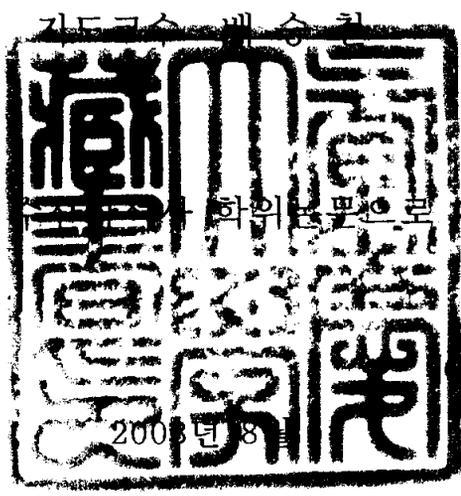


수산학석사 학위논문

치어기 넙치에 있어서 사료내
 β -1, 3 glucan과
사료섭취촉진제의 복합첨가에
따르는 상승효과

이 논문을  학위논문으로 제출함.



부경대학교 산업대학원

수산양식학과

한용옥

한용옥의 수산학석사 학위논문을 인준함

2003년 6월 일

주 심 이 학 박사 허 성 범 (興)

위 원 이 학 박사 김 기 홍 (洪)

위 원 영 양 학 박사 배 승 철 (承)

목 차

Abstract	i
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	2
III. 결과	9
IV. 결론 및 고찰	21
V. 요약	24
VI. 감사의 글	26
VII. 참고 문헌	28

치어기 넙치에 있어서 사료내
 β -1, 3 glucan과 사료섭취촉진제의
복합첨가에 따르는 상승효과

**Synergistic effects of dietary β -1, 3
glucan and feed stimulants in
juvenile olive flounder, *Paralichthys
olivaceus***

Yong-ok Han

*Department of Aquaculture, Graduate School of Industry,
Pukyong National University,
Busan 608-737, Korea*

abstracts

The present study was conducted to investigate the effects of dietary supplementation of β -1,3 glucan and feed stimulants(BAISM) as a feed additive for juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). The first experiment was conducted to investigate the effects of dietary supplementation of β -1,3 glucan and feed stimulants on growth performance, blood parameters and body composition in juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). The second experiment was conducted to investigate the effects of dietary supplementation of β -1,3 glucan and feed stimulants on non-specific immune reaction in juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). The third experiment was conducted to investigate the effects of dietary supplementation of β -1,3 glucan and feed stimulants on challenge infection in juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).

Experiment 1 : Effects of dietary supplementation of β -1,3 glucan and feed stimulants on growth performance, blood parameters and body composition in juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).

Eight experimental diets supplemented with β -1,3 glucan and feed stimulants at 0%, β -1,3 glucan 0.05% + Baism 0.45%, β -1,3 glucan 0.05% + Baism 0.95%, β -1,3 glucan 0.10% + Baism 0.90%, β -1,3 glucan 0.10% + Baism 1.90%, β -1,3 glucan 0.15% + Baism 1.35%, β -1,3 glucan 0.15% + Baism 2.85% and β -1,3 glucan 0.30% + Baism 2.70% of diets as a dry-mater(DM) basis were prepared. Three replicate groups of fish averaging $9.2 \pm 0.1\text{g}$ (Mean \pm SD) were randomly distributed in each

aquarium as a group of 15 fish and fed one of eight experimental diets for seven weeks. After the feeding trial, β -1,3 glucan 0.10% + Baism 0.90%, β -1,3 glucan 0.10% + Baism 1.90% diets had a higher weight gain (WG), feed efficiency (FE), specific growth rate (SGR) and protein efficiency ratio (PER) than did fish fed 0%, β -1,3 glucan 0.05% + Baism 0.45%, β -1,3 glucan 0.05% + Baism 0.95%, β -1,3 glucan 0.15% + Baism 2.85% and β -1,3 glucan 0.30% + Baism 2.70% ($P < 0.05$). however, there was no significant difference among fish fed β -1,3 glucan 0.05% + Baism 0.45%, β -1,3 glucan 0.05% + Baism 0.95%, β -1,3 glucan 0.15% + Baism 2.85% and β -1,3 glucan 0.30% + Baism 2.70% ($P > 0.05$).

Experiment 2 : Effects of dietary supplementation of β -1,3 glucan and feed stimulants on non-specific immune reaction in juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).

After the feeding trial, β -1, 3 glucan 0.10% + Baism 0.90% and β -1, 3 glucan 0.10% + Baism 1.90% diets had a higher peak value of CL, than did fish fed 0%, β -1,3 glucan 0.05% + Baism 0.45%, β -1,3 glucan 0.05% + Baism 0.95%, β -1, 3 glucan 0.15% + Baism 1.35%, β -1,3 glucan 0.15% + Baism 2.85% and β -1,3 glucan 0.30% + Baism 2.70% ($P < 0.05$). however, there was no significant difference among fish fed β -1, 3 glucan 0.05% + Baism 0.45%, β -1, 3 glucan 0.05% + Baism 0.95% and β 1, 3 glucan 0.15% + Baism 1.35%, β -1, 3 glucan 0.15% + Baism 2.85% ($P > 0.05$).

Experiment 3 : Effects of dietary supplementation of β -1,3 glucan and feed stimulants on challenge infection in juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).

There was no significant difference in challenge infection among all the dietary treatments ($P>0.05$).

These results indicated that dietary supplementation of β -1, 3 glucan and Baism affected growth, feed efficiency, specific growth rate, protein efficiency ratio, Peak value of CL and Lysozyme activity, and the optimum dietary supplementation level of β -1, 3 glucan and Baism as a feed additive could be approximately β -1, 3 glucan 0.10% + Baism 0.90% of diet in juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).

I. 서론

국내 양식어류의 종묘생산 및 양성과정에 있어서 수많은 세균성 질병, 바이러스성 질병 및 기생충성 질병은 커다란 문제로 대두되고 있어 막대한 경제적 손실을 초래하고 있다. 아울러, 현장에서는 양식어류의 질병 대책으로 미연 방지보다 질병 발생 후에 항생제 및 여러 종류의 화학약품을 사용하고 있다. 이와 같은 약제의 과다 사용, 오·남용은 어류의 자체 면역반응을 감소시킬 뿐만 아니라 환경오염 및 병원체의 내성 증가 문제와 나아가서는 인체에도 영향을 줄 수 있는 가능성 등 많은 문제점을 가지고 있다. 특히 일본으로 수출되는 넙치의 경우 어체 내의 항생제 잔류검사 실시 등으로 항생제 및 약제의 과다사용, 오·남용 문제에 대하여는 심사숙고해야 할 시점에 이르렀으며, 또한 어가의 지속적인 하락으로 말미암아 생산성을 향상시킬 수 있는 방안이 무엇인지를 찾는 양식 어가의 고민은 심히 크다고 말할 수 있다. 이에 국내에서는 성장촉진 및 사료효율을 개선하거나 어류의 비 특이적 면역반응을 증강시켜 생산성 향상 및 양식어류의 질병을 예방할 수 있는 저가의 사료첨가제 필요성이 대두되고 있다. 이에 본 실험에서는 현재 면역증강 물질로 알려진 β -glucan과 사료섭취촉진제인 BAISM을 혼합첨가하여 치어기 넙치 사료내 면역증강 및 사료섭취촉진을 첨가하여 성장 및 비특이적 면역반응에 미치는 영향과 최적 첨가 농도를 규명하고자 한다.

