

碩士學位論文

까막전복 (*Haliotis discus discus*)의 기초
생리학적 특성 분석 및 사료첨가제 급여에
따른 생리학적 변화에 관한 연구

The logo of Jeju National University is a large, stylized 'J' shape. The left vertical stroke of the 'J' is composed of three curved, flame-like shapes in blue, green, and grey. The right vertical stroke is a solid purple bar. At the bottom of the 'J' is a horizontal purple bar. In the center of the 'J' is a small square containing the Korean characters '국립' (National) and '대' (University). Below the 'J' is the text 'JEJU' in blue, with '1952' in a smaller font below it. The entire logo is surrounded by a circular border containing the text 'JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952' at the top and '제주대학교' (Jeju National University) at the bottom.

濟州大學校 大學院

水產生命醫學科

左 旻 昔

2009 年 2 月

까막전복 (*Haliotis discus discus*)의 기초
생리학적 특성 분석 및 사료첨가제 급여에
따른 생리학적 변화에 관한 연구

指導教授 呂寅圭

左 旻 昔

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2009 年 2 月

左旻昔의 理學碩士 學位論文을 認准함

審査委員長 이 경 준 (印)

委 員 전 유 진 (印)

委 員 여 인 규 (印)

濟州大學校 大學院

2009 年 2 月

Studies on physiology of disk abalone
(*Haliotis discus discus*): Basic characteristics
of physiology and their changes by
different food supplements

Min-Seok Jwa
(Supervised by professor In-Kyu Yeo)

A thesis submitted in partial fulfillment
of the requirement for the degree of
Master of Science

Department of Aquatic life medicine
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2009

목 차

목 차.....	i
List of Tables.....	iii
List of Figures.....	iv
Abstract.....	vi
I. 서 론.....	1
II. 염분변화 스트레스에 따른 까막전복(<i>Haliotis discus discus</i>)의 생리학적 변화에 관한 연구.....	6
1. 서론	6
2. 재료 및 방법	9
2-1. 실험 재료 및 사육 관리.....	9
2-2. 생존율 측정.....	10
2-3. 혈림프(Hemolymph) 수 측정.....	10
2-4. 항산화효소 측정.....	11
2-5. RT-PCR 분석.....	15
2-6. SDS-PAGE 분석.....	17
2-7. Western blot 분석.....	19
2-8. Respiratory burst activity 측정.....	20
2-9. Phenoloxidase activity 측정.....	20
2-10. Lysozyme activity 측정.....	21
2-11. 통계처리.....	21
3. 결과	22
3-1. 급격한 염분 변화에 따른 까막전복의 초기 생리 변화	22
3-1-1. 생존율 변화	22
3-1-2. 혈림프 수 변화.....	23
3-1-3. 항산화효소 변화.....	24
3-1-4. HSP 70 mRNA 발현량의 변화.....	25
3-1-5. 단백질 발현의 변화.....	26
3-1-6. Respiratory burst activity 변화.....	27
3-1-7. Phenoloxidase activity 변화.....	28
3-1-8. Lysozyme activity 변화.....	29
3-2. 저염분수 유입 변화에 따른 까막전복의 초기 생리 변화.....	30
3-2-1. 생존율 변화.....	30
3-2-2. 혈림프 수 변화.....	31
3-2-3. 항산화효소 변화.....	32
3-2-4. HSP 70 mRNA 발현량의 변화.....	33

3-2-5. 단백질 발현의 변화.....	34
3-2-6. Respiratory burst activity 변화.....	35
3-2-7. Phenoloxidase activity 변화.....	36
3-2-8. Lysozyme activity 변화.....	37
4. 고찰.....	38
III. 사료첨가제 급여에 따른 까막전복(<i>Haliotis discus discus</i>)의	44
생리학적 변화에 관한 연구.....	44
1. 서론.....	44
2. 재료 및 방법.....	47
2-1. 실험 재료 및 사육 관리.....	47
2-2. 전복용 사료제조.....	48
2-3. 생존율 측정.....	51
2-4. 성장도 측정.....	51
2-5. 패각색 변화 관찰.....	51
2-6. 혈림프구수 측정.....	51
2-7. 항산화 효소 측정.....	52
2-8. SDS-PAGE 분석.....	53
2-9. Western blot 분석.....	53
2-10. 통계처리.....	53
3. 결과.....	54
3-1. 사료급여에 따른 까막전복의 생리 변화.....	54
3-1-1. 생존율 변화.....	54
3-1-2. 성장율 변화.....	55
3-1-3. 패각색의 변화.....	61
3-1-4. 가식부의 일반성분 변화.....	62
3-1-5. 혈림프구 수의 변화.....	66
3-1-6. 단백질 발현의 변화.....	68
3-2. 사료 급여 후 저염분 스트레스에 대한 전복의 생리적인 변화.....	70
3-2-1. 생존율 변화.....	70
3-2-2. 혈림프구수의 변화.....	71
3-2-3. 항산화 효소의 활성 변화.....	72
3-2-4. SDS-PAGE 분석.....	74
3-2-5. Respiratory burst activity 변화.....	75
3-2-6. Phenoloxidase activity 변화.....	76
3-2-7. Lysozyme activity 변화.....	77
4. 고찰.....	78
IV. 종합 고찰.....	83
V. 요약.....	88
VI. 참고 문헌.....	90

List of tables

Table 1. Oligonucleotide of primers for RT-PCR	16
Table 2. Compositions of reagents related to SDS gel	17
Table 3. Regents for preparing for SDS-PAGE	18
Table 4. Variations of hemolymph factors of abalone (<i>H. discus discus</i>) exposed to acute water-salinity stress.	23
Table 5. Ingredients and proximate analysis of the experimental diets for disk abalone	49
Table 6. Sources of dietary survival rate(%) of disk abalone(<i>H. discus discus</i>)	54
Table 7. Variations of moisture content in disk abalone (<i>H. discus discus</i>) reared with different dose diets	62
Table 8. Variations of crude ash content in disk abalones (<i>H. discus discus</i>) reared with different dose diets	63
Table 9. Variations of crude protein content in disk abalones (<i>H. discus discus</i>) reared with different dose diets	64
Table 10. Variations of crude lipid content in disk abalone (<i>H. discus discus</i>) reared with different dose diets.	65
Table 11. Variations of the number of hemolymph of disk abalone (<i>H. discus discus</i>) to sources of dietary additives	67
Table 12. Survival rate(%) of the disk abalone (<i>H. discus discus</i>) exposed to acute water-salinity stress	70
Table 13. Variations of the number of hemolymph of the disk abalone (<i>H. discus discus</i>) exposed to acute water-salinity stress	71

List of figures

Fig. 1. Take a blood sample in abalone.	10
Fig. 2. Procedures for extraction of protein.	12
Fig. 3. Procedures for protein assay by Lowery method.	13
Fig. 4. Procedures for measurement of catalase activity.	14
Fig. 5. Procedures for measurement of SOD activity.	14
Fig. 6. Set up of Whatman paper (blotting paper), gel and PVDF between the plate electrodes. Blotting paper and PVDF are used in the same size as the gel.	19
Fig. 7. Survival rates of the abalone (<i>H. discus discus</i>) exposed to acute water-salinity stress.	22
Fig. 8. Change of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity in abalone (<i>H. discus discus</i>) exposed to acute water-salinity stress.	24
Fig. 9. Effect of acute water-salinity stress on β -actin mRNA and HSP 70 mRNA of gill in abalone (<i>H. discus discus</i>).	25
Fig. 10. Effect of acute water-salinity stress on HSP 70 mRNA of gill in abalone (<i>H. discus discus</i>).	25
Fig. 11. Protein expression of abalone (<i>H. discus discus</i>) exposed to acute water-salinity stress.	26
Fig. 12. Effect of acute water-salinity stress on Respiratory burst activity in abalone (<i>H. discus discus</i>).	27
Fig. 13. Phenoloxidase activity of abalone (<i>H. discus discus</i>) exposed to acute water-salinity stress.	28
Fig. 14. Effects of acute water-salinity stress on Lysozyme activity in abalone (<i>H. discus discus</i>).	29
Fig. 15. Survival rates of the abalone (<i>H. discus discus</i>) exposed to low salinity stress.	30
Fig. 16. Variations of hemolymph factors of abalone (<i>H. discus discus</i>) exposed to low-salinity stress.	31
Fig. 17. Change of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity in abalone (<i>H. discus discus</i>) exposed to low-salinity stress.	32
Fig. 18. Effect of low-salinity stress on β -actin mRNA and HSP 70 mRNA of gill in abalone (<i>H. discus discus</i>).	33
Fig. 19. Effect of low-salinity stress on HSP 70 mRNA of gill in abalone (<i>H. discus discus</i>).	33
Fig. 20. Protein expression of abalone (<i>H. discus discus</i>) exposed to low-salinity stress.	34

Fig. 21. Effect of low-salinity stress on respiratory burst activity in abalone (<i>H. discus discus</i>).	35
Fig. 22. Phenoloxidase activity of abalone (<i>H. discus discus</i>) exposed to low-salinity stress.	36
Fig. 23. Effects of low-salinity stress on lysozyme activity in abalone (<i>H. discus discus</i>).	37
Fig. 24. The external form of manufactured feed1 for disk abalone.	50
Fig. 25. Variations of shell length for disk abalone (<i>H. discus discus</i>) reared with different dose diets.	56
Fig. 26. Variations of shell width for disk abalone (<i>H. discus discus</i>) reared with different dose diets.	58
Fig. 27. Variations of total weight for disk abalone (<i>H. discus discus</i>) reared with different dose diets.	60
Fig. 28. The change of shell color as time passes with different dose diets in disk abalone (<i>H. discus discus</i>).	61
Fig. 29. Phase of SDS-PAGE in gill of disk abalone (<i>H. discus discus</i>) reared with different dose diets.	69
Fig. 30. Immuno-detection of heat shock protein 70(HSP 70) in gill of disk abalone (<i>H. discus discus</i>) reared with different dose diets.	69
Fig. 31. Change of superoxide dismutase (SOD) activity in disk abalone (<i>H. discus discus</i>) exposed to acute water-salinity stress.	72
Fig. 32. Change of catalase (CAT) activity in disk abalone (<i>H. discus discus</i>) exposed to acute water-salinity stress.	73
Fig. 33. Phase of SDS-PAGE in gill of disk abalone (<i>H. discus discus</i>) exposed to acute water-salinity stress.	74
Fig. 34. Effect of acute water-salinity stress on respiratory burst activity in <i>H. discus discus</i>	75
Fig. 35. Phenoloxidase activity of <i>H. discus discus</i> exposed to acute water-salinity stress.	76
Fig. 36. Effect of acute water-salinity stress on lysozyme activity in <i>H. discus discus</i>	77

Abstract

The primary purpose of these studies was to develop feed additives in producing a way of safe abalone farming. In conducting this experiment, *Haliotis discus discus* was used to represent how the levels of saline stress affect the survival rate of *H. discus discus*. First, the changes of Super Oxide Dismutase (SOD), an antioxidant enzyme activity, Catalase (CAT), manifestation of HSP 70 mRNA and protein, and the immune reaction were measured based on the saline stress of *H. discus discus*. A physiological index of the stress levels, then, was established. In additory, *Citrus pomace powder* (CP) and *Ecklonia cava* by-product powder (ECR), which are additives of abalone's assorted feed in Korea, were fermented in high temperature. After performing these processes, the feed additives were added to abalones and did evaluate how it has an effect on growth and production of the abalones and the levels of saline stress.

The survival rate of *H. discus discus* affected by the saline stress represented that the standard model of this experiment (33psu) showed 100% survival. The test models in 25 psu and 30 psu of salinity had some dead abalones in 48 hours, but the models showed each 93% and 97% survivals. Most experiments injected low salinity into represented 100% survival mostly in 24 hours.

The changes of Hemolymph of *Haliotis discus discus* affected by the saline stress had no differences at first, but as time went by, the model with 25 psu of salinity showed decreasing rate of Hemolymph. On the other hand, the model with 30 psu of salinity had increasing numbers of Hemolymph. After 6 hours, there was declining in the model with 25psu of salinity. In addition, after 24 hours, the model with 30psu of salinity decreased in rate of Hemolymph in process.

The protein synthesis in the saline stress was also verified. Since the experiments that control the saline stress to *H. discus discus* were

initiated, most test models proved that there was clearly a protein synthesis around 21 kDa in 12 hours. However, after 48 hours, all of the test models except the standard model did not have any symptom of the protein synthesis.

The respiratory burst activity in this experiment which was conducted with inputting low salinity showed no significant change in the process. The activity of phenoloxidase of *H. discus discus* had a uniform numerical value until the saline stress increasing to become 31 psu. But later on, it changed in decrease and increase.

By-product of CP and ECR that were a carbohydrate in the experiment were used as feed additives. The main consistency was 2%, 4%, and 6%. In combining CP with ECR that the proportion rate was 1:1, the mixture was added to feeds in 2%, 4%, and 6%. The standard model, ECR 2%, CP+ECR2%, and CP+ECR6% demonstrated low survival rate in adding the feed additives to *H. discus discus*.

The shell of abalone added the feed additives in presented light green which is greatly close to the natural color of abalones compared to the abalones that rose with raw feed.

Because the highest value of the crude protein is found in ECR 6%, we could assume that if ECR is added to an abalone, it would increase an amount of protein; therefore, to add ECR contribute to make abalone taste better, and eventually it could double the value of this commodity. In addition, ECR 6% had the greatest effect in this experiment.

In conclusion, ECR has proven to be a better additive as a feed additive to decrease the stress of *H. discus discus* compared with the different test models in the experiments. The main point of this experiment was that applying ECR to abalones will be able to decrease the deleterious effects of the saline stress.

I. 서론

전복은 복족류에 속하는 수산생물로 간조선에 수심 5~50 m 되는 외양의 섬 지방이나 암초에 서식하며 바닷물이 깨끗해 해조류가 많이 번식하는 지역에서 해조류를 주된 먹이로 하여 생육하는 것으로 알려져 있다. 전복은 현재 100여종 이상 알려져 있으나 우리나라에 분포하는 전복류는 한류계인 참전복(*Haliotis discus hannai*), 까막전복(*H. discus discus*), 말전복(*H. gigantea*) 그리고 제주도에 서식하는 가장 소형종인 오분자기(*H. diversicolor aquatilis*)등 5종이 서식하는 것으로 알려져 있다(Ryu, 1989).

제주도 주변해역은 기본적으로 제주도 남쪽 해역에서 북상하는 대마난류수의 영향을 받고(Rho, 1985), 제주도 해협 북쪽에는 한국 남해안 연안수가 영향을 미치며(Choi, 1989) 그리고 하계표층은 고온 및 저염분인 중국대륙연안수의 영향을 받는다(Kim and Rho, 1994). 이처럼 제주도 주변 해역은 다양한 이질 수괴가 출현하고 이들 이질 수괴의 경계역엔 계절에 따라 복잡한 해양학적 특성이 나타난다(Yang et al., 1998). 또한 한국 남서해 및 동중국해 북부 해역에 출현하는 수온전선은 동계에는 대마난류 및 황해난류, 황해냉수 및 한국 남서해 연안수 등이 출현하고, 하계에는 고온 저염의 중국대륙연안수가 표층을 점유하면서 중·저층에는 황해 저층 냉수, 한국 남서해 연안수, 대마난류수 등이 출현하여 이러한 이질수괴들이 시기와 계절별로 서로 상접하여 복잡한 해황을 형성한다(Nakao, 1977; Kim and Rho, 1994; Rho, 1985; Kim, 1995; Zhang et al., 1996; Yoon and Byun, 2004).

이러한 외해역 환경에 영향을 받는 제주도 연안 천해역의 환경은 이들 수괴의 세력변화에 의해 크게 좌우되지만 이외에도 제주도의 강수량, 기온, 북서계절풍 등과 같은 기상 상태나 육수 유입, 파랑, 조석 상태 등에 의해서도 시·공간적 차가 생길 수 있다(Go et al., 2003). 그 중 양자강 배출수가 주 원인이 되는 중국 대륙연안수는 하계가 되면 동중국해를 거쳐 확장해 오기 때문에 제주도 주변 해역은 물론 한국 남해 및 동부 남부해역까지 염분을 매우 저하시키고, 해수면의 높이를 상승시키는 것으로 알려져 있다(Kang, 1971, 1974; Moriyasu, 1972;

Lim, 1976).

여름철 제주도 주변에 출현하는 양자강 저염분수는 제주도 수산업에 크고 작은 피해를 끼치는데 특히, 1996년 여름에는 제주도 서부해역의 염분이 26psu 이하로 낮아졌으며 이 양자강 저염분수가 제주해협을 통과하여 지나가면서 제주도 서부 연안 양식생물을 모두 폐사시켜 약 60억원에 이르는 막대한 손실을 입히기도 했다. 1998년의 경우에도 피해규모는 1996년도에 비해 적었지만 제주도 수산업에 큰 피해를 입혔다.

수중에는 질병을 유발할 수 있는 환경적인 요인 그리고 생물학적 요인들이 존재한다. 그 중에서도 온도와 염분 농도는 복족류(Gastropoda)의 성장에 영향을 끼치는 중요한 요소(Chen et al., 1984)로써 우리나라처럼 계절적인 변화로 인하여 여름철 장마기간 동안 저염분수 현상이 나타나는 경우에는 전복 생산에 있어서 많은 문제가 발생된다. 우리나라의 장마철인 6~8월 사이의 염분변화는 해양예보시스템(<http://kops.kordi.re.kr>)에 따르면 10psu 이하로 내려가는 일수가 5일 이상 지속되거나 반대로 35 psu 이상 염분 농도가 올라가는 경우도 나타났다.

염분농도 1의 변화는 삼투압으로 2/3기압에 해당하므로 염분농도의 변화는 해양동물의 삼투압에 상당한 영향을 끼칠 수 있다. 특히 경골어류와 달리 해양 무척추동물은 삼투 순응형동물(osmoconformer)이므로 체내 삼투압의 조절 능력이 없어 체내의 삼투압을 외계의 삼투압과 함께 변화 시키게 된다. 이 경우 삼투 조절 실패로 인하여 치사에 이르게 된다. 우리나라에서 해수의 염분변화가 생물에 미치는 영향에 관한 연구로는 대표적인 양식산 경골어류인 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 저염분수에 의한 연구로 생리적 반응, 생존율 및 성장에 관한 보고가 있다(Hur et al., 2003). 이 연구에서는 30일 이상 염분 저하 현상이 지속되는 경우가 아니면 넙치에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보고하였다. 그러나 까막전복을 비롯한 패류에 대한 환경적 요인과 병원성 질병에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

또한 Chen(1984)은 오분자기에서 최적의 염분도 및 수온에 관한 연구를 실시하여 염분농도 30~35 psu와 수온 24~30℃가 최적의 조건임을 보고 하였다. 그리고 오분자기의 염분농도에 따른 *V. parahaemolyticus* 감수성 실험에서 감염

후 30 psu 농도에서 20 psu, 25 psu 그리고 35 psu로 각각 옮겼을 시 폐사율이 높았고 그 밖의 면역 지표인 phenoloxidase activity, respiratory burst activity, phagocytic activity 그리고 clearance efficiency가 낮아졌다고 보고하였다(Winton et al., 2004). 그리고 tigershrimp(*Penaeus monodon*)는 유생 단계에서 저염분수(10, 15 psu)일 경우 *Vibrio harveyi* 높은 폐감염시 사를 일으킨다고 보고하였다(Prayitno et al., 1995).

무척추동물의 면역계는 대부분 선천적 면역계로 이루어져 있다(Mullen and Goldsworthy, 2003). 비특이적 면역의 지표로 알려져 있는 lysozyme(Murray et al., 1976)은 그람양성균 세균벽을 용해시키는 작용을 하는 효소로써 어류에서는 점액과 혈청 그리고 백혈구가 존재하는 조직 내에서 분리 할 수 있다.

제주도는 무척추동물인 전복을 육상수조에서 고밀도로 양성하는 곳이 계속 증가되는 등 양식 방법이 다양해지고 있지만 (Kim et al., 1998a; Lee et al., 1999a), 양성용 전복 먹이로 해조류가 주로 사용되고 있다. 이러한 해조류는 공급이 불안정한 등의 문제점이 잠재되어 있기 때문에 이를 대체할 수 있는 고품질의 경제적인 배합사료의 보급이 시급하다. 그 동안 참전복용 배합사료에 관해 기초적인 연구가 수행 (Uki et al., 1985; 1986a; b)되어 왔고, 이와 함께 양식 생산 단가에 높은 비중을 차지하고 있는 사료비를 절감시키기 위하여 영양소 요구량 설정 및 경제적인 전복 배합사료 개발을 위한 연구(Lee et al., 1998a, b; Lee and Park, 1998; Lee, 1998; Kim et al., 1998b)가 수행되었다. 하지만 전복 배합사료가 개발되었다 하더라도 그 품질을 계속 개선하여 사료효율을 높이는 한편, 값비싼 영양소의 첨가 수준을 최소화하여 사료 원가를 줄이는 연구와 양식 전복의 품질을 개선시키기 위한 노력은 계속되어야 할 것이다.

전복의 성장을 증진시키거나 품질을 개선시키는 미지의 인자를 규명하는 것은 어렵지만, 이들의 식성 등을 고려하여 사료섭취 유인 물질이나 성장 또는 품질을 개선시키는 원료를 사료에 첨가하여 사료의 품질을 개선하려는 연구가 필요하다.

전복은 밤에 먹이를 섭취하므로 먹이 섭취를 유인하거나 성장을 개선시킬 수 있는 원료를 탐색하는 것은 사료개발에 중요한 자료가 될 것이다. 이러한 연구의 일환으로 Lee et al. (1998c, 1999b)은 전복 배합사료에 해조류 등의 몇 종의 첨가제 효능을 비교하여 그들의 사용 가능성을 제시한 바 있다. 또한, 최근에 사

료 첨가제로서 감태부산물과 감굴박이 어류의 성장 및 면역력을 높이고 육질을 개선시킨다고 알려져 있다.

감굴박은 섬유소, 유기산 및 유리당 등의 영양기능 성분과 항암, 항산화 및 항염증 등의 생리기능이 우수한 carotenoids 및 flavonoids가 다량 함유되어 있어 예로부터“진피”라는 이름으로 한약소재로 사용되고 있으나, 그 양이 5,000톤 미만으로 극히 미미한 수준이다. 최근, 축산사료 분야에서 감굴박을 이용하는 사례가 늘어남으로서 약 20,000톤 정도가 사료 및 퇴비로 활용되고 있다.

한편, 감태는 갈조식물문(phaeophyta) 갈조식물강(phaeophyceae) 다시마목(laminariales) 다시마과(laminariaceae)에 속하는 다년생 갈조류로 모자반 속과 함께 우리나라에서 가장 큰 해조이며, 일본 및 우리나라 연안에만 국한되어 분포한다. 감태는 제주 연안 수심 10m 이내에 서식하고 있으며 거의 식용되지 않고 전복 및 소라 먹이로 주로 이용되고, 극히 일부만 알긴산 원료 등 한정된 용도로 사용되어 왔다. 최근 감태에 많이 들어 있는 폴리페놀 물질인 플로로타닌(phlorotannin)이 항산화, 항고혈압, 혈전생성저해 및 항암 활성이 우수한 것으로 알려져있다.

제주도에서 감굴 가공부산물로 나오는 감굴박 중 현재 활용되지 않고 해양 투기 등으로 버려지는 양이 약 35,000톤으로 추정되어 감굴박의 유용 활용을 위한 가공방법 및 새로운 용도 개발이 시급한 실정이며 또한, 폐기되는 감태 줄기도 2006년 기준으로 가공 처리된 감태 생산량(600톤)을 감안할 때 약 150톤 정도로 추정하고 있으며, 2007년도에는 1,000톤 이상의 감태가 이용될 것으로 보고 있어 폐기되는 감태 줄기만 약 250톤 이상이다. 또한, 감태로부터 폴리페놀 성분 등을 추출하고 남은 가공잔사도 약 300톤 이상으로 예상하고 있어 매년 총 550톤 이상의 미이용 감태 가공부산물이 발생할 것으로 추정된다. 따라서 본 연구에서는 제주특별자치도에서 생산되는 까막전복(*H. discus discus*)을 이용하여 염분 스트레스에 대한 항산화효소인 SOD 및 CAT의 변화와 HSP 70 mRNA의 발현, 면역반응 등을 측정하여 스트레스에 대한 생리학적 지표를 설정하고 이를 바탕으로 우리나라의 주요 양식 대상종인 전복 배합사료의 첨가제로서 부산물인 감굴박과 감태 가공부산물을 고온속성발효 한 후 사료첨가제로 이용하여 전복의 성장 및 생산성 개선과 염분 스트레스에 미치는 영향을 평가하여 안정적인 전복

양식 생산을 위한 사료첨가제를 개발하고자 한다.



II. 염분변화 스트레스에 의한 까막전복

(*Haliotis discus discus*)의 생리학적 변화에 관한 연구

1. 서론

제주도는 경도 33°06'~34°00'에 위치하여 아열대성 기후 조건을 가지고 있어 어류 및 패류 양식에 있어 유리한 지리적 위치에 있다. 이러한 이유로 제주도 해역에서 생산되는 수산물은 과거에는 어류를 포함한 패류, 해조류 등과 같은 다양한 종에서 많은 양이 생산되었으나 최근 급속한 산업화와 기후변화 등에 따라 많은 어족 자원이 감소되는 현상이 나타나고 있다. 이 중 과거에 많은 양이 생산되어 제주도 수산물 생산에 많은 기여를 하였던 전복과 소라등과 같은 패류 등은 현재 과거와 비교했을 때 많은 양이 감소되어 미미한 양만이 포획되고 있으며, 이에 따라 연근해 어업을 생계로 하는 어민들의 소득감소로 이어지고 있다. 한편 해양 환경변화는 서식 생물들의 생리학적 변화를 초래하여 번식, 생존 등에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(원 등, 2001). 그 중에서도 수온과 염분변화는 복족류(Gastropoda)의 성장에 영향을 끼치는 중요한 요소(Chen et al., 1984)로써 우리나라처럼 계절적인 변화로 인하여 여름철 장마기간 동안 저염분 현상이 나타나는 경우에는 전복생산에 있어서 많은 문제가 발생된다. 이러한 현상은 1996년도 제주도 서부해역 마을어장을 중심으로 저염분이 발생하여 전복류를 포함한 수산동물이 폐사하는 사례가 발생하면서 그 피해액이 59억원에 달했다고 조사된바 있다(제주도, 1996).

수온과 염분은 수중생물의 생리, 생태를 지배하는 주요인이며, 특히 해수의 염분변화에 대하여 전복과 같은 변삼투압 생물(poikilosmotic animal)은 변화된 삼투압에 적응하기 위한 생리적 반응을 나타낸다. 이러한 염분 변화에 따른 환경적 변화는 해양 생물들에게는 많은 물리·화학적 스트레스 요인으로 작용을 한다.

특히, 복족류인 전복과 같이 이동성이 매우 제한적인 패류에 있어서는 어류와 달리 급격한 환경 변화에 대처하는 능력이 매우 부족하다고 여겨지며, 연안환경 오염에 따른 피해를 많이 받을 것이라 생각된다. 이러한 연구들은 양식 산업에

많은 도움을 주고 있다. 하지만 이러한 연구 대부분이 어류에 국한 되어지고 있으며, 일부 전복 등과 같은 패류에 관한 연구가 이루어지고 있지만 어류 종들과 비교하면 미미한 실정이다. 현재까지 패류에 있어서의 스트레스에 관한 연구는 수온, 염분, 용존산소, 수용밀도, 소음, 진동 등 물리적 스트레스(Drew et al., 2001; Holliday et al., 1993; Jung et al., 2004; Mgaya, Y.D. and J.P. Mereer, 1995; Shin et al., 2002)와 우레아의 마취효과나 폐놀의 독성영향과 같은 일부 화학적 스트레스(Han et al., 2003; Kim, 1997)에 관한 연구가 이루어져 있으며, 이러한 스트레스는 질병에 대한 내성을 감소시키고, 성장률의 감소, 먹이 섭취율의 감소 및 호흡 대사율의 변화를 유발한다고 알려져 있다(Agnar and Albert, 2003; Brown et al., 1995; Harris et al., 1998, 1999; Chen and Chen, 2000; Laughlin and Linden, 1983; Laughlin and Neff, 1980, 1981; Maule et al., 1989; Pedro et al., 2004; Tsuchiya, 1983; Cheng et al., 2004). 그러나 이러한 연구는 양식산업을 위한 기초연구에 그치고 있어 패류에 있어서의 스트레스에 대한 기초 생리학적인 반응 및 적응 메커니즘을 이해하기에는 부족한 점이 많다. 따라서 이러한 패류가 생태계에서 겪게 되는 환경 스트레스 등과 같은 변화에 의해 야기되는 생리적 변화 등에 관한 연구가 절실하게 요구 되어진다.

