

## Yeast $\beta$ -glucan 첨가 사료가 뱀장어의 비특이적 면역 반응에 미치는 영향

김진도 · 우승호\* · 김이청 · 이준희\* · 조용철 · 최상민 · 박수일\*\*

\*부경대학교 수산생명의학과, 국립수산과학원 남부내수면연구소

## The Effects of yeast $\beta$ -glucan in the Diet on Immune Response of Japanese eel, *Anguilla japonica*, by Oral Administration

Jin Do Kim, Sung-Ho Woo\*, Yi Cheong Kim, Jun Hee Lee\*, Yong Chul Cho,  
Sang Min Choi and Soo Il Park\*\*

\*Department of Aquatic life medicine, 599-1, Pukyong National University, Namgu, Busan 608-737, Korea  
Inland Aquaculture Research Institute, National Fisheries Research & Development Institute (NFRDI), Jinhae, Gyeongnam, 645-251, Korea

The effects of dietary yeast  $\beta$ -glucan administration on growth, nonspecific immune responses, serum lysozyme, skin mucous lysozyme, NBT (nitroblue tetrazolium) reduction by phagocytes, and disease resistance against *Edwardsiella tarda* in Japanese eel, *Anguilla japonica* were evaluated. Fish were fed the diets supplemented with 0%, 0.1% and 0.5% of yeast  $\beta$ -glucan to a commercial diet for 6 weeks. The body weight gain from the fish fed on the 0.5% supplemented diet for 6 weeks was significantly higher than the control. Both serum and skin mucous lysozyme were significantly higher in the all experimental groups except 2 weeks of 0.5% group. The bactericidal activity of serum was slightly increased at 6 weeks. Also, The intracellular superoxide anion production of kidney phagocytes was significantly higher in the all experimental groups. The diet supplemented with 0.1% were also found to raise the relative percent survival (RPS) of Japanese eel after an artificial challenge with  $1 \times 10^7$  cells of *Edwardsiella tarda* per fish. The results suggested the potential of yeast  $\beta$ -glucan to activate some innate immune responses and to improve the growth in Japanese eel.

Key words :  $\beta$ -glucan, Yeast, Immune response, Eel

어류 양식장에서 질병의 치료 목적으로 주로 항생제와 화학요법제를 사용하고 있다. 그러나 항생제와 화학요법제 치료에 대한 소비자의 구매욕구 저하와 내성균 출현 등의 부작용으로 인해 양어장에서 사용을 자제하고 있는 추세이며, 바이러스성 질병 같은 난치성 질병에는 효과를 나타내지 못하는 한계점이 있어 자연적으로 질병의 치료보다는 예방에 중점을 두고 양식 경영을 하고 있다. 한편 예방 목적으로 백신을 사용하고 있으나 이들 제품은 에드워드병이나 연쇄

구균병 등의 특정 질병에 대해서 개발되어 제한적으로 이용되고 있을 뿐이다. 이에 대한 대안으로 한약제와 프로바이오틱스 등의 면역증강제를 첨가한 사료를 투여하여 질병에 대한 내병성을 길러 건강한 양식 어류를 생산하고 브랜드화시키고 있는 양어가가 늘어가는 추세이다.

어류의 면역증강제로 잘 알려져 있는 물질로는 달갈 유래 생산물인 EF203 (Yoshida *et al.*, 1993), 갈조류 유래의 laminaran (Samuel *et al.*, 1996), 균류인 *Schizophyllum commune* 유래의

