

육상어류양식장 배출물의 재활용 방안 연구

A Study on Recycling of Effluent
Sediment from the Land-Based
Seawater Fish Farm

2005. 1

제주대학교(주 관 기 관)
부경대학교(협동연구기관)

농림수산식품자료실



0014456

해 양 수 산 부

0

310732

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “육상어류 양식장 배출물의 재활용 방안 연구” 과제의
최종보고서로 제출합니다.

2005 년 1월 일

주관연구기관명 : 제주대학교
총괄연구책임자 : 김 세 재
연 구 원 : 이 영 돈
연 구 원 : 문 상 욱
협동연구기관명 : 부경대학교
협동연구책임자 : 강 주 찬
연 구 원 : 지 정 훈

요 약 문

I. 제 목

육상어류양식장 배출물의 재활용 방안 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 연구의 목적

제주도 해안가에 밀집되어 있는 육상양어장에서 배출되는 침전물의 처리 및 재활용 기술의 개발은 친환경적인 양식업의 토대 구축과 제주의 청정 이미지 부각하는데 매우 중요하다. 본 연구는 젖산균, 효모 등의 유용미생물을 이용하여 육상양어장 배출물의 발효기술을 확립하고, 발효 산물이 어류 사료 첨가제로 활용 가능성을 발효물의 어류 사료 첨가에 따른 어류의 생산성 및 경제성을 검토하기 위하여 수행하였다.

2. 연구의 중요성

단백질의 함량이 높은 양식장 배출물이 적절히 처리되지 않고 일부 한정된 지역에서 축적되면 악취 등과 함께 독성이 있는 아민류 등의 오염물질의 생성이 활발하게 일어나 위생보건의 측면에서도 문제점을 유발한다. 양식장 배출수 중에 함유된 고형물의 관리방안에는 중요한 애로사항이 존재하는데, 상대적으로 단백질의 함량이 높은 양식장 배출고형물의 보관 및 수집에서 나타나는 어려움이며, 처리단계에서도 일반적으로 수행되는 활성오니법에 의해서는 쉽게 처리되지 않는 어려움 등을 내포하고 있다. 특히, 양식장 (고형물 배출시설)이 해안가를 중심으로 넓게 분포하고 있다는 점은 국내외를 불문하고 많은 연구자들의 표준적인 처리법 개발에 걸림돌이 되고 있다.

따라서 양식장 배출물의 처리법 개발은 양식장에서 분리·수집된 배출물의 보관 및

수거 단계에서부터 시작되어야 하며, 처리법으로는 경제성에 기초를 둔 재활용 방안의 확립이 가장 중요한 것으로 인식되고 있다. 양식장 등으로부터 배출되는 고형물은 상대적으로 단백질 함량이 높아서 처리에 문제점으로 부각되어지나, 역으로 판단하면 재활용가치가 크며, 축산동물의 소화 가능한 수준까지 혐기분해를 거치거나 또는 미생물 균체로서 사료첨가제로 이용 가능한 연구개발이 절실히 요구되고 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 양식장 배출물의 특성 및 혐기분해를 위한 미생물 탐색·선발

제주도 내 넙치양식장 1개소를 선정하여 각 양식장 배출물 (사료찌꺼기 등)을 수집하고, 이들의 물리화학적 특성 (수분, 단백질 함량, 기타 지방산, 아미노산 등)을 분석하였다. 또한, 배출물로부터 대표적인 전염성 어병균의 오염여부를 검출하였고, 배출물의 혐기적 분해에 최적인 젖산균, 효모 등의 미생물 종을 선별하였다.

2. 양식장 배출물의 발효

수거된 배출물 중 일부는 고압멸균기 등을 이용하여 멸균 처리한 후 발효에 이용하였다. 혐기발효는 젖산균, 효모 등의 미생물을 이용하여 혐기적 분해를 수행하고 배출물을 기질로 할 때 각 미생물 종의 최적 성장조건을 탐색하여 경제적인 발효공정을 확립하였다.

3. 발효물의 특성 평가

발효 전 및 후의 배출물의 성분분석을 통하여 발효처리에 의한 성분변화를 평가하였다. 또한, 세포배양과 어류를 이용한 기능성 및 안전성 평가 (조직학 및 혈액학적 분석)를 수행하였다.

4. 발효물의 양식어 사료 첨가제로서의 투여 실험

전장 8~10 cm 크기의 치어기 넙치를 1 ton 사육수조에서 발효물을 사료 공급량의 0.2~2.0%까지 단계적으로 첨가하여 사육하고, 적정 첨가농도 및 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 발효물의 공급에 따른 성장과 증체율, 일간성장률, 일간섭이율, 비만도, 사료계수 등의 성장을 조사하였고, 간과 소화관의 조직학적 변화, 혈액학적 변화 (혈액성상, 혈청 무기성분, 혈청 유기성분, 혈청 효소 활성분석 등), 면역학적 변화 등을 조사하였다.

5. 사료첨가제로서의 발효물의 산업화 검토

양식어류 적용 실험결과와 수거체계, 생산시설비 등의 자료까지 포함하여 총괄적으로 검토한 후, 산업화 평가를 수행하고, 결과에 따라 기업체에 기술이전 또는 벤처 창업방안을 제시하였다.

IV. 연구개발결과

1. 양식장 배출물의 특성 평가 및 혐기분해를 위한 미생물 탐색·선발

가. 양식장 배출물의 물리화학적 특성 파악 및 어병균 검사

양어장 투여 생사료, 배출물, 배출물 발효물 등 3시료에서 수분, 회분, 조단백, 조지방, 유해미네랄, 지방산, 구성아미노산, 유리 아미노산 등의 물리화학적 특성을 비교 분석하였다. 양식장 배출물은 단백질, 조지방, 아미노산의 조성이 생사료와 유사하여 재활용 가치가 높은 자원으로서 인식되었다. 양어장 배출물에 존재하는 어병균을 검사하여 어병균 사멸 방안을 강구하였다. 대표적인 어병균인 비브리오를 집중적으로 검사하였으며, 배출물 중에는 항시 존재하는 것으로 나타났다. 발효처리 후 시료내의 세균수 측정 결과를 보면 대부분의 처리구에서 세균이 검출되지 않았는데 이는 본 연

구에 사용한 세균수 측정방법이 일반적인 종속영양 세균수를 측정하는 방법으로 이루어진 점과 발효산물에 의해 일반 세균이 생존이 저해됨으로써 세균수 측정 방법으로는 계수가 어려웠던 것으로 사료되며, 발효에 관여하는 미생물 중에서 젖산균의 성장과 관련한 일반세균의 사멸 또는 생장억제 효과에 기인하는 것으로 판단되었다.

나. 발효미생물의 보존 및 배양

젖산균 1종 (*Lactobacillus plantarum*), 효모 1종 (*Saccharomyces cerevisiae*) 등 각 미생물 균주를 구입하여 젖산균과 효모는 혐기조건에서 각각 38, 25℃에서 배양하였다.

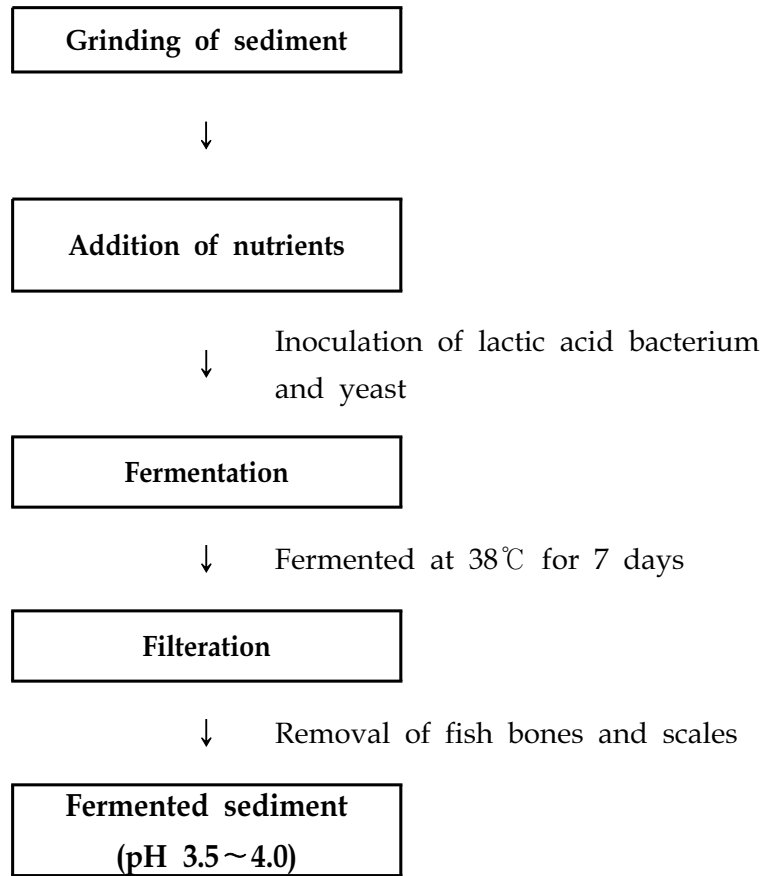
2. 양식장 배출물의 발효

가. 발효조건

젖산균 (10^6 cells/ml)과 효모 배양액 (10^6 cells/ml)을 1:2 (V/V)의 비율로 혼합한 액을 양어장 배출물 발효 접종액으로 하였다. 양어장 배출물을 분쇄한 후, 당분을 첨가하며 최적의 당 첨가량을 결정하였다. 발효온도는 38℃이며, 약 6~7일간 배양하였다. 젖산균은 배양개시 후 약 2~3일째에 최대 개체수에 도달하였고, 효모는 배양개시 후 점진적으로 그 개체수가 증가하였다. 배양완료 후 약 15일 경과시점까지 젖산균은 10^7 cfu/ml의 개체수 수준을 유지하였고, 효모는 10^7 cfu/ml의 개체수 수준을 유지하였다. 배양개시 후 약 15일 경과시점까지 어병균은 검출되지 않았다.

나. 발효공정

발효공정을 도식으로 표시하면 다음과 같다.



3. 발효물의 특성 평가

가. 영양적 측면

생사료와 배출물 시료는 수분, 조지방, 조단백, 회분 등의 항목에서 유사한 값들을 나타내었으나, 이들과 배출물 발효물의 비교에서는 발효물 시료에서 수분이 다소 높았고, 조단백 함량은 상대적으로 낮게 나타났으며, 수분의 증가와 조단백의 감소는 발효에 따른 미생물 분해작용에 기인하는 것으로 추론되었다. 무기물인 경우에는 생사료, 배출물, 배출물 발효물 시료별로 전반적으로 비슷한 농도값을 나타내었고, 배출물 발효물에서 Ca와 P의 농도가 상대적으로 낮게 나타났다. 유해물 분석실험에서는 Pb, Cd 등은 불검출이거나 극히 적은 농도로 검출되었으며, 본 실험에서 나타난 특이한 점으로서 Se 농도는 배출물 발효물에서 상대적으로 높게 나타났으나, Cr, Hg, As 등은 생

사료, 배출물에 비교하여 배출물 발효물 시료에서 그 농도가 상대적으로 낮았다. 각 시료별 (생사료, 배출물, 배출물발효물) 15종의 아미노산의 상대적인 함량의 차이점은 발견되지 않았으며, 유리아미노산인 경우에는 생사료에서 20종류, 배출물에서 22종이 검출된 반면 배출물 발효물에서는 30종류의 유리아미노산이 검출되었다.

나. 기능성 측면 (항산화, 세포생존능 등)

DPPH radical 소거활성에 의한 항산화 활성, Xanthine oxidase 억제 및 Superoxide 소거 활성, LPS로 유발된 대식세포에서 nitric oxide (NO) 생성에 대한 억제 효과, 세포 생존 강화작용 확인을 위해 HepG2 세포의 생존능에 미치는 영향, 세포 내 Reactive Oxygen Species (ROS) 제거 활성을 분석하였다.

다. 비료로서의 활용성 평가

(1) 쪽파 실험

약 2개월간 쪽파재배실험을 통해 가닥의 개당 중량을 측정한 결과 대조구에서는 1.73 ± 0.16 g이었고, 비료 처리구에서 1.35 ± 0.09 g으로 나타났다. 배출물 처리구에서는 1.67 ± 0.22 g으로 쪽파의 길이, 중량, 가닥 개수, 가닥 중량 모두 대조구와 다른 실험구간에 차이는 없었다.

(2) 브로콜리와 양배추 실험

브로콜리의 높이는 대조구에서 10.53 ± 0.24 cm였고, 배출물 처리구에서는 11 cm로 나타났다. 가로와 세로의 길이는 대조구에서 각각 9.56 ± 0.33 , 8.39 ± 0.28 cm로 배출물 처리구의 9.68 ± 0.31 cm와, 8.50 ± 0.26 cm 였다. 중량은 대조구가 182.82 ± 14.88 g, 처리구 186.96 ± 11.36 g으로 대조구와 실험구간에 성장차이는 없었다.

그러나 양배추에서는, 높이는 대조구에서 12.27 ± 0.27 cm였고, 배출물 처리구는 13.77 ± 0.23 cm로 대조구에 비해 유의한 차이를 보였고, 길이는 대조구가 12.4 ± 0.26 cm, 배출물 처리구에서는 13.53 ± 0.27 cm로 대조구보다 높게 성장하였고, 무게는 대조구에서 579.26 ± 33.04 g인 반면에 배출물 처리구에서는 829.56 ± 40.88 g으로 대조구와 유의한 성장 차이가 나타났다.

4. 발효물의 양식어 사료투여 적용 및 대상 어류의 생리·조직학적 평가

가. 사육실험을 통한 평가

(1) 성장

실험 시작 시 실험어의 평균전장은 12.3 cm 내외였으나, 실험종료시 전장은 대조구에서 18.6 ± 0.13 cm로 성장하였다. 감귤 농축액과 양어장 배출물 10, 30, 50% 혼합 발효실험구와 10, 50% 농축 실험구, 양어장 배출물 발효 실험구에서 각각 20.84 ± 0.15 , 21.03 ± 0.13 , 20.47 ± 0.14 , 21.03 ± 0.12 , 20.64 ± 0.13 , 20.79 ± 0.16 cm로 성장하여 30% 발효구와 10% 농축 실험구에서 대조구보다 유의한 성장을 보여 주었다 ($P < 0.05$). 실험시작시 실험어의 체중은 19.70 g이었으며, 실험종료시 체중은 대조구에서 61.88 ± 1.17 g으로 성장하였고, 감귤 농축액과 양어장 배출물 10, 30, 50% 혼합 발효실험구와 10, 50% 농축 실험구, 양어장 배출물 발효 실험구에서 각각 94.39 ± 1.89 , 94.55 ± 1.72 , 90.62 ± 1.16 , 96.31 ± 1.46 , 92.91 ± 1.67 , 94.68 ± 1.74 g로 성장하여, 10% 농축 실험구에서 높은 성장을 하였다 ($P < 0.05$). 증중량은 대조구에서 1158.0 g이었고, 감귤 농축액과 양어장 배출물 10, 30, 50% 혼합 발효실험구와 10, 50% 농축 실험구, 양어장 배출물 발효 실험구에서 각각 1124.6 g, 1179.6 g, 1177.8 g, 1307.3 g, 1127.3 g, 1259.7 g이었다 ($P < 0.05$).

(2) 사료계수, 일간성장률 및 일간섭이율

생존율은 모든 실험구에서 96.0~99.0% 수준이었다 ($P > 0.05$). 사료계수는 50% 농축 실험구에서 1.09로 가장 높게 조사되었고, 대조구를 비롯한 거의 모든 실험구에서 1.03~1.08의 범위로 조사되었으나, 10% 농축 실험구에서는 1.00으로 가장 낮았다. 일간 성장률은 1.52~1.56% 범위였고, 일간섭이율은 1.60~1.68% 범위로 대조구를 비롯한 모든 실험구에서 유사한 결과를 보였다 ($P > 0.05$).

나. 혈액, 효소학적 평가

(1) 혈액 및 조직학적 접근을 통한 영향 평가

적혈구수는 대조구의 경우 274.6×10^4 cells/mm³, 사료 첨가 실험구에서 292.2×10^4 cells/mm³ ~ 316.2×10^4 cells/mm³로 대조구에 비해 높은 값을 나타냈다. 특히, 10% 및 50% 발효구 (10%F, 50%F) 그리고 10% 농축구 (10%FC)에서 대조구와 비교하여 유의

하게 높으며 ($P < 0.05$), 혈색소 (Hb) 농도 사료 첨가구에서 대조구에 비해 비교적 높게 나타났고, 특히 10% 및 30% 발효구에서는 통계적으로 유의하게 나타났다 ($P < 0.05$).

혈색소 지수 (Ht)는 대조구가 24.8, 발효구는 26.5~27.3의 범위였고 10% 및 50% 농축구는 각각 24.6 및 24.7로 대조구와 유사하였으나, 배출물 발효물에서는 21.9로 대조구와 비교하여 유의하게 낮은 값을 나타내었다 ($P < 0.05$). 혈청 무기성분 중 마그네슘은 대조구에서 2.46 mg/L, 발효구에서는 2.44 mg/L. 또한, 혼합 발효구와 농축액 실험구에서 2.58~2.82 mg/L으로 대조구와 비교하여 높은 범위를 나타내었으나 유의한 차이는 없었다 ($P > 0.05$). 칼슘 농도는 전 실험구에서 9.99~10.40 mg/L으로 각 실험구별 유의한 차이는 없었으나 ($P > 0.05$), 혈청 인의 농도는 대조구가 8.27 mg/L이었으나 10% 및 30% 혼합 발효구에서 각각 10.35 및 10.37 mg/L로 대조구에 비해 높은 값을 보였다 ($P < 0.05$). 혈청 삼투압의 경우 305.2~322.8 (mOsm)의 범위를 나타내었으며 유의한 차이는 없었다 ($P > 0.05$).

혈청 총 단백질은 대조구에서 3.24 g/dL, 100% 배출물 발효구는 3.28 g/dL, 혼합 투여구에서 3.66~3.84 g/dL의 범위를 나타내었음. 10% 농축액 실험구 (10%FC)에서는 4.01 g/dL로 대조구에 비해 유의하게 높게 나타났다 ($P < 0.05$). 알부민의 경우 전 투여구에서 그룹별 유의한 차이가 없었으며, 혈당 및 총 콜레스테롤의 경우 50% 농축구와 100% 배출물 발효구에서 대조구에 비해 낮은 혈당과 콜레스테롤 수치를 보였으며, 트리글리세라이드농도는 50% 농축구에서만 대조구에 비해 유의하게 높은 값을 나타내었다 ($P < 0.05$).

(2) 성장 관련 인자를 통한 종합적 생산성 평가

배출물 발효물은 어류의 성장 촉진에 기여하며, 발효물을 투여하지 않을 때 보다 약 7.1%의 성장촉진 효과가 나타났다. 혈액학적 및 조직학적 검사결과에서 배출물 발효물의 안전성을 확인하였으며, 특히 발효 산물에 기인하는 소화관 활성화 유도가 건전한 양식어 생산을 가능케 하는 것으로 사료되었다. 배출물 발효물은 항산화 작용을 갖고 있어 사료 등의 산패억제 효과가 기대되었고, 배출물 발효물의 첨가에 의해 어류 혈액 내 미네랄 농도가 상승하고, 총콜레스테롤과 혈당치가 저하된 점으로부터 어류의 건강유지에 크게 기여하는 것으로 판단된다.

배출물 발효물의 생산은 크게 경제적이며, 어류사료 첨가제로서 그 활용가능성이

매우 높게 나타났고, 특히, 배출물의 처리방법이 많지 않은 상황 속에서 우수한 처리방법으로 사료된다. 배출물 발효물의 이용은 어류의 건강유지, 성장촉진 등의 측면에서 어병유발 가능성을 저하시킬 가능성이 높을 것으로 판단되며, 나아가 항생제 등의 약제 사용의 절감효과가 기대된다. 특히, 양식장 배출수 중 고형물의 회수는 양식장 주변 해역의 청정화에 기여하며, 이는 주변 해수를 이용하는 양식장의 측면에서 생산성 향상에 기여하게 될 것으로 사료된다.

5. 사료첨가제로서의 발효물의 산업화

가. 경제성에 근거한 각 공정 설정

- 당밀을 기질로 한 젖산균, 효모 대량배양
- 배출물 발효공정 확립
 - 양식장 현장에 100~200 ℓ 용량의 용기를 비치
 - 수거된 배출물을 용기에 넣고 현장에 미리 배포한 복합미생물 원액을 배출물 양의 10%되게 주입 후 혼합
 - 각 양식장에 저장중인 배출물을 수거
 - 수집된 배출물을 발효조에 투입 후 38℃ 7일간 발효
 - 발효물의 pH 검사, 젖산균, 효모, 대표적인 어류 전염성미생물 검사
 - 발효물을 분무건조기, 열풍건조기 등으로 건조
 - 건조된 발효물을 10~20 Kg 단위로 포장
- 공정의 단순성 증대
 - 젖산균의 증식에 따른 어류 전염성 미생물의 저해효과에 의해 배출물의 살균 열처리 공정이 생략됨 (경제성 증진).
 - 현장에서의 발효미생물 투입에 의한 배출물의 보존성 증진 (일상적인 수거방법에 의해 배출물 수거가능; 경제성 증진)
 - 적당한 부형제의 이용에 의해 건조공정 효율 상승 및 건조시간 단축
 - 발효물의 낮은 pH에 의해 제품의 보존성 증대 및 이에 따른 저장비용 감소

나. 기술이전 및 사업화 방안

- 본 연구결과를 토대로 파일럿 수준에서 배출물 수거, 보존, 생산, 품질관리 등의 공정 확립 [참여기업인 (주)대우환경산업과 공동 수행]
- 생산체제를 구축하고, 제품의 품질기준 등이 설정되면 본격적인 기술이전 계약을 체결할 수 있음.
- 본 연구사업의 성과를 지자체 수산관련 정책수립의 기초자료로 제공
- 각 양식장에서 책임감을 갖고 배출물 관리를 실시하는 것이 본 연구개발의 산업화에 중요한 단계가 되며, 양식장에서 배출물 보존과 관련한 내용을 책자로 만들어 배포할 필요성이 있음
- 파일럿 수준에서 검토 후 본격적인 제품생산은 가능함.
- 향후 배출물 발효물은 사료첨가제 뿐만 아니라 기능성 비료 등의 제품으로서도 개발할 수 있음.

V. 연구개발결과의 활용계획

1. 정책수립을 위한 기초자료로 활용

- 배출물 자원화 기술 개발로 경제성이 확보된다면 수산물 가공과정에 발생하는 부산물 또는 폐기물의 처리 등과 연계함으로써 각종 부산물의 효율적 활용을 위한 기본 지침 제시
- 양식장 배출물 등의 천연물을 이용한 사료첨가제의 개발은 양식동물의 청정 이미지 개선에 기여함
- 연안 해양환경 보존을 위한 오염부하 저감 방안으로서 활용
- 젓산균, 효모를 이용한 발효 공정의 확대방안으로 다른 기타 폐기물 처리에 활용함으로써 보다 산업적으로 확대방법을 모색

2. 타 기술개발에의 활용

- 수협공판장 등의 유기물 부하가 많은 오폐수처리 기술개발에 기여
- 폐사 양식어의 재활용 방안으로서 응용
- 고단백 폐기물 발생이 높은 식품공장 등의 폐기물 처리법으로서 응용

- 본 연구에 개발된 균주 외 다른 미생물을 이용한 발효 첨가제의 개발로 각종 사료에 첨가제로 활용 방안 기대
- 양식어장 생산성향상을 위한 오염 퇴적물 개선방안으로 활용
- 육상어류양식장 배출물의 연구결과로부터 지역 특산물 부산물 의 사료첨가제로서의 재활용이 가능하게 되며, 축산업, 양식업의 소득수준 향상에 기여할 수 있음
- 연구결과의 기술이전에 의한 배출물 발효물 사료첨가제 산업화
- 배출물 발효물을 이용한 사료첨가제로서의 아미노산 소재 제품화

SUMMARY

I . Title

The Study on the Recycling of Effluent sediment from the Land-Based Sea water Fish Farm

II. Goal and importance of the research

This study was accomplished to established the fermentation technique for the recycling of effluent sediment derived from land-based seawater fish farm. The effluent sediment was fermented using useful microorganism such as lactic acid, yeast. The fermented sediment was evaluated to be reused as functional feed additive for fish farm. This study will be helpful in constructing pro-environmental fish farm industry by raising the clean image of Jeju.

III. Research contents and scope

The effluent sediments were collected from 1 place among the land-based seawater fish farms in Jeju-do. The physico-chemical characterization of effluent sediments were determined, and then screened the microorganisms most suitable for fermentation of the effluent sediments. The functional effect and safety of the fermented sediment was tested using the major aquaculture fish species, olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). After fishes were fed the experimental diets for 63 days, the effect of on growth performance of olive flounder was investigated. Also, the availability of the product as an additive in diets for fish were investigated using the histological and biochemical techniques.

IV. Results

The fermentation condition of the effluent sediment was established using useful microorganism such as lactic acid bacteria and yeast. Concentration of free

amino acids in fermented product was relatively higher than that in the raw effluent sediment. The concentrations of harmful inorganic (Cr, Hg), the number of marine bacteria and *Vibrio* sp. were remarkably reduced after fermentation of the effluent sediment.

To estimate the availability of the fermented sediment product as a feed additive for cultivating fishes, we investigated the effects of oral administration with the fermented sediment product on the growth performance of olive flounder. Fishes were distributed into seven groups; control, solution of fermented sediment added with concentrated citrus juice (10%F, 30%F, 50%F), concentrates of 10%F and 50%F (10%FC, 50%FC) and solution of fermented sediment (FS). Fish were fed the experimental diets for 63 days. Growth of olive flounder fed diets containing 30%F and 10%FC was higher than that of the control ($P < 0.05$). The weight gain of fish fed 10%FC diet was significantly higher compared to that of fish fed the control diet. Feed coefficient value was lower in 10%FC and FS than in the control diet.

In haematological characteristics, RBC contents of 10%F, 50%F and 10%FC groups were higher than that of the control group ($P < 0.05$). Fish fed the diets containing 10%FC had the highest total protein among all groups ($P < 0.05$). Blood glucose level of fish fed the diets containing 10%F, 50%FC and FS was significantly lower than that of fish fed the control diet ($P < 0.05$). A lower blood LDH was observed in fish fed 30%F diet compared to the control group ($P < 0.05$). No significant differences were found in GOT and GPT values among treatment groups ($P > 0.05$). The fermented product of fish farm sediment with concentrated citrus juice might be used as an additive of flounder diet.

CONTENTS

| | |
|--|------------|
| Chapter 1. Outlines of the Research | 26 |
| 1. Goal of the Research | 26 |
| 2. Scope of the Research | 30 |
| Chapter 2. Status of the Research | 32 |
| 1. Oversea Status of the Research | 32 |
| 2. Domestic Status of the Research | 33 |
| 3. Evaluation of the Research Status | 34 |
| Chapter 3. Research Contents and Results | 36 |
| 1. Materials and Method | 36 |
| 2. Results | 47 |
| Chapter 4. Objective Achievement and Contribution to Related Fields | 116 |
| 1. Object of Research | 116 |
| 2. Object Achievement | 117 |
| 3. Contribution to Related Fields | 122 |
| Chapter 5. Their Applications of Research Results | 124 |
| Chapter 6. State of the Art Report | 128 |
| Chapter 7. Reference | 132 |

목 차

| | |
|------------------------------|----|
| 제 1 장 연구개발과제의 개요 | 26 |
| 제 1절 연구개발의 필요성 | 26 |
| 1. 기술적 측면 | 26 |
| 2. 경제·산업적 측면 | 27 |
| 3. 사회·문화적 측면 | 27 |
| 4. 국내·외 관련 연구의 현황과 문제점 | 28 |
| 5. 전망 | 29 |
| 6. 기술도입의 타당성 | 29 |
| 제 2절 연구개발의 목표 및 범위 | 30 |
| 1. 연구목표 | 30 |
| 2. 연구범위 | 30 |
| 가. 1차년도 | 30 |
| 나. 2차년도 | 31 |
| 제 2장 국내·외 기술개발 현황 | 32 |
| 제 1절 연구사례의 조사 | 32 |
| 1. 외국의 경우 | 32 |
| 2. 국내의 경우 | 33 |
| 3. 조사연구개발 사례에 대한 평가 | 33 |
| 4. 주요 관련 기술의 검토 | 34 |
| 제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과 | 36 |
| 제 1절 연구방법 | 36 |

| | |
|--|----|
| 1. 미생물 배양 및 발효 | 36 |
| 가. 미생물 배양 | 36 |
| 나. 발효 | 36 |
| 2. 어병균 검정 | 38 |
| 3. 발효물의 이화학적 분석 | 38 |
| 4. 어류사육실험 | 39 |
| 가. 실험어 및 사육환경 | 39 |
| 나. 양어장 배출물과 감귤농축액 혼합발효물의 제조 | 39 |
| 다. 사료공급 | 40 |
| 라. 성장 | 40 |
| 마. 통계처리 | 41 |
| 5. 어류의 혈액학적 및 면역학적 분석 | 41 |
| 가. 발효물의 양식어 사료투여 적응 및 대상어류의 생리학적 평가 | 41 |
| 나. 혈액시료 채취성상 변동관찰 | 41 |
| 다. 혈액성상 관찰 | 41 |
| 라. 혈청무기성분 관찰 | 42 |
| 마. 혈청유기성분 관찰 | 42 |
| 바. 효소활성 | 42 |
| 사. 병리학적 안전성 검토 | 42 |
| 아. 조직학적 분석 | 42 |
| 자. 간 및 신장의 glutathione 농도 및 포합효소 활성조사 | 43 |
| 6. 배출물 발효물의 기능성 탐색 | 44 |
| 가. Xanthine oxidase 억제 및 Superoxide 소거활성 | 44 |
| 나. 양식장 배출물과 배출물 발효물의 LPS로 유발된 대식세포에서의 nitric oxide (NO)생성에 대한 억제효과 검색 | 44 |
| 7. 배출물 발효물의 비료로서의 기능성 탐색 | 46 |
| 가. 쪽파실험 | 46 |
| 나. 브로콜리와 양배추 | 46 |

| | |
|--|-----|
| 제 2절 연구결과 | 47 |
| 1. 배출물을 기질로 한 미생물 배양 및 최적조건 탐색 | 47 |
| 2. 넙치양어장 선정 및 양식장 배출물의 물리화학적 특성 파악 | 48 |
| 3. 배출물의 전처리 (살균처리) 및 어병균 검사 | 54 |
| 가. 어병균 검출 | 54 |
| 나. 총 세균수 | 55 |
| 다. 어병균 검색 | 57 |
| 4. 어류사육실험 | 59 |
| 【실험 I】 | |
| 가. 사육환경 | 59 |
| 나. 양어장 배출물 발효시료 첨가사료의 성장효과 | 59 |
| 다. 사육어류의 조직학적 평가 | 64 |
| 라. 1차 어류사육실험에 따른 혈액학적, 효소학적 평가 및 병리학적 검토 ... | 67 |
| 【실험 II】 | |
| 가. 사육환경 | 79 |
| 나. 양어장 배출물 발효시료 첨가사료의 성장효과 | 80 |
| 다. 사육어류의 조직학적 평가 | 87 |
| 라. 2차 어류사육실험에 따른 혈액학적, 효소학적 평가 | 90 |
| 마. 간 및 신장의 glutathione 농도 및 포함효소 활성 | 100 |
| 5. 어류양식 실험결과 종합 | 103 |
| 6. 배출물 발효물의 기능성 탐색 | 107 |
| 가. Xanthine oxidase 억제 및 Superoxide 소거활성 | 107 |
| 나. 양식장 배출물과 배출물 발효물의 LPS로 유발된 대식세포에서의 nitric oxide (NO)생성에 대한 억제효과 검색 | 107 |
| 다. 대식세포의 생존력에 미치는 효과 | 107 |
| 라. 세포의 대사활성 측정 | 107 |
| 마. 양어장 배출물의 항산화 활성 | 108 |

| | |
|--------------------------------------|------------|
| 7. 배출물 발효물의 비료로서의 기능성 탐색 | 114 |
| 가. 쪽과실험 | 114 |
| 나. 브로콜리와 양배추 | 114 |
| 제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 | 116 |
| 제 1절 목표달성도 | 116 |
| 1. 목표 | 116 |
| 가. 최종목표 | 116 |
| 나. 연도별 연구목표 | 116 |
| 2. 달성도 | 117 |
| 가. 최종목표 달성도 | 117 |
| 나. 세부목표 달성도 | 121 |
| 제 2절 관련분야에의 기여도 | 122 |
| 1. 배출물 재활용에 의한 양식생물 피해저감 | 122 |
| 2. 배출물 재활용에 의한 자원화 | 123 |
| 제 5장 연구개발결과의 활용계획 | 124 |
| 제 1절 연구결과 활용방안 | 124 |
| 1. 정책수립을 위한 기초자료로 활용 | 124 |
| 2. 타 기술개발에의 응용 | 124 |
| 3. 연구성과 활용 | 125 |
| 제 2절 산업화 방안 | 125 |
| 1. 시험생산 | 125 |
| 2. 배출물 수거이동 | 125 |
| 3. 현장 적용성 평가 | 125 |

| | |
|----------------------------------|-----|
| 4. 경제성 평가 | 126 |
| 5. 기술이전 및 사업화 | 127 |
| | |
| 제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 | 128 |
| | |
| 제 7장 참고문헌 | 132 |

