creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

석사학위논문

넙치(*Paralichthys olivaceus*) 사료내 발효글루칸의 이용성에 관한 연구

제주대학교 대학원

생 명 공 학 과

오 대 한

2011년 7월

넙치(*Paralichthys olivaceus*) 사료내 발효글루칸의 이용성에 관한 연구

지도교수 이 경 준

오 대 한

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2011년 7월

오대한의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ ㊞

위 원 _____ ㊞

위 원 _____ ㊞

제주대학교 대학원

2011년 7월

dCollection @ jeju

Abstract

This research work was conducted to investigate the effects of dietary supplementation of fermented yeast glucans (FG) on growth performance, feed utilization, hematological compositions, innate immunity, and disease resistance against *Streptococcus iniae* for olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) at three different growth stages. Six experimental diets were formulated to contain FG at six different levels of 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25 and 0.5% (designated as Con, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.25% and 0.5%, respectively). All diets were formulated to be isonitrogenous and isocaloric. Triplicate groups of fish (2.6g) in Exp-I were fed the experimental diets to apparent satiation (5-6 times a day, from 08:00 to 18:00 h with 2 h intervals) for 7 weeks. In Exp-II, triplicate groups of fish (20g) were fed the same experimental diets but different pellet sizes to apparent satiation (twice a day, 08:00 and 18:00 h) for 9 weeks. In Exp-III in which sub-adult size of olive flounder were used, duplicate groups of fish (145g) were fed the same experimental diets but different pellet sizes to apparent satiation (twice a day, 08:00 and 18:00 h) for 8 weeks. At the end of the three feeding trials, growth performance of fish at three different growth stages were not significantly affected by the supplementation of FG. Hematocrit and hemoglobin values were not affected by the supplementation of FG. Respiratory burst, lysozyme activity and

dCollection @ jeju

superoxide dismutase activity were not significantly different among all the fish groups. However, cumulative mortality of fish fed the control and 0.01% FG diet was lower than other groups (0.05%, 0.1%, 0.25% and 0.5%) in Exp-I and II for the 14 days and 21 days of challenge tests, respectively. In conclusion, dietary supplementation of FG over 0.25% seems to have negative effects on growth performances and feed utilization by decreased diet palatability. The optimum supplementation level of the FG into diets for olive flounder is suggested to be lower than 0.05%.

Collection @ jeju

국 문 초 록

넙치를 대상으로 발효 처리한 yeast glucan(FG)의 해산어용 배합사료 첨가제로서의 가능성에 대해 조사하였다. 실험은 넙치의 성장 단계별로 총 3개의 실험이 실시되었다(Exp-I, II, III). 실험사료는 총 6개가 되도록 설계하였다. 6개의 실험사료 중 FG가 첨가되지 않은 대조구를 제외한 5개의 실험사료에는 FG가 단계별로(0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.25%, 0.5%)첨가되었다. 치어(2.6g)를 대상으로 한 Exp-I의 사료는 1일 5~6회 (08:00에서18:00 hr까지)에 나누어 만복공급을 하였으며 사양실험 기간은 7주간 수행되었다. Exp-II (20g) 와 Exp-III (145g)의 경우 1일 2회 (08:00 hr 와 18:00 hr) 만복공급 하였으며 실험기간은 각각 9주와 8주간 수행되었다. 성장실험 결과, 모든 실험에서 FG가 고농도로 첨가된 0.25%, 0.5% 실험구가 대조구에 비해 낮은 증체율을 보이고 있으나 유의적인 차이는 없었다. 또한 모든 실험구의 성장관련 결과에서도 유의적인 차이가 없었다. 비특이적 면역관련 분석결과 EXP-II와 EXP-III의 모든 실험구에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 하지만 NBT 분석결과 EXP-II와 EXP-III에서 0.5% FG가 첨가된 실험구가 대조구에 비해 약10% 정도 높은 값을 보였으며, lysozyme 활성 역시 0.5% FG가 첨가된 실험구가 대조구에 비해 약 14-25% 높은 값을 보였다. 공격실험 결과 EXP-I와

Collection @ jeju

EXP-II에서 FG의 첨가효과는 없었고, 오히려 고농도인 0.5% 첨가구에서 낮은 challenge 결과를 보였다. 결론적으로, FG의 사료 내 첨가는 0.25%를 초과하지 말아야 하며, 적정 성장률을 위해서는 0.05% 이하가 적합할 것으로 판단된다.

JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952
제주대학교
JEJU 1952
dCollection @ jeju

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Growth performance of olive flounder fed the six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 7 weeks.

Fig. 2. Cumulative mortality of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan after challenge with *Streptococcus iniae* by immersion (Exp-I).

Fig. 3. Growth performance of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 9 weeks.

Fig. 4. Blood parameters of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 9 weeks.

Fig. 5. Non-specific immune responses of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 9 weeks.

Fig. 6. Cumulative mortality of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan after challenge with *Streptococcus iniae* by immersion (Exp-II).

Fig. 7. Growth performance of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 8 weeks.

Collection @ jeju

Fig. 8. Blood parameters of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 8 weeks.

Fig. 9. Non-specific immune responses of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 8 weeks.

Collection @ jeju

LIST OF TABLES

Table 1. Formulation and proximate composition of basal diet for three different feeding trials with olive flounder at three different growth stages (% DM).

Table 2. Growth performance of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 7 weeks.

Table 3. Growth performance of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 9 weeks.

Table 4. Blood parameters of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 9 weeks.

Table 5. Non-specific immune responses of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 9 weeks.

Table 6. Growth performance of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 8 weeks.

Table 7. Blood parameters of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 8 weeks.

Table 8. Non-specific immune responses of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 8 week.

Collection @ jeju

I. 서 론

우리나라의 양식생산량은 1990년 1,037톤에서 2008년 54,700톤으로 꾸준히 증가하는 경향을 보이고 있다(Maritime Affairs and Fisheries 2009). 하지만 양식생산성은 점차 감소되고 있는 실정이다. 양식생산성이 감소되는 원인으로는 산업화와 도시화에 의한 연안환경의 악화, 양식품종의 열성화 그리고 어류질병 발생 등 여러 가지가 있다. 이와 같은 요인 중 가장 큰 비중을 차지하는 것이 어류질병에 의한 피해라 할 수 있다. 어류 양식장에서 감염성 질병의 치료를 위해 주로 항생제와 화학요법제를 사용하고 있지만 정확한 약제 사용법에 대한 부재로 인해 어류의 약제에 대한 내성을 증가시키고, 종류에 따라서는 어류의 면역기능을 저해하고 있다(Heo et al., 2001). 어류의 면역력 감소는 질병저항성을 감소시키고 결국 어류의 질병발생률을 높여 양식어가에 경제적으로 큰 피해를 입히게 된다(Kim et al., 2010).

최근 어류의 질병저항성을 향상시키기 위해 생균제, β-glucan 및 한약재 등 면역증강 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Liu et al., 2010; Daniels et al., 2010). 이중에서도 β-glucan에 관한 연구가 많다. Glucan은 D-glucose monomer의 글리코시드 결합(glycosidic linkage)을 기본 구조로 가지고 있는 다당류이다. Glucan은 화학적 결합구조에 따라 α-glucan과 β-glucan으로 나눌

Collection @ jeju

수 있으며, 그 중에서도 β-glucan이 생리활성에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Misra et al., 2006). 이러한 β-glucan은 사람에게 있어서 면역증강효과 및 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며, 어류에 있어서도 질병저항성 및 macrophages, lysozyme과 같은 면역관련 인자들의 활성을 증가 시키는 것으로 연구 보고되고 있다(Misra et al., 2006; Siwicki et al., 1994; Robertsen, 1990). 생체내 β-glucan의 작용기전을 살펴 보면 다음과 같다. 먼저 섭취된 β-glucan은 분해되지 않고 그대로 장으로 전달된다. 전달된 β-glucan은 장내 존재하는 microfold cell을 통해 Peyer's patch로 이동되어 그곳에 존재하는 대식세포의 덱틴-1 이라는 수용체에 부착된다. 이러한 일련의 과정을 통해 대식세포를 활성화시키고 활성화된 대식세포는 interleukin과 cytokine 같은 물질을 분비하여 면역조절에 관여하게 된다(Ai et al., 2007). 어류에게 있어서 β-glucan은 면역활성 뿐만 아니라 성장을 촉진시킨다는 연구결과 또한 보고되고 있다(Cook et al., 2003). 하지만 일부 연구의 결과를 살펴보면 β-glucan이 어류의 성장과 면역력에 아무런 영향을 미치지 않으며 오히려 좋지 않은 영향을 미칠 수 있다고 보고하고 있다(Anderson 1992; Couso et al., 2008; Whittington et al., 2005). 어류를 대상으로한 β-glucan에 대한 연구는 실험환경, 사료공급방법 및 어종에 따라 다양한 결과들이 도출되고 있다. 따라서 이 연구는 국내 최대 생산어종인 넙치를 대상으로 각 성장단계별로 발효 처리한 yeast

Collection @ jeju

glucan (FG)의 해산어용 양어배합사료 첨가제로서의 가능성에 대해 조사하였다. 특히, 성장률, 사료효율, 면역력 분석뿐만 아니라 국내양식장에서 큰 피해를 입히고 있는 *Streptococcus iniae*병원균에 대한 공격실험을 실시하였고 그에 따른 면역력 증진 효과를 조사하였다.

