J. of Aquaculture
Vol. 16(1) : 1-7, 2003

한국양식학회지
Journal of Aquaculture
©Korean Aquaculture Society

외과적 수술에 의한 송어의 혈장 아미노산 농도 측정을 이용한 아미노산 요구량 설정 모델 개발에 관한 기초연구

배승철* · 옥임호 · 박건준 · 김강웅[1] · 최세민
부경대학교 양식학과/사료영양연구소, [1]국립수산과학원

Development of Modeling System for Assessing Essential Amino Acid Requirements Using Surgically Modified Rainbow Trout

Sungchul C. Bai*, Im-Ho Ok, Gun-Jun Park, Kang-Woong Kim[1] and Se-Min Choi
Department of Aquaculture/Feeds & Foods Nutrition Research Center, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea
[1]National Fisheries Research & Development Institute, Busan 619-900, Korea

A new technique combining forced-feeding and dorsal aorta cannulation was developed to monitor concentration of nutritions in the blood circulation and their metabolites in rainbow trout. To study the effect of dorsal aorta cannulation on stress, 30 rainbow trout (523±5.4 g; Mean±SD) were divided into 6 groups of 5 individuals each. A group was anesthetized and blood samples were taken at 0, 3, 6, 12, 24 or 48 h after dorsal aorta cannulation. Hematocrit peaked at 6 h and returned to 0 values by 12 h after dorsal aorta cannulation. Plasma cortisol and glucose concentrations also peaked at 6 h and returned to 0 values by 48 h after dorsal aorta cannulation. Based on the plasma cortisol and glucose concentrations, the rainbow trout recovered from the operation of dorsal aorta cannulation within 48 h. To compare the patterns of plasma free amino acid concentrations after force-feeding in the fish with dorsal aorta cannulation, 5 dorsal aorta cannulated individuals (511±6.2 g) were kept in a cage. After 48 h starvation, they were anesthetized and blood samples were taken at 0, 4, 8, 12, 24, 36 or 48 h after forced-feeding. The concentration of all plasma free amino acids, except isoleucine, leucine, phenylalanine, and tryptophan, also peaked at 4 h and returned to 0 values by 24 h after feeding. The combined technique allows forced-feeding and repeated sampling of blood in rainbow trout with minimum stress.

Keywords: Essential amino acid, Rainbow trout, Forced-feeding, Dorsal aorta cannulation

서 론

혈장내 유리 아미노산을 지표로 하여 사료내 필수 아미노산의 요구량 추정에 대한 연구는 연어과 어류(Walton et al., 1986; Kaushik et al., 1988), channel catfish(Robinson et al., 1981)와 red drum(Barziza et al., 2000)을 대상으로 수행되어져 왔다. 상기의 실험들은 혈장내 유리 아미노산 농도와 성장결과를 사료내 아미노산 요구량 추정 지표로 사용하였다. 그러나 성장결과와 달리 사료내 아미노산 수준이 증가함에 따라 혈장내 유리 아미노산의 농도가 함께 직선적으로 증가하거나, 같은 실험구간에 큰 편차를 보이고 있다.

무지개송어의 혈장내 유리 아미노산 농도 변화에 관한 연구는 사료공급 및 혈액채취 방법에 따라 혈장내 각 유리 아미노산의 최대농도수치 및 변화패턴에 많은 차이를 보이고 있다 (Walton and Wilson, 1986; Murai et al., 1987; Cowey and Walton, 1988; Schuhmacher et al., 1993, 1997). 이와 같이 실험사료 공급시 각 개체가 어체중당 동일한 양을 섭취하는 것이 아니라 섭취량에 차이를 보인다. 그리고, 미부동맥에서의 혈액채취에는 다음과 같은 문제점을 가지고 있다. 첫째, 스트레스는 여러 가지 영양소의 대사에 영향을 준다. 둘째, 같은 개체에서 계속해서 혈액의 채취가 불가능하기 때문에 많은 수의 어류와 실험공간이 필요하다. 이러한 문제들로 인해 각 개체마다 혈장내 유리 아미노산의 변화 패턴 및 농도에 편차를 줄 수 있어 혈장내 유리 아미노산의 측정으로 필수 아미노산의 요구량 추정 연구가 실효성을 거두지 못하고 있다.

Schuhmacher et al.(1997)과 Deng et al.(2000)은 각 개체에

*Corresponding author: scbai@mail.pknu.ac.kr

어체중 당 동일한 양의 실험사료를 공급할 수 있는 방법으로 위내 강제 투여방법을 이용하고, 그 결과 혈장내 유리 아미노산과 글루코스의 대사와 관련하여 기존의 사료공급방법에 비해 보다 안정된 결과를 보여주고 있다. 대동맥 삽입방법(Dorsal aorta cannulation)이 무지개송어와 철갑상어를 대상으로 동일한 각 어류개체에서 혈액의 반복된 샘플을 가능하게 하였고(Soivio et al., 1972; Deng et al., 2000), 이 방법은 혈액채취에 따른 스트레스를 감소시켜줄 수 있다고 한다(Woodward, 1982). 이러한 위내 강제투여 방법과 대동맥 삽입방법은 무지개송어의 혈장내 유리 아미노산 대사와 관련한 연구를 디자인하는데 유용한 방법임을 명백히 보여주고 있다.

