

치어기 넙치 사료내 β -1,3 글루칸의 첨가가 성장 및 비특이적 면역반응에 미치는 영향

김영철, 김강웅, 이승형¹, 박건준², Okorie Eme Okorie¹, 강용진, 배승철^{1*}
국립수산물과학원 양식사료연구센터, ¹부경대학교 양식학과/사료영양연구소, ²우성사료

Effects of Dietary β -1,3 Glucan on Growth and Immune Responses in Juvenile Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Young-Chul Kim, Kang-Woong Kim, Seunghyung Lee¹, Gun-Jun Park², Okorie Eme Okorie¹, Yong Jin Kang and Sungchul C. Bai^{1*}

Aquafeed Research Center, National Fisheries Research & Development Institute, Pohang 791-923, South Korea
¹Dept. of Aquaculture/Feeds & Foods Nutrition Research Center/Pukyong National University, Busan 608-737, South Korea
²WooSung Co. Ltd, WoonAm B/D, #62-1, Ojung-dong, Taedug-gu, Daejeon 306-817, South Korea

This study was conducted to investigate the effects of dietary supplementation of β -1,3 glucan on growth and immune responses in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed the white fish meal based diets for 6 weeks. Five experimental diets supplemented with β -1,3 glucan at 0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 % (Control, G_{0.01}, G_{0.025}, G_{0.05} and G_{0.1}, respectively) of diet on a dry-matter basis. Five experimental diets were formulated to be isonitrogenous and isocaloric to contain 50.0% crude protein and 16.7 kJ available energy g⁻¹. Fish averaging 3.2±0.1 g (mean±SD) were randomly distributed in each aquarium as triplicate groups of 15 fish. Weight gain (WG, %), specific growth rate (SGR, %), and feed efficiency (FE, %) of fish fed G_{0.1} diet were found significantly higher than those of fish fed Control, G_{0.01}, G_{0.025} and G_{0.05} diets (P<0.05). However, there was no significant difference among the fish fed control, G_{0.01}, G_{0.025}. Chemiluminescent responses (CL) of fish fed G_{0.1} diet were significantly higher than those of fish fed the other diets. Serum lysozyme activities of fish fed G_{0.05} and G_{0.1} diets were higher than those of fish fed control, G_{0.025} and G_{0.05} diets. Fish fed G_{0.1} diet showed a significantly lower cumulative mortality than did fish fed control diet throughout the challenge test (P<0.05). These results suggested that based on growth rate, feed efficiency, non-specific immunity and protection against microbial infections the optimum dietary β -1,3 glucan could be greater than 0.05% but less than 1.0% in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

Keywords: β -1,3 glucan, Olive flounder, Growth, Non-specific immune response, Mortality

서 론

양식업의 팽창과 더불어 고밀도 사육과 같은 인위적 양식 환경은 자연 상태의 어류에서 크게 피해가 없었던 많은 문제점을 야기시켰다. 먼저 수질오염으로 인하여 어류에게 외부적 스트레스를 증가시켰으며, 스트레스 증가로 인한 양식 어류의 면역력이 현저히 감소하게 되어 질병에 대한 감염률이 증가하게 되었고, 또한, 고밀도 사육으로 인하여 질병에 대한 전이가 빨라 감염성 질병 발생 시 질병으로 인한 폐사율이 증가하게 되어 양어들에게 경제적 큰 손실을 초래하고 있다(Donaldson et al., 1979; Wendelaar Bonga, 1997). 이러한 감염성 질병에 대한 치

료 대책으로 양식장에서 널리 사용되고 있는 항생제와 화학요법제는 또 다른 문제점을 야기하고 있는데 항생제와 화학요법제를 무분별하게 사용함으로써 어류에 대한 약제 내성을 증가시켰으며(McPhearson et al, 1991), 종류에 따라서는 어류의 면역기능을 저해하고 있다(Pickering, 1992). 다른 치료방법으로 일시적으로 절식시켜 질병을 치유하기도하고 있으나, 이 방법은 절식에 의한 성장을 지연시켜 양어들에게 적지 않은 경제적 손실을 준다. 또한, 백신법의 경우 각각의 질병에 대한 저항성을 증가시킬 뿐이며, 가격이 비싸므로 양어들이 사용하기에는 적절하지 못한 반면에, 어류의 비특이적 면역반응 증강법은 사용하기 편리하며 백신법보다 가격이 저렴한 이점을 가지고 있다. 따라서 현재 양식어류의 질병을 예방하기 위한 면역증강물질(immunostimulant)에 대한 평가가 최근 들어 많은 연구

