

치어기 넙치의 면역 증강에 대한 셀레늄의 적정 첨가량 평가

이준호·김영철·박수일¹·배승철*
부경대학교 양식학과, ¹부경대학교 수산생명의학과

Evaluation of the Optimum Dietary Selenium (Se) Level to Improve Immune Responses in Juvenile Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Jun-Ho LEE, Young Chul KIM, Soo-Il PARK¹ and Sungchul C. BAI*
Department of Aquaculture/Feeds & Foods Nutrition Research Center,
Pukyong National University, Daeyon-3-dong, Busan 608-737, Korea
¹Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University,
Daeyon-3-dong, Busan 608-737, Korea

This experiment was conducted to examine the utilization of added dietary selenium (Se) as an immune stimulant in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Fish averaging 4.0 ± 0.1 g (mean \pm SD) were fed one of seven semi-purified diets containing 0.56, 1.07, 2.86, 4.56, 43.15, 90.71, or 161.74 mg of Se/kg ($Se_{0.56}$, $Se_{1.07}$, $Se_{2.86}$, $Se_{4.56}$, $Se_{43.2}$, $Se_{90.7}$ and $Se_{161.7}$, respectively) for 12 weeks, respectively. At the end of the feeding trial, the fish fed diets containing more than 43.2 mg of Se/kg showed above 90% mortality. There were no significant differences in weight gain, feed efficiency, specific growth rate, protein efficiency ratio, or hematological characteristics among the fish fed the $Se_{0.56}$, $Se_{1.07}$, $Se_{2.86}$, and $Se_{4.56}$ diets. Se concentrations of the gill, kidney, muscle and liver tissues occurred in dose-dependent manners. Alternative complement pathway activation and the chemiluminescence responses of the fish fed the $Se_{1.07}$ diet were significantly higher than those of the fish fed the other diets ($P < 0.05$). These results indicate that the optimum dietary supplementation level of Selenium as seleno yeast could be 1.07 mg of Se/kg based on the non-specific immune responses of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

Key words: Dietary selenium, Seleno yeast, Olive flounder, Immune response

서 론

셀레늄은 동물의 면역 시스템에 다양한 측면에서 효과적으로 작용되는 필수 미량영양소이다. 체내의 면역 시스템은 병원체의 공격에 대항하는 복잡한 일련의 과정이며 이러한 면역 반응은 심혈관성 질병이나 암, 류마티스와 같은 질병이 발병하였을 때 발생하는 복잡한 염증 반응과도 관계되어져 있으며 셀레늄 또한 다양한 형태의 셀레늄단백질의 형태로 면역에 관여하게 된다 (Kryukov and Gladyshev, 2002; Lescure et al., 2002). 셀레늄은 세계 여러 지역에서 토양과 암석 등의 다양한 형태로 발견되어지며 이것은 지역마다 생산되어진 음식이나 축산용 건조에 서로 다른 양의 셀레늄이 포함되어 있다는 것을 의미한다. 따라서 생물의 셀레늄 상태를 조정하는 것은 질병의 발병률을 조정할 수 있는지에 대해서 많은 논쟁이 벌어지고 있다. 하지만 의심할 여지가 없는 것은 셀레늄의 섭취가 낮은 경우 비타민 E 결핍과 관련된 많은 질병을 발생시키는 결과를 낳을 수 있다는 것이다 (Turner and Finch, 1991; Wichtel, 1998). 따라서 이러한 셀레늄의 결핍에 의한 질병의

발생 매카니즘을 이해하기 위해 설치류와 그 밖에 가축들에서 이미 관련된 실험이 시행되어져 왔으며 그 결과 비타민 E와 셀레늄의 결핍은 산화 및 항산화 과정에 영향을 준다는 결과를 도출하게 되었다 (Walsh et al., 1993).

셀레늄의 항산화 효과는 Glutathione peroxidase를 통해 지질의 과산화에 의한 피해를 제거하는 것으로 알려져 있다 (Arthur, 2000; Pfeifer et al., 2001). 따라서 셀레늄은 항산화 활동을 통하여 세포 밖의 공간 즉, 세포막과 세포질의 모든 면역과정에 영향을 줄 수 있으며 (Miller et al., 2001) 또한 이러한 셀레늄의 항산화 효과는 활성산소로부터 호중성백혈구를 보호하여 외부에서 침입한 병원체에 대한 대식작용 효과를 증진 시키게 한다는 보고가 되어져 있다 (Arthur et al., 2003).

한편, 이러한 셀레늄을 섭취하였을 경우 체내 축적되어 줄 수 있는 효과는 유기와 무기 형태에 따라 다른 것으로 나타났다. 특히, 유기태가 무기태 셀레늄보다 체내 축적이 더 많이 된다고 알려져 있다 (Mahan and Kim, 1996; Kim and Mahan, 2001). 그리고 셀레늄원에 따른 생화학적 이용률에 서는 seleno-methionine 이 가장 높았으며 이어서 seleno yeast

*Corresponding author: scbai@pknu.ac.kr

와 sodium-selenite 순으로 높은 것으로 나타났다 (Jaramillo, 2006). 본 논문에 사용되어진 셀레늄원인 selenoyeast는 축산에 있어서 면역 증강 첨가제로 이미 사용되고 있으며 미국 FDA에서도 셀레늄원으로 사용을 일부 허용하고 있다 (CFR, 2004).

반면에 이러한 셀레늄 또한 필요량 이상이 공급 되어졌을 경우 필수 미량영양소인 철이나 구리가 과량 공급되었을 경우 유해한 활성산소종을 발생시키는 것처럼 독성 증상을 보이게 된다 (Stohs and Bagchi, 1995). 그리고 1987년 미국 FDA에서는 모든 돼지 사료의 무기 셀레늄의 첨가를 허용 하였으나 일부 환경 단체를 중심으로 호수 및 토양 중에 축적되는 불용성 셀레늄의 문제점과 이로 인한 야생동물의 번식력 저하 현상을 제기하고 있다 (Kim, 2000). 이처럼 셀레늄의 필요성은 인정되고 있지만 가축에게 공급하였을 경우 발생하는 문제점은 비단 축산뿐 아니라 양식에 있어서도 고려되어야 할 것이며 양어 사료의 셀레늄 첨가는 면역 상승의 수준과 독성 수준에 대한 연구가 반드시 선행되어야 할 것이다.

