

## 키토산올리고당(Chitosan oligosaccharide)이 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 성장에 미치는 영향

송 영 보 · 이 영 돈 · 오 천 금  
제주대학교 해양과환경연구소 · (주)건풍바이오

### Effects of Chitosan oligosaccharide on Growth of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Young-Bo SONG, Young-Don LEE and Chen-Gum OH

Marine and Environmental Research Institute, Cheju National University, Jeju 695-814, Korea  
Kunpoong Bio Co., Ltd., Jeju 695-832, Korea

This research was investigated to verify the effects of Chitosan oligosaccharide (COS) on the growth of the olive flounder *P. olivaceus* and the optimal dietary concentration of the COS. The total length and body weight of experimental fish were significantly different between the control group and each treatment group ( $P < 0.05$ ). Total weight gain, daily growth rate, daily feeding rate, and feed coefficient were higher in the COS treatment groups compared to the control group. Levels of GOT, GPT, and total cholesterol were much lower in the COS treatment groups than in the control group. From the above results, it is considered that the addition of COS to feeds for *P. olivaceus* could be effective on fish growth.

**Key words** : *Paralichthys olivaceus*, chitosan oligosaccharide, growth, GOT, GPT.

Corresponding author: leemri@cheju.ac.kr

#### 서 론

우리나라의 넙치, *Paralichthys olivaceus* 양식은 1980년대 들어 인공종묘생산 기술이 개발된 이후 현재 양식기술의 보편화로 종묘생산부터 양성까지 완전 양식이 이루어지고 있다. 넙치 양식에 있어서 사료는 이체의 건강과 성장에 영향을 미치는 주된 요인으로 작용한다. 사료의 효율과 양식생산성을 향상시키기 위하여

생명 공학지 기법을 이용해 동물의 성장호르몬 (Ishioke et al., 1992; Kawachi et al., 1992; Rho et al., 1999)이나 천연물질의 추출물(Kim et al., 1998; Song, 2000)을 사료에 첨가하여 급여 한 경우가 있다.

키티탄·키토산은 게, 새우등의 갑각류 및 연체류의 껍질, 그리고 곤충류, 미릿류 및 사상균의 세포벽 등에 함유되어 있으며, 그 생산량은 연간  $1.2 \times 10^{11}$ 톤에 이르며, 셀룰로오스와 유사한

구조를 가진 천연 고분자 화합물이다(김, 1997). 키틴·키틴산은 면역력 증가, 항균성, 콜레스테롤 저하, 식욕증진 효과 등이 있다(김, 1997; Kim et al., 2000; Bullock et al., 2000). 그리고 키틴·키틴산은 식품첨가물로서 이용가능성(Shahidi et al., 1999), 그리고 어류의 성장에 미치는 영향(Kono et al., 1987; Kono et al., 1995; Shiao and Yu, 1999) 및 어류의 혈액조성에 미치는 영향(Wada et al., 1995)에 대한 연구가 있다.

이 연구는 (주)건풍바이오에서 해산 갑각류에 속하는 게의 껍질을 이용하여 추출한 키틴산을 주원료로 효소 분해한 키틴산올리고당(Chitosanoligosaccharide, COS)을 낚치 사료에 첨가하였을 때, COS가 낚치의 성장에 미치는 영향을 조사하여 사료에 첨가할 적정 농도를 결정하고, 사료첨가제로서의 가능성을 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험어 및 사육환경

실험어는 평균 전장  $9.64 \pm 0.39$  cm, 평균 체중  $8.76 \pm 1.22$  g인 낚치 치어를 이용하여, 1999년 11월 11일부터 2000년 10월 21일까지 총 49주 동안 사육하였다. 실험구는 COS 0.2% 처리구는 2반복 그 외의 실험구는 각각 3반복으로 각 수조당 50~55마리씩 PP원형수조( $\varnothing 70$  cm $\times$ 60 cm)에서 16주동안 사육하였고, 이후 FRP원형수조( $\varnothing 150$  cm $\times$ 100 cm)에서 실시하였다. 환수량은 20~25회전/일 이었다.