<List of Tables>

| | | |
|-----------|---|----|
| Table 1. | General composition of sediment from land-based seawater fish farm | 49 |
| Table 2. | Concentration of inorganic materials in sediment from land-based seawater fish farm | 49 |
| Table 3. | Concentrations of harmful inorganic materials in sediment from land-based seawater fish farm | 50 |
| Table 4. | Amino acids composition of sediment from land-based seawater fish farm | 51 |
| Table 5. | Free amino acids composition of sediment from land-based seawater fish farm | 53 |
| Table 6. | Total number of marine bacteria and <i>Vibrio</i> sp. in raw effluent sediment from land-based seawater fish farm | 55 |
| Table 7. | Counting of total number of marine bacteria and <i>Vibrio</i> spp. from fermented sediment | 56 |
| Table 8. | Total length, body weight and survival rate of <i>Paralichthys olivaceus</i> by oral administration of fermented sediment from land-based seawater fish farm at different concentration (Feeding period: May. 23, 2003 through July. 18, 2003) | 60 |
| Table 9. | Feed coefficient, daily feeding rate and daily growth rate of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> fed with different levels of fermented sediment from land-based seawater fish farm (Feeding period: May. 23, 2003 through July. 18, 2003) | 62 |
| Table 10. | Total length, body weight and survival rate of <i>Paralichthys olivaceus</i> by oral administration of fermented sediment from land-based seawater fish farm at different concentration (Feeding period: May. 29, 2004 through August. 03, 2004) | 81 |
| Table 11. | Feed coefficient, daily feeding rate and daily growth rate of olive | |

| | |
|--|-----|
| flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> fed with different levels of fermented sediment from land-based seawater fish farm (Feeding period: May 29, 2004 through August. 03, 2004) | 85 |
| Table 12. Erythrocyte count, hemoglobin concentration and hematocrit level of olive flounder by administration of various diet supplement for 3 months | 91 |
| Table 13. Magnesium, calcium, phosphorus and osmolality level of olive flounder by administration of various diet supplement for 3 month .. | 93 |
| Table 14. Total protein, albumin, glucose, triglyceride and total cholesterol concentration of olive flounder by administration of various diet supplement for 3 month | 95 |
| Table 15. GOT, GPT, LDH and ALP activities of olive flounder by administration of various diet supplement for 3 month | 97 |
| Table 16. Hepatic glutathione peroxidase and reductase enzyme activity of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> administrated with the different diet supplement | 99 |
| Table 17. Renal glutathione peroxidase and reductase enzyme activity of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> administrated with the different diet supplement | 100 |
| Table 18. Effect of fermented sediment on growth of welsh onoin | 114 |
| Table 19. Effect of fermented sediment on growth of broccoli | 115 |
| Table 20. Effect of fermented sediment on growth of cabbage | 115 |

<List of Figures>

| | |
|---|----|
| Fig. 1. Process of fermentation of sediment by lactic acid bacterium and yeast | 38 |
| Fig. 2. Growth of <i>L. plantarum</i> and <i>S. cerevisiae</i> on sediment from land-based seawater fish farm at 38°C | 47 |
| Fig. 3. Microphotograph of bacterium from the fermented sample grown on BHI agar medium (× 1,000) | 54 |
| Fig. 4. Microphotograph of bacterium from the raw sediment sample grown on BHI agar medium | 55 |
| Fig. 5. Result of PCR amplification of fermentation product for <i>Edwardsiella tarda</i> (A, 461bp), <i>Flexibacter maritimus</i> (B, 715bp), <i>Lactococcus garvieae</i> (C, 1,100bp), <i>Vibrio anguillarum</i> (D, 367bp) | 58 |
| Fig. 6. Change of the goblet cell (number of goblet cells per a mucosal fold) of intestine in <i>Paralichthys olivaceus</i> fed with different levels of fermented sediment administration to diet | 65 |
| Fig. 7. Photomicrographs on goblet cell and epithelial element of intestine of the olive flounder, <i>Paralichthys. olivaceus</i> . ct: connective tissue, g: goblet cell, mf: mucosal fold, HE. Scale bar = 25 μm | 68 |
| Fig. 8. Photomicrographs of liver tissue of HE stain in olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> . (A) control group, (B) 0.1% group, (C) 0.5% group, (D) 2.0% group, fg: fat globule, n: nucleus, scale bar = 25 μm | 67 |
| Fig. 9. Red blood cells number of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> fed with fermented sediment | 68 |
| Fig. 10. Changes of hemoglobin level in olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> fed with fermented sediment | 69 |
| Fig. 11. Changes of hematocrit level of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> fed with fermented sediment | 70 |
| Fig. 12. Magnesium level in the blood plasma of olive flounder fed with fermented sediment | 71 |

| | |
|--|-----|
| Fig. 13. Calcium level in the blood plasma of olive flounder fed with fermented sediment | 72 |
| Fig. 14. Total protein level in the blood plasma of olive flounder fed with fermented sediment | 73 |
| Fig. 15. Glucose level in the blood plasma of olive flounder fed with fermented sediment | 74 |
| Fig. 16. LDH level in the blood plasma of olive flounder fed with fermented sediment | 78 |
| Fig. 17. GOT level in the blood plasma of olive flounder fed with fermented sediment | 77 |
| Fig. 18. GPT level in the blood plasma of olive flounder fed with fermented sediment | 78 |
| Fig. 19. Weekly changes of water temperature and salinity of sea water in the rearing tank during the study | 79 |
| Fig. 20. Weekly changes of dissolved oxygen and pH of sea water in the rearing tank during the study | 80 |
| Fig. 21. Change of the goblet cell (number of goblet cells per a mucosal fold) of intestine in <i>Paralichthys olivaceus</i> fed with different levels of fermented sediment administration to diet | 88 |
| Fig. 22. Photomicrographs on goblet cell and epithelial element of intestine of the olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> , A: anterior intestine of control group, B: anterior intestine of treatment group, C: mid intestine of control group, D: mid intestine of treatment group, ct, connective tissue; g, goblet cell; mf, mucosal fold, H · E stain, Scale bar = 50 μm | 89 |
| Fig. 23. Hepatic glutathione concentration of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> administrated with the different diet supplement. F: fermented group, FC: concentrated fermentation, FS: fermented sediment | 101 |
| Fig. 24. Renal glutathione concentration of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> administrated with the different diet supplement. F: fermented | |

| | |
|---|-----|
| group, FC: concentrated fermentation, FS: fermented sediment | 102 |
| Fig. 25. Superoxide scavenging activity. Each value is represented as mean \pm SEM from triplicate measurements. A: 10% fermented sediment, B: 30% fermented sediment, C: Fermented sediment not added with concentrated orange | 109 |
| Fig. 26. Cell viability of RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 macrophages were either untreated (white bars) or treated (gray bars) with LPS (100 ng/ml) in the presence or absence of test samples | 110 |
| Fig. 27. Inhibitory effect of fermented extracts of on the growth of HL-60 cells. A: 10% fermented sediment, B: 30% fermented sediment, C: Fermented sediment not added with concentrated orange | 111 |
| Fig. 28. Inhibitory effect of fermented extracts of on the growth of Jurkat cells. A: 10% fermented sediment, B: 30% fermented sediment, C: Fermented sediment not added with concentrated orange | 112 |
| Fig. 29. Effect of fermented sediment on the intracellular ROS content in H ₂ O ₂ -treated HepG2 cells | 113 |

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

- 양식장 현장에서 배출되는 폐기물은 연안 환경과 직결되는 사안으로, 현재 연안에 분포 하는 양식장에 대한 배출물의 획기적인 조절 방안이 절실히 요구되고 있는 실정임
- 해양환경의 보존을 위한 혁신적 기술개발 및 적용을 위한 과학적인 방법론의 대두 되도 있음
- 우리나라 여건에 적합한 배출 폐기물의 회수 및 처리방법을 확립하여 외국으로의 기술 이전이 가능한 기술력 확보가 시급함
- 양식장 배출물에 따른 연안역의 황폐화를 극복하기 위한 유용 미생물의 이용에 따른 적정 균주의 확보가 시급히 요구되고 있어 우리나라 연안역에 적합한 시험균주의 확보와 고 효율의 실험 발효법 개발이 필요함
- 고 효율의 발효법을 이용한 어류사료 첨가제 적용성 검토 및 개발하며 양식장 주변 지역의 퇴적토에 대한 고효율 개선방안으로 연안 환경역 보존방법의 확립을 기술 개발이 필요함
- 오폐수 처리 공정에 대한 기술력을 이용한 양식장 배출고형물을 포함한 수산폐기물의 처리와 관련된 획기적인 방안 마련이 절실히 요구됨
- 단백질의 함량이 높은 양식장 배출고형물이 적절히 처리되지 않고 일부 한정된 지역에서 축적하게 되면 악취 등과 함께 인체에 암을 유발시키는 아민류 등의 오염 물질의 생성이 활발하게 일어나 위생보건의 측면에서의 문제점을 해결해야하는 당면 과제의 문제점 해결을 위한 방안이 요구됨
- 광합성세균의 이용으로 산업적 이용가치가 매우 높은 양식 개발법의 필요성 증대되고 있음
- 양식장 배출수 중에 함유된 고형물의 관리방안에는 여러 애로사항이 있음
 - 상대적으로 단백질 함량이 높은 양식장 배출고형물의 보관 및 수집이 어려움
 - 처리단계에서도 일반적으로 수행되는 활성오니법에 의해 쉽게 처리되지 않음

- 양식장(고형물 배출시설)이 해안가를 중심으로 넓게 분포하고 있고 있음
- 양식장에서 배출되는 고형물의 처리법 개발은 양식장에서 수집된 고형물의 보관 및 수거단계에서부터 시작되어야 하며, 처리법으로는 경제성에 기초를 둔 재활용 기술 개발이 절실히 요구되고 있음

2. 경제·산업적 측면

- 자원감소와 어획량의 지속적인 감소 및 수입에 의존하는 우리나라 어업 현실에 대응하는 양식업의 개발 필요성의 증대가 요구됨
- 양식산업의 지속적인 확산으로 주변 환경의 황폐화 및 오염화로 인해 주변 자연환경 및 레저 공간의 축소 및 가치 손상을 해결할 연안 환경 관리를 위한 양식장 배출수의 처리가 절실히 요구되고 있음
- 양식장 배출수의 적절한 처리에 따른 비용적인 문제를 해결하고자 노력의 일환으로 배출물질의 경제적 처리 방법에 대한 해결책이 요구됨
- 양식장 등으로부터 배출되는 고형물은 상대적으로 단백질 함량이 높아서 처리에 문제점으로 부각되어지나, 역으로 판단하면 재활용가치가 크며, 축산동물의 소화가능한 수준까지 혐기분해를 거치거나 또는 미생물 균체로서 사료첨가제로 이용 가능성에 대한 검토가 요구됨
- 양식장 배출수 처리에 이용되는 부담을 줄이기 위한 미생물 균체 개발하면 양식어민에 대한 경제성 문제에 대한 해결을 모색할 수 있음
- 고효율 발표 균주의 확보로 현재 우리나라에 정립되어 있지 않은 양식분야의 기술력을 세계적 수준으로 끌어올리기 위한 기술혁신이 필요함
- 균체 첨가 사료를 이용한 어류의 생산성 평가를 통한 어업 생산력의 증대를 모색해야 함
- 환경적 조절을 통한 양식장 주변의 환경관리로 인해 어병 감소 및 양식지 주변의 환경보전을 기대할 수 있음

3. 사회·문화적 측면

- 부존자원의 부족에 기인하는 근검절약 정신이 제주 사회·문화 발전의 한 축이 되고 있음

- 폐기물을 재활용하여 자원으로 이용하는 기술개발노력은 지역사회 발전에 크게 기여하며, 제주의 친환경 산업 발전에 대한 욕구를 고취시킴
- 오염원으로 인식되고 있는 양식장에 대한 기술적용으로 기존의 고정관념에서 인식 전환으로 수산업의 청청 이미지 증대에 기여

4. 국내·외 관련연구의 현황과 문제점

- 광합성세균을 이용한 오폐수처리는 일본에서 처음 시도되었으며 (Kobayashi, 1972), 국내에서의 광합성세균을 이용한 오폐수처리는 축산분뇨, 두부공업폐수, 도시하수 등의 분야에서 주로 이루어지고 있음 (이 등, 1998; 정 등, 1997; 오 등, 1996)
- 국내에서는 양식장 배출물의 제거를 위한 여과장치의 개발 및 순환여과식 양식법 개발에 따른 수질관리기술 확립과 관련한 연구들이 보고되고 있음 (Kim et al., 1997; Kim et al., 1997; Kim, 1999; 강 등, 1998; 강 등, 1999)
- 외국에서는 지난 20년간 양식장의 규모와 수가 증대하여 왔으며, 양식활동에 의한 연안해양 생태계의 변화가 사회적 관심사로 대두되고 있음 (Wu, 1995)
- 양식장 배출물과 관련한 주요 연구분야는 투여된 사료 중 섭이되지 않고 저층에 침전된 사료찌꺼기의 생태적 영향을 밝히는 것이며 (Nordvang & Johansson, 2002; Tucker et al., 1996), 순환여과식 양식분야에서는 질산화 (Nitrification)와 탈질 (Denitrification)을 중심으로 연구가 활발히 진행되고 있음 (Asano et al., 1992; Myoga et al., 1991)
- 국내외로 수집된 양식장 배출물의 처리 및 재활용과 관련해서는 아직 구체적인 연구보고는 없는 것으로 나타났으며, 경제적인 배출물 처리와 관련한 연구가 시급히 요구됨
- 본 과제의 다른 중요성으로서 배출물의 사료첨가제로의 이용이 있으며, 산업적 가치가 높은 것으로 생각됨
- 현재 사료에 첨가되고 있는 여러 종류의 첨가제에 대한 효과 및 생산성 검토가 이루어지고 있으나, 첨가제의 원자재는 대부분 수입에 의존하는 현실로 양식어업의 애로사항으로 나타나고 있음

5. 전 망

- 양식장 배출수에 대한 각종 규제 법안이 도입될 경우, 본 연구결과는 이에 대한 대안으로 제시할 수 있을 것으로 판단됨
- 연안 오염의 방지에 대한 지속적인 노력에도 불구하고, 연안 오염이 가중되고 있는 상황에서 양식장 원인의 오염원을 근원적으로 차단할 수 있는 매우 가치 있는 연구결과를 도출 할 수 있을 것으로 사료됨
- 양식장 배출물의 처리법과 관련한 연구개발 및 산업화 분야는 많은 연구자들에게 매력적인 분야로 인식되어질 것이며, 나아가서 친환경 양식산업 발전의 토대를 제공하리라 사료됨

6. 기술도입의 타당성

- 고단백 물질을 포함하는 폐수의 처리법은 일반적인 2차 처리법 (활성오니법, 살수여상법, 회전원판법 등)의 시행에 의해서는 만족할만한 결과를 얻을 수 없으며, 농도가 비교적 높은 오폐수의 처리에 이용되는 혐기처리법은 그 가능성이 높은 반면에 시설비, 미생물의 환경변화에 대한 민감성, 처리기간 등의 문제점을 내포하고 있음
- 양식장 배출물의 처리에는 현실적인 문제점이 존재하는데, 무엇보다도 부패하기 쉬운 배출물의 수집 및 보관, 수거체계, 신속하고 경제적인 처리, 최종처리물의 부가가치성 (처리자의 수익성) 등의 문제점을 하나도 빠짐이 없이 전부 해결해야 하는 특수성을 갖고 있음
- 국내외의 문헌 탐색결과로부터 배출물의 경제적인 처리 및 재활용과 관련된 연구보고가 없는 것으로 나타났으며, 국내에서 개발하여 일본, 중국, 미국 등의 외국으로의 기술이전까지 고려하는 것이 타당함

제 2절 연구개발의 목표 및 범위

1. 연구목표

- 젖산균, 효모 등의 유용미생물을 이용한 양식장 배출물 재활용 기술의 확립
- 배출물을 이용한 기능성 사료의 개발
- 발효물의 어류 사료 첨가에 따른 어류의 혈액 및 생화학 기능에 미치는 영향 확인
- 발효물의 어류 사료 첨가에 따른 어류의 생산성 평가 및 경제성 검토
- 친환경적인 양식업의 토대를 구축하여 제주의 청정 이미지 부각

2. 연구범위

가. 1차년도

- 광합성세균, 젖산균 등의 미생물 균주 보존 및 배양
- 넙치 양식장 2개소 선정 및 각 배출물 수집 (배출량 파악) 후 물리화학적 특성 파악
- 배출물 존재 어병균 검사
- 배출물의 전처리 (살균처리) 및 광합성세균 또는 젖산균을 이용한 배출물의 최적 발효조건확립
- 발효물의 성분분석 (기능성 성분 확인)
- *In vivo* 테스트에 의한 발효물의 기능성 및 안전성 평가
- 발효산물의 양식어 사료첨가제로서의 실험실 적용
- 발효물의 병리학적 안정성 검토
- 발효산물의 적용가능한 양식어 검토
- 어류 혈액을 이용한 생리, 면역학적, 생화학적 분석 (기능성 분석)
- 조직학적 방법을 통한 영향 평가

나. 2차년도

- 발효물을 양식어 사료첨가제로서 제조하는 경제성 평가 (생산 원가 및 경제성 평가)
- 벤처기업화 또는 기술이전
- 양식어 사료첨가제로서의 적용 및 효과 비교분석
- 투여 첨가제에 대한 적정 함량비 결정을 위한 현장 적용
- 성장 관련 인자를 통한 종합적 생산성 평가

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 연구사례의 조사

1. 외국의 경우

외국에서는 지난 20년간 양식장의 규모와 수가 증대하여 왔으며, 양식활동에 의한 연안해양 생태계의 변화가 사회적 관심사로 대두되고 있다 (Wu, 1995). 오염원 배출의 측면에서 관심의 대상이 되는 양식형태로는 해상가두리양식 (cage), 야외연못형 담수양식 (pond) 등이 있으며, 연안생태계 보전의 차원에서 순환여과식 형태의 양식활동도 점점 활발해지고 있는 추세이다 (Nordvarg & Johansson, 2002; Tucker et al., 1996).

양식장 배출물과 관련한 주요 연구분야는 투여된 사료 중 섭이되지 않고 저층에 침전된 사료찌꺼기의 생태적 영향을 밝히는 것이며 (Nordvarg & Johansson, 2002; Tucker et al., 1996), 순환여과식 양식분야에서는 질산화 (Nitrification)와 탈질 (Denitrification)을 중심으로 연구가 활발히 진행되고 있다 (Asano et al., 1992; Myoga et al., 1991).

메기류 (야외 연못형 양식어종)는 미국의 양식어류 생산량의 60 %에 달하는 주요한 양식어종이며, 1980년에는 35,000 ton의 생산량을 나타냈으나, 1989년에는 155,000 ton으로 급격한 생산량 증가추세를 나타내고 있다. 이들 어종의 최대생산지는 미시시피강 유역이며, 양식활동에 따른 배출수 중 오염물질의 처리가 중요한 사회적 관심사로 부각되고 있다 (Kouka & Engle, 1996). 이들 양식과 관련한 배출수 중의 오염물 처리에는 하나의 방법을 채택하여 수행하기 보다는 처리와 관련한 여러 대안을 설정하여 해당 양식시설에서 가장 경제적인 처리법을 개발하는 추세이고, 대안적인 처리법을 보면 배출수의 농경지로의 유입, 인공습지 조성법 (인공습지를 조성하여 이곳으로 배출수를 유입하고 다시 습지 내 물을 재사용하는 방법), 인공연못 조성법 (인공연못을 조성하여 잉어 등을 사육하고, 이곳의 물을 재사용하는 방법) 등이 있으며, 각 양식시설의 입장에서 가장 경제성이 높은 처리법을 선택하여 배출수를 처리하게 되는데, 한 사례연구로부터 인공습지조성법에 의한 배출수 처리결과 메기류 생산비용이 단지 \$0.11/Kg의

증가에 지나지 않았다는 결과가 보고된 바 있다 (Kouka & Engle, 1996).

외국의 경우에는 연안생태계의 보전을 위한 해양오염 방지 및 지역특성에 부합되는 처리법 (기후조건, 토지이용 등의 입지적 특성에 따름) 등의 분야에 많은 연구가 집중되어 있고, 북유럽 등지에서 순환여과식 양식시스템의 개발에 따른 생물화학적인 처리법 (질화 및 탈질 등)의 연구가 활발히 수행되고 있다.

2. 국내의 경우

광합성세균을 이용한 오폐수처리는 일본에서 처음 시도되었으며 (Kobayashi, 1972), 국내에서도 광합성 세균을 이용한 축산분뇨 (이 등, 1998), 두부공업폐수 (정 등, 1997)의 처리, 광합성세균 미생물막을 이용한 유기성폐수의 처리 (오 등, 1996) 등이 보고되고 있다. 그리고 광합성세균은 특정한 조건에서 수소 (H_2)를 생성하며, 대체에너지로서의 수소의 생산을 위한 연구 등도 활발히 진행되고 있다 (Moon and Matsuyama, 1997; 고 등, 1999). 폐수처리와 더불어 회수되는 광합성세균은 양질의 단백질로서 그 산업적 이용가치는 매우 높은 것으로 알려져 있다 (Kobayashi, 1972; Kobayashi and Kurata, 1978). 광합성세균을 이용한 오폐수처리는 축산분뇨, 두부공업폐수, 도시하수 등의 분야에서 주로 이루어지고 있는 실정이며, 양식장 배출물을 포함한 수산가공 부산물의 처리와 관련한 연구는 아직 활발히 수행되고 있지 않다.

현재까지 국내에서는 양식장 배출물의 제거를 위한 여과장치의 개발 및 순환여과식 양식법 개발에 따른 수질관리기술 확립과 관련한 연구들이 보고되고 있다 (Kim et al., 1997; Kim et al., 1997; Kim, 1999; 강 등, 1998; 강 등, 1999). 수집된 양식장 배출물의 처리 및 재활용과 관련한 연구는 미미한 실정이다.

3. 조사연구개발사례에 대한 평가

국내외의 연구결과 자료로부터, 연안 해양환경 보전을 위한 양식장 배출수 및 배출수 중 함유된 고형물질 (배출물)의 관리방안에는 크게 세가지 방안으로 검토되었다. 첫째, 양식산업의 지속적인 발전은 필수적이지만 연안 해양환경 보전의 틀 내에서 이루어져야 한다는 것이다. 둘째, 양식산업 활동에서 발생하는 오염물질의 해양생태계에 미치는 영향을 파악하고, 이로부터 오염물질의 해양으로의 유입을 차단해야 하는 근거를 제시해야 한다. 셋째, 양식장으로부터 배출되는 오염물질을 차단하는 기술개발은 해당

양식시설의 입지적 특성을 고려하여 경제성, 처리효율 등의 측면에서 진행되어야 하며, 또한 배출물의 해양으로의 유입이 없는 순환여과식 양식법 및 수질관리기법의 개발노력이 동시에 병행되어야 한다.

현재까지 양식장 배출물은 영양적 가치가 높은 것으로 알려져 있음에도 불구하고, 배출량이 상대적으로 적은 문제점, 수거체계 시스템, 배출물 (고단백, 염분 등)의 전문적 처리법 개발 등 해결해야 할 문제점들이 배출물의 처리 또는 재활용에 대한 연구개발 노력을 감소시키는 주된 요인들이었다.

그러나, 제주와 같이 한정된 지역에서 단조로운 해안선을 따라 육상 수조식 넓치양식이 발달한 지역에서는 배출물의 수거체계 설정이 비교적 용이하다고 판단되며, 대부분의 양식장에서는 이미 배출물의 분리·수집을 위해 여과장치 등을 설치해 놓고 있다. 따라서 분리·수집된 배출물의 경제적이고 간단한 보관법, 재활용 방안 등의 기술적인 문제가 해결되면 제주에서 양식산업에 의한 해양오염의 가능성을 완전히 배제시킬 수 있게 된다. 이와 관련하여 아직까지 구체적인 방안의 설정은 보고된 바 없으나, 이것은 지역적 특성, 양식형태 (육상, 가두리 등) 등의 차이로 인해 포괄적이며 광범위하게 양식장 배출물 처리에 적용시킬 수 있는 기술개발은 현실적으로 어렵기 때문이다. 따라서 각 지역의 특성, 양식형태에 근거하여 만족시킬 수 있는 기술의 개발이 선행되어야 하며, 이러한 기술개발 결과 또는 성과들이 전체적으로 구성되어 종합적인 배출물 처리 관리방안의 틀을 마련되어야 할 것으로 판단된다.

4. 주요 관련기술의 검토

본 연구과제의 기술개발은 크게 두가지로 구성된다. 첫째는 고단백질의 부산물을 경제적으로 처리하는 것이며, 둘째는 처리된 부산물을 사료첨가제로 이용하는 것이다. 육상 수조식 양식장에는 고품질 분리·수집장치가 설치되어 있으나, 이들 고품질을 부패하지 않은 상태로 보관하는 문제와 이들 물질의 물리화학적 특성 (예, 염분)에 기인하는 문제점 등으로 현실적인 처리가 곤란한 실정에 있다. 이러한 애로사항을 해결하려는 구체적인 시도는 아직 보고된 바 없으며, 이러한 측면에서 본 과제의 중요성을 파악할 수 있다.

일반적으로 단백질 함량이 높은 물질을 분해 및 추출과정 없이 그대로 재활용할 때는 살균 및 건조가 전체 처리공정의 중요한 부분이 되며, 이에 따른 비용의 증가뿐만

아니라 악취 등의 문제점이 발생하게 된다. 또한 양식장 배출물의 재활용인 경우에는 양식장에서 수집하여 보관하는 단계에서 산패될 가능성이 높기 때문에 재활용의 어려움이 발생한다. 이외에도 특정한 물질 (예, 아미노산)을 추출하고자 하는 경우에는 다시 처리해야 할 부산물이 형성되어 재활용의 의미가 없어지게 된다.

따라서, 배출물을 수집하는 단계에서 젖산균과 같은 유용미생물로 처리하여 보존성을 높이며, 수거된 배출물+젖산균 혼합액을 미생물로 처리하여 사료첨가제로서 활용하는 방법이 제주도 육상 수조식 양식장 배출물 처리의 가장 타당한 방법이라고 판단된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구방법

1. 미생물 배양 및 발효

가. 미생물 배양

젖산균 *Lactobacillus plantarum* (ATCC8014)을 GYP 액체배지로 30℃의 항온기 내에서 정치배양하였다. 24시간마다 *L. plantarum* 배양액의 pH를 측정하고, 균수변화를 GYP 한천배지를 이용하여 희석평판법으로 측정하였다. 준비한 각 평판은 30℃의 항온기 내에서 24~48시간 배양한 후 출현한 콜로니수를 측정하였다.

효모 *Saccaromyces cerevisiae* (IFO 0203)를 YM 액체배지로 25℃의 항온기 내에서 정치배양하였다. 24시간마다 *S. cerevisiae* 균수변화를 YM 한천배지를 이용하여 희석평판법으로 측정하였다. 준비한 각 평판은 25℃의 항온기 내에서 5~7일간 배양한 후 출현한 콜로니수를 측정하였다.

나. 발효

양식장 배출물 시료를 믹서로 분쇄하고, 분쇄시료 10 g에 증류수를 첨가하여 전체가 100 ml이 되도록 조절한 후, 30분간 교반하였다. 이 액을 시료로 하여 미생물 배양 실험에 이용하였다. 양식장 배출물 분쇄시료를 120℃, 1 기압하에서 20분간 멸균하고, 이 시료를 증류수로 10배 희석시킨 후 교반하였으며, 그 후 미생물 배양실험에 이용하였다.

상기의 방법으로 작성된 양식장 배출물 시료는 젖산균과 효모의 배양기질로서 이용하였다(Fig. 1).

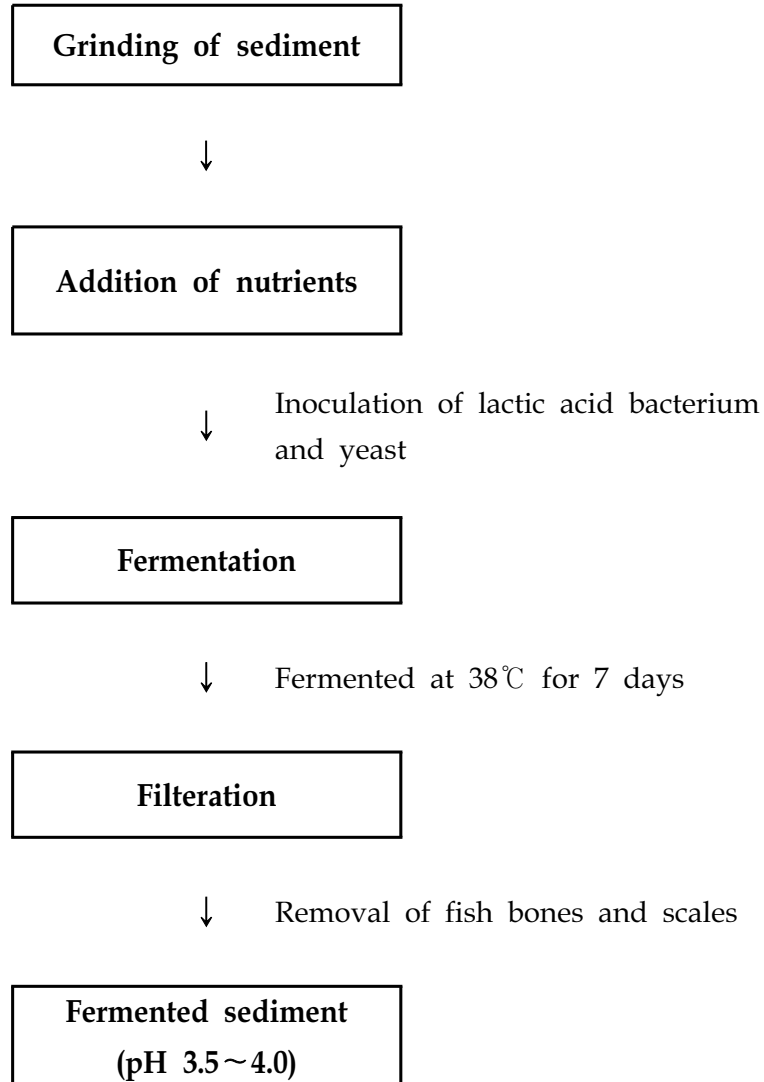


Fig. 1. Process of fermentation of sediment by lactic acid bacterium and yeast.

2. 어병균 검정

발효용 시료 및 발효된 시료내의 총 해양세균수 (marine bacteria) 및 비브리오속 세균수의 측정에는 Jannasch and Jones (1959)의 membrane filter법을 응용하여 생균수를 측정하였다. 즉 시료 1g 및 1 ml를 멸균 생리식염수를 이용하여 단계희석(serial dilution) 한 후 멸균된 pore size 0.45 μm membrane filter(GN-6 Metrice $\text{\textcircled{R}}$ Grid 47mm, Pall Corporation, USA)를 이용하여 여과한 후 membran filter를 Marine agar 2216 (Difco, USA) 및 TCBS agar (Difco, USA) 평판에 얹은 후 배양하였다.

연중 어병발병율이 높은 에드워드균, 비브리오균, 연쇄구균 등의 검출을 목적으로 양어장 배출물 시료를 희석하여 각 희석액을 SS한천배지, TCBS한천배지, BHI한천배지 등의 선택배지에 도말접종하였다. 25 $^{\circ}\text{C}$, 호기조건에서 약 24시간 배양 후 발생 콜로니를 이용하여 어병균 판정 (미생물의 형태, 배지 상에서의 콜로니의 특성, 기타 선택배지를 이용한 배양특성 등)을 실시하였다. 각각의 배지를 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 48 \pm 2시간 배양 후 Marine agar 2216 평판배지에 형성된 집락을 총 해양세균수로 측정하였고, TCBS agar 평판배지에 형성된 황색 및 녹색 집락을 비브리오속 균으로 판단하여 측정하였다. 균수는 집락 계수가 가능한 3개의 평판을 취하여 평균으로 처리하였다. 시료의 세균수 측정을 위해 총 해양세균수 측정용 여과시료는 각각 10³배, 10⁵배, 10⁷배로 희석된 시료를 선택하였으며, 비브리오속 세균수측정용 여과시료는 각각 10배, 10³배, 10⁵배로 희석된 시료를 선택하여 측정에 이용하였다. 이때 여과용 시료는 고체 및 액체의 상태에 따라 각각 g당 세균수 및 ml당 세균수로 나타내었다.

3. 발효물의 이화학적 분석

양식장 배출물, 배출물 발효물 시료의 수분, 조단백, 조지방, 조회분 등은 각각 Kjeltex Auto 1030 Analyzer, Soxtec System 1046, 회화로, 항온건조기 등을 이용하여 측정하였다. 지방산 함량은 SRI 8610C Gas Chromatograph을 이용하여 측정하였다. 중금속 성분은 원자흡광광도계를 이용하여 측정하였다.

4. 어류사육실험

어류사육실험은 1차 년도에 실시한 1 차 실험을 토대로 2차 년도에 실시한 2차 실험을 실시하였다.

가. 실험어 및 사육환경

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

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

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

나. 양어장 배출물과 감귤 농축액 혼합발효물의 제조

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

북제주군에 위치한 육상 넙치 양식장에서 배출된 배출물을 screen filter로 수거하였다. 수거된 배출물은 -20°C 에서 보관한 후, 발효에 사용하였다. 그리고 배출물의 성분 조성을 알아보기 위하여 성분을 분석하였다 (Table 1~5). 감귤 농축액은 제주도 지방개발공사에서 시판되는 원료를 구입하여 배출물과의 혼합발효에 사용하였다. 발효는 양

어장 배출물 단독발효구와 배출물과 감귤 농축액 (30, 50%)을 혼합하여 발효한 발효구, 배출물 (5%)과 감귤 농축액 (5%)을 물에 넣어 발효한 발효물(10% 발효구) 등 4가지의 형태로 발효를 하였다. 그리고 위의 발효물 중 10%와 50% 발효구의 시료를 각각 10배 농축하여 실험에 이용하였다. 실험구는 대조구를 비롯하여 배출물 단독 발효구, 30, 50% 발효구와 10% 발효구 그리고 10%와 50% 발효물을 농축한 10%와 50% 농축구 등 총 7개의 실험구로 하였다.