Collection @ jeju

II. 재료 및 방법

Exp-I: 치어기(2.6g) 넙치 사료내 발효글루칸의 이용성

실험사료

실험사료는 총 6개가 되도록 설계하였으며, 조단백질 함량이 42.5%, 에너지 함량이 4200 kcal/kg diet로 동일하게 제작되었다. 기초사료 조성표는 Table 1에 나타내었다. 총 6개의 실험사료는 FG가 첨가되지 않은 기초사료를 이용한 대조구와 기초사료에 FG를 단계별로(0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.25%, 0.5%)첨가하여 제작되었다. 실험사료는 파쇄기를 이용하여 사료원들을 분말형태로 일정하게 만든 후 사료조성표에 따라 정확히 무게를 측정하였다. 사료원들을 사료혼합기(NVM-14-2P, KOREA)에 넣어 완전히 섞은 다음, 어유를 첨가한 뒤 사료원 중량의 30%에 해당하는 증류수를 첨가하여 혼합, 반죽하였다. 혼합반죽물은 소형초파기(SMC-12, Kuposlice, Busan, Korea)를 이용하여 직경 3mm 크기로 성형되었다. 성형된 실험사료를 -70℃ 동결건조기에서 건조시킨 후 시브(Sieve)를 이용하여 실험어류가 섭이하기 적당한 크기로 가공하였다. 가공된 실험사료는 사료 공급 전까지 -20°C에 보관되었다.

Collection @ jeju

Table 1. Formulation and proximate composition of basal diet for three different feeding trials with olive flounder at three different growth stages (% DM).

Ingredients	**%**
White fish meal	45.0
Soybean meal	5.0
Corn gluten meal	5.0
Wheat flour	28.0
Squid liver oil	12.5
Choline chloride	0.5
Mineral mix [1]	1.0
Vitamin mix [2]	1.0
Cellulose	0.5
Carboxymethylcellulose	1.0
Proximate composition	
Crude protein	42.5
Crude lipid	17.1
Ash	9.4

[1] $MgSO_4.7H_2O$, 80.0; $NaH_2PO_4.2H_2O$, 370.0; KCl, 130.0; Ferric citrate, 40.0; $ZnSO_4.7H_2O$, 20.0; Ca-lactate, 356.5; CuCl, 0.2; $AlCl_3$. $6H_2O$, 0.15; $Na_2Se_2O_3$, 0.01; $MnSO_4.H_2O$, 2.0; $CoCl_2.6H_2O$, 1.0.

[2] L-ascorbic acid, 121.2; DL-α tocopheryl acetate, 18.8; thiamin hydrochloride, 2.7; riboflavin, 9.1; pyridoxine hydrochloride, 1.8; niacin, 36.4; Ca-$_D$-pantothenate, 12.7; myo-inositol, 181.8; $_D$-biotin, 0.27; folic acid, 0.68; p-aminobezoic acid, 18.2; menadione, 1.8; retinyl acetate, 0.73; cholecalficerol, 0.003; cyanocobalamin, 0.003.

Collection @ jeju

실험어 및 사육관리

실험에 사용된 넙치는 제주도내에 위치한 양어장(창해수산)에서 구입하여 제주대학교 해양과환경연구소로 운송하였다. 운송된 실험어류는 2 주 동안 배합사료(수협사료)를 공급하면서 실험환경에 적응할 수 있도록 순치시킨 후 사료공급실험에 사용되었다. 예비사육 후 넙치치어(초기평균무게: 2.60±0.00)는 총 18 개의 50 L 원형플라스틱 수조에 각 수조 당 25 마리씩 무작위로 선택되어 배치되었다. 사육수는 모래여과해수를 사용하였으며, 2-3L/min 의 유수량이 되도록 조절하였고, 모든 실험수조에 용존산소 유지를 위하여 에어스톤을 설치하였다. 광주기는 형광등을 이용하여 12L:12D 조건으로 유지되었고 사료공급 실험의 사육수온은 18℃에서 23℃로 자연수온에 의존하였다. 실험사료는 1 일 5~6 회 (08:00 에서 18:00 까지)로 나누어 만복공급을 하였다. 사료공급 실험은 총 7 주간 수행되었다.

실험사료 분석

실험사료원 및 실험사료의 분석은 AOAC (1995) 방법에 따라 수분은 상압건조법(125℃, 3 시간), 조회분은 직접회화법(550℃, 6 시간), 단백질은 자동조단백분석기(Kejltec System 2300, Sweden)로 분석되었으며, 지방은 folch et

Collection @ jeju

al. (1959)의 방법에 따라 Soxhlet 추출장치(Soxhlet Heater System C-SH6, Korea)를 이용하여 분석되었다.

성장률 측정

성장률은 2주마다 측정하였다. 측정 24시간 전에 실험어류의 스트레스를 줄이기 위해 모든 실험어류를 절식시켰다. 사양실험기간 동안의 증체량을 알아보기 위해 다음과 같은 방법으로 성장률을 조사하였다.

증체율(WG, %) = 100 × (final mean body weight - initial mean body weight)/initial mean body weight; 사료전환효율(FCR) = dry feed fed/wet weight gain; 일간성장률(SGR, %) = [($\log_e$ final body weight - $\log_e$ initial body weight)/days] ×100; 단백질전환효율(PER) = wet weight gain/total protein given.

공격실험을 통한 질병저항성 실험

성장실험 종료 후, FG가 넙치의 항병력에 미치는 영향을 조사하기 위해 혈액샘플을 하고 남은 어류를 대상으로 병원성 세균인 *S. iniae*를 사용하여 공격실험을 실시하였다. 병원성 세균은 Tryptic Soy Agar 배지를 사용하여 25°C에서 24시간 배양한 후 집균 하였고, PBS 1 x 10^6cfu/ml이 되도록

Collection @ jeju

현탁하여 각 그룹별로 1시간 동안 침지하였다. 침지 후 실험어류는 60L 사각 플라스틱 수조에 실험구별로 3반복으로 배치하였으며 모든 수조는 24°C 수온과 에어스톤을 설치하여 충분한 용존산소를 유지하였다. 사육수는 매일 100% 환수를 하였고 실험은 총 14일간 진행되었다.

통계학적 분석

실험사료의 배치는 완전확률계획법(Completely randomized design)을 실시하였고, 성장 및 분석결과는 SPSS (Version 11.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석된다. 그룹 평균값의 유의차는 Turkey's HSD test ($P \leq 0.05$)로 비교하였다. 데이터는 평균값 ± 표준편차(mean ± SD)로 나타내었다. 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석하였다.

dCollection @ jeju

Exp-II: 성장기(20g) 넙치 사료내 발효글루칸의 이용성

실험어 및 사육관리

실험에 사용된 어류는 제주도내 양어장(창해수산)에서 구입하여 제주대학교 해양과환경연구소로 운송되었다. 운송된 실험어류는 2 주 동안 시판 배합사료(수협사료)를 공급하면서 실험환경에 적응할 수 있도록 순치시킨 후 사료공급실험에 사용되었다. 예비사육 후 넙치(초기평균무게: 19.9g±0.1)는 총 18 개의 150L 원형플라스틱 수조에 각 수조 당 30 마리씩 무작위 선택되어 배치되었다. 사육수는 모래여과해수를 사용하였으며, 2-3L/min 의 유수량이 되도록 조절하였고, 모든 실험수조에 용존산소 유지를 위하여 에어스톤을 설치하였다. 광주기는 형광등을 이용하여 12L:12D 조건으로 유지되었고 사료공급 실험의 사육수온은 18℃에서 23℃로 자연수온에 의존하였다. 실험사료는 1 일 2 회(08:00 와 18:00 시) 만복공급을 하였다. 사료공급 실험은 총 9 주간 수행되었다.

샘플수집

사료공급실험 종료 후, 수조당 4 마리의 어류를 무작위 샘플하여 2-phenoxyethanol (200ppm)용액으로 마취시킨 후 헤파린 처리된 주사기를

Collection @ jeju

이용하여 꼬리 미병부에서 채혈하였다. 채혈된 전혈은 Hematocrit, Hemoglobin 및 대식세포활성(NBT) 분석에 이용되었으며, 분석이 끝난 후 원심분리기(Micro 17TR, Hanil Science, Korea)를 이용하여 혈장을 분리하였다. 또한 수조 당 4 마리의 어류를 부가적으로 무작위 샘플하여 동일한 방법으로 항응고제가 처리되지 않은 원심분리관에 넣고 상온에서 30 분 방치 후 원심분리기를 이용하여 면역분석에 사용될 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 비특이적 면역력 관련 분석에 사용되었다.

성장률 측정

성장률은 3주마다 측정하였다. 측정 24시간 전에 실험어류의 스트레스를 줄이기 위해 모든 실험어류를 절식시켰다. 사양실험기간 동안의 증체량을 알아보기 위해 다음과 같은 방법으로 성장률을 조사하였다.

증체율(WG, %) = 100×(final mean body weight − initial mean body weight)/initial mean body weight; 사료전환효율(FCR) = dry feed fed/wet weight gain; 일간성장률(SGR, %) = [($\log_e$ final body weight − $\log_e$ initial body weight)/days]×100; 단백질전환효율(PER) = wet weight gain/total protein given.

