

발간등록번호

11-1541000-000781-01

새우 및 어류의 먹이 유인제 개발

(Development of fish and of shrimp feed attractant)

세농

해 양 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “새우와 어류의 먹이 유인제 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010 년 11 월 일

주관연구기관명 : 세 농
주관연구책임자 : 김 만 희
연 구 원 : 이 연 옥
연 구 원 : 한 일 지
연 구 원 : 김 시 문
연 구 원 : 서 선 정
위탁연구기관명 : 동의대학교
위탁연구책임자 : 한 창 희
연 구 원 : 김 광 현
연 구 원 : 배 선 혜
연 구 원 : 채 선 영
연 구 원 : 이 은 희
연 구 원 : 신 혜 윤
연 구 원 : 이 아 름

요 약 문

I. 제 목

새우와 어류의 먹이 유인제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

사료의 전환효율을 높이기 위해서는 단위시간당 많은 사료를 먹도록 유인하는 것이 가장 바람직하다고 보기 때문에 사료 섭취율을 높일 수 있는 새우의 기호성 물질을 개발하여 이를 사료에 첨가함으로써 사료 전환효율을 높이고 새우에 의한 사료의 소비가 빨리 이루어지게 되어 수질관리에도 유익하다.

본 연구에서는 양식 대상이 되는 생물들이 좋아하는 물질들을 찾고 이를 사료에 첨가하였을 때 사료 섭취율을 높여 성장촉진 및 공식 억제 기능성을 향상시키고 또한 건강한 새우를 생산하여 양식 생산성을 향상시킬 수 있는 사료 첨가제 개발하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 기호성 물질의 개발

한약제 등의 천연 식물자원으로부터 새우의 사료 효율성을 높일 수 있는 사료 첨가제를 개발하기 위해 새우의 기호성 물질을 탐색하고, 각 물질들에 대한 성장 효과와 소화효소분비 효과, 그리고 면역활성 증강 효과 등을 조사하여 우수한 사료 첨가제를 개발한다.

2. 시제품개발

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

3. 현장 적용

위의 시제품을 국내 새우양식장에서 현장실험을 통하여 본 제품의 효능과 효율성을 조사하기 위하여 국내양식장에 본 연구에서 개발한 액상 제품을 사료에 첨

가하여 성장률과 생산량을 조사하였다.

IV. 연구개발결과

1. 기호성 물질의 개발

기호성물질을 탐색하기 위해 곡류 6종, 한약재 6종, 해조류 6종 중 먹이 유인 효과가 있는 기호성 물질을 함유하고 있는 곡류에서 세 종(C2, C4, C6), 그리고 한약재에서 두 종(O3, O6)을 탐색하였다. 이들 재료들 중 기호성이 뛰어나면서 소화율이 좋은 두 종(C2, O3)을 대상 식물로 선정하였다. 또한 형광색소 중 황색 형광색소가 유의하게 유인효과를 보였다. 오징어 간유 및 내장분말은 기존사료에 들어있는 간유와 오징어 분말보다 0.5%와 1%를 더 첨가해 주어도 먹이 유인효과는 없었다.

가장 높은 기호성을 보이고 소화율도 높은 두 종 C2와 O3를 대상으로 이로부터 기능성 성분을 추출 분리하기 위해 MeOH로 추출한 후 CH₂Cl₂, EtOAc, n-BuOH, H₂O로 순차적으로 분획하여 분리한 결과, 곡류인 C2는 EtOAc 분획층에서, 그리고 한약재인 O3는 H₂O 분획층에서 가장 먹이 유인효과가 높았다.

2. 시제품 개발

C2의 EtOAc 분획층(C2-E)는 사료 1kg에 0.5g 이상 첨가하면 유의한 먹이 유인효과가 있었으며 6g을 첨가하였을 때까지 동일한 먹이 유인효과를 보였다. 반면 그러나 O3의 H₂O 분획층(O3-W)에서는 사료 1kg에 1g~2g을 첨가하였을 때는 유의한 먹이 유인효과를 보였으나 3g 이상에서는 오히려 먹이 유인효과가 없었다.

C2와 O3를 7:3, 5:5 그리고 3:7로 배합하여 70% EtOH로 추출하여 사료 1kg에 1g씩 첨가하였을 때 배합 비율에 따른 먹이유인효과의 차이는 없었으며, 재료의 가격, 추출량 그리고 적정농도를 고려하여 C2와 O3의 배합비율을 7:3으로 하였다.

C2와 O3의 배합비율을 7:3으로 한 재료로부터 EtOH의 농도를 100%, 70%, 40%의 농도 비율로 추출하여 사료 1kg에 1g씩 첨가하였을 때 70%의 EtOH로 추출하였을 때가 가장 먹이 유인효과가 좋았다.

C2와 O3를 7:3으로 배합한 재료를 70% EtOH로 추출하였을 때 433nm에서 최대 흡광도를 가졌으며 430nm에서 흡광도가 0.9일 때 추출액 1L를 농축하여 건조하였을 때 건 중량은 6.09g이었다. 430nm에서 흡광도가 0.9일 때 추출액을 사

료첨가제 제품(SP10)으로 하였다.

사료 1kg당 SP10 500mL이상 첨가하였을 때 먹이 유인효과, 소화효율, 공식억제 효과 등을 조사한 결과 일반사료를 투여하였을 때 보다 유의하게 높은 결과를 얻을 수 있었다.

3. 현장 적용

전남 영광군에 위치한 A물산의 수 면적 300m², 수량 300톤 규모의 Zero-exchange system으로 운영되는 시설 2개에서 현장 적용 실험을 하였다. 140일째 SP10 첨가사료를 투여한 호지에서 평균 체중 19.55±0.67g으로 성장하여 출하하였다. 그러나 일반사료를 투여한 대조 실험 호지에서는 평균 체중이 13.508±0.814g이 되어 1개월 이상 더 양성해야 20g 전후가 되어 출하할 수 있을 것으로 보인다. 이때 SP10 첨가사료를 투여한 호지에서의 총 사료 투여량은 2,679.8kg이었으며, 새우의 생산량은 2.2톤으로 나타나 FCR은 1.22로 나타났다. 반면 일반사료를 투여한 호지에서의 FCR은 1.47로 추정할 수 있었다.

SP10이 어류에 대해서도 유의한 먹이 섭취효과와 성장효과를 조피볼락에 대해 조사한 결과 어류에서는 새우와 같이 유의한 효과는 얻을 수 없었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

- 새우의 먹이유인효과를 보이는 식물 재료 5종을 탐색하였다.
- 황색 형광색소도 새우의 유인효과를 나타내고 있음을 알았다.
- 먹이 유인효과, 소화효율 등에서 가장 좋은 곡류의 한 종(C2)와 한약재 한 종(O3)을 선정하였으며, C2는 EtOAc 분획 층에, O3는 H₂O 분획층에 먹이 유인효과를 나타내는 물질이 함유되어 있음을 밝혔다.
- C2와 O3의 배합은 7:3으로, 추출용매는 70% EtOH로 추출한 사료 첨가제 SP10를 사료에 0.3g/kg이 되도록 첨가한 사료를 투여하여 양식을 하였을 때 사육기간의 단축 및 우수한 사료전환효율을 보였다.

2. 활용계획

- 실용화 및 산업화 계획

사료유인 효과 증대에 의한 성장 촉진을 도모할 수 있는 새우 사료 첨가제에 대한 제품을 생산할 계획임

- 특허 등 지식재산권 확보 계획

본 기술을 정리하여 특허 출원 및 학술지에 발표할 계획임

Contents

Chapter 1. Outline of research and development project	11
Chapter 2. The present state of study in home and abroad	14
Chapter 3. Contents and results	17
Section 1. Aim of research	17
Section 2. Result of development contents	18
1. Development of favorite substances	18
A. Screening of favorite substances	18
(1) Selection of plants and materials	18
a. Selection of plants	18
b. Selection of some other materials	18
(2) Rearing apparatus and experiments	19
(3) Effects on feed attraction	20
a. Effects of plants on feed attraction	20
b. Effects of extractions on growth	24
c. Effects of extractions on digestive promotion	25
d. Effects of some other materials on feed attraction	26
B. Partial purification of favorite substances	29
(1) Effects of C2 on feed attraction	29
(2) Feed safety of C2 and O3	30
(3) Partial purification of functional substances	31
(4) Effects of purified fractions on feed attraction	33
2. Development of feed additive product	35

A.	Effects on feed attraction with concentration of each fraction	35
B.	Effects on feed attraction with mixing ratio of EtOAc fraction of C2(C2-E) and H ₂ O fraction of O3(O3-W)	37
C.	Production of feed additive	39
(1)	Optimum component of materials (C2 and O3)	39
(2)	Condition of extraction solvent	39
(3)	Standardization of product	40
D.	Properties of feed additive product(SP10)	42
(1)	Optimum concentration on feed attraction	42
(2)	Digestive efficiency	43
(3)	Effects on suppression of cannibalism	48
2.	Field application	50
A.	Culture equipment	50
B.	Changes of water quality	52
C.	Cultivation and production	54
D.	Analysis of productivity	58
E.	Application in a fish	59
Chapter 4.	Attainability of a goal and degree of contribution in relevant field study	62
Chapter 5.	Results of study, application plan of results and expectancy	63
Chapter 6.	Collected Information of overseas scientific technique in process of developmental study	64
Chapter 7.	References	65

목 차

제 출 문	1
요 약 문	2
제 1 장 연구개발과제의 개요	11
제 2 장 국내외 기술개발 현황	14
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	17
제 1 절 기술개발 목표 및 세부 내용	17
제 2 절 세부 개발 내용	18
1. 기호성 물질의 개발	18
가. 기호성 물질 탐색	18
(1) 대상 식물 및 물질의 선정	18
(가) 식물의 선정	18
(나) 기타 물질의 선정	18
(2) 사육장치 및 실험	19
(3) 먹이 유인 및 성장 효과	20
(가) 천연 식물에 대한 먹이 유인효과	20
(나) 식물 추출물에 대한 성장 효과	24
(다) 식물 추출물에 대한 소화 촉진 효과	25
(라) 기타물질들에 대한 먹이 유인효과	26
나. 기호성물질의 분리	29
(1) C2의 먹이 유인 효과	29
(2) C2와 O3의 안전성	30

(3) 기능성 물질의 분리	31
(4) 분리된 분획물의 먹이 유인 효과	33
2. 시제품 개발	35
가. 분획층의 농도에 따른 먹이 유인 효과	35
나. C2의 EtOAc 분획층(C2-E)과 O3의 H ₂ O 분획층(O3-W)의 배합 비율에 따른 먹이 유인 효과	37
다. 첨가제의 제조	39
(1) 첨가제 재료의 적정구성 비율	39
(2) 추출 용매의 조건	39
(3) 첨가제의 표준화	40
라. 첨가제(SP10)의 특성	42
(1) 먹이 유인 적정 농도	42
(2) 소화율	43
(3) 공식(cannibalism) 억제 효과	48
3. 현장 적용	50
가. 새우 양식 시설 및 사육	50
나. 수질의 변화	52
다. 양성과 생산	54
라. 생산성 분석	58
마. 어류에 대한 적용	59
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	62
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 기대효과	63

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	64
제 7 장 참고문헌	65

제 1 장 연구개발과제의 개요

새우는 종교, 인종 국가에 관계없이 전 세계인들이 좋아하는 식품대상 종으로서 톤당 10,000-15,000불에 이르는 세계적으로 높은 고부가 수산물종의 하나이다. 1970년대부터 새우 양식산업이 발달하면서 세계의 새우양식 총생산량은 1994년에 약 88만톤, 1996년에 92만톤, 1998년에 100톤, 2000년에 114만톤으로 매년 증가하여 2002년도에는 148만톤에 이르고 있다(Briggs et al., 2004). 이러한 생산량 중 태국, 중국, 인도네시아, 인도 등 아시아 지역의 생산량이 2002년도에 109만톤으로 전 세계생산량의 약 74%를 차지하고 있으며, 이들 나라에서 새우류의 양식은 가장 고부가가치의 중요한 양식 산업으로 국가적인 차원에서 적극적으로 지원하고 있다.

우리나라의 새우 양식은 초기에는 보리새우(*kuruma shrimp*, *Marsupenaeus japonicus*)와 대하(*fleshy shrimp*, *Fenneropenaeus chinensis*)를 대상으로 양식을 해왔다. 보리새우는 1985년에 44톤, 1990년에 55톤, 1994년에 58톤을 생산하였으나 서식 습성이 저질 잠입형으로 대하에 비해 저질관리 등 양식방법의 어려움으로 1999년에는 35톤이하로 생산량이 감소하면서 그 이후는 거의 양식을 하지 않았다. 그러나 대하는 유영형으로 보리새우에 비해 양식장 저질관리의 필요성이 덜하기 때문에 1985년 39톤에서 1990년에 257톤, 그리고 1994년에 517톤을 생산하여 매년 증가추세에 있었으며 1997년에는 1,533톤으로 생산량은 계속 상승하였다. 그 후 바이러스에 의한 피해가 나타나기 시작하면서 1998년에는 998톤을, 1999년에는 1,142톤을 생산하였다 (해양수산통계연보, 2000). 2004년까지 대하의 생산량이 조금씩 증가하여 2,426톤까지 증가하였으나 2005년 바이러스 등의 질병에 의한 피해로 1,399톤으로 감소하였고, 이를 대체할 수 있는 품종으로 바이러스나 기타 질병에 강하다는 흰다리새우(*white lege shrimp*, *Litopenaeus vannamei*)을 2003년 국립수산물과학원에서 미국 화와이로부터 처음으로 도입되면서 이를 개기로 2006년에는 대하가 1,022톤으로 감소한 반면 흰다리새우가 661톤을 생산하였다. 그 후로 우리나라의 새우양식 대상 종은 대하에서 흰다리새우로 바뀌면서 2008년에는 대하의 생산량이 130톤에 비해 흰다리새우는 1,794톤에 이르렀다(농림수산식품부, 2009). 그러나 바이러스 질병에 의한 새우의 대량폐사를 막고 국내 새우 생산량의 증대를 위해 도입된 흰다리새우도 흰반점증후군(WSSD, white spot syndrome

disease)에 의한 대량 폐사는 막지를 못하고 있다.

바이러스나 기타 질병의 감염은 사육수의 교환을 통해 이루어지고 (Brock et al., 1997; Flegel et al., 1997; Lotz and Lightner, 2000), 바이러스는 수직 또는 수평적으로 일어난다고 알려져 있어(Lo et al., 1996; Chang et al., 1998), 바이러스 감염에 의한 질병으로부터 피해를 최소화 할 수 있는 사육방법의 하나로 최근에는 새우 치하의 입식에서 생산될 때까지 사육수를 교환하지 않은 무환수사육법 (zero-water-exchange culture system, 또는 biofloc technology (BFT))이 개발되고 있다(Tacon, et al., 2002; Burford et al., 2003; Vinatea et al., 2010). 이러한 방법에서 가장 문제가 되는 것은 양식장에 투여한 잉여 사료와 새우의 배설물과 사체로부터 나오는 유기물을 어떻게 처리할 것인가에 달려있다. 이는 사육수 내에 광합성 자가영양 군집 (photoautotrophic community)보다 타가영양 (heterotrophy)하는 세균의 군집을 우점적으로 만들어 넘으로써 해결 할 수 있다 (Avinimelech, 1999; McIntosh, 1999). 일반적으로 먹이로 섭취된 사료의 36%정도가 배설물로 사육수내로 들어오고 (Brune et al., 2003), 먹이로 섭취하지 못해 사육수내에 남아있는 것이 약 75%나 된다(Piedrahita, 2003; Gutierrez-Wing and Malone, 2006). 이러한 것들이 사육수의 수질을 악화시키는 요인이 되고 이를 최소화 하는 것이 양식의 성공과 직결이 된다. 따라서 투입된 사료를 새우들이 얼마나 빨리 먹어 소비하느냐 하는 것은 사육수의 수질 악화를 막는 것이 되고 새우의 사료 전환효율을 높이는 결과를 가져올 것이다.

새우 양식 사료 전략에서 가장 중요한 요점은 사료량을 적게 주어서 많은 생산을 올리려는 것이다. 사료를 많이 주게 되면 새우에 의해 섭취되지 않은 잔류 사료에 의해 수질이 악화되기 때문에 투여한 사료에 대한 사료전환효율을 높이기 위한 최적의 방법을 찾기 위해 주로 일정한 사료의 양을 얼마나 자주 주는 것이 좋은가에 대한 적정 사료투여횟수에 대하여 연구해왔다(Sedgwick, 1979; Robertson et al., 1993; Jaime et al., 1996). 그러나 최근에는 사료투여횟수는 사료전환효율이나 성장, 수질관리에 별 관계가 없다는 연구가 발표되었다 (Velasco et al., 1999; Smith et al., 2002). Cuzon et al., (1982)은 사료의 영양가의 소실을 줄이고 생산량을 높이기 위해서는 투여한 사료가 새우에 의해 얼마나 빨리 섭취되어지는가가 가장 중요하다고 하고 있다. 이러한 연구들을 종합하면 사료의 전환효율을 높이기 위해서는 사료 투여횟수에 관계가 없으므로 단위시간당 많은 사료를 먹도록 유인하

는 것이 가장 바람직하다고 본다. 따라서 사료 섭취율을 높일 수 있는 새우의 기호성 물질을 개발하여 이를 사료에 첨가함으로써 사료 전환효율을 높이고 새우에 의한 사료의 소비가 빨리 이루어지게 되어 수질관리에도 유리하게 될 수 있다고 할 수 있다.

본 연구에서는 양식 대상이 되는 생물들이 좋아하는 물질들을 찾고 이를 사료에 첨가하였을 때 사료의 섭취율을 높이고 또한 성장에 효과적인 사료첨가제를 개발하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

새우 양식산업의 성장과 더불어 새우 양식은 점점 더 고밀도 양식으로 발전해 왔고, 이에 따라 양식장에 투여되는 사료의 양은 더 증가해 왔다 (FAO, 2000; Tacon et al., 2000). 이러한 다량의 사료 투여는 결국 많은 배설물을 생산하게 되고 이는 배출수를 통해 밖으로 배출하게 됨으로써 양식장 주변 환경에 나쁜 영향을 미치게 된다(Persson, 1991; Cho and Bureau, 2001). 사육수내에 새우가 먹지 않고 남긴 잉여 사료는 결국 양식장내의 수질을 악화시키게 되고 이로 인해 성장이 둔화되고 생존율이 떨어져 생산량이 감소하고 이로 인해 수익성이 감소하게 된다 (Wyban et al., 1989). 이렇기 때문에 새우양식장의 경제적인 수익성을 증진시키고 환경에 대한 영향력을 줄일 수 있는 최적사료투여량을 알아내고자 하는데 관심이 집중되어 왔다. 이처럼 사료는 새우 양식 산업에서 가장 중요한 부분이며, 새우 양식에서 사료의 선택이나 급이 방법은 새우의 성장을 효율적으로 도모하는데 매우 중요한 사항이다.

