

산화된 사료에 첨가한 비타민과 Glycyrrhizin이
나일틸라피아의 성장 및 *Edwardsiella* 감염시
저항력에 미치는 영향

장선일 · 조재윤 · 이주석*

부산수산대학교 양식학과
*부산수산대학교 어병학과

Effects of Vitamins and Glycyrrhizin Added to Oxidized
Diets on the Growth and on the Resistance to *Edwardsiella*
Infection of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*

Seon-Il JANG, Jae-Yoon JO and Joo-Seok LEE*

Dept. of Aquaculture, National Fisheries University of Pusan
Pusan 608-737, Korea

*Dept. of Fish Pathology, National Fisheries University of Pusan

ABSTRACT

Effects of vitamin E, C and/or glycyrrhizin in the artificially oxidized feed on the growth and on the resistance against *Edwardsiella tarda* infection to Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, were examined. The thiobarbitric acid (TBA) values of the oxidized feed were 80~88 mg/kg. The fingerling fish were fed the oxidized feed with or without the mixture of vitamin E (50 mg), C (60 mg) and/or glycyrrhizin (25~200 mg) per 100 g of the feed for 7 weeks. The fish fed the oxidized feed with vitamin E, C and/or glycyrrhizin showed better growth than the fish fed the oxidized feed only. But growth rates among the fish fed different amount of vitamins or glycyrrhizin mixed feed were not different. Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT) levels in the serum increased only in the fish which were fed oxidized feed without vitamin E, C and/or glycyrrhizin. With the fish artificially infected with *E. tarda*, they showed low survival rate when fed oxidized feed and oxidized feed plus 25 mg glycyrrhizin per 100 g feed. The fish fed oxidized feed plus vitamin E, C and/or glycyrrhizin (50~200 mg/100 g), showed higher survival.

These results show that the supplementation of oxidized lipids depress the growth and liver activity, while the addition of vitamin E, C and/or glycyrrhizin in the diet accelerated the growth, liver activity, and the resistance to *E. tarda* infection.

서 론

어분은 쉽게 지질 산화가 일어나는데 이는 식물성 지방보다 불포화 지방산이 매우 높게 함유되어 있을 뿐 아니라 어분을 만드는 과정에서 근육이나 혈액 중의 마이오글로빈과 헤모글로빈을 제거하지 않으므로써 지방산화효소 (lipoxidase)에 의한 지질 산화가 촉진되며, 열처리 가공 과정에서 지질 산화가 매우 촉진되기 때문이다(전 1989). 이러한 일련의 지질 산화 과정에서 만들어지는 free radical은 높은 반응성이 있고 매우 유독하다. 어분의 지질과 산화에 따른 어류의 질병은 소장, 비장, 신장 조직의 괴사와 지방 침착에 따른 울혈, 충혈이 심해지면서 용혈되기도 한다 (Wassobluth et al. 1971). 지질산화물이 더욱 더 각 장기에 축적되면 체내에 단백질과 결합하여 용해되지 않는 ceroid가 형성되어 어류의 생리적 장애와 면역기관의 손상으로 면역 능력이 심히 저하되어서 병원성 질병원에 쉽게 노출된다 (Ferguson et al. 1990). 잉어, 틸라피아, 방어, 참돔, 넙치 등에서 발생하는 피부염, 녹간증, 등여염, 근육의 괴사, 복수병, 체색의 흑화 현상 등 일련의 질병이 산패된 사료의 투여로 인해 유발됨이 보고 되었고, 어류의 양식에 있어서 큰 제한 요인이 지적되고 있다 (Murai et al. 1988; 조와 전 1990).

이를 해결하기 위해서 항산화제 즉 butyl hydroxyanisole (BHA), dibutyl hydroxytoluene(BHT), ethoxyguine 등이 개발되었다 (Feher et al. 1987; Murai et al. 1988). 또한, 비타민계 영양원이 항산화제 역할을 하는 것이 최근에 알려졌으며 (Friedrich 1988), 특히 틸라피아 (*Oreochromis niloticus*)를 비롯한 차넬메기, 잉어, 연어 등 실제 양식에 비타민 E와 C를 적용한 많은 연구보고가 있다 (Gatlin et al. 1986; Sato et al. 1991).

Glycyrrhizin은 감초 (*Glycyrrhiza glabra*의 뿌리)로 부터 분리된 triterpenoid saponin 계의 일종으로 만성 간염, 항염제, 직접 또는 간접적인 항바이러스제, 항궤양 등과 같은 여러가지 작용이 있을 뿐만 아니라 interferon (IFN)과 interleukin (IL) 등과 같은 cytokine 등을 분비시켜 면역 반응을 조절하는 조절제로서 알려졌다 (Abe et al. 1982; Mizoguchi et al. 1984; Chung et al. 1990; 장 1992). 그러나 최근 인간을 비롯한 포유동물에서 적용되고 있는 glycyrrhizin 같은 생체 반응 조절 물질 (biological response modifier; BRM)을 이용한 어류사료 또는 어류 생체 내의 지질 산화에 따른 free radical의 제거에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 치어 시기의 나일 틸라피아 (*Oreochromis niloticus*)에 있어서 산화된 사료에 비타민 C와 E 및 glycyrrhizin 등을 첨가하여 사육했을 때 이들 첨가 물질이 사육 어류의 성장에 미치는 영향과 인위적으로 *Edwardsiella tarda*를 감염시켰을 때의 저항력에 관하여 조사하였다.