다. 사료 공급

안정성이 확인된 시료는 상업적으로 시판되는 고압팽창사료(extruded pellet, EP: LE GOUESSANT AQUACULTURE)에 발효물은 각각 1.0%의 농도로, 10%와 50% 농축액은 0.1%의 농도로 각각 침적하여 혼합시킨 후 공급하였다. 시료의 첨가 방법은 액상 시료를 농도에 따라 물에 희석하여 총 사료량의 10.0%로 만들어 사료에 혼합시켰고, 대조구는 물만 사용하였다. 사료의 크기는 성장함에 따라 바꾸어 주었고, 사료 공급은 1일 2회 충분히 공급하였다.

라. 성장

실험어 어체 측정은 4-3주 간격으로 전장과 체중을 전수 측정하였고, 측정 전날 및 당일엔 절식하였다. 전장은 자체 제작한 측정판으로 1 mm까지 측정하였으며, 체중은 전자저울 (Sartorius, BP 3100S)로 0.1 g까지 측정하였다. 전장은 자체 제작한 측정판으로 1 mm까지 측정하였다. 어체 측정 후에는 모든 실험구의 실험어를 HCl-Oxytetracycline 50ppm으로 1시간 약욕하였다. 어체 측정 후에는 모든 실험구의 실험어를 50 ppm HCl-Oxytetracycline으로 1시간 약욕하였다.

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

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

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

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

Feed coefficient (FC) = TF/WG

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

WG : weight gain

마. 통계처리

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

5. 어류의 혈액학적 및 면역학적 분석

가. 발효물의 양식어 사료투여 적용 및 대상어류의 생리학적 평가

발효물의 공급에 따른 혈액 및 효소학적 변화 (혈액성상, 혈청무기성분, 혈청유기성분, 혈청효소활성분석 등)를 조사하였다.

나. 혈액시료 채취성상 변동 관찰

실험기간 동안 혈액검사는 실험어 건강도를 조사하기 위하여 혈액성상과 혈청성분을 조사하였다. 혈액은 ethyl aminobenzoate (Sigma, USA)로 마취시킨 후, 1회용 주사기를 사용하여 미부혈관 (caudal vein or artery)에서 채혈하였다. 채혈한 혈액은 2개로 나누어, 한 개는 heparin-Na (25,000 IU, 중외제약)을 첨가하여 혈액성상을 측정하였고, 다른 한 개는 혈청화학성분을 측정하기 위하여 1시간 동안 실온에 방치한 후, 4℃에서 2시간동안 방치한 후에 6,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 혈액성상은 채혈 후 곧바로 실시하였고, 혈청화학 측정은 혈청을 분리한 후 냉장상태를 유지하면서 3시간 이내에 측정하였다.

다. 혈액성상 관찰

개발된 사료에 대한 양식생물의 영향을 파악하기 위하여 혈액학적 분석을 실시한다. 적혈구(RBC) 수는 hendrick's diluting solution으로 혈액을 1:200으로 희석한 후에 hemo-cytometer (Improved Neubauer, Germany)를 이용하여 광학 현미경하에서 계수

하였다. 혈색소 (Hb)농도는 시판되고 있는 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 사용하여 cyan-methemoglobin법, 상대혈구용적 (Ht) 값은 microhematocrit centrifuge (Model 01501, Hawksley and Sons Ltd., England)에서 12,000 rpm으로 5분간 원심 침적시켜 판독판으로 측정하였다.

라. 혈청 무기성분 관찰

혈청 마그네슘농도는 키시딜블루-I이 마그네슘의 존재하에서 마그네슘 콤플렉스를 생성하여 홍색을 나타내므로 이것을 파장 515nm에서 비색 정량하는 키시리딜블루법 (Xylidyl blue method)으로 실시하였다. 혈청 칼슘농도는 OCPC (o-cresolphthalein-complexon)법으로 시판되고 있는 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 사용하여 정량하였다.

마. 혈청 유기성분 관찰

총단백질량 (total protein)은 Biuret법으로 측정하였다. 혈당량 (glucose)은 GOD/POD법으로 (Werner et al., 1970)측정하였다.

바. 효소활성 변동 관찰

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

사. 병리학적 안전성 검토

병리학적 안전성은 대사생물을 대상으로 혈액 및 효소학적 반응을 조사하여, 이에 대한 결과를 바탕으로 검토하였다.

아. 조직학적 분석

양어장 배출물 발효시료 공급에 따른 간과 장의 조직학적 변화를 관찰하기 위하여 각 실험구별로 5마리씩 표본 추출하여 장을 Bouin's solution에 고정하였고, paraffin 절편법에 의해 5 μ m 두께로 절편하였다. Hansen's hematoxylin과 0.5% eosin의 비교염

색 후 광학 현미경으로 조직학적 변화를 검경하였다. 장의 조직학적 관찰은 장 (intestine) 의 전장 (anterior intestine) 과 중장 (mid intestine) 등의 점막주름에 나타나는 배상세포 (goblet cell) 의 분포 수를 검경하였다.

자. 간 및 신장의 glutathione 농도 및 포함효소 활성 조사

각각의 사료 첨가제에 따른 실험어의 체내 조직의 효소 활성을 조사하기 위하여 실험어의 간 및 신장을 분리하여 장기 무게를 측정하였다. 분리된 간 및 신장 조직은 1.15% KCl 용액 (washign buffer)에 2-3회 세척하여 hemoglobin의 오염을 방지하였다. 일정량의 장기를 분리하여 pH 7.25 인산완충용액 (0.1M KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 20% glycerol)으로 teflon-glass homogenizer (099C K4424, Glas-Col)를 이용하여 teflon pestle을 상하로 왕복하면서 균질화 하였다. 균질화된 시료는 4°C에서 12,000 rpm으로 25분간 원심분리 (Supra 21K, Hanil Science Industrial Co.)하였다. 원심분리 후 상등액을 효소학적 분석에 대한 시료로 사용하였다.

(1) Glutathione peroxidase (GPx)

GPx는 Bell 등 (1985)의 방법을 수정한 것으로 H_2O_2 를 기질로, sodium azide를 catalase 억제제로 사용한 방법을 사용하였다. 일정 시료에 1 mM GSH, 0.1 mM NADPH, 0.5 U GSH-reductase, 1 mM EDTA, 2 mM sodium azide 및 50 mM 인산완충용액 (pH 7.4)이 포함된 혼합용액을 가한 후 6분 동안 20°C에서 incubation한다 반응은 2.5 mM H_2O_2 를 넣는 동시에 시작하였다. NADPH가 산화되는 비율은 340 nm에서 3분 동안 20초 단위로 분광광도계 (Zenyn 200, Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria)로 측정하였다.

(2) Glutathione reductase (GR)

GR은 Beutler (1984)의 방법을 통하여 측정하였다. 시료 20 μl 에 1 mM EDTA가 포함된 potassium phosphate (pH 7.5), 2 mM 산화형 글루타티온 및 3 mM DTNB를 첨가한다. 반응은 당일 조제한 NADPH의 첨가로 시작하였다. NADPH가 산화형 글루타티온 (GSSG)을 환원형 글루타티온 (GSH)으로 환원시킨 후, DTNB에 의하여 발색된 용액을 분광흡광도 412 nm에서 3분 동안 측정 30초 단위로 분광광도계 (Zenyn 200,

Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria)를 이용하여 측정하였다.

(3) Glutathione level (GSH)

GSH_T (GSSG+GSH)는 Baker 등 (1990)의 방법에 의하여 측정되어졌다. 측정을 위한 시료는 GSH의 측정시 방해되는 protein을 제거하기 위하여 5% 5-sulfosalicylic acid (SSA)로 희석하여 사용하였다. 일정 시료에 혼합시액 (100 mM NaH₂PO₄, 1mM EDTA (pH 7.5), 0.15 mM DTNB, 0.2 mM NADPH 및 1U/mL GR)을 첨가하여 파장 405 nm에서 2분 넘게 측정하였다 (Zenyn 200, Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria). GSH 함량 계산은 GSSG를 사용한 검량선을 바탕으로 계산하여 단위는 uM/mg protein으로 나타내었다.

(4) protein

조직의 단백질 양은 Bradford (1976) 방법으로 측정하였다. 표준물질로는 bovine serum albumin (Sigma, USA)을 사용하였다.

6. 배출물 발효물의 기능성 탐색

가. Xanthine oxidase 억제 및 Superoxide 소거 활성

배출물에 대한 Xanthine oxidase 활성 억제 및 superoxide radical 소거활성을 조사하였다. 발효는 배출물 (5%)과 감귤 농축액 (5%)을 물에 넣어 발효한 발효물 (10% 발효구; A), 배출물과 감귤 농축액 (30%)을 혼합하여 발효한 발효물 (30% 발효구; B), 양어장 배출물 단독발효구 (C) 등 3가지의 형태로 발효를 하여 각 시료(A, B, C)를 제작하였다.

나. 양식장 배출물과 배출물 발효물의 LPS로 유발된 대식세포에서의 nitric oxide (NO) 생성에 대한 억제 효과 검색

(1) 세포 배양

마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포는 KCLB (Korean Cell Line Bank)로 부터 분양 받아 100 units/ml penicillin-streptomycin과 10% fetal bovine serum(FBS)이

함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였으며, 계대 배양은 3~4일에 한번씩 시행하였다. Lipopolysaccharide (LPS, E. coli serotype 0111:B4)는 Sigma로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

(2) 세포독성 시험

RAW264.7 세포를 1.0×10^5 cells/ml의 농도로 48 well plate의 각 well에 넣고 24시간 배양 후, 시료를 31-1000 µl/ml 농도로 첨가하였다. 이를 24시간 배양한 다음, 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma) 100 µg을 첨가하고 3시간 동안 더 배양하였다. 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma) 150 µl를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 성장억제정도를 조사하였다.

(3) NO 생성 억제력 검색

RAW264.7 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.0×10^5 cells/ml로 조절한 후 48 well plate에 접종하고, 시험물질과 LPS (1 µg/ml)를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 µl와 Griess시약 [1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid] 100 µl를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite (NaNO₂)를 standard로 비교하였다.

(4) 대식세포의 생존력에 미치는 효과

NO 생성의 억제효과를 관찰하기 전에 먼저 시료가 대식세포의 생존에 영향을 미치지 않는 농도를 결정하기 위해 31, 63, 125, 250, 500, 1000 µg/ml의 농도에서 MTT reduction법에 의해 세포 생존률을 조사하였다.

(5) 세포의 대사활성 측정

양어장 배출물 및 배출물 발효 추출물 시료에 따른 HL-60 및 Jurkat 세포의 성장에 대한 억제효과는 tetrazolium salt의 하나인 MTT를 사용하여 MTT의 환원에 의해 생성되는 formazan의 흡광도로 측정하였다.

(6) 양어장 배출물의 항산화활성(antioxidant activity)

각 실험군 (A:침전물, B:10%, C:50%)들을 다양한 농도군 (50, 100, 250, 500, 1000 ug/ml)에 따라 처리하여 양어장 폐기물의 항산화 활성을 검증하였다. 먼저 HepG2 간암세포주를 영양결핍배지 (serum-free media)에서 24시간동안 배양한 후에 각각의 폐기물을 1시간동안 전처리하고 그 다음으로 H₂O₂ (5 mM)을 처리하였다. Hydrogen peroxide 처리 후 15분 후에 세포내 활성산소물질 (reactive oxygen species, ROS)의 함량변화를 측정하였다.

7. 배출물 발효물의 비료로서의 가능성 탐색

가. 쪽과 실험

쪽과 실험은 2004년 2월부터 4월까지 3개월간 제주도 농업시험장에서 실시하였다. 실험기간 중 기온이 낮아 실험구들 가운데 일부는 냉해를 입은 경우도 발생하였다. 실험이 끝나고 난 후, 각 실험구당 30포기 (큰 것 :10 포기, 중간 것 :10 포기, 작은 것 : 10 포기)를 채집하여 측정을 하였다. 측정은 쪽과의 길이, 포기중량, 가닥 개수, 가닥 중량으로 나누어 측정하였다.

나. 브로콜리와 양배추

브로콜리와 양배추는 제주도 북제주군 한림읍 소재 친환경 농법으로 농업을 하고 있는 금산농장에서 실험을 수행하였다. 생육실험은 2004년 4월부터 5월까지 약 2개월간 실시되었다. 브로콜리는 총 8주간 재배되었고 수확 시에 일정량 (10 ~ 20)을 채집하여 높이, 길이, 무게 등을 측정하였다.

제 2 절 연구결과

1. 배출물을 기질로 한 미생물 배양 및 최적조건 탐색

양어장 배출물을 100℃, 10분간 가열처리 하여 상온으로 냉각하여 배양기질로 이용하였다. 배양은 혐기조건, 38℃에서 수행되었으며, *L. plantarum* 및 *S. cerevisiae*의 생장은 Fig. 2와 같다. *S. cerevisiae*는 배양개시 후 2일째까지 지속적으로 개체수가 증가하여 3일째부터 배양종료 시까지 개체수의 빠른 증가는 없었다. 최대개체수는 배양 6일째에 6.0×10^7 cfu/ml 였다. *L. plantarum*은 배양개시 후 급속한 성장을 나타내 2일째에 최대개체수 (1.4×10^8 cfu/ml)를 나타냈으며, 3일째부터 안정기에 접어들어 이후 배양종료 시까지 완만한 개체수의 감소가 나타났다 (Fig. 2).

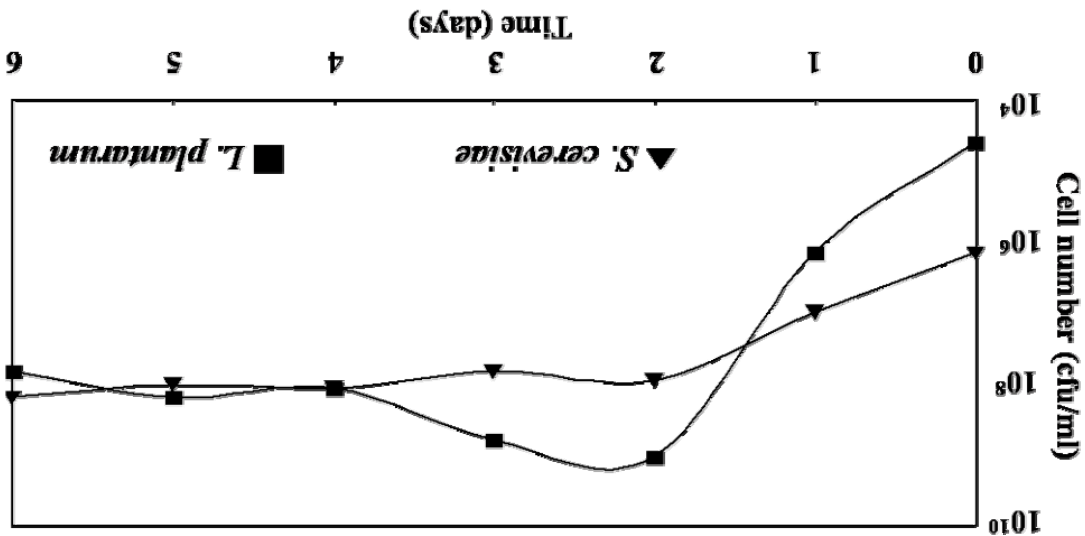


Fig. 2. Growth of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* on fermented product at 38℃.

2. 넙치 양식장 선정 및 양식장 배출물의 물리화학적 특성 파악

제주도 북제주군 북촌리 소재 넙치 양식장 한 곳을 선정하여 배출물 채집을 수행하였다. 넙치사료 투여 시 섞이지 않고 침전되어 배출수와 함께 양식수조 밖으로 유출되는 배출물은 최종적으로 경사식 스크린 장치에 의해 여과되어 망사식 용기에 포집되며, 수거된 배출물은 간단한 탈수작업 후 실험실로 이송되어 실험에 이용될 때까지 -20°C 에서 보존되었다. 생사료, 배출물, 배출물 발효물 등 3종류 시료의 일반성분 분석 결과는 생사료와 배출물 시료의 경우 수분, 조지방, 조단백, 회분 등의 항목에서 유사한 값들을 나타내었으나, 이들과 배출물 발효물의 비교에서는 발효물 시료에서 수분이 다소 높았고, 조단백 함량은 상대적으로 낮게 나타났으며 (Table 1), 수분의 증가와 조단백의 감소는 발효에 따른 미생물 분해작용에 기인하는 것으로 추찰하였다. Table 2와 3은 각 시료 중 무기물과 유해물의 종류 및 각 농도를 나타내고 있다. 무기물인 경우에는 전반적으로 비슷한 농도값을 보였으나, 배출물 발효물에서 Ca과 P의 농도가 상대적으로 낮았다 (Table 2). 유해물 분석실험에서는 Pb, Cd 등은 불검출이거나 극히 적은 농도로 검출되는 수준이었다. 본 실험에서 나타난 특이한 점으로서 Se 농도는 배출물 발효물에서 상대적으로 높았으나, Cr, Hg, As 등은 생사료, 배출물에 비교하여 배출물 발효물 시료에서 그 농도가 상대적으로 낮았다 (Table 3).

<Table 1> Proximate composition of moist pellet, sediment from effluent and fermented sediment

| | Moist pellet (%) | Sediment (%) | Fermented sediment (%) |
|---------------|------------------|--------------|------------------------|
| Moisture | 86.5±0.46 | 84.8±0.13 | 87.7±1.17 |
| Crude ash | 4.3±0.17 | 6.2±0.96 | 3.0±0.07 |
| Crude protein | 7.7±0.10 | 6.9±0.49 | 3.9±0.01 |
| Crude fat | 1.6±0.01 | 1.9±0.01 | 1.9±0.05 |

<Table 2> Inorganic Concentrations in moist pellet, sediment from effluent and fermented sediment

| | Moist pellet (%) | Sediment (%) | Fermented sediment (%) |
|----|------------------|--------------|------------------------|
| Ca | 0.633 | 0.930 | 0.328 |
| P | 0.321 | 0.341 | 0.114 |
| K | 0.105 | 0.101 | 0.162 |
| Mg | 0.105 | 0.148 | 0.094 |
| Fe | 0.004 | 0.021 | 0.005 |
| Zn | 0.001 | 0.001 | 0.001 |

<Table 3> Harmful inorganic Concentrations in moist pellet, sediment from effluent and fermented sediment

| | Moist pellet (ppm) | Sediment (ppm) | Fermented sediment (ppm) |
|----------|--------------------|----------------|--------------------------|
| Pb | ND ¹ | ND | ND |
| Cd | ND | 0.06 | ND |
| Cr | 0.70 | 8.53 | 0.63 |
| Se | ND | 0.32 | 0.36 |
| Hg (ppb) | 12.60 | 8.33 | 1.18 |
| As | 0.85 | 0.52 | 0.29 |

ND¹ : Not detected

<Table 4> Total amino acids composition of moist pellet, sediment from effluent and fermented sediment

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

각 시료의 구성 아미노산과 유리아미노산의 함량을 Table 4와 5에 나타내었다. 15종의 구성아미노산 분석결과로부터 각 시료별 아미노산 함량의 상대적인 함량의 차이점은 발견되지 않았으며, Asparagin, Glutamic acid, Glycine, Alanine, Leucine, Arginine 등의 아미노산이 전체 함량의 60%이상을 차지하였다 (Table 4). 유리아미노산인 경우에는 각 시료별 유리아미노산의 상대적인 함량의 차이점이 뚜렷하게 나타났다 (Table 5). 총 33종의 유리아미노산 분석결과로부터 생사료에서는 20종류, 배출물에서는 22종이 검출된 반면 배출물 발효물에서는 30종류의 유리아미노산이 검출되었다. 또한, 대체적으로 각 유리아미노산의 농도가 생사료나 배출물 시료에 비해 배출물 발효물 시료에서 상대적으로 높은 함량을 가졌다.

<Table 5> Free amino acids composition of moist pellet, sediment from effluent and fermented sediment

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

ND¹ : Not detected

3. 배출물의 전처리(살균처리) 및 어병균 검사

가. 어병균 검출

양식장 배출물에 존재하는 어병균 검사를 위해 3종류의 선택배지(SS 한천배지, TCBS 한천배지, BHI 한천배지)를 이용하였다. 시료는 채집 후 곧바로 실험실로 이송되어 준비한 각 선택배지에 접종하여 25℃, 호기조건에서 24시간 배양하였다. 또한, 양식장 배출물을 100℃, 20분간 살균 처리한 시료와 살균처리하지 않고 젖산균, 효모혼합액으로 발효 처리한 시료 등을 준비하여 상기의 선택배지에 접종하여 동일한 배양조건 하에서 배양하였다. 100℃에서 20분간 살균 처리한 시료에서는 24시간 배양 후 어떠한 콜로니도 발생되지 않았다. 또한, 발효시료는 배양개시 후 2일째부터 배양종료일까지 SS 한천배지, TCBS 한천배지에서 어떠한 콜로니도 발생되지 않았으나, BHI 한천배지에서는 구균과 간균이 각 1종씩 발생되었다. BHI 한천배지는 연쇄구균 검출을 목적으로 하였으나, 발효시료로부터 연쇄구균의 형태를 갖는 미생물의 발생은 없었다(Fig. 3a와 b).

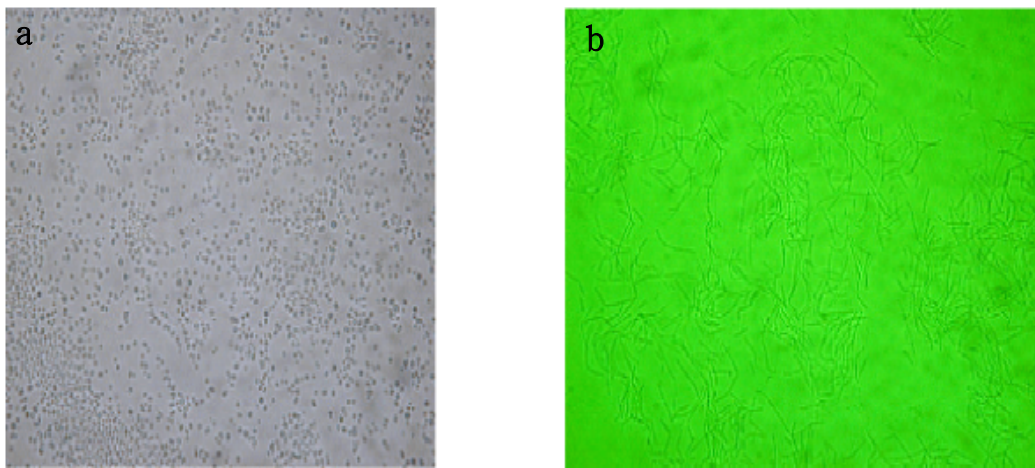


Fig. 3. Microphotograph of bacterium from the fermented sample grown on BHI agar medium ($\times 1,000$).



Fig. 4. Microphotograph of bacterium from the raw sediment sample grown on BHI agar medium ($\times 1,000$).

나. 총 세균수

발효전 시료내의 세균수 측정결과 총 해양 세균수는 4.1×10^7 CFU/g, 비브리오속 세균수는 4.6×10^3 CFU/g 으로 나타났다 (Table 6).

<Table 6> Total number of marine bacteria and *Vibrio* sp. in raw effluent sediment from land-based seawater fish farm

| | NO. of marine bacteria ($\times 10^7$ CFU/g) | NO. of <i>Vibrio</i> spp. ($\times 10^3$ CFU/g) |
|--|--|---|
| No. of bacteria of sample for fermentation | 41 | 4.6 |

각 발효처리구별 및 발효 시간대별 발효액내의 세균수 측정 결과를 Table 7에 나타내었다.

<Table 7> Counting of total number of marine bacteria and *Vibrio* spp. from fermented sediment

| | Time(day) | NO. of marine bacteria ($\times 10^3$ CFU/g or mL) | NO. of <i>Vibrio</i> spp. ($\times 10^1$ CFU/g or mL) |
|----------------------------------|-----------|--|---|
| 10% fermentation | 2 | ND ¹ | ND |
| | 4 | ND | ND |
| | 8 | ND | ND |
| | 16 | ND | ND |
| | 30 | 55 | ND |
| sediment fermentation | 2 | ND | ND |
| | 4 | ND | ND |
| | 8 | ND | ND |
| | 16 | ND | ND |
| | 30 | ND | ND |

¹⁾ Not detection

발효 처리 후 시료내의 세균수 측정 결과를 보면 대부분의 처리구에서 세균이 검출되지 않았는데 이는 본 연구에 사용한 세균수 측정방법이 일반적인 종속영양세균수를 측정하는 방법으로 이루어진 점과 발효과정 중에 증식하는 젖산균, 효모 등에 의해 일반 세균의 생존이 완전히 저해됨으로써 세균수 측정방법으로는 계수가 어려웠던 것으로 사료되며, 발효에 관여하는 미생물인 젖산균 등에 의해 대부분의 해수 유래의 세균 생장이 어렵다는 것이 나타났다. 본 실험에서는 어병균 간이진단법 (선택배지 이용) 과 현미경 하에서의 형태적 관찰 등에 의해 어병균 검사가 수행되었다. 그 결과 양식장 배출물에는 어병균의 존재가능성이 매우 높다고 판단되었다. 열처리 100℃, 20 분) 나 발효처리를 한 시료에서는 선택배지 (SS 한천배지, TCBS 한천배지)상에 어떠한 미생물 콜로니의 발생이 없었다. 이러한 열처리나 발효처리는 어병균의 사멸효과를 유도하는 대책으로서 매우 유효한 것으로 나타났다.

다. 어병균 검색

우리나라 연안에서 검출되는 대표적인 어병균인 *Edwardsiella tarda*, *Flexibacter maritimus*, *Lactococcus garvieae*, *Vibrio anguillarum* 등의 표준 미생물 DNA를 이용하여 양식장 배출물 중에서 검출된 미생물과 비교하여 상기의 어병균들이 존재하는지 검색하였으나, 일치되는 어병균은 나타나지 않았다 (Fig. 5).

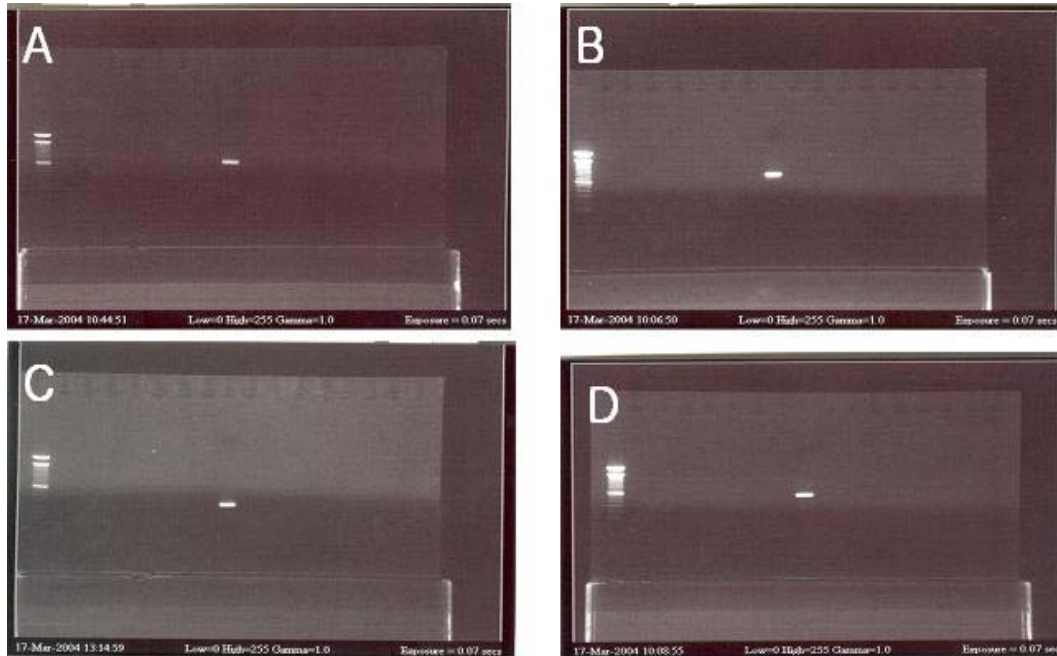


Fig. 5. Result of PCR amplification of fermentation product for *Edwardsiella tarda* (A, 461bp), *Flexibacter maritimus* (B, 715bp), *Lactococcus garvieae* (C, 1,100bp), *Vibrio anguillarum* (D, 367bp); Lane 1, Marker (100bp ladder); Lane 2, sediment; Lane 3, Fermented sediment (2-day); Lane 4, Fermented sediment (4-day); Lane 5, Fermented sediment (6-day); Lane 6, Fermented sediment (8-day); Lane 7, Fermented sediment (10-day); Lane 8, negative control; Lane 9, positive control.

4. 어류사육실험

【1차 사육 실험】

배출물 발효물을 사료에 첨가 공급시에 어류성장과 건강에 미치는 영향을 탐색하기 위한 1차 사육 실험은 2003년 4월부터 7월까지 총 12주간 수행하였다.

가. 사육환경

실험기간 중 실험구의 환경 요인중 주별 평균 수온, 염분, DO, pH의 결과는 다음과 같다.

사육 수온은 실험기간 중 15.2~24.8℃의 범위로, 최저수온은 실험 첫 주에 15.2℃ 였으며, 최고수온은 실험 9주에 24.8℃ 이었다. 염분은 34.0~36.0‰의 범위였다. 사육수의 DO는 7.2~8.7 mg/L였고, pH는 7.5~8.4 범위였다.

나. 양어장 배출물 발효시료 첨가사료의 성장효과

(1) 성장 및 생존율

실험 시작시 실험어의 전장은 7.13±0.02 cm이었다. 실험종료시 실험어의 전장은 대조구에서 14.35±0.09 cm로 성장하였고, 양어장 배출물 발효시료 0.1%, 0.5%, 1.0% 그리고 2.0% 공급구에서 각각 14.70±0.09 cm, 14.70±0.10 cm, 14.62±0.10 cm, 14.42±0.09 cm로 성장하여 대조구와 모든 양어장 배출물 발효시료 공급구간에 유의한 성장 차이는 없었다 (Table 8).

실험시작시 실험어의 체중은 4.24±0.05 g이었다. 실험종료시 실험어의 체중은 대조구에서 32.16±0.65 g으로 성장하였고, 양어장 배출물 발효시료 0.1%, 0.5% 1.0% 그리고 2.0% 공급구에서 각각 34.50±0.61 g, 33.67±0.62 g, 33.77±0.64 g, 32.61±0.61 g로 성장하여, 대조구와 모든 양어장 배출물 발효시료 공급구간에 유의한 성장 차이는 없었다.

실험구별 생존율은 대조구에서 86.67%이었고, 양어장 배출물 0.1%, 0.5% 1.0% 그리고 2.0% 공급구에서 각각 88.33%, 88.33%, 88.00%, 79.33%로 나타났다 (Table 8).

<Table 8> Total length, body weight and weight gain of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed with different levels of fermented sludge from land-based seawater fish farm

Feeding period: April 28, 2003 through May 23, 2003

| Exp. group | Number of fish | Initial | | Number of fish | Final | | | Survival rate (%) |
|------------|----------------|-----------|-----------|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------|-------------------|
| | | TL (cm) | BW (g) | | TL (cm) | BW (g) | W. gain (g) | |
| A | 300 | 7.10±0.02 | 4.28±0.04 | 297 | 8.63±0.04 ^{ab} | 7.29±0.10 ^{ab} | 886.12 | 99.0 |
| B | 300 | 7.15±0.02 | 4.26±0.04 | 299 | 8.82±0.04 ^b | 7.57±0.10 ^b | 985.85 | 99.7 |
| C | 300 | 7.12±0.02 | 4.25±0.04 | 299 | 8.72±0.04 ^a | 7.49±0.09 ^a | 965.02 | 99.7 |
| D | 300 | 7.16±0.02 | 4.26±0.04 | 300 | 8.74±0.04 ^a | 7.45±0.09 ^a | 959.60 | 100.0 |
| E | 300 | 7.13±0.02 | 4.15±0.04 | 299 | 8.75±0.04 ^a | 7.47±0.10 ^a | 989.86 | 99.7 |

Feeding period: May. 23, 2003 through June. 21, 2003

| Exp. group | Number of fish | Initial | | Number of fish | Final | | | Survival rate (%) |
|------------|----------------|-------------------------|-------------------------|----------------|--------------------------|------------|-------------|-------------------|
| | | TL (cm) | BW (g) | | TL (cm) | BW (g) | W. gain (g) | |
| A | 292 | 8.63±0.04 ^{ab} | 7.29±0.10 ^{ab} | 288 | 11.13±0.06 ^a | 14.74±0.25 | 1979.61 | 98.63 |
| B | 294 | 8.82±0.04 ^b | 7.57±0.10 ^b | 287 | 11.37±0.07 ^b | 15.35±0.24 | 2003.18 | 97.62 |
| C | 294 | 8.72±0.04 ^a | 7.49±0.09 ^a | 290 | 11.16±0.07 ^b | 14.78±0.24 | 1949.81 | 98.64 |
| D | 295 | 8.74±0.04 ^a | 7.45±0.09 ^a | 287 | 11.26±0.06 ^{ab} | 14.86±0.23 | 1886.80 | 97.29 |
| E | 294 | 8.75±0.04 ^a | 7.47±0.10 ^a | 290 | 11.25±0.07 ^{ab} | 15.08±0.25 | 2139.60 | 98.64 |

Values (mean±s.e.) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05). A : 0.1%, B : 0.5, C : 1.0%, D : 2.0%, E : Control, Sampling : 5 fish

<Table 8> continued

Feeding period: June. 22, 2003 through July. 18, 2003

| Exp. group | Initial | | | Final | | | | Survival rate (%) |
|------------|----------------|--------------------------|------------|----------------|--------------------------|--------------------------|-------------|-------------------|
| | Number of fish | TL (cm) | BW (g) | Number of fish | TL (cm) | BW (g) | W. gain (g) | |
| A | 278 | 11.13±0.06 ^a | 14.74±0.25 | 265 | 14.35±0.09 ^b | 32.16±0.65 ^b | 4276.70 | 95.32 |
| B | 277 | 11.37±0.07 ^b | 15.35±0.24 | 265 | 14.70±0.09 ^a | 34.50±0.61 ^a | 4735.90 | 95.67 |
| C | 280 | 11.16±0.07 ^b | 14.78±0.24 | 264 | 14.70±0.10 ^a | 33.67±0.62 ^{ab} | 4603.00 | 94.29 |
| D | 277 | 11.26±0.06 ^{ab} | 14.86±0.23 | 238 | 14.62±0.10 ^{ab} | 33.77±0.64 ^{ab} | 3772.30 | 85.92 |
| E | 280 | 11.25±0.07 ^{ab} | 15.08±0.25 | 260 | 14.42±0.09 ^{ab} | 32.61±0.61 ^{ab} | 4104.90 | 92.86 |

Sampling : 10 fish

Values (mean±s.e.) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05). A : 0.1%, B : 0.5, C : 1.0%, D : 2.0%, E : Control,

Sampling : 5 fish

Feeding period: May. 23, 2003 through July. 21, 2003

| Exp. group | Initial | | | Final | | | | Survival rate (%) |
|------------|----------------|-----------|-----------|----------------|--------------------------|--------------------------|-------------|-------------------|
| | Number of fish | TL (cm) | BW (g) | Number of fish | TL (cm) | BW (g) | W. gain (g) | |
| A | 300 | 7.15±0.02 | 4.26±0.04 | 265 | 14.35±0.09 ^b | 32.16±0.65 ^b | 4276.70 | 88.33 |
| B | 300 | 7.10±0.02 | 4.28±0.04 | 265 | 14.70±0.09 ^a | 34.50±0.61 ^a | 4735.90 | 88.33 |
| C | 300 | 7.12±0.02 | 4.26±0.04 | 264 | 14.70±0.10 ^a | 33.67±0.62 ^{ab} | 4603.00 | 88.00 |
| D | 300 | 7.16±0.02 | 4.25±0.04 | 238 | 14.62±0.10 ^{ab} | 33.77±0.64 ^{ab} | 3772.30 | 79.33 |
| E | 300 | 7.13±0.02 | 4.15±0.04 | 260 | 14.42±0.09 ^{ab} | 32.61±0.61 ^{ab} | 4104.90 | 86.67 |

Values (mean±s.e.) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05). A : 0.1%, B : 0.5, C : 1.0%, D : 2.0%, E : Control

(2) 사료계수, 일간성장률 및 일간섭이율

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

사료계수 (feed coefficient) 는 대조구에서 0.84였고, 양어장 배출물 발효시료 0.1%, 0.5% 1.0% 그리고 2.0% 공급구에서 각각 0.85, 0.80, 0.83, 0.88 이었다.