II. 재료 및 방법

실험 1 : 성 장

1) 실험사료

실험사료의 조성표는 Table 1에 나타내었다. 실험사료의 조단 백질 함량은 50%, 가용에너지는 17.6KJ/g (protein, carbohydrate and lipid: 16.7, 16.7 and 37.7J/g)으로(Lee and Putnam, 1973; Garling and Wilson, 1977) 맞추어 제조하였다. 사료원을 혼합한 후 펠렛제조기로 압출·성형하여 밀봉상태로 -20℃에 냉동 보관하여 사용하였다.

실험사료는 다음과 같다.

- Diet 1 : Control
- Diet 2 : β -1, 3 glucan 0.05% + Baism 0.45%
- Diet 3 : β -1, 3 glucan 0.05% + Baism 0.95%
- Diet 4 : β -1, 3 glucan 0.10% + Baism 0.90%
- Diet 5 : β -1, 3 glucan 0.10% + Baism 1.90%
- Diet 6 : β -1, 3 glucan 0.15% + Baism 1.35%
- Diet 7 : β -1, 3 glucan 0.15% + Baism 2.85%
- Diet 8 : β -1, 3 glucan 0.30% + Baism 2.70%

2) 실험어 및 실험디자인

실험사료 및 환경에 적응시키기 위해 1주일간 기초를 공급하면서 예비사육을 하였다. 실험어는 넙치 치어 ($9.2 \pm 0.1g$)를 사용하였으며 60ℓ 사각수조에 15마리씩 각 실험구당 3반복으로 무

작위 배치하였다. 사육수 유수식으로 유수량은 2-4ℓ/min로 조절하였다. 수온은 전 실험기간동안 16 + 1.1℃였다. 각 수조에 충분한 산소공급을 위해 에어스톤을 설치하였다. 일일 사료공급량은 어체중의 3-5%(건물량 기준)로 1일 2회(10:00, 16:00h)공급 하였다. 2주마다 각 수조의 전체 실험어 무게를 측정하고 사료공급량을 조절하였다.

3) 샘플 수집 및 분석

8주간의 실험종료 후, 200ppm의 MS 222에 실험어를 마취하여 전체 무게 및 마리수를 측정하고 증체율, 사료효율, 일간성장율, 단백질 전환효율, 비만도와 생존율을 계산하였다. 혈액 및 혈청 성분분석에 있어서 실험종료 후, 증중율 조사와 함께 혈액성분 분석을 위하여 실험어를 채혈하기 전까지 약 24시간 동안 절식시켰다. 실험어를 각 수조당 3마리씩 무작위로 추출하여 일회용 주사기를 이용하여 실험어의 미부정맥에서 혈액을 채혈한 후, micro-hematocrit 방법(Brown, 1980)에 의해 헤마토크리트(hematocrit, PCV)를 측정하고, 동시에 Drabkin's 용액을 사용하여 cyan-methemoglobin 방법(Sigma Chemical, St. Louis MO; total hemoglobin procedure No. 525)으로 헤모글로빈(hemoglobin, Hb)을 측정하였다. 혈청성분의 분석을 위하여 채혈한 혈액을 항응고제가 처리되지 않은 원심분리관에 넣고 실온에 30분간 방치한 후 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 냉장보관하면서 16시간 이내에 분석하였다. 혈청성분은 임상용 kit(아산제약주식회사, 대한민국)를 사용하여 총단백질(total protein)은 biuret법으로, 글루코스(glucose)는 효소법으로 그리고 GOT (glutamic oxaloacetic acid)와 GPT(glutamic pyruvic acid)는 Reitman- Frankel법으로 분석

하였다.

간중량 지수와 전어체 성분 분석을 위한 실험어는 20℃에서 보관하였다. 전어체 성분 분석을 위한 실험어는 각 수조마다 5마리씩 무작위로 선택하였다. 전어체의 단백질, 수분과 회분은 Association of Official Analytical Chemists (AOAC 1995)에 따라 분석을 실시하였고, 지방은 샘플을 -80℃에서 20시간 동결건조후 Soxtec system 1046 (Tecator AB, Sweden)을 이용하여 분석하였다.

4) 통계분석

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

Table 1. Composition and proximate analysis of the basal diet (% of DM basis)

Ingredient	%
White Fish Meal ¹	57.0
Gelatin ²	2.5
Casein ³	2.0
Wheat meal ⁴	15.4
Fish oil ⁵	13.4
EPA-DHA(45%) ⁶	0.5
Vitamin premix ⁷	3.0
Mineral premix ⁸	3.0
Alanine	1.5
Corn oil	1.1
Cellulose ⁹	0.6
Proximate analysis (% of dry matter basis)	
Moisture	19.4
Crude protein	51.0
Crude lipid	18.2
Crude ash	8.5

¹Han Chang Fishmeal Co., Pusan, Korea.

^{2,3,9}United States Biochemical, Cleveland, Ohio 44122.

⁴Young Nam Flour Mills Co., Pusan, Korea.

^{5,6}E-Wha oil Co., Ltd., Pusan Korea

⁷Vitamin premix(mg/kg feed unless indicated otherwise): vit.A, 3000IU; vit.D₃, 2400IU; vit.E, 120IU ; menadione sodium bisulfate, 6; vit. B₁-HCl, 15; vit.B₂, 30; vit. B₆-HCl, 15 ; vit.B₁₂, 0.06; vit.C, 300;

calcium pantothenate, 150; nicotin amide, 150; inositol, 150; d-biotin, 1.5 ; choline chloride, 3000; pancreatin, 12.5

⁸Mineral premix (mg/kg feed): MnSO₄, 320; ZnSO₄, 270; FeSO₄, 750; CuSO₄, 60; CoSO₄, 7; MgSO₄, 17.25; K₂SO₄, 212.24; NaCl, 51.88; K₂HPO₄, 136.09; NaScO₃, 0.013; KI, 0.15.

