

사료 내 타우린 첨가에 의한 넙치 치어의 망막조직 변화

김신권* · 신민규 · 이배익
국립수산과학원(연구원)

The Effect of Dietary Taurine Levels on the Developing Retina of Juvenile Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*

Shin-Kwon KIM[†] · Min-Gyu SHIN · Bae-Ik LEE
National Institute of Fisheries Science(researcher)

Abstract

This study was conducted to investigate the effect of dietary taurine levels on change of retina development of juvenile olive flounder. Three different taurine level diets were prepared by supplementation of taurine (T-0, 0.5 and 1.5%) to the basal diet. Fish meal washed with 70% ethanol to remove taurine was used as the sole protein source. Feeding experiments were carried out at 20°C for 4 weeks by using size of fish (average body weight: 0.3 g). The feeding behavior of fish was observed throughout the experimental period. At the end of experiments, fish were killed for using the histological observation of the developing retina on juvenile olive flounder. In contrast to retina of T-1.5% group, the most prominent morphological feature of T-0% group was progressive retinal degeneration. The outer and inner photoreceptor segments of T-0% group were much smaller than those of T-1.5% group. These flounder might show a loss of vision due to severe retinal degeneration. This study identifies an important role of the taurine for the development and maintenance of retinal function and morphology. These finding suggests that the taurine is essential for the normal retinal development related with the feeding behavior avoided predation in juvenile olive flounder.

Key words : Juvenile, Olive flounder, Retina, Taurine

I. 서론

어분은 필수아미노산과 지방산이 다량 함유하고 있고 소화율이 높으며, 탄수화물과 항산화물질이 적어서 육식성 어류의 사료를 만드는 가장 중요한 원료이다. 육식성 어류는 다른 초식성이나 잡식성 어류에 비하여 사료 중 높은 단백질 함량을 요구한다. 전 세계 어분 생산량은 세계 어획량의 35%를 차지하고 있으며 최근에는 가격 상승과 불안정한 공급량 때문에 양식산업을 제한

하는 요소가 되고 있다. 어분대체 원료를 찾는 연구가 최근 국제적으로 중요시 되고 있으며 경제적으로 중요한 연구로 자리매김하고 있다. 어분의 성분 중 타우린(2-aminoethanesulfonic acid)은 그 중요성에 대하여서는 알려지지 않고 있으나 유리아미노산 중에는 그 성분이 가장 많이 함유되고 있는 성분으로 중추 신경계 및 망막의 발달, 칼슘 조절, 막 안정화, 담즙산 조성, 생식 및 면역과 같은 생리 기능에 관여하는 것으로 알려져 있다(Huxtable, 1992; Limbardini et al., 1979;

[†] Corresponding author : 051-720-2421, ksk4116@korea.kr

* 이 논문은 2020년 국립수산과학원 수산시험연구사업(R2020003)의 지원으로 수행된 연구입니다.