따라서 본 실험은 국내 주요 양식 어종인 넙치에 있어서 사료내 유기 셀레늄원인 selenoyeast를 수준별로 첨가하여 치어기 넙치에 있어서 성장, 혈액 및 조직 (아가미, 간, 신장, 근육)내 셀레늄의 축적량에 미치는 영향과 비특이적 면역반응을 통하여 치어기 넙치에 미치는 영향을 규명하고 사료내 적정 셀레늄 첨가수준을 평가하고자 수행하였다.

재료 및 방법

실험어 및 사육관리

실험어는 전남 무안에서 운반된 넙치를 부경대학교 사료 영양학실험실내 250 L수조에서 실험환경에 적응할 수 있도록 2주간 예비 사육하였다. 예비사육 후 실험어는 평균무게 4.0 ± 0.1 g (mean \pm SD) 인 넙치를 30 L 사각수조에 각 실험구당 각각 20마리씩 3반복으로 무작위 배치하였다. 각 실험수조는 순환여과식으로 유수량은 0.8 L/min으로 조절하여 주었으며, 매일 사료 급여 후 20%의 환수를 시행하였다. 또한 충분한 산소 공급을 위해 에어스톤을 설치하였으며 전 실험기간 동안 평균 수온은 18 ± 1 °C, 염분은 32 psu, pH는 8.1을 유지하였다. 그리고 총 사육실험 기간은 12주간 실시하였다.

실험사료 및 실험설계

실험에 사용된 기본사료의 조성표와 일반성분은 Table 1에 나타내었다. 실험사료의 단백질원으로 카제인, 어분을 사용하였으며, 탄수화물원으로는 밀가루, 덱스트린, 콘스타치를 지질원으로는 어유를 사용하였다. 총 7개의 실험사료는 조단백 50%, 조지방 10%로 하였으며, 에너지는 15.8 kJ/g이었다. 그리고 사료내 셀레늄을 각각 0 ppm, 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 45 ppm, 90 ppm, 180 ppm 으로 설정하여 셀레늄원으로 1,000 ppm 농도의 Selenoyeast premixture를 사료원 혼합시 첨가하였다. 표준

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

Ingredients	Diets
	%
Fish meal ²	10.0
Casein ³	46.3
Wheat flour ⁴	7.7
Dextrin ⁵	8.8
Corn starch ⁶	3.3
Fish oil ⁷	8.9
Vit. Mix. ⁸	1.0
Min. Mix. ⁹ (selenium-free)	1.0
Cellulose	13.0
Proximate analysis (% of dry matter basis)	
Moisture	11.8
Crude protein	49.4
Crude lipid	8.9
Crude ash	3.0

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

^{2,3,4,5}Suhyup feed Co. Uiryeong, Korea

^{6,7}Jeil feed Co. Haman, Korea

⁸Contains (as mg/kg in diets) : Ascorbic acid, 300; dl-Calcium pantothenate, 150; Choline bitartrate, 3000; Inositol, 150; Menadione, 6; Niacin, 150; Pyridoxine·HCl, 15; Riboflavin, 30; Thiamine mononitrate, 15; dl- α -Tocopherol acetate, 201; Retinyl acetate, 6; Biotin, 1.5; Folic acid, 5.4; B₁₂, 0.06

⁹Contains (as mg/kg in diets): NaCl, 437.4; MgSO₄·7H₂O, 1379.8; NaH₂P₄·2H₂O, 877.8; Ca(H₂PO₄)₂·2H₂O, 1366.7; KH₂PO₄, 2414; ZnSO₄·7H₂O, 226.4; Fe-Citrate, 299; Ca-lactate, 3004; MnSO₄, 0.016; FeSO₄, 0.0378; CuSO₄, 0.00033; Calcium iodate, 0.0006; MgO, 0.00135.

법 (AOAC, 2000)을 통한 실험사료 내 셀레늄 함량 분석결과 각각 0.56, 1.07, 2.86, 4.56, 43.15, 90.71 및 161.74 mg Se/kg으로 나타났다 (Se_{0.56}, Se_{1.07}, Se_{2.86}, Se_{4.56}, Se_{43.15}, Se_{90.71}, 및 Se_{161.74}). 실험사료는 모든 원료를 혼합한 후 펠렛제조기로 압출·성형하였으며, 입자크기는 sieve로 고르게 친 후, 밀봉하여 -20°C에 냉동 보관하면서 사용하였다. 일일사료공급량은 어체 중의 3-4% (건물량 기준)로 1일 2회 (오전 10:00, 오후 16:00 h) 공급하였다.

어체 측정

어체 측정은 12주간의 실험 종료 후, 성장률을 측정하기 위하여 24시간 절식시킨 후 MS-222 (100 ppm)로 마취시켜 전체무게를 측정하였다. 실험종료 후, 증체율 (weight gain, %), 사료효율 (feed efficiency, %), 일간성장률 (specific growth rate, %/day), 단백질전환효율 (protein efficiency ratio)을 조사하였다. 상기 측정 항목들의 계산식은 다음과 같다.

$$\text{Weight gain (WG, \%)} = (\text{final body weight} - \text{initial body weight}) \times 100 / \text{initial body weight}$$

$$\text{Feed efficiency (FE, \%)} = (\text{wet weight gain} / \text{dry feed intake}) \times 100$$

$$\text{Specific growth rate (SGR, \%)} = (\log_e \text{ final body weight} - \log_e \text{ initial body weight}) / \text{days}$$

Protein efficiency ratio=(wet feed weight gain/protein intake)

셀레늄 분석

사료 및 조직내 셀레늄 측정은 표준법(AOAC, 2000)을 사용하여 측정하였다. 12주간의 실험 종료 후, 각 수조당 3마리씩 무작위로 선택하여 아가미, 신장, 간 및 근육을 샘플링한 후 Perkin-Elmer 3300 Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA)을 사용하여 조직내 셀레늄 함량을 측정하였다.

