

기 0023 02.11

해양수산중소·벤처기업 기술개발지원사업 최종보고서

새우의 다기능성 사료첨가제 시제품 개발

2007 년 11 월 30 일

주 관 기 업 (주) 세 농

해 양 수 산 부
한국해양수산기술진흥원

제 출 문

해양수산부장관 귀하

본 보고서를 “새우의 다기능성 사료첨가제 시제품 개발에 관한 해양수산 중소·벤처기업 기술개발지원사업”(개발기간 : 2006. 12. 01.~2007. 11. 30.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007. 11. 30.

주 관 기 업 : (주) 세 농 (대표자) 이 연 옥 (인)

총괄책임자 : 한 창 희

연 구 원 :

“ : 한 상민

“ : 강 동식

“ : 여 승철

“ : 이 승민

“ : 배 선혜

“ : 백 경란

요 약 서 (초 록)				
과 제 명	새우의 다기능성 사료첨가제 시제품 개발			
키 워 드	새우, 사료첨가제, 면역증강, 성장촉진, 섭이촉진			
개발목표 및 내용				
항 목	계 획		실 적	달성도 (%)
개발목표	새우의 면역증강, 사료섭이 촉진, 성장촉진 및 공식 억제제의 기능성을 통합한 다 기능성 새우사료 첨가제 제품 개발		개발된 제품(SP)의 효능 1. 면역증강 효과 70% 이상 2. 섭이효과 : FCR 1.4 이하 3. 성장효과 : 20%이상 촉진	100
세부개발 내용 및 목표치	1. 면역 활성화	면역관련 유전자발현	proPO유전자 발현에 효과적임	100
	2. 생존 효과	70%이상	실내 실험 : 90% 이상 현장 실험 : ~ 80%	100
	3. 성장 효과	평균체중 20g/100일	대하 : 평균체중 20g/98일 흰다리새우 : 평균체중 20g/92일	100
	4. 섭이촉진 효과	FCR1.5이하	대하 : FCR 1.04 흰다리새우 : FCR 1.05~1.43	100
	5.			
	6.			
	7.			
	8.			
기타성과	지식재산권(특허, 실용신안 등) : 0 건수 논문발표 : 0 건수 기 타 : 개발제품 매출 0 원			
기대효과	1. 면역증강 효과로 바이러스나 세균성 질병에 대한 면역력 증대를 가져다준다. 2. 성장촉진으로 양식기간의 20% 단축으로 양식비용을 절감할 수 있다. 3. 사료효율의 높혀줌으로서 사료량을 줄일 수 있다.			
적용분야	1. 어류의 면역증강 및 성장촉진 사료첨가제로 이용 가능 2. 패류의 인공사료 첨가제 개발 3. 성장촉진 신기능성 사료의 신제품 개발			
변경사항				

목 차

제 출 문	1
요 약 서(초록)	2
제 1 장 서 론	5
제 1 절 개발대상 제품의 필요	5
1. 경제, 사회적 배경	5
2. 기술적 배경	6
제 2 절 국내외 관련기술의 현황(시장규모 포함)	7
1. 국내 시장 규모	7
2. 국외 시장 규모	8
제 3 절 기술 개발시 예상되는 과급효과 및 활용방안	9
1. 기술적인 측면	9
2. 경제·산업적인 측면	9
제 2 장 본 론 (기술개발 내용 및 방법)	11
제 1 절 기술개발 목표 및 세부내용	11
1. 최종 목표	11
2. 세부내용	11
제 2 절 세부개발내용 및 실적	13
1. 기능성 물질의 개발	13
1) 천연식물 탐색	13
2) 먹이 유인 물질 개발	13
3) 면역활성 촉진물질	15
4) 성장 촉진 물질 개발	17
5) 소화 촉진 물질	18
6) 첨가 물질의 추출 및 기능성 분획 조사	20
2. 시제품개발	23

1) 시제품 제조	23
2) 섭이효과 조사	25
3) WSSV에 대한 challenge test	26
4) 면역관련 유전자 발현에 미치는 영향	27
3. 현장 실험	29
1) 국내 적용 실험	29
2) 국외 적용 실험	33
4. 경제성 분석	28
제 3 절 제조장치의 도면 및 상품 사진	41
1. 공장의 설계도면	41
2. 전체 생산 설비의 모식도	41
3. 추출기와 혼합기	42
4. 농축기	43
5. 제 품	44
제 3 장 결 론	46
제 1 절 계획대비 실적 및 성과	46
제 2 절 향후 개선 사항	47
제 3 절 적용분야 및 기대효과	47
제 4 장 문 헌	48

제 1 장 서 론

제 1 절 개발대상 제품의 필요

1. 경제, 사회적 배경

새우는 종교, 인종 그리고 국가에 관계없이 전 세계인들이 좋아하는 식품으로서 톤당 6,000~12,000불에 이르는 세계적으로 높은 고부가 수산물중의 하나다. 세계의 새우양식 총생산량은 1994년에 약 88만톤에서 매년 증가하여 2002년도에는 148만톤에 이르렀고 생산 금액으로는 약 100억불(9조원)에 이르렀다 (Briggs et al., 2004). 국내의 새우양식은 외국에 비해서는 빈약하지만 1996년도부터 폐염전이 새우 양식장으로 개발되면서 증가하여 2004년도에는 2,426톤에 달해서 · 남해안 지역에서는 매우 중요한 양식 산업의 하나다 (해양수산부, 2005).

최근 흰반점증후군바이러스(WSSV), 타우라바이러스(TSV), 간췌장바이러스(HPV)에 의한 질병의 만연으로 새우 생산량이 감소하여 이로 인한 피해액만도 아시아에서만 매년 3조원에 이르고 있다 (Subasinghe 1997). 우리나라에서도 바이러스에 의한 피해가 1993년 충남과 전북의 일부 새우 양식장에서 나타난 이후, 매년 증가하여 1996년도에는 대하의 생산량이 지역에 따라 50~75%나 감소하는 피해를 가져왔다. 1997년부터 대하 양식장이 꾸준히 개발되어 왔음에도 불구하고 2000년도 이후부터는 그 생산량은 거의 변화가 없었으며 단위면적당 생산량이 ha당 2000년에 1.3M/T, 2002년에는 1.1M/T, 2004년에는 1.0M/T에 지나지 않았다. 이러한 원인의 주된 요인은 WSSV에 의한 대하의 대량 폐사로 알려져 왔으며, 매년 대하종묘 입식량의 60%가 WSSV에 의해 폐사되었다는 보고가 있다 (해양수산청, 2001). 따라서 우리나라에서도 바이러스와 세균성 질병에 의한 피해액이 매년 200억원이 넘는 것으로 추정된다.

이러한 피해를 막기 위해 새우 양식업자들은 양식시설 개선, 수질환경 개선 그리고 질병치료 및 면역증강 촉진 사료첨가제의 개발에 많은 연구와 비용을 쓰고 있다. 전 세계적으로 2조원이상의 비용을 쓰고 있지만 아직까지 질병에 대한 피해를 획기적으로 줄일 수 있는 방안은 마련되어 있지 않은 상태이다. 특히 바이러스에 대한 질병치료 방법은 전무하기 때문에 바이러스에 의한 피해를 최대한 줄이기 위해 대부분 면역증강제를 개발하여 사용하고 있으나 그 효과가 아직 미미한 상태이다. 바이러스와 세균에 대한 피해 저감효과가 기존 시제품보다 우수하다면 사료첨가제의 시장은 황금시

장이라 할 수 있다.

2. 기술적 배경

국내의 새우양식 생산량 감소에 가장 크게 영향을 미치는 질병의 원인은 WSSV로 알려져 있으며, WSSV에 감염된 새우류는 그 감염 강도에 따라 3~10일 내에 80~100%가 폐사되며, 20일 이내에 전량 폐사되는 새우류의 치명적인 질병원이다 (Lightner, 1996).

바이러스로부터 피해를 막기 1994년 이후부터 흰반점증후군에 대한 연구를 시작하여 원인균인 WSSV의 유전자 서열이 밝혀지면서 PCR에 의한 검출방법, 조직학적 병변현상, 전염과정 등 많은 연구들이 이루어지고 있다(Lo et al., 1997; Nunam and Lightner, 1997; Supamattaya, et al., 1998; Hossain et al., 2001). 또한 최근에는 갑각류의 면역기구 규명(review in Smith et al., 2003)과 이들에 관여하는 유전자들을 밝혀 이들 유전자 발현을 유도하는 물질들을 규명하는 연구들도 많이 이루어지고 있다 (Sritunyalucksana et al., 1999, Lai et al., 2005, Hsu et al., 2006, Lu et al., 2006, Ko et al., 2007).

한편에서는 세균이나 바이러스에 대한 면역증강효과를 낼 수 있는 사료 첨가제 개발을 위한 연구들이 많이 이루어져, yeast cell wall에서 추출한 glucan, *Bifidobacterium thermophilum*에서 추출한 peptidoglycan(PG), 밀에서 추출 분리한 lipopolysaccharide (LPS), 그외에 fucoidan, 갈조류 추출물 등이 바이러스나 세균 감염에 의한 폐사율을 낮춘다는 연구보고들이 있으며 (Chang et al., 1998, 1999, 2000, 2003; Hennig et al., 1998, 2005; Itami et al., 1998; Liao et al., 1996; Song et al., 1997; Su et al., 1995; Sung et al., 1994; Takahashi et al., 2000), vitamin C가 먹이 섭취효과 뿐만 아니라 면역활성을 촉진한다는 보고가 있어 vitamin C에 대한 관심이 많이 가지고 있다(Lee and Shiao, 2002). 그러나 이들 물질의 효과는 실험실 수준에서 이루어진 결과들이며, 이들 물질을 사용하여 새우양식 현장에 적용하였을 때 바이러스성 질병에 의한 대량 감모를 줄였다는 연구보고는 아직 없다. 최근에 유전공학적인 방법에 의한 WSSV의 진단법, 감염경로, 정량 등에 대한 연구들이 대단히 많이 있다 (Bruce et al., 1993; Linda and Donald, 1996; Lo et al., 1996; Nunan and Lightner 1997; Chang et al., 1998; Nunan et al., 2004; Tang and Lightner, 2000; Tang et al., 2004). 그리고 저항성 유전자 검색 및 바이러스에 대한 면역백신개발도 이루어지고 있으나(Teunissen et

al., 1998; Yukinori et al., 2000; Namikoshi et al., 2004; Preston et al., 2004; Witteveldt et al., 2004; Pan et al., 2005; Pantoja et al., 2005), 이 질병에 대한 예방이나 구제 방법에 대해서는 아직 개발되어있지 않아 전 세계적으로 WSSV에 의한 질병에 속수무책이다.

바이러스와 기타 질병예방에 의한 생존율 증가는 새우양식의 성패를 가름하는 중요한 요소이다. 이를 해결하기 위해 한 등(2005)은 WSSV에 대한 저항성을 높여 생존율을 증가시키는 면역증강물질을 개발한바가 있으며, 실용화 단계에 와있다.

조방적인 양식에서 집약적인 양식으로 전환되면서 많은 양의 사료 투입으로 인한 양식장의 부영양화를 막기 위한 수질과 저질의 환경관리와 사료전환효율(FCR, feed conversion ratio) 제고 또한 새우양식의 성패를 좌우하는 또 하나의 중요한 요소가 되고 있다. 사료전환효율을 높이기 위해 단백질함량의 증가 등을 도모하고 있으나 단백질 함량의 증가에 따른 효율이 유의적이지 않고 사료가격에서 경쟁력이 떨어져 이는 바람직하지 않다고 알려져 있다. 사료전환효율을 높이기 위해서는 질병예방에 의한 생존율 증가 외에 섭이율과 소화율 증강, 성장 촉진 및 공식을 (canibalistic rate) 저하를 도모해야 한다. 이를 위해 새우양식 어민들은 사료에 수십 가지의 검정되지 않은 약제들을 첨가하여 새우에 급여하고 있는 실정이다.

지금까지 면역증강을 위한 물질들은 많이 개발된 반면, 섭이율을 높이기 위한 먹이 유인 물질, 소화 촉진 물질, 성장촉진 물질 등에 대해서는 개발된 바가 없다. 본 사업에서는 면역증강 물질 외에 천연물로부터 먹이 유인 물질, 소화 촉진 물질, 성장 촉진 물질, 공식을 저하 유도물질을 탐색, 분리하여 이미 많은 연구들에서 밝히고 개발된 면역증강물질들에 본 연구에서 개발된 섭이 촉진, 성장 촉진 등의 신 기능성 물질을 배합한 저가의 다기능성 사료첨가제를 개발하여 이를 상품화 하였다.

제 2 절 국내외 관련기술의 현황(시장규모 포함)

1. 국내 시장 규모

해양수산부의 통계자료(2005)에 의하면 2004년도 국내의 새우 양식 생산량은 2,426 Ton으로 그 생산 금액은 약 396억원에 이른다. 이때 국내에서 소비된 새우 사료의 총량은 약 9,230 Ton이며 그 비용은 약 115억원에 달한다. 일반적으로 양

식어민들은 질병에 의한 피해를 줄이고 사료의 효율을 높이기 위해 영양제, 면역증강제 등의 첨가제를 부가적으로 사료에 첨가하고 있다. 이때 들어가는 비용이 국내에서는 사료비의 10~20%이상을 차지한다고 알려져 있어서 국내에서 새우양식 사료에 첨가하는 사료첨가제의 시장은 23억원이상으로 추정할 수 있다.

최근 국내 새우양식장의 바이러스성 질병이나 기타 요인에 의한 새우양식생산량의 둔화에 의한 소득 감소로 적지 않은 새우양식장들이 전어 등 어류양식장으로 전용되고 있다. 새우양식장 환경의 개선 방법 개발이나 새로운 사료첨가제의 개발에 의해 새우양식생산량이 증가되고 수익성이 양호해진다면 현재 어류 양식하고 있는 양식장이나 쉬고 있는 양식장이 새우양식장으로 활용될 경우 그 시장은 더욱 커질 수 있다.

2. 국외 시장 규모

전 세계의 양식새우 생산량은 년도에 따라 다르지만 일반적으로 약 110~150만톤 생산하고 있으며 양식생산금액은 10조원에 이르고 있다. 이때 사료비용은 약 3조 원 이상으로 추정하고 있다. 최근 새우양식이 고부가가치산업으로 인식되면서 기후조건이 좋은 중동지역과 아프리카지역 등의 경제개발도상국가나 후진국가에서 많은 투자를 하고 있어서 새우양식은 매년 5.3~6.8%의 성장률을 보이고 있다.

한편 중국, 인도, 태국 등 동남아시아에서는 질병에 의한 양식생산량 감소 피해를 줄이고 사료의 효율을 높이기 위해 항생제, Vitamin C, 미생물 등을 사료에 첨가하고 있고 태국 등 동남아시아에서는 총 사료비용의 10%정도를 사료첨가제 비용으로 쓰고 있어서 세계의 사료 첨가제 시장은 약 3,000억원에 이른다.

그러나 국가에 따라 다르긴 하지만 항생제 사용이 제한되어있어서 현재까지 이에 대체할만한 물질이 개발되어 있지 않은 실정이다. 주로 이에 대한 대체 물질로서 면역활성을 증가시킨다고 알려진 LPS, PG 그리고 β -glucan 등을 사용하고 있으나 바이러스에 의한 폐사율을 획기적으로 줄일 수 있는 제품이 되지 않고 단지 보조적으로 사용되고 있는 상태이다. 더구나 LPS, β -glucan 등도 사료에 1% 이상을 첨가해야 다소 유효한 면역증강 효과를 얻을 수 있으므로 현장에서는 가격의 고가 및 저효율로 잘 사용되지 않고 있다. 기존에 개발된 LPS, β -glucan보다 면역증강 효과가 우수하고 저가 제품이 개발된다면 세계의 사료첨가제 시장을 선점할 수 있을 것으로 본다.

더구나 면역증강 외에 성장 촉진과 사료 효율을 높임으로써 사육기간의 단축과 사료 양의 절감을 가져올 수 있다면 사료첨가제 시장의 석권뿐만 아니라 이를 사료에 이용하여 기능성 사료 개발도 가능하며 이를 개기로 해외의 새우시장에도 진출할 수 있으며 그 시장은 훨씬 크다고 볼 수 있다.

제 3 절 기술 개발시 예상되는 파급효과 및 활용방안

1. 기술적인 측면

- 새우에 대한 성장촉진 물질, 먹이유인 물질, 면역증강 물질 등을 천연식물로부터 기능성 물질들을 탐색하고 개발함으로써 이들 물질들을 배합한 다양한 기능성 사료첨가제를 구현할 수 있다.
- 개발된 기능성 물질들을 사료 제조에 첨가하여 새로운 개념의 기능성 새우 사료 개발이 가능하다.
- 새우에 대한 기능성 물질의 화학적 구조와 특성을 구명하고자 하는 연구가 활발하게 전개될 것으로 본다.
- 본 연구에서 구명된 기능성물질들은 넙치나 뱀장어 등 어류의 성장과 면역증강 등의 기능성 촉진에 적용하여 어류에 대한 기능성 사료 첨가제 연구 개발에 활용가능하다.
- 항생제 또는 화학약제를 대체할 수 있는 물질로 활용이 가능하다.

