

## 경구투여 $\beta$ -glucan이 잉어와 넙치의 비특이적 면역활성에 미치는 영향

박성우<sup>+</sup> · 곽중기\* · 구재근\*\* · 조만기\*

군산대학교 해양생명과학부, \*동서대학교 산업기술연구센터, \*\*군산대학교 식품공학과

### Effects of $\beta$ -glucan from *Schizophillum commune* on Non-specific Immune Parameters in Common Carp (*Cyprinus carpio*) and Flounder (*Paralichthys olivaceus*) by Oral Administration

Sung-Woo PARK, Jung-Ki KWAK\*, Jae-Geun KOO\*\* and Man-Gi CHO\*

Faculty of Marine Life Science, Kunsan National University, Kunsan 573-702, Korea

\*Engineering Center, Dongseo University, Pusan 617-716, Korea

\*\*Faculty of Ocean Applied Science & Technology, Kunsan National University, Kunsan, 573-702, Korea

The effects of dietary  $\beta$ -glucan administration on non-specific immune parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, (1.0 g and 68.7 g of body weight) and flounder, *Paralichthys olivaceus* (12.1 g and 54.0 g of body weight) were evaluated. All fishes were fed an experimental diet supplemented with  $\beta$ -glucan at 0.1% per kg diet for 5 weeks. A week intermission with basal diet occurred between first 2 weeks and second 2 weeks of  $\beta$ -glucan administration. The changes in the numbers of peripheral neutrophils and macrophages were counted under light microscopy and serum lysozyme activity was also analysed at a week of interval during the experiment. Phagocytic activities of leucocytes from the swim bladder of carp and the peritonium of flounder were measured 5 weeks after feeding. The oral administration of  $\beta$ -glucan induced significant reduction in mortality after an artificial challenge with  $1 \times 10^6$  cells of *Aeromonas hydrophila* in larger carp and  $1 \times 10^5$  cells of *Edwardsiella tarda* in larger flounder but did not in other groups. The numbers of peripheral macrophages and neutrophils, phagocytic activities of leucocytes, and the activity of serum lysozyme were greatly increased in the fish fed a  $\beta$ -glucan supplemented diet. These suggest that  $\beta$ -glucan administration by oral route can enhance leucocyte phagocytic activity, serum lysozymal activity, and survival rate against artificial infections depending on the infected fish size and challenged bacterial concentration.

Key words:  $\beta$ -glucan, Oral administration, Survival rate, Leucocyte, Phagocytic activity, Lysozyme

### 서 론

어류에  $\beta$ -glucan과 같은 면역증강제의 투여는 비특이적 면역반응계를 자극함으로써 질병에 대한 저항성이 증가된다고 보고되고 있지만 거의 대부분이 주사에 의한 결과 (Yano et al., 1989; Yano et al., 1991; Chen and Ainsworth, 1992; Jeney and Anderson, 1993; Jorgensen et al., 1993)로서 주사법은 시간적으로 경제적으로 어려움이 있을 뿐만 아니라 15 g 이하의 소형의 어류에는 적용할 수 없다는 한계가 있다 (Sakai, 1999). 한편 경구투여법은 어류에 스트레스를 주지않을 뿐 아니라 어체의 크기에 관계없이 대량으로 처리 가능한 방법이지만 효과면에서 일치된 결과를 얻고 있지 못하다. 즉 대서양연어 (Dalmo et al., 1998), chinook salmon (Nikl et al., 1993), 무지개송어 (Onarheim, 1992; Swicki et al., 1994; Verlhac et al., 1998), 방어 (Itami et al., 1996) 및 African catfish (Yoshida et al., 1995)에서 비특이 면역계의 활성화 또는 세균성질병에 대한 증가가 보고되었지만, Chen and Ainsworth (1992)는 차벌메기에 효모 glucan을 주사하였을 때 인위감염 *Edwardsiella ictaluri*에 대한 저항성이 증가되었으나 경구투여

하였을 경우에는 방어능의 증가가 없다고 하였다. 또 넙치에 1%의 curdlan 첨가사료를 4주간 연속투여 또는 2일간격으로 4개월간 투여하였을 때는 투여기간과 투여방법에 따라 백혈구수와 식작용능에 차이를 나타내고 있다 (Ashida et al., 1999). 그러나 어류도 포유류와 마찬가지로 경구투여한 다당체가 장의 상피를 통하여 흡수되어 혈류를 따라 운반되어 림프조직내에서 처리되는 것이 밝혀져 (Dalmo et al., 1995),  $\beta$ -glucan과 같은 다당체가 비특이 면역증강제로서의 가능성은 높지만 어종과 투여방법에 따라 투여 효과에 차이가 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 *Schizophillum commune*의 체외배출 다당체 (extracellular polysaccharide)에서 저비용으로 대량정제가 가능한  $\beta$ -glucan을 크기가 다른 잉어와 넙치에 각각 경구투여한 다음 세균의 인위감염에 대한 생존율, 백혈구 수와 식작용능 및 혈청 리소자임의 활성화에 미치는 영향을 조사하였다.

### 재료 및 방법

공시어 및 다당체 투여

잉어 (평균 체중, 1.0 g 및 68.7 g) 및 넙치 (평균 체중, 12.1 g 및 54.0 g)를 사용하였다. 잉어는 88 cm  $\times$  29 cm  $\times$  33 cm의 4각수조

<sup>+</sup> Corresponding author: psw@kunsan.ac.kr

(수량 70 L)에 소형어는 100마리, 중형어는 20마리를 넣고 통기하면서 25°C에서 사육하였다. 사육수는 2일간격으로 1/2씩 미리 가온하여 둔 25°C의 깨끗한 물로 교환하여 주었다. 넙치는 군산대학교 천해양식실습장의 직경 1.3 m의 FRP원형수조에 소형은 100마리, 중형은 50마리를 넣은 다음 유수식으로 사육하였다.