어체의 혈액 및 혈청성분 분석

실험종료 후, 증체를 조사와 함께 혈액성분 분석을 위하여 실험어를 채혈하기 전까지 약 24시간 동안 절식시켰다. 각 수조당 3마리씩 무작위로 추출하여 실험어의 미부정맥에서 혈액을 채혈한 후, 자동혈액분석기(Excell 500, USA)를 사용하여, 전혈에 대한 적혈구용적(hematocrit, PCV), 적혈구수(red blood cell, RBC), 혈색소농도(hemoglobin, Hb)를 측정하였다. 혈청성분의 분석을 위하여 채혈한 혈액을 항응고제가 처리되지 않은 원심분리관에 넣고 실온에 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 냉장보관하면서 16시간 이내에 분석하였다. 혈청성분은 임상용 kit(아산제약주식회사, 한국)를 사용하여 총단백질(total protein)은 biuret법으로, 글루코스(glucose)는 효소법으로 그리고 GOT(glutamic oxaloacetic transaminase)와 GPT(glutamic pyruvic transaminase)는 Reitman-Frankel법으로 분석하였다.

Lysozyme의 활성

점액 lysozyme의 활성

대조구와 각 구간의 실험어의 체표 점액을 분리한 후 lysozyme 활성을 Takahashi et al. (1986)의 방법에 따라 측정하였다. 점액 lysozyme 용균능력을 측정하기 위하여 slide glass로 어류의 체표 점액을 모으고, 시료의 5배량의 0.005 M PBS(pH 7.4)를 첨가하여 균질화한 후 원심 분리(12,000×g, 20분, 4°C)하여 사용하였다. 이 시료에 미리 PBS에 현탁하여 530 nm 파장에서 흡광도가 0.6이 되도록 조정해 둔 *Micrococcus lysodeikticus* 균을 혼합하였다. 측정용 시료 0.5 mL에 균액 2.5 mL를 첨가하여 25°C에서 20분간 반응시킨 후 530 nm 파장의 흡광도에서 감소량을 측정하였으며 흡광도 값이 0.001 감소한 것을 1 unit으로 나타내었다.

혈청 lysozyme의 활성

대조구와 각 구간의 실험어의 혈청을 분리한 후 lysozyme 활성을 Takahashi et al. (1986)의 방법에 따라 측정하였다. 혈청 lysozyme의 용균능을 측정하기 위하여 미부 정맥으로부터 혈액을 채취하여 실온에 30분간 방치하고 1시간 동안 냉장보관하여 혈병을 수축시킨 후 혈청을 분리하였다. 혈청 시료 200 μ L에 530 nm에서 0.7이 되도록 조정해 둔 0.05 M PBS(pH 6.2)의 농도로 조정된 *Micrococcus lysodeikticus* 균 현탁액

800 μ L을 첨가하여 최종 농도가 1 mL이 되게 하고 25°C에서 반응시켰다. 반응 후 30초, 4분 30초에 530 nm 파장의 흡광도에서 측정하여 1분 동안 0.001의 흡광도 감소값을 1 unit으로 나타내었다.

보체 대체 경로 (Alternative Complement Pathway) 활성의 분석

혈청 내 보체에 의한 세균 살해능력의 조사는 Yoo et al. (1992)의 방법에 따라 실험하였다. 대조구와 각 구간의 실험구의 시료로부터 분리한 혈청은 혈청 분리 후, -70°C에 보관하며 실험에 사용하였다. 각 혈청의 희석은 GVB²⁺ (Gelatin veronal buffer: VB 200 mL, 0.03 M CaCl₂·2H₂O 5 mL, MgCl₂·6H₂O 5 mL, 2% gelatin 50 mL, DW 740 mL, pH 7.4)를 사용하였다. 모든 시료는 GVB²⁺로 5배 희석한 후, 1×10⁵ CFU/mL의 *Escherichia coli*와 동량으로 혼합하여 20°C에서 배양하였다. 배양 후 0, 1, 3 및 6시간째에 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 TSA (Difco)에 배양 용액을 단계 희석하여 적하하고 27°C, 24시간 배양한 후 세균 집락수를 계수하였다.

두신 식세포의 Chemiluminescent 반응

두신 macrophages의 분리

넙치의 두신 macrophage는 Secombes (1990)의 방법에 따라 분리하였다. 대조구와 각 구간의 실험구의 넙치의 미부정맥에서 채혈하여 순환 혈액을 가능한 한 모두 제거한 후, 무균적으로 해부하여 두신을 절취하였다. 이를 2% penicillin/streptomycin 및 1% heparin이 함유된 L-15 medium (sigma)을 2 mL씩 소형 disposable petridish에 분주한 뒤 40 μ m의 nylon membrane을 통과시켜 세포 현탁액을 준비하였다. 이 세포 현탁액을 siliconized tube에 미리 분주해 둔 34%와 51% percoll 용액 위에 조심스럽게 중층시킨 다음 600 g, 30분간 원심분리하여 백혈구를 분리하였다. 분리한 백혈구를 1×HBSS로 3회 세척(3,000 rpm, 10분, 4°C)한 다음 0.1% trypan blue로 viability를 관찰한 후, 1×10⁶ cell/mL로 조정하였다.

감작 zymosan 제작

멸균된 tube에 CL용 PBS 2.5 mL과 zymosan 25 mg을 넣어 섞는다. 이 tube를 boiling water bath에서 자주 흔들어주며 30분 동안 둔다. 600×g에서 5분 동안 원심분리하여 zymosan pellet을 만든 후 opsonization을 위하여 5 mL의 넙치 혈청에 pellet을 재부유하고 25°C에서 30분 동안 배양한다. 원심분리 후 zymosan은 5 mL의 PBS로 2번 세척하고 25 mL의 PBS에 재부유시켜 1 mg/mL이 되게 하여 4°C에 보관한다.

