

수산특정연구개발사업 (중점과제명)

미생물 발효에 의한 베타글루칸의 대량생산 및 이를 이용한 면역증강용 사료개발 (세부과제명)

Development of mass production process of microbial
 β -glucan and its application to immunestimulatory feed
additives

2005. 07

(주)더멋진바이오텍 더멋진생명공학연구소 (주관연구기관)
부경대학교 사료영양연구소 (협동연구기관)

해 양 수 산 부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “미생물 발효에 의한 베타글루칸 대량생산 및 이를 이용한
면역증강용 사료개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 7 월 15 일

주관연구기관명 : (주)더멋진바이오텍 더멋진생명공학연구소

총괄연구책임자 : 이 인 영

참 여 연 구 원 : 김 미 경, 조 한 영, 김 경 태, 이 재 용, 조 규 전, 김 판 규,
정 경 희, 최 원 아, 박 병 옥, 문 찬 준

협동연구기관명 : 부경대학교 사료영양연구소

협동연구책임자 : 배 승 철

참 여 연 구 원 : 김 강 응, 옥 임 호, 박 건 준, 김 준 형, 왕 소 길, 김 영 철

요 약 문

I. 제 목

미생물 발효에 의한 베타글루칸 대량생산 및 이를 이용한 면역증강용 사료개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

해산어 소비가 급격히 팽창하면서 인공 사육이 집중적으로 이루어지고 있다. 고밀도 인공 양식에서는 자연 상태의 어류에 없었던 질병이 발생하고 집단 폐사의 위험성이 크다. 이를 방지하기 위하여 현재까지 주로 항생제를 빈번하게 사용하였으나, 항생제 잔류의 문제나 내성 균주의 출현으로 점차 사용이 규제되어왔다. 한편, 질병을 미연에 방지하는 목적으로 백신과 면역증가제가 사용되고 있다. 백신은 질병에 특이적인 효과가 있으나 대부분 고가이며 경구투여 제품개발이 필요하다. 반면 면역증가제는 비특이적으로 항병력을 강화하며 어류의 증체를 향상하는 장점이 있다. 베타글루칸은 대표적 면역증강제로 효모 유래 제제가 사용되어 왔으나, 순도가 낮으며 영양 효과는 우수하나 항병력강화 효과는 비교적 미약한 것으로 나타났다. 미생물 이용한 베타글루칸 생산은 분리 정제가 용이하여 고순도의 베타글루칸을 대량 생산 할 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서는 미생물발효에 의한 베타글루칸 대량생산 공정을 확립하고, 이를 이용한 양식어의 질병발생을 억제하고 성장을 촉진할 수 있는 사료첨가제로서의 개발하는 데 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

○ 베타글루칸 대량생산 공정을 확립

- 1) 미생물 발효 공정의 생산성을 증대하기 위하여 돌연변이 방법에 의한 고생산성 균주를 개발하고, 배지를 최적화하고 발효 조건을 확립한다.
- 2) 대량생산을 위한 scale-up 조건을 확립하고 34톤 대형 발효조에서 대량 생산 공정을 확립한다.
- 3) 베타글루칸 분말 생산공정을 확립하기 위하여, 원심분리, 건조, 분쇄조건을 확립하고, 원료의 성분을 분석하여 표준화한다.

○ 베타글루칸의 면역증강효과를 과학적으로 입증

- 1) 베타글루칸의 면역강화 효능을 검증하기 위하여, 넙치 혈액 내 헤마토크리트 및 라이소자임 활성 증가를 조사하였다.
- 2) 에드워드 병원균 공격실험을 통하여 항병력 강화 효과를 조사하였다.

○ 베타글루칸과 성장촉진용 아미노산 복합체로 이루어진 최종 사료첨가제의 설계

- 1) 베타글루칸과 아미노산 혼합제 개발
- 2) 면역증강능, 사료효율 및 증체효과 확인

○ 시제품의 현장적용 시험 및 제품화 연구

- 1) 최종제품의 조성비 결정
- 2) 양식 현장 적용 실험 및 평가

Ⅳ. 연구개발결과

○ 베타글루칸 대량생산 공정을 확립

- 1) 돌연변이주 개발: *Agrobacterium* 속 모균주보다 생산성이 20% 향상된 돌연변이주를 개발하였다 (대한민국 특허 450277)
- 2) 발효 최적화: 탄소원으로는 설탕, 질소원으로는 염화암모늄을 선정하고, 세포성장시기와 베타글루칸 생산시기 (베타글루칸은 질소원이 고갈된 후 생산이 됨)를 나누고, 질

소원이 고갈되는 시점에서 pH를 7.0에서 5.5로 전이하는 이단계 회분식 배양법을 개발하였다. 이 결과 5리터 발효조에서 5일간 배양 후 베타글루칸을 60g/L 이상 고농도로 생산할 수 있었다.

3) Scale-up 기술개발로 베타글루칸 발효공정 확립

*Agrobacterium*은 호기성 균주로 산소 요구도가 크기 때문에 산소전달을 원활히 하기 위하여, 교반속도를 올리거나 (5리터 교반조에서는 700 rpm) 공기 공급을 충분히 (공기부양형 배양기에서 0.75vvm) 하였을때 생산성은 대규모 발효조에서도 큰 차이가 없었다. 이 연구를 위하여 각각 300리터 교반형 발효기, 6톤과 34톤의 공기부양형 발효기 (air lift fermentor)를 사용하였다. 대량생산을 위하여 34톤 발효조를 이용하였다. 플라스크에 균주를 접종하여 24시간 배양하고 7리터 발효조로 전이하여 20시간, 300리터로 전이하여 12시간, 그리고 6톤 발효조에서 15시간 발효한 배양액 3톤을 30톤에서 배양부피를 22톤으

로

하여 온도 30℃, 통기량 0.75vvm으로 하여 배양하였다. 세포성장은 초기 12시간 지속되고 질소원이 고갈되면 세포성장이 중단되고 베타글루칸이 생성되기 시작한다. 최종 120

시

간 배양 후 베타글루칸 농도가 60 g/L를 상회하였다. 배양액 부피는 증발로 20톤 정도로 감소되었으나, 최종 베타글루칸 생산량은 1200kg에 달하였고 이때 설당의 베타글루칸에로의 전환률은 0.42 g/g이었다.

4) 베타글루칸 분말 생산 공정을 확립 :

베타글루칸 분말을 대량으로 생산하기 위해서는 발효액으로부터 베타글루칸의 분리, 건조, 그리고 분쇄 공정이 필요하다. 베타글루칸은 수용액에서 불용성이므로 원심분리에 의해서 상등액으로부터 분리된다. 이를 위하여 decanter 연속원심분리기를 선정하였으며 유속을 300리터/hr로 하여 1기 당 일간 200kg의 베타글루칸을 생산할 수 있으며 이때 수율은 80%를 상회한다. 열풍건조기에서 50℃로 건조한 시료는 경도가 높기 때문에 햄머밀 (hammer mill) 분쇄기가 적합하고, 시간 당 300kg 이상 생산할 수 있었다. 이렇게 조분

쇄

한 시료는 최종적으로 에어밀로 미분쇄한다. 미분쇄된 시료중의 베타글루칸 함량은 75%이며 분말의 입도는 150µm이었다. 이렇게 확립한 공정은 베타글루칸 함량 기준으로 월 2000 kg 이상 대량생산할 수 있다.

○ 베타글루칸의 면역증강효과를 과학적으로 입증

베타글루칸의 면역증강 효과를 관찰하기 위하여 넙치 치어를 대상으로 하였으며, 대조

구와 사료 당 베타글루칸을 0.01%, 0.025%, 0.05%, 0.1%첨가한 실험구를 사용하였다. 베타글루칸을 0.05% 이상 공급한 사료구에서 보체 대체 경로 활성화 (ACH50)과 혈청의 lysozyme 활성화, 그리고 두신 phagocyte의 chemiluminescent (CL) 반응이 가장 높아, 베타글루칸이 비특이적 면역반응을 강화함을 확인할 수 있었다. 베타글루칸이 폐사율 억제 효과가 있는지 알아보기 위하여 *Edwardsiella tarda*를 접종하여 폐사율을 관찰하였다. 대조구에서는 접종 3일 후부터 폐사가 발생하여 6일 이내에 모두 폐사된 반면 베타글루칸을 함유한 실험구에서는 초기 폐사율이 현저히 감소되었으며 0.05% 이상에서는 7일 경과 후에도 30% 이상이 생존하였다. 이상의 결과로부터 베타글루칸이 넙치의 면역력을 증가시키는 효과를 확연히 알 수 있었다.

○ 베타글루칸과 성장촉진용 아미노산 복합체로 이루어진 최종 사료첨가제의 설계

양식어의 면역증강뿐만 아니라 성장촉진을 위하여 사료첨가제 배합에 대한 연구를 하였다. 사료첨가제는 베타글루칸과 케라틴 가수분해물로 구성되었다. 케라틴 가수분해물의 아미노산 조성은 아르기닌, 히스티딘, 이소루이신, 류신, 라이신, 메티오닌, 트레오닌, 발린, 시스틴, 세린, 프롤린 등을 1에서 7% 함유한다. 넙치치어를 대상으로 최종 급이되는 사료 중 베타글루칸 농도를 0.05%에서 0.15%, 아미노산복합체 함량을 0.45%에서 1.35%로 조정된 실험구를 급이하면서, 면역증강, 사료효율, 증체에 대한 연구를 하였다. 혈액 및 혈청의 성분 분석에서 헤모글로빈은 베타글루칸이 첨가된 모든 실험구에서 높았으며 헤마토크리트는 베타글루칸 농도 0.1%이상에서 유의적으로 높았다. 혈청내 GOT양이 베타글루칸 0.1%함유 실험구에서 낮았다. 한편, 베타글루칸을 0.1%에서 0.15%로 하고 아미노산 복합체를 0.9%에서 1.35%한 실험구에서 증체율이 다른 실험구보다 50% 이상 높았으며, 사료효율, 일간성장률, 단백질 전환효율도 높았다. 이상의 결과로부터 최종 사료중 급이되는 베타글루칸 함량은 0.1%, 아미노산 복합체의 함량은 0.9%로 함이 면역력 강화와 증체에 가장 우수할 것으로 판단되었다.

○ 시제품의 현장적용 시험 및 제품화 연구

최종 시제품의 조성은 이차년도 연구 결과를 토대로 베타글루칸과 아미노산 복합체가 면역증강 및 증체에 유효한 농도와 제품의 가격 경쟁력을 고려하여 배합비를 설계하였다. 시제품을 ‘베타맥스’라 명명하고 그 조성은 베타글루칸 10%, 케라틴 가수분해물 50%, 그리고 3등급 밀가루를 40%로 구성하였다. 제주도 M 양식장을 선정하여 넙치양식현장에 적용하였다. 베타맥스를 MP사료내 0.5%를 첨가하여 총 2 실험구를 8반복으로 나누어 6개월간 사육한 결과, 증체율, 일간성장률과 비만도에 있어서 베타맥스 첨가구가 대조구에

비해 유의적으로 높은 결과를 보였다. 헤모글로빈(Hb)과 헤마토크리트(hematocrit)에 있어서 베타맥스 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 높은 결과를 보였다. 육성기 넘치에 있어서 성장 및 사료효율 촉진과 비특이적 면역반응 향상을 위해 면역증강물질과 사료섭취 촉진물질의 혼합제인 베타맥스의 효과를 넘치 양식현장적용이 가능함을 보여주었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

○ 미생물 발효에 의한 생산공정 기술의 활용방안

베타글루칸은 곡류, 효모의 세포벽, 버섯류 등에 존재하는 다당으로서 본 연구과제에서는 미생물발효에 의하여 베타글루칸을 대량생산하기 위하여 고농도 생산균주를 개발하였고, Scale-up공정을 확립하였으며, 현재 자사 공장에서 34톤 발효기를 이용하여 월 2000kg 이상, 완제품 기준으로 40톤 이상을 생산할 수 있게 되었다. 이러한 공정결과는 다당을 포함한 생리활성 물질의 대량생산을 위한 기반기술로 활용될 수 있다.

○ 제품 (면역증강 사료첨가제)의 활용 방안

본 연구개발로 베타글루칸과 아미노산 복합제로 이루어진 새로운 양식어용 면역강화 사료첨가제를 개발하여, 2004년 하반기부터 베타맥스, FC119 등 제품을 출시하였다. 이러한 제품은 기존의 항생제를 대체할 수 있는 면역증강 효과가 높은 경쟁력있는 제품이 될 수 있다. 또한 넘치, 조피볼락 등 해수어 뿐만 아니라 송어, 미꾸라지 등 담수어, 그리고 새우양식에 이르기까지 폭넓게 사용할 수 있다. 향후 다양한 어종 이외에도 동물사료첨가제에서 면역증강제로서 활용을 계획하고 있으며 제품의 확장을 위해 해외시장을 개척하기 위한 노력을 병행하고 있다.

○ 기능성 소재 베타글루칸의 활용방안

최근 건강기능식품의 시장이 빠른 속도로 성장하고 있으며, 국민들의 웰빙에 대한 관심이 높아지고 있다. 본 연구에서 개발한 베타글루칸 소재는 면역활성능이 있는 생리활성 물질로서 효능이 밝혀져 건강기능식품 산업분야에서 기능성 식품소재로의 용도 활용이 가능하다.

S U M M A R Y

I . Title of research

Development of mass production process of microbial β -glucan and its application to immune-stimulatory feed additives

II. The object and need of research

As the consumption of fish for natural food has been expanded, it has been mostly cultivated in house at a high density. Under these conditions, fish diseases quite often occur and might result in a massive death. Antibiotics have been usually used to prevent this dangerous happening. However, the use of antibiotics becomes strictly regulated under the law since the occurrence of antibiotic resistant mutants and remaining of the antibiotics. Vaccines and immune stimulatory substances are the other choices to prevent the disease in advance. The advantage of vaccines is the specific effect on the disease, but they are usually sold at a higher price. It is also needed to develop new types of vaccines which can be administrated orally. On the other hand, immune stimulatory substances are beneficial for fish farming in enhancing nonspecific defence mechanisms against diseases, consequently increasing body weight. β -Glucan is one of the typical immune stimulatory substances, and it has been mostly obtained from the extract of the cell wall of yeasts. In this study, firstly, we attempted to develop mass production system of β -glucan by using bacterial microorganisms, which belong to *Agrobacterium* species. Microbial fermentation system is good tools for obtaining large quantity of β -glucan at a higher content since microbial β -glucan is extracellularly accumulated in the broth, enabling the separation process much easier. Main objective of the study is to verify the immune stimulatory activity of β -glucan and to develop a new effective feed additive enhancing immune activity and health of aquatic organisms. We believe that this work gives an impetus to increase the market of immune stimulatory feed

additives and provides good fish farming conditions with the product to aquafarming land.

III. Scope and contents of research

- Development of mass production process of β -glucan
 - 1) Development of high producing mutant strains by the mutation technique, and optimization of fermentation media and conditions to increase of productivity of β -glucan by microbial fermentation process
 - 2) Establishment of scale-up processes and mass production of β -glucan in a 34 ton scale air-lift fermenter
 - 3) Development of separation, drying, and milling conditions of β -glucan, and standardization of the raw material of β -glucan powder
- Verification of immune stimulatory effect of β -glucan
 - 1) Examination of weight gain, feed efficiency, specific growth rate, and protein efficiency rate for olive flounder fed with β -glucan diet
 - 2) Observation of hematological and serological characteristics, and lysozyme activities of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) to examine immune stimulatory effects
 - 3) Examination of cumulative mortality after intraperitoneal injection of *Edwardsiella tarda*
- Development of feed additives consisted with β -glucan and amino acid complex for enhancing growth
 - 1) Design of composition ratio of β -glucan to amino acid complex
 - 2) Examination of weight gain, feed efficiency, and immune stimulatory effects
- Field test with the newly developed feed additives (BetaMax), and production of final product
 - 1) Formulation design of final product
 - 2) Field tests of the product in aquafarms cultivating olive flounder in CheJu island and Wando island

IV. Results

○ Development of mass production process of β -glucan

1) Mutant strain: We developed a mutant strain, which showed a higher β -glucan production than the parent strain, *Agrobacterium* sp. ATCC31750. A maximum β -glucan concentration of 76 g/l was obtained in 120 h of cultivation with the mutant strain, while the parent strain produced 64 g/l under the same condition.

2) Fermentation optimization: Sucrose and ammonium chloride were chosen as efficient carbon and nitrogen sources, respectively, for the production of β -glucan. Two-step fed-batch fermentation technique was designed in which biomass was first produced, followed by β -glucan production which was stimulated by nitrogen limitation. pH was controlled at 7.0 at the cell growing stage, and shifted to 5.5 at the time of nitrogen limitation.

3) Mass production of β -glucan in 34 ton air-lift fermenter

The oxygen transfer rate is a crucial factor in the scale-up of the fermentation since *Agrobacterium* sp. is a strict aerobic bacterium and β -glucan inhibits oxygen transfer at its higher concentration. When a 34 ton scale air lift fermenter was used for the β -glucan production, air was supplied at aeration rate of 0.75vvm. Under the optimized condition, β -glucan concentration was as high as 60 g/l in 120 h operation. Final production amount of β -glucan was 1200kg by one batch fermentation and conversion ratio from sugar was 0.42 g β -glucan/g sucrose.

4) Development of β -glucan powder production process

As β -glucan is insoluble in aqueous solution, it can be separated from culture broth by centrifugation. When a decanter type of continuous centrifuge was used, 200 kg of β -glucan a day was obtained with a higher than 80% recovery yield at the flow rate of 300 l/hr. β -Glucan paste was dried in a hot air dryer at 50°C. It is powdered with a hammer mill at a production rate of 300 kg/hr. Fine powder with particle size of 100–200 μ m was obtained by using air mill. With this process, the production amount of β -glucan powder having 75% purity was more than 2000 kg/month.

- Verification of immune stimulatory effect of β -glucan
 - 1) Weight gain and feed efficiency of fish fed $G_{0.1}$ (0.1% β -glucan) diet were significantly higher than those of fish fed control diet.
 - 2) Chemoiluminescence and lysozyme activity of fish fed $G_{0.1}$ diet were significantly higher than those of fish fed control diet.
 - 3) Fish fed $G_{0.1}$ diet showed a significantly lower cumulative mortality than did fish fed control diet.
 - 4) These results implies that dietary supplement with β -glucan enhances the non-specific defense mechanism and increase the resistance to disease infection.

- Development of feed additive consisted of β -glucan and amino acid complex for enhancing growth

Not only for the stimulation of immune system of fish but also enhancement of fish growth, we studied composition of feed additive consisted of β -glucan and amino acid complex (keratin hydrolyate). Feed additive composition varied as follows: β -glucan concentration ranging from 0.05% to 0.15% and amino acid complex concentration ranging from 0.45% to 1.35%. The levels of hemoglobin and hematocrit in the blood serum of fish fed with 0.1 % β -glucan were significantly higher than those without β -glucan. On the other hand, weight gain, feed efficiency, and specific growth rate of the sample fed with β -glucan ranging from 0.1% to 0.15% and amino acid complex ranging from 0.9% to 1.35% were at least 50% higher than those of the other groups tested. From this result, it was concluded that feed additive composed of 0.1% β -glucan and 0.9% amino acid complex was significantly efficient for both enhancing immune system and increasing weight gain.

- Field test with the newly developed feed additives (Betamax), and production of final product

Final product named as 'BetaMax' composed with β -glucan 10%, keratin hydrolyate 50%, and wheat powder 40%. Field tests of the product were carried out over 6 months in aquafarms cultivating oliver flounder in CheJu island and Wando island. BetaMax 5 kg was mixed with 1000kg of moist pellet (MP) feed

diet. Weight gain and, specific growth rate, levels of hemoglobin and hematocrit of fish fed with BetaMax were significantly higher than those with the control group. In conclusion, BetaMax developed in this study was proven as an efficient immune stimulation feed additive for olive flounder farming, revealing a high potential in the market.

CONTENTS

Summary	7
Contents	12
Chapter 1 Overview	16
Section 1. Introduction	16
Section 2. Needs for the study	31
Section 3. Objective and research contents	35
Chapter 2 R&D status	37
Section 1. Study of R&D examples	37
Section 2. Analysis of R&D status	38
Chapter 3 Scope and Results	41
Section 1. Development of high producing mutant strains	41
Section 2. Optimization of medium and fermentation conditions	45
Section 3. Mass production of betaglucan in a 34 ton air-lift fermenter	59
Section 4. Process development of betaglucan powder and its composition analysis	63
Section 5. Immunestimulatory effect of betaglucan	65
Section 6. Development of a feed additive composed of betaglucan and amino acid comple	76
Section 7. Field tests of BetaMax in oliver flounder aquaculture farms	85
Chapter 4 Purpose achievement and expected contributions	108
Section 1. Purpose achievement	108
Section 2. Expected contributions	11

Chapter 5	Application plan of results	-----115
Section 1.	Application of fermentation technology	-----115
Section 2.	Expansion of usage of the immunestimulatory feed additive	--115
Section 3.	Application of the betaglucan in other fields	-----115
Chapter 6	References	-----119

목 차

제출문	1
요약문	2
Summary	7
Contents	12
목 차	14
제 1 장 연구개발과제의 개요	16
제 1 절 서 론	16
제 2 절 연구개발의 필요성	31
제 3 절 연구개발의 목표 및 내용	35
제 2 장 국내외 기술개발 현황	37
제 1 절 연구사례의 조사	37
제 2 절 세부기술사항의 검토분석	38
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	41
제 1 절 고효율 발효균주 개발	41
제 2 절 베타글루칸 생산을 위한 배지 및 발효공정 최적화	45
제 3 절 34톤 공기부양식 발효조에서의 베타글루칸 대량생산	57
제 4 절 베타글루칸 분말의 제조공정과 성분분석	63
제 5 절 베타글루칸의 면역증강 효과	65
제 6 절 베타글루칸과 아미노산 복합제로 구성된 첨가제 개발	76
제 7 절 베타맥스의 양식 현장적용 실험	85
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	108
제 1 절 목표달성도	108
제 2 절 기대효과	111

제 5 장 연구개발결과의 활용계획-----	115
제 1 절 미생물 발효에 의한 생산공정 기술의 활용방안-----	115
제 2 절 면역증강 사료 첨가제의 보급확대-----	115
제 3 절 절 여러 분야에서 기능성 소재로서의 활용방안-----	115
제 6 장 참고문헌-----	119

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 서론

1. 개요

전세계 양식용 배합사료의 총 생산량이 1999년도 약 3,000만 톤으로 보고 되었으며(FEED INTERNATIONAL, 2000), 주요 수산식품(어류, 갑각류 및 연체동물)의 양식생산량이 1999년에 약 3330만 톤(FAO, 2000)임을 감안한다면 양어용 배합사료 개발의 산업적 수요는 실로 엄청난 규모가 아닐 수 없다.

어류양식에 있어서 종묘생산 기술 및 고밀도 사육기술이 진보함에 따라 우리나라에서는 조피볼락을 비롯하여 넙치, 방어, 참돔, 돌돔 및 자주복 등 여러 어류의 생산이 이루어지고 있으며, 시험연구 단계인 어종을 포함한다면 종묘생산 혹은 양식대상 어종은 현재 40여종 이상을 헤아린다. 그러나, 이들 어종의 종묘생산 및 양성과정에 있어서 첫째로, 낮은 사료 섭취로 인한 성장저하 및 사료유실로 인한 수질오염, 둘째로, 고밀도 사육과 같은 인위적 양식환경으로 인한 수많은 세균성 질병, 바이러스성 질병 및 기생충성 질병 등이 커다란 문제로 대두되고 있다. 하지만, 양식어류의 성장을 촉진시킴과 동시에 사료유실을 최소화 하기 위한 사료섭취촉진물질에 대한 연구가 미비한 실정이다. 또한 현재의 질병 대책으로서는 예방보다 발생 후에 항생제 및 여러 종류의 화학약품 등을 사용한 치료에 급급하고 있으며, 이와 같은 약제의 남용으로 어류에게 스트레스를 주어 면역반응을 감소시킬 뿐만 아니라 환경오염 및 병원체의 내성 증가의 문제와 나아가서는 이러한 어류를 섭취하는 인체에도 나쁜 영향을 줄 수 있는 가능성 등의 많은 문제점을 가지고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해서 면역증강과 사료 섭취 촉진을 위한 사료첨가제에 대한 검색이 어종별로 이루어져 어류의 성장촉진과 면역증강을 위한 첨가제 개발이 시급히 이루어져야 한다. 또한 질병예방을 위한 백신법(vaccination)과 비특이적 면역반응 증강법 (immunostimulation of nonspecific immune response)에 대한 연구가 뒷받침되어야 한다. 백신은 질병에 대한 저항성을 증가시키는 매우 효과적인 방법으로 하나의 질병에 대한 특이적 면역반응만을 생겨나게 하고 있다. 그러나, 현재까지 성공적으로 개발된 어류질병 백신은 거의 없으며, 가격도 사용하기에 너무 비싼 단점이 있다. 반면에 어류의 비특이적 면역반응을 증강시키는 것은 많은 종류의 어류 질병에 대한 저항성을 높일 수 있다는 의미에서 매우 중요하며, 비특이적 면역반응의 증진을 통해 양식

어류의 질병을 예방하기 위한 면역증강물질(immunostimulant)에 대한 평가가 최근 들어 많은 연구자들에 의해 평가되어지고 있다.

그러므로, 어류에게 성장 및 사료효율을 높이기 위한 사료섭취촉진제와 질병에 대한 저항성 향상 및 면역증강을 위한 양어용 사료 첨가제의 개발이 우선적으로 이루어져, 원활한 종묘생산의 공급뿐만 아니라, 국내 양식산업이 국가 식량 기간산업으로 발전할 수 있는 토대가 될 수 있기를 기대한다.

2. 사료 섭취 촉진 물질

어류에 있어서 섭취 촉진 물질들은 각 어종마다의 먹이생물의 엑기스에 보편적으로 존재하는 아미노산, 핵산관련화합물, 유기산, 당류 등이다. 예를 들면 잉어는 누에의 번데기와 지렁이 엑기스에서, 줄복은 모시조개 엑기스에서, 쏘롱개는 실갯지네 엑기스에서 섭취 촉진 물질들을 검색할 수 있다. 이러한 사료섭취를 촉진하는 물질은 분자량이 1,000 미만인 수용성 물질로서 이온 흡착 기능을 가진 성분으로 알려져 있으며, 섭취촉진 물질의 특성과 관련하여 복어의 섭취촉진 물질은 비휘발성의 저분자물질이다. 무지개 송어에 대한 오징어 추출물의 주요 자극 물질은 아미노산 혼합물로서, 대부분 L-형의 아미노산이 자극제로 작용한다. 또한, 섭취촉진 물질의 종류에 있어서는 대부분 염기성 아미노산, 인지질 및 몇 가지 핵산관련물질은 미꾸리, 전복, 방어에 대하여 사료섭취촉진 효과를 가지는 것으로 알려져 있다.

가. 아미노산

동일어종에서도 검색에 이용했던 엑기스 및 검색 방법 차이에 의해 활성 아미노산을 찾는 것이 다소 문제가 있지만, 각각 어종의 먹이생물 엑기스 중에 다량으로 존재하는 아미노산들을 단독 또는 혼합 병용함으로써 높은 섭취촉진 활성이 얻어지는 것으로 보고되고 있다. 벤자리, 줄벤자리, 감성돔, 참돔, 줄복은 먹이 생물의 엑기스 중에 많이 함유되어 있는 Gly, Ala, Pro, Arg 등에서 섭취촉진 효과가 나타났다. 차넬메기는 아미노산이 강한 사료섭취촉진 효과를 갖는 것이 밝혀졌는데, 가장 효과적인 아미노산인 Ala과 Arg에 대한 침지농도(浸漬濃度, immersion)가 $10^{-11} \sim 10M^{-9}$ 으로 나타났으며, 줄복에서도 Gly에 대한 침지농도(浸漬濃度, immersion)가 $10^{-6} \sim 10^{-5}M$ 으로 나타났다. 참돔의 자어에서 사료내 0.5%의 Ala, Gly, Ser 혼합, Ala, Ser 혼합, Ala, Gly 혼합 등 아미노산 혼합시에 단일 아미노산 첨가구나 첨가하지 않은 구에 비해 성장과 생존율에서 효과가 있는 것으로 나타났다. 넙치의 자어에서도 Ala, His혼합, Leu, Gly 혼합, Ala, Ser

혼합, Ala, Gly 혼합, Ala, Val 혼합 등 2가지 아미노산 혼합시에 단일 아미노산 첨가구나 첨가하지 않은 구에 비해 성장과 생존율에 효과가 있는 것으로 나타났다. 돌돔 치어에서는 Ala, Gly, Ser 혼합, Ala, Ser 혼합구가 성장 및 유인효과가 있는 것으로 나타났다. 뱀장어에서는 사료내 Ala, Gly, Pro, His, UMP(uridine monophosphate)혼합을 하였을 때, 첨가하지 않은 구에 비해 섭취의 활성이 높을 뿐만 아니라 당대사 효소활성의 증대에도 효과가 있었다.

나. 핵산관련 물질

현재까지 각종 어류에 대한 먹이 액기스 중에서 검색·동정된 섭취자극 물질로서 핵산관련 화합물을 Table 1에 나타내었다. 뉴클레오타이드인 IMP(inosine monophosphate)는 방어, 전갱이, 참돔, Tubot(가자미의일종) 등의 육식성어류에 대해 유효하며, 이들 어류가 선호하여 섭취하는 어육과 오징어육 액기스 중의 주요성분이다. 지금까지 IMP의 대부분의 침지농도(浸漬濃度, immersion)시 농도는 10^{-4} ~ 10^{-3} M의 범위이다. 이들 이외에도 ADP(adenosine diphosphate)가 참돔에서 UMP(Uracil monophosphate)가 뱀장어에 대해 Inositol은 Tubort과 솜뱅이에서 각각 높은 섭취자극 활성을 나타내었다. 전갱이에서 사료중의 IMP의 농도와 활성의 크기와의 관계를 조사한 결과 활성을 최대한 높이는 데에 필요한 사료중의 농도는 0.8mM/100g 사료였다(Fig. 1). 이 농도는 전갱이 근육 액기스 중의 농도와 일치하였다.

Table 1. 먹이 생물의 액기스 중에 포함된 어류의 섭취자극 핵산관련 물질

대상 어종	먹이생물 액기스	섭취자극물질
방어	어육	IMP
전갱이	어육	IMP
참돔	해안갯지네	IMP, ADP
솜뱅이	오징어근육	Inositol
Turbot(가자미의 일종)	오징어근육	Inositol, IMP
뱀장어	참갯지렁이	UMP

※ 자료 : 細川秀毅 et al.(1976, 1978)

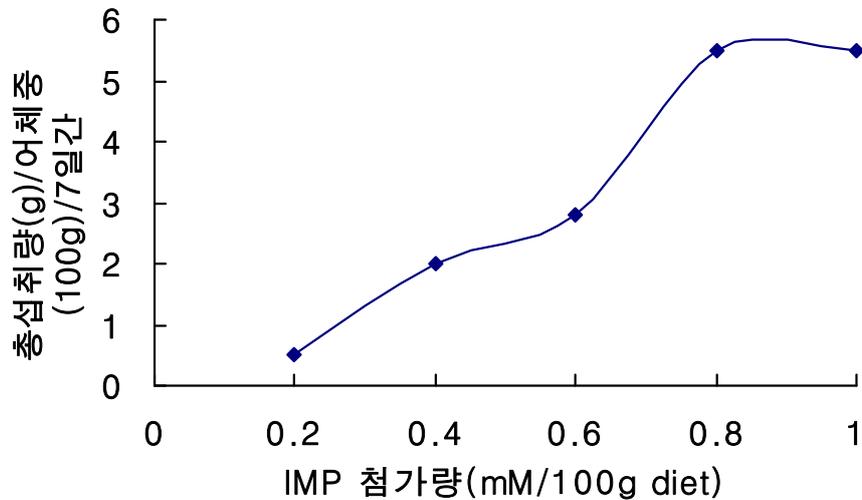


Figure 1. IMP의 첨가량과 그 섭취자극 활성

※ 자료 : 池田靜徳(1981)

다. 유기산

모노카본산인 개미산, 초산, 프로피온산, 부틸산, 길초산, 카프론산 등의 자극효과가 메기 (*Silurus asotus*), *Atalantic Salmon*, 갈문망둑, 뱀장어, 잉어에서 확인되고 있다. 대략적으로 자극효과는 탄소쇄(炭素鎖)의 길이와 관계하며, 긴 측쇄를 가질수록 큰 반응이 유발되었다. 침지농도(浸漬濃度, immersion)는 뱀장어에서 가장 낮고, 프로피온산에서 $10^{-7} \sim 10^{-6}M$ 의 범위에 있었다. 뱀장어의 경우 아미노산에서도 예민하게 반응하며, 수용기는 카본산과 아미노산에서 다르다는 것이 시사되고 있다. 잉어에서는 디카본산인 옥살산, 마롱산(밤산), 호박산, 글루탈산도 $10^{-3}M$ 에서 강한 자극효과가 있었다. 한편 줄벤자리는 구연산, 호박산, 프로피온산, 유산, 옥살산 등의 $10^{-4}M$ 에서 거의 효과가 없었다. 방어에서도 푸말산과, 사과산, 옥살산이 $10^{-4}M$ 에서 효과가 없었다. 따라서 유기산에 대한 감수성에서도 어종별로 특이성이 달라나타는 것으로 판단된다.

라. 당 류

미꾸라지와 방어에 대해 당류(단당류, 이당류, 당알콜과 배당체)의 섭취유인효과가 계통적으로 조사되었다. 그 결과 두 어종에서 공통적으로 유인효과를 보였던 당류는 Fructose와 배당체인 글리틸리틴, 스테비오사이드, 레버디오시드와 피로글루틴이었다. 또한 미꾸라지에 대해서는 레버디오시드가, 방어에 대해서는 글리틸리틴이 가장 효과적인 섭취촉진물질이었다. 담수어인 잉어, 메기, 참붕어, 차넬메기는 Sucrose에 대해 침지농

도(浸漬濃度, immersion)는 상당히 높아 10^{-3} M 이상에서 유인효과가 나타났다. 또한 잉어는 Glucose와 Fructose에서도 그 유인효과가 나타났으며, 참붕어에서는 이들 당류에 더하여 Mannose, Maltose, Galactose에서도 유인효과가 나타났다. 하지만, 쏘중개, 대구, 줄복, 방어등의 해산어에서는 당류의 첨가 효과가 없는 것으로 나타났다.

마. 기 타

줄복과 Pinfish (*Lagodon rhomboides*)에서 섭취 촉진효과가 밝혀지고 있는 Betaine은 그대부분의 물고기에서 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 침지농도(浸漬濃度, immersion)도 상당히 낮으며, 줄벤자리에서는 10^{-8} ~ 10^{-7} M였다. 기타 사료 섭취 촉진물질로는 다양한 염류, 퀴닌, 탄산가스 등이 있다.