$\beta$ -glucan생산을 위한 균주는 독일 DSMZ사 (deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zerkulturen GmbH)로부터 분양 받은 *Schizophillum commune*를 사용하였다. 멸균한 B-1배지 (보리; 10 g/L, 식염; 5 g/L)에 *S. commune*를 접종하여 15 L 배양조에서 배양한 후 4,500 g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 상층액에 에틸알콜을 첨가하여 다당을 분리한 후 alditol acetate형태로 또는 methylation시킨 후 alditol acetate형태로 유도체를 만들어 (Blakeney et al., 1983), GC (Hewlett Packard, 6890) 및 GC. MSD (Hewlett Packard, 5973)를 이용하여 분석한 결과  $\beta$ -(1,3)-(1,6) 결합이었으며 순도는 95% 이상이었다. 배양액에서 분리한  $\beta$ -glucan은 40°C에서 건조하여 냉장고에 보관하였다. 건조시킨  $\beta$ -glucan을 증류수에 현탁시켜 얼음 위에서 초음파분쇄기 (Nihon Seiki Kaisha Ltd., US-50)로 3시간동안 분쇄하여 사료중량의 20%의 증류수에 재현탁시켜 실험에 사용하였다.

$\beta$ -glucan을 시판 배합사료 중량의 0.1%를 첨가하여 흡착시킨 다음 풍건하여 냉장고에 보관하여 사용하였다. 사료의 투여량은 어체중의 2%를 일일량으로 하여 오전과 오후에 나누어 2주간 첨가투여-1주간 무첨가투여-2주간 무첨가투여의 방법으로 5주간 투여하였다. 대조구는  $\beta$ -glucan 무첨가 사료를 같은 양 투여하였다.

#### 인위감염에 대한 생존율

$\beta$ -glucan 첨가사료 또는 무첨가사료를 5주간 투여한 후 잉어는 70 L의 사각수조에 소형은 20마리, 대형은 10마리를, 넙치는 0.3 t의 원형수조에 소형은 100마리, 대형은 20마리를 수용하여 미리 병원성을 확인한 *Aeromonas hydrophila* 또는 *Edwardsiella tarda*를 복강주사하였다. *A. hydrophila*와 *E. tarda*는 각각 Trypticase soy agar (TSA, Difco)와 Brain heart infusion agar (BHIA)에 25°C에 24시간 배양하여 균을 모은 다음 멸균생리식염수에 희석하여 각각  $2 \times 10^{10}$  cells/mL의 균액을 만들었다. 제조 균액을 멸균생리식염수로 단계희석하여 어류당  $1 \times 10^4$  cells,  $1 \times 10^5$  cells,  $1 \times 10^6$  cells,  $1 \times 10^7$  cells을 잉어의 복강과 넙치의 근육에 주사하였다. 균접종후 25°C에서 잉어는 지수식으로, 넙치는 유수식으로 무급이 사육하면서 7일 동안의 사망률을 %로 나타냈다. 대조구는 멸균생리식염수를 0.1 mL씩 주사하여 같은 방식으로 사육하였다.

#### 백혈구수의 변화와 식작용

백혈구수의 변화와 식작용의 평가는 소형의 어류는 채혈이 불가능하므로 평균체중 68.7 g군의 잉어와 54.0 g군의 넙치를 대상으로 조사하였다.  $\beta$ -glucan 첨가사료 또는 무첨가사료를 투여하면서 1주일 간격으로 헤파린코팅 멸균 플라스틱주사기를 사용하여 미부혈관에서 채혈하여 슬라이드글라스에 도말한 다음 May-Grunwald Giemsa염색후 광학현미경으로 검경하면서 적혈구 2,000개당 출현하는 마크로파아지와 호중구의 수를 계수하였다.

백혈구의 식작용능은  $\beta$ -glucan 첨가사료 또는 무첨가사료를 5주간 투여한 다음 잉어는 부레에서, 넙치는 복강내에서 채취한 백혈구를 사용하였다. 잉어는 백혈구의 채취 24시간전에 Endo et al. (1997)의 방법에 따라 멸균 2% 카제인액 0.1 mL를 부레에 접종하였다. 100 unit/mL의 헤파린을 첨가한 Hanker's blanced salt solution (HBSS) 0.8 mL를 부레에 주사기로 주입한 다음 어체를 상하로 흔들어 부레내를 세척한 후 주입한 액을 재흡입하였다. 부레내에 HBSS액을 주입, 흡입하는 과정을 3~4회 반복하여 흡입액을 모은 다음 혈구계산판으로 혈구수를 계수한 후 HBSS로  $2 \times 10^6$  cells/mL의 백혈구 부유액을 만들었다. 넙치는 2% 카제인액을 복강에 주사하고 24시간후에 복강을 절개하고 복강내를 세척한 헤파린첨가 HBSS액을 시험관에 옮긴 다음 원심세척하여 HBSS로  $2 \times 10^6$  cells/mL로 조정하였다.

백혈구 부유액 ( $2 \times 10^6$  cells/mL)과 육소닌화 *Escherichia coli* 포르말린사균액 ( $2 \times 10^8$  cells/mL)을 실리콘 코팅 유리시험관에 동량 혼합한 다음 0분, 30분, 60분 및 120분 후에 0.2 mL를 들어 내어 다량의 냉각 HBSS를 첨가하여 800 rpm에 10분간 원심하여 상층을 제거하였다. 침전 백혈구를 소량의 HBSS에 현탁시켜 cell-spine (Hanil, Korea)으로 슬라이드글라스 도말표본을 만든 다음 May-Grunwald Giemsa염색 후 광학현미경으로 200개의 백혈구를 관찰하여 식작용율 (phagocytic rate)과 식작용지수 (phagocytic index)를 구하였다.