일반적으로 집약적인 고밀도 양식 시스템에서 총 생산비 대비 사료에 들어가는 비용이 약 50%에 이른다(Davis et al., 2006). 따라서 사료비를 절약할 수 있는 방법을 찾는 것은 새우양식 산업에 있어서 매우 중요한 요소가 된다. 새우양식의 사료는 대부분 사료회사에서 제조된 사료를 구입하여 사용하고 있으며, 사료의 가격은 매년 증가하고 있다. 이는 단백질이나 지방의 공급원인 어분이나 어유의 가격이 상승하기 때문이라고 한다. 이러한 요인 때문에 회사에서는 사료의 단백질 함량을 낮추려고 하지만 새우를 양식하고 있는 사람들은 단백질이 고농도로 함유되어 있는 사료를 선호하고 있는 실정이다. 몇몇 연구에 의하면 사료내 단백질 함량의 증가는 사료효율을 높이지만 여러 가지 상황을 고려하여 보리새우류 양식에 사료내 단백질 함량의 권장량은 30%에서 45%대가 가장 적당하다고 보고하고 있으며 (Andrews and Sick, 1972; Balaz, 1973; New, 1976; Neal, 1980; Piedad-Pascual, 1990; Akiyama et al., 1991), 사료의 지방 함량의 권장량은 성장을 위해서는 5~8% (D'Abramo, 1997)가 적당하지만, 많은 종묘를 얻기 위한 종묘생산용 사료의 경우는 11.1%가 적당하다고 보고하고 있다 (Bray et al., 1990). 단백질은 새우 성장에 가장 중요한 영양소이며 사료 제작에 있어 가장 높은 비율의 비용을 차지하고 있다 (Tacon and Akiyama, 1997). 따라서 대부분의 연구들이 새

우 양식에서 최대한 단백질의 함량을 줄일 수 있는 다양한 방안들을 제시하였으며, 콩과 같은 식물성 단백질을 사료의 원료로 사용하고자 시도하였으나 콩 단백질에는 새우의 필수아미노산의 함량이 부족하고 항영양 성분들이 있어 전적으로 콩단백질을 새우의 사료에 사용하는 것은 불가능한 것으로 알려져 있어(Ezquerria et al., 1997; Floreto et al., 2000), 가격이 비싼 해산어류나 오징어와 같은 무척추동물의 단백질이나 지방을 사용하고 있다.

양식에서 사료의 효율성을 높이기 위해서는 투여한 사료량에 대해 먹이 섭취량의 비율을 얼마나 높일 수 있도록 해야 한다. 먹이의 섭취는 여러 가지 요인에 영향을 받으며 특히 먹이 섭취횟수와 시간(Sick et al., 1973; Sedgwick, 1979), 탈피(Hill and Wassenberg, 1992), 먹이량, 먹이분포(Sick et al., 1973, Nunes and Parsons, 1999), 사료의 조성 및 기호성(Sick and Baptist, 1973; Holland and Borski, 1993), 일장기간(Reymond and Lagardère, 1990; Nunnes et al., 1996), 수질변화(Liao,1969)등의 조건에 영향을 받는다는 다양한 연구들이 있다.

일반적으로 새우류 양식에서는 먹이공급횟수를 늘리는 것이 영양의 손실을 막고 수질악화를 방지하며 새우의 성장을 증가시킨다고 하여 일일공급량을 분할하여 다회 공급하는 것이 통념으로 알려져 있다. 그러나 최근 연구에서는 먹이공급횟수가 흰다리새우의 성장에는 큰 영향을 미치지 않는다는 결과가 보고되기도 하였으며(Velasco et al., 1999), 보리새우류에 속하는 *Penaeus merguensis* (Sedgwick, 1979)와 호주산 가재의 일종인, *Cherax destructor* (Mills and McCloud, 1983)에서 먹이 섭취율이 높으면 먹이전환과 동화율이 낮고 잔류먹이뿐만 아니라 소화기 이루어지지 않은 상태에서 배설물로 배출이 된다는 기존 통념과 상반된 결과가 보고되기도 하였다. 따라서 새우의 섭취율을 높이는 효과에 있어서 먹이로 섭취한 사료들을 얼마나 효율적으로 충분히 소화시킬 수가 있는가도 중요한 요소이다.

따라서 최근의 대부분의 연구들은 새우양식장의 경제적인 수익성을 증진시키고 환경에 대한 영향력을 줄이는 방안으로 사료내의 단백질 함량을 최소로 할 수 있는 최적의 조건을 찾는데 중점을 두고 있으며, 기호성이 높은 물질을 첨가하여 사료의 섭취율을 높여 잉여 사료의 양을 최소화함과 동시에 소화율을 높여 양식방법을 효과적으로 전환하고자 하는 연구는 아직까지 찾아볼 수 없었다.

본 연구에서는 새우가 좋아하는 물질이 함유해 있는 천연 식물을 찾아내고, 이것으로부터 기호성 물질을 분리하고 그 물질의 화학적 특성을 알아내고자 한다.

그리고 분리된 기호성 물질을 첨가한 사료를 사용하여 흰다리새우 또는 대하를 대상으로 섭이효과와 더불어 성장효과 및 공식제어 효과 등을 밝혀내고, 실제 양식장을 대상으로 생산성 확대에 얼마나 기여할 수 있는지를 조사하고자 한다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 기술개발 목표 및 세부 내용

1. 최종 목표

사료 섭취율을 높여 성장촉진 및 공식 억제 기능성을 향상시키고 또한 건강한 새우를 생산하여 양식 생산성을 향상시킬 수 있는 사료 첨가제 개발하고자 한다.

2. 세부내용

가. 기호성 물질의 개발

한약제 등의 천연 식물자원으로부터 새우의 사료 효율성을 높일 수 있는 사료 첨가제를 개발하기 위해 새우의 기호성 물질을 탐색하고, 각 물질들에 대한 성장 효과와 소화효소분비 효과, 그리고 면역활성 증강 효과 등을 조사하여 우수한 사료 첨가제를 개발한다.

나. 시제품개발

위의 기능성 물질들이 함유되어있는 천연재료로부터 기능성물질을 추출 분리한 후 이들을 배합하여 사료 효율을 높이고 면역활성을 증진시킬 수 있는 사료 첨가제의 시제품을 만든다.

다. 현장실험 및 생산성 분석

위의 시제품을 국내 새우양식장에서 현장실험을 통하여 본 제품의 효능과 효율성을 조사하기 위하여 국내양식장에 본 연구에서 개발한 액상 제품을 사료에 첨가하여 성장률과 생산량을 조사하였다.

제 2 절 세부 개발 내용

1. 기호성 물질의 개발

가. 기호성물질 탐색

(1) 대상 식물 및 물질의 선정

(가) 식물의 선정

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

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

(나) 기타 물질의 선정

일반적으로 새우사료에 새우의 유인제로 널리 사용되고 있는 오징어 간유와 오

징어 내장 분말에 대해 먹이 유인효과를 조사하였다. 또한 복안을 가지는 곤충류나 갑각류들은 자외선에 대한 광수용체를 가지고 있어서 자외선에 민감하게 반응한다고 알려져 있다 (Smith et al., 1990; Goldsmith & Cronin, 1993; Cronin et al., 1994). 따라서 식물에는 flavonoid와 같은 형광을 띠는 물질들이 있어서 이들에 의한 먹이 유인효과가 있을 거라고 생각되어 형광색소에 따른 먹이 유인효과를 조사하였다. 이때 형광색소는 적색형광 염료, 청색형광 염료, 녹색형광 염료, 황색형광 염료를 구입하여 사용하였다.

(2) 사육 장치 및 사육 실험

새우에 대한 먹이 유인 효과를 가지는 물질을 탐색하기 위해 서해 갑각류 연구 센터에서 종묘 생산하여 사육중인 평균 체중 $3.0 \pm 0.2g$ 의 흰다리새우(*Penaeus vannamei*) (그림 2) 300마리를 사용하여 그림 1과 같이 0.2Ton 원형수조 20개에 나누어 수용하여 사육실험을 실시하였다. 사육 수조의 수온은 $25. \pm 0.5^{\circ}C$ 로 유지하였으며, 10일간 체중의 10%에 해당하는 사료를 급여하면서 한 마리당 일일 섭취량을 조사하였다. 사료 섭취량을 편리하게 조사하기 위해 그림 2와 같이 직경 30cm 가 되는 원형 먹이 틀을 만들고 일정량을 먹이 틀에 넣은 후 일정시간이 경과된 후 먹이 틀을 꺼내어 사료의 잔량을 회수하였다.

시험용 사료는 표1과 같은 조성에 따라 재료를 사용하여 제조하였으며 이때 단백질과 지질 그리고 회분의 조성은 각각 43.38%, 6.82% 그리고 11.3%이었다. 시험용 용도에 따라 첨가제의 첨가량에 따라 cellulose의 농도를 달리하였다. 사료의 개체별 일일 섭취량은 다음과 같은 공식에 의해 산정하였다: $FC = F_1 \times (F_0 - F_r)$ (Nunes and Parsons, 2000). FC는 하루동안 섭취된 먹이의 건중량(g)을 나타내며, F_0 는 실험구의 급여된 하루의 먹이량, F_r 은 수집된 먹이 잔류량(g)을 나타내었다. 수조 내 사료의 자연소모율 F_1 은 $F_1 = CF_r / CF_0$ 의 식으로 계산하였으며, CF_0 은 새우를 수용하지 않은 수조에 넣은 먹이의 양을 나타내며, CF_r 은 일정시간 경과 후 수조로부터 사료를 회수하였을 때 먹이의 양을 나타낸다.

사료는 P사의 대하용 pellet 사료를 사용하였으며, 시험용 첨가물을 사료에 일정량 첨가한 후 그늘에서 풍건한 후 사용하였다.

표 3. 시험용 사료의 재료와 영양분의 조성

Ingredients	Concentration (%)
Wheat flour	34.90
Hulled soybean	10.00
Corn gluten	5.00
Anchovy fish meal	35.00
Squid liver flour	5.00
CaCO ₃	1.00
Cholesterol	0.10
Shrimp meal	4.00
Soybean lecithin	1.00
Squid oil	1.00
Mineral premix ¹	1.00
Vitamin premix ¹	1.00
Cellulose ²	1.00
<i>Proximate analysis (% , DM basis)</i>	
Crude protein	43.38
Crude lipid	6.82
Crude ash	11.3

¹Premix(mg/kg): KI 250, MnSO₄*H₂O 2800, ZnSO₄*H₂O 2350, Vt K 225, Biotin(2%) 3500, Niacin 4850, Calcium pantothenate 11000, folic acid 2000, Vt-B₁ 1500, Vt-B₂ 2000, Vt-B₆ 2000, Vt-C 50000.

²Provided by Suhyup Feed Co., Kyong-Nam, Korea.

(3) 먹이 유인 및 성장 효과

(가) 천연 식물에 대한 먹이 유인효과

그림 3에서 보는바와 같이 곡류로부터 추출한 물질들은 대체적으로 새우들이 싫어하지 않은 것으로 나타났으며, 특히 C2, C4 그리고 C6를 첨가한 사료가 각각 0.22±0.02g/day, 0.24±0.03g/day 그리고 0.23±0.03g/day로 나타나 선정된 곡류 중 가장 새우들이 유의하게 좋아하는 것으로 나타났다.

그림 4는 한약재 6종에 대한 새우의 기호성을 조사한 결과로 한약재 2종을 제외하면 각 재료에 대한 기호성에 유의한 차이는 보이지 않았다. 한약재 추출물에 대해 흰다리새우에서는 사료 일일 섭취량이 O3와 O6에서 각각 0.26±0.04g/day와 0.23±0.02g/day로 다른 한약재보다 섭취량이 높게 나타나 새우들이 이들 추출물 (O3와 O6)을 좋아하는 것으로 나타났다.



그림 1. 새우에 대한 사료첨가제의 기호성 실험을 수행하는데 사용된 사육장치와 사육수조



그림 2. 기호성 실험을 위해 사육한 흰다리새우(좌측)와 사료섭취량을 조사하기 위해 제작한 먹이 틀(우측)

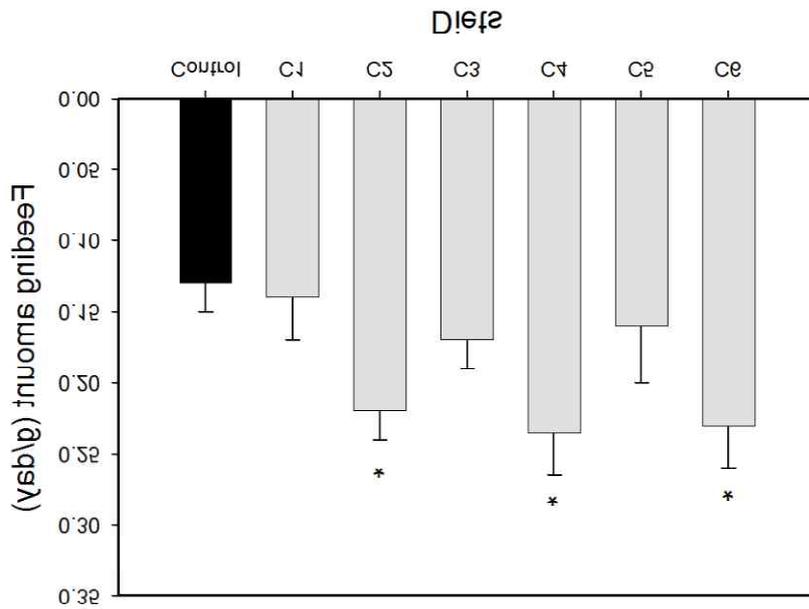


그림 3. 흰다리새우에 곡류 6종(C1, C2, C3, C4, C5, C6)의 추출물을 사료 kg당 2g을 첨가하여 급여하였을 때 개체당 일일 사료 섭취량. * 는 대조구와의 유의한 차이($p < 0.05$)를 나타냄.

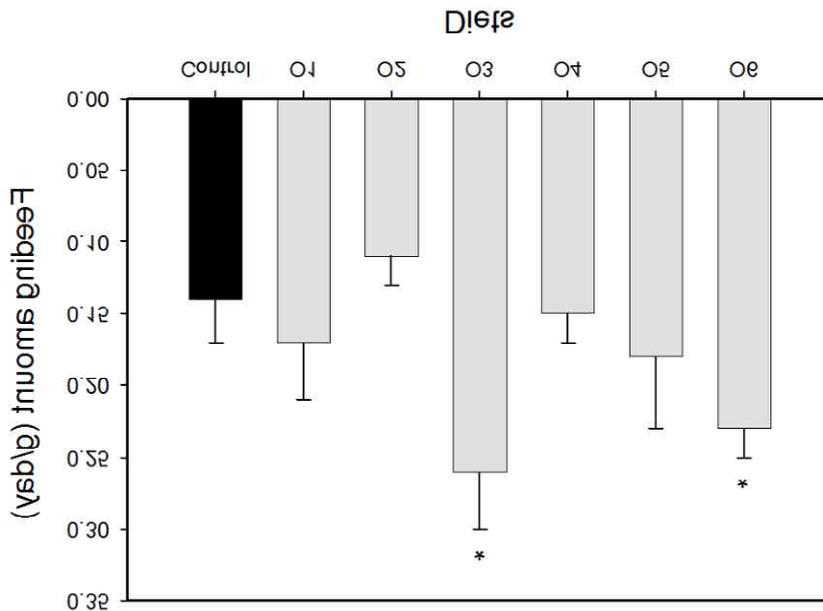


그림 4 흰다리새우에 한약재 6종 (O1, O2, O3, O4, O5, O6)의 추출물을 사료 kg당 2g을 첨가하여 급여하였을 때 개체당 일일 사료 섭취량. * 는 대조구와의 유의한 차이($p < 0.05$)를 나타냄.

한편, 그림 5에서 보는바와 같이 해조류 추출물을 첨가한 실험구들은 대조구의 사료 섭취량에 비해 유의한 차이를 보이지 않았으며, 해조류의 추출물은 새우들이 좋아하지도 싫어하지도 않은 것으로 나타났다. 해조류 중에서도 홍조류에 속하는 Pac와 Por를 첨가한 사료의 섭취율이 각각 $0.18 \pm 0.05 \text{g/day}$ 와 $0.17 \pm 0.04 \text{g/day}$ 로 나타나 다른 해조류 즉, 녹조류나 갈조류 보다 흰다리새우가 다소 좋아하는 것으로 보였으나 유의한 차이는 보이지 않았다. 이러한 결과들은 대하에서와 유사한 결과를 보여주고 있다 (한 등 2005). 따라서 기호성에는 대하나 흰다리새우 등의 양식 새우의 종류에 대한 차이는 보이지 않은 것으로 보여 모든 양식새우에도 적용이 될 것으로 보인다.

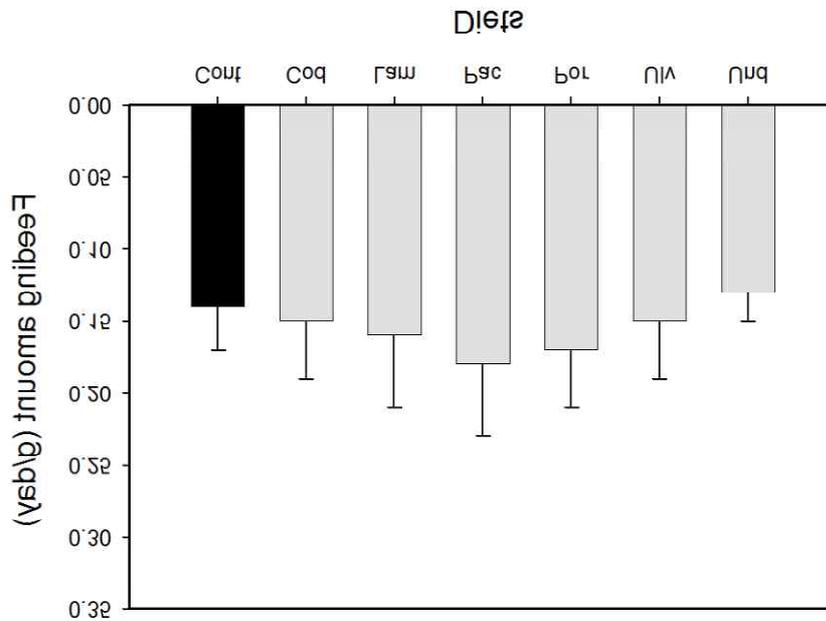


그림 5 흰다리새우에 해조류 6종 (Cod, Lam, Pac, Por, Ulv, Und)의 추출물을 사료 kg당 2g을 첨가하여 급여하였을 때 개체당 일일 사료 섭취량.

(나) 식물 추출물에 대한 성장 효과

단기간에 성장효과를 파악하기 위해 갑각류는 탈피라는 생리적인 기작을 거쳐 성장을 하기 때문에 성장 촉진에 대한 생리적인 지표를 일일 탈피 빈도(daily molt frequency)로 나타냈다. 상기의 시료들 중 가장 기호성이 좋은 한약재 O3, O6와 곡류 C2, C4, C6, 그리고 해조류 Pac에 대해 일일 탈피 빈도를 조사한 결과를 그림 6에 나타내었다.

각 실험구에 따른 탈피빈도에 유의한 차이는 보이지 않았지만 일반적으로 탈피 빈도의 변화는 사료섭취율의 변화와 동일한 경향을 보여주고 있었으며, 사료 섭취율이 가장 좋았던 한약재 O3 실험구에서 탈피빈도가 $10.2 \pm 2.7(\%)$ 로 가장 좋은 효과를 보였다. 사료 섭취율이 좋은 곡류에서도 일일 탈피빈도에서 대조구보다 높은 값을 보여주었으며, 해조류 Pac에서는 대조구와 동일한 결과를 보여 성장효과는 없는 것으로 나타났다. 이러한 경향은 일반적으로 기호성의 순으로 탈피빈도도 높게 나타났으며, 이는 기호성이 높은 물질을 사료에 첨가하여 사료를 많이 먹게 하면 성장에도 좋은 효과를 얻을 수 있다는 것을 알 수 있다.