3. 면역 증강 물질

어류의 면역 시스템은 기본적으로 포유류와 비슷하다. 세포적인 방어시스템의 경우 경골어류는 T와 B같은 림프구뿐만 아니라 대식세포(macrophages), 호중구(neutrophils, 백혈구의 일종), natural killer cell과 유사한 식세포를 가지고 있다. 그리고 경골어류는 보충물질로서 lysozyme, 용혈소(hemolysin, 적혈구의 구조의 파괴로 적혈구에서 헤모글로빈을 유리시키는 물질), 트랜스페린(transferrin, 혈청 β -글로불린), C-reactive protein과 같은 포유동물의 방어 기작을 가지고 있다. 또한 인터페론(interferon), 인터류킨-2(interleukin-2), 대식세포 활성화 요인들과 같은 사이토카인(cytokines, 면역반응의 강도와 지속시간을 조절)의 존재가 보고 되고 있다. 일반적으로, 면역증강물질(클루칸, 락토페린(lactoferrin), 레바미솔(levamisole, 구충제의 일종), FK-565, Chitin, EF203 등)로 처리된 어류에서 식세포활성의 증대를 보인다. 식세포의 활성화는 식균작용, 제거, 주화성에 의해 감지 될 수 있다. 병원균 제거가 면역증강물질로 처리된 어류의 대식세포에서 하는 가장 중요한 일이다. 대식세포의 병원균 제거 메카니즘은 호기성과 혐기성 조건으로 크게 나뉘어 질수 있다. 호기성 종들(reactive oxygen species, ROS)에 의해 중재되는 호기성 병원균제거 메카니즘은 화학발광이나 NBT test (Sakai *et al.*, 1995e)에 의해 감지될 수 있다. 특히 최근들어 대식세포에서 세포내 병원체를 제거하는 질화성 종들(reactive oxygen species, RNS)의 중요성이 알려지고 있다. 그러나 면역증강물질에 처리된 어류의 대식세포내 RNS의 활성화에 대한 보고는 아직 알려지고 있지 않다. 면역증강물질은 콘카나발린 A(concanavalin A, 유사분열물질) 또는 지다당류(lipopolysaccharides)에 의해 유도된 유사분열촉진인자(mitogen)의 활성을

증대시키고 대식세포 활성 인자들을 제공한다. Li & Lovell(1985)과 Hardie (1991)는 비타민 C를 충분히 섭취한 어류에서 면역보조인자의 활성이 증가하였다고 보고하였다. lysozyme 활성은 면역증강물질의 처리에 의해 영향을 받고(Engstad *et al.*, 1992), natural killer cell은 성장호르몬(growth hormone, GH)(Kajita *et al.*, 1992a)과 레바미솔(Kkajita *et al.*, 1990)에 의해 활성화될 수 있음이 여러 연구에 의해 밝혀지고 있다. 일반적으로 항체생산은 많은 면역증강물질에 의해 증대될 수 있다. 예를 들어, 효모글루칸을 주사한 차넬메기는 *Edwardsiella ictaluri*에 대한 면역반응에 있어서 대조구와 비교하여 높은 serum 항체농도를 보였다. Aakre 등(1994)는 *Aeromonas salmonicida* bacterin과 효모글루칸을 주사한 대서양연어에서 항체반응을 증대시킨다고 보고하였다. *A. salmonicida* bacterin에 대한 항체반응의 증대는 Vitamin C와 Fk-565(Kitao *et al.*, 1987)의 관리에 의해 이루어진다는 보고도 있다(Tompson *et al.*, 1993). 현재 연구된 어류와 패류에 효과적인 면역증강물질에 대한 내용이 Table 2에 나타나 있다. 이러한 면역증강물질은 화학물질과 박테리아구성소, 다당류, 동물·식물 추출물과 영양성요인과 사이토카인 등을 포함한다.

가. 합성 화합물

(1) 레바미솔 (Levamisole)

레바미솔은 인간과 동물에 있어 선충류 감염을 치료하기 위해 이용되는 구충제의 일종으로 다양한 질병에 대한 저항성을 증대시키는 효과가 있다는 사실이 보고되고 있다. 포유류에 있어서 레바미솔은 호중구(neutrophils, 백혈구의 일종)의 대사활성과 식세포활성을 증대시키고 식세포와 백혈구의 수, 혈청 내 lysozyme의 수준을 증대시킨다. 동물연구에 있어서도 종양(tumor)면역에 촉진효과가 있다고 보고되고 있다(Filder & Spitler, 1975). 그 예로 MFCA(Modified Freud's complete adjuvant)와 혼합한 레바미솔을 주사한 연어에 있어서 *A. salmonicida*에 대한 저항력이 증대되었고(Olivier *et al.*, 1985), 레바미솔을 주사한 잉어에서 호중구내 식세포와 미엘로페록시다아제(myeloperoxidase, 화학반응을 촉매하는 산화환원 효소)의 활성이 증대되었으며 백혈구수와 혈청 내 lysozyme 수준이 증가하였다는 보고가 있다 (Siwicki, 1989). 또, 레바미솔을 주사한 무지개송어에서 식세포 활성, 백혈구의 케밀루미네스칸스(Chemiluminescence, 화학발광) 반응과 백혈구에 의한 natural killer cell 활성화 등과 같은 비특이적 면역반응의 증대에 의해 야기되는 *Vibrio anguillarum*에 대한 저항력의 증가가 관찰되었다(Kajita *et al.*, 1990). 레바미솔을 주사한 무지개송어에서 보조인자의

농도가 증가하였다. 또, 레바미솔은 생체 외(시험관 내)에서 면역반응을 촉진시킬 수 있

Table 2. Immunostimulants used in fish and shrimp

Synthetic chemicals	<ul style="list-style-type: none"> • Lavamisole • FK-565 • MDP(Muramyl dipeptide)
Biological substances	
(1) Bacterial derivatives	<ul style="list-style-type: none"> • β-glucan • Peptidoglycan (<i>Brevibacterium lactofermentum</i>; <i>Vibrio</i> sp.) • FCA • EF203 • LPS(lipolysaccharide) • <i>Clostridium butyricum</i> cells • <i>Achromobacter stenohalis</i> cells • <i>Vibrio anguillarum</i> cells (Vibrio vaccine)
(2) Polysaccharides	<ul style="list-style-type: none"> • Chitin • Chitosan • Lentinan • Schizophyllan • Oligosaccharide
(3) Animal and plant extracts	<ul style="list-style-type: none"> • Ete (Tunicate) • Hde (Abalone) • Firefly squid • Quillaja saponin (soap tree) • Glycyrrhizin (licorice) • Keratin Hydrolysis • Smoke Natural Flavor, SNF
(4) Nutritional factors	<ul style="list-style-type: none"> • Vitamin C • Vitamin E
(5) Hormones, cytokines and others	<ul style="list-style-type: none"> • Lactoferrin • Interferon • Growth hormone • Prolactin

※ 자료 : Masahiro Sakai(1999)

다. 레바미솔로 배양된 생체 외 spleen 세포의 면역이 식세포활성과 NBT반응, 식세포의 활성을 증대시키고, *Yersinia ruckeri*에 저항력을 가지는 형성세포의 수를 증대시킨다는 것은 이미 보고된 바 있다(Siwicki, 1990). 경구투여와 침지투여(물속에 담구어 투여)에 의한 레바미솔의 면역 촉진 효과 또한 보고되어 왔다(Siwicki, 1989). 레바미솔의 경구투여는 혈청내 백혈구의 수와 lysozyme 활성을 증가시키고 NBT의 감소와 식세포의 식세포 지수를 촉진시킨다. 예를 들면, 잉어를 레바미솔로 수조에 침지농도(浸漬濃度, immersion)를 10 μ g/ml로 24시간 동안 하였을 때, *Aeromonas hydrophila*에 대한 저항력이 증대되고 식세포의 주화성, 식세포활성, 화학발광작용이 증가되었다(Baba et al., 1993). 또한 레바미솔 5 μ g/ml용액에 30분간 무지개 송어를 침지농도(浸漬濃度, immersion)하였을 때 비특이적 방어 메카니즘과 특정 항체 모두가 증대하였다(Jeney & Anderson, 1993b).

그러나, 어류에서 적절한 레바미솔의 면역증강 효과를 얻기 위해서는 적정농도를 규명하는 것이 필요하다. Kajita 등(1990)은 높은 농도(5mg/kg)의 레바미솔을 주사한 무지개송어는 적정농도(0.1~0.5mg/kg)를 주사한 개체에 비해 간의 백혈구에서 화학발광 반응을 촉진시키지 못하였다고 보고하였다. 이와 같은 현상은 비브리오에서도 발견되었다. 어류에서 레바미솔의 면역증강효과는 명확히 입증된다. 그러나 레바미솔의 안정성에 대한 사항 (특히 높은 농도에 대한 것)은 여전히 숙제로 남아 있고 규명되어야 할 것이다.

(2) FK-565

FK-565 (heptanoyl- γ -D-glutamyl-(L)-meso-diaminopimelyl-(D)-alanine)는 *Streptomyces olivaceogriseus*의 배양으로부터 분리된 락토일테트라펩타이드 (lactoyl tetrapeptide, FK-156)와 관련된 펩타이드이며, 쥐에서 미생물감염에 대한 활성을 나타낸다. FK-565를 주사한 무지개송어에서 *A. salmonicida*에 대한 저항성이 증가하고 뒤이어 식세포의 활성이 나타난다는 것이 증명되었다. 식세포의 활성은 또한 방어에서도 관찰되었다. 무지개송어에게 FK-565가 혼합된 *Y. ruckeri* 또는 *A. salmonicida*를 이용하여 면역처리를 실시하였을 때 비장의 항체 생산 세포의 수와 체액의 항체 적정농도를 증가시킬 수 있다.

나. Bacterial derivatives

(1) MDP

mycobacterium으로부터 추출한 MDP (Muramyl depeptide, N-acetyl-muramyl- muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine)는 면역자극제에 대한 영향을 나타낸다(ex: 쥐들의 보체 alternative pathway, B 림프구와 대식세포의 활성화). coho salmon에 MDP와 modified Freund's incomplete adjuvant를 혼합 주사했을 때 *A. salmonioida*에 대한 저항이 47배 증가하였다는 보고가 있다. MDP-Lys를 무지개송어의 복막 내에 주사하면 *A. salmonioida* 감염되었을 때 송어의 저항력뿐만 아니라 식세포의 활성화와 respiratory burst, 신장 내 백혈구의 이동 활성을 증가되었다. 게다가 MDP-Lys를 주사한 어류의 혈청은 신장 세포의 군집 형성을 자극하였다.

(2) LPS

LPS (lipopolysaccharide)는 그람음성균의 세포벽 성분으로 B세포 증식을 자극하는데, 참돔에 LPS (lipopolysaccharide)를 주사하여 Macrophage phagocytic activity가 향상된 것이 증명되었다(Salati *et al.*, 1987). MacArthur 등(1985)은 LPS (lipopolysaccharide)를 주사한 넙치(*Pleuronectes platessa*)에 대식세포 이동활성이 증가된다는 것을 보고했다. in vitro에서 LPS (lipopolysaccharide)는 대서양 연어의 macrophage내 super oxide anions의 생산과 phagocytosis를 자극한다. 마찬가지로 LPS (lipopolysaccharide)는 goldfish의 lymphocytes내 macrophage activating factor의 생산과 catfish monocytes내 interleukin 1 like molecules의 생산을 자극한다.

(3) FCA

치사된 *Mycobacterium butyricum*을 함유하는 광물질 보조약인 FCA(Freund's complete adjuvant)는 면역 반응을 강화시키고 어류에서 백신접종의 효능을 증대시킨다. Olivier 등 (1985)은 FCA를 주입한 coho salmon(*O. kisutch*)에서 *A. salmonicida*의 감염에 대한 방어력이 증대되었다고 보고하였다. FCA는 *A. hydrophila*와 *V. ordalii*의 감염에 대해서도 방어력을 증대시키고, 면역학적으로 어류 내에 macrophage (phagocytosis와 killing)의 활성으로 인해 *A. salmonicida*에 대한 저항력이 증대되었다. Adams 등(1988)도 FCA를 주사한 무지개송어의 furunculosis, vibriosis와 redmouth disease에 대한 방어력이 증대된다고 보고했다. Kajita 등(1992a)는 FCA를 주사한 무지개송어는 respiratory burst, phagocytic과 leucocytes의 natural killer cell activity가 증가하고, *V. anguillarum* infection에 대한 방어도 증가한다는 것을 확인하였다. 그러나 Kawakami 등(1998)은 어류 내에 *P. piscida* vaccine에 대해 FCA의 보

조효과가 보고 되었지만, yellowtail은 *P. piscida*의 감염에 대해 저항성이 증가되지 않는다고 보고하였다.

(4) *Vibrio bacterin*

V. anguillarum bacterin은 연어 류에 있어 가장 효과적인 백신으로 주사, 경구투여와 약욕에 의해 이용될 수 있다. Sakai 등(1995c)는 *V. anguillarum* bacterin solution에 침지시킨 무지개송어는 *streptococcus sp.* 감염에 대한 방어력이 증가한다는 것을 보고하였다. Norqvist 등(1989)도 *V. anguillation*을 물게 희석하여 무지개송어를 침지시키면 *A. salmonicida*의 감염에 대한 방어력이 증대한다고 보고했다. 그러나 *P. piscicida*에 감염된 방어에서는 어떠한 *V. anguillarum* bacterin의 면역자극도 나타나지 않았다. vibrio bacterins의 면역자극 영향은 Kuruma prawns에서도 보고 되었다. Itami 등(1989)는 새우(prawns)에게 vibrio bacterins을 주사 또는 침지시켜 30일 후 vibrio에 감염되었을 때 치사량이 감소된다고 보고했다. Horne 등(1995)도 tiger shrimp내에 vibrio vaccines의 효과를 보고했다. vibrio bacterin을 처리한 집단의 hemocytes의 migration은 대조군에 비해 증가되었다(Itami *et al.*, 1989). 이러한 사실은 무척추동물인 prawn과 shrimp내 vibrio bacterin에 대해 면역자극이 되어 종 특이적 면역반응을 가지지 않는다. *V. anguillarum* cells의 components가 어떻게 비특이적 면역반응을 자극하는지 아직까지는 알 수 없다. 그러나 bacterial LPS(lipopolysaccharide)처럼 비특이적 면역반응(특히 macrophage activation)을 자극하고 *V. anguillarum* LPS(lipopolysaccharide)는 면역자극제 역할을 할 것으로 사료 된다.

(5) *A. stenohalic* and *C. butyricum*

*A. stenohalis*는 바닷물에서 분리될 수 있는 호기성 그람음성 유기물이다. 이 bacteria의 LPS(lipopolysaccharide)는 쥐의 대식세포와 B-림프구를 활성화하며 항암 효과를 나타낸다(Chang 1966). Kawahara 등(1994)는 비활성화된 *A. stenohalis*를 주사한 white-spotted char(*Salvelinus leucomaenis*)는 신장세포의 화학발광반응과 보체 활성이 향상되었고 *A. salmonicida*의 감염에 대한 방어력이 증가되었다. butyric acid bacterium(*C. butyricum*)은 인간의 장내에 microflora를 예방하기 위해 임상적으로 이용되어 왔고 사람의 설사, 변비, 복부의 팽창에 이 bacterium의 포자를 경구투여하여 치료해왔다. *C. butyricum*은 대식세포와 natural killer cells의 자극과 같은 면역자극적 영향을 보여주었고, *Candida*의 감염에 대해 방어력을 증가시켰다. Sakai 등(1995e)은 식작용을 포함하고 백혈구 활성화에 의해 중재되는 *C. butyricum* bacterin의

경구 투여에 의해 무지개송어 내에 vibriosis에 대한 저항력이 증가되었고 과산화 이온 생산이 증가되었다고 보고했다. Sakai 등(1995e)는 무지개송어 내에 *C. butyrium* bacterin을 경구투여 하여 식작용을 포함한 백혈구 활성화와 과산화 이온 생산이 증가되어 vibriosis에 대한 저항력이 증가된다고 보고했다.

(6) 키틴과 키토산(chitin and chitosan)

키틴은 어떤 균류의 세포벽과 갑각류와 곤충 외골격의 중요한 구성요소인 다당류이다. Sakai 등(1992)는 키틴을 주사한 무지개송어는 대식세포 활성이 자극받아 *V. anguillarum* 감염에 대한 저항이 증가한다고 보고했다. 키틴을 주사한 방어에 비특이적 면역반응이 증가되는 것과 대조적으로, 키틴이 첨가제로서 영향이 없다는 것이 쥐와 guinea pig에서 증명되었다. de-N-acetylated인 chitosan도 면역자극 영향이 있다고 보고 되었다. 키토산을 경구투여한 무지개송어에서처럼 키토산 용액을 주사 또는 약육한 Brook trout에서도 *A. salmonicida*의 감염에 대한 저항력이 증가되었다고 보고 되었다. 키토산을 주사 또는 약육한 무지개 송어는 혈액 내 면역학적인 인자(예 : NBT, potential killing activity, myeloperoxidase, 총 Ig 농도)가 증가한다고 보고 되었다.

(7) EF203

EF203은 chicken egg의 발효산물이다. 무지개송어에게 EF203을 경구투여하면 식작용과 화학발광과 같은 백혈구의 활력을 증강시키고, Streptococcus의 감염에 대해 저항력이 증가한다. Sakai 등(1995)는 EF203 첨가없이 백신처리된 어류와 백신처리하지 않은 어류와 비교해서 EF203와 salmoninarum으로 백신처리된 송어에서 높은 식세포 활성화와 신장 내 백혈구에서 NBT responses를 보였다고 보고했다. 그러나 백신처리된 어류의 serum agglutinating antibody titers는 EF203군과 대조군 사이에 큰 차이는 없었고, EF203으로 백신처리된 어류가 *R. salmoninarum*에 감염되었을 때 다른 집단에 비해 생존율이 약간 높았다.

(8) Glucan

Glucan의 면역증강에 대한 효과는 많이 연구되었다. glucan의 여러 가지 형태에 관한 영향은(예: yeast glucan, peptide-glucan, β -1,3-glucan) 어류에서 세밀히 조사되었다. 이러한 글루칸중 yeast glucan은 가장 널리 연구되었다. *Saccharomyces cerevisiae*의 세포벽에서 추출한 yeast glucan(β -1,3- and β -1,6-linked glucan)을 대서양 연어의 복강 내 주사한 결과 *V. anguillarum*, *V. salmonicida*, *Y. ruckeri*에

대한 저항이 증가한다고 보고했다. 그러나 Thompson 등(1995)는 yeast glucan을 주사한 무지개송어에서는 *V. anguillarum*의 감염에 대한 저항력이 증가되지 않는다고 보고했다. yeast glucan은 침지(immersion)와 경구(oral) 투여방법에 의해 적용이 되었다. Raa 등(1992)는 대서양 연어에 yeast glucan을 경구투여하면 *V. anguillarum*과 *V. salmonicida*에 대한 저항력이 증가되었다고 보고했다. yeast glucan solution(0.5, 1mg/l)에 immersed(침지)한 Tiger shrimp는 *V. vulnificus*의 감염에 대한 방어가 증가되었다고 보고했다. 차빌메기에서 yeast glucan을 주사하면 *E. ictaluri*에 대한 방어가 증가되었지만, 경구투여 했을 때에는 동일한 효과가 나타나지 않았다. yeast glucan에 대한 adjuvant 영향도 증명되었다. *A. salmonicida* vaccine와 yeast glucan을 주사한 대서양 연어에서는 항체반응이 향상되었고 yeast glucan 없이 vaccines된 것보다 furunculosis에 대한 방어가 상당히 증가되었다. yeast glucan을 단독으로 주사하면 protection이 나타나지 않았다. Baulny 등(1996)은 *V. anguillarum*에 침지한 turbot에 yeast glucan을 경구투여 한 것은 bacterin 단독처리구에 비하여 저항력이 증가한다고 보고했다. 상기의 실험처럼, yeast glucan을 단독으로 처리하면 *V. anguillarum*의 감염에 대한 저항력이 증가하지 않는다. yeast glucan은 대서양연어, 무지개송어, turbot에 있어서 lysozyme활성과 보체 활성화에 대한 효과가 관찰되었으며, 무지개송어, 대서양연어, 메기에 있어서는 대식세포의 살균작용에 대한 효과, 무지개송어, tiger shrimp, 메기, 대서양연어에 있어서는 대식세포, 혈구에 의한 과산화물의 생산을 증가시키는 효과가 관찰되었다. *schizophyllum commune*로부터 유래되는 β -1,3 glucan(VST)도 질병에 대한 저항력을 증가시킨다. VST를 주사 또는 경구투여한 coho salmon은 *A. salmonicida*에 대한 저항력이 증가된다고 보고되었으나 glucan 용액에 침지한 chinook salmon은 저항력이 증대되지 않는다고 보고되었다. Ainsworth 등(1994)는 VST를 섭취한 메기는 혈청내 lysozyme 활성이 증가하지 않은 반면에 대식세포에 의해 과산화이온의 생산이 증가되어서 *E. ictaluri*에 감염되었을 때 사망률이 감소된다고 보고했다. 게다가 antibody titers가 증가했음에도 불구하고 *E. ictaluri* bacterins에 대한 glucan의 보조 효과는 나타나지 않았다. peptidoglucan은 *Brevibacterium*으로부터 얻을 수 있으며, 방어가 *Enterococcus seriosa*에 감염되었을 때 식작용을 증대시켜 면역력을 증강시키는 효과를 나타낸다(Itami *et al.*, 1996). peptidoglucan은 무지개송어(Matsuo and Miyazano, 1993)에서 vibriosis, black tiger shrimp(Boonyaratpalin *et al.*, 1995)에서 yellow head baculovirus에 대한 효과를 나타낸다. Sigma(Jeney and Anderson, 1993b), Lentinan, Schizophyllan, Scleoglucan(Yano *et al.*, 1989)에 의해 공급되는 glucan의 효능은 무지개송어, 잉어, 방어, 새우 등에서 증명되었다.

다. 동물과 식물의 구성분

(1) 동물 추출물

일부 무척추동물로부터의 추출물은 면역증강효과를 나타낸다. 해양 피막동물로부터 추출물인 *Ecteinascida turbinata* (Ete)와 전복 (*Haliotis discus hannai*)으로부터 추출한 당 단백질의 조각(Hde)은 생체 내 종양세포의 괴사를 증강시키고 생체 외 종양의 성장을 억제한다(Sigel *et al.*, 1970). Ete를 주사한 뱀장어는 식작용이 강화되었으며 *A. hydrophila* 감염시 생존율이 향상되었다(Davis and Hayasaka, 1984). 그러나, Stanley 등(1995)은 Ete를 주사한 차널메기에서 면역증강효과가 관찰되었지만 *E. ictaluri*에 감염된 후의 생존율이 Ete를 주사한 차널메기에서 감소하였다는 것을 증명하였다. Hde를 주사한 무지개송어에서 또한 식세포와 natural killer 세포의 활력이 강화된 것을 볼 수 있었고, *V. anguillarum* 감염에 대한 생존율의 증가를 보여주었다(Sakai *et al.*, 1991). 또, firefly squid로부터의 가열추출물인 *Watasenia scintillans*은 무지개송어에서 과산화물 이온의 생산, 대식세포와 생체 외 림프구의 림프아구로의 형질전환에 의한 살균작용과 같은 면역증강효과를 나타내었다 (Siwicki *et al.*, 1994).

(2) Glycyrrhizin

항염증, 항종양의 활성을 가진, 그것의 면역변조 활성에 의해 전달되는 glycyrrhizin은 한 분자의 글리시레티닉산을 함유하는 글리코실레이트 사포닌이다(Wada *et al.*, 1987) Edahiro 등(1990)은 glycyrrhizin을 경구투여한 방어는 비록 혈액의 lysozyme 활성과 대식세포의 식작용 활성이 강화되지는 않았지만 *E. seriola*의 감염에 대한 저항력이 증가되었음을 보고하였다. 그러나, Jang 등(1995)은 glycyrrhizin으로 생체 외에서의 투여는 대식세포의 respiratory burst activity와 무지개송어에 있어서 림프구의 proliferative response를 증강시켰음을 보고하였다.

(3) 다른 면역증강제들

대두단백질을 경구투여한 무지개송어에서 백혈구의 활동(식작용, 살균작용과 과산화물 생산)이 증가됨을 보여준다(Rumsey *et al.*, 1994). *Y. ruckeri* 백신을 첨가한 Quil A 사포닌에 용액에 무지개 송어를 약육처리 하였을 때 생체 외 살균작용 활성을 증대시켰다(Grayson *et al.*, 1987). Ninomiya 등(1995)은 Quil A 사포닌의 경구투여는 방어에서 백혈구의 이동을 증가시킨다고 보고하였다. PS-K(단백질 결합형태의 다당), *Spirulina*, 어류 단백질 가수 분해물로부터 분리한 산 펩티드의 면역증강 효과가 킬라피

아(*Oreochromis niloticus*), 차넬메기와 대서양 연어에서도 보고 되고 있다.

라. 비타민 등 사료 내 영양소

사료 내 비타민 C는 정상적인 성장과 대부분의 어류에서 몇 가지 생리적인 기능에 필수적으로 요구된다(Halver, 1989). 사료 내 높은 수준의 비타민 C함량은 차넬메기(Li & Lovell, 1985)에서 *Edwardsiella tarda*와 *E. ictaluri* 감염, 무지개송어에서 *V. anguillarum*, IHN과 *Ichthyophthirius multifiliis*에 대한 감염, 대서양 연어에서 *A. salmonicida*와 *V. salmonicida*의 감염에 대한 저항력의 증가에 효과가 있다고 보고 되었다(Erdal *et al.*, 1991). Li & Lovell(1985)은 많은 양의 비타민 C 투여가 메기와 대서양 연어에서 보체 활성을 증가시켰다고 보고하였다. 반면, Yano 등(1998)과 Liu 등(1989)은 메기와 참돔에서 그러한 효과가 관찰되지 않았다고 보고하였다. 대서양연어(Thompson *et al.*, 1993), turbot(Roberts *et al.*,1995)에서는 대식세포의 활성화가 관찰되었다. Hardie 등(1991)은 많은 양의 비타민 C를 어류에 투여했을 때 림프구 급증에 따라 대식세포의 활성을 증대시킨다고 보고하였다. 이러한 결과는 다량의 비타민 C (1000mg/kg이상)를 섭취한 어류에서 protective immune response를 나타내기 때문인 것으로 알려졌다. 비타민 E는 또한 포유류에서 체액과 세포의 면역기능을 강화한다. Blazer & Wolke(1984)가 보고하기를 비타민 E가 결핍된 사료를 먹인 무지개 송어에서 specific, cell-mediated immunity 그리고 대식세포의 식작용이 모두 감소하였다고 하였다. 게다가, Hardie 등(1990)은 비타민 E가 결핍된 사료를 먹인 대서양 연어는 상업 사료를 먹은 어류와 비교하여 *A. salmonicida* 감염에 따라 사망률이 유의하게 증가하였다고 보고하였다. Wise 등(1993)은 많은 양의 비타민 E를 먹인 메기에서 phagocytic indices와 백혈구에 의한 과산화 이온의 생성이 증가되는 것을 보여주었다. 지질, 다른 비타민, 미량 원소와 같은 다른 사료 내 사료원들은 어류에서 면역반응에 영향을 끼칠 수 있다. 어류에서 사료 내 면역반응의 중요성이 검토되고 있다.

마 호르몬, 시토카인 및 기타

(1) 호르몬

GH주사는 무지개송어에 있어서 *V.anguillarum*에 대한 저항력을 증가시킨다. Prolactin(PRL) 역시 면역 증강 효과를 나타낸다. Sakai 등(1996b)의 보고에서 동종의 PRL을 chum salmon *Oncorhynchus keta*에 투여하였을 때 lymphocyte mitogenic 반응을 유발시킨다고 하였으며 PRL은 무지개송어의 백혈구를 통하여 과산화이온의 생산을 증가시킨다고 하였다(Sakai *et al.*, 1996a). Sakai 등은 또한 β -endorphin이 무지개송어 백혈구의 식세포 작용을 활성화시킨다고 보고하였다.

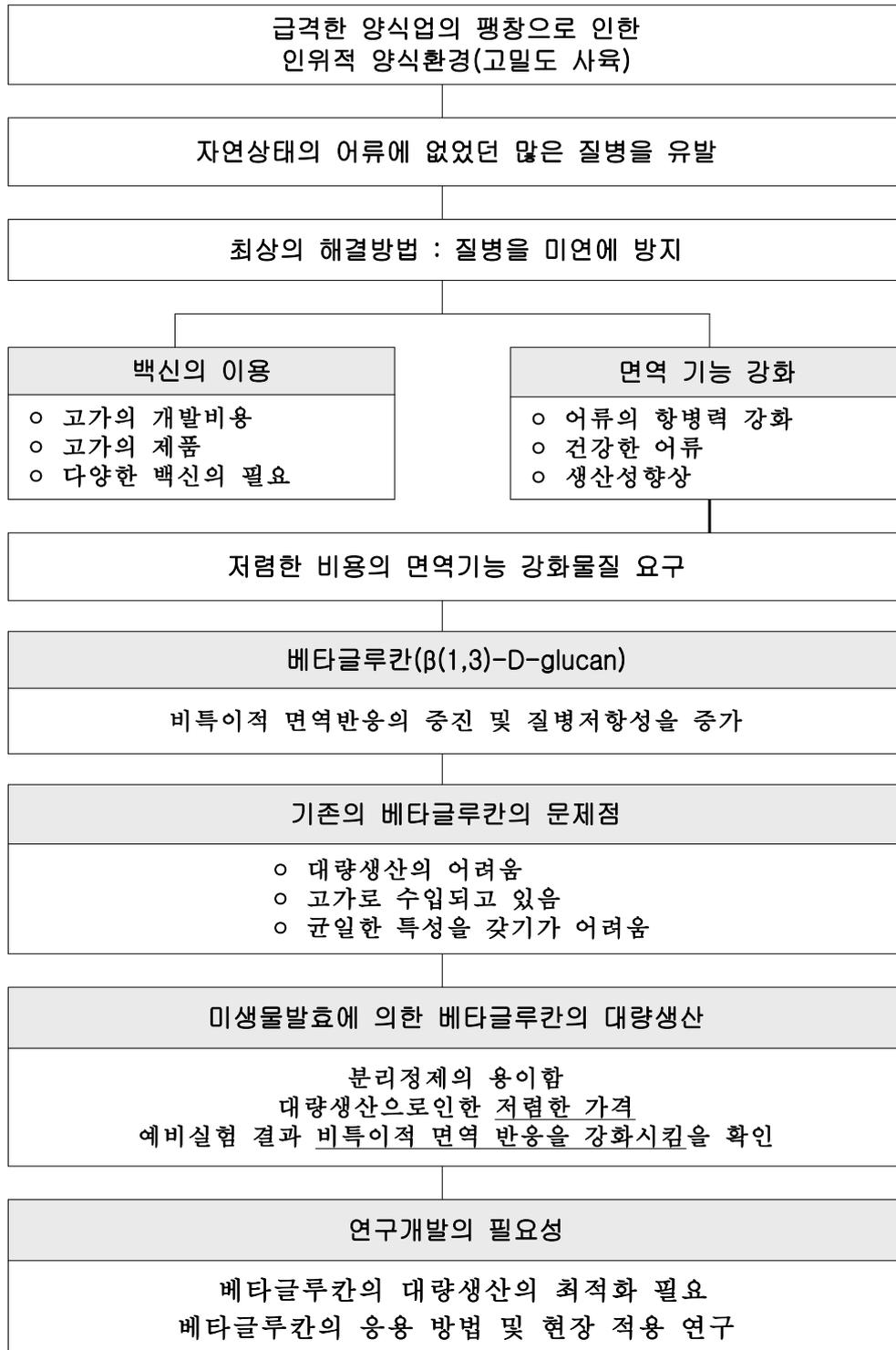
(2) Cytokines

사이토킨은 면역체계에 있어서 조절자 역할을 하는 polypeptide 또는 glycoprotein이다. 어류에 있어서 몇몇 사이토킨의 존재가 보고된 바 있다(Secombes *et al.*, 1996). interleukin 2와 같은 사이토킨의 구조는 일찍이 보고된 바 있으며(Tamai *et al.*, 1992), 몇몇의 사이토킨은 면역증강제로 이용될 수 있다. Tamai *et al.*, (1993)은 Japanese flatfish *Paralichthys livaceus*에서 생산된 recombinant interferon-like protein이 hiramherhabdovirus에 의한 EPC 세포의 감염을 억제시킨다고 보고하였다. 비록 사이토킨의 면역증강물질로서의 이용은 위에서 언급한 Tamai 등(1993)의 연구밖에 없지만 사이토킨은 그 구조가 규명되고 값싸게 공급될 수 있다면 강력한 면역증강물질로써 유용하게 쓰일 수 있을 것이다.

(3) Lactoferrin

락토페린은 single peptide의 사슬로 구성되어 있으며 약 87,000의 분자량을 가지는데 각 분자마다 2개의 Fe-binding site를 가지며 포유류의 모유에서 흔히 발견된다. 많은 생물학적 기능이 락토페린에 기인하는데 항병원체 효과(Arnold & Brewer, 1980), Fe 흡수의 조절(Kawakami *et al.*, 1988) 그리고 macrophage의 성장촉진(Amberuso and Johnston 1981) 등이 보고된 바 있다. Sakai *et al.*(1993)은 무지개 송어에 있어서 소의 락토페린을 투여한 실험에서 식세포활동의 증강과 대식세포에 의한 과산화이온의 생산, *V.anguillarum*에 대한 높은 저항력(40-fold increase in LD50), *Streptococcus sp.*에 대한 저항력의 증가 등을 보고 하였다. 최근 Kakuta and Kurokura(1995)는 참돔에게 락토페린을 투여했을 때 granulocyte 수의 증가와 혈액내 백혈구의 증가, 몸의 점액분비물 증가, *Cryptocaryon irritans* 감염에 대한 저항력증가 등에 효과가 있다고 보고하였다.

제 2 절 연구개발의 필요성



1. 기술적 측면

- 대표적인 면역증강물질로서 펩티드 글리칸, 세균, 효모, 버섯, 식물의 세포벽을 구성하는 물질인 베타글루칸 등이 알려져 있다.
- 베타글루칸의 면역기능 강화에 의한 어류의 질병 예방 효과 규명되고 있음
- 현재 경구투여에 의한 어류의 면역증강제로서 가장 많이 연구되어 있음
- 비특이적 면역반응의 증진 및 질병저항성을 증가시켰다는 보고가 많음.
- 면역 증강 반응에 대한 더 많은 검증이 필요
- 어종에 따른 작용기전 규명이 필요
- 투여량 및 투여기간의 차이
- 병원성 세균의 종류에 따른 저항성 여부 조사

2. 경제·산업적 측면

- 세계적으로 수산양식업의 생산 및 공급이 증가할 것으로 예상
- 국내의 양식생산량이 점차적으로 급속히 늘어나고 있음
- 고밀도 사육과 같은 인위적 양식환경은 많은 질병 발생을 유발함으로써 막대한 경제적 손실을 초래하고 있음
- 면역기능 강화에 의한 질병 예방으로 경제적 손실 최소화
- 성장, 사료효율 및 생존율의 향상으로 양식의 생산성을 증대
- 폐사를 줄임으로써 양식경영비의 절반 이상 되는 사료비의 절감

3. 사회·문화적 측면

- 우리나라는 세계 2위 수산물 소비국
- 광우병과 구제역에 따른 양식어류의 수요 증가 예상
- 부족한 수산물을 양식생산으로 충당해야 함
- 양식산업은 식량 안보 차원에서 보호 육성되어야 함
- 친환경적인 양식의 필요 >> 항생제 사용의 규제 강화
- 열악한 환경 속에서도 건강한 (깨끗한) 어류의 양식 방법이 개발되어야 함

4. 국내·외 관련연구의 현황과 문제점

가. 외국의 경우

포유류를 비롯한 다른 동물에서 뿐 아니라 어류에 있어서도 잉어, 무지개 송어, chinook salmon, 차넬메기, 대서양연어 등에 베타글루칸을 투여함으로써 포유류의 경우와 마찬가지로 비특이적 면역계를 활성화시킨다고 보고 되어지고 있다.

