

버섯균사체 배양액 첨가사료가 넙치 치어의 생존 및 성장에 미치는 영향

김민주, 김만철, 김택¹, 김기영, 송춘복, 전유진, 허문수[†]
제주대학교 해양과학부, ¹(주) 대우환경

Effect of Dietary Supplementation of Extracts of Mushroom Mycelium on Survival and Growth of juvenile Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Min Ju Kim, Man Chul Kim, Taeg Kim¹, Ki Young Kim and Moon Soo Heo[†]
Faculty of Marine Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea
¹Dae-Woo Environment Co. Jeju-Si, Jeju 695-810, Korea

The effects of mycelium cultural extract supplemented diet, hematology and disease resistance against *Vibrio anguillarum* in juvenile flounder, *Paralichthys olivaceus* were evaluated. Fish were fed the *Phellinus linteus* with *Coriolus militaris* versicolor mixed mycelium cultural extract supplemented diet, *Phellinus linteus* mycelium cultural extract supplemented diet and *Coriolus militaris* mycelium cultural extract supplemented diet a commercial diet for 12 week. The body weight and length gain from the fish fed on daily the *phellinus* with *coriolus* versicolor mixed mycelium cultural extract supplemented diet, *phellinus linteus* mycelium cultural extract supplemented diet and *Coriolus versicolor* mycelium cultural extract supplemented diet of each mycelium cultural extract were higher than the control and the Glutamic oxalacetic transaminase (GPT) were of lower than the control. The relative percent survival rate (RPS) after an artificial challenge with 7×10^5 CFU of *Vibrio anguillarum* per fish was higher than the control.

Keywords: *Phellinus linteus*, *Coriolus militaris*, *Vibrio anguillarum*

서론

현재 까지 어류 양식장에서 발생하는 질병에 대한 치료방법으로는 항생제의 사용에 의한 치료가 가장 많이 이루어지고 있으나, 항생제의 오남용으로 인한 내성균의 출현 및 주변의 수질 오염 등의 문제로 인해서 항생제의 사용은 한계에 이르고 있다 (Aoki, 1992; Anderson, 1992).

이와 같은 문제에 대처하기 위해서 많은 방안의 제시되고 있으며 그 중 백신과 면역 증강 물질 개발이 대부분을 차지하고 있다. 백신의 경우 한 종류의 질병에만 특이적으로 작용하고 처리 방법에 의한 어류의 스트레스 발생 등 고비용, 저효율의 (Paterson et al., 1992; Sakai, 1999) 문제점을 안고 있다.

면역증강물질의 경우 특정 질병에 대한 방어능력이 아닌 어류의 자체 방어능력을 증강시킨으로서 다양한 질병에 대처할 수 있다는 특이성을 갖고 있으며, 현재 Bacterial, Fungal components, plant extracts, animal 등 다양한 생물로부터 분리한 천연물을 이

용하여 많은 연구가 진행되고 있으며 분리된 물질들에 의해서 어류 질병에 대한 방어능력을 증가했다는 연구보고가 있다(Engstad et al., 1992; Sakai, 1999).

버섯은 예전부터 식용뿐만 아니라 약재로도 사용되어져 오고 있으며, 최근에 와서 버섯의 새로운 특성이 밝혀지면서 버섯에 관하여 많은 연구가 진행되고 있다. 버섯은 당질, 단백질, 비타민 및 무기질과 같은 영양소를 골고루 함유하고 있을 뿐만 아니라 항세균, 항진균 및 항암작용과 같은 유용한 효능이 있어 많은 연구가 진행되었다(Ikekawa et al., 1969; Kupka et al., 1979; Ebihara, and Minamishima., 1984).

본 연구의 실험재료로 사용되어진 상항버섯에는 β -glucan성 다당류가 다량 포함되어 있으면, β -glucan은 체액성 및 세포성 면역반응을 증가시키며(Won et al, 2004), 건강보조제로서 많이 사용되고 있다.

운지버섯은 Protein-bound polysaccharide 라는 단백질인 Polysaccharide-K (krestin)가 함유되어 있으며 그 중에서 glucose, mannose 등의 주종을 이루는 5종의 당과 Asp, Glu 및 Leu 등이 주종을 이루는 15종의 아미노산으로 구성된 proteoglycan

*Corresponding author: jkjeon@kangnung.ac.kr

(Tsukagoshi, 1974; Mau., 2001) 및 스테로이드(Kim, 1978)등이 보고되었고 이 성분들은 항바이러스, 항세균, 및 항암효과를 나타냈다는 연구보고가 있다.

