면역기능

1. 렉틴(Lectin)을 이용한 양식넙치 조직에서의 조직화학 성상

가. 서론

렉틴은 자연적으로 넓게 분포하는 비면역원성의 carbohydrate 부착 단백질이다³². Glycoprotein과 glycolipid의 carbohydrate 부위에 부착하는 렉틴은 세포부착³⁶, 세포 인식³⁷, protein folding¹¹, signal transduction^{7,31} 등의 다양한 생물학적 과정 등과 관계가 있다.

모든 렉틴분자들은 carbohydrate에 반응하거나 세포를 응고시키는 특성을 갖는 두 개 이상의 carbohydrate 부착부위를 가진다⁵⁶. 각각의 다른 렉틴들은 carbohydrate 에 있는 sugar의 group이나 특이한 sugar에 부착한다⁵¹. 이전의 연구들에서 SBA는 lymphocyte에서 mitogenicity를 일으키는 능력을 포함하여 중요한 생물학적인 능력을 가지는 식물 lectin의 legume family의 member라고 알려져 있다³⁹. DBA는 a-linked N-acetylgalactosamine에 carbohydrate specificity를 갖고 DBA 부착위치는 embryonic mouse organs의 상피에 특이하게 발현되었다^{9,40}. 식물 lectin인 isolectin B4는 membrane과 연관된 glycoconjugate의 carbohydrate chain에 있는 a-D-galactose 잔기에 높은 특이성을 갖는다고 한다^{13,19}. 또한 Galectin-3는 beta-galactoside-binding protein인 galectin family 중 하나로 단핵세포, 큰포식세포⁵⁷, 그리고 상피세포 등의 다양한 세포에서 발현, 분비된다³⁸. 이렇게 발현된 단백질은 세포를 활성화시키고, 단핵세포, 큰포식세포 및 상피세포의 이동을 유도하며, 세포의 부착, 세포성장, 암세포의 전이, 그리고 apoptosis에 관여하는 것으로 알려지고 있다^{12,25,28}. 한편 세포표면의 galectin-3는 T-cell receptor clustering을 제한하여 T-cell활성을 억제하는 것이 규명되기도 하였다¹⁴.

점액은 물고기에서의 자가방어 system에서 중요한 화학적 방어막이다. 이는 내재성 혹은 습득성 면역에 참여하는 다양한 종류의 분자를 포함한다. 그리고 렉틴과 렉틴유사물질들은 많은 종류의 물고기에서 피부점액에서 관찰되었다¹. 이는 물고기 cutaneous lectin이 이들의 응고능력 때문에 물고기 체표면에서 생체방어 system에 기여한다고 추측된다⁴¹.

넙치는 제주의 양식 산업에 중요한 물고기이다. 그러므로, 더 나은 양식 환경을 위

해서 양식 물고기에서 생체방어기전을 연구하는 것이 중요하다. 양식 물고기에서 생체 방어에 참여하는 다양한 후보들 중의 하나라고 알려진 렉틴의 분포양상은 많이 알려져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 물고기에서 생체방어에 어떠한 기능을 갖는지 확인하고자 넙치의 다양한 조직에서 SBA, DBA, isolectin B4를 포함하는 세가지 렉틴의 분포위치에 초점을 맞추었다.

나. 재료 및 방법

1) 실험어

제주 해양수산자원 연구소에서 5개월간 실온($20\pm 2^{\circ}\text{C}$)의 흐르는 바닷물에서 기른 100-200g의 넙치를 사용하였다. 1일 2회 사료를 급여하였고 체중이 300-400g 일 때 sacrifice 하였다 (n=5).

2) 샘플채취

물고기는 sacrificed 하여 조직학적 관찰을 위해서 48시간 동안 10% 중성 formalin 에 간, 신장, 아가미, 장, 심장 그리고 비장을 고정하였다.

3) 조직학적 관찰

조직은 10% 중성 포르말린에 고정하고 파라핀 포매 후 $5\mu\text{m}$ 두께로 절편한후 routine histological technique에 의해 H-E 염색을 실시하였다. 이하 정상 넙치의 파라핀 포매 조직의 절편들은 렉틴 관찰을 위해 염색되었다.

4) lectin

본 연구에서 사용된 lectin은 *Bandeiraea simplicifolia* agglutinin (isolectin B4, Peroxidase labeled, Sigma, St. Louis, MO), *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA, Peroxidase labeled, Sigma), *Glycine max* agglutinin (SBA, Peroxidase labeled, Sigma) 이며 표1과 같다. 또한 galectin-3가 비브리오균을 접종한 후, 선인장 발효물을 사료에 첨가하여 섭식한 군과 그렇지 않은 군에서 galectin-3의 발현을 광학현미경 상에서 5시야로 나누어 양성세포의 수를 세어 각각 평균을 내었으며, 선인장 발효물을 첨가한 사료를 섭식한 군과 그렇지 않은 군을 비교하였다.

Table 1. Lectin specificity

Lectin	Abbreviation	Binding specificity
N-acetylgalactosamine group		
Bandeiraea simplicifolia lectin	isolectin B	α -GalNAc, α -Gal
Dolichos biflorus agglutinin	DBA	α -GalNAc
<i>Glycine max</i> (soybean agglutinin)	SBA	α -GalNAc
N-acetylglucosamine group		
<i>Triticum vulgaris</i> (wheat germ)	WGA	β -GalNAc
Galactose group		
<i>Arachis hypogaea</i> (peanut)	PNA	β -Gal
Fucose group		
<i>Ulex europaeus</i> - I	UEA- I	α -Fuc

5) lectin 조직화학

조직은 단계별로 된 알콜(70, 80, 90, 95, 100%)을 통과하여 탈수 시켰고, xylene에서 투명화, 파라핀 포매를 거쳐 microtome에서 5 μ m 두께로 절편되었다. 절편은 파라핀 제거, 탈수과정을 거치기 전에 slide glass 위에 놓았다. endogenous peroxidase activity는 30분간 0.3% hydrogen peroxide에 처리하여 block하였다. PBS 에 3회 수세 후 10% normal horse serum에 노출하였고, 그리고 나서 3시간 동안 DBA(1:10희석), SBA(1:400희석), isolectin B4(1:50 희석)를 실온에서 처리하였다. peroxidase는 DAB-hydrogen peroxidase solution에 의해 발현시켰다. 절편은 hematoxylin으로 counterstain 하였다.

다. 결과

1) lectin의 조직학적 관찰

조직학적 관찰은 아가미, 간, 장, 신장, 심장, 비장등에서 염증세포가 없음을 보여

주고, lectin histochemistry를 위해 사용되었다.

아가미에서 렉틴 반응은 DBA (Fig. 1A), SBA (Fig. 1B), isolectin B4 (Fig. 1C), WGA (Fig. 1D), PNA(Fig. 1E), UEA-I (Fig. 1F)가 gill filament의 점액 세포와 상피 세포에 특이적으로 발현되었다. 이들 중 isolectin B4, WGA, UEA는 gill의 표면 세포에 강하게 양성반응을 나타내었다. 반면 PNA는 약하게 양성이거나 gill arch 부위에서 발현되지 않았다.

DBA (Fig. 2A), SBA (Fig. 2B), isolectin B4 (Fig. 2C)는 gill racker에서 약하게, 점액세포와 gill racker의 점액 상피에서 WGA (Fig. 2D)와 UEA-I (Fig. 2F)은 강하게 관찰되지만 PNA (Fig. 2E)는 모든 세포에서 반응이 없었다.

간에서 몇몇 담관의 상피세포는 SBA (Fig. 3B), UEA-I (Fig. 3F)에 강하게 양성 있었고 isolectin B4 (Fig. 3C)는 담관의 적은 상피세포에서만 양성을 보였다. 또한 WGA (Fig. 3D)에서는 sinusoid에 강한 양성반응을 나타내었다. 하지만 DBA (Fig. 3A), PNA (Fig. 3E)는 간에서 어떠한 세포에서도 나타나지 않았다. 간세포에서는 렉틴반응이 없었다.

장에서 DBA반응은 장샘의 점액세포에서 나타났다 (Fig. 4A). SBA (Fig. 4B), WGA (Fig. 4D)는 club cell에 나타났으며 isolectin B4는 상피세포에서 나타났다 (Fig. 4C). PNA (Fig. 4E)는 반응을 나타내지 않았다. club cells은 핵의 위 혹은 아랫쪽 둘다에 위치하는 큰 분비 vacuole을 갖는 둥근 모양의 머리를 가진다.

신장에서 렉틴 반응 (Fig. 5)은 신세뇨관의 상피세포에서 나타났다. DBA는 다른 두 렉틴보다 신장에서 덜 풍부했다. PNA는 반응을 보이지 않았다. 심장과 비장에서 렉틴반응은 나타나지 않았다(data not shown).

아가미, 간, 장, 신장에서 6가지 렉틴의 조직화학적 반응은 Table 2에 요약하였다.

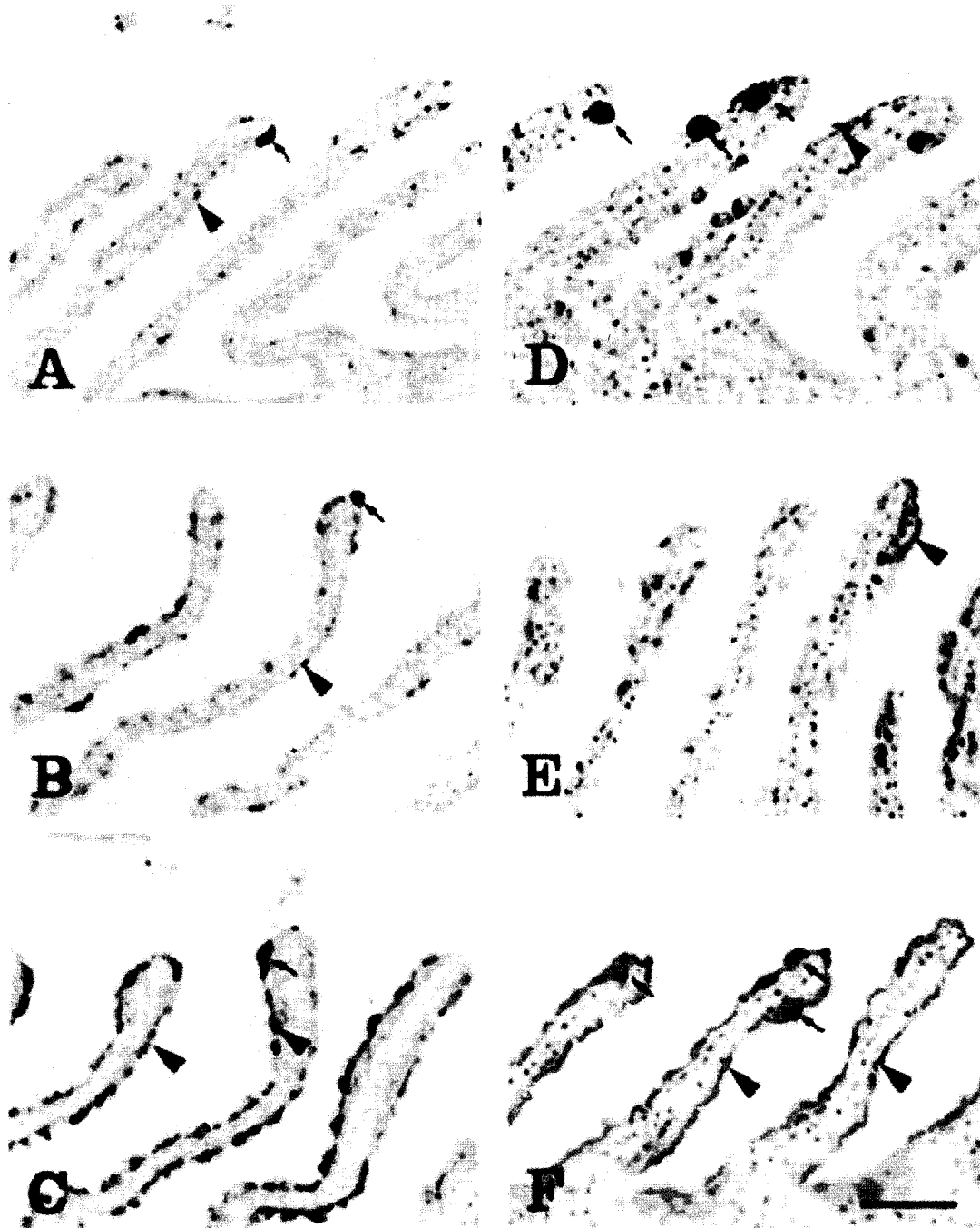


Fig. 1. Histochemical staining of DBA (A), SBA (B), isolectin B4 (C), WGA(D), PNA(E) and UEA-I(F) in the gill filament of the flat fish, *Paralichthys olivaceus*. Lectins including DBA (A), SBA (B), isolectin B4 (C), WGA(D), PNA(E) and UEA(I) were specifically expressed in the mucus (arrow) and epithelial (arrowhead) cells of the gill. Counterstaining with hematoxylin. Scale bar = 30 μ m.

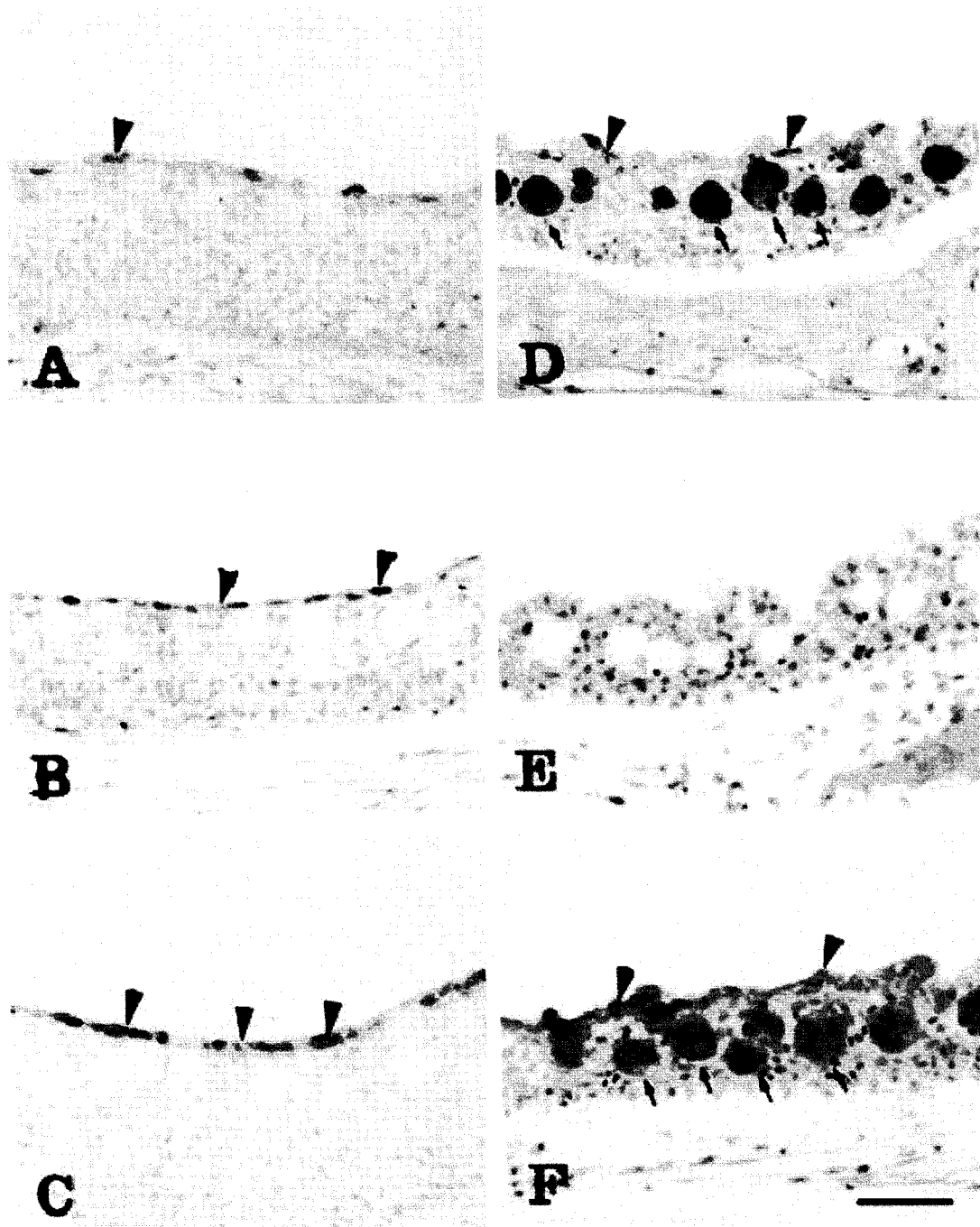


Fig. 2. Histochemical staining of DBA (A), SBA (B), isolectin B4 (C), WGA(D), PNA(E) and UEA-I(F) in the gill arch of the flat fish, *Paralichthys olivaceus*. Lectins, DBA (A), SBA (B), isolectin B4 (C), WGA(D) and UEA(F) were specifically expressed in the mucosal (arrow) and gill raker (arrowhead) cells of the gill. PNA(E) was not expressed. Counterstaining with hematoxylin. Scale bar = 30 μ m.

