

생약재 첨가 사료를 투여한 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 비특이적 면역반응, 혈액성분 및 항병력 효과

정승희[†] · 이주석 · 한형균* · 전창영* · 이해영**

국립수산과학원 병리연구과, *국립수산과학원 거제수산종묘시험장, **국립수산과학원 양식생물과

Effects of Medicinal Herb Extract on Non-specific Immune Responses, Hematology and Disease Resistance on Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus* by Oral Administration

Sung-Hee Jung[†], Joo-Seok Lee, *Hyoung-kyun Han, *Chang-yeong Jun and Hae-Young Lee**

Pathology Division, National Fisheries Research & Development Institute,
408-1 Sirang-ri Gijang-eup Gijang-gun, Busan 619-902, Korea

*Koje Marine Hatchery, South Sea Fisheries Research Institute, NFRDI

**Aquaculture Division, National Fisheries Research & Development Institute

Effects of medicinal herb extract on nonspecific immune responses, hematology and disease resistance against *Edwardsiella tarda* in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* were evaluated. Wormwood, *Artemisia asiatica* NAKAI and barrenwort, *Epimedium koreanum* NAKAI were mixed at a ratio of 7 : 3 (w/w) for 2-herbs extract and wormwood, barrenwort, Korean forsythia, *Forsythia koreana* NAKAI, chrysanthemum, *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* KITAMURA, peppermint, *Mentha arvensis* L. var. *piperascens* MALINV., great burnet, *Sanguisorba officinalis* L., lizard tail, *Saururus chinensis* BAILL., mulberry, *Morus alba* L., and star anise, *Illicium verum* HOOK. f. at the same weight for 9-herbs extract. Two-herbs or 9-herbs extract were prepared by heating after adding 10 ml of distilled water per g of the herb mixtures. Fish (10.3 ± 2.5 g) were fed the experimental diets supplemented with the 2-herbs or 9-herbs extract at the different concentrations of 0%, 0.1%, 0.5% and 1% per kg diet for 12 weeks. Lysozyme and bactericidal activities of serum, and hematological characteristics were examined during experimental period. After feeding test period, all experimental groups were challenged with *E. tarda*. Lysozyme activity from the fish fed the diet supplemented with 0.1% or 0.5% of 2-herbs extract was significantly higher than the control. But there was no difference both in bactericidal activity and hematology among each group. Sixty seven % of relative percent survival values (RPS) in the group fed the diet supplemented with 0.1% of 2-herbs was higher than the other group and the control. These results suggest that supplementation of 0.1% of 2-herbs extract to a commercial diet may enhance disease resistance in olive flounder. Although both 0.1% and 0.5% 9-herbs extract did not improve non-specific immune responses, they could enhance disease resistance of 53% RPS, respectively.

Key words : Olive flounder, Lysozyme activity, Bactericidal reaction, Hematological changes, Relative percent survival, *Edwardsiella tarda*.

[†]Corresponding Author

서론

근래의 어류 양식은 단위 면적당 생산량이 증가하면서 사육환경이 점차 악화되고 더불어 어체의 내병성 저하로 인해 연중 질병이 발생하고 있다. 특히 병원체의 혼합감염 중에서 세균 및 기생충의 혼합 질병이 많이 발생하는 경향을 보이고 있다. 그런데 치료를 위해 사용되는 값비싼 항생물질은 양식 어업인들에게 경제적 부담이 되고 있으며, 그동안 양식현장에서 사용된 항생물질의 오용과 남용 때문에 내성균이 출현되어 점차 치료효과가 경감되고 있는 추세이다. 육상 양식장의 사육수는 대부분 자연 환경수에 직접적으로 연결되어 있어 어체내에 흡수되지 않은 약제가 함유된 사육수의 배출은 주변 수역에 대한 오염의 유발 요인이 될 수도 있으며, 항생물질의 어체내 잔류성에 대한 의혹 때문에 양식어류의 소비 둔화를 초래할 여지도 남아있다.

양식어류의 질병 예방과 함께 생리기능을 향상시키고 아울러 육질개선 및 성장 촉진을 도모할 수 있는 천연 물질인 β -glucan(Niki et al., 1991, 1993; Yano et al., 1991; Matsuo and Miyazono, 1993; Park et al., 1997; Park et al., 2001), 다시마(Nakagawa et al., 1985), 파래(Nakagawa et al., 1984; Nakagawa and Kasahara, 1986; Satoh et al., 1987; Yi and Chang, 1994, Choi et al., 1995), 미역(Yone et al., 1986a, 1986b), 유산균(Kim et al., 1998c), chlorella(Nakagawa et al., 1982, 1983; Nakazoe et al., 1985; Nematipour et al., 1987, 1988), 알로에(Kim et al., 1999), 녹차(Park et al., 1999), 감귤발효액(Song et al., 2002) 등에 관한 연구가 수행되어 왔다.

최근 들어 한방에서 치료제 및 보약 재료로 이용되는 식물성 생약재인 구기자, 인삼, 오미자, 하수오(Hwang et al., 1999; Kwon et al., 1999), 약쑥, 연교, 삼지구엽초(Jung et al., 2001b), 중국산 혼합 생약재 C-UP III(Chansue et al., 2000), 태국산 생약재 *Clinacanthus nutans* Lindua (Direkbusarakom et al., 1998), 인도산 생약재 *Acalypha*

indica, *Phyllanthus niruri*, *Ocimum sanctum* (Hemapriya et al., 1997), 두충차 *Eucommia ulmoides* Oliver(Tanimoto et al., 1993), 시판 한방 사료 첨가제 어보산(Kim et al., 1998a, b; Lee et al., 1998)을 수산생물에 직접 투여함으로써 면역능력, 항병력, 성장 및 육질개선의 효능이 있다고 보고되었다.

