Journal of Life Science 2007 Vol. 17. No. 10. 1434~1440 ©JLS / ISSN 1225-9918

경구투여에 의한 버섯균사체 배양액이 넙치의 성장 및 비특이적 면역활성에 미치는 영향

김만철 · 김민주 · 김주상 · 허문수*

제주대학교 해양과학대학 수산생명의학과

Received September 11, 2007 / Accepted September 21, 2007

Effect of Culture Broth from Mushroom Mycelium on Growth and Non-specific Immune Parameters in Flounder (*Paralichthys olivaceus*) by Oral Administration. Man-Chul Kim, Min-Joo Kim, Ju-Sang Kim and Moon-Soo Heo*. *Department of Aquatic Life Medicine, Cheju National University, Jeje 690-756, Korea* - We have investigated the effects of mushroom mycelium (*Phellinus linteus, Coriolus versicolor*) mixed cultural extract on the immune responses of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. The mixed culture extracts were evaluated for the growth, hematology, lysozyme activity, leukocyte phagocytic activity, and disease resistance against *Vibrio anguillarum*. In the effect of the growth, the body weight and length gain in the group, which fed with mushroom mycelium mixed cultural extract, were 52 g and 3.4 cm higher than that in the control, respectively. For the hematology, the administration of mushroom mycelium mixed cultural extract resulted in increase of glucose. However, there was no distinct differences in GOT (glutamic oxaloacetic transaminase), GPT (glutamlc pyruvic transamlnase), TG, TP, and LDH (lactate dehydronase) among each group. The activities of lysozyme were 80% higher in the experimental groups than in the control. The activities of leucocyte were 66% higher in the experimental groups than in the control. Although lysozyme activity and leucocyte activity showed somewhat decrease after 12 weeks, these activities were still higher than in the control. The cumulative mortality (%) after an artificial challenge with 7×10^8 CFU of *Vibrio anguillarum* per fish was 25% higher in the experimental groups than the control.

Key words – Mushroom mycelium, immune responses, *Paralichthys olivaceus*, administration cumulative mortality

서 론

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[4,8,13].

버섯 중 일부는 자연계에서 분포 및 발생수가 극히 적어 자실체를 얻기 어려우며 인공배양 역시 계절의 제약을 받는 등 어려운 것으로 알려져 이에 대한 화학적, 생화학적 연구가 거의 이루어지지 못하였지만, 1990년대 중반 균사체 배양기술과 인공재배법이 확립된 후 농가에서 대량생산이 가능하게 되었다. 또한 버섯균사체는 자실체[7,19]와 유사한 항암, 체지방 감소, 혈중 콜레스테롤 저하 및 면역증강 효과 등의 활성을 갖으며, 성장 중에 섬유소 분해효소, 단백질 분해효소, 지방질 분해효소 등의 다양한 가수분해 효소를 생성한다[10,18].

이와 같은 버섯균사체의 생육특성을 이용하여 액체배양을 할 경우, 배지의 조성과 생육조건에 따라 항균, 항산화, 항암활성을 갖는 다양한 대사산물을 얻을 수 있다. 즉 버섯균은 배지에 함유된 성분을 다양한 기능성을 갖는 물질로 생물 전환할 수 있고, 배지에 함유된 특수한 기능을 갖는 2차 대사산물 자체도 배양액으로 유입시킬 수 있다. 또한 이와 같은 버섯균배양물의 생산은 계절의 제한을 받지 않고, 값싸게 대량생산이 가능하여 원료공급이 용이하고, 산업화가 쉽지만 식품소재 및 의약품 소재에 응용되는 부분은 매우 미흡한 편으로 본 연구에서도 균사체 배양액의 다양한 이용한 기능성을 확인하고자 실험을 실시하였다.

현재까지 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[1].

이와 같은 문제에 대처하기 위해서 많은 방안이 제시되고 있으며 그 중 백신과 면역 증강 물질 개발이 대부분을 차지하고 있다. 백신인 경우 한 종류의 질병에만 특이적으로 작용하고 처리 방법에 의한 어류의 스트레스 발생, 고비용, 저효율의 문제점을 안고 있다.

본 연구의 실험재료로 사용되어진 상황버섯에는 β-glucan성 다당류가 다량 포함되어 있으며, β-glucan은 체액성 및 세

*Corresponding author
Tel : +82-64-754-3473, Fax : +82-64-756-3493
E-mail : msheo@cheju.ac.kr

포성 면역반응을 증가시키며[23], 건강보조제로서 많이 사용되고 있다. 또한 운지버섯은 Protein-bound polysaccharide라는 단백 다당류인 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[14,20]및 스테로이드[11]등이 보고 되었으며, 이 성분들은 항바이러스, 항세균 및 항암효과를 나타낸다는 연구보고가 있다.