Sturman, 1988, 1993; Sturman and Chesney, 1995). 포유동물에서 타우린의 주요 생합성경로는 cysteine 이 산화에 의해 cysteine sulfinate가 되고 다시 decarboxy화에 의해 hytaurine이 되고 다시 이것은 타우린이 된다(Weinstein and Griffith, 1987). Cystein sulfinate decarboxylase는 타우린 생합성 경로에서 매우 중요하다. Cystein sulfinate decarboxylase(CSD)는 Cystein sulfinate의 decarboxy 화 반응을 촉매하여 hypotaurine을 형성한다. 고양이, 원숭이 및 인간의 간에서 타우린 생합성에 중요한 효소인 CSD의 낮은 활성은 망막 내 타우린 부족에 의한 결핍성을 나타내고 섭취에 의한 타우린 공급이 중요하다고 발표하였다(Lombardini, 1991). 어류 조직에서는 일반적으로 많은 양의 타우린이 포함되어 있지만, 어류의 황 함유 아미노산 대사와 관련하여 타우린 전구체에 대한 정보는 거의 없다. 어류에서는 CSD 활성이 어종마다 다르다는 것이 알려져 있고 특히, 참다랑어, 방어, 넙치의 간 조직내 CSD는 비교적 낮은 활성을 보인다(Yokoyama et al., 2001). Kim et al.(2005)은 타우린 섭취가 넙치의 담낭 내 담즙산 구성 및 성장에 영향을 미친다고 보고하였다. 또한 Kim et al.(2005)은 넙치 치어는 최소 타우린이 사료 내 15 mg/g이 필요하다는 것을 발견하였다. Kim et al.(2008)은 이전연구에서 사료 내 타우린 첨가가 성장을 개선하고 타우린 0% 실험구에서 다중 섭취행동(포식되기 쉬운 행동)의 관찰을 보고하였다. 최근 미국, EU, 일본에서는 타우린을 사료 첨가제로 인정하고 식물성 단백질을 이용한 어분 대체 사료에 타우린 사용이 가능하게 되었다(Salze et al., 2015). 어분에는 일반적으로 높은 농도의 타우린이 포함되어 있지만 식물성 단백질에는 함유되어 있지 않다. 하지만 어류에서 타우린의 역할에 대한 정보는 단편적이며, 특히 망막 내 조직발생에 미치는 영향에 대한 연구는 없다. 따라서, 본 연구는 사료 내 타우린을 0%, 0.5%, 1.5%를 첨가한 사료를 넙치 치어에 공급한 후 치어의 망막 발생을 관찰하여 타우린 첨가가 망막

발생에 미치는 영향을 조직학적 관찰을 통해 조사하였다.

II. 연구 방법

1. 실험어 사육관리 및 실험재료

본 실험은 Kim et al.(2005b)의 사육실험 후 채취된 실험어의 망막조직을 조직학적 분석을 통해 타우린 첨가가 치어의 망막에 미치는 영향을 조직학적 관찰을 통해 분석하였다. 본래 어분에도 타우린이 존재하기 때문에 어분을 70% 에탄올로 씻어서 다시 건조시킨 후 어류의 섭취 유인물질로 알려진 IMP와 inosine을 첨가하고 타우린을 0%, 0.5%, 1.5% 첨가하여 실험사료를 제작하였다. 넙치 실험어는 평균무게 0.3g 내외인 넙치 치어를 30마리씩 투명 아크릴 사각수조(60L, 60×35×30 cm³)에서 타우린 0%, 0.5%, 1.5%를 첨가한 배합사료를 이용하여 사육실험을 2반복으로 실시하였다.

2. 조직학적 분석

사육시작 시기의 초기 넙치 5마리와 실험 종료 되는 시점(4주 후)에서 각 실험구별 5마리의 넙치 치어를 10% 중성포르말린 용액에 24시간 동안 고정하였다. 그 후 안구가 있는 두부를 절개하여 다시 10% 중성포르말린에 24시간 재고정한 후 24시간 동안 흐르는 물에 수세하였다. 그 후 표본조직가공기를 이용하여 70%, 80%, 90%, 95%, 100% 순으로 1시간씩 단계별 에탄올 탈수 과정을 거친 후 파라핀 포매기를 이용해 포매를 하였다. 포매 된 시료는 5 μm로 연속 절편하여 조직표본을 제작한 후 Harris hematoxylin-eosin Y (H-E) 대비 염색을 하여 광학-형광 현미경(Leica, DM6000B)으로 관찰하였다. 망막 면적 측정의 정확도를 높이기 위해, 각 개체 마다 연속 절편된 샘플 중 눈 단면이 가장 두꺼운 3곳을 선정한 뒤 망막의 가장 두꺼운 부분을 디지털카메라

(AxioCam MRc5; Carl Zeiss, Göttingen, Germany)가 연결된 실체현미경(SteREO Discovery V20; Carl Zeiss, Germany)으로 촬영하였다. 이후 폭 0.286 mm안의 Pigment epithelium, Outer nuclear layer, Inner nuclear layer, Inner plexiform layer에 대해 이미지 분석 소프트웨어(Carl Zeiss ZEN 2012 ver., Germany)를 이용하여 면적을 측정하여 평균을 구하였다.