실험 기간중의 수온, 용존산소(dissolved oxygen, DO), pH, 비중을 매일 측정하였으며, DO는 DO meter (DO-14P), pH는 pH meter (HM-12P), 염분은 광학염분계(S/Mill-E, ATAGO)를 사용하였다.

### 2. COS 첨가사료 및 성장

#### 1) 사료공급

실험구는 COS를 고압팽창사료(extruded pellet, EP) kg당 0.2%, 0.5%, 1.0%를 사료에 혼합시켜 첨가하여 공급한 처리구와 COS를 첨가하지 않고 고압팽창사료만을 공급한 대조구로 선정하였으며, 1일 2~3회 실험이 끝날 때까지 섭이할때까지 공급하였다.

#### 2) 성장

실험어의 전장과 체중은 4주마다 각 수조별로 무작위로 30마리씩 샘플링하여 측정하였으며, 전장은 1mm까지, 체중은 전자저울(Sartorius, BP 3100S)로 0.1 g까지 측정하였다. 총 증중량(total weight gain), 일간성장률(daily growth rate), 일간섭이율(daily feeding rate) 및 사료계수(feed coefficient)를 계산하여 각 실험구간의 값을 비교하였다.

### 3. 조직학적 관찰

COS 첨가에 따른 간의 조직학적 변화를 관찰하기 위해, 각 실험구별로 5마리씩 표본 추출하여 실험어의 간을 Bouin's solution에 고정하였고, paraffin에 포매하여 5  $\mu$ m 두께로 절편을 제작하였다. 절편은 Hansen's hematoxylin과 0.5% eosin의 비교염색과 Periodic Acid Schiff (PAS) 염색을 실시한 후 광학현미경으로 검경하였다. 간세포와 핵의 크기는 digital camera로 촬영한 후 Image analysis program (Image Line, Inc)을 이용하여 측정하였다.

### 4. 혈액분석

혈액은 하루동안 절식시킨 실험어의 미부 동맥에서 일회용 주사기로 채혈하였다. 혈액 분석은 각 실험구별로 3~5마리씩 혈액을 채취한 후 원심분리(5,000 rpm, 15분)하여 혈장 내의

GOT (glutamic oxaloacetic transaminase), GPT (glutamic protein transaminase)의 활성 및 total cholesterol 양을 Reitman-Frankel 방법으로 측정하였다. 혈액분석은 총 3회에 걸쳐 4월과 5월 그리고 11월에 실시하였다.

## 결 과

### 1. 사육환경

실험기간 동안 사육 수온은 12.2~25.8°C의 범위였고, 최저수온은 1월달에 10.7°C 이었으며, 최고수온은 8월달에 28.7°C 이었다. 사육수의 염분, DO, pH는 각각 32.7~35.0‰, 6.3~9.5 mg/L, 7.5~8.5 범위였다.

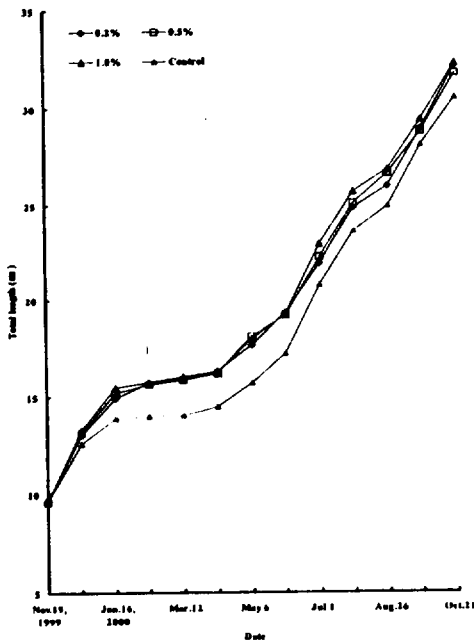


Fig. 1. Changes of the total length of olive flounder, *P. olivaceus* by oral administration of COS (Chitosan oligosaccharide) at different concentrations and control.