본 연구에서는 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양액을 첨가한 사료가 넙치 치어의 성장 및 세균공격에 따른 생존율을 조사하여 사료첨가제로써의 효용성을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

사용시료

실험에 사용된 버섯균사체 배양액 시료는 제주도에 소재한 (주)대우 환경에서 공급받은 혼합 배양된 상황버섯과 운지버섯 (*Phellinus linteus*, *Coriolus versicolor*: PL + CV) 균사체 배양액, 상황버섯 균사체(*Phellinus linteus mycelium*: PL)배양액과 운지버섯 균사체(*Coriolus versicolor mycelium*: CV)배양액 총 3종류 사용하였다(Table 1).

균주보관은 4 냉장실에 20 ml 시험관에 Potato Dextrose Agar (PDA; Difco. Co. USA). YM (Dextrose 1%, Peptone 0.5%, Malt extract 0.3%, Yeast extract 0.3%, Agar 1.8%) Slant로 보관하면서 필요할 때마다 같은 배지의 8.5 mm 평판 배양기에 이식하여 확대 배양을 하였다. 그리고 균사체 직경이 5 cm 이상 자랐을 때 균사체 가장자리에서 Cork boter (5 mm)로 떼어서 접종하였다.

추출물의 조제

배양이 완료된 배양물을 121°C에서 60분간 고압추출한 후 4000 g에서 10분간 원심분리(union 32R Plus, Hanil) 한 후, filter paper (Whatman NO. 2)로 여과하였다. 배양 균사체를 제거한 후 여액에 ethanol을 3배 첨가하고, 강력하게 교반한 후 4의 저온에서 24시간 방치한 후 4000 g에서 30분간 원심 분리하여 상등액과 침전물로 분리한 후, 상등액을 회전감압농축기로 농축 및 동결건조한 후, -70°C의 deep freezer 에 보관하면서 각 실험에 사용하였다.

실험어 및 사육수조

본 실험에 사용된 실험어는 제주도에 소재 육상 수조식 종묘 배양장에서 분양받은 평균 어체중 5.79 ± 1.3 g, 전장 7.7 ± 0.8 cm인 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 480미를 차량을 이용하여 운

반 한 후, 실험 수조는 순환 여과식으로 90 cm * 60 cm * 1 m 크기의 사각수조에(500 L 용량) 사육 수량은 1일 20회 환수시켰으며, 수조 4개에 각각 실험구 120마리씩 수용하였다.

넙치의 생리를 안정화 시키기 위하여 양식 전 기간 동안 검은색 차광막을 설치하였다.

실험어는 사육수조 내에서 일주일 동안 적응을 시킨 후, 세균성 질병이나 기생충에 의한 감염유무를 확인하여 질병에 감염되지 않은 건강한 치어를 본 연구의 실험구 및 대조구로 사용하였다. 또한 사육수의 환경적인 측면을 고려하여 10일 마다 사육수를 교환해 주었으며, 실험기간 중의 해수 온도는 19±0.5°C이었으며, 총 실험기간은 2005년 10월 21일부터 2월 12일 까지 총 12주 실험 하였다.

실험용 사료 제작 및 투여 방법

사료 제작을 위하여 시판되는 넙치용 배합사료(조단질 50%, 조지방 10%, 조섬유 5%, 조회분 15%, 인 1%, 칼슘 0.9%, Daehanfeed, KOREA)에 3종류의 버섯균사체 배양액을 각각 10% 첨가한 후, 건조기를 사용하여 40에서 사료를 건조시킨 후, 완전히 건조된 상태에서 밀봉하여 4 냉장보관 하면서 사료로서 사용하였다. 또한 대조구로 사용된 사료인 경우에는 버섯균사체 배양액을 첨가하지 않은 일반 시중에서 판매되는 배합사료(Daehanfeed, KOREA)를 사용하였다. 제작한 사료는 매일 2회(AM 9h, PM 9h) 12주 동안 투여하였다.