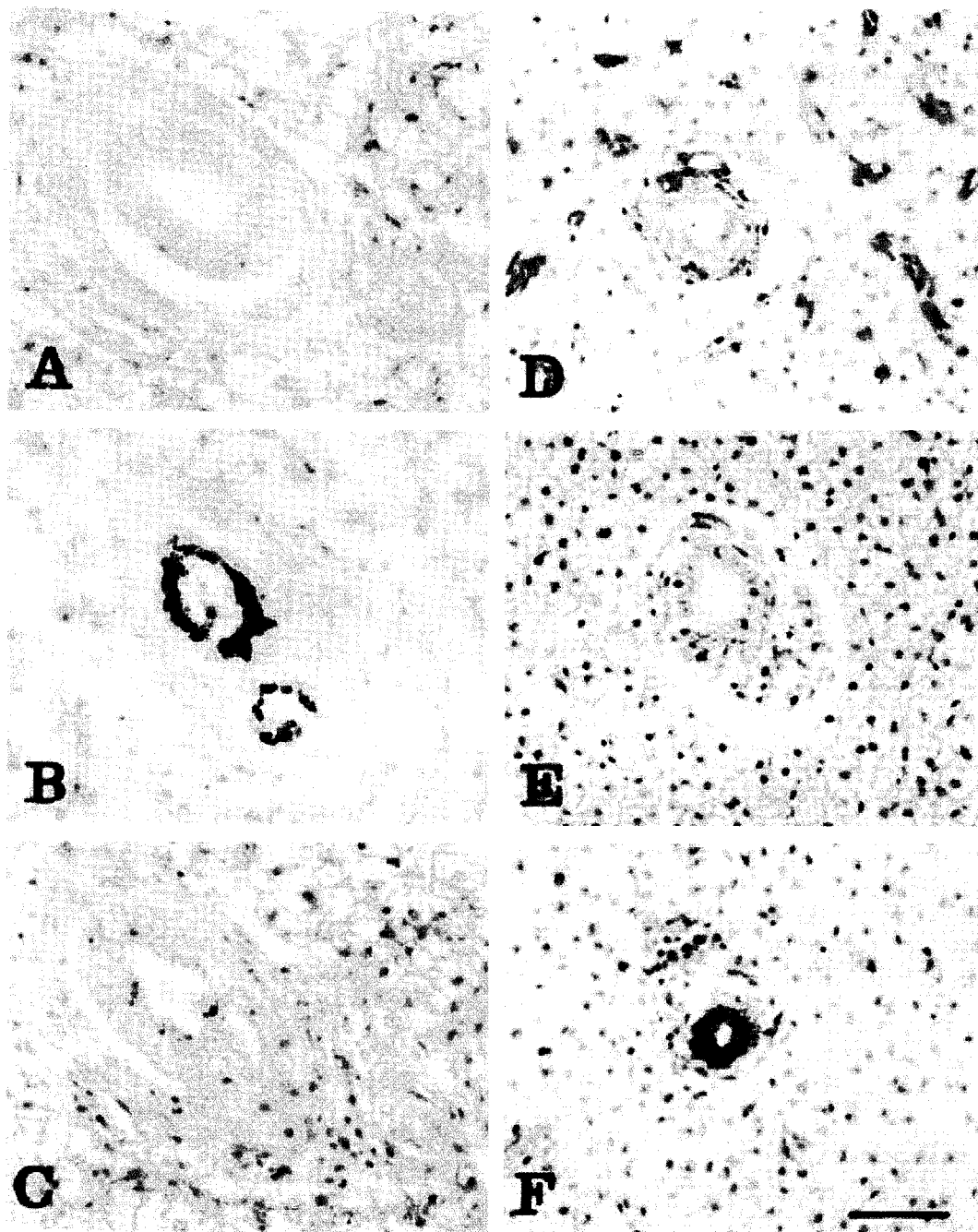


Fig. 3. Histochemical staining of DBA (A), SBA (B), isolectin B4 (C), WGA(D), PNA(E) and UEA-I(F) in the liver. Some epithelial cells of the bile duct were positive for SBA (B), isolectin B4 (C) and UEA-I(F), but DBA(A) and PNA(E) was not seen in the liver. WGA(D) was expressed in the sinusoid. Counterstaining with hematoxylin. Scale bar = 30 μ m.

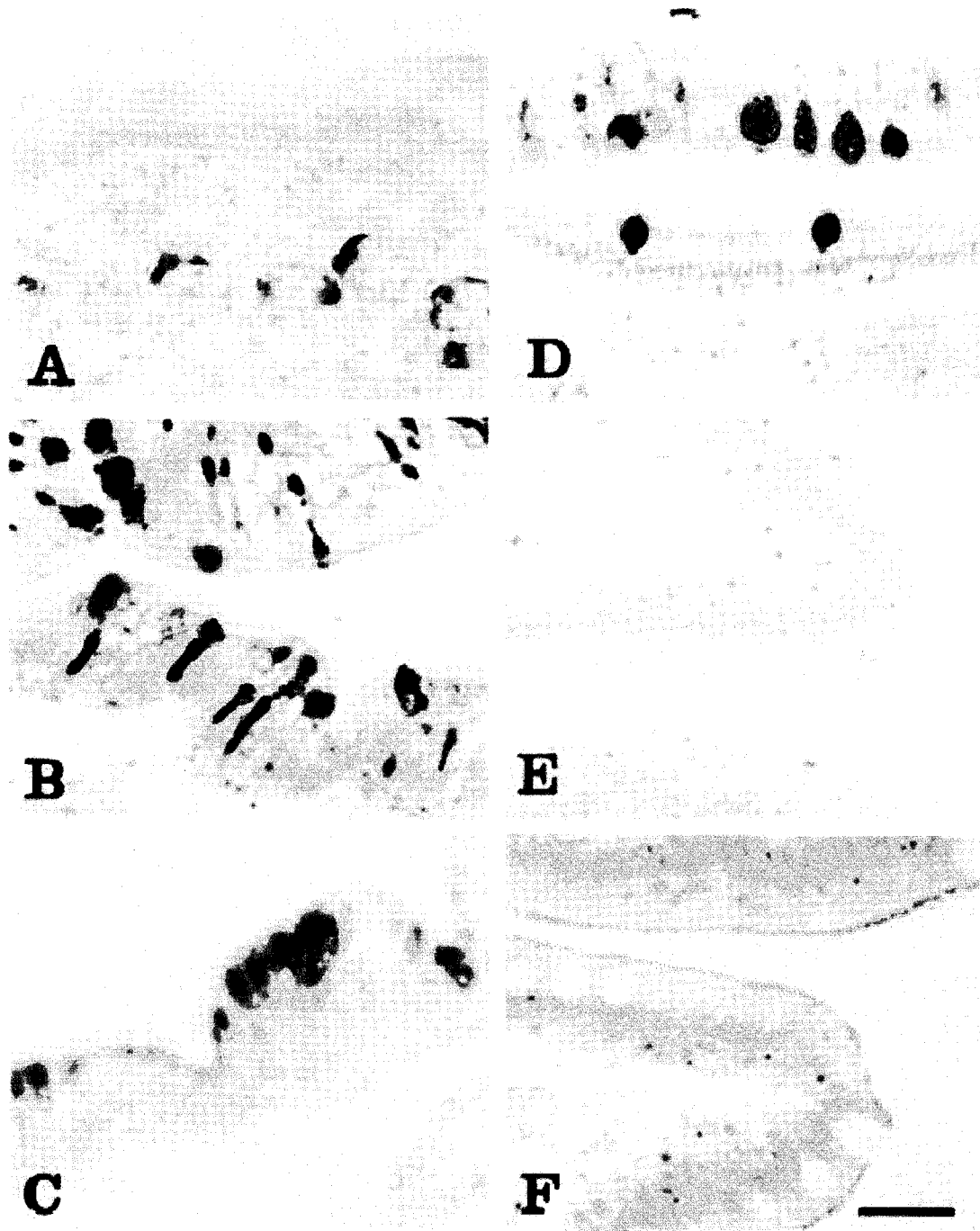


Fig. 4. Histochemical staining of DBA (A), SBA (B), isolectin B4 (C), WGA(D), PNA(E) and UEA-I(F) in the intestine. DBA (A), isolectin B4 (C) and WGA(D) were expressed in mucous cells (A), while SBA was expressed in club cells (B) and UEA-I(F) was expressed in brush border. PNA(E) was not expressed. Counterstaining with hematoxylin. Scale bar = 30 μ m.

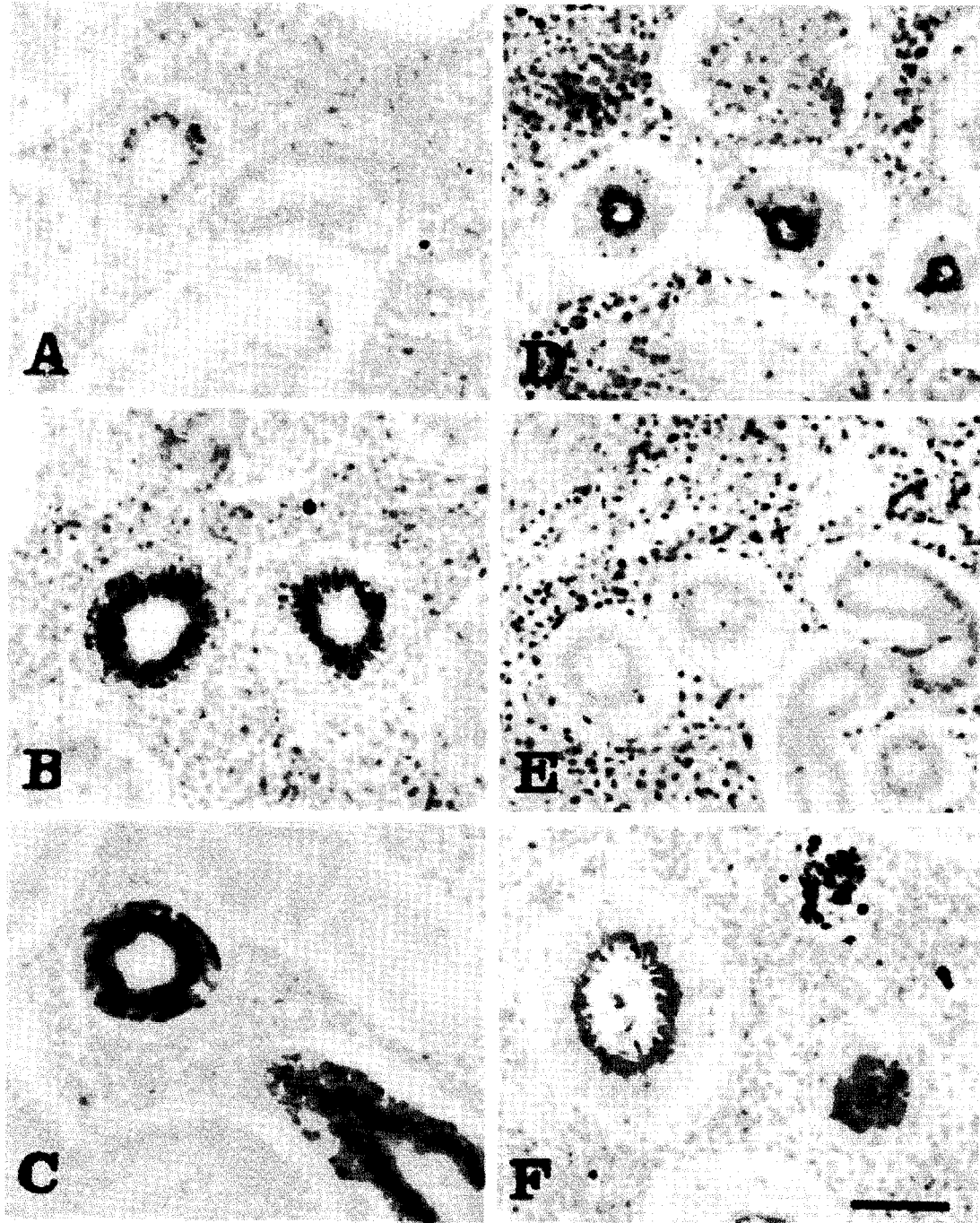


Fig. 5. Histochemical staining of DBA (A), SBA (B), isolectin B4 (C), WGA(D), PNA(E) and UEA-I(F) in the kidney. SBA (B), isolectin B4 (C), WGA(D) and UEA-I(F) were detected in renal tubule epithelial cells. PNA(E) was not expressed. Counterstaining with hematoxylin. Scale bar = 30 μ m

Table 2. Histochemical localization of *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA), *soybean agglutinin* (SBA), *Bandeiraea simplicifolia* BS-1 (isolectin B4), *Triticum vulgare* (WGA), *Arachis hypogaea* (PNA) and *Ulex europaeus* (UEA-I)-positive cells in the tissues of normal *Paralichthys olivaceus*.

Tissue	Positive cells	Lectin					
		DBA	SBA	Isolectin B4	WGA	PNA	UEA- I
Gill	Epithelial cells	+	+	++	+	+	+
	Mucous cells	+	+	++	++	-	++
	Gill racker	+	+	+	+	-	+
Liver	Epithelial cells of the bile duct	-	++	+	+	-	+
	Hepatocyte	-	-	-	-	-	-
	Sinusoid	-	-	-	++	-	-
Esophagus	Epithelial cells	-	-	+	-	-	-
	Mucous cells	-	-	+	-	-	-
Stomach	Epithelial cells	-	-	-	-	-	-
	Mucous cells	-	-	-	-	-	-
Skin	Mucous cells	-	-	+	-	-	-
Intestine	Epithelial cells	+	+	++	+	-	-
	Mucous cells	++	-	-	++	-	-
	Club cells	-	++	-	-	-	-
	Brush border	-	-	-	-	-	++
Kidney	Epithelial cells of renal tubule	+	++	++	++	-	++
	Glomerulus	-	-	-	-	-	-
Heart	Cardiac muscle	-	-	-	-	-	-
Spleen	Lymphoid cells	-	-	-	-	-	-

No binding, + weak binding, ++ intense binding. (Andreas G. *et al.*, 2000)

2) 비브리오균 접종 넙치에서 galectin-3의 면역조직 화학적 조사

비브리오를 접종한 후 선인장발효물을 첨가한 사료를 섭취한 군에서는 그렇지 않은 군에 비해 장에서 슬잔세포의 수가 증가 하였으며, galectin-3의 발현도 슬잔세포에서 약 8배 증가하였다 (Table 3). 또한 그 발현 세포의 수를 확인한 결과 슬잔세포에서 발현이 증가하였다 (Fig.6).

Table 3. immunohistochemical expression of galectin-3 in the intestine with *Paralichthys olivaceus*

	선인장발효물을 첨가한 사료를 섭식한 넙치의 장	선인장발효물을 첨가하지 않은 사료를 섭취한 넙치의 장
galectin-3의 양성세포 수	41±4.12**	5.8±1.64

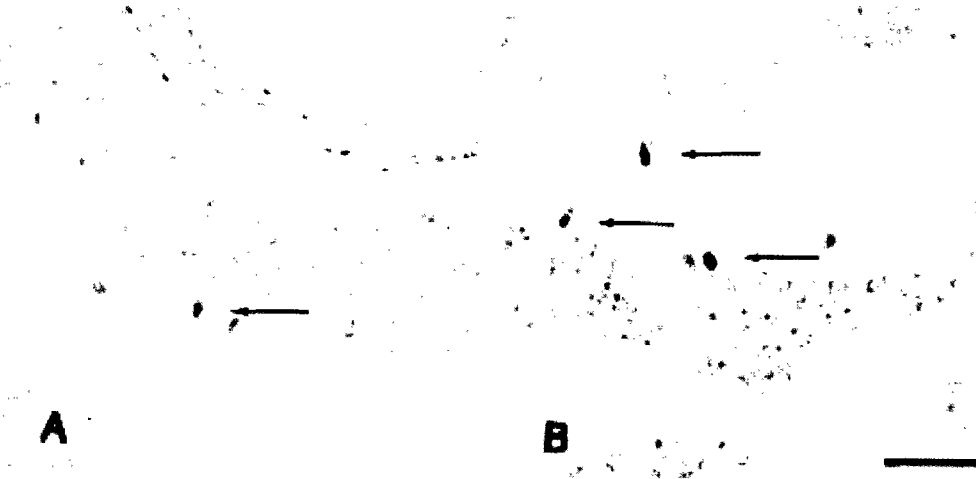


Fig.6. 비브리오균을 접종한 후 선인장 발효물을 첨가하지 않은 넙치의 장 (A)과 비브리오균을 접종한후 선인장 발효물을 첨가한 넙치의 장(B)에서 galectin-3의 발현

라. 고찰

본 실험은 양식 물고기에서 DBA, SBA, isolectin B4, WGA, PNA UEA를 포함하는 6가지 렉틴의 부착을 실험한 처음의 연구이다. SBA와 isolectin B4는 위장관의 상피 세포에 밀접하게 부착하는 것을 보여주었고, DBA는 아가미 상피세포에 결합하는 것으로 나타났다. Nakamura등³⁰은 lectin의 하나인 galectin은 상부소화기관, 피부, 아가미의 club cell들에 강하게 발현된다고 보고하였으며, β -galactoside 부착 렉틴인 congerin은 병원성 미생물과 기생충등에 대항하는 생체방어에 기여한다고 추정하였다.

물고기 점액에서의 생리학적 면역학적 중요성은 분명히 밝혀져 있지 않다. 다만 동물 lectin의 주요 종류의 하나인 galectin은 동물 조직에 광범위하게 존재하며, 면역 반응의 조절, 세포성장조절 같은 다양한 생물학적 과정에 영향을 준다고 알려져 있다. 따라서 어류의 피부 또는 소화관내에서 주요 분비물인 점액에서 렉틴이 많이 관찰되는 것은 어류의 방어기전과 밀접한 관련성이 있는 것으로 추정된다. 한편 물고기의 종류에 따라서 점액의 agglutinin은 피부로부터 bacteria를 차단하는데 효과적이라고 한다.

본 실험에서는 다양한 렉틴 (DBA, SBA, isolectin B4, WGA, PNA UEA)을 이용하여 어류 조직내 결합 부위를 조사하였으며, 이들 lectin은 다양한 장기의 상피에 존재하는 점액분비 세포에서 결합하는 것을 확인하였다. 그 결과 종류에 따른 차이는 있으나 대부분의 렉틴은 넙치에서 생체방어 효과를 한다고 추정된다. 또한 galectin-3는 다양한 조직에서 상존하고 있는 beta-galactoside-binding protein의 일종으로 여러 기능을 가진 것으로 알려지고 있고, 비브리오 균을 감염시킨 후 선인장 발효물을 투여한 양식 넙치의 장에서 다수 발견되었다. 이러한 발현은 점막면역기능의 증가를 의미하는데 galectin-3가 중요한 역할을 했을 것으로 사료된다.

2. 양식넙치 장내 세균상 변화

가. 서론

손바닥 선인장(*Opuntia ficus-indica* var. *saboten*)은 제주도에서 경작 또는 자생되는 선인장 중에 *Opuntia*속에 속하는 열대성 다년생식물로서 식용, 약용 및 관상용으로 이용되고 있다⁴⁵. 그리고 식이섬유, 비타민 및 프라보노이드 성분 등이 다량 함유되어 있어 여러 가지 다양한 약리작용을 갖는다^{11,23,29}. 유산균은 인간 및 동물의 장내에 서식하면서 정균작용을 할 수 있고, 당류를 발효해서 다량의 젖산등 유기산을 생성하여 장내 pH를 낮추어 병원성균의 생육을 억제한다. 이러한 유산균이 함유된 젖산발효제품의 섭취가 동물의 소화관 내에서 유해 세균의 증식을 억제한다는 사실이 밝혀짐에 따라 *Lactobacilli*는 가축이나 사람의 생균제재 또는 정장제로 그 이용가치가 매우 높아지고 있다. 또한 최근 연구 결과 장내 유해세균의 억제, 항암효과, 유당(lactose) 이용성 증진, 혈중 콜레스테롤 저하 등 인체의 건강에 유용한 다양한 생리적 기능을 담당하는 것으로 인식된 후 국내·외에서 연구가 활발히 수행되고 있다. 특히 *Lactobacillus acidophilus*와 *L. casei*등은 위와 같은 기능 이외에 소장 점막에 정착이 가능한 균주로 보고된 바 있으며, 이러한 이유로 현재 상업적으로 생산되고 있는 Probiotic 요구르트 제품용 스타터로 널리 사용되고 있다.

