



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](#)

수산학박사학위논문

뱀장어의 인공종묘생산을 위한 성성숙
유도와 치어의 영양학적 연구



2009년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

배 준 영

수산학박사학위논문

뱀장어의 인공종묘생산을 위한 성성숙
유도와 치어의 영양학적 연구



지도교수 배 승 철

이 논문을 수산학박사 학위논문으로 제출함.

2009년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

배 준 영

배준영의 수산학박사 학위논문을 인준함.

2009년 2월 25일



목 차

Abstract	xvii
List of tables	xviii
List of figures	xx
제 1장 서 론	1
1. 연구배경	1
2. 연구목표 및 필요성	11
3. 참고문헌	21
제 2장 뱀장어의 인공종묘생산을 위한 성성숙 유도	30
제 1절 친어관리를 위한 양식산 뱀장어의 성감별 방법	30
1. 서론	30
2. 재료 및 방법	31
1) 실험어 및 사육관리	31
2) 생식소의 조직학적 관찰	32
3) 혈중 호르몬 조사	32
4) 혈액학적 성상 조사	33
5) 통계처리	34

3. 결과	34
1) 성비	34
2) 혈중 성호르몬 함량	34
3) 혈액학적 성상	35
4. 고찰	35
5. 참고문헌	39
 제 2절 양식산 수컷 뱀장어의 인위적 성성숙 유도	47
1. 서론	47
2. 재료 및 방법	48
1) 실험어 및 사육관리	48
2) 호르몬 처리	48
3) 어체측정 및 혈액채취	49
4) 방사선 면역 측정법	49
5) 조직학적 관찰	50
5) 통계처리	50
3. 결과	50
1) 체중 및 성호르몬의 변화	50
2) 수컷 뱀장어의 정소 발달	51
4. 고찰	51
5. 참고문헌	54
 제 3절 양식산 암컷 뱀장어의 인위적 성성숙 유도	61
1. 서론	61

2. 재료 및 방법	62
1) 실험어 및 사육관리	62
2) 호르몬 처리	63
3) 배란유도	63
4) 방사선 면역 측정법	64
5) 조직학적 관찰	64
6) 통계처리	64
3. 결과	65
1) 호르몬 처리에 의한 난소발달 양상	66
2) 수정률과 부화율	66
4. 고찰	67
5. 참고문헌	72
제 4절 양식산 뱀장어의 적정 인공성숙시기 설정	82
1. 서론	82
2. 재료 및 방법	83
1) 실험어 및 사육관리	83
2) 호르몬 처리	84
3) 배란 및 수정	84
4) 통계처리	85
3. 결과	85
1) 배란율과 산란수	85
2) 수정란의 부상률과 수정률 및 부화율	86
3) 부화유생수와 유생 생존기간	87

4. 고찰	87
5. 참고문헌	91

제 5절	인위적으로 성성숙 유도된 뱀장어의 자연산란에 의한 난발생과 Pre-leptocephalus 자어의 발달	102
1. 서론		102
2. 재료 및 방법		103
1) 실험어 및 사육관리		103
2) 호르몬 처리		103
3) 배란유도 및 수정란 관리		104
4) 난발생 및 Pre-leptocephali 형태학적 특성조사		105
3. 결과		105
1) 배란 및 자연산란		105
2) 난의 특징		105
3) 난발생 단계의 형태적 특징		106
4) Pre-leptocephalus 자어의 형태적 특징		107
4. 고찰		109
5. 참고문헌		113

제 3장	뱀장어 치어의 영양학적 연구	120
-------------	------------------------------	------------

제 1절 에너지에 대한 적정 단백질 비 평가	120
1. 서론	120
2. 재료 및 방법	122

1) 실험어 및 사육관리	122
2) 실험사료 및 실험설계	123
3) 어체측정	123
4) 성분분석	124
5) 통계처리	125
3. 결과 및 고찰	125
4. 참고문헌	128
 제 2절 필수지방산 적정 요구량 평가	137
1. 서론	137
2. 재료 및 방법	138
1) 실험어 및 사육관리	138
2) 실험사료 및 실험설계	139
3) 어체측정	140
4) 일반성분 분석	140
5) 지방산 분석	140
6) 혈액학적 조사	141
7) 통계처리	141
3. 결과 및 고찰	142
4. 참고문헌	144
 제 3절 아라키돈산의 필수성과 적정 요구량 평가	153
1. 서론	153
2. 재료 및 방법	154

1) 실험어 및 사육관리	154
2) 실험사료 및 실험설계	154
3) 어체측정	155
4) 일반성분 분석	155
5) 지방산 분석	155
6) 통계처리	156
3. 결과 및 고찰	156
4. 참고문헌	159
제 4절 항산화 비타민 C와 E의 적정 요구량 평가	167
1. 서론	167
2. 재료 및 방법	169
1) 실험어 및 사육관리	169
2) 실험사료 및 실험설계	169
3) 어체측정	170
4) 성분분석	170
(1) 일반성분 분석	170
(2) Vitamin C 분석	171
(3) Vitamin E 분석	171
5) 통계처리	172
3. 결과 및 고찰	172
1) Vitamin C	172
2) Vitamin E	174
4. 참고문헌	176

제 4장 종합고찰 및 결론	189
제 5장 요약	195
1. 뱀장어의 인공종묘생산을 위한 성성숙 유도	195
1-1. 친어관리를 위한 양식산 뱀장어의 성감별 방법	195
1-2. 양식산 수컷 뱀장어의 인위적 성성숙 유도	196
1-3. 양식산 암컷 뱀장어의 인위적 성성숙 유도	197
1-4. 양식산 뱀장어의 적정 인공 성성숙 시기 설정	198
1-5. 인위적으로 성성숙 유도된 뱀장어의 자연산란에 의한 난발생과 Pre-leptocephalus 자어의 발달	199
2. 뱀장어 치어의 사료영양학적 연구	200
2-1. 에너지에 대한 적정 단백질 비 평가	200
2-2. 필수지방산 적정 요구량 평가	201
2-3. 아라키돈산의 필수성과 적정 요구량 평가	202
2-4. 항산화 비타민 C와 E의 적정 요구량 평가	203
감사의 글	204

Induction of artificial maturation for the seedling of eel, and nutritional studies of juvenile eel, *Anguilla japonica*

Jun Young Bae

***Department of Fisheries Biology, Graduate School,
Pukyong National University, Busan 608-737, Korea***

Abstract

Series of studies were conducted to induce sexual maturation for the artificial propagation of eel, *Anguilla japonica* and to evaluate major nutrients requirements of juvenile eel for the managements of hatched larvae and broodstock by nutritional approaches. Firstly, five experiments were examined for sex determination of cultured eel for broodstock managements (Exp. 1-1), induction of artificially sexual maturation in male eel (Exp. 1-2), induction of artificially sexual maturation in male eel (Exp. 1-3), development of the eggs and pre-leptocephalus larvae by natural spawning of artificially matured eel (Exp. 1-4), and determination of optimum induction periods for artificially sexual maturation in cultured eel (Exp. 1-5). Secondly, five experiments were conducted to evaluate optimum dietary protein to energy ratio (Exp. 2-1) and

requirements of optimum dietary essential fatty acids (Exp. 2-2), arachidonic acid (Exp. 2-3), antioxidant vitamins (Exp. 2-4) for juvenile eel, *A. japonica*.

1. Induction of artificial maturation for the seedling of eel, broodstock

Experiment 1-1. Methods of sex determination for broodstock managements in cultured eel

This study investigated sex determination through serum steroid hormone level and compared hematological characteristics of one-year old cultured eels, *Anguilla japonica*. Four different groups were divided with total length at 40~45, 45~50, 50~55 and 55~60 cm. Males dominated eels of 40~50 cm in total length group, while females dominated eels of more than 50 cm. All females and males were immature. Hematocrit levels of males (total length: 40~50 cm) were higher than those of females (total length: 50~60 cm). Hemoglobin content also differed between males and females. Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) levels of 40~45 cm males tended to be higher (157 ± 3.46 IU/L) than that of other sized males, but there were no significant differences between groups ($P < 0.05$). The highest GOT levels were found in of 55~60cm females (148 ± 3.46 IU/L) compared with that of other female groups ($P < 0.05$). Glutamate pyruvate transaminase (GPT) levels of males and females in the 55~60cm size range was significantly higher than others ($P < 0.05$). The result of this study indicated steroid hormone content of males

and females were very low, but testosterone (T) and estradiol-17 β (E₂) contents of females were higher than those of males. For further research of sex determination in cultured eels, it needs to investigate in more defined body length.

Experiment 1-2. Induction of artificial maturation in male eel

This study was conducted to investigate the changes in body weight (BW), plasma sex steroid hormone profiles and testicular developments of cultured male eel *Anguilla japonica* during artificial maturation process. Eels that received weekly intraperitoneal injections of eel's ringer solution containing human chronic gonadotropin (HCG) were examined. In ringer-treated control, the BW changes decreased slowly during the experiment period. Plasma testosterone (T), 11-ketotestosterone (11-KT) and 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) levels in control remained low and did not show any significant changes. Moreover, all germ cells in the testes of the control were spermatogonia. In the HCG-treated male eels, however, the BW changes gradually increased from 5th week and then slowly decreased. Plasma T level rapidly increased ($P<0.05$) at 2nd week and then slowly decreased. Plasma 11-KT level dramatically increased ($P<0.05$) at 2nd week and maintained until the end of the experiment. Plasma DHP level progressively increased from 2nd week and peaked at 8th week ($P<0.05$). The HCG-treated male eels had more developed testes; most were at spermatozoa and spermatid stages and showed active spermiation. Thus, spermatogenesis and spermiation in the cultured eel can be induced by repeated injections of HCG.

Experiment 1-3. Induction of artificial maturation in female eel

The present study demonstrates the changes in body weight (BW) and plasma sex steroid hormone profiles during artificial maturation induced by human chorionic gonadotropin (HCG) or salmon pituitary extract (SPE) injections in cultured eel *Anguilla japonica*, kept in seawater for 3 months. In the weekly SPE-injected female group, BW was relatively stable during vitellogenesis. Following induction of vitellogenesis, females exhibited a rapid increase of BW, and the oocytes were observed to be in the migratory nucleus stage at the end of the experiment. Plasma testosterone (T) and estradiol-17 β (E₂) levels increased slightly during vitellogenesis and peaked at an average of 5.82 ng/mL and 4.76 ng/mL, respectively, at the end of the experiment. In the weekly control and HCG-injected female groups, BW slowly decreased during the experimental period, and the oocytes of the two groups were observed to be at the primary yolk globule stage. In the weekly HCG injected female group, plasma T and E₂ levels increased slightly during vitellogenesis and decreased afterward. In the control female group, however, plasma T and E₂ levels were not altered during the experimental period. Furthermore, plasma 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) was not detected in all experimental groups. Fertility and hatching rates of SPE-injected females were significantly higher in those that ovulated 15 h after DHP injection than 18 h. These results indicate that long rearing in seawater increases responsiveness to SPE in ovarian maturation of the eel *A. japonica*, resulting in shortened period from completion of vitellogenesis by sex steroid hormone production.

Experiment 1-4. Development of the eggs and pre-leptocephalus larvae by natural spawning of artificially matured eel

Embryonic and pre-leptocephalic larvae development of the eel, *Anguilla japonica*, are described following natural fertilization in the indoor tank of 23°C water temperature. Following a routine hormone treatment technique for the brood stock, female eels were artificially matured by weekly intramuscular injections of salmon pituitary extracts (SPE) at a dosage of 20 mg/kg body weight (BW) for a total of 10-14 doses to induce ovarian maturation, while male eels received weekly intramuscular injections of human chorionic gonadotropin (HCG) at a dosage of 1 IU/g BW for a total of 6-10 doses to induce testicular maturation in a separate aquarium and induced natural spawning. Fertilized eggs of about 1.0 mm in diameter were pelagic and showed a typical discoidal cleavage. Hatching occurs 38 hrs after fertilization at a water temperature of 23°C. The newly hatched larvae measured about 3.0 mm in total length and the number of myomeres averages 42. Their mouths and anuses were opened at 4.5 days and the yolk sacs of the pre-leptocephalic larvae were almost absorbed at 6.5 days after hatching. Preleptocephalic larvae survive for 14.5 days. At this time they are 5.87 ± 0.25 mm in total length and have about 98 myomeres. However, morphological characterization of embryonic and pre-leptocephalic larvae were not different between natural fertilization and artificial fertilization by the dry method.

Experiment 1-5. Determination of optimum induction periods for artificially sexual maturation in cultured eel

This study investigated the correlationship between artificial maturation season and reproduction coefficient of cultured eel *Anguilla japonica* from May (spring) to next January (winter). The brood stock, female eels (400~600 g) were artificially matured by weekly intramuscular injections of salmon pituitary extracts (SPE, 20 mg/fish) to induce a completion of vitellogenesis. After completion of vitellogenesis, final oocyte maturation and ovulation was induced by injection of 17 α , 20 β -dihydroxyprogesterone (DHP) at about 2 μ g/g body weight. Most fish ovulated 15~18 h following the DHP injection. The ovulated fish were induced to natural spawning or artificial fertilization by the dry method. Males (200~350 g) were received weekly intramuscular injections of human chorionic gonadotropin (HCG) at a dosage of 1 IU/g body weight to induce testicular maturation and spermiation. Seasonal reproduction coefficient which includes the rate of ovulation, buoyancy, fertilization and hatching of eggs in the artificially matured eel during spring to summer (May~July) were significantly higher than the other season, while there were no significant difference among spring and summer ($P<0.05$). Furthermore, the number of eggs spawned and larvae hatched in the artificially matured eel during spring to summer (May~July) were significantly higher than the other season, while there were no significant difference in spring and summer ($P<0.05$).

These results indicate that artificial maturation by hormone treatment of *A. japonica* was successful only during spring to summer, which is the maturation period in the wild stock in nature. Consequently, it is possible to determine the period of artificially induced sexual maturity by the reproduction coefficient which includes the rate of ovulation, buoyancy, fertilization and hatching of eggs in the cultured eel *A. japonica*.

2. Nutritional studies of juvenile eel

Experiment 2-1. Evaluation of the optimum dietary protein to energy ratio

A 16-week feeding trial was conducted to estimate the optimum dietary protein to energy ratio (P/E ratio, mg protein/kJ) in juvenile Japanese eel, *Anguilla japonica*. Six experimental diets were formulated with three energy levels and two protein levels at each energy level. Three energy levels of 16, 17 and 19 kJ per g diets were included at 45 and 50% crude protein (CP) levels, respectively ($_{45}P_{16}$, $_{45}P_{17}$, $_{45}P_{19}$, $_{50}P_{17}$, $_{50}P_{17}$ and $_{50}P_{19}$). After four weeks of the conditioning period, fish initially averaging 15 ± 0.3 g (means $\pm$ SD) were randomly distributed into each tank as groups of 20 fish. Each diet was fed to fish in three randomly selected tanks at a rate of 2-3% wet body weight per day in the recirculated system. Weight gain (WG) and specific growth rate of fish fed diet $_{45}P_{19}$ were significantly higher ($P < 0.05$) than those of fish fed the other diets. WG of fish fed diet $_{50}P_{17}$ was also significantly higher than those of fish fed diets $_{50}P_{16}$ and $_{50}P_{19}$. Feed efficiency ratio of fish fed diets $_{45}P_{19}$ was significantly higher ($P < 0.05$) than those of fish fed other diets, however $_{45}P_{17}$ and $_{45}P_{19}$ were no significant differences ($P > 0.05$). These results suggest that the optimum P/E ratio may be 24.1 mg protein/kJ with 44.3% protein diets, and 28.1 mg protein/kJ 49.3% protein diets for the maximum growth of juvenile eel under the experimental condition.

Experiment 2-2. Evaluation of the optimum dietary essential fatty acids requirements

The present study was conducted to evaluate the optimum dietary requirements of essential fatty acids (EFAs) such as linoleic acid (LA, 18:2n-6), α -lenolenic acid (LNA, 18:3n-3), or docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3), eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and arachidonic acid (ARA, 20:4n-6) in juvenile eel *Anguilla japonica* cultured in the recirculating system for 16 weeks. The experimental diets contained 50% crude protein 10% crude lipid and 3800 kcal/kg energy. Brown fish meal and blood meal were used as the main protein sources, while coconut oil, corn oil and linseed oil were used as the lipid source to get different fatty acids ratios. The effects of the essential fatty acids supplementation on weight gain (WG), specific growth rate (SGR), feeding efficiency (FE), proximate composition and fatty acids contents of whole body were examined after the feeding trial. WG, SGR, and FE of fish fed diet D₂, D₃ were significantly higher ($P<0.05$) than those of fish fed the other diets. HUFA concentration of whole body of fish fed D₁ was significantly lower ($P<0.05$) than those of fish fed the other diets. HUFA/SFA (saturated fatty acids) ratio of whole body in fish fed diets D₂, D₃ and D₆ were significantly higher than that of fish fed diet D₁ ($P<0.05$). DHA/EPA ratio of whole body in fish fed diet D₇ was significantly higher than those of fish fed the other diets; and fish fed diet D₅ showed the lowest DHA/EPA ratio among all the dietary treatments ($P<0.05$). Based on the experimental results, we concluded that LNA (n-3) and LA (n-6) were necessary for optimum growth of juvenile eel, and the dietary requirement of LNA and LA were 0.35-0.5% and 0.5-0.65%, respectively.

Experiment 2-3. Evaluation of the optimum dietary arachidonic acid requirements and essentiality

This study was conducted to evaluate the optimum dietary arachidonic acid (ARA) requirements on growth performance, body composition and fatty acid profile of juvenile eel, *Anguilla japonica*. Six experimental diets (18.3 kJ of available energy g⁻¹) were formulated to be iso-nitrogenous and iso-caloric to contain 55.0% crude protein, 15% crude lipid. Six different levels of ARA were added to the basal diet, with 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.2% per kg diet on dry matter (DM) basis, respectively (ARA₀, ARA_{0.2}, ARA_{0.4}, ARA_{0.6}, ARA_{0.8} and ARA_{1.2}). After 2 conditioning period, fish initially averaging 27±0.5 g (mean±SD) were randomly distributed into each aquarium as triplicate groups of 20 fish. Water temperature was maintained at 25±1 °C. One of six experimental diets was fed on a DM basis to fish in three randomly selected aquaria at rate of 3-4% of total body weight twice a day. Growth performance and ARA deposition of whole body in fish fed ARA_{0.6} and ARA_{0.8} diets were significantly higher than that of the other diets ($P<0.05$), there were no significant differences among fish fed ARA_{0.6} and ARA_{0.8} diets. Broken-line model analyses of WG and FE were 0.63 and 0.71 % in diet, respectively. These results indicated that the optimum dietary arachidonic acid levels could be greater than 0.63% but less than 0.71% in juvenile eel.

Experiment 2-4. Evaluation of the optimum dietary antioxidant vitamin C and E requirements

This study was conducted to evaluate the optimum dietary antioxidant vitamin C (ascorbic acid, AA) and vitamin E (α -tocopherol, TA) requirements on growth performance and body composition of juvenile eel, *Anguilla japonica*. Five different levels of AA were added to the basal diet, with 0, 30, 60, 120 and 1200 mg AA per kg diet on dry matter (DM) basis, respectively (AA₀, AA₃₀, AA₆₀, AA₁₂₀ and AA₁₂₀₀). Five different levels of TA were added to the basal diet, with 0, 15, 30, 60 and 120 mg TA per kg diet on DM basis, respectively (TA₀, TA₁₅, TA₃₀, TA₆₀ and TA₁₂₀). After 2 conditioning period, fish initially averaging 15 $\pm$ 0.3 g (mean $\pm$ SD) were randomly distributed into each aquarium as triplicate groups of 20 fish. Water temperature was maintained at 25 $\pm$ 1 °C. One of five experimental diets was fed on a DM basis to fish in three randomly selected aquaria at rate of 3-4% of total body weight twice a day. Broken-line model analyses of WG was 38.1 mg/kg in diet, respectively. These results indicated that the optimum dietary vitamin C levels could be greater than 24 mg/kg but less than 38.1 mg/kg diet in juvenile eel. Broken-line model analyses of WG was 12.8 mg/kg in diet, respectively. These results indicated that the optimum dietary vitamin E levels could be greater than 12.8 mg/kg but less than 16.5 mg/kg diet in juvenile eel.

List of tables

Table 1. Annual aquaculture production of marine fish and freshwater fish in Korea	6
Table 2. Sample size description of cultured eels	43
Table 3. Hematological characteristics on sex in cultured eel	44
Table 4. Fertility and hatching rates of SPE-injected female eel, reared in seawater for 3 months	76
Table 5. Reproductive performance during the artificial maturation periods of <i>Anguilla japonica</i> from May 2005 to January 2006	98
Table 6. Estimated and actual values of crude protein, P/E ratio and energy for the six experimental diets	133
Table 7. Composition of the six experimental diets	134
Table 8. Effects of the different dietary protein to energy ratio	135
Table 9. Whole body proximate composition of juvenile eel fed the six different experimental diets for 16 weeks	136
Table 10. Composition of the experimental diets	149
Table 11. Effects of feeding experimental diets on growth performance of juvenile eel fed seven different experimental diet	150

Table 12. Serological characteristics of juvenile eel fed seven different experimental diet for 16 weeks	151
Table 13. Whole body proximate fatty acid composition of juvenile eel fed seven different experimental diet for 16 weeks	152
Table 14. Composition and proximate analysis of the basal diets for juvenile eel	162
Table 15. Growth performance and survival of juvenile eel fed the diets containing different ARA levels for 10 weeks	163
Table 16. Fatty acid composition of the experimental six diets	164
Table 17. Whole body fatty acid composition of the juvenile eel fed the diets containing different ARA levels for 10 weeks	165
Table 18. Composition of the experimental diets	182
Table 19. Effects of feeding experimental diets on growth parameters for 12 weeks in juvenile eel	183
Table 20. Effects of feeding experimental diets on growth parameters for 12 weeks in juvenile eel	184
Table 21. Whole body proximate composition of juvenile eel, fed experimental diet for 12 weeks	185
Table 22. Whole body proximate composition of juvenile eel, fed experimental diet for 12 weeks	186

List of figures

Fig. 1.	Global aquaculture production of anguillidae including <i>anguilla japonica</i>	4
Fig. 2.	Annual eel production in the world	5
Fig. 3.	Annual domestic capture and import amount of glass eel for the eel farms in Korea	7
Fig. 4.	Collection sites of small eel larvae	9
Fig. 5.	Summary of the methods for artificially inducing maturation and fertilization in <i>A. japonica</i>	14
Fig. 6.	Sex ratio in relations to total length (cm) of cultured eels	45
Fig. 7.	Gonadal histology of cultured eels	46
Fig. 8.	Changes in body weight (BW) and plasma levels of sex steroid hormone (T, 11-KT, DHP) in cultured male eel injected with eel's ringer solution (control)	58
Fig. 9.	Changes in body weight (BW) and plasma levels of sex steroid hormone (T, 11-KT, DHP) in cultured male eel injected with human chronic gonadotropin (HCG)	59
Fig. 10.	Light micrographs of the testes in the cultured male eels with or without repeated injections of HCG	60
Fig. 11.	Changes in body weight (BW) and plasma levels of sex steroid hormones (T, E ₂ , DHP) in cultured female eel, <i>Anguilla japonica</i> injected with eel's Ringer (control) in Freund's incomplete adjuvant emulsion	77
Fig. 12.	Changes in body weight (BW) and plasma levels of sex steroid hormones (T, E ₂ , DHP) in cultured female eel, <i>Anguilla japonica</i> injected with HCG in Freund's incomplete adjuvant emulsion	78

•

Fig. 13.	Changes in body weight (BW) and plasma levels of sex steroid hormones (T, E ₂ , DHP) in cultured female eel, <i>Anguilla japonica</i> injected with SPE in Freund's incomplete adjuvant emulsion	79
Fig. 14.	Representative photographs of ovary after 12 weeks of exogenous hormone injection of cultured female eel, <i>Anguilla japonica</i> reared in seawater for 3 months	80
Fig. 15.	Light micrographs of the ovaries in the cultured female eel, <i>Anguilla japonica</i>	81
Fig. 16.	Annual changes in the number of eggs spawned, the proportion of floating eggs to eggs sunk and the ovulation rate during the artificial maturation periods of <i>Anguilla japonica</i> from May 2005 to Jan. 2006	99
Fig. 17.	Rate of buoyancy, fertilization and hatching of eggs during the artificial maturation periods of <i>Anguilla japonica</i> from May 2005 to January 2006	100
Fig. 18.	Annual changes in the number of hatched larvae and larvae survival periods during the artificial maturation periods of <i>Anguilla japonica</i> from May 2005 to January 2006	101
Fig. 19.	Egg cleavage and embryonic development of cultured eel, <i>Anguilla japonica</i>	116
Fig. 20.	Morphological changes on the pre-leptocephalic larvae of eel, <i>Anguilla japonica</i>	117
Fig. 21.	Morphological changes on the head part of pre-leptocephalic larvae, <i>Anguilla japonica</i>	118
Fig. 22.	Changes of total length (TL, mm) and rates of pre-anal length (PAL) to total length (PAL/TL, %) of pre-leptocephalic larvae, <i>Anguilla japonica</i> in aquaria	119
Fig. 23.	Broken line analysis on weight gain of juvenile eel fed the diets containing different ARA levels for 10 weeks	166
Fig. 24.	Broken line analysis on weight gain of juvenile eel fed the diets containing different AA levels for 12 weeks	187
Fig. 25.	Broken line analysis on weight gain of juvenile eel fed the diets containing different TA levels for 12 weeks	188

제 1장 서 론

1. 연구배경

인류의 가장 중요한 단백질 식량자원은 농·축산업과 수산업 분야에서 공급되어왔다. 하지만 현재 농·축산업의 생산량은 한계에 이른 상태이고, 인구 증가와 환경문제 등을 고려할 때 계속해서 증가하는 인류의 단백질 수요는 지속적으로 증대될 것으로 보인다. 또한, 세계 곡물 위기에 관한 FAO의 보고에 의하면 지구 온난화로 인한 곡물 생산량 감소, 중국과 인도의 경제 발전으로 인한 고급 단백질 수요의 증가, 바이오 디젤과 에탄올 개발(전 세계 옥수수과 콩 생산량의 12% 이용) 및 선진국들의 전략적 곡물구매 등으로 인해 세계 식량자원의 수급에 큰 위기가 닥쳐올 것으로 예견되고 있어 지속적으로 증가하는 인류의 식량자원 및 단백질 수요를 향후 많은 부분을 수산업에서 충당해야 할 것으로 보인다.

세계적으로 다른 육류에 비해 저지방 고단백인 수산물의 소비 수요는 계속해서 증가하고 있는 반면 주요 수산식품(어류, 갑각류 및 연체동물)의 세계 어업 생산고는 연간 6,000만 톤(해조류와 어분 및 어유 생산용 잡어 3,000-4,000만 톤은 제외)으로 환경오염과 어자원의 남획 등으로 인해 앞으로 그 생산량은 현 수준 이상이 되지 않을 것이라는 가정이 지배적이다. 그러나 지난 10년간 주요 수산식품 중 양식 생산량은 1988년 1,170만 톤에 비하여 2006년 6,700만 톤으로 양적팽창이 463%에 도달하였다. 따라서 현 소비수준을 기준하여 양식 산업에서 감당해야 할 주요 수산식품의 예상 소

비량은 최소한의 증가폭인 연간 1%씩 수산물 소비가 증가할 것이라고 가정하면, 2035년에 1억 2천만 톤(세계 주요 수산식품에 대한 어업 생산량의 두 배) 정도가 생산되어야 할 것으로 추정되어(New, 1997) 양식 산업의 중요성이 그만큼 부각되고 있다. 이러한 전 세계적인 수산물 어획량의 정체 현상은 세계 인구의 자연발생적 증가에 따른 수산물 수요량의 증가를 충족시키기 위하여 양식 산업 전반에 걸쳐 급진적 발전을 요구하고 있다. 아울러 우리나라의 어류 양식 역시 1980년대 들어 주요 양식 어종에 대한 인공 종묘생산 기술이 정립된 이후, 현재 넙치와 조피볼락은 비롯한 다수의 어종에 대한 양식 기술의 보편화로 종묘생산부터 양성까지 완전양식을 통해 연중 생산되고 있다.

그러나 뱀장어는 지난 수십 년간 세계 각국에서 인공 종묘 생산에 관한 연구를 수행해 왔으나 아직까지 산업적인 종묘생산 기법이 정립되지 않아 종묘는 전적으로 자연산 실뱀장어의 채포에만 의존하는 불완전 양식이 이루어지고 있다. 국내 뱀장어 양식은 지난 1960년대 후반에 실뱀장어를 채포하여 흑자(黑仔; 어린 새끼 뱀장어)까지 양성하여 일본, 대만 등에 수출하는 형태로 시작하였으며, 그 이후로 지속적인 발전에 힘입어 현재 넙치, 조피볼락 등의 해산어류와 더불어 국내 3대 양식어종 중 하나이다.

뱀장어는 담수에서 성장한 후 해양으로 회유하여 산란하는 강하성(catadromous) 어류로 뱀장어목 뱀장어아목 뱀장어과(anguillidae)에 속한다. 세계적으로 뱀장어속 어류는 16종과 3아종 19종(African longfin eel, *Anguilla mossambica* Peters, 1852; African mottled eel, *A. bengalensis labiata* Peters, 1852; American eel, *A. rostrata* Le Sueur, 1821; Celebes longfin eel, *A. celebesensis* Kaup, 1856; European eel, *A. anguilla* Linnaeus, 1758; Highlands longfin eel, *A. interioris* Whitley, 1938; Indian mottled eel, *A. bengalensis bengalensis* Gray, 1831; Indian shortfin eel, *A. bicolor pacifica*

Schmidt, 1928; Indonesian longfinned eel, *A. malgumora* Kaup, 1856; Indonesian shortfin eel, *A. bicolor bicolor* McClelland, 1844; Japanese eel, *A. japonica* Temminck and Schlegel, 1847; Marbled eel, *A. marmorata* Quoy and Gaimard, 1824; Mottled eel, *A. nebulosa* McClelland, 1844; New Zealand longfin eel, *A. dieffenbachii* Gray, 1842; Pacific shortfinned eel, *A. obscura* Gunther, 1872; Polynesian longfin eel, *A. megastoma* Kaup, 1856; Short-finned eel, *A. australis* Richardson, 1841; Speckled longfin eel, *A. reinhardtii* Steindachner, 1867)으로 분류되고 있는데, 대부분이 인도양과 태평양의 열대지방에 서식하며, 북반구의 온대종으로는 극동산 뱀장어(Japanese eel, *A. japonica*), 유럽장어(European eel, *A. anguilla*) 및 미국장어(American eel, *A. rostrata*) 3종류와 남태평양의 온대에 3종류가 분포하는 것으로 알려져 있다(Aoyama, 2003). 이들 중 전 세계적으로 주로 양식되는 종류는 극동산 뱀장어(*A. japonica*)로 FAO 2007년 통계자료에 의하면 전 세계 총 양식 생산량은 257,818 톤으로 뱀장어과 총 양식 생산량인 266,335톤의 97% 이상을 차지하는 것으로 나타나 있다(Fig. 1).

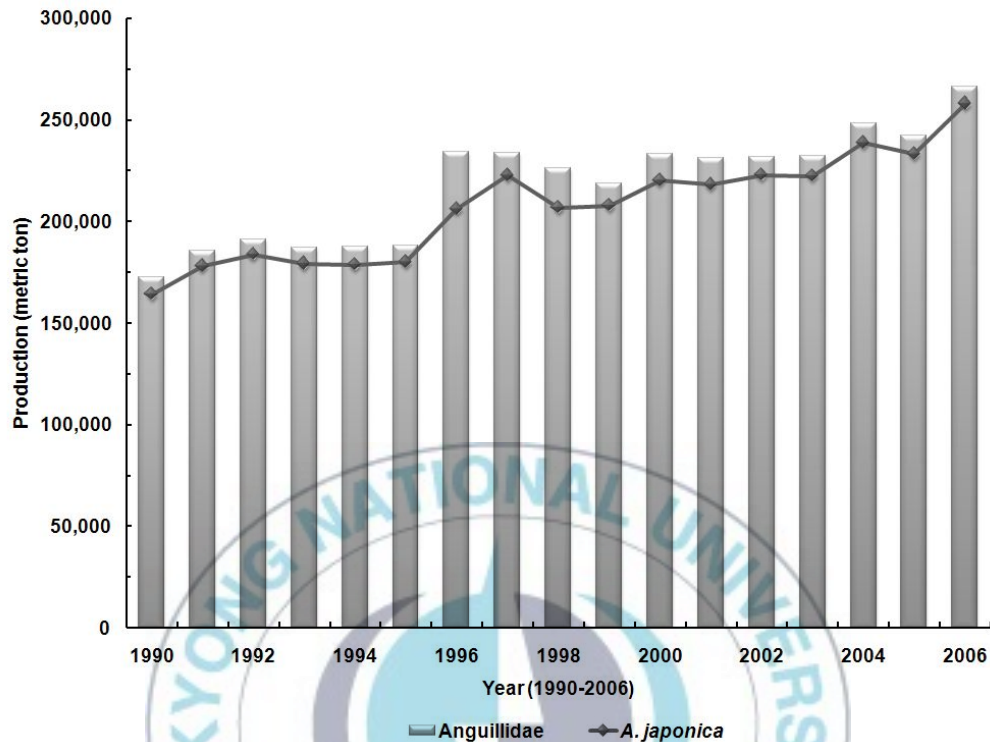


Fig. 1. Global aquaculture production of anguillidae including *A. japonica*.

특히, 중국, 대만, 일본 그리고 한국을 포함한 동북아시아 4개국의 뱀장어 양식 생산량이 전 세계 태평양산 뱀장어 생산량의 99% 이상에 이르는 것으로 나타났다. 주목할 점은 대만과 일본의 경우 1990년대에 뱀장어 양식 산업의 중흥기로 양식 생산량은 전 세계 총 생산량의 57%에 달했으나 환경·생태·산업적 여러 가지 문제점들로 인해 최근 뱀장어 양식 생산량은 정체 및 감소추세에 있다. 반면에 중국은 풍부한 노동력과 자원을 앞세워 1990년 67,672톤에 비해 2006년에 205,282톤으로 약 200% 증가를 보였으며, 전 세계 뱀장어 양식 생산량에서 차지하는 비율도 4%에서 80%로 괄목할 만한 성장을 이룩하였다(Fig. 2). 우리나라의 경우 2008년 통계청 자료에

의하면 뱀장어 양식 생산량은 1990년(1,146톤)부터 2007년(10,597톤)까지 지속적으로 증가하였고 전체 내수면 양식 어류 생산량의 약 절반(45.2%)을 차지하는 것으로 나타났으며, 넙치, 조피볼락과 더불어 국내 주요 3대 양식 어종으로 자리 잡고 있다(Table 1).

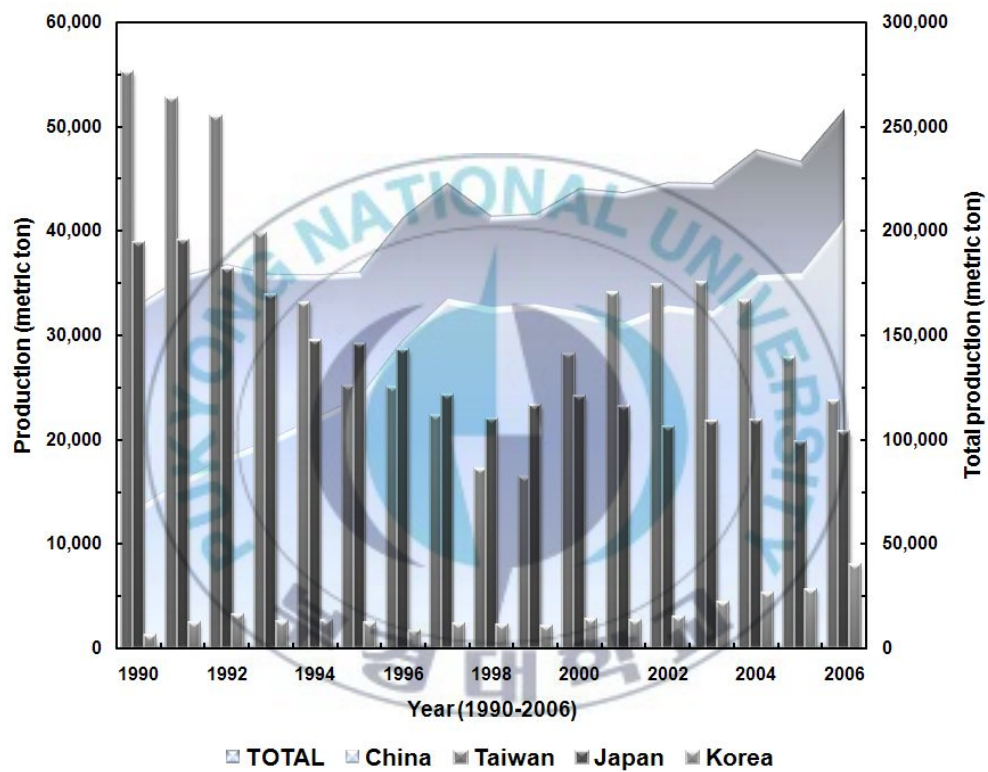


Fig. 2. Annual eel production in the world.

Table. 1. Annual aquaculture production of marine fish and freshwater fish in Korea (1990-2007)¹

		Units: metric ton									
		1990	1995	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Marine fish	Flounder	1,037	6,733	14,127	16,426	23,348	34,533	32,141	40,075	43,852	41,171
	Korea rockfish	0	985	8,473	9,254	16,550	23,771	19,576	21,297	27,517	35,564
	Red seabream	228	25	412	641	960	4,417	3,988	5,816	4,386	7,213
	Mullet	0	34	968	1,415	3,898	4,093	3,596	5,500	5,651	4,921
	Black seabream	0	9	221	275	685	1,084	1,379	2,671	2,705	2,841
	Seabass	391	193	605	873	2,006	2,778	1,850	2,600	1,571	2,361
	Others	1,000	381	1,180	413	626	1,717	1,946	3,478	5,441	3,592
Sub total		2,656	8,360	25,986	29,297	48,073	72,393	64,476	81,437	91,123	97,663
Fresh water fish	Eel	1,271	2,471	2,739	2,661	2,978	4,332	5,205	5,810	8,012	10,597
	Trout	1,542	2,799	2,808	2,834	2,869	3,521	3,502	3,320	1,878	2,882
	Catfish	606	2,150	2,966	2,669	2,634	1,708	1,916	2,575	2,985	2,266
	Crusian carp	6,146	2,790	2,432	2,065	1,659	1,107	1,503	1,321	1,223	1,495
	Common carp	2,875	1,687	1,716	1,325	1,166	1,137	1,661	1,640	1,281	1,094
	Israeli carp	9,926	10,918	1,838	1,222	991	920	702	975	706	800
	Mudfish	1,092	493	644	644	398	974	1,837	1,953	1,138	798
	Others	8,154	4,749	4,471	3,512	3,585	3,700	4,089	4,166	7,620	3,492
Sub total		31,612	28,057	19,614	16,932	16,280	17,399	20,415	21,760	24,843	23,424
Grand total		34,268	36,417	45,600	46,229	64,353	89,792	84,891	103,197	115,966	121,087

¹Korea national statistical office, Korean statistical information service (KOSIS).

뱀장어의 종묘 생산은 지난 수십 년간 세계 각국에서 연구를 수행해 왔으나 아직까지 산업적인 종묘생산 기법이 정립되지 않아 현재 뱀장어 양식은 자연산 실뱀장어의 채포에 의한 불완전 양식으로 이루어지고 있는 실정이다. 그런데, 최근 기후 및 대기환경의 변화, 환경오염, 남획 등의 문제로 인해 전 세계적으로 실뱀장어 자원량은 급격히 감소하고 있고(NOAA, 2008), 이러한 실뱀장어 자원량의 불안정은 전 세계적으로 뱀장어 양식의 큰 문제점으로 지적되고 있다. 최근 국내 보고에 의하면, 뱀장어 양식에 종묘로 이용되는 실뱀장어의 국내 입식량은 2007년에 13톤(국내 8.4톤, 수입 4.6톤)이지만, 1991년부터 현재까지 국내 실뱀장어 입식량은 등락을 반복하고 있어 뱀장어 양식을 위한 안정적인 종묘 수급에 걸림돌이 되고 있다(Fig. 3).

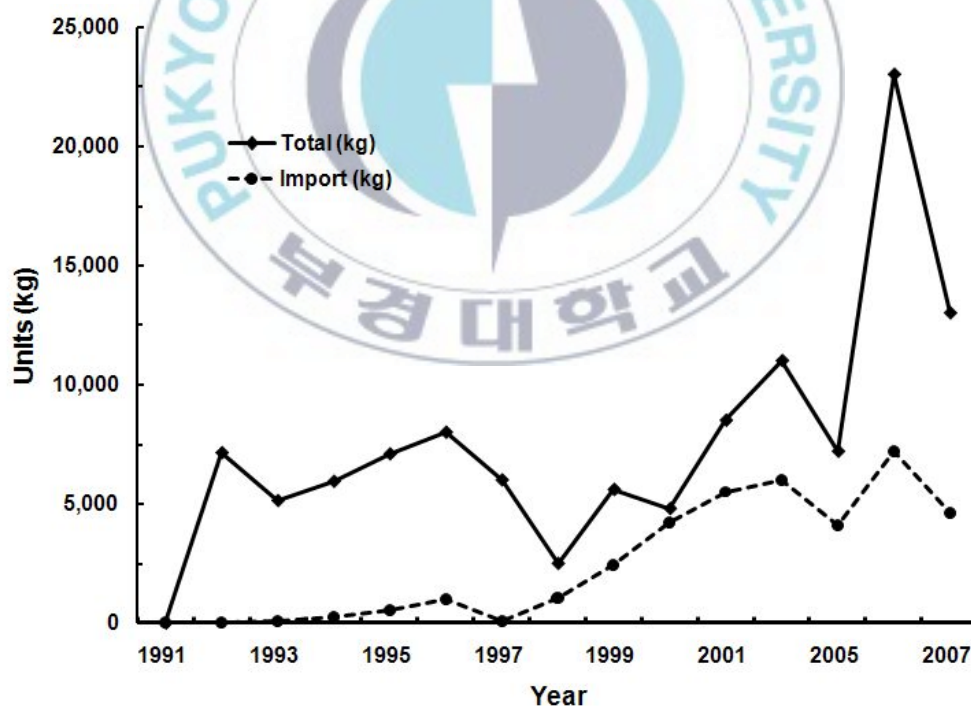


Fig. 3. Annual domestic amount of glass eel for the eel farms in Korea.

뱀장어의 인공 종묘 생산 기법을 정립하기 위해서는 먼저 자연계에서 산란장의 환경조건에 관한 생태학적 조사와 아울러 생활사가 우선적으로 구명되어야 한다. 1970년대 이후로 자연계에서 뱀장어의 주산란장을 구명하기 위한 수많은 연구가 수행된 결과, Tsukamoto (1992, 2003, 2006)는 북태평양 Mariana 군도 서부해역의 Suruga seamount 서부(14°N, 142°E)에서 갓 부화한 pre-leptocephali (전장 4.2-6.5 mm, 130 개체)와 leptocephali (전장 11.7-18.4 mm, 60 개체)를 채집하여 유전자 분석(real time polymerase chain reactions)을 통하여 *A. japonica*의 자어임을 확인하였고, 이석(otolith)의 미세구조의 분석을 통해 부화 후 2-5일이 경과한 개체들로 확인함으로써 이 부근이 뱀장어의 주산란장이라고 밝혔다.

현재까지 뱀장어의 자어들이 채집된 지역은 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 그림 내 왼쪽 지도의 경우 1961년과 2002년에 북태평양 서부에서 *A. japonica*가 채집된 지역으로, 노란색 원으로 표시된 구역에서 7mm 이상의 leptocephali가 발견되었고, 파란색 삼각형과 녹색 사각형으로 표시된 구역에서 실뱀장어로 변태단계의 leptocephali와 실뱀장어가 발견되었으며, 검정색 점으로 표시된 구역에서는 어떠한 자어도 발견되지 않았다. 오른쪽 지도는 북대서양 서부에서 *A. rostrata*와 *A. anguilla*의 leptocephali (전장 10 mm 이하)가 채집된 지역을 나타내고 있다. 또한, 두 개의 지도 내 적색 사각형으로 표시된 구역에서는 전장 7mm 이하의 leptocephali가 발견되었으며, 산란장에서 부화한 자어들은 북적도 해류를 타고 성장하면서 대륙으로 이동하는 것으로 밝혀졌다. 그러나 산란장 부근에서 성숙한 뱀장어가 발견되지 않아서 아직까지 전생활사를 구명하지 못하고 있다.

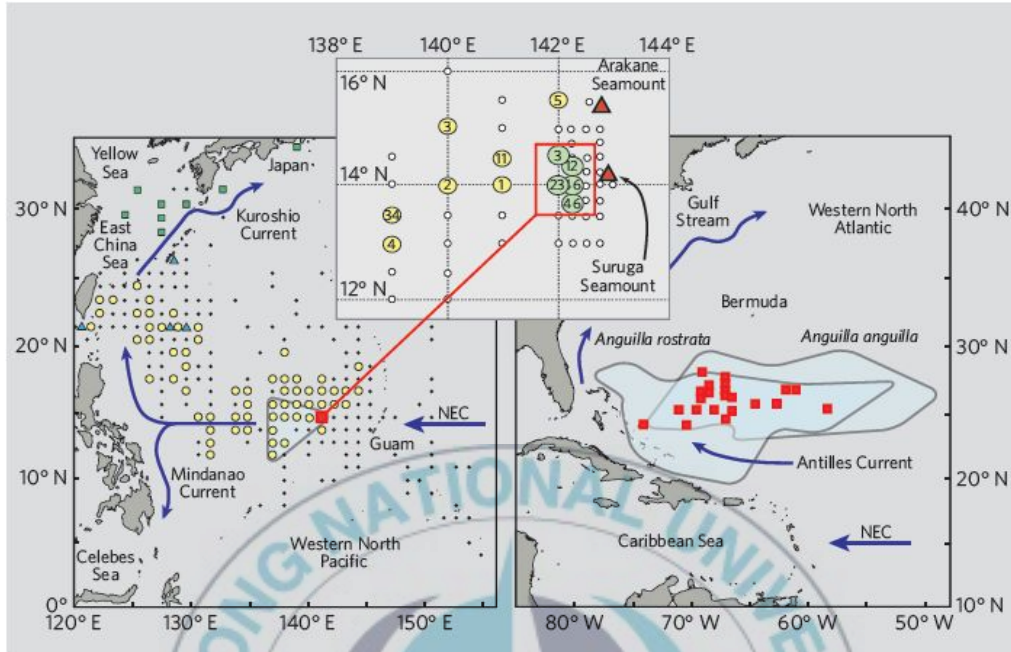


Fig. 4. Collection sites of small eel larvae (Tsukamoto, 2006).

이러한 이유로 뱀장어의 인공 종묘 생산 기술을 개발하여 알에서 어미까지 완전양식을 실현하고자 뱀장어의 성숙과 번식기구에 관한 많은 연구가 수행되어 오고 있다. 호르몬 처리에 의한 *A. japonica*의 인공 성성숙이 성공적으로 유도되었고 (Yamamoto and Yamauchi, 1974), 이후 초기발생 및 부화자어에 관한 연구가 진행되어 호르몬 처리에 의해 획득한 알과 정자를 인공수정하여 부화 후 5일(Yamamoto et al., 1975a, 1975b), *A. anguilla*에 있어서 부화 후 3.5일(Bezdenezhnykh et al., 1983)과 부화 후 2일(Pederson, 2003, 2004)까지 자어를 생존시킨 보고가 있다. 또한, 일본 양식연구소 번식연구팀에서 인위적인 성성숙에 의해 유도된 양식산 뱀장어에서 인공 수정법에 의해 자어를 생산 및 사육하여 부화 후 270일째 실뱀장어로 변태에

성공하였고, 그 후 60 cm 이상 사육한 것으로 보도된 바 있어(Tanaka et al., 2001, 2003) 뱀장어의 인공 종묘 생산 기법의 정립에 대한 과학적 가능성이 제시되고 있다. 그러나 수정률과 부화율 및 자어의 생존율이 극히 미약하여 최근까지 뱀장어의 인공 종묘 생산에 관한 기법은 정립하지 못하고 있는 실정이다. 따라서 뱀장어 양식에 있어 안정적인 종묘의 수급과 실뱀장어의 방류를 통한 자원량 증대를 위해 성공적인 뱀장어의 인공 종묘 생산 기법의 정립은 반드시 필요하고, 전 세계적으로 초미의 관심사가 되고 있다.



2. 연구의 필요성 및 목표

어류를 포함한 척추동물의 뇌하수체(pituitary)에서는 생식선 자극 호르몬(gonadotropins, GTHs)이 합성 및 분비된다. GTHs는 분자량 약 30 KDa의 당단백질 호르몬으로 여포 자극 호르몬(follicle-stimulating hormone; FSH)과 황체 형성 호르몬(luteinizing hormone, LH)의 두 가지 종류가 있고, 뇌하수체 전엽의 GTHs 생성세포에서 합성되어 세포질에 일차적으로 저장된다. 뇌하수체에서 GTHs의 합성과 분비는 시상하부에서 합성되는 생식선 자극 호르몬 방출 호르몬(gonadotropin-releasing hormone, GnRH), dopamine 그리고 생식선에서의 성호르몬에 의해 조절된다(Kobayashi et al., 2006; Ko et al., 2007; Hayakawa et al., 2008).

일반적으로 경골어류는 성성숙에 적절한 시기와 환경조건 하에서 우선 시상하부에서 합성 및 방출되는 GnRH의 자극에 의해 뇌하수체에서 합성되는 GTHs의 분비를 촉진한다. GTHs의 자극에 의해 난소 내 여포세포에서 합성 및 분비되는 성호르몬인 estradiol-17 β (E₂)가 혈류를 통해 간에 도달한 후, 난황단백전구체(vitellogenin; VTG)를 합성한다. VTG는 혈중으로 분비되어 난모세포에 흡수되어 난황구로써 축적되면서 난황형성(vitellogenesis)이 진행된다. 난황형성을 종료한 난모세포는 최종성숙 단계에 돌입하고 LH의 분비가 증대되면서 난소 내 여포조직에서 germinal vesicle breakdown (GVBD)를 유도하는 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP), prostaglandin (PG)과 같은 난성숙유도 스테로이드 호르몬(maturation inducing steroid hormone; MIH)이 생성되어 MIH이 난세포에 직접 작용함으로써 난성숙 및 배란이 유도되는 것으로 알려져 있다(Nagahama and Yamamoto, 1973; Nagahama, 1997). 따라서 경골어류에서 이러한 당단백질성 GTHs는

생식소의 형성과 발달 및 성성숙 유도에 필수적이다.

국내 주요 양식어종인 넙치, 조피볼락, 돔류, 송어 등은 완전 양식 대상종으로써 인위적인 번식조절에 의해 연중 안정적으로 종묘가 수급되어 생산되고 있다. 또한, 대부분의 어종에서는 사육 환경 하에서 성숙은 하지만 산란하지 않는 경우가 많고, 산란환경이 부적절하기 때문에 배란을 유도하는 내인성 LH surge가 억제된다고 추측되고 있고 이러한 경우 외인성 호르몬 1회 투여로 배란유도가 가능하다. 그러나 뱀장어는 인위적인 사육환경에서 생식소 형성과 발달이 이루어지지 않는다. 이를 위해 외인성 호르몬 처리 등의 인위적인 생식제어에 의한 성성숙 유도가 요구된다. 성숙·산란유도에 이용되어지는 호르몬으로는 GnRH 와 GTH가 주로 이용되고 있다. 현재 여러 양식 대상종을 중심으로 주로 이용되고 있는 종류로는 어류의 뇌하수체 추출물과 포유류 유래의 GTH 등이 있다. 어류의 뇌하수체는 GTH 와 LHRH의 함량이 높아서 대상 어류의 성성숙과 배란유도에 효과가 높은 것으로 알려져 있고, 생리 식염수에 마쇄 후 사용하거나 아세톤으로 탈수시켜 분말을 생리 식염수로 균질화하여 이용하고 있다. 잉어의 뇌하수체 추출물은 잉어류, 금붕어 그리고 메기 등의 어류에 주로 이용되고 있고, 연어 뇌하수체추출물은 연어와 뱀장어에 성공적으로 이용되고 있다. 한편, 포유류 유래의 GTH에 있어 인간태반용모성 GTH (human chorionic gonadotropin, HCG)은 줄무늬 농어, 흰농어, 홍민어, 메기 그리고 송어 등의 성숙 및 산란유도에 효과적으로 이용되고 있고, 임마혈청성 GTH (pregnant mare serum gonadotropin; PMSG)도 일부 이용되고 있다. 또한 시상하부에서는 GTH 방출을 억제하는 dopamine이 분비되고 있는 것이 알려져 있어, 그 저해제인 dopamine antagonist와 GnRH의 복합투여도 이용되고 있다. 이 방법에 의해 dopamine에 의한 GTH 방출억제가 약해지고, GnRH에 의한 GTH 방출작용이 증가되는 것으로 알려져 있다. 이러한 여러 종류의 외인성 호

르몬들은 대상 어종의 크기와 연령, 성성숙 정도, 산란이력, 수온, 계절 등을 충분히 고려하여 적절한 호르몬을 선정하는 것이 중요하다(Rottmann et al., 1991).

