

수산화석사 학위논문

치어기 넙치 (*Paralichthys
olivaceus*)의 사료내 복합 유기산제
및 Essential Oil 첨가에 따른
성장효과 및 항생제 대체 효과

2011년 1월

부 경 대 학 교 대 학 원

수산생물학과

박 건 현

수산화석사 학위논문

치어기 넙치 (*Paralichthys
olivaceus*)의 사료내 복합 유기산제
및 Essential Oil 첨가에 따른
성장효과 및 항생제 대체 효과

지도교수 배 승 철

이 논문을 수산화석사 학위논문으로 제출함

2011년 1월

부 경 대 학 교 대 학 원

수산생물학과

박 건 현

박건현의 수산학석사 학위논문을 인준함

2011년 1월



주 심 농 학 박 사 장 영 진 (印)

부 심 농 학 박 사 김 동 수 (印)

위 원 영 양 학 박 사 배 승 철 (印)

목 차

Abstract	i
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
III. 결 과	11
IV. 고 찰	29
V. 요 약	32
VI. 감사의 글	34
VII. 참고 문헌	35

Effect of dietary organic acid products
and essential oil products in growth
performance and antibiotics
replacement in olive flounder
paralichthys olivaceus

The logo of Pukyong National University is a circular emblem. It features a stylized 'P' and 'U' intertwined in the center, with a blue and grey color scheme. The words 'PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY' are written in a circular path around the emblem, and Korean text is visible at the bottom.

Gunhyun Park

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

ABSTRACT

The present study was conducted to determine Effect of dietary organic acid products and Essential Oil products in growth performance and antibiotics replacement in olive flounder *paralichthys olivaveraging*. Fish averaging 3.5 ± 0.05 g(mean $\pm$ SD) were fed one of the ten semi-purifide diets :

Diet 1 ; Control (Con), Diet 2 ; add antibiotics – 50mg OTC / kg body weight / day(Antibio), Diet 3 ; Add organic acid blend A – 4g/kg diet(OABA), Diet 4 ; add organic acid blend B – 4g/kg diet(OABB), Diet 5 ; add Essential oil blend – 0.25g/kg diet(EO0.25), Diet 6 ; add Essential oil blend – 0.5g/kg diet(EO0.5) for 10 weeks. There was no significant differences in weight gain(WG), feed efficiency(FE), specific growth rate(SGR) and protein efficiency ratio(PER) among fish fed all diet. Total bacterial count in intestine showed that fish fed OABA diet, OABB diet, EO0.25 diet, EO0.5diet and Antibio diet has a significantly lower than fish fed Control diet($P < 0.05$). Fish fed organic acid, EO or OTC supplemented diets in this experiment tended to decrease count of *Vibrio* spp. compared with fish fed control diet without any added additives but these differences were not significantly different. Challenge test showed that fish fed Antibio diet, OABA diet, OABB diet, EO0.25diet and EO0.5diet has a significantly lower cumulative mortality rate than fish fed Control diet. There were no significant differences In GOT, GPT, cholesterol and glucose among fish fed the various diets.

In conclusion, the results of the present study indicated that dietary organic acids or essential oil has the potential to be used as an effective health management practice for preventing

diseases caused by *Edwardsiella tarda* in olive flounder. But bio-availability between OABA diet and OABB has not different.



I. 서 론

항생제(antibiotics)의 사용은 영양소 이용률을 개선시키고 질병의 예방, 치료, 성장촉진 효과가 있기 때문에 오늘날 대규모의 집단 사육을 가능하게 하였으며 경제적으로 가장 효과적인 사료 첨가제로서 이용되어 왔다. 양식 산업에 있어서도 성장촉진과 질병의 예방, 치료 등의 목적으로 많은 양의 항생제가 사용되어 왔다(Hernandez-Serrano 2005). 하지만 이러한 항생제의 과다사용으로 인해, 최근 많은 병원균들이 항생제에 내성을 갖게 되었고 특히 여러 항생제에 동시 내성을 갖는 내성균들이 출현하게 되었다(De Paola 등 1995; Agers 등 2007). 또한 항생제를 사료에 혼합하여 사용하였을 경우 종종 수산물 속에 잔류하여 최종소비자인 인간의 건강을 해치고 자연환경으로 흘러나온 항생제로 인해 수계환경의 불안정을 가져오게 되었다(Nawaz 등 2001). 이러한 영향으로 인해 최근 2006년 유럽연합(EU)에서는 사료내 항생제의 사용을 금지시켰으며 이외에도 대부분의 국가들이 이를 따르고 있는 실정이다. 따라서 수산양식에 있어서 이러한 항생제 대체품에 대한 연구가 필요한 실정이다.

유기산은 lactic acid, citric acid, formic acid, fumaric acid 등으로 카르복실기를 가지는 짧은 사슬의 지방산이다. 이러한 유기산은 전통적으로 항 곰팡이제로서 사용되어져 왔으나 최근 항생제 대체물질로서 관심을 받고 있다. 유기산재를 사료에 첨가하면 위내의 pH를 감소시킬 수 있다(Garrido 등, 2004). 위 내의 pH 저하는

pepsinogen의 pepsin으로의 전환을 촉진하여 단백질, amino acid, mineral 흡수율을 개선할 수 있다(Omogbenigum 등, 2003 ; Mroz 등, 2000 ; 윤병선 등, 2005). Pepsin은 유기산의 첨가량, 원료 사료의 비중, 입자도, 가공형태, mineral과 영양소의 함량 등에 영향을 많이 받는다. 생화학적 특성에 따라 병원균의 세포막내로 투과되면 세포 내부의 pH를 저하시켜 대사에너지 고갈, 세포막 대사 저하, 세포액의 유출, 영양소 이용 차단 등의 작용으로 병원균을 사멸시킨다 (Kirchgesser와 Roth, 1982). 또한 유기산의 사료내 첨가는 사료의 소화기관 통과속도를 감소시키는 효과가 있는데 소화효소에 의한 소화시간이 증가하여 영양소 이용률이 개선되고(Son 등., 2002)점막에 영향을 미치어 면역 기능을 향상시킨다. Baruah 등 2007; Hossain 등 2007; Sarker 등 2007; Luckstadt 2008 등의 보고에 의하면 양어 사료 내 유기산 또는 그 복합체의 첨가는 성장촉진, 사료 이용률 증가 및 내병성에 효과가 있는 것으로 보고하고 있다. 하지만 이러한 효과는 어종 및 실험어의 크기 유기산의 종류에 따라 달라질 수 있다(Luckstadt 2008).

Essential oil은 전통적으로 질병 치료 목적으로 지구상에서 자생하는 약용식물 중 방향성 있는 식물에서 추출한 방향유를 말한다. Essential oil은 식물성 천연원료로서 무독성, 체내 무잔류성, 병원균의 내성이 나타나지 않아 최근 문제가 되고 있는 항생제를 대체할 물질로 많은 연구가 진행되고 있다. Essential oil은 사료 섭취, 소화효소 분비, 면역 기능 향상 작용이 있으며(Adams, 1999; Wenk, 2003) 육계의 소장에서 괴사성 장염의 원인균인 *Cl.*

*perfringens*의 증식을 억제하고(Mitsch 등, 2004), 육계의 수컷에서 지방의 대사와 소화효소 생산 및 생산성에 영향을 미치며(Lee 등, 2003), Essential oil 중 하나인 Grapefruit seed에서 추출한 bioflavonoids는 손상된 위 점막에서 항산화 작용을 한다고 보고되었으며(Rao 등, 2003) *Echinacea purpurea* 는 세포 독성을 저하시킨다고 보고되었다(박진홍 등, 2004).

