

최 종
보 고 서

새우류의 흰반점증후군바이러스(WSSV)에 대한 저항성물질 개발

Immune resistance materials against white spot
syndrome virus (WSSV) of shrimps

2005. 12.

동의대학교

해 양 수 산 부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “새우류의 흰반점증후군바이러스(WSSV)에 대한 저항성물질 개발”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 12월

주관연구기관명 : 동의대학교

총괄연구책임자 : 한 창 희

연 구 원 : 김 병 우, 김 광 현

김 병 기, 최 홍 대

김 명 희, 이 재 용

권 지 영, 조 형 구

협동연구기관명 : 국립수산과학원 갑각류연구센터

협동연구책임자 : 서 형 철

연 구 원 : 김 종 화, 김 봉 래

김 대 현, 김 종 식

김 수 경

요 약 문

I. 제 목

새우류의 흰반점증후군바이러스(WSSV)에 대한 저항성물질 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 목적

천연 식물들로부터 새우의 면역증강을 촉진하고 바이러스성 질병에 대한 저항성을 높일 수 있는 약재들을 탐색하고, 이들로부터 면역증강, 성장촉진 등 생리적인 기능성 물질들을 추출 분리한 후 이를 이용하여 대하 등 새우류의 WSSV에 대한 저항성을 향상시켜 새우의 양식생산성을 높일 수 있는 면역증강 사료 첨가제를 개발하는데 그 목적이 있다.

2. 중요성

새우의 양식은 우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로 수산양식 중 가장 고 부가가치 산업으로 각광을 받고 있다. 세계의 새우양식 총생산량이 2003년에 148만톤에 이르고 있으며 우리나라에서도 매년 조금씩 증가하여 2004년도에는 2,426톤으로 서해안 지역에서는 매우 중요한 양식 산업의 하나로 자리 잡고 있다.

그러나 흰반점증후군바이러스(white spot syndrome virus, WSSV)에 의한 질병으로 새우의 대량폐사가 일어나면서 최근에는 전 세계적으로 새우 양식 산업에 막대한 피해를 미쳐 매년 40억불의 손실을 입고 있다. 우리나라에서도 WSSV질병에 의한 피해가 매년 증가하여 대하종묘 입식량의 60%가 WSSV에 의해 폐사되는 실정이어서 적어도 매년 200억원의 손실을 가져오고 있다.

WSSV에 감염된 새우류는 그 감염 강도에 따라 3~10일 내에 80~100%가 폐사되며, 20일 이내에 전량 폐사되는 새우류의 치명적인 질병으로 최근 새우양식에 가장 큰 걸림돌이 되고 있다.

이러한 피해를 막기 위해 1994년 이후부터 흰반점증후군에 대한 연구를 시작

하여 원인균인 WSSV의 유전자 서열이 밝혀지면서 PCR에 의한 검출방법, 조직학적 병변현상, 전염과정 등 많은 연구들이 이루어지고 있다. WSSV에 대한 면역증강제의 개발을 위한 연구들이 많이 이루어져있으나 지금까지 개발된 물질을 이용하여 새우양식에 적용하였을 때 WSSV에 의한 대량 감모를 줄였다는 연구보고는 아직 없다.

최근에 유전공학적인 방법에 의한 WSSV의 진단법, 감염경로 등에 대한 연구들이 대단히 많이 있으나 이 질병에 대한 예방이나 치료법에 대해서는 아직 개발되어있지 않아 전 세계적으로 WSSV에 의한 질병에 속수무책이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 식물성 약재들의 면역 및 생리활성

1-1. 면역활성

면역활성이 우수한 식물 약재를 찾기 위해 다음 같은 방법으로 조사하였다.

1) 약재의 선정

팥(red bean of *Phaseolus angularis*), 땅콩(peanut of *Arachis hypogaea*) 옥수수(maize of *Zea mays*), 보리(barley, *Hordeum vulgare var. hexastichon*), 밀(wheat, *Triticum aestivum (vulgare)*), 울무(grains of adlay, *Coix lachrymajobi var. mayuen*), 조(seed of millet, *Setaria italica*), 메밀(seed of buck wheat, *Fagopyrum esculentum*) 등 곡류 9종과 감초(*Glycyrrhiza uralensis*)와 川芎(*Cnidium officinale*), 當歸(*Angelica gigas*), 인삼(*Panax ginseng*), 구기자(*Lycium chinense*), 오미자(*Schisandraceae chinensis*), 산수유(*Cornus officinalis*) 등 7종의 한약재, 그리고 미역(*Undaria pinnatifida*), 다시마(*Laminaria japonica*), 모자반(*Sargassum fulvellum*), 청각(*Codium fragile*), 구멍갈파래(*Ulva lactuca*), 김(*Porphyra tenera*), 우뚝가사리(*Gelidium amansii*), 서실(*Chondria crassicaulis*), 도박(*Pachymeniopsis elliptica*) 등 해조류 9종을 대상으로 선정하여 조사하였다.

2) 새우

우리나라의 주된 양식대상종인 대하와 최근 새우양식 대체품종으로 관심을 갖고

있는 흰다리새우를 대상으로 실험하였다.

3) 면역활성 조사

새우의 혈액으로부터 혈구를 분리하여 nitro blue tetrazolium(NBT)법을 이용하여 superoxide production 평가법으로 조사하였다.

1-2. 기호성

약재의 사료 첨가가 새우의 사료 섭취에 영향을 받는지를 조사하기 위해 약재 추출물을 첨가한 사료의 일일 사료섭취량을 조사하였다.

사료 섭취량의 측정은 (Nunes and Parsons, 2000)의 방법에 의해 하였다.

1-3. WSSV에 대한 challenger test

WSSV의 감염되어 폐사된 대하를 비감염상태의 사육중인 대하에 먹이로 주어 인위적으로 감염시킨 후 상기의 각 약재들의 추출물을 첨가한 사료를 각 실험구의 새우에게 급이하여 생존율을 조사하였다.

1-4. PCR법에 의한 WSSV 감염 조사

PCR 반응에 사용된 primer는 13-20 mer의 2 set (1F/1R: -5'-AATC TGATGAGACAGCCCAAG-3' / -5'-GGGAATGTTAAATATGTATCGG-3', 2F/2R : -5'-CCAAGTTGTTAAACAGGCCG-3' / -5'-GGCATGGACA GTCAGGTCTT-3')로서 이들 두 set를 이용하여 1차와 2차에 걸쳐 nested PCR을 수행한 후 전기영동하여 감염상태를 확인하였다.

1-5. *in situ*법에 의한 WSSV 감염기관의 관찰

감염된 새우에서 DNA 추출 후, 5'-CCAAGTTGTTAAACAGGCCG-3'와 5'-GACCTGACTGTCCATGCC-3' primer로 RCR을 이용하여 WSSV 단편을 증폭시켰으며, 증폭된 WSSV의 DNA 단편을 vector에 삽입하여 형진전환 된 균주로부터 plasmid DNA 분리하고 DNA sequencing를 확인한 다음 RNA용 probe를 제작하였

다. 제작된 prove를 이용하여 실험용 새우의 각 조직에 hybridization시켜 현미경에서 검경하여 감염을 확인하였다.

1-6. 약제의 배합비율에 따른 WSSV에 대한 저항성 조사

WSSV에 대한 저항성을 더 높을 수 있는 약제의 배합율과 조성을 찾기 위해 기호성이 뛰어난 곡류 세 종, 한약재 두 종 그리고 해조류 두 종에 대하여 배합 비율을 각기 달리하여 추출한 후 농축한 물질을 각각 SP-1, SP-2, SP-3로 하여 이들 물질을 사료 1kg에 0.5g씩 첨가하여 WSSV에 대한 challenger test를 하여 최적의 배합비율을 조사하였다.

1-7. 추출물 분획의 면역활성 및 생리활성 효과

상기의 조사된 약제들 중 섭이효과와 면역활성 효과가 우수한 두 종의 식물을 대상으로 이들의 methanol(MeOH)추출물을 얻은 후 dichloromethane (CH_2Cl_2), ethyle acetate (EtOAc), butanol (BuOH) 그리고 물(H_2O)을 이용하여 순차적으로 분획하고 이를 각각 사료에 첨가하여 급이하였을 때 대하의 superoxide 생성, 사료 섭취율, 탈피율을 조사하여 각 분획에 대한 기능성을 조사하였다. WSSV에 대한 저항성이 우수한 약제 혼합비율에 따라 각 약제의 기능성 분획들을 혼합하여 새우의 면역증강 및 성장촉진 사료첨가제 SP(shrimp power)-04를 제조하였다.

2. 첨가제 SP-04의 WSSV에 대한 저항성 및 생리활성 효과

2-1. SP-04 첨가 농도별 먹이유인효과

SP-04 첨가량에 따른 대하의 먹이 유인효과를 알기 위하여 SP-04를 0.2g/kg, 0.4g/kg, 0.8g/kg으로 일반사료에 첨가하여 일일 사료 섭취량을 조사하였다. 그리고 최적의 첨가량을 알기위해 SP-04를 0.5g/kg, 1.0g/kg, 2.0g/kg, 4.0g/kg으로 일반사료에 첨가하여 일일 사료 섭취율 조사하였다.

2-2. SP-04 첨가량의 변화에 따른 소화능력

SP-04를 사료에 첨가하였을 때 많이 섭취된 먹이들을 충분히 소화해 낼 수 있는 능력이 있는 지를 조사하기 위하여 대하를 사용하여 SP-04를 첨가한 사료를

급이하여 1시간 후에 각 실험구로부터 채집된 각 개체들의 전장(foregut), 중장(midgut) 그리고 배설물(feces)내의 trypsin의 활성도를 측정하였다.

2-3. SP-04 첨가량에 따른 성장효과

SP-04를 0.2g/kg, 0.4g/kg, 0.8g/kg으로 일반사료에 첨가하여 8월1일부터 20일간 평균 체중 $4.31 \pm 0.29g$, 체장 $68.63 \pm 1.41mm$ 의 대하를 2Ton 원형 수조에 사육한 후 체장과 체중의 변화를 조사하였다.

2-4. SP-04 첨가사료의 최적 사료 급여율

SP-04를 사료에 0.4g/kg의 농도로 첨가하여 새우에 급여할 때 가장 적당한 사료 투입량을 조사하기 위하여 새우의 총 체중에 1%, 3%, 5%, 8% 그리고 10%를 투입하였을 때 전장과 중장 그리고 배설물에 있는 단백질량을 시간별로 조사하여 최적의 사료 급여율을 조사하였다.

2-5. SP-04 첨가사료의 공식제어 효과

SP-04를 첨가한 사료가 공식제어에 얼마나 효과가 있는지를 조사하기 위해 $1m \times 1m \times 0.7m$ 의 수조에 3.5g 전후의 대하를 30마리를 넣고 매일 전 체중에 5%되도록 SP-04 0.4g/kg을 첨가한 사료를 급여하면서 15일간 사육하여 SP-04 무첨가 일반 사료로 사육한 실험구와 공식에 의한 사망 개체수를 비교 조사하였다.

2-6. SP-04의 WSSV 발병 저항 효과

SP-04를 첨가한 사료를 새우에 급여하였을 때 WSSV에 대한 저항성을 조사하기 위하여 대하 1Ton FRP 수조에 20마리씩 8개의 수조에 나누어 4개의 실험구로 나누고 WSSV를 감염시키기 전 10일부터 미리 두 개의 실험구에는 SP-04 0.4g/kg 과 0.2g/kg을 첨가한 사료를 급여하고, 2개의 대조 실험구에는 SP-04를 첨가하지 않은 일반사료를 급여하여 조사하였다.

2-7. WSSV가 대하의 성장에 미치는 영향

바이러스에 감염된 대하와 비 감염된 대하에서 SP-04 첨가제의 효과를 비교하

기 위하여 비 감염새우와 감염새우에 SP-04 0.4g/kg과 0.2g/kg을 첨가한 사료를 급이하여 성장효과를 조사하였다.

3. SP-04 첨가 사료를 사용한 대하와 흰다리새우의 양식효과

3-1. 대하의 양식 효과

5월 26일부터 2,000평 3개 호지에 0.02g크기의 대하 치하를 30마리/m²의 밀도로 입식한 후 퓨리나사 제품의 사료에 SP-04를 0.4g/kg으로 첨가하여 급이한 양식장에서 정기적으로 채집하여 대하의 체장과 체중을 측정하였다. 항생제나 그 외 어떠한 약품도 사료에 첨가하지 않았다.

3-2 흰다리새우의 양식 효과

6월 4일부터 5,000평 2개 호지에 0.02g크기의 흰다리새우 치하를 50마리/m²의 밀도로 입식한 후 수협사료 제품의 사료에 SP-04를 0.4g/kg으로 첨가하여 급이한 양식장에서 정기적으로 투망에 의해 채집하여 평균 체중의 변화를 조사하였다.

3-3 경제성 분석

SP-04 첨가제를 사용하여 대하를 양식하였을 때 ha당 사료의 일일 투여량의 변화와 전체 투여량을 조사하였으며, SP-04를 첨가한 사료를 급이하여 양식한 경우의 생산금액과 각종 비용들을 조사하여 일반양식장에서의 생산금액과 각종 비용들을 비교 조사하였다.

IV. 연구개발 결과

1. 식물성 약재들의 면역 및 생리활성

1) 면역활성

곡류는 건강식품으로 널리 이용하는 팥(red bean of *Phaseolus angularis*), 땅콩(peanut of *Arachis hypogaea*) 옥수수(maize of *Zea mays*), 보리(barley, *Hordeum vulgare* var. *hexastichon*), 밀(wheat, *Triticum aestivum* (*vulgare*)), 울무(grains of adlay, *Coix lachrymajobi* var. *mayuen*), 조(seed of millet, *Setaria*

italica), 메밀(seed of buck wheat, *Fagopyrum esculentum*) 등 곡류 9종과 감초 (*Glycyrrhiza uralensis*)와 川芎(*Cnidium officinale*), 當歸(*Angelica gigas*), 인삼 (*Panax ginseng*), 구기자(*Lycium chinense*), 오미자(*Schisandraceae chinensis*), 산수유(*Cornus officinalis*) 등의 한약재와 미역(*Undaria pinnatifida*), 다시마 (*Laminaria japonica*), 모자반(*Sargassum fulvellum*), 청각(*Codium fragile*), 구멍 갈파래(*Ulva lactuca*), 김(*Porphyra tenera*), 우뚝가사리(*Gelidium amansii*), 서실 (*Chondria crassicaulis*), 도박(*Pachymeniopsis elliptica*) 등 해조류 9종을 대상으로 이들 추출물을 대하여 급이하여 superoxide anion assay를 통해 혈구세포에서의 O_2^- 의 생성 효과면역활성을 조사하였다. 곡류에서는 조와 옥수수가 높게 나왔으며, 한약재에서는 당귀와 천궁이 높게 나왔다. 그리고 해조류에서는 청각과 구멍갈파래가 높게 나왔다.

2) 기호성

상기 약제들에 대한 일일사료 섭취량을 조사한 결과 곡류에서는 조, 옥수수, 메밀이 높게 나왔으며 한약재에서는 감초와 천궁이 가장 높게 나왔으며 실험한 약제 중에서 가장 높게 나왔다. 해조류에서는 김과 도박 등 홍조류가 높게 나왔으나 곡류나 한약재 보다 기호성이 낮게 나왔다.

3) WSSV에 대한 저항성

상기 실험에서 superoxide 생성과 기호성 조사에서 양호한 약제들을 대상으로 조사한 결과 기호성이 뛰어난 감초와 옥수수의 추출물을 첨가한 사료를 급이한 실험구에서는 7일과 9일에 모두 폐사되어 생존율이 0%였다. 그러나 면역력이 높은 청각과 천궁의 추출물을 첨가한 사료를 급이한 실험구에서는 8일 이후에는 각각 2마리와 3마리가 살아남아 20~30%의 생존율을 보였다. 이러한 실험결과는 WSSV에 대한 저항성은 기호성보다 면역력을 높이는 물질이 더 효과적임을 보여주고 있다.

4) *in situ*법에 의한 WSSV 감염기관의 조직학적 관찰

감염된 개체들은 대체로 아가미와 상피세포 층에 virus에 대해 양성반응을 보였으며, 간체장과 근육층에는 virus에 대해 양성반응을 거의 보이지 않았다. 그리고

생식소의 난모세포에서도 virus에 양성을 보였다.

5) 약재의 배합율에 따른 WSSV에 대한 저항성

기호성이 우수한 약재를 주로 하여 배합한 SP-01, 기호성이 우수한 약재와 면역증강 효과가 우수한 약재를 1:1의 비율로 혼합한 SP-02, 기호성이 우수한 약재보다 면역증강 효과를 보인 약재들을 많이 혼합한 SP-03를 사용하여 WSSV에 대한 저항성을 조사한 결과 생존율이 각각 0%, 20%, 30%로 나왔다.

그러나 SP-03을 바이러스 감염시키기 전 2주부터 먹인 대하들은 70%의 생존율을 보였다.

6) 추출물 분획의 면역활성 및 생리활성 효과

기호성이 우수한 식물의 각 분획물들 중 면역활성, 일일사료섭취율, 탈피율 모두 물 분획이 좋았으며, 면역기능성이 우수한 식물에서는 면역활성은 CH_2Cl_2 분획이, 일일 사료섭취율은 물 분획이, 탈피율은 EtOAc 분획이 높은 값을 보였다.

2. 첨가제 Shrimpower-04(SP-04)의 WSSV에 대한 저항성 및 생리활성 효과

1) SP-04 첨가 농도별 먹이유인 효과

SP-04을 0.2g/kg, 0.4g/kg, 0.8g/kg으로 사료에 첨가했을 때 새우의 일일 사료섭취량은 $0.25 \pm 0.02\text{g}$, $0.28 \pm 0.03\text{g}$, $0.30 \pm 0.03\text{g}$ 으로 첨가량이 증가함에 따라 일일 사료섭취량도 증가하였다.

그러나 SP-04를 0.5g/kg, 1.0g/kg, 2.0g/kg, 4.0g/kg으로 사료에 첨가했을 때 새우의 일일 사료섭취량은 각각 $0.24 \pm 0.03\text{g}$, $0.26 \pm 0.03\text{g}$, $0.20 \pm 0.02\text{g}$ 그리고 $0.15 \pm 0.02\text{g}$ 으로 SP-04를 2.0g/kg 이상 첨가하였을 때는 일일 사료섭취량이 오히려 감소하였다.

2) SP-04 첨가량의 변화에 따른 소화능력

무 첨가 일반 사료의 경우는 먹이를 섭취하지 않은 개체들이 30%나 되지만 SP-04를 0.1g/kg과 0.2g/kg으로 첨가한 실험구에서는 먹이를 섭취하지 않은 개체들이 각각 23.3%와 6.7%로 나타났다. SP-04를 0.3g/kg 이상을 첨가한 실험구에

서는 먹이를 섭취하지 않은 개체들은 하나도 보이지 않았다.

SP-04를 첨가하는 양에 따라 체중에 대한 전장과 중장의 무게의 비가 실험구에 따라 유의한 큰 차이는 보이지 않았지만 SP-04를 첨가하는 양이 많을수록 그 비율이 점점 증가하는 경향을 보였다.

간체장에서 trypsin의 활성도는 SP-04 첨가량이 증가하더라도 이에 따른 변화는 볼 수 없었으나 전장에서는 SP-04 첨가량이 증가함에 따라 trypsin의 활성도가 점점 증가하고 있는 것을 볼 수 있었다. 중장에서는 무첨가 실험구와 SP-04 0.1g/kg 첨가 실험구에서는 유의한 차이가 없었으나 SP-04 0.3g/kg 이상 첨가한 실험구에서는 SP-04의 첨가량에 따른 변화는 없었다.

3) SP-04 첨가량의 변화에 따른 성장

사육 20일 후 SP-04를 사료에 0g/kg, 0.2g/kg, 0.4g/kg, 0.8g/kg으로 첨가하여 새우에 급여하였을 체장은 각각 $73.16 \pm 2.78\text{mm}$, $80.44 \pm 2.60\text{mm}$, $82.82 \pm 2.11\text{mm}$, $83.63 \pm 2.98\text{mm}$ 으로 성장하였고, 체중은 $5.44 \pm 0.69\text{g}$, $7.32 \pm 0.72\text{g}$, $7.91 \pm 0.47\text{g}$, $8.18 \pm 0.86\text{g}$ 으로 성장하여 SP-04의 첨가량이 증가함에 따라 성장도 양호한 것으로 나타났다.

4) SP-04 첨가사료의 최적 사료 급여율

0.4g/kg의 농도로 SP-04를 사료에 첨가하여 새우의 총 체중에 1%, 3%, 5%, 8% 그리고 10%로 투여하였을 때 소화 시간에 따른 각 소화기관과 배설물의 소화 효소 활성의 변화나 단백질 함량의 변화에는 차이가 없었다.

5) SP-04의 공식 제어 효과

SP-04 무첨가 일반 사료를 투여한 경우 일일 공식율이 초기에는 8.3%로 높았으나 사육이 계속되어 사육 밀도가 작아지면서 서서히 내려가 4%전후로 유지하였다. SP-04를 첨가한 사료를 투여한 실험구에서는 사육기간 동안 일일 공식율이 2%대로 일정하게 유지하였다. 공식으로 인한 사망개체수도 무첨가 일반사료 실험구가 SP-04 첨가 실험구보다 높게 나타나 생존율에서도 큰 차이를 보였다. 따라서 SP-04를 첨가할 경우 공식제어에도 많은 효과가 있음을 보여주고 있다.

6) SP-04의 WSSV 저항성 효과

대하에 WSSV를 인위적으로 감염시킨 후 SP-04를 첨가하지 않은 일반사료를 급이한 실험구에서는 감염 후 6일 만에 전부 폐사하였으나 SP-04 0.4g/kg의 첨가사료 실험구에서는 80%의 생존율을 보였다. SP-04 0.2g/kg의 첨가사료 실험구에서는 72%의 생존율을 보여 SP-04 사료 첨가제가 WSSV에 대해 높은 저항성을 갖고 있음을 보여주었다.

흰다리새우를 이용하여 대하와 동일한 방법으로 SP-04 첨가제를 사용하여 WSSV에 대한 challenger test를 한 경우에서도 일반사료를 급이한 감염실험구에서는 10일만에 전부 폐사된 반면 SP-04를 첨가하여 사육한 실험구에서는 80%의 높은 생존율을 보여 흰다리새우에서도 WSSV에 대해 높은 저항성을 보였다.

7) WSSV가 성장에 미치는 영향

비 감염 실험구에서 SP-04를 첨가하지 않은 일반사료를 급이한 새우들은 일일 탈피율이 3.3%인 반면 SP-04 0.4g/kg, 0.2g/kg 첨가한 실험구의 새우의 탈피율은 13.3%, 6.0%였다. 감염시킨 대하에서 일반사료를 급이한 새우들은 일일 탈피율이 1.3%인 반면 SP-04 0.4g/kg, 0.2g/kg을 첨가한 실험구의 새우에서는 탈피율이 각각 11.3%, 9.3%로 나타났다.

3. SP-04 첨가 사료를 사용한 대하와 흰다리새우의 양식효과

1) 대하의 양식

SP-04를 첨가한 사료를 급이한 양식지에서 대하는 5월 26일 입식한 후 양식 50일(7월 14일)에 평균 5.59g으로 자랐으며, 75일(8월 4일)에는 11.81g, 83일(8월 16일)에는 15.27g 그리고 93일째 되는 8월 30일에는 18.35g으로 성장하여 입식한 후 3개월 만에 9월 1일 출하하였다.

SP-04를 첨가한 양식 실험구에서의 성장 속도는 일반사료를 급이한 양식지에 비하여 월등히 좋았다.

PCR 방법으로 입식 후 50일이 지난 후부터 양식장에서 새우들을 채집하여 WSSV를 조사한 결과 20%가 감염되어 있었으며 그 후 조금씩 증가하여 수확기에

는 90% 이상 거의 전개체가 감염되어 있었으나 폐사는 일어나지 않았다.

2) 흰다리새우의 양식

사료첨가제 SP-04를 사용하여 흰다리새우 양식을 하기 위하여 2005년 6월 4일부터 전남 신안군 임자면 대기리 T 양식장에서 5,000평 호지에 0.02g크기의 흰다리새우를 평당 150마리의 밀도로 입식하였다. 입식한 후 37일째인 7월 11일에 평균 체중은 3.70g이었으며, 51일째인 7월 15일에 체중은 6.50g으로 성장하였다. 65일째인 8월 8일에는 평균 체중이 9.42g으로 성장하였으며 77일째인 8월 20일에는 15.00g으로 급격히 성장하면서 91일째인 9월 1일에는 평균 체중이 18.81g까지 성장하여 9월 3일 수확하여 출하하였다.

3) 경제성 분석

대하의 수확기까지 투여한 사료의 총량은 3,035kg/ha이었다. 이때 대하의 수확량은 2,850kg/ha이었으며 사료 전환률 (FCR, feed conversion ratios)은 1.07로 나타났다.

반면, 일반 양식장에서의 평균 체중 18g까지의 양식하는데 필요한 사료 총량은 5,198kg/ha이며, 대하의 생산량을 3,000kg으로 하였을 때 FCR은 1.73으로 나타났다.

순 수익에서는 SP-04 첨가제를 사용한 경우는 4,063만원/ha으로 수익률은 71.28%가 되었으며, 일반사료를 사용하여 양식을 성공하였을 경우는 순수익은 2,562만원/ha이며 수익률은 53.38%로 계산되었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

1. 학문적 분야

대상 식물들로부터 면역활성을 높이는 물질과 먹이 유인 및 성장촉진 물질들을 분리, 정제하고 구조적 특성을 밝히는 연구를 계속 진행할 예정이다. 또한 이들 물질들을 이용하여 새우의 면역증강과 성장에 대한 생리학적 작용기작을 연구하는데 생리활성 조절 물질로서 제공 되어질 수 있다. 그리고 새우의 기호성에 대한 생리

적 연구에도 활용될 수 있다.

2. 산업적 분야

바이러스성 질병으로 우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로 새우류 양식에서 매년 15억불 이상의 막대한 손실을 입고 있다. 이를 막기 위해 많은 연구들이 있어왔으나 아직까지 괄목할만한 방법이 개발되지 않았다.

본 연구 결과에 의하면 WSSV에 감염된 새우에 개발된 사료 첨가제인 SP-04를 사용하면 80% 이상 생존율을 유지해 줄 수 있어 지금까지 개발된 어떠한 사료첨가제보다 월등히 우수함을 보였다.

따라서 새우의 WSSV 등 바이러스성 질병에 대해 저항성을 높이고 성장을 촉진시키는 새우사료첨가제 개발 기술을 기업체에 이전하여 제품개발과 대량생산 체제를 만들어 새우양식 어민에 제공함으로써 사료비의 절감, 생산성의 향상에 의해 어민소득 증대에 이바지 고자 한다.

또한 어류나 새우양식에 항생제 대용으로 천연 면역증강제의 사용으로 잔류항생제나 발암성물질에 대한 불안을 불식시킴으로서 수산물 소비 증대와 국민건강 증진에도 도움이 된다.

그리고 전 세계적으로 바이러스성 질병을 제어하기 위해 항생제, 면역증강제 등 약품시장이 매년 3억불 이상 되기 때문에 본 연구에서 개발된 면역증강 새우사료 첨가제의 다양한 상품 개발로 해외 사료첨가제 시장 개척에 활용하면 막대한 수출 효과를 얻을 수 있다.

S U M M A R Y

I. Title

Immune resistance materials against white spot syndrome virus (WSSV) of shrimps

II. Objective and significance

Shrimp is one of the most important species in aquaculture all over the world. Total production of penaeid shrimps in the world was approximately 1.48 million metric tonnes in 2002. During the last decade, the worldwide shrimp culture was greatly puzzled by diseases caused by viruses particularly by white spot syndrome virus (WSSV) and suffered significant economic losses.

In Central and South America, shrimp production fell by 17% during the period 1998~1999, mainly through virus infections. For Asia, a survey of the shrimp aquaculture industry in Thailand found that approximately 66% of farmers had experienced at least one disease outbreak per year producing a financial loss of over US\$6000 per hectare per year. The outbreak of virus disease in Asia from 1994 caused continuing direct losses of approximately US\$ 1 billion per year to the native cultured shrimp industry. In Korea, total yield of cultured shrimp was 1,533 metric tones in 1997. Since harmful the outbreak of WSSV disease developed in shrimps farms, the yield of shrimp has decreased to 998 metric tones in 1998 and to 1,142 metric tones in 1999.

WSSV is extremely virulent, has a wide host range and targets various tissues. It can induce 100% mortality in infected shrimp within 3–5 days in infection trials. Due to the extreme virulence of WSSV and a wide host range covering almost all crustaceans, it is difficult to prevent and inhibit the spread of the virus. Therefore, the health of shrimp and enhancement of its immunity

are of primary concern.

Among the polysaccharides, schizophyllan extracted from the fungus *Schizophyllum commune*, scleroglucan extracted from the fungus *Sclerotium gluconicum*, and yeast glucan extracted from yeast *Saccharomyces cerevisiae* have been widely studied to increase the survival of teleosts and penaeid shrimp, and their non-specific immune system. Sodium alginate extracted from brown algae *Undaria pinnatifida* and *Lessonia nigrescens* have been reported to increase the resistance of white shrimp, *Penaeus vannamei* against *Vibrio alginolyticus*. It is known that extraction from a brown alga, *Sargassum duplicatum*, has been reported to enhance the immune resistance of white shrimp *P. vannamei*. However, there was no finding of compounds or materials perfectly enhance the immune resistance against WSSV in penaeid shrimps.

III. Contents and scope

To find suitable compounds with potential immunostimulating properties against WSSV, this study was screened natural medicines enhance immune resistance and promote growth of shrimp from 9 cereals, 7 oriental medicinal herbs and 9 algae. We examined the superoxide anion generation from hematocyte by NBT staining method, survival rates of shrimp after the WSSV challenge trial, and daily feeding amount and molting frequency of shrimps, *Penaeus chinensis* fed a diet supplemented with extraction from natural materials. Then, we fractionated the functional substances for the shrimps from selected materials, and manufacture the feed supplement increase feeding rate of diet and immune activity.

VI. Results

Production of superoxide anion was high value for shrimps that fed a diet contain extraction from seed of millet and maize of cereals, *Cnidium officinale*

and *Angelica gigas* of oriental medicinal herbs, and *Codium fragile* and *Ulva lactuca* of algae. The highest value for daily feeding amount was shown in shrimps fed a diet contains extraction from *Cnidium officinale* and *Angelica gigas* of oriental medicinal herbs. Of cereals and algae, daily feeding amount of diets was high for the shrimps fed a diet contained extrction from seed of millet, maize, seed of buck wheat of cereals, *Porphyra tenera* and *Pachymeniopsis elliptica*.

Survival rate of shrimps infected WSSV was high in experimental groups of shrimps fed a diet contained extraction from *Cnidium officinale* of oriental medicinal herbs, *Codium fragile* of algae, and seed of *Setaria italica* and *Fagopyrum esculentum* of cereals. Positive reaction of WSSV in situ hybridization was observed in tissues of gill and epidermis, but few observed in tissue of muscle, hepatopanceras and ovary.

In challenger test on WSSV, survival rate was higher for shrimps fed a diet supplemented with SP-03, which mostly made from extractions of materials had efficiency of immune resistances then for the shrimps fed a diet supplemented with SP-01 and SP-02 mostly made from extractions of materials had efficiency of attraction for feeding.

The MeOH extraction of selected medicinal stuff was partitioned into CH₂Cl₂, EtOAc, n-BuOH, and H₂O fractions. To identify the activity principles, we evaluated the production of superoxide anion from hematocyte, daily feeding amount and molting frequency of shrimps fed diets supplemented with each fraction. The H₂O fraction of them showed high activity in daily feeding amount, while the CH₂Cl₂ fraction showed high activity in superoxide anion production. High value of molting frequency was shown in EtOAc fraction.

Daily feeding amount was 0.25 ± 0.02 g, 0.28 ± 0.03 g and 0.30 ± 0.03 g for the 0.2g/kg, 0.4g/kg, 0.8g/kg supplemented diets of SP-04, respectively. However, daily feeding amount was decreased in 2.0g/kg and 4.0g/kg supplemented diets of SP-04. Trypsin activity in foregut, midgut and hepatopancreas was measured when the shrimps were fed a diet supplemented with SP-04 0g/kg, 0.1g/kg,

0.2g/kg, 0.3g/kg, 0.4g/kg, 0.5g/kg and 0.6g/kg. No significant differences in trypsin activity were observed in hepatopancreas of shrimps. However trypsin activity in foregut and midgut of shrimps were increased gradually with increasing concentration of SP-04 supplement. Total length and body weight of shrimps fed diets supplemented with 0.2g/kg, 0.4g/kg and 0.8g/kg was significantly higher than that of control shrimps fed a diet not containing SP-04. Daily carnivorous rate was lower in rearing group of shrimps fed a diet supplemented with SP-04 than that of rearing group of shrimps fed a nonsupplement diet. Viral challenged shrimps fed a control diet were died within 6 days. However survival rate was 80% of challenged shrimps fed a diet supplemented with SP-04 0.4g/kg.

Two commercial farms for *P. chinensis* located in Jido of Cheonnam province for experiment and in Daesan of Chungcheongnam province for control. The shrimp culture for experiment was initiated on May 26 and harvested on September 1. 75 days after stocking (August 4), the average weight of shrimps fed a diet supplemented SP-04 was 11.81g, and reached 18.35g by the time of the harvest, however, the average weight of shrimps fed a common diet was 6.70 ± 0.96 g, and harvested in early on August 18 because shrimps showed symptoms of the WSSV outbreak.

The culture for *P. vannamei* was initiated on June 4 and harvested on September 3 in Imjado of Cheonnam province. About one month after stocking (July 11), the average weight of shrimps fed a diet supplemented SP-04 was 3.70g, and reached 18.81g by the time of the harvest.