뱀장어는 양식장과 같은 인위적인 사육환경에서 뇌하수체의 GTHs 합성 능력이 극히 미약하여 생식소 형성과 발달이 이루어지지 않는 것으로 보고 되어(Kumar et al., 1997; Ma et al., 2004) 이를 위해 상기에서 언급한 외인 성 호르몬 처리 등의 인위적인 생식제어에 의한 성성숙 유도가 요구된다. 이러한 문제점을 해결하여 뱀장어의 인공 종묘 생산을 통한 완전양식을 실현하고자 지난 반세기 전 세계적으로 연구가 수행되어 왔다. 그 결과 암컷 뱀장어의 경우 외재성 GTH의 일종인 연어뇌하수체 추출물 salmon pituitary extracts, SPE)의 반복주사로 난황형성기 완료와 17α , 20β -dihydroxyprogesterone (DHP)를 처리하여 최종성숙 및 배란을 유도하였고 (Yamamoto and Yamauchi, 1974; Ohta et al., 1996a; Adachi et al., 2003; Kim et al., 2006a), 수컷의 경우 HCG의 반복주사를 통해 정자형성 및 배정을 유도하였다(Yamamoto and Yamauchi, 1972; Miura et al., 1991, 2003; Ohta et al., 1996b; Adachi et al., 2003; Kim et al., 2006b). 상기 인공 성성숙 유도의 방법에 관한 모식도는 Fig. 5와 같다(Tanaka et al., 2003). 이러한 방식으로 뱀장어의 인위적인 성성숙을 유도하였고 수정란과 자어를 획득하여 실험뱀장어로 변태 후 60cm 이상의 성체까지 성공적으로 사육한 보고(Tanaka et al., 2001, 2003)가 있지만, 배란이 유도된 암컷의 비율, 수정란의 수정률과 부화율, 자어의 생산량 및 생존율은 극히 낮은 실정이며 현재까지 산업적 규모의 종묘생산을 위한 기법은 정립하지 못한 상황에 있다. 따라서 본 연구에서는 성공적인 뱀장어의 인공 종묘 생산을 위한 기초연구로 먼저 번식 내분비학적 접근을 통해 효과적인 인공 성성숙 유도와 수정 및 부화를 위한 연구를 수행하였고, 이어 사료 영양학적 접근을 통해 치어기 뱀장어의

주요 영양소 요구량을 구명하여 향후 부화자어 및 친어의 사육 관리를 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

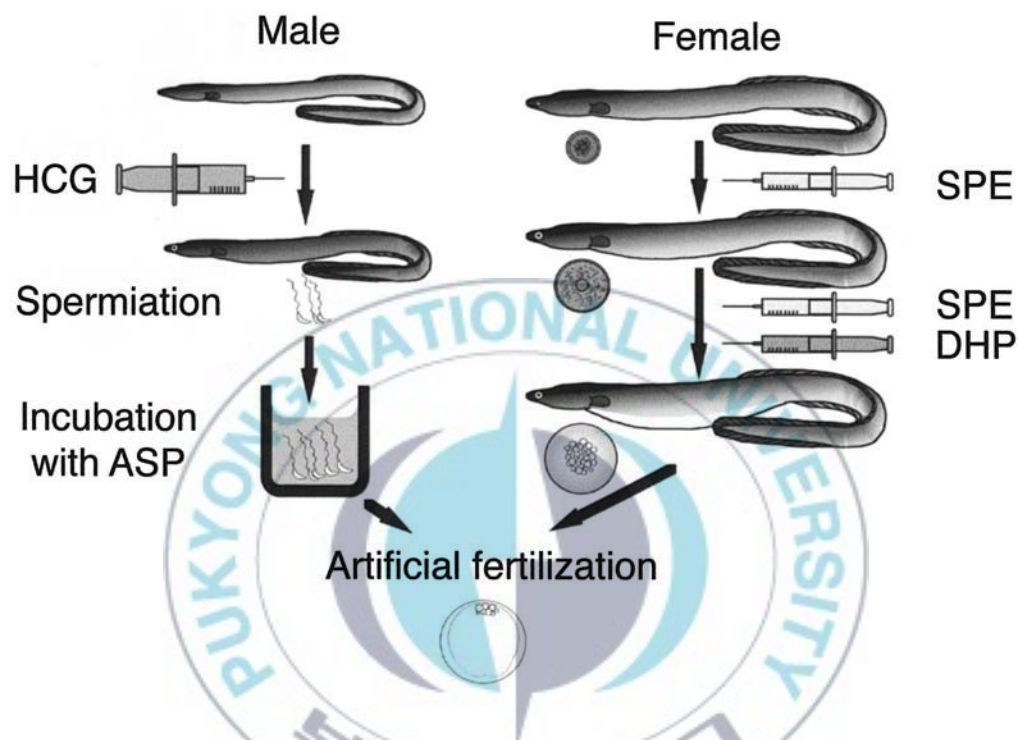


Fig 5. Summary of the methods for artificially inducing maturation and fertilization in *A. japonica*. HCG, human chorionic gonadotropin; ASP, artificial seminal plasma; SPE, salmon pituitary extract; DHP, 17, 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (Tanaka et al., 2003).

먼저 제 2장에서는 뱀장어 친어의 번식 내분비학적 연구의 일환으로 양식산 뱀장어의 암수 성감별법 제시, 인위적 성성숙 유도에 따른 성숙도 조사, 친어의 최적 성성숙 유도시기 확인 및 수정란과 부화자어의 형태학적 특징에 관한 5 가지의 세부연구를 수행하였다.

뱀장어는 성성숙 시기에 혼인색이나 체형 변화를 보이는 연어과 어류 등과는 달리 암·수의 외관상 구별이 매우 어렵다. 현재까지 호르몬 처리를 통한 성성숙 유도 시 어체의 성별에 상관없이 어체중에 따른 성성숙 유도가 이루어져 왔다. 그러나 양식산 뱀장어 또한 자연산과 마찬가지로 외관상 암·수 구별법이 명확하지 않으며, 자연에서와 달리 고밀도, 고수온 등의 특수한 환경 하에서 양식되고 있어 암·수의 비율이 자연산과는 차이가 있을 것으로 생각된다. 자연에서 채집된 뱀장어의 암·수 성비가 1:1에 가까운데 반하여, 양식산은 수컷의 비율이 월등히 높다고 보고 된 바 있다(Degani and Kushnirov, 1992; Tzchori et al., 2004). 그러므로 양식산 뱀장어를 이용하여 성공적인 종묘생산 기술을 확립하기 위해서는 호르몬으로 성숙을 유도하기에 앞서, 체계적이고 효과적인 성 구별법을 확립할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 양식 1년산 뱀장어를 이용하여 경골어류의 내분비학적 성숙 메커니즘을 이해하는데 도움이 된다고 알려져 있는 혈중 성호르몬 함량(Young et al., 1982; Kagawa et al., 1984)과 성비의 관련성을 조사하고, 아울러 혈액학적 성상 조사를 통하여 건강한 뱀장어 암·수 구별 및 친어 관리를 위한 기초조사를 수행하였다(제 2장 제 1절).

양식산 수컷 뱀장어의 정소는 대부분 정원세포로 구성되어 있으며, 이러한 개체를 해수에 장기 사육하더라도 암컷과는 달리 성숙이 진행되지 않는다고 보고하였다(Yamamoto et al., 1972). 그러므로 수컷 뱀장어의 인위적 성성숙 유도는 HCG 처리에 의해 정자형성 및 배정이 효과적으로 유도된다고 보고하고 있다(Yamamoto and Yamauchi, 1972; Miura et al., 1991, 2003; Ohta et al., 1996b; Adachi et al., 2003; Kim et al., 2006b). 이러한 이전의 연구들은 수컷 뱀장어의 정소발달 및 배정에 HCG가 효과적임을 입

증하고 있으나, HCG의 처리기간에 따른 개체들의 성성숙 정도와 관련된 혈중 성호르몬의 변동에 관한 내분비학적 접근이 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다. 따라서 본 연구는 뱀장어의 인공종묘생산 기술을 확립하기 위한 목적으로 수컷 뱀장어에 있어서 HCG 처리에 의한 인위적인 성성숙 기간 동안 체중의 변화와 혈중 성호르몬의 농도분석을 통해 성숙도를 확인하여 인위적 성성숙 유도에 의한 내분비 기구를 파악하고자 한다(제 2장 제 2절).

1970년대 이후, 많은 연구자들은 뱀장어의 인공종묘 생산을 위해 자연산 뱀장어(silver eel)의 생식소 발달과 성숙에 관한 연구를 수행한 바 있다(Yamamoto and Yamauchi, 1974; Satoh et al., 1992; Sato et al., 2000; Kim et al., 2006a). 그러나, 최근 하천 환경의 오염으로 인하여 뱀장어의 자원량이 급격히 감소하고 있고, 자연에서 친어로 사용 가능한 크기의 뱀장어를 채집하는 것이 점차 어려워지고 있는 실정이다. 양식산 뱀장어는 자연산과는 달리 연중 확보가 가능하고, 가격이 저렴하며, 성장 과정에서 여러 가지 생리학적인 조절이 용이한 양식산 뱀장어를 대상으로 한 연구가 수행되고 있으나 자연산 뱀장어에 비해 번식률이 저조한 것으로 알려져 있다(Ijiri et al., 1995, 1998; Sato et al., 2000). 이러한 문제점을 해결하기 위해, Kagawa et al. (1998)은 양식산 뱀장어를 해수에 순치하여 3개월 동안 사육한 결과 초기 난황형성이 유도되었고, 그 결과 알은 자연산의 silver eel의 성숙상태와 유사한 단계로 발달하였다고 보고하였다. 상기의 결과는 양식산 뱀장어도 사육환경 하에서 어떠한 호르몬 처리 없이 난황형성이 유도될 수 있다는 최초의 연구결과이다. 그러나 3개월 동안의 해수순치에 의해 초기 난황형성이 유도된 양식산 뱀장어와 관련한 혈중 성호르몬의 변동양상에 관한 연구는 전무한 실정이다. 본 연구는 3개월의 장기간 해수에 순치 후 호르

몬 처리(SPE or HCG)에 의해 성성숙이 유도된 양식산 암컷 뱀장어의 체중과 혈중 성호르몬 변동(testosterone; T, estradiol-17 β ; E₂, DHP)과 배란 후 인공수정에 의한 수정률과 부화율 측정에 관한 연구를 수행하였다(제 2장 제 3절).

자연계에서 뱀장어는 담수에서 yellow eel로 성장하다가 성숙기가 되면 체표가 은백색으로 변하는 silvering (은화과정)을 통해 silver eel로 변태하여 가을에서 초겨울 사이에 산란지로 강하한다. 이때 산란지로 회유하는 기간은 6개월(half year migrating) 정도로 이듬해 4월부터 11월 사이에 산란하는 것으로 알려져 있다(Tsukamoto, 1990). 그러나 채집된 부화유생수의 출현빈도와 이들의 이석 미세구조의 분석에 의하면 뱀장어의 주산란시기는 6월에서 7월 사이로 산란지로 회유하는 6개월의 기간 동안 생식소 발달이 이루어진다(Aoyama et al., 2001; Ishikawa et al., 2001). 한편, Yoshikawa (1995)는 담수에서 사육 중인 4년생 양식산 암컷 뱀장어(500 g 이상)에 있어서 계절에 따른 GSI의 변화를 조사한 결과, 가을부터 서서히 증가하기 시작하여 겨울에는 약 1.8 정도로 연중 최고치에 도달하여 이 시기에 외재성 호르몬 투여에 의한 성성숙 유도 개시시기로 판단하고 있다. 또한 자연산 뱀장어에 있어서도 가을에 난소의 성숙상태가 가장 잘 발달되었으나, 겨울에 난소가 퇴화하는 경향을 나타낸다고 보고하였다(Satoh et al., 1962). 이러한 결과는 자연산 뱀장어와 마찬가지로 양식산 뱀장어에 있어서도 계절에 따라 생식소 발달정도 및 성성숙 관련호르몬 작용에 대한 감수성이 변화하는 것으로 추측되어진다. 양식산 뱀장어의 경우 여러 연구자들의 결과를 종합해 보면 SPE 투여시기에 따라 투여횟수의 상이한 차이를 나타낸다(Ijiri et al., 1995; Ohta et al., 1997). 이러한 결과는 계절에 따라 난소에 대한 GTH 반응성 차이 뿐만 아니라 이러한 차이에 의해 번식률(배란율,

수정률 및 부화율)에 영향을 끼칠 것으로 추정된다. 따라서 본 연구는 양식산 뱀장어에 있어서 인위적 성성숙 처리시기에 따른 계절별 번식률을 조사하여 자연 산란시기와의 상호 관련성을 확인하고, 이를 통해 뱀장어의 적정 인공성성숙시기를 결정하고자 한다(제 2장 제 4절).

어류의 종묘생산의 관건은 양질의 수정란을 충분히 확보하는 것이다. 이러한 양질의 수정란을 확보하는 방법에는 자연산 어미에서 채란 및 채정하여 수정시키는 방법, 어미에 호르몬을 주사 후 배란 및 배정을 유도하여 인공수정 혹은 자연산란을 유도하는 방법 등이 있다. 이 중 가장 효과적인 방법은 자연산란을 유도하는 방법이라 할 수 있다. 또한, 뱀장어의 산란장과 산란시기의 수온이 명확히 밝혀져 있지 않았기 때문에 생태학적 연구와 더불어 부화율 향상을 위한 부화 적정수온 및 환경 조건 등에 관한 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다. 따라서 이 연구는 뱀장어의 인공종묘생산을 위한 중요한 과정 중의 하나인 양질의 수정란을 대량 확보하는 방법으로서, 호르몬 처리에 의해 인위적으로 성성숙을 유도한 어미를 실내수조에 수용하여 자연산란을 유도하였고, 난 발생 및 부화자어의 형태학적 연구를 통해 뱀장어 종묘생산을 위한 기초자료로 제공하고자 한다(제 2장 제 5절).

난질은 친어에 있어 난황형성 기간 동안의 환경조건, 연령, 크기 등에 영향을 받고, 특히 수정란의 영양·생화학적 조성은 난질과 배발생 및 부화유생의 생존력에 중요한 요인으로 작용하는 것으로 알려져 있다(Bromage, 1995). 이러한 결과는 일차적으로 난질(egg quality)에 문제가 있을 것으로 판단되고, Shin (2004)은 난질을 난의 생존능력이라 정의하여 그 중요성을 언급한 바 있다. 따라서 뱀장어의 인위적인 성성숙 유도 기간(3-4개월) 동안 친어의 체내 영양소 불균형과 결핍이 생식소 형성과 발달 및 성호르몬

합성에 직·간접적인 영향을 끼치는 것으로 추정된다. 친어의 적절한 영양학적 관리는 난질의 개선뿐만 아니라 종묘생산에도 영향을 미친다. 아울러 생식소의 발달과 번식력은 주요 영양소에 의해 영향을 받고, 특히 짧은 난황형성기간 동안 친어에게 영향을 미치는 것으로 알려져 있어 친어와 부화자어의 사양관리를 위한 영양학적 관리체계가 확립되어야 할 것으로 판단된다.

현재까지 알려진 어류의 생식에 영향을 미치는 주요한 영양소들 중에는 단백질, 지질, 고도 불포화 지방산 (n-3, n-6 highly unsaturated fatty acids, HUFAs)에 속하는 eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3), docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) arachidonic acid (ARA, 20:4n-6), 그리고 항산화 비타민에 속하는 비타민 C (ascorbic acid)와 비타민 E (α -tocopherol) 등이 있다. 이들 중 단백질과 지질은 동물에 있어 필수영양소로 여러 아미노산과 지방산들로 구성되어 있고, 에너지 생산에도 관여를 하며, 사료 생산비의 대부분을 차지하는 중요한 영양소이다. 따라서 단백질과 지질의 적절한 배합을 통해 뱀장어에 적합한 단백질과 에너지 비율을 설정하는 것은 중요하다. 또한 단백질 내 여러 아미노산들과 지질 내 지방산들은 수정란의 난질과 배발생에도 크게 영향을 미치는 것으로 보고된 바 있다(Seoka et al., 2003; Unuma et al., 2005). 따라서 본 연구에서는 뱀장어 치어를 대상으로 사료 내 에너지에 대한 적정 단백질 비율을 결정함으로써 체계적이고 경제성 있는 배합 사료 개발의 기초를 확립함과 동시에 친어의 번식률 향상과 부화자어의 생존율 향상을 위한 영양학적 기초자료를 제공하고자 한다(제 3장 제1절).

어류는 체내 세포의 기능유지를 위해 필연적으로 특정한 지방산을 요구하는데, 이러한 지방산은 체내에서 자체적으로 합성될 수 없어, 외부적으로 공급해 주지 않으면 정상적인 성장과 생존을 할 수 없다. 이와 같이 어류의 정상적인 성장과 생존을 위해 사료내 필수적으로 공급해 주어야 하는 지방산을 필수지방산(essential fatty acid, EFA)이라 하며, 뱀장어는 α

-linolenic acid (LNA, 18:3 n -3)와 linoleic acid (LA, 18:2 n -6)을 각각 0.5%씩 요구하는 것으로 알려져 있다(Takeuchi et al., 1980). 이는 생체막의 구성 성분으로서 뿐만 아니라 prostaglandins, thromboxanes 및 leukotrienes과 같은 eicosanoids의 주된 전구물질로서 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려져 있으나(Sargent, 1999), 실제 체내에서의 대사적 기능에 대한 구체적인 경로에 관한 연구는 아직 밝혀지지 않았다. 또한, HUFAs에 속하는 EPA와 DHA는 세포막의 인지질 구성성분으로 어류의 난발달과 번식력 및 자어의 생존을 결정하는 중요한 영양소로 알려져 있고, 일부 어종에서는 사료 내 HUFAs는 산란기 동안 난에 흡수되고 대사작용을 통해 어류의 성숙과 스테로이드 합성에 영향을 준다(Bruce et al., 1999; Sargent et al., 1995; Bell et al., 1997; Estevez et al., 1999). 그리고 ARA는 eicosanoids의 전구물질로 배란을 유도하는 prostaglandin의 합성(Abayasekara and Wathes, 1999; Farndale et al., 1999)에 작용하여 번식과 난발달에 영향을 미치고(Abayasekara and Wathes, 1999) 뱀장어와 같은 회유성 어류의 성장과 번식에도 중요한 요인으로 작용할 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서는 n -3원으로 LNA, DHA 그리고 EPA와 n -6원으로 LA와 ARA를 사료 내 적정 비율로 첨가하여 뱀장어 치어의 성장과 체조성 및 혈액성상에 미치는 영향을 평가하였다. 상기의 결과를 통해 뱀장어의 필수지방산과 아라키돈산 요구량을 평가하고, HUFAs에 대한 이용성을 확인함으로써 향후 뱀장어 치어의 번식률 향상 및 부화자어의 사육을 위한 기초자료로 활용하고자 한다(제 3장 제 2절, 제 3절).

항산화 비타민에 속하는 비타민 C와 비타민 E는 강력한 항산화제로 어류의 생식에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 비타민 C는 정자의 형성과정 동안 정모세포가 지방산 축적에 따른 산화현상을 방지하는 항산화 기능을 가지고 있어 정자의 활성을 높여주고, 성호르몬 합성, 난황 형성, 난질개선, 수정률 및 부화율 향상을 위한 중요한 영양소이다

(Dabrowski et al., 1994; Dabrowski and Ciereszko, 2001; Lee and Dabrowski, 2004;). 비타민 E 역시 어류의 번식에 중요한 작용을 하는 영양소로 생식소 형성 및 발달, 난황형성, 배발생 단계, 자어의 부화 및 생존율 향상에 영향을 미치는 것으로 여러 어종에 대한 연구결과에서 보고된 바 있다 (Takeuchi et al., 1981; Izquierdo et al., 2001). 이에 대해, 현재 뱀장어의 친어관리에 있어 항산화 비타민의 이용성에 관한 연구는 아주 미흡한 실정이며 성공적인 뱀장어의 인공종묘생산을 위해 상기 영양소에 관한 영양학적 연구는 절대적으로 필요한 상황이다. 따라서 본 연구는 뱀장어의 성공적인 인공종묘생산을 위한 기초연구의 일환으로 치어기 뱀장어에 있어 항산화 비타민 C와 E의 적정 요구량을 평가하여 친어의 번식률 향상 및 부화자어 사육을 위한 영양학적 기초자료로 활용하고자 한다(제 3장 제 4절).

3. 참고문헌

- Abayasekara, D. R. E. and D. C. Wathes, 1999. Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 61, 275-287.
- Adachi, S., S. Ijiri, Y. Kazeto and K. Yamauchi, 2003. Oogenesis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. (in) K. Aida, K. Tsukamoto and K. Yamauchi (eds.), Eel Biology. Springer-Verlag, Tokyo, pp. 301-329.
- Aoyama, J., 2003. Origin and evolution of the freshwater eels, genus *Anguilla*. (in) K. Aida, K. Tsukamoto, K. Yamauchi (eds.), Eel Biology. Springer-Verlag, Tokyo, pp. 19-29.
- Aoyama, J., S. Ishikawa, T. Otake, N. Mochioka, Y. Suzuki, S. Watanabe, A.

- Shinoda, J. Inoue, P. M. Lokman, T. Inagaki, M. Oya, H. Hasumoto, K. Kubokawa, T. W. Lee, H. Fricke and K. Tsukamoto, 2001. Molecular approach to species identification of eggs with respect to determination of the spawning site of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Fish. Sci., 67, 761-763.
- Bell, J. G., B. M. Farndale, M. P. Bruce, J. M. Navas and M. Carrillo, 1997. Effects of broodstock dietary lipid on fatty acid composition of eggs from sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture, 149, 107-119.
- Bezdenezhnykh, V. A., G. A. Prokhorchik, A. M. Petrikov, V. B. Petukov and M. V. Plyuta, 1983. Obtaining the larvae of European eel *Anguilla anguilla* L. (Pisces, Anguillidae) under experimental conditions. Dokl. Akad. Nauk SSSR., 268(5), 1264-1266.
- Bromage, N., 1995. Broodstock management and seed quality general considerations. (in) N. R. Bromage and R. G. Robert (eds), Broodstock management and egg and larval quality. Blackwell, Oxford, pp. 1-24.
- Bruce, M., F. Oyen, G. Bell, J. F. Asturiano, B. Farndale, M. Carrillo, S. Zanui, J. Ramos and N. Bromage, 1999. Development of broodstock diets for the European sea bass with special emphasis on the importance of n-3 and n-6 highly unsaturated fatty acids to reproductive performance. Aquaculture, 177, 85-97.
- Dabrowski, K. and A. Ciereszko, 2001. Ascorbic acid and reproduction in fish: endocrine regulation and gamete quality. Aquac. Res., 32, 1-19.
- Dabrowski, K., A. Ciereszko, L. Ramseyer, D. Culver and P. Kestemont, 1994. Effects of hormonal treatment on induced spermiation and ovulation in the yellow perch, *Perca flavescens*. Aquaculture, 120, 171-180.

- Degani, G. and D. Kushnirov, 1992. Effects of 17β -estradiol and grouping on sex determination of European eels. *Prog. Fish Culturist.*, 54, 88-91.
- Estevez, A., L. A. McEvoy, G. Bell and J. R. Sargent, 1999. Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot, *Scophthalmus maximus* larvae fed live prey enriched in AA and EPA. *Aquaculture*, 180, 321-343.
- Farndale, B. M., G. Bell, M. P. Bruce, N. R. Bromage, F. Oyen, S. Zanuy, and J. R. Sargent, 1999. Dietary lipid composition affects blood leucocyte fatty acid compositions and plasma eicosanoid concentrations in European sea bass. *Aquaculture*, 179, 335-350.
- Hayakawa, Y., T. Morita, W. Kitamura, S. Kanda, A. Banba, H. Nagaya, K. Hotta, Y. C. Sohn, G. Yoshizaki and M. Kobayashi, 2008. Biological activities of single-chain goldfish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Aquaculture*, 274, 408-415.
- Ijiri, S., Y. Kazeto, N. Takeda, H. Chiba, S. Adachi and K. Yamauchi, 1995. Changes in serum steroid hormones and steroidogenic ability of ovarian follicles during artificial maturation of cultivated Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 135, 3-16.
- Ijiri, S., T. Takaki, N. Takeda, H. Tachiki, S. Adachi and K. Yamauchi, 1998. Pretreatment reproductive stage and oocyte development induced by salmon pituitary homogenate in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.*, 64, 531-537.
- Ishikawa, S., K. Suzuki, T. Inagaki, S. Watanabe, Y. Kimura, A. Okamura, T. Otake, N. Mochioka, Y. Suzuki, H. Hasumoto, M. Oya, M. J. Miller, T.

- W. Lee, H. Fericke and K. Tsukamoto, 2001. Spawning time and place of the Japanese eel, *Anguilla japonica* in the North Equatorial Current of the western North Pacific Ocean. Fish. Sci., 67, 1097-1103.
- Izquierdo, M. S., H. F. Palacios and A. G. J. Tacon, 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. Aquaculture, 197, 25-42.
- Kagawa, H., G. Young and Y. Nagahama, 1984. In vitro estradiol-17 β and testosterone production by ovarian follicles of the goldfish, *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol., 54, 139-143.
- Kagawa, H., N. Iinuma, H. Tanaka, H. Ohta and K. Okuzawa, 1998. Effects of rearing period in seawater on induced maturation in female Japanese eel, *Anguilla japonica*. Fish. Sci., 64, 77-82.
- Kim, D. J., E. H. Kim, M. W. Park, Y. C. Cho and S. G. Lim, 2006a. Plasma sex steroid hormone profiles in artificially maturing wild eel, *Anguilla japonica*. J. Aquacult., 19(4), 267-274.
- Kim, E. O., J. Y. Bae, S. G. Lim, M. H. Son, M. W. Park, M. S. Park, Y. C. Cho and D. J. Kim, 2006b. Plasma sex steroid hormone profiles and testicular development in artificially maturing cultured male eel, *Anguilla japonica*. J. Kor. Fish. Soc., 39(6), 466-471.
- Ko, H., W. D. Park, D. J. Kim, M. Kobayashi and Y. C. Sohn, 2007. Biological activities of recombinant Manchurian trout FSH and LH: their receptor specificity, steroidogenic and vitellogenic potencies. J. Mol. Endocrinol., 28, 99-111.

- Kobayashi, M., T. Morita, K. Ikeguchi, G. Yoshizaki, T. Suzuki and S. Watabe, S, 2006. In vivo biological activity of recombinant goldfish gonadotropins produced by baculovirus in silkworm larvae. *Aquaculture*, 256, 433-442.
- Kumar, T. R., Y. Wang, N. Lu and M. M. Matzuk, 1997. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat. Genet.*, 15, 201-204.
- Lee, K. J. and K. Dabrowski, 2004. Long-term effects and interactions of dietary vitamins C and E on growth and reproduction of yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquaculture*, 230, 377-389.
- Ma, X., Y. Dong, M. M. Matzuk and T. R. Kumar, 2004. Targeted disruption of luteinizing hormone β -subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 101, 17294-17299.
- Miura T., K. Yamauchi, H. Takahashi and Y. Nagahama. 1991. Human chorionic gonadotropin induces all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Dev. Biol.*, 146, 258-262.
- Miura, T., C. Miura and K. Yamauchi. 2003. Spermatogenesis in the Japanese eel. (in) K. Aida, K. Tsukamoto and K. Yamauchi (eds.), *Eel Biology*. Springer-Verlag, Tokyo, pp. 319-329.
- Nagahama, Y., 1997. 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocyte: Mechanisms of synthesis and action. *Steroids*, 62, 190-196.
- New, M. B., 1977. *Aquaculture and the capture fisheries balancing the scales*.

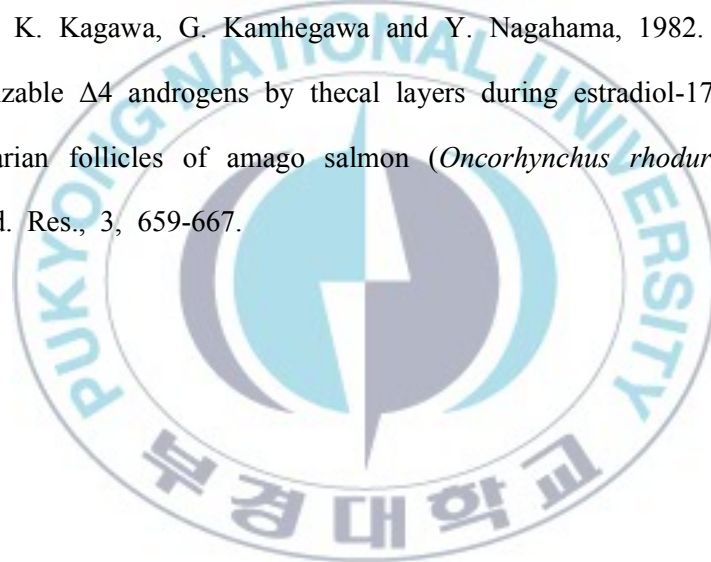
- World Aquacult. Soc., 28, 11-30.
- NOAA, National Marine Fisheries Service, Mysterious eel fishery decline blamed on changing ocean conditions. Science Daily, 2008.
- Ohta, H., H. Kagawa, H. Tanaka, K. Okuzawa and K. Hirose, 1996a. Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture, 139, 191-301.
- Ohta, H., H. Kagawa, K. Tanaka, K. Okuzawa and K. Hirose. 1996b. Milt production in the Japanese eel, *Anguilla japonica* induced by repeated injections of human chorionic gonadotropin. Fish. Sci., 62, 44-49.
- Ohta, H., H. Kagawa, H. Tanaka, K. Okuzawa, N. Iinuma and K. Hirose, 1997. Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Fish. Physiol. Biochem., 17, 163-169.
- Pedersen, B. H., 2003. Induced sexual maturation of the European eel, *Anguilla anguilla* and fertilisation of the eggs. Aquaculture, 224, 323-338.
- Pedersen, B. H., 2004. Fertilisation of eggs, rate of embryonic development and hatching following induced maturation of the European eel *Anguilla anguilla*. Aquaculture, 237, 461-473.
- Rottmann, R. W., J. V. Shireman and F. A. Chapman, 1991. Hormonal control of Reproduction in Fish for Induced Spawning. Southern Regional Aquaculture Center, No, 424.
- Sargent, J. R., G. Bell, M. V. Bell, R. J. Henderson and D. R. Tocher, 1995. Requirement criteria for essential fatty acids. J. Applied Ichthy. 11, 183-198.

- Sargent, J., R. G. Bell, L. McEvoy, D. Tocher and A. Estevez, 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, 177, 191-199.
- Sato, N., I. Kawazoe, Y. Suzuki and K. Aida, 2000. Adequate intervals of sGTH administration to induce vitellogenesis, and induction of ovulation by simultaneous administration of sGTH and 17 α -hydroxyprogesterone in the Japanese eel. *Fish. Sci.*, 66, 644-654.
- Satoh, H., N. Nakamura and T. Hibiya, 1962. Studies on the sexual maturation of the eel- I . On the sex differentiation and the maturing process of the gonads. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 28, 579-584.
- Satoh, H., Y. Yamamori and T. Hibiya, 1992. Induced spawning of the Japanese eel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 825-832.
- Seoka, M., S. Yamada, Y. Iwata, T. Yanagisawa, T. Nakagawa and H. Kumai, 2003. Differences in the biochemical content of buoyant and non-buoyant eggs of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 216, 355-362.
- Shin, D. H., 2004. Biochemical and histological studies on egg quality in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Ph. D. thesis, Hokkaido University, Hokkaido, Japan, 104 pp.
- Takeuchi, M., S. Ishii and T. Ogiso, 1981. Effect of dietary vitamin E on growth, vitamin E distribution, and mortalities of the fertilized eggs and fry in ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Bull. Tokai Regional Fish. Res. Lab.*, 104, 111-122.
- Takeuchi, T., S. Arai, T. Watanabe, and Y. Shimma. 1980. Requirement of eel *Anguilla japonica* for essential fatty acids. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 46,

345-353.

- Tanaka, H., H. Kagawa and H. Ohta, 2001. Production of leptocephali of Japanese eel, *Anguilla japonica* in captivity. *Aquaculture*, 201, 51-60.
- Tanaka, H., H. Kagawa, H. Ohta, T. Unuma and K. Nomura, 2003. The first production of glass eel in captivity: fish reproductive physiology facilitates great progress in aquaculture. *Fish Physiol. Biochem.*, 28, 493-497.
- Tsukamoto, K., 1992. Discovery of spawning area for the Japanese eel. *Nature*, 356, 789-791.
- Tsukamoto, K., 2006. Spawning of eels near a seamount. *Nature*, 439(23), 929.
- Tsukamoto, K., T. Otake, N. Mochioka, T. W. Lee, H. Fricke, T. Inagaki, J. Aoyama, S. Ishikawa, S. Kimura, M. J. Miller, H. Hasumoto, M. Oya and Y. Suzuki, 2003. Seamounts, new moon and eel spawning: The search for the spawning site of the Japanese eel. *Environmental Biology of Fishes*, 66(3), 221-229.
- Tzchori, I., G. Degani, R. Elisha, R. Eliyahu, A. Hurvitz, J. Vaya and B. Moav, 2004. The influence of phytoestrogens and oestradiol-17 β on growth and sex determination in the European eel, *Anguilla anguilla*. *Aquacult. Res.*, 35, 1213-1219.
- Unuma, T., S. Kondo, H. Tanaka, H. Kagawa, K. Nomura and H. Ohta, 2005. Relationship between egg specific gravity and egg quality in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 246, 493-500.
- Yamamoto, K., O. Hiroi, T. Hirano and T. Morioka, 1972. Artificial maturation of cultivated male Japanese eel by single synahorin injection.

- Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 40, 1-7.
- Yamamoto, K and K. Yamauchi, 1974. Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium. Nature, 251, 220-221.
- Yamamoto, K., K. Yamauchi and S. Kasuga, 1975a. On the development of Japanese eel, *Anguilla japonica*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 41(1), 21-28.
- Yamamoto, K., K. Yamauchi and T. Morioka, 1975b. Pre-leptocephalic larvae of Japanese eel, *Anguilla japonica*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 41(1), 29-34.
- Young, G., K. Kagawa, G. Kamhegawa and Y. Nagahama, 1982. Secretion of aromatizable $\Delta 4$ androgens by thecal layers during estradiol-17 β production by ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) in vitro. Biomed. Res., 3, 659-667.



제 2장 뱀장어의 인공 종묘생산을 위한 성성숙 유도

제 1절 친어관리를 위한 양식산 뱀장어의 성감별 방법

1. 서론

지금까지 뱀장어의 인공 성숙에 관한 연구는 어류의 뇌하수체 추출물을 사용하여 유럽산 뱀장어의 성성숙 유도가 성공한 이래 많은 연구자들에 의해 수행되어 왔다(Fontaine, 1936; Yamamoto and Yamauchi, 1974; Tanaka et al., 1997). 그러나 이러한 수년간의 노력에도 불구하고 뱀장어의 종묘생산 기술은 아직 확립되지 못한 실정이다.

뱀장어는 성성숙 시기에 혼인색이나 체형 변화를 보이는 연어과 어류 등과는 달리 암·수의 외관상 구별이 매우 어렵다. 현재까지 호르몬 처리를 통한 성성숙 유도 시 어체의 성별에 상관없이 어체중에 따른 성성숙 유도가 이루어져 왔다. 즉 가을과 겨울에 걸쳐 바다로 내려가는 자연산 뱀장어를 채집하여 어체중 500 g 이상의 것을 암컷으로, 300~500 g을 수컷으로 판정하고 성성숙에 사용하였다(Ijiri et al., 1995, 1998). 또한 뱀장어는 어체의 연령보다는 크기에 높은 상관성을 보인다고 보고된 바 있었으나(Colombo et al., 1984), 자연산 뱀장어를 사용하여 호르몬 처리를 통한 인공적인 성성숙 유도는 보다 체계적인 유도 방법의 고찰이

필요하다. 최근 하천 환경의 오염으로 인하여 뱀장어의 자원량이 감소하고, 자연에서 친어로 사용가능한 크기의 뱀장어를 채집하는 것이 점차 어려워지고 있는 실정이므로 자연산과는 달리 연중 채집이 가능하고, 가격이 저렴하며, 성장 과정에서 여러 가지 생리학적인 조절이 용이한 양식산 뱀장어를 친어로 하여 성성숙을 유도하고자 하는 연구가 시도되고 있다(Ohta and Tanaka, 1997, Ijiri et al., 1995). 그러나, 양식산 뱀장어 또한 자연산과 마찬가지로 외관상 암·수의 성구별 방법이 명확하지 않으며, 자연에서와 달리 고밀도, 고수온 등의 특수한 환경 하에서 양식되고 있어 암·수의 비율이 자연산과는 차이가 있을 것으로 생각된다. 자연에서 채집된 뱀장어의 암·수 성비가 1:1에 가까운데 반하여, 양식산은 수컷의 비율이 월등히 높다고 보고 된 바 있다(Degani and Kushnirov, 1992; Tzchori et al., 2004). 그러므로 양식산 뱀장어를 이용하여 성공적인 종묘생산 기술을 확립하기 위해서는 호르몬으로 성숙을 유도하기에 앞서, 체계적이고 효과적인 성 구별법을 확립할 필요가 있다.

따라서 본 연구에서는 양식 1년산 뱀장어를 이용하여 경골어류의 내분비학적 성숙 메커니즘을 이해하는데 도움이 된다고 알려져 있는 혈중 스테로이드 호르몬 함량(Young et al., 1982; Kagawa et al., 1984)과 성비의 관련성을 조사하고, 아울러 혈액학적 성상 조사를 통하여 건강한 뱀장어 암·수 구별 및 친어 관리를 위한 기초 자료로서 사용하고자 한다.

2. 재료 및 방법

1) 실험어 및 사육관리

실험어는 경남 김해에 위치한 축양장에서 전장 40~60 cm, 체중 100~400 g 사이의 1년산 양식 뱀장어(n=50)를 구입하여 이용하였다(Table 20). 뱀장어는 어체중을 측정한 후, 부경대학교 수산과학연구소 내의 2,000 L FRP 수조에 혈액 샘플 전까지 이동 스트레스로 인한 혈액학적 변화를 최소화하기 위하여 1주일간 순치시켰다. 이때 수온은 24℃ 였으며 담수를 이용하였다. 순치가 완료된 뱀장어는 어체의 크기에 따라 각각 4그룹(전장 G1: 40~45; G2: 45~50; G3: 50~55; G4: 55~60 cm)으로 나누었으며, 2-phenoxyethanol (sigma, USA)를 이용하여 마취한 후, 미부정맥에서 헤파린을 처리한 1 mL 주사기로 혈액을 채취하여 실험에 사용하였다. 해부 후 간과 생식소를 절취하였고, 생식소의 외부 형태 관찰을 통해 1차적으로 암수를 나누고, 조직학적 관찰을 실시하여 확인하였다.

2) 생식소의 조직학적 관찰

혈액을 채취한 뱀장어의 생식소 일부를 절취한 다음 10% 중성 포르말린에 1차 고정하고, Bouin 용액(picric acid 75 mL + formaldehyde 25 mL + acetic acid 5 mL)으로 2차 고정하였다. 이후 파라핀 상법에 따라 4~5 μ m의 두께로 절편한 다음, haematoxylin과 eosin으로 이중 염색하고, 광학현미경으로 관찰하여 개체의 성비와 생식소 발달 단계를 관찰하였다.

3) 혈중 호르몬 조사

뱀장어 혈장 estradiol-17 β , testosterone의 농도 (ng/mL)는 Aida et al. (1984)의 방법에 따라 RIA (radioimmunoassay)를 이용하여 이루어졌다. 스테로이드 추출은 혈장 200 μ l에 2.0 mL의 diethyl ether를 첨가하여 잘

혼합한 후 5~10분간 -80°C 상태에서 방치하였다. 상층의 유기 용매층(free steroid)만을 시험관에 옮겨 원심 농축기로 완전 건조시켰으며, 위의 추출 과정을 2회 반복 실시하였다. 각각의 추출물은 1 mL의 0.1% gel PBS 완충용액(pH 7.5)에 재용해되어 정량할 때까지 -20°C 에 보관하였다. 3.84~0.03 ng/mL까지 8단계로 만들어진 standard와 시료 각각 200 μL 에 3H으로 방사 표지된 스테로이드(NEN과 Amersham제품) 100 μL (약 10,000 cpm)씩 첨가 후 희석 항체 200 μL 를 넣고 교반시켜 4°C 하에서 12시간 동안 반응시켰다. 항원 항체의 결합형과 유리형을 분리하기 위해 DCC (dextran coated charcoal)를 250 μL 씩 첨가하여 4°C 에서 15분간 방치한 후 원심분리(4°C , 2000 g, 15 min.)한 뒤, 결합형 상등액을 취하여 여기에 3mL의 scintillation cocktail (liquifluor와 toluene의 혼합)을 넣고 액체 섬광계측기로 측정하였다. Estradiol-17 β , testosterone에 대한 항체는 Sigma 제품을 사용하였다.

4) 혈액학적 성상 조사

채취한 혈액의 헤마토크리트(Ht, %)는 micro hematocrit법(Micro Hematocrit Reader, Hawksley)에 의해 측정하였으며, 헤모글로빈 함량(Hb, g/dL)은 cyanhemoglobin 법(Yokoyama, 1960)에 의하여 측정하였다. 이후 남은 혈액을 상온에서 10분 이상 방치하였다가 원심 분리(12,000 rpm, 5 min)하여 얻은 혈장을 분석 전까지 -76°C 에 보관하였다. 혈장 glucose, GOT, GPT, 총 단백질량의 측정에는 혈액 분석기(Vitros DT 60 II, KOREA)를 사용하였다.

5) 통계처리

실험 자료는 SPSS-PC 통계 패키지를 이용하여 one-way ANOVA 및 Duncan's multiple range test에 의하여 분석하였다.

3. 결과

1) 성비

양식산 뱀장어의 크기에 따른 성비는 Fig. 6에 나타낸 바와 같다. 본 연구에서 조사한 G1그룹의 뱀장어는 100%, G2 그룹에서는 75%로 수컷의 비율이 높았으나, 이와는 반대로 G3 그룹에서는 암컷의 비가 67%, G4 그룹에서는 72%가 암컷으로 나타나 개체의 크기가 클수록 암컷의 비가 높아지는 경향을 보였다. 또한 이들 생식소의 외부 형태는 암컷은 뱀장어 생식소의 전형적인 형태로서 생식소의 외부 형태는 암·수 모두 생식소가 배측을 따라 선형으로 항문 부분까지 연장되어 있었다. 또한 수컷은 투명한 흰색으로 반원형의 엽상체가 관찰되었으며, 암컷은 작은 주름이 생식소 전체를 덮어 커튼 모양으로 관찰되었다. 조직학적 관찰을 통한 생식소 발달 단계는 수컷은 초기 정모세포 단계로 나타났으며, 암컷의 경우에도 제 1차 난황구기로서 난황이 형성되는 생식소의 발달 초기 단계였다(Fig. 7).

2) 혈중 성호르몬 함량

수컷과 암컷의 혈장 내 호르몬 함량 중 testosterone의 함량은 0.08 ng/mL로 나타난 수컷 그룹에 비해 암컷 그룹이 0.13 ng/mL로 나타나

유의하게 높은 값을 보였으며, estradiol-17 β 의 함량 또한 암컷 그룹(0.14 ng/mL)이 수컷 그룹(0.05 ng/mL)보다 유의하게 높은 결과를 나타내었다(Table 2).

3) 혈액학적 성상

뱀장어 성별에 따른 헤마토크리트의 결과는 Table 3에 나타내었다. 수컷의 함량이 31.7%로 37.7%의 암컷 그룹보다 낮은 값을 나타내었으나, 유의한 차이는 없었다($P>0.05$). 혈중 헤모글로빈의 함량은 수컷은 14.0 g/dL로 11.4 g/dL를 보인 암컷 그룹보다 높은 값을 나타내었으나, 유의차는 없었다($P>0.05$). 수컷의 GOT 결과는 152 IU/L로 125 IU/L를 보인 암컷 그룹보다 유의하게 높은 값을 보였으나($P<0.05$), 이와 반대로 GPT의 결과는 암컷 그룹이 수컷 그룹보다 높은 함량을 나타내었다. 혈중 protein의 함량과 glucose 함량은 암·수 그룹 사이에 유의한 차이를 나타내지 않았다.

4. 고찰

일반적으로 양식에 있어서 중요한 가치를 가지는 많은 어종들이 자연산과 양식산 모두에서 인공적으로 성성숙 시키는데 어려움을 겪고 있다. 이것은 양식산과 자연산의 환경적인 차이에서 기인하는 것으로 이러한 환경적인 차이가 때로는 비정상적인 생리학적인 반응을 유발하거나 또는 정상적인 방법으로 성성숙을 할 수 없게 하기도 한다. 특히 자연 상태와 다른 양식 환경은 어류의 성숙에 있어서 내분비적인 조절 과정에 영향을 미칠 수 있는 스트레스를 유발하기도 한다(Donaldson and Hunter,

1983; Sumpter, 1991). 뱀장어 양식에 있어서 중요한 환경 요인은 고밀도, 고수온의 조건이라 할 수 있으며, 이러한 조건은 실제 하천 또는 바다 서식 환경과는 많은 차이를 보이고 있다. 또한 이러한 환경 조건은 수컷으로의 성분화에 가장 중요한 영향을 주는 조건이라고 보고 된 바 있다(D'Ancona, 1957). Matsui (1952)는 뱀장어가 서식하는 여러 지역에서 채집한 결과 37.5%가 생식소의 외형에 의해 성별 구분이 가능하였고, 22.8%는 성을 결정할 수 없었다고 하였으며, 양식산의 경우에 암컷의 비율은 0.5~8.6%로 매우 낮다고 하였다. 또한 Tzeng et al. (1996)은 수조 내에 20 마리/m²의 반집약적(semi-intensive) 양식 밀도로 사육한 결과, 40~55cm의 범위 내에서는 수컷의 비가 높았으며, 60 cm 이상에서는 암컷의 비가 높다고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 양식 1년산 뱀장어의 크기에 따른 성비가 40~50 cm 내외의 뱀장어에서는 수컷의 비율이 75~100%로 매우 높은 비율을 보였고, 50 cm 이상의 개체에서는 반대로 암컷의 비율이 높게 관찰 되어, 이들의 연구와 유사한 경향을 보였는데, 이는 양식산 뱀장어의 성결정 요인으로서 자연 상태와는 다른 양식장 내의 환경 요인의 중요성을 제안하는 것으로 생각된다. 또한 여러 연구자들(Rossi and Colombo, 1976; Poole and Reynolds, 1996)에 의하여 같은 시기에 채집한 유럽산 뱀장어(*Anguilla anguilla*) 암컷의 크기가 수컷보다 크다고 보고하여, 성장 단계와 성비의 관련성을 시사한 바 있으나, 산란을 위하여 바다로 내려가는 뱀장어(*Anguilla japonica*)에서는 수컷의 전장과 암컷의 전장 사이에 유의한 차이를 보이지 않는다고 보고(Tzeng et al., 2000)된 바 있어 뱀장어 암컷과 수컷의 성장 차이에 대한 관계를 확신할 수는 없다.

조직학적 관찰을 통한 암컷과 수컷의 생식소 발달 단계는 모든 어체 크기에서 발달 초기 단계(수컷: 정원세포, 암컷: 제1차 난황구기)에 머물러 있었고, 양식산 뱀장어는 미성숙한 상태(immature)이며 일반적인 양식 환경 하에서는 성숙하지 않는다고 보고한 Yamamoto et al.(1972)의 보고와 일치하는 결과였다.

양식산 뱀장어의 혈중 호르몬의 농도는 T와 E₂ 모두 극히 낮은 값을 보였으며, 호르몬 처리를 통해 뱀장어의 성성숙 유도 실험을 실시한 타 연구자(Ijiro et al., 1995)가 보고한 뱀장어의 성성숙 처리전 T와 E₂의 혈중 호르몬 함량이 각각 0.25~0.29 ng/mL, 0.1~1.3 ng/mL 였다는 결과에 비해서도 매우 낮은 값을 보였다. 그러나 본 연구에서 조사한 수컷 뱀장어에 비해 암컷 T, E₂의 함량이 유의하게 높게 나타나 성에 따른 차이를 관찰할 수 있었다. 이러한 결과에 의하면, 45~50 cm의 뱀장어 중 2마리가 해부 후 생식소의 육안 관찰이 어려워 생식소의 형태에 의한 성결정이 불가능하였으나, 혈중 호르몬 함량 범위(T, 0.044 ng/mL; E₂, 0.012 ng/mL)로 미루어 보았을 때, 수컷으로 분화될 수 있는 개체로 판단할 수 있으며, 향후 뱀장어의 혈중 호르몬 함량과 생식소 발달, 그리고 성별과 관계에 관한 연구가 계속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

양식산 뱀장어의 헤마토크리트의 값과 헤모글로빈 함량은 동일한 크기 내에서는 암·수간의 유의한 차이가 없었다. 그러나 헤모글로빈의 함량은 동일한 크기(50~55 cm, 55~60 cm) 내에서는 암컷 개체들 수컷보다 낮은 헤모글로빈 함량을 보여, 성호르몬 처리 전의 암컷과 수컷의 혈액학적 성상을 비교한 Ochiai et al. (1975)의 결과와 유사한 경향이였다. 그러나 혈장 단백질 함량의 결과는 암·수 모두에서 크기와 상관없이 유의한

차이를 보이지 않았으며, 5.30~5.83 g/dL의 범위로 6.5~8.6 g/dL의 범위를 보인 Ochiai et al. (1975)의 결과에 비해 다소 낮은 값을 나타내었다.

GOT, GPT와 같은 혈중 transaminase의 측정은 어류의 간과 신장의 조직학적인 손상을 가리키는 지표로 사용될 수 있다(Kristofferson et al., 1974). 본 연구에서는 양식산 뱀장어의 건강상태를 조사하기 위한 항목으로 혈액학적 지표를 이용하였는데, GOT값은 암·수 모두 104~157 IU/L의 범위에 있어, 유럽산 뱀장어(*A. anguilla*)의 154.2~311.9 IU/L보다 다소 낮은 범위를 나타내었으며, GPT값 또한 유럽산 뱀장어(20~30 IU/L)보다 낮은 값을 보였다(Balint et al., 1997).

지금까지 양식 1년산 뱀장어는 인공 종묘 생산에 이용하기에는 그 연령이 어리다고 판단되어 왔지만, 몇몇 연구자들이 호르몬 주사에 대한 성숙 결과가 좋다고 하여 이미 양식산 수컷을 이용한 성숙 유도의 성공으로 그 가능성이 제시된 바 있다(Yamamoto et al., 1972; Ohta et al., 2001).

따라서 본 연구결과에 의하면 전장에 따라 수컷은 40~50 cm 이하, 그리고 암컷은 50 cm 이상인 것으로 확인되었고, 혈중 성호르몬 농도에 있어 암컷이 수컷에 비해 testosterone과 estradiol-17 β 의 농도가 유의하게 높은 것으로 확인됨에 따라 양식산 뱀장어의 성감별을 위한 지표로써 전장과 혈중 성호르몬 수준이 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 판단된다. 향후 인공 종묘 생산에 있어서 양식산 뱀장어의 이용 가능성을 높이기 위한 방법의 일환으로서 성 결정 시기(Colombo and Grandi, 1984)로 알려져 있는 전장 20 cm 크기에서부터 60 cm에 이르기까지 다양한 개체들의 크기에 따른 성비 변화에 관한 조사가 이루어져야 할 것이다.

5. 참고문헌

- Aida, K., T. Kato and M. Awaji, 1984. Effects of castration on the smoltification of precocious male salmon, *Oncorhynchus masou*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 50, 565-571.
- Balint, T., J. Ferenczy, F. Katai, I. Kiss, L. Kraczer, O. Kufesak, G. Lang, C. Polyhos, I. Szabo, T. Szeleter and J. Nemcsok, 1997. Similarities and difference between the massive eel (*Anguilla anguilla* L.) devastations that occurred in lake Balton in 1991 and 1995. Ecol. Envi. Safe., 37, 17-23.
- Colombo, G., G. Grandi and R. Rossi, 1984. Gonad differentiation and body growth in *Anguilla anguilla* L. J. Fish. Biol., 24, 215-228.
- D'Ancona, U., 1957. Nuove ricerche sulla determinazioine sessuale dell'Anguilla. II. Le influenze ambientali sul differenzizmento della fonade. Archivio di Oceanografia e Limnologia, 11, 69-111.
- Degani, G. and D. Kushnirov, 1992. Effects of 17 β -estradiol and grouping on sex determination of European eels. Prog. Fish Culturist., 54, 88-91.
- Donaldson, E. M. and G. A. Hunter, 1983. Induced final maturation, ovulation and spermiation in cultured fish. (in) Hoar, W. S., D. J. Randall and E. M. Donaldson. (eds.), Fish Physiol., IXB. Academic press, New York, pp. 351-403.
- FAO. 2001. Foods and Agriculture Organization of United Nations.

- Fontaine, M., 1936. Sur la maturation complete des organes genitaux de l'anuille male et l'emission spontanee de ses produits sexuels. C. R. Acad. Sci. Paris, 202, 1312-1315.
- Ijiri, S., Y. Kazeto, N. Takeda, H. Chiba, S. Adachi and K. Yamauchi, 1995. Changes in serum steroid hormones and steroidogenic ability of ovarian follicles during artificial maturation of cultivated Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture, 135, 3-16.
- Ijiri, S., T. Koayaba, N. Takeda, H. Tachiki, S. Adachi and K. Yamauchi. 1998. Pretreatment reproductive stage and oocyte development induced by salmon pituitary homogenate in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Fish. Sci., 64(4), 531-537.
- Kagawa, H., G. Young and Y. Nagahama, 1984. In vitro estradiol-17 β and testosterone production by ovarian follicles of the goldfish, *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol., 54, 139-143.
- Kristofferson, R., S. Broberg, A. Oskari and M. Pekkarinen, 1974. Effect of a sublethal concentration of phenol on some blood plasma enzyme activities in the pike (*Esox lucius* L.) in brackish water. Ann. zool. Fennici., 11, 220-223.
- Matsui, I., 1952. Study on the morphology, ecology and culture of Japanese eel. J. Shimonoseki Coll. Fish., 2, 1-245.
- Ochiai, A., O. Manabu and U. Susumu, 1975. Changes in blood properties of maturing Japanese eel, *Anguilla japonica*, with hormone injection. Bull. Jpn. Soc. Sic. Fish., 41(6), 609-614.

- Ohta, H. and H. Tanaka, 1997. Relationship between serum levels of human chorionic gonadotropin (hCG) and 11-ketotestosterone after a single injection of hCG and induced maturity in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 153, 123-134.
- Ohta, H., H. Kagawa, H. Tanaka and T. Unuma, 2001. Control by the environmental concentration of ions of the potential for motility in Japanese eel spermatozoa. *Aquaculture*, 198, 339-351.
- Ojima, Y., 1983. Karyotype and specimen in fishes. (in) *Fish cytogenetics*. Suikosha. Japan. pp. 1-64.
- Poole, W. R. and J. D. Reynolds, 1996. Growth rate and age at migration of *Anguilla anguilla*. *J. Fish Biol.*, 48, 733-642.
- Rossi, R. and G. Colombo, 1976. Sex ratio, age and growth of silver eels in two brackish lagoons in the northern Adriatic valli of Comacchio and Valle Nuova. *Arch. of Oceanogr. Lmm*, 18, 325-341.
- Sumpster, J. P., 1991. The stress response and its consequences in cultured fish. *Bull. Inst. Zool., Acad. Sin., Monogr.*, 16, 229-236.
- Tanaka, H., K. Okuzawa, N. Iinuma and K. Hirose, 1997. Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiol. Bilchem.*, 17, 163-169.
- Tzchori, I., G. Degani, R. Elisha, R. Eliyahu, A. Hurvitz, J. Vaya and B. Moav, 2004. The influence of phytoestrogens and oestradiol-17 β on growth and sex determination in the European eel, *Anguilla anguilla*. *Aquacult. Res.*, 35, 1213-1219.