따라서, 본 연구에서는 무지개송어를 대상으로 대동맥 삽입관을 부착한 후 스트레스와 관련한 생리화학적 반응을 조사하고, 혈장내 유리 아미노산의 농도 비교를 통해 사료 영양학적 연구의 새로운 방법론을 제시하고, 사료내 아미노산의 요구량 설정 모델 개발을 위한 기초연구로서 대동맥 삽입방법의 적용 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

실험어 및 실험조건

실험 I. 대동맥 삽입관의 부착이 스트레스 반응에 미치는 영향

본 실험은 대동맥 삽입관 부착후 스트레스에서 회복되는 시간을 알아보았다. 실험어는 무지개송어 523±5.4 g을 사용하였으며, 1.3×1.3×1.3 m 그물케이지에 5마리씩 수용한 후 실험환경에 적응시키기 위해 3일간 상업용 사료를 공급하였다. 그물케이지는 유수식 콘크리트 수조에 배치하였고 유수량은 60 L/min이었다. 충분한 산소공급을 위해 수차를 설치하였고 실험기간 동안 용존산소량은 7.4±0.7 mg/L이었으며, 평균수온은 17±0.2℃이었다.

실험 II. 대동맥 삽입관을 부착한 무지개송어의 혈장내 유리 아미노산 농도 변화

무지개송어 504±7.8 g을 사용하였으며, 기타 조건은 실험 I과 같았다.

대동맥 삽입관 부착

실험 I. 대동맥 삽입관의 부착이 스트레스 반응에 미치는 영향

실험어는 플라스틱 사각수조(40×60×30 cm, 수용량 60 L)에서 200 mg/L 수준의 3-aminobenzoic acid ethyl ester methansulfonate(MS 222, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)에 3~5분 동안 수용하여 마취하였다. 대동맥 삽입은 마취한 상태에서 V자형의 수술대에서 실시하였다. 수술하는 동안 MS-222 100 ppm의 물을 아가미를 통해 계속 공급하였다. 대동맥 삽입관 부착은 10~15분 정도 소요되었으며, 수술 후 그물 케이지에 재수용하였다. 구체적인 대동맥 삽입방법은 다음과 같다.

① V형의 아크릴 수술대에 마취된 어류를 배를 위쪽으로 올리고 입을 벌린 상태에서 MS-222 100 ppm의 물을 아가미를 통해 실리콘 튜브로 수술이 끝날 때까지 계속해서 공급한다.

② 13 gauge needle을 이용하여 콧구멍을 뚫고 콧구멍 연결관(Clay Adams PE 250 tubing, Parsippany, NJ)을 꽂는다.

③ 19 gauge needle을 이용하여 입천정 아가미 3번째뒤 중간라인에 30° 각도로 구멍을 낸다.

④ Cortland saline solution(Houston, 1990)으로 세척된 약 50 cm의 대동맥 삽입관(Clay Adams PE 50 tubing, Parsippany, NJ) 안에 피아노줄을 약 1.5~2 mm 정도 나오도록 하여 끼운다.

⑤ 피아노줄이 끼워진 대동맥 삽입관을 입천정에 뚫은 구멍을 통하여 척추에 도달할 때까지 삽입한다.

⑥ 피아노줄과 대동맥 삽입관 사이로 혈액이 올라오면 대동맥 삽입관을 밀어 피아노줄과 일직선이 되게 하여 혈관안으로 1.5 cm정도 밀어 넣는다.

⑦ 피아노줄을 대동맥 삽입관으로부터 빼내고 콧구멍 연결관을 통해 머리위쪽으로 뺀다.

⑧ 대동맥 삽입관에 1 ml 주사기와 23 gauge needle을 이용하여 Cortland saline solution을 채우고 막는다.

⑨ 대동맥 삽입관이 움직이지 않도록 입천정에 봉합선으로 고정한다.

⑩ PE 250을 통해 나온 대동맥 삽입관이 입안쪽에 고정이 되면, 어류의 등지느러미에 다시 봉합, 고정한다.

실험 II. 대동맥 삽입관을 부착한 무지개송어의 혈장내 유리 아미노산 농도 변화

실험 I과 동일한 방법으로 실시하였다.