Collection @ jeju

혈액분석

Hematocrit은 microhematocrit technique 방법으로 분석하였으며, hemoglobin 함량은 자동 생화학분석기(Express plus system, Bayer, USA)를 이용하여 분석되었다.

비특이적 면역력 관련 분석

대식세포 활성(Nitroblue tetrazolium activity)

대식세포 활성분석 방법은 다음과 같이 분석되었다(Kumari and Sahoo, 2005). 우선 혈액과 NBT solution(0.2%)을 각각 50ul씩 섞은 후 25°C 에서 30분 동안 반응시켰다. 반응물 50ul를 glass tube에 옮긴 후 Dimethyl formamide를 1ml씩 넣었다. 그 후 2000rpm으로 5분 동안 원심 분리한 후 상층액을 분광광도계(Genesys, Series 10 UV, Rochester, NY, USA)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 분석하였다. 이때 blank는 Dimethyl formamide로 하였다.

Lysozyme activity 분석

혈청 내 라이소자임 분석을 위해 *Micrococcus lysodeikticus* cell을 이용하여 분석하였다(Swain et al., 2007). 먼저, 0.1 M sodium phosphate buffer

Collection @ jeju

(pH 6.4)에 동결 건조된 *M. lysodeikticus* (Sigma)를 첨가하여 0.75 mg/ml 농도의 현탁액을 만든다. 200ul의 현탁액을 96-well plates에 분주하고, 어류에서 분리한 혈청 20ul를 넣는다. 접종 후 즉시, 570nm 흡광도에서 최초 흡광도 값을 측정하고, 상온에서 5분 동안 배양 후, 마지막 흡광도 값을 측정한다. 분석 값은 혈청 1ml당 lysozyme unit으로 표현되며, 1 unit은 분당 0.001 흡광도의 감소를 일으키는 총량으로 정의하였다.

SOD (Superoxide dismutase) activity 분석

혈청 내 SOD는 superoxide dismutase assay kit (Sigma, 19160)를 이용하여 분석되었다. 우선 혈청 샘플을 96-well plates에 20ul radical detector를 첨가한 후 샘플을 10ul씩 넣는다. 그 후 20ul xanthine oxidase를 첨가하여 20분간 반응시킨다. 최종적으로 microplate reader 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

공격실험을 통한 질병저항성 실험

성장실험 종료 후, FG가 넙치의 항병력에 미치는 영향을 조사하기 위해 혈액샘플을 하고 남은 어류를 대상으로 병원성 세균인 *S. iniae*를 사용하여 공격실험을 실시하였다. 병원성 세균은 Tryptic Soy Agar 배지를 사용하여

Collection @ jeju

25°C에서 24시간 배양한 후 집균 하였고, PBS 1 x 10^7cfu/ml이 되도록 현탁하여 각 그룹 별로 1시간 동안 침지하였다. 침지 후 실험어류는 60L 사각 플라스틱 수조에 실험구별로 3반복으로 배치하였으며 모든 수조는 24°C 수온과 에어스톤을 설치하여 충분한 용존산소를 유지하였다. 사육수는 매일 100% 환수를 하였고 실험은 총 21일간 진행되었다.

통계학적 분석

실험사료의 배치는 완전확률계획법(Completely randomized design)을 실시하고, 성장 및 분석결과는 SPSS (Version 11.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석된다. 그룹 평균값의 유의차는 Turkey's HSD test ($P \leq 0.05$)로 비교하였다. 데이터는 평균값 ± 표준편차(mean ± SD)로 나타낸다. 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석하였다.

Collection @ jeju

Exp-III: 육성기(145g) 넙치 사료내 발효글루칸의 이용성

실험어 및 사육관리

실험에 사용된 넙치는 제주도내에 위치한 양어장(창해수산)에서 구입하여 제주대학교 해양과환경연구소로 운송하였다. 운송된 실험어류는 2 주 동안 시판 배합사료(수협사료)를 공급하면서 실험환경에 적응할 수 있도록 순치시킨 후 사료공급실험에 사용되었다. 예비사육 후 넙치(초기평균무게: 145g ±3)는 총 12 개의 500L 원형 플라스틱 수조에 각 수조 당 23 마리씩 무작위 선택되어 배치되었다. 사육수는 모래여과해수를 사용하였으며, 2-3L/min 의 유수량이 되도록 조절하였고, 모든 실험수조에 용존산소 유지를 위하여 에어스톤을 설치하였다. 광주기는 형광등을 이용하여 12L:12D 조건으로 유지되었고 사료공급 실험기간의 사육수온은 16℃에서 23℃로 자연수온에 의존하였다. 실험사료는 1 일 2 회(08:00 와 18:00 시) 만복공급을 하였다. 사료공급 실험은 총 8 주간 수행되었다.

샘플수집

사육실험 종료시 수조당 5 마리의 어류를 무작위 샘플하여 2-phenoxyethanol (200ppm)용액으로 마취시킨 후 헤파린 처리된 주사기를

Collection @ jeju

이용하여 꼬리 미병부에서 채혈하였다. 채혈된 전혈은 Hematocrit, Hemoglobin 및 대식세포활성(NBT) 분석에 이용되었으며, 분석이 끝난 후 혈장을 분리하였다. 또한 수조 당 5 마리의 어류를 부가적으로 무작위 샘플하여 동일한 방법으로 항응고제가 처리되지 않은 원심분리관에 넣고 상온에서 30 분 방치 후 면역분석에 사용될 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 비특이적 면역력관련 분석에 사용되었다.

성장률 측정

성장률은 3주마다 측정하였다. 측정 24시간 전에 실험어류의 스트레스를 줄이기 위해 모든 실험어류를 절식시켰다. 사양실험기간 동안의 증체량을 알아보기 위해 다음과 같은 방법으로 성장률을 조사하였다.

증체율(WG, %) = 100 × (final mean body weight − initial mean body weight)/initial mean body weight; 사료전환효율(FCR) = dry feed fed/wet weight gain; 일간성장률(SGR, %) = [($\log_e$ final body weight − $\log_e$ initial body weight)/days] ×100; 단백질전환효율(PER) = wet weight gain/total protein given.

혈액분석

Collection @ jeju

Hematocrit은 microhematocrit technique 방법으로 분석하였으며, hemoglobin 함량은 자동 생화학분석기(Express plus system, Bayer, USA)를 이용하여 측정하였다.

비특이적 면역력 관련 분석

대식세포 활성(Nitroblue tetrazolium activity)

대식세포 활성분석 방법은 다음과 같이 분석되었다(Kumari and Sahoo, 2005). 우선 혈액과 NBT solution(0.2%)을 각각 50ul씩 섞은 후 25°C 에서 30분 동안 반응시켰다. 반응물 50ul를 glass tube에 옮긴 후 Dimethyl formamide를 1ml씩 넣었다. 그 후 2000rpm으로 5분 동안 원심분리한 후 상층액을 분광광도계(Genesys, Series 10 UV, Rochester, NY, USA)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 분석하였다. 이때 blank는 Dimethyl formamide로 하였다.

Lysozyme activity 분석

혈청 내 라이소자임 분석을 위해 *Micrococcus lysodeikticus* cell을 이용하여 분석하였다(Swain et al., 2007). 먼저, 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.4)에 동결 건조된 *M. lysodeikticus* (Sigma)를 첨가하여 0.75 mg/ml

Collection @ jeju

농도의 현탁액을 만든다. 200ul의 현탁액을 96-well plates에 분주하고, 어류에서 분리한 혈청 20ul를 넣는다. 접종 후 즉시, 570nm 흡광도에서 최초 흡광도 값을 측정하고, 상온에서 5분 동안 배양 후, 마지막 흡광도 값을 측정한다. 분석 값은 혈청 1ml당 lysozyme unit으로 표현되며, 1 unit은 분당 0.001 흡광도의 감소를 일으키는 총량으로 정의하였다.

SOD (Superoxide dismutase) activity 분석

혈청 내 SOD는 superoxide dismutase assay kit (Sigma, 19160)를 이용하여 분석되었다. 우선 혈청 샘플을 96-well plates에 20ul radical detector를 첨가한 후 샘플을 10ul씩 넣는다. 그 후 20ul xanthine oxidase를 첨가하여 20분간 반응시킨다. 최종적으로 microplate reader 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계학적 분석

실험사료의 배치는 완전확률계획법(Completely randomized design)을 실시하고, 성장 및 분석결과는 SPSS (Version 11.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석된다. 그룹 평균값의 유의차는 Turkey's HSD test ($P \leq 0.05$)로 비교하였다. 데이터는 평균값 ± 표준편차(mean ± SD)로

Collection @ jeju

나타낸다. 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석하였다.

dCollection @ jeju

III. 결 과

Exp-I: 치어기(2.6g) 넙치 사료내 발효글루칸의 이용성

성장률 측정

사육실험 종료시 조사된 성장결과는 Table 2에 나타내었다. FG가 첨가됨에 따라 증체율이 감소되는 경향을 관찰할 수 있었다. FG가 0.25% 이상 첨가된 처리구의 경우 대조구에 비해 상대적으로 낮은 증체율을 나타내었지만 유의적인 차이가 없었다. 하지만 FG가 0.01% 첨가된 처리구의 증체율은 대조구보다 다소 높은 경향을 나타내었다. 일간성장률, 사료전환효율, 단백질 전환효율 또한 증체율과 유사한 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과를 미루어볼 때 사양실험기간이 연장되었다면 0.25% 이상의 FG를 첨가한 실험구에서 유의적으로 낮은 성장을 보였으리라 추측된다.