따라서 본 연구는 유산균을 이용하여 발효한 선인장 열매 발효물을 제조하여 양식넙치의 질병 예방, 성장 촉진 및 양식사료의 품질 개선을 위한 사료 첨가제로서 이용성을 조사하였다.

나. 연구내용 및 방법

1) 시료채취 및 총 세균수 측정

넙치의 장을 무균적으로 분리하여 멸균된 생리식염수(0.9%NaCl)로 3번 세척한 후 생리식염수에 현탁한 후 무균적으로 균질화한 다음 생리식염수에 현탁하여 단계 희석액을 0.5% CaCO₃과 2% NaCl을 첨가한 MRS, marine agar 2216, 2%NaCl을 첨가한 TSA(tryptic Soy agar)에 도말하여 25℃에서 3일간 배양하여 형성된 colony를 계수하였고, 동일한 실험을 3번 반복하여 평균치를 산출하였다.

다. 연구결과 및 고찰

1) 선인장 열매 발효액 투여구와 대조구의 장내 세균상 분포

Lactobacillus plantarum CNU001 균주를 이용하여 발효한 선인장 발효물을 연속 투여한 다음 넙치의 장내 세균상의 변화를 생균수로 측정된 결과 대조구는 일반적인 장내 세균만 주류를 이루었으나 발효물을 투여한 시험군은 장내 세균수가 대조구보다 약 23.6% 감소한 반면 투여구에서 유산균이 장 1g당 3.3 Log CFU이 존재하였다(Fig. 1).

이러한 결과는 probiotics의 투여가 인간 및 가축, 어류의 장내 개선 및 건강증진에 효과적이라는 것²⁷ 과 *Lactobacillus sp.* DS-12를 넙치에 투여하여 넙치의 체중을 증가시킨다는 보고⁸ 와 같이 유산균을 이용한 선인장 발효물이 probiotics 또는 prebiotics로서 효과가 있는 것으로 보임으로서 넙치의 장내에 유익한 세균층을 형성하여 병원성 세균의 증식을 억제하고 성장촉진 효과를 증대시킬 것으로 판단된다.

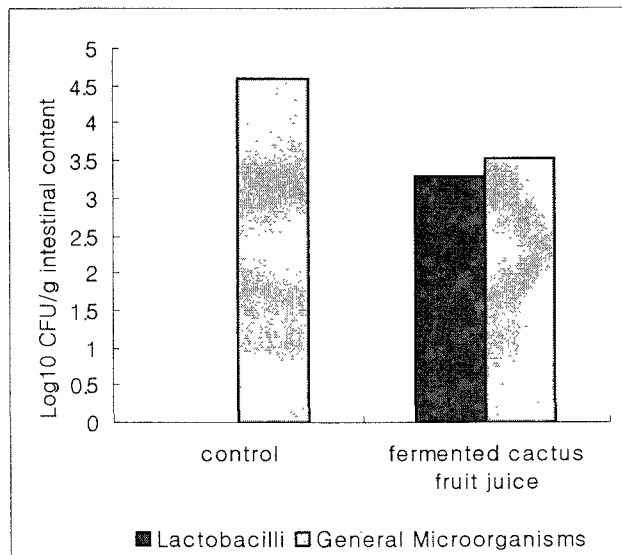


Fig. 1. Changes in the intestinal flora of flounder after administration of fermented cactus fruit juice with *L. plantarum* CNU001.

3. 선인장발효물의 항균효과

가. 서론

우리나라에서는 1980년대 후반부터 넙치양식이 시작되면서 양식 초기에는 별다른 질병 증상을 찾아볼 수 없었으나, 양식 회수가 거듭되고 사육밀도가 높아지면서 연쇄구균증, 에드워드병 및 비브리오팀균 등이 발생하여 많은 피해를 입고 있다. 이들 병원체의 특징은 다음과 같으며 본 연구는 고밀도 사육 양식을 하고 있는 넙치에서 연쇄구균증, 에드워드증, 비브리오팀균의 증식 및 병원성에 미치는 선인장 열매 발효물(선인장 발효물)의 효과를 구명함으로써 안정적인 종묘 생산 및 양성에 기초를 두고자 하는데 목적이 있다.

1) 연쇄구균의 특징

연쇄구균증의 원인균인 *Streptococcus sp.*는 직경 $2\mu\text{m}$ 이하인 그람 양성의 구형 또는 난원형의 세균으로써 액체배지 상에서 한쌍 또는 연쇄상으로 나타나며, endospores를 형성하지 않는다. 대부분 운동성이 없고, 일부의 균종은 capsules를 형성한다¹⁵. 대부분은 통성 혐기성이며, 일반적인 배지에서 쉽게 자랄 수 있으나 대개 2% NaCl이 첨가된 Tryptic Soy Agar에 배양하며, 혈액을 첨가시킨 배지에서는 더욱 잘 증식한다⁵³. 이러한 연쇄구균에 감염된 넙치에서는 안구의 돌출 및 백탁증상이 나타나고 체표면에 점액이 나타나며^{10,23}, 부검시 간장의 울혈이나 퇴색, 복수, 장관의 발적이 특징적으로 나타난다.

2) 에드워드균의 특징

에드워드증의 원인균인 *Edwardsiella tarda.*는 직경 $(0.5\sim1\times3\mu\text{m})$ 인 그람 음성의 주모성의 단간균으로써 XLD 배지상에 중심부가 흑색이고 가장자리가 투명한 작은 집락을 형성한다. 대부분 운동성이 있으며, capsules은 없다. 대부분은 통성 혐기성이며, 보통 한천 배지에서 발육이 늦고 병어의 병소신장으로부터 SS한천배지 또는 XLD(xylose lysine desoxycholate)배지에서 균을 분리한다. 이러한 에드워드균에 감염된 넙치에서는 안구의 돌출 및 백탁, 체표면에 점액이 나타나며, 개복하면 간장의 울혈이나 퇴색, 복수, 장관의 발적이 특징적으로 나타난다.

3) 비브리오균의 특징

비브리오병은 담수어와 해산어 등 광범위한 숙주 범위를 가지는 질병으로 넙치에서 원인균은 대부분이 *vibrio anguillarum*과 *vibrio sp.*으로 보고되고 있다⁴⁷.

*vibrio sp.*는 그람 음성의 단간균으로 1개의 극편모를 가지고 있으며, 운동성이 있고, glucose를 발효적으로 분해하지만 gas는 생산하지 않으며 catalase는 양성이다. 이러한 비브리오균에 감염된 넙치에서는 비늘의 탈락, 지느러미의 붕괴, 결손이 국소적으로 일어나 주변에 파급 확대된다. 또 피부가 파괴되어 궤양을 형성한다. 일반적으로 체색이 검게 되나 비늘이 탈락한 부위는 체색이 퇴색된다. 이 병의 발생은 계절성이 없으나 겨울철에는 비교적 적다.

나. 재료 및 방법

1) 공시균주

(가) 연쇄구균

본 시험에 사용한 공시균주는 양식 넙치에서 분리한 *Streptococcus sp.*로서 혈액배지에서 용혈성, 그람양성 연쇄구균, catalase 음성의 균을 사용하였다. *Streptococcus sp.*는 -20℃ glycerol 용액에 보관되어 왔으며, 본 실험을 위하여 균을 5% 면양 혈액이 첨가된 Trypticase blood agar base에 접종하여 24시간 동안 30℃에 배양 시킨 후 전형적인 균 집락을 2% NaCl이 첨가된 Brain heart infusion agar (BHI; Difco)에 2회 계대 배양시킨 후 사용하였다.

(나) 에드워드스균

본 시험에 사용한 공시균주는 제주도해양수산연구소에서 양식 넙치 병어로부터 분리한 *Edwardsiella tarda*,로서 XLD배지상에 중심부가 흑색이고 가장자리가 투명한 작은 집락 형성, 그람 음성 단간균을 사용하였다. *Edwardsiella tarda*,는 -20℃ glycerol 용액에 보관되어 왔으며, 본 실험을 위하여 *Edwardsiella tarda*,균을 XLD(xylose lysine desoxycholate)에 접종하여 24시간 동안 30℃에 배양 시킨 후 전형적인 균 집락을 2% NaCl이 첨가된 Brain heart infusion agar (BHI; Difco)에 2회 계대배양시킨 후 사용하였다.

(다) 비브리오균

본 시험에 사용한 공시균주는 양식 넙치에서 분리한 *vibrio sp.*로서 제주도해양수산

연구소에서 분양받아 -20℃ glycerol 용액에 보관하여 사용하였다. 본 실험을 위하여 *vibrio* sp. 균을 2% NaCl이 첨가된 Brain heart infusion agar (BHI; Difco)에 접종하여 48시간 동안 30℃에 2회 계대배양 시킨 후 사용하였다.

2) 항균시험방법

연쇄구균, 에드워드균 및 비브리오균의 증식에 미치는 선인장 발효물의 효과를 알아보기 위하여 액체 배지에서의 균의 증식률을 비교분석하였다. 먼저 동결건조된 선인장 발효물을 Brain Heat Infusion (BHI; Difco)에 최종농도 2% (w/v)로 부유시킨 후, 실온에서 30분간 혼합한 후 pH를 7.0으로 조정하였다. 이 혼합물을 얼음 상자에 담아 15초간 초음파 처리, 15초간 정치하기를 8회 반복하였다. 초음파 처리후 거름종이로 불용성의 물질을 제거한 다음 주사기 여과 멸균기 (0.45um pore size)를 통과시켜 실험균으로 사용하였다. 선인장이 첨가되지 않은 BHI를 대조균으로 하였다.

실험균과 대조균에 미리 BHI에서 18시간동안 배양된 연쇄구균, 에드워드균 및 비브리오균을 각각 1.2×10^4 CFU/ml 수준으로 접종한 다음 22℃에서 정치하면서 접종 후 0, 2, 4, 8, 12 및 24 시간에 각각의 균수를 측정하였다. 균수의 측정은 실험균과 대조균에서 매 측정 시기에 100 μ l의 배양액을 멸균된 생리식염수에 희석한 후 2% NaCl이 첨가된 Tryptic Soy agar (TSA; Difco)에 도말 접종하였으며 각 실험은 2회 반복하여 측정하였다.

3) 공시넙치

실험용넙치는 6cm급 크기로 제주도해양수산자원연구소에 설치된 FRP 원형수조(ϕ 74cm \times 80cm)에서 3개월간 선인장 발효물 1.0%가 첨가된 사료로 사육한 것을 사용하였다. 사육기간중 사육수온은 17.4~21.6℃, 염분농도 33.0~35.4‰, DO 5.84~7.12 mg/l, 그리고 pH는 7.57~8.04의 범위였다.

4) 병원균 접종 실험

선인장 발효물을 첨가한 사료를 섭취한 넙치와 일반 사료를 섭취한 넙치를 각각 5개의 실험군과 5개의 대조군으로 나누어 배치하였다. 각 군은 4마리의 넙치로 구성되었으며 활성화시킨 연쇄구균을 BHI 액체배지에 배양하여 ml 당 9.8, 9.8 \times 10², 9.8 \times 10⁴, 9.8 \times 10⁶, 9.8 \times 10⁸ 의 연쇄구균을 복강에 0.1ml씩 접종하였다. 접종 후 30일간 사육하면서 폐사 유무 및 외관 증상을 매일 확인하였다. 폐사어와 발현어는 해부하여 병변을 관찰하고 간과 신장에서 세균을 배양하였다.

다. 결과

1) 연쇄구균

선인장 발효물이 연쇄 구균의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 발효물을 여과한 후 배양액에 첨가한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 연쇄구균의 증식이 현저히 억제되었다. 선인장이 첨가되지 않은 대조군의 경우, 처음 $4.1 \log_{10}$ CFU/ml의 균수에서 24시간 후 $9.2 \log_{10}$ CFU/ml까지 증식하였으나, 선인장 발효물이 첨가된 실험군에서는 배양 24시간 후 $4.7 \log_{10}$ CFU/ml의 균수를 나타내어 균의 증식을 거의 인정할 수 없었다.

연쇄구균에 감염된 넙치는 외관상으로 채색이 흑화되었고, 탈장, 안구 돌출 및 백탁, 체표면의 점액 등의 주 증상을 나타내었다. 해부학적으로는 전반적인 묽은 점액성의 복수가 많이 차 있었고, 간 울혈 및 신장과 비장의 비대를 보여 자연 감염어와 비슷한 증상을 보였다.

병원성 실험에서, 일반 사료로 사육한 넙치는 9.8×10^8 viable cell을 접종한 대조군 5에서 9일만에 4마리 중 3마리가 폐사하여 78%의 폐사율을 나타내었고, 9.8×10^4 viable cell을 접종한 대조군 3에서는 12일만에 50% (2/4)의 폐사율을 보였으며, 9.8 viable cell을 복강주사한 대조군 1에서도 10일만에 25% (1/4)가 폐사하였다.

9.8×10^6 을 접종한 대조군 4에서는 한 마리의 폐사도 없었으나 복수 및 안구돌출의 임상증상이 보였고, 간, 신장 등에서 접종균과 동일한 원인균이 검출되었다. 선인장 발효물을 첨가한 사료를 섭취한 실험군의 경우 실험군 5와 4에서는 8일과 13일만에 각각 50% (2/4), 13일만에 25% (1/4)가 폐사하였을 뿐 다른 군에서의 폐사는 관찰할 수 없었다 (Table 1).

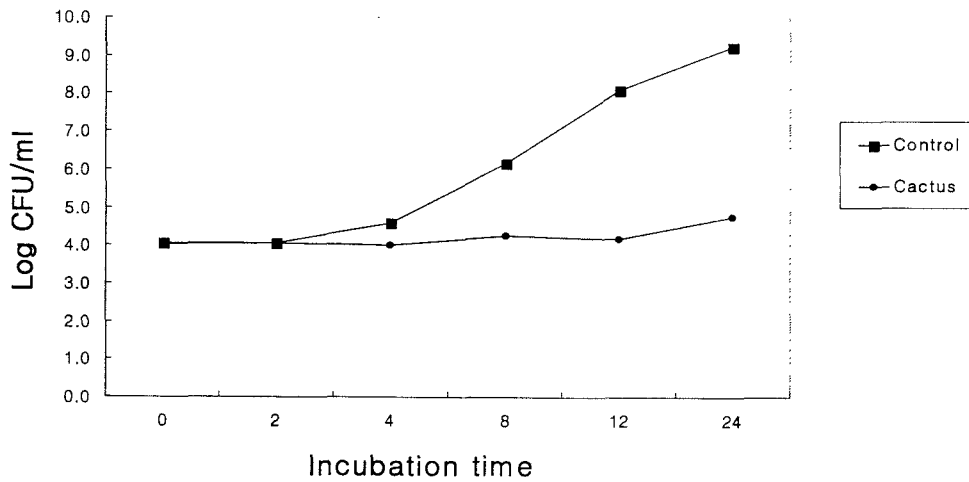


Fig. 1. Effect of *Opuntia ficus-indica* fermented with effective microorganisms on growth rate of *Streptococcus* sp., fish pathogen.

Table 1. Pathogenicity of EM-fermented *Opuntia ficus indica* against streptococcal infection in cultured flounder (*Paralichthys olivaceus*).

Group	Inoculum (cell/ml)	Number of death after challenge												No. of fish died/tested	Mortality rate (%)		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			13	14
Opuntia	1	9.8														0/4	0
	2	9.8×10^2														0/4	0
	3	9.8×10^4														0/4	0
	4	9.8×10^6												1		1/4	25
	5	9.8×10^8						2								2/4	50
Control	1	9.8								1					1/4	25	
	2	9.8×10^2									1		1		2/4	50	
	3	9.8×10^4					1		1						2/4	50	
	4	9.8×10^6													0/4	0	
	5	9.8×10^8						2		1					3/4	78	

2) 에드워드균

선인장 발효물이 에드워드균의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 발효물을 여과한 후 배양액에 첨가한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 대조군의 경우 배양 12시간 후 $8.4 \log_{10}$ CFU/ml, 24시간 후 $11.0 \log_{10}$ CFU/ml의 균수를 나타내었고 손바닥선인장 열매 발효분말이 첨가된 실험군의 경우 배양 12시간 후 $4.5 \log_{10}$ CFU/ml, 24시간 후 $9.5 \log_{10}$ CFU/ml 균수를 나타내어 에드워드균의 증식 억제효과를 12시간까지 세균 증식 억제 효과를 볼 수 있었다.

실험적으로 에드워드균에 감염된 넙치는 외관상으로 채색이 흑화되었고 탈장, 안구 돌출 및 백탁, 체표면의 점액 등의 주 증상을 나타내었다. 해부학적으로는 전반적인 묽은 점액성의 복수가 많이 차 있었고 간 울혈 및 신장과 비장의 비대를 보여 자연 감염어와 비슷한 증상을 보였다. 에드워드균에 감염된 넙치의 신장조직은 뇨세관 상피세포의 박리 및 괴사증상과 뇨세관의 현저한 감소가 관찰되었다. 일부 개체의 간에서는 간체장과 인접한 결합조직 영역에 괴사세포와 그 집단이 확인되었다 (Fig 2, 3).

손바닥선인장 발효물을 사료에 첨가하는 것이 양식 넙치의 급성 세균감염에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다. 선인장 발효물을 첨가한 사료를 먹지 않은 넙치는 1×10^9 viable cell을 접종한 대조군에서 9일만에 100%가 폐사하였고 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7$ viable cell을 접종한 대조군에서는 16일만에 25%가 폐사하였으며, 1×10^1 viable cell을 복강 주사한 대조군에서는 12일만에 50%가 폐사하였다. 선인장 발효물을 첨가한 사료를 섭취한 넙치는 1×10^9 viable cell을 접종한 분말과 액상실험구 모두에서 8~14일 사이에 100%가 폐사하였다. 1×10^7 viable cell을 접종한 실험구와 대조구에서 비슷한 폐사율을 나타내 유의한 차이를 볼 수 없었다 (Table 2).