일간성장률 (daily growth rate) 은 대조구에서 1.91%였으며 양어장 배출물 발효시료 0.1%, 0.5% 1.0% 그리고 2.0% 공급구에서 각각 1.89%, 1.94%, 1.84%, 1.86% 이었다.

일간섭이율 (daily feeding rate) 은 대조구에서 1.59%였고, 양어장 배출물 발효시료 0.1%, 0.5% 1.0% 그리고 2.0% 공급구에서 각각 1.60%, 1.54%, 1.55%, 1.65% 이었다.

<Table 9> Feed coefficient, daily feeding rate, daily growth rate and survival rate of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed with different levels of fermented sludge from land-based seawater fish farm

Feeding period: April 28, 2003 through May 23, 2003

| Experimental group | Feed coefficient | Daily growth rate (%) | Daily feeding rate (%) |
|--------------------|------------------|-----------------------|------------------------|
| A | 0.73 | 1.98 | 1.45 |
| B | 0.60 | 2.14 | 1.29 |
| C | 0.69 | 2.11 | 1.46 |
| D | 0.67 | 2.10 | 1.40 |
| E | 0.67 | 2.19 | 1.47 |

Feeding period: May. 23, 2003 through June. 21, 2003

| Experimental group | Feed coefficient | Daily growth rate (%) | Daily feeding rate (%) |
|--------------------|------------------|-----------------------|------------------------|
| A | 0.88 | 2.38 | 2.10 |
| B | 0.89 | 2.31 | 2.06 |
| C | 0.88 | 2.30 | 2.03 |
| D | 0.91 | 2.23 | 2.04 |
| E | 0.76 | 2.49 | 1.89 |

A : 0.1%, B : 0.5, C : 1.0%, D : 2.0%, E : Control

Table 9. continued

Feeding period: June. 22, 2003 through July. 18, 2003

| Experimental group | Feed coefficient | Daily growth rate (%) | Daily feeding rate (%) |
|--------------------|------------------|-----------------------|------------------------|
| A | 0.87 | 2.58 | 2.25 |
| B | 0.82 | 2.69 | 2.20 |
| C | 0.83 | 2.69 | 2.23 |
| D | 0.96 | 2.36 | 2.26 |
| E | 0.90 | 2.46 | 2.22 |

Feeding period: April 28, 2003 through July. 18, 2003

| Experimental group | Feed coefficient | Daily growth rate (%) | Daily feeding rate (%) |
|--------------------|------------------|-----------------------|------------------------|
| A | 0.85 | 1.89 | 1.60 |
| B | 0.80 | 1.94 | 1.54 |
| C | 0.83 | 1.88 | 1.55 |
| D | 0.88 | 1.86 | 1.65 |
| E | 0.84 | 1.91 | 1.59 |

A : 0.1%, B : 0.5, C : 1.0%, D : 2.0%, E : Control

다. 장(intestine) 및 간(liver) 조직양상

소화기관의 조직학적 관찰은 장 (intestine) 의 전장 (anterior intestine) 과 중장 (mid intestine) 부분을 중심으로 각각의 소화기관의 점막주름에 배상세포 (goblet cell) 의 분포를 검경 하였다 (Fig. 6). 모든 실험어에서 전장 점막주름의 배상세포는 대조구에서 24.78 ± 1.82 개 였고, 양어장 배출물 발효시료 0.1%, 0.5%, 1.0% 그리고 2.0% 처리구에서 각각 33.19 ± 3.17 , 34.17 ± 3.52 , 24.87 ± 2.24 그리고 25.17 ± 2.02 개로 대조구보다 0.1%와 0.5% 실험구에서 배상세포가 많이 분포하였다 (Fig. 7, $P < 0.05$).

중장 점막주름의 배상세포는 양어장 배출물 발효시료 0.1%, 0.5%, 1.0% 그리고 2.0% 처리구에서 각각 42.25 ± 3.89 , 42.00 ± 3.06 , 33.17 ± 3.30 , 29.00 ± 2.55 개로 3.67 ± 3.29 개의 대조구와 실험구간에 유의차는 없었다 (Fig. 7, $P > 0.05$).

간의 조직학적 관찰은 간세포와 조직의 치밀도등 조직학적 특성을 관찰한 결과 대조구와 실험구간의 특이한 차이를 볼 수 없었다 (Fig. 8).

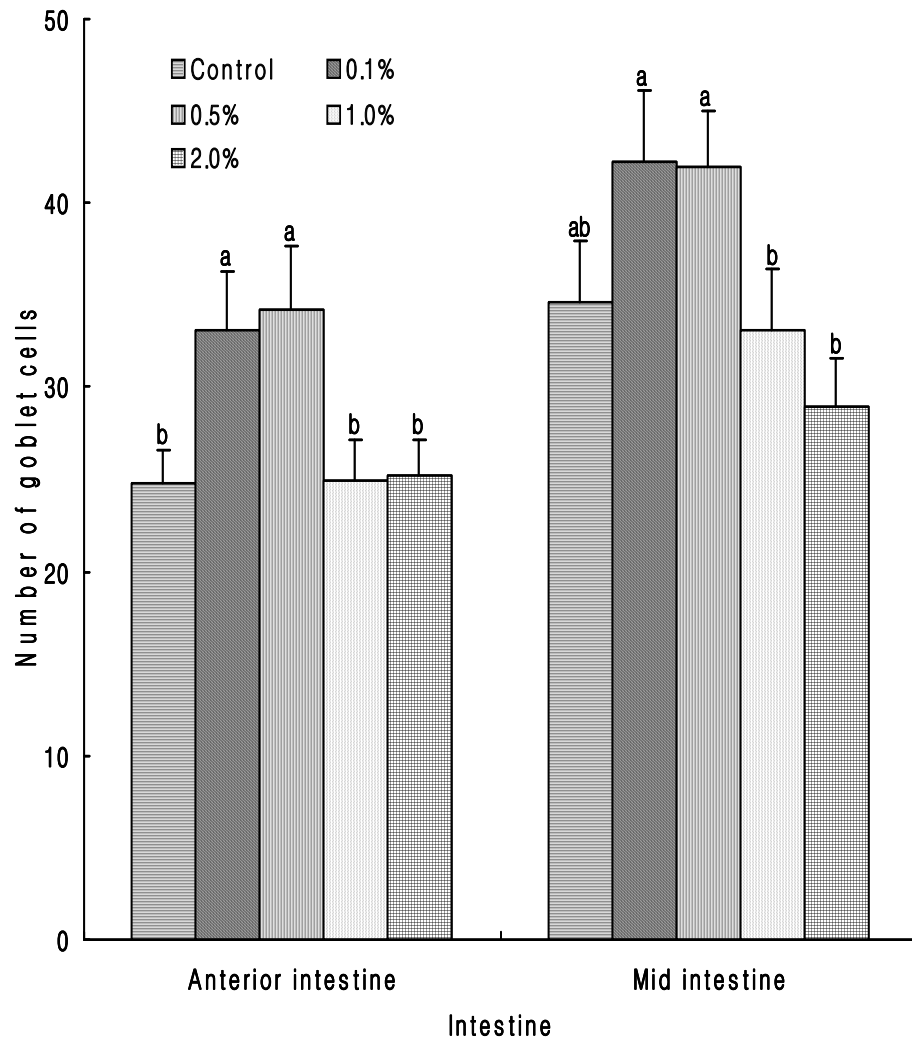
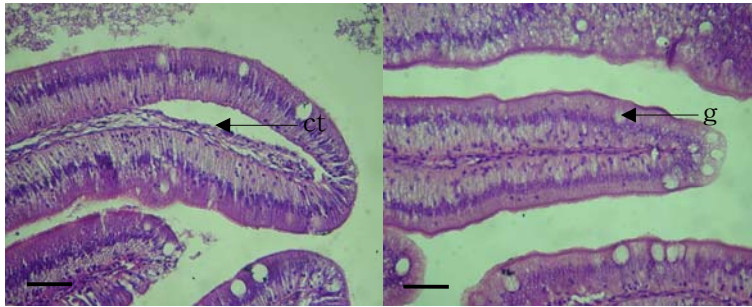


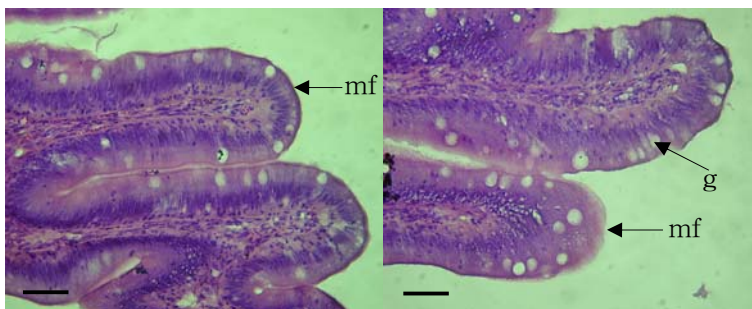
Fig. 6. Change of the goblet cell (number of goblet cells per a mucosal fold) of intestine in *Paralichthys olivaceus* fed with different levels of fermented sediment

Control

Treatment



anterior intestine



mid intestine

Fig. 7. Photomicrographs on goblet cell and epithelial element of intestine of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. ct: connetive tissue, g: goblet cell, mf: mucosal fold, HE. Scale bar = 25 μ m

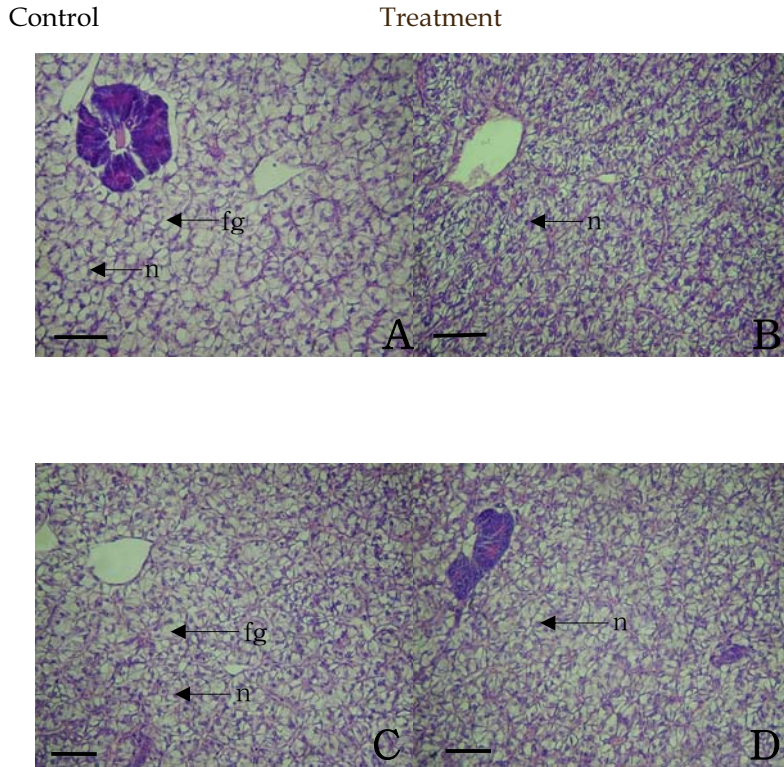


Fig. 8. Photomicrographs of liver tissue of HE stain in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. (A) control group, (B) 0.1% group, (C) 0.5% group, (D) 2.0% group fg: fat globule, n: nucleus, scale bar = 25 μ m.

라. 1차 어류사육실험에 따른 혈액학적, 효소학적 평가 및 병리학적 검토

(1) 배출물 발효물의 사료첨가 공급 적용 및 대상어류의 생리학적 평가

전장 8~10 cm 크기의 치어기 넙치를 1 ton 사육수조에서 발효물을 사료 공급량의 0.2~2.0%까지 첨가하여 사육하는데, 적정첨가농도 및 성장에 미치는 영향을 5월, 6월, 7월로 세 번의 시기에 걸쳐 조사하였다.

(2) 혈액성상 관찰

개발된 사료에 대한 양식생물의 영향을 파악하기 위하여 혈액학적 분석을 실시하였다. 적혈구(RBC) 수는 5월 대조구가 191×10^4 cells/mm³이었으며, 6월 조사에서는 대조구가 199×10^4 cells/mm³, 2% 첨가구가 160×10^4 cells/mm³으로 조사되었다. 7월조사

에서는 실험구 전체가 259~288 cells/mm³으로 전반적으로 적혈구수가 증가하는 경향을 보이는데 이는 어류의 성장과 관련이 있는 것으로 생각된다 (Fig. 9). 혈색소 (Hb) 농도는 Fig. 10에 나타내었다. 초기 넙치의 혈색소 농도는 2.02 g/dL 이었으나, 7월조사에서는 대조구가 3.4g/dL 이었으나, 2% 첨가구에서는 4.7g/dL로 조사되어 첨가구가 다소 높았다. 또한 혈색소 지수는 초기 14%이었으나, 7월 조사에서는 23.7~27.5%의 범위를 나타내어 첨가농도별로 유의한 차이는 관찰되지 않았다 (Fig. 11).

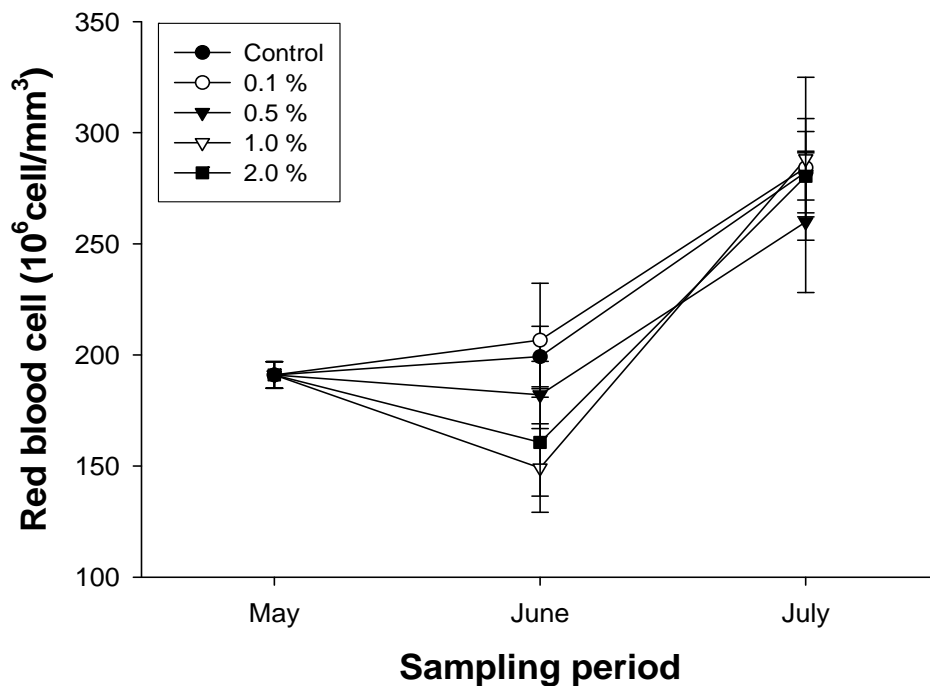


Fig. 9. Red blood cells number of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed with fermented sediment.

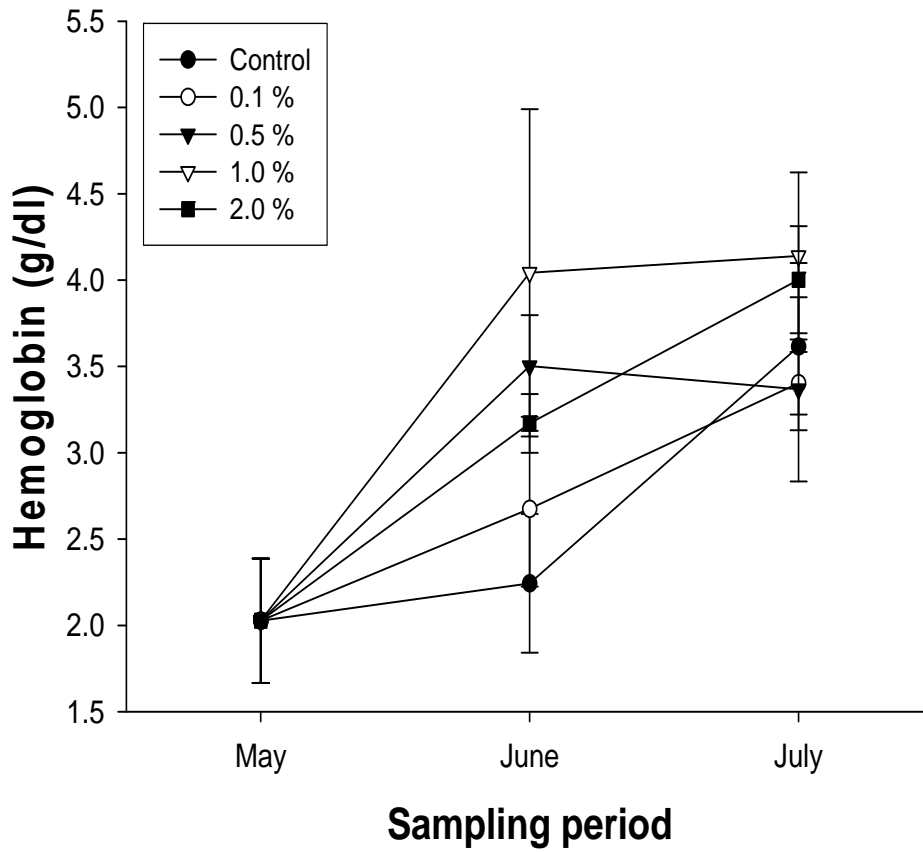


Fig. 10. Changes of hemoglobin level in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed with fermented sediment.

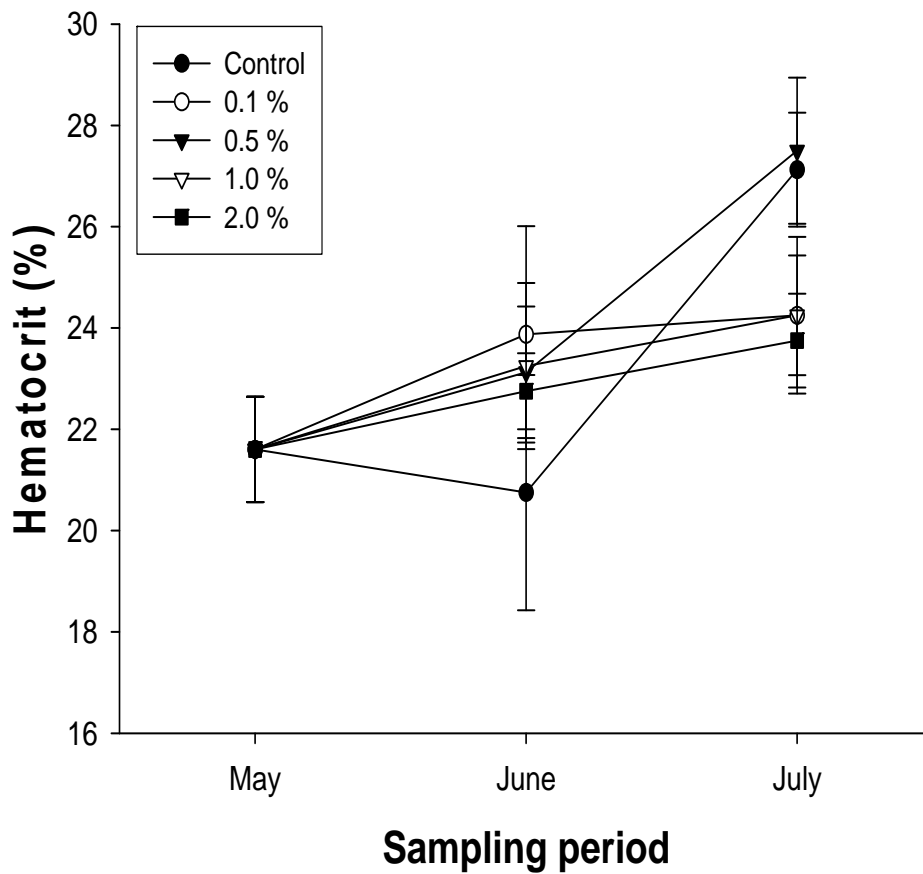


Fig. 11. Changes of hematocrit level of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed with fermented sediment.

(3) 혈청 무기성분 관찰

혈청 마그네슘농도는 Fig. 12에 나타내었다. 5월 조사에서는 2.26 mg/dL였으며, 6월 조사에서는 대조구가 2.93 mg/dL이었으며 0.1, 0.5, 1 및 2% 첨가구에서는 각각 3.51, 2.68, 3.65 및 3.15 mg/dL으로 조사되어 발효물 첨가구가 대조구에 비해 비교적 높았다. 하지만, 7월에는 6월 보다는 다소 낮게 나타나서 1 및 2% 발효물 첨가구에서 각각 2.73 및 2.71 mg/dL이었다. 혈청 칼슘 농도는 5월에는 9.24 mg/dL이었으나, 6월 조사에서는 대조구가 10.24 mg/dL이었으며 0.1, 0.5, 1 및 2% 첨가구에서는 각각 9.66, 8.56, 8.77 및 7.68 mg/dL으로 조사되어 발효물 첨가구가 대조구에 비해 낮았다. 이러한 경향은 7월 조사에서도 대조구가 11.45 mg/dL이었으나, 1 및 2% 첨가구에서는 각각 10.03 및 9.35 mg/dL으로 조사되어 발효물 첨가구가 대조구에 비해 낮은 혈청 칼슘농도를 나타내었다 (Fig. 13).

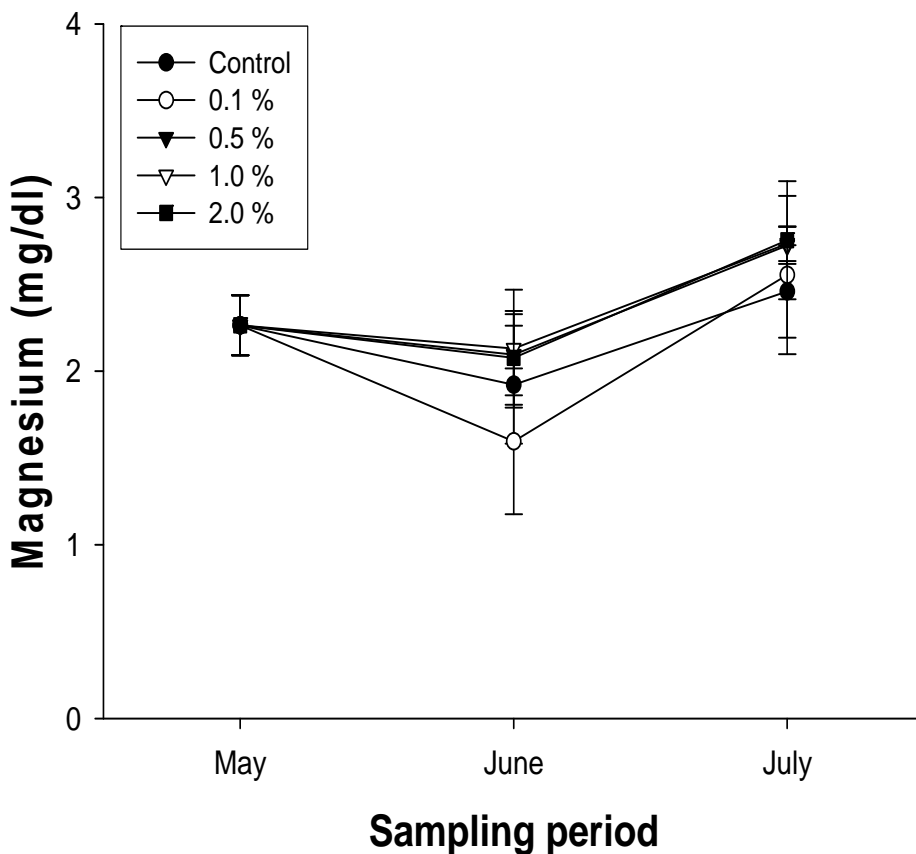


Fig. 12. Magnesium level in the blood plasma of olive flounder fed with fermented sediment.

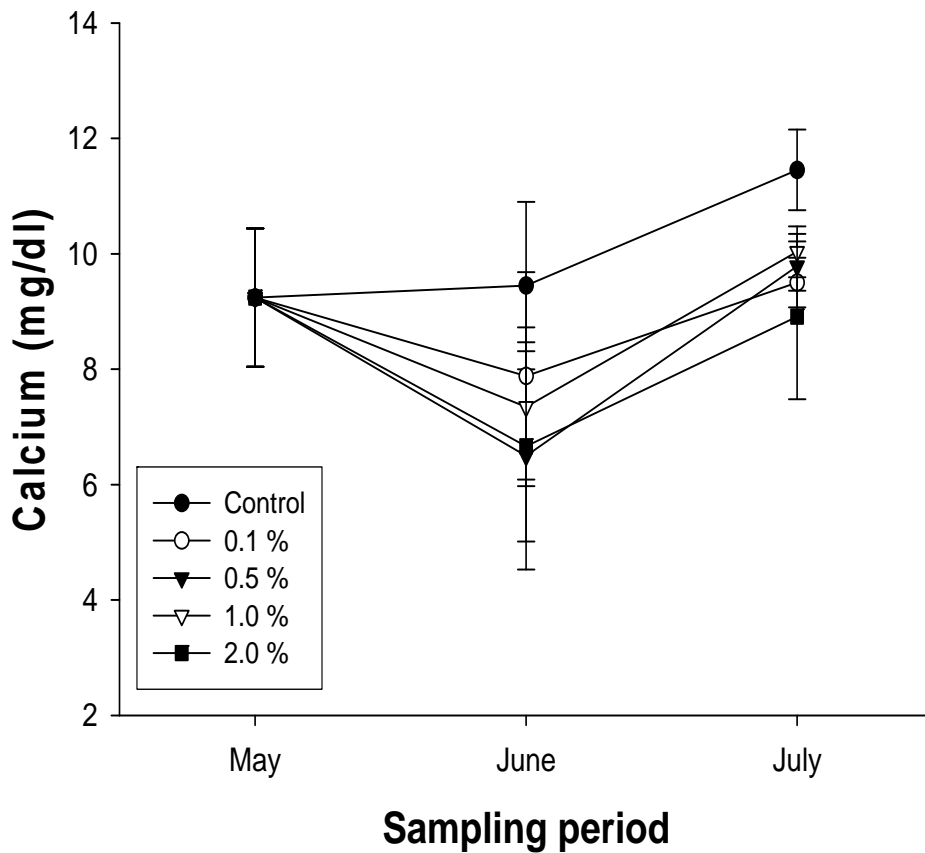


Fig. 13. Calcium level in the blood plasma of olive flounder fed with fermented sediment.

(4) 혈청 유기성분 관찰

혈청 총 단백질 농도는 5월 조사에서는 2.71 g/dL이었으나, 6월조사에서는 대조구가 2.86 g/dL이었으며 0.1, 0.5, 1 및 2% 첨가구에서는 각각 2.74, 2.57, 2.75 및 2.72 g/dL으로 조사되어 발효물 첨가구와 대조구가 유의한 차이가 나타나지 않았다. 7월 조사에서는 대조구가 3.27 g/dL이었으며, 발효물 첨가구는 2.79~3.50의 범위를 나타내어 대조구와 유의한 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 14). 혈당농도는 5월 조사에서 32.12 mg/dL이었으나, 6월조사에서는 대조구가 77.69 mg/dL이었으며 0.1, 0.5, 1 및 2% 첨가구에서는 각각 62.86, 98.75, 79.73 및 58.49 mg/dL으로 조사되어 2%발효물 첨가구

가 대조구에 비해 낮은 수치로 조사되었으나, 모든 농도구에서 유의한 차이는 없었다. 7월조사에서도 대조구가 129.51 mg/dL이었으나, 0.5 및 1% 첨가구에서는 각각 88.54 및 74.94 mg/dL으로 조사되어 발효물 첨가구가 대조구에 비해 낮은 혈당량을 보였다 (Fig. 15).

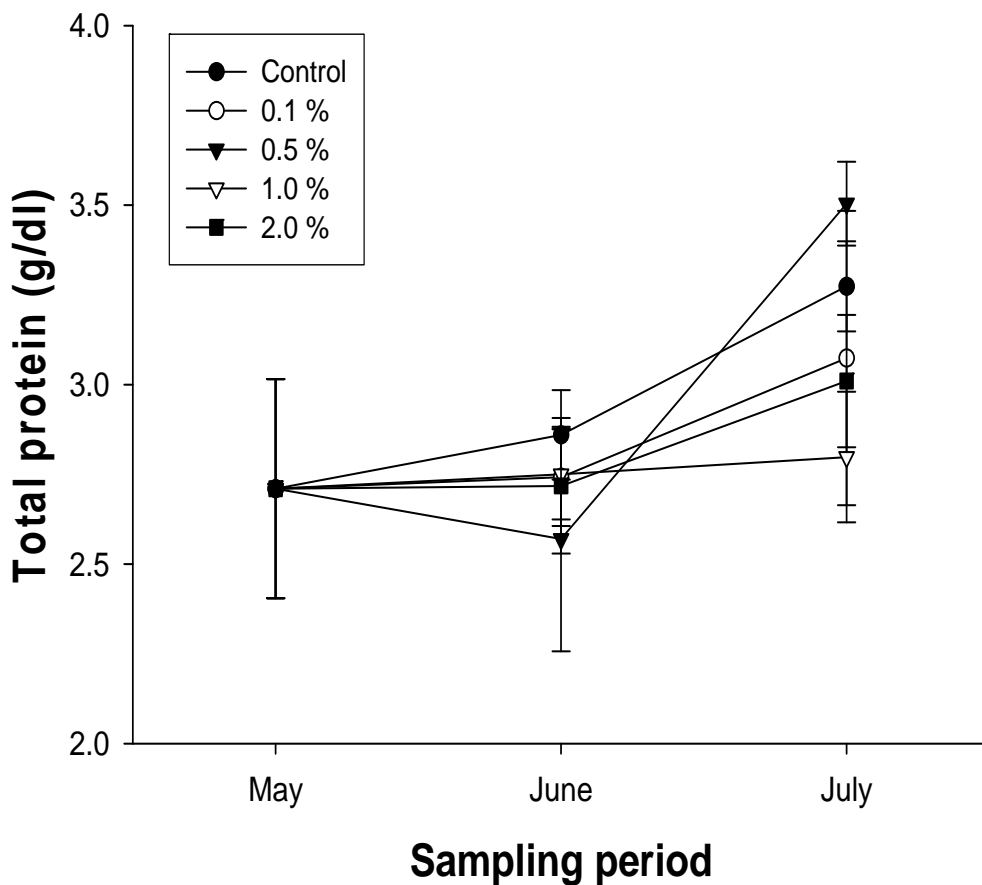


Fig. 14. Total protein level in the blood plasma of olive flounder fed with fermented sediment.