따라서 본 실험은 국내 주요 양식 어종인 넙치를 대상으로 사료 내 유기산 및 Essential Oil을 첨가하여 성장, 장내미생물상의 변화, 혈액학적 분석 및 공격 실험 등을 통해서 치어기 넙치사료에 있어서 유기산 및 Essential Oil의 첨가효과와 항생제 대체가능성에 대하여 평가하고자 수행하였다.



II. 재료 및 방법

1. 실험어 및 사육관리

실험어는 넙치 치어를 실험에 들어가기에 앞서 2주간 기초사료를 주면서 예비사육 하였으며 주 사육실험기간은 10주간 실시하였다. 예비사육 후, 평균 어체중 $3.5 \pm 0.05\text{g}$ (mean $\pm$ SD)인 치어를 50L 사각수조에 25마리씩 수용하여 각 실험구당 5반복으로 무작위 배치하였다. 일일 사료공급량은 어체중의 3%(건물량 기준)씩 1일 2회 공급하였다. 각 수조당 충분한 산소공급을 위해서 에어스톤을 설치하여 용존산소가 포화상태가 되도록 해주었고, 실험기간 동안 수온은 $20 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였으며 유수량은 2 L/min 이 되도록 하였고 사육수의 염도는 31 ± 1 ppt를 유지하였다.

2. 실험사료 및 실험설계

실험에 사용된 실험사료의 조성표와 일반성분은 table 1에 나타내었다. 실험사료의 단백질원으로는 Fish meal, Squid liver powder, Dehulled soybean meal를 사용하였으며 탄수화물원으로는 Corn starch를 지질원으로는 Fish oil을 사용하였다. 사료내 항생제 및 유기산의 첨가수준에 따른 6개의 실험사료 : Diet 1, 대조구 (Con); Diet 2, 항생제 첨가구 - 50mg OTC / kg body weight / day(Antibio); Diet 3 ; 복합유기산제 A 첨가구 - 4g/kg

diet(OABA); Diet 4, 복합유기산제 B 첨가구 - 4g/kg diet(OABB); Diet 5, 복합 Essential oil 첨가구 - 0.25g/kg diet(EO0.25); Diet 6, 복합 Essential oil 첨가구 - 0.5g/kg diet(EO0.5) 를 조단백 50%, 조지방 10%, 에너지는 15.4 kJ/g 으로 맞추어 펠렛 제조기로 압출 성형 하였으며, 입자크기는 sieve로 고르게 치 후, 밀봉하여 -20℃에 냉동 보관하면서 사용하였다.

3. 어체 측정

어체 측정은 10주간의 실험 종료후, 성장률을 측정하기 위하여 24 시간 절식시킨 후 전체무게를 측정하였다. 실험종료 후 증체율 (weight gain, %), 사료효율(feed efficiency, %), 일간성장률 (specific growth rate, %/day), 단백질전환효율(protein efficiency ratio)를 조사하였다. 상기측정 항목들의 계산식은 다음과 같다.

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

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

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

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

4. 일반성분 분석

일반성분은 AOAC(Association of Official Analytical Chemists, 1995)방법으로 분석하였는데, 수분은 상압 가열 건조법으로, 조단백질은 Kjeldahl 질소 정량법($N \times 6.25$), 조지방은 Soxtec system 1046 (Tecator AB, Sweden)으로 그리고 조회분은 직접 회화법으로 각각 분석하였다.

5. 혈액의 채취와 분석

사육실험 종료 후 각 사육수조별로 실험어 3마리씩 무작위로 선별하여 주사기 (1 mL)를 사용하여 마취 없이 미부 혈관에서 30초 이내에 혈액을 채취하였다. 실험어로부터 혈액을 채취하기 이전에 24시간 절식시켰다. 채취한 혈액의 일부를 원심분리 (3,000 RPM 10분) 하여 냉장보관 후 16시간 이내에 사용하였으며, Glucose, glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), glutamate pyruvate transaminase (GPT) 와 Total cholesterol 는 FUJI DRI-DHEM auto analyzer (FIJIFILM, Japan).를 이용하여 분석하였다.

6. 장내 미생물수 측정

사육실험 종료 후 실험구당 당 5마리씩에서 소장을 채취하여 채취한 내용물 약 1g을 멸균된 15mL test tube에 담고 멸균된 증류수

9mL를 펌가하여 희석액 (10^{-1})시킨후 $10^{-2} \sim 10^{-8}$ 까지 단계적으로 희석하여 total bacterial count 의 경우 PCA(Plate Count Agar)배지를 *Vibrio* spp. 의 경우에는 TCBS 배지를 사용하여 평판에 희석된 샘플을 1mL 씩 접종시키고 35℃에서 24~48시간 배양하였다. 배양후 미생물의 수를 각 평판의 coloney forming unit (CFU)로 계산후 $\log_{10}$ 로 나타내었다.

7. 공격실험

Edward 균에 의한 공격실험은 *Edwardsiella tarda*를 BHI broth 배지에서 27℃로, 24~48시간 배양후 평균증류수에 1×10^6 cfu / ml로 현탁하여 현탁액을 0.1ml 씩 복강 주사한 후 폐사를 기록하였다. 폐사어의 폐사원인을 확인하기 위해 매일 폐사된 어체로부터 신장을 채취하여 TSA에 배양하여 *E. tarda* 존재를 확인하였다.

8. 통계처리

모든 자료는 SAS Program 으로 ANOVA(analysis of variance) test를 실시하여 최소유의차검정 (LSD : Least Significant Difference)으로 평균간의 유의상 ($P < 0.05$)을 검정하였다.

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

Ingredients	g / kg diet
Fish meal	380
Squid liver powder	250
Dehulled soybean meal	200
Corn starch	20
Fish oil	20
Vit. mix ⁴	5
Min. mix ⁵	5
Wheat flour	120
<i>Proximate analysis (%)</i>	
Moisture	7.17
Crude Protein	54.5
Crude fat	9.5
Crude ash	9.4

¹Feed stuffs not mentioned here are the same feed stuffs as the domestic aquaculture feed companies are using currently

²Suhyup feed Co. ujiryeong, Korea

³Jeil feed co. Hamma, Korea.

⁴Contains(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

⁵Contains (as mg/kg in diets) : NaCl, 437.4; MgSO₄·7H₂O, 1379.8; ZnSO₄·7H₂O, 226.4; Fe-Citrate, 299; MnSO₄, 0.016; FeSO₄, 0.0378; CuSO₄, 0.00033; Calcium iodate, 0.0006; MgO, 0.00135; NaSeO₃, 0.00025



Table 2. Dietary supplements sources contents of six different experimental diets

Diets ¹	Supplements			
	Antibiotics ² oxytetracycline	organic acid blend (A)	organic acid blend (B)	Essential Oil
D1 (Con)	—	—	—	—
D2 (Antibio)	50mg/kg body weight/day	—	—	—
D3 (OABA)	—	4g/kg diet	—	—
D4 (OABB)	—	—	4g/kg diet	—
D5 (EO _{0.25})	—	—	—	0.25 g/kg diet
D6 (EO _{0.5})	—	—	—	0.5 g/kg dirt

¹ Refer to Table 1

² Antibio group will be fed the control diet with OTC for 3rd, 4th, 5th, 8th, 9th & 10th week only during the experimental period of 10 weeks (1st, 2nd, 6th, 7th, week fish fed only the control diet without OTC)

Ⅲ. 결과

1. 성장률 및 어체 일반성분 조사

성장결과는 Table 3과 Figure 1~4 에 나타내었다. 실험결과 총 사육실험기간 10주간의 증체율(WG), 사료효율(FE), 일간성장률(SGR), 단백질 전환효율(PER)에 있어서 대조구와 항생제, 유기산 복합제, essential oil 복합제를 첨가한 Antibio, OABA, OABB, EO_{0.25}, 그리고 EO_{0.5} 실험구에서 유의한 차이를 보이지 않았다. ($P < 0.05$). 전어체의 일반성분 분석결과에서 대조구와 항생제, 유기산 복합제, essential oil 복합제를 첨가한 Antibio, OABA, OABB, EO_{0.25}, 그리고 EO_{0.5} 실험구에서 유의한 차이를 보이지 않았다. ($P < 0.05$).