2. 경제·산업적인 측면

- 본 연구에서 개발된 사료 첨가제를 사용한 경우 양식기간을 25% 단축시킬 수 있어 이를 양식에 적용할 경우 사료비 절감 및 양식기간 단축으로 인한 양식 비용 절감 등으로 어민 소득증대효과 얻을 수 있다.
- 바이러스 질병 피해에 대한 새우양식의 불안감을 해소해 줌으로써 새우양식어가의 증가 및 양식장 면적의 확대로 국내 새우양식생산량증가로 전국적으로 300억 원 이상 소득증대효과를 얻을 수 있다.
- 지금까지 국내외적으로 본 연구 개발된 물질 보다 기능성이 다양하고 효과적인 사료첨가제가 없기 때문에 단기간에 시장점유 가능성이 매우 높다. 따라서 국내 시장에 적극적으로 홍보하면 5년 이내 30% 이상 점유할 경우 2011년에는 10억원/

년 매출이 가능하다.

- 해외 시장 개척을 위해 액상뿐만 아니라 시럽형, 분말형 등 다양한 제형의 제품 개발이 필요하며 이를 활용하여 해외 시장에 그 효과의 우수성이 인정되어 5년 이내에 2%시장을 점유한다면 2011년에는 연간 60억원 이상 매출이 가능하다고 본다.
- 새우양식 사료의 개발에 새로운 기능성 물질의 도입으로 3조원의 막대한 해외 사료시장에 진출 또는 도약할 수 있다.
- 본 제품의 주요 성분에는 플라보노이드 계통의 당 화합물들이 다량 함유되어 있고 이들 물질들은 척추동물의 면역활성에 관여한다고 알려져 있어서 새우 이외의 수산동물, 즉 양식어류, 전복, 해삼 등의 면역증강 사료첨가제로 활용이 가능하며 이를 입증되었을 때는 그 활용범위가 더욱 넓어진다.

제 2 장 본 론 (기술개발 내용 및 방법)

제 1 절 기술개발 목표 및 세부내용

1. 최종 목표

새우류의 양식 생산성 향상을 제고하기 위한 면역증강, 사료섭이와 소화촉진, 성장촉진 및 공식 억제 기능성을 통합한 다 기능성 새우사료 첨가제 개발과 상품개발

2. 세부내용

1) 기능성물질의 개발

한약재 등의 천연 식물자원으로부터 새우의 사료 효율성과 면역활성을 높일 수 있는 사료 첨가제를 개발하기 위해 새우의 기호성 물질, 소화효소분비촉진 물질, 면역활성 증강물질들을 탐색, 추출하여 그 기능성을 확인하였다.

2) 시제품개발

위의 기능성 물질들이 함유되어있는 천연재료로부터 기능성물질을 추출 분리한 후 이들을 배합하여 사료 효율을 높이고 면역활성을 증진 시킬 수 있는 사료첨가제의 시제품을 만들었다.

시제품의 종류는 사용의 편리성, 운반성 등을 고려하여 다양한 형태의 제품을 구상하고 그 제조방법을 고안하였다.

3) 현장실험

위의 시제품을 국내와 해외 새우양식장에서 현장실험을 통하여 본 제품의 효과와 가능성과 효율성을 조사하기 위하여 국내양식장 5개소, 해외 양식장은 인도네시아 Kalimantan Barat의 Pontianak Utara에 위치한 3개의 양식장 6개소에서 본 연구에서 개발한 액상 제품을 사료에 첨가하여 성장률, 생존율 및 생산량을 조사하여 사업성을 검토하였다.

4) 경제성 분석

시제품을 사용하였을 때 대하를 양식한 새우양식 어가를 대상으로 본 연구에서 개발된 사료첨가제의 사용에 따른 경제적 이익을 산출하여 비교하였다.

제 2 절 세부개발내용 및 실적

1. 기능성 물질의 개발

1) 천연식물 탐색

새우의 먹이 유인 및 성장 효과가 있는 물질이 함유된 천연식물을 탐색하기 위하여 팥(red bean of *Phaseolus angularis*, Pha), 울무(grains of adlay, *Coix lachrymajobi var. mayuen*, Coi), 보리(barley, *Hordeum vulgare var. hexastichon*, Hor), 옥수수(maize of *Zea mays*, Zea), 조(seed of millet, *Setaria italica*, Set), 밀(wheat, *Triticum aestivum (vulgare)*, Tri)등의 곡류와 동양에서 전통적으로 소화기능을 돕고 식욕을 높여준다고 알려진 감초(*Glycyrrhiza uralensis*, Gly)를 비롯해서 소담지해(消痰止咳)에 효과가 있다는杏仁(seed of *Prunus armeniaca*)과 보혈 강장제(强壯劑)로 널리 사용되어 왔던 川芎(*Cnidium officinale*, Cni), 當歸(*Angelica gigas*, Ang), 인삼(*Panax ginseng*, Pan), 독성이 적고 간 기능 보호와 강장효과가 있다고 알려져 기능성 식품으로 사람들이 이용되어지고 있는 구기자(*Lycium chinense*, Lyc)와 오미자(*Schisandraceae chinensis*, Sch), 그리고 강음(强陰), 신정(腎精)과 신기(腎氣)보강, 수렴 등의 효능이 있다고 알려진 산수유(*Cornus officinalis*, Cor) 등의 한약재, 그리고 우리나라 연안에 흔히 구할 수 있고 식용으로 사용되는 미역(*Undaria pinnatifida*, Und), 다시마(*Laminaria japonica*, Lam), 모자반(*Sargassum fulvellum*, Sar), 청각(*Codium fragile*, Cod), 서실(*Chondria crassicaulis*, Cho), 김(*Porphyra tenera*, Por), 그리고 정화기능 및 다당류가 다량 함유된 구멍갈파래(*Ulva lactuca*, Ulv), 우뚝가사리(*Gelidium amansii*, Gel), 도박(*Pachymeniopsis elliptica*, Pac) 등을 대상으로 선정하였다.

상기 식물들을 메탄올을 이용하여 추출, 농축한 阻추출물은 실험을 실시할 때까지 4℃의 냉장상태에서 보관하였다.

2) 먹이 유인 물질 개발

새우에 대한 먹이 유인 효과를 조사하기 위해 갑각류 연구센터에서 종묘 생산하여 사육중인 평균 체중 $3.0 \pm 0.2g$ 의 흰다리새우(*Penaeus vannamei*) 300마리를 사용하여 0.1Ton 사각수조 20개에 나누어 수용하였다. 수온은 $25. \pm 0.5^{\circ}C$ 로 유지하고 10일간 체중의 10%에 해당하는 사료를 급여하명서 한 마리당 일일 섭이량을 조사한 결과를 그림 1에 나타내었다.

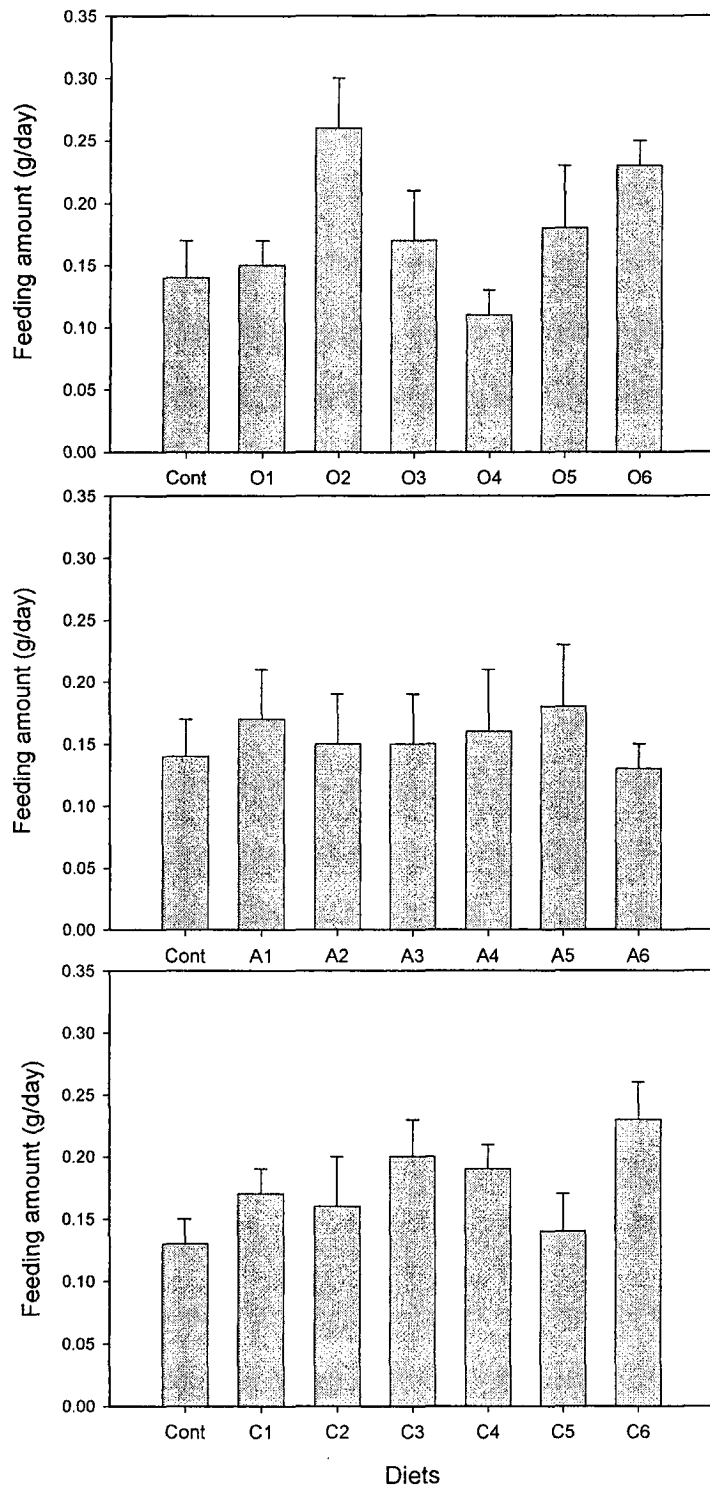


그림 1. 흰다리새우에 한약재 O1, O2, O3, O4, O5, O6 추출물, 곡류 C1, C2, C3, C4, C5, C6 추출물, 해조류 A1, A2, A3, A4, A5, A6 추출물들을 각각 첨가한 사료를 급여하였을 때 사료 섭취량.

개체별 일일 섭취량은 다음과 같은 공식에 의해 산정하였다: $FC = F_1 \times (F_0 - F_r)$ (Nunes and Parsons, 2000). FC는 하루동안 섭취된 먹이의 건중량(g)을 나타내며, F_0 는 실험구의 급여된 하루의 먹이량, F_r 는 수집된 먹이 잔류량(g)을 나타내었다. $F_1 = CF_r / CF_0$ 로 계산하였으며, CF_0 은 새우를 수용하지 않은 수조에 넣은 먹이의 양을 나타내며, CF_r 는 일정시간 경과 후 수조에서 회수하였을 때 먹이의 양을 나타낸다.

그림 1에서 보는바와 같이 각 재료에 대한 기호성은 유의한 차이는 보이지 않았지만 일반적으로 한약재 추출물에 대해 흰다리새우에서는 사료 일일 섭취량이 O2와 O6에서 각각 $0.26 \pm 0.04 \text{g/day}$ 와 $0.23 \pm 0.02 \text{g/day}$ 로 다른 한약제보다 섭취량이 높게 나타나 새우들이 이들 추출물을 좋아하는 것으로 나타났다. 곡류를 추출한 물질들이 대체적으로 새우들이 싫어하지 않은 것으로 나타났으며, 특히 C3과 C6를 첨가한 사료가 각각 $0.20 \pm 0.03 \text{g/day}$ 와 $0.23 \pm 0.03 \text{g/day}$ 로 나타나 선정된 곡류 중 가장 새우들이 좋아하는 것으로 나타났다. 한편, 해조류들은 대체적으로 해조류 추출물을 첨가하지 않은 대조구의 사료를 급여한 실험구와 유의한 차이를 보이지 않아 해조류의 추출물은 새우들이 좋아하지도 싫어하지도 않은 것으로 나타났다. 해조류 중에서도 A1와 A5를 첨가한 사료의 섭취율이 각각 $0.17 \pm 0.04 \text{g/day}$ 와 $0.18 \pm 0.05 \text{g/day}$ 로 다른 해조류 보다 흰다리새우가 다소 좋아하는 것으로 나타났으나 유의한 차이는 보이지 않았다. 이러한 결과들은 대하에서와 유사한 결과를 보여주고 있다 (한 등 2005). 따라서 기호성에는 대하나 흰다리새우 등의 양식 새우의 종류에 대한 차이는 보이지 않은 것으로 보여 모든 양식새우에도 적용이 될 것으로 보인다.

3) 면역활성 촉진물질

기호성을 조사한 흰다리새우를 대상으로 nitro blue tetrazolium(NBT)을 이용한 superoxide production 평가법(Song & Hsieh, 1994)에 의하여 면역활성을 조사하였으며 이를 위하여 흰다리새우의 위심강으로부터 1ml syringe (26 gauge needle)를 이용하여 혈액을 뽑은 후 Itami et al.(1994)의 방법을 변형한 Chang et al.(2000)의 방법으로 면역활성을 조사하기 위해 혈구세포를 분리하였으며 이를 이용하여 조사한 결과를 그림 2에 나타내었다.

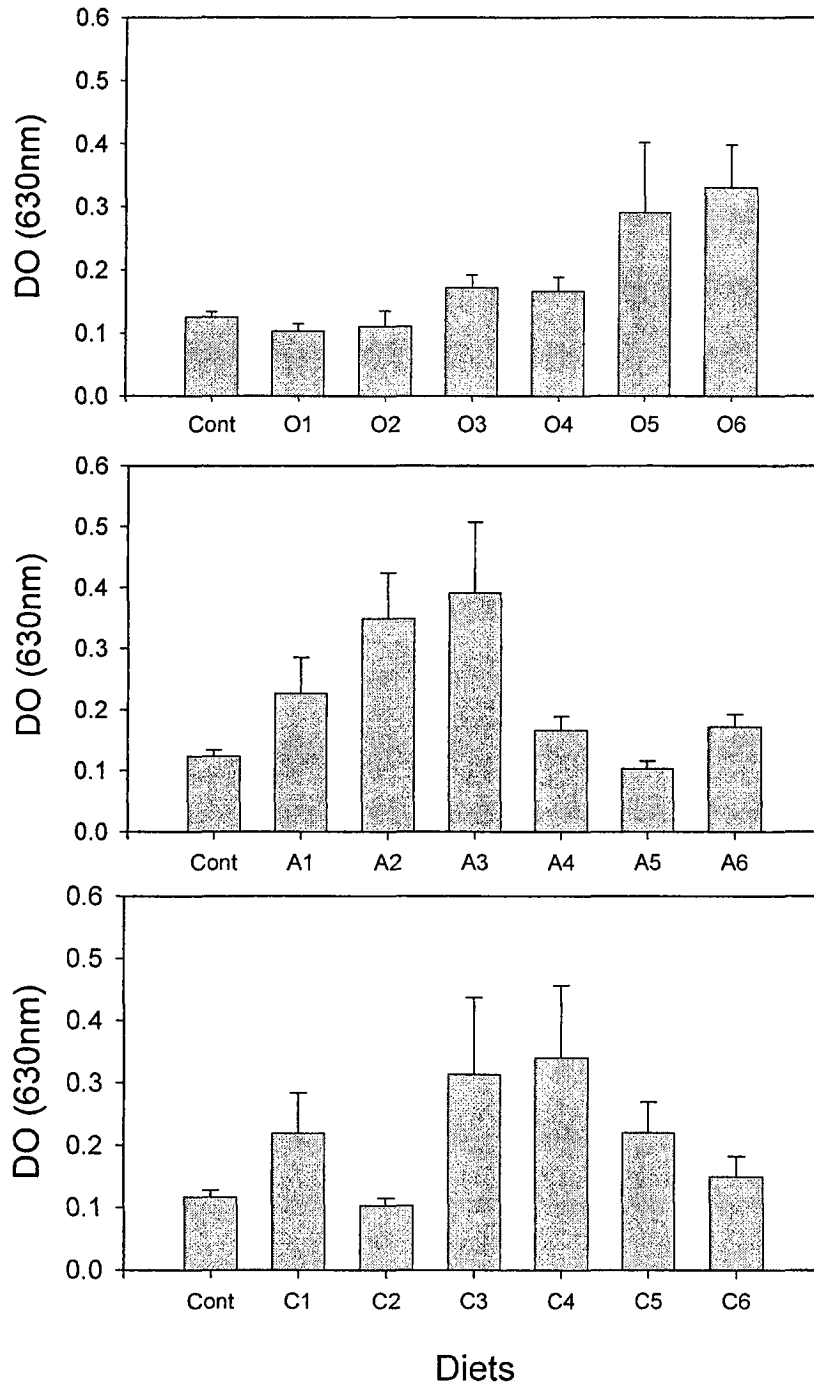


그림 2. 흰다리새우에 한약재 O1, O2, O3, O4, O5, O6 추출물, 곡류 C1, C2, C3, C4, C5, C6 추출물, 해조류 A1, A2, A3, A4, A5, A6 추출물들 각각 첨가한 사료를 급여하였을 때 혈구세포에서의 O_2 의 생성.