#### 리소조움의 활성

Litwick (1955)의 방법에 따라 0.066 M phosphate buffer (pH 6.2)에 0.02% (W/V)로 부유시킨 *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, M-3770)부유액 1.7 mL를 큐벳에 옮긴 다음 미부혈관에서 채혈한 혈액 유래의 혈청 100  $\mu$ L를 첨가하여 20°C에 배양하면서 30초와 150초후의 흡광도의 변화를 450 nm에서 측정하여 분당의 0.001의 흡광도 감소치를 리소자임의 활성 1단위로 표시하였다.

#### 통 계

인위감염에 대한 생존율은 Fisher의 정확확률검정법으로, 백혈구수, 식작용능 및 리소자임의 활성은 student-t검정법으로  $P < 0.05$ 의 수준에서 유의차를 조사하였다.

## 결 과

담수어인 잉어와 해산어인 넙치에 2주간 투여-1주간 무투여-2주간 투여의 투여방법에 의해  $\beta$ -glucan을 5주간 투여한 후 병원세균인 *A. hydrophila*와 *E. tarda*를 각각 잉어와 넙치에 복강주사한 다음 7일간 사육하면서 생존율의 변화를 조사한 결과는 Fig. 1과 Fig. 2에 표시하였다.

두어종 모두  $1 \times 10^7$  cells의 고농도의 세균을 접종한 경우에는  $\beta$ -glucan첨가투여군과 무첨가투여군의 생존율에는 차이가 없었다. 그러나 이보다 낮은 농도에서는  $\beta$ -glucan첨가투여군의 생존율이 무첨가투여군과 같거나 높았다. 즉 소형의 잉어는 저농도에서  $\beta$ -glucan첨가투여군이 무첨가투여군보다 생존율이 높았지만 통계적

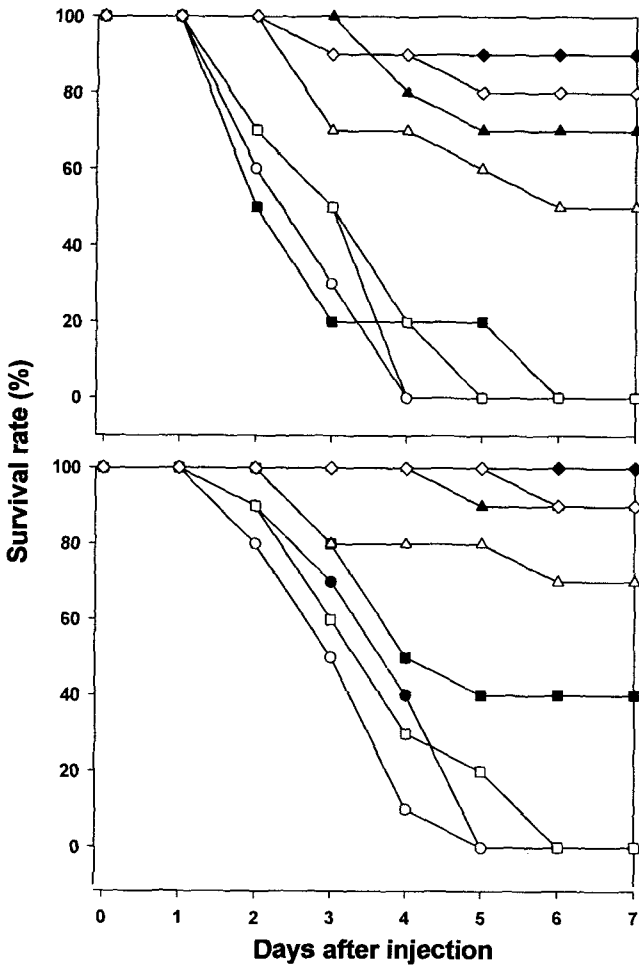


Fig. 1. Survival rate of carp (upper: 1.0 g body weight, lower: 68.7 g body weight) intraperitoneally injected with various concentrations of *Aeromonas hydrophila*. (○●:  $1 \times 10^7$  cells, □■:  $1 \times 10^6$  cells, △▲:  $1 \times 10^5$  cells, ◇◆:  $1 \times 10^4$  cells). All fishes were fed an experimental diet supplemented with  $\beta$ -glucan at 0.1% per kg diet. One week intermission with basal diet occurred between first 2 weeks and second 2 weeks of  $\beta$ -glucan administration. Filled and opened symbols indicate the experimental and control 4 groups, respectively.

유의차는 없었으며, 대형의 경우도  $\beta$ -glucan첨가투여군이 무첨가투여군에 비해 높은 생존율을 나타내었지만 통계적으로는  $1 \times 10^6$  cells 에서만 차이가 있었다 ( $P < 0.05$ ).

소형의 넙치에서는 모든 접종농도에서  $\beta$ -glucan첨가투여군과 무첨가투여군간의 생존율에 유의차는 없었다. 대형의 넙치에서는  $1 \times 10^5$  cells 접종군에서만  $\beta$ -glucan첨가투여군이 무첨가투여군에 비해 통계적으로 높은 생존율을 보였을 뿐 ( $P < 0.05$ ) 다른 접종농도에서는 무첨가투여군과 차이가 없었다.

