



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

아연 (Zn) 노출에 따른 돌돔,  
*Oplegnathus fasciatus*의 기관별  
축적 및 생리학적 반응



2010년 8월

부경대학교 대학원

수산생명의학과

김 용 석

이 학 석 사 학 위 논 문

아연 (Zn) 노출에 따른 돌돔,  
*Oplegnathus fasciatus*의 기관별  
축적 및 생리학적 반응

지도교수 강 주 찬

이 논문을 석사학위논문으로 제출함.

2010년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

수산생명의학과

김용석

김용석의 이학석사 학위논문을 인준함.

2010년 8월 25일

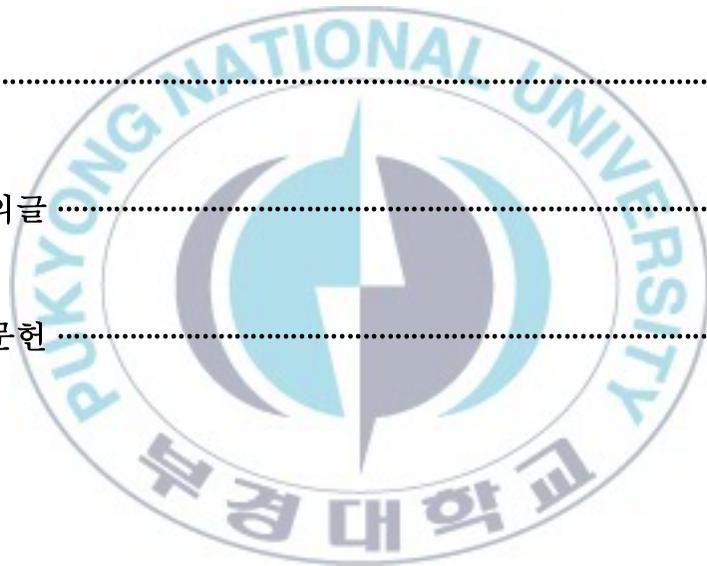


|   |   |      |         |
|---|---|------|---------|
| 주 | 심 | 이학박사 | 김기홍 (인) |
| 위 | 원 | 이학박사 | 정현도 (인) |
| 위 | 원 | 이학박사 | 강주찬 (인) |

# 목차

|                             |     |
|-----------------------------|-----|
| 목 차 .....                   | i   |
| Abstract .....              | iii |
| <br>                        |     |
| I. 서론 .....                 | 1   |
| <br>                        |     |
| II. 재료 및 방법 .....           | 6   |
| 1. 실험어 및 사육환경 .....         | 6   |
| 2. 실험 사료 및 사료 투여 .....      | 7   |
| 3. Bioaccumulation 분석 ..... | 8   |
| 4. 성장률 측정 .....             | 9   |
| 5. 혈액 성분 .....              | 10  |
| 6. 혈청 성분 .....              | 11  |
| 7. 생화학 분석 .....             | 12  |
| 8. 간조직 표본 제작 .....          | 14  |
| 9. 유의성 검정 .....             | 14  |
| <br>                        |     |
| III. 결과 .....               | 15  |
| 1. Bioaccumulation 분석 ..... | 15  |
| 2. 성장에 미치는 영향 .....         | 20  |

|                   |    |
|-------------------|----|
| 3. 혈액 성상 .....    | 25 |
| 4. 혈청 성분 .....    | 27 |
| 5. 생화학 분석 .....   | 30 |
| 6. 간 조직의 관찰 ..... | 38 |
| <br>              |    |
| IV. 고찰 .....      | 40 |
| <br>              |    |
| V. 요약 .....       | 49 |
| <br>              |    |
| VI. 감사의글 .....    | 51 |
| <br>              |    |
| VII. 참고문헌 .....   | 52 |



**Effect of Zinc administration on organ-bioaccumulation and physiological responses of rock bream, *Oplegnathus fasciatus***

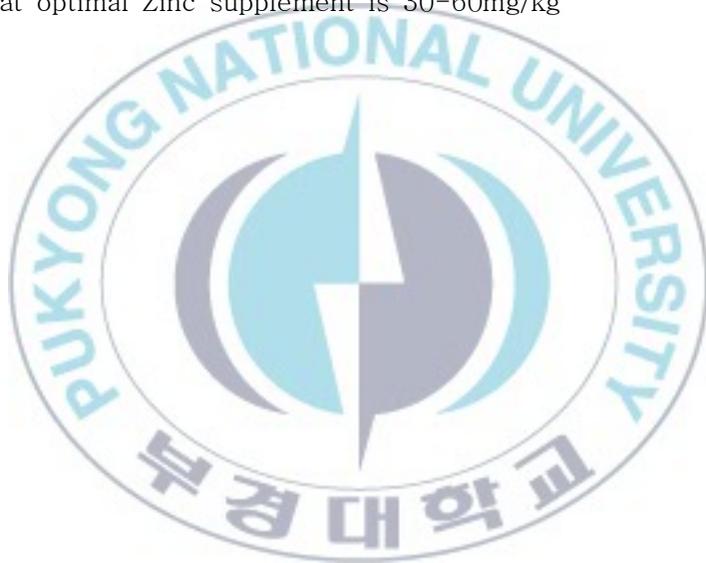
Young-sug Kim

*Department of Fish Pathology, Graduate School  
Pukyong National University*

**Abstract**

Zinc is essential inorganic matter for metabolism of life, meanwhile having heavy metal characters that can be toxic. Since fish have a problem usually when this element is deficient, there were extensive researches about insufficiency of this element. However there are few researches about sufficient amount of zinc for fish species. This research examines how zinc influence to physiology of rock bream, *Oplegnathus faasciatus*, its accumulation and elimination when exceeding amount of requirement of zinc. Dietary 30, 60 120 and 240 mg/kg of zinc was exposed to the fish during first 40 days, and then feed without zinc was provided for 20 days. After experiment, the result shows the variation of zinc accumulation, that is: liver>intestine>gill>muscle. The elimination of zinc was fast at intestine and gill, but slow at liver. Otherwise, almost non elimination in muscle. There were significant differences in growth among control and 30, 60, 120, 240 mg/kg group. However, there was no significant difference among 30, 60, 120 and 240 mg/kg group. Zinc toxicity was not observed during day 20 and day 40,

when zinc was added to the feed. There was significant difference in SOD, GSH and GPx activities for the first 20, 40 and 50 days, but no significant difference was observed after 60 days exposure. This is considered due to the increase of antioxidant ability on the tissues of the rockbream, not by toxicity of zinc. Therefore, there was no toxicity when 240 mg/kg dietary zinc on rockbream. And antioxidation ability of fish increased when 30 mg/kg of zinc were fed for 20 days. These data indicate that optimal Zinc supplement is 30-60mg/kg



# I 서론

육상 동물과 마찬가지로 어류에도 그들이 처해 있는 환경에서 정상적인 생명을 유지하기 위하여 각종 미네랄이 필요하다. 현재까지 어류에 대하여 칼슘(Ca), 인(P), 마그네슘(Mg), 철(Fe), 구리(Cu), 망간(Mn), 아연(Zn), 셀레늄(Se)과 요오드(I)의 요구량이 연구되어 왔다(NRC, 1993). 이러한 미량금속은 보통 두 종류로 구분되는데, 그 중 한 종류는 정상적인 생화학적 반응과정에 필수적인 구리(Cu), 아연(Zn), 철(Fe), 망간(Mn) 등이며, 또 다른 한 종류는 확실한 생화학적 기능을 가지지 않는 금속들로서 카드뮴(Cd), 수은(Hg), 납(Pb) 등으로 이들은 수서환경에서 중요한 오염원으로 작용하는데 다른 미네랄들에 비하여 아연은 주로 뼈, 피부, 근육조직에 축적되고 간, 신장 정소조직에는 그에 비해 적게 축적된다(Pentreath, 1973; Wicklund, 1990). 아연은 metalloenzyme으로 주로 여러 가지 효소와 단백질을 구성하는 필수인자이며 탄수화물과 지방의 대사에도 관여하는 미량원소이다(Song and Jung, 1990). 아연은 척추동물의 몸에서 Fe 다음으로 많이 찾아볼 수 있으며 주기율표의 Group IIB에 속하는 원소로 S, P, C와 안정적으로 결합되며 carboxypeptidase, lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD), phosphatase, glutamate dehydrogenase, carbonic anhydrase 등과 같은 몇몇 효소에 필수적 또는 보조적으로 필요하다(SORENSEN, 1991). 미네랄은 체중의 4%에 불과하지만 우리 몸의 생물학적 기능에 필수적인 요소로 건강과 웰빙에 대한 관심이 높아지면서 그 중요성이 부각되고 있다. 미네랄은 크게 macromineral과 micromineral로 나뉘고, 사람에게 있어서 일일요구량이 100mg 이하이면 미량 무기질로 분류된다(Gropper et al. 2005). 미량 미네랄은 체중의 0.01%이지만 그 중요성이 날로 증가하고 있으며

아연은 필수 미네랄로서 최근까지 알려진 32,000 유전자 중 3%가 아연이 연관된 단백질 생성(zinc protein)의 유전정보를 가지고 있다(Breg and Shi, 1996). 많은 효소 반응들 중 300 가지 이상에 아연이 관여하며, 특히 진핵세포(eukaryotic) 단백질 중 가장 많은 zinc finger protein 중 DNA polymerase와 RNA polymerase는 핵산대사에 필수적이다(Schwartz et al. 2005) 아연은 섭취 후 운반체매개운반(carrier-mediated process)과정이나 단순확산(simple diffusion)을 통해서 흡수된다. 또한 세포횡단간 이동에는 metallothionein이 중요한 역할을 하는데, 아연의 섭취가 증가할수록 장 세포에서 metallothionein의 발현이 높아지게 된다(Cousins and Lee, 1992). 흡수된 과량의 아연은 metallothionein에 결합되어 소장 점막세포 내에 저장되거나 간에 저장된다. 아연은 DNA, RNA 합성 및 세포 분열에 관여하여 세포의 증식과 면역 체계의 발달에 중요한 역할을 수행하는 미량 원소이다. 또한 아연은 인슐린양 성장인자-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1), 인슐린양 성장인자 결합단백-3(IGF binding protein-3, IGFBP-3), osteocalcin, testosterone, 갑상선호르몬, 알칼리성인산분해효소(Alkaline phosphatase, ALP), 그리고 인슐린과 같은 성장에 영향을 미치는 중요한 호르몬과 상호 작용을 하며 이와 같은 호르몬의 합성 및 분비에 관여하는 것으로 알려져 있다(Brown 2003, Nishi 1996). IGF-1의 합성에도 성장호르몬의 자극 외에 아연이 합성에 필요한 기질로 사용된다. 또한 아연은 간장에서 성장호르몬의 작용을 강화시키며, 뼈와 연골에서 IGF-1의 활동을 증강시키는 것으로 보고 되고 있다(Solomons et al 1976). 이와 같은 아연의 작용기전으로 인하여 빠르게 성장하는 시기에서의 아연의 중요성이 보다 강조되고 있다(Martorell 2002).

인체 내에서 Zn의 생물학적 기능은 1)생물학적대사를 촉진하는 촉매기능(catalytic function)이 있고, 2)핵산의 구조를 안정화하는 형태학적 기능(structural function), 3)T 림프구 수용체매개 신호전달이나 인슐린 유사성장인

자(Insulinlike growth factor)의 수용체 결합, metal-response element (MRE)-binding transcriptional factor (NTF1) 발현에 관여하는 조절기능 (regulation function)으로 나눌 수 있다. 임상적으로는 아연의 기능은 4가지로 요약할 수 있다. 1)산화 환원 반응, 2)세포 사멸의 조절, 3)세포 증식과 성장, 4)면역 기능의 조절 등이다(Shils et al, 2005).

Zn은 비중이 4~5이상인 중금속으로 중금속은 비록 미량일지라도 수중생물에 농축, 축적이 가능하며 먹이연쇄를 통해 인체에까지 영향을 미치므로 중금속에 의한 수서생물의 오염은 인류의 공중보건에 직결되는 심각한 문제이며 (Friverg and Vostal, 1972) 중금속의 축적은 자연 상태의 어류에 있어서 중요한 오염경로가 되기 때문에(Dallinger and Kautzky, 1985) 중금속인 아연의 축적에 대한 연구는 매우 중요하다. 각종 중금속이 근육에 축적되는 양은  $Fe > Zn > Pb > Cd > Hg > Cu > Mn > meHg > Ni > Cr > Co$  순으로 Zn은 비교적 높은 농도로 근육에 축적되며(Jaroslav et al, 2006). 수중 노출보다 먹이노출에서 독성 영향이 낮게 나타난다(Lundebye et al. 1999). 일반적으로 아연이 결핍되게 되면 성장의 저하가 오게 되며 심할 경우 폐사가 올 수 있다. 반대로 과대하게 되면 Cu와 Fe의 흡수가 저하되고 Tetracycline과 quinolone계열의 약효를 저해한다.

Zn에 노출된 수서동물에 대한 연구를 살펴보면 수중 노출에 대해서는 연구가 이루어지고 있는 반면 먹이 노출에 대한 연구는 미미하고 담수어종에 관한 것이 대부분이다. 담수어종에 있어서도 먹이 내 아연의 과잉보다는 결핍에 초점을 맞추어 연구해 왔으며, 과잉에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 독성에 관한 연구 또한 waterborne에 초점이 맞추어져 dietborne에 관한 연구는 거의 이루어져 있지 않다. 아연에 관한 요구량은 담수어인 무지개 송어와 잉어에 대하여 15-30mg/kg인 것으로 알려져 있다(Ogino and Yang 1978, Ogino and Yang 1979). 하지만 이러한 연구는 성장을 바탕으로 한 요구량의 연구이며 아연의 다

른 이로운 점에 대해서는 배제되어 있다.

돌돔은 분류학상 농어목(Perciformes) 돌돔과(Oplegnathidae)로 우리나라와 일본, 중국 연안의 암초지대에 서식하는 연안 정착성 어류로(Jung, 1977) 현재 대량 종묘 생산되는 유망 양식어종이다. 저수온에서 성장이 늦은 단점이 있지만 빛이나 수온으로 산란시기를 조절하여 본래의 산란기인 4-7월이 아닌 저수온기인 겨울에 종묘를 생산하고 고수온기인 봄부터 가을까지 양성을 하는 방법이 개발되어 있으며(Hwang, 1997) 식욕이 왕성하여 moist pellet이나 dry pellet를 모두 잘 먹고 돌돔의 사료에 대한 적정 단백질 및 지질의 함량이 연구되어 있다(강용진, 1998). 돌돔은 현재 남해안과 제주에서 고밀도로 양식되고 있는데 고밀도 양식은 그 밀도에 따라서 만성적인 스트레스 요인으로 작용한다(Conte, 2004, Barton, 2002, Barton and Iwama., 1991, Billard et al, 1975, Wedemeter et al., 1997; Schreck et al., 1997; Ellis et al., 2002). 이러한 요인은 성장이나 면역에 있어서 부정적인 영향을 야기한다(Procarione et al., 1999; Irwin et al., 1999; Montero et al., 1999; Ellis et al., 2002; Iguchi et al., 2003; Barcellos et al., 2004; Kristiansen et al., 2004; Schram et al., 2006, Marco et al., 2008). 아연은 간수치를 감소시키고 특히 비만상태에 투여시 유의한 효과가 있는 것으로 보고 되어 있으며(Kim and Cho., 2009) 단백질 합성, 핵산, 지질 및 탄수화물대사와 면역기능에도 관여하고(Singh et al 1992, Haynes et al 1985) 항산화효과를 증가시키는 것으로 보고(Bray and Bettger., 1990)되어 있다. 식이성 아연의 항산화적 기능은 간, 신장 및 장내 Zn-metallothionein pool의 세포 크기가 증가하는 것에 의하며 이는 다량의 아연 공급시 일어나는 것으로(Samman 1993) 사료에 아연을 첨가하였을 시 밀식상태의 질병을 예방하고 항산화 효과를 증진시키는 데 효과가 있을 것으로 생각되지만 아연흡수에 관련된 복잡한 반응(Hill and Matrone., 1970) 때문에 항산화력을 증가시키기 위한 세포내 적정 아연농도는 연구가 더 필요하다.