실험 디자인

실험 I. 대동맥 삽입관의 부착이 스트레스 반응에 미치는 영향

대동맥 삽입관을 부착한 30마리의 실험어를 혈액샘플 시간대별로 5마리씩 총 6개의 그룹으로 나누어 1.3×1.3×1.3 m 그물케이지에 무작위 배치하였다. 혈액샘플은 대동맥 삽입관 부착후 0, 3, 6, 12, 24와 48시간에 각 실험구별로 5마리씩 혈액을 채취하였다.

실험 II. 대동맥 삽입관을 부착한 무지개송어의 혈장내 유리 아미노산 농도 변화

대동맥 삽입관을 부착한 무지개 송어의 혈장내 유리 아미노산 농도 변화패턴을 알아보기 위해 실시하였다. 대동맥 삽입관을 부착한 5마리의 실험어를 1.3×1.3×1.3 m 그물케이지에 배치하였다. 대동맥 삽입관 부착에 따른 스트레스에서 회복시키기 위해 실험어를 48시간동안 절식시켰다. 48시간의 절식 후 기초사료를 어체중의 1%(건물기준)를 위내 강제 공급하였다. 혈액샘플은 기초사료를 위내 강제 투여한 후, 동일한 각 개체에서 0, 4, 8, 12, 24, 36과 48시간에 연속적으로 반복해서 혈액을 채취하였다. 기초사료의 강제투여 및 혈액 샘플을 위해서 MS-222 200 ppm에 실험어를 마취하였다. 기초사료의 조성과 아미노산 조성은 Table 1과 2에 각각 나타내었다. 기초사료는

Table 1. Composition of the basal diet[1]

Ingredient	Dry Matter (%)
EAA[2]	17.27
NEAA[3]	12.36
Casein[4]	5.00
Gelatin[4]	2.00
Dextrin[4]	27.97
Dextrose[4]	5.00
Cellulose[4]	8.20
Fish oil[5]	10.00
Carboxymethyl cellulose[4]	1.00
$Ca(H_2PO_4)_2H_2O$	3.00
Choline bitartrate[4]	1.20
Vitamin mixture[6]	3.00
Mineral mixture[7]	4.00

[1]Diets were neutralized with NaOH to give a final pH 6.6
[2]EAA=Essential amino acids, Ajinomoto, Tokyo, Japan
[3]NEAA=Non-Essential amino acids, Ajinomoto, Tokyo, Japan
[4]United States Biochemical (USB), Cleveland, Ohio
[5]Ewha Oil Company, Busan, Korea
[6]Vitamin mixture(mg·kg^{-1} feed unless indicated otherwise): A, 3000 IU; D_3, 2400 IU; E, 120 IU; menadione sodium bisulfate, 6; B_1-HCl, 15; B_2, 30; B_6-HCl, 15; B_{12}, 0.06; C, 300; calcium pantothenate, 150; nicotin amide, 150; inositol, 150; d-biotin, 1.5; choline chloride, 3000; pancreatin, 12.5. Individual vitamins purchased from USB, Cleveland, Ohio
[7]Mineral mixture (mg·kg^{-1} feed): $MnSO_4$, 320; $ZnSO_4$, 270; $FeSO_4$, 750; $CuSO_4$, 60; $CoSO_4$, 7; $MgSO_4$, 17.3; K_2SO_4, 212; NaCl, 519; K_2HPO_4, 36; $NaSeO_3$, 0.01; KI, 0.15. Individual minerals purchased from Junsei Chemical, Tokyo, Japan

Table 2. Amino acid composition of the basal diet (% of dry diet)

Amino acid	Casein + gelatin	Crystalline amino acids	Total[1]
EAA			
Arginine	0.353	1.924[2]	2.277
Histidine	0.194	0.725	0.919
Isoleucine	0.252	1.674	1.926
Leucine	0.493	2.702	3.195
Lysine	0.502	1.904	2.406
Methionine	0.152	1.030	1.182
Cystine	0.019	0.172	0.191
Phenylalanine	0.271	1.742	2.013
Tyrosine	0.270	1.335	1.605
Threonine	0.221	1.601	1.822
Trptophan	0.065	0.462	0.527
Valine	0.350	1.999	2.349
NEAA			
Alanine	0.345	1.741	2.086
Aspartic acid	0.483	3.280	3.763
Glycine	0.538	0.758	1.296
Glutamic acid	1.298	3.616	4.914
Proline	0.790	0.568	1.358
Serine	0.374	2.398	2.772

[1]The amino acid profile simulated that of 35% whole chicken egg protein (Robinson et al., 1981).

Kim et al.(1992)의 자료를 참고하여, 조단백 36.6%로 제작하였으며 결정체 아미노산 29.6%, 단백질 공급원으로 Casine과 Gelatin을 7%를 사용하였다. 사료원은 oil과 혼합한 후 사용하기 전까지 -80°C에서 보관하였다. 기초사료의 공급은 사료원과 증류수를 1 : 0.4의 비율로 혼합하여 MS 222 200 ppm에 마취한 후, 3 ml 주사기를 이용하여 위내 강제 투여하였다.

