

사료 내 Nucleotides 첨가가 참돔(*Pagrus major*)의 성장, 사료효율, 혈액성상 및 비특이적 면역반응에 미치는 영향

송진우 · 이경준*

제주대학교 해양생명과학과

Effects of Dietary Nucleotide Supplementation on the Growth Performance, Feed Utilization, Hematological Parameters and Innate Immunity in Red Seabream *Pagrus major*

Jin-Woo Song and Kyeong-Jun Lee*

Department of Marine Life Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Two studies were conducted to investigate the effects of dietary nucleotides (NT) on the growth performance, hematological parameters, and innate immune responses of red seabream *Pagrus major*. In Expt I, six experimental diets were formulated: a control, four that contained each NT at a level of 0.15% (inosine monophosphate, IMP; adenosine monophosphate, AMP; guanosine monophosphate, GMP; and uridine monophosphate, UMP), and one with a 1:1:1:1 mixture of NTs (IMP, AMP, GMP, and UMP). In Expt II, five experimental diets were formulated that contained 0, 0.1, 0.2, 0.4, and 1.0% IMP (commercial product). Triplicate groups of juvenile (initial body weight 33.1 g) and growing (initial body weight 120 g) red seabream were fed one of the experimental diets to apparent satiation for 8 weeks in Expt I and 12 weeks in Expt II. In Expt I, fish fed diets with NT had higher growth performance than the control group. The nitroblue tetrazolium and lysozyme activities were higher in fish fed the mixed-NT diet, and lowest in the control group. In Expt II, the final body weight and feed utilization of fish fed the 0.1% IMP diet were significantly higher than those of fish fed the control or 1.0% IMP diets. Diet palatability was improved significantly when 0.1% IMP was added. The lysozyme activity was higher in fish fed diets with 0.4–1.0% than in the control group. These results suggest that supplementation of 0.15% IMP and Mixed-NTs in diet can enhance the growth and immune responses in juvenile red seabream. The optimum IMP level appears to be 0.2% in practical feed formulation for growing red seabream.

Key words: *Pagrus major*, Red seabream, Nucleotides, Growth, Immunostimulant

서 론

뉴클레오티드(nucleotide, NT)는 핵산을 구성하는 단위체로서 에너지 공급원, 세포 내 신호전달 및 효소반응에 중요한 역할을 한다(Carver and Walker, 1995). 양어사료 분야에서는 사료섭이율이 증가한다는 연구결과가 보고되면서 NT에 대한 관심이 계속적으로 높아지고 있다(Mackie, 1973; Kiyohara et al., 1975; Li and Gatlin, 2006; Song et al., 2012). Inosine monophosphate (IMP)와 guanosine monophosphate (GMP)는 식품 내 특정 풍미를 변화시키며, 화학조미료인 monosodium glutamate와의 상승작용으로 인해 식품첨가제로 이용되고 있

다(Adamek et al., 1996; Kubitza et al., 1997). Adenine monophosphate (AMP)와 uridine monophosphate (UMP)는 모든 생체내에 존재하며 에너지 전달체로서 중요한 역할을 한다. 양어사료 내 NT를 첨가함으로써 어류의 성장과 면역활성이 증가된 여러 연구결과가 있지만, 그 원인에 대한 정확한 메커니즘은 현재까지도 분명하게 밝혀지지 않았다(Li et al., 2007; Lin et al., 2009).

참돔은 농어목(Perciformes), 도미과(Sparidae)에 속하는 상품가치가 높은 대표 양식어종이다. 성장률이 빠르고 다양한 환경변화에 내성이 높은 어류로 알려져 있지만, 성장단계에 맞는 영양소 제공과 양식환경이 적절치 못하면 성장률이 감소하고

Article history;

Received 14 October 2013; Revised 13 December 2013; Accepted 17 December 2013

*Corresponding author: Tel: +82. 64. 754. 3423 Fax: +82. 64. 756. 3493

E-mail address: kjlee@jejunu.ac.kr

Kor J Fish Aquat Sci 46(6) 785-792, December 2013

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2013.0785>

pISSN:0374-8111, eISSN:2287-8815

© The Korean Society of Fisheries and Aquatic Science. All rights reserved

Table 1. Composition of basal diet for juvenile red seabream *Pagrus major* in Exp I

Ingredients	%
Casein	51.0
Dextrin	23.0
Squid liver oil	15.0
Carboxyl methyl cellulose	1.0
Mineral mix ¹	3.0
Vitamin mix ²	3.0
Taurine	1.0
Cellulose	3.0
Proximate composition (%)	
Moisture	14.1
Crude protein	49.2
Crude lipid	13.5
Ash	2.4

¹MgSO₄·7H₂O, 80.0; NaH₂PO₄·2H₂O, 370.0; KCl, 130.0; Ferric citrate, 40.0; ZnSO₄·7H₂O, 20.0; Ca-lactate, 356.5; CuCl₂, 0.2; AlCl₃·6H₂O, 0.15; Na₂Se₂O₃, 0.01; MnSO₄·H₂O, 2.0; CoCl₂·6H₂O, 1.0.