본 연구에서는 상황버섯과 운지버섯 균사체 혼합 배양액을 첨가한 사료가 양식 넙치의 성장, 혈액성상의 변화 및 세균공격에 따른 생존율을 조사하여 사료첨가제로써의 효용성을 확인하여, 그 이용 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

사용시료

실험에 사용된 버섯균사체 액체 배양액 시료는 제주도내에 소재한 (주) 대우 환경에서 일반 합성배지에서 상에서 액상으로 복합 배양된 상황버섯 (*Phellinus linteus*)과 운지버섯 (*Coriolus versicolor*) 균사체 혼합배양액을 사용하였다. 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 평판배양기에 이식하여 확대 배양을 하였으며, 균사체 직경이 5 cm 이상 자랐을 때 균사체 가장자리에서 Cork borer (5 mm)로 떼어서 접종하였다.

플라스크배양 및 Carboy 배양

기본 실험배지는 Potato Dextrose Broth (Difco. Co. USA)와 YM 배지를 사용하였다. 배지는 300 ml 삼각 flask 에 100 ml씩 분주하여 121℃, 20분 도안 고압 멸균하였다. 공시균주 접종원을 Cork borer (5 mm)로 5개씩 떼어서 접종하였다. 배양은 120 rpm의 회전수에 온도는 24~30℃ 사이에서 회전진탕 배양기에서 균에 따라 7일에서 15일까지 배양하였다. 본 배양의 영양원으로 감귤농축액 첨가 배지를 사용하였는데 대량 배양에 흔히 사용되는 방법인 carboy 배양방법을 이용하였으며, 감귤농축액배지 (10%)는 2 l의 병에 증류수를 첨가한 후, 감귤농축액의 농도 10% (v/v)로 배지를 조제하여 121℃에서 30분간 가압 살균하여 배지를 조제하였으며, 접종원은 균질기로 균질화한 후 2% 접종비로 무균적으로 접종하였다. 25 ± 1℃의 항온시설에서 통기량 0.2 vvm (volume of air added to liquid volume per mimute)으로 7~10일간 통기 배양하였다. 배양액을 바로 실험에 사용하였다.

실험어 및 사육수조

본 실험에 사용된 실험어는 제주도내 소재 육상 수조식 배양 장에서 육성되어진 평균 어체중 116±20 g, 전장 22±1.2 cm인 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)를, 콘크리트 수조 (11m, 1.2톤)에서 4500마리씩 무작위 배치하였다.

각각의 실험 수조는 유수식으로 처음에는 유수량을 시간당 7회전으로 조절하였으며, 성장함에 따라 시간당 10회전으로 유수량을 증가시켰다. 넙치 생리리듬을 안정화시키기 위하여 양식 전 기간 동안 검은색 차광망을 설치하였고 실험기간 중의 해수 온도는 18±1.5℃, 염분은 30‰~32.6‰이었고 용존산소 (DO)는 6~7.25였다.

사료 제작을 위하여 생사료 (전갱이, 정어리, 고등어 등의 소형잡어)에 복합 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양액을 각각 1% 첨가한 후, 제작한 사료를 매일로 2회 (AM; 8hr, PM; 5hr) 12주 동안 투여하였다. 대조구는 생사료만을 투여하였으며, 총 실험기간은 2006년 8월14일부터 11월 14일 까지 총 14주 동안 실험을 실시하였다.

성장도조사, 채혈방법 및 혈액학적 성분 분석

실험어의 어체중 측정은 실험 시작 후 3주마다 측정을 하였으며, 측정 24시간 전에 절식시킨 후, 각 실험구에서 무작위로 12마리를 선발하여 실험어 전체 무게를 측정하여 증중량을 구하였고, 실험어의 전장은 각각의 개체의 전장을 확인한 후, 평균을 측정하였다. 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℃에서 2시간 보관 후에 4℃ 원심분리기를 이용하여 3000 rpm에서 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 간수치 측정을 위해 실험에 사용하였으며, 남은 시료의 경우 -60℃ 에서 따로 보관하였다. 혈청 중의 성분에 대해서는 9가지 항목을 조사하였는데, Glutamic pyruvic transaminase (GPT), Glutamic oxalacetic transaminase (GOT), Total protein, LDH, Glouse 그리고 TG 의 성분 조사는 혈액자동분석기을 이용하여 측정하였다

혈청 라이소자임 활성 조사

넙치의 혈청 라이소자임 측정을 위해서 turbidimetric method를 이용하였다. 0.066M Phosphate buffer (pH 6.2)에 부유시킨 Micrococcus lysodeikticus (0.2 mg/ml) 부유액 950 μl와 미부 혈관에서 채혈한 혈액 유래의 혈청 50 μl를 혼합하여 25℃에 30초 와 4분 30초의 흡광도의 변화를 530 nm 서 측정하여 분당의 0.001의 흡광도 감소치를 라이소자임의 활성 1단위로 표시하였다.