그림 2에서 보는 것처럼 한약재에서는 O6와 O5에서 O₂의 생성이 높게 나왔으며, 해조류에서는 A1, A2 그리고 A3에서, 그리고 곡류에서는 C1, C3, C4 그리고 C5에서 높은 O₂의 생성을 나타내었다. 일반적으로 곡류에서는 C2를 제외하면 모든 종류에서 높은 면역활성을 보였다. 이는 곡류의 대부분에 LPS가 다량 존재하기 때문이라고 추측할 수 있다. 해조류에서는 A2와 A3서 다른 재료들에 비해 비교적 높은 활성을 나타내었는데 이들 두 종은 다른 종보다 점액이 많이 나오는 종들이어서 해조류의 점액에 함유하고 있는 당 성분이 면역활성을 높이는 것으로 볼 수 있다.

반면 대부분의 한약재에서는 면역활성이 기대 이하로 낮게 나타났으며 그중 활성이 다소 높은 O6와 O5에서도 다른 종에 비하면 낮은 값을 나타내었다. 이러한 결과로부터 새우류의 면역활성을 높이는 재료로는 해조류의 A3를 선택하였다.

4) 성장 촉진 물질 개발

갑각류는 탈피라는 생리적인 기작을 거쳐 성장을 하기 때문에 성장 촉진에 대한 생리적인 지표를 탈피율로 정하여 상기의 시료들 중 가장 기호성이 좋은 O2, O6 한약재와 면역증강 효과가 있는 O5 한약재, 그리고 기호성과 면역증강 효과가 다소 좋은 C4와 기호성이 좋은 C6, 기호성이 떨어지지만 면역 증강효과가 뛰어난 A3의 추출물을 첨가한 사료를 흰다리새우에 급여하여 일일 탈피율을 조사한 결과를 그림 2에 나타내었다.

탈피율 촉진 효과에서는 O2가 가장 좋은 효과를 보였으며, 곡류에서는 C6가 높은 성장효과를 나타내었다. 면역활성이 가장 높게 나타내었던 해조류 A3에서는 대조구와 동일한 결과를 보여 성장효과는 없는 것으로 나타났다. 이러한 경향은 일반적으로 기호성의 순으로 나타났으며, 면역증강 효과와는 관계가 없는 것으로 보였다. 사료 유인효과가 좋은 물질을 첨가한 사료를 급여한 실험구가 탈피율에서도 높은 값을 보여주고 있었다. 이는 이들 물질내에 성장촉진 요인이 있다기보다 많은 사료의 섭취에 의한 성장효과라고 볼 수 있었다.

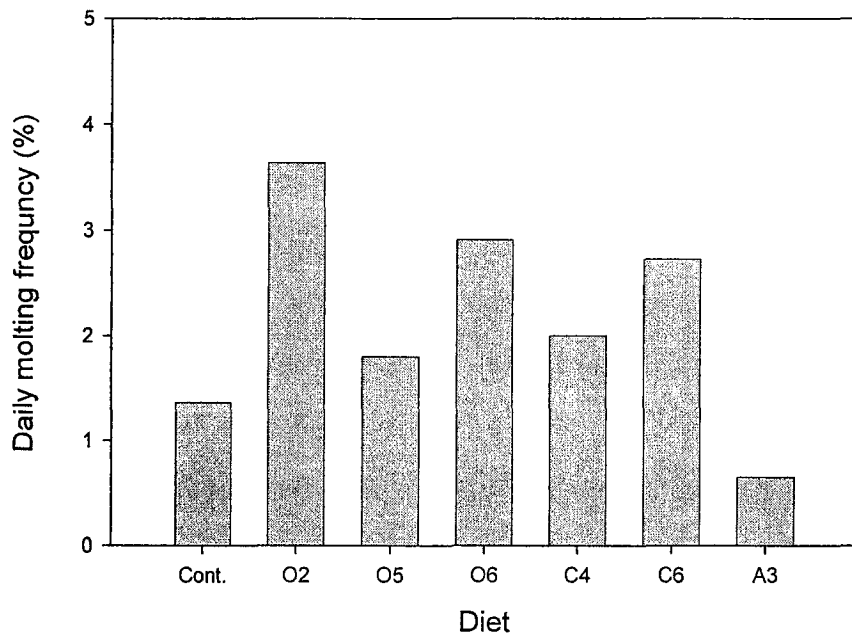


그림 3. 흰다리새우에 한약재 O2, O5, O6, 곡류 C4, C6 그리고 A3로부터 얻은 추출물들을 각각 첨가한 사료를 급여하였을 때 일일 탈피율의 변화

5) 소화 촉진 물질

상기의 먹이유인 물질 개발을 위한 실험에서 섭이효과가 우수한 한약재 O2, O6, 그리고 곡류 C3, C6의 추출물을 사료에 첨가하여 먹이공급 후 한 시간후에 실험구 내의 새우를 수거하여 간췌장(hepatopancreas), 전장(foregut), 중장(midgut)을 분리하여 -60°C 에서 동결건조한 후 Uebershaer(1999)와 Drossou (2004, 미발표)의 방법에 따라 trypsin의 활성도를 측정하여 그림 5에 나타내었다.

trypsin의 활성도를 측정하기 위해 각 새우들로부터 절취한 간췌장, 전장 그리고 중장들은 Tris-HCl 완충액 (0.1molar Tris(hydroxymethyl) aminomethan, 0.02 molar $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Merck사, HCl pH8) $500\mu\text{l}$ 를 첨가하여 마쇄를 하고, $0\sim 4^{\circ}\text{C}$, 4110g에서 60분간 원심분리를 하였다. 상등액을 $50\mu\text{l}$ 씩 취하여 microplate에 3배구로 하여 분주 하고 기질용액(0.2 mmol의 Na-benzoyl-L-arginin-4-methylcoumarinyl-7-amid (MCA), Bachem,사, 0.5% Dimethylsulfoxide, Merck)을 $250\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 Fluorescence microplate reader (Fluoroskan Ascent FL, Thermo사)로 30°C 에서 20

분간 가운을 하고 2분 간격으로 5번 측정을 하여 평균 trypsin의 활성도를 측정하였다. 효소의 활성도는 단위시간당 기질의 가수 분해된 양으로 표시하였다(hydrolysed MCA $\text{mg}^{-1}\text{min}^{-1}$).

그림 4에서 보는 바와 같이 일반사료를 급이하였을 때 전장과 중장 그리고 간췌장의 trypsin의 활성은 각각 220.7, 243.9 그리고 1961.2 $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 이었으나 섭취효과가 좋은 O2를 첨가한 사료를 투여한 실험구 새우의 전장, 중장 그리고 간췌장의 trypsin의 활성은 각각 489.2, 564.6, 그리고 2248.8 $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 로 대조구에 비해 전장과 중장에서는 2배이상 높았다. 그리고 C6에서도 O2보다는 다소 낮지만 전장과 중장에서 높은 활성을 보이고 있다. 그리고 먹이 섭취효과가 O2나 C6보다 다소 낮은 O6, C3에서는 전장과 중장에서 trypsin의 활성이 O2나 C6보다 낮게 나타났지만 대조구에 비해서는 높게 나타났다.

이러한 결과는 먹이 유인효과를 나타내는 물질들은 소화 효소의 생성 분비도 왕성하게 일어나게 하고 있음을 잘 보여주고 있다. 이는 먹은 사료의 양에 따라 소화효소의 분비되는 양도 달라지는 것인지 아니면 섭취효과가 높은 물질에 소화효소를 분비하게 하는 요인이 있는 것인지는 확실치 않으나 본 연구에서 찾은 O2나 C3는 새우의 사료효율을 높이는데 아주 유효한 물질이라는 것을 알 수 있었다.

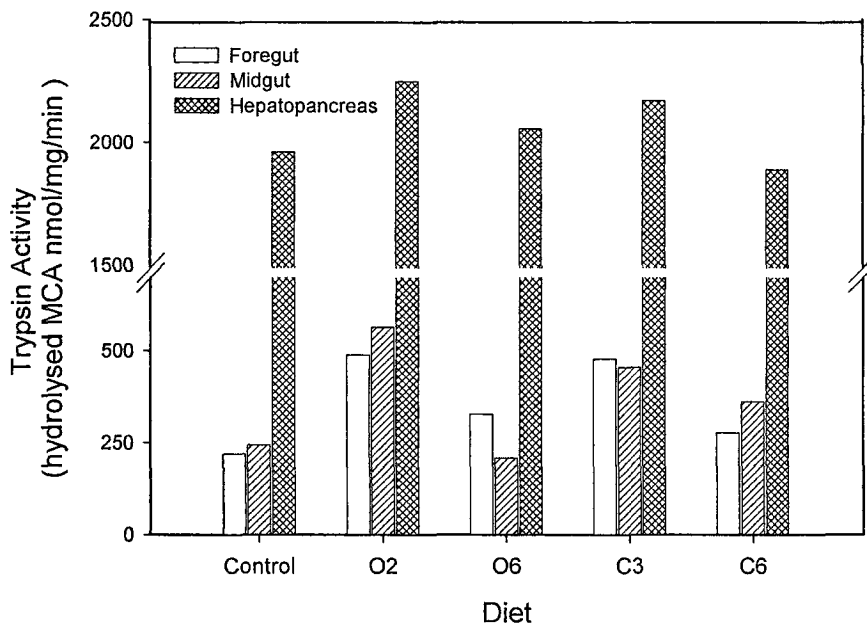


그림 4. 사료 첨가제에 따른 흰다리새우의 전장, 중장 그리고 간췌장의 trypsin 활성도의 변화.

6) 첨가 물질의 추출 및 기능성 분획 조사

상기 실험에서 대상 시료들 중 가장 기호성, 소화율 및 성장효과가 뛰어난 재료로는 O2와 C3로 밝혀졌으며 이중에서 면역활성에서도 뛰어난 효과를 나타낸 C3를 대상으로 먹이 섭취 유인 효과와 면역활성을 나타내는 물질의 특성을 규명하기 위하여 상기의 재료로부터 methanol로 추출하여 표준 검색시료를 만들었으며, 그림 5와 같이 water(H₂O), dichloromethane (CH₂Cl₂), ethyle acetate (EtOAc), butanol (BuOH)등을 이용하여 계통적으로 추출, 분획을 실시하였다.

시료 25kg을 methanol로 추출하였을 때 520.1g이 용출되어 나왔으며 이를 CH₂Cl₂, EtOAc, BuOH, H₂O로 분획하였을 때 각 분획의 중량은 각각 134.1g, 32.5g, 100.2g, 157.4g 으로 나타났다.

분획물들은 농축 및 건조 후 사료에 첨가하여 먹이섭취효과를 조사하여 기호성 물질을 분획을 조사하였으며, 면역활성 분획을 조사하기 위해 prophenoloxidase 유전자의 발현 유도 효과를 조사하였다.

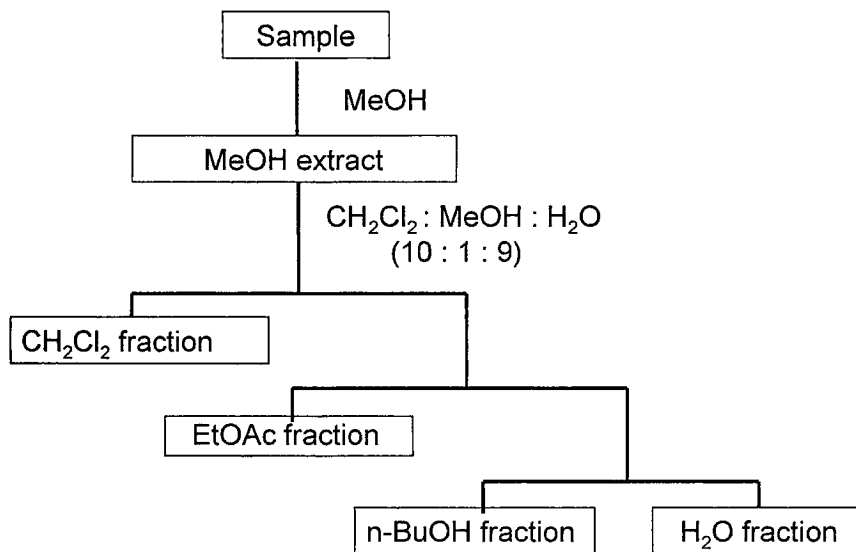


그림 5. 탐색된 재료에 대한 추출물의 분획 과정의 순서도.

① 먹이 유인 효과 및 성장 촉진 효과

상기 실험에서 사료 섭취율과 탈피율에서 양호한 효과를 보인 재료 C3를 그림 5과 같은 방법으로 분획한 물질들을 흰다리새우를 대상으로 사료에 대한 섭취율과 탈피율을 조사하여 그림 6에 나타내었다.

탈피율 변화에서는 EtOAc 분획 층과 물 분획 층이 일일 탈피율이 12%로 가장 높게 나타났으며 그 외의 분획에서는 C3의 추출액보다 낮은 값을 보였다. 사료 일일 섭취율은 물 분획 층에서 $1.50 \pm 0.10g$ 으로 가장 높게 나타났으며 그다음으로 EtOAc 분획 층이 $1.31 \pm 0.07g$ 으로 유의하게 높게 나타났다. BuOH층에서도 대조구에 비해서는 유의하게 높은 $1.19 \pm 0.10g$ 을 나타내었지만 물과 EtOAc 분획 층에 비하면 낮은 값을 보였다. 이러한 결과는 물층과 EtOAc 분획 층에서 탈피촉진 효과가 나타난 것은 이들 분획 층에 탈피촉진 물질이 함유되어 있다기보다는 사료 섭취를 촉진하는 유인 물질이 함유되어있어서 섭취율의 증가에 의한 탈피율의 증가로 보여 진다.

② 면역활성 효과

최근에 갑각류를 포함한 절족동물의 면역기구들이 밝혀지면서 phenoloxidase (PO)가 세포성면역담당에 매우 중요한 역할을 한다고 알려지면서 많은 사람들이 PO 전구물질인 prophenoloxidase(proPO)의 유전자 발현에 관심을 가지고 있다 (Smith et al., 2003, Jiravanichpaisal et al., 2006).

본 실험에서는 한 (2008 in press)등이 대하의 proPO cDNA서열을 밝혔으며 이 서열을 이용하여 primer를 구축하고 대하의 혈구세포를 대상으로 RT-PCR법을 이용하여 proPO mRNA 발현상태를 조사하였다.

혈구를 포함하고 있는 혈액은 23gauge needle이 장착된 3ml syringe를 이용하여 각 새우 개체의 위심강으로 부터 채혈하였으며, 채혈 전에는 미리 syringe내에 anticoagulant buffer(glucose 113.0 mM, sodium citrate 27.2 mM, citric acid 2.8 mM, NaCl 71.9 mM)를 넣어서 혈액의 응고를 방지하였고, 채혈 후 즉시 700g, 4°C, 5min.의 조건으로 원심분리하여 혈구를 분리하였다. anticoagulant buffer로 한번 더 세척한 후, total RNA 추출 전 까지 RNA stabilization reagent(Qiagen 社)에 넣어 -80°C에서 보관하였다. Total RNA는 RNeasy midi kit(Qiagen 社)를 이용하여 혈구로부터 추출 하였다.