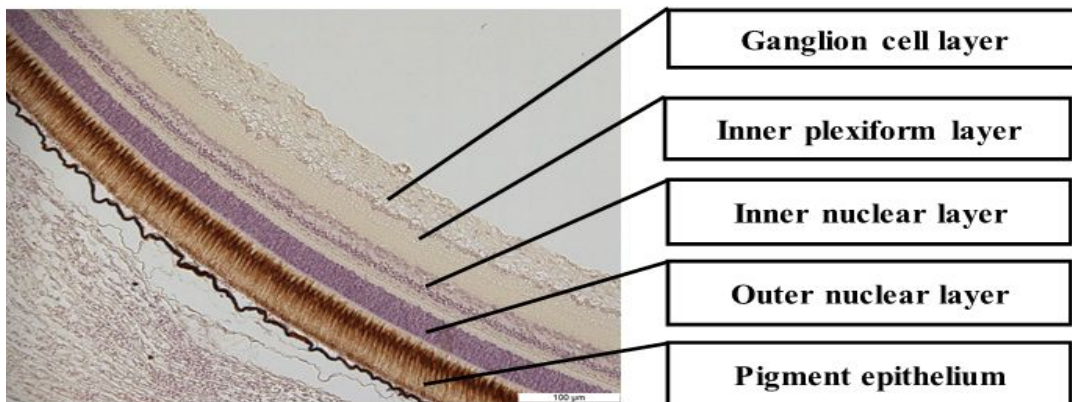
3. 통계처리

모든 분석자료는 3회 반복하여 측정한 평균치(mean)와 표준편차(SD)로 나타내었으며, 결과의 통계처리는 SPSS statistics ver. 25 (IBM, Chicago, IL, USA)을 사용하여 Kruskal-Wallis test를 실시하였다($P < 0.05$).