$\beta$ -glucan첨가사료 또는 무첨가사료를 투여하면서 1주일간격으로 채취한 말초혈액중의 백혈구수의 변화는 Fig. 3에 나타났다. 잉어의 마크로파아지수는  $\beta$ -glucan첨가사료 투여 일주일후에 적혈구 2,000개당 46.3개로 급격히 증가한 후 점차 감소하기 시작하

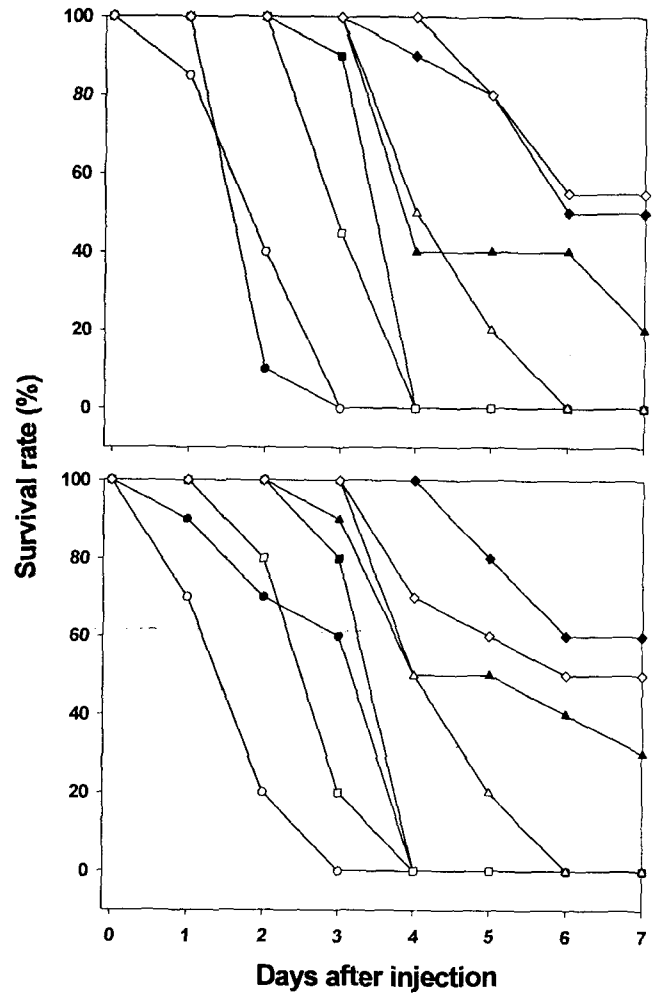


Fig. 2. Survival rate of flounder (upper: 12.1 g body weight, lower: 54.0 g body weight) intramuscularly injected with various concentrations of *Edwardsiella tarda*. The feeding schedule and the symbols are the same as shown in Fig. 1.

여 일주일간의  $\beta$ -glucan첨가사료 무투여 후에는 30.0개로 감소하였다. 그러나 2차  $\beta$ -glucan첨가사료 투여 후에는 다시 상승하여 투여 2주후에도 47.7개로 최대치를 나타내어 전기간을 통하여 무첨가투여군에 비해 높은 수치를 나타내었다. 한편 호중구수는 1차  $\beta$ -glucan첨가사료 투여기간 동안에 13.0~15.0개로 증가하였고 무첨가사료 투여기간 동안에 6.3개로 감소하였지만 2차  $\beta$ -glucan첨가사료 투여후에는 13.7~16.0으로 증가하여, 변동의 경향은 마크로파아지수의 변동과 비슷하였지만 그 숫자는 마크로파아지수보다는 적었다. 이러한  $\beta$ -glucan첨가사료투여후의 호중구나 마크로파아지의 숫자는 무첨가투여군의 마크로파아지수 18.3~23개와 호중구수 4.0~7.0에 비해 높게 나타났다 ( $P < 0.05$ ).

넙치의 마크로파아지수도  $\beta$ -glucan첨가사료 투여 1주일후에 38.0개로 상승하였다가 무첨가사료 투여후에는 32.3개로 감소하였다. 2차  $\beta$ -glucan첨가사료 투여 후에는 다시 41.0~43.0개로 증가하였다. 호중구도  $\beta$ -glucan첨가사료 투여후에 10.7~12.0개와 10.0~

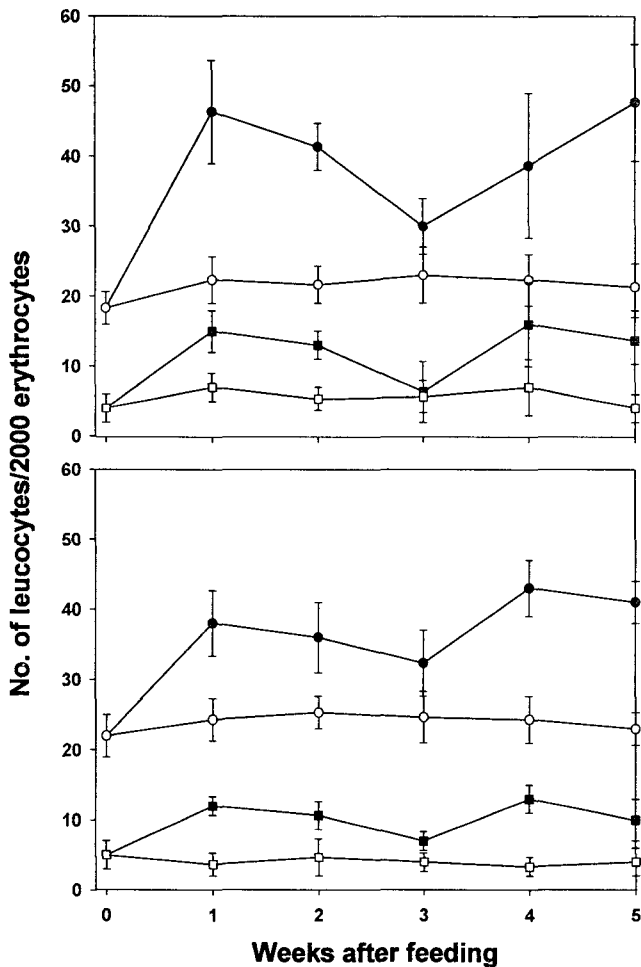


Fig. 3. Changes in the number of the peripheral macrophages (●○) and neutrophils (■□) in carp (upper) and flounder (lower) fed the  $\beta$ -glucan supplemented diet according to the feeding schedule shown in Fig. 1. Filled and opened symbols indicate the experimental and control groups, respectively.