*Corresponding author: scbai@pknu.ac.kr

자들에 의해 진행되어지고 있다(Sakai, 1999). 이와 같은, 면역증강물질은 어류의 비특이적 면역 인자를 증진시키는 화학화합물과 박테리아 유도물 등이 있으며, 레바미솔(Levamisole)과 FK-565는 합성화합물, MDP (Muramyl deptide), LPS (Lipopolysaccharide), 키토산(Chitosan), glucan 등은 박테리아 유도체로 어류의 비특이적 면역인자를 증강시켜 질병에 대한 저항성을 증강시켜 준다(Engstad et al., 1992; Kawakami et al., 1998; Kim et al., 1998; Kitao et al., 1987; Kodama et al., 1994; Sakai, 1999; Siwicki et al., 1990; Solem et al., 1995). 어류의 비특이적 면역인자로 는 세포성 면역인자인 macrophage, granulocyte, nonspecific cytotoxic cell 등이 있으며, 체액성 면역인자로 는 lysozyme, complement, interferon, transferrin, lectin 등이 있다. 이러한 비특이적 면역인자의 활성을 증가시켜 질병으로부터 저항성을 증가시키게 되는데, 어류에서의 면역증강제를 이용한 실험 등에서 어류의 식세포 활성(Raa et al., 1992; Jørgensen et al., 1993a), natural killer cell 활성(Kajita et al., 1992), 라이소자임(Engstad et al., 1992; Jørgensen et al., 1993b)과 보체의 대사 경로 활성화(Yano et al., 1991) 등을 포함한 다양한 면역반응을 증강시키는 것으로 보고되어져 있으며, 뿐만 아니라 어류의 면역증강을 통해서 질병으로 인한 폐사 방지 및 건강한 어류의 생산성 향상 등을 시킨다는 보고가 있었다(Chen and Ainsworth et al., 1992; Siwicki, 1987).

본 연구의 목적은 β -1,3 glucan을 사료에 첨가하여 투여한 후 첨가수준에 따른 넙치의 성장 및 비특이적 면역능에 미치는 영향과 병원성 균인 *Edwardsiella tarda*을 복강내 인위감염에 대한 저항능의 변화를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

치어기 넙치사료내 β -1,3 글루칸 첨가에 따른 성장 효과

1) 실험어 및 사육관리

실험어는 경상남도 거제 부경수산에서 운반된 넙치를 부경대학교 부설 수산과학연구소로 운반하여 2톤 원형수조에서 실험환경에 적응할 수 있도록 2주간 예비사육 하였다. 예비사육 후 실험어는 평균무게 3.2 ± 0.1 g (Mean \pm SD)인 넙치를 40 L 사각수조에 각 실험구 당 각각 15마리씩 3반복으로 무작위 배치 하였다. 각 실험수조는 유수식으로 유수량은 1~2 L/min으로 조절하여 주었으며, 충분한 산소 공급을 위해 에어스톤을 설치하였다. 전 실험기간 동안 평균 수온은 19 ± 2 로 자연수온에 의존하였으며, 일일 사료공급량은 전 실험기간 동안 1일 2회 어체중 3~4%(dry matter base) 매일(10:00, 16:00) 공급하였으며 총 사육실험 기간은 6주간 실시하였다.

2) 실험사료 및 실험설계

실험에 사용된 실험사료의 조성표와 일반성분은 Table 1에 나타내었다. 실험사료의 단백질원으로 북양어분, 젤라틴, 카제

Table 1. Composition and proximate analysis of the basal diet (% of DM basis)

Ingredient	%
White Fish Meal ¹	59.0
Gelatin ²	2.5
Casein ³	2.0
Wheat meal ⁴	16.0
Fish oil ⁵	14.0
EPA-DHA (45%) ⁶	0.5
Vitamin premix ⁷	3.0
Mineral premix ⁸	3.0
Proximate analysis (% of dry matter basis)	
Moisture	20.5
Crude protein	49.6
Crude lipid	19.1
Crude ash	9.2

¹Han Chang Fishmeal Co., Pusan, Korea.

^{2,3}United States Biochemical, Cleveland, Ohio 44122.

⁴Young Nam Flour Mills Co., Pusan, Korea.

^{5,6}E-Wha oil Co., Ltd., Pusan Korea.

⁷Vitamin premix (mg/kg feed): vit.A, 3000IU; vit.D, 2400IU; vit.E, 120IU; menadione sodium bisulfate, 6; vit. B1-HCl, 15; vit.B2, 30; vit. B6-HCl, 15; vit.B12, 0.06; vit.C, 300; calcium pantothenate, 150; nicotin amide, 150; inositol, 150; d-biotin, 1.5; choline chloride, 3000; pancreatin, 12.5.

⁸Mineral premix (mg/kg feed): MnSO₄, 320; ZnSO₄, 270; FeSO₄, 750; CuSO₄, 60; CoSO₄, 7; MgSO₄, 17.25; K₂SO₄, 212.24; NaCl, 51.88; K₂HPO₄, 136.09; NaSeO₃, 0.013; KI, 0.15.

인을 사용하였으며, 탄수화물원으로는 소맥분을 지질원으로는 어유를 사용하였다. β -1,3 글루칸의 사료내 이용가능성을 확인하기 위하여 실험사료내에 각각 0%(Control), 0.01%(G_{0.01}), 0.025%(G_{0.025}), 0.05%(G_{0.05}) 및 0.1%(G_{0.1})의 5가지 수준으로 β -1,3 글루칸을 첨가하였다. 실험사료는 모든 원료를 혼합한 후 펠렛제조기로 압출·성형하였으며, 입자크기는 sieve로 고르게 친 후, 밀봉하여 -20 °C에 냉동 보관하면서 사용하였다. 실험은 실험사료내 glucan의 함량을 로 하여 5개의 실험구로 나누어 실시하였다.