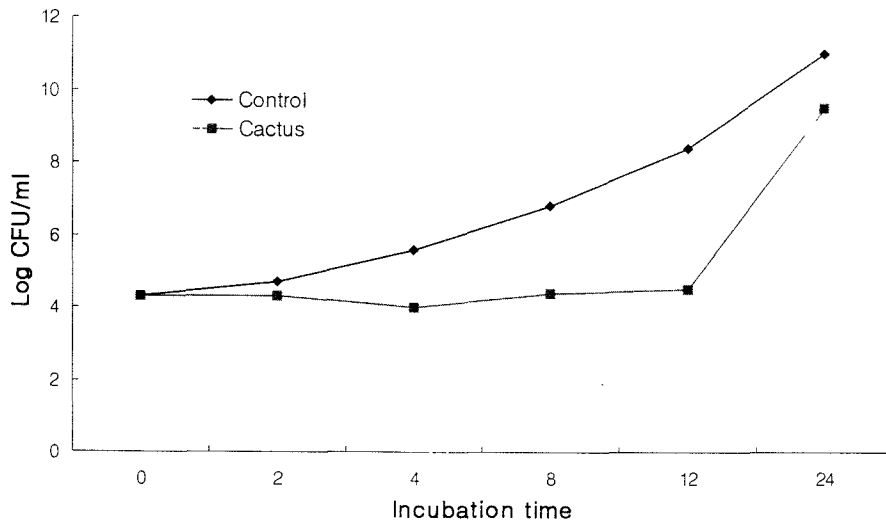


Fig. 2. Effect of *Opuntia ficus-indica* fermented with effective microorganisms on growth rate of *Edwardsiella tarda* fish pathogen.

Table 2. Pathogenicity of EM-fermented *Opuntia ficus indica* against *Edwardsiella tarda* infection in cultured flounder (*Paralichthys olivaceus*).

Group control	Inoculum (cell/ml)	Number of death after challenge																			No. of fish died/tested	Neab ti died(day)	mortality (%)
		1	--	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20					
1	1×10^1				1						1									2/4	10	50	
2	1×10^3				1															1/4	8	25	
3	1×10^5																	1		1/4	16	25	
4	1×10^7																	1		1/4	16	25	
5	1×10^9				2	2														4/4	8.5	100	

Group cactus	Inoculum (cell/ml)	Number of death after challenge																			No. of fish died/tested	Neab ti died(day)	mortality (%)
		1	--	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20					
1	1×10^1																			0/4	-	0	
2	1×10^3																			0/4	-	0	
3	1×10^5																			0/4	-	0	
4	1×10^7																			0/4	-	0	
5	1×10^9				2							1								3/4	10	75	

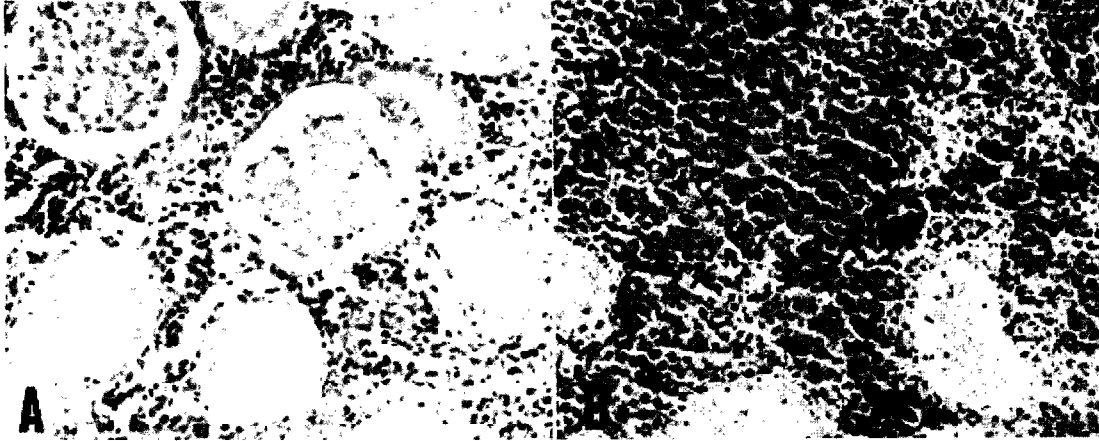


Fig. 3. Kidney of a fish that was challenged with *E. tarda* at a dose 1.0×10^9 viable cell and become moribund.
(A: normal B: *Edwardsiella* sp. infection HE, $\times 400$)

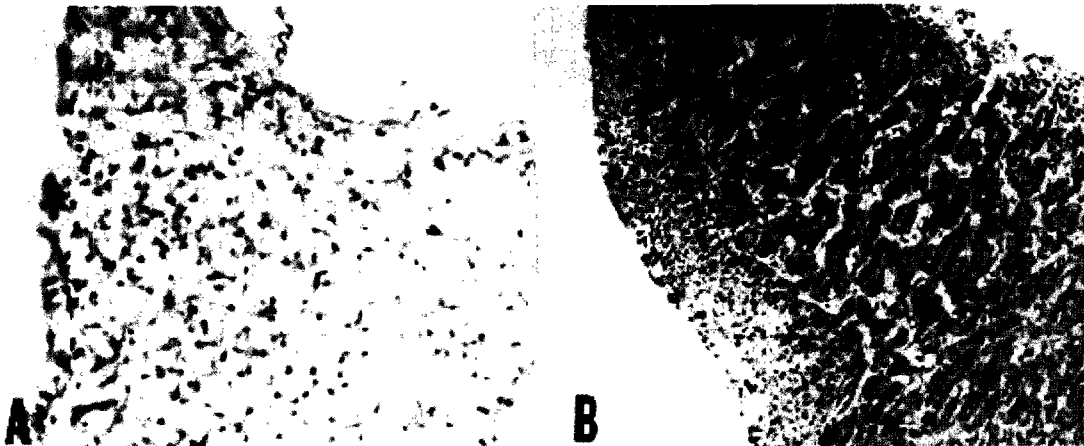


Fig. 4. Liver of a fish that was challenged with *E. tarda* at a dose 1.0×10^9 viable cell and become moribund.
(A: normal B: *Edwardsiella* sp. infection HE, $\times 400$)

3) 비브리오균

손바닥선인장 열매의 발효분말이 비브리오균의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 각각의 시료를 여과한 후 BHI에 첨가한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 대조군의 경우 배양 12시간 후 $9.2 \log_{10}$ CFU/ml, 24시간 후 $11.1 \log_{10}$ CFU/ml의 균수를 나타내었고 손바닥선인장 열매의 발효분말이 첨가된 실험군의 경우 배양 12시간 후 3.6

log₁₀ CFU/ml, 24시간 후 6.4 log₁₀ CFU/ml 균수를 나타내어 비브리오균의 증식 억제 효과를 24시간까지 세균 증식 억제 효과를 볼 수 있었다(Fig. 1).

비브리오균에 감염된 넙치는 외관상으로 체색이 흑화되었고 탈장, 안구 돌출 및 백탁, 체표면의 점액 등의 주 증상을 나타내었다. 해부학적으로는 전반적인 묽은 점액성의 복수가 많이 차 있었고 간 울혈 및 신장과 비장의 비대를 보여 자연 감염어와 비슷한 증상을 보였다. 비브리오균에 감염된 넙치의 신장조직은 뇨세관 상피세포의 박리 및 괴사증상과 뇨세관의 현저한 감소가 관찰되었다. 일부 개체의 간에서는 간체장과 인접한 결합조직 영역에 괴사세포와 그 집단이 확인되었다.

병원성 실험은 선인장 발효물을 첨가한 사료를 먹지 않은 넙치는 1×10⁹ viable cell을 접종한 대조군에서 1일째에 100%가 폐사하였고 1×10⁷ viable cell을 접종한 대조군에서는 3일째에 25%가 폐사하였다. 선인장 발효물을 첨가한 사료를 섭취한 넙치는 1×10⁹ viable cell을 접종한 실험군에서 2일째에 100%가 폐사하였고 1×10⁷ viable cell을 접종한 실험군에서 4일째에 50% 폐사하였다. 대조군과 비슷한 폐사율을 나타내어 유의한 차이를 볼 수 없었다 (Table 1).

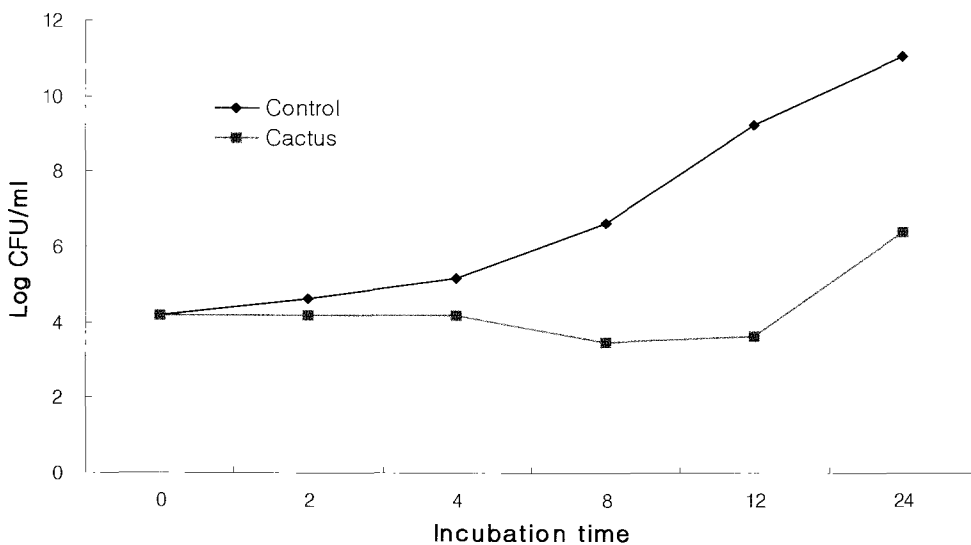


Fig. 1. Effect of *Opuntia ficus-indica* fermented with effective microorganisms on growth rate of *vibrio* sp. fish pathogen.

Table 1. Pathogenicity of EM-fermented *Opuntia ficus indica* against *vibrio sp.* infection in cultured flounder(*Paralichthys olivaceus*).

Group (control)	Inoculum (cell/ml)	Number of death after challenge													No.of fish died/tested	Neab ti died(day)	mortality (%)	
		1	2	3	4	5	6	7	---	-----	26	27	28	29				30
1	1×10 ¹															0/4	-	0
2	1×10 ³															0/4	-	0
3	1×10 ⁵															0/4	-	0
4	1×10 ⁷				1											1/4	3	25
5	1×10 ⁹	4														4/4	1	100

Group (cactus)	Inoculum (cell/ml)	Number of death after challenge													No.of fish died/tested	Neab ti died(day)	mortality (%)	
		1	2	3	4	5	6	7	---	-----	26	27	28	29				30
1	1×10 ¹															0/4	-	0
2	1×10 ³															0/4	-	0
3	1×10 ⁵															0/4	-	0
4	1×10 ⁷				1	1										2/4	3.5	50
5	1×10 ⁹	3	1													4/4	1.5	100

라. 고찰

국내 양식 넙치에서 막대한 경제적 피해를 주고 있는 세균성 질병은 주로 그람 양성 균인 *Streptococcus sp.*, 그람 음성균인 *Edwardsiella tarda* 및 *Vibrio sp.* 에 의해 발병되고 있다. 어류의 사육 중에 빈발하는 세균성 질병의 치료를 위하여 항생물질을 비롯한 각종 화학요법제가 사용되고 있으나, 항생제 잔류에 기인한 환경 문제와 이들 약제의 오용과 남용에 의한 약제 내성균의 출현은 질병의 치료를 어렵게 할 뿐 만 아니라 양식어민에 대한 경제적 부담을 가중시키고 있다^{26,42}. 따라서 어류의 경우 질병의 치료보다는 예방에 중점을 둔 백신의 개발에 노력하여 왔으나 그 효용의 가치가 인정되는 경우는 극히 드문 편이어서 면역기능을 자극하는 면역자극제에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다⁴⁷. 본 실험에서는 선인장 발효물의 효능 시험을 통하여 수산용 예방제재로서의 적용 가능성을 밝히고자 하였다.

선인장 발효물은 손바닥 선인장의 열매를 유용 미생물로 발효시켜 만든 동결건조 제

품으로서 기본적으로 선인장 열매 자체의 항균효과 여부에 관한 의견들이 제기되어 왔다³⁵. 유용미생물은 유산균을 포함한 몇 종류의 발효 미생물을 포함하는 복합 미생물 제제로서 여러 가지 용도에 활용되고 있다. 특히 유산균은 probiotics로서 살균 작용을 하는 성분들을 분비하기 때문에 식품 등을 장기 보관할 목적으로 연구되고 있다⁴⁸. 본 연구에서 사용한 선인장 발효물은 동결저온건조한 제품으로서 시험관내 시험결과 연쇄구균, 에드워드균, 비브리오균의 성장을 억제하는 효력이 있었다. 이러한 효과가 선인장 열매 자체의 효과인지, 아니면 단순히 유산균들에 의한 probiotics의 효과인지에 대한 검정이 필요하겠지만, 적어도 본 연구에 사용한 선인장 발효물이 각각의 균의 증식을 억제하는 물질을 함유하고 있어 양식장에서 양식하는 어류에 대한 생체 실험을 실시할 가치는 충분히 인정되었다. 따라서 선인장 발효물을 양식업치의 사료에 첨가하여 섭이하게 하고 각각의 균의 농도를 달리하여 접종한 결과 연쇄구균의 경우는 농도가 높을수록 폐사율이 높았고 대조군보다는 실험군의 폐사율이 더 낮게 나타나 양식업치의 연쇄구균증의 완화에 효과를 보였다. 에드워드균에 있어서는 시험관내 실험결과 에드워드균의 성장을 12시간까지 세균 증식을 억제하는 효과는 나타내었지만 연쇄구균에 비해 효과가 떨어지는 것으로 보아 선인장 발효물의 항균효과는 그람음성균보다는 그람양성균에서 효과가 더욱 큰 것으로 사료된다.

Vibrio sp. 경우에도 선인장발효물의 세균증식 억제효과는 *Streptococcus* sp. 에 대한 효과보다는 낮았지만 24시간 까지 세균증식 억제효과가 나타났다. 이는 사료에 첨가한 발효물의 양이 전체 사료의 1%에 해당하며 시험관내 시험에서는 선인장발효분말을 2%를 사용하였고 병원성 시험에서는 선인장 발효물액상을 1% 첨가하였다. 두 시험에서 첨가한 농도가 같지 않았기 때문이라 분석된다.

결론적으로 볼 때 선인장 발효물이 연쇄구균, 에드워드균, 비브리오균의 증식을 억제하며 양식업치에서 이들 병원균주에 의한 증상 및 폐사율을 감소시킬 수 있는 효과를 보임으로서 수산 양식산업에 경제적으로 가치가 있다고 판단된다. 따라서 선인장 열매의 가공방법, 발효법 및 사료첨가제로서의 개발 방법 등에 관한 연구를 통하여 물고기 양식에 사용되고 있는 항균제의 남용을 막고 경제적 및 환경적인 양식어민의 부담을 줄여 줄 필요성이 있는 것으로 사료된다.

4. 선인장에 함유된 프라보노이드 성분의 항균효과

가. 서론

손바닥 선인장 (*Opuntia ficus indica*)은 선인장과에 속하는 열대성 식물로 우리나라의 제주도 등지에서 자생하고 있는 귀화식물이다. 그리고 특용작물로 재배되면서 다양한 형태의 기호식품으로 개발되고 있으며 성분분석 결과 식이섬유, 비타민 및 프라보노이드 성분 등이 다량 함유되어 있다³³. 손바닥선인장 프라보노이드 성분으로 isorhamnetin, quercetin, kaempferol 등이 보고되었다⁶. 이러한 성분 중 quercetin은 항바이러스¹⁶, 항균효과⁴ 등 여러 가지 약리작용을 갖는다.

손바닥선인장 발효물은 양식넙치에서 연쇄구균, 에드워드균, 비브리오균의 증식을 억제하는 효능을 가지는 것을 증명되었으며, 이러한 효능이 손바닥선인장 구성 성분들 중에서 어떤 성분에 의한 것인지 증명하기 위해, 본 연구에서는 손바닥선인장 프라보노이드 성분중 하나인 quercetin이 고밀도 사육 양식을 하고 있는 넙치에서 연쇄구균 증, 에드워드균 증, 비브리오균 증에 대한 항균 효과를 규명함으로써 안정적 종묘 생산 및 양성에 기초를 두고자 하는데 목적이 있다.

나. 재료 및 방법

1) 공시균주

본 시험에 사용한 균주는 *Streptococcus* sp., *Edwardshiella* sp., *Vibrio* sp. 로서 제주도해양수산자원연구소에서 분리한 균주를 분양받아 사용하였다. 프라보노이드는 Quercetin dihydrate (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

2) 항균시험방법

Quercetin을 이용하여 *Streptococcus* sp., *Edwardshiella* sp., *Vibrio* sp. 균에 증식에 미치는 효과를 알아보기 위하여 액체배지에서의 균의 증식률을 비교분석하였다. 먼저 동결 건조된 각각의 실험균을 Brain Heart Infusion broth (BHI; Difco)에 최종 농도 2% (w/v)로 부유시킨 후, 실온에서 30분간 혼합한 후 pH를 7.0으로 조정하였다. 이 혼합물을 균질화 하기 위해서 얼음 상자에 담아 초음파 파쇄기를 이용하여 15초간 초음파 처리, 15초간 정지하기를 8회 반복하였다. 초음파 처리 후 거름종이로 불용성의 물질을 제거한 다음 주사기 여과 멸균기 (0.45 μ m pore size)를 통과시켜 실험재료

로 사용하였다. 손바닥선인장 열매 발효분말이 첨가되지 않은 BHI broth를 대조군으로 하였다.

실험군과 대조군에 미리 BHI broth에서 18시간동안 배양된 각각의 균주를 1.5×10^4 CFU/ml 수준으로 접종한 다음 *Streptococcus* sp.은 37°C에서 *Edwardshiella* sp., *Vibrio* sp.은 30°C에서 정치하면서 접종 후 0, 2, 4, 8, 12 및 24 시간에 균수를 측정하였다. 균수의 측정은 실험군과 대조군에서 매 측정 시기에 100 μ l의 배양액을 멸균된 생리 식염수에 희석한 후, BHI agar에 도말 접종하였다.

3) 공시넙치

실험용넙치는 6cm급 크기로 제주도해양수산자원연구소에 설치된 FRP 원형수조($\phi 74$ cm \times 80cm)에서 3개월간 quercetin 1.0%가 첨가된 사료로 사육한 것을 사용하였다. 사육기간 중 사육수온은 17.4~21.6°C, 염분농도 33.0~35.4‰, DO 5.84~7.12 mg/l, 그리고 pH는 7.57~8.04의 범위였다.