²L-ascorbic acid, 121.2; DL- 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-aminobenzoic acid, 18.2; menadione, 1.8; retinyl acetate, 0.73; cholecalciferol, 0.003; cyanocobalamin, 0.003.

질병이 자주 발병하게 된다(Kinoshita and Tanaka, 1990; Tang et al., 2003). 어류의 질병치료 및 예방을 위한 방법으로 항생제를 많이 사용하고 있지만, 항생제 사용의 오남용으로 인해 내성균 출현과 체내잔류 등의 문제를 일으켜 항생제를 대체하는 연구가 절실히 필요하다. 사료 내 천연물질을 첨가하여 어류의 성장, 비특이적 면역반응 및 질병저항성을 증가시킨다는 연구결과는 보고되었지만 양식현장에서 실제로 이용되는 경우는 미비한 실정이다.

현재까지 보고된 대부분의 NT 첨가실험은 상업제품을 이용하여 진행되었다(Burrells et al., 2001a; Tahmasebi-Kohyani et al., 2011). 상업제품은 NT외에 미네랄, 아미노산 등 다양한 물질을 함유하고 있어 양식어종에 따른 정확한 NT 요구량을 제시하기가 어려웠다. 따라서 실험 I에서는 정제된 형태의 IMP, AMP, GMP, UMP 및 혼합 Mix-NTs (IMP+AMP+GMP+UMP)가 치어기 참돔의 성장, 사료효율 및 비특이적 면역반응에 미치는 영향을 조사하여 최적의 NT를 선별하였다. 실험 II에서는 선별

Table 2. Composition of basal diet for growing red seabream *Pagrus major* in Exp II

Ingredients	%
White fish meal	48.0
Soybean meal	8.0
Corn gluten meal	8.0
Wheat flour	21.3
Squid liver oil	10.0
Mineral mix ¹	1.0
Vitamin mix ²	1.0
Choline chloride	0.5
Alanine	1.2
Cellulose	1.0
Proximate composition (%)	
Moisture	11.6
Crude protein	49.6
Crude lipid	15.2
Ash	9.5

¹See the footnote in Table 1

²See the footnote in Table 1.

된 IMP를 상업화 한 제품을 이용하여 미성어기 참돔에 농도 별로 공급한 후 성장, 혈액성상 및 면역반응에 미치는 영향을 조사하여 실제 양식현장에서 적용가능한지를 판단하고자 수행되었다.

재료 및 방법

실험사료

실험 I에 사용된 6개의 실험사료는 49%의 조단백질과 19.1 MJ/kg의 에너지 함량이 되도록 제조하였다(Table 1). 사료원으로부터 NT 함량을 최소화하기 위해 어분 대신 casein을 사용하였다. NT 첨가효과를 조사하기 위해 대조사료(Con)에 cellulose 양을 감소시켜 IMP, AMP, GMP, UMP, Mix-NTs를 0.15%씩 각각 첨가하였다. Mix-NT는 IMP, AMP, GMP, UMP를 같은 비율로 혼합하여 준비한 다음 사료에 첨가하였다. 실험 II에 사용된 5개의 실험사료는 어분을 단백질원으로 사용하여 48%의 조단백질과 20 MJ/kg의 에너지 함량이 되도록 동일하게 제조하였다(Table 2). 실험에 사용된 상업 NT제품은 46%의 IMP와 그 외 다른 NT를 극소량 함유하고 있다. 상업제품인 IMP의 첨가효과를 조사하기 위해 대조사료에 alanine 양을 감소시켜 농도 별로 첨가하였다(Con, 0.1%, 0.2%, 0.4%, 1.0%). 실험사료 제조는 파쇄기로 모든 사료원을 분말형태로 일정하게 만든 후,

Table 3. Growth performance of red seabream *Pagrus major* fed experimental diets for 8 weeks (Exp I) and 12 weeks (Exp II)

	FBW ¹ (g)	FCR ²	PER ³	FI ⁴	Survival (%)
<i>Exp I (33 g)</i>					
Con	43.6±1.4 ^a	3.24±0.17 ^c	0.66±0.03 ^a	28.2±1.2 ^a	98±3.8
IMP	52.9±1.3 ^d	1.98±0.09 ^a	1.07±0.05 ^b	30.9±0.6 ^b	100±0.0
AMP	47.0±1.7 ^b	3.04±0.43 ^{bc}	0.71±0.11 ^a	29.5±0.5 ^{ab}	88±7.7
GMP	52.6±2.0 ^d	2.12±0.25 ^a	1.01±0.13 ^b	31.1±0.6 ^b	91±10.2
UMP	48.9±0.8 ^{bc}	2.62±0.24 ^{abc}	0.82±0.07 ^{ab}	30.2±1.2 ^b	91±10.2
Mix-NTs	50.9±3.2 ^{cd}	2.34±0.24 ^{ab}	0.92±0.09 ^{ab}	31.1±1.7 ^b	89±13.9
<i>Exp II (120 g)</i>					
Con	219±7 ^a	1.48±0.02 ^c	1.36±0.02 ^a	146±6.4	93.3±5.8
0.1%	253±27 ^b	1.21±0.02 ^a	1.66±0.03 ^c	144±3.3	86.7±11.5
0.2%	231±10 ^{ab}	1.25±0.01 ^{ab}	1.60±0.02 ^{bc}	145±6.0	86.7±5.8
0.4%	237±3 ^{ab}	1.22±0.05 ^a	1.65±0.07 ^c	143±3.7	93.3±5.8
1.0%	224±6 ^a	1.31±0.04 ^{bc}	1.53±0.05 ^b	140±4.4	90.0±5.8