3) 샘플 수집 및 분석

6주간의 실험종료 후, MS222 200 ppm에 실험어를 마취하여 전체 무게 및 마리수를 측정하고 증체를, 사료효율, 일간성장률, 단백질 전환효율, 비만도와 생존율을 계산하였다. 헤마토크리트 치는 각 수조마다 3마리씩의 어류로부터 혈액을 채취하여 microhematocrit 방법(Brown, 1980)으로 측정을 하였다. 간중량 지수와 전어체 성분 분석을 위한 실험어는 -20 °C에서 보관하였다. 전어체 성분 분석을 위한 실험어는 각 수조마다 3마리씩 무작위로 선택하였으며, 전어체의 단백질, 수분과 회분은 Association of Official Analytical Chemists (AOAC 1995)에 따라 분석을 실시하였고, 지방은 샘플을 -80 °C에서 20시간 동결건조 후 Soxtec system 1046 (Tecator AB, Sweden)을 이용하여 분석하였다.

비특이적 면역반응

1) 두신 식세포의 Chemiluminescent 반응

① 두신 백혈구의 분리

성장실험 종료 후 각 수조에서 3 마리씩의 어류를 임의로 잡아 MS222로 마취시켰다. 마취된 어류로부터 두신을 무균적으로 분리한 후 4 °C로 냉장한 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)에 넣어 가는 망사를 이용하여 세포들을 분리해 내었다. 분리된 두신 세포는 다시 34/51%의 Percoll (Sigma) density gradient를 이용하여, 4 °C에서 400 g로 30분간 원심분리한 다음 34%와 51% 사이의 세포층을 파스퇴르 피펫을 이용하여 분리하였다. 최종적으로 분리된 세포는 HBSS로 400 g에서 5분간 2번 세척하였다. 세포의 생존유무는 trypan blue stain을 이용하여 분석하였으며, 모든 실험구에서 분리된 세포들의 생존율은 98% 이상이었다. 실험에 사용한 식세포의 세포수는 *in vitro* 1×10⁶ cells/ml HBSS로, *in vivo*에서는 2×10⁶ cells/ml HBSS 조절하였다.

② Opsonization of Zymosan

Zymosan (Sigma)은 본 실험사료 투여에 사용하지 않은 건강한 넙치 성어로부터 분리한 혈청과 혼합하여 30 °C에서 30분간 배양하였다. 이 과정을 통해 opsonization이 된 zymosan을 원심분리하여 분리하고, HBSS를 이용하여 3회 세척하였다.

③ Chemiluminescent (CL) response 분석

식세포에서 방출되는 Reactive oxygen intermediates (ROIs)는 automatic photoluminometer (Bio-Orbit 1251, Finland)에 의해 정량적으로 분석하였다. 즉, 각 test cuvette은 조제한 luminol (Sigma) 0.7 ml과 cell suspension 0.4 ml을 혼합하여 5분간 실온에서 incubation 한 후 측정 바로 전에 opsonized zymosan 0.3 ml을 첨가하여 100분간 측정하였다(Scott and Klesius, 1981).

2) Lysozyme의 활성

각각의 실험구 어류에서 분리한 혈청 0.1 ml과 0.05M sodium phosphate buffer (pH 6.2)에 *Micrococcus lysodeikticus* (0.2 mg/ml)를 부유시킨 suspension 2 ml과 혼합하였다. 반응은 20 °C 조건에서 분광 흡광도계의 흡광도 530 nm에서 0.5분과 4.5분에 측정하였다. lysozyme의 활성 단위는 분당 0.001의 흡광도 감소를 나타내는 효소량으로 정의하였다.

3) 보체의 용혈 능력의 변화

보체의 용혈 능력의 변화는 각 실험구별 실험어의 미부정맥으로부터 혈청을 분리한 다음 Matsuyama et al. (1985)의 방법을 변형하여 sheep red blood cells (SRBC)에 대한 보체의 용혈능을 조사하였다. 방법은 넙치에 대한 SRBC 항혈청(1:400으로 희석)과 SRBC를 30 °C에서 30분간 반응시켜 자극 시킨 SRBC 용액을 만든다. 이 용액과 실험어에서 분리한 혈청(1:50으로 희석)을 혼합하여 30 °C에서 1시간 동안 반응시킨 후 SRBC의 용혈 정도는 흡광도(OD at 541 nm)를 측정하여 ACH₅₀ units/ml

로 표시하였다. 또한 각 실험구의 혈청내 보체에 의한 살균 작용은 Yoo et al.(1992)의 방법을 이용하였다. 실험어에서 분리한 혈청은 1:4로 희석하고 이용하여 분석하였다. SRBC를 Mg²⁺와 EGTA가 포함된 gelatin veronal buffer (GVB)에 3번 세척하고, 같은 완충액에서 2×10⁸/ml로 조절하였다. 실험 혈청을 GVB를 이용하여 연속적으로 단계 희석한 후, SRBC를 100 ml 첨가하였다. 이 혼합액을 가끔씩 흔들어 주면서 20 °C에서 90분간 배양한 후, 4 °C에서 1600 g로 원심분리하여 상층액을 분광 흡광도계의 흡광도 414 nm에서 측정하였다. ACP (ACH50) 활성은 용혈의 정도에 따라 계산하였다.