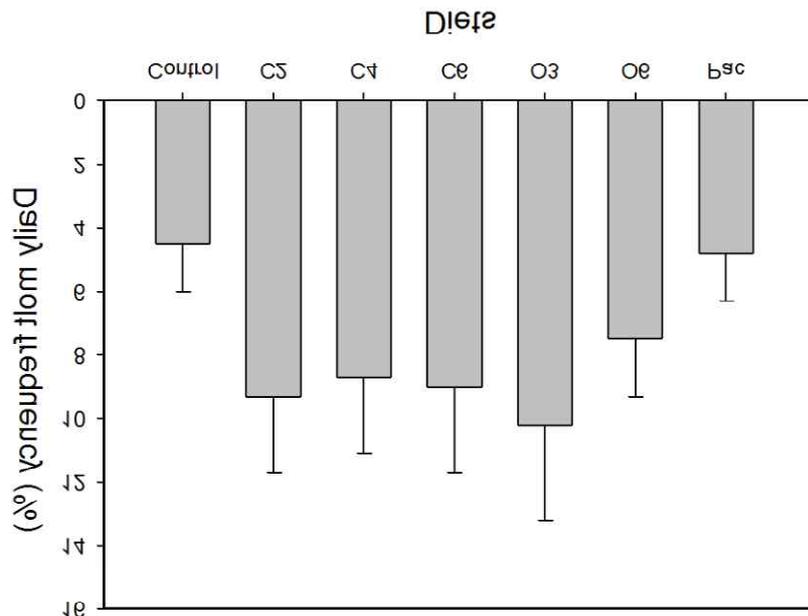


그림 6 흰다리새우에 곡류 C2, C4, C6 한약재 O3, O6, 그리고 해조류 Pac로부터 얻은 추출물들을 사료 kg당 2g을 첨가하여 급여하였을 때 개체당 일일 탈피빈도의 변화

(다) 식물 추출물에 대한 소화 촉진 효과

상기의 먹이유인 물질 개발을 위한 실험에서 섭이효과가 우수한 곡류 C2, C6, 그리고 한약재 O3, O6의 추출물을 표 1과 같은 조성의 사료에 첨가하여 먹이공급 후 한 시간후에 실험구내의 새우를 수거하여 간췌장(hepatopancreas), 전장(foregut), 중장(midgut)을 분리하여 -60°C 에서 동결건조한 후 Uebershaer(1999)와 Drossou (2004, 미발표)의 방법에 따라 trypsin의 활성도를 측정하여 그림 7에 나타내었다.

trypsin의 활성도를 측정하기 위해 각 새우들로부터 절취한 간췌장, 전장 그리고 중장들은 Tris-HCl 완충액 (0.1molar Tris(hydroxymethyl) aminomethan, 0.02 molar $\text{CaCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, Merck사, HCl pH8) 500 μl 를 첨가하여 마쇄를 하고, $0\sim 4^{\circ}\text{C}$, 4110g에서 60분간 원심분리를 하였다. 상등액을 50 μl 씩 취하여 microplate에 3배구로 하여 분주 하고 기질용액(0.2 mmol의 Na-benzoyl-L-arginin-4-methylcoumarinyl-7-amid (MCA), Bachem,사, 0.5% Dimethylsulfoxide, Merck)을 250 μl 씩 첨가하여 Fluorescence microplate reader (Fluoroskan Ascent FL, Thermo사)로 30°C 에서 20분간 가운을 하고 2분 간격으로 5번 측정을 하여 평균 trypsin의 활성도를 측정하였다. 효소의 활성도는 단위시간당 기질의 가수 분해된 양으로 표시하였다(hydrolysed MCA $\text{mg}^{-1}\text{min}^{-1}$).

그림 7에서 보는 바와 같이 일반사료를 급이하였을 때 전장과 중장 그리고 간췌장의 trypsin의 활성은 각각 220.7, 243.9 그리고 1961.2 $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 이었으나 섭이효과가 좋은 O2를 첨가한 사료를 투여한 실험구 새우의 전장, 중장 그리고 간췌장의 trypsin의 활성은 각각 489.2, 564.6, 그리고 2248.8 $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 로 대조구에 비해 전장과 중장에서는 2배이상 높았다. 그리고 C6에서도 O3보다는 다소 낮지만 전장과 중장에서 높은 활성을 보이고 있다. 그리고 먹이 섭이효과가 O3나 C6보다 다소 낮은 O6, C2에서는 전장과 중장에서 trypsin의 활성이 O3나 C6보다 낮게 나타났지만 대조구에 비해서는 높게 나타났다.

이러한 결과는 먹이 유인효과를 나타내는 물질들은 소화 효소의 생성 분비도 왕성하게 일어나게 하고 있음을 잘 보여주고 있다. 이는 먹은 사료의 양에 따라 소화효소의 분비되는 양도 달라지는 것인지 아니면 섭이효과가 높은 물질에 소화효소를 분비하게 하는 요인이 있는 것인지는 확실치 않으나 본 연구에서 찾은 O3나 C2는 새우의 사료효율을 높이는데 아주 유효한 물질이라는 것을 알 수 있었다.

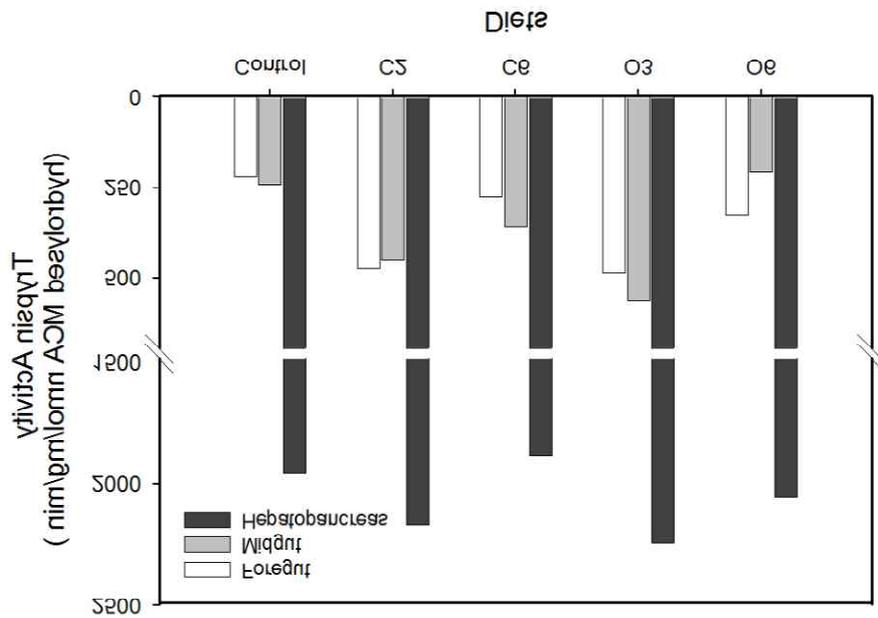


그림 7. 사료 첨가제에 따른 흰다리새우의 전장, 중장 그리고 간췌장의 trypsin 활성도의 변화.

(라) 기타물질들에 대한 먹이 유인효과

곤충이나 갑각류들은 척추동물과 달리 자외선에 대한 광수용체를 가지고 있어서 자외선에 민감하게 감응한다고 알려져 있다 (Smith et al., 1990; Goldsmith & Cronin, 1993; Cronin et al., 1994). 따라서 자외선에 의해 색깔이 나타나는 형광 물질들이 새우류를 유인하는 요인이 될 수 있다고 생각 할 수 있다. 특히 식물에는 flavonoid와 같은 형광을 띠는 물질들이 있어서 이들에 의한 먹이 유인효과가 있을 가능성이 높다. 본 실험에서는 형광색소에 따른 먹이 유인효과를 조사하기 위해 적색형광 염료, 청색형광 염료, 녹색형광 염료 그리고 황색형광 염료를 구입하여 그림 8과 같이 사료 1Kg에 형광염료를 5g을 넣었다. 일반 가시광선에서는 그림 8-A 처럼 형광염료에 따라 구별이 되지 않지만 자외선 하에서는 그림 8-B처럼 자외선을 쬐었을 때 형광 염료 간 뚜렷한 구분이 되어 진다.

그림 9에서 보는바와 같이 대조구의 사료 섭취량은 $0.426 \pm 0.018 \text{g/day}$ 이었으나 황색 형광염료를 첨가한 사료를 투여한 실험구에서는 사료 섭취량이 $0.481 \pm 0.017 \text{g/day}$ 로 가장 많은 사료를 섭취하였다. 청색과 녹색의 형광염료를 첨

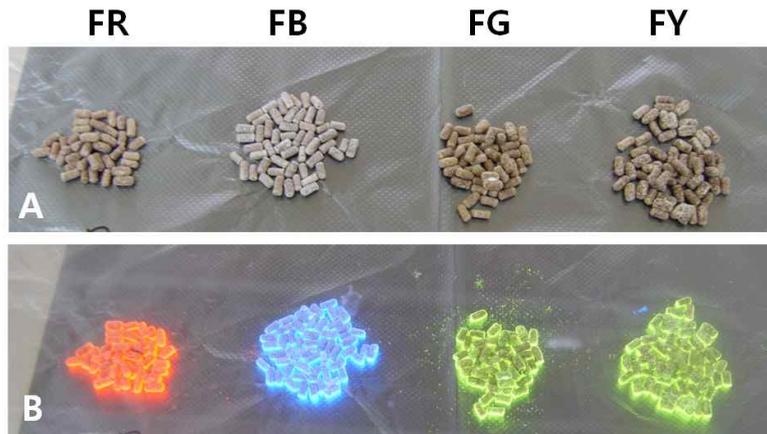


그림 8. 사료 1kg당 형광염료 5g을 첨가했을 때 일반 가시광선 하(A)에서, 그리고 자외선 하(B)에서 찍은 사료의 모습.

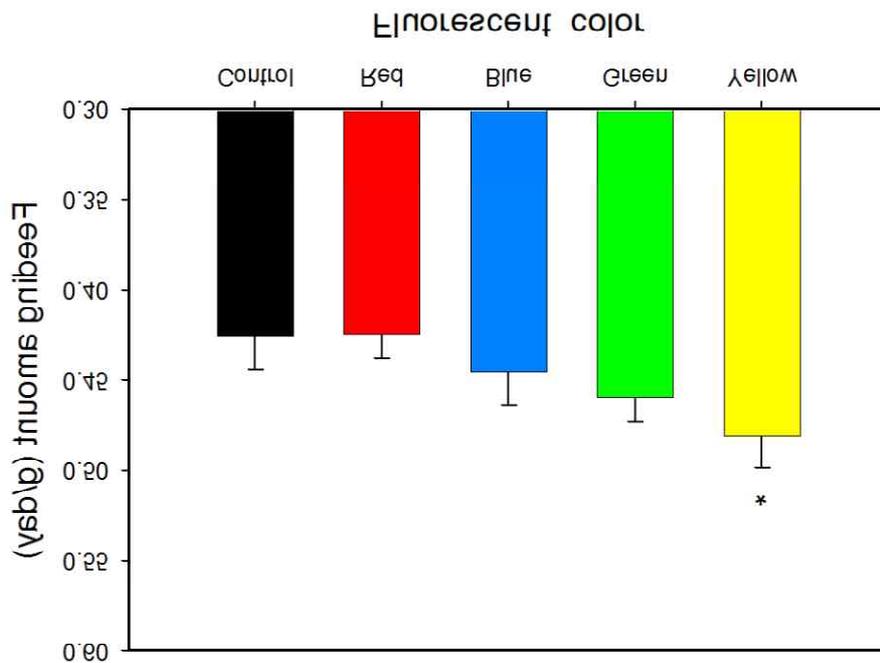


그림 9. 적색, 청색, 녹색 그리고 황색 형광 염료를 사료 1Kg에 5g씩 첨가하여 흰다리새우에 투여하였을 때 새우의 일일사료섭취량은 대조구와의 유의한 차이($p < 0.05$)를 나타냄.

가한 사료를 투여한 실험구에서도 각각 $0.446 \pm 0.018 \text{g/day}$, $0.459 \pm 0.013 \text{g/day}$ 로 대조구에 비해 높은 사료섭취량을 보였으나 유의한 차이는 보이지 않았다.

새우 사료에 오징어는 오래전부터 사용되어 왔으며 특히 새우의 성장을 촉진하기 위한 단백질원으로 널리 사용되어 왔다(Fenucci et al., 1980; Cruz and Guillaume, 1983; Co'rdova-Murueta and Garcí'a-Carren~, 2002). 또한 오징어의 내장이나 오징어 간유는 새우의 사료의 섭취를 돕기 위한 먹이 유인물질로 일반적으로 사용되어 왔다. 본 연구에서는 오징어 간유와 오징어 내장을 냉동 건조한 분말을 각각 새우 사료에 첨가하여 먹이 유인효과를 조사하여 그림 10에 나타내었다.

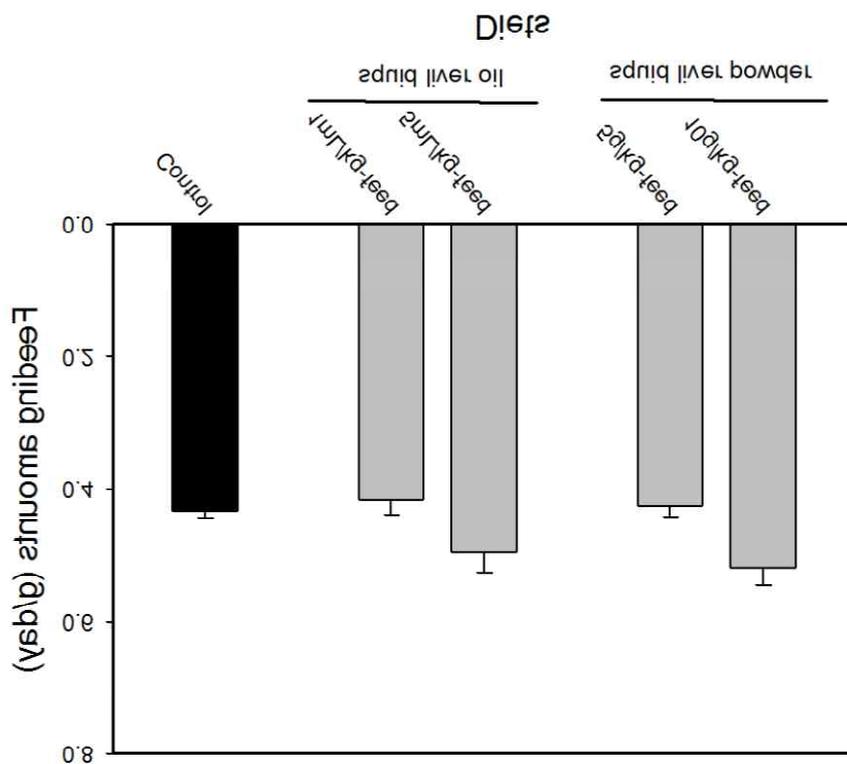


그림 10. 사료 1Kg에 오징어 간유를 1mL 및 5mL을 첨가하였을 때와 오징어 내장 분말을 1g과 5g을 첨가하였을 때 흰다리새우의 개체당 일일 사료 섭취량.

오징어 간유를 1mL/kg-feed로 첨가하였을 때는 사료섭취량이 0.417 ± 0.022 g/day로 대조구 (0.433 ± 0.010 g/day)와 차이가 없었으며 5mL/kg-feed로 첨가하였을 때 사료섭취량이 0.494 ± 0.032 g/day로 증가하였으나 유의한 차이는 보이지 않았다. 그러나 내장 분말을 5g/kg-feed로 첨가하였을 때는 사료섭취량에 차이를 보이지 않았지만 10g/kg-feed로 첨가하였을 때는 사료 섭취량이 0.519 ± 0.026 g/day로 유의한 차이는 아니지만 증가하는 경향을 보였다. 따라서 오징어 간유 및 내장분말은 기존사료에 각각 1%와 5%들어있는데 여기에 오징어 간유와 오징어 분말을 각각 0.5%와 1%를 더 첨가해 주어도 유의한 먹이 유인효과는 없었다.

나. 기호성물질의 분리

(1) C2의 먹이 유인효과

C2로부터 먹이 유인 기호성 물질을 분리하기 위해 먼저 곡류 C2는 겨(껍질)와 알곡 부분 중 어느 부분이 기호성 물질이 많은지를 파악하기 위해 겨와 알곡으로 구분하여 이들에 대한 MeOH 추출물을 대상으로 사료섭취량을 평균 체중 4.75g의 흰다리새우를 대상으로 조사하여 그림 11에 나타내었다.

대조구의 일일 사료 섭취량은 0.263 ± 0.030 g/day이었으며 겨에서 추출한 물질을 사료에 첨가하여 투여한 실험구(HL)은 일일 사료섭취량이 0.416 ± 0.055 g/day로 대조구에 비해 높은 값을 나타내었으나 유의한 차이는 보이지 않았다. 반면 알곡에서 추출한 물질을 첨가한 사료를 투여한 실험구(FR)와 알곡과 겨를 분리하지 않은 원래 상태의 곡류전체를 추출한 물질을 사료에 첨가하여 투여한 실험구(WL)에서는 일일 사료 섭취량이 각각 0.529 ± 0.072 g/day와 0.463 ± 0.072 g/day로 나타났으며 대조구에 비해 유의하게 높은 값을 보여주었다. C2에는 flavonoid들이 많이 함유하고 있다고 알려져 이 곡류에서 추출하여 시판하고 있는 flavonoid를 구입하여 사료에 첨가하여 투여하여 일일 사료 섭취량을 조사하였다. flavonoid를 첨가한 실험구에서는 일일 사료 섭취량이 0.331 ± 0.029 g/day로 대조구에 비해 약간 높게 사료를 섭취하는 경향은 보이지만 유의한 차이는 보이지 않았다.

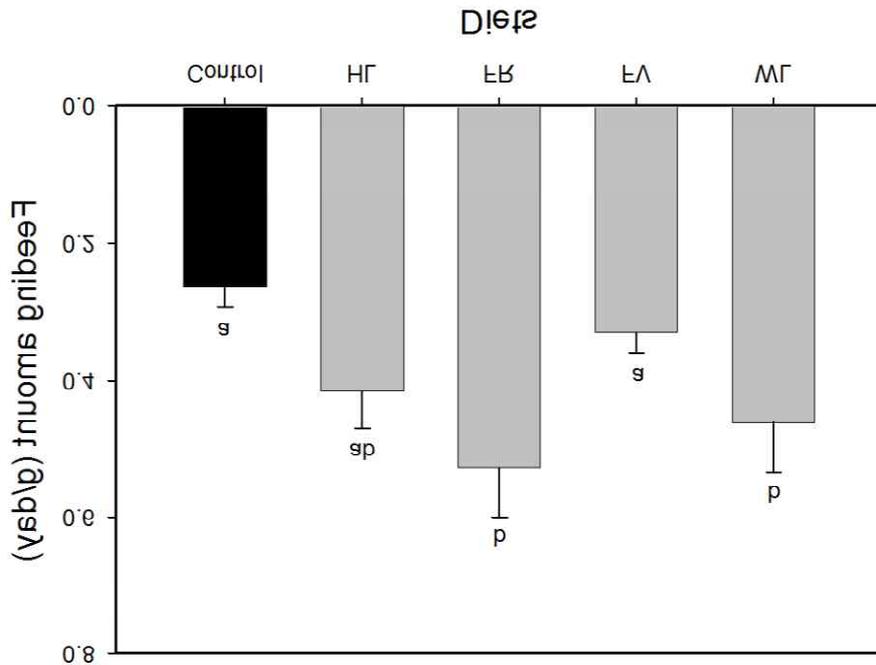


그림 11. 사료 1kg에 각 첨가물 1g을 첨가하였을 때 흰다리새우의 개체당 일일 사료 섭취량. HL: 겨, FR: 알곡 분말, FV: flavonoid, WL: 겨와 알곡으로 분리하지 않은 원래 상태. 그래프내의 다른 글자는 각기 유의성($p < 0.05$)이 있음을 표시함.

(2) C2와 O3의 안전성

한약재 O3는 일반적으로 한약제조에 많이 사용하는 것으로 다소 독성이 있다고 알려져 있다. 한방에서는 물에 넣어 끓이든지 아니면 볶으면 독성이 약해진다고 알려져 있다. 따라서 O3를 새우 사료첨가제로 장기간 사용할 경우 새우에 대한 안전성을 고려해야하기 때문에 O3를 처리하지 않고 추출하였을 때와 O2를 볶아서 추출하였을 때 이를 사료에 첨가하여 새우에 첨가사료를 투여하였을 때 새우에 대한 생존율을 조사하여 안전성을 파악하였으며, 그 결과를 그림12에 나타내었다.

대조구와 C2 추출물을 첨가한 실험구에서는 사육 40일 후에도 생존율이 계속 각각 85%와 90%를 유지하였다. 그러나 O3를 처리하지 않고 그대로 추출한 물질 20g을 사료 1kg에 첨가하여 투여한 실험구에서는 사육후 15일까지는 90%의 생존율을 보였으나 15일 이후부터 사육중인 개체들이 죽기 시작하여 20일에는 40%로 생존율이 떨어졌으며 사육 40일에는 15%로 더 떨어졌다. 한편 O3를 볶아 열

처리를 한 후 추출한 물질 20g을 사료 1kg에 첨가하여 투여한 실험구에서는 대조구나 C2 실험구와 거의 동일한 생존율을 보여주었다. 따라서 본 조사 결과로 O3를 사료첨가제로 사용할 때에는 열처리를 하여 사용하는 것이 안전하다.