본 연구는 한방에서 면역기능이 있는 식물성 생약재로 알려져 있고, 비특이적 면역능력의 *in vitro* 및 *in vivo* 효과가 확인된 생약재(Jung et al., 2001a, b)인 약쑥, 삼지구엽초, 연교, 구절초, 박하, 지유, 삼백초, 삼백피, 팔각의 열수추출물을 사료에 첨가하여 넙치에 경구 투여한 후 면역반응, 혈액생리학적 변화 및 *Edwardsiella tarda*에 대한 저항성의 변화를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험어

국립수산과학원 거제수산종묘시험장에서 종묘 생산한 체중 10.3 ± 2.5 g, 전장 10.5 ± 0.8 cm 인 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 수량 200 l 유수식 원형 FRP수조(10회전/1일) 14개 시험구(2반복)에 각 30마리씩 수용하였다. 실험기간은 2001년 7월 24일부터 11월 3일까지였고 이 기간 동안 수온은 Fig. 1에 나타내었다.

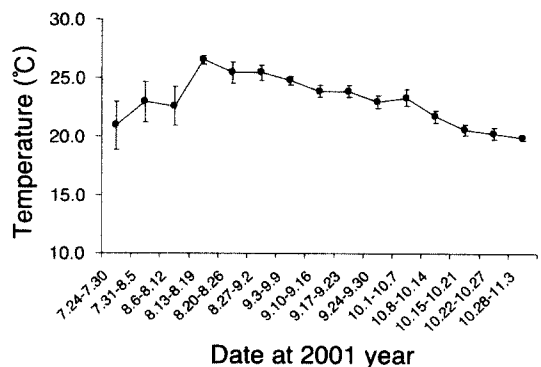


Fig. 1. Weekly water temperature of experimental period. Results are means \pm SD.

생약재 첨가사료 제작, 투여 및 채혈

실험에 사용한 생약재는 줄기, 잎, 열매 등을 따로 분리하지 않고 한약재 도매상에서 팔고 있는 원료 그대로를 전부 사용하였다. 생약재의 혼합은 2종류 혼합생약재(2-혼합구)와 9종류 혼합생약재(9-혼합구)로 구분하였다.

2-혼합구에는 약쑥(*Artemisia asiatica* NAKAI) 과 삼지구엽초(*Epimedium koreanum* NAKAI)를 7:3(w:w)의 비율로 혼합하였다. 9-혼합구는 약쑥(*Artemisia asiatica* NAKAI), 삼지구엽초(*Epimedium koreanum* NAKAI), 연교(*Forsythia koreana* NAKAI), 구절초(*Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* KITAMURA), 박하(*Mentha arvensis* L. var. *piperascens* MALINV.), 지유(*Sanguisorba officinalis* L.), 삼백초(*Saururus chinensis* BAILL.), 상백피(*Morus alba* L.), 팔각(*Illicium verum* HOOK. f.) 등 9종류의 생약재를 같은 중량으로 혼합하였다.

이들 혼합생약재는 g 당 10배의 증류수를 첨가하여 고압증기멸균기에서 열수추출(110°C, 4 시간)하였다. 이 추출물을 rotatory vacuum evaporator에 넣고 5배로 농축시켜 추출원액으로 하였다. 이들 추출원액이 0%(대조구), 0.1%, 0.5%, 1%씩 첨가된 실험용 생약재 첨가사료 7종류를

제작하였다(Table 1).

준비된 생약재 첨가사료는 1일 2회 반복급이를 실시하였으며, 12주간 투여하면서 6주 간격으로 채혈하여 분석항목을 측정하였다. 헤파린(150 usp units/mg, Sigma) 처리한 주사기(23G)를 이용하여 6마리의 미부혈관에서 혈액(0.2 ml)을 채취하여 헤마토크리트치(Ht)와 헤모글로빈량(Hb)의 측정에 사용하였다. 그리고 헤파린 처리하지 않은 주사기(23G)로써 다른 12마리의 미부혈관에서 채혈(0.5 ml)한 후 상법에 따라 혈청을 분리하여, 라이소자임 활성과 살균능력을 측정하였다. 이 혈청 시료 4개체를 pool하여 혈액 화학 성분 분석에 사용하였다. 한편, 6주 후에 채혈한 넙치는 수조에 다시 넣고 생약재 첨가사료 투여를 계속하였으며, 투여 종료 시에 채혈한 넙치는 제거한 다음 나머지 넙치를 병원세균의 공격시험에 사용하였다. 생약재 첨가사료 투여기간 중 각 시험구 당 폐사어는 관찰되지 않았다.

혈청의 라이소자임 활성

32 mM KH₂PO₄(A용액), 32 mM K₂HPO₄(B용액)을 만들고 A용액 200 ml와 B용액 50 ml를 섞어서 pH 6.5로 맞추었다(이하 LY배지라 함).

Table 1. Composition(% dry wt.) of the experimental diets.

Ingredient	Herbs extract diet						
	1	2	3	4	5	6	7
White fish meal	69.5	69.5	69.5	69.5	69.5	69.5	69.5
Wheat flour	19.7	19.7	19.7	19.7	19.7	19.7	19.7
2-herbs extract		0.1	0.5	1.0			
9-herbs extract					0.1	0.5	1.0
Squid liver oil	4.83	4.83	4.83	4.83	4.83	4.83	4.83
Vitamin premix ^a	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Mineral premix ^b	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0

a: "Fish-health" of commercial products from Daesung Microbiological Labs. CO., LTD, Korea was used.

b: Ingredients(g/kg mix): Ca(C₆H₁₀O₆) · 5H₂O, 348.49; Ca(H₂PO₄)₂ · H₂O, 136.0; FeSO₄ · 7H₂O, 132.0; K₂HPO₄, 240.0; NaH₂PO₄ · H₂O, 88.0; NaCl, 45.0; AlCl₃ · 6H₂O, 0.15; KI, 0.15; CuSO₄ · 5H₂O, 0.5; MnSO₄ · H₂O, 0.7; CoCl₂ · 6H₂O, 1.0; ZnSO₄ · 7H₂O, 3.0; Na₂SeO₃, 0.011.