### 2. COS 첨가사료의 성장효과

#### 1) 성장 및 생존율

실험시작시 실험어의 전장은  $9.64 \pm 0.39$  cm 이었으며, 실험종료시 대조구에서  $30.42 \pm 2.03$  cm로 성장하였고, COS 0.2%, 0.5% 그리고 1.0% 처리구에서 각각  $32.04 \pm 1.70$  cm,  $31.64 \pm 1.53$  cm,  $32.19 \pm 2.14$  cm로 성장하여 대조구와 모든 COS 처리구간에 유의한 차이가 있었다 (Fig. 1, Table 1,  $P < 0.05$ ).

실험시작시 실험어의 체중은  $8.50 \pm 2.93$  g 이었으며, 실험종료시 대조구에서  $307.99 \pm 69.05$  g으로 성장하였고, COS 0.2%, 0.5% 그리고 1.0% 처리구에서 각각  $348.85 \pm 58.01$  g,  $337.44 \pm 57.77$  g,  $356.18 \pm 73.62$  g으로 성장하여, 대조구와 모든 COS 처리구간에 유의한 차이가 있었다 (Fig. 2, Table 1,  $P < 0.05$ ).

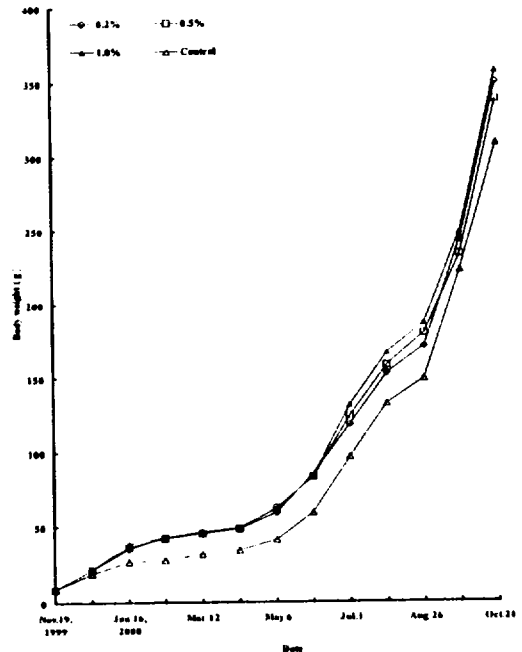


Fig. 2. Changes of the body weight of olive flounder, *P. olivaceus* by oral administration of COS (Chitosan oligosaccharide) at different concentrations and control.

**Table 1.** Total length, body weight and survival rate of olive flounder, *P. olivaceus* by oral administration of COS (Chitosan oligosaccharide) at different concentration and control

Feeding period: Nov. 20, 1999 through Oct. 20, 2000

Experimental group	Initial			Final				Survival rate (%)
	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	Number of fish	TL (cm)	BW (g)	W. gain (g)	
Control	150	9.67±0.40	8.69±1.15	127	30.42±2.0 <sup>b</sup>	307.99±69.1 <sup>b</sup>	37,811.2	84.7
0.2%	100	9.69±0.37	9.00±1.29	84	32.04±1.7 <sup>n</sup>	348.85±58.0 <sup>n</sup>	28,403.4	84.0
0.5%	155	9.57±0.44	8.64±1.29	129	31.64±1.5 <sup>n</sup>	337.44±57.8 <sup>n</sup>	42,190.6	83.2
1.0%	150	9.67±0.35	8.82±1.20	129	32.19±2.1 <sup>n</sup>	356.18±73.6 <sup>n</sup>	44,624.2	86.0

Mean values in the same column which have different superscript letter differ significantly (P<0.05). Control, 0.5%, and 1.0% treatment groups were conducted in triplicate and 0.2% treatment group was conducted in duplicate.

\* Weight gain (TWG) = IW - FW (FW: final weight IW: initial weight)

**Table 2.** Feed coefficient, daily feeding rate and daily growth rate of olive flounder, *P. olivaceus* fed a diet with different levels of COS (Chitosan oligosaccharide)

Feeding period: Nov. 20, 1999 through Oct. 20, 2000

Experimental group	Feed coefficient <sup>1)</sup>	Daily growth rate(%) <sup>2)</sup>	Daily feeding rate(%) <sup>3)</sup>
Control	0.75	0.58	0.44
0.2%	0.71	0.57	0.41
0.5%	0.72	0.60	0.43
1.0%	0.70	0.58	0.41

The quantity of COS (Chitosan oligosaccharide) added to the extruded pellet (EP) was expressed as the percent of the amount of feed supplied

<sup>1)</sup> feed coefficient (FC) = TF/WG

<sup>2)</sup> daily growth rate (DGR) = (W. gain×100)/(IW + FW)×day fed/2)

<sup>3)</sup> daily feeding rate (DFR) = (TF × 100)/(IW + FW) × day fed/2)

BW: body weight, FW: final weight IW: initial weight.