실험2. : 비특이적 면역반응

1) 두신 식세포의 *Chemiluminescent* 반응

7주간의 성장실험 종료후, MS222로 마취시킨 넙치로 부터 두신을 무균적으로 분리한 후 냉장한 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)에 넣어 가는 방사를 이용하여 세포들을 분리해 내었다. 분리된 두신 세포는 다시 34/51%의 Percoll (Sigma) density gradient를 이용하여, 4°C에서 400g로 30분간 원심분리한 다음 34%와 51% 사이의 세포층을 가는 파스퇴르 피펫을 이용하여 분리하였다. 최종적으로 분리된 세포는 헤파린과 항체가 포함되어 있는 HBSS로 400g에서 5분간 2번 세척하였다. 세포의 생존유무는 trypan blue stain을 이용하여 분석하였으며, 모든 실험구에서 분리된 세포들의 생존율은 98% 이상이었다. 실험에 사용한 식세포의 세포수는 1×10^6 cells/ml HBSS로 조절하였다.

Zymosan (Sigma)을 본 실험에 사용하지 않은 건강한 넙치 성어로부터 분리한 혈청과 혼합하여 30°C에서 30분간 배양하였다. 이 과정을 통해 opsonization이 된 zymosan을 원심분리하여 분리하고, HBSS를 이용하여 3회 세척하였다.

식세포에서 방출되는 Reactive oxygen intermediates (ROIs)는 automatic photoluminometer (Bio-Orbit 1251, Finland)에 의해 정량적으로 분석하였다. 즉, 각 test cuvette은 Scott and Klesius

(1981)의 방법에 따라 조제한 luminol (Sigma) 0.7 ml과 cell suspension 0.4 ml을 혼합하여 5분간 실온에서 incubation 한 후 측정 바로 전에 opsonized zymosan 0.3 ml을 첨가하여 100분간 측정하였다. 결과는 mV로 기록하였다.

2) Lysozyme의 활성

각각의 실험구 어류에서 분리한 혈청 0.1 ml과 0.05M sodium phosphate buffer, (pH 6.2)에 *Micrococcus lysodeikticus* (0.2 mg/ml)를 부유시킨 suspension 2 ml과 혼합하였다. 반응은 20°C 조건에서 분광 흡광도계의 흡광도 530nm에서 0.5분과 4.5분에 측정하였다. lysozyme의 활성 단위는 분당 0.001의 흡광도 감소를 나타내는 효소양으로 정의하였다.

3) 보체 대체 경로 (ACP) 활성 분석

보체 대체 경로 (ACP) 활성은 sheep red blood cells (SRBC)를 이용하여 분석하였다. SRBC를 Mg²⁺ 와 EGTA가 포함된 gelatin veronal buffer (GVB)에 3번 세척하고, 같은 완충액에서 2×10⁸/ml로 조절하였다. 실험 혈청을 GVB를 이용하여 연속적으로 단계 희석한 후, SRBC를 100I 첨가하였다. 이 혼합액을 가끔씩 흔들며 주면서 20°C에서 90분간 배양한 후, 4°C에서 1600g로 원심분리하여 상층액을 분광 흡광도계의 흡광도 414nm에서 측정하였다. ACP (ACH50) 활성은 용혈의 정도에 따라 계산하였다.

4) 통계분석

Students *t*-test를 사용하여 유의차를 검증하였다.

실험3. : 공격실험

1) 병원균 배양

독성이 있는 *Edwardsiella tarda* 부유액 (1×10^6 cfu/ml)을 1.5% NaCl이 첨가된 trypticase soy agar (TSA)에 27°C에서 48시간 배양하여 준비하였다. 폐사어의 폐사원인을 확인하기 위해 매일 폐사된 어체로 부터 신장을 채취하여 TSA에 배양하여 *E. tarda*의 존재를 확인하였다.

2) 통계분석

Students *t*-test를 사용하여 유의차를 검증하였다.

Ⅲ. 결 과

실험1. : 성장 결과

7주간의 실험결과는 Table 2와 3에 나타내었다. 증체율, 사료효율, 일간성장율, 단백질 전환효율 비만도에 있어서 diet 4, 5와 6이 다른 모든 실험구가 유의적으로 높은 결과를 보였으며($P < 0.05$), diet 4, 5와 6사이에는 유의적인 차이를 보이지 않았다($P > 0.05$).

간중량 지수와 생존율에 있어서 모든 실험구간에 유의적인 차이가 없었다($P > 0.05$).

전어체 일반성분 분석치는 Table 4에 나타내었다. 전어체 단백질함량에 있어서 diet 4, 5와 6이 다른 모든 실험구에 비해서 높게 나타났으나($P < 0.05$), 전어체 지방함량에 있어서는 diet 4, 5와 6이 다른 모든 실험구에 비해 유의적으로 낮게 나타났다($P < 0.05$). 전어체 수분과 회분함량은 모든 실험구간에 유의적인 차이가 없었다($P > 0.05$).

혈액 및 혈청 성분변화는 Table 5에 나타내었다. 헤모글로빈(Hb)은 모든 실험구에서 유의적인 차이가 없었다($P > 0.05$). 헤마토크리트(Hematocrit)에 있어서 diet 1, 3, 4, 5, 6과 7이 diet 2와 8에 비해 유의적으로 높은 값을 보였으며($P < 0.05$), diet 3, 4, 5, 6과 7사이에는 유의적인 차이를 보이지 않았다($P > 0.05$). 혈청내 총단백질, 글루코스와 GPT는 모든 사료구에서 유의적인 차이를 보이지 않았다($P > 0.05$). 반면에 혈청내 GOT에 있어서 diet 4, 5와 6이 다른 모든 실험구에 비해 유의적으로 낮은 값을 보였고, diet 4, 5와 6사이에는 유의적인 차이를 보이지 않았다($P > 0.05$).