일반적으로 생물은 스트레스를 받게 되면 활성산소(superoxide, hydrogen peroxide, peroxy radical, hydroxyl radical 등)가 발생하는 것으로 알려져 있으며, 활성산소는 생체내에서 다른 물질과 결합하려는 화학적 산화력이 강해서 세포나 기관의 막을 공격하여 세포의 기능을 손상시킨다(Ferraris et al., 2002). 이러한 활성산소에 대하여 체내에서는 항산화효소인 superoxide dismutase (SOD)와 catalase (CAT) 등을 생성하여 세포기능 손상을 막는 것으로 알려져 있으며(Chance et al., 1979; Wendel and feuerstein, 1981), 이러한 항산화효소는 온도 변화에 의해 효소 활성이 증가 하는 것으로 보고되고 있다(Parihar et al., 1996; Parihar et al., 1997). 또한, 이와 유사한 결과로 해산어류인 넙치 (*Paralichthy solivaceus*)에서도 온도 변화에 따라 2h에서 4h까지 SOD 및 CAT가 증가하였다는 연구결과가 있다(Yang and Yeo, 2004). 이처럼 항산화효소의 활성은 생체내의 스트레스 반응과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다.

최근, 생화학적 및 분자생물학적 연구에 따르면 외부의 스트레스로부터 개체를 보호하기 위하여 열충격단백질 (Heat Shock Protein, HSP)들을 포함한 여러 가지 스트레스 단백질 발현 및 활성이 상승하는 것으로 밝혀졌다. 계속되는 스트레스의 결과로 나타나게 되는 스트레스 단백질들의 발현은 암, 자가면역, 심혈관계통의 질병 등의 결과를 궁극적으로 일으킨다고 보고되고 있다. 대표적인 스트레스 단백질에서 열충격단백질 70(HSP70)을 들 수 있다. 이 단백질은 molecular chaperone 같은 작용을 주로 하지만 최근 연구에서는 apoptosis의 억제, 암의 발생, 그리고 면역계통에 영향 등 다른 여러 가지 생화학적 기전에 관여하고 있다는 것이 여러 연구진들의 보고되고 있다(Seo, 1997).

무척추동물의 면역계는 대부분 선천성 면역계로 이루어져 있다(Mullen and Goldsworthy, 2003). 면역반응의 초기 단계는 호흡폭발로 알려져 있는 phagocytic activity로 이 때, 혈구세포에서 H_2O_2 와 O_2^- 와 같은 활성산소종이 발생한다(Pipe, 1992). Phagocytosis와 라이소자임 활성측정은 환경오염이 면역독성에 미치는 영향을 측정하기 위한 좋은 도구로 활용되어 왔으나(Anderson et al., 1992; Cheng and Sullivan, 1984), 남에 직접 노출시켜 혈구세포에서 호흡폭발을 측정한 보고는 거의 없다. Phenoloxidase는 구리를 함유하는 산화효소의 일종으로 세균이나 기생충과 같은 병원성 미생물 및 이물질이 체내에 들어왔을 때 이에 필요한 멜라닌의 합성과 상처 부위의 치유에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Jonhson et al., 2003).

따라서, 본 실험에서는 제주도에서 생산되는 까막전복(*Haliotis discus discus*)의 기초 생리학적 자료를 획득하여 지속적인 자원 보존을 위한 기초 생리학적 실험을 실시하였다. 스트레스 작용은 제주 해역에서 자주 나타나는 저염분을 이용하여 염분 스트레스에 대한 항산화효소인 SOD 및 CAT의 변화와 HSP 70 mRNA의 발현, 면역반응 등을 측정하여 스트레스에 대한 생리학적 지표를 설정하고자 본 연구를 실시하였고, 이러한 연구를 기초로 고부가가치를 창출하는 전복 양식 산업에 물리적 스트레스에 대한 경쟁력을 확보할 수 있는 종에 대한 기초 자료를 제공하고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 실험 재료 및 사육 관리

실험에 사용된 까막전복, *Haliotis discus discus*은 조간대에서 수심 20~30 m에 이르는 바위가 많은 곳에 서식하며, 주로 일본, 우리나라 전 연안에 분포한다. 급격한 염분 스트레스에 의한 생리학적 변화에 관한 실험에 사용된 전복은 제주특별자치도 서쪽의 개인양식장에서 구입하여 사용하였으며 까막전복의 경우 평균 각장 4.03 ± 0.2 cm, 각폭 2.08 ± 0.1 cm, 전중량 8.2 ± 0.13 g인 개체를 사용하였으며 저염분수 유입에 대한 생리학적 변화에 관한 실험에 사용된 까막전복의 경우 평균 각장 4.1 ± 0.16 cm, 각폭 2.7 ± 0.13 cm, 전중량 7.9 ± 0.11 g을 사용하였으며 실험 전복은 미리 18 ± 0.4 °C에서 1~2주 동안 사육하며 순치시킨 후 순환여과가 가능한 수조를 제작하여 수조에 라벨을 붙여 사육하였다. 이 때 염분은 33.04 ± 0.41 psu ~ 33.52 ± 0.56 psu을 유지하였고 PVC 파이프(\varnothing 20 cm, L 20 cm)를 세로로 절단한 은신처(shelter)를 넣어서 공기를 공급하였다. 예비 사육기간에 먹이는 생다시마를 충분히 공급하였으며, 실험구는 50마리의 전복을 실험에 사용하였으며, 자연해수 염분농도인 33 psu에서 각각 25 psu, 30 psu, 33 psu, 35 psu로 맞춰 놓은 사육수조에 넣은 실험과 33 psu에서 서서히 1 psu씩 낮추어 25 psu까지 낮추었다가 다시 33 psu로 원상복구 되는 실험을 하였으며 염분변화를 가한 시간을 0h로 정하여 0, 3, 6, 12, 24 및 48h 쯤에 각각 5마리의 전복으로부터 혈구와 아가미 조직, 간 부위를 조직 샘플을 채취하여 -70°C 로 보관하며 분석에 사용하였다. 저염분수 유입에 따른 실험의 염분 농도는 담수와 천일염을 혼합하여 염분 농도를 맞추었다.

2-2. 생존율 측정

실험 개시 후 0, 3, 6, 12, 24 및 48 h째에 폐사한 개체를 각각 조사하였다. 폐사 개체의 계수는 은신처(shelter)와 수조 벽면에 부착 능력이 없고, 유리봉으로 발과 촉수를 자극하여 반응이 없는 개체를 선택하여 조사하였다.

2-3. 혈림프(Hemolymph) 수 측정

혈림프 수 측정은 실험개시 후 0, 3, 6, 12, 24 및 48 h째에 전복의 심장 옆 혈관으로부터 바늘 규격 26GX 1/2인 1 ml 주사기를 이용하여 혈액을 채취한 후 0.9% 생리식염수로 10배 희석하여 혈구 계산판을 이용하여 살아있는 혈구를 계수하였다(Fig. 1).

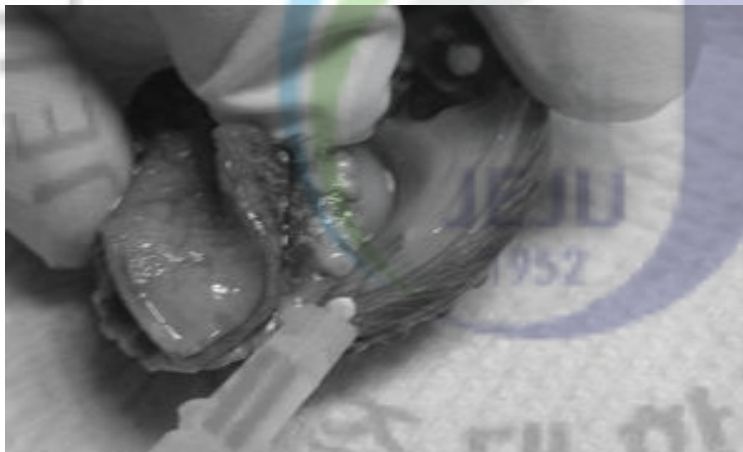


Fig. 1. Take a blood sample in abalone.

2-4. 항산화 효소 측정

항산화효소는 간부위를 적출하여 SOD 및 CAT를 각각 분석하였다. 간부위를 적출 후 약 0.1 g을 0.9% NaCl에 3회 세척한 다음 KCl (1.17%)을 함유한 100 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 첨가하여 균질화 하였고, 균질화된 시료는 원심분리(1,000 rpm, 15 min, 4°C)에 의해 지방 및 침전물을 제거하였다. 균질액은 다시 원심분리(13,000 rpm, 20 min, 4°C)한 후 상등액을 항산화 효소 측정용 시료로 사용하였다(Fig. 2). 단백질 함량은 Lowry et al. (1951)의 방법에 따라 표준 단백질로서 BSA(bovine serum albumin)를 사용하여 spectrophotometer를 이용 750 nm에서 측정하였다(Fig. 3). SOD는 pyrogallol의 자동 산화율이 억제되는 양을 측정하는 Marklund and Marklund (1974)의 방법으로 측정하였으며, 50 mM phosphate buffer (pH 8.24) 1.3 ml에 간장 균질액 25 μ l을 넣은 후 45 μ l의 3mM progallol 용액을 첨가하여 spectrophotometer를 이용하여 325 nm의 파장에서 측정하였고, 효소활성의 1 단위는 반응액 중의 pyrogallol의 산화를 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다(Fig. 4). CAT활성도 측정은 H₂O₂를 기질로 사용하여 spectrophotometer에 의해 240 nm파장에서 H₂O₂가 환원되어 감소하는 흡광도로서 효소 활성도를 측정하는 Nelson and Kiesow (1972)의 방법에 의하여 측정하였으며, 효소 활성도의 단위는 1분간 1 mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 H₂O₂를 nmol로 나타내었다(Fig. 5).

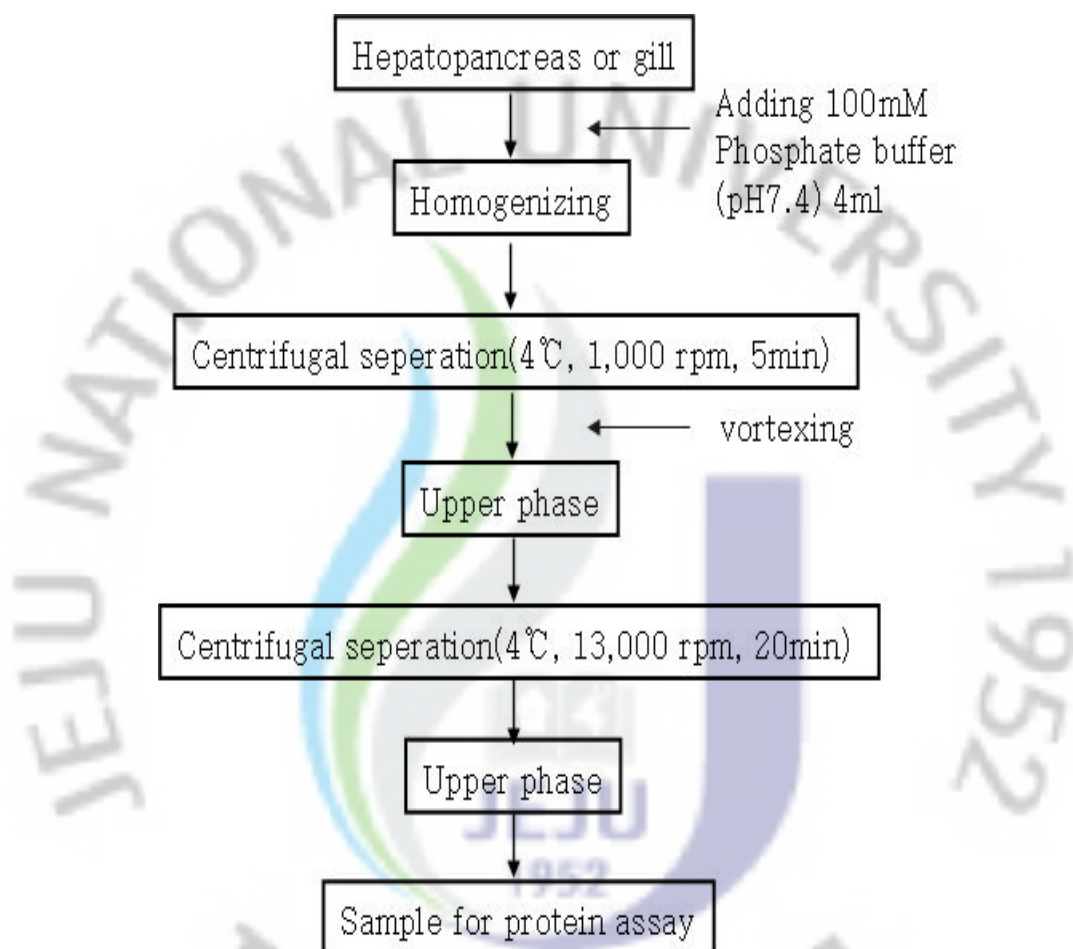


Fig. 2. Procedures for extraction of protein.

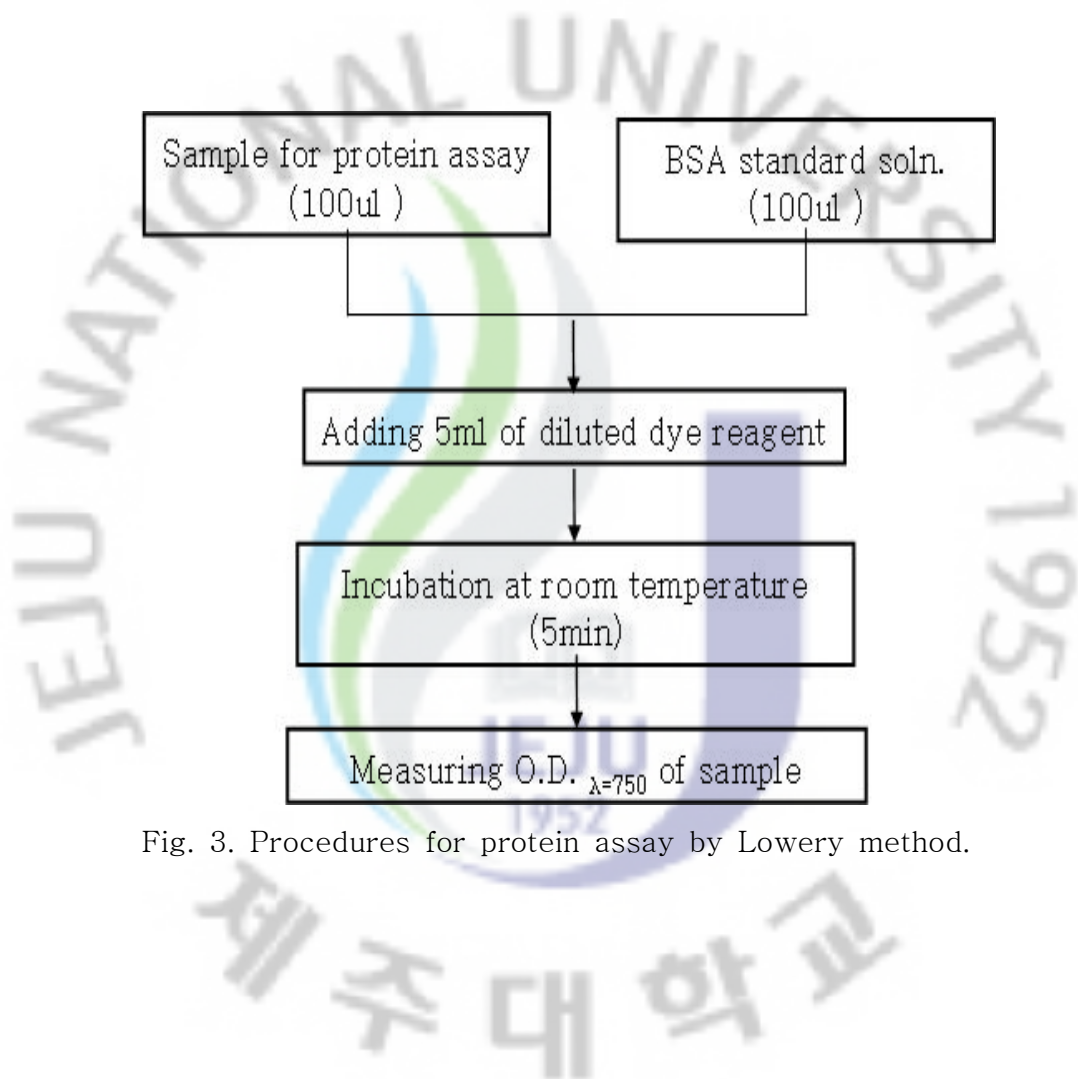


Fig. 3. Procedures for protein assay by Lowery method.

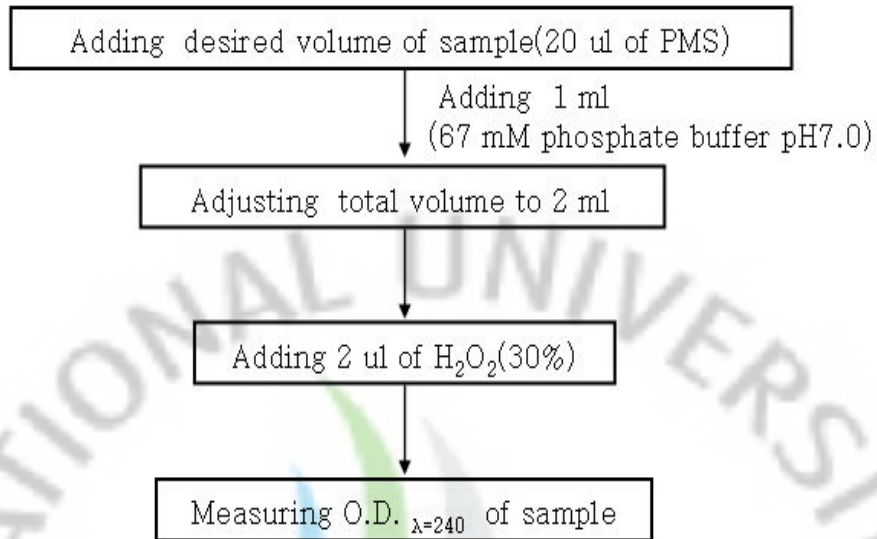


Fig. 4. Procedures for measurement of catalase activity.

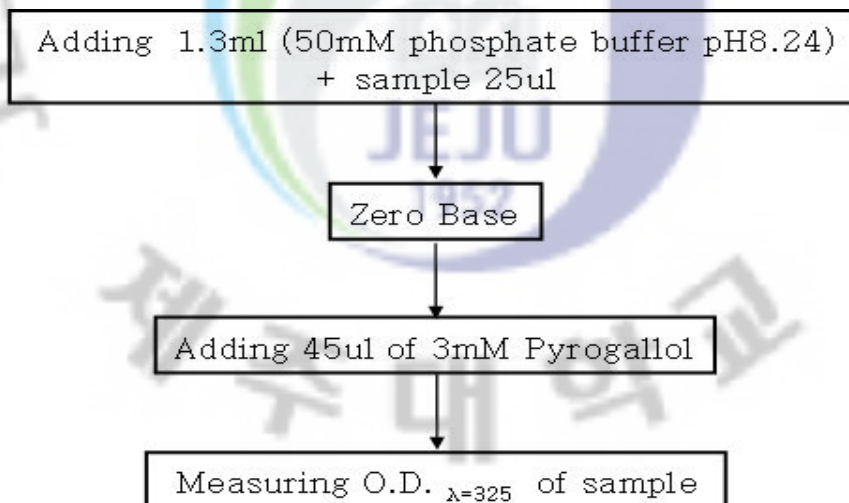


Fig. 5. Procedures for measurement of SOD activity.

2-5. RT-PCR 분석

동결된 아가미 조직에 Tri-reagent 500 μl 를 가한다. 호모젠아이저로 시료를 균질화한 후 상온에서 5분간 방치한다. Chloroform 100 μl 가한 후 혼합하여 상온에서 3분간 방치한다. 원심분리(13,000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 min) 후 상청액을 다른 tube 에 옮겨 동량의 차가운 isopropanol을 넣어서 혼합한다. 10분간 상온에 방치 후 원심분리(13,000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 min) 한다. 상청액을 제거하고 차가운 75% ethanol을 1 ml 넣어서 혼합 후 원심분리(13,000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 min)한다. 이를 3회 반복하고 상청액을 제거하고 실온에서 1시간동안 방치하여 ethanol을 증발시킨다. 여기에 DEPC 25 μl 넣어서 total RNA를 놓인다. 추출된 total RNA는 -70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하여 실험에 사용하였으며, PROMEGA사의 cDNA합성 kit인 Im Prom reverse transcriptase kit A3800을 이용하여 cDNA 를 합성하였다. 합성된 cDNA를 증폭시키기 위해서 cDNA 2 μl , 10x PCR buffer 5 μl , MgCl 3 μl , dNTP 1 μl , primer (sence) 1 μl (50 pmol), antisence 1 μl , Taq DNA polymerase 0.5 μl 및 Nuclease-Free water 36.5 μl 를 혼합하여 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 predenaturation 시켜준 후 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 denaturation, 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 45초간 annealing, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 extension 조건으로 30회 증폭하고, 이 후 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 더 반응시켰다.

HSP 70 mRNA에 대한 oligonucleotide primer를 제작 합성하였고, 양성대조로 사용하기 위해 β -actin mRNA를 제작하였다(Table 1). PCR로 증폭된 산물은 1% agarose gel에서 100V로 전기영동 하여 분리하였으며, 100 bp DNA ladder를 size marker로 사용하여 UV transilluminator하에서 사진을 촬영하여 이미지 분석 프로그램(Labworks 4.5)을 이용하여 mRNA의 발현량을 정량하였다.

Table 1. Oligonucleotide of primers for RT-PCR

RNA species	Expected size	Primer sequence
β -actin mRNA	520bp	5'-GACHCAGATCATGTTYGARACC-3' 5'-CCTTCTGCATRCGGTCAGC-3'
HSP70 mRNA	400bp	5'-CAGGACTTCTTCAACGGCAAG-3' 5'-GTGCTCTTGTCACAGCTGA-3'

bp: base pairs



2-6. SDS-PAGE 분석

전복의 아가미를 채취하여 분쇄 완충용액 100 mM phosphate buffer에서 호모게나이저로 분쇄하여 원심분리(12,000 rpm, 15 min, 4°C) 하였다. 상청액을 2:1 비율로 2 X Laemmli sample buffer (80 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 1% β -mercaptoethanol, 15% glycerol 및 0.012% bromphenol blue)에 용해시켜 90°C 이상의 온도에서 3분간 boiling 한 후 Laemmli (1970)의 방법에 따라 SDS-PAGE를 실시하였다. 7.5~10% polyarylamide gel 을 사용하여 250V, 55mA로 4시간 동안 전기영동을 실시한 후, 염색액 (0.136% coomassie brilliant blue R-250, 45% methanol 및 10% acetic acid)에서 40분간 염색하고, 7.5% methanol, 7.5% acetic acid에서 탈색하였다(Table 2, 3). 분자량 측정용 표준단백질은 myosin (200 kD), β -galactosidase (116 kD), phospholylase b (97 kD), bovine serum albumin (66 kD), ovalbumin (45kD) 및 carbonic anhydrase (31kD)를 사용하였다.

Table 2. Compositions of reagents related to SDS gel

Solution	Component	
Acrylamide A	Acrylamide Methylene-bis-Acrylamide	22.2 g 0.6 g Adjust to 100 ml
Lower gel buffer (4×concentrated)	18.15g Tris base adjusted to pH 8.8 with 6N HCl	Final volume 100ml Tris 1.5M
Upper gel buffer (4×concentrated)	6g Tris base adjusted to pH 8.8 with 6N HCl	Final volume 100ml Tris 0.5M
10% SDS	SDS(sodium dodecyl sulfate) Distilled water	10 g Adjust to 100 ml
10% APS	Ammonium persulfate(APS) Distilled water	0.1 g 1 ml

Table 3. Regents for preparing for SDS-PAGE

Lower gell	7.5%	10%	Upper gel	3%
Acrylamide A	12.12 ml	16.2 ml	Acrylamide A	2.7 ml
Water	14.16 ml	10.08 ml	Water	12 ml
Lower gel buffer	9 ml	9 ml	Lower gel buffer	5 ml
10% APS	0.36 ml	0.36 ml	10% APS	0.2 ml
10% SDS	0.36 ml	0.36 ml	10% SDS	0.2 ml
TEMED	0.036 ml	0.036 ml	TEMED	0.02 ml
Total volume	36.036ml	36.036ml	Total volume	20.12ml



2-7. Western blot 분석

Western blot은 Towbin et al. (1979)의 방법을 변형하여 실시하였다(Fig. 6). SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질을 15V에서 4시간 동안 nitrocellulose (NC) 막으로 전사시킨 후 ponceau S 용액 (0.2% ponceaus, 3% trichloroacetic acid 및 3% sulfosalicyclic acid)으로 전사됨을 확인하였다. 그 후 항체의 비특이적 결합을 막기 위해 3% bovin serum albumin과 0.05% Tween 20이 함유된 0.1M Tris buffered saline (TTBS, pH7.4)을 이용하여 40분 상온에서 약하게 흔들면서 blocking 시켰다. Blocking이 끝난 후 HSP70 (Sigma, H5147)에 대한 항체를 NC막에 첨가하여 1시간 동안 실온에서 배양한 후, TBS-T (0.05% Tween 20 in TBS)로 5분씩 3회 세척하였다. Alkaline phosphatase-conjugated goat antimonuse IgG로 1시간 동안 실온에서 배양하고 TBS-T 용액으로 5번 세척한 후, DAB(0.1%)와 0.03% H₂O₂가 함유된 PBS (pH7.2)로 발색을 유도하였다.

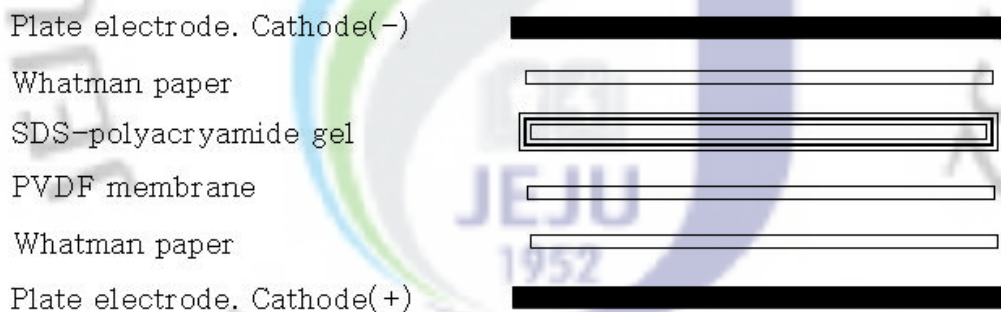


Fig. 6. Set up of Whatman paper (blotting paper), gel and PVDF between the plate electrodes. Blotting paper and PVDF are used in the same size as the gel.

2-8. Respiratory burst activity 측정

Respiratory burst 활성은(Song and Hsieh et al., 1994; Anderson, 1998), 의 방법을 응용하여 측정하였다. Hamocyte의 활성산소 중 Intracellular superoxide anion (O_2^-)의 분석을 위해 혈청 $500\mu l$ 와 NBT 용액 (2mg NBT, 1 μg PMA/ml in 50Mm Tris-HCL buffer, pH 7.5) $500\mu l$ 을 혼합하여 $10^\circ C$ 배양기에서 30분 동안 반응 시킨 후, $120 \times g$, $4^\circ C$ 로 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 버리고, 세포를 TBS buffer (pH 7.5)로 세척하는 작업을 두 번 반복한 뒤, 100% methanol로 세포를 고정하였다. 50% methanol로 여러 번 세척하고, 물기를 클린벤치에서 제거하였다. 물기가 없어지면 바닥에 가라앉은 pellet에 2M KOH $600\mu l$ 와 DMSO $700\mu l$ 를 첨가하여 pellet을 용해시켰다. 푸르게 발색된 용액을 파장 620nm에서 측정하였다.

2-9. Phenoloxidase activity 측정

phenoloxidase의 활성은 Ashida와 Dohke (1980)의 방법을 응용하여 측정하였다. 96 well plate에 0.1M phosphate buffer (pH 6.0) $150\mu l$ 에 혈청 $15\mu l$ 를 넣고 잘 혼합 한 뒤 0.01M L-DOPA $150\mu l$ 를 넣은 후 $25^\circ C$ 배양기에서 10분 동안 반응 시킨 후 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 최종 값은 흡광도 값이 0.001/ml 감소한 값을 1unit으로 표시하였다.

2-10. Lysozyme activity 측정

혈청 내 lysozyme 활성은 Parry (1965)의 방법에 따라 Turbimetric assay로 조사하였다. *Micrococcuslysodeikticus*(0.1mg/ml PBS, pH6.8) 현탁액 90 μ l와 혈청 100 μ l를 96 well plate에 혼합하여 25 $^{\circ}$ C 배양기에서 5분 동안 반응 시킨 후 530nm에서 흡광도를 측정하였다. Lysozyme 활성은 흡광도 값이 0.001/ml 감소한 값을 1unit으로 표시하였다.

2-11. 통계처리

각 실험에서 얻어진 자료에 대한 값의 유의차 유무는 SPSS 통계 패키지에 의한 ANOVA로 분석하여, *P*값이 0.05보다 작은 경우를 유의하다고 판정하였다. 반복 실험의 결과는 평균 \pm 표준편차 평균으로 나타내었다.