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

¹Final body weight (g)

²Feed conversion ratio = dry feed fed/wet weight gain

³Protein efficiency ratio = wet weight gain/total protein given

⁴Feed intake (g/fish)

각 사료원을 사료조성표에 따라 정확히 무게를 측정하고 혼합하였다. 혼합 후 사료원 총량의 20-30%에 해당하는 증류수를 첨가하여 사료혼합기(NVM-14-2P, Korea)로 혼합하였다. 혼합물은 소형초파기(SMC-12, Korea)를 이용하여 압출 성형하였다. 제작된 실험사료는 선풍기로 2일간 자연 건조시킨 후, 시브(sieve)를 이용하여 적당한 크기로 준비하였으며 사료공급 전까지 -20℃ 냉동고에 보관한 후 실험에 사용하였다.

실험어 및 사육관리

참돔은 경상남도 고성군에 위치한 양어장에서 구입하여 제주대학교 소속 해양과학연구소로 운송하였다. 예비사육 후, 실험 I은(초기평균무게: 33.1 g) 18개의 150 L 원형 플라스틱 수조에 15마리씩 무작위 배치하였고, 실험 II는(초기평균무게: 120 g) 15개의 300 L 원형 플라스틱 수조에 10마리씩 무작위 배치하였다. 사료공급은 실험구당 3반복구를 두었으며, 사육수는 모래 여과해수를 사용하여 1-2 L/min의 유수량이 공급되도록 하였고 모든 실험수조에 충분한 용존산소 유지를 위하여 에어스톤을 설치하였다. 실험 I의 사육실험은 저수온(15℃-18℃)에서 8주 동안 1일 2회로 반복 공급하였다. 실험 II의 사육실험은 적수온(22℃-26℃)에서 12주 동안 1일 2회로 반복 공급하였다.

어체측정 및 혈액샘플

실험종료 후 실험어의 최종무게, 마리수, 사료공급량을 측

정하여 사료전환효율(feed conversion ratio), 단백질이용효율(protein efficiency ratio) 및 생존율을 계산하였다. 최종무게 측정 후, 각 수조당 6마리의 실험어를 무작위로 선별하여 2-phenoxyethanol 용액(100 ppm)으로 마취시킨 후 6마리 중 3마리는 헤파린이 처리된 주사기로 꼬리 미병부에서 채혈하였다. 채혈된 전혈은 hematocrit (Ht), hemoglobin (Hb) 및 대식세포활성(nitro-blue tetrazolium, NBT) 분석에 이용되었고 분석이 끝난 후, 원심분리기로(5,000×g) 혈장을 분리하여 혈장 성분 분석을 실시하였다. 남은 3마리의 혈액은 헤파린이 처리되지 않은 주사기로 채혈하였고 채혈된 전혈은 상온에서 60분간 방치시킨 후 원심분리기로(5,000×g) 혈청을 분리하여 비특이적면역 분석을 실시하였다.

분석

실험사료의 일반성분 분석은 AOAC (1995) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125℃, 3 h), 조회분은 직접회화법(550℃, 12 h), 조단백질은 자동조단백질 분석기(Kejltec system 2300, Sweden)로 분석하였고, 지방은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 Soxhelt 추출장치(Soxhlet heater system C-SH6, Korea)로 분석하였다.

Ht은 혈액진단원심분리기(Micro hematocrit VS-12000, Korea)에서 10분간 원심분리하여 값을 측정하였고 Hb, total protein (TP), glucose는 kit시약과 반응시킨 후 혈액생화학분석기

Table 4. Hematological parameters of red seabream *Pagrus major* fed five experimental diets experimental diets for 8 weeks (Exp I) and 12 weeks (Exp II)