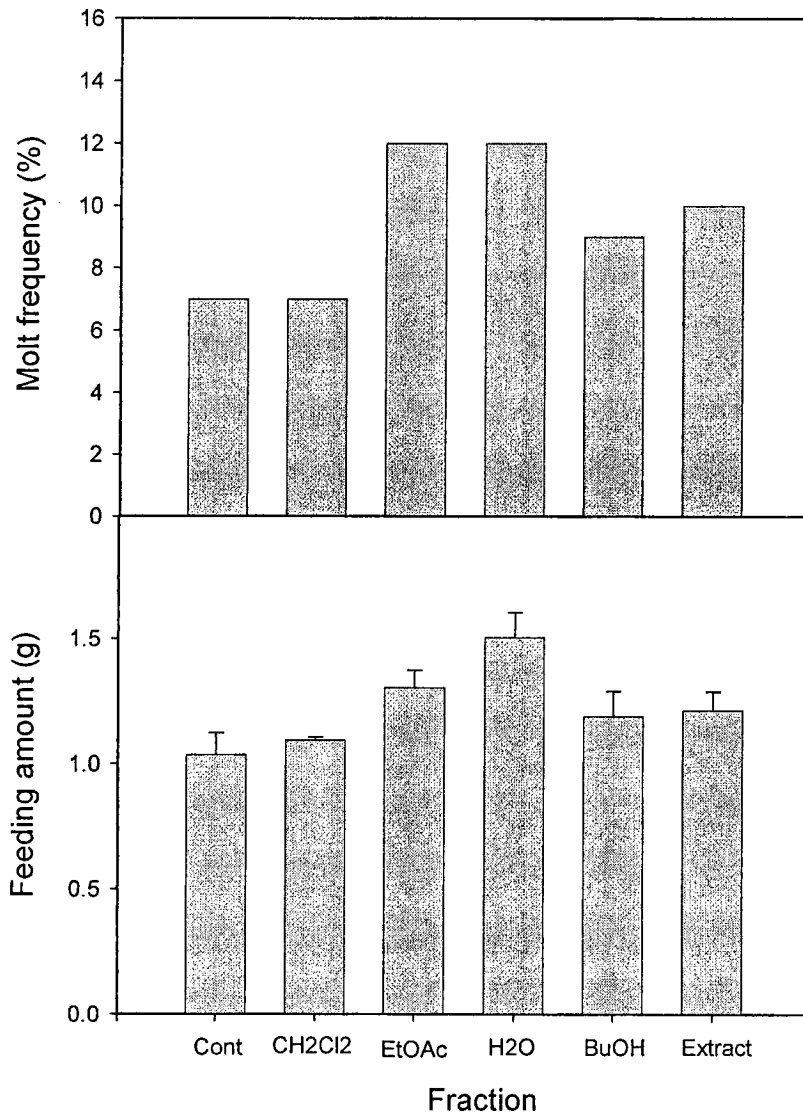


그림 6. 먹이 유인 효과를 보인 재료의 각 분획에 대한 흰다리새우의 탈피율과 사료 섭취율

RT-PCR은 cDNA Synthesis를 45℃에서 60분간, RTase Inactivation step을 95℃에서 5min분간 처리한 후, forward primer (5'ATTAGGTAGATTTATCACAGAAAC3') reverse primer (5'TATACAGTTACACTTCATAAAACAT3')를 이용하여 PCT을 하여 420bp의 band를 조사하여 그림 7에 나타내었다.

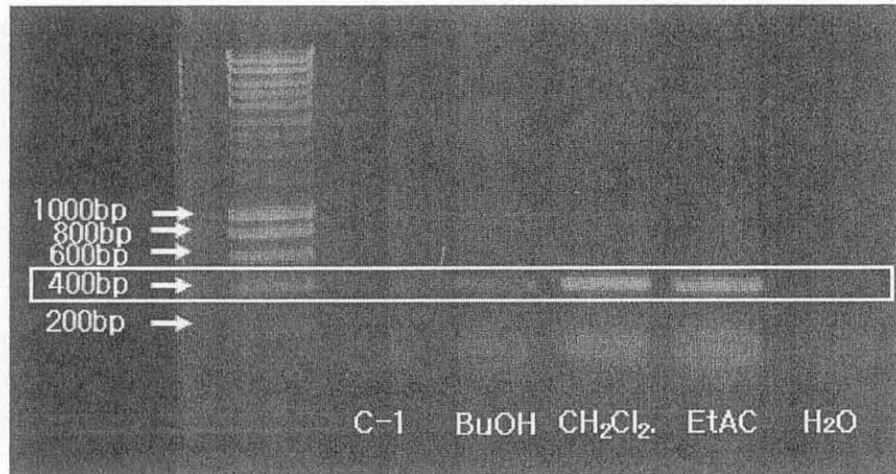


그림 7. C3 추출물을 CH_2Cl_2 , EtOAc, BuOH, H_2O 로 분획한 물질을 대하여 먹여 10일 후 혈구세포로부터 proPO mRNA 발현 양상을 보기 위해 RT-PCR한 전기영동상.

그림 7에서 보는 바와 같이 proPO mRNA의 유전자 발현은 대조구와 물 분획층을 먹인 새우에서보다 CH_2Cl_2 와 EtOAc 분획물을 먹은 새우에서 보다 더 높은 proPO mRNA의 발현양을 보이고 있다. 이러한 결과는 면역활성을 나타내는 물질은 수용성 물질보다 지용성 물질일 가능성이 매우 높으며 페놀 화합물일 가능성도 높ی 시사하고 있다.

2. 시제품개발

1) 시제품 제조

한 등 (2005)이 대한의 기호성과 면역활성을 높여 WSSV에 저항성을 나타내는 물질들로부터 제조한 사료첨가제 SP-04를 기본으로 하여 보다 우수한 사료첨가제를 만들기 위해 본 연구에서 흰다리새우를 대상으로 조사한 기호성이 뛰어나고 또한 면역활성이 높은 약재를 이용하여 다양한 배합율을 만들었다. 기호성이 뛰어나며 면역활성이 높으면서 가격이 저렴한 곡류 C3를 주재료로 하고 보조 재료로써 곡류 C6, 한약재 O2와 O6 그리고 해조류 A6를 이용하여 면역활성만 높다든지 기

호성만 뛰어나든지 한 재료는 보조적 재료로 하여 배합 비율을 각기 달리하였다. 배합한 이들은 70%에타놀로 추출한 후 기호성을 찾기 위해 사료의 섭취량을 조사하였고 면역활성을 조사하기 위해 WSSV에 대한 저항성을 조사하였다. 70% 에타놀에 대한 추출상태와 표준화를 위해 주재료와 모두 배합한 재료의 추출물에 대해 spectrophotometer로 scanning하여 그 결과를 그림 8에 나타내었다.

그림 8-A의 주재료 C3 추출물에 대한 흡광도 scanning 결과에서 주재료는 갈색을 띄고 있어서 430nm에서 최대 흡광도를 나타내었다. 모든 재료를 배합한 후 추출한 용액에 대한 흡광도 조사에서 주재료 C3는 430nm에서, 나머지 부재료들, 즉 C6, O2, O6 그리고 A6의 추출액에 대한 각각 510, 540, 610 그리고 670 nm에서 최대 흡광도를 나타내고 있었다.

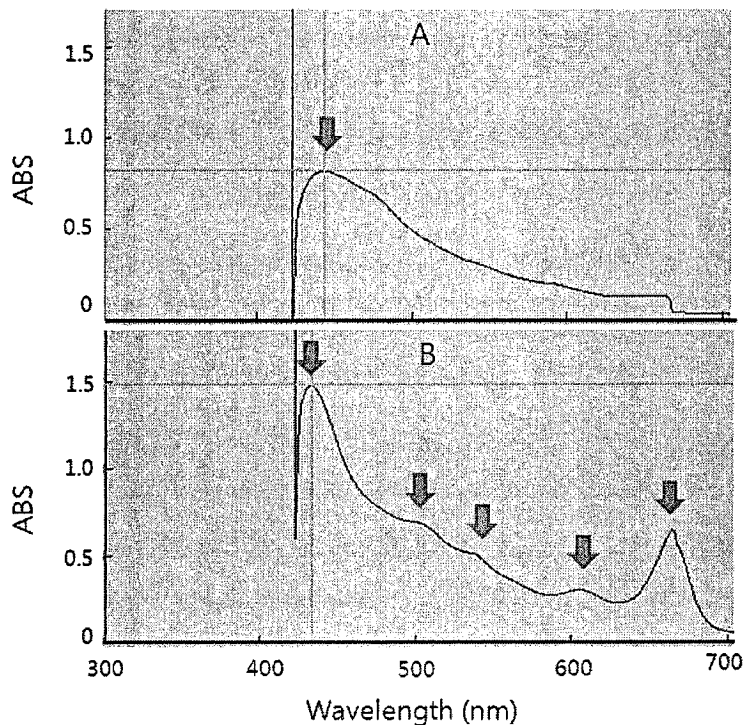


그림 8. 주재료 C3 추출물에 대한 흡광도의 양상 (A)과 모든 재료들을 배합하여 추출한 추출물(SP-6)에 대한 흡광도의 양상 (B). 화살표는 각 재료들에 대한 최대흡광도를 나타냄.

2) 섭이효과 조사

섭이효과를 조사하기 위하여 대하는 충남 서산시에 있는 (주) 한국바이오컨설팅의 새우양식장으로부터 8월 28일 평균 체중 $4.34 \pm 0.32\text{g}$ 의 양성중인 것을 구입하여 실험실로 옮겨 10일간 순치 사육하였다. 조사를 위한 사육방법을 상기한 흰다리새우와 같은 방법으로 조사하였다. 배합율을 달리하여 추출하여 제조한 SP-04, SP-05, SP-06를 사료 1kg에 0.5g씩 첨가하여 섭이효과와 WSSV에 대한 challenger test를 하였다.

그림 9는 새우에 대한 사료첨가제의 먹이 유인 효과를 찾기 위해 조사한 사료 섭이량의 변화를 나타낸 것이다. SP-04, SP-05, SP-06 모두 대조구 보다는 유의하게 사료 섭이량이 높게 나타났다. SP-04와 SP-05는 유사한 결과를 보여주었으며, SP-06은 SP-04와 SP-05보다 유의하게 높은 사료 섭이량을 보여주었다.

이러한 결과로부터 먹이 유인 효과가 큰 재료 O2의 함량이 많은 것이 사료 섭이량에서도 많이 나타났다.

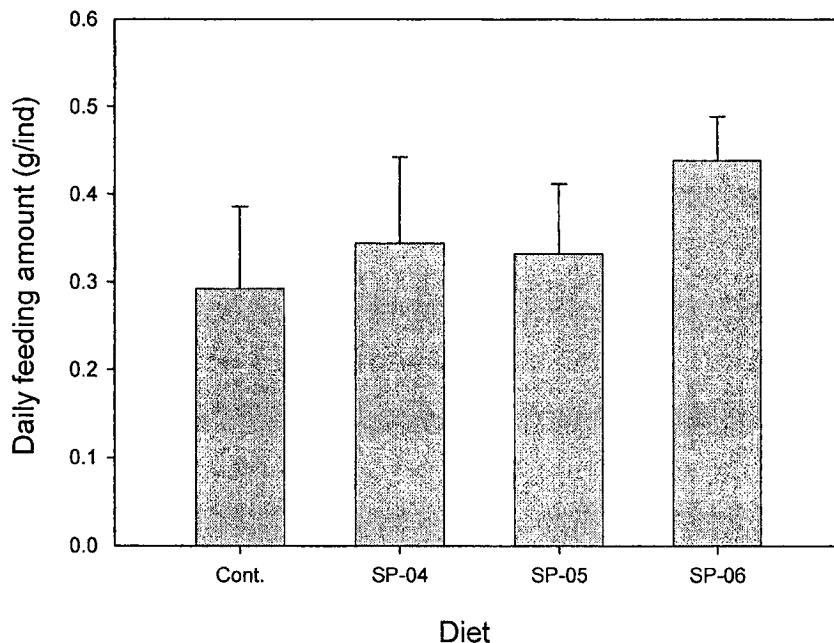


그림 9. 혼합약제 추출물 SP-04, SP-05, SP-06을 각각 첨가한 대하 (*P. chinensis*)의 사료 섭이량.

3) WSSV에 대한 challenge test

재료의 배합율을 달리하여 추출하여 제조한 SP-04, SP-05, SP-06를 사료 1kg에 0.5g씩 첨가하여 먹인 후 WSSV에 대한 저항성을 조사한 결과를 그림 10에 나타내었다. 상기실험과 동일한 방법으로 이들 대하들을 WSSV에 인위적으로 감염시킨 후 일반 사료를 급이한 대조 실험구에서는 감염 후 3일째부터 행동이 둔하고 먹이 섭취를 전혀 하지 않았으며 폐사된 개체들이 나타나기 시작하여 9일째 되는 날에는 전부 폐사하였다.

반면 SP-04는 사육 5일째부터 활동에는 변화가 없으나 죽는 개체들이 나타났으며 사육10일째에 50%의 생존율을 보였다. SP-05와 SP-06은 감염후 먹이 섭취 행동이나 활력은 감염되지 않은 정상적인 새우와 동일하였으며 생존율에서도 8일 이후에 한 두 마리가 폐사하였으나 이는 바이러스 감염에 의한 것이 아니고 사육관리 중에 폐사한 것으로 나타났다.

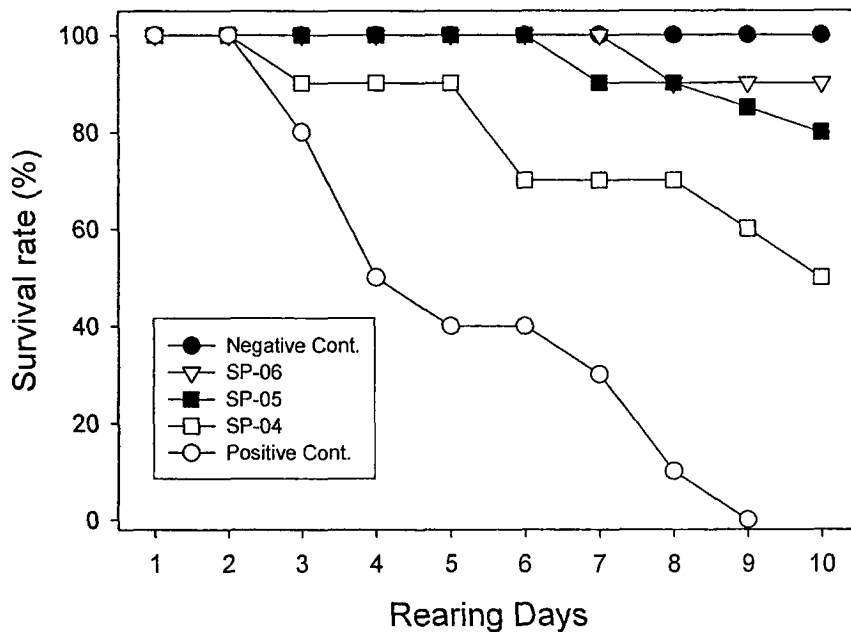


그림 10. 혼합약제 추출물 SP-04, SP-05, SP-06을 각각 급이한 WSSV에 감염된 대하(*P. chinensis*)의 생존율.

4) 면역관련 유전자 발현에 미치는 영향

시제품 SP-06의 면역활성 효과를 구명하기 위해 proPO 유전자외에 면역활성과 연관이 있다고 알려진 C-type lectin, LGBP(LPS and β -1,3 glucan binding protein) 등의 유전자의 발현 양상을 조사하기 위하여 GenBank로부터 이들 유전자의 서열을 탐색하여 각각의 유전자 서열로부터 primer를 제작하여 상기한 방법과 동일한 방법으로 RT-PCR을 하였다. C-type lectin 유전자에 대한 forward primer는 5'TTATTGGAAGTCTATTTCAGTTTCTT3', reverse primer는 5'GCATGTTTGATTAGAGAA TAAAAGT3'를 이용하였으며, LGBP 유전자에 대한 forward primer는 5'AGAAGT TCTACCTGATC CTGAAC3', reverse primer는 5'ACTTTCACTTTTAGTTTTTATCT GA3'를 이용하였다. 그리고 대조유전자로는 β -actin 유전자를 사용하였으며 β -actin 유전자의 forward primer는 5'TTATTGGAAGTCTATTTCAGTTTCTT3, reverse primer는 5'TCCTTATCCTAATGGAATAATTA AAA3'를 이용하였다.