Table 2. Weight gain, feed efficiency, specific growth rate and protein efficiency rate for olive flounder fed experimental diet for the seven-weeks of feeding period¹

Diets	WG(%) ²	FE(%) ³	SGR(%) ⁴	PER ⁵
1	199 ^c	76.3 ^c	2.24 ^c	1.53 ^c
2	217 ^b	80.0 ^b	2.35 ^b	1.60 ^b
3	215 ^b	79.9 ^b	2.34 ^b	1.58 ^b
4	243 ^a	84.8 ^a	2.52 ^a	1.70 ^a
5	240 ^a	84.4 ^a	2.50 ^a	1.69 ^a
6	244 ^a	85.5 ^a	2.52 ^a	1.72 ^a
7	215 ^b	79.3 ^b	2.34 ^b	1.59 ^b
8	218 ^b	79.3 ^b	2.36 ^b	1.57 ^b
Pooled SEM ⁶	3.11	1.23	0.03	0.03

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

²Weight gain (%) = (final weight - initial weight) × 100 / initial weight

³Feed Efficiency (%) = wet weight gain (g) × 100 / dry feed intake (g)

⁴Specific growth rate (%) = (log_e final wt. - log_e initial wt.) / days

⁵Protein efficiency ratio : wet weight gain / protein intake

⁶Pooled standard error of mean

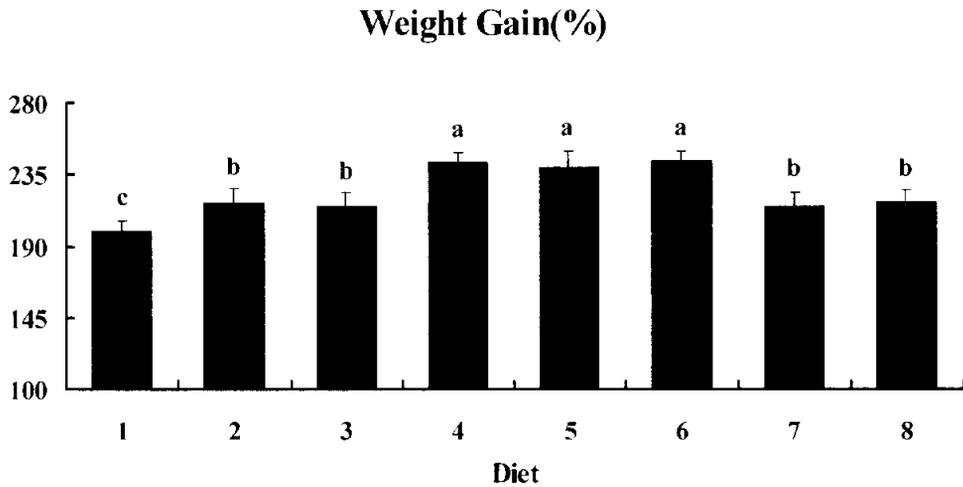


Fig. 1 Weight gain (%) of oliver flounder fed the experimental diet for the seven-weeks of feeding period

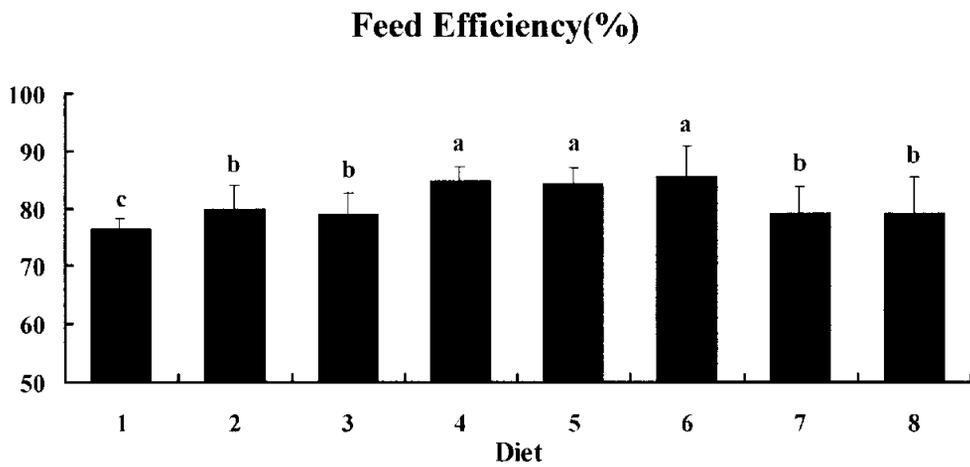


Fig. 2 Feed efficiency (%) of oliver flounder fed the experimental diet for the seven-weeks of feeding period

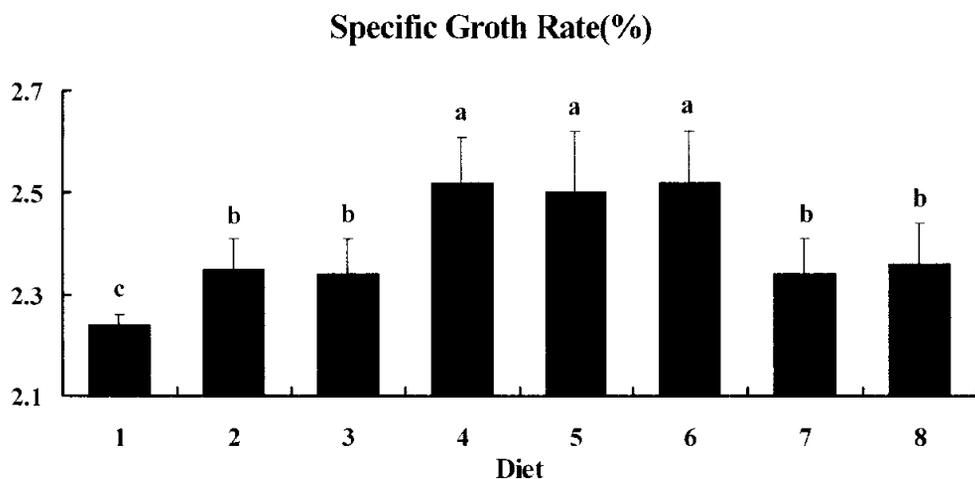


Fig. 3 Specific growth rate (%) of oliver flounder fed the experimental diet for the seven-weeks of feeding period

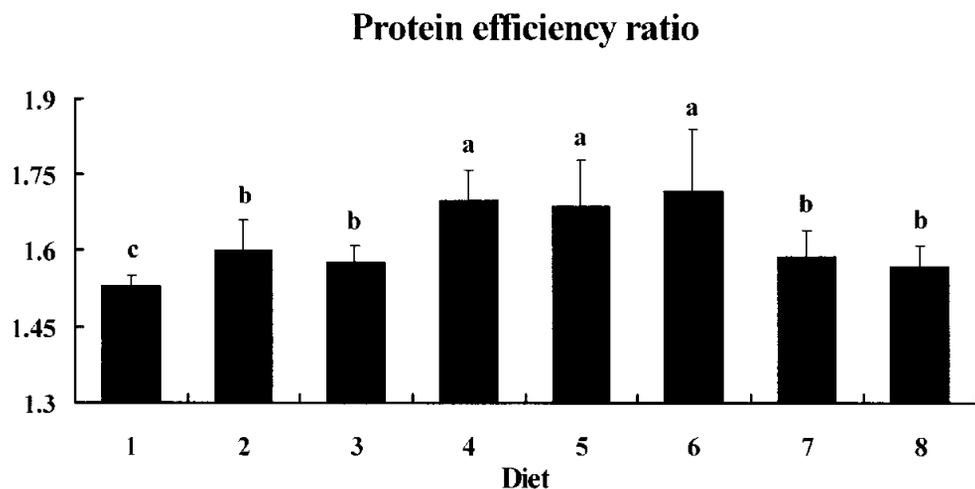


Fig. 4 Protein efficiency ratio of oliver flounder fed the experimental diet for the seven-weeks of feeding period