- Tzeng, W. N., 1985. Immigration timing and activity rhythms of the eel, *Anguilla japonica*, elvers in the estuary of northern Taiwan, with emphasis on environmental influences. Bull. Jpn. Soc. Fish. Ocean., 47/48, 11-28.
- Tzeng, W. N., H. R. Lin, C. H. Wang and S. N. Xu, 2000. Differences in size and growth rates of male and female migrating Japanese eels in Pearl River, China. J. Fish Biol., 57, 1245-1253.
- Tzeng, W. N., 1996. Short-and long-term fluctuations in catches of elvers of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. (in) D. A. Hancock, D. C. Smith, A. Gant and J. B. Beumer (eds.), Developing and sustaining world fisheries resources: The state of science and management. 2nd world fisheries compass proceedings. CSIRO publishing, Victoria, Australia, pp. 11-128.
- Yamamoto, K. and K. Yamauchi, 1974. Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium. Nature, 251, 220-221.
- Yamamoto, K., O. Hiroi, T. Hirano and T. Morioka, 1972. Artificial maturation of cultivated male Japanese eels, *Anguilla japonica*, a review. Int. Revue Gesamten. Hydrobiol., 75, 859-860.
- Yokoyama, H. O., 1960. Studies on the origin, development and seasonal variation in the blood cells of perch, *Perca flavescens*. J. Wild. Dis., 6, 1-102.
- Young, G., K. Kagawa, G. Kamhegawa and Y. Nagahama, 1982. Secretion of aromatizable $\Delta 4$ androgens by thecal layers during estradiol-17 β production by ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) in vitro. Biomed. Res., 3, 659-667.

Table 2. Sample size description of cultured eels¹

Hormone	Sex of cultured eels								pooled SEM
	Male					Female			
	G1	G2	G3	G4	Avg.	G3	G4	Avg.	
Total length (cm)	43.4	47.5	51.5	59.0	50.4	51.3	57.6	54.5	0.20
Body weight (g)	115	138	172	318	186	182	320	251	2.55
Testosterone (ng/ml)	0.10	0.06	0.06	0.09	0.08 ^b	0.12	0.14	0.13 ^a	0.01
Estradiol-17(ng/ml)	0.05	0.03	0.03	0.03	0.05 ^b	0.14	0.14	0.14 ^a	0.01
n	10	7	8	7		8	8		

¹G1: group 1 (TL: 40~45 cm); G2: group 2 (TL: 45~50 cm); G3: group 3 (TL: 50~55 cm); G4: group 4 (TL: 55~60 cm).

Table 3. Hematological characteristics on sex in cultured eel

Character	Sex of eels						Pooled SEM
	Male			Female			
	G3	G4	Avg.	G3	G4	Avg.	
Total length (cm)	51.5	59.0	55.3	51.3	57.6	54.5	0.20
Body weight (g)	172	318	245	182	320	251	2.55
Hematocrit (%)	31.5	31.8	31.7	42.5	32.8	37.7	0.51
Hemoglobin (g/dl)	13.9	14.0	14.0	11.7	11.1	11.4	0.25
GOT (IU/L) ²	155	148	152 ^a	104	148	126 ^b	0.73
GPT (IU/L) ³	2.78	5.03	4.01 ^b	6.11	8.87	7.45 ^a	0.16
Plasma protein (g/dl)	5.30	5.75	5.37	5.83	5.60	5.72	0.10
Plasma glucose (g/dl)	73.5	96.1	84.7	96.5	66.4	81.5	0.70

¹ The values within the same row with different alphabetic letters are significantly different ($P<0.05$).

² GOT: glutamate oxaloacetate transaminase.

³ GPT: glutamate pyruvate transaminase.

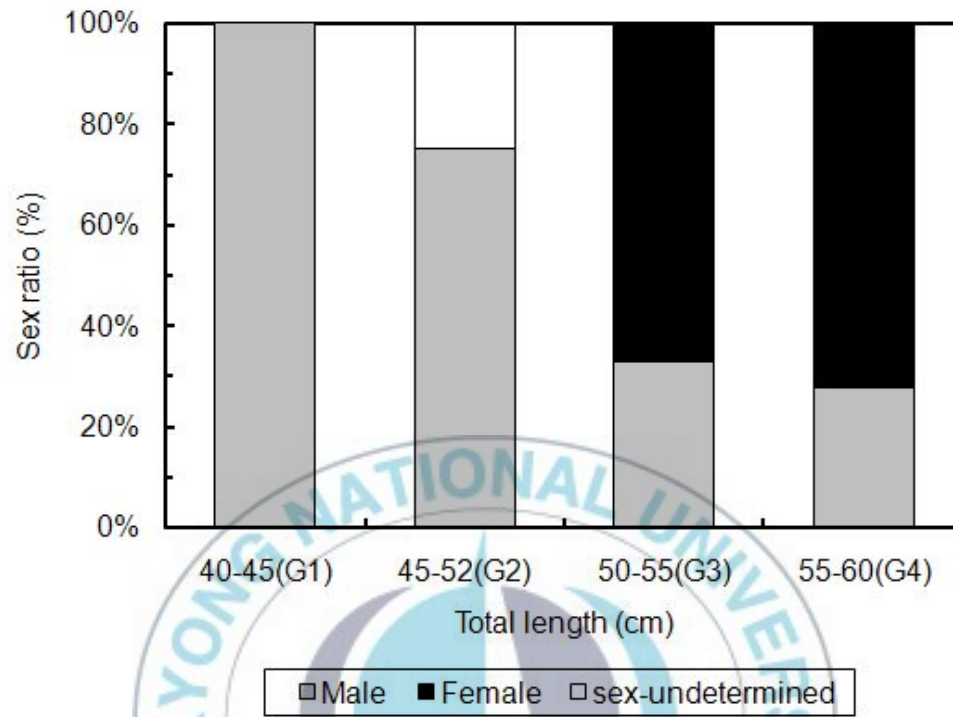


Fig. 6. Sex ratio in relations to total length (cm) of cultured eels.

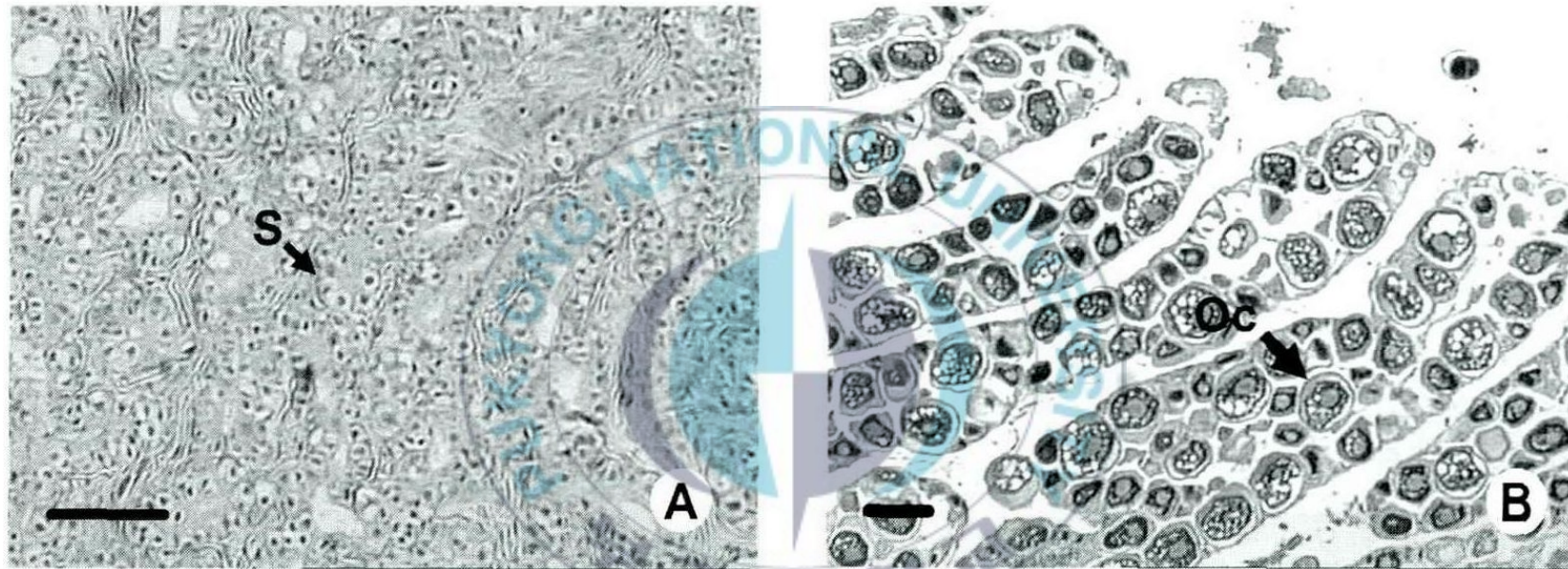


Fig. 7. Gonadal histology of cultured eels. A: spermatogonium in testis of male, B: primary yolk globule stage in ovary of female; S: spermatogonium; Oc: Oocyte; Bar: 50 μ m.

제 2절 양식산 수컷 뱀장어의 인위적 성성숙 유도

1. 서론

극동산 뱀장어(*Anguilla japonica*)는 고부가가치의 양식어종으로 현재까지 인공 종묘 생산 기술이 정립되지 않아 100% 자연산 실뱀장어 채포에 의존한 불완전양식으로 수행되고 있다. 또한 종묘로 이용되는 실뱀장어의 공급량과 가격이 불안정하여 뱀장어 양식의 문제점으로 지적되고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 뱀장어 인공 종묘 생산을 통한 완전양식을 실현하고자 많은 연구가 수행되어 왔으며(Yamamoto and Yamauchi, 1974), 최근 일본 양식 연구소 변식 연구팀에서 인위적인 성성숙에 의해 유도된 양식산 뱀장어에서 부화자어를 생산 및 실뱀장어로 변태에 성공(Tanaka et al., 2001; Tanaka, 2003) 하여 이후 60 cm 이상 성장한 것으로 알려져 있다.

뱀장어는 인위적인 사육 환경에서는 뇌하수체의 gonadotropin (GTH) 합성능력이 미흡하여 생식소가 발달하지 않는 것으로 알려져 있고(Nagahama and Yamamoto, 1973), 이러한 당단백질성 GTH는 어류를 포함한 척추동물의 생식소 형성과 발달에 필수적인 것으로 보고되고 있다(Kumar et al., 1997; Ma et al., 2004). 그러나 최근 연구결과에 따르면 양식산 암컷 뱀장어를 장기간(3개월) 해수에 순치함으로써 GSI 증가 및 초기 난황구기의 난소발달을 나타내고, 또한 외재성 GTH에 대한 반응성을 증가시켜 투여횟수를 단축시킬 수 있다고 보고하였다(Kagawa et al., 1997).

한편, 양식산 수컷 뱀장어의 정소는 대부분 정원세포로 구성되어 있으며, 이러한 개체를 해수에 장기 사육하더라도 암컷과는 달리 성숙이 진행되지 않는다고 보고하였다(Yamamoto et al., 1972). 그러므로 수컷 뱀장어의

인위적 성성숙 유도는 human chorionic gonadotropin (HCG) 처리에 의해 정자형성(spermatogenesis) 및 배정(spermiation)이 효과적으로 유도된다고 보고하고 있다(Yamamoto and Yamauchi, 1974; Ohta et al., 1996; Adachi et al., 2003). 이러한 이전의 연구들은 수컷 뱀장어의 정소발달 및 배정에 HCG가 효과적임을 입증하고 있으나, HCG의 처리기간에 따른 개체들의 성성숙 정도와 관련된 혈중 성호르몬의 변동에 관한 내분비학적 접근이 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다.

따라서 본 연구는 뱀장어의 인공 종묘 생산 기술을 확립하기 위한 목적으로 수컷 뱀장어에 있어서 HCG 처리에 의한 인위적인 성성숙 기간 동안 체중의 변화와 혈중 성호르몬의 농도분석을 통해 성숙도를 확인하여 인위적 성성숙 유도에 의한 내분비 기구를 파악하고자 한다.

2. 재료 및 방법

1) 실험어 및 사육관리

실험어 (평균 220 g)는 국립수산물과학원 진해 내수면 연구소에서 제공받아, 유수식 사육시스템에 수용하여 일주일간 점차적으로 해수에 순치시켰다. 실험기간 동안 사육수온은 히터펌프를 이용하여 $19.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였고, 에어레이션을 통해 산소를 충분히 공급하였다. 실험기간 중 사료는 공급하지 않았다.

2) 호르몬 처리

해수 순치 이후, 1회 호르몬 투여 직전에 개체식별을 위해 Tag ID microchip ($\phi 2.1 \times 12$ mm, DESTRON technologies, USA)을 뱀장어 등근육에 삽입하여 mini portable reader (HS5900LF, DESTRON technologies, USA)로

개체 ID를 식별하였다. 양식산 수컷 뱀장어에 human chronic gonadotropin (HCG; 1 IU/g body weight/week; Sigma)을 매주 복강에 주사하였고(n=12), 대조구(n=6)는 eel's ringer (Ohta et al., 1996)를 주사하였다.

3) 어체측정 및 혈액채취

실험어는 2-phenoxyethanol (200 ppm)로 마취하여 매주 어체 측정을 실시하여 체중 변화를 확인하였고, 격주별로 채혈하여 성호르몬 분석에 이용하였다. 호르몬 측정을 위한 plasma는 heparin을 처리한 일회용 주사기로 채혈하여 원심분리(6000 rpm, 15 min, 4℃)후 획득하였고, 방사선 면역 측정법으로 혈장 내 성호르몬(testosterone, T; 11-ketotestosterone, 11-KT 및 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, DHP)을 분석하였으며, 농도 측정 전까지 -40℃에서 보관하였다.

4) 방사선 면역 측정법

혈중 T와 DHP 농도는 국립수산물품질관리원 수산물안전정보센터에서 Kim et al. (2006)의 방법에 따라 방사선 면역 측정법(radioimmunoassay, RIA)에 의해 측정하였다. 또한 혈중 11-KT RIA계에 있어서 항체 anti-11-KT-6-CMO-BSA는 Cosmo-Bio Co. Ltd. (Tokyo, Japan), 비방사선 11-KT 호르몬은 Steraloids Inc. (Wilton, NH, USA) 및 방사선 표지 호르몬 [2,4,6,12-³H]-11-KT는 Amersham Life Science (England)로부터 구입하여 측정계를 구축하였다. 11-KT RIA계에 있어서 최소 검출량은 10 pg/mL이었으며, assay내와 assay간의 변동계수는 3.9% (n=4), 7.3% (n=8) 였다. 11-KT RIA계에 있어서 11-KT 항체와 dihydrotestosterone과는 1.4%, androsten-3,17-dione과는 0.1%, totetosterone과는 7.5% 및 androstenedione과는 0.5%의 교차율을 나타내었으며, 조사된 타 steroid들과는 0.001% 이하의 교차율을 나타내었다.

5) 조직학적 관찰

양식산 수컷 뱀장어의 정소 발달 정도를 확인하기 위해 실험종료 후, 각 실험구 당 3마리씩 2-phenoxyethanol (200 ppm)로 마취시킨 뒤 정소를 적출하여 Bouin's액에 고정하였다. 고정된 조직들은 paraffin 상법에 따라 paraplast로 포매한 후, 미세 조직 절편기를 이용하여 5 μm 크기로 연속절편하였다. 각 조직의 절편은 hematoxylin-eosin으로 이중 염색하여 Miura et al. (1991a)의 방법에 따라 정소 발달정도를 판독하였다.

6) 통계처리

통계처리는 분산분석 후, Duncan's new multiple range test에 의해서 유의성 검정을 실시하였다($P<0.05$).

3. 결과

1) 체중 및 성호르몬의 변화

대조구의 체중변화와 혈중 성호르몬의 변동에 관한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 각 개체별($n=6$) 체중변화에 있어서 대부분의 개체는 주사 1주 후 체중이 증가하였다가 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 혈중 성호르몬 (T, 11-KT 및 DHP) 농도 역시 실험기간 동안 검출한계 이하 혹은 저농도였고, 호르몬 투여 기간별 유의한 차이는 없었다($P<0.05$).

HCG 처리구에 대한 체중변화와 혈중 성호르몬의 변동에 관한 결과를 Fig. 9에 나타내었다. 각 개체별($n=12$) 체중변화에 있어서 대부분의 개체는 HCG 투여 후 1-5주까지 점차적으로 증가하였고, 그 이후부터 실험 종료기간까지 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 각 개체들에 대한 혈중 T의 평균농도는 HCG 투여 2주 후에 0.96 ± 0.099 ng/mL로 최대치를 나타내었고,

투여 4주 후 0.81 ± 0.102 ng/mL로 감소하기 시작하여 투여 8주 후에는 0.26 ± 0.031 ng/mL로 감소하였다. 각 개체들에 대한 혈중 11-KT의 평균농도는 HCG 투여 후 지속적으로 증가하였고, 투여 2주 후에 6.95 ± 0.606 ng/mL, 투여 8주 후에는 최대치 7.83 ± 0.954 ng/mL를 나타내었지만, HCG 투여 후 각 기간별 유의한 차이는 없었다($P < 0.05$). 각 개체들에 대한 혈중 DHP의 평균농도는 HCG 투여 후부터 전 실험기간 동안 유의적으로 증가하였다($P < 0.05$). 투여 4주 후 혈중 DHP의 평균농도는 0.15 ± 0.027 ng/mL로 급격히 증가하였고, 투여 8주 후 0.26 ± 0.031 ng/mL로 최대치를 나타내었다($P < 0.05$).

2) 수컷 뱀장어의 정소 발달

양식산 수컷 뱀장어의 인위적 성숙유도에 따른 정소내 정모세포의 발달정도를 Fig. 10에 나타내었다. 대조구 개체들의 정소 내 생식세포(germ cells)는 정원세포(spermatogonia)들로 구성되어 있었고(Fig. 10-A), 이는 실험 개시 이전과 유사한 발달정도를 나타내었다(data not shown). 8주간 HCG를 투여한 개체들의 정소는 정세포(spermatid)와 정자포낭(cysts of spermatozoa)으로 구성되어 있었으며(Fig. 10-B), 대부분의 개체들에서 배정이 유도되었다(data not shown).

4. 고찰

뱀장어를 포함한 경골어류에서 정자형성과정은 정원세포 증식기(spermatogonial proliferation), 감수분열기(meiosis) 그리고 정자완성기(spermiogenesis)의 3 단계의 과정으로 나눌 수 있다. 정원세포는 유사분열을 통해 증식하고, 정모세포(spermatocytes)로 발달하여 감수분열을 통해 반수체의 정세포(spermatids)가 생산되어 정자(spermatozoa)로 분화한다(Miura

et al., 2002). 뇌하수체에서 분비되는 당단백질 호르몬인 GTHs (FSH, LH)는 어류를 포함한 척추동물의 생식소 형성과 발달에 관여하는 주요 호르몬이지만, 직접적으로는 작용하지 않고 GTHs의 자극에 의해 정소에서 합성되는 여러 스테로이드 호르몬들의 작용으로 유도된다(Nagahama, 1994). 그러나 뱀장어는 암컷과 수컷 모두 이들의 사육환경에서는 뇌하수체의 GTH의 합성능력이 미약하여 생식소 발달 및 최종성숙이 이루어지지 않기 때문에 외재성 호르몬을 처리하여 인위적으로 성숙을 유도하고 있다.

뱀장어(*Anguilla japonica*)에 있어서, GTH의 일종인 HCG를 처리하게 되면 HCG가 정소내 Leydig cell를 자극하여 수컷의 주요 안드로겐인 11-KT의 합성을 유도하며, 11-KT는 Sertoli cell에 작용하여 activin B를 생산하여 정원세포의 증식을 유도한다. 한편 정자 성숙과정에 있어서 DHP 전구체가 Leydig cell에서 합성되어 정자 내 존재하는 20 β -hydroxysteroiddehydrogenase (20 β -HSD)의 작용에 의해 DHP로 전환되며, 수정관내 pH를 상승시켜 정자의 성숙을 유도한다고 알려져 있다(Miura et al., 1991a; 1991b, 2003). Ohta와 Takano (1996)는 *A. japonica* (14.8 cm, 3.2 g)에 methyl-testosterone을 경구투여한 결과 정자형성 및 배정을 유도한 반면, Chiba 등(1996)은 *A. japonica* (29 cm, 30-50 g) 수컷에 HCG를 주사한 결과 혈중 11-KT 농도에 영향이 없거나 정자가 형성되지 않았지만, 32cm 이상의 개체들은 혈중 11-KT 농도의 증가에 의해 정소의 성숙이 유도되었다. 이러한 연구결과는 HCG에 대한 뱀장어 수컷의 정자형성과정은 정소에서 합성되는 안드로겐 생산능력에 의해 좌우됨을 제시하고 있으며, 향후 뱀장어 수컷의 안드로겐 생산능력에 관한 세부적인 연구가 수반되어야 할 것으로 생각된다.

본 연구는 양식산 수컷 뱀장어에 있어서 8주간의 HCG 처리에 따른 인위적인 성숙유도 기간에 대한 체중과 혈중 성호르몬의 변화 및 정소 발달양상을 조사하였다. 혈중 11-KT의 농도는 HCG 처리 2주 후부터 급격히 증가

하여 이후 소량 감소하거나 유지되는 경향을 보였고, 이는 HCG를 처리한 뱀장어는 정소에서 11-KT를 생산하여 정원세포의 증식과정과 감수분열에 중요한 역할을 수행했음을 나타내고 있다. 또한, 본 연구에서 뱀장어의 혈중 T 농도는 HCG 처리 2주 후부터 급격히 증가하여 이후 점차적으로 감소하는 경향을 나타내었고, 이는 HCG 처리 2주 후부터 뱀장어 수컷의 정소에서 정자형성기에 접어든 것으로 판단된다. 이러한 결과는 경골어류에 있어서 T는 정자형성기간동안 증가하여 정자완성기가 시작되면 감소함으로써 정자형성과정에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있는 결과와 일치하나(Fostier et al., 1983), 정어리(*Sardinops melanostictus*)에서는 정자형성보다는 배정과정에서 중요한 역할을 수행한다는 보고도 있다(Matsuyama et al., 1991).

Ohta et al. (1996)은 양식산 수컷 뱀장어, *A. japonica*에 HCG (1 IU/g body weight (BW) / week)를 5-6주간 반복 주사하여 정자완성 및 배정을 효과적으로 유도하였고, Miura et al. (1991a)은 고농도의 HCG (5 IU/g BW) 주사 18일 후 정자형성이 유도되었다고 보고하였다. 또한 유럽산 뱀장어 *A. anguilla*의 경우, HCG (250 IU/g 40-110 g BW) 처리에 의해 3개월 이내에 배정이 유도되었다(Khan et al., 1987). 이러한 이전의 연구들은 뱀장어 수컷의 정소발달 및 성숙에 HCG가 효과적임을 입증하고 있다. 한편, HCG의 처리간격에 대한 연구에 있어서, Ohta 등(1997)은 *A. japonica*에 HCG 1회 주사 후 1, 3, 7, 14 그리고 21일 후 혈중 성호르몬 농도를 측정한 결과, 주사 후 3일까지는 유의한 차이가 없다고 보고하였다. 이는 뱀장어에 대한 HCG 주사간격은 일주일 정도가 적합한 것으로 판단된다. 이에 대해 본 연구에서 호르몬 주사는 일주일 간격으로 실시했으나 혈액채취는 2주 간격으로 실시했으므로 이전의 결과와 직접적인 비교는 할 수 없으나, 향후 이에 대한 세부적인 연구를 통해 호르몬 주사에 관한 적절한 간격을 설정해야

할 것으로 판단된다.

뱀장어를 포함한 다수의 경골어류에서는 정자의 성숙에 DHP가 관여하는 것으로 보고된 바 있으며, 연어과 어류의 난 성숙 유도에도 관여하는 것으로 알려져 있다(Nagahama and Adachi, 1985). DHP는 정자에 직접적으로 작용하지 않고, 정장의 pH를 상승시켜 정자 내 cAMP의 함량을 증가시킴으로써 정자의 운동성과 배정을 유도하는 기능을 수행하는 것으로 보고되었다(Miura 1995). 본 연구에서 8주간 HCG를 주사한 수컷 뱀장어의 혈중 DHP의 농도는 실험기간 동안 점차적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 정자형성과정 이후 정소가 발달하면서 정자의 성숙을 위해 정소에서 지속적으로 생산되는 것으로 추정된다.

결론적으로 본 연구에서는 양식산 수컷 뱀장어의 인위적인 성숙은 GTH의 일종인 HCG의 반복주사에 의해 효율적으로 유도할 수 있었고, 이는 HCG의 주사에 의해 정소에서 생산 및 분비되는 T, 11-KT 및 DHP와 같은 성호르몬의 작용에 의해 정자형성 및 배정이 이루어졌다. 향후, 뱀장어에 대한 호르몬의 적정 처리간격과 체내 반응성 향상에 관한 연구가 수반된다면 뱀장어의 정소발달에 관한 성호르몬들의 역할과 내분비 기구를 구명할 수 있을 것으로 생각된다.

5. 참고문헌

- Adachi, S., S. Ijiri, Y. Kazetom and K. Yamauchi. 2003. Oogenesis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. (in) K. Aida, K. Tsukamoto and K. Yamauchi (eds.), Eel Biology. Springer-Verlag, Tokyo, pp. 301-317.
- Chiba, H., T. Miura, M. Nakamura and K. Yamauchi. 1996. Differentiation of steroid-producing cells and induction of spermatogenesis during testicular

- differentiation in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. (in) J. Joss (ed.), Proc. 3rd Congress of the Asia and Oceania Society of Comparative Endocrinology. Macquarie University, Sydney, 232-233.
- Fostier, A., B. Jalabert, R. Billard, B. Breton and Y. Zohar. 1983. The gonadal steroid. (in) W. S. Hoar and D. J. Randall (eds.), Fish Physiology. Vol. 9B. Academic Press, New York, pp. 277-316.
- Kagawa, H., N. Iinuma, H. Tanaka, H. Ohta and K. Okuzawa. 1997. Effects of rearing period in seawater on induced maturation in Japanese eel, *Anguilla japonica*. Fish. Sci., 64, 77-82.
- Khan, I. A., E. Lopez and J. Leloup-Hatey. 1987. Induction of spermatogenesis and spermiation by a single injection of human chorionic gonadotropin in intact and hypophysectomized immature European eel (*Anguilla anguilla* L.). Gen. Comp. Endocrinol., 68, 91-103.
- Kim, D. J., E. H. Kim, M. W. Park, Y. C. Cho and S. G. Lim. 2006. Plasma sex steroid hormone profiles in artificially maturing wild eel, *Anguilla japonica*. J. Aquacult., 19(4), 267-274.
- Kumar, T. R., Y. Wang, N. Lu and M. M. Matzuk. 1997. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. Nat. Genet., 15, 201-204.
- Ma, X., Y. Dong, M. M. Matzuk and T. R. Kumar. 2004. Targeted disruption of luteinizing hormone β -subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 101, 17294-17299.
- Matsuyama, M., S. Adachi, Y. Nagahama, C. Kitajima and S. Matsuura. 1991. Testicular development and serum levels of gonadal steroids during the

- annual reproductive cycle of captive Japanese sardine. Jap. J. Ichthyol., 37, 381-390.
- Miura, T., K. Yamauchi, Y. Nagahama and H. Takahashi. 1991a. Induction of spermatogenesis in male Japanese eel, *Anguilla japonica* by a single injection of human chorionic gonadotropin. Zool. Sci., 8, 63-73.
- Miura T., K. Yamauchi, H. Takahashi and Y. Nagahama. 1991b. Human chorionic gonadotropin induces all stages of spermatogenesis *in vitro* in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). Dev. Biol., 146, 258-262.
- Miura, T., K. Yamauchi, H. Takahashi and Y. Nagahama. 1991c. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis *in vitro* in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88, 5774-5778.
- Miura, T., T. Kasugai, Y. Nagahama and K. Yamauchi. 1995. Acquisition of potential for sperm motility *in vitro* in Japanese eel, *Anguilla japonica*. Fish. Sci., 61, 533-534.
- Miura, T., N. Ando, C. Miura and K. Yamauchi. 2002. Comparative studies between *in vivo* and *in vitro* spermatogenesis of Japanese eel (*Anguilla japonica*). Zool. Sci., 19, 321-329.
- Miura, T., C. Miura and K. Yamauchi. 2003. Spermatogenesis in the Japanese Eel. (in) K. Aida, K. Tsukamoto and K. Yamauchi (eds.), Eel Biology. Springer-Verlag, Tokyo, pp. 319-329.
- Nagahama, Y. and K. Yamamoto. 1973. Cytological changes in the adenohypophysis of fresh water cultivated male Japanese eel, *Anguilla japonica* induced to maturation by transfer to sea water and synahorin injection. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 39, 585-594.

- Nagahama, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. Int. J. Dev. Biol., 38, 217-229.
- Nagahama, Y. and S. Adachi. 1985. Identification of maturation inducing steroid in a teleost, the Atlantic salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). Dev. Biol., 109, 428-435.
- Ohta, H., H. Kagawa, K. Tanaka, K. Okuzawa and K. Hirose. 1996. Milt production in the Japanese eel, *Anguilla japonica* induced by repeated injections of human chorionic gonadotropin. Fish. Sci., 62, 44-49.
- Ohta, H. and K. Takano. 1996. Testicular maturation induced by methyl-testosterone in elvers of the Japanese eel. Fish. Sci., 62, 990-991.
- Ohta, H., H. Kagawa, H. Tanaka, K. Okuzawa, N. Linuma and K. Hirose. 1997. Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Fish. Sci., 62, 990-991.
- Tanaka, H., H. Kagawa and H. Ohta, 2001. Production of leptocephali of Japanese eel (*Anguilla japonica*) in captivity. Aquaculture, 201, 51-60.
- Tanaka, H., 2003. Techniques for larval rearing. (in) K. Aida, K. Tsukamoto and K. Yamauchi (eds.), Eel Biology. Springer-Verlag, Tokyo, 427-434.
- Yamamoto, K, O. Hiroi, T. Hirano and T. Morioka. 1972. Artificial maturation of cultivated male eel Japanese eel by synahorin injection. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 38, 1083-1090.
- Yamamoto, K. and K. Yamauchi. 1974. Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium. Nature, 251, 220-222.

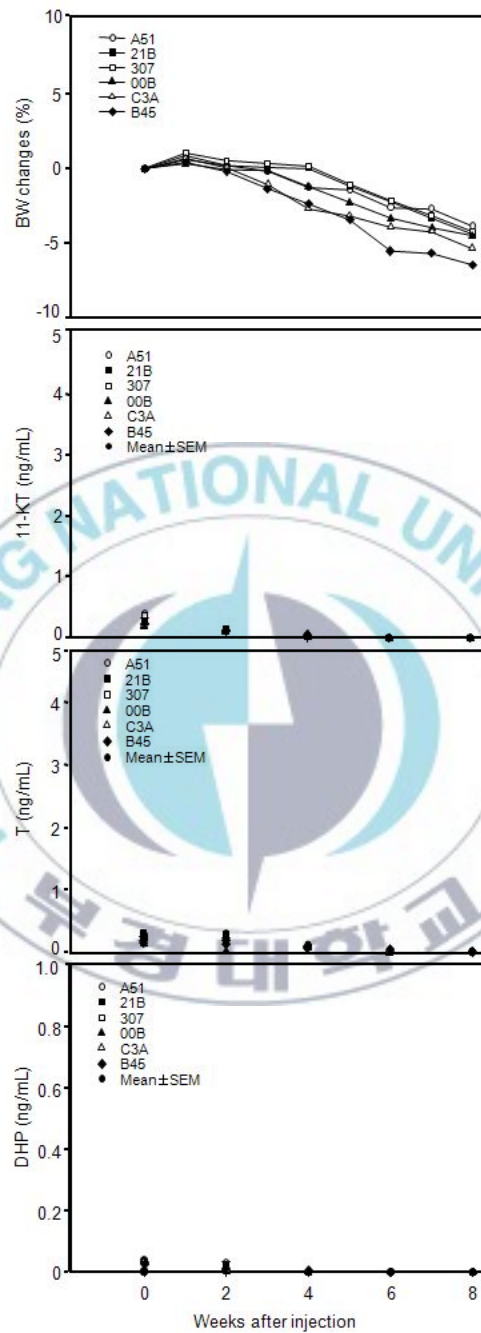


Fig. 8. Changes in body weight (BW) and plasma levels of sex steroid hormone (T, 11-KT, DHP) in cultured male eel injected with eel's ringer solution (control). Different symbols indicate individual fish.

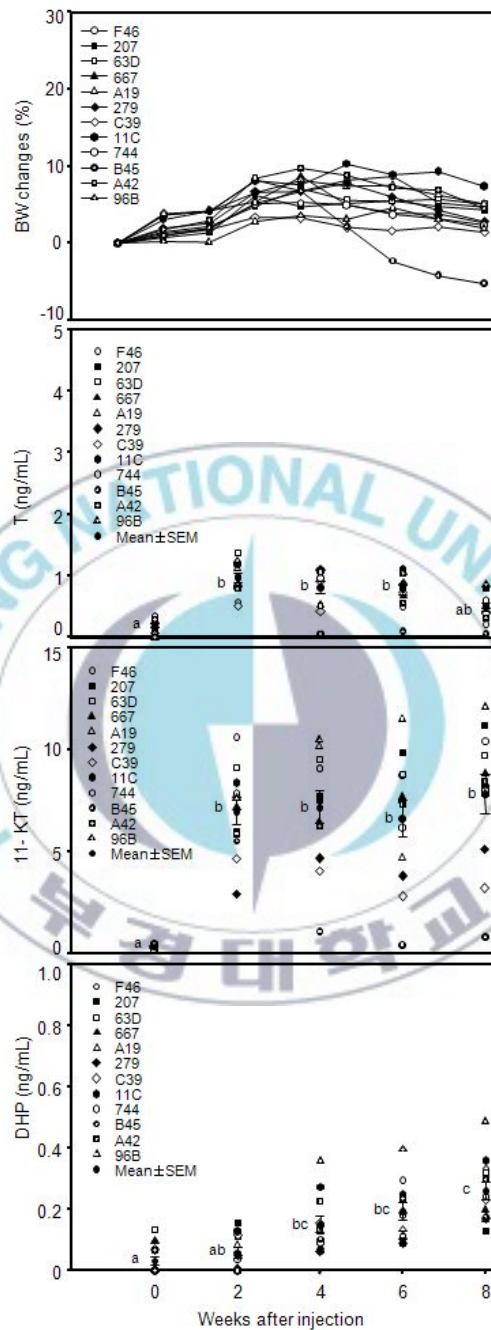


Fig. 9. Changes in body weight (BW) and plasma levels of sex steroid hormone (T, 11-KT, DHP) in cultured male eel injected with human chronic gonadotropin (HCG). Different symbols indicate individual fish.

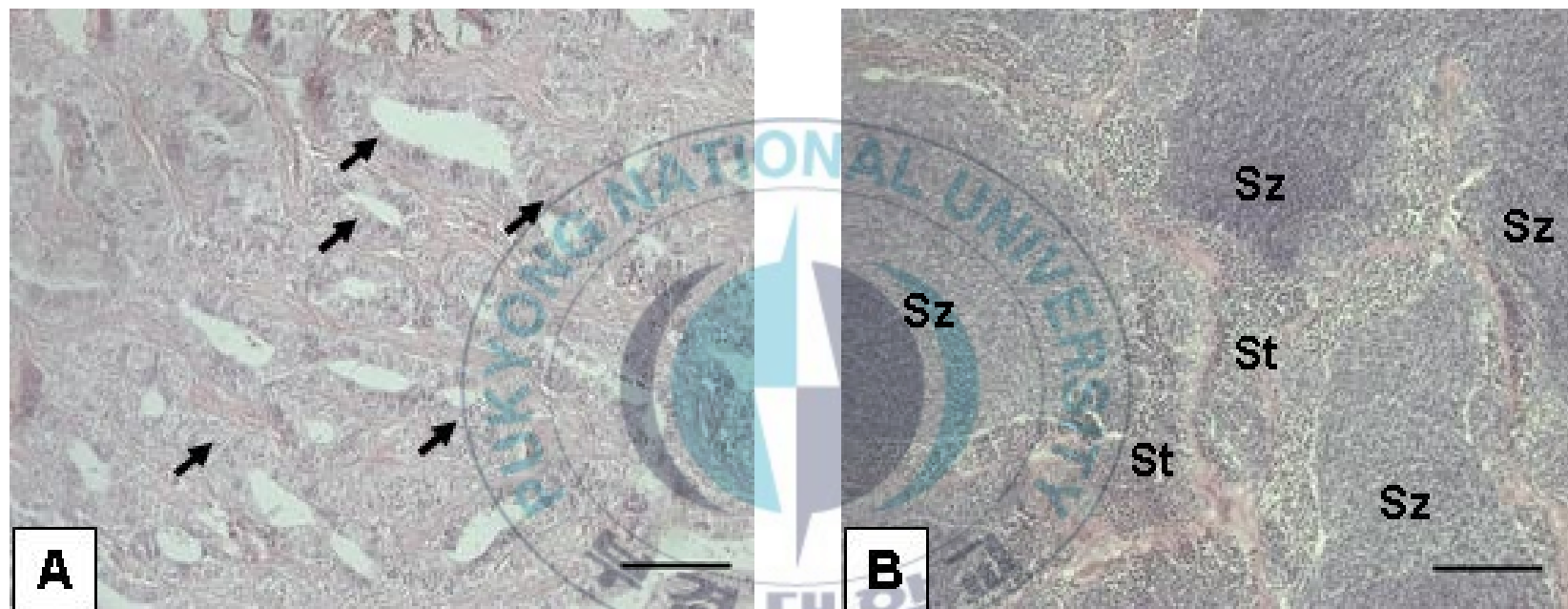


Fig. 10. Light micrographs of the testes in the cultured male eels with or without repeated injections of HCG. (A) Portion of testis of male eel that received weekly injections with eel's ringer solution (control). Arrows (in A) indicate germ cell (spermatogonia). (B) Portion of testis of male eel that received weekly injections with HCG at a dose of 1 IU/g BW. Abbreviations: Sz, spermatozoa; St, spermatid. Bars indicate 100 μ m.

제 3절 양식산 암컷 뱀장어의 인위적 성성숙 유도

1. 서론

*Anguilla japonica*를 포함한 뱀장어과는 담수에서 성장 후 해양으로 회유하여 산란하는 강하성 어류로 자연계에서 뱀장어의 주산란장은 북태평양 마리아나 군도 서부해역으로 추정하고 있으나(Tsukamoto et al., 2003), 산란장 부근에서 성숙한 뱀장어가 발견되지 않아서 전생활사는 구명하지 못하고 있다. 현재, 뱀장어 양식을 위한 종묘의 공급은 전적으로 자연산 실뱀장어의 채포에 의존하고 있다. 그러나 뱀장어는 인위적인 사육환경에서는 뇌하수체의 gonadotropins (GTHs) 합성능력이 미흡하여 생식소가 발달하지 않는 것으로 알려져 있다(Sato et al., 2003). 따라서, 암컷 뱀장어의 경우 외재성 GTH 일종인 salmon pituitary extracts (SPE)의 반복주사로 난황형성기 완료와 17 α , 20 β -dihydroxyprogesterone (DHP)에 의한 최종성숙 및 배란을 유도하고 있다(Yamamoto and Yamauchi, 1974; Sato et al., 2000, 2003; Kim et al., 2006a). 상기에서 언급한 방식에 의해 난황형성, 최종성숙 및 배란은 성공적으로 유도되지만, 배란된 암컷의 비율이 매우 낮고, 배란된 알과 이들의 수정률 및 부화율이 매우 낮은 실정인데(Sugimoto et al., 1976; Satoh et al., 1992), 이는 인위적 성성숙 유도에 따른 불완전한 난성숙과 배란 때문인 것으로 추측되어 진다.

1970년대 이후, 많은 연구자들은 뱀장어의 인공 종묘 생산을 위해 자연산 뱀장어(silver eel)의 생식소 발달과 성숙에 관한 연구를 수행한 바 있다(Yamamoto and Yamauchi, 1974; Satoh et al., 1992; Sato et al., 2000; Kim et al., 2006a). 그러나, 현재 자연산 뱀장어의 어획량이 급감한 탓에 양식산 뱀

장어를 대상으로 한 연구가 수행되고 있으나 자연산 뱀장어에 비해 번식률이 저조한 것으로 알려져 있다(Ijiri et al., 1995, 1998; Sato et al., 2000). 이러한 문제점을 해결하기 위해, Kagawa et al. (1998)은 양식산 뱀장어를 해수에 순치하여 3개월 동안 사육한 결과 초기 난황형성이 유도되었고, 그 결과 알은 자연산의 silver eel의 성숙상태와 유사한 단계로 발달하였다고 보고하였다. 상기의 결과는 양식산 뱀장어도 사육환경 하에서 어떠한 호르몬 처리 없이 난황형성이 유도될 수 있다는 최초의 연구결과이다. 그러나 3개월 동안의 해수순치에 의해 초기 난황형성이 유도된 양식산 뱀장어와 관련한 혈중 성호르몬의 변동양상에 관한 연구는 전무한 실정이다.

본 연구는 3개월의 장기간 해수에 순치 후 호르몬 처리(SPE or HCG)에 의해 성성숙이 유도된 양식산 암컷 뱀장어의 체중과 혈중 성호르몬 변동(testosterone; T, estradiol-17 β ; E₂, DHP)과 배란 후 인공수정에 의한 수정률과 부화율 측정에 관한 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

1) 실험어 및 사육관리

실험어로 이용한 양식산 암컷 뱀장어는 국립수산물과학원 남부 내수면 연구소에서 제공받아 1000 L FRP 사육수조에 수용하여 1일 5psu 씩 증가시켜 일주일간의 해수 순치기간을 통해 점차적으로 해수에 적응시켰다. 해수에 완전히 적응된 이후, Kagawa (1998)의 방법에 따라 20℃의 여과해수를 공급하였고 에어레이션을 통해 충분한 산소를 공급하면서 3개월간 해수에서 사육하면서 호르몬 처리에 의한 인위적인 성성숙을 유도하였다.

2) 호르몬 처리

해수순치 3개월 이후, 각 실험구별 양식산 암컷 뱀장어는 연어 뇌하수체 추출물(salmon pituitary extract, SPE; 20mg/fish/week)과 human chorionic gonadotropin (HCG; 2 IU/g body weight/week; Sigma)를 eel's ringer액에 균질화(Ohta et al., 1996)하여 매주 복강에 주사하였고, 대조구는 eel's ringer액을 매주 복강에 주사하였다. 실험어는 2-phenoxyethanol (200ppm)로 마취하여 매주 어체중을 측정하여 체중변화를 확인하였고, 격주별로 채혈하여 성호르몬 분석에 이용하였다. 성호르몬 측정을 위한 혈장(plasma)은 헤파린을 처리한 일회용 주사기로 채혈하여 원심분리(6000 rpm, 15 min, 4℃)후 획득하였고, 방사선 면역 측정법으로 혈장 내 성호르몬을 분석하였으며, 농도 측정 전까지 -40℃에서 보관하였다.

3) 배란유도

SPE (20 mg/fish) 주사 10~14주 이후 외관적으로 복부가 팽만한 증체를 20% 이상의 암컷 뱀장어(핵 이동기 단계의 난경 750 µm)는 Ohta et al. (1996)의 방법에 따라 SPE (20 mg/fish)를 복강 내 1회 투여한 후, 2~3일 경과 후 증체량이 32~37%로 증가한 개체를 다시 선별하여 polyethylene canula를 산란관에 삽입하여 난 성숙 상태를 확인한 후, 당일 18시경에 2 µg/g body weight 농도의 DHP를 주사하여 배란을 유도하였다. 이때, 수온은 20±1℃에서 22.5±0.5℃로 조절하였고, 3중 필터(10 µm, 5 µm 및 3 µm)로 여과한 해수를 공급하였다. 각 계절별 수정란의 수정률(fertilization rate, %)과 부화율(hatching rate, %)은 Ohta et al. (1996)의 방법에 따라 조사하였다.

Fertilization rate (%) = $100 \times \text{number of fertilized eggs} / \text{number of buoyant eggs}$

Hatching rate (%) = $100 \times \text{number of hatched larvae} / \text{number of buoyant eggs}$

4) 방사선 면역 측정법

혈중 estradiol-17 β (E₂), testosterone (T), 그리고 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) 농도는 방사선 면역 측정법(radioimmunoassay, RIA)에 의해 측정하였다(Kim et al., 2006a; Ko et al., 2007).

5) 조직학적 관찰

양식산 암컷 뱀장어의 난소 발달 정도를 확인하기 위해 실험종료 후, 각 실험구 당 3마리씩 2-phenoxyethanol (200 ppm)로 마취시킨 뒤 난소를 적출하여 생식소중량지수(gonadosomatic index, GSI)를 확인하였고, Bouin's액에 고정하였다. 고정된 조직들은 paraffin 상법에 따라 paraplast로 포매한 후, 미세 조직 절편기를 이용하여 5 μ m 크기로 연속절편하였다. 각 조직의 절편은 hematoxylin-eosin으로 이중염색하여 Yamamoto et al. (1972)의 방법에 따라 난소 발달정도를 판독하였다.

Gonadosomatic index (GSI) = $100 \times \text{gonad weight} / \text{body weight}$.

6) 통계처리

통계처리는 분산분석 후, Duncan's new multiple range test에 의해서 유의성을 검정하였다(P<0.05).

3. 결과

실험개시 12주 후 대조구의 암컷 뱀장어 6마리의 어체중과 혈중 성호르몬 농도의 변화는 Fig. 11에 나타내었다. 대부분의 실험어의 증체율은 실험 종료 기간까지 점차적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 혈중 T와 E₂ 농도 역시 전 실험기간 동안 점차적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 혈중 DHP 농도는 50 pg/mL 이하로 측정되거나 검출되지 않는 것으로 나타났다.

12주간 매주 HCG를 주사한 암컷 뱀장어 6마리의 어체중과 혈중 성호르몬 농도의 변화는 Fig. 12에 나타내었다. 대부분의 실험어의 증체율은 실험 종료 기간까지 점차적으로 감소하여 대조구와 유사한 경향을 나타내었다. 혈중 T농도는 주사 4주 이후까지 증가하였고, 이후 점차적으로 감소하는 경향을 나타내었다. HCG 처리에 따른 혈중 E₂ 농도 주사 2주 후 최고값을 나타내었고, 4주 후 0.74 ± 0.069 ng/mL로 감소하였으나, 6주 후 0.85 ± 0.142 ng/mL로 다시 증가하다가 이후 감소하기 시작하여 처리 전 농도로 돌아가는 경향을 나타내었다(0.32 ± 0.055 ng/mL). 한편, 혈중 DHP 농도는 전 실험기간 동안 50 pg/mL이하로 측정되거나 검출되지 않았다.

12주간 매주 SPE를 주사한 암컷 뱀장어 10마리의 어체중과 혈중 성호르몬 농도의 변화는 Fig. 13에 나타내었다. 대부분 개체들은 SPE 처리 6주 후까지 어체중에 대한 증감의 경향은 없었고, 8주 이후부터 급격히 증가하는 경향을 나타내었다. 혈중 T와 E₂ 농도는 실험개시 이후 점차적으로 증가하여 10주 후 급격히 증가하였고, 12주 후 최고값(T; 5.82 ± 0.972 , E₂; 4.76 ± 1.181 ng/mL)을 나타내었다. 그러나 혈중 DHP 농도는 전 실험기간 동안 50 pg/mL이하로 측정되거나 검출되지 않았다.

1) 호르몬 처리에 의한 난소발달 양상

12주간 외인성 호르몬 처리(HCG or SPE)에 의한 난소의 형태학적 발달 양상은 Fig. 14에 나타내었다. 해수순치 3개월 후, 호르몬 처리 전 암컷 뱀장어의 GSI는 $1.9 \pm 0.19\%$ 로 확인되었고, SPE와 HCG의 처리 12주 후 실험구별 GSI는 각각 47.2%, 3.1% (data not shown)로 나타났다. 한편, 12주 후 대조구의 GSI는 2.1%로 주사 이전의 값과 차이가 없었다.

양식산 암컷 뱀장어의 실험개시 이전과 3개월간의 해수순치 후, 그리고 외인성 호르몬의 12주 처리 후 난소 내 난모세포의 발달정도는 Fig. 15에 나타내었다. 실험개시 이전, 암컷 뱀장어의 난소는 대부분 유구기(oil droplet stage)의 난모세포들로 이루어져 있었고(Fig. 15A), 3개월 동안의 해수순치 완료 후에 난소는 유구기 혹은 제 1 난황구기(primary yolk globule stage)의 난모세포들로 이루어져 있었다(Fig. 15B). SPE 처리 2주 후 난소는 제 2 난황구기(secondary yolk globule stage)의 난모세포들로 이루어져 있었다(Fig. 15C). 외인성 호르몬 처리 12주 후, HCG 처리구의 암컷 뱀장어의 난소는 대부분 유구기의 난모세포들로 구성되어 있는 반면, SPE 처리구의 암컷 뱀장어의 난소는 난황형성이 완료되었고, 핵이동기 단계로 발달하였다(migratory nucleous stage, Fig. 15D).

2) 수정률과 부화율

12주간 매주 SPE를 처리한 암컷 뱀장어 8마리 중 5마리가 09:00-10:00시 (DHP 주사 15-16시간 후)에 배란되었고, 3마리는 12:00-13:00시(DHP 주사 18-19시간 후)에 배란되었다. 이들에 대한 수정율은 각각 $75.2 \pm 9.3\%$ 와 $15.1 \pm 4.3\%$, 부화율은 $55.2 \pm 12.3\%$ 와 0%로 확인되었고, DHP 주사 15시간 후

의 수정율과 부화율이 18시간 후에 비해 유의하게 높은 것으로 나타났다 ($P<0.01$). 그러나 대조구와 HCG 처리구에서는 배란된 개체가 없었다(Table. 4)

4. 고찰

본 연구는 3개월간의 장기간 해수에 순치된 양식산 암컷 뱀장어에 있어 12주간의 인공 성성숙 유도에 따른 어체중과 혈중 성호르몬의 변동양상에 관해 조사하였다. 대부분의 암컷 뱀장어의 난소는 제 1 난황구기의 난모세포들로 구성되어 있었다. 이러한 조직학적 양상은 이전의 연구결과(Yamamoto et al., 1974; Kim et al., 2006a)에서 보고된 바 있는 자연산 뱀장어(silver eel)의 난소 발달단계와 유사한 것으로 나타났다. Kagawa et al. (1998)은 3개월 동안 해수에 순치된 양식산 암컷 뱀장어의 난소에서 난황형성이 유도되는 것을 확인하였고, 이는 자연산 암컷 뱀장어(silver eel stage)가 산란을 위해 강에서 해양으로 회유할 때와 비슷한 발달단계에 해당한다고 보고하였다. 따라서 상기의 결과를 바탕으로 향후 자연적으로 난황형성을 유도할 수 있는 해수순치 기간에 관한 세부적 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

뱀장어는 인위적 사육환경에서는 난황형성 및 생식소 발달이 이루어지지 않기 때문에 외인성 호르몬 처리에 의한 뱀장어의 인공 종묘생산을 위한 연구가 지난 반세기 동안 전 세계적으로 수행되어 왔다. 특히, 일본에서는 1960년대 이후 호르몬 처리에 의한 뱀장어 인공 성성숙 유도에 관한 연구가 지속적으로 시도되고 있다. 고농도의 synahorin (포유류의 뇌하수체 추출물과 HCG 혼합물)과 합성 에스트로젠(Satoh et al., 1992; Ochiai et al.,

1972)의 반복주사에 의해 직경 1mm의 난모세포를 획득하였지만, 완전히 성숙된 난모세포의 획득률은 매우 저조하였다. Yamamoto et al. (1974)는 뱀장어에 SPE의 반복주사에 의해 성공적으로 인공 성성숙을 유도하였고, 상기의 방식을 통해 Yamamoto는 최초로 뱀장어 자어를 생산하는데 성공하였다(Yamamoto and Yamauchi, 1974; Yamauchi et al., 1976). 그 이후로, 암컷 뱀장어의 인공 성성숙 유도를 위한 방법으로 SPE의 반복주사가 일반적으로 이용되고 있다.

경골어류는 배란기에 암컷의 체중이 급격히 증대되는 것으로 알려져 있다(Shehadeh and Ellis, 1970; Ishida et al., 1972). 이러한 체중의 급격한 증가는 전배란 난모세포의 수화작용(hydration of pre-ovulatory oocytes)과 직접적인 관련이 있다(Hirose et al., 1974; Hirose, 1976). *Anguilla japonica*에 있어, 암컷의 체중변화 역시 난성숙이 최종단계에 달했음을 암시하는 것이다(Yamamoto et al., 1974; Sugimoto et al., 1976; Oka, 1979; Satoh et al., 1992). 본 연구에서, SPE를 처리한 실험구에서 대부분의 암컷 뱀장어들의 증체량이 30~40%로 증대되었고, 조직학적 관찰을 통해 난모세포는 핵이동 단계로 발달했음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해 증체량이 30~40%가 되면 최종 성숙단계로 접어들었음을 알 수 있고, 또한 배란이 개시되었음을 확인할 수 있는 지표로 활용할 수 있음을 제시한다.

본 연구에서 SPE (20 mg/fish/week)를 처리한 개체들의 혈중 T와 E₂ 농도는 점차적으로 증대되는 경향을 보였다. 이와는 반대로 HCG (2 IU/g BW/week) 처리구의 혈중 T와 E₂ 농도는 주사 6주 후까지 점차적으로 증대되다가 이후부터 실험종료시까지 점차적으로 감소하는 경향을 나타내었다. Sato et al. (2003)는 자연산 뱀장어(silver eels)에 대해 연어의 GTH 단독 혹은

FSH와 LH의 혼합주사가 연어의 FSH나 LH의 단독주사의 처리에 비해 배란율과 수정율이 높았다고 보고하였다. 본 연구에서 SPE 처리구가 HCG 처리구에 비해 혈중 성호르몬 농도가 높은 것으로 확인되었다. 이는 난황형성과 배란유도를 위해서 FSH와 LH가 혼합되어 있는 SPE가 HCG에 비해 효과적임을 제시한다.

본 연구에서 SPE 처리구의 혈중 T농도는 실험개시 이후부터 증대되기 시작하였고, European eels에 있어서 Chiba et al. (1994)가 보고한 바와 같이 난황형성기간 동안 E₂와 함께 고농도로 유지되었다. 충분한 T의 분비는 E₂의 전구체로 작용할 수 있고, 혈중 E₂ 수준이 급격하게 증대될 때 난소의 난황형성이 완료되고, 난모세포는 핵이동기로 발달하는 단계임을 양식산 European eel, *A. anguilla* (Chiba et al., 1994)와 Japanese eel, *A. japonica* (Ijiri et al., 1995)를 대상으로 수행된 연구결과를 통해 구명된 바 있다. 혈중 E₂농도의 증대는 인위적으로 성숙이 유도된 뱀장어들의 독특한 특징으로 볼 수 있다. DHP는 *A. japonica*의 성숙 유도 호르몬(maturation-inducing hormone, MIH)으로 알려져 있지만(Ohta et al., 1996), 현재까지 자연산의 성숙 뱀장어가 확인된 바 없기 때문에 세부적 사항에 대해서는 알려져 있지 않다. 본 연구에서 혈중 DHP는 난모세포의 핵이동기 단계를 포함해서 전 실험기간 동안 검출되지 않았다. 지금까지, 인위적으로 성숙이 유도된 뱀장어의 난모세포 후기 발달 단계에서 혈중 E₂ 수준의 증대와 DHP 합성과의 관계에 대해서는 명확하게 밝혀지지 않았다. Matsubara et al. (2005)는 수컷 뱀장어(*A. japonica*)에 있어 11-ketotestosterone (11-KT; 수컷 뱀장어의 특이적 성호르몬)의 생리학적 중요성에 대해 보고하였다. 이 연구결과에 의하면 혈청 11-KT 농도의 변화는 E₂의 변동수준과

유사한 경향을 나타내는 것으로 확인되었다. 따라서, 혈중 11-KT 수준의 증대는 뱀장어의 난모세포 발달을 포함한 성성숙에 중요한 요인으로 작용하는 것으로 판단된다.