2. 장내 미생물상의 변화

장내 미생물을 분석한 결과는 장내 총균수는 Table 4와 Figure 5 에 나타내었다. 대조구에 비해 항생제, 유기산복합제, essential oil 복합제를 첨가한 Antibio, OABA, OABB, EO_{0.25}, 그리고 EO_{0.5} 실험구에서 유의하게 낮은 미생물 총 균수(total bacterial count)를 보였으며($P < 0.05$), Antibio, OABA 그리고 OABB 에서는 유의적으로 가장 낮게 나타났다. ($P < 0.05$). *Vibrio* spp 수의 결과는 Table 5와

Figure 6 에 나타내었다. 항생제, 유기산복합제, essential oil 복합제를 첨가한 Antibio, OABA, OABB, EO_{0.25}, 그리고 EO_{0.5}에서 줄어드는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

3. 특정 병원균 감염에 대한 내성 효과

공결실험 결과는 Table 6, Figure 7에 나타 내었다. *E.tarda* 균주를 복강주사한 후 실험구별 누적 폐사율을 조사해본 결과, 항생제, 유기산복합제, essential oil 복합제를 첨가한 Antibio, OABA, OABB, EO_{0.25}, 그리고 EO_{0.5} 실험구에서 대조구에 비해 유의하게 누적 폐사율이 낮게 나타났다. ($P < 0.05$)

4. 혈액학적 분석

실험사료를 섭취한 치어기 넙치의 혈청 성분의 변화는 Table 6과 Figure 8~11에 나타내었다. GOT(18.6~24.4 IU/L), GPT(4.6~6.6 IU/L), Total cholesterol(106.2~117.8 mg/dL), glucose (20.0~23.0 mg/dL)로 서 전실험구에 있어서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

Table 3. Effects of the basal diet and five test diets on growth performance (weight gain, Feed efficiency, Specific growth rate, Protein efficiency ratio) in olive flounder¹

	Diets ²						Pooled SEM
	Con	Antibio	OABA	OABB	EO _{0.25}	EO _{0.5}	
WG(%) ³	337.0	323.9	328.1	333.7	321.2	321.3	2.8
FE(%) ⁴	101.5	98.1	101.3	101.9	101.9	101.1	0.7
SGR(%) ⁵	2.46	2.41	2.42	2.43	2.40	2.40	0.01
PER ⁶	1.99	1.96	1.97	2.01	2.02	2.02	0.01

¹ Mean of five replicate groups ; Values in the same row different superscripts are significantly different (P <0.05).

² Refer to the Table 1

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

⁴ Weight gain : $[(\text{final wt.} - \text{initial wt.}) / \text{initial wt.}] \times 100$.

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

⁶ Specific growth rate : $[(\log_e \text{ final wt.} - \log_e \text{ initial wt.}) / \text{days}] \times 100$.

⁷ Protein efficiency ratio : wet wt gain / protein intake.

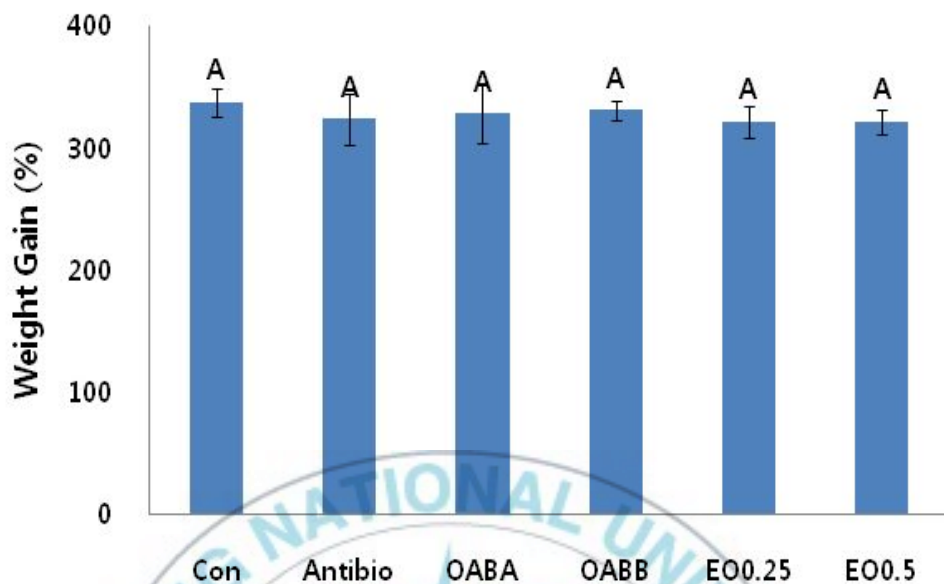


Fig 1. Average Weight gain (WG, %) from juvenile olive flounder fed 6 diets for 10 weeks. Values are means from five replicate group where the bar have different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

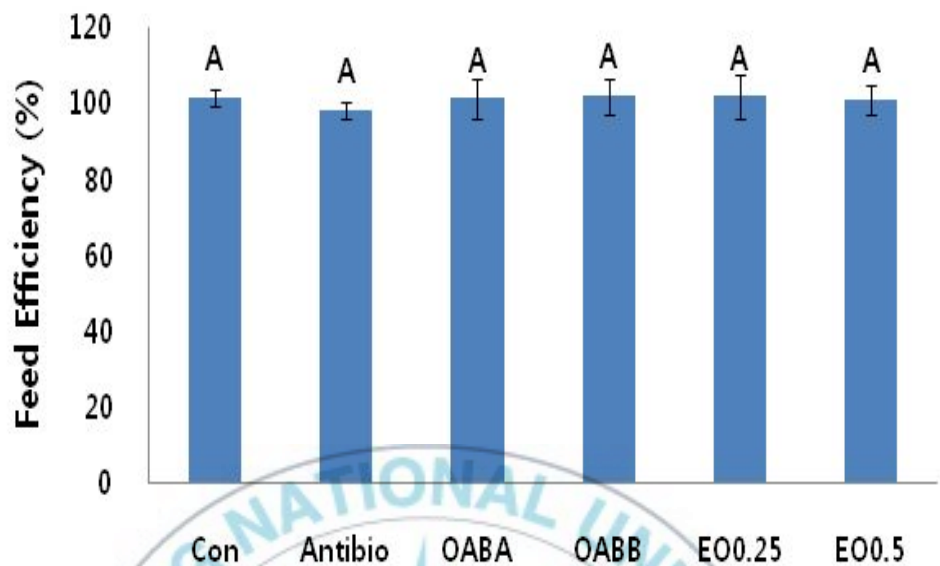


Fig 2. Average Feed efficiency (FE, %) from juvenile olive flounder fed 6 diets for 10 weeks. Values are means from five replicate group where the bar have different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