백혈구 활성

넙치의 신장에서 두신을 분리한 후에 L-15 medium (2% fetal calf serum (FCS), 1% penicillin/streptomycin 및 0.2%

heparin)과 함께 nylon mesh 에 통과 시켜서 세포 현탁액을 준비하였다. 54% percoll 에 중층 시킨 후, 450 xg에서 30분간 원심 분리 하였다. 그 후, 0.1% tryphan blue 로 분리된 백혈구의 viability 를 확인 한 후에 2×10^6 cell/ml 농도로 조정하여 96 well tissue culture plate 에 분주하고 18℃에서 2시간 부착시켜 상징액을 제거한 후 3회 세척하여 식세포를 준비하였다. 식세포가 부착된 well 에 FCS 로 옵소닌화 (opsonin) zymosan 을 nitroblue tetrazolium (NBT) 용액에 현탁시킨 부유액을 100 μl씩 첨가하고 18℃에서 30분간 반응시킨 다음 100% methanol로 세포를 고정시켰다. 2M KOH 용액 120 μl와 dimethyl suphoxide (DMSO) 140 μl를 각 well 에 첨가한 후 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. 2M KOH 와 DMSO 혼합액을 blank 로 사용하였다.

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℃ 배양하였으며, 7×10^8 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 16마리씩 선정하여 1 ml 주사기를 이용하여 각 마리당 100 μl 씩 복강주사 한 후 15일 동안 누적 폐사율을 조사하였다.

결과 및 고찰

성장도 조사

버섯균사체 배양액 첨가 사료 투여가 넙치의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위해 12주 동안 넙치에게 공급한 결과 실험 개시 후 3주 동안은 아무런 유의차가 없었으나, Fig. 1 에서 볼 수 있듯이 6주 이후부터 대조구와 실험구의 어체중 증가 차이가 나타나기 시작했다. 넙치의 어체중은 복합 배양된 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양액 첨가 사료를 투여한 실험 그룹이 9주 이후부터 버섯균사체 배양액을 첨가하지 않은 실험구 보다 약 30 g 정도 높은 체중 증가를 나타냈으며, 대조구와 어체중 비교 실험 결과 최종적으로 12주 후에는 복합 배양된 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양액을 첨가한 실험구에서 대조구 보다 약 52 g 정도의 더 높은 어체중 증가를 확인 할 수가 있었다.

또한 넙치의 전장 변화는 실험 개시부터 3주까지는 Fig. 2

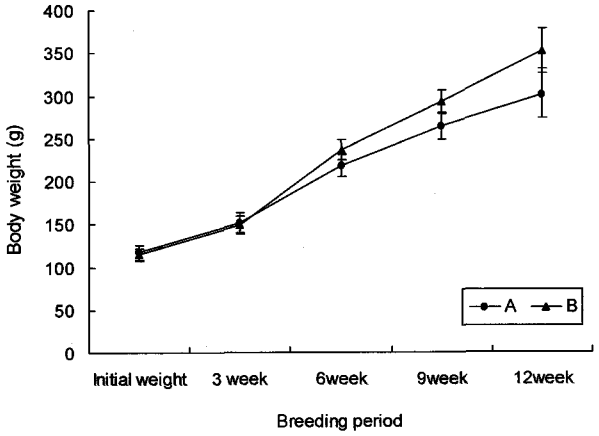

Fig. 1. Changes of the weight gain in the juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed a commercial diet supplemented with 1% myceilum culture broth for 12 weeks.
A, Basal diet; B, *Coriolus versicolor* + *Phellinus lintrus*.

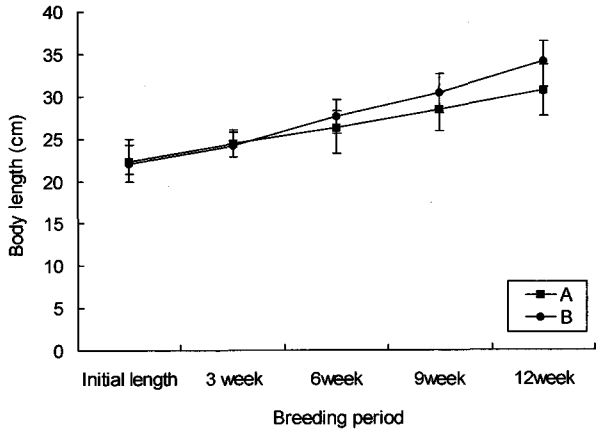

Fig. 2. Changes of the body length in the juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed a commercial diet supplemented with 1% myceilum culture broth for 12 weeks.
A, Basal diet; B, *Coriolus versicolor* + *Phellinus lintrus*.

