

## 사료 첨가제에 의한 대하의 혈액학적 특성

김영진 · 이선이 · 조효진 · 유선영 · 김광연 · 최원철<sup>1</sup> · 허문수<sup>2</sup> · 안순철\*

부산대학교 의과대학 미생물학 및 면역학 교실, <sup>1</sup>부산대학교 자연과학대학 생물학과, <sup>2</sup>제주대학교 해양과학대학 해양과학부

Received July 16, 2006 / Accepted August 2, 2006

**Hematological Characterization of *Penaeus chinensis* by Feed-additives.** Yeong-Jin Kim, Sun-Yi Lee, Hyo-Jin Cho, Sun-Nyoung You, Kwang-Youn Kim, Won-Chul Choi<sup>1</sup>, Moon-Soo Heo<sup>2</sup> and Soon-Cheol Ahn\*. Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine, Pusan National University, Busan 602-739, Korea, <sup>1</sup>Department of Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 609-735, Korea, <sup>2</sup>Faculty of Ocean Science, College of Ocean Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea – Shrimp has efficient non-specific defense mechanisms based on activities of the hemocytes against pathogens. Up to now, it has been known that one of the non-specific immune reactions is related to mutual association among types of hemocyte, granular cell, semi-granular cell, and hyaline cell. In this study, we tried to know the effectiveness of feed-additives such as 5-aminolevulinic acid (ALA), chitosan, and hot-water extract of herb on immunity of shrimp (*Penaeus chinensis*) by hemocytic observation and SDS-PAGE analysis. Finally, we suggest a principle of the examination system for effects of various feed-additives.

**Key words** – Shrimp, feed-additives, hemolymph, hemocyte, immunity

국내 새우양식산업은 대하(*Penaeus chinensis*)를 주 양식품종으로 하여 1980년대 후반부터 서해안 지역을 중심으로 활발히 성행하다가 1993년에 충남 태안 및 전북 고창지역에서 처음 발병한 후 매년 대량 폐사가 일어나고 있고 피해지역도 점차 확산되고 있다. 감염된 새우는 두홍갑 및 체표에 흰반점을 형성하는 증상이 주를 이루어 white spot syndrome disease (WSSD)로 보고되고 있으나[2], 최근에는 외형적 특징 없이 폐사하는 경우도 발생하고 있다. 이에 대해 다수의 국내 연구진에 의해 새우의 대량폐사를 유발하는 바이러스에 대한 보고와 함께 현장에서 방역대책과 다양한 신속진단법이 개발되기도 하였지만[4], 아직까지 크게 실효를 거두지는 못하고 있다. 따라서 이에 대한 해결책으로 그동안 부각되지 않았던 질병의 예방과 직접적으로 연결되는 체내 면역력에 대한 다양한 연구가 요구되고 있다.

대표적인 무척추동물인 대하의 일반 어류와는 달리 병원체에 대한 방어기작으로서 과립세포 등의 세포성 인자와 prophenoloxidase(pro-PO) 등의 체액성 인자를 기초로 하는 비특이 면역계를 가진다[9]. 주된 방어기작을 담당하는 세포성 인자에는 과립이 없고 식작용을 하는 무과립세포(hyaline cell)와 적은 수의 과립이 존재하며 이물질에 대한 인식작용을 하는 반과립세포(semi-granular cell), 그리고 체액성 인자인 prophenoloxidase activating system (pro-PO system)과 연결하여 직접적인 방어작용을 하는 과립세포(granular cell)가 있다. 이외에도 보조작용을 하는 체액성 인자에는 물질용

집의 효과를 가지는 lectin 등이 있다[1].

한편,  $\beta$ -1,3-glucan,  $\beta$ -1,3-1,6-glucan, peptidoglycan, 그리고 다수의 면역기능 다당류 등이 면역강화제의 형태로 사료에 혼합되어 사용되고 있으나 그 효과에 대한 보고는 전무한 실정이다. 따라서 이러한 문제를 해결하기 위해서는 효율성과 경제성을 고려한 다양한 사료첨가제의 개발이 요구되고 있으며, 다양한 사료첨가제의 개발에 있어 그 효과를 검증할 수 있는 시스템이 동물사육실험을 제외하고는 전무한 것도 문제점으로 지적될 수 있다.