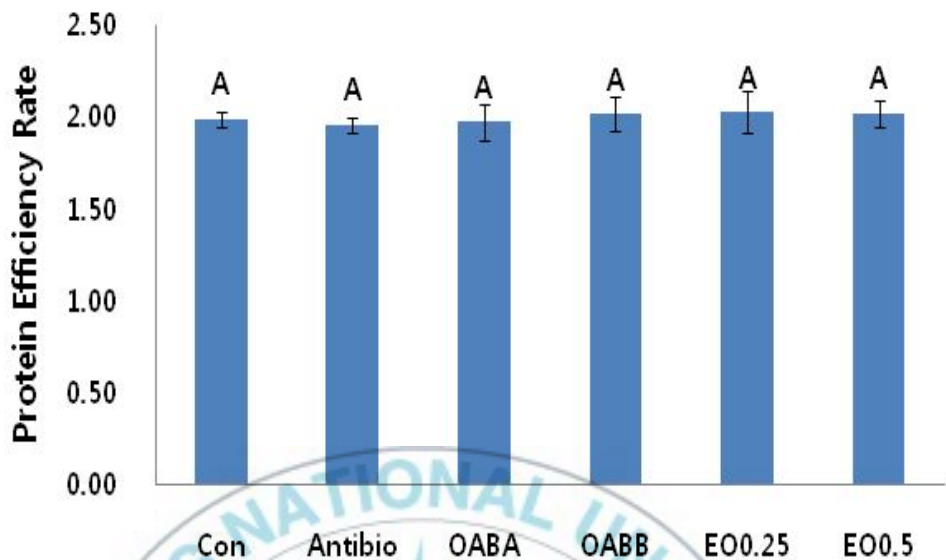


Fig 3. Average Specific growth rate(SGR %) from juvenile olive flounder fed 6 diets for 10 weeks. Values are means from five replicate group where the bar have different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

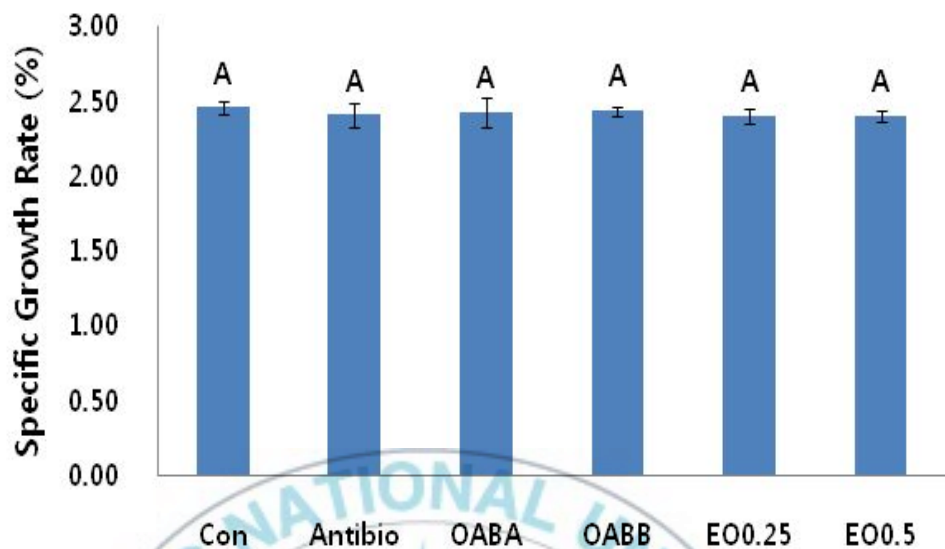


Fig 4. Average Protein efficiency ratio (PER) from juvenile olive flounder fed 6 diets for 10 weeks. Values are means from five replicate group where the bar have different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Table 4. Effects of the basal diet and five test diets on total bacterial count in intestine ¹

diets ²	Total bacterial count CFU X 10 ⁶ / g
D1 (Con)	1.79 ± 0.14 ^A
D2 (Antibio)	1.13 ± 0.10 ^C
D3 (OABA)	1.20 ± 0.04 ^C
D4 (OABB)	1.14 ± 0.07 ^C
D5 (EO _{0.25})	1.39 ± 0.04 ^B
D6 (EO _{0.5})	1.33 ± 0.09 ^B

¹ Mean of five replicate groups ; Values in the same row different superscripts are significantly different (P <0.05).

² Refer to the Table 1

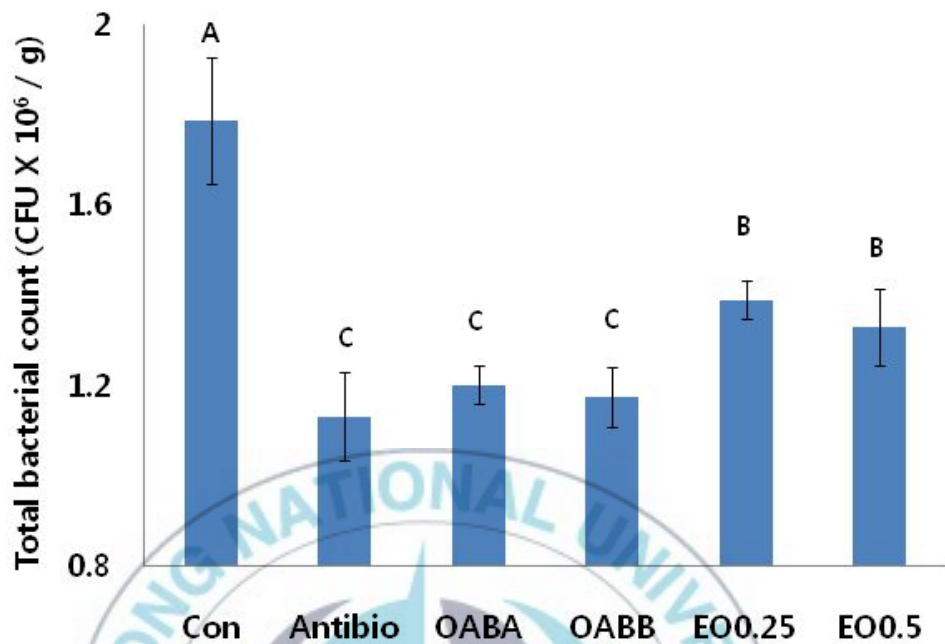


Fig 5 Average total bacterial count in intestine from juvenile olive flounder fed 6 diets for 10 weeks. Values are means from five replicate group where the bar have different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Table 5. Effects of the basal diet and five test diets on *Vibrio* spp. in intestine ¹

diets ²	Count of <i>Vibrio</i> spp. CFU X 10 ⁴ /g
D1 (Con)	2.31 ± 0.53
D2 (Antibio)	1.47 ± 0.40
D3 (OABA)	1.60 ± 0.48
D4 (OABB)	1.61 ± 0.47
D5 (EO _{0.25})	1.95 ± 0.49
D6 (EO _{0.5})	1.82 ± 0.53

¹ Mean of five replicate groups ; Values in the same row different superscripts are significantly different (P <0.05).

² Refer to the Table 1

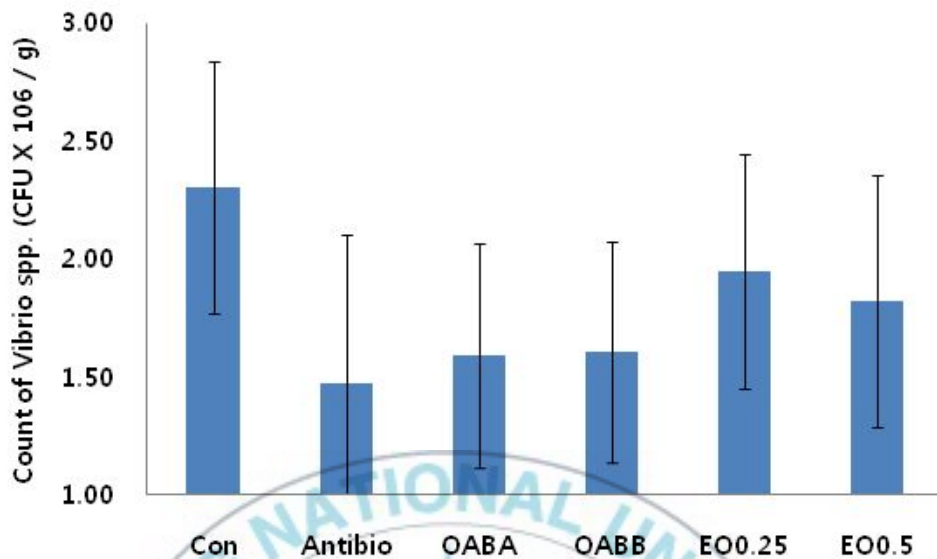


Fig 6 Average count of *Vibrio* spp. in intestine from juvenile olive flounder fed 6 diets for 10 weeks. Values are means from five replicate group where the bar have different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Table 6. Cumulative mortality rate (%) due to *Edwardsiella tarda* in juvenile olive flounder fed experimental diets. ¹

Diets ²	Cumulative mortality rate (%)									
	Days after challenge									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
D1 (Con)	0	0	0	16	32	56	56	80	80	100
D2 (Antibio)	0	0	0	0	8	20	32	48	48	48
D3 (OABA)	0	0	0	0	12	16	40	40	60	60
D4 (OABB)	0	0	0	0	12	16	48	48	60	60
D5 (EO0.25)	0	0	0	0	8	20	32	32	56	56
D6 (EO0.5)	0	0	0	0	8	20	32	32	48	56

¹ Mean of five replicate groups ; Values in the same row different superscripts are significantly different (P <0.05).