에서와 같이 대조구와 복합 배양된 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양액을 첨가한 실험구에서 비슷한 양상을 보였지만, 사료 투여 후 4주 이후부터 대조구와 복합 배양된 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양액을 첨가한 실험구의 전장에 차이를 보이면서 최종적으로 12주 후의 전장을 비교해 보았을 때 약 3.4 cm 정도의 전장의 차이를 보였다.

원 등[23]은 7주 동안 4가지 농도가 다른 β-1,3/1,6-linked glucan 을 첨가한 사료를 투여한 결과 실험구가 대조구에 비해 대체적으로 높거나 유의차가 없었다고 보고하였다. 이러한 결과는 버섯 균사체의 2차 대사산물로서 많이 함유되어 있는 수용성인 β-giucan 과 같은 다당류의 성분에 의해 어체의 면역기능 항상 및 림프구의 활성을 강화시켜 양식넙치의

성장에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

혈액의 성분 분석

버섯 균사체 배양액 첨가 사료 투여가 넙치의 생리 상태에 미치는 영향을 조사하기 위해 Glutamic pyruvic transaminase (GPT), Glutamic oxalacetic transaminase (GOT), Total protein, LDH, Glouse 그리고 TG 의 변화를 생리적 지표로 하여 조사하였다(Table 1). Total protein 의 경우 대조구와 혼합 상황, 운지버섯 균사체 배양액을 첨가한 실험구는 대체적으로 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이는 세포의 항상성을 유지하는 역할을 하고 있는 혈청 내 단백질의 농도 변화가 없다는 것으로 생리적으로 넙치에게 나쁜 영향을 주지 않은 것으로 사료된다.

혈액내의 Gloucose는 버섯 균사체를 첨가한 실험구가 유의적으로 대조구에 비해 높게 나타났으며, 9주에 가장 높은 값을 기록했지만 그 이후에 그 농도가 내려갔다.

이는 혈액내의 Cortisolr 과 Gloucose 농도는 생체의 2차 스트레스 지표[22]로 사용되어지고 있는데, 이런 Gloucose 농도의 증가는 버섯 균사체 배양액에 성분 중 β-glucan 에 의한 반응으로 사료된다. β-glucan은 효모, 사상균, 버섯등의 세포벽에 주요 구조 다당체로서 면역 자극 효과를 가지며 포유류의 저항성을 증가시킨다는 보고가 있으며[21], 어류의 경우에도 비 특이적 면역능을 증가시킨다는 보고가 있다[6,17]. 본 실험에서는 β-glucan 이 넙치의 면역 자극제로 작용되어 졌으며, 이로 인해 스트레스 지표인 Gloucose 농도가 증가되어진 것으로 생각된다. 하지만 12주 후에 수치가 낮아졌는데, 이는 버섯 균사체 배양 추출물의 투여기간에 주요한 단서로 여겨지며 추후 더 많은 연구가 진행 되어야 할 것이다.

TG는 Triglyceride 라는 콜레스테롤, 인지질, 유리지방산과 같이 혈중 지질의 주체를 이루고 있으며 간장에 저장된 TG는 에너지원으로서 이용되는데 본 연구에서는 전체적으로 대조구와 실험구가 비슷한 수치를 나타내고 있다.

GOT (glutamic oxaloacetic transaminase) 란 생체의 여러 가지 장기 세포 가운데 있는 효소로 몸의 중요 구성 요소인 아미노산을 형성하는 작용을 한다. GOT 는 장기의 세포가 파괴되면 대량으로 존재하고 이 효소가 특히 많은 곳은 심장, 간, 근육, 적혈구이다. 그러므로 이러한 장기들의 손상은 혈청 GOT가 상승한다는 것을 의미하는 것이다. GPT (glutamlc pyruvic transamlnase)도 GOT와 마찬가지로 아미노산을 형성하는 효소로서 간과 특정장기가 손상되면 이러한 효소가 세포외로 유출되어 이 효소의 수치가 상승한다. 그리고 혈장 전이효소인 GPT 의 활성은 오염물질에 의한 간, 심장 및 근육 등의 조직 손상의 지표로 이용되고 있으며, 일반적으로 오염물질에 의해 증가하는 경향을 나타낸다.

대조구와 실험구의 GOT 수치는 지속적으로 9주까지 수치가 낮아졌지만, 12주 부터는 다시 높아지긴 했으나 그 수치가 미미하여 거의 비슷한 수치를 나타냈고 처음 측정한 수치보다 모두 낮은 수치를 기록하였다.

GPT 는 12주 까지 지속적으로 낮는 수치를 나타냈으며, 12주 부터는 대조구에 비해 실험구가 낮은 수치를 나타내었다. 실험구의 GOT 와 GPT 수치가 대조구와 거의 비슷한 수치를 나타내는 것으로 보아 버섯 균사체 배양액을 첨가하여도 간 기능의 손상이나 혈액 내의 생리 기능에 장해가 없는 것으로 사료된다.