나. 국내의 경우

효모의 세포벽으로부터 생리활성 성질을 갖는 베타글루칸과 만노프로테인을 생산, 이것을 사료제품의 첨가제로 이용(산학협동재단 지원사업, 1996~1998), 보리로부터 추출한 베타글루칸을 투여하여 면역기능 활성화에 의한 어류질병 피해를 감소시키면서 생산성을 향상시키고자 하는(국립수산진흥원, 1997~1999) 등의 연구과제가 수행된 바 있다. 뿐만 아니라 베타글루칸 투여에 의해 조피볼락, 메기 등의 세균 감염증에 대한 저항성을 나타낸다는 연구결과들이 몇 차례 보고 된 바 있다.

5. 조사연구개발사례에 대한 평가

위에서 기술한 여러 연구들은 대부분 효모의 세포벽이나 보리로부터 분리된 시약용 시료를 사용한 것이며, 제품화된 것들도 효모나 곡물의 발효를 통한 것들이다. 따라서 이러한 연구들은 베타글루칸이 면역증강능 사료첨가제로써 가지는 효과를 뒷받침할 수는 있으나, 대량생산에는 문제가 있는 것이다.

따라서 본 과제를 통해서 수행하고자 하는 베타글루칸은 대량 생산이 가능하며 이미 예비실험을 통해 면역증강능은 확인되었으며 본 연구를 통해 그 효능을 면밀히 밝히고 제품화하는 것은 연구 가치가 크다고 할 수 있겠다.

6. 앞으로 전망

- 고밀도 사육과 같은 인위적 양식환경은 많은 질병 발생을 유발
- 친환경적인 양식의 요구 >> 항생제 사용의 규제 강화
 - >>> 항생제 사용절감으로 위생적인 어류를 생산해야 함
- 항생(균)물질의 과대 사용 규제 시 이를 대체할 물질을 시장에서 찾고 있음
- 이것을 해결할 수 있는 것은 면역증강제임
- 질병 예방을 위한 면역기능 강화제에 대한 요구가 증가하고 있음

- 현재 번역기능 강화제 중에서는 베타글루칸이 시장에 통용되고 있음
- 경쟁력 있는 가격에 공급된다면 시장은 급격하게 증가할 것으로 예상됨

7. 기술도입의 타당성

- 현 단계에서는 외국 기술은 잘 알려져 있는 몇 어종을 제외한 대부분의 연구가 초기 단계에 머물러 있을 뿐만 아니라 어종의 특이성에 따른 제품의 개발이 필요하므로 국내 어종에 적합한 제품 및 사용 방법 등을 개발하여야 하므로 기술도입의 타당성은 매우 낮다.

제 3 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 최종 목표

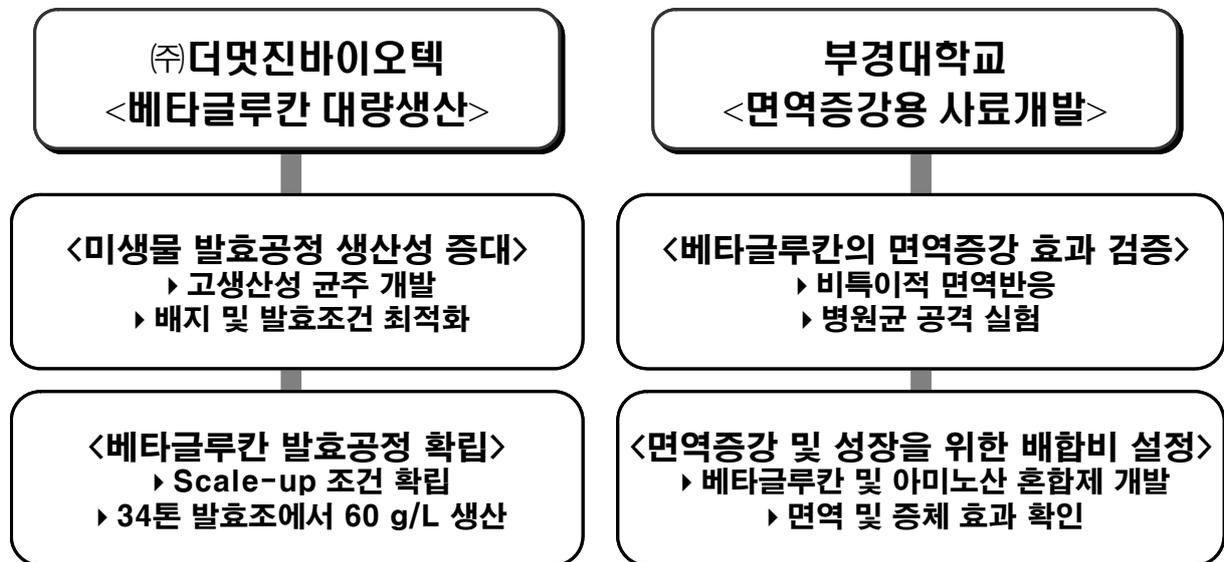
- 베타글루칸의 경제적인 생산
- 베타글루칸의 사료첨가제로의 가공법 확립
- 베타글루칸의 급이 방법 최적화 프로그램 개발
- 면역증강효과를 과학적으로 입증하여 사료첨가제로서의 상품 가치를 극대화
- 이상의 결과를 종합하여 양식농가의 생산경쟁력을 강화하고 소득을 높이는데 기여

2. 연차별 연구개발목표와 내용

구 분	목 표	내용 및 범위
1차 년도 (2001년)	<p>기초 연구 단계:</p> <p>1) 베타글루칸의 대량생산 및 글루칸 원료 가공법 확립</p> <p>2) 면역반응 기초자료 확보</p>	<p>1) 발효공정의 생산성증대 : - 발효효율 개선, 후처리 공정 확립 - 대규모 발효 (34톤) 최적화</p> <p>2) 넙치에서의 면역 증강효과 규명 - 베타글루칸의 적용 실험 - 제품용 부형제의 영향 평가</p>
2차 년도 (2002년)	<p>응용 연구 단계:</p> <p>1) 최종 제품 개발</p> <p>2) 제품의 급이 방법 결정</p>	<p>1) 최종제품의 조성비 결정 : - 최종제품(생장촉진용 부형제 포함)의 조성비 결정</p> <p>2) 제품의 급이 방법 연구 - 육성기 및 성장기에 대한 적용 - 장기간 급이 시 면역능 조사</p>
3차 년도 (2003년)	<p>사업화 단계:</p> <p>1) 최종제품의 현장 적용 및 상품화</p>	<p>1) 최종 제품 생산 : - 제품화 공정 확립 및 시장 진입</p> <p>2) 현장 적용 - 양식현장 적용 실험 - 배합사료에 첨가한 실험 수행</p>

3. 추진전략 및 방법

제품의 개발 및 생산은 (주)더멋진바이오텍에서 수행하고 어류의 영양 및 사양 실험은 전문적인 기술을 겸비한 연구팀으로 구성된 부경대학교 사료영양연구소와 협력하여 수행한다. 본사는 발효를 전문으로 하는 생명공학 벤처로서 제품의 생산에 필요한 미생물 발효생산 공정을 제공하고 본 연구 수행에 필요한 다양한 문헌자료, 정보 및 노하우 (know-how)를 보유한 부경대학교와 공동 연구를 수행하게 될 것이다.



면역증강 사료개발 및 현장검증실험



면역증강용 사료개발

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 연구사례의 조사

1. 외국의 경우

포유류를 비롯한 다른 동물에서 뿐 아니라 어류에 있어서도 잉어, 무지개 송어, chinook salmon, 차넬메기, 대서양연어 등에 베타글루칸을 투여함으로써 포유류의 경우와 마찬가지로 비특이적 면역계를 활성화시킨다고 보고 되어지고 있다.

2. 국내의 경우

효모의 세포벽으로부터 생리활성 성질을 갖는 베타 글루칸과 만노프로테인을 생산, 이것을 사료제품의 첨가제로 이용(산학협동재단 지원사업, 1996~1998), 보리로부터 추출한 베타 글루칸을 투여하여 면역기능 활성화에 의한 어류질병 피해를 감소시키면서 생산성을 향상시키고자 하는(국립수산진흥원, 1997~1999) 등의 연구과제가 수행된 바 있다. 뿐만 아니라 베타 글루칸 투여에 의해 조피볼락, 메기 등의 세균 감염증에 대한 저항성을 나타낸다는 연구결과들이 몇 차례 보고 된 바 있다.

3. 조사연구개발사례에 대한 평가

위에서 기술한 여러 연구들은 대부분 효모의 세포벽이나 보리로부터 분리된 시약용 시료를 사용한 것이며, 제품화된 것들도 효모나 곡물의 발효를 통한 것들이다. 따라서 이러한 연구들은 베타글루칸이 면역증강능 사료첨가제로써 가지는 효과를 뒷받침할 수 있으며, 현재 수행하고자 하는 베타글루칸과는 상이한 것으로 그 효능을 면밀히 밝히고 제품화하는 것은 연구 가치가 크다고 할 수 있겠다.

제 2 절 세부 기술사항의 검토분석

1. 국·내외 기술수준 비교표

기 술 사 항	국 내	국 외(선진국)
면역증강제의 사용방법	중	상
베타글루칸의 생산기술	중	상
양식장 사양에서의 응용 기술	중	상

2. 공정단위별로 주요 기술사항 및 그 기술수준의 분석평가

- 가. 외국의 경우 : 주로 효모에서 분리하며 단순한 제품의 생산공정이 정립되어 있음
 나. 국내의 경우 : 국내에서 생산되는 제품은 전무한 상태임

3. 기존 공정방법, 기술의 사례

가. 기술적인 평가 :

효모나 곡물로부터 베타글루칸을 정제하는 것은 공정이 여러 단계로 이루어져 순수하게 얻는데 어려우며 특히 효모 세포벽은 극히 견고하고 소화하기 어려워 가축이나 어류의 글루칸 이용율이 낮은 단점이 있다. 이를 해결하기 위해서는 화학적·생물학적으로 분해해야 하고 글루칸을 효율적으로 분리하여 흡수되기 쉬운 형태로 만들어야 하나, 본 연구를 통해서 개발되는 공정은 세포 밖으로 분비되기 때문에 분리 정제가 용이하다.

나. 경제적인 평가 : 제조원가, 기술수준 등

기존의 베타글루칸은 정제공정의 어려움 뿐 만 아니라 함유량이 적은 성분을 추출 정제하는 공정이 필요하므로 고가로 공급될 수밖에 없는 실정이다. 이에 비하여 본 제품의 공정은 제조원가가 저렴한 공정이라 할 수 있다.

다. 산업기술에 미치는 파급효과 분석

베타글루칸을 경제적인 가격으로 생산하고 이를 현장에서 사용하기 위한 이용 기술이 확립되면 국내의 양식을 질병의 공격으로부터 보호하여 양식 농가에 소득을 증대 시킬 수 있을 것으로 기대됨은 물론 배합사료의 원료로서 첨가된다면 국내 사료회사의 국제경쟁력이 강화되리라 예상된다.

4. 주요 관련기술의 검토

본 제품을 생산하기 위한 발효 기술은 매우 높은 수준이며 생산된 베타글루칸을 이용한 현장 적용 및 연구실 수준도 충분히 제품을 개발 완성시킬 수 있음

5. 특허 및 기술도입과의 중복여부에 대한 검토·분석

가. 관련기술의 특허내용과 차이점 비교

면역증강능을 가지는 베타글루칸을 사료첨가제로 이용한 특허들은 대부분 효모(일본 특개평10-229831)와 곡물(JP-11511012)에서 얻어진 것으로, 효모 세포벽이 극히 견고하고 소화하기 어려워 가축이나 어류의 글루칸 이용율이 낮은 단점이 있다. 이를 해결하기 위해서는 화학적·생물학적으로 분해해야 하고 글루칸을 효율적으로 분리하여 흡수되기 쉬운 형태로 만드는 방법들(대한민국 특허공개번호 1999-028736)이 보고되어 있으나, 함유량이 적은 성분을 추출 정제하는 공정이 필요하므로 고가로 공급될 수밖에 없는 실정이다.

나. 관련기술도입 내용과 차이점 비교

본 연구에서 사용되는 베타글루칸은 박테리아가 체외로 분비하는 것으로 그 생산효율이 매우 뛰어나며 발효 후 분리공정이 간단하여 보다 값싸게 적용 가능하게 할 수 있다.

6. 원재료에 대한 검토 분석

가. 원재료에 관련된 국내·외 기술의 현황분석 및 전망

최근 우리나라에서도 축산동물이나 양식어에 사용되는 항균성물질에 대한 잔류문제가 법적으로 대두되면서 항생제의 사용이 제한될 전망이며, 백신 또한 어종간의 면역시스템과 질병에 대한 감수성 또는 저항성이 각기 다르므로 기본적으로 종마다 독자적인 백신을 개발해야 하는 단점이 있다. 따라서 면역증강제를 사용하여 숙주의 비특이적인

면역체계를 강화함으로써 항병력을 증강시키려는 시도가 불가피하다. 이러한 면역증강제제 중 베타글루칸이 대두되고 있으며, 노르웨이에서 MacroGard (KS Biotec-Machymal) 등의 베타 글루칸을 이용한 양어용 사료 첨가제를 판매하고 있으며, 우리나라의 배합사료회사(우성사료 등)에서도 효모 발효로부터 생산된 펩티도 글루칸이나 올리고당을 양어용 사료에 첨가하고 있다. 그러나 이들은 효모의 세포벽으로부터 얻은 베타 글루칸을 상품화한 것으로 그 가격이 비싸다 (수입판매가격 베타글루칸 kg 당 가격이 100,000원).

7. 산업계 현황

가. 제품의 발전주기 (product life cycle)로 볼 때

- (1) 생산하려는 제품이 세계시장에서 현재 어느 상태에 있으며
 - (2) 생산 또는 수출을 시작할 때에 동 제품이 선진국에서는 어느 상태에 있을 것인지
- 각 각 다음의 커브위에 (1), (2)로 표기함.

	(1)	(2)		
개발기	도입기	성장기	포화기	쇠퇴기

나. 시장규모

- 주시장 (국가 또는 지역) : 동남아, 중국, 미국
- 시장규모
 - 세계사료시장 : 353 백만톤
 - 아시아사료시장 : 128 백만톤
 - 한국사료시장 (한국양어용 사료시장) : 15 백만톤

이러한 사료 시장을 근거로 0.1%의 베타글루칸을 사용한다면 국내의 경우 15000톤의 잠재적시장이 존재하며 이들 시장 중 500톤을 목표로 보면 75억 (단가 1.5만원/kg) 정도의 시장이 형성될 수 있을 것으로 보여진다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 고효율 발효균주 개발

1. 목적

생산성은 원료의 가격을 좌우하는 가장 중요한 인자이다. 베타글루칸의 생산성을 향상하기 위하여 생산성이 향상된 돌연변이주 개발이 필요하다.

2. 재료 및 방법

베타글루칸을 생산하는 미생물은 *Alcaligenes faecalis* 균주와 *Agrobacterium* 속 균주로 알려져 있다. 베타글루칸 생산 균주로 알려진 균주들을 대상으로 플라스크 배양을 통해 생산성이 높은 균주를 선별하였으며, 최종선별된 균주인 *Agrobacterium sp.* ATCC 31750로부터 생산량이 증가하는 고효율 돌연변이주를 개발하기 위한 실험을 수행하였다. 고생산성 균주개발을 위한 변이주 선별방법으로 MNTG를 1mg/ml 수준으로 처리하는 random mutagenesis를 수행하였다. MNTG 처리 후 99.9%의 사멸율을 갖는 조건하에서 1차적으로 773개의 변이주를 선별하였다. 선별기준은 이들 균주가 생산하는 다당구조의 β -1,3-glucan과 Aniline blue 염색약이 특이적으로 반응하여 푸른색을 띄게 하므로 푸른색의 진한정도로 균주를 선별하게 된다. 균주는 고체배지에서 30℃, 2주 간격으로 계대 배양하여 보관하였으며, 장기간의 보존을 위해서는 5 g/l yeast extract, 5 g/l peptone, 20 g/l sucrose, pH 7.0 조성으로 된 Nutrient rich medium (YP)에서 15-18시간 배양한 후 40% glycerol 용액에 넣어 -70℃에서 보관하였다.

3. 결과 및 고찰

고생산성 베타글루칸 균주개발을 위한 변이주 선별은 MNTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)를 이용한 화학적 처리 방법으로 수행하였다. MNTG 처리 후 99.9%의 사멸율을 갖는 조건하에서 1차적으로 773개의 변이주를 선별하였다. 선별기준은 이들 균주가 생산하는 다당구조의 β -1,3-glucan과 Aniline blue 염색약이 특이적으로 반응하여 푸른색을 띄게 하므로 푸른색의 진한정도로 균주를 선별하게 된다. 베타글루칸 생산균주

를 선별할 시 염색약의 진한정도는 다당의 농도, 분자량에 의해 영향을 받으므로 염색약의 이러한 원리를 이용하여 여러 계대를 거치면서 푸른색의 진한정도와 생산되는 베타글루칸 농도에 의해 499개의 균주를 선별하여 수 회 고체배지에서 계대배양한 후 β -glucan 생산조건에서 배양하면서 실험 한 결과, 최종적으로 선별된 변이주 M85와 R259 두 균주를 5 L 발효조에서 배양한 결과 모균주에 비해 세포생장률이 우수하였으며, glucan 생산량도 증가됨을 알 수 있었다 (Fig. 2). M85의 경우 모균주에 비해 배양 130시간에 생산량이 10g이상 증가되었으며, R259의 경우는 25g이상 증가되었고, 다당대비 글루칸 수율(yield)도 역시 증가함을 알 수 있었다. 5 L 발효조 배양으로 R259 균주가 베타글루칸 생산이 모균주보다 25 g 이상 증가하였기 때문에 시험공장 (pilot plant) 규모에서 300 L Jar fermentor로 배양을 하였다. 그 결과 β -glucan 생산은 모균주에 비해 20g 이상 증가되었다. 이 결과를 볼 때 모균주보다 15% 이상 베타글루칸 생산이 증가되었기 때문에 이 변이주 R259를 이용하여 본 연구의 베타글루칸 생산에 이용하였다.

변이주 R259의 특성을 API Kit와 Biolog Kit를 이용하여 미생물학적, 생화학적 특성을 조사한 결과 R259 모두 모균주와 동일한 *Agrobacterium* sp.로 나타났으며, 그 물리적인 특성 또한 모균주와 유사한 것으로 나타났다 (Table 3). 선별된 R259 변이주는 고생산성 균주로 최종 선정하였으며 형태학적 특징으로는 모균주와 변이주 모두 Gram negative균주로서 세포모양은 막대형이며 고체배지에서 모균주의 모양은 주름이 지고, 거친표면과 돌출된 colony를 형성하는 반면, 변이주는 모균주에 비해 윤기가 나며 Aniline blue가 포함된 배지에서 모균주보다 더 진한 푸른색을 나타내었다. 액체배양 후 배양액의 색깔은 변이주가 더 밝은 색을 띠었다. 선별된 변이주는 미생물 국제기탁기관인 한국생명공학연구원 유전자은행 (KCTC)에 2002년 3월 18일자로 *Agrobacterium* sp. R259 KCTC 10197BP 균주로 기탁하였다.

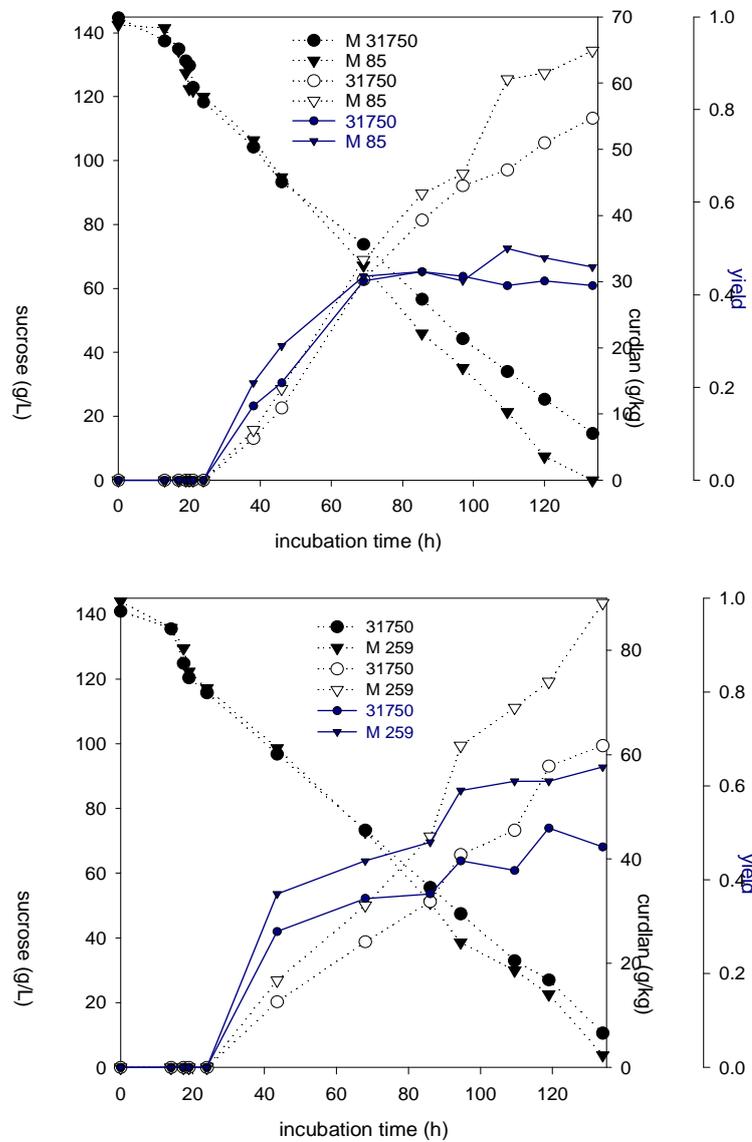


Figure 2. Production of beta-glucan by batch fermentation with various mutant strains in a 5l jar fermenter.

Table 3. Biochemical characteristics of *Agrobacterium* sp. R259.

Characteristics	Reaction	Characteristics	Reaction
Oxidase	+	Mannose assimilation	+
NO ₃ production	-	N-Acetyl-glucosamine assimilation	+
Indole production	-	Maltose assimilation	+
Glucose acidification	-	Gluconate assimilation	-
Arginine dihydrolase	-	Caprate assimilation	-
Urease	+	Adipate assimilation	-
Esculin hydrolysis (β -glucosidase)	+	Malate assimilation	+
Gelatinase	-	Citrate assimilation	-
Beta galactosidase	+	Phenyl-acetate assimilation	-
Glucose assimilation	+		
Arabinose assimilation	+		

Biochemical tests were carried out by using API 20NE (BioMerieux, USA) assay kit.

제 2절 베타글루칸 생산을 위한 배지 및 발효공정 최적화

1. 연구의 목적

발효 인자로는 배지의 최적화, pH, 온도, 통기량, 교반속도, 조업방법 등을 들수있다. 이들 발효 인자를 최적화함으로써 생산성을 극대화 할 수 있다.

2. 재료 및 방법

가. 발 효 배 지

본 연구에서 사용된 배지는 두 개의 다른 배지를 사용하였다. 종배양 배지 조성은 20 g/l sucrose, 5 g/l yeast extract 그리고 5 g/l peptone 이며 초기 pH를 7.0으로 맞추었다. 본 발효배지 조성은 리터당 100 g sucrose, 4.2 g NH_4Cl_2 , 1.0 g KH_2PO_4 , 0.4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 그리고 10 ml 의 미량원소 용액 (0.1 N HCl 1 리터에 5 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 그리고 1 g ZnCl_2 를 녹여서 만듦)이고, 초기 pH는 7.0 이었다. 플라스크 배양을 위하여, 100 ml 종배양 배지에서 30℃에서 17시간 동안 배양한 세포 5 ml를 0.3% (W/V)의 CaCO_3 를 포함한 발효배지에 접종하여 30℃에서 배양하였다.

나. 배 양 방 법

발효조 배양은 용존산소분석기와 pH 조절기를 장착한 한국발효기 5 리터 발효기를 사용하였다. 30℃에서 17시간 동안 배양한 종배양액 100 ml를 발효배지 1.9리터를 포함한 발효조에 접종하였다. 배양 pH는 4N NaOH/KOH를 사용하여 7.0으로 조절하였다. 교반 속도와 통기량은 600rpm, 1.0vvm으로 각각 유지하였다.

다. 분 석 방 법

(1) 생체량 및 β -glucan 측정

베타글루칸은 물에 불용성이므로 배양이 끝난 배양액을 적당히 희석하여 5000 rpm, 4℃, 15분간 원심 분리하여 얻어진 침전물에 0.5N NaOH를 처리하여 β -glucan을 녹인

후 다시 원심 분리하여 얻어진 침전물은 생체량 측정을 위해 2-3회 증류수로 세척하여 80℃, 24시간 dry oven에서 건조시켜 질량을 측정하였다. 또한 얻어진 상등액에는 β -glucan이 녹아있으므로 2.0 N HCl을 처리하여 중화시킨 후 원심 분리하여 수확하고, 2-3회 증류수로 세척하여 80℃, 24시간 dry oven에서 건조시켜 질량을 측정하였다.

(2) Sucrose, Ammonium 농도 측정

Sucrose 농도는 2N HCl을 이용하여 100℃에서 15분간 가수분해 시킨 후 dinitrosalicylic acid 방법 (Miller, 1959)을 이용하여 측정하였으며, ammonium 이온분석은 indophenol 방법(Srienc 등, 1984)에 따랐다.

3. 결과 및 고찰

베타글루칸의 발효 생산을 위하여 우선적으로 발효 배지의 최적화 연구를 수행하였다. 다당 생산을 위해 발효 공정을 최적화 하는 데는 많은 변수를 고려해야 한다. 온도, pH, 영양원 공급, 교반속도, 그리고 통기량 등이 대표적인 변수이다. 본 연구에서는 베타글루칸 생산균주인 *Agrobacterium* sp. R259 균주를 이용하여 발효공정의 변수로 작용하는 탄소원, 질소원, 그 외 영양원, pH, 교반속도, 통기량 등의 여러요인을 조사하여 5L, 300L, 34톤 발효조를 이용하여 대량생산을 위한 공정을 확립하였다.

가. 탄소원의 영향 및 sucrose의 농도

Agrobacterium sp. R259을 이용하여 β -glucan 생산시 최적 탄소원을 조사하기 위하여 기초배지에 glucose, fructose, galactose, maltose, sucrose, lactose, raffinose 같은 다양한 탄소원을 각각 포함하여 배양하였다. 탄소원의 농도를 각각 100 g/l되게 첨가하여 30℃에서 3일간 배양한 결과, maltose 가 포함된 배지에서 배양했을 시 조사한 탄소원 중에서 가장 높은 β -glucan 생산을 보였다(48 g/l) (Fig. 3). sucrose의 경우 maltose와 동일한 양의 β -glucan을 생산(47 g/l)하였으며, sucrose은 다른 maltose와 glucose보다는 저렴한 탄소원 이기에 β -glucan 생산을 위한 적절한 탄소원으로 선택하였다.

설탕 (sucrose)의 최적농도에 따른 β -glucan 생산과 세포성장을 조사해보고자

sucrose의 농도를 60에서 200 g/l까지 각각 달리하여 *Agrobacterium* sp. R259 균주를 이용 30°C에서 3일간 배양하였다. β -glucan 생산에 있어 sucrose 농도가 100-160 g/l까지는 최대의 β -glucan 생산(50 g/l)을 보였으며 그 이하와 이상에서는 β -glucan 생산이 감소하였다. 이때 세포의 성장 양상은 전 범위에 걸쳐 비슷하였다 (Fig. 4). 이외에도 값싼 탄소원을 이용하고자 당밀을 사용한 베타글루칸 생산을 수행하였다. 사탕수수 당밀을 사용할 경우 불순물 제거를 위해 황산처리, 원심분리, NaOH를 사용하여 중화 등 전처리 공정과 발효후 당밀의 진한 색소제거를 위한 후처리 공정이 별도로 요구되므로 본 연구에서는 *Agrobacterium* 균주를 이용하여 베타글루칸 생산 시 sucrose를 사용하여 베타글루칸 생산 공정을 최적화 하였다.

나. 무기질소원의 영향 및 농도

Sucrose 100 g/l를 탄소원으로 한 기초배지에 무기질소원을 각각 달리하여 세포성장과 β -glucan 생산성을 조사하였다. 사용한 무기질소원은 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , NH_4NO_3 , NH_2CONH_2 , KNO_3 , NaNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 이었다. 조사한 질소원 중에서 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl 첨가 시 높은 β -glucan 생산을 나타내었다 (Fig. 5). 다른 질소원에 비해 NH_4Cl 경우 가장 높은 생산성을 보였기에 β -glucan 생산을 위한 최적의 질소원으로 선정하였다. NH_4Cl 농도에 따른 β -glucan 생산을 보고자 기초배지에 NH_4Cl 초기농도를 각각 달리하여 세포성장과 β -glucan 생산을 조사하였다. β -glucan 생산은 질소원이 고갈된 후부터 생합성이 증대되는데 4 g/l 이상의 농도에서는 세포성장은 증가하지만 β -glucan 합성은 감소하는 경향을 띤다. 특히 NH_4Cl 의 농도가 2-4 g/l 일 때 β -glucan 생산이 가장 좋았다.

다. 세포외 인산염의 농도에 의한 베타글루칸 생산

최적의 phosphate 농도를 얻어 대량생산을 꾀하고자 5L 발효조에서 phosphate 초기 농도를 달리하여 β -glucan 생산을 보았다 (Fig. 6). 5L 발효결과 세포의 농도, 암모니움의 농도, 인산염 소모, 베타글루칸 생산량을 보여준다. 세포성장은 암모니움의 소모와 비례하여 성장하며 인산염 농도와는 상관관계가 없는 데 이러한 결과는 세포성장에 인산염의 농도가 영향을 주지 않는 것으로 해석된다. 세포농도가 최고 12 g/L에 달하였을때 인산염은 0.5g/L로 소모되었으며 cell yield는 24 g이 된다. 베타글루칸 생산은 암모니

음이 고갈되었을 때 시작되며 초기 인산염의 농도가 0.5 g/L일때 글루칸 생산량은 15 g/L로 낮게 생산되었다. 초기 인산염의 농도가 0.5에서 1.0 g/L로 증가하였을 때 베타글루칸의 생산은 120시간에 65 g/L로 생산되었다. 이 기간 동안 남아있는 인산염의 농도는 0.5 g/L 였으며 인산염의 농도가 2.0 g/L일때는 베타글루칸 생산이 54 g/L, 인산염의 농도가 3.0 g/L일때는 베타글루칸 생산이 35 g/L로 낮게 생산되었다. 이러한 결과로 베타글루칸의 대량생산을 위해서는 초기 인산염의 농도를 결정할 필요가 있으며 질소원과 같은 필수 영양원이 제한된 조건하에서 원하는 물질을 생산하고자 할 때 적용될 수 있는 공정이다.

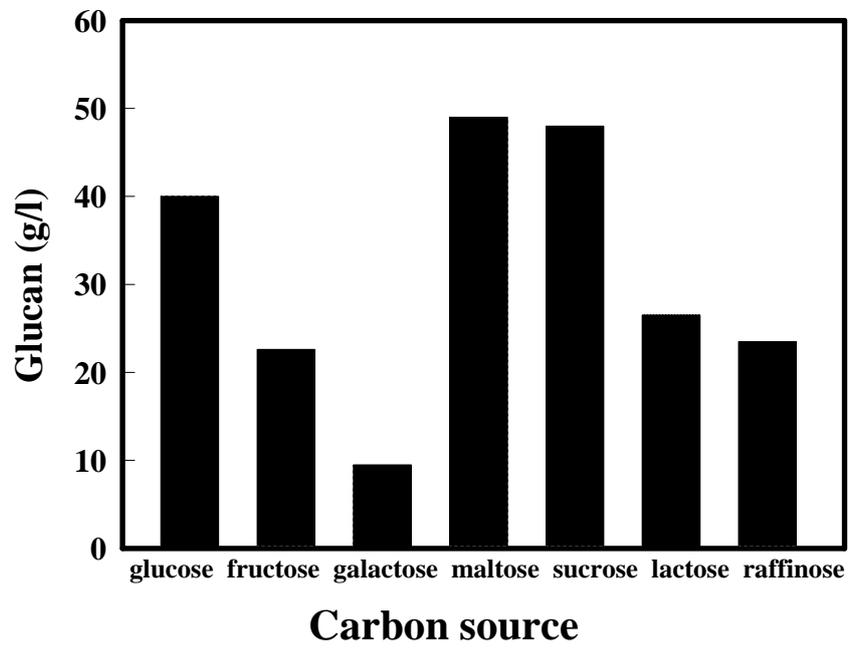


Figure 3. Effect of carbon source on glucan production

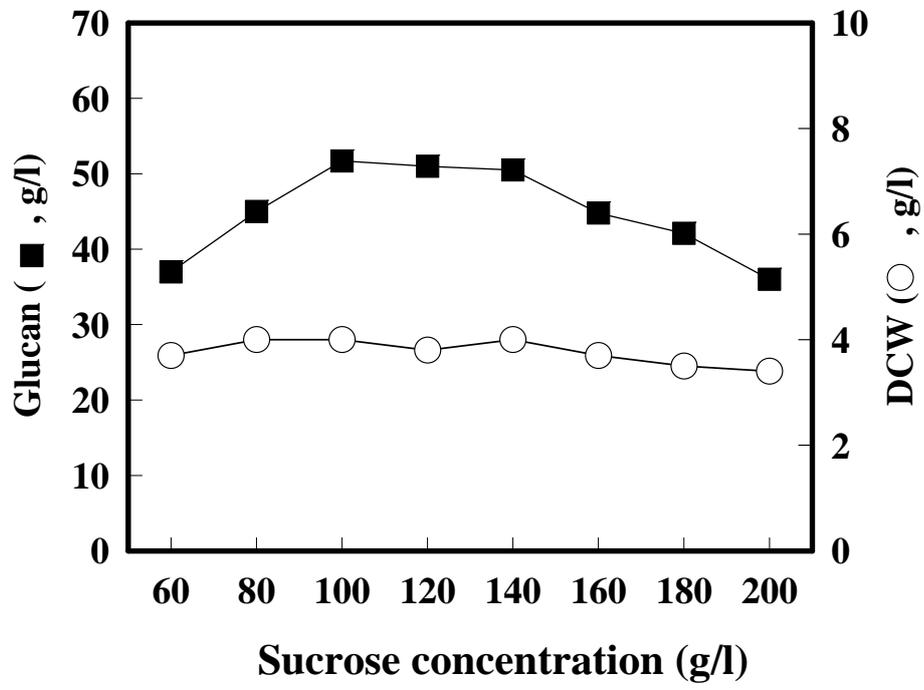


Figure 4. Effect of sucrose concentration on glucan production

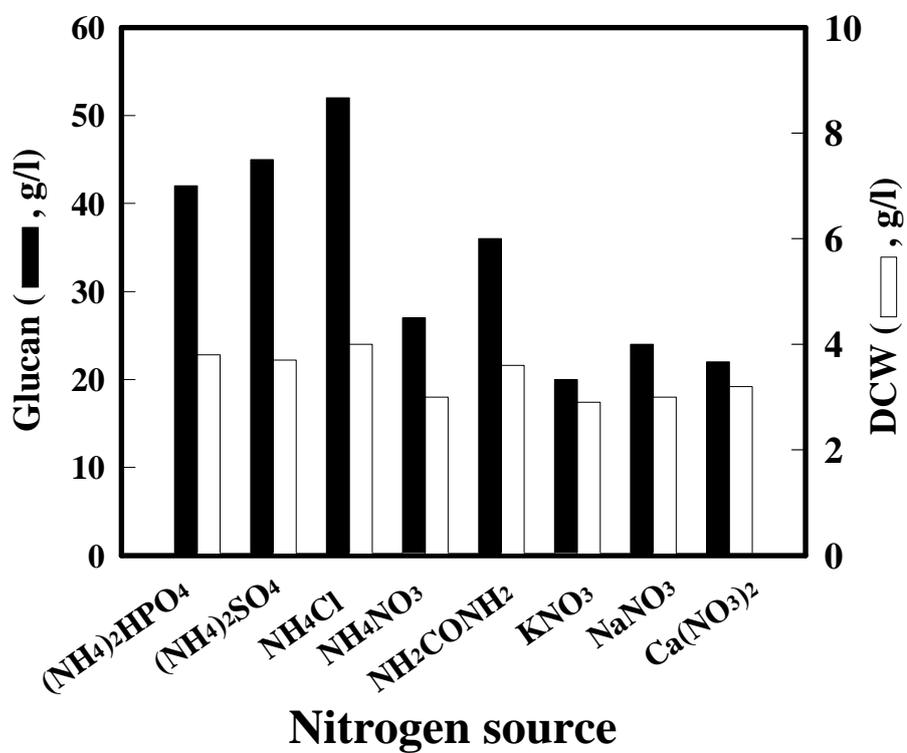


Figure 5. Effect of nitrogen source on glucan production

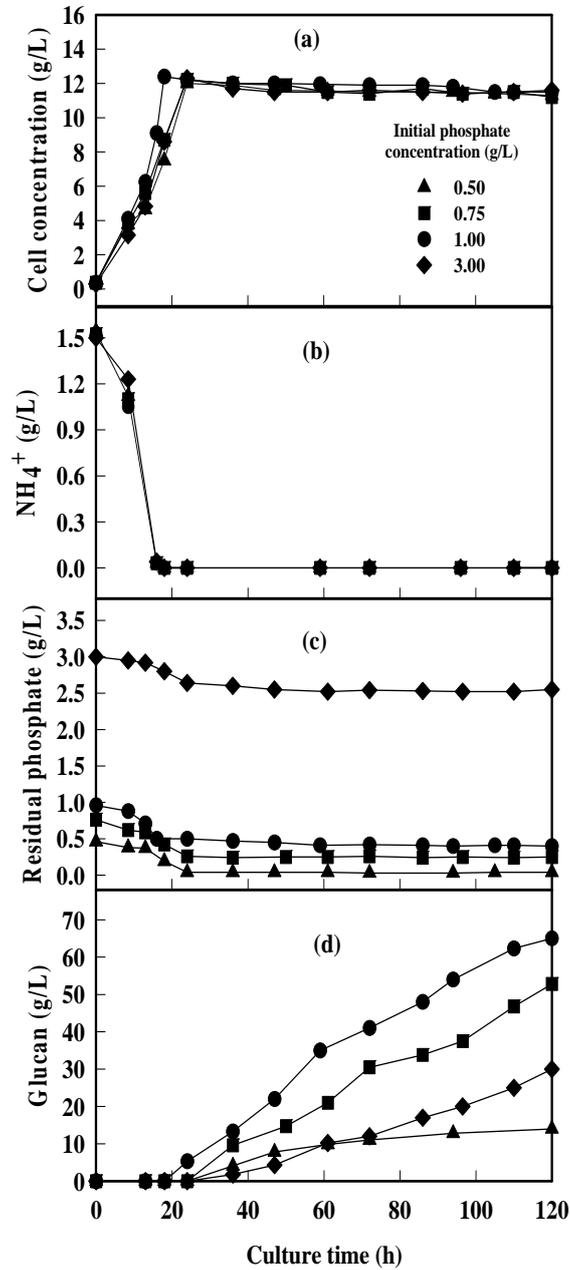


Figure 6. Batch fermentation profiles with different phosphate concentrations in a 5-liter jar fermentor. (a) cell growth, (b) ammonium concentration, (c) phosphate consumption, and (d) glucan production. Details are described in Materials and Methods.