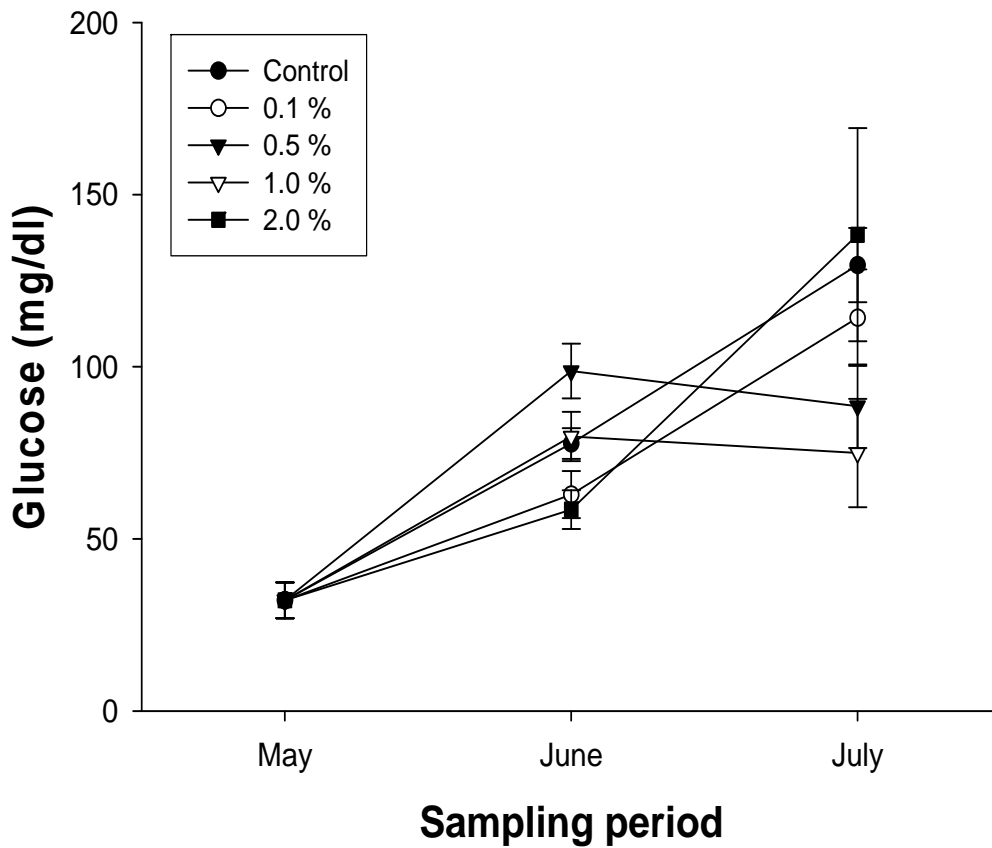


Fig. 15. Glucose level in the blood plasma of olive flounder fed with fermented sediment.

(5) 혈청 효소활성 변동 관찰

효소활성은 GOT (Glutamic oxalate transaminase), GPT (Glutamic pyruvate transaminase), LDH (Lactate dehydrogenase)에 대하여 측정하였다. 혈청 LDH 활성은 5월 조사에서는 508.9 W.U./dL이었으나, 6월조사에서는 대조구가 727.0 W.U./dL으로 조사되어 5월보다 다소 높게 조사되었다. 이러한 경향은 발효물 첨가구에서도 비교적 높게 조사되었는데, 0.1, 0.5, 1 및 2% 첨가구에서는 각각 622.0, 632.1, 482.7 및 674.9 W.U./dL으로 조사되어 발효물 첨가구와 대조구가 유의한 차이가 나타나지 않았다. 7월조사에서는 대조구가 439.2 W.U./dL이었으며, 발효물 첨가구는 1 및 2% 첨가구에서

는 각각 430.0 및 478.6 W.U./dL으로 조사되어 발효물 첨가구와 대조구가 유사한 활성을 나타내었다 (Fig. 16). 혈청 GOT 활성은 5월 조사에서는 95.15 Karmen Unit 이었으나, 6월조사에서는 대조구가 81.51 Karmen Unit 이었으며 0.1, 0.5, 1 및 2% 첨가구에서는 각각 81.72, 80.93, 86.77 및 82.90 Karmen Unit 으로 조사되어 발효물 첨가구와 대조구가 유의한 차이가 나타나지 않았다. 7월조사에서는 대조구가 78.72 Karmen Unit 이었으며, 발효물 첨가구는 72.75~88.05 Karmen Unit 의 범위를 나타내어 대조구와 유의한 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 17). 혈청 GPT활성은 5월 대조구에서는 53.37 Karmen Unit 이었으나, 6월조사에서는 전 실험구에서 46.10~59.80 Karmen Unit의 범위를 나타내어 유사한 활성을 나타내었다. 7월조사에서도 혈청 GPT 활성이 대조구에서는 65.34 Karmen Unit 이었으며, 발효물 첨가구에서는 64.34~76.91 Karmen Unit 으로 조사되어 유사한 범위의 활성을 나타내었다. 따라서 발효물 첨가가 낚치의 효소 활성에 영향을 주지 않는 것으로 조사되었다 (Fig. 18).

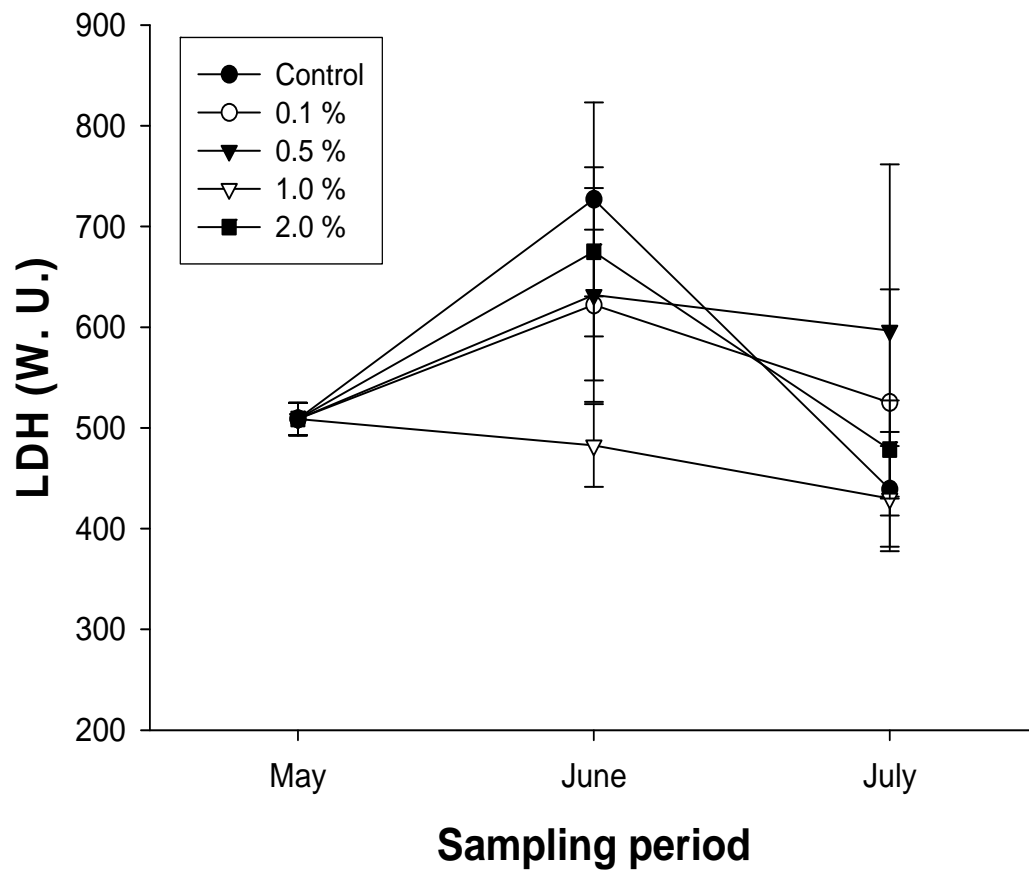


Fig. 16. LDH level in the blood plasma of olive flounder fed with fermented sediment.

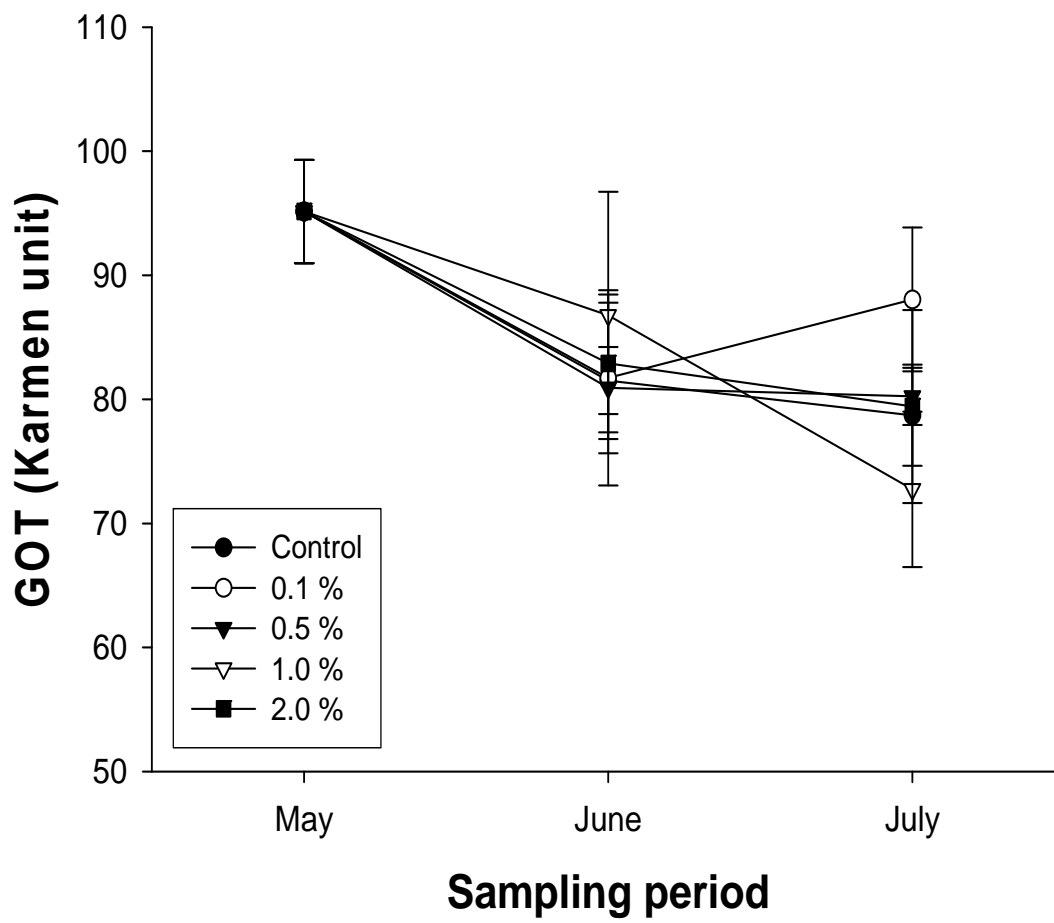


Fig. 17. GOT level in the blood plasma of olive flounder fed with fermented sediment.

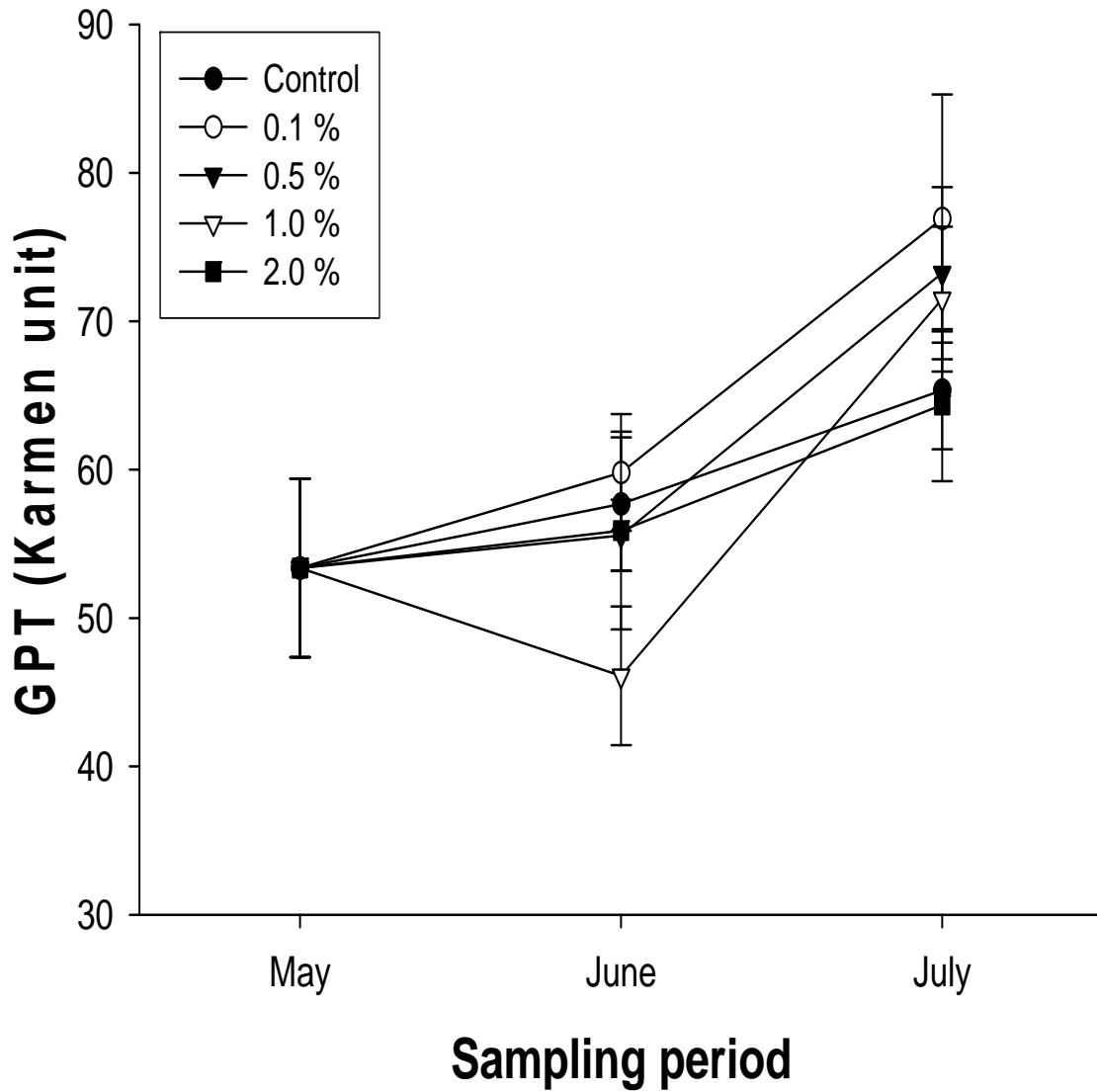


Fig. 18. GPT level in the blood plasma of olive flounder fed with fermented sediment

【2차 사육 실험】

1차 사육실험결과를 토대로 배출물 발효물을 사료에 첨가공급시에 어류성장과 건강에 미치는 영향을 탐색하기 위한 2차 사육실험은 2004년 5월부터 8월까지 총 9주간 수행하였다.

가. 사육환경

실험기간 중 실험구의 환경 요인중 주별 평균 수온, 염분, DO, pH의 변화를 조사하였다. 사육 수온은 실험기간 중 16.1 ~ 29.7℃의 범위였다. 최저수온은 실험 둘째 주에 16.1℃ 였으며, 최고수온은 실험 11주에 29.7℃ 이었다. 염분은 31.0 ~ 35.0‰의 범위였다. 사육수의 DO는 5.19 ~ 8.72 mg/L의 범위였으며, pH는 8.22 ~ 9.4 범위였다 (Fig. 19, 20)

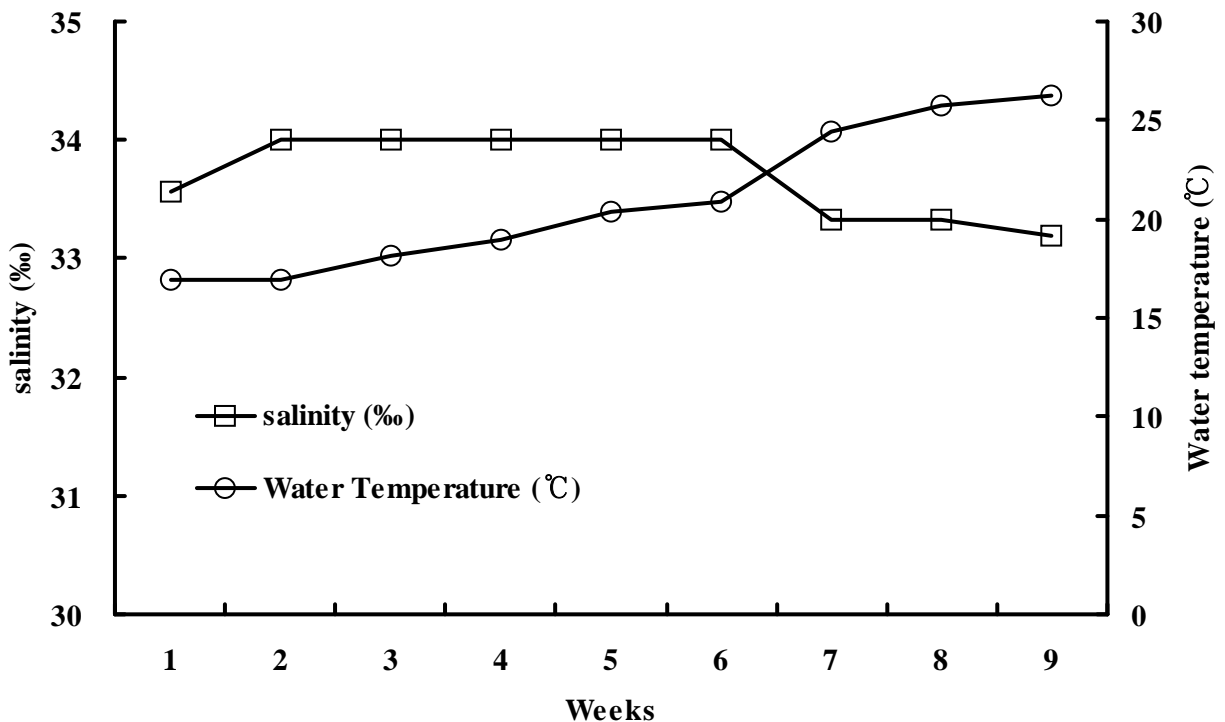


Fig. 19. Weekly changes of water temperature and salinity of sea water in the rearing tank during the study.

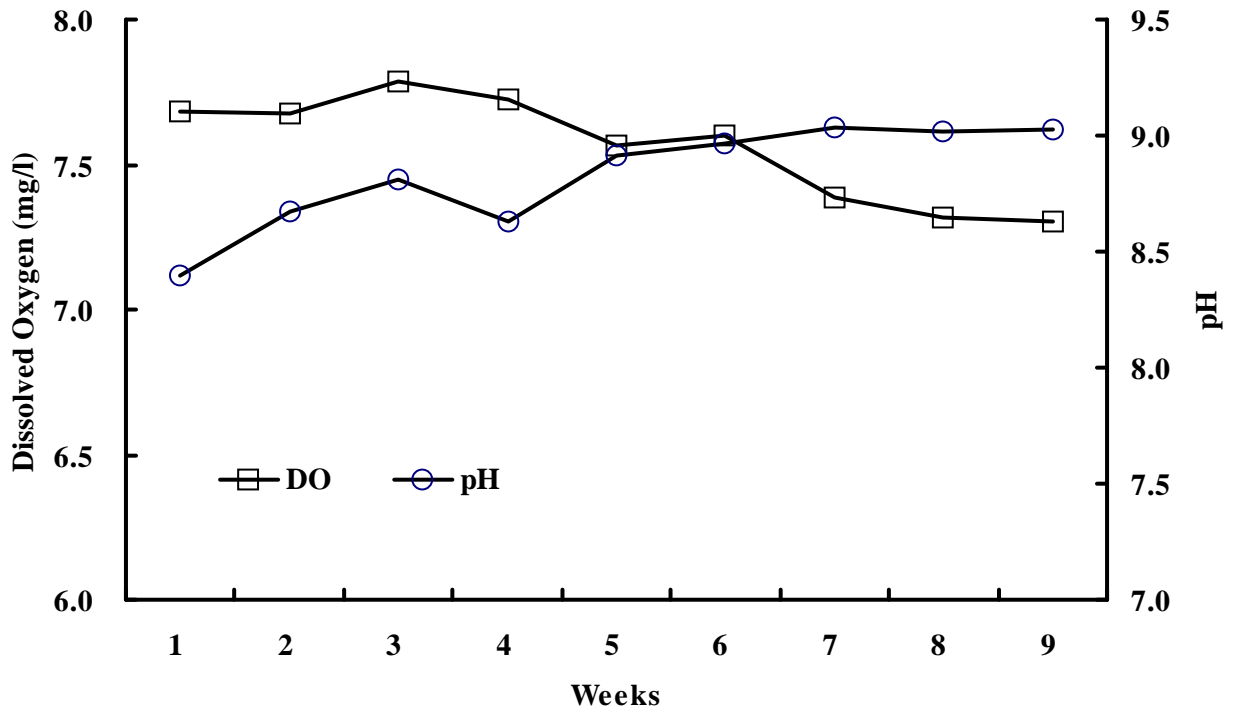


Fig. 20. Weekly changes of dissolved oxygen and pH of sea water in the rearing tank during the study.

나. 양어장 배출물 발효시료 첨가사료의 성장효과

(1) 성장 및 생존율

실험 시작 시 실험어의 평균전장은 12.3 cm 내외였으며, 실험종료시 실험어의 전장은 대조구에서 20.46 ± 0.14 cm로 성장하였고, 감귤 농축액과 양어장 배출물 10, 30, 50% 혼합 발효 실험구와 10, 50% 농축액 실험구, 양어장 배출물 발효 실험구에서 각각 20.84 ± 0.15 , 21.03 ± 0.13 , 20.47 ± 0.14 , 21.03 ± 0.12 , 20.64 ± 0.13 , 20.79 ± 0.16 cm로 성장하여 30% 발효구와 10% 농축 실험구에서 대조구보다 유의한 성장을 하였다 (Table 10, $p < 0.05$). 실험시작시 실험어의 체중은 19.7 g이었다. 실험종료시 실험어의 체중은 대조구에서 89.89 ± 1.62 g으로 성장하였고, 감귤 농축액과 양어장 배출물 10, 30, 50% 혼합

발효 실험구와 10, 50% 농축액 실험구, 양어장 배출물 발효 실험구에서 각각 94.39±1.89, 94.55±1.72, 90.62±1.16, 96.31±1.46, 92.91±1.67, 94.68±1.74 g로 성장하여, 10% 농축 실험구에서 높은 성장을 하였다 (Table 10, p<0.05). 실험구별 생존율은 대조구에서 98.9%이었고, 10%, 30%, 50% 혼합 발효실험구 그리고 10%, 50% 농축액 실험구 그리고 배출물 발효 실험구에서 각각 97.8%, 96.8%, 97.8%, 97.8%, 96.8%, 97.9% 였다 (Table 10).

<Table 10> Total protein, albumin, glucose, triglyceride and total cholesterol concentration in serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed with different levels of fermented product

Feeding period: May 29, 2004 through June 19, 2004

| Exp. group | Initial | | | Final | | | | Survival rate (%) |
|------------|----------------|------------|------------|----------------|------------|------------|-------------|-------------------|
| | Number of fish | TL (cm) | BW (g) | Number of fish | TL (cm) | BW (g) | W. gain (g) | |
| A | 100 | 12.32±0.06 | 19.50±0.34 | 100 | 14.86±0.08 | 31.77±0.57 | 1226.60 | 100.0 |
| B | 100 | 12.36±0.07 | 19.46±0.34 | 100 | 14.87±0.09 | 31.88±0.60 | 1242.10 | 100.0 |
| C | 100 | 12.46±0.07 | 20.32±0.36 | 100 | 15.05±0.09 | 33.06±0.59 | 1273.20 | 100.0 |
| D | 100 | 12.22±0.07 | 19.49±0.36 | 99 | 14.80±0.10 | 31.41±0.65 | 1160.90 | 99.0 |
| E | 100 | 12.33±0.06 | 19.84±0.35 | 99 | 15.14±0.10 | 33.32±0.65 | 1315.00 | 99.0 |
| F | 100 | 12.42±0.07 | 19.87±0.32 | 99 | 14.97±0.09 | 32.25±0.57 | 1205.00 | 99.0 |
| G | 100 | 12.39±0.07 | 20.03±0.35 | 100 | 14.91±0.09 | 32.23±0.65 | 1220.00 | 100.0 |

Values (mean±s.e.) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05). A : Control, B : 10% Fermentation, C : 30% Fermentation, D : 50% Fermentation, E : 10% Concentration, F : 50% Concentration, G : fermented sediment

<Table 10> continued

Feeding period: June 19, 2004 through July. 11, 2004

| Exp. group | Initial | | | Final | | | | Survival rate (%) |
|------------|----------------|------------|------------|----------------|---------------------------|--------------------------|-------------|-------------------|
| | Number of fish | TL (cm) | BW (g) | Number of fish | TL (cm) | BW (g) | W. gain (g) | |
| A | 100 | 14.86±0.08 | 31.77±0.57 | 100 | 16.41±0.11 ^c | 45.96±0.86 ^b | 1419.40 | 100.0 |
| B | 100 | 14.87±0.09 | 31.88±0.60 | 98 | 16.66±0.12 ^{abc} | 48.40±1.02 ^{ab} | 1555.80 | 98.0 |
| C | 100 | 15.05±0.09 | 33.06±0.59 | 100 | 16.85±0.11 ^{ab} | 49.35±0.92 ^a | 1629.10 | 100.0 |
| D | 99 | 14.80±0.10 | 31.41±0.65 | 99 | 16.49±0.12 ^c | 46.76±1.01 ^{ab} | 1519.80 | 100.0 |
| E | 99 | 15.14±0.10 | 33.32±0.65 | 99 | 16.92±0.11 ^a | 49.71±0.98 ^a | 1621.90 | 100.0 |
| F | 99 | 14.97±0.09 | 32.25±0.57 | 99 | 16.75±0.11 ^{abc} | 47.91±0.93 ^{ab} | 1551.00 | 100.0 |
| G | 100 | 14.91±0.09 | 32.23±0.65 | 100 | 16.52±0.13 ^{bc} | 47.77±1.06 ^{ab} | 1554.40 | 100.0 |

sampling : 6 fish

Values (mean±s.e.) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05). A : Control, B : 10% Fermentation, C : 30% Fermentation, D : 50% Fermentation, E : 10% Concentration, F : 50% Concentration, G : fermented sediment

<Table 10> continued

Feeding period: July. 12, 2004 through August. 03, 2004

| Exp. group | Initial | | | Final | | | | Survival rate (%) |
|------------|----------------|---------------------------|--------------------------|----------------|--------------------------|---------------------------|-------------|-------------------|
| | Number of fish | TL (cm) | BW (g) | Number of fish | TL (cm) | BW (g) | W. gain (g) | |
| A | 94 | 16.41±0.11 ^c | 45.96±0.86 ^b | 93 | 18.60±0.13 ^b | 61.88±1.17 ^c | 1158.00 | 98.9 |
| B | 92 | 16.66±0.12 ^{abc} | 48.40±1.02 ^{ab} | 90 | 18.85±0.15 ^{ab} | 65.20±1.55 ^{abc} | 1124.60 | 97.8 |
| C | 94 | 16.85±0.11 ^{ab} | 49.35±0.92 ^a | 91 | 19.00±0.13 ^{ab} | 67.19±1.32 ^{ab} | 1179.60 | 96.8 |
| D | 93 | 16.49±0.12 ^c | 46.76±1.01 ^{ab} | 91 | 18.65±0.14 ^b | 63.82±1.37 ^{bc} | 1177.80 | 97.8 |
| E | 93 | 16.92±0.11 ^a | 49.71±0.98 ^a | 91 | 19.11±0.13 ^a | 68.44±1.30 ^a | 1307.30 | 97.8 |
| F | 93 | 16.75±0.11 ^{abc} | 47.91±0.93 ^{ab} | 90 | 18.78±0.12 ^{ab} | 65.23±1.21 ^{abc} | 1127.30 | 96.8 |
| G | 94 | 16.52±0.13 ^{bc} | 47.77±1.06 ^{ab} | 92 | 18.85±0.14 ^{ab} | 65.62±1.39 ^{abc} | 1259.70 | 97.9 |

Sampling : 5 fish

Values (mean±s.e.) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05). A : Control, B : 10% Fermentation, C : 30% Fermentation, D : 50% Fermentation, E : 10% Concentration, F : 50% Concentration, G : fermented sediment

<Table 10> continued

Feeding period: May. 29, 2004 through August. 03, 2004

| Exp. group | Initial | | | Final | | | | Survival rate (%) |
|------------|----------------|------------|------------|----------------|--------------------------|---------------------------|-------------|-------------------|
| | Number of fish | TL (cm) | BW (g) | Number of fish | TL (cm) | BW (g) | W. gain (g) | |
| A | 94 | 12.32±0.06 | 19.50±0.34 | 93 | 18.60±0.13 ^b | 61.88±1.17 ^c | 1158.00 | 98.9 |
| B | 92 | 12.36±0.07 | 19.46±0.34 | 90 | 18.85±0.15 ^{ab} | 65.20±1.55 ^{abc} | 1124.60 | 97.8 |
| C | 94 | 12.46±0.07 | 20.32±0.36 | 91 | 19.00±0.13 ^{ab} | 67.19±1.32 ^{ab} | 1179.60 | 96.8 |
| D | 93 | 12.22±0.07 | 19.49±0.36 | 91 | 18.65±0.14 ^b | 63.82±1.37 ^{bc} | 1177.80 | 97.8 |
| E | 93 | 12.33±0.06 | 19.84±0.35 | 91 | 19.11±0.13 ^a | 68.44±1.30 ^a | 1307.30 | 97.8 |
| F | 93 | 12.42±0.07 | 19.87±0.32 | 90 | 18.78±0.12 ^{ab} | 65.23±1.21 ^{abc} | 1127.30 | 96.8 |
| G | 94 | 12.39±0.07 | 20.03±0.35 | 92 | 18.85±0.14 ^{ab} | 65.62±1.39 ^{abc} | 1259.70 | 97.9 |

sampling : 11 fish

Values (mean±s.e.) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05). A : Control, B : 10% Fermentation, C : 30% Fermentation, D : 50% Fermentation, E : 10% Concentration, F : 50% Concentration, G : fermented sediment

(2) 사료계수, 일간성장률 및 일간섭이율

실험기간동안의 사료계수 (feed coefficient), 일간성장률 (daily growth rate) 및 일간섭이율 (daily feeding rate)을 조사하였다. 사료계수 (feed coefficient) 는 대조구에서 1.08이었고, 감귤농축액과 양어장 배출물 혼합 발효시료 10%, 30%, 50% 그리고 농축 실험구 10%, 50%, 마지막으로 배출물 단독 발효 실험구는 각각 1.08, 1.05, 1.07, 1.00, 1.09, 1.03 이었다. 일간성장률 (daily growth rate) 은 대조구에서 1.70%였으며 감귤농축액과 양어장 배출물 10%, 30%, 50% 혼합 발효 실험구 그리고 10%, 50% 농축액 실험구와 배출물 발효 실험구는 각각 1.73%, 1.73%, 1.72%, 1.78%, 1.70%, 1.73% 였다.

일간섭이율 (daily feeding rate) 은 대조구에서 1.84%였고, 감귤농축액과 양어장 배출물 10%, 30%, 50% 혼합 발효실험구 그리고 10%와 50% 농축 실험구에서는 각각 1.87%, 1.81%, 1.84%, 1.78%, 1.85% 그리고 1.78% 이었다 (Table 11).

<Table 11> Feed coefficient, daily feeding rate, daily growth rate and survival rate of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed with different levels of fermented product

Feeding period: May 29, 2004 through June 19, 2004

| Experimental group | Feed coefficient | Daily growth rate (%) | Daily feeding rate (%) |
|--------------------|------------------|-----------------------|------------------------|
| A | 0.81 | 2.39 | 1.94 |
| B | 0.82 | 2.42 | 1.98 |
| C | 0.82 | 2.39 | 1.96 |
| D | 0.87 | 2.30 | 1.99 |
| E | 0.80 | 2.49 | 1.98 |
| F | 0.86 | 2.33 | 2.00 |
| G | 0.81 | 2.33 | 1.89 |

A : Control, B : 10% Fermentation, C : 30% Fermentation, D : 50% Fermentation, E : 10% Concentration, F : 50%Concentration, G : fermented sediment

<Table 11> continued

Feeding period: June. 20, 2004 through July. 12, 2004

| Experimental group | Feed coefficient | Daily growth rate (%) | Daily feeding rate (%) |
|--------------------|------------------|-----------------------|------------------------|
| A | 1.02 | 1.92 | 1.96 |
| B | 0.98 | 2.06 | 2.01 |
| C | 0.95 | 2.08 | 1.97 |
| D | 0.99 | 2.07 | 2.05 |
| E | 0.94 | 2.08 | 1.95 |
| F | 0.97 | 2.06 | 2.00 |
| G | 0.96 | 2.05 | 1.96 |

<Table 11> continued

Feeding period: July. 13, 2004 through August. 03, 2004

| Experimental group | Feed coefficient | Daily growth rate (%) | Daily feeding rate (%) |
|--------------------|------------------|-----------------------|------------------------|
| A | 1.44 | 1.18 | 1.70 |
| B | 1.51 | 1.12 | 1.69 |
| C | 1.43 | 1.12 | 1.60 |
| D | 1.38 | 1.19 | 1.63 |
| E | 1.28 | 1.23 | 1.58 |
| F | 1.49 | 1.12 | 1.67 |
| G | 1.33 | 1.23 | 1.63 |

A : Control, B : 10% Fermentation, C : 30% Fermentation, D : 50% Fermentation, E : 10% Concentration, F : 50% Concentration, G : fermented sediment

<Table 11> continued

Feeding period: May 29, 2004 through August. 23, 2004

| Experimental group | Feed coefficient | Daily growth rate (%) | Daily feeding rate (%) |
|--------------------|------------------|-----------------------|------------------------|
| A | 1.08 | 1.70 | 1.84 |
| B | 1.08 | 1.73 | 1.87 |
| C | 1.05 | 1.73 | 1.81 |
| D | 1.07 | 1.72 | 1.84 |
| E | 1.00 | 1.78 | 1.78 |
| F | 1.09 | 1.70 | 1.85 |
| G | 1.03 | 1.73 | 1.78 |

A : Control, B : 10% Fermentation, C : 30% Fermentation, D : 50% Fermentation, E : 10% Concentration, F : 50% Concentration, G : fermented sediment

다. 장(intestine)의 조직 양상

소화기관의 조직학적 관찰은 장 (intestine) 의 전장 (anterior intestine) 과 중장 (mid intestine) 부분을 중심으로 각각의 소화기관의 점막주름에 배상세포 (goblet cell) 의 분포를 검경 하였다 (Fig. 21, 22). 모든 실험어에서 전장 점막주름의 배상세포는 대조구에서 37.12 ± 3.16 개였고, 10%, 30%, 50% 혼합 발효액, 10%, 50% 농축액 그리고 배출물 발효액 실험구에서 각각 37.32 ± 2.78 , 33.92 ± 2.40 , 35.44 ± 3.51 , 33.32 ± 2.80 , 34.02 ± 2.42 , 28.16 ± 2.63 개로 대조구와 유사하였다 (Fig. 21, 22, $P < 0.05$).