양식산 뱀장어의 인공성성숙 유도기간은 자연산 뱀장어에 비해 더 많은 기간이 소요된다. 자연산 *A. anguilla* (silver eel)에 있어 HCG (100 IU/fish)와 잉어 뇌하수체 추출물(30 mg/fish/week)의 반복주사를 통한 인공성성숙 유도기간은 8~10주가 소요되는 것으로 보고된 바 있다(Boetius and Boetius, 1980). 한편, SPE (50 mg/kg BW/week)의 반복주사에 의한 양식산 뱀장어의 인공성성숙 유도기간은 *A. anguilla* 은 10~15주, *A. japonica*는 15~19주가 소요되는 것으로 보고되었지만(Hirose, 1992), 사용한 외인성 호르몬의 종류가 다르기 때문에 직접적인 비교는 어려울 것으로 판단된다. 본 연구에서는 해수에서 3개월간 사육된 양식산 뱀장어에 있어 10~12주간 SPE (20 mg/fish/week)의 반복주사와 이후 DHP (2 µg/g BW)를 1회 주사하여 10마리의 암컷 중 8마리의 배란이 성공적으로 유도되었다.

뱀장어의 인공 성성숙 유도를 위한 수많은 연구가 지속적으로 수행되어 왔지만 배란된 알들에 대한 수정률과 부화율에 관한 정보는 미흡한 실정으로 이러한 정보의 부족은 최종성숙 처리 및 배란유도를 위한 명확한 기법이 설정되어 있지 않기 때문일 것으로 판단된다. 수정률과 부화율은 배란된 알들이 뱀장어의 체내에서 유지되는 기간에 영향을 받는다(Ohta et al., 1996). 본 연구에서 8마리의 배란된 개체들 중 5마리에서 수정 및 부화가 성공적으로 유도되었고, DHP 주사 15~16시간 후 배란된 알들의 수정률과 부화율이 각각 75.2%와 55.2%로 DHP 주사 18~19시간 후 배란된 알들에 비해 높은 것으로 나타났다. 이전의 연구결과에 의하면 Sugimoto et al.

(1976)는 5마리의 배란된 개체들 중 1마리에서 부화를 유도하였고, Satoh et al. (1992)는 15마리의 배란된 개체들 중 2마리만 부화를 유도할 수 있었다고 보고하였다. Kagawa et al. (1998)은 DHP 주사 15시간 후의 수정률과 부화율은 각각 65%와 58%였고, DHP 주사 18~21시간 후의 수정률과 부화율은 각각 30%와 21%로 확인되었음을 보고하였다. 또한, 배란된 개체들에 있어 배란 6시간 경과 후 수정률과 부화율은 거의 0%로 매우 낮았다고 보고하였다. 따라서 상기의 결과들에 의하면 양질의 알을 확보하기 위해서 인공수정은 배란이 확인되는 즉시 수행되어야 함을 제시할 수 있다.

결론적으로 본 연구에서 양식산 암컷 뱀장어의 인위적인 성성숙은 SPE의 반복주사에 의해 효과적으로 유도할 수 있었고, 또한 해수에 3개월간의 순치를 통해 SPE에 대한 반응성을 증대시킬 수 있고, 그 결과 혈중 성호르몬(T, E₂)의 합성이 촉진되어 난황형성이 완료되는 기간을 단축시킬 수 있음을 확인하였다. 또한 뱀장어의 인공 종묘 생산에 관한 연구를 수행함에 있어 생식소 발달에 관한 내분비학적 기구를 구명함과 동시에 번식률을 향상시킬 수 있는 효과적인 인공 성숙성 관련 기법을 정립하기 위해 친어로써 자연산 뱀장어를 대체하여 양식산 뱀장어를 이용할 수 있음을 제시한다. 향후, 뱀장어의 효율적인 성성숙을 위한 적합한 환경조건에 관한 연구가 수반되어야 할 것으로 판단된다.

5. 참고문헌

- Boetius, I. and J. Boetius, 1980. Experimental maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla*. Estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. Dana, 1, 1-28.
- Chiba, H., K. Iwatsuki, K. Hayami, A. Hara and K. Yamauchi, 1994. Changes in serum steroid hormones and vitellogenin levels in cultured female European eels (*Anguilla anguilla*) during artificially induced ovarian development. J. World Aquacult. Soc., 25, 553-560.
- Hirose, K., T. Hirano and R. Ishida, 1974. Effects of salmon gonadotropin on ovulation in the ayu, *Plecoglossus altivelis* with special reference to water balance. Comp. Biochem. Physiol., 47A, 283-289.
- Hirose, K., 1976. Endocrine control of ovulation in medaka (*Oryzias latipes*) and ayu (*Plecoglossus altivelis*). J. Fish. Res. Bd. Can., 33, 989-999.
- Hirose, K., 1992. Induced spawning of Japanese eel with LHRH-A copolymer pellet. NOAA Tech. Rep. NMFS., 106, 43-48.
- Ishida, R., K. Hirose and E. M. Donaldson, 1972. Induction of ovulation in ayu, *Plecoglossus altivelis*, with salmon pituitary gonadotropin. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 38, 1007-1012.
- Ijiri, S., Y. Kazeto, N. Takeda, H. Chiba, S. Adachi and K. Yamauchi, 1995. Changes in serum steroid hormones and steroidogenic ability of ovarian follicles during artificial maturation of cultivated Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture, 135, 3-16.

- Ijiri, S., T. Takaki, N. Takeda, H. Tachiki, S. Adachi and K. Yamauchi, 1998. Pretreatment reproductive stage and oocyte development induced by salmon pituitary homogenate in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Fish. Sci., 64, 531-537.
- Kagawa, H., N. Iinuma, H. Tanaka, H. Ohta and K. Okuzawa, 1998. Effects of rearing period in seawater on induced maturation in female Japanese eel, *Anguilla japonica*. Fish Sci., 64, 77-82.
- Kim, D. J., E. O. Kim, M. W. Park, Y. C. Cho and S. G. Lim SG, 2006a. Plasma sex steroid hormone profiles in artificially maturing wild eel, *Anguilla japonica*. J. Aquacult., 19, 267-274.
- Kim, E. O., J. Y. Bae, S. G. Lim, M. H. Son, M. W. Park, M. S. Park, Y. C. Cho and D. J. Kim, 2006b. Plasma sex steroid hormone profiles and testicular development in artificially maturing cultured male eel, *Anguilla japonica*. J. Kor. Fish. Soc., 39, 466-471.
- Ko, H. Y., W. D. Park, D. J. Kim, M. Kobayashi and Y. C. Sohn, 2007. Biological activities of recombinant Manchurian trout FSH and LH: their receptor specificity, steroidogenic and vitellogenic potencies. J. Molecular Endocrinol., 38, 99-111.
- Matsubara, H., P. M. Lokman, Y. Kazeto, S. Adachi and K. Yamauchi, 2005. Serum steroid profiles in artificially maturing female Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture, 243, 393-402.
- Ochiai, A., S. Umeda and H. Ota, 1972. On the eggs of Japanese eel and induction of maturation by hormone injection. Jap. J. Ichthyol., 19,

312-316.

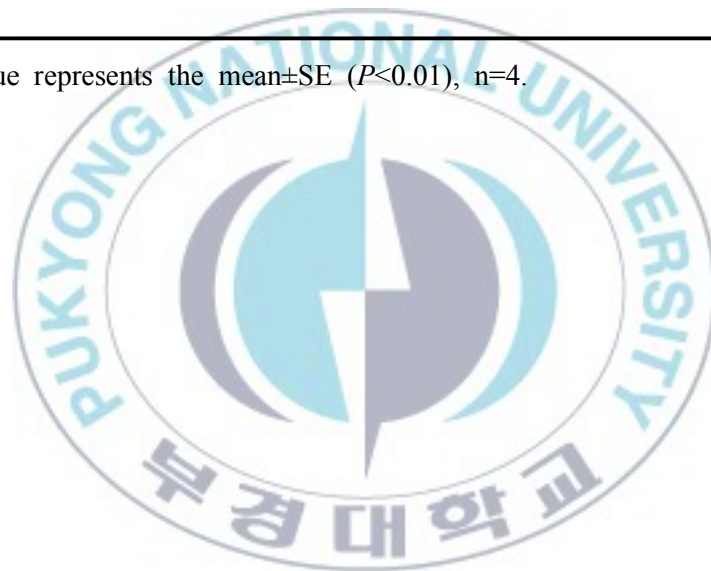
- Ohta, H., H. Kagawa, H. Tanaka, K. Okuzawa and K. Hirose, 1996. Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture, 139, 291-301.
- Oka, P. H., 1979. Studies on the artificial maturation in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. On the relation between the changes in body weight and the oogenesis during the course of maturation. Bull Shizuoka Pref. Fish. Exp. Stn., 13, 101-111.
- Sato, N., I. Kawazoe, Y. Suzuki and K. Aida, 2000. Adequate intervals of sGTH administration to induce vitellogenesis, and induction of ovulation by simultaneous administration of sGTH and 17 α -hydroxyprogesterone in the Japanese eel. Fish. Sci., 66, 644-654.
- Sato, N., I. Kawazoe, Y. Suzuki and K. Aida, 2003. Induction of vitellogenesis. (in) K. Aida, K. Tsukamoto and K. Yamauchi (eds), Eel Biology. Springer-Verlag, Tokyo, pp. 387-399.
- Satoh, H., Y. Yamamori and T. Hibiya, 1992. Induced spawning of the Japanese eel. Nippon Suisan Gakkaishi, 58, 825-832.
- Shehadeh, Z. and J. N. Ellis, 1970. Induced spawning of the striped mullet, *Mugil cephalus*. J. Fish. Biol., 2, 355-360.
- Sugimoto, Y., Y. Takeuchi, K. Yamauchi and H. Takahashi, 1976. Induced maturation of female Japanese eels (*Anguilla japonica*) by administration of salmon pituitaries, with notes on changes of oil droplets in eggs of

- matured eels. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., 27, 107-120.
- Tsukamoto, K., T. W. Lee and H. Fricke, 2003. Spawning area of the Japanese eel. (in) K. Aida, K. Tsukamoto and K. Yamauchi (eds), Eel Biology. Springer-Verlag, Tokyo, pp. 121-140.
- Yamamoto, K., O. Hiroi, T. Hirano and T. Morioka, 1972. Artificial maturation of cultivated male Japanese eel by synahorin injection. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 38, 1083-1090.
- Yamamoto, K. and K. Yamauchi, 1974. Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium. Nature, 251, 220-221.
- Yamamoto, K., T. Morioka, O. Hiroi and M. Omori, 1974. Artificial maturation of female Japanese eels by the injection of salmonid pituitary. Nippon Suisan Gakkaishi, 40, 1-7.
- Yamauchi, K., M. Nakamura, H. Takahashi and K. Takano, 1976. Cultivation of larvae of Japanese eel. Nature, 263, 412.

Table 4. Fertility and hatching rates of SPE-injected female eel, *Anguilla japonica* reared in seawater for 3 months

Ovulation time (Time after DHP injection)	09:00 - 10:00 (15 h - 16 h)	12:00 - 13:00 (18 h - 19 h)
Fertility (%)	75.2±9.3*	15.1±4.3
Hatching rates (%)	55.2±12.3*	-

* Each value represents the mean±SE ($P<0.01$), n=4.



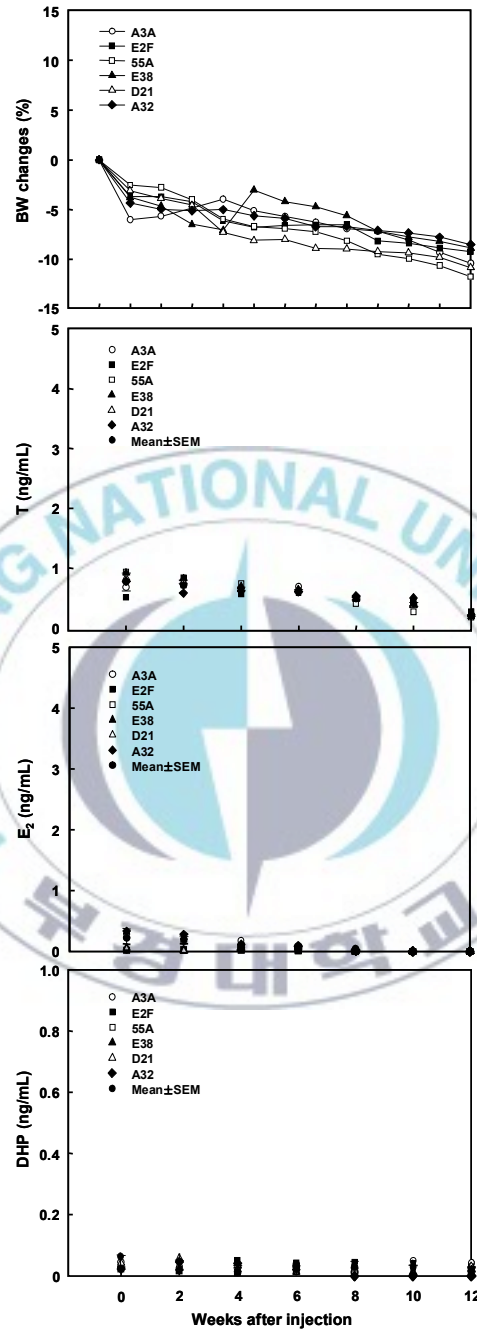


Fig. 11. Changes in body weight (BW) and plasma levels of sex steroid hormones (T, E₂, DHP) in cultured female eel, *Anguilla japonica* injected with eel's Ringer (control) in Freund's incomplete adjuvant emulsion.

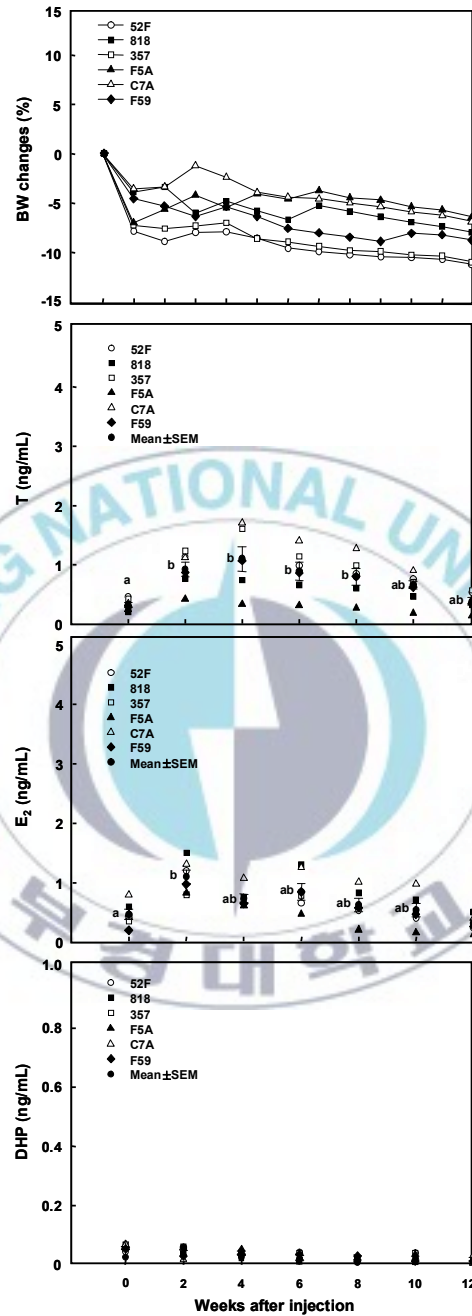


Fig. 12. Changes in body weight (BW) and plasma levels of sex steroid hormones (T, E₂, DHP) in cultured female eel, *Anguilla japonica* injected with human chorionic gonadotropin (HCG) in Freund's incomplete adjuvant emulsion.

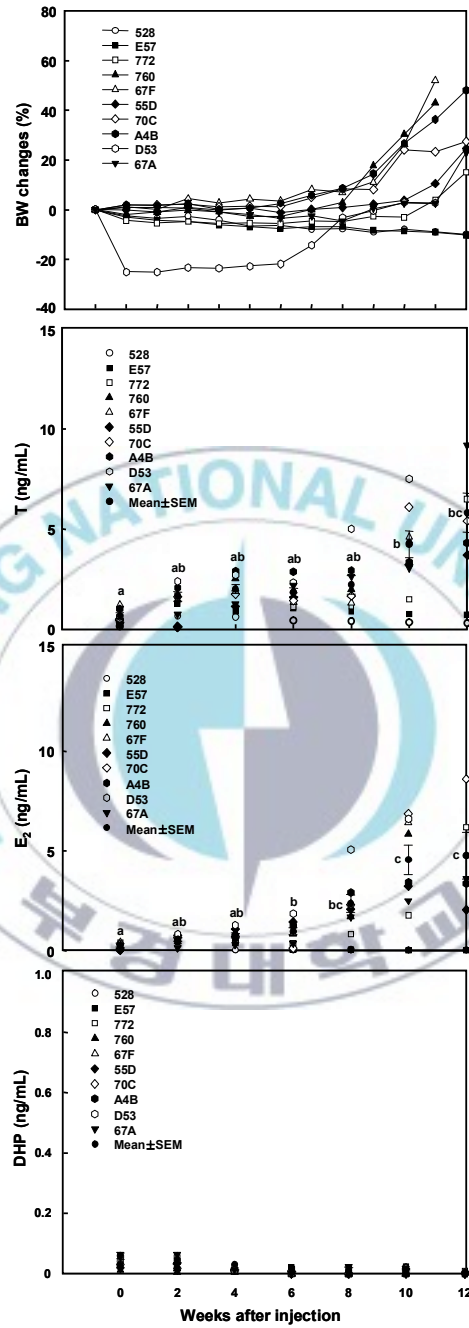


Fig. 13. Changes in body weight (BW) and plasma levels of sex steroid hormones (T, E₂, DHP) in cultured female eel, *Anguilla japonica* injected with salmon pituitary extraction (SPE) in Freund's incomplete adjuvant emulsion.

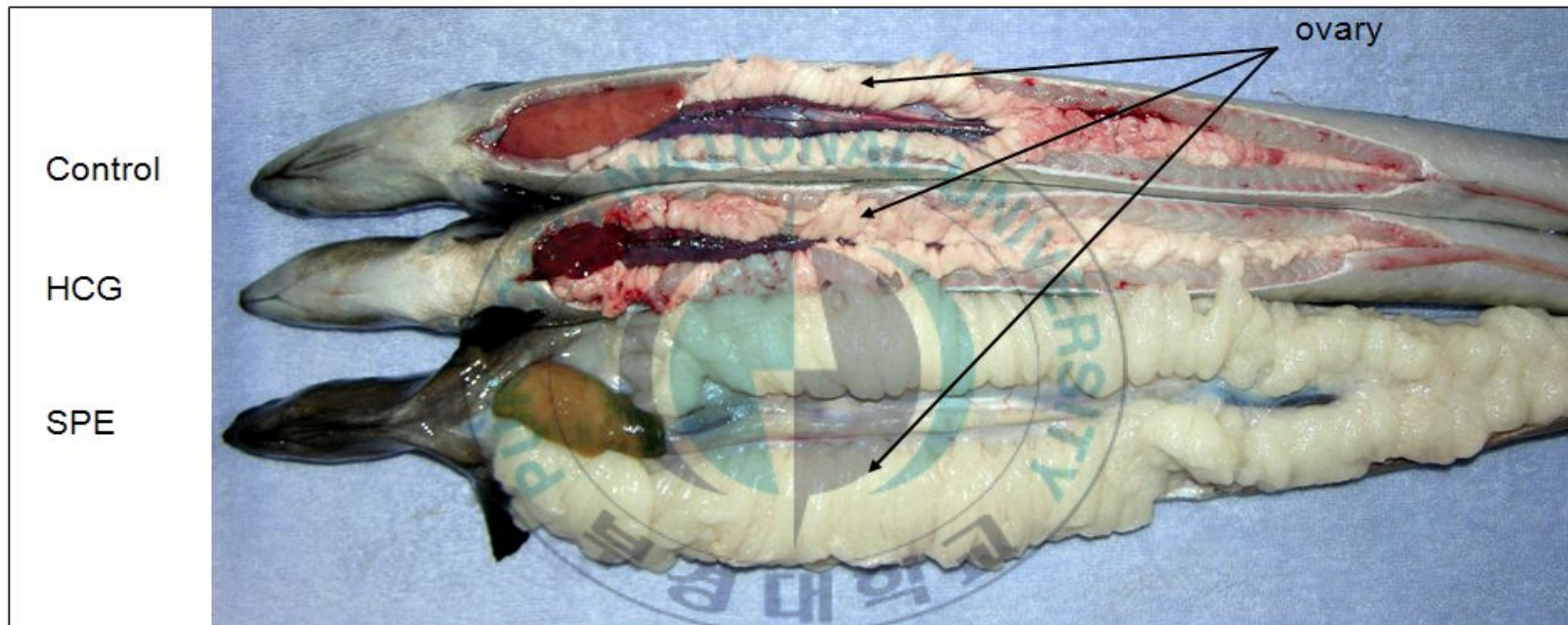


Fig. 14. Representative photographs of ovary after 12 weeks of exogenous hormone injection of cultured female eel, *Anguilla japonica* reared in seawater for 3 months. Note that the ovary of SPE-injected female is bigger than that of control or HCG-injected female.

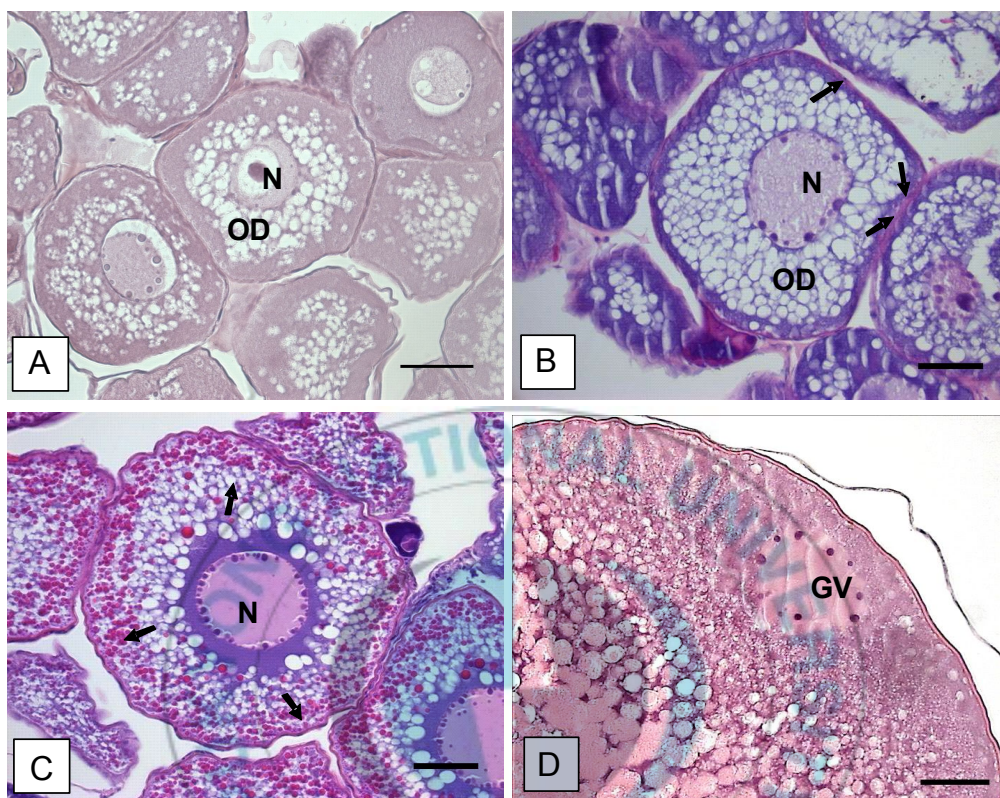


Fig. 15. Light micrographs of the ovaries in the cultured female eel, *Anguilla japonica*. A, Oocytes of female eels without acclimation to seawater were observed to be at the oil droplet stage; B, Oocytes at the primary yolk globule stage were observed in the ovaries of cultured female eels acclimated to seawater for 3 month (initial experimental group); C, Oocytes of SPE injected cultured female eels 2 weeks after the beginning of the experiment were observed to be at the secondary yolk globule stage; D, Oocytes of SPE injected cultured female eels 12 weeks after the start of the experiment were observed to be at the migratory nucleus stage. Abbreviations: N, nucleus; Arrow (in B, C), yolk globule; OD, oil droplet; GV, germinal vesicle. Bars indicate 50 μm .

제 4절 양식산 뱀장어의 적정 인공 성숙시기 설정

1. 서론

극동산 뱀장어(*Anguilla japonica*)를 포함한 뱀장어과는 강하성(catadromous) 어류로 담수에서 성장 후 해양으로 회유하여 산란한다. 그러나 최근 Tsukamoto (2006)는 Mariana 군도 서부해역에 있는 Suruga seamount 서부(14° N, 142° E)에서 갓 부화한(부화 후 2-5일) 전장 4.2-6.5 mm의 pre-leptocephalus를 대량으로 채집하여 유전자 분석(real time polymerase chain reactions)에 의해 *A. japonica*의 유생임을 확인함으로써 이 부근을 산란장으로 추정하고 있다. 또한, 이러한 유생채집 시기와 유생의 이석(otolith) 미세구조를 분석하여 6월에서 7월 사이를 자연계에서 뱀장어의 산란시기로 보고하고 있다(Ishikawa et al., 2001).

뱀장어는 인위적인 사육환경에서는 뇌하수체의 gonadotropins (GTHs) 합성능력이 미흡하여 생식소가 발달하지 않는 것으로 알려져 있고(Nagahama and Yamamoto, 1973), 이러한 당단백질성 GTH는 어류를 포함한 척추동물의 생식소 형성과 발달에 필수적인 것으로 보고되고 있다(Kumar et al., 1997; Ma et al., 2004). 따라서, 암컷 뱀장어의 경우 외재성 GTH 일종인 salmon pituitary extracts (SPE)의 반복주사로 난황형성기 완료와 17 α , 20 β -dihydroxyprogesterone (DHP)에 의한 최종성숙 및 배란을 유도하였고(Yamamoto and Yamauchi, 1974; Ohta et al., 1996; Adachi et al., 2003; Kim et al., 2006a), 수컷의 경우 human chorionic gonadotropin (HCG)의 반복주사로 배정을 유도하였다(Kim et al., 2006b). 이러한 뱀장어의 인공종묘생산에 관한 연구는 연중 특정한 시기와 상관없이 여러 연구자들에 의해 수행된 결과 뱀장어의 유생(leptocephali) 생산 및 실험뱀장어(glass eel)로 변태를

유도하였으나(Tanaka et al., 2001, 2003), 배란이 유도된 암컷의 비율과 배란된 알들의 수정률과 부화율 등은 매우 낮은 것으로 보고하고 있다. 최근 leptocephalus형 유생기간을 거치는 어류인 갯장어(*Muraenesox cinereus*)의 경우 육상사육 수조에서 양성중인 암·수컷은 자연상태와 마찬가지로 동일한 생식소의 변화를 나타내어 7월경에 다량의 수정란을 확보하였다고 보고하였다(加治 등, 2004).

양식산 뱀장어의 경우 여러 연구자들의 결과를 종합해 보면 SPE 투여시기에 따라 SPE 투여횟수의 상이한 차이를 나타낸다(Ijiri et al., 1995; Ohta et al., 1997). 이러한 결과는 계절에 따라 난소에 대한 GTH 반응성 차이뿐만 아니라 이러한 차이에 의해 번식률(배란율, 수정률 및 부화율)에 영향을 끼칠 것으로 추정된다. 따라서 본 연구는 양식산 뱀장어에 있어서 인위적 성성숙 처리시기에 따른 계절별 번식률을 조사하여 자연산란시기와의 상호관련성을 확인하고, 이를 통해 뱀장어 적정한 인공성성숙시기를 결정함으로써 인공종묘생산을 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

2. 재료 및 방법

1) 실험어 및 사육관리

실험어는 국립수산물과학원 남부 내수면 연구소에서 사육중인 2.5년생 양식산 뱀장어를 일주일간 1일 5psu씩 점차적으로 해수에 적응시킨 후, 암컷 뱀장어(400~600 g)와 수컷 뱀장어(200~350 g)를 1000 L 사육수조에 수용하여 3월부터 익년 1월까지(3~5월, 봄; 5~7월, 여름; 9~12월, 가을; 10~1월, 겨울) 각 계절별로 호르몬 처리에 의한 인위적인 성성숙을 유도하였다. 호르몬 처리기간 동안 사육수온은 $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였고, 충분한 산소를 공급하였다. 호르몬 처리기간 동안 사료는 별도로 공급하지 않았고, 수조 위에 검정색 차광막을 덮어서 친어가 안정되게 하였다.

2) 호르몬 처리

해수순치 완료 후, 실험구별 각 개체들은 1회 호르몬 투여 직전에 ID microchip (φ 2.1×12 mm)을 등근육에 삽입하여 mini portable reader (HS5900LF, DESTRON technologies, USA)로 개체를 식별하였다. 실험어에 대한 외재성 호르몬 처리에 있어서 수컷 뱀장어는 Kim et al. (2006b)의 방법에 따라 2-phenoxyethanol (200 ppm)에 마취 후 HCG (1 IU/g body weight/week; Sigma)을 매주 복강에 주사하여 정자형성 및 배정을 유도하였다. 한편, 암컷 뱀장어는 Kim 등(2006a)의 방법에 따라 Chum salmon (*Oncorhynchus keta*) pituitary powder (i-JARD, Hokkaido, Japan)를 eel's ringer 액으로 균질화한 추출액(SPE; 20 mg/fish)을 매주 복강에 주사하여 인위적인 성성숙을 유도하였고, 매주 증체량(WG %, $\text{Weight Gain} = [(\text{final body weight} - \text{initial body weight}) / \text{initial body weight} \times 100]$) 측정을 통해 성숙도를 결정하였다.

3) 배란 및 수정

SPE (20 mg/fish) 주사 10-14주 이후 외관적으로 복부가 팽만한 암컷 뱀장어(WG 20% 이상)는 Ohta et al. (1996)의 방법에 따라 SPE (20 mg/fish)를 복강 내 1회 투여한 후, 2~3일 경과 후 증체량이 32~37%로 증가한 개체를 다시 선별하여 polyethylene canula를 산란관에 삽입하여 난 성숙 상태를 확인한 후, 당일 18시경에 2 µg/g body weight 농도의 DHP를 주사하여 배란을 유도하였다. 한편, HCG (1 IU/g body weight) 주사 6-10주 이후 성숙상태가 양호한 수컷 뱀장어는 복부에 압박을 가해 소량의 정액을 채취하여 정자의 운동성을 확인하였고, 암컷 뱀장어의 배란시기와 맞추어 고농도의 HCG (1000 IU/g body weight)를 주사하여 암컷과 수컷을 각 1:2 비율로 수조에 수용하여 자연산란 및 수정을 유도하였다. DHP 처리 15~18시간 이

후, 자연산란에 의해 수정된 수정란을 산란수조의 배수관에 연결된 집란조 (60×40×30 cm, 200 μ m muller gauze)를 이용하여 부상란을 수거한 후 메스 실린더(1 L)를 이용하여 산란량을 조사하였다. 수거한 부상란은 부화수조 (20 L 아크릴 수조)에 수용하여 미량의 산소를 공급해 주었다. 집란조 내 침하란은 사이펀을 통해 메스실린더로 옮긴 후 총중량을 측정하였고, 페트리디쉬에 1 g의 난을 취하여 개수를 체크한 다음 침하란 총중량에 대한 비율로 침하란의 개수를 측정하였다. 한편, 자연산란하지 않은 개체들은 복부에 압박을 가해 알과 정액을 각각 채취하였고, 정액은 인공 정장액 (artificial seminal plasma, ASP)에 희석하여 인공수정(건조법)을 실시하였다. 이때, 수온은 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 $22.5\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 로 조절하였고, 3중 필터(10 μ m, 5 μ m 및 3 μ m)로 여과한 해수를 공급하였다. 각 계절별 수정란의 부상률과 수정률 및 부화율은 Seoka (2003)의 방법에 따라 조사하였고, 이후 부화 유생수와 생존일수를 측정하였다.

4) 통계처리

통계처리는 분산분석 후, Duncan's new multiple range test에 의해서 유의성을 검정하였다($P<0.05$).

3. 결과

1) 배란율과 산란수

각 실험구별 대부분의 암컷 뱀장어는 10~14 주간 SPE (20 mg/fish) 처리에 의해 난황형성이 완료되었고, 이후 상기의 개체들에 대해 DHP (2 μ g/g body weight)를 주사하여 배란 및 산란을 유도하였다. 각 계절별 배란율과 산란수는 Table 5와 Fig. 16에 나타내었다. 3월 7일부터 매주 호르몬을 처

리한 실험구에서 5월 6일(봄)부터 배란된 개체가 나타났고, 5월 23일까지 총 10마리 중 8마리가 배란(80%)하였고, 그 중 3마리가 자연산란하였으며, 배란한 개체들에 대한 평균 산란수는 584,830개였다. 5월 11일부터 인위적으로 성성숙을 유도한 실험구는 7월 3일(여름)부터 배란된 개체가 나타났고, 7월 27일까지 총 9마리 중 6마리가 배란(67%)하였고, 그 중 2마리가 자연산란하였으며, 배란한 개체들에 대한 평균 산란수는 546,370개였다. 9월 26일부터 인위적으로 성성숙을 유도한 실험구는 11월 29일(가을)부터 배란한 개체가 나타났고, 12월 2일까지 총 8마리 중 3마리(38%)가 배란하였고, 배란한 개체들에 대한 평균 산란수는 213,400개였다. 2005년 10월 21일부터 인위적으로 성성숙을 유도한 실험구는 익년 1월 7일(겨울)부터 배란된 개체가 나타났고, 1월 24까지 총 10마리 중 4마리(40%)가 배란하였고, 배란한 개체들에 대한 평균 산란수는 248,200개였다. 계절별 배란율과 산란수에 있어서 봄과 여름에 산란한 실험구의 배란수가 나머지 계절의 산란수에 비해 유의하게 높았으나, 두 계절간 유의한 차이는 없었다($P<0.05$).

2) 수정란의 부상률과 수정률 및 부화율

계절별 수정란의 부상률과 수정률 및 부화율을 포함한 번식률에 관한 결과는 Table 5와 Fig. 17에 나타내었다. 봄에 산란한 수정란의 부상률($76.8\pm2.7\%$)이 가을($41.3\pm8.9\%$)과 겨울($44.3\pm3.1\%$)에 산란한 수정란의 부상률에 비해 유의하게 높았으나, 여름에 산란한 수정란의 부상률($62.7\pm4.8\%$)과는 유의한 차이가 없었다($P<0.05$). 수정률과 부화율은 각각 봄($74.1\pm3.4\%$, $60.4\pm5.5\%$)과 여름($73.5\pm3.1\%$, $54.0\pm3.2\%$)이 다른 계절에 비해 유의하게 높았으나, 두 계절간 유의한 차이는 없었다($P<0.05$).

3) 부화유생수와 유생생존기간

계절별 부화 유생수와 유생의 생존기간은 Fig. 18에 나타내었다. 계절별 부화 유생수에 있어서 봄(평균 106,000 마리)과 여름(평균 104,000 마리)에 산란한 개체들의 부화 유생수가 나머지 계절에 산란한 개체들의 부화 유생수에 비해 유의하게 많았으나, 두 계절간 유의한 차이는 없었다($P<0.05$). 또한 봄(11.55 ± 1.05 일)과 여름(10.8 ± 0.83 일)에 부화한 유생의 평균 생존기간이 나머지 계절에 부화한 유생의 평균 생존기간에 비해 유의하게 길었으나, 두 계절간 유의한 차이는 없었다($P<0.05$).

4. 고찰

본 실험에서 외인성 호르몬인 SPE 처리에 의해 인위적으로 난황형성은 유도되었지만, 최종성숙 및 배란은 유도되지 않았다. 따라서, 난황형성이 완료된 개체들에 대해 Ohta et al. (1996)의 방법에 따라 DHP ($2 \mu\text{g/g}$ body weight)를 주사하여 배란 및 산란을 유도하였다. 그 결과, 배란율과 번식률 등에 있어서 인위적으로 성성숙을 유도한 시기에 따라 상이한 차이를 나타내었다. 성숙한 뱀장어에 있어서 DHP가 난성숙 유도 성호르몬으로 작용하여 배란을 유도할 수 있음을 보고하였으나, 배란된 난의 과숙 및 미숙 등의 문제로 인해 현재까지 수정률과 부화율 등이 저조한 실정이다(Kagawa et al., 1995; Ohta et al., 1996). 이를 위해 DHP 적정처리시기 및 농도 등에 관한 세부적인 연구를 통해 난질을 향상시킬 수 있는 방안을 모색해야 될 것으로 판단된다.

본 연구에서는 5월과 7월(봄~여름)에 배란된 개체군에 대한 계절별 수정란의 부상률과 수정률 및 부화율을 포함한 번식률이 다른 계절의 개체군들에 비해 높았고, 유생의 생존기간 역시 양호한 것으로 나타났다. 이는 호

르몬 처리에 의해 인공성숙이 유도된 양식산 뱀장어(651-1120 g)의 수정란에 있어서 Seoka et al. (2003)이 보고한 부상률($61.7 \pm 28.1\%$), 수정률($50.8 \pm 16.2\%$) 및 부화율($40.5 \pm 22.4\%$)에 관한 결과에 비해 본 연구의 봄과 여름철 결과가 높은 경향을 나타내었으나, 성숙시기의 불일치로 인해 직접적인 비교는 어려울 것으로 판단된다.

수정 후 부화까지 소요되는 시간에 있어서 본 연구에서는 수온 $22.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 수정 후 38시간 후부터 부화가 개시되었다. 이에 대해 인공수정 한 극동산 뱀장어의 수정란은 수온 $22 \sim 23^\circ\text{C}$ 에서 수정 38시간(Yamamoto et al., 1975), 38~45시간(Yamamoto and Yamauchi, 1974), 40시간(Tanaka et al., 2003) 이후부터 부화가 개시되었다는 결과와 유사하여 이는 수정방식에 따른 수정란의 부화시간은 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한, 유럽산 뱀장어의 부화시간은 수온 $20 \sim 21^\circ\text{C}$ 에서 수정 후 48시간(Pedersen, 2004), 붕장어의 경우 수온 $12 \sim 14^\circ\text{C}$ 에서 84시간(Horie et al., 2002)으로 극동산 뱀장어에 비해 소요시간이 다소 길었고, 갯장어의 경우 수온 25°C 에서 36시간(Umezawa et al., 1991), 떡붕장어의 경우 수온 $22.6 \sim 23.8^\circ\text{C}$ 에서 27~36시간(Asano et al., 1997)이 소요되는 것에 비해 짧았다. 이러한 결과는 부화시간은 수온에 영향을 받는다고 할 수 있으나, 극동산 뱀장어의 산란장과 산란시기의 수온이 명확히 밝혀져 있지 않았기 때문에 생태학적 연구와 더불어 부화율 향상을 위한 부화 적정수온 및 환경 조건 등에 관한 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

뱀장어과를 포함한 부상란을 산출하는 red sea bream *Pagrus major* (Watanabe et al., 1984a, 1984b), sea bass *Dicentrarchus labrax* (Carrillo et al., 1989), yellowtail *Seriola lalandi* (Mushiake et al., 1994), Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (Furuita et al., 2000, 2002), Japanese whiting *Sillago japonica* (Kondo et al., 2001)와 같은 경골어류에 있어서 수정란의

부상물은 수정률과 부화율 등에 관한 난질의 척도로 이용될 수 있다. 이에 대해, 뱀장어의 수정란에 있어서 Seoka et al. (2003)과 Unuma et al. (2005)은 부상란과 침성란에 대한 생화학적 조성의 차이와 난질과의 관계에 관해 보고하였다. 상기의 연구에 의하면 부상란의 수분함량(93.1%)과 유리아미노산(free amino acids, FAA) 함량($573.5 \mu\text{mol/g}$ in dry weight)은 침성란(87.5%, $385.8 \mu\text{mol/g}$)에 비해 유의하게 높은 반면, 단백질과 지질함량은 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 수정란에 대한 생화학적 조성의 차이는 배란기 이후 과숙의 유무에 의해 발생할 수 있는 것으로 부상란에 있어서 높은 수분함량과 FAA 함량은 필수적임을 제안하고 있다. 부상란의 난황단백질은 최종성숙기에 proteolysis로 인해 가수분해되어 FAA의 함량이 증대되고, FAA는 삼투압 조절에 작용하여 환경수로부터 수분을 유입함으로써 부상란을 증대시킬 수 있으며, 이후 배발생 단계에서 영양원으로 이용될 수 있음을 보고하였다(Fyhn, 1990). 따라서, FAA를 포함한 뱀장어 수정란의 생화학적 조성은 난질과 배발생 및 부화유생의 생존과 관련이 있을 것으로 판단되는 바 향후 관련 연구가 수행되어야 할 것이다.

자연계에서 뱀장어는 담수에서는 yellow eel로 성장하다가 성숙기가 되면 체표가 은백색으로 변하는 silvering (은화과정)을 통해 silver eel로 변태하여 가을에서 초겨울 사이에 산란지로 강하한다. 이때 산란지로 회유하는 기간은 6개월(half year migrating) 정도로 이듬해 4월부터 11월 사이에 산란하는 것으로 알려져 있으나(Tsukamoto, 1990), 채집된 부화유생수의 출현빈도와 이들의 이석 미세구조의 분석에 의하면 뱀장어의 주산란시기는 6월에서 7월 사이로 보고되고 있다(Aoyama et al., 2001; Ishikawa et al., 2001). 자연계에서 뱀장어는 산란지로 회유하는 6개월의 기간 동안 생식소 발달이 이루어지는데 반해, 본 연구에서 양식산 뱀장어에 있어서 호르몬 처리에 의해 인위적으로 성숙을 유도한 결과 계절별 그리고 개체별로 차이는 있

으나, 자연산 뱀장어의 성숙속 기간보다 짧은 평균 8~14 주 이내에 대부분의 개체들의 배란이 유도되었다. 한편, Yoshikawa (1995)는 담수에서 사육 중인 양식산 4년생 암컷 뱀장어(500 g 이상)에 있어서 계절에 따른 GSI의 변화를 조사한 결과, 가을부터 서서히 증가하기 시작하여 겨울에는 약 1.8 정도로 연중 최고치에 도달하여 이 시기에 외재성 호르몬 투여에 의한 성숙 유도 개시시기로 판단하고 있다. 또한 자연산 뱀장어에 있어서도 가을에 난소의 성숙상태가 가장 잘 발달되었으나, 겨울에 난소가 퇴화하는 경향을 나타낸다고 보고하였다(Satoh et al., 1962). 이러한 결과는 자연산 뱀장어와 마찬가지로 양식산 뱀장어에 있어서도 계절에 따라 생식소 발달 정도 및 성숙속 관련 호르몬 작용에 대한 감수성이 변화하는 것으로 추측되어진다. 그러나 본 연구에서는 3월과 5월에 SPE 처리 후, 5월(봄)과 7월(여름)에 배란이 유도된 개체군에 대한 번식률이 다른 계절의 개체군에 비해 높았으며, 이러한 결과는 자연계에서 6월에서 7월사이가 뱀장어의 주산란시기로 추정되는 결과와 일치하였으나(Aoyama et al., 2001; Ishikawa et al., 2001), Yoshikawa (1995)의 연구와는 상이한 결과를 나타내었다. 이러한 차이점은 최근 뱀장어의 초기성숙(난황형성) 유도기구에 관한 결과에 의하면 수온(Sato et al., 2006), 장기간의 해수적응(Kagawa et al., 1997; Kalujnaia et al., 2007; Kim et al., unpublished data), 고정수압(high hydrostatic pressure; Sebert et al., 2007) 혹은 장기간의 유영(van Ginneken et al., 2007) 등과 같은 환경적인 요인에 의해 유도될 가능성이 높기 때문에 외재성 호르몬 투여에 의한 뱀장어의 초기성숙 유도가 오히려 저해될 뿐만 아니라 난질에도 영향을 미칠 것으로 추정된다.

본 연구 결과, 양식산 뱀장어를 대상으로 호르몬 처리에 의한 계절별 인공성숙 유도시 자연계에서의 주산란시기인 5월과 7월(봄~여름)에 번식률이 가장 양호한 것으로 확인되었다. 따라서 상기의 연구는 양식산 뱀장어

의 종묘생산을 위한 인공성성숙시기의 결정과 번식률 향상을 위한 하나의 지표로 유용할 것으로 판단되며, 향후 유생의 생존을 향상 및 사육에 관한 연구가 다각적으로 수행되어야 할 것이다.

5. 참고문헌

- Adachi, S., S. Ijiri, Y. Kazeto and K. Yamauchi, 2003. Oogenesis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. (in) K. Aida, K. Tsukamoto and K. Yamauchi (eds), Eel Biology. Springer-Verlag, Tokyo, pp. 301-329.
- Asano, H., Y. Kubo and H. Hayashi, 1997. Location and numbers of oil globules in unfertilized and fertilized eggs, and larvae in the preleptocephalic stage in the order Anguilliformes. Mem. Fac. Agr. Kinki Univ., 30, 19-31.
- Aoyama, J., S. Ishikawa, T. Otake, N. Mochioka, Y. Suzuki, S. Watanabe, A. Shinoda, J. Inoue, P.M. Lokman, T. Inagaki, M. Oya, H. Hasumoto, K. Kubokawa, T.W. Lee, H. Fricke and K. Tsukamoto, 2001. Molecular approach to species identification of eggs with respect to determination of the spawning site of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Fish. Sci., 67, 761-763.
- Bae, J. Y., K. M. Han, G. J. Park and S. C. Bai, 2004. Studies on requirements of optimum dietary essential fatty acids in juvenile eel, *Anguilla japonica*. J. Aquacult., 17(4), 275-281.
- Carrillo, M., N. Bromage, S. Zanuy, R. Serrano and F. Prat, 1989. The effect of modifications in photoperiod on spawning time, ovarian development and egg quality in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture, 81,

351-365.

- Furuita, H., H. Tanaka, T. Yamamoto, M. Shiraishi and T. Takeuchi, 2000. Effects of n-3 HUFA levels in broodstock diet on the reproductive performance and egg and larval quality of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 187, 387-398.
- Furuita, H., H. Tanaka, T. Yamamoto, N. Suzuki and T. Takeuchi, 2002. Effect of high levels of n-3 HUFA in broodstock diet on egg quality and egg fatty acid composition of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 210, 323- 333.
- Fyhn, H. J., 1990. Energy production in marine fish larvae with emphasis on free amino acids as a potential fuel. (in) J. Mellinger (ed.), *Nutrition in Wild and Domestic Animals*. Karger, Basel, pp. 176-192.
- Horie, N., T. Utoh, Y. Yamada, A. Okamura and H. Zhang, 2002. Development of embryos and larvae in the common Japanese conger *Conger myriaster*. *Fish. Sci.*, 68, 972-983.
- Ijiri, S., Y. Kazeto, N. Takeda, H. Chiba, S. Adachi and K. Yamauchi, 1995. Changes in serum steroid hormones and steroidogenic ability of ovarian follicles during artificial maturation of cultivated Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 135, 3-16.
- Ishikawa, S., K. Suzuki, T. Inagaki, S. Watanabe, Y. Kimura, A. Okamura, T. Otake, N. Mochioka, Y. Suzuki, H. Hasumoto, M. Oya, M.J. Miller, T.W. Lee, H. Fericke and K. Tsukamoto, 2001. Spawning time and place of the Japanese eel, *Anguilla japonica* in the North Equatorial Current of the western North Pacific Ocean. *Fish. Sci.*, 67, 1097-1103.
- Jeon, M. J., K. M. Han, J. Y. Bae, J. H. Yoo, K. A. Lee and S. C. Bai,

- 2003a. Serum steroid hormone level and hematological characteristics of one year cultured eels, *Anguilla japonica* based on total length and sex. J. Aquacult., 16(4), 267-272.
- Jeon, M. J., K. M. Han, J. H. Yoo, K. A. Lee and S. C. Bai, 2003b. Nutritional properties of body composition based on captured location and size in wild eels, *Anguilla japonica*. J. Aquacult., 16(4), 273-278.
- Kagawa, H., H. Tanaka, H. Ohta, K. Okuzawa and K. Hirose, 1995. In vitro effect of 17 α -hydroxyprogesterone and 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one on final maturation of oocytes at various developmental stages in artificially matured Japanese eel *Anguilla japonica*. Fish. Sci., 61, 1012-1015.
- Kagawa, H., N. Inuma, H. Tanaka, H. Ohta and K. Okuzawa, 1997. Effects of rearing period in seawater on induced maturation in female Japanese eel *Anguilla japonica*. Fish. Sci., 64, 77-82.
- Kalujnaia, S., I. S. McWilliam, V. A. Zaguinaiko, A. L. Feilen, J. Nicholson, N. Hazan, C. P. Cutler, R. J. Balment, A. R. Cossins, M. Hughes and G. Cramb, 2007. Salinity adaptation and gene profiling analysis in the European eel *Anguilla anguilla* using microarray technology. Gen. Comp. Endocrinol., 152, 274-280.
- Kim, D. J., E. H. Kim, M. W. Park, Y. C. Cho and S. G. Lim, 2006a. Plasma sex steroid hormone profiles in artificially maturing wild eel, *Anguilla japonica*. J. Aquacult., 19(4), 267-274.
- Kim, E. O., J. Y. Bae, S. G. Lim, M. H. Son, M. W. Park, M. S. Park, Y. C. Cho and D. J. Kim, 2006b. Plasma sex steroid hormone profiles and testicular development in artificially maturing cultured male eel, *Anguilla*

- japonica*. J. Kor. Fish. Soc., 39(6), 466-471.
- Kondo, S., M. Yoshioka and M. Kashiwagi, 2001. Changes in specific gravity and osmolarity of eggs of Japanese whiting, *Sillago japonica* during the embryonic development. Nippon Suisan Gakkaishi, 67, 743-744.
- Kumar, T. R., Y. Wang, N. Lu and M. M. Matzuk, 1997. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. Nat. Genet., 15, 201-204.
- Ma, X., Y. Dong, M.M. Matzuk and T.R. Kumar, 2004. Targeted disruption of luteinizing hormone β -subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 101, 17294-17299.
- Mushiake, K., K. Kawano, W. Sakamoto and I. Hasegawa, 1994. Effects of extended daylength on ovarian maturation and HCG induced spawning in yellowtail fed moist pellets. Fish. Sci., 60, 647-651.
- Nagahama, Y. and K. Yamamoto, 1973. Cytological changes in the adenohypophysis of fresh water cultivated male Japanese eel, *Anguilla japonica* induced to maturation by transfer to sea water and synahorin injection. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 39, 585-594.
- Okorie, O. E., Y. C. Kim, S. H. Lee, J. Y. Bae, J. H. Yoo, K. M. Han and S. C. Bai, 2007. Reevaluation of the dietary protein requirements and optimum dietary protein to energy ratios in Japanese Eel, *Anguilla japonica*. J. World Aquacult., 38(3), 418-426.
- Ohta, H., H. Kagawa, H. Tanaka, K. Okuzawa and K. Hirose, 1996. Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*.

- Aquaculture, 139, 191-301.
- Ohta, H., H. Kagawa, H. Tanaka, K. Okuzawa, N. Inuma and K. Hirose, 1997. Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Fish Physiol. Biochem., 17, 163-169.
- Pedersen, B. H., 2004. Fertilisation of eggs, rate of embryonic development and hatching following induced maturation of the European eel *Anguilla anguilla*. Aquaculture, 237, 461-473.
- Sato, N., I. Kawazoe, Y. Suzuki and K. Aida, 2006. Effects of temperature on vitellogenesis in Japanese eel *Anguilla japonica*. Fish. Sci., 72, 961-966.
- Satoh, H., N. Nakamura and T. Hibiya, 1962. Studies on the sexual maturation of the eel- I. On the sex differentiation and the maturing process of the gonads. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 28, 579-584.
- Sebert, M.E., A. Amerand, A. Vettier, F.A. Weltzien, C. Pasqualini, P. Sebert and S. Dufour, 2007. Effects of high hydrostatic pressure on the pituitary-gonad axis in the European eel, *Anguilla anguilla*. Gen. Comp. Endocrinol., 153, 289-298.
- Seoka, M., S. Yamada, Y. Iwata, T. Yanagisawa, T. Nakagawa and H. Kumai, 2003. Differences in the biochemical content of buoyant and non-buoyant eggs of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture, 216, 355-362.
- Tanaka, H., H. Kagawa and H. Ohta, 2001. Production of leptocephali of Japanese eel, *Anguilla japonica* in captivity. Aquaculture, 201, 51-60.
- Tanaka, H., H. Kagawa, H. Ohta, T. Unuma and K. Nomura, 2003. The first production of glass eel in captivity: fish reproductive physiology facilitates great progress in aquaculture. Fish Physiol. Biochem., 28, 493-497.
- Tsukamoto, K., 1990. Recruitment mechanism of the eel, *Anguilla japonica* to

- the Japanese coast. J. Fish. Biol., 36, 659-671.
- Tsukamoto, K., 2006. Spawning of eels near a seamount. Nature, 439, 929.
- Umezawa, A., T. Otake, J. Hirokawa, K. Tsukamoto and M. Okiyama, 1991. Development of the eggs and larvae of the pike eel, *Muraenesox cinereus*. Jpn. J. Ichthyol., 38, 35-40.
- Unuma, T., S. Kondo, H. Tanaka, H. Kagawa, K. Nomura and H. Ohta, 2005. Relationship between egg specific gravity and egg quality in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture, 246, 493-500.
- Van Ginneken, V., S. Dufour, M. Sbaili, P. Balm, K. Noorlander, M. de Bakker, J. Doombos, A. Palstra, E. Antonissen, I. Mayer and G. van den Thillart, 2007. Does a 5500-km swim trial stimulate early sexual maturation in the European eel, (*Anguilla anguilla*). Comp. Biochem. Physiol., 147, 1095-1103.
- Watanabe, T., A. Itoh, C. Kitajima and S. Fujita, 1984a. Effect of dietary protein levels on reproduction of red sea bream. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 50, 1015-1022.
- Watanabe, T., A. Itoh, A. Murakami, Y. Tsukashima, C. Kitajima and S. Fujita, 1984b. Effect of nutritional quality of diets given to broodstock on the verge of spawning on reproduction of red sea bream. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 50, 1023-1028.
- Yamamoto, K. and K. Yamauchi, 1974. Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium. Nature, 251, 220-221.
- Yamamoto, K., K. Yamauchi and S. Kasuga, 1975a. On the development of Japanese eel, *Anguilla japonica*. Jpn. Soc. Sci. Fish., 41(1), 21-28.
- Yoshikawa, M., 1995. Relationships between gonadal maturity and body weight

or age, and seasonal change of them in cultivated Japanese eel, *Anguilla japonica*. Bull. Shizuoka Perf. Fish. Exp. Stn., 30, 23-27.