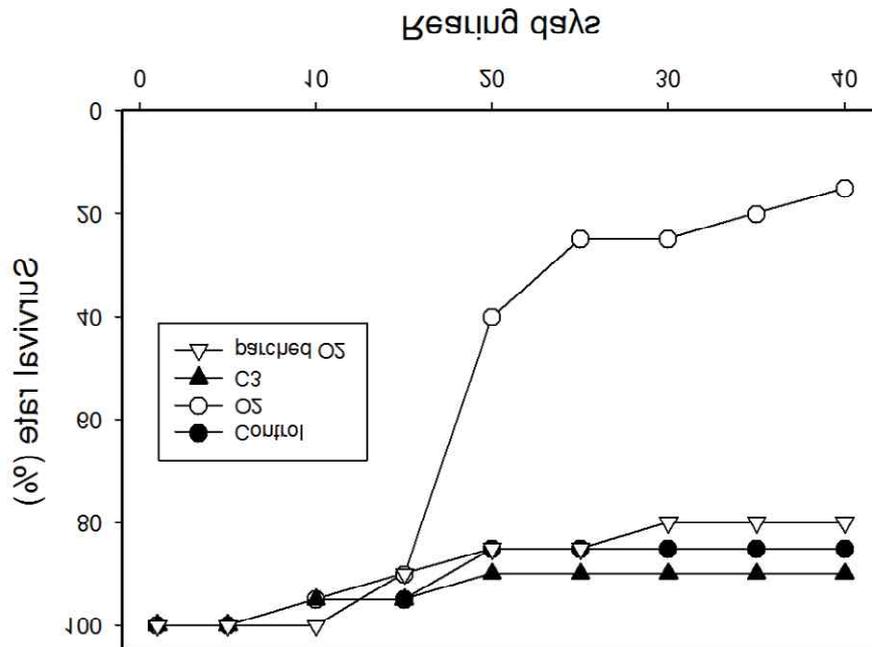


그림 12. 사료 1kg에 각 첨가물 20g을 첨가하였을 때 흰다리새우의 생존율의 변화.

(3) 기능성 물질의 분리

상기 실험에서 대상 시료들 중 가장 기호성, 소화율 및 성장효과가 뛰어난 재료로는 C2와 O3로 밝혀졌기 때문에 C2와 O3를 대상으로 기능성 물질을 분리하였다. C2는 그림 11에서 보는 바와 같이 알곡이 가장 기능성 물질이 많이 들어있었으나 겨와 알곡상태로 분리하지 않은 원상태의 C2를 추출한 것도 대조구에 비해 유익하게 높은 값을 보여주어 가격이 비싼 알곡을 사용하지 않고 원상태 그대로 사용하였으며 알곡부분에 있는 물질을 잘 추출되도록 추출하기 전에 압착하여 깨뜨린 뒤에 사용하였다. 특히 O3는 볶아서 사용하면 독성이 없어지므로 O3는 볶아서 사

용하였다. 이들 두 재료를 methanol로 추출하여 표준 검색시료를 만들었으며, 그림 13과 같이 water(H₂O), dichloromethane (CH₂Cl₂), ethyle acetate (EtOAc), butanol (n-BuOH)등을 이용하여 계통적으로 추출, 분획을 실시하였다. 분획된 분획물은 농축기를 이용하여 농축하여 분말화한 후 사용할 때까지 -80℃에 보관하였다.

시료 C2 25kg을 methanol로 추출하였을 때 520.1g이 용출되어 나왔으며 이를 CH₂Cl₂, EtOAc, n-BuOH, H₂O로 분획하였을 때 각 분획의 중량은 각각 134.1g, 32.5g, 100.2g, 157.4g 으로 나타났다. 또한 O3 25kg을 methanol로 추출하였을 때 601.3g이 용출되었으며 이를 CH₂Cl₂, EtOAc, n-BuOH, H₂O로 분획하였을 때 각 분획의 중량은 각각 98.7g, 15.7g, 170.8g, 201.5g이 용출되었다.

분획물들은 농축 및 건조 후 사료에 첨가하여 먹이섭이효과를 조사하여 기호성 물질을 분획을 조사하였다.

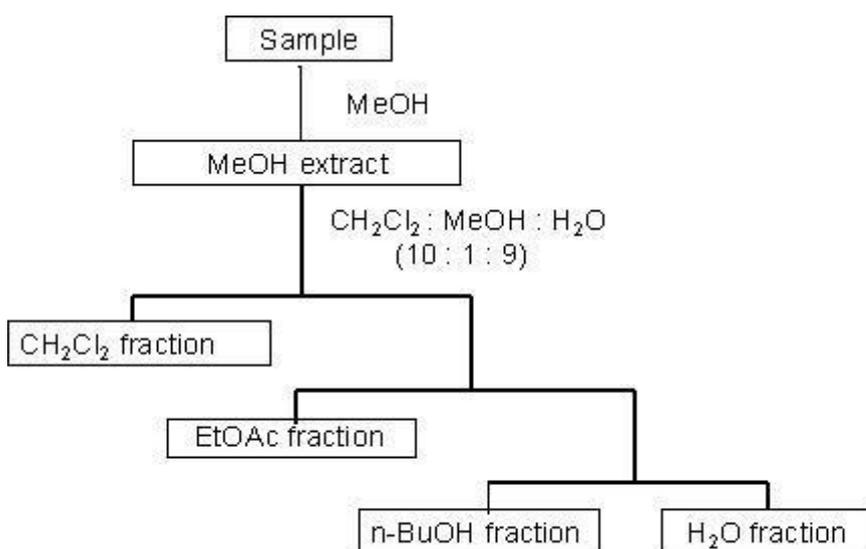


그림 13. 탐색된 재료에 대한 추출물의 분획 과정의 순서도.

(4) 분리된 분획물의 먹이 유인 효과

상기 실험에서 사료 섭취율과 탈피율에서 양호한 효과를 보인 재료 곡류 중 C2을 그림 13과 같은 방법으로 분획한 물질들을 흰다리새우를 대상으로 사료에 대한 섭취율을 조사하여 그림 14에 나타내었다. 흰다리새우의 사료 일일 섭취량은 대조구는 $0.292 \pm 0.024 \text{g/day}$ 로 가장 낮았으며, 첨가제를 넣은 실험구에서는 EtOAc 분획층을 사료에 첨가한 실험구가 $0.406 \pm 0.031 \text{g/day}$ 로 가장 높은 값을 보여주었고, 그다음은 높은 사료 섭취량을 보인 실험구는 n-BuOH 분획 층으로 사료 섭취량이 $0.342 \pm 0.033 \text{g/day}$ 로 나타났다. CH_2Cl_2 분획층과 H_2O 분획층도 대조구보다 높은 값을 보였으나 EtOAc 분획층을 제외하고는 모두 유의한 차이가 보이지 않았다.

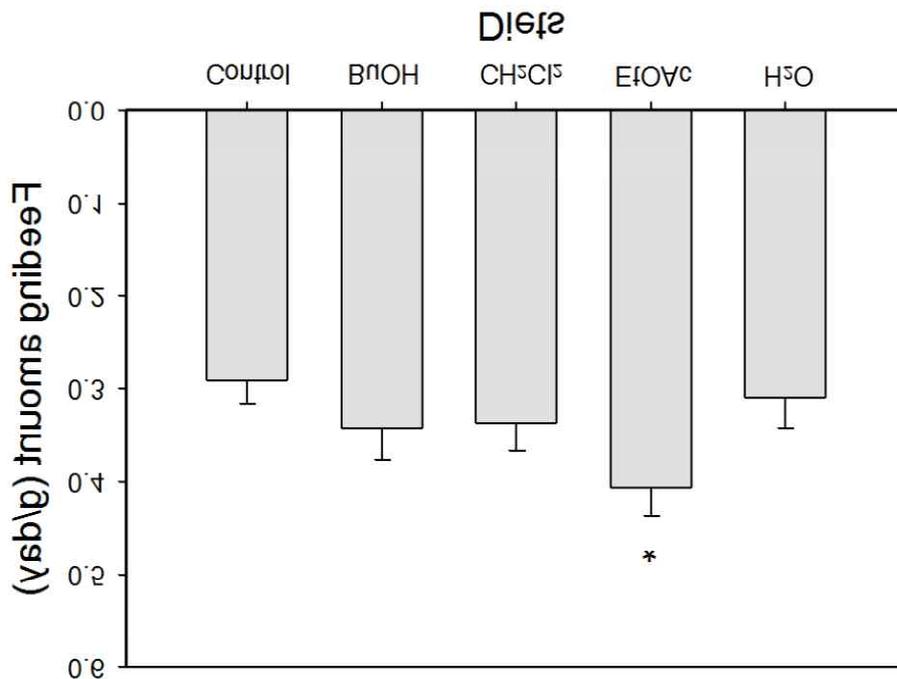


그림 14. C2를 그림 13과 같이 분획하여 사료 1kg에 각 분획물 1g을 첨가하였을 때 흰다리새우의 개체당 일일 사료 섭취량. *는 대조구와의 유의한 차이($p < 0.05$)를 나타냄.

한약재 중에 가장 사료 섭취율이 높았던 O3를 그림 13과 같은 방법으로 분획한 물질들을 흰다리새우를 대상으로 사료에 대한 섭취율을 조사하여 그림 15에 나타내었다. 사료 일일 섭취율은 모든 분획층에서 대조구 $0.35 \pm 0.03 \text{g/day}$ 에 비해 높은 값을 보였으며 물 분획 층을 첨가한 실험구가 일일 사료 섭취량이 $0.52 \pm 0.05 \text{g/day}$ 로 가장 높게 나타났으며 이 실험구만 대조구에 비해 유의한 차이를 보였다.

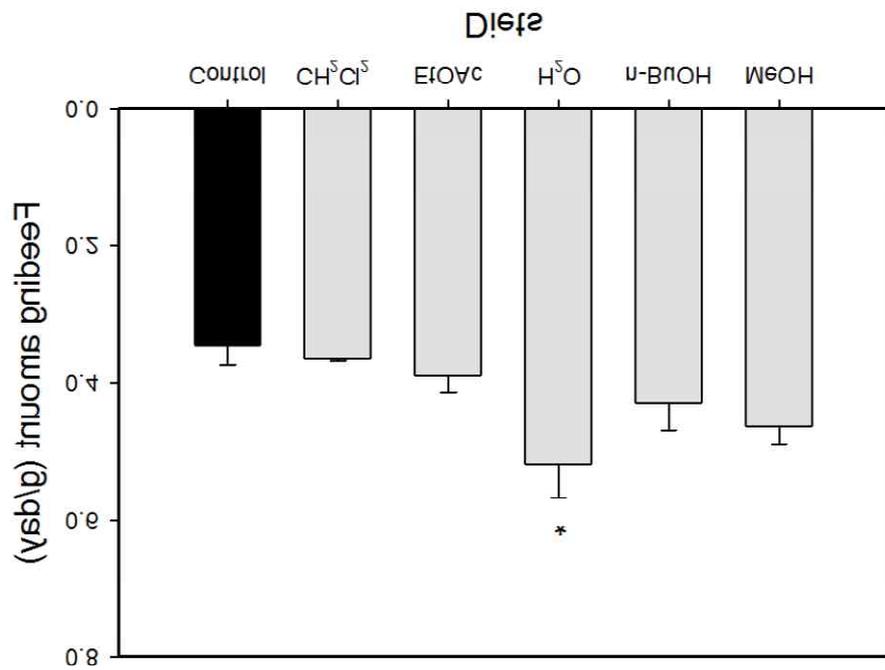


그림 15. O3를 그림 13과 같이 분획하여 사료 1kg에 각 분획물 1g을 첨가하였을 때 흰다리새우의 개체당 일일 사료 섭취량. * 는 대조구와의 유의한 차이($p < 0.05$)를 나타냄.

2. 시제품 개발

가. 분획층의 농도에 따른 먹이 유인 효과

C2를 분리한 분획물들 중 제일 기호성이 높은 EtOAc 분획층과 O3의 분획물들 중 제일 기호성이 높은 H₂O 분획층에 대해 첨가 농도별 사료 섭취량을 조사하였다. 이때 사용한 사료는 표 1에 의해 제조한 사료를 사용하였다.

C2로부터 추출 분리한 EtOAc 분획층을 사료 1kg당 0.5g, 1g, 2g, 4g 그리고 6g을 첨가하여 흰다리새우에 투여하여 사료 섭취량을 조사한 결과 그림 16에서 보는 바와 같이 대조구의 사료 섭취량이 $0.422 \pm 0.009 \text{g/day}$ 에 비해 사료 1kg에 0.5g을 첨가한 실험구에서의 사료 섭취량은 $0.514 \pm 0.022 \text{g/day}$ 로 높은 섭취량을 보였으며 유의한 차이를 나타내었다. 사료 1kg에 EtOAc 추출물 1g과 2g을 첨가한 사료를 투여한 실험구들에서는 사료 섭취량이 각각 $0.537 \pm 0.017 \text{g/day}$ 와 $0.540 \pm 0.011 \text{g/day}$ 로 대조구에 비해 유의하게 높은 값을 보였다. 사료 1kg에 EtOAc 추출물 4g과 6g을 첨가하여 투여한 실험구에서도 $0.529 \pm 0.017 \text{g/day}$ 와 $0.517 \pm 0.022 \text{g/day}$ 로 대조구에 비해 유의하게 높은 값을 보였다. 본 연구결과에서 C2로부터 추출 분리한 EtOAc 분획층은 사료 1kg당 0.5g이상 첨가하여 투여한 실험구들은 모두 대조구에 비해 유의하게 높은 사료 섭취량을 보였으며 실험구들 간 사료 일일 섭취량의 변화에는 유의한 차이가 보이지 않았다. 따라서 C2로부터 추출 분리한 EtOAc 분획층은 사료 1kg당 0.5g을 첨가하면 먹이 유인효과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

한편 O3로부터 추출 분리한 H₂O 분획층을 사료 1kg당 0.5g, 1g, 2g, 4g 그리고 6g을 첨가하여 흰다리새우에 투여하여 사료 섭취량을 조사한 결과 그림 17에서 보는 바와 같이 대조구의 사료 섭취량이 $0.425 \pm 0.008 \text{g/day}$ 에 비해 사료 1kg당 0.5g, 1g 그리고 2g을 첨가하여 투여한 실험구에서는 각각 $0.474 \pm 0.019 \text{g/day}$, $0.499 \pm 0.019 \text{g/day}$ 그리고 $0.529 \pm 0.017 \text{g/day}$ 로 첨가제의 농도가 높은 수록 사료 섭취량이 많아졌으며, 1g 그리고 2g을 첨가하여 투여한 실험구의 사료 섭취량은 대조구의 사료 섭취량에 대해 유의한 차이를 보였으며 두 실험구간 유의한 차이는

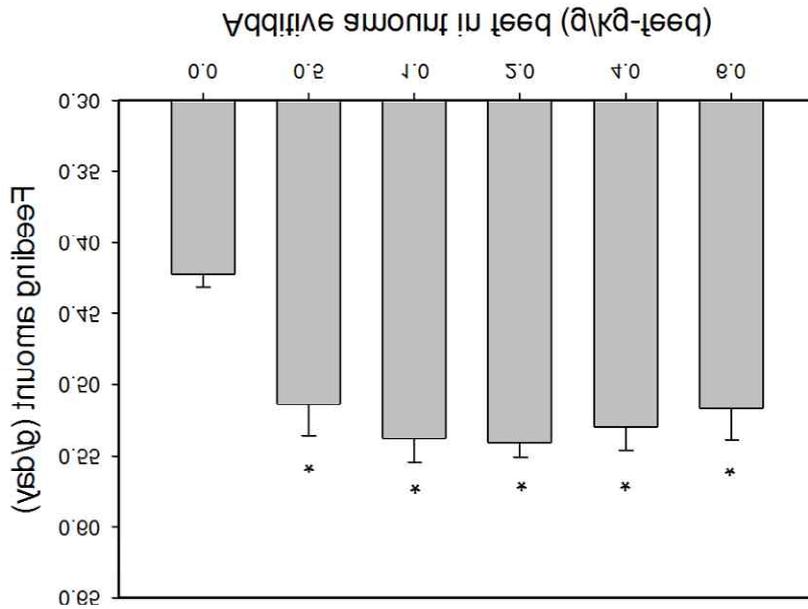


그림 16. C2로부터 추출 분리한 EtOAc 분획층을 사료 1kg당 0.5g, 1g, 2g, 4g 그리고 6g을 첨가하여 흰다리새우에 투여하였을 때 사료 섭취량. * 는 대조구와의 유의한 차이($p < 0.05$)를 나타냄.

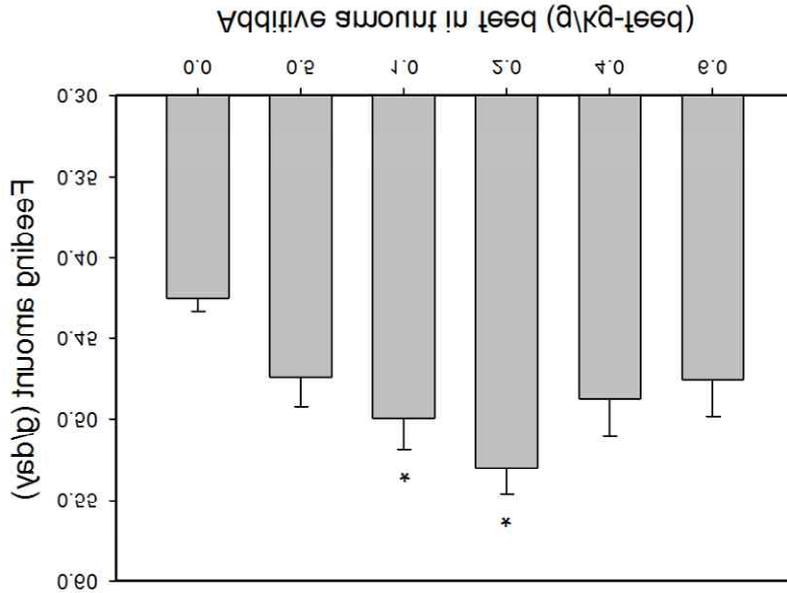


그림 17 O3로부터 추출 분리한 H₂O 분획층을 사료 1kg당 0.5g, 1g, 2g, 4g 그리고 6g을 첨가하여 흰다리새우에 투여하였을 때 사료 섭취량. * 는 대조구와의 유의한 차이 ($p < 0.05$)를 나타냄.

보이지 않았다. 그러나 사료 1kg당 H₂O 분획층을 4g과 6g을 첨가하여 투여한 실험구들에서는 사료 섭취량이 각각 0.487±0.023g/day와 0.476±0.023g/day로 첨가제의 농도가 높을수록 오히려 일일 사료 섭취량이 감소하였다. 그리고 대조구와의 유의한 차이도 보이지 않았다. 따라서 O3로부터 추출 분리한 H₂O 분획층은 흰다리새우에 대해 먹이 유인효과를 나타낼 수 있는 적정 농도가 있는 것으로 보이며 최적 사료첨가량은 사료 1kg당 1~2g이 가장 적당하다고 볼 수 있다.

나. C2의 EtOAc 분획층(C2-E)와 O3의 H₂O 분획층(O3-W)의 배합 비율에 따른 먹이 유인 효과

CEt와 OHO의 배합 비율에 따른 새우의 먹이 유인효과를 조사하기 위해 표 2와 같이 C2-E와 O3-W의 비율을 각각 3:7, 5:5 그리고 7:3의 비율로 조제하여 이를 사료 1kg에 1g씩 첨가하여 흰다리새우에 대해 일일 사료 섭취량을 조사하였다. 이때 사용한 새우는 전남 영광군 염산면에 위치한 (주) 아세아물산의 새우양식장으로부터 8월 15일 평균 체중 3.34±0.82g의 양성중인 것을 구입하여 실험실로 옮겨 10일간 순치 사육하였다.