3. 결과

3-1. 급격한 염분 변화에 따른 까막전복의 초기 생리 변화

3-1-1. 생존율 변화

급격한 염분 스트레스에 따른 까막전복의 생존율에서는 대조구(33 psu)를 비롯한 35 psu에서는 실험 종료 시 까지 폐사된 개체가 발견되지 않아 100%의 생존율을 나타내었으나, 25, 30 psu 실험구에서만 48h 쯤에 폐사된 개체가 발견되었고, 실험종료 시 25 psu은 93%, 30 psu은 97%의 생존율을 나타내었다 (Fig. 7).

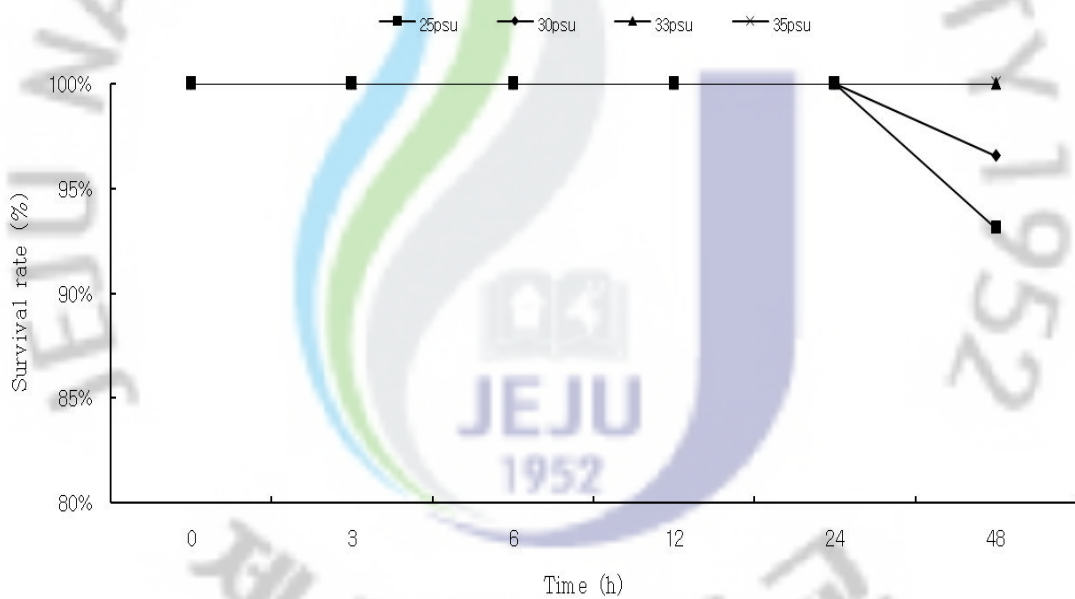


Fig. 7. Survival rates of the abalone (*H. discus discus*) exposed to acute water-salinity stress.

3-1-2. 혈림프 수 변화

급격한 염분 스트레스에 따른 까막전복의 혈림프 수의 변화는 0h에는 유의차가 없었으며 3h째에 대조구인 33 psu에 비하여 25 psu은 유의적으로 감소하였고 30 psu은 유의적으로 증가한 것을 확인하였다(Tabel 4, $P<0.05$). 하지만 6h에는 25 psu만 유의적으로 감소하였으며 나머지는 유의적인 차이는 확인되지 않았다($P<0.05$). 하지만 12, 24h에는 30 psu만 유의적으로 감소한 것을 확인하였고, 48h에는 25와 30 psu에서 대조구(33 psu)보다 유의적인 감소를 확인 할 수 있었다($P<0.05$)

Table 4. Variations of hemolymph factors of abalone (*H. discus discus*) exposed to acute water-salinity stress.

Salinity (psu)	0h	3h	6h	12h	24h	48h
25 psu	1.58±0.32	1.44±0.28*	1.38±0.38*	1.33±0.40	1.33±0.42	1.23±0.10*
30 psu	1.55±0.65	1.90±0.54*	1.46±0.26	1.28±0.15*	1.25±0.21*	1.23±0.42*
33 psu	1.58±0.32	1.60±0.18	1.53±0.31	1.40±0.35	1.38±0.35	1.38±0.13
35 psu	1.58±0.47	1.61±0.45	1.45±0.38	1.44±0.12	1.38±0.44	1.28±0.38

The values are mean±S.D. (n=3). * $P<0.05$

3-1-3. 항산화효소 변화

급격한 염분 변화에 따른 항산화 효소인 SOD와 CAT 효소를 확인하였다(Fig. 8-A, B). 염분변화에 따른 SOD효소는 실험 개시 후 25 psu은 3h째에 증가하였다가 감소하는 경향을 나타내었으며 모든 실험구간이 24h까지는 일정하다가, 실험 종료 48시간에는 25, 30 psu에서 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 8-A). 염분 변화에 따른 CAT효소는 실험 개시 후 24h까지는 일정하다가 실험 종료 48시간에는 25 psu를 제외한 실험구와 대조구(33 psu)가 비슷한 수치를 나타내는 것을 확인하였다(Fig. 8-B).

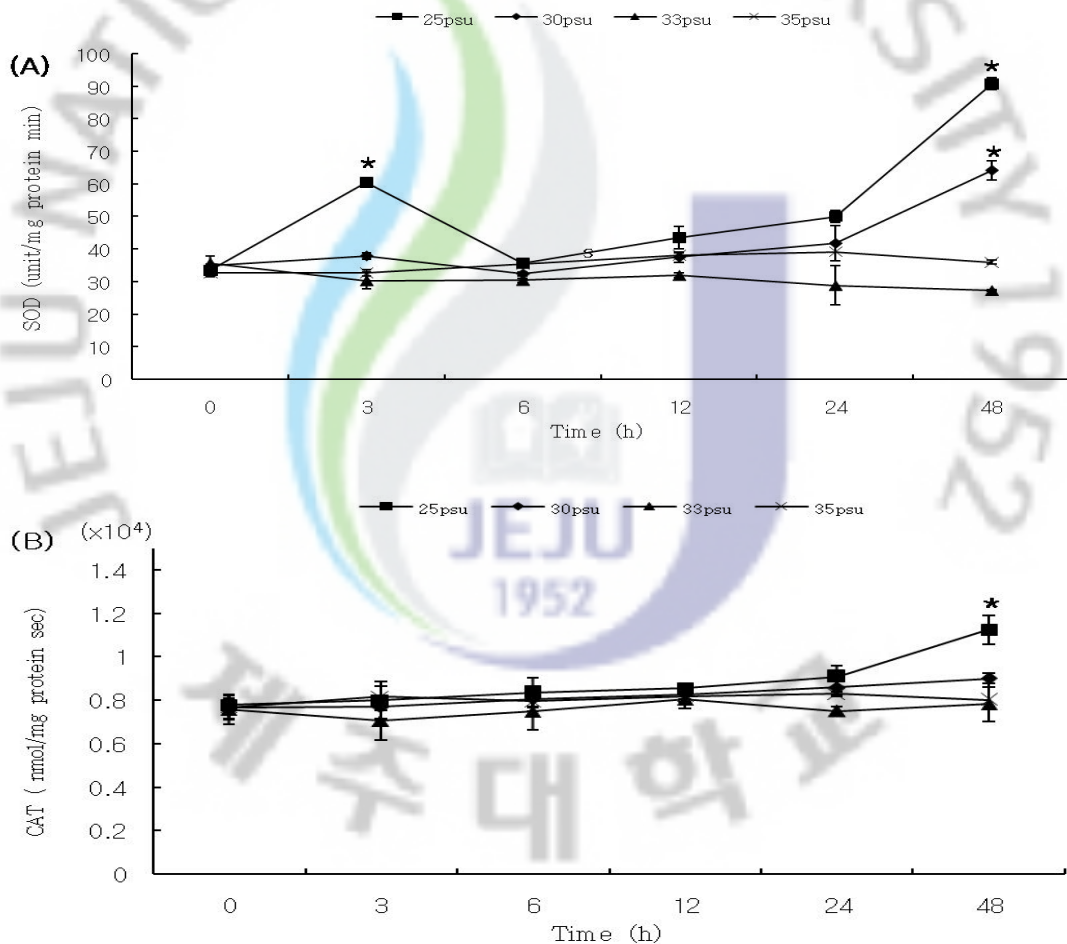


Fig. 8. Change of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity in abalone (*H. discus discus*) exposed to acute water-salinity stress.

3-1-4. HSP 70 mRNA 발현량의 변화

염분 변화에 따른 HSP 70의 변화를 관찰하기 위하여 염분별과 시간대 별로 아가미 조직에서 샘플을 적출하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 RT-PCR을 통한 HSP 70 mRNA의 발현은 대조구(33 psu)와 실험구에서 전부 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 9). 그래서 HSP 70 mRNA 발현을 β -actin mRNA를 기준으로 나타낸 결과를 확인하였다(Fig. 10). 염분 변화 실험 개시 후 대부분이 HSP 70 mRNA가 증가하였고, 33 psu에서는 3시간째에 HSP 70 mRNA가 감소하는 것을 확인하였다. 실험구들은 실험 12시간까지 HSP 70 mRNA의 증가를 확인하였다. 그리고 종료 48시간에는 모든 실험구에서 HSP 70 mRNA가 감소하는 것을 확인하였다.

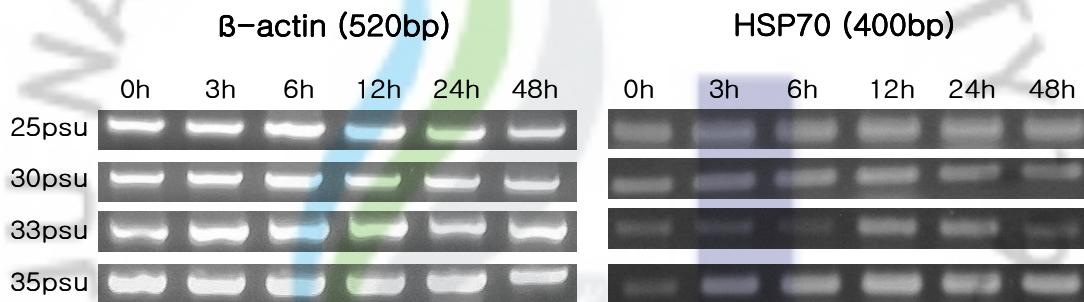


Fig. 9. Effect of acute water-salinity stress on β -actin mRNA and HSP 70 mRNA of gill in abalone(*H. discus discus*)

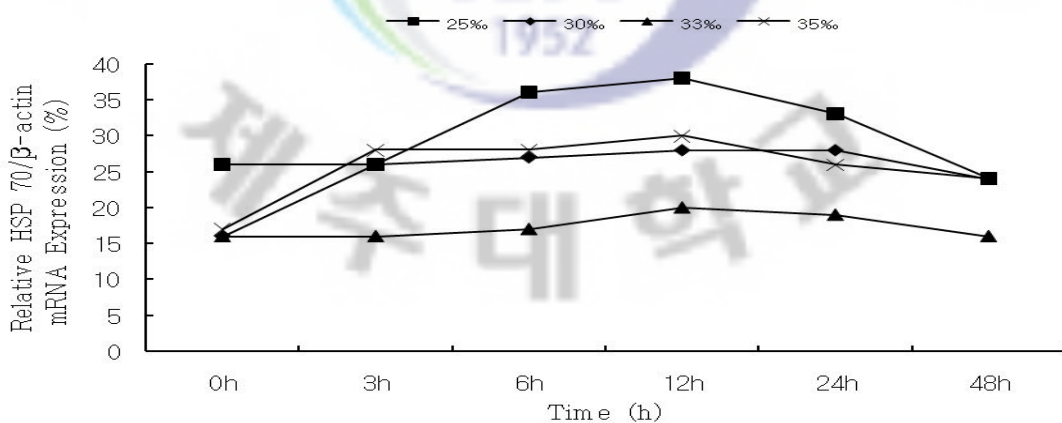


Fig. 10. Effect of acute water-salinity stress on HSP 70 mRNA of gill in abalone (*H. discus discus*)

3-1-5. 단백질 발현의 변화

염분변화에 따른 단백질 발현의 영향을 알아보기 위하여 전복의 아가미를 적출하여 10% SDS-PAGE로 분석하였다. 염분변화 실험 개시 후 대조구를 제외한 모든 실험구에서 12째에 21 kDa 부근에서 단백질 발현이 뚜렷하게 확인되었다 (Fig. 11-A, B, D). 염분 변화 실험 개시 후 48h째에 대조구와 25 psu를 제외한 모든 실험구에서 31kDa 부근에 확인되지 않은 단백질이 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 11-B, D). 염분변화에 따른 HSP 70의 단백질 발현을 확인하기 위하여 western blot을 실시하였다. 하지만 염분 변화에 대한 HSP 70 단백질은 실험 종료 까지 실험구들에서 나타나지 않았다(Data not shown).

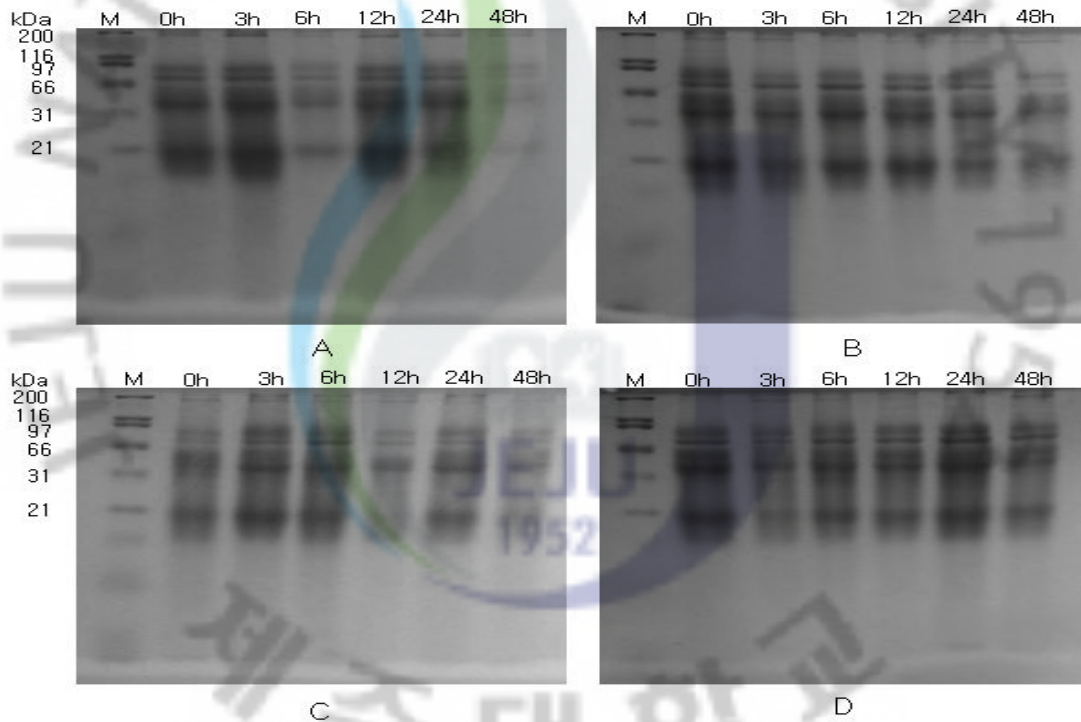


Fig. 11. Protein expression of abalone (*H. discus discus*) exposed to acute water-salinity stress.

A : 25 psu, B : 30 psu, C : 33 psu, D : 35 psu

3-1-6. Respiratory burst activity 변화

염분변화에 따른 Respiratory burst activity 변화를 알아보기 위하여 전복의 혈액을 채취하여 분석하였다. 염분 변화 개시 후 0, 3h 에는 유의차가 없었으며 6h째에 30, 35 psu에서 유의적으로 증가하였다가 감소하는 경향을 확인하였고 실험 종료 시에 일정한 수치를 나타내었다(Fig. 12).

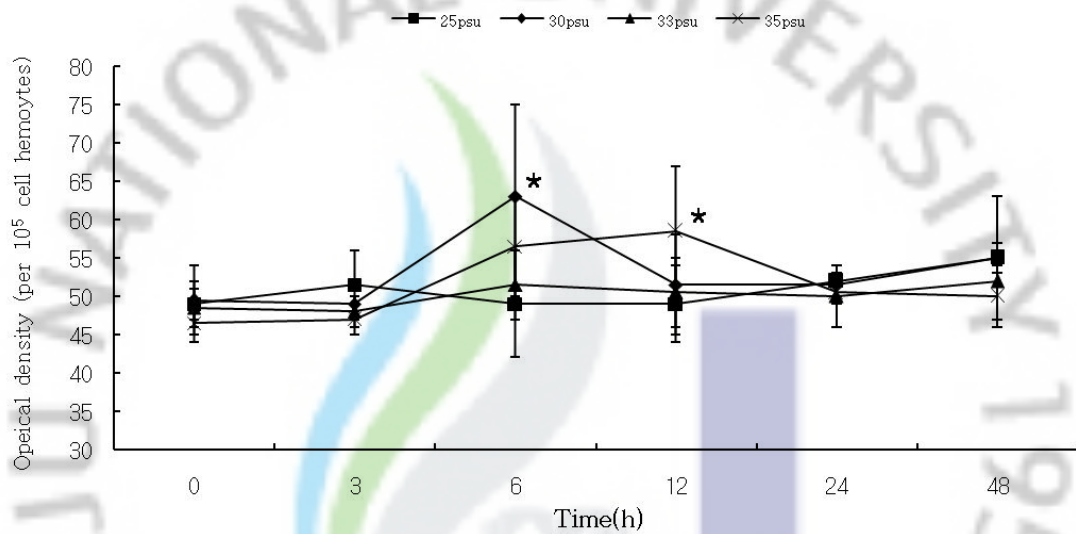


Fig. 12. Effect of acute water-salinity stress on Respiratory burst activity in abalone (*H. discus discus*)

3-1-7. Phenoloxidase activity 변화

염분변화에 따른 Phenoloxidase activity 변화를 알아보기 위하여 전복의 혈액을 채취하여 분석하였다. 염분 변화 개시 후 0h에는 유의차가 없었으며 대조구(33 psu)를 제외한 나머지 실험구에서는 3h째에 증가하였다가 감소한 것을 확인하였다(Fig. 13). 하지만 35 psu은 대조구와 실험 종료 48h째에 비슷한 수치를 나타내었으며 나머지 실험구에서는 유의적인 감소를 확인 할 수 있었다.

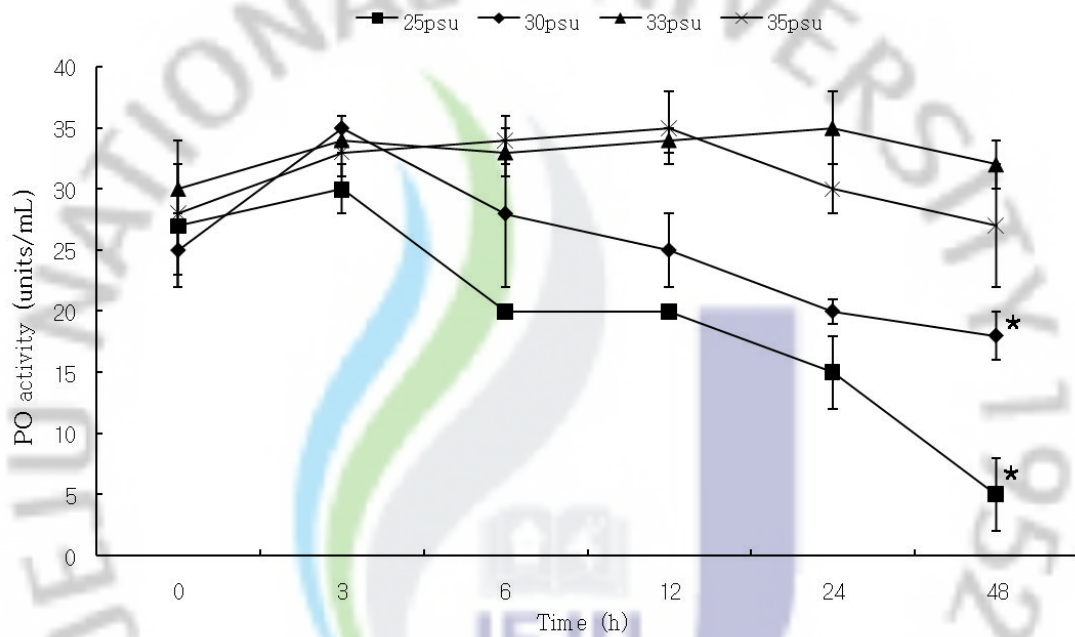


Fig. 13. Phenoloxidase activity of abalone (*H. discus discus*) exposed to acute water-salinity stress.

3-1-8. Lysozyme activity 변화

염분변화에 따른 Lysozyme activity 변화를 알아보기 위하여 전복의 혈액을 채취하여 분석하였다. 염분 변화 개시 후 0h 에는 유의차가 없었으며 6h째까지는 일정한 수치를 나타내었으며 12h째에 대조구(33 psu)에 비하여 25 psu은 유의적으로 증가하였다가 실험 종료 48h째에 유의적인 감소를 확인하였다(Fig. 14). 나머지 실험구에서도 대조구(33 psu)에 비하여 유의적인 감소를 확인하였다.

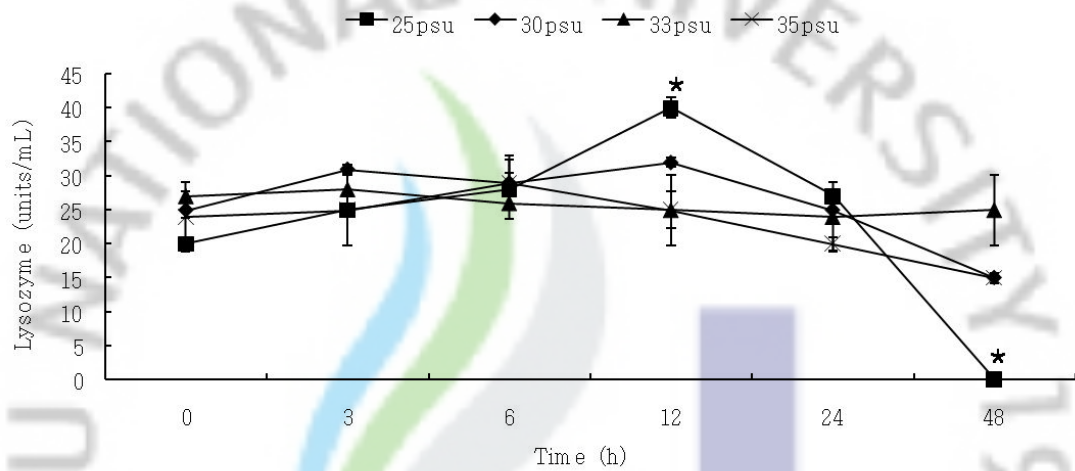


Fig. 14. Effects of acute water-salinity stress on Lysozyme activity in abalone (*H. discus discus*)

3-2. 저염분수 유입 변화에 따른 까막전복의 초기 생리 변화

3-2-1. 생존율 변화

저염분수 유입 변화에 대한 까막전복의 생존율을 확인하였다. 실험 개시 후 실험구는 대조구(33 psu)와 동일한 100%의 생존율을 실험 종료 시인 24h까지 확인하였다(Fig. 15).

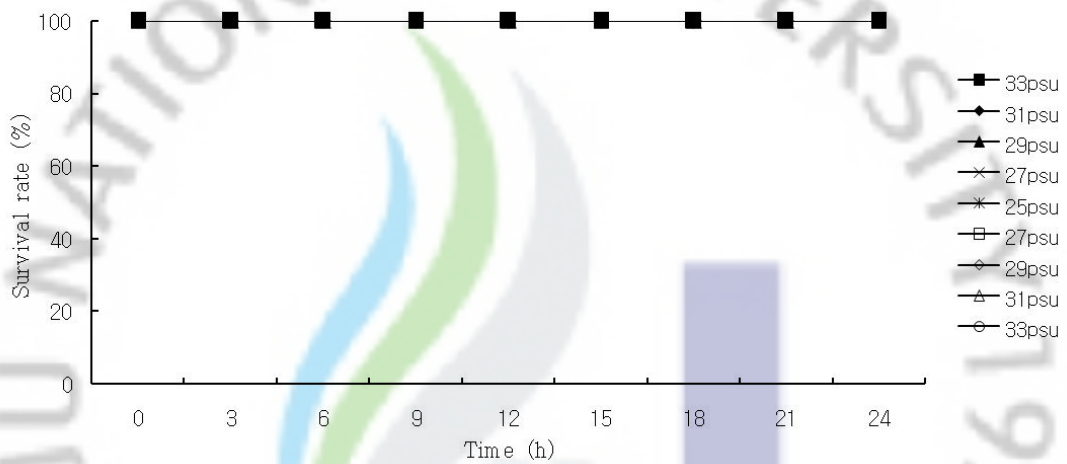


Fig. 15. Survival rates of the abalone (*H. discus discus*) exposed to low salinity stress.

3-2-2. 혈림프 수 변화

저염분수 유입에 대한 까막전복의 혈림프 수의 변화는 대조구(33 psu)에서 염분농도가 낮아질수록 혈림프 수는 29 psu에서 증가하였다가 감소하는 경향을 나타내었으며 25 psu에서 유의적으로 감소한 것을 확인하였다(Fig. 16). 염분 농도가 높아질수록 혈림프 수도 증가하는 경향을 확인하였으며 대조구인(33 psu)로 원상복구 되었을 때에는 실험 개시 때와 일정한 수치를 나타내었다.

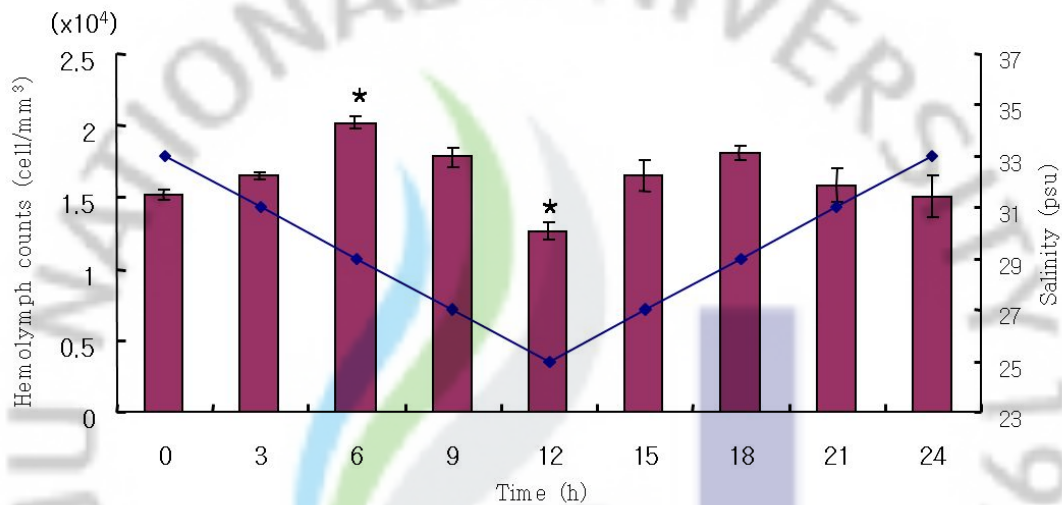


Fig. 16. Variations of hemolymph factors of abalone (*H. discus discus*) exposed to low-salinity stress.

3-2-3. 항산화효소 변화

저염분수 유입에 따른 항산화 효소인 SOD와 CAT 효소를 확인하였다(Fig. 17-A, B). 저염분수 유입에 따른 SOD효소는 실험 개시 후 유의적인 감소를 확인하였으며 25 psu에서 유의적으로 증가하였다가 감소하는 경향을 확인하였다(Fig. 17-A). 저염분수 유입에 따른 CAT효소는 실험 개시 후 유의적으로 감소하였다가 29 psu에서 유의적으로 증가하였고 다시 유의적인 감소를 확인하였다(Fig. 17-B).