Contents

List of table	26
List of figure	27
Chapter 1. Outline of research and development project	31
Chapter 2. The present state of study in home and abroad	33
Chapter 3. Contents and results	35
Section 1. Immunological and physiological activity of vegetable medicine	35
1. Introduction	35
2. Materials and methods	36
A. Materials	36
(1) Screen of medicine	36
(2) Shrimp	37
B. Methods of extraction	37
C. Rearing experiment	37
D. Immune activity	37
E. Taste properties	38
F. Challenger test of WSSV	38
G. Fractionation of functional substances	38
(1) Extraction of genomic DNA	40
(2) Polymerase chain reaction	40
H. <i>in situ</i> of WSSV	41

(1) Probe production for <i>in situ</i>	41
(a) Ligation	41
(b) Transformation	41
(c) Isolation of plasmid DNA	41
(d) Agarose gel electrophoresis	41
(e) DNA sequencing	42
(f) RNA prove	42
(2) Hybridization	42
3. Results and discussion	43
A. Immune activity	43
B. Taste properties	49
C. Immune resistance against WSSV	53
D. <i>In situ</i> histological observation of organs infected with WSSV	57
E. Immune resistance against WSSV according to the mixture ratio of medicines	58
F. Effects of immunological and physiological activity of fractions	65
Section 2. Effects of enhance immune resistance against WSSV and physiological activity of Shrimpower-04 (SP-04) supplement	74
1. Introduction	74
2. Methods and materials	76
A. Materials	76
(1) Manufacture of SP-04	76
(2) Shrimps	76
B. Rearing experiment	76

(1) Optimum amount of supplement and daily feed supply	76
(2) Growth and carnivalism	77
(3) Challenger test of WSSV	77
C. Activity of trypsin	78
3. Results and discussion	78
A. Effects of feed attraction	78
B. Secretion of trypsin	82
C. Growth	87
D. Optimum amount of daily feed supply	90
E. Effects of canivalism control	93
F. Effects of enhancement of immune resistance against WSSV	95
G. Growth of shrimps infected with WSSV	100
Section 3. Aquaculture of <i>P. chinensis</i> and <i>P. vannamei</i> fed a diet supplemented with SP-04	102
1. Introduction	102
2. Material and methods	104
A. Shrimps	104
B. Aquaculture	104
(1) <i>Penaeus chinensis</i>	104
(2) <i>Penaeus vannamei</i>	105
C. Growth	105
D. Ratio of WSSV infection	106
E. Analysis of economical efficiency	106
3. Results and discussion	106

A. Aquaculture of <i>Penaeus chinensis</i>	106
B. Aquaculture of <i>Penaeus vannamei</i>	114
C. Analysis of economical efficiency	116
Chapter 4. Plans of apply on study results	121
Chapter 5. References	123

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	31
제 2 장	국내외 기술개발 현황	33
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	35
제 1 절	식물성 약재들의 면역 및 생리활성	35
1. 서론	35
2. 재료 및 방법	36
가. 재료	36
(1) 약재의 선정	36
(2) 대하새우	37
나. 추출방법	37
다. 사육실험	37
라. 면역활성 조사	37
마. 기호성 조사	38
바. WSSV에 대한 challenger test	38
사. 기능성물질의 분획	38
(1) Genomic DNA 추출	40
(2) Polymerase chain reaction	40
자. WSSV에 대한 <i>in situ</i> 법	41
(1) <i>in situ</i> 용 probe 제작	41
(가) Ligation	41
(나) 형질전환	41

(다) Plasmid DNA 분리	41
(라) Agarose gel electrophoresis	41
(마) DNA sequencing	42
(바) RNA probe 제작	42
(2) Hybridization	42
3. 결과 및 고찰	43
가. 면역 활성화	43
나. 기호성	49
다. WSSV에 대한 저항성	53
라. WSSV에 대한 in situ법에 의한 감염기관의 조직학적 관찰	57
마. 약재의 배합율에 따른 WSSV에 대한 저항성	58
바. 추출물 분획의 면역활성 및 생리활성 효과	65
제 2 절 첨가제 Shrimpower-04 (SP-04)의 WSSV에 대한 저항성 및 생리활성 효과	74
1. 서 론	74
2. 재료 및 방법	76
가. 재료	76
(1) SP-04의 제조	76
(2) 새우	76
나. 사육실험	76
(1) 첨가제의 적정 첨가량 및 적정사료급이량 조사	76
(2) 성장 및 공식제어효과 실험	77
(3) WSSV에 대한 challenger test	77
다. trypsin의 활성화도 측정	78

3. 결과 및 고찰	78
가. SP-04 첨가 농도별 먹이유인 효과	78
나. SP-04 첨가량의 변화에 따른 소화능력	82
다. SP-04 첨가량의 변화에 따른 성장	87
라. SP-04 첨가사료의 최적 사료 급여율	90
마. SP-04의 공식 제어 효과	93
바. SP-04의 WSSV 저항성 효과	95
사. WSSV가 성장에 미치는 영향	100
제 3 절 SP-04 첨가 사료를 사용한 대하와 흰다리새우의 양식효과	102
1. 서 론	102
2. 재료 및 방법	104
가. 양식 대상종	104
나. 양성실험	104
(1) 대하	104
(2) 흰다리새우	105
다. 성장 조사	105
라. WSSV 감염율 조사	106
마. 경제성 분석	106
3. 결과 및 고찰	106
가. 대하의 양식	106
나. 흰다리새우의 양식	114
다. 경제성 분석	116
제 4 장 연구개발 결과의 활용 계획	121
제 5 장 참고문헌	123

표 목 차

표 1. SP-04 첨가사료를 사용하여 양식한 양어장과 일반 양어장에서의 수익성 비교	120
--	-----

그 립 목 차

그림 1-1. 탐색된 식물들에 대한 추출물의 분획 과정의 순서도.	39
그림 1-2. 대하(<i>Penaeus chinensis</i>)에 울무(Coi), 보리(Hor), 옥수수(Zea), 조(Set), 메밀(Fag), 밀(Tri) 추출물들을 각각 사료에 첨가하여 급이하였을 때 혈구세포에서의 O_2^- 의 생성.	45
그림 1-3. 대하(<i>Penaeus chinensis</i>)에 한약제, 감초 (<i>Glycyrrhiza uralensis</i> , Gly), 구기자(<i>Lycium chinense</i> , Lyc), 오미자(<i>Schisandraceae chinensis</i> , Sch), 산수유(<i>Cornus officinalis</i> , Cor), 당귀(<i>Angelica gigas</i> , Ang) 그리고 천궁(<i>Cnidium officinale</i> , Cni) 추출물들을 각각 사료에 첨가하여 급이하였을 때 혈구세포에서의 O_2^- 의 생성.	46
그림 1-4. 대하(<i>Penaeus chinensis</i>)에 김(<i>Porphyra tenera</i> , Por), 구멍갈파래(<i>Ulva lactuca</i> , Ulv), 청각(<i>Codium fragile</i> , Cor), 다시마(<i>Laminaria japonica</i> , Lam), 미역(<i>Undaria pinnatifida</i> , Und), 도박(<i>Pachymeniopsis elliptica</i> , Pac), 모자반(<i>Sargassum fulvellum</i> , Sar) 추출물들 각각을 사료에 첨가하여 급이하였을 때 혈구세포에서의 O_2^- 의 생성.	47
그림 1-5. 대하(<i>Penaeus chinensis</i>)에 보리(Hor), 밀(Tri), 조(Set), 메밀(Fag), 울무(Coi) 그리고 옥수수(Zea) 추출물들을 각각 첨가한 사료를 급이하였을 때 일일 사료 섭취량.	50
그림 1-6. 대하(<i>Penaeus chinensis</i>)에 한약제인 감초(Gly), 구기자(Lyc), 오미자(Sch), 산수유(Cor), 당귀(Ang) 그리고 천궁(Cni) 추출물들을 각각 첨가한 사료를 급이하였을 때 일일 사료 섭취량.	51
그림 1-7. 대하(<i>Penaeus chinensis</i>)에 해조류인 김(Por), 구멍갈파래(Ulv), 청각(Cor), 다시마(Lam), 도박(Pac), 미역(Und) 그리고 모자반(Sar) 추출물들을 각각 첨가한 사료를 급이하였을 때 하루 사료 섭취량.	52
그림 1-8. 감초(Gly), 옥수수(Zea), 천궁(Cni) 그리고 청각(Cod) 추출물을 급이한 WSSV에 감염된 대하(<i>P. chinensis</i>)의 생존율. Neg Cont : WSSV에 대한 negative control, Pos Cont : WSSV에 대한 positive control.	54
그림 1-9. 구멍갈파래(Ulv), 메밀(Fag), 조(Set) 추출물을 급이한 WSSV에 감염된 대하(<i>P. chinensis</i>)의 생존율. Nega Cont : WSSV에 대한 negative control, Posi Cont : WSSV에 대한 positive control.	55

그림 1-10. WSSV를 인위적으로 감염시키지 않은 대조구의 대하(<i>P. chinensis</i>) (위)와 WSSV 감염후 폐사된 개체(아래 A)와 살아남은 개체(아래 B)의 유영지에 대한 PCR결과 전기영동 사진. M, molecular weight marker; N, negative control; P, positive control; 1-8, shrimp sample number.	56
그림 1-11. WSSV에 대한 <i>in situ</i> hybridization에 사용되는 probe의 서열을 확인하기 위한 DNA 서열.	59
그림 1-12. DIG labeled RNA의 형성 확인을 위한 전기영동 사진.	60
그림 1-13. <i>in situ</i> hybridization법에 의한 각 기관의 WSSV 감염 상태. 1, epithelial tissue of intestine; 2, gill plate; 3, hepatopanceas; 4, muscle layer; tissue; 5, oocytes; 6, eyestalk organ.	61
그림 1-14. 혼합약제 추출물 SP-01, SP-02, SP-03을 각각 급이한 WSSV에 감염된 대하(<i>P. chinensis</i>)의 생존율.	62
그림 1-15. SP-03 추출물을 2주간 미리 급이한 후 WSSV에 감염시킨 대하(<i>P. chinensis</i>)의 생존율.	64
그림 1-16. 기호성을 보인 약제의 각 분획물을 사료에 첨가하여 급이한 대하(<i>P. chinensis</i>)의 혈구세포에서 superoxide(O ₂ ⁻) 생성 효과.	67
그림 1-17. 기호성을 보인 약제의 각 분획물을 사료에 첨가하여 급이한 대하(<i>P. chinensis</i>)의 일일 사료 섭취량의 변화.	68
그림 1-18. 기호성을 보인 약제의 각 분획물을 사료에 첨가하여 급이한 대하(<i>P. chinensis</i>)의 탈피 빈도의 변화.	69
그림. 1-19. 면역활성을 보인 약제의 각 분획물을 사료에 첨가하여 급이한 대하(<i>P. chinensis</i>)의 혈구세포에서 superoxide(O ₂ ⁻) 생성 효과.	70
그림 1-20. 면역활성을 보인 약제의 각 분획물을 사료에 첨가하여 급이한 대하(<i>P. chinensis</i>)의 일일 사료섭취량의 변화.	71
그림 1-21. 면역활성을 보인 약제의 각 분획물을 사료에 첨가하여 급이한 대하(<i>P. chinensis</i>)의 탈피 빈도의 변화.	72

그림 2-1. 일반사료 1kg에 SP-04를 0.2g, 0.4g, 0.8g 첨가하여 대하(<i>P. chinensis</i>)에 급이하였을 때 일일 사료 섭취량의 변화.	80
그림 2-2. 일반사료 1kg에 SP-04를 0.5g, 1.0g, 2.0g, 4.0g 첨가하여 대하(<i>P. chinensis</i>)에 급이하였을 때 일일 사료 섭취량의 변화.	81
그림 2-3. SP-04의 첨가량에 따른 전장의 trypsin 활성도가 10 nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹ 이하인 새우들의 빈도 수.	83
그림 2-4. SP-04의 사료 첨가량에 따른 새우의 체중에 대한 전장과 중장의 비율.	84
그림 2-5. SP-04 사료 첨가량에 따른 새우의 전장, 중장 그리고 간췌장의 trypsin 활성도의 변화.	86
그림 2-6. SP-04 사료 첨가량에 따른 새우의 전장과 중장에서 단백질 농도의 변화.	88
그림 2-7. SP-04 사료 첨가량에 따른 20일간 사육한 후 새우의 체장과 체중의 변화.	89
그림 2-8. 사료를 체중의 1%, 3%, 5%, 8%, 10% 비율로 투여하였을 때의 전장, 중장 그리고 배설물의 단백질 함량 변화.	92
그림 2-9. SP-04 첨가사료 급이에 의한 대하의 일일공식율, 공식율 및 생존율의 변화.	94
그림 2-10. SP-04를 첨가한 사료를 급이한 대하(<i>P. chinensis</i>)의 WSSV에 대한 challenger test. SP-04 0.4g: 0.4g/kg을 첨가한 사료 급이 실험구, SP-04 0.2g: 0.2g/kg을 첨가한 사료 급이 실험구. Positive control과 Negative control은 WSSV를 인위적으로 감염시킨 실험구와 비감염 실험구.	96
그림 2-11. WSSV 감염시키기 전 개체들(A)과 실험후 살아남은 개체들(B)의 유영지에 대한 PCR 후 전기영동사진.	97
그림 2-12. SP-04 0.4g/kg을 첨가한 사료를 급이한 흰다리새우(<i>P. vannamei</i>)의 WSSV에 대한 challenger test. Positive control과 Negative control은 WSSV를 인위적으로 감염시킨 실험구와 비감염 실험구.	99
그림 2-13. WSSV 비 감염대하와 감염대하에 SP-04 0.4g/kg과 0.2g/kg을 첨가한 사료를 급이하였을 때 일일탈피빈도의 변화.	101

그림 3-1. 5월 26일부터 8월 29일까지의 양식기간 동안 대하(<i>P. chinensis</i>)의 체장 변화. Nonadditive: 일반사료에 SP-04를 첨가하지 않은 사료를 급이한 새우, SP-04: 일반사료에 SP-04를 첨가한 사료를 급이한 새우.	107
그림 3-2. 양식기간 동안 대하(<i>P. chinensis</i>)의 체중의 변화. Date of Purina Co.: 퓨리나 사료회사에서 제공한 대하의 성장 data, Nonadditive: 일반사료에 SP-04를 첨가하지 않은 사료를 급이한 새우, SP-04: 일반사료에 SP-04를 첨가한 사료를 급이한 새우.	108
그림 3-3. T 양식장의 양식기간 동안 수온 변화. Nighttime: 밤 수온 변화, Daytime: 낮 수온 변화.	109
그림 3-4. 대하 양식장에서 RCR법에 의해 조사한 대하(<i>P. chinensis</i>)의 WSSV의 감염빈도의 변화.	112
그림 3-5. 일반사료를 급이한 양식지의 대하(<i>P. chinensis</i>)(A)와 SP-04 첨가사료를 급이한 양식지의 대하(<i>P. chinensis</i>)(B)에 대해 PCR을 한 WSSV의 DNA 전기영동 사진. M: marker.	113
그림 3-6. 6월 4일부터 9월 3일까지의 양식기간 동안 흰다리새우(<i>P. vannamei</i>)의 평균 체중의 변화.	115
그림 3-7. 대하 양식기간 동안 ha당 사료의 일일 투여량의 변화. 양식기간 동안 사료의 총 투여량은 3,035kg.	117
그림 3-8. 일반양식장에서 대하 18g까지 양성할 때까지 ha당 사료의 일일 투여량의 변화 (퓨리나사 사료자료 참조함). 120일간 사료 총 투여량은 5,198kg.	119

제 1 장 연구개발과제의 개요

새우는 종교, 인종 국가에 관계없이 전 세계인들이 좋아하는 식품대상 종으로서 톤당 10,000-15,000불에 이르는 세계적으로 높은 고부가 수산물중의 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 새우류 양식도 태국이나 중국에 비하면 매우 빈약하지만 1995년도에 대한 양식 생산량이 517톤이었으나 1996년도부터 서·남해안지역의 폐염전이 대한 양식장으로 개발되면서 1997년도에 1,533톤으로 증가하였으며 1999년도에는 1,142톤, 2001년도에는 2,081톤, 2003년도에는 2,324톤, 2004년도에는 2,426톤으로 조금씩 증가하여 지금까지 대한 양식은 서·남해안 지역에서는 매우 중요한 양식 산업의 하나로 자리 잡고 있다 (해양수산부, 2005).

그러나 10여 년 전에 중국에서 처음으로 새우류에서 흰반점증후군바이러스(white spot syndrome virus, WSSV)에 의한 흰반점증후군(WSSD, white spot syndrome disease)의 발생과 이로 인한 새우양식의 대량폐사가 일어나면서(Huang et al., 1994; Inouye et al., 1994; Nakano et al., 1994), 태국, 인도 등 인접한 아시아 전역으로 WSSV에 의한 질병이 빠르게 확산되어 동남아시아와 새우 양식 산업에 막대한 피해를 가져오기 시작하였다(Flegel, 1997; Huang et al., 1995; Krishna et al., 1997; Lightner, 1999; Park et al., 1998). 그 후 1995년 미국의 Texas에서 처음으로 발견되어 1997년과 1998년에는 South Carolina에서도 발견되었으며, 최근에는 중앙아메리카와 남아메리카에서도 발견되어 이들 지역의 국가에서도 WSSV에 의한 피해가 막대하게 나타나 WSSV에 의한 피해는 전 세계적으로 확산되

어 있다 (Tang et al., 2000). 바이러스에 의한 피해액이 아시아에서만 매년 600만 원/ha로 전체로는 3조원이 넘고 있다 (Smith et al., 2003).

우리나라에서도 WSSV질병에 의한 피해가 1993년 충남과 전북의 일부 새우 양식장에서 나타난 이후, 매년 증가하여 1996년도에는 대하의 생산량이 지역에 따라 50~75%나 감소하는 피해를 가져왔다. 1997년부터 대하 양식장이 꾸준히 개발되어 왔음에도 불구하고 2000년도 이후부터는 그 생산량은 거의 변화가 없었으며 단위면적당 생산량이 ha당 2000년에 1.3M/T, 2002년에는 1.1M/T, 2004년에는 1.0M/T에 지나지 않았다. 이러한 원인의 주된 요인은 WSSV에 의한 대하의 대량 폐사로 알려져 왔으며, 매년 대하종묘 입식량의 60%가 WSSV에 의해 폐사되었다는 보고가 있다 (해양수산청, 2001). 따라서 우리나라에서도 바이러스 질병에 의한 피해액이 매년 200억원이 넘는 것으로 추정된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

지금까지 알려진 바로는 WSSV에 감염된 새우류는 그 감염 강도에 따라 3~10일 내에 80~100%가 폐사되며, 20일 이내에 전량 폐사되는 새우류의 치명적인 질병으로 최근 새우양식에 가장 큰 걸림돌이 되고 있다 (Lightner, 1996). 이러한 피해를 막기 위해 1994년 이후부터 흰반점증후군에 대한 연구를 시작하여 원인균인 WSSV의 유전자 서열이 밝혀지면서 PCR에 의한 검출방법, 조직학적 병변현상, 전염과정 등 많은 연구들이 이루어지고 있다(Lo et al., 1997; Nunam and Lightner, 1997; Supamattaya, et al., 1998; Hossain et al., 2001; Soto et al., 2001). 또한 Vibrio와 WSSV에 대한 면역증강제의 개발을 위한 연구들이 많이 이루어져, yeast cell wall에서 추출한 glucan, *Bifidobacterium thermophilum*에서 추출한 peptidoglycan, 밀에서 추출 분리한 lipopolysaccharide, 그외에 fucoidan, 갈조류 추출물 등이 면역증강 효과를 보인다는 연구보고들도 있으며 (Chang et al., 1999, 2000; Henning et al., 1998; Itami et al., 1998; Liao et al., 1996; Song et al., 1997; Su et al., 1995; Sung et al., 1994; Takahashi et al., 1998, 2000), vitamin C가 딱이 섭취효과 뿐만아니라 면역활성을 촉진한다는 보고가 있어 vitamin C에 대한 관심이 많이 가지고 있다(Lee and Shiau, 2002). 그러나 이들 물질의 효과는 실험실 수준에서 이루어진 결과이며, 이들 물질을 사용하여 새우양식에 적용하였을 때 WSSV에 의한 대량 감모를 줄였다는 연구보고는 아직 없다. 최근에 유전공학적인 방법에 의한 WSSV의 진단법, 감염경로 등에 대한 연구들이 대단히 많이 있으나 (Lo et al., 1996; Nunan and Lightner 1997; Chang et al., 1998; Nunan et al., 2004; Tang et al., 2004), 이 질병에 대한 예방이나 치료법에 대해서는 아직 개발되어있지 않아 전 세계적으로 WSSV에 의한 질병에 속수무책이다.

본 연구에서는 WSSV에 의한 피해를 줄일 수 있는 방안을 마련하기 위해 한약재 등 천연 식물로부터 새우류의 면역력을 향상시킬 수 있는 물질을 찾아내고자 한다. 또한 그 외 성장촉진 등 여러 가지 생리 기능을 촉진하는 물질을 찾아내어 이 물질들을 이용하여 신기능성 사료첨가제를 개발하고, 이를 새우양식에 적용하

여 WSSV 등 여러 가지 질병으로부터 피해를 줄이고 양식 새우의 생산성을 높일 수 있는 방안을 제시하고자 한다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 식물성 약재들의 면역 및 생리활성

1. 서 론

1996년부터 대하양식이 본격화 되면서 새우의 대량생산을 위해 다량의 사료 투입으로 수질악화와 양식장의 노후 및 비브리오나 바이러스 등에 의한 피해도 많이 나타나기 시작하였다. 이러한 질병을 예방하기 위하여 여러 가지 방법으로 감염경로를 차단하고 있으나 양식장 주위에 서식하는 거의 대부분의 수생무척추동물들이 바이러스를 보균하고 있어서 이를 막을 뚜렷한 방법이 개발되어 있지 않은 상태이며 항생제나 기타 강장제 등을 사용하고 있지만 바이러스 질병에는 속수무책인 상태이다.

최근에는 무분별한 항생제나 약제의 사용으로 양식장 인근 수계의 오염뿐만 아니라 내성균의 출현과 수산물의 체내 축적으로 소비자의 건강에도 문제를 야기시킬 수 있다는 인식 때문에 소비자들은 항생제의 사용을 꺼리고 있다. 이에 대한 대책으로 새우나 어류가 병에 대한 저항력을 증강시킬 수 있는 면역증강 기능성물질을 해조류나 육상식물 등의 천연소재로부터 찾으려는 연구들이 수행되고 있다.

균류인 *Schizophyllum commune*와 *Sclerotium gluconicum*에서 추출한 다당체인 schizophyllan과 scleroglucan, 그리고 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*에서 추출한 yeast glucan 등을 사용하여 몇몇 어류와 보리새우류의 비특이적 면역계를 증진시키려는 수단으로 널리 사용되어져 왔다(Yano et al., 1991, Sakai 1999, Song and Huang 1999, Chang et al., 2000, Park et al., 2001).

해조류에서는 갈조류의 몇 종이 항암효과가 있다는 보고가 나온 이후(Noda et al., 1989), 갈조류에 관심을 갖기 시작하여 *Undaria pinnatifida*와 *Sargassum autumnale*의 열탕 추출물이 잉어(*Cyprinus carpio*)와 방어(*Seriola quinqueradiata*)

의 면역증강에 효과적이었다는 보고가 있으며(Fujiki et al., 1992), *Sargassum duplicatum*의 열탕 추출물도 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)의 면역증강에 양호한 효과를 나타내었다는 보고가 있다(Yeh et al., 2006). 그리고 밑에서 추출 분리한 lipopolysaccharide가 보리새우(*Penaeus japonicus*)의 면역증강 효과를 보여 바이러스에 감염시켰을 경우 높은 생존율을 보였다는 보고가 있다(Takahashi et al., 2000). 그러나 이들 물질의 효과는 단지 면역증강 효과만을 측정된 결과들이며 일부는 실험실 수준에서 바이러스에 대한 저항성을 조사한 결과들에 불과하며, WSSV에 대해 광목할 만 수준의 높은 생존율을 보인 결과들은 없는 실정이다.

본 연구에서는 새우의 WSSV에 대한 면역증강효과를 나타내는 천연물질을 탐색하기 위하여 곡류 9종, 한약재와 해조류 각각 10종을 선정하여 이들 식물들로부터 추출한 추출액을 첨가한 사료를 대하에 급이한 후 면역활성, 기호성, WSSV에 대한 저항성 등을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

가. 재료

(1) 약재의 선정

곡류는 건강식품으로 널리 이용하는 팥(red bean of *Phaseolus angularis*), 땅콩(peanut of *Arachis hypogaea*) 옥수수(maize of *Zea mays*), 보리(barley, *Hordeum vulgare* var. *hexastichon*), 밀(wheat, *Triticum aestivum* (*vulgare*)), 율무(grains of adlay, *Coix lachrymajobi* var. *mayuen*), 조(seed of millet, *Setaria italica*), 메밀(seed of buck wheat, *Fagopyrum esculentum*) 등 곡류 9종과 동양에서 전통적으로 소화기능을 돕고 식욕을 높여준다고 알려진 감초(*Glycyrrhiza uralensis*)와 보혈 강장제(強壯劑)로 널리 사용되어 왔던 川芎(*Cnidium officinale*), 當歸(*Angelica gigas*), 인삼(*Panax ginseng*) 등과 독성이 적고 간 기능 보호와 강장효과가 있다고 알려져 기능성 식품으로 사람들이 이용되어지고 있는 구기자(*Lycium chinense*)와 오미자(*Schisandraceae chinensis*), 그리고 강음(強陰), 신정(腎精)과 신기(腎氣)보강, 수렴 등의 효능이 있다고 알려진 산수유(*Cornus officinalis*) 등의 한약재와 우리나라 연안에 흔히 구할 수 있는 미역(*Undaria pinnatifida*), 다시마(*Laminaria japonica*), 모자반(*Sargassum fulvellum*), 청각

(*Codium fragile*), 구멍갈파래(*Ulva lactuca*), 김(*Porphyra tenera*), 우뚝가사리(*Gelidium amansii*), 서실(*Chondria crassicaulis*), 도박(*Pachymeniopsis elliptica*) 등 해조류 9종을 대상으로 선정하였다.

(2) 대하새우

실험에 사용한 대하는 충남 태안에 위치한 국립수산과학원 태안 갑각류연구센터에서 WSSV에 감염되지 않은 모하로부터 수정란을 얻어 종묘 생산하여 0.2ha의 야외호지에서 양성중인 것을 분양받아 사용하였다.

나. 추출방법

상기 각 종의 식물약재들에 대하여 각각 100g을 취하여 ethanol로 3회 냉침 추출한 후 이를 동량의 volume 200ml로 만들어 이들을 표준약제로 하였으며, 사료 kg당 추출약제 10ml씩 첨가하였다.

다. 사육실험

면역활성과 기호성 실험은 갑각류연구센터에서 분양 받은 대하를 동의대학교 생물생산연구실로 옮겨 순환여과 장치가 되어있는 12개의 0.7Ton 수조(1m^L×1m^D×0.7m^H)에서 10마리씩 수용하여 수온 25~27℃에서 사육하면서 10일간 조사하였다. 그리고 WSSV에 대한 저항성 실험은 8월에 갑각류연구센터에 설치되어 있는 40개의 0.2Ton 유수식 수조(0.8m^L×0.5m^D×0.5m^H)에 5마리씩 넣어 10일~13일간 실험하였다.

라. 면역활성 조사

새우의 위심강으로부터 1ml syringe (26 gauge needle)를 이용하여 혈액을 뽑은 후 Itami et al.(1994)의 방법을 변형한 Chang et al.(2000)의 방법으로 면역활성을 조사하기 위해 혈구세포를 분리하였다.

분리된 혈구는 nitro blue tetrazolium(NBT)을 이용한 superoxide production 평가법(Song & Hsieh, 1994)에 의하여 면역활성을 조사하였다.

마. 기호성 조사

약제의 첨가에 의한 먹이 섭취에 대한 영향을 조사하기 위하여 상기한 약제추출 물을 첨가한 사료를 오전 8시와 오후 6시에 총 체중의 10%가 되도록 투여하고 사료 투여 한 시간 전에 수조 내에 있는 잔류사료를 회수하여 60°C에서 24시간 건조한 후 정량하여 새우가 먹이를 섭취한 후의 잔류량을 10일간 조사하였다. 자연손실에 의한 먹이 잔류량의 감소를 비교구로 하여 섭취량을 조사하였다.

사료 섭취량의 측정은 다음과 같은 공식에 의해 산정하였다: $FC = F_1 \times (F_0 - F_r)$ (Nunes and Parsons, 2000). FC는 섭취된 사료의 건중량(g)을 나타내며, F_0 는 실험구의 공급된 사료량, F_r 은 회수된 사료의 잔류량(g)을 나타낸다. $F_1 = CF_r / CF_0$ 의 식으로 계산하였으며, CF_0 은 새우를 수용하지 않은 수조에 넣은 최초의 사료량을 나타내며 CF_r 은 일정시간 경과 후 수조에서 회수하였을 때 사료의 양을 나타낸다.

바. WSSV에 대한 challenger test

충남 대산에 있는 한 양식장으로부터 WSSV의 감염되어 폐사된 대하 (체중 약 8g~14g)를 10kg 구입하여 challenger test를 위하여 -80°C 저온냉동고에 보관하였다.

평균 체장 69.8mm, 체중 4.80g되는 대하를 20L의 유수식 플라스틱 수조 40개에 5마리씩 수용하여 25°C~28°C의 조건에서 13일간 사료를 총 체중의 10%가 되도록 하루에 2회 투여하면서 사육하였다. 사육중인 대하에 WSSV를 인위적으로 감염시키기 위해서 냉동 보관중인 폐사된 대하의 아가미, 유영지 및 복부부위를 세절한 후 혼합하여 총 체중의 5%가 되도록 하루에 3회씩 연속 2일간 투여하였으며 인위적 감염유발기간 동안은 일반 사료는 급이하지 않았다. 감염시킨 후부터 상기의 약제 추출물을 첨가한 사료를 각 실험구에 투여하였다.

사. 기능성물질의 분획

탐색된 약제들로부터 먹이유인, 면역활성 및 성장촉진에 유효한 성분을 분획하기 위하여 각 재료를 물(H_2O), dichloromethane (CH_2Cl_2), ethyle acetate (EtOAc), butanol (BuOH)을 이용하여 그림 1-1과 같은 분리 순서에 의하여 분획하였다.

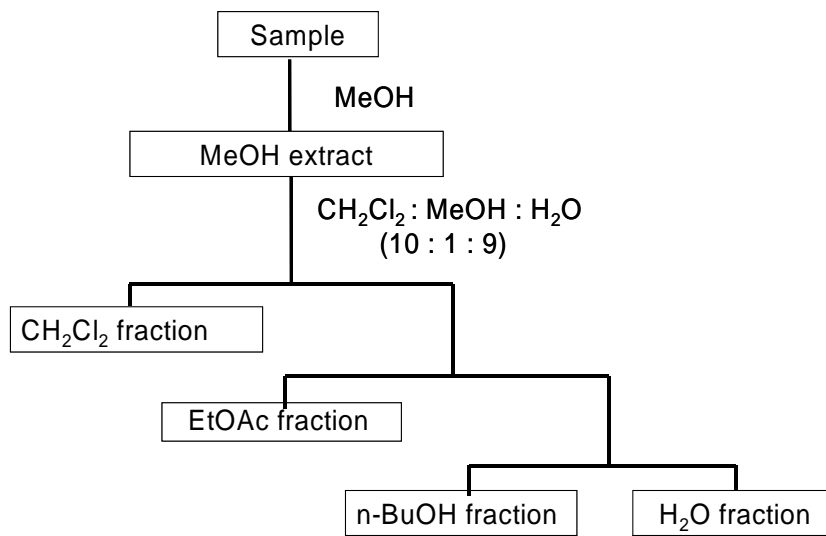


그림 1-1. 탐색된 식물들에 대한 추출물의 분획 과정의 순서도.

아. PCR법에 의한 WSSV 감염 조사

(1) Genomic DNA 추출

각 개체별 복지(pleopod)의 근육조직 약 25mg를 분리하여 1.5ml microtube에 넣고, 180 μ l의 lysis buffer (10mM EDTA; 30mM Tris-HCl, pH 8.0; 1% SDS)와 proteinase K sol. (10 mg/mL) 20 μ l를 첨가하여 55 $^{\circ}$ C에서 4시간 digestion 후 200 μ l phenol을 넣고 흔든 다음 8,000 rpm에서 1분간 원심분리를 시킨 혼합액의 상층액을 회수하여 new microtube로 옮기고 다시 phenol/choloroform/isoamyl alcohol (25:24:1), chloroform의 순서로 extraction을 시킨 후 옮겨진 상층액에 20 μ l의 3M sodium acetate (pH 5.6)과 2.5 vol의 ethanol을 넣고 가볍게 흔든 후 -20 $^{\circ}$ C에서 1시간 incubation, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하여 핵산을 침전시킨다. 상층액을 완전히 버린 다음 70% cold ethanol로 DNA pellet을 세척한 후 microtube의 수분을 완전히 건조시킨 다음 100 μ l의 1x TE buffer (pH 8.0)에 용해하여 PCR 반응의 template로 사용할 때까지 냉장보관하였다.

(2) Polymerase chain reaction

PCR 반응에 사용된 primer는 13-20 mer의 2 set (1F/1R: -5'-AATC TGATGAGACAGCCCAAG-3'--/5'-GGGAATGTTAAATATGTATCGG-3', 2F/2R: -5'-CCAAGTTGTTAAACAGGCCG-3'--/5'-GGCATGGACA GTCAGGTCTT-3')로서 이들 두 set를 이용하여 1차와 2차에 걸쳐 nested PCR을 수행하였다. PCR reaction solution (1.0 unit Taq polymerase, 250 μ M dNTP, 10mM Tris-HCl, 40mM KCl, 1.5mM MgCl₂)에 10 ng/tube의 template DNA와 2.5 pmol의 primer를 첨가하여 총 반응액이 20 μ l/tube가 되게 하였다.

PCR은 1차 (pre-reaction 94 $^{\circ}$ C 5분, denaturation 94 $^{\circ}$ C 30초, annealing 52 $^{\circ}$ C 1분, DNA extension 72 $^{\circ}$ C 1분간 20-30 cycles), 2차 (94 $^{\circ}$ C 5분, 94 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 45초, 72 $^{\circ}$ C 45초, 30 cycles)로 반응한 산물을 1.2% agarose gel에서 70~100 volts에서 전기영동 후 UV 하에서 관찰하여 바이러스 유전자 증폭 여부를 확인하였다.

자. WSSV에 대한 *in situ*법

(1) *in situ*용 probe 제작

(가) Ligation

감염된 새우에서 추출된 WSSV의 단편을 PCR로 증폭시킨 뒤 1% agarose gel에 전기영동하여 확인한 후 gel purification kit (Nucleogen)를 이용하여 DNA 단편을 추출한다. 추출된 WSSV DNA 단편은 PCR 반응액 (dNTP, PCR buffer, r-Taq)과 함께 72°C에서 10분간 반응시킨 뒤 pBluescript II SK- vector에 T4 DNA ligase를 첨가하여 16°C에서 overnight 반응하여 삽입시켰다.