	Hematocrit (%)	Hemoglobin (g/dL)	Total protein (g/dL)	Glucose (mg/dL)
<i>Exp I (33 g)</i>				
Con	40.1±2.7 ^a	6.39±0.11		
IMP	48.2±3.4 ^b	6.47±0.47		
AMP	44.8±2.8 ^b	6.42±0.21		
GMP	47.6±2.1 ^b	6.79±0.45		
UMP	45.8±2.4 ^b	6.75±0.26		
Mix-NTs	49.1±1.9 ^b	6.62±0.52		
<i>Exp II (120 g)</i>				
Con	39.9±1.8 ^a	6.60±0.22 ^b	4.65±0.52 ^a	43.3±10.2 ^a
0.1%	41.8±2.0 ^{ab}	6.81±0.11 ^b	4.89±0.11 ^{ab}	46.5±8.5 ^a
0.2%	45.7±5.3 ^b	6.59±0.43 ^b	5.74±0.33 ^c	49.6±3.6 ^a
0.4%	41.2±1.0 ^{ab}	5.86±0.07 ^a	5.38±0.49 ^{bc}	51.2±3.3 ^a
1.0%	40.6±2.5 ^{ab}	5.53±0.47 ^a	5.51±0.25 ^{bc}	64.8±4.4 ^b

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

(Express plus system, USA)로 분석하였다.

혈액 내 대식세포 활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 분석방법을 토대로 호중구의 oxidative radical 생성량을 측정하였고, lysozyme 분석은 Sankaran and Shanto (1972)의 방법으로 분석하였다. Myeloperoxidase (MPO)활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 방법을 기초로 분석하였고, superoxide dismutase (SOD)활성은 SOD assay kit (Sigma, USA)로 분석하였다.

사료유인성(Instantaneous feed intake) 테스트

실험 9주째(실험 II), 동일한 환경조건에서 3분 동안 사료를 반복공급 하였을 때 어류가 섭취한 사료의 양을 측정하였다. 3일간 3번의 반복실험을 통하여 100 g의 어류가 섭취한 양으로 계산하였다.

통계학적 분석

실험사료의 배치는 완전확률계획법(Completely randomized design)으로 실시하였고, 성장 및 분석결과는 SPSS (Version 11.0)프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석하였다. 데이터 값은 최소유의차 검정 (LSD; Least Significant Difference)으로 유의성($P<0.05$)을 비교 검정하였다. 데이터는 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 백분율 데이터는 arcsine 변형값으로 계산한 뒤 통계분석 하였다.

결 과

실험 I

NT첨가에 따른 참돔의 성장결과는 Table 3에 나타내었다. 최종무게와 사료효율은 IMP, GMP, Mix-NTs 그룹이 대조구에 비해 유의적으로 높았고 AMP와 UMP 그룹과는 유의적인 차이가 없었다. 사료섭이율 결과에서도 NT첨가 그룹이 대조구에 비해 유의적으로 높은 값을 보였다. 생존율은 모든 그룹에서 유의적인 차이가 없었다. Ht함량은 대조구가 NT첨가구에 비해 유의적으로 낮은 수치를 보였지만, Hb함량은 모든 그룹에서 유의적인 차이가 없었다(Table 4).

실험사료 공급에 따른 참돔의 비특이적 면역반응 결과는 Table 5에 나타내었다. NBT활성에서는 Mix-NTs그룹이 대조구에 비해 유의적으로 높은 활성을 보였지만 단일 형태로 첨가된 NT그룹과는 유의적인 차이가 없었다. Lysozyme활성은 NT가 첨가된 모든 그룹이 대조구에 비해 유의적으로 높은 활성을 보였다. SOD와 MPO활성은 모든 그룹에서 유의적인 차이는 없었다.

실험 II

12주간의 성장실험 결과는 Table 3에 나타내었다. 0.1% 첨가 그룹은 대조구와 1.0% 첨가그룹에 비해 유의적으로 높은 성장을 및 사료효율을 보였다. 생존율은 모든 실험구에서 유의적인

Table 5. Nitro blue tetrazolium (NBT), lysozyme, superoxide dismutase (SOD) and myeloperoxidase (MPO) activities of red seabream *Pagrus major* fed experimental diets for 8 weeks (Exp I) and 12 weeks (Exp II)

	NBT (absorbance)	Lysozyme (μ g HEWL/mL)	SOD (% inhibition)	MPO (absorbance)
<i>Exp I (33 g)</i>				
Con	1.58 \pm 0.15 ^a	1.33 \pm 0.4 ^a	65.4 \pm 15.2	1.81 \pm 0.04
IMP	1.71 \pm 0.05 ^{ab}	2.18 \pm 0.48 ^b	57.4 \pm 10.5	1.80 \pm 0.20
AMP	1.65 \pm 0.06 ^{ab}	2.02 \pm 0.15 ^b	58.1 \pm 5.5	1.80 \pm 0.19
GMP	1.72 \pm 0.10 ^{ab}	2.17 \pm 0.42 ^b	68.8 \pm 6.3	1.80 \pm 0.28
UMP	1.62 \pm 0.09 ^{ab}	2.17 \pm 0.17 ^b	54.9 \pm 9.1	1.83 \pm 0.09
Mix-NTs	1.79 \pm 0.04 ^b	2.23 \pm 0.21 ^b	70.5 \pm 10.0	1.81 \pm 0.10
<i>Exp II (120 g)</i>				
Con	0.91 \pm 0.07	1.79 \pm 0.55 ^a	48.5 \pm 2.9	1.12 \pm 0.09
0.1%	0.92 \pm 0.05	2.64 \pm 0.61 ^{ab}	52.4 \pm 9.6	1.23 \pm 0.24
0.2%	0.88 \pm 0.06	2.51 \pm 0.55 ^{ab}	51.1 \pm 3.2	1.28 \pm 0.15
0.4%	0.99 \pm 0.06	2.75 \pm 0.07 ^b	49.3 \pm 8.6	1.18 \pm 0.04
1.0%	0.92 \pm 0.07	2.80 \pm 0.63 ^b	46.1 \pm 4.3	1.14 \pm 0.07