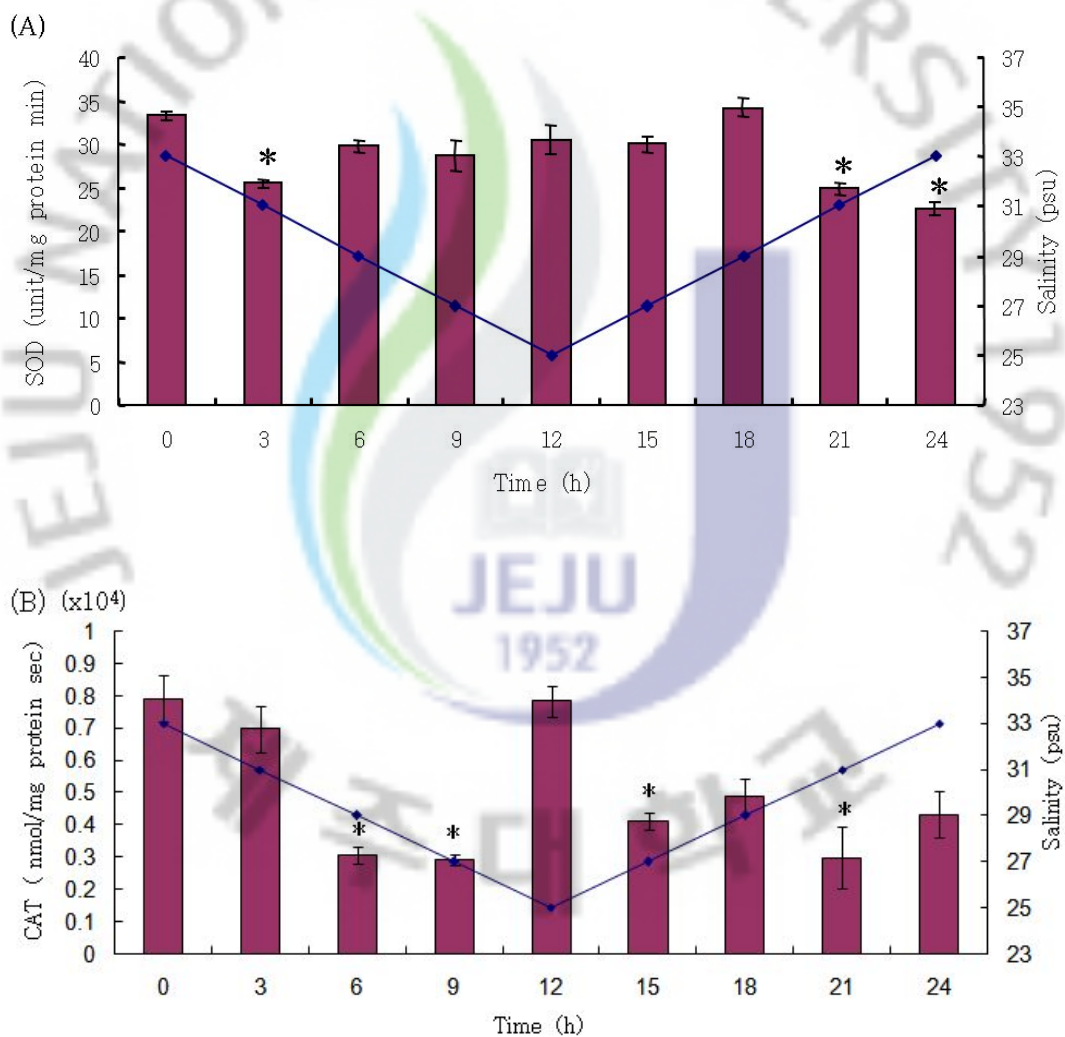


Fig. 17. Change of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity in abalone (*H. discus discus*) exposed to low-salinity stress.

3-2-4. HSP 70 mRNA 발현량의 변화

저염분수 유입에 따른 HSP 70의 변화를 관찰하기 위하여 염분별과 시간대 별로 아가미 조직에서 샘플을 적출하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 RT-PCR을 통한 HSP 70 mRNA의 발현은 대조구(33 psu)와 실험구에서 전부 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 18). 그래서 HSP 70 mRNA 발현을 β -actin mRNA를 기준으로 나타낸 결과를 확인하였다(Fig. 19). 염분 변화 실험 개시 후 HSP 70 mRNA가 감소하였고, 25 psu에서 급격하게 증가하는 것을 확인하였으며 실험 종료 24시간에는 HSP 70 mRNA가 감소하는 것을 확인하였다.

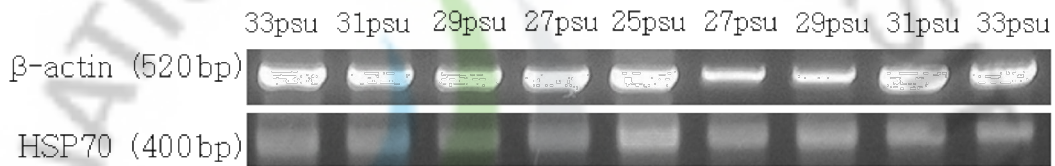


Fig. 18. Effect of low-salinity stress on β -actin mRNA and HSP 70 mRNA of gill in abalone(*H. discus discus*)

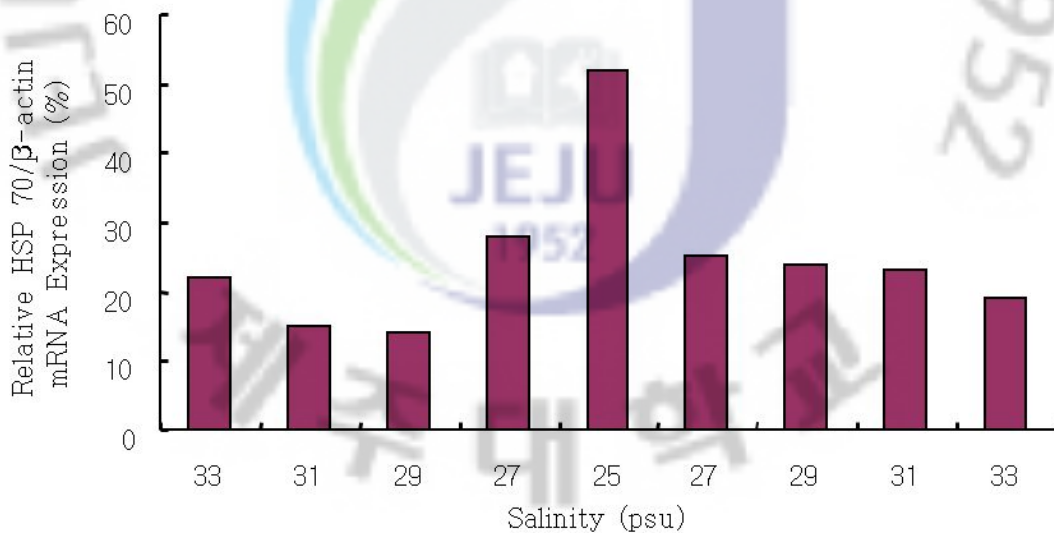


Fig. 19. Effect of low-salinity stress on HSP 70 mRNA of gill in abalone (*H. discus discus*)

3-2-5. 단백질 발현의 변화

저염분수 유입에 따른 단백질 발현의 영향을 알아보기 위하여 전복의 아가미를 적출하여 10% SDS-PAGE로 분석하였다. 염분 변화 실험 개시 모든 실험구에서 31kDa 부근에 확인되지 않은 단백질이 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 20). 염분변화에 따른 HSP 70의 단백질 발현을 확인하기 위하여 western blot을 실시하였다. 하지만 저염분수 유입에 대한 HSP 70 단백질은 실험 종료 까지 실험구들에서 나타나지 않았다(Data not shown).



Fig. 20. Protein expression of abalone (*H. discus discus*) exposed to low-salinity stress.

3-2-6. Respiratory burst activity 변화

저염분수 유입에 따른 Respiratory burst activity 변화를 알아보기 위하여 전복의 혈액을 채취하여 분석하였다. 실험 개시 후 와 실험 종료 시까지 유의적인 차이를 확인 할 수 없었다(Fig. 21).

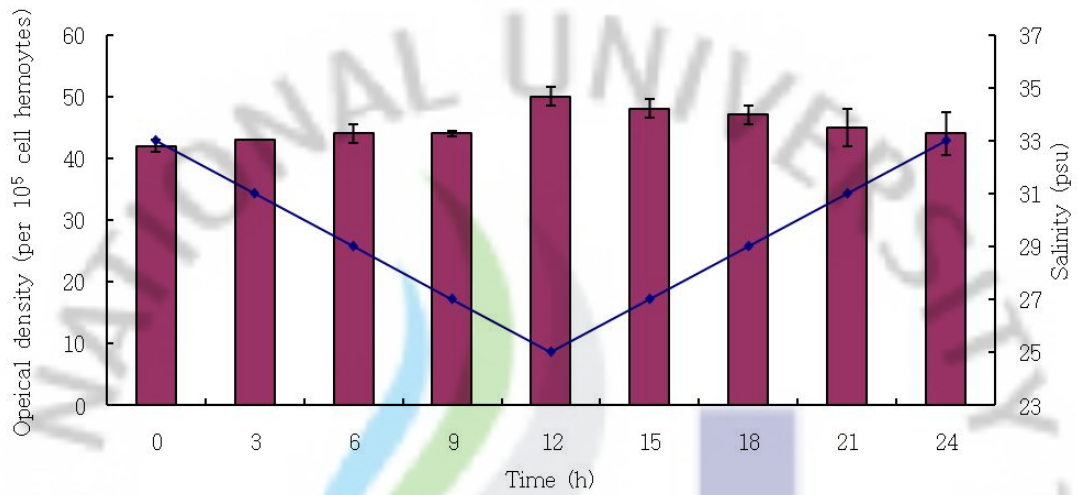


Fig. 21. Effect of low-salinity stress on respiratory burst activity in abalone (*H. discus discus*)

3-2-7. Phenoloxidase activity 변화

저염분수 유입에 따른 Phenoloxidase activity 변화를 알아보기 위하여 전복의 혈액을 채취하여 분석하였다. 실험 개시 후 염분농도 31psu까지는 일정한 수치를 나타내었다가 유의적인 감소를 확인하였고 다시 증가하는 경향을 확인하였다 (Fig. 22).

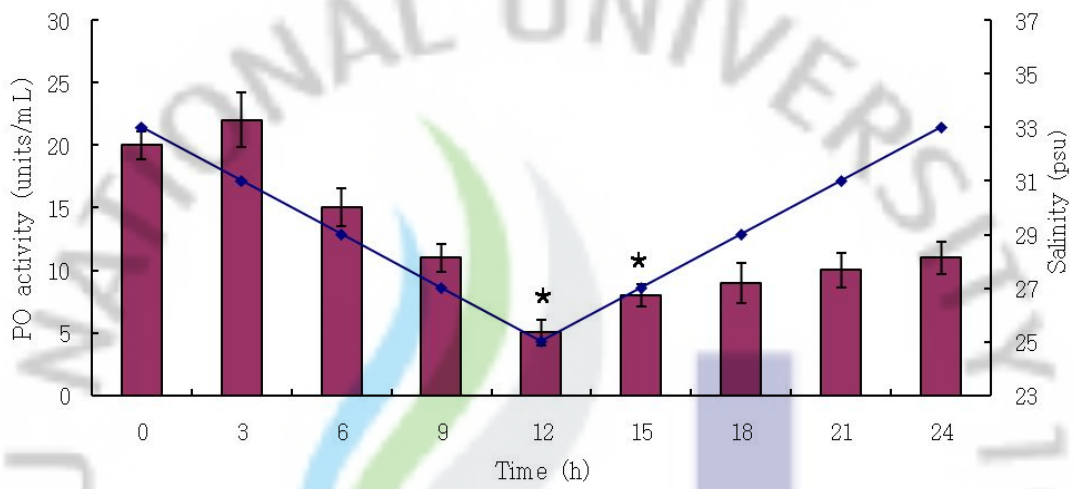


Fig. 22. Phenoloxidase activity of abalone (*H. discus discus*) exposed to low-salinity stress.

3-2-8. Lysozyme activity 변화

저염분수 유입에 따른 Lysozyme activity 변화를 알아보기 위하여 전복의 혈액을 채취하여 분석하였다. 실험 개시 후 29 psu까지는 일정한 수치를 나타내었다가 25 psu에서 유의적인 감소를 확인하였고 다시 유의적으로 회복되는 경향을 확인하였다(Fig. 23).

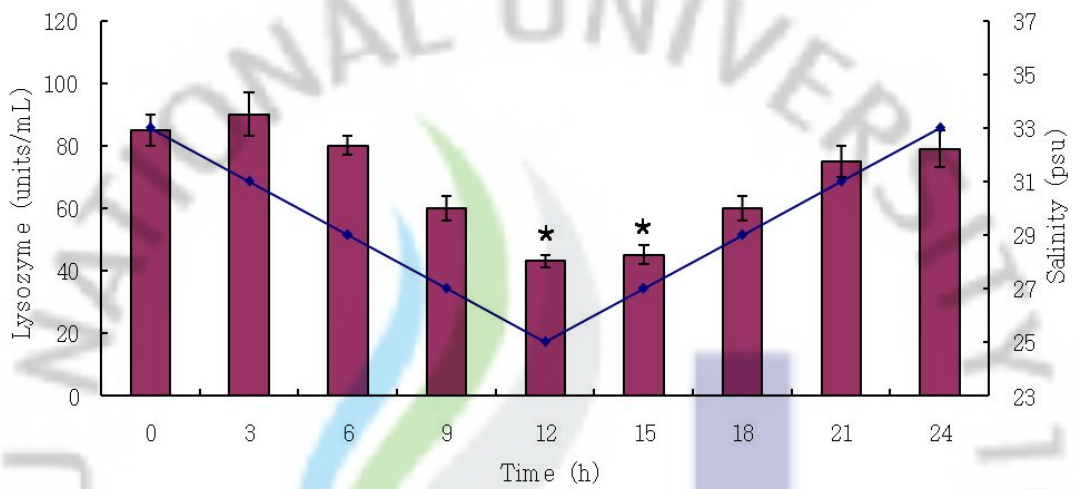


Fig. 23. Effects of low-salinity stress on lysozyme activity in abalone (*H. discus discus*)

4. 고 찰

급격한 염분 변화가 패류인 까막전복에게 미치는 영향을 알아보기 위하여 기초 생리적인 특성과 변화를 단기간 사육하여 관찰하였다. 수온은 전복의 성장에 있어서 가장 적합한 18℃를 유지하였으며, 염분농도는 일반해수 농도에서 급격하게 염분 농도를 낮추었을 때 생리학적인 변화를 알아보기 위한 실험을 하였다.

염분 스트레스에 따른 까막전복의 생존율에서는 대조구(33 psu)를 비롯한 35 psu에서는 실험 종료 시 까지 폐사된 개체가 발견되지 않아 100%의 생존율을 나타내었고, 25 및 30 psu 실험구에서만 48h 쯤에 폐사된 개체가 발견되었으며, 실험종료 시 25 psu은 93%, 30 psu은 97%의 생존율을 보였다(Fig. 7). 염분 변화에 따른 실험군들과 대조군을 비교 하였을 때, 뚜렷한 생존율에 차이를 보이지 않았다. 또한 저염분수 유입 변화에 대한 까막전복의 생존율을 확인하였는데 실험 개시 후 실험구는 대조구(33 psu)와 동일한 100%의 생존율을 실험 종료 시인 24h까지 확인하였다(Fig. 15).

수온과 염분변화는 복족류(Gastropoda)의 성장에 영향을 끼치는 중요한 요소(Chen et al., 1984)로써 우리나라처럼 계절적인 변화로 인하여 여름철 장마기간 동안 저염분 현상이 나타나는 경우에는 전복생산에 있어서 많은 문제가 발생된다. 이러한 현상은 1996년도 제주도 서부해역 마을어장을 중심으로 저염분이 발생하여 전복류를 포함한 수산동물이 폐사하는 사례가 발생하면서 그 피해액이 59억원에 달했다고 조사된바 있다 (제주도, 1996). 폐사 원인은 저염분과 고수온기로 인한 섭이 부진으로 생각되어지며, 대조군과 실험군들 사이에 유의적인 차이가 나타나지 않는 것을 보면 수온은 전복의 성장에 있어서 가장 적합하였으며 급격하게 염분 농도를 낮춘 것 만으로는 생존율에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 이는 급격한 염분 변화가 까막전복의 단기 사육에 있어서 생존율에 큰 영향이 없다는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 스트레스와 대사의 지표로 가장 많이 이용되고 있는 것이 혈액(Cho et al., 2002; Vijayan and Moon, 1994)이다. 혈액은 혈장과 혈구로 이루어지며 혈구는 적혈구, 백혈구, 그리고 혈소판으로 나누어진다. 따라서 본 실험에서는 전복의 심장 옆 혈관에서 주사기를 이용하여 채취 한 뒤, 혈림프(Hemolymph)를 계수하여 급격한 염분 스트레스에 따른 혈림

프 수의 변화를 조사하였는데, 패류의 혈림프는 상처의 수복, 패각의 재생, 영양 물질의 소화와 수송, 배설 및 생체방어에 관여 한다고 알려져 있다.

그 결과 급격한 염분 스트레스에 따른 까막전복의 혈림프 수의 변화는 0h에는 유의차가 없었으며 3h째에 대조구인 33 psu에 비하여 25 psu은 유의적으로 감소하였고 30 psu은 유의적으로 증가한 것을 확인하였다(Tabel 4, $P<0.05$). 하지만 6h에는 25 psu만 유의적으로 감소하였으며 나머지는 유의적인 차이는 확인되지 않았다($P<0.05$). 하지만 12, 24h에는 30 psu만 유의적으로 감소한 것을 확인하였고, 48h에는 25와 30 psu에서 대조구(33 psu)보다 유의적인 감소를 확인 할 수 있었다($P<0.05$).

생물에서는 각종 스트레스에 의해 생성된 활성산소는 어떤 유해물질이나 약물 등에 노출되었을 때 병적 상태에서는 이들이 과다하게 생성되어 조직에 치명적인 손상을 입힐 수 있다(Goldberg and stern, 1977; Simon et al., 1981; Moody and Hassan, 1982). 이러한 활성산소에 대하여 체내에서는 항산화효소인 superoxide dismutase (SOD)와 catalase(CAT) 등을 생성하여 세포기능 손상을 막는 것으로 알려져 있으며, 그 중 SOD는 superoxide radical (O_2^-)를 H_2O_2 와 O_2 ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)로 전환시키며, 이 전환된 H_2O_2 H_2O_2 를 CAT가 O_2 와 H_2O ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$)로 분해하여 활성산소를 형성하기 전에 생체에 무해한 분자들로 전환시킨다(Forman and Fridovich, 1973). 그리고 급격한 수온 변화에 따른 참전복에서 SOD의 변화가 시간이 지남에 따라 급격히 증가한 것을 확인 할 수 있었다(Kim and Yeo, 2005). 급격한 염분 변화에 대한 까막전복의 SOD와 CAT효소 변화를 확인하였다. 급격한 염분변화에 따른 SOD효소는 실험 개시 후 25 psu은 3h째에 증가하였다가 감소하는 경향을 나타내었으며 모든 실험구간이 24h까지는 일정하다가, 실험 종료 48시간에는 25, 30 psu에서 증가하는 것을 확인하였다. 염분 변화에 따른 CAT효소는 실험 개시 후 24h까지는 일정하다가 실험 종료 48시간에는 25 psu를 제외한 실험구와 대조구(33 psu)가 비슷한 수치를 나타내는 것을 확인하였다. 또한 저염분수 유입에 따른 까막전복의 SOD효소는 실험 개시 후 유의적인 감소를 확인하였으며 25 psu에서 유의적으로 증가하였다가 감소하는 경향을 확인하였다. 저염분수 유입에 따른 CAT효소는 실험 개시 후 유의적으로 감소하였다가 29psu에서 유의적으로 증가

하였고 다시 유의적인 감소를 확인하였다. 이상의 결과를 보면 염분 농도 33 psu에서 순치된 전복을 급격하게 낮은 염분 농도 25 psu로 옮겼을 때 생체나방어 기작이 가지는 한계를 넘어 SOD 활성은 증가하는 경향을 나타내었으며, CAT 활성은 감소하는 경향을 나타내었는데, 이러한 결과로 비추어 볼 때 25 psu과 같은 한계 스트레스 상황에서는 SOD가 superoxide radical를 H_2O_2 와 O_2 로 전환시키기는 하지만 이 전환된 H_2O_2 를 CAT가 O_2 와 H_2O 로 분해하는 능력이 떨어져 생체내 유해한 활성산소를 제거하지 못하고 있음을 보여주는 결과라고 여겨진다.

RT-PCR을 통한 HSP 70 mRNA의 발현은 대조구(33 psu)와 실험구에서 전부 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 9). 그래서 HSP 70 mRNA 발현을 β -actin mRNA를 기준으로 나타낸 결과를 확인하였다.(Fig. 10). 염분 변화 실험 개시 후 대부분이 HSP 70 mRNA가 증가하였고, 33 psu에서는 3h시간째에 HSP 70 mRNA가 감소하는 것을 확인하였다. 실험구들은 실험 12시간까지 HSP 70 mRNA의 증가를 확인하였다. 그리고 종료 48시간에는 모든 실험구에서 HSP 70 mRNA가 감소하는 것을 확인하였다. 염분 변화에 따른 까막전복의 HSP 70 mRNA 발현은 실험 개시 후 증가하였다가 감소되는 현상이 나타나며, 각 실험구에 대한 차이에 의해서 감소와 증가가 나타난다고 사료되어진다.

염분 변화에 따른 단백질 발현량을 확인하였다. 염분변화 실험 개시 후 대조구를 제외한 모든 실험구에서 12째에 21 kDa 부근에서 단백질 발현이 뚜렷하게 확인되었다(Fig. 11-A, B, D). 염분 변화 실험 개시 후 48h째에 대조구와 25 psu을 제외한 모든 실험구에서 31kDa 부근에 확인되지 않은 단백질이 나타나는 것을 확인하였다(Fig. 11-B, D). 이는 염분 변화로 인하여 까막전복의 단백질 발현의 차이가 뚜렷이는 구분되지는 않지만, 염분 변화의 영향으로 단백질의 변형과 새로운 단백질의 생성으로 사료되어진다.

최근, 생화학적 및 분자생물학적 연구에 따르면 외부의 스트레스로부터 개체를 보호하기 위하여 열충격단백질 (Heat Shock Protein, HSP)들을 포함한 여러 가지 스트레스 단백질 발현 및 활성이 상승하는 것으로 밝혀졌다. 계속되는 스트레스의 결과로 나타나게 되는 스트레스 단백질들의 발현은 암, 자가면역, 심혈관계통의 질병 등의 결과를 궁극적으로 일으킨다고 보고되고 있다. 대표적인 스트

레스 단백질에서 열충격단백질 70(HSP70)을 들 수 있다. 이 단백질은 molecular chaperone 같은 작용을 주로 하지만 최근 연구에서는 apoptosis의 억제, 암의 발생, 그리고 면역계통에 영향 등 다른 여러 가지 생화학적 기전에 관여하고 있다는 것이 여러 연구진들의 보고되고 있다(Seo, 1997). 염분 변화에 따른 까막전복의 기초 생리변화를 알아보기 위한 실험에서 HSP 70 단백질 발현을 보았을 때, 까막전복은 실험 종료까지 HSP 70 단백질 발현이 나타나지 않았다. 염분 변화가 까막전복에게 실험 종료까지 영향을 미치지 못하였다고 사료되어진다. 따라서 좀 더 구체적인 단백질의 연구가 필요하다고 사료되어진다.

Respiratory burst이란 식세포가 식작용 동안 혹은 다른 물질들에 의해서 자극 받았을 때 산소 소비량이 증가함과 동시에 O_2^- , OH^- , H_2O_2 와 같은 산소라디칼(reactive oxygen intermediates, ROIs)을 다량으로 방출하는 현상을 말하며, 이러한 ROIs는 병원체를 죽이는데 매우 중요한 역할을 한다 (Siwicki, 1994). 이러한 호흡폭발을 측정하는 방법으로 NBT법이 많이 사용되어져 왔으며, 최근 chemiluminescence (CL)법이 일부 사용되고 있다. 본 실험에서는 NBT법을 사용하였으며 염분 변화에 따른 Respiratory burst 활성 변화를 확인하였다. 염분 변화 개시 후 0, 3h 에는 유의차가 없었으며 6h째에 30, 35 psu에서 유의적으로 증가하였다가 감소하는 경향을 확인하였고 실험 종료 시에 일정한 수치를 나타내었으며 저염분수 유입에 따른 까막전복의 Respiratory burst activity활성의 변화는 실험 개시 후와 실험 종료 시까지 유의적인 차이를 확인할 수 없었다. 이러한 결과로 보았을 때 33 psu과 근접한 염분 농도에서 식균작용을 더 잘 일으켜 외부 물질에 대한 잠재적인 저항성이 더 높을 것으로 사료된다.

무척추동물의 면역계는 선천성 면역계가 주를 이루고 있으며, pro-phenoloxidase를 매개로 하는 멜라닌 자극계는 방어 수단에서 중요하다. Phenoloxidase는 hemolymph 내 hemocyte에 의해 합성되며, 초기에는 pro-phenoloxidase로 합성되었다가 체내에 세균이나 기생충과 같은 미생물이나 기타 이물질이 침입하면 phenoloxidase로 활성화 된다. 본 실험에서는 염분 변화에 따른 phenoloxidase activity 변화를 확인하였다. 염분 변화 개시 후 0h 에는 유의차가 없었으며 대조구(33 psu)를 제외한 나머지 실험구에서는 3h째에 증가하였다가 감소한 것을 확인하였다(Fig. 13). 하지만 35 psu은 대조구와 실험 종료

48h째에 비슷한 수치를 나타내었으며 나머지 실험구에서는 유의적인 감소를 확인 하였으며 저염분수 유입에 따른 까막전복의 phenoloxidase 활성의 변화는 실험 개시 후 염분농도 31psu까지는 일정한 수치를 나타내었다가 유의적인 감소를 확인하였고 다시 증가하는 경향을 확인하였다. 이러한 결과로 보았을 때 대조구를 제외한 나머지 실험구에서 식균작용을 더 잘 일으키는 것으로 사료된다. 하지만 염분 변화가 까막전복에게 실험 종료까지 유의적인 감소와 증가가 확인되어 좀 더 구체적인 phenoloxidase activity 연구가 필요하다고 사료되어진다.

Lysozyme은 살균 및 항 염증성 성질을 지니고 있어 흡소닌 및 항 기생충 작용, 항 바이러스 작용 및 오염물질의 작용 등에 관여함으로써 생체의 방어기작에 다양한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다 (Mohandas, 1985). 본 실험에서는 염분 변화에 따른 Lysozyme 활성 변화를 확인하였다. 염분 변화 개시 후 0h 에는 유의차가 없었으며 6h째까지는 일정한 수치를 나타내었으며 12h 째에 대조구(33 psu)에 비하여 25 psu은 유의적으로 증가하였다가 실험 종료 48h 째에 유의적인 감소를 확인하였다. 나머지 실험구에서도 대조구(33 psu)에 비하여 유의적인 감소를 확인하였으며 저염분수 유입에 따른 까막전복의 Lysozyme 활성의 변화는 실험 개시 후 29 psu까지는 일정한 수치를 나타내었다가 25 psu에서 유의적인 감소를 확인하였고 다시 유의적으로 증가하는 경향을 확인하였다. 이러한 결과를 보았을 때 염분농도 저하가 스트레스 요인으로 작용하여 lysozyme 활성이 낮아졌다고 여겨진다. 하지만 염분 변화가 까막전복에게 실험 종료까지 유의적인 감소와 증가가 확인되어 좀 더 구체적인 Lysozyme 활성 연구가 필요하다고 사료되어진다.

Fisher et al.(1986)은 American oyster (*Crassostrea virginica*)에서 염분도가 낮아질수록 혈구의 활성은 증가한다는 보고가 있었다. 그리고 *Halotis refescens*에서 염분농도 35 psu와 45 psu에서 phagocytic activity가 감소하지만 25 psu에서는 감소하지 않는다는 보고 (Martello et al., 2000)도 있다.

급격한 염분 변화와 저염분수 유입에 따른 까막전복의 기초 생리적인 특성과 변화는 혈액에서의 변화, 단백질 발현 변화, 항산화 효소의 변화, HSP 70 mRNA의 변화, Respiratory burst 활성변화, phenoloxidase 활성변화, Lysozyme 활성 변화를 확인하였다. 단기간 사육을 통하여 25 psu은 전복의 생

리적인 특성에 악영향을 미치나 제주도에 저염분 현상이 나타나는 경우 저염분과 고수온이 같이 유입되지 않으면 수산동물이 폐사하는 사례가 줄어들 것으로 파악된다. 하지만 저염분수 유입에 대한 대책을 미리 마련하여 수산동물이 폐사를 예방하여야 하며 대처 방안으로 추가적인 연구가 이루어져야 할 것이다.



Ⅲ. 사료첨가제 급여에 따른 까막전복

(*Haliotis discus discus*)의 생리학적 변화에 관한 연구

1. 서론

전복은 단백질과 비타민이 풍부하여 피부미용, 자양강장, 산후조리 등에 효능이 있을 뿐 아니라, 특히 타우린이 풍부하여 간장보호, 피로회복 및 심근경색에 대한 예방효과를 가지고 있다. 최근 이러한 전복의 양식에 대한 관심이 높아짐에 따라 육상 사육 수조에 관한 효과를 비교한 연구(Jeong et al., 1994a, b) 등의 다양한 전복 양식 산업의 연구를 통해 제주도 등지에서는 전복을 육상 수조에서 양성하는 곳이 현저히 증가되고 있는 실정이며, 전복의 먹이인 해조류가 풍부한 전남지역에서는 가두리 양식 또한 활발히 진행되어 오고 있다. 그 결과 2006년의 전복류 양식 생산량(3,050톤)은 패류 양식 생산량(약 391천 톤)의 약 0.8%에 불과하였지만, 전복류 양식 생산 금액(약 1,200억원)은 패류 양식 생산금액(3,430억원)의 35% 이상을 차지할 만큼 우리나라 패류 양식 산업에 있어서 전복의 중요성은 더욱 높아질 것을 암초지대에 방류하여 것으로 예상된다. 전복은 주로 인공종묘로 생산하여 종묘상품 크기의 것을 다시 수확하는 방식으로 이루어져 왔으며 부분적으로 채룡 수하식으로 양식되어 왔다. 하지만 최근 전복양식에 대한 관심이 높아짐에 따라 전복을 육상수조에서 양성하는 곳이 현저히 증가되고 있는 실정이다. 양식에 있어 가장 중요하게 고려되어야 할 것은 대상종에 적합한 서식환경, 질병과 성장 효과를 높일 수 있는 먹이 공급이다. 이러한 외부 요인들 중 환경이나 질병은 자연 의존적인 인자인 반면에 사료는 양어가들이 적절히 조절할 수 있고, 특히 사료는 양식 경영비의 절반 이상을 차지하는 중요한 요소로서 값싸고 질 좋은 사료의 안정적 확보가 양식의 성패를 좌우할 수 있는 중요한 요인이다.