따라서 우리나라 중요 해산 양식종인 돌돔, *Oplegnathus fasciatus*를 대상으로 사료내 Zn첨가에 따른 성장, 혈액과 장기에서의 생화학적 변화에 미치는 영향과 생체내 Zn의 축적과 제거에 대하여 검토하였다.



## II 재료 및 방법

### 1. 실험어 및 사육환경

본 실험에서 사용한 실험어는 경남소재 양식장으로부터 돌돔, *Oplegnathus fasciatus*을 분양받아 4주 이상 순치 시킨 후, 체장  $12.14 \pm 0.08$ cm, 체중  $33.78 \pm 0.74$ g의 개체를 실험에 사용하였다. 실험조건은 수온, pH 및 용존산소가 각각  $19.2 \sim 20.4^\circ\text{C}$ ,  $6.8 \sim 7.2$  및  $6.4 \sim 6.9$  mg/L(Table 1) 이였고, 사육수 수질은 Table 1과 같다. 실험은 항온실 ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ )에서  $500 \times 280 \times 310$  mm의 유리수조에 환수식 방법 (1일마다 환수)으로 실시하였다.

Table 1. The chemical components of seawater and experimental condition used in the experiments

| Item                                      | Value           |
|---|-----------------|
| Temperature( $^\circ\text{C}$ )           | $20.0 \pm 1$    |
| pH  | $8.10 \pm 0.5$  |
| Salinity( $\%$ )                          | $33.5 \pm 0.6$  |
| Dissolved oxygen(mg/l)                    | $7.1 \pm 0.3$   |
| Chemical Oxygen Demand( $\mu\text{g/l}$ ) | $1.13 \pm 0.1$  |
| Ammonia(mg/l)                             | $12.50 \pm 0.7$ |
| Nitrite(mg/l)                             | $1.30 \pm 0.3$  |
| Nitrate(mg/l)                             | $11.48 \pm 1.0$ |

## 2. 실험 사료

실험을 시작하기 전까지는 시판용 돔용사료(CJ사료 한국)를 1일 2회 충분히 공급하였고(Table 2), 시판용 돔용사료에는 Zn가 약 20mg/kg 함유되어있었다. 실험에 사용한 사료는 시판용 돔용사료에 아연을 사료 1kg당 30mg, 60mg, 120mg, 240mg 첨가하였으며 대조구의 사료는 돔용사료에 아연첨가 시 가해지는 아연의 첨가를 제외한 전처리과정을 거친 후 사용하였다. 사료는 전처리 후 밀봉상태로 -20℃ 냉동 보관하였다. 실험사료의 공급량은 1일 2회(오전 9시, 오후 5시) 어체중에 1%(건중량 하루 기준)를 공급하였다.

Table 2. Composition of the experimental diet

| Component  | Composition (%) |
|------------|-----------------|
| Protein    | 48.0            |
| Lipid      | 10.0            |
| Fiber      | 5.0             |
| Ash        | 15.0            |
| Calcium    | 2.5             |
| Phosphorus | 2.7             |

### 3. Bioaccumulation 분석

간, 아가미, 근육 및 창자를 채취하여 각 기관을 3차 증류수로 세척한 후 동결 건조기에서 24시간 건조시키고 건조량(Dry weight)을 측정하였다. 시료 분해는 wet digestion method로 HNO<sub>3</sub> (Merck, 65% ultra pure)을 사용하여 120℃의 hot plate에서 가온 시켰으며 유기물이 완전히 없어져 맑아질 때까지 HNO<sub>3</sub> 를 첨가하고 가온하는 과정을 반복하였다 (APHA, 1992). 유기물이 완전히 없어져 맑아진 후에는 마른 시료에 2% HNO<sub>3</sub> 20ml를 넣고 시료를 하루 동안 암소에 방치한 후 이 용액을 membrane filter (Advantec mfs, Inc. 0.2 $\mu$ m)을 이용하여 필터링하였다. 이렇게 만들어진 용액을 원액을 사용하거나 2% HNO<sub>3</sub>로 희석하여 시료로 사용하였다. 검량선은 ICP Multi-Element Standard Solution Vi For ICP-Ms (30 Elements In Dilute Nitric Acid) Certipur(Merck)를 이용하였으며 ICP-Ms (Inductively Coupled Plasma - Mass spectroscopy. Perkin Elmer, ELAN 6600DRC)를 이용해 시료내 Zn의 함유량을 측정하였다. 또한 표준물질인 ERM (European Reference Material ERM<sup>®</sup>-CE278)을 이용하여 시료와 같은 전처리를 가한 후 시료내 Zn의 함유량을 측정함으로써 회수율을 측정하였다.

#### 4. 성장률 측정

실험어는 실험수조에 수용하기 전에 체장 및 체중을 측정하였고, 실험사료는 실험어를 실험수조에 수용한 다음날부터 공급하였다. 모든 실험에서 1일전 절식시킨 후 MS-222(100ppm)로 마취시킨 후 체장과 체중을 측정하였고, 실험 20일, 40일, 50일, 60일에 각각 전장 및 체중을 측정하여 이를 바탕으로 성장률과 사료 효율을 측정하였으며 비만도 지수와 간중량지수를 계산하였다.

Weight growth rate(%) = (final weight-initial weight)\*100/initial weight

Length growth rate(%) = (final length-initial length)\*100/initial length

Condition factor(%) = (weight/length<sup>3</sup>)\*100

Feed efficiency(%) = weight gain(final weight-initial weight)/dry feed intake\*100

LSI(%) = liver wet weight/weight\*100

## 5. 혈액 성상

혈액은 혈액 응고방지제인 heparin-Na(25,000 I.U., 중외제약)을 처리한 0.5ml 1회용 주사기를 사용하여 미부정맥 (caudal vein)으로부터 채혈하였다. 채혈한 혈액을 사용하여 적혈구 (Red Blood cell)수, hemoglobin (Hb) 및 Hematocrit (Hct)를 측정하였다 (Brown, 1980). 적혈구 수는 Hendrick's diluting solution 으로 혈액을 1:200으로 희석한 후, hemocytometer (Improved Neubauer, Gemany)를 이용하여 광학 현미경하에서 계수하였다. 혈중 Hb는 시판되고 있는 Clinic kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 이용하여 Cyan-methemoglobin법으로, Hct 값은 Hct용 모세관을 사용하여, microhematocrit centrifuge (Model: 01501, HAWKSLEY AND SONS Ltd., England)로 12,000rpm, 5분간 원심분리한 다음 판독관으로 측정하였다.

## 6. 혈청 성분

채취한 혈액을 1시간 동안 실온에 방치한 후 4℃에서 2시간 동안 보관후 3000G로 5분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 냉장 보관하였고 8시간 이내에 생화학적 분석을 하였다.

혈청 무기성분의 변동은 칼슘 (Calcium), 마그네슘 (Magnesium)에 대하여 측정하였다. Calcium은 o-cresolphthalein-complexon법, Magnesium은 Xylidyl blue법에 의하여 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)를 사용하여 측정하였다.

혈청 유기성분 변동은 혈당 (Glucose) 및 총단백질 (Total protein), 중성지방 (Triglyceride)에 대하여 측정하였다. Glucose는 GOD/POD법으로, Total protein은 biuret법, TriGlyceride는 Enzyme법으로 시판되고 있는 임상용 kit (Aan Pharm. Co., Ltd.)를 사용하여 측정하였다.

혈청 효소활성의 변동은 GOT (Glutamic oxalate transminase), GPT (Glutamic pyruvate transminase), ALP (Alkaline phosphatase), LDH (Lactate dehydrogenase)를 측정하였다. GOT와 GPT는 Reitman-Frankel법, ALP는 Kind-king법, LDH는 UV Rate법을 이용한 임상용 kit (Asan Pharm. Co., Ltd.)로 측정하였다.

## 7. 생화학 분석

### Superoxide dismutase(SOD) activity

간과 아가미 조직으로부터 SOD activity를 측정하였다. 측정 방법은 SOD Assay Kit-WST (Dojindo Co., Japan)를 이용하였다. 어체에서 간을 분리한 후 0.1M PBS로 2회 세척한 후 각각 간과 아가미의 3배에 해당하는 sucrose buffer (0.25ml/l sucrose, 10mmol/l HEPES, 1mmol/l EDTA, PH 7.4)를 첨가하고 homogenizer를 이용하여 얼음 위에서 균질화하였다. 이 균질액을 4℃에서 10,000g로 60분간 원심분리한 후 상층액을 분리하여 분석에 사용하였다. 상층액은 5의 배수로 희석하여 각 희석배수에 따른 inhibition rate를 구한 후 inhibition rate를 이용하여 inhibition curve를 작성하고 작성한 inhibition curve에서 활성이 50% 방해받는 희석배수를 찾고 이 희석배수를 1unit/20ul로 하여 계산하였다. 이렇게 나온 값을 단백질량으로 나누어 1unit/mg protein으로 SOD activity를 나타내었다. 단백질의 정량은 Bradford 법을 이용한 kit(Biorad. Co., Ltd.)를 이용하여 Protein량을 정량하였다.

### Glutathione(GSH) level

총 글루타치온 (GSH) 함량은 Baker 등 (1990)의 방법에 의하여 측정되었다. 측정을 위한 시료는 GSH의 측정시 방해되는 protein을 제거하기 위하여 5% 5-sulfosalicylic acid (SSA)로 희석하여 사용하였다. 일정 시료에 혼합시액 (100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM EDTA, 0.15mM DTNB, 0.2mM NADPH 및 1U/mL

glutathione reductase, pH 7.5)을 첨가하여 파장 405nm에서 2분 이상 측정하였다 (Zenyn 200, Anthos Labtec Instruments Gmbh, Austria). GSH 함량 계산은 GSSG를 사용한 검량선을 바탕으로 계산하여 단위는  $\mu\text{M/g}$  tissue로 나타내었다.

## Glutathione peroxidase(GPx)

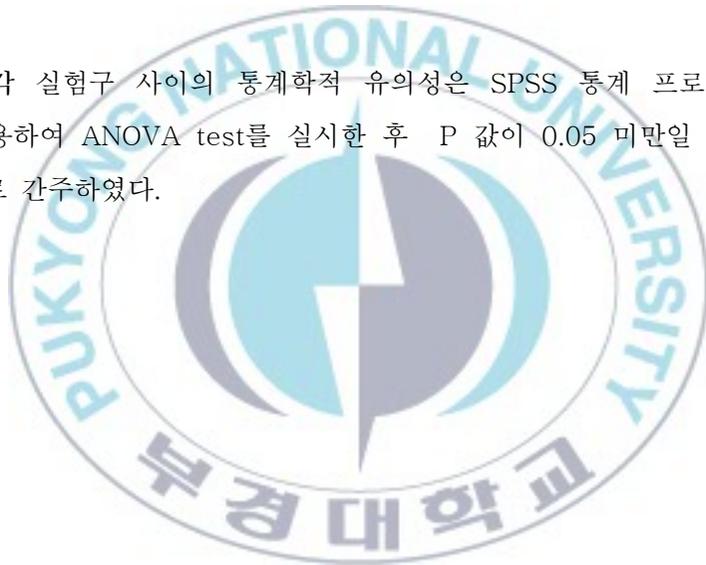
GPx 효소는 Bell 등 (1985)의 방법을 수정한 것으로  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 기질로, sodium axide를 catalase 억제제로 사용하였다. 시료에 1mM GSH, 0.1mM NADPH, 0.5U GSH-reductase, 1mM EDTA, 2mM sodium azide 및 50mM 인산완충용액 (pH, 7.4)이 포함된 혼합용액을 가한 후 5분 동안  $20^\circ\text{C}$ 에서 배양하였다. 반응은 2.5mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 넣는 동시에 시작되었다. NADPH가 산화되는 비율을 340nm에서 4분 동안 20초 단위로 분광광도계 (Zenyn 200, Anthos Labtec Instruments Gmbh, Austria)로 측정하였고, 단위는 nmol/min/mg protein으로 표시하였다.

## 8. 간 조직 표본 제작

Zn 노출에 의한 간 조직의 병변을 알기 위하여 hematoxylin-eosin(H-E)으로 염색한 후 광학 현미경으로 관찰하였다.

## 9. 유의성 검정

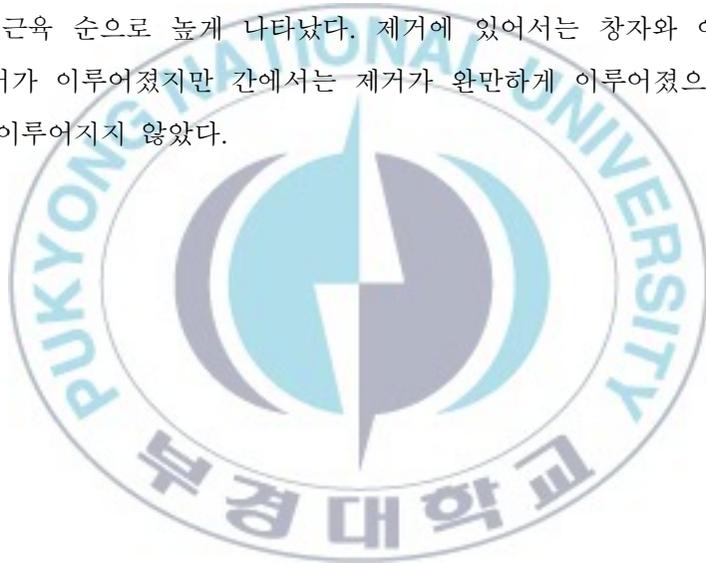
대조구와 각 실험구 사이의 통계학적 유의성은 SPSS 통계 프로그램 (SPSS Inc.)을 이용하여 ANOVA test를 실시한 후 P 값이 0.05 미만일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.



### Ⅲ 결과

#### 1. Bioaccumulation 분석

아연의 생체내 축적은 Fig 1~4. 에 나타내었다. 아연의 생체 내 축적은 간>창자>아가미>근육 순으로 높게 나타났다. 제거에 있어서는 창자와 아가미에서는 급격한 제거가 이루어졌지만 간에서는 제거가 완만하게 이루어졌으며 근육에서는 제거가 이루어지지 않았다.