III. 결과 및 고찰

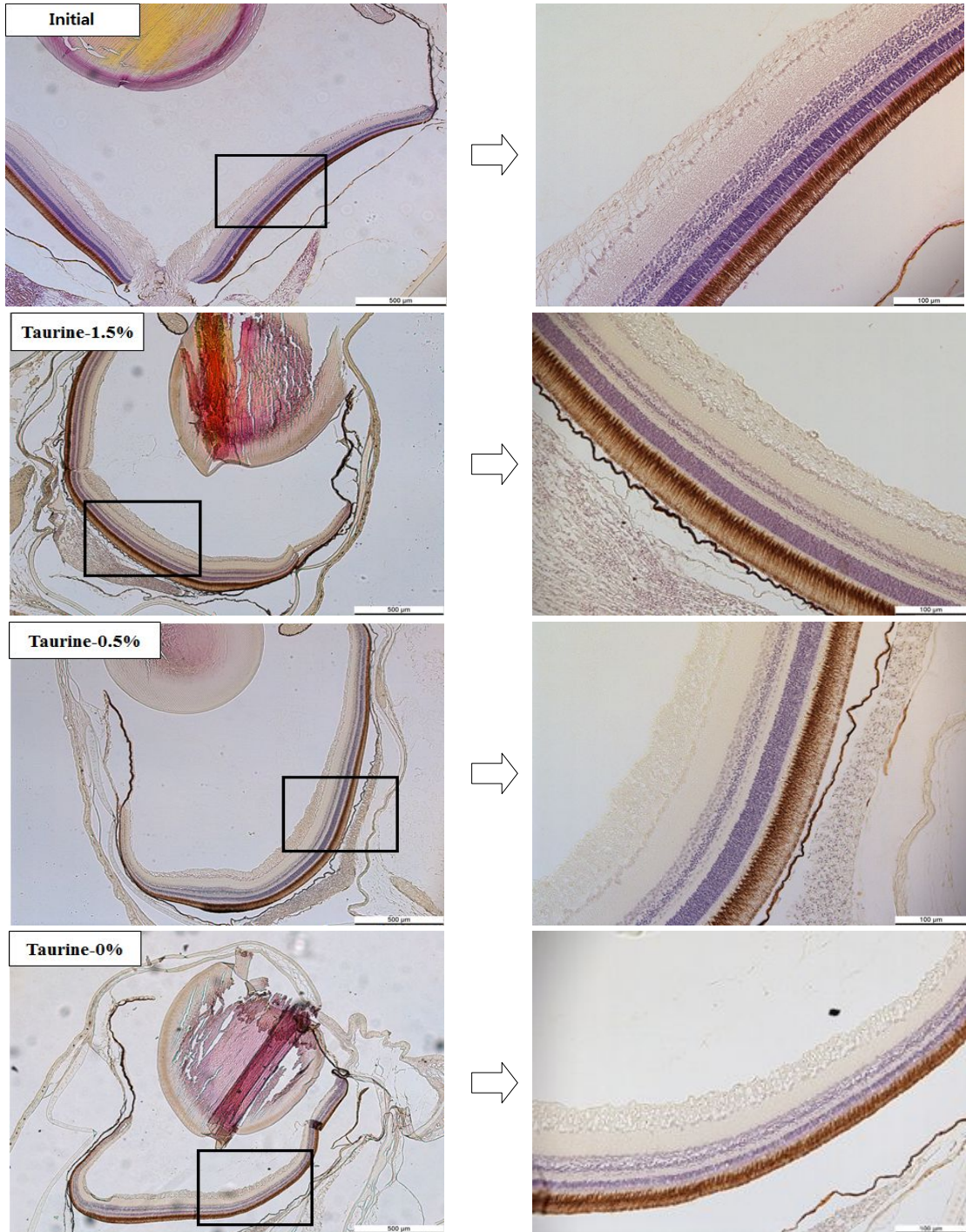
본 연구에서는 사료 내 타우린 첨가량 차이가 넙치 치어의 안구, 특히 망막조직 내에 미치는 영향에 대하여 연구하였다. 사료 내 타우린 함량이 0.5%인 기존사료에 비해 1.5%인 실험구에서 초기 성장 및 사료효율 향상에 도움이 되고, 사료 내 타우린 함량의 증가에 따라 근육, 간, 뇌, 등의 타우린 함량이 증가하여 체내 축적이 되었

다(Kim et al., 2003, 2005a), 또한 사료 내 타우린 첨가에 의해 담낭내의 담즙산인 taurocholic acid와 taurochenodeoxycholic acid의 함량이 증가하였다(Kim et al., 2007, 2008b). 이러한 담즙산은 소장으로 분비되어 지방의 소화, 분해에 영향을 주는 주요한 성분이다(Kim et al., 2005a). Kim et al. (2005b)의 연구에서 사료 내 타우린 성분 차이에 따라 넙치 치어의 섭취행동을 분석한 결과, 타우린 첨가구에서 자연산 넙치 치어의 행동에 가까운 행동패턴이 관찰되었고 타우린 결핍사료 실험구에서는 한번의 저층 이탈에 의해 여러 번 사료를 섭취하는 다중 섭취행동이 관찰되어 타우린 첨가가 행동에 미치는 영향을 확인하였다. 이러한 행동학적 차이는 여러 가지 원인이 있을 것으로 예상되며 본 논문에서는 넙치 치어의 망막 내 발달단계를 조직학적 분석을 통해 비교 분석하였다. 넙치 망막조직은 pigment epithelium, outer nuclear layer, inner nuclear layer, inner plexiform layer, ganglion cell layer가 관찰되었다([Fig 1]). 사료 내 타우린 함량에 따라 조직학적으로 망막 내 pigment epithelium과 outer nuclear layer의 발달단계 있어서 비정상적인 형태적 차이를 보이고 있으며, 실험사육 최초 넙치 치어의 망막 조직과 비교하면 오히려 일부 조직에서 비정상적인 발달로 인해 퇴화하는 경향을 보여주고 있다([Fig. 2]).