라. 베타글루칸 생산에서의 pH 최적화

배양 조건에 따른 세포성장과 베타글루칸 생산의 변화를 측정하였다. pH에 따른 세포의 성장과 베타글루칸의 생산속도를 알아보기 위해서 pH를 바꾸어 가면서 세포의 성장과 베타글루칸의 생산속도를 구하였다. 설탕과 암모니움 농도에 따른 세포의 비성장속도를 추정하였고 또한, pH가 세포성장에 미치는 영향을 구하였다. pH를 일정하게 운전한 결과 베타글루칸의 생산량이 120 시간에 36 g/L를 생산하였고 베타글루칸은 암모니움 고갈 상태에서 생산되었다 (Fig. 7).

베타글루칸의 생성에는 암모니움의 저해가 매우 크므로 암모니움 존재할 때는 pH를 7.0으로 유지시키고 암모니움의 농도가 0으로 떨어짐에 따라 발효조의 조건이 베타글루칸의 생산 최적인 조건인 pH 5.5로 변환시키는 것이 최적 profile로 나타남을 볼 수 있었다.

pH에 따른 세포의 성장과 베타글루칸의 생산은 세포성장기에는 세포성장의 최적점인 pH 7.0에 맞추고 생산 기에는 베타글루칸 생산의 최적점인 pH 5.5에 맞추어 생산한 결과 일정한 pH에서 발효조를 운전하는 것보다 60 %이상 생산성을 증가시킬 수 있었다.

마. 교반속도의 영향

산소전달 속도에 직접적으로 영향을 미치는 교반속도와 통기량은 대량생산을 위한 scale-up 연구에서 반드시 고려해야할 중요한 변수이다. 사용한 5 리터, 300 리터 발효조는 (주)코바오텍 제품이다. 5 리터 발효조의 크기는 직경 16.4 cm 높이 23.4 cm 이며, impeller의 직경은 7.9 cm 이다. 300 리터 발효조는 직경 53.5 cm 높이 145.6 cm 이며 3개의 6 blade disk turbine impeller가 장착되어 있는 데, 두 개는 직경 18 cm 이고 제일 아래 있는 impeller의 직경은 23 cm이다. 다당의 분자량은 gel permeation chromatography 방법으로 분석하였다. HPLC system은 Waters 제품으로 pump, differential refractometer, 그리고 data module로 이루어져 있으며 column은 길이 30cm, 직경 7.5 mm, 입자크기 8 micro, pore size가 300 Å인 Polymer Laboratories Inc 제품을 사용하였다. 이동상으로 1 mM NaOH를 사용하여 유속 1.0 ml/min으로 흘려보냈다. 표준시료는 Sigma사로부터 구입한 dextran (분자량 15000-20000, 60000-90000, 143000, 580000, 그리고 2000000)을 사용하였다.

교반속도에 의한 세포성장과 베타글루칸 생산에 의한 영향을 살펴보기 위하여 5 리터

발효조에서 300에서 700 rpm으로 교반속도를 달리하여 배양하였다. 교반속도가 300에서 600 rpm으로 증가할수록 베타글루칸 생산이 증가하여, 최대 생산량은 교반속도 600 rpm에서 64.4 g/l에 달하였고 700 rpm에서는 더 이상 증가하지 않았다 (Fig. 8). 한편, 교반속도 300 rpm에서는 배양액 내에 암모니움이 여전히 남아 있었으며, 배양말기에 단지 소량 (2.5 g/l)의 베타글루칸이 생산되었다. 세포성장 속도도 교반속도가 높을 때 우수하였다. 교반속도 600 또는 700 rpm에서, 세포농도는 암모니움이 고갈되는 20 시간에 최대 6.2 g/l에 달했다.

산소전달 속도는 발효공정을 scale-up할 때 종종 커다란 장애 요인이 된다. 특히, 미생물 다량의 생산 시, 발효액의 점도가 크게 상승하기 때문에 이러한 문제는 더욱 심각해진다. 베타글루칸 생성을 위해 공정을 scale-up 하기 이전에, 5 리터 발효조와 300 리터 발효조에서 교반속도와 내압을 달리하면서 산소전달 상수 (K_{La})를 조사하였다. 300 리터 발효조에서는 교반속도를 100에서 300 rpm으로 증가시켰을 때, 산소전달 상수가 크게 증가하였다 (Fig. 9). 5 리터 발효조에서 최대 베타글루칸 생성이 달성되었던 교반속도 600 rpm에서의 산소전달 상수 값이 147.8 h^{-1} 이었는데, 동일한 값이 300 리터 발효조에서는 교반속도를 200 rpm 그리고 발효조 내압을 0.2 bar로 하였을 때 얻어졌다. 이 결과와 5 리터 발효조에서 베타글루칸 생산을 위하여 최적화 한 발효조건을 300 리터 발효조에서 베타글루칸을 대량 생산하기 위하여 적용하였다. 산소전달이 동일할 수 있도록 300 리터 발효조에서 교반속도를 200 rpm, 분압을 0.2 bar로 하고 기타 발효조건은 5 리터 발효 배양과 동일한 조건에서 조업하였다. 배양시간이 20시간 지난 후 배양액 내 암모니움은 고갈되었고, 이때 세포농도는 6.8 g/l에 달하였다. 베타글루칸은 암모니움이 고갈된 시점부터 생산되기 시작하여 120 시간 배양 후 최대 58 g/l의 베타글루칸을 생산할 수 있었다 (Fig. 10). 용존산소는 세포가 성장하면서 급격히 떨어졌고, 암모니움이 고갈되면서 세포성장은 정지하고 용존산소량은 급격히 증가하였다. 베타글루칸 생산량이 25 g/l에 이를 때까지는 용존산소량이 포화상태의 10%를 유지하였는데, 베타글루칸 생산량이 증가하면서 배양액의 점도가 증가하고 이로 인하여 용존산소가 다시 부족하게되는 것을 알 수 있었다. 이러한 300 리터 발효조에서 얻은 결과는 5 리터 발효조에서 얻은 결과와 매우 유사한 것으로, 충분한 산소의 공급은 세포 성장에 유리할 뿐만 아니라 베타글루칸 생산에도 매우 중요함을 알 수 있었다.

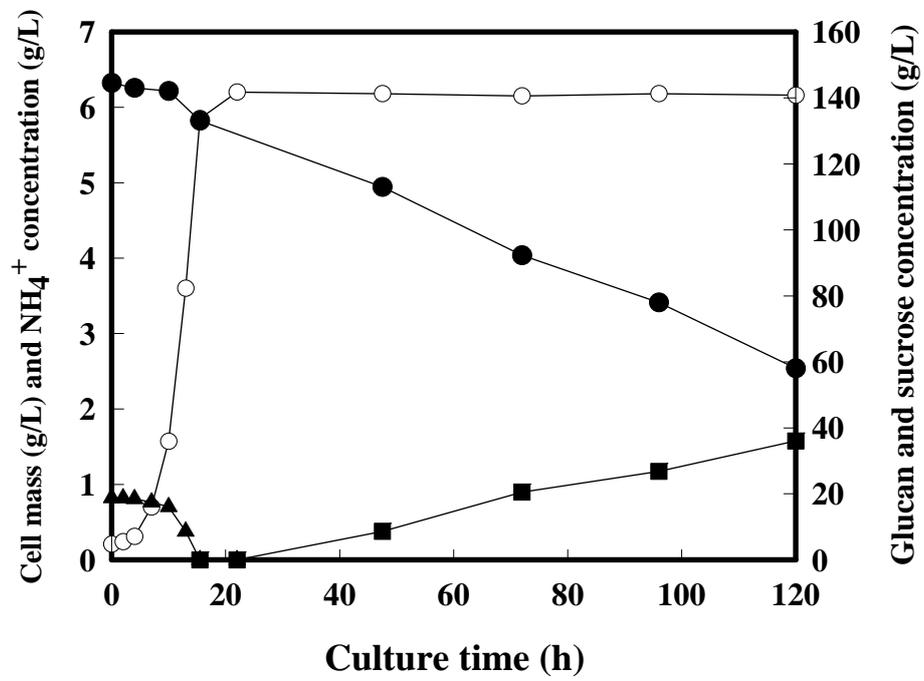


Figure 7. The cell growth and glucan production at the constant pH

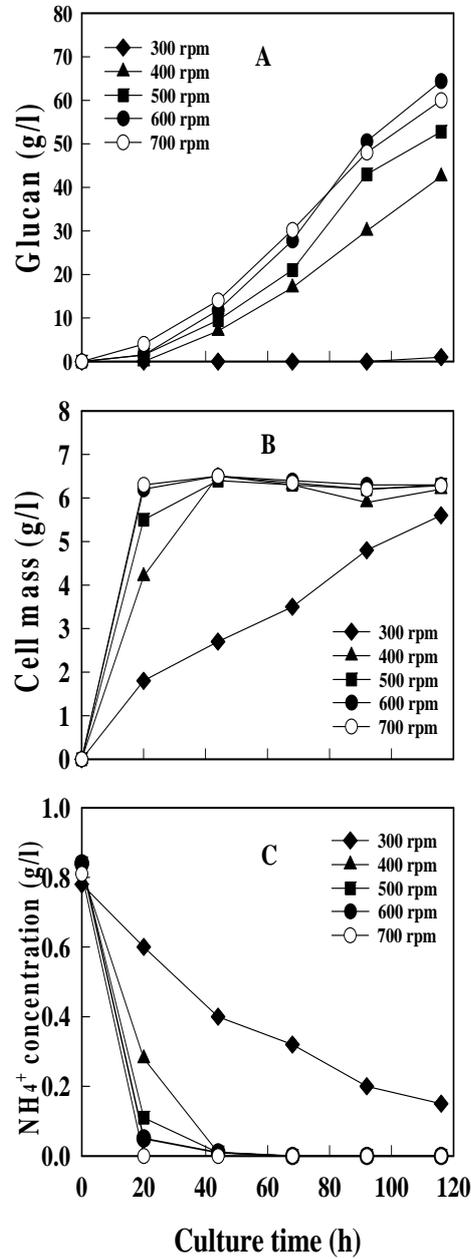


Figure 8. Effect of agitation speed on (A) glucan concentration, (B) cell concentration, and (C) ammonium consumption. Jar fermentations were carried out in a 5-l jar fermenter at different agitation speeds.

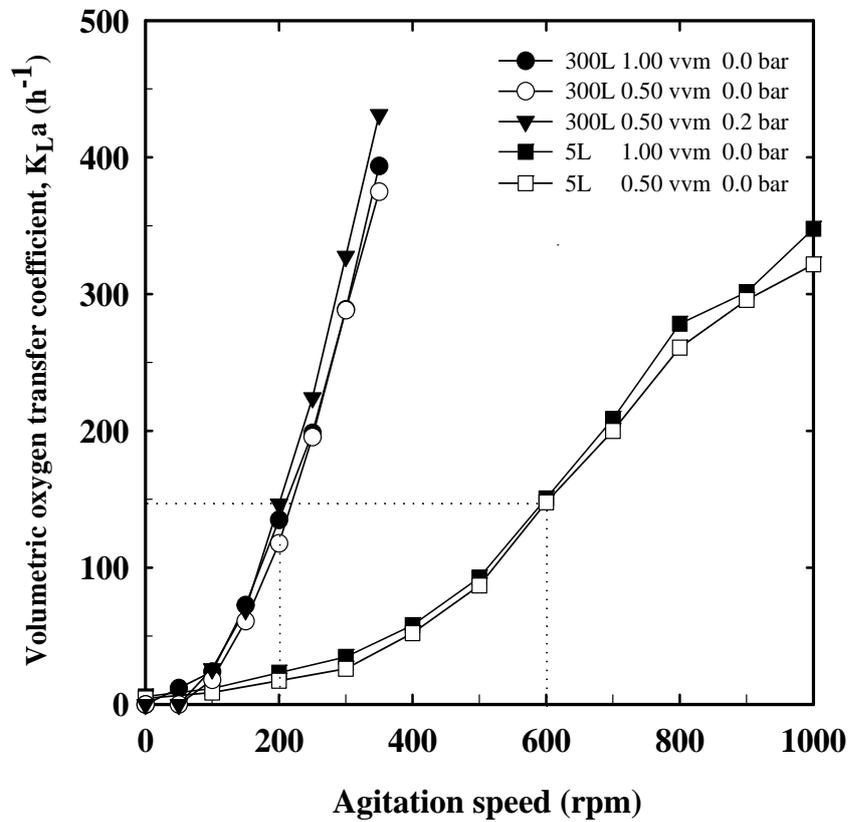


Figure 9. Volumetric oxygen transfer coefficient ($K_L a$) in 5-L and 300-L fermenter. The working volumes were 3 liters in 5-L fermenter and 160 liters in 300-L fermenter. $K_L a$ was determined by direct measurement method using an oxygen analyzer (TOA Electronics Ltd., Japan)

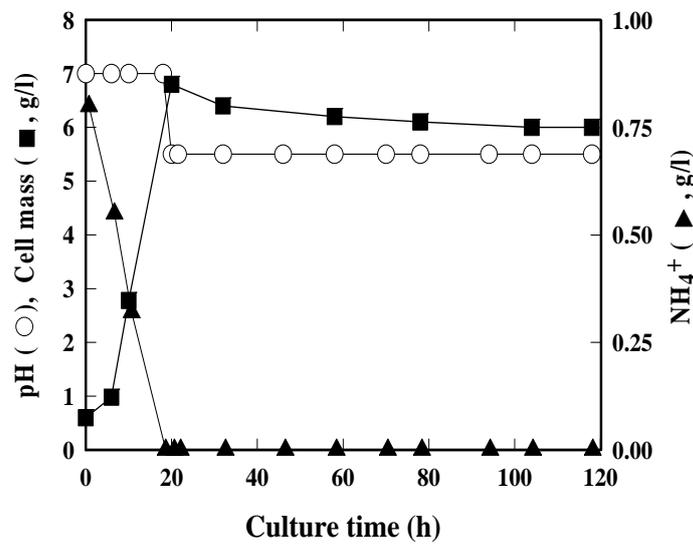
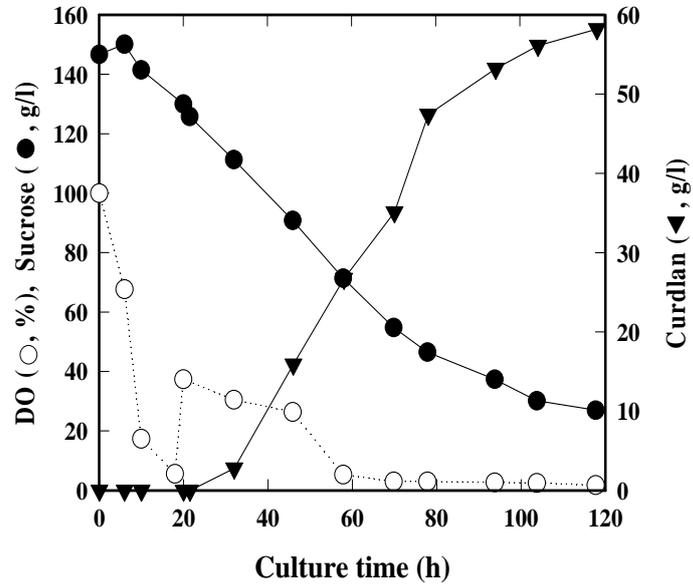


Figure 10. Time profiles of concentration of cells, glucan, sucrose, NH₄⁺, dissolved oxygen level, and pH. Jar fermentation was carried out in a 300-l jar fermenter.

제 3절 34톤 공기부양식 발효조에서의 베타글루칸 대량생산

제품의 생산 원가는 생산 규모에 크게 영향을 받는다. 규모가 큰 발효조에서 생산하기 위해서는 본 발효 전까지 다단계의 균주배양이 필요하며, 대규모 발효조에서는 공기전달 및 혼합 특성이 실험실 규모와는 크게 다른 특징이 있다.

34톤 발효조에서 최적 생산 조건에 대한 연구는 다음과 같이 수행하였다. 34톤 발효조는 공기부양식 (air lift) 이며 발효조의 직경은 1.97m이다. 베타글루칸 발효생산은 전체 공정에서 유틸리티 비용이 가장 편중되어 있는 부분이기도 하다. 본 발효에 이르기까지 총 5단계로 발효가 이루어진다 (Fig. 11). 1) 먼저 플레이트로부터 100ml 발효액을 포함한 500ml 플라스크 4개에 균체를 접종한다. 30℃에서 24시간 배양 후 2) 발효액 4리터를 포함한 7리터 발효조에서 20시간 배양 후 3) 160리터 발효액을 포함한 300리터 발효조에서 14 시간 배양한다. 4) 다시 3,000리터 발효액을 포함한 6,000리터 공기부양형 발효조에서 12시간 배양 후 5) 최종적으로 24,000리터 발효액을 포함한 34톤 본 발효조에서 베타글루칸을 생산한다. 최초 균주 접종단계에서 본 발효까지는 약 3일 (76시간)이 소요되었다. 1회 베타글루칸 생산 발효 시간은 seed culture 3일(72시간), 주 발효 5일(120시간)로 약 9일이 소요된다. 먼저 주 발효배지성분인 sucrose와 미량 원소들을 정량하여 발효조에 투입하고 물에 녹인 후 121℃, 압력 1.2bar 조건 하에서 30분간 스팀으로 멸균하게 된다. 멸균이 끝나고 배지를 냉각시키게 되는데 이때 발효조 내부에 코일링 된 냉각코일을 통해 냉각수를 공급하여 30℃까지 냉각시키게 된다. 냉각코일을 통과해서 처음 나오는 냉각수는 온도가 약 95℃이상으로 직접 배출 시 폐수로 분류되기 때문에 곧바로 배출 할 수 없다. 따라서 배출 시에 냉각시켜서 배출 할 수밖에 없 저장조를 여러 개 설치하여 멸균 후 고온으로 나올 때 저장해 두었다가 온도가 내려가면 공장의 청소 용수나 설비세척용으로 재활용 할 수 있도록 하였다. 멸균 후 일반 배양 작업 시에는 냉각수의 온도가 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 정도로 발생되기 때문에 바로 다른 작업용수로 사용하거나 외부 냉각기를 통해 순환하여 사용한다. 발효가 다 끝난 후에는 발효액을 사용하고 비어있는 발효조를 세척해야하는데 고압세척기를 사용하게 되면 적은 양의 물로 발효조 내부에 붙어 있는 찌꺼기들을 쉽게 제거할 수 있다. 고압세척기로 내부를 씻어내고 난 후 15 - 20kL의 물을 채워 다시 한번 스팀멸균을 행하여 준다.

발효에 이용되는 균주는 sucrose를 기질로 베타글루칸을 생산하게 되는데 전환효

율은 약 50%정도이며 평균 전환속도는 0.5g/hr 정도이다. 발효온도는 30℃로 조절하였으며 통기량은 원활한 공기 공급을 위하여 교반식 발효조 보다 2.5배 높은 1.0 vvm으로 유지하였다. 발효 초기 세포성장 단계에서는 배양액의 pH를 7.0으로 조절하였으며, 질소원이 고갈되어 세포성장이 정지되고 글루칸이 생성되는 시점부터 pH를 5.5로 전이하여 조업하였다. 대표적인 발효 조업 결과를 Fig. 12에 도시하였다. 초기에 첨가한 암모니움의 농도는 1.5g/L로 배양 18시간만에 고갈이 되고 세포성장은 정지된다. 이때의 세포 건조 중량은 약 12 g/L이다. 이 시점에서 베타글루칸이 생성되기 시작하는 데 생산을 원활하게 하기 위하여 발효 pH를 7.0에서 5.5로 전이하였다. 베타글루칸 생성이 증가함에 따라 발효액 자체의 점도가 올라가 용존산소의 유지가 어렵게 되어 효과적인 발효를 할 수 없게 되므로 베타글루칸이 60g/L 이상 생성되면 발효를 중단하게 된다. 최종 발효액은 약 22톤 정도가 되는데 이는 한 번의 회분식 배양에 의하여 1200kg 이상의 베타글루칸을 대량으로 생산하는 결과로 scale-up이 매우 성공적임을 알 수 있다.

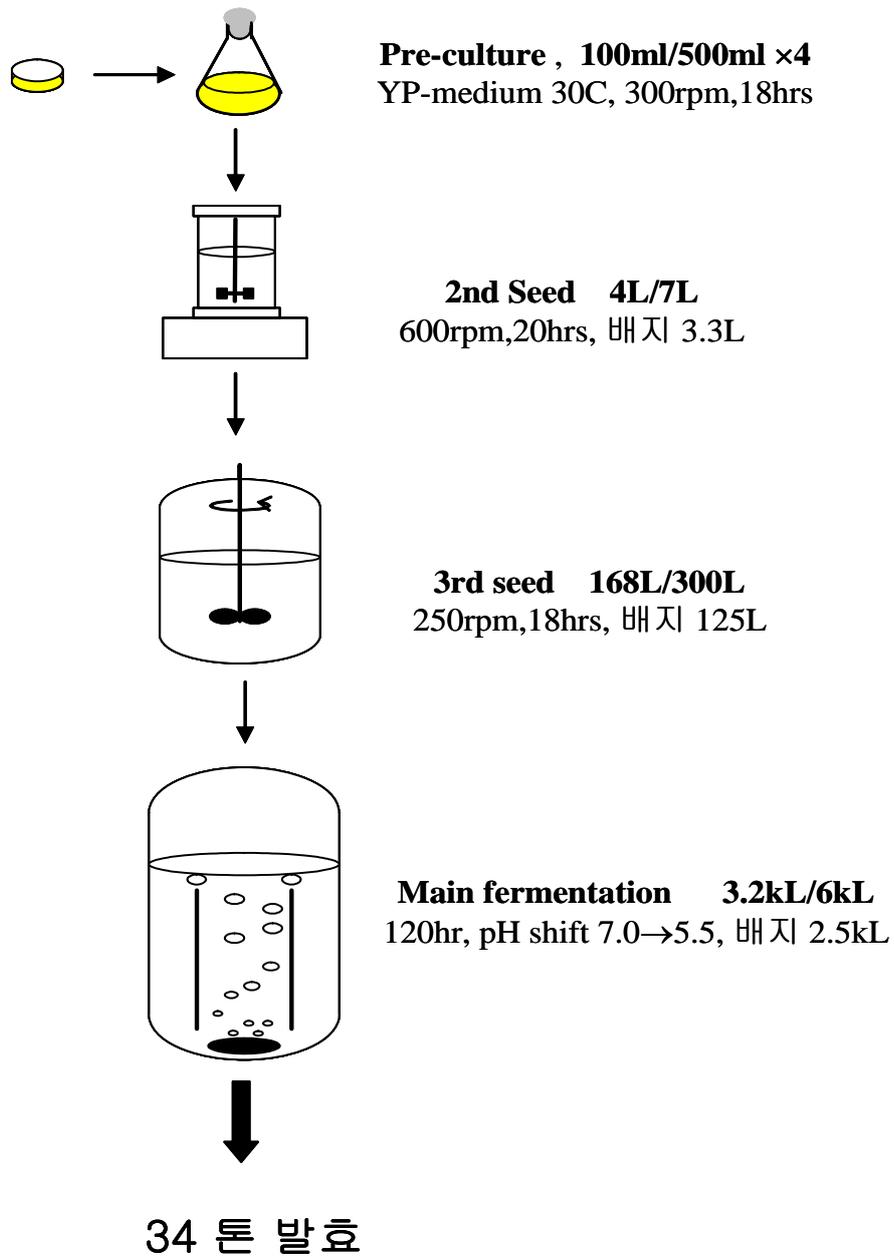


Figure 11. Flow diagram of betaglucan production



34톤 공기부양형 발효조

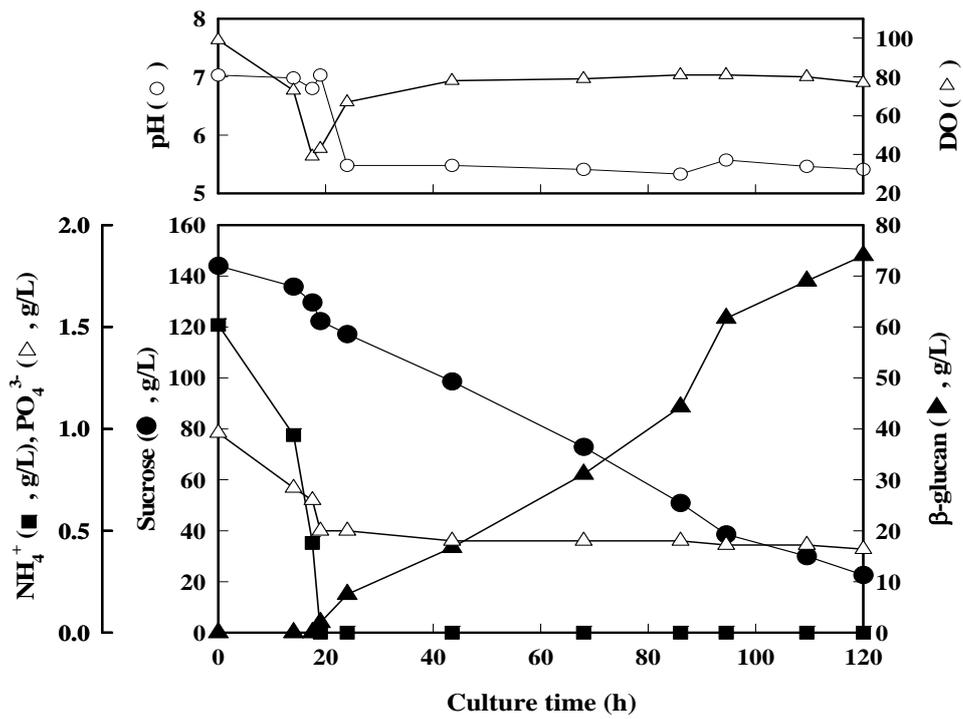


Figure 12. Time profiles of concentration of cells, glucan, sucrose, NH_4^+ , dissolved oxygen level, and pH. Jar fermentation was carried out in a 34 ton air lift fermenter.

제 4절 베타글루칸 분말의 제조공정과 성분분석

베타글루칸 분말을 대량으로 생산하기 위해서는 발효액으로부터 베타글루칸의 분리, 건조, 그리고 분쇄 공정이 필요하다. 분말생산 공정 도식을 Fig. 13에 나타내었다. 베타글루칸은 수용액에서 불용성이므로 원심분리에 의해서 상등액으로부터 분리된다. 이를 위하여 decanter 연속원심분리기를 선정하였으며 유속을 300리터/hr로 하여 1기 당 일간 200kg의 베타글루칸을 생산할 수 있으며 이때 수율은 80%를 상회한다. 열풍건조기에서 50°C로 건조한 시료는 경도가 높기 때문에 햄머밀 (hammer mill) 분쇄기가 적합하고, 시간 당 300kg 이상 생산할 수 있었다. 이렇게 조분쇄한 시료는 최종적으로 에어 밀로 미분쇄한다. 미분쇄 시료중의 베타글루칸 함량은 75%이며 분말의 입도는 150 μ m 이었다. 이렇게 확립한 공정으로 베타글루칸 기준으로 월 2000kg 이상 대량생산할 수 있다.

미생물 발효 후 생산된 베타글루칸의 성분안전성을 조사하고자 베타글루칸 분말의 수분, 일반세균, 대장균군, 용혈성균 등에 대한 조사를 하였다. 발효 후 분리정제 된 베타글루칸 분말의 수분함량은 5-7% 범위에 있었으며 분말에 존재하는 대장균군, 용혈성균에 대해서는 음성의 결과를 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 사료첨가제로서 사용이 가능하며 상온에서 장기간 (18개월 이상) 보관기간하였을 경우에도 변질이나 대장균오염에 대해 음성의 결과를 얻을 수 있었다.

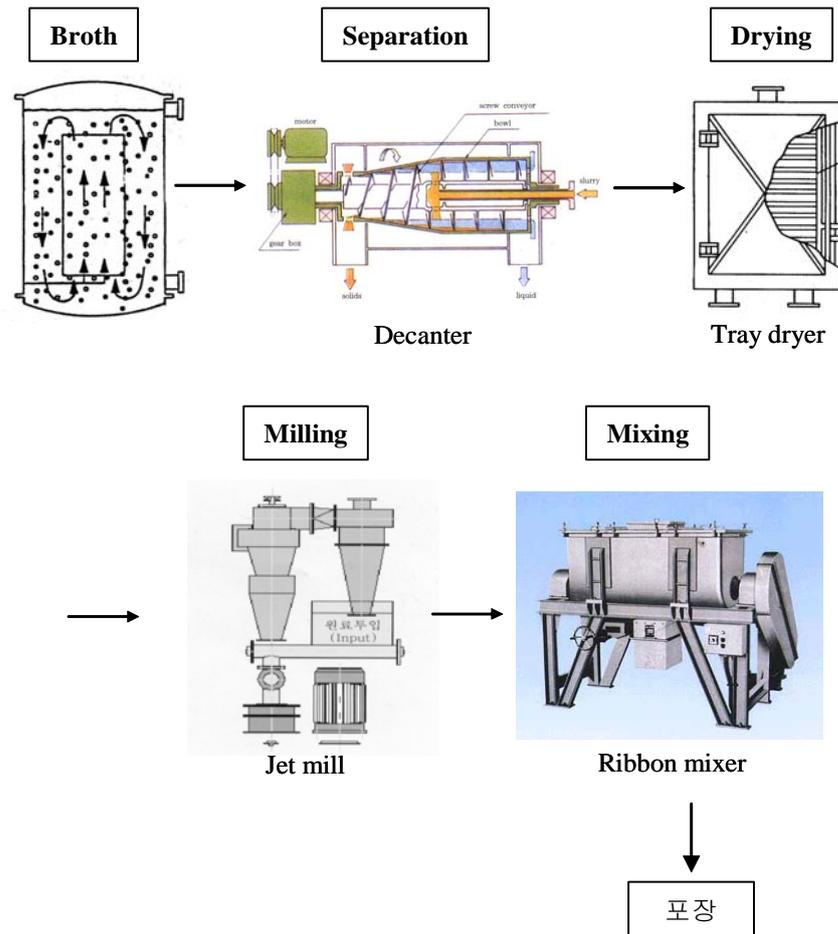


Figure 13. Process flow diagram for the β -glucan production.

제 5절 베타글루칸의 면역증강 효과

1. 연구의 목적

최근 우리나라의 해산어류 양식 기술의 발전으로 국내 양식 총 생산량 중에서 해산 어류가 차지하는 비율이 증가 추세이다. 특히 해산어 양식 주요종인 넙치의 경우 지난 10년 동안 약 600% 이상의 성장을 보였다(해양수산부, 2004). 이러한 넙치 양식 생산량 증가는 지난 10년간의 질적 발전보다는 양적인 발전에 급급한 고밀도 사육으로 인하여 생산량이 증대된 것으로 사료된다.