†Corresponding Author : Soo Il Park, Tel : 051-629-5939  
Fax : 051-629-5939, E-mail : parksi@pknu.ac.kr

schizophyllan (Matsuyama *et al.*, 1992), yeast 유래의 glucan (Brattgjerd *et al.*, 1994; Baulny *et al.*, 1996; Duncan and Klesius, 1996; 박 등., 2001) 등이 있다. 이 중에서도  $\beta$ -glucan의 투여 효과에 관한 연구가 많으며, 특히 yeast, *Saccharomyces cerevisiae*의 세포벽에서 분리한  $\beta$ -1,3/1,6-linked glucan을 주사한 Atlantic salmon이 여러 세균성 감염에 대한 저항성을 나타내었으며 (Robertson *et al.*, 1990), 혈청 내의 lysozyme 활성과 보체 매개성 용혈능이 증가하고 (Engstad *et al.*, 1992), 전신 macrophages의 식작용 능력이 증가 (Chen *et al.*, 1992)된다고 보고 하였다. 경구 투여한 경우에도 catfish의 백혈구 활성 산소 생성능을 증가시키고(Yoshida *et al.*, 1995; Duncan *et al.*, 1996), turbot의 혈청 내의 lysozyme 활성이 증가 (Baulny *et al.*, 1996) 된다는 몇몇 보고가 있다. 이들 연구의 대부분이 연어과 어류와 메기과 어류에 한정되어 있고, 주로 주사법에 의한 실험으로써 주기적 또는 연속적으로 주사해야 효과가 있기 때문에 양식 현장에서 지속적으로 처리하기에는 무리가 있어 실제로 적용하는 데는 한계가 있다고 하겠다.

따라서 본 연구에서는 뱀장어에 yeast  $\beta$ -glucan 첨가 사료를 투여 후 성장률을 측정하고, 경시적으로 뱀장어의 비특이적 면역에 미치는 영향을 조사하였다. 마지막으로 양식 뱀장어에 문제가 되고 있는 *Edwardsiella tarda* 균을 인위 감염시켜 실제로 뱀장어의 방어능이 증가 되는지를 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시험어

경남 밀양 소재 양만장에서 구입한 평균 어체중  $11.44 \pm 0.53$  g의 뱀장어를 1톤 용량의 순환여과식 수조에서 사육하면서 사용하였다. 시험을 위해 200L FRP 수조에 40마리씩 수용하여 1주일간 순치시킨 후 유수식으로 실험하였다. 2주마다 각 시험구의 20마리를 대상으로 어체중을

조사하고, 각 시험구에서 6마리씩 임의로 선정하여 시험에 사용하였다. 공격 시험은 실험 마지막 주인 6주째에 실시하였다. 시험 기간 동안 사육 수온은  $27 \sim 28^\circ\text{C}$  이었으며, 사육수의 1일간 환수량은 3회전으로 하였다.

### 시험용 사료의 제작 및 투여 방법

시판되는 yeast  $\beta$ -glucan (Immunocorp AS, Norway)을 물에 희석하여 0.1% 및 0.5%가 되도록 조절하여 시판되는 뱀장어용 분말 사료를 반죽하는 방식으로 떡사료로 제작하여 사용하였다. 시험구는 6주간 yeast  $\beta$ -glucan 첨가 사료를 연속 투여하였고, 대조구는 분말 사료만을 이용하여 떡사료를 제작하여 시험구와 동일한 기간 동안 투여하였다. 1일간 투여량은 어체중의 10%로 조절하여 매일 1회 공급하였다.

### 성장률 측정

시험구와 대조구의 뱀장어 20마리를 임의로 잡아내 어체중을 2주마다 측정하였으며, 6주간의 yeast  $\beta$ -glucan 첨가 사료 투여 시험 후 뱀장어의 최종 평균 무게를 측정하여 증체율 (Weight gain, WG)을 계산하였다.

### 혈청의 분리와 보존

실험에 사용한 혈청은 벤조카인 50 ppm으로 마취시킨 후 뱀장어 꼬리 절단법으로 채혈하여 분리하였다. 채취한 혈액을 60분간 실온에 방치한 후  $4^\circ\text{C}$ 에서 1시간 정도 두어 혈병을 수축시킨 후 6,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 시험에 바로 사용하거나  $-20^\circ\text{C}$ 에 보관하여 사용하였다.