² Refer to the Table 1

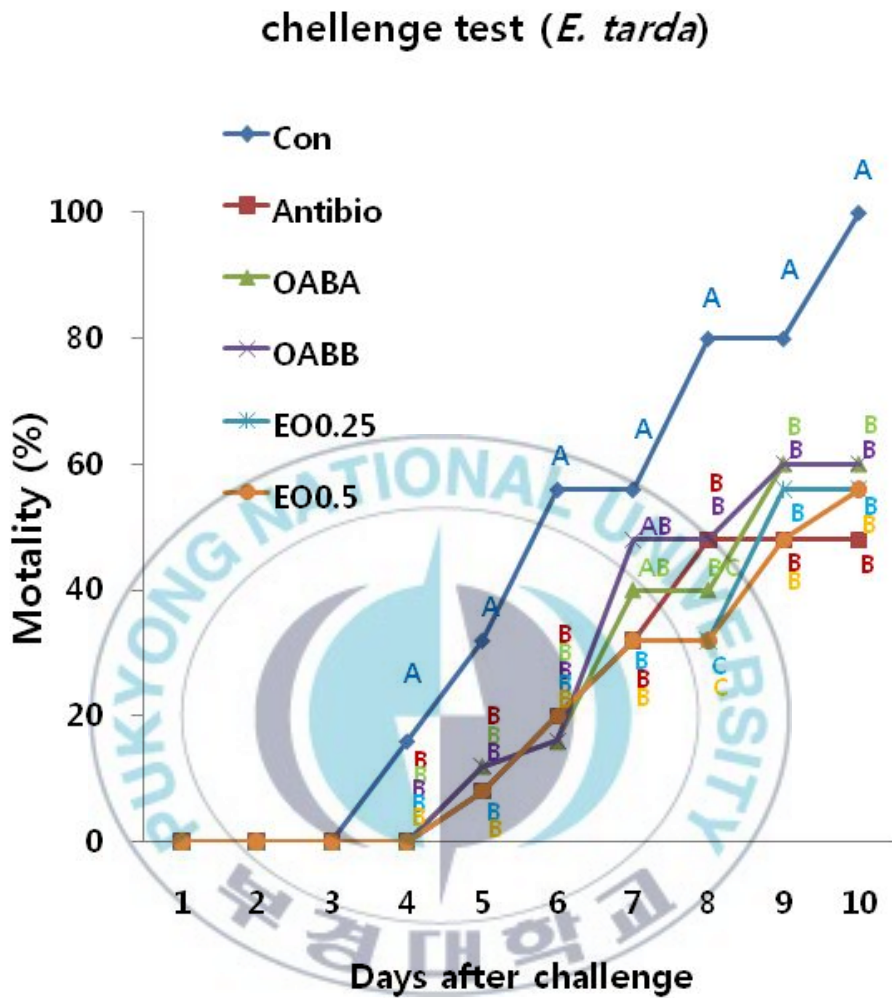


Fig 7. Cumulative mortality rate (%) due to *Edwardsiella tarda* in juvenile olive flounder fed experimental diets. Values are means from five replicate group where the bar have different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Table 7. Blood results of juvenile olive flounder fed five experimental diets for 10 weeks¹

	Diets ²						Pooled SEM
	Con	Antibio	OABA	OABB	EO _{0.25}	EO _{0.5}	
GOT ³	21.6	24.4	19.6	18.4	18.6	18.6	0.9
GPT ⁴	6.0	6.6	6.2	6.4	5.6	4.6	0.3
TCHO ⁵	112.6	114.8	113.0	117.8	106.2	111.4	1.7
GLU ⁶	23.0	21.4	20.8	20.8	20.2	20.0	0.9

¹ Mean of five replicate groups ; Values in the same row different superscripts are significantly different (P <0.05).

² Refer to the Table 1

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

⁴ Glutamic pyruvic transaminase. One unit is defined as the amount of enzyme causing the transamination of 1.0 umol of L-aspartate per minute at 25°C and pH 7.4 : IU/L

⁵ Total cholesterol : mg/dL

⁶ Glucose : mg/dL

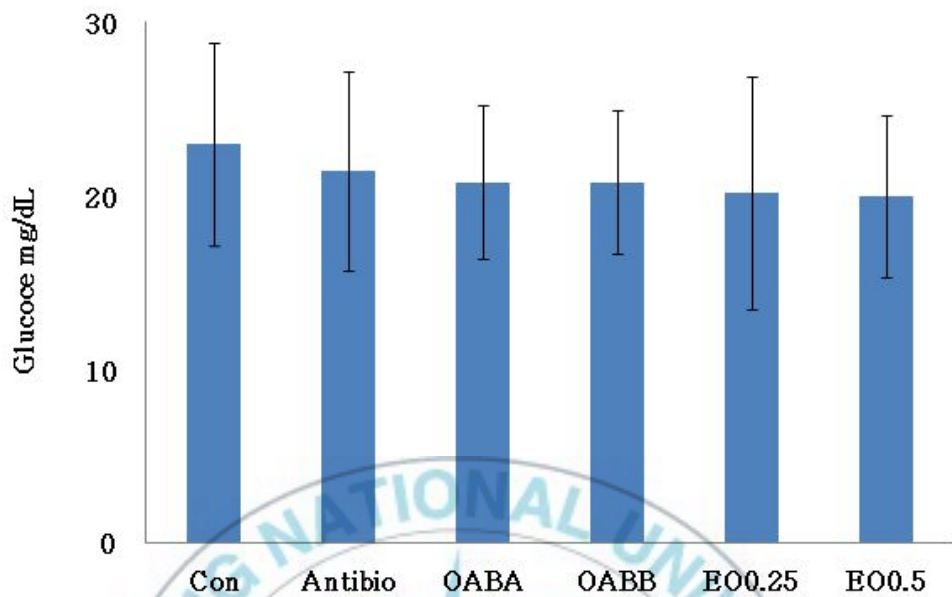


Fig 8 Average Glucose from juvenile olive flounder fed 6 diets for 10 weeks. Values are means from five replicate group where the bar have different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