재료 및 방법

어류

실험 어류는 부산수산대학교 양어장에서 사육하고 있는 나일 틸라피아 (*Oreochromis niloticus*)로, 충분히 성숙된 1 kg 이상되는 암컷 두 마리와 수컷 한 마리의 친어로 부터 생산된 0.5~0.7 g 치어 600 여 마리를 본 실험에 사용하였다.

사료

지질 산화 유도: 본 실험에서 사용한 잉어용 2호와 3호 사료의 기본 조성은 table 1과 같다. 지질 산화를 촉진시키기 위한 사료는 실내에서 끌고루 퍼두고 thiobarbitric acid (TBA) 값이 80~88 mg/kg이

될때까지 실온에서 약 8~10 시간 선풍기를 사용하여 인위적으로 산화를 촉진시켰다. 인위적으로 산화시키기 전 사료의 TBA 값은 50~60 mg/kg이었다. TBA 값의 측정은 사료를 1 mm 정도의 크기로 균일하게 마쇄시킨 후 5g을 취하여 20% trichloroacetic acid 5 ml와 10 ml의 TBA 용액을 첨가하여 30 분간 끓인 다음 15 ml의 isoamylalcohol pridine 혼합액을 첨가하고 2 분간 방치한 후 2400 rpm으로 15 분간 원심 분리시켜 상층액을 취하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Table 1. Composition of the each experimental diets for the test of the effects of vitamins and/or glycyrrhizin in oxidized feed on the growth and on the resistance to *Edwardsiella* infection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*.

Experimental group	Sources
1*	Basal diet (control)
2	Basal diet plus 1.0% vitamin & mineral premix
3	Basal diet (100 g) plus 50 mg α -tocopherol
4	Basal diet (100 g) plus 60 mg L-ascorbic acid
5	Basal diet (100 g) plus 50 mg α -tocopherol and 60 mg L-ascorbic acid
6	Basal diet (100 g) plus 25 mg glycyrrhizin
7	Basal diet (100 g) plus 50 mg glycyrrhizin
8	Basal diet (100 g) plus 100 mg glycyrrhizin
9	Basal diet (100 g) plus 200 mg glycyrrhizin
10	Basal diet (100 g) plus 50 mg α -tocopherol, 60 mg L-ascorbic acid and 50 mg glycyrrhizin

* : The basal test diets have following composition (g/100g diet) : crude protein, 42.0 ; crude fat, 3.0 ; crude cellulose, 4.0 ; calcium, 1.6 ; phosphate, 1.6 ; moisture, 11~12.

Thiobarbitric acid(TBA) values of experimental diets : group 2, 50~60 mg/kg ; all others, 80~88 mg/kg.

사료 제조 : TBA 값이 50~60 mg/kg인 사료는 비타민과 미량 원소 premix를 1% 첨가시켜 table 1에서 나타낸 모든 실험군의 정상 대조군 (group 2)으로 사용하였으며, TBA 값이 80~88 mg/kg인 사료는 대조군 (group 1)을 제외한 실험군 (group 3-10)에 50 mg DL- α -tocopherol 과 60 mg L-ascorbic acid (Junsei chemical Co. Ltd, Japan)등을 첨가 또는 glycyrrhizic acid, monoammonium salt trihydrate (Alderich, Milwaukee, US)을 여러가지 농도 별 (group 6-10)로 첨가 하여 실험 사료를 제작하였다. 사료 제조는 모든 사료에 100% ethanol 과 5 ml의 수돗물을 사용하여 첨가 물질을 용해시킨 후 사료에 침착하여 ethanol을 증발 시킨 다음 -30°C 냉동고에 2 주일 넘지 않게 보관하였다.

사육 및 수질

스치로폴과 자갈이 채워져 있는 650 l 원형 여과조에 40.5 l 유리 수조(45×30×30 cm) 20 개를 연결하여 실험어를 사육하였다. 자어 시기 (0.5~8 g)에는 분당 3.6 l씩 물을 순환시키고 어류가 성장함에 따라 모든 수조의 순환율을 일정하게 높여 주었으며 6~7 주 시기에는 분당 10 l씩 순환시켰다.

사료는 오전 8시 부터 오후 8시 까지 매 2시간 간격으로 충분히 공급하였다. 배설물은 하루에 2~3회 사이폰으로 제거하였으며, 사육 용수는 지하수를 이용하여 매일 1/2 씩 교환하고, 여과조는 매주마다 1번씩 청소하였다. 사육 수온은 보일러와 전기 히터를 사용하여 $28.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ 를 유지하였고, 용존산소량은 2.5~5.0 ppm을 유지하였다. 광주기는 인위적으로 100 W 전구를 사용하여 14 (light)시간 : 10 (dark)시간이 되도록 조절하였다. 사육수의 암모니아 ($\text{NH}_4\text{-N}$)과 아질산 ($\text{NO}_2\text{-N}$)의 농도는 각각 0.50 mg/l와 2.20 mg/l가 넘지 않도록 수질을 관리하였다. 이와 같은 조건하에서 한 실험군당 2 개의 수조에 1992 년 6월 28일 에서 동년 8월 15일 까지 7주 동안 반복 사육하여 사료 효율과 성장율을 측정하였다.