중장 점막주름의 배상세포는 대조구에서 44.50 ± 2.94 개였고, 10%, 30%, 50% 혼합 발효액, 10%, 50% 농축액 그리고 배출물 발효액 실험구에서 각각 43.88 ± 2.91 , 54.25 ± 2.98 , 45.38 ± 2.77 , 46.88 ± 2.13 , 48.22 ± 2.45 , 로 대조구와 실험구간의 유의차는 없었다 (Fig. 21, 22, $P > 0.05$).

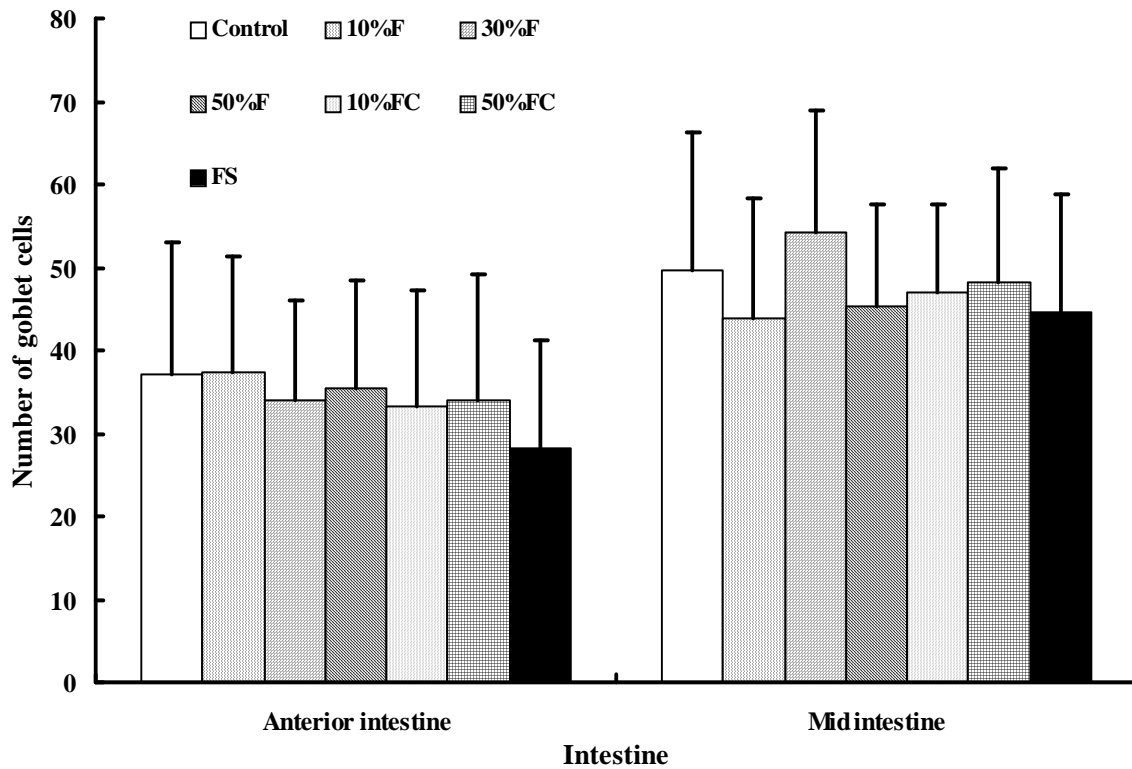


Fig. 21. Change of the goblet cell (number of goblet cells per a mucosal fold) of intestine in *Paralichthys olivaceus* fed with different levels of fermented product. A : Control, B : 10% Fermentation, C : 30% Fermentation, D : 50% Fermentation, E : 10% Concentration, F : 50% Concentration, G : fermented sediment

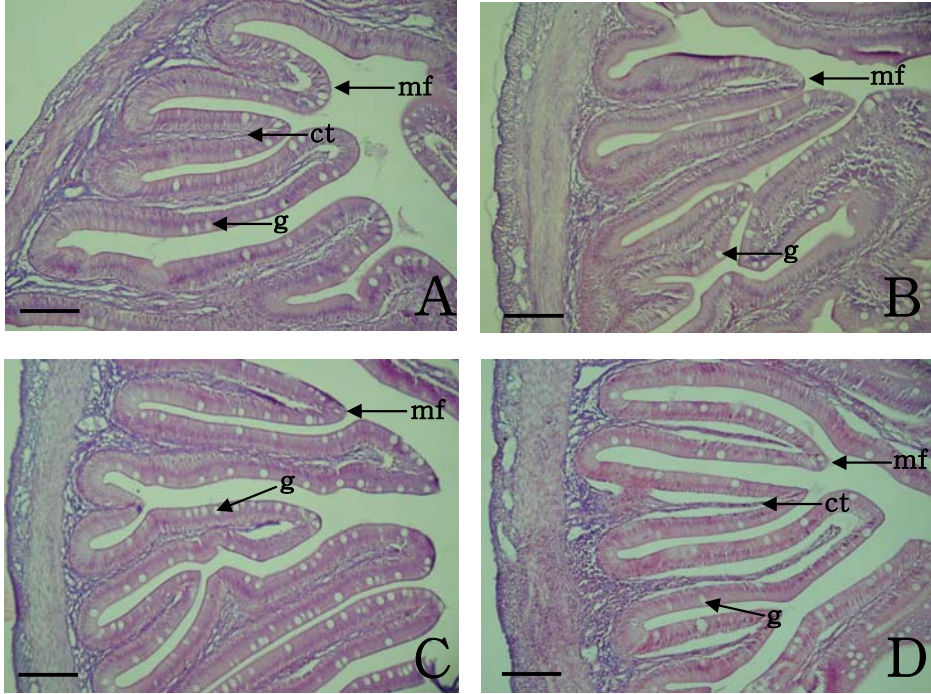


Fig. 22. Photomicrographs on goblet cell and epithelial element of intestine of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, A: anterior intestine of control group, B: anterior intestine of treatment group, C: mid intestine of control group, D: mid intestine of treatment group, ct, connective tissue; g, goblet cell; mf, mucosal fold, H · E stain, Scale bar = 50 μ m.

라. 2차 어류사육실험에 따른 혈액학적, 효소학적 평가

(1) 혈액성상 관찰

혈액은 스트레스를 유발하는 오염물질들에 의하여 그 구성이 변동된다. 그러므로 오염물질로 인한 어류의 혈액학적인 변수 (haematological parameters)에 대한 연구는 환경의 오염수준을 감시하는 유용한 수단으로서 연구되고 있다 (Chandraseker, 1990). 2차 년도에는 현재까지의 여러 방식과 종류의 발효물을 대상으로 보다 다양한 투여를 위해 총 7개의 실험구를 설정하여 노출하였다. 3개월 동안 투여 후 혈액성상 결과 적혈구 수는 대조구의 경우 274.6×10^4 cells/mm³ 로 대부분의 사료 첨가 실험구가 대조구에 비해 높았다 (Table 12). 특히, 10% 및 50% 발효구 그리고 10% 농축구에서 대조구와 비교하여 유의하게 높았다 ($P < 0.05$). 혈색소 (Hb) 농도 사료 첨가구에서 대조구에 비해 비교적 높았으며, 특히 10% 및 30% 발효구에서는 통계적으로 유의하게 높았다 ($P < 0.05$). 혈색소 지수 (Ht)는 대조구가 24.8 이었고, 발효구는 26.5~27.3, 10% 및 50% 농축구는 각각 24.6 및 24.7로 대조구와 유사하였다. 100% 배출구 발효물에서는 21.9로 대조구와 비교하여 유의하게 낮았다 (Table 12, $P < 0.05$).

<Table 12> Erythrocyte count, hemoglobin concentration and hematocrit level of olive flounder by administration of various diet supplement for 3 months

| Group | Erythrocyte count (10 ⁴ cell/mm ³) | Hemoglobin con. (g/dL) | Hematocrit (%) |
|-------|--|---------------------------|------------------------|
| A | 274.6±8.9 ^a | 3.8±0.3 ^a | 24.8±1.1 ^{ab} |
| B | 316.2±13.3 ^b | 4.8±0.2 ^b | 27.3±1.5 ^a |
| C | 303.2±16.0 ^{ab} | 4.8±0.4 ^b | 27.1±1.1 ^a |
| D | 315.0±12.5 ^b | 4.2±0.1 ^{ab} | 26.5±1.1 ^a |
| E | 314.2±11.2 ^b | 4.2±0.3 ^{ab} | 24.7±0.9 ^{ab} |
| F | 292.2±7.6 ^{ab} | 4.3±0.3 ^{ab} | 24.6±1.5 ^{ab} |
| G | 297.0±12.3 ^{ab} | 4.0±0.2 ^{ab} | 21.9±1.4 ^b |

Values (mean±s.e.) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05). A : Control, B : 10% Fermentation, C : 30% Fermentation, D : 50% Fermentation, E : 10% Concentration, F : 50% Concentration, G : fermented sediment

(2) 혈청 무기성분 관찰

다양한 방식과 종류의 발효물을 대상으로 3개월동안 투여 후 넙치의 혈청 무기성분을 조사한 결과에서, 혈청 무기성분 중 마그네슘은 대조구에서 2.46 mg/L, 발효구에서는 2.44 mg/L 이었다. 또한, 혼합발효구와 농축구는 2.58 ~ 2.82 mg/L로 대조구와 비교하여 높은 범위를 보였으나 유의한 차이는 없었다 ($P>0.05$). 칼슘 농도는 전 실험구에서 9.99 ~ 10.40 mg/L으로 각 실험구별 유의차는 없었다 ($P>0.05$). 혈청 인의 농도는 대조구가 8.27 mg/L이었으나 10% 및 30% 혼합 발효구에서 각각 10.35 및 10.37 mg/L로 대조구에 비해 높았다 (Table 13, $P<0.05$). 혈청 삼투압의 경우 305.2~322.8 (mOsm) 의 범위로 유의한 차이는 없었다 (Table 13, $P>0.05$). 일반적으로, 혈청 무기성분 중 사료 및 환경수중에 유해한 물질이 상존할 경우, 어류 체내의 마그네슘과 칼슘 농도가 변동을 나타낼 수 있는데 (Leatherland et al., 1981; Singh et al., 1997), 마그네슘의 증가는 조직 등에서의 혈청으로 유리된 결과로 짐작할 수 있다 (Ma et al., 1995). 본 연구에서는 특이할만한 무기성분의 변동이 관찰되지 않아 사료 첨가제에 대한 무기성분에 대한 영향이 나타나지 않았다.

<Table 13> Magnesium, calcium, phosphorus and osmolality level of olive flounder by administration of various diet supplement for 3 month

| Group | Magnesium (mg/dL) | Calcium (mg/dL) | Phosphorus (mg/dL) | Osmolality (mOsm) |
|-------|----------------------|--------------------|-------------------------|----------------------|
| A | 2.49±0.06 | 10.40±0.14 | 8.27±0.68 ^a | 322.80±10.43 |
| B | 2.67±0.14 | 10.52±0.10 | 10.35±0.84 ^b | 316.00±7.70 |
| C | 2.82±0.17 | 10.00±0.19 | 10.37±0.53 ^b | 321.40±13.74 |
| D | 2.62±0.17 | 66.55±56.36 | 8.99±0.61 ^{ab} | 308.20±5.44 |
| E | 2.66±0.04 | 10.04±0.24 | 9.01±0.28 ^{ab} | 305.20±9.27 |
| F | 2.58±0.08 | 9.89±0.25 | 9.14±0.74 ^{ab} | 318.60±14.15 |
| G | 2.44±0.05 | 9.88±0.33 | 8.55±0.42 ^{ab} | 305.20±7.32 |

Values (mean±s.e.) in the same column not sharing a common superscript are significantly different ($P<0.05$). A : Control, B : 10% Fermentation, C : 30% Fermentation, D : 50% Fermentation, E : 10% Concentration, F : 50% Concentration, G : fermented sediment

(3) 혈청 유기성분 관찰

3개월 동안 각각의 사료로 투여 한 넙치의 혈청 유기성분 중 혈청 총 단백질, 알부민, 혈당, 트리글리세라이드 및 총 콜레스테롤 농도를 조사하였다. 혈청 총 단백질은 대조구에서 3.24 g/dL, 100% 배출물 발효구는 3.28 g/dL으로 대부분의 혼합 투여구에서 3.66 ~ 3.84 g/dL의 범위 였다. 10% 농축구 (10%CG)에서는 4.01 g/dL로 대조구에 비해 유의하게 높았다 (Table 14, $P<0.05$). 알부민의 경우 전 투여구에서 그룹별 유의한 차이가 없었다. 혈당 및 총 콜레스테롤의 경우 50% 농축구와 100% 배출물 발효구에서 대조구에 비해 낮은 혈당과 콜레스테롤 수치를 보였으며, 트리글리세라이드 농도는 50% 농축구에서만 대조구에 비해 유의하게 높았다 ($P<0.05$). 어류의 total protein 농도의 변화는 최근 환경오염의 지표로 사용되고 있으며 (Ito and Murata,

1990; Hodson et al., 1992), 일반적으로 오염물질에 의해 감소하며, 그 원인중의 하나는 장관 손상에 따른 흡수장애를 들 수 있다 (Mayer, 1985; Yamawaki et al., 1986; Khattak et al., 1996). Glucose의 경우 외인성 화합물질과 같은 독성물질에 대하여 증가하는 경향을 나타내는데, 이것은 아드레날린의 과분비에 의한 과혈당 조건을 유발할 수 있으며 체내 glycogen을 분해하여 혈장 glucose가 증가하게 된다 (Gupta, 1974). 이번조사에서 대조구에 비해 혈청 총 단백질이 감소한 경우를 확인할 수 없었고, 다만 몇몇 구간에서 높은 값을 보임으로써 보다 높은 효율의 단백질 대사가 이루어진다고 평가할 수 있었다.

<Table 14> Total protein, albumin, glucose, triglyceride and total cholesterol concentration of olive flounder by administration of various diet supplement for 3 month

| Group | Total protein (g/dL) | Albumin (g/dL) | Glucose (mg/dL) | Triglyceride (mg/dL) | Total cholesterol (mg/dL) |
|-------|-------------------------|-------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------------|
| A | 3.24±0.17 ^a | 1.16±0.06 | 45.46±5.46 ^a | 225.67±9.97 ^a | 183.88±10.43 ^a |
| B | 3.74±0.11 ^{ab} | 1.14±0.05 | 30.08±0.92 ^b | 247.75±14.51 ^{ab} | 212.12±13.43 ^{ab} |
| C | 3.66±0.15 ^{ab} | 1.28±0.03 | 36.86±1.59 ^{ab} | 254.42±15.54 ^{ab} | 211.44±5.84 ^{ab} |
| D | 3.84±0.23 ^{ab} | 1.27±0.03 | 39.80±3.22 ^{ab} | 262.58±17.14 ^{ab} | 222.16±5.26 ^{ab} |
| E | 4.01±0.10 ^b | 1.21±0.05 | 38.27±3.35 ^{ab} | 228.14±19.57 ^a | 217.28±10.95 ^{ab} |
| F | 3.63±0.16 ^{ab} | 1.21±0.05 | 35.05±1.45 ^b | 279.31±10.16 ^b | 239.78±20.47 ^b |
| G | 3.28±0.33 ^a | 1.15±0.05 | 33.69±3.46 ^b | 267.00±12.33 ^{ab} | 236.54±19.67 ^b |

Values (mean±s.e.) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05). A : Control, B : 10% Fermentation, C : 30% Fermentation, D : 50% Fermentation, E : 10% Concentration, F : 50% Concentration, G : fermented sediment

(4) 혈청 효소활성 변동 관찰

발효물의 사료 내 첨가에 따른 넙치 혈청 항목 중 효소활성에 대한 조사를 통한 안정성 평가를 실시하기 위해 3개월간 7가지의 사료군으로 실험하였다 (Table 15). 혈청 GOT 효소활성은 대조구에서 51.14 (Karmen unit), 첨가 사료군에서는 42.22 ~ 48.11 unit을 나타내어 비교적 낮았으나 유의한 차이는 없었다. LDH의 경우 실험군 차

이를 조사한 결과 대조구에 비해 유의하게 감소한 실험구는 30% 혼합 발효구였으며, 유의하게 증가한 실험구는 10% 혼합 발효구 였다 ($P<0.05$). GPT 및 ALP 효소는 서로 다른 첨가 조성에 대하여 넙치 혈청 효소에 영향을 주지 않았다. 어류의 혈청 효소 활성 중 혈장 전이효소인 GOT 및 GPT의 활성은 오염물질에 의한 간, 심장 및 근육 등의 조직 손상의 지표로 사용되기 때문에 어류의 환경성 질병 진단에 이용되고 있으며 (Sakamoto and Yone, 1978; Shich, 1978; Smith and Ramos, 1980), 일반적으로 오염물질에 의해 증가하는 경향을 나타낸다 (Casillas and Ames, 1985; Rao *et al.*, 1990). 이번 연구의 결과 사료에 발효물 첨가가 어류의 간을 비롯한 내부 장기에 미치는 영향이 없음을 확인 할 수 있었다.

<Table 15> GOT, GPT, LDH and ALP activities of olive flounder by administration of various diet supplement for 3 month

| Group | GOT (Karmen unit) | GPT (Karmen unit) | LDH (W.U.) | ALP (K-A unit) |
|-------|----------------------|----------------------|-----------------------------|-------------------|
| A | 51.14±3.06 | 22.86±2.07 | 395.20±20.66 ^{bc} | 3.63±0.25 |
| B | 42.22±1.11 | 23.86±2.88 | 450.00±22.30 ^d | 3.51±0.33 |
| C | 42.75±4.53 | 21.14±2.83 | 338.00±12.98 ^a | 4.05±0.28 |
| D | 48.11±5.00 | 23.22±2.45 | 413.20±10.77 ^{cd} | 4.10±0.31 |
| E | 42.87±3.89 | 21.96±2.34 | 360.80±9.02 ^{ab} | 3.25±0.28 |
| F | 45.29±3.10 | 20.56±1.98 | 351.00±5.21 ^{ab} | 3.68±0.29 |
| G | 44.07±4.51 | 21.00±1.37 | 381.20±24.91 ^{abc} | 3.81±0.36 |

Values (mean±s.e.) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05). A : Control, B : 10% Fermentation, C : 30% Fermentation, D : 50% Fermentation, E : 10% Concentration, F : 50% Concentration, G : fermented sediment

마. 간 및 신장의 glutathione 농도 및 포함효소 활성

발효물의 안정성에 대한 자료 제시의 일환으로 간 및 신장 조직의 glutathione 함량 및 glutathione peroxidase (GPx) 및 glutathione reductase (GR) 의 효소 활성을 조사하였다. 일반적으로 외부의 오염물질 유입에 대한 생화학적 지표로써 glutathione-conjugation 관련 phase II 해독 효소가 널리 사용되고 있다 (Livingstone, 1998; Payne et al., 1987; Rodriguez-Ariza et al., 1991). 따라서 이번 연구에서 사료의 첨가제 투여에 따른 어류의 안정성 확보의 측면에서 상기의 효소 활성을 조사하였다. 현재까지 어류의 GPx 활성에 대한 연구로는 오염물질에 노출된 어류는 그 활성이 증가된다고 알려져 있다 (Radi et al., 1985; Bell et al., 1986). Glutathione peroxidase (GPx)는 살아있는 세포에서 과산화물을 해독하는 메카니즘을 가지고 있다. 이 반응은 프리 라디칼에 의한 손상을 방어하는데 중요한 역할을 하고, 과산화물을 분해한다. 세포의 지질 화합물은 프리 라디칼과 민감하게 반응하는데, 그 결과 지질과산화가 일어난다. GPx는 glutathione을 사용하여 과산화수소를 알콜로 환원시키기 때문에 프리라디칼의 생성을 막는다. 하지만, 이번 조사에서 각 사료첨가별 실험구에서 간의 GPx 활성은 50% 발효구의 경우 대조구와 비교하여 유의한 증가를 나타내었다. 따라서 50%의 발효구 농도는 실험 설정농도로서 감안할 때 다소 높은 것으로 생각되어진다. 하지만, 다른 실험구에서는 통계적으로 유의한 차이를 찾을 수 없었으며, 이러한 양상은 GR 효소 활성에서도 나타났다. GR은 세포질에 GSH의 농도를 유지시키는 역할을 한다. 즉, GR 활성의 유도는 산화스트레스의 잠재적인 생화학적 지표이다 (Stegeman et al., 1992). GR 활성의 감소는 새로운 글루타티온 분자의 합성에 의해서 채워지지 않는다면 GSH의 고갈을 야기시킨다. 하지만 본 연구에서는 GPx와 더불어 GR의 활성에도 첨가 사료별 유의한 차이가 나타나지 않아 각각의 사료첨가에 따른 해독작용 관련 효소의 유의한 활성 증감이 나타나지 않았다. 이번 연구에서는 이러한 효소의 활성 변화와 함께, 조직내 glutathione(GSH) 함량의 변동도 조사하였다. GSH는 외부 오염원에 대한 산화스트레스에 대하여 첫 번째 방어기작을 나타낸다. 가벼운 산화스트레스에 대하여 GSH의 합성을 증가시키는 적합한 대사로서 GSH함량이 증가되어질 수 있다. 그러나, 심한 산화스트레스는 적합한 대사를 잃고 GSH를 산화형인 GSSG로의 산화 때문에 GSH의 함량이 감소되어질 수 있다. 하지만, 이번 조사에서 각각의 사료 첨가별 특이한 증감을 나타내는 실험구는 없었다 (Figs.23, 24; Tables 16, 17). 따라서, 이러한 glutathione 함량 및 glutathione 포함 효소의 활성 변동을 고려해 볼 때 각각의 첨가사료가 어류의 체내에서 오염원으로 작용하지 않는 것으로 생각되며, 이러한 연구는 좀더 다양한 어종과 다양한 효소반응을 중심으로 연구할 가치가 크다고 하겠다.

<Table 16> Hepatic glutathione peroxidase and reductase enzyme activity of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* administrated with the different diet supplement

| Experimental groups | GPx *1 (unit/min/mg protein) | GR *2 (unit/min/mg protein) |
|---------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Control | 252.21±25.09 ^a | 45.46±5.46 |
| A | 255.55±25.42 ^{ab} | 37.35±3.28 |
| B | 269.84±14.66 ^{ab} | 35.47±3.24 |
| C | 335.65±12.86 ^b | 40.97±3.32 |
| D | 235.45±36.92 ^a | 41.89±3.68 |
| E | 285.98±22.70 ^{ab} | 33.65±2.64 |
| F | 294.60±29.46 ^{ab} | 39.29±4.04 |

Values (mean±s.e.) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05). A : Control, B : 10% Fermentation, C : 30% Fermentation, D : 50% Fermentation, E : 10% Concentration, F : 50% Concentration, G : fermented sediment

1. GPX (Glutathione peroxidase)

2. GR (Glutathione Reductase)

<Table 17> Renal glutathione peroxidase and reductase enzyme activity of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* administrated with the different diet supplement

| Experimental groups | GPx *1 (unit/min/mg protein) | GR *2 (unit/min/mg protein) |
|---------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Control | 103.53±8.43 | 32.50±3.03 |
| A | 108.11±8.25 | 29.22±2.38 |
| B | 103.17±11.99 | 27.52±2.56 |
| C | 103.18±6.23 | 29.95±3.39 |
| D | 96.45±6.59 | 35.34±1.90 |
| E | 92.88±6.62 | 27.45±2.74 |
| F | 110.57±7.27 | 41.00±7.29 |

Values (mean±s.e.) in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05). A : Control, B : 10% Fermentation, C : 30% Fermentation, D : 50% Fermentation, E : 10% Concentration, F : 50% Concentration, G : fermented sediment

1. GPX (Glutathione peroxidase)
2. GR (Glutathione Reductase)

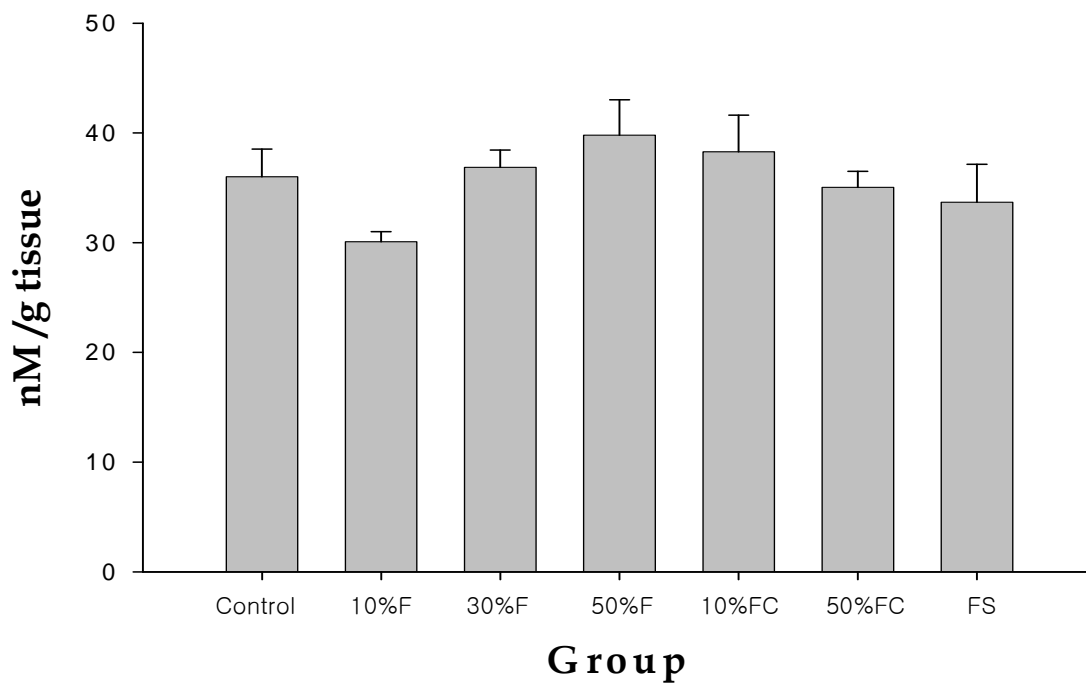


Fig. 23. Hepatic glutathione concentration of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* administrated with the different diet supplement. F: fermented group, FC: Concentrated fermentation, FS: fermented sediment.

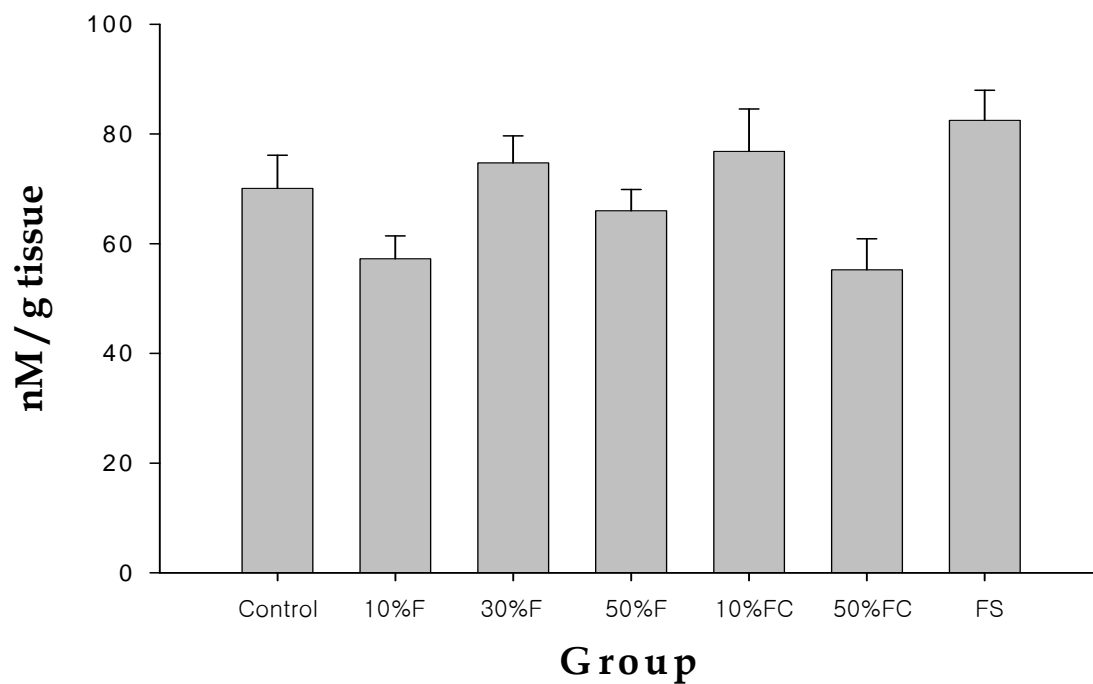


Fig. 24. Renal glutathione concentration of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* administrated with the different diet supplement. F: fermented group, FC: Concentrated fermentation, FS: fermented sediment.

5. 어류양식 실험결과 종합

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

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

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

병원균 검사를 실시한 결과 양어장 배출물을 SS 한천배지에서 H₂S 생성으로 검은색 집락을 형성한 미생물이 검출되었다. BHI 한천배지에서 배양한 실험구에서도 연쇄구균 형태를 갖는 미생물이 검출되었다. 양어장 배출물을 발효한 실험구에서는 어떠한 병원균도 발견되지 않았는데, 발효과정에서 접종된 젖산균과 효모의 우선 증식으로 상대적으로 수가 적은 병원균의 성장을 억제하여 결국 소멸되었을 것이라 생각된다. 생균제를 이용한 어류의 질병억제 및 건강도 향상에 관한 연구로써 젖산균을 대서양 대구의 사료에 첨가하여 공급하였을 때 젖산균이 장내에서 우선적으로 콜로니를 형성하게 되면 다른 유해 미생물의 증식을 억제하는 결과 (Gildberg and Mikkelsen, 1998)와 유사하였다. 광합성세균 (photosynthetic bacteria) 등 EM 미생물은 증식특성이 매우 다양하여 호기적 암조건 (aerobic dark), 혐기적 명조건 (anaerobic light), 미호기적 조건 (microaerobic) 등 여러 조

건에서 유기물을 이용, 증식이 가능하므로 양식 및 축산사료의 첨가제, 유기질 비료의 기능개선제, 수소생산 및 폐수처리등에 광범위하게 이용되고 있으며 (Kobayashi, 1972), 폐수처리에 이용할 경우 고농도 폐수 및 유해물질의 처리가 가능하다는 장점을 갖고 있다 (Sasaki et al., 1985). 이와 같은 결과들은 배출물을 유용미생물을 이용하여 발효했을 때, 발효물의 안전성을 확인할 수 있는 중요한 지표로 사용될 수 있을 것이라 생각된다.

제주도에서 생산되는 감귤은 각종 유기산, 비타민, 베타카로틴, 플라보노이드 등 기능성이 높은 영양물질을 함유하고 있다. 감귤에 함유된 플라보노이드와 비타민 E 등은 항산화 활성을 높이는데 효과적으로 작용하였다 (Moon et al., 2000; Kim et al., 2001; Kim and Kim, 2003). 2차 실험에서는 발효시 미생물의 생장에 필요한 에너지원으로 당밀을 대신하여 감귤농축액을 사용하였다. 실험어 전장은 대조구에서 18.6 ± 0.13 cm로 성장하였고, 30% 발효액과 10%농축액 실험구에서 각각 19.0 ± 0.13 cm, 19.1 ± 0.13 cm로 대조구에 비해 유의한 성장을 하였다 ($P < 0.05$). 체중은 30% 발효액과 10% 농축액 실험구에서 각각 67.19 ± 1.17 , 68.44 ± 1.30 g으로 대조구보다 높은 성장을 하였다 ($P < 0.05$). 증중량은 10% 농축액 실험구에서 1307.3 g으로 대조구의 1158.0 g보다 12.08%의 성장 효과를 보였다.

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

어류의 성장을 위한 사료 첨가제에 대한 연구들로는 은어 자어의 미립자 사료에 효모, *Kluyveromyces fragilis*를 5% 첨가하여 실험 7주 후 은어의 성장과 생존률 그리고 증중률에서 대조구에 비하여 유의한 차이를 보였고 (Lee et al., 2000), 지질 및 한방제 첨가가 돌돔의 성장을 향상시켰던 결과 (Kim et al., 2003)는 이 연구의 2차 실험과 유사한 경향을 보였다. 그리고 사료효율 및 어류의 건강을 향상시키기 위한 사료첨가제로써 한약재 및 키토산, 미역, 클로렐라 등을 각각 넙치와 참돔, *Pagrus major* 등의 사료에 첨가하여 공급하였을 때 성장 및 사료효율을 향상시키는 연구 (Nakagawa and Kasahara, 1986; Yone et al., 1986; Nematipour et al., 1988)들이 활발히 진행되고 있다.