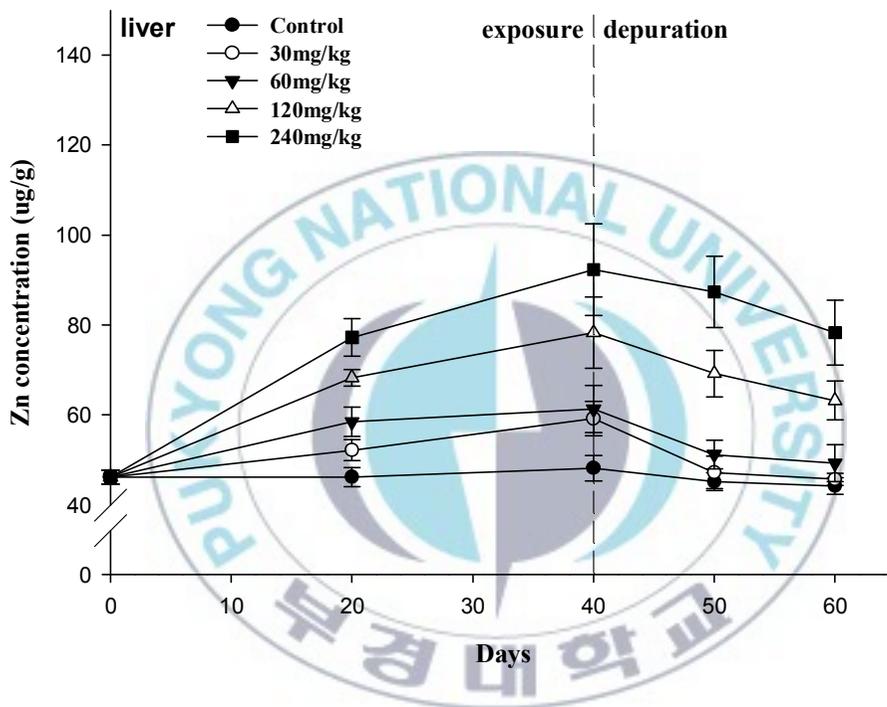


Fig 1. Changes of Zn Concentration (ug/g) in liver of Rock bream, *Oplegnathus faasciatus* exposed dietary Zn for 40 days, Followed by a depuration period of 20 days. Values with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

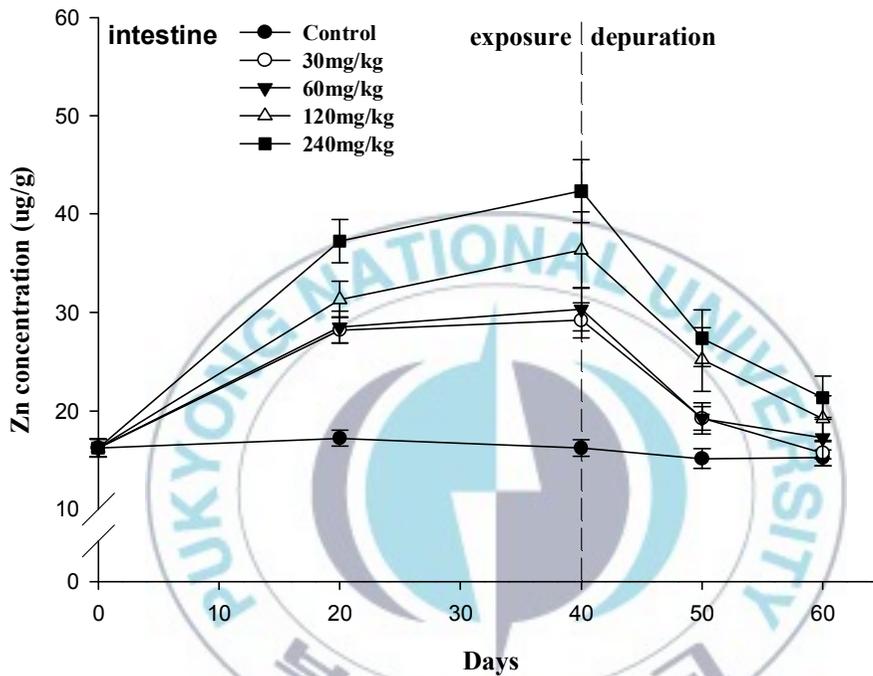


Fig 2. Changes of Zn Concentration (ug/g) in intestine of Rock bream, *Oplegnathus fasciatus* exposed dietary Zn for 40 days, Followed by a depuration period of 20 days. Values with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

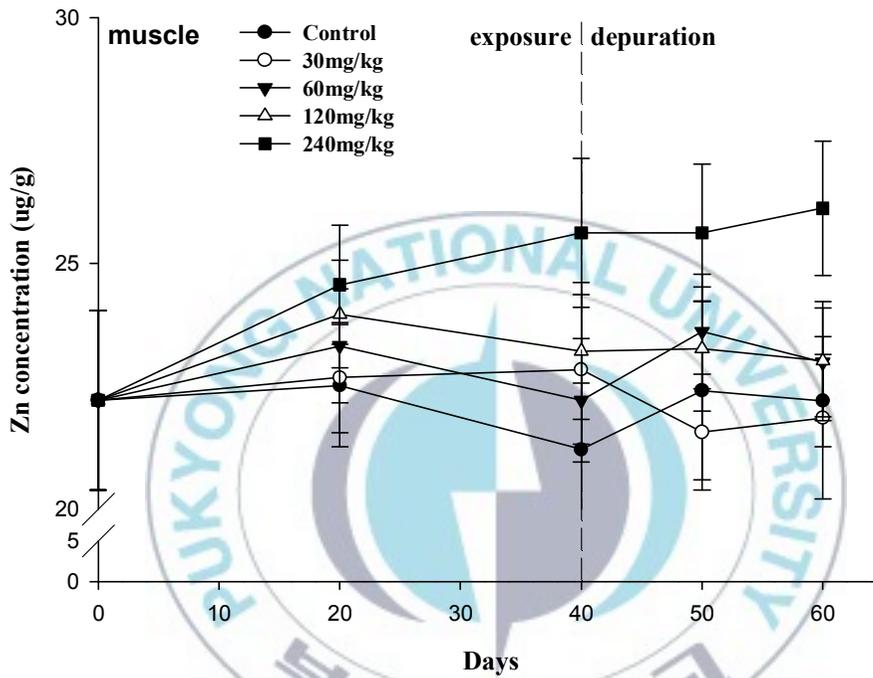


Fig 3. Changes of Zn Concentration (ug/g) in muscle of Rock bream, *Oplegnathus faasciatus* exposed dietary Zn for 40 days, Followed by a depuration period of 20 days. Values with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

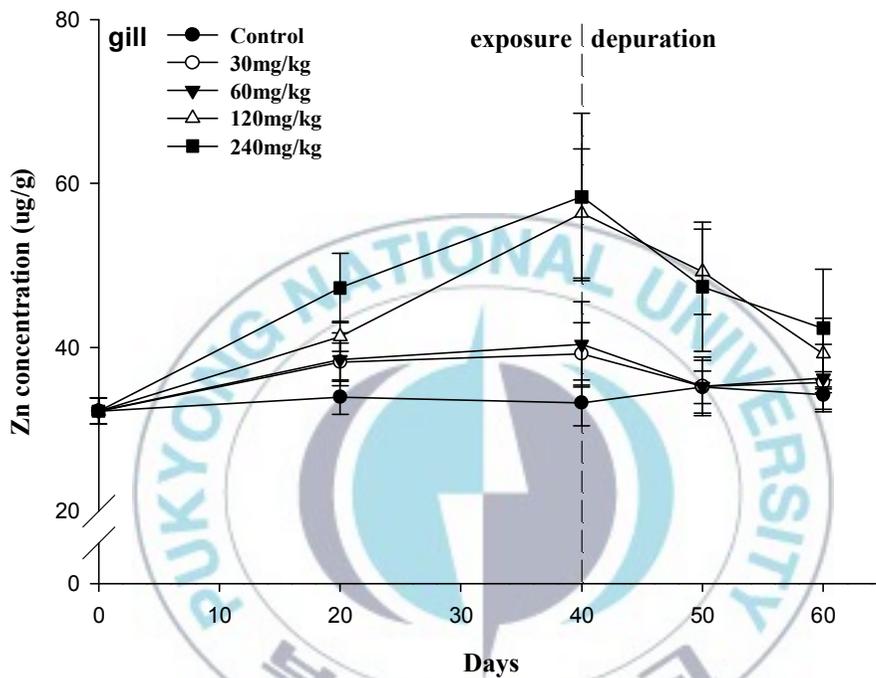


Fig 4. Changes of Zn Concentration (ug/g) in gill of Rock bream, *Oplegnathus faasciatus* exposed dietary Zn for 40 days, Followed by a depuration period of 20 days. Values with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

## 2. 성장에 미치는 영향

전장 및 체중의 성장률과 사료효율은 Fig. 5~7에 나타내었다. 성장률은 0-20, 20-40, 40-50, 50-60일로 나타내었으며 체장 성장률은 실험기간동안 전 구간에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 하지만 체중 성장률은 대조구에 비하여 아연을 첨가한 사료를 급여한 전 구간에서 유의한 증가를 보였다. 유의한 증가는 아연을 첨가한 사료를 섭취한 40일까지 계속되었으며 아연을 첨가한 사료를 주지 않은 50일과 60일에는 전 구간에서 대조구와 비슷한 성장률을 보였다. 사료효율은 체중 성장율에 비례하여 유의하게 증가하였다. 비만도지수와 간중량지수는 Table 3에 나타내었으며 뚜렷한 경향을 보이지 않았다.



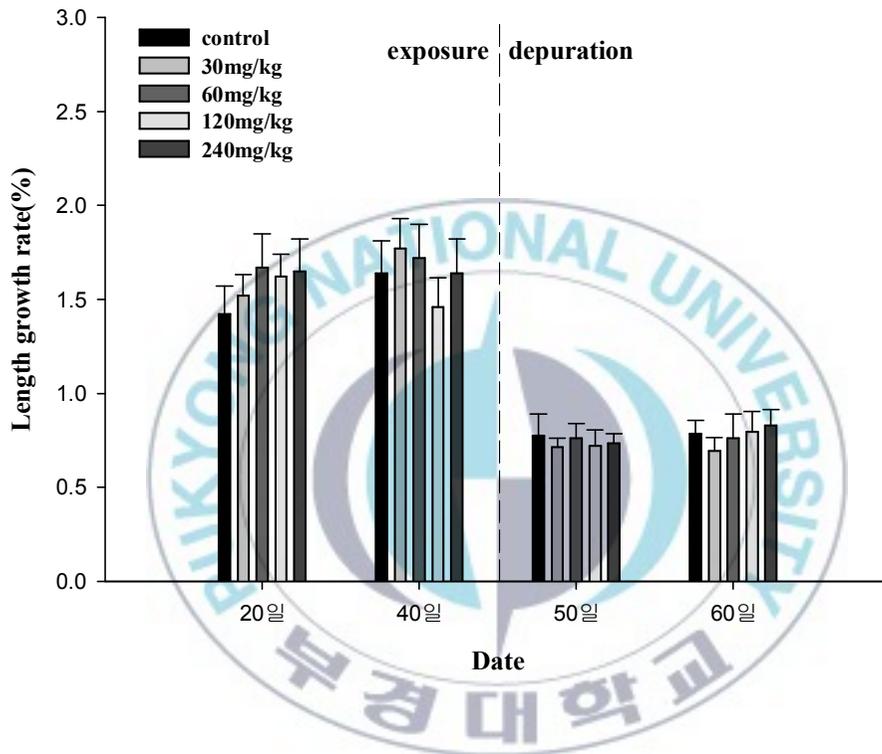


Fig. 5. Changes of Length growth rate (%) of Rock bream, *Oplegnathus faasciatus* exposed dietary Zn for 40 days, Followed by a depuration period of 20 days. Values with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

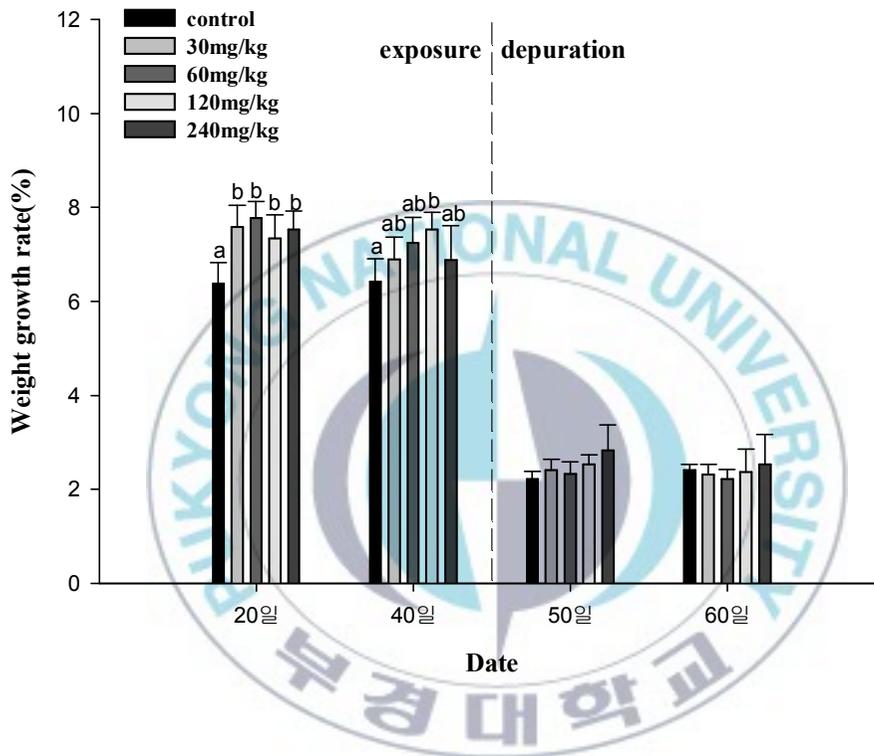


Fig. 6. Changes of Weight growth rate (%) of Rock bream, *Oplegnathus faasciatus* exposed dietary Zn for 40 days, Followed by a depuration period of 20 days. Values with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

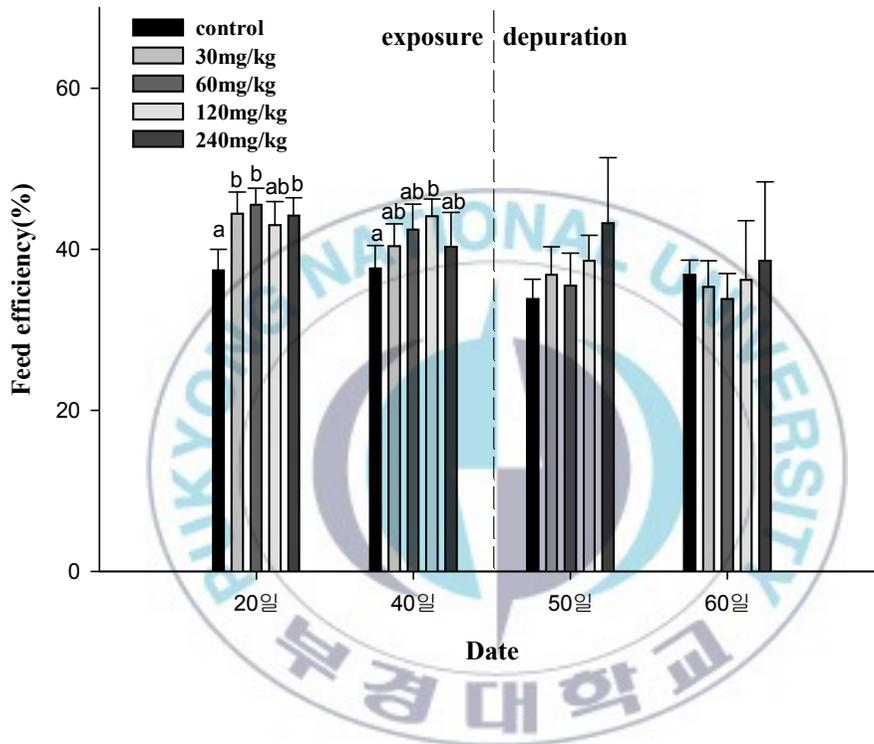


Fig. 7. Changes of Feed efficiency (%) of Rock bream, *Oplegnathus fasciatus* exposed dietary Zn for 40 days, Followed by a depuration period of 20 days. Values with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