加治俊二, 西 明文, 足立純一, 2004. 陸上水槽で養成しているハモの成熟状況の季節変化. 栽培漁業センタ-技報, 1, 16-18.



Table 5. Reproductive performance during the artificial maturation periods of *Anguilla japonica* from May 2005 to January 2006

Period	Spring	Summer	Autumn	Winter
	Mar. 7 to May 23, 2005	May 11 to July 27, 2005	Sep. 26 to Dec. 2, 2005	Oct. 21 to Jan. 24, 2006
Buoyancy (%) ¹	76.8±2.7	62.7±4.8	41.3±8.9	44.3±3.1
Fertility (%) ²	74.1±3.4	73.5±3.1	30.0±6.4	28.8±3.1
Hatchability (%) ³	60.4±5.5	54.0±3.2	18.0±4.2	16.5±3.3
Number of spawned egg (×10 ⁴)	29.1	28.3	12	13.1
Number of hatched larvae (×10 ⁴)	10.6	10.4	1.4	1.7

¹ Buoyancy (%) = (number of buoyant eggs / number of ovulated eggs) × 100.

² Fertility (%) = (number of fertilized eggs / number of buoyant eggs) × 100.

³ Hatchability (%) = (number of hatched larvae / number of buoyant eggs) × 100.

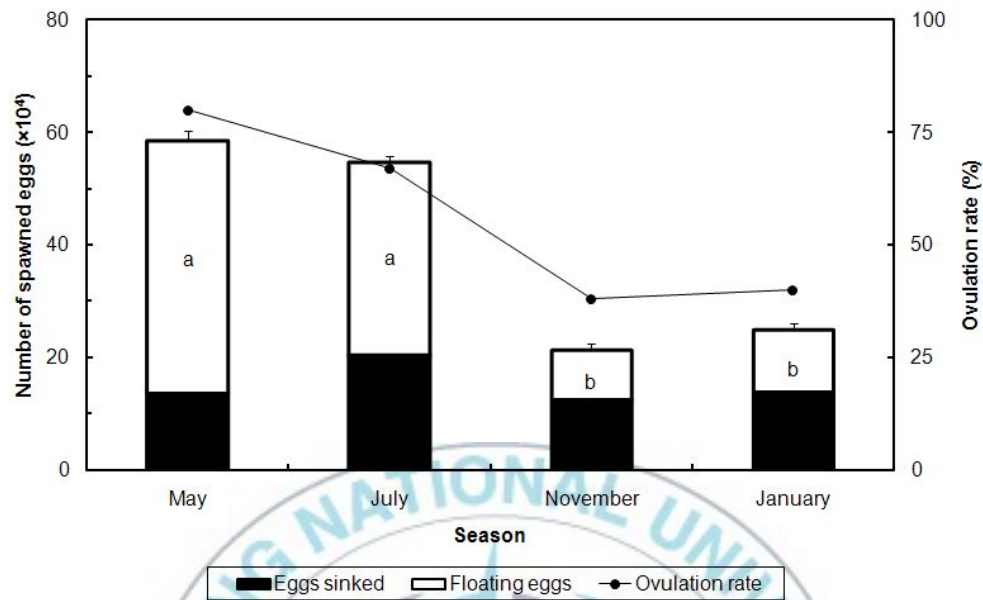


Fig. 16. Annual changes in the number of eggs spawned, the proportion of floating eggs to eggs sunk and the ovulation rate during the artificial maturation periods of *Anguilla japonica* from May 2005 to January 2006. Bar indicates the standard error. Different letters in the squares indicate a significantly different at $P < 0.05$.

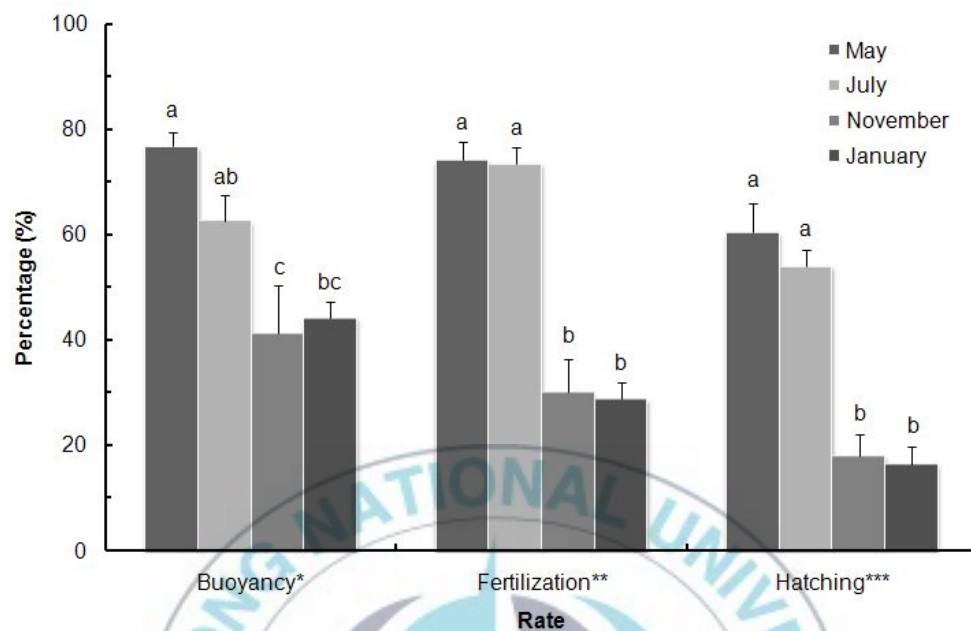


Fig. 17. Rate of buoyancy, fertilization and hatching of eggs during the artificial maturation periods of *Anguilla japonica* from May 2005 to January 2006. Bar indicates the standard error. Different letters on the bars indicate a significantly different at $P < 0.05$. *Buoyancy rate (%) = (number of buoyant eggs / number of ovulated eggs) $\times 100$; **Fertilization rate (%) = (number of fertilized eggs / number of buoyant eggs) $\times 100$; ***Hatching rate (%) = (number of hatched larvae / number of buoyant eggs) $\times 100$.

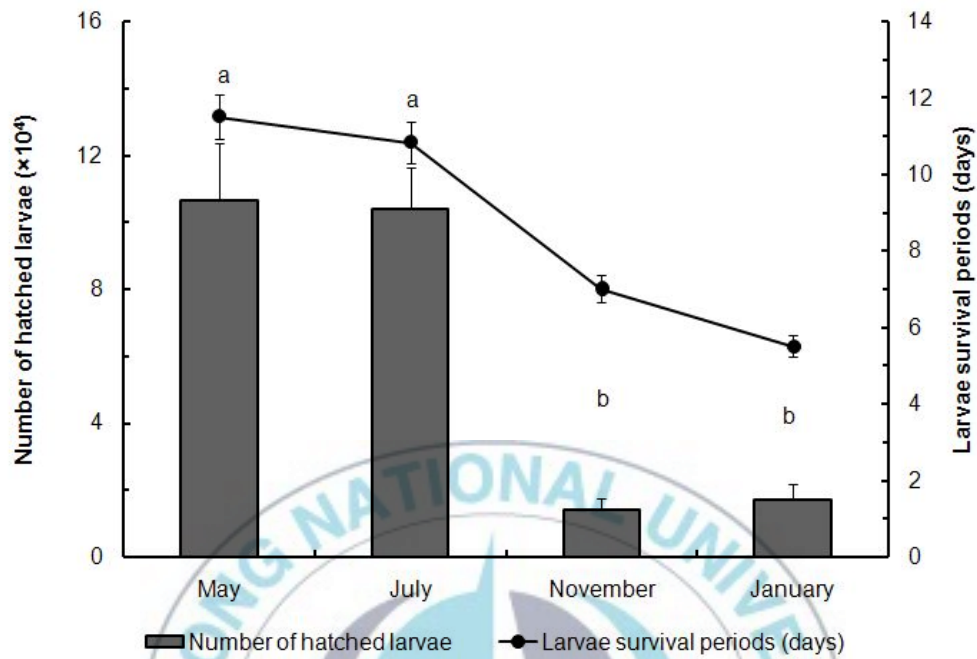


Fig. 18. Annual changes in the number of hatched larvae and larvae survival periods during the artificial maturation periods of *Anguilla japonica* from May 2005 to January 2006. Bar indicates the standard error. Different letters on the bars indicate a significantly different at $P<0.05$.

제 5절 인위적 성성숙 유도된 뱀장어의 자연산란에 의한 난발생과 *Pre-leptocephalus* 자어의 발달

1. 서론

극동산 뱀장어(*Anguilla japonica*)는 고부가가치의 양식어종으로 현재까지 인공종묘생산기술이 정립되지 않아 강하구로 소상하는 자연산 실뱀장어의 채포에 의존한 불완전양식으로 수행되고 있다. 또한, 종묘로 이용되는 실뱀장어의 공급량과 가격이 불안정하여 뱀장어 양식의 문제점으로 지적됨에 따라 이러한 문제점을 해결하기 위해 뱀장어 인공종묘생산을 통한 완전양식을 실현하고자 활발히 연구가 수행되어 왔다. 특히, 호르몬 처리에 의한 *A. japonica*의 인공 성성숙이 성공적으로 유도되었고(Yamamoto and Yamauchi, 1974), 이후 초기발생 및 부화자어에 관한 연구가 진행되어 호르몬 처리에 의해 획득한 알과 정자를 인공수정하여 부화 후 5일(Yamamoto et al., 1975a; 1975b), *A. anguilla*에 있어서 부화 후 3.5일(Bezdenezhnykh et al., 1983)과 부화 후 2일(Pederson, 2003; 2004)까지 자어를 생존시킨 보고가 있으나, 부화율과 생존율이 극히 미약하였다. 최근 일본 양식연구소 번식연구팀에서 인위적인 성성숙에 의해 유도된 양식산 뱀장어에서 인공 수정법에 의해 자어를 생산 및 사육하여 부화 후 270일째 실뱀장어로 변태에 성공하였다(Tanaka et al., 2003).

어류의 종묘생산의 관건은 양질의 수정란을 충분히 확보하는 것이다. 이러한 양질의 수정란을 확보하는 방법에는 자연산 어미에서 채란 및 채정하여 수정시키는 방법, 어미에 호르몬을 주사 후 배란 및 배정을 유도하여 인공수정 혹은 자연산란을 유도하는 방법 등이 있다. 이 중 가장 효과적인

방법은 자연산란을 유도하는 방법이라 할 수 있다.

따라서 이 연구는 뱀장어의 인공종묘생산을 위한 중요한 과정 중의 하나인 양질의 수정란을 대량 확보하는 방법으로서, 호르몬 처리에 의해 인위적으로 성성숙을 유도한 어미를 실내수조에 수용하여 자연산란을 유도하였고, 난 발생 및 부화자어의 형태학적 연구를 통해 뱀장어 종묘생산을 위한 기초자료로 제공하고자 한다.

2. 재료 및 방법

1) 실험어 및 사육관리

이 연구의 실험어는 국립수산물과학원 남부내수면연구소에서 사육중인 양식산 뱀장어를 제공받아, 1일 5 psu 씩 증가시켜 일주일 간 해수 순치기간을 통해 점차적으로 해수에 적응시켰다. 이후, 암컷 뱀장어(400~600 g)와 수컷 뱀장어(200~350 g)를 1000 L FRP 사육수조에 수용하여 호르몬 처리에 의한 인위적인 성성숙을 유도하였다. 호르몬 처리 기간 동안 사육수온은 $20\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였고, 에어레이션을 통해 충분한 산소를 공급하였다. 사육기간 동안 사료는 공급하지 않았고, 수조 위에 검은색 차광막을 덮어서 어미가 안정되도록 하였다.

2) 호르몬 처리

해수 순치 이후, 1회 호르몬 투여 직전에 개체식별을 위해 2-phenoxyethanol (200 ppm)에 마취하여 Tag ID microchip ($\phi 2.1\times 12\text{ mm}$, DESTRON technologies, USA)을 암컷 뱀장어 등근육에 삽입하여 mini portable reader (HS5900LF, DESTRON technologies, USA)로 개체 ID를 식별하였다. 그 후, Kim et al. (2006a)의 방법에 따라 연어 뇌하수체 추출물

(SPE, Salmon Pituitary Extraction)을 eel's ringer로 균질화한 추출액 (20mg/fish)을 10-14주간 매주 복강에 주사하여 인위적인 성성숙을 유도하였다. 수컷 뱀장어는 Kim et al. (2006b)의 방법에 따라 human chronic gonadotropin (HCG; 1 IU/g body weight/week; 대성 미생물)을 6-10주간 매주 복강에 주사하여 배정(spermiation)을 유도하였다. 양식산 암컷 뱀장어는 매주 증체량(WG %, $\text{Weight Gain} = \frac{(\text{final body weight} - \text{initial weight})}{\text{initial weight}} \times 100$) 측정을 통해 성숙도를 결정하였다.

3) 배란 유도 및 수정란 관리

외관적으로 복부가 팽만한 암컷 뱀장어(WG 20% 이상)를 선별하여 여과사에 의한 1차 여과장치 및 카트리지 3중 필터(10 μm , 5 μm 및 3 μm)로 여과한 가온해수가 공급되는 2000 L FRP 산란수조에 수용하였으며, 이때 가온해수를 $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 서서히 조절하였다. 이후 상기 개체들에 대해 Ohta et al. (1996)의 방법을 변형하여 고농도의 SPE (35 mg/fish)를 복강 내 1회 투여한 후, 2~3일 경과 후 증체량이 32~37%로 증가한 개체를 다시 선별하여 polyethylene canula를 산란관에 삽입하여 난 성숙 상태를 확인한 후, 당일 18시경에 2 $\mu\text{g/g}$ body weight 농도의 17α , 20β -dihydroxy-progesteron (DHP)를 주사하여 배란을 유도하였다.

수컷 뱀장어는 복부에 압박을 가해 소량의 정액을 채취하여 정자의 운동성을 확인한 후, 암컷 뱀장어의 배란시기에 맞추어 고농도의 HCG (1000 IU/g body weight)를 주사하여 암컷과 수컷을 각 1:2 비율로 산란수조에 수용하여 자연산란 및 수정을 유도하였다.

DHP 처리 15~18시간 이후, 자연산란에 의해 수정된 수정란을 산란수조의 배수관에 연결된 집란조(60×40×30 cm, 200 μm 물러가제)를 이용하여 부상란을 수거하였다. 수정란 관리 및 pre-leptocephali 사육은 분당 0.4 L의

여과된 $23\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 가온해수가 공급되는 부화수조(20 L 원형 아크릴 수조)에 수용하여 미량의 산소를 공급해 주었다.

4) 난발생 및 Pre-leptocephali 형태학적 특성 조사

난발생 단계 및 pre-leptocephali의 형태학적 특성을 조사하기 위하여 수정 후 일정시간 간격으로 무작위로 100개 이상의 수정란과 10~50개체의 pre-leptocephali를 5% 중성 formalin에 고정한 후 스테레오 현미경을 이용하여 난과 pre-leptocephali의 크기 및 형태를 조사하였다. 또한, 부화 7~8일 이후부터 Tanaka et al. (2001) 방법에 따라 shark egg powder를 공급하면서 pre-leptocephali의 발육에 따른 체형 변화를 조사하기 위하여 전장(Total Length, TL), 항문체장(Preanal Length, PAL), 전장에 대한 항문체장의 비율(PAL/TL) 및 근절수의 변화를 측정하였다.

3. 결과

1) 배란 및 자연산란

10~14 주간 SPE를 처리한 암컷 뱀장어는 대부분 난황형성이 완료되었고, 이후 상기의 개체들에 대해 DHP를 주사하여 배란 및 자연산란을 유도하였다. 그 결과 총 10마리 중 8마리가 배란(80%)하였고, 그 중 3마리가 자연산란하였으며, 배란한 개체들에 대한 평균 산란수는 584,830개였다. 또한, 수정란의 평균 부상률과 수정률 및 부화율은 각각 $76.8\pm2.7\%$, $74.1\pm3.4\%$, $60.4\pm5.5\%$ 로 나타났다.

2) 난의 특징

SPE (20mg/fish) 주사 10-14주 이후 polyethylene canula로 채취된 성숙란의

난경은 평균 800 μm (n=50) 이상으로 확인되었고, DHP (2 $\mu\text{g/g}$ body weight) 주사 16시간 후에 자연산란한 수정란의 난경은 평균 1 mm (n=10) 정도인 구형의 분리 부성란으로 40~50개 정도의 유구를 가지고 있었으며, 무색의 투명한 형태를 띠고 있었다(Fig. 19A). 수정 30분 후 수정란의 세포 질과 난막이 분리되어 위란강이 형성되는 것을 관찰할 수 있었고, 이때 난 경은 위란강을 포함하여 1.3 mm였다.

3) 난발생 단계의 형태적 특징

수정 약 1시간 후에 동물극 쪽의 배반에서 분할이 시작되었다. 수정 약 1시간 30분 후에 4세포기(Fig. 19-B; 난경 1.39 ± 0.07 mm)와 수정 후 약 3시간 후에 16세포기(Fig. 19-C)로 진행되었다. 수정 4시간 후에 64세포기 이상의 상실기에 접어들었고, 이때 일부 수정란에서 세포의 분리 등 기형 발생이 관찰되었다. 수정 5시간 후에 수정란은 대형 유구 1개와 중소형 유구 2~3개로 구성되어졌고, 포배기로 진행되었다(Fig. 19-D). 수정 8시간 후부터 낭배기에 접어들기 시작하여, 수정 14시간 후에는 낭배 중기로 진행되었고, 중앙의 대형 유구 1개 주변에 소형 유구 15개 이상이 관찰되었다(Fig. 19-E).

수정 21시간 후에는 배체가 형성되기 시작하여 수정 24시간 후에 유구가 하나로 융합되면서 12~15개의 근절이 형성되었다(Fig. 19-F). 수정 27시간 후에는 안포가 형성되었고, 안포 후부에 이포가 관찰되었다. 수정 30시간 후에는 머리의 아랫부분에서 심장 형성이 관찰되었고, 심장에서 난황 앞부분을 둘러싸는 혈관이 관찰되었다. 이때 근절은 24~30개였다(Fig. 19-G). 수정 33시간 후에는 28~35개의 근절이 관찰되었고, 꼬리부분이 난황에서 분리되어 꼬리의 형태를 갖추고 있었으며, 심장이 박동하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 19-H). 수정 38시간 후에는 격렬한 움직임과 함께 난막을 뚫고 돌출하면서 부화가 개시되었다(Fig. 19-I). 부화 직후의 pre-leptocephalus 자

어들은 전장 약 3 mm 정도의 조금 만곡한 상태로 근절은 40~44개였으며, 약 1시간 후부터 몸이 수평으로 되기 시작하였다.

4) Pre-leptocephalus 자어의 형태적 특징

성장에 따른 pre-leptocephali 자어의 형태적 특징과 머릿부분의 발달 정도를 Fig. 20와 Fig. 21에 각각 나타내었고, 전장(Total Length, TL) 및 전장에 대한 항문체장의 비율(PAL/TL)을 Fig. 22에 나타내었다. 부화 후 0.5일 정도가 경과한 pre-leptocephali 자어들은 대부분 수면중층과 표층 사이에서 몸통을 수직으로 부유 상태 혹은 꼬리를 움직여서 상하수직 운동을 통해 수조 바닥으로 내려갔다가 다시 떠오르는 행동을 하거나, 수평 운동을 통해 유영행동을 하기도 하였다. 샘플링을 위해 외부적으로 스트레스를 가하면 빠른 속도로 회피하는 행동을 보였다. 머릿부분에는 대형의 뇌가 관찰되었지만, 각 부분의 분화는 이루어지지 않은 상태였다. 눈에는 명료한 안구가 관찰되었으나 렌즈는 수정체 섬유에서 아직 완성되지 않은 상태였고, 색소도 전혀 출현하지 않았다. 꼬리부분에 나뭇가지모양의 흑색소포가 관찰되었고, 근절은 총 72개로 몸통부분에 44개, 꼬리부분에 28개로 이루어져 있었다(Fig. 20-A). 자어의 전장은 3.53 ± 0.29 mm, 항문체장은 3.07 ± 0.25 mm, 전장에 대한 항문체장의 비율은 85.9%였다(Fig. 22).

부화 후 1.5일이 경과한 pre-leptocephali 자어의 근절은 몸통부분에 45개, 꼬리부분에 40개로 총 85개의 근절로 형성되어 있었다(Fig. 20-B). 머릿부분은 난황의 말단보다 약간 후부에 위치하였고, 유구는 머릿부분 후하면에 하나로 형성되었으며, 입과 항문은 형성되지 않았다(Fig. 21-A). 전장은 5.23 ± 0.28 mm로 성장하였고, 항문체장은 3.98 ± 0.19 mm, 전장에 대한 항문체장의 비율은 76.5%였다(Fig. 22).

부화 후 4.5일이 경과한 pre-leptocephali 자어의 근절은 몸통부분에 55개,

꼬리부분에 35개로 총 90개가 형성되었고, 꼬리부분의 흑색소포의 양이 증대되었다. 이 시기에 난황의 흡수가 왕성함을 확인하였다(Fig. 20-C). 머릿부분에 손가락 모양의 위아래턱 원기가 발달하기 시작하였고, 입과 항문이 형성되었으며, 머릿부분은 난황 말단보다 전방으로 발달하였다. 유구는 수평으로 신장하였고, 뇌는 전·중·후의 각 부분으로 분화하였으며, 눈에는 수정체가 형성되었다(Fig. 21-B). 이 시기에 대량의 폐사가 발생하였다. 전장은 5.08 ± 0.25 mm로 성장이 다소 감소하는 경향을 나타내었고, 항문체장은 3.74 ± 0.27 mm, 전장에 대한 항문체장의 비율은 72.7%였다(Fig. 22).

부화 후 6.5일이 경과한 pre-leptocephali 자어의 근절은 부화 4.5일 째와 동일하였고, 꼬리부분 흑색소포의 밀도는 농후해졌다(Fig. 20-D). 머릿부분의 위턱은 부리형태로 변형되었고, 아래턱에는 약 3개의 이빨 원기가 형성되기 시작하였다(Fig. 21-C). 전장은 5.40 ± 0.40 mm로 성장하였고, 항문체장은 3.67 ± 0.31 mm로, 전장에 대한 항문체장의 비율은 68.7%였다(Fig. 22).

부화 후 7.5일에는 아래턱이 위턱보다 돌출되었고, 아래턱에는 이빨원기가 명료하게 관찰되었으며, 턱 후부의 공간에 식도가 형성되기 시작하였다. 난황은 거의 흡수되었고, 머릿부분 상후부 막상구조는 더욱 넓어졌으며, 가슴지느러미가 형성되기 시작하였다(Fig. 21-D).

부화 후 8.5일이 경과한 pre-leptocephali 자어의 근절은 몸통부분에 58개, 꼬리부분에 36개로 총 94개로 형성되었다(Fig. 20-E). 상하악이 새부리 형태로 개구되어 전방을 향하고, 위아래턱의 길이는 거의 동일하며 약 3개의 날카로운 이빨이 형성되었다. 눈은 흑색소포가 착색되어 검게 변하였고, 가슴지느러미가 명료하게 형성되었으며, 후두부가 둥근 구형으로 확장되기 시작하였다(Fig. 21-E). 이 시기에 난황과 유구의 흡수가 완료되었고, 소화기관이 발달되어 먹이섭취행동에 돌입하였다. 전장은 6.25 ± 0.40 mm로 성장하였고, 항문체장은 4.49 ± 0.22 mm, 전장에 대한 항문체장의 비율은 72.5%

였다(Fig. 22).

대부분의 개체가 폐사한 부화 후 14.5일째 pre-leptocephali 자어의 근절은 몸통부분에 56개, 꼬리부분에 42개로 총 98개가 형성되었다(Fig. 20-F). 아래턱이 위턱보다 전방으로 돌출되었고, 위아래턱의 이빨은 더욱 발달하였다(Fig. 21-F). 전장은 5.87 ± 0.25 mm로 감소하였고, 항문체장은 4.43 ± 0.27 mm로, 전장에 대한 항문체장의 비율은 74.2%였다(Fig. 22).

4. 고찰

극동산 뱀장어(*Anguilla japonica*)에 있어서 이 연구 결과 자연산란에 의한 난발생과 pre-leptocephalus 자어의 형태학적 발달은 인공수정에 의한 결과(Yamamoto et al., 1975a; 1975b)와 큰 차이점은 관찰되지 않았다. 극동산 뱀장어의 수정란은 구형의 분리 부성란으로 전형적인 반상분할(discoidal cleavage)을 통해 분할이 이루어졌다. 난발생 과정은 수온 23 ± 0.5 °C에서 수정 후 약 38시간부터 부화하기 시작하였으며, 이때 부화자어의 전장은 2.99 ± 0.19 mm였다. pre-leptocephali 자어는 난황 흡수가 완료되는 부화 후 8일까지 성장하였으며, 부화 8.5일 후부터 shark egg powder를 젤리타입으로 제조하여 공급하였으나, 폐사율이 증가하면서 자어는 부화 14.5일까지 생존하였다. 이 연구의 결과 자연산란에 의해 얻어진 수정란의 평균 부상률과 수정률 및 부화율은 각각 $76.8 \pm 2.7\%$, $74.1 \pm 3.4\%$, $60.4 \pm 5.5\%$ 로 나타났다(unpublish data). 또한 수정란의 평균 크기는 1 mm로 나타났다. 뱀장어과(Anguillidae) 어류의 수정란의 크기에 있어서 *A. japonica*에 대한 이전의 연구(Yamamoto et al., 1975a) 및 유럽산 뱀장어 *A. anguilla* (Pedersen, 2004)의

크기와 유사한 범위에 있었지만, 갯장어 *Muraenesox cinereus* (Umezawa et al., 1991) 1.8~2.1 mm, 먹붕장어 *Ariosoma anagoides* (Asano et al., 1997) 1.18 mm에 비해 작았고, 붕장어 *Conger myriaster* (Horie et al., 2002) 0.86~1.06 mm에 비해 큰 것으로 확인되었다. 수정 후 부화까지 소요되는 시간에 있어서 본 연구에서는 수온 $23\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 에서 수정 후 38시간 후부터 부화가 개시되었다. 이에 대해 인공수정한 극동산 뱀장어의 수정란은 수온 $22\sim23^{\circ}\text{C}$ 에서 수정 38시간(Yamamoto et al., 1975a), 38~45시간(Yamamoto and Yamauchi, 1974), 40시간(Tanaka et al., 2003) 이후부터 부화가 개시되었다는 결과와 유사하여 이는 수정방식에 따른 수정란의 부화시간은 차이가 없음을 확인할 수 있었으며, 수차례 실험을 통해 자연산란에 의한 수정란의 부화율이 높은 것으로 생각되었다. 또한, 유럽산 뱀장어의 부화시간은 수온 $20\sim21^{\circ}\text{C}$ 에서 수정 후 48시간(Pedersen, 2004), 붕장어의 경우 수온 $12\sim14^{\circ}\text{C}$ 에서 84시간(Horie et al., 2002)으로 극동산 뱀장어에 비해 소요시간이 다소 길었고, 갯장어의 경우 수온 25°C 에서 36시간(Umezawa et al., 1991), 먹붕장어의 경우 수온 $22.6\sim23.8^{\circ}\text{C}$ 에서 27~36시간(Asano et al., 1997)이 소요되는 것에 비해 짧았다. 이러한 결과는 부화시간은 수온에 영향을 받는다고 할 수 있으나, 극동산 뱀장어의 산란장과 산란시기의 수온이 명확히 밝혀져 있지 않았기 때문에 생태학적 연구와 더불어 부화율 향상을 위한 부화 적정수온 및 환경 조건 등에 관한 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

이 연구에서 극동산 뱀장어의 부화 직후 pre-leptocephalus 자어들의 전장은 2.99 ± 0.19 mm로 Yamamoto et al. (1975b)이 보고한 2.9 mm와는 유사하였으나, Tanaka 등(2001; 2003)이 보고한 극동산 뱀장어의 부화 직후 자어

는 3.6~3.7 mm, 유럽산 뱀장어의 2.35 mm (Pedersen, 2004)와는 상이한 차이를 나타내었다. 그러나, 최근 Tsukamoto (2006)는 Mariana 군도 서방해역에 있는 Suruga seamount 서부(14°N, 142°E)에서 부화 후 2~5일로 추정되는 전장 4.2~6.5 mm의 극동산 뱀장어 *preleptocephalus* 자어를 채집 조사한 결과에 의하면 이 시기에 눈에 색소포 착색과 이빨 및 턱 형성이 완료되어 인위적인 성숙 유도 및 인공부화 혹은 자연산란에 의해 생산된 부화 자어와는 발달 정도 및 형태적으로 많은 차이를 나타내었다. 따라서 이러한 차이들은 어미의 인공성숙유도 과정에서 호르몬 농도 및 투여 방법이나 난질의 영향에 의한 것으로 추정되며, 추후에 산란장 환경 조건에 맞는 인공종묘생산 기법을 정립해야 될 것으로 판단된다.

뱀장어 자어사육을 위한 영양학적 연구로 rotifer, *Artemia*, 여러 어류의 난황 및 해산어용 초기미립자 사료를 부화 7~13일 이후의 자어에게 공급한 결과, 섭취 및 소화는 하는 것으로 확인되었으나(Tanaka et al., 1995), 성장 및 생존기간을 지속시키지 못하였다고 보고하였다(Kurokawa et al., 1995; 1996). 이에 대해 부화 8일 이후부터 소화관 내 소화효소의 합성이 시작되는 점(Kurokawa and Pedersen, 2003)을 감안하여 Tanaka et al. (2001; 2003)은 부화유생에 shark egg powder를 주요성분으로 제조한 인공배합사료를 공급한 결과 부화 50일 이후 버드나뭇잎 형태의 *leptocephalus*로 변태를 유도하였고(전장: 16.7 mm), 부화 270일 이후 glass eel (전장 52.6 mm) 단계까지 성장시켰다고 보고하였다. 이 연구에서 부화 직후의 자어는 입과 항문이 개구되지 않았고, 완전히 난황 및 유구흡수가 완료되는 부화 후 8.5일까지 전장 6.25 mm로 성장하면서 체형이 발달하고 소화관이 형성되어, shark egg powder를 주요성분으로 soybean peptide와 비타민 및 미네랄을 첨

가한 인공배합사료를 젤리타입으로 제조하여 공급하였으나, 사료섭취율 미흡과 사육 환경의 악화 등으로 부화 후 14.5일까지 생존하였다. 따라서 이 연구에서는 shark egg powder에 대한 뱀장어 자어의 인공배합사료로써의 성장 효과 등을 증명하지는 못하였지만, 이전 연구들의 결과에 의해 현재 까지 뱀장어 자어사육을 위한 적합한 사료로 받아들여지고 있다.

이 연구에서 자연산란에 의해 생산된 부화 직후 자어들의 항문 후방의 근절은 아직 분화 중으로 개체에 따른 변이가 높았으나, 항문 전방의 근절은 부화 0.5일부터 1.5일까지와 부화 4.5 일부터 14.5일까지의 자어에서는 각각 44~45개, 55~58개 사이로 부화 일수에 따른 근절의 변화가 관찰되었다. 또한, 전장에 대한 항문체장의 비율은 부화 후 0.5일째 항문체장이 85.9%로 항문은 몸의 후부에 위치하였고, 부화 1.5일 후부터 서서히 몸의 전방으로 이동하기 시작하여 부화 6.5일 후 최대 성장시기의 자어에서는 68.7%로 항문이 몸의 전방으로 이동하였다가, 이후 다시 후방으로 이동하는 경향을 나타내었다. 그러나 Yamamoto et al. (1975b)의 결과에 의하면 인공수정에 의해 생산된 *A. japonica* 자어의 경우 부화 2일부터 5일까지 항문 전방의 근절은 51~54마디 사이로 큰 변화는 없다고 보고하였다. 따라서 이 연구에 대한 근절수의 차이는 부화일수에 따른 차이인지 혹은 수정 방법에 의한 차이인지를 확인하기 위한 추후 관련 연구가 요구된다.

한편, 뱀장어과의 다른 어종인 유럽산 뱀장어 *A. anguilla*의 전장 9~20 mm와 미국산 뱀장어 *A. rostrata*의 전장 10~22 mm의 자어에 있어서 복부 측의 근절은 각각 65~68개, 63~68개로 이 연구의 결과보다 약 10개 정도 많았다(Watanabe, 2003). 이러한 차이는 종에 따른 차이, 발생시기에 의한 차이 혹은 비교한 자어 크기의 차이인지 알 수 없으나, 앞으로 흥미로운 문제가 될 수 있으리라 판단된다.

결론적으로 자연산란 및 수정에 의해 획득된 수정란은 분리 부성란으로 난경은 평균 1 mm로 수온 23℃에서 수정 38시간 후부터 부화가 개시되었다. 부화 직후 pre-leptocephalus는 전장 약 3 mm였고, 부화 8.5일 후에 난황 흡수 완료 및 소화기관이 발달되어 이 시기부터 사료를 공급했으나 부화 14.5일 후 전량 폐사하였다. 따라서 향후 부화자어의 사육을 위한 적합한 사료와 사육 시스템의 개발이 수반되어야 할 것으로 판단된다.

5. 참고문헌

- Asano, H., Y. Kubo, H. Hayashi, 1997. Location and numbers of oil globules in unfertilized and fertilized eggs, and larvae in the preleptocephalic stage in the order Anguilliformes. Mem. Fac. Agr. Kinki Univ., 30, 19-31.
- Bezdenzhnykh, V. A., G. A. Prokhorchik, A. M. Petrikov, V. B. Petukov and M. V. Plyuta, 1983. Obtaining the larvae of European eel *Anguilla anguilla* L. (Pisces, Anguillidae) under experimental conditions. Dokl. Akad. Nauk SSSR., 268 (5), 1264-1266.
- Horie, N., T. Utoh, Y. Yamada, A. Okamura and H. Zhang, 2002. Development of embryos and larvae in the common Japanese conger *Conger myriaster*. Fish. Sci., 68, 972-983.
- Kim, D. J., E. H. Kim, M. W. Park, Y. C. Cho and S. G. Lim, 2006a. Plasma sex steroid hormone profiles in artificially maturing wild eel, *Anguilla japonica*. J. Aquacult., 19(4), 267-274.
- Kim, E. O., J. Y. Bae, S. G. Lim, M. H. Son, M. W. Park, M. S. Park, Y. C. Cho and D. J. Kim, 2006b. Plasma sex steroid hormone profiles and testicular development in artificially maturing cultured male eel, *Anguilla*

- japonica*. J. Kor. Fish. Soc., 39(6), 466-471.
- Kurokawa, T., H. Kagawa, H. Ohta, H. Tanaka, K. Okuzawa, K. and K. Hirose, 1995. Development of digestive organs and feeding ability in larvae of Japanese eel *Anguilla japonica*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 52, 1030-1036.
- Kurokawa, T., H. Tanaka, H. Kagawa and H. Ohta. 1996. Absorption of protein molecules by the rectal cells in eel larvae *Anguilla japonica*. Fish. Sci., 62, 832-833.
- Kurokawa, T. and B. H. Pedersen. 2003. The digestive system of eel larvae. (in) K. Aida, K. Tsukamoto and K. Yamauchi (eds), Eel Biology. Springer-Verlag, Tokyo, pp. 435-444.
- Ohta, H., H. Kagawa, H. Tanaka, K. Okuzawa, K. Hirose, 1996. Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17, 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture, 139, 191-301.
- Pedersen, B. H., 2003. Induced sexual maturation of the European eel, *Anguilla anguilla* and fertilisation of the eggs. Aquaculture, 224, 323-338.
- Pedersen, B. H., 2004. Fertilisation of eggs, rate of embryonic development and hatching following induced maturation of the European eel *Anguilla anguilla*. Aquaculture, 237, 461-473.
- Tanaka, H., H. Kagawa, H. Ohta, K. Okuzawa and K. Hirose, 1995. The first report of eel larvae ingesting rotifers. Fish. Sci., 61, 171-172.
- Tanaka, H., H. Kagawa and H. Ohta, 2001. Production of leptocephali of Japanese eel, *Anguilla japonica* in captivity. Aquaculture, 201, 51-60.
- Tanaka, H., H. Kagawa, H. Ohta, T. Unuma and K. Nomura, 2003. The first

- production of glass eel in captivity: fish reproductive physiology facilitates great progress in aquaculture. *Fish Physiol. Biochem.*, 28, 493-497.
- Tsukamoto, K., 2006. Spawning of eels near a seamount. *Nature*, 439-929.
- Umezawa, A., T. Otake, J. Hirokawa, K. Tsukamoto and M. Okiyama, 1991. Development of the eggs and larvae of the pike eel, *Muraenesox cinereus*. *Jpn. J. Ichthyol.*, 38, 35-40.
- Watanabe, S., 2003. Taxonomy of the freshwater eels, Genus *Anguilla*. (in) K. Aida, K. Tsukamoto and K. Yamauchi (eds.), *Eel Biology*. Springer-Verlag, Tokyo, pp. 3-18.
- Yamamoto, K and K. Yamauchi, 1974. Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium. *Nature*, 251, 220-221.
- Yamamoto, K., K. Yamauchi and S. Kasuga, 1975a. On the development of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 41(1), 21-28.
- Yamamoto, K., K. Yamauchi and T. Morioka, 1975b. Pre-leptocephalic larvae of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 41(1), 29-34.

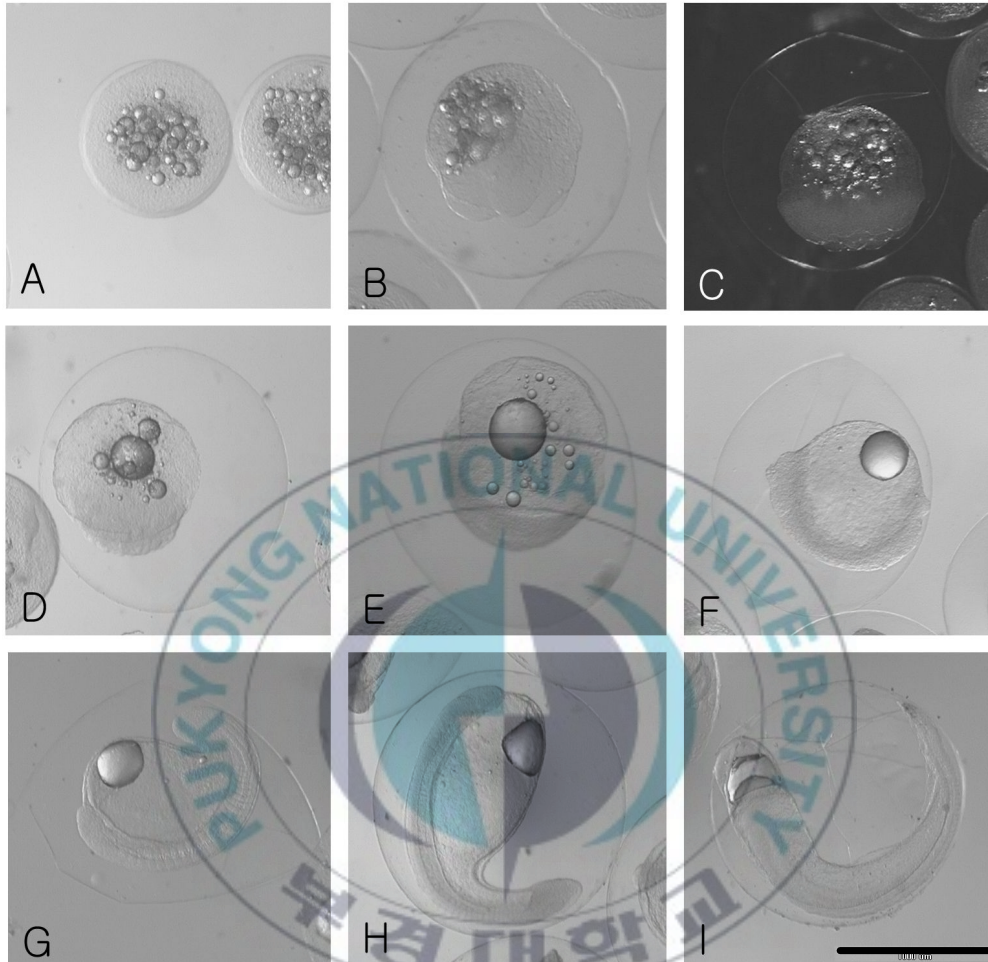


Fig. 19. Egg cleavage and embryonic development of cultured eel, *Anguilla japonica*. A. fertilized egg; B. 4 cell stage, 1 hr 30 min after fertilization; C. 16 cell stage, 3 hrs after fertilization; D. blastula stage, 5 hrs after fertilization; E. gastrula stage, 14 hrs after fertilization; F. embryonic body formation stage, 24 hrs after fertilization; G. heart formation stage, 30 hrs after fertilization; H. heart pulsation commencing, 33 hrs after fertilization; I. hatching stage, 38 hrs after fertilization. Scale bar = 1000 μm .

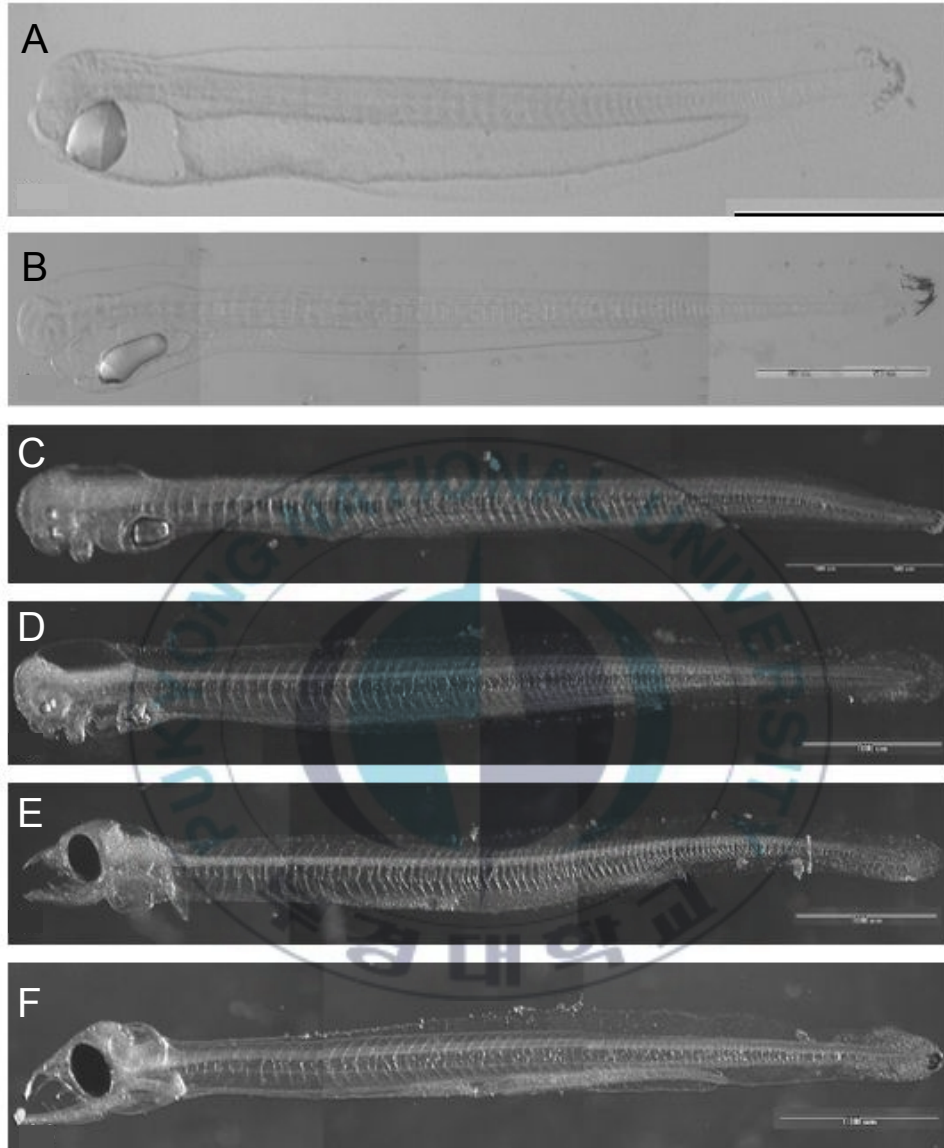


Fig. 20. Morphological changes on the pre-leptocephalic larvae of eel, *Anguilla japonica*. A. 0.5-day-old larva after hatching, 3.53 ± 0.29 mm in total length; B. 1.5-days-old larva after hatching, 5.23 ± 0.28 mm in total length; C. 4.5-days-old larva after hatching, 5.08 ± 0.25 mm in total length; D. 6.5-days-old larva after hatching, 5.40 ± 0.40 mm in total length; E. 8.5-days-old larva after hatching, 6.25 ± 0.35 mm in total length; F. 14.5-days-old larva after hatching, 5.87 ± 0.25 mm in total length. Scale bar = 1000 μm .

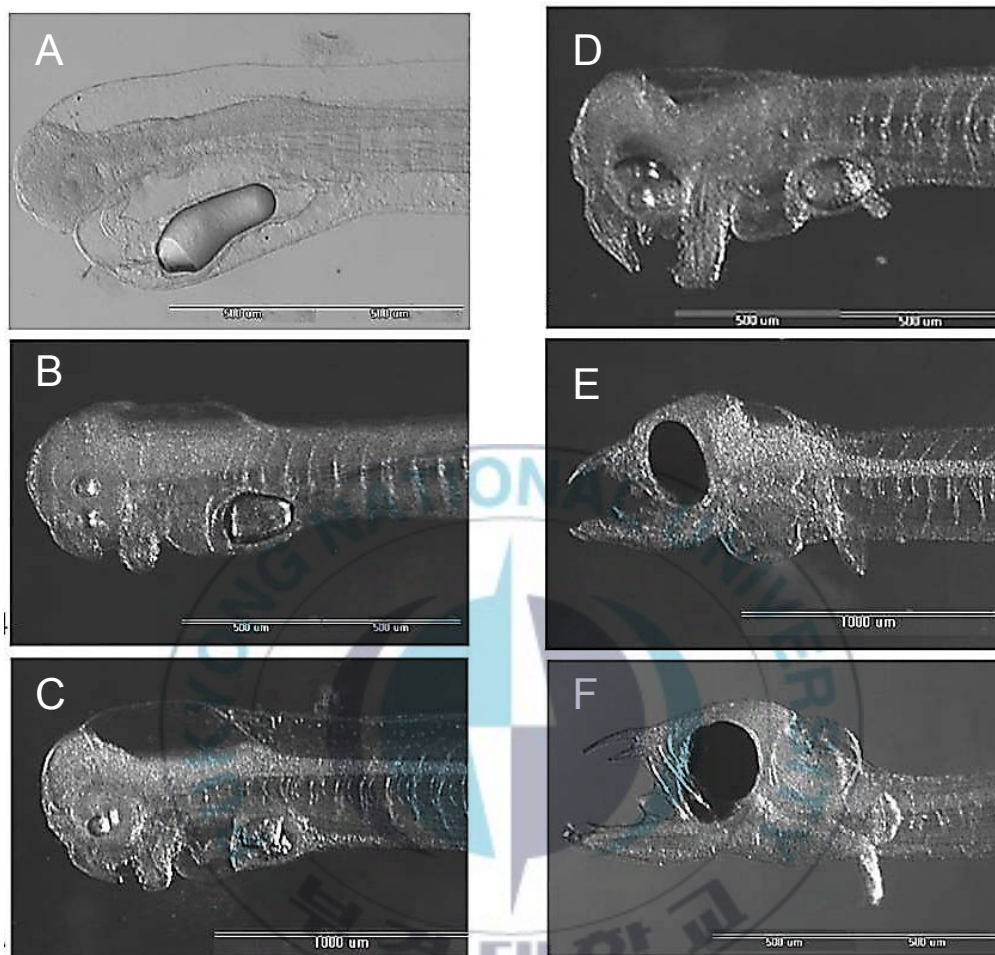


Fig. 21. Morphological changes on the head part of pre-leptocephalic larvae, *Anguilla japonica*. A. 1.5-days-old larva after hatching; B. 4.5-days-old larva after hatching; C. 6.5-days-old larva after hatching; D. 7.5-days-old larva after hatching; E. 8.5-days-old larva after hatching; F. 14.5-days-old larva after hatching. Scale bar = 1000 μ m.

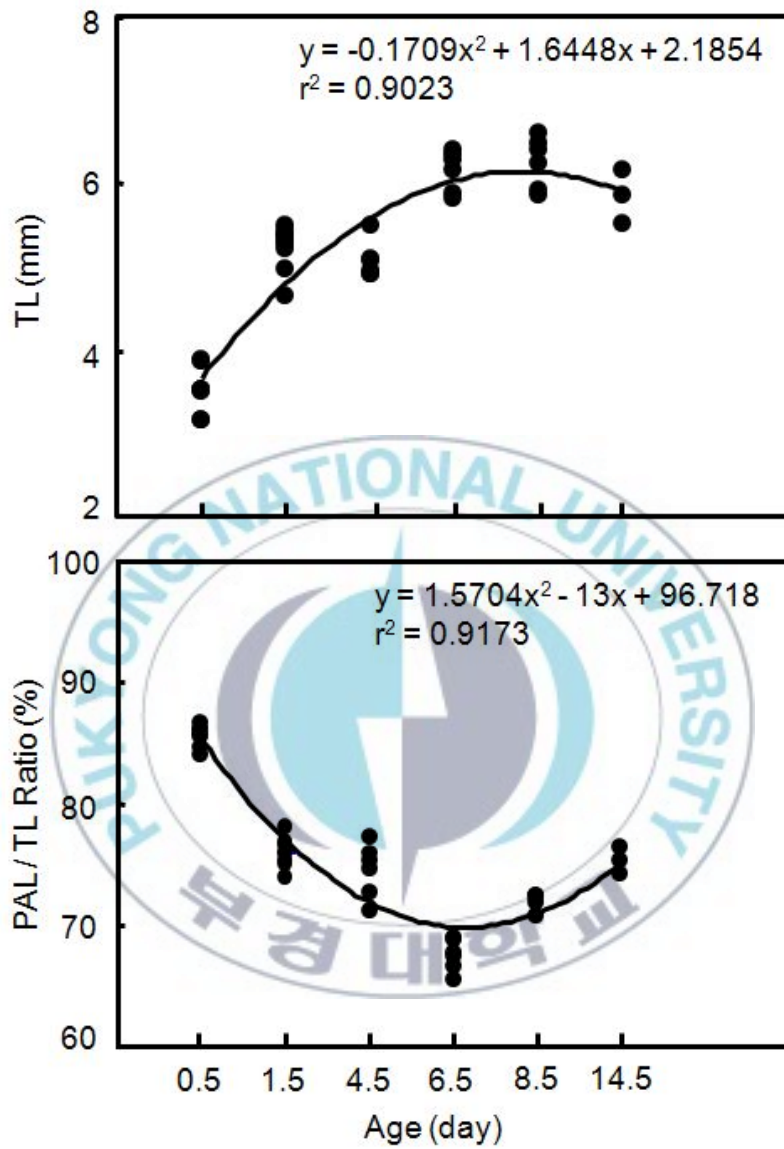


Fig. 22. Changes of total length (TL, mm) and rates of pre-anal length (PAL) to total length (PAL/TL, %) of pre-leptocephalic larvae, *Anguilla japonica* in aquaria.

제 3장 뱀장어 치어의 영양학적 연구

제 1절 에너지에 대한 적정 단백질 비 평가

1. 서 론

동물에 있어서 단백질은 필수영양소로서 에너지 생산에도 관여하는데 먹이를 통하여 섭취한 모든 에너지는 체내에 축적되거나 대사과정을 통한 상실 및 배설질소와 분의 형태로 배출되어진다. 이러한 단백질의 대사산물은 유독질소의 형태로 배설 되므로 수질환경과 밀접한 관련이 있으므로(Kim and Chin, 1995) 영양적, 환경적 측면에서 중요한 요인이 될 수 있다. 일반적으로 양어 사료에 가장 많이 쓰이는 동물성 단백질 사료원은 어분이며, 대두박과 같은 식물성 단백질원의 사용이 확대되어 가고 있다. 그러나 육상동물과 달리 어류는 에너지원으로서 저가의 탄수화물이나 식물성 단백질원 보다는 어분과 같은 동물성 단백질 사료원을 더 효율적으로 이용하는데, 어분은 고가의 에너지원이므로 단백질의 적정 요구량에 따른 에너지 함량의 균형은 경제적인 사료관리와 사육어의 건강에 많은 영향을 미치게 된다(Shiau and Huang, 1990; Takeuchi et al., 1992; Shiau and Lan, 1996).

에너지는 영양소는 아니지만 생명체의 생존에 가장 기본적으로 요구되므로 양어사료를 배합하는데 있어 우선적으로 고려해야 할 것이 사료의 에너지 함량이다. 그렇지만, 실제에 있어서 단백질이 가장 비싼 에너지원이고 성장

에 필수적인 영양소이므로 단백질 요구량이 먼저 고려의 대상이 되며, 결과적으로 단백질과 에너지의 균형에 초점을 맞추게 된다(Kaushik, 1994). 이런 점에서 어류의 에너지 요구량은 단백질과 에너지 비(Digestible protein to Digestible energy ratio, DP/DE ratio)로써 나타내는데, 사료의 에너지 함량이 단백질에 비하여 너무 적거나 또는 많아도 사육어의 성장에 지장을 줄 수 있으므로 단백질과 에너지 비는 항상 균형을 이루어야 한다(Shiau and Lan, 1996; Peres and Oliva-Teles, 1999; Samantaray and Mohanty, 1999). 즉, 단백질에 비해 에너지가 부족한 사료를 먹이면 사육어는 유지에 필요한 에너지를 충당하기 위해 단백질을 분해하여 에너지원으로 사용하므로 단백질 효율이 낮아지고 성장도 저하시킬(Garling and Wilson, 1976; McGoogan and Gatlin, 1999) 뿐만 아니라 암모니아 생성으로 인한 과다한 질소 배설을 초래한다(Ballestrazzi et al., 1994; Cai et al., 1996). 한편, 단백질에 비해 에너지가 과잉 함유된 사료를 섭취하게 되면 사육어의 사료 섭취량이 적어지고, 이로 인해 단백질이나 아미노산과 같은 다른 필수 영양소를 충분히 공급받을 수 없게 되므로 성장이 저하된다. 뿐만 아니라, 사료의 에너지 함량이 지나치게 높을 때에는 어체 내 지방이 과도하게 축적되어 식품으로서의 가치가 떨어지기도 한다(Cowey, 1993; Hillestrad and Johnsen, 1994; McGoogan and Gatlin, 1999). 이러한 사료 내 단백질과 에너지의 비율(mg protein/kcal)은 양식어류의 상품성과 더불어 성장에도 직접적인 영향요인으로 작용하므로 grass carp, 100-124 (Xianghua, 1988); Nile tilapia, 110 (El-Sayed and Teshima, 1992); hybrid striped bass, 125 (Nematipour et al., 1992); European seabass, 88 (Peres and Oliva-Teles, 1999) 및 snakehead 91 (Samantaray and Mohanty, 1999) 등의 양식 어종을 대상으로 사료 내 적정

단백질과 에너지의 비율과 사료효율 및 체조성에 관한 연구가 많이 수행되어 왔다. 뱀장어의 단백질 요구량은 그 종류와 어체의 크기에 따라 다소의 차이가 있으나 45~50% 범위에서 요구되는 것으로 나타났지만, 현재 배합 사료 제작 시 가장 중요하게 고려되어야 할 사료 내 에너지에 대한 적정 단백질 비의 평가에 관한 연구는 American eel, *Anguilla rostrata*에 있어서 가소화 단백질과 에너지의 적정비율에 관한 연구(Tibbetts et al., 2001) 외에는 희소한 실정이다.