(나) 형질전환

Vector에 삽입된 WSSV DNA 단편(약 0.5 μ g)은 competent cell(약 50 μ l)과 혼합하여 얼음위에서 30분간 방치한 다음 37°C에서 5분간 heat shock를 주었다. Heat shock 후 즉시 얼음 위에 3분간 두고, SOC 250 μ l 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 정지 배양하였다. 배양액은 50 μ g/ml의 ampicillin과 0.1mM IPTG, 40 μ g/ml의 X-Gel이 포함된 LB agar 배지에 spreading하여 37°C에서 overnight 배양하였다.

형질전환 된 균주의 선별은 흰색 colony를 T₃, T₄ primer와 PCR 반응액을 혼합하여 94°C에서 3분간 1회, 94°C에서 1분, 50°C에서 30초, 72°C에서 30초간 30회, 12°C에서 무한대의 조건으로 PCR한 뒤 전기영동으로 확인하였다.

(다) Plasmid DNA 분리

WSSV DNA 단편이 증폭된 흰색 colony를 선택하여 50 μ g/ml의 ampicillin이 첨가된 LB 배지 5ml에서 16시간 배양하였다. 배양된 plasmid DNA는 AccuPrep™ plasmid extraction kit(Bioneer)를 이용하여 추출하였고, 추출된 plasmid는 Hind III와 EcoRV 제한효소를 처리하여 agarose gel 전기영동으로 vector에 삽입여부와 DNA size 확인하고, 염기서열 분석을 하였다.

(라) Agarose gel electrophoresis

DNA의 분리 및 확인은 Southern의 방법에 따라 agarose gel 전기영동으로 하였다. 전기영동은 수평형 전기 영동조에서 행하였으며, 1%(w/v)의 agarose 농도를 사용하였다. 영동 buffer는 TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA, 0.5 μ g/ml ethidium bromide, pH 8.0)를 사용하였고, 전기영동 후 UV광 하에서 촬

영하였다. 분자량 측정을 위한 standard mark는 Takara 사의 Φ X174-Hinc II digest (1,057, 770, 612, 495, 392, 345, 341, 335, 297, 291, 210, 162, 79 bp) 를 사용하였다.

(마) DNA sequencing

염기서열은 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer)을 사용하여 분석하였다. Nucleotide와 amino acid sequence 분석은 GENETYX-WIN 3.1 software program을 사용하였다.

(바) RNA probe 제작

염기서열이 확인된 plasmid(2 μ g)는 Hind III를 처리하여 overnight으로 반응시킨다. 다음날 전기영동으로 제한효소 처리 여부가 확인되면 동량의 PCI를 넣고 vortex 후 원심분리한다 (15,000rpm, 3min). 원심 후 상층은 새 tube에 옮기고 동량의 chloroform을 더하여 섞은 후 원심분리한다 (15,000rpm, 3min). 상층은 다시 새 tube에 옮겨 1/10의 3M CH₃COONa, 2.5x ethanol을 첨가하여 섞은 뒤 15,000rpm에서 20분간 원심분리 하여 DNA를 침전시킨다. pellet에 70% ethanol 1ml 첨가하여 다시 원심분리 한다 (15,000rpm, 5min). 원심 후 상층을 제거하고 evaporation으로 ethanol을 완전히 제거한다. DNA pellet은 멸균수 20 μ l로 녹인 다음 10x buffer, NTP mix(DIG-UTP+dNTP), RNase Inhibitor, T₃ polymerase 를 첨가하여 37°C에서 1시간 배양함으로써 RNA probe를 합성한다. 전기영동으로 probe 생성 여부를 확인한 뒤 DNase I을 첨가하고 37°C에서 15분간 배양하여 DNA를 제거한다. 배양 후 2.5 volume의 100% ethanol을 첨가하여 15,000rpm, 4°C, 20분간 원심분리 하여 RNA를 침전시킨다. 상층은 조심히 버리고 70% ethanol 1ml 첨가하여 원심분리(15,000rpm, 4°C, 5min) 한다. 상층은 조심히 부워 완전히 제거하고 멸균수(100ng/ μ l의 농도가 되게)를 첨가하여 녹이 뒤 분주하여 -20°C에 보관한다.

(2) Hybridization

pre-hybridization이 끝나면 완성된 probe를 100°C 물에서 10분간 변성시킨 뒤 얼음 위에 5분간 둔 다음 prehybri-solution에 100ng/ml의 농도로 첨가하여

hybri-solution을 만든다.

슬라이드 글라스에서 prehybri-solution을 제거하고 그 위에 hybri-solution을 올려놓고 silicon 코팅된 커버 글라스를 덮어 95°C에서 5분간 변성시킨 뒤, 37°C에서 overnight으로 반응시킨다.

Hybridization이 끝난 슬라이드 글라스는 50% formamid가 첨가된 4x SSC 용액에 담겨서 커버 글라스를 제거한 뒤 4x SSC에 담겨 37°C에서 5분간 반응시킨다. 슬라이드 글라스를 20 μ g/ml RNase가 첨가된 4x SSC에 담겨 37°C에서 30분간 반응시키고, 4x SSC에 3분간 두어 RNase를 제거한다. 그 다음 2x SSC에 1시간동안 두었다가 1x SSC로 옮겨서 1시간 반응시킨다. 반응이 끝난 슬라이드 글라스는 0.5x SSC에 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤 새로운 0.5x SSC로 옮겨서 상온에서 30분간 둔 다음 검경한다.

3. 결과 및 고찰

가. 면역 활성화

곡류, 한약재 및 해조류의 추출물 섭취가 새우의 면역활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 8월 30일부터 평균 체중 10.49 \pm 0.63g, 체장 110.89 \pm 2.99mm되는 대하를 동의대학교 생물생산 연구실의 순환여과장치가 되어있는 사육수조에 각각 10마리씩 수용하여 각종 약재 추출물이 첨가된 사료를 급이하면서 10일간 사육한 후 채혈하여 NBT를 이용한 superoxide production 평가법에 의하여 조사하여 곡류의 경우는 그림 1-2에, 한약재의 경우는 그림 1-3에 그리고 해조류의 경우는 그림 1-4에 나타내었다.

곡류의 경우는 울무, 보리 등 총 9종을 추출하여 실험하였으며 이들 중 면역효과가 양호한 5종과 효과가 낮은 보리에 대해서만 그림 1-2에 나타내었다. 그림 1-2에서 보는바와 같이 조(seed of *Setaria italica*)가 DO 0.34 \pm 0.12로 superoxide 생산이 가장 높게 나타났으며 그 다음으로 옥수수가 0.31 \pm 0.12로 높게 나타났다. 울무와 메밀은 각각 DO가 0.22 \pm 0.06과 0.22 \pm 0.05로 조와 옥수수보다는 낮은 값을 보였으나 대조 실험구 0.12 \pm 0.01 보다는 높은 값을 보였다.

그러나 밀과 보리의 추출물을 급이한 실험구는 DO가 각각 0.15 \pm 0.03와

0.10±0.01로 대조군과 거의 동일한 결과를 보여주었다. 한편 Takahashi et al. (2000)가 밀가루(flour of wheat, *Pantoea agglomerans*)로부터 분리 추출한 lipopolysaccharide (LPS)를 급이한 보리새우 (*P. japonicus*)에서 phagocytic activity, phenoloxidase activity에서 높은 활성을 보였으며 virus에 감염시켰을 경우 LPS를 섭취하지 않은 대조 실험구는 5일만에 모두 폐사하였으나 LPS를 섭취한 보리새우들은 50%의 생존율을 보였다고 보고하고 있어, 본 실험에서 밀에 대한 실험 결과와는 상이한 결과를 보여주고 있다. 이러한 실험적 결과의 차이는 본 실험에서는 粗추출물을 사용하였으며 실험 대상종과 밀의 종류가 다르기 때문이라고 생각한다.

한약재 6종의 추출물들을 새우 사료에 첨가하여 대하에 급이한 후 superoxide 생산에 대한 효과를 그림 1-3에 나타내었다. 소화기능을 촉진시키는 감초와 간 기능 보호와 강장효과가 있다고 알려진 구기자와 오미자, 그리고 신경, 신기 보강에 좋다는 산수유 추출물을 첨가한 사료를 먹은 대하의 superoxide 생산에 의한 DO값은 0.10±0.02 ~ 0.17±0.04로 대조 실험구와 거의 같든지 아니면 약간 높게 나타났다. 반면 보혈 강장제로 알려진 당귀와 천궁은 각각 0.29±0.19와 0.33±0.12로 대조 실험구에 비해 높은 값을 나타내었다.

새우류에서 한약재를 사용한 면역증강 효과를 조사한 연구들은 찾아보기 힘들지만 어류에서는 많은 연구들이 수행되어져 왔다. 감초의 glycyrrhizin은 *Edwardsiella tarda* 병원성 세균에 대한 저항성을 높여준다는 보고가 있어 어류에서는 감초가 면역증강에 좋은 재료로 보고되어지고 있다(Jang et al., 1992). 그리고 구기자와 오미자 등도 *Edwardsiella tarda* 병원성 세균에 대한 저항성이 어류에서 높게 나타난다는 보고가 있다 (Kim, 1999). 그러나 본 연구에서 대하의 경우에서 면역증강효과의 지표로 사용하는 superoxide 생성에서는 높은 효과를 보이지 않았다. 이러한 차이는 면역증강효과를 알아보는 지표의 차이에서 나타날 수도 있지만 사람과 어류는 척추동물에 속하지만 대하는 무척추동물인 절족동물에 속하기 때문에 계통발생학적 관계가 멀기 때문이라고 생각된다.

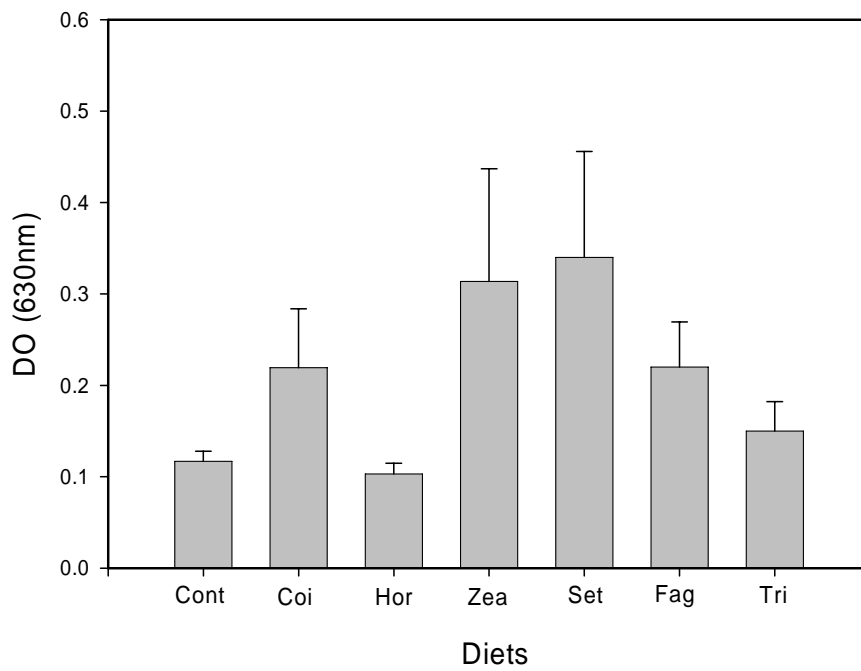


그림 1-2. 대하(*Penaeus chinensis*)에 울무(Coi), 보리(Hor), 옥수수(Zea), 조(Set), 메밀(Fag), 밀(Tri) 추출물들을 각각 사료에 첨가하여 급이하였을 때 혈구세포에서의 O_2^- 의 생성.

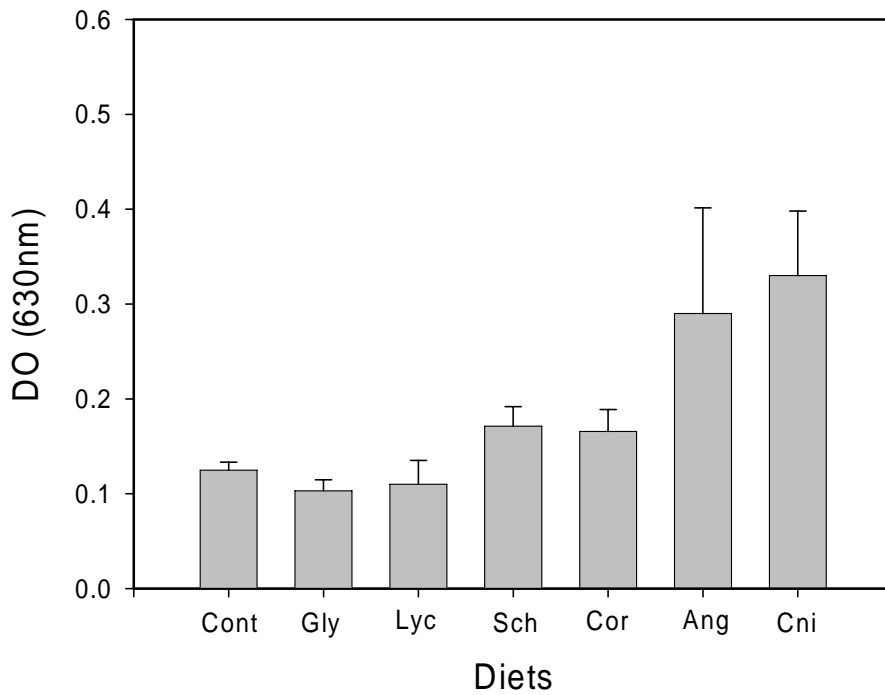


그림 1-3. 대하(*Penaeus chinensis*)에 한약제, 감초(*Glycyrrhiza uralensis*, Gly), 구기자(*Lycium chinense*, Lyc), 오미자(*Schisandraceae chinensis*, Sch), 산수유(*Cornus officinalis*, Cor), 당귀(*Angelica gigas*, Ang) 그리고 천궁(*Cnidium officinale*, Cni) 추출물들을 각각 사료에 첨가하여 급이하였을 때 혈구세포에서의 O_2^- 의 생성.

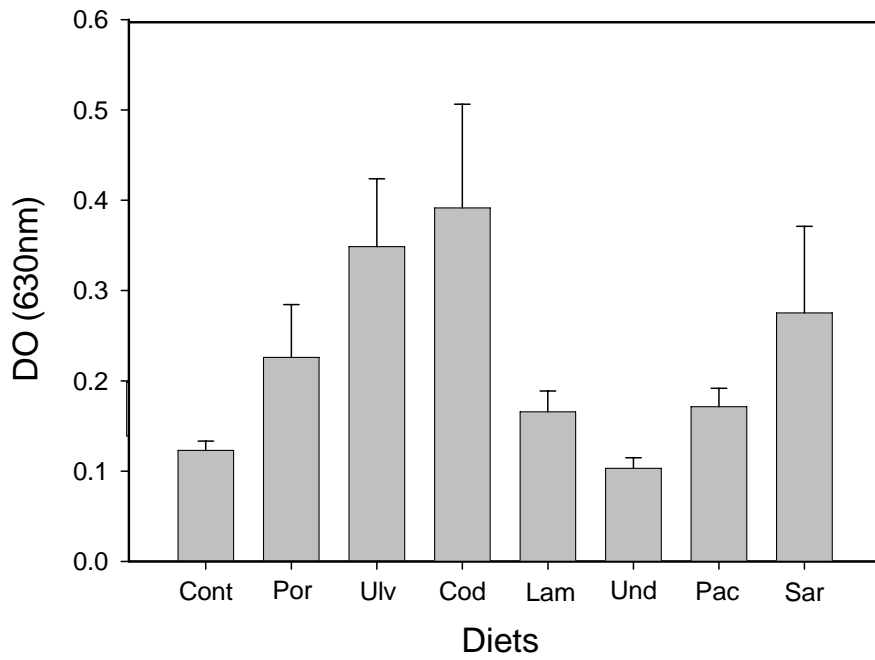


그림 1-4. 대하(*Penaeus chinensis*)에 김(*Porphyra tenera*, Por), 구멍갈파래(*Ulva lactuca*, Ulv), 청각(*Codium fragile*, Cor), 다시마(*Laminaria japonica*, Lam), 미역(*Undaria pinnatifida*, Und), 도박(*Pachymeniopsis elliptica*, Pac), 모자반(*Sargassum fulvellum*, Sar) 추출물들 각각을 사료에 첨가하여 급이하였을 때 혈구세포에서의 O_2^- 의 생성.

해조류의 추출물이 대하의 면역증강 효과에 미치는 영향을 조사하기 위해 우리나라 연안에 흔히 볼 수 있고 쉽게 구할 수 있는 김, 구멍갈파래, 청각, 다시마, 미역, 도박, 모자반을 대상으로 조사하여 그림1-4에 나타내었다. 해조류에서는 미역을 제외하고 대부분 superoxide 생성에 효과적인 것으로 나타났다. 구멍갈파래와 청각이 0.35 ± 0.18 과 0.39 ± 0.28 로 다른 해조류보다 높은 값을 나타내었으며, 김과 모자반은 각각 0.23 ± 0.13 과 0.27 ± 0.17 로 녹조류인 구멍갈파래와 청각보다 다소 낮은 값을 보였지만 대조구에 비하여 유의한 차이를 보였다.

해조류로부터 기능성 물질을 찾고자 하는 연구자들이 최근에 많이 늘어가는 추세이지만 Noda et al. (1989)가 갈조류의 몇 종이 항암효과가 있다는 보고가 나온 이후 갈조류인 미역(*Undaria pinnatifida*)과 알퐁이모자반(*Sargassum autumnale*)의 열탕 추출물이 잉어(*Cyprinus carpio*)와 방어(*Seriola quinqueradiata*) 등 어류의 면역증강에 효과적이었다는 보고가 있다(Fujiki et al., 1992). 그리고 Itoh et al. (1993, 1995)가 지층이(*Sargassum thunbergii*)에서 추출한 polysaccharide와 fucoidan이 면역증강에 의해 항암효과가 있다는 연구결과의 바탕으로 Yeh et al.(2006)은 같은 모자반속에 속하는 *Sargassum duplicatum*의 열탕 추출물을 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)에 주사하였을 때와 먹이에 첨가하여 먹었을 때 모두 면역증강에 양호한 효과를 나타내었다고 보고를 하였다. 이들 보고에 의하면 갈조류 중 모자반 속에 속하는 종류들은 어류와 새우류의 면역증강에 매우 효과적임을 보여주고 있다. 본 연구에서도 모자반이 대조구에 비해서는 높은 superoxide 생성 효과를 보여주고 있어서 대하의 면역활성을 일으키는데 모자반이 효과적이라고 할 수 있다.

한편 Supamattaya et al. (2005)는 *Penaeus monoton*에 녹조류의 일종인 *Dunaliella* 추출물을 사료 1kg에 300mg을 첨가하여 먹었을 경우 면역활성을 나타내는 phenoloxydase(PO) activity에는 대조 실험구와 차이가 없으나 WSSV를 인위적으로 감염시켰을 경우 33%의 생존율을 보여 바이러스에 대한 저항성을 높이는 효과뿐만 아니라 β -carotene이 새우의 체색에도 좋은 효과를 보여주어 상품가치를 높일 수 있다는 보고를 하였다. 본 연구에서도 녹조류에 속하는 청각과 구멍갈파래가 면역활성에 좋은 효과를 보여주고 있어 향후 이들 녹조류에 대해 많은 연구가 필요하다고 본다.

나. 기호성

상기 면역증강 실험을 실시하는 동안 약제의 첨가물 종류에 따라 새우들의 사료를 먹는 양이 각기 다른 것을 알 수 있었으며, 이러한 첨가물에 대한 기호성은 면역증강에 대한 효율성뿐만 아니라 성장과 그 외 여러가지 생리학적인 기능에 많은 영향을 줄 것이라고 생각된다. 따라서 상기의 각 추출물에 대해서 대하의 기호성을 조사하기 위하여 추출물을 첨가한 사료를 급이하였을 때 대하의 일일 사료 섭취량을 조사하였다.

곡류 추출물들에 대한 일일 먹이 섭취량은 그림 1-5에 나타내었다. 이번 실험에 사용한 곡류를 추출한 물질들은 대체적으로 대하가 좋아하는 것으로 나타났으며, 특히 조, 메밀, 옥수수를 첨가한 사료를 대하가 하루 섭취하는 먹이양이 각각 $0.22\pm 0.03\text{g}$, $0.22\pm 0.02\text{g}$, $0.22\pm 0.03\text{g}$ 으로 나타나 대조 실험구보다 유의하게 높은 것으로 나타났다. 특히 조와 옥수수는 면역증강에서도 높은 값을 나타내었다.

그림 1-6에서 보는바와 같이 한약제의 추출물을 첨가한 사료를 준 경우는 대하의 하루 먹이 섭취량이 감초가 $0.26\pm 0.04\text{g}$ 으로 가장 좋은 것으로 나타났다. 이는 곡류의 조나 옥수수보다 더 높은 섭취량을 보여주고 있다. 감초는 전통적으로 소화증진효과가 있다고 알려져 모든 약제에 사용되고 있는 한약제로서 새우에서는 사료 섭취를 촉진하는 유인 물질이 있음을 보여주고 있다. 또한 면역증강 효과를 보였던 천궁의 경우도 감초보다는 사료 섭취효과는 다소 떨어지지만 사료 섭취량이 $0.22\pm 0.02\text{g}$ 으로 대조 실험구보다 유의하게 많은 양을 섭취하고 있다. 반면, 면역증강 효과를 보였던 당귀는 $0.13\pm 0.02\text{g}$ 으로 대조 실험구의 사료 섭취량보다 다소 떨어지는 경향이 있어 면역증강효과는 높으나 먹이유인 효과는 없는 것으로 나타났다.

한편, 해조류에서는 그림 1-7에서 보는 바와 같이 김과 도박 등 홍조류의 경우는 사료 일일 섭취량이 각각 $0.17\pm 0.04\text{g}$, $0.18\pm 0.05\text{g}$ 으로 대조 실험구보다 다소 많은 양의 사료를 섭취하는 경향은 보이지만 거의 유사한 결과를 나타내고 있다. 미역 추출물을 첨가한 사료의 경우는 $0.13\pm 0.02\text{g}$ 으로 대조 실험구보다 더 적은 양의 사료를 섭취하였으며 그 외 갈조류에 속하는 다시마도 대조 실험구와 같은 결과를 보여주었다. 또한 녹조류인 청각과 구멍갈파래의 경우도 갈조류와 같은 결과를 보여주었다. 이처럼 해조류의 경우는 면역증강 효과에서는 곡류나 한약제보다 양호한 결과들을 얻었으나 기호성에서는 가장 낮은 결과를 나타내었다.

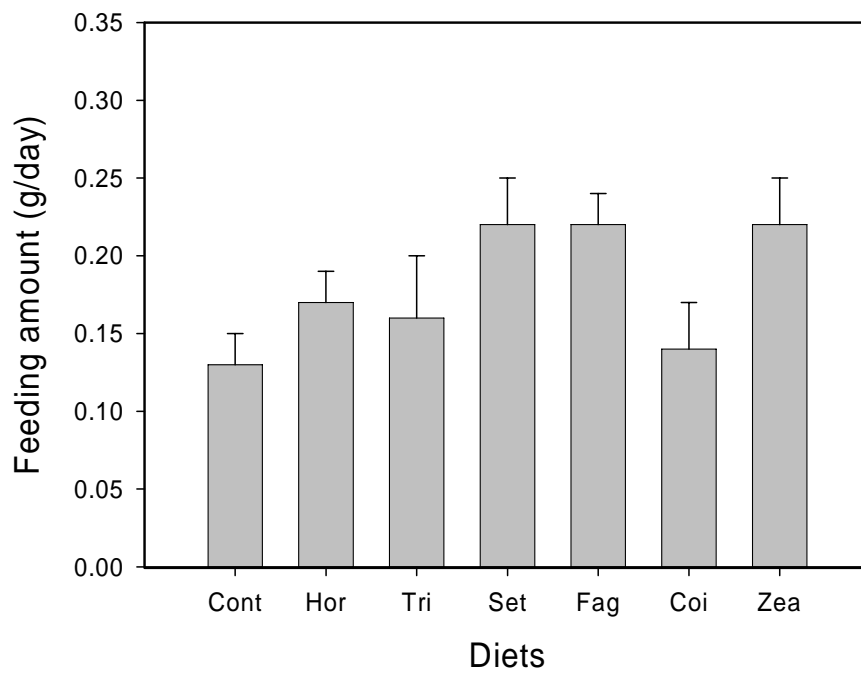


그림 1-5. 대하(*Penaeus chinensis*)에 보리(Hor), 밀(Tri), 조(Set), 메밀(Fag), 울무(Coi) 그리고 옥수수(Zea) 추출물들을 각각 첨가한 사료를 급여하였을 때 일일 사료 섭취량.

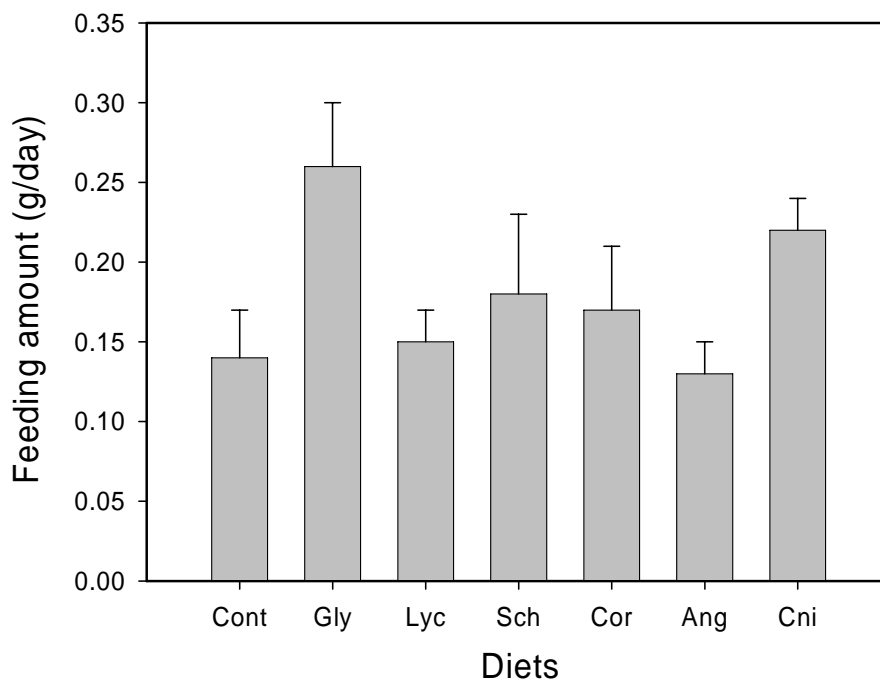


그림 1-6. 대하(*Penaeus chinensis*)에 한약제인 감초(Gly), 구기자(Lyc), 오미자(Sch), 산수유(Cor), 당귀(Ang) 그리고 천궁(Cni) 추출물들을 각각 첨가한 사료를 급여하였을 때 일일 사료 섭취량.

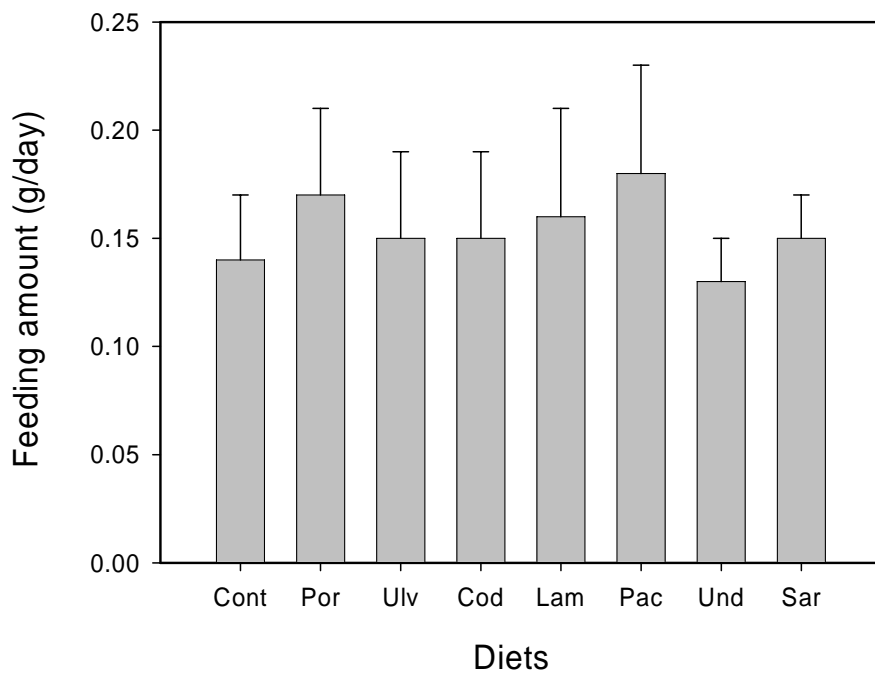


그림 1-7. 대하(*Penaeus chinensis*)에 해조류인 김(Por), 구멍갈파래(Ulv), 청각(Cor), 다시마(Lam), 도박(Pac), 미역(Und) 그리고 모자반(Sar) 추출물들을 각각 첨가한 사료를 급이하였을 때 하루 사료 섭취량.

지금까지 면역 활성화와 기호성 대한 실험에서 대체적으로 곡류에는 기호성에서 우수하고 해조류는 면역 활성화에서 우수하게 나타났으며 한약재에서는 기호성에서 우수한 것과 면역 활성화에서 우수한 것들이 같이 탐색되었다.

다. WSSV에 대한 저항성

상기 실험의 superoxide 생성 조사와 기호성 조사에서 양호한 결과를 보인 곡류에서는 조, 옥수수, 메밀, 한약재에는 감초와 천궁, 해조류에서는 구멍갈파래와 청각의 추출물을 대상으로 WSSV에 대한 challenger test를 2회에 나누어 실시하여 그 결과를 그림 1-8과 1-9에 나타내었다.

그림 1-8에서 보는바와 같이 WSSV에 감염되지 않은 대하들(negative control)은 사육기간 동안 모두 생존하였으나 WSSV에 감염된 대하들(positive control)은 사육 8일 만에 전량 폐사되었다. WSSV를 인위적으로 감염시키기 전의 대하들에 대하여 WSSV 감염여부를 PCR법으로 검사한 결과 그림 1-10에서 나타낸바와 같이 대부분 WSSV에 감염되어 있지 않은 상태였다. 또한 기호성 조사에서 가장 양호한 결과를 보였던 감초의 경우는 7일 만에 폐사하는 결과를 보여 바이러스에 대한 저항성을 전혀 보이지 않았다. 기호성과 면역활성에서 양호한 결과를 보였던 옥수수의 경우도 9일 만에 전량 폐사하여 바이러스에 대한 저항성을 보이지 않았다.

그러나 기호성과 면역활성에서 양호한 결과를 보였던 천궁의 경우는 사육 8일 동안은 지속적으로 폐사 개체들이 나타났으나 그 다음부터는 폐사된 개체들이 나타나지 않아 20%의 생존율을 보였다. 그리고 기호성에서는 양호한 결과를 보이지 않았으나 면역활성에서 가장 양호하게 나타났던 청각의 경우는 사육 7일 동안은 폐사 개체들이 지속적으로 나타났지만 8일부터는 30%의 생존율을 계속 유지하였다.

두 번째 실험에서는 그림 1-9에서 보는바와 같이 WSSV에 감염되지 않은 대하들(negative control)은 사육 8일째 이후부터 90%의 생존율을 나타냈으며, WSSV를 감염시키지 않은 대하들(positive control)은 사육 6일째 30%, 8일째 20%, 10일째 이후부터 10%의 생존율을 보여 서서히 폐사하는 양상을 보여 1차 실험 때 보다 WSSV의 감염이 약하게 된 상태였다. 사육 11일째에 구멍갈파래의 경우는 30%, 메밀의 경우는 50%, 조의 경우는 40%의 생존율을 보여 거의 동일한 면역활성을 보였던 구멍갈파래보다 메밀과 조의 경우가 높은 생존율을 보였다.

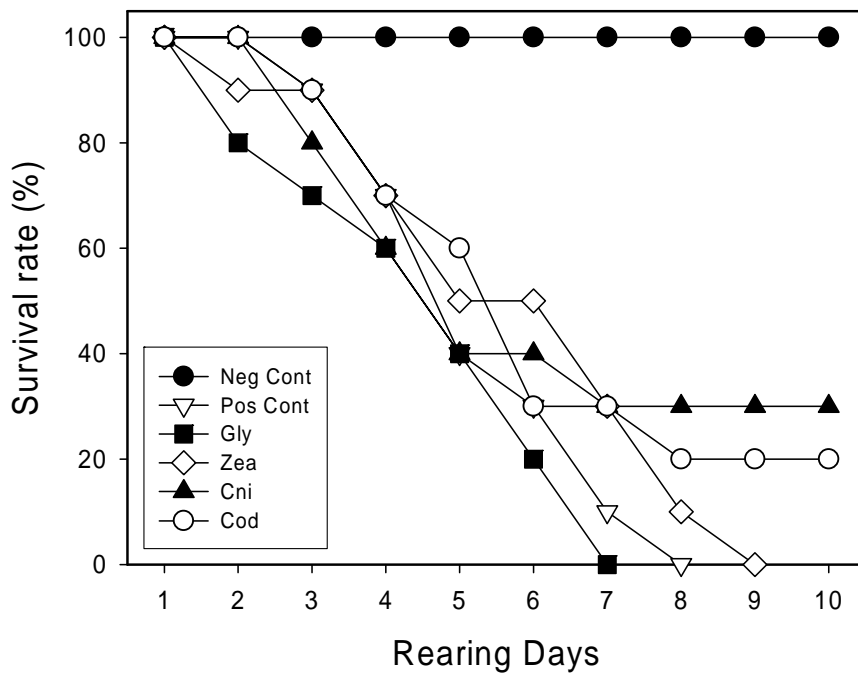


그림 1-8. 감초(Gly), 옥수수(Zea), 천궁(Cni) 그리고 청각(Cod) 추출 물을 급이한 WSSV에 감염된 대하(*P. chinensis*)의 생존율. Neg Cont : WSSV에 대한 negative control, Pos Cont : WSSV에 대한 positive control.