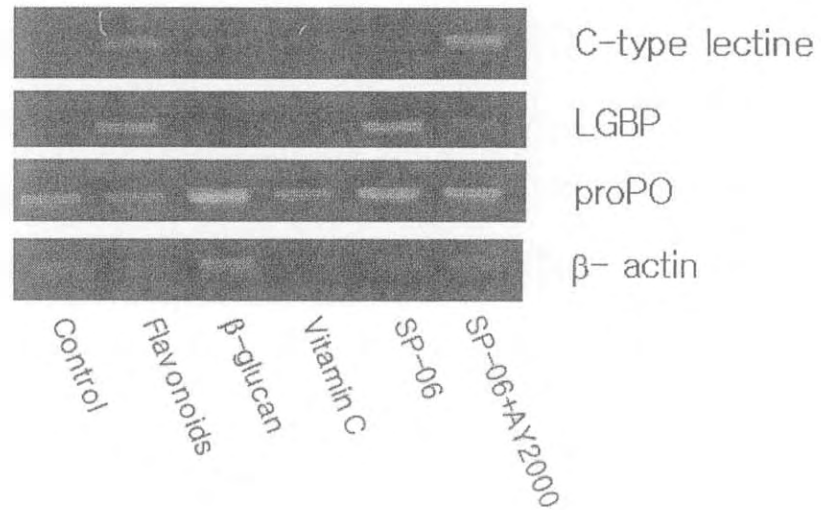


그림 11. SP-06, Vitamin C, β -glucan, flavonoids 등을 대하에 먹여 10일 후 혈구 세포로부터 C-type lectin, LGBP, proPO의 mRNA 발현 양상을 보기 위해 RT-PCR한 후 전기영동상. SP-06+AY2000: SP-06에 Bacillus sp. AY2000균을 혼합하여 급이한 실험군

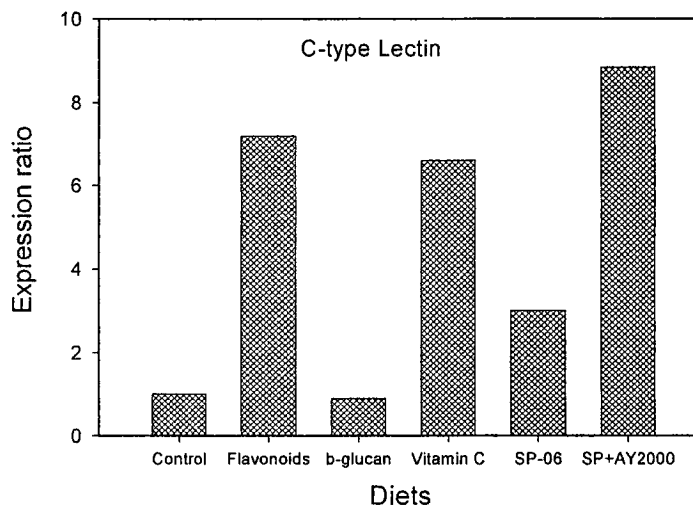
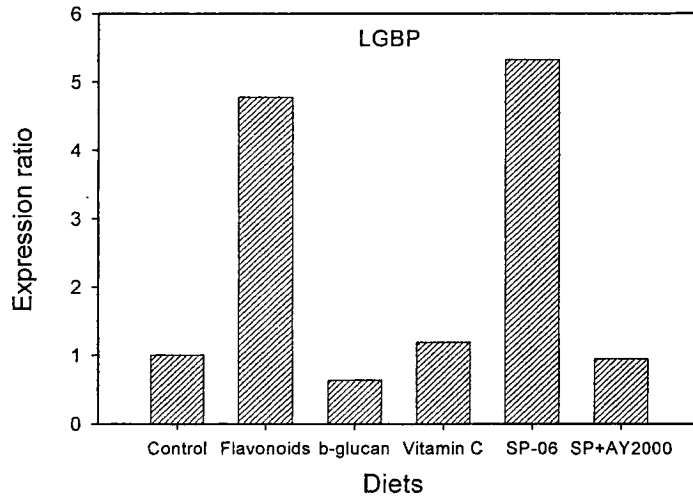
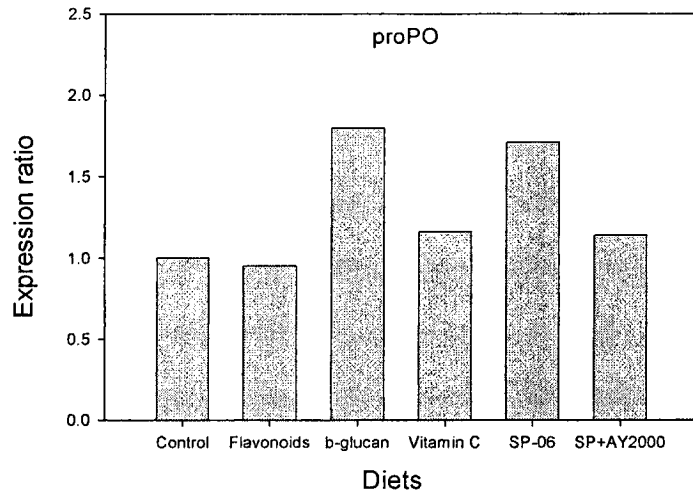


그림 12. 다양한 사료첨가제를 먹인 대하의 면역관련 유전자 발현율의 변화

지금까지 면역증강물질로 널리 이용되고 있는 β -glucan과 최근 면역증강과 관련이 있다고 알려져서 많은 사람들이 관심을 가지고 있는 항산화 효과를 나타내는 Flavonoids 와 Vitamin C와의 면역관련 유전자의 발현에 미치는 영향을 비교하여 RT-PCR을 하여 전기영동 결과는 그림 11에 나타내었으며 그 변화율은 그림 12에 나타내었다.

RT-PCR의 전기영동상과 그 변화율을 보면 proPO 유전자 발현은 β -glucan과 SP-06을 섭취한 실험구에서 높게 나타났으며, vitamin C도 대조구에 비해서는 다소 높게 나타났다. LGBP 유전자는 flavonoids와 SP-06을 섭취한 실험구가 발현양이 많았다. 그리고 외래분자의 인식과 관련이 있다고 알려진 C-type lectin 유전자 발현은 항산화제인 flavonoids와 vitamin C가 높게 나타났으며, SP-06을 섭취한 실험구에서는 대조구 보다는 높게 나타났으나 flavonoids와 vitamin C보다는 낮게 나타났다. 그러나 SP-06에 Bacillus sp. AY2000균을 혼합하여 섭취시킨 새우들에서는 높은 유전자 발현율을 보였다. 이상의 결과에서 SP-06을 첨가한 사료를 섭취한 새우들은 모든 면역관련 유전자들에서 높은 발현율을 나타내고 있어서 SP-06은 면역증강제로서의 효과가 높을 것으로 보여 진다.

3. 현장 실험

1) 국내 적용 실험

충남 당진군 송악에 위치한 C양시장 3개의 호지(그림 13)에서 5월 14일 평균 체중 0.005g의 흰다리새우를 50만마씩 입식하여 본 시제품 (Srimpower, SP)을 사료에 첨가하여 수확이 완료한 8월 20일까지 98일간 급이하였다. 이때 사료는 S사 제품을 사용하였다.

수질상황의 조사는 치하 입식 10일전부터 수온, pH, OD 및 ORP의 변화를 조사하여 각각 그림 14, 15, 16에 나타내었으며, 이들의 각 호지에서의 평균 성장상태는 그림 17에 나타내었다.

송악에 위치한 C양식장은 치하를 입식하는 5월 14일 경에는 수온이 18℃ 전후였으며 5월 20일 이후부터 20℃ 이상 올라갔다. 금년에는 비가 많이 오고 일조량이 많지 않아 수온은 7월까지 25℃ 전후였으며 8월에 들어서서 28℃ 이상 유지되었다. 흰다리새우 양식 수온조건은 양호하지 않은 편이었다. pH는 모든 양

식 호지에서 7월 중순까지는 8.0 전후였으나 그 이후부터 서서히 내려가기 시작하여 8월 중순에는 7.6까지 내려갔다. DO는 양식기간 내내 5mg/L의 양호한 조건을 유지하였다.

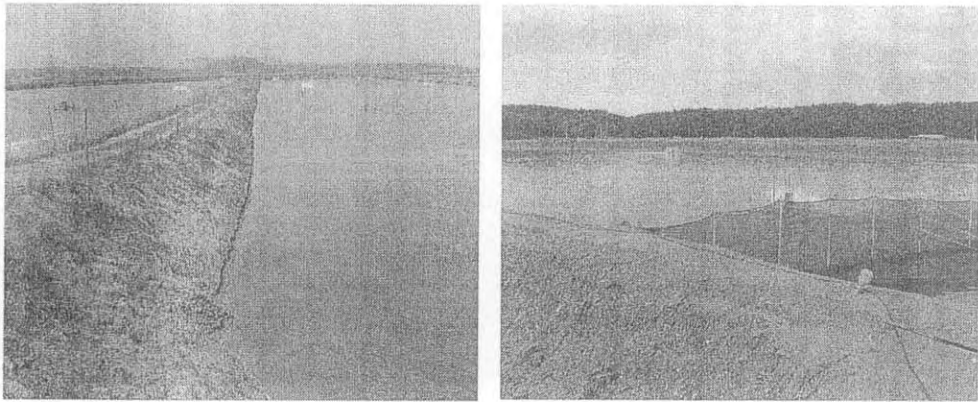


그림 13. 충남 당진군 송악에 위치한 C 양식장. 5월 14일 흰다리새우를 입식하여 8월 17일부터 출하하기 시작하여 8월 20일 까지 수확하여 출하함.

그림 17에서 보는바와 같이 본 사료첨가제를 첨가하여 흰다리새우를 양식한 경우 양식 시작 약 90일 후에는 체중이 17g 전후로 성장하여 98일째에는 18~20g으로 성장하여 수확하였으며 (그림 그 출하를 하였다. 이러한 성장 속도는 국내에서는 한등 (2005)의 보고외에는 보고된바가 없으며 외국에서도 120일 정도 양식해야 성장할 수 있는 크기이다. 이러한 결과로 보아 본 사료첨가제는 성장을 빠르게 하는데 효과적이라는 것이 입증되었다.

그러나 생산량에서 1호지에서는 1.8Ton/ha, 2호지에서는 2.8Ton/ha 그리고 3호지에서는 3.5Ton/ha의 수확을 하였다. 1호지와 2호지에서의 수확량은 일반적인 수확량 3Ton/ha에 이르지 못했으며 3호지만 양호한 수확량을 얻었다.

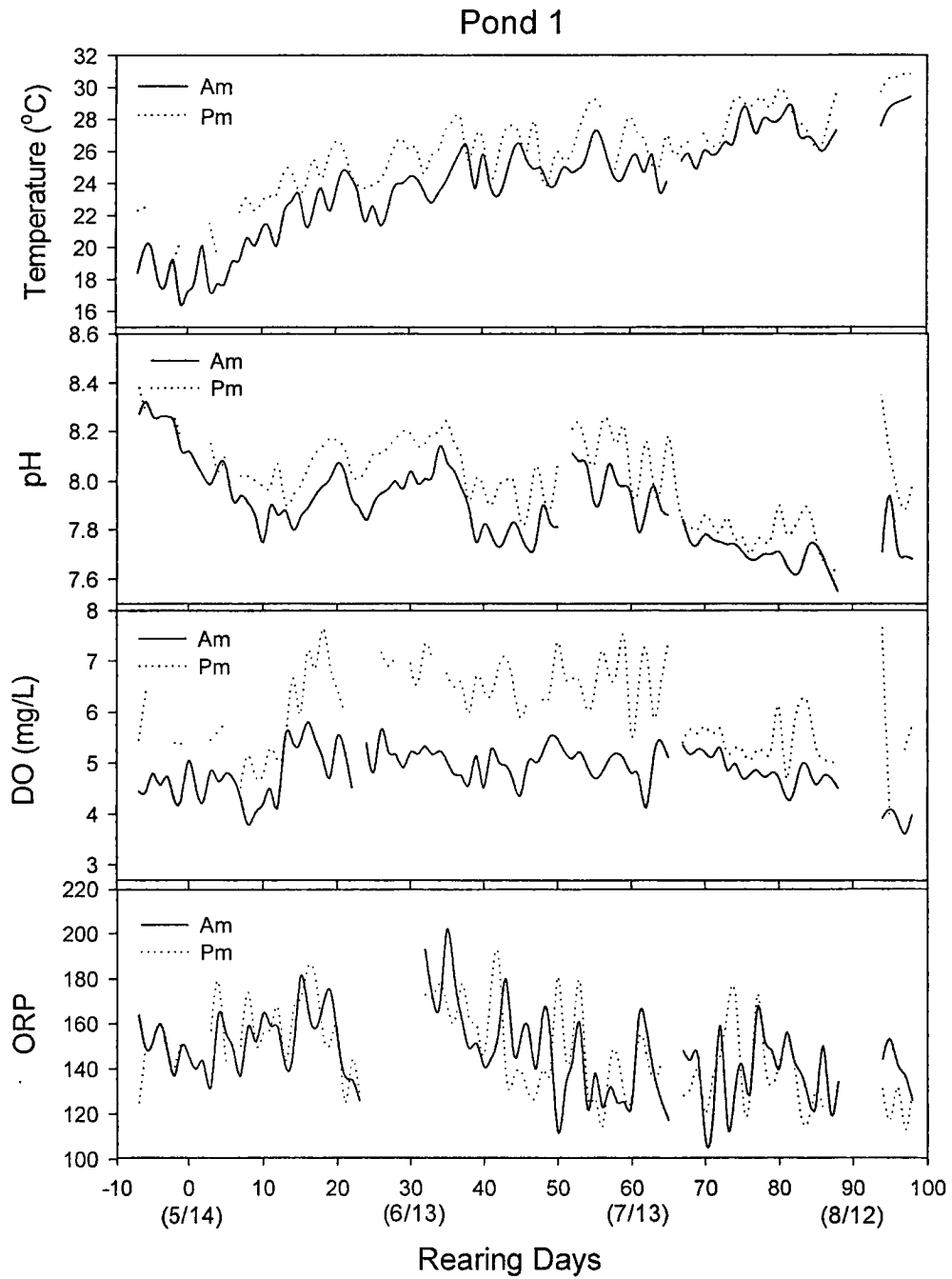


그림 14. C양식장 1호지의 흰다리새우 양식기간(5월14일~8월20일)동안 수온, pH, DO, ORP의 변화.

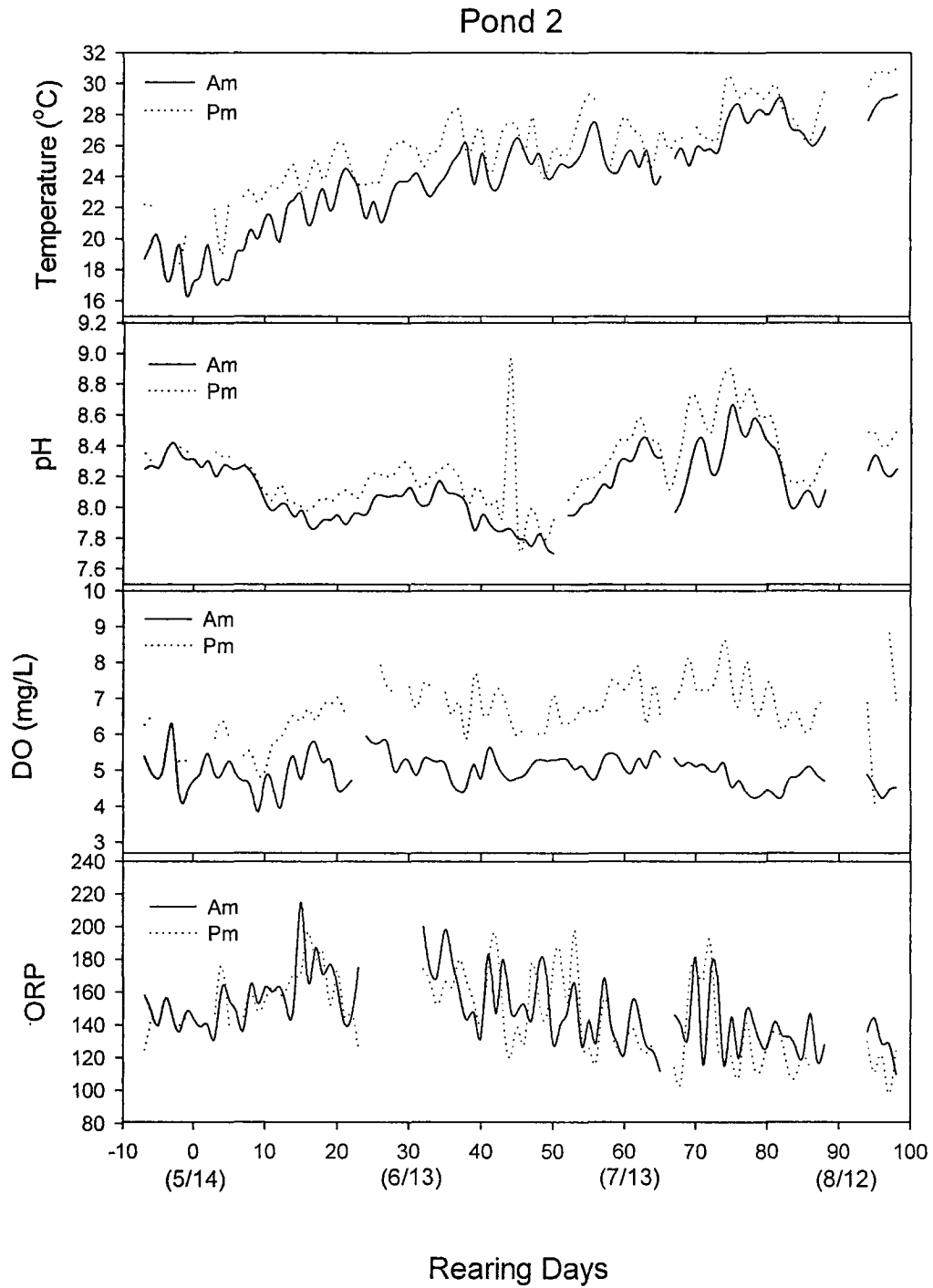


그림 15. C양식장 2호지의 흰다리새우 양식기간(5월14일~8월20일)동안 수온, pH, DO, ORP의 변화.