이에 본 연구에서는 그동안 대하의 면역에 대한 기초 연구가 미비한 점에 감안하여 사료첨가제 성분을 급이한 후, 진행되는 대하의 체내 면역력에 대한 기본적인 이해와 함께 사료첨가제의 효과를 검증할 수 있는 시스템 개발을 위한 기초 연구를 실시하였다.

우선 본 연구를 위해 전남 신안 지역의 양식장에서 사육 중인 평균 체중 5~6 g 정도의 대하 치하를 구입하여 4개 수조에 각 10미씩 분산 수용하고 1주일간 일반사료를 급이하면서 순치시켰으며, 사료 첨가제로 사용될 5-aminolevulinic acid(ALA), 수용성 키토산, 그리고 감초와 녹용이 각각 5% 정도 포함된 한약재의 열수 추출물 등은 1 g/L 농도로 조절하여 각각 시판되는 새우 일반사료(치하용 사료, (주)천하제일사료)에 분무하여 흡착시킨 후, 4℃에서 3일간 저온 건조시켜 준비하였다. 이 때 사용된 치하용 사료에는 조단백 45%, 조지방 5%, 조회분 17%, 조섬유 5%, 칼슘 1.2% 그리고 인 2.7%가 포함되어 있다. 그런 다음 일반사료, ALA 첨가사료, 키토산 첨가사료, 한약재 열수 추출물 첨가사료를 2주간 지속적으로 체중의 10% 분량으로 1일 2회 급이 하였다. 실험

\*Corresponding author

Tel : +82-51-240-7735, Fax : +82-51-243-2259

E-mail : ahnsc@pusan.ac.kr

Table 1. State of the external health on the test groups.

Test	General-feed	ALA	Chitosan	Hot-water extract of herbal
Body intensity	+	+++	++	+++
Response	+	++	+	++

+ : normal, ++ : good, +++ : best

종료 후, 각 시험구별로 시료 개체당 0.5~1 ml 정도의 hemolymph를 심장으로부터 직접 채혈하여 준비하였는데 시료 채집 시, 체강도와 자극에 대한 반응성을 기준으로 각 시험구별 외형적 건강도를 조사한 결과, Table 1에서 보는 것처럼 대조구인 일반사료 급이구와 비교하여 ALA, 키토산, 한약재 추출물 사료첨가제 급이구에서 전반적으로 더 좋은 건강상태를 보였다.

채혈된 hemolymph로부터 hemocyte의 수와 조성을 확인하기 위해 Kondo 등의 방법[5]에 따라 5,000 rpm으로 5분간 원심분리하고 동량의 medium 199과 혼합한 다음, Giemsa 용액으로 염색하여 광학현미경 상에서 관찰하였다. 먼저 hemocyte의 수에 있어서는 전체적으로 평균  $3\sim3.5 \times 10^5$  CFU/ml 정도의 유사한 수준을 보였지만, hemocyte 조성에 있어 무과립(hyaline), 반과립(semi-granular), 과립(granular) 세포의 상대적인 비율에서는 시험구별로 다소 큰 편차를 보이고 있다. 일반사료 투여구에서는 전체적으로 무과립(hyaline) 형태의 세포가 많이 관찰된 데 비해 ALA와 키토산, 그리고 한약재 열수 추출물 첨가사료 투여구의 경우, 반과립(semi-granular) 혹은 과립(granular) 형태의 세포가 상대적으로 많이 관찰되었다(Fig. 1). 이는 바이러스 감염 시 전체 hemocyte의 수는 감염 전과 비교하여 큰 차이가 없지만 hemocyte의 조성에 있어 과립 세포와 반과립 세포는 62%에서 46%로 감소하고 무과립 세포는 38%에서 54%로 증가한다는 결과와 함께 면역증강 물질을 투여할 경우, 일반 사료를 투여한 시험구와 비교하여 hemocyte의 수는 거의 유사하지만, 조성에 있어 과립 세포와 반과립 세포는 10%이상 증가하지만 무과립 세포는 오히려 10% 이상 감소한다는 서로 상반된 결과를 나타낸 이전의 보고[3]에 대한 결과를 재확인함과 동시에 본 실험에서 사용된 ALA와 키토산, 그리고 한약재 추출물 등의 사료첨가제에 대한 면역증강 관련물질로서의 사용 가능성을 나타내는 것이기도 하다.