사료 효율과 성장을 측정

사육된 어류의 체중은 사육 시작 후 6주까지는 매 2주 간격으로 어체중을 측정하였으며, 최종 7주째는 일주일간 사육한 후에 측정하였다. 사료 효율과 성장율은 다음과 같은 식에 의해 계산하였다.

$$\text{사료 계수 (feed conversion ratio)} = \text{Feed intake (g)} / (W_t - W_0)$$

$$\text{성장율 (weight gain \%)} = [(W_t - W_0) / W_0] \times 100$$

(W_t : t 일 경과시 어체중, W_0 : 실험 시작시 어체중)

혈액학적 검사

Table 1과 같이 사료 성분을 7주간 투여 후 각 실험군으로부터 4~6 마리를 무작위로 포획하여 미병부 정맥에서 헤파린을 처리하여 채혈한 혈액은 해마토크리치 측정에 사용하였으며, 헤파린이 처리되지 않은 혈액은 채혈 후 4°C 암냉 상태에서 30 분간 응고 시킨 후 2000 rpm으로 20 분간 혈청을 분리하였다. 혈청으로부터 glutamic oxalacetic transaminase (GOT)와 glutamic pyruvic transaminase (GPT)활성도 측정은 GOT, GPT kit (Iatron Lab, Japan)를 이용하여 측정하였다.

균주

실험 균주는 뱀장어 신장으로 부터 분리한 *Edwardsiella tarda* (T1123)로서 동결 보존된 것을 BHI (Difco, USA) 한천 고형배지에서 계대 배양하였다. 배양된 균주는 약 40 g 되는 나일틸라피아의 복강에 1.2×10^7 cells/0.1 ml PBS를 주사하여 48 시간 이상 경과된 어체의 신장으로 부터 분리한 균을 다시 BHI 한천 고형배지에서 27°C , 72 시간 배양 후 공격 실험과 항원 제작 균주로 사용하였다.

공격 실험

사육 실험 종료 후 각 실험군의 어류를 대상으로 *E. tarda*를 감염시켜 공격 실험을 하였다. 각 실험군으로부터 무작위로 8~12 마리를 포획하여 어체내 통과된 배양 *E. tarda*균 1.2×10^7 cells/fish를 복강에 주사하여 20 l (40×25×20 cm) 유리 수조에 수용하였으며, 수온과 산소는 각각 $25\sim 26^\circ\text{C}$ 와 3~4 ppm을 유지시키고 지하수로 12 시간마다 50% 씩 물을 교환하면서 14 일 동안 폐사율을 조사하였다. *E. tarda*에 대한 공격 실험의 정상 대조군은 어체당 멸균 PBS (pH 7.2)을 복강에 0.1 ml 주사하여 폐사율을 비교 측정하였다.

응집 항체가 측정

공격 실험일로부터 10 일째 각 실험군으로부터 살아남은 개체 중 2~3 마리를 포획하여 응집

비타민과 Glycyrrhizin이 틸라피아의 성장 및 저항력에 미치는 영향

항체가를 측정하였다. 혈청은 미병부 미정맥에서 채혈한 다음 4°C 암냉 상태에서 30 분간 응고시킨 후 2000 rpm에서 20 분간 원심 분리하였다. 혈청으로 부터 보체의 활성을 제거하기 위해 56 °C에서 30 분간 방치한 후 0.5% 포르말린으로 불활성화 시킨 *E. tarda* 항원 5.0×10^7 cells를 사용하여 각 실험군의 혈청에 대한 응집 항체가를 microtiter 법에 의해 측정하였다.

통계 처리

실험 결과의 유의차 검정은 t-test와 분산 분석에 의하였다.

결 과

비타민 E와 C 첨가에 따른 성장

산화된 사료에 비타민 E와 C를 첨가하여 나일 틸라피아에 투여 했을 때 성장율에 어떠한 영향을 미치는가 알아 보기 위해 50 mg의 α -tocopherol과 60 mg의 L-ascorbic acid를 각기 또는 혼합하여 7 주간 사육한 결과 table 2와 Fig. 1에 나타낸 바와 같다. 비타민 E와 C를 산화 사료에 첨가 (group 3~5)하여 사육했을 때 최종 성장 배수 (weight gain%)는 7800 이상으로 나타나 산화 사료를 투여한 대조군 (group 1) 5960 에 비해 현저히 높았으며 정상 대조군 (group 2)과 비슷하였다 (Table 2).

Table 2. Weight gain, food conversion ratio and survival of fingerling tilapia fed oxidized feed with or without vitamin C, E and glycyrrhizin for 7 weeks

Parameters	Experimental groups ^a									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Initial stage										
Total weight (g)	18.40	16.72	16.58	16.31	19.30	20.40	17.55	16.61	18.75	19.80
Ave. weight/fish (g)	0.61	0.60	0.57	0.54	0.64	0.72	0.63	0.57	0.65	0.68
No. of fish	28	28	29	30	30	28	28	29	29	29
Final stage										
Total weight(g)	1115	1353	1343	1394	1533	1347	1365	1372	1322	1465
Ave. weight/fish(g)	39.83	48.33	46.32	46.47	51.11	48.11	48.77	47.32	45.59	50.50
No. of fish	28	28	29	30	30	28	28	29	29	29
Weight gain (%)	5960	7992	8000	8447	7843	6503	7678	8160	6951	7299
Feed given (g)	1250	1286	1267	1215	1270	1380	1266	1260	1200	1200
Feed conversion ratio	1.14	0.96	0.92	0.88	0.84	1.04	0.94	0.93	0.92	0.83
Survival rate (g)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

^a: shown in table 1.