샘플 채취 및 분석

실험 I. 대동맥 삽입관의 부착이 스트레스 반응에 미치는 영향

혈액샘플은 실험어를 200 ppm MS-222에 마취한 후 채취하였다. 혈액은 대동맥 삽입관을 통하여 3 ml 주사기로 채취하였다. 각 개체별로 채취한 혈액은 튜브에 분주하였으며, 이중 혈액성상 분석용 시료는 혈액 분석기(Excell 500, USA)로 헤마토크리트(hematocrit; Ht), 헤모글로빈(hemoglobin; Hb)과 적혈구수(red blood cell; RBC)를 측정하였다. 나머지는 상온에서 20분간 방치한 뒤, 원심분리(3000 g, 5분)에 의해 혈장을 분리하여 -70°C에 보관하면서 코티졸과 글루코스 등의 분석에 사용하였다. 혈장내 코티졸 농도는 cortisol RIA kit(DSL, USA)를 사용하여 항원 · 항체반응을 유도한 다음, Wizard 1470 γ-counter (Hewlett Packard, USA)를 사용하여 radioimmunoassay(RIA)로 분석하였다. 삼투질 농도는 Na염의 함유량에 따라 동결점이 다른 것을 응용하여 micro osmometer를 사용하여 측정하였고 (3MO, USA), 혈장내 젖산, 글루코스, chloride, sodium, potassium과 총단백질은 건식생화학분석기(Kodak, USA)로 분석하였다.

실험 II. 대동맥 삽입관을 부착한 무지개송어의 혈장내 유리 아미노산 농도 변화

혈액샘플은 실험어를 MS-222 200 ppm에 마취한 후, 대동맥 삽입관을 통하여 1 ml 주사기로 각 시간대별로 200 μl씩 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 원심분리한 혈장내 단백질을 제거하기 위하여 혈장과 10% 5-sulphosalicylic acid를 4:1 비율로 혼합하여 30분간 냉장상태로 보관한 후 다시 원심분리하였다. 단백질이 제거된 상층액을 pH 2.2 lithium citrate buffer와 1:1로 혼합하고 0.22 μm의 polycarbonate filter로 여과하여 분석전까지 -80°C에서 보관하였다. 혈장내 유리 아미노산의 분리 및 정량은 Amino acid analyzer S433(Sykam, Germany)을 이용하여 Ninhydrin법으로 분석하였다. 분석조건은 다음과 같다: Column size; 4 mm× 150 mm, Absorbance; 570 nm 440 nm, Reagent flow rate; 0.25 ml/min, Buffer flow rate; 0.45 ml/min, Reactor temperature; 120, Reactor Size; 15 m.

통계처리

실험 I, II의 각 측정항목의 data는 Computer Program Statistix 3.1(Analytical Software, St. Paul, MN. USA)로 ANOVA(Analysis of variance) test를 실시하여 최소유의차검정(LSD: Least Significant Difference)으로 평균간의 유의성을 검정하였다.

Table 3. Hematocrit (Ht), hemoglobin (Hb) and red blood cell (RBC) from rainbow trout after dorsal aorta cannulation[1]

	Time (h) after dorsal aorta cannulation						Pooled SEM[2]
	0	3	6	12	24	48	
Ht (%)	25.7[b]	29.2[a]	30.0[a]	27.8[b]	26.3[b]	25.4[b]	3.23
Hb (g/dl)	25.0	25.5	21.5	23.1	25.8	23.7	2.16
RBC ($\times 10^6$cell/μl)	1.30	1.21	1.34	1.42	1.45	1.32	1.01

[1]Values are means (n=5) where the means in each row with a different superscript are significantly different (P<0.05).
[2]Pooled standard error of mean.

Table 4. Plasma cortisol, glucose and total protein levels from rainbow trout after dorsal aorta cannulation[1]

	Time (h) after dorsal aorta cannulation						Pooled SEM[2]
	0	3	6	12	24	48	
Cortisol (ng/ml)	35[d]	123[b]	195[a]	109[b]	82[c]	38[d]	11.2
Glucose (mg/ml)	71[c]	97[b]	122[a]	79[c]	98[b]	63[d]	7.68
Total % Protein (mg/ml)	36	40	35	31	34	32	2.14

[1]Values are means (n=5) where the means in each row with a different superscript are significantly different (P<0.05).
[2]Pooled standard error of mean.

Table 5. Plasma osmolality (OSM), Na, K and Cl levels from rainbow trout after dorsal aorta cannulation[1]

	Time (h) after dorsal aorta cannulation						Pooled SEM[2]
	0	3	6	12	24	48	
OSM (mOsm/kg)	295	312	332	284	303	286	15.6
Na (mEq/l)	135	132	131	124	129	131	7.21
K (mEq/l)	3.4	4.8	3.2	2.5	3.4	2.9	1.64
Cl (mEq/l)	96	89	88	78	87	86	5.43

[1]Values are means (n=5) where the means in each row with a different superscript are significantly different (P<0.05).
[2]Pooled standard error of mean.