Micrococcus lysodeikticus(Sigma)를 대략 1.4 mg 칭량하여 LY배지 1 ml로써 현탁하고, 이 현탁액을 흡광도 490 nm에서 LY배지를 blank로 하여 흡광도 약 1.1이 되도록 만들었다. 96 well microplate에 혈청 100 μ l를 분주하고 여기에 *M. lysodeikticus* 현탁액 100 μ l를 분주하였다. 미리 37°C, 550 nm로 조절해 둔 ELISA reader(TECAN SPECTRA, Hybaid Ltd., UK)에 넣고 곧바로 0분에 해당하는 흡광도를 측정 한 후, 15분 동안 정치시켜 한번 더 흡광도를 측정하였다. 라이소자임 활성 수치는 15분 후의 흡광도에서 0분의 흡광도를 뺀 뒤, 이 값에서 10,000을 곱하여 unit로 나타내었다.

혈청의 살균능력

실험 하루 전에 *Escherichia coli* JM109를 tryptic soy agar(TSA) 사면배지에 27°C, 24시간 배양하여 준비하였다. 루프를 이용하여 *E. coli*를 멸균한 시험관에 소량 취해 넣고 멸균생리식염수로써 흡광도 650 nm에서 대략 0.071이 되도록 조절하여 *E. coli* 균액으로 하였다. 유리시험관(5 ml)을 샘플 수만큼 준비하여 gelatin veronal buffer (GVB, gelatin 1 g; NaCl 8.5 g; 5.5-diethyl barbital acid 0.575 g; Na-diethyl baturate 0.375 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.102 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.022 g; D.W. 1 l) 용액을 400 μ l씩 분주한 뒤, 이 시험관에 혈청 100 μ l씩 분주하였다. 이어서 *E. coli* 균액 500 μ l씩 분주하여 충분히 잘 섞었다. 이 시험관의 용액을 단계별로 희석하여 TSA 평판배지에 곧바로 25 μ l씩 분주한 뒤(0시간), shaking incubator(27°C)에 넣어두고 1, 3, 6 시간마다 단계별로 희석하여 TSA 평판배지에 분주하면서 Miles and Misra method에 따라서 세균수를 계수하였다.

혈액학적 성분 조사

Ht는 microhematocrit법, Hb는 cyanmethemoglobin법으로 측정하였다. 혈청화학 성분은 임상혈액자동분석기(Hitachi 739-20, 7170 automatic

analyzer)로써 측정하였다.

병원세균의 공격실험

넙치 신장으로부터 분리하여 동정된 *Edwardsiella tarda* 균주를 3.5×10^6 CFU/ml의 농도로 생리식염수에 현탁하여 공격 실험용 균액으로 준비하였다. 공격실험은 생약재 첨가사료 투여가 완료된 12주 후에 준비된 *E. tarda* 균액을 실험어 마리당 0.1 ml씩 복강을 통하여 주사하였는데, 시험구 당 총 24마리씩 공격실험에 사용하였다. 그리고 30일 동안 누적폐사율을 조사하여 상대생존율(RPS, relative percent survival)을 구하였다.

통계처리

대조구와 각 시험구 사이의 통계학적 유의성은 $P < 0.05$ 의 수준에서 Student's t-test로 비교하였다.

결 과

혈청의 라이소자임 활성

라이소자임 활성은 Fig. 2에서 나타낸 것처럼 2-혼합구 0.1% 및 0.5%는 투여 6주와 12주후 모두 대조구보다 유의적으로 높게 나타났다($P < 0.05$). 그러나, 2-혼합구 1%와 농도별 9-혼합구는 6주와 12주후 모두 대조구와 유의차가 없었다.

혈청의 살균능력

Fig. 3에는 생약재 첨가사료의 투여기간 중 조사한 혈청의 살균능력을 나타내었다. 2-혼합구 0.1%는 6주와 12주후 모두 *E. coli*에 대한 살균능력이 가장 높게 나타났으나, 대조구와 유의차는 없었다. 2-혼합구 0.5% 및 9-혼합구 0.1%는 12주후에 살균능력이 높게 나타났으나 대조구와 유의차는 없었다. 2-혼합구 1% 및 9-혼합구 1%는 6주와 12주 모두 대조구보다 살균능력이 떨어졌으나 대조구와 유의차는 없었다.

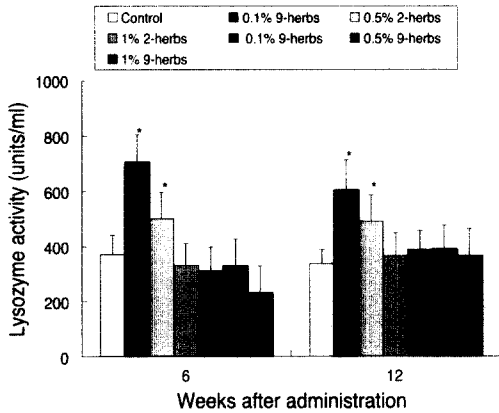


Fig. 2. Changes of lysozyme activity in serum of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed the experimental diets with different concentrations of medicinal herb. Results are means-SD. * Asterisk indicates significant difference ($p < 0.05$) using a Student's t-test.