공격 실험

독성이 있는 *E. tarda* 부유액(1 × 10⁶ cfu/ml)을 1.5% NaCl이 첨가된 trypticase soy agar (TSA)에 27 °C에서 48시간 배양하여 준비하였다. 각 실험구당 5마리씩 3반복으로하여 어류당 박테리아 부유물을 0.1 ml씩 복강 주사한 후 폐사를 기록하였다. 폐사어의 폐사원인을 확인하기 위해 매일 폐사된 어체로부터 신장을 채취하여 TSA에 배양하여 *E. tarda*의 존재를 확인하였다.

통계 분석

모든 자료는 Computer Program Statistix 3.1(Analytical Software, St. Paul, Mn. USA)로 분산분석(ANOVA)을 실시하여 최소유의차검정(LSD: Least Significant Difference)으로 평균간의 유의성(P<0.05)을 검정하였다.

결 과

실험 6주간의 성장 실험결과 Table 2에 나타내었다. 면역증강물질인 β-1,3 글루칸의 첨가에 따르는 증체율(WG)과 일간 성장률(SGR)에 있어서 β-1,3 글루칸 0.1%를 공급한 사료구가 대조구와 비교하여 유의하게 높은 값을 나타냈다(P<0.05). 하지만 0.05%를 첨가한 실험구에 있어서는 유의한 차이를 보이지 않았다. 사료효율(FE)과 단백질전환효율(PER)에 있어서도 β-1,3 글루칸 0.1%를 공급한 실험구가 대조구 및 β-1,3 글루칸 0.01%, 0.025, 0.05%를 공급한 실험구와 비교하여 유의하게 높은 값을 나타내었다(P<0.05). 비만도(CF)에 있어서는 β-1,3 글루칸 0.05%와 0.1%를 첨가한 실험구가 다른 실험구보다 유의한 차이를 보였다.

β-1,3 글루칸의 실험사료를 섭취한 넙치 치어의 혈액 및 혈청 성분변화는 Table 3에 나타내었다. 헤마토크리트(Hematocrit)는 β-1,3 글루칸 0.05%와 0.1%를 첨가한 실험구가 다른 실험구에 비하여 유의하게 높은 값을 나타내었으며(P<0.05), β-1,3 글루칸 0.025%를 첨가한 실험구는 대조구와 β-1,3 글루칸 0.01%를 첨가한 실험구보다 유의하게 높은 값을 나타내었다(P<0.05). 혈청내 GOT에 있어서는 β-1,3 글루칸을 0.05%와 0.1%를 첨

Table 2. Growth performance of juvenile olive flounder fed experimental diets for 6 weeks¹

	Diets					Pooled SEM ⁷
	Control	G _{0.01}	G _{0.025}	G _{0.05}	G _{0.1}	
WG (%) ²	177 ^b	186 ^b	188 ^b	198 ^{ab}	216 ^a	4.26
FE (%) ³	80.3 ^b	83.0 ^b	84.7 ^b	89.7 ^b	97.3 ^a	1.7
SGR (%) ⁴	2.43 ^b	2.50 ^b	2.52 ^b	2.60 ^{ab}	2.74 ^a	0.04
PER (%) ⁵	1.67 ^c	1.73 ^{bc}	1.76 ^{bc}	1.87 ^b	2.03 ^a	0.02
CF ⁶	1.13 ^b	1.16 ^b	1.14 ^b	1.23 ^a	1.20 ^a	0.01

¹Values are means from triplicate groups of fish where the means in each column with a different superscript are significantly different (P<0.05).

²Weight gain (%) = (final weight - initial weight) × 100 / initial weight.

³Feed Efficiency (%) = wet weight gain (g) × 100 / dry feed intake (g).

⁴Specific growth rate (%) = (loge final wt. - loge initial wt.) × 100/ days.

⁵Protein efficiency ratio : wet weight gain / protein intake.

⁶Condition factor : (fish weight / total length³) × 100.

⁷Pooled standard error of mean : SD/√n.

Table 3. Hematological and serological characteristics of olive flounder fed experimental diets for 6 weeks¹

	Diets					Pooled SEM ⁴
	Control	G _{0.01}	G _{0.025}	G _{0.05}	G _{0.1}	
Hemoglobin (g/dL)	6.14	6.17	6.11	6.08	6.12	0.21
Hematocrit (%)	26.5 ^c	26.8 ^c	27.2 ^b	28.6 ^a	29.2 ^a	1.04
Serum GOT (IU/L) ²	52.5 ^a	53.1 ^a	50.1 ^b	47.3 ^c	46.6 ^c	2.06
Serum GPT (IU/L) ³	11.2	10.4	11.5	10.8	10.1	1.12

¹Means of triplicate groups; Values in the same row with different superscripts are significantly different (P<0.05).

²Glutamic oxaloacetic transaminase. One unit is defined as the amount of enzyme causing the transamination of 1.0 μmol of L-aspartate per minute at 25 °C and pH 7.4.

³Glutamic pyruvic transaminase. One unit is defined as the amount of enzyme causing the transamination of 1.0 μmol of L-alanine per minute at 25 °C and pH 7.4.