전복류의 초기 먹이에 Ioriya and Suzuke (1987), Norman-Boudrean et al., (1986), Ohgai et al. (1991), 한(1994)과 김(1992)이 연구한 바 있다. 전복 종묘생산은 부착기 이후부터 부착규조가 붙은 파관에 부착시켜 규조를 주

먹이로 사육하여 각장 1cm 가까이 키운 후에는 과관에서 박리하여 중간 육성하거나 바다에 방류하고 있다. 전복 종묘를 바다에 방류하면 생존율일 50% 이하로 낮지만 육상수조 등에서 중간 육성할 경우에는 생존율이 훨씬 높아지는 것으로 알려져 있다. 하지만 전복의 육성용 먹이로는 주로 생미역, 생과래, 생다시마와 같은 천연 먹이를 사용하다가 여름에는 염장미역이나 염장다시마를 주 먹이로 사용하고 있는 실정이다. 이러한 천연먹이는 공급이 불안정할 뿐 아니라 가격의 변동이 심하고, 성장 효과 역시 배합사료로 사육하는 것보다 낮은 것으로 보고되어(Kim et al., 1998; Lee et al., 1998a, b, c; viana et al., 1993), 체계적인 전복 양식 발전에 제한적인 요인이 되고 있다. 이에 전복 사료 개발에 관한 연구들이 이미 외국에서 일부 수행되어 왔으며(Mai et al., 1995a, b; Uki et al., 1985a, b; Uki et al., 1986a, b), 국내에서도 국내 실정에 맞는 경제적인 배합사료를 개발하기 위해서 일련의 연구들이 수행되어왔다(Lee et al., 1997; Lee et al., 1998a, b, c; Lee, 1998; Lee and Pa가, 1998; Cho et al., 2006; Cho et al., 2007). 이러한 연구 이외에도, 먹이 식성 등을 고려하여 사료섭취 유인효과 물질이나 성장, 생산성 및 품질 개선효과를 위한 사료첨가제 개발을 위한 연구가 필요하다.

제주도의 주요 1차산업 생산물은 감귤, 감태가 있으며 이러한 생산물의 가공처리 후 부산물들은 환경오염원이 되기도 한다. 그러나 최근 이러한 부산물을 활용한 기능성 물질의 추출 등 다양한 연구가 이루어지고 있다(이성태, 2001).

그 중 제주도의 주요 1차산업 대상종인 감귤의 생산량은 약 660,000톤이며, 이중 감귤 주스 등의 생산을 위하여 가공 처리된 감귤 양은 약 120,000톤으로 여기에서 나오는 감귤 부산물인 감귤박은 약 60,000톤에 이르고 있다.

감귤박은 섬유소, 유기산 및 유리당 등의 영양기능 성분과 항암, 항산화 및 항염증 등의 생리소재로 사용되고 있으나, 그 양이 5,000톤 미만으로 극히 미미한 수준이다. 기능이 우수한 carotenoids 및 flavonoids가 다량 함유되어 있어 예로부터“진피”라는 이름으로 한약 최근, 축산사료 분야에서 감귤박을 이용하는 사례가 늘어남으로서 약 20,000톤 정도가 사료 및 퇴비로 활용되고 있다.

한편 감태는 갈조식물문(phaeophyta) 갈조식물강(phaeophyceae) 다시마목(laminariales) 다시마과(laminariaceae)에 속하는 다년생 갈조류로 모자반 속과 함께 우리나라에서 가장 큰 해조이며 최근 감태에 많이 들어 있는 폴리페놀 물질인 플로로타닌(phlorotannin)이 항산화, 항고혈압, 혈전생성저해 및 항암 활성이 우수한 것으로 알려짐으로서 기능성 식품 및 의약품 산업의 중요 소재로 부각되고 있다. 그러나 감태 무게의 약 25%를 차지하고 있는 감태 줄기는 가공적성의 문제로 전혀 이용되지 않고 폐기처리 되는 실정이기 때문에 감귤박과 마찬가지로 활용 방안에 대한 기술개발이 필요하다. 따라서 본 실험에서는 우리나라의 주요 양식 대상종인 전복 배합사료의 첨가제로서 부산물인 감귤박과 감태 가공부산물을 고온속성발효 한후 사료첨가제로 이용하여 전복의 성장 및 생산성 개선과 염분 스트레스에 미치는 영향을 평가하여 이러한 연구를 기초로 고부가가치를 창출하는 전복 양식 산업에 경쟁력을 확보할 수 있는 기초 자료를 제공하고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 실험 재료 및 사육 관리

실험에 사용된 까막전복(*Haliotis discus discus*)은 제주특별자치도 제주시 부근 양식장에서 구입하여 사용하였다. 까막전복의 경우 평균 각장 3.8 ± 0.2 cm, 각폭 2.5 ± 0.2 cm, 전중량 6.4 ± 0.1 g인 개체를 사용하였다. 실험 전복은 미리 $18 \pm 0.3^\circ\text{C}$ 에서 1주 동안 사육하며 순치시킨 후 순환여과가 가능한 수조를 제작하여 사육하였다. 이때 염분은 약 33.5psu을 유지하였고, PVC 파이프(\varnothing 20cm, L 20cm)를 세로로 절단한 은신처(Shelter)를 넣어서 공기를 공급하였다. 예비사육기간에 먹이는 생미역을 전복체중의 2%를 공급하였으며, 실험 수조마다 80마리의 까막전복을 넣어 실험하였고, 사료를 공급한 직후를 0주로 정하여 0, 1, 2, 3, 4, 8 및 12주째에 각각 3마리의 까막전복 으로부터 혈구와 아가미 조직, 간 부위를 채취하여 -70°C 로 보관하면서 분석에 사용하였다.

한편, 급격한 염분 스트레스에 대한 까막전복의 생리적인 변화를 알아보기 위하여 12주간 사육한 각 실험군에서 50마리씩을 무작위로 선별하여 33 psu의 정상 해수로부터 염분농도가 25 psu인 수조로 옮겨 실험을 실시하였다. 0, 3, 6, 12, 24 및 48시간째에 각각 3마리의 전복으로부터 혈구와 아가미 조직, 간 부위를 채취하여 실험에 사용하였다.

2-2. 전복용 사료제조

본 사육실험에는 총 10종류의 사료가 준비 되었으며, 각 실험구는 3 반복구를 두어 실시하였다. 주요 단백질원으로 casein을 사용하였으며, 탄수화물원으로는 dextrin 지질원으로는 fishoil과 soybean oil을 이용하여 조절하였으며, 감태추출물 잔사 발효물(ECR)과 감귤박(CP)에 따라 변화하는 탄수화물의 변화를 조절하기 위하여 wheat flour을 첨가하여 조절하였다. 실험구는 ECR 및 CP의 농도가 각각 2%, 4% 및 6%가 되도록 첨가하였고 혼합 첨가 실험구에는 ECR과 CP를 1:1의 비율로 혼합한 후 각각 2%, 4%, 6%가 되도록 첨가하여 총 10개의 실험 사료를 제작하였다. 실험사료와 ECR, CP 및 CP+ECR의 조성은 (Tabel 5)와 같다. 실험사료의 성형은 각각의 사료원료를 잘 혼합하여 혼합물100g당 물 100g을 가하여 다시 잘 혼합한 후 압착하여 가로 1cm, 세로 1cm, 두께 0.15cm가 되도록 실험사료를 절단한 후, 5%의 염화칼슘 수용액에 1분간 담가서 알긴산나트륨을 칼슘염으로 치환시켰다. 제조된 실험사료에서 CP를 첨가한 사료의 경우에는 CP건조물의 색깔이 노란빛을 많이 띄어서 대조군에 비해서 노란색빛이 진하고, CR의 경우에는 ECR 건조물의 갈색빛을 많이 띄어서 대조군에 비해 갈색빛을 띄었다(Fig. 24). 제조된 실험사료는 응달에서 36시간 건조시킨 후 냉동고(-20℃)에 저장하였다.

Table 5. Ingredients and proximate analysis of the experimental diets for disk abalone

Ingredients	Diets (%)									
	Control	ECR ¹			CP ²			ECR+ CP		
		2%	4%	6%	2%	4%	6%	2%	4%	6%
ECR		2	4	6						
CP					2	4	6			
ECR+ CP								2	4	6
Fish meal	15.5	15.5	15.5	15.5	15.5	15.5	15.5	15.5	15.5	15.5
Dextrin	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Wheat flour	6.5	4.5	2.5	0.5	4.5	2.5	0.5	4.5	2.5	0.5
Casein	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Sodium alginate	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
Mineral	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Vitamin	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Choline	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Soybean oil	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Fish oil	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Proximate analysis(%)										
Crude protein	28.8	28.8	28.8	28.8	28.7	28.6	28.5	28.7	28.7	28.6
Crude lipid	1.47	1.72	1.97	2.22	1.57	1.67	1.77	1.64	1.82	1.99
Crude carbohydrate	4.97	5.22	5.47	5.72	5.07	5.17	5.27	5.14	5.32	5.49

¹ECR : Fermented *Ecklonia cava* by-product powder

²CP : High temperature and speed time-dried citrus pomace powder

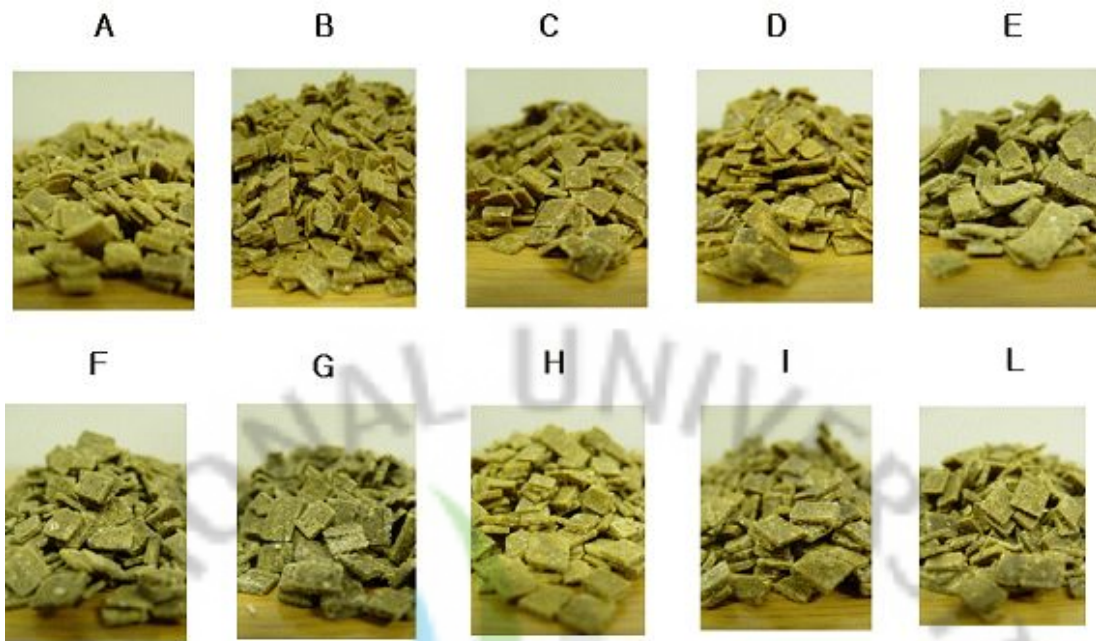


Fig. 24. The external form of manufactured feed¹ for disk abalone.

¹CP : High temperature and speed time-dried citrus pomace powder

ECR : Fermented *Ecklonia cava* by-product powder

A : Control, B : CP 2%, C : CP 4%, D : CP 6%, E : ECR 2%,

F : ECR 4%, G : ECR 6%, H : CP+ECR 2%, I : CP+ECR 4%,

L : CP+ECR 6%

2-3. 생존율 측정

실험개시 후 0, 1, 2, 3, 4, 8 및 12주째에 폐사한 개체를 각각 조사하여 나타내었는데, 폐사 개체의 계수는 은신처(shelter)와 수조 벽면에 부착능력이 없고, 유리봉으로 발과 촉수를 자극하여도 반응이 없는 개체를 선택하여 조사하였다.

2-4. 성장도 측정

전복의 성장을 측정하기 위하여 실험개시 직후, 4주, 8주, 12주째까지의 크기 변화를 각장과 각폭은 Digimatic cliper(0.01mm)로, 중량은 이동식 저울(0.01g)로 각각 측정하였다.

2-5. 패각색 변화 관찰

전복 패각색의 변화는 먹이의 종류에 따라 변화하기 때문에 양식산과 자연산을 구별하는데 쉽게 이용되는 항목이다. 이 실험에서는 사료 급여 후 0, 4, 8 및 12주째에 각 수조에서 무작위로 3마리의 전복을 선별하여 전복 패각의 색채 분포를 비교하였다.

2-6. 혈림프구수 측정

혈림프구수의 측정은 실험개시 후, 1, 2, 3, 4, 8 및 12 주째에 전복의 심장 옆 혈관으로부터 바늘 규격 GX1/2 인 1ml 주사기를 이용하여 혈액을 채취한 후 0.9% 생리식염수로 10배 희석하여 혈구 계산판을 이용하여 살아있는 혈구를 계수하였다.

2-7. 항산화 효소 측정

항산화 효소는 간부위를 적출하여 SOD 및 CAT를 저염분 스트레스를 가한 후 48시간째의 변화를 각각 분석하였다. 간부위를 적출 후 약 0.1g을 0.9% NaCl에 3회 세척한 다음 KCl(1.17%)을 함유한 100mM phosphate buffer (pH7.0)를 첨가하여 균질화 하였다. 균질화 된 시료는 원심분리(1,000rpm, 15min, 4℃)에 의해 지방 및 침전물을 제거하였으며, 균질액은 다시 원심분리(13,000rpm, 20min, 4℃)한 후 상등액을 항산화 효소 측정용 시료로 사용하였다. 단백질 함량은 Lowry 등의 방법에 따라 표준 단백질로서 BSA를 사용하여 spectrophotometer로 750nm에서 흡광도를 측정하였다.

SOD는 pyrogallol의 자동 산화율이 억제되는 양을 측정하는 Marklund and Marklund의 방법으로 측정하였다. 즉, 50mM phosphate buffer(pH 8.24) 1.3ml에 간장 균질액 25 μ l을 넣은 후 45 μ l의 3mM progallol 용액을 첨가하여 spectrophotometer로 325nm의 파장에서 흡광도를 측정하였고, 효소활성의 1 unit은 반응액 중의 pyrogallol의 산화를 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다.

CAT활성 측정은 H₂O₂를 기질로 사용하여 spectrophotometer로 240nm에서 H₂O₂가 환원되어 감소하는 흡광도로서 효소 활성도를 측정하는 Nelson and Kiesow의 방법에 의하여 측정하였다. 효소 활성의 unit은 1분간 1mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 H₂O₂를 nmol로 나타내었다.

2-8. SDS-PAGE 분석

전복의 아가미를 채취하여 분쇄 완충용액 100mM phosphate buffer에서 호모젠아이저로 분쇄하여 원심분리(12,000rpm, 15min, 4℃)하였다. 상층액을 2:1 비율로 2X Laemmli sample buffer(80mM Tris-HCl (pH6.8), 2% SDS, 12% β -mercaptoethanol, 15% glycerol 및 0.012% bromphenol blue)에 용해시켜 90℃ 이상의 온도에서 3분간 boiling 한 후 Laemmli의 방법에 따라 SDS-PAGE을 실시하였다. 7.5~10% polyarylamide gel을 사용하여 250V, 55mA로 4시간동안 전기영동을 실시한 후, 염색액(0.136% coomassie brilliant blue R-250, 45% methanol 및 10% acetic acid)에서 40분간 염색하고, 7.5% methanol, 7.5% acetic acid에서 탈색하였다.

2-9. Western blot 분석

Western blot은 Towbin 등의 방법을 변형하여 실시하였다. SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질을 15V에서 4시간 동안 nitrocellulose(NC)막으로 전사시킨 후 ponceau S 용액(0.2% ponceaus, 3% trichloroacetic acid 및 3% sulfosalicylic acid)으로 전사됨을 확인하였다. 그 후 항체의 비특이적 결합을 막기 위해 3% bovin serum albumin과 0.005% Tween 20이 함유된 0.1M Tris buffered saline(TTBS, pH7.4)을 이용하여 40분 상온에서 약하게 흔들면서 blocking 시켰다. Blocking이 끝난 후 HSP70에 대한 항체를 NC막에 첨가하여 1시간 동안 실온에서 배양한 후, TBS-T(0.05% Tween 20 in TBS)로 5분씩 3회 세척하였다. Alkaline phosphatase-conjugated goat antimonuse IgG로 1시간 동안 실온에서 배양하고 TBS-T 용액으로 5번 세척한 후, DAB(0.1%)와 0.03% H₂O₂가 함유된 PBS(pH7.2)로 발색을 유도하였다.

2-10. 통계처리

실험에서 얻어진 결과는 SPSS의 ANOVA test를 이용하여 분산분석한 후 Duncan의 다중위검정으로 최소 유의차 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

3. 결 과

3-1. 사료급여에 따른 까막전복의 생리 변화

3-1-1. 생존율 변화

까막전복의 생존율 변화를 살펴보면 사료에 따른 생존율의 변화폭은 크지 않았다. 0~2주까지 100%의 생존율을 보이다가 3주째에 대조군과 ECR 2%에서 폐사한 개체가 발생하였다. 그 후 8주에 CP+ECR 2%와 CP+ECR 6%에서 폐사된 개체가 발생하였고, 12주에서는 대조군과 ECR 2%에서 추가로 폐사된 개체가 발생하였다(Table 6). 한편, CP만 단독으로 첨가한 전 실험군과 ECR 4% 및 6% 첨가된 실험군에서는 폐사가 전혀 일어나지 않았다. 따라서, 대조군 및 ECR 2% 등의 실험군에서 폐사 개체가 발생한 것은 서로 유의성이 인정되지 않아 제작된 실험사료에 의한 폐사로 판단하기는 힘든 것으로 여겨졌다.

Table 6. Sources of dietary survival rate(%) of disk abalone(*H. discus discus*)

Week	Diet Control	CP			ECR			CP+ ECR		
		2%	4%	6%	2%	4%	6%	2%	4%	6%
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	94	100	100	100	94	100	100	100	100	100
4	94	100	100	100	94	100	100	100	100	100
8	94	100	100	100	94	100	100	96	100	98
12	92	100	100	100	92	100	100	96	94	98

*CP : High temperature and speed time-dried citrus pomace powder,
 ECR : Fermented *Ecklonia cava* by-product

3-1-2. 성장을 변화

3-1-2-1. 전복 각장의 변화

12주째의 각장의 크기로 ECR 6%에서 최대치인 39.99mm를 나타내었으며, CP 4%에서 최소치인 39.18mm를 나타내었다. 대조군에서는 사육 12주 후의 각장 크기가 39.11mm로 나타나 사육에 따른 최종 크기는 ECR 6%(39.99 mm), ECR+CP4%(39.97mm), CP 2%(39.91mm), ECR+CP6%(39.74mm), ECR 2%(39.47mm), ECR4%(39.38mm), ECR+CP2%(39.26mm)에서 대조군보다 좋은 성장을 보인 것으로 나타났다(Fig. 25).

성장변화를 나타내는 성장 기울기의 변화는 대부분의 실험군에서 대조군보다 높은 값을 나타내었다. 성장 기울기의 변화를 살펴보면, ECR+CP 4%($y=0.4883x+38.116$)에서 가장 높은 기울기를 나타내었고, CP 6%($y=0.0631x+38.679$)는 대조군($y=0.1461x+38.672$)보다 낮은 성장기울기를 나타내었다. 성장기울기와 성장 패턴을 살펴보면 대부분의 실험군에서 대조군보다 높은 성장률을 보이지만 ECR+CP 2%의 경우에는 대조군보다 낮은 성장률을 보였다.

따라서, ECR 및 CP를 첨가한 사료를 이용한 전복사육은 시판되는 일반사료에 비해 좋은 성장효과를 나타내는 것으로 판단되나, ECR+CP 2% 실험군에서 나타나는 성장저해 현상에 대해서는 생리적인 분석을 통해 그 원인규명이 되어져야 할 것으로 판단되었다.

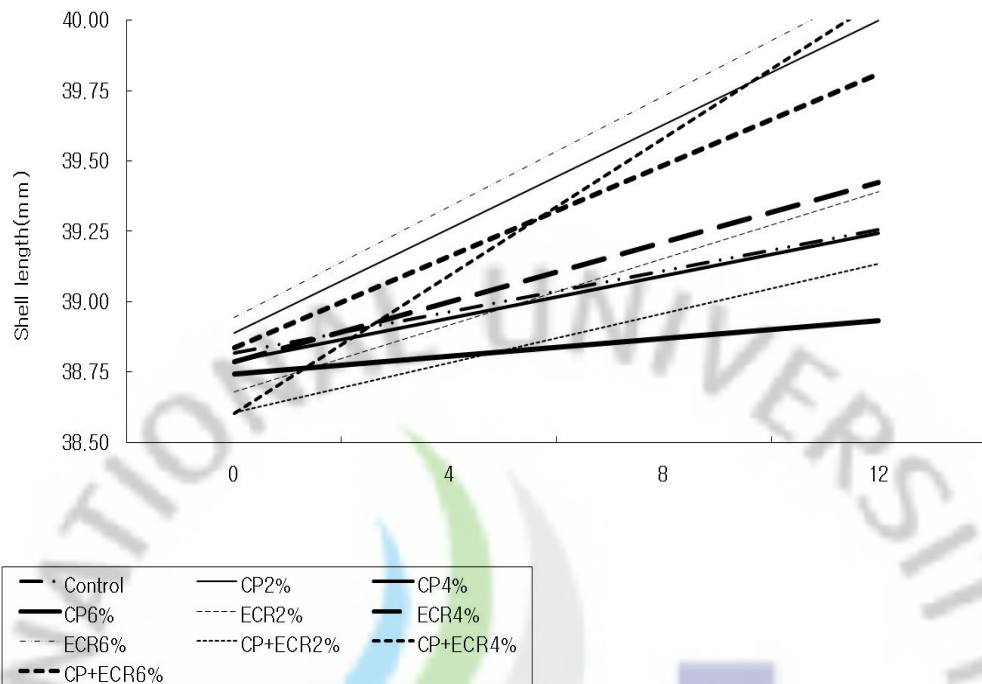


Fig. 25. Variations of shell length for disk abalone(*H. discus discus*) reared with different dose diets.

*CP : High temperature and speed time-dried citrus pomace powder,

ECR : Fermented *Ecklonia cava* by-product

Control : $y = 0.1461x + 38.672$, $R^2 = 0.7347$

CP 2% : $y = 0.3699x + 38.519$, $R^2 = 0.859$

CP 4% : $y = 0.1514x + 38.639$, $R^2 = 0.8396$

CP 6% : $y = 0.0631x + 38.679$, $R^2 = 0.8526$

ECR 2% : $y = 0.237x + 38.444$, $R^2 = 0.9291$

ECR 4% : $y = 0.2123x + 38.573$, $R^2 = 0.9191$

ECR 6% : $y = 0.3929x + 38.551$, $R^2 = 0.8066$

CP+ECR 2% : $y = 0.176x + 38.432$, $R^2 = 0.7305$

CP+ECR 4% : $y = 0.4883x + 38.116$, $R^2 = 0.8515$

CP+ECR 6% : $y = 0.3699x + 38.519$, $R^2 = 0.9067$

3-1-2-2. 전복 각폭의 변화

12주째의 각폭의 크기로 ECR 6%(26.97mm)에서 최대치를 나타냈으며, CP 6%(25.65mm)에서 최소치를 나타내었다. 대조군에서는 사육 12주 후의 각폭 크기가 26.50mm로 나타나 사육에 따른 최종 크기는 ECR 6%(26.97mm)에서 대조군 보다 좋은 성장을 보인 것으로 나타났다(Fig. 26). 성장변화 속도를 나타내는 성장기울기의 변화도 ECR 6%($y=0.4217x+25.48$)가 가장 빠른 성장변화를 보였으며, ECR 2%($y=0.2161x+25.371$) 및 ECR+CP 6%($y=0.2507x+25.543$)도 비교적 성장이 빠른 것으로 나타났지만, 대조군과 비교해서 ECR 6% ($y=0.4217x+25.48$)를 제외한 모든 실험군이 대조군보다 낮은 값을 나타내었다.

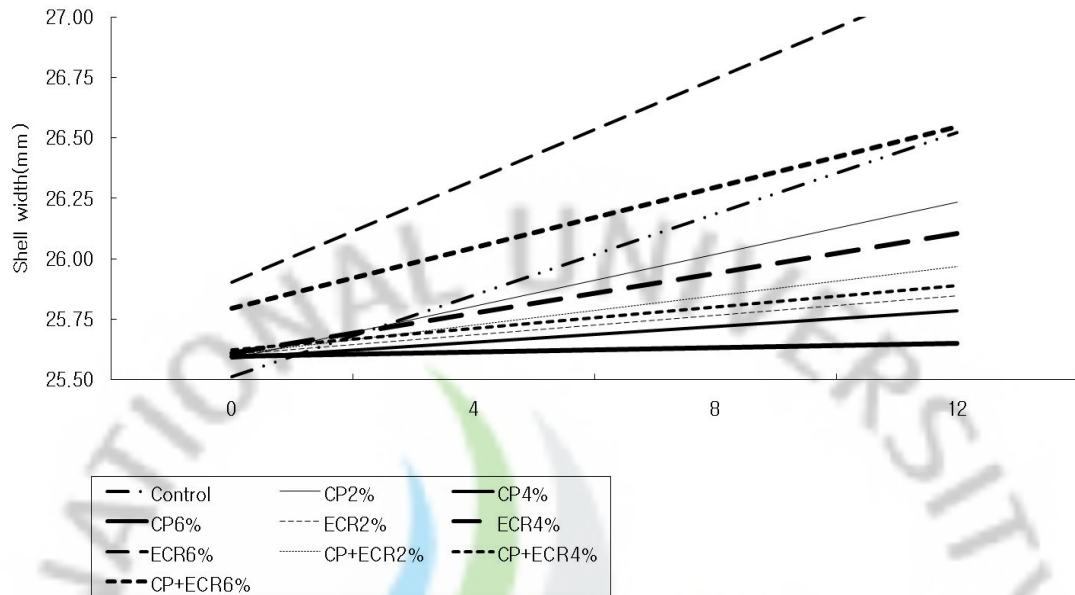


Fig. 26. Variations of shell width for disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose diets.

*CP : High temperature and speed time-dried citrus pomace powder,

ECR : Fermented *Ecklonia cava* by-product

Control : $y = 0.3376x + 25.173$, $R^2 = 0.8974$

CP 2% : $y = 0.2161x + 25.371$, $R^2 = 0.9546$

CP 4% : $y = 0.0654x + 25.523$, $R^2 = 0.9689$

CP 6% : $y = 0.0181x + 25.577$, $R^2 = 0.9856$

ECR 2% : $y = 0.0815x + 25.522$, $R^2 = 0.9862$

ECR 4% : $y = 0.1647x + 25.445$, $R^2 = 0.9831$

ECR 6% : $y = 0.4217x + 25.48$, $R^2 = 0.7423$

CP+ECR 2% : $y = 0.1211x + 25.484$, $R^2 = 0.9959$

CP+ECR 4% : $y = 0.0881x + 25.536$, $R^2 = 0.9234$

CP+ECR 6% : $y = 0.2507x + 25.543$, $R^2 = 0.7081$

3-1-2-3. 무게 변화

Fig. 11에서 보는 바와 같이 사육 12주 후 까막전복의 최종 무게는 ECR+CP 6%가 7.66g, ECR+CP 4%가 7.45g, ECR 2%가 7.40g, CP 2%가 7.28g, ECR 4%가 7.24g, ECR 6%가 7.20g 순으로 나타나 대조군 7.15g 보다 높은 값을 나타내었다. 한편, CP 4%, CP 6% 및 ECR+CP 2%에서는 실험군보다 낮은 값을 나타내었다(Fig. 27)

성장 변화를 나타내는 성장기울기의 변화도 ECR+CP 6%($y=0.3761x+ 6.3741$)가 가장 높은 기울기를 나타내었고, ECR+CP 4%($y= 0.3131x+6.3434$), ECR 2%($y=0.2501x+ 6.3467$), CP 2%($y=0.2621x+ 6.3344$), ECR 4%($y=0.2501x+ 6.3467$), ECR 6%($y=0.2381x+ 6.2874$)도 비교적 빠른 패턴을 나타내었다. 그러나 CP 6%($y=0.1721x+ 6.3044$), ECR+CP 2%($y=0.3131x+ 6.3434$), CP 4%($y=0.1181x+ 6.3527$)는 대조군의 비하여 낮은 값을 나타내었다.