Chemiluminescence response (CL response)

1×10⁶ cell/mL로 조정된 macrophage를 96 well plate에 100 μ L 씩 분주한 후 실험에 사용하였으며, luminol은 Scott and Klesius (1981)의 방법에 따라 준비하였다. 100 μ L의 세포액에 100 μ L의 luminol working solution을 넣은 후 20분간 반응시킨 다음 준비한 감작 zymosan을 각각 50 μ L 씩 첨가하였고,

대조구에는 1×HBSS를 50 μ L 첨가하여 lumicount로 측정하였다. 측정시간은 1시간이었으며 각 시료에 대한 peak 값을 구하였다.

통계처리

모든 자료는 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 유의성 ($P < 0.05$)을 검정하였다.

결과 및 고찰

사료에 항산화 효과 및 면역 상승 효과를 위하여 첨가제로써 일반적으로 사용되어지고 있는 셀레늄원은 무기태인 sodium selenite가 있으며, 유기 셀레늄으로는 selenocystine, selenomethionine 그리고 selenoyeast가 사용되고 있다.

현재 미국 FDA에서는 유기셀레늄원인 selenomethionine을 강화한 selenoyeast 제제를 가금류, 돼지 그리고 소의 사료 내 첨가제로의 사용을 승인하였다 (CFR, 2004). 그리고 selenoyeast와 같은 유기 셀레늄의 사용은 다른 여러 가지 미네랄과 같이 유기형태일 경우 동물에 있어서 이용률이 더 큰 것으로 알려져 있다.

대서양 연어 사료에 sodium selenite, selenomethionine 그리고 selenocystine을 각각 첨가하였을 경우 selenomethionine이 가장 이용률이 높았으며 (Bell and Cowey, 1989), Wang and Lovell (1997)의 보고에 따르면 sodium selenite와 selenomethionine을 채널메기 (Channel catfish) 사료에 각각 첨가하였을 경우 간의 Glutathione peroxidase 활성에서 selenomethionine이 sodium selenite 보다 2배 이상 높은 것으로 나타났다. 그리고 채널메기 사료에 selenomethionine, selenoyeast, sodium selenite를 각각 첨가하였을 경우 *Edwardsiella ictaluri* 균의 저항성에 있어서 selenomethionine과 selenoyeast가 sodium selenite 보다 낮은 폐사율을 보였다 (Wang et al., 1997).

본 실험은 국내 주요 양식어종인 넙치에 대해 면역 상승 첨가제로써 유기태 셀레늄원인 selenoyeast를 수준별 사용하였다. 그리고 각 실험 사료에 첨가되어지는 셀레늄의 첨가수준은 다음과 같은 셀레늄 요구량 및 독성 수준을 토대로 하여 설정하였다. 무지개송어 (Rainbow trout) 0.38 mg/kg (Hilton et al., 1980), 채널메기 (Channel catfish) 0.25 mg/kg (Gatlin III and Wilson, 1984) 및 그루퍼 (Grouper) 0.7 mg/kg (Lin and Shiau, 2005)의 셀레늄 요구량 수준을 보인다고 보고되어져 있다. 그리고 독성 수준에 대한 연구는 블루길 (Blue gill)의 사료 내에 6.5 mg Se/kg을 59일 동안 공급하였을 경우 생존율을 감소가 나타났으며 (Cleveland et al., 1993), 북부산연어 (Chinook salmon) 사료 내에 9.6 mg Se/kg을 90일 동안 공급하였을 경우 높은 폐사율을 나타내었다 (Hamilton et al., 1990). 그리고 줄무늬농어 (Striped bass)에 있어서 사료 내에 39 mg Se/kg을 80일 동안 공급하였을 경우 높은 폐사율을

보였다 (Coughlan and Velte, 1989). 반면에 흰철갑상어 (White sturgeon)의 경우 사료 내에 0.4-191.1 mg Se/Kg을 8주 동안 공급하였을 경우에도 평균 99%의 생존율을 보였다 (Tashjian et al., 2006). 또한 감성돔 (Black seabream)의 경우 사료 내에 12.1 mg Se/kg을 15주 동안 공급하였어도 폐사는 나타나지 않았다 (Lee, 2008).

본 실험에 있어서 12주간의 실험기간 동안 $Se_{43.15}$, $Se_{90.71}$ 및 $Se_{161.7}$ 첨가 수준에 있어서 셀레늄 농도가 증가함에 따라 높은 폐사율을 보였다. 주별 누적 폐사율을 측정된 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 실험이 경과됨에 따라 고농도의 실험구에서부터 폐사율이 발생되어지는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 본 결과는 셀레늄의 과잉 공급됨으로 인해 폐사율이 증가했을 것으로 사료된다. Lee (2008)의 보고에 따르면 넙치에 있어서 selenomethionine을 35.9 mg Se/kg 이상의 수준에서 90% 이상의 폐사율을 보였으며, 본 실험과 유사한 경향을 나타내었다. 또한, 넙치와 습성이 유사한 어종인 흰철갑상어 (White sturgeon)에 있어서 사료 내에 0.4-191.1 mg Se/kg을 8주 동안 공급하였을 경우 평균 99%의 생존율 (Tashjian et al., 2006)을 보인 것에 비하면 치어기 넙치에 있어서는 비교적 낮은 농도에서도 과잉 공급된 셀레늄에 의하여 독성영향을 받는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 이렇게 발생한 폐사율의 패턴은 앞서 설명되어진 것과 같이 사료에 첨가되어진 셀레늄 첨가 수준이 가장 높은 $Se_{161.7}$ 실험구에서 최초 발생하였으며 실험이 경과함에 따라 $Se_{90.7}$ 실험구에서도 높은 폐사가 발생하였다. 그리고 실험 진행 3주차에서부터 $Se_{43.2}$ 실험구에서도 급격히 폐사가 증가하였다. 이러한 경향은 조식내 셀레늄 축적량의 증가가 사료에 첨가한 셀레늄의 농도가 증가함에 따라 유의하게 증가한 점에서 미루어 조식내 셀레늄의 축적이 폐사율과 상관관계가 있음을 예측할 수 있으며, 이러한 구체적인 상관관계는 추가적인 실험을 통하여 연구되어야 할 것이다. 증체율 (WG), 사료효율 (FE), 일간성장률 (SGR), 단백질전환 효율 (PER)에 있어서 대조구와 실험구에서 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 2). 본 실험과 유사하게 채널 메기에 있어서는 사료에 0.2-5 mg Se/kg을 첨가하였을 경우 성장 차이를 보이지 않았다 (Gatlin III and Wilson, 1984). 하지만, 그루퍼 (Grouper)의 사료에 0.79 mg Se/kg, 1.23 mg Se/kg을 첨가하였을 경우 증체율과 사료 효율이 증가하는 것을 보였으며 (Lin and Shiau, 2005), 잡종 줄무늬농어 (Hybrid striped bass)의 경우 사료에 0.2 mg Se/kg을 첨가하였을 경우 높은 증체율과 일간성장률을 보였다고 보고한바 있다 (Cotter et al., 2007). 따라서 사료내 셀레늄 첨가에 따른 성장 효과의 차이는 어종 특이성을 가지며 넙치에 있어서는 0.56-4.56 mg Se/kg을 사료에 첨가하였을 경우 성장에는 영향을 미치지 않을 것으로 사료된다.