표 2와 같이 사료첨가제를 제조하여 사료에 kg당 1g씩 첨가한 후 새우에 투여하였을 때 새우의 사료 섭취량을 조사한 결과 그림 18에 나타내었다. 이때 대조구의 사료 섭취량은 0.271±0.027g/day이었으며 Ex-1, Ex-2 그리고 Ex-3의 사료 섭취량은 각각 0.380±0.028g/day, 0.400±0.021g/day 그리고 0.432±0.027g/day로 나타났다. 모든 실험구는 대조구에 비해 유의하게(p<0.05) 높은 사료섭취량을 보였다. 각 실험구에 따른 사료 섭취량은 C2-E와 O3-W의 비율이 7:3의 비율로 제조한 것이 가장 높았으며, C2-E의 첨가비율이 높을수록 사료 섭취량이 높아지는 경향을 보였으나 통계적인 유의성(p<0.05)은 보이지 않았다. 따라서 C2-E와 O3-W의 배합 비율을 어떻게 하든지 새우의 사료 섭취량에는 관계가 없음을 보여주었으나 C2-E의 비율이 높은 것이 먹이 유인하는데 더 효과적일 것이라고 생각되어진다.

표 4. 각 실험군에 따른 C2의 EtOAc 분획층(C2-E)과 O3의 H₂O 분획층(O3-W)의 첨가제 배합 제조 비율 (사료 1kg에 첨가되는 양)

Supplements	Experimental group		
	Ex-1	Ex-2	Ex-3
C2-E	0.30g	0.50g	0.70g
O3-W	0.70g	0.50g	0.30g
Total	1.00g	1.00g	1.00g

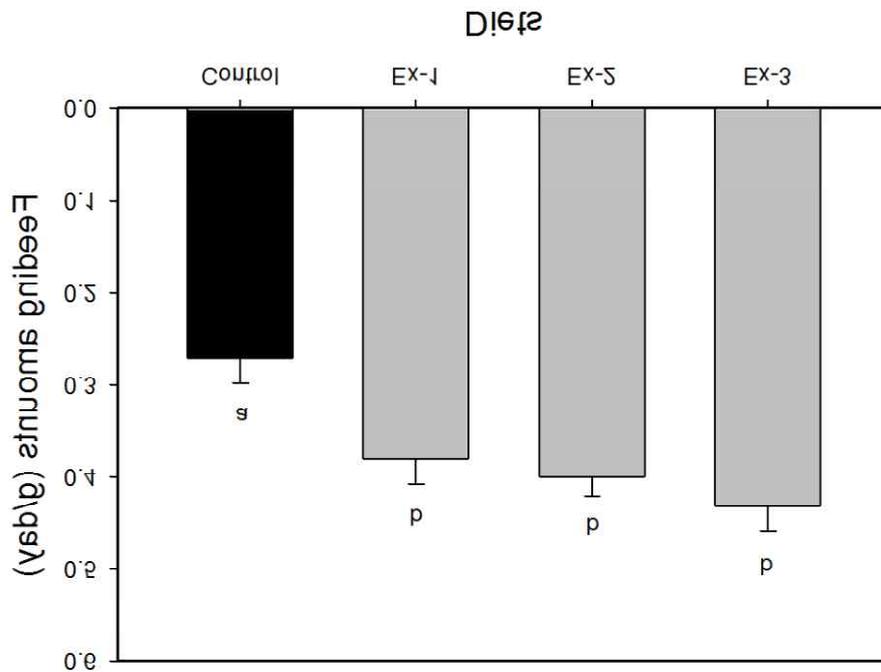


그림 18. C2의 EtOAc 분획층(C2-E)과 O3의 H₂O 분획층(O3-W)의 첨가제 배합 제조 비율에 따른 일일 사료 섭취량의 변화. 그래프내의 서로 다른 글자는 유의성($p < 0.05$)이 있음을 나타냄.

다. 첨가제의 제조

(1) 첨가제 재료의 적정구성 비율

C2의 가격은 일반 곡류 시장에서 1kg에 약 2,000원 이었으며, O3의 가격은 한 약 건재상에서 1kg에 약 40,000원에 거래가 되고 있었다. O3가 C2보다 가격면에서 20배 이상 비싼 반면 C2의 EtOAc에서 추출된 양과 O3의 H₂O에서 추출된 양을 비교하면 C2를 EtOAc에서 추출된 양이 O3를 H₂O에서 추출된 양에 비해 1/6정도 밖에 되지 않았다. 또한 O3의 농도보다 C2의 추출액 농도가 높을 수록 먹이 유 인효과가 좋아 C2와 O3의 농도 비율을 7:3으로 하였다.

(2) 추출 용매의 조건

C2와 O3의 조성 비율을 7:3으로 하여 최적의 추출용매의 조건을 파악하기 위해 Ethanol (EtOH) 100%, 70%, 40%의 농도 비율로 추출하였다. 추출 원재료 1kg에 추출용 용매를 2L 넣어 30°C에서 4일간 추출하였으며, 그 후 농축 및 냉동 건조한 후 실험에 사용하였다. 첨가제의 사료 첨가량을 1g/kg으로 하여 사료에 첨가한 후 새우에 투여하였을 때 각 추출 용매의 조건에 따른 사료 섭취량의 변화는 그림 19에 나타내었다. 대조구에서 사료 섭취량은 $5.417 \pm 1.083 \text{mg/hr}$ 이었으며 EtOH 100%로 추출한 것을 사료에 첨가하여 투여한 실험구 (EtOH-100)에서는 대조구에 비해 유의한 차이는 아니지만 $8.595 \pm 1.338 \text{mg/hr}$ 로 높은 값을 보여주었고 EtOH 70%로 추출한 것을 사료에 첨가하여 투여한 실험구 (EtOH-70)에서는 사료 섭취량이 $9.702 \pm 1.183 \text{mg/hr}$ 로 대조구에 비해 유의하게($p < 0.05$) 높은 사료 섭취량을 보였다. 그러나 EtOH 40%로 추출한 것을 사료에 첨가하여 투여한 실험구 (EtOH-40)에서는 사료 섭취량이 $8.026 \pm 1.189 \text{mg/hr}$ 로 EtOH-70 실험구보다 유의한 차이는 아니지만 낮은 값을 보였다. 따라서 본 연구에서 C3와 O2의 조성 비율을 7:3으로 하였을 때 가장 적당한 추출용매는 EtOH 70%로 정하였다.

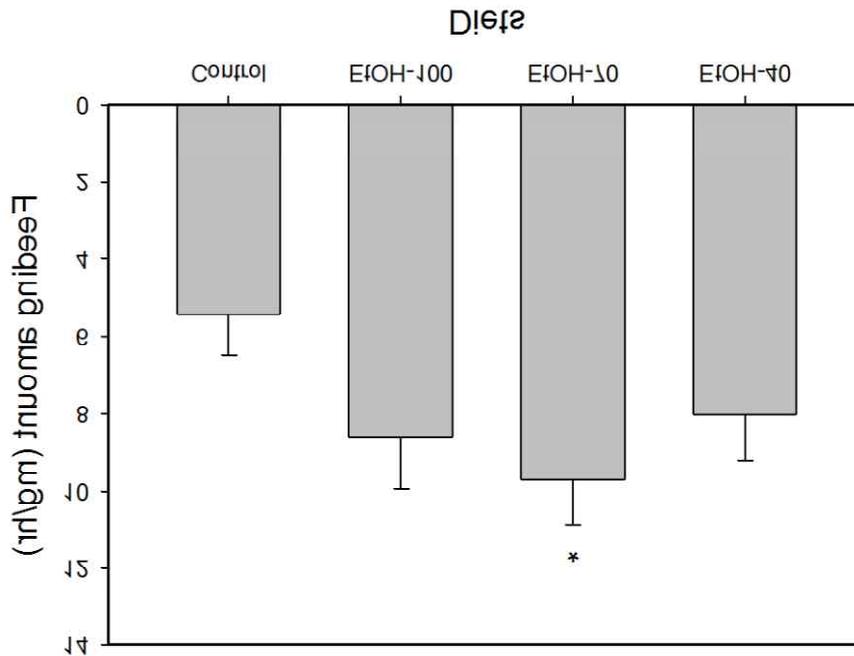


그림 19. C2와 O3의 조성 비율을 7:3으로 하여 추출 용매인 Ethanol (EtOH)의 농도 비율을 100%(EtOH-100), 70%(EtOH-70), 40%(EtOH-40)에서 추출한 물질을 사료에 첨가하여 투여하였을 때 새우의 사료 섭취량의 변화. * 는 대조구와의 유의한 차이($p < 0.05$)를 나타냄.

(3) 첨가제의 표준화

C2와 O3의 조성 비율을 7:3으로 하고 추출용매는 EtOH 70%로 하였을 때 항상 일정한 추출 효율을 정하여 제품을 표준화 할 수 있는 조건을 조사하기 위해 우선 상기 실험에서 얻은 추출액에 대해 최대 흡광도를 파악하기 위해 파장 300nm에서 700nm까지 scanning을 한 결과 그림 20과 같이 433nm와 665nm에서 2개의 peak을 보였으며 433nm에서 최대 흡광도를 가지는 것이 보였다. C2는 433nm에서 최대 흡광도를 가지고 O3는 665nm에서 최대 흡광도를 가지는 것으로 생각된다.

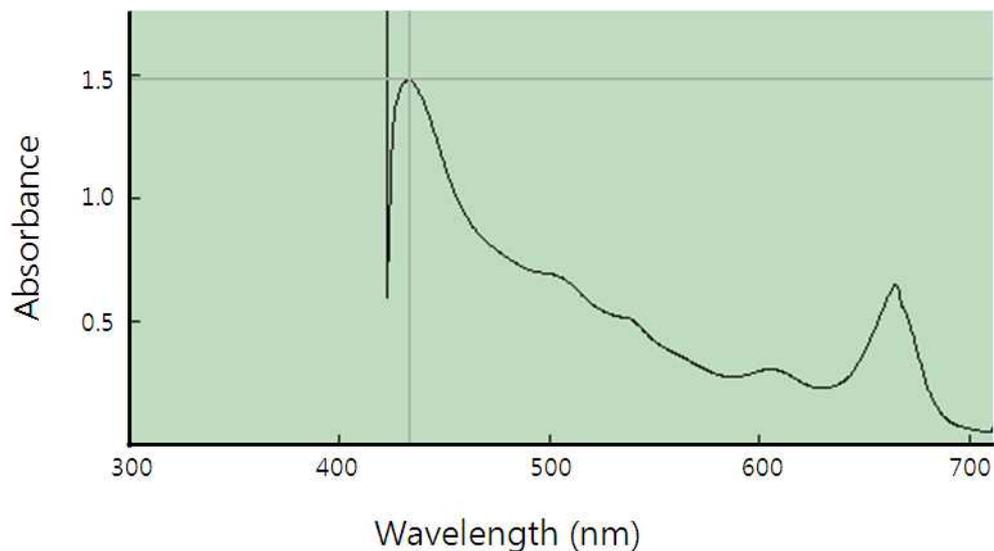


그림 20. C2와 O3를 7:3으로 하여 70% EtOH로 추출한 용액을 파장 300nm에서 700nm까지 scanning하였을 때 흡광도의 변화

온도에 따른 추출 효과를 조사하기 위해 추출 원재료 1kg에 추출용 용매를 2L 넣어 22°C와 30°C에서 하루에 3회 교반하면서 주기적으로 추출액을 채취하여 430nm에서 흡광도를 조사하여 그 결과를 그림 21에 나타내었다. 22°C에서 추출한 경우 3일후에 흡광도가 0.598이었으며 6일째 되는 날에 0.790, 8일째 되는 날에 0.864, 10일째 되는 날에 0.897로 나타나 8일 후에는 거의 변화가 없었다. 한편 30°C에서 추출한 경우는 추출 4일 후에 430nm에서 흡광도가 0.846으로 나타났으며 그 후로는 서서히 변화하였으며 8일째 되는 날에는 흡광도가 1.018이 되었다. 본 실험 결과 추출되는 물질의 농도는 온도 조건에 따라 다르게 나타나므로 추출 온도에 따른 추출일수를 정하지 않고 430nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도가 0.9 이상이 될 때까지 추출하는 것으로 하였다. 이때 추출액 1L를 농축하여 냉동 건조하였을 때 건 중량은 6.09g으로 나왔다.

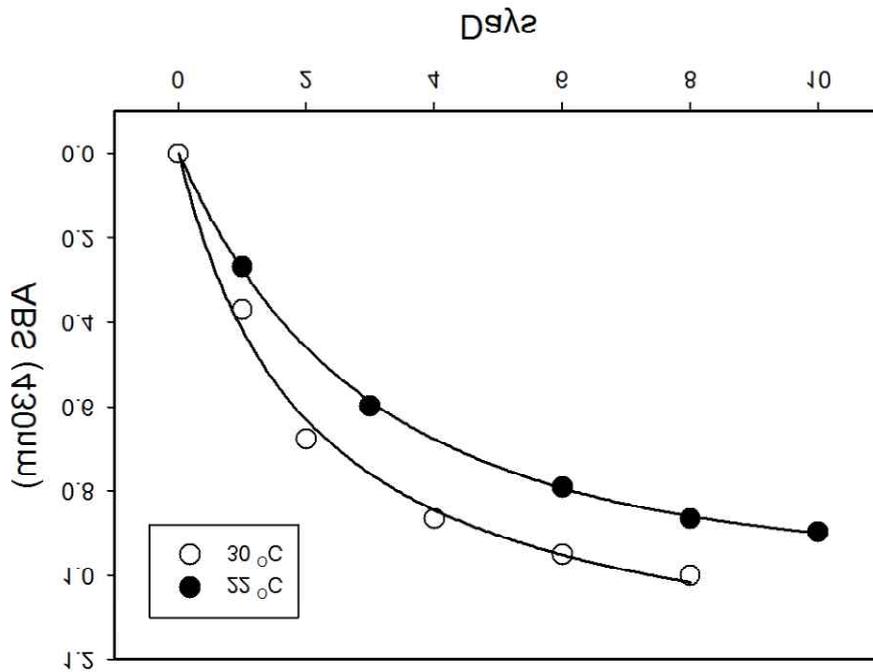


그림 21. 추출 원재료 1kg에 추출용 용매를 2L 넣어 22°C와 30°C에서 추출했을 때 추출 일수에 따른 추출액의 흡광도 변화

라. 첨가제(SP10)의 특성

(1) 먹이 유인 적정 농도

C2와 O3를 7:3으로 하여 70% EtOH로 추출한 용액(SP10)이 430nm에서 흡광도 0.9일 때의 용액을 SP10이라 명명하였다. SP10에 대해 1L를 농축하여 냉동 건조하였을 때 건 중량은 6.09g로 나타났다. SP10의 먹이 유인효과를 얻을 수 있는 최적 첨가량을 조사하기 위해 SP10을 사료 1kg에 50mL(0.3g), 100mL(0.6g), 150mL(0.9g)을 첨가하여 건조시켜 EtOH성분을 완전히 증발시킨후 새우에 투여하였다. 그림 22에서 보는 바와 같이 대조구의 사료 섭취량은 $0.163 \pm 0.019 \text{g/day}$ 이었으며, SP10 0.3g을 사료에 첨가한 실험구에서는 사료 섭취량이 $0.245 \pm 0.023 \text{g/day}$ 로 유의한($p < 0.05$) 증가를 보여주었다. SP10 0.6g, 0.9g을 첨가한 실험구에서도 사료 섭취량은 각각 $0.283 \pm 0.032 \text{g/day}$, $0.301 \pm 0.033 \text{g/day}$ 로 나타나 모두 대조구에 비해 유의하게 많은 양의 사료를 먹는 것으로 나타났다. 또한 SP10을 많이 첨가할수록 사료 섭취량은 증가하는 경향을 보였으나 유의한 차이는 보이지 않았다.

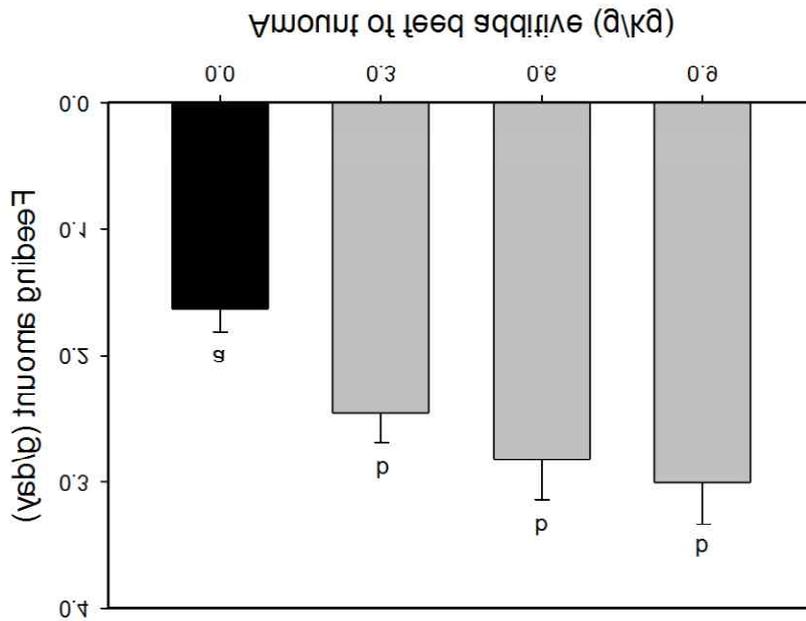


그림 22. SP10을 사료 1kg에 0.3g, 0.6g, 0.9g을 첨가하여 흰다 리새우에 투여하였을 때 일일 사료 섭취량의 변화. 그래프내의 서로 다른 글자는 유의성($p < 0.05$)이 있음을 나타냄.

(2) 소화효율

SP10을 사료에 첨가하였을 때 섭취된 사료들에 대한 소화상태를 조사하기 위하여 체중이 6.06 ± 0.31 g인 대하를 사용하여 SP10을 첨가한 사료를 급여하여 1시간 후에 각 실험구로부터 채집된 각 개체들의 전장(foregut)의 trypsin의 활성도를 측정하였다. 하루 이상 사료를 주지 않았을 때 전장과 중장의 trypsin의 활성도는 모두 10 nmol/mg/min으로 나타나 trypsin의 활성도가 10 nmol/mg/min 이하인 개체들은 먹이를 섭취하지 않은 것으로 간주하고, trypsin의 활성도가 10 nmol/mg/min 이상이 되는 개체수를 조사하여 그림 23에 나타내었다.

SP10을 첨가하지 않은 사료를 급여한 실험구에서는 전장의 소화효소 활성도가 10 nmol/mg/min 이상 되는 개체들의 수가 전체의 70.0%였으며, 0.2g/kg의 농도로 첨가한 실험구에서는 74.7%, 0.3g/kg의 농도로 첨가한 실험구에서는 93.4%로 나타

났다. 그러나 0.4g/kg의 농도 이상으로 첨가한 실험구에서는 전장의 소화효소 활성도가 10 nmol/mg/min이하가 되는 개체는 한 마리도 나타나지 않아 100%의 모든 개체들이 사료를 섭취하였다고 볼 수 있었다. 본 실험에서 SP10의 첨가량이 증가할수록 전장의 소화효소 활성도가 10 nmol/mg/min 이상인 개체들의 수도 따라서 증가하였으며 사료에 대해 0.3g/kg 이상으로 첨가한 실험구들에서는 모든 개체들이 한 시간 내에 사료를 섭취하는 것으로 나타나 SP10을 사료 1kg에 0.3g 이상 첨가하면 먹이 유인효과가 충분히 있다고 할 수 있다.