Table 3. Changes of Condition factor and liver Somatic Index of Rock bream, *Oplegnathus faasciatus* exposed dietary Zn for 40 days, Followed by a depuration period of 20 days.

| Parameter | Time (day) | Zn concentration (mg/kg) |            |            |            |            |
|-----------|------------|--------------------------|------------|------------|------------|------------|
|           |            | 0                        | 30         | 60         | 120        | 240        |
| CF (%)    | 20         | 350.2±22.4               | 341.7±31.7 | 299.8±41.7 | 332.6±39.2 | 317.5±29.4 |
|           | 40         | 341.2±35.6               | 313.7±42.1 | 348.4±28.9 | 327.8±33.7 | 283.7±31.2 |
|           | 50         | 293.8±31.4               | 322.7±26.8 | 247.2±25.9 | 314.1±30.2 | 294.7±34.1 |
|           | 60         | 314.5±23.7               | 247.7±36.7 | 327.2±21.7 | 289.1±31.4 | 301.5±24.1 |
| LSI (%)   | 20         | 9.0±0.7                  | 8.3±1.2    | 7.2±1.4    | 9.1±0.7    | 8.8±0.7    |
|           | 40         | 8.4±1.2                  | 8.6±1.1    | 8.1±0.8    | 7.7±1.4    | 8.3±1.3    |
|           | 50         | 8.8±0.9                  | 7.9±1.0    | 9.1±1.1    | 8.4±1.3    | 8.1±0.8    |
|           | 60         | 8.7±1.1                  | 8.9±1.2    | 7.9±0.7    | 8.2±0.8    | 7.9±0.5    |

Values are mean±S.E. Values with different superscript are significantly different (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

### 3. 혈액성상

Zn 노출에 따른 혈액의 성상의 변화를 알기 위하여 적혈구 수, Hb 및 Hct를 측정 한 결과는 Table 4에 나타내었다. 적혈구 수 와 Hb, Hct에서는 유의한 변화가 나타나지 않았다.



Table 4. Changes of Haematological paramatter of Rock bream, *Oplegnathus faasciatus* exposed dietary Zn for 40 days, Followed by a depuration period of 20 days.

| Parameter                               | Time (day) | Zn concentration (mg/kg) |                  |                  |                  |                  |
|---|------------|--------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|   |            | 0                        | 30               | 60               | 120              | 240              |
| RBC count ( $\times 10^4 \text{mm}^3$ ) | 20         | 350.2 $\pm$ 22.4         | 341.7 $\pm$ 31.7 | 299.8 $\pm$ 41.7 | 332.6 $\pm$ 39.2 | 317.5 $\pm$ 29.4 |
|   | 40         | 341.2 $\pm$ 35.6         | 313.7 $\pm$ 42.1 | 348.4 $\pm$ 28.9 | 327.8 $\pm$ 33.7 | 283.7 $\pm$ 31.2 |
|   | 50         | 293.8 $\pm$ 31.4         | 322.7 $\pm$ 26.8 | 247.2 $\pm$ 25.9 | 314.1 $\pm$ 30.2 | 294.7 $\pm$ 34.1 |
|   | 60         | 314.5 $\pm$ 23.7         | 247.7 $\pm$ 36.7 | 327.2 $\pm$ 21.7 | 289.1 $\pm$ 31.4 | 301.5 $\pm$ 24.1 |
| Ht (%)                                  | 20         | 46.0 $\pm$ 4.0           | 47.0 $\pm$ 3.0   | 46.0 $\pm$ 0.8   | 41.0 $\pm$ 1.5   | 44.3 $\pm$ 2.8   |
|   | 40         | 47.1 $\pm$ 1.2           | 49.8 $\pm$ 0.9   | 47.8 $\pm$ 2.3   | 48.8 $\pm$ 5.5   | 48.5 $\pm$ 3.4   |
|   | 50         | 49.7 $\pm$ 1.8           | 44.2 $\pm$ 0.7   | 43.6 $\pm$ 1.2   | 44.5 $\pm$ 4.5   | 42.5 $\pm$ 1.5   |
|   | 60         | 48.2 $\pm$ 1.3           | 46.6 $\pm$ 1.1   | 43.2 $\pm$ 0.9   | 45.5 $\pm$ 1.8   | 42.9 $\pm$ 2.9   |
| Hb (g/dL)                               | 20         | 9.0 $\pm$ 0.7            | 8.3 $\pm$ 1.2    | 7.2 $\pm$ 1.4    | 9.1 $\pm$ 0.7    | 8.8 $\pm$ 0.7    |
|   | 40         | 8.4 $\pm$ 1.2            | 8.6 $\pm$ 1.1    | 8.1 $\pm$ 0.8    | 7.7 $\pm$ 1.4    | 8.3 $\pm$ 1.3    |
|   | 50         | 8.8 $\pm$ 0.9            | 7.9 $\pm$ 1.0    | 9.1 $\pm$ 1.1    | 8.4 $\pm$ 1.3    | 8.1 $\pm$ 0.8    |
|   | 60         | 8.7 $\pm$ 1.1            | 8.9 $\pm$ 1.2    | 7.9 $\pm$ 0.7    | 8.2 $\pm$ 0.8    | 7.9 $\pm$ 0.5    |

Values are mean $\pm$ S.E. Values with dtfferent superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

## 4. 혈청성분

혈청성분의 결과를 Table 5-6. 에 나타내었다.

아연 노출 후 혈청내 무기성분인 칼슘, 마그네슘에 대해서 측정하였으나 유의적인 변화는 관찰할 수 없었다.

유기성분인 혈당 및 총단백질, 중성지방에 대한 조사에는 혈당은 20일 40일째에 전구간에서 감소하는 경향을 보였으나 유의성이 인정되지 않았고, 아연의 섭취를 중지한 50일과 60일째에서도 전 구간에서 감소하는 경향을 보였으나 마찬가지로 유의성이 인정되지 않았으며, 높은 농도의 Zn을 첨가할수록 더 감소하는 경향이 두드러졌다. 총 단백질은 20일째에 120, 240mg/kg에서 감소하는 경향을 보였으나 40일째에는 각 구간별 유의성이 없었고 50일째는 60-240mg/kg구간에서 감소하는 경향을 보였으나 유의적이지 않았으며 60일째에는 유의적인 증가를 보였다. 중성지방은 아연을 섭취한 20-40일에는 유의한 변동이 없었으나 아연의 섭취를 중지한 50과 60일에는 유의한 감소가 확인되었다.

GOT, GPT, ALP, LDH의 효소활성의 변동은 GOT와 GPT에서는 유의한 변화가 확인되지 않았다. ALP는 20일에는 30-120mg/kg에서 증가의 양상을 보였으나 유의성이 인정되지 않았으며 40일째에는 30-240mg/kg에서 유의한 증가가 확인되었다. 50일과 60일에는 ALP가 감소하여 전 구간에서 유의한 감소가 확인되었다. LDH는 20일째에 전 구간에서 유의한 감소가 확인되었지만 40, 50, 60일에는 유의한 변화를 보이지 않았다.

Table 5. Changes of inorganic and organic paramatter of Rock bream, *Oplegnathus faasciatus* exposed dietary Zn for 40 days, followed by a depuration period of 20 days.

| Parameter            | Time (day) | Zn concentration (%/kg) |                         |                          |                          |                          |
|----------------------|------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                      |            | Control                 | 30                      | 60                       | 120                      | 240                      |
| Calcium (mg/dL)      | 20         | 13.8±1.0                | 14.5±0.7                | 14.3±0.5                 | 12.9±0.8                 | 13.1±0.3                 |
|                      | 40         | 13.2±0.5                | 14.4±0.4                | 15.1±0.8                 | 15.5±1.5                 | 13.3±0.9                 |
|                      | 50         | 13.4±0.8                | 11.3±1.2                | 12.6±0.6                 | 13.0±0.8                 | 12.5±1.0                 |
|                      | 60         | 12.2±2.4                | 13.8±1.9                | 11.2±1.0                 | 10.9±1.1                 | 10.7±1.2                 |
| Magnesium (mg/dL)    | 20         | 3.27±0.05               | 3.31±0.09               | 3.25±0.09                | 3.00±0.06                | 3.10±0.10                |
|                      | 40         | 3.12±0.03               | 3.06±0.06               | 3.14±0.06                | 3.20±0.17                | 3.16±0.04                |
|                      | 50         | 3.12±0.07               | 3.12±0.14               | 2.99±0.11                | 3.05±0.03                | 3.11±0.10                |
|                      | 60         | 2.82±0.15               | 2.88±0.04               | 2.88±0.02                | 2.72±0.12                | 2.83±0.08                |
| Glucose (mg/dL)      | 20         | 101.1±8.9               | 101.5±14.0              | 95.7±13.4                | 97.3±15.0                | 90.8±9.5                 |
|                      | 40         | 140.0±13.3              | 125.1±24.0              | 137.2±13.7               | 123.1±8.8                | 113.4±26.4               |
|                      | 50         | 103.0±7.5               | 92.4±12.5               | 88.0±10.4                | 85.2±8.1                 | 80.2±11.8                |
|                      | 60         | 74.5±11.9               | 70.6±2.9                | 57.5±8.3                 | 59.6±8.9                 | 56.5±6.3                 |
| Total protein (g/dL) | 20         | 3.78±0.52               | 4.48±0.70               | 4.26±0.53                | 2.90±0.75                | 3.07±0.29                |
|                      | 40         | 3.22±0.46               | 4.37±0.40               | 4.10±0.83                | 4.46±0.54                | 3.26±0.90                |
|                      | 50         | 3.36±0.75               | 3.35±1.20               | 2.54±0.62                | 3.04±0.76                | 2.47±0.99                |
|                      | 60         | 2.95±0.14 <sup>a</sup>  | 2.35±0.90 <sup>b</sup>  | 2.87±0.60 <sup>ab</sup>  | 3.92±0.40 <sup>b</sup>   | 3.67±0.78 <sup>ab</sup>  |
| Triglyceride (mg/dL) | 20         | 222.7±20.8              | 259.7±24.9              | 206.0±15.2               | 200.7±14.6               | 211.8±23.3               |
|                      | 40         | 234.6±21.6              | 256.0±13.7              | 195.7±33.2               | 199.0±30.7               | 174.4±38.9               |
|                      | 50         | 183.8±27.4 <sup>a</sup> | 136.2±22.3 <sup>b</sup> | 215.8±35.1 <sup>a</sup>  | 194.8±26.7 <sup>a</sup>  | 135.1±42.6 <sup>ab</sup> |
|                      | 60         | 197.7±11.0 <sup>a</sup> | 148.1±21.4 <sup>b</sup> | 165.3±29.3 <sup>ab</sup> | 170.2±10.4 <sup>ab</sup> | 151.6±17.0 <sup>ab</sup> |

Values are mean±S.E. Values with dtfferent superscript are significantly different (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

Table 6. Changes of enzymes paramatter of Rock bream, *Oplegnathus fasciatus* exposed dietary Zn for 40 days, followed by a depuration period of 20 days.

| Parameter  | Time (day) | Zn concentration (%/kg) |                         |                         |                        |                        |
|------------|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
|            |            | Control                 | 30                      | 60                      | 120                    | 240                    |
| GOT (KU)   | 20         | 56.04±8.32              | 58.22±7.78              | 57.28±3.74              | 57.36±2.94             | 55.00±6.46             |
|            | 40         | 56.00±5.70              | 65.14±5.94              | 53.48±5.14              | 56.93±5.56             | 52.43±0.50             |
|            | 50         | 51.64±2.20              | 48.93±2.10              | 43.70±3.37              | 44.46±4.13             | 47.21±3.21             |
|            | 60         | 52.85±6.16              | 53.43±2.64              | 52.14±5.0               | 50.70±5.55             | 51.26±3.17             |
| GPT (KU)   | 20         | 32.31±2.88              | 33.78±4.28              | 30.29±3.00              | 36.18±3.13             | 35.98±2.85             |
|            | 40         | 31.50±1.49              | 34.14±1.53              | 27.36±2.56              | 28.64±3.42             | 30.93±1.40             |
|            | 50         | 26.68±1.78              | 25.83±3.25              | 30.74±0.93              | 27.12±1.23             | 27.57±3.36             |
|            | 60         | 29.46±1.46              | 27.90±3.02              | 25.38±3.45              | 26.35±3.45             | 27.50±1.94             |
| ALP (K-A)  | 20         | 10.1±1.1                | 12.3±1.5                | 11.8±1.4                | 10.8±2.0               | 8.2±1.3                |
|            | 40         | 12.3±1.2 <sup>a</sup>   | 15.8±2.2 <sup>b</sup>   | 13.5±1.7 <sup>ab</sup>  | 12.5±2.1 <sup>ab</sup> | 11.9±2.5 <sup>ab</sup> |
|            | 50         | 11.6±1.3 <sup>a</sup>   | 9.7±1.4 <sup>ab</sup>   | 7.0±1.7 <sup>b</sup>    | 7.9±1.3 <sup>b</sup>   | 8.8±1.2 <sup>b</sup>   |
|            | 60         | 12.9±1.2 <sup>a</sup>   | 8.7±1.6 <sup>b</sup>    | 8.1±1.1 <sup>b</sup>    | 10.7±2.6 <sup>ab</sup> | 8.3±1.2 <sup>b</sup>   |
| LDH (IU/L) | 20         | 107.7±7.7 <sup>a</sup>  | 99.5±8.16 <sup>ab</sup> | 89.4±12.3 <sup>ab</sup> | 82.5±12.7 <sup>b</sup> | 80.6±10.4 <sup>b</sup> |
|            | 40         | 105.4±17.4              | 121.2±13.7              | 94.3±14.1               | 105.2±5.9              | 103.6±9.9              |
|            | 50         | 107.0±15.2              | 117.6±14.0              | 116.2±11.1              | 115.2±18.0             | 107.7±21.4             |
|            | 60         | 101.9±12.8              | 107.0±16.9              | 103.9±10.4              | 109.1±15.2             | 104.5±14.2             |

Values are mean±S.E. Values with dtfferent superscript are significantly different (P<0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

## 5. 생화학적분석

### Superoxide dismutase(SOD) activity

간과 아가미의 SOD를 Fig 8~9.에 나타내었다. 간에서는 20일과 40일에서 30-240mg/kg 구간에서 유의적인 증가를 확인할 수 있었고 50일은 증가한 양상은 있었으나 유의성은 없었으며 60일째는 대조구와 차이를 보이지 않았다. 아가미에서는 20일째 120, 240mg/kg 구간에서 유의적인 증가를 보였고 40일째는 60mg/kg에서도 증가하는 양상을 보였으나 유의성이 인정되지 않았다. 50일째는 240mg/kg에서만 약간의 증가가 보였고 나머지 구간에서는 대조구와 유사했으며 60일째에는 모든 구간이 대조구와 비슷했다.