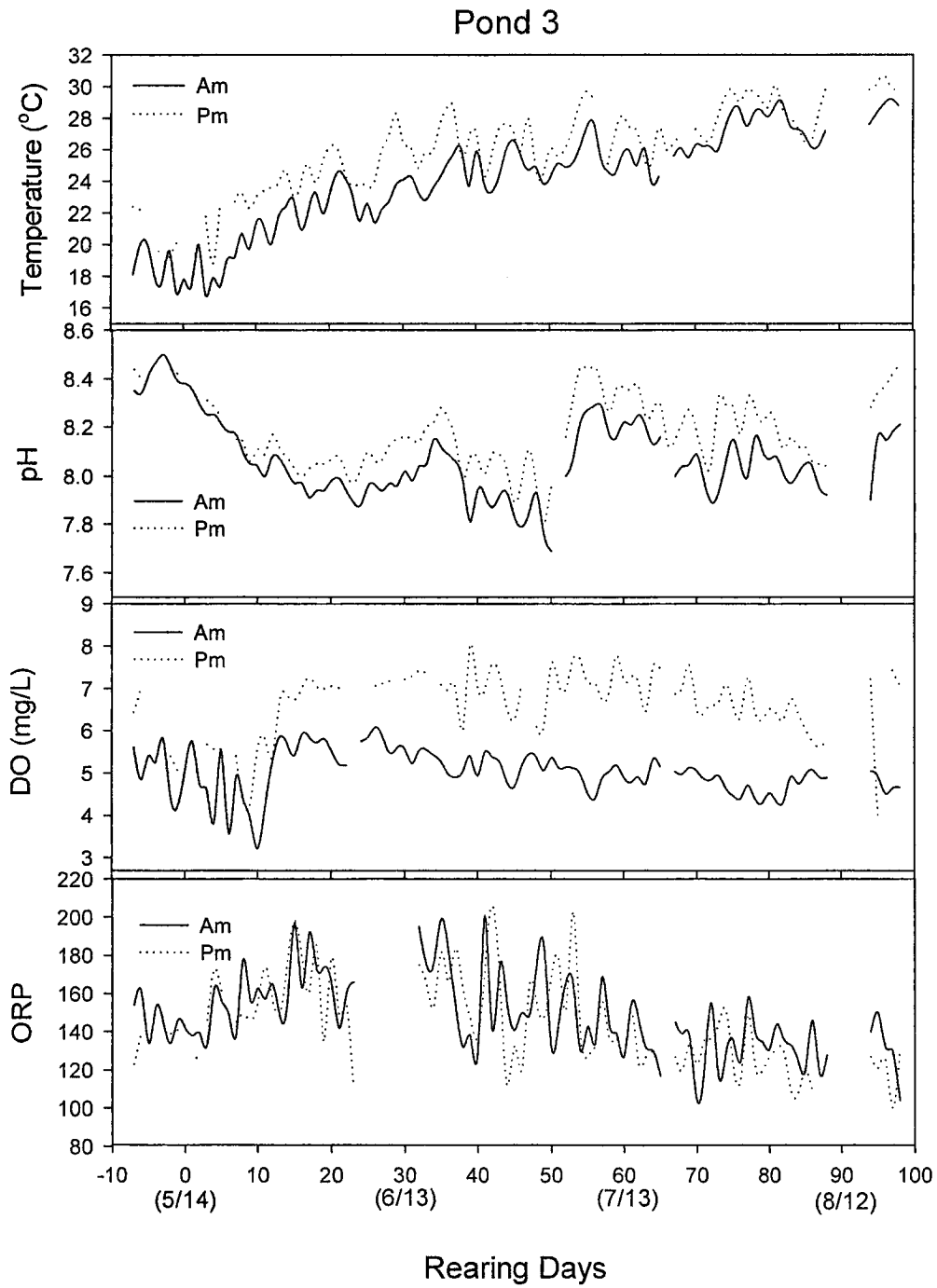


그림 16. C양식장 3호지의 흰다리새우 양식기간(5월14일~8월20일)동안 수온, pH DO, ORP의 변화.

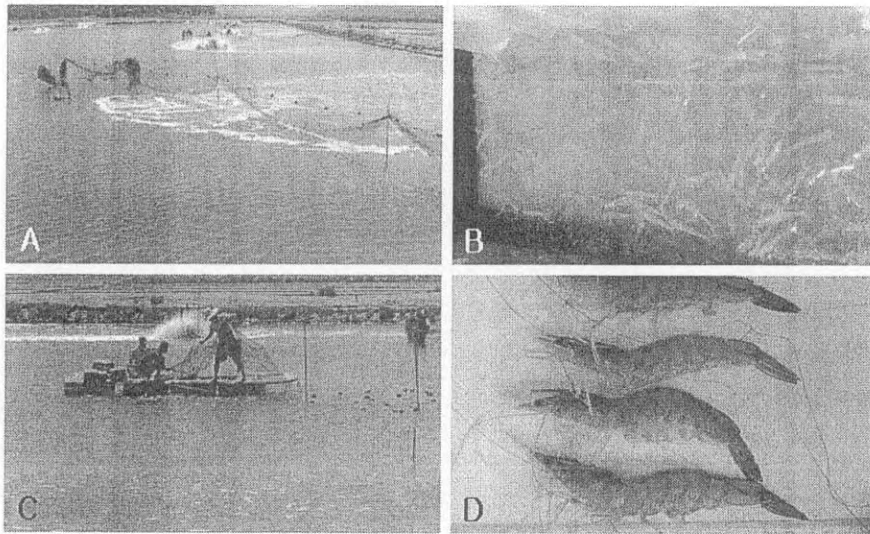


그림 17. 송악 C양식장에서 8월 20일에 수확하는 모습. A: 수확용 그물 설치, B: 수확된 흰다리새우, C: 수확하는 모습, D: 수확된 흰다리새우

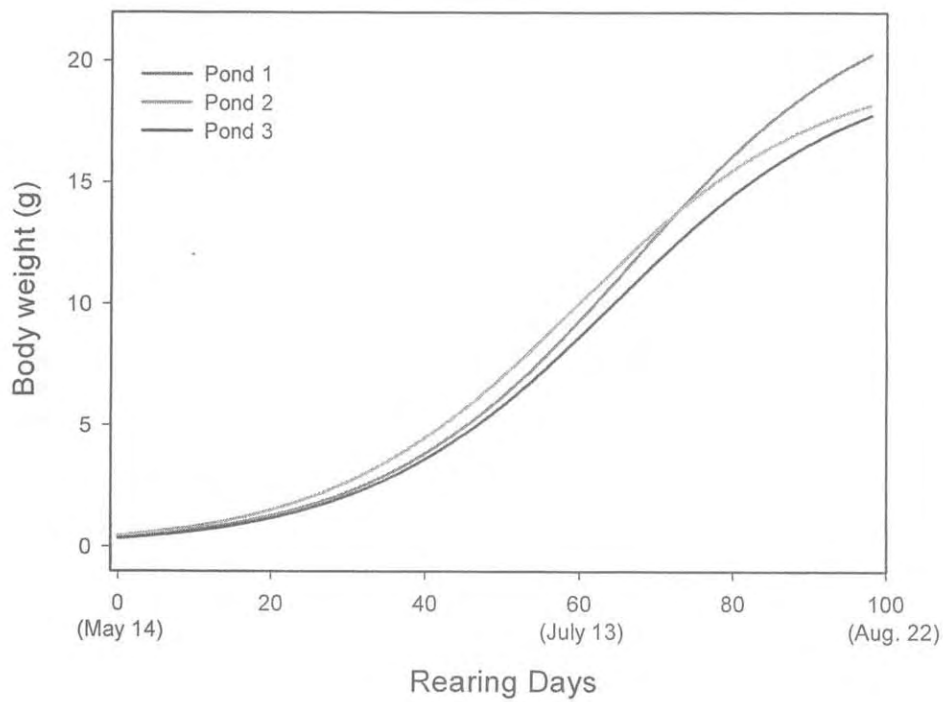


그림 18. 송악에 위치한 C 양식장에서 양식한 흰다리새우의 평균체중 변화

2) 국외 적용 실험

외국의 새우양식장에 적용하기 위하여 인도네시아의 Kalimantan Barat의 Pontianak Utara 78244에 위치한 PT. Aquarium shrimp사 새우 양식장 (그림 17)의 0.5ha의 호지 5개에 대하여 양식한 결과를 표 1에 나타내었다.

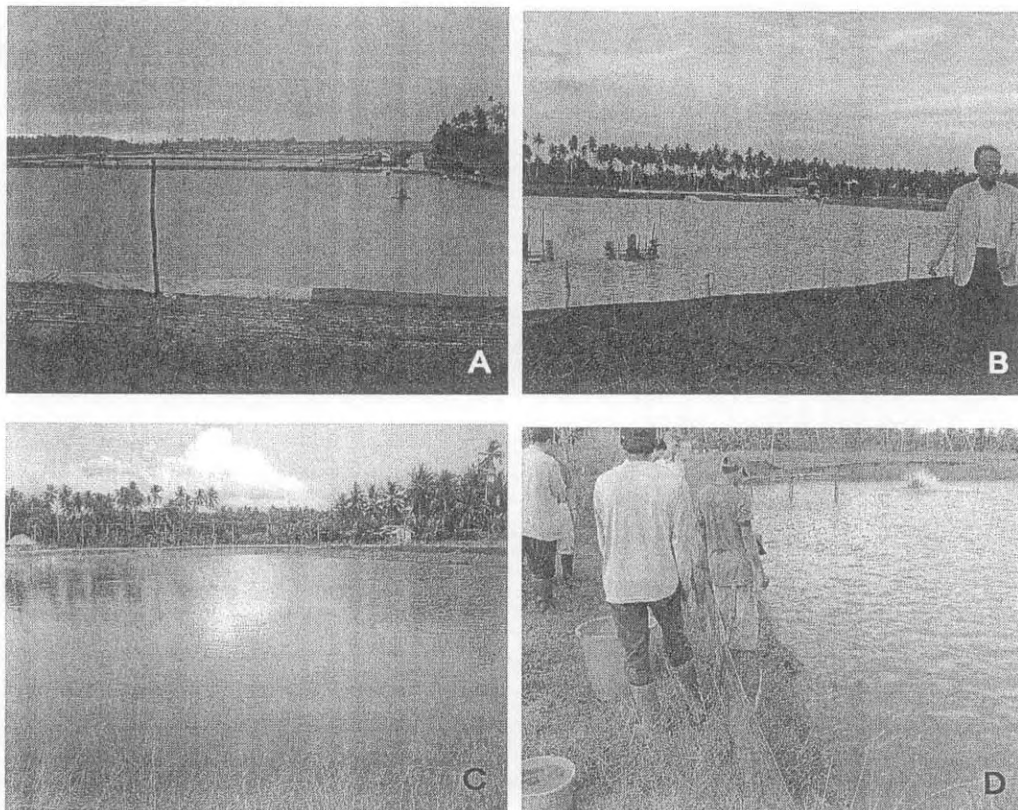


그림 19. 인도네시아의 Kalimantan Barat의 Pontianak Utara 지역에 위치한 PT. Aquarium shrimp사 새우 양식장들의 전경. A: Genghis-Khan 양식장, B~C: Poseidon 양식장, D: Imperial 양식장

표. 1. 양식 적용실험 장소와 실험조건 및 그 결과의 특성

실험구 (양식장)	pond 명	양성 기간 (일)	사육면적 입식 마리수 (밀도)	최종 생존율 (%)	ADG (52일)	비 고
1 CP feed	Genghis-Khan A8	123	3700m ² 445,952마리 (120.5/m ²)	85	0.095	SP첨가하지 않음 (Control)
2 CP+SP(full time)-exp1	Poseidon A1	101	5000m ² 583,800마리 (116.8/m ²)	56	0.150	입식 16일 이 후부터 첨가제 사용
3 CP+SP(full time)-exp2	Genghis-Khan B7	98	4157m ² 585,228마리 (140.8/m ²)	68	0.129	"
4 CP+SP(full time)-exp3	Poseidon D3	110	5000m ² 815,600마리 (163.1/m ²)	73	0.096	"
5 CP+SP(30 days)-exp1	Imperial 6	105	4600m ² 440,250마리 (95.7/m ²)	85	0.102	초기 30일간 만 첨가제 사용
6 CP+SP(30 days)-exp2	Imperial 7	103	5000m ² 412,000마리 (82.4/m ²)	75	0.130	"

주: CP feed : CP사 사료 급여 + 기타 사료첨가제

CP+ SP(full time)-exp1 : 사육 16일 이후부터 수확할 때까지 SP-04 첨가한 양식 실험구1

CP+ SP(full time)-exp2 : 사육 16일 이후부터 수확할 때까지 SP-04 첨가한 양식 실험구2

CP+ SP(full time)-exp3 : 사육 16일 이후부터 수확할 때까지 SP-04 첨가한 양식 실험구3

CP+ SP(30 days)-exp1 : 사육 16일과 19일 이후부터 30일간 SP-04 첨가한 양식 실험구1

CP+ SP(30 days)-exp2 : 사육 16일과 19일 이후부터 30일간 SP-04 첨가한 양식 실험구2

CP+ SP(from 45 days after) : 사육 45일 이후부터 SP-04 첨가한 양식 실험구

표 1에서 보는바와 같이 인도네시아에서는 입식밀도를 m²당 100마리 전후로 하고 있었으며, 본 실험에서도 Imperial 7 pond에서는 입식밀도가 82.4/m²로 가장 낮았으며 Poseidon D3 pond에서는 163.1/m²로 가장 높은 밀도로 양식을 하

였다. 이러한 양식밀도는 국내의 30~50마리/m² 보다 2배~3배 이상 고밀도로 양식을 하였다.

표 1에서 보는바와 같이 CP사 제품 일반사료를 공급하였을 때의 평균 20g/마리 전후까지 양성한 기간은 123일 거렸으나, CP사 사료에 본사에서 개발한 사료첨가제(SP)첨가하여 사료를 급이한 양식장에서의 양성기간은 98일~110일로 나타나 양성기간이 25일~13일이 단축되었다. 그러나 생존율에서는 CP사 제품 일반사료를 공급하였을 때와 차이가 거의 없었으며 오히려 Poseidon A1 pond와 Genghis-Khan B7 pond에서는 각각 56%, 68%로 낮았다.

그림 18은 입식후 52일까지의 일일성장율(ADG)을 비교한 것으로 CP사 제품 사료를 공급하였을 때는 0.095이었으나 사료첨가제(SP04)첨가한 경우는 0.128로 유의하게 높게 나타나 초기 성장에 매우 좋음을 알 수 있었다.

따라서 본 제품을 사용할 경우 양식기간의 단축으로 인한 양식비용이 현저하게 절약될 수 있음을 보여 주고 있다.

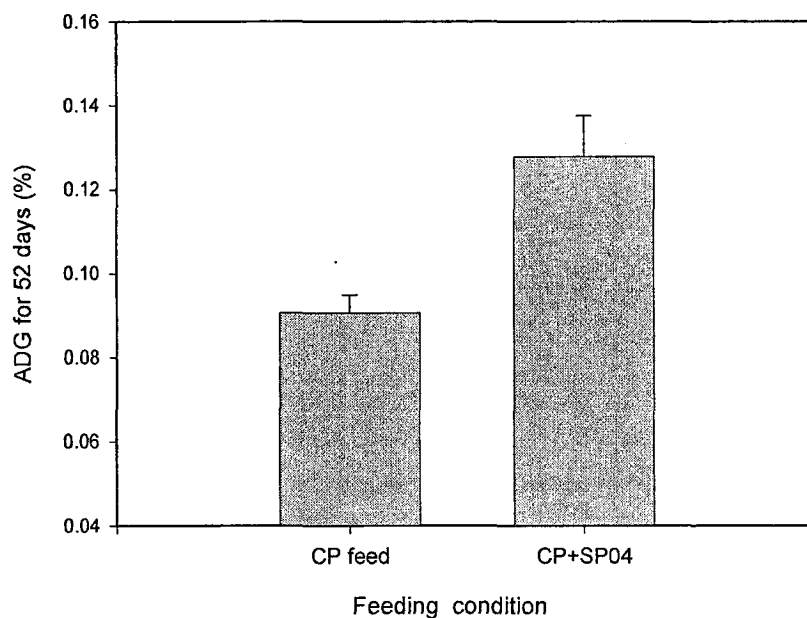


그림 120. 인도네시아 Aquarium shrimp사 양식장(Pontianak, Kalimantan 위치)에서 사료첨가제(SP04) 사용에 의한 유생 입식 후 52일간의 일일 성장률.