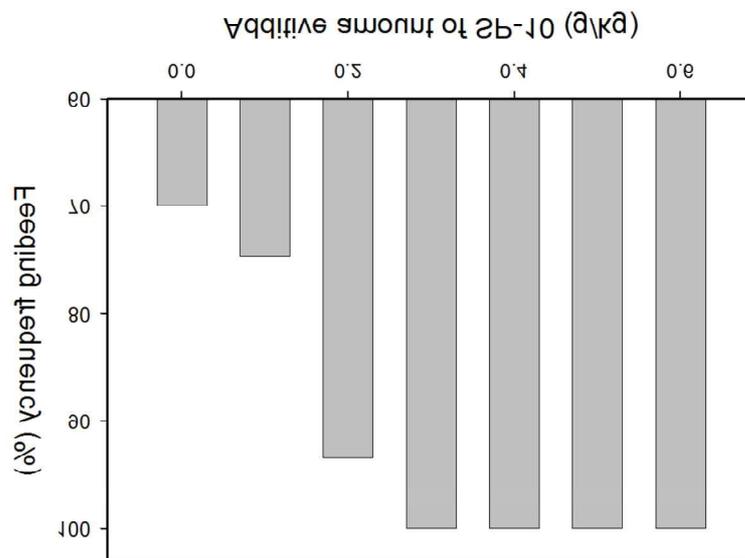


그림 23. SP10의 첨가량에 따른 전장의 trypsin 활성도가 10 nmol/mg/min이상 되는 개체 수의 출현 빈도

또한 이들이 섭취된 사료의 실제 체내의 양의 변화를 알아보기 위하여 사료 투여 후 2시간 지난 다음 체중에 대한 전장(foregut)과 중장(midgut)의 비를 조사하여 그림 24에 나타내었다. SP10을 첨가하지 않은 일반사료를 투여한 실험구의 체중에 대한 전장의 무게의 비가 0.096%이었으나 SP-04의 첨가량이 증가할수록 그 비가 증가하여 사료 1kg에 SP10을 0.2g/kg을 첨가하였을 때 0.103%, 0.4g/kg 첨가하였을

때는 0.116%, 0.6g/kg 첨가하였을 때는 0.127%로 증가하고 있는 것을 알 수 있다. 증장에서 SP-10을 0.1g/kg으로 첨가하였을 때는 대조 실험구 보다 체중에 대한 비가 낮으나 0.2g/kg으로 첨가한 실험구에서는 0.108로 증가하였다. 그 후 0.3g/kg으로 첨가한 실험구에서는 0.107로 변화가 없었으나 0.4g/kg으로 첨가한 경우 0.106으로 증가하여 증장에서 전장보다는 뚜렷하지는 않지만 SP-10의 첨가량이 증가할수록 체중에 대한 증장의 무게의 비도 전장과 마찬가지로 증가하는 현상을 보여주고 있다. 이 실험에서 체중은 습중량(wet weight)로 전장과 증장은 건중량(dry weight)으로 정량하여 계산된 값으로 표시하였는데도 변화의 양상이 뚜렷이 나타나 SP-10의 첨가에 의한 먹이 유인효과로 섭취되는 사료의 양이 일반사료보다 많다는 것이 확실히 증명된다고 할 수 있다.

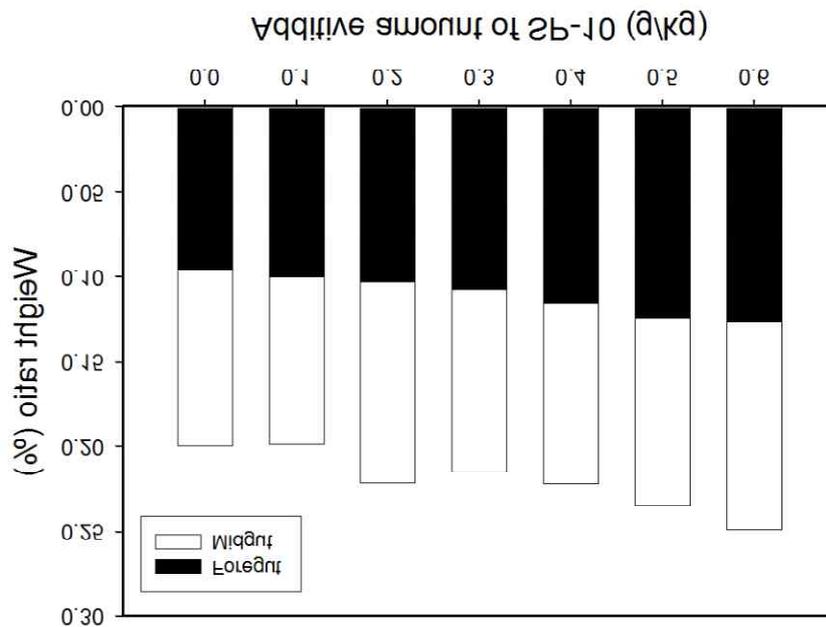


그림 24. SP10을 사료에 첨가하는 양에 따른 흰다리새우의 체중에 대한 전장과 증장의 비율

상기의 결과에서 SP10을 많이 첨가할수록 사료를 많이 섭취하는 것으로 나타났으며, 많은 양의 사료를 섭취하였을 때 이들을 충분히 소화해내고 있는지를 알아보기 위하여 상기 실험의 각 개체들로부터 각 소화관에서 trypsin의 활성도를 조사하여 그림 25에 나타내었다.

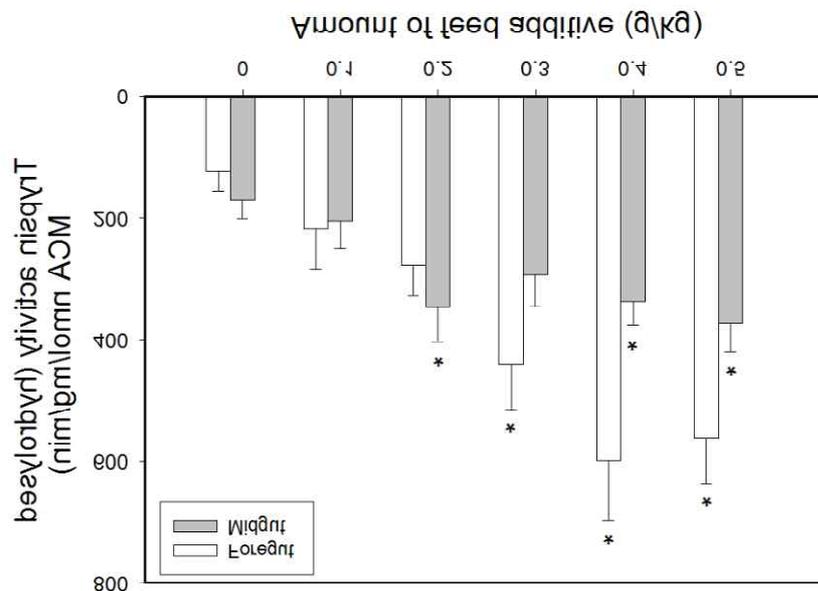


그림 25. SP10의 사료 첨가량에 따른 흰다리새우의 전장과 중장의 trypsin 활성도의 변화. * 는 대조구와의 유의한 차이 ($p < 0.05$)를 나타냄.

SP10을 첨가하지 않은 사료를 투여한 대조 실험구에서 전장과 중장에서 trypsin의 활성도는 각각 123.99 ± 31.40 과 168.86 ± 31.87 nmol/mg/min로 나타났다. 전장에서는 SP10의 첨가량이 증가할수록 trypsin의 활성도도 증가하는 경향을 보여 SP10를 0.1g 첨가했을 때에는 217.05 ± 67.24 nmol/mg/min, 0.2g을 첨가했을 때에는 276.36 ± 51.81 nmol/mg/min로 대조구에 비해 유의한 증가는 없었으나 0.3g을 첨가하였을 때는 276.36 ± 51.81 nmol/mg/min로 대조구에 비해 유의한($p < 0.05$) 증가를 보여주었다. 0.4g 첨가했을 때에는 599.07 ± 99.40 nmol/mg/min로 가장 높았

으며 0.5g을 첨가했을 때에는 $562.07 \pm 75.70 \text{ nmol/mg/min}$ 으로 나타나 0.4g을 첨가했을 때와 차이가 없었다. 중장에서도 SP10의 첨가농도가 증가할수록 trypsin의 활성도가 증가하는 경향은 보였으며 0.2g을 첨가한 실험구에서 trypsin의 활성도가 $346.87 \pm 56.90 \text{ nmol/mg/min}$ 으로 대조구 $169.86 \pm 31.87 \text{ nmol/mg/min}$ 보다 유의하게 증가($p < 0.05$)한 것을 알 수 있었다. 0.3g을 첨가한 실험구에서는 $293.59 \pm 52.47 \text{ nmol/mg/min}$ 으로 유의한 증가는 보이지 않았지만 0.4g을 첨가한 실험구에서는 $338.02 \pm 37.94 \text{ nmol/mg/min}$ 으로 유의한 증가 현상을 보여주었다. 중장에서는 전장과 같이 뚜렷한 증가 현상은 보여주지 않았으나 0.4g 이상 첨가한 실험구에서는 대조구에 비해 유의한 trypsin의 활성을 보여주었다. 중장에서 전장과 같이 뚜렷한 증가현상이 나타나지 않은 것은 trypsin과 같은 단백질소화효소에 의해 단백질들이 대부분 소화되어 중장으로 넘어오기 때문에 중장에서는 단백질을 분해하기 위한 trypsin같은 효소의 활성이 떨어지기 때문으로 생각되어 진다. 또한 중장에서는 단백질 분해효소의 활성보다는 탄수화물이나 지방 등의 분해를 위한 효소들이 분비되기 때문인 것으로도 생각되어진다.

호주의 가재 일종인, *Cherax destructor* (Mills and McCloud, 1983)에서 먹이 섭취율이 높아지면 먹이전환과 동화율이 낮고 잔류먹이뿐만 아니라 소화가 이루어지지 않은 상태에서 배설물로 배출이 된다는 결과를 보고하였으나 본 실험의 결과로 보면 SP10의 첨가로 인해 사료 섭취율이 높아지더라도 먹이전환과 동화율도 아울러 높아져 소화되지 않은 상태에서 사료가 배설되는 것은 적을 것으로 생각된다. 새우 양식 사료 전략에서 가장 중요한 요점은 사료량을 적게 주어서 많은 생산을 올리려는 것이다. 사료를 많이 주게 되면 새우에 의해 섭취되지 않은 잔류 사료에 의해 수질이 악화되기 때문에 투여한 사료에 대한 사료전환효율을 높이기 위한 최적의 방법을 찾기 위해 주로 일정한 사료의 양을 얼마나 자주 주는 것이 좋은가에 대한 적정 사료투여횟수에 대하여 연구해왔다(Sedgwick, 1979; Robertson et al., 1993; Jaime et al., 1996). 그러나 최근에는 사료투여횟수는 사료전환효율이나 성장, 수질관리에 별 관계가 없다는 연구가 발표되었다 (Velasco et al., 1999; Smith et al., 2002). Cuzon et al., (1982)은 사료의 영양가의 소실을 줄이고 생산량을 높이기 위해서는 투여한 사료가 새우에 의해 얼마나 빨리 섭취되어지는가가 가장 중요하다고 하고 있다. 이러한 연구들을 종합하면 사료의 전환효율을 높이기 위해서는 사료 투여횟수에 관계가 없으므로 단위시간당 많은 사료를 먹도록 유인하는

것이 가장 바람직하다고 본다. 따라서 SP-04를 첨가함으로써 사료 전환효율을 높이고 새우에 의한 사료의 소비가 빨리 이루어지게 되어 수질관리에도 유리하게 될 수 있다고 할 수 있다.

(3) 공식(cannibalism) 억제 효과

SP10을 첨가한 사료가 공식을 저하시키는데 얼마나 효과가 있는지를 조사하기 위해 1m×1m×0.7m의 수조에 3.5g 전후의 대하(*Fenneropenaeus chinensis*)를 30마리를 넣고 SP10을 0.3g/kg되도록 첨가한 사료를 매일 전 체중에 3%되도록 급여하면서 15일간 사육하여 SP10을 첨가한 사료를 투여한 실험구와 무첨가 일반 사료로 사육한 대조 실험구간 공식에 의한 사망 개체수를 조사하여 생존율의 변화는 그림 27에, 일일 공식율(daily cannibalistic rate)의 변화는 그림 27에 나타내었다.

사육시작 2일 후부터 공식에 의해 사망한 개체들이 나타나기 시작하여 SP10을 첨가하지 않은 일반 사료를 투여한 실험구에서는 30마리 중 5마리가 공식에 의해 폐사되어 생존율은 83.3%, 일일 공식율은 8.3%으로 나타났다. 그러나 SP10을 첨가한 사료를 투여한 실험구에서는 한마리가 공식에 의해 폐사되어 생존율은 96.7%, 일일 공식율은 1.67%로 SP10 첨가 실험구가 대조구에 비해 공식율이 매우 낮게 나타났다. 사육 5일째에도 일반사료 투여 실험구에서는 다시 5마리가 공식에 의해 폐사되어 생존율은 66.7%, 일일 공식율이 6.7%로 나타났으며, SP10을 첨가한 실험구에서는 2마리가 더 폐사되어 생존율은 90%, 일일 공식율은 2.30%로 나타났다. 사육 8일째와 11일째의 일반사료를 투여한 실험구의 생존율은 각각 53.3%, 50.0%로 나타났으며, 일일 공식율은 각각 5.00%와 2.08%로 점차 낮아졌으며 15일째는 생존율이 36.7%이었으며, 일일 공식율은 2.22%로 나타났다. SP10을 첨가한 실험구에서는 사육 8일째, 11일째 그리고 15일째의 생존율은 80.0%, 73.3% 그리고 70.0%이었으며, 일일 공식율은 2.47%, 2.78%, 1.52%로 낮은 값을 유지하였다. SP10을 첨가하지 않은 일반 사료를 투여한 경우는 사육일수가 진행될수록 사육밀도가 낮아짐에 의해 공식율이 떨어지는 것으로 보이며 SP10을 첨가한 실험구에서는 사육밀도가 높이 유지하고 있음에도 일일 공식율은 2%대의 낮은 값을 보여주었다. 이러한 결과는 SP10을 첨가함으로써 새우들이 먹이 섭취에 대한 기호성이 높아 공식제어에도 많은 효과가 있음을 보여주어 새우양식에서 사육밀도를 높이는데도 도움이 되리라 생각된다.

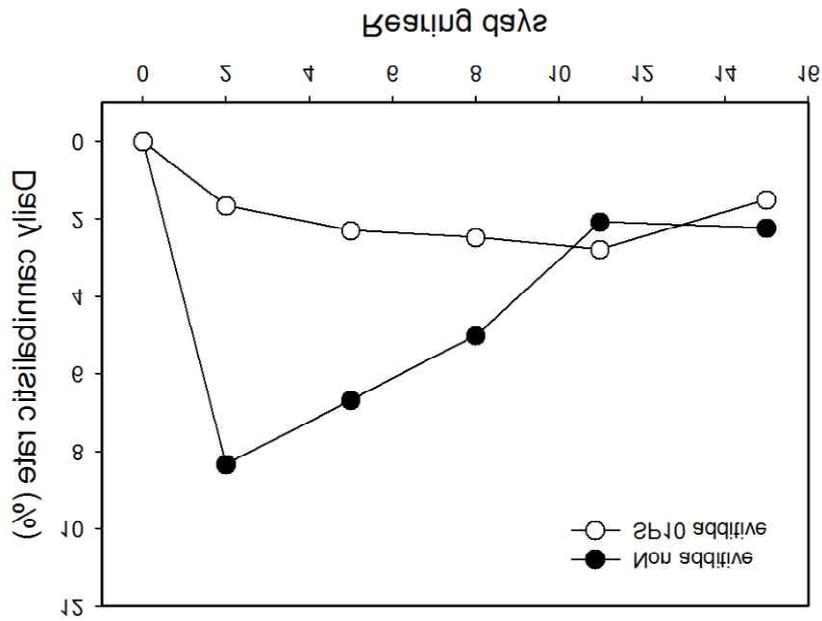


그림 26. 일반사료와 SP10 첨가 사료를 투여하였을 때 대하 (*Fenneropenaeus chinensis*)의 일일 공식율의 변화

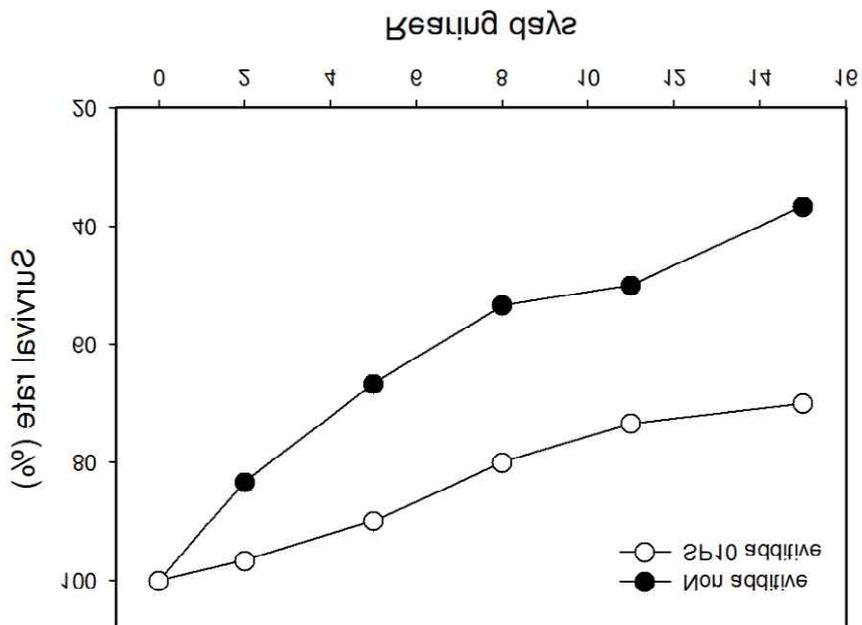


그림 27. 일반사료와 SP10 첨가 사료를 투여하였을 때 대하 (*Fenneropenaeus chinensis*)의 생존율의 변화

지금까지 새우양식에 사육밀도를 높일수록 사망률이 높아지고 사료전환효율이 떨어져 성장이 둔화되어 생산성이 낮아진다고 알려져 왔다(Martin et al., 1998; Ray and Chien, 1992; Tseng et al., 1998). 이러한 생산성 저하는 고밀도 양식을 할 때 사료의 대량투여에 의한 수질 악화와 공식현상 때문이라고 생각하고 있다. 최근에는 순환식 여과시스템의 개발로 수질의 문제를 효율적으로 해결되면서 흰다리새우의 경우는 150~300마리/m²의 밀도로 집약식으로 양식을 하고 있다. 흰다리새우는 공식이 이루어지지 않은 종이라고 알려져 있어 집약식 양식을 할 수 있다고 하고 있지만 대하의 경우도 SP10을 첨가하여 사육하면 현재의 30마리/m²의 밀도보다 더 높은 밀도로 양식이 가능하다고 할 수 있다.

3. 현장 적용

가. 새우 양식 시설 및 사육

2010년 6월 5일부터 전남 영광군 염산면리에 위치한 A물산 (그림 28)에 면적 300m², 수량 300톤 규모의 그림 29와 같은 Zero-exchange system으로 운영되는 시설 2개에서 현장 실험을 하였다. 사육실험을 시작하기 전 사육수내의 미생물이 충분히 번식할 수 있도록 미생물 접종 후 시비를 하여 양식하기 위한 물 만들기를 실시하였다 (그림 29-C). 6월 20일 0.17g크기의 대하 치하(그림 29-D)를 하나의 호지에 20만 마리를 입식하여 500마리/m²의 밀도로 입식하였다. 입식 후 15일간은 치하용 일반사료를 투여하여 양성한 후, 15일 후부터 일반사료에 SP10을 첨가하여 투여하였다. SP10은 사료 20kg(한포)에 1L를 첨가한 후 그림 30-A와 같이 그늘에서 4시간 정도 건조시켜 알콜 성분을 완전히 증발시킨 다음 사료를 투여하였다. 한 개의 호지는 계속 일반사료를 투여하면서 양식을 하였다. 사료의 섭취상태는 그림 30-C와 같은 먹이망을 제작하여 사료를 넣고 일정시간 지난 후 사료의 섭취여부를 확인하였다.