4) 병원성 균주 접종 실험

일반 사료를 섭취한 넙치를 각각 5개의 실험군과 5개의 대조군으로 나누어 배치하였다. 각 군은 4마리의 넙치로 구성되었으며, 활성화시킨 연쇄구균, 에드워드 및 비브리오균을 BHI 액체배지에 배양하여 ml 당 9.8, 9.8 $\times 10^2$, 9.8 $\times 10^4$, 9.8 $\times 10^6$, 9.8 $\times 10^8$ 의 연쇄구균을 복강에 0.1ml씩 접종하였다. 접종 후 30일간 사육하면서 폐사 유무 및 외관 증상을 매일 확인하였다. 폐사어와 발현어는 해부하여 병변을 관찰하고 간과 신장에서 세균을 배양하였다.

다. 결과

1) 연쇄구균

Quercetin이 연쇄구균의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 시료를 여과한 후 BHI에 첨가한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 대조군의 경우 배양 12시간 후 8.4 log₁₀ CFU/ml, 24시간 후 11.1 log₁₀ CFU/ml의 균수를 나타내었고, Quercetin이 첨가된 실험군의 경우 배양 12시간 후 6.9 log₁₀ CFU/ml, 24시간 후 9.5 log₁₀ CFU/ml의 균수를 나타내어 연쇄구균의 증식 억제효과를 다소간 나타냈다.

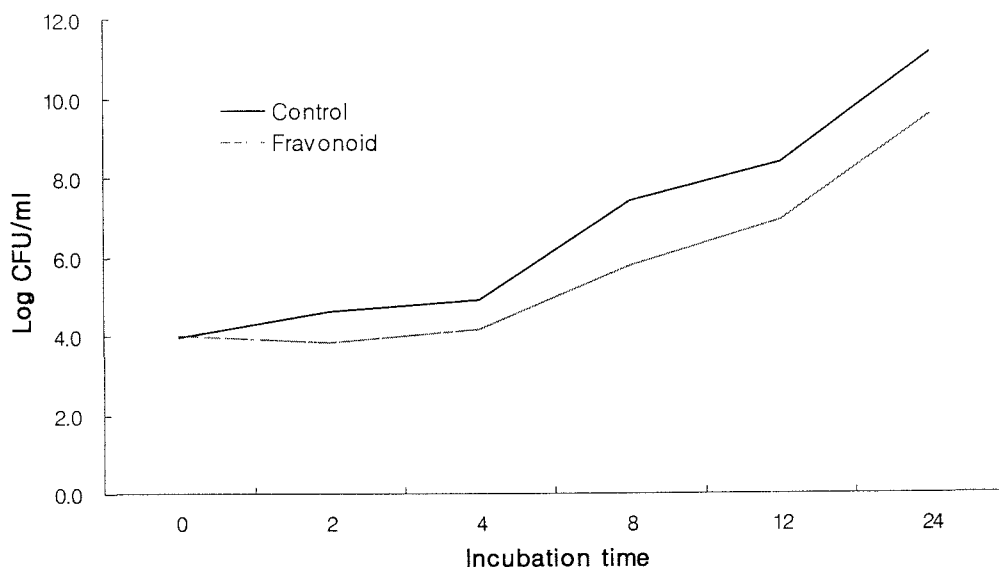


Fig. 1. Effect of *Opuntia ficus-indica* fermented with Quercetin dihydrate on growth rate of *Streptococcus* sp., fish pathogen.

병원성 실험은 프라보노이드(Quercetin)을 첨가한 사료를 먹지 않은 넙치는 1×10^9 viable cell을 접종한 대조군에서 20일만에 100%가 폐사하였고 1×10^7 viable cell을 접종한 대조군에서는 6일만에 25%가 폐사하였다. 프라보노이드를 첨가한 사료를 섭취한 넙치는 1×10^9 viable cell을 접종한 실험군에서 22일만에 25%가 폐사하였고 1×10^7 viable cell을 접종한 실험군에서는 22일만에 50%가 폐사하였다. 임상증상으로 복수 및 안구돌출이 나타났고 간, 신장등에서 접종균과 같은 원인균이 검출되었다 (Table 4).

2) 에드워드균

손바닥선인장 Quercetin이 에드워드균의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 시료를 여과한 후, BHI에 첨가한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 대조군의 경우 배양 12시간 후 8.4 log₁₀ CFU/ml, 24시간 후 11.0 log₁₀ CFU/ml의 균수를 나타내었고 Quercetin이 첨가된 실험군의 경우 배양 12시간 후 4.7 log₁₀ CFU/ml, 24시간 후 9.5 log₁₀ CFU/ml의 균수를 나타내어 에드워드균의 증식 억제효과는 12시간까지는 뚜렷한 증식 억제 효과를 볼 수 있었으나 24시간 이후부터는 경미하게 나타났다.

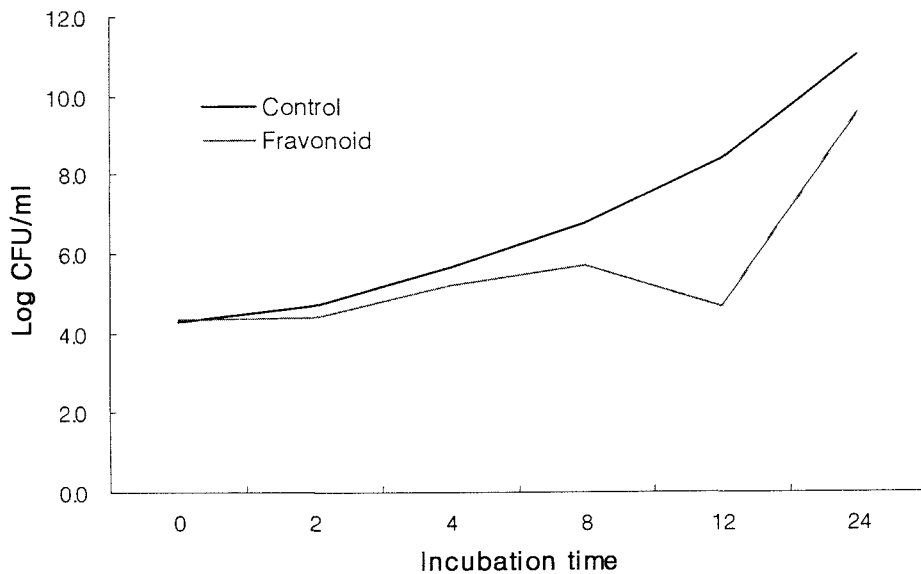


Fig. 2. Effect of *Opuntia ficus-indica* fermented with Quercetin dihydrate on growth rate of *Edwardsiella* sp., fish pathogen.

병원성 실험은 프라보노이드(Quercetin)을 첨가한 사료를 먹지 않은 넙치는 1×10⁹ viable cell을 접종한 대조군에서 6일만에 100%가 폐사하였고, 1×10⁷ viable cell을 접종한 대조군에서는 30일만에 100%가 폐사하였으며, 1×10⁵ viable cell을 접종한 대조군에서는 24일만에 25%가 폐사하였다. 프라보노이드를 첨가한 사료를 섭취한 넙치는 1×10⁹ viable cell을 접종한 실험군에서 5일만에 25%가 폐사하였고, 1×10⁷ viable cell을 접종한 실험군에서는 10일만에 50%가 폐사하였다. 복수 및 안구돌출이 임상증상이 보였고 간, 신장등에서 접종균과 같은 원인균이 검출되었다 (Table 2).

Table 2. Pathogenicity of Quercetin against *edwardsiella* sp. infection in cultured flounder(*Paralichthys olivaceus*).

Group control	Inoculum (cell/ml)	Number of death after challenge																														No. of fish died/tested	Neab ti died(day)	mortality (%)			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30						
1	1×10 ¹																																		0/4	-	0
2	1×10 ³																																		0/4	-	0
3	1×10 ⁵																																		1/4	24	25
4	1×10 ⁷																																		4/4	17	100
5	1×10 ⁹																																		3/4	5	100

Group (quercetin)	Inoculum (cell/ml)	Number of death after challenge																														No. of fish died/tested	Neab ti died(day)	mortality (%)			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30						
1	1×10 ¹																																		0/4	-	0
2	1×10 ³																																		0/4	-	0
3	1×10 ⁵																																		0/4	-	0
4	1×10 ⁷																																		2/4	9.5	50
5	1×10 ⁹																																		1/4	5	25

3) 비브리오균

손바닥선인장 Quercetin이 비브리오균의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 시료를 여과한 후 BHI에 첨가한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 대조군의 경우 배양 12시간 후 9.2 log₁₀ CFU/ml, 24시간 후 11.1 log₁₀ CFU/ml의 균수를 나타내었고, Quercetin이 첨가된 실험군의 경우 배양 12시간 후 6.9 log₁₀ CFU/ml, 24시간 후 9.6 log₁₀ CFU/ml의 균수를 나타내어 비브리오균의 증식 억제효과를 12시간 까지 비브리오균의 증식 억제 효과를 볼 수 있었고 24시간 이후부터는 약하게 나타났다.

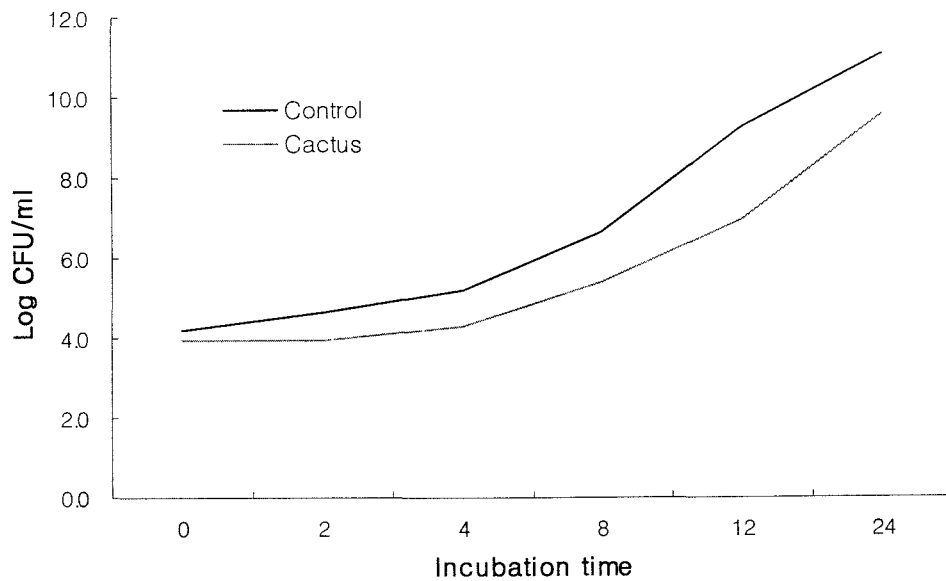


Fig. 3. Effect of *Opuntia ficus-indica* fermented with Quercetin dihydrate on growth rate of *Vibrio* sp., fish pathogen.

병원성 실험에서는 프라보노이드(Quercetin)를 첨가한 사료를 먹지 않은 넙치는 1×10^9 viable cell을 접종한 대조군에서 1일만에 100%가 폐사하였고, 1×10^7 viable cell을 접종한 대조군에서는 3일만에 100%가 폐사하였다. 프라보노이드를 첨가한 사료를 섭취한 넙치는 1×10^9 viable cell을 접종한 실험군에서 1일만에 100%가 폐사하였고, 1×10^7 viable cell을 접종한 실험군에서는 4일만에 75%가 폐사하였다 (Table 2). 복수 및 안구가 돌출되는 임상증상이 보였고 간, 신장등에서 접종균과 같은 원인균이 검출되었다.

Table 3. Pathogenicity of Quercetin against *Vibrio* sp. infection in cultured flounder (*Paralichthys olivaceus*).

Group control	Inoculum (cell/ml)	Number of death after challenge																														No. of fish died/tested	Neab ti died(day)	mortality (%)			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30						
1	1×10 ¹																																		0/4	-	0
2	1×10 ³																																	0/4	-	0	
3	1×10 ⁵																																	0/4	-	0	
4	1×10 ⁷		2	2																														4/4	2.5	100	
5	1×10 ⁹	4																																4/4	1	100	

Group (quercetin)	Inoculum (cell/ml)	Number of death after challenge																														No. of fish died/tested	Neab ti died(day)	mortality (%)			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30						
1	1×10 ¹																																		0/4	-	0
2	1×10 ³																																		0/4	-	0
3	1×10 ⁵																																		0/4	-	0
4	1×10 ⁷		1	2																															3/4	3	75
5	1×10 ⁹	4																																	4/4	2	100

4) 감염 넙치의 증상

연쇄구균, 에드워드균, 비브리오균에 감염된 넙치는 외관상으로 채색이 흑화되었고, 탈장, 안구 돌출 및 백탁, 체표면의 점액현상이 주 증상이었다. 해부학적으로는 전반적으로 묽은 점액성의 복수가 많이 차 있었고, 간 울혈 및 신장과 비장의 비대를 보여 자연 감염어와 비슷한 증상을 보였다.

5) 병리조직학적 소견

연쇄구균, 에드워드균, 비브리오균에 감염된 넙치의 신장조직은 뇨세관 상피세포의 박리 및 괴사증상과 뇨세관의 현저한 감소가 관찰되었다. 일부 개체의 간에서는 간체장과 인접한 결합조직 영역에 괴사세포와 그 집단이 확인되었다. 그리고 뇌 조직에서는 울혈을 관찰할 수 있었다.

라. 고찰

국내 양식 넙치에서 막대한 경제적 피해를 주고 있는 세균성 질병은 주로 그람 양성균인 *Streptococcus* sp., 그람 음성균인 *Edwardsiella tarda* 및 *Vibrio* sp. 에 의해 발병되고 있다. 어류의 사육 중에 빈발하는 세균성 질병의 치료를 위하여 항생물질을 비롯한 각종 화학요법제가 사용되고 있으나, 항생제 잔류에 기인한 환경 문제와 이들 약제의 오용과 남용에 의한 약제 내성균의 출현은 질병의 치료를 어렵게 할 뿐 만 아니라 양식어민에 대한 경제적 부담을 가중시키고 있다^{26,42}. 따라서 어류의 경우 질병의 치료보다는 예방에 중점을 둔 백신의 개발에 노력하여 왔으나 그 효용의 가치가 인정되는 경우는 극히 드문 편이어서 면역기능을 자극하는 면역자극제에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다⁴⁷. 본 실험에서는 손바닥 선인장 프라보노이드 성분중 하나인 quercetin의 효능 시험을 통하여 수산용 예방제재로서의 적용 가능성을 밝히고자 하였다.

프라보노이드류는 현재까지 약 4,000종 이상이 알려져 있으며, 손바닥선인장에서는 대표적으로 isorhamnetin, quercetin, kaempferol 등이 보고되었다⁶. 이러한 성분 중 quercetin은 항바이러스¹⁶, 항균효과⁴ 등 여러 가지 약리작용을 갖는데, 시험관내 시험 결과 24시간까지 연쇄구균에서는 증식을 억제하는 효력이 있었고, 에드워드균에서는 초기 12시간까지는 뚜렷하게 증식 억제효과를 볼 수 있었으나 24시간 이후부터는 경미하게 나타났다. 또한 비브리오균에서는 12시간까지 비브리오균의 증식 억제 효과를 볼 수 있었고, 24시간 이후부터는 약하게 나타났다. 이러한 효능을 볼 때 quercetin은 세균 증식 초기 억제하는 효력이 있었다. 따라서 본 연구에 사용한 선인장 발효물이 각각의 균의 증식을 억제하는 물질을 함유하고 있어 양식장에서 양식하는 어류에 대한 생체 실험을 실시할 가치는 충분히 인정되었다. 따라서 선인장 발효물을 양식넙치의 사료에 첨가하여 섭이하게 하고 각각의 균의 농도를 달리하여 접종한 결과 연쇄구균의 경우는 농도가 높을수록 폐사율이 높았고 대조군보다는 실험군의 폐사율이 더 낮게 나타나 양식 넙치의 연쇄구균증의 완화에 효과를 보였다. 에드워드균에 있어서는 시험관내 실험결과 에드워드균의 성장을 12시간까지 세균 증식을 억제하는 효과는 나타내었지만, 연쇄구균에 비해 효과가 떨어지는 것으로 보아 선인장 발효물의 항균효과는 그람음성균보다는 그람양성균에서 효과가 더욱 큰 것으로 사료된다. 비브리오균에 대한 효과는 대조군보다는 실험군의 폐사율이 대조군보다 낮게 나타났다.

결론적으로 볼 때, 손바닥 선인장 프라보노이드 성분 중 하나인 quercetin이 연쇄구균, 에드워드균, 비브리오균의 증식을 억제하며 양식넙치에서 이들 병원균주에 의한 증상 및 폐사율을 감소시킬 수 있는 효과를 보임으로서, 수산 양식산업에 경제적으로 가치가 있다고 판단된다. 또한 손바닥선인장 발효물이 양식넙치에서 연쇄구균, 에드워드

균, 비브리오균의 증식을 억제하는 효능을 가지는 것을 증명하였고, 이러한 효능이 손바닥선인장 프라보노이드 성분중 하나인 quercetin에 의한 역할이라고 추정할 수 있다.

5. 유산균(*Lactobacillus plantarum* CNU001)의 항균효과

가. 서론

미생물 중에는 생육하면서 유산(lactic acid)을 대사산물로서 많이 생성하는 것이 있는데 그러한 세균들을 총칭하여 유산균이라고 한다. 말 그대로 유산(lactic acid)을 많이 생성하는 세균이란 뜻이며, 이것은 김치, 치즈, 요쿠르트, 젓갈류, 그리고 사람이나 동물의 장에 많이 살고 있다. 이러한 유산균이 우리의 건강과 어떤 관련을 갖고 있는지에 대한 흥미있는 연구가 계속되고 있다.

Lactobacilli 와 *bifidobacteria* 는 정상인 intestinal microbialflora의 주요한 균총으로서 이 유산균은 acetic acids와 lactic acids를 생성하여, 장내 pH를 낮추어 장내 병원성균의 생육을 억제한다. 이러한 유산균의 항균작용은 pH effects 이외에도 여러 항균성 대사산물의 생성에 기인한다^{2,18,30}. 또한 여러 발효산물들에 의한 항암효과 및 면역증강작용이 있다고 보고되어 있다^{25,28}.

넙치는 세계적으로 널리 분포하며, 넙치과에 속하는 어류로서 종류는 22종이나 된다. 이 중 우리나라에서 서식하는 종류는 7종으로 알려져 있다. 이중 넙치는 대형종으로서 체장이 80cm나 되지만, 그 외에는 체장이 20-30cm 내외로 소형종들이다.