공격실험

사육실험 종료 후 실시된 공격실험 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 공격실험 시작 후 2일째부터 폐사어가 관찰되기 시작하였으며 14일 경과 후 FG가 0.5% 첨가된 실험구에서 100%의 폐사율을 보였다. 작은 크기의 어류에 공격농도가

Collection @ jeju

약간 높았던 것으로 판단된다. 반면에 대조구와 FG가 0.01% 첨가된 실험구의 폐사율은 각각 36%와 44%로 50%가 넘지 않았다.

dCollection @ jeju

Table 2. Growth performance of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 7 weeks.

	Con	0.01%	0.05%	0.1%	0.25%	0.5%
Exp-I (~2.6 g)						
IBW (g)	2.60±0.00	2.60±0.00	2.60±0.00	2.60±0.00	2.60±0.00	2.60±0.00
FBW (g)	9.30±0.74	9.41±0.65	8.67±0.66	8.13±0.53	8.12±0.51	7.72±0.55
WG (%)[1]	258±29	262±25	234±25	213±20	212±20	197±21
SGR (%)[2]	3.03±0.24	3.06±0.20	2.86±0.22	2.71±0.19	2.71±0.19	2.59±0.21
FCR[3]	1.14±0.21	1.12±0.22	1.22±0.24	1.23±0.23	1.26±0.19	1.33±0.13
PER[4]	2.10±0.37	2.16±0.46	1.97±0.41	1.96±0.35	1.90±0.26	1.78±0.17
Survival (%)	89.3±8.2	81.33±9.4	81.3±8.2	82.7±6.8	81.3±5.0	96.0±3.3

Mean values of triplicate groups; values are presented as mean ± SD. Values in the same row having different superscript letters are significantly different ($P< 0.05$).

[1]Weight gain (%) = 100 X (final mean body weight – initial mean body weight)/initial mean body weight

[2] Specific growth rate (%) = [(loge final body weight – loge initial body weight)/days] x 100

[3]Feed conversion ratio = dry feed fed/wet weight gain

[4] Protein efficiency ratio = wet weight gain/total protein given

Collection @ jeju

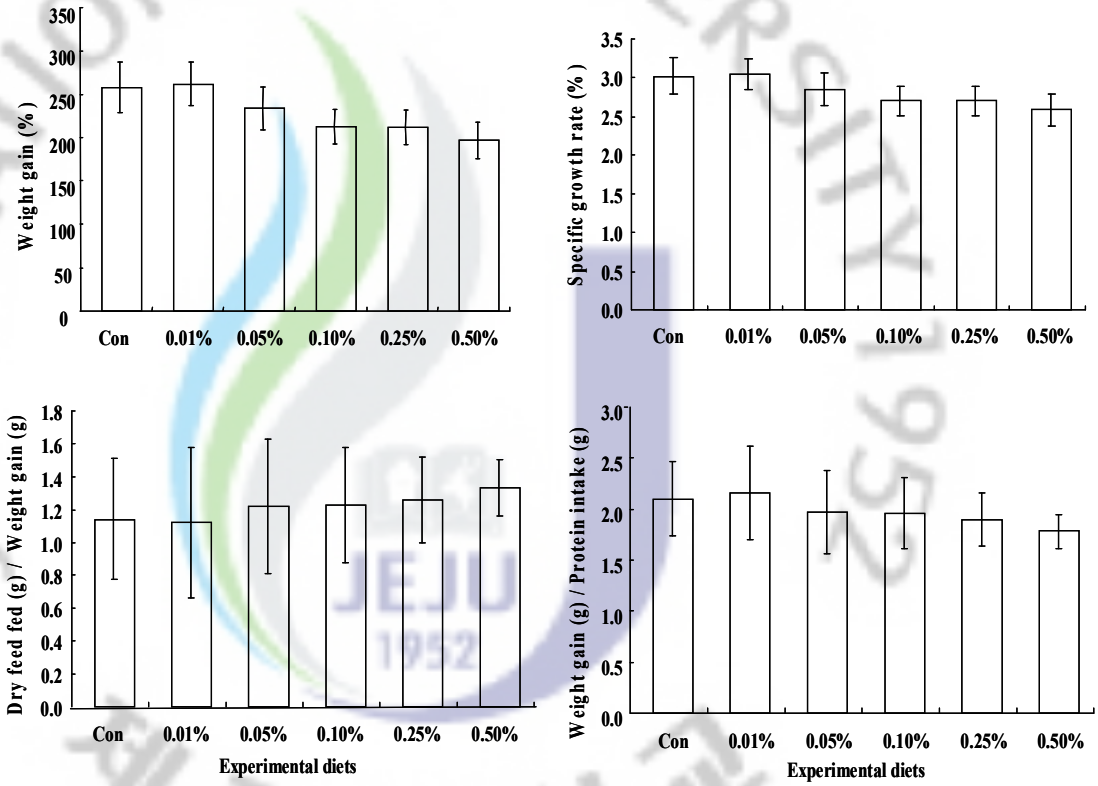

Fig. 1. Growth performance of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 7 weeks.

Collection @ jeju

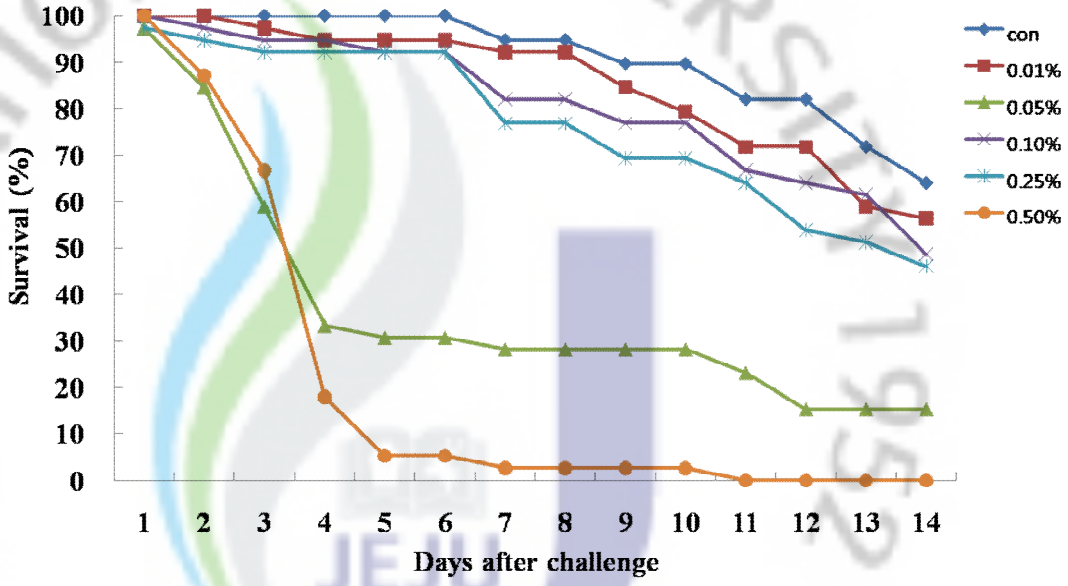

Fig. 2. Cumulative mortality of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan after challenge with *Streptococcus iniae* by immersion (EXP-I).

Collection @ jeju

Exp-II: 성장기(20g) 넙치 사료내 발효글루칸의 이용성

성장률 측정

사육실험 종료 시 조사된 성장 결과를 Table 3에 나타내었다. 생존률은 모든 처리구에서 90%가 넘는 양호한 결과를 나타내었다. 증체율의 경우 Exp-I과 마찬가지로 FG가 고농도로 첨가된 0.25%, 0.5% 실험구가 대조구에 비해 낮은 증체율을 보이고 있으나 그에 대한 유의적인 차이가 없었다. 또한 모든 처리구의 성장관련 결과에서 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다. 하지만 FG가 0.01% 첨가된 처리구의 경우 대조구에 비해 증체율이 다소 증가하는 상승효과를 관찰할 수 있었다.

혈액분석

성장실험 종료 후 분석된 혈액분석 결과를 Table 4에 나타내었다. Hematocrit 과 hemoglobin은 어류의 일반적인 건강도를 나타내는 지표로 사용된다. 분석결과 모든 실험에서 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다. FG의 사료 내 첨가는 넙치의 성장과 일반적인 건강도에 영향을 끼치지 않는 것으로 사료된다.

dCollection @ jeju

비특이적 면역력 관련 분석

NBT, lysozyme, SOD활성 분석결과를 Table 5에 나타내었다. NBT, lysozyme, SOD활성은 비특이적 면역반응을 나타내는 지표로 사용되는 분석항목이다. 분석결과 모든 처리구에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 하지만 NBT 분석결과에서 0.5% FG가 첨가된 실험구가 대조구에 비해 약 10% 정도 높은 값을 보였으며, lysozyme 활성 역시 0.5% FG가 첨가된 실험구가 대조구에 비해 약 14% 높은 값을 보였다.