TF: total feed, TL: total length, WG: weight gain

총 증중량은 실험종료시 COS 0.2%와 0.5% 그리고 1.0%처리구에서 28,403.4g, 42,190.6 g, 44,624.2 g 이었고, 대조구는 37,811.2 g 이었다(Table 1).

실험 종료시 생존율은 COS 1.0% 처리구에서 86.0%로 대조구와 다른 실험구의 83.2~84.7%보다 높은 생존율을 보였다.

2) 사료계수, 일간성장률 및 일간섭이율 실험기간동안의 사료계수, 일간성장률 및 일간섭이율에 대한 결과는 Table 2에 나타내었다.

사료계수는 대조구에서 0.75였고, COS 0.2%, 0.5% 그리고 1.0% 처리구에서 각각 0.71, 0.72, 0.70이었다. 일간성장률은 대조구

**Table 3.** Levels of GOT, GPT and total cholesterol of the blood plasma with the different levels of COS supplement to diet in olive flounder, *P. olivaceus*

Items	Experimental groups		Control	0.2%	0.5%	1.0%
	Sampling date					
GOT (IU/ℓ)	Apr. 8		34.05±1.42	23.13±1.69	24.62±1.79	18.29±1.28
	May 6		30.70±6.22	31.08±8.40	23.33±1.03	26.10±2.13
	Oct. 21		40.64±11.57	35.12±8.77	27.44±7.39	28.93±8.23
GPT (IU/ℓ)	Apr. 8		6.34±0.87	6.42±1.76	5.47±1.14	5.53±1.39
	May 6		11.08±3.16	11.44±2.11	8.58±1.20	10.13±0.10
	Oct. 21		35.18±14.83	33.45±9.05	26.50±3.75	27.71±5.99
Total cholesterol (mg/dl)	Apr. 8		293.38±0.68	270.78±58.23	276.81±21.89	279.22±12.05
	May 6		320.17±28.78	308.83±43.22	191.67±29.33	296.83±11.56
	Oct. 21		233.62±56.47	205.04±39.39	166.61±20.51	160.55±23.18

GOT: glutamate oxaloacetate transaminase or AST (aspartate aminotransferase)

GPT: glutamate pyruvate transaminase or ALT (alanine aminotransferase)

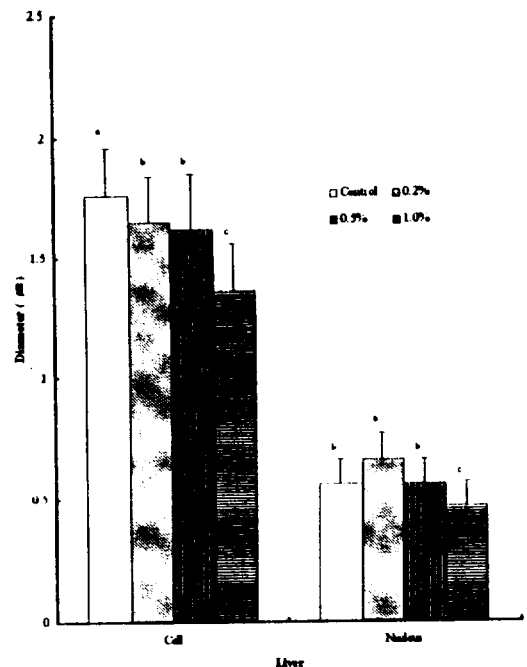
에서 0.58%였으며 COS 0.2%, 0.5%, 1.0% 처리구에서 각각 0.57%, 0.60%, 0.58%이었다. 일간섭이율은 대조구에서 0.44%였고, COS 0.2%, 0.5%, 1.0% 처리구에서 각각 0.41%, 0.43%, 0.41% 이었다.