사료 계수에 있어서도 대조군 1.14에 비해 비타민 E와 C를 투여한 실험군이 0.84~0.92로 낮았다. 또한 실험 기간동안 매 2 주마다 어체중을 측정한 결과 Fig. 1과 같으며, 사료 투여 개시 4 주때 대조군에 비해 비타민 E와 C를 투여한 실험군 (group 3~5)에서는 평균 체중 2~4 g의 차이를 보였고, 최종

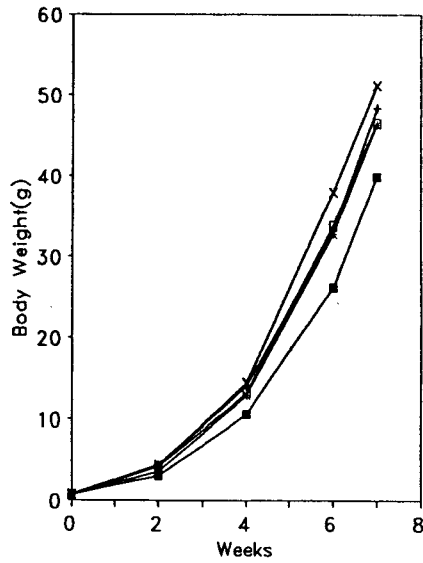


Fig. 1. Growth in body weight of *Oreochromis niloticus* fed oxidized diet and oxidized diet plus vitamin E and/or C for 7 weeks. Compositions of the diet of each experimental group (■ : 1, + : 2, □ : 3, * : 4, × : 5) are shown in the table 1.

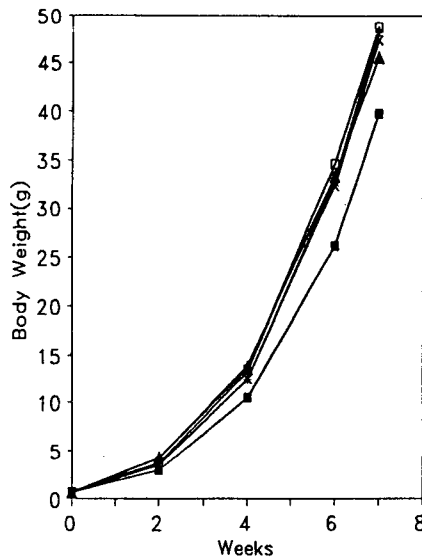


Fig. 2. Growth in body weight of *Oreochromis niloticus* fed oxidized diet and oxidized diet plus several doses of glycyrrhizin for 7 weeks. Compositions of the diet of each experimental group (■ : 1, + : 2, * : 6, □ : 7, × : 8, ▲ : 9) are shown in the table 1.

7주 후에는 평균 7-10g($P<0.05$)이상 큰 차이를 보였다. 비타민 E와 C를 혼합하여 투여한 실험군 (group 5)은 단독 투여군 (group 3, 4)에 비해 7주 후에는 5g ($P<0.1$) 이상의 차이를 보였으나, 비타민 E 또는 C를 투여한 실험군에서는 차이가 ($P>0.1$) 없었다. 산화된 사료에 있어서도 7주간 사육한 결과 비타민 E나 C의 결핍증에 의한 형태적 변화는 관찰되지 않았다. 실험 기간동안 생존율은 모든 실험군에서 100%였다.

Glycyrrhizin 첨가에 따른 성장

산화된 사료에 glycyrrhizin을 첨가하여 나일 틸라피아에 투여 했을때 성장율에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 사료 100g 당 25, 50, 100, 200 mg의 glycyrrhizin을 첨가 하여 7주간 사육한 결과 table 2와 Fig. 2에서 나타낸 바와 같다. 대조군 (group 1)의 최종 성장 배수 5960, 사료 계수 1.14에 비해 여러가지 농도의 glycyrrhizin을 첨가한 실험군 (group 6-9)에 있어서는 최종 성장율이 6500 이상, 사료 계수가 1.04 이하로 큰 차이를 보여 주었고 정상 대조군 (group 2)과는 비슷하였다. 또한 실험 기간 동안 2주마다 어체중을 측정한 결과 Fig. 1에서와 같이 6주때에는 산화사료 투여 대조군에 비해 여러가지 농도의 glycyrrhizin을 첨가한 실험군이 6g ($p<0.1$)이상 성장율이 높았다. 그러나 glycyrrhizin의 농도를 달리한 사료에서는 다른 성장율과 사료 전환율에 있어서 차이가 없었다.

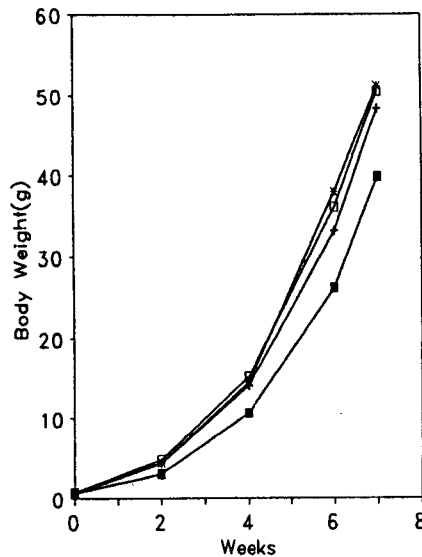


Fig. 3. Growth in body weight of *Oreochromis niloticus* fed oxidized diet and oxidized lipids plus vitamin E, C and/or glycyrrhizin for 7 weeks. Composition of the diet of each experimental group (■ : 1, + : 2, × : 5, □ : 10) are shown in the table 1.