[Fig. 1] Histological analysis of the retinal development of olive flounder juvenile.

사료 내 타우린 첨가에 의한 넙치 치어의 망막조직 변화



[Fig. 2] Histological analysis of the retinal development of olive flounder juvenile with different taurine supplement diets.

이러한 조직학적 차이를 규명하기 위해 망막조직 내 각 부분의 면적을 계산하여 조사한 결과 특정 조직의 발달이 퇴화하였고 특히 여러 가지 망막조직 내 층중에 pigment epithelium과 outer nuclear layer의 면적이 유의적으로 감소하였다 (<Table 1>). 특히 pigment epithelium 조직은 망막의 가장 바깥에 단층으로 존재하며, 망막의 발달에 관여하고 간상세포와 원추세포를 보호하는 역할을 한다고 알려져 있다. 사료 내 타우린 결핍에 의해 낚치 치어의 망막조직의 pigment epithelium 및 outer nuclear layer 조직에서 퇴화하는 경향을 보인 결과를 통해 타우린이 통상 알려져 있는 삼투압 조절물질, 신경전달 물질, 항산화작용 등의 기존 연구결과와 함께 망막조직에 영향을 주는 빛에 의해 조직이 파괴되어 퇴화하였다고 사료된다.

타우린은 중추신경계에 매우 중요한 역할을 한다는 연구결과가 다수 있다(Chesney et al., 1998; Huxtable, 1992; Jacobsen and Smith, 1968; Moriis et al., 1990; Sturman and Hayes, 1980). 타우린은 신경계의 유리 아미노산중 50% 이상을 차지하고 있고, 지속적으로 세포내 삼투압을 유지하기 위해서 타우린을 삼투압 조절물질로 이용한다는 연구결과가 발표되어 있다(Forster and Goldstein, 1979). Chesney et al.(1998)는 타우린이 중요한 삼투압 조절물질로 특히 유아기의 뇌와 신장 형성에 중요하다고 발표하였다. 삼투압에 관련된 타

우린의 중요성을 발표한 여러문헌에서와 같이 타우린은 세포를 유지하는 삼투압 조절 및 급박한 삼투압 변화에 따른 세포팽창 및 수축을 도와주는 중요한 물질임을 알 수 있다. 또한 이러한 역할은 유아기 및 태아시기때 그 중요성이 높아 임신기의 필수 영양성분으로 타우린의 중요성이 부각되고 있다(Chesney et al., 1999). Sturman and Messing(1991)은 체내 타우린 생성능력이 낮은 것으로 알려져 있는 고양이에게 타우린 결핍사료를 공급하여 임신한 어미고양이가 가지고 있는 태아의 발생에 문제가 발생하였으며 특히 안구조직의 비정상적인 발생을 관찰하였다. 특히 pigment epithelium는 망막 감각신경 부분의 바깥에 존재하며, 색소가 있는 세포로 망막의 발달에 관여하고 간상세포와 원추세포를 보호하는 역할을 하는데 pigment epithelium는 여러 가지 역할이 있으며 망막에서 산란된 빛을 흡수하는 광수용 역할과 혈액 망막 장벽을 형성하여 망막 내의 대사산물과 수분을 망막 외부로 내보내는 역할 등을 한다.