공격실험

공격실험 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 총 21일 동안 공격실험이 진행되었다. 실험 시작 후 10일째부터 폐사어가 관찰되기 시작하였는데, 이는 공격농도가 정확하게 잘 조절된 것으로 판단되는 결과이다. 실험 종료 시 FG가 0.5% 첨가된 실험구에서 87%의 폐사율을 보였다. 또한 대조구와 FG가 0.01% 첨가된 실험구의 폐사율은 각각 42%와 47%로 나타나 Exp-I과 같은 경향을 보였다. 이러한 결과로 미루어볼 때 사료내 고농도(0.5%이상)의 FG의 첨가는 넙치의 질병저항성에 긍정적인 영향을 미치지 않을 것으로 추측된다.

Collection @ jeju

Table 3. Growth performance of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 9 weeks.

	Con	0.01%	0.05%	0.1%	0.25%	0.5%
Exp-II (~20 g)						
IBW (g)	19.9±0.1	19.9±0.0	19.9±0.0	19.9±0.0	19.9±0.0	19.9±0.0
FBW (g)	72.7±2.7	75.5±2.0	66.0±1.6	71.2±3.1	64.9±5.0	65.1±7.3
WG (%)[1]	266±15	279±10	232±8	258±16	226±25	227±36
SGR (%)[2]	2.03±0.08	2.08±0.05	1.87±0.05	1.99±0.09	1.84±0.15	1.84±0.21
FCR[3]	1.12±0.07	1.08±0.05	1.27±0.05	1.19±0.06	1.28±0.25	1.29±0.28
PER[4]	2.12±0.13	2.18±0.10	1.85±0.06	1.98±0.09	1.88±0.33	1.88±0.45
Survival (%)	96.4±2.9	100±0.0	92.9±0.0	96.4±2.9	91.7±9.4	91.7±3.4

Mean values of triplicate groups; values are presented as mean ± SD. Values in the same row having different superscript letters are significantly different ($P< 0.05$).

[1]Weight gain (%) = 100*(final mean body weight – initial mean body weight)/initial mean body weight

[2] Specific growth rate (%) = [(loge final body weight - loge initial body weight)/days] x 100

[3]Feed conversion ratio = dry feed fed/wet weight gain

[4] Protein efficiency ratio = wet weight gain/total protein given

Collection @ jeju

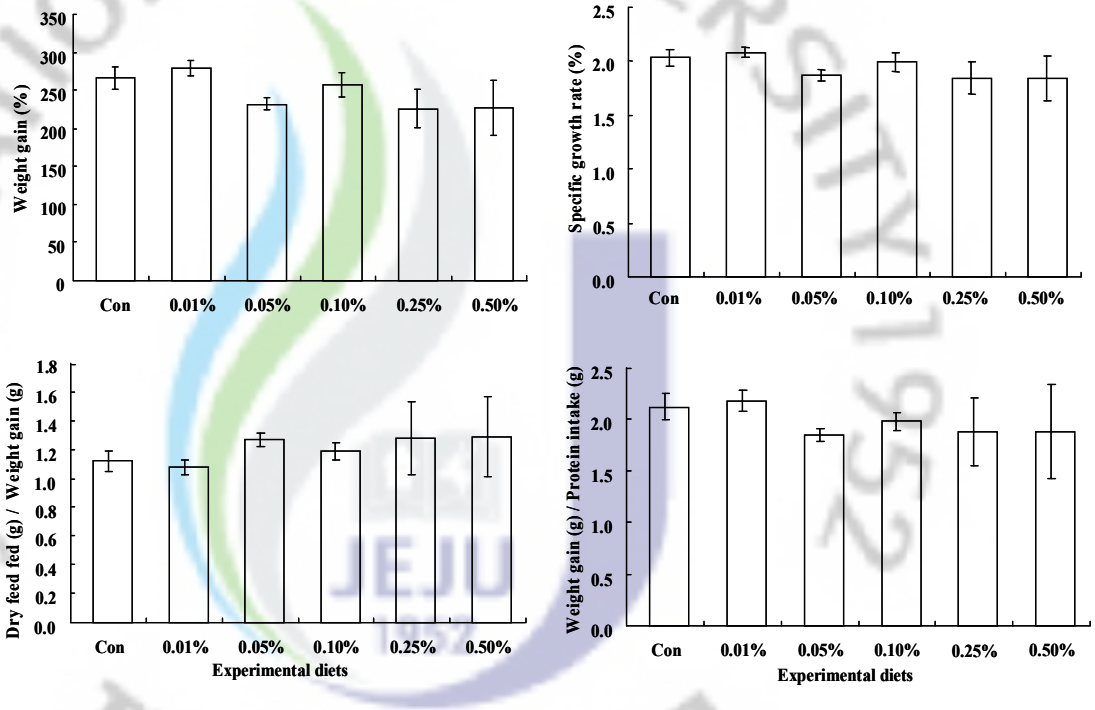

Fig. 3. Growth performance of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 9 weeks.

Collection @ jeju

Table 4. Blood parameters of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 9 weeks.

	Con	0.01%	0.05%	0.1%	0.25%	0.5%
Exp-II (~20 g)						
Hematocrit (%)	26.9±3.6	27.3±2.9	25.8±2.6	25.2±1.8	25.3±1.3	27.3±0.3
Hemoglobin (g/dL)	5.1±0.8	6.0±0.6	5.4±0.3	6.0±0.4	5.6±0.5	5.7±0.2

Mean values of triplicate groups; values are presented as mean ± SD. Values in the same row having different superscript letters are significantly different ($P< 0.05$).

Collection @ jeju

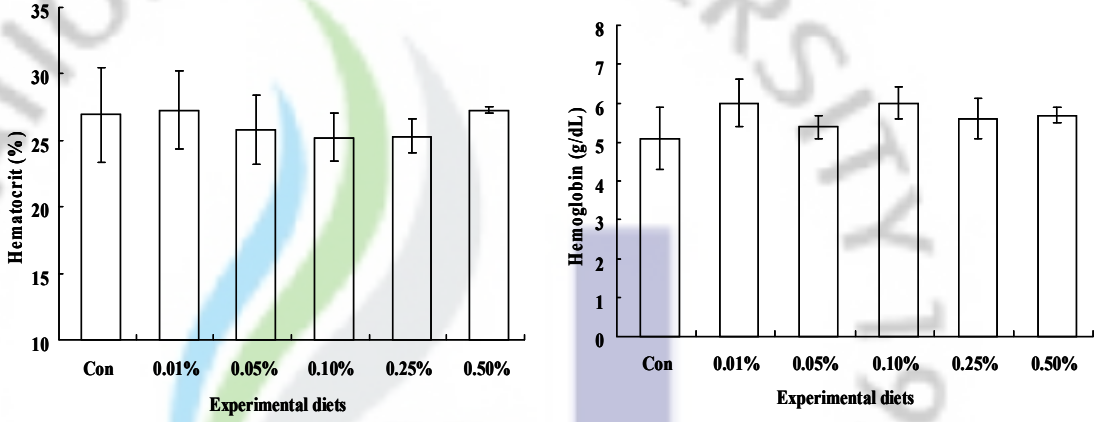

Table 4. Blood parameters of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 9 weeks.

dCollection @ jeju

Table 5. Non-specific immune responses of olive flounder the six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 9 weeks.

	Con	0.01%	0.05%	0.1%	0.25%	0.5%
Exp-II (~20 g)						
NBT (absorbance)	0.74±0.11	0.79±0.09	0.78±0.06	0.76±0.09	0.77±0.07	0.83±0.02
Lysozyme (ugHEWL/ml)	5.86±1.90	5.39±0.59	4.39±2.05	5.36±1.69	5.63±1.81	6.84±0.97
SOD (% inhibition)	42.0±15.4	39.2±13.8	36.6 ±16.7	29.3±8.9	36.8±18.1	32.6±12.1

Mean values of triplicate groups; values are presented as mean ± SD. Values in the same row having different superscript letters are significantly different (P< 0.05).