비타민 E, C 및 glycyrrhizin 첨가에 따른 성장

산화된 사료에 비타민 E, C 및 glycyrrhizin을 모두 첨가 했을때 나일 틸라피아의 성장에 미치는

영향을 알아 보기 위해서 50 mg의 α -tocopherol, 60 mg의 L-ascorbic acid 및 50 mg의 glycyrrhizin을 산화사료 100 g에 첨가하여 7 주간 나일틸라피아를 사육한 결과 table 2와 Fig. 3과 같다. 비타민 E, C 및 glycyrrhizin을 모두 첨가한 실험군 (group 10)의 성장율과 사료 전환효율은 대조군 (group 1)에 비해 현저한 차이가 있었으나($p < 0.05$), 비타민 E와 C를 투여한 실험군 (group 5) 및 정상 대조군 (group 2)과는 차이가 없었다.

혈액 검사

7 주간 사육 실험이 끝난 각 실험군에서 무작위로 4~6 마리 씩의 어류를 포획하여 혈액 검사한 결과 table 3과 같다. 산화된 사료를 투여한 대조군 (group 1)의 헤마토크리트치는 34 ± 3 였고, 비타민과 glycyrrhizin을 투여한 실험군 (group 3-10)에서는 36 ± 2 에서 41 ± 3 까지 나타나 다소 상승 효과가 있으나 큰 변동은 없었다. GOT와 GPT에 있어서는 산화된 사료의 경우 각각 90과 62로 나타나 정상 대조군에 비해 현저히 높게 나타났으나, 비타민이나 glycyrrhizin을 첨가한 모든 실험군의 경우 GOT와 GPT의 활성도가 현저히 감소되었다.

Table 3. Hematocrit, GOT and GPT values of Nile tilapia fed oxidized feed with or without vitamin C, E and glycyrrhizin for 7 weeks

Experimental group ^a	Hematocrit	GOT ^b	GPT ^c
1	34 ± 3	90	62
2	38 ± 3	30	17
3	38 ± 2	40	23
4	37 ± 3	47	24
5	38 ± 2	34	28
6	38 ± 4	40	32
7	36 ± 2	45	31
8	41 ± 3	44	34
9	39 ± 3	38	35
10	40 ± 4	34	23

a : shown in table 1

b : GOT : glutamic oxaloacetic transaminase activity on serum

c : GPT : glutamic pyruvic transaminase activity on serum

Values are the mean \pm SD in triplicate or duplicate

E. tarda 감염에 대한 저항력

사육 실험이 끝난 각 실험군에서 무작위로 8~12 마리씩의 어류를 포획하여 *E. tarda*를 1.2×10^7 cells을 복강에 주사하여 비교 실험한 결과는 table 4와 같다.

산화된 사료를 투여한 대조군 (group 2)은 균 감염 후 3 일만에 약 50%의 폐사율을 보였으며, 실험 기간 동안의 누적 폐사율은 73%로 나타났으나, 정상 대조군 (group 2)은 누적 폐사율이 40% ($P < 0.05$)로 나타나 큰 차이를 보였다. 비타민 E와 C를 각각 또는 혼합하여 투여한 실험군 (group 3~5)에서는 누적 폐사율이 33~40% ($P < 0.05$)로 나타나 정상 대조군과 비슷하였다. glycyrrhizin을

Table 4. Mortalities of Nile tilapia after challenge with 1.2×10^7 cells/fish of *E. tarda*. The fish were fed oxidized feed with or without vitamin C, E and glycyrrhizine for 7 weeks

Experimental groups ^a	No. of fish	Deaths from Edwardsiellosis after challenge											Cumulative mortality(%)		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	... 14			
Control ^b	12														0.0
1	11		1	4	3										72.7
2	10			1	2	1									40.0
3	8				2	1									37.5
4	10			1	1		1	1							40.0
5	9			1	1	1									33.3
6	10			1	4										50.0
7	11			2					1						27.3
8	10		1	1						1					30.0
9	9			1		1									22.2
10	12			1		1					1				25.0

a : shown in table 1

b : PBS (pH 7.2) injected fish

여러 가지 농도별로 투여한 실험군 중 산화사료 100 g 당 25 mg을 투여한 실험군 (group 6)은 누적 폐사율이 50%로 나타난 반면, 다른 농도 (group 7~9)에서는 22~30% ($P < 0.01$)까지 누적 폐사율이 현저히 낮았다. 또한 비타민 E, C 및 glycyrrhizin을 첨가하여 투여한 실험군 (group 10)에서는 25% ($P < 0.01$)로 폐사율이 현저히 낮았다.

E. tarda 감염 후 10 일 이후에는 어떠한 실험군에서도 폐사된 개체를 발견할 수 없었다. 그리고 생존한 모든 실험군에서 2~3 마리를 포획하여 응집 항체를 조사한 결과 모두 512 이상의 높은 항체가를 나타 내었다.

고 찰

지방질 과산화 반응은 분자상의 산소가 불포화 지방질에 부가되는 일종의 산소 산화 반응이다 (Feher et al. 1987). 불포화 지방질의 자동 산화는 지방질이 활성화되는 지방질 과산화 반응이며 반응성이 높은 일중양 산소 (singlet oxygen)가 원인이 되고 lipoxygenase에 의한 효소 반응에 의해 그 반응이 촉진된다. 인간을 비롯한 포유 동물에서는 외부에서 유입되는 과산화물 뿐만 아니라 생체에서 생성되는 일련의 free radical 연쇄 반응에 의해 DNA의 손상 (Schraufstatter et al. 1986), 세포성 돌연 변이 (Feher et al. 1987), 발암 유도 (Ames 1982) 등 세포 파괴 및 노화를 촉진시키는 것으로 알려졌다. 어류에 있어서도 외부에서 유입되는 지방질 산패에 의한 병리적 현상이 알려졌는데, 이는 정어리를 비롯한 잡어의 어분에 고도불포화 지방산이 함유되어 있어서 일련의 지방질 과산화 반응에 의한 free radical이 그 원인인 것으로 알려졌다. 즉, 산패된 사료를 어류에 장기간 투여 했을때 빈혈증, 각 장기의 ceroid 형성, myophathy 증 및 등 여염병 등 병리적 현상이 초래되어 성장율이 저하되고 그정도가 심하면 폐사를 유발하는 것으로 보고되었다 (Yokote 1970 ; Roald and Armstrong 1981 ; 조와 전

1990).