Values are mean of triplicate groups and presented as mean \pm SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

차이가 없었다. 사양실험 9주째 실시된 사료유인성 테스트 결과, 0.1% 첨가그룹이 대조구와 1.0% 첨가그룹에 비해 유의적으로 높은 사료섭이율을 보였다(Figure 1).

Ht함량은 0.2% 첨가그룹이 대조구에 비해 유의적으로 높은 수치를 보였지만 다른 NT 그룹과는 유의적인 차이가 없었다. Hb함량은 0-0.2% 첨가그룹이 0.4-1.0% 첨가그룹에 비해 유의적으로 증가하였다(Table 4). 혈장 내 TP 함량은 0.2% 첨가그룹이 대조구와 0.1% 첨가그룹에 비해 유의적으로 높았고, glucose 함량에서는 1.0% 첨가그룹이 0-0.4% 첨가그룹에 비해 유의적으로 높은 수치를 보였다.

비특이적 면역반응 결과는 Table 5에 나타내었다. Lysozyme의 경우, 0.4-1.0% 첨가그룹이 대조구에 비해 유의적으로 높은 활성을 보였다. NBT, MPO 및 SOD활성에서는 0.1-0.2% 그룹에서 대조구에 비해 높은 활성 경향을 보였지만 유의적인 차이는 없었다.

고 찰

실험에 사용된 대조사료는 참돔의 성장에 필요한 영양소를 충족시켜주었지만 대조사료를 먹인 그룹은 NT첨가그룹에 비해 성장률이 낮았다. 이번 연구결과를 통해 사료 내 NT 첨가는 치어기와 미성어기 참돔의 성장과 사료효율 증진에 도움이 될 것으로 판단된다. 실험 I의 경우, IMP 또는 Mix-NTs가 첨가된 그룹이 다른 그룹에 비해 유의적으로 높은 성장률을 보

였다. Grouper (*Epinephelus malabaricus*)를 대상으로 사료 내 정제된 NT를 0.15%씩 첨가하여 8주간 공급하였을 때 본 실험과 동일하게 NT첨가그룹이 무첨가 그룹에 비해 유의적으로 높은 성장률을 보였다(Lin et al., 2009). 실험 II의 경우, 최종 무게와 사료효율은 0.1% 첨가그룹이 대조구와 1.0% 첨가그룹에 비해 유의적으로 높은 값을 보였다. 넙치를 대상으로 사료 내

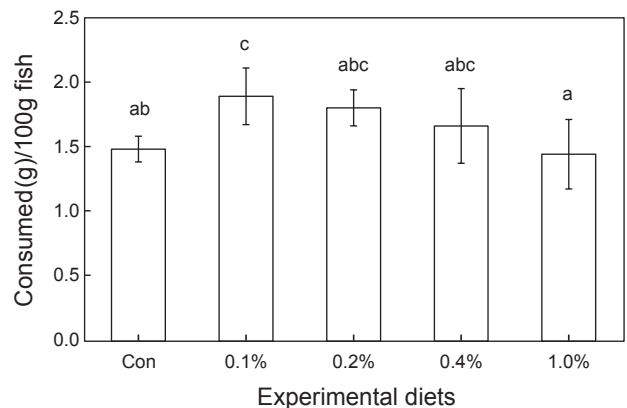


Fig. 1. Instantaneous feed intake for red seabream *Pagrus major* fed five experimental diets containing different levels of IMP (Exp II). The fish were allowed to consume the diets for 3 min. Values are expressed as consumed feed amounts per 100 g fish and means of 9 replicates (3 replicates per diet with 3 time tests).