### Glutathione(GSH) level

간과 아가미의 GSH는 Fig 10~11.에 나타내었다. 간에서의 GSH level은 20, 40일에 전구간에서 증가하였으며 50일에서는 240mg/kg에서 대조구에 비해 증가하는 양상을 보였으나 유의성이 인정되지 않았으며 60일은 대조구와 유의한 차이가 없었다. 아가미에서는 20일에 120, 240mg/kg에서 유의한 증가가 있었으며 40일에는 60-240mg/kg에서 유의한 증가를 관찰할 수 있었다. 50일과 60일은 대조구와 유의한 차이를 발견할 수 없었다.

## Glutathione peroxidase(GPX)

간과 아가미의 GPX는 Fig 12~13.에 나타내었다. 간에서는 20일의 30-120mg/kg 구간에서 유의적인 증가를 확인할 수 있었고 240mg/kg은 대조구와 유의한 변화가 보이지 않았지만 30-120과도 연관되어 있었다. 40일에는 30-120mg/kg에서만 유의한 증가를 보였다. 50일과 60일은 대조구와 유사하였다. 아가미는 20, 40일의 60-240mg/kg 구간에서 유의적인 증가를 보였고 40일에서는 30mg/kg에서도 증가하는 경향을 보였으나 대조구와 유의성이 인정되지 않았다. 50일과 60일 구간에서는 대조구와 비교하였을 때 유사하게 나타났다.



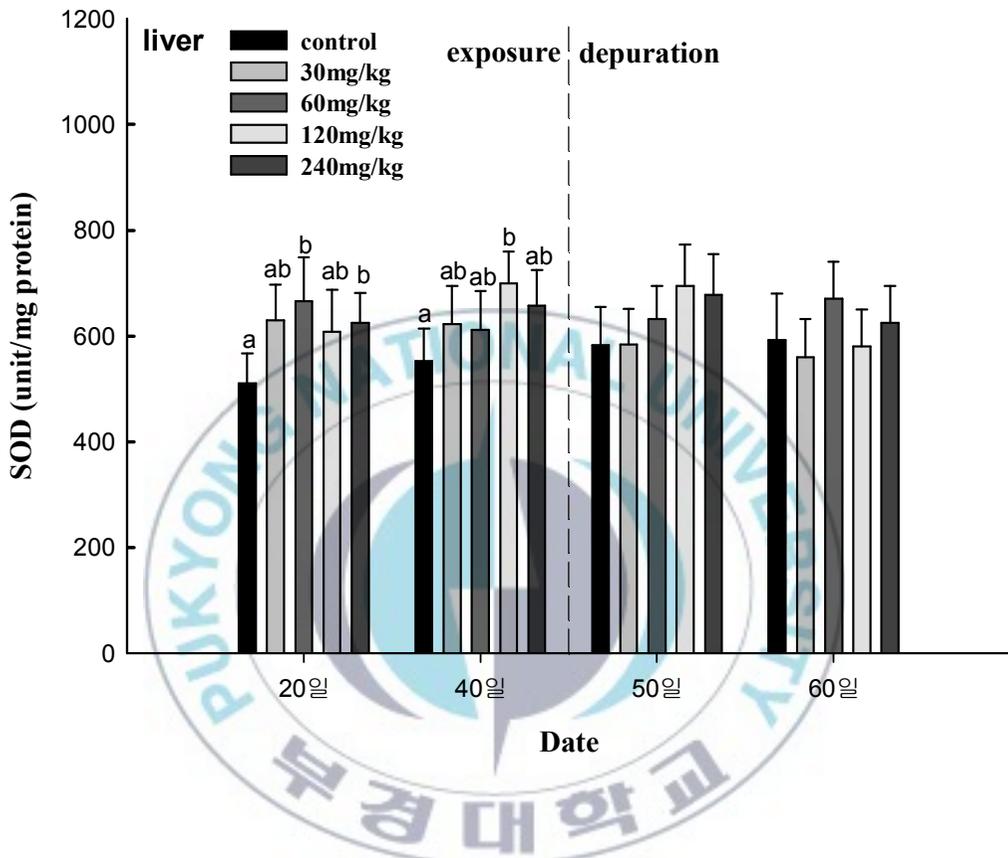


Fig. 8. Changes of SOD (unit/mg protein) in liver of Rock bream, *Oplegnathus faasciatus* exposed dietary Zn for 40 days, Followed by a depuration period of 20 days. Values with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

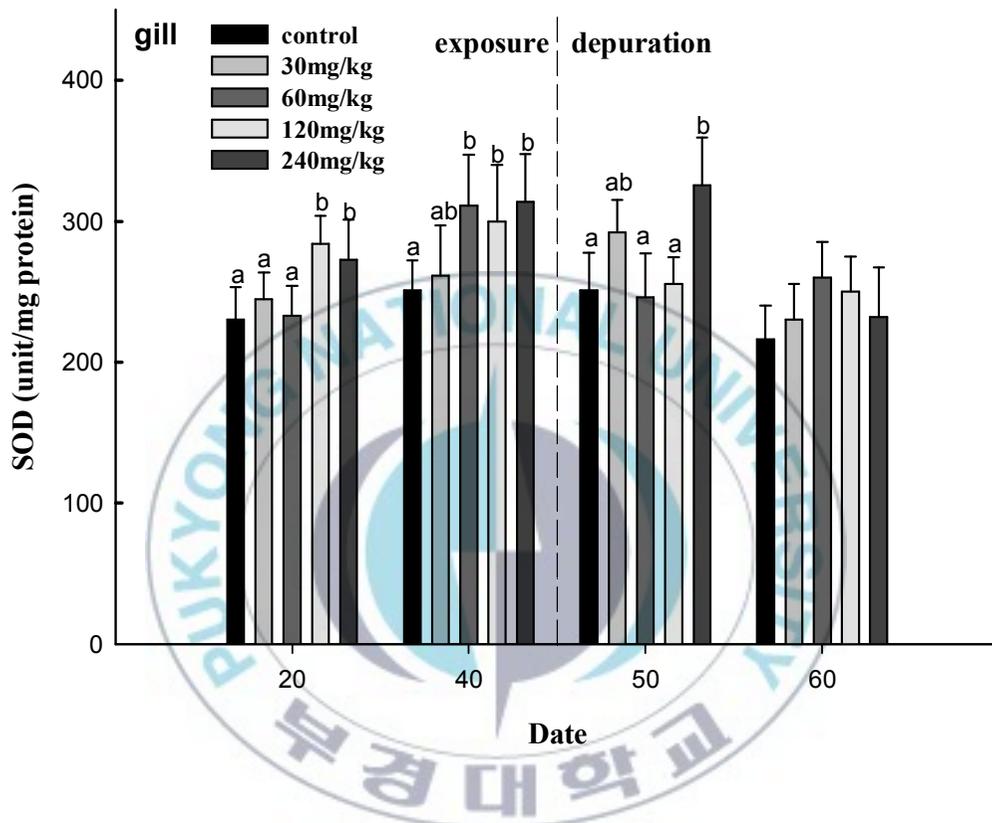


Fig 9. Changes of SOD (unit/mg protein) in gill of Rock bream, *Oplegnathus faasciatus* exposed dietary Zn for 40 days, Followed by a depuration period of 20 days. Values with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

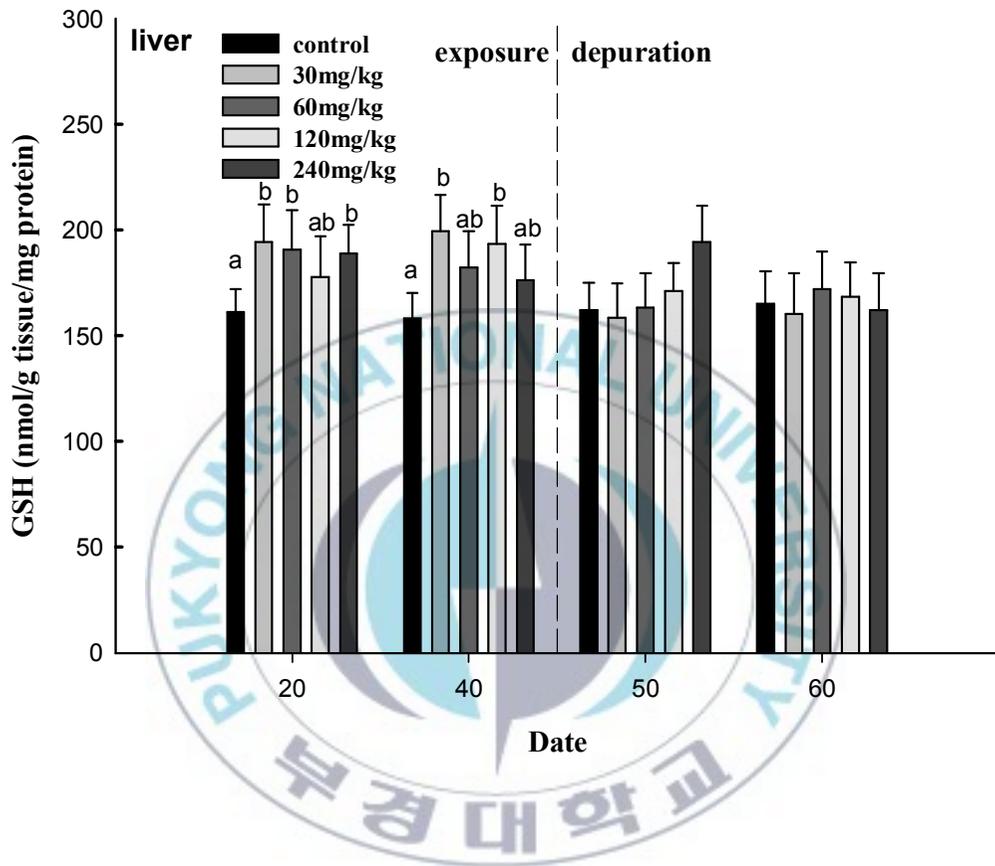


Fig. 10. Changes of GSH (nmol/g tissue/mg protein) in liver of Rock bream, *Oplegnathus faasciatus* exposed dietary Zn for 40 days, Followed by a deuration period of 20 days. Values with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

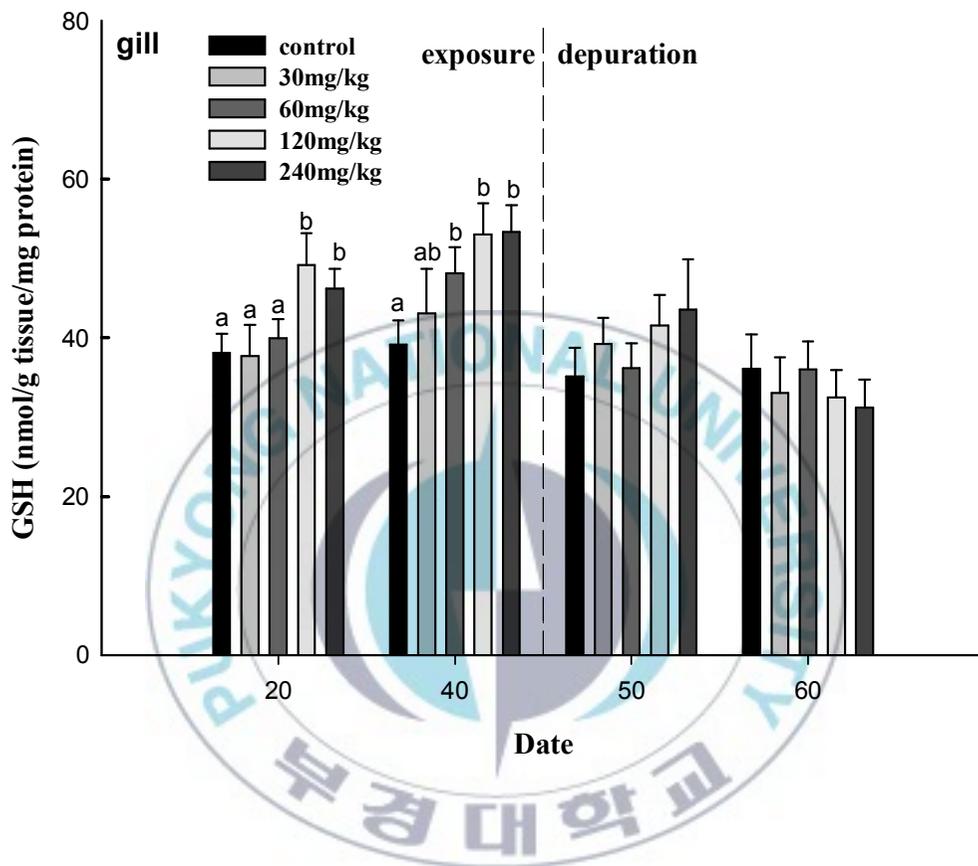


Fig. 11. Changes of GSH (nmol/g tissue/mg protein) in gill of Rock bream, *Oplegnathus faasciatus* exposed dietary Zn for 40 days, Followed by a depuration period of 20 days. Values with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

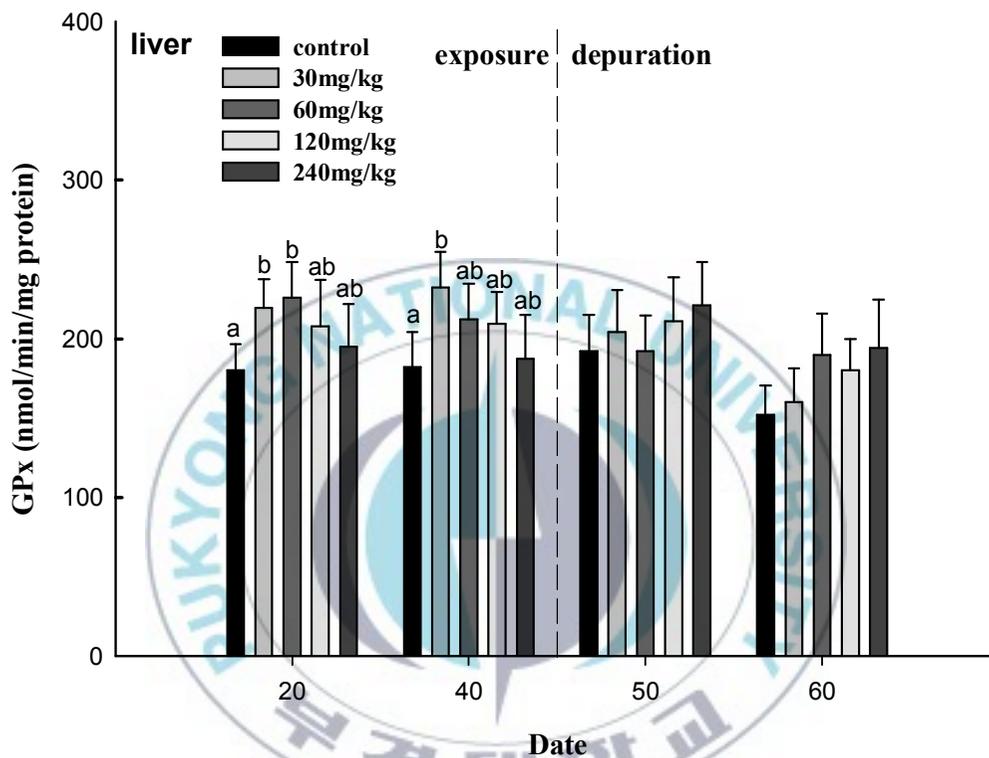


Fig 12. Changes of GPx (nmol/g tissue/mg protein) in liver of Rock bream, *Oplegnathus faasciatus* exposed dietary Zn for 40 days, Followed by a depuration period of 20 days. Values with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