### 혈청 내 lysozyme의 응균 활성 조사

Yeast  $\beta$ -glucan 첨가 사료 투여 후 2주, 4주 및 6주에 각 시험구 별로 6마리씩 임의로 잡아낸 시험어를 대상으로 혈청을 분리하여 2마리씩 pooling한 후  $48^\circ\text{C}$ , 30분간 처리하여 바로 사용

하거나  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하며 혈청 내 lysozyme의 용균 활성 시험에 사용하였다.

lysozyme의 활성은 Parry *et al.* (1965)의 turbidimetric method를 이용하여 측정하였다. 즉 *Micrococcus lysodeikticus* 균 현탁액에 대한 흡광도의 감소량을 O.D.(optical density) 530 nm에서 측정하였다. 시험용 균액은 *M. lysodeikticus*를 0.05M PBS (pH 7.4)에 현탁시켜 O.D. 530 nm에서 흡광도가 0.7이 되게 조정하여 준비하였다. 이 현탁액 450  $\mu\text{l}$ 와 혈청 50  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여  $25^{\circ}\text{C}$ 에서 30초 및 4분 30초 씩 반응시킨 후 O.D. 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. lysozyme의 활성은 unit/ml로 나타내었으며, 흡광도 값이 0.001 감소한 값을 1 unit로 나타내었다.

#### 체표 점액 중 lysozyme의 용균 활성 조사

##### 1) 체표 점액 시료의 준비

각 시험구 별로 6마리씩 임의로 잡아낸 시험어를 대상으로 김 (1992)의 방법에 따라 체표 점액을 취하여 2마리씩 pooling 하였다. 채취된 시료에는 5배의 0.005M PBS (pH 7.4)를 첨가하여 균질화한 후 원심분리 ( $4^{\circ}\text{C}$ ,  $12,000 \times g$ , 20분)한 다음 상정액을 용균 활성 측정용 시료로 사용하였다.

##### 2) 용균 활성 조사

체표 점액의 lysozyme 활성 조사는 Takahashi *et al.*, (1986)의 방법에 따라 *Micrococcus lysodeikticus* 균 현탁액에 대한 흡광도의 감소량을 O.D. 530 nm에서 측정하였다. 시험용 균액은 *M. lysodeikticus*를 0.005M PBS(pH 7.4)에 현탁시켜 O.D. 530 nm에서 흡광도가 0.6이 되게 조정하여 준비하였다. 측정용 시료 300  $\mu\text{l}$ 에 균 현탁액 1.5 ml를 첨가하여  $25^{\circ}\text{C}$ 에서 0분 및 20분 반응시킨 후 O.D. 530 nm에서 흡광도의 감소량을 측정하였으며, 용균 활성은 20분간 반응 후 흡광도를 0.001 감소시키는 값을 1 unit로 나타내었다.

#### 혈청의 살균능 조사

혈청의 살균 능력을 조사하기 위하여 유 등 (1992)의 방법에 따라 시험하였고 신선혈청을 바로 사용하거나  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하며 시험에 사용하였다.

살균능의 변화 정도를 알기 위해 *Escherichia coli* ATCC 25922를 Tryptic Soy Agar (TSA)에  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 배양하여 준비하였다. 혈청은 gelatin veronal buffer (GVB<sup>2+</sup>)에 1:4로 희석하였으며, *E. coli*는 멸균 생리식염수를 이용하여 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 맞춘 후 혈청 희석액과 1:1로 혼합하였다. 이 혼합액을  $25^{\circ}\text{C}$ 로 교반 배양기에서 반응시키면서 0, 1, 3, 6시간 경과할 때마다 단계 희석하여 Miles and Misra (1938)에 따라 생균수를 계수하였다.