### 3. 조직학적 관찰

간세포의 크기는 대조구에서  $1.76 \pm 0.20 \mu\text{m}$ 였고 COS 0.2%, 0.5%, 1.0% 처리구에서 각각  $1.65 \pm 0.19 \mu\text{m}$ ,  $1.62 \pm 0.23 \mu\text{m}$ ,  $1.36 \pm 0.20 \mu\text{m}$ 로, 처리구와 대조구간에 유의차가 있었다 (Fig. 3,  $P < 0.05$ ). 대조구의 간 조직에서 간세포는 간세포질의 공포화 현상이 있었으나, 반면에 COS 처리구에서 간세포의 세포질은 PAS에 양성 반응을 가져 공포화 현상은 거의 없었다 (Fig. 4).

### 4. 혈액분석

총 3회에 걸쳐 실시한 혈액분석 결과는 Table 3과 같다. GOT와 GPT 값은 실험어가



**Fig. 3.** Diameter of the liver cell and nucleus of liver cell of olive flounder, *P. olivaceus* fed a diet with different levels of COS (Chitosan oligosaccharide)

성장함에 따라 증가하는 경향을 보였으며, 3회 모두 대조구보다 COS 처리구에서 낮은 값을 나타내었다. 3차 실험시 GOT 값은 대조구에서  $40.64 \pm 11.57$  IU/L 이었고, COS 0.2%, 0.5% 그리고 1.0% 처리구에서 각각  $35.12 \pm 8.77$  IU/L,  $27.44 \pm 7.39$  IU/L,  $28.93 \pm 8.23$  IU/L로 대조구보다 낮았다.

3차 실험시 GPT의 값은 대조구에서  $35.18 \pm 14.83$  IU/L 이었고, COS 0.2%, 0.5%, 1.0% 처리구에서 각각  $33.45 \pm 9.05$  IU/L,  $26.50 \pm 3.75$  IU/L,  $27.71 \pm 5.99$  IU/L로 대조구보다 낮았다.

Total cholesterol 양은 모든 실험구에서 실험어가 성장함에 따라 점점 낮아지는 경향을 나

타내었으며, 3차 실험시 대조구에서  $233.62 \pm 56.47$  mg/dl로 가장 높은 값을 보인 반면, COS 0.2%, 0.5%, 1.0% 처리구에서 각각  $205.04 \pm 39.39$  mg/dl,  $166.61 \pm 20.51$  mg/dl,  $160.55 \pm 23.18$  mg/dl로 모든 처리구에서 대조구보다 낮았다.

## 고 찰

이 연구는 계의 껍질을 이용하여 추출한 키토산을 주원료로 효소 분해한 키토산올리고당을 넉치의 사료에 혼합하여 공급하였을 때, 넉치의 성장, 혈액조성, 체성분 등에 미치는 영향을 조사하였다.