또한 각 시험구의 차이를 확인하기 위한 방법으로 hemolymph 내 단백질의 변화를 확인하기 위해 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)[6]를 실시하였다. 우선 시료는 PBS로 수세한 다음, SDS sample buffer로 처리하였고, 1% polyacrylamide gel로 전기영동 후, 0.5% Coomassie brilliant blue R-250 solution으로 염색하여 molecular weight standard marker(Roche, Germany)와 비교하

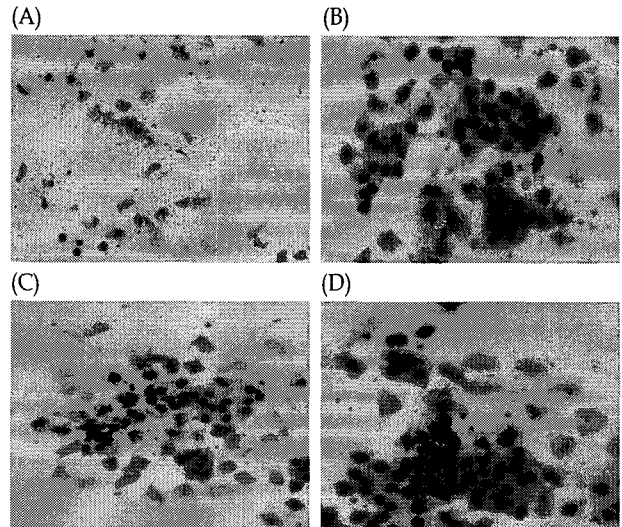


Fig. 1. Observation of the hemocytes in each test group by Giemsa-stain. (A) General-feed, (B) ALA-additive, (C) Chitosan-additive, (D) Hot-water extract of herbal-additive.

면서 확인한 결과, 각 시험구별로 특정 위치에서 단백질량의 변화를 나타내었다(Fig. 2). ALA-사료첨가제 투여구의 경우에는 60 kDa 위치에서, 그리고 한약재 열수추출물 사료첨가제 투여구의 경우에는 75 kDa 위치에서 각각 일반사료를 투여한 대조구에 비해 높은 수준의 단백질 함량을 보이고 있는데 이 중 75 kDa 크기의 단백질은 이전의 연구[3, 8]에서 보고되었던 것처럼 hemocyanin으로, 60 kDa 크기의 단백질의 경우 미확인된 hemolymph protein 중 한 종류일 것으로 각각 추정된다. 특히적으로 증가한 이들 단백질들에 대해 ALA의 경우에는 각종 유기체의 tetrapyrrole 생합성 (porphyrin, chlorophyll, heme 및 vitamin B<sub>12</sub> 등) 과정에서 발견되는 중간물질의 하나로서, C-5의 지방족 화합물이며 heme 구조를 가진 각종 효소나 porphyrin 중간물질, 비타민 등의 제조에서 전구물질로 사용되고 있다는 점[7]과, 한약재 열수 추출물의 경우에도 주로 보혈작용을 하는 것으로 알려진 녹용과 감초 등이 포함되어 있다는 점이 본 연구에서 나타난 결과에 대한 근거가 될 수 있을 것으로 예상된다.

한편, 상기의 이러한 시험구별 차이에 대해 간접적인 외부

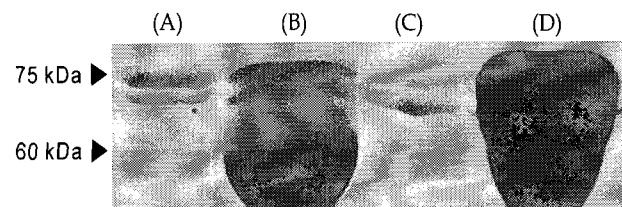


Fig. 2. Protein patterns of hemolymph in each test group by SDS-PAGE. (A) General-feed, (B) ALA-additive, (C) Chitosan-additive, (D) Hot-water extract of herbal-additive

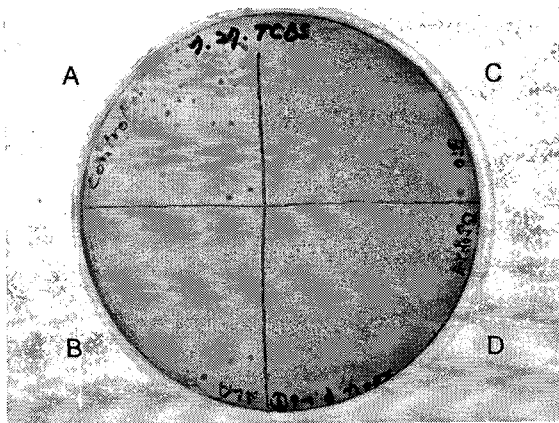


Fig. 3. Culture of *Vibrio* sp. on TCBS agar plate from the tested shrimps. (A) General-feed, (B) ALA-additive, (C) Chitosan-additive, (D) Hot-water extract of herbal-additive.