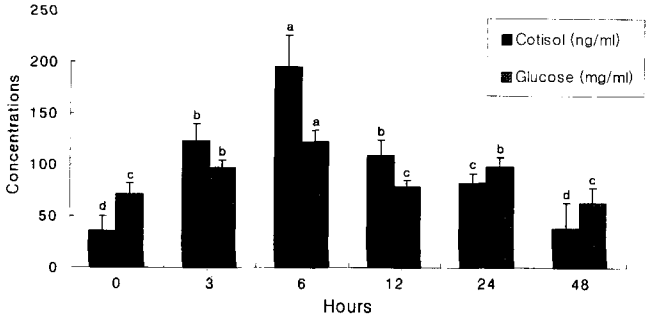

Fig. 1. Plasma cortisol and goucose concentrations at the commencement (0 hr) and increments after dorsal aorta cannulation.

결 과

실험 I. 대동맥 삽입관의 부착이 스트레스 반응에 미치는 영향

대동맥 삽입관 부착이 무지개송어의 스트레스에 미치는 생리화학적 결과는 Table 3, 4 및 5에 나타내었다. 혈액내 헤마토크리트(Ht)는 대동맥 삽입관을 부착한 후 6시간에 최대치를 보였고, 12시간에 최초수준으로 돌아와 48시간까지 유지되었다. 헤모글로빈(Hb)과 적혈구수(red blood cell; RBC)는 대동맥 삽입관을 부착한 후 48시간 동안 큰 변화를 보이지 않았다. 혈장내 코티졸과 글루코스는 대동맥 삽입관을 부착한 후 3시간에 증가하기 시작하여 6시간에 최대치를 보였고(P<0.05), 48시간에 최초수준으로 돌아왔다. 혈장내 총 단백질 함량은 31.4~39.6 mg/ml로 유의적인 차이를 보이지 않았다(P>0.05). 혈장내 삼투압, 혈장의 전해질인 Na, K과 Cl 농도는 대동맥 삽입관을 부착한 후 48시간 동안 큰 변화를 보이지 않았다.

실험 II. 대동맥 삽입관을 부착한 무지개 송어의 혈장내 유리 아미노산 농도 변화

대동맥 삽입관을 부착한 무지개송어에 기초사료를 투여한 후의 혈장내 유리 아미노산의 농도는 Table 6에 나타내었다. 혈장내 arginine, histidine, lysine, methionine, threonine, valine과 glutamic acid의 농도는 사료공급 후 4시간에 최대치를 보였고, 8~24시간사이에 기본수준으로 돌아와 48시간까지 유지되었다. 혈장내 isoleucine, leucine, phenylalanine과 tryptophan의 농도는 사료공급 후 4시간에 최대치를 보였고, 8~24시간 사이에 감소하여 48시간까지 일정하게 유지되었다. 혈장내 glycine은 사료공급 후 4~8사이에 감소하여 12시간에 최대치를 보였고 24시간에 최초수준으로 돌아왔다. 혈장내 alanine과 aspartic acid의 농도는 사료공급 후 4시간에 최대치를 보였고 48시간에 최초농도로 돌아왔다.

Table 6. Plasma free amino acid concentrations (nmol/ml) from fish with dorsal aorta cannulation after force-feeding the basal diet[1]

Amino acids	Time (h) after force-feeding							Pooled SEM[2]
	0	4	8	12	24	36	48	
EAA								
Arginine	102^{b}	668^{a}	354^{b}	245^{b}	195^{b}	145^{b}	212^{b}	36.2
Histidine	141^{b}	327^{a}	150^{b}	93^{b}	94^{b}	91^{b}	135^{b}	14.6
Isoleucine	113^{c}	654^{a}	465^{b}	327^{c}	273^{cd}	216^{d}	175^{d}	33.3
Leucine	152^{e}	738^{a}	688^{b}	612^{c}	275^{d}	254^{d}	310^{d}	44.1
Lysine	637^{bc}	$1,257^{a}$	$1,019^{ab}$	767^{abc}	707^{bc}	417^{c}	753^{bc}	50.7
Methionine	273^{b}	628^{a}	515^{a}	522^{a}	277^{c}	218^{c}	272^{c}	42.3
Phenylalanine	132^{c}	792^{a}	672^{b}	534^{c}	232^{d}	194^{d}	212^{d}	47.8
Threonine	253^{c}	641^{a}	437^{b}	392^{b}	274^{c}	252^{c}	206^{d}	27.2
Tryptophan	8^{e}	31^{a}	27^{b}	19^{c}	12^{d}	11^{d}	12^{d}	2.12
Valine	175^{d}	432^{a}	318^{b}	233^{c}	195^{cd}	154^{e}	176^{d}	19.2
NEAA								
Alanine	567^{e}	$1,105^{a}$	984^{b}	842^{c}	727^{d}	682^{d}	593^{e}	38.3
Aspartic acid	563^{e}	$1,087^{a}$	872^{b}	784^{c}	813^{bc}	721^{d}	594^{e}	31.7
Glycine	653^{c}	582^{cd}	472^{d}	899^{a}	724^{b}	632^{c}	474^{d}	27.5
Glutamic acid	351^{c}	$1,171^{a}$	983^{b}	725^{c}	513^{d}	479^{d}	452^{d}	54.4
Serine	251^{e}	914^{a}	783^{b}	561^{c}	541^{c}	411^{d}	395^{d}	47.2
Tyrosine	81^{d}	401^{a}	195^{b}	212^{b}	105^{c}	93^{cd}	87^{d}	22.6