적혈구용적 (PCV), 적혈구수 (RBC), 혈색소농도 (Hb) 있어서도 전실험구에서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 3). 본 실험에서 혈액내 혈색소농도의 수치는 9.0-11.3

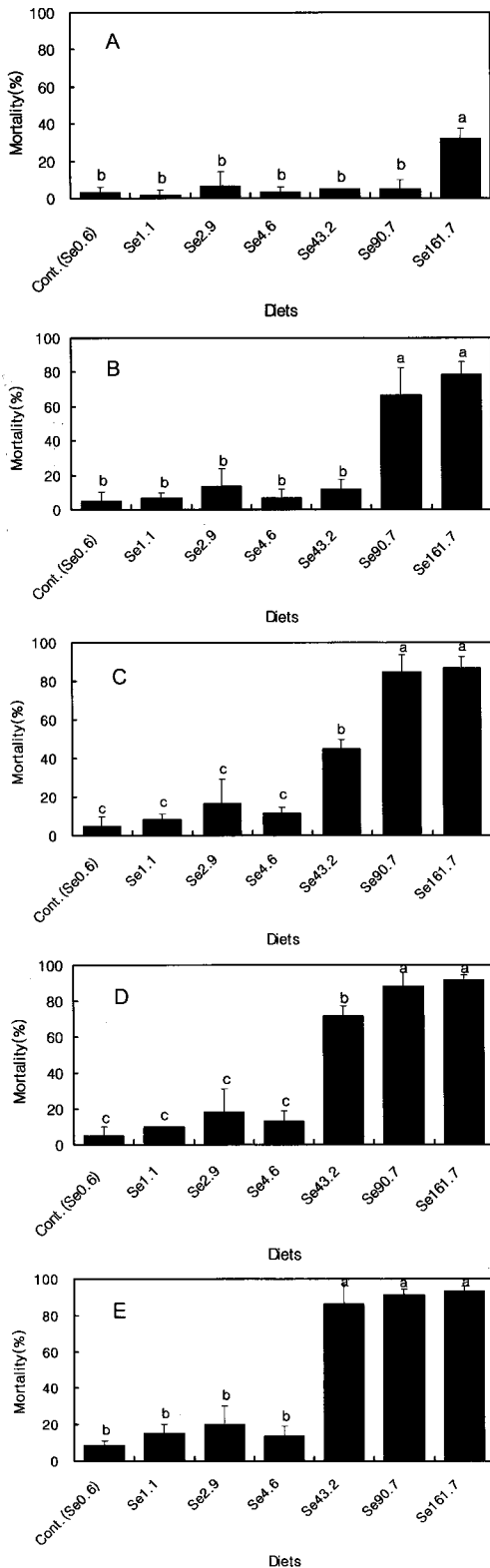


Fig. 1. Cumulative mortality of juvenile olive flounder fed the experimental diets for 12 weeks. (A) Mortality of fish fed the experimental diets for 1 week, (B) 2 weeks (C) 3 weeks (D) 4 weeks (E) 5 weeks. Different letters above the bars indicate significant difference among treatments, $p < 0.05$.

Table 2. Weight gain (WG), feed efficiency (FE), specific growth rate (SGR) and protein efficiency ratio (PER) of juvenile olive flounder fed four experimental diets¹

	Diets				Pooled SEM ⁶
	Cont. (Se _{0.56})	Se _{1.07}	Se _{2.86}	Se _{4.56}	
WG (%) ²	279.1	259.3	274.5	283.7	19.7
FE (%) ³	120.0	115.4	116.9	120.9	7.4
SGR (%) ⁴	2.0	1.9	2.0	2.0	0.1
PER ⁵	2.3	2.1	2.2	2.4	0.1

¹Means of triplicate groups; Values in the same row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

²Weight gain: [(final body weight-initial body weight)/initial body weight] × 100

³Feed efficiency: (wet feed weight gain/dry feed intake) × 100

⁴Specific growth rate: [(loge final body weight-loge initial body weight)/days] × 100

⁵Protein efficiency ratio: wet feed weight gain/protein intake

⁶Pooled standard error of mean: SD/\sqrt{n} .