Table 3. Condition factor, hepatosomatic index (HSI) and survival for olive flounder fed experimental diet for the seven weeks of feeding period¹

Diets	CF ²	HSI ³	Survival(%)
1	1.16 ^b	2.53	100
2	1.17 ^b	2.47	100
3	1.19 ^b	2.51	100
4	1.27 ^a	2.45	100
5	1.24 ^a	2.39	100
6	1.26 ^a	2.49	100
7	1.16 ^b	2.51	100
8	1.14 ^b	2.44	100
Pooled SEM ⁴	0.04	0.21	0.00

¹Values are means from triplicate groups of fish.

²Condition factor : {fish wt.(g) / fish length (cm)³ } × 100

³Hepatosomatic index : (liver weight / body weight)×100

⁴Pooled standard error of mean

Table 4. Proximate analysis of whole-body of olive flounder fed experimental diet for the seven-weeks of feeding period (% of dry matter basis)¹

Diets	Moisture	Crude Protein	Crude fat	Ash
1	74.2	66.5 ^c	16.8 ^a	12.3
2	73.9	68.8 ^b	16.4 ^a	12.4
3	73.8	69.1 ^b	15.2 ^b	12.5
4	74.1	72.1 ^a	14.4 ^c	12.3
5	74.3	72.5 ^a	14.2 ^c	11.9
6	73.9	71.8 ^a	14.5 ^c	12.1
7	74.5	68.4 ^b	15.5 ^b	11.8
8	73.6	66.9 ^c	16.6 ^a	12.2
Pooled SEM ⁵	1.12	0.91	0.27	0.34

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

²Pooled standard error of mean

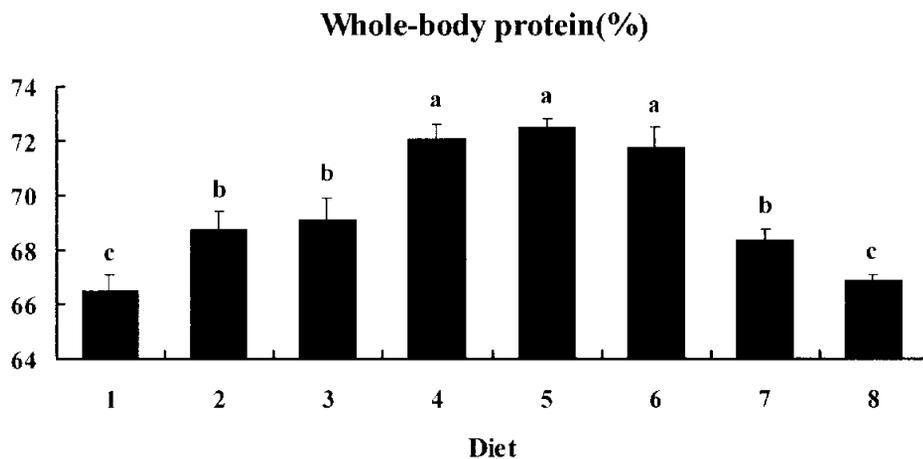


Fig. 5 Whole-body protein (%) of olive flounder fed the experimental diet for the seven-weeks of feeding period

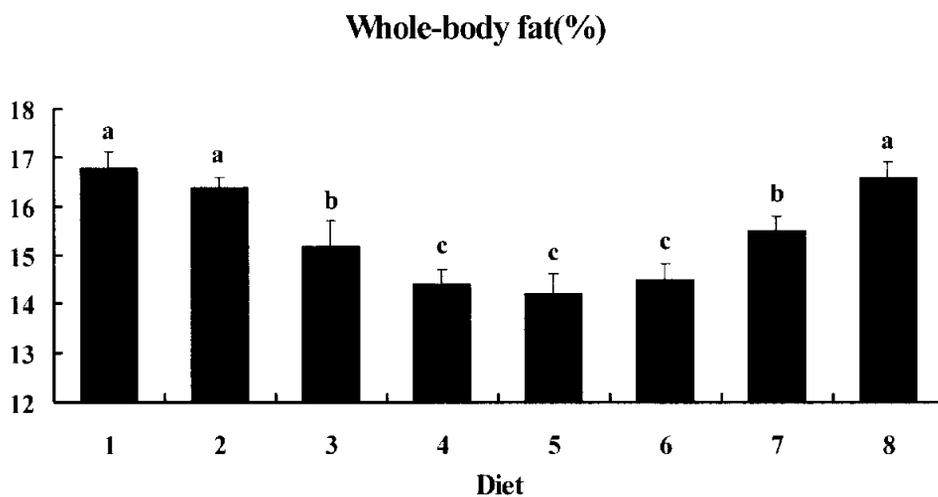


Fig. 6 Whole-body fat (%) of olive flounder fed the experimental diet for the seven-weeks of feeding period

Table 5. Serological and hematological characteristics of olive flounder fed the experimental diet for the seven-weeks of feeding period¹.

	Diets								Pooled SEM ²
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Hemoglobin(g/dL)	6.24	6.13	6.19	6.07	6.21	6.27	6.15	6.12	0.35
Hematocrit(%)	27.6 ^b	26.8 ^c	27.8 ^{ab}	28.1 ^{ab}	28.7 ^a	28.5 ^a	27.9 ^{ab}	26.5 ^c	1.74
Serum Total protein (g/dL)	3.6	3.3	3.7	3.6	3.5	3.3	3.5	3.2	0.33
Serum glucose (mg/dL)	47.8	46.5	47.5	46.8	47.3	46.5	46.3	47.2	3.74
Serum GOT (IU/L) ³	49.7 ^a	51.4 ^a	48.6 ^b	46.9 ^c	47.2 ^c	46.4 ^c	48.3 ^b	50.3 ^a	2.56
Serum GPT (IU/L) ⁴	10.1	9.7	10.5	10.2	9.5	10.5	10.3	10.6	1.37

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

²Pooled standard error of mean

³Glutamic oxaloacetic transaminase. One unit is defined as the amount of enzyme causing the transamination of 1.0 μ mol of L-aspartate per minute at 25°C and pH 7.4.

⁴Glutamic pyruvic transaminase. One unit is defined as the amount of enzyme causing the transamination of 1.0 μ mol of L-alanine per minute at 25°C and pH 7.4.