NT 함량을 농도 별로 첨가하여 14주간 공급하였을 때, 적정농도(0.1-0.4%)그룹이 고농도(1.0%)그룹에 비해 유의적으로 높은 성장률을 보여 본 실험과 비슷한 결과를 보였다(Song et al., 2012). 고농도로 첨가한 그룹이 적정 그룹에 비해 성장이 감소한 이유는 purine 염기로부터 생성된 uric acid가 독성을 보였기 때문이라 추측하고 있다(Rumsey et al., 1992). 본 실험에서도 1.0% 첨가그룹이 0.1% 첨가그룹에 비해 성장률이 감소한 이유로 uric acid에 의한 독성 때문이라고 판단된다. 반면, Welker et al. (2011)은 차넬메기 (*Ictalurus punctatus*)를 대상으로 정제된 NT혼합물을 농도별로(0%, 0.1%, 0.3% 0.9%, 2.7%) 8주간 공급하였을 때, 어류의 성장에 아무런 영향을 미치지 않았다고 보고하였다. 이처럼 어류에서 보고된 상반된 결과는 실험대상 어종과 NT첨가농도 및 사료의 구성성분의 차이 때문인 것으로 판단된다.

실험 I의 사료섭이율 결과, NT첨가 그룹이 대조구에 비해 유의적으로 높은 값을 보였다. Largemouth bass (*Micropterus salmoides*)를 대상으로 사료 내 아미노산, betaine, NT를 단독 또는 혼합 첨가하였을 때, NT를 단독 또는 혼합 첨가한 그룹이 아미노산 및 betaine이 첨가된 그룹에 비해 사료섭이율이 유의적으로 증가하여 본 연구결과와 유사한 것으로 나타났다(Kubitza et al., 1997). 실험 I은 사료섭이율이 감소되는 저수온기에 사육실험이 진행되었고 NT의 효능을 증명하기 위해 어분이 포함되지 않은 정제사료를 공급하였다. 그럼에도 불구하고 사료 내 NT의 첨가가 참돔의 사료섭이율을 증가시켜 어류의 성장뿐만 아니라 사료효율에도 긍정적인 영향을 주었다. 반면 실험 II의 사료섭이율 결과는 모든 그룹에서 유의적인 차이는 없었다. 하지만 사양실험 9주째 실시한 사료유인성 테스트 결과는 0.1% 첨가그룹이 대조구 및 1.0% 첨가그룹에 비해 유의적으로 높은 값을 보였다. 즉 NT 첨가가 사료의 풍미를 증가시켜 일시적(순간적)인 사료섭이율을 증가시킬 수 있다고 증명하였지만, 사료 내 적정량 이상으로 첨가될 경우에는 오히려 부정적 영향을 미칠 수 있음을 보여 주었다.

실험 II에 사용된 실험사료는 48%의 어분을 함유하고 있다. 어분에는 약 0.2%의 NT가 포함(Carver and Walker, 1995)되어 NT가 첨가되지 않은 대조사료도 약 0.96 g/kg의 NT를 포함하고 있다. 즉, 대조사료에 1.0% (4.6 g NT/kg)의 NT를 첨가하면 약 5.5 g NT/kg사료의 농도가 된다. 따라서 미성어기 참돔 사료 내 5.5 g NT/kg 이상의 첨가는 성장률에 부정적인 영향을 미칠 것으로 판단된다.

혈액학적 분석은 어류의 건강상태 및 생리활성을 나타내는 지표로 이용되며 영양소 결핍, 양식환경, 성장단계에 따라 달라질 수 있다(Houston, 1997; Kumar et al., 2005; Garrido et al., 1990; Lim and Lee, 2009). Ht는 혈액에서 적혈구가 차지하고 있는 비중을 의미하며 영양소 결핍에 따라 수치가 감소한다. 실험 I과 II의 경우, 대조사료를 먹인 그룹이 NT첨가 그룹에 비해 유의적으로 낮은 값을 보임으로서 NT는 어류의 정상적인 건강

상태를 유지하는데 필요한 영양소라 판단된다. Hb는 철(Fe)을 포함하는 단백질로써 적혈구에서 산소를 운반하는 역할을 한다. Beluga sturgeon (*Huso huso*) 사료에 NT를 첨가하여 9주간 공급 했을 때 0-0.35% 첨가그룹이 0.5% 첨가그룹에 비해 유의적으로 높은 Hb 수치를 보여 실험 II와 비슷한 경향을 보였다(Yousefi et al., 2012). NT는 철분을 흡수하는데 중요한 역할을 함으로써 사료 내 NT 첨가로 인해 Hb 수치가 증가되었을 것이라 판단되지만(Grimble 1996), 적정농도 이상에서는 그 효능이 미비한 것으로 판단된다. 혈액 내 단백질은 호르몬과 결합하여 세포의 항상성을 유지하거나 면역반응에 중요한 역할을 하기 때문에 혈액 내 TP가 감소하게 되면 생체의 평형상태를 깨트리게 된다(Kumar et al., 2005). 실험 II의 결과, 대조구는 0.2-1.0% 첨가그룹에 비해 유의적으로 낮은 TP값을 보였다. 이전의 많은 연구에서는 사료 내 부가적인 첨가 없이도 어류의 생리기능에서의 이상이나 결핍증상이 발견되지 않아 NT는 어류에서 중요하게 생각되지 않았다(Li and Gatlin, 2006). 이번 연구결과를 통해 사료 내 NT의 공급은 어류 혈액 내 TP함량에 영향을 주어 참돔의 정상적 생리기능 유지에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다. 어류를 포함한 대부분의 동물들은 외부스트레스 환경에 노출되면 glucose 함량이 상승하게 된다. Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) 사료 내 상업적 NT 제품인 Optimun (Chemoforma, Augst, Switzerland)을 첨가하여 고밀도 스트레스 환경에서 glucose 함량을 조사했을 때, NT가 첨가되지 않은 대조구가 NT첨가 그룹에 비해 유의적으로 높은 함량을 보였다. 즉, 사료 내 NT의 첨가로 인해 어류는 외부의 스트레스에 대한 내성을 증가시킬 수 있다고 보고하였다(Tahmasebi-Kohyani et al., 2012). 실험 II에서도 고농도로 첨가된 그룹(1.0%)이 적정농도(0-0.4%)에 비해 glucose 함량이 증가한 이유는 uric acid와 같은 독성물질에 의해 실험어류가 장기적인 스트레스를 받았기 때문인 것으로 추측된다.