어류의 배상세포는 종에 따라 식도에서부터 후장의 말단부까지 분포하고 있다 (Tibbetts, 1997). 배상세포는 소화관의 점막주름에 분포하며 점액을 분비하는데, 점액세포에서 분비된 점액은 어류의 사료와 같은 미립자와 흡착, 미립자를 운반하며 동시에 물을

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

어류의 혈액은 어류의 건강을 간접적으로 확인할 수 있는 중요한 요소로 활용되고 있다. 어류가 스트레스를 받으면 혈액 구성이 변동된다. 그러므로 스트레스에 인한 어류의 혈액학적인 변수 (haematological parameters)에 대한 연구는 어류의 성장과 생리적 안정성 등에 밀접한 관련이 있다 (Chandraseker and Jayabalan, 1993). 급격한 수온변화 스트레스에 관한 생리학적인 연구에서 수온을 30°C, 25°C, 15°C로 급격하게 낮추었을 때, RBC와 Ht의 수치가 현저하게 감소하는데, 이와 같은 결과는 환경적 스트레스가 어류의 생리적 변화에 영향을 주기 때문이다 (Yang and Yeo, 2004). 양어장 배출물 발효물의 사료첨가 실험에서 발효물을 농도별로 처리하였을 때, 실험구와 대조구 간 혈액성상의 차이는 없었다 (Kang et al., 2004). 이 연구의 2차 실험에서 혈액성상을 관찰한 결과 적혈구 수는 대조구의 경우 274.6×10^4 cells/mm³였고 10% 발효액과 10% 농축액 실험구에서는 각각 316.2 ± 13.3^4 cells/mm³과 314.2 ± 11.2^4 cells/mm³로 대조구와 비교하여 유의하게 높았다 (P<0.05).

혈색소 (Hb) 농도는 희석발효액 및 혼합발효액 실험구에서 4.8 ± 0.2 g/dL와 4.8 ± 0.4 g/dL로 대조구의 3.8 ± 0.3 g/dL 보다 유의하게 높았다 (P<0.05). 혈색소지수 (Ht)는 대조

구와 모든 실험구에서 유사한 경향을 보였다. RBC, Hb 농도, Ht 수치가 낮아지면 산소 등 가스의 운반이 감소하기 때문에 빈혈증과 영양분의 결핍으로 어류의 건강을 악화시킬 수 있다. 이 실험에서 어류사료 첨가제로 사용된 발효물을 첨가하게 되면 어류의 생리적 변화와 건강도 향상에 기여 할 것으로 생각된다.

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

Glucose는 외인성 화합물질과 같은 외부 환경요인 (독성물질)에 의하여 증가하는 경향을 나타내는데, 이것은 아드레날린 과분비에 의한 과혈당 조건을 유발할 수 있으며 체내 glycogen을 분해하여 혈장 glucose가 증가하게 된다 (Gupta, 1974). 이 연구에서 glucose는 대조구에서 45.5 mg/dL로 가장 높았고, 10% 발효액과 배출물 발효액 (FS) 실험구에서는 30.1 mg/dL과 33.7 mg/dL로 가장 낮았다.

어류의 혈청 효소활성 중 혈장 전이효소인 GOT 및 GPT 활성은 스트레스와 급격한 운동에 의한 간, 심장 및 근육 등의 조직 손상의 지표로 사용되기 때문에 어류의 환경성 질병 진단에 이용되고 있다 (Sakamoto and Yone, 1978; Shich, 1978; Smith and Ramos, 1980). 일반적으로 스트레스 등에 의해 증가하는 경향을 나타낸다 (Casillas and Ames, 1985; Rao et al., 1990). 혈청 GOT 효소활성은 대조구에서 51.1 unit, 발효물 첨가 실험구에서는 42.2~48.1 unit으로 비교적 낮았으나 유의한 차이는 없었다. GPT 효소는 서로 다른 발효물 첨가는 넉치 혈청 효소 변화에 영향을 주지 않았다. 이와같이 배출물 발효물을 어류사료에 첨가하여 공급하였을 때, 성장과 건강도 향상에 도움을 주었다고 생각된다.

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

6. 배출물 발효물의 기능성 탐색

가. Xanthine oxidase 억제 및 Superoxide 소거 활성

배출물에 대한 Xanthine oxidase 활성 억제 및 superoxide radical 소거활성은 10% 발효구 (A), 30% 발효구 (B), 양어장 배출물 단독발효구(C) 모두 xanthine oxidase 활성 억제능은 나타나지 않았으나, 비슷한 superoxide radical 소거활성을 보여주었다 (Fig. 25). 시료 A, B, C는 모두 DPPH radical과 superoxide의 소거활성을 가지고 있는 것으로 평가되었으며 본 시료로 이들의 항산화능을 서로 비교하기에는 그 차이가 경미한 것으로 판단된다.

나. 양식장 배출물과 배출물 발효물의 LPS로 유발된 대식세포에서의 nitric oxide (NO) 생성에 대한 억제 효과 검색

LPS로 유발한 대식세포의 NO 생성에 미치는 효과를 63, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 관찰하였다. 대식세포를 시료의 각 농도에서 1시간 동안 전처리 한 후 LPS를 100 ng/ml의 농도로 처리하여 24 시간동안 NO의 생성을 유도하였다. 그 결과 시료 A, B, C 모두에서 농도의존적으로 NO의 생성을 유의성있게 증가시키는 양상을 나타내었으며 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 NO의 생성이 감소되나 유의성은 없었다. 실험 방법의 정확성을 위해 사용한 NOS 억제인 L-NAME의 경우는 63 μM 부터 유의성 있게 NO의 생성을 억제시키는 결과를 보여주었다 (Fig. 26).

다. 대식세포의 생존력에 미치는 효과

NO 생성의 억제효과를 관찰하기 전에 먼저 시료가 대식세포의 생존에 영향을 미치지 않는 농도를 결정하여 MTT reduction법에 의해 세포 생존률을 조사한 결과 시료 A, B, C 모두 세포의 생존에 영향을 주지 않았다. 또한 NO 생성을 유발하기 위해 LPS를 처리한 경우에는 세포의 생존력이 유의성 ($P < 0.05$) 있게 감소하였다 (Fig. 26).

라. 세포의 대사활성 측정

A (배출물)는 HL-60 및 Jurkat 세포 모두 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리시 농도별로 그다지 영향을 받지 않았지만, 발효물 B(10%)와 C는 농도 의존적으로 세포 증식억제 효과를 보였다. 그리고 발효물 B (10%)와 C에 있어서는 HL-60 세포 및 Jurkat 세포 모두에서 C 처리구 (50% 발효)에 비해 B 처리구가 다소 세포 증식 억제 효과가 높았으나 각각의 시료들은 혈액암 세포주인 HL-60 및 Jurkat 세포에 있어 세포 증식 억제효과는 높지 않았다 (Fig. 27, 28).

마. 양어장 배출물의 항산화활성(antioxidant activity)

형광표지인자인 H_2DCFDA 를 사용하여 세포내에 과산화수소(hydrogen peroxide)가 있을 경우에 발광하는 형광의 세기를 ROS의 지표로 간주하였다. 간암세포주에서 양어장 폐기물이 과산화수소에 의해 야기된 세포내의 ROS를 농도 의존적으로 감소시키는 경향이 관찰되었다(Fig. 29).

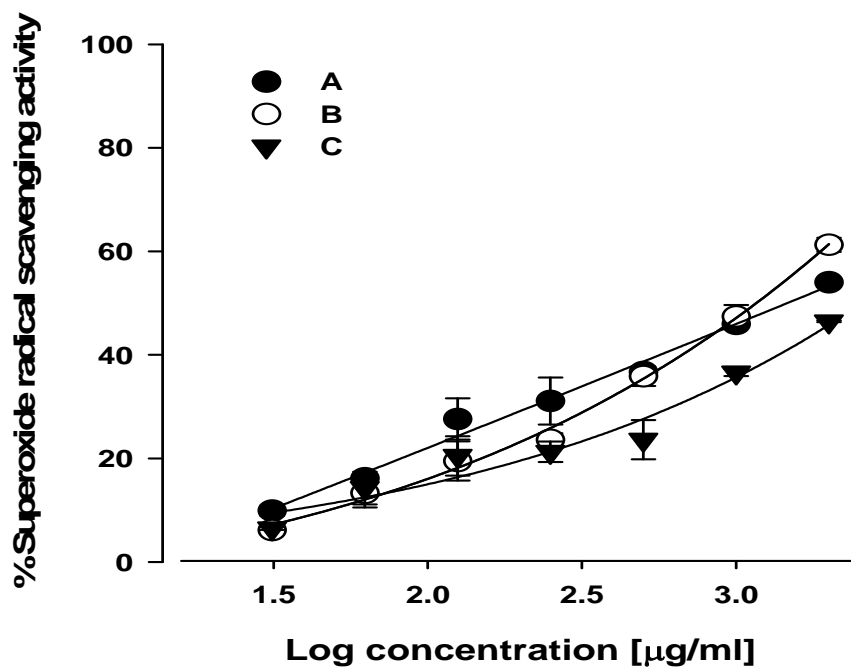


Fig. 25. Superoxide scavenging activity. Each value is represented as mean \pm SEM from triplicate measurements. A: 10% fermented sediment, B: 30% fermented sediment, C: Fermented sediment not added with concentrated orange.

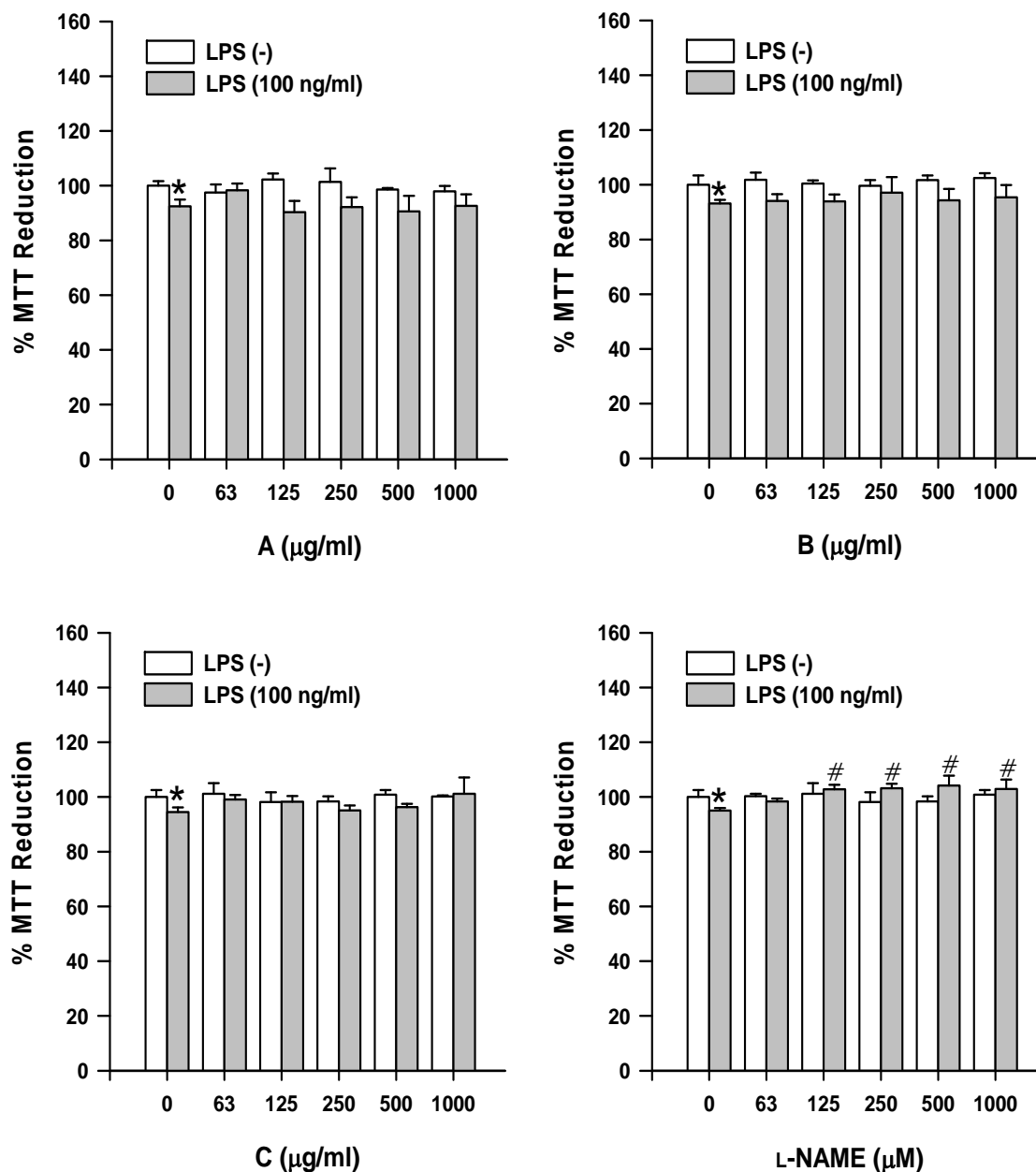


Fig. 26. Cell viability of RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 macrophages were either untreated (white bars) or treated (gray bars) with LPS (100 ng/ml) in the presence or absence of test samples. Cell viability was determined by mitochondrial reduction of MTT test. Data are expressed as means \pm SEM of two independent experiments performed in triplicates. * $P < 0.05$ represent significant differences compared to the values seen in LPS-untreated cells. # $P < 0.05$ represent significant differences compared to the values seen in LPS only-treated cells. A: 10% fermented sediment, B: 30% fermented sediment, C: Fermented sediment not added with concentrated orange.

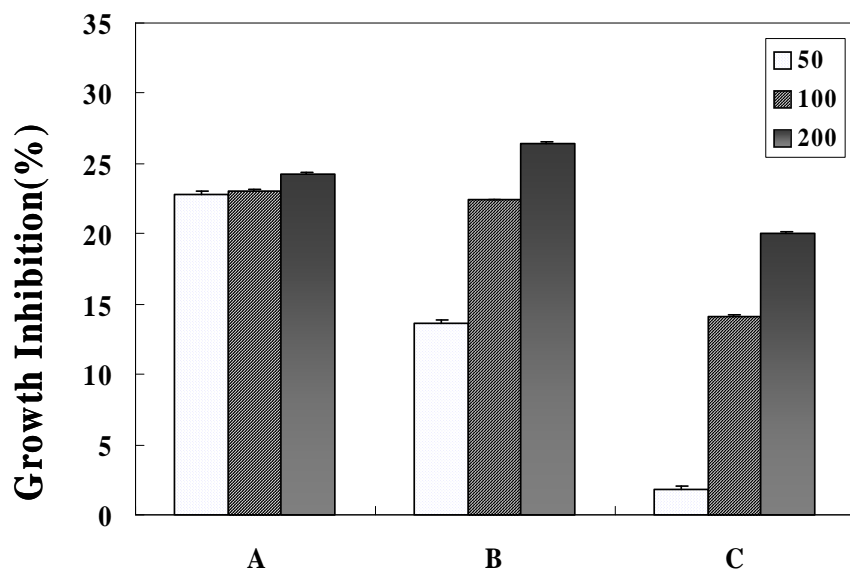


Fig. 27. Inhibitory effect of fermented extracts of on the growth of HL-60 cells. A: 10% fermented sediment, B: 30% fermented sediment, C: Fermented sediment not added with concentrated orange.

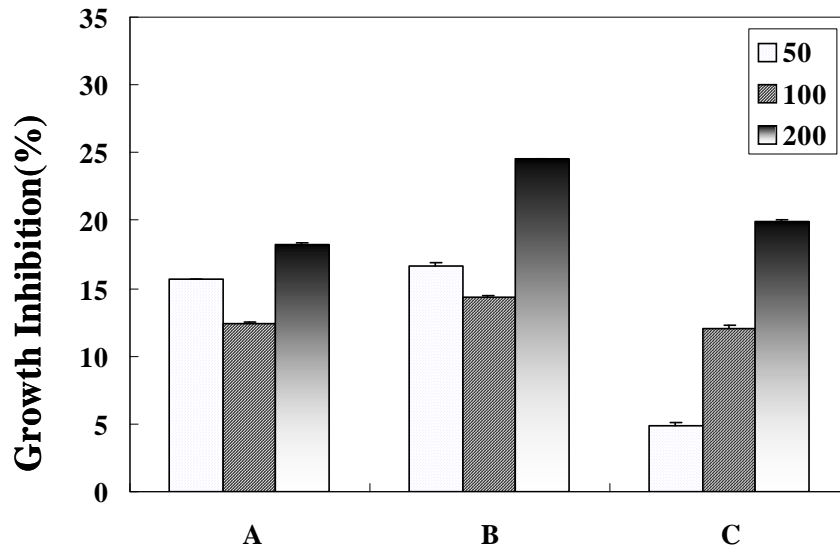


Fig. 28. Inhibitory effect of fermented extracts of on the growth of Jurkat cells. A: 10% fermented sediment, B: 30% fermented sediment, C: Fermented sediment not added with concentrated orange.

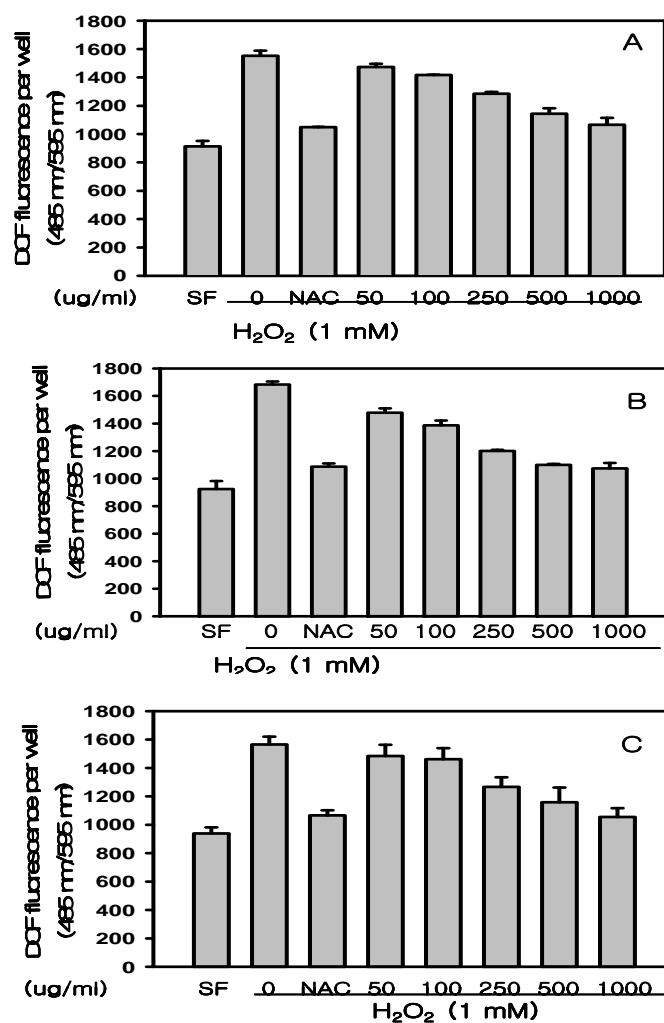


Fig. 29. Effect of fermented sediment on the intracellular ROS content in H₂O₂-treated HepG2 cells. HepG2 cells were serum-starved for 24 h, and then pretreated with NAC(5 mM) and fermented solids for 1 h and further incubated in medium containing H₂O₂ (1 mM) and together with/without different doses of waste material (50, 100, 250, 500, 1000 ug/ml) for 15 min in the presence of H₂DCFDA. The fluorescence reader at 485 nm /595 nm for excitation and emission, respectively. FBS (10%), SF (serum-free media). A: 10% fermented sediment, B: 30% fermented sediment, C: Fermented sediment not added with concentrated orange.

7. 배출물 발효물의 비료로서의 가능성 탐색

가. 쪽파 실험

각각 측정된 쪽파의 길이는 대조구에서 18.81 ± 1.69 cm였고, 비료 처리구와 배출물 처리구는 15.90 ± 0.71 , 18.08 ± 1.04 cm 였다. 포기당 중량은 대조구에서 32.37 ± 5.13 cm 였고, 비료 처리구는 22.51 ± 2.58 cm, 배출물 처리구는 26.69 ± 4.19 cm였다. 하나의 포기 에 달려있는 가닥의 개수를 측정한 결과 대조구는 16.50 ± 1.69 개였고, 비료 처리구는 16.87 ± 1.65 였으며, 배출물 처리구는 14.80 ± 1.11 개였다. 가닥의 개당 중량을 측정한 결 과 대조구에서는 1.73 ± 0.16 g 이었고, 비료 처리구에서 1.35 ± 0.09 g 이었다. 배출물 처 리구에서는 1.67 ± 0.22 g으로 쪽파의 길이, 중량, 가닥 개수, 가닥 중량 모두 대조구와 다른 실험구간에 차이는 없었다 (Table 18).

<Table 18> Effect of fermented sediment on growth of welsh onion

| | Length(cm) | Weight(g) | Leaf number | Leaf weight |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|
| Control | 18.81 ± 1.16 | 32.37 ± 5.13 | 16.50 ± 1.69 | 1.73 ± 0.16 |
| Fertilizer | 15.90 ± 0.71 | 22.51 ± 2.58 | 16.87 ± 1.65 | 1.35 ± 0.09 |
| Fermented sediment | 18.08 ± 1.04 | 26.69 ± 4.19 | 14.80 ± 1.11 | 1.67 ± 0.22 |

나. 브로콜리와 양배추

브로콜리의 높이는 대조구에서 10.53 ± 0.24 cm였고, 배출물 처리구에서는 11 cm 이었다. 가로와 세로의 길이는 대조구에서 각각 9.56 ± 0.33 , 8.39 ± 0.28 cm로 배출물 처리 구의 9.68 ± 0.31 cm와, 8.50 ± 0.26 cm 였다. 중량은 대조구가 182.82 ± 14.88 g, 처리구 186.96 ± 11.36 g으로 대조구와 실험구간에 성장차이는 없었다(Table 19).

양배추의 높이는 대조구에서 12.27 ± 0.27 cm였고, 배출물 처리구는 13.77 ± 0.23 cm 로 대조구에 비해 유의한 차이를 보였다. 길이는 대조구가 12.4 ± 0.26 cm, 배출물 처리

구에서는 13.53 ± 0.27 cm로 대조구보다 높게 성장하였다. 무게는 대조구에서 579.26 ± 33.04 g인 반면에 배출물 처리구에서는 829.56 ± 40.88 g으로 대조구와 유의한 성장 차이가 있었다 (Table 20).

<Table 19> Effect of fermented sediment on growth of broccoli.

| | Length (Breadth × height, cm) | Weight(g) |
|--------------------|--------------------------------------|--------------------|
| Control | $9.56 \pm 0.33 \times 8.39 \pm 0.28$ | 182.82 ± 14.88 |
| Fermented sediment | $9.68 \pm 0.31 \times 8.50 \pm 0.26$ | 186.96 ± 11.36 |

<Table 20> Effect of fermented sediment on growth of cabbage.

| | Height(cm) | Breadth(cm) | Weight(g) |
|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| Control | 12.27 ± 0.27^b | 12.4 ± 0.26^b | 579.26 ± 33.04^b |
| Fermented sediment | 13.77 ± 0.23^a | 13.53 ± 0.27^a | 829.56 ± 40.88^a |

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

1. 목표

가. 최종목표

- 젓산균, 효모 등의 유용미생물을 이용한 양식장 배출물 재활용 기술의 확립
- 배출물을 이용한 기능성 사료의 개발
- 발효물의 어류 사료 첨가에 따른 어류의 혈액 및 생화학 기능에 미치는 영향 확인
- 발효물의 어류 사료 첨가에 따른 어류의 생산성 평가 및 경제성 검토
- 친환경적인 양식업의 토대를 구축하여 제주의 청정 이미지 부각

나. 연도별 연구목표

(1) 1차년도

- 혐기성 미생물을 이용한 양식장 배출물의 발효 및 발효물의 기능성·안전성 평가
- 발효물의 어류의 첨가에 따른 어류 면역능, 생리·생화학 및 생산성 평가를 통한 산업화 가능성 검토 및 경제성 평가

(2) 2차년도

- 발효물의 양식어 사료첨가제로서의 적용 및 산업화 가능성 검토
- 발효물의 어류의 첨가에 따른 어류 면역능, 생리·생화학 및 생산성 평가를 통한 산업화 가능성 검토 및 경제성 평가

2. 달성도

가. 최종목표 달성도

- 양어장 투여 생사료, 배출물, 배출물 발효물 등 3시료의 물리화학적 특성을 파악 및 비교하였고, 일반분석 (수분, 회분, 조단백, 조지방 등), 유해미네랄, 지방산, 구성아미노산, 유리아미노산 등을 분석하여 배출물의 물리화학적 특성을 파악하여 배출물 발효연구의 기초자료로 활용하여 당초 연구목표에 달성하였음
- 발효에 의한 어병균 억제 효과를 확인하였고, 발효는 양어장 배출물에 존재하는 어병균 사멸 방안으로서 제시되었음
- 발효미생물의 보존 및 배양을 수행하여 배출물 발효 스타터로서 활용
- 발효조건을 성공적으로 확립하여 당초 목표에 달성하였음
 - 각 젖산균 (10^6 cells/ml)과 효모 배양액 (10^6 cells/ml)을 1:2(V/V)의 비율로 혼합한 액을 양어장 배출물 발효 접종액으로 함.
 - 양어장 배출물을 분쇄한 후, 당분을 첨가하며, 최적의 당 첨가량을 결정함.
 - 당분의 첨가 이외에는 일체의 첨가가 없음
 - 발효온도는 38°C 이며, 약 6~7일간 배양됨
 - 젖산균은 배양개시 후 약 2~3일째에 최대 개체수에 도달함
 - 효모는 배양개시 후 점진적으로 그 개체수가 증가함
 - 배양완료 후 약 15일 경과시점까지 젖산균은 10^7 cfu/ml의 개체수 수준을 유지함
 - 배양완료 후 약 15일 경과시점까지 효모는 10^7 cfu/ml의 개체수 수준을 유지함
 - 배양개시 후 약 15일 경과시점까지 어병균은 검출이 안됨
- 어류성장에 미치는 사료첨가제의 효과 분석
 - 5 실험구 (대조구, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0% 투여구), 12주간 (2003. 04. 25~07. 25) 사육실험 수행
 - 각 실험구당 치어 (4.2 cm, 7.1 g) 150미씩 사육
 - 대조구에 비해 0.5%, 1.0% 투여구에서 체중과 전장이 상대적으로 증가하였으나 통계적 유의차는 없었음
- 육상어류양식장 배출물 발효물의 어류 사료 첨가에 따른 혈액학적 평가
 - 어류에 대한 혈액학적인 항목은 건강을 나타내는 보조지표로 널리 이용되고 있음. 본 연구에서는 어류의 혈액성상, 혈액화학 및 혈액 효소학적인 항목을 중심으로 육

상어류 양식장 배출물 발효물의 어류 사료 첨가에 따른 평가 실시하여 배출물 발효물의 어류에 미치는 안전성을 확인하였음

- 육상어류양식장 배출물 발효물의 어류 사료 첨가에 따른 병리학적 안전성 검토
 - 육상어류 양식장 배출물 발효물의 어류 사료 첨가에 따른 어류의 영향을 파악하기 위해 효 소학적 및 혈액학적 연구를 바탕으로 그 영향을 조사하였고, 배출물 발효물의 어류에 미치는 안전성을 확인하여 당초 목표에 달성하였음
- 경제성에 근거한 각 공정 설정
 - 경제적으로 비용이 적게 들면서 당, 미네랄 등이 풍부한 당밀을 기질로 한 젖산균, 효모 대량 배양 성공
 - 배출물 발효공정을 확립함으로써 당초 목표에 달성하였음
- 공정의 단순성을 증대시켜 산업화가 용이하도록 함
- 발효물의 기능성 및 안전성 (전염성 어병균 검사 포함)을 평가하였고, 배출물 발효물은 항산화, 세포생존능에 기여하는 것으로 나타났고, 또한, 발효처리후 시료내의 세균수 측정 결과를 보면 대부분의 처리구에서 일반세균이 검출되지 않았는데 이는 본 연구에 사용한 세균수 측정방법이 일반적인 종속영양 세균수를 측정하는 방법으로 이루어진 점과 발효산물에 의해 일반 세균이 생존이 저해됨으로써 세균수 측정방법으로는 계수가 어려웠던 것으로 사료되며, 발효에 관여하는 미생물 중에서 젖산균의 성장 등에 의한 일반세균의 사멸 또는 성장억제 효과에 기인하는 것으로 판단됨
- 사료첨가제로서의 현장 적용 평가
 - 실험 시작 시 실험어의 평균전장은 12.3 cm이었으며, 실험종료시 실험어의 전장은 대조구에서 20.46 ± 0.14 cm로 성장하였고, 감귤 농축액과 양어장 배출물 혼합 발효시료 10%, 30%, 50% 그리고 농축 실험구인 10% 농축구, 50% 농축구, 양어장 배출물 단독 발효구는 각각 20.84 ± 0.15 , 21.03 ± 0.13 , 20.47 ± 0.14 , 21.03 ± 0.12 , 20.64 ± 0.13 , 20.79 ± 0.16 cm로 성장하여 30% 발효구와 10% 농축 실험구에서 대조구보다 유의한 성장을 하였음.
 - 실험시작시 실험어의 체중은 19.7 g이었으며, 실험종료시 실험어의 체중은 대조구에서 89.89 ± 1.62 g으로 성장하였고, 감귤 농축액과 양어장 배출물 혼합 발효시료 10%, 30%, 50%와 농축 실험구인 10%, 50% 농축 실험구, 배출물 단독 발효 실험구에서

각각 94.39 ± 1.89 , 94.55 ± 1.72 , 90.62 ± 1.16 , 96.31 ± 1.46 , 92.91 ± 1.67 , 94.68 ± 1.74 g로 성장하여, 10% 농축 실험구에서 유의한 성장을 하였음.

- 실험구별 생존율은 대조구에서 98.9%이었고, 10%, 30%, 50% 혼합 발효 실험구 그리고 10%, 50% 농축 실험구 그리고 배출물 발효 실험구에서 각각 97.8%, 96.8%, 97.8%, 97.8%, 96.8%, 97.9%로 조사됨.

○ 혈액 및 조직학적 접근을 통한 영향 평가

- 적혈구 수는 대조구의 경우 274.6×10^4 cells/mm³, 사료 첨가 실험구에서 292.2×10^4 cells/mm³ ~ 316.2×10^4 cells/mm³로 대조구에 비해 높은 값을 나타냄.
- 특히, 10% 및 50% 발효구 (10%F, 50%F) 그리고 10% 농축구 (10%FC)에서 대조구와 비교하여 유의하게 높음 ($P < 0.05$). 혈색소 (Hb) 농도 사료 첨가구에서 대조구에 비해 비교적 높게 나타났으며, 특히 10% 및 30% 발효구에서는 통계적으로 유의하게 나타남 ($P < 0.05$). 혈색소 지수 (Ht)는 대조구가 24.8, 발효구는 26.5~27.3의 범위였고 10% 및 50% 농축구는 각각 24.6 및 24.7로 대조구와 유사하였으나, 100% 배출물 발효물에서는 21.9로 대조구와 비교하여 유의하게 낮은 값을 나타냄 ($P < 0.05$).
- 혈청 무기성분 중 마그네슘은 대조구에서 2.46 mg/L, 발효구에서는 2.44 mg/L. 또한, 혼합발효구와 농축구는 2.58~2.82 mg/L으로 대조구와 비교하여 높은 범위를 나타내었으나 유의한 차이는 없었음 ($P > 0.05$). 칼슘 농도는 전 실험구에서 9.9~10.40 mg/L으로 각 그룹별 유의한 차이는 없었으나 ($P > 0.05$), 혈청 인의 농도는 대조구가 8.27 mg/L이었으나 10% 및 30% 혼합 발효구에서 각각 10.35 및 10.37 mg/L로 대조구에 비해 높은 값을 가짐 ($P < 0.05$). 혈청 삼투압의 경우 305.2~322.8 (mOsm)의 범위를 나타내었으며 유의한 차이는 없었음 ($P > 0.05$).
- 혈청 총 단백질은 대조구에서 3.24 g/dL, 100% 배출물 발효구는 3.28 g/dL, 혼합 투여구에서 3.66~3.84 g/dL의 범위를 나타내었음. 10% 농축구 (10%CG)에서는 4.01 g/dL로 대조구에 비해 유의하게 높게 나타남 ($P < 0.05$). 알부민의 경우 전 투여구에서 그룹별 유의한 차이가 없었으며, 혈당 및 총 콜레스테롤의 경우 50% 농축구와 100% 배출물 발효구에서 대조구에 비해 낮은 혈당과 콜레스테롤 수치를 보였으며, 트리글리세라이드농도는 50% 농축구에서만 대조구에 비해 유의하게 높은 값을 나타내었음 ($P < 0.05$).

○ 성장 관련 인자를 통한 종합적 생산성 평가

- 배출물 발효물은 어류의 성장 촉진에 기여하며, 발효물을 투여하지 않을 때 보다 약 7.1%의 성장촉진 효과가 나타남.
- 혈액학적 및 조직학적 검사결과에서 배출물 발효물의 안전성을 확인하였으며, 특히 발효산물에 기인하는 소화관 활성 유도가 건전한 양식어 생산을 가능케 함.
- 배출물 발효물은 항산화 작용을 갖고 있어 사료 등의 산패억제 효과가 기대됨.
- 배출물 발효물의 첨가에 의해 어류 혈액 내 미네랄 농도가 상승하고, 총콜레스테롤과 혈당치가 저하된 점으로부터 어류의 건강유지에 크게 기여하는 것으로 판단됨.
- 배출물 발효물의 생산은 크게 경제적이며, 어류사료 첨가제로서 그 활용가능성이 매우 높게 나타났고, 특히, 배출물의 처리방법이 많지 않은 상황 속에서 우수한 처리방법으로 사료됨.
- 배출물 발효물의 이용은 어류의 건강유지, 성장촉진 등의 측면에서 어병유발 가능성을 저하시킬 가능성이 높을 것으로 판단되며, 나아가 항생제 등의 약제사용의 절감효과가 기대됨.
- 양식장 배출수 중 고형물의 회수는 양식장 주변 해역의 청정화에 기여하며, 이는 주변 해수를 이용하는 양식장의 측면에서 생산성 향상에 기여하게 됨.