13.0개로 투여전의 5.0개와 무첨가사료 투여후의 7.0개에 비해 높게 나타났다 ( $P < 0.05$ ). 무첨가사료투여군의 넙치의 마크로파아지와 호중구수는 22.0~25.3개와 3.3~5.0개로 거의 변동이 없었다.

$\beta$ -glucan첨가사료 또는 무첨가사료를 5주간 투여후 잉어의 부레와 넙치의 복강에서 채취한 백혈구의 *E. coli*포르말린사균에 대한 탐식율과 탐식지수는 Fig. 4에 나타내었다. 잉어의 백혈구의 탐식율은 배양 30분후에는 무첨가투여군과 차이가 없었으나, 1시간후에는 45.0%, 2시간 후에는 75.3%, 4시간 후에는 79.8%가 탐식하여 무첨가투여군의 35.3~64.2%보다는 현저히 높았다. 탐식지수도 반응 30분에는 무첨가투여군과 차이가 없었으나 1시간 후부터 2.9~4.7개로 무첨가투여군의 1.5~3.0개보다는 많은 수의 세균을 탐식하였다 ( $P < 0.05$ ). 넙치의 백혈구는 반응 30분후부터 38.5~67%가 탐식하여 무첨가투여군에 비해 탐식율이 현저히 높았으며, 탐식지수도 반응 30분후에 2.1개를 탐식하여 무첨가투여군의 1.8개와 차이가 없었지만 1시간 후에는 최대인 6.0개를 탐식하여

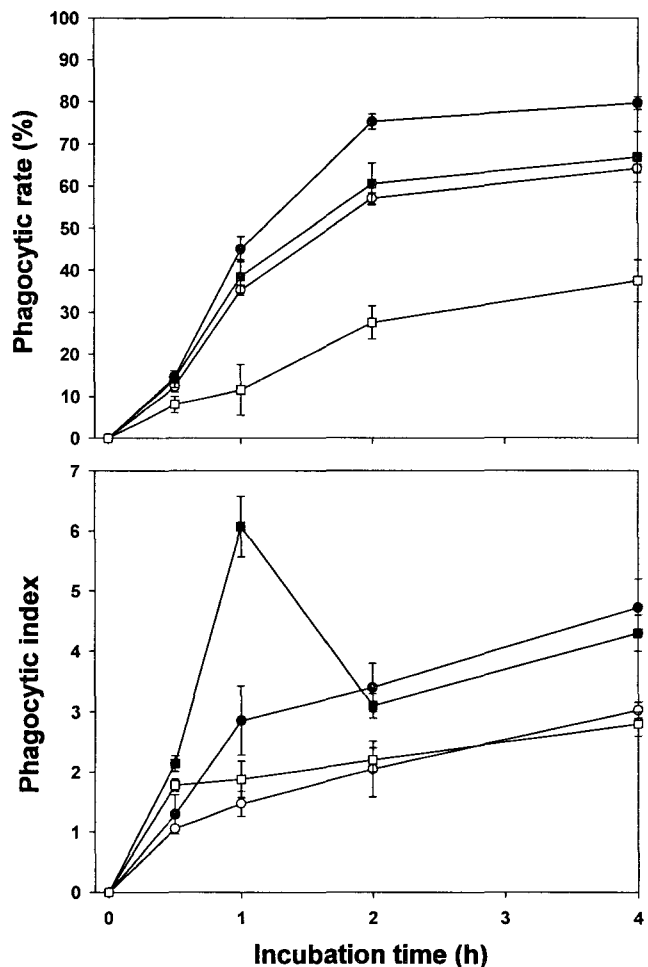


Fig. 4. Phagocytic rates and phagocytic index of leucocytes against formalin-killed *Escherichia coli*. Leucocytes were collected from the swim bladder lumen of carp (circle) or peritoneal cavity of flounder (rectangle) fed a  $\beta$ -glucan supplemented diet according to the feeding schedule shown in Fig. 1. Symbols are the same as in Fig. 3.

1.8개를 탐식한 무첨가투여군보다는 현저히 높았다 ( $P < 0.05$ ). 그러나 그 후의 탐식지수는 약간 감소한 3.1~4.3개를 탐식하였지만 대조군의 2.2~2.8보다는 여전히 많은 수를 탐식하였다.

$\beta$ -glucan첨가사료 또는 무첨가사료를 투여하면서 1주일 간격으로 채취한 말초혈액에서 분리한 혈청중의 리소자임의 활성변화는 Fig. 5에 표시하였다. 무첨가 사료를 투여한 잉어의 말초혈액중의 리소조움의 활성은 전기간을 통하여 8~13 uint/min이었지만,  $\beta$ -glucan첨가사료를 투여한 잉어는 2주간 투여후에는 24 uint/min로 급증하였다. 그러나 무첨가사료를 일주일간 투여한 후에는 무첨가투여군과 비슷한 12 uint/min로 감소하였다. 또 2차로  $\beta$ -glucan첨가사료를 투여한 일주일후에는 33 uint/min으로 최고치를 나타내다가 2주간 투여후에는 22 uint/min로 감소하였지만  $\beta$ -glucan첨가사료투여군의 리소자임 활성은 무첨가투여군에 비해 현저히 높았다. 한편 넙치의 말초혈액중의 리소자임의 활성은  $\beta$ -glucan첨가