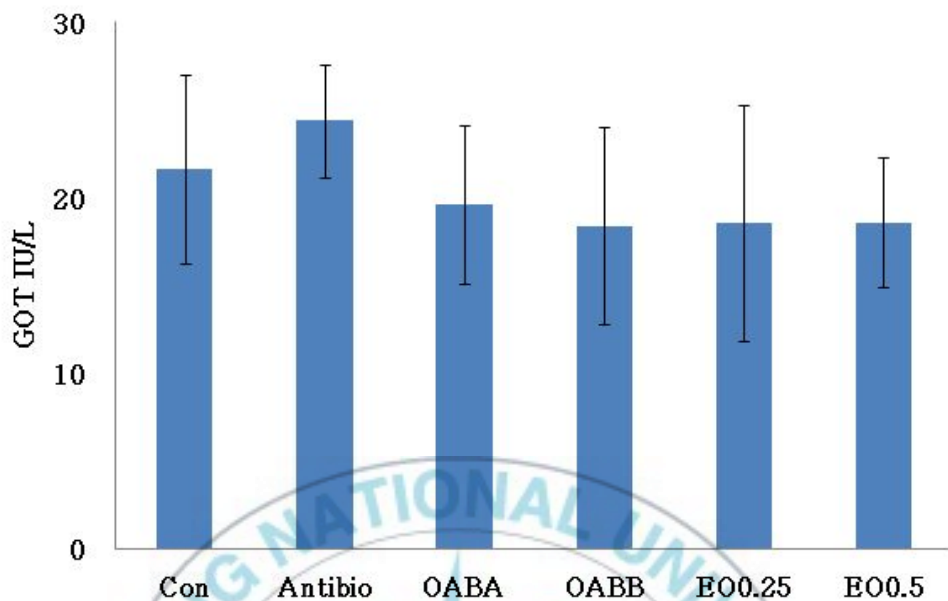


Fig 9 Average GOT from juvenile olive flounder fed 6 diets for 10 weeks. Values are means from five replicate group where the bar have different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

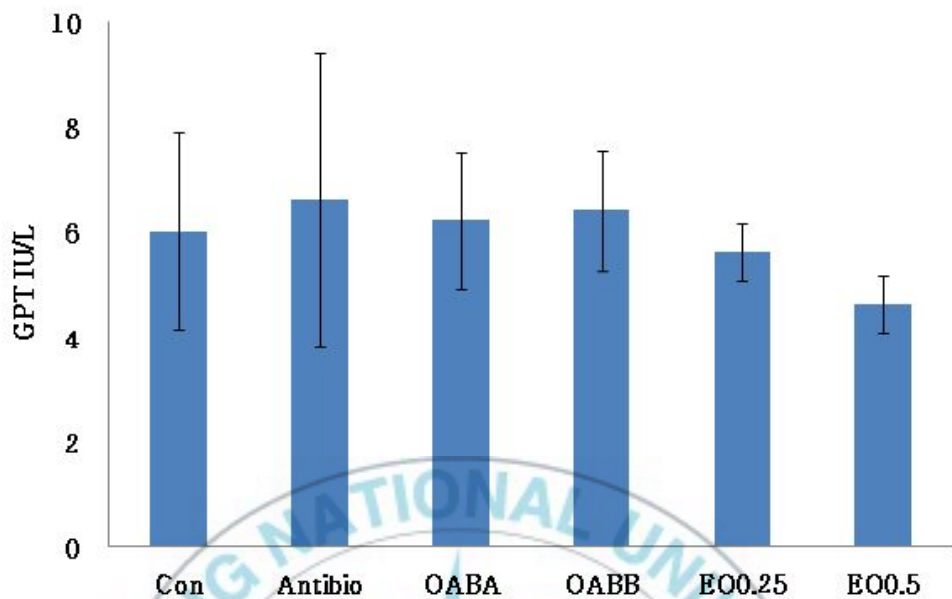


Fig 10 Average GPT from juvenile olive flounder fed 6 diets for 10 weeks. Values are means from five replicate group where the bar have different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

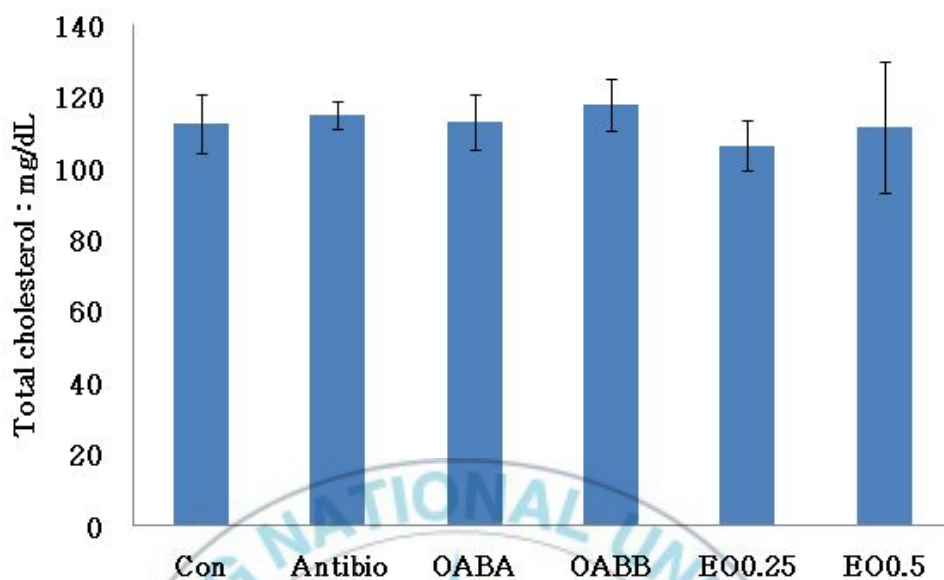


Fig 11 Average total cholesterol from juvenile olive flounder fed 6 diets for 10 weeks. Values are means from five replicate group where the bar have different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

IV. 고 찰

항생제는 성장촉진과 질병의 예방, 치료의 목적으로 많은 양의 항생제가 과다 사용되어 왔다. (Hernandez-Serrano 2005) 하지만 최근 항생제의 과다사용으로 인해, 최근 많은 병원균들이 항생제에 내성을 갖게 되었고 특히 여러항생제에 동시 내성을 갖는 내성균들이 출현 하게 되었다. (De Paola 등 1995; Agers 등 2007). 또한 항생제 잔류 문제들로 인해 최근 여러나라에서 항생제의 사용을 금하고 있으며 이러한 항생제 사용의 금지로 인한 항생제 대체물질에 대한 연구와 노력을 기울이고 있다.

본 실험에 사용된 유기산과 essential oil은 성장촉진 및 면역력 향상 등의 효과를 가짐으로서 항생제를 대체할 물질중의 하나로서 텔라피아(Ramli 등, 2005 ; Zhou 등, 2009), 무지개 송어(De wet, 2005), 대서양 연어 (Lundebye 등, 1999), 도미 (Hossain M.A 등, 2007)등의 어류뿐만 아니라 가금류나 돼지(Lluge H 등, 2006)등에서 종에 따라, 유기산 및 essential oil의 종류에 따라 많은 연구가 있어 왔다.

본 실험에서 10주간 넙치의 성장 실험 결과 증체율과 일간 성장률, 사료효율 및 단백질 전환효율에서 전 실험구간 유의한 차이는 보이지 않았다. 보고된 결과에 따르면 사료내 유기산의 첨가를 통해서 성장 촉진 효과를 확인할 수 있었으며(Gislason 등, 1996 ; De Wet,2005 ; Baruah 등, 2007) 이와는 반대로 사료내 유기산의 첨

가를 통해서 통계적으로 유의한 성장촉진 효과를 보지 못했다는 보고(Owen 등, 2006 ; Hossain 등, 2007)도 있었다. 하지만 어종 및 실험어의 크기(Gislason 등, 1994), 유기산의 종류 및 첨가수준(Ringo 1991; De Wet, 2005), 사료의 조성(Owen 등 2006 ; Sarker 등, 2007)등에 따라 차이는 있으나 성장촉진물질의 가능성은 확인할수 있었다. 본 실험에서도 사료효율에서 실험초기 유기산 및 essential 첨가 실험구에서 사료효율이 감소하는 모습을 보이다 실험후기에는 사료효율이 증가하는 경향을 보였다. 이로서 유기산 및 essential oil의 장기간 첨가시 사료효율이나 성장촉진 효과 가능성이 있을 것으로 판단된다.