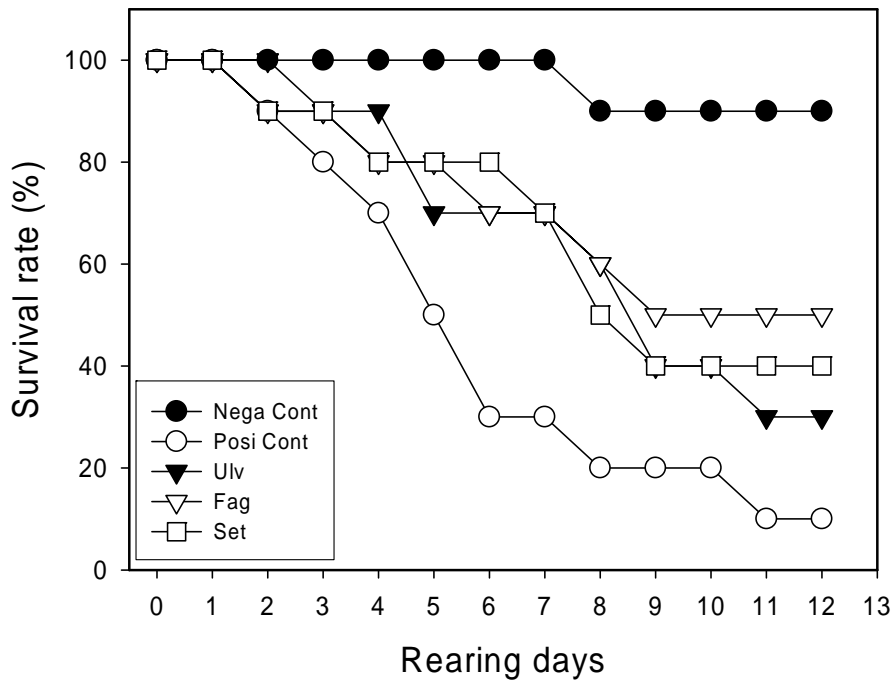


그림 1-9. 구멍갈파래(Ulv), 메밀(Fag), 조(Set) 추출물을 급이한 WSSV에 감염된 대하(*P. chinensis*)의 생존율. Nega Cont : WSSV에 대한 negative control, Posi Cont : WSSV에 대한 positive control.

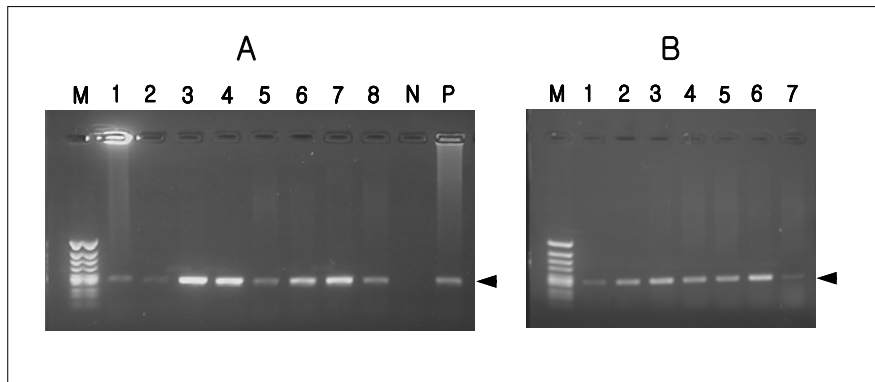
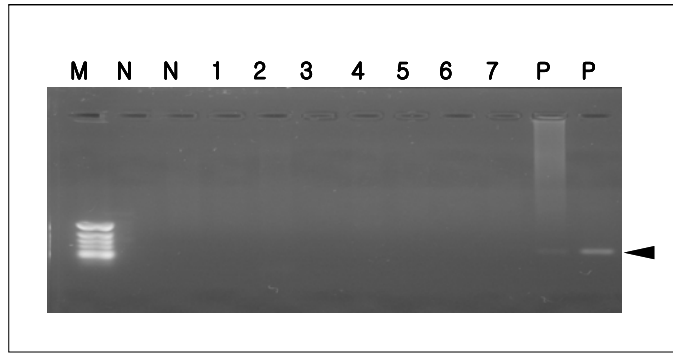


그림 1-10. WSSV를 인위적으로 감염시키지 않은 대조구의 대하(*P. chinensis*)(위)와 WSSV 감염후 폐사된 개체(아래 A)와 살아남은 개체(아래 B)의 유영지에 대한 PCR결과 전기영동 사진. M, molecular weight marker; N, negative control; P, positive control; 1-8, shrimp sample number.

각 실험구에서 생존한 개체들에 대하여 WSSV에 대한 감염여부를 PCR로 조사한 결과 그림 1-10에서 보는바와 같이 모든 개체들에서 WSSV에 대한 유전자들이 검출되어 WSSV에 감염되어있는 상태임을 알 수 있었다. 따라서 본 실험에서 급이한 약재의 추출물들에 의해 바이러스에 대한 치료효과 보다는 새우 자체의 건강을 유지함으로써 바이러스의 증폭과 발병을 억제하고 이에 대한 저항성을 키워주는 효과를 나타낸 결과라고 볼 수 있다.

지금까지 결과로 보아 기호성이 좋은 약재보다 해조류 등 면역활성이 양호한 약재가 WSSV에 대한 저항성에서 양호한 결과를 보였으며, 면역활성과 기호성 양쪽 모두에서 양호한 결과를 보인 천궁, 조, 메밀과 같은 것들이 WSSV에 대한 저항성에서도 더 좋은 결과를 보여주었다.

본 실험에서 1차의 실험과 2차의 실험에서 대조 실험구의 생존율의 변화가 각기 다르게 나타난 것은 WSSV에 대한 감염강도가 각기 다르기 때문인 것으로 판단된다. 따라서 2차 실험에서 메밀과 조 추출물을 급이한 대하의 생존율의 각각 50%, 40%로 나타난 것이 2차 실험 때 천궁과 청각의 추출물을 급이한 대하의 생존율이 각각 30%, 20%로 나타나 것보다 WSSV에 대해 더 저항성을 보인다고는 할 수 없으며 오히려 천궁과 청각이 더 저항성이 좋을 가능성이 높다 할 수 있다. 바이러스에 대한 저항성을 보다 더 높일 수 있는 물질을 개발하기 위해서는 기호성보다 면역활성이 높은 물질을 주재료로 사용하는 것이 바람직 하지만 면역활성의 상승작용을 얻기 위해서는 기호성의 높은 물질 첨가도 바람직하다.

따라서 지금까지 실험한 재료들 중에서 기호성이 뛰어난 재료와 면역활성이 뛰어난 재료들에 대하여 여러 가지 배합 조건을 달리한 약재로부터 추출한 물질을 사용하여 WSSV에 대한 저항성을 다시 조사할 필요가 있다.

라. WSSV에 대한 *in situ*법에 의한 감염기관의 조직학적 관찰

상기 실험의 개체들에 대하여 기관과 조직별 WSSV의 감염 상태를 조직학적으로 조사하기 위하여 WSSV의 유전자로부터 *in situ*용 RNA probe를 제작한 후 각 기관의 조직을 대상으로 *in situ* hybridization을 개발하였다.

WSSV에 대한 *in situ*용 RNA probe를 제작하기 위하여 우선 5'-CCAAGTTGTAAACAGGCCG-3'와 5'-GACCTGACTGTCCATGCC-3' 두개의

primer로 RCR을 이용하여 WSSV 단편을 증폭시켰으며, 증폭된 서열이 WSSV의 단편임을 확인하기 위하여 DNA를 cloning한 후 DNA sequence를 하였다. 그 결과는 그림 1-11에 나타난 것처럼 WSSV에 대한 단편임이 확인되었다.

염기서열이 확인된 plasmid로부터 Hind III를 처리하여 분리 추출된 DNA로부터 NTP mix(DIG-UTP+dNTP), RNase Inhibitor, T₃ polymerase를 첨가하여 37°C에서 1시간 배양하여 RNA probe를 합성하였다. 전기영동으로 probe 생성 여부를 확인한 결과는 그림 1-12에 나타내었다. 그 후 ethanol 침전법으로 DIG-labeled RNA를 분리하여 hybridization에 사용하였다. 조직내의 WSSV 유전자에 DIG-labeled RNA를 반응시킨후 AP labeled anti DIG를 이용하여 발색시켜 현미경하에서 대하 조직내의 WSSV 감염세포를 관찰하였다. 그 결과는 그림 1-13에 나타내었다. 감염된 개체들은 대체로 아가미와 상피세포 층에 virus에 대해 양성반응을 보이는 세포들이 다른 기관의 조직들에 비해 많이 나타났다. 간췌장에서 흔하지는 않지만 일부 개체의 조직에서 양성반응을 보이는 세포들이 나타났으나 대부분의 개체들의 간췌장과 근육층에는 virus에 대해 양성반응을 보이지 않았다. 그리고 생식소의 난모세포에서도 virus에 양성을 보였으나 난외의 여포세포층의 세포인지 난내에 나타난 virus 양성 반응인지는 더 많은 조사가 필요하다.

마. 약재의 배합율에 따른 WSSV에 대한 저항성

WSSV에 대한 저항성을 더 높을 수 있는 약재의 배합율과 조성을 찾기 위해 기호성이 뛰어난 곡류 세 종, 한약재 두 종 그리고 해조류 두 종에 대하여 배합 비율을 각기 달리하여 총량을 1,000g으로 하여 추출한 후 농축한 물질을 각각 SP-1, SP-2, SP-3로 하여 이들 물질을 사료 1kg에 0.5g씩 첨가하여 WSSV에 대한 challenger test를 하였다.

그림 1-14는 배합율과 조성을 각기 달리하여 추출한 물질들을 사료에 첨가하여 새우에 먹인 후 WSSV에 대한 저항성을 조사한 결과를 나타내고 있다. 상기실험과 동일한 방법으로 이들 대하들을 WSSV에 인위적으로 감염시킨 후 일반 사료를 급이한 대조 실험구에서는 감염 후 2일째부터 행동이 둔하고 먹이 섭취를 전혀 하지 않았으며 폐사된 개체들이 나타나기 시작하여 4일째 되는 날에는 전부 폐사하였다.

```
5` - CAAGTTGTTAAACAGGCCGTTGATGAAAAATACGATGAATTATTAGA  
AGATAAGGTTGAAGAAATGAGACCGGATATAATCAATGAAGCATCCGAAA  
CATATGATAAACTTGCTGCTGATATGATAAGAGAGGTAGACACTAGTAGT  
GTTATTGCTCCTGCAATAGCTGGCACAGTGGCAAGAACTATCAATAATTT  
AAGAGATAAAAGGAAAGAATATGAAAAGAGGCTATGGACATTAGCCTACA  
AACCATGGAGAAGATATGTACAAGCAATTACAGTGATGGAATTTTCGTTTAT  
CATATAAAGACCTGACTGTCCATGCC -3'
```

그림 1-11. WSSV에 대한 *in situ* hybridization에 사용되는 probe의 서열을 확인하기 위한 DNA 서열.

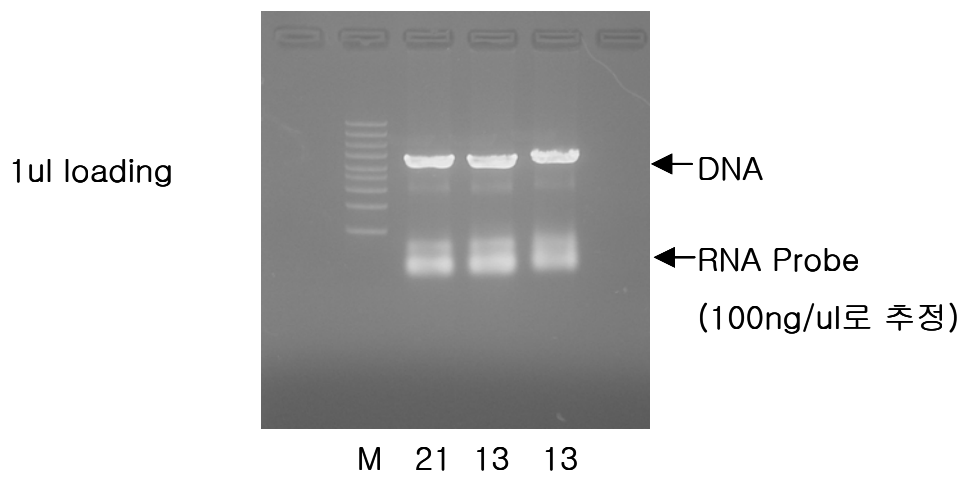


그림 1-12. DIG labeled RNA의 형성 확인을 위한 전기영동 사진.

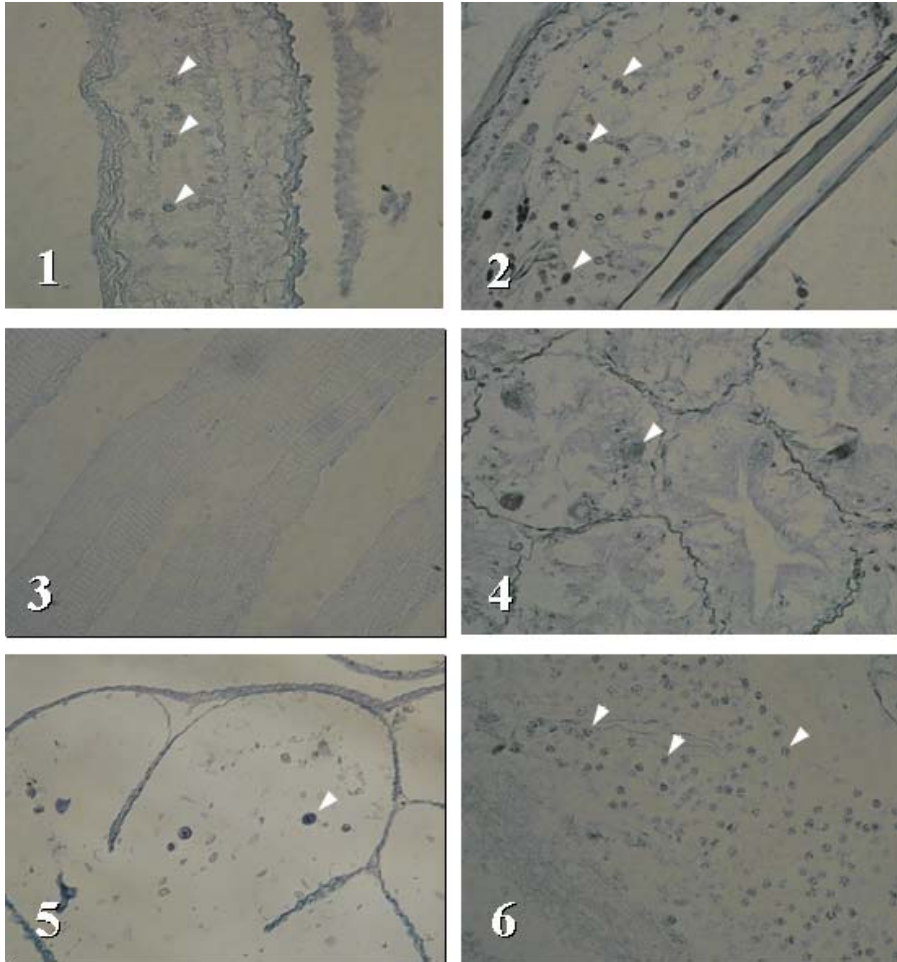


그림 1-13. *in situ* hybridization법에 의한 각 기관의 WSSV 감염 상태.
 1, epithelial tissue of intestine; 2, gill plate; 3, hepatopancreas; 4, muscle layer; tissue; 5, oocytes; 6, eyestalk organ.

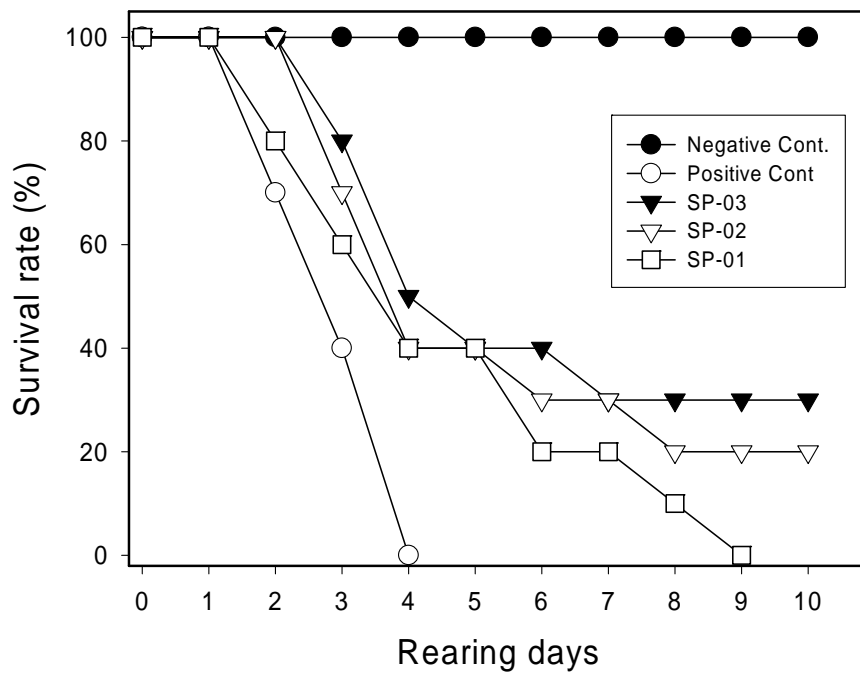


그림 1-14. 혼합약제 추출물 SP-01, SP-02, SP-03을 각각 급이한 WSSV에 감염된 대하(*P. chinensis*)의 생존율.

앞의 WSSV 저항성 실험에서는 감염시킨 후 7일후에 100% 폐사가 일어났으며, 또한 실험에서는 10일 동안 서서히 폐사가 일어나 그 이후에도 10%의 생존율을 유지하였다. 이러한 결과와 비교하면 이번 감염실험에서는 새우들의 감염상태가 매우 강하게 되었음을 보여주었다.

기호성이 우수한 약재를 주로 하여 배합한 SP-1의 경우는 대조구보다 먹이 섭취는 많이 했으나 WSSV를 감염시킨 후 4일째에 40%의 생존율을 보였으며 그 후 서서히 생존율이 떨어져 감염시킨 후 9일째 되는 날에 모두 폐사되었다.

기호성이 우수한 약재와 면역증강 효과가 우수한 약재를 1:1의 비율로 혼합하여 제조한 사료첨가제 SP-02의 경우는 먹이 섭취 행동은 SP-01의 경우와 거의 같았으며 WSSV를 감염시킨 후 4일째까지의 생존율의 변화도 거의 유사하여 40%의 생존율을 보였으나 그 후 서서히 생존율이 떨어져 감염시킨 후 8일째부터는 20%의 생존율을 유지하였다. 생존한 개체들은 그 후 20일간 계속 사육하였을 때도 건강하게 살아있었다.

한편 기호성이 우수한 약재보다 면역증강 효과를 보인 약재들을 많이 혼합한 추출물로 만든 첨가제 SP-03을 급이한 대하들은 WSSV를 감염시킨 후 4일째 50%의 생존율을 보였으며 그 후 생존율이 서서히 감소하여 7일째 이후부터는 30%의 생존율을 유지하였다.

지금까지의 결과들을 보면 WSSV에 대한 저항성은 기호성 보다는 면역활성이 우수한 약재가 양호하지만 면역활성을 나타내는 물질에 기호성을 나타내는 물질을 첨가한 것이 WSSV에 대한 저항성은 더 높음을 알 수 있다. 앞의 사육실험 결과에서 언급한 것처럼 바이러스에 감염된 새우들은 먹이 섭취활동이 둔화되어 먹이를 거의 먹지 않으며 행동도 거의하지 않는다. 그러므로 이러한 결과는 기호성이 높은 물질을 첨가해 주게 되면 먹이 섭취량이 많게 되고 따라서 면역증강물질의 섭취도 많게 되기 때문이라고 할 수 있다.

바이러스에 감염되기 전에 미리 면역을 증진시켰을 때 생존율의 변화를 알아보기 위하여 WSSV를 인위적으로 감염시키기 2주전부터 SP-03을 사료에 첨가하여 급이한 결과를 그림 1-15에 나타내었다.

WSSV를 감염시킨 후 SP-03을 첨가한 사료를 먹인 새우들은 30%의 생존율에 머물렀으나 2주전부터 SP-03을 첨가한 사료를 먹인 새우들은 감염시킨 후 6일째까지는 서서히 폐사된 개체들이 나타났으며, 7일째 이후부터는 생존율이 70%를 유

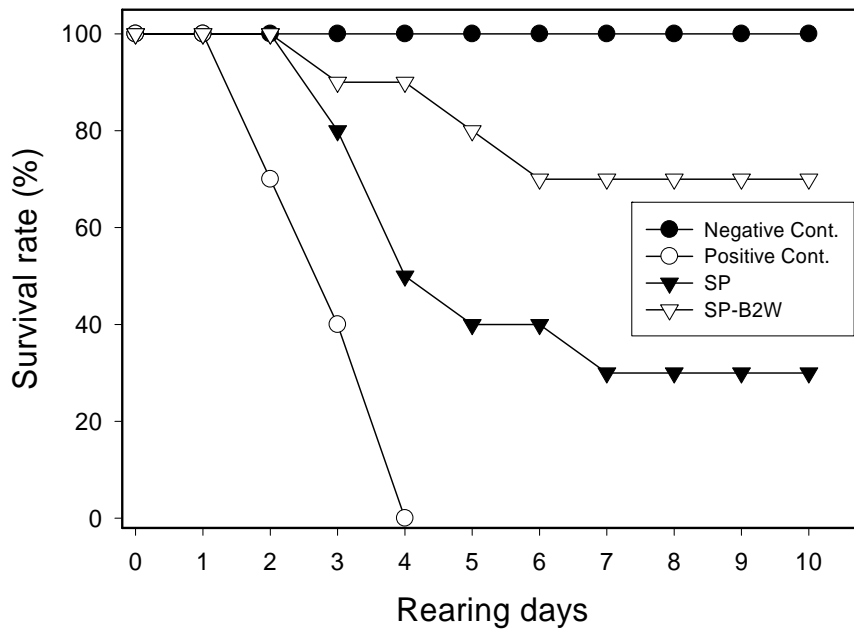


그림 1-15. SP-03 추출물을 2주간 미리 급이한 후 WSSV에 감염시킨 대하(*P. chinensis*)의 생존율.

지하여 높은 생존율을 보였다.

새우류에서 바이러스의 활성을 제어할 수 있는 물질을 찾기 위한 challenger test를 한 연구는 미약하나 vibrio에 대한 challenger test를 한 연구들은 많이 이루어져 있다 (Itami et al., 1994; Su et al., 1995; Liao et al., 1996; Chang et al., 2000). 이들 연구에서 Vibrio에 대한 challenger test에서는 β -1, 3-glucan이 매우 효과적이라고 보고하고 있다. 그리고 *Schizophyllum commune*에서 분리한 β -1,3-glucan이 WSSV에 대해 효과에서도 사료에 1%를 첨가한 경우 42%의 생존율을 보이는 저항효과를 얻었다는 보고도 있다 (Chang et al., 2003). 갈조류에서 분리한 sodium alginate가 면역증강 효과를 높여 vibrio에 대해 저항성을 갖게 한다는 연구들도 보고되고 있다(Cheng et al., 2004, 2005). 그러나 이들 물질이 바이러스성 질병에도 저항효과가 좋다는 보고는 아직 없다.

WSSV을 감염시킨 홍다리얼룩새우(*P. monodon*)에 녹조류인 *Dunaliella* 추출물을 급이하였을 때 33.3%의 생존율을 보였다는 보고가 있으나 이 실험에서 대조 실험구에서도 10%의 생존율을 나타내고 있어서 본 연구에서 찾아낸 약재보다 바이러스에 대한 저항성이 떨어짐을 알 수 있다(Supamattaya et al., 2005). 또한 보리새우(*P. japonicus*)에서 *Pantoea agglomerans*에서 추출한 LPS를 challenger test하기 전 8일 동안 먹인 다음 LPS를 7일 동안 먹었을 때 생존율이 50%였다고 보고하고 있다 (Takahashi et al., 2000). 이러한 보고는 지금까지 보고된 연구결과들 중 가장 효과 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 본 실험에서는 70%의 생존율을 보이고 있어서 보리새우에 대한 연구보다 더 효과적이라고 할 수 있다.

바. 추출물 분획의 면역활성 및 생리활성 효과

지금까지 조사된 약재들 중 먹이효과와 면역증강 효과가 우수한 두 종의 식물을 대상으로 이들의 methanol(MeOH)추출물을 그림 1-1에 따라 분리를 하였다. 각 MeOH 추출물에 대하여 최종적으로 추출 분리한 dichloromethane (CH_2Cl_2), ethyle acetate (EtOAc), butanol (BuOH) 그리고 물(H_2O)분획을 각각 사료에 첨가하여 먹이로 급이하였을 때 대하에 대한 면역활성을 조사하기 위해 superoxide 생성, 기호성을 조사하기 위해 사료섭이량, 성장촉진 효과를 조사하기 위해 탈피율 등을 조사하였다.

면역활성보다 먹이 섭취효과가 우수한 약재의 분획물들을 각각 사료 1kg에 0.3g을 첨가한 사료를 급여하였을 때 대하의 superoxide 생성, 일일사료섭취량, 탈피율에 대한 결과를 그림 1-16, 1-17, 1-18에 나타내었다.

그림 1-16에서 보는바와 같이 각 분획마다 superoxide의 생성에 대한 조사에서 DO값이 CH₂Cl₂분획의 0.23±0.06에서 물 분획 0.29±0.01 사이로 분획물간 차이도 없었으며, 대조실험구와 차이도 거의 없었다.

이들 분획물을 첨가한 사료를 투여하였을 때 사료 섭취량은 물 분획층을 첨가하였을 때가 1.55±0.15g으로 가장 많았으며, CH₂Cl₂ 분획을 첨가하였을 때는 1.09±0.01g으로 대조 실험구와 유사한 값을 보였다. 그리고 EtOAc 분획과 BuOH 분획을 첨가하였을 때는 각각 1.17±0.07g과 1.29±0.12g으로 MeOH 분획을 첨가한 실험구와 유사한 결과를 보였다.

대하 한 마리의 일일 탈피율을 조사한 결과 그림 1-17에서처럼 H₂O분획이 16%로 가장 높았으며, EtOAc 분획에서는 14%로 다음으로 높았다. CH₂Cl₂ 분획과 BuOH 분획에서는 탈피율이 각각 10%와 9%로 거의 대조 실험구와 같은 수준으로 나타났다. 따라서 먹이를 많이 섭취한 물 분획을 첨가한 실험구에서 탈피율도 높게 나타나 많이 먹는 실험구가 성장도 좋은 효과를 나타내고 있음을 보여주고 있다.

그러나 EtOAc 분획을 첨가한 실험구에서 먹이섭취량은 BuOH 분획과 MeOH 분획을 첨가한 실험구와 유사하지만 탈피율에서는 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 EtOAc 분획에는 새우의 성장을 촉진하는 물질이 존재하고 있음을 보여주고 있다.

한편, 먹이유인효과보다 superoxide 생성을 유도하여 면역활성이 뛰어난 약재에 대하여 상기의 동일한 방법으로 분리 추출하였을 때 각 분획물을 사료 1kg에 0.3g을 첨가하여 대하에 먹이로 급여하였을 때 superoxide 생성, 사료섭취량, 그리고 탈피율을 조사하여 그림 1-19, 1-20, 1-21에 나타내었다.

그림 1-19에서 나타난바와 같이 MeOH추출물을 첨가한실험구에서는 DO값이 0.35±0.03이지만 CH₂Cl₂ 분획을 첨가한 실험구에서는 0.47±0.05로 가장 높은 값을 보였다. EtOAc 분획을 첨가한 실험구에서도 0.41±0.01로 대조 실험구의 0.25±0.01보다 유의하게 높은 값을 나타내었다.

일일 먹이 섭취량에서는 그림 1-20에서 보는바와 같이 모든 분획들이 대조 실험구에 비해서 먹이를 많이 섭취하도록 하는 유인효과가 있었으며 그중에서도 H₂O분획을 첨가한 실험구가 1.34±0.06g으로 먹이 섭취량이 가장 많았다. EtOAc 분획을

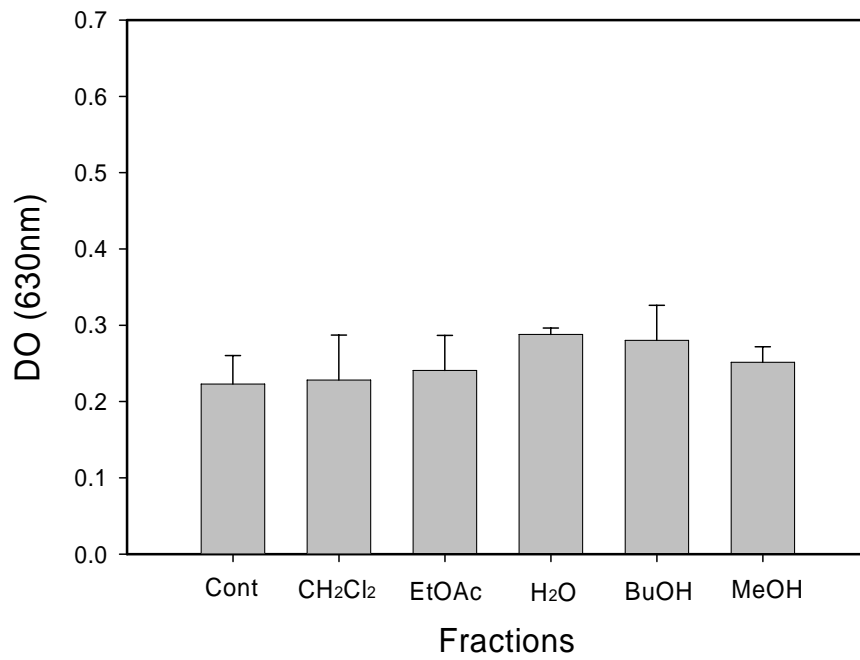


그림 1-16. 기호성을 보인 약재의 각 분획물을 사료에 첨가하여 급이한 대하(*P. chinensis*)의 혈구세포에서 superoxide(O_2^-) 생성 효과.

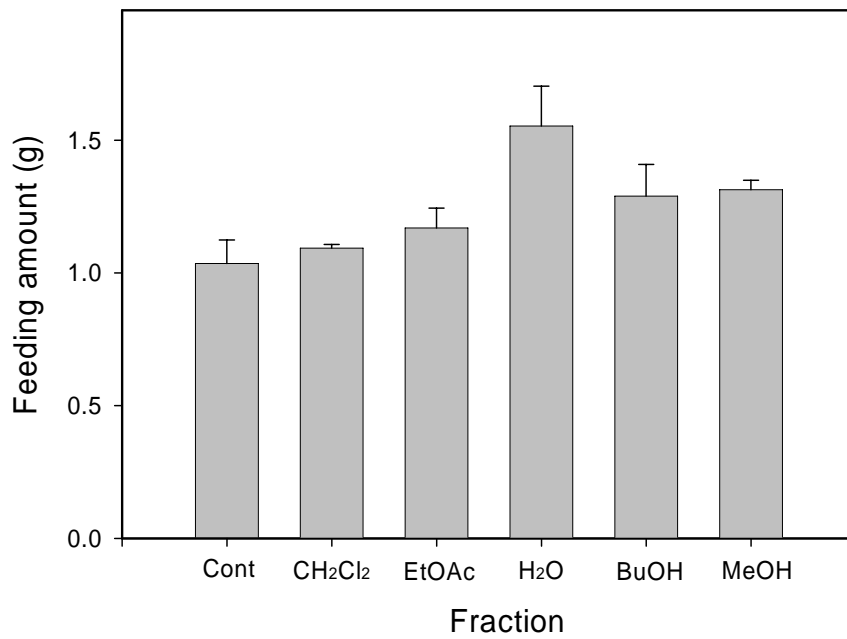


그림 1-17. 기호성을 보인 약재의 각 분획물을 사료에 첨가하여 급이한 대하(*P. chinensis*)의 일일 사료 섭취량의 변화.

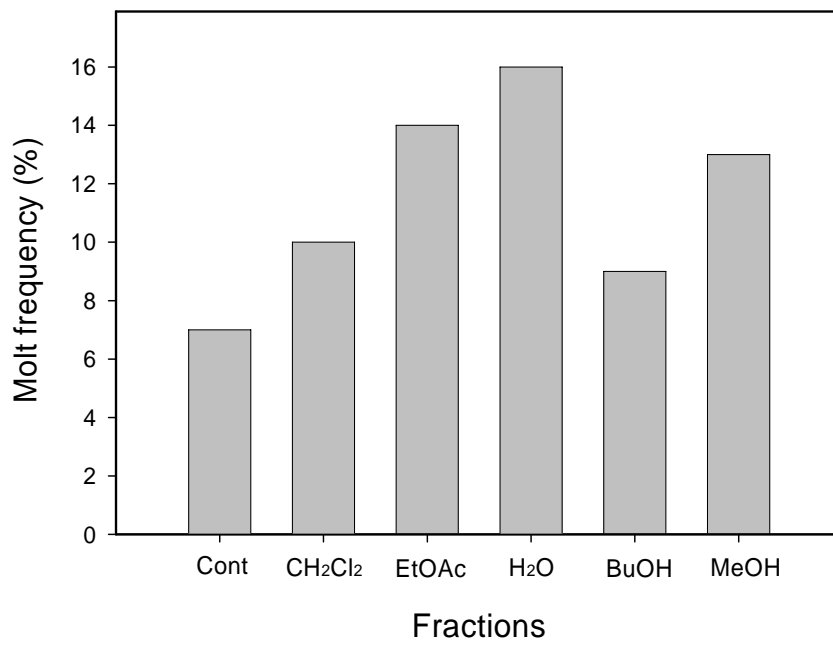


그림 1-18. 기호성을 보인 약재의 각 분획물을 사료에 첨가하여 굶이한 대하(*P. chinensis*)의 탈피 빈도의 변화.