실험2. 비특이적 면역반응실험 결과

7주간의 성장실험 후, 비특이적 면역반응과 관련한 자료는 Table 6에 나타내었다. 두신 식세포의 Chemiluminescence (CL) 반응에 있어서 diet 4와 5가 다른 모든 실험구에 비해 유의적으로 높은 결과를 보여주었고($P < 0.05$), diet 4와 5사이에는 유의적인 차이가 없었다($P > 0.05$). 혈청의 lysozyme 활성에 있어서 대조구에 비해 다른 모든 실험구가 유의적으로 높은 결과를 보였고($P < 0.05$), diet 4가 유의적으로 가장 높은 결과를 보였다. 보체 대체 경로의 활성(ACH50)에 있어서 모든 실험구간에 유의적인 차이는 없었다($P > 0.05$).

Table 6. Non-specific immune factors of olive flounder fed the experimental diet for the seven-weeks of feeding period¹

Diet	Peak value of CL Lysozyme activity (mV)	Lysozyme activity (U/ml)	ACH50 (U/ml)
1	437 ^d	306 ^d	56
2	478 ^c	357 ^c	49
3	541 ^b	349 ^c	51
4	675 ^a	453 ^a	45
5	701 ^a	401 ^b	61
6	592 ^b	412 ^b	58
7	577 ^b	358 ^c	52
8	441 ^d	368 ^c	36
Pooled SEM ²	27	19	8

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

²Pooled standard error of mean

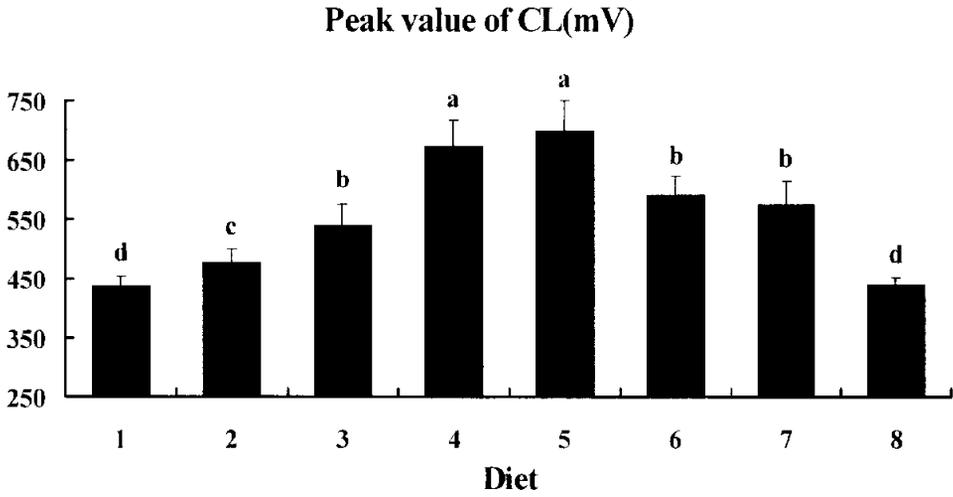


Fig. 7 Peak value of CL (mV) of olive flounder fed the experimental diet for the seven-weeks of feeding period

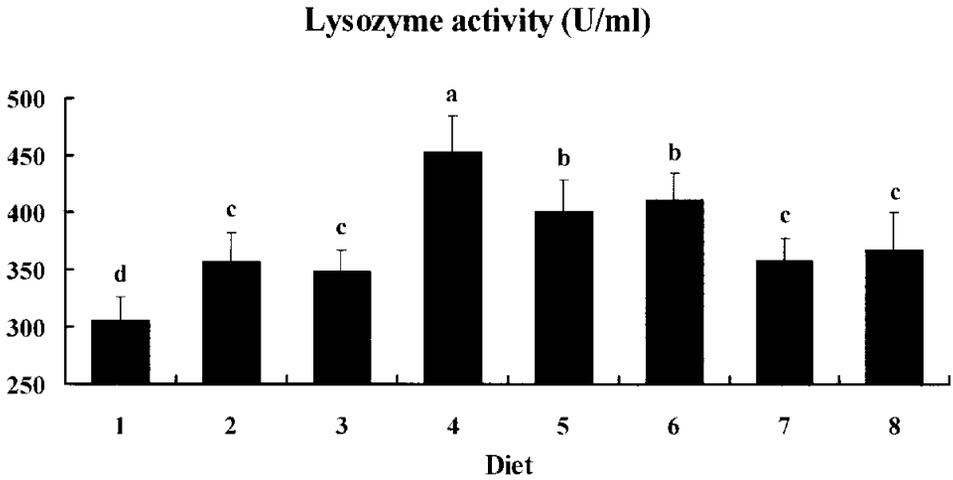


Fig. 8 Lysozyme activity (U/ml) of olive flounder fed the experimental diet for the seven-weeks of feeding period

실험3. 공격실험 결과

7주간의 성장실험 후, 독성이 있는 *Edwardsiella tarda*를 이용하여 공격실험을 한 결과, 실험 시작 후 30일까지 모든 실험구의 어류가 전체 폐사 하였으며 실험구간에 유의적인 차이는 없었다 ($P>0.05$).

IV. 결론 및 고찰

우리나라의 주요 해산어종인 넙치 치어에 있어서 면역증강 물질인 β -1, 3 glucan(글루칸)과 사료섭취촉진물질인 BAISM의 혼합에 따르는 성장률(WG), 사료효율(FE), 일간성장률(SGR) 및 단백질 전환효율(PER)에 있어서 사료내 글루칸과 Baism의 농도가 증가함에 따라 diet 1-6까지 유의적으로 증가하였으나 diet 7(글루칸 0.15%, Baism 2.85%)과 8(글루칸 0.30%, Baism 2.70%)에서는 감소하였다. 그리고 diet 4(글루칸 0.10%, Baism 0.90%), diet 5(글루칸 0.10%, Baism 1.90%)와 diet 6(글루칸 0.15%, Baism 1.35%)이 다른 모든 실험구와 비교하여 유의적으로 높게 나타났다. 이러한 결과는 사료내 과다한 글루칸과 Baism의 공급은 넙치의 성장을 저해할 것으로 생각된다.

본 실험에 사용된 Baism은 아미노산이 주 성분으로 양어 사료내 아미노산의 첨가는 사료 섭취촉진의 효과가 있는 것으로 알려져 있으며(Harada and Ikeda, 1984; Harada, 1985; Harada and Akishima, 1985; Harada, 1986), 상기 실험의 결과 또한 성장률(WG), 사료효율(FE), 일간성장률(SGR) 및 단백질 전환효율(PER)을 증가 시키는 것으로 나타났다.