사료 투여 직전과 최종 투여 후 수용한 각 실험군의 생존율은 100%로 비타민 및 glycyrrhizin의 자체 독성은 없는 것으로 나타났으며 TBA값이 80~88 mg/kg인 산화 사료를 투여한 대조군 (group 1)은 정상 대조군 (group 2)에 비해 성장율과 사료 전환율이 현저히 낮은 반면 산화된 사료에 비타민 E, C 및 여러 가지 농도의 glycyrrhizin을 첨가한 실험군 (group 3~10)에 있어서는 산화 사료 투여군에 비해 성장과 사료 전환 효율이 정상 대조군과 비슷하였다. 이와 같이 산패된 사료만을 투여한 대조군에 비해 비타민 류와 glycyrrhizin 등을 첨가한 실험군에서 성장율이 좋은 것은 이들 물질이 지방질 산패에 따른 일련의 free radical에 의한 조직 손상을 억제 시킨 것으로 사료된다. 그러나 산패된 사료를 투여한 대조군에 있어서 실험 기간 동안 체색 변화 및 근육 탈피에 의한 형태적 병리 현상은 나타나지 않았다. Yokote (1970)는 산화된 사료가 어류에 미치는 영향을 알아보기 위해 과산화물가가 19.1 meq/kg인 번데기 기름을 10% 사료에 첨가 하여 잉어를 3 개월간 사육한 결과 100% myopathy가 출현되었음을 보고한 바 있으며, 조와 전 (1990)은 틸라피아를 대상으로 산패에 따른 병리적 조사에서 과산화물가가 102 mg/kg인 배합 사료를 67 일간 투여 했을 때 신장을 비롯한 각 장기 조직에 ceroid 침착이 현저했음을 발견 했으나 외부 형태적인 변화는 없었다고 보고한 바 있다. 이와 같이 어류의 종류나 사료의 산패 정도 및 투여 기간에 따라 병리 현상이 차이가 있으므로 틸라피아의 경우는 보다 장기간 사육 실험을 해야 형태적 병리 현상을 관찰 할 수 있는 것으로 사료된다.

비타민 E가 지질 과산화 반응에 관여하는 기전은 phospholipase A₂ 와 lipoxxygenase의 활성을 억제시켜 arachidonic acid와 hydroxy fatty acid의 생성을 감소 시키고 prostaglandin 류의 합성을 촉진 시키는 cyclooxygenase의 활성이 관여 되지 않아 hydroxy radical의 생성을 억제 시키는 것으로 알려졌다 (Panagamal and Cornwell 1982). 또 비타민 C는 지질 과산화 반응으로 부터 방출되는 리보조음 효소의 활성을 억제시키고 세포내 Ca²⁺ 펌프의 교란을 억제시켜 산화 반응에 따른 세포 및 조직 파괴를 보호 해 줄 뿐만 아니라 조직 내의 collagen의 합성을 촉진시켜 생체 물질 대사에 필수적임이 알려졌다 (Feher et al. 1987). 이와 같은 기전으로 항산화제 역할을 하는 비타민 E와 C의 산패된 사료에 첨가되는 양은 어종 및 사료의 산패된 정도에 따라 차이가 있으나, 잉어, 틸라피아, 차멜 메기등에서는 대개 사료 100 g 당 α -tocopherol이 50~100 mg, L-ascorbic acid가 40~100 mg이 효과가 있다고 보고한 바 있다 (Gatlin et al. 1986 ; Sato et al. 1991). 본 실험에서는 이를 기준으로 하여 사육 실험을 한 바, 성장율에 있어서 정상 대조군과 비슷함을 알 수 있었다.

Glycyrrhizin이 항산화제로 역할을 하는 기전은 phospholipase A₂ 의 활성을 억제 시키므로써 지질 과산화 반응에 따른 free radical을 억제 시키는 것으로 알려졌다 (Shiki et al. 1986). 최근 Edahiro 등 (1991)은 방어를 대상으로 산패된 사료에 glycyrrhizin을 첨가 했을 때 이 약물에 대한 효과를 알아보기 위해 과산화물가가 89.4 meq/kg인 사료에 어체중 kg 당 50 mg을 첨가하여 4 주간 사육한 결과 간에서 산화된 지질의 양이 현저히 감소됨을 확인하여 항산화제 역할을 할 가능성을 제시 한 바 있다. 본 연구에서는 산화된 사료 100 g 당 25~200 mg까지 여러 가지 농도의 glycyrrhizin을 첨가하여 나일 틸라피아에 7 주간 투여한 결과 산패된 사료만을 투여한 어류에 비해 성장율이 현저히 좋았으며, 비타민 E와 C를 투여한 실험군들의 성장율과 비슷하게 나타났다. 그리고 첨가된 농도에 따른 성장율의 차이는 없었고 200 mg의 높은 농도를 투여 했을 때도 생존율이 100%로 나타나 이 약물에 대한 독성은 없었다. 따라서 glycyrrhizin은 비타민 E와 마찬가지로 항산화제 역할을 할 수 있는 것으로 추론된다.