성장도조사 및 채혈 방법

실험어의 생존율은 실험 시작 후부터 매일 폐사어를 수거하여 누적 폐사율을 조사하였다. 그리고 실험어의 어체중 측정은 실험 시작 후 2주마다 측정을 하는데 측정 24시간 전에 절식하였다. 측정방법은 각 실험구에서 무작위로 25마리를 선발하여 실험어 전체 무게를 측정하여 중증량을 구하였고, 실험어의 전장은 각각의 개체의 전장을 확인한 후, 평균을 내었다.

간수치 측정을 위한 채혈 방법으로는 채혈 24시간 전부터 절식을 시킨 후, 마취제를 사용하지 않고 각 실험구에서 무작위로 10마리를 선발한 후, 1 ml 주사기를 사용하여 넙치의 미부정맥에서 1 ml 채혈하였다. 채취된 혈액은 4°C에서 2시간 보관 후 4°C 원심분리기를 이용하여 3000 rpm에서 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 간수치 측정을 위해 실험에 사용하였으며, 남은 시료의 경우 -60°C에서 따로 보관하였다.

Glutamic pyruvic transaminase (GPT) 측정

Glutamic oxalacetic transaminase (GPT)는 Reitman-Franke (1957) 방법을 사용하여 시중에 시판중인 GOT, GPT 측정 kit (Asan. Co. KOREA)를 사용하여 넙치 혈액 내 간 수치의 변화를 측정하였다. 측정값은 표준곡선용 시약을 이용하여 표준곡선을 그려준 후, 각 시료가 첨가된 곡선의 그래프의 차를 이용하여 간수치를 계산하였다.

Table 1. The mushroom myshroom mycelium used for the tests of Physiological Response

Name of mushroom		Part used
Korean name	Scientific name	
Sanghwang + Eunji	<i>Phellinus linteus</i>	Mycelium
	+ <i>Coriolus versicolor</i>	Mycelium
Sanghwang	<i>Phellinus linteus</i>	Mycelium
Eunji	<i>Coriolus versicolor</i>	

인위감염에 의한 생존율

3종의 버섯균사체 배양액 첨가 사료의 투여가 넙치의 항병력에 미치는 영향을 조사하기 위하여 해산어류는 물론 갑각류와 패류에까지 침투하여 병을 일으키는 독성이 강한 그람음성 세균인 *Vibrio anguillarum*을 이용하여 공격실험을 하였다. 실험에 사용된 균주인 *Vibrio anguillarum* (KCCM 2711)은 한국 미생물 보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에서 분양받아 Nutrient Agar (Difco. Co. USA)을 사용하여 3반복 계대하여 26°C 배양하였으며, 7×10^5 cfu/ml의 농도가 되도록 0.85% 멸균 생리식염수에 현탁한 후, 공격 실험용액으로 사용하였다.

공격실험은 사료투여 12주 후에 실시하였으며 대조군을 비롯하여 총 4개의 실험구에서 각각 무작위로 30마리씩 선정하여 1ml 주사기를 이용하여 각 마리당 100 ul 씩 복강주사 한 후 18일 동안 누적 폐사율을 조사하였다.

결과 및 고찰

성장도 조사

버섯균사체 배양액을 사료첨가제로서 사용하여, 어체중 및 성장률의 변화가 있었는지를 조사한 결과 실험 개시 후 4주까지는 Fig. 1에서 볼 수 있듯이 대조구와 실험구에서의 체중 변화는 유의차가 없었으나, 4주 이후부터 대조구와 실험구의 어체중 증가 차이가 확연히 나타나기 시작했다.

어체중인 경우에 10주 까지 버섯균사체 배양액 첨가 사료를 투여한 결과에서는 상황버섯(PL)과 운지버섯(CV)균사체 혼합 배양액을 첨가한 그룹이 상황버섯(PL) 균사체 배양액과 운지버