혈액학적 성분

투여 6주후에 조사한 혈액학적 성분은 Table 2에 표시하였다. 2-혼합구와 9-혼합구는 농도별로 Hb 및 Ht가 모두 대조구와 유의차가 없었다. 그리고 2-혼합구 0.1% 및 0.5%, 9-혼합구 0.1% 및 0.5%는 TP를 비롯한 혈청화학 성분이 대조구와 유의차가 없었다. 그러나 9-혼합구 1%의 ALB, 2-혼합구 1% 및 9-혼합구 1%의 ALP 그리고 9-혼합구 1%의 TG는 대조구보다 유의적으로 낮게 나타났다.

투여 12주후에 조사한 혈액학적 성분은 Table 3에 나타내었다. 2-혼합구 0.1% 및 0.5%, 9-혼합구 0.1% 및 0.5%는 Hb, Ht 및 TP를 포함한 혈청화학 성분이 대조구와 유의차가 없었다. 그러나 2-혼합구 1% 및 9-혼합구 1%는 Hb, Ht 및 TG가 모두 유의적으로 낮게 나타났으며, TP 및 GLU는 유의적으로 높은 값을 보였다.

병원세균에 대한 항병력

생약재 첨가사료를 12주 동안 투여한 넙치에 병원성 세균인 *E. tarda*의 공격 후의 상대생존율 (RPS)을 Table 4에 나타내었다. 2-혼합구 0.1%가 67%로 가장 높았으며, 그 다음으로 9-혼합구

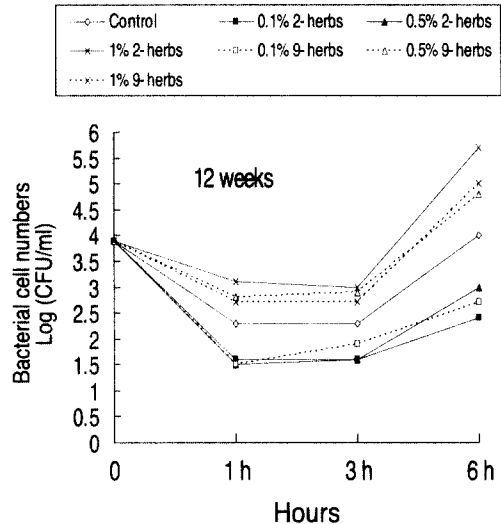
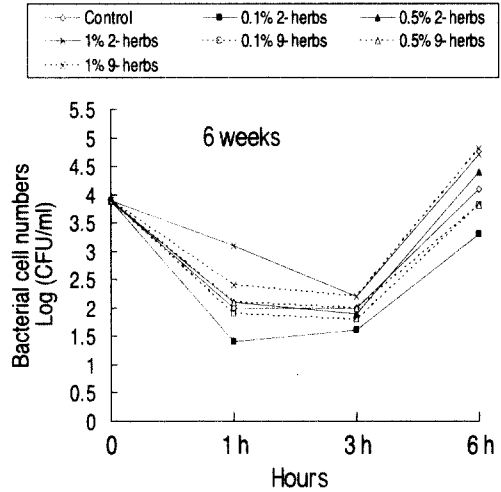


Fig. 3. Changes of bactericidal reaction in serum against *Escherichia coli* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed the experimental diets with different concentrations of medicinal herb for 12 weeks. Results are means.

0.1% 및 0.5%, 2-혼합구 0.5%의 순서로 높았다. 그러나 9-혼합구 1% 및 2-혼합구 1%는 매우 낮은 RPS를 나타내었다.

고 찰

라이소자임은 항생물질과 같은 성상을 나타내는 임파구 유래의 점액 용균성 효소로 이 효소는 자연계에 널리 분포하고 있고 점액 및 타액

Table 2. Hematological changes in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed the experimental diets with different concentrations of medicinal herb for 6 weeks (mean \pm SD).

Medicinal herb in diet	Hb (g/dl)	Ht (%)	TP (g/dl)	ALB (g/dl)	GLU (mg/dl)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	ALP (IU/L)	TCHO (mg/dl)	TG (mg/dl)	BUN (mg/dl)	CRE (mg/dl)
Control	5.2 \pm 0.6	25 \pm 4.2	3.53 \pm 0.2	0.59 \pm 0.05	35 \pm 1	9 \pm 1	7 \pm 2	277 \pm 13	334 \pm 16	766 \pm 59	3.9 \pm 0.4	1.2 \pm 0.2
0.1%	4.7 \pm 0.4	27 \pm 1.2	3.06 \pm 0.25	0.48 \pm 0.09	35 \pm 3	7 \pm 0	5 \pm 1	229 \pm 15	325 \pm 20	675 \pm 16	3.3 \pm 0.5	1.1 \pm 0.1
2-herbs	4.7 \pm 0.3	24 \pm 3.8	3.22 \pm 0.15	0.49 \pm 0.03	43 \pm 3	11 \pm 2	6 \pm 1	232 \pm 22	336 \pm 28	691 \pm 43	3.7 \pm 0.4	1.0 \pm 0.2
1%	5.3 \pm 0.7	25 \pm 3.1	3.53 \pm 0.17	0.56 \pm 0.0	27 \pm 8	11 \pm 2	7 \pm 1	212 \pm 20	375 \pm 1	717 \pm 41	3.7 \pm 0.4	1.0 \pm 0.1
0.1%	4.8 \pm 0.4	24 \pm 2.4	3.0 \pm 0.18	0.44 \pm 0.04	26 \pm 13	10 \pm 2	6 \pm 1	248 \pm 93	342 \pm 16	696 \pm 72	4.0 \pm 0.3	1.1 \pm 0.3
9-herbs	4.7 \pm 0.4	26 \pm 3.6	3.39 \pm 0.04	0.48 \pm 0.03	51 \pm 6	11 \pm 1	6 \pm 0	268 \pm 23	378 \pm 6	701 \pm 40	3.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.2
1%	4.7 \pm 0.4	27 \pm 2.3	2.95 \pm 0.09	0.40 \pm 0.01	32 \pm 2	9 \pm 1	4 \pm 1	214 \pm 8*	334 \pm 33	548 \pm 25*	3.0 \pm 0.5	1.0 \pm 0.4

* Asterisk indicates significant difference ($p < 0.05$) using a Student's t-test.