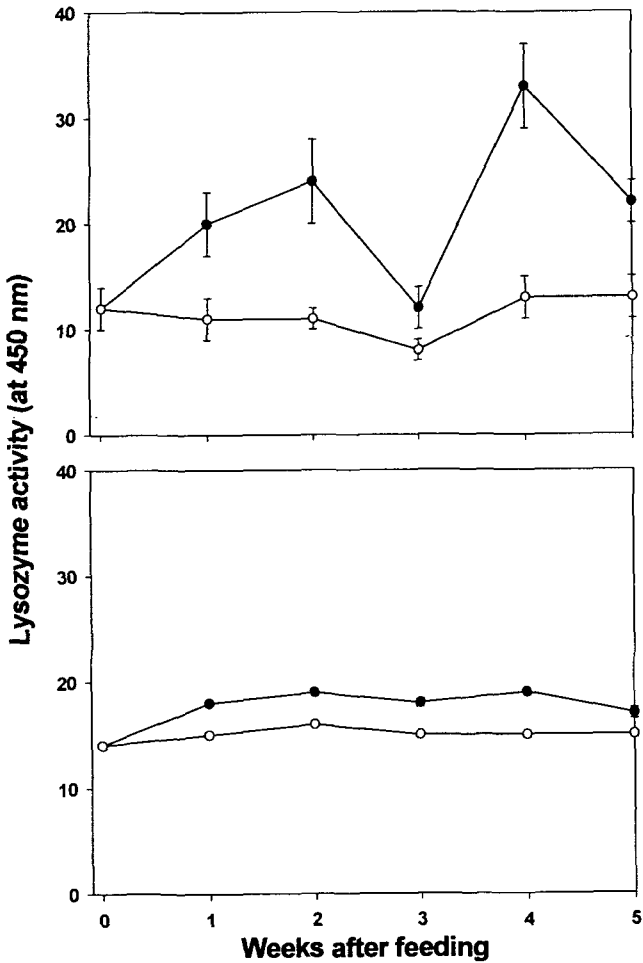


Fig. 5. Serum lysozyme activity of carp (upper) and flounder (lower) fed a  $\beta$ -glucan supplemented diet according to the feeding schedule in Fig. 1. Filled and opened symbols indicate the experimental and control groups, respectively.

사료 투여 후 상승하여  $\beta$ -glucan첨가사료 투여기간과 무첨가사료 투여기간 동안에도 거의 변동이 없는 18~19 uint/min로 무첨가투여군의 14~16 uint/min보다는 높았다. ( $P < 0.05$ )

### 고 찰

$\beta$ -glucan와 유사한 구조를 가진 다당체인  $\beta$ -1,3 glucose를 대서양연어 (*Salmo salar*)에 경구투여한 결과 장의 후반부에서 흡수된다고 보고한 이래 (Ingebrigtsen et al., 1993), 소화관이나 직장을 통하여 강제 주입된 다당체가 결합조직과 단핵식세포군 및 림프조직으로 구성되어 있는 장의 후반부의 점액성면역계 (mucosal immune system)을 통하여 흡수되며 혈액에 의해 림프조직으로 운반되어 처리된다는 것이 밝혀졌다 (Sveinbjornsson et al., 1995). 또 난황을 가진 대서양 halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) 치어에서 수용성  $\beta$ -glucan이 장의 후반부를 통하여 흡수되는 것이

조직학적으로 입증되어 (Strand and Dalmo, 1997) 수산양식에서의  $\beta$ -glucan의 경구투여의 효용성이 확립되게 되었다.

$\beta$ -glucan의 경구투여는 주사에 의한 투여와 마찬가지로 많은 어종에서 백혈구의 탐식능 (Itami et al., 1996), 리소자임의 활성 (Yoshida et al., 1995; Baulny et al., 1996), 화학발광의 증가 (Duncan and Klesius, 1996)와 백혈구의 유주능 (Duncan and Klesius, 1996) 및 활성산소의 생성 증가 (Yoshida et al., 1995) 등과 같은 비특이 방어인자의 활성을 증가시킨다고 보고되었다.

본 연구에서는 담수어인 잉어와 해산어인 넙치에 각각  $\beta$ -glucan을 경구투여한 다음 인위감염에 대한 생산율, 말초혈액중의 백혈구수의 변화, 백혈구의 식작용능 및 혈중 리소자임의 활성의 변화를 조사하였다. 경구투여후의 인위감염에 대한 생산율에서는 두어종 모두 각각 접종균으로 사용한 *A. hydrophila*와 *E. tarda*에 대한 생산율 대형의 잉어에  $1 \times 10^6$  cells을 접종한 경우와 대형의 넙치에  $1 \times 10^5$  cells을 접종한 경우에만 차이가 날 뿐 나머지 접종균의 생산율에는 영향이 없었다.  $\beta$ -glucan을 경구투여한 무지개송어 (Onarheim, 1992; Siwiki et al., 1994), 시누크연어 (Nikl et al., 1993)에서의 *Aeromonas salmonicida*와 대서양연어에서의 *Vibrio anguillarum* (Dalmo et al., 1998)에 대한 저항성은 증가되었다. 그러나 차넬메기 (Duncan and Klesius, 1996)의 *Edwardsiella ictaluri*, turbot (Baulny et al., 1996)와 대서양연어 (Dalmo et al., 1998)의 *V. anguillarum*에 대한 생산율은 대조군과 차이가 없었다. 한편 주사로서  $\beta$ -glucan을 강제주입한 방어의 경우 *Streptococcus* sp.에 대한 저항성은 증가하였지만 *Pasteurella piscicida*에 대한 저항성에는 차이가 없어 (Matsuyama et al., 1992) 접종균의 종류에 기인할 수도 있다. 그러나 이러한 비특이면역계의 활성인자는 그 작용범위가 광범위한 반면에 특이면역활성인자에 비해 활성도 낮아 Baulny et al. (1996)이 지적한 것처럼 감염경로에 따라 방어능에 차이가 나기 때문으로 생각된다.