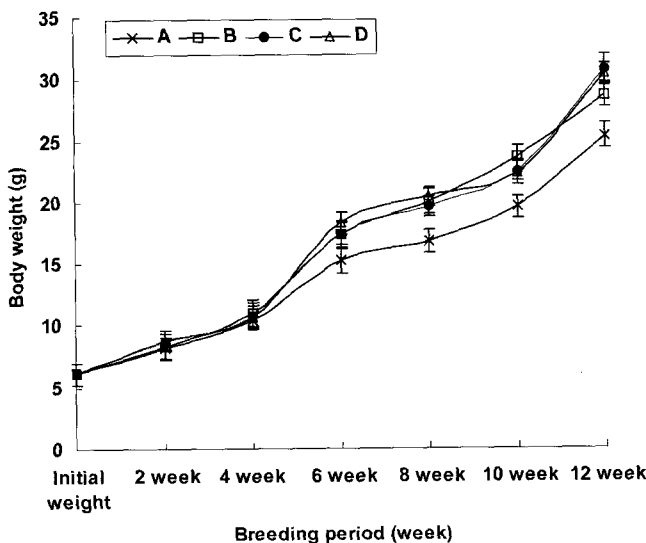


Fig. 1. Changes of the weight gain in the juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed a commercial diet supplemented with 10% mycelium culture broth for 12 weeks. A, Basal diet; B, *Coriolus versicolor* +*Phellinus lintrus*; C, *Phellinus lintrus*; D, *Coriolus versicolor*.

섯(CV)균사체 배양액을 첨가한 그룹에 비해 약 1 g 정도 높은 체중 증가율을 보였고, 균사체 배양액이 첨가되지 않은 대조구에 비해 약 4 g 정도의 어체중의 증가를 보였다. 최종적으로 12주에는, 상황버섯(PL)과 운지버섯(CV)균사체 혼합배양액은 대조구에 비해 3 g 높은 어체중의 증가를 보였으나, 상황버섯(PL)균사체 배양액과 운지버섯(CV)균사체 배양액은 대조구에 비해 약 5 g에 높은 어체중 증가를 보였으며, 또한 혼합 배양액 첨가보다 단독배양액 첨가사료가 약 2 g 정도의 체중 증가율을 나타냈다. 대조구와의 어체중 비교 실험 결과 최종적으로 버섯균사체 배양액을 첨가한 실험구에서 약 3~5 g 정도의 어체중의 증가를 확인할 수가 있었다.

또한 어체의 전장인 경우에 실험개시부터 4주까지는 Fig. 2에서와 같이 대조구와 실험구에서의 어체 전장은 비슷한 양상을 보였지만, 사료 투여 후 4주 이후부터 대조구와 실험구의 전장에 차이를 보이면서 최종적으로 12주후의 전장을 비교해 보았을 때 약 1.1 cm 정도의 전장의 차이를 보였다.

혼합 배양된 버섯균사체 배양액 첨가 사료 투여가 단독 배양된 버섯균사체 배양액 첨가 사료 보다 약 0.3 cm 정도의 유의차를 확인 할 수가 있었다.

Won et al.,(2004)은 7주 동안 4가지 농도가 다른 β -1,3/1,6-linked glucan을 첨가한 사료를 투여한 결과 실험구가 대조구에 비해 대체적으로 높거나 유의차가 없었다고 보고하였다. 이러한 결과는 버섯균 균사체의 2차 대사산물로서 많이 함유되어 있는 수용성인 β -giucan과 같은 다당류의 성분에 의해서 넙치의 성장에도 도움이 되는 것으로 사료된다.

Glutamic pyruvic transaminase (GPT) 측정

혈액성분의 분석은 매우 유용한 생태독성학적 방법이라고 생각할 수 있다. 그중에서 이번에 조사한 GPT (ALT)는 아미노산 합성 효소로서 간과 특정장기가 손상되면 이러한 효소가 세포

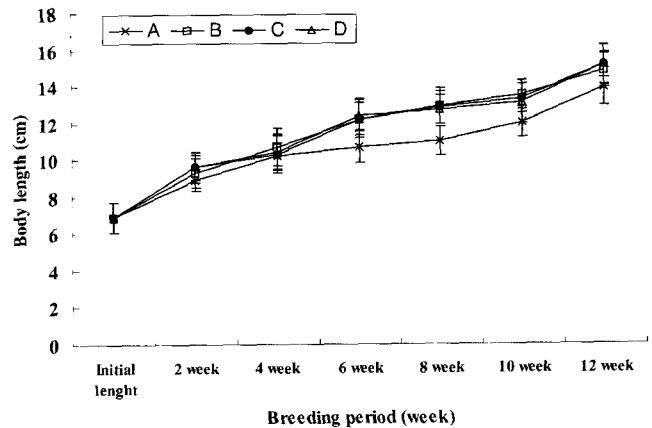


Fig. 2. Changes of the body length in the juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed a commercial diet supplemented with 10% mycelium culture broth for 12 weeks. A, Basal diet; B, *Coriolus versicolor* +*Phellinus lintrus*; C, *Phellinus lintrus*; D, *Coriolus versicolor*.