분리된 혈청으로 부터 생화학적 특징을 검사한 결과 산패된 사료의 경우 GOT와 GPT가 각각 90과 62로 높게 나타난데 비해 비타민 E, C 및 glycyrrhizin을 첨가한 실험군에서는 현저히 낮았고, 산패된 사료에 첨가한 물질에 따른 GOT와 GPT의 값은 큰 변동없이 정상치로 회복되었다 (Table 3). Edahiro

등 (1991) 은 방어에 산패된 사료를 4 주간 투여한 후 혈청내 GOT와 GPT의 활성을 측정한 결과 정상 사료를 투여한 방어에 비해 그 활성도가 현저히 증가되어 있음을 확인하고, 이와 같은 현상은 산패된 사료에 의해 간 조직을 비롯한 각 장기 조직의 파괴에 따른 것이라 하였다. 따라서 본 실험의 결과는 산화된 사료에 첨가한 비타민 E, C 및 glycyrrhizin 등이 지질 과산화 반응에 따른 각 장기 조직의 파괴를 억제 시킬 수 있는 것으로 추론 된다.

담수어 (Horiuchi et al. 1980 ; Miyashita 1984) 및 해산어 (Kusuda et al. 1977 ; Yasunaga et al. 1982 ; Nakatsugawa 1983)의 중요한 질병원으로 알려진 *E. tarda*균을 각 실험 어류 복강에 감염시켜 이 균에 대한 저항력을 조사한 결과 산패된 사료에 비타민 E와 C를 투여한 실험군에서는 높은 생존율을 보여 주었고 25 mg을 제외한 여러 가지 농도의 glycyrrhizin을 투여한 실험군에서도 매우 높은 생존율을 보여 주었다. 비타민 E와 C는 탐식 세포와 림프구를 자극 시켜 interferon과 같은 cytokine의 분비를 촉진 시키고 항체 형성을 향진 시키는 면역 세포 조절 물질이라 알려졌다(Pinnell 1985 ; Wittes 1985 ; Friedrich 1988). 본 실험의 결과 *E. tarda*에 대한 저항력은 아마도 이들 비타민이 항산화제로서 뿐만 아니라 면역 세포의 기능에도 영향을 준 것으로 추론된다. 그러나 면역 기능에 대한 이들 비타민의 역할에 대해서는 앞으로 조사해 보아야 확실할 것으로 사료 된다.

최근 glycyrrhizin은 간염 바이러스를 비롯한 *Salmonella*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*과 *Nocardia*등과 같은 각종 세균에 대한 성장 억제 효과가 있는 것으로 알려졌으며(Abe et al. 1982 ; Tanaka et al. 1987), 세포성 면역과 체액성 면역 및 탐식 세포의 탐식능을 향진 시킬 뿐만 아니라 만성적으로 향진된 면역 기능을 낮추어 줄 수 있는 면역 조절자로서의 역할을 할 수 있는 것으로 알려졌다 (Mizoguchi et al. 1984 ; Chung et al. 1990 ; 장 1992). 여러 가지 농도의 glycyrrhizin을 투여한 본 실험에서도 *E. tarda*에 대한 저항력이 매우 높았음을 알 수 있었고, 그 농도는 최소한 50 mg/l 이상인 경우 효과가 있는 것으로 나타나, Edahiro 등 (1991)이 방어를 대상으로 산패된 사료에 glycyrrhizin을 투여하여 Streptococcal에 대한 높은 저항력을 보여준 결과와 일치하였다. 그러나 나일 틸라피아에서 glycyrrhizin이 항균제로서 작용 하였는지 또는 면역 세포의 기능을 향진 시키므로써 이 균에 대한 저항력이 증가 되었는지에 대해서는 면역학 및 세균학적인 측면에서 보다 상세히 다루어야 될 것으로 사료 된다.

요 약

산화된 사료에 첨가한 비타민 E, C 와 glycyrrhizin이 나일 틸라피아의 성장 및 *Edwardsiella tarda* 감염시 저항력에 미치는 영향을 알아 보기 위해 thiobarbitric acid (TBA) 값이 80~88 mg/kg인 사료만을 단독으로 또는 이 사료 100. g 당 비타민 E (50 mg), C (60 mg)과 glycyrrhizin (25~200 mg) 등을 각기 또는 상호 혼합하여 7 주간 사육하였다. 사육후 성장을 조사한 결과 비타민 E, C 및 glycyrrhizin 등을 각기 또는 혼합한 실험군이 산화된 사료만을 투여한 대조군에 비해 성장율이 좋았으며, 혈청 내의 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT)와 glutamic pyruvic transaminase (GPT) 값은 산화된 사료를 투여한 실험군에서만 매우 높게 나타났다. 질병원인 *E. tarda*를 인위적으로 감염시켰을 때 저항력에 있어서도 glycyrrhizin 25 mg 투여군을 제외한 비타민 E, C 및 glycyrrhizin 등을 투여한 실험군이 산화된 사료만을 투여한 대조군에 비해 생존율이 현저히 높았다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 산화된 사료만을 나일 틸라피아에 투여했을 때 성장 및 간의 활성도가 떨어지는 반면, 비타민 E, C 및 glycyrrhizin 등을 섞어서 투여했을 때 성장 및 간의 활성도가 증가되었을 뿐만 아니라 *E. tarda*에 대한 저항력도 증가되었음을 알 수 있었다.

사 사

본 실험을 위하여 사료의 산화도를 측정해 주신 부산수산대학교 식품영양학과 류홍수 교수님께
심심한 사의를 표하는 바 입니다.