Collection @ jeju

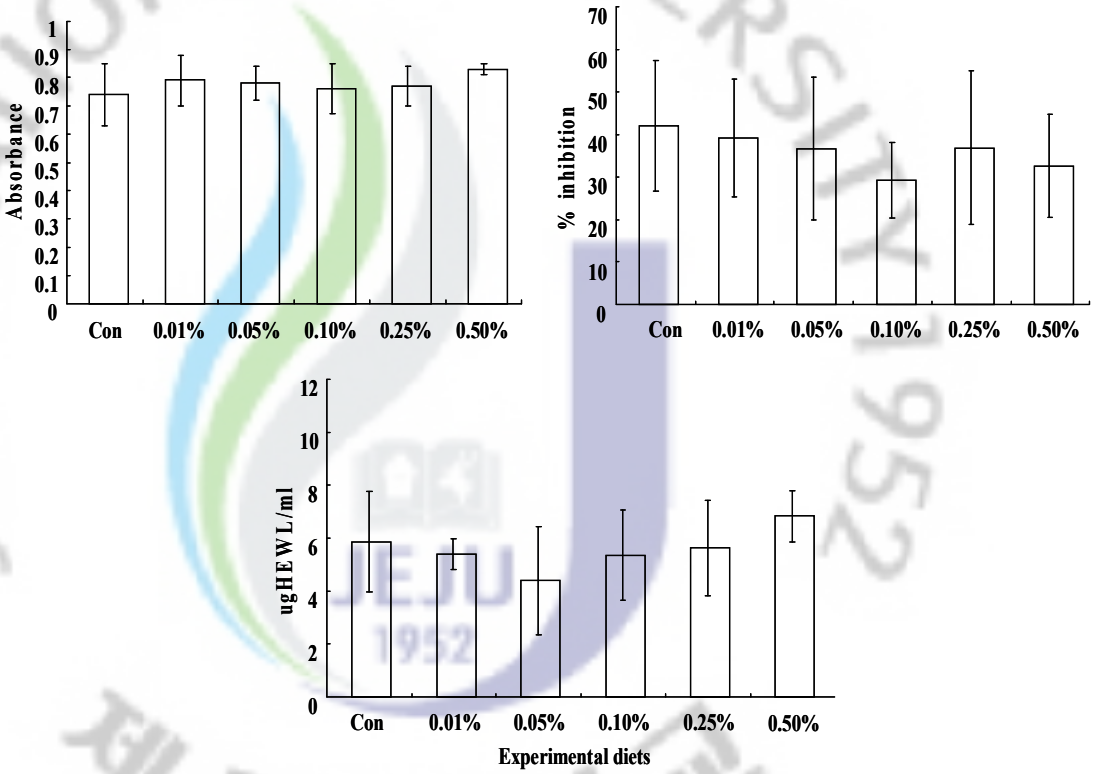

Fig. 5. Non-specific immune responses of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 9 weeks.

Collection @ jeju

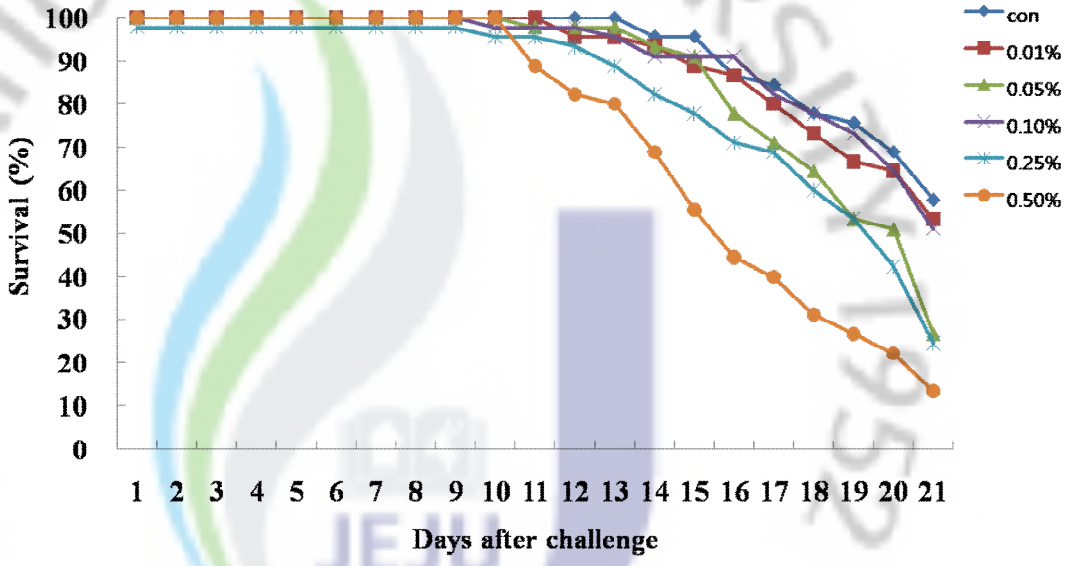

Fig. 6. Cumulative mortality of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan after challenge with *Streptococcus iniae* by immersion (Exp-II).

Collection @ jeju

Exp-III: 육성기(145g) 넙치 사료내 발효글루칸의 이용성

성장률 측정

사육실험 종료 후의 성장결과를 Table 6에 나타내었다. Exp-III의 경우 성장결과가 다소 뚜렷하지 못한 결과를 나타내었다. FG가 0.05% 이상 첨가된 처리구중 0.1% 처리구를 제외한 나머지 처리구의 증체율이 대조구에 비해 다소 낮은 경향을 보이고 있으나 그에 대한 유의적인 차이가 없었다. 또한 모든 실험구의 성장관련 결과에서 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다.

혈액분석

성장실험 종료 후 분석된 혈액분석 결과를 Table 7에 나타내었다. 분석결과 모든 분석에서 유의적인 차이를 관찰 할 수 없었다. 하지만 헤모글로빈의 경우 FG가 첨가됨에 따라 대조구에 비해 다소 감소되는 경향을 보이는 것이 관찰되었으며 0.05% 이상 첨가된 처리구는 대조구에 비해 상대적으로 낮은 헤모글로빈 수치를 나타내었다.

비특이적 면역력 관련 분석

NBT, lysozyme, SOD활성 분석결과를 Table 8에 나타내었다. 분석결과

dCollection @ jeju

모든 실험구에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 하지만 NBT 분석결과 0.5% FG가 첨가된 실험구가 대조구에 비해 약 10% 정도 높은 값을 보였으며, lysozyme 활성 역시 0.5% FG가 첨가된 실험구가 대조구에 비해 약 25% 높은 값을 보였다.

dCollection @ jeju

Table 6. Growth performance of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 8 weeks.

	Con	0.01%	0.05%	0.1%	0.25%	0.5%
Exp-III (~145 g)						
IBW (g)	146±3	145±1	147±1	145±1	145±1	142±6
FBW (g)	203±7	196±1	185±14	206±14	189±3	201±5
WG (%)[1]	38.9±7.8	35.4±0.3	26.2±10.3	42.6±9.5	30.2±3.1	22.5±9.6
SGR (%)[2]	0.59±0.10	0.54±0.00	0.41±0.15	0.63±0.12	0.47±0.04	0.62±0.12
FCR[3]	1.23±0.21	1.25±0.04	1.28±0.43	1.13±0.13	1.26±0.04	1.28±0.31
PER[4]	1.97±0.48	1.89±0.09	2.07±0.98	2.11±0.33	1.87±0.08	1.95±0.67
Survival (%)	80.4±3.1	78.3±0.0	76.1±3.1	80.4±3.1	78.3±6.2	78.3±6.2

Mean values of triplicate groups; values are presented as mean ± SD. Values in the same row having different superscript letters are significantly different ($P< 0.05$).

[1]Weight gain (%) = 100*(final mean body weight – initial mean body weight)/initial mean body weight

[2] Specific growth rate (%) = [(loge final body weight – loge initial body weight)/days] x 100

[3]Feed conversion ratio = dry feed fed/wet weight gain

[4] Protein efficiency ratio = wet weight gain/total protein given

Collection @ jeju

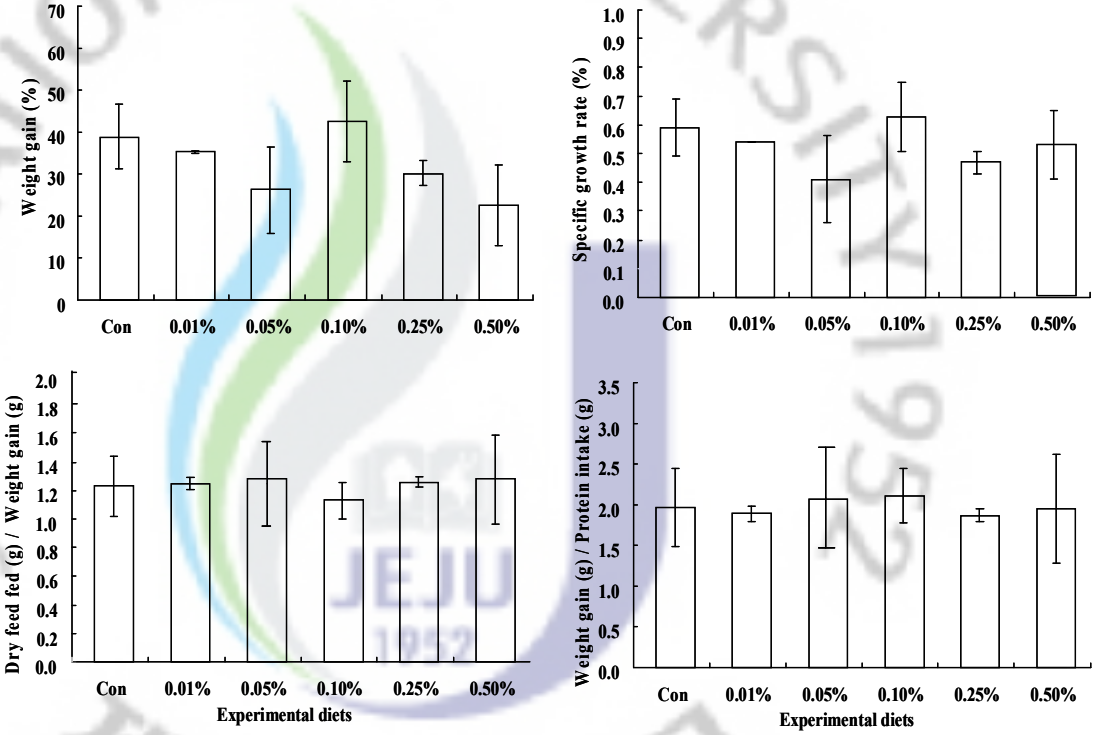

Fig. 7. Growth performance of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 8 weeks.