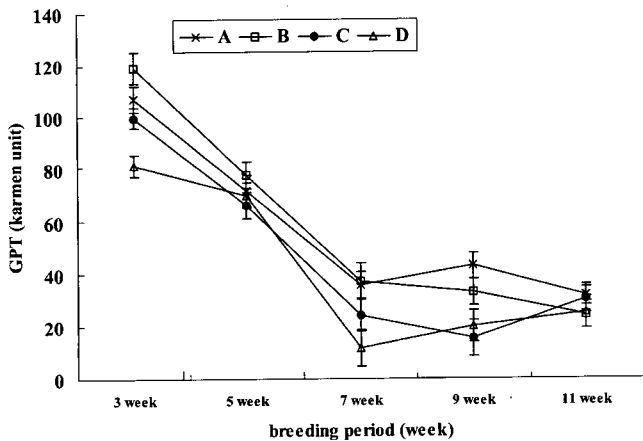


Fig. 3. Mean accumulated specific feeding rate in Groups A, B, C and D in different duration of experiment on the induction GPT in Liver tissue of olive flounder. A, Basal diet; B, *Phellinus lintrus*; C, *Coriolus versicolor* D, *Coriolus versicolor* + *Phellinus lintrus*.

의로 유출되어 이 효소의 수치가 상승 한다 그리고 혈장 전이 효소인 GPT의 활성은 오염물질에 의한 간, 심장 및 근육 등의 조직 손상의 지표로 이용되고 있으며(SaKamoto and Yone, 1978; Shich, 1978; Smith and Ramos, 1980), 일반적으로 오염물질에 의해 증가하는 경향을 나타낸다(Casillas and Ames, 1985; Rao et al., 1990).

넙치 혈액 내 GPT에 대한 버섯균사체 배양액 첨가에 따른 영향을 조사한 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

본 연구에서 GPT의 수치는 Fig. 3에서와 같이 실험 시작 3주일 때 모든 실험구에서 가장 높은 수치인 120 Karmen unit를 나타내어 실험구와 대조구와의 비교가 어려웠다. 점차 실험 기간이 길어질수록 실험구 및 대조구의 Karmen unit가 정상치에 가까워지는 것을 볼 수 있었으며, 균사체 배양액 첨가 사료를 투여한 실험구에서는 7주 이후부터 GPT수치가 대조구와 비교했을 때 낮아지는 양상을 보였으며, 9주 이후부터는 대조구에 비해 Karmen unit의 수치가 현격히 낮아지고 있는 것을 확인할 수가 있었다. 따라서 버섯 균사체 배양액 첨가가 넙치의 효소활성에 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

인위감염에 의한 생존율

버섯균사체 배양액 첨가사료를 12주 동안 투여한 질병이 없는 건강한 넙치에 어류 병원성 세균인 *Vibrio anguillarum*을 인위 감염 시킨 후 18일 동안에 상대생존율(RPS)을 조사하였다(Fig. 4). 그 결과 상황버섯과 운지버섯 균사체 혼합배양액을 첨가한 실험구에서 균사체 배양액을 첨가하지 않은 대조구에 비해 약 40%정도의 상대생존율이 차이가 나타나는 것을 확인할 수가 있었으며, 상황버섯균사체 배양액과 운지버섯균사체 배양액이 각각 첨가된 사료를 투여한 실험구에서는 대조구에 비해 약 20%정도의 상대생존율의 차이를 보였다. 넙치 폐사는 인위