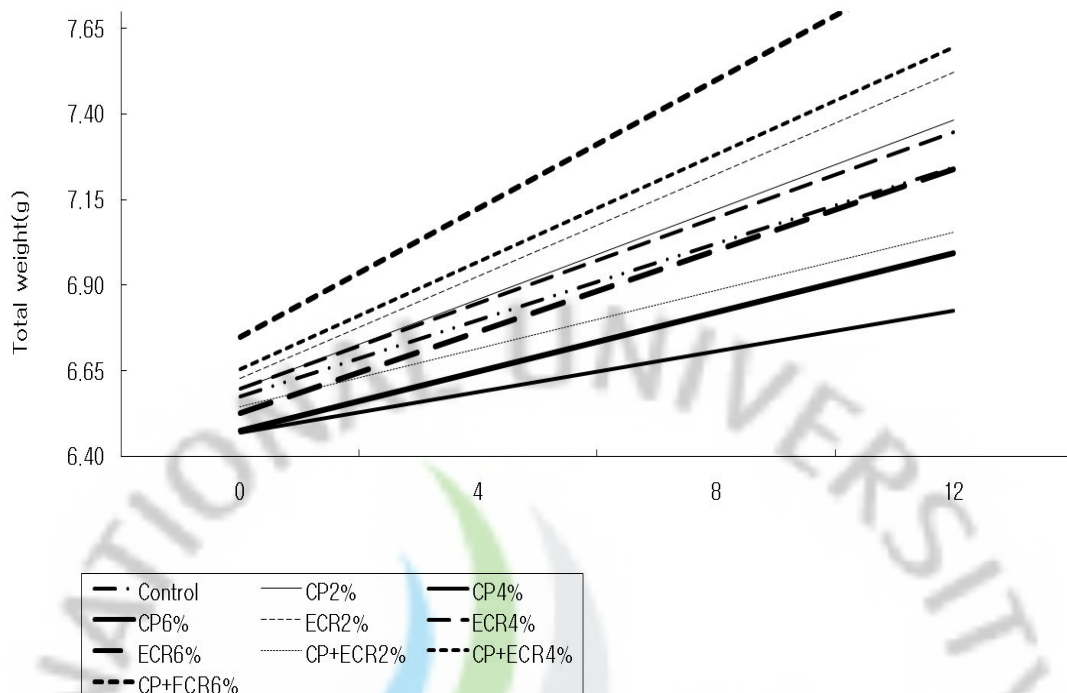


Fig. 27. Variations of total weight for disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose diets.

*CP : High temperature and speed time-dried citrus pomace powder,

ECR : Fermented *Ecklonia cava* by-product

Control : $y = 0.2231x + 6.3512$, $R^2 = 0.8044$

CP 2% : $y = 0.2621x + 6.3344$, $R^2 = 0.8073$

CP 4% : $y = 0.1181x + 6.3527$, $R^2 = 0.9543$

CP 6% : $y = 0.1721x + 6.3044$, $R^2 = 0.9651$

ECR 2% : $y = 0.2981x + 6.3299$, $R^2 = 0.7897$

ECR 4% : $y = 0.2501x + 6.3467$, $R^2 = 0.7917$

ECR 6% : $y = 0.2381x + 6.2874$, $R^2 = 0.9148$

CP+ECR 2% : $y = 0.1701x + 6.3748$, $R^2 = 0.7931$

CP+ECR 4% : $y = 0.3131x + 6.3434$, $R^2 = 0.7578$

CP+ECR 6% : $y = 0.3761x + 6.3741$, $R^2 = 0.6871$

3-1-3. 패각색의 변화

실험 개시 전 모든 실험군의 패각색은 진한 녹색이었으나 실험 종료 후 모든 실험군의 패각색은 옅은 주황색과 옅은 녹황색의 범위를 나타내었다(Fig. 28). 자연산 전복의 패각색이 주황과 귤색의 범위를 나타내기 때문에 실험 사료를 먹인 모든 까막전복들이 미역이나 다시마를 급여하여 사육한 양식산에 비해 자연산 전복의 패각과 비슷해지는 것을 알 수 있었다.

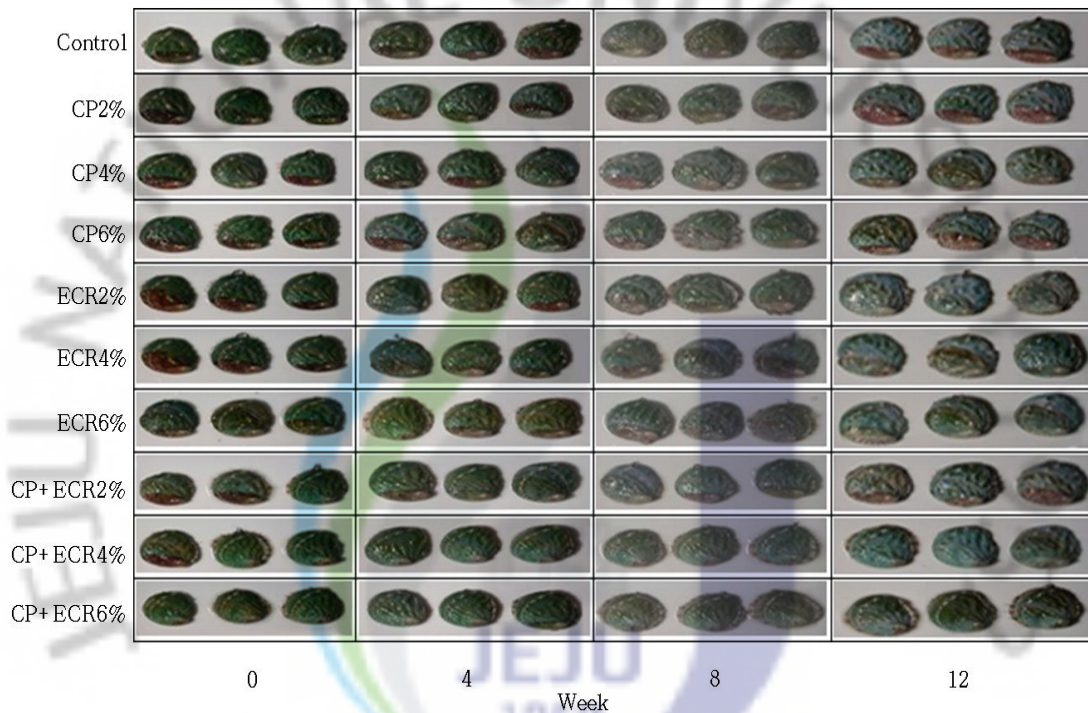


Fig. 28. The change of shell color as time passes with different dose diets in disk abalone(*H. discus discus*).

*CP : High temperature and speed time-dried citrus pomace powder,
 ECR : Fermented *Ecklonia cava*

3-1-4. 가식부의 일반성분 변화

3-1-4-1. 수분의 변화

까막전복 가식부의 수분함량은 사육 2주 후에 대조군에 비하여 ECR 6%가 80.17%, CP+ECR 2%가 80.33%로 낮은 수치를 나타내었다. 4주 후에는 대조군과 비교하여 CP+ECR 2%가 79.62%로 낮았으며, 8주 후에는 대조군과 비교하여 CP 2%가 79.76%, CP 4%가 80.11%, CP 6%가 80.50%, ECR 2%가 79.51%, ECR 4%가 79.43%, ECR 6%가 80.47%, CP+ECR 6%가 79.98%로 높은 값을 나타내었다(Table. 7).

사료급여에 따른 수분함량의 변화를 살펴보면, 사육기간이 증가함에 따라 대조군에서 가장 급격한 감소를 나타내었으며, CP와 ECR의 농도가 높을수록 가식부의 수분함량이 덜 감소하는 경향을 나타내었다. 수분함량의 감소는 육질의 경도를 높여 상품으로서의 가치를 떨어뜨리는 요인이 되는 것으로 알려져 있다. 따라서 CP 및 ECR이 첨가된 사료의 급이는 전복사육시 생사료를 먹여 사육한 전복의 육질과 유사한 수분함량을 가지게 하는 것으로 판단되었다.

Table 7. Variations of moisture content in disk abalone(*H. discus discus*) reared with different dose diets

Week	Diet	CP			ECR			CP+ECR			
		Control	2%	4%	6%	2%	4%	6%	2%	4%	6%
0		81.61	80.00	81.53	80.76	80.51	80.46	80.51	79.90	81.06	81.21
		±0.61	±0.43	±0.46	±0.73	±0.39	±0.67	±0.67	±1.13	±0.38	±0.44
2		81.48	81.67	81.20	81.22	80.87	81.94	80.17	80.33	81.54	80.51
		±0.15	±1.30	±0.12	±0.02	±0.21	±0.84	±0.03*	±0.11*	±0.33	±0.50
4		80.30	80.58	80.35	81.42	80.66	80.15	80.55	79.62	80.09	80.64
		±0.04	±0.52	±0.87	±0.54	±1.44	±1.07	±0.12	±0.03*	±0.08	±1.12
8		78.22	79.76	80.11	80.50	79.51	79.43	80.47	78.77	79.71	79.98
		±0.08	±0.15*	±0.05*	±0.60*	±0.08*	±0.38*	±0.28*	±0.43	±0.66	±0.31*

*CP : High temperature and speed time-dried citrus pomace powder,

ECR : Fermented *Ecklonia cava*

The values are mean±S.D., *P<0.05 for each control.

3-1-4-2. 조회분의 변화

까막전복의 조회분 함량은 생사료를 급여한 실험 직전에 약 2.2% 전후였으며, ECR 및 CP를 첨가하여 제작한 사료로 사육한 실험군과도 큰 차이를 나타내지 않았다. 사육 8주 후의 조회분 함량은 대조군에서는 2.16%이었으나 CP 2% 실험군의 경우 가장 높은 2.40%를 나타내어 대조군에 비해 높은 수치를 나타내었다. 실험 전 구간을 살펴볼 때, 조회분의 함량은 실험 기간의 경과와 무관하게 거의 일정한 수치를 나타내었으며, 일반사료를 급여한 대조군에 비하여 ECR 및 CP를 첨가한 모든 실험군에서 높은 수치를 나타내었다(Table 8).

Table 8. Variations of crude ash content in disk abalones(*H. discus discus*) reared with different dose diets

Week	Diet			ECR			CP+ ECR			
	Control	CP		ECR			CP+ ECR			
		2%	4%	6%	2%	4%	6%	2%	4%	6%
0	2.13	2.14	1.90	2.60	2.20	2.17	2.34	2.19	2.12	2.21
	±0.10	±0.02	±0.08	±0.46	±0.02	±0.24	±0.18	±0.06	±0.13	±0.14
2	2.21	2.57	2.17	2.31	2.13	1.75	2.22	2.40	2.20	2.17
	±0.08	±0.03*	±0.10	±0.24	±0.08	±0.01*	±0.02	±0.19	±0.09	±0.02
4	2.04	2.38	2.16	2.40	2.69	2.29	2.22	2.45	2.17	2.07
	±0.07	±0.05*	±0.13	±0.13	±0.03*	±0.22	±0.14	±0.05*	±0.03	±0.09
8	2.16	2.4	2.31	2.26	2.30	2.39	2.22	2.21	2.23	2.28
	±0.05	±0.01*	±0.02	±0.03	±0.05	±0.07	±0.02	±0.01	±0.01	±0.06

*CP : High temperature and speed time-dried citrus pomace powder,

ECR : Fermented *Ecklonia cava*

The values are mean±S.D., *P<0.05 for each control.

3-1-4-3. 조단백질의 변화

까막전복의 조단백질 함량은 실험 개시 전에는 12.42~16.15%를 나타내어 개체간의 차이가 있는 것으로 확인되었다. ECR 및 CP가 첨가된 실험사료 및 일반사료를 첨가하여 사육한 결과, 단백질 함량은 사육기간의 경과와 함께 증가하여 사육 8주후 대조군에서는 16.19%를 나타내었으며, ECR 6% 실험군은 20.03%로 가장 높은 증가를 보였다. 그 다음으로는 CP+ECR 4% 및 6%의 실험군에서 17.44%의 수치를 나타내었다. 한편, ECR 첨가 실험군에서 CP 첨가 실험군 보다 높은 조단백질 함량을 나타내었다(Table 9).

Table 9. Variations of crude protein content in disk abalones(*H. discus discus*) reared with different dose diets

Week	Diet Control	CP			ECR			CP+ECR		
		2%	4%	6%	2%	4%	6%	2%	4%	6%
0	13.02	15.81	16.15	13.62	13.93	12.42	15.14	14.67	14.14	14.34
	± 1.05	± 0.34	± 0.46	± 1.00	± 0.63	± 1.22	± 0.88	± 0.27	± 0.38	± 0.08
2	14.12	14.74	14.50	14.12	13.59	15.58	16.08	14.92	15.16	14.85
	± 0.76	± 1.17	± 2.46	± 0.44	± 0.44	± 0.90	± 1.44	± 1.07	± 1.91	± 0.43
4	15.23	16.04	16.36	15.12	14.12	18.80	16.73	16.81	16.88	16.30
	± 0.19	± 1.05	± 0.21*	± 0.30	± 2.67	± 2.80	± 0.33*	± 0.63	± 0.47*	± 0.79
8	16.19	15.22	16.87	16.39	16.48	17.29	20.03	17.90	17.44	17.44
	± 0.50	± 3.35	± 0.08	± 0.84	± 0.81	± 0.08	± 4.50	± 0.28	± 0.58	± 0.31

*CP : High temperature and speed time-dried citrus pomace powder,

ECR : Fermented *Ecklonia cava*

The values are mean±S.D., *P<0.05 for each control.

3-1-4-4. 조지방의 변화

까막전복의 조지방 함량은 실험 개시전의 수치는 0.04~0.217%의 범위로 매우 낮은 수치를 나타내었으며, 개체간의 차이도 매우 큰 것으로 나타났다. ECR 및 CP가 첨가된 실험사료를 급여한 실험군에서도 전체적인 조지방 함량은 매우 낮은 값을 나타내어 CP±ECR 2%에서 0.002%로 가장 낮았으며, ECR 4%에서 0.54%로 가장 높은 수치를 나타내었다(Table 10). 그러나 이러한 결과는 전복의 조지방 함량이 매우 낮은 점과 개체간의 차이가 크다는 점에서 사료첨가에 따른 차이로 해석하기에는 다소 어려운 점이 있는 것으로 판단되었다.

Table. 10. Variations of crude lipid content in disk abalone(*H. discus discus*) reared with different dose diets.

Week	Diet									
	Control	CP			ECR			CP+ ECR		
		2%	4%	6%	2%	4%	6%	2%	4%	6%
0	0.05 ± 0.01	0.21 ± 0.07	0.13 ± 0.08	0.21 ± 0.05	0.17 ± 0.06	0.04 ± 0.04	0.19 ± 0.04*	0.02 ± 0.01*	0.16 ± 0.12	0.04 ± 0.06
2	0.63 ± 0.03	0.03 ± 0.02*	0.06 ± 0.03*	0.20 ± 0.03*	0.32 ± 0.02*	0.06 ± 0.03*	0.32 ± 0.04*	0.53 ± 0.05	0.66 ± 0.22	0.53 ± 0.09
4	0.12 ± 0.03	0.38 ± 0.10	0.43 ± 0.04*	0.17 ± 0.07	0.25 ± 0.01*	0.12 ± 0.01	0.18 ± 0.10	0.37 ± 0.06*	0.24 ± 0.05	0.34 ± 0.02*
8	0.07 ± 0.03	0.19 ± 0.02*	0.06 ± 0.02	0.18 ± 0.04	0.19 ± 0.07	0.54 ± 0.07*	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.22 ± 0.04*	0.10 ± 0.03

*CP : High temperature and speed time-dried citrus pomace powder,

ECR : Fermented *Ecklonia cava*

The values are mean±S.D., *P<0.05 for each control.

3-1-5. 혈림프구 수의 변화

ECR 및 CP가 첨가된 실험사료의 급이에 따른 까막전복의 혈림프구수의 변화는 실험직후인 0주차 및 1주에서는 유의적인 차이를 보이지 않았지만, 2주째에는 대조군에 비하여 CP 6%가 유의적으로 증가하였으며, 3주째에는 대조군에 비하여 CP 2%가 다른 실험군에 비하여 1.59%로 높게 나타났다. 한편, 4주째에는 대조군과 다른 실험군과의 혈림프구수의 유의적 변화는 보여지지 않았다. 8주째에는 CP 4%의 혈림프구수가 1.49%, CP 6%가 1.40%, ECR 2%가 1.42%, ECR 6%가 1.41%, CP+ECR 2%가 1.46%, CP+ECR 4%가 1.40%로 CP 4%의 혈림프구수가 가장 높게 나타났다. 12주째의 혈림프구수의 변화를 보면 대조군에 비하여 CP 4%가 1.42%, CP 6%가 1.36%, ECR 2%가 1.38%, ECR 6%가 1.35%, CP+ECR 2%가 1.42%, CP+ECR 4%가 1.37%, CP+ECR 6%가 1.44%로 높게 나타났으며, 이 중 CP+ECR 6%의 혈림프구가 가장 높게 나타났으며 CP 2%가 가장 낮은 값을 나타내었다. 모든 실험군에서 사료의 급이에 따라 혈림프구수는 전반적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 일반사료 급여군인 대조군에 비해 ECR 및 CP가 첨가된 실험군에서 높은 혈림프구수를 나타내었다. 이는 ECR 및 CP가 까막전복의 생리활성을 높일 수 있는 기능성 사료첨가제로서 이용이 가능하다는 것을 의미한다(Table 11).

Table 11. Variations of the number of hemolymph of disk abalone(*H. discus discus*) to sources of dietary additives

Week	Diet									
	Control	CP			ECR			CP+ECR		
		2%	4%	6%	2%	4%	6%	2%	4%	6%
0	1.53	1.53	1.59	1.53	1.49	1.55	1.58	1.59	1.5	1.54
	±0.14	±0.16	±0.16	±0.18	±0.14	±0.12	±0.07	±0.07	±0.05	±0.07
1	1.59	1.62	1.64	1.5	1.65	1.7	1.74	1.64	1.56	1.61
	±0.16	±0.20	±0.2	±0.39	±0.42	±0.05	±0.07	±0.16	±0.15	±0.11
2	1.5	1.51	1.55	1.63	1.59	1.6	1.55	1.59	1.57	1.53
	±0.13	±0.15	±0.07	±0.05*	±0.12	±0.42	±0.39	±0.20	±0.20	±0.14
3	1.49	1.55	1.59	1.55	1.55	1.58	1.50	1.54	1.50	1.57
	±0.05	±0.07	±0.14*	±0.05	±0.05	±0.05*	±0.11	±0.14	±0.07	±0.05*
4	1.50	1.52	1.57	1.5	1.55	1.45	1.56	1.55	1.55	1.53
	±0.24	±0.20	±0.13	±0.13	±0.13	±0.02	±0.12	±0.7	±0.10	±0.10
8	1.34	1.37	1.49	1.40	1.42	1.40	1.41	1.46	1.40	1.45
	±0.07	±0.10	±0.23*	±0.02*	±0.10*	±0.07	±0.02*	±0.12*	±0.02*	±0.08*
12	1.29	1.32	1.42	1.36	1.38	1.35	1.35	1.42	1.37	1.44
	±0.07	±0.10	±0.23*	±0.02*	±0.10*	±0.07	±0.02*	±0.12*	±0.02*	±0.08*

*CP : High temperature and speed time-dried citrus pomace powder,

ECR : Fermented *Ecklonia cava*

The values are mean±S.D., *P<0.05 for each control.

3-1-6. 단백질 발현의 변화

전복의 아가미 부위는 외부의 스트레스 작용에 대한 반응으로 Heat shock protein 70(HSP 70)의 발현이 가장 두드러진 부위이다. ECR 및 CP가 첨가된 실험사료의 사육환경에 따른 생리학적 반응의 차이를 판별하기 위하여 사료를 급여한 후 스트레스에 따른 HSP 70의 발현 여부를 알아보기 위하여 실험을 실시하였다. 각 실험군별과 시간대에 따른 까막전복의 아가미를 적출하여 SDS-PAGE로 분석해 본 결과 모든 실험구에서 70kDa 부근의 밴드의 염색성이 확인되지 않았다(data not shown).

전복사육 관련 결과를 종합해 보면, 제주도에서 폐기되는 감태 가공부산물과 감귤박을 이용한 경제적인 전복용 배합사료의 개발은 유용할 것으로 판단되었다. 이 중 ECR 6%의 실험군에서 가장 좋은 효과가 나타나 향후 까막전복의 성장 및 면역증강용 기능성 사료첨가제로서 감귤박 보다 감태 가공부산물이 더 가능성이 큰 것으로 사료되었다(Fig. 26, 27).

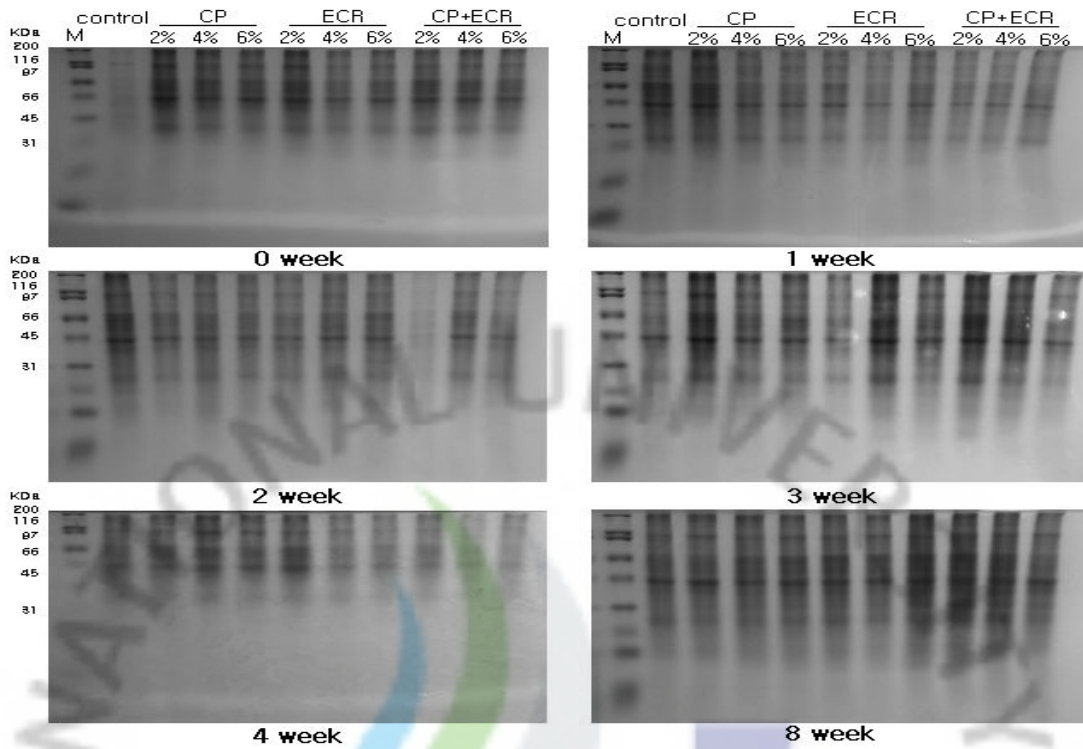


Fig. 29. Phase of SDS-PAGE in gill of disk abalone(*H. discus discus*) reared with different dose diets.

*CP : High temperature and speed time-dried citrus pomace powder
 ECR : Fermented *Ecklonia cava*

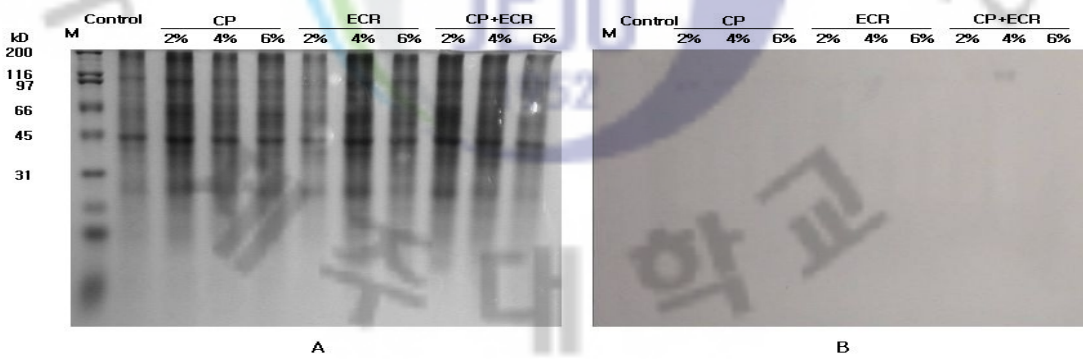


Fig. 30. Immuno-detection of heat shock protein 70(HSP 70) in gill of disk abalone(*H. discus discus*) reared with different dose diets.

*CP : High temperature and speed time-dried citrus pomace powder
 ECR : Fermented *Ecklonia cava*
 A : SDS-PAGE B : Western blot

3-2. 사료 급여 후 저염분 스트레스에 대한 전복의 생리적인 변화

3-2-1. 생존율 변화

급격한 염분 스트레스에 따른 까막전복의 생존율 변화를 나타내었다. 12시간까지는 100%의 생존율을 보였으나 24시간째에 ECR+ CP 4% 실험구에서 폐사된 개체가 발견 되었으며, 그 후 48시간까지 급격한 폐사율을 보였다. 가장 높은 폐사율을 보인 ECR 4%는 70.4%의 생존율을 나타냈으며, ECR 6%는 96.3%의 가장 높은 생존율을 나타내었다. 이러한 결과는 상기 언급한 스트레스 내성 확인을 위하여 장시간 사육한 결과와 유사한 결과를 나타내어 ECR 6%의 실험군이 스트레스에 강한 내성을 가지는 것으로 여겨진다(Table 12).

Table 12. Survival rate(%) of the disk abalone(*H. discus discus*) exposed to acute water-salinity stress

Time(h)	Diet										
	Control	CP			ECR			CP+ ECR			
		2%	4%	6%	2%	4%	6%	2%	4%	6%	
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
12	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
24	100	100	100	100	100	100	100	100	96.3	100	
48	74.1	85.2	81.5	88.9	77.8	70.4	96.3	88.9	81.5	70.4	

*CP : High temperature and speed time-dried citrus pomace powder,
 ECR : Fermented *Ecklonia cava*

3-2-2. 혈림프구수의 변화

급격한 염분 스트레스에 따른 까막전복의 혈림프구수를 보면, 대조군에서는 3 시간째 급격한 증가를 보인 후 감소하는 경향을 나타내었으며, CP 및 ECR이 단독으로 첨가된 실험군에서도 유사한 패턴을 보였다(Table 13). 그러나 CP 2%, CP 4%, ECR 4%, ECR 6% 및 CP+ECR 4% 구간에서는 3시간째에 대조군에 비해 급격한 증가를 나타내지 않았다($P < 0.05$). 혈림프구수의 변화는 모든 실험군에서 저염분 자극 후 48시간이 경과한 시점에서 대조군과 유사한 수치를 나타내었다. 한편 CP+ECR 4% 및 6% 급여 실험군에서는 혈림프구수가 48시간까지 지속적으로 증가하는 양상을 나타내었다. 이러한 결과의 원인에 대해서는 불분명하여 이후 추가적인 조사가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

Table 13. Variations of the number of hemolymph of the disk abalone (*H. discus discus*) exposed to acute water-salinity stress

Time(h)	Diet											
	Control			CP			ECR			CP+ ECR		
	2%	4%	6%	2%	4%	6%	2%	4%	6%	2%	4%	6%
0	1.37 ± 0.10	1.38 ± 0.10	1.43 ± 0.13	1.39 ± 0.20	1.4 ± 0.10	1.43 ± 0.05	1.39 ± 0.05	1.4 ± 0.13	1.42 ± 0.10	1.42 ± 0.07		
3	1.96 ± 0.23	1.69 ± 0.20*	1.8 ± 0.05*	1.98 ± 0.01	1.88 ± 0.13	1.78 ± 0.10*	1.65 ± 0.13*	1.86 ± 0.16	1.79 ± 0.10*	1.92 ± 0.20		
6	1.66 ± 0.07	1.59 ± 0.05	1.58 ± 0.08*	1.65 ± 0.18	1.59 ± 0.10	1.6 ± 0.13	1.54 ± 0.02*	1.59 ± 0.15	1.56 ± 0.07*	1.6 ± 0.08		
12	1.64 ± 0.16	1.52 ± 0.07*	1.54 ± 0.12	1.58 ± 0.12	1.57 ± 0.10	1.53 ± 0.02	1.46 ± 0.05*	1.3 ± 0.08	1.58 ± 0.13	1.63 ± 0.10		
24	1.59 ± 0.40	1.71 ± 0.07	1.7 ± 0.21	1.69 ± 0.17	1.63 ± 0.16	1.7 ± 0.21	1.56 ± 0.24	1.87 ± 0.50	1.67 ± 0.16	1.82 ± 0.10*		
48	1.6 ± 0.08	1.7 ± 0.25	1.66 ± 0.20	1.7 ± 0.18	1.65 ± 0.31	1.63 ± 0.10	1.58 ± 0.16	1.56 ± 0.40	1.73 ± 0.23	1.83 ± 0.05*		

*CP : High temperature and speed time-dried citrus pomace powder,

ECR : Fermented *Ecklonia cava*

The values are mean±S.D., * $P < 0.05$ for each control.