사료의 급여 횟수는 Velasco et al., (1999)와 Smith et al.,(2002)에 의하면 급여 횟수가 성장에 관계가 없다고 보고하고 있어서 하루에 2회로 나누어 투여하였다. 사료 급여율(feed rate)은 일반적으로 알려진 방법으로 평균 체중이 3g 전후에는 하루에 체중의 5% 전후로 투여하였으며, 10g 전후에는 3.5%이하로 하였으나 수질의 상태를 보면서 투여하는 사료량을 조절하였다.



그림 28 고밀도 양식장에 현장 적용실험을 한 양식장 시설 (영광군 염산면 소재 (주) A물산).



그림 29. A 물산에 시설한 Zero-exchange system의 내부 및 입식한 흰다리새우의 치하. A: 취수하기 전의 양식장 내부, B: 호지내에 취수한 후 양식 물 만들기 전의 모습, C: 물만들기를 한 후의 호지, D: 입식할 때의 치하

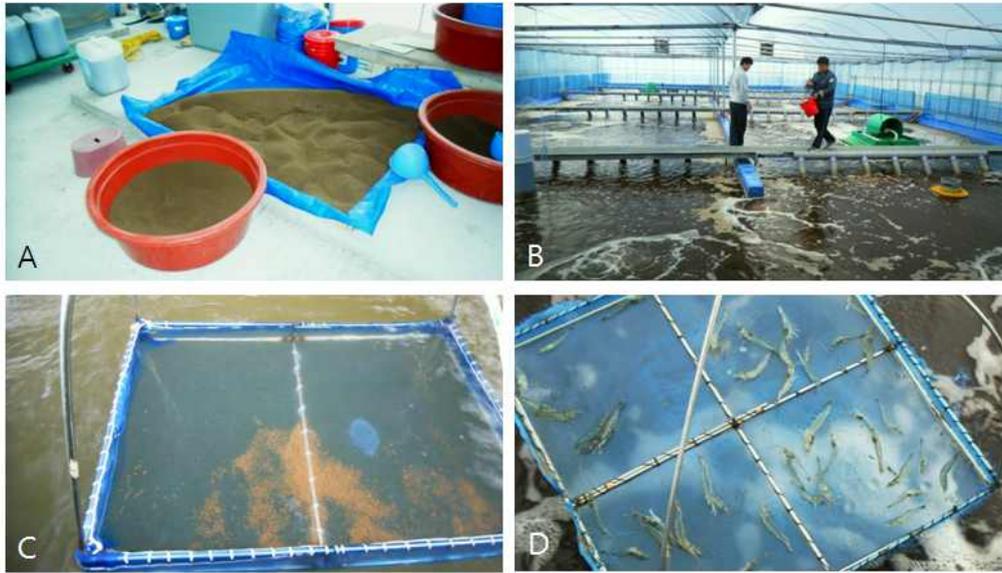


그림 30. SP10 첨가사료의 제조와 사료 투여, 먹이 틀에 의한 사료 섭취 상태 조사. A: SP10를 첨가한 사료의 제조, B: 사료의 투여 장면, C: 사료를 넣은 먹이 틀, D: 먹이 틀을 들어 올렸을 때 먹이 틀에 있는 새우.

나. 수질의 변화

사육호지의 수질의 변화는 수온, 염분농도, DO는 YSI-85 (Yellow Springs Ins. 사, USA)을 이용하여 측정하였고, pH는 YSI pH meter로, NO₂-N과 alkalinity는 calorimetric kit (Merck Co., Germany)를 이용하여 오후 2시에 정기적으로 측정하여 그림 31에 나타내었다.

수온은 사육 100일까지는 26°C~30°C 사이를 유지하였으나, 9월 20일 이후 기온이 갑자기 내려가면서 수온이 내려가 약 40일간 수온을 22°C~25°C로 유지되었다. 130일 이후부터는 열 병합 heat pump를 이용하여 수온을 25°C전후로 유지하였다. 염분농도는 22~27 psu를 유지하였으며, pH는 6.5~ 8.0의 범위를 유지하였으며 사육 초기에 일시적으로 pH 8.5이상 올라가는 경우도 있었으나 이때는 중탄산을 처리하여 pH를 내렸다. DO는 액화산소를 이용하여 4~8 mg/L을 유지하였다. NO₂-N의 농도는 사육 시작 후 2일 이후부터 호지 내 농도가 올라가기 시작하여 40mg/L까지 올라가 지속되었으며 사육 50일째부터 10mg/L이상 될 때도 있었지만 그 이하로 유지되었다. alkalinity는 50일 이후 상승하기 시작하여 130mg/L 전후의 농도를 유지하였다.

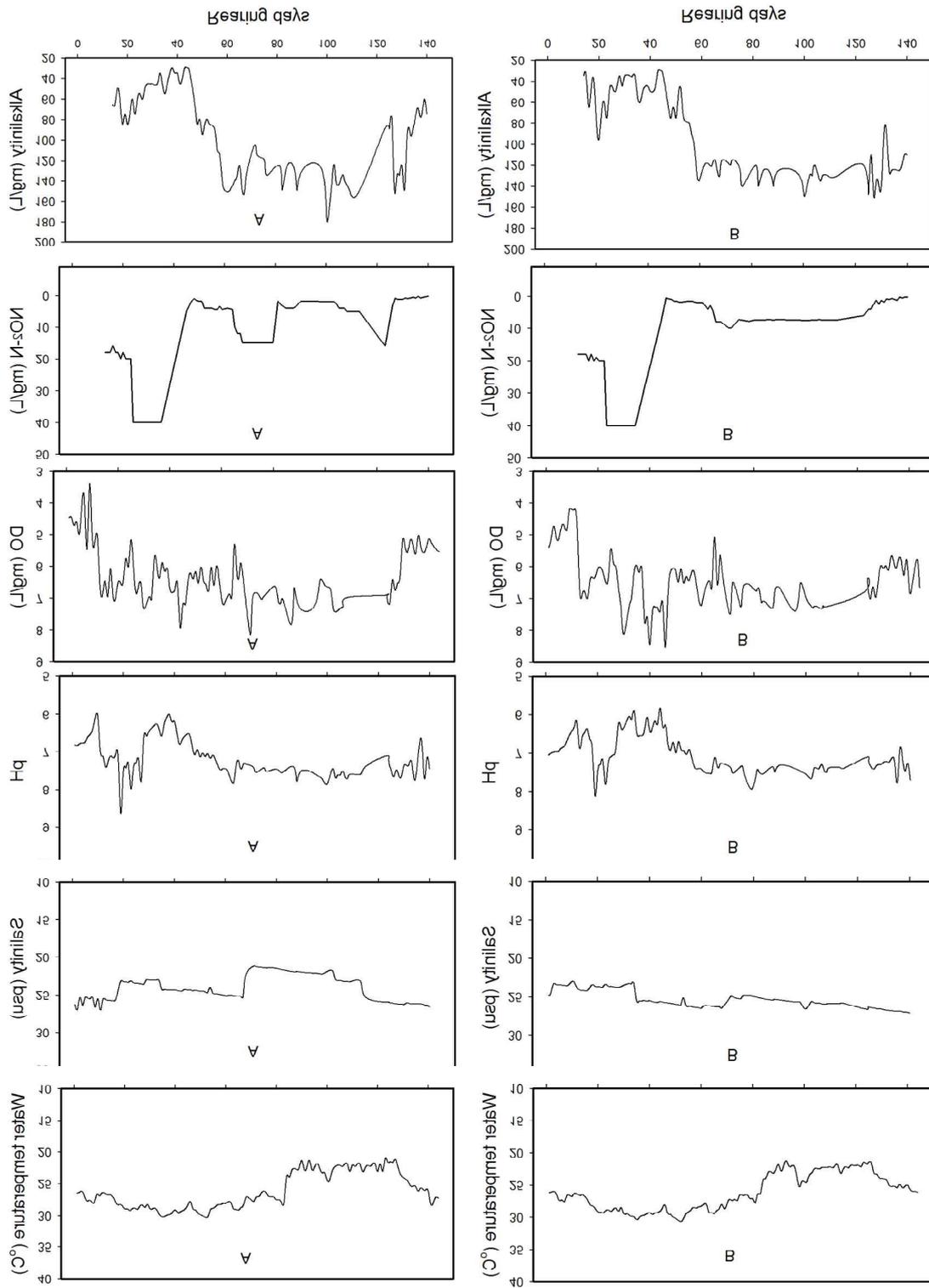


그림 31. 사육일수에 따른 일반사료 투여 실험구(A)와 SP10 사료첨가제 투여 실험구(B)에서의 수온, 염분농도, pH, DO, NO₂-N, alkalinity의 변화

다. 양성과 생산

6월 20일부터 치하를 입식하여 양식을 한 후 SP10을 첨가한 사료를 투여한 실험구는 11월 8일까지 사육하여 출하하였으며 일반사료를 투여한 실험구에서는 11월 20일 현재까지 사육 중에 있다. 양식 기간 일일 사료의 투여량의 변화는 그림 32에 나타내었으며, 누적사료의 변화는 그림 33에 나타내었다.

사육초기부터 30일째까지 사료의 투여량을 서서히 늘려 25kg/day까지 주었으나 $\text{NO}_2\text{-N}$ 의 농도가 40mg/L까지 올라가 사료의 양을 줄여 17kg/day을 투여하였다. 이후부터 먹이들을 이용하여 새우의 사료 섭취 상태를 보면서 사료의 양을 달리하였으며 50일 이후부터 수질이 안정되고 $\text{NO}_2\text{-N}$ 의 농도도 5mg/L이하로 떨어지면서 SP10을 첨가한 사료를 투여한 실험구에서는 사료 섭취량이 늘어 20kg/day 전후로 주기 시작하였다. 반면 일반사료를 투여한 실험구에서는 수질이 안정됨에도 불구하고 사료의 섭취율이 떨어져 17kg/day 전후로 사료를 투여하였다. 140일째 SP10 첨가사료를 투여한 호지에서 평균 체중 $19.55\pm 0.67\text{g}$ 으로 성장하여 출하하였다. 그러나 일반사료를 투여한 대조 실험 호지에서는 150일 되는 현재까지 일일 평균 19kg의 사료를 투여하면서 사육을 계속하고 있다.

140일째까지 총 사료의 투여량은 표 33에서 보여주는 바와 같이 SP10 첨가사료를 투여한 호지에서는 2,679.8kg이었으며 일반사료를 투여한 호지에서는 2,352.6kg이었다. 140일 이후 일반사료를 투여하는 호지에는 계속 사료를 투여하고 있으며 155일까지 총 사료투여량은 2,615.6kg이었다.

이 두 실험구간 새우의 성장에 대해 조사한 결과 그림 34에서 보여주는 바와 같이 일반사료를 투여한 호지보다 SP10을 첨가한 사료를 투여한 호지의 새우가 성장속도가 빠른 것을 알 수 있다. 사육 40일째 일반사료를 투여한 대조구 호지의 새우의 평균 체중은 $1.711\pm 0.238\text{g}$ 이었으며 SP10을 첨가한 사료를 투여한 호지의 새우의 평균 체중은 $4.228\pm 0.286\text{g}$ 으로 대조구에 비해 유의하게 성장이 빨랐다. 100일째에도 일반사료를 투여한 대조구 호지의 새우의 평균 체중은 $9.502\pm 0.611\text{g}$ 이었으며 SP10을 첨가한 사료를 투여한 호지의 새우의 평균 체중은 $13.275\pm 0.728\text{g}$ 으로 나타났다. 140일째에는 SP10을 첨가한 사료를 투여한 호지의 새우의 평균 체중은 $19.549\pm 0.673\text{g}$ 으로 충분한 상품으로 성장하였으나 일반사료를 투여한 대조구 호지의 새우의 평균 체중은 $13.508\pm 0.814\text{g}$ 으로 상품으로 출하하기 위해서는 1개월 이상 사육을 더해야 할 것으로 보인다.

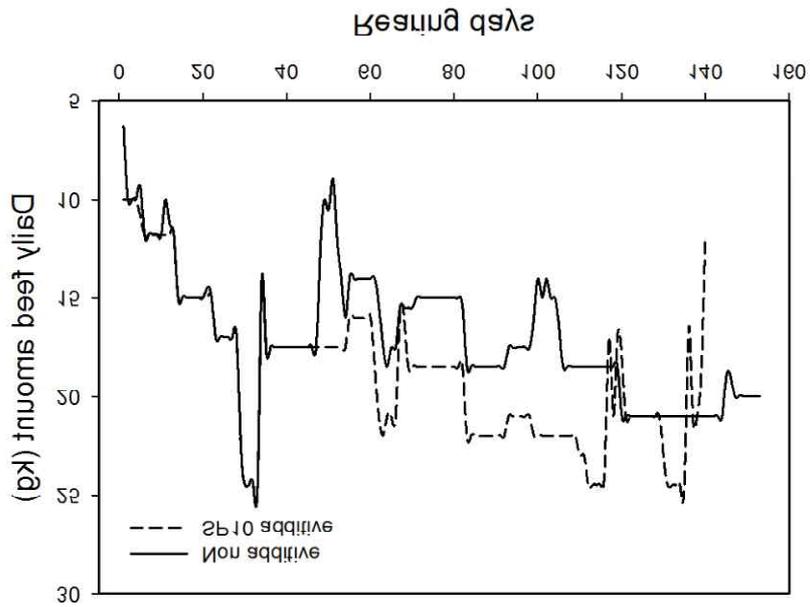


그림 32. 양식기간동안 일반사료 투여 실험구(Non additive)와 SP10 첨가사료 투여 실험구(SP10 additive)에 투여한 일일 사료량의 변화

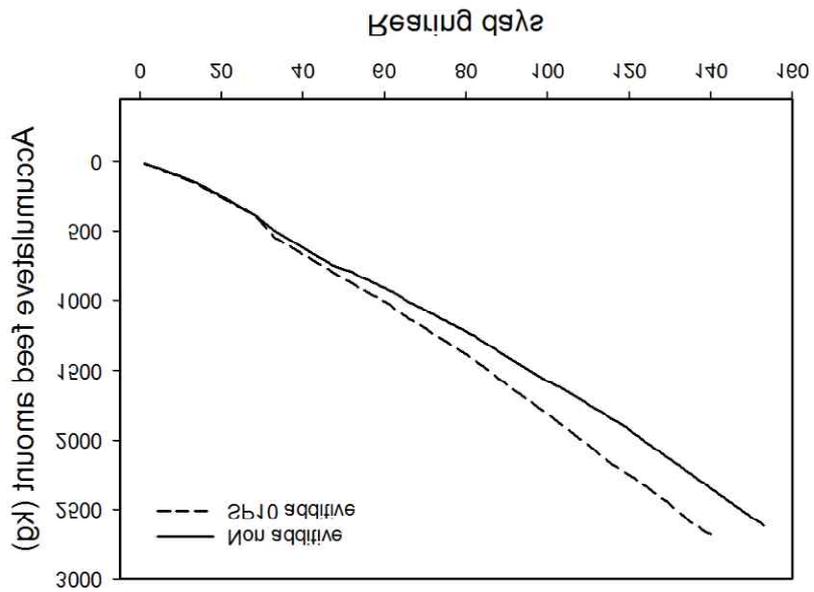


그림 33. 일반사료 투여 실험구(Non additive)와 SP10 첨가사료 투여 실험구(SP10 additive)에 투여한 일일 누적 사료량의 변화

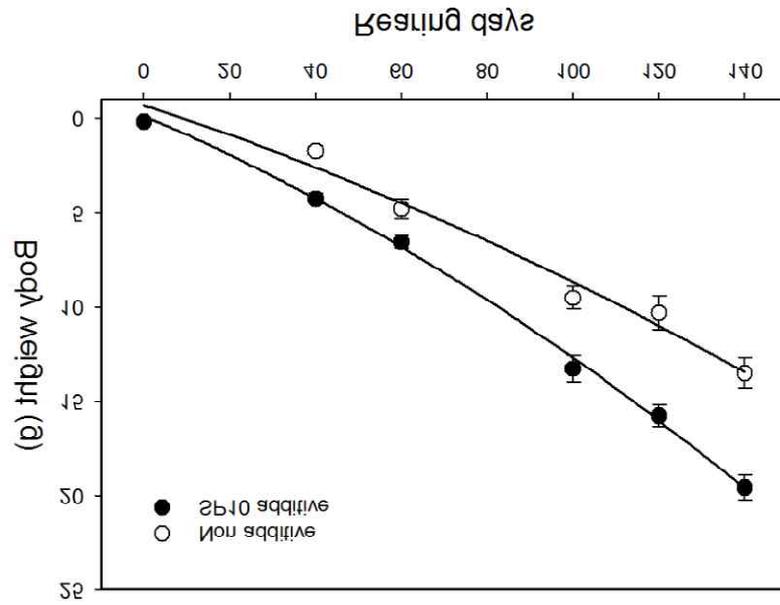


그림 34. 일반사료 투여 실험구(Non additive)와 SP10 첨가사료 투여 실험구(SP10 additive)의 새우의 평균체장의 변화.



그림 35. 사육 40일째 채집한 새우의 크기. A: 일반사료 투여 실험구, B: SP10 첨가사료 투여 실험구



그림 36. 사육 100일째(왼쪽)와 140일째(오른쪽) 채집한 새우의 크기. A: 일반사료 투여 실험구, B: SP10 첨가사료 투여 실험구.

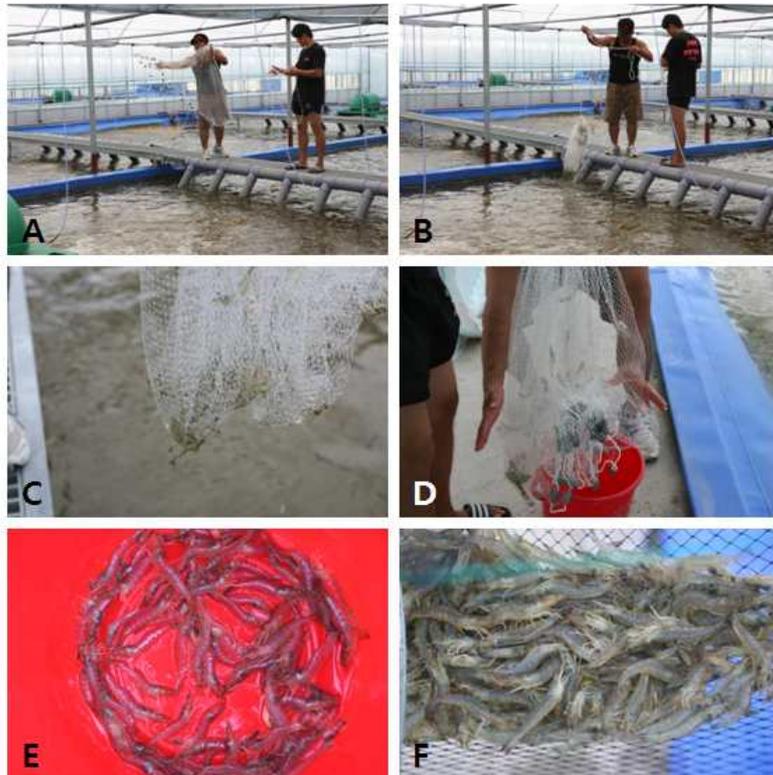


그림 37. 사육기간 동안 성장 상태를 조사하기 위해 투망을 이용하여 새우를 채집하였다. A, B: 투망을 던지고 새우를 건져 올리는 모습, C: 투망에 걸린 새우, D, E:새우를 양동이에 넣는 모습과 새우, F: 대량 채집된 새우



그림 38. 새우의 성장 조사와 수질 조사하는 모습

라. 생산성 분석

고밀도 사육시설에서 두 개의 실험 호지에 각각 200,000마리를 입식하였으며 SP10을 첨가한 사료를 투여하여 양식한 경우 새우 수확시까지 총 사료 투여량은 2,679.8kg이었다. 140일째 수확한 새우의 생산량은 2.2톤이었다. 따라서 본 실험에서 새우의 생존율은 약 60%로 나타났으며 FCR은 1.22로 나타났다. 생존율이 60%로 낮게 나타난 것은 사육초기에 수질관리가 안되어 NO₂-N의 농도가 40mg/L이상 되었으며 한 달 가까이 지속되어 이때 많은 폐사가 일어났을 것으로 추측한다.