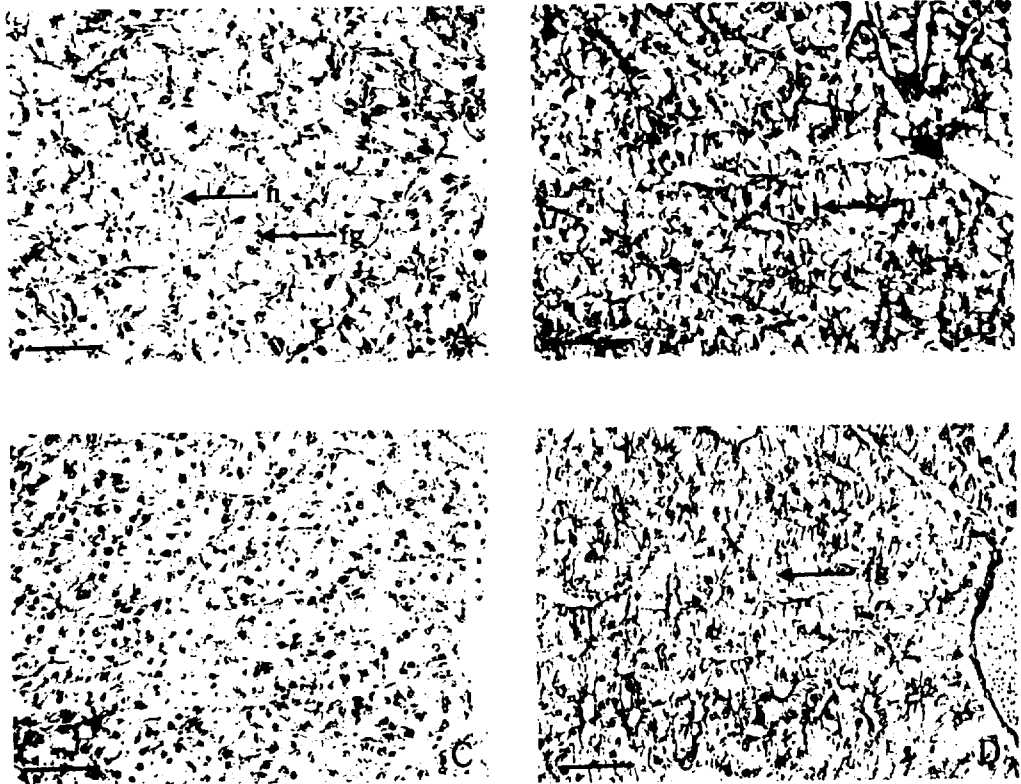


Fig. 4. Photomicrographs of liver tissue of olive flounder fed a diet supplemented with Chitosan oligosaccharide (C and D) and only a diet (A and B). A. control group. HE stain; B. control group. PAS reaction; C. Chitosan oligosaccharide supplement groups. HE stain; D. Chitosan oligosaccharide supplement groups. PAS stain. fg. fat globule; n. nucleus. Scale bar = 25  $\mu$ m.

전장은 실험시작 4주 후부터 실험구간에 유의차가 인정되어 실험 종료시 대조구에서  $30.42 \pm 2.03$  cm이었고, COS 0.2%, 0.5% 그리고 1.0% 처리구에서 각각  $32.04 \pm 1.70$ ,  $31.64 \pm 1.53$ ,  $32.19 \pm 2.14$  cm로, 대조구와 모든 COS 처리구간에 유의한 성장 차이가 인정되었다( $P < 0.05$ ). 체중 또한 실험 시작 4주 후부터 실험구간에 유의차가 인정되었으며, 실험 종료시 평균체중은 대조구에서  $307.99 \pm 69.05$  g이었으며, COS 0.2%, 0.5% 그리고 1.0% 처리구에서는 각각  $348.85 \pm 58.01$  g,  $337.44 \pm 57.77$  g,  $356.18 \pm 73.62$  g을 나타내어 대조구와 모든 COS 처리구간에 유의한 성장 차이가 인정되었다( $P < 0.05$ ). 이러한 성장 차이는 실험 초기에 일일성장률이 대조구에 비해서 COS 처리구가 높았기 때문으로 생각된다.

실험구별 생존율은 대조구에서 84.7%이었고, COS 0.2%, 0.5% 그리고 1.0% 처리구에서 각각 84.0%, 83.2%, 86.0%로 COS 1.0% 처리구에서 대조구보다 높았으나, 나머지 처리구에서는 대조구와 비슷한 값을 보였다. 총 증중량은 실험종료시 COS 0.2%와 0.5% 그리고 1.0% 처리구에서 28,403.4g, 42,190.6g, 44,624.2g 이었고, 대조구는 37,811.2 g 이었다.

키토산·키토산이 어류의 성장에 미치는 연구에 있어서 키틴, 키토산 그리고 셀룰로오스를 참돔, 뱀장어 그리고 망어의 사료에 첨가하여 공급한 실험에서 키틴 10%를 공급한 실험구에서 성장률이 높았고(Kono et al., 1987), 키토산을 공급한 실험구에서는 대조구와 차이가 없었다. 키틴을 가수분해한 D-glucosamine 0.1%를 사료에 첨가하여 공급한 실험구와 N-acetyl-D-glucosamine 0.1% 처리구에서 낚치와 뱀장어의 성장에 효과가 있었으나(Kono et al., 1995), 키틴(poly-β-(1-4)-N-acetyl-glucosamine) 과 키틴을 탈아세틸화하여 얻은 키토산을 틸라

피아, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* 치어에 공급하였을 때 대조구보다 성장이 낮았다(Shiau and Yu, 1999).