#### 뱀장어 두신 식세포의 활성 산소 생성능 측정

##### 1) 식세포의 준비

각 시험구 별로 6마리씩 임의로 잡아낸 시험어를 대상으로 뱀장어를 꼬리 절단법으로 채혈하여 가능한 한 순환 혈액을 제거한 후 해부하여 두신을 무균적으로 조심스럽게 분리한 후 2마리씩 pooling하여 준비하였다. 이것을 10 U/ml heparin, 1% penicillin/streptomycin, 2% fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 L-15 (pH 7.4)를 1 ml 분주한 petridish에 넣고, 마쇄하여 nylon mesh에 통과시켜 세포 현탁액을 준비하였다. 이 현탁액을 34% 및 51% percoll에 중층한 후,  $500 \times g$ , 30min간  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 원심 분리하여 백혈구를 분리하였다. 분리한 세포는 0.1% fetal bovine serum이 첨가된 L-15 medium (pH 7.4)을 이용하여 2회 세척한 다음 0.2% trypan blue에서 viability를 관찰한 후,  $1 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 조정하여 96-well cell culture plate에 각 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 다음  $20^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 부착시켰다. 부착시킨 후 각 well 내의 상정액을 제거하여 식세포로 사용하였다.

##### 2) 자극물의 조제

Zymosan 0.02 g에 FBS 1 ml를 첨가하여 20°C, 30분간 반응시켰다. 반응시킨 zymosan을 2,000 rpm에 10분간 원심 분리하여 상정액을 제거하였다. 감작시킨 zymosan을 L-15 medium으로 세척한 후 상정액을 버리고 1 mg NBT(nitroblue tetrazolium)/L-15 medium ml로 조정된 NBT 용액을 넣어 총 10 ml가 되게 하였다.

### 3) NBT 환원 시험

NBT 환원 실험은 식세포가 부착된 cell culture plate의 각 well에 흡소닌화 시킨 zymosan이 첨가된 NBT 용액을 100  $\mu$ l씩 첨가하여 20°C, 30분 동안 반응시켰다. 반응시킨 후 상정액을 버리고 L-15 medium으로 세척한 다음 100% methanol로 고정시켰다. 고정된 세포를 70% methanol로 세척한 후 건조시킨 다음 각 well에 2M KOH 용액 120  $\mu$ l와 dimethyl sulphoxide (DMSO) 용액 140  $\mu$ l를 첨가한 후 O.D. 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 zymosan이 첨가되지 않은 NBT 용액으로 처리된 식세포의 값을 사용하였다. NBT 환원 값은 zymosan을 첨가한 시료의 흡광도 측정치에서 첨가하지 않은 시료의 흡광도 측정치를 뺀 값을 사용하였다.

### 세균 공격 시험

Yeast  $\beta$ -glucan 첨가 사료 투여가 뱀장어의 방어능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 병든 뱀장어에서 분리한 *Edwardsiella tarda* 균으로 공격 시험을 하였다. 시험 균주는 TSA 배지에서 27°C, 24시간 배양한 후 집균하여 멸균 생리 식염수로

$1 \times 10^8$  cfu/ml이 되도록 조절하여 0.1 ml 씩 복강 주사하였으며, 각 시험구 당 20마리씩 시행하였다. 결과는 상대 생존율로 나타내었다.

$$\text{상대생존율} = \left(1 - \frac{\text{Yeast } \beta\text{-glucan 시험구의 폐사율}}{\text{대조구의 폐사율}}\right) \times 100$$

### 통계학적 분석

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

## 결 과

### 성장률 측정

Yeast  $\beta$ -glucan 0.5% 첨가 사료 시험구에서 대조구와 비교하여 유의적으로 높은 증체율을 나타내었으며, 0.1%와 0.5% 첨가 사료 시험구 간에는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 요컨대 0.5% 첨가 시험구에서 대조구에 비해 높은 성장률을 나타내는 것을 알 수 있었다 (Table 1).