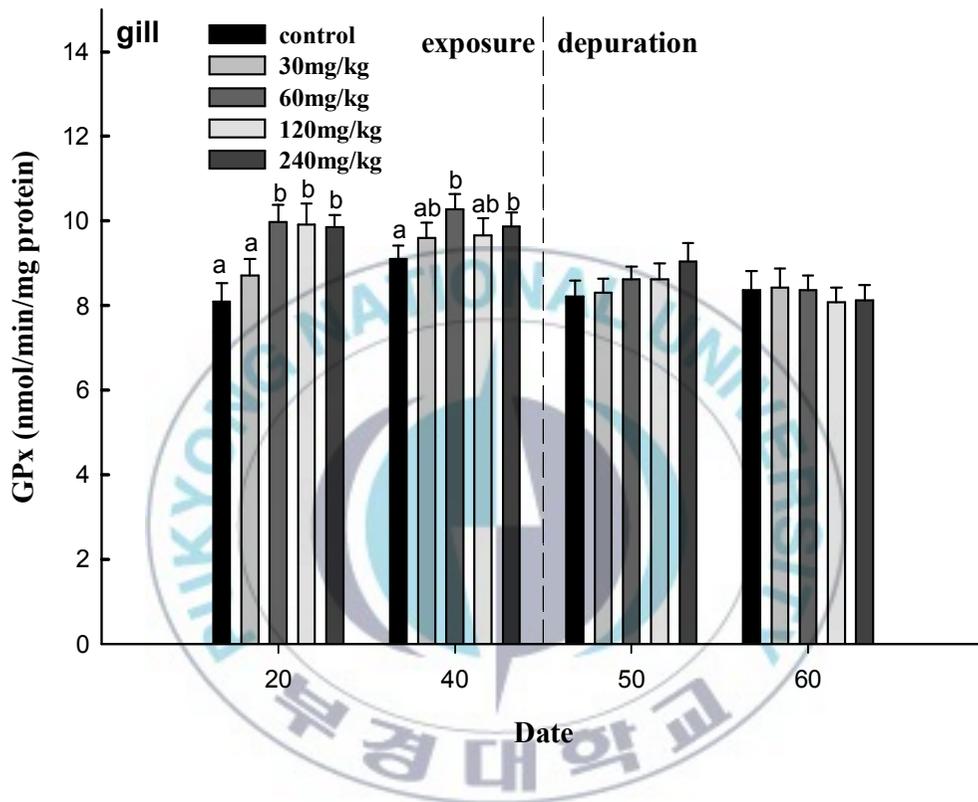


Fig 13. Changes of GPx (nmol/g tissue/mg protein) in gill of Rock bream, *Oplegnathus faasciatus* exposed dietary Zn for 40 days, Followed by a depuration period of 20 days. Values with different superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

## 6. 간조직의 관찰

간조직은 전구간에서 일부 세포에서의 핵탈락이 확인되었으며 염색중 지방조직이 녹음으로 인하여 염색이 되지 않은 백색부분이 많이 발견되었으나 대체적으로 정상이었다. (Fig. 14)



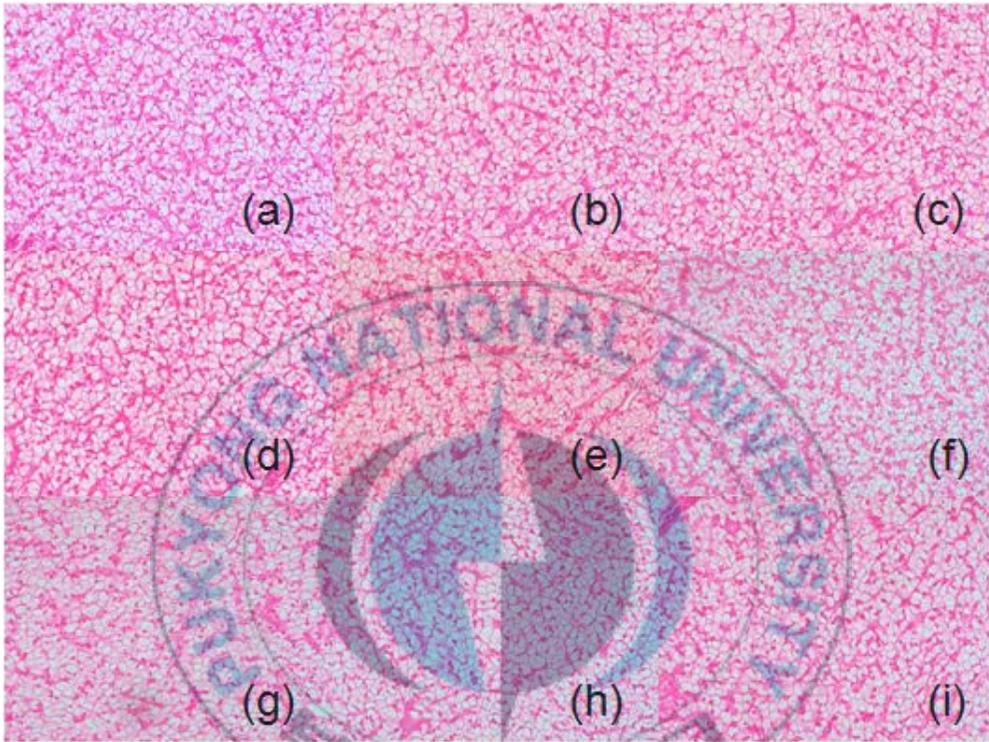


Fig 14. Histological changes of liver in Rock bream, *Oplegnathus fasciatus* exposed dietary Zn. (A)Control. ; (B) Dietary Zn 30mg/kg/20days ; (C) Dietary Zn 60mg/kg/20days ; (D) Dietary Zn 240mg/kg/20days ; (E) Control/40days ; (F) Dietary Zn 30mg/kg/40days ; (G) Dietary Zn 60mg/kg/40days ; (H) Dietary Zn 120mg/kg/40days ; (I) Dietary Zn 240mg/kg/20days

## IV 고찰

아연이 생체 내에 미치는 영향은 많은 척추동물들을 대상으로 연구되어 왔다. 어류에게 있어서 아연은 미량원소임에도 불구하고 타 미네랄보다 사료의 미네랄에 더 의존적일 수 있다(이상민 and 방승렬 1998). 아연으로 인한 어체 내의 문제는 아연의 결핍으로 인한 것이 대부분이다. 그렇기 때문에 결핍에 관련해서 여러 가지 연구가 진행되어 왔지만 어체 내 아연이 과잉되었을 때에 야기되는 문제에 있어서는 많이 알려져 있지 않다. 아연은 필수미네랄이기도 하지만 중금속이기도하다. 중금속이란 비중이 4~5이상인 금속을 말하는 것으로 중금속은 비록 미량일지라도 수중생물에 농축, 축적이 가능하며 먹이연쇄를 통해 인체에까지 영향을 미치므로 중금속에 의한 수서생물의 오염은 인류의 공중보건에 직결되는 심각한 문제이며 (Friverg and Vostal, 1972) 중금속의 축적은 자연 상태의 어류에 있어서 중요한 오염경로가 되기 때문에(Dallinger and Kautzky, 1985) 중금속인 아연이 과량으로 어체 내에 유입되었을 시 미치는 영향에 대한 연구는 중요하며 때문에 아연이 과량 유입되었을 시 어체 내 반응에 대한 연구 또한 매우 중요하다.

일반적으로 필수적인 금속들은 비필수적인 금속들에 비해서 체내 영양분 저장처에 적게 농축된다 (Heath, 1987). 먹이를 통하여 이루어지는 아연의 체내 흡수는 장을 통하여 이루어진다. 이곳에서 흡수되어진 아연은 피를 통하여 아가미, 근육, 간, 신장으로 이동하여 축적되게 된다. 또한 제거는 신장을 통하여 오줌으로 배출되거나 장에서 배설물로 또는 아가미에서 배출된다. 아연의 생체 내 축적은 간>장>아가미>근육 순으로 나타났다. 제거에 있어 창자와 아가미에서는 급격한 감소가 일어났고 간에서는 완만한 감소가, 근육에서는 제거가 거의 이루어지

지 않았다. 생체 내 필요한 미네랄(ex. Zn, Cu, Cr)의 경우 그렇지 않은 그룹보다(Pb, Cd) 간에서 더 많은 양이 축적되는 것이 특징이다. 아연은 필수미네랄로서 장보다 간에 더 많은 양이 축적되었다. 본 실험에서는 간, 장, 아가미, 근육의 전체 시료에서 완만한 증가가 보이고 독성 영향이 올 정도로 많은 양을 공급했을 때 나타날 수 있는 급격한 증가 곡선이 보이지 않았으며 식육부위인 근육에 있어서는 120mg/kg까지 축적이 이루어지지 않은 것으로 보인다. 제거양상을 볼 때 장과 아가미에서는 제거 20일째에 대조구와 비교할 때 거의 차이를 보이지 않을 정도로 감소되는 것이 확인되었으며 또한 원상태까지 감소되지 않은 간도 다소 감소하는 경향을 보였다. 다만 근육에서는 제거의 양상이 보이지 않았다. 제거의 양상을 볼 때 아연의 축적은 장과 아가미에서는 원활하게 이루어지는 것으로 보이며 간에서도 시간을 두고 관찰하였을 때 유의한 감소를 확인할 수 있을 것으로 보이며, 제거 시 사용한 사료는 Zn을 완전히 제거하지 않은 사료를 사용하였기 때문에 완전한 제거의 양상을 파악하기 위해서는 Zn을 완전히 배제한 사료를 사용함으로써 제거의 양상을 파악하는 실험이 필요할 것으로 생각한다.

본 실험에서 돌돔에게 먹인 사료량은 10~30g사이의 돌돔의 경우 19℃에서 최대 어체중의 2.29%(최대 2.40%)의 먹이를 먹는다는 보고(김경민, 2008)가 있었으나 본 실험에서는 30L들이 유리 수조에서 실험하였고 사료에 임의로 Zn을 첨가하였으며 겨울에 실험을 실시하였기 때문에 2.29%보다 적은 어체중의 1%의 사료를 급이하였다.

담수어의 Zn 요구량은 15~30mg/kg diet수준으로 알려져 있으며 아연이 결핍되었을 시 성장이 감소하고 심한 경우 폐사할 수 있으며(Ogino and Yang 1978, 1979; Gatin and Wolson, 1983; McClanin and Gatlin, 1988 Gatlin and Wilson 1983) 다른 P, Ca, Mg, Fe, K, Mn, Se와 같은 미네랄들에 비해 결핍 시 성장에 큰 영향을 미친다(이상민 et al. 1998). 아연은 DNA와 RNA의 합성

과 세포분열을 촉진시킴으로써 성장에 영향을 주는데 보통 결핍 시에 성장의 장애를 일으키는 것으로 알려져 있다. 아연은 신체의 성장 및 발달에 중요한 미량 원소로서 세포의 증식과 면역체계의 발달에 관여하며 성장기의 성장과 발달에 관여한다(Brown 2003, Nishi 1996). 아연은 특히 IGF-1, IGFBP-3의 작용을 강화하고 단백질, phosphorus 등과 더불어 IGF-1 및 IGFBP-3의 합성에 필요한 기질을 형성한다(Solomons et al 1976, Martorell 2002, Imamoglu et al 2005). 또한 알카리성 인산분해효소의 합성 및 뼈 조직 안에서의 활성화도 강화하여 전반적인 뼈와 조직의 성장에 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다(Doherty et al 2002, Neve 1992, Butrimovitz and Purdy 1978). 아연의 수준별 급이에 따른 성장률의 변화에 대한 연구는 많이 진행되어 왔지만 어류에 대한 연구는 부족한 실정이다. Cox등(1960)의 보고에 의하면 흰쥐에게 과량의 Zn을 첨가시킨 식이로 8주간 사육결과 대조군에 비해 증체량이 유의하게 감소되었고, Magee등(1960)도 4~6주된 흰 쥐에게 5주간 과량의 Zn을 첨가시킨 식이로 사육한 결과 Zn 수준이 높을수록 증체량이 감소된다고 보고하였다. 하지만 반대의 경우도 있는데 Jo and Kim(1994)에 의하면 쥐의 경우 식이효율은 정상군에 비하여 과잉군이 다소 증가하는 경향은 있었으나 유의적이지는 않았고 아연의 수준의 변화 시 성장률에 영향이 없었다는 보고(Fisher et al., 1981)도 있다. 일반적으로 정상적인 성장을 보이는 경우 아연공급은 성장을 촉진시키지는 못하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 30-240mg/kg의 전 구간에서 성장률의 증가를 보였지만 각 구간간의 유의성은 없었다. 이러한 차이는 과잉군으로 설정한 농도의 차이에 있는 것으로 보인다. Magee등과 Cox들은 5000mg이상의 매우 높은 량의 아연을 첨가시킨 식이로 아연의 독성으로 인하여 증체량의 감소가 나타났다고 보고하였다. 하지만 비교적 낮은 1000 mg/kg이하로 과량 첨가한 Jo and Kim 이나 Fisher등의 실험에서는 본 실험의 결과와 같이 과량으로 갈수록 증체량의 감소가 나타나지 않았다. 아연의 결핍 시 성장률의 저하가 온다는

보고(Wallwork et al, 1981)에 따라 30-240mg/kg 구간에서 Control에 비하여 증체량이 증가된 본 실험에서는 Control에서 아연의 부족으로 인한 성장률의 감소가 있었던 것으로 생각된다. 체장 성장률에 있어서는 성장의 증가가 보이지 않았는데 이것은 30L의 유리 수조에 환수식으로 실험을 하였기 때문에 좁은 공간에서의 사육이 성장에 영향을 준 것으로 보이며 사료효율은 증체량과 관계가 있기 때문에 체중성장률의 증가에 따라서 증가하는 모습을 보였다.