인도네시아에서 사육한 결과를 CP사와 Gold coin사에서 제시한 사육일 수에 따른 성장 곡선과 비교해본 결과 그림 19에서 보는 바와 같이 CP사와 Gold coin사의 사료만 주었을 때보다 매우 본 개발한 사료첨가제를 첨가하여 투여하였을 때가 유의하게 성장이 빨랐음을 보여주고 있다.

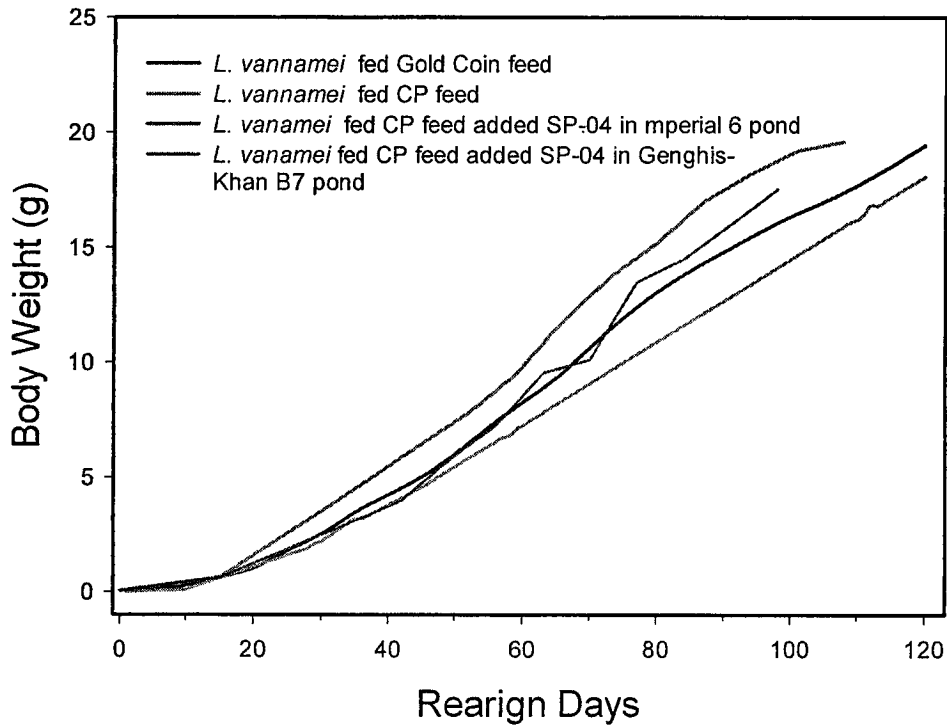


그림 21. CP사와 Gold coin사 제품에 대한 새우성장도와 비교한 인도네시아 Aquarium shrimp사 양식장 Imperial 6 pond와 Genghis-Khan B7에서 양식한 흰다리새우 성장과의 비교

4. 경제성 분석

일반적으로 우리나라에서 최적의 상태에서 4개월간 (120일) 양식하고 있으며 이 때까지 투여하는 사료 총량은 약 5,200kg/ha이며, 이때 최적의 새우 생산량은 3,000kg으로 사료회사(C사, P사)에서는 제시하고 있다. 그리고 이때 FCR은 1.7으로 나타난다.

일반적으로 FCR의 값이 2이하이면 사료전환 효율이 좋다고 하고 있으며, 1이 되면 최고의 사료전환 효율을 보인다고 하고 있다 (Wyk, 2004). 따라서 SP를 첨가하였을 때 사료의 전환률에서도 좋은 효과를 보이고 있다.

SP 첨가제를 사용하여 새우를 양식 한 경우와 일반사료를 사용하여 새우를 양식 한 경우의 새우 생산금액과 양식비용들을 각 항목에 따라 상호 비교하여 표 1에 나타내었다.

SP 첨가제를 사용하여 대하를 양식하였을 때 양식기간의 단축으로 5월 14일 입식하여 8월17일부터 8월 20일까지 수확하였으며 이때 활어업자에게 kg에 20,000원에 출하하여 5,700만원/ha의 조수입을 올렸다. 그러나 일반적인 대하양식장에서 같은 기간에 입식하면 9월말이나 10월초에 수확하게 되고 이때 일상적인 출하가격으로 계산하면 약 3톤 생산하였다고 가정하였을 때 4,800만원/ha의 조수입을 올릴 수 있다.

치하구입비, 저질 개선비, 수질정화비용 등은 동일하겠지만 전력비, 인건비의 절감과 특히 사료비에서 약 300만원/ha의 절감효과가 있었다. 그리고 SP-04를 첨가함으로써 인해 항생제나 그 외 강장제 등 약품을 일체 사용하지 않았기 때문에 약품비에 대한 절감효과가 350만원/ha을 얻을 수가 있었다. 만일 SP-04 첨가제의 비용을 180만원/ha로 계산하더라도 순 수익에서는 SP-04 첨가제를 사용한 경우는 4,063만원/ha으로 수익률은 71.28%가 되었으며, 일반사료를 사용하여 양식을 성공하였을 경우는 순수익은 2,562만원/ha가 되고 수익률은 53.38%가 된다.

또한 조수익에 대한 생산비용이 차지하는 비율이 SP를 첨가한 사료를 주었을 때는 28.7%가 되었고 일반사료를 주어서 생산하였을 때는 46.6%가 든다.

따라서 SP 첨가제를 사용하여 양식을 하였을 경우 ha당 1,501만원의 수익을 더 올릴 수 있는 결과를 얻을 수 있으며 기존의 수익률보다 58%의 수익을 더 올릴 수 있다.

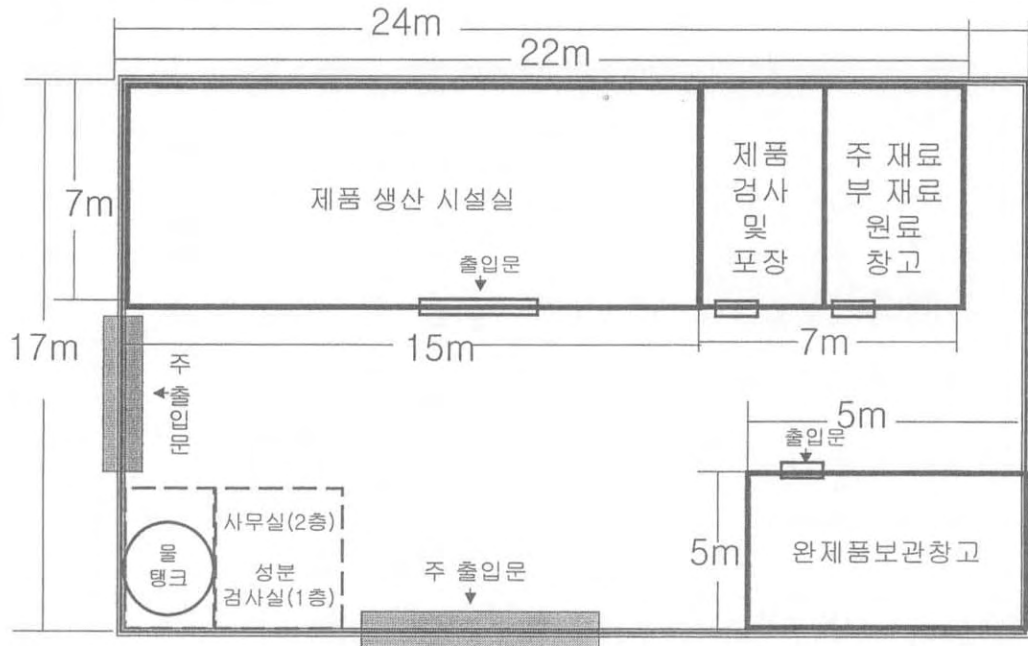
그리고 면역증상이나 성장이 뛰어나기 때문에 항생제나 기타 약제를 사용하지 않고 양식을 할 수 있으므로 잔류 항생제나 그 외 발암성 물질 등에 대한 불안을 없앨 수 있어 소비자들로 부터 안전한 새우라는 인식으로 새로운 식생활 문화를 이끌어갈 수 있다.

항 목	SP-04 첨가 사료 사용 양식장 (1ha)		일반 사료 사용 양식장 (1ha)		
	금액 (만원)	산 출 내 역	금액 (만원)	산 출 내 역	
조수익(새우 출하)	5,700	2,850 kg×20,000원	4,800	3,000kg×16,000원	
생 산 비 용	전력비	108	360,000 (1달 평균 전력비) × 3개월	144	360,000 (1달 평균 전력비) × 4개월
	치하비	150	30만마리× 5원/tail	150	30만마리× 5원/tail
	사료비	405	3,035kg × 1,350원 (포/27,000원)	702	5,198kg × 1,350원 (포/27,000원)
	수질정화제	400	300,000원(광합성세균원 종구입비) × 5통 250,000원(광합성세균중 식제구입비) × 10통	400	300,000원(광합성세균원 종구입비) × 5통 250,000원(광합성세균중 식제구입비) × 10통
	저질개선비	100	생석회, 소석회, 석회석 등 구입비	100	생석회, 소석회, 석회석 등 구입비
	SP-04	180	200,000원×9통 (SP-04 240g)	0	
	액화산소비	36	60,000원/통×2통×3개월	48	60,000원/통×2통×4개월
	약품비	0		350	암피실린, 강장제, 비타민 제, 크로르칼퀴, 녹조제거제, 포르말린, 차 박 등등
	인건비	258	남자, 50만원×3개월 여자, 36만원×3개월	344	남자, 50만원×4개월 여자, 36만원×4개월
	계	1,637		2,238	
수 익 (조수익 - 생산비)	4,063		2,562		
수 익 률 (수익 ÷ 조수입)	71.28%		53.38%		

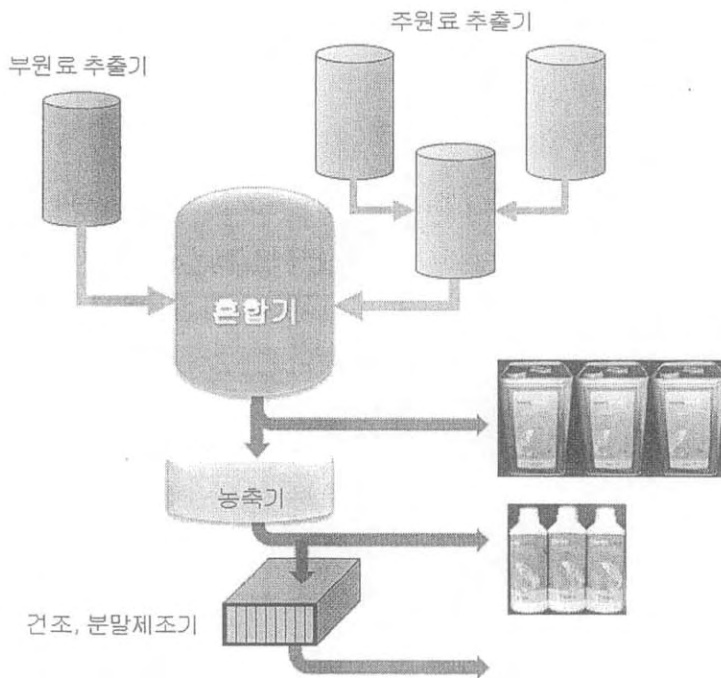
표 2. SP 첨가사료를 사용하여 양식한 양어장과 일반 양어장에서 수익성 비교

제 3 절 제조장치의 도면 및 상품 사진

1. 공장의 설계 도면

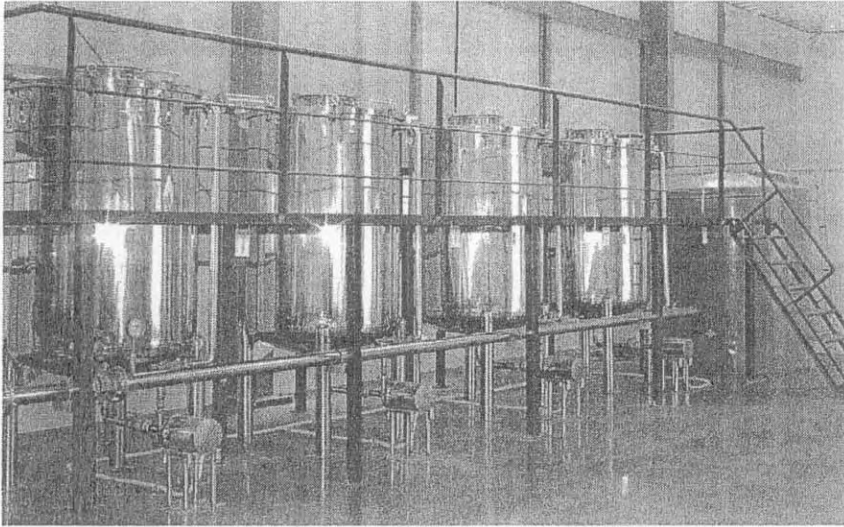


2. 전체 생산 설비의 모식도

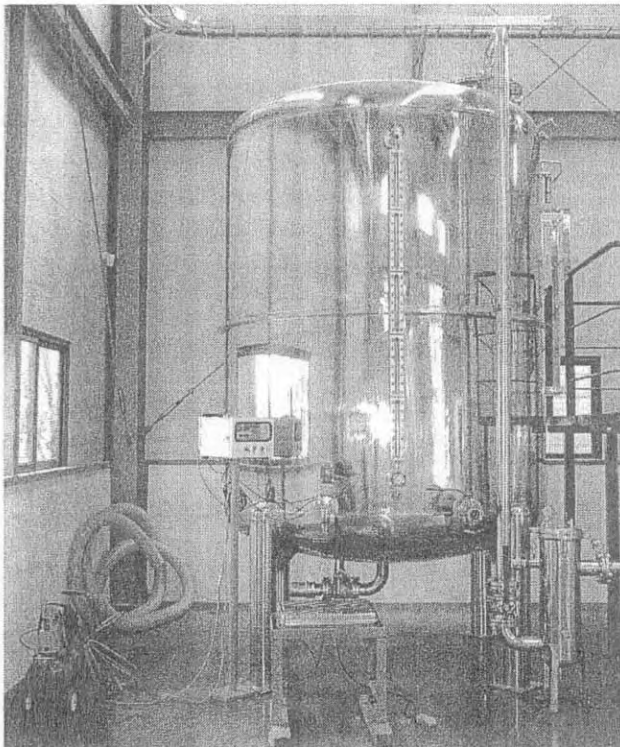


3. 추출기와 혼합기

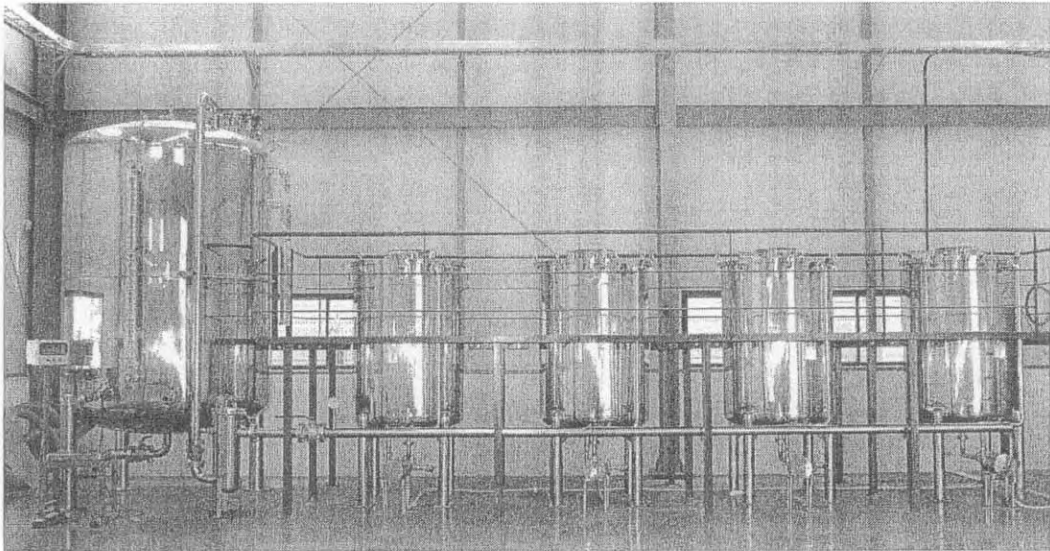
1) 제작한 추출기와 설치 상태



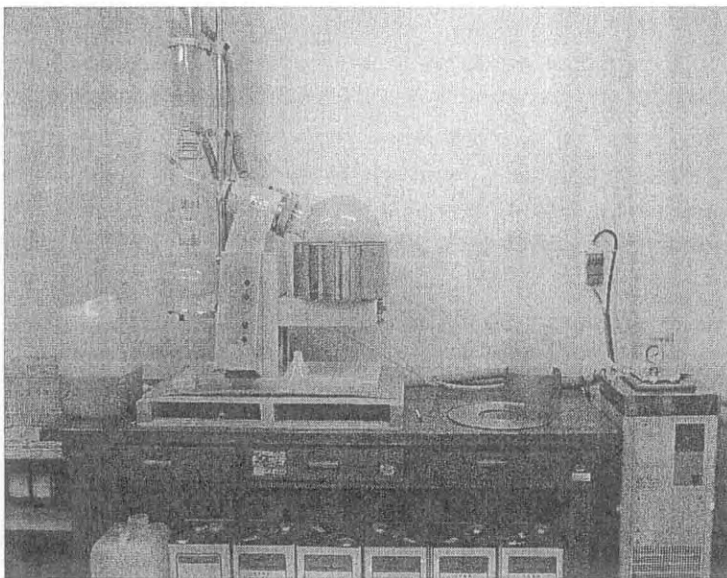
2) 추출액 혼합기



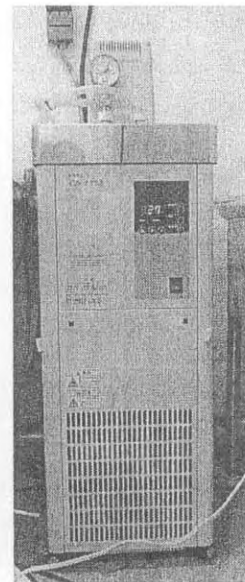
3) 추출기와 혼합기의 설치 상태



4. 농축기



(농축기)



(냉각기)

5. 제 품

1) 국내 시판용 액상 사료첨가제

그림 A는 1.8L용 용기에 포장한 제품의 사진이며, 그림 B는 1L용 플라스틱 용기에 포장한 제품의 사진이다.