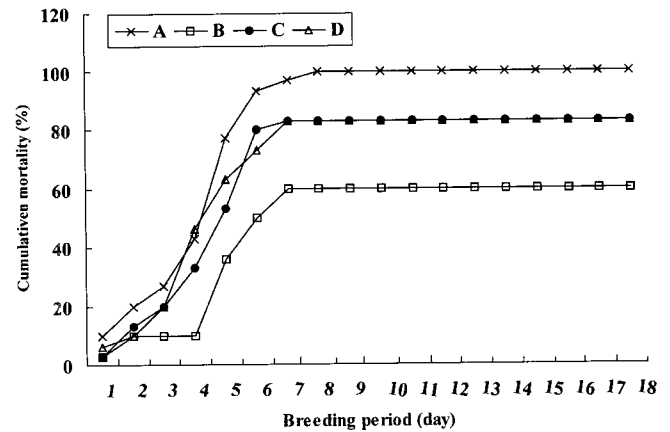


Fig. 4. Cumulative mortality (%) of flounder after 18-day feeding incremental levels after challenge with *V. anguillarum* (n=30). A, Basal diet; B, *Coriolus versicolor* + *Phellinus lintrus*; C, *Phellinus lintrus*; D, *Coriolus versicolor*.

감염 시켜서 24시간이 지난 후부터 나타났으며, 특히 5일부터 폐사율이 급격히 증가함을 보였다. 폐사 9일째부터 대조구의 경우 100%의 폐사율을 나타냈지만, 대조구를 제외한 모든 실험구의 경우 더 이상 폐사가 나타나지 않았다.

상황버섯과 운지버섯 균사체 혼합배양액을 첨가한 사료의 경우에 상황버섯(PL)균사체 배양액과 운지버섯(CV) 균사체 배양액을 단독으로 투여했을 때 보다 20% 낮은 폐사율을 나타냈다. 어류의 혈청중의 라이소자임은 세균 세포벽의 삼투압 작용에 손상을 주어 용균 시키며, 라이소자임의 존재 부위와 활성은 어종에 따라 다른 것으로 알려져 있다. lysozyme은 많은 어류에 정균 효과가 있다고 보고(Grinde, 1989)되고 있으며, Robertsen et al., (1994)에 의하면 lysozyme의 활성도는 식작용 및 전신 백혈구의 살균 작용과 상응하게 일어난다고 보고 하였고, 또한 Park et al., (2001) 넙치와 잉어에게 β -glucan을 접종하였을 때 라이소자임 활성이 높게 나타난다고 하였다. 이와같이 β -glucan과 같은 다당류에 의해서 라이소자임의 활성능이든지 식세포의 활성에 영향을 주어 높은 생존율을 보인 것으로 사료되어지며, 앞으로 버섯균사체 배양액의 적절한 농도 및 적절한 투여 기간등과 성분 분석 등 같은 연구가 깊이 이루어진다면, 사료첨가제로서의 충분한 가능성이 있다고 사료된다.

요약

본 연구는 항암, 항균, 항산화 활성이 뛰어나다고 보고되고 있는 버섯균사체를 사료첨가제 이용 가능성을 확인하기 위하여 실험을 실시하였다. 일반 시중에서 판매중인 배합사료에 상황버섯 균사체와 운지버섯 균사체를 혼합배양한 배양액 1개와, 상황버섯 균사체와 운지버섯균사체를 각각 단독으로 배양한 배양액 2개로 총 3종류의 배양액을 가지고 배합사료와 혼합하여 12주

동안 넙치에게 급이 하여 성장률, GPT측정 및 *V. anguillarum* 을 이용하여 공격 실험한 결과 대조구에 비해 균사체배양액이 첨가된 실험구에서 좋은 효과를 보였다.

성장률인 경우 대조구에 비해 실험구가 12~20% 가량 어체중이 증가와 어체의 평균 전장이 길이도 전체적으로 증가하는 양상을 나타내었다. 또한 10주에서는 윤지버섯(CV)과 상황버섯(PL) 균사체 혼합 배양액을 첨가한 사료의 실험구가 다른 실험구에 비해 높은 체중을 나타냈다.