우리나라에서는 1980년대 후반부터 넙치양식이 시작되면서 양식 초기에는 별다른 질병증상을 찾아볼 수 없었으나, 양식 회수가 거듭되고 사육밀도가 높아지면서 연쇄구균증, 에드워드병 및 비브리오병등이 발생하여 많은 피해를 입고 있다. 이 들 병원체의 특징은 다음과 같으며, 본 연구는 고밀도 사육 양식을 하고 있는 넙치에서 연쇄구균증, 에드워드증, 비브리오증의 증식 및 병원성에 미치는 유산균의 효과를 구명함으로써 안정적 종묘 생산 및 양성에 기초를 두고자 하는데 목적이 있다.

나. 재료 및 방법

1) 공시균주

본 시험에 사용한 균주는 *Streptococcus* sp., *Edwardshiella* sp., *Vibrio* sp.로서 제주도해양수산자원연구소에서 분리한 균주를 분양받아 사용하였다. 유산균은 제주대학교 생명과학과에서 분리한 유산균을 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

2) 항균시험방법

유산균을 이용하여 *Streptococcus* sp., *Edwardshiella* sp., *Vibrio* sp. 균의 증식에 미치는 효과를 알아보기 위하여 액체배지에서 균의 증식률을 비교분석하였다. 먼저 동결 건조된 각각의 실험균을 Brain Heart Infusion broth (BHI; Difco)에 최종농도 2% (w/v)로 부유시킨 후 실온에서 30분간 혼합하여 pH를 7.0으로 조정하였다. 이 혼합물을 균질화 하기 위해서 얼음 상자에 담아 초음파 파쇄기를 이용하여 15초간 초음파 처리, 15초간 정치하기를 8회 반복하였다. 초음파 처리 후 거름종이로 불용성의 물질을 제거한 다음 주사기 여과 멸균기 (0.45 μ m pore size)를 통과시켜 실험재료로 사용하였다. 손바닥선인장 열매 발효분말이 첨가되지 않은 BHI broth를 대조군으로 하였다.

실험균과 대조군에 미리 BHI broth에서 18시간동안 배양된 각각의 균주를 1.5×10^4 CFU/ml 수준으로 접종한 다음 *Streptococcus* sp.은 37°C에서 *Edwardshiella* sp., *Vibrio* sp.은 30°C에서 정치하면서 접종 후 0, 2, 4, 8, 12 및 24 시간에 균수를 측정하였다. 균수의 측정은 실험균과 대조군에서 매 측정 시기에 100 μ l의 배양액을 멸균된 생리 식염수에 희석한 후 BHI agar에 도말 접종하였다.

3) 공시넙치

실험용넙치는 6cm급 크기로 제주도해양수산자원연구소에 설치된 FRP 원형수조($\phi 74$ cm \times 80cm)에서 3개월간 유산균 1.0%가 첨가된 사료로 사육한 것을 사용하였다. 사육기간중 사육수온은 17.4~21.6°C, 염분농도 33.0~35.4‰, DO 5.84~7.12 mg/l, 그리고 pH는 7.57~8.04의 범위였다.

4) 병원성 균주 접종 실험

일반 사료를 섭취한 넙치를 각각 5개의 실험군과 5개의 대조군으로 나누어 배치하였다. 각 군은 4마리의 넙치로 구성되었으며, 활성화시킨 연쇄구균, 에드워드 및 비브리오균을 BHI 액체배지에 배양하여 ml 당 9.8, 9.8 \times 10², 9.8 \times 10⁴, 9.8 \times 10⁶, 9.8 \times 10⁸의 연쇄구균을 복강에 0.1ml씩 접종하였다. 접종 후 30일간 사육하면서 폐사 유무 및 외관 증상을 매일 확인하였다. 폐사어와 발현어는 해부하여 병변을 관찰하고 간과 신장에서 세균을 배양하였다.

다. 결과

1) 연쇄구균

유산균이 연쇄구균의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 각각의 시료를 여과한 후 BHI에 첨가한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 대조군의 경우 배양 12시간 후 8.4 log₁₀ CFU/ml, 24시간 후 11.1 log₁₀ CFU/ml의 균수를 나타내었고, 유산균이 첨가된 실험군의 경우 배양 12시간 후 7.0 log₁₀ CFU/ml, 24시간 후 11.0 log₁₀ CFU/ml의 균수를 나타내어 연쇄구균의 경미하게 증식 억제효과를 볼 수 있었다.

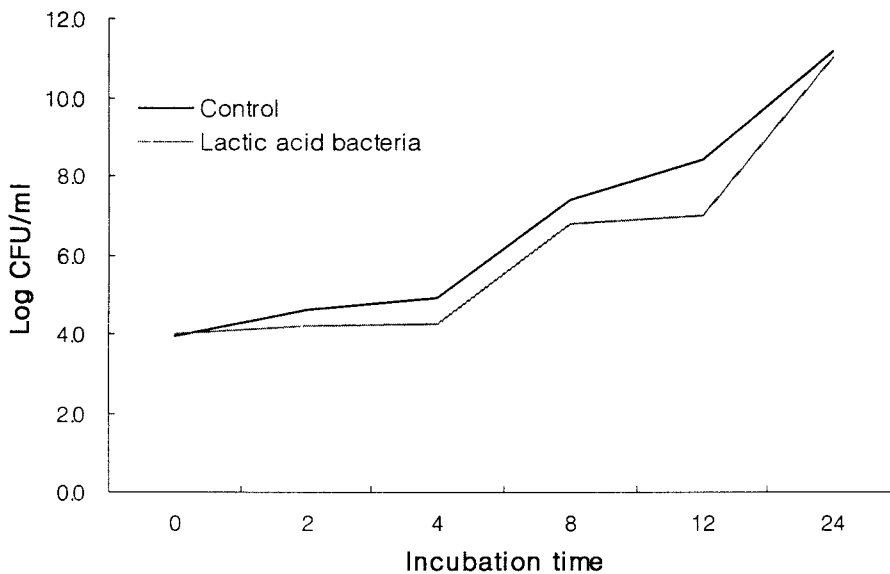


Fig. 1. Effect of *Opuntia ficus-indica* fermented with Lactic acid bacteria on growth rate of *Streptococcus* sp., fish pathogen.

병원성 실험은 유산균(*Lactobacillus plantarum*)을 첨가한 사료를 먹지 않은 넙치는 1×10⁹ viable cell을 접종한 대조군에서 10일만에 50%가 폐사하였고, 1×10⁷ viable cell을 접종한 대조군에서는 25일만에 100%가 폐사하였으며, 1×10⁵ viable cell을 접종한 대조군에서는 30일만에 25%가 폐사하였다.

유산균을 첨가한 사료를 섭취한 넙치는 1×10⁹ viable cell을 접종한 실험군에서 25일만에 100%가 폐사하였고, 1×10⁷ viable cell을 접종한 실험군에서는 14일만에 25%가 폐사하였으며 1×10⁵ viable cell을 접종한 실험군에서는 21일만에 50%가 폐사하였고, 1×10³ viable cell을 접종한 실험군에서는 11일만에 25%가 폐사하였다

(Table 5). 복수 및 안구돌출이 임상증상이 보였고 간, 신장등에서 접종균과 같은 원인균이 검출되었다.

Table 1. Pathogenicity of *Lactobacillus plantarum* against streptococcus sp. infection in cultured flounder(*Paralichthys olivaceus*).

Group control	Inoculum (cell/ml)	Number of death after challenge																														No. of fish died/tested	Yeab ti died(day)	mortality (%)		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30					
1	1×10 ¹																																	0/4	-	0
2	1×10 ³																																	0/4	-	0
3	1×10 ⁵																															1	1/4	30	25	
4	1×10 ⁷						1				1																					1	1	4/4	16	100
5	1×10 ⁹					1					1																						2/4	8	50	

Group (Lplantarum)	Inoculum (cell/ml)	Number of death after challenge																														No. of fish died/tested	Yeab ti died(day)	mortality (%)		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30					
1	1×10 ¹																																	0/4	-	0
2	1×10 ³										1																							1/4	11	25
3	1×10 ⁵																1															1	2/4	18.5	50	
4	1×10 ⁷																1																1/4	14	25	
5	1×10 ⁹																																1	4/4	17	100

2) 에드워드균

유산균이 에드워드균의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 시료를 여과한 후 BHI에 첨가한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 대조균의 경우 배양 12시간 후 8.4 log₁₀ CFU/ml, 24시간 후 11.0 log₁₀ CFU/ml의 균수를 나타내었고, 유산균이 첨가된 실험균의 경우 배양 12시간 후 4.5 log₁₀ CFU/ml, 24시간 후 9.6 log₁₀ CFU/ml의 균수를 나타내어 에드워드균의 증식 억제효과를 12시간 까지 에드워드균의 증식 억제 효과를 볼 수 있었고 24시간 이후부터는 볼 수 없었다.

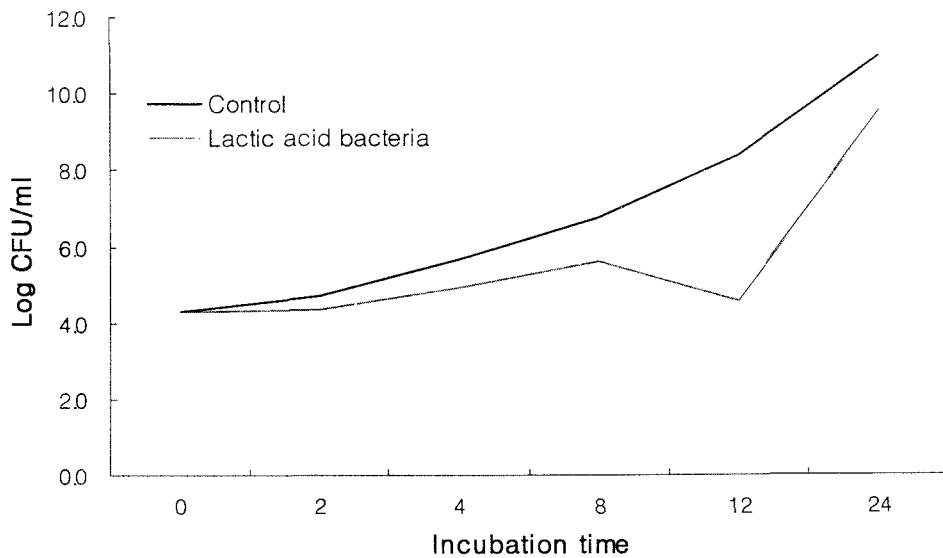


Fig. 2. Effect of *Opuntia ficus-indica* fermented with Lactic acid bacteria on growth rate of *Edwardsiella* sp., fish pathogen.

병원성 실험은 유산균(*Lactobacillus plantarum*)을 첨가한 사료를 먹지 않은 넙치는 1×10^9 viable cell을 접종한 대조군에서 6일만에 100%가 폐사하였고 1×10^7 viable cell을 접종한 대조군에서는 11일만에 75%가 폐사하였다. 유산균을 첨가한 사료를 섭취한 넙치는 1×10^9 viable cell을 접종한 실험군에서 6일만에 100%가 폐사하였. 복수 및 안구가 돌출되는 임상증상이 보였고 간, 신장등에서 접종균과 같은 원인균이 검출되었다 (Table 7).

Table 2. Pathogenicity of *Lactobacillus plantarum* against *edwardsiella* sp. infection in cultured flounder(*Paralichthys olivaceus*).

Group control	Inoculum (cell/ml)	Number of death after challenge																														No. of fish died/tested	Mean ti died(day)	mortality (%)		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30					
1	1×10 ¹																																			0/4
2	1×10 ³																																			0/4
3	1×10 ⁵																																			0/4
4	1×10 ⁷																																			3/4
5	1×10 ⁹																																			4/4

Group (<i>L. plantarum</i>)	Inoculum (cell/ml)	Number of death after challenge																														No. of fish died/tested	Mean ti died(day)	mortality (%)		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30					
1	1×10 ¹																																			0/4
2	1×10 ³																																			0/4
3	1×10 ⁵																																			0/4
4	1×10 ⁷																																			0/4
5	1×10 ⁹																																			4/4

3) 비브리오균

유산균이 비브리오균의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 시료를 여과한 후 BHI에 첨가한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 대조군의 경우 배양 12시간 후 9.2 log₁₀ CFU/ml, 24시간 후 11.1 log₁₀ CFU/ml의 균수를 나타내었고, 유산균이 첨가된 실험군의 경우 배양 12시간 후 6.9 log₁₀ CFU/ml, 24시간 후 10.4 log₁₀ CFU/ml의 균수를 나타내어 비브리오균의 증식 억제효과를 12시간 까지 비브리오균의 증식 억제 효과를 볼 수 있었고 24시간 이후부터는 볼 수 없었다.

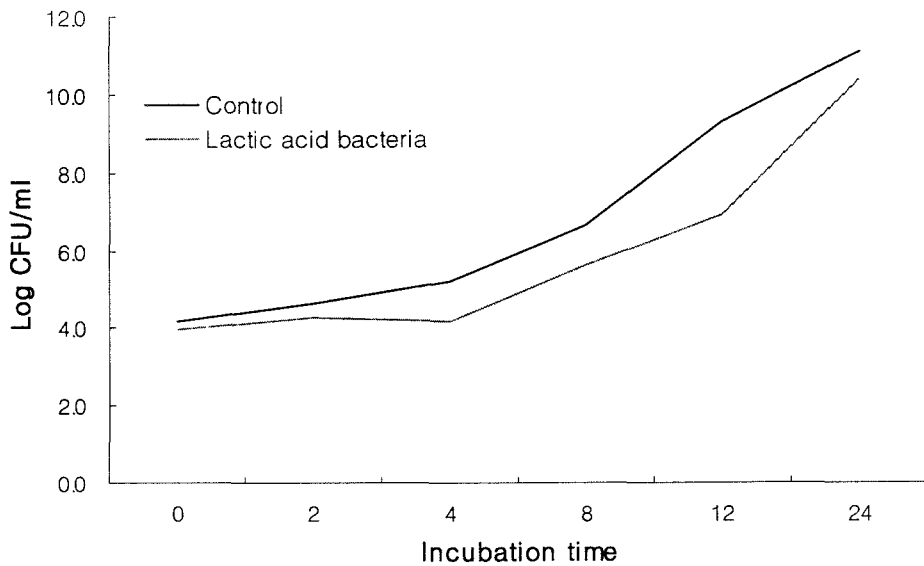


Fig. 3. Effect of *Opuntia ficus-indica* fermented with Lactic acid bacteria on growth rate of *Vibrio* sp., fish pathogen.

병원성 실험은 유산균(*Lactobacillus plantarum*)을 첨가한 사료를 먹지 않은 넙치는 1×10^9 viable cell을 접종한 대조군에서 1일만에 100%가 폐사하였고, 1×10^7 viable cell을 접종한 대조군에서는 3일만에 75%가 폐사하였으며, 1×10^5 viable cell을 접종한 대조군에서는 8일만에 25%가 폐사하였다. 선인장 발효물을 첨가한 사료를 섭취한 넙치는 1×10^9 viable cell을 접종한 실험군에서 1일만에 100%가 폐사하였고 1×10^7 viable cell을 접종한 실험군에서는 4일만에 50%가 폐사하였다 (Table 3). 복수 및 안구돌출의 임상증상이 보였고 간, 신장등에서 접종균과 같은 원인균이 검출되었다.

Table 3. Pathogenicity of *Lactobacillus plantarum* against *vibrio* sp. infection in cultured flounder (*Paralichthys olivaceus*).

Group control	Inoculum (cell/ml)	Number of death after challenge																														No. of fish died/tested	Survival time (day)	mortality (%)				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30							
1	1×10 ¹																																			0/4	-	0
2	1×10 ³																																			0/4	-	0
3	1×10 ⁵																																			1/4	8	25
4	1×10 ⁷																																			3/4	2.5	75
5	1×10 ⁹																																			4/4	1	100

Group (L. plantarum)	Inoculum (cell/ml)	Number of death after challenge																														No. of fish died/tested	Survival time (day)	mortality (%)					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30								
1	1×10 ¹																																			0/4	-	0	
2	1×10 ³																																			0/4	-	0	
3	1×10 ⁵																																			0/4	-	0	
4	1×10 ⁷																																				2/4	3.5	50
5	1×10 ⁹																																				4/4	1	100

라. 고찰

국내 양식 넙치에서 막대한 경제적 피해를 주고 있는 세균성 질병은 주로 그람 양성 균인 *Streptococcus* sp., 그람 음성균인 *Edwardsiella tarda* 및 *Vibrio* sp.에 의해 발병되고 있다. 어류의 사육 중에 빈발하는 세균성 질병의 치료를 위하여 항생물질을 비롯한 각종 화학요법제가 사용되고 있으나, 항생제 잔류에 기인한 환경 문제와 이들 약제의 오용과 남용에 의한 약제 내성균의 출현은 질병의 치료를 어렵게 할 뿐 만 아니라 양식어민에 대한 경제적 부담을 가중시키고 있다^{26,42}. 따라서 어류의 경우 질병의 치료보다는 예방에 중점을 둔 백신의 개발에 노력하여 왔으나 그 효용의 가치가 인정되는 경우는 극히 드문 편이어서 면역기능을 자극하는 면역자극제에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다⁴⁷. 본 실험에서는 유산균의 효능 시험을 통하여 수산용 예방제재로서의 적용 가능성을 밝히고자 하였다.

유산균은 probiotics로서 살균 작용을 하는 성분들을 분비하기 때문에 식품 등을 장기 보관할 목적으로 연구되고 있다⁴⁸. 본 연구에서 유산균을 동결저온 건조한 제품으로

서 시험관내 시험결과 연쇄구균, 에드워드균, 비브리오균의 성장을 억제하는 효력이 선인장 발효물이나 프라보노이드 보다는 낮게 나타났다. 본 연구에 사용한 유산균이 각각의 균의 증식을 억제하는 물질을 함유하고 있어 양식장에서 양식하는 어류에 대한 생체 실험을 실시할 가치는 충분히 인정되었다. 따라서 유산균을 양식넙치의 사료에 첨가하여 섭이하게 하고 각각의 균의 농도를 달리하여 접종한 결과 연쇄구균의 경우는 농도가 높을수록 폐사율이 높았고 대조군보다는 실험군의 폐사율이 더 낮게 나타나 양식 넙치의 연쇄구균증의 완화에 효과를 보였다. 에드워드균에 있어서는 시험관내 실험 결과 에드워드균의 성장을 12시간까지 세균증식을 억제하는 효과는 나타내었지만 연쇄구균에 비해 효과가 떨어지는 것으로 보아 선인장 발효물의 항균효과는 그람음성균보다는 그람 양성균에서 효과가 더욱 큰 것으로 사료된다.

Vibrio sp. 경우에도 유산균의 세균증식 억제효과는 *Streptococcus* sp.에 대한 효과 보다는 낮았지만 24시간 까지 세균증식 억제효과가 나타났다. 이는 사료에 첨가한 유산균의 양이 전체 사료의 1%에 해당하며 시험관내 시험에서는 선인장 발효분말을 2%를 사용하였고 병원성 시험에서는 선인장 발효물액상을 1% 첨가하였다. 두 시험에서 첨가한 농도가 같지 않았기 때문이라 분석된다.