### 혈청 내 lysozyme의 용균 활성 조사

Yeast  $\beta$ -glucan을 각 0.1% 및 0.5% 첨가시킨 사료를 6주간 투여하면서 어류의 비특이적인 체액성 면역의 일종인 혈청 내 lysozyme의 활성을 측정하였다. 그 결과 0.1% yeast  $\beta$ -glucan을 첨가한 사료를 투여한 시험구에서 시험 기간 중 가장 높은 용균 활성을 나타내었다. 4 주째까지 증가하다가 감소하는 경향을 나타내었고 모든 구

**Table 1.** Body weight gain of Japanese eel, *Anguilla japonica*, fed a commercial diet supplemented with various amount of yeast  $\beta$ -glucan for 6 weeks.

Diet	Weingt gain (%)
Control	15.02 $\pm$ 3.05
0.1% yeast $\beta$ -glucan supplemented feed	19.55 $\pm$ 6.83
0.5% yeast $\beta$ -glucan supplemented feed	23.75 $\pm$ 5.43*

\*, significant difference from control,  $P < 0.05$ .

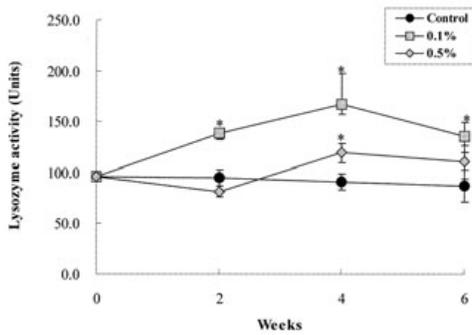


Fig. 1. Changes of lysozyme activity in the serum from Japanese eel, *Anguilla japonica*, fed with yeast  $\beta$ -glucan supplemented diet for 6 weeks.

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

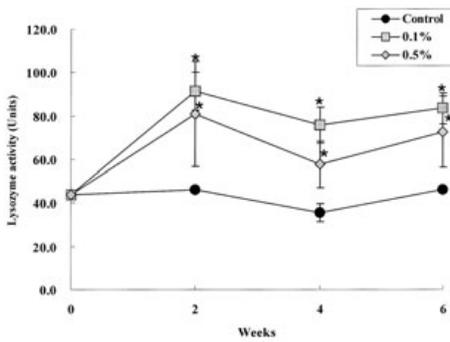


Fig. 2. Changes of lysozyme activity in the skin mucous from Japanese eel, *Anguilla japonica*, fed with yeast  $\beta$ -glucan supplemented diet for 6 weeks.

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

간에 걸쳐 대조구에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 0.5% yeast  $\beta$ -glucan을 첨가한 사료를 투여한 시험구에서도 4 주째부터 대조구보다 높은 용균활성을 나타내었다. 2 주째와 4 주째에는 시험구 사이에도 유의적인 차이를 나타내었고 0.1%가 높은 활성을 나타내었다 (Fig. 1).

### 체표 점액 중 lysozyme의 용균 활성 조사

yeast  $\beta$ -glucan을 각 0.1% 및 0.5% 첨가시킨 사료를 6 주간 투여하면서 어류의 비특이적인 체액성 면역의 일종인 체표 점액 lysozyme의 활성