⁴Pooled standard error of mean : SD/√n.

Table 4. Non-specific immune factors of olive flounder fed experimental diets for 6 weeks feeding trial¹

Diet	Peak value of CL (mV)	Lysozyme activity (units/ml)	ACH50 (units/ml)
Control	387 ^c	315 ^b	47
G _{0.01}	395 ^c	331 ^b	53
G _{0.025}	373 ^c	322 ^b	45
G _{0.05}	512 ^b	415 ^a	56
G _{0.1}	635 ^a	432 ^a	49
Pooled SEM ²	23	15	5

¹Values are means from triplicate groups of fish where the means in each column with a different superscript are significantly different (P<0.05).

²Pooled standard error of mean : SD/√n.

가한 실험구가 대조구, β-1,3 글루칸 0.01%와 0.025%를 첨가한 실험구보다 유의하게 낮은 값을 나타내었다(P<0.05). 반면에 헤모글로빈과 GPT에 있어서 전실험구간에 유의한 차이를 보이지 않았다.

비특이적 면역반응 결과는 Table 4에 나타내었다. CL반응에 있어서 β-1,3 글루칸을 0.1%로 첨가한 실험구가 다른 실험구간에 있어서 유의하게 높은 값을 나타내었으며(P<0.05), β-1,3 글루칸 0.05%를 첨가한 실험구는 대조구, β-1,3 글루칸 0.01%와 0.025%를 첨가한 실험구보다 유의하게 높은 값을 나타내었다(P<0.05). 혈청 내의 lysozyme 활성에 있어서는 β-1,3 글루칸 0.05%와 0.1%를 첨가한 실험구가 다른 실험구보다 유의하게

높은 값을 나타내었으며, 반면 대조구, β-1,3 글루칸 0.01%와 0.025%를 첨가한 실험구간에 있어서는 유의한 차이를 보이지 않았다. 보체대체활성경로의 활성(ACH50)에 있어서는 전실험구간에 유의한 차이를 보이지 않았다.

공격 실험(인위 감염에 의한 누적폐사율)의 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 첫 폐사개체는 *E. tarda*를 복강내 주사한지 3일 후부터 시작하였으며, 7일째 대조구에서 전량 폐사하여 7일째 종료하였다. 4일째는 대조구보다 β-1,3 글루칸을 첨가한 실험구가 유의하게 높은 값을 나타내었으며(P<0.05), 5일째와 6일째 있어서 또한 3일째 결과와 같은 값을 나타내었다. 하지만 실험 종료일인 7일째에 있어서는 β-1,3 글루칸을 0.025%, 0.05%와

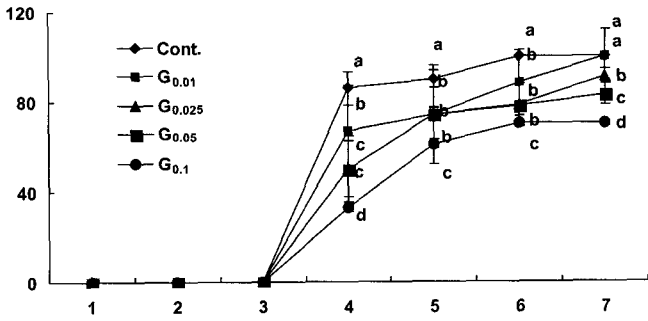


Fig. 1. Cumulative mortality (%) after intraperitoneal injection of *E. tarda* in cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

0.1%를 첨가한 실험구가 대조구와 β -1,3 글루칸 0.025%를 첨가한 실험구보다 유의하게 높은 값을 나타내었다. 전반적으로 β -1,3 글루칸을 첨가한 실험구들이 대조구에 비하여 *E. tarda* 균에 대한 저항성 증가를 확인 할 수 있었다.

고찰

넙치 치어에 있어서 면역증강물질인 β -1,3 글루칸의 첨가에 따르는 성장률(WG), 사료효율(FE), 일간성장률(SGR) 및 단백질 전환효율(PER)에 있어서 β -1,3 글루칸 0.1% 공급한 사료구는 대조구와 비교하여 유의하게 높은 값을 나타내었으나($P < 0.05$), 글루칸 0.025%를 공급한 사료구와 글루칸 0.05%를 공급한 사료구간에는 유의한 차이가 없었다. 면역반응 조사에 있어서 두 신 식세포 활성 분석, 혈청내 lysozyme의 활성 조사 및 공격 실험한 결과는 β -1,3 글루칸을 공급한 사료구가 대조구와 비교하여 유의적으로 높은 경향을 나타내었으며, 보체 대체 경로의 활성(ACH50)에 있어서는 글루칸을 공급한 사료구와 대조구 사이에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. Won et al. (2004)의 보고에 따르면, 성장기 넙치(60 g)에 있어서 7주간 β -1,3/1,6-linked 글루칸을 매일 및 격주 간격으로 투여한 실험에 있어서는 성장면에서 매일 투여한 0.05% 글루칸 사료구와 연속 투여한 0.1% 글루칸 사료구가 높은 성장률을 보였으며, 면역반응에 있어서도 글루칸을 투여한 사료구에서 높은 수치를 나타내었다고 보고하였다. 또한, Sung et al. (1994)은 새우(*tiger shrimp*, *Penaeus monodon*)를 4가지 농도에서 글루칸액을 3일간 침지하여 40일간 관찰한 결과, 0.5, 1 및 5 mg/ml의 사료구에서 대조구와 비교하여 빠른 성장을 보였으나, 낮은 농도인 0.25 mg/ml의 사료구에서는 대조구와 유의한 차이가 없었다. 이와 같은 결과는 상기 실험과 비교하여 실험조건, 어종 및 개체간의 크기에 따른 차이를 보일 수 있을 것으로 사료된다.