양어사료 내 NT의 첨가는 어류의 비특이적 면역반응과 질병 저항성을 증가시킬 수 있다는 최근의 많은 연구결과들에 의해 주목 받기 시작했다(Burrells et al., 2001ab). 이번 연구에서도 정제된 Mix-NTs (실험 I)나 상업용 IMP (실험 II)에 의해 비특이적 면역지표인 lysozyme과 대식세포 활성이 증가된 것을 확인할 수 있었다. Lysozyme은 특정세균이 아닌 다양한 균에 항균작용을 나타내는 효소로 어류를 포함한 대부분의 동물실험에서 비특이적 면역반응을 측정하는 항목이며(Jollès and Jollès, 1984; Grinde, 1989), 대식세포는 체내로 침입한 병원성 미생물을 가수분해하여 사멸시키는 역할을 한다. 연어를 대상으로 사료 내 NT를 농도 별로 공급하여 lysozyme 활성을 측정하였을 때, 대조구에 비해 NT첨가 그룹이 유의적으로 높은 활성을 보였다(Tahmasebi-Kohyani et al., 2011). 이처럼 최근의 연구결과들은 사료 내 NT첨가가 어류의 면역력 증진에 효과가 있다고 보고하고 있다. Bricknell and Dalmo (2005)는 NT가 Toll-like receptors (TLRs) 유전물질을 발현시켜 면역반응

을 증가시킨다고 보고하였다. TLRs는 비특이적 면역반응과 특이적 면역반응에 관여하는 유전물질로 어류에서도 TLRs 유전자가 존재한다고 보고되었다(Werling and Jungi 2003). 반면, hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*)와 red drum (*Sciaenops ocellatus*)을 대상으로 사료 내 NT를 공급하였을 경우, lysozyme 활성에 아무런 영향이 없었다고 보고되었다(Li et al., 2004; Cheng et al., 2011). 따라서 실험어종, 사육환경 및 NT제품의 활성과 실험사료의 영양소 구성에 따라 면역반응에 관여하는 유전물질 발현량이 달라질 수 있을 것으로 판단된다.

치어기 참돔을 대상으로 사육실험을 진행한 결과, IMP 또는 Mix-NTs가 효율적인 사료첨가용 NT로 선택되었다. 이러한 결과를 바탕으로 IMP가 첨가된 물질이 상업화 될 수 있고, 첨가 농도에 따라 미성어기 참돔에서는 성장률에 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있었다. 따라서 정제된 형태의 NT는 약 0.15% 농도로 단일형태 또는 혼합형태로 첨가할 경우 효과가 있을 것으로 사료되며, 어분이 다량 첨가된 실용사료에서는 상업용 IMP (약 46% 순도)의 첨가농도가 약 0.2% 이하가 되어야 할 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2013학년도 제주대학교 학술진흥연구비 지원사업에 의하여 연구되었음.