Collection @ jeju

Table 7. Blood parameters of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 8 weeks.

	Con	0.01%	0.05%	0.1%	0.25%	0.5%
Exp-III (~145 g)						
Hematocrit (%)	25.8±3.1	24.7±0.9	23.1±0.5	25.4±0.8	23.4±0.5	26.8±0.8
Hemoglobin (g/dL)	6.1±0.3	5.6±0.5	4.5±1.3	4.8±0.1	4.7±0.6	4.9±1.0

Mean values of triplicate groups; values are presented as mean ± SD. Values in the same row having different superscript letters are significantly different ($P< 0.05$).

Collection @ jeju

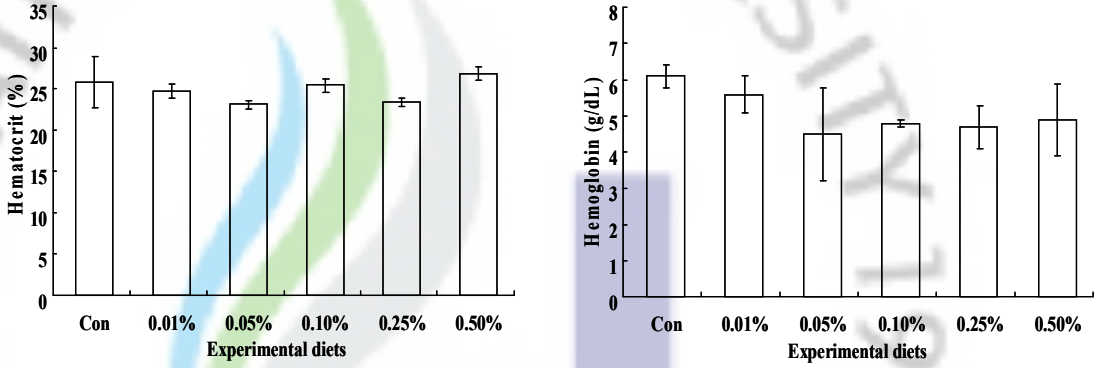

Fig. 8. Blood parameters of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 8 weeks.

dCollection @ jeju

Table 8. Non-specific immune responses of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 8 weeks.

	Con	0.01%	0.05%	0.1%	0.25%	0.5%
Exp-III (~145 g)						
NBT (absorbance)	0.69±0.02	0.65±0.03	0.62±0.02	0.77±0.04	0.62±0.10	0.79±0.07
Lysozyme (ugHEWL/ml)	7.78±1.12	10.9±1.68	10.0±0.00	6.58±2.59	10.6±2.45	10.4±6.67
SOD (% inhibition)	26.0±5.6	31.4±7.0	28.1±0.9	38.2±8.7	30.1±6.8	33.0±1.7

Mean values of triplicate groups; values are presented as mean ± SD. Values in the same row having different superscript letters are significantly different ($P< 0.05$).

Collection @ jeju

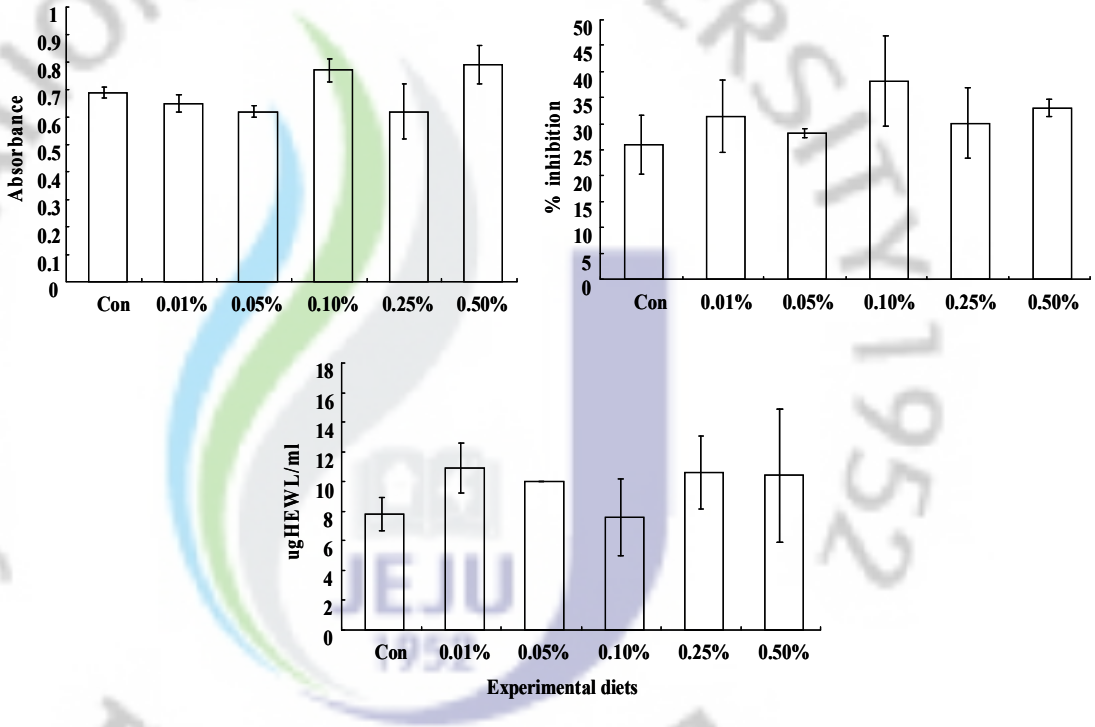

Fig. 9. Non-specific immune responses of olive flounder fed six experimental diets containing 6 different levels of fermented yeast glucan for 8 weeks

Collection @ jeju

IV. 고 찰

최근 β-glucan 이 어류의 성장과 면역활성에 미치는 영향에 대해서 많은 연구들이 수행되어 왔다. β-glucan 에 대한 연구는 투여방법, 투여기간, 어종 등 다양한 형태의 방법으로 시도되고 있으며 각 연구 결과 또한 다소 상이하게 나타나고 있다(Misra et al., 2006; Whittington et al., 2005; Couso et al., 2003). 본 연구의 연구결과를 살펴보면 넙치사료 내 발효처리한 글루칸(FG)을 첨가할 경우 넙치의 성장과 비특이적 면역활성 그리고 *S. iniae* 에 대한 질병저항성에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 하지만 실험 결과의 경향을 살펴보면 FG 가 0.05% 이상 첨가된 처리구의 경우 대조구에 비해 상대적으로 낮은 성장을 보이고 있으며 FG 가 0.25%이상 고농도로 첨가된 처리구는 이러한 경향이 더욱 뚜렷이 나타나는 것이 관찰되었다. 또한 FG 가 0.01% 첨가된 처리구의 성장 결과가 대조구에 비해 다소 높은 값을 나타내는 상승효과를 관찰할 수 있었다. Ai et al. (2007)의 연구결과에 따르면 large yellow croaker(*Pseudosciaena crocea*)의 사료내 β-1, 3 glucan 을 첨가하였을 때 저농도로 0.09%를 첨가한 실험구에서는 성장과 비특이적 면역활성 그리고 질병저항성이 유의적으로 증가하였으나 0.18% 고농도로 첨가된 실험구의 경우 아무런 유의적인 차이를 보이지 않았다고 보고하였다. 비록 첨가물질의 성분,

Collection @ jeju

첨가량, 실험어종에 차이가 있어 직접적인 비교는 어려우나 이와 같은 결과는 본 연구의 결과와도 유사한 결과라 할 수 있다. 본 연구에 사용된 FG 는 일반적으로 사용되는 β-glucan 을 농축한 것으로 약 10 배 높은 순도를 가지고 있다. 이러한 점을 감안한다면 본 연구결과와의 유사성이 한층 높다고 할 수 있다. 본 연구에서와 같은 어종인 넙치를 대상으로 수행된 연구결과 또한 사료내 β-glucan 의 적정 첨가농도를 0.05%이상 0.1%미만으로 보고하였다(Kim et al., 2006).

β-glucan 의 비특이적 면역활성에 대한 연구결과는 대부분 비특이적 면역활성에 효과가 있다는 것이다. 그러나 β-glucan 을 경구투여할 경우 lysozyme 활성에 효과가 없다는 보고도 있다(Verlhac et al., 1996; Ogier et al., 1996). 반면에 β-glucan 을 복강내 주사할 경우 lysozyme 활성이 증가된 것을 관찰할 수 있었다는 보고가 있다(Engstad et al., 1992; Misra et al., 2006). 이처럼 비특이적 면역활성에 대한 β-glucan 의 효과는 투여방법과 투여농도에 따라 그 결과가 다르게 나타나고 있다. 이는 아마도 투여방법뿐 아니라 실험환경, 어종 및 개체특성에 의해서도 좌우될지 모른다. 본 연구에서 나타난 비특이적 면역활성에 대한 분석결과는 FG 의 첨가에 따른 유의적인 차이를 나타내지 않았으며 모든 실험에서 뚜렷한 상관관계를 관찰할 수 없었다. 따라서 FG 의 사료내 첨가가 어류의 비특이적 면역활성에 미치는 영향에 대한 추가적인

Collection @ jeju

연구가 요구된다. 추후연구진행 시에는 다양한 관점에서 결과를 해석할 수 있는 많은 변수를 고려한 세밀하고 심도있는 실험디자인을 설계하여 수행되어야 할 것으로 판단된다.