참 고 문 헌

- Abe, N., T. Ebina and N. Ishida. 1982. Interferon induction by glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in mice. *Microbil. Immunol.* 26 : 535~539.
- Ames, B. N. 1982. Lipid peroxidation and oxidative damage to DNA. p. 339~351. In : K. Yagi. *Lipid peroxides in biology and medicine.* Academic Press.
- Chung, H. T., S. I. Jang, S. E. Lee, I. H. Oh, H. M. Kim and J. B. Kim. 1990. Biochemical signals involved in the immunomodulation caused by glycyrrhizin administration. *Japanese Biochem. Soci* 67 : 648 (Abstract).
- Edahiro, T., M. Hamaguchi and R. Kusuda. 1991. Suppressive effect of glycyrrhizin against streptococcal infection promoted by feeding oxidized lipids to yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Suisanzoshku* 39 : 21~27.
- Feher, J., G. Csomos and A. Vereckei. 1987. Free radical reaction in medicine. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, p. 18~147
- Ferguson, H. W., T. Poppe and D. J. Speare. 1990. Cardiomyopathy in farmed Norwegian salmon. *Dis. Aquat. Org.* 8 : 225~231.
- Friedrich, W. 1988. *Vitamins*, Walter De Gruyter Berlin, New York, pp. 280~430.
- Gatlin, D. M. III, W. E. Poe, R. P. Wilson, A. J. Ainsworth and P. R. Bowser. 1986. Effects of stocking density and vitamin C status on vitamin E-adequate and vitamin E-deficient fingerling channel catfish. *Aquaculture* 56 : 187~195.
- Horiuchi, M., T. Sato, H. Takagi and K. Tozuka. 1980. Studies on rapid diagnosis system of main bacterial diseases of pond cultured ell in Japan. I. Basic investigation on the diagnosis of Edwardsiellosis by direct immunofluorescence. *Fish Pathol.* 15 : 49~55.
- Kusuda, R., T. Itami, M. Munekiyo and H. Nakajima. 1977. Characteristics of a *Edwardsiella* sp. from an epizotic of cultured crimson sea breams. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 43 : 129~134.
- Miyashita, T. 1984. *Pseudomonas fluorescens* and *Edwardsiella tarda* isolated from diseased tilapia. *Fish Pathol.* 17 : 45~150.
- Mizoguchi, Y., Y. Ikemato, T. Arai and S. Yamamoto. 1984. Effects of glycyrrhizin on antibody production of PWM-stimulated lymphocytes in vitro. *Allergi, Japan.* 33 : 328~335.
- Murai, T., T. Akiyama, H. Ogata and T. Suzuki. 1988. Interaction of dietary oxidized fish oil and glutathione on fingerling yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *N. Suisan Gakkaishi.* 54 : 147~148.
- Nakatsugawa, T. 1983. *Edwardsiella tarda* isolated from cultured young flounder. *Fish Pathol.* 18 : 99~101.

- Panagamala, R. V. and D. G. Cornwell. 1982. The effects of vitamin E on arachidonic acid metabolism. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 393 : 376~390.
- Pinnell, S. R. 1985. Regulation of collagen biosynthesis by ascorbic acid : a review. *Yale J. Bio. Med.* 58 : 553~572.
- Roald, S. O. and D. Armstrong. 1981. Histochemical, fluorescent and electromicroscopical appearance of hepatocellular ceroidosis in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 4 : 1~14.
- Sato, M., Y. Hatano and R. Yoshinaka. 1991. L-ascorbyl 2-sulfate as a dietary vitamin C source for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 57 : 717~721.
- Schraufstatter, I. U., P.A. Hyslop, D. B. Hinshaw, R. G. Spragg, L. A. Sklar and C. G. Cochrane. 1986. Hydrogen peroxide-induced injury of cells and its prevention by inhibitors of Poly-ADP-ribose polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83 : 4908~4912.
- Shiki, Y., Y. Ishikawa, K. Shirai, Y. Saito and S. Yoshida. 1986. Effect of glycyrrhizin on lysosomes labilization by phospholipase A₂. *American J. Chinese Medicine.* XIV : 131~137.
- Tanaka, M, N. Mano, E. Akazai, Y. Narui, F. Kato and Y. Koyama. 1987. Inhibition of mutagenicity by glycyrrhiza extract and glycyrrhizin. *J. Pharmacobio-Dyn.* 10 : 685~688.
- Wassobluth, M. D., L. Guzman and F. P. Plachco. 1971. Oxidation in the meal. *J. Am. oil Chemists. Soc.* 48 : 420~424.
- Wittes, R. E. 1985. Vitamin C and cancer. *N. Engl. J. Med.* 312 : 178~184.
- Yasunaga, N., S. Ogawa and K. Hatai. 1982. Characteristics of the fish pathogen *Edwardsiella tarda* isolated from several species of cultured marine fishes. *Bull. Nagasaki Pref. Inst. Fish.* 8 : 57~65.
- Yokote, M. 1970. Sekoke Disease, spontaneous diabetes in carp, *Cyprinus carpio*, found in fish farms. I. Pathological study. *Bull. Fre. Fish. Res. Lab.* 20 : 39~72.
- 장선일. 1992. 마우스 흉선 세포의 Apoptosis 조절기전. 박사학위 논문, 전북대학교.
- 전세규. 1989. 산화된 사료에 의한 질병. *한국어병학회지* 2 : 109~114.
- 조문규, 전세규. 1990. 산화된 Pellet에 의한 틸라피아의 Ceroid 증과 비타민 E, C의 예방 효과. *한국어병학회지* 3 : 69-79.