Lombardini(1991)은 타우린이 모든 종류의 동물 망막에 다량 함유되어 있으며 이러한 동물들 특히 타우린 합성의 중요 효소인 cysteinesulfinic acid decarboxylase의 활성이 낮은 고양이, 원숭이, 사람에서 타우린은 먹이원내 섭취가 중요한 공급원이 된다고 하였다. 또한 타우린은 빛과 화학성분에 대한 rod outer segments의 보호기능이 있으며,

<Table 1> Area analysis of each layer in retinal tissue by histological observation according to the different taurine level in experimental diets.

| | Pigment epithelium (mm ²) | Outer nuclear layer (mm ²) | Inner nuclear layer (mm ²) | Inner plexiform layer (mm ²) |
|--------------|--|---|---|---|
| Initial | 0.011 ± 0.002 | 0.006 ± 0.001 | 0.005 ± 0.001 | 0.014 ± 0.002 |
| Taurine-0% | 0.009 ± 0.001 ^a | 0.004 ± 0.001 ^a | 0.004 ± 0.001 ^a | 0.011 ± 0.002 ^a |
| Taurine-0.5% | 0.010 ± 0.002 ^{ab} | 0.007 ± 0.002 ^{ab} | 0.004 ± 0.002 ^a | 0.010 ± 0.004 ^a |
| Taurine-1.5% | 0.011 ± 0.001 ^b | 0.007 ± 0.001 ^b | 0.004 ± 0.001 ^a | 0.010 ± 0.002 ^a |

Mean values in the same column with different superscripts are significantly different (P<0.05).

망막 내 칼슘 전이 조절의 역할이 있다고 알려져 있다. 어류에서도 Lima et al.(1993)은 금붕어 망막에서 타우린이 칼슘 유입을 증가시킴으로써 분쇄 후 망막 외식 편에 재생 효과를 부분적으로 발휘함을 시사하였다. 또한 Nusetti et al.(2005)은 금붕어 망막 외식편의 성장에 최적의 아연 농도가 필요하고 아연 결핍 망막에서 타우린이 성장을 자극 할 수 있음을 나타내었다. 넙치에서도 Omura and Yoshimura(1999)는 넙치의 망막에 다량의 타우린이 함유되어 있으며 이러한 타우린이 망막의 광수용체와 신경계에 존재하고 있고 이러한 타우린이 광수용체의 outer segment의 자극을 타우린에 의해서 보호하고 있다는 연구결과를 발표하였다.

이상의 결과로부터, 넙치 치어기의 망막발달에 타우린 결핍이 발생단계에 영향을 주고 있으며, 이러한 영향은 타우린이 광자극에 의한 급격한 망막 내 삼투압 변화에 적응하기 위해 타우린이 삼투압 조절역할을 하고 있으나 결핍에 의해 조직 내 부족 시 특정부분의 조직발달이 저하되어 망막의 기능에 문제가 발생할 가능성이 높다. 또한 망막의 발생단계에 미치는 영향에 의해 섭취 행동에 영향을 주었다고 할 수 있다. 사료 내 타우린 첨가에 의해 넙치 치어 망막이 정상적으로 발달이 되고, 넙치 치어 단계에서는 타우린이 필수 영양소이라는 것을 증명한다. 본 연구결과는 타우린이 성장 및 생존 뿐 만 아니라 담즙산 조성에 영향을 주며 또한 정상적인 섭취행동에 영향을 미치는 망막의 정상적인 발달에도 관여한다는 과학적인 연구결과를 제공한다.