LDH 는 lactate dehydronase 라는 당분해과정의 마지막 단계에 작용하는 효소의 이름이다. 이 LDH 는 간, 근육, 골격, 뇌, 신장, 적혈구, 심장 등에 많이 분포하는 효소이기 때문에 이러한 장기에 염증이나 세포 파괴시 LDH 가 올라갈 수 있다.

실험구의 경우 LDH 는 12주 까지 지속적으로 낮는 수치

Table 1. Blood chemistry of juvenile flounder fed on myceilum mixed culture broth supplemented feeds

		GLU(mg/DL)	GOT(U/L)	GPT(U/L)	TP(g/DL)	LDH(W.U)	TG(mg/DL)
0 week	A	45±7	60±6	45±9	3.22±0.29	589±48	645±39
	B	47±5	71±9	52±3	3.41±0.2	590.8±79	600±55
3 week	A	46±11	52±3	37±4	4.0±0.56	482.7±34	657±12
	B	52±7	58±7	40±8	4.1±0.89	520.9±70	645±76
6 week	A	48±6	45±9	27±8	5.6±0.27	520.9±21	592±76
	B	55±11	43±8	27±6	5.2±0.53	490.1±72	620±22
9 week	A	51±9	24±8	18±9	5.2±0.32	448.4±89	590±67
	B	60±9	26±3	20±5	5.4±01	470.9±55	612±10
12 week	A	53±3	32±7	14±9	5.9±0.6	400.9±92	642±78
	B	55±7	29±1	16±7	5.1±0.12	390±76	600±46

*, significant difference from control, $p<0.05$.

A, Basal diet; B, *Coriolus versicolor* + *Phellinus lintrus*

를 나타냈지만 대조구의 경우 유의적인 것을 찾을 수가 없었다. 하지만 대조구와 실험구 둘다 처음 수치 보다 다 낮아지는 현상을 나타냈으며, 대조구와 실험구가 거의 비슷한 수치를 나타내는 거승로 보아 버섯 균사체 배양액을 첨가하여도 세포의 손상이나 혈액 내의 생리기능에 장해가 없는 것으로 생각된다.

라이소자임 활성

lysozyme 은 비 특이적 방어기작들 중에 대표적인 것으로 자연계에 넓게 분포하는 효소로서, 이 효소는 peptidoglycan 이라는 세균의 세포벽 성분을 분해하는 작용을 가지고 있으며, 이외에도 옵소닌, 항바이러스, 항암작용 등에도 관여를 하는 것으로서 보고 되고 있다[9].

버섯 균사체 혼합 배양액을 첨가 사료를 공급한 결과 6주까지는 대조구와 실험구의 거의 비슷한 값을 보였지만 9주와 12주에서는 대조구에 비해 높은 수치를 나타냈다. 실험구의 경우 지속적으로 증가하다가 12주에는 다소 낮아지는 경향을 보였지만 대조구에 비해 높은 수치를 나타냈다(Fig. 3).

이는 버섯 균사체 배양액 성분 중에 β-glucan 성분에 의한 것으로 사료되다. β-glucan 경구투여는 주사에 의한 투여와 마찬가지로 많은 어종에서 lysozyme 의 활성이 증가 되었고 [2,24], Won 등[23]은 7주 동안 4가지 농도가 다른 β-1,3/1,6-linked glucan 을 첨가한 사료를 투여한 결과 6주까지는 lysozyme 증가 하다가 7주에서는 대조구와 비슷한 수치로 감소한다고 하였다. 또한 박 등[16]은 주사법으로 3일 간격으로 β-glucan 을 2번 접종 하였을 때 1차 접종 보다 2차 접종 때 더 높은 lysozyme 활성을 보였다고 하였다. 또한 박 등[15]이 잉어와 넙치에 5주간 β-glucan 을 투여한 결과도 lysozyme 활성이 증가하였다고 보고하였고, Yoshida[24]는 African catifish 에서는 투여 후 50일 까지도 lysozyme 활성이 높았다고 보고했다. 이는 어종에 따라 어체내의 β-glucan 을 배출하는 기간에 차이가 나며, 기간이 길어질수록 비 특이적 면역계를 지속적으로 자극함으로서 lysozyme 의 활성을 증가시킨다고 사료된다. 체액성 면역계를 담당하고 있는 lysozyme 의 활성이 증가하는 것으로 보아 버섯 균사체 배양 추출물이 면역 기능 향상에 효과가 있을 것으로 사료된다.

식세포 활성 산소 측정

두신 식세포의 살균 작용의 지표로 널리 이용되고 있는 O_2^-생성능의 조사하여 식세포 활성을 알아보았다. 식세포는 병원체가 침입하여 자극하면 활성산소 (O_2^-)와 같은 reactive oxygen species (ROS)를 생산하는데, 이 물질들이 강력한 살균 효과가 있는 것으로 알려져 있다[5].