결론적으로 볼 때 유산균이 연쇄구균, 에드워드균, 비브리오균의 증식을 억제하며 양식넙치에서 이들 병원균주에 의한 증상 및 폐사율을 감소시킬 수 있는 효과를 보임으로서 수산 양식 산업에 경제적으로 가치가 있다고 판단된다.

6. 항바이러스효과

가. 서론

어류는 인간의 고급 단백질 공급원으로서 세계 여러 지역에서 대량 양식되고 있다. 이들 양식 어류에 전염성 췌장괴저바이러스 (Infectious Pancreatic Necrosis Virus, IPNV), 전염성 조혈괴저바이러스 (Infectious Hematopoietic Necrosis Virus, IHNV), 버나바이러스 (birnavirus), 이리도바이러스 (iridovirus), 노다바이러스 (Nodavirus), 히라메 랍도바이러스 (hirame rhabdovirus) 등의 바이러스가 감염하여 대량 폐사를 유발함으로써 막대한 피해를 주고 있다^{17, 24, 34, 43, 49}. 우리나라의 경우에도, 양식 어류에서 IPNV^{20, 21, 44}, IHNV⁴⁶, 버나바이러스⁵², 이리도바이러스, 노다바이러스 등이 검출되어 이들 바이러스의 감염이 대량폐사의 원인임이 확인되었다. 따라서 양식 어류의 바이러스 감염에 의한 피해를 줄이기 위한 대책 마련이 시급한 상황이다.

일반적으로 바이러스 질병을 막는 가장 좋은 방법은 효과적인 백신을 개발하여 바이러스 질병을 미연에 방지하는 것이다. 이러한 이유로 인하여 세계 여러 나라에서 어류의 병원성 바이러스에 대한 백신을 개발하고자 많은 노력을 기울여 왔다. 현재까지 국내 및 국외의 연구 결과 양식어류에 피해를 유발하는 바이러스들 중 IPNV, IHNV, 버나바이러스, iridovirus 등에 대하여는 백신을 이미 개발하여 일부는 사용 중에 있거나 효과를 실험 중에 있다. 그러나 IPNV 백신을 제외한 다른 백신은 실용화 되지 않고 있는 상황이다. 따라서 이들 바이러스 질병을 조절할 수 있는 방법의 개발이 필요한 상황이다.

본 연구에서는 제주도 특산물인 선인장의 발효물을 대상으로 항바이러스 효과를 측정하고자 하였다. 본 연구결과, 선인장 발효물이 병원성 바이러스의 증식을 억제할 수 있음이 확인되면 양식 어류에 발생하는 대량 폐사를 어느 정도 줄일 수 있어 양식업자들의 피해를 줄임은 물론, 양식업의 활성화에 큰 기여를 할 수 있을 것으로 판단된다.

나. 재료 및 방법

1) 시료

A, 선인장 분말

B, 선인장 발효분말

위의 시료들을 DMSO를 사용하여 40 mg/ml로 녹인 후 혈청이 들어 있지 않은 세포배양액을 사용하여 2배씩 희석을 하였다.

2) 바이러스

IPNV, MABV (marine birnavirus), IHNV, iridovirus 등과 같이 4종류의 어류 바이러스를 대상으로 시료의 항바이러스 효과를 분석하였다.

3) 세포주

CHSE-214와 GF 등의 2종류 세포를 사용하였는데, CHSE-214는 IPNV, MABV 및 IHNV의 실험에 사용하였고, GF는 iridovirus의 실험에 사용하였다. 이들 2종류의 세포 모두 fetal bovine serum 10%가 첨가된 EMEM을 사용하여 배양하였다.

4) 실험방법

시료의 항바이러스 효과는 바이러스에 의한 cytopathic effect (CPE)를 억제하는 정도를 측정하여 분석하였다. 96-well plate에 24시간 동안 배양한 세포를 사용하여 실험을 수행하였는데, 두 가지 방법을 사용하여 항바이러스 효과를 분석하였다. 첫째, 바이러스의 흡착 때부터 시료를 첨가하여 항바이러스 효과를 분석하는 방법과, 둘째, 바이러스의 흡착 이후부터 시료를 첨가하여 항바이러스 효과를 분석하는 방법을 사용하였다.

첫 번째 방법의 경우, 먼저 혈청 2%가 첨가된 EMEM을 사용하여 시료를 2배씩 연속적으로 희석하였다. 각 희석액 50 ul를 세포가 배양된 4개의 well에 첨가한 다음 100 TCID₅₀의 바이러스가 들어 있는 EMEM 100ul를 각 well에 접종하였다. 상온에서 1시간 동안 흡착 시킨 다음 흡착되지 않은 바이러스를 제거하였다. 각 well에 앞에서와 같이 희석된 시료 100 ul를 첨가하고 5일간 배양하면서 CPE를 관찰하였다.

두 번째 방법은, 먼저 세포가 배양된 well에 100 TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose)의 바이러스가 들어있는 배양액 100 ul를 접종하였다. 상온에서 1시간 동안 배양한 다음 바이러스를 제거하였다. 앞에서와 같이 시료를 2% 혈청이 들어 있는 EMEM을 사용하여 2배씩 희석한 다음 각 희석액 100ul를 4개의 well에 첨가하였다. 이후 5일간 배양하면서 CPE를 관찰한 결과를 바탕으로 세포의 50%를 살아남게 한 약물의 농도, EC₅₀ (50% effective concentration)를 결정하였다.

시료에 의한 세포독성을 확인하기 위하여 바이러스가 접종되지 않은 세포에 앞에서와 같이 희석된 시료를 첨가한 후 5일간 배양하면서 세포독성을 관찰하였다. 바이러스

와 시료 모두를 첨가하지 않은 대조구 세포와 비교하여 50%의 세포를 죽도록 한 시료의 농도, CC50 (50% cytotoxic concentration)를 결정하였다.

Selective index (SI)의 값은 CC50과 EC50의 비율 (CC50/EC50)로부터 구하였다.

다. 결과

1) IPNV

IPNV의 증식억제효과가 관찰되지 않았다.

Name	Anti-IPNV/CHSE-214				
	Toxicity (CC ₅₀ , µg/ml)	Antiviral activity (EC ₅₀) (µg/ml)		SI (CC ₅₀ /EC ₅₀)	
	D&A*	D&A	A**	D&A	A
A (선인장 분말)	>500	>500	>500	ND	ND
B (선인장 발효분말)	>125	>125	>125	ND	ND

*D&A: drug added during and after adsorption

**A: drug added after adsorption

2) MABV (marine birnavirus)

MABV의 증식억제효과가 관찰되지 않았다.

Name	Anti-MABV/CHSE-214				
	Toxicity (CC ₅₀ , µg/ml)	Antiviral activity (EC ₅₀) (µg/ml)		SI (CC ₅₀ /EC ₅₀)	
	D&A*	D&A	A**	D&A	A
A (선인장 분말)	>500	>500	>500	ND	ND
B (선인장 발효분말)	>125	>125	>125	ND	ND

*D&A: drug added during and after adsorption

**A: drug added after adsorption

3) IHNV

실험에 사용한 2가지 시료 모두 IHNV 감염 후 3일째까지는 바이러스의 성장억제효과가 명확하게 관찰되었고, 성장 억제효과는 시료를 바이러스 흡착 전부터 첨가한 것과 흡착 후에 첨가한 것 사이에 차이가 없었다.

그러나 5일 째에 관찰한 결과에서는 2가지 시료 모두 성장억제효과가 없었고 이 결과로부터 감염 초기인 3일째에 보인 성장 억제 효과는 바이러스 성장을 지연시킨 결과인 것으로 분석되었다.

실험에 사용한 2가지 시료가 어떤 기작을 통하여 바이러스 성장을 지연 시켰는지는 본 결과만으로는 명확하지 않으며 추후, 이 부분에 대한 연구가 지속적으로 필요하다고 사료된다.

Name	Anti-IHNV/CHSE-214 (3 day p. i.)				
	Toxicity (CC ₅₀ , µg/ml)	Antiviral activity (EC ₅₀) (µg/ml)		SI (CC ₅₀ /EC ₅₀)	
	D&A*	D&A	A**	D&A	A
A (선인장 분말)	>500	62.5	62.5	8	8
B (선인장 발효분말)	>125	31.25	31.25	4	4

*D&A: drug added during and after adsorption

**A: drug added after adsorption

Name	Anti-IHNV/CHSE-214 (5 day p. i.)				
	Toxicity (CC ₅₀ , µg/ml)	Antiviral activity (EC ₅₀) (µg/ml)		SI (CC ₅₀ /EC ₅₀)	
	D&A*	D&A	A**	D&A	A
A (선인장 분말)	>500	>500	>500	ND	ND
B (선인장 발효분말)	>125	>125	>125	ND	ND

*D&A: drug added during and after adsorption

**A: drug added after adsorption

4) Iridovirus

2가지 시료 모두 Iridovirus의 성장억제효과가 없었다.

Name	Anti-Iridovirus/GF				
	Toxicity (CC ₅₀ , µg/ml)	Antiviral activity (EC ₅₀) (µg/ml)		SI (CC ₅₀ /EC ₅₀)	
	D&A*	D&A	A**	D&A	A
A (선인장 분말)	>400	>400	>400	ND	ND
B (선인장 발효분말)	>400	>400	>400	ND	ND

*D&A: drug added during and after adsorption

**A: drug added after adsorption

라. 고찰

실험에 사용한 바이러스는 IPNV, IHNV, MABV, iridovirus 등의 4종류인데, IPNV, Iridovirus, MABV 등의 3 종류 바이러스들에 대하여는 항바이러스 효과가 관찰되지 않았다. 그런데, IHNV의 경우 2종류의 시료 모두에서 감염 초기의 바이러스 증식을 억제하는 효과가 있었으나 IHNV의 감염 후 5일 이상 배양한 경우 바이러스 증식 억제효과가 사라지는 것으로 보아 시료들이 IHNV의 증식을 완전히 억제하기보다는 증식을 지연시키는 효과가 있는 것으로 판단된다. 현재의 결과로는 어떤 기작을 통하여 바이러스 증식을 지연 시키는지는 알 수 없다.

선인장 분말과 발효분말이 IHNV의 증식을 완전히 억제하지 못하고 초기증식만을 억제하는 효과를 보였지만 이러한 증식억제 효과는 양식현장에 사용시 IHNV에 의한 폐사를 어느정도 줄일 수 있을 가능성이 매우 높다. 또한 선인장 일반분말 보다는 발효분말을 이용한 쪽에서 보다 효과가 있는 것으로 나타났다. 대개 바이러스에 의한 폐사는 바이러스에 걸린 개체의 면역반응이 활성화되기 전에 바이러스가 급격하게 증가하여 조직을 파괴함으로써 발생한다. 만약 선인장 발효분말의 처리결과 바이러스 감염 초기에 증식을 조금이라도 억제시켜 놓으면 그 이후 자체 면역 반응 활성화로 인하여 폐사율이 상당히 감소할 수 있을 것으로 판단된다.

따라서 향후 양식현장에 적용하여 이 것이 맞는지의 여부를 확인할 필요가 있다고 판단된다. 그리고 양식어류에 감염하는 바이러스들 중 IHNV와 같은 family에 속하는 것들로 hirame rhabdovirus, spring viremia carp virus 등이 있다. 이들 바이러스의 구조 및 특성이 IHNV와 유사하기 때문에 본 연구에서 개발한 선인장 발효물이 이들 바이러스의 초기 증식을 억제할 가능성이 매우 높다. 이것 또한 양식 현장에서 확인할 필요가 있다고 판단된다.

7. 항산화효과

가. 서론

산소 대사과정에서 생성되는 활성산소는 많은 경우에 성인병, 염증, 암, 동맥경화 등과 관련되어 있다. 따라서 항산화물질의 섭취는 성인병 예방이나 치료에 도움이 될 수 있다³². 각종 곡물, 채소, 과일, 해조, 약초류 등은 강한 자외선 등으로부터 자신을 보호하기 위해 세포내에 polyphenol류 등의 항산화물질을 풍부하게 포함하고 있다^{35,36}.

지금까지 개발되어 사용되고 있는 항산화제로는 tertbutylhydroxytoluene(BHT)이나 tertbutylhydroxyanisol(BHA)등과 같은 합성 항산화제와 α -tocopherol, vitamin C, carotenoids, flavonoids와 탄닌 등과 같은 일부 천연항산화제 및 SOD와 같은 항산화 효소이다. 그런데 이들 항산화제는 독성, 저활성 및 용도의 한계성 등으로 인하여 사용에 제한을 받고 있다. 따라서 보다 안전하고 강한 항산화제를 천연물 또는 미생물 대사산물로부터 얻고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 활성산소 제거능력이 향상된 유산균은 식품산업에 중요하며⁹, 유산균을 이용한 항산화제의 고부가가치 창출을 위해서는 식품, 의약품, 농업분야 등 다방면에서 이용하여 산업적 효과를 기대할 수 있다. 따라서 본 연구는 유산균을 이용한 선인장열매 발효물과 원재료의 항산화 활성을 비교 조사하였다.

나. 연구내용 및 방법

선인장 열매 착즙액과 발효액을 농축기로 감압농축한 다음 각각의 시료를 100% 에탄올에 10% 농도가 되도록 넣고, 30℃ 진탕수조에서 24시간 진탕시킨 후 12000 x g, 4℃에서 10분간 원심분리하여 고형물을 제거한 후 상청액을 0,2 μ m membrane filter로 여과하였다. 에탄올 추출물의 황산화 활성도는 Blois의 방법¹⁰을 변형하여 전자공여능(Electron donating ability, EDA)으로 측정하였다.

즉 0.1mM PPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)용액(에탄올에 용해)에 에탄올 추출액 50ul를 넣고 5초간 교반하여 10분간 반응시킨 후 517nm에서 흡광도를 측정하여 대조구에 대한 흡광도의 감소 비율로서 전자공여능을 나타내었다.

다. 연구 결과 및 고찰

손바닥 선인장 열매 발효물의 항산화능을 조사하기 위해 에탄올로 추출하여 항산화 활성능을 조사한 결과 Fig. 1과 같이 희석액을 *Lactobacillus plantarum* 균주로 발효한 발효물에서 대조구보다 3배 항산화 활성이 높은 것으로 나타내었다. 그 다음으로 *Lactobacillus brevis*, EM순으로 항산화 활성이 대조구에 비해 높게 나타났으며, 원액 발효물에서는 EM을 제외하고는 대조구보다 항산화 활성이 낮은 것으로 나타내었다. 이는 선인장 열매의 원재료에 없었던 새로운 생리활성 물질이 발효에 의해 생성될 수 있고, 이들 중에 항산화물질도 포함되어 있을 것으로 판단된다.

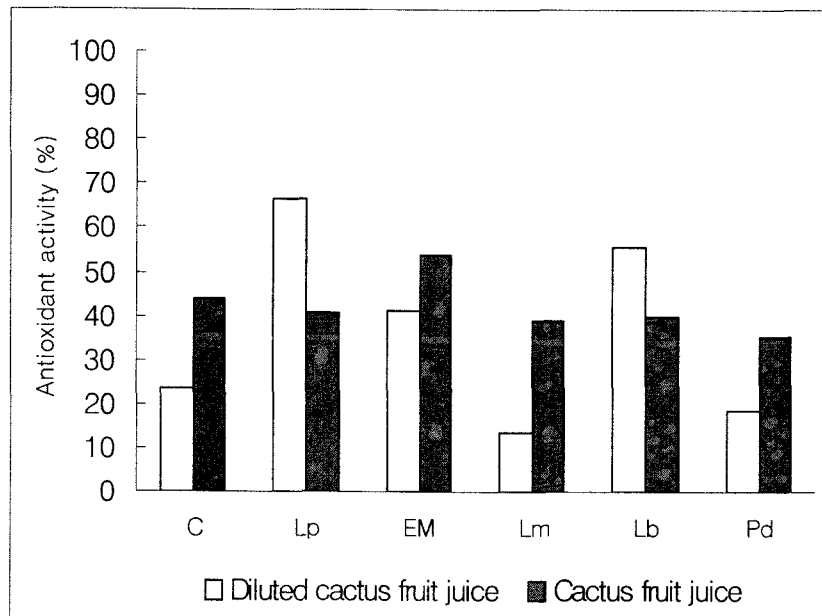


Fig. 1. Antioxidant activity of fermented Cactus fruit juice.
 C: Cactus fruit juice, Lp: *Lactobacillus plantarum* 11060,
 EM: Effective Microorganisms, Lm: *Leuconostoc mesenteroides* 10146,
 Lb: *Lactobacillus brevis* 10110, Pd : *Pediococcus dextrinicus* 3506

8. 참고문헌

1. Alexander, J. B., Ingram, G. A., 1992. Noncellular nonspecific defense mechanisms of fish. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 2, 249-279.
2. Apella, M. C., Gonzalez, S.N., Nader de Macias, M.E., Romero, N. and Oliver, G., 1992. In vitro studies on the inhibition of the growth of shigella sonnei by *Lactobacillus casei* and *Lact. acidophilus*. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 480-483.
3. Ahotupa, M., Saxelin, M. and Korpela, R., 1996. Antioxidative properties of *Lactobacillus* GG. *Nutr. Today (Suppl.)* 31, 51S-52S.
4. Arima, H., Ashida, H., Danno, G., 2002. Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 66(5), 1009-1014.
5. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 181, 1199-1200.
6. Burrer, F., Lebreton, P. H. and Voirin, B., 1982. Les aglycones flavoniques de catees: distribution, signification. *J. Nat. Prod.*, 45, 687-693.
7. Brandley, B. K., Schnaar, R. L., 1986. Cell-surface carbohydrates in cell recognition and response. *J. Leukocyte Biol.*, 40, 97-111.
8. Byun, J. W., Park, S. C., Beno, Y. and Oh, T. K., 1997. Probiotics effects of *Lactobacillus sp.* DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Gen. Appl. Microbiol.* 43, 305-308.
9. Carter, W.G., Etzler, M.E., 1975. Isolation characterization and subunit structures of multiple forms of Dolichos biflorus lectin. *J. Biol.*

Chem., 250, 2756-2762.