References

Chesney RW, Helms RA, Christensen M, Budreau AM, Han X and Sturman JA(1998). The role of taurine in infant nutrition. *Adv. Nutr. Res.* 442, 463~476.
Forster RP and Goldstein L(1979). Amino acids and

cell volume regulation. *Yale J. Biol. Med.* 52, 497~519.
Huxtable RJ(1992). Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* 72, 101~163.
Jacobsen JG and Smith LH(1968). Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol. Rev.* 48, 424~511.
Kim SK, Takeuchi T, Yokoyama M and Murata Y(2003). Effect of dietary supplementation with taurine, β -alanine and GABA on the growth of juvenile and fingerling Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Sci.* 69, 242~248.
Kim SK, Takeuchi T, Akimoto A, Furuita H, Yamamoto T, Yokoyama M and Murata Y(2005a). Effect of taurine supplemented practical diet on growth performance and taurine contents in whole body and tissues of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Sci.* 71, 627~632.
Kim SK, Takeuchi T, Yokoyama M, Murata Y, Kaneniwa M and Sakakura Y(2005b). Effect of dietary taurine levels on growth and feeding behavior of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 250, 765~774.
Kim SK, Matsunari H, Takeuchi T, Yokoyama M, Murata Y and Ishihara K(2007). Effect of different dietary taurine levels on the conjugated bile acid composition and growth performance of juvenile and fingerling Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 273, 595~601.
Kim SK, Matsunari H, Takeuchi T, Yokoyama M, Furuita H, Murata Y and Goto T(2008a). Comparison of taurine biosynthesis ability between juveniles of Japanese flounder and common carp. *Amino acids* 35, 161~168.
Kim SK, Matsunari H, Nomura K, Tanaka H, Yokoyama M, Murata Y, Ishihara K and Takeuchi T(2008b). Effect of dietary taurine and lipid contents on conjugated bile acid composition and growth performance of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Sci.* 74, 875~881.
Knopf K, Sturman JA, Armstrong M and Hayes KC(1978). Taurine: an essential nutrient for the cat. *J. Nutr.* 108, 773~778.
Lima L, Matus P and Drujan B(1993). Taurine-induced regeneration of goldfish retina in culture may involve a calcium-mediated mechanism. *J. of*

- Nerurochem. 60, 2153~2158.
- Lombardini JB, Pang PKT and Griffith RW(1979). Amino acids and taurine in intracellular osmoregulation in marine animals. *Occas. Papers Calif. Acad. Sci.* 134, 160~171.
- Lombardini JB(1991). Taurine: retinal function. *Brain Res. Brain Rev.* 16(2), 151~169.
- Morris JG, Kulanthaivel P and Pacioretty LM(1990). Taurine: an essential nutrient for cats. *J. Small Anim. Pract.* 31, 502~509.
- Nusetti S, Obregon F, Quintal M, Benzo Z and Lima L(2005). Taurine and zinc modulate outgrowth from goldfish retinal explants. *Neurochem. Res.* 30, 1483~1492.
- Omura Y and Yoshimura R(1999). Immunocytochemical localization of taurine in the developing retina of the lefteye flounder *Paralichthys olivaceus*. *Arch. Histol. Cytol.* 62, 441~446.
- Salze G, Gaylord G, Johnson R and Davis DA(2015). Taurine as an additive to aquaculture feeds: A petition for the amendment of the U.S AAFCO taurine definition.
- Sturman JA(1988). Taurine in development. *J. Nutr.* 118, 1169~1176.
- Sturman JA(1993). Taurine in development. *Physiol. Rev.* 73, 119~147.
- Sturman JA and Chesney RW(1995). Taurine in pediatric nutrition. *Pediatric Nutr.* 42, 879~897.
- Sturman JA and Hayes KC(1980). The biology of taurine in nutrition and development. *Adv. Nutri. Res.* 3, 231~299.
- Sturman JA and Messing JM(1991). Dietary taurine content and feline reproduction and outcome. *J. Nutr.* 121, 1195~1203.
- Yokoyama M, Takeuchi T, Park GS and Nakazoe J(2001). Hepatic cysteine sulfinate decarboxylase activity in fish. *Aquacult. Res.* 32 (Suppl. 1), 216~220.
-
- Received : 04 June, 2020
 - Revised : 23 June, 2020
 - Accepted : 03 July, 2020