상황버섯과 운지버섯 균사체 복합 배양액 첨가사료를 12주간 투여하면서 식세포의 활성 산소를 측정 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 실험 시작 6주 까지는 비슷한 값을 나타냈지만, 9주와 12주에서는 실험구가 대조구에 비해 높은 활성을 보였다. 특히 9주에서 실험구가 가장 좋은 활성을 나타냈고 12주에는 다소 낮아지는 활성을 나타냈지만 대조구에 비해 높은 활성을 보였다.

12주 후 활성이 낮아지는 현상은 버섯 균사체 혼합 배양물의 첨가사료에서의 투여시기에 관련하여 기초 자료로서 활용 할 수 있을 것으로 여겨지며, 추 후 더 많은 실험을 통해서 버섯 균사체 혼합 배양물의 첨가 농도와 시기에 관련된 연구가 진행 되어져야 할 것이다

버섯균사체 혼합배양액 첨가 사료를 투여한 실험구에서 식세포의 높은 활성이 나타난 것으로 보아 버섯 균사체 배양액에 함유되어 있는 생리활성물질 성분이 어류의 비특이적 세포성 면역기능 증강에 중요한 역할을 갈 것으로 기대된다.

이와 유사한 결과로, Won 등[23]은 7주 동안 4가지 농도

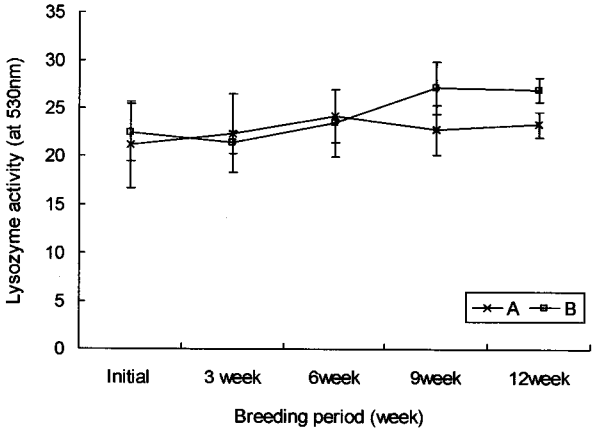

Fig. 3. Lasozyme activity in the serum from the olive flounder, Paralichthys olivaceus fed on myceilum culture broth supplemented feeds for 12 weeks.
A, Basal diet; B, *Coriolus versicolor* + *Phellinus lintrus*.

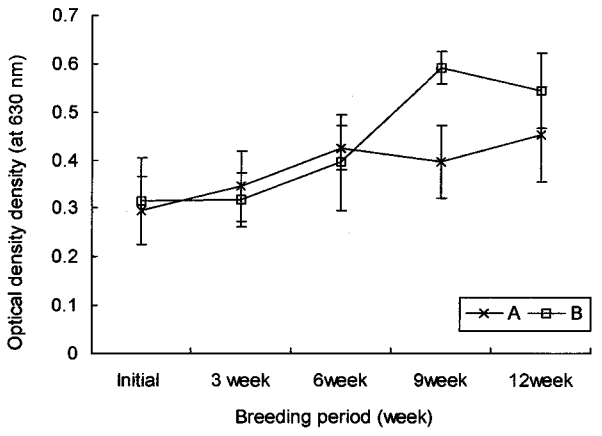

Fig. 4. NBT reduction of phagocytes in the head kidney of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed on myceilum culture broth supplemented feeds for 12 weeks.
A, Basal diet; B, *Coriolus versicolor* + *Phellinus lintrus*.

가 다른 β-1,3/1,6-linked glucan 을 첨가한 사료를 투여한 결과 0.05%와 0.1%첨가구에서 7주째 까지 다른 실험구에 비해 비교적 높은 활성을 나타냈으며, 박 등[15] 은 β-glucan 첨가 사료 투여기간 동안 마크로파아지와 호중구수는 투여기간에는 증간, 무투여기간에는 감소하는 경향을 보였지만, 재 투여 후에는 급격히 상승하여 높은 활성을 유지하였다고 보고 하였다. 또한 Baulny 등[2]은 yeast glucan 을 35일간 경구 투여한 turbot 에서도 1일 째와 14일 째에 NBT 환원능이 유의 하게 향상된다고 하였다.

공격 실험

버섯균사체 배양액 첨가사료를 12주 동안 투여한 질병이 없는 건강한 넙치에 어류 병원성 세균인 *Vibrio anguillarum* 을 인위 감염 시킨 후 15일 동안에 누적 폐사률을 조사한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 그 결과 혼합 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양액 첨가한 실험구에서 대조구보다 25% 높은 생존률을 나타냈으며, 항생제를 투여한 그룹에 비해서는 12.5% 높은 생존률을 보였다.