양식업의 팽창과 더불어 고밀도 사육과 같은 인위적 양식 환경은 자연 상태의 어류에서 크게 피해가 없었던 많은 문제점을 야기 시켰다. 먼저 수질오염으로 인하여 어류에게 외부적 스트레스를 증가시켰으며, 스트레스 증가로 인한 양식 어류의 면역력이 현저히 감소하게 되어 질병에 대한 감염률이 증가하게 되었다. 또한, 고밀도 사육으로 인하여 질병에 대한 전이가 빨라 감염성 질병 발생 시 질병으로 인한 폐사어가 증가하게 되어 양어가에 경제적으로 큰 손실을 초래하고 있다. 이러한 감염성 질병에 대한 치료 대책으로 현재 양어장에서 널리 사용되고 있는 항생제와 같은 화학요법제는 또 다른 문제점을 야기하고 있다. 항생제와 같은 화학요법제를 무분별하게 사용함으로써 어류에서 항생제 및 화학요법제에 대한 약제 내성을 증가시켰으며(Mcpherson *et al*, 1991), 종류에 따라서는 어류의 면역기능을 저해하고 있다. 다른 방법인 일시적으로 절식시켜 질병을 치유하기도 하나, 이 방법은 절식시킴으로 성장을 지연시켜 양어가에 적지 않은 경제적 손실을 준다. 따라서 어류가 질병에 걸렸을 때의 치료보다는 질병에 걸리지 않도록 미연에 예방하는 것이 최상의 방법이라 할 수 있으며, 이러한 예방 방법으로는 백신법(vaccination)과 비특이적 면역반응 증강법 (immunostimulation of nonspecific immune response)을 예로 들 수 있다. 하지만 백신법의 경우 각각의 질병에 대한 내성을 증가시킬 뿐이며, 가격이 비싸므로 양어가들이 사용하기에는 적절하지 못한 반면에, 어류의 비특이적 면역반응 증강법은 사용하기 편리하며 백신법보다 가격이 저렴한 이점을 가지고 있다. 따라서 현재 양식어류의 질병을 예방하기 위한 면역증강물질(immunostimulant)에 대한 평가가 최근 들어 많은 연구자들에 의해 진행되어지고 있다. 이와 같은, 면역증강물질은 어류의 비특이적 면역 인자를 증진시키는 화학화합물과 박테리아 유도물 등이 있으며, 레바미솔과

FK-565는 합성화합물, MDP(Muramyl depeptide), LPS(Lipopolysacchride), 키틴, glucan 등은 박테리아 유도체로 어류의 비특이적 면역인자를 증강시켜 질병에 대한 저항성을 증강시켜 준다. 어류의 비특이적 면역인자로는 세포성 면역인자인 macrophage, granulocyte, nonspecific cytotoxic cell 등이 있으며, 체액성 면역인자로는 lysozyme, complement, interferon, transferrin, lectin 등이 있다. 이러한 비특이적 면역인자의 활성을 증가시켜 질병으로부터 저항성을 증가시키게 되는데, 어류에서의 면역증강제를 이용한 실험 등에서 어류의 식세포 활성화(Raa *et al.*, 1992; Jorgensen *et al.*, 1993a), natural killer cell 활성화, 라이소자임(Engstad *et al.*, 1992; Jorgensen *et al.*, 1993b)과 보체의 대사 경로 활성화(Yano *et al.*, 1991) 등을 포함한 다양한 면역반응을 증진시키는 것으로 보고되어져 있으며, 뿐만 아니라 어류의 면역증진을 통해서 질병으로 인한 폐사 방지 및 건강한 어류의 생산성을 향상 시킨다는 보고가 있었다(Yano *et al.*, 1989; Robertsen *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1992; Siwicki, A. K., 1987).

척추 동물에 있어서 비특이적 면역반응은 미생물의 감염에 대한 첫 번째 방어선 역할을 한다. 양식 어류는 양식과정 중에 다양한 종류의 스트레스에 노출되게 되며, 이로 인한 비특이적 면역력의 저하는 다양한 감염증을 일으키게 된다. 따라서 이러한 비특이적 면역계의 활성화를 통해서 병원체의 감염에 대한 저항능력을 증가시키는 것이 가능하다 (Anderson & Siwicki, 1944).

Glucan이 어류에서 다양한 미생물의 감염과 비특이적 면역반응 증가에 유용하다는 것은 많은 연구를 통해 보고되었다 (Yano *et al.*, 1989; Robertsen *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1944; Siwicki *et al.*, 1944). glucan은 lysozyme 활성화 증가 (Engstad *et al.*, 1922; Jorgensen *et al.*, 1992), 식세포의 활성화 증진 (Raa *et al.*, 1922; Jorgensen *et al.*, 1993) 및 보체의 대체 경로를 활성화 (Yano *et al.*, 1991)하는 과정에 관여함으로써 전반적인 비특이적 면역능력을 증진시키는 것으로 알려져 있다. 특히 효모 유래 베타글루칸의 면역증강 효과는 일반적으로 잘 알려져 있는 반면, 미생물 유래 베타글루칸은 아직까지 생산하여 사용하는 경우가 거의 없는 실정이다. 실제로 효모 베타글루칸은 포도당이 베타 1,3 결합뿐만 아니라 1,6 결합한 분지가 많이 있는 반면 본 연구에서 개발한 베타글루칸은 베타 1,3 결합만을 가지고 있는 분지가 없는 분자량 30만 정도의 고분자이다.

따라서, 본 연구의 목적은 베타글루칸에 대하여 총체적으로 면역증강 효과를 살펴볼 필요가 있으며 이를 근거로 β -glucan을 사료에 첨가하여 첨가수준에 따른 넙치의 성장

및 비특이적 면역능력에 미치는 영향과 병원성 세균인 *Edwardsiella tarda* 인위적 감염에 대한 저항능력의 변화를 조사하여 사료첨가 배합을 결정하는 데 활용하고자 한다.

2. 재료 및 방법

가. 실험어 및 사육관리

실험실 규모 실험을 위해 실험어는 넙치 치어를 사용하여, 예비사육 후 60와 120 ℓ 수조를 이용하여 각 실험구당 3반복으로 무작위 배치한다. 사육수는 유수식으로 유수량은 2~4 ℓ/min로 조절하였다. 각 수조에 충분한 산소공급을 위해 에어스톤을 설치하고 일일 사료공급량은 어체중의 3~4%(건물량 기준)로 1일 2회(10:00, 16:00h)공급 한다. 실험기간은 6주간 동안 실시하였다.

나. 실험사료 및 투여 방법

실험사료내 β-1,3 glucan의 첨가농도는 glucan이 첨가되지 않은 사료구를 대조구로 하여 0.01%, 0.025%, 0.05%, 0.10%의 4가지 농도로 첨가하였다. 실험사료는 모든 원료를 혼합한 후 펠렛 제조기로 압출·성형하였으며, 입자크기는 sieve로 고르게 친 후, 밀봉하여 -20℃에 냉동 보관하면서 사용하였다. 실험은 실험사료내 glucan의 함량을 0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 % (Control, G_{0.01}, G_{0.025}, G_{0.05} and G_{0.1})로 하여 5개의 실험구로 나누어 실시하였다. 일일사료공급량은 어체중의 3~4%(건물량 기준)로 1일 2회(오전 10:00, 오후 16:00h) 공급하였다.

다. 어체샘플 수집 및 분석

어체 측정은 2주 간격으로 실시하였으며, 성장률을 측정하기 위하여 24시간 절식시킨 후 MS-222 (100 ppm)로 마취시켜 수조별로 전체무게를 측정하였다. 실험종료 후, 증체율(weight gain, %), 사료효율(feed efficiency, %), 일간성장률(specific growth rate, %/day), 단백질전환효율(protein efficiency ratio), 간중량지수(hepatosomatic index), 비만도(condition factor) 및 생존율(survival, %)을 조사하였다. 간중량지수를 구하기 위해 각 수조별로 3마리씩 간의 무게를 측정하였다. 상기 측정 항목들의 계산식

은 다음과 같다.

- Weight gain (%) : (final wt. - initial wt.) × 100 / initial wt.
- Feed efficiency (%) : (wet weight gain / dry feed intake) × 100
- Specific growth rate (%/day) : (log_e final wt. - log_e initial wt.)/ days
- Protein efficiency ratio : (wet weight gain / protein intake)
- Hepatosomatic index : (liver weight / body weight) × 100
- Condition factor : [fish wt. (g) / fish length (cm)³] × 100

Table 4. Composition and proximate analysis of the basal diet (% of DM basis)

Ingredient	%
White Fish Meal ¹	59.0
Gelatin ²	2.5
Casein ³	2.0
Wheat meal ⁴	16.0
Fish oil ⁵	14.0
EPA-DHA(45%) ⁶	0.5
Vitamin premix ⁷	3.0
Mineral premix ⁸	3.0
Proximate analysis (% of dry matter basis)	
Moisture	20.5
Crude protein	49.6
Crude lipid	19.1
Crude ash	9.2

¹Han Chang Fishmeal Co., Pusan, Korea.

^{2,3}United States Biochemical, Cleveland, Ohio 44122.

⁴Young Nam Flour Mills Co., Pusan, Korea.

^{5,6}E-Wha oil Co., Ltd., Pusan Korea

⁷Vitamin premix(mg/kg feed unless indicated otherwise): vit.A, 3000IU; vit.D₃, 2400IU; vit.E, 120IU ; menadione sodium bisulfate, 6; vit. B₁-HCl, 15; vit.B₂, 30; vit. B₆-HCl, 15 ; vit.B₁₂, 0.06; vit.C, 300; calcium pantothenate, 150; nicotin amide, 150; inositol, 150; d-biotin, 1.5 ; choline chloride, 3000; pancreatin, 12.5

⁸Mineral premix (mg/kg feed): MnSO₄, 320; ZnSO₄, 270; FeSO₄, 750; CuSO₄, 60; CoSO₄, 7; MgSO₄, 17.25; K₂SO₄, 212.24; NaCl, 51.88; K₂HPO₄, 136.09; NaSeO₃, 0.013; KI, 0.15.

라. 성분분석

(1) 일반성분 분석

일반성분은 실험사료와 각 수조별로 6마리씩 무작위로 추출하여 분쇄한 전어체를 분석하였으며, AOAC (1995)방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125℃, 3시간), 조단백질은 kjeldahl 질소정량법(N×6.25), 조회분은 직접회화법으로 분석하였다. 조지방은 샘플을 12시간 동결건조한 후 Soxtec system 1046 (Tacator AB, Sweden)을 사용하여 soxhlet 추출법으로 분석하였다.

(2) 어체의 혈액 및 혈청성분 분석

실험종료 후, 증체율 조사와 함께 혈액성분 분석을 위하여 실험어를 채혈하기 전까지 약 24시간 동안 절식시켰다. 실험어를 각 수조당 3마리씩 무작위로 추출하여 실험어의 미부정맥에서 혈액을 채혈한 후, micro-hematocrit 방법(Brown, 1980)에 의해 헤마토크리트(hematocrit, PCV)를 측정하고, 동시에 Drabkin's 용액을 사용하여 cyan-methemoglobin 방법(Sigma Chemical, St. Louis MO; total hemoglobin procedure No. 525)으로 헤모글로빈(hemoglobin, Hb)을 측정하였다. 혈청성분의 분석을 위하여 채혈한 혈액을 항응고제가 처리되지 않은 원심분리관에 넣고 실온에 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 냉장보관하면서 16시간 이내에 분석하였다. 혈청성분은 임상용 kit(아산)를 사용하여 총단백질(total protein)은 buret법으로, triglyceride와 glucose는 효소법으로 그리고 GOT (glutamic oxaloacetic acids)와 GPT (glutamic pyruvic acid)는 Reitman-Frankel법으로 분석하였다.

마. 두신 식세포의 Chemiluminescent 반응

(1) 두신 백혈구의 분리

성장실험 종료후, MS222로 마취시킨 넙치로 부터 두신을 무균적으로 분리한 후 4℃로 냉장한 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)에 넣어 가는 망사를 이용하여 세포들을 분리해 내었다. 분리된 두신 세포는 다시 34/51%의 Percoll (Sigma) density

gradient를 이용하여, 4°C에서 400 rpm으로 30분간 원심분리한 다음 34%와 51% 사이의 세포층을 가는 파스퇴르 피펫을 이용하여 분리하였다. 최종적으로 분리된 세포는 HBSS로 400 g에서 5분간 2번 세척하였다. 세포의 생존유무는 trypan blue stain을 이용하여 분석하였으며, 모든 실험구에서 분리된 세포들의 생존율은 98% 이상이었다. 실험에 사용한 식세포의 세포수는 *in vitro*에서는 1×10^6 cells/ml HBSS로, *in vivo*에서는 2×10^6 cells/ml HBSS로 조절하였다.

(2) Opsonization of Zymosan

Zymosan (Sigma)을 본 실험에 사용하지 않은 건강한 넙치 성어로부터 분리한 혈청과 혼합하여 30°C에서 30분간 배양하였다. 이과정을 통해 opsonization이 된 zymosan을 원심분리하여 분리하고, HBSS를 이용하여 3회 세척하였다.

(3) Chemiluminescent (CL) response 분석

식세포에서 방출되는 reactive oxygen intermediates (ROIs)는 automatic photoluminometer (Bio-Orbit 1251, Finland)에 의해 정량적으로 분석하였다. 즉, 각 test cuvette은 Scott and Klesius (1981)의 방법에 따라 조제한 luminol (Sigma) 0.7 ml과 cell suspension 0.4 ml을 혼합하여 5분간 실온에서 incubation 한 후 측정 직전에 opsonized zymosan 0.3 ml을 첨가하여 100분간 측정하였다.

바. Lysozyme의 활성

각각의 실험구 어류에서 분리한 혈청 0.1 ml과 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.2)에 *Micrococcus lysodeikticus* (0.2 mg/ml)를 부유시킨 suspension 2 ml과 혼합하였다. 반응은 20°C 조건에서 분광 흡광도계의 흡광도 530 nm에서 0.5분과 4.5분에 측정하였다. lysozyme의 활성 단위는 분당 0.001의 흡광도 감소를 나타내는 효소양으로 정의하였다.

사. 보체 대체 경로 (ACP) 활성의 분석

보체 대체 경로 (ACP) 활성은 sheep red blood cells (SRBC)를 이용하여 분석하였다. SRBC를 Mg^{2+} 와 EGTA가 포함된 gelatin veronal buffer (GVB)에 3번 세척하

고, 같은 완충액에서 2×10^8 cell/ml로 조절하였다. 실험 혈청을 GVB를 이용하여 연속적으로 단계 희석한 후, SRBC를 100 ℓ 첨가하였다. 이 혼합액을 가끔씩 흔들어 주면서 20°C에서 90분간 배양한 후, 4°C에서 1600 g로 원심분리하여 상층액을 분광 흡광도계의 흡광도 414 nm에서 측정하였다. ACP (ACH50) 활성은 용혈의 정도에 따라 계산하였다.

아. 공격 실험

독성이 있는 *Edwardsiella tarda* 부유액 (1×10^6 cfu/ml)을 1.5% NaCl이 첨가된 trypticase soy agar (TSA)에 27°C에서 48시간 배양하여 준비하였다. 어류당 박테리아 부유물을 0.1ml씩 복강 주사한 후 폐사를 기록하였다. 폐사어의 폐사원인을 확인하기 위해 매일 폐사된 어체로 부터 신장을 채취하여 TSA에 배양하여 *E. tarda*의 존재를 확인하였다.

자. 통계분석

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

3. 결과 및 고찰

본 실험에서는 글루칸이 넙치의 성장 또는 비특이적 면역반응에 미치는 영향을 조사하여 사료내 적정 투여량을 추정하기 위해 실험사료에 글루칸을 0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1%를 각각 첨가하여 제작하였다.

6주간의 성장 실험결과는 Table 5에 나타내었다. 면역증강물질인 β -1,3 글루칸의 첨가에 따르는 증체율과 일간성장률에 있어서 글루칸 0.1%를 공급한 사료구가 대조구와 비교하여 유의적으로 높은 경향을 나타내었다. 사료효율(FE)과 단백질전환효율에 있어서도 글루칸 0.1%를 공급한 사료구가 대조구 및 글루칸 0.01, 0.025%를 공급한 사료구와 비교하여 유의적으로 높은 경향을 보였다. 글루칸의 실험사료를 섭취한 넙치 치어의 혈액 및 혈청 성분변화는 Table 6에 나타내었다. 헤마토크리트는 글루칸을 공급한 사료구에서 높은 수치를 나타내었으며, 특히 성장이 가장 좋았던 글루칸 0.05% 와 0.1% 사료구에서 가장 높은 값을 보였다. 넙치의 질병에 대한 저항력이 높아질 때, 헤마토크리트가 정상어

류보다 높아질 수 있다고 하였으므로 본 실험의 결과도 글루칸의 투여에 의해 저항력이 변화한 것과 관련이 있을 것으로 생각된다. 반면에 혈청내 GOT에 있어서 G0.05와 G0.1 사료구는 다른 사료구와 비교하여 유의적으로 낮은 값을 보였다.

비특이적 면역반응 결과, β -glucan을 공급한 사료구는 대조구와 비교하였을 때, 보체 대체 경로의 활성화(ACH50)과 혈청의 lysozyme 활성화 및 두신 phagocyte의 chemiluminescent (CL) 반응에서 0.05% 이상을 투여하였을 때 통계학적으로 유의적인 차이가 있었다(Table 7). 베타글루칸 0.1 %를 공급한 사료구(G_{0.1})와 글루칸 0.05%를 공급한 사료구(G_{0.05})는 CL 반응에 있어서 대조구보다 상당히 높게 나타났으며, 반면에 글루칸 0.05% 이하에서는 효과가 거의 없었다. 어류의 혈청내 lysozyme의 활성화는 글루칸 0.1%를 공급한 사료구(G_{0.05})와 글루칸 0.05%를 공급한 사료구(G_{0.05})가 대조구와 다른 시험구에 비해서 유의적으로 높은 결과를 보였다. 공격 실험(인위 감염에 의한 누적폐사율 결과는 그림 14에 나타내었다. 폐사는 *Edwardsiella tarda*를 접종한지 3일 후부터 시작하여 7일째 끝났다. 모든 폐사된 개체로부터 *E. tardar*가 양성반응으로 분리되었으며, 글루칸을 투여한 모든 사료구가 대조구에 비해 초기폐사율이 낮게 나타났다. 공격 실험한 후 7일째 글루칸 0.025%, 0.05%와 0.10%를 공급한 사료구에서 어류의 폐사가 대조구보다 유의적으로 낮았다.

Table 5. Weight gain, feed efficiency, specific growth rate and protein efficiency rate for oliver flounder fed experimental diet for the six-weeks of feeding period¹

	Diets					Pooled SEM ⁷
	Control	G _{0.01}	G _{0.025}	G _{0.05}	G _{0.1}	
WG (%) ²	177 ^b	186 ^b	188 ^b	198 ^{ab}	216 ^a	4.26
FE (%) ³	80.3 ^b	83.0 ^b	84.7 ^b	89.7 ^b	97.3 ^a	1.7
SGR (%) ⁴	2.43 ^b	2.50 ^b	2.52 ^b	2.60 ^{ab}	2.74 ^a	0.04
PER (%) ⁵	1.67 ^c	1.73 ^{bc}	1.76 ^{bc}	1.87 ^b	2.03 ^a	0.02
CF ⁶	1.13 ^b	1.16 ^b	1.14 ^b	1.23 ^a	1.20 ^a	0.01

¹Values are means from triplicate groups of fish where the means in each column with a different superscript are significantly different (P<0.05).

²Weight gain (%) = (final weight - initial weight) × 100 / initial weight

³Feed Efficiency (%) = wet weight gain (g) × 100 / dry feed intake (g)

⁴Specific growth rate (%) = (log_e final wt. - log_e initial wt.) / days

⁵Protein efficiency ratio : wet weight gain / protein intake

⁶Condition factor : (fish wt. / fish length³) × 100

⁷Pooled standard error of mean

Table 6. Hematological and serological characteristics of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed experimental diets for the 6 weeks¹

	Diets					Pooled SEM ⁴
	Control	G _{0.01}	G _{0.025}	G _{0.05}	G _{0.1}	
Hemoglobin (g/dl)	6.14	6.17	6.11	6.08	6.12	0.21
Hematocrit (%)	26.5 ^c	26.8 ^c	27.2 ^b	28.6 ^a	29.2 ^a	1.04
Serum GOT (IU/L) ²	52.5 ^a	53.1 ^a	50.1 ^b	47.3 ^c	46.6 ^c	2.06
Serum GPT (IU/L) ³	11.2	10.4	11.5	10.8	10.1	1.12

¹Means of triplicate groups; Values in the same row with different superscripts are significantly different (P<0.05).

²Glutamic oxaloacetic transaminase. One unit is defined as the amount of enzyme causing the transamination of 1.0 µmol of L-aspartate per minute at 25°C and pH 7.4.

³Glutamic pyruvic transaminase. One unit is defined as the amount of enzyme causing the transamination of 1.0 µmol of L-alanine per minute at 25°C and pH 7.4.

⁴Pooled standard error of mean : SD/ √n

Table 7. Non-specific immune factors of olive flounder fed the experimental diet for the six-weeks of feeding period¹

Diet	Peak value of CL (mV)	Lysozyme activity (U/ml)	ACH50 (U/ml)
Control	387 ^c	315 ^b	47
G _{0.01}	395 ^c	331 ^b	53
G _{0.025}	373 ^c	322 ^b	45
G _{0.05}	512 ^b	415 ^a	56
G _{0.1}	635 ^a	432 ^a	49
Pooled SEM ²	23	15	5

¹Values are means from triplicate groups of fish where the means in each column with a different superscript are significantly different (P<0.05).

²Pooled standard error of mean.

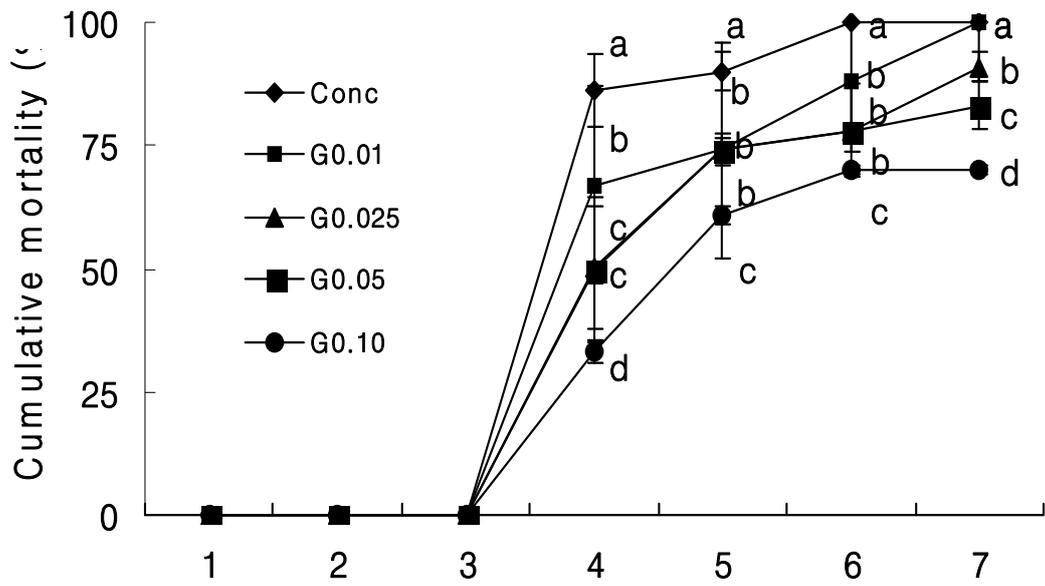


Fig. 14. Cumulative mortality (%) after intraperitoneal injection of *Edwardsiella tarda* in cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

제 6절 베타글루칸과 아미노산 복합제로 구성된 첨가제 개발

1. 연구의 목적

국내 양식어류의 종묘생산 및 양성과정에 있어서 수많은 세균성 질병, 바이러스 질병 및 기생충성 질병은 커다란 문제로 대두되고 있어 막대한 경제적 손실을 초래하고 있다. 아울러, 현장에서는 양식어류의 질병 대책으로 미연 방지보다는 질병 발생 후에 항생제 및 여러 종류의 화학약품을 사용하고 있다. 이와 같은 약제의 과다 사용, 오·남용은 어류의 자체 면역 반응을 감소시킬 뿐만 아니라 환경오염 및 병원체의 내성 증가 문제와 나아가서는 인체에도 영향을 줄 수 있는 가능성 등 많은 문제점을 가지고 있다. 특히 일본으로 수출되는 넙치의 경우 어체 내의 항생제 잔류검사 실시 등으로 항생제 및 약제의 과다사용, 오·남용 문제에 대하여는 심사숙고해야 할 시점에 이르렀으며, 또한 어가의 지속적인 하락으로 말미암아 생산성을 향상시킬 수 있는 방안이 무엇인지를 찾는 양식 어가의 고민은 심히 크다고 말할 수 있다. 이에 국내에서는 성장촉진 및 사료효율을 개선하거나 어류의 비 특이적 면역반응을 증강시켜 생산성 향상 및 양식어류의 질병을 예방할 수 있는 저가의 사료 첨가제 필요성이 대두되고 있다.

이에 본 실험에서는 현재 면역증강물질로 알려진 베타글루칸과 사료 섭취 촉진제인 케라틴 가수분해물이 1대 9로 혼합되었으며, 베타맥스 (BM)라 명명하였다. 케라틴(keratin) 가수분해물의 아미노산 조성은 아르기닌, 히스티딘, 이소루이신, 류신, 라이신, 메티오닌, 트레오닌, 발린, 시스틴, 세린, 프롤린 등을 1에서 7% 함유하며, 치어기 넙치 사료내 면역증강 및 사료섭취촉진제를 첨가하여 성장 및 비특이적 면역반응에 미치는 영향과 최적 첨가 농도를 규명하고자 한다.

2. 재료 및 방법

가. 실험어 사육 및 관리

실험사료 및 환경에 적응시키기 위해 1주일간 기초를 공급하면서 예비사육을 하였다.

실험어는 넙치 치어 ($9.2 \pm 0.1\text{g}$)를 사용하였으며 60ℓ 사각수조에 15마리씩 각 실험구당 3반복으로 무작위 배치하였다. 사육수는 유수식으로 유수량은 2-4ℓ/min로 조절하였다. 수온은 전 실험기간동안 $16 \pm 1.1^\circ\text{C}$ 였다. 각 수조에 충분한 산소공급을 위해 에어스톤을 설치하였다. 일일 사료공급량은 어체중의 3-5% (건물량 기준)로 1일 2회 (10:00, 16:00h) 공급 하였다. 2주마다 각 수조의 전체 실험어 무게를 측정하고 사료공급량을 조절하였다.

나. 어체측정

어체 측정은 2주 간격으로 실시하였으며, 성장률을 측정하기 위하여 24시간 절식시킨 후 MS-222 (100 ppm)로 마취시켜 수조별로 전체무게를 측정하였다. 실험종료 후, 증체율(weight gain, %), 사료효율(feed efficiency, %), 일간성장률(specific growth rate, %/day), 단백질전환효율(protein efficiency ratio), 간중량지수(hepatosomatic index), 비만도(condition factor) 및 생존율(survival, %)을 조사하였다. 간중량지수를 구하기 위해 각 수조별로 3마리씩 간의 무게를 측정하였다. 상기 측정 항목들의 계산식은 다음과 같다.

- Weight gain (%) : $(\text{final wt.} - \text{initial wt.}) \times 100 / \text{initial wt.}$
- Feed efficiency (%) : $(\text{wet weight gain} / \text{dry feed intake}) \times 100$
- Specific growth rate (%/day) : $(\log_e \text{ final wt.} - \log_e \text{ initial wt.}) / \text{days}$
- Protein efficiency ratio : $(\text{wet weight gain} / \text{protein intake})$
- Hepatosomatic index : $(\text{liver weight} / \text{body weight}) \times 100$
- Condition factor : $[\text{fish wt. (g)} / \text{fish length (cm)}^3] \times 100$

다. 성분분석

(1) 일반성분 분석

일반성분은 실험사료와 각 수조별로 6마리씩 무작위로 추출하여 분쇄한 전어체를 분석하였으며, AOAC (1995)방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125°C , 3시간), 조단백질은 kjeldahl 질소정량법($N \times 6.25$), 조회분은 직접회화법으로 분석하였다. 조지방은 샘플을 12시간 동결건조한 후 Soxtec system 1046 (Tacator AB, Sweden)을 사용하여 soxhlet 추출법으로 분석하였다.

(2) 어체의 혈액 및 혈청성분 분석

실험종료 후, 증체를 조사와 함께 혈액성분 분석을 위하여 실험어를 채혈하기 전까지 약 24시간 동안 절식시켰다. 실험어를 각 수조당 3마리씩 무작위로 추출하여 실험어의 미부정맥에서 혈액을 채혈한 후, micro-hematocrit 방법(Brown, 1980)에 의해 헤마토크리트(hematocrit, PCV)를 측정하고, 동시에 Drabkin's 용액을 사용하여 cyan-methemoglobin 방법(Sigma Chemical, St. Louis MO; total hemoglobin procedure No. 525)으로 헤모글로빈(hemoglobin, Hb)을 측정하였다. 혈청성분의 분석을 위하여 채혈한 혈액을 항응고제가 처리되지 않은 원심분리관에 넣고 실온에 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 냉장보관하면서 16시간 이내에 분석하였다. 혈청성분은 임상용 kit(아산)를 사용하여 총단백질(total protein)은 biuret법으로, 트리글라이세라이드(triglyceride)와 글루코스(glucose)는 효소법으로 그리고 GOT (glutamic oxaloacetic acids)와 GPT (glutamic pyruvic acid)는 Reitman - Frankel 법으로 분석하였다.

라. 두신 식세포의 Chemiluminescent 반응

(1) 두신 백혈구의 분리

성장실험 종료후, MS222로 마취시킨 넙치로 부터 두신을 무균적으로 분리한 후 4℃로 냉장한 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)에 넣어 가는 망사를 이용하여 세포들을 분리해 내었다. 분리된 두신 세포는 다시 34/51%의 Percoll (Sigma) density gradient를 이용하여, 4℃에서 400 rpm으로 30분간 원심분리한 다음 34%와 51% 사이의 세포층을 가는 파스퇴르 피펫을 이용하여 분리하였다. 최종적으로 분리된 세포는 HBSS로 400 g에서 5분간 2번 세척하였다. 세포의 생존유무는 trypan blue stain을 이용하여 분석하였으며, 모든 실험구에서 분리된 세포들의 생존율은 98% 이상이었다. 실험에 사용한 식세포의 세포수는 *in vitro*에서는 1×10^6 cells/ml HBSS로, *in vivo*에서는 2×10^6 cells/ml HBSS로 조절하였다.

(2) Opsonization of Zymosan

Zymosan (Sigma)을 본 실험에 사용하지 않은 건강한 넙치 성어로부터 분리한 혈청

과 혼합하여 30℃에서 30분간 배양하였다. 이과정을 통해 opsonization이 된 zymosan을 원심분리하여 분리하고, HBSS를 이용하여 3회 세척하였다.

(3) Chemiluminescent (CL) response 분석

식세포에서 방출되는 reactive oxygen intermediates (ROIs)는 automatic photoluminometer (Bio-Orbit 1251, Finland)에 의해 정량적으로 분석하였다. 즉, 각 test cuvette은 Scott and Klesius (1981)의 방법에 따라 조제한 luminol (Sigma) 0.7 ml과 cell suspension 0.4 ml을 혼합하여 5분간 실온에서 incubation 한 후 측정 직전에 opsonized zymosan 0.3 ml을 첨가하여 100분간 측정하였다.

마. Lysozyme의 활성

각각의 실험구 어류에서 분리한 혈청 0.1 ml과 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.2)에 *Micrococcus lysodeikticus* (0.2 mg/ml)를 부유시킨 suspension 2 ml과 혼합하였다. 반응은 20℃ 조건에서 분광 흡광도계의 흡광도 530 nm에서 0.5분과 4.5분에 측정하였다. lysozyme의 활성 단위는 분당 0.001의 흡광도 감소를 나타내는 효소량으로 정의하였다.

바. 보체 대체 경로 (ACP) 활성의 분석

보체 대체 경로 (ACP) 활성은 sheep red blood cells (SRBC)를 이용하여 분석하였다. SRBC를 Mg^{2+} 와 EGTA가 포함된 gelatin veronal buffer (GVB)에 3번 세척하고, 같은 완충액에서 $2 \times 10^8/ml$ 로 조절하였다. 실험 혈청을 GVB를 이용하여 연속적으로 단계 희석한 후, SRBC를 100 μ l 첨가하였다. 이 혼합액을 가끔씩 흔들어 주면서 20℃에서 90분간 배양한 후, 4℃에서 1600 g로 원심분리하여 상층액을 분광 흡광도계의 흡광도 414 nm에서 측정하였다. ACP (ACH50) 활성은 용혈의 정도에 따라 계산하였다.

사. 통계분석

모든 자료는 Computer Program Statistix 3.1 (Analytical Software, St. Paul, Mn. USA)로 분산분석(ANOVA)을 실시하여 최소유의차검정(LSD : Least Significant Difference)으로 평균간의 유의성(P = 0.05)을 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

양식어의 면역증강뿐만 아니라 성장촉진을 위하여 사료첨가제 배합에 대한 연구를 하였다. 사료첨가제는 베타글루칸과 케라틴 가수분해물이 1대 9로 혼합되었으며, 베타맥스(BM)라 명명하였다. 케라틴(keratin) 가수분해물의 아미노산 조성은 아르기닌, 히스티딘, 이소류이신, 류신, 라이신, 메티오닌, 트레오닌, 발린, 시스틴, 세린 프롤린 등을 1에서 7% 함유한다.

베타글루칸과 사료섭취촉진물질이 넙치의 성장 또는 비특이적 면역반응에 미치는 영향을 조사하여 사료내 적정 투여량을 추정하기 위해 실험사료에 베타맥스(베타글루칸과 사료섭취촉진물질 혼합제)의 함량이, 0%, 0.5%, 1.0%, 1.5%, 3.0%가 되도록 제작하였다. 7주간의 실험결과는 Table 8와 Table 9에 나타내었다. 증체율, 사료효율, 일간성장율, 단백질 전환효율 비만도에 있어서 BM_{1.0}와 BM_{1.5}이 다른 모든 실험구가 유의적으로 높은 결과를 보였다. 간중량 지수와 생존율에 있어서 모든 실험구간에 유의적인 차이가 없었다. 전어체 일반성분 분석치는 Table 10에 나타내었다. 전어체 단백질함량에 있어서 BM_{1.0}와 BM_{1.5}이 다른 모든 실험구에 비해서 높게 나타났으나, 전어체 지방함량에 있어서는 BM_{1.0}와 BM_{1.5}이 다른 모든 실험구에 비해 유의적으로 낮게 나타났다. 혈액 및 혈청 성분변화는 Table 11에 나타내었다. 헤모글로빈(Hb)은 모든 실험구에서 유의적인 차이가 없었으나, 헤마토크리트(Hematocrit)에 있어서 control, BM_{1.0}와 BM_{1.5}이 BM_{0.5}와 BM_{3.0}에 비해 유의적으로 높은 값을 보였다. 혈청내 총단백질, 글루코스와 GPT는 모든 사료구에서 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 혈청내 GOT에 있어서 BM_{1.0}와 BM_{1.5}이 다른 모든 실험구에 비해 유의적으로 낮은 값을 보였다. 성장실험 후, 비특이적 면역반응과 관련한 자료는 Table 12에 나타내었다. 두신 식세포의 chemiluminescence (CL) 반응에 있어서 diet 4와 5가 다른 모든 실험구에 비해 유의적으로 높은 결과를 보여주었다. 혈청의 lysozyme 활성에 있어서 대조구에 비해 다른 모든 실험구가 유의적으로 높은 결과를 보였고, BM_{1.0}가 유의적으로 가장 높은 결과를 보였다.

Table 8. Weight gain, feed efficiency, specific growth rate and protein efficiency rate for olive flounder fed experimental diet for the seven-weeks of feeding period¹

Diets	WG (%) ²	FE (%) ³	SGR (%) ⁴	PER ⁵
Control	199 ^c	76.3 ^c	2.24 ^c	1.53 ^c
BM _{0.5}	217 ^b	80.0 ^b	2.35 ^b	1.60 ^b
BM _{1.0}	243 ^a	84.8 ^a	2.52 ^a	1.70 ^a
BM _{1.5}	244 ^a	85.5 ^a	2.52 ^a	1.72 ^a
BM _{3.0}	218 ^b	79.3 ^b	2.36 ^b	1.57 ^b
Pooled SEM ⁶	3.11	1.23	0.03	0.03

¹Values are means from triplicate groups of fish where the means in each column with a different superscript are significantly different (P<0.05).