병원체에 대한 지표로서 *Vibrio* 균의 존재 여부를 확인하기 위해 혈액채취 후 각 시험구별로 3미씩 남은 시료의 간췌장과 아가미 등 내부 장기를 시료로 하여 TCBS agar plate (DIFCO, USA)에 접종한 다음, 25°C에서 3일간 배양하였다. 각 시험구별로 *Vibrio* 균의 배양 결과를 확인해 본 결과, 일반 사료 급이구에서는 평균  $3 \times 10^3$  CFU/ml 인데 비해 나머지 3개 사료첨가제 시험구에서는 모두  $1 \times 10^2$  CFU/ml 미만의 낮은 수치를 나타내었다(Fig. 3). 이는 상기의 hemocyte의 조성이나 hemolymph 단백질의 패턴과 더불어 일반 사료와 비교하여 사료첨가제를 투여함에 따라 새우 체내에서 면역 혹은 방어능력이 향상되고 있음을 간접적으로 시사해 주는 것으로도 볼 수 있다.

그러므로 본 연구에서는 현재 새우양식산업에 있어 질병에 따른 폐사와 관련하여 가장 시급한 것은 면역과 관련하여 기존에 보고되어 있는 다양한 천연물 중 대하의 체내 면역력을 강화시킬 수 있는 물질을 탐색할 수 있는 시스템을 확립하는 것이라 예상하여 이를 위해 새우의 체내 요소 중 면역과 직접적인 관련이 있는 hemocyte를 중심으로 연구를 진행하였으며, 면역관련물질의 투여를 통해 hemocyte의 조성과 hemolymph 단백질, 그리고 병원성 지표로서 *Vibrio* 균의 배양결과에 대한 특이성을 확인하였으므로 이를 새우의 체내 면역력을 검증할 수 있는 시스템 개발에 대한 기초 자료로 이용하고자 한다. 또한 ALA와 한약재 열수 추출물을 투여했

을 경우, 새우의 hemolymph 내에서 hemocyanin으로 추정되는 75 kDa 크기의 단백질과, 미확인된 hemolymph protein의 일종인 60 kDa 크기의 단백질이 각각 특이적으로 발현된 데 대해 추가적인 연구를 통해 hemocyte를 중심으로 한 해양 무척추동물의 면역기작을 규명해 나갈 예정이다.

## 감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비 (2년)에 의하여 연구되었습니다.

## 참고 문헌

- Bachere, E., E. Mialhe and J. Rodriguez. 1995. Identification of defense effectors in the haemolymph of crustaceans with particular reference to the shrimp *P. japonicus* (Bate): prospects and applications. *Fish Shellfish Immunol.*, 5, 597-612.
- Kim, Y. J., W. C. Choi, H. R. Kim, J. H. Kim, S. J. Jung and M. J. Oh. 1999a. Detection of white spot baculovirus from *Penaeus chinensis* in Korea. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 19(2), 170-172.
- Kim, Y. J., W. C. Choi, H. R. Kim, S. J. Jung and M. J. Oh. 1999b. Change in *Penaeus chinensis* haemocytes during white spot baculovirus (WSBV) infections. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 19(5), 213-215.
- Kim, Y. J., S. J. Jung and M. J. Oh. 2001. Investigation of the pathway of white spot syndrome virus (WSSV) infection. *J. Fish Pathol.* 14(3), 129-136.
- Kondo, M., H. Matsuyama and T. Yano. 1992. The opsonic effect of lectin on phagocytosis by haemocytes of kuruma prawn, *P. japonicus*. *Fish Pathol.* 27(4), 217-222.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Sasaki, K., M. Watanabe, T. Tanaka and T. Tanake. 2002. Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 23-29.
- Sellos, D., S. Lemoine and A. V. Wormhoudt. 1997. Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): structure, evolution and physiological aspects. *FEBS Lett.* 407, 153-158.
- Soderhall, K. and L. Cerenius. 1992. Crustacean Immunity. *Ann. Rev. Fish Dis.* 2, 3-23.