Table 3. ALT (GPT), AST (GOT), Glucose (FBS), Total Protein, Red blood cell (RBC), haematocrit (PCV) and hemoglobin (Hb) of juvenile olive flounder fed four experimental diets¹

	Diets				Pooled SEM ⁹
	Cont. (Se _{0.56})	Se _{1.07}	Se _{2.86}	Se _{4.56}	
ALT ²	2.3	2.00	2.67	2.7	0.7
AST ³	36.0	38.3	40.7	46.0	6.9
Glucose ⁴	23.0	17.0	25.0	23.7	6.4
Total Protein ⁵	2.4	2.5	2.5	2.5	0.2
RBC ⁶	2.6	2.6	2.6	2.6	0.4
PCV ⁷	16.2	16.9	17.6	18.0	3.2
Hb ⁸	9.0	11.1	11.3	11.0	1.5

¹Means of triplicate groups; Values in the same row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

²Aspartic acid transaminase (GPT): IU/L

³Alanine transaminase (GOT): IU/L

⁴Glucose (FBS): mg/dL

⁵Total Protein: g/dL

⁶Red blood cell ($\times 10^6$ cell/ μ L).

⁷Hematocrit (%)

⁸Hemoglobin (g/100 mL).

⁹Pooled standard error of mean: SD/\sqrt{n} .

g/dL로 나타났으며, 이러한 수치는 일반적으로 건강한 어류의 혈액소농도 수치가 10 g/dL로 나타난 것과 비교하여 비슷한 수치를 나타내었다 (Post, 1983). 적혈구용적의 경우 본 실험에서는 16.2-18.0%로 나타났으며 치어기 넙치에 있어서 송강약들의 이용가능성을 평가한 실험 (Choi et al., 2004)에서 나타난 20.7-24.7%보다 낮은 수치를 나타내었다.

혈청성분에 있어서 Kim et al. (1998)은 사료 첨가제로서 간 기능 향상 효과가 있는 어보산의 경우 넙치 치어에서 어보산 첨가농도가 증가할수록 혈청내 총단백질 (total protein) 과 글루코스 (glucose) 함량은 증가한 반면에 AST (GPT), ALT (GOT)는 감소하는 경향을 나타냈다고 보고하였다. 하지만 본 실험에서는 혈청내 총단백질 (total protein) 2.4-2.5 g/100

mL, 글루코스 (glucose) 17.0-23.7 mg/100 mL, AST (GPT) 2.0-2.7 IU/L, ALT (GOT) 36-46 IU/L로서 유의적인 차이가 나타나지 않았다 (Table 3). 본 실험에 있어서 혈청성분 분석으로는 사료내 셀레늄의 효과를 파악할 수 없었다.

섭취한 사료를 통하여 흡수된 셀레늄은 혈액을 통하여 체내 여러 조직으로 운송되어 축적되는데 간과 신장에서 가장 높은 농도를 보이게 된다 (Jenkin and Winter, 1973). 본 실험 결과에서도 조직 내 셀레늄 축적량에 있어서 신장과 간이 사료 내 증가하는 셀레늄의 농도에 따라 축적률이 증가되는 것으로 나타났으며 축적량은 사료 내 셀레늄의 양이 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였으며 (Table 4), 흰철갑상어 (White sturgeon)에 있어서도 신장과 간이 아가미와 근육 조직 보다 셀레늄 축적률이 더 높은 것으로 나타났으며 (Tashjian et al., 2006), 새크라멘토 스피릿테일 (Sacramento splittail)에 있어서 또한 간의 셀레늄 축적률이 근육보다 높은 것으로 나타났다 (Teh et al., 2004). 일반적으로 동물의 혈액 중 셀레늄의 농도는 단기간 동안의 셀레늄 영향 상태를 나타내지만, 셀레늄이 조직 중에 축적되는 경우는 상당한 시간이 소요되므로 조직내의 셀레늄 농도를 통하여 장기간의 셀레늄에 대한 노출 상태를 확인할 수 있다. 그리고 간에서의 셀레늄 농도를 통하여 셀레늄 과잉 또는 결핍 유무를 확인할 수 있는 지표로 사용하고 있다 (Ammerman and Miller, 1975).

Table 4. Gill, muscle, kidney and liver Se concentration of juvenile olive flounder fed four experimental diets for 12 weeks¹

	Diets				Pooled SEM ²
	Cont. (Se _{0.56})	Se _{1.07}	Se _{2.86}	Se _{4.56}	
Gill	0.1 ^d	0.2 ^c	0.4 ^b	0.6 ^a	0.02
Muscle	0.1 ^d	0.2 ^c	0.7 ^b	1.0 ^a	0.02
Kidney	0.3 ^c	0.4 ^c	1.1 ^b	1.4 ^a	0.01
Liver	0.2 ^d	0.5 ^c	1.5 ^b	3.0 ^a	0.06

¹Values are means from triplicate groups of fish where the means in each row with a different superscript are significantly different (P<0.05).

²Pooled standard error of mean: SD/√n.

혈청 lysozyme의 활성 결과 유의한 차이는 없었지만 Se_{1.07}, Se_{2.86} 실험구의 lysozyme 활성이 대조구와 Se_{4.56} 실험구에 비하여 높은 경향을 나타냈다. Jaramillo (2006)의 보고에 따르면 잡종 줄무늬농어 (Hybrid striped bass)의 사료내 0.2 mg Seleno-DL-methionine/kg, 0.2 mg selenoyeast/kg을 첨가할 경우 lysozyme 활성이 증가 되며, 0.4 mg Se/kg에서는 lysozyme 활성이 오히려 감소한다고 보고하였다. 그리고 블루 구라미 (Blue gourami) 의 사육수에 Se₃²⁻의 형태로 0.1 ppm, 0.5 ppm, 2 ppm을 첨가하였을 경우 0.5 ppm을 첨가한 실험구에서 높은 lysozyme 활성을 보였다 (Low and Sin, 1996). 따라서 사료 내 일정수준의 셀레늄은 lysozyme 활성을 높여주지만 필요량 이상의 셀레늄은 오히려 활성을 떨어뜨린다고 사료되며

본 실험에서는 lysozyme 활성에서 유의한 차이를 보이지 않았지만 1.07-2.86 mg Se/kg에서 lysozyme 활성에 영향을 준 것으로 사료된다.