면역반응 조사에 있어서 두신 식세포 활성 분석과 혈청내 lysozyme의 활성 조사 결과는 사료내 글루칸과 Baism의 농도가 증가함에 따라 diet 1-6까지 유의적으로 증가하였으나 diet 7과 8에서는 감소하였다. 그리고 diet 4, diet 5와 diet 6이 다른 모든 실험구와 비교하여 유의적으로 높게 나타났다. 라이조자임 활성은 면역증강물질의 관리에 의해 영향을 받는다고 하였으며(Engstad et al., 1992), yeast glucan은 대서양연어에 있어서 lysozyme과 보체 활성

에 대한 효과가 관찰되었다(Engstad et al., 1992; Jorgensen et al., 1993a). 메기에 있어서는 대식세포의 살균작용에 대한 효과(Chen and Ainsworth, 1992), 대서양연어에 있어서는 대식세포, 혈구에 의한 과산화물의 생산을 증가시키는 효과가 관찰되었다(Aakre et al., 1990). Raa et al.(1992)는 대서양 연어에 yeast glucan을 경구투여하면 *V. anguillarum*과 *V. salmonicida*에 대한 저항력이 증가되었다고 보고했으며, yeast glucan solution(0.5, 1mg/ℓ)에 침지한 Tiger shrimp는 *V. vulnificus*의 감염에 대한 방어가 증가되었다고 보고했다(Sung et al., 1994). *A. salmonicida* vaccine와 yeast glucan을 주사한 대서양 연어에서는 항체반응이 향상되었고 yeast glucan 없이 vaccines된 것보다 furunculosis에 대항한 방어가 상당히 증가되었다(Aakre et al., 1994). yeast glucan을 단독으로 주사하면 방어기작이 나타나지 않았다(Rorstad et al., 1993). Baulny et al.(1996)은 *V. anguillarum*에 침지한 turbot에 yeast glucan을 경구투여 한 것은 bacterin 단독처리구에 비하여 저항력이 증가한다고 보고했다. 상기의 실험처럼, yeast glucan을 단독으로 처리하면 *V. anguillarum*의 감염에 대한 저항력이 증가하지 않는다.

*Saccharomyces cerevisiae*의 세포벽에서 추출한 yeast glucan(β -1,3- and β -1,6-linked glucan)을 대서양 연어의 복강내 주사한 결과 *V. anguillarum*, *V. salmonicida*, *Y. ruckeri*에 대한 저항이 증가한다고 보고 하였으나(Robertsen et al., 1990), Thompson et al.(1995)는 yeast glucan을 주사한 무지개송어에서는 *V. anguillarum*의 감염에 대한 저항력이 증가되지 않는다고 보고했다. 본 실험에서는 *E. tarda*를 수조에 2일간 침지하여 공격실험을 한 결과 누적 폐사율에 있어 모든 실험구간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 glucan의 첨가효과가 나타나지 않은 것 보

나, 실험기간의 수온이 낮아 *E. tarda*의 활성을 감소에 의한 것으로 사료된다.

전어체 단백질함량에 있어서 diet 4, 5와 6이 다른 모든 실험구에 비해서 높게 나타났으나($P < 0.05$), 전어체 지방함량에 있어서는 diet 4, 5와 6이 다른 모든 실험구에 비해 유의적으로 낮게 나타났다($P < 0.05$). 이러한 결과는 넙치전어체내 단백질의 축적을 증가와 지방대사의 활성화를 통한 지방축적을 감소시켜 건강한 상태를 유지하고 고급육질 생산에도 기여할 것으로 사료된다. 넙치 치어에 있어서 글루칸과 Baism이 생리 상태에 미치는 영향을 조사에 하기 위해, 헤모글로빈, 헤마토크리트, 혈청내 total protein, glucose양, GOT, GPT의 변화를 생리적 지표로 하여 조사하였다. 헤마토크리트는 성장 및 비특이적 면역반응 효과가 좋았던 diet 4, 5와 6이 높은 값을 보였다. 심(1992)은 넙치의 질병에 대한 저항력이 높아질 때, 헤마토크리트가 정상 어류보다 높아질 수 있다고 하였으므로 본 실험의 결과도 글루칸과 Baism의 혼합투여에 의해 저항력이 변화한 것과 관련이 있을 것으로 생각된다. 혈청내 GOT는 성장 및 비특이적 면역반응 효과가 좋았던 diet 4, 5와 6이 낮은 값을 보였다.

따라서, 상기 실험의 결과를 토대로 면역증강물질인 β -1,3 glucan과 사료섭취촉진물질의 혼합을 통한 치어기 넙치의 성장과 면역증강의 향상을 위한 사료내 β -1, 3 글루칸 0.10%와 Baism 0.90%의 혼합이 가장 바람직 한 것으로 판단된다.

V. 요약

1. 성장

우리나라의 주요 해산어종인 넙치 치어에 있어서 면역증강 물질인 β -1, 3 glucan(글루칸)과 사료섭취촉진물질인 BAISM의 혼합에 따르는 성장률, 사료효율(FE), 일간성장률(SGR) 및 단백질 전환 효율(PER)에 있어서 사료내 글루칸과 Baism의 농도가 증가함에 따라 diet 1-6까지 유의적으로 증가하였으나 diet 7(글루칸 0.15%, Baism 2.85%)과 8(글루칸 0.30%, Baism 2.70%)에서는 감소하였다. 그리고 diet 4(글루칸 0.10%, Baism 0.90%), diet 5(글루칸 0.10%, Baism 1.90%)와 diet 6(글루칸 0.15%, Baism 1.35%)이 다른 모든 실험구와 비교하여 유의적으로 높게 나타났다.

전어체 단백질함량에 있어서 diet 4, 5와 6이 다른 모든 실험구에 비해서 높게 나타났으나($P < 0.05$), 전어체 지방함량에 있어서는 diet 4, 5와 6이 다른 모든 실험구에 비해 유의적으로 낮게 나타났다($P < 0.05$).

2. 비특이적 면역반응

면역반응 조사에 있어서 두신 식세포 활성 분석과 혈청내 lysozyme의 활성 조사 결과는 사료내 글루칸과 Baism의 농도가 증가함에 따라 diet 1-6까지 유의적으로 증가하였으나 diet 7(글루칸 0.15%, Baism 2.85%)과 8(글루칸 0.30%, Baism 2.70%)에서는 감소하였다. 그리고 diet 4(글루칸 0.10%, Baism 0.90%), diet 5(글루칸 0.10%, Baism 1.90%)와 diet 6(글루칸 0.15%, Baism 1.35%)이 다른 모든 실험구와 비교하여 유의적으로 높게 나타났다.