따라서 본 연구는 국내 주요 담수 양식 어종인 치어기 Japanese eel, *A. japonica*를 대상으로 영양학적이고 생화학적인 평가를 통해 사료 내 에너지에 대한 적정 단백질 비를 결정함으로써 체계적이고 경제성 있는 실용적 배합사료 개발의 기초를 확립하고 이에 대한 영양학적 관리와 배합사료의 효율적 이용성을 제안하고자 한다.

2. 재료 및 방법

1) 실험어 및 사육관리

실험어는 반죽사료로 사육한 전남 나주의 개인 양만장으로 부터 2003년 10월 27일에 본 대학 양어장으로 수송하여 10톤 콘크리트 수조에 수용하였으며, 실험 전 4주간 상업용 펠렛사료를 공급하면서 펠렛사료에 적응시키는 예비사육을 실시하였다. 예비사육 후, 평균 체중 15.0 ± 0.3 g (mean $\pm$ SD)의 치어기 뱀장어를 순환여과식 사육시스템에 각 실험수조(60 L 사각수조)당 20마리씩 3반복으로 무작위 배치하였으며, 유수량은 4.5 L/min, 사육수온은 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지하였다. 일일 사료공급량은 어체중의 2~3%(건물량)를

일일 2회(9:00, 18:00)공급하였으며, 사료공급 시, 유수는 중단했다. 실험기간은 2004년 2월 6일부터 2004년 6월 5일까지로 16주간 사육실험을 실시하였고, 8주째에 성장을 확인하기 위하여 ethylene glycol phenyl ether 90% (200 ppm)에 실험어를 마취시켜 스트레스를 최소화하고 각 수준의 실험어를 계측하였으며 사료공급량 역시 어체중의 증가에 따라 보정하였다.

2) 실험사료 및 실험설계

실험사료는 조단백질 2 가지 수준(45, 50%)에 대해 에너지 3 가지 수준(16, 17, 19 kJ/g)으로 총 6개의 실험구를 설정($_{45}P_{16}$, $_{45}P_{17}$, $_{45}P_{19}$, $_{50}P_{16}$, $_{50}P_{17}$, $_{50}P_{19}$)하였고, Table 6에 나타내었다. 실험에 사용된 실험사료의 조성과 일반 성분은 Table 7에 각각 나타내었다. 실험사료의 단백질원으로는 갈색어분(brown fish meal) 및 혈분(blood meal)을 사용하여 조단백질 함량은 에너지에 대해 각각 45%와 50%로 설계하였고, 지질원으로는 n-3와 n-6 지방산이 다량 함유된 어유(fish oil)와 옥수수유(corn oil)를 사용하였다. 그리고 탄수화물원으로는 옥수수전분(corn starch)과 밀가루(wheat meal)를 사용하였으며, 실험사료의 조단백질 함량과 에너지를 맞추기 위하여 셀룰로스를 이용하여 반정제사료(semi purified) 형태로 제조하였고, 실험사료는 원료를 혼합한 후 펠렛제조기로 압출성형하여 밀봉상태로 -20에 냉동보관 후 필요에 따라서 사용하였다. 실험사료는 조단백질 2 가지 수준(45, 50%)에 대해 에너지 3 가지 수준(16, 17, 19 kJ/g)으로 총 6개의 실험구를 설정하였다

3) 어체측정

실험종료 후, 실험어를 24시간 절식시킨 후 ethylene glycol phenyl ether

90% (200 ppm)로 마취시켜 어체중을 측정하여 증체율(weight gain, WG), 사료효율(feed efficiency, FE), 일간성장률(specific growth rate, SGR) 및 단백질 전환효율(protein efficiency ratio, PER)을 조사하였다.

4) 성분분석

일반성분은 실험사료와 전어체에 대해서 실시하였으며, 전어체 분석을 위해서 각 수조별로 6마리씩 무작위로 추출하여 분쇄한 전어체를 사용하였다. AOAC (1995)에 의해 수분은 상압가열건조법(125, 3시간), 조단백질은 Kjeldahl 질소정량법($N \times 6.25$), 조지방은 직접회화법으로 각각 분석하였다. 조지방은 샘플을 12시간 동결건조한 후 Soxtec system 1046 (Tacator AB, Sweden)을 사용하여 soxhlet 추출법으로 분석하였다. 실험 종료 후, 증체율 측정과 함께 혈액성분 분석을 위하여 채혈하기 전까지 실험어를 약 24시간 동안 절식시켰다. 실험어를 각 수조당 4마리씩 무작위로 추출하여 일회용 주사기를 이용하여 실험어의 미부정맥에서 혈액을 채혈한 후 micro-hematocrit 법(Micro Hematocrit Reader, Hawksley)에 의해 헤마토크리트(hematocrit, PCV)를 측정하였으며, 헤모글로빈 함량(Hb, g/dl)은 cyan-methemoglobin 법(Yokoyama, 1960)에 의하여 측정하였다. 이후 남은 혈액을 상온에서 10분 방치하였다가 원심분리(12,000 rpm, 5 min)하여 얻은 혈청을 분석 전까지 -76에 보관하였다. 혈청 glucose (mg/dl), cholesterol (mg/dl), GOT (IU/L), GPT (IU/L), total protein (TP, g/dl)의 측정에는 혈액 분석기(Vtros DT60 II, Korea)를 사용하였다.

5) 통계처리

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

3. 결과 및 고찰

16주간의 성장결과를 Table 8에 나타내었다. 증체율(WG)에 있어서 $45P_{19}$ 실험구가 다른 실험구들에 비해서 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$). $45P_{17}$ 실험구는 $50P_{16}$, $50P_{19}$ 실험구보다 유의적으로 높게 나타났지만, $45P_{16}$, $50P_{17}$ 실험구와는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($P<0.05$). 일간성장률(SGR)에 있어서 $45P_{19}$ 실험구가 다른 실험구들에 비해 유의하게 높았다($P<0.05$). 한편, $45P_{17}$ 실험구와 $50P_{17}$ 실험구 및 $45P_{16}$ 실험구는 $50P_{16}$ 실험구와 $50P_{19}$ 실험구에 비해 유의적으로 높게 나타났으나, 이들 간의 유의한 차이는 없었다($P<0.05$). 사료효율(FE)에 있어서 $45P_{19}$ 실험구가 $45P_{17}$ 실험구를 제외한 다른 실험구들에 비해서 유의하게 높은 것으로 나타났으며, $45P_{16}$ 실험구를 제외한 나머지 실험구들간의 유의한 차이는 나타나지 않았다($P<0.05$). 단백질전환효율(SGR)에 있어서 $45P_{19}$ 실험구가 다른 실험구들에 비하여 유의적으로 높게 나타났는데 $45P_{17}$ 실험구와는 유의적인 차이가 없었으며, 이들을 제외한 나머지 실험구들간에 있어서 유의한 차이는 나타나지 않았다($P<0.05$).

혈액성상학적 평가에 관한 결과는 Table 9에 나타내었다. 본 실험에서 PCV는 30~38%로 나타났는데 $45P_{19}$ 실험구가 다른 실험구들에 비해서 유의

적으로 높게 나타났으며, 50P17실험구는 50P16, 50P19실험구보다 유의적으로 높았지만 45P16, 45P17실험구와는 유의적인 차이를 보이지 않았다($P<0.05$). 이는 무지개송어(Alexis et al., 1985)에 있어서 측정된 32~42%와 유사하게 나타났으며, 잉어(Song, 1995)와 채널메기(Bai et al., 1994)에서 확인된 44%보다는 낮은 값을 나타내었다. 혈청 내 Hb은 9.9~13.2 (g/dl)로 나타났으며, 전 실험구간 유의적인 차이는 없었다($P<0.05$). 일반적으로 건강한 어류의 Hb함량은 10g/dl 정도로 보고하고 있으며(Post, 1983), 아직도 어종별 정확한 정상치는 규명되지 않고 있다. 그러나 필수영양소의 결핍 및 어종에 따른 환경조건과 성장상태에 따라서 변할 수 있다고 여러 연구자들은 밝히고 있다(Babin, 1987; Garrido et al., 1990). 혈청 내 GOT는 45P16실험구가 다른 모든 실험구들에 비해 유의적으로 높았으며($P<0.05$), GPT는 50P19실험구가 나머지 실험구들에 비해 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$). TP (혈청 내 총단백질 함량)는 모든 실험구에서 유의적인 차이를 보이지 않았다($P<0.05$). 혈청 내 글루코스(Glucose)는 다른 실험구들에 비해 45P16실험구가 유의적으로 낮았다($P<0.05$). 그리고 혈청 내 콜레스테롤(Cholesterol)은 50P19실험구가 다른 실험구들에 비해 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$). 실험사료를 섭취한 치어기 뱀장어의 전어체 구성에 대한 결과는 Table 5에 나타내었다. 전어체 내 수분(80.9~83.3%), 조회분 함량(1.4~2.3%), 조단백질 함량(45.8~51.0%), 조지방 함량(7.6~9.4%)과 에너지(18.1~19.5 kJ/g)는 이와 같은 범위를 나타내었다.

본 연구에 따르면 Japanese eel (*A. japonica*)의 사료내 단백질과 에너지의 비율에 있어서 단백질 함량 45%의 실험구간에서는 단백질과 에너지의 비가 증가함에 따라 성장률 및 사료효율이 증가하는 경향이 있었고, P/E ratio가 24 (mg protein / kJ)인 45P19실험구에서 최적의 결과를 나타내었다.

이는 P/E ratio가 22.1로 보고된 American eel (*A. rostrata*)에 비해 높은 것으로 확인되었으며, 이러한 차이는 실험어의 종류, 크기, 수온, 사육밀도 등에 기인한 것으로 추측된다(Tibbetts et al., 2001).

한편 성장률과 사료효율에 있어서 단백질 함량이 50% 실험구에 비해 단백질 함량이 45%인 실험구가 유의하게 높은 것으로 나타났는데, 이는 이전의 연구에 있어서 Nose and Arai (1973)에 의한 Japanese eel (*A. japonica*)의 적정 단백질 요구량 45%, 그리고 Degani et al. (1985)에 의한 European eel (*A. anguilla*)의 적정 단백질 요구량 45%와 동일한 결과를 보였으나, 적정 단백질 요구량(Tibbetts et al., 2000)이 48.3%인 American eel (*A. rostrata*)과 50%인 Australian eel (*A. austaralus*)에 비해서는 그 요구량이 낮은 것으로 확인되었다(De Silva, 2001). 이러한 종에 따른 단백질과 에너지 비의 차이는 사료의 조성, 먹이습성, 실험디자인, 사육방법, 수온, 그리고 염분과 같은 환경적 요인 등에 의해 달라질 수 있다(Tuncer et al., 1990; Gatlin, 1994; Keembiyehetty and Wilson, 1998).

따라서 본 결과를 통하여 치어기 *A. japonica*의 사료 내 적정 P/E ratio를 살펴보면, 성장률과 사료효율 등을 고려한 에너지 수준별 사료 내 적정 단백질 함량은 에너지 19 kJ/g 수준에서 단백질 함량 45% 실험구에서 최적의 성장을 나타내었으며, 이를 토대로 사료 내 적정 P/E ratio는 24 mg protein/kJ 가 적합한 것으로 판단된다. 상기의 결과를 바탕으로 소화율 평가를 통한 가소화 단백질에 대한 가소화 에너지의 비율에 관한 연구를 수행함으로써 어체 내에서 일어나는 단백질과 에너지에 대한 생화학적인 메커니즘을 확인할 수 있는 연구가 수반되어야 될 것으로 생각된다. 이를 통해 향후 체계적이고 경제성 있는 실용적인 배합사료 개발에 대한 기초를

확립함과 동시에 적정 P/E ratio에 의한 사료를 제조함으로써 양식어류의 단백질 대사산물인 질소와 황의 배출을 최소화시키고 영양학적 환경적 측면에 있어서도 도움이 될 것으로 기대된다.

4. 참고문헌

- Alexis, M. N., E. Papaparaskeva-Papoutsoglou and V. Theochari, 1985. Formulation of paractical diets for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) made by partial or complete substitution of fishmeal by poultry by-products and certain plant by-products. *Aquaculture*, 50, 61-73.
- AOAC, 1995. Official methods of analysis of the association of official analysis chemicals, 14th edition. Arlington. AV, 1141 pp.
- Babin, P. J., 1987. Apolipoproteins and the association of egg yolk proteins with plasma high density lipoproteins after ovulation and follicular atresia in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Biol. Chem.*, 262, 4290-4296.
- Bai, S. C. and D. M. Gatlin, 1994. Effects of L-lysine supplementation of diets with different protein levels and sources on channel catfish (*Ictalurus Punctatus*). *Aquaculture and Fish. Man.*, 25, 465-474.
- Ballestrazzi, R., D. Lanari, E. D. Agaro and A. Mion, 1994. The effect of dietary protein level and source on growth, body composition, total ammonia and reactive phosphate excretion of growing sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 127, 197-206.
- Cai, Y. and J. Wermerskirchen, 1996. Ammonia excretion indicates protein adequacy for fish. *Prog. Fish cult.*, 58, 124-127.

- Cowey, C. B., 1993. Some effect of nutrition and flesh quality of cultured fish. (in) S. J. Kaushik and P. Luquet (Eds), Fish Nutrition in Practice, Proc. of the IV Int. Symp. on Fish Nutrition and feedings., Les Colloques INRA 6, pp. 227-236.
- De Silva S. S., R. M. Gunasekera, G. Gooley and B. A. Ingram. 2001. Growth of Australian shortfin eel, *Anguilla australis* elvers given different dietary protein and lipid levels. Aquacult. Nutr., 7, 53-57.
- Degani, G., A. Horowitz and D. Levanon, 1985. Effect of protein level in purified diet and of density, ammonia and O₂ levels on growth of juvenile european eels, *anguilla anguilla*. Aquaculture, 46, 193-200.
- El-Sayed, A. M. and S. Teshima, 1992. Protein and energy requirements of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fry. Aquaculture, 103, 55-63.
- Garrido, L. G., R. M. Chapuli and A. V. Adres, 1990. Serum cholesterol and triglyceride levels in (*Scyliorhinus canicula*) during sexual maturation. J. Fish Biol., 36, 499-509.
- Gatlin, D. M., 1994. Advancements in nutrition of hybrid striped bass. Aquacult. Mag., 20, 95-98.
- Hillestrad, M. and F. Johnsen, 1994. High energy/low protein diets for Atlantic salmon: effects on growth, nutrient retention and slaughter quality. Aquaculture, 124, 109-116.
- Kaushik, S. J., 1994. Nutritional strategies for the reduction of aquaculture wastes. Proc. of the Fisheries and Ocean Industrial Development, Research Center for Ocean Industrial Development, Pusan, Korea, pp. 115-132.
- Keembiyehetty, C. N. and R. P. Wilson. 1998. Effect of water temperature on growth and nutrient utilization of sunshine bass fed diets containing

- different energy/protein ratios. *Aquaculture*, 166, 151-162.
- Kim, K. W. and S. C. Bai, 1997. Fish meal analog as a dietary protein source in Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. *J. Aquacult.*, 10, 143-151.
- Kim, C. H. and P. Chin, 1995. The effects of dietary energy protein ratio on oxygen consumption, ammonia nitrogen excretion and body composition in juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli*. *J. Korean Fish. Soc.*, 28, 412-420.
- McGoogan B. B. and D. M. Gatlin III, 1999. Dietary manipulations affecting growth and nitrogenous waste production of red drum, *Sciaenops ocellatus*. I. Effects of dietary protein and energy levels. *Aquaculture*, 178, 333-348.
- National Research Council, 1981. Nutritional Energetics of Domestic Animals and Glossary of Energy Terms. National Acad. Press, Washington, DC.
- National Research Council, 1993. Nutrient Requirements of Warm water Fishes and Shellfishes. National Acad. Press, Washington, DC.
- Nematipour, G. R., M. L. Brown and D. M. Gatlin, 1992. Effects of dietary energy:protein ratio on growth characteristics and body composition of hybrid striped bass, *Morone chrysops*×*M.saratis*. *Aquaculture*, 107, 359-368.
- Peres, H. and A. Oliva-Teles, 1999. Effect of dietary lipid level on growth performance and feed utilization by European sea bass juvenile (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 179, 325-334.
- Post, G., 1983. Nutrition and nutritional diseases of fish (in) Text-book of fish health. TFH. Publications, Inc., Ltd., pp. 199-207.
- Reinitz, G. L., L. E. Orme, C. A. Lemm and F. N. Hitzel, 1978. Influence of varying lipid concentration with two protein concentrations in diets for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Trans. Am. Fish. Soc.*, 107, 751-754.

- Samantaray, K. and S. S. Mohanty, 1999. Interactions of dietary levels of protein and energy on fingerling snakehead, *Channa striata*, Aquaculture, 156, 241-249.
- Shiau, S. Y. and C. W. Lan, 1996. Optimum dietary protein level and protein to energy ratio for growth of grouper (*Epinephelus malabaricus*). Aquaculture, 145, 259-266.
- Shiau, S. Y. and S. L. Huang, 1990. Influence of varying energy levels with two protein concentrations in diets for hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*×*O. aureus*) reared in seawater. Aquaculture, 91, 143-152.
- Song, M. H., 1995. Studies on utilization of blood meal as a source of dietary protein in growing common carp (*Cyprinus carpio*). MS. thesis, Pukyong National University, Busan, Korea, 34 pp.
- Stickney, R. R., 1977. Lipids in catfish nutrition. (in) R. R. Stickney and R. T. Lovell (editors), Nutrition and Feeding of Channel Catfish. Southern cooperative Series Bulletin, 218, pp. 14-18.
- Takeshi N. and S. Arai, 1973. Optimum level of protein in purified diet for eel, *Anguilla japonica*. Bull. Freshwater Fish. Res. Lab., 22, 145-154.
- Takeuchi, T., Y. Shiina, T. Watanabe, S. Sekiya and K. Imaizumi, 1992. Suitable protein and lipid levels in diet for fingerlings of yellowtail. Nippon Suisan Gakkaishi, 58, 1333-1339.
- Tibbetts S. M., S. P. Lall and D. M. Anderson, 2000. Dietary protein requirement of juvenile American eel, *Anguilla rostrata* fed practical diets. Aquaculture, 186, 145-155.
- Tibbetts S. M., S. P. Lall and D. M. Anderson, 2001. Optimum dietary ratio of digestible protein and energy for juvenile American eel, *Anguilla*

- anguilla*, fed practical diets. Aquacult. Nutr., 7, 213-220.
- Tuncer, H., R. M. Harrell and E. D. Houde, 1990. Comparative energetics of striped bass (*Morone saxatilis*) and hybrid (*M. Saxatilis* × *M. chrysops*) juveniles. Aquaculture, 86, 387-400.
- Wang, K. W., T. Takeuchi and T. Watanabe, 1985. Optimum protein and digestible energy level in diets for *Tilapia nilotica*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 51, 141-146.
- Winfree, R. A. and R. R. Stickney, 1981. Effects of dietary protein and energy on growth, feed conversion efficiency and body composition of *Tilapia aurea*. J. Nutr., 111, 1001-1012.
- Xianghua, L., 1988. Research on fish nutrition in China. (in) S. de Silva (Ed.), Finfish Nutrition Research in Asia. Proceedings of the Second Asian fish Nutrition Network Meeting, Singapore, pp. 92-95.
- Yokoyama, H. O., 1960. Studies on the origin, development and seasonal variation in the blood cells of perch, *Perca flavescens*. J. Wild. Dis., 6, 1-202.

Table 6. Estimated and actual values of crude protein, P/E ratio and energy for the six experimental diets

Diets ¹	Crude protein (%)		P/E ratio (mg protein / kJ)		Energy (kJ / g)	
	EV ²	AV ³	EV	AV	EV	AV
₄₅ P ₁₆	45	44.7	28.3	27.1	16	16
₄₅ P ₁₇	45	44.1	25.9	25.6	17	17
₄₅ P ₁₉	45	44.3	23.9	24.1	19	18
₅₀ P ₁₆	50	49.2	31.4	29.9	16	16
₅₀ P ₁₇	50	49.3	28.8	28.1	17	18
₅₀ P ₁₉	50	50.2	26.5	26.6	19	19

¹ Three energy levels of 16, 17 and 19 kJ per g diets were included at 45 and 50% crude protein levels.

² EV: estimated values.

³ AV: actual values as determined by analyses.

Table 7. Composition of the six experimental diets (% of dry matter basis)¹

	Diets ²					
	45P ₁₆	45P ₁₇	45P ₁₉	50P ₁₆	50P ₁₇	50P ₁₉
Ingredients						
Brown fish meal ³	51.0	51.0	51.0	57.5	57.5	57.5
Blood meal ⁴	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Corn starch ⁵	17.0	17.0	12.7	10.0	10.0	6.0
Wheat meal ⁶	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.1
Fish oil ⁷	1.9	3.2	5.1	2.0	3.2	5.1
Corn oil ⁸	3.8	6.4	10.2	4.0	6.4	10.3
Vitamin mixture ⁹	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Mineral mixture ¹⁰	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Cellulose	5.4	1.5	0.1	5.6	1.8	0.1
Proximate analysis						
Moisture	7.91	7.71	7.30	7.74	7.61	7.91
Ash	8.48	8.43	8.55	9.40	9.15	9.38
Crude protein	44.7	44.1	44.3	49.2	49.3	50.2

¹ Ingredients information and formulation method are explained in Kim and Bai (1997).

² See Table 1. Estimated and actual values of crude protein, P/E ratio and energy for the six experimental diets.

³ Imported from Chile, provided by Su Hyup Feed Co., Uiryeong, Korea.

⁴ Provided by Il Shin feed Co., Hampyeong, Korea.

⁵ Provided by Su Hyup Feed Co., Uiryeong, Korea.

⁶ Provided by Young Nam Flour Mills Co., Busan, Korea.

⁷ Provided by E-Wha oil and Fat Industry Co., Ltd., Pusan, Korea.

⁸ Provided by Dong Suh Oil & Fats Co., Changwon, Korea.

⁹ Contains (as mg/kg in diets): Ascorbic acid, 300; dl-Calcium pantothenate, 150; Choline bitartrate, 3000; Inositol, 150; Menadione, 6; Niacin, 150; Pyridoxine · HCl, 15; Riboflavin, 30; Thiamine mononitrate, 15; dl- α -Tocopherol acetate, 201; Retinyl acetate, 6; Biotin, 1.5; Folic acid, 5.4; B₁₂, 0.06.

¹⁰ Contains (as mg/kg in diets): NaCl, 437.4; MgSO₄ · 7H₂O, 1379.8; NaH₂P₄ · 2H₂O, 877.8; Ca(H₂PO₄)₂ · 2H₂O, 1366.7; KH₂PO₄, 2414; ZnSO₄ · 7H₂O, 226.4; Fe-Citrate, 299; Ca-lactate, 3004; MnSO₄, 0.016; FeSO₄, 0.0378; CuSO₄, 0.00033; Calcium iodate, 0.0006; MgO, 0.00135; NaSeO₃, 0.00025.

Table 8. Effects of the different dietary protein to energy ratio (P/E ratio)

	Diets ¹						Pooled SEM ¹¹
	45P ₁₆	45P ₁₇	45P ₁₉	50P ₁₆	50P ₁₇	50P ₁₉	
Growth performance							
WG ²	79.9 ^{bc}	92.8 ^b	108.7 ^a	67.5 ^c	92.0 ^{bc}	68.1 ^c	6.56
FE ³	44.1 ^c	58.0 ^{ab}	61.4 ^a	48.6 ^{bc}	53.1 ^b	47.7 ^{bc}	2.69
SGR ⁴	0.52 ^{bc}	0.58 ^b	0.66 ^a	0.46 ^c	0.58 ^b	0.46 ^c	0.03
PER ⁵	0.98 ^b	1.29 ^{ab}	1.36 ^a	0.93 ^b	1.06 ^b	0.95 ^b	0.08
Serological characteristics							
PCV ⁶	31 ^{cd}	34 ^{bc}	37 ^{ab}	38 ^a	30 ^d	31 ^{cd}	1.38
Hb ⁷	9.9	11.9	12.5	13.2	10.3	10.1	0.57
GOT ⁸	139 ^a	53 ^b	73 ^b	54 ^b	87 ^b	72 ^b	12.9
GPT ⁹	8 ^b	6 ^{bc}	7 ^{bc}	5 ^c	6 ^{bc}	11 ^a	0.87
TP ¹⁰	3.0	2.9	2.8	3.0	2.8	3.1	0.05
Glocuse	93 ^b	140 ^a	129 ^a	145 ^a	155 ^a	131 ^a	8.74

Values in the same row with different superscripts are significantly different (P<0.05).

¹ See Table 1. Design and actual values of crude protein, P/E ratio and energy for the six experimental diets.

² Weight gain (%): [(final wt. - initial wt.) / initial wt.] × 100.

³ Feed efficiency (%): (wet wt. gain / dry feed intake) × 100.

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

⁵ Protein efficiency ratio (%): wet wt. gain / protein intake.

⁶ Hematocrit (%).

⁷ Hemoglobin (g/100 mL).

⁸ Glutamate oxaloacetate tran-saminase (IU/L).

⁹ Glutamate pyruvate transaminase (IU/L).

¹⁰ Total protein (g/dl).

¹¹ Pooled standard error of mean: SD/√n.

Table 9. Whole body proximate composition of juvenile eel fed the six different experimental diets for 16 weeks (% of dry matter)

Diets	Moisture	Crude ash	Crude Protein	Crude lipid	Energy
	(% in diet)				(kcal/g)
⁴⁵ P ₁₆	83.3	2.1	45.8	7.6	18.1
⁴⁵ P ₁₇	81.9	1.4	46.5	7.9	18.5
⁴⁵ P ₁₉	80.9	2.3	46.9	8.2	18.9
⁵⁰ P ₁₆	82.4	1.6	49.2	8.3	19.3
⁵⁰ P ₁₇	81.7	1.4	49.8	8.9	19.1
⁵⁰ P ₁₉	80.3	1.9	51.0	9.4	19.5
Pooled SEM ¹	0.44	0.15	0.85	0.27	0.2

¹ Pooled standard error of mean: $SD/\sqrt{n}$.

제 2절 필수지방산 적정 요구량 평가

1. 서 론

어류는 체내 세포의 기능유지를 위해 필연적으로 특정한 지방산을 요구하는데, 이러한 지방산은 체내에서 자체적으로 합성될 수 없어, 외부적으로 공급해 주지 않으면 정상적인 성장과 생존을 할 수 없다. 이와 같이 어류의 정상적인 성장과 생존을 위해 사료 내 필수적으로 공급해 주어야 하는 지방산을 필수지방산(essential fatty acid, EFA)이라 하며, 이는 생체막의 구성 성분으로서 뿐만 아니라 prostaglandins, thromboxanes 및 leukotrienes과 같은 eicosanoids의 주된 전구물질로서 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려져 있으나(John Sargent, 1999), 실제 체내에서의 대사적 기능에 대한 구체적인 경로에 관한 연구는 아직 밝혀지지 않았다. 그러나 필수지방산이 결핍된 사료로 사육된 어류는 성장이 지연되고 사료효율이 낮으며, 무지개송어, 잉어, 뱀장어, 채널메기 등의 결핍증상으로는 지느러미 부식, 심근의 염증, 쇼크증세, 혈액 내 hemoglobin 함량의 저하, 근육 내 수분함량의 증가 및 폐사율의 증가 등이 발생하고(Castell et al., 1972a; Takeuchi and Watanabe, 1977a,b; Takeuchi et al., 1980; Satoh et al., 1989), 잉어(Shimma et al., 1977), 무지개송어(Watanabe, 1982; Watanabe et al., 1984c; Leray et al., 1985), 참돔(Watanabe et al., 1984a,b)에서 생식력의 저하가 보고된 바 있다.

어류는 염분의 농도와 수온에 따라 필수지방산의 요구량이 달라지는데, 은연어는 1-2.5%의 18:3n-3을 요구하고(Yu and Sinnhuber, 1979), 잉어는 18:2n-6과 18:3n-3 각 1% 요구하며(Watanabe et al., 1975; Takeuchi and Watanabe, 1977a), 틸라피아는 0.5% 수준에서 n-3 계열의 지방산 보다 n-6 계열의 지방산을 더 필요로 한다(Takeuchi et al., 1983). 해산어류는 n-3 계

열의 지방산을 더 많이 요구하는 경향이 있으며 참돔은 0.5%의 n-3 (highly unsaturated fatty acid, HUFA)를 요구하며(Yone et al., 1975), 터봇(Gatesoupe et al., 1977)과 방어(Deshimaru and Kuroki, 1983)는 각각 0.8%와 2%의 eicosapentaenoic acid, EPA와 docosahexaenoic acid, DHA를 요구한다. 뱀장어 (*Anguilla japonica*)에 필수지방산의 첨가효과는 Takeuchi et al. (1980)에 의해 이미 보고된 바 있으며, European eel (*Anguilla anguilla*)의 지질원과 첨가량에 대해 Degani et al. (1986)에 의해, De Silva et al., (1997)은 Australian eel (*Anguilla australis*)의 성장 단계별 지방산 체조성의 변화, 그리고 지질의 종류가 Australian eel (*Anguilla australis*)의 성장에 미치는 영향에 대해서는 Gunasekerfa et al. (2002)에 의해 보고되었다. 그러나 뱀장어에 있어서 여러 가지 고도불포화지방산(highly unsaturated fatty acid, HUFA)에 대한 적정 필수지방산의 종류와 그 요구량에 관한 부가적 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 뱀장어 치어의 필수지방산의 요구량을 설정하기 위하여 n-3원으로써 α -linolenic acid (LNA, 18:3n-3), docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3), eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3)와 n-6원으로써 linoleic acid (LA, 18:2n-6), arachidonic acid (ARA, 20:4n-6)을 사료내 수준별로 첨가하여 성장과 체조성 및 혈액성상에 미치는 영향을 실험하였다. 본 실험결과를 통해 뱀장어 치어의 적정 필수지방산의 종류와 그 요구량을 평가하고자 한다.

2. 재료 및 방법

1) 실험어 및 사육관리

실험에 이용된 뱀장어 치어는 반죽사료로 사육한 전남 나주의 개인 양만장으로부터 2003년 10월 27일에 부경대학교 양어장으로 수송하여 10톤 콘크리트 수조에 수용하였으며, 실험 전 4주간 상업용 펠렛사료를 공급하면

서 펠렛사료에 적응시키는 예비사육을 실시하였다. 예비사육 후, 평균 어체 중 15.0 ± 0.3 g (mean $\pm$ SD)의 뱀장어 치어를 순환여과식 사육시스템에 각 실험수조(60 L 사각수조)당 20마리씩 3반복으로 무작위 배치하였으며, 유수량은 45 L/min, 사육수온은 25 ± 1 °C를 유지하였다. 일일 사료공급량은 어체중의 2~3% (건물량)를 일일 2회(9:00, 18:00)공급하였으며 이때, 유수는 중단했다. 실험 기간은 2004년 2월 6일부터 2004년 6월 5일까지로 16주간 사육 실험을 실시하였고, 8주째에 성장양상을 확인하기 위하여 Ethylene glycol phenyl ether 90% (200ppm)에 실험어를 마취시켜 스트레스를 최소화하여 각 수조의 실험어를 측정하였으며 사료공급량 역시 이에 따라 보정하였다.

2) 실험사료 및 실험설계

실험에 사용된 실험사료의 조성은 Table 10에 나타내었다. 실험사료는 단백질원으로 갈색어분(brown fish meal)과 혈분(blood meal)을 사용하였고, 지질원으로 야자유(coconut oil), 옥수수유(corn oil) 및 아마인유(linseed oil)를, 그리고 탄수화물원으로 옥수수전분(corn starch)과 밀가루(wheat meal)를 사용하였다. 치어기 뱀장어의 사료내 필수지방산과 그 적정 요구량을 평가하기 위하여 5가지 필수지방산을 사료내 첨가하여 제조하였다. 실험사료의 조단백질 함량은 52%, 조지방 함량은 9.3%로 맞추어 제조하였고, 실험사료는 원료를 혼합한 후 펠렛제조기로 압출성형하여 밀봉상태로 -20°C에 냉동 보관하여 사용하였다. 어분에 함유되어 있는 지질성분을 제거하기 위해 용기에 fish meal : ethanol = 1 : 2, (W/V)의 비율로 수용하여 water bath에서 약 30분간 75-80°C로 가열 및 교반하여 지질을 제거하였고(3~4회 반복), 공기순환이 원활한 공간에서 유기용매가 완전히 기화할 때 까지 48시간 이상 건조하여 어분 내 지질 함량을 0.5% 이내로 조정 후 실험사료에 사용하였다(Kosutarak et al., 1995). 실험구는 1) 대조구(Basal diet), 2) LNA 0.5% +

LA 0.5% 함유구, 3) LNA 0.33% + LA 0.66% 함유구, 4) LNA 0.25% + LA 0.75% 함유구, 5) AA 0.25% + EPA 0.375% + DHA 0.375% 함유구, 6) AA 0.5% + EPA 0.25% + DHA 0.25% 함유구, 7) AA 0.75% + EPA 0.125% + DHA 0.125% 함유구로 총 7개의 실험구를 설정하였다.

3) 어체측정

실험종료 후, 실험어를 24시간 절식시킨 후 ethylene glycol phenyl ether 90% (200ppm)로 마취시켜 어체중을 측정하여 증체율(weight gain, WG), 사료효율(feed efficiency, FE), 일간성장률(specific growth rate, SGR) 및 단백질 전환효율(protein efficiency ratio, PER)을 확인하였으며 어체내 일반성분 및 지방산 조성을 조사하였다.

4) 일반성분 분석

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

5) 지방산 분석

실험사료와 분쇄한 전어체에서 추출한 지방의 methylation은 Metcalfe et al. (1966)의 방법에 의해 분석하였다. 지방산 methylation은 ferries silica capillary column을 장착한 gas chromatography (Trace GC)에 의해 분석하였다. 캐리어 기체는 질소를 사용하였고, detection은 FID 모드를 사용하였으며 분석조건은 다음과 같다. Instrument: Trace GC gas chromatograph,

column: quadrex, 30M, bonded carbowax 0.25 mm I.D $\times$ 0.25 μ m film, cat. No.: 007-CW-30-0.25F, injector temperature: 250 $^{\circ}$ C, Detector temperature: 250 $^{\circ}$ C, flow (gas press): 65 psi. helium, splite: 1:50 도출된 크로마토그램은 분석 프로그램인 peak sample에 의해 분석하였다.

6) 혈액학적 성상조사

실험 종료 후, 증체율 측정과 함께 혈액성분 분석을 위하여 채혈하기 전 까지 실험어를 약 24시간 동안 절식시켰다. 실험어를 각 수조당 4마리씩 무작위로 추출하여 일회용 주사기를 이용하여 실험어의 미부정맥에서 혈액을 채혈한 후 micro-hematocrit법(Micro Hematocrit Reader, Hawksley)에 의해 헤마토크리트(hematocrit, PCV)를 측정하였으며, 헤모글로빈 함량(Hb, g/dl)은 cyan-methemoglobin 법(Yokoyama, 1960)에 의하여 측정하였다. 이후 남은 혈액을 상온에서 10분 방치하였다가 원심분리(12,000 rpm, 5 min)하여 얻은 혈청을 분석 전까지 -76 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 혈청 글루코스(mg/dl), 혈청 콜레스테롤(mg/dl), AST (IU/L), ALT (IU/L), total protein (TP, g/dl)의 측정에는 혈액 분석기 (Vtros DT 60 II, Korea)를 사용하였다.

7) 통계처리

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

3. 결과 및 고찰

본 실험에서는 뱀장어의 적정 필수지방산과 그 요구량을 확인하기 위해서, 5종류의 고도불포화지방산(HUFA)을 실험사료에 첨가하여 제조하였으며, 본 사료를 공급하여 사육실험을 실시하였다. 그 결과 LA과 LNA를 각각 0.35-0.5%, 0.5-0.65% 함유 시, 나머지 실험구들에 비해 성장 및 사료효율이 유의적으로 높은 것으로 나타났다.

4주간의 예비사육 후 16주간의 사육실험 결과는 Table 11에 나타내었다. 증체율과 일간성장률에 있어서 D₃: LA_{0.35}-LNA_{0.65} 실험구가 다른 실험구들과 비교하여 가장 높게 나타났으며($P<0.05$), D₂: LA_{0.5}-LNA_{0.5} 실험구와는 유의적인 차이가 나지 않았다($P>0.05$). 한편, 대조구(D₁: LA-LNA 결핍사료)는 다른 실험구들에 비해 유의적으로 낮았다($P<0.05$). 사료효율과 단백질전환효율 역시 성장결과와 유사한 경향을 보였는데 D₂: LA_{0.5}-LNA_{0.5} 실험구와 D₃: LA_{0.35}-LNA_{0.65} 실험구가 다른 실험구에 비해 유의적으로 높았는데($P<0.05$), 이들 실험구간에는 유의적 차가 없었으며($P>0.05$), 대조구 사료를 공급한 실험구가 다른 실험구들에 비해 유의적으로 낮았다($P<0.05$).

혈액성상학적 평가에 관한 결과는 Table 12에 나타내었다. 헤마토크리트(Hematocrit)는 대조구에서 유의적으로 가장 높게 나타났으며($P<0.05$), D₂: LA_{0.5}-LNA_{0.5} 실험구와는 유의적인 차이를 보이지 않았다($P>0.05$). 혈장 내 헤모글로빈(Hemoglobin)은 9.5-11.6 (g/100mL)로 나타났으며, 전 실험구간 유의적인 차이는 없었다($P>0.05$). 혈장 내 AST는 D₇: AA_{0.75}-EPA_{0.125}-DHA_{0.125} 실험구가 다른 실험구들에 비해 가장 높았는데, D₁, D₂, D₅, D₆ 실험구와는 유의적인 차이가 없었다($P>0.05$). 혈장 내 ALT와 Total protein은 모든 실험구에서 유의적인 차이를 보이지 않았다($P>0.05$). 혈장 내 Glucose는 다른 실험구들에 비해 D₅: AA_{0.25}-EPA_{0.375}-DHA_{0.375} 실험구가 가장 높았으며, D₁, D₂,

D₃, D₄, D₆, D₇ 실험구와는 유의적인 차이가 없었다($P>0.05$). 혈장 내 콜레스테롤(Cholesterol)은 D₄: LA_{0.25}-LNA_{0.75} 실험구가 다른 실험구들에 비해 가장 높게 나타났으며 D₁, D₆, D₇ 실험구와는 유의적인 차이를 보이지 않았다($P>0.05$).

뱀장어 치어의 전어체 지방산조성을 Table 13에 나타내었다. 전어체내 HUFA 함량에 있어서 대조구는 나머지 실험구들에 비해 유의적으로 낮게 나타났으며, D₁, D₄ 실험구와 D₂-D₇ 실험구간 사이에서는 각각 유의적인 차이를 보이지 않았다($P>0.05$). HUFA/SFA 비율에 있어서 D₂, D₃, D₆이 D₁에 비해 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$). 하지만 D₁, D₄, D₅, D₇ 실험구간 그리고 D₂-D₇ 실험구간 사이에서는 각각 유의한 차이가 없었다($P>0.05$). DHA/EPA의 비율에 있어서 D₇이 다른 실험구들에 비해 유의적으로 가장 높게 나타났으며, D₅가 유의적으로 가장 낮게 나타났다($P<0.05$).

뱀장어의 어체 내 지방산 함량의 변화에 있어서 DHA, EPA, AA는 glass eel에서 juvenile eel로 성장하면서 점점 감소하고, 반대로 LA와 LNA는 점점 증가하는 경향이 있다(De Silva et al., 1997). 이러한 명확한 차이는 성장하면서 염분이 다른 지역으로 이주하는 회유성 어류의 대표적인 특징으로 보고되었다(Borlongan and Benitez, 1992; De Silva et al., 1997). 뱀장어에 있어서 사료 내 LA와 LNA 비율은 1% 전후로 확인되는데, 1% 이상으로 확인된 잉어(Watanabe et al., 1975; Takeuchi et al and Watanabe, 1977a)와 연어(Yu and Sinnhuber, 1979) 등의 다른 담수어에 비해서 다소 낮은 경향을 보인다. 그리고 사료 내 LNA의 과잉 첨가 시 증체율과 사료효율이 감소하는 경향을 보였는데, 무지개 송어의 결과와 유사한 경향을 나타내었다(Watanabe, 1974). 한편, 어체 내 지방산 조성의 차이가 사료(Watanabe et al., 1983; Olsen and Skjervold, 1995), 먹이의 결핍(Dave et al., 1976; Jezierska et al., 1982; De Silva et al., 1997), 그리고 서식수온을 포함한 비영양적 요인(Satoh et al., 1984; Bell et al., 1986) 등에 영향을 받는다는 보고가 있다.

본 실험에서 치어기 뱀장어의 성장과 전어체 지방산 조성 결과 사료 내 LNA (n-3)와 LA (n-6)를 각각 0.35%, 0.65% 첨가했을 때 WG, SGR, FE, PER이 가장 높았으나, 이전의 실험(Takeuchi, 1980)과 동일한 수준인 n-3와 n-6를 각각 0.5%씩 첨가한 실험구와는 유의한 차이를 보이지 않았다. 따라서 뱀장어 치어의 필수지방산은 LNA (n-3), LA (n-6)이고, 그 적정수준은 각각 0.35-0.5%, 0.5-0.65%로 판단된다. 향후 수행해야 할 뱀장어의 필수지방산에 관한 연구에 있어서 성장 단계별 뱀장어의 지방산 조성변화와 뱀장어에 대한 지질원의 이용성과 소화율에 대한 연구 또한 뒷받침되어야 할 것이다.

4. 참고문헌

- AOAC., 1995. Official methods of analysis of the association of official analysis chemicals, 14th edition. Arlington. AV, pp. 1141.
- Bell, M. V., R. J. Henderson and J. R. Sargent, 1986. The role of polyunsaturated fatty acids in fish. Comparative Biochemistry and Physiology 83B, 711-719.
- Borlongan, I. G. and L. V. Benitez, 1992. Lipid and fatty acid composition of milkfish (*Chanos chanos Forsskal*) grown in freshwater and seawater. Aquaculture 104, 79-89.
- Castell, J. D., R. O. Sinnhuber, J. H. Wales and D. J. Lee, 1972. Essential fatty acids in the diets of rainbow trout (*Salmo gairderi*): Growth, feed conversion and some gross deficiency symptoms. J. Nutr. 102, 77-86.
- Dave, G., M. J. Sjobeck, A. Larsson, K. Lewander and U. Lidman, 1976. Metabolic and hematological effects of starvation in the European eel, *Anguilla anguilla* L. III. Comparative Biochemistry and Physiology 53B,

509-515.

- Deshimaru, O. and K. Kuroki. 1983. Studies on the optimum levels of protein and lipid in yellowtail diets. pp. 44-79 in Reports of Kagoshima Prefectural Fishery Experimental Station. Kagoshima, Japan: Kagoshima Prefectural Fishery Experimental Station.
- De Silva, S. S., R. M. Gunasekera, R. Collins, B. A. Ingram and C. M. Austin, 1997. Changes in the fatty acid profile of the Australian shortfin eel in relation to development. J. Fish Biol., 50, 992-998.
- Degani G., 1986. Dietary effects of lipid source, lipid level and temperature on growth of glass eel (*Anguilla anguilla*). Aquaculture, 56, 207-214.
- Gatesoupe, F. J., C. Leger, R. Metailler and P. Luquet. 1977. Alimentation lipidique du turbot (*Scophthalmus maximus* L.). 1. Influence de la longueur de chaînes des acides gras de la série $\omega 3$. Annu. Hydrobiol., 8, 89-97.
- Jezierska, B., J. R. Hazel and S. D. Gerking, 1982. Lipid mobilization during starvation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, with attention to fatty acids. J. of Fish Bio., 21, 681-692.
- John, S., G. Bell, L. McEvoy, D. Tocher and A. Estevez, 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. Aquaculture, 177, 191-199.
- Leray, C., G. Nonnotte, P. Roubaud and C. Leger, 1985. Incidence of n-3 essential fatty acid deficiency on trout reproductive processes. Reprod. Nutr. Dev., 25, 567-581.
- Metcalf, L.D., A. A. Schmitz and J. R. Pelka, 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. Anal. Chem., 38, 514-515.

- Olsen, Y. and H. Skjervold, 1995. Variation in content of ω 3 fatty acids in farmed Atlantic salmon, with special emphasis on effects on non-dietary factors. *Aquaculture International*, 3, 22-35.
- Rasanthi M. G., K. Leelarasamee and S. S. De Silva, 2002. Lipid and fatty acid digestibility of three oil types in the Australian shortfin eel, *Anguilla australis*. *Aquaculture*, 203, 335-347.
- Sargent, J., R. J. Henderson and D. R. Tocher, 1989. The lipids. (in) J. E. Halver (Ed.), *Fish Nutrition*, 2nd. Academic Press, New York, pp. 153-218.
- Satoh, S., T. Takeuchi and T. Watanabe, 1984. Effect of starvation and environmental temperature on proximate and fatty acid composition of *Tilapia nilotica*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 50, 79-84.
- Satoh, S., W. E. Poe and R. P. Wilson. 1989. Effect of dietary n-3 fatty acids on weight gain and liver polar lipid fatty acid composition of fingerling channel catfish. *J. Nutr.*, 119, 23-28.
- Shimma, Y., R. Suzuki, M. Yamaguchi and T. Akiyama, 1977. On the lipids of adult carps raised on fish meal and SCP feeds, and hatchabilities of their eggs. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.*, 27, 35-48.
- Takeuchi, T. and T. Watanabe, 1977a. Requirement of carp for essential fatty acids. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 43, 541-551.
- Takeuchi, T. and T. Watanabe, 1977b. Dietary levels of methyl laurate and essential fatty acid requirement of rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 43, 893-898.
- Takeuchi, T., S. Arai, T. Watanabe and Y. Shimma, 1980. Requirement of eel *Anguilla japonica* for essential fatty acids. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 46,

345-353.

- Takeuchi, T., S. Satoh and T. Watanabe, 1983. Requirement of *Tilapia nilotica* for essential fatty acids. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 49, 1127-1134.
- Watanebe, T., C. Ogino, Y. Koshiishi and T. Matsunaga, 1974. Requirement of rainbow trout for essential fatty acids. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 40, 493-499.
- Watanebe, T., T. Takeuchi and C. Ogino, 1975. Effect of dietary methyl loleate and linolenate on growth of carp-2. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 41, 263-269.
- Watanebe, T., M. Ohta, C. Kitajima and S. Fujita, 1982. Improvement of dietary value of brine shrimp *Artemia salina* for fish larvar by feeding them on n-3 highly unsaturated fatty acids. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 48, 1175-1782.
- Watanabe, T., C. Kitajama and S. Fujita, 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. Aquaculture, 34, 115-143.
- Watanebe, T., T. Arakawa, C. Kitajima and S. Fujita, 1984a. Effect of nutritional quality of broodstock diets on chemical components of red sea bream. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 50, 495-501.
- Watanebe, T., S. Ohhashi, A. Itoh, C. Kitajima and S. Fujita, 1984b. Effect of nutritional composition of diets on chemical components of red sea bream broodstock and eggs produced. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 50, 503-515.
- Watanebe, T., T. Takeuchi, M. Saito and K. Nishimura, 1984c. Effect of low protein-high caloris or essential fatty acid deficient diet on reproduction of rainbow trout. Jap. Soc. Sci. Fish., 50, 1207-1215.

- Yokoyama, H. O., 1960. Studies on the origin, development and seasonal variation in the blood cells of perch, *Perca flavescens*. J. Wild. Dis., 6, 1-10.
- Yone, Y., M. Furuichi and S. Sakamoto., 1971. Studies on nutrition or red sea bream. 3. Nutritive value and potimum content of lipids in diet. Rep. Fish. Res. Lab. Kyusu Univ., 1, 49-60.
- Yu, T. C. and R. O. Sinnhuber., 1979. Effect of dietary $\omega 3$ and $\omega 6$ fatty acids on growth and feed conversion efficiency of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Aquaculture, 16, 31-38.

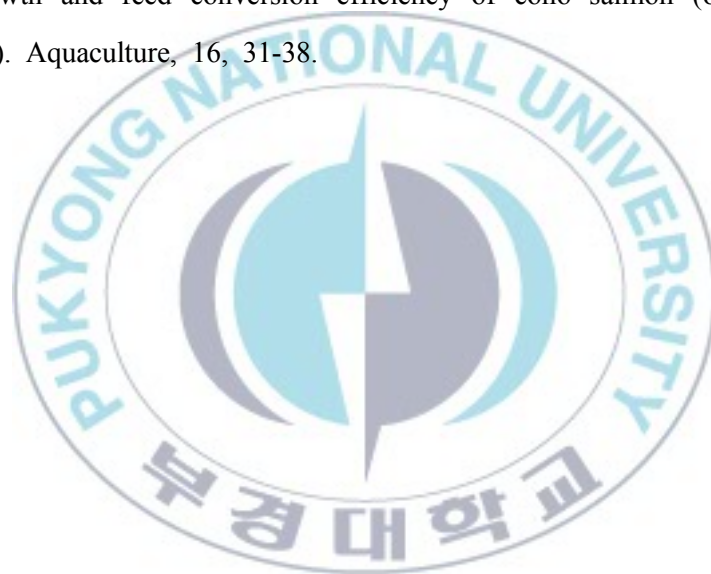


Table 10. Composition of the experimental diets (% of dry matter basis)¹

Ingredients	Diets						
	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆	D ₇
DFBFM ^{2*}	59.0	59.0	59.0	59.0	59.0	59.0	59.0
Blood meal ³	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Corn starch ⁴	10.4	10.5	10.6	10.5	10.5	10.5	11.4
Wheat meal ⁵	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Coconut oil ⁶	9.6	7.9	7.9	8.0	8.1	8.0	7.0
Corn oil ⁷	-	0.7	0.3	0.1	-	-	-
Linseed oil ⁸	-	0.9	1.2	1.4	-	-	-
ARA ⁹	-	-	-	-	0.4	0.9	1.3
EPA ¹⁰	-	-	-	-	0.5	0.3	0.2
DHA ¹¹	-	-	-	-	0.5	0.3	0.2
Vitamin mixture ¹²	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Mineral mixture ¹³	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Proximate analysis							
Moisture (%)	8.3	7.8	7.3	7.5	7.5	7.5	7.6
Crude protein (% DM)	51.6	52.8	52.3	52.2	52.5	52.6	52.1
Crude lipid (% DM)	9.4	9.4	9.2	9.3	9.4	9.3	9.3
Crude ash (% DM)	9.3	9.2	9.3	9.1	9.2	9.2	9.2

¹ Ingredients information and formulation method are explained in Kim and Bai (1997).

^{2,4} Su Hyup Feed Co., Uiryeong, Korea; *De-fatted brown fish meal.

³ Il Shin feed Co., Hampyeong, Korea

⁵ Young Nam Flour Mills Co., Busan, Korea

^{6,7,8} Dong Suh Oil & Fats Co., Changwon, Korea

⁹ ARA: arachidonic acid triacylglycerol (40% purity). Martek, USA.

¹⁰ EPA: eicosa-pentaenoic acid ethyl ester (95% purity). Itochu Techno-Chemical Inc, Japan.

¹¹ DHA: docosahexaenoic acid ethyl ester (95% purity). Itochu Techno-Chemical Inc, Japan.

¹² Contains (as mg/kg in diets): Ascorbic acid, 300; dl-Calcium pantothenate, 150; Choline bitartrate, 3000; Inositol, 150; Menadione, 6; Niacin, 150; Pyridoxine · HCl, 15; Riboflavin, 30; Thiamine mononitrate, 15; dl- α -Tocopherol acetate, 201; Retinyl acetate, 6; Biotin, 1.5; Folic acid, 5.4; B₁₂, 0.06.

¹³ Contains (as mg/kg in diets): NaCl, 437.4; MgSO₄ · 7H₂O, 1379.8; NaH₂P₄ · 2H₂O, 877.8; Ca(H₂PO₄)₂ · 2H₂O, 1366.7; KH₂PO₄, 2414; ZnSO₄ · 7H₂O, 226.4; Fe-Citrate, 299; Ca-lactate, 3004; MnSO₄, 0.016; FeSO₄, 0.0378; CuSO₄, 0.00033; Calcium iodate, 0.0006; MgO, 0.00135; NaSeO₃, 0.00025.

Table 11. Effects of feeding experimental diets on growth performance of juvenile eel fed seven different experimental diet for 16 weeks¹

	WG ²	SGR ³	FE ⁴	PER ⁵
	(%)			
D ₁ : control	30.34 ^f	0.31 ^f	23.50 ^d	0.47 ^d
D ₂ : LA _{0.5} -LNA _{0.5}	44.72 ^{ab}	0.43 ^{ab}	33.40 ^a	0.67 ^a
D ₃ : LA _{0.35} -LNA _{0.65}	47.14 ^a	0.45 ^a	35.67 ^a	0.71 ^a
D ₄ : LA _{0.25} -LNA _{0.75}	42.40 ^{bc}	0.42 ^{bc}	32.19 ^{ab}	0.64 ^{ab}
D ₅ : AA _{0.25} -EPA _{0.375} -DHA _{0.375}	38.62 ^e	0.38 ^e	26.82 ^{cd}	0.54 ^{cd}
D ₆ : AA _{0.5} -EPA _{0.25} -DHA _{0.25}	39.24 ^{de}	0.39 ^{de}	28.16 ^c	0.56 ^c
D ₇ : AA _{0.75} -EPA _{0.125} -DHA _{0.125}	41.28 ^{cd}	0.41 ^{cd}	29.43 ^{bc}	0.59 ^{bc}
Pooled SEM ⁶	1.12	0.01	0.86	0.02

¹ Means of single groups; Values in the same row with different superscripts are not significantly different ($P < 0.05$).