[1]Values are means (n=5) where the means in each row with a different superscript are significantly different ($P<0.05$).
[2]Pooled standard error of mean.

고 찰

최근 어류의 스트레스 연구는 스트레스에 대한 반응, 생식능력 및 시상하부-뇌하수체-간신선 축을 통한 대사생리 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 어류는 외부환경의 변화에 따라 어느 정도는 스트레스를 극복할 능력을 가지고 있으나, 임계수준을 넘어선 스트레스는 어체의 생리활성을 떨어뜨림으로써 건강도를 약화시킬 수 있다고 보고하고 있다(Batton and Iwama, 1991).

대동맥 삽입방법이 무지개송어의 스트레스에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험 I에서 실험개시시 혈장내 코티졸 농도는 35.2 ng/ml로 연어과 어류에서 안정상태이거나 스트레스를 받지 않은 상태에서의 혈장내 코티졸 수준인 30~40 ng/ml과 유사한 결과를 보여주었다(Wedemeyer et al., 1990).

무지개송어의 혈장내 코티졸과 글루코스의 농도가 대동맥 삽입관 부착 후 3시간에 증가하여 6시간에 최대치를 보여 대동맥 삽입관 부착에 따른 스트레스 영향이 인정된다. 하지만 대동맥 삽입관 부착 후 48시간에 안정된 수준으로 돌아와 대동맥 삽입관 부착에 따른 스트레스에서 회복됨을 보여주었다. 철갑상어에 있어 대동맥 삽입관 부착 후 혈장내 코티졸 농도가 6시간에 최대치를 보이고 이후 감소하기 시작하여 24시간에 대동맥 삽입관 부착 전 수준으로 되돌아 왔으며, 혈장내 글루코스는 대동맥 삽입관 부착 후 6시간에 증가하기 시작하여 12시간에 최대치를 보였고 48시간에 대동맥 삽입관 부착전 수준으로 되돌아온다고 보고하고 있어(Deng et al., 2000), 본 실험과 유사한 결과를 보여 주고 있다.

포유류에서는 쥐(Young and Zamora, 1968), 돼지(Puchal et al., 1962), 개(Longenecker and Hause, 1961)와 인간(Young and Scrimshaw, 1970)의 경우 여러 가지 필수 아미노산이 사료공급 후 12~24시간에 최초수준으로 돌아온다고 보고되고 있다. 실험 II에서 대동맥 삽입관을 부착한 무지개 송어에 있어 혈장내 대부분의 유리아미노산 농도가 사료공급 후 4시간에 최대치를 보였고 24시간에 최초수준으로 돌아와 포유류와 유사한 결과를 보였다. 나아가, Murai et al.(1987)과 Schuhmacher et al.(1997)은 무지개 송어에 있어 결정체 아미노산 사료를 위내 강제 투여한 후, 혈장내 arginine, leucine, isoleucine, valine, phenylalanine과 threonine의 농도가 6시간에 최대치를 보였고, 24시간에 최초수준으로 돌아온다고 보고와 일치하였다. 하지만, Yamada et al.(1981)은 카제인을 주 단백질원으로한 사료를 공급한 경우 혈장내 유리 아미노산의 농도가 사료공급 후 24~36시간에 최대치를 나타낸다고 보고하였고, Walton and Wilson(1986)은 혈장내 유리 아미노산이 사료공급 후 12시간에 최대치를 보인다고 보고하고 있다. 이러한 결과는 절식기간과 사료의 강제투여로 인한 스트레스와 관련하여 아미노산의 소화흡수가 지연되어 혈장내 유리 아미노산이 최대치를 보이는 시간이 12시간 늦어진 것으로 사료된다(Walton and Wilson, 1986, Cowey and Walton, 1988).