생체방어의 최일선에서 외부로부터 침입한 이물질을 적극적으로 탐식하는 능력을 가지고 있는 백혈구인 호중구와 마크로파아지는 외부의 자극에 말초혈액중에 나타내는 숫적 증가의 형태로 반응함과 동시에 식작용능이 증가하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서도  $\beta$ -glucan을 경구투여한 결과 말초혈액의 호중구와 마크로파아지의 수와 식작용능의 증가가 관찰되어 차넬메기 (Duncan and Klesius, 1996)와 무지개송어 (Jeney et al., 1997)의 결과와 일치한다. 그러나 호중구와 마크로파아지의 수의 변화를 보면 만성적 감염시에 출현하는 마크로파아지수의 증가가 현저하고 또한  $\beta$ -glucan을 투여한 일주일후에 가장 많이 증가되고 그 다음의 일주일간은 감소하는 경향이였으며, 무투여기간에는 투여전과 비슷한 최저의 수치를 나타내었다.  $\beta$ -glucan을 강제로 메기의 체내에 주사하였을 때는 호중구수가 주사후 3일후에 최대치에 도달한 후 감소하여 주사 5일후에는 비접종어와 비슷한 수준으로 감소하며 (박 등, 1996), 대서양연어에  $\beta$ -glucan을 주사하였을 때 2일 후까지는 마크로파아지나 호중구가 증가하지만 주사 8일후에는 호중구는 현저히 감소하고 마크로파아지가 대부분을 차지한다고 보고되었다 (Jorgensen et al., 1993). 또한 Ashida et al. (1999)은 혈구를 구분하지 않았지만 넙치에  $\beta$ -glucan을 4주간 연속적으로 경

구투여하였을 때 말초혈액중의 백혈구수가 투여 2주후에 최대에 도달한 다음 감소한다고 보고하였다. 이처럼 주사법과 경구투여간의 백혈구의 조성의 차이는 Dalmo et al. (1995)가 다당체를 대서양연어의 정맥에 직접 주입한 12시간후에 조직내에 수치가 최대로 출현한다고 밝힌 것처럼 경구투여가 림프조직에 전달되는 것이 주사에 의한 강제주입보다는 늦기 때문 초기 방어에 관여하는 호중구보다는 만성염증반응에 관여하는 마크로파아지가 더욱 활성화된다고 생각된다.

$\beta$ -glucan의 투여는 혈중 리소자임의 활성을 증가시키지만 박 등 (1996)은 주사법으로 3일간격으로 2회 접종하였을 때 2회 접종후의 리소자임 활성이 1차 접종시에 비해 현저히 증가되었으며, Baunly et al. (1996)는 무치개송어에 5주간 연속으로  $\beta$ -glucan을 경구투여하였을 때는 투여 14일째와 21일째에 대조군과 차이가 난다고 보고하였고, Yoshida et al. (1996)는 African catfish에서는 투여후 50일째까지도 리소자임의 활성이 높았다고 하였다. 이는 일정기간 경구적으로 투여된 글루칸은 어체내에 배출되어지는 기간이 어종에 따라 차이가 나며, 잔류하는 기간이 길어질수록 비특이면역계를 지속적으로 자극함으로써 리소자임의 활성을 증가시킨다고 생각된다.

이상과 같은 본실험의 결과로서  $\beta$ -glucan의 경구투여는 어체내로부터  $\beta$ -glucan입자를 제거하기 위한 작용으로 만성염증과 유사한 반응이 유발되어 마크로파아지 및 혈중 리소자임과 같은 비특이 방어인자를 활성화시켜 생체를 방어하려는 움직임이 나타나 주사와 같은 강제주입시 보다는 인위감염에 대한 생장율이 낮지만 일시에 다량의 인위감염이 아닌 양어장내에서의 자연발생 감염에는 방어능력을 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

## 요 약

$\beta$ -glucan을 시판의 배합사료에 0.1% 첨가한 다음 담수어인 잉어 (평균체중 1.0g 및 68.7g)와 해산어인 넙치 (평균 체중, 12.1g 및 54.0g)에 2주간 첨가사료, 1주간 무첨가사료, 2주간 첨가사료 투여의 투여방법으로 5주간 경구투여한 다음 인위감염에 대한 생장율을 조사하였다. 또 투여기간중의 말초혈액의 백혈구수와 혈중리소자임의 활성과 5주간 투여후에 채취한 백혈구의 식작용능을 조사하였다.

$\beta$ -glucan첨가사료 투여군에  $1 \times 10^6$  cells의 *Aeromonas hydrophila*를 접종한 평균체중 68.7g의 잉어군과  $1 \times 10^5$  cells의 *Edwardsiella tarda*를 접종한 평균체중 68.7g의 넙치군에서  $\beta$ -glucan첨가사료 투여군이 무첨가투여군에 비해 생존율이 높았고 ( $P < 0.05$ ), 그외의 접종군에서는 무첨가투여군과 차이가 없었다.  $\beta$ -glucan첨가사료 투여기간 동안 말초혈액중의 마크로파아지와 호중구수는 투여기간에는 증가, 무투여기간에는 감소하는 경향이였으며 특히 마크로파아지의 증가가 현저하였다. 혈중 리소자임은 잉어에서는  $\beta$ -glucan첨가사료 투여기간에는 상승하고 무투여기간에는 감소하였지만,  $\beta$ -glucan첨가사료를 다시 투여한 후 급격히 상승하여 높은 활성을 유지하였다. 그러나 넙치는 잉어보다는 활성의 증가는 현저하지 않았고 무투여기간에도 변동이 없었지만 무첨가투여군보다는 항상 높은 활성을 나타내었다.