실험구의 경우 3일부터 폐사가 시작되어 6일까지 나타났고 그 이후에 폐사가 일어나지 않았으며, 대조구와 항생제 첨가구인 경우 4일부터 폐사어가 일어나 7~8일 까지 폐사가 일어났다.

이러한 결과는 버섯균사체 배양액에 포함된 성분이 넙치의 비 특이적 면역계 중 세포성 면역을 담당하는 식세포의 활성과 체액성 면역계를 담당하는 라이소자임 활성에 영향을 준 것으로 사료 된다. 일반적으로 면역증강물질로 잘 알려진 β-glucan 과 같은 다당류의 성분이 버섯균 균사체의 2차 대사산물로서 많이 함유되어 있다는 연구결과가 있으며, 또한 이러한 성분이 경구투여로 장의 흡수도외 백혈구의 탐

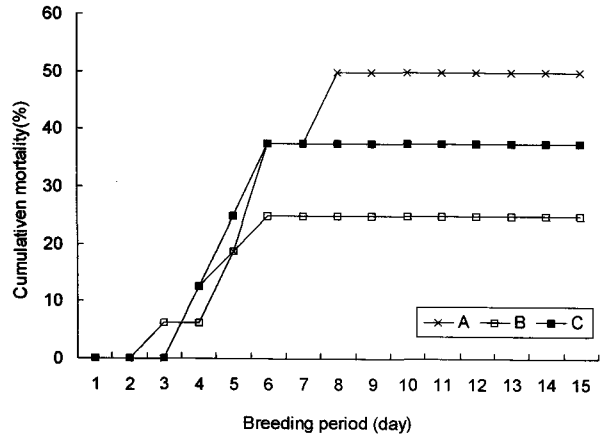

Fig. 5. Cumulative mortality (%) of flounder after 15-day feeding incremental levels after challenge with *V. anguillarum* (n=16).
A, Basal diet; B, *Coriolus versicolor* + *Phellinus lintrus*; C. Basal diet + Tetracycline

식능, 리소자임의 활성[2,24], 화학발광의 증가와 백혈구의 유주능[3] 및 활성산소의 생성 증가[24]등과 같은 비 특이적 방어인자의 활성을 증가시킨다는 보고가 있다. 체액성 면역계를 담당하는 식세포는 병원체가 침입하여 자극하면 활성산소(O_2^-)와 같은 reactive oxygen species (ROS)를 생산하는데, 이 물질들은 강력한 살균 효과가 있는 것으로 알려져 있다[5]. 어류의 혈청중의 라이소자임은 세균 세포벽의 삼투압 작용에 손상을 주어 용균시키며, lysozyme 은 많은 어류에 정균 효과가 있다고 보고 되고 있으며, 김 등[12]은 넙치의 라이소자임이 *Micrococcus luteuse*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus epidermis* 에 대해서 높은 정균 효과가 있으며, 실제 생체 내에서는 보체나 식세포 등과 협력하여 훨씬 높은 용균 효과를 보일 것이라고 하였다. 또한 박 등[16]은 한국산 메기에 β-glucan 을 접종하였을 때 라이소자임 활성이 높게 나타난다고 하였다. 본 실험에서는 라이소자임의 활성능을 측정한 결과 대조구에 비해 수치가 높았으면 뿐만 아니라 백혈구의 활성 또한 대조구에 비해 높은 수치를 나타내어 공격실험과 일맥상통하는 결과를 나타내고 있다. 결론적으로 버섯균사체 배양액의 포함되어진 β-glucan 과 같은 다당류가 라이소자임의 활성이라든지 식세포의 활성에 영향을 주어 높은 생존율을 보인 것으로 사료되어지며, 앞으로 버섯균사체 배양액의 적절한 농도, 적절한 투여 기간 및 성분 분석 등과 같은 연구가 깊이 있게 이루어진다면, 사료첨가제로서의 충분한 이용 가능성이 있다고 사료된다.

요 약

본 연구는 넙치의 면역반응에서 버섯균사체 (상황버섯, 운지버섯) 혼합배양추출물의 효과에 대해서 연구하였다. 혼합배양추출물은 넙치에 대해서 성장, 혈액, 라이소자임활성, 백혈구, 식세포활성 및 *Vibrio anguillarum*에 대한 질병저항성에 관해서 평가되었다. 성장에 있어서 버섯균사체 혼합 배양 추출물을 섭이한 그룹의 체중은 52 g 전장은 2.1 cm가 대조구보다도 증가하였다. 혈액학적으로 버섯균사체 혼합 배양추출물을 경구투여 했을 때 글루코오스의 양이 증가하였다.