Table 3. Hematological changes in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed the experimental diets with different concentrations of medicinal herb for 12 weeks (mean \pm SD).

Medicinal herb in diet	Hb (g/dl)	Ht (%)	TP (g/dl)	ALB (g/dl)	GLU (mg/dl)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	ALP (IU/L)	TCHO (mg/dl)	TG (mg/dl)	BUN (mg/dl)	CRE (mg/dl)
Control	5.5 \pm 0.3	26 \pm 2.2	3.44 \pm 0.16	0.57 \pm 0.06	35 \pm 2	14 \pm 1	10 \pm 1	267 \pm 62	405 \pm 31	765 \pm 13	3.9 \pm 0.4	1.2 \pm 0.1
0.1%	5.3 \pm 0.9	28 \pm 3.6	3.67 \pm 0.29	0.62 \pm 0.09	32 \pm 8	14 \pm 2	10 \pm 3	273 \pm 45	433 \pm 5	723 \pm 149	4.0 \pm 0	1.2 \pm 0.1
2-herbs	5.2 \pm 0.7	26 \pm 4.9	3.51 \pm 0.18	0.60 \pm 0.03	39 \pm 6	12 \pm 2	8 \pm 2	259 \pm 64	410 \pm 29	689 \pm 129	4.0 \pm 0.2	1.1 \pm 0.1
1%	4.6 \pm 0.5*	22 \pm 1.3*	3.79 \pm 0.2*	0.65 \pm 0.07	44 \pm 5*	13 \pm 3	10 \pm 3	269 \pm 33	416 \pm 23	528 \pm 36*	3.8 \pm 0.3	1.1 \pm 0.1
0.1%	5.3 \pm 0.7	26 \pm 2.8	3.60 \pm 0.23	0.60 \pm 0.03	39 \pm 8	13 \pm 2	10 \pm 0	325 \pm 3	445 \pm 2	756 \pm 133	4.0 \pm 0.5	1.2 \pm 0.1
9-herbs	5.4 \pm 0.9	25 \pm 2.9	3.66 \pm 0.47	0.57 \pm 0.06	36 \pm 6	14 \pm 3	11 \pm 3	268 \pm 9	424 \pm 14	711 \pm 85	4.0 \pm 0.3	1.2 \pm 0.2
1%	4.9 \pm 0.5*	23 \pm 1.2*	3.71 \pm 0.06*	0.56 \pm 0.03	54 \pm 8*	13 \pm 1	11 \pm 2	346 \pm 19	453 \pm 34	510 \pm 100*	4.7 \pm 1.2	1.2 \pm 0

* Asterisk indicates significant difference ($p < 0.05$) using a Student's t-test.

Table 4. Cumulative mortality and relative percent survival of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) challenged intraperitoneally with 3.5×10^6 cells of *Edwardsiella ictaluri* 12 weeks after administration of medicinal herbs supplemented diet.

Medicinal herb in diet	Cumulative mortality (%)	Relative percent survival (%)
Control	70	-
0.1%	23	67
2-herbs	40	43
1%	60	14
0.1%	33	53
9-herbs	33	53
1%	54	23

* RPS = $[1 - (\% \text{ mortality experimental group}) \div (\% \text{ mortality in control group})] \times 100$.

과 같은 분비액, 혈액 등의 조직 중에서 관찰되고 있다. 이 효소는 gram 양성균에 대하여는 세포벽에 함유된 acetyl-aminopolysaccharide를 용해하며, gram 음성균에 대하여는 직접 용균작용을 나타내고 또한 보체 및 항체의 도움을 받아서 보체 의존성인 용균반응을 증강시킨다. 그러므로 라이소자임은 보체와 밀접한 연관성이 있으며 많은 동물의 기생성, 세균성 및 바이러스성 감염에 대하여 내인성 방어기구의 일부가 된다 (Ingram, 1980). 어류의 라이소자임은 담수어 및 해산어의 혈청과 점액 및 특정한 조직 안에서 발견되고 있으며 호중구 및 단구에서 주로 생산되고 macrophage에서는 소량밖에 검출되지 않는다 (Hansen, 1974). 특히 넙치의 혈청, 체표점액

및 조직으로부터 분리된 라이소자임은 gram 음성 및 양성세균에 대한 정균작용을 나타낸다 (Kim *et al.*, 1992).

2-혼합구 0.1%는 투여 6주에 라이소자임 활성이 가장 높게 나타났으며 2-혼합구 0.5%도 비교적 높은 값을 나타내었다. 이러한 경향은 투여 12주까지 지속적으로 유지되었다. 그러나 농도별 9-혼합구의 라이소자임 활성은 투여기간 동안 대조구와 비교하여 유의적인 증진효과를 관찰할 수 없었다. Hwang *et al.*(1999)은 나일틸라피아(*Oreochromis niloticus*)에 생약재를 12주 동안 경구 투여함으로써 혈청 내 라이소자임 활성정도를 비교하였는데, 3% 구기자는 4주까지는 별다른 차이를 보이지 않았으나 6주째에 급격하게 증가하였으며, 1% 인삼은 구기자보다 늦은 8주째에 이르러 뚜렷하게 향상되었다. 이 결과에서 8주 이상의 투여에 따른 라이소자임 활성 값이 제시되어 있지 않아 증가한 라이소자임의 활성 값이 이후에도 지속해서 유지되는 지는 비교할 수 없었다.