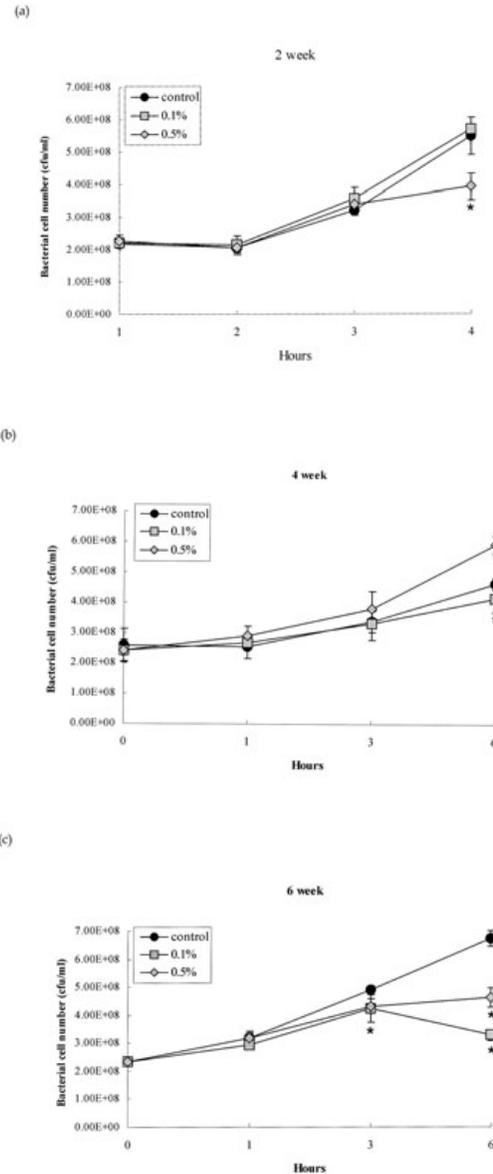


Fig. 3. Bactericidal reaction of serum against *E. coli* in Japanese eel, *Anguilla japonica*, fed a commercial diet supplemented with yeast  $\beta$ -glucan supplemented diet for 6 weeks. (a) 2 week, (b) 4 week and (c) 6 week.

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

을 측정하였다. 그 결과 0.1% yeast  $\beta$ -glucan을 첨가한 사료를 투여한 시험구에서 시험 기간 중 가장 높은 용균 활성을 나타내었다. 시험 기간 내내 대조구 보다 유의적으로 높게 나타났고, 0.5% yeast  $\beta$ -glucan을 첨가한 사료를 투여한 시

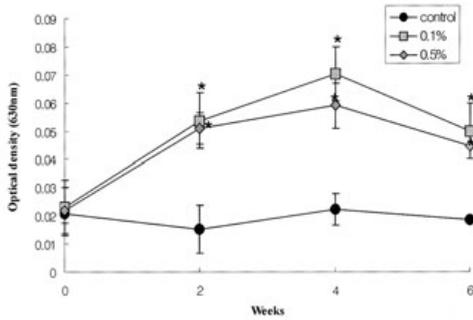


Fig. 4. NBT reduction of phagocytes in the head kidney of the Japanese eel, *Anguilla japonica*, fed a commercial diet with various amount of yeast  $\beta$ -glucan for 6 weeks.

험구에서도 0.1% 보다는 낮고 대조구 보다 높은 수준의 점액 lysozyme 용균 활성을 나타내었다 (Fig. 2). 4주째에는 시험구 사이에서도 유의적인 차이를 나타내었다.

#### 혈청의 살균능 조사

Yeast  $\beta$ -glucan 0.1% 첨가 사료 시험구에서는 4주, 6주째에 그리고 0.5% 첨가 사료 시험구에서 2, 6주째에 대조구 보다 유의적으로 높은 혈청 살균능을 나타내었다. 6주째에는 0.1% 와 0.5% 두 시험구 모두에서 대조구보다 높은 활성을 나타내었으며, 0.1% 첨가 사료 시험구에서 가장 높은 활성이 나타났다 (Fig. 3).

#### 식세포의 활성 산소 생성 반응에 대한 시험

Yeast  $\beta$ -glucan 첨가 사료를 6주간 연속 투여하면서 백장어의 비특이적 세포성 면역을 담당하는 식세포의 활성 산소를 측정하였다. 그 결과, 0.1% 와 0.5% 두 시험구 모두에서 시험 전 구간에 걸쳐 대조구보다 유의적으로 높은 활성을 유지 하였으며, 4주째 0.1%에서 가장 높은 활성을 나타내었고, 이 활성은 6주째까지 유지 되었다 (Fig. 4).