그러나 각 그룹에 대한 GOT (glutamic oxaloacetic transaminase), GPT (glutamlc pyruvic transamlnase), TG, TP, LDH (lactate dehydronase)의 유의적인 차이는 없었다. 라이소자임 활성은 대조구 보다 실험구에서 80%의 높은 결과를 얻을 수 있었으며, 식세포 활성은 실험구에서 대조구 보다 60% 높은 활성을 보였다. 라이소자임 활성과 식세포 활성의 결과 경우에는 12주후에 다소 감소하는 양상을 보였지만, 대조구 보다는 높은 활성을 보였다.

그리고 7×10^8 CFU 농도로 어류 병원성 세균인 *Vibrio anguillarum*를 어류 당 투여하여 병원성 테스트를 한 결과 누적

폐사율을 대조구와 비교해 보았을 때 25%의 높은 생존율을 보였다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구 (KRF-2006-F00051)로서 연구비 지원에 깊은 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Anderson, D. P. 1992. Immunostimumulants, adjuvants, and vaccine carrires in fish: applications to aquaculture. *Annu. Rev. Fish Dis.* **2,** 281-307.
2. Baulny, M. O., C. Quentel, V. Foundier, F. Lamour and R. L. Gouvello. 1996. Effect of long term oral administration of β-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.
3. Duncan, P. L. and P. H. Klesius. 1996. Dietary immunomodulants enhance nonspecifis immune responses in channel catifish but not resistance to *Edwardsiella ictaluri. T. Aquat. Anim. Health* **8,** 241-248.
4. Ebihara, K. and Y. Minamishima. 1984. Protective effect of biological response modifiers on murine cytomegalovirus infection. *J. Virology* **51,** 117-120.
5. Ellis, A. E. 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish Immunol.* **9,** 291-308.
6. Figueras, A., M. M. Santarem and B. Novoa. 1997. In vitro immunostimulation of turbot (Scophthalmus maximus) leukocytes with β-glucan and/or Photobacterium damsela bacterin. *Fish Pathol.* **32,** 153-157.
7. Hikino, H., C. Kanno. Y. Mirin and T. Hayashi. 1985. Isolation and hypoglycemic activity of Ganoderans A and B, glycans of *Ganoderman lucidum* fruit bodies. *Planta. Med.* **51,** 339-340.
8. Ikekawa, T., M. Nakanishi, N. Uehara, G. Chihara and F. Fukuoka. 1969. Antitumor activitn of aqueous extracts of edible mushroom. *Jpn. J. Cancer Res.* **29,** 734-735.
9. Jolles, P. and J. Jolles. 1984. What is new in lysozyme research Always a model system, todays as yesterday. *Mol. biachem.* **63,** 165-189.
10. Jung, I. C., S. Park, K. S. Park and C. H. Ha. 1996. Antioxidative effect of fruit body and mycelia extracts of *Pleurotus ostreatus. Korean J. Food Sci. Technol.* **28,** 464-469.
11. 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.
12. Kim, J. W., S. I. Park and S. K. Chun. 1992 Purification and antibacterial effect of lysozyme from flounder, *Paralichthys olivaceus. J. Fish Pathol.* **5,** 87-92.
13. 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.
14. Mau, J. T., H. C. Lin and C. C. Chen. 2001. Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Research International* **3,** 521-526.
15. 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.
16. Park, S. W., Y. G. Kim and D. L. Choi. 1996. Increase in phagocytic activity of peripheral neutrophil and lysozyme activity of blood serum in Korea catfish (*Silurus asotus*) intraperitoneally injected with β-glucan. *J. Fish Pathol.* **9,** 87-93.
17. Robertsen, B., R. E. Engstad and J. B. Jørgensen. 1994. β-glucans as immunostimulants in fish. pp. 83-99, In: Stolen, J. S., Fletcher, T. C. (Eds.), Modulators of Fish Immune Responses, vol. **1**. SOS Publications, Fair Haven, NJ.
18. Song, C. H., J. H. Kim, B. K. Yang and K. W. Kim. 1996. Anti-complementary polysaccharides produced from submerged mycelial culture of *Pleurotus sajocaju. Korea J. Mycology* **24,** 104-110.
19. Suzuki, S. and S. Oshima. 1976. Influence of Shitake (*Lentinus edodes*) on human serum cholesterol. *Mushroom Sci.* **9,** 463-467.
20. 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.
21. Williams, D. L., I. W. Browder and N. R. Luzio. 1983. Immunotherapeutic modification of *Escherichia coli*-induced experimental peritonitis and bacteremia by glucan. *Surgery* **93,** 448-454.
22. Wedemeyer, G. A. and W. T. Yasutake. 1977. Clinical methods for the effects of environmental stress on fish health. U.S. pp. 89, Fish and Wildlife *Service Technical.*
23. 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.
24. Yoshida, T., R. Kruger and V. lnglis. 1995. Aguroentation of non-specific in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long-term oral administration of immunostimulants. *J. Fish Dis.* **18,** 195-198.