생약재 농도별 시험구의 *E. coli*에 대한 살균 능력은 혈청처리 3시간까지 유지되는 것으로 나타났다(Fig. 3). 생약재를 경구 투여한 시험구의 혈청내 살균능력은 6주에는 2-혼합구 0.1%만이 높게 나타났으며, 투여 12주가 되어 2-혼합구 0.1% 및 0.5%, 9-혼합구 0.1%가 대조구에 비하여 뚜렷하게 차이가 나서 높게 나타났다. 그러나 라이소자임 활성 효과와는 달리 보체의 살균 능력은 실험기간 중 대조구와 비교하여 유의적인 향상을 나타내지 못하였다. 생약재의 12주 투여에 따른 나일틸라피아의 혈청내 살균능력 효과에서 구기자 시험구가 10주째 살균능력이 비로소 향상되었으며 인삼, 하수오, 오미자 투여구는 12주째 모두 살균능력이 크게 향상되었다 (Hwang *et al.*, 1999). 본 실험에서와 마찬가지로 이들의 연구에서 구기자 및 인삼을 투여한 나일틸라피아의 라이소자임 활성수치가 6~8주째 높은 값을 보인 것과 비교할 때 혈청의 살균능력은 라이소자임 활성보다 늦게 향상되는 것으로

해석되었다.

TCHO, BUN, ALT 및 AST는 어류에 있어 간 기능 검사의 지표로 그리고 CRE는 신장 기능 검사의 지표로 활용되고 있는데, 생약재 첨가사료의 투여 12주에 이르러 2-혼합구 및 9-혼합구는 농도별로 TCHO, BUN, ALT, AST, CRE가 모두 대조구와 유의차가 없었다. 따라서 이들 생약재는 넙치의 간 및 신장 기능에 악영향을 미치지 않은 것으로 추정되었다. 그런데 2-혼합구 및 9-혼합구 1%는 투여 12주후에 Hb 및 Ht가 유의적으로 낮게 나타나 이 기간의 투여가 넙치의 조혈기능에 장애를 주어 빈혈을 유도하는 것으로 생각되었다. 또한 이들 시험구는 TP 및 GLU가 유의적으로 높은 값을 나타냄으로써 운동 및 운송으로 인해 스트레스를 받은 효과와 같은 양상을 나타내었다. TG는 콜레스테롤, 인지질, 유리지방산과 같이 혈중 지질의 주체를 이루고 있으며 간장에 저장된 TG는 에너지원으로서 이용된다. 특히 2-혼합구 1%와 9-혼합구 1%는 12주후에 TG가 유의적으로 매우 낮은 값을 보여, 넙치의 소화관에 흡수장애를 일으키고 체내 에너지원으로서의 지질 소비가 줄어서 장기간 투여할 경우 성장이 둔화될 수 있고 질병의 저항력이 약화될 수 있음을 암시하였다.

*E. tarda*의 공격시험에서 2-혼합구 0.1%는 RPS가 대조구에 비하여 67%나 향상되었다. 그 다음으로 9-혼합구 0.1% 및 0.5%는 RPS가 53%, 2-혼합구 0.5%는 RPS가 43%를 나타냄으로써 이들 생약재 농도는 에드워드병에 대한 항병력을 어느 정도 향상시킬 수 있는 것으로 나타났다. 반면에 2-혼합구 1%와 9-혼합구 1%는 낮은 RPS를 나타내어 항병력 개선효과는 미약하였다. 이들 시험구는 면역능력의 실험에서 뚜렷한 증진효과가 없었고, 혈액생리학적으로도 질병의 저항력이 약화될 것을 암시한 결과와 잘 일치하였다. 3% 구기자를 투여한 나일틸라피아는 *E. tarda*의 공격시험에서 RPS 85%로 뛰어난 항병력을 나타내었으며, 그 다음으로 2% 오미자 및 3% 하수오가 69%, 47%의 RPS를 보였다

(Hwang *et al.*, 1999). 그런데 이들의 실험에는 생약재의 분말이 사용되었으므로 본 실험에서 사용된 추출물의 농도와 직접적으로 비교하기는 어려웠다.

Chansue *et al.*(2000)은 0.4% lactoferrin, 1% glucan, 중국산 혼합생약재 0.2% C-UP III를 나일틸라피아에 투여한 연구에서 이들은 neutophils의 phagocytic indicies와 chemiluminescent assay에서 대조구에 비하여 모두 유의적으로 높은 활성을 보였다. 그러나 lactoferrin 및 glucan은 phagocytic indicies에서는 유의적인 증가를 보였으나, chemiluminescent assay에서는 동일한 결과를 얻지 못하였다. 즉, lactoferrin은 유의적인 감소를 그리고 glucan은 별다른 차이를 나타내지 못하였다. lactoferrin과 glucan은 *Aeromonas hydrophila*에 대한 RPS가 각각 46.2%, 69.3%인데 반하여 C-UP III는 92.4%의 RPS를 나타내었다. 그들은 C-UP III가 현장에서 사용할 있는 우수한 면역증강제로서 질병의 저항성을 높일 수 있다고 제시하였다. 질병의 저항성은 면역증강을 측정하는 실험항목에서 반드시 동일한 결과를 나타내지는 않는 것으로 사료된다. 이러한 사실은 본 연구에서 9-혼합구 0.1% 및 0.5%가 라이소자임 활성 및 혈청내 살균능은 관찰되지 않았으나 질병 저항성이 향상된 결과와 잘 일치하였다. 한편, 사료 kg 당 1g의 농도로 함유된 태국산 생약재 *C. nutans*를 투여한 black tiger shrimp(*Penaeus monodon*)는 yellow-head rhabdovirus(YRV)에 대한 RPS를 57.6%나 향상시켰다. 그러나 이들은 면역력의 활성항목은 측정하지 않았고 높은 항바이러스 활성(antiviral activity)만을 확인하였다.