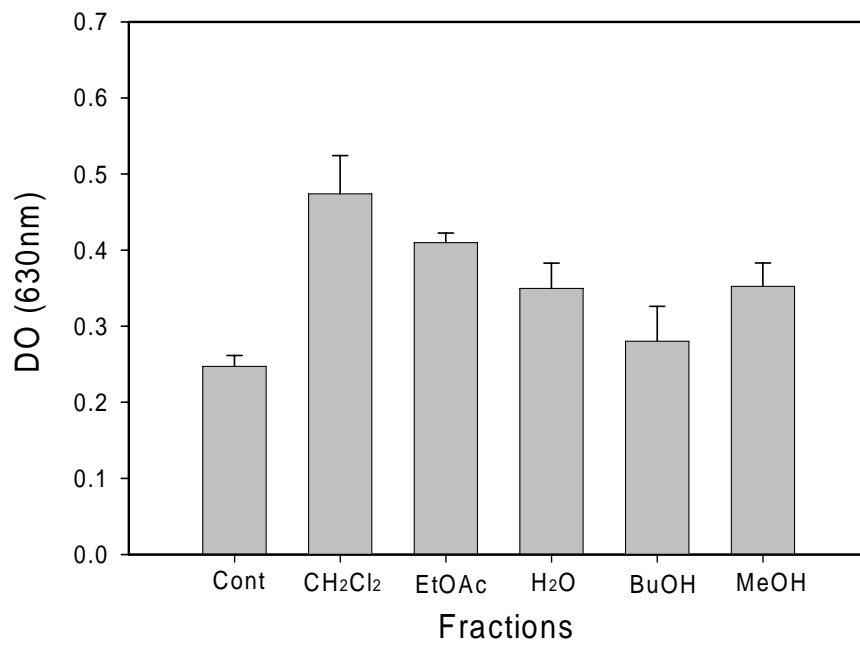


그림. 1-19. 면역활성을 보인 약재의 각 분획물을 사료에 첨가하여 급이한 대하(*P. chinensis*)의 혈구세포에서 superoxide(O₂⁻) 생성 효과.

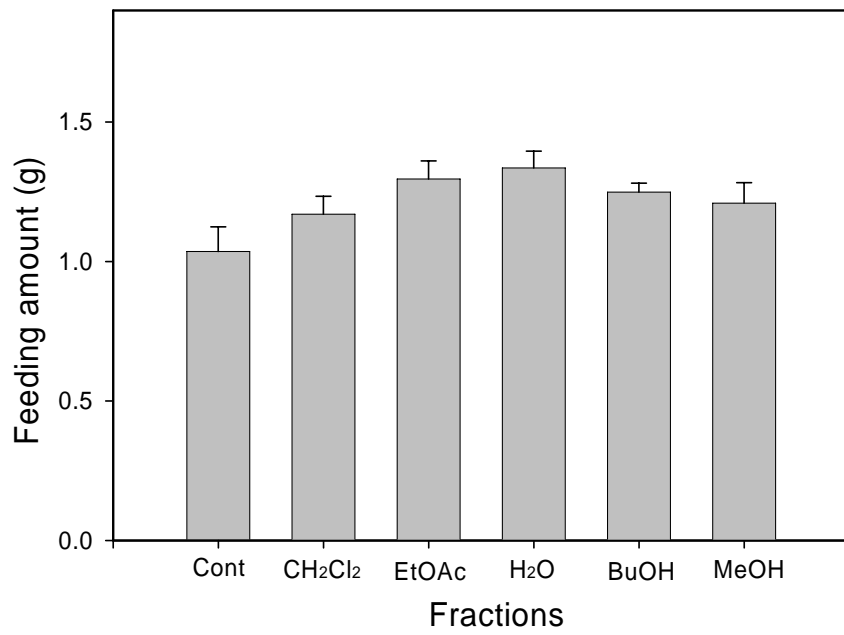


그림 1-20. 면역활성을 보인 약재의 각 분획물을 사료에 첨가하여 굶이 한 대하(*P. chinensis*)의 일일 사료섭취량의 변화.

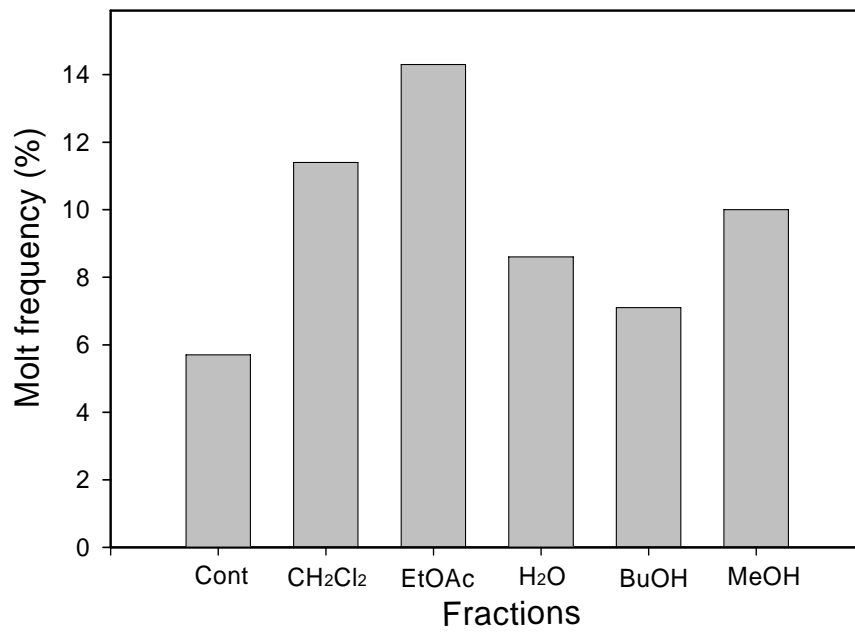


그림 1-21. 면역활성을 보인 약재의 각 분획물을 사료에 첨가하여 급이한 대하(*P. chinensis*)의 탈피 빈도의 변화.

첨가한 실험구에서는 1.30 ± 0.07 로 두 번째로 먹이를 많이 섭취하였다. 그 외 분획들은 MeOH 분획을 첨가한 실험구와 거의 같은 양을 나타내었다.

그림 1-21에서 나타낸바와 같이 성장 촉진 효과를 알기위해 일일 탈피율을 조사한 결과에서는 EtOAc 분획을 첨가한 실험구에서 탈피율이 14.3%로 가장 높았으며, 먹이 섭취량이 가장 많았던 H₂O분획을 첨가한 실험구에서는 탈피율이 8.6%로 나타났으며 분획물중 먹이 섭취효과가 가장 낮았던 CH₂Cl₂ 분획을 첨가한 실험구에서는 11.4%로 두 번째로 높은 값을 나타내었다.

이처럼 먹이 섭취량이 적어도 탈피 촉진효과가 있는 것은 이 CH₂Cl₂분획에 탈피를 촉진하는 식물성 ecdysteroid가 존재할 수 있다. 이미 120여종의 식물에 대해 육상식물의 700여종 중에서 400여종이 식물성 ecdysteoid가 있으며 이들 모두 활성을 가진다는 보고가 있다(Volodin et al., 2002). 그리고 육상식물 뿐만 아니라 조류나 균류에도 있으며, 식물에 존재하는 ecdysone은 갑각류나 곤충의 혈중농도보다 3배정도 높게 존재한다는 보고가 있다 (Lafont and Wilson, 1992; Bathori, 1998; Bajguz and Koronka, 2001). 따라서 본 실험에 사용된 식물로부터 추출 분리된 CH₂Cl₂분획에는 식물성 ecdysone이 존재할 가능성을 배제할 수 없다.

이러한 결과들을 종합해보면 기호성이 높은 약재와는 달리 면역활성이 높은 약재의 경우는 CH₂Cl₂ 분획과 EtOAc 분획에 면역활성을 촉진하는 물질이 존재하고 있을 가능성이 매우 높다. 그리고 기호성이 높은 약재와 마찬가지로 면역활성이 좋은 약재에 있어서도 H₂O 분획을 첨가한 사료를 주었을 때 가장 먹이 섭취량이 많았으나 탈피율에서는 오히려 EtOAc 분획을 첨가한 사료를 섭취한 새우들이 더 높은 결과를 보였다. 이러한 것은 EtOAc 분획에 성장을 촉진하는 물질이 존재하고 있음을 보여주고 있다.

따라서 기호성이 높은 약재를 추출할 때는 물과 EtOAc를 혼합한 물질로 추출하는 것이 섭이효과와 성장에 더 효율적인 물질들을 얻을 수 있을 것이라고 생각한다. 또한, 면역증강 효과가 높은 약재의 경우는 물보다는 CH₂Cl₂와 EtOAc를 혼합한 물질로 추출하는 것이 면역증강과 성장을 촉진하는 효과를 더 얻을 수 있을 것이라고 본다.

제 2 절 첨가제 Shrimpower-04 (SP-04)의 WSSV에 대한 저항성 및 생리활성 효과

1. 서 론

새우류에 면역을 증진시킴으로써 바이러스성 질병으로부터 저항성을 높여 새우의 양식 생산성을 증대시키기 위해 건강식품으로 많이 이용하는 곡류 9종과 식욕 및 보혈 강장제로 널리 사용하는 한약재 7종 그리고 식용으로 이용하고 우리나라 연안에 많이 분포하고 있는 해조류 9종에 대해 새우류 중 우리나라의 양식 대상종으로 중요한 대하를 대상으로 기호성과 면역활성 및 WSSV에 대한 저항성 등을 조사하였다. 그 결과 일반적으로 곡류들은 일부 면역활성이 좋은 것이 있지만 대부분 기호성에서 우수하고, 한약재는 종류에 따라 기호성이 매우 뛰어나지만 면역활성에서 떨어지는 것과 기호성은 다소 떨어지지만 면역활성에서 뛰어난 것들이 있었다. 반면 해조류들은 대부분 기호성에서는 매우 낮은 것으로 나타났으나 면역활성에서는 양호한 결과를 얻었다.

이들 중 면역활성보다 기호성이 뛰어난 곡류와 기호성보다 면역활성이 뛰어난 한약재를 대상으로 유효성분을 추출 분리하기 위하여 H_2O , CH_2Cl_2 , EtOAc, BuOH을 이용하여 분획하여 이들 물질들에 대해 기호성, 탈피율 그리고 면역활성을 조사한 결과 두 재료 모두 H_2O 분획이 사료섭취효과가 양호하게 나왔으나 탈피율에서는 곡류의 경우는 H_2O 분획이, 한약재의 경우는 EtOAc과 CH_2Cl_2 분획이 효과적으로 나타났다. 따라서 면역활성, 기호성 및 성장에도 효과적인 사료첨가제를 제조하기 위해서는 이러한 특성을 고려하여 약재에 따라 분획물을 선택하고 이들 분획물들을 혼합하여 사료첨가제를 다시 제조하여 그 기능성을 조사할 필요가 있다.

새우 양식에서 사료의 효율성 제고는 새우를 양식할 때 사료비용이 전체 비용의 60%를 차지하고 생산량의 약 15% 이상을 차지하기 때문에 사료비를 줄이는 것은 매우 중요하다. 따라서 사료의 효율성을 높이기 위해서는 기호성이 뛰어나야하지만 이와 더불어 섭취한 먹이를 얼마나 많이 소화 흡수하고 이로부터 에너지를 얼마나 효율적으로 얻을 수 있는가도 중요하다. 이르기 위해서는 우선 섭취된 먹이를 많은

소화효소를 분비하여 먹이를 분해하고 소화하여 분해산물들이 소화관내의 생피세포가 잘 흡수가 될 수 있도록 하여야 하며, 흡수되지 않은 물질들은 잔여 먹이와 효소가 함께 소화관 밖으로 배출이 된다(Córdova-Murueta et al., 2003). 갑각류 중 보리새우류는 먹이 조성의 변화에 잘 적응을 하여 간체장에서 소화효소를 합성하고 분비를 한다고 알려져있다(Le Moullac et al., 1997). 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; Nunnnes 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 소화 이루어지지 않은 상태에서 배설물로 배출이 된다는 기존 통념과 상반된 결과가 보고되기도 하였다. 따라서 본 연구에서 개발된 사료첨가제는 새우의 섭취율을 높이는 효과가 있어서 먹이로 섭취한 사료들을 얼마나 효율적으로 충분히 소화시킬 수가 있는가를 조사할 필요가 있다.

새우류의 소화생리를 이해하기 위한 지표로서 사용된 단백질 분해효소의 일종인 trypsin은 해양생물, 특히 어류유생의 소화과정 및 영양상태를 나타내는 지표로 많은 이용이 되어 왔다(Ueberschaer 1988, 1995; Hjelmeland et al., 1984).

본 연구에서는 복합재료로 이루어진 SP-03의 재료들을 대상으로 혼합비율에 따라 추출용 용매의 조성을 달리하여 추출하고 이들 양을 달리하여 사료에 첨가하여 새우에 급이하였을 때 새우들의 사료 섭취효과와 소화율을 조사하였으며 이들 결과로부터 적정 사료첨가제의 첨가량을 규명하였고, 공식의 제어 효과와 성장, 그리고 WSSV에 대한 저항성들을 조사하여 양식에 적용가능성을 확인하였다.

2. 재료 및 방법

가. 재료

(1) SP-04의 제조

SP-03에서 사용한 곡류와 해조류 및 한약재들 중 감초, 천궁, 메밀, 조, 청각 및 김을 각각 1절에 기재한 동일한 방법으로 추출하여 하였다. 각 약재의 추출 분획들 중 기호성 또는 면역활성의 기능성이 뛰어난 분획들을 선택하여 각각 동량의 비율로 정량하여 혼합하고 혼합물 10g에 100% ethanol 100ml을 넣어 용해한 것을 표준 첨가제 SP-04로 하고, 이를 일반 시판용 사료에 첨가하여 사육실험에 사용하였다.

(2) 새우

실험에 사용한 대하와 흰다리새우는 충남 태안에 있는 국립수산물과학원 태안 갑각류연구센터에서 종묘 생산하여 양성한 것을 사용하였다. 대하의 어미새우는 3월에 산란을 위해 회유해오는 자연산을 채집하여 이들 중 PCR검사에 의해 WSSV에 감염되지 않은 것을 사용하였다. 흰다리새우의 어미새우는 미국 하와이의 High Health Aquaculture Inc.사로부터 무병(SPF)새우를 수입한 것을 사용하였다. 종묘 생산된 치하는 실내 10ton 수조에서 양성하였으며, 이들 중 일부는 야외에 설치한 0.2ha의 호지에서 양성하여 각종 실험에 사용하였다.

나. 사육실험

(1) 첨가제의 적정 첨가량 및 적정사료급이량 조사

사료에 적정 SP-04 첨가량을 조사하기 위하여 실험시작 하루 전에 2톤 수조에 새우를 수용한 후 한 개의 실험구에 15마리씩 50리터 사각수조(PVC) 3개에 총 45마리를 넣었으며 총 7개의 실험구 (일반사료에 0g/kg, 0.2g/kg, 0.3g/kg, 0.4g/kg, 0.5g/kg, 0.6g/kg, 0.7g/kg첨가한 실험구)를 준비하여 새우 총 체중의 10%의 먹이를 공급하고 한 시간 동안 섭이가 이루어지게 한 후, 새우를 30마리 수거하였고 2시간 후 15마리를 수거하여 분석하였다.

SP-04 첨가사료의 적정 급이량을 조사하기 위해서는 새우 15마리씩 50리터 아

크릴 사각수조 6개에 총 90마리 수용하여 1차 실험결과 최적 먹이섭취량을 보인 0.7g/kg으로 사료에 첨가하여 총 체중의 0, 1, 3, 5, 8 그리고 10%가 되도록 SP-04 첨가사료를 일일공급량으로 계산하고 5회로 나누어 급이하였다.

실험을 하는 동안 수온은 26°C를 유지하였으며, 지수식으로 에어공급하면서 사육하였다.

(2) 성장 및 공식제어효과 실험

공식제어 효과 실험은 1m×1m×0.7m의 수조에 3.5g 전후의 대하를 30마리를 넣고 매일 전 체중에 5%되도록 SP-04 0.4g/kg을 첨가한 사료를 급이하면서 15일간 사육하여 SP-04 무첨가 일반 사료로 사육한 실험구와 공식에 의한 사망 개체수를 비교 조사하였다.

성장에 미치는 영향을 조사하기 위해서는 20일간 평균 체중 4.31 ± 0.29 g, 체장 68.63 ± 1.41 mm의 대하를 2Ton 원형 수조에서 사육한 후 체장과 체중을 조사하였다.

(3) WSSV에 대한 challenger test

WSSV에 대한 저항성을 조사하기 위하여 1Ton FRP수조 14개에 각각 20마리씩 수용하여 30일간 사육하였으며, 대하는 평균 체중 4.57 ± 0.21 g의 160마리를 사용하였으며, 흰다리새우는 평균체중 5.48 ± 0.36 g의 120마리를 사용하였다. 사육수온은 자연수온을 유지하였으며 사육기간 동안 수온 범위는 25°C~28°C이었다.

충남 대산에 있는 한 양식장으로부터 WSSV의 감염되어 폐사직전의 대하 (체중 약 8g~14g)를 10kg 구입하여 바이러스 challenger test를 위하여 -80°C저온냉동고에 보관한 것을 감염용 새우로 사용하였다.

바이러스 감염효과를 일정하게 하기 위하여 WSSV에 감염된 새우 1kg을 homogenize한 후 밀가루 0.5kg과 새우 초기배합사료 1kg을 섞어 반죽한 다음 moisture pellet을 만들었으며 사용할 때까지 냉동고에 보관하였다. 바이러스 감염 시키기 위해서는 냉동보관중인 WSSV에 감염된 새우로 만든 pellet를 하루에 3회에 걸쳐 체중의 5%가 되도록 사료로 급이하였다. 인위적 감염유발기간 동안은 일반 사료는 급이하지 않았다. 감염시키기 10전부터 SP-04를 첨가한 사료를 급이하였으며 바이러스 감염후에도 계속하여 SP-04 첨가사료를 급이하면서 생존율을 조사하였다.

다. trypsin의 활성화 측정

먹이공급 후 1시간과 2시간 후 새우를 각각 수거하여 체장, 두흉갑장, 체중을 측정하고 간췌장, 전장(foregut), 중장(midgut)을 분리하여 -20°C 에 보관한 후, trypsin, 단백질을 측정하였다.

Uebershaer(1999)와 Drossou (2004)의 방법에 따라 형광광도법으로 trypsin의 활성도를 측정하였다. 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, $0\sim 4^{\circ}\text{C}$, $4,000\times\text{G}$ 에서 60분간 원심분리를 하였다. 상등액을 50 μl 씩 취하여 microplate에 3배구로 하여 분주를 하고 기질용액(0.2 mmol의 Na-benzoyl-L-arginin-4-methylcoumarinyl-7-amid, Bachem 사, 0.5% Dimethyl-sulfoxide, 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 가수분해된 양으로 표시하였다(hydrolysed MCA $\text{mg}^{-1}\text{min}^{-1}$) 측정시 Extinction은 380 nm, Emission은 440 nm였다. 표준검정식(Standard curve)은 7-amino-4-methylcoumarin (Bachem사) 0.5 mg을 100 μl DMSO에 녹여 Tris buffer로 희석을 하고 각 농도별로 측정을 하였다.

3. 결과 및 고찰

가. SP-04 첨가 농도별 먹이유인 효과

SP-04 첨가량에 따른 대하의 먹이 유인효과를 알기 위하여 일반사료 1kg에 SP-04를 0.2g, 0.4g, 0.8g을 첨가하여 새우에 급이하였을 때 하루 사료 섭취량을 조사하여 그림 2-1에 나타내었다.

SP-04를 첨가하지 않은 일반사료만 급이한 대조 실험구에서는 일일 사료섭취량이 0.16 ± 0.02 이였으나 SP-04 0.2g/kg으로 첨가한 사료를 급이한 실험구에서는 일일 사료섭취량이 $0.25\pm 0.02\text{g}$ 으로 대조 실험구에 비해 유의한 증가를 보였다 ($p<0.05$). SP-04 0.4g/kg으로 첨가한 사료를 급이한 실험구에서는 일일 사료섭

취량이 $0.28 \pm 0.03\text{g}$ 으로 대조실험구에 비해서는 유의한 증가를 보였으며($p < 0.01$), SP-04 0.2g/kg으로 첨가한 사료를 급이한 실험구보다는 약간 증가하였으나 유의한 차이는 보이지 않았다. SP-04 0.8g/kg으로 첨가한 사료를 급이한 실험구에서는 일일 사료섭취량이 $0.30 \pm 0.03\text{g}$ 으로 SP-04 0.8g/kg으로 첨가한 사료를 급이한 실험구에 비해서는 증가하였으나 유의한 증가는 보이지 않았다. 그러나 SP-04 0.2g/kg으로 첨가한 사료를 급이한 실험구에 비해서는 유의한 증가를 보였다.

이 실험에서 SP-04를 첨가한 것과 그러하지 않은 것과의 차이가 확실히 나고 있으나 SP-04의 첨가량이 증가함에 따라 그 효과가 확연하게 달라지지는 않은 것으로 보아 SP-04의 첨가가 사료의 섭취를 촉진하게 하는 먹이 유인효과가 확실히 있으나 그 첨가량의 한계가 있음을 보여준다.

따라서 SP-04의 첨가량의 한계를 조사하기 위하여 사료 1kg에 SP-04를 0.5g, 1g, 2g, 4g을 각각 첨가하여 사료 섭취효과를 조사하여 그림 2-2에 나타내었다.

SP-04를 첨가하지 않은 일반사료만 급이한 대조 실험구에서는 일일 사료섭취량이 0.13 ± 0.02 이였으나 SP-04 0.5g/kg으로 첨가한 사료를 급이한 실험구에서는 일일 사료섭취량이 $0.24 \pm 0.03\text{g}$ 으로 대조 실험구에 비해 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$). 그리고 SP-04 1.0g/kg으로 첨가한 사료를 급이한 실험구에서는 일일 사료섭취량이 $0.26 \pm 0.03\text{g}$ 으로 대조 실험구에 SP-04 0.5g/kg으로 첨가한 사료를 급이한 실험구 보다는 증가하였으나 유의한 차이는 보이지 않았다.

그러나 SP-04 2.0g/kg으로 첨가한 사료를 급이한 실험구의 일일 사료섭취량이 $0.20 \pm 0.02\text{g}$ 으로 대조 실험구 보다는 유의한 증가를 보였으나 SP-04 0.5g/kg과 1.0g/kg으로 첨가한 사료를 급이한 실험구보다 유의하게 감소를 하였다. 그리고 SP-04 4.0g/kg으로 첨가한 사료를 급이한 실험구의 일일 사료섭취량이 $0.15 \pm 0.02\text{g}$ 으로 SP-04 2.0g/kg으로 첨가한 사료를 급이한 실험구 보다 더 감소하였으며 대조실험구와 유사한 값을 보였다.

지금까지 결과로 SP-04는 1.0g/kg까지는 첨가량에 따라 사료 섭취량이 증가하지만 그 이상 첨가할 경우 오히려 섭취량을 저해하는 것으로 나타나며, SP-04 0.4g/kg SP-04의 적정 첨가량은 0.4g/kg으로 판단된다.

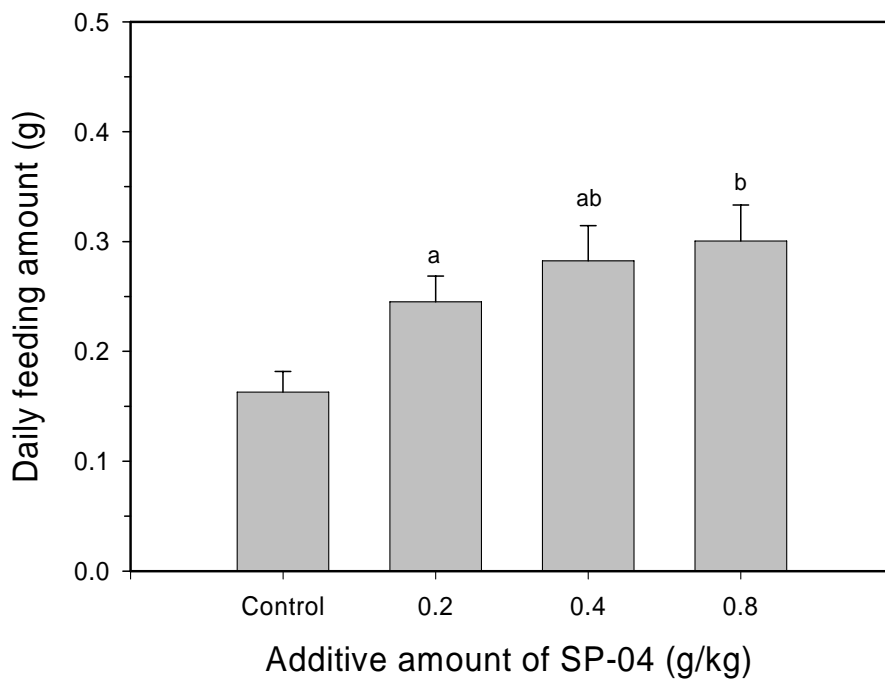


그림 2-1. 일반사료 1kg에 SP-04를 0.2g, 0.4g, 0.8g 첨가하여 대하 (*P. chinensis*)에 급이하였을 때 일일 사료 섭취량의 변화.

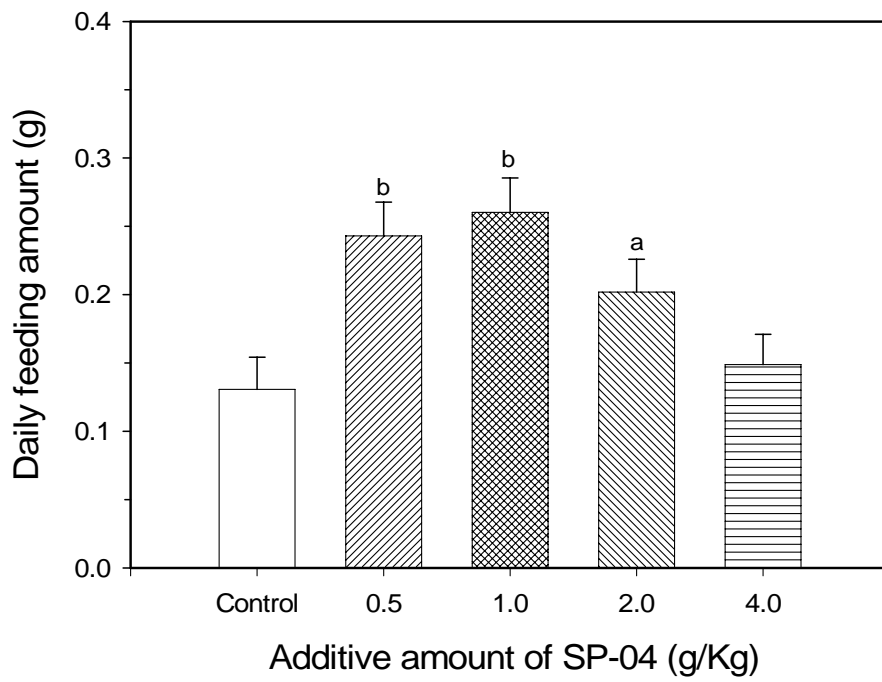


그림 2-2. 일반사료 1kg에 SP-04를 0.5g, 1.0g, 2.0g, 4.0g 첨가하여
 대하(*P. chinensis*)에 급이하였을 때 일일 사료 섭취량의 변화.

나. SP-04 첨가량의 변화에 따른 소화능력

SP-04를 사료에 첨가하였을 때 섭취된 사료들에 대한 소화상태를 조사하기 위하여 체중이 $6.67 \pm 0.34\text{g}$ 인 대하를 사용하여 SP-04를 첨가한 사료를 급이하여 1시간 후에 각 실험구로부터 채집된 각 개체들의 전장(foregut)의 trypsin의 활성도를 측정하였다.

하루 이상 사료를 주지 않았을 때 전장과 중장의 trypsin의 활성도는 모두 $10 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 로 나타나 trypsin의 활성도가 $10 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 이하인 개체들은 먹이를 섭취하지 않은 것으로 간주하고 그 개체수를 조사하여 그림 2-3에 나타내었다.

SP-04를 첨가하지 않은 사료를 급이한 실험구에서는 전장의 소화효소 활성도가 $10 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 이하인 개체들의 수가 전체의 30.0%였으며, 0.2g/kg의 농도로 첨가한 실험구에서는 23.3%, 0.3g/kg의 농도로 첨가한 실험구에서는 6.7%로 나타났다. 그러나 0.4g/kg의 농도 이상으로 첨가한 실험구에서는 한 마리도 나타나지 않아 모든 개체들이 사료를 섭취하였다고 볼 수 있으며 SP-04의 첨가량이 증가할수록 전장의 소화효소 활성도가 $10 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 이하인 개체들의 수가 감소하여 SP-04의 첨가농도를 증가 시킬수록 사료를 섭취한 개체들이 증가한다는 것을 보여주고 있어서 SP-04의 첨가를 많이 할수록 사료를 많이 먹는다는 것을 알 수 있었다.

또한 이들이 섭취된 사료의 실제 양의 변화를 알아보기 위하여 사료 급이후 2시간 지난 다음 체중에 대한 전장과 중장의 비를 조사하여 그림 2-4에 나타내었다. SP-04를 첨가하지 않은 일반사료를 급이한 실험구의 체중에 대한 전장의 무게의 비가 0.096%이었으나 SP-04의 첨가량이 증가할수록 그 비가 증가하여 사료 1kg에 SP-04를 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. 중장에서 SP-04 0.1g/kg을 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 중장에서도 전장보다는 뚜렷하지는 않지만 SP-04의 첨가량이 증가할수록 체중에 대한 중장의 무게의 비도 전장과 마찬가지로 증가하는 현상을 보여주고 있다.

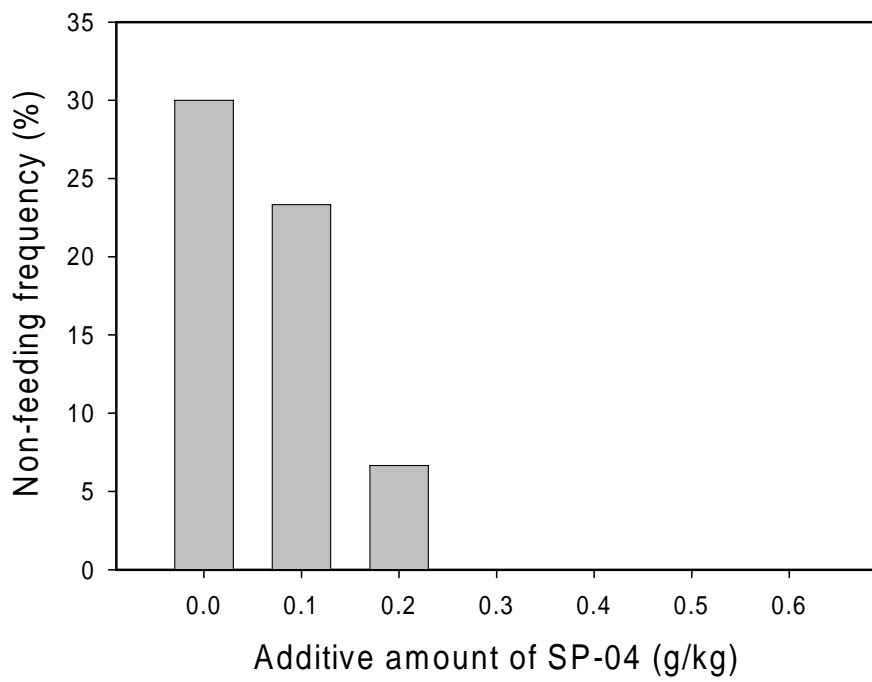


그림 2-3. SP-04의 첨가량에 따른 전장의 trypsin 활성도가 $10 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 이하인 새우들의 빈도 수.

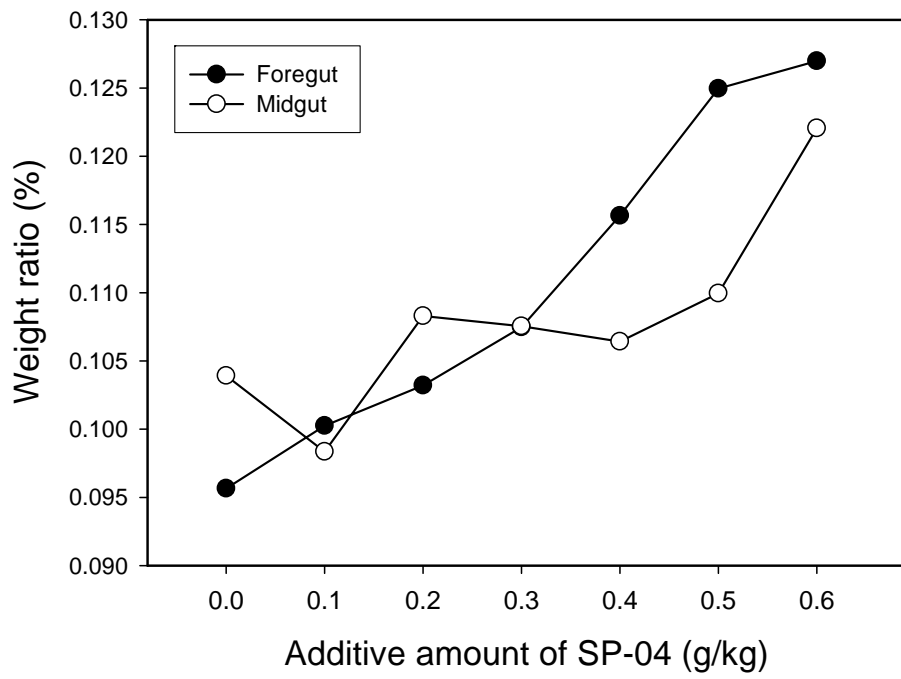


그림 2-4. SP-04의 사료 첨가량에 따른 새우의 체중에 대한 전장과 중장의 비율.

이 실험에서 체중은 습중량(wet weight)로 전장과 중장은 건중량(dry weight)으로 정량하여 계산된 값으로 표시하였는데도 변화의 양상이 뚜렷이 나타나 SP-04의 첨가에 의한 먹이 유인효과로 섭취되는 사료의 양이 일반사료보다 많은 것이 확실히 증명된다고 할 수 있다.

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.

상기의 결과에서 SP-04를 많이 첨가할수록 사료를 섭취하는 양이 많아지는 것을 보았다. 이렇게 많은 양의 사료를 섭취하였을 때 이들을 충분히 소화해내고 있는지를 알아보기 위하여 상기 실험의 각 개체들로부터 각 소화관에서 trypsin의 활성도를 조사하여 그림 2-5에 나타내었다.