## 감사의 글

본 논문은 1998년 해양수산부의 특정과제 연구비 지원에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Ashida, T., E. Okimasu, T. Nishihara, T. Kitanaka, K. Nomura and A. Ameura. 1999. Oral administration of curdlan ( $\beta$ -1,3-glucan) potentiates the nonspecific immune system of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, and its effect is influenced by the feeding period. *Suisanzoshoku*, 47, 439~444.
- Baulny, M.O., C. Quentel, V. Fournier, F. Lamour and R.L. Gouvello. 1996. Effect of long term oral administration of  $\beta$ -glucan as an immunomodulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. *Dis. Aquat. Org.*, 26, 139~147.
- Blakeney, A.B., P.P. Harris, R.J. Henry and B.A. Stone. 1983. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research*, 113, 291~299.
- Chen, D. and A.J. Ainsworth. 1992. Glucan administration potentiates immune defense mechanism of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafineswue. *J. Fish Dis.*, 15, 295~304.
- Dammo, R.A., K. Ingerbrigtsen, J. Bogwald, T.E. Horsberg and R. Seljelid. 1995. Accumulation of immunomodulatory  $\beta$ (1,3)-D-glucan in the spleen and kidney of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 18, 545~553.
- Dalmo, R.A., B. Martinsen, T.E. Horsberg, A. Ramstad, C. Syvertsen, R. Seljelid and K. Ingebrigtsen. 1998. Prophylactic effect of  $\beta$ (1,3)-D-glucan (laminaran) against experimental *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio salmonicida* infections. *J. Fish Dis.*, 21, 459~462.
- Duncan, P.L. and P.H. Klesius. 1996. Dietary immunomodulants enhance nonspecific immune responses in channel catfish but not resistance to *Edwardsiella ictaluri*. *J. Aquat. Anim. Health*, 8, 241~248.
- Endo, M., C. Anuntaree, L. Ruangpan, A. ponpornpisit, T. Yoshida and T. Iida. 1997. A new method for collecting neutrophils using swim bladder. *Fish. Sci.*, 63, 644~645.
- Ingebrigtsen, K., T.E. Horsberg, R. Dalmo and R. Seljelid. 1993. Tissue distribution of the immunomodulator aminated  $\beta$ 1~3 polyglucose in Atlantic salmon (*Salmo salar*) after intravenous, intraperitoneal and peroral administration. *Aquaculture*, 117, 29~35.
- Itami, T., M. Kondo, M. Uozu, A. Suganuma, T. Abe, A. Nakagawa, N. Suzuki and Y. Takahashi. 1996. Enhancement of resistance against *Enterococcus seriolocida* in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* (Temminck & Schlegel), by oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *J. Fish Dis.*, 19, 185~187.
- Jeney, G. and D.P. Anderson. 1993. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the nonspecific defense mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 116, 315~329.
- Jeney, G., M. Galeotti, D. Volpatti, Z. Jeney and D.G. Anderson. 1997. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed

- diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*, 154, 1~15.
- Jorgensen, J.B., H. Lunde and B. Robertsen. 1993. Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 16, 313~325.
- Litwack, G. 1955. Photometric determination of lysozyme activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 89, 401~403.
- Matsuyama, H., R.E.P. Mangindaan and T. Yano. 1992. Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture*, 101, 197~203.
- Nikl, L., T.P.T. Evelyn and L.J. Albright. 1993. Trials with an orally and immersion-administrated  $\beta$ -1,3 glucan as an immunoprophylactic against *Aeromonas salmonicida* in juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis. Aquat. Org.*, 17, 191~196.
- Onarheim, A.M. 1992. Now a yeast extract to fortify fish. *Fish Farmer*, 15, 45.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172, 63~92.
- Strand, H.K. and R.A. Dalmo. 1997. Absorption of immunomodulating  $\beta$ (1,3)-glucan in yolk sac larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *J. Fish Dis.*, 20, 41~49.
- Sveninbjornsson, B., B. Smedsrod, T. Berg and R. Seljelid. 1995. Intestinal uptake and organ distribution immunomodulatory aminated  $\beta$ -1,3-D-polyglucose in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunol.*, 5, 39~50.
- Swiki, A.J., D.P. Anderson and G.L. Rumsey. 1994. Dietary intake of immunomodulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 41, 125~139.
- Verlhac, V., A. Obach, J. Gabaudan, W. Schuep and R. Hole. 1998. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunol.*, 8, 409~424.
- Yano, T., R.E.P. Mangindaan and H. Matsuyama. 1989. Enhancement of the resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by some  $\beta$ -1,3-glucans. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, 1815~1819.
- Yano, T., H. Matsuyama and R.E.P. Mangindaan. 1991. Polysaccharide-induced protection of carp, *Cyprinus carpio* L., against bacterial infection. *J. Fish Dis.*, 14, 577~582.
- Yoshida, T., R. Kruger and V. Inglis. 1995. Agumentation of non-specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long-term oral administration of immunostimulants. *J. Fish Dis.*, 18, 195~198.
- 박성우, 김영길, 최동림. 1996.  $\beta$ -glucan을 접종한 한국산 메기 (*Silurus asotus*)의 호중구와 리소자임 활성. *한국어병학회지*, 9, 87~93.

---

2001년 4월 3일 접수

2001년 7월 30일 수리