10. Cha, Y.B., Yahg, H.C., Choi, S.D. and Cho, J.K., 1997. Pathogenic *Staphylococcus epidermidis* isolated from cultured fingerling of sea bass, *Lateolabrax japonicus*, in Korea. *Kor. J. Fish Pathol.*, 10(1), 1-14.
11. Chung, M. S., 2000. Antioxidantive and antimicrobial activities of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Kor. J. Soc. Food Sci.*, 12, 506-510.
12. Cooper, D.N., 2002. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1572, 209-231.
13. DeBray, H., DeCout, D., Strecker, G., Spik, G. and Montreuil, J., 1981. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *Eur. J. Biochem.*, 117, 4155.
14. Demetriou, M., Granovsky, M., Quaggin, S. and Dennis, J.W., 2001. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature*, 409, 733-739.
15. Evans, J., Shoemaker, C. and Klesius, P., 2000. Experimental streptococcus *iniae* infection of hybrid striped (Morone chrysops × Morone saxatilis) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation. *Aquaculture*, 189, 197-210.
16. Formica, J.V., Regelson, W., 1995. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.*, 33(12), 1061-1080.
17. Fukuda, Y., 1996. Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis. *Fish Pathol.*, 31, 165-170.

18. Gonzalez, S.N., Apella, M.C., Romero, N.C. and Oliver, G., 1993. Inhibition of enteropathogens by Lactobacilli strains used in fermented milk. *J. Food Protect.*, 56(9),773-776.
19. Hayes, C. E., Goldstein, I. J., 1974. An a-D-galactosyl-binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. *J. Biol. Chem.*, 249, 1904-1914.
20. Hah, Y. C., Hong, S. W., Kim, M. H., Fryer, J. L. and Winton, J. R., 1984. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from gold fish (*Carassius auratus*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in Korea. *KOR. J. Microbiol.*, 22(2),85-90.
21. Hedrick, R. P, Eaton, W. D., Fryer, J. L., Hah, Y. C., Park, J. W. and Hong, S. W., 1985. Biochemical and serological properties of birnaviruses isolated from fish in Korea. *Fish Pathol.*, 20(4), 463-468.
22. Helenius, A., 1994. How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.*, 5, 253-265.
23. Heo, M. S., Song, C. .B., Lee, J. H., Yeo, I. K., Jeon, Y. J., Lee, J.J., Chung, S.C., Lee, K. W., Rho, S., Choi, K. S. and Lee, Y. D., 2001. Characteristics of β -Streptococcus spp. Isolated in cultured Flounder (*Paralichthys olivaceus*) of Jeju Island. *J. Korean Fish. Soc.*, 34(4), 365-369.
24. Inouye, K., 1992. Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.*, 27, 19-27
25. Itoh, K., 1999. Lactic acid bacteria and intestinal microflora. The 11th international symposium on Lactic acid bacteria and human health. Seoul, Korea. 23-25.
26. Imazato, S., Ebi, N., Takahashi, Y., Kaneko, T., Ebisu, S., Russell, R.,

2003. Antibacterial activity of bactericide-immobilized filler for resin-based restoratives. *Biomaterials*, 24(20), 3605-3609.
27. Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., and Jalaudin, S., 1998. Growth performance, intestinal microbial populations and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. *Poult. Sci.*, 77, 1259-1265.
28. Kroger, M., Kurmann, J. A., 1989. Fermented milk-past present and future. *Food Technol.*, 43, 92-99.
29. Kim, I. H., Kim, M. H., Kim, H. M., and Kim, Y. E. 1995. Effect of antioxidants on the thermostability of red pigment in prickly pear. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 27, 1013-1016.
30. Kim, S.H., Kim, Y.K. and Gilliland, S.E., 1997. Screening and partial purification of bacteriocins by strains of *Lactobacillus acidophilus* isolated from human origin. *Kor. Dairy Technol.*, 15(1), 21-26.
31. Lasky, L., 1992. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science*, 258, 964-969.
32. Lis, H., Sharon, N., 1993. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur. J. Biochem.*, 218, 1-27.
33. Lee, Y.C., Hwang, K.H., Han, D.H. and Kim, S.D., 1997. Compositions of *Opuntia ficus-indica*. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 29(5), 847-853.
34. Le Breton, A., 1997. Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L). *J. Fish Dis.*, 20, 145-151.
35. Lee, E.B., Hyun, J.E., Li, D.W. and Moon, Y.I., 2002. Effects of *Opuntia*

- ficus-indica var. Saboten stem on gastric damages in rats. Arch Pharm Res., 25(1), 67-70.
36. Moore, K.L., Varki, A. and McEver, R.P., 1991. GMP-140 binds to a glycoprotein receptor on human neutrophils: evidence for a lectin-like interaction. J. Cell Biol., 112, 491-499.
37. McEver, R.P., Moore, K.L. and Cumming, R.D., 1995. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. J. Biol. Chem., 270, 11025-11028.
38. Maeda, N., Kawada, N., Seki, S., Arakawa, T., Ikeda, K., Iwao, H., Okuyama, H., Hirabayashi, J., Kasai, K. and Yoshizato, K., 2003. Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways. J Biol Chem., 278(21), 18938-18944.
39. Novogrodsky, A., Katchalski, E., 1973. Induction of lymphocyte transformation by sequential treatment with neuraminidase and galactose oxidase E. Proc. Natl. Acad. Sci., 70, 1824-1827.
40. Noguchi, M., Noguchi, T., Watanabe, M. and Muramatsu, T., 1982. Localization of receptors for Dolichos biflorus agglutinin in early post implantation embryos in mice, J. Embryol. Exp. Morphol., 72, 39-52.
41. Nakamura, O., Watanabe, T., Kamiya, H. and Muramoto, K., 2001. Galectin containing cells in the skin and mucosal tissues in Japanese conger eel, Conger Myriaster: an immunohistochemical study. Dev. Comp. Immunol., 25, 431-437.
42. Nakanishi, T., Kiryu, I. and Ototake, M., 2002. Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument. Vaccine, 20, 3302, 1-6.

43. Pilcher, K. S., and Fryer, J. L., 1980. The viral diseases of fish: a review through 1978. *Crit. Rev. Microbiol.*, 7, 287-364.
44. Park, J. W., Lee, J. J., Jeong, G. and Hah, Y. C., 1989. Characterization of the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolated from pen-cultured rainbow trout in Korea. *KOR. J. Microbiol.*, 27(3), 225-230.
45. Pyungbumsa. 1989. Useful plants of the world. Tokyo, p., 53.
46. Park, M. A., Sohn, S. G., Lee, S. D., Chun, S. K., Park, J. W., Fryer, J. L. and Hah, Y. C., 1993. Infectious Hematopoietic Necrosis Virus from salmonids cultured in Korea. *J. Fish Dis.*, 16, 471-478.
47. Park, S. W., Kim, Y. G. and Choi, D. L., 1996. Enhancement of bacterial disease resistance in rockfish (*Sebastes schlegelii*) by β -glucan administration. *J. Fish Pathol.*, 10(2), 143-152.
48. Park, M. J. and Lee, S. Y., 1997. Effects of Lactose and Yeast on the Changes of Oligosaccharides during the fermentation of Soy Yogurts. *Kor. J. Food Sci. Tech.*, 29(3), 539-545.
49. Sorimachi, M. and Hata, T. 1985. *Fish Pathol.*, 19, 231-238.
50. Simic, M. G. 1988. Mechanism of inhibition of free radical processed in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 202, 377-386.
51. Sharon, N., Lis, H., 1993. Carbohydrates in cell recognition. *Scientific Am.*, 268-748.
52. Sohn, S. G., Park, M. A., Do, J. W., Choi, J. Y. and Park, J. W., 1995. Birnavirus isolated from cultured flounder in Korea. *Fish Pathol.*, 30(4), 279-280.

53. Shoemaker, C., Evans, J. and Klesius, P., 2000. Density and dose: factors affecting mortality of streptococcus iniae infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 188, 229-235.
54. Song, Y.K., Billiar, T.R. and Lee, Y.J., 2002. Role of galectin-3 in breast cancer metastasis: involvement of nitric oxide. *Am. J. Pathol.*, 160(3), 1069-1075.
55. Van Der Sluis A. A., Dekker, M., and Jongen, W. M. F., 1997. Flavonoids as bioactive components in apple products. *Cancer Letter*, 114, 107-108.
56. Wu, A. M., Sugii, S., Herp, A., 1988. A guide for carbohydrate specificities of lectins. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 228, 819-847.
57. Woo, H.J., Shaw, L.W., Messier, J.M., Mercurio, A.M., 1990. The major non-integrin laminin binding protein of macrophages is identical to carbohydrate binding protein 35 (Mac-2). *J. Biol. Chem.*, 265(13), 7097-7099.
58. Wang, H., Gao, G. and Prior, R. L., 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food. Chem.*, 44, 701-705.
59. Yang, R.Y., Hsu, D.K. and Liu, F.T., 1996. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93(13), 6737-6742.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

가. 목표달성도

1) 제 1 세부과제 : 선인장 발효물이 양식넙치의 성장에 미치는 영향

당초 연구 목표	당초 목표 대비 연구결과
<p><1차년도> 선인장 발효물의 최적 투여농도 확인</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 양식넙치의 성장에 미치는 선인장 발효액의 최적투여농도 확인 ⇒ 사료량대비 1% • 선인장 원액과 발효액의 효과를 볼 때 발효액이 양식넙치의 성장에 효과 입증 • 혈액 분석결과 선인장 발효액이 어류의 건강도에 다소 효과가 있으리라 보아짐 • 육질 관능검사에서 맛의 차별화를 내는 것으로 판단되어 브랜드화의 가능성을 제시함
<p><2차년도> 선인장 발효물의 양식생산성 가치 및 효능성검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 타 시판 사료첨가제 비교실험에서 선인장 발효물이 비교우위 차지 • 양식넙치의 성장에 미치는 선인장 발효분말의 최적 농도는 0.08% • 발효미생물과 발효방법으로 당을 이용한 유산균(<i>Lactobacillus plantarum</i>) 혐기발효가 선인장발효에 적합
<p><3차년도> 현장적용시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 3종류의 플라보노이드 성분인 <i>quercetin</i>, <i>isorhamnetin</i>, <i>kaempferol</i> 가 양식넙치의 생존을 향상. • 필수아미노산에서 Lysine, Valine등과 당(Sugar)성분, 그리고 Taurine성분도 넙치 성장에 효과적 • 유산균(<i>Lactobacillus plantarum</i>) 은 넙치 성장과 생존을 향상. • 선인장 발효액과 발효분말을 이용한 양식현장의 실증시험에서 효과입증 • 특허출원

2) 제 2 세부과제 : 고효율 양식사료 첨가제 개발을 위한 선인장 발효기법 연구

당초 연구 목표	당초 목표 대비 연구결과
<p><1차년도> 발효 미생물의 탐색 및 발효조건 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 선인장 열매 착즙액에 당 또는 에너지원의 첨가 없이도 발효가 진행이 이루어졌다. • 유산균주 중 <i>Lactobacillus plantarum</i> 11060, <i>Pediococcus dextrinicus</i> 3506 균주가 발효능이 우수한 균주로 선발하였다. • 발효산물의 화학적 성분을 조사하였다.
<p><2차년도> 선인장 발효물의 항균·항산화 활성조사</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 우수한 발효 미생물 선발 및 발효조건외 재현성을 확인하였으며, HPLC를 이용하여 당과 유기산을 정량 분석한 결과 주로 sucrose를 이용하여 발효산물로 Lactic acid와 acetic acid가 주로 생성되었다. • 발효액의 항균효과는 넙치의 주요 질병원인 <i>Vibrio anguillarum</i> 에 대해 항균효과가 있는 것으로 확인되었다. • 항산화 활성은 <i>Lactobacillus plantarum</i> 11060에 의해 발효된 발효액에서 대조구에 비해 3배의 활성을 보였다.
<p><3차년도> 넙치의 장내세균상 변화 조사 및 제품제조에 대한 공정확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 선인장 열매로부터 발효능이 우수한 유산균을 분리·동정한 결과 <i>Lactobacillus plantarum</i> CNU001 과 <i>Lactobacillus brevis</i> CNU010 로 확인되었다. • 분리 균주의 발효특성을 산도, pH의 변화, 당함량, 유기산 함량을 분석한 결과 발효능이 <i>Lactobacillus plantarum</i> CNU001 가 <i>Lactobacillus brevis</i> CNU010 보다 우수한 것으로 조사되었다. • 장내세균상의 분포를 비교한 결과 대조구에 비해 투여구에서 일반 장내세균이 약 23.6% 감소하는 결과를 얻었고, 분자생물학적 방법을 통해 50~70개의 clone를 확보하였다. • 액상 발효액과 분말용 제품에 buffering agent의 첨가나 pH를 중성 범위로 보정하면 유산균의 생존율을 향상시키는 결과를 얻었다.

3) 제 3 세부과제 : 선인장 발효물을 이용한 양식넙치의 면역체계 강화기법 개발

당초 연구 목표	당초 목표 대비 연구결과
<p><1차년도> 양식넙치의 면역장기 특성 규명</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 3가지 렉틴(DBA, SBA, isolectin B4)은 여러장기의 상피에 위치하며 특히 감염되기 쉬운 내부 표면부위에서 생체방어 역할을 할 것으로 조사되었다.
<p><2차년도> 양식넙치에서 선인장 발효액의 면역기능 향상능 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 제주도 양식넙치에서 분리된 연쇄구균 및 에드워드균을 이용하여 손바닥선인장 발효물의 항균효과를 시험관내에서 조사한 결과 대조군에 비하여 높은 증식억제효과가 있었다. • 감염실험에서 손바닥선인장 발효물은 넙칭서 문제되는 연쇄구균 및 에드워드균에 강한 항균력을 나타내며 특히 그람 양성균인 연쇄구균에 대해 특이하게 강한 항균력을 보이고 있었다.
<p><3차년도> 면역기능 향진이 감염증에 미치는 영향</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 선인장발효물은 그람양성균과 그람음성균인 비브리오균에 대해 세균증식을 억제하는 효과가 확인되었다. • 유산균과 Quercetin에서도 선인장발효물과 비슷한 경향을 보임으로서 선인장발효물이 항산화제로도 활용될 수 있을 것으로 사료된다. • 선인장발효물, 프라보노이드등의 급이는 생물체의 비특이 면역기능의 향진에 경미한 효과가 있을 것으로 추정된다. 그러나 생물양식의 경우, 개체의 상태뿐만 아니라 환경적 요인을 감안할 경우 양식조건에 따라 많은 차이가 예상될 수 있어 향후 이에 대한 보완적 연구가 필요할 것으로 생각된다.

나. 관련분야에의 기여도

- 납치 이외의 타품종 양식산업에 활용
- 효과인정시 식품산업 등에 발효미생물 응용가능
- 면역기법을 이용한 어류질병 조기진단 활용

제 5 장 연구개발결과의 활용도

제 1 절 연구성과의 발표

1. 논문게재 실적

제 목	발표자	학술지명	통권, 호	년, 월	발행기관
Histochemistry of 6 lectins in the tissues of the flat fish, <i>Paralichthys olivaceus</i>	Jung, K.S. Ahn, M.J. Go, G.M. Shin, T.K.	J. Vet Sci.	3(4)	2002.12	
양식넙치에서 손바닥선인장 발효물의 항균효과	허 승 답 박 달 수 고 경 민 김 문 관 손 원 근 이 두 식 신 태 군	한국수의 공중보건학회지	217(3)	2003.9	

2. 학술회의 발표실적

제 목	발표자	학술회의명	호	발표년월일	발행기관
넙치(<i>Paralichthys olivaceus</i>) 의 장조직에서 Lectin의 조직화학적 관찰	정경숙 고경민 안미정 신태군	한국가축해부학회		2002. 2. 1	한국가축 해부학회
Antibacterial effect of <i>Opuntia ficus-indica</i> fermentation in cultured Olive Flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i>	Park, D.S. Heo, S.D. Go, G.M. Kim, M.K. Son, W.G. Lee, D.S. Lee, K.H. Shin, T.K	대한수의학회 학술발표회		2003. 10. 17	대한수의학회
Fermentation characteristics of Cactus(<i>Opuntia ficus-idica</i>) fruit Juice by Newly Isolated Lactobacilli Strains from Fermented Cactus Fruit.	오 덕 철	International Meeting of the Microbiological Society of Korea		2004. 5. 13	한국미생물학회

3. 산업재산권(특허)

기술명칭	출원번호	출원일자	발명자	출원국	비고
선인장의 유산균 발효물의 제조를 위한 신규한 유산균 균주, 및 이를 이용한 선인장 발효물의 제조 방법 (Novel Lactic Bacterium, And A Method for preparing the fermented Cactus)	10-2003-0050090	2004. 12. 02	고경민 오덕철 신태균 이동헌	한국	국내특허

4. 언론홍보

연번	홍보유형	매체명	제목	홍보내용	일시
1	지방일간지	한라일보	선인장 이용 넙치사료 개발	연구개발내용 및 기대효과	2001. 8. 24
2	지방일간지	제주일보	넙치사료 첨가제 기술개발	연구개발내용 및 기대효과	2001. 8. 24
3	중앙TV방송	서울SBS	뉴스-손바닥선인장 물고기 사료로 이용	연구개발내용 및 기대효과	2001. 10. 16
4	지방TV방송	제주MBC	뉴스-손바닥선인장 넙치 사료로 이용	연구개발내용 및 기대효과	2003. 9. 12
5	지방TV방송	제주SBS	뉴스-손바닥선인장 넙치 브랜드개발	연구개발내용 및 기대효과	2005. 1. 07
6	지방일간지	한라일보	선인장넙치 개발	연구개발내용 및 기대효과	2005. 1. 8
7	지방일간지	제민일보	손바닥선인장 넙치사료 기술개발 산업화 돌입	연구개발내용 및 기대효과	2005. 1. 8
8	지방일간지	제주일보	선인장넙치 생산성공	연구개발내용 및 기대효과	2005. 1. 8
9	지방TV방송	제주MBC	TV 매거진 제주시대 - 제주수산업희망찾기 (선인장넙치)	연구개발내용 및 기대효과	2005. 1. 21

제 2 절 연구성과의 활용계획

1. 활용분야

- 가. 양식산업의 미생물 응용 활성화
 - 기타 발효 사료 첨가제 개발 및 산업활동분야 활용
- 나. 순바닥선인장 발효공정 응용
 - 식품산업등에 발효미생물 적용 분야
- 다. 순바닥선인장 효능분야
 - 건강식품 천연소재 개발 재료로 활용
- 라. 넙치 이외의 타품종 양식산업에 활용

2. 활용방안

- 가. 사료 첨가제 활용방안 강구
 - 사료업체와 연계, 산업화 추진
- 나. 선인장 발효물을 이용한 배합사료 기술개발 활용
 - 친환경 넙치 고품사료(EP사료) 개발
- 다. 발효공정 활용방안 강구
 - 타 식품산업에 활용
- 라. 저비용 고효율 양식사료 첨가제 개발
 - 넙치이외의 타품종 양식산업에 활용
- 마. 지역상품 브랜드화 추진
 - “ 선인장넙치 ”