넙치의 치어에 있어서 β -글루칸의 생리 상태에 미치는 영향을 조사 하기 위하여, 헤마글로빈, 헤마토크리트값, GOT, GPT의 변화를 생리적 지표로써 조사하였다. 헤마토크리트는 글루칸을 공급한 사료구에서 높은 수치를 나타내었으며, 특히 성장

이 가장 좋았던 글루칸 0.05%와 0.1% 사료구에서 가장 높은 값을 보였다. Sim et al. (1995)은 넙치의 질병에 대한 저항력이 높아질 때, 헤마토크리치가 정상어류보다 높아질 수 있다고 하였으므로 본 실험의 결과도 글루칸의 투여에 의해 저항력이 변화한 것과 관련이 있을 것으로 생각된다. 혈청내 GOT 및 GPT는 사료구에 따라 조금 차이가 있으나, 대조구와 유사한 경향을 보이고 있다.

그리고 글루칸을 투여한 어류가 질병 감염균에 대한 저항하는 능력이 증가되는 것은 식세포 활성의 증가를 기초로 하여 설명되어져 왔다(Robertsen et al., 1994). Macrophage 활성화에서 β -글루칸의 유익한 영향, 특히 식작용과 살균 효과를 가지고 있는 것은 이 물질을 복강주사 하였을 때 명백히 증명되어졌다(Jørgensen et al., 1993a,b). 그러나 경구 투여한 경우에 있어서는 글루칸이 macrophage의 활성을 증가시키는 가에 대해서는 학자에 따라 실험결과가 다르게 나타났기 때문에 아직 불명확한 상태이다. Yoshida et al. (1995)은 4주간 β -glucan을 먹인 아프리카 메기에서 비특이적 방어능의 증가를 확인하였고, 5주 동안 turbot에 β -glucan을 첨가하여 공급한 실험구에서 두신 macrophage의 호흡폭발을 증가시켰다. 그러나 대조구 사료로 바꾼 후 2주째에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Ogier et al., 1996). 1주간 β -glucan을 먹인 무지개송어는 β -glucan을 먹이지 않은 대조구와 비교했을 때 높은 살균 능력, phagocyte 활성 및 호흡폭발능의 증가를 나타내었다(Siwicki et al., 1994).

본 실험에서 베타글루칸을 0.05% 이상 공급한 실험구가 대조구보다 상당히 lysozyme 활성이 높은 것을 알 수 있다. 베타글루칸의 복강주사에 의해 증가된 lysozyme 활성에 대한 여러 보고가 있다(Engstad et al., 1992; Jørgensen et al., 1993a,b). 그러나 복강 주사 실험과 대조적으로 lysozyme 활성에 있어서 경구적으로 투여한 β -glucan은 효과가 없다는 보고도 있다(Verlhac et al., 1996; Ogier et al., 1996). 이러한 연구는 경구적인 투여와 복강주사를 비교했을 때 어류에 있어서 β -glucan이 다른 효과를 가진다는 것을 제시하고 있다. 이질적인 물질의 주입 또는 감염에 의해 어류 혈액의 lysozyme 농도는 증가하는 것으로 알려져 있고(Fletcher, 1973), Ogier et al. (1996)은 베타글루칸 투여시에 2가지 경로에 있어서 복강 주사에 의해 야기되는 염증반응과 면역반응 증가로 추측된다.

본 연구에서 β -1,3 글루칸을 투여한 모든 실험구와 대조구 사이에서 보체 대체 경로(ACH50)의 활성이 유의한 차이를 나타내지 않았다. Yano et al. (1991)은 베타글루칸의 방어 효과는 보체 대체 경로와 관련이 있을 것이라고 제시하였다. 그러나, Verlhac et al. (1996)은 보체의 대체 경로 활성화는 베타글루칸의 경구적 투여에 의해 영향을 받지 않는다고 보고하였다. 따라서 보체 대체 경로에 대한 베타글루칸 경구 투여의 효과에 대한 명확한 연구가 요구된다.