² Weight gain (%): [(final wt. - initial wt.) / initial wt.] $\times$ 100.

³ Feed efficiency (%): (wet wt. gain / dry feed intake) $\times$ 100.

⁴ Specific growth rate (%): $[(\log_e \text{ final wt.} - \log_e \text{ initial wt.}) / \text{days}] \times 100$.

⁵ Protein efficiency ratio (%): wet wt. gain / protein intake.

⁶ Pooled standard error of mean: $SD/\sqrt{n}$.

Table 12. Serological characteristics of juvenile eel fed seven different experimental diet for 16 weeks¹

	Diets							Pooled ⁷
	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆	D ₇	SEM
PCV (%) ²	25 ^d	26 ^{cd}	27 ^{cd}	28 ^{bc}	32 ^a	25 ^d	30 ^{ab}	0.53
Hb (g/100ml) ³	9.9	10.1	10.5	11.6	10.7	9.5	10.4	0.14
AST (IU/L) ⁴	90 ^{ab}	84 ^{ab}	49 ^c	71 ^{bc}	91 ^{ab}	90 ^{ab}	106 ^a	3.76
ALT (IU/L) ⁵	12	10	8	10	10	10	10	0.25
TP (g/dl) ⁶	2.9	3.3	3.4	3.4	3.2	3.7	3.1	0.05
Glocuse (mg/dl)	107 ^a	70 ^b	58 ^b	63 ^b	120 ^a	79 ^b	78 ^b	4.77

¹ Means of single groups; Values in the same row with different superscripts are not significantly different ($P < 0.05$).

² Hematocrit (%).

³ Hemoglobin (g/100ml).

⁴ AST: aspartate amino-transferase (IU/L).

⁵ ALT: alanine amino-transferase (IU/L).

⁶ TP: total protein (g/dl).

⁷ Pooled standard error of mean: $SD/\sqrt{n}$.

Table 13. Whole body proximate fatty acid composition of juvenile eel fed seven different experimental diet for 16 weeks¹

	Diets (% fatty acid) ¹							Pooled SEM
	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆	D ₇	
C10:0	0.15 ^a	0.07 ^{ab}	0.11 ^{ab}	0.08 ^{ab}	0.03 ^{ab}	nd	0.12 ^a	0.02
C11:0	nd ²	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.16
C12:0	3.25 ^a	2.10 ^b	2.69 ^{ab}	2.65 ^{ab}	2.12 ^b	0.61 ^c	3.16 ^a	0.30
C13:0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.00
C14:0	6.54 ^a	5.04 ^{cd}	6.08 ^{ab}	5.56 ^{bc}	5.41 ^{bcd}	4.52 ^d	5.91 ^{abc}	0.43
C15:0	0.29 ^{ab}	0.27 ^{bc}	0.32 ^a	0.28 ^b	0.31 ^a	0.29 ^{ab}	0.27 ^b	0.02
C16:0	19.6 ^{abc}	18.9 ^c	20.6 ^a	19.8 ^{abc}	20.2 ^{ab}	19.8 ^{abc}	19.3 ^{bc}	0.89
C17:0	0.19	0.21	0.12	0.11	0.14	0.11	0.19	0.02
C18:0	3.45 ^b	3.86 ^a	3.87 ^a	3.79 ^a	3.50 ^b	3.92 ^a	3.52 ^b	2.89
C20:0	0.09	0.13	0.06	0.09	0.11	0.06	0.11	0.17
C21:0	0.73 ^a	0.71 ^{ab}	0.69 ^{ab}	0.63 ^{ab}	0.70 ^{ab}	0.59 ^b	0.71 ^{ab}	0.05
C22:0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.01	0.02
C23:0	0.20	0.14	0.13	0.25	0.21	0.14	0.13	0.13
C24:0	1.89	1.99	1.78	1.74	1.99	2.02	1.88	0.16
SFA	38.38	33.42 ^{bc}	36.45	34.98	34.72	32.06	35.31	
C14:1	0.19 ^a	0.15 ^{bc}	0.17 ^b	0.16 ^b	0.17 ^{ab}	0.13 ^c	0.18 ^{ab}	0.01
C15:1	0.11	0.04	0.02	0.04	0.05	0.05	0.05	1.47
C16:1	7.19	6.59	7.06	6.89	7.38	6.95	7.03	0.49
C17:1	0.24	0.29	0.25	0.20	0.21	0.25	0.25	0.23
C18:1	43.6 ^b	44.9 ^b	42.1 ^c	44.2 ^b	44.2 ^b	46.6 ^a	43.6 ^b	2.92
C20:1	2.71 ^{ab}	2.94 ^a	2.43 ^b	2.61 ^{ab}	2.53 ^b	2.61 ^{ab}	2.51 ^b	0.18
C22:1	0.17	0.18	0.14	0.20	0.19	0.21	0.15	0.02
Monoene	54.2 ^{bc}	55.1 ^b	52.2 ^d	54.3	54.73	56.8 ^a	53.77	
C18:2n9c	3.19 ^c	4.08 ^a	4.18 ^a	3.47 ^b	3.62 ^b	3.69 ^b	3.64 ^b	0.28
C18:2n9t	nd	nd	nd	nd	nd	0.02	nd	0.00
C18:3n6,9,12c	0.05	0.03	0.11	0.43	0.05	0.03	0.04	0.06
C18:3n9,12,15c	0.33 ^{cd}	0.51 ^a	0.46 ^{ab}	0.45 ^{ab}	0.41 ^{bc}	0.31 ^d	0.28 ^d	0.03
C20:2	0.29	0.33	0.31	0.28	0.24	0.29	0.27	0.01
C20:3	0.21 ^{bc}	0.26 ^a	0.24 ^{ab}	0.20 ^c	0.19 ^c	0.18 ^c	0.25 ^a	0.03
C20:4	nd	0.08	0.04	nd	0.04	0.03	0.03	0.10
C20:5	1.25 ^c	1.51 ^{ab}	1.47 ^{ab}	1.37 ^{bc}	1.58 ^a	1.56 ^a	1.45 ^{ab}	0.11
C22:2	0.04	0.07	nd	nd	nd	nd	0.07	0.02
C22:6	4.05 ^c	4.67 ^{ab}	4.56 ^{abc}	4.49 ^{abc}	4.38 ^{bc}	4.99 ^a	4.90 ^{ab}	0.34
Polyene	9.41	11.54	11.37	10.69	10.51	11.1 ^a	10.93	
PUFA/SFA	0.26 ^b	0.35 ^a	0.31 ^a	0.31 ^{ab}	0.30 ^{ab}	0.35 ^a	0.31 ^{ab}	
DHA/EPA	3.24 ^b	3.09 ^c	3.11 ^c	3.28 ^b	2.77 ^d	3.21 ^b	3.38 ^a	

¹Means of single groups: Values in the same row with different superscripts are not significantly different ($P<0.05$); ²nd: not detected.

제 3절 아라키돈산의 필수성과 적정 요구량 평가

1. 서론

ω -6계열의 고도 불포화 지방산(highly unsaturated fatty acids, HUFA)에 속하는 아라키돈산(arachidonic acid, ARA; 20:4n-6)은 생체막의 구성 성분으로서 뿐만 아니라 prostaglandins, thromboxanes 및 leukotrienes과 같은 eicosanoids의 주된 전구물질로서 생체내에서 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다(Sargent, 1999). ARA는 치어기 turbot의 정상적인 성장 및 생존을 위한 필수지방산으로 보고되었고(Castell et al., 1994), European sea bass의 성장과 번식에 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 바 있으며(Bruce et al., 1999), gilthead sea bream 자어의 성장 및 생존을 향상(Bessonart et al., 1999)과 스트레스에 대한 저항성 증대에 효과적인 것으로 보고된 바 있다(Koven et al., 2001). 한편, ARA는 대사작용을 통해 성숙과 성호르몬 합성에 관련하는 것으로 알려져 있고, 특히 이를 통해 합성되는 prostaglandins는 어류의 배란 및 산란유도에 작용하여(Sargent et al., 1995) 번식과 난발달에 영향을 미치는 것으로 보고된 바(Abayasekara and Wathes, 1999)있고, Atlantic salmon에서 해수 순화 기간 동안 삼투압 조절에도 관여하는 것으로 보고되고 있어(Bell et al., 1997; Tocher et al., 2000) prostaglandins의 전구물질인 ARA는 뱀장어와 같은 회유성 어류의 성장과 번식률 향상에 중요한 요인으로 작용할 수 있을 것으로 판단된다.

따라서 본 연구에서는 치어기 뱀장어를 대상으로 ARA를 사료 내 수준별로 첨가하여 성장과 체조성에 미치는 영향을 확인하여 적정 요구량을 평가하고, 그 이용성을 확인함으로써 향후 뱀장어 친어의 번식률 향상 및 부화자어의 사육을 위한 기초자료로 활용하고자 한다.

2. 재료 및 방법

1) 실험어 및 사육관리

실험어는 국립수산물과학원 남부 내수면 연구소에서 사육한 뱀장어 치어를 1 ton FRP 수조에서 대조구 사료를 공급하여 실험환경에 적응할 수 있도록 4주간 예비사육을 실시하였다. 이후, 평균 27 ± 0.5 g (mean $\pm$ SD)인 뱀장어 치어를 100 L FRP 원형수조에 20마리씩 3반복으로 실험구별로 무작위 배치하여 총 10주간 사육실험을 진행하였다. 실험기간 동안 평균 수온은 25 ± 1 °C를 유지하였고 에어레이션을 통해 충분한 산소를 공급하였다. 일일 사료공급량은 전 실험기간 동안 체중 당 3~4%를 일일 2회(09:00, 17:00) 공급하였다. 사료공급 30~60분 후 남은 사료는 수거하여 -20°C에서 보관하였고, 실험종료 후 건중량을 사료효율 측정에 이용하였다.

2) 실험사료 및 실험설계

본 실험에 사용된 실험사료의 조성과 일반성분 분석결과는 Table 14에 나타내었다. 실험사료의 단백질원으로 탈지어분(defatted fish meal), casein (vitamin-free), 그리고 gelatine을 사용하였고, 지질원으로는 어유와 대두유를 사용하였으며, 탄수화물원으로는 전분을 사용하여 조단백질 55%, 조지방 15% 및 가용에너지 18.3 kJ/g로 조절하였다. 사료 내 아라키돈산(arachidonic acid, ARA)의 적정 첨가수준을 확인하기 위하여 기초사료에 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2% (per kg diet, DM)를 각각 첨가(ARA₀, ARA_{0.2}, ARA_{0.4}, ARA_{0.6}, ARA_{0.8}, ARA_{1.2})하여 첨가 수준별 6가지 실험사료를 제작하였다. 첨가수준별 실험사료의 ARA 분석결과 사료 내 함량은 각각 0.07, 0.22, 0.43, 0.57, 0.78, 1.23%로 나타났다. 모든 실험사료는 원료를 혼합하여 펠렛기로 압출

성형하여 제조하였고(diameter 1 mm), 자연건조 시킨 다음 밀봉하여 -20℃에서 보관하면서 실험어에 공급하였다.

3) 어체측정

10주간의 사육실험 종료 후, 어체측정을 위해 실험어를 24시간 절식시킨 후 ethylene glycol phenyl ether 90% (200 ppm)로 마취시켜 수준별 실험어의 전체무게를 측정하였고, 이를 통해 증체율(weight gain, WG), 사료효율(feed efficiency, FE), 일간성장률(specific growth rate, SGR), 단백질전환효율(protein efficiency ratio, PER) 및 생존율을 조사하였다.

4) 일반성분 분석

일반성분은 실험사료와 전어체에 대해서 실시하였고, 전어체 분석을 위해 수조별로 10마리씩 무작위로 추출하여 분쇄한 전어체를 사용하였다. AOAC (1995)에 의해 수분은 상압 가열 건조법(125℃, 3시간), 조단백질은 Kjeldahl 질소 정량법(N×6.25) 그리고 조회분은 직접 회화법으로 각각 분석하였다. 또한, 조지방은 샘플을 12시간 동결 건조한 후 Soxtec system 1046 (Tacator AB, Sweden)을 사용하여 Soxhlet 추출법으로 분석하였다.

5) 지방산 분석

전어체의 지방산 분석에 있어 분쇄한 전어체에서 추출한 지방의 methylation은 Metcalfe et al. (1966)의 방법에 의해 ferries silica capillary column을 장착한 gas chromatography (Trace GC)에 의해 분석하였다. 캐리어 기체는 질소를 사용하였고, detection은 FID 모드를 사용하였으며 분석조건은 다음과 같다(Instrument: Trace GC gas chromatograph, column: quadrex, 30M, bonded carbowax 0.25 mm I.D × 0.25 μ m film, cat. No.:

007-CW-30-0.25F, injector temperature: 250℃, Detector temperature: 250℃, flow (gas press): 65 psi. helium, splite: 1:50). 도출된 크로마토그램은 분석 프로그램인 peak sample (Maestro, Chrompack)에 의해 분석하였다.

6) 통계처리

모든 자료의 통계처리는 SPSS (Analytical Software, SPSS 10.0)로 분산분석(ANOVA test) 후, 최소유의차검정(LSD: least significant difference)으로 평균간의 유의성($P<0.05$)을 검정하였다. 사료내 ARA의 적정 요구량은 broken-line model을 통해 결정하였다.

3. 결과 및 고찰

10주간 뱀장어 치어에 6가지 수준의 아라키돈산 첨가사료를 공급한 성장 결과를 Table 15에 나타내었다. 증체율(WG)에 있어서 $ARA_{0.8}$ 그리고 $ARA_{1.2}$ 실험구는 대조구, $ARA_{0.2}$ 그리고 $ARA_{0.4}$ 실험구에 비해 유의하게 높은 반면($P<0.05$), $ARA_{0.6}$ 실험구와는 유의한 차이가 없었다($P>0.05$). 또한, $ARA_{0.6}$ 실험구는 대조구와 $ARA_{0.2}$ 실험구에 비해 유의하게 높은 반면($P<0.05$), $ARA_{0.4}$ 실험구와는 유의한 차이가 없었다($P>0.05$). 일간성장률(SGR)에 있어 $ARA_{0.8}$ 실험구는 대조구, $ARA_{0.2}$ 그리고 $ARA_{0.4}$ 실험구에 비해 유의하게 높은 반면($P<0.05$), $ARA_{0.6}$ 그리고 $ARA_{1.2}$ 실험구와는 비해 유의한 차이가 없었다($P>0.05$). 사료효율(FER)에 있어서 $ARA_{0.8}$ 그리고 $ARA_{1.2}$ 실험구는 대조구, $ARA_{0.2}$ 그리고 $ARA_{0.4}$ 실험구에 비해 유의하게 높은 반면($P<0.05$), $ARA_{0.6}$ 실험구와는 유의한 차이가 없었다($P>0.05$). 또한, $ARA_{0.6}$ 실험구는 대조구와 $ARA_{0.2}$ 실험구에 비해 유의하게 높은 반면($P<0.05$), $ARA_{0.4}$ 실험구와는 유의한 차이가 없었다($P>0.05$). 한편, 각 실험

구별 생존율은 91.7~96.7%로 사료내 아라키돈산의 수준별 첨가에 따른 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다($P>0.05$).

뱀장어(Japanese eel, *Anguilla japonica*)는 필수지방산으로 α -lenolenic acid (LNA, 18:3n-3)와 linoleic acid (LA, 18:2n-6)를 각각 0.5% 씩 요구하는 것으로 알려져 있다(Takeuchi, 1980). 한편, Furuita et al. (2007)는 평균 566 g 뱀장어, *A. japonica*에 있어 사료내 7%의 지질원을 n-3으로 대구어유(pollack oil)를 첨가한 실험구는 n-6원으로 대두유(corn oil)와 대구어유와 대두유를 혼합 첨가한 실험구에 비해 성장률이 낮았으나 유의한 차이는 없었으며, 특히 간과 난소에 축적된 ARA의 함량이 EPA와 DHA에 비해 유의하게 높게 나타났다음을 보고하였다. 상기의 결과에 의하면 뱀장어는 치어 뿐만 아니라 성어(500 g 이상의 친어용)도 성장과 번식을 위해 n-6 계열의 지방산, 특히 ARA를 요구하고 성장 단계별 적정 요구량을 구명하여 사료에 첨가해 주어야 될 것으로 판단된다.

본 연구에서 증체율에 대한 broken-line model 분석결과, 치어기 뱀장어의 사료내 ARA의 적정 첨가수준은 0.63%로 나타났다(Fig. 23). 이러한 결과는 사료 내 ARA를 0.6%를 요구하는 Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*의 결과(Furuita et al., 2003)와는 유사한 것으로 나타났지만, 0.78%를 요구하는 치어기 turbot, *Scophthalmus maximus*의 결과(Castell et al., 1994)와 1%를 요구하는 gilthead sea bream, *Sparus aurata* 자어의 결과(Bessonart et al., 1999)에 비해서 낮은 것으로 확인되었다. 치어기 turbot, *S. maximus*에 있어 ARA 첨가구가 DHA 단독 혹은 ARA와 복합 첨가구에 비해 성장률과 생존율이 유의하게 높았고, 특히 DHA 단독 첨가구의 성장률과 생존율이 가장 낮은 것으로 확인되었으며 이를 통해 turbot, *S. maximus*은 필수지방산으로 ARA를 요구하는 것으로 구명된 바 있다(Castell et al., 1994). Gilthead sea bream, *S. aurata* 자어에 있어 사료 내 ARA를 1% 첨가 시 성장이 증대되

었고, 1.8% 첨가 시 생존율이 향상 될 수 있음이 보고된 바 있다(Bessonart et al., 1999). Koven et al. (2001)은 gilthead sea bream 자어에 ARA를 강화한 로티퍼를 공급 시 대조구에 비해 폐사율이 유의하게 감소하였음을 보고하였다. 이러한 결과는 외부적으로 스트레스를 받으면 시상하부-뇌하수체 신경축에서 합성 및 분비되는 cortisol은 ARA에 의해 합성된 prostaglandins에 의해 중화 및 제거됨에 따라 폐사율이 감소한 것으로 보고하고 있다.

한편, Atlantic salmon에 있어 담수에서 해수로 순치(smoltification)하는 과정에서 체내 ARA 함량이 증대됨을 보고하였고(Bell et al., 1997; Tocher et al., 2000), ARA는 어류의 삼투압 조절에도 중요한 요인으로 작용하는 것으로 밝혀졌으나 ARA이 직접적으로 작용하는 것은 아니고 아가미 세포에서 ARA에 의해 합성되는 prostaglandins ($\text{PGE}_{2\alpha}$)에 의한 것으로 보고되고 있다(Mustafa and Srivastava, 1989). 따라서 담수에서 성장하여 산란을 위해 해양으로 회유하는 뱀장어 역시 삼투압 조절 및 체내 항상성 유지를 위해 ARA이 중요한 작용을 할 것으로 판단되며, 향후 해수순화 및 성숙속 유도에 따른 ARA의 작용기구에 관한 연구가 수반되어야 할 것으로 판단된다.

10주간 6가지 수준별 ARA 첨가사료를 공급한 뱀장어의 전어체 내 지방산의 분석결과를 Table 17에 나타내었다. 각 실험구별 전어체 내 ARA 함량은 사료내 ARA의 첨가수준에 따라 유의하게 증가하는 경향을 나타내었으며, 특히 $\text{ARA}_{1.2}$ 실험구는 나머지 모든 실험구들에 비해 유의하게 높았다($P<0.05$). 또한, $\text{ARA}_{0.6}$ 과 $\text{ARA}_{0.8}$ 실험구는 대조구와 $\text{ARA}_{0.2}$ 그리고 $\text{ARA}_{0.4}$ 실험구들에 비해 유의하게 높은 반면($P<0.05$), 이들 두 개의 실험구는 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다($P>0.05$). 이러한 결과는 성장과 사료효율이 높은 실험구일수록 어체 내 ARA 함량 역시 높게 나타났으며, 사육실험 기간 동안 사료를 통해 뱀장어에 공급된 ARA이 체내에서 효과적으로 이용된 것으로 판단된다.

본 실험에서 증체율과 사료효율에 대한 broken-line model 분석 결과, 뱀장어 치어의 성장과 사료효율 향상을 위한 사료 내 아라키돈산의 적정 첨가수준은 0.63% 보다는 높아야 하지만 0.71% 수준이면 충분할 것으로 판단된다. 또한 뱀장어의 필수지방산으로 알려져 있는 α -linolenic acid (18:3n-3) 그리고 linoleic acid (18:2n-6)와 함께 중요한 지방산으로 작용할 수 있을 것으로 생각되며, 향후 아라키돈산의 필수지방산으로써의 이용성에 관한 세부연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

4. 참고문헌

- Abayasekara, D. R. E. and D. C. Wathes, 1999. Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 61, 275-287.
- Bell, J. G., D. R. Tocher, B. M. Farndale, D. I. Cox, R. W. McKinney and J. R. Sargent, 1997. The effect of dietary lipid on polyunsaturated fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) undergoing parr-smolt transformation. Lipids, 32, 515-525.
- Bessonart, M., M. S. Izquierdo, M. Salhi, C. M. Hernandez-Cruz, M. M. Gonzalez and H. Fernandez-Palacios, 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and fatty acid composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. Aquaculture, 179, 265-275.
- Bruce, M., F. Oyen, G. Bell, J. F. Asturiano, B. Farndale, M. Carrillo, S. Zanuy, J. Ramos and N. Bromage, 1999. Development of broodstock diets for the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) with special

- emphasis on the importance of n-3 and n-6 highly unsaturated fatty acid to reproductive performance. *Aquaculture*, 177, 85-97.
- Castell, J. D., J. G. Bell, D. R. Tocher and J. R. Sargent, 1994. Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 128, 315-333.
- Furuita, H., T. Yamamoto, T. Shima, N. Suzuki and T. Takeuchi, 2003. Effect of arachidonic acid levels in broodstock diet on larval and egg quality of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 220, 725-735.
- Furuita, H., K. Hori, Suzuki, T. Sugita and T. Yamamoto, 2007. Effect of n-3 and n-6 fatty acids in broodstock diet on reproduction and fatty acid composition of broodstock and eggs in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 267, 55-61.
- Koven, W., Y. Barr, S. Lutzky, I. B. R. Weiss, M. Harel, P. Behrens and A. Tandler, 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, 193, 107-122.
- Mustafa, T. and K. C. Srivastava, 1989. Prostaglandins (eicosanoids) and their role in ectothermic organisms. *Adv. Comp. Environ. Physiol.*, 5, 157-207.
- Sargent, J. R., J. G. Bell, M. V. Bell, R. J. Henderson and D. R. Tocher, 1995. Requirement criteria for essential fatty acids. *J. Appl. Ichthyol.*, 11, 183-198.
- Sargent, J. R., G. Bell, L. McEvoy, D. Tocher and A. Estevez, 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, 177, 191-199.

- Takeuchi, T., S. Arai, T. Watanabe, and Y. Shimma, 1980. Requirement of eel *Anguilla japonica* for essential fatty acids. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 46, 345-353.
- Tocher, D. R., J. G. Bell, J. R. Dick, R. J. Henderson, F. McGhee, D. Mitchell and P. C. Morris, 2000. Polyunsaturated fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) undergoing parr. smolt transformation and the effects of dietary linseed and rapeseed oils. Fish Phys. Biochem., 23, 59-73.



Table 14. Composition and proximate analysis of the basal diets for juvenile eel (% of dry matter basis)

	% in diet
Ingredients	
Fish meal (defatted) ¹	51.6
Casein (vitamin-free) ²	11.4
Gelatine ²	3.0
Corn starch ¹	16.0
Fish oil ³	3.0
Soy bean oil ⁴	6.0
Arachidonic acid ⁵	0
Ethyl oleate ²	6.0
Other ingredients ⁶	2.0
Proximate analysis (% of dry matter basis)	
Moisture	12.5
Crude protein	54.7
Crude lipid	14.5
Crude ash	9.9

¹ Provided by A-Bank Co., Ltd. Seoul, Korea.

² United States Biochemical (USB), Cleveland, Ohio.

³ Provided Ehwa fat industry Co. Ltd., Busan, Korea.

⁴ Dong Suh Oil & Fats, Changwon, Korea.

⁵ Provided by DSM Nutritional Production, 41.3 % in fatty acid.

⁶ Other ingredients: 1% vitamin pre-mixture, 1% mineral premix (Bae et al., 2004).

Table 15. Growth performance and survival of juvenile eel fed the diets containing different ARA levels for 10 weeks¹

	Experimental diets ²						Pooled SEM ⁶
	ARA ₀	ARA _{0.2}	ARA _{0.4}	ARA _{0.6}	ARA _{0.8}	ARA _{1.2}	
Initial wt. (g)	27.3	27.5	27.4	27.6	27.4	27.6	0.05
Final wt. (g)	59.2	61.9	67.2	75.7	80.6	78.2	2.11
WG (%) ³	117.0 ^c	125.1 ^c	145.2 ^{bc}	174.7 ^{ab}	194.1 ^a	183.4 ^a	7.58
SGR (%) ⁴	1.55 ^c	1.62 ^c	1.79 ^{bc}	20.2 ^{ab}	2.16 ^a	2.08 ^{ab}	0.06
FER (%) ⁵	46.8 ^c	50.1 ^c	58.1 ^{bc}	69.6 ^{ab}	77.6 ^a	73.4 ^a	3.03
Survival (%)	91.7	95.0	96.7	96.7	93.3	91.7	1.09

¹ Values are means of triplicate groups, values in the same row not sharing a common superscript are significantly different ($P < 0.05$).

² Diets: Control group 0% (ARA₀), 0.2% (ARA_{0.2}), 0.4% (ARA_{0.4}), 0.6% (ARA_{0.6}), 0.8% (ARA_{0.8}), 1.2% (ARA_{1.2}) in diets.

³ Weight gain: $[(\text{final body weight} - \text{initial body weight}) / \text{initial weight}] \times 100$.

⁴ Specific growth rate: $[(\ln(\text{final weight} - \text{initial weight}) / \text{days})] \times 100$.

⁵ Feed efficiency ratio: $(\text{wet weight gain} / \text{dry feed intake}) \times 100$.

⁶ Pooled standard error of mean: $SD/\sqrt{n}$.

Table 16. Fatty acid composition of the experimental six diets¹ (% of total fatty acids)

Fatty acids	Experimental diets ²						Pooled SEM ³
	ARA ₀	ARA _{0.2}	ARA _{0.4}	ARA _{0.6}	ARA _{0.8}	ARA _{1.2}	
C14:0	1.03	1.14	1.03	1.06	1.12	1.02	0.05
C15:0	0.11	0.12	0.12	0.12	0.13	0.12	0.01
C16:0	13.48	12.76	13.15	13.21	13.29	13.38	0.25
C16:1n-7	1.55	1.57	1.52	1.48	1.57	1.24	0.13
C17:0	0.37	0.32	0.37	0.37	0.38	0.32	0.03
C18:0	4.40	4.41	4.69	4.81	4.96	5.37	0.37
C18:1n-9	25.31	25.33	24.27	24.37	24.06	22.83	0.93
C18:2n-6	4.14	4.27	3.82	3.77	3.58	3.64	0.28
C18:3n-3	38.38	39.72	37.29	37.20	35.21	35.33	1.74
C18:3n-6	0.00	0.11	0.20	0.26	0.36	0.58	0.20
C20:0	0.35	0.37	0.37	0.39	0.40	0.45	0.04
C20:1n-11	0.90	0.88	0.91	0.86	0.93	0.80	0.04
C20:2n-6	0.14	0.15	0.17	0.17	0.19	0.20	0.03
C20:3n-6	0.00	0.14	0.26	0.35	0.48	0.77	0.27
C20:4n-6	0.42	1.39	2.72	3.59	4.89	7.71	2.62
C20:5n-3	3.26	2.61	3.18	2.77	2.86	2.04	0.44
C22:0	0.39	0.43	0.46	0.50	0.52	0.62	0.08
C22:1n-9	0.36	0.14	0.36	0.37	0.37	0.29	0.09
C23:0	0.13	0.12	0.13	0.12	0.13	0.08	0.02
C24:0	0.78	0.73	0.75	0.72	0.78	0.57	0.08
C22:6n-3	4.40	3.18	4.11	3.39	3.65	2.53	0.67
ΣSaturates	21.02	20.40	21.07	21.30	21.70	21.92	0.54
ΣMonoenes	28.12	27.92	27.05	27.08	26.93	25.16	1.05
Σn-3	11.80	10.06	11.11	9.93	10.10	8.20	1.22
Σn-6	38.93	41.50	40.64	41.57	41.13	44.60	1.85
Σn-9	25.67	25.47	24.62	24.74	24.43	23.12	0.91

¹Diets: Control group 0% (ARA₀), 0.2% (ARA_{0.2}), 0.4% (ARA_{0.4}), 0.6% (ARA_{0.6}), 0.8% (ARA_{0.8}), 1.2% (ARA_{1.2}) in diets.

²Pooled standard error of mean: SD/ $\sqrt{n}$.

Table 17. Whole body fatty acid composition of the juvenile eel fed the diets containing different ARA levels for 10 weeks (% of total fatty acids)

Fatty acids	Experimental diets ¹						Pooled SEM ²
	ARA ₀	ARA _{0.2}	ARA _{0.4}	ARA _{0.6}	ARA _{0.8}	ARA _{1.2}	
C14:0	3.34	3.14	2.99	2.73	3.04	2.81	0.09
C15:0	0.36	0.31	0.32	0.30	0.32	0.29	0.01
C16:0	18.75	19.67	18.65	18.41	19.31	18.66	0.19
C16:1n-7	5.70	5.86	5.83	4.92	5.43	5.18	0.16
C17:0	0.34	0.32	0.35	0.33	0.34	0.33	0.00
C18:0	3.60	3.71	3.50	4.07	4.02	3.85	0.09
C18:1n-9	36.53	37.21	35.23	36.64	36.36	33.06	0.62
C18:2n-6	1.16 ^b	1.16 ^b	1.46 ^a	1.29 ^{ab}	1.27 ^{ab}	1.48 ^a	0.06
C18:3n-3	12.59 ^c	11.86 ^d	14.35 ^b	14.30 ^b	12.55 ^c	15.15 ^a	0.53
C18:3n-6	0.91 ^e	1.27 ^b	1.01 ^d	1.09 ^c	0.78 ^f	1.63 ^a	0.12
C20:0	0.15	0.16	0.17	0.15	0.18	0.18	0.01
C20:1n-11	1.97	1.72	1.65	1.51	1.87	1.49	0.08
C20:2n-6	0.67	0.62	0.74	0.77	0.80	0.73	0.03
C20:3n-6	0.89	0.72	1.22	1.11	0.97	1.09	0.07
C20:4n-6	1.24^e	1.52^d	1.79^c	2.02^b	1.97^b	3.46^a	0.32
C20:5n-3	1.87 ^a	1.86 ^a	1.64 ^b	1.55 ^b	1.57 ^b	1.66 ^b	0.06
C22:1n-9	0.33	0.28	0.27	0.22	0.27	0.26	0.01
C23:0	0.39	0.41	0.48	0.53	0.61	0.84	0.07
C24:0	1.50	1.43	1.36	1.39	1.42	1.32	0.03
C22:6n-3	7.39 ^a	6.50 ^b	6.65 ^b	6.42 ^b	6.65 ^b	6.30 ^b	0.16
ΣSaturates	28.43 ^b	29.15 ^a	27.82 ^c	27.90 ^{bc}	29.23 ^a	28.27 ^{bc}	0.25
ΣMonoenes	44.53 ^b	45.08 ^a	42.98 ^d	43.29 ^d	43.94 ^c	39.99 ^e	0.73
Σn-3	10.4 ^a	9.51 ^b	9.75 ^b	9.25 ^b	9.49 ^b	9.43 ^b	0.17
Σn-6	16.3 ^d	16.0 ^e	19.1 ^b	19.3 ^b	17.1 ^c	22.1 ^a	0.95
Σn-9	36.9 ^b	37.5 ^a	35.5 ^c	36.9 ^b	36.6 ^b	33.3 ^d	0.62

¹ Values are means of triplicate groups, values in the same row not sharing a common superscript are significantly different ($P<0.05$).

² Diets: Control group 0% (ARA₀), 0.2% (ARA_{0.2}), 0.4% (ARA_{0.4}), 0.6% (ARA_{0.6}), 0.8% (ARA_{0.8}), 1.2% (ARA_{1.2}) in diets.

³ Pooled standard error of mean: $SD/\sqrt{n}$.

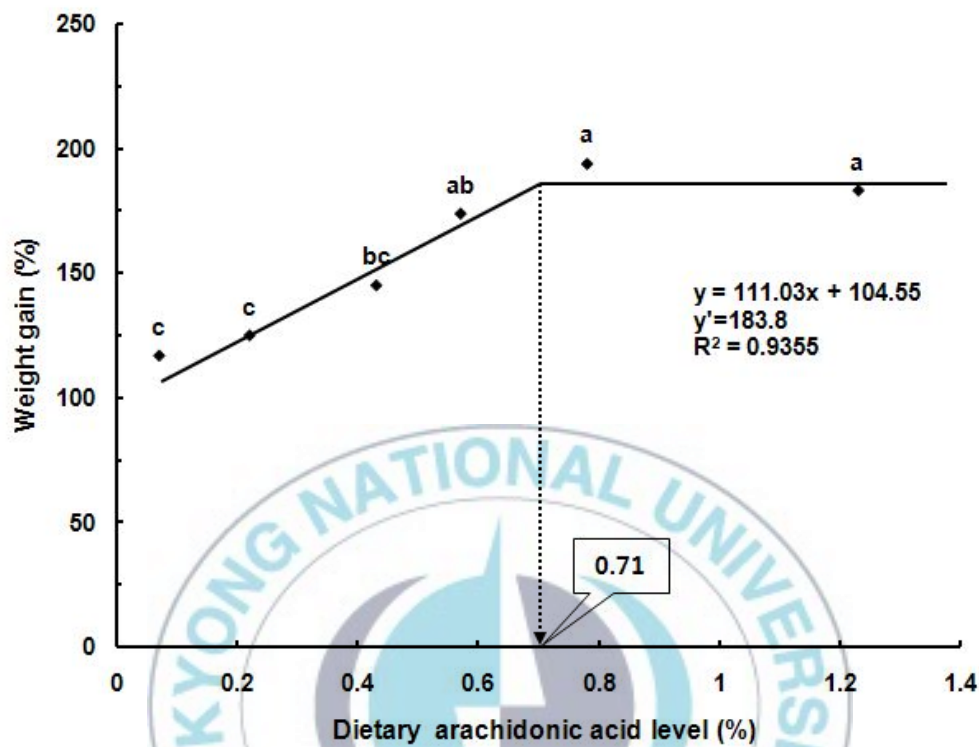


Fig. 23. Broken line analysis on weight gain of juvenile eel fed the diets containing different ARA levels for 10 weeks.

제 4절 항산화 비타민 C와 E의 적정 요구량 평가

1. 서론

Vitamin C (Ascorbic acid, $C_6H_8O_6$)는 수용성 비타민으로 식물과 동물에서 ascorbic acid (AA)와 dehydroascrobic acid (DHAA)의 두 가지 형태로 존재한다. Vitamin C는 생물의 정상적인 생명현상과 생산활동을 위해 반드시 필요한 필수 영양소(Tolbert, 1979)로 대부분의 척추동물에서는 L-gulonolactone oxidase에 의해 D-glucose로부터 체내에서 합성할 수 있지만, 무척추동물과 대부분의 어류에서는 합성되지 않기 때문에 외부로부터 공급해 주어야 하는 필수 영양소이다(Wilson, 1973; Fracalossi et al., 2001). Vitamin C는 collagen 형성에 중요한 hydroxuproline과 hydroxylysine을 합성하는 cofactor로 작용하여 골격형성에 필수적인 영양소이며, 철의 흡수를 도와 빈혈을 예방할 수 있다(Sato et al., 1982). 그리고 vitamin C는 vitamin E (α -tocopherol)와 selenium 등과 함께 체내에서 강력한 항산화제로 작용하여 glutathione 및 peroxidase superoxide의 활력을 유지하며, 어류의 번식현상에도 중요한 역할(Sandnes et al., 1984; Dabrowski and Ciereszko, 2001)을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, 기생충 및 세균 등에 대한 질병 저항성 증대가 channel catfish (Durve and Lovell, 1982; Li and Lovell, 1985), Atlantic salmon (Hardie et al., 1991), 그리고 rainbow trout (Navarre and Halver, 1989)에서 보고되고 있다. 특히, vitamin C는 정자의 형성과정 동안 정모세포가 지방산 축적에 따른 산화현상을 방지하는 항산화 기능에 의해 정자의 활성을 높여주고, 성호르몬 합성, 난황형성, 난질개선, 수정률 및 부화율 향상을 위한 중요한 영양소이다(Dabrowski et al., 1994; Dabrowski and Ciereszko,

2001; Lee and Dabrowski, 2004).

한편, Vitamin E는 지용성 비타민으로 생체막, 지단백질 그리고 지방 그리고 불포화지방산에 대한 강력한 항산화제로 작용하는 것으로 알려져 있다. Vitamin E는 자연계에 존재하는 8가지의 tocopherols를 총칭하는 화합물로 그 중 α -Tocopherol ($C_{29}H_{50}O_2$)의 활성이 가장 높으며, 일반적으로 DL- α -tocopheryl atetate (TA)를 양어사료에 첨가하고 있다. Vitamin E는 면역계에도 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 사료 내 vitamin E가 결핍된 사료를 섭취한 rainbow trout에서 phagocytotic indes와 B-cell 및 T-cell 반응 저하가 보고된 바 있다(Blazer and Wolke, 1984). 또한, vitamin E는 어류의 번식에 중요한 역할을 하는 영양소로 생식소 형성 및 발달, 난황형성, 배발생 단계, 자어의 부화 및 생존율 향상에 영향을 미치는 것으로 여러 어종에 대한 연구결과에서 보고된 바 있다(Takeuchi et al., 1981; Izquierdo et al., 2001; Lee and Dabrowski, 2004; Canyurt and Akhan). 어류의 체내에서 vitamin E는 수온과 사료 내 지질과 selenium 그리고 다른 항산화제의 함량 등에 의해 이용성이 달라질 수 있다. 이들 중 사료 내 지질의 함량, 특히 고도불포화지방산(highly unsaturated fatty acids, HUFA)의 함량에 의해 크게 영향을 받으며, 사료 내 HUFA의 함량이 높을수록 vitamin E의 요구량은 높아지는 것으로 나타났다(Schwartz et al., 1998; Roem et al., 1990; Lee, 1996). 이에 대해, 현재 뱀장어에 있어 vitamin C와 E의 효과에 관한 연구는 아주 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 치어기 뱀장어를 대상으로 vitamin C와 E를 각각 사료 내 수준별로 첨가하여 성장과 체조성에 미치는 영향을 확인하여 적정 요구량을 평가하고, 그 이용성을 확인함으로써 향후 뱀장어 친어의 번식률 향상 및 부화자어의 사육을 위한 기초자료로 활용하고자 한다.

2. 재료 및 방법

1) 실험어 및 사육관리

실험에 이용된 뱀장어 치어는 반죽사료로 사육된 전남 나주의 개인 양만장으로부터 2004년 9월 3일에 본 대학 양어장으로 수송하여 10톤 콘크리트 수조에 수용하였으며 실험 전 4주간 상업용 펠렛사료의 공급을 통해 펠렛 사료에 적응시키면서 예비사육을 실시하였다. 예비사육을 통해 평균무게 15 ± 0.3 g의 뱀장어 치어는 순환여과식 사육 시스템에 각 실험수조(60 L 사각수조)당 20마리씩 3반복으로 무작위 배치하였으며, 유수량은 4 L/min을 유지하였다. 사료는 어체중의 2-3%를 일일 2회 공급하였으며 오후의 사료 공급 1시간 후에 사이폰으로 바닥청소를 실시하였다. 사료공급 시 유수를 중단하였다. 6주째에 성장양상을 확인하기 위하여 실험어의 총무게를 측정하였으며 사료공급량 역시 그에 따라 보정하여 공급하였다. 사육수온은 25 ± 1 °C를 유지하였으며 12주간 사육실험을 실시하였다.

2) 실험사료 및 실험설계

실험에 사용된 비타민 기초사료의 조성은 Table 18에 나타내었다. 기초사료는 단백원으로 defatted fish meal과 casein을 사용하였고, 탄수화물원으로는 wheat flour 와 corn starch, 지질원으로는 어유와 옥수수유를 각각 3.1%, 6.2% 첨가하여 조단백질 50%, 조지방 10% 및 가용에너지 19.8 kJ/g으로 조절하였다. 그리고 사료 내 vitamin C의 적정 첨가수준을 확인하기 위해 기초사료에 0 (control), 30, 60, 120, 1200 mg L-Ascorbyl-2-monophosphate / kg diet (dry matter basis)의 5 가지 수준(AA₀, AA₃₀, AA₆₀, AA₁₂₀, AA₁₂₀₀)으로 첨가하였고, 첨가수준별 실험사료의 vitamin C 분석결과 사료 내 함량은 각각 0, 24, 52, 108, 1137 mg/kg으로 나타났다.

한편, 사료 내 vitamin E의 적정 수준을 확인하기 위해 기초사료에 0(control), 15, 30, 60, 120 mg DL- α -tocopheryl acetate (TA) / kg diet (dry matter basis)의 5가지 수준(TA₀, TA₁₅, TA₃₀, TA₆₀, TA₁₂₀)으로 첨가하였고, 첨가수준별 실험사료의 vitamin E 분석결과 사료 내 함량은 각각 1.2, 16.5, 31.7, 62.2, 118.5 mg/kg으로 나타났다. 사료 섭취율을 높이기 위해 지질을 추출해 낸 탈지어분을 30%씩 첨가하여 pellet (직경: 1 mm)으로 성형하였다. 어분의 탈지방법은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 chloroform : methanol (2 : 1, v/v)혼합 용매를 시료에 3배가량 첨가하여 2회 이상 어분에 포함된 지질을 제거하였으며, 이를 건조시켜 mesh size가 1 mm인 sieve로 걸러 입자를 고르게 하여 사용하였다. 또한 사료의 pH 조절을 위해 NaOH를 사료 kg당 1.15 g씩 첨가하여 제조하였다.

3) 어체측정

어체측정은 실험개시 6주 및 실험 종료 시 측정하였으며, 성장률을 측정하기 위하여 24시간 절식시킨 후 ethylene glycol phenyl ether 90% (200ppm)로 마취시켜 어체중을 측정하였다. 실험종료 후, 증체율 (percent weight gain, %), 일간성장률(specific growth rate, %/day), 단백질효율(protein efficiency ratio, %), 사료효율(feed efficiency, %) 등을 측정하였다.

4) 성분분석

(1) 일반성분 분석

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

(2) Vitamin C 분석

Vitamin C 분석은 AOAC (1995) 방법에 따라 분석하였다. 분석할 시료 1g을 정확히 측정 후, HPO_3 9mL을 넣어 20분 정도 반응시킨다. 반응시킨 용액을 원심분리기 1000 rpm, 4℃에서 분리시킨 다음, 상층액을 분석용 시료로 사용한다. Vitamin C는 UV 감지기가 달린 HPLC로 분석하였으며, 용매는 0.1M KH_2PO_4 , 파장은 254 nm, 시료는 20 μm 를 주입하였다.

(3) Vitamin E 분석

시료를 0.5 g을 정확히 달고 50 mL 원심분리용 tube에 담은 다음 α -tocophenyl acetate (TA) 0.1g을 넣어준다. Ethanol 5 mL을 넣어 주고 vortex한 다음, 질소 충전한다. Water bath 80~90℃에서 30분 경과 후, 50% KOH 0.5mL 넣고, 다시 10분간 saponification한 다음, 10분 경과 후 즉시 얼음물에 넣어 냉각시킨다. 냉각 후 test tube에 hexane 5mL을 넣은 후, vortex한 다음, 4℃, 3000 rpm, 5분간 centrifuge에서 분리시킨다. 상층액(hexane층)을 Pasteur Pipettes으로 취해, 100 mL 분액여두에 옮긴다 (1번째). 다시 test tube에 hexane 5 mL 넣고 vortex후 centrifuge (4℃, 3000 rpm, 5분) 한다. 상층액(hexane층)을 Pasteur Pipettes으로 취해, 100 mL 분액여두에 옮긴다 (2번째). 다시 test tube에 hexane 5 mL 넣고 vortex후 centrifuge(4℃, 3000 rpm, 5분) 한다. 상층액(hexane층)을 Pasteur Pipettes으로 취해, 100 mL 분액여두에 옮긴다(3번째). 분액여두에 10% NaCl 5 mL을 넣어 흔든 후 10% NaCl 층은 버린다. 분액여두에 증류수 5 mL를 넣어 흔든 후 증류수 층은 버린다(2회 반복). 깔때기에 여과지(No.2 filter paper, diameter 10 mm)를 깔고, Na_2SO_4 를 적당량 담고, hexane층을 통과시키면서 50 mL test tube에 받는다. N_2 gas로 완전히 날려버린다. Isooctane 1 mL을 넣어 녹인 후 시료분석용 시료로 한다. 비타민 E 분석은 FLD 검출기가 장치된 HPLC로 분석하였다.

5) 통계처리

모든 자료의 통계처리는 Computer Program Statistix 3.1 (Analytical Software, St. Paul MN. USA)로 분산분석(ANOVA test)을 실시하여 최소유의차검정(LSD : Least Significant Difference)으로 평균간의 유의성($P<0.05$)을 검정하였다. 그리고, 증체량을 지표로 broken-line model을 이용하여 측정하였다(SAS procedure NLIN, 1985).

3. 결과 및 고찰

1) Vitamin C

12주간 뱀장어 치어에 5가지 수준의 vitamin C (AA) 첨가사료를 공급한 성장결과를 Table 19에 나타내었다. 증체율(WG)과 일간성장율(SGR)에 있어 AA₆₀과 AA₁₂₀실험구는 대조구에 비해 유의하게 높은 반면($P<0.05$), AA₃₀과 AA₁₂₀₀실험구와는 유의한 차이가 없었다($P>0.05$). 사료효율(FE)과 단백질 전환효율(PER) 역시 유사한 경향을 나타내었으며, AA₆₀실험구는 대조구에 비해 유의하게 높은 반면($P<0.05$), AA₃₀, AA₁₂₀ 그리고 AA₁₂₀₀실험구와는 유의한 차이가 없었다($P>0.05$).

증체율에 대한 broken-line model 분석결과, 치어기 뱀장어의 사료 내 AA의 적정 첨가수준은 38.1 mg/kg 으로 나타났다(Fig. 24). 상기의 결과에 의하면 사료 내 vitamin C를 11 mg/kg에서 25 mg/kg을 요구하는 channel catfish (Mustin and Lovell, 1992), rainbow trout (Cho and Cowey, 1993), hybrid striped bass (Sealey and Gatlin, 1999) and hybrid tilapia (Shiau and Hsu, 1999)에 비해 높게 요구하는 것으로 나타난 반면, 50 mg/kg을 요구하는 coho salmon (Halver et al., 1969)과는 유사한 것으로 나타났으며,

Korean rockfish 106 mg/kg (Wang et al., 2003a), parrot fish 118 mg/kg (Wang et al., 2003b), Japanese seabass 53.5 mg/kg (Ai et al., 2004), grouper 45.3 mg/kg (Lin and Shiau, 2005)에 비해서는 낮게 요구하는 것으로 확인되었다. 상기에 결과들에 의하면 어종별 vitamin C의 요구량은 상당한 차이를 보였으며, 특히 해산어류는 담수어류에 비해 월등히 높은 수준의 vitamin C를 요구하는 것으로 추측되나, 사료에 함유된 vitamin C의 종류, 어종, 크기, 사육기간 및 실험환경과 같은 여러 요인들 또한 각 어종별 요구량의 차이에 기인했을 것으로 판단된다.

실험사료를 섭취한 치어기 뱀장어의 전어체 조성에 대한 결과는 Table 21에 나타내었다. 전어체 내 일반성분에 있어서 수분함량(60.0~62.5%), 조회분 함량(3.0~3.5%), 조지방 함량(44.5~46.6%), 조단백질 함량(44.5~46.7%)은 사료 내 vitamin C의 첨가수준에 따른 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다($P>0.05$). 전어체 내 vitamin C의 함량은 대조구인 AA₀(4.98 mg/kg)에서 AA₁₂₀₀(6.05 mg/kg) 실험구까지 사료 내 vitamin C의 첨가수준이 증가함에 따라 증대되는 경향을 나타내었다.

Vitamin C는 온도, 습기, 공기 그리고 빛에 매우 불안정하기 때문에 펠렛 사료나 반죽사료 제조 시 약 30-40%의 손실이 발생할 수 있다(Lee, 1996). 따라서 vitamin C를 첨가한 사료의 공급에 의해 수행된 사육실험의 요구량은 펠렛사료의 제조 과정, 보관 및 사료공급 시 수중에서 용해 등의 여러 요인들을 감안한다면 더 높게 측정될 수 있을 것으로 판단된다.

증체율과 사료효율에 대한 broken-line model 분석결과, 뱀장어 치어의 성장과 사료효율 향상을 위한 사료 내 vitamin C의 적정 첨가수준은 24 mg/kg 보다는 높아야 하지만 38.1 mg/kg 수준이면 충분할 것으로 판단된다.

2) Vitamin E

12주간 뱀장어 치어에 5가지 수준의 vitamin E (TA) 첨가한 사료를 공급한 성장결과를 Table 20에 나타내었다. 증체율(WG), 사료효율(FE) 그리고 단백질전환효율(PER)에 있어서 TA₁₅실험구는 대조구, TA₆₀ 그리고 TA₁₂₀ 실험구에 비해 유의하게 높은 반면($P<0.05$), TA₃₀실험구와는 유의한 차이가 없었다($P>0.05$). 그리고 TA₃₀실험구는 대조구와 TA₁₂₀실험구에 비해 유의하게 높은 반면($P<0.05$), TA₆₀실험구와는 유의한 차이가 없었다($P>0.05$). 일간 성장율(SGR)에 있어서 TA₁₅실험구는 대조구, TA₆₀ 그리고 TA₁₂₀실험구에 비해 유의하게 높은 반면($P<0.05$), TA₃₀실험구와는 유의한 차이가 없었다($P>0.05$). TA₃₀실험구는 대조구에 비해 유의하게 높은 반면($P<0.05$), TA₆₀과 TA₁₂₀실험구와는 유의한 차이가 없었다($P>0.05$). 증체율에 대한 broken-line model 분석결과, 뱀장어 치어의 사료 내 TA의 적정 첨가수준은 12.8 mg/kg 으로 나타났다(Fig. 25).

이러한 결과는 blue tilapia 25 mg/kg (Roem et al., 1990), channel catfish 25-50 mg/kg (Murai and Andrews, 1974; Wilson et al., 1984), rainbow trout 25-100 mg/kg (Woodall et al., 1964; Hung et al., 1980; Watanabe et al., 1981; Cowey et al., 1983), salmon 30-50 mg/kg (Woodall et al., 1964; Halver, 1972; Lall et al., 1988), Korean rockfish 45 mg/kg (Bai and Lee, 1998), Nile tilapia 50-100 mg/kg (Satoh et al., 1987), common carp 100 mg/kg (Watanabe et al., 1970), yellowtail 119 mg/kg (Shimeno, 1991)와 같이 현재까지 알려진 주요 양식어종의 성장을 위한 vitamin E 적정 요구량에 비해 낮은 것으로 확인되었고, vitamin E는 수용성인 vitamin C와는 달리 담수어종과 해산 어종에 따른 차이나 온수성 어종과 냉수성 어종에 따른 차이 역시 없는 것으로 보여졌다. 그러나 뱀장어의 vitamin E 요구량이 다른 어종들에 비해 특히 낮게 나타난 이유는 다른 어종들에 관한 연구에 있어 사료내 주요 지

질원으로 사용한 어유에는 다량의 고도불포화지방산(highly unsaturated fatty acids, HUFA)이 함유되어 있고 사료 내 HUFA의 함량이 높을수록 vitamin E의 요구량은 높아진다는 결과가 보고된 바 있다(Schwartz et al., 1998; Roem et al., 1990; Lee, 1996). 그러나 본 실험에서는 뱀장어의 필수지방산인 α -linolenic acid (LNA, 18:3n-3)와 linoleic acid (LA, 18:2n-6)의 공급을 위해 식물유를 사료 내 지질원으로 이용했기 때문에 체내에서 다른 어종들에 비해 소량의 vitamin E를 효과적으로 이용되었을 것으로 판단된다. 또한, Shiau and Shiau (2001)는 hybrid tilapia에 있어 vitamin E의 적정 요구량은 사료 내 지질함량이 5% 일 때 40-44 mg/kg, 사료 내 지질함량이 12% 일 때 60-66 mg/kg를 요구하는 것으로 보고하였고, Lin and Shiau (2005)는 grouper에 있어 사료 내 지질함량이 4% 일 때 61-68 mg/kg, 사료 내 지질함량이 9% 일 때 104-115 mg/kg를 요구하는 것으로 보고하였다. 이에 대해 뱀장어의 사료에 함유되는 지질원의 종류에 따른 vitamin E의 이용성 및 요구량에 대한 연구가 수반되어야 할 것으로 판단된다.

실험사료를 섭취한 치어기 뱀장어의 전어체 조성에 대한 결과는 Table 22에 나타내었다. 전어체 내 일반성분에 있어서 수분함량(61.9~64.4%), 조회분 함량(2.3~2.9%), 조지방 함량(47.1~49.0%), 조단백질 함량(15.0~16.8%)은 이와 같은 범위를 나타내었으며, vitamin E 첨가수준에 따른 유의한 차이는 없었다($P>0.05$). 전어체 내 비타민 E의 함량은 대조구인 TA₀ (27.7 mg/kg)에서 TA₁₂₀ 실험구(36.4 mg/kg)까지 사료 내 vitamin E의 첨가농도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 나타내었다.

증체율과 사료효율을 토대로 한 broken-line model 분석결과, 뱀장어 치어의 성장과 사료효율 향상을 위한 사료 내 vitamin E의 적정 첨가수준은 12.8 mg/kg보다는 높아야 하지만 16.5 mg/kg 수준이면 충분할 것으로 판단된다. 본 실험의 결과를 바탕으로 항산화 vitamin C와 E의 혼합첨가에 따

른 상승효과에 관한 연구를 수행한다면 향후 사료영양학적 접근을 통한 배
장어 인공종묘생산에 관한 연구에 있어서 양질의 난을 확보하기 위한 친어
사육관리 프로그램과 부화 후 자·치어의 사육관리 프로그램 개발에 관한
연구에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 판단된다.