²Weight gain (%) = (final weight - initial weight) × 100 / initial weight

³Feed Efficiency (%) = wet weight gain (g) × 100 / dry feed intake (g)

⁴Specific growth rate (%) = (log_e final wt. - log_e initial wt.) / days

⁵Protein efficiency ratio : wet weight gain / protein intake

⁶Pooled standard error of mean.

Table 9. Condition factor, hepatosomatic index (HSI) and survival for olive flounder fed experimental diet for the seven-weeks of feeding period¹

Diets	CF ²	HSI ³	Survival (%)
Control	1.16 ^b	2.53	100
BM _{0.5}	1.17 ^b	2.47	100
BM _{1.0}	1.27 ^a	2.45	100
BM _{1.5}	1.26 ^a	2.49	100
BM _{3.0}	1.14 ^b	2.44	100
Pooled SEM ⁴	0.04	0.21	0.00

¹Values are means from triplicate groups of fish.

²Condition factor : {fish wt. (g) / fish length (cm)³ } × 100

³Hepatosomatic index : (liver weight / body weight)×100

⁴Pooled standard error of mean

Table 10. Proximate analysis of whole-body of olive flounder fed experimental diet for the seven-weeks of feeding period (% of dry matter basis)¹

Diets	Moisture	Crude Protein	Crude fat	Ash
Control	74.2	66.5 ^c	16.8 ^a	12.3
BM _{0.5}	73.9	68.8 ^b	16.4 ^a	12.4
BM _{1.0}	74.1	72.1 ^a	14.4 ^b	12.3
BM _{1.5}	73.9	71.8 ^a	14.5 ^b	12.1
BM _{3.0}	73.6	66.9 ^c	16.6 ^a	12.2
Pooled SEM ⁵	1.12	0.91	0.27	0.34

¹Values are means from triplicate groups of fish where the means in each column with a different superscript are significantly different (P<0.05).

²Pooled standard error of mean

Table 11. Serological and hematological characteristics of oliver flounder fed the experimental diet for the seven-weeks of feeding period¹.

	Diets					Pooled SEM ²
	Control	BM _{0.5}	BM _{1.0}	BM _{1.5}	BM _{3.0}	
Hemoglobin (g/dL)	6.24	6.13	6.07	6.27	6.12	0.35
Hematocrit (%)	27.6 ^b	26.8 ^c	28.1 ^{ab}	28.5 ^a	26.5 ^c	1.74
Serum Total protein (g/dL)	3.6	3.3	3.6	3.3	3.2	0.33
Serum glucose (mg/dL)	47.8	46.5	46.8	46.5	47.2	3.74
Serum GOT (IU/L) ³	49.7 ^a	51.4 ^a	46.9 ^b	46.4 ^b	50.3 ^a	2.56
Serum GPT (IU/L) ⁴	10.1	9.7	10.2	10.5	10.6	1.37

¹Values are means from triplicate groups of fish where the means in each column with a different superscript are significantly different (P<0.05).

²Pooled standard error of mean

³Glutamic oxaloacetic transaminase. One unit is defined as the amount of enzyme causing the transamination of 1.0µmol of L-aspartate per minute at 25°C and pH 7.4.

⁴Glutamic pyruvic transaminase. One unit is defined as the amount of enzyme causing the transamination of 1.0 µmol of L-alanine per minute at 25°C and pH 7.4.

Table 12. Non-specific immune factors of oliver flounder fed the experimental diet for the seven-weeks of feeding period¹

Diets	Peak value of CL (mV)	Lysozyme activity (U/ml)	ACH50 (U/ml)
Control	437 ^d	306 ^d	56
BM _{0.5}	478 ^c	357 ^c	49
BM _{1.0}	675 ^a	453 ^a	45
BM _{1.5}	592 ^b	412 ^b	58
BM _{3.0}	441 ^d	368 ^c	36
Pooled SEM ²	27	19	8

¹Values are means from triplicate groups of fish where the means in each column with a different superscript are significantly different (P<0.05).

²Pooled standard error of mean

국내 주요 해산어종인 넙치 치어에 있어서 면역증강 물질인 베타글루칸과 사료섭취 촉진물질인 케라틴 가수분해물의 혼합제인 베타맥스(Betamax)의 첨가에 따르는 성장률, 사료효율(FE), 일간성장률(SGR) 및 단백질 전환효율(PER)에 있어서 베타맥스(Betamax)의 농도가 증가함에 따라 BM_{1.5}실험구까지 유의적으로 증가하였다. 그리고 BM_{1.0}와 BM_{1.5}이 다른 모든 실험구와 비교하여 유의적으로 높게 나타났다. 면역반응 조사에 있어서 두신 식세포 활성 분석과 혈청내 lysozyme의 활성 조사 결과는 BM_{1.0}까지 유의적으로 증가하였다. 그리고 BM_{1.0}이 다른 모든 실험구와 비교하여 유의적으로 높게 나타났다. 이는 글루칸이 어류의 식세포를 활성화시키는 기작에 대한 최근의 연구결과에 의하면, 식세포의 표면에는 글루칸과 결합할 수 있는 수용기(receptor)가 있어서 이 부위에 글루칸이 결합되면 식세포가 활성화되는 것이다.

비만도(CF)에 있어서도 대조구에 비해 BM_{1.0}와 BM_{1.5} 첨가 실험구가 높게 나타났다. 전어체 단백질함량에 있어서 BM_{1.0}와 BM_{1.5} 첨가 실험구가 다른 모든 실험구에 비해서 높게 나타났다. 이러한 결과는 넙치전어체내 단백질의 축적을 증가와 지방대사의 활성화를 통한 지방축적을 감소시켜 건강한 상태를 유지하고 고급육질 생산에도 기여할 것으로 사료된다. 헤마토그리트는 성장 및 비특이적 면역반응 효과가 좋았던 BM_{1.0}와 BM_{1.5} 첨가 실험구가 높은 값을 보였다. 혈청내 효소중의 하나인 GOT와 GPT는 간과 심장의 조직 손상으로 인해서 혈장 내의 농도가 증가하는 것으로 알려져 있다. 혈청 내 GOT는 성장 및 비특이적 면역반응 효과가 좋았던 BM_{1.0}와 BM_{1.5} 첨가 실험구가 낮은 값을 보여 어류의 생리적 활성을 높여주는 결과를 나타내었다. 따라서, 상기 실험의 결과를 토대로 면역증강물질인 베타글루칸과 사료섭취촉진물질의 혼합한 베타맥스(Betamax)는 치어기 넙치의 성장과 면역증강의 향상을 위한 사료내 BM_{1.0}의 혼합이 가장 바람직한 것으로 판단된다.

제 7절 베타맥스의 양식 현장적용 실험

- 제주도 M 양식장에서의 현장적용 -

1. 연구목표

현대사회는 국민의 소득수준 향상에 따라 식생활이 육류에서 수산물로 중심축이 변하여 국가마다 수산물의 소비량은 점차 증가하고 있으나, 어업생산량은 환경오염과 수산자원의 남획으로 인해 현재의 어업생산량 6천만 톤 이상의 증가는 기대하기 어려운 실정이다. 따라서 부족한 생산량은 양식어업에 의해 보충되어져 2001년에 2천 9백만 톤에 달하고 있으며 FAO(2003), 매년 1% 가량의 성장률을 보이고 있어 2035년에는 1억 2천만 톤의 생산이 예상되고 있다.

농축산업의 생산성이 한정된 토지에 영향을 받고 있는 것처럼, 양식산업도 연안 수괴의 한정적인 이용에 제한을 받으면서, 이용효율을 극대화하기 위하여 고밀도 양식이 널리 확산되고 있다. 특히 한국의 경우 산업화에 의한 수질 오염, 연안개발에 따른 매립 및 수자원 보호의 환경정책 등으로 인해 양식을 위한 이용 수면적이 줄어들면서 고밀도 양식은 필요불가결한 요소가 되었다.

고밀도 양식이 양식의 효율을 높일 수는 있으나, 인위적인 고밀도 양식 시스템에서의 어류는 다양한 형태의 스트레스(고밀도 사육, 물리적 장애, 수질 악화, 항생제 및 화학약품의 남용, 선별 등등)에 노출되어 있다(Donaldson, 1981; Wendelaar Bonga, 1997). 이러한 양식 조건은 사육 중인 어류의 최적 성장을 방해하며(Wedemeyer, 1976; Wardle, 1981), 주변 환경에 의해 체내대사와 생리적 상태가 부정적 변화를 가져오게 한다(Clark et al., 1981; Berg et al., 1992). 이러한 예로서, 종묘생산 및 양성과정에 있어서 에너지 대사와 성장률 저하(Barton and Iwama, 1991) 및 사망 후 육질의 변성(Lowe et al., 1993) 등을 유발하여 궁극적으로는 양식 생산량의 감소를 가져온다. 또한, 어류의 면역기능을 억압함으로써 질병에 대한 감수성을 증가시켜 낮은 성장률을 유발하는데 직접적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Pickering, 1992). 그리고 비특이적 면역조절 능력을 저하시키고 병원균으로부터 감염을 일으킨다. 척추동물에 있어 비특이적 방어는 병원균의 감염시 첫 번째 방어선으로 알려져 있으며, 선천적인 면역시스템의 활성화에 의해 병원균으

로부터 저항할 수 있는 능력이 강화될 수 있음이 보고되고 있다(Anderson and Siwicki, 1994).

이러한 문제로 인한 어류의 생산량 감소와 함께 가장 큰 문제점은 양식 시설 및 부화장내에 서식하고 있는 상재세균의 영향이 큰 것으로 보고되고 있다(Vadstein, 1997). 병원성 세균 보다는 감염의 기회가 많이 주어진 이러한 세균에 의한 피해가 해마다 증가하고 있음을 보고하고 있다(Munro et al., 1995). 세균성 질병으로 인한 문제점을 해결하기 위해 사육수를 소독하거나 혹은 항생제를 사용하기도 하는데, 이러한 방법들은 세균 개체군간의 균형을 불안정하게 만들며, 궁극적으로는 단시간적인 해결책에 지나지 않는다. 또한 최근 항생제 사용의 증가로 인해 항생제에 대한 내성균주의 발생이 계속적으로 보고되고 있으며(Aoki, 1992), 장기간에 걸친 항생제의 사용은 어류에게 많은 스트레스를 줄 뿐만 아니라 환경오염 및 인체에 나쁜 영향을 미칠 수 있는 문제점들을 안고 있다. 일본에서는 정부차원에서 법령을 정비하여 양어장을 관리하고 있으며 현장지도 지침서를 통한 적정밀도의 유지를 통해 1차적인 질병관리를 지도하고 있다. 화학약제 및 항생제 사용량 감소를 유도하여 내성균 발생 문제를 해결하기 위한 노력을 기울이고 있다. 이러한 지속적이고 체계적인 관리를 통해서 매년 항균성 약제의 사용량은 급감하는 반면, 양식생산량은 오히려 급격히 증가하고 있다. 따라서 최근에는 화학제제가 아닌 환경친화적인 양어사료 첨가제에 대한 관심이 집중되고 있다.

본 연구를 통하여 넙치에서 비특이적 면역 반응 및 질병 저항력을 증가시키는 베타글루칸과 성장 촉진 인자인 아미노산 체제를 혼합하여 개발한 베타맥스를 이용하여 실제 넙치 양식장에서 현장 적용 평가를 실시 하고자 한다. 이를 위해 베타맥스의 첨가가 넙치의 성장을 촉진하는 지 검증하고, 비특이적 면역반응에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 제주도와 남해안의 넙치 양식장을 대상으로 현장적용 실험을 수행하였다. 제주도 성산에 위치한 양식장 2곳과 경북, 포항, 완도 등지에 시제품을 공급하여 모두 긍정적인 결과를 보였다.

2. 재료 및 방법

가. 실험사료 및 실험디자인

실험사료는 넙치 양식장에서 일반적으로 사용하는 MP사료를 사용하였다. 베타맥스는

실험실규모의 성장 및 면역 증강물질의 효과를 바탕으로 제작하여 MP사료내 1.0% (DM basis)를 첨가하여 공급하였다. 실험디자인은 M 양어장의 넙치중 선두그룹(평균 168 g)을 대조구로 하고, 중·하위그룹(평균 141 g)을 베타맥스 첨가구로 하였다.

- Diet 1 : 대조구(Con.) - 선두그룹
- Diet 2 : 베타맥스 첨가구(BM) - 중·하위그룹

나. 실험어 및 사육관리

실험은 제주도에 위치한 M 양어장에서 실시하였다. 실험어는 넙치 육성어를 사용하였다. 수온은 전 실험기간동안 자연수온에 의존하였다. 일일 사료공급량은 어체중의 3~8%(As is basis)로 1일 2회 공급 하였다. 4주마다 실험어 무게를 측정하였는데, 각 수조에서 무작위로 20마리를 잡아 총무게를 측정하고 어체의 평균을 구하였다.

다. 어체측정

어체 측정은 2주 간격으로 실시하였으며, 성장률을 측정하기 위하여 24시간 절식시킨 후 MS-222 (100ppm)로 마취시켜 수조별로 전체무게를 측정하였다. 실험 종료 후, 증체율(weight gain, %), 사료효율(feed efficiency, %), 일간성장률(specific growth rate, %/day), 단백질전환효율(protein efficiency ratio), 간중량지수(hepatosomatic index), 비만도(condition factor) 및 생존율(survival, %)을 조사하였다. 간중량지수를 구하기 위해 수조별로 3마리씩 간의 무게를 측정하였다. 상기 측정 항목들의 계산식은 다음과 같다.

- Weight gain (%) : $(\text{final wt.} - \text{initial wt.}) \times 100 / \text{initial wt.}$
- Feed efficiency (%) : $(\text{wet weight gain} / \text{dry feed intake}) \times 100$
- Specific growth rate (%/day) : $(\log_e \text{ final wt.} - \log_e \text{ initial wt.}) / \text{days}$
- Protein efficiency ratio : $(\text{wet weight gain} / \text{protein intake})$
- Hepatosomatic index : $(\text{liver weight} / \text{body weight}) \times 100$
- Condition factor : $[\text{fish wt. (g)} / \text{fish length (cm)}^3] \times 100$

라. 성분분석

(1) 일반성분 분석

일반성분은 실험사료와 각 수조별로 6마리씩 무작위로 추출하여 분쇄한 전어체를 분석

하였으며, AOAC(1995) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125℃, 3시간), 조단백질은 kjeldahl 질소정량법(N×6.25), 조지방은 직접회화법으로 분석하였다. 조지방은 샘플을 12시간 동결건조한 후 Soxtec system 1046(Tacator AB, Sweden)을 사용하여 soxhlet 추출법으로 분석하였다.

(2) 혈액성분 분석

실험종료 후 증체율 조사와 함께 혈액성분 분석을 위하여 실험어를 채혈하기 전까지 약 24시간동안 절식시켰다. 실험어를 각 수조당 3마리씩 무작위로 추출하여 실험어의 미부정맥에서 혈액을 채혈한 후, micro-hematocrit 방법(Brown, 1980)에 의해 헤마토크리트(hematocrit, PCV)를 측정하고, 동시에 Drabkin's 용액을 사용하여 cyan-methemoglobin 방법(Sigma chemical, St. Louis MO; total hemoglobin procedure No. 525)으로 헤모글로빈(hemoglobin, Hb)을 측정하였다. 혈청성분의 분석을 위하여 채혈한 혈액을 항응고제가 처리되지 않은 원심분리관에 넣고 실온에 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 냉장보관하면서 16시간 이내에 분석하였다. 혈청성분은 임상용 kit(아산)를 사용하여 총단백질(total protein)은 biuret법으로, 트리글라이세라이드(triglyceride)와 글루코스(glucose)는 효소법으로 그리고 GOT(glutamic oxaloacetic acid)와 GPT(glutamic pyruvic)는 Reitman-Frankel 법으로 분석하였다.

마. 두신 식세포의 Chemiluminescent 반응

두신 백혈구의 분리 : 성장실험 종료 후, MS-222로 마취시킨 넙치로부터 두신을 무균적으로 분리한 후 4℃로 냉장한 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)에 넣어 가는 망사를 이용하여 세포들을 분리해 내었다. 분리된 두신 세포는 다시 34/51%의 Percoll (Sigma) density gradient를 이용하여, 4℃에서 400rpm으로 30분간 원심분리한 다음 34%와 51% 사이의 세포층을 가는 파스퇴르 피펫을 이용하여 분리하였다. 최종적으로 분리된 세포는 HBSS로 400g에서 5분간 2번 세척하였다. 세포의 생존유무는 trypan blue stain을 이용하여 분석하였으며, 모든 실험구에서 분리된 세포들의 생존율은 98% 이상이었다. 실험에 사용한 식세포의 세포수는 *in vitro*에서는 1×10^6 cell/ml HBSS로, *in vivo*에서는 2×10^6 cell/ml HBSS로 조절하였다.

Opsonization of zymosan : Zymosan(Sigma)을 본 실험에서 사용하지 않은 건강한 넙치

성어로부터 분리한 혈청과 혼합하여 30℃에서 30분간 배양하였다. 이과정을 통해 opsonization이 된 zymosan을 원심분리하여 분리하고, HBSS를 이용하여 3회 세척하였다. Chemiluminescent(CL) response : 식세포에서 방출되는 reactive oxygen intermediates (ROIs)는 automatic photoluminometer (Bio-Orbit 1251, Finland)에 의해 정량적으로 분석하였다. 즉, 각 test cuvette은 Scott and Klesius (1981)의 방법에 따라 조제한 luminol(Sigma) 0.7ml과 cell suspension 0.4 ml을 혼합하여 5분간 실온에서 incubation 한 후 측정 직전에 opsonized zymosan 0.3 ml을 첨가하여 100분간 측정하였다.

바. Lysozyme의 활성

Lysozyme activity는 Parry et al. (1995)의 turbidimetric method를 이용하여 측정하였다. 즉, 각 실험구에서 분리한 혈청을 *Micrococcus lysodeikticus*를 0.2 mg/ml의 농도로 0.05M sodium phosphate buffer (pH 6.2)에 현탁 시킨 다음 이 현탁액의 950 μ l와 혈청 50 μ l를 혼합하여 25℃에서 30초 및 4분 30초 간 반응시킨 후 Spectrophotometer (530 nm)를 이용하여 unit/ml로 lysozyme 활성을 측정하였다. lysozyme의 활성 단위는 분당 0.001의 흡광도 감소를 나타내는 효소량으로 정의하였다.

사. 통계분석

모든 자료는 Computer program statistix 3.1 (Analytical Software, St. Paul, Mn. USA)로 분산분석(ANOVA)을 실시하여 최소유의차검정(LSD : Least significant difference)으로 평균 간의 유의성(P<0.05)를 검정하였다.

3. 제주도 M 양식장에서의 결과

본 실험에서는 성장 및 면역촉진물질을 넙치양식현장에 적용하였을 때, 성장촉진효과를 검증하고 비특이적 면역반응에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 베타맥스는 실험실규모의 성장 및 면역 증강물질의 효과를 바탕으로 제작하여 MP사료내 0.5%를 첨가하여 공급하였다.

6 개월간의 실험결과는 Fig. 15와 Table 13에 나타내었다. 증체율, 일간성장율과 비만도에 있어서 베타맥스 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 높은 결과를 보였다. 간중량 지수에 있어서 두 실험구간에 유의적인 차이가 없었다. 전어체 일반성분 분석치는 Table

14에 나타내었다. 전어체 단백질함량에 있어서 베타맥스 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 높은 결과를 보였다($P<0.05$). 하지만, 전어체 수분, 지방과 회분함량에 있어서는 두 실험구간에 유의적인 차이가 없었다. 이러한 차이는 넙치전어체내 단백질의 축적을 증가와 지방대사의 활성화를 통한 지방축적을 감소시켜 건강한 상태를 유지하고 고급육질 생산에도 기여할 것이다. 혈액 및 혈청 성분변화는 Table 15에 나타내었다. 헤모글로빈(Hb)과 헤마토크리트(Hematocrit)에 있어서 베타맥스 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 높은 결과를 보였다($P<0.05$). 혈청내 GOT에 있어서 베타맥스 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 낮은 결과를 보였다($P<0.05$). 하지만 혈청내 GPT에 있어서는 두 실험구간에 유의적인 차이가 없었다. 혈청내 GOT는 베타맥스 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 낮은 값을 보였고, GOT와 GPT는 간과 심장의 조직손상으로 인해서 혈장 내의 농도가 증가하는 것으로 알려져 있어 넙치의 생리활성과 건강도가 높아졌음을 단적으로 보여주었다. 비특이적면역 반응으로 두신 식세포의 chemiluminescent 반응 및 lysozyme의 활성의 결과는 표 16에 나타내었다. lysozyme의 활성에 있어서 베타맥스 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 높은 결과를 보였다($P<0.05$). 하지만 두신 식세포의 chemiluminescent 반응에 있어서는 두 실험구간에 유의한 차이가 없었다.

Table 13. Weight gain, specific growth rate, condition factor and hepatosomatic index for olive flounder fed experimental diet for the six-months of feeding period¹

Diets	Control	Betamax	Pooled SEM ²
Initial wt. (g)	168 ^a	141 ^b	6.30
Final wt. (g)	974	968	5.82
WG (%) ³	480 ^b	587 ^a	3.94
SGR (%) ⁴	0.98 ^b	1.07 ^a	0.03
CF ⁵	1.18 ^b	1.28 ^a	0.04
HSI ⁶	1.85	1.68	0.10

¹Values are means from triplicate groups of fish where the means in each row with a different superscript are significantly different (P<0.05).

²Pooled standard error of mean

³Weight gain (%) = (final weight - initial weight) × 100 / initial weight

⁴Specific growth rate (%) = ((log_e final wt. - log_e initial wt.) / days) × 100

⁵Condition factor : {fish wt. (g) / fish length (cm)³ } × 100

⁶Hepatosomatic index : (liver weight / body weight)×100

Table 14. Proximate analysis of whole-body of oliver flounder fed experimental diet for the six-months of feeding period (% of dry matter basis)¹

	Diets		Pooled SEM ²
	Control	Betamax	
Moisture	69.2	69.9	1.3
Crude Protein	62.8 ^b	64.6 ^a	1.2
Crude fat	27.5 ^a	26.2 ^b	0.8
Ash	2.87	2.50	0.2

¹Values are means from triplicate groups of fish where the means in each row with a different superscript are significantly different ($P < 0.05$).

²Pooled standard error of mean

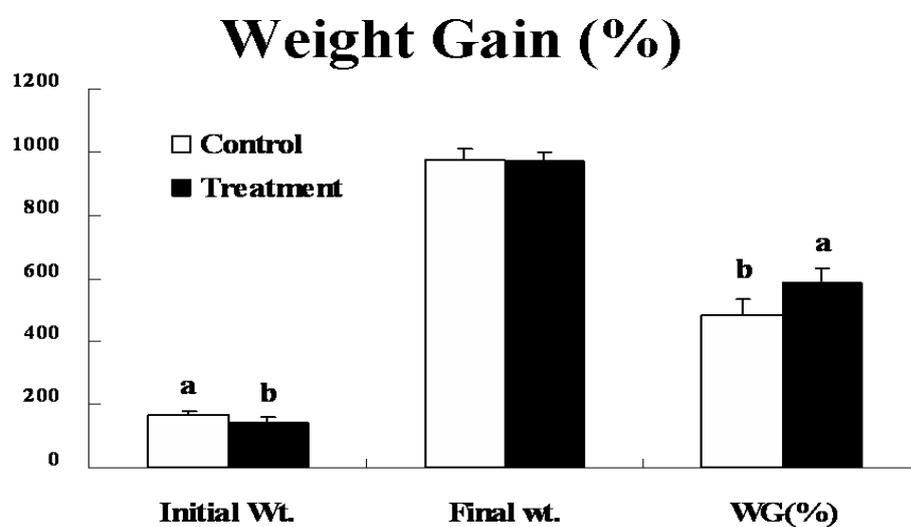


Fig. 15. Weight gain (%) of oliver flounder fed the experimental diet during six months.

Table 15. Serological and hematological characteristics of olive flounder fed the experimental diet for the six-months of feeding period¹.

	Diets		Pooled SEM ²
	Control	Betamax	
Hemoglobin (g/dL)	10.2 ^b	11.8 ^a	0.23
Hematocrit (%)	28.5 ^b	32.3 ^a	1.88
Serum GOT (IU/L) ³	48.2 ^a	46.4 ^b	2.12
Serum GPT (IU/L) ⁴	11.3	10.9	1.23

¹Values are means from triplicate groups of fish where the means in each column with a different superscript are significantly different (P<0.05).

²Pooled standard error of mean.

³Glutamic oxaloacetic transaminase. One unit is defined as the amount of enzyme causing the transamination of 1.0 μmol of L-aspartate per minute at 25°C and pH 7.4.

⁴Glutamic pyruvic transaminase. One unit is defined as the amount of enzyme causing the transamination of 1.0 μmol of L-alanine per minute at 25°C and pH 7.4.

Table 16. Non-specific immune factors of olive flounder fed the experimental diet for the the six-months of feeding period¹

Diets	Peak value of CL (mV)	Lysozyme activity (U/ml)
Control	371	341 ^b
Betamax	382	370 ^a
Pooled SEM ²	20.4	11.7

¹Values are means from triplicate groups of fish where the means in each column with a different superscript are significantly different (P<0.05).

²Pooled standard error of mean.

4. 고찰

우리나라의 주요 해산어종인 넙치양식현장에 있어서 면역증강 물질(Glucan)과 사료 섭취촉진물질(BAISM; 아미노산, 핵산관련물질, 염기성물질 및 산가수분해 물질의 혼합제)을 적정수준으로 혼합한 베타맥스의 첨가는 성장률, 일간성장율과 비만도를 유의적으로 증가시켰다. 이러한 실험결과는 이전의 실험실 규모의 실험과 같은 결과를 보여, 넙치양식현장에 베타맥스가 적용가능 함을 보여주었다. 그리고 비특이적 면역반응 실험결과, 두신 식세포의 chemiluminescence (CL) 반응과 혈청내 lysozyme 활성에 있어서 BAISM 첨가구가 대조구에 비해 혈청내 lysozyme 활성에서만 유의적으로 높은 결과를 보였다. 혈청내 lysozyme 활성증가는 베타맥스에 함유된 글루칸이 어류의 식세포를 활성화시키는 기작에 기인하며 식세포의 표면에는 글루칸과 결합할 수 있는 수용기 (receptor)가 있어서 이 부위에 글루칸이 결합되면 식세포가 활성화시키는 역할을 한 것으로 사료되며, 이와 함께 BAISM을 단독 첨가하였을 때, 아미노산의 섭취촉진효과(Fukuda *et al.*, 1989; Kohbara *et al.*, 1989; Elias and Joseph, 1999; Iwao *et al.*, 2000)와 핵산관련물질들에 의한 면역기능, NK (natural killer) cell 활성, macrophage 기능과 cytokine의 체내생산력의 향상(Carver, 1994) 및 체내 항체의 농도, B-cell 및 T-cell의 활성 증가(Ramadan *et al.*, 1994)로 인하여 어류의 질병과 스트레스 저항성, 백신 효율, 성장률 및 면역반응을 향상시키는 결과(Burrells *et al.*, 2001a,b)를 가져오는 효과가 synergistic 효과를 나타낸 것으로 사료된다.

전어체 일반성분 함량에 있어서 베타맥스 첨가에 의해 단백질의 함량이 유의적으로 증가하였으나($P < 0.05$), 전어체 수분, 지방과 회분함량에 있어서는 별다른 변화가 없었다. 넙치 치어를 대상으로한 실험실 규모의 실험에서는 전어체내 단백질 함량이 증가하고 지방 함량은 감소하는 결과를 보여주었다. 이러한 차이는 넙치전어체내 단백질의 축적을 증가와 지방대사의 활성화를 통한 지방축적을 감소시켜 건강한 상태를 유지하고 고급육질 생산에도 기여할 것이다. 넙치에 있어서 베타맥스가 생리 상태에 미치는 영향을 조사하기 위해, 헤모글로빈, 헤마토크리트, 혈청내 GOT와 GPT의 변화를 생리적 지표로 하여 조사하였다. 헤마토크리트는와 헤모글로빈은 베타맥스 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 높은 값을 보였다. 심(1992)은 넙치의 질병에 대한 저항력이 높아질 때, 헤마토크리트

가 정상어류보다 높아질 수 있다고 하였으므로 본 실험의 결과도 베타맥스 투여에 의해 저항력이 변화한 것과 관련이 있을 것으로 생각된다. 그러나 헤마토크리트, 헤모글로빈 등의 혈액 인자는 체내 산소 운반능력에도 관계가 있어 외부 자극에 대한 체내 산소 소비량의 증가로 인해 헤마토크리트, 헤모글로빈의 수치가 높아진다고 보고(Davis and Parker, 1990)하였으나 대부분의 연구자들은 외부자극이 가해지면 혈액성상이 변화하는 것으로 보고하고 있어(Benifey and Biron, 2000; Mattsson *et al.*, 2001) 이 분야에 대한 명확한 연구가 필요하다.

혈청내 GOT는 베타맥스 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 낮은 값을 보였고, GOT와 GPT는 간과 심장의 조직손상으로 인해서 혈장 내의 농도가 증가하는 것으로 알려져 있어(Hans, 1974) 넙치의 생리활성과 건강도가 높아졌음을 단적으로 보여주었다.

상기 연구결과를 통해 면역증강물질과 사료섭취촉진물질의 혼합제인 베타맥스의 효과를 넙치 양식현장적용이 가능함을 확인 할 수 있었다.

- 추가 현장 적용실험 -

1. 완도 D 수산에서의 현장적용

어류에서 질병에 대한 저항성을 증가시키는 방법으로는 매우 효과적인 방법으로 백신법이 있다. 하지만 백신법의 경우 하나의 질병에 대한 특이적 면역반응에 관여하고 있으며, 현재까지 성공적으로 개발된 어류질병 백신은 그 범위가 제한적이며, 가격면에서 사용하기에 너무 비싸고, 넙치 양식장에서 직접적으로 사용하기에는 많은 애로사항이 따른다. 반면에 어류의 비특이적 면역반응을 증강시키는 것은 많은 종류의 어류 질병에 대한 저항성을 높일 수 있다는 의미에서 매우 중요하며, 비특이적 면역반응의 증진을 통해 양식어류의 질병을 예방하기 위한 면역증강물질(Immunostimulant)에 대한 평가가 최근 들어 많은 연구자들에 의해 평가되어지고 있다. 현재까지 알려져 있는 대부분의 면역증강제는 복강주사를 통해서 면역증강효과가 검증되었을 뿐 경구투여를 통해서 그 효과가 정확히 검증된 자료가 일부에 국한되어 있는 실정이다. 그러나 양식현장에서 면역증강제를 사용할 때 주사법은 아무리 효과가 탁월하다 하더라도 실용적인 측면에서는 거의 효용성이 없다. 특히 비특이적 면역반응에 대한 의존도가 매우 높은 치어기에는 주사법을 사용하는 것이 거의 불가능하다. 따라서 가장 좋은 방법은 면역증강제를 사료에 섞어서 경구투여 하는 방법이라 할 수 있다. 실용적인 면역증가제는 이를 투여함으로써 인한 양식어가의 경제적 부담이 적어야 한다.

따라서 어중에 따른 면역증강제에 대한 반응을 조사하여 어류의 면역증진을 통해서 질병을 예방할 수 있다는 점에서 매우 매력 있는 분야라 할 수 있으나 아직 양식현장에서 실용적으로 면역증강제를 사용하기에는 부족한 부분이 많다. 양식현장에서 면역증강제를 실용적으로 사용하기 위해서는 많은 실험을 통해 개발하고자 하는 면역증강제의 효과 및 투여농도에 대한 철저한 검증이 이루어져야 한다. 본 실험은 베타맥스의 첨가가 넙치의 성장을 촉진하는 지 재검증하고, 혈액내 삼투질(Osmolality) 농도를 측정하여 어류에서 스트레스에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 완도의 D 수산에서 넙치를 대상으로 실험을 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 실험사료 및 실험디자인

실험사료는 넙치 양식장에서 일반적으로 사용하는 MP사료를 사용하였다. 베타맥스는 실험실규모의 성장 및 면역 증강물질의 효과를 바탕으로 제작하여 MP사료내 1.0% (DM basis)를 첨가하여 공급하였다. 실험디자인은 완도의 D 양어장 넙치중 700g 정도의 넙치를 이용하였으며, 베타맥스를 첨가하지 않은 그룹을 대조구로 하여 베타맥스를 첨가한 구를 실험구로 하였다. 실험 수조는 10 × 10 m에 3,000미씩 수용하였으며, 환수율은 매일 24회전 실시하였다.

- Diet 1 : 대조구(Con.) - 무첨가
- Diet 2 : 베타맥스 첨가구(BM) - 첨가

나. 실험어 및 사육관리

실험은 완도에 위치한 D 양어장에서 실시하였다. 실험어는 넙치 육성어를 사용하였다. 수온은 전 실험기간동안 자연수온에 의존하였다. 일일 사료공급량은 어체중의 2~4%(As is basis)로 1일 2회 공급 하였다. 4주마다 실험어 무게를 측정하였는데, 각 수조에서 무작위로 20마리를 잡아 총무게를 측정하고 어체중의 평균을 구하였다.

다. 어체측정

어체 측정은 4주 간격으로 실시하였으며, 성장률을 측정하기 위하여 24시간 절식시킨 후 MS-222 (100ppm)로 마취시켜 수조별로 전체무게를 측정하였다. 실험 종료 후, 증체율 (weight gain, %), 사료효율(feed efficiency, %), 일간성장률(specific growth rate, %/day), 단백질전환효율(protein efficiency ratio), 간중량지수(hepatosomatic index), 비만도(condition factor) 및 생존율(survival, %)을 조사하였다. 간중량지수를 구하기 위해 수조별로 3마리씩 간의 무게를 측정하였다. 상기 측정 항목들의 계산식은 다음과 같다.

- Weight gain (%) : $(\text{final wt.} - \text{initial wt.}) \times 100 / \text{initial wt.}$
- Feed efficiency (%) : $(\text{wet weight gain} / \text{dry feed intake}) \times 100$
- Specific growth rate (%/day) : $(\log_e \text{ final wt.} - \log_e \text{ initial wt.}) / \text{days}$
- Protein efficiency ratio : $(\text{wet weight gain} / \text{protein intake})$

- Hepatosomatic index : (liver weight / body weight) × 100
- Condition factor : [fish wt. (g) / fish length (cm)³] × 100

라. 성분분석

(1) 일반성분 분석

일반성분은 실험사료와 각 수조별로 6마리씩 무작위로 추출하여 분쇄한 전어체를 분석하였으며, AOAC(1995) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125℃, 3시간), 조단백질은 kjeldahl 질소정량법(N×6.25), 조지방은 직접회화법으로 분석하였다. 조지방은 샘플을 12시간 동결건조한 후 Soxtec system 1046(Tacator AB, Sweden)을 사용하여 soxhlet 추출법으로 분석하였다.