3-2-3. 항산화 효소의 활성 변화

실험사료를 공급한 후 급격한 염분 스트레스에 따른 항산화 효소인 SOD와 CAT의 활성을 확인하였다. 급격한 저염분의 자극에 따른 SOD의 활성은 스트레스를 가하기 전인 0시간째의 구간과 비교하여 대조군을 비롯한 모든 실험군에서 큰 차이를 나타내지 않았다(Fig. 31). 이에 반해 (Fig. 32)에서 보는 바와 같이 CAT의 변화는 실험 개시전의 수치와 비교할 때 ECR을 단독으로 첨가한 군에서만 유사한 수치를 나타내었고, 대조군과 그 이외의 실험군에서는 유의하게 높은 수치를 나타내었다. 이러한 결과는 ECR의 첨가에 의해 외부 스트레스 작용에 대한 생체 내의 항산화 효소 활성의 변화가 없어지게 되고 외부 환경에 대한 덜 민감하여 생리적으로 건강한 전복을 생산할 수 있을 것으로 판단된다.

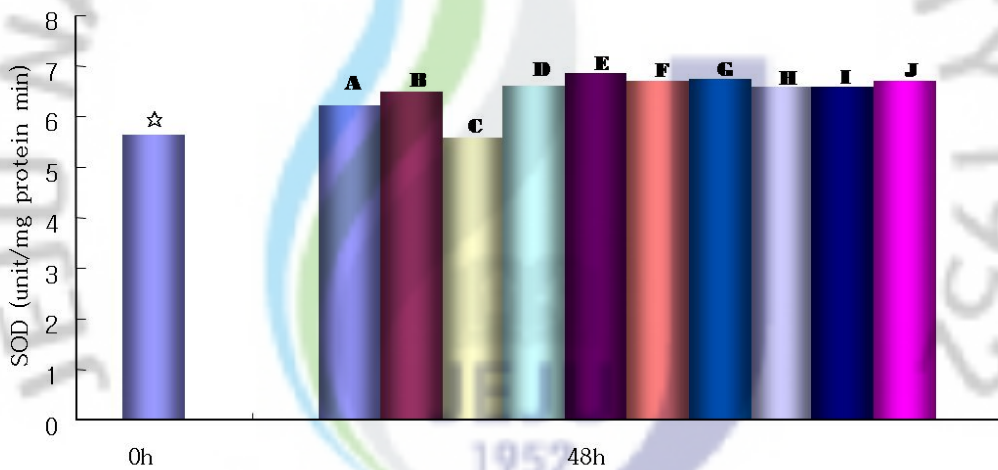


Fig. 31. Change of superoxide dismutase(SOD) activity in disk abalone(*H. discus discus*) exposed to acute water-salinity stress.

*CP : High temperature and speed time-dried citrus pomace powder,
ECR : Fermented *Ecklonia cava*

☆ : Vehicle, A : Control, B : CP2%, C : CP4%, D : CP6%, E : ECR2%,
F : ECR4%, G : ECR6%, H : CP+ECR2%, I : CP+ECR4%, J : CP+ECR6%

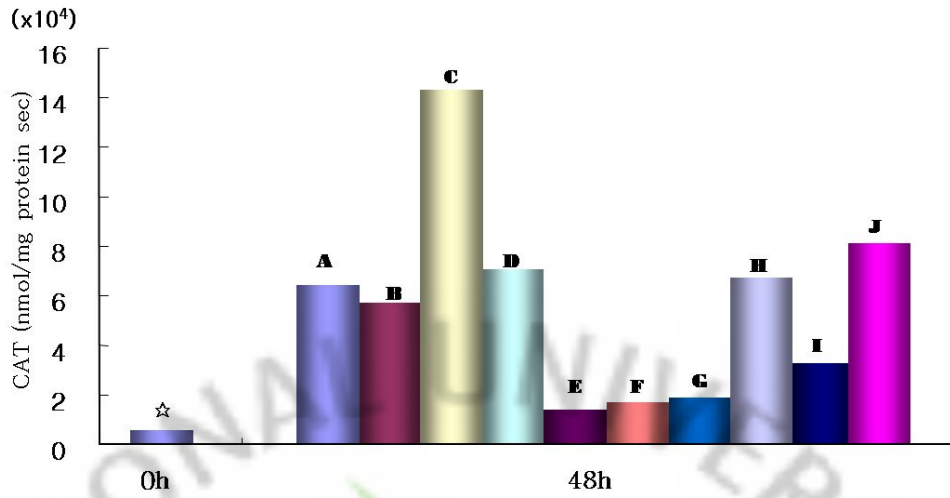


Fig. 32. Change of catalase(CAT) activity in disk abalone(*H. discus discus*) exposed to acute water-salinity stress.

*CP : High temperature and speed time-dried citrus pomace powder,

ECR : Fermented *Ecklonia cava*

☆ : Vehicle, A : Control, B : CP2%, C : CP4%, D : CP6%, E : ECR2%,

F : ECR4%, G : ECR6%, H : CP+ECR2%, I : CP+ECR4%, J : CP+ECR6%

3-2-4. SDS-PAGE 분석

저염분 스트레스에 따른 HSP 70의 발현 여부를 알아보기 위하여 각 실험군별과 시간 경과별로 까막전복의 아가미를 적출하여 SDS-PAGE로 분석하였다. 그 결과 HSP 70 밴드의 염색성을 확인할 수 없었으며(Fig. 33), western blot을 이용한 분석에서도 HSP 70밴드를 확인할 수 없었다(data not shown).

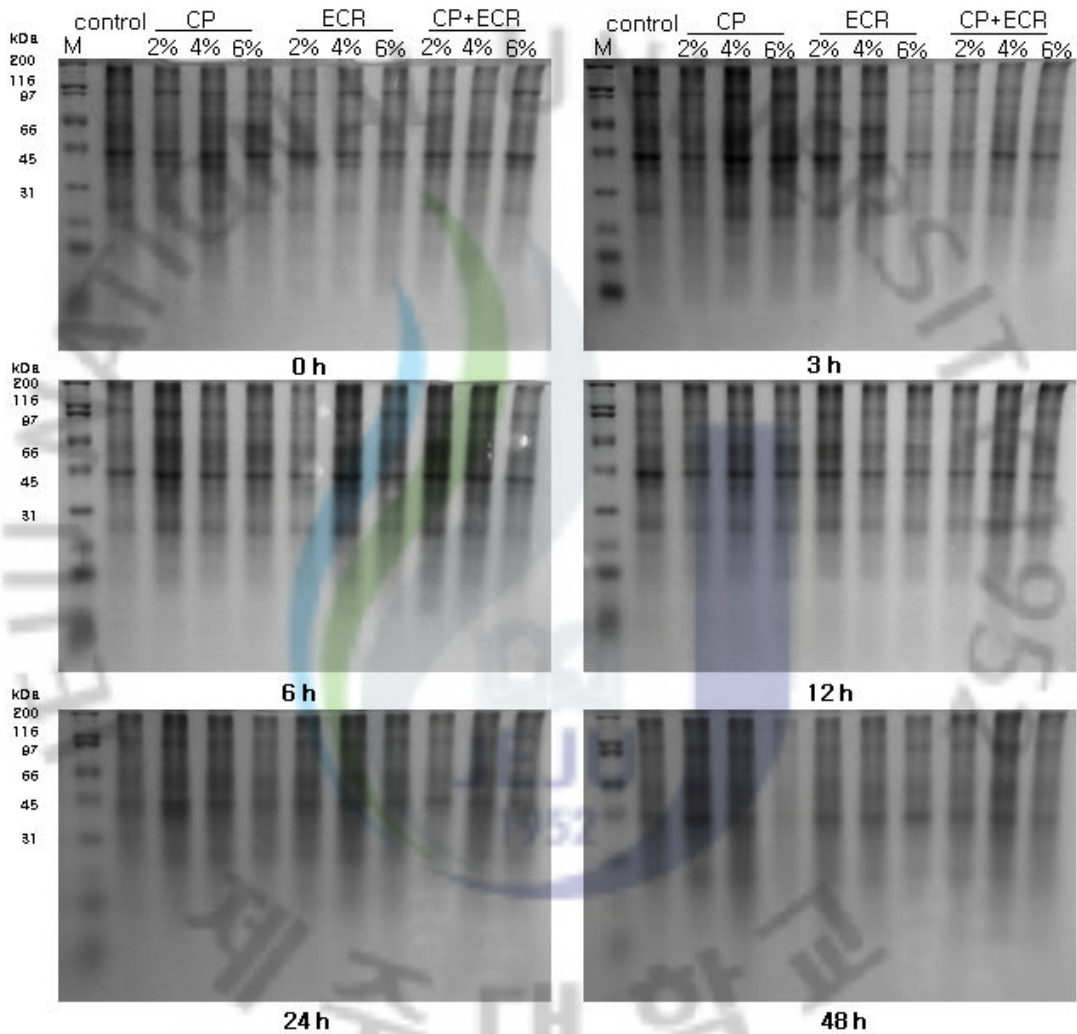


Fig. 33. Phase of SDS-PAGE in gill of disk abalone(*H. discus discus*) exposed to acute water-salinity stress.

*CP : High temperature and speed time-dried citrus pomace powder,
ECR : Fermented *Ecklonia cava*

3-2-5. Respiratory burst activity 변화

사료 급여 후 급격한 염분변화 스트레스에 따른 Respiratory burst activity 변화를 알아보기 위하여 전복의 혈액을 채취하여 분석하였다. 실험 개시 전 0h째의 구간과 실험종료 48h째의 구간과 비교하였을 때 대조군을 비롯한 모든 실험군에서 유의적인 차이를 확인 할 수 없었다(Fig. 34).

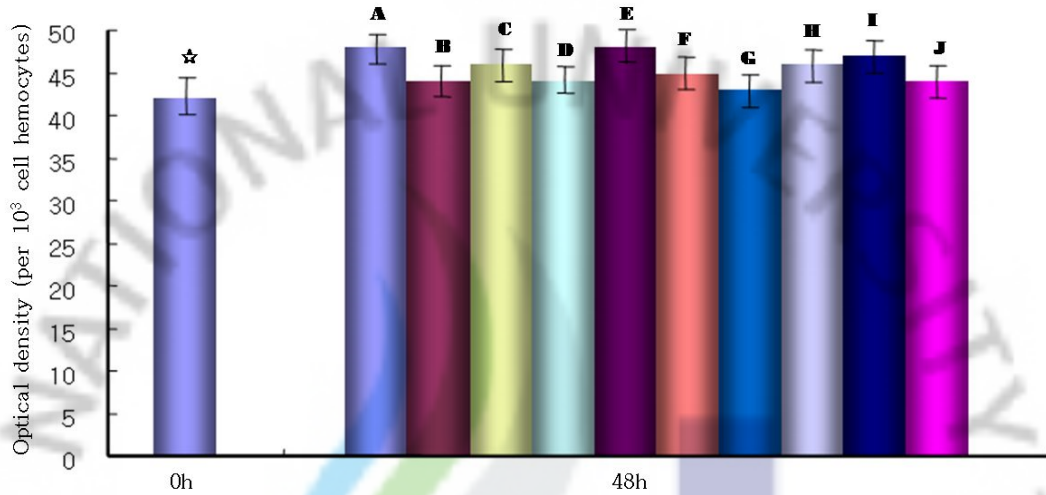


Fig. 34. Effect of acute water-salinity stress on respiratory burst activity in *H. discus discus*

*CP : High temperature and speed time-dried citrus pomace powder,

ECR : Fermented *Ecklonia cava*

☆ : Vehicle, A : Control, B : CP2%, C : CP4%, D : CP6%, E : ECR2%,

F : ECR4%, G : ECR6%, H : CP+ECR2%, I : CP+ECR4%, J : CP+ECR6%

3-2-6. Phenoloxidase activity 변화

사료 급여 후 급격한 염분변화 스트레스에 따른 Phenoloxidase activity 변화를 알아보기 위하여 전복의 혈액을 채취하여 분석하였다. 실험 개시 전 0h째의 구간과 실험종료 48h째의 구간과 비교하였을 때 대조구와 ECR6%에서는 유사한 수치를 나타내었고 다른 실험구에서는 감소되는 경향을 나타내었다(Fig. 35).

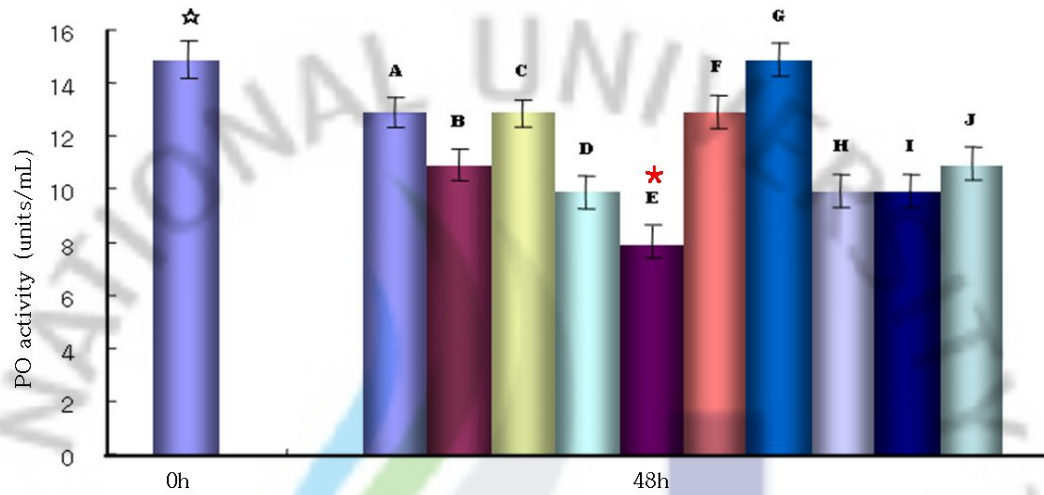


Fig. 35. Phenoloxidase activity of *H. discus discus* exposed to acute water-salinity stress

*CP : High temperature and speed time-dried citrus pomace powder,

ECR : Fermented *Ecklonia cava*

☆ : Vehicle, A : Control, B : CP2%, C : CP4%, D : CP6%, E : ECR2%,

F : ECR4%, G : ECR6%, H : CP+ECR2%, I : CP+ECR4%, J : CP+ECR6%

3-2-7. Lysozyme activity 변화

사료 급여 후 급격한 염분변화 스트레스에 따른 Lysozyme activity 변화를 알아보기 위하여 전복의 혈액을 채취하여 분석하였다. 실험 개시 전 0h째의 구간과 실험종료 48h째의 구간과 비교하였을 때 대조구와 ECR6%와 CP+ECR2%를 첨가한 실험구에서는 유사한 수치를 나타내었고 다른 실험구에서는 감소되는 경향을 나타내었다(Fig. 36).

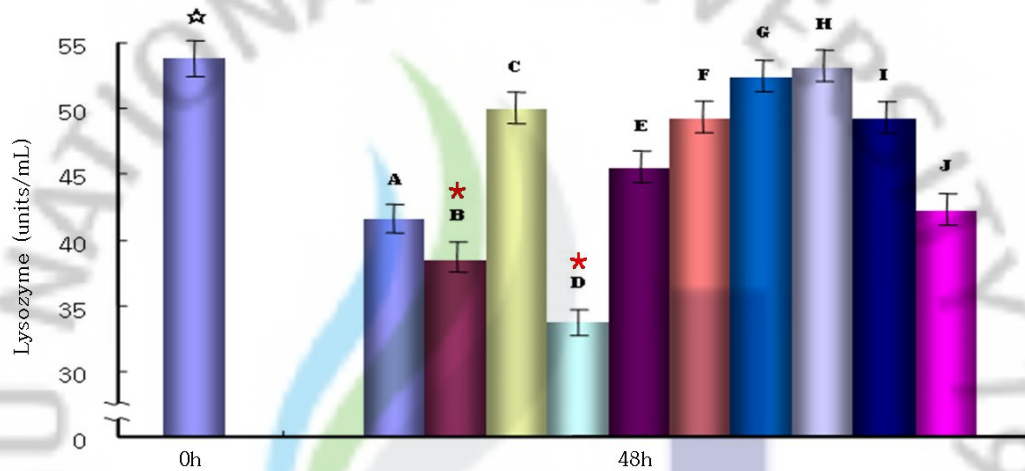


Fig. 36. Effect of acute water-salinity stress on lysozyme activity in *H. discus discus*

*CP : High temperature and speed time-dried citrus pomace powder,

ECR : Fermented *Ecklonia cava*

☆ : Vehicle, A : Control, B : CP2%, C : CP4%, D : CP6%, E : ECR2%,

F : ECR4%, G : ECR6%, H : CP+ECR2%, I : CP+ECR4%, J : CP+ECR6%

4. 고 찰

오늘날 양어사료 영양분야는 양식 산업 성공의 중요한 몇 가지 열쇠 중의 하나이다. 양식 산업에 있어 우선 양식 가능한 중요 어종을 선택하여 종묘생산기술이 개발되면, 질 좋은 사료에 의한 사육관리가 뒷받침되어야 하는 것은 잘 알려진 사실이다. 특히 사료비가 어종별로 차이는 있지만 양식 생산단가의 30~60%를 차지하는 것을 보아서도 사료 영양의 중요성을 알 수 있다(NRC, 1993).

전복류는 세계적으로 100여종 이상이 분포하고 있으며, 우리 나라에서는 한류계인 참전복(*H. discus hannai*)과 난류계의 말전복(*Haliotis gigantea*), 까막전복(*H. discus Reeve*), 시볼트전복(*H. silboldii*) 등이 서식하고 있다. 전복류는 옛날부터 식용으로 이용되어지는 등 산업적으로 매우 중요하게 취급 되어져왔고, 앞으로도 고가의 기호 식품으로서 전망이 밝은 유용 수산물이다. 1970년대부터 전복 종묘를 바다에 방류하여 양식이 이루어져 온 전복은 우리나라의 고급 수산 식품으로 각광을 받고 있다(유, 1994).

최근 전복 종묘생산 시설의 증가와 종묘생산 기술의 향상으로 전복 종묘의 대량공급이 이루어져 2000년에는 89,931천 마리, 2001년에는 274,980천 마리가 공급되었다. 매년 전복 종묘의 생산이 꾸준히 증가하여 공급 초과 현상이 일어날 것으로 보인다. 그러나 전복양성 시설도 꾸준히 증가되고 있어 전복 생산량의 지속적인 증가가 예상되는데 전복 생산량의 50%가 4년 뒤 상품크기로 된다고 가정할 때, 전복의 먹이인 미역, 다시마 등의 해조류 확보 문제가 대두될 것으로 예상된다.

이때 소요되는 전복먹이인 해조류를 다른 요소는 배제하고 단순히 생산량에 대한 필요 해조류의 양을 구해보면, 전복을 1 kg 증육 시키는데 필요한 해조류(미역, 다시마)는 20kg 이므로 2004년에는 90,000톤, 2005년에는 274,000톤, 2006년에는 372,000톤의 해조류가 필요하여, 이 경우 우리나라 미역과 다시마 년 평균 생산량 25만톤을 넘어서게 되어 먹이 부족 현상이 예상된다. 양어가들은 양성용 먹이가 부족할 경우 건조 미역이나 다시마를 이용하기로 하고 외국에서 값 비싼 배합사료를 수입하여 이용하기 때문에 전복의 체계적인 양식 발전에 걸림돌이 되고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해서도 적정 배합사료의 개발이

필요하다. 전복 사료 개발에 관한 연구들이 이미 외국에서 몇 수행되어 있으나 (Harada and Akishima, 1985; Ogino and Kato, 1964; Ogino and Ohta, 1963; Mai et al., 1994, 1995a,b; Uki et al., 1985a,b; Uki et al., 1986a,b,c), 그들의 연구결과만으로는 경제적인 배합사료를 설계하기가 어려운 면이 있다.

경제적이고 사료효율이 높은 배합사료를 개발하기 위해서는 단백질, 지질 및 탄수화물 등의 영양소 균형이 중요한데, 참전복에 대해서는 이미 적정 단백질원(이 등, 1997b; Uki et al., 1985a, 1986a), 단백질 및 지질 함량(Uki et al., 1986b; Mai et al., 1995a,b)에 대한 연구가 수행되어 있으나 전복의 탄수화물 이용성은 아직 연구되지 않았다. 탄수화물은 사료의 성형을 도와주는 역할을 할 뿐 아니라 체내의 중요한 에너지원으로 작용하기 때문에 사료 단백질을 절약할 수 있는 영양소이다. 또한 탄수화물원의 원가가 다른 영양소원에 비해 싸기 때문에 대상종의 이용성이 연구되면 사료단가를 절감할 수 있는 영양소이다. 전복은 해조류를 주 먹이로 섭취하기 때문에 탄수화물 이용성이 높을 것으로 판단되나, 전복사료를 연구한 학자들은 사료의 탄수화물원으로 dextrin을 주로 첨가하였고(Furuichi and Yone, 1980; Mai et al., 1995a,b; Uki et al., 1985a,b; Uki et al., 1986a,b), 이에 대한 언급은 없었다. 이에 따라 감태는 갈조식물문(*phaeophyta*) 갈조식물강(*phaeophyceae*) 다시마목(*laminariales*) 다시마과(*laminariaceae*)에 속하는 다년생 갈조류로 모자반 속과 함께 우리나라에서 가장 큰 해조이며, 일본 및 우리나라 연안에만 국한되어 분포한다. 제주도 서귀포 앞 바다산인 감태(*Ecklonia cava kjellum*)에 대해 1년간 조사한 결과 단백질은 1~4월에 12.7%로 최고였고 8~9월로 최저였으며 봄부터 초여름까지 회분 및 alginic acid, 단백질 함량은 급속히 감소하는 반면 manitol 과 laminarin 함량은 급격히 증가하는 경향이 있다. 회분 및 alginic acid 함량의 계절적 변화는 연중 2회 극대기가 있어 회분 함량은 12~2월, 6~7월, alginic acid 1~3월, 6~7월이 극대기이며, 최저치 시기는 모두 8~10으로 합성된 탄수화물의 저장형태인 laminarin과 manitol과는 거의 반대 양상을 나타냈다. 감태는 탄수화물이 40~65%를 차지하고 있으며, 육상식물과의 탄수화물과는 다른 형태이다. 감태의 식이섬유는 장의 활동을 활발하게 하고 식염, 중금속 등의 배출, 콜레스테롤의 혈관 내 침착 방지

등의 효과가 높다고 알려져 있다. 감귤박은 섬유소, 유기산 및 유리당 등의 영양 기능 성분과 항암, 항산화 및 항염증 등의 생리기능이 우수한 carotenoids 및 flavonoids가 다량 함유되어 있어 예로부터 “진피”라는 이름으로 한약소재로 사용되고 있다. 따라서 감태를 탄수화물원으로 사용하였으며 감귤박 역시 탄수화물원으로 사용하였다.

이 연구에서는 이러한 사료 첨가제를 까막전복에 급여하여 생존율의 변화를 살펴 보았다. 사료에 따라 생존율은 대조군, ECR2%, CP+ECR2% 및 CP+ECR6%에서 낮은 수치를 나타내었으며, 이 실험군에서는 사료급여 3주후에 HSP70의 발현이 나타났다. 이러한 결과는 본 실험에서 개발한 사료첨가제에 의해 사육을 한 경우, 사육에 따른 스트레스에 대한 내성이 발생하여 사망개체가 나타나지 않은 것으로 판단된다.

까막전복의 각장의 크기의 변화를 보면 CP6%는 대조군에 비하여 성장이 저조하였고, CP2%, ECR6%, CP+ECR4%, CP+ECR6%의 경우에는 높은 성장률을 보였다. 특히 ECR6%에 가장 높은 성장 기율기와 최대치를 나타내어 성장에 효과가 있는 것으로 나타났다. 한편, 각폭의 크기의 변화에 있어서도, ECR6%에 가장 높은 성장 기율기와 최대치를 나타내어 각폭의 성장에 있어서도 효과가 있는 것으로 판단된다. 무게의 경우에는 각장 및 각폭의 결과와는 달리 CP+ECR6%에서 가장 높은 수치를 나타내었으며, ECR의 첨가 실험군에도 비교적 높은 수치를 나타내었다. 이처럼 ECR6%의 첨가군이 성장에 좋은 효과를 나타내고 있는 것으로 판단된다.

폐각의 변화는 생사료에 의해 사육된 전복에 비해 사료 첨가제를 첨가한 실험군을 비롯한 대조군에서 옅은 녹색을 나타내어 자연산에 가까운 폐각색을 띄는 것으로 여겨진다.

사료첨가제의 급여에 의한 까막전복의 가식부 수분함량은 배합사료의 공급에 의해 낮아지는 경향을 나타내었으나, 대조군에 비해 실험군에서 유의하게 높은 수치를 나타내어 감태잔사추출물이나 감귤박을 다량으로 첨가하면 수분함량이 높아지는 것으로 판단된다. 회분함량 및 조지방 함량은 개체간의 차이가 크고 전체적으로 큰 차이를 나타내지는 않았으나, 조단백질의 함량은 ECR6%에서 가장 높은 수치를 나타내어, ECR을 첨가하게 되면 단백질의 함량이 증가하여 육질의

맛 성분이 증가하게 되는 결과를 초래하여 상품적 가치가 높아질 것으로 여겨진다.

사료에 따른 까막전복의 혈림프구수의 변화는 생사료로 사육한 전복에 비하여 배합사료를 급여하는 경우 그 수가 감소하는 경향을 보이지만, 일반사료를 급여한 대조군에 비해 모든 실험군에서 높은 수치를 나타내었다. 이러한 결과는 실험에 사용한 사료첨가제는 전복의 생리활성을 증대시켜 건강한 전복을 육성하는데 효과가 있을 것으로 판단된다.

이러한 결과로 제주도에서 폐기되는 감귤의 부산물인 감귤박과 감태를 이용한 경제적인 배합사료의 개발은 전복의 사육에 유용한 것으로 판단된다. 그 중 감태 잔사추출물인 ECR6%의 실험군에서 가장 좋은 효과가 나타나는 것으로 판단된다. 감귤박의 첨가에 있어서는 대조군인 일반사료 급여군에 비해 생리적인 활성 증대는 나타나지만 성장에는 그다지 큰 효과를 나타내지 않는 것으로 판단된다.

또한, 감귤박과 감태잔사추출물의 사료 첨가에 따른 까막전복의 염분 스트레스에 따른 생리적인 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 급격한 저염분 자극을 통하여 생존율과 혈림프구수, 항산화 효소 활성, SDS-PAGE를 알아보았다.

25 psu의 저염분 상태에 사육을 할 경우, ECR6%에서 가장 높은 생존율을 나타내었으며, CP6%가 그 다음으로 생존율이 높게 나타났다. 이러한 결과는 2장의 결과에서 나타난 정상적인 사육에 있어서의 결과와도 유사하여 ECR6% 첨가 실험군이 외부의 급격한 스트레스에 대한 내성도 강한 것으로 여겨진다.

혈림프구수의 경우, 대부분의 실험군에서 급격한 증가 이후 감소의 경향을 나타내었으나, ECR의 첨가군에서는 급격한 상승이 다른 실험군에 비해 낮아 혈림프구수의 변화가 가장 적게 나타나는 것으로 여겨진다. 혈림프구수는 일반적으로 외부의 자극에 대한 면역 활성 정도를 나타내는 것이므로 이 연구 결과에서 나타난 ECR첨가군에서의 낮은 폭의 변화는 전복 자체가 외부에 대한 스트레스 작용에 덜 민감한 결과라고 추정된다. 그러나 혈림프구수의 변화와 생리 면역학적 활성에 대한 연구는 이후 이루어져야 할 것이며 이러한 연구결과를 통하여 ECR의 효과에 대한 보다 더 자세한 이론을 확립할 수 있을 것으로 판단된다.

한편, 사료를 공급한 후 급격한 염분 스트레스에 따른 SOD 활성은 모든 실험군에서 저염분 스트레스를 가하기 전과 유의한 차가 나타나지 않았다. 그러나

CAT효소 활성의 경우는 실험 개시전과 비교하면 ECR 첨가군에서만 유의한 차이를 나타내지 않았으며, 대조군을 비롯한 다른 실험군에서는 유의하게 증가하였다. 이러한 결과는 급격한 스트레스 작용에 의하여 생체 내에서는 일반적으로 항산화효소가 증가하게 되고 이것이 과도하게 되면 사망에 이르는 것으로 알려져 있으므로, ECR의 첨가에 의해 생체 내 내성 작용이 강하여 외부 스트레스에 대한 작용이 덜 민감하게 작용한 것에 기인한 것으로 판단된다. 이에 따라 ECR6%의 생존율과 성장률이 높게 나타나는 원인이 되는 것으로 판단된다.