4. 참고문헌

- Ai, Q., K. Mai, C. Zhang, W. Xu, Q. Duan, B. Tan and Zhiguo Liufu, 2004.
Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese
seabass, *Lateolabrax japonicus*. Aquaculture, 242, 489-500.
- Bai, S. C. and K. J. Lee, 1998. Different levels of dietary DL- α -tocopheryl
acetate affect the vitamin E status of juvenile Korean rockfish, *Sebastes*
schlegelii. Aquaculture, 161, 405-414.
- Canyurt, M. A. and S. Akhan, 2008. Effect of dietary vitamin E on the sperm
quality of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquacult. Res., 39,
1014-1018.
- Cho, C. Y. and C. B. Cowey, 1993. Utilization of monophosphate esters of
ascorbic acid by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In: Kaushik, S. J.,
P. Luquet (Eds.), Fish Nutrition in Practice, Biarritz (France), Les
Colloques, vol. 61. INRA, Paris, pp. 149-156.
- Cowey, C. B., J. W. Adron and A. Youngson, 1983. The vitamin E
requirement of rainbow trout, *Salmo gairdneri* given diets containing
polyunsaturated fatty acids derived from fish oil. Aquaculture, 30, 85-93.
- Dabrowski, K. and A. Ciereszko, 2001. Ascorbic acid and reproduction in fish:

- endocrine regulation and gamete quality. *Aquacult. Res.*, 32, 1-19.
- Dabrowski, K., A. Ciereszko, L. Ramseyer, D. Culver and P. Kestemont, 1994. Effects of hormonal treatment on induced spermiation and ovulation in the yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquaculture*, 120, 171-180.
- Durve, V. S and R. T. Lovell, 1982. Vitamin C and disease resistance in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Can. J. Fish. Aquacult. Sci.*, 39, 948-951.
- Halver, J. E., 1972. The vitamins. In: Halver, J. E. Ed., *Fish Nutrition*. Academic Press, New York, pp. 29-103.
- Halver, J. E., L. M. Ashley and R. P. Smith, 1969. Ascorbic acid requirements of coho salmon and rainbow trout. *Trans Am. Fish. Soc.*, 90, 762-771.
- Hardie, L. J., T. C. Fletcher and C. J. Secombes, 1991. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture*, 95, 201-214.
- Hung, S. S. O., C. Y. Cho and S. J. Slinger, 1980. Measurement of oxidation in fish oil and its effect on vitamin E nutrition of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.*, 37, 1248-1253.
- Izquierdo, M. S., H. Fernandez-Palacios and A. G. J. Tacon, 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197, 25-42.
- Lall, S. P., G. Olivier, J. A. Hines and H. W. Fergusson, 1988. The role of vitamin E in nutrition and immune response of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Bull. Aquatic Assoc. Can.*, 88, 76-78.

- Lee, K. J. and K. Dabrowski, 2004. Long-term effects and interactions of dietary vitamins C and E on growth and reproduction of yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquaculture*, 230, 377-389.
- Lee, K. J., 1996. Studies on requirements of dietary vitamin C and E in Korean Rockfish, *Sebastes schlegeli*. MS thesis, Department of Fisheries Biology, Pukyong National University, Korea, 54 pp.
- Li, Y. and R. T. Lovell, 1985. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. *J. Nutr.*, 115, 123-131.
- Lin, M. F. and S. Y. Shiau, 2005. Dietary L-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*, 244, 215-221.
- Lin, Y. H. and S. Y. Shiau, 2005. Dietary vitamin E requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus* at two lipid levels, and their effects on immune responses. *Aquaculture*, 248, 235-244.
- Murai, T. and J. W. Andrews, 1974. Interactions of dietary α -tocopherol, oxidized menhaden oil and ethoxyquin on channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Nutr.*, 104, 1416-1431.
- Mustin, W. G. and R. T. Lovell, 1992. Na-L-Ascorbyl-2-monophosphate as a source of vitamin C for channel catfish. *Aquaculture*, 105, 95-105.
- Navarre, O. and J. E. Halver, 1989. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture*, 79, 207-221.
- Roem, A. J., C. C. Kohler and R. R. Stickney, 1990. Vitamin E requirements of the blue tilapia, *Oreochromis aureus* in relation to dietary lipid levels.

- Aquaculture 87, 155-164.
- Sandnes, K., T. Hansen, J. A. Killie and R. Waagbø, 1990. Ascorbate-2-sulfate as a dietary vitamin C source for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. growth, bioactivity, haematology and humoral immune response. Fish Physiol. Biochem., 8, 419-427.
- Sato, M., T. Kondo, R. Yashinaka and S. Ikeda, 1982. Effect of dietary ascorbic acid levels on collagen formation in rainbow trout. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 48, 553-556.
- Satoh, S., T. Takeuchi and T. Watanabe, 1987. Requirement of tilapia for α -tocopherol. Nippon Suisan Gakkaishi, 53, 119-124.
- Schwarz, F. J., M. Kirchgessner, H. Steinhart and G. Runge, 1998. Influence of different fats with varying additions of α -tocopherol acetate growth and body composition of carp, *Cyprinus carpio*. Aquaculture, 69, 57-67.
- Sealey, W. M. and D. M. Gatlin III, 1999. Dietary vitamin C requirement of hybrid striped bass *Morone chrysops* $\times$ *M. saxatilis*. J. World Aquac. Soc., 30, 297-301.
- Shiau, S. Y. and T. S. Hsu, 1999. Quantification of vitamin C requirement for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* $\times$ *O. aureus*, with L-ascorbyl-2-monophosphate-Na and L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg. Aquaculture, 175, 317-326.
- Shiau, S. Y. and L. F. Shiau, 2001. Re-evaluation of the vitamin E requirements of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus* $\times$ *O. aureus*). Anim. Sci., 72, 529-534.
- Shimeno, S., 1991. Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. (in) R. P. Wilson (Ed.),

- Handbook of Nutrient Requirements of Finfish. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 181-191.
- Takeuchi, M., S. Ishii and T. Ogiso, 1981. Effect of dietary vitamin E on growth, vitamin E distribution, and mortalities of the fertilized eggs and fry in ayu, *Plecoglossus altivelis*. Bull. Tokai Regional Fish. Res. Lab., 104, 111-122.
- Tolbert, B. M., 1979. Ascorbic acid metabolism and physiological function. Int. J. Vit. Nutr. Res. Suppl., 19, 127-142.
- Wang, X., K. W. Kim and S. C. Bai, 2003a. Comparison of L-ascorbyl-2-monophosphate-Ca with L-ascorbyl-2-monophosphate-Na / Ca on growth and tissue ascorbic acid concentrations in Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. Aquaculture, 225, 387-395.
- Wang, X., K. W. Kim, S. C. Bai, M. D. Huh and B. Y. Cho, 2003b. Effects of the different levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid changes in parrot fish, *Oplegnathus fasciatus*. Aquaculture, 215, 203-211.
- Watanabe, T., F. Takashima, C. Ogino and T. Hibiya, 1970. Requirements of young carp for α -tocopherol. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 36, 972-976.
- Watanabe, T., T. Takashima, M. Wada and R. Uehara, 1981. The relationship between dietary lipid levels and α -tocopherol requirement of rainbow trout. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 47, 1463-1471.
- Wilson, R. P., 1973. Absence of ascorbic acid synthesis in channel catfish, *Ictalurus punctatus* and blue catfish, *Ictalurus furcatus*. Comp. Biochem. Physiol., B46, 635-638.

- Wilson, R. P., P. R. Bowser and W. E. Poe, 1984. Dietary vitamin E requirement of fingerling channel catfish. J. Nutr., 114, 2053-2058.
- Woodall, A. N., L. M. Ashley, J. E. Halver, H. S. Olcott and J. Van Der Veen, 1964. Nutrition of salmonoid fishes: XIII. The α -tocopherol requirement of chinook salmon. J. Nutr., 84, 125-135.



Table 18. Composition of experimental diets

Ingredients	basal diet (% of dry matter)
Casein ¹	27.5
Defat fish meal ²	27.5
Wheat flour ³	11.3
Corn starch ³	16.0
Fish oil ⁴	3.1
Corn oil ⁵	6.2
Vitamin premix (vitamin C or E free) ⁶	3.0
Mineral premix ⁷	3.0
Carboxymethylcellulose ¹	2.4

¹ United States Biochemical, Cleveland, Ohio, USA.

² Han Chang Fishmeal Co., Pusan, Korea.

³ Young Nam Flour Mills Co., Pusan, Korea.

⁴ E-Wha oil Co., Ltd., Pusan, Korea.

⁵ Dong Suh Oil & Fats, Changwon, Korea.

⁶ Vitamin C premix (Wang et al., 2003a); vitamin E premix (Bai et al., 1998).

⁷ Mineral premix (Wang et al., 2003a).

Table 19. Effects of feeding experimental diets on growth parameters for 12 weeks in juvenile eel, *Anguilla japonica*¹

	Diets (vitamin C, AA mg/kg in diet)					Pooled SEM ⁶
	AA ₀	AA ₃₀	AA ₆₀	AA ₁₂₀	AA ₁₂₀₀	
WG ²	68.2 ^b	85.6 ^{ab}	98.0 ^a	91.6 ^a	89.1 ^{ab}	2.9
SGR ⁴	0.74 ^b	0.88 ^{ab}	0.98 ^a	0.93 ^a	0.91 ^{ab}	0.0
FE ³	48.0 ^b	59.8 ^{ab}	65.3 ^a	63.9 ^{ab}	62.2 ^{ab}	2.2
PER ⁵	0.96 ^b	1.20 ^{ab}	1.31 ^a	1.28 ^{ab}	1.24 ^{ab}	0.1

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

² Weight gain (%): $[(\text{final wt.} - \text{initial wt.}) / \text{initial wt.}] \times 100$.

³ Feed efficiency (%): $(\text{wet wt. gain} / \text{dry feed intake}) \times 100$.

⁴ Specific growth rate (%): $[(\log_e \text{ final wt.} - \log_e \text{ initial wt.}) / \text{days}] \times 100$.

⁵ Protein efficiency ratio (%): $\text{wet wt. gain} / \text{protein intake}$.

⁶ Pooled standard error of mean: $SD/\sqrt{n}$.

Table 20. Effects of feeding experimental diets on growth parameters for 12 weeks in eel (*Anguilla japonica*)

	Diets					Pooled SEM
	TA ₀	TA ₁₅	TA ₃₀	TA ₆₀	TA ₁₂₀	
WG ²	61.4 ^d	91.9 ^a	88.7 ^{ab}	80.3 ^{bc}	79.2 ^c	5.0
SGR ⁴	0.68 ^c	0.93 ^a	0.91 ^{ab}	0.84 ^b	0.83 ^b	0.0
FE ³	40.9 ^d	61.2 ^a	59.2 ^{ab}	53.5 ^{bc}	52.8 ^c	2.0
PER ⁵	0.82 ^d	1.22 ^a	1.18 ^{ab}	1.07 ^{bc}	1.06 ^c	0.1

¹ Means of single groups; Values in the same row with different superscripts are not significantly different (P<0.05)

² Weight gain (%): [(final wt. - initial wt.) / initial wt.] × 100.

³ Feed efficiency (%): (wet wt. gain / dry feed intake) × 100.

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

⁵ Protein efficiency ratio (%): wet wt. gain / protein intake.

Table 21. Whole body proximate composition of juvenile eel, *Anguilla japonica* fed experimental diet for 12 weeks

Diet (mg/kg)	Moisture	Ash	Protein	Lipid	Vitamin C (mg/kg)
	(%)				
AA ₀	61.0	3.0	17.1	44.5	4.98
AA ₃₀	62.5	3.2	16.3	46.7	5.21
AA ₆₀	62.5	3.3	18.2	46.3	5.23
AA ₁₂₀	63.2	3.1	18.4	46.6	5.79
AA ₁₂₀₀	60.0	3.5	18.4	46.6	6.05
Pooled SEM ¹	0.58	0.09	0.42	0.42	0.20

¹ Pooled standard error of mean: $SD/\sqrt{n}$.

Table 22. Whole body proximate composition of juvenile eel (*Anguilla japonica*) fed experimental diet for 12 weeks

	Moisture	Ash	Crude Protein	Crude Lipid	Vitamin E
Diet (mg/kg)	(%)				(mg/kg)
TA ₀	63.0	2.3	16.8	49.0	27.7
TA ₁₅	62.3	2.6	14.8	47.1	28.4
TA ₃₀	64.3	2.8	15.4	48.2	30.2
TA ₆₀	61.9	2.9	15.0	48.7	31.3
TA ₁₂₀	64.4	2.8	15.3	48.8	36.4
Pooled SEM ¹	0.51	0.11	0.35	0.34	1.54

¹ Pooled standard error of mean: $SD/\sqrt{n}$.

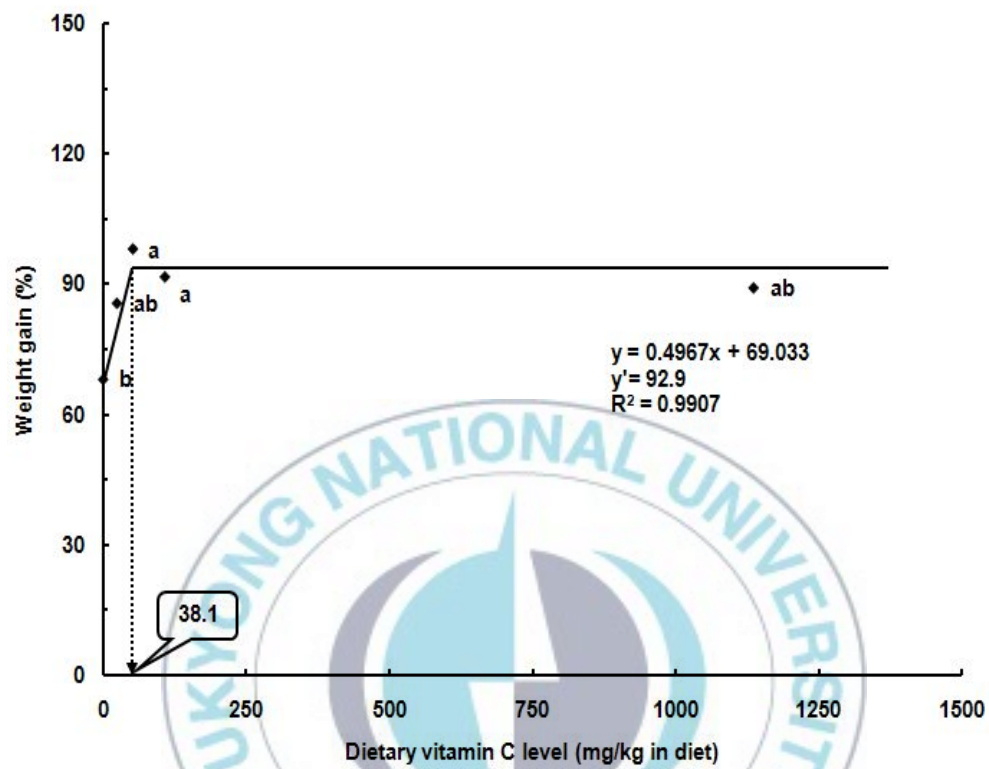


Fig. 24. Broken line analysis on weight gain of juvenile eel fed the diets containing different AA levels for 12 weeks.

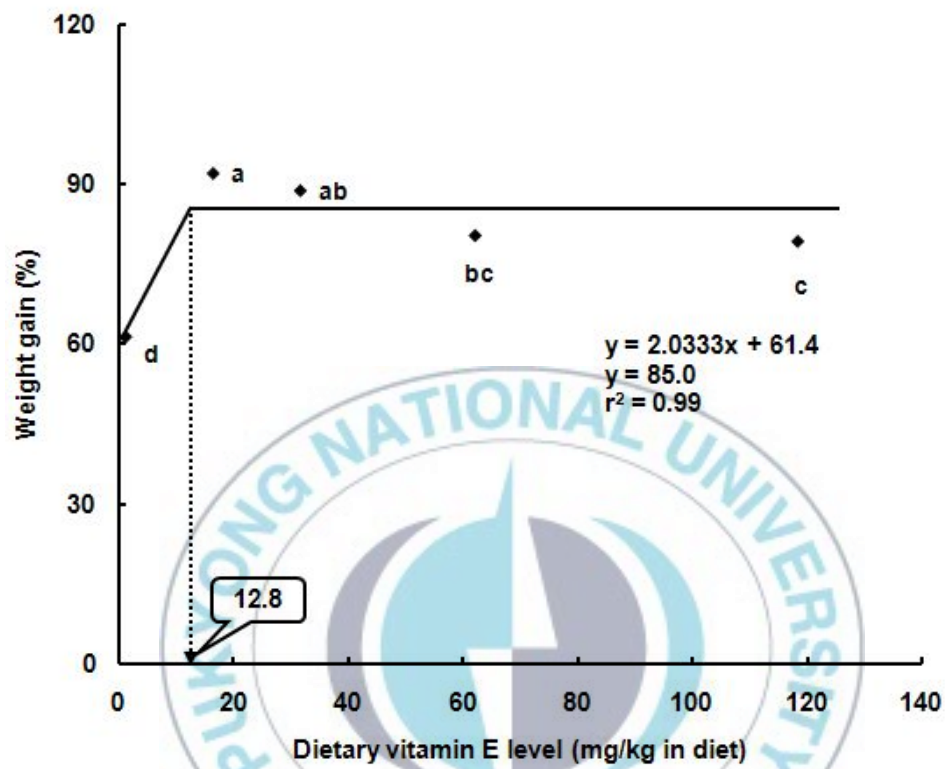


Fig. 25. Broken line analysis on weight gain of juvenile eel fed the diets containing different TA levels for 12 weeks.

제 4장 종합고찰 및 결론

뱀장어의 종묘 생산은 지난 수십 년간 세계 각국에서 연구를 수행해 왔으나 아직까지 산업적인 종묘생산 기법이 정립되지 않아 현재 뱀장어 양식은 자연산 실뱀장어의 채포에 의한 불완전 양식으로 이루어지고 있는 실정이다. 그런데, 최근 기후 및 대기환경의 변화, 환경오염, 남획 등의 문제로 인해 전 세계적으로 실뱀장어 자원량은 급격히 감소하고 있고, 아울러 세계적으로 실뱀장어의 어획에 대한 규정을 강화하고 있는 추세이다. 이러한 실뱀장어 자원량의 불안정은 전 세계적으로 뱀장어 양식의 큰 문제점으로 부각되고 있으며, 뱀장어 양식 사육가들은 인공 종묘 생산에 의한 종묘의 공급을 절실히 요구하고 있다. 이에 대해 뱀장어는 현재 실험적 규모에서 인공 종묘 생산은 가능하지만 자어의 생존율이 극히 미약하기 때문에 산업적인 규모로 종묘를 생산하기 위한 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

따라서 본 연구에서는 성공적인 뱀장어의 인공 종묘 생산을 위한 기초 연구로 번식 내분비학적 접근을 통해 효과적인 인공 성성숙 유도와 수정 및 부화를 위한 연구를 수행하였고, 이어 사료 영양학적 접근을 통해 치어기 뱀장어의 주요 영양소 요구량을 구명하여 향후 부화자어 및 친어의 사육 관리를 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

먼저 뱀장어의 인공 성성숙 유도를 위한 기초연구의 일환으로 번식 내분비학적 연구를 수행하였다. 뱀장어의 효율적인 친어관리를 위한 양식산 뱀장어의 암수 성감별에 관한 연구결과에 의하면 전장에 따라 수컷은 40~50 cm 이하, 그리고 암컷은 50 cm이상의 개체인 것으로 확인되었고, 혈중 성호르몬 농도에 있어 암컷이 수컷에 비해 testosterone과 estradiol-17 β 의 농도가 유의하게 높은 것으로 확인되었다. 따라서 뱀장어의 전장과 혈중 성호르

몬 농도는 성감별을 위한 지표로써 효과적으로 이용될 수 있음을 제시하였다. 양식산 수컷 뱀장어의 인위적 성성숙 유도에 따른 성숙 정도를 확인하기 위해 혈중 성호르몬 변동과 정도 발달 정도를 조사한 결과 수컷 뱀장어에 HCG (human chorionic gonadotropin, 1 IU/g body weight)의 반복주사에 의해 어체중과 혈중 성호르몬(T, 11-KT, DHP)의 수준이 증대됨에 따라 정자형성 및 배정이 효과적으로 유도되었고, 이를 통해 수컷 뱀장어의 인공 성성숙 유도를 위해 HCG의 반복주사가 적합한 것으로 확인되었다. 양식산 암컷 뱀장어의 인위적 성성숙 유도에 따른 성숙 정도를 확인하기 위해 혈중 성호르몬 변동과 정도 발달 정도를 조사한 결과에 의하면 암컷 뱀장어에 연어 뇌하수체 추출물(salmon pituitary extract, SPE; 20mg/fish/week)의 반복주사에 의해 어체중과 혈중 성호르몬(T, E₂)의 수준이 증대됨에 따라 난황형성이 효과적으로 유도된 반면 난소에서 DHP의 합성이 미약하여 혈중 DHP는 거의 검출되지 않았다. 따라서 최종성숙 및 배란을 위해 DHP (2 µg/g body weight)를 처리해야 하고, 아울러 성공적인 배란과 양질의 알을 획득하기 위해서는 DHP의 처리시기가 중요한 요인으로 작용하는 것으로 나타났다. 이를 통해 암컷 뱀장어의 인공 성성숙 유도에 있어 난황 형성 유도를 위해 SPE, 그리고 최종성숙 및 배란을 위해 DHP가 적합한 것으로 확인되었다. 뱀장어의 종묘생산을 위한 여러 연구들에 의하면 양식산 뱀장어의 인공 성성숙 유도에 있어 외인성 호르몬의 투여 시기에 따라 투여 횟수에 상이한 차이를 나타내었고, 이러한 결과는 계절에 따라 생식소에 대한 GTH 반응성 차이에 의한 것으로 이러한 차이에 의해 번식률에 영향을 끼칠 것으로 추정된다. 따라서 계절별로 뱀장어의 인위적인 성성숙을 유도하였고 이에 따른 수정률, 부화율 및 자어의 생존율 등을 포함한 번식률을 조사하여 효과적인 인공 성성숙 유도를 위한 뱀장어 친어의 최적 성성숙 유도시기를 확인한 결과 자연상에서의 주 산란기간인 봄과 여름철(5~7월)

다른 계절들에 비해 번식률이 유의하게 높은 것으로 나타났으며, 상기 기간 동안에는 인공 성성숙 유도에 의해 자연산란 및 수정도 유도할 수 있었으며, 인공수정에 의해 획득된 수정란에 비해 번식률이 높은 것으로 나타났다. 이를 통해 뱀장어의 인공 성성숙 유도 시기는 봄과 여름철(5~7월) 적합할 것임을 제시하였다. 인공 성성숙 유도 후 자연산란 및 수정을 유도하여 획득한 수정란과 부화자어에 대한 형태학적 특징을 조사한 결과 뱀장어 수정란은 무색의 투명한 분리 부성란으로 난경은 평균 1 mm였으며, 전형적인 반상분할을 통해 난발생이 이루어졌으며, 수정 38시간 후부터 부화가 개시되었다. 부화 직후의 *pre-leptocephalus* 자어들은 전장 약 3 mm 정도의 조금 만곡한 상태로, 약 1시간 후부터 몸이 수평으로 향하였다. 부화 후 4.5일 후, 입과 항문이 형성되었고, 이 시기에 1차적으로 대량의 폐사가 발생하였다. 부화 후 7.5일 후, 소화기관과 가슴지느러미가 형성되기 시작하였다. 부화 후 8.5일 후, 난황흡수가 완료되었고, 소화기관이 발달되어 외부적으로 사료를 공급해 주었고, 자어는 사료 섭취를 개시하였다. 그러나 부화 후 14.5일 후 자어는 전량 폐사하였고, 이때 전장은 5.87 ± 0.25 mm로 확인되었다. 대량폐사의 주요 원인은 자어에 적합한 사료를 공급해 주지 못함에 따른 사료 섭취율 저하와 이로 인해 난황 흡수 완료 후 영양결핍과 적절한 사육 시스템의 부재로 인해 폐사한 것으로 추정된다. 따라서 향후 부화자어의 사육을 위한 적합한 사료와 사육 시스템의 개발이 수반되어야 할 것으로 판단된다.

상기의 번식 내분비학적 연구 결과들에 의하면 뱀장어의 인공 종묘 생산에 있어 인공 성성숙 유도와 부화자어는 성공적으로 생산할 수 있었지만, 번식률과 부화자어의 생존율은 극히 미약한 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서는 번식 내분비학적 연구를 뒷받침하기 위한 연구의 일환으로 뱀장어의 번식률과 부화자어의 생존율 향상을 위한 사료 영양학적 연구를 통

해 치어기 뱀장어의 주요 영양소 요구량을 구명하였다. 뱀장어 치어의 에너지에 대한 적정 단백질의 비율(P/E ratio)에 있 성장률과 사료효율 등을 고려한 에너지 수준별 사료 내 적정 단백질 함량은 에너지 19 kJ / g에서 단백질 함량 45% 실험구에서 최적의 성장을 나타내었으며, 이를 토대로 사료 내 적정 P/E ratio는 24 mg protein / kJ 가 적합한 것으로 판단된다. 필수지방산과 그 적정 요구량을 평가하기 위하여 n-3원으로써 α -linolenic acid (LNA, 18:3n-3), docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3), eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3)와 n-6원으로써 linoleic acid (LA, 18:2n-6), arachidonic acid (ARA, 20:4n-6)을 사료 내 수준별로 첨가한 사료를 공급하여 성장과 체조성 및 혈액성상에 미치는 영향을 확인한 결과 뱀장어 치어의 필수지방산 요구량은 n-6 계열의 LA 과 n-3 계열의 LNA를 사료 내 1% 수준에서 1:1 혹은 1:2의 비율로 동시에 첨가해 주는 것이 적합한 것으로 나타났다. Arachidonic acid (ARA; 20:4n-6)의 적정 요구량을 평가하기 위해 사료 내 수준별로 첨가한 사료를 공급하여 사육실험을 수행하였고, 증체율과 사료효율에 대한 broken-line model 분석 결과, 뱀장어 치어의 성장과 사료효율 향상을 위한 사료 내 아라키돈산의 적정 첨가수준은 0.63% 보다는 높아야 하지만 0.71% 수준이면 충분할 것으로 확인되었다. 항산화 vitamin C (ascorbic acid)와 E (α -Tocopherol, TA)의 적정 요구량을 평가하기 위해 사료 내 각각의 수준별로 첨가한 사료를 공급하여 사육실험을 수행하였고, 증체율과 사료효율에 대한 broken-line model 분석결과, 뱀장어 치어의 성장과 사료효율 향상을 위한 사료 내 vitamin C의 적정 첨가수준은 24 mg/kg 보다는 높아야 하지만 38.1 mg/kg 수준이면 충분한 것으로 판단되고, vitamin E의 적정 첨가수준은 12.8 mg/kg보다는 높아야 하지만 16.5 mg/kg 수준이면 충분한 것으로 확인되었다.

상기의 주요 영양소 요구량에 대한 연구들은 부화자어와 친어의 영양학적 사육관리를 위한 기초자료를 제공하기 위한 목적으로 수행된 결과 성장

단계가 다른 치어기 뱀장어를 대상으로 평가되었다는 한계점이 있다. 이에 대해 실험적 규모로 뱀장어 친어를 대상으로 영양소의 요구량을 평가하기에는 한계가 있었고, 현 단계에서 사육실험을 위한 충분한 양의 부화자어를 확보할 수 있는 수준에 이르지 못하였다. 따라서 실험적 규모에 적합하고 확보와 관리가 용이한 치어기 뱀장어를 대상으로 주요 영양소 요구량을 구명하였고, 동일한 종에 있어 성장단계가 진행됨에 따라 영양소의 요구량이 감소하는 경향이 있음을 감안한다면, 향후 부화자어의 적합한 사료 개발을 통한 생존율 향상과 친어의 영양학적 관리를 통한 번식률 향상에 기초자료를 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

성공적인 뱀장어의 종묘생산을 위해서는 본 연구에서 수행한 번식 내분비학적 연구와 사료 영양학적 연구가 선행되어야 하지만 자연계에서 산란장의 환경조건에 관한 생태학적 조사와 아울러 생활사가 구명되어야 한다. 이에 대해 최근 북태평양 Suruga seamount 서부(14°N, 142°E)해역이 주산란장으로 밝혀졌고, 최근 일본 수산청은 상기의 주산란장에서 2008년 5월~9월에 수행한 생태조사를 통해 수심 200~350 m에서 성숙한 수컷 뱀장어와 산란한 것으로 추정되는 암컷 뱀장어를 포획하였고, 수심 100~150 m 수온 26.5~28℃에서 부화 후 2~3일이 경과했을 것으로 추정되는 자어를 포획한 것으로 보고하였다. 이를 통해 획득된 성숙 개체가 포획된 장소의 수온, pH, 염분 및 조도 등과 같은 환경조건에 대한 정보를 향후 뱀장어 친어의 인공 성성숙 유도에 활용한다면 양질의 알을 효율적으로 확보하여 번식률을 향상시킬 수 있을 것으로 판단된다. 또한, 부화자어가 포획된 장소의 환경조건과 생화학적 분석을 통해 위 내용물과 체조성을 조사하여 향후 인공 성성숙 유도에 의해 생산된 부화자어의 적합한 사료와 사육 시스템 개발에 활용할 수 있고, 이를 통해 자어의 생존율 향상에 따른 대량생산에 기여할 수 있을 것이다.

이러한 생태학적 연구결과와 함께 뱀장어의 인공 성숙속 유도 및 영양학적 연구가 상호 유기적으로 수행된다면 근 시일 내에 성공적인 인공 종묘 생산이 가능할 것으로 판단되고, 이를 통해 현재 뱀장어 양식을 위한 자연산 종묘를 인공 종묘로 대체할 수 있어 생태계에서 뱀장어 자원량의 유지뿐만 아니라 뱀장어 양식 산업 발전에도 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.



제 5장 요약

1. 뱀장어의 인공종묘생산을 위한 성성숙 유도

1-1. 친어관리를 위한 양식산 뱀장어의 성감별 방법

양식산 뱀장어, *Anguilla japonica*의 어체 크기에 따른 성비와 혈액학적 정상 및 성호르몬 함량을 조사하였다. 전장 40~50 cm 사이의 뱀장어에서는 수컷의 비율이 높았으나, 50 cm 이상의 뱀장어에서는 암컷의 비율이 유의하게 높은 결과를 보였다. 그러나 암·수 모두 생식소 발달 초기 단계였다. 수컷과 암컷의 혈액학적 정상에 있어서 헤마토크리트 값은 40~50 cm 그룹의 수컷이 크기가 큰 암컷 그룹의 결과보다 높은 값을 나타내었고, 헤모글로빈 함량은 반대의 경향을 보였다. 수컷의 혈중 GOT 결과는 전장 40~45 cm 그룹에서는 157 ± 3.46 IU/L로 다른 그룹에 비해 높은 값을 나타내었으나, 유의차는 없었으며, 암컷은 가장 큰 그룹인 55~60 cm의 뱀장어 집단이 148 ± 3.46 IU/L로 유의하게 높은 값을 보였다($P < 0.05$). GPT의 결과는 암·수 모두 55~60 cm 집단이 유의하게 높은 값을 나타내었다($P < 0.05$). 혈중 성호르몬의 함량은 암·수 모두 매우 낮은 값을 보였으나, 수컷에 비해 암컷의 T, E₂ 함량이 높게 나타났다.

1-2. 양식산 수컷 뱀장어의 인위적 성성숙 유도

양식산 뱀장어, *Anguilla japonica* 수컷의 인위적인 성성숙 기간 동안 체중과 혈중 성호르몬 농도 및 생식소 발달정도를 조사하기 위해 human chorionic gonadotropin (HCG; 1 IU/g body weight/week; Sigma)을 8주간 매주 복강에 주사하였고, 격주별로 혈액을 채취하여 RIA법에 의해 혈중 성호르몬 농도(testosterone, T; 11-ketotestosterone, 11-KT; 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, DHP)를 분석하였다. 대조구의 체중변화와 혈중 성호르몬의 변동에 있어서 대부분의 개체는 실험기간 동안 점차적으로 감소하였고, 혈중 T, 11-KT 및 DHP 농도 역시 실험기간 동안 거의 검출되지 않았다. 한편, HCG 처리구에 대한 체중변화에 있어서 대부분의 개체는 HCG 투여 후 5주까지 점차적으로 증가하였고, 이후 실험 종료기간까지 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 혈중 T의 평균농도는 HCG 투여 2주 후에 최고값을 나타내었고, 이후 점차 감소하였다. 혈중 11-KT의 평균농도는 HCG 투여 2주 후에 급격히 증가하여 실험 종료때까지 높은 농도로 유지하였다. 혈중 DHP의 평균농도는 HCG 투여 후부터 전 실험기간 동안 점차적으로 증가하였으며, 투여 4주 후부터 급격히 증가하여 8주 후 최고값을 나타내었다. 또한, 정소의 조직학적 관찰에 있어서, 실험종료 후 대조구 개체들의 정소는 대부분 정원세포들로 구성되어 있었다. 한편 HCG 투여 개체들의 정소는 정세포와 정자들로 구성되어 있었고, 대부분 배정이 유도되었다. 따라서 뱀장어 수컷의 인위적인 성성숙은 HCG에 의해 효율적으로 유도할 수 있었으며, 이는 HCG에 의해 정소에서 합성 및 분비되는 성호르몬 작용에 의해 정자형성 및 배정이 이루어진 것으로 판단된다.

1-3. 양식산 암컷 뱀장어의 인위적 성성숙 유도

본 연구는 3개월의 장기간 해수에 순치 후 호르몬 처리 salmon pituitary extract (SPE) or human chorionic gonadotropin (HCG)에 의해 성성숙이 유도된 양식산 암컷 뱀장어, *Anguilla japonica*의 체중과 혈중 성호르몬 변동 (testosterone; T, estradiol-17 β ; E₂, DHP)과 배란 후 인공수정에 의한 수정률과 부화율 측정에 관한 연구를 수행하였다. 실험어로 이용한 양식산 암컷 뱀장어는 국립수산물과학원 남부 내수면 연구소에서 제공받아 1000 L FRP 사육수조에 수용하여 1일 5psu 씩 증가시켜 일주일간의 해수 순치기간을 통해 점차적으로 해수에 적응시켰다. 해수에 완전히 적응된 이후, 20℃의 여과해수를 공급하였고 에어레이션을 통해 충분한 산소를 공급하면서 3개월간 해수에서 사육하면서 호르몬 처리에 의한 인위적인 성성숙을 유도하였다. 해수순치 3개월 이후, 각 실험구별 양식산 암컷 뱀장어는 SPE (20mg/fish/week)과 HCG (2 IU/g body weight/week)를 eel's ringer액에 균질화하여 매주 복강에 주사하였고, 대조구는 eel's ringer액을 매주 복강에 주사하였다. 실험개시 12주 후 대조구와 HCG처리구의 암컷 뱀장어 6마리의 어체중과 혈중 성호르몬 농도는 실험종료 기간까지 점차적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 혈중 T와 E₂ 농도 역시 전 실험기간 동안 점차적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 12주간 매주 SPE를 주사한 암컷 뱀장어 10마리의 어체중과 혈중 성호르몬 농도의 변화에 있어 대부분 개체들은 SPE 처리 6주 후까지 어체중에 대한 증감의 경향은 없었고, 8주 이후부터 급격히 증가하는 경향을 나타내었다. 혈중 T와 E₂ 농도는 실험개시 이후 점차적으로 증가하였고 10주 후 급격히 증가하여 12주 후 최고값을 나타내었다. 또

한, 난소는 난황형성이 완료되었고 핵이동기 단계로 발달하였으며 이후 최종성숙유도를 통해 배란 및 수정을 유도하였다. 본 연구를 통해 양식산 뱀장어에 있어 해수에 장기간의 순치는 인공성성숙 유도에 있어 SPE에 대한 반응성을 증대시킬 수 있고, 그 결과 혈중 성호르몬)의 합성이 촉진되어 난황형성이 완료되는 기간을 단축시킬 수 있음을 확인하였다.

1.4. 양식산 뱀장어의 적정 인공 성성숙 시기 설정

본 연구는 양식산 뱀장어, *Anguilla japonica*의 인위적인 성성숙 처리시기와 번식률과의 상호 관련성을 확인하기 위해 5월(봄)부터 익년 1월(겨울)까지 각 계절별로 수행되었다. 실험어의 인공 성성숙 유도를 위해 암컷(400~600 g) 뱀장어에 salmon pituitary extraction (SPE, 20 mg/fish/week)를 매주 복강에 주사하여 인위적인 성성숙을 유도하였다. 호르몬 처리 8~13주 이후 대부분의 개체들은 난황형성이 완료되었고, 17 α , 20 β -dihydroxyprogesterone (DHP, 2 μ g/g body weight)를 주사하여 배란을 유도하였다. 수컷 뱀장어(200~350 g)는 human chorionic gonadotropin (HCG, 1 IU/g body weight/week)을 매주 복강에 주사하여 정자형성 및 배정을 유도하였고, 이후 상기의 개체들에 대해 자연산란에 의한 수정 및 인공수정을 병행하였다. 배란율, 부상률, 수정률 및 부화율을 포함한 계절별 번식률에 있어서 봄과 여름(5~7월)에 인공성성숙을 유도한 실험구가 다른 계절에 비해 높았다. 산란수와 부화 유생수 및 부화유생의 생존일수는 번식률과 유사한 경향을 나타내었다. 본 연구결과, 양식산 뱀장어에 있어서 호르몬 처리에 의한 인공성성숙 유도의 시기는 자연계에서 주산란시기인 봄과 여름철이 적합함을 나타내고 있다. 따라서 상기의 연구는 양식산 뱀장어의 종묘생산을 위한 인공성성숙 시기의 결정과 번식률 향상을 위한 하나의 지표로 유용할 것으로 판단된다.

1-5. 인위적 성숙 유도된 뱀장어의 자연산란에 의한 난발생과

Pre-leptocephalus 자어의 발달

양식산 뱀장어, *Anguilla japonica*의 자연 수정란을 이용하여 $23\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 의 여과해수가 공급되는 실내수조에서 난발생과 pre-leptocephalus 자어발달을 관찰하였다. 친어 관리에 있어서 암컷은 연어 뇌하수체 추출물(20 mg/fish)과 수컷은 HCG (1 IU/g BW)를 매주 복강 주사하여 인위적인 성성숙 및 자연산란을 유도하였다. 수정란은 직경 1.0 mm 정도의 분리 부성란으로, 전형적인 반상분할(discoidal cleavage)을 통해 분할이 이루어졌다. 부화는 23°C 의 여과 해수에서 수정 후 38시간부터 개시되었다. 부화 직후의 자어는 전장 약 3.0 mm, 근절수는 평균 42개였다. 부화자어의 입과 항문은 부화 후 4.5일째에 열렸고, 난황은 부화 후 6.5일째에 거의 흡수되었다. 자어는 14.5일 동안 생존하였고, 이때 전장 5.87 ± 0.25 mm, 근절은 98개였다. 그러나 수정란과 preleptocephalus 자어발생의 형태학적 특징은 자연수정과 건식법에 의한 인공수정과의 큰 차이점은 없었다.

2. 뱀장어 치어의 영양학적 연구

2-1. 에너지에 대한 적정 단백질 비 평가

본 실험은 치어기 뱀장어, *Anguilla japonica*의 에너지 수준에 대한 사료 내 적정 단백질 비를 평가하기 위하여 갈색어분(brown fish meal)과 혈분(blood meal)을 사용하여 조단백질함량은 에너지에 대해 각각 45%와 50%, 그리고 총에너지 함량은 각각 16, 17 and 19 kJ/g의 6가지 수준($^{45}\text{P}_{16}$, $^{45}\text{P}_{17}$, $^{45}\text{P}_{19}$, $^{50}\text{P}_{17}$, $^{50}\text{P}_{17}$ and $^{50}\text{P}_{19}$)의 반정제사료(semi-purified)를 제조하여 16주간 사육실험을 실시하였다. 본 연구는 사료내 에너지 수준에 따라 단백질 함량을 달리 조절하여 사육실험을 실시하여 에너지 수준에 따른 적정 단백질 함량을 구명하는데, 증체율(WG), 일간성장률(SGR) 등의 성장평가와 사료효율(FE), 단백질효율(PER) 등의 사료영양학적 평가 및 혈액성상학적 평가와 연관해서 수행하였으며 실험 종료 후 어체내 일반성분 및 혈청 내 생화학적 조성을 비교 조사하였다. WG과 SGR에 있어서 $^{45}\text{P}_{19}$ 실험구가 다른 실험구들에 비해서 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$). FE에 있어서 $^{45}\text{P}_{19}$ 실험구가 $^{45}\text{P}_{17}$ 실험구를 제외한 다른 실험구들에 비해서 유의하게 높은 것으로 나타났다($P<0.05$), SGR 역시 $^{45}\text{P}_{19}$ 실험구가 다른 실험구들에 비하여 유의적으로 높게 나타내는데 $^{45}\text{P}_{17}$ 실험구와는 유의적인 차이가 없었으며, 이들을 제외한 나머지 실험구들 간에 있어서 유의한 차이는 나타나지 않았다($P>0.05$). 따라서, 본 결과를 통하여 치어기 Japanese eel (*A. japonica*)에 있어서 최적 성장을 위한 단백질 수준에 따른 에너지 비율은 단백질 함량 44.3% 수준에서 24.1 mg protein/kJ, 그리고 단백질 함량 49.3% 수준에서 28.1 mg protein/kJ가 최적의 성장을 나타낼 것으로 판단된다.

2-2. 필수지방산 적정 요구량 평가

본 실험은 치어기 뱀장어, *Anguilla japonica*의 사료 내 필수지방산과 그 적정 요구량을 평가하기 위하여 5종의 고도불포화지방산을 종류별, 수준별로 첨가하여 성장 및 체조성에 미치는 영향을 확인하였다. 실험어는 평균무게 15 g인 뱀장어 치어를 사용하였으며, 실험사료 내 5종류의 고도불포화지방산(LA, LNA, AA, DHA, EPA)을 첨가하여 총 7가지 실험구를 3반복으로 설정하여 16주간 사육실험을 진행하였다. WG과 SGR에 있어서 D₃실험구가 가장 높게 나타났다($P<0.05$). FE과 PER역시 성장결과와 유사한 경향을 보였는데 D₂, D₃실험구가 다른 실험구에 비해 유의적으로 높았는데, 이들 실험구간에는 유의적 차가 없었다($P>0.05$). 혈액성상 중 헤마토크리트(Hematocrit)는 대조구에서 가장 높게 나타났다($P<0.05$). Hemoglobin은 9.5-11.6 (g/100ml)로 전 실험구간 유의적인 차이는 없었다($P>0.05$). 전어체내 고도불포화지방산 함량에 있어서 대조구는 나머지 실험구들에 비해 유의적으로 낮게 나타났으며, D₁, D₄실험구와 D₂-D₇ 실험구간 사이에서는 각각 유의적인 차이가 없었다. HUFA/SFA 비율에 있어서 D₂, D₃, D₆이 D₁에 비해 유의적으로 높게 나타났지만 D₁, D₄, D₅, D₇ 실험구간 그리고 D₂-D₇ 실험구간 사이에서는 각각 유의적인 차이가 없었다($P>0.05$). DHA/EPA의 비율에 있어서 D₇이 유의적으로 높았으며, D₅가 유의적으로 낮았다($P<0.05$). 상기의 결과를 토대로, 성장과 전어체내 지방산조성에 있어서 뱀장어 치어의 사료 내 EPA와 DHA의 첨가효과는 미약한 것으로 판단되며, 사료 내 LNA (n-3)와 LA (n-6)을 각각 0.35%, 0.65% 첨가했을 때 WG, SGR, FE, PER이 가장 높았으나, 이전의 실험(Takeuchi, 1980)과 동일한 수준인 n-3와 n-6를 각각 0.5%씩 첨가한 실험구와는 유의한 차이를 보이지 않았다. 이렇게 볼 때, 뱀장어 치어의 필수지방산은 LNA (n-3), LA (n-6)이고, 그 적정수준은 각각 0.35-0.5%, 0.5-0.65%임을 보여준다.

2-3. 아라키돈산의 필수성과 적정 요구량 평가

본 연구는 치어기 뱀장어, *Anguilla japonica*를 대상으로 arachidonic acid (ARA; 20:4n-6)을 사료 내 수준별로 첨가하여 성장과 체조성에 미치는 영향을 확인하여 적정 요구량을 평가하였다. 실험사료는 조단백질 55%, 조지방 15% 및 가용에너지 18.3 kJ/g으로 조절하였으며, 사료 내 ARA의 적정 첨가수준을 확인하기 위하여 기초사료에 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2% (per kg diet, dry matter basis)를 각각 첨가(ARA₀, ARA_{0.2}, ARA_{0.4}, ARA_{0.6}, ARA_{0.8}, ARA_{1.2})하여 첨가 수준별 6가지 실험사료를 제작하였다. 실험어는 평균 27±0.5 g (mean±SD)인 뱀장어 치어를 이용하였고 100 L FRP 원형수조에 20마리씩 3반복으로 실험구별로 무작위 배치하여 총 10주간 사육실험을 진행하였다. 10주간의 사육실험 종료 후 증체율(WG)에 있어서 ARA_{0.8} 그리고 ARA_{1.2} 실험구는 대조구, ARA_{0.2} 그리고 ARA_{0.4} 실험구에 비해 유의하게 높은 반면($P<0.05$), ARA_{0.6} 실험구와는 유의한 차이가 없었다($P>0.05$). 일간성장률(SGR)에 있어 ARA_{0.8} 실험구는 대조구, ARA_{0.2} 그리고 ARA_{0.4} 실험구에 비해 유의하게 높은 반면($P<0.05$), ARA_{0.6} 그리고 ARA_{1.2} 실험구와는 비해 유의한 차이가 없었다($P>0.05$). 사료효율(FER)에 있어서 ARA_{0.8} 그리고 ARA_{1.2} 실험구는 대조구, ARA_{0.2} 그리고 ARA_{0.4} 실험구에 비해 유의하게 높은 반면($P<0.05$), ARA_{0.6} 실험구와는 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다($P>0.05$). 본 실험에서 증체율과 사료효율에 대한 broken-line model 분석 결과, 뱀장어 치어의 성장과 사료효율 향상을 위한 사료 내 아라키돈산의 적정 첨가수준은 0.63% 보다는 높아야 하지만 0.71% 수준이면 충분할 것으로 판단되며, 상기는 결과는 향후 뱀장어의 번식률 향상을 위한 친어관리 및 부화자어 사육을 위한 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

2-4. 항산화 비타민 C와 E의 적정 요구량 평가

본 연구는 치어기 뱀장어, *Anguilla japonica*를 대상으로 항산화 vitamin C (ascorbic acid, AA)와 E (α -Tocopherol, TA)를 각각 사료 내 수준별로 첨가하여 성장과 체조성에 미치는 영향을 확인하여 적정 요구량을 평가하였다. 사료 내 AA의 적정 첨가수준을 확인하기 위하여 기초사료에 0, 30, 60, 120, 1200 mg L-Ascorbyl-2-monophosphate / kg diet (dry matter basis)를 각각 첨가 (AA₀, AA₃₀, AA₆₀, AA₁₂₀, AA₁₂₀₀)하여 첨가 수준별 5가지 실험사료를 제작하였다. 한편, 기초사료 0(control), 15, 30, 60, 120 mg DL- α -tocopheryl acetate (TA) / kg diet (dry matter basis)를 각각 첨가(TA₀, TA₁₅, TA₃₀, TA₆₀, TA₁₂₀)하여 첨가 수준별 5가지 실험사료를 제작하였다. 실험어는 평균 15 ± 0.3 g (mean $\pm$ SD)인 뱀장어 치어를 이용하였고 60 L FRP 원형수조에 20마리씩 3반복으로 실험구별로 무작위 배치하여 총 12주간 사육실험을 진행하였다. 증체율과 사료효율에 대한 broken-line model 분석결과, 뱀장어 치어의 성장과 사료효율 향상을 위한 사료 내 vitamin C의 적정 첨가수준은 24 mg/kg 보다는 높아야 하지만 38.1 mg/kg 수준이면 충분한 것으로 판단되고, vitamin E의 적정 첨가수준은 12.8 mg/kg보다는 높아야 하지만 16.5 mg/kg 수준이면 충분할 것으로 판단된다. 본 실험의 결과와 함께 상기 두 가지 항산화 비타민 C와 E의 혼합첨가에 따른 상승효과에 관한 연구를 수행한다면 향후 사료 영양학적 접근을 통한 뱀장어 인공 종묘 생산에 관한 연구에 있어서 양질의 난을 확보하기 위한 친어 사육관리 프로그램과 부화 후 자치어의 사육 관리 프로그램 개발에 관한 연구에 기초자료로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

국립 부경대학교 1기로 입학하여 박사학위를 취득하기까지 어언 10년 시간 동안 결코 혼자서는 이 결실을 맺을 수 없기에 학위과정 동안 힘이 되어 주신 소중한 분들께 글로써나마 감사의 마음을 대신하고자 합니다.

먼저 학문과 연구에 임하는 자세에 대해 끊임없이 강조하시어 논리적이고 과학적인 사고를 함양시켜 학문의 길을 열어주시고 연구자로서의 길을 열어주신 배승철 지도 교수님의 노고와 은혜에 진심으로 감사드립니다. 아울러 논문의 심사를 기꺼이 수락하시어 많이 부족한 논문이 알곡이 되어 하나의 책자로 완성되기까지 세심한 조언으로 아낌없이 지도해 주신 김창훈 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 멀리 군산에서 친히 왕립하시어 심사를 맡아주시고 많은 지도 조언을 아끼지 않으신 군산대학교의 이정열 교수님께 감사드립니다. 학위논문 관련 실험 수행 기간 동안 지도교수의 마음으로 헌신적으로 지도해 주시고 정성 어린 조언으로 논문을 다듬어 주신 국립수산물과학원의 김대중 박사님께 감사의 말씀을 드립니다. 학부생 시절부터 지금까지 학문적 가르침과 바른길을 찾을 수 있도록 인도해 주시어 이 자리의 제가 있게 해 주신 늘 고마우신 한경민 박사님께도 심심한 감사의 마음을 전합니다. 그리고 학부와 학위 과정 동안 학문적 지식과 연구자의 길을 일깨워 주신 손철현 교수님, 조재운 교수님, 허성범 교수님, 장영진 교수님, 김동수 교수님, 남윤권 교수님 그리고 김종명 교수님께도 진심으로 감사드립니다.

학부 2학년에 어류 영양학 실험실 문을 두드려 학부 그리고 석·박사과정 동안 여러 선후배님과 맺은 인연이 지금의 저에게 소중한 재산이 되었습니다. 학부시절부터 지금까지 아낌없는 사랑과 관심으로써 학문의 길을 열어주시고 인생의 정도를 일깨워 주신 친형님과도 같은 우성사료의 박건준 박사님,

국립 수산과학원의 김강웅 박사님, 최세민 박사님 그리고 김준형 선배님, 제주대학교의 이경준 교수님, 에이뱅크의 김기훈 선배님, 수협사료의 박홍식 박사님과 구자완 선배님, 천하제일사료의 유진형 박사님, 아쿠아리움의 한정수 선배님, 옥임호 박사님, 이정기 선배님, 전민지 박사님 그리고 필리핀에 계신 고수홍 박사님께 깊은 감사의 마음을 전합니다.

학위과정 중 약 2년간 국립 수산과학원에서 근무하면서 많은 도움과 가르침을 주신 민광식 박사님, 박미선 박사님, 박민우 박사님, 김응오 연구관님, 손맹현 박사님, 김성연 연구사님, 임한규 박사님, 임상구 박사님, 민병화 박사님, 허윤성 박사님, 박윤정 선생님, 장정아 선생님 그리고 성국현 선생님께 감사의 말씀을 드리며, 함께 동고동락한 조현경 선배님, 이상목, 공지희, 강선영, 유은진, 정희경, 전해영, 강경립 그리고 박우동 후배님께도 감사드립니다.

실험 결과물들을 학회지에 투고하면서 세심한 지적과 조언으로 논문작성 요령을 터득할 수 있게 지도해 주신 홍성운 교수님께 진심으로 감사의 말씀을 드리며, 한국양식학회의 전민선 간사님께도 감사의 마음을 전합니다.

학부시절부터 지금까지 곁에서 희로애락을 함께하며 든든한 후원자가 되어 준 동기이자 친구 이상의 교수님 군과 강수운군에게 늘 고맙고 감사한 마음을 전하며, 학교에서 연을 맺어 소중한 노경언, 손명백, 이승기, 황철희, 김영수, 도용현 그리고 김선규 학우님과 민병희 선배님께도 감사드립니다.

힘들 때마다 버팀목이 되어 주고 서로에게 위안이 되어 준 충청남도 수산연구소의 유광열 연구사님께 깊은 감사의 마음을 전합니다. 실험실 생활에서 헌신적으로 도움을 아끼지 않았던 이승형 후배님, 이준호 후배님, 윤용현 후배님, 박건현 후배님, 이상재 후배님, 이세광 후배님, 허셋별 후배님, 조유경 후배님, 백희정 후배님께도 감사드립니다. 그리고 학과 사무실에서 행정적인 지원과 도움을 아끼지 않은 최수희 조교 선생님이자 후배님, 멀리 대전에서 꿈을 펼치고 있는 소중한 민문경 후배님, 김달영 후배님, 박성준 후배님,

우인구 후배님, 공석표 후배님, 이지훈 후배님, 하가영 후배님, Mahmoud Mohseni님께도 감사의 마음을 전합니다.

학위논문을 같이 준비하면서 많은 도움과 의지가 되어 주신 경기도 민물고기 연구소의 임성률 연구사님과, 김영철 학우님께 이 글을 빌어 감사의 말씀을 드리며, 학위준비 기간 동안 고생 많으셨던 경상북도 내수면 연구소의 김옥신 연구사님께도 감사드립니다.

평생을 자식 뒷바라지를 유일한 낙으로 삼으시어 묵묵히 저를 지켜주신 존경하옵는 아버지와 오늘이 있기까지 못한 자식의 뒷바라지에 일생을 헌신하신 어머니의 은혜에 이 세상 그 누구보다 두 손 모아 깊이 감사드리며 건강과 행복을 기원합니다. 부모님과 같은 마음으로 못한 동생 잘되길 바라는 마음 뿐인 존재 그 자체만으로도 너무나 큰 의지가 되어 주신 형님과 형수님께 머리 숙여 감사드리며, 사랑스러운 성윤이와 주희가 늘 건강하고 착하게 성장하길 기원합니다.

공부하는 사위를 늘 자랑스럽게 생각하시며 항상 저를 위해 공을 빌어 주신 장모님과 장인어른께 진심으로 감사드리며, 처제 정숙이와 처남 제우 그리고 제용이에게도 이 글을 빌어 사랑의 마음을 전합니다.

영원한 인생의 동반자이자 후원자로 오늘이 있기까지 늘 곁에서 의지가 되어 주고 먹성 좋은 신랑 조·석반을 정성스레 차려주며 갇은 뒷바라지도 마다치 않고 저를 믿고 따라준 사랑스런 아내 정아와 함께 이 자그마한 결실을 함께 나누고자 합니다.

본 연구는 학술진흥재단(2002년 중점연구소 지원과제)과 국립수산물과학원(2007년 수산생물 번식기구 연구)의 지원에 의해 운영되었습니다.