이 실험의 결과 키토산을 효소 분해하여 추출한 키토산올리고당(Chitosan oligosaccharide)을 낚치의 사료에 0.2~1.0% 공급한 모든 실험구에서 대조구보다 성장이 양호하였다. 이러한 차이는 효소 분해를 통한 키토산 올리고당이 어체 내에서 소화흡수가 용이하기 때문이라 생각된다.

이 실험에서 사료계수는 대조구에서 0.75였고, COS 0.2%, 0.5% 그리고 1.0% 처리구에서 각각 0.71, 0.72, 0.70으로 대조구보다 낮았고, 일간성장률 및 일간섭이율 또한 대조구보다 모든 COS 처리구에서 향상되었다. 키틴, 키토산 그리고 셀룰로오스를 참돔, 뱀장어 그리고 망어의 사료에 첨가하여 공급한 실험에서 키틴 10%를 공급한 실험구는 사료효율이 높았으나, 키토산 실험구에서 사료효율이 낮게 나타났다(Kono et al., 1987). COS와 키토산 그리고 키틴의 첨가에 따른 사료효율의 차이는 첨가농도와 어종의 차이에서 기인하는 것으로 생각된다.

COS 공급에 따른 낚치의 간세포의 크기는 대조구에서  $1.76 \pm 0.20$  μm였고 COS 0.2%, 0.5%, 1.0% 처리구에서 각각  $1.65 \pm 0.19$ ,  $1.62 \pm 0.23$ ,  $1.36 \pm 0.20$  μm로, 처리구와 대조구간에 유의차가 있었다( $P < 0.05$ ). 그러나 간세포내의 핵의 크기에서는 별다른 차이를 발견할 수 없었다.

간 기능에 대한 간접적인 지표인 GOT, GPT의 변화를 3회에 걸쳐 관찰한 이번 실험에서 GOT 값은 실험어가 성장할수록 점차 증가하는 경향이 있었으며, 각각의 실험에서 모든 COS 처리구에서 대조구보다 낮았다. 또한 GPT의 값은 GOT와 같은 경향으로 실험어가 성장할수록 점차 증가하였고, 모든 COS 처리구에서 대조구

보다 낮았다. total cholesterol의 양은 실험이  
가 성장할수록 점차 낮아지는 경향이었고, 모든  
COS 처리구에서 대조구보다 낮았다. 이는 키토  
산을 쥐를 대상으로 경구투여와 복강주사를 했  
을 때 혈청 total cholesterol과 중성지방의 저  
하와 GPT가 저하하는 것(Wada et al.,  
1995)과 같은 경향이였다. 키토산이 혈액 성상  
에 미치는 원인으로는 첫째, 키토산에 의해 담  
즙산이 변으로 배설이 증가시키는 작용과 둘째,  
키토산이 콜레스테롤 에스테라제의 저해를 통한  
콜레스테롤 에스테르의 분해저해와 콜레스테롤  
흡수저해를 통한 혈액 중 콜레스테롤의 저하에  
서 기인한다(김, 1997). 어류의 혈액내 적정  
GOT, GPT 및 total cholesterol의 양은 아직  
까지 그 기준 범위가 구체화되고 있지 않으나,  
대조구와 처리구를 비교하여 보면, COS는 어류  
의 간 기능을 향상시키고, 혈중 cholesterol을  
저하시키는 것으로 판단되었다.

COS를 넙치사료에 첨가하였을 때, 넙치의  
사료효율 증가와 간 기능 활성으로 넙치의 성장  
과 생리활성에 보조하는 사료첨가제로서 이용가  
치가 높은 것으로 생각된다.