이 연구결과를 종합하여 볼 때, 까막전복의 스트레스를 감소시킬 수 있는 배합 사료 첨가제로서는 ECR 첨가군이 다른 실험군에 비해 월등히 좋은 것으로 판단되어졌으며, ECR을 배합 사료 첨가제로 활용하였을 때 염분 스트레스로 인한 폐사율을 줄일 수 있어 고부가가치를 창출하는 전복 양식 산업에 큰 이익을 줄 것으로 사료된다.

IV. 종합 고찰

전복은 복족류에 속하는 수산생물로 간조선에 수심 5~50m 되는 외양의 섬 지방이나 암초에 서식하며 바닷물이 깨끗해 해조류가 많이 번식하는 지역에서 해조류를 주된 먹이로 하여 생육하는 것으로 알려져 있다. 전복은 현재 100여종 이상 알려져 있으나 우리나라에 분포하는 전복류는 한류계인 참전복(*Haliotis discus hannai*), 까막전복(*Haliotis discus*), 말전복(*Haliotis gigantea*) 그리고 제주도 서식하는 가장 소형종인 오분자기(*Haliotis diversicolor aquatilis*) 등 5종이 서식하는 것으로 알려져 있다(Ryu, 1989).

제주도 주변해역은 기본적으로 제주도 남쪽 해역에서 북상하는 대마난류수의 영향을 받고(Rho, 1985), 제주도 해협의 북쪽에는 한국 남해안 연안수가 영향을 미치며(Choi, 1989) 그리고 하계표층은 고온 및 저염분인 중국대륙연안수의 영향을 받는다(Kim and Rho, 1994). 이처럼 제주도 주변 해역은 다양한 이질 수괴가 출현하고 이들 이질 수괴의 경계역엔 계절에 따라 복잡한 해양학적 특성이 나타난다(Yang et al., 1998). 또한 한국 남서해 및 동중국해 북부 해역에 출현하는 수온전선은 동계에는 대마난류 및 황해난류, 황해냉수, 한국 남서해 연안수 등이 출현하고, 하계에는 고온 저염의 중국대륙연안수가 표층을 점유하면서 중·저층에는 황해 저층 냉수, 한국 남서해 연안수, 대마난류수 등이 출현하여 이러한 이질수괴들이 시기와 계절별로 서로 상접하여 복잡한 해황을 형성한다(Nakao, 1977; Kim and Rho, 1994; Rho, 1985; Kim, 1995; Zhang et al., 1996; Yoon and Byun, 2004).

특히 여름철 제주도 주변에 출현하는 양자강 저염분수는 제주도 수산업에 크고 작은 피해를 끼치는데 특히, 1996년 여름에는 제주도 서부해역의 염분이 26psu 이하로 낮아졌으며 이 양자강 저염분수가 제주해협을 통과하여 지나가면서 제주도 서부 연안 양식생물을 모두 폐사시켜 약 60억원에 이르는 막대한 손실을 입히기도 했다. 1998년의 경우에도 피해규모는 1996년도에 비해 적었지만 제주도 수산업에 큰 피해를 입혔다. 따라서, 본 실험에서는 제주도에서 생산되는 까막전복(*H. discus discus*)의 기초 생리학적 자료를 획득하여 지속적인 자원 보존을

위한 기초 생리학적 실험을 실시하였다. 스트레스와 대사의 지표로 가장 많이 이용되고 있는 것이 혈액(Cho et al., 2002; Vijayan and Moon, 1994)이다. 혈액은 혈장과 혈구로 이루어지며 혈구는 적혈구, 백혈구, 그리고 혈소판으로 나뉘어진다. 급격한 염분 스트레스에 따른 까막전복의 혈림프구 수의 변화는 0h에는 유의차가 없었으며 3h째에 대조구인 33 psu에 비하여 25 psu은 유의적으로 감소하였고 30 psu은 유의적으로 증가한 것을 확인하였다(Tabel 4, $P<0.05$). 하지만 6h에는 25 psu만 유의적으로 감소하였으며 나머지는 유의적인 차이는 확인되지 않았다($P<0.05$). 하지만 12, 24h에는 30 psu만 유의적으로 감소한 것을 확인하였고, 48h에는 25와 30 psu에서 대조구(33 psu)보다 유의적인 감소를 확인할 수 있었다($P<0.05$).

생물에서는 각종 스트레스에 의해 생성된 활성산소는 어떤 유해물질이나 약물 등에 노출되었을 때 병적 상태에서는 이들이 과다하게 생성되어 조직에 치명적인 손상을 입힐 수 있다(Goldberg and stern, 1977; Simon et al., 1981; Moody and Hassan, 1982). 이러한 활성산소에 대하여 체내에서는 항산화효소인 superoxide dismutase (SOD)와 catalase(CAT) 등을 생성하여 세포기능 손상을 막는 것으로 알려져 있으며, 그 중 SOD는 superoxide radical (O_2^-)를 H_2O_2 와 O_2 ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)로 전환시키며, 이 전환된 H_2O_2 를 CAT가 O_2 와 H_2O ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$)로 분해하여 활성산소를 형성하기 전에 생체에 무해한 분자들로 전환시킨다(Forman and Fridovich, 1973).

급격한 염분 변화에 대한 까막전복의 SOD와 CAT효소 변화를 확인하였다. 염분 농도 33 psu에서 순치된 전복을 급격하게 낮은 염분 농도 25 psu로 옮겼을 때 생체나 방어 기작이 가지는 한계를 넘어 SOD 활성은 증가하는 경향을 나타내었으며, CAT 활성은 감소하는 경향을 나타내었는데, 이러한 결과로 비추어 볼 때 25 psu과 같은 한계 스트레스 상황에서는 SOD가 superoxide radical를 H_2O_2 와 O_2 로 전환시키기는 하지만 이 전환된 H_2O_2 를 CAT가 O_2 와 H_2O 로 분해하는 능력이 떨어져 생체내 유해한 활성산소를 제거하지 못하고 있음을 보여주는 결과라고 여겨진다.

Respiratory burst이란 식세포가 식작용 동안 혹은 다른 물질들에 의해서 자극 받았을 때 산소 소비량이 증가함과 동시에 O_2^- , OH^- , H_2O_2 와 같은 산소라디칼

(reactive oxygen intermediates, ROIs)을 다량으로 방출하는 현상을 말하며, 이러한 ROIs는 병원체를 죽이는데 매우 중요한 역할을 한다 (Siwicki, 1994).

본 실험에서는 NBT법을 사용하였으며 염분 변화에 따른 Respiratory burst 활성 변화를 확인하였다. 염분 변화 개시 후 0, 3h 에는 유의차가 없었으며 6h째에 30, 35 psu에서 유의적으로 증가하였다가 감소하는 경향을 확인하였고 실험 종료 시에 일정한 수치를 나타내었으며 저염분수 유입에 따른 까막전복의 Respiratory burst activity 활성의 변화는 실험 개시 후 와 실험 종료 시까지 유의적인 차이를 확인 할 수 없었다. 이는 33 psu과 근접한 염분 농도에서 식균 작용을 더 잘 일으켜 외부 물질에 대한 잠재적인 저항성이 더 높을 것으로 사료된다.

Lysozyme은 살균 및 항 염증성 성질을 지니고 있어 흡소년 및 항 기생충 작용, 항 바이러스 작용 및 오염물질의 작용 등에 관여함으로써 생체의 방어기작에 다양한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다 (Mohandas, 1985). 본 실험에서는 염분 변화에 따른 Lysozyme 활성 변화를 확인하였다. 염분 변화 개시 후 0h 에는 유의차가 없었으며 6h째까지는 일정한 수치를 나타내었으며 12h째에 대조구(33 psu)에 비하여 25 psu은 유의적으로 증가하였다가 실험 종료 48h째에 유의적인 감소를 확인하였다. 나머지 실험구에서도 대조구(33 psu)에 비하여 유의적인 감소를 확인하였으며 저염분수 유입에 따른 까막전복의 Lysozyme 활성의 변화는 실험 개시 후 29psu까지는 일정한 수치를 나타내었다가 25 psu에서 유의적인 감소를 확인하였고 다시 유의적으로 증가하는 경향을 확인하였다. 이러한 결과를 보았을 때 염분농도 저하가 스트레스 요인으로 작용하여 lysozyme 활성이 낮아졌다고 여겨진다. 하지만 염분 변화가 까막전복에게 실험 종료까지 유의적인 감소와 증가가 확인되어 좀 더 구체적인 Lysozyme 활성 연구가 필요하다고 사료되어진다.

생리활성 촉진을 위한 사료 첨가제로 제주특별자치도에서 감귤 가공부산물로 나오는 감귤박과 폐기되는 감태줄기를 사용하였다. 감태는 탄수화물이 40~65%를 차지하고 있으며, 육상식물과의 탄수화물과는 다른 형태이다. 감태의 식이섬유는 장의 활동을 활발하게 하고 식염, 중금속 등의 배출, 콜레스테롤의 혈관 내 침착 방지 등의 효과가 높다고 알려져 있다. 감귤박은 섬유소, 유기산 및 유리당

등의 영양기능 성분과 항암, 항산화 및 항염증 등의 생리기능이 우수한 carotenoids 및 flavonoids가 다량 함유되어 있어 예로부터 “진피”라는 이름으로 한약 소재로 사용되고 있다. 사료에 따른 생존율은 대조군, ECR2%, CP+ECR2% 및 CP+ECR6%에서 낮은 수치를 나타내었으며, 이러한 결과는 본 실험에서 개발한 사료첨가제에 의해 사육을 한 경우, 사육에 따른 스트레스에 대한 내성이 발생하여 사망개체가 나타나지 않은 것으로 판단된다.

각쪽의 크기의 변화에 있어서도, ECR6%에 가장 높은 성장 기율기와 최대치를 나타내어 각쪽의 성장에 있어서도 효과가 있는 것으로 판단된다. 무게의 경우에는 각장 및 각쪽의 결과와는 달리 CP+ECR6%에서 가장 높은 수치를 나타내었으며, ECR의 첨가 실험군에도 비교적 높은 수치를 나타내었다. 이처럼 ECR6%의 첨가군이 성장에 좋은 효과를 나타내고 있는 것으로 판단된다.

폐각색의 변화는 생사료에 의해 사육된 전복에 비해 사료 첨가제를 첨가한 실험군을 비롯한 대조군에서 옅은 녹색을 나타내어 자연산에 가까운 폐각색을 띄는 것으로 여겨진다. 또한 감태잔사추출물이나 감굴박을 다량으로 첨가하면 수분함량이 높아지는 것으로 판단되며, 조단백질의 함량은 ECR6%에서 가장 높은 수치를 나타내었다. ECR을 첨가한 실험구에서 단백질의 함량이 증가하여 육질의 맛 성분이 증가하게 되는 결과를 초래하여 상품적 가치가 높아질 것으로 여겨진다. 또한, 감굴박과 감태잔사추출물의 사료 첨가에 따른 까막전복의 염분 스트레스에 따른 생리적인 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 급격한 저염분 자극을 통하여 생존율과 혈림프구수, 항산화 효소 활성을 조사한 결과 25 psu의 저염분 상태에 사육을 할 경우, ECR6%에서 가장 높은 생존율을 나타내었다. 이러한 결과는 정상적인 사육에 있어서의 결과와도 유사하여 ECR6% 첨가 실험구가 외부의 급격한 스트레스에 대한 내성도 강한 것으로 사료된다.

혈림프구 수의 경우, 대부분의 실험구에서 급격한 증가 이후 감소의 경향을 나타내었으며, ECR의 첨가군에서는 급격한 상승이 다른 실험군에 비해 낮아 혈림프구수의 변화가 가장 적게 나타나는 것으로 여겨진다. 혈림프구 수는 일반적으로 외부의 자극에 대한 면역 활성 정도를 나타내는 것이므로 본 연구 결과에서 나타난 ECR첨가군에서의 낮은 폭의 변화는 전복 자체가 외부에 대한 스트레스 작용에 덜 민감하다고 사료된다. 사료를 공급한 후 급격한 염분 스트레스에 따른

SOD 활성은 모든 실험군에서 저염분 스트레스를 가하기 전과 유의한 차가 나타나지 않았으며 CAT효소 활성의 경우는 실험 개시전과 비교하면 ECR 첨가군에서만 유의한 차이를 나타내지 않았다. 대조군을 비롯한 다른 실험구에서는 유의적으로 증가하였다. 이러한 결과는 급격한 스트레스 작용에 의하여 생체 내에서는 일반적으로 항산화효소가 증가하게 되고 이것이 과도하면 사망에 이르는 것으로 알려져 있으며, ECR의 첨가에 의해 생체 내 내성 작용이 강하여 외부 스트레스에 대한 작용이 덜 민감하게 작용한 것으로 사료된다.

본 연구결과를 종합하여 볼 때, 까막전복의 스트레스를 감소시킬 수 있는 배합 사료 첨가제로서는 ECR 첨가군이 다른 실험구에 비해 월등히 좋은 것으로 판단되어졌으며, ECR을 배합 사료 첨가제로 활용하였을 때 염분 스트레스로 인한 폐사율을 줄일 수 있어 고부가가치를 창출하는 전복 양식 산업에 큰 이익을 줄 것으로 사료된다.

V. 요약

본 연구에서는 제주도에서 생산되는 까막전복(*Haliotis discus discus*)의 기초 생리학적 자료를 획득하여 지속적인 자원 보존을 위한 염분변화에 따른 기초 생리학적 변화를 확인 하고자 혈액 및 항산화 효소, 단백질 변화, 생존율, 면역활성 변화, 염분 변화가 미치는 영향에 대해서 조사하여 염분변화에 대한 기초 자료를 제공하고자 본 실험에 수행하였다. 염분 변화가 까막전복에 미치는 영향을 알아보기 위하여 33 psu 농도에서 25, 30, 33, 35 psu로 급격하게 염분 변화를 주었다. 까막전복은 0, 3, 6, 12, 24 및 48h에 시간단계별로 샘플을 취하여 실험에 사용하였다. 저염분수 유입에 따른 까막전복의 생리학적 변화를 확인하기 위하여 여름철 저염분수가 제주도에 유입 되었다가 빠져 나갈 때의 염분농도로 24h동안 33 psu 농도에서 1psu씩 서서히 25 psu 까지 낮추었다가 다시 원래의 염분농도로 회복된 33 psu로 조절하고 33, 31, 29, 27, 25, 27, 29, 31 및 33 psu째에 샘플을 취하여 실험에 사용하였다.

제주도의 주요 1차산업 생산물은 감귤, 감태가 있으며 이러한 생산물의 가공처리 후 부산물들은 환경오염원이 되기도 한다. 그러나 최근 이러한 부산물을 사료첨가제로 활용하여 전복의 성장 및 생리 활성을 측정하였다.

급격한 염분변화에 따른 SOD효소는 실험 개시 후 25 psu은 3h째에 증가하였다가 감소하는 경향을 나타내었으며 모든 실험구간이 24h까지는 일정하다가, 실험 종료 48시간에는 25, 30 psu에서 증가하는 것을 확인하였다. 염분 변화에 따른 CAT효소는 실험 개시 후 24h까지는 일정하다가 실험 종료 48시간에는 25 psu를 제외한 실험구와 대조구(33 psu)가 비슷한 수치를 나타내는 것을 확인하였다. 또한 저염분수 유입에 따른 까막전복의 SOD효소는 실험 개시 후 유의적인 감소를 확인하였으며 25 psu에서 유의적으로 증가하였다가 감소하는 경향을 확인하였으며 CAT효소는 실험 개시 후 유의적으로 감소하였다가 29psu에서 유의적으로 증가하였고 다시 유의적인 감소를 확인하였다.

염분 변화에 따른 Respiratory burst 활성 변화는 염분 변화 개시 후 0, 3h 에는 유의차가 없었으며 6h째에 30, 35 psu에서 유의적으로 증가하였다가 감소하

는 경향을 확인하였고 실험 종료 시에 일정한 수치를 나타내었으며 저염분수 유입에 따른 까막전복의 Respiratory burst activity활성의 변화는 실험 개시 후와 실험 종료 시까지 유의적인 차이를 확인 할 수 없었다.

사료 첨가제를 까막전복에 급여하여 생존율의 변화를 살펴보았으며 사료에 따라 생존율은 대조군, ECR2%, CP+ECR2% 및 CP+ECR6%에서 낮은 수치를 나타내었다. 까막전복의 각장의 크기의 변화를 보면 CP6%는 대조군에 비하여 성장이 저조하였고, CP2%, ECR6%, CP+ECR4%, CP+ECR6%의 경우에는 높은 성장률을 보였다. 특히 ECR6%에 가장 높은 성장 기울기와 최대치를 나타내어 성장에 효과가 있는 것으로 나타났다. 한편, 각폭의 크기의 변화에 있어서도, ECR6%에 가장 높은 성장 기울기와 최대치를 나타내어 각폭의 성장에 있어서도 효과가 있는 것으로 판단된다. 무게의 경우에는 각장 및 각폭의 결과와는 달리 CP+ECR6%에서 가장 높은 수치를 나타내었으며, ECR의 첨가 실험군에도 비교적 높은 수치를 나타내었다. 이처럼 ECR6%의 첨가군이 성장에 좋은 효과를 나타내고 있는 것으로 판단된다.

까막전복의 스트레스를 감소시킬 수 있는 배합사료 첨가제로서는 ECR 첨가군이 다른 실험구에 비해 월등히 좋은 것으로 판단 되며, ECR을 배합 사료 첨가제로 활용하였을 때 염분 스트레스로 인한 폐사율을 줄일 수 있고 다양한 변화에 대한 종합적인 검토를 위해서 좀 더 다양한 실험 분석과 장기간에 걸친 연구가 필요하다고 생각되어진다.

VI. 참고 문헌

- Anderson RS, 1996. Interactions of *Perkinsus marinus* with humoral factors and hemocytes of *Crassostrea virginica*. J Shellfish Res ;15:127-34.
- Anderson RS, Brubacher L, Calvo LR, Unger MA, Bureson EM, 1998. Effects of tributyltin and hypoxia on the progression of *Perkinsus* infections and host defence mechanisms in oyster, *Crassostrea Virginica* (Gmelin). J Fish Dis ;21:371-80.
- Ashida M. Soderhall K. 1984, The prophenoloxidase activating system in crayfish. Comp Biochem Physiol ;77B:21-6.
- Aksnes, A. and L. R. Njaa, 1981. Catalase, Glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. comp. Biochem. Physiol., 69B:893-896.
- Amro M. H., D. P. Cheney and G. N. Cherr, 2003. Phenotypic plasticity of HSP 70 and HSP 70 gene expression in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): Implications for thermal limits and induction of thermal tolerance. Biol. Bull., 205, 160-169.
- Barracco MA, Medeiros ID, Moreira FM, 1999. Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna*. Fish Shellfish Immunol ;9:387-404.
- Brown, P. B., K. A. Willson, J. E. Wetzel II and B. Hoene, 1995. Increased densities result in reduced weight gain of crayfish *Orconectes virilis*. Journal of the World Aquaculture Society, 26, 165-171.

- Chen, H. C. 1984. Recent innovations in cultivation of edible molluscs in Taiwan with special reference to the small abalone *Haliotis diversicolor* and the hard clam *metretrix lusoria*. *Aquaculture*, 39, 11-27.
- Choi, C. M., 1989. A study on the origin of coastal waters in the southwestern seas of Korea. MS Thesis, Cheju Nat'l. Univ., 44 pp.(in Korean).
- Chen, J. C. and W. C. Chen, 2000. Salinity tolerance of *Haliotis diversicolor supertexta* at different salinity and temperature levels. *Aquaculture*, 181, 191-203.
- Chance, B. B. and K. A. Boveris, 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiology Review*, 59, 527-605.
- Drew, B., D. Miller, T. Toop and P. Hanna, 2001. Identification of expressed HSP's in black abalone (*Haliotis rubra leach*) during heat and salinity stresses. *J. Shellfish. Research*, 20(2), 695-703.
- Ellis AE. Lysozyme assays. In: Stolen JS, Fletcher DP, Anderson BS, Roberson BS, editors. *Techniques in fish immunology*. Fair Haven, USA: SOS Publication; 1990. p. 101-103.
- Ferraris, M., S. Radice, P. Catalani, M. Francolini, L. Marabini and E. Chiesara, 2002. Early oxidative damage in primary cultured trout hepatocytes a time course study. *Aquatic Toxicology*, 59, 283-296.
- Harris, J. O., G. B. Maguire, S. J. Edwards and S. M. Hindrum, 1998. Effect of ammonia on growth and oxygen consumption rate for juvenile greenlip abalone, *Haliotis laevigata* Donnan. *Aquaculture*, 160, 259-272.

- Harris, J. O., G. B. Maguire, S. J. Edwards and D. R. Johns, 1999. Low dissolved oxygen reduces growth rate and oxygen consumption rate of juvenile greenlip abalone, *Haliotis laevigata* Donovan. *Aquaculture*, 174, 265-278.
- Han, S. J., B. R. Kim, S. H. Won and J. W. Kim. 2003. Effect of Urea on the exfoliation of juvenile abalone, *Haliotis discus reeve*. *J. Aquaculture*. 16(4), 223-228. (in korean)
- Kim, T. H., M. H. Yang, M. G. Choe, S. J. Han and I. K. Yeo. 2005. Physiological studies on acute water-temperature stress of abalone (*Haliotis discus hannai*). *Kor. J. of aquaculture*, Vol. 18, 7~12.
- Kim, I. O. and Rho, H. K., 1994. A Study on China Coastal Water appeared in the Neighbouring Seas of Cheju Island. *Bull. Kor. Fish. Soc.*, 27(5), 515-528.
- Ko, J. C., Kim, J. T. Kim, S. H., and Rho, H. K., 2003. Fluctuation Characteristic of Temperature and Salinity in Coastal Waters around Jeju Island. *Jour. Korean Fish*, 36(3); 306-316.
- Kim, B. H., S. M. Lee, C. S. Go, J. W. Kim and J. I. Myeong. 1998. Optimum stocking density of juvenile abalone (*Haliotis discus hannai*) fed the formulated diet or macroalgae (*Undaria*). *Journa of Korea Fishery Science and Technology*, 31, 869-874.
- Liu, P.C., Y.C. Chen., C.Y. Huang and K.K. Lee. 2000. Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultured small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*, with wither-in syndrome. *Lett. Appl. Microbiol.*, 31, 433-7.

- Lim, D. B., 1976. The Movement of the waters off the South Coast of Korea. J. Oceanol. Soc. Korea, 11(2): 77-88.
- Lee, S. M. and H. G. Park. 1998, Evaluation of dietary lipid sources for juvenile abalone (*Haliotis discus hannai*). Journal of Aquaculture, 11, 381-390.
- Laughlin, R. B. and J. M. Neff, 1981. Ontogeny of respiratory and growth responses of larval mud crabs *Rhithropanopeus harristii* exposed to different temperature, salinities, and naphthalene concentration. Marine Ecology-progress Series, 5, 319-332.
- Laughlin, R. B. and O. Linden, 1983. Oil pollution and Baltic mysid: Acute and chronic effects of the water soluble fractions of light fuel oil on the mysid shrimp *Neomysis integer*. Marine Ecology-progress Series, 12, 29-41.
- Lowry O. H., N. J. Rosenbrought., A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- Moriyasu, S., 1972. The Tsushima Current. In Kuroshio, its physical aspects. edited by H. Stommel and K. Yoshida. Univ. of Tokyo Press, Tokyo, 353-369.
- Mai, K., J. P. Mercer and J. Donlon, 1995a. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. III. Responses of abalone to various levels of dietary lipid. Aquaculture, 134, 65-80.

- Mai, K., J. P. Mercer and J. Donlon, 1995b. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. IV. Optimum dietary protein level for growth. *Aquaculture*, 136, 165-180.
- Nakao, T., 1977. Oceanic variability in relation to fisheries in the East China Sea and the Yellow Sea. *J. Fac. mar. Sci. Technol. Tokai Univ.*: 199-367.
- Nelson D. P. and L. A. Kiesow, 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem*, 49, 474-478.
- Ordas MC, Ordas A, Beloso C, Figueras A, 2000. Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus atlanticus*. *Fish Shellfish Immunol* ;10:597-609.
- Ryu, S. K., 1989. Shallow-sea Aquaculture. Sae-ro publishing Group. Busan, pp. 309-368.
- Rho, H. K., 1985. Studies on marine environments of fishing ground in the waters around Cheju Island, Ph. D. Thesis, *Univ. of Tokyo*, pp. 255.
- Song, Y. L., Hsieh YT, 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Dev Comp Immunol* ;18:201-9.
- Tsuchiya, M., 1983. Mass mortality in a population of the mussel *Mytilus edulis* L. caused by high temperature on rocky shores. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 66, 101-111.

Uki, N., A. Kemuyama and T. Watanabe, 1985a. Development of semipurified test diets for abalone. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 51, 1825-1833.

Uki, N., A. Kemuyama and T. Watanabe, 1985b. Nutritional evaluation of several protein sources in diets for abalone *Haliotis discus hannai*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 51, 1835-1839.

Wendel, A. and S. Feuerstein, 1981. Drug-induced lipid peroxidation in mice-1. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. Biochemical Pharmacology, 30, 2513-2520.

Yanagi, T., T. Shimizu, and H. J. Lie. 1998. Detailed structure of the Kuroshio frontal eddy along the shelf edge of the East china Sea, continental Shelf Research, 18: 1039-1056.

Yang, J. H. and I. K. Yeo, 2004. Physiological studies on acute water-temperature stress of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Kor. J. Ichthyol., 16, 19-26.

Zhang, Q. L and A. C. Weng, 1996. Analysis of water masses in the south Yellow Sea in spring. The Yellow Sea, 2(1): 74-82.

제주특별자치도, 1996. 해양수산현황, pp. 78-79.

허준욱, 장영진, 이복규, 이정열. 2003. 저염분에서 사육한 양식 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 생리적 반응, 생존율 및 성장 Korea. Journal of Ichthyology, 15(2),77-86.

감사의 글

대학원 생활 동안 세심한 관심과 격려 그리고 많은 깨달음을 주시고 이 논문이 완성되도록 지도해 주신 여인규 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 바쁘신 가운데에도 저의 논문을 심사해주시고, 귀중한 조언과 따뜻한 격려를 아끼지 않으셨던 전유진 교수님과 이경준 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 늘 관심과 조원으로 격려해주신 허문수 교수님과 이제희 교수님 송춘복 교수님 그리고 최미경 박사님께도 진심으로 감사드립니다.

실험실 생활을 하며 저의 가족보다 더 많은 시간을 같이 보내고 항상 제 2의 가족처럼 같이 생활하며 많은 도움을 준 실험실 식구인 수아, 경필, 병욱, 창수, 한솔 졸업하셨지만 항상 찾아와주셔서 따뜻한 격려를 해주신 문휴형, 정환형, 태형형에게도 감사드리고, 조교를 하면서 졸업하기까지 많은 도움을 주신 경주형에게도 감사의 마음을 전하며 저희 어류 분자생리학 실험실을 거쳐서 졸업한 이들에게도 감사드립니다. 아울러 항상 우리 실험실과 가까이 있어 많은 일을 공유하며 도움을 주었던 해양 병원 미생물 실험실 식구들 영건형, 만철형, 주상형, 태원형, 용재, 익수, 동민, 창영 에게도 감사드립니다. 분자유전육종 실험실에 맹진형, 상규형, 송헌형, 혜영이 그리고 분자유전학 실험실에 철홍이형, 숙경, 영화, 완창, 나둔, 마하나마, 차밀라니의 실험실 식구들에게도 감사드립니다. 해양생물자원이용공학 실험실 수진형, 승홍형, 선희누나, 긴내누나, 아름다슬의 실험실 식구들에게도 감사드립니다.

또한 멀리서 많은 조언을 해주신 국립수산과학원의 이정의 팀장님, 제주수산연구소의 한석중 소장님, 김경민 박사님, 표선자원연구소의 김수완 소장님, 김문관 과장님, 강봉조 박사님, 고희범 박사님, 오성립 박사님, 김필연 연구사님, 양병규 박사님께도 감사의 말씀을 드립니다. 또한, 대학원 생활동안 항상 믿고 의지하며 많은 시간을 함께 하고, 모든 것을 함께 나누던 대학원 동기인 윤범이형, 영득이형, 석천이형, 성명이형, 봉근이 에게도 고맙고 수고했다는 말을 하고 싶습니다.

그리고 여기에 이름을 올리지는 못했지만 부족한 저에게 항상 관심을 보여주고, 항상 격려의 말을 해주신 많은 분들과 우리 친구들 중에도 석사가 생겼다고 기뻐해주고 응원해준 팔용회 친구들에게도 고마운 마음을 전합니다.

길고 긴 대학 생활과 대학원 생활동안 많은 뒷바라지를 해주셨던 부모님과 항상 나를 세상에서 누구보다 가장 좋아하고 잘 따라 주었던 동생 민우에게도 감사드리고, 앞으로 더욱더 낳아지는 모습 보여 드리겠습니다.

이분들이 계시기에 이렇게 무사히 졸업을 할 수 있는 것이라 생각하고 다시 한번 모든 분들에게 머리 숙여 진심으로 감사드립니다.