References

- Adamek Z, Hamackova J, Kouril J, Vachta R and Stibranyiova I. 1996. Effect of Ascogen probiotics supplementation on farming success in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and wels (*Silurus glais*) under conditions of intensive culture. *Krmiva (Zagreb)* 38, 11-20.
- AOAC. 1995. Official methods of analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, U.S.A. 1298.
- Bricknell I and Dalmo RA. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol* 19, 457-472. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2005.03.008>.
- Burrells C, William PD and Forno PF. 2001a. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds 1. Effects on resistance to diseases in salmonids. *Aquaculture* 199, 159-169. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00577-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00577-4).
- Burrells C, William PD, Southage PJ and Wadsworth SL. 2001b. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds 2. Effects on vaccination, salt water transfer, growth rate and physiology of Atlantic salmon. *Aquaculture* 199, 171-184. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00576-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00576-2).
- Carver JD and Walker WA. 1995. The role of nucleotides in human nutrition. *J Nutr Biochem* 6, 58-72.
- Cheng Z, Buentello A and Gatlin III DM. 2011. Dietary nucleotides influence immune responses and intestinal morphology of red drum *Sciaenops ocellatus*. *Fish Shellfish Immunol* 30, 143-147. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.09.019>.
- Folch J, Lee M and Sloane-Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497-509.
- Garrido LG, Chapuli RM and Andres AV. 1990. Serum cholesterol and triglyceride levels in *Scyliorhinus canicula* (L.) during sexual maturation. *J Fish Biol* 36, 499-509.
- Grimble GK. 1996. Why are dietary nucleotides essential nutrients?. *Br J Nutr* 76, 475-478.
- Grinde B. 1989. Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. *J Fish Dis* 12, 95-104.
- Houston H. 1997. Are the classical hematological variables acceptable indicators of fish health? *Trans Am Fish Soc* 126, 879-894.
- Jollès P and Jollès J. 1984. What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Mol Cell Biochem* 63, 165-189.
- Kinoshita I and Tanaka M. 1990. Differentiated spatial distribution of larvae and juveniles of the two sparids, red and black seabream, in Shijiki Bay. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56, 1807-1813.
- Kiyohara S, Hidaka I and Tamura T. 1975. Gustatory response in the puffer-II. Single fiber analysis. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 41, 383-391.
- Kubitza F, Lovshin LL and Lovell RT. 1997. Identification of feed enhancers for juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Aquaculture* 148, 191-200.
- Kumar S, Sahu NP, Pal AK, Choudhury D, Yengkokpam S and Mukherjee SC. 2005. Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory burst activity and histological changes in *L. rohita* juveniles. *Fish Shellfish Immunol* 19, 331-344. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2005.03.001>.
- Kumari J and Sahoo PK. 2005. Effects of cyclophosphamide on the immune system and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus*. *Fish Shellfish Immunol* 19, 307-316. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2005.01.008>.
- Li P and Gatlin III DM. 2006. Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications. *Aquaculture* 251, 141-152.
- Li P, Gatlin III DM and Neill WH. 2007. Dietary supplementation of a purified nucleotide mixture transiently enhanced growth and feed utilization of juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*. *J World Aquacult Soc* 38, 281-286. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-7345.2007.00096.x>.
- Li P, Lewis DH, Gatlin III DM. 2004. Dietary oligonucleotides from yeast RNA influence immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Fish Shellfish Immunol* 16, 561-569.

- Lim SJ and Lee KJ. 2009. Partial replacement of fish meal by cottonseed meal and soybean meal with iron and phytase supplementation for parrot fish *Oplegnathus fasciatus*. *Aquaculture* 290, 283-289.
- Lin YH, Wang H and Shiau SY. 2009. Dietary nucleotide supplementation enhances growth and immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquacult Nutr* 15, 117-122. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00561.x>.
- Mackie AM. 1973. The chemical basis of food detection in the lobster *Homarus gammarus*. *Mar Biol* 21, 103-108.
- Rumsey GL, Winfree RA and Hughes SG. 1992. Nutritional value of dietary nucleic acids and purine bases to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 108, 97-110.
- Sankaran K and Shanto G. 1972. On the variation in catalytic activity of lysozyme in fishes. *Indian J Biochem Biophys* 91, 162-165.
- Song JW, Lim SJ and Lee KJ. 2012. Effects of dietary supplementation of inosine monophosphate on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol* 33, 1050-1054. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.07.011>.
- Tahmasebi-Kohyani A, Key vanshokoo S, Nematollahi A, Mahmoudi N and Pasha-Zanoosi H. 2012. Effects of dietary nucleotides supplementation on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) performance and acute stress response. *Fish Physiol Biochem* 38, 431-440. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-011-9524-x>.
- Tahmasebi-Kohyani A, Keyvanshokoo S, Nematollahi A, Mahmoudi N and Pasha-Zanoosi H. 2011. Dietary administration of nucleotides to enhance growth, humoral immune responses, and disease resistance of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Fish Shellfish Immunol* 30, 189-193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.10.005>.
- Tang QS, Sun Y and Zhang B. 2003. Bioenergetics models for seven species of marine fish. *J Fish Chn* 27, 443-449.
- Welker TL, Lim C, Yildirim-Aksoy M and Klesius PH. 2011. Effects of dietary supplementation of a purified nucleotide mixture on immune function and disease and stress resistance in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquac Res* 42, 1878-1889. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02794.x>
- Werling D and Jungi TW. 2003. Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol* 91, 1-12.
- Yousefi M, Abtahi B and Abedian Kenari A. 2012. Hematological, serum biochemical parameters, and physiological responses to acute stress of Beluga sturgeon (*Huso huso*, Linnaeus 1785) juvenile fed dietary nucleotide. *Comp Clin Pathol* 21, 1043-1048. <http://dx.doi.org/10.1007/s00580-011-1225-4>.