넙치의 간수치를 실험한 결과 GPT 측정 Karamen unit 수치가 사육기간이 지날수록 지속적으로 낮아졌으며, 실험구들 또한 대조구와 비교해보았을 때 전체적으로 수치가 낮은 것을 확인할 수가 있었다. 인위적인 세균 공격실험의 경우 전체적으로 실험구가 대조구에 비해 20~40% 정도의 높은 생존율의 차이를 보였으며, 특히 혼합배양액을 첨가한 실험구의 경우 가장 높은 40%의 생존율을 나타냈다. 그러므로 버섯 균사체 배양액을 일 반 사료에 사료첨가제로서의 이용가능성이 매우 크다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 사업자원부의 지역산업기술개발사업의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Anderson, D. P., 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 2, 281-307.
- Aoki, T., 1992. Chemotherapy and drug resistance in fish farms in Japan. In: Shariff, M., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R. (Eds.), *Diseases in Asian Aquaculture Vol. 1. Fish Health Section.* Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp.519-529.
- Casillas, E. and W. Ames., 1985. Serum chemistry of diseased English sole, *Parophrys vetulus* Girard, from polluted areas of Puget Sound, Washington. *J. Fish Dis.*, 8, 437-449.
- Ebihara, K. and Y. Minamishima, 1984. Protective effect of biological response modifiers on murine cytomegalovirus infection. *J. Virology.*, 51, 117.
- Engstad, R. E., B. Robertson and E. Frivold, 1992. Yeast glucan induces increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish Shellfish Immunol.*, 2, 287-729.
- Grinde, B., 1989. Lysozyme from rainbow trout, *Salmogairdneri* Richardson. as an antibacterial against fish pathogens. *Natural of Fish Diseases.*, 12, 95-104.
- Ikekawa, T., M. Nakanishi, N. Uehara, G. Chihara and F. Fukuoka: *Jpn. J.*, 1969. *Cancer Res.(Gann)*, 59, 155, 159(1968); *Cancer Res.* 29, 734.
- Kim, B. K., S. Y. Jang, and M. J. Shim., 1978. Studies on the higher fungi of Korea (VIII), Sterols of *Coriolus versicolor* (Fr), *Korean J Mycology.*, 6, 1-4.
- Kupka, J., T. Anke, and F. Oberwinkler, 1979. Antibiotics from Basidiomycetes. VII. Crinipellin, A New Antibiotic from the Basidiomycetous Fungus *Crinipellis stipitaria*(Fr.) Pat. *J. Antibiotics.*, 32(2), 130-135.
- Mau J. T., H. C. Lin and C. C. Chen, 2001. Non - volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Research International.*, 3, 521-526.
- Park S. W., J. K. Kwak, J. G. Koo and M. G. Cho, 2001. 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. Korean Fish. Soc.*, 34(4), 412-418.
- Park S. W., J. K. Kwak, J. G. Koo and M. G. I. Cho, 2001. 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. Korean Fish.*, 34(4), 412-418.
- Paterson, W. D., W. Parker, M. Poy and M. J. Horne, 1992. Prevention of furunculosis using orally applied vaccines. In: Kimura, T. (Ed.), *Proceedings of the OJI International Symposium on Salmonid Diseases.* Hokkaido University Press, Japan., pp.225-232.
- Rao, P. P., K. V. Joseph and K. J. Rao, 1990. Histopathological and biochemical changes in the liver of a fresh water fish exposed to heptachlor. *J. Nat. Conserv.*, 2, 133-137.
- Reitman, S. and S. Frankel, 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *J Biol Chem.*, 28, 56pp.
- Robertson, B., R. E. Engstad and J. B. Jørgensen, 1994. β -glucans as immunostimulants in fish. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C. (Eds.), *Modulators of Fish Immune Responses*, vol. 1. SOS Publications, Fair Haven, NJ., pp.83-99.
- Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture.*, 172, 63-92.
- Sakamoto, S. and Y. Yone, 1978. Requirement of red sea bream for dietary iron. 2. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 44, 223-225.
- Shich, M. S., 1978. Changes of blood enzymes in brook trout induced by infection with *Aeromonas salmonicida*. *J. Fish Biol.*, 11, 13-18.
- Smith, A. C. and F. Ramos, 1980. Automated chemical analysis in fish health assessment. *J. Fish Biol.*, 17, 445-450.
- Song, C. H., K. S. Ra, B. K. Yang and Y. J. Jeon, 1998. Immuno-stimulating activity of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Mycol.*, 26(1), 86-90.
- Tsukagoshi, S. and F. Ohashi, 1974. Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma AII-13 by oral use. *Jpn. J. Cancer Res.*, 65, 557-560.
- Won K. M., S. M. Kim and S. I. Park., 2004. The Effects of β -1,3/1,6-linked Glucan in the Diet on Immune Responses of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus* by Oral Administration. *J. Fish Pathol.*, 17(1), 29-38.

원고접수 : 2006년 6월 7일

수정본 수리 : 2006년 10월 24일