장내 미생물을 분석한 결과 대조구에 비해 항생제, 유기산복합제, essential oil 복합제를 첨가한 Antibio, OABA, OABB, EO_{0.25}, 그리고 EO_{0.5} 실험구에서 대조구에 비해 유의하게 낮은 미생물 총균수(total bacterial count)를 보였으며($P < 0.05$), Vibrio 수에 있어서도 대조구에 비해 항생제, 유기산복합제, essential oil 복합제를 첨가한 Antibio, OABA, OABB, EO_{0.25}, 그리고 EO_{0.5} 실험구가 줄어드는 경향을 보였다. Booth and Stratford, 2003 는 어체내로 유기산이 유입되면 박테리아 세포속으로 확산이 되고 그 속에서 분리되어 세포질 내의 pH를 저하시켜 결국에는 세포가 사멸하게 된다고 하였다. 티라피아 사료내 복합유기산제(OAB)를 첨가한 경우 배설물과 장 표면의 총균수가 감소하였다는(wing-Keong 등 2009) 보고와, 육상 가축의 사료내 유기산 첨가시 장내 세균의 성장 저해 작용을 한다는 보고(Alp 등 1999; Kluge 등 2006)가 있었다.

*Edwardsiella tarda*는 넙치뿐만 아니라 여러 종의 해수어에 유행하며, 주로 여름철에 발생하는 대표적인 질병으로서, 항문이 붉어지고 배가 부어오르는 것이 대표적인 증상이다. 이 병에 감염되면 일일 폐사량은 많지 않더라도 장기간에 걸쳐 폐사가 일어나기 때문에 결과적으로 피해가 큰 질병중 하나이다. 공격실험으로 *E.tarda* 균주를 복강주사한 후 실험구별 누적 폐사율을 조사해본 결과, 항생제, 유기산 복합제, essential oil 복합제를 첨가한 Antibio, OABA, OABB, EO_{0.25}, 그리고 EO_{0.5} 실험구에서 대조구에 비해 유의하게 누적 폐사율이 낮게 나타났다. (P < 0.05). Ramli et al. (2005)는 틸라피아 사료내 유기산제의 한 종류인 potassium diformate를 첨가하였을 경우 *V. anguillarum* 균에 대한 공격실험 결과 생존률이 증가한다고 보고하였으며, W-K NG et al. (2009)는 사료내 유기산 첨가시 *S. agalactiae* 균에 대한 저항성이 증가한다고 보고하였다. 또한 여러 보고에 의하면 식물에서 추출한 방향유가 양식에 있어서 항생제의 대체물질로서 사용될 가능성이 있다고 보고되어 왔다.

따라서 장내 미생물 총균수와 *E.tarda*에 의한 공격실험결과 및 성장결과들을 토대로 보았을 때 치어기 넙치 사료내 유기산 및 essential oil 의 첨가가 장내미생물상의 안정과 *E.tarda*균에 대한 저항성을 높일수 있으며 또한 성장효과 및 항생제의 대체가능성이 있을 것으로 판단된다.

V. 요 약

본 연구는 사료내 복합유기산제의 첨가에 따른 넙치의 성장효과 및 항생제 대체가능성을 확인하기 위한 목적으로 수행되었다.

평균무게 $3.5 \pm 0.05\text{g}$ (mean $\pm$ SD)인 넙치 치어 25마리를 50L 사각수조에서 5반복으로 무작위 배치하였고 사료내 항생제 및 유기산의 첨가수준에 따른 6개의 실험사료(Diet 1 : control, Diet2 : 항생제첨가구 - 50mg OTC / kg body weight / day, Diet 3 : 복합유기산제 I 첨가구 - 4g/kg diet, Diet 4 복합유기산제 II 첨가구 - 4g/kg diet, Diet 5 복합유기산제 III 첨가구 - 0.25g/kg diet, Diet6 복합유기산제 III 첨가구 - 0.5g/kg diet)를 제작하여 각 실험구별로 일일 어체중의 3%씩 공급하였으며, 총 10주간 사육실험을 수행하였다. 실험결과 총 사육실험기간 10주간의 증체율(WG), 사료효율(FE), 일간성장률(SGR), 단백질 전환효율(PER)에 있어서 실험구간 유의한 차이를 보이지 않았다. 장내미생물의 총균수 변화에서 있어서 대조구에 비해 항생제, 유기산복합제, essential oil 복합제를 첨가한 Antibio, OABA, OABB, EO_{0.25}, 그리고 EO_{0.5} 실험구에서 유의하게 낮은 미생물 총 균수(total bacterial count)를 보였으며($P < 0.05$), *Vibrio* spp 수의 결과 항생제, 유기산복합제, essential oil 복합제를 첨가한 Antibio, OABA, OABB, EO_{0.25}, 그리고 EO_{0.5}에서 줄어드는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

*Edwardsiella tarda*균을 이용한 공격실험결과 항생제, 유기산복합

제, essential oil 복합제를 첨가한 Antibio, OABA, OABB, EO_{0.25}, 그리고 EO_{0.5} 실험구에서 대조구에 비해 유의하게 누적 폐사율이 낮게 나타났다. ($P < 0.05$) 실험사료를 섭취한 치어기 넙치의 혈청 성분의 변화는 GOT(18.6~24.4 IU/L), GPT(4.6~6.6 IU/L), Total cholesterol (106.2~117.8 mg/dL), glucose(20.0~23.0 mg/dL)로서 전실험구에 있어서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

따라서 복합유기산제는 항생제대체 물질로 사용 가능할 것으로 판단된다. 복합유기산의 종류 및 essential oil의 농도 수준에 관한 실험은 추가적으로 필요할것으로 판단된다.



VI. 감사의 글

석사 과정의 미흡한 논문을 마무리 하면서 여러 고마운 분들께 감사의 마음을 전하고 싶습니다. 먼저, 저에게 고등학교 졸업하고부터 지금까지 오도록 길을 안내해 주시고 본 논문 디자인에서부터 전 실험과정에 이르기까지의 지도는 물론, 학문하는 자세에 대해 끊임 없이 강조하시고 가르쳐 주신 지도교수 배승철 교수님께 진심어린 존경과 감사의 말씀을 올리며, 아울러 바쁘신 와중에서도 부족한 논문의 심사를 맡아주신 장영진 교수님과 김동수 교수님께도 감사드립니다. 그리고 석사과정동안 강의 및 세미나를 통해 학문적 지식과 연구자의 길을 일깨워주신 조재운 교수님, 허성범 교수님, 김창훈 교수님, 김종명 교수님, 남윤권 교수님, 공승표 교수님께도 깊은 감사드립니다. 그리고 실험을 도와 주신 군산대학교 박관하 교수님과 실험실원들에게도 감사드리며 본 실험을 원활히 수행 할수 있도록 도와주신 NOVUS International 의 한경민 박사님께도 감사드립니다. 그리고 언제나 사고만 치는 저를 감싸주시고 격려해 주시며 부족한 점을 가르쳐 주신 구자완, 배준영, 김영철, 이승형, 이준호 선배님, 이번에 같이 졸업준비를 하며 서로 부족한 점들을 많이 도와주었던 용현형과 친구 남용이, 그리고 잔소리만 하는 선배의 실험을 군소리 없이 잘 도와준 친구 유의, 후배 진혁, 현호 또한 실험실 동료 Mahmoud와 Okorie에게도 진심으로 감사드립니다. 끝으로 사랑하는 할머니, 못난 자식의 뒷바라지하산다고 고생하신 부모님, 학위중이라 형 노릇 한번 못해준 동생 시현 그리고 언제나 내편에서서 힘이 되어준 여자친구에게 두 손 모아 감사드립니다.