### 참고문헌

- Allen, A., D. A. Hutton, A. J. Leonard, J.  
P. Pearson and L. A. Sellers. 1986.  
The role of mucus in the protection  
of the gastroduodenal mucosa. Scand  
J. Gastroenterol. 21(suppl. 125), 7  
1~77.
- Bullock, G., V. Blazer, S. Tsukuda and S.  
Summerfelt. 2000. Toxicity of acidified  
chitosan for cultured rainbow trout,  
*Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture. 185  
(3~4), 273~280.
- Fukuhara, O. 1986. Morphological and  
functional development of japanese  
flounder in early life stages. Bull.  
Jap. Soc. Sci. Fish., 52, 81~91.
- Ishioka, H., R. Kosugi, K. Ouchi, A. Hara,  
T. Nagamatsu, S. Mihara, and H.  
Ogai. 1992. Effects of recombination  
red sea bream growth hormone on  
growth of young red sea bream.  
Nippon Suisan Gakkaishi. 58(12),  
2335~2340.
- Jo, U. B., S. R. Kim and B. T. Choi.  
1994. Alleviating effects of vitamin  
C on the gramoxone toxicity in the  
mucosubstances of rat duodenum.  
J. Korean Soc. Food Nutr., 23(3),  
396~401.
- Kawauchi, H., S. Moriyama and T.  
Hirano. 1992. Oral administration of  
recombinant salmon growth hormone  
to rainbow trout. Oceanis. 18, 109~  
120.
- 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*. Journal of Aquaculture.  
11(2), 213~221 (in Korean).
- Kim, S. K., Y. J. Jeon and C. Z. Hong.  
2000. Antibacterial effect of  
chitooligosaccharides with different  
molecular weights prepared using  
membrane bioreactor. J. Chitin ·  
Chitosan. 5(1), 1~8.
- Kono, M., T. Matsui and C. Shimizu.  
1987. Effect of chitin, chitosan and



- cellulose as diet supplements on the growth of cultured fish. Nippon Suisan Gakkaishi. 53(1), 125~129.
- Kono, M., K. Y. Matahiru and K. Sakai. 1995. Effect of D-glucosamine and N-acetyl-D- glucosamine as diet supplement on the growth of cultured fish. Research of Chitin · Chitosan. 1, 144~145.
- Lee, J. M. 1988. Histological studies on the digestive tracts of the larvae and juveniles of the right-eye flounder, *Limanda yokohama* (Gunther), Graduate School Nat. Fish. Univ. of Pusan. 1~28.
- Nakagawa, H., Y. Inazuka, S. Yamasaki, H. Hirata and S. Ksahara. 1982. Effect of feeding of chlorella -extract suppliment in diet on cultured yellow tail I. Growth and blood properties. Aquaculture. 30, 60~75.
- Nakagawa, H., S. Ksahara, E. Uno, T. Minami and K. Akira. 1983. Effect of chlorella -extract suppliment on blood properties and body composition of ayu. Aquaculture. 30, 193~220.
- Ricker, W. E. 1969. Effect of size -selective mortality and sampling bias an estimates of growth, mortality, production and yield. J. Fish. Res. Board can. 26, 479~541.
- Rho, S., P. Y. Kim, Y. D. Lee, K. S. Choi and C. B. Song. 1999. Effect of recombinant bovine somatotropin on growth of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Journal of Aquaculture. 12(2), 79~89.
- Shahidi, F., J. K. V. Arachchi and Y. J. Jeon. 1999. Food applications of chitin and chitosans. Tends in Food Science & Technology. 10, 37~51.
- Shiau, S. Y. and Y. P. Yu. 1999. Dietary supplementation of chitin and chitosan depresses growth in tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. Aquaculture. 179(1~4), 439~446.
- Song, Y. B. 2000. Effect of EM-fermented orange on growth of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. MS. thesis, Cheju national University, Korea. 41 pp (Korean)
- Wada, M., Y. Nishimura and Y. Watanabe. 1995. The effect of intraperitoncal administration of chitosan on the blood and liver. Rsearch of Chitin · Chitosan. 2, 116~117.
- Yone, Y., M. Fruichi and K. Urano. 1986. Effects of wakame *Undaria pinnatifida* and *Ascophyllum nodosum* supplements on absorption of dietary nutrients, and blood sugar and plasma free amino-N levels of red seabream. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 52(10), 1817~1819.
- 김세권. 1997. 키틴·키토산 기초와 약리. 이화문화출판사. pp 156.