SP-04를 첨가하지 않은 일반사료만 급이한 실험구에서 전장, 중장 및 간체장에서 trypsin의 활성도는 각각 123.99 ± 31.40 , 168.86 ± 31.87 그리고 $1772.66 \pm 127.47 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 이었다. 전장에서는 SP-04의 첨가량이 증가할수록 trypsin의 활성도도 증가하여 SP-04 0.2g 첨가했을 때에는 $276.36 \pm 51.81 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 0.4g 첨가했을 때에는 $599.07 \pm 99.40 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 0.6g을 첨가했을 때에는 $870.57 \pm 116.67 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 으로 나타났다. 중장에서는 SP-04의 첨가농도가 증가할수록 trypsin의 활성도가 증가하는 경향은 보이지만 전장과 같이 유의한 증가는 보이지 않았다. 이러한 현상은 전장에서 trypsin과

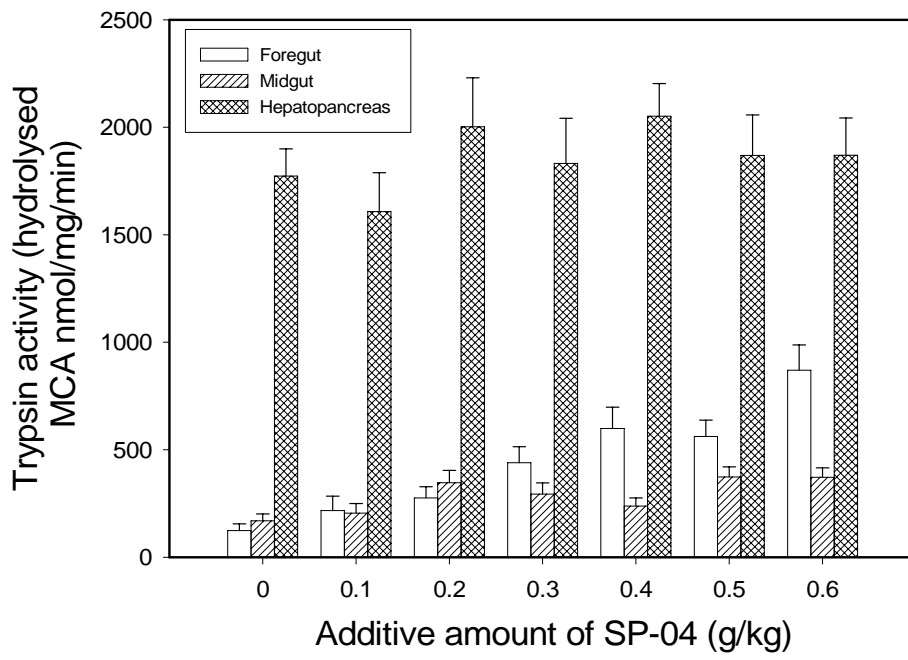


그림 2-5. SP-04 사료 첨가량에 따른 새우의 전장, 중장 그리고 간췌장의 trypsin 활성도의 변화.

같은 단백질소화효소에 의해 단백질들이 대부분 소화하여 중장으로 넘어오기 때문에 중장에서는 trypsin같이 단백질을 분해하기 위한 효소의 활성이 떨어질 수밖에 없다. 그리고 중장에서는 단백질 분해효소의 활성보다는 탄수화물이나 지방 등의 분해를 위한 효소들이 분비되기 때문에 그림 2-5에서 보았던 것처럼 중장에서의 trypsin의 활성도 변화는 유의한 차이를 보이지 않았던 것으로 생각된다.

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 SP-04의 첨가로 인해 높아진 사료 섭취율에 의해 먹이전환과 동화율이 낮아 소화되지 않은 상태에서 사료가 배설되지는 않을 것으로 생각된다.

SP-04의 첨가량에 따라 간체장에서 trypsin의 활성도를 보면 그림 2-4에서 나타낸바와 같이 0.2g 첨가했을 때 $1607.65 \pm 180.51 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 으로 무첨가 실험구 $1772.66 \pm 127.47 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 보다 낮은 값을 나타내었으나 0.3g 이상 첨가하여 사료를 급이한 실험구에서는 trypsin의 활성도의 범위가 $1832.06 \pm 209.87 \sim 2051.27 \pm 151.75 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 로 무첨가 실험구보다 높은 값을 보여주었다. SP-04의 첨가량에 따라 증가하는 양상은 보이지 않아 SP-04의 섭취로 간체장에서 소화효소의 생성을 촉진하는 효과는 없는 것으로 보인다.

한편, 전장과 중장에서 단백질 함량을 보면 그림 2-6에서 나타낸바와 같이 무첨가사료를 급이한 실험구를 제외하면 SP-04의 첨가량을 0.3g까지는 증가할수록 단백질 함량도 증가하였지만 그 후에는 SP-04의 첨가량을 증가시킬수록 오히려 감소하는 경향을 보였다. 그러나 유의한 변화는 보이지는 않았다. 이는 장내의 먹이와 소화효소 그리고 장 자체에 존재하는 단백질들에 대한 전체의 총합이므로 이러한 경향이 소화의 활력과 관계를 설명하기는 어려울 것 같다.

다. SP-04 첨가량의 변화에 따른 성장

SP-04를 첨가한 사료를 주었을 때 대하의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 8월 1일부터 20일간 평균 체중 $4.31 \pm 0.29\text{g}$, 체장 $68.63 \pm 1.41\text{mm}$ 의 대하를 2 Ton 원형 수조에서 사육한 후 체장과 체중의 변화를 조사하여 그림 2-7에 나타내었다.

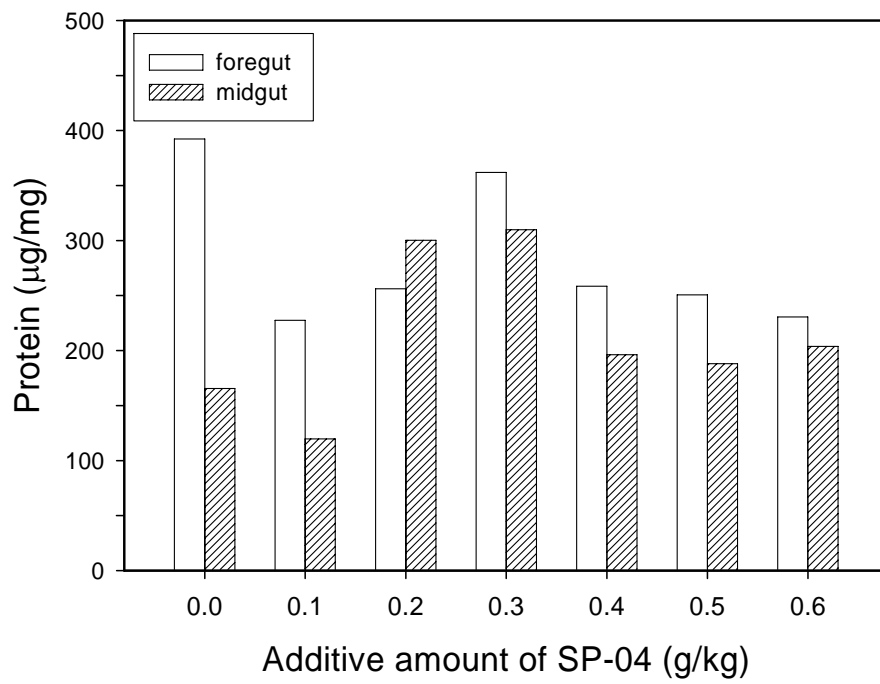


그림 2-6. SP-04 사료 첨가량에 따른 새우의 전장과 중장에서 단백질 농도의 변화.

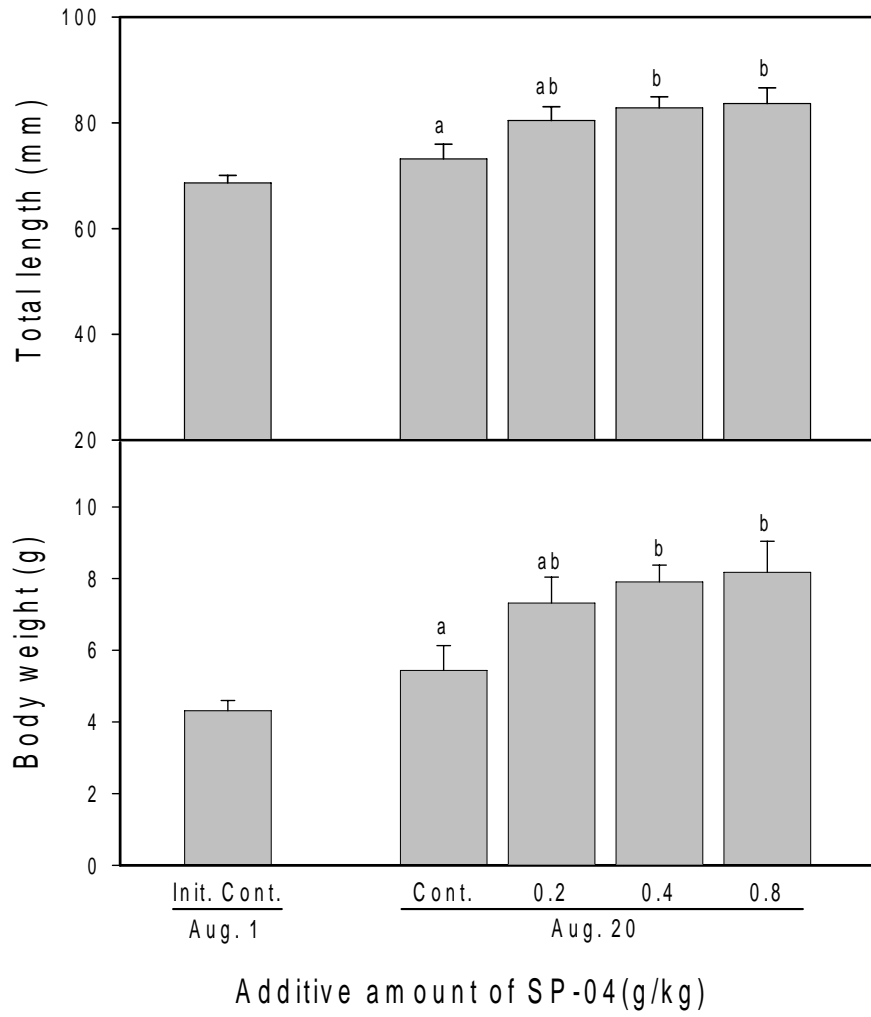


그림 2-7. SP-04 사료 첨가량에 따른 20일간 사육한 후 새우의 체장과 체중의 변화.

사육 20일 후 SP-04를 첨가하지 않고 일반사료를 급이한 대조 실험구의 대하의 체장은 73.16 ± 2.78 mm로 성장하였고 이때 체중은 5.44 ± 0.69 g이었다. SP-04 0.2g을 첨가한 사료를 급이한 실험구의 대하 체장은 80.44 ± 2.60 mm, 체중은 7.32 ± 0.72 g으로 대조 실험구의 대하보다는 증가하였으나 유의한 차이는 보이지 않았다. 그러나 SP-04 0.4g을 첨가한 실험구에서는 체장이 82.82 ± 2.11 mm, 체중이 7.91 ± 0.47 g으로 대조 실험구에 비하여 약 69%나 더 성장을 하여 유의한 증가를 보였다. 그리고 SP-04 0.8g을 첨가한 실험구에서는 체장이 83.63 ± 2.98 mm, 체중이 8.18 ± 0.86 g으로 0.2g 첨가 실험구에 비해서는 유의한 증가를 보였으나 0.4g 첨가 실험구와 비교해서는 유의한 증가는 보이지 않았다.

성장 실험에서도 SP-04의 첨가량을 증가시킬수록 체장과 체중이 증가하는 현상을 보였다. 특히 SP-04의 첨가량이 0.4g에서는 성장에 유의한 차이를 보이는 반면 첨가량이 0.4g과 0.8g의 실험구 사이에는 유의한 차이가 보이지 않아 사료첨가제 SP-04의 사료 첨가량은 0.4g/kg이 적당할 것으로 보였다. 따라서 앞으로 WSSV에 대한 저항성 실험과 현장 실험에서는 SP-04의 첨가량을 사료 1kg당 0.4g으로 정하여 실험을 하였다.

라. SP-04 첨가사료의 최적 사료 급이율

SP-04를 사료에 0.4g/kg의 농도로 첨가하여 새우에 급이할 때 가장 적당한 사료 투여량을 조사하기 위하여 새우의 총 체중에 1%, 3%, 5%, 8% 그리고 10%를 투여하였을 때 전장과 중장 그리고 배설물에 있는 단백질량을 조사하여 그림 2-8에 나타내었다. 사료 투여 후 0.5시간 지난 후 전장의 단백질 함량이 10% 투여 실험구에서 $582.2 \mu\text{g}/\text{mg}$, 8% 투여 실험구에서 $370.6 \mu\text{g}/\text{mg}$, 5% 투여 실험구에서 $413.5 \mu\text{g}/\text{mg}$, 3% 투여 실험구에서 $524.3 \mu\text{g}/\text{mg}$, 1% 투여 실험구에서 $374.7 \mu\text{g}/\text{mg}$ 나타나 투여량에 따른 단백질 함량의 뚜렷한 변화는 보이지 않으나 일반적으로 사료 투여량이 많을수록 단백질 함량은 높은 경향을 보였다. 그 후 모든 실험구에서 2시간까지는 감소하였으며 3시간 이후에 다시 증가하였다가 감소하는 경향을 보였다. 중장에서는 사료투여 1시간 후에 가장 높은 단백질 함량을 보였으며 그 이후 1%, 3% 투여실험구에서 4시간째에 약간 상승하는 양상이 보였으나 모든 실험구에서 감소하였다. 중장에서도 사료 투여량에 따른 단백질 함량의 변화에 일정한 경향은

찾아보기 힘들었다. 그러나 전장의 경우는 사료투여 0.5시간 후에 단백질 함량이 높았으나 중장의 경우는 사료 투여 후 1시간 경과후가 가장 높은 단백질 함량을 보여 이는 사료를 섭취하면 전장에서 중장으로 이동하는데 약 30분~1시간 정도 걸린다고 할 수 있다.

배설물의 단백질 함량은 사료 투여후 2시간까지는 투여량에 따라 변화폭이 컸지만 3시간 이후부터는 모든 실험구에서 감소하는 경향을 보였으며 먹이섭취후 5시간 후가 되면 거의 소화가 이루어지는 것으로 볼 수 있다.

또한 전장의 단백질 함량의 범위는 257.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ~ 582.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 였으나 중장의 단백질 함량의 범위는 186.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ~ 462.58 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 약 72%가 감소하여 전장에서 중장으로 오면서 약 30%정도가 소화 흡수되었다고 할 수 있다. 그리고 배설물의 단백질 함량의 범위는 3.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ~ 159.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 중장의 약 35%에 해당하여 중장에서 배설될 때까지 약 65%가 소화 흡수되고 있다는 것을 알 수 있었으며 전장에 들어온 사료들은 전체적으로 5시간 후가 되면 70% 이상이 소화 흡수되었다고 간접적으로 알 수 있었다. 이들의 감소비율은 사료투여량에 따라 뚜렷한 변화는 볼 수 없었으며, 대하에서는 사료 섭취율이 증가함에 따라 그 소화율도 이에 따라 증가하는 것으로 생각된다.

따라서 이러한 실험 결과들로 보아 총 생체량의 1%와 10%의 비율로 투여한 실험구에서는 전장, 중장에서 단백질 함량의 변화 폭이 크게 나타났지만 3%, 5%, 8%의 비율로 사료를 투여한 실험구에서는 큰 차이를 보이지 않아 사료 투여량을 8%까지 높여도 새우의 소화 흡수에 영향을 미치지 않을 것으로 보인다. 그리고 일반적으로 사료투여량은 크기가 작을 때는 사료투여량을 높이고 점차 성장할수록 그 비율을 낮추어 투여한다고 알려져 있으며 체중이 6g 전후의 새우에게는 5%전후의 사료를 투여하는 것이 가장 사료전환효율이 좋다고 하고 있다(Wyk, 2003). 그러나 SP-04를 첨가하였을 때는 먹이를 섭취하는 비율이 높기 때문에 3%를 투여하여도 먹이유인효과가 있으므로 사료전환효율이 높아 새우의 성장에 충분하리라고 생각한다.

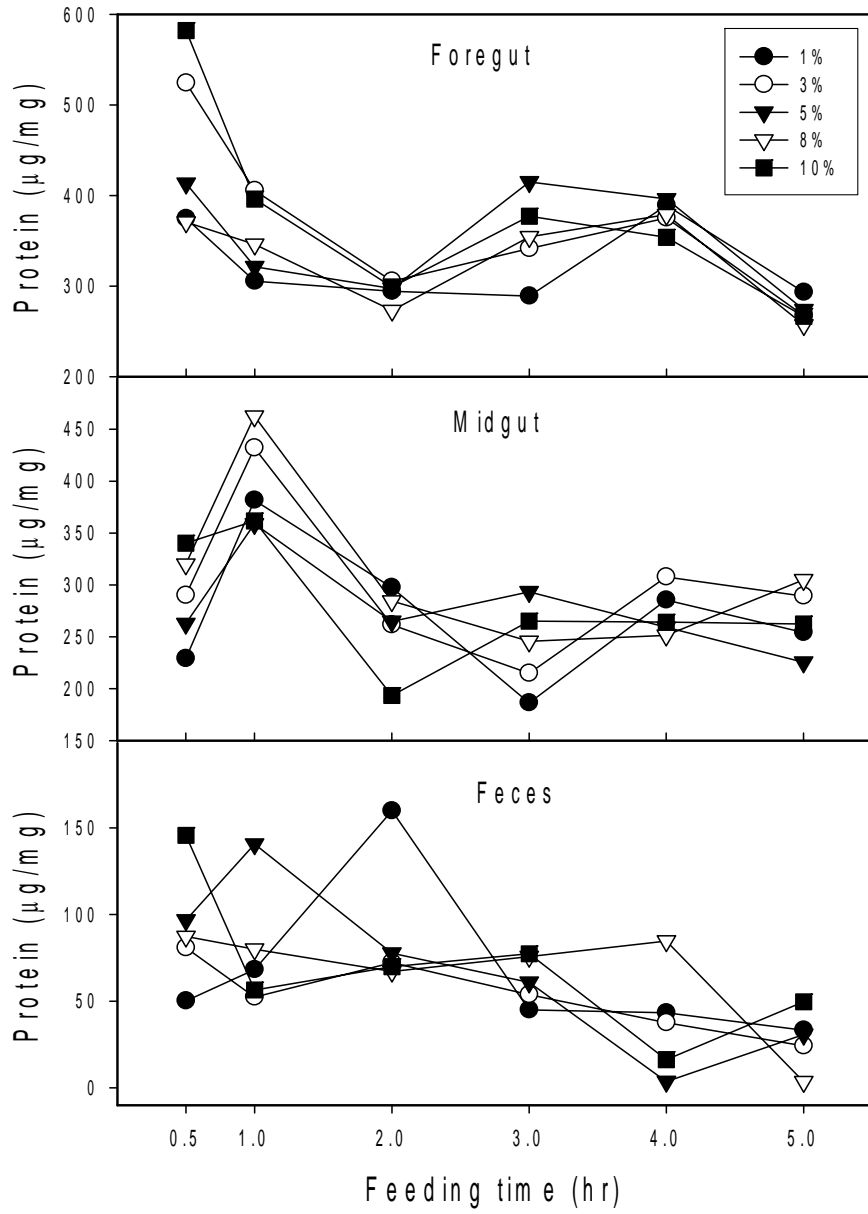


그림 2-8. 사료를 체중의 1%, 3%, 5%, 8%, 10% 비율로 투여하였을 때의 전장, 중장 그리고 배설물의 단백질 함량 변화.

마. SP-04의 공식 제어 효과

SP-04를 첨가한 사료가 공식을 저하시키는데 얼마나 효과가 있는지를 조사하기 위해 1m×1m×0.7m의 수조에 3.5g 전후의 대하를 30마리를 넣고 매일 전 체중에 5%되도록 SP-04 0.4g/kg을 첨가한 사료를 급이하면서 15일간 사육하여 SP-04 무첨가 일반 사료로 사육한 실험구와 공식에 의한 사망 개체수를 비교 조사하여 SP-04 첨가에 의한 공식제어 효과에 대한 결과를 그림2-9에 나타내었다.

사육시작 2일 후부터 공식에 의해 사망한 개체들이 나타나기 시작하여 SP-04를 첨가하지 않은 사료를 급이한 실험구에서는 30마리 중 5마리가 공식에 의해 폐사되어 공식률은 16.7%, 일일 공식율은 8.3%으로 나타났다. 그러나 SP-04를 첨가한 사료를 급이한 실험구에서는 한마리가 공식에 의해 폐사되어 공식률은 3.3%, 일일 공식률은 1.67%로 SP-04 무첨가 실험구보다 매우 낮게 나타났다. 사육 5일째에도 SP-04 무첨가 실험구에서는 다시 5마리가 공식에 의해 폐사되어 5일째 공식률은 33.3%에 이르렀으며, 일일 공식율도 6.7%로 높은 공식률을 보였다. SP-04를 첨가한 실험구에서는 2마리가 더 폐사되어 이때까지 공식률은 10%, 일일 공식률은 2%로 나타나 SP-04 무첨가 실험구보다 낮게 나타났다. 사육 7일째부터 15일째까지의 SP-04 무첨가 실험구의 공식률은 46.7%, 50.0%, 63.3%로 나타났으며 사육기간이 진행될수록 사육밀도가 작아지더라도 일일 공식률은 6.7%, 3.8%, 4.2%로 크게 감소하지 않았다.

그러나 SP-04를 첨가한 실험구에서는 사육 7일째부터 15일째까지의 SP-04 무첨가 실험구의 공식률은 20.0%, 26.7%, 30.0%로 나타났으며 사육기간이 진행될수록 사육밀도가 작아지면서 일일 공식률은 2.8%, 2.1%, 2.0%로 감소하였다.

SP-04를 첨가하지 않은 일반 사료를 투여한 경우는 사육일수가 진행될수록 사육밀도가 작아짐에도 불구하고 SP-04를 첨가한 실험구보다 일일 공식률이 거의 2~3배나 높게 나타났다. 이러한 결과는 SP-04를 첨가함으로써 새우들이 먹이 섭취에 대한 기호성이 높아 공식제어에도 많은 효과가 있음을 보여주어 새우양식에서 사육밀도를 높이는 데도 도움이 되리라 생각된다.

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 고밀도에 사료의

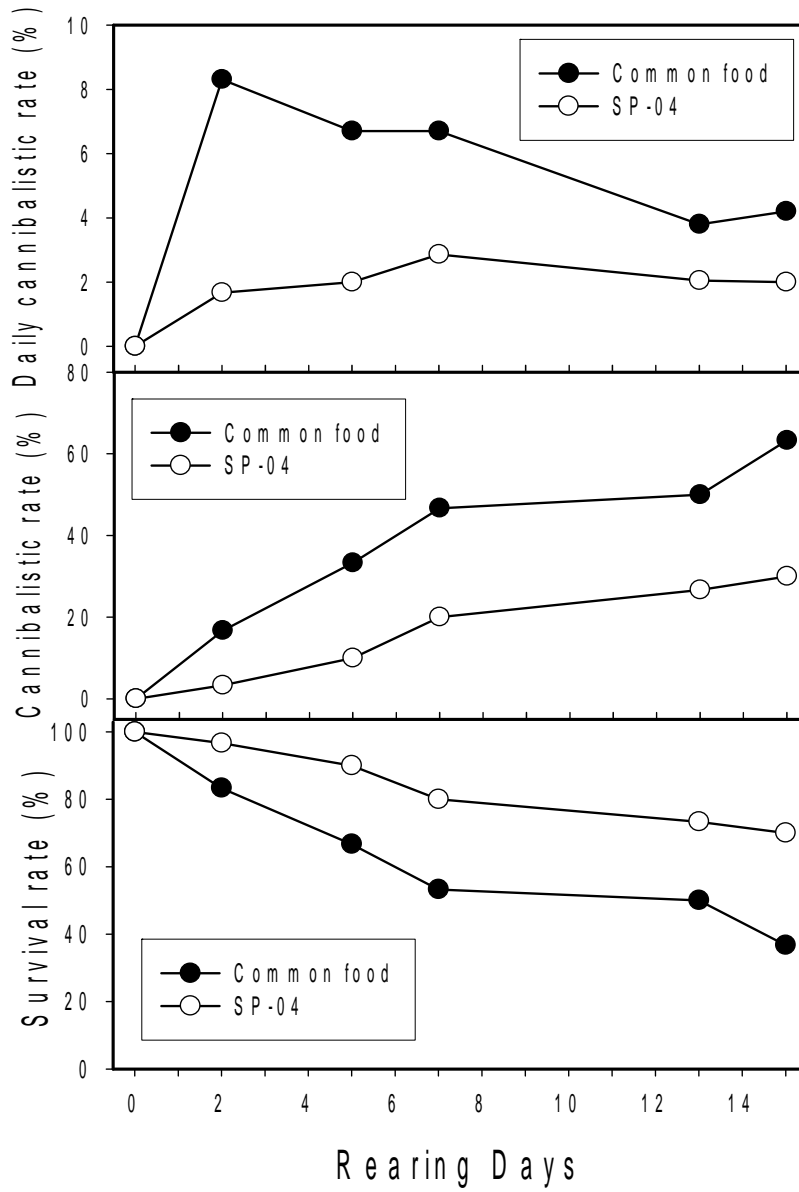


그림 2-9. SP-04 첨가사료 급이에 의한 대하의 일일공식율, 공식율 및 생존율의 변화.

대량투여에 의한 수질 악화, 공식 때문이라고 생각하고 있다. 최근에는 순환식 여과 시스템의 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 SP-04를 첨가하여 사육하게 되면 현재의 30마리/m²의 밀도보다 더 높은 밀도로 양식이 가능하다고 할 수 있다.

바. SP-04의 WSSV 저항성 효과

SP-04를 첨가한 사료를 새우에 급이하었을 때 WSSV에 대한 저항성을 조사하기 위하여 대하 1Ton FRP 수조에 20마리씩 8개의 수조에 나누어 4개의 실험구로 나누고 WSSV를 감염시키기 전 10일부터 미리 두 개의 실험구에는 SP-04 0.4g/kg과 0.2g/kg을 첨가한 사료를 급이하였으며, 2개의 대조 실험구에는 SP-04를 첨가하지 않은 일반사료를 급이하였다. WSSV를 인위적으로 감염 시킨 후의 각 실험구의 생존율의 변화는 그림 2-10에 나타내었으며 감염상태를 조사한 PCR 전기영동사진은 그림 2-11에 나타내었다.

대조 실험구중 WSSV 비감염 실험구(Negative control)에서의 생존율은 사육 3일까지 100%의 생존율을 보이다가 4일째부터 96%로 줄어들기 시작하여 사육 7일째에 85%의 생존율을 나타낸 이후부터는 그대로 유지하였다. 사육 20일째에 82%, 30일째에는 76%를 나타내었다. 반면 WSSV를 감염시킨 후 SP-04를 첨가하지 않고 일반사료를 급이한 실험구(Positive control)에서는 바이러스를 감염시킨 후 2일째부터 폐사되는 개체들이 나타나기 시작하여 3일째는 77%의 생존율을 나타내었지만 4일째 67%, 6일째 19%, 7일째에는 모든 개체들이 폐사되었다.

그러나 SP-04 0.4g/kg 첨가한 사료를 급이한 실험구(SP 0.4g)에서는 바이러스를 감염시킨 3일까지도 폐사된 개체들이 나타나지 않았으며 4일째부터 6일째까지 96%의 높은 생존율을 나타내었다. 7일째에도 93%의 생존율을 나타내어 SP-04가 WSSV에 대한 저항성을 나타내고 있다고 할 수 있다. 그 후 사육 14일째 생존율은 85%를 나타내었으며 20일째 82%, 30일째 80%의 높은 생존율을 유지하였다.

SP-04를 0.2g/kg으로 첨가한 사료를 급이한 실험구에서도 사육 2일째까지 100%의 생존율을 나타내었으며, 사육 3일째부터 폐사된 개체들이 나타나기 시작하

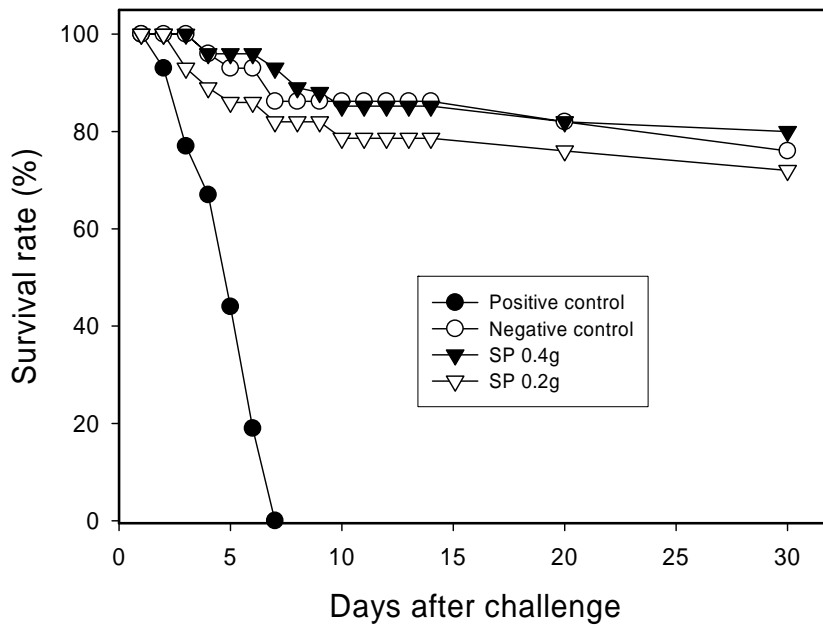


그림 2-10. SP-04를 첨가한 사료를 급이한 대하(*P. chinensis*)의 WSSV에 대한 challenger test. SP-04 0.4g: 0.4g/kg을 첨가한 사료 급이 실험구, SP-04 0.2g: 0.2g/kg을 첨가한 사료 급이 실험구. Positive control과 Negative control은 WSSV를 인위적으로 감염시킨 실험구와 비감염 실험구.

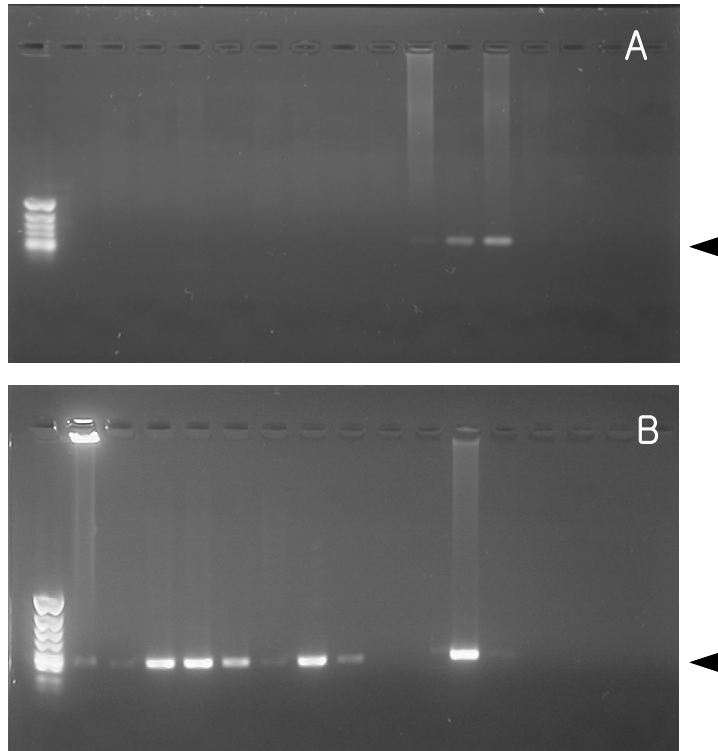


그림 2-11. WSSV 감염시키기 전 개체들(A)과 실험후 살아남은 개체들(B)의 유영지에 대한 PCR 후 전기영동사진.

면서 4일째 89%, 6일째 86%, 8일째 82%로 서서히 감소하여갔다. 그러나 사육 10일째부터는 78%의 생존율을 계속 유지하였으며, 20일째에 76%, 30일째에 72%의 생존율을 보여 SP-04 0.4g/kg을 첨가한 실험구보다는 다소 낮은 생존율을 보였으나 지금까지 보고된 lipopolysaccharide (Takahashi et al., 2000), β -1,3-glucan (Chang et al., 1999; 2003), peptidoglycan (Itami et al., 1998), WSSV에 대한 항체 IgY (Kim et al., 2004) 등의 연구들의 결과보다는 높은 수준의 생존율을 보여주고 있다.

SP-04가 흰다리새우에서도 WSSV에 대한 저항효과가 있는지를 보기위하여 1Ton FRP 수조에 20마리씩 6개의 수조에 나누어 3개의 실험구로 나누고 WSSV를 감염시키기 전 10일부터 미리 SP-04 0.4g/kg을 첨가한 사료를 급이하였으며, 2개의 대조 실험구에는 SP-04를 첨가하지 않은 일반사료를 급이하여 사육하였다. WSSV를 인위적으로 감염 시킨 후의 각 실험구의 생존율의 변화는 그림 2-12에 나타내었다.

대조 실험구중 WSSV 비감염 실험구(Negative control)에서의 생존율은 사육 3일까지 100%의 생존율을 보이다가 4일째부터 생존율이 98%로 다소 줄어들어 사육 7일째에 96%의 생존율, 9일째 90%, 11일째 86%, 14일째 85%의 생존율을 나타낸 이후부터는 그대로 유지하였다. 사육 20일째 에 85%, 30일째에는 83%를 나타내었다.

반면 WSSV를 감염시킨 후 SP-04를 첨가하지 않고 일반사료를 급이한 실험구 (Positive control)에서는 바이러스를 감염시킨 후 2일째부터 폐사된 개체들이 나타나기 시작하여 3일째는 80%의 생존율을 나타내었지만 4일째 77%, 6일째 26%, 8일째 10%, 10일째에 모든 개체들이 폐사되어 생존율이 0%를 나타내었다

SP-04 0.4g/kg 첨가한 사료를 급이한 실험구에서는 바이러스를 감염시킨 3일까지도 폐사된 개체들이 나타나지 않아 100%의 생존율을 나타내었으며 4일째 98%, 6일째 96%, 8일째 90%의 높은 생존율을 나타내었다. 사육 10일째에도 86%의 생존율을 나타내어 그 후 사육 14일째 생존율은 84%를 나타내었다. 사육 20일째 82%, 30일째 78%의 높은 생존율을 나타내어 흰다리새우에서도 SP-04가 WSSV에 대한 저항성을 나타내고 있다고 볼 수 있었다.

따라서 이번 개발된 SP-04 사료 첨가제는 종에 관계없이 새우의 면역증강을 촉진하여 WSSV에 대한 저항성을 높여주는 효과가 있다고 할 수 있다.