스트레스는 여러 어류에서 체내 단백질 이화작용을 증가시켜 짧은 시간내에 혈장내 유리 아미노산 농도를 증가시키고 아

미노산을 에너지원으로 사용하여 스트레스에서 회복한다. 단백질원에 있어서 결정체 아미노산을 기초로 제작한 사료는 카제인과 같이 정제 단백질(intact protein)을 기초로 제작된 사료보다 빨리 혈장내 유리 아미노산 농도가 최대치를 보인다. 이러한 이유는 정제 단백질이 위장계에서 소화효소에 의해 각각의 아미노산으로 분해가 된 후 장에서 흡수가 이루어져 혈액내로 들어가게 되지만, 결정체 아미노산은 이러한 과정 없이 바로 장에서 빨리 흡수되어 이화되기 때문이다(Schuhmacher et al., 1997; Rodehutscord et al., 2000; Kim et al., 2001). 그리고 단백질원을 에너지로 잘 이용하는 어류의 경우 혈장내 아미노산의 흡수가 사료내 에너지원과 에너지 수준과도 관련이 있다고 보고하였다(Ogino and Takeuchi, 1976; Pfeffer, 1982).

상기 결과를 토대로, 위내 사료 강제 공급방법과 대동맥 삽입은 무지개송어의 혈액내 사료 영양학적 연구에 적용이 가능함을 보여주었다. 따라서 본 실험의 결과, 위내 사료 강제 공급방법, 대동맥 삽입방법과 혈장내 유리아미노산의 농도 측정을 통하여 필수 아미노산 요구량 추정을 위한 실험디자인의 개발이 가능함 보여주었다. 지금까지 막대한 비용과 시간을 들여 행하여 온 필수 아미노산 요구량 추정 및 단백질원의 질 평가 실험에 상기의 실험모델이 사용 가능할 것이다. 그리고 향후 어류영양 및 생리, 혈액학적 연구와 어병분야에 상기 연구방법이 적용 가능할 것이다.

요 약

무지개송어의 대동맥에 삽입관을 부착한 후 스트레스와 관련된 생리화학적 반응을 조사하였고, 실험사료의 위내 강제공급 후 혈장내 유리 아미노산의 농도변화를 비교하였다. 무지개송어에 있어 아미노산의 요구량 설정 모델 개발을 위한 기초연구로서 사료 영양학적 연구를 위한 새로운 사료공급 및 혈액채취 방법의 개발을 위하여, 강제투여 및 대동맥 삽입방법의 적용 가능성을 조사하였다. 스트레스와 관련된 생리화학적 반응조사에 있어서 혈액내 헤마토크리트(Ht)는 6시간에 최대치를 보였고, 12시간에 최초수준으로 돌아와 48시간까지 유지되었고 혈장내 코티졸과 글루코스는 3시간에 증가하기 시작하여 6시간에 최대치를 보였으며($P<0.05$), 48시간에 최초수준으로 돌아왔다. 혈장내 총 단백질 함량, 삼투압, Na농도, K농도, Cl농도, 헤모글로빈(Hb)수와 적혈구수(red blood cell; RBC)는 48시간 동안 큰 변화를 보이지 않았다. 실험사료의 위내 강제 공급 후 혈장내 유리 아미노산의 농도 변화는, arginine, histidine, lysine, methionine, threonine, valine, glutamic acid, isoleucine, leucine, phenylalanine과 tryptophan이 사료공급 후 4시간에 최대치를 보였고, 8~24시간사이에 최초수준 또는 감소하고, 48시간까지 일정하게 유지되었다. glycine은 사료공급 후 4~8사이에 감소하여 12시간에 최대치를 보였고 24시간에 최초수준으로 돌아왔다. alanine과 aspartic acid의 농도는 사료공급 후 4시간에 최대치를 보였고, 48시간에 기본농도로 돌아왔다. 상기 결과를 토대로, 위내 강제 공급 방법과 대동맥 삽입방법을 무지개송어의 사료 영양학적 연구에 적용 가능하였고, 유리아미노산의 농도 측정으로 필수 아미노산 요구량 추정이 가능함을 보여주었다.

감사의 글

본 연구는 1999년도 부경대학교 연구년 지원에 의하여 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

참고문헌

Barton, B. A. and G. K. Iwama, 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annu. Rev. Fish Dis., **1**: 3–26.

Barziza, D. E., J. A. Buentello and D. M. Gatlin, 2000. Dietary arginine requirement of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*) based on weight gain and feed efficiency. J. Nutr., **130**: 1796–1799.

Cowey, C. B. and M. J. Walton, 1988. Studies on the uptake of 14C-amino acids derived from both dietary 14C-protein and dietary 14C-amino acids by rainbow trout. J. Fish Biol., **33**: 293–305.

Deng, D. F., S. Refsite, G. I. Hemre, C. E. Crocker, H. Y. Chen, J. J. Cech Jr. and S. S. O. Hung, 2000. A new technique of feeding, repeated sampling of blood and continuous collection of urine in white sturgeon. Fish physiology and biochemistry, **22**: 191–197.