결론적으로 넙치 사료내 0.25%를 초과한 FG 의 첨가는 넙치의 성장에 부정적인 영향을 미칠 것으로 추측된다. 따라서 넙치사료에서의 적정첨가 함량은 0.05% 이하가 되어야 할 것이며 본 연구에 사용된 FG 가 일반적인 β-glucan 에 비해 10 배 이상 농축된 점을 감안하였을 때 일반적인 β-glucan 의 적정 첨가 함량은 0.5% 이하가 되어야 할 것으로 사료된다.

Collection @ jeju

V. 요 약 문

발효 처리한 글루칸(FG)의 첨가가 넙치의 성장단계별 성장과 비특이적 면역활성 그리고 질병저항성에 미치는 영향을 조사하기 위해 사료내 FG 를 단계별로 첨가하여 연구를 수행하였다. 연구결과 사료내 FG 의 첨가는 넙치의 성장에 유의적인 영향을 미치지 못하며 0.05% 이상 첨가할 경우 성장이 다소 감소되는 경향을 관찰 할 수 있었다. 비특이적 면역활성을 분석한 결과 모든 실험에서 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다. 하지만 Exp-II 과 Exp-III 의 0.5% 첨가 실험구에서 NBT 와 lysozyme 활성이 각각 약 10% 그리고 14-25% 증가되는 것을 관찰 할 수 있었다. 공격실험 결과 Exp-I 과 Exp-II 모두 FG 가 고농도로 첨가된 0.5% 실험구의 생존율이 가장 낮게 나타났으며 FG 가 단계별로 첨가된 실험구 모두 대조구에 비해 낮은 생존율을 나타내었다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 넙치 사료내 FG 의 적정 첨가농도는 0.05% 이하가 되어야 할 것으로 판단되며 이 연구에 사용된 FG 가 일반적인 β-glucan 에 비해 10 배 이상 농축된 점을 감안할 때 넙치 사료내 일반적인 β-glucan 의 적정 첨가 농도는 0.5%이하가 되어야 할 것으로 사료된다.

Collection @ jeju

VI. 참고문헌

Ai, Q., Mai, K., Zhang, M. L., Tan, B., Zhang, W., Xu, W. and Li, H. 2007. Effect of dietary β-1, 3 glucan on immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. Fish Shellfish Immunol. 22, 333–345.

Anderson, D.A. 1992. In vitro immunization of fish spleen sections and NBT, phagocytic, PFC and antibody assays for monitoring the immune response. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Kaatari, S.L., Rowley, A.F. (Eds.), Techniques in Fish Immunology. SOS Publications, Fair Haven, NJ, pp. 79– 88.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 1995. Official Methods of Analysis.

Brown, B.A., 1980. Routine hematology procedures. In: Brown, B.A. (Ed.), Hematology, Principles and Procedures, Lea and Febiger, Philadelphia, PA, USA, pp. 71–112.

Cook, M.T., Hayball, P.J., Hutchinson,W., Nowak, B.F. and Hayball, J.D. 2003. Administration of a commercial immunostimulant preparation, Ecoactiva as a feed supplement enhances macrophase respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. Fish Shellfish Immunol. 14, 333–345.

Couso, N., Castro, R., Magarinos, B., Obach, A. and Lamas, J. 2003. Effect of oral

dCollection @ jeju

administration of glucans on the resistance of gilthead seabream pasteurellosis. Aquaculture. 219, 99–109

Daniels, C. L., Merrifield, D. L., Boothroyd, D. P., Davies, S. J., Factor, J. R. and Arnold, K. E. 2010. Effect of dietary *Bacillus* spp. And mannan oligosaccharides (MOS) on European lobster (*Homarus gammarus* L.) larvae growth performance, gut morphology and gut microbiota. Aquaculture. 304, 49–57.

Engstad, R. E., Robertson, B. and Frivold, E. 1992. Yeast glucan induce increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish Shellfish Immunol. 2, 287−297.

Folch, J., Lee, M. and Sloane-Stanley, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497–509.

Heo, M. S., Song, C. B., Lee, J., Yeo, I. I., Jeon, Y. J., Lee, J. J., Chung, S. C., Lee, K. W., Rho, S., Choi, K. S. and Lee, Y. D. 2001. Characteristic of β-*Streptococcus* spp. Isolated in cultured flounder (*Paralichthys olivaceus*) of jeju Island. J. Kor. Fish Soc. 34, 365–369.

Hultmark, D. 1980. Insert immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of hyalophora cecropia. Eur. J. Biochem. 106, 7–16.

Collection @ jeju

Kim, S., Song, J., Lim, S., Jeong, J. B., Jeon, Y. J., Yeo, I. K. and Lee, K. J. 2010. Effects of dietary supplementation of fermented garlic powder on lmmune responses blood components, and disease resistance against principal fish disease of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in low temperature season. Journal of Animal Science and Technology. 52, 337–346.

Kim, Y., Kim, K., Lee, S., Park, G., Okorie, O. E., Kang, Y. J. and Bai, S. C. 2006. Effects of dietary β-1,3 glucan on growth and immune responses in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Kor. Aquaculture Soc. 19, 247-253.

Kumari, J. and Sahoo, P. K. 2005. Effects of cyclophosphamide on the immune system and disease resistance of Asian catfish *Clasrias batrachus*. Fish Shellfish Immunol. 19, 307–16.

Liu, K., Chiu, C., Shiu, Y., Cheng, W. and Liu, C. 2010. Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. Fish Shellfish Immunol. 28, 837–844.

Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, 2011. Aquaculture Statistic from Ministry of Maritime Affairs and Fisheries.

Misra, C. K., Das, B. K., Mukherjee, S. C. and Pattnaik, P. 2006. Effect of long term administration of dietary β-glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita*

Collection @ jeju

fingerlings. Aquacultuer. 255, 82–94

NRC (National Research Council), 1993. Nutritional Requirements of Fish. National Academy Press, Washington, DC, USA.

Ogier, D. B. M., Quentel, C., Fournier, V., Lamour, F. and Le Gouvello, R. 1996. Effect of long-term oral administration of ß-glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some nonspecific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. Dis. Aquatic Organisms. 26, 139−147.

Robertsen, B., Rorstad, G., Engstad, R. and Raa, J. 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. by a glucan from *Succhuromyces cereuisiae* cell walls. J. Fish Dis. 13, 391-400.

Siwicki, A.K., Anderson, D.P. and Rumsey, G.L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protects against furunculosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 41, 125-139.

Verlhac, V., Jacques, G., Alex, O., Willy, S. and Reid, H. 1996. Influense of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture. 143, 123−133.

Whittington, R., Lim, C. and Klesius, P. H. 2005. Effect of dietary h-glucan levels on the growth response and efficacy of Streptococcus iniae vaccine in Nile tilapia,

Collection @ jeju

Oreochromis niloticus. Aquaculture. 248, 217−225.

Collection @ jeju

감사의 글

석사기간을 마무리하면서 석사학위논문 뒤편에 감사의 글을 적고 있다는게 실감이 나질 않습니다. 참 많은 추억과 미련을 남기는 것 같습니다. 제가 석사학위를 무사히 마칠 수 있게 도와주신 분들이 너무나 많습니다. 먼저 저를 학문에 길로 인도해 주시고 항상 진심 어린 배려와 관심을 아끼지 않으셨던 인생의 스승이자 지도교수님이신 이경준 교수님께 존경과 감사의 마음을 전하고 싶습니다. 바쁘신 와중에도 제 석사학위논문 심사를 위해 고생하신 이영돈 교수님 정준범 교수님 그리고 석사과정 동안 많은 가르침을 주신 이기완 교수님, 송춘복 교수님, 최광식 교수님, 이제희 교수님, 허문수 교수님, 여인규 교수님, 전유진 교수님, 김기영 교수님, 정석근 교수님, 이승헌 교수님께도 감사의 말씀 전합니다.

양어사료영양학연구실에 관련된 일이라면 언제나 큰 힘을 보태주시는 큰 형님이신 장계환 선배님, 저의 모자란 부분을 채울 수 있게 도와주신 박영준 선배님 그리고 먼 미국에서 응원해 주신 이봉주 선배님께도 감사의 말씀 드립니다. 형이 없는 저에게 언제나 친형제 같이 많은 도움을 주신 세진이 형, 성삼이 형, 지훈이 형 그리고 성격 급한 나의 실수를 말없이 도와준 진우, 시간이 지나도 한결 같은 호관이, 바쁜 연구실 일들을 불평 없이 도와준 현석이, 정목이, 초롱이, 지미 이러한 식구들이 있었기에 지금 이 시간이 저에게 있는 것 같습니다. 끝으로 말로는 감사의 마음을 표현하기 어려운 사랑하는 부모님과 저를 항상 자랑스럽게 생각해 주시는 이모에게 감사드립니다.

dCollection @ jeju