Park *et al.*(1997)은 β -glucan을 투여한 조피볼락(*Sebastes schlegeli*)이 *Staphylococcus epidermidis* 및 *Vibrio ordalii*에는 방어효과가 인정되었으나, *E. tarda*에는 방어효과가 전혀 관찰되지 않았다고 하였다. 본 실험에서 *E. tarda*에 대하여 우수한 방어효과가 확인된 생약재 역시 모든 세균성 질병에 대하여 항병력을 보유하는지 여부

는 좀더 깊이 연구되어야 할 것이다.

결론적으로 2-혼합구 0.1%는 넙치 비특이적 체액성 면역기구인 라이소자임 활성과 혈청의 살균능력을 크게 자극하는 기능을 가지고 있어 넙치의 체내 자연 저항성을 증강시켜 질병의 감염에 대해 유효한 방어력을 가질 수 있다고 판단되었다.

요약

본 연구는 식물성 생약재의 열수추출이 농도별로 첨가된 사료를 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에 경구 투여한 다음 비특이적 면역반응 및 질병 저항성의 향상여부를 알아보려고 하였다. 실험에는 약쑥과 삼지구엽초를 7:3 (w/w)의 비율로 열수추출한 후, 0%, 0.1%, 0.5% 및 1%의 농도로 첨가하여 만든 2종류 혼합생약재(2-혼합구)와 약쑥, 삼지구엽초, 연교, 구절초, 박하, 지유, 삼백초, 상백피, 팔각의 9종류 생약재가 동일한 농도로 열수추출한 후 제작한 9종류 혼합생약재(9-혼합구)를 사용하였다. 이들 농도별 첨가사료를 넙치(평균 10.3 ± 2.5 g)에 12주 동안 경구 투여하면서 혈청내 라이소자임 활성, 혈청의 *Escherichia coli*에 대한 살균능력 및 혈액학적 변화를 조사하였다. 그리고 최종 투여 12주 후에 넙치 에드워드병의 원인균 *Edwardsiella tarda*의 생균 공격실험을 실시하여 상대생존율(RPS)로써 저항성 향상효과를 살펴보았다.

2-혼합구 0.1%는 비특이적 면역활성을 크게 증가시켰으며, 상대생존율이 67%로 높게 나타나 가장 효과적인 질병 저항성 향상효과를 보였다. 따라서 2-혼합구 0.1%는 넙치 체내 비특이적인 면역기구를 자극함으로써 어체의 자연저항성을 증강시켜 세균성 질병의 감염에 대한 방어력을 상당히 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다. 9-혼합구 0.1% 및 0.5%는 비록 비특이적 면역활성은 증가시키지 못하였으나, 상대생존율은 각각 53%를 나타내어 질병 저항성을 일부 향상시키는 효과가 있었다.

참고 문헌

- Chansue, N., Ponpornpisit, A., Endo, M., Sakai, M. and Yoshida, S.: Improved immunity of Tilapia *Oreochromis niloticus* by C-UP III, a herb medicine. *Fish Pathol.*, 35(2): 89-90, 2000.
- Choi, M.S., Park, K.H., Choi, S.H., Kim, J.Y., Kim, J.M., Choi, J.G. and Jang, S.I.: Effect of *Enteromorpha compressa* on the physiological activities in carp, *Cyprinus carpio*. *J. Fish Pathol.*, 8(2): 149-156, 1995.
- Direkbusarakom, S., Ruangpan, L. and Ezura, Y.: Protective efficacy of *Clinacanthus nutans* on yellow-head disease in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathol.*, 33(4): 401-404, 1998.
- Hansen, N.E.: Plasma lysozyme a measure of neutrophil turnover. An analytical review. *Acta Haematol.*, 7: 7-87, 1974.
- Hemapriya, V.S., Logambal, S.M. and Michael, R. D.: Immunostimulation by leaf extracts of a few south indian medical plants in *Oreochromis mossambicus* (peters). *Dev. Comp. Immunol.*, 21(2): 175, 1997.
- Hwang, M.H., Park, S.I. and Kim, Y.C.: Effect of dietary herb medical stuff on the non-specific immune response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Fish Pathol.*, 12(1): 7-14, 1999.
- Ingram, G.A.: Substances involved in the natural resistance of fish to infection-a review. *J. Fish Biol.*, 16(1): 23-60, 1980.
- Jung, S.H., Sohn, Y.C. and Kim, Y.C.: *In vitro* effect of medicinal herb water-extracts to antimicrobial activity against fish-pathogenic bacteria and superoxide production of kidney macrophage in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.*, 14(1): 3-10, 2001a.
- Jung, S.H., Sohn, Y.C. and Lee, J.S.: Effect of oral administration by medicinal herb water-extracts to nonspecific immunity of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Nat'l. Fish Res. Dev. Inst. Korea*, 60: 38-44, 2001b.
- Kim, D.S., Noh, C.H., Jung, S.W. and Jo, J.Y.: Effects of obosan supplemented diet on growth, feed conversion ratio and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Aquacult.*, 11(1): 83-90, 1998a.
- Kim, D.S., Kim, J.H., Jeong, C.H., Lee, S.Y., Lee, S.M. and Moon, Y.B.: Utilization of Obosan (dietary herbs) I. Effects on survival, growth, feed conversion ratio and condition factor in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Aquacult.*, 11: 213-221, 1998b.
- Kim, K.H., Hwang, Y.J. and Bai, S.C.: Resistance to *Vibrio alginolyticus* in juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*) fed diets containing different doses of aloe. *Aquaculture*, 180: 13-21, 1999.
- Kim, J.W., Park, S.I. and Chun, S.K.: Purification and antibacterial effect of lysozyme from flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.*, 5(2): 87-92, 1992.
- Kim, Y.H., Oh, S.Y., Hwang, M.H., Jo, J.Y., Park, S.I., Kim, Y., Yoon, G.H. and Park, J.: Effects of bisroot in the diet on growth, body composition, immune responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Aquacult.*, 11(4): 495-503, 1998c.
- Kwon, M.G., Kim, Y.C., Sohn Y.C. and Park, S.I.: The dietary supplementing effects of Kugija, *Lycium chinense*, on immune responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, to *Edwardsiella tarda*. *J. Fish Pathol.*, 12(2): 73-81, 1999.