(2) 혈액성분 분석

혈액성분 분석을 위하여 실험어를 채혈하기 전까지 약 24시간 동안 안정시켰다. 실험어를 실험구당 2마리씩 무작위로 추출하여 헤파린 처리한 일회용 주사기를 이용하여 실험어의 미부정맥에서 혈액을 채혈한 후, 전혈분석에 있어서 헤마토크리트(hematocrit: Ht), 적혈구수(red blood cell: RBC), 헤모글로빈(hemoglobin: Hb)과 같은 혈액 성분은 자동혈액분석기 (Excell 500, U.S.A.)로 측정하였다. 혈청성분의 분석을 위하여 채혈한 혈액을 항응고제가 처리되지 않은 원심분리관에 넣고 실온에 3시간 방치한 후 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 냉장보관하면서 24시간 이내에 분석하였다. 혈청성분은 혈액분석기 CH 100 (대광메디텍, 한국)을 이용하여 GOT (glutamate oxaloacetate transaminase), GPT (glutamate pyruvate transaminase)는 Kinetic 방법을 이용하여 분석하였다. 혈장의 삼투질 농도는 Na 염의 함유량에 따라 동결점이 다른 것을 응용하여 micro somsmeter (3MO, U.S.A.)로 측정하였다.

마. 누적 폐사율

실험 2개월간에 걸쳐 대조구 및 실험구간에 있어서 각각의 수조에서의 폐사된 개체를 매일 누적하여 폐사율을 구하였다.

바. 통계분석

모든 자료는 Computer program statistix 3.1 (Analytical Software, St. Paul, Mn. USA) 로 분산분석(ANOVA)을 실시하여 최소유의차검정(LSD : Least significant difference)으로 평균간의 유의성($P < 0.05$)를 검정하였다.

3. 결 과

본 실험에서는 성장, 스트레스 및 누적폐사율을 넙치양식현장에 적용하였을 때, 성장촉진효과를 재검증하고 스트레스에 미치는지 영향을 알아보며, 누적폐사율을 알아보기 위해 실제 넙치 양식장에서 베타맥스를 MP사료내 0.5%를 첨가하여 공급하였다.

2 개월간의 실험결과는 Fig. 16, 17 과 Table 17에 나타내었다. 증체율, 일간성장율, 단백질 전환효율, 사료효율과 간중량지수에 있어서 베타맥스 첨가구가 대조구에 비해 유의하게 높은 결과를 보였다. 전어체 일반성분 분석치는 Table 18에 나타내었다. 전어체 단백질함량과 조회분에 있어서 베타맥스 첨가구와 대조구에 있어서 유의한 차이를 보이지 않았으며, 수분 있어서는 베타맥스 첨가구가 대조구보다 유의하게 높은 값을 나타내었다. 하지만, 조지방에 있어서는 베타맥스 첨가구가 대조구보다 유의하게 낮은 값을 나타내었다. 넙치 근육내 단백질 함량에 통계적인 차이를 보이지 않았으나, 베타맥스 첨가구가 대조구보다 높은 값을 나타내었고 베타맥스 첨가구가 조지방에 있어서는 대조구보다 유의하게 낮은 값을 나타냄으로서 넙치가 지방대사의 활성을 통한 지방축적을 감소시키고 건강상태를 유지함으로서 고급육생산에도 기여할 것으로 생각되어 지며, 전 실험의 결과와 유사하였다. 혈액 및 혈청 성분변화는 Table 19에 나타내었다. 헤모글로빈(Hb)과 헤마토크리트(Hematocrit)에 있어서 베타맥스 첨가구가 대조구에 비해 유의하게 높은 결과를 보였다. 혈청내 GOT에 있어서 베타맥스 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 낮은 결과를 보였다. 하지만 혈청내 GPT에 있어서는 두 실험구간에 유의적인 차이가 없었다. 혈청내 GOT는 베타맥스 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 낮은 값을 보였고, GOT와 GPT는 간과 심장의 조직손상으로 인해서 혈장 내의 농도가 증가하는 것으로 알려져 있어 넙치의 생리활성과 건강도가 높아졌음을 단적으로 보여주었으며, 그림 18에서 대조구와 실험구간에 간의 상태를 확인한 결과 대조구에서는 넙치의 간의 상태가 실험구에 비하여 울혈이 심하였다. 혈액내 RBC에 있어서는 베타맥스 첨가구와 대조구간의 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 전 실험에서 비특이적 면역반응인 라이소자임과 CL반응에서 첨가구가 높은 값을 얻음으로 인하여 추가실험에서는 어류의 스트레스의 지표인 삼투질

(Osmolality) 농도를 측정하였다. Table 20에 삼투질 농도를 나타내었으며, 베타맥스를 공급한 실험구가 공급하지 않은 대조구에 비하여 유의하게 낮은 값을 나타내었다. 일반적인 넙치의 경우 삼투질 농도가 300-400 mOsm/kg 정도인 점을 감안하면 본 실험의 대조구의 경우 462 mOsm/kg을 나타냄으로서 베타맥스 첨가구 보다 장기적으로 스트레스를 받고 있는 것으로 사료 되어진다. 또한, 실험 2개월 동안의 누적 폐사율을 Fig. 19에 나타내었다. 실험 시작 초에는 누적폐사율이 비슷하였으나 실험 종료 시점에는 폐사미수에 있어서 실험구와 대조구 사이간의 현저한 차이를 보였다.

Table 17. Weight gain, specific growth rate, protein efficiency ratio and feed efficiency for oliver flounder fed experimental diet for the two-months of feeding period¹

Diets	Control	Betamax	Pooled SEM ²
Initial wt. (g)	703	697	3.76
Final wt. (g)	851 ^b	894 ^a	11.9
WG (%) ³	21.1 ^b	28.3 ^a	1.71
SGR (%) ⁴	0.32 ^b	0.42 ^a	0.03
PER ⁵	1.10 ^b	1.47 ^a	0.09
FE ⁶	53.2 ^b	66.6 ^a	3.26
HSI ⁷	1.91 ^b	1.50 ^a	0.15

¹Values are means from triplicate groups of fish where the means in each row with a different superscript are significantly different (P<0.05).

²Pooled standard error of mean

³Weight gain (%) = (final weight - initial weight) × 100 / initial weight

⁴Specific growth rate (%) = ((log_e final wt. - log_e initial wt.) / days) × 100

⁵Protein efficiency ratio : wet weight gain / protein intake

⁶Feed efficiency (%) : increase in biomass of fish × 100 / feed intake

⁷Hepatosomatic index : (liver / body weight) × 100

Table 18. Proximate analysis of whole-body of oliver flounder fed experimental diet for the two-months of feeding period (% of as is basis)¹

	Diets		Pooled SEM ²
	Control	Betamax	
Moisture	68.7 ^b	72.2 ^a	0.73
Crude Protein	19.4	20.0	0.17
Crude fat	9.32 ^a	5.45 ^b	0.79
Ash	3.41	3.14	0.11

¹Values are means from triplicate groups of fish where the means in each row with a different superscript are significantly different ($P < 0.05$).

²Pooled standard error of mean

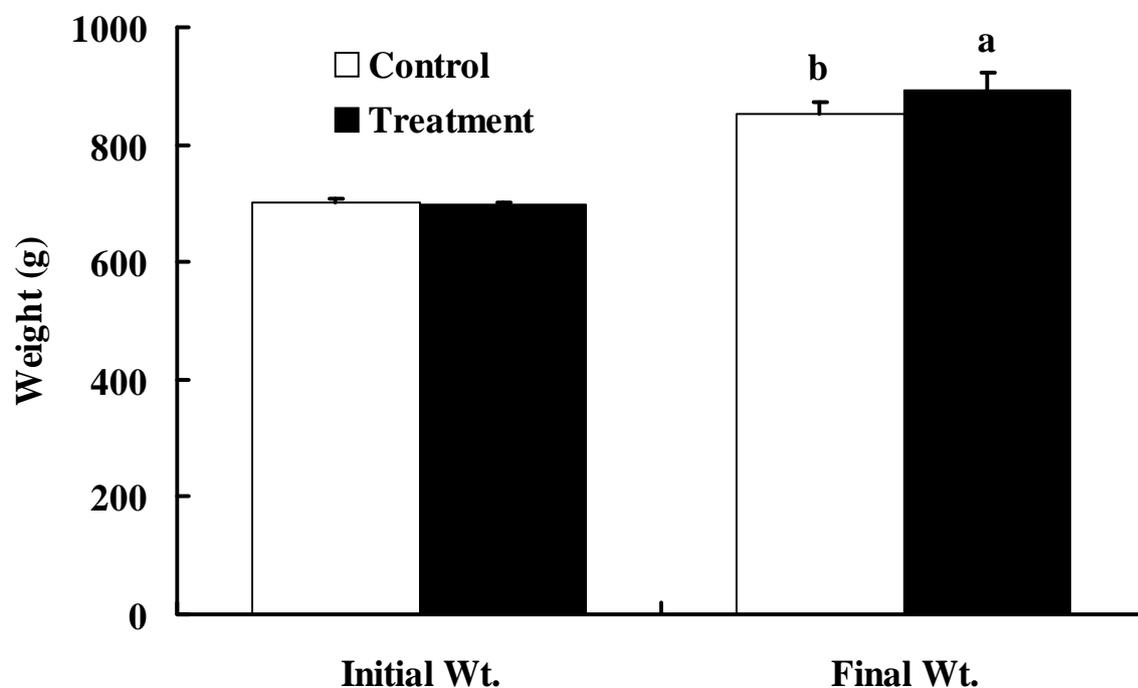


Fig. 16. Body weight of oliver flounder fed the experimental diet during two months.

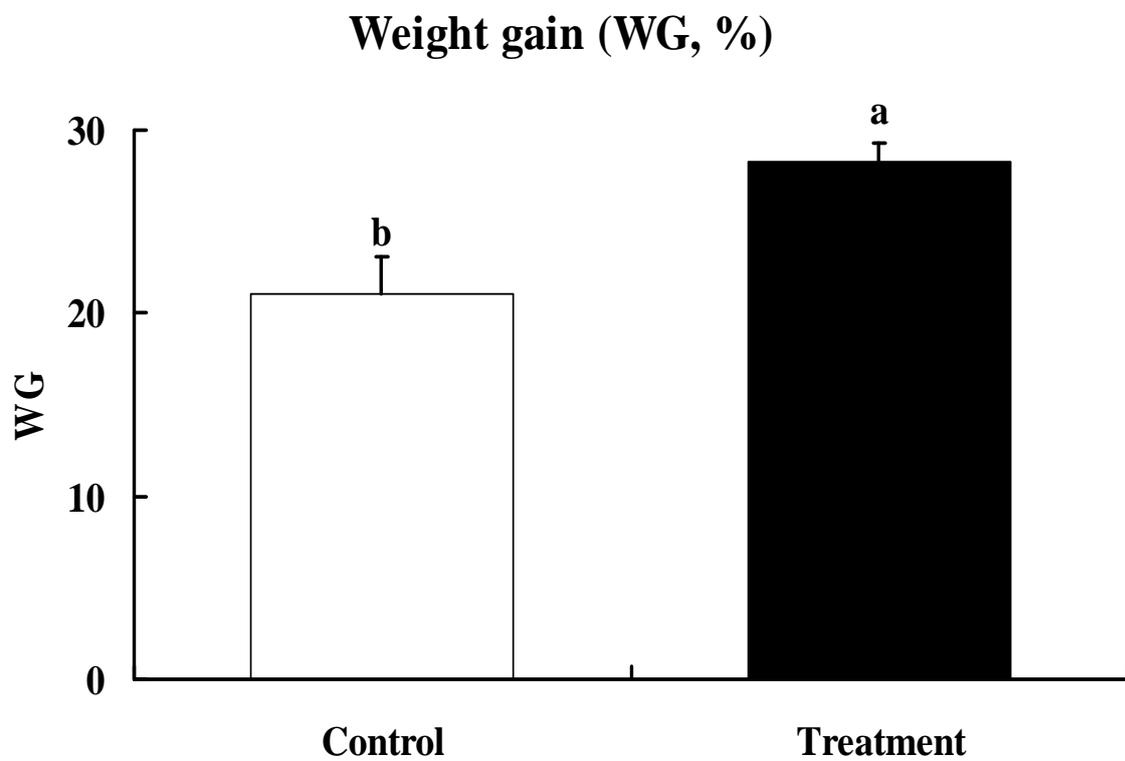


Fig. 17. Weight gain (%) of oliver flounder fed the experimental diet during two months.

Table 19. Serological and hematological characteristics of olive flounder fed the experimental diet for the two months of feeding period¹.

	Diets		Pooled SEM ²
	Control	Betamax	
Hemoglobin (g/dL)	10.6 ^b	13.4 ^a	0.23
Hematocrit (%)	18.7 ^b	22.0 ^a	1.88
Serum GOT (IU/L) ³	18.2 ^a	15.0 ^b	2.12
Serum GPT (IU/L) ⁴	7.40	6.00	1.23
RBC (×10 ⁶ cell/ul) ⁵	2.97	3.30	0.29

¹Values are means from triplicate groups of fish where the means in each column with a different superscript are significantly different (P<0.05).

²Pooled standard error of mean.

³Glutamic oxaloacetic transaminase. One unit is defined as the amount of enzyme causing the transamination of 1.0 μmol of L-aspartate per minute at 25°C and pH 7.4.

⁴Glutamic pyruvic transaminase. One unit is defined as the amount of enzyme causing the transamination of 1.0 μmol of L-alanine per minute at 25°C and pH 7.4.

⁵Red blood cell

Table 20. Osmolality in plasma of olive flounder fed the experimental diet for the two-months of feeding period¹

Diets	Control	Betamax	Pooled SEM ²
Osmolality (mOsm/kg)	462 ^a	400 ^b	14.7

¹Values are means from triplicate groups of fish where the means in each column with a different superscript are significantly different (P<0.05).

²Pooled standard error of mean.



Fig. 18. Liver of olive flounder fed the experimental diet for the two-months of feeding period¹

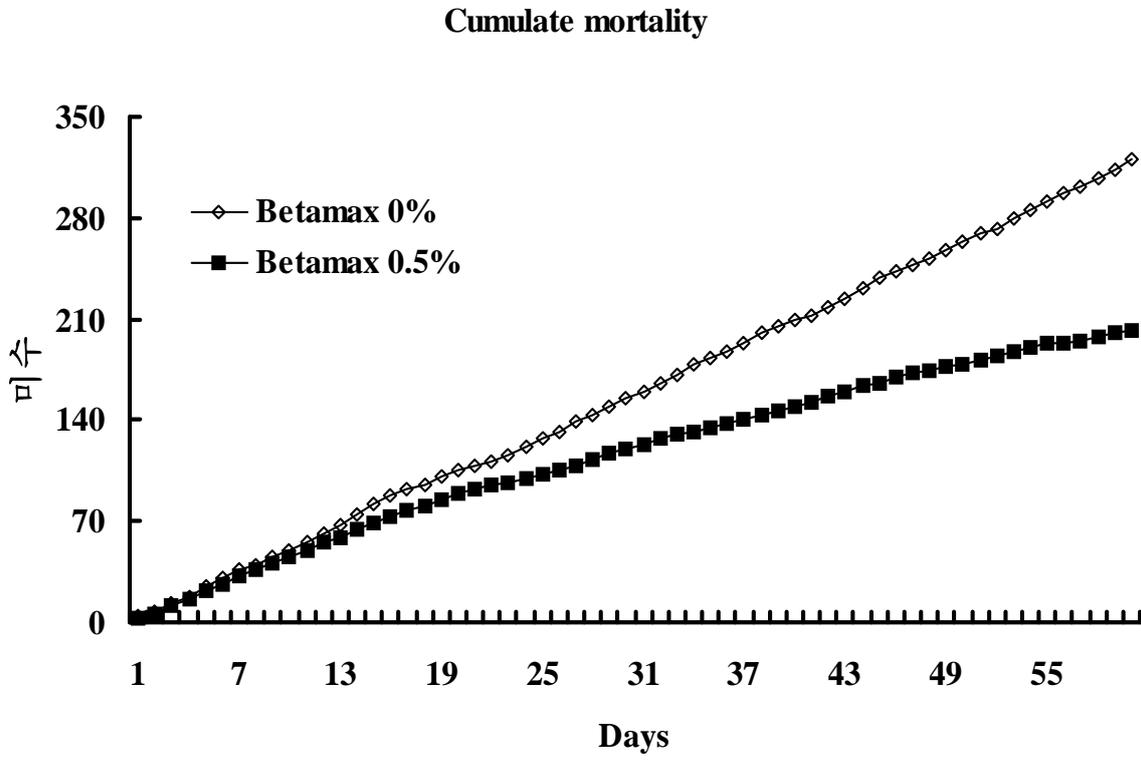


Fig. 19. Cumulative mortality of juvenile olive flounder fed two experimental diets for two months.

우리나라의 주요 해산어종인 넙치양식현장에 있어서 면역증강 물질(Glucan)과 사료섭취 촉진물질을 적정수준으로 혼합한 베타맥스의 첨가는 성장률, 일간성장율과 비만도를 유의적으로 증가시켰다. 이러한 실험결과는 이전의 실험실 규모의 실험과 전 실험의 현장 실험에서와 같은 결과를 보여, 넙치양식현장에 베타맥스가 적용가능 함을 보여주었다. 그리고 베타맥스를 장기간 공급할 경우 스트레스의 지표인 삼투질 농도에서 공급하지 않은 대조구에 비하여 낮은 값을 얻음으로서, 베타맥스를 공급할 경우 넙치에 있어서 스트레스를 감소시키는 것으로 사료된다. 따라서 본 실험에서 사용된 베타맥스를 넙치 사료내 첨가하여 공급할 경우 어류에서 성장을 향상, 폐사율 감소, 비특이적 면역반응을 증강시키며, 어류에서 스트레스가 감소되는 것으로서 면역증강물질과 사료섭취촉진물질의 혼합제인 베타맥스는 넙치 양식현장적용이 가능할 것으로 사료되어 진다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 목표달성도

1. 베타글루칸 생산공정 달성도

가. 미생물에 의한 베타글루칸의 발효생산 최적화

베타글루칸 생산균주인 *Agrobacterium* 속 균주를 선별하여, 모균주보다 생산성이 20% 향상된 돌연변이주를 개발하였다 (대한민국 특허 450277). 탄소원으로는 설탕, 질소원으로는 염화암모늄을 선정하여, 세포성장시기와 베타글루칸 시기 (베타글루칸은 질소원이 고갈된 후 생산이 됨)를 나누고, 질소원이 고갈되는 시점에서 pH를 7.0에서 5.5로 전이하는 이단계 회분식 배양법을 개발하였다. 이 결과 5리터 발효조에서 5일간 배양 후 베타글루칸을 60g/L 이상 고농도로 생산할 수 있어, 당초 목표를 달성하였다.

나. Scale-up 기술개발로 베타글루칸 발효공정 확립

Scale-up 배양조건은 대량생산을 위하여 반드시 신경해야할 과제이다. *Agrobacterium*은 호기성 균주로 산소 요구도가 크기 때문에 산소전달을 원활히 하기 위하여, 교반속도를 올리거나 (5리터 교반조에서는 700 rpm) 공기 공급을 충분히 (공기부양형 배양기에서 0.75vvm) 하였을때 생산성은 대규모 발효조에서도 큰 차이가 없었다. 이 연구를 위하여 각각 300리터 교반형 발효기, 6톤과 34톤의 공기부양형 발효기 (air lift fermentor)를 사용하였다. 대량생산을 위하여 34톤 발효조를 이용하였다. 플라스크에 균주를 접종하여 24시간 배양하고 7리터 발효조로 전이하여 20시간, 300리터로 전이하여 12시간, 그리고 6톤 발효조에서 15시간 발효한 배양액 3톤을 30톤에서 배양 부피를 22톤으로 하여 온도 30°C, 통기량 0.75vvm으로 하여 배양하였다. 세포성장은 초기 12시간 지속되고 질소원이 고갈되면 세포성장이 중단되고 베타글루칸이 생성

되기 시작한다. 최종 120시간 배양 후 베타글루칸 농도가 60 g/L를 상회하였다. 배양액 부피는 증발로 20톤 정도로 감소되었으나, 최종 베타글루칸 생산량은 1200kg에 달하였고 이때 설탕의 베타글루칸으로의 전환률은 0.42 g/g이었다. 이상의 결과는 당 초 목표를 충분히 달성한 결과이다.

다. 베타글루칸 대량생산을 위한 분리, 정제 및 분말화 공정 확립

베타글루칸 분말을 대량으로 생산하기 위해서는 발효액으로부터 베타글루칸의 분리, 건조, 그리고 분쇄 공정이 필요하다. 베타글루칸은 수용액에서 불용성이므로 원심분리에 의해서 상등액으로부터 분리된다. 이를 위하여 decanter 연속원심분리기를 선정하였으며 유속을 300리터/hr로 하여 1기 당 일간 200kg의 베타글루칸을 생산할 수 있으며 이때 수율은 80%를 상회한다. 열풍건조기에서 50℃로 건조한 시료는 경도가 높기 때문에 햄머밀 (hammer mill) 분쇄기가 적합하고, 시간 당 300kg 이상 생산할 수 있었다. 이렇게 조분쇄한 시료는 퇴종적으로 에어밀로 미분쇄한다. 미분쇄 시료중의 베타글루칸 함량은 75%이며 분말의 입도는 150 μ m이었다. 이렇게 확립한 공정으로 베타글루칸 기준으로 월 2000kg 이상 대량생산할 수 있다.

34톤 발효조에서 *Agrobacterium* 속 미생물 배양에 의하여 베타글루칸을 60g/L의 고농도로 생산할 수 있는 발효 생산공정을 확립하였다. 베타글루칸을 분리하기 위하여 decanter 타입의 연속 원심분리기를 선정하였고, 열풍건조기에서 건조하여 햄머밀 분쇄기와 에어밀 분쇄기로 연이어 분쇄함으로써 150micrometer의 미분을 80%의 수율로 확보할 수 있었다. 이는 월 생산능력이 2000kg 이상에 해당하는 것으로 **최종 사료첨가제를 월 40톤 생산할 수 있는 대량생산 공정**이다.

2. 면역증강제로서의 베타글루칸 적용

베타글루칸의 면역증강 효과를 관찰하기 위하여 넙치 치어를 대상으로 하였으며, 대조구와 사료 당 베타글루칸을 0.01%, 0.025%, 0.05%, 0.1%첨가한 실험구를 사용하였다. 베타글루칸을 **0.05% 이상** 공급한 사료구에서 보체 대체 경로 활성화 (ACH50) 과 혈청의 lysozyme 활성화, 그리고 두신 phagocyte의 chemiluminescent (CL) 반응이 가장 높아, 베타글루칸이 비특이적 면역반응을 강화함을 확인할 수 있었다. 베타글루칸이 폐사율 억제 효과가 있는지 알아보기 위하여 *Edwardsiella tarda*를 접종하여 폐

사율을 관찰하였다. 대조구에서는 접종 3일 후부터 폐사가 발생하여 6일 이내에 모두 폐사된 반면 베타글루칸을 함유한 험구에서는 초기 폐사율이 현저히 감소되었으며 0.05% 이상에서는 7일 경과 후에도 30% 이상이 생존하였다. 이상의 경과로부터 베타글루칸이 넙치의 면역력을 증가시키는 효과를 확연히 알 수 있었다.

3. 사료첨가제 배합비 설계 및 시료의 면역증강 효과 조사

양식어의 면역증강뿐만 아니라 성장촉진을 위하여 사료첨가제 배합에 대한 연구를 하였다. 사료첨가제는 베타글루칸과 케라틴 가수분해물로 구성되었다. 케라틴 가수분해물의 아미노산 조성은 아르기닌, 히스티딘, 이소류이신, 류신, 라이신, 메티오닌, 트레오닌, 발린, 시스틴, 세린, 프롤린 등을 1에서 7% 함유한다. 넙치치어를 대상으로 최종 급이되는 사료 중 베타글루칸 농도를 0.05%에서 0.15%, 아미노산복합제 함량을 0.45%에서 1.35%로 조정된 시험구를 급이하면서, 면역증강, 사료효율, 증체에 대한 연구를 하였다. 혈액 및 혈청의 성분 분석에서 헤모글로빈은 베타글루칸이 첨가된 모든 실험구에서 높았으며 헤마토크리트는 베타글루칸 농도 0.1%이상에서 유의적으로 높았다. 혈청내 GOT양이 베타그루칸 0.1%함유 실험구에서 낮았다. 한편, 베타글루칸을 0.1%에서 0.15%로 하고 아미노산 복합체를 0.9%에서 1.35%한 실험구에서 증체율이 다른 실험구보다 50% 이상 높았으며, 사료효율, 일간성장률, 단백질 전환효율도 높았다. 이상의 결과로부터 최종 사료중 급이되는 베타글루칸 함량은 0.1%, 아미노산 복합체의 함량은 0.9%로 함이 면역력 강화와 증체에 가장 우수할 것으로 판단되었다.

넙치를 대상어로 선정하여 베타글루칸의 면역증강효과를 살펴본 결과, 혈액내 헤마토크리트 및 라이소자임 활성 증가함을 확인하였으며, 에드워드 병원균 공격실험에서 폐사율 감소함을 알 수 있었다. 이를 토대로, 질병발생을 억제하고 성장을 촉진할 수 있는 베타글루칸과 keratin 가수분해물 등 아미노산 혼합제로 구성된 **면역증강 사료첨가제**를 개발하였다. 현장에서 이를 사용한 급이(생사료 톤 당 3내지 5kg을 혼합하여 자어에서는 지속적으로 성어에서는 격주투여)한 결과 사료효율 및 증체에 끼치는 영향이 매우 큼을 알 수 있었다.

4. 시제품의 현장적용 시험 및 제품화 추진

현재, 최종제품을 ‘베타맥스’라는 상품으로 제주도 및 남해안을 중심으로 홍보를 강화하고, 판매를 개시하였다. 주로 넙치를 대상으로 연구를 진행하여 왔는데, 최근 들어 새우양식 및 내수어, 나아가서 돼지, 닭 등 일반 축종으로 사용범위를 확대하고 있으며, 이를 토대로 해외 수출에도 적극 노력을 기울이고 있다.

최종 시제품의 조성은 이차년도 연구 결과를 토대로 베타글루칸과 아미노산 복합제가 면역증강 및 증체에 유효한 농도와 제품의 가격 경쟁력을 고려하여 배합비를 설계하였다. 시제품을 ‘베타맥스’라 명명하고 그 조성은 베타글루칸 10%, 케라틴 가수분해물 50%, 그리고 3등급 밀가루를 40%로 구성하였다. 제주도 M 양식장을 선정하여 넙치양식현장에 적용하였다. 베타맥스를 MP사료내 0.5%를 첨가하여 총 2 실험구를 8반복으로 나누어 6개월간 사육한 결과, 증체율, 일간성장율과 비만도에 있어서 베타맥스 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 높은 결과를 보였다. 헤모글로빈(Hb)과 헤마토크리트(hematocrit)에 있어서 베타맥스 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 높은 결과를 보였다. 육성기 넙치에 있어서 성장 및 사료효율 촉진과 비특이적 면역반응 향상을 위해 면역증강물질과 사료섭취촉진물질의 혼합제인 베타맥스의 효과를 넙치 양식 현장적용이 가능함을 보여주었다.

제 2절 기대효과

인류의 가장 중요한 식량 자원 중에 하나인 단백질 자원은 농·수·축산업분야에서 생산되어 왔다. 하지만 현재 농·축산업의 생산량은 증가율이 한계에 이른 상태이고 인구 증가와 환경문제 등을 고려할 때 계속해서 증가하는 인류의 단백질 수요를 앞으로 많은 부분 수산업에서 충당해야할 것으로 보인다. 현재 주요수산식품(어류, 갑각류 및 연체동물)의 세계 어업 생산고는 6천만 톤으로 한계에 도달한 것으로 예측되며 앞으로 다가오는 2000년 이후에도 환경오염, 남획 등으로 말미암아 증가할 가능성은 매우 희박하다. 반면에 전세계 주요수산식품의 양식 생산량은 지속적인 증가추세에 있어 수산양식업의 중요성이 부각되고 있다. 이러한 상황에서 주요수산식품의 일인당 소비를 현 수준인 연간

13.5kg으로 잡아도 21세기초에는 인구의 자연증가에 따르는 소비의 급속한 양적 팽창이 요구되어 2010년에는 3천4백90만 톤(2000년에 이미 3,500만 톤을 넘어선 것으로 추정됨), 2025년에는 5천2백만 톤이며, 2035년에는 6천1백70만 톤으로 세계 어업 생산고보다 많은 양이 수산 양식업에서 생산 공급되어야 할 것으로 예상되고, 소비 수준이 최소한의 증가폭인 연간 1%씩 증가할 것을 가정하면 2035년에 1억2천만 톤 정도가 양식산업을 통하여 생산되어야 할 것으로 추정되어 세계 수산 양식산업의 전망을 밝게 하고 있다.

외국의 경우 집약적 고밀도 사육에 의한 생산성 저하 및 어병에 대처하고, 양식산업의 출발점이라고 할 수 있는 건강한 자·치어를 안정적으로 확보하고, 수산약품, 항생제 등이 축적되지 않은 신선한 양식어류를 공급하기 위해서, 어류의 성장촉진 및 면역증강을 위한 첨가제 개발이 지속적이고 집중적인 연구를 통해 체계적으로 어종별로 이루어지고 있다. 현재, 양식의 생산단가 중 어종별로 차이는 있지만 30~60%를 차지하는 배합사료의 생산량이 전세계적으로 급속히 성장하고 있으므로, 성장촉진 및 면역증강을 위한 사료첨가제의 수요가 급증하고 있다. 또한 새로운 첨가제를 개발을 위한 연구들이 전세계적인 관심속에서 많이 이루어지고 있는 실정이다. 예를 들어, 일본의 경우 1960년대부터 사료첨가제 개발의 중요성을 인식하고 뱀장어의 성장촉진 및 면역증강을 위한 첨가제 개발 연구를 시작하였다. 현재, 방어, 은어, 참돔, 전복 등 여러 어종에 사료첨가제 개발을 위한 연구가 수행중에 있으며 이러한 연구를 통해 사료 섭취 촉진, 사료 유실 감소, 생산성 증대, 건강한 종묘확보 등 양식산업전반에 많은 도움을 주고 있다.

하지만, 국내의 양식산업의 경우 사료첨가제에 대한 중요성을 인식하지 못하고, 사료 유실로 인한 수질오염과 질병치료를 위한 과도한 항생제의 사용으로 인해 생산성저하와 소비자들의 양식어류에 대한 불신 등으로 인하여 경제적인 손실의 악순환이 계속되어 왔다. 그나마 다행인 것은 최근에 들어 각 사료회사 및 연구기관에서 사료첨가제의 중요성을 인식하고 산학협동으로 국내 주요어종인 넙치와 조피볼락의 사료섭취촉진제 및 면역증강 첨가제개발을 위한 연구가 이루어지고 있는 것이다. 따라서, 건강한 종묘생산의 확보를 통한 양식산업의 생산성 증대와 신선하고 고품질인 양식어류를 소비자들이 안심하고 구매할 수 있게 하기 위해서 각 어종별 성장촉진 및 면역증강을 위한 첨가제 개발이 집중적으로 이루어져야 될 것으로 생각된다. 이러한 연구개발을 통해 국내 양식산업의 활성화뿐만 아니라 국내양식수산물의 수출을 통한 수산 양식산업의 국제경쟁력 향상을 이루고 수산 양식산업이 국가식량 기간산업으로 성장할수 있는 계기를 마련할 수 있을 것으로 생각된다.

기대효과	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 양식업자들의 소득증대 : 전염병에 대한 자체방어능력을 강화하여 육성을 증가 소모성 질병을 미연에 방지함으로써 사료효율의 개선 >>> 전체적으로 경제적 생산을 가능케 함 ○ 항생제의 남용 방지 : 고급 수산물의 생산을 가능케 함>> 수출 · 입 경쟁력 및 부가가치 증대 ○ 베타글루칸의 작용 기전에 대한 이해 : 신기능 면역증강제의 개발 가능성 제시 ○ 유사제품의 수입 대체 효과 및 수출 시장 참여
문제점(개선방향)	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 베타글루칸의 작용기전에 대한 이해 부족 >>> 본 과제를 통해 기초 지식 및 응용 기술 개발 ○ 시장진입의 어려움(사료 시장의 배타적 구조) >>> 제품의 확실한 효과와 적용기술을 개발하여 시장으로 진입 ○ 제품의 경제적인 생산 >>> 발효공정 개선, 생산 균주 개량 및 후처리 공정의 효율화를 통해 해결

1. 기술적 측면

- 환경친화적인 베타글루칸 생산 가능
- 효모나 곡물로부터 베타글루칸을 정제하는 것은 공정이 여러 단계로 이루어져
순수하게 분리정제의 어려움 >>> 화학처리 복잡 >>> 공해 유발
- 특히 효모유래 베타글루칸은 소화하기 어려워 어류의 이용율이 낮은 단점이 있음
- 본 연구를 통해서 개발되는 베타글루칸 공정은 세포 밖으로 분비되므로 분리·정제
가 용이하다.

2. 경제 · 산업적 측면

- 기존의 베타글루칸은 정제공정의 어려움 뿐만 아니라 함유량이 적은 성분을
추출 정제하는 공정이 필요하므로 고가로 공급 (kg당 100,000원선에서 판매)
- 이에 비하여 본 제품은 제조원가가 저렴한 공정 (목표 판매가 15,000원/kg)
- 양식 농가에 소득을 증대 시킬 수 있을 것으로 기대됨
- 배합사료의 원료로서 첨가된다면 국내 사료회사의 국제경쟁력이 강화

3. 생사료내 베타맥스 첨가에 따른 경제성 분석

제주도의 1600평 규모의 넙치 양식장에서의 치어 20만미를 입식하고 12개월간 사육하였다. 각각의 실험구당 생사료내 베타맥스를 첨가하지 않을 경우 실험구와 첨가했을 경우에 따른 차이를 12개월로 하여 추정하였다(넙치 kg 단가는 10,000원, 베타맥스 15,000원, 넙치 양식장 한달 운영비(전기료, 약제대금) 25백만원). 생사료 내 베타맥스는 0.5% 첨가하여 공급하였다. 그 결과 사료내 베타맥스를 첨가시 전체 폐사율이 약 10,000미 정도(5%) 감소하였고 증체량은 약 5% 정도 상승하였다.

앞의 결과에 따라 베타맥스를 첨가할 경우 사육기간을 첨가하지 않은 경우보다 약 1개월 정도 앞당길 수 있었다. 따라서 사육기간을 1개월 앞당김으로서 양식장 운영비를 한달 절약할 수 있고, 또한 질병 발생률이 5% 감소함에 따라 폐사량이 약 10,000정도가 감소하게 된다. 따라서, 베타맥스를 첨가하여 공급할 경우의 수익은 약 95백만원(한달 운영비 25백만원, 10,000미* 700g*10,000원 = 70백만원)정도 이며, 베타맥스를 첨가할 경우 사육 기간 동안의 사료량은 약 420톤으로 베타맥스를 0.5%씩 첨가하여 공급할 경우 약 2,100kg이 첨가되어 진다. 그러므로 베타맥스 이용대금은 약 31.5백만원이다. 따라서, 넙치 양식장 1600평 규모에서 1년 동안 베타맥스를 사료내 첨가하여 공급할 경우 베타맥스를 첨가하지 않을 경우보다 약 63.5백만원 정도가 절약되는 것으로 추정된다.