Houston A. H, 1990. Blood and circulation. (*in*) Methods for Fish Biology, (eds.) C. B. Schreck and P. B. Moyle, Amer. Fish. Soc., New York, pp. 273–343.

Kaushik, S. J., 1979. Application of a biochemical method for the estimation of amino acid needs in fish: quantitative arginine requirements of rainbow trout in different salinities. (*in*) Finfish Nutrition and Fish Feed Technology, (eds.) J. E. Hlaver and I. Tiews. Heenemann. Berlin, Vol. 1, pp. 197–207.

Kim, K. I., T. B. Kayes and C. H. Amundson, 1992. Requirements for lysine and arginine by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, **106**: 333–344.

Kim, K. W., J. Y. Lee, S. C. Bai, and H. S. Lee, 2001. Effects of dietary supplementation of lysine cell mass as a fish replacer in juvenile nile tilapia. J. of Aquaculture, **14**(3): 197–203.

Longnecker, J. B. and N. L. Hause, 1961. Relationship between plasma amino acids and composition of ingested protein. II. A shortened procedure to determine plasma amino acid ratios. Amer. J. Clin. Nutr., **4**: 356.

Murai, T., H. Ogata, Y. Hirasawa, T. Akiyama and T. Nose, 1987. Portal absorption and hepatic uptake of amino acids in rainbow trout force-fed complete diets containing casein or crystalline amino acids. Nippon Suisan Gakkaishi, 53: 1847–1859.

Ogino, C. and T. Takeuchi, 1976. Protein nutrition in fish. VI. Effects of dietary energy sources on the utilization of proteins

by rainbow trout and carp. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., **42**: 213–218.

Pfeffer, E, 1982. Utilization of dietary protein by salmonid fish. Comp. Biochem. and Physiol., **73B**: 51–57.

Robinson, E. H., R. P. Wilson and W. E. Poe, 1981. Arginine requirement and apparent absence of a lysine-arginine antagonist in fingerling channel catfish. Journal of Nutrition **111**: 46–52.

Rodehutscord, M., F. Borchert, Z. Gregus, P. Michael and E. Pfeffer, 2000. Availability and utilization of free lysine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) 1. Effect of dietary crude protein level. Aquaculture, **187**: 163–176.

Schuhmacher, A., M. Goldberg, J. Schön, C. Wax and J. M. Gropp, 1993. Plasma amino acid levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). EIFAC Workshop on Methodology for Determination of Nutrition Requirements in Fish, 29 June-1 July 1993, Eichenau, Germany.

Schuhmacher, A., C. Wax and J. M. Gropp, 1997. Plasma amino acids in rainbow trout fed intact protein or a crystalline amino acid diet. Aquaculture, **151**: 15–28.

Soivio, A., K. Westman and K. Nyholm, 1972. Improved method of dorsal aorta catheterization: haematological effects followed for three weeks in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Finnish Fish Res., **1**: 11–21.

Walton, M. and R. Wilson, 1986. Postprandial changes in plasma and liver free amino acids of rainbow trout fed complete diets containing casein. Aquaculture, **51**: 105–115.

Walton, M. J., C. B. Cowey, R. M. Coloso and J. W. Adron, 1986. Dietary requirements of rainbow trout for tryptophan, lysine and arginine determined by growth and biochemical measurements. Fish Physiol. Biochem., **2**: 161–169.

Wedemeyer, G. A., B. A. Barton and D. J. McLeay, 1990. Stress and acclimation. (*in*) Methods for Fish biology, (eds.) Schreck, C. B., Moyle, P. B. Amer. Fish. Soc., Bethesda, MD, pp. 451–489.

Woodward, J. J, 1982. Plasma catecholamines in resting rainbow trout, *salmo gairdneri* Richardson, by high pressure liquird chromatography. J. Fish Biol., **21**: 429–432.

Yamada, S., K. Simpson, Y. Tanaka, and T. Katayama, 1981. Plasma amino acid changes in rainbow trout force-fed casein and corresponding amino acid mixture. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., **47**: 1035–1040.

Young-Jin Chang, Jun-Wook Hur, Seung-Hyen Moon and Jung-Uie Lee, 2001. Stress response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and japanese croaker (*Nibea japonica*) to live transportation. J. of Aquaculture, **14**(1): 57–64.

Young, V. R. and J. Zamora, 1968. Effects of altering the proportions of essential-to- nonessential amino acid levess in the rat. J. Nutr., **96**: 21.

Young, V. R. and N. S. Scrimshaw, 1970. The nutritional significance of plasma and uninary amino acids. (*in*) The International Encyclopedia of Food and Nutrition, (ed.), E. J. Bigwood, Pergamon Press, Oxford., Vol. 11, Chap. 16.

원고접수 : 2002년 11월 18일
수정본 수리 : 2002년 12월 24일
책임편집위원 : 이정열