(A)



(B)

2) 해외 시험용 액상 농축 사료첨가제

인도네시아 Kalimantan Barat의 Pontianak Utara 78244에 위치한 PT. Aquarium shrimp사의 새우 양식장에 있는 흰다리새우를 대상으로 양식실험을 하기 위해 국내시판용 액상 사료첨가제를 10배 농축하여 포장한 상태이다.



제 3 장 결 론

제 1 절 계획대비 실적 및 성과

1. 면역증강 효과

1) proPO 유전자 발현 효과

SP 미첨가 실험군에서는 발현되지 않았으나 SP를 첨가한 실험군에서는 많은 유전자 발현이 나타났다.

2) WSSV에 대한 생존율

일반사료 실험군에서는 WSSV 감염 후 10일 이내에 폐사되었으나 SP 첨가실험군에서는 10일 이후의 생존율이 80%이상이었다.

2. 사료효율

대하에서는 FCR 1.04, 흰다리새우 양식에서는 FCR 1.05 ~ 1.43으로 1.5 이하로 나타났다.

3. 양식기간의 단축효과

SP를 첨가하지 않고 일반사료만 급여한 양식장의 경우는 50마리/kg까지 양성하는데 120일 ~ 140일 걸린다. 그러나 SP를 첨가해 양성할 경우 대하와 흰다리새우 모두 95일 ~ 103일 걸렸다. 따라서 20%이상의 양식기간의 단축효과를 얻었다.

4. 양식 어민의 소득 증대효과

20% 이상의 양식기간의 단축으로 사료비의 절감 등 양식비용의 절감으로 기존 수익률보다 70% 이상 얻을 수 있다. 그리고 동남아시아 등에서는 양식기간이 120일 이상 걸리므로 연간 2회 양식을 하고있다. 그러나 양성기간의 단축으로 연간 3회 이상 양식이 가능하여 연간 수익률을 높일 수 있다.

제 2 절 향후 개선 사항

1. 사료첨가의 편리성

새우의 양식 후기에는 대량의 사료가 투여되므로 대량의 사료에 본 제품을 첨가하기에 매우 불편한 점이 있다. 이를 해결하기 위해 사료 첨가 자동화 장치 개발이 필요하다.

2. 사료 제조용 첨가제품 개발

사료회사에서 사료 제조과정에 첨가하여 특화된 기능성 사료로 개발할 수 있도록 사료회사와 협약을 위한 data 생산과 첨가제제의 개발 필요

3. 분말형 사료첨가제 개발

액상형은 해외 수출시 보관상의 어려움과 운반비용의 부담이 매우 크기 때문에 분말 제재화가 필요하다.

4. 출하 가격 인하

현재의 출하가격은 10만원/18L으로 결정하였지만 출하가격을 인하하기 위해서는 추출용매의 비용이 60%차지하므로 용매의 재활용 방안을 강구하여 원재료 비용을 줄일 수 있는 방법을 개발한다.

제 3 절 적용분야 및 기대효과

1. 어류의 성장 촉진 및 면역 증강제

넙치와 뱀장어의 사료 첨가제로 이용 가능성을 조사하여 어류용 면역증강 및 성장촉진에 적용한다. 넙치 등은 기존의 배합사료로 만든 EP사료는 성장이 느리고 면역력이 떨어진다고 일반어민들이 생각하고 있어서 이를 해결할 수 있다면 넙치 양식장 연안 오염을 줄일 수 있다.

2. 패류의 인공사료 첨가제 개발

전복 등의 복족류 양식에 최근에는 배합사료 사용 비중이 커지고 있다. 그러나 아직 자연산 조류보다 섭이효과가 떨어져 그 기능성을 높이는데 적용할 수 있다. 이에 대한 적용이 가능하게 되면 해조류의 공급이 적은 하계철의 전복양식에 많은 도움이 될 것이다.

3. 새우사료 신제품 개발

세계의 사료시장은 2조원을 상회하고 있으며 해외의 새우양식어민들은 면역증상보다 성장이 빠른 사료를 원하고 있으므로 본 제품을 이용할 경우 성장촉진 사료의 신제품 개발에 적용할 수 있다.

본 첨가제를 첨가할 경우 세계적으로 사료시장을 선점하고 있는 CP사나 Gold coin사 제품보다 성장이 월등하게 뛰어나므로 본 제품을 첨가한 사료 신제품이 개발된 경우 사료시장 석권은 머지않은 장래에 이루어질 것이라고 본다.

제 4 장 문 헌

- Briggs, M., Funge-Smith, S., Subasinghe, R. and Phillips, M. (2004). Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. FAO regional office for Asia and the Pacific publication, Bangkok.
- Bruce, L.D., Redman, R.M., Lightner, D.V. and Bonami, J.R. (1993). Application of gene probes to detect a penaeid shrimp baculovirus in fixed tissue using in situ hybridization. Diseases of aquatic organisms 17, 215-221.
- Carvalho, E.A. and Nunes, Alberto J.P. (2005). Effects of feeding frequency on feed leaching loss and grow-out patterns of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed under a diurnal feeding regime in pond enclosures. Aquaculture

- Chang, C. F., Chen, H. Y., Su, M. S. & Liao, I. C. (2000). Immunomodulation by dietary β -1,3-glycan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology* 10, 505-514.
- Chang, C. F., Chen, H. Y., Su, M. S. and Liao, I. C. (2003). Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology* 00, 1-14.
- Chang, C. F., Su, M. S., Chen, H. Y., Lo, C. F., Kou, G. H. & Liao, I. C. (1999). Effect of dietary beta-1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. *Disease of Aquatic Organisms* 36, 163-168.
- Chang, P.S., Chen, H.C. and Wang, Y.C. (1998). Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization. *Aquaculture* 164, 233-242.
- Fast, A.W. and Menasveta, P. (2000). Some recent issue and innovations in marine shrimp pond culture. *Reviews in fisheries Science* 8, 151-233.
- Han, C. H. and Bae, S. H. (2008). Molecular cloning and expression of the prophenoloxidase mRNA in the fleshly shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. (in press)
- Hennig, O. L., Arce, S.M., Moss, S. M., Pantoja, C. R. and Lightner, D. V. (2005). Development of a specific pathogen free population of the chinese fleshy prawn, *Fenneropenaeus chinensis* Part II. Secondary quarantine. *Aquaculture* 250, 579-585.
- Hennig, O., Itami, T., Maeda, M. Kondo, M., Natsukari, Y. & Takahashi, Y. (1998). Analyses of hemolymph immunoparameters in kuruma shrimp infected with penaeid rod-shaped DNA virus. *Fish Pathology* 33, 389-393.
- Hossain, Md. S., Chakraborty, A., Joseph, B., Otta, S. K., Karunasagar, I., Karunasagar I., (2001). Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. *Aquaculture*

198, 1-11.

- Hsu, P.-I., C.-H. Liu, D.-Y. Tseng, P.-P. Lee, Winton Cheng (2006). Molecular cloning and characterisation of peroxinectin, a cell adhesion molecule, from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology* 21: 1-10.
- Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagaqa, A., Takeno, N., Nishimura, H., Maeda, M. Kondo, M. & Takahashi, Y. (1998). Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture* 164, 277-288.
- Itami, T., Takahashi, Y. Tsuchihira E, Igusa H, Kondo, M. (1994). Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocyte after oral administration of β -1,3-glucan (*Schizophyllum*). In: Chou LM, Munro AD, Lam JJ, Chen TW, Cheong LKK, Ding JK et al., editors. THE third Asian fisheries forum. Manila, Philippines: Asian Fisheries Society, pp.375-8.
- Jiravanichpaisal, P., B. L. Lee, K. So“derha“ll (2006). Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 211: 213 - 236.
- Karoshna, R. R., Rao, K. G., Rao, P. and P. H. Babu. (1997) A catastrophic outbreak of white spot disease virus devastates the Indian shrimp culture industry. *World Aquaculture*, December 14-19.
- Ko, C.-F., T.-T. Chiou, B. Vaseeharan, J.-K. Lu, J.-C. Chen (2007). Cloning and characterisation of a prophenoloxidase from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata*. *Developmental and Comparative Immunology* 31: 12 - 22.
- Lai, C.-Y., W. Cheng, C.-M. Kuo (2005). Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase from haemocytes of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology* 18: 417-430.
- Lee, M.H. and Shiau, S.Y. (2002). Dietary vitamin C and its derivatives affect immune responses in grass shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish*

Immunol 12, 119-129.

- Liao, I. C., Su, M. S., Chang, C. F., Her, B. Y. & Kojima, T. (1996). Enhancement of the resistance of grass prawn *Penaeus monodon* against *Vibrio damsela* infection by beta-1,3-glycan. *Journal of The Fisheries Society of Taiwan* 23, 109-116.
- Lightner, D. V., (1996). The Penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. *J. Appl. Aquacult.* 9, 27-52.
- Linda, M. N., Donald, V. L. (1996) Development of non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J. Virological Methods* 63, 193-201.
- Lo, C. F., Ho, C. H., Chen, C. H., Liu, K. F., Chiu, Y. L., Yeh, P. Y., Peng, S. E., Hsu, H. C., Liu, H. C., Chang, C. F., Su, M. S., Wang, C. H., Kou, G. H., (1997). Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Diseases of Aquatic Organisms* 30, 53-72.
- Lo, C.F., Ho, C.H., Peng, S.E., Chen, C.H., Hsu, H.C., Chiu, Y.L., Chang, C.F., Liu, K.F., Su, M.S. and Wang, C.H., Kou, G.H. (1996). White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of aquatic organisms* 27, 215-225.
- Lu, K.-Y., Y.-T. Huang, H.-H. Lee, H.-H. Sung (2006). Cloning the prophenoloxidase cDNA and monitoring the expression of proPO mRNA in prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) stimulated in vivo by CpG oligodeoxynucleotides. *Fish & Shellfish Immunology* 20: 274-284.
- Namikoshi, A., Wu, J.L., Yamashita, T., Nishizawa, T., Nishioka, T., Arimoto, M., Muroga, K. (2004). Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to whitespot syndrome virus. *Aquaculture* 229, 25-35.
- Nunan, L.M. and Lightner, D.V. (1997), Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV).

- Journal of Virological Methods 63, 193-201.
- Nunan, L.M., Tang-Nelson, K. and Lightner, D.V. (2004). Real-time RT-PCR determination of viral copy number in *Penaeus vannamei* experimentally infected with Taura syndrome virus. *Aquaculture* 229, 1-10.
- Pan, D., He, N., Yang, Z., Liu, H. and Xu, X. (2005). Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. *Developmental and Comparative Immunology* 29, 103-112.
- Pantoja, C.R., Song, X., Xia, L., Gong, H., Wilkenfeld, J., Noble, B. and Lightner, D.V. (2005). Development of a specific pathogen-free (SPF) population of the Chinese fleshy prawn *Fenneropenaeus chinensis* Part 1: Disease pre-screening and primary Quarantine. *Aquaculture* 250, 573-578.
- Preston, N. P., Crocos, P. J., Keys, S. J., Coman, G. J. and Koenig, R. (2004). Comparative growth of selected and non-selected Kuruma shrimp *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* in commercial farm ponds; implications for broodstock production *Aquaculture* 231, 73-82.
- Smith, V. J., Janet H. Brown, Chris Hauton (2003). Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? *Fish & Shellfish Immunology* 15: 71 - 90.
- Soares. R., Wasielesky, W., Peixoto, S. and D'Incao, F. (2005). Food consumption and gastric emptying of *Farfantepenaeus paulensis*. *Aquaculture* 250, 283-190.
- Song, Y. L., Liu, J. J., Chan, L. C. and Sung, H. H. (1997). Glucan-induced disease resistance in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Vaccinology : Developments in Biological Standardization* 90, 413-421.
- Sritunyalucksana, K., L. Cerenius, K. Söderhäll (1999). Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology* 23: 179-186.
- Su, M. S., Liu, K. F., Chang, C. F. and Liao, I. C. (1995). Enhancement of grass prawn *Penaeus monodon* postlarvae viability by beta-1,3-glycan from

- Schizophyllum commune. Journal of Taiwan Fisheries Research 3, 125-132 (in Chinese with English abstract).
- Sung, H. H., Kou, G. H. & Song, Y. L. (1994). Vibriosis resistance induced by glycan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish Pathology 29, 11-17.
- Supamattaya, K., Hoffmann, R. W., Boonyaratpalin, S., Kanchanaphum, P., (1998). Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. Diseases of Aquatic Organisms 32, 79-85.
- Takahashi, Y., Kondo, M., Itami, T., Honda, T., Inagawa, H., Nishizawa, T., Soma, G. I. and Yokomizo, Y. (2000). Enhancement of disease resistance of against panaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, by oral administration of Pantoea agglomerans lipopolysaccharide (LPS). Fish & Shellfish Immunol 10, 555-558.
- Tang, F. J., Lightner, D. V., (2000). Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. Aquaculture 189, 11-21.
- Tang, Kathy F.J., Wang, J. and Lightner, D.V. (2004). Quatitation of taura syndrome virus by real-time RT-PCR with a TaqMan assay. Journal of Virological Methods 115, 109-114.
- Teunissen, O.S.P., R. Faber, G.H.R. Booms, T. Latscha, J.H. Boon (1998). Influence of vaccination on vibriosis resistance of the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). Aquaculture 164: 359 - 366.
- Ueberschaer, Bern, (1999). Die Trypsinaktivitaet als biochemischer Indikator zur Bestimmung des Ernaehrungszustandes sowie der Fressaktivitaet von Fischlarven und seine Anwendung in Feldstudien. PhD Thesis, University of Hamburg. Weissensee Verlag, Berlin 2000, p201, ISBN 3-934479-11-1

- Witteveldt, J., J. M. Vlak, M.C.W. van Hulten (2004). Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. *Fish & Shellfish Immunology* 16: 571-579.
- Yukinori, T., Masakazu K., Toshiaki, I., Teruko, H., Hiroyuki, I., Takeshi, N., Gen, I.S. and Yuchi, Y. (2000) Enhancement of disease resistance against penaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, *Panaeus japonicus*, by lipopolysaccharide(LPS). *Fish & Shellfish immunology*. 10, 555-558
- 한창희 (2000) 대하의 친하관리와 성 성숙조절에 의한 수정란 대량확보기술 개발 (수산특정과제 보고서). 해양수산부, pp168.
- 한창희 (2005) 새우류의 흰반점증후군바이러스(WSSV)에 대한 저항성 물질 개발 (수산특정과제 보고서). 해양수산부, pp141.
- 해양수산부 (2001) 수산통계연보.
- 해양수산부 (2005) 수산통계연보.