혈액학적 지표들은 고농도의 금속을 노출시켰을 때 빠르게 반응한다. 이러한 반응은 스트레스원이 체내에 들어오거나 제거될 때 해독하거나 상쇄할 수 있으며, 그 활성은 일정기간 계속된다. 아연은 다른 중금속에 노출되었을 때 높아지는 GOT의 활성을 감소시키는 역할을 한다(Mitsure and Morita, 1992, Morita, 1984)고 알려져 있다. 본 실험에서 혈청의 분석결과 무기성분인 Ca와 Mg는 아무런 변화가 없었는데 이것은 아연의 공급수준이 혈중 Ca와 Mg에는 영향을 미치지 못한다고 하는 보고(Kang, 2000)와 부합된다. 유기성분인 혈당 및 총 단백질, 중성지방에 대한 조사에서 혈당은 전 구간에서 감소하는 경향을 보였지만 유의적이지는 않았다. 이것은 아연을 결핍 섭취 시 아연 보충군보다 유의적으로 혈당이 높게 나타났다는 보고(Boquist and Lemmark, 1989)와 다르게 나타났다. 아연과 인슐린은 기능과 구조에서 밀접한 관계가 있다는 것은 많은 연구에서 확인된 바 있으며(Coulson et al 1980, Levin et al 1983) 아연이 부족하면 면역반응성 인슐린과 insulin-like activity가 감소되고 혈청의 인슐린 농도도 감소되어 췌장에서 방출되는 인슐린의 양이 감소하게 되는데(Huber and Gershaff, 1978) 이로 인하여 Control 구간보다 혈당이 감소하는 효과가 나타난 것으로 생각되며 조금 더 긴 기간 동안 노출이 된다면 혈당의 유의한 감소가 나타날 것으로 보인다. 중성지방은 20-30일 구간에서는 유의적인 변화가 관찰되지 않았으나 50일과 60일에는 유의적인 변화가 나타났다. 하지만 50일의 변화는 유의성은 있으나 경향성은 보이지 않았고 60일에서는 전 구간에서 유의적으로

중성지방의 감소가 확인되었다. 60일에서의 중성지방량의 감소는 Koo와 Turk의 아연 결핍 시 중성지방의 소화과정은 정상이나 췌장 lipase 활성이 유의적으로 감소됨으로써 흡수를 저해하고, 또한 Chylomicron 생성에 영향을 미쳐 장점막 세포내에 lipid droplets의 축적을 일으킴으로써 혈청 중성지방 함량감소가 초래되었다는 보고에 따라 갑작스럽게 아연의 공급이 중단되면서 일시적인 아연의 부족현상이 생긴 것으로 생각된다. 또한 유의적이지는 않았지만 대조구에 비하여 30mg/kg의 구간에서 20-30일째에 유의적이지 않은 약간의 중성지방량 증가가 보였는데 이것은 아연 결핍시 혈청 중 중성지방의 농도가 현저히 증가했다는 보고(Park et al 1986)에 따라 대조구에서 아연의 부족현상이 보이고 있는 것으로 보인다. 또한 과량의 아연을 처지했을 경우에 정상치에 비하여 혈당과 총 단백질이 감소되었다는 보고(Atakisi et al. 2009)와 부합된다. 효소활성에 있어서 ALP의 경우 20일째에 30-120mg/kg에서 증가하는 양상을 보였으나 유의성이 인정되지 않았으며 40일째에 30-240mg/kg에서 유의한 증가가 나타났는데, 이것은 ALP활성이 아연의 결핍 시 감소된다는 보고(Adeniyi and Haton 1980, 조수열 and 김명주 1994, Satish and Poonam, 1992)와 부합된다. 하지만 과량의 아연을 먹었을 시 ALP가 증가한다는 보고(Huberl, 1973)와는 다르게 고농도에서 ALP의 활성치의 추가증가가 일어나지는 않았다. 이것은 240mg/kg이 비교적 낮은 농도이기 때문인 것으로 보이며 ALP의 추가적인 증가를 보기 위해서는 보다 높은 농도에서의 실험이 필요할 것으로 생각된다. ALP의 변화는 그 원인에 있어서 ALP활성의 변화는 아연의 공급수준에 기인한다는 보고(Luecke et al, 1968)도 있으나 반대로 영양실조의 결과라고 하는 보고(Hove et al, 1940)도 있고 또한 아연이온 결핍이나 영양실조로 인한 문제가 아닌 효소자체의 활성문제라는 보고(Satish et al, 1992)도 있어 원인 규명 연구가 더 필요할 것으로 생각된다. LDH는 아연의 공급으로 인해서 2주 동안은 LDH의 활성의 감소가 나타났으나 4주 후에는 LDH 활성이 다시 증가했다는 보고(Huber and Gershoff, 1983)와

일치한다. GOT와 GPT는 아연이 결핍과 과잉되었을 시 현저한 증가를 보였다는 보고(조수열 and 김명주, 1994)가 있으나 본 실험에서는 GOT와 GPT의 유의있는 변동이 없었다. 이는 대조구에서 약간의 아연 결핍이 생겼으나 미약한 정도였고 가장 높은 농도 구간인 240mg/kg도 비교적 낮은 농도였기 때문인 것으로 생각된다.

식이성 아연의 공급수준은 oxygen free radical 방어효소계의 활성화에 영향을 준다(Tattior and Bray, 1991). 식이성 아연은 cysteine을 함유한 metallothionein과 친화력이 커서 metallothionein과의 합성을 초래하며 metallothionein은 생체내 아연의 항상성을 유지하며 독성효과를 방어한다(Zhou et al, 1992). 아연의 첨가로 인한 항산화능력의 변화를 알아보는 실험은 매우 중요하다. SOD와 GSH, GPx는 항산화 효소로서 SOD는  $O_2^-$ 를  $H_2O_2$ 로 바꾸는 역할을 하며 GPx는  $H_2O_2$ 를  $2H_2O + O_2$ 로 바꾼다. GPx와 CAT는  $H_2O_2$ 를  $2H_2O + O_2$ 로 바꾸면서 그 반대급부로 Glutathion의 환원형인 GSH를 산화형인 GSSG로 바꾸고 GR은 GSSG를 NADPH를 소모하여 다시 GSH로 바꾸는 역할을 한다. 생화학분석적으로 시행한 Superoxide dismutase(SOD) activity, Glutathione (GSH) level, Glutathione peroxidase(GPx)로 어체내 항산화 능력의 변화를 알아보았다. 본 실험에서 SOD는 간에서 20일과 40일에서 30-240mg/kg 구간에서 유의적인 증가를 확인할 수 있었다. 50일에는 증가한 양상을 있었으나 유의성은 없었으며 60일째는 대조구와 차이를 보이지 않았으며 아가미에서는 20일째 120, 240mg/kg 구간에서 유의적인 증가를 보였고 40일째는 60mg/kg에서도 증가하는 양상을 보였으나 유의성이 인정되지 않았다. 50일째는 240mg/kg에서만 약간의 증가가 보였고 나머지 구간에서는 대조구와 유사했으며 60일째에는 모든 구간이 대조구와 비슷해졌다. 이것은 대조구에서의 아연의 부족으로 SOD의 활성이 유의하게 감소한 것으로 생각되며 이러한 현상에 대하여 아연의 결핍시 SOD의 활성이 감소되는 것이 보고(Katherine et al. 1995, Amira et al., 1995)되었다. 또한 일반적으로

SOD의 활성은 아연의 과잉 시에도 감소되는 것으로 보고(조수열 et al 1994)되었지만 과량이어도 비교적 낮은 농도에서 실험했을 경우에는 SOD의 활성감소가 나타나지 않은 것으로 보고(Amira et al., 1995)된 경우도 있으며 본 실험에서 가장 높은 농도로 설정한 240mg/kg에서는 SOD의 활성 감소가 나타나지 않았다. 아연 결핍시 SOD활성의 감소가 일어나 과산화지질 생성이 증가됨으로써 막 보호를 위하여 방어적 단백질 합성을 위한 전사나 번역에서의 Zn의 역할(Taylor and Bettger, 1991) 및 유리기가 매개된 손상의 재생을 위하여 Zn의 필요가 증가할 것으로 생각된다. SOD는 Zn의 노출정도에 따라 다른 활성을 보이는데 우선 Low zinc의 경우 Zn의 부족으로 인하여 활성이 감소되며 Optimal zinc는 적절한 SOD의 활성이 유지되고 High Zinc에서는 Cu의 흡수가 저해됨으로써 SOD의 활성이 감소하다 더 많은 양의 Zinc가 유입되게 되면 체내 산화됨에 따라 SOD의 활성이 급격하게 증가하며 이보다 더 많은 양의 SOD가 유입되게 되면 체내 항상성이 무너지기에 따라 SOD의 활성이 급격하게 감소된다. 본실험에서의 농도구간은 Control 구간에서 SOD활성의 감소가 보이고 가장 높은 구간인 240mg/kg에서도 Zn의 감소가 보이지 않아 Low zn에서 Optimal zn까지의 범위인 것으로 판단된다. GSH level은 20, 40일에 전구간에서 증가하였으며 50일에서는 240mg/kg에서 대조구에 비해 증가하는 양상을 보였으나 유의성이 인정되지 않았으며 60일은 대조구와 유의한 차이가 없었다. 아가미에서는 20일에 120, 240mg/kg에서 유의한 증가가 있었으며 40일에는 60-240mg/kg에서 유의한 증가를 관찰할 수 있었다. 50일과 60일은 대조구와 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 이전과 마찬가지로 30mg/kg구간에서의 증가는 대조구의 결핍으로 인한 증가로 보인다. GSH의 경우 아연의 과잉시 지질과산화물을 증가 시키고 이의 분해에 GPx가 소모되면서 활성의 감소가 이루어지지만 본실험에서는 가장 높은 240mg/kg구간에서도 GSH활성의 감소는 일어나지 않았다. GPx는 간에서 20일에 30-120mg/kg 구간에서 유의적인 증가를 확인할 수 있었고 240mg/kg은 대

조구와 유의한 변화가 보이지 않았지만 30-120mg/kg과도 연관되어 있었다. 40 일에는 30-120mg/kg에서만 유의한 증가를 보였다. 50일과 60일은 대조구와 유사하였다. 아가미는 20, 40일에서 60-240mg/kg 구간에서 유의적인 증가를 보였고 40일에서는 30mg/kg에서도 증가하는 경향을 보였으나 대조구와 유의성이 인정되지 않았다. 50일과 60일 구간에서는 대조구와 비교하였을 때 유사하게 나타났다. GPx는 Se containing 항산화 효소로서 지질과산화와 hydrogen peroxide에 대하여 detoxification을 촉매하는 작용(Geeta ea al, 1991)이 있기 때문에 중금속에 의하여 GSH활성이 저해된다고 보고(Spilttgerber and Tappel, 1979) 되어있다. 따라서 본 실험의 결과 GSH와 GPx활성의 증가는 SOD의 유의한 증가에 따라 유의하게 증가가 이루어진 것으로 보이며 감소는 과량의 아연으로 인한 지질과산화물의 생성으로 약간 감소하는 모습을 보인 것으로 보인다.

간조직의 표본을 만든 결과 자연산 간조직에 비하여 볼 때 핵탈락과 염색과정 중 지방이 녹음으로 인한 백색부분이 많이 발생되었다. 이러한 현상은 양식어류에 있어서 대체적으로 나타나며 정상범위로 보아도 문제가 없는 것으로 보인다.

본 연구를 종합해 볼 때 240mg/kg의 아연을 돌돔에게 섭이시켰을 때에도 독성의 영향은 나타나지 않았으며 항산화능력의 증가가 나타났다. 또한 중금속인 아연의 축적을 살펴보았을 때 240mg/kg구간에서는 아연이 근육에 축적되었지만 120mg/kg이하 구간에서는 40일간의 아연 공급에도 불구하고 축적량이 증가하는 경향은 보였으나 유의적이지 않았으며 증가하였다고 하더라도 가식부위인 근육에 있어서의 축적은 25ug/g이하로 아연의 안전한 하루 섭취 상한선인 elemental zinc로 영아 4~5mg, 1-3세 7mg, 4-8세 12mg, 9-13세 23mg, 14-18세 34mg, 성인 40mg (윤희상, 2005)에 비교하여 많은 양이 아니다. 또 30-240mg/kg에서 전 구간에 있어서 성장의 증가가 이루어졌고 30-240mg/kg에서 항산화능력의 증가가 이루어졌지만 120-240mg/kg구간에서 일부 항산화효소의 활성이 떨어졌다. 이러한 결과를 볼 때 본 실험의 결과 아연의 적정 첨가량

은 30-60mg임을 알게 되었다. 또한 240mg이하에서는 독성영향이 나타나지 않는 것으로 나타나 아연의 섭취로 인한 독성연구를 위해서는 더 높은 아연 첨가 구간으로 연구가 필요할 것으로 보인다.



## V 요약

생물의 물질대사에 반드시 필요한 무기물질이기도하지만 동시에 중금속으로 독성을 나타내기도 하는 아연은 보통 어체 내에서 부족했을 경우 많은 문제가 야기되어 성장에 관한 아연 요구량에 대한 연구는 되어 있지만 아연을 풍부하게 공급하였을 때에 관련된 연구는 거의 되어 있지 않다. 아연을 먹인 돌돔, *Oplegnathus faasciatus*에 있어서 아연의 최소 요구량 이상의 아연을 공급하였을 시 생리적인 변화와 아연의 체내 축적과 제거 대하여 알아보았다. 각각 30, 60, 120, 240mg/Kg의 아연을 첨가한 사료를 40일간, 이후 20일간 아연을 첨가하지 않은 사료를 돌돔에게 섭이했다. 이 결과 아연의 생체 내 축적은 간>창자>아가미>근육 순으로 나타났다. 제거에 있어 창자와 아가미에서는 급격한 감소가 일어났고 간에서는 제거가 완만하게 나타났으며 근육에서는 제거가 거의 일어나지 않았다. 성장에 있어서 대조구에 비하여 아연을 공급한 40일간에는 30, 60, 120, 240mg/kg의 전 구간에서 체중성장률이 유의하게 증가되었다. 하지만 공급을 중단한 20일간은 30, 60, 120, 240mg/kg간에는 체중성장률의 유의한 변화를 확인할 수 없었다. 혈액성상과 혈청성분 분석에서는 아연을 첨가한 사료를 먹인 20일 40일 구간에서 독성영향으로 보이는 이상 징후는 나타나지 않았으며 간조직의 관찰에서도 이상 징후를 보이지 않았다. 생화학적분석으로 실시한 SOD, GSH, GPx에서는 20일부터 유의적인 변화를 관찰할 수 있었으며 60일부터는 관찰되지 않았다. SOD, GSH, GPx의 활성증가는 어체의 항산화능력의 증가에 따른 것으로 독성영향에 의한 급격한 변화는 보이지 않는다. 따라서 240mg/kg의 아연을 돌돔에게 섭이할 경우에도 독성 영향은 없으며 20일간 30mg/kg이상의 아연을 섭이시켰을 경우 어체의 항산화능력이 증가되었다. 다만 아연의 증가에 따라 지질과산화물의 증가로 GSH와 GPx가 120-240mg/kg에서

감소하는 모습을 보였기 때문에 이와 같은 결과를 보았을 때 돌돔에 있어서 아연의 적정 사료 첨가량은 30-60mg/kg으로 보인다.



## VI 감사의글

제주도에서 부산으로 진학하여 2002년에 학부 1학년으로 처음 수권환경학 실험실에 들어온지가 엇그제같은데 벌써 석사졸업을 하게되었습니다. 석사논문을 쓰기까지 많은 도움과 격려를 주신 고마운분들께 감사의 마음을 전하고자 이글을 씁니다.

석사 논문을 쓰는데 있어 아낌없이 지도해주시고 조언해주신 강주찬 교수님, 심사를 맡아 주신 김기홍, 정현도 교수님, 석사과정 2년동안 많은 도움을 주신 박수일, 허민도, 정준기 교수님께 감사드립니다.

실험실에서 같이 생활한 수권환경학 실험실원들에게 감사의 마음을 전합니다. 졸업동기로 같이 졸업하게된 박희주, 이영주 선배님, 졸업실험을 하는데 많은 도움을 준 형준형, 동재, 태영이, 또 같이 실험실 생활하고 있는 수경이, 지원이, 민영이 그리고 실험실생활하면서 많은 것을 가르쳐주고 도움주신 수권환경학 실험실을 거쳐 간 선배님, 후배님과 비록 저희 수권환경학 실험실은 아니지만 무작정 찾아가 물어도 싫은 내색없이 잘 가르쳐주시는 약리방 상환형, 나영누나 조직만드는데 도움을 준 병리방 태우, 실험에 쓰일 물고기를 구하는데 도움을 준 홍근이 수산해양생명과학과군 02학번 동기들 감사합니다.

부산에서 무작정 보낸 논문 수정해주신 중학교 1학년 담임 부희숙 선생님 제주도 내려가면 반갑게 맞아주는 고향친구들 전국각지에 퍼져있는 Ragnarok Trinity 친구들 감사합니다.

마지막으로 부족한 아들이지만 항상 믿어주시고 후원해주시는 사랑하는 부모님과 할머니께 감사드리며 이 논문을 바칩니다.