- Lee, K.H., Lee, Y.S., Kim, J.H. and Kim, D.S.: Utilization of obosan (dietary herb)- II . Muscle quality of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed with diet containing obosan. J. Aquacult., 11(3): 319-325, 1998.
- Matsuo, K. and Miyazono, I.: The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout. Nippon Suisan Gakkaishi, 59(8): 1377-1379, 1993.
- Nakagawa, H., Kumai, H., Nakamura, M. and Kasahara, S.: Effect of feeding of chlorella-extract supplement in diet on cultured yellow tail- II . Effect on resisting power monitored by blood parameters against air-dipping. The Aquacult., 30(2): 76-83, 1982.
- Nakagawa, H., Kumai, H., Nakamura, M. and Kasahara, S.: Effect of algae diet on serum and body constituents of cultured yellowtail. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 51(2): 279-286, 1985.
- Nakagawa, H. and Kasahara, S.: Effect of ulva-meal supplement to diet on the lipid metabolism of red sea bream. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 52(11): 1887-1893, 1986.
- Nakagawa, H., Kasahara, S., Uno, E., Minami, T. and Akira, K.: Effect of chlorella-extract supplement on blood properties and body composition of ayu. The Aquacult., 30(4): 192-201, 1983.
- Nakagawa, H., Kasahara, S., Sugiyama, T. and Wada, I.: Usefulness of ulva-meal as feed supplementary in cultured black sea bream. The Aquacult., 32(1): 20-27, 1984.
- Nakazoe, J., Kimura, S., Yokoyama, M. and Iida, H.: Effect of the supplementation of algae or lipids to the diets on the growth and body composition of nibbler *Girella punctata* Gray. Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab., 120: 43-51, 1985.
- Nematipour, G., Nakagawa, H., Kasahara, S., Nanba, K., Tsujimura, A. and Akira, K.: Effect of *Chlorella*-extract and *Ulva* supplement to diet on lipid accumulation of Ayu. Nippon Suisan Gakkaishi, 53(9): 1687-1692, 1987.
- Nematipour, G., Nakagawa, H., Kasahara, S. and Ohya, S.: Effect of dietary lipid level and *Chlorella*-extract on Ayu. Nippon Suisan Gakkaishi, 54(8): 1395-1400, 1988.
- Nikl, L., Albright, L.J. and Evelyn, T.P.T.: Influence of seven immunostimulants on the immune response of coho salmon to *Aeromonas salmonicida*. Dis. Aqua. Org., 12: 7-12, 1991.
- Nikl, L., Evelyn, T.P.T. and Albright, L.J.: Trials with an orally and immersion-administered β -glucan as an immunoprophylactic against *Aeromonas salmonicida* in juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. Dis. Aqua. Organ., 17: 191-196, 1993.
- Park, S.W., Kim, Y.G. and Choi, D.L.: Enhancement of bacterial diseases resistance in rockfish (*Sebastes schlegeli*) by β -glucan administration. J. Fish Pathol., 10(2): 143-152, 1997.
- Park, S.W., Kwak, J.K., Koo, J.G. and Cho, M.G.: Effects of β -glucan from *Schizophillum commune* on non-specific immune parameters in common carp (*Cyprinus carpio*) and flounder (*Paralichthys olivaceus*) by oral administration. J. Kor. Fish. Soc., 34(4): 412-418, 2001.
- Park, S.M., Park, S.I., Huh, M.D. and Hong, Y.G.: Inhibitory effect of Green Tea extract on collagenase activity and growth of fish pathogenic bacteria. J. Fish Pathol., 12(2): 83-88, 1999.

- Satoh, K., Nakagawa, H. and Kasahara, S.: Effect of *Ulva* meal supplementation on disease resistance of red seabream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53(7): 1115-1120, 1987.
- Song, Y.B., Moon, S.W., Kim, S.J. and Lee, Y.D.: Effect of EM-fermented orange in commercial diet on growth of juvenile flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. of Aqua.*, 15(2): 103-110, 2002.
- Tanimoto, S.Y., Koike, K. and Takahashi, S.: Improvement of broiled meat texture of cultured eel by feeding of tochu leaf powder. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57(2): 325-327, 1993.
- Yi, Y.H. and Chang, Y.J.: Physiological effects of seamustard supplement diet on the growth and body composition of young rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Bull. Kor. Fish. Soc.*, 27(1): 69-82, 1994.
- Yano, T., Matsuyama, H. and Mangindaan, R.E.P.: Polysaccharide -induced protection of carp, *Cyprinus carpio* L., against bacterial infection. *J. Fish Dis.*, 14: 577-582, 1991.
- Yone, Y., Furuichi, M. and Urano, K.: Effects of wakame *Undaria pinnatifida* and *Ascophyllum nodosum* supplements on growth, feed efficiency and proximate composition of liver and muscle of red seabream. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 52(8): 1465-1468, 1986a.
- Yone, Y., Furuichi, M. and Urano, K.: 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, 1986b.