보체의 살균 능력은 24시간째부터 다른 실험구와 비교하여 Se_{1.07} 실험구에서 유의하게 높은 살균능력을 나타내었으며 (Fig. 2), Chemiluminescence (CL) response에 있어서도 Se_{1.07} 실험구가 유의하게 높은 값을 나타냈다 (Fig. 3). Wise et al. (1993)의 보고에 따르면, 채널 메기 (Channel catfish) 사료에 0.8 mg Se/kg을 첨가하였을 경우 0.06 mg Se/kg을 첨가한 실험구에 비하여 높은 호흡폭발 (Respiratory burst activity)활성을 나타내었으며, Arthur et al. (2003)은 셀레늄이 면역세포의 산화적 스트레스를 막는 역할을 한다고 보고하고 있으며 실제로 그루퍼 사료 내 적정량의 두 배 농도의 셀레늄을 첨가하였을 경우 구리에서 발생하는 산화적 스트레스를 이완시켜 면역을 향상시키는 결과가 나타났다 (Lin and Shiau, 2007). 또한, Low and Sin (1996)의 보고에서도 셀레늄은 lysozyme 활성과 Chemiluminescence (CL) response을 향상시키는 결과를 보였다.

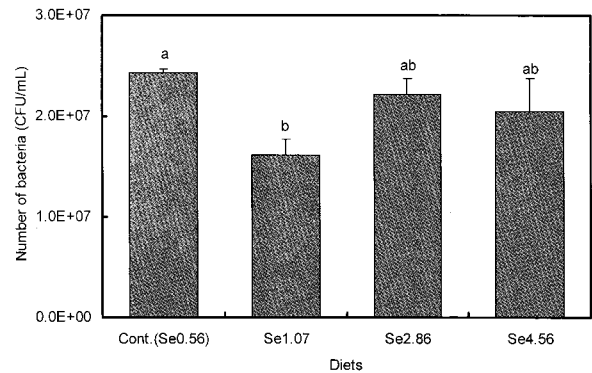


Fig. 2. Survival of *Escherichia coli* ATCC25922 in the complement of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed selenium in various concentration, respectively.

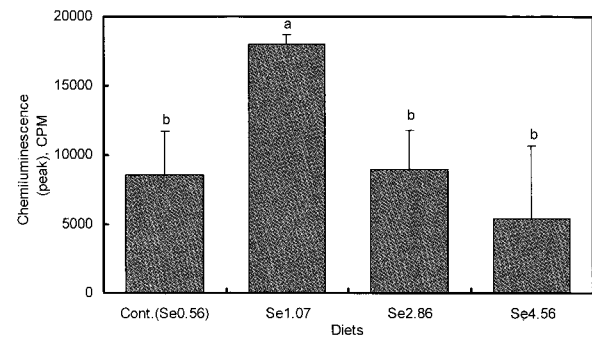


Fig. 3. Effect of selenium concentration on chemiluminescence response of head kidney macrophage of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

따라서 치어기 넘치 사료 내 첨가제로써 Selenoyeast를 셀레늄원으로 사용하였을 경우 적정 첨가 수준은 1.07 mg/kg으로 면역증진 효과를 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 (주)한국수리미와 2008년도 정부의 지원(교육과학기술부)으로 한국과학재단(No. R01-2007-000-11484-0)의 공동지원으로 수행된 결과이다. 본 연구 수행을 위하여 시료 분석을 도와주신 부경대학교 사료영양연구소 연구원들에게 깊은 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

- Ammerman, C.B. and S.M. Miller. 1975. Selenium in ruminant nutrition: A review. *J. Dairy Sci.*, 58, 1561-1577.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2000. Cunniff, P. (Ed.), *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 16th edition. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, VA.
- Arthur, J.R. 2000. The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 57, 1825-1835.
- Arthur, J.R., R.C. McKenzie and G.J. Beckett. 2003. Selenium in the Immune System. *J. Nutr.*, 133, 1457-1459
- Bell, J.G. and C.B. Cowey. 1989. Digestibility and bioavailability of dietary selenium from fishmeal, selenite, selenomethionine and selenocysteine in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 81, 61-68.
- CFR (Code of Federal Regulations). 2004. Office of the Federal Register, National Archives and Records Administration. Washington, D.C., USA. Title 21, Chapter I, Part 573.920.
- Choi, S.M., S.H. Ko, G.J. Park, S.R. Lim, G.Y. Yu, J.K. L and S.C. Bai. 2004. Utilization of Song-Gang stone as the dietary additive in Juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Aquaculture*, 17, 39-45.
- Cleveland, L., E.E. Little, D.R. Buckler and R.H. Wiedmeyer. 1993. Toxicity and bioaccumulation of waterborne and dietary selenium in juvenile bluegill, *Lepomis macrochirus*. *Aquat. Toxicol.*, 27, 265-280.
- Cotter, P.A., S.R. Craig and E. Mclean. 2007. Hyperaccumulation of selenium in hybrid striped bass: a functional food for aquaculture. *Aquaculture Nutr.*, 13, 1-8.
- Coughlan, D.J. and J.S. Velte. 1989. Dietary toxicity of selenium-contaminated red shiners to striped bass. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 118, 400-408.
- Gatlin III, D.M. and R.P. Wilson. 1984. Dietary selenium requirement of fingerling channel catfish. *J. Nutr.*, 114, 627-633.
- Hamilton, S.J., K.J. Buhl, N.L. Faerber, R.H. Wiedmeyer and F.A. Bullard. 1990. Toxicity of organic selenium in the diet of chinook salmon. *Envir. Toxicol. Chem.*, 9, 347-358.
- Hilton, J.W., P.V. Hodson and S.J. Slinger. 1980. The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Nutr.*, 110, 2527-2535.
- Jaramillo, F. 2006. Selenium Nutrition of Morone Hybrids Including Dietary Requirements, Bioavailability, Toxicity and Effects on Immune Responses and Disease Resistance. Ph.D dissertation, Texas A&M University, Texas, USA.
- Jenkin, K.J. and K.A. Winter. 1973. Effects of selenium supplementation of naturally high selenium swine rations on tissue levels of the element. *Can. J. Anim. Sci.*, 53, 561-567.
- Kim, D.S., J.H. Kim, C.H. Jeong, S.Y. Lee, S.M. Lee, and Y.B. Moon. 1998. Utilization of Obosan (dietary herbs) I. Effects on survival, growth, feed conversion ratio and condition factor in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Aquaculture*, 11, 213-221.
- Kim, Y.Y. 2000. Differences in biological activity and methbolism of selenium due to its chemical form. *J. Anim. Sci. Technol. (Kor.)*, 42, 835-848.
- Kim, Y.Y. and D.C. Mahan. 2001. Comparative effects of high dietary levels of organic and inorganic selenium on selenium toxicity of grower finisher pigs. *J. Anim. Sci.*, 79, 942-948.
- Kryukov, G.V. and V.N. Gladyshev. 2002. Mammalian selenoprotein gene signature: identification and functional analysis of selenoprotein genes using bioinformatic methods. In: *Methods in Enzymology* 347 (Sies, H. and Packer, L., eds.), 84-100. Academic Press, San Diego, CA.
- Lee, S.H. 2008. Effects of dietary selenium (Se) levels in juvenile black seabream, *Acanthopagrus* and olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. MS Thesis, Pukyong National University, Busan, Korea.
- Lescure, A., D. Gautheret and A. Krol. 2002. Novel selenoproteins identified from genomic sequence data. In: *Methods in Enzymology* 347 (Sies, H. and Packer, L., Eds.), 57-70. Academic Press, San Diego, CA.
- Lin, Y.H. and S.Y. Shiau. 2005. Dietary selenium requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*, 250, 356-363.
- Lin, Y.H. and S.Y. Shiau. 2007. The effects of dietary selenium on the oxidative stress of grouper, *Epinephelus malabaricus*, fed high copper. *Aquaculture*, 267, 38-43.
- Low, K.W. and Y.M. Sin. 1996. In vivo and in vitro