3. 공격실험

*E. tarda*를 수조에 2일간 침지하여 공격실험을 한 결과 누적 폐사율에 있어 모든 실험구간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

VI. 감사의글

나의 길을 지도하시고 이끄시는 하나님께 깊이 감사 드리며, 지난 2년 반 동안 만학의 길에 많은 실수와 허물에도 격려와 위로로 함께 한 배승철 교수님과 사료 영양학 실험실 학우 여러분께 진심으로 감사 드립니다.

심히 부족하고 여러 가지로 미흡한 저에게 많은 사랑과 관심을 가져주신 박건준님, 최세민님, 옥임호 박사님께 감사 드리며 먼길 온다고 늘 웃음으로 맞아 주었던 김강웅 박사님, 한경민 박사님, 왕소길 박사님, 전민지 박사님, 김준형님, 배준영님, 유광렬님, 김영철님, 장혜진님, 최하님께 감사 드립니다. 그리고 만날 때마다 따듯이 대해주신 학우 고수홍님, 박헌식 소장님, 김근태님께도 감사 드립니다.

만학의 길에 들어설 때 이끌어 주신 김동수 교수님께 감사 드리며, 대학원 과정동안 많은 지도와 관심을 보여주신 손철현 교수님, 조재운 교수님, 김창훈 교수님, 허성범 교수님, 남윤권 교수님께도 감사 드립니다. 그리고 논문심사를 위해 바쁜 시간을 쪼개어 지도 해주신 김기홍 교수님께 감사드립니다.

여러 가지 복잡한 일들이 있음에도 불구하고 불편함 없도록 배려해 주신 일출수산 김대식 사장님, 김성석 부장님께 깊이 감사 드립니다.

논문제목을 선정함에 힘을 실어주신 정경희 박사님께 감사 드리며, 현장응용에 있어서 실험 양어장이 되어준 명진수산 오태부 사장님과 오기수 상무님께도 감사 드립니다.

늘 후원자가 되 주었던 제주양식포럼 오정성 사장님, 서종표 사

장님, 고경민 박사님, 한재영 사장님, 이안배 사장님, 현민호 소장님
께도 감사 드립니다.

나에게 새로운 길을 가르치고, 새로운 비전과 꿈을 갖도록 지도
해준 이보영 목사님과 이혜경 사모님께 깊이 감사 드립니다.

오늘의 내가 있기까지 험한 세월 인내와 사랑으로 이끌어주신 아
버님 어머니님, 나를 사랑하여 지금껏 인내해준 사랑하는 아내 강여
신, 그리고 귀한 아들 호진, 호석 에게 이 논문을 바치고자 합니다.

2년 반이라는 시간동안 제주와 부산을 오가며 힘들게 지냈던 시
간들 내 인생에 있어 소중한 추억의 시간들이 될 것입니다.

2003년 여름. 사료 영양학 실험실에서 - -.

VII. 참고문헌

- Aakre, R., Wergeland, H.I., Aasjord, P.M., Endersen, C., 1994. Enhanced antibody response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to *Aeromonas salmonicida* cell wall antigens using a bacterin containing β -1,3-M- glucan as adjuvant. Fish Shellfish Immunol. 4, 47-61.
- Anderson, D.P. 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. Annual Review of Fish Diseases, 2: 281-307.
- Chen, D., Ainsworth, A.J., 1992. Glucan administration potentiates immune mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafineque. J. Fish Dis. 15, 295-304.
- Duncan, P.L. and Klesius, P.H. 1996. Dietary immunostimulants enhance nonspecific immune responses in channel catfish but not resistance to *Edwardsiella ictaluri*. Journal of Aquatic Animal Health, 8: 241-248.
- Engstad, R. E., Robertsen, B., Fribold, E., 1992. Yeast glucan induces increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish Shellfish Immunol. 2, 287-297.
- Graves, S.S., Evans, D.L. and Dawe, D.L. 1985. Mobilization and activation of nonspecific cytotoxic cells (NCC) in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) infected with *Ichthyorhthirius multifiliis*. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 8: 43-51.

- Harada, K. 1985. Feeding attraction activities of amino acids and lipids for juvenile yellowtail. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 51(3), 453-459.
- Harada, K. 1986. Feeding attraction activities of nucleic acid-related compounds for abalone, oriental weatherfish and yellowtail. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 52(11), 1961-1968.
- Harada, K. and Ikeda, I. 1984. Feeding attractants in chemical constituents of lake prawn for oriental weatherfish. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 50(4), 617-622.
- Harada, K. and Y. Akishima. 1985. Feeding attraction activities of proteins, amino acids, lipid and nitrogenous bases for abalone. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 51(12), 2051-2058.
- Jeney, G., Galeotti, M., Volpatti, D., Jeney, Z. and Anderson, D.P. 1997. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. Aquaculture, 154: 1-15.
- Jorjensen, J.B., Lunde, H., Robertsen, B., 1993a. Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.J. Fish Dis. 16, 313-325.
- Munro, P., Barbour, A. and Birkbeck, T.H. 1995. Comparison of the growth and survival of larval turbot in the absence of culturable bacteria with those in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* or a marine *Aeromonas* sp. Applied Environmental Microbiology, 61: 4425-4428.
- Ogier de Baulny, M., Quentel, C., Fournier, V., Lamour, F. and

- Le Gouvello, R. 1996. Effect of long-term oral administration of β -glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 26: 139-147.
- Pickering, A.D. 1992. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. *Aquaculture*, 100: 125-139.
- Raa,R., Rorstad, G., Engstad, R., Robertson, B., 1992. The use of immunostimulants to increase reiatance of aquatic organism to microbial infections. In : Sharriff, M., Subasighe, R.P., Arthur, J.R., (Eds), *Diseases in Asian Aquaculture Vol. 1. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippine*, PP. 39-50.
- Rorstad, G., Aasjord, P.M., Robertsen, B., 1993. Adjuvant effect of a yeast glucan in vaccines against furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 3, 179-190.
- Robertsen, B., Rorstad, G., Engstad, R. and Raa, J. 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Journal of Fish. Diseases*, 13: 391-400.
- Sung, H.H., Kou, G.H., Song, Y.L., 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathol.* 29, 11-17.
- Thompson, K.D., Cachos, A., Inglis, V., 1995. Immunomodulating effects of glucans and oxytetracycline in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, on serum lysozime and protection. In:

- Shariff, M., Subasighe, R.P., Arthur, J.R. (Eds.), Disease in Asian Aquaculture Vol. 11. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 433-439.
- Vadstein, O. 1997. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture*, 155: 401-417.
- Yano, T., Mangindaan, R.E.P. and Matsuyama, H. 1989. Enhancement of the resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by some β -1,3 glucans. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 1815-1819.