한편 일반사료를 투여한 호지에서는 140일째까지 총 사료 투여량은 2,352.6kg이었으며 평균 체중은 $13.275 \pm 0.728\text{g}$ 으로 나타났다. 이 호지에서도 SP10을 첨가한 사료를 투여한 호지와 같이 사육초기에 수질관리가 안되어 NO₂-N의 농도가 40mg/L이상 되었으므로 동일한 생존율을 보였을 것으로 보아 생존율을 60%로 추정하였을 때 140일째까지의 총 생산량은 1.6톤으로 추정할 수 있으며 FCR은 1.47로 나타났다.

마. 조피볼락에 대한 적용실험

어류에 대한 SP10의 사료섭취효과와 성장에 대한 효과를 조사하기 평균체중 $188.22 \pm 6.27\text{g}$ 되는 조피볼락을 구입하여 2010년 7월 25일부터 9월24일까지 그림 39와 같은 1.2 m² 원형 FRP 수조(수량 800 L)에 수용하였다. 2010년 9월 24일까지 사육기간 동안 수온은 22.7~25.8℃, 염분은 29.1~31.0 psu 범위였다. 실험어는 한 수조에 40마리씩 수용하였으며 10 L/min의 여과해수를 흘려주었다. 사료는 1일 1회 충분히 먹을 때까지 공급하였다. 실험어는 실험시작 1주 전부터 대조구 사료에 각각 순차시킨 후 실험에 이용하였다. 기능성 사료첨가제 SP10의 첨가농도별 실험에 사용한 기본사료의 조성은 표 3과 같으며, SP10 함량이 0%, 1% 그리고 2%가 되도록 3종류의 실험사료를 제조하였다.



그림 39. 조피볼락, *Sebastes schlegeli*에 대한 SP10의 사료 첨가에 의한 성장 효과를 검증하기 위한 사육 FRP 수조(800L)와 사육중인 어류.

표 5. Ingredients and nutrient contents of experimental diets

	Concentration of SP10 (%)		
	0	1	2
<i>Ingredients</i>			
White fish meal ¹	60.0	60.0	60.0
Wheat flour ¹	28.0	28.0	28.0
Cellulose ¹	2.0	1.0	-
Squid liver oil ¹	5.0	5.0	5.0
Mineral premix ²	1.0	1.0	1.0
Vitamin premix ²	1.0	1.0	1.0
Carboxymethyl cellulose ³	3.0	3.0	3.0
SP10	-	1.0	2.0
<i>Proximate analysis (% DM basis)</i>			
Moisture	9.1	9.1	9.1
Crude protein	45.1	45.1	45.1
Crude lipid	11.4	11.4	11.4
Crude ash	9.3	9.3	9.3

¹Provided by Suhyup Feed Co., Kyong-Nam, Korea.

²Premix(mg/kg): KI 250, MnSO₄*H₂O 2800, ZnSO₄*H₂O 2350, Vt K 225, Biotin(2%) 3500, Niacin 4850, Calcium pantothenate 11000, folic acid 2000, Vt-B₁ 1500, Vt-B₂ 2000, Vt-B₆ 2000, Vt-C 50000.

³Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA.

어류들은 1개월 간격으로 각 실험구로부터 10마리씩(수조당 5마리) 무작위로 추출하여 체장과 체중을 측정하여 그 결과를 그림 40에 나타내었다. 사육 초기의 조피볼락의 체중은 188.22±6.27g 이었으며 1개월 후 대조구의 조피볼락은 219.89±4.60g으로 성장하였으며, SP10 1% 첨가 실험구에서는 221.00±4.58g, 2% 첨가 실험구에서는 224.77±4.68g으로 성장하였다. 2개월 후에는 대조구, SP10 1% 첨가 실험구 그리고 SP10 2% 첨가 실험구에서 평균 체장은 각각 255.44±6.03g, 257.11±4.50g, 261.89±7.49g으로 성장하여 실험구간 유의한 차이는 보이지 않았다.

한편 2개월 동안 조피볼락을 사육한 결과 표 4에서 보는바와 같이 증중율(rate of weight gain), 일일 증중율(daily weight gain), 사료효율(feed efficiency), 일일 사료 섭취율(daily feed intake) 등에서 실험구간 차이는 보이지 않았다. 따라서 SP10은 어류에 대해서는 새우와 같이 유의한 효과는 보이지 않았다.

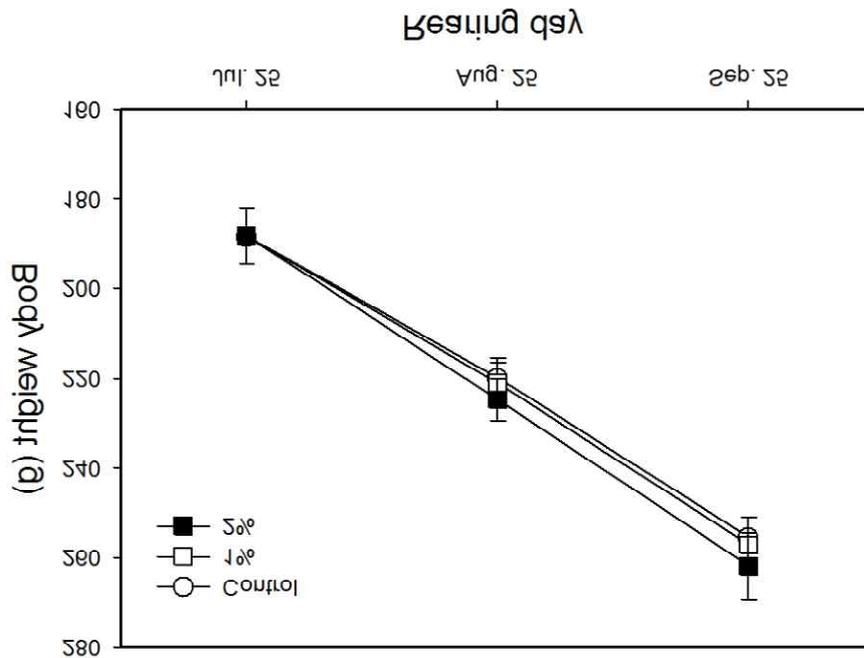


그림 40. 기본 사료에 SP10 1%와 2%를 첨가한 사료를 투여하여 사육한 조피블락의 평균 체중의 변화

표 6. SP10 1%와 2%를 첨가한 사료를 투여하여 사육한 조피블락의 사육성적

Diets	Concentration of SP10 (%)		
	0	1	2
Initial mean weight (g)	188.2	188.2	188.2
Final mean weight (g)	255.4	257.1	261.9
Weight gain (g)	67.2	68.9	73.7
Rate of weight gain (%) ¹	35.71	36.61	39.16
Daily weight gain (%) ²	0.489	0.498	0.528
Feed efficiency (%) ³	82.05	84.13	89.99
Daily feed intake (%) ⁴	0.596	0.594	0.588

1 Rate of weight gain(%) = (Weight gain/Initial mean weight)×100(%)

2 Daily weight gain(%) = (Weight gain×100)/[(Initial mean weight+Final mean weight)×days/2]

3 Feed efficiency(%) = (Weight gain×100)/Total feed intake

4 Daily feed intake(%) = (Total feed intake×100)/[(Initial mean weight+Final mean weight)×days/2]

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 성장촉진 효과

일반사료를 급여한 양식장의 경우는 140일째 평균체장이 $13.51 \pm 0.81g$ 이었으나, SP10을 첨가한 사료를 투여한 호지의 새우의 평균 체중은 $19.55 \pm 0.67g$ 으로 성장하여 일반사료를 투여한 호지의 새우에 비해 1개월 이상 빠른 성장을 하였다.

2. 사료효율 증대 효과

Zero-exchange system의 고밀도 흰다리새우 양식에서 SP10 첨가 사료를 투여한 결과 FCR이 1.22로 나왔으며, 일반사료를 투여하여 양식한 경우 FCR은 1.47로 나와 사료에 SP10을 첨가할 경우 사료효율이 좋음을 보여주었다.

3. 양식기간의 단축효과

SP10 첨가 사료를 투여한 호지에서는 140일째 50마리/kg으로 나타나 상품으로 출하하였으며, 일반사료만 급여한 양식장의 경우는 140일째에도 75마리/kg로 나타났고 SP10을 첨가해 양식한 경우 75마리/kg정도 성장하였을 때는 100일째이었으므로 양식기간을 한 달 이상 단축하는 효과를 얻어 20%이상 양식기간을 단축시킬 수 있다.

4. 양식 어민의 소득 증대효과

20% 이상의 양식기간의 단축으로 사료비의 절감 등 양식비용의 절감으로 기존 수익률보다 70% 이상 얻을 수 있다. 그리고 Zero-exchange system의 고밀도 새우 양식방법을 이용할 경우 연중 양식할 수 있어 연간 3회 양식을 할 수 있다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 실용화 및 산업화 계획

사료유인 효과 증대에 의한 성장 촉진을 도모할 수 있는 새우 사료 첨가제에 대한 제품을 생산할 계획임

2. 특허 등 지식재산권 확보 계획

본 기술을 정리하여 특허 출원 및 학술지에 발표할 계획임

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

없 음

제 7 장 참고문헌

- D'Abramo, L.R., 1997. Triacylglycerols and fatty acids. In: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.), Crustacean Nutrition. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, pp. 71-84.
- Andrews, J.W., Sick, L.V., 1972. Studies on the nutritional requirements of penaeid shrimps. Proc. World Maricult. Soc. 3, 403-414.
- Akiyama, D.M., Dominy, W.G., Lawrence, A., 1991. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry: revised. In: Akiyama, D.M., Tan, R.K.H. (Eds.), Proceeding of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop, September 19-25, 1991. American Soybean Association, Singapore, pp. 80-97.
- Avnimelech, Y., 1999. Carbon and nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. Aquaculture 176, 227-235.
- Balaz, G.H., 1973. Preliminary studies on the preparation and feeding of crustacean feeds. Aquaculture 2, 369-377.
- Bray, W.A., Lawrence, A.L., Lester, L.J., 1990. Reproduction of eyestalk-ablated *Penaeus stylirostris* fed various levels of total dietary lipid. J. World Aquac. Soc. 21, 41-52.
- Briggs, M., Funge-Smith, S., Subasinghe, R. and Phillips, M. (2004). Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. FAO regional office for Asia and the Pacific publication, Bangkok.
- Brock J.A., Gose R.B., Lightner D.V. & Hasson K. (1997) Recent developments and an overview of Taura syndrome of farmed shrimp in the Americas. In: Diseases in Asian Aquaculture III (ed. by T.W. Flegel & I.H. McRae) pp. 275-284. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.
- Brune, D., Schwartz, G., Eversole, A.G., Collier, J.A., Schwedler, T.E., 2003. Intensification of pond aquaculture and high rate photosynthetic system. Aquacult. Eng. 28 (1-2), 65-86.
- Burford, M. A., P. J. Thompson, R. P. McIntosh, R. H. Bauman and D. C. Pearson, 2004. The contribution of flocculated material to shrimp

- (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero exchange system. *Aquaculture*, 232, 525–537.
- Chang, P.S., Chen, H.C. and Wang, Y.C. (1998). Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization. *Aquaculture* 164, 233–242.
- Cho, C.Y., Bureau, D.P., 2001. A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. *Aquaculture Research* 32 (Suppl. 1), 349–360.
- Coórdova–Muruetá, J.H., Garcí’a–Carren~, F.L., 2002. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture*, 210, 371–84
- Cronin, T.W., Marshall, N.J. and Caldwell, R.L. (1994) *Vision Res.* 34, 279–291
- Cronin, T.W., Marshall, N.J., Quinn, C.A. and King, CA. (1994) *Vision Res.* 34,1443–1452
- Cruz, E., Guillaume, J., 1983. Facteur de croissance inconnu de la farine de calamar pour la crevette japonaise: localization de ce facteur. ICES council meeting 1983 (collected papers). Copenhagen, 1983, 13 pp.
- Davis, D.A., 2001. Best management practices for feeds and feeding practices. Book of Abstracts. *Aquaculture 2001*, The Annual International Conference and Exhibition of the World Aquaculture Society, Jan 21–25, 2001. Orlando, FL. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, p. 166.
- Davis, D.A., Robinson, E.H., 1986. Estimation of the dietary lipid requirement level of the white crayfish *Procambrus acutus acutus*. *J. World Aquacult. Soc.* 17, 37–43.
- FAO, 2000. Yearbook of Fisheries Statistics 2000. Rome, Italy
- Fenucci, J.L., Zein–Eldin, Z.P., Lawrence, A.L., 1980. The nutritional response of two penaeid species to various levels of squid meal in a prepared feed. *Proc. World Maricult. Soc.* 11, 403–09.
- Flegel, T. W., 1997. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. in: NRIA International Workshop, New

- Approaches to Viral Diseases of Aquatic Animal. National Research Institute of Aquaculture, nansei, Mie, Hapen, pp. 167–189.
- Floreto, E.A.T., Bayer, R.C., Brown, P.B., 2000. The effect of soybean-based diets, with and without amino acid supplementation, on growth and biochemical composition of juvenile American lobster, *Homarus americanus*. *Aquaculture* 189, 211–235.
- Goldsmith, T.H. and Cronin, T.W. (1993) *Visual Neurosci.* 10,915–920
- Hill, B.J. and Wassenberg, T.J., 1987. Feeding behaviour of adult tiger prawns, *Penaeus esculentus*, under laboratory conditions. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 38: 183–190.
- Hill, B.J., Wassenberg, T.J., 1992. Preferences and amount of food eaten by the prawn *Penaeus esculentus* over the moult cycle. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 43, 727–735.
- Holland, K.N., Borski, R.J., 1993. A palatability bioassay for determining ingestive stimuli in the marine shrimp *Penaeus íannamei*. *Aquaculture* 109, 153–164.
- Liao, I.C., 1969. Study on the feeding of Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *China Fish. Mon.* 197, 17–18.
- Lo, C.F., Ho, C.H., Peng, S.E., Chen, C.H., Hsu, H.C., Chiu, Y.L., Chang, C.F., Liu, K.F., Su, M.S. and Wang, C.H., Kou, G.H. (1996). White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of aquatic oranisms* 27, 215–225.
- Lotz, J. M. and D. V. Lightner, 2000. Shrimp Biosecurity: Pathogens and Pathogen Exclusion. (in) R. A. Bullis and G. D. Pruder (eds.), *Controlled and Biosecure Production Systems, Proceedings of a Special Session – Integration of Shrimp and Chicken Models*, The Oceanic Institute, Waimanalo, Hawaii, USA, pp. 67–74.
- McIntosh R.P. (1999) Changing paradigms in shrimp farming: I. General description. *Global Aquaculture Advocate* 2, 40–47.
- Martin, J.–L.M., Veran, Y., Guelorget, O., Pham, D., 1998. Shrimp rearing: stocking density, growth, impact on sediment, waste output and their

- relationships studied through the N budget in rearing ponds. *Aquaculture* 164, 135-149.
- Mills, B.J. and McCloud, P.I. (1983). Effects of stocking and feeding rates on experimental pond production of the crayfish *Cherax destructor* clark (Decapoda: Parastacidae). *Aquaculture* 34, 51-72.
- Neal, R.A., 1980. Penaeid shrimp culture research at the National Marine Fisheries Service Galveston Laboratory. In: Pillay, T.V.R., Dill, W.A. (Eds.), *Advances in Aquaculture*. FAO Technical Conference on Aquaculture. Kyoto, 26 May-2 June 1976. Fishing News Books, Oxford, UK, 653 pp.
- New, M.B., 1976. A review of dietary studies with shrimp and prawns. *Aquaculture* 9, 101-144.
- Nunes, A.J.P., Goddard, S., Gesteira, T.C.V., 1996. Feeding activity patterns of the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. *Aquaculture* 144, 371-386.
- Nunes, A.J.P., Parsons, G.J., 1999. Feeding levels of the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* in response to food dispersal. *J. World Aquac. Soc.* 30, 331-348.
- Nunes, A.J.P., Parsons, G.J., 2000. Size-related feeding and gastric evacuation measures for the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis*. *Aquaculture* 187, 133-151.
- Piedad-Pascual, F., 1990. Feeds and feeding of cultured tiger prawns in Southeast Asia. *SEAFDEC Asian Aquacult.* 12, 5-8.
- Reymond, H., Lagarde`re, J.P., 1990. Feeding rhythms and food of *Penaeus japonicus* Bate (Crustacea, Penaeidae) in salt water ponds: role of halophilic entomofauna. *Aquaculture* 81, 125-143.
- Robertson, L., Lawrence, A.L., Castille, F.L., 1993. Effect of feeding frequency and feeding time on growth of *Penaeus íanname* Boone.. *Aquacult. Fish. Manage.* 24, 1-6.
- Sedgwick, R.W., 1979. Effect of ration size and feeding frequency on the growth and food conversion of juvenile *Penaeus merguirnsis* de Man. *Aquaculture*, 16: 279-298.
- Sick, L.V., Baptist, G.J., 1973. Effects of selected physical and nutritional

- factors on rates of pelleted diet ingestion by postlarval penaeid shrimp. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.* 89, 161–165.
- Sick, L.V., White, D.B., Baptist, G.J., 1973. The effect of duration of feeding, amount of food, light intensity and animal size on rate of ingestion of pelleted food by juvenile penaeid shrimp. *Prog. Fish-Cult.* 35, 22–26.
- Smith, K.C. and Macegno, E.R. (1990) *J. Camp. Physiol. A* 166,597–606
- Smith, D.M., Burford, M.A., Tabrett, S.J., Irvin, S.J. and Ward, L. (2002). The effect of feeding frequency on water quality and growth of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* 207, 125–136.
- Tacon, A.G.J., 2001. Minimizing environmental impacts of shrimp feeds. *Global Aquaculture Advocate* 4 (6), 34–35.
- Tacon, A.G.J., Akiyama, A.G.J., 1997. Feed ingredients. In: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.), *Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture*, vol. 6. World Maric. Soc, Baton Rouge, LA, pp. 411–472.
- Tacon, A.G.J., Cody, J.J., Conquest, L.D., Divakaran, S., Forster, I.P., Decamp, P., O.E., 2002. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition* 8, 121–137.
- Tacon, A.G.J., Dominy, W.G., Pruder, G.D., 2000. Tendencias y retos globales de los alimentos para el camarón. In: Ricque-Marie, D., Cruz Suarez, L.E. (Eds.), *Avances en Nutrición Acuicóla IV, Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicóla*. Merida, Yucatan, Mexico, pp. 1–26.
- Tacon, A.G.J., Phillips, M.J., Barg, U.C., 1995. Aquaculture feeds and the environment. *Water Science Technology* 31 (10), 41–50.
- Ueberschaer, Bern, (1999). Die Trypsinaktivität als biochemischer Indikator zur Bestimmung des Ernährungszustandes sowie der Fressaktivität von Fischlarven und seine Anwendung in Feldstudien. PhD Thesis, University of Hamburg. Weissensee Verlag, Berlin 2000, p201, ISBN
- Velasco, Mario, Addison L. Lawrence, Frank L. Castille, 1999. Effect of variations in daily feeding frequency and ration size on growth of

shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone), in zero-water exchange culture tanks, Aquaculture 179:14-148.

Vinatea, L., Ga´ lvez, A. O., Browdy, C.L., Stokes, A., Venero, J., Haveman, J., Lewis, B.L., Lawson, A., Shuler, A., Leffler, J.W. 2010. Photosynthesis, water respiration and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in a super-intensive raceway culture with zero water exchange: Interaction of water quality variables. Aquacult. Eng. 42 (2010) 17-24.

Wyban, J.A., Pruder, G.D., Leber, K.M., 1989. Paddlewheel effects on shrimp growth, production and crop value in commercial earthen ponds. J. World Aquac. Soc. 20, 18-23.

한창희 (2005) 새우류의 흰반점증후군바이러스(WSSV)에 대한 저항성 물질 개발 (수산특정과제 보고서). 해양수산부, pp141.

해양수산부 (2000) 수산통계연보.

농림수산식품부 (2009) 통계연보.