사료내 베타맥스 첨가시에 따른 이익 추정치 (인건비 제외)

	기존방법	베타맥스 제품 사용
운영비 (전기료, 약제비)	- 25백만원 * 12 = 300백만원	- 25백만원 * 11 = 275백만원
치어 대금	- 20만미 * 300원 = 60백만원	- 20만미 * 300원 = 60백만원
넙치 생산량	+ 14만미 * 700g = 980백만원	+ 15만미 * 700g = 1050백만원
사료 대금	- 420톤 * 500원/kg = 210백만원	- 420톤 * 500원/kg = 210백만원
첨가제 대금	0원	- 420톤 * 15,000원/kg = 31.5백만원
수익금	410백만원	473.5백만원
베타맥스 첨가시의 이점		+ 63.5백만원

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1절 미생물 발효에 의한 생산공정 기술의 활용방안

베타글루칸은 곡류, 효모의 세포벽, 버섯류 등에 존재하는 다당으로서 본 연구과제에서는 미생물발효에 의하여 베타글루칸을 대량생산하기 위하여 고농도 생산균주를 개발하였고, Scale-up공정을 확립하였으며, 현재 자사 공장에서 34톤 발효기를 이용하여 월 2000kg 이상, 완제품 기준으로 40톤 이상을 생산할 수 있게 되었다. 이러한 공정결과는 다당을 포함한 생리활성 물질의 대량생산을 위한 기반기술로 활용될 수 있다.

- 제품의 제조방법, 규격, 급여 방법, 첨가물 조성에 대한 특허 확보
- 특허로 기술을 보호하면서 국내 시장 뿐 아니라 국제 시장으로의 진출
- 시장 확대시 대형 발효회사에 기술 이전

제 2절 면역증강 사료첨가제로서의 활용 방안

본 연구개발로 베타글루칸과 아미노산 복합제로 이루어진 새로운 양식어용 면역강화 사료첨가제를 개발하여, 2004년 하반기부터 베타맥스, FC119 등 제품을 출시하였다. 이러한 제품은 기존의 항생제를 대체할 수 있는 면역증강 효과가 높은 경쟁력있는 제품이 될 수 있다. 또한 넙치, 조피볼락 등 해수어 뿐만 아니라 송어, 미꾸라지 등 담수어, 그리고 새우양식에 이르기까지 폭넓게 사용할 수 있다. 향후 다양한 어종 이외에도 동물사료첨가제에서 면역증강제로서 활용을 계획하고 있으며 제품의 확장을 위해 해외시장을 개척하기 위한 노력을 병행하고 있다.

- 제주도를 비롯한 국내 넙치 양식장에 최종 사료첨가제로 공급시 (당해년도 연매출을 2억원 이상 예상)
- 중국 및 베트남, 인도네시아 등 동남아시아 사료양식장에 수출
- 넙치 이외에 다른 어종으로의 적용확대

제 3절 기능성 소재로서의 활용방안

최근 건강기능식품의 시장이 빠른 속도로 성장하고 있으며, 국민들의 웰빙에 대한 관심이 높으므로 본 연구에서 개발한 베타글루칸 소재는 면역활성능이 있는 생리활성 물질로서 밝혀져 건강기능식품 산업분야에서 기능성 식품소재로 용도 활용이 가능하다.

[별지 제11호 서식]

수산특정연구개발사업 연구성과활용결과 보고서

※ 작성요령 : 해당되는 항목은 빠짐없이 기록하되 란이 부족하면 별지작성 가능

① 연구과제명	미생물 발효에 의한 베타글루칸 대량생산 및 이를 이용한 면역증강용 사료개발					
② 주관연구기관	(주)더멋진바이오텍 더멋진생명공학연구소	③ 총괄연구책임자	이 인 영 (인) (전화 : 041-861-9773) (HP : 011-9808-9432)			
④ 참여기업	(주)더멋진바이오텍	⑤ 총연구기간	2001년 9월 ~ 2005년 4월 (3년 6월)			
⑥ 연구개발비 (천원)	계	225,000	⑦ 총참여연구원 (명)	총인원	18	
	정부출연금	180,000		내부인원	15	
	기업부담금	45,000		외부인원	3	
	기타					
⑧ 주요 연구개발 목표 및 연구내용(간략히 작성)						
<ul style="list-style-type: none"> - 연구목표 및 내용 건강한 양식어의 생산량을 증대하기 위한 면역증강용 사료개발을 최종 목적으로 한다. 이를 위하여 베타글루칸 대량생산 공정을 확립하고, 첨가제 개발을 위한 설계 시험과 현장 평가를 한다. - 연구결과 및 결과별 활용가능영역(산업체활용, 교육·지도활용, 정책활용 등) 베타글루칸을 항생제 대체 면역증강제로 수산어 용 배합사료에 보급하여 사용을 확대한다. 						
연구성과의 활용	⑨ 연구성과활용 총괄 (해당되는 모든 란 기재)					
	산업화 (기술실시계약 체결건수)	산업화 추진실적 (보류, 중단 등)	교육·지도활용	정책활용	타연구에 활용 및 2단계연구에 활용	기타 활용 (내용 :)
	건	건	건	건	건	건
	산업재산권	학술지 게재	학술대회 발표	언론·저널보도	전시회참가	기타 홍보 (내용 :)
	3 건 (국내 : 3 건) (국외 : 건)	2 건 (국내 : 1 건) (국외 : 1 건)	9 건 (국내 : 5 건) (국제 : 4 건)	건 (국내 : 건) (국외 : 건)	건 (국내 : 건) (국제 : 건)	건
	⑩ 연구성과 활용에 따른 예상 기대효과		넙치 치어 20만마리 입식하여 1년을 육성하였을때 약 60천만원의 농가 수익증대가 예상된다. 농가 보급 및 배합사료에 첨가제를 확대하여 베타글루칸 면역증강제의 사용을 확대한다.			
⑪ 연구성과 활용시 애로사항 및 건의사항		국내외 사용을 확산하기 위하여 다양한 홍보 정책을 강화하여야 한다				

연 구 성 과 의 활 용	⑫ 산업화 활용(기술실시계약 체결)내역 또는 산업화 추진실적							
	업체명 (대표자 및 연락책임자)	전 화 번 호	업체현황 (설립시기, 자본금, 직원수 등)		산업화시기 (예정)	기업활용유형 (신제품명 및 특성, 공정개선등)		
	※ 기술료징수내역							
	1년차(년)		2년차(년)		3년차(년)			
	4년차(년)		5년차(년)		6년차(년)			
	7년차(년)		8년차(년)		현재징수총액			
	⑬ 실적(1년동안)							
	수입대체효과 (백만원/년)	수출증대효과 (백만원/년)	매출증대효과 (백만원/년)	생산성향상효과 (백만원/년)	고용창출효과 (인력양성인원수)	기타		
	⑭ 향후 기대효과							
	수입대체효과 (백만원/년)	수출증대효과 (백만원/년)	매출증대효과 (백만원/년)	생산성향상효과 (백만원/년)	고용창출효과 (인력양성인원수)	기타		
	⑮ 교육 및 지도활용 내역							
	교육명칭	교재명	일시	장소	참석 대상	인원	주요내용	기대효과
	⑯ 정책활용 내역(수산시책 반영 및 정책건의)							
	시책명	주관부처	일시	시책추진실적 및 계획		기대효과		
	⑰ 타 연구개발사업에의 활용							
연구사업명	연구제목	연구자	연구기간	본 연구와의 관계				

연 구 성 과 의 활 용	⑱ 산업재산권(발명특허, 실용신안, 의장 등)										
	구 분 (발명특허, 실용신안 등)		명칭(기술명)		출원국가	출원			등록		
						출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호
	국 내	발명특허	베타글루칸을 고농도로 생산하는 신균주		대한민국				김미경 이인영	2004.9.15	특허450227
	국 내	발명특허	어류의 생장을 촉진시키는 베타글루칸을 포함한 사료		대한민국	정 경 희 , 최 원 아 ,	2001. 6. 8	2001-31885			
	국 내	발명특허	생장촉진용복합 아미노산 조성물 및 사료		대한민국	배 승 정 , 정 경 희 , 최 원 아 , 옥임호	2002.2.28	2002-10842			
	⑲ 국내외 전문학술지 게재										
	연구자		연구제목		학술지명	통권, 호		년, 월		발행기관(국명)	
	국 내	심정현, 최원아, 외 2인	Agrobacterium 베타글루칸의 면역활성 효능		약학회지	46권, 제6호		2002년 6월		한국약학회지, 한국	
	국 외	김미경 외 3인	Enhanced production of betaglucan by a mutant strain		Biochemical Eng. J	16		2003년		Elsevier, 영국	
	⑳ 국내 및 국제학술회의 발표										
	발표자		발표제목		학술대회명	인쇄물 명칭, 통권, 호		년, 월, 일		장소, 국명	
	국 내	이인영 외 3인	Immunopharmacological activity of betaglucan		한국식품 과학회			2001년 10월 18일		제주도, 한국	
	국 외	심정현, 최원아, 윤도영	Immunomodulative activity of various betaglucan		Experimental Biology			2001년 4월 20일		New Orleans, USA	
	국 외	옥임호, 배승철 외3인	Effect of dietary betaglucan on immune response in juvernile oliver flounder		World aquaculture			2002년 4월 22일		북경, 중국	
	㉑ 홍보실적(신문, 방송, 저널 등)										
	홍보유형 및 매체		제 목		내 용			일시		홍보면 (채널)	
	저널		양어용 면역증강사료의 필요성 및 개발동향		베타글루칸의 활용 소개			2004. 8		월간사료	
	㉒ 전시회 등 참여(전시회, 박람회, 제품설명회 등)										
	행사주최		행사명칭		참가주체	전시품목			일시		장소
	㉓ 기타 활용 및 홍보실적										
	- 118 -										

※ 첨부 : 작성내용 증빙자료 사본(기제출 자료는 제외)

제 6 장 참 고 문 헌

- Aakre, R., Wergeland, H.I., Aasjord, P.M., Endersen, C., 1994. Enhanced antibody response in Atlantic salmon *Salmo salar* L. to *Aeromonas salmonicida* cell wall antigens using a bacterin containing β -1, 3-M-glucan as adjuvant. Fish Shellfish Immunol. 4, 47-51.
- Abel, G., Czop, J. K. (1992) Stimulation of human monocyte β -glucan receptors by glucan particles induces production of TNF- γ and IL-1. Int. J. Immunopharmacol. 14:1363-1373.
- Adachi, Y., Miura, N. N., Ohno, N., Tamura, H., Tanaka, S., yadomae, T. (1999) Enzyme immunoassay system for estimating the ultrastructure of (1,6)-branched (1,3)- β -glucans. Carbohydrate Polymers 39:225-229.
- Adams, A., Auchinachie, N., Bundy, A., Tatner, M.F., Horne, M.T., 1988. The potency of adjuvanted injected vaccines in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson and bath vaccines in Atlantic salmon *Salmo salar* L. against furunculosis. Aquaculture 69, 15-26.
- Ainsworth, A.J., Mao, C.P., Boyle, C.R., 1994. Immune responses enhancement in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, using β -glucan from *Schizophyllum commune*. In: Stolen, J.S. Fletcher, T.C. Eds. , Modulators of Fish Immune Responses Vol. 1, SOS Publications, Fair Haven, NJ, pp. 67-81.
- Akiyama, T., S. Arai, T. Murai, T. Nose (1985) Threonine, histidine and lysine requirements of chum salmon fry. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish, 51 : 635-639.
- Aman, p., Graham, H. (1987) Analysis of total and insoluble mixed-linked (1,3)(1,4)-D-glucans in barley and malt. J. Agric. Food Chem 35:704-709
- Anderson, D.P. (1992) Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. Annual Review of Fish Diseases, 2: 281-307.
- Anderson, D.P. 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. Annual Review of Fish Diseases, 2: 281-307.
- AOAC, 1995. Official methods of analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia, USA.
- Arnold, R.R., Brewer, M., Gauthier, J.J., 1980. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. Infect. Immun. 28,

893–898.

- Asenjo, J. A., Sun, W-H., Spencer, J. L. (1996) Optimal control of batch processes involving simultaneous enzymatic and microbial reactions. *Bioprocess Eng* 14: 323–329.
- Baba, T., Watase, Y., Yoshinaga, Y., 1993. Activation of mononuclear phagocyte function by levamisole immersion in carp. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59, 301–307.
- Baulny, M.O.D., Quentel, C., Fournier, V., Lamour, F., Gouvello, R.L., 1996. Effect of long-term oral administration of β -glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. *Dis. Aquat. Org.* 26, 139–147.
- Blazer, V.S., Wolke, R.E., 1984. The effects of α -tocopherol on the immune response and non-specific resistance factors of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Aquaculture* 37, 1–9.
- Bogwald, J., Johnson, E., Hoffman, J., Seljelid, R. (1984) Lysosomal glycosidases in mouse peritoneal macrophages stimulated in vitro with soluble and insoluble glycans. *J. Leukoc. Biol.* 35:357–371.
- Bohn, J. A., BeMiller, J. N. (1995) (1,3)- β -D-glucans as biological response modifiers: a review of structure–functional activity relationships. *Carbohydr. Res.* 28:3–14.
- Boonyaratpalin, S., Boonyaratpalin, M., Supamattaya, K., Toride, Y., 1995. Effects of peptidoglycan PG on growth, survival, immune responses, and tolerance to stress in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. In: Shariff, M., Subasighe, R.P., Arthur, J.R. (Eds). , *Diseases in Asian Aquaculture* Vol. 11. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 469–477.
- Boren, R. S., D. M. Gatlin III (1995) Dietary threonine requirement of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Journal of World Aquaculture Society*, 26(3) : 279–283.
- Brown, B.A. 1980. Routine hematology procedures. In *Hematology: Principles and Procedures*. pp. 71–112. Lea and Febiger, Philadelphia. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.*, 12, 1~4.
- Carr, W. E. S. (1976) Chemoreception and feeding behavior in the pigfish, *Orthopristis chrysopterus*: Characterization and identification of stimulatory substance in a shrimp extract. *Comp. Biochem. Physiol.*, 55A :

155–157.

- Carr, W. E. S. (1982) Chemical stimulation of feeding behaviour. pp. 259–273 in Chemoreception in fishes, T. J. Hara, ed. Amsterdam: Elsevier.
- Chang, K.L., 1966. Experimental studies on biochemical characters of *Achromobacter stenohalis*. J. Jinsen Med. Sci. 11, 142–148.
- Davis, J.F., Hayasaka, S.S., 1984. The enhancement of resistance of the American eel, *Anguilla rostrata* Le Sueur, to a pathogenic bacterium *Aeromonas hydrophila*, by an extract of the tunicate *Ecteinascidia turbinata*. J. Fish Dis. 7, 311–316.
- Di Luzio, N. R. (1983) Immunopharmacology of glucan: a broad spectrum enhancer of host defence mechanisms. *Trends Pharmacol. Sci.* 4: 344–347.
- Di Luzio, N. R., Williams, D. L., McNamee, R. B., Edwards, B. F., Kitahama, A. (1979) Comparative tumor-inhibitory and anti-bacterial activity of soluble and particulate glucan. *Int. J. Cancer* 24:773–779.
- Duncan, P.L. and Klesius, P.H. 1996. Dietary immunostimulants enhance nonspecific immune responses in channel catfish but not resistance to *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 8: 241–248.
- Duncan, P.L., Klesius, P.H. (1996) Dietary immunostimulants enhance nonspecific immune responses in channel catfish but not resistance to *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 8: 241–248.
- Edahiro, T., Hamoguchi, M., Kusuda, R., 1990. Effect of glycyrrhizine against streptococcal infection of young yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Suisanzoshoku* 38, 239–243, In Japanese.
- Elias, P., H. S. Joesph (1999) Identification of feeding stimulants for striped bass, *Morone saxatilis*. *Aquaculture*, 185 : 339–352.
- Engstad, R.E., Robertsen, B., Frivold, E., 1992. Yeast glucan induces increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish Shellfish Immunol.* 2, 287–297.
- Erdal, J.I., Evensen, O., Kaursted, O.K., Lillehaug, A., Solbakken, R., Thorud, K., 1991. Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon *Salmo salar* L. after feeding various levels of ascorbic acid and omega-3 fatty acids. *Aquaculture* 98, 363–379.
- Feed international, Netline corporation, 2000

- Fidler, I.J., Spitler, L.E., 1975. Effects of levamisole on in vivo and in vitro murine host response to syngeneic transplantable tumor. J. Natl. Cancer Inst. 55, 1107–1112.
- Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. 2000, Aquaculture Production Statistics. Rome
- Fukuda, K., J. Kohbara, C. Zeng, I. Hidaka (1989) The feeding stimulatory effects of squid muscle extracts on the young yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Nippon Suisan Gakkaishi, 55(5) : 791–797.
- Garling, D.L. Jr. and R.P. Wilson, 1977. Effects of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth and body composition of fingerling channel catfish. Prog. Fish-Cult., 39: 43–47.
- Graves, S.S., Evans, D.L. and Dawe, D.L. 1985. Mobilization and activation of nonspecific cytotoxic cells (NCC) in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) infected with *Ichthyorhthirus multifiliis*. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 8: 43–51.
- Graves, S.S., Evans, D.L., Dawe, D.L. (1985) Mobilization and activation of nonspecific cytotoxic cells (NCC) in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) infected with *Ichthyorhthirus multifiliis*. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 8: 43–51.
- Grayson, T.H., Williams, R.J., Wrathmell, A.B., Munn, C.B., Harris, J.E., 1987. Effects of immunopotentiating agents on the immune responses of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to ERM vaccine. J.Fish Biol. 31, 195–202.
- Halver, J.E., 1989. The vitamins. In: Halver, J.E.(Ed.), Fish Nutrition, 2nd edn., Academic Press, San Diego, CA, pp. 32–102.
- Harada, K. (1985) Feeding attraction activities of amino acids and lipids for juvenile yellowtail. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish, 51(3) : 453–459.
- Harada, K. (1992) Effect of attract and repellent mixtures on behavior of the oriental weather fish *Misgurnus anguillicandatus*. Nippon Suisan Gakkaishi, 58(8) : 1427–1430.
- Hardie, L.J., Fletcher, T.C., Secombes, C.J., 1990. The effect of vitamin E on the immune response of Atlantic salmon *Salmo salar* . Aquaculture 87,

1–13.

- Hardie, L.J., Fletcher, T.C., Secombes, C.J., 1991. The effect of dietary vitamin C on the immune response of Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquaculture* 95, 201–214.
- Horan, N. J., Jarman, T. R., Dawes, E. A. (1981) Effect of carbon source and inorganic phosphate concentration on the production of alginic acid by a mutant of *Azotobacter vinelandii* and on the enzymes involved in its biosynthesis. *J Gen Microbiol* 127:185–191.
- Horne, M.T., Poy, M., Pranthanpipat, P., 1995. Control of vibriosis in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, by vaccination. In: Chou, L.M. et al. Eds. , *The Third Asian Fisheries Forum*. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 459–467.
- Ikeda, I., H. Hosokawa, S. Shimeno, M. Takeda (1988) Identification of feeding stimulant in the krill extract for jack mackerel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54(2) : 235–238.
- Itami, T., Kondo, M., Uozu, M., Suganuma, A., Abe, T., Nakagawa, A., Suzuki, N., Takahashi, Y., 1996. Enhancement of resistance against *Enterococcus seriolicida* infection in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* Temminck and Schlegel , by oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *J. Fish Dis.* 19, 185–187.
- Itami, T., Takahashi, Y., Nakamura, Y., 1989. Efficacy of vaccination against vibriosis in cultured kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *J. Aquat. Anim. Health* 1, 238–242.
- Iwao H., K. Jun, A. Toshiyoshi, M. Tatsuo, M. Toshiaki, S. Shigeki, K. Isao (2000) Identification of feeding stimulants from a jack mackerel muscle extract for young yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture*, 181(1–2) : 115–126.
- Jang, S.I., Marsden, M.J., Kim, Y.G., Choi, M.S., Secombes, C.J., 1995. The effect of glycyrrhizin on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum , leucocyte responses. *J. Fish Dis.* 18, 307–315.
- Janusz, M. J., Austen, K. F., Czop, J. K (1987) Lysosomal enzyme release from human monocytes by particulate activators is mediated by β -glucan inhibitable receptors. *J. Immunol.* 138:3397–3901.
- Jeney, G., Anderson, D.P., 1993b. Glucan injection or bath exposure given alone

- or in combination with a bacterin enhance the non-specific defense mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* . Aquaculture 116, 315–329.
- Jeney, G., Galeotti, M., Volpatti, D., Jeney, Z. and Anderson, D.P. 1997. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. Aquaculture, 154: 1–15.
- Jeney, G., Galeotti, M., Volpatti, D., Jeney, Z., Anderson, D.P. (1997) Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. Aquaculture, 154: 1–15.
- Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S., Kobayashi, M., 1990. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish Pathol. 25, 93–98.
- Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S., Kobayashi, M., 1992a. Immunopotential activity of Freund's complete adjuvant in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Nippon Suisan Gakkaishi 58, 433–437.
- Kakuta, I., Kurokura, H., 1995. Defensive effect of orally administered bovine lactoferrin against *Cryptocaryon irritans* infection of red sea bream. Fish Pathol. 30, 289–290, In Japanese.
- Kasumyan, A. O., A. M. K. Morsi (1996) Taste sensitivity of common carp (*Cyprinus carpio*) to free amino acids and classical taste substances. J. of Ichthyology, vopr. Ikhtiol., 36 : 391–403.
- Kawahara, E., Sakai, M., Nomura, S., Chang, K.L., Muraki, K., 1994. Immunomodulatory effects on white-spotted char, *Saflaelinus leucomaenis*, injected with *Achromobacter stenohalis*. In: Chou, L.M. et al.(Eds.), The Third Asian Fisheries Forum. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 390–393.
- Kawakami, H., Shinohara, N., Sakai, M., 1998. The non-specific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, chitin or Freund's complete adjuvant in yellowtail *Seriola quinqueradiata* to *Pasteurella piscicida* infection. Fish Pathol. 33, 287–292.
- Kitao, T., Yoshida, T., Anderson, D.P., Dixon, O.W., Blanch, A., 1987. Immunostimulation of antibody-producing cells and humoral antibody to fish bacterins by a biological response modifier. J. Fish Biol. 31, 87–91.
- Kohbara, J., K. Fukuda, I. Hidaka, (1989) The feeding stimulatory effects of

- jack mackerel muscle extracts on the young yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Nippon Suisan Gakkaishi, 55(8) : 1343–1347.
- Kokashis, P.L., Williams, D.L., Cook, J.A., Di Luzio, N.R. (1978) Increased resistance to staphylococcus aureus infection and enhancement in serum lysozyme activity by glucan. Science 199, 1340–1342
- Krieh, N.R., K. J. Steel. (1974) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The William Wilkins Co., Baltimore
- Lawford, H. G., Rousseau, J. D. (1991) Bioreactor design considerations in the production of high-quality microbial exopolysaccharide. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28/29:667–684.
- Lawford, H. G., Rousseau, J. D. (1992) Production of β -1,3-glucan exopolysaccharide in low shear systems. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 34/35:597–612.
- Lawford, H., Keenan, J., Phillips, K., Orts, W. (1986) Influence of bioreactor design on the rate and amount of curdlan-type exopolysaccharide production by *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnol. Lett.* 8:145–150.
- Lawford, H.G., Rousseau, J. D. (1989) Effect of oxygen on the rate of β -1,3-glucan microbial exopolysaccharide production. *Biotechnol Lett* 11: 125–130.
- Lee, D.J. and G.B. Putnam, 1973. The response of rainbow trout to varying protein/energy ratios in a test diet. *J. Nutr.*, 103: 916–922.
- Lee, I. Y., Seo, W. T., Kim, K. G., Kim, M. K., Park, C. S., Park, Y. H. (1997) Production of curdlan using sucrose or sugar cane molasses by two-step fed-batch cultivation of *Agrobacterium* species. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18:255–259.
- Lee, I-Y, Kim, M-K., Lee, J-H., Seo, W-T., Jung, J-K., Lee, H-W., Park, Y-H., (1999) Influence of agitation speed on production of curdlan by *Agrobacterium* species. *Bioprocess Eng.* 20, 283–287.
- Lee, J-H, Lee, I-Y., Kim, M-K., Park, Y-H. (1999) Optimal pH control of batch processes for production of curdlan by *Agrobacterium* species. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23, 143–148.
- Li, Y., Lovell, R.T., 1985. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. *J. Nutr.* 115, 123–131.
- Luquet, P., J. J. Sabaut, (1973) Preliminary study of the protein requirements of the gilthead bream (*Chrysophrys aurata*). Symposium on Brackish water

- Aquaculture., 52 : 81–89.
- MacArthur, J.I., Thomson, A.W., Fletcher, T.C., 1985. Aspects of leucocyte migration in the plaice, *Pleuronectes platessa* L. J. Fish Biol. 27, 667–676.
- Masahiro Sakai, 1999, Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture, 172: 63–92.
- Matsuo, K., Miyazano, I., 1993. The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout. Nippon Suisan Gakkaishi 59, 1377–1379.
- Munro, P., Barbour, A. and Birkbeck, T.H. 1995. Comparison of the growth and survival of larval turbot in the absence of culturable bacteria with those in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* or a marine *Aeromonas* sp. Applied Environmental Microbiology, 61: 4425–4428.
- Munro, P., Barbour, A., Birkbeck, T.H. (1995) Comparison of the growth and survival of larval turbot in the absence of culturable bacteria with those in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* or a marine *Aeromonas* sp. Applied Environmental Microbiology, 61: 4425–4428.
- Ninomiya, M., Hatta, H., Fujiki, M., Kim, M., Yamamoto, T., Kusuda, R., 1995. Enhancement of chemotactic activity of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) leucocytes by oral administration of quillaja saponin. Fish Shellfish Immunol. 5, 325–328.
- Norqvist, A., Hagstrom, A., Wolf-Watz, H., 1989. Protection of rainbow trout against vibriosis and furunculosis by the use of attenuated strains of *Vibrio anguillarum*. Appl. Environ. Microbiol. 55, 1400–1405.
- Ogier de Baulny, M., Quentel, C., Fournier, V., Lamour, F. and Le Gouvello, R. 1996. Effect of long-term oral administration of β -glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. Diseases of Aquatic Organisms, 26: 139–147.
- Ogier de Baulny, M., Quentel, C., Fournier, V., Lamour, F., Le Gouvello, R. (1996) Effect of long-term oral administration of β -glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. Diseases of Aquatic

- Organisms, 26: 139–147.
- Olivier, G., Evelyn, T.P.T., Lallier, R., 1985. Immunity to *Aeromonas salmonicida* in coho salmon *Oncorhynchus kisutch* induced by modified Freund's complete adjuvant: its non-specific nature and the probable role of macrophages in the phenomenon. Dev. Comp. Immunol. 9, 419–432.
- Phillips, K. R., Lawford, H. G. (1983) Theoretical maximum and observed product yields associated with curdolan productin by *Alcaligenes faecalis*. Can J. Microbiol. 29:1270–1276.
- Pickering, A.D. 1992. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. Aquaculture, 100: 125–139.
- Pickering, A.D. 1992. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. Aquaculture, 100: 125–139.
- Raa, R., Røstad, G., Engstad, R., Robertsen, B., 1992. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: Shariff, M., Subasighe, R.P., Arthur, J.R. Eds. , Diseases in Asian Aquaculture Vol. 1. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 39–50.
- Roberts, M.L., Davies, S.J., Pulsford, A.L., 1995. The influence of ascorbic acid (vitamin C) on non-specific immunity in the turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Fish Shellfish Immunol. 5, 27–38.
- Robertsen, B., Rorstad, G., Engstad, R. and Raa, J. 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. Journal of Fish. Diseases, 13: 391–400.
- Robertsen, B., Rorstad, G., Engstad, R., Raa, J. (1990) Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. Journal of Fish. Diseases, 13: 391–400.
- Ruchimat, T, T. Masumoto, H. Hosokawa, S. Shimeno, (1997) Quantitative methionine requirement of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). Aquaculture, 150(1–2) : 113–122.
- Rumsey, G.L., Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Bowser, P.R., 1994. Effect of soybean protein on serological response, non-specific defense mechanisms,

- growth, and protein utilization in rainbow trout. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 41, 323–339.
- Saito, H., Ohki, T., Sacaki, T. (1979) A ^{13}C -nuclear magnetic resonance study of polysaccharide gels. Molecular architecture in the gels consisting of fungal, branched (1,3)- β -D-glucans (lentinan and schizophyllan) as manifested by conformational changes induced by sodium hydroxide. *Carbohydr. Res.* 74:227–240.
- Sakai, M., Atsuta, S., Kobayashi, M., 1995c. Efficacies of combined vaccine for *Vibrio anguillarum* and *Streptococcus* sp. *Fisheries Sci.* 61, 359–360.
- Sakai, M., Atsuta, S., Kobayashi, M., 1995e. The activation of leucocytes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by oral administration of *Clostridium butyricum* bacterin. In: Shariff, M., Subasighe, R.P., Arthur, J.R. (Eds.), *Diseases in Asian Aquaculture Vol. 11.* Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 433–437.
- Sakai, M., Kamiya, H., Atsuta, S., Kobayashi, M., 1991. Immunodulatory effects on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, injected with the extract of abalone, *Haliotis discus hannai*. *J. Appl. Ichthyol.* 7, 54–59.
- Sakai, M., Kamiya, H., Ishii, S., Atsuta, S., Kobayashi, M., 1992. The immunostimulating effects of chitin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In: Shariff, M., Subasighe, R.P., Arthur, J.R. Eds. , *Diseases in Asian Aquaculture Vol. 1.* Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 413–417.
- Sakai, M., Kobayashi, M., Kawauchi, H., 1996a. In vitro activation of fish phagocytic cells by GH, prolactin and somatolactin. *J. Endocrinol.* 151, 113–118.
- Sakai, M., Kobayashi, M., Kawauchi, H., 1996b. Mitogenic effects of growth hormone and prolactin on chum salmon *Oncorhynchus keta* leucocytes in vitro. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 53, 185–189.
- Sakai, M., Yoshida, T., Kobayashi, M., 1995. Influence of the immunostimulant, EF203, on the immune responses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to *Renibacterium salmoninarum*. *Aquaculture* 138,61–67.
- Salati, F., Hamaguchi, M., Kusuda, R., 1987. Immune response of red sea bream to *Edwardsiella tarda* antigens. *Fish Pathol.* 22, 93–98.
- Sasaki T, Takasuka N, Chihara G, Maeda YY (1976) Antitumor activity of degradaed products of lentinan: its correlation with molecular weight. *Gann* 67: 191–195.

- Secombes, C.J., Hardie, L.J., Daniels, G., 1996. Cytokines in fish: an update. *Fish Shellfish Immunol.* 6, 291–304.
- Sigel, M.M., Wellham, L.L., Lichter, W., Dudeck, L.E., Gargus, J.L., Lucas, A.H., 1970. Anticellular and antitumor activity of extracts from tropical marine invertebrates. In: Youngken, H.W. Ed. , *Food and Drugs from the Sea.* Marine Technology Society, Washington, D.C., pp. 281–291.
- Siwicki, A.K., 1989. Immunostimulating influence of levamisole on nonspecific immunity in carp (*Cyprinus carpio*). *Dev. Comp. Immunol.* 13, 87–91.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Dixon, O.W., 1990. In vitro immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spleen cells with levamisole. *Dev. Comp. Immunol.* 14, 231–237.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey, G.L., 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 41, 125–139.
- Sola, C, P. Tongiorgi, (1998) Behavioural responses of glass eels of *Anguilla anguilla* to non-protein amino acids. *J. of Fish Biology*, 53(6) : 1253–1262.
- Stanley, L.A., Hayasaka, S.S., Schwedler, T.E., 1995. Effects of the immunomodulator *Ecteinascida turbinata* extract on *Edwardsiella ictaluri* infection of channel catfish. *J. Aquat. Anim. Health* 7, 141–146.
- Stone, B. A., Clarke, A. E. (1992) (1,3)- β -Glucans in animal defense mechanisms. In *Chemistry and Biology of (1,3)- β -Glucans.* (La Trobe. Ed.) Victoria, Australia:University Press, 525–564.
- Sutherland, I. W. (1977) Microbial exopolysaccharide synthesis, in: *Extracellular Microbial Polysaccharides* (Sanford, P. A., Laskin, A. Eds.) pp 40–57. Washinton, DC: American Chmical Society.
- Sutherland, I. W. (1993) Biosynthesis of extracellular polysaccharides, in: *Industrial gums* (Whistler, R. L., Bemiller, J. N. Eds.) pp 69–85. Sandiego: Academic Press, Inc.
- Tamai, T., Shirahata, S., Noguchi, T., Sato, N., Kimura, S., Murakami, H., 1993. Cloning and expression of flatfish *Paralichthys loquaceus* interferon cDNA. *Biochem. Biophys. Acta* 1174, 182–186.
- Teshima, S. I., A. Kanazawa, S. Koshio, S. Itoh, (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.

- Thompson, I., White, A., Fletcher, T.C., Houlihan, D.F., Secombers, C.J., 1993. The effect of stress on the immune responses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets containing different amounts of vitamin C. *Aquaculture* 114, 1–18.
- Vadstein, O. (1997) The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture*, 155: 401–417.
- Vadstein, O. 1997. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture*, 155: 401–417.
- Wada, T., Arima, T., Nagashima, H., 1987. Natural killer activity in patients with chronic hepatitis treated with OK432, interferon, adenine arabinoside and glycyrrhizin. *Gastroenterol. Jpn.* 22, 312–321.
- Whistler R. L., BcMiller, J. N. (1993) *Industrial gums*, 3rd ed., Academic Press, San Diego
- Williams, D. L., McNamee R.B. Jones, E.L. (1991) A method for the solubilization of a (1,3)- β -D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Research* 219:203–213.
- Williams, D. L., Pretus, H. A., Ensley, H. E., Browder, I. W. (1994) Molecular weight analysis of a water-insoluble, yeast-derived (1,3)- β -D-glucan by organic-phase size-exclusion chromatography. *Carbohydr. Res.* 253:293–298.
- Williams, D. L., Mueller, A., Browder, W. (1996) Glucan-based macrophate stimulators: A review of their anti-infective potential. *Clin. Immuno-ther.* 5:392–399.
- Wise, D.J., Tomasso, J.R., Gatlin, D.M. III, Bai, S.C., Blazer, V.S., 1993. Effects of dietary selenium and vitamin E on red blood cell preoxidation, glutathione peroxidase activity, and macrophage superoxide anion production in channel catfish. *J. Aquat. Anim. Health* 5, 177–182.
- Wolk, M. and Danon, D. Promotion of wound healing by yeast glucan evaluated on single animals. *Med. Biol.* 63, 73–80 (1985)
- Yano, T., Mangindaan, R.E.P. and Matsuyama, H. 1989. Enhancement of the resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by some β -1,3 glucans. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 1815–1819.
- Yano, T., Mangindaan, R.E.P., Matsuyama, H. (1989) Enhancement of the

resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by some β -1,3 glucans. Nippon Suisan Gakkaishi, 55: 1815-1819.

Yano, T., Matsuyama, H., Mangindaan, R.E.P., 1991. Polysaccharide-induced protection of carp, *Cyprinus carpio* L., against bacterial infection. J. Fish Dis. 14, 577-582.

Zlli, F., Suter, F. (1998) Carboxymethylated glucan an immune-stimulating polysaccharide from bakers yeast. Agro-food-Industry Hi-Tech 6-8.

細川秀毅, 瀧井健二, 竹田正産, 1978, 1978년도 일본수산학회 춘계대회 강연집, p.17.

細川秀毅, 竹田正産, 瀧井健二, 植月則幸, 1976, 1976년도 일본수산학회 춘계대회 강연집, p.21.

池田靜徳, 1981, 魚介類の微量成分, 恒星社厚生閣, p.39-46.

주 의

1. 이 보고서는 해양수산부에서 시행한 수산특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 해양수산부에서 시행한 수산특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.