β -1,3 글루칸을 공급한 어류는 *E. tarda*를 복강 주사하였을 때 β -1,3 글루칸을 공급하지 않은 어류보다 초기 폐사가 매우

낮음을 알 수 있다. 특히, 0.05% β -1,3 글루칸을 매일 공급한 어류의 누적 폐사율은 대조구보다 유의적으로 낮았다. 사료를 투여할 때 원충류 또는 세균의 감염에 대하여 어류의 방어능력을 증가시키는 베타글루칸의 효과에 대해서는 이미 많이 보고되어 있다(Robertsen et al., 1990; Raa et al., 1992; Nikl et al., 1993; Siwicki et al., 1994; Yoshida et al., 1995). 그러나 일부 보고는 글루칸의 투여에 의해 어류의 방어능력 증진을 얻을 수 없다고 보고하였다(Ogier et al., 1996). 이러한 결과의 차이는 실험 체계와 어종의 차이에 기인한 것으로 여겨진다. 결론적으로 본 연구에 따르면 치어기 넙치사료 내 β -1,3 글루칸 0.05% 이상 0.1% 미만을 첨가하여 공급할 경우 성장률, 사료효율, 비특이적 면역반응 및 질병저항성에 있어서 가장 좋은 효과를 나타낼 수 있을 것을 사료된다.

요 약

본 실험은 치어기 넙치에 있어서 β -1,3 글루칸을 사료내 첨가시 성장, 비특이적 면역반응 및 질병저항성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사료내 β -1,3 글루칸을 수준별 첨가하여 실시하였다. 실험어는 평균무게 3.2 g인 넙치 치어를 사용하였으며, 기초사료에 β -1,3 글루칸을 대조구, β -1,3 글루칸 0.01, 0.025%, 0.05% 및 0.1%를 각각 첨가하여 총 5개 실험구로 3반복배치하여 6주간 실시하였다.

총 6주간의 성장 실험결과, 면역증강물질인 β -1,3 글루칸의 첨가에 따르는 사료효율과 단백질전환효율에 있어서 β -1,3 글루칸 0.1%를 공급한 사료구가 대조구와 다른처리구에 비하여 유의하게 높은 값을 나타냈다($P < 0.05$). 증체율과 일간성장율에 있어서는 β -1,3 글루칸 0.1%를 공급한 사료구가 대조구, β -1,3 글루칸 0.01%, 0.025%를 첨가한 구보다 유의하게 높은 값을 나타내었지만 β -1,3 글루칸 0.05%구와는 유의한 차이가 없었다. 비만도에 있어서는 β -1,3 글루칸 0.05%와 0.1%를 첨가한 구가 대조구와 첨가구보다는 유의적으로 높았다.

헤마토크리트치는 β -1,3 글루칸 0.05%와 0.1%첨가한 실험구가 대조구와 β -1,3 글루칸을 0.01%와 0.025%를 첨가한 실험구에 비하여 유의하게 높은 값을 나타내었다($P < 0.05$). 혈청내 GOT에 있어서 β -1,3 글루칸 0.05%와 0.1%를 첨가한 실험구가 대조구, β -1,3 글루칸 0.01%와 0.025%를 첨가한 실험구보다 유의하게 낮은 값을 나타내었다($P < 0.05$). 비특이적 면역반응 결과에 있어서는 β -1,3 글루칸을 0.05%와 0.1%를 첨가한 실험구가 혈청의 lysozyme 활성 및 두신 phagocyte의 chemiluminescent (CL) 반응에서 대조구, β -1,3 글루칸 0.01%와 0.025%를 첨가한 실험구보다 유의하게 높은 값을 나타내었으나, 보체대체활성의 경로에 있어서는 전실험구간의 유의한 차이를 보이지 않았다. 공격 실험 결과에서는 β -1,3 글루칸을 첨가한 실험구가 대조구에 비하여 초기폐사율이 낮음을 확인할 수 있었으며, 상기 결과를 토대로, 넙치 치어의 경우 β -1,3 글루칸을 0.05% 이

상 0.1% 미만을 사료에 첨가하는 것이 성장, 사료효율 증진, 항산화능 및 질병저항성에 가장 좋은 효과를 나타낼 수 있을 것을 사료된다.

감사의 글

본 연구는 국립수산물과학원(해산어 실용배합사료개발, RP-2006-AQ-033)의 지원과 부경대학교 사료영양연구소의 공동연구로 수행된 결과이며, 시료를 제공해주신 (주)DMJ에 감사드립니다.

참고문헌

- AOAC, 1995. Official Methods of Analysis, 16th Ed., Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia, USA.
- Brown, B. A. 1980. Routine hematology procedures. In: Hematology Principles and Procedures. Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 71-112.
- Chen, D. and A. J. Ainsworth. 1992. Glucan administration potentiates immune defense mechanism of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. J. Fish Dis., 15, 295-304.
- Donaldson, E. M., U. H. M. Fagerlund, D. A. Higgs and J. R. McBride. 1979. Hormonal enhancement of growth in fish. (in) W. S. Hoar, D. J. Randall and J. R. Brett (eds), Fish Physiology, Vol. . Academic Press, New York, NY, pp. 455-597.
- Engstad, R. E., B. Robertsen and E. Frivold. 1992. Yeast glucan induce increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish Shellfish Immunol., 2, 287-297.
- Fletcher, G. 1973. The acute toxicity of a yellow phosphorus contaminated diet to brook trout *Salvelinus fontinalis*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 10, 123-128.
- Jørgensen, J. B., H. Lunde and B. Robertsen. 1993a. Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J. Fish Dis., 16, 313-325.
- Jørgensen, J. B., G. J. E. Sharp, C. J. Secombes and B. Robertsen. 1993b. Effect of a yeast-cell wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. Fish Shellfish Immunol., 3, 267-277.
- Kajita, Y., M. Sakai, M. Kobayashi and H. Kawashiri. 1992. Enhancement of non-specific cytotoxic activity of leucocytes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* injected with growth hormone. Fish Shellfish Immunol., 2, 155-157.
- Kawakami, H., M. Hiratsuka and S. Dosako. 1998. Effects of iron-saturated lactoferrin on iron absorption. Agri. Biol. Chem., 52, 903-908.
- Kim, K. H., Y. J. Hwang and S. C. Bai. 1998. Enhancement of chemiluminescent response of phagocytic cells from juvenile Rockfish, *Sebastes schlegeli*, by oral administration of levamisole. J. Fish. Sci. Tech., 1, 42-47.
- Kitao, T., T. Yoshida, D. P. Anderson, O. W. Dixon and A. Blanch. 1987. Immunostimulation of antibody-producing cells and humoral antibody to fish bacterins by a biological response