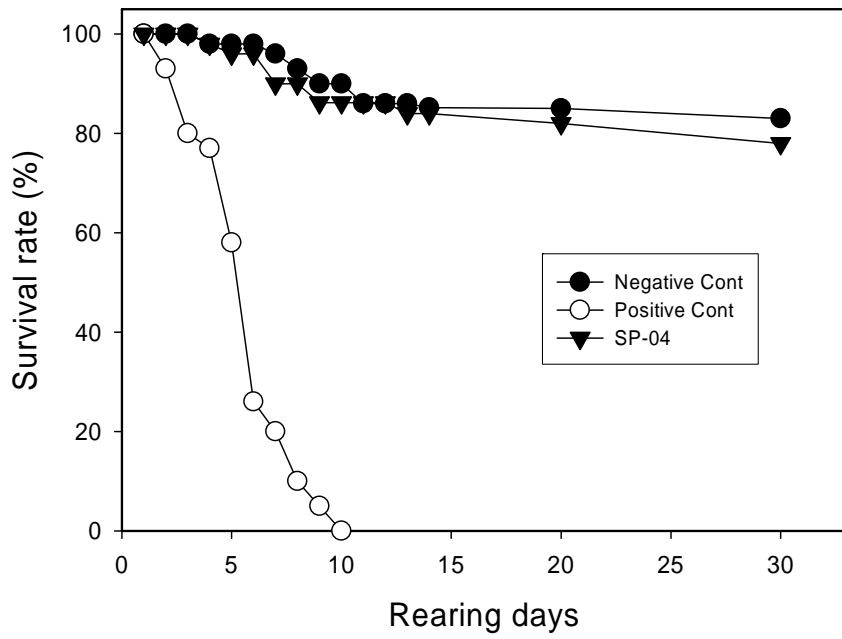


그림 2-12. SP-04 0.4g/kg을 첨가한 사료를 급이한 흰다리새우(*P. vannamei*)의 WSSV에 대한 challenger test. Positive control과 Negative control은 WSSV를 인위적으로 감염시킨 실험구와 비감염 실험구.

사. WSSV가 성장에 미치는 영향

바이러스에 감염된 대하와 비 감염된 대하에서 SP-04 첨가제의 효과를 비교하기 위하여 비 감염새우와 감염새우에 SP-04 0.4g/kg과 0.2g/kg을 첨가한 사료를 급이하여 성장효과를 조사하기 위하여 일일 탈피율을 조사하여 그림 2-13에 나타내었다.

비 감염 실험구에서 SP-04를 첨가하지 않은 일반사료를 급이한 새우들은 일일 탈피율이 3.3%인 반면 SP-04 0.4g/kg을 첨가한 사료를 급이한 새우의 탈피율은 13.3%로 매우 높았다. 0.2g/kg을 첨가한 사료를 급이하였을 때도 6.0%로 대조실험구보다 두 배 정도 탈피율이 높게 나타났다.

감염시킨 대하에서는 SP-04를 첨가하지 않은 일반사료를 급이한 새우들은 일일 탈피율이 1.3%로 비 감염 새우의 탈피율보다 1/3정도로 감소하였다. 그러나 SP-04 0.4g/kg을 첨가한 사료를 급이한 감염새우에서는 탈피율이 11.3%로 비 감염새우보다는 낮았지만 대조구의 비 감염새우 보다는 높게 나타났다. 또한 SP-04 0.2g/kg을 첨가한 사료를 급이한 감염새우에서도 탈피율이 9.3%로 나타나 대조구의 비 감염새우 보다는 높게 나타났다.

이러한 결과는 WSSV의 감염에 의해 탈피가 억제되고 있다는 것은 성장에 영향을 주고 있다는 것을 의미한다. Y-organ은 탈피와 성장에 중요한 내분비 기관으로 WSSV에 감염된 새우들에서 Y-organ cell의 70% 이상이 감염되어 있다는 보고 (Vijayan et al., 2003)가 있어 바이러스의 감염이 Y-organ으로부터 탈피호르몬인 ecdysone의 생성 분비에 영향을 주는 것이라고 볼 수 있다.

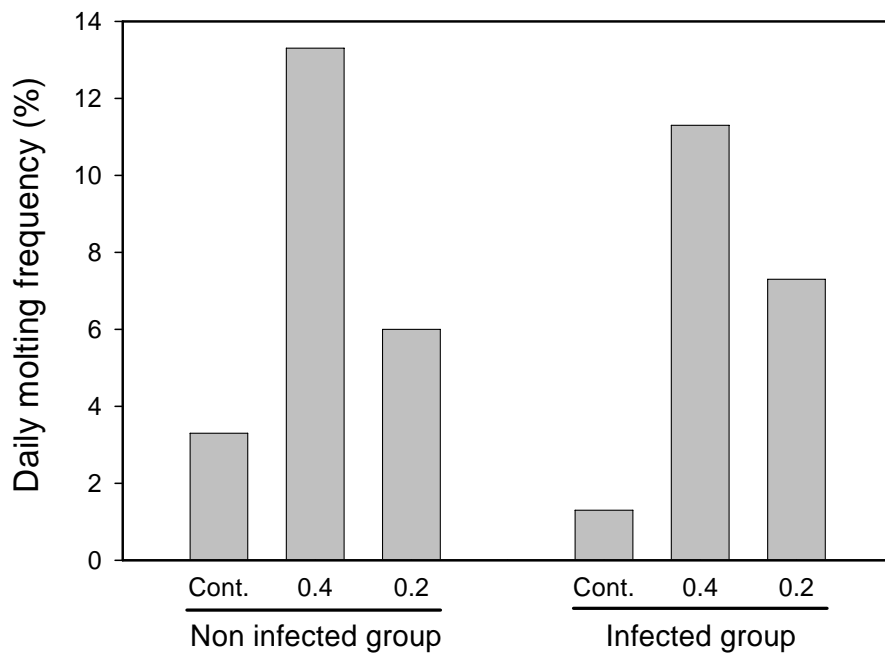


그림 2-13. WSSV 비 감염대하와 감염대하에 SP-04 0.4g/kg과 0.2g/kg 을 첨가한 사료를 급이하였을 때 일일탈피빈도의 변화.

제 3 절 SP-04 첨가 사료를 사용한 대하와 흰다리새우의 양식효과

1. 서 론

우리나라의 새우양식은 1970년대부터 보리새우양식을 시작하였지만 1980년대 후반에 우리나라 서해안 등의 황해에만 서식하는 대하를 양식하게 되면서 1990년에 257톤을 생산하였다. 그 후 점점 증가하여 1995년에 405톤을 생산하게 되어 약 54억원의 어민소득을 올리게 되었다. 이때부터 대하양식이 고부가가치의 양식품종으로 각광을 받으면서 1996년부터 서해안의 폐염전이 대하양식장으로 전환되고 또한 새로운 양식장들이 개발되면서 1997년에 양식장은 1,839ha로 증가하게 되었다. 이때 대하의 양식생산은 1,533톤에 이르러 214억원의 어민소득을 올려 서해안에서는 대하양식이 어민 소득원으로 중요한 위치를 차지하게 되었다.

2000년에 들어와 양식장의 면적은 2,223ha로 21%나 증가하였으나 생산량은 1,158톤밖에 이르지 못했다. 이후 양식장의 면적은 2001년 약 2,600ha에서 2004년 2,400ha로 다소 줄어드는 상태이며 양식 생산량도 2001년 2,081톤, 2002년 1,403톤, 2003년 2,324톤, 2004년에 2,426톤 생산으로 대하 양식은 정체된 상태가 되었다.

이러한 원인은 양식장의 노화와 환경의 악화에도 원인이 있지만 주된 원인은 바이러스성 질병에 의한 대량폐사에 의한 것이라고 할 수 있다. 이러한 현상은 우리나라뿐만 아니라 우리나라보다 백배 이상 양식을 하는 중국이나 태국, 인도네시아 등 동남아시아와 에콰도르 등의 중남미에서도 바이러스성 질병이 생산량 증대를 가로막고 있는 최대의 걸림돌이 되고 있다. 이러한 걸림돌이 되는 바이러스 질병으로는 WSSV, HPV(hepatopancreatic parvo-like virus), TSV(Taura syndrome virus), IHNV(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus), YHV(Yellow head virus) 등이 알려져 있으나, 이들 중 특히 WSSV는 그 감염 강도에 따라 3~10일 내에 100~80% 폐사되고, 20일 이내에 전량 폐사되는 새우류에서는 가장 치명적인 질병으로 알려져 있다(Lightner, 1996).

아시아에서는 1992년에 YHV와 WSSV에 의해 연간 10억불(약 1조원)의 직접적인 손실을 가져왔으며, 남미에서는 1999년에 WSSV에 의해 연간 약 5억불의 손실을 입었다. 이로 인한 경제적, 사회적 파장은 더욱 커져 간접적인 손실을 계산하면 엄청난 액수에 이르게 된다. 이러한 예는 인도의 Andhra Pradesh 한 지역에서만 WSSV에 의한 직접적인 손실액이 1억7000만불이었으나 이로 인한 어민의 실직과 관련산업의 폐업 등의 간접적인 손실액은 5억불에 이른다는 보고에서 잘 알 수 있다(Krishna et al., 1997).

이러한 막대한 손실을 줄이기 위해 새우에 발생하는 바이러스에 대한 연구들이 1990년대 후반에 들어와 많이 이루어졌다. 이러한 연구들에 의해 WSSV에 대한 분자생물학적 특징들이 완전히 밝혀졌으며(Lieu et al., 2001; Marlëlle et al., 2001; van Hulten et al., 2001), 새로운 Family와 Genus가 설정되어 Family Nimaviridae, Genus Whispovirus로 새로운 분류군이 설정되었다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>).

이 WSSV는 새우에만 감염되는 것이 아니라 게나 가제와 같은 새우 이외의 갑각류에도 감염된다 (Lo et al., 1996; Maeda et al., 1998). 바이러스 감염은 주로 먹이를 통해 수평감염이 주로 이루어지며 특히 양식장에서는 바이러스에 감염된 새우 끼리의 공식현상에 의해 순식간에 양식장 전체가 감염이 이루어진다(Corsin et al., 2001; Soto and Lotz, 2001; Wu et al., 2001).

특히 수직감염이 바이러스 감염경로의 원초적인 경로라고 알려져 이를 막기 위해서는 종묘생산할 때 바이러스에 감염된 어미새우로부터 얻은 수정란의 도입을 차단하는 것이 무엇보다도 중요하다고 알고 있다(Mushiake et al., 1999). 따라서 최근에는 SPF(specific pathogen free) 어미새우확보와 종묘생산 또는 SPR(specific pathogen resistant) 새우의 생산에 많은 관심을 가지고 있다(Fast and Menasveta, 2000; Preston et al., 2004; Hennig et al., 2005; Pantoja et al., 2005). 하와이의 High Health Aquaculture사에서 TSV에 내성을 가지는 SPF 흰다리새우를 개발하여 시판하고 있으며 국내에서도 태안 갑각류연구센터와 그 외 흰다리새우 종묘생산업자가 이를 수입하여 종묘생산과 양성을 하고 있다.

한편으로는 백신개발에도 연구들이 진행되고 있으나(Namikoshi et al., 2003; Venegas et al., 2000; Wu et al., 2002), 새우류의 면역은 척추동물과 같이 면역글로브린을 만드는 특이적인 면역기능을 가지고 있지 않기 때문에(Söderhäll and

Thornqvist, 1997; Lee and Söderhäll, 2002) 많은 연구에서는 면역력을 증강시킬 수 있는 물질들을 찾고 이를 이용하여 모든 질병으로부터 저항성을 키우는데 관심을 가지고 있다(Chang et al., 1999; Itami et al., 1998; Song et al., 1997; Takahashi et al., 2000).

지금까지 많은 연구들이 이루어졌음에도 불구하고 바이러스의 피해로부터 완전하게 막을 수 있는 방법은 아직도 개발되어있지 않다. 이번 연구에서는 지금까지 WSSV에 높은 저항성을 보였던 SP-04를 실제로 양식에 적용하여 WSSV에 대한 저항효과와 성장효과들을 분석하고 생산성 향상에 얼마나 기여할 수 있는지를 분석하였다.

2. 재료 및 방법

가. 양식 대상종

현재 우리나라에서 주된 새우양식 대상 종인 대하와 최근 대하의 대체품종으로 관심을 가지고 양식을 시도하기 시작한 흰다리새우를 대상으로 양성실험을 하였다. 대하와 흰다리새우는 일반 종묘생산 업자로부터 0.02g의 종묘를 구입하여 사용하였으며, 종묘생산에 사용한 어미새우의 출처 및 바이러스 감염여부는 조사하지 않았다.

나. 양성실험

(1) 대하

2004년 5월 26일부터 전남 신안군 지도읍 태평리에 위치한 S양식장에서 2,000평 3개 호지에 0.02g크기의 대하 치하를 30마리/m²의 밀도로 입식하였다. 입식 후 15일간은 치하용 일반사료(퓨리나사 제품)를 급이하여 양성한 후 일반사료에 SP-04를 첨가하여 급이하였다.

한 개의 호지는 계속 일반사료를 급이하면서 양식을 하였으며, 2개의 호지는 6월 10일부터 SP-04를 0.4g/kg의 농도로 일반사료에 첨가한 사료를 급이하면서 8월 30일까지 양식하여 9월 1일에 출하하였다.

사료의 급이 횟수는 Velasco et al., (1999)와 Smith et al.,(2002)에 의하면 급이 횟수가 성장에 관계가 없다고 보고하고 있어서 하루에 3~ 5회로 나누어 투여하

였다. 사료 급여율(feed rate)은 일반적으로 알려진 방법으로 평균 체중이 3g 전후에는 하루에 체중의 7~8%로 하였으며, 5g 전후에는 5%, 10g 전후에는 3.5%, 15g 전후에는 2.5%로 계산하여 사료를 투여하였다.

양식기간 동안 비브리오나 그 외 세균성질병 예방이나 치료를 위해 항생제나 그 외의 약품은 일체 사용하지 않았으며, 시판용 강장제나 면역강화제도 일체 급여하지 않았다. 단지 수질관리를 위하여 증식 배양된 광합성세균을 2주일간격으로 한 호지에 20L씩 뿌려주었다.

야간에 빈 산소상태에 대비하여 산소용해기를 제작, 설치하여 야간에 용존산소가 1ppm이하로 떨어질 때 이를 이용하여 3ppm 이상을 유지하였다.

(2) 흰다리새우

사료첨가제 SP-04를 사용하여 흰다리새우 양식에 적용실험을 하기 위해 2004년 6월 4일부터 전남 신안군 임자면 대기리에 위치한 T 양식장에서 5,000평 넓이의 2개의 호지에 0.02g크기의 흰다리새우를 50마리/m²의 밀도로 입식하여 일반사료(수협사료 제품)를 급여하면서 양성하였다. 6월 14일부터 SP-04를 0.4g/kg의 농도로 일반사료에 첨가한 것을 급여하면서 9월 2일까지 양식을 하여 9월 3일 출하하였다.

흰다리새우 양성에도 대하와 마찬가지로 항생제나 기타 면역강화제 등 약품을 일체 급여하지 않았으며 SP-04만 사료에 첨가하여 급여하였다. 단지 수질관리를 위하여 증식 배양된 광합성세균을 2주일간격으로 한 호지에 30L씩 뿌려주었다.

다. 성장 조사

성장변화를 조사하기 위하여 대하는 입식 후 50일째인 7월14일부터 정기적으로 8월 8일, 8월16일, 8월 29일에 양성중인 호지로부터 투망에 의해 채집하여 체장과 체중을 조사하였다. 흰다리새우는 입식 후 38일째인 7월 11일부터 정기적으로 7월 25일, 8월 8일, 8월 20일 그리고 9월 3일에 투망을 이용하여 채집하여 체장과 체중을 조사하였다.

일반사료만을 급여한 새우들의 성장과 비교하기 위하여 본 실험에 사용한 각 사료회사에서 내놓은 성장 data를 참고하였다.

라. WSSV 감염을 조사

WSSV의 감염여부는 현장에서 채집된 새우들을 70%의 알콜에 고정하여 동의대학교 실험실에서 2장에 설명한 것과 같은 방법으로 PCR을 이용하여 조사하였으며, 성장을 위해 채집한 것들을 대상으로 조사하였다.

마. 경제성 분석

SP-04 첨가제를 사용하여 새우를 양식하였을 때 경제적인 효율성을 분석하기 위하여 사료 투여량과 사료 효율 등을 조사하고 양식에 들어간 모든 비용들을 비교 분석하였다.

SP-04 첨가 사료의 투여량은 입식 후부터 매일 투여된 사료의 중량으로 하였으며, SP-04를 투여하지 않은 실험구의 경우는 퓨리나사에서 제공한 사료 투여량과 장 등(2000)의 자료를 참고하여 120일간 사육하였을 때 18g까지 성장한 것으로 간주하여 사료량을 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 대하의 양식

5월 26일부터 2,000평 3개 호지에 0.02g크기의 대하 치하를 30마리/m²의 밀도로 입식한 후 퓨리나사 제품의 사료에 SP-04를 첨가하여 급이한 양식장의 대하의 체장의 변화는 그림 3-1에, 체중의 변화는 그림 3-2에 나타내었다. 사육기간 동안의 수온변화는 3-3에 나타내었다.

입식후 15일간은 일반사료를 급이하고 그 이 후부터 SP-04를 첨가하여 주었으며 사료의 크기는 체중의 변화에 따라 사료회사에서 제시한 방법대로 주었다.

평균 체중이 0.02g의 대하를 입식한 후 50일째인 7월 14일에 SP-04를 첨가한 사료를 급이한 호지에서 대하의 체장은 74.3mm, 체중은 5.59±0.37g이었으며, SP-04를 첨가하지 않은 호지의 대하의 체장은 54.8mm, 체중은 2.30±0.26g으로 나타나 SP-04를 첨가한 대하가 체장에서 36%, 체중에서 143%나 더 성장하였다. 퓨리나 사료회사가 제시하고 있는 자료의 데이터에 비해서도 124%나 더 성장하였다.

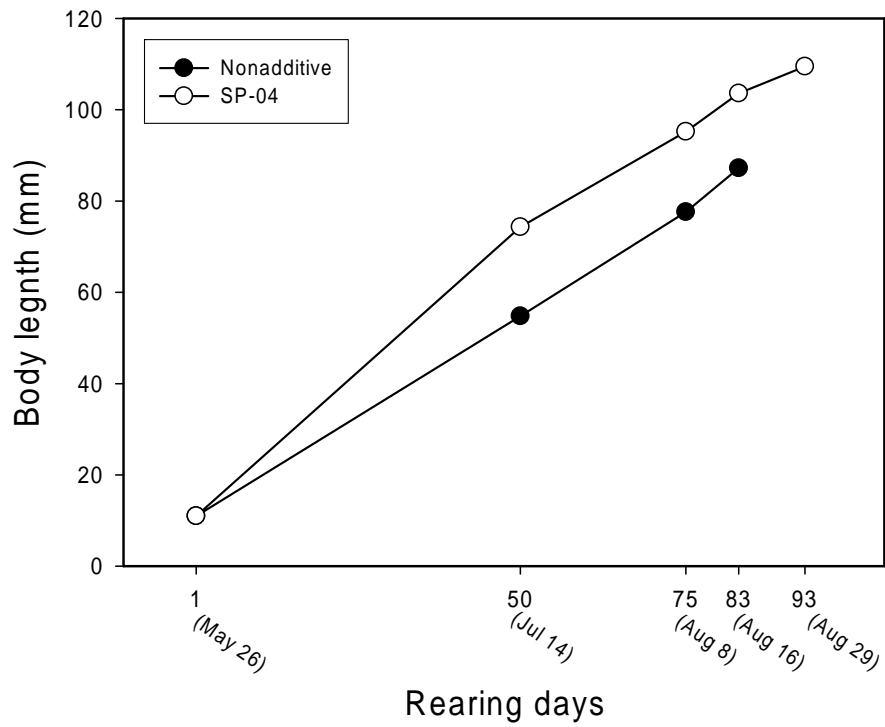


그림 3-1. 5월 26일부터 8월 29일까지의 양식기간 동안 대하(*P. chinensis*)의 체장 변화. Nonadditive: 일반사료에 SP-04를 첨가하지 않은 사료를 급이한 새우, SP-04: 일반사료에 SP-04를 첨가한 사료를 급이한 새우.

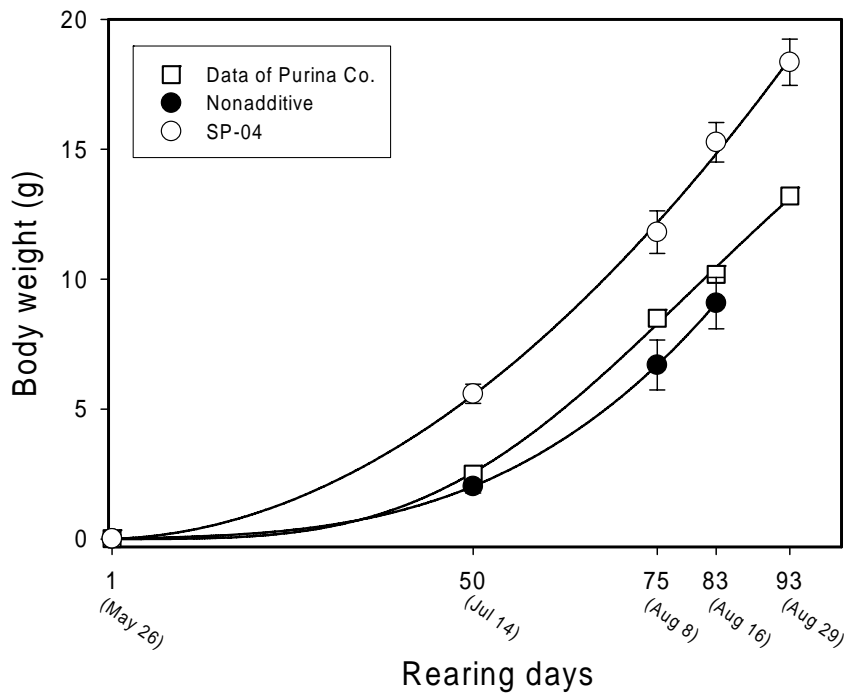


그림 3-2. 양식기간 동안 대하(*P. chinensis*)의 체중의 변화. Date of Purina Co.: 퓨리나 사료회사에서 제공한 대하의 성장 data, Nonadditive: 일반사료에 SP-04를 첨가하지 않은 사료를 급이한 새우, SP-04: 일반사료에 SP-04를 첨가하한 사료를 급이한 새우.

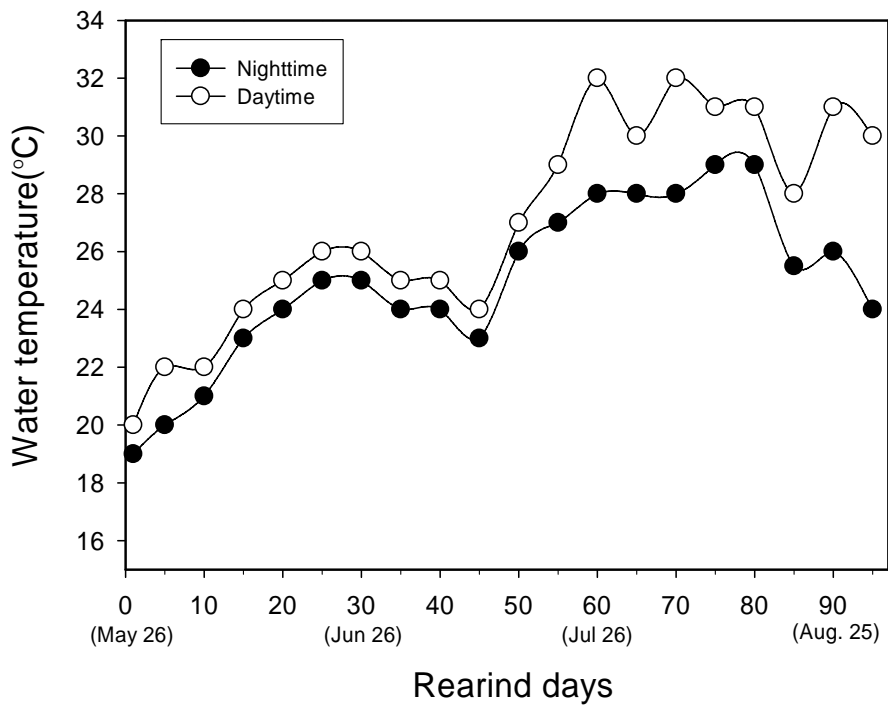


그림 3-3. T 양식장의 양식기간 동안 수온 변화. Nighttime: 밤 수온 변화, Daytime: 낮 수온 변화.

양성 후 75일째인 8월 8일에 SP-04를 첨가한 사료를 급이한 대하의 체장은 95.2mm, 체중은 $11.81 \pm 0.82\text{g}$ 으로 성장하였으나, SP-04를 첨가하지 않은 호지의 대하는 체장이 77.6mm, 체중이 $6.70 \pm 0.96\text{g}$ 으로 나타나 SP-04를 첨가함으로써 체장에서 23%, 체중에서 76%의 더 높은 성장효과를 얻을 수 있었다. 83일째 되는 8월 16일에는 SP-04를 첨가한 사료를 급이한 대하의 체장은 103.6mm, 체중은 $15.27 \pm 0.76\text{g}$ 으로 성장하였으며, SP-04를 첨가하지 않은 호지의 대하 체장은 87.2mm, 체중은 $9.08 \pm 0.99\text{g}$ 으로 성장하여 SP-04를 첨가한 사료를 섭취한 대하가 체장에서 18%, 체중에서 68%가 더 성장하였다.

입식하여 93일째가 되는 8월 29일에 SP-04를 첨가한 사료를 급이한 대하의 체장은 109.5mm, 체중은 $18.35 \pm 0.89\text{g}$ 으로 성장하였다. 그러나 SP-04를 첨가하지 않은 호지의 대하는 8월 16일부터 바이러스 발병 증상이 보이는 개체들이 나타나기 시작하여 8월 18일 조기 수확하였다. 퓨리나 사료회사가 제시하고 있는 자료에 의하면 0.02g의 대하를 입식하여 93일째의 대하의 크기는 체장이 98mm, 체중이 13.2g으로 나타나있어서 SP-04를 첨가하여 사료를 급이하게 되면 체중에서 39%의 더 높은 성장을 얻을 수 있다고 할 수 있다.

사육기간 동안 수온의 변화는 낮의 수온은 $20^{\circ}\text{C} \sim 32^{\circ}\text{C}$ 의 범위였으며, 밤 수온의 범위는 $19^{\circ}\text{C} \sim 29^{\circ}\text{C}$ 였다. 7월에 들어와 장마로 수온이 $1 \sim 2^{\circ}\text{C}$ 내려갔으나 7월 중순 이후 장마가 끝이 나면서 수온은 상승하기 시작하였으며 8월 초순에서 중순까지 30°C 이상의 고수온이 지속되었다. 5월 말에서 7월 중순까지는 밤과 낮의 온도 차이는 2°C 로 크지 않았으나 7월 중순 이후부터 9월초까지는 밤과 낮의 온도차가 $3^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}$ 나 되었으며 9월에 들어서서는 그 차가 더 커졌다. 양식기간 동안 낮 평균기온은 27.0°C 이었으며, 밤 평균기온은 24.9°C 이었으며 전체 평균기온은 26.0°C 이었다.

우리나라에서 대하는 3월에서 4월에 걸쳐 월동 회유하여 복상한 어미를 채집하여 종묘생산을 한다. 대하 양식업자들은 체중 0.01g~0.02g의 치하들을 종묘생산 업자로부터 분양받아 대부분 5월초부터 6월초사이에 입식하여 양식을 시작한다. 대하의 성장은 수온과 염분농도의 변화에 따라 다르기 때문에 양식기간은 평년 수온분포나 강우량과 장마기간의 길이에 다를 수 있다. 그러나 우리나라의 5월부터 9~10월까지의 년 평균수온이나 강우량은 매년 거의 일정하기 때문에 양식기간은 크게 차이가 나지 않는다. 우리나라에서 대하를 평균체중 20g까지 키우는데 걸리는 양식기간은 5개월에서 6개월 걸리는 것으로 알려져 있다(장 등, 2000). 최근에는

사료효율에 따른 경제적인 손익과 바이러스 발병에 대한 위험성 때문에 15g~17g 정도 키우면 출하하는 실정이다. 대체적으로 5월초에 입식하면 9월 중순에서 10월 초순경에 수확하고 5월말에 입식하면 9월말이나 10월 중순에 수확하고 있다.

중국에서도 일반적으로 체장 100mm~120mm(평균 체중 18g)까지 양식한 후 수확하여 출하하고 있으며, 5월 중순에 체장 7mm의 치하를 입식한 후 9월 중순까지 4개월간 양식하여 이러한 marketing size까지 키우고 있다(Zhang, 1990).

그러나 본 양식실험에서 SP-04를 첨가한 사료를 급이하였을 때 대하를 약 3개월 만에 평균 체중 18.4g까지 키울 수 있었으며, 상품으로 출하할 수 있는 충분한 크기로 양성할 수가 있었다. 이러한 양식기간은 우리나라의 일반적인 양식기간에 비해 2개월 정도 획기적으로 단축한 것이며, 우리보다 수온 조건이 양호한 중국에서의 양식기간보다도 1개월 정도 단축한 결과이다.

양식기간 동안 대하의 WSSV감염율의 변화를 PCR법에 의해 조사한 결과 그림 3-4에서 보는바와 같이 50일째에는 SP-04를 첨가한 사료를 급이한 대하나 SP-04를 첨가하지 않은 호지의 대하나 모두 20%의 감염율을 나타내었으며 75일째는 SP-04를 첨가하지 않은 호지의 대하에서는 26%, SP-04를 첨가한 사료를 급이한 대하에서는 22%의 감염률을 나타내었다. 83일째에는 SP-04를 첨가하지 않은 호지의 대하에서는 90%, SP-04를 첨가한 사료를 급이한 대하에서는 70%의 감염률을 나타내었고, 93일째에는 SP-04를 첨가한 사료를 급이한 대하에서도 90%의 감염률을 나타내어 SP-04를 첨가한 사료를 급이한 대하와 그렇지 않은 대하와의 차이는 거의 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 보아 SP-04의 급이로 WSSV의 수평감염을 막을 수는 없는 것으로 보인다.

그러나 PCR을 하여 DNA 전기영동을 한 결과를 보면 그림 3-5에서 보는바와 같이 band의 굵기가 SP-04를 첨가한 사료를 급이한 대하보다 SP-04를 첨가하지 않은 호지의 대하들에서 나타난 band의 굵기가 더 굵게 나타나 감염의 정도가 SP-04를 첨가하지 않은 호지의 새우들이 더 강하게 나타난다고 할 수 있다. 이 결과로 보면 SP-04의 급이가 면역활성을 강화하여 감염된 바이러스의 활동을 억제하고 발병을 지연시키는 효과가 있다고 할 수 있다.

최근에는 real-time PCR법으로 바이러스의 양적인 변동을 측정할 수 있는 방법들이 보고되어 있어서(Tang et. al., 2004) 이러한 방법을 이용하여 조사하면 SP-04를 급이하였을 때 WSSV에 대한 저항성을 명확히 밝힐 수 있을 것이다.

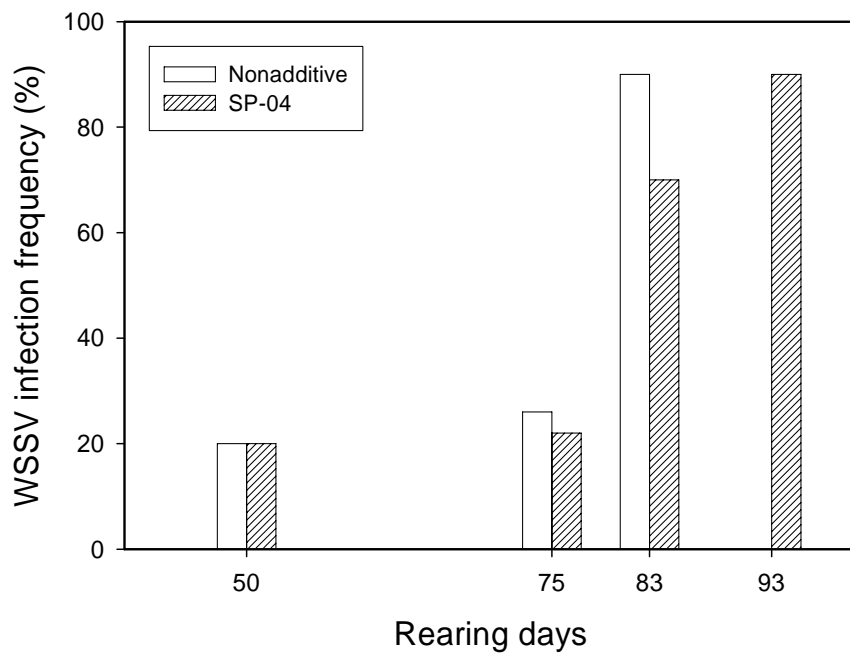


그림 3-4. 대하 양식장에서 RCR법에 의해 조사한 대하(*P. chinensis*)의 WSSV의 감염빈도의 변화.

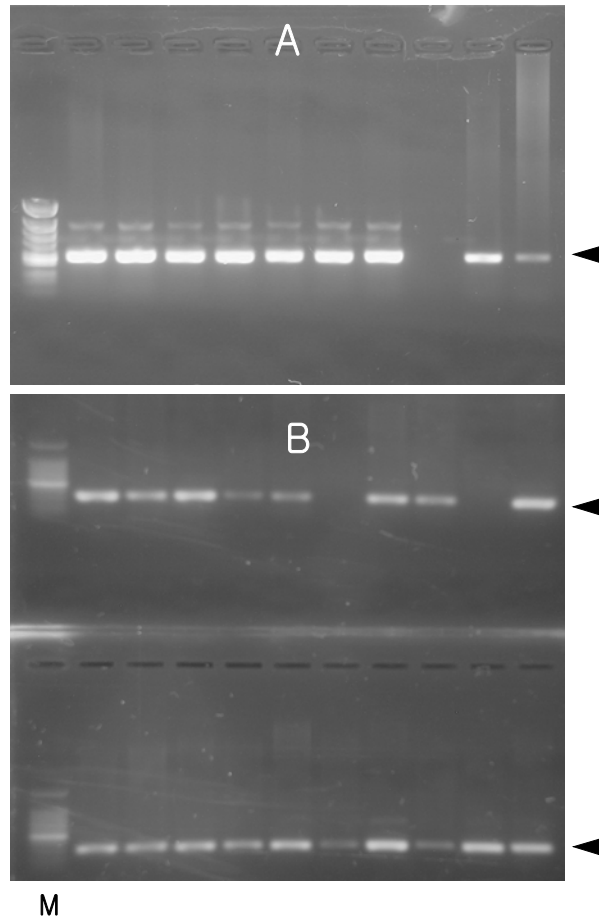


그림 3-5. 일반사료를 급이한 양식지의 대하(*P. chinensis*)(A)와 SP-04 첨가사료를 급이한 양식지의 대하(*P. chinensis*)(B)에 대해 PCR을 한 WSSV의 DNA 전기영동 사진. M: marker.