VII. 참고 문헌

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1995. Official methods of analysis, 16th edition. AOAC International, Arlington, Virginia.
- Abutbul, S., Golan-Goldhirsh, A., Barazani, O. and Zilberg, D. (2004) Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp.). *Aquaculture* 238, 97-105.
- Alp M., Kocabagfl i N., Kahraman R. & Bostan K. (1999) Effects of dietary supplementation with organic acids and zinc bacitracin on ileal microflora, pH and performance in broilers. *Tropical Journal of Veterinary and Animal Sciences* 23,451-455.
- Baruah K., Pal A.K., Sahu N.P., Jain K.K., Mukherjee S.C. & Debnath D. (2005) Dietary protein level, microbial phytase, citric acid and their interactions on bone mineralization of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles. *Aquaculture Research* 36, 803-812.
- Baruah K., Sahu N.P., Pal A.K., Jain K.K., Debnath D. & Mukherjee S.C. (2007) Dietary microbial phytase and citric acid synergistically enhances nutrient digestibility and growth performance of *Labeo rohita* (Hamilton) juvenile sat

- sub-optimal protein level. *Aquaculture Research* 38,109–120.
- Booth I.R. & Stratford M. (2003) Acidulants and low pH. In: *Food Preservatives* (ed. by N.J. Russell & G.W. Gould), pp. 25–47. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, USA.
- Citarasu, T., Babu, M.M., Sekar, R.R.J. and Marian, M.P. (2002) Developing Artemia enriched herbal diet for producing quality larvae in *Penaeus monodon*, Fabricius. *Asian Fish Sci* 15,21–32
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W. and Bossier, P. (2007) Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent *vibrios* is in aquaculture as an example. *Trends Biotechnol* 25,472–479.
- DeWet L. (2005) Organic acids as performance enhancers. *AquaFeeds: Formulation and Beyond* 2,12–14.
- Didry, N., Dubreuil, L., Pinkas, M., 1993. Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. *Pharmazie* 48, 301–304.
- Direkbusarakom, S., Ezura, Y., Yoshimizu, M. and Herunsalee, A. (1998) Efficacy of Thai traditional herb extracts against fish and shrimp pathogenic bacteria. *Fish Pathol* 33, 437–

441.

- Dorman, H.J.D. and Deans, S.G. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 88, 308-316.
- Economou, K.D., Oreopoulou, V., Thomopoulos, C.D., 1991. Antioxidant activity of some plant extracts of the family *Labiatae*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 109-113.
- FAO Fishery Information Data and Statistics Unit. FISHSTAT+Databases and Statistics. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nation; 2005.
- GESAMP (IMO/FAO/UNESCO-IOC/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP). Toward safe and effective use of chemicals in coastal aquaculture. Reports and studies, GESAMP. 1997; vol. 65. FAO.
- Gislason G., Olsen R.E. & Ring E. (1994) Lack of growth stimulating effect of lactate on Atlantic salmon, *Salmosalar L.* *Aquaculture and Fisheries Management* 25,861-862.
- Gislason G., Olsen R.E. & Hinge E. (1996) Comparative effects of dietary NaI-lactate on Arctic char, *Salvelinus alpinus L.*, and Atlantic salmon, *Salmosalar L.* *Aquaculture Research* 27,429-435.
- Hernandez-Serrano P. (2005) Responsible use of antibiotics in aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 469. Food and

- Agriculture Organization of the United Nations, Rome 97pp.
- Hossain M.A., Pandey A. & Satoh S. (2007) Effects of organic acids on growth and phosphorus in red sea bream *Pagrus major*. Fisheries Science 73, 1309–1317.
- Hsieh, T.-J., Wang, J.-C., Hu, C.-Y., Li, C.-T., Kuo, C.-M. and Hsieh, S.-L. (2008) Effects of Rutin from *Toona sinensis* on the immune and physiological responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under *Vibrio alginolyticus* challenge. Fish Shellfish Immunol 25, 581–588.
- Immanuel, G., Vincybai, V.C., Sivaram, V., Palavesam, A. and Marian, M.P. (2004) Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. Aquaculture 236, 53–65.
- Kluge H., Broz J. & Eder K. (2006) Effect of benzoic acid on growth performance, nutrient digestibility, nitrogen balance, gastrointestinal micro flora and parameters of microbial metabolism in piglets. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 90, 316–324.
- Kim, J.M., Marshall, M.R., Cornell, J.A., Preston III, J.F., Wei, C.I., 1995. Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. J. Food Sci. 60, 1364–1374.

- Lean^o, E.M., Xi, Y.C. and Liao, I.C. (2007) Effects of steiva extract on growth, non-specific immune response and disease resistance of grass prawn, *Penaeus monodon* (Fabricius) ,juveniles.J Fish Soc Taiwan 34,165-175.
- Luckstadt C. (2008) The use of acidifiers in fish nutrition. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources 3,1[^]8.
- Owen M.A.G.,Waines P., Bradley G. & Davies S. (2006) The effect of dietary supplementation of sodium butyrate on the grow th and microflora of Clariasgariepinus (Burchell1822). Abstract, XII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, Biarritz, France, 149pp.
- Papageorgiou, G., Botsoglou, N., Govaris, A., Giannenas, I., Botsoglou, E., 2003. Effect of dietary oregano oil and alpha-tocopheryl acetate supplementation on iron-induced lipid oxidation of turkey breast, thigh, liver and heart tissues. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.) 87, 324-335.
- Partanen K., Siljander-Rasi H., Alaviuhkola T., Suomi K. & Fossi M. (2002) Performance of growing-finishing pigs fed medium- or high-fiber diets supplemented with avilamycin, formic acid or formic acid-sorbate blend. Livestock Production Science 73,139[^]152.
- Parisien, A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R. and Lan, C.Q.

- (2008) Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. J Appl Microbiol 104, 1-13.
- Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Kole, C.R., Sahoo, S. (1995). Antibacterial activity of essential oils from cymbopogon: inter and intra specific differences. Microbios 84, 239-245.
- Petkam R., Luckstadt C., Nittayachit P., Sadao S. & Encarnacao P. (2008) Evaluation of a dietary organic acid blend on tilapia *Oreochromis niloticus* growth performance. Abstract, World Aquaculture 2008, Busan, Korea.
- Pond M.J., Stone D.M. & Alderman D.J. (2006) Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the intestinal micro flora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 261, 194-203.
- Ramli N., Heindl U. & Sunanto S. (2005) Effect of potassium diformate on growth performance of tilapia challenged with *Vibrio anguillarum*. Abstract, World Aquaculture 2005, Bali, Indonesia.
- Ringo E. (1991) Effects of dietary lactate and propionate on growth and digesta in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). Aquaculture 96, 321-333.
- Sarker M.S.A., Satoh S. & Kiron V. (2007) Inclusion of citric acid and/or acid-chelated trace elements in alternate plant

- protein source diets affects growth and excretion of nitrogen and phosphorus in red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture* 262,436–443.
- Vielma J. & Lall S.P. (1997) Dietary formic acid enhances apparent digestibility of minerals in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Nutrition* 3, 265–268.
- Vielma J.R., Rouhonen K. & Lall S.P. (1999) Supplemental citric acid and particle size of fish-bone meal influence the availability of minerals in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Nutrition* 5, 65–71.
- Yeh, R.-Y., Shiu, Y.-L., Ju, J.-Y., Cheng, S.-C., Huang, S.-Y., Lin, J.-C. and Liu, C.-H. (2008) Evaluation of the antibacterial activity of leaf and twig extracts of stout camphor tree, *Cinnamomum kanehirae*, and the effects on immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 27, 26–32.
- Zhou Z., Liu Y., Wang P., He S., Yao B., Gao X. & Wang X. (2008) The effects of dietary potassium diformate on growth performance, feed conversion and intestinal microbiota of hybrid tilapia. Abstract, XIII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, Florianopolis, Brazil.