- modifier. *J. Fish Biol.*, 31, 87-91.
- Kodama, H., N. Mukamoto, T. Baba and D. M. Mule. 1994. Macrophage-colony stimulating activity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* serum. (in) J. S. Stolen and T. C. Fletcher(eds), *Modulators of fish Immune Responses Vol. 1*, SOS Publication, Fair Haven, NJ. pp. 59-66.
- Matsuyama H. A., M. H. M. Nakao and T. Yano. 1985. Optimum conditions for the assay of hemolytic complement tiger of porgy (*Pagrus major*) serum. *J. Fac. Arg. Kyushu Univ.*, 30, 149-158.
- McPhearson, R. M., A. DePaola, S. R. Zywno, J. M. L. Motes and A. M. Guarino. 1991. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. *Aquaculture*, 99, 203-211.
- Nikl, L., T. P. T. Evelyn and L. J. Albright. 1993. Trials with an orally and immersion-administered β -1,3 glucan as an immunoprophylactic against *Aeromonas salmonicida* in juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis. Aquat. Org.*, 7, 191-196.
- Ogier, D. B. M., C. Quentel, V. Fournier, F. Lamour and R. Le Gouvello, 1996. Effect of long-term oral administration of β -glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. *Dis. Aquatic Organisms*, 26, 139-147.
- Pickering, A. D. 1992. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. *Aquaculture*, 100, 125-139.
- Raa, J., G. Tørstad, R. Engstad and B. Robertsen. 1992. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. (in) M. Sharif, R. P. Subasighe and Arthur, J. R. (eds.), *Dis. Asian A. Vol. 1. Fish Health Section*, Asian Fish. Soc., Manila, Philippines, pp. 39-50.
- Robertsen, B., G. Rorstad, R. Engstad and J. Raa. 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. Fish. Dis.*, 13, 391-400.
- Robertsen, B., R. E. Ehgstad and J. B. Jørgensen. 1994. β -glucan as immunostimulation in fish. (in) J. S. Stolen and T. C. Fletcher (eds.), *Modulators of Fish Immune Response Vol. 1*, SOS Publications, Fair Haven, NJ, pp. 83-99.
- Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172, 63-92.
- Scott, A. L. and P. H. Klesius. 1981. Chemiluminescence: a novel analysis of phagocytosis in fish. *Develop. Bio. Standardization*, 49, 243-254.
- Sim, D. S., S. H. Jung and S. D. Lee. 1995. Changes of blood parameters of the culture flounder (*Paralichthys olivaceus*) naturally infected with *Staphylococcus epidermidis*. *Bull. Nat. Fish. Res. Dev. Age.*, 49, 149-155.
- Siwicki, A. K. 1987. Immunomodulatory activity of leavamisole in carp spawners, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Biol(suppl. A)*., 31, 245-246.
- Siwicki, A. K., D. P. Anderson and O. W. Dixon. 1990. In vitro immunostimulation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spleen cells with lavamisole. *Dev. Comp. Immunol.*, 14, 231-237.
- Siwicki, A. K., D. P. Anderson and G. L. Rumsey. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protects against furunculosis. *Verter. Immun. Immunopathology*, 41, 125-139.
- Solem, S. T., J. B. Jørgensen and B. Robertsen. 1995. Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon *Salmo salar* L. macrophages by lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.*, 5, 475-491.
- Sung, H. H., G. H. Kou and Y. L. Song. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathol.*, 29, 11-17.
- Verlhac, V., G. Jacques, O. Alex, S. Willy and H. Reid. 1996. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 143, 123-133.
- Wendelaar Bonga, S. E. 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77, 591-625.
- 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, 29-38.
- Yano, T., R. E. P. Mangindaan and H. Matsuyama. 1991. Enhancement of the resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by some β -1,3 glucans. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, 1815-1819.
- Yoo, B. H., S. I. Park and S. K. Chun. 1992. Bactericidal action by complement of fish serum. *J. Fish Pathol.*, 5, 9-18.
- Yoshida, T., R. Kruger and V. Inglis. 1995. Augmentation of non-specific protection in african catfish, *Claria gariepinus* (Burchell), by the long-term oral administration of immunostimulants. *J. Fish Disease*, 18, 195-198.

원고접수 : 2006년 7월 18일

수정본 수리 : 2006년 11월 6일