나. 흰다리새우의 양식

6월 4일부터 5,000평 2개 호지에 0.02g크기의 흰다리새우 치하를 50마리/m²의 밀도로 입식한 후 수협사료 제품의 사료에 SP-04를 첨가하여 급이한 양식장에서 평균 체중 변화를 그림 3-6에 나타내었다.

입식후 10일간은 일반사료를 급이하고 그 이 후부터 SP-04를 첨가하여 주었으며 사료의 크기는 체중의 변화에 따라 사료회사에서 제시한 방법대로 주었다.

평균 체중이 0.02g의 흰다리새우를 입식한 후 37일째인 7월 11일에 SP-04를 첨가한 사료를 급이한 호지에서 흰다리새우의 평균 체중은 3.70g이었으며, 51일째인 7월 15일에 체중은 6.50g으로 성장하였다. 65일째인 8월 8일에는 평균 체중이 9.42g으로 성장하였으며 77일째인 8월 20일에는 15.00g으로 급격히 성장하면서 91일째인 9월 1일에는 평균 체중이 18.81g까지 성장하여 9월 3일 수확하여 출하하였다.

흰다리새우는 성장이 빠른 것으로 알려진 홍다리얼룩새우(*P. monodon*)와 거의 유사하여 동남아시아에서는 주당 성장률이 1.0~1.5g/week로 성장한다고 알려져 있다 (Briggs et al., 2004). 본 실험에서는 12.9주 만에 0.02g에서 18.81g까지 성장하여 주당 성장률이 1.5g/week로 나타나 동남아시아의 가장 좋은 조건과 같은 결과를 얻었다. 이러한 결과는 동남아시아나 남미의 28℃ 이상 지속적으로 유지되는 조건이라는 점을 감안 한다면 우리나라의 5월부터 8월까지의 평균 수온이 25℃이기 때문에 흰다리새우의 성장에도 매우 효과적으로 작용했다고 볼 수 있다.

흰다리새우는 20~25년 전부터 미국과 브라질 등의 남미지역에서 널리 양식하고 있었던 종으로 동남아시아에 소개된 것은 1978년도지만 1996년 이후에 중국이 WSSV에 의해 대하의 대량폐사가 일어나면서 이에 대한 대체 품종으로 흰다리새우를 도입하면서 흰다리새우 양식이 산업적으로 시도하게 되었다. 그 후 인도네시아, 필리핀, 태국, 말레이시아 등 동남아시아에서 널리 양식하게 되었다. 지금은 흰다리새우 한 종이 2003년도에 중국에서만 30만톤을 생산하였으며 전 세계적으로 50만톤 이상 생산으로 수출에 의한 소득을 40억불 이상이나 올리고 있다. 흰다리새우는 공식을 거의 하지 않은 습성 때문에 최근에는 태국이나 인도네시아 등에서 보통 60~150마리/m²의 밀도로 양식하고 있고 초 집약식 양식에서는 400마리/m²의 밀도로 양식도 하고 있는 전 세계적으로 관심을 갖는 양식 대상종이다(Briggs et al., 2004).

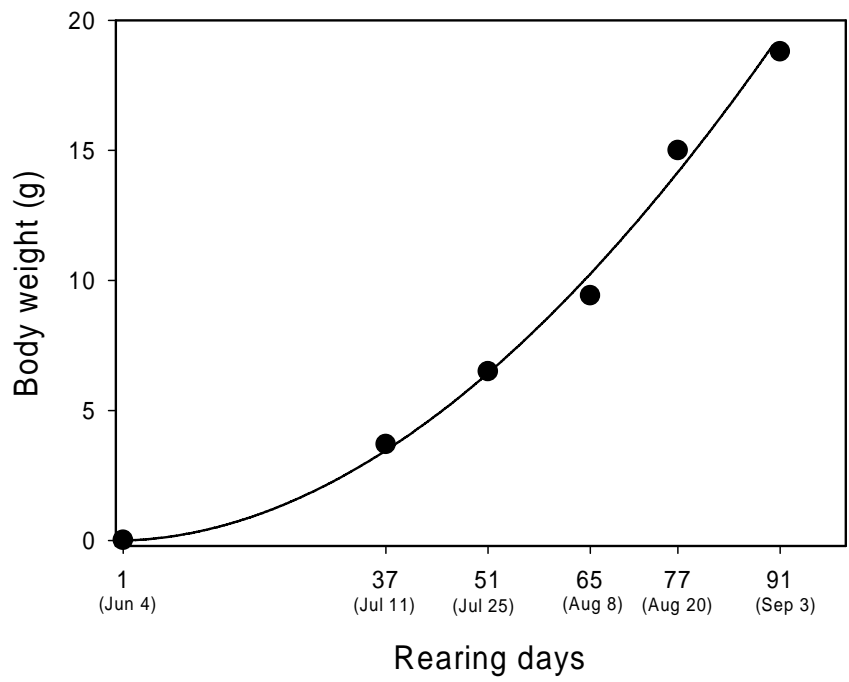


그림 3-6. 6월 4일부터 9월 3일까지의 양식기간 동안 흰다리새우(*P. vannamei*)의 평균 체중의 변화.

다. 경제성 분석

SP-04 첨가제를 사용하여 대하를 양식하였을 때 ha당 사료의 일일 투여량의 변화를 그림 3-7에 나타내었다. 입식 후 일주일간은 3.0~3.5kg/ha의 양으로 사료를 주었으며 그 이후 50일까지는 푸리나사에서 제공한 사육일수에 따른 사료 투여량과 동일하게 주었다.

50일째 평균 체장이 54.8mm, 체중이 5.59g으로 나타나 사료 투여량을 22.1kg/ha에서 34.5kg/ha로 증가시켜 주었다. 그 후 사료 투여량을 매일 3~4%씩 증가하여 주었으며 65일째에는 53.0kg/ha, 70일째 63.6kg/ha를 투여하였으며 75일째 72.7kg/ha로 투여해 나갔다. 사육 65일째부터 75일째 사육기간 동안은 비오는 날이 많고 태풍이 와서 사료의 투여량을 일시적으로 조절하였다. 75일째 이후부터는 맑은 날씨가 계속되어 사료의 양을 78일째부터 86일째까지 84.8kg/ha로 거의 일정하게 사료를 투여하였다. 87일째부터 수확하기 전까지 90kg/ha로 사료를 투여하였다. 사료는 수확하기 전날인 92일간 투여하였으며 이때까지 투여한 사료의 총량은 3,035kg/ha이었다. 이때 대하의 수확량은 2,850kg/ha이었으며 사료 전환률(FCR, feed conversion ratios)은 1.07로 나타났다.

반면, 일반적으로 우리나라에서 최적의 상태에서 4개월간 양식하여 대하를 생산하였을 때의 사료투여량의 변화는 그림 3-8에 나타내었으며 이때 사료 총량은 5,198kg/ha으로 나타났다. 이때 대하의 생산량을 3,000kg으로 하였을 때 FCR은 1.73으로 나타났다.

일반적으로 FCR의 값이 2이하이면 사료전환 효율이 좋다고 하고 있으며, 1이 되면 최고의 사료전환 효율을 보인다고 하고 있다 (Wyk, 2004). 따라서 SP-04를 첨가하였을 때 사료의 전환률에서도 좋은 효과를 보이고 있다.

SP-04 첨가제를 사용하여 대하양식을 한 경우와 일반사료를 사용하여 대하를 양식한 경우의 새우 생산금액과 양식비용들을 각 항목에 따라 상호 비교하여 표 1에 나타내었다.

SP-04 첨가제를 사용하여 대하를 양식하였을 때 양식기간의 단축으로 5월 26일 입식하여 8월31일과 9월 1일에 수확하였으며 이때 활어업자에게 kg에 20,000원에 출하하여 5,700만원/ha의 조수입을 올렸다. 그러나 일반적인 대하양식장에서 같은 기간에 입식하면 9월말이나 10월초에 수확하게 되고 이때 일상적인 출하가격으로

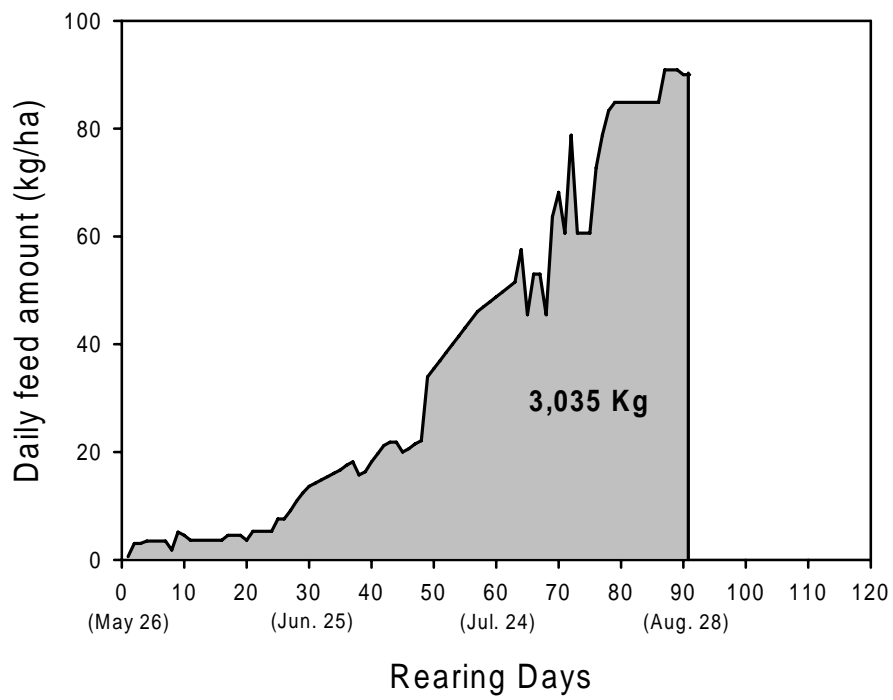


그림 3-7. 대하 양식기간 동안 ha당 사료의 일일 투여량의 변화. 양식 기간 동안 사료의 총 투여량은 3,035kg.

계산하면 약 3톤 생산하였다고 가정하였을 때 4,800만원/ha의 조수입을 올릴 수 있다.

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

또한 조수익에 대한 생산비용이 차지하는 비율이 SP-04를 첨가한 사료를 주었을 때는 28.7%가 되었고 일반사료를 주어서 생산하였을 때는 46.6%가 든다.

따라서 SP-04 첨가제를 사용하여 양식을 하였을 경우 ha당 1,501만원의 수익을 더 올릴 수 있는 결과를 얻을 수 있으며 기존의 수익률보다 58%의 수익을 더 올릴 수 있다.

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

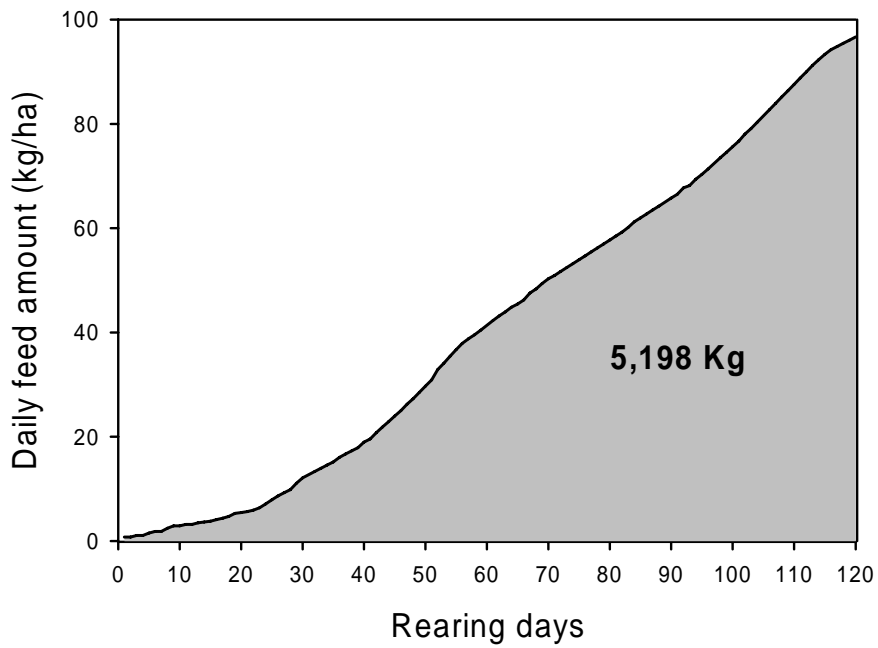


그림 3-8. 일반양식장에서 대하 18g까지 양성할 때까지 ha당 사료의 일일 투여량의 변화 (푸리나사 사료자료 참조함). 120일간 사료 총 투여량은 5,198kg.

표 1. SP-04 첨가사료를 사용하여 양식한 양어장과 일반 양어장에서의 수익성 비교

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

제 4 장 연구개발 결과의 활용계획

- 학문적 분야

곡류, 한약재 및 해조류 총 25종에 대하여 새우에 대한 면역활성, 섭이유인 및 탈피촉진 등의 효과를 조사하였으며 또한 이들 추출물로부터 분획한 물질들의 새우의 면역과 생리기능에 미치는 영향을 조사한 자료들은 새우외의 케나 가제류와 같은 유용 갑각류의 생리활성에 미치는 천연 물질을 찾는 데 유용한 자료로 사용될 것이다.

조사 대상 식물들 중 새우에 대해서 면역활성을 높이는 물질과 먹이 유인 및 성장촉진 물질들을 분획을 얻었으므로 이들 기능성물질을 더 분리, 정제하여 구조적 특성을 밝히는 연구에 자료를 제공할 수 있으며, 이와 관련된 연구를 이어서 진행할 수 있다. 또한 이들 물질들을 이용하여 새우의 면역증강과 성장에 대한 생리학적 작용기작을 연구하는데 생리활성 조절 물질로서 제공되어 질 수 있다. 그리고 새우의 기호성에 대한 생리적 연구에도 활용될 수 있다.

- 산업적 분야

바이러스성 질병으로 새우류 양식에서 우리나라에서는 매년 200억원 정도의 직접적인 경제적인 손실을 가져다주고 있으며, 전 세계적으로는 매년 15억불(1조5천억 원) 이상의 막대한 손실을 가져다주고 있다. 이를 막기 위해 많은 연구들이 있어 왔으나 아직까지 산업에 이용할 수 있을 만큼 괄목할만한 방법은 개발되어있지 않았다.

본 연구 결과에 의하면 WSSV에 감염된 새우에 개발된 사료 첨가제인 SP-04를 사용하면 80%이상 생존율을 유지해 줄 수 있어 지금까지 개발된 어떠한 사료첨가제보다 월등하게 우수함을 보여주었을 뿐만 아니라 성장촉진으로 양식기간을 획기적으로 줄일 수 있어 양식비용도 40%나 줄일 수 있다.

따라서 새우의 WSSV 등 바이러스성 질병에 대해 저항성을 높이고 성장을 촉진 시키는 새우사료첨가제 개발 기술을 기업체에 이전하여 제품개발과 대량생산 체제를 만들어

새우양식 어민에 제공함으로써 사료비의 절감, 생산성의 향상에 의해 어민소득 증대에 이바지 하고자 한다.

또한 어류나 새우양식에 항생제 대응으로 천연 면역증강제의 사용으로 잔류항생제나 발암성물질에 대한 불안을 불식시킴으로서 수산물 소비 증대와 국민건강 증진에도 도움이 된다.

그리고 전 세계적으로 바이러스성 질병을 제어하기 위해 항생제, 면역증강제 등 약품시장이 매년 3억불 이상 되기 때문에 본 연구에서 개발된 면역증강 새우사료 첨가제의 다양한 상품 개발로 해외 사료첨가제 시장 개척에 활용하면 막대한 수출 효과를 얻을 수 있다.

제 5 장 참고문헌

- Andres, M. S., Virginia, R. S., Jeffrey, M., L. (2001) Transmission of white spot syndrome virus(WSSV) to *Litopenaeus vannamei* from infected cephalothrax, abdomen, or Whole shrimp cadaver. Disease of aquatic organisms. vol. 45 81–87.
- Bajgus, A. and Koronka, A. (2001). Effect of ecdysone application on the growth and biochemical changes in *Chlorella vulgaris* cells. Plant Physiol. Biochem. 39, 707–715.
- Bathori, M. (1998). Purification and characterization of plant ecdysteroid of *Silene* species. trends in analytical chemistry 17, 372–383.
- Briggs, M., Funge-Smith, S., Subasinghe, R. and Phillips, M. (2004). Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. FAO regional office for Asia and the Pacific publication, Bangkok.
- Bruce, L.D., Redman, R.M., Lightner, D.V. and Bonami, J.R. (1993). Application of gene probes to detect a penaeid shrimp baculovirus in fixed tissue using in situ hybridization. Diseases of aquatic organisms 17, 215–221.
- Carvalho, E.A. and Nunes, Alberto J.P. (2005). Effects of feeding frequency on feed leaching loss and grow-out patterns of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed under a diurnal feeding regime in pond enclosures. Aquaculture .
- Chang, C. F., Chen, H. Y., Su, M. S. & Liao, I. C. (2000). Immunomodulation by dietary β -1,3-glycan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish & Shellfish Immunology 10, 505–514.
- Chang, C. F., Chen, H. Y., Su, M. S. & Liao, I. C. (2000). Immunomodulation by dietary β -1,3-glycan in the brooders of the grass prawn *Penaeus*

- monodon. Fish & Shellfish Immunol 10, 505–514.
- Chang, C. F., Chen, H. Y., Su, M. S. and Liao, I. C. (2003). Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. Fish & Shellfish Immunology 00, 1–14.
- Chang, C. F., Su, M. S., Chen, H. Y., Lo, C. F., Kou, G. H. & Liao, I. C. (1999). Effect of dietary beta-1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. Disease of Aquatic Organisms 36, 163–168.
- Chang, P.S., Chen, H.C. and Wang, Y.C. (1998). Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization. Aquaculture 164, 233–242.
- Fast, A.W. and Menasveta, P. (2000). Some recent issue and innovations in marine shrimp pond culture. Reviews in fisheries Science 8, 151–233.
- Flegel, T. W., 1997. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. in: NRA International Workshop, New Approaches to Viral Diseases of Aquatic Animal. National Research Institute of Aquaculture, Nansei, Mie, Japan, pp. 167–189.
- Hennig, O.L., Arce, S.M., Moss, S.M., Pantoja, C.R. and Lightner, D.V. (2005). Development of a specific pathogen free population of the chinese fleshy prawn, *Fenneropenaeus chinensis* Part II. Secondary quarantine. Aquaculture 250, 579–585.
- Henning, O., Itami, T., Maeda, M. Kondo, M., Natsukari, Y. & Takahashi, Y. (1998). Analyses of hemolymph immunoparameters in kuruma shrimp infected with penaeid rod-shaped DNA virus. Fish Pathology 33, 389–393.
- Hossain, Md. S., Chakraborty, A., Joseph, B., Otta, S. K., Karunasagar, I., Karunasagar I., (2001). Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. Aquaculture 198, 1–11.

- Huang, J., Song, X. L., Yu, C. H., (1994). Baculoviral hypodermal and haematopoietic necrosis—pathology of the shrimp explosive epidermic disease. Abstract In: Abstract. Yellow Sea Fishery Research Institute, Qingdao, P. R. China
- Huang, J., Song, X. L., Yu, C. H., (1995). Baculoviral hypodermal and haematopoietic necrosis—study on the pathogen and pathology of the shrimp explosive epidermic disease of shrimp. Marine Fisheries Research 16, 1–10.
- Inouye, K., Miwa, S., Oseko, N., Nakano, H., Kimura, T., Momoyama, K., Hiraoka, M., (1994). Mass mortality of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. Fish Pathol. 29, 149–158.
- Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagaqa, A., Takeno, N., Nishimura, H., Maeda, M. Kondo, M. & Takahashi, Y. (1998). Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. Aquaculture 164, 277–288.
- Itami, T., Takahashi, Y. Tsuchihira E, Igusa H, Kondo, M. Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocyte after oral administration of β -1,3-glucan (*Schizophyllum*). In: Chou LM, Munro AD, Lam JJ, Chen TW, Cheong LKK, Ding JK et al., editors. The third Asian fisheries forum. Manila, Philippines: Asian Fisheries Society; 1994, pp.375–8.
- Karoshna, R. R., Rao, K. G., Rao, P. and P. H. Babu. (1997) A catastrophic outbreak of white spot disease virus devastates the Indian shrimp culture industry. World Aquaculture, December 14–19.
- Kim, D.K., Jang, I.K., Seo, H.C., Sin,S.O., Yang, S.Y. and Kim, J.W. (2004). Shrimp protected from WSSV disease by treatment with egg yolk antibodies (Ig Y) against a truncated fusion protein derived from WSSV. Aquaculture 237, 21–30.

- Lee, M.H. and Shiau, S.Y. (2002). Dietary vitamin C and its derivatives affect immune responses in grass shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunol* 12, 119–129.
- Liao, I. C., Su, M. S., Chang, C. F., Her, B. Y. & Kojima, T. (1996). Enhancement of the resistance of grass prawn *Penaeus monodon* against *Vibrio damsela* infection by beta-1,3-glycan. *Journal of The Fisheries Society of Taiwan* 23, 109–116.
- Lightner, D. V., (1999). The Penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. *J. Appl. Aquacult.* 9, 27–52.
- Linda, M. N., Donald, V. L. (1996) Development of non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J. Virological Methods* 63, 193–201.
- Lo, C. F., Ho, C. H., Chen, C. H., Liu, K. F., Chiu, Y. L., Yeh, P. Y., Peng, S. E., Hsu, H. C., Liu, H. C., Chang, C. F., Su, M. S., Wang, C. H., Kou, G. H., (1997). Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Diseases of Aquatic Organisms* 30, 53–72.
- Lo, C.F., Ho, C.H., Peng, S.E., Chen, C.H., Hsu, H.C., Chiu, Y.L., Chang, C.F., Liu, K.F., Su, M.S. and Wang, C.H., Kou, G.H. (1996). White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Diseases of aquatic organisms* 27, 215–225.
- 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.
- Nakano, H., Koube, H., Umezawa, S., Momoyama, K., Hiraoka, M., Inouye, K., Oseko, N., (1994). Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *P. japonicus*, in Japan in 1993 : epizootiological survey and infection

- trails. *Fish Pathol.* 29, 135–139.
- Namikoshi, A., Wu, J.L., Yamashita, T., Nishizawa, T., Nishioka, T., Arimoto, M., Muroga, K. (2004). Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to whitespot syndrome virus. *Aquaculture* 229, 25–35.
- Nunan, L.M. and Lightner, D.V. (1997), Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *Journal of Virological Methods* 63, 193–201.
- Nunan, L.M., Tang-Nelson, K. and Lightner, D.V. (2004). Real-time RT-PCR determination of viral copy number in *Penaeus vannamei* experimentally infected with Taura syndrome virus. *Aquaculture* 229, 1–10.
- Pan, D., He, N., Yang, Z., Liu, H. and Xu, X. (2005). Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. *Developmental and Comparative Immunology* 29, 103–112.
- Pantoja, C.R., Song, X., Xia, L., Gong, H., Wilkenfeld, J., Noble, B. and Lightner, D.V. (2005). Development of a specific pathogen-free (SPF) population of the Chinese fleshy prawn *Fenneropenaeus chinensis* Part 1: Disease pre-screening and primary Quarantine. *Aquaculture* 250, 573–578.
- Park, J. H., Lee, Y. S., Lee, S., Lee, Y., (1998). An infectious viral disease of penaeid shrimp newly found in Korea. *Dis. Aquat. Org.* 34, 71–75.
- Preston, N. P., Crocos, P. J., Keys, S. J., Coman, G. J. and Koenig, R. (2004). Comparative growth of selected and non-selected Kuruma shrimp *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* in commercial farm ponds; implications for broodstock production *Aquaculture* 231, 73–82.
- R. Lafont and I.D. Wilson, *The Ecdysone Handbook*, The Chromatographic Society, Nottingham, 1992.
- Shahadat Hossain, Md., Chakraborty, A., Joseph, B., Otta, S.K., Karunasagar, I.

- and Karunasagar, I. (2001). Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. *Aquaculture* 198, 1–11.
- Shi, Z., Huang, C., Zhang, J., Chen, D. and Bonami, J.R. (2000). White spot syndrome virus (WSSV) experimental infection of the freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Journal of Fish Diseases* 23, 285–288.
- 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.
- Soares, R., Wasielesky, W., Peixoto, S. and D'Incao, F. (2005). Food consumption and gastric emptying of *Farfantepenaeus paulensis*. *Aquaculture* 250, 283–190.
- Song, Y. L., Liu, J. J., Chan, L. C. and Sung, H. H. (1997). Glucan-induced disease resistance in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Vaccinology : Developments in Biological Standardization* 90, 413–421.
- Su, M. S., Liu, K. F., Chang, C. F. and Liao, I. C. (1995). Enhancement of grass prawn *Penaeus monodon* postlarvae viability by beta-1,3-glycan from *Schizophyllum commune*. *Journal of Taiwan Fisheries Research* 3, 125–132 (in Chinese with English abstract).
- Sung, H. H., Kou, G. H. & Song, Y. L. (1994). Vibriosis resistance induced by glycan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology* 29, 11–17.
- Supamattaya, K., Hoffmann, R. W., Boonyaratpalin, S., Kanchanaphum, P., (1998). Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. *Diseases of Aquatic Organisms* 32, 79–85.
- Takhashi, Y., Kondo, M., Itami, T., Honda, T., Inagawa, H., Nishizawa, T., Soma, G. I. and Yokomizo, Y. (2000). Enhancement of disease

- resistance of against penaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, by oral administration of *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide (LPS). *Fish & Shellfish Immunol* 10, 555–558.
- Tang, F. J., Lightner, D. V., (2000). Quantification of white spot syndrome virus DNA through a competitive polymerase chain reaction. *Aquaculture* 189, 11–21.
- Tang, Kathy F.J., Wang, J. and Lightner, D.V. (2004). Quantitation of taura syndrome virus by real-time RT-PCR with a TaqMan assay. *Journal of Virological Methods* 115, 109–114.
- Ueberschaer, Bern, 1999. Die Trypsinaktivitaet als biochemischer Indikator zur Bestimmung des Ernahrungszustandes sowie der Fressaktivitaet von Fischlarven und seine Anwendung in Feldstudien. PhD Thesis, University of Hamburg. Weissensee Verlag, Berlin 2000, p201, ISBN 3-934479-11-1
- Vijayan, K.K., Balasubramanian, C.P., Jithendra, K.P., Alavandi, S.V. and Santiago, T.C. (2003). Histopathology of Y-organ in Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*, experimentally infected with white spot syndrome virus. *Aquaculture* 221, 97–106.
- Volodin, V., Chadin, I., Whiting, P. and Dinan, L. (2002). Screening plants of European North-East Russia for ecdysteroids. *Biochemical Systematics and Ecology* 30, 525–578.
- Yukinori, T., Masakazu K., Toshiaki, I., Teruko, H., Hiroyuki, I., Takeshi, N., Gen, I.S. and Yuchi, Y. (2000) Enhancement of disease resistance against penaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, *Panaeus japonicus*, by lipopolysaccharide(LPS). *Fish & Shellfish immunology*. 10, 555–558
- 목종수, 송기철, 최낙중, 양호식. (2001). 계피 추출물의 어류 질병 세균에 대한 항균 효과. 계피 추출물의 어류 질병 세균에 대한 항균 효과. *J. Korean fish. Soc.* 34(5), 545~549.

- 목종수, 송기철, 최낙중. (2001). 단삼 추출물의 어류 질병 세균에 대한 항균 작용 및 사료 적용 시험. J. of Aquaculture. 14(3), 157~163.
- 박성우, 광중기, 구재근, 조만기. (2001). 경구투여 β -glucan이 잉어와 넙치의 비특이적 면역활성에 미치는 영향. J. Korean fish. Soc. 34(4), 412~418.
- 송영보, 문상욱, 김세재, 이영돈. (2002). 상품 사료에 첨가한 감귤발효액이 치어기 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 성장에 미치는 영향. J. of Aquaculture 15(2), 103~110.
- 이근광, 이정열. (2001). 식물 추출 정유가 어류의 병인체에 미치는 항미생물 효과. J. of Aquaculture 14(2), 81~87.
- 이학성, 서정호, 서근학. (2000). 해조류 추출물로부터 향균제의 제조 및 향균효과. J.Korean Fish. Soc. 33(1), 32~37.
- 장인권, 박민우, 정달승, 송재희, 최용석, 임현정, 김종화. (2000). 새우양식과 질병 관리. 해양수산부, pp127.
- 한창희, 장인권 등 (2000) 대하의 친하관리와 성 성숙조절에 의한 수정란 대량 확보 기술 개발 (수산특정과제 보고서). 해양수산부, pp168.

사 진
(PLATE)

사진 | 설명

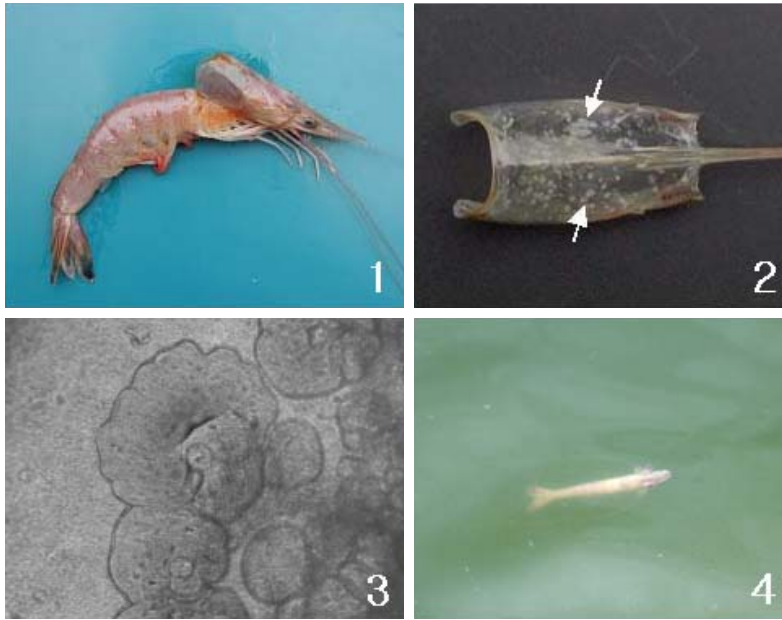
A. WSSV에 의한 대하의 발병 상태

1. WSSV에 의해 폐사된 대하, 탈피전기가 아니라도 쉽게 갑각이 탈락된 모습
2. 두흉갑에 나타난 WSSV에 의한 흰 반점 무늬의 모습
3. 광학현미경상에서 나타난 국화 모양의 흰 반점
4. WSSV에 감염되어 폐사직전의 새우가 몸 전체가 적색을 띄면서 수면 위를 유영하는 모습

B. 사육실험에 사용한 야외호지와 수조

1. 0.2ha의 야외 호지의 전경
2. 새우를 실내수용하고 있는 10 ton 원형 수조
3. 2톤 원형 수조
4. 0.7톤의 사각 수조

A



B



사진 II 설명

- 1~2. 2004년 대하 양식실험을 한 충남 대산에 있는 A양식장 전경
- 3~4. 2005년도 흰다리새우 양식실험을 한 전남 신안군 지도읍 태평리에 위치한 T양식장 전경
- 4~5. 2005년 대하 양식실험을 한 전남 신안군 임자도에 위치한 S양식장 전경



사진 III 설명

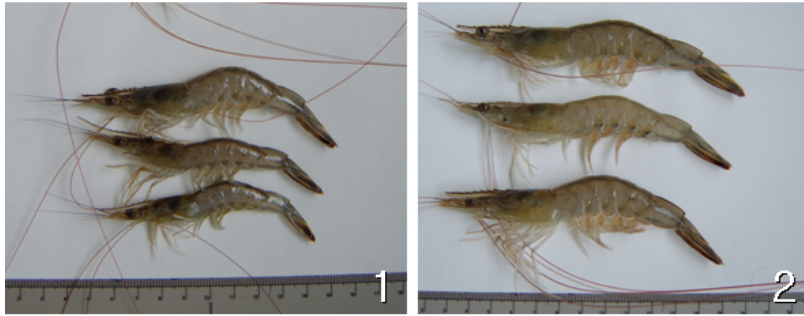
A. 8월 8일 채집한 대하

1. SP-04를 첨가하지 않은 일반사료를 급이한 대하. 평균체장 77.6 mm, 체중 6.70g
2. SP-04를 첨가한 사료를 급이한 호지에서 양식한 대하. 평균 체장 95.2mm, 체중 11.81g

B. 8월 21일 채집한 대하

1. 투망으로 대하를 채집한 모습
2. 채집된 대하의 모습
3. 평균체장 105.2mm, 체중 16.03g의 대하

A



B



사진 IV 설명

1. 9월 1일 대하를 수확하기 위해 그물을 끌어올리는 모습
2. 그물에서 건져올리고 있는 모습
3. 수확한 대하
4. 평균 체장 109.5mm, 체중 18.35g 크기의 대하
5. 대하를 출하하는 광경
6. 수확한 대하의 무게를 측정하는 모습



사진 V 설명

A. 9월 3일 흰다리새우를 수확하는 광경

1. 새우를 수확하기 위해 그물을 설치하는 모습
2. 그물로 새우들을 수확하는 모습
3. 수확된 흰다리새우
4. 흰다리새우의 크기 비교
5. 평균 체장 110.6 mm, 체중 18.81g의 흰다리새우

B. SP-04를 사료에 첨가하는 과정

1. 알콜에 용해된 SP-04를 1L 정량하는 모습
2. 한 포대(20kg)의 사료를 통에 넣어 SP-04가 사료에 첨가되도록 섞는 모습
3. SP-04가 첨가된 사료를 건조시키기 위해 건조대에 옮기는 모습
4. SP-04 첨가사료를 건조대에서 퍼서 말리는 모습

A



B