- effects of mercuric chloride and sodium selenite on some non-specific immune responses of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus). *Fish Shellfish Immunol.*, 6, 351-362.
- Mahan, D.C. and Y.Y. Kim. 1996. Effect of inorganic or organic selenium at two dietary levels on reproductive performance and tissue selenium concentrations in first-parity gilts and their progeny, *J. Anim. Sci.*, 74, 2711-2718.
- Miles, A.A. and S.S. Misra. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood, *J. Hygiene*, 38, 732-49.
- Miller, S., S.W. Walker, J.R. Arthur, F. Nicol, K. Pickard, M.H. Lewin, A.F. Howie and G.J. Beckett. 2001. Selenite protects human endothelial cells from oxidative damage and induces thioredoxin reductase. *Clin. Sci.*, 100, 543-550
- Pfeifer, H., M. Conrad, D. Roethlein, A. Kyriakopoulos, M. Brielmeier, G.W. Bornkamm and D. Behne. 2001. Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J.*, 15, 1236-1238
- Post, G. 1983. Nutrition and nutritional diseases of fish In: *Textbook of fish health*. TFH. Publications, Inc., Ltd., 199-207.
- Scott, A.L. and P.H. Klesius. 1981. Chemiluminescence: a novel analysis of phagocytosis in fish. *Develop. Bio. Standardization*, 49, 243-254.
- Secombes, C.J. 1990. Isolation of Salmonid Macrophages and Analysis of their Killing Activity in Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS and van Muiswinkel WB (eds) *Techniques in Fish Immunology*, No. 1, SOS Publications, 137-154.
- Stohs, S.J. and D. Bagchi. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.*, 18, 321-336.
- Takahashi, K., K. Mori and T. Nomura. 1986. Occurrence and characterization of lysozyme from marine bivalves, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 52, 863-868.
- Tashjian, D.H., S.J. Teh, A. Sogomonyan and S. Hung. 2006. Bioaccumulation and chronic toxicity of dietary l-selenomethionine in juvenile white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Aquatic Toxicol.*, 79, 401-409.
- Teh, S.J., X. Deng, D.F. Deng, F.C. Teh, S.S.O. Hung, T.W.M. Fan, J. Liu and R.M. Higashi. 2004. Chronic effects of dietary selenium on juvenile Sacramento splittail, *Pogonichthys macrolepidotus*. *Environ. Sci. Technol.*, 38, 6085-6093.
- Turner, R.J. and J.M. Finch. 1991. Selenium and the immune response. *Proc. Nutr. Soc.*, 50, 275-285.
- Walsh, D.M., D.G. Kennedy, E.A. Goodall and S. Kennedy. 1993. Antioxidant enzyme activity in the muscles of calves depleted of vitamin E or selenium or both. *Br. J. Nutr.*, 70, 621-630.
- Wang, C., R.T. Lovell and P.H. Klesius. 1997. Response to *Edwardsiella ictaluri* challenge by channel catfish fed organic and inorganic sources of selenium. *J. Aquat. Anim. Health*, 9, 172-179.
- Wang, C. and R.T. Lovell. 1997. Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than an inorganic selenium source, sodium selenite, in diets for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 152, 223-234.
- Wichtel, J.J. 1998. A review of selenium deficiency in grazing ruminants part 1: new roles for selenium in ruminant metabolism. *N. Z. Vet. J.*, 46, 47-52.
- Wise, D.J., J.R. Tomasso, D.M. Gatlin, III, S.C. Bai and V.S. Blazer. 1993. Effects of dietary selenium and vitamin E on red blood cell peroxidation, glutathione peroxidase activity, and macrophage superoxide anion production in channel. *J. Aquat. Anim. Health*, 5, 177-182.
- Yoo, B.H., S.I. Park and S.K. Chun. 1992. Bactericidal action by complement of fish serum. *J. Fish Pathol.*, 5, 9-18.

2008년 11월 25일 접수
2009년 2월 17일 수리