나. 세부목표 달성도

| 세부과제 | 항 목 | 달성도 (%) | 주요 내용 |
|---|--|---------|---|
| ○양식장 배출물의 특성 파악, 발효 및 발효산물의 양식어 사료첨가제 로서의 실험실 적용 | 1. 광합성세균, 젖산균 등의 미생물 균주 보존 및 배양 | 100 | 1. 광합성세균 1종, 젖산균 1종 및 효모 1종 등을 구입하여 보존하면서 실험에 이용 |
| | 2. 넙치 양식장 2개소 선정 및 각 배출물 수집(배출량 파악) 후 물리화학적 특성 파악 | 100 | 2. 제주도 내 양식장 1개소를 선정하여 배출물의 물리화학적 특성을 파악하였음 |
| | 3. 배출물 존재 어병균 검사 | 100 | 3. 배출물 중 비브리오증, 에드워드증 등의 어병유발 가능성이 높은 세균이 검출되었음 |
| | 4. 배출물의 전처리(살균처리) 및 광합성세균 또는 젖산균을 이 용한 배출물의 최적 발효조건 확립 | 100 | 4. 배출물을 100℃에서 20분이상 살균하였을 때 어병균은 검출되지 않았으며, 어병균이 존재하여도 발효과정에서 완전히 사멸되는 것을 확인하였음. |
| | 5. 발효물의 성분분석(기능성 성분 확인) | 100 | 5. 발효물의 이화학적 검사를 수행하였음 |
| | 6. <i>In vivo</i> (실험용 마우스) 테스트 에 의한 발효물의 기능성 및 안전성 평가 | 100 | 6. 어류사육실험으로 평가함 |
| | 7. 발효산물의 양식어 사료첨가제로서의 실험실 적용 | 100 | 7. 실험실 규모로 양식어 사료첨가제 투여 실험 적용 |
| | 8. 효소학적 양식어 영향 조사 | 100 | 8. 양식어의 효소학적 영향 조사 |
| | 9. 어류 혈액학적 평가 및 검토 | 100 | 9. 양식어에 대한 혈액성상, 혈액화학 분석 |
| | 10. 병리학적 안전성 검토 | 100 | 10. 혈액 및 효소학적 반응을 종합한 결과를 바탕으로 검토 |

| | | | |
|--|---|-----|--|
| ○양식장 배출물의 최적 발효공정 확립, 기능성·안 전성 평가 및 최종 개발된 발효산물 첨가제를 사료첨가제 로서의 적용효과 비교분석 | 1. 발효공정 설계 및 발효물 안전성 평가 - 경제성에 근거한 각종 공정 작성 - 공정의 단순화 탐색 - 실험동물을이용한 발효물의 안전성 평가 - 어병균 동정 | 100 | 1. 발효공정 설계 및 발효물 안전성 평가 - 젖산균, 효모 복합발효 공정 확립 - 안전한 배출물 수거방법 확립 - 세포수준에서의 배출물의 기능성 평가 - 어병균 평가 및 발효배출물에서의 어병균 불검출 확인에 의한 안전성 확립 (2차평가) |
| | 2. 최종 개발된 발효산물 첨가제를 사료첨가제로서의 현장(양식장, 농업분야) 적용 및 적용효과 비교분석 - 첨가제 투여효과 분석을 위한 현장 적용(양식장, 농장 등) - 어류 건강 지표를 이용한 생물 영향 평가 - 성장 관련 인자를 통한 종합적 생산성 평가 | 100 | 2. 최종 개발된 발효산물 첨가제를 사료첨가제로서의 현장(양식장, 농업분야) 적용 및 적용효과 비교분석 - 어류성장 효과실험 수행 및 배출물의 사료첨가에 의한 성장촉진 효과 확인 - 조직학적 분석에 의한 성장촉진 효과 파악 - 혈액학적 분석 - 발효배출물의 안전성 평가 - 발효배출물의 비료로서의 가능성 탐색 및 식물성장촉진 효과 확인 - 발효배출물의 높은 산업적 활용가치 평가 |

제 2 절 관련분야에의 기여도

1. 배출물 재활용에 의한 양식생물 피해저감

- 배출수 중 고형물제거에 의한 유출수 오염부하 저감
- 유출수 오염부하 저감에 따른 연안해양환경 자정작용 상승
- 오염물질 저감에 따른 연안해양 생물종의 다양성 증진

- 오염부하가 적은 연안수의 양식생물 양식에의 이용 및 양식생물 건강 증진

2. 배출물 재활용에 의한 자원화

- 배출수 중 고형물은 상대적으로 단백질의 함량이 높아 산화처리에 애로사항이 많은 단점이 있으나, 오히려 이들 고형물을 사료나 비료 등의 자원으로 재활용함으로써 폐기물처리에 기여
- 고형물을 유용미생물에 의한 혐기처리에 의해 소화성 및 기능성을 증진시켜, 사료 첨가제로 활용하여 사료첨가제 소비자의 경제성을 높임
- 고형물의 발효처리에 의해 보존성이 증진되어 산업화에 기여함
- 본 연구에서 개발된 발효기술은 단백질 함량이 높은 폐기물의 재활용 처리기술 발전에 기여

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구결과 활용방안

1. 정책수립을 위한 기초자료로 활용

- 배출물 자원화 기술 개발로 경제성이 확보된다면 수산물 가공과정에 발생하는 부산물 또는 폐기물의 처리 등과 연계함으로써 각종 부산물의 효율적 활용을 위한 기본 지침 제시
- 양식장 배출물 등의 천연물을 이용한 사료첨가제의 개발은 양식동물의 청정 이미지 개선에 기여함
- 연안해양환경 보존을 위한 오염부하 저감 방안으로서 활용
- 젓산균, 효모를 이용한 발효 공정의 확대방안으로 다른 기타 폐기물 처리에 활용함으로써 보다 산업적으로 확대방법을 모색

2. 타 기술개발에의 활용

- 수협공판장 등의 유기물 부하가 많은 오폐수처리 기술개발에 기여
- 폐사 양식어의 재활용 방안으로서 응용
- 고단백 폐기물 발생이 높은 식품공장 등의 폐기물 처리법으로서 응용
- 본 연구에 개발된 균주 외 다른 미생물을 이용한 발효 첨가제의 개발로 각종 사료에 첨가제로 활용 방안법 기대
- 양식어장 생산성향상을 위한 오염 퇴적물 개선방안으로 활용
- 육상어류양식장 배출물의 연구결과로부터 지역 특산물 부산물 의 사료첨가제로서의 재활용이 가능하게 되며, 축산업, 양식업의 소득수준 향상에 기여할 수 있음
- 연구결과의 기술이전에 의한 배출물 발효물 사료첨가제 산업화
- 배출물 발효물을 이용한 사료첨가제로서의 아미노산 소재 제품화
- 건강식품 소재 개발을 위한 기초자료의 제공

3. 연구성과 활용

- 본 과제에의 연구결과를 기초로 특허출원 및 전문학술지에의 게재를 수행하며, 사료 첨가제로서의 수산양식분야에의 이용을 적극적으로 유도
- 논문투고 (1건) : 한국어병학회지 제17권 1호, 2004
그 외 2편 준비중
- 특허등록 (1건) : 대한민국 특허 제0436223호 : 양식장 배출물을 이용한 발효액과 그 제조방법(2004년 6월 등록)

제 2 절 산업화 방안

1. 시험생산

- 100 ℓ 규모의 반복 시험생산을 통해 안정적인 생산체제를 구축
- 배출물 중 함유된 어병균의 확인 및 발효과정에서의 사멸과정을 파악
- 발효과정에서의 젖산균, 효모 등의 유용미생물수를 파악
- 발효물의 품질관리 기준 확립(pH, 미생물수 등)
- 배출물 발효산물의 경제적인 건조공정 확립

2. 배출물 수거이동

- 배출물 수거함(PP 또는 PE 재질의 밀폐형 용기; 200 ℓ 용량)과 발효미생물액(20 ℓ)을 육상수조식 양식장에 비치
- 당일 수거되는 배출물을 가능한 물기를 제거하여 배출물 수거함에 투입
- 1일 1회 미생물액을 2~3 ℓ 정도 수거함에 살포
- 수거함에 투입된 배출물은 발효가 진행되고 있으므로 부패할 가능성이 거의 없음
- 10일에 1회 정도 배출물 수거차량으로 배출물을 수거하여 본사로 이동
- 수거된 배출물은 본 발효조에서 온도 및 pH의 조절, 적정농도의 기질 첨가 등의 조건에서 발효수행

3. 현장 적용성 평가

- 양식장 배출물은 타 산업폐기물에 비해 상대적 단백질 함량이 높은 특징이 있음
- 이들 배출물의 처리는 하수처리장 또는 분뇨처리장으로의 유입이 현실적으로 어려운 상태임
- 또한, 양식장 배출물은 봄, 가을철인 경우에도 실온에서 약 2~3일이면 상당한 악취가 발생
- 하수처리장 또는 분뇨처리장에서 처리가 가능하다 하여도 수거이동 과정에서의 부패 및 발암성 물질의 발생은 작업환경의 질을 저하시키는 요인이 되며, 작업자의 작업효율이 저하될 우려가 있음
- 본 연구에서 개발된 발효처리 및 재활용 방안은 상기의 문제점을 해결하는 측면을 갖고 있음
- 또한, 양식장 배출물의 현장 보존, 수거 및 처리가 용이하도록 현장에서 발효를 개시함으로써 보존, 수거, 이동에 따른 부패를 방지하고, 본 발효의 기간을 단축시킴
- 본 연구에서 개발된 기술의 현장적용성은 여러 측면에서 매우 탁월함

4. 경제성 평가

- 사료첨가제로서의 원가계산

(단위 : 원)

| 구 분 | | 금 액 | 비 고 |
|----------------|-----|--------|--|
| 원료수거비용(/50 Kg) | | 10,000 | 양식장배출물 배출물 발효물 분말 50 Kg 제조(부형제 포함;포장제외) |
| 발효 | | 15,250 | |
| 농축 | | 7,000 | |
| 건조비 | | 13,000 | |
| 부재료 | | 4,000 | |
| 재 료 비 소 계 | | 49,250 | |
| 노무비.경비 | 노무비 | 3,345 | 단위제조원가: 1351.6원/Kg |
| | 경비 | 8,980 | |
| 소 계 | | 12,325 | |
| 제 조 원 가 | | 61,575 | |
| 일반관리비 및 판매비 | | 6,005 | |
| 총 원 가 | | 67,580 | |

- 기존 사료첨가제(소화제 등)의 판매가 5,000원/Kg과 비교하여 본 제품의 제조원가는 경제적으로 적정하다고 판단
- 본 사업의 산업화와 관련한 초기 시설비의 부담이 있으나, 본 사업을 수행할 예정

인 (주)대우환경산업은 사료제조업도 수행하고 있는 업체로서 초기 자본이 상대적으로 적게 들 것으로 예상됨

- 배출물 발효물의 제조원가는 약 1,350원/kg으로서 이윤 30%를 고려하여도 최종 판매가는 타 제품 등의 판매가격과 비교하여도 우수하므로 마케팅 전략수립에 유리하다고 판단
- 배출물 보존과 관련한 문제점이 해결되었기 때문에 추가적인 잠재비용 발생가능성이 적어지고, 사업화의 장점이 부각됨
- 현실적으로 계상되기 어려운 연안해양오염 저하에 따른 경제적 이익, 양식수의 청정화 기여에 대한 양식생물의 건강도 증진 등과 관련한 경제적 이익 등은 사회적 측면에서 중요하다고 판단

5. 기술이전 및 사업화

- 파일럿 수준에서부터 (주)대우환경산업과 공동으로 수행
- 생산체제를 구축하고, 제품의 품질기준 등이 설정되면 본격적인 기술이전 계약을 체결할 예정
- 세부적인 내용(기술이전료 등)은 추후 협의할 예정임
- 본 연구사업의 성과를 지자체 수산관련 정책수립의 기초자료로 제공
- 각 양식장에서 책임감을 갖고 배출물 관리를 실시하는 것이 본 연구개발의 산업화에 중요한 단계가 됨
- 따라서, 지자체의 해당 부서를 통해 적극적으로 홍보, 계몽활동을 펴나가는 것도 중요하게 됨
- 본격적인 제품생산은 향후 1~2년 정도면 수행될 것으로 판단
- 향후 배출물 발효물은 사료첨가제 뿐만 아니라 기능성 비료 등의 제품으로서도 개발될 예정임

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

국내외에 걸쳐 육상수조식 양식장 배출물을 처리 또는 사료첨가제로서 재활용하고자 하는 연구는 그다지 많지 않은 실정이다. 제주처럼 육상수조식 양식산업이 발달한 지역도 매우 드문 편이며, 본 연구에서 개발된 기술은 실로 많은 분야에 응용 가능한 것으로 판단되고 있다.

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

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

병원균 검사를 실시한 결과 양어장 배출물을 SS 한천배지에서 H₂S 생성으로 검은색 집락을 형성한 미생물이 검출되었다. BHI 한천배지에서 배양한 실험구에서도 연쇄구균 형태를 갖는 미생물이 검출되었다. 양어장 배출물을 발효한 실험구에서는 어떠한 병원균도 발견되지 않았는데, 발효과정에서 접종된 젖산균과 효모의 우선 증식으로 상대적으로 수가 적은 병원균의 성장을 억제하여 결국 소멸되었을 것이라 생각된다. 생균제를 이용한 어류의 질병억제 및 건강도 향상에 관한 연구로써 젖산균을 대서양 대구의 사료에 첨가하여 공급하였을 때 젖산균이 장내에서 우선적으로 콜로니를 형성하게 되면 다른 유해 미생물의 증식을 억제하는 결과 (Gildberg and Mikkelsen, 1998)와 유사하였다. 젖산균, 효모 등은 혐기 또는 미호기 조건에서 다양한 유기물을 이용, 증식이 가능하므로 양식 및 축산사료의 첨가제, 유기질 비료의 기능개선제, 수소생산 및 폐수처리등에 광범위하게 이용되고 있으며, 광합성세균은 폐수처리에 이용할 경우 고

농도 폐수 및 유해물질의 처리가 가능하다는 장점을 갖고 있다 (Sasaki et al., 1985). 이와 같은 결과들은 배출물을 유용미생물을 이용하여 발효했을 때, 발효물의 안전성을 확인할 수 있는 중요한 지표로 사용될 수 있을 것이라 생각된다.

제주도에서 생산되는 감귤은 각종 유기산, 비타민, 베타카로틴, 플라보노이드 등 기능이 높은 영양물질을 함유하고 있다. 감귤에 함유된 플라보노이드와 비타민 E 등은 항산화 활성을 높이는데 효과적으로 작용하였다 (Moon et al., 2000; Kim et al., 2001; Kim and Kim, 2003). 이와 같은 결과는 감귤발효액을 넙치 사료에 첨가하여 공급하였을 때 성장을 향상시킨 결과 (Song et al., 2002)와 유사하였다. 배출물 발효를 통한 단백질 등 영양적 성분들과 감귤이 함유하고 있는 유기산, 비타민, 카로티노이드 등 기능성 물질들과 젖산균, 효모 등 유용미생물을 어류가 복합적으로 이용하였기 때문이라 생각된다.

어류의 성장을 위한 사료 첨가제에 대한 연구들로는 은어 자어의 미립자 사료에 효모, *Kluyveromyces fragills*을 5% 첨가하여 실험 7주 후 은어의 성장과 생존률 그리고 증중률에서 대조구에 비하여 유의한 차이를 보였고 (Lee et al., 2000), 지질 및 한방제 첨가가 돌돔의 성장을 향상시켰던 결과 (Kim et al., 2003)는 이 연구의 2차 실험과 유사한 경향을 보였다. 그리고 사료효율 및 어류의 건강을 향상시키기 위한 사료첨가제로써 한약재 및 키토산, 미역, 클로렐라 등을 각각 넙치와 참돔, *Pagrus major* 등의 사료에 첨가하여 공급하였을 때 성장 및 사료효율을 향상시키는 연구 (Nakagawa and Kasahara, 1986; Yone et al., 1986; Nematipour et al., 1988)들이 활발히 진행되고 있다.

어류의 배상세포는 종에 따라 식도에서부터 후장의 말단부까지 분포하고 있다 (Tibbetts, 1997). 배상세포는 소화관의 점막주름에 분포하며 점액을 분비하는데, 점액세포에서 분비된 점액은 어류의 사료와 같은 미립자와 흡착, 미립자를 운반하며 동시에 물을 수용하는 역할을 한다 (Hafez, 1977). 또한 점액은 소화관 표면에 윤활작용을 하여 음식물을 식도에서 위로 그리고 장으로의 이동을 용이하게 하며 외막을 보호하고 소화시에 일어날 수 있는 화학적인 손상과 소화효소에 의한 장관벽의 손상 그리고 방대한 양의 음식물을 받아들여 소화관으로 원활하게 소통할 수 있게 해준다 (Reifel and Travill, 1979; Jo et al., 1984; Allen et al., 1986). 물질공급에 따른 장내 배상세포의 변화에 관한 연구로 흰쥐 장내 배상세포에 미치는 영향 (Jo et al., 1994)과 흰쥐 십이지장 점액질에 미치는 gramoxone 독성 및 비타민 C의 완화효과를 조사하였을 때

독성물질 단독 처리 실험구에서는 배상세포 수가 줄어들었으나, 비타민 C와 혼합처리 한 실험구에서는 배상세포 수의 감소를 완화 시켰다 (Jo et al., 1994). 그리고 감귤을 이용한 넙치실험에서 감귤발효액을 섭취한 넙치의 전장과 중장에 존재하는 배상세포를 관찰한 결과 배상세포 수가 대조구보다 유의하게 증가하였다 (Song et al., 2002). 이 연구에서 배상세포 수는 전장과 중장 모두에서 유사하게 분포하였다. 배상세포의 분포는 모든 실험구에서 전장보다 중장으로 갈수록 점차 많아지는 경향을 보였고, 이것은 점막주름이 발달과 관련이 있다 (Kim et al., 2004). 넙치는 전장에서보다 중장에서 점막주름이 잘 발달되어 중장에서 높은 효율의 소화 작용을 하는 것으로 사료된다.

어류의 혈액은 어류의 건강을 간접적으로 확인할 수 있는 중요한 요소로 활용되고 있다. 어류가 스트레스를 받으면 혈액 구성이 변동된다. 그러므로 스트레스에 인한 어류의 혈액학적인 변수 (haematological parameters)에 대한 연구는 어류의 성장과 생리적 안정성 등에 밀접한 관련이 있다 (Chandraseker and Jayabalan, 1993). 급격한 수온변화 스트레스에 관한 생리학적 연구에서 수온을 30°C, 25°C, 15°C로 급격하게 낮추었을 때, RBC와 Ht의 수치가 현저하게 감소하는데, 이와 같은 결과는 환경적 스트레스가 어류의 생리적 변화에 영향을 주기 때문이다 (Yang and Yeo, 2004). 양어장 배출물 발효물의 사료첨가 실험에서 발효물을 농도별로 처리하였을 때, 실험구와 대조구 간 혈액성상의 차이는 없었다 (Kang et al., 2004).

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

어류의 total protein은 스트레스 등으로 어류내 조직이 손상되게 되면 농도가 감소하며, 그 원인중의 하나는 장관 손상에 따른 흡수장애를 들 수 있다 (Mayer, 1985; Yamawaki et al., 1986; Khattak and Hafeez, 1996). Glucose는 외인성 화합물질과 같은 외부 환경요인 (독성물질)에 의하여 증가하는 경향을 나타내는데, 이것은 아드레날린 과분비에 의한 과혈당 조건을 유발할 수 있으며 체내 glycogen을 분해하여 혈장 glucose가 증가하게 된다 (Gupta, 1974).

어류의 혈청 효소활성 중 혈장 전이효소인 GOT 및 GPT 활성은 스트레스와 급격한 운동에 의한 간, 심장 및 근육 등의 조직 손상의 지표로 사용되기 때문에 어류의 환경성 질병 진단에 이용되고 있다 (Sakamoto and Yone, 1978; Shich, 1978; Smith and Ramos, 1980). 일반적으로 스트레스 등에 의해 증가하는 경향을 나타낸다 (Casillas and Ames, 1985; Rao et al., 1990). 이와같이 배출물 발효물을 어류사료에 첨가하여 공급하였을 때, 성장과 건강도 향상에 도움을 주었다고 생각된다.

본 연구에서는 양어장에서 배출되는 배출물은 발효함으로써 배출물의 물리화학적 성분 변화와 젖산균과 효모 등 미생물의 배양기질로 이용이 가능하였다. 발효물의 어류사료 첨가제로 이용하기 위한 안전성 검사로 실시한 어병균검사서 발효물은 병원성 미생물의 증식을 억제하였고, 어류에 공급하여 성장과 건강도 향상에 도움을 주었다. 이러한 결과들은 양어장 배출물 발효물이 어류사료 첨가제로 활용할 수 있다는 중요한 기초자료로 제시되었다.

제 7 장 참고문헌

- Allen, A., D. A. Hutton, A. J. Leonard, J. P. Pearson and L. A. Sellers. 1986. The role of mucus in the protection of the gastroduodenal mucosa. *Scand J. Gastroenterol*, 21(suppl. 125), 7-77.
- Asano, H., H. Myoga, M. Asano and M. Toyao, 1992. A study of nitrification utilizing whole microorganisms immobilized by the PVA-freezing method. *Water Sci. Tech.*, 26, 1037-1046.
- Bell, J. G., J. W. Andron, C. B. Cowey. 1986. Effect of selenium deficiency on hydroperoxide-stimulated release of glutathione from isolated perfused liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*), *Br. J. Nutr.* 56, 421-428.
- Beutler, E. 1984. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*, 2nd reprint. New York, Grune and Starton, 133 pp.
- Boonyaratpalin M., P. Suraneiranat and T. Tumpibal. 1998. Replacement of fish meal with various types of soybean products in diets for the Asian seabass, *Lates calcarifer*. *Aquaculture*, 161, 67-78.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Casillas, E. and W. Ames. 1985. Serum chemistry of diseased English sole, *Parophrys vetulus* Girard, from polluted areas of Puget Sound, Washington. *J. Fish Dis.*, 8, 437~449.
- Chandrasekar, S. and N. Jayabalan. 1993. Hematological responses of the common carp, *Cyprinus carpio* L. exposed to the pesticide endosulfan. *Asian Fish. Sci.*, 6(3), 331-340.
- Gildberg, A. and H. Mikkelsen. 1998. Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with *vibrio anguillarum*. *Aquaculture*, 167, 103-113.

- Glencross, B., D. Evans, W. Hawkins and B. Jones. 2004. Evaluation of dietary inclusion of yellow lupin (*Lupinus luteus*) kernel meal on the growth, feed utilisation and tissue histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 235, 411-422.
- Gómez-Requeni, P., M. Mingarro, J. A. Calduch-Giner, F. Médale, S. A. M. Martin, D. F. Houlihan, S. Kaushik and J. Pérez-Sánchez. 2004. Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 232, 493-510.
- Gupta, P. K. 1974. Malathion induced biochemical changes in rats. *Acta Pharmac. Tox.*, 35, 191-194.
- Hafez, E. S. E. 1977. Functional anatomy of mucus secreting cell. In mucus in health and disease (Elstein, M. and Parke, D. V., eds), New York : Plenum Press. pp. 19-38.
- Jang, S. I., J. Y. Jo and J. S. Lee. 1992. Effects of vitamins and glycyrrhizin added to oxidized diets on the growth and on the resistance to *Edwardsiella* infection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, *J. Aquaculture*, 5, 143-155.
- Jo, U. B., B. S. Kim, I. J. Chai, S. Y. Back and I. S. Shin. 1984. Histochemical properties of mucosubstances on the intestinal mucosa cell in the teleosts. *J. Sci.*, Pusan National Uni., 37, 317-327. (in Korean)
- Jo, U. B., S. R. Kim and B. T. Choi. 1994. Alleviating effects of Vitamin C on the Gramoxone Toxicity in the mucosubstance of rat duodenum. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 23(3), 387-395. (in Korean)
- Kang, J. C., J. H. Jee, S. Y. Song, S. W. Moon, J. W. Kang, Y. D. Lee and S. J. Kim. 2004. Effects of oral administration with fermented product from sewage in land-based seawater fish farm on haematological factors of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.*, 17(1), 57-66. (in Korean)
- Kang, J. C., Osamu M. and Norifumi I. 1995. Effects of hypoxia and hydrogen sulfide on survival of the prawn *Macrobrachium nipponense* in Lake Kojima,

- Japan. The Jap. Soc. Fish. Sci., 61(6), 821-826.
- Kang, J. C., S. I. Park and S. G. Kim. 1999. The development of filter for environmental improvement in land based seawater fish farm. III. Purification efficiency of rearing seawater by screen filter and ultraviolet. J. Korean Fish. Soc., 32(4), 501-506. (in Korean)
- Khattak, I. U. D. and Hafeez, M. A. 1996. Effect of malathion on blood parameters of the fish, *Cyprinion watsoni*. Pak. J. Zool., 28, 45-49.
- Kikuchi K. 1999. Use of defatted soybean meal as a substitute for fish meal in diets of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture, 179, 3-11.
- Kim, C. H. and P. Chin. 1995. The effect of dietary energy/protein ratio on oxygen consumption, ammonia nitrogen excretion and body composition in juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli*. J. Korean Fish. Soc., 28(4), 412-420. (in Korean)
- Kim, D. S., J. H. Kim, C. H. Jeong, S. Y. Lee, S. M. Lee and Y. B. Moon. 1998a. Optimum dietary protein and lipid levels on growth in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). J. Aquacult., 11, 1-10. (in Korean)
- Kim, J. H. and M. K. Kim. 2003. Effect of different part mandarin intake on antioxidative capacity in 15-month-old rats. Korean Nutr. Soc., 36(6), 559-569. (in Korean)
- Kim, J. H., S. M. Lee, J. M. Baek, J. K. Cho and D. S. Kim. 2003. Effect of dietary lipid level and herb mixture on growth of parrot fish, *Oplegnathus fasciatus*. J. Kor. Fish. Soc., 36(2), 113-119. (in Korean)
- Kim, J. H., Y. B. Moon, C. H. Jeong and D. S. Kim. 2000b. Utilization of dietary herb Obosan III. Growth of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Aquaculture, 13, 231-238. (in Korean)
- Kim, J. K. 1999. Characterization of denitrifying photosynthetic bacteria isolated from photosynthetic sludge. Aquacultural Engineering. 19, 179-193.
- Kim, J. W., S. M. Choi, H. J. Baek and S. C. Bai. 2004. The morphological structure and histochemical features of the alimentary tract in parrot fish, *Oplegnathus fasciatus*. J. of Aquaculture. 17(3), 215-220. (in Korean)

- Kim, S. G., J. C. Kang and S. I. Park. 1998b. The development of filter for environmental improvement in land based seawater fish farm I. Development of screen and drum filter. J. Korean Fish. Soc., 31(6), 908-313. (in Korean)
- Kim, S. K. Kim, J. K. Seo, J. S. Lee, I. S. Kong and K. H. Suh. 1997. Immobilization of nitrifier consortium for the removal of ammonium ion in the recirculating aquaculture system. J. Kor. Fish Soci., 30(5), 816-822. (in Korean)
- Kim, S. K., I. S. Kong, J. K. Seo, B. J. Kim, M. G. Lee and K. H. Suh. 1997. Removal of total ammonia-nitrogen(TAN) using immobilized nitrifier consortium. Kor. J. Biotechnol. Bioeng. 12(5), 543-549.
- Kim, S. K. Kim, J. K. Seo, J. S. Lee, I. S. Kong and K. H. Suh. 1997. Immobilization of nitrifier consortium for the removal of ammonium ion in the recirculating aquaculture system. J. Kor. Fish Soci. 30(5), 816-822.
- Kim, S. M., Y. S. Cho and S. K. Sung. 2001. The antioxidant and nitrite scavenging ability of waste resource (crab shell, sesame meal, Korean tangrin peel) extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 30(4), 589-593. (in Korean)
- Kim, Y. S., B. S. Kim, T. S. Moon and S. M. Lee. 2000a. Utilization of defatted soybean meal as a substitute for fish meal in the diet of juvenile flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Korean Fish. Soc., 33(5), 469-474. (in Korean)
- Kobayashi, M. 1972. Utilization of photosynthetic bacteria. Proc. IV. Internal. Ferment. Sympo., 527-531.
- Kobayashi, M. and K. Fujii. 1979. Studies on photosynthetic bacteria in red tide. Bull. Japan Soc. Sci. Fish., 45, 849-855.
- Kobayashi, M. and S. Kurata. 1978. Mass culture and cell utilization of photosynthetic bacteria. Process Biochemistry, 13, 27-29.
- Koh, S. C., Y. C. Song and I. S. Kim. 1997. Efficient treatment of food wastes by EM (Effective Microorganisms) and their recycling. J. Korea Solid Wastes Engineering Society, 14(7), 729-740. (in Korean)
- Kouka, P. J. and C. R. Engle. 1996. Economic implications of treating effluents from catfish production. Aquacultural Engineering, 15(4), 273-290

- Lee, J. Y., Y. J. Kang, S. M. Lee and I. B. Kim. 1993. Protein requirement of the Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. J. Aquacult., 6(1), 13-27. (in Korean)
- Lee, K. H., Y. S. Lee, J. H. Kim and D. S. Kim. 1998. Utilization of Obosan (dietary herbs) II. Muscle quality of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed with diet containing Obosan. J. Aquacult., 11, 319-325. (in Korean)
- Lee, S. M. and J. H. Yoo. 1996. Evaluation of cotton seed meal or rapeseed meal as a partial substitute for meal in formulated diets for Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*). Kor. J. Anim. Nutr. Feed., 20(2), 128-135. (in Korean)
- Lee, S. M., D. J. Kim, K. D. Kim, J. K. Kim and J. H. Lee. 2000. Growth and body composition of larval ayu (*Plecoglossus altivelis*) fed the micro-diets containing *Kluyveromyces fragilis* and *Candida utilis*. J. Korean Fish. Soc., 33(1), 20-24. (in Korean)
- Livingstone, D.R. 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. Comp. Biochem. Physiol. A 120, 43 - 49.
- Lovell, T. 1989. Nutrition and feeding of fish. Auburn University, New York, 260pp.
- Mayer, K. S., F. L. Mayer and A. Witt. 1985. Waste transformer oil and PCB toxicity to rainbow trout. Am. Fish. Soc., 114, 869-886.
- Moon, S. W., Y. D. Lee, J. B. Lee and Y. B. Go. 2000. Antioxidant characteristics of EM-Fermented orange as an additive in fish feed. Bull. Mar. Res. Inst. Cheju Nat. Univ., 24, 49-54. (in Korean)
- Moon, S. W., J. B. Lee, Y. D. Lee, S. J. Kim, B. J. Kang and Y. B. Go. 2002. Recycling marine fish farm effluent by microorganisms. J. of Aquaculture, 15(4), 261-266. (in Korean)
- Myoga, H., H. Asano, Y. Nomura and H. Yoshida. 1991. Effect of immobilization on nitrification treatability of entrapped cell reactors using the PVA freezing method. Water Sci. Tech., 23, 1117-1124.
- Nakagawa, H. and S. Kasahara. 1986. Effect of Ulva-meal supplement to diet on the

- lipid metabolism of red sea bream. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 52, 1887-1893.
- Nematipour, G. R., H. Nakagawa, S. Kasahara and S. Ohya. 1988. Effect of dietary lipid level and Chlorella-extract on ayu. Nippon Suisan Gakkaishi, 54, 1395-1400.
- Nordvag, L. and T. Johansson. 2001. The effects of fish farm effluents on the water quality in the Aland archipelago, Baltic Sea. Aquacultural Engineering, 25(4), 253-279.
- Payne, J. F., Fancey, L. L., Rahimtula, A. D., Porter, E. L. 1987. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. Comp. Biochem. Physiol. C 86, 233 - 245.
- Radi, A. A. R., Hai, D. Q., Matkovics, B., Gabrielak, T. 1985. Comparative antioxidant enzyme study in fresh water fish with different types of feeding behavior. Comp. Biochem. Physiol. C 81, 395 - 399.
- Rao, P. P., K. V. Joseph and K. J. Rao. 1990. Histopathological and biochemical changes in the liver of a fresh water fish exposed to heptachlor. J. Nat. Conserv., 2, 133-137.
- Regost, C., J. Arzel and S. J. Kaushik. 1999. Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*). Aquaculture, 180, 99-177.
- Reifel C. W. and A. A. Travill. 1979. Structure and carbohydrate histochemistry of the intestine in ten teleostean species. J. Morph., 162, 343-360.
- Rodriguez-Ariza, A., Dorado, G., Peinado, J., Pueyo, C., Lopez- Barea, J. 1991. Biochemical effects of environmental pollution in fishes from Spanish South-Atlantic littoral. Biochem. Soc. Trans., 19, 301S.
- Ryu, J. S., J. K. Leem and J. Y. Lee. 1998. The swine wastewater treatment by a phototrophic bacterium "*Phodopseudomonas capsulata*". J. of Environ. Sci., 12, 29-42. (in Korean)
- Sakamoto, S. and Y. Yone. 1978. Effect of starvation on hematological characteristics, and contents of chemical components and activities of enzymes in blood serum of red sea bream. J. Fac. Agric. Kyushu Univ., 23, 63-69.

- Sasaki, K., M. E. Hurtado, Y. Nishizawa and S. Nagai. 1985. Aerobic-heterotrophic and photoheterotrophic growth in microaerobic light chemostat cultures of *Rhodopseudomonas sphaeroides* S. H. J. Ferment Technol., 63, 377-381.
- Shich, M. S. 1978. Changes of blood enzymes in brook trout induced by infection with *Aeromonas salmonicida*. J. Fish Biol., 11, 13-18.
- Smith, A. C. and F. Ramos. 1980. Automated chemical analysis in fish health assessment. J. Fish Biol., 17, 445-450.
- Song, Y. B., S. M. Moon, S. J. Kim and Y. D. Lee. 2002. Effect of EM-fermented orange in commercial diet on growth of juvenile flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. of Aquaculture, 15(2), 103-110. (in Korean)