## VII 참고문헌

- Adeniyi, F.A. and Haton, F.W. 1980. The effect of zinc deficiency on alkaline phosphatase and its isoenzymes. Br. J. Nutr., 43, 561-569.
- Aly, S.M., Ahmed, Y.A., Ghareeb, A.A. and Mohamed, M.F. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infection. Fish Shell. Immuno., 25, 128-136.
- AMIRA, A. SHAHEEN, AMAL A. ABD EL-FATTAH, 1995. Effect of Dietary Zinc on Lipid Peroxidation, Glutathione, Protein Thiols Levels and Superoxide Dismutase Activity in Rat Tissues. Int. J. Cell. Biol., Vol. 27, No. I. pp. 89-95.
- Atakisi, O., Atakisi, E., and Kart. A., 2009. Effects of Dietary Zinc and L-Arginine Supplementation on Total Antioxidants Capacity, Lipid Peroxidation, Nitric Oxide, Egg Weight, and Blood Biochemical Values in Japanese Quails. Bio. Biologica trace element research, 132(1), 136-143.
- Barton, B.A., 2002. Stress in fish: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integ. Comp. Biol., 42, 517-525.
- Barcellos, L.J., Kreutz, L.C., de Souza, C., Rodrigues, L.B., Fioreze, I., Quevedo, R.M., Cericato, L., Soso, A.B., Fagundes, M., Conrad, J., Lacerda, L.A. and Terra, S., 2004. Hematological changes in jundia

- (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. *Aquaculture*, 237, 229–236.
- Berg, J.M., Shi, Y., 1996. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science*, 271(52), 1081–1085.
- Brown, K.H., 2003. Zinc and child growth. *Int. J. Epidemiol.*, 32, 1103–1104.
- Butrimovitz, G.P. and Purdy, W.C., 1978. Zinc nutrition and growth in a childhood population. *Am. J. clin. Nutr.*, 31, 1409–1412.
- Coulston, L. and Dandonn, P., 1980. Insulin like effect of zinc on adipocytes, *Diabetes*. 29, 665–667.
- Cousins, R.J. and Lee-Ambrose, L.M., 1992. Nuclear zinc uptake and interactions and metallothionein gene expression are influenced by dietary zinc in rats. *J. Nutr.*, 122(1), 56–64.
- Cox, D.H. and Harris, D.L., 1960. Effect of excess dietary zinc on iron and copper in the rat. *J. Nutr.*, 70, 514–520
- Barton, B.A., Iwama, I.W., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *A. Rev. Fish Dis.*, 1, 3–26.
- Billard, R., Bry, B.O. and Gillett, C., 1981. Stress, environment and reproduction in teleost fish. In: Pickering, A.D. (Ed.), *Stress in Fish*. Academic Press, London, pp. 185–208.
- Boquist, L. and Lernmark, A., 1989. Effect on the endocrine pancreas in Chinese hamsters fed zinc deficient diet. *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, 76, 215–228.
- Bray, T.M. and Bettger, W.J., 1990. physiological role zinc as an antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.*, 8, 281.
- Conte, F.S., 2004. Stress and the welfare of cultured fish. *App. Ani. Beh.*

Svi., 86, 205-223.

- Dallinger, R. and Kautzky, H., 1985. The importance of contaminated food for the uptake of heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*): a field study. *Oecologia*, 67, 82-89
- Doherty, C.P., Crofton, P.M., Sarkar, M.A., Shakur, M.S., Wade, J.C., Kelnar, C.J., et al. 2002. Malnutrition, zinc supplementation and catch-up growth: changes in insulinlike growth factor I, its binding proteins, bone formation and collagen turnover. *Clin. Endocrinol.*, 57, 391-399.
- Fisher, P.W., Giroux, A. and L'Abbe, M.R., 1981. The effect of dietary zinc on intestinal copper absorption. *Am. J. Clin. Nutr.*, 34, 1670-1675.
- Magee, A.C. and Matrone, G. 1960. Studies on growth, copper metabolism and iron metabolism of rats fed high levels of zinc. *J. Nutr.*, 72, 233-242.
- Nishi, Y., 1996. Zinc and growth. *J. Am. Coll. Nutr.* 15, 340-344.
- Ellis, T., North, B., Scott, A.P., Bromage, N.R., Porter, M. and Gadd, D., 2002. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *J. Fish Biol.*, 61, 493-531.
- ELSA M.B. SORENSEN. 1991. METAL POISONING IN FISH. Environmental and life Sciences Associates Austin, Texas 78720. 119-174pp
- Friverg, I. and Vostal, J., 1972. Mercury in the environment. CRS Press(develand), ISI
- Gatin, D.M. III., and Wilson, R.P., 1983. Dietary zinc requirement of fingerling channel cat fish. *J. Nutr.*, 114, 630-635.
- Geeta, S., Ravindra, N. and Kiran, D.G., 1991. Effect of ethanol on

- Cd-induced lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat liver. *Biochemical pharmacology.*, 42, S9-S16
- Gropper, S.S., Smith, J.L. and Groff, J.L.. 2005. *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. 4th ed. Belmont:Thomson Wadsworth; p. 417-45.
- Haynes, D.C., Gershwin, M.E., Golub, M.S., Cheung, A.T., Hurley, L.S. and Hendrickx, AG., 1985. Studies of marginal zinc deprivation in rhesus Monkeys :VI. Influence on the immunohematology of infant in the first year. *J. Clinical Nutr.*, 42, 252-262
- Heath, A.G., 1987. *Water Pollution and Fish Physiology*. CRC press, Florida, USA.
- Hill, C.H. and Matrone, G., 1970. Chemical parameters in the study of in vivo and in vitro interactions of transition element. *Ged. Proc.*, 29, 1474
- Hove, E., Elvehjem, C.A. and Hart, E.B., 1940. The effect of zinc on alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 134, 425-442.
- Huber, A.M. and Gershoff, S.N., 1973. Effect of dietary Zinc on Zinc enzymes in the rat. *J. Nutr.*, 103, 1175-1181.
- Huber, A.M. and Gershoff, S.N., 1973. Effect of zinc deficiency in rats on insulin release from the pancreas. *J. Nutr.*, 103, 1739-1744.
- Iguchi, K., Ogawa, K., Nagae, M., Ito, F., 2003. The influence of rearing density on stress response and disease susceptibility of ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture* 220, 515-523.
- Imamoglu, S., Bereket, A., Turan, S., Taga, Y. and Haklar, G., 2005. Effect of zinc supplementation on growth hormone secretion, IGF-I, IGFBP-3, somatomedin generation, alkaline phosphatase, osteocalcin

- and growth in prepubertal children with idiopathic short stature. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, 18, 69–74.
- Irwin, S., O'Halloran, J. and FitzGerald, R.D., 1999. Stocking density, growth and growth variation in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque). *Aquaculture* 178, 77–88.
- Jaroslav, A., Ivan, S. and Peter, M. 2006. Accumulation of some metals in muscles of five fish species from lower nitra river. *J. Environ. Sci. Health Part A*, 41, 2607–2622.
- Olin, K.L., Golub, M.S., Gershwin, M.E., Hendrickx, A.G., Lonnerdal, B. and Keen, C.L., 1995. Extracellular superoxide dismutase activity is affected by dietary zinc intake in nonhuman primate and rodent models<sup>1-3</sup>, *Am. J. Clin. Nutr.*, 61, 1263–1267.
- Kang, M.H., 2000. Effects of dietary zinc and iron on body macro mineral contents in the high fat diet-induced obese rats. *MS Thesis*. Sookmyung Women's University, Seoul. P 44–46.
- Koo, S.I., and Turk, D.E., 1977. Effect of Zn deficiency on intestinal transport of triglyceride in the rat. *J. Nutr.*, 107, 909–919.
- Kristiansen, T.S., Ferno, A., Holm, J.C., Privitera, L., Bakke, S. and Fosseidengen, J.E., 2004. Swimming behaviour as an indicator of low growth rate and impaired welfare in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) reared at three stocking densities. *Aquaculture*, 230, 137–151.
- Levine A.S., McClain D.A. Handwerker. B.S., Brown D.W. and Morlet J.E., 1983 Tissue zinc status of genetically diabetic and streptozotocin induced diabetic mice. *Am. J. Clin. Nutr.*, 37(3), 382–386.

- Luecke, R.W., Olmam, M.E. and Baltzer, B.V. 1968. Zinc deficiency in the rat : Effect on serum and intestinal alkaline phosphatase activities. *J. Nutr.*, 94, 344-350.
- Lundebye, A.K., Berntssen, M.H.G., Wendelaar Bonga, S.E. and Maage, A., 1999. Biochemical and physiological responses in atlantic salmon (*Salmo salar*) following dietary exposure to copper and cadmium. *Mar. Poll. Bull.*, 39, 137-144.
- Marco, P.Di. and Priori, A., Finioia, M.G., Mandich, A. and Marino, G., 2008. Physiological responses of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to different stocking densities and acute stress challenge. *Aquaculture* 275. 319-328.
- Martorell, R. 2002. Benefits of zinc supplementation for child growth. *Am. J. Clin. Nutr.* 75, 957-958.
- McClain, W.E. and Gatlin, D.M. III., 1988. Dietary zinc requirement of *Oreochromis aureus* and effects of dietary calcium and phytate on zinc bioavailability. *J. World Aquacult. Soc.*, 19, 103~108.
- Mitsure, S. and Morita, S. 1992. Effect of feeding and fasting on hepatolobular distribution of glutathione and Cadmium-induced hepatotoxicity. *Toxicology*, 75, 97-107.
- Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robaina, L. and Vergara, J.M., 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiol. Biochem.*, 20, 53-60.
- Morita, S., 1984. Defence mechanism against cadmium toxicity. I. A biochemical and histological study of the effect of pretreatment with

- cadmium on the acute oral toxicity of cadmium in mice. Japan, J. Pharmacol., 35, 129-141.
- Neve, J., 1992. Clinical implications of trace elements in endocrinology. Biol. Trace. Elem. Res., 32, 173-185.
- NRC(National Research Council). 1993. Nutrient Requirements of fish. National Acad. Press, Washington, D.C. 114pp.
- Ogino, C. and Yang, G.Y., 1978. Requirement of rainbow trout for dietary zinc. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 42, 793~799.
- Ogino, C. and Yang, G.Y., 1979. Requirement of carp for dietary zinc. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 46, 455~458.
- Park J.H.Y., Grandjean, C.J., Antonson, D.L. and Vanderhoof, J.A., 1986. Effect of isolated parameters of the composition of skeletal muscle, liver and bone during growth in rats. J. Nutr., 116, 610-617.
- Pentreath, R.J., 1973. The accumulation and retention of Zn and Mn by the plaice, *Pleuronectes platessa* L, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 12, 1-18.
- Procarione, L.S., Barry, T.P. and Malison, J.A., 1999. Effects of high rearing densities and loading rates on the growth and stress responses of juvenile rainbow trout. N. Am. J. Aquac., 61, 91-96.
- Samman, S. 1993. Dietary versus cellular zinc : The antioxidant paradox. Free Radical biol. Med., 14, 95-96.
- Satish, K.T. and Poonam, A., 1992. Inanition may reduce alkaline phosphatase activity in liver and intestine of Zn-deficient mice. J. Nit., 122, 1744-1747.
- Schram, E., Van der Heul, J.W., Kamstra, A. and Verdegem, M.C.J., 2006.

- Stocking density-dependent growth of Dover sole (*Solea solea*).  
*Aquaculture*, 252, 339-347.
- Schwartz, J.R., Marsh, R.G., Draelos, Z.D.. 2005. Zinc and skin health: overview of physiology and pharmacology. *Dermatol. Surg.* 31, 837-847.
- Schreck, C.B., Olla, B.L. and Davis, M.W., 1997. Behavioral responses to stress. In: wama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.), *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Society for Experimental Biology Seminar Series, vol. 62. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., pp. 145-170.
- Shils, M.E., Shike, M., Ross, A.C., Caballero, B. and Cousins, R.J., 2005. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 10th ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins. p. 271-285.
- Singh, K.P., Zaidi, S.I A., Raisuddin, S., Saxena, A.K., Murthy, R.C. and Ray, P.K., 1992. Effect of zinc on immune functions and host resistance against infection and tumor challenge. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 14, 813-840.
- Singh, R.P., chidamdara, M. and Jaysprakasha, G.K., 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 50, 81-86.
- Solomons, N.W., Rosenfield, R.L., Jacob, R.A. and Sandstead, H.H., 1976. Growth retardation and zinc nutrition. *Pediatr. Res.*, 10, 923-927.
- Spilttgerber, A.G. and Tappel, A.L., 1979. Inhibition of glutathione peroxidase by cadmium and other metal ions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 197(2), 534-542
- Takamatsu, s., Hodges, T.W., Rajbhandari, I., Gerwick, W.H., Hamann, M.T. and Nagle, D.G. 2003. Marine natural products as novel

- antioxidant prototypes. *J. Natural Products.*, 66, 605-608.
- Taylor, C.G. and Bray, T.M. 1991. Effects of hyperoxia on oxygen free radical defense enzymes in the lung of Zn-deficient rats. *J. Nutr.*, 121(4), 460-466.
- Wedemeyer, G.A., 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.), *Society for Experimental Biology Seminar Series*, vol. 62. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., pp. 35-71
- Wallwork, J.C., Fosmire, G.J. and Sandstead, H.H., 1981. Effect of zinc deficiency on appetite and plasma amino acid concentrations in the rat. *Br. J. Nutr.*, 45, 127-136.
- Wicklund, A., Norrgren, L. and Rune, P., 1990. The influence of cadmium and zinc on cadmium turnover in the zebrafish, *Brachydanio rerio*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 3, 348-353.
- Zhou, Y., Hu, X., Dou, C., Liu, H., Wang, S. and Shen, P. 1992. Structural studies on metal-serum albumin IV. The interaction of Zn(II), Cd(II) and Hg(II) with HSA and BSA. *Biophys. Chem.*, 42(2), 201-211.
- 강용진, 이상민, 황형규, 배승철, 1998. 돌돔사료의 적정 단백질 및 지질 함량. *J. Aquaculture* 11(1), 1~10.
- 김경민, 이지의, 김재우, 한석중, 김경덕, 조재윤. 2008. 돌돔 *Oplegnathus fasciatus* 성장단계별 수온에 따른 배합사료 섭취율. *한국양식학회지*, 21(4), 294-298
- 김현숙, 조경옥, 2009. 아연 수준이 비만쥐의 당대사와 혈청 아연, 마그네슘, 크롬 함량에 미치는 영향. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 38(9),

1174-1178.

송미영, 정영진, 1990. 아연 보충이 젊은 여성의 혈청 콜레스테롤 농도에 미치는 영향. 한국영양학회지, 23, 237-247.

이상민, 박승렬, 1998. 사료의 P, Ca, Zn, Mg, Fe, K, Mn과 Se이 조피볼락의 성장 및 체성분에 미치는 영향. J. Korea Fish. Soc., 31(2), 245-251.

윤희상, 2005. 비타민과 무기질의 새로운 영양학적 의미. Korean J. Pediatr., 48. 1295-1309.

정문기, 1977. 한국어도보, 일지사, 서울, P. 502

조수열, 김명주, 1994. 식이성 아연 수준이 카드뮴 중독에 미치는 영향. J. Korean Soc. Food Nutr., 23(4), 574-580.

황형규, 강용진, 이종하, 양상근, 1996. 돌돔 종묘생산시험, 남해수산연구소사업 보고, p. 381-383