#### 세균 공격 시험

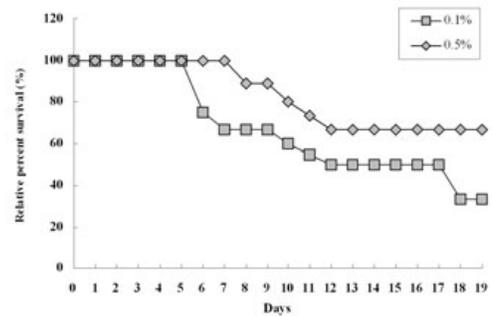


Fig. 5. Relative percent survival (RPS) of the Japanese eel, *Anguilla japonica*, challenged intraperitoneally with *Edwardsiella tarda* ( $1 \times 10^7$  cells/fish) after administration of yeast  $\beta$ -glucan supplemented diet for 6 weeks.

Yeast  $\beta$ -glucan 첨가 사료를 6주간 투여한 다음 *E. tarda*에 대한 방어능을 조사하기 위하여 상대 생존율을 조사하였다. Yeast  $\beta$ -glucan 0.5% 첨가 시험구에서 상대 생존율 67%로 높은 방어력을 나타내었으며, 0.1% 첨가 시험구에서 상대 생존율 33%로 상대적으로 낮은 방어력을 나타내었다.

## 고 찰

본 연구에서 yeast  $\beta$ -glucan 첨가 사료를 투여한 시험구의 성장이 대조구에 비해 높게 나타났다. 특히 0.5% 첨가 사료를 6주간 연속 투여한 시험구에서는 대조구에 비해 유의적으로 높은 성장률을 나타내었고 성장이 가장 좋은 것으로 나타났다. Won *et al.* (2004)은 넙치에 yeast 유래의  $\beta$ -1,3/1,6-linked glucan을 첨가한 사료를 7주간 연속 투여한 시험구와 격주로 투여한 시험구에서 각 0.05%와 0.1% 첨가 투여 시험구에서 대조구에 비해 유의적으로 높은 성장률을 나타내었다고 보고 하였다. 이들 실험과 본 실험은 시험 양식 대상 생물과 첨가 물질의 차이가 있어 직접적인 비교는 어려우나 적정 농도의 yeast  $\beta$ -glucan 첨가 사료의 투여가 백장어의 성장에도 큰 도움이 되는 것으로 사료된다.

Yeast  $\beta$ -glucan 첨가 사료의 투여가 백장어의 비특이적 면역 반응에 미치는 효과를 조사한 결

과, 체액성 면역의 지표인 혈청 내 lysozyme, 점액 내 lysozyme 및 두신 식세포의 활성 산소 생성능을 모두 향상 시키는 것으로 나타났다. 먼저 lysozyme의 활성을 조사한 결과 4 주째에 최대치를 나타내었고 6주째에 다시 감소하는 경향을 나타내었다. 박 등. (2001)의 넙치와 잉어에 0.1%  $\beta$ -glucan을 첨가하여 2주 투여 - 1주 대조 사료 투여 - 다시 2주 투여한 시험 결과, 잉어에서는 투여 기간 내 지속적으로 lysozyme의 활성이 증가된 상태로 유지되었고 대조 사료 투여시 감소하였다가 첨가 사료 투여시 다시 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 넙치의 경우에는 잉어와는 달리 투여, 비투여에 대한 즉각적인 반응이 나타나지 않았고, 시험 기간 내 대조구 보다는 조금 높게 유지되는 것으로 보고하였으나, Won *et al.* (2004)은 넙치에서도  $\beta$ -1,3/1,6-linked glucan의 첨가 사료 투여가 lysozyme의 활성을 최대 7배 이상 증가시키는 것으로 나타나 상이한 결과를 보고하였다. 연어과 어류에서 glucan 첨가 사료를 투여하여 lysozyme의 활성을 측정하는 연구는 거의 없으나, 복강 주사한 경우 Atlantic salmon (Engstad *et al.*, 1992)과 rainbow trout (Thompson *et al.*, 1995)의 lysozyme의 활성을 증가시켰다는 보고가 있었다. 본 연구의 결과, 잉어의 혈청 내 lysozyme의 활성을 자극하였다는 박 등. (2001)의 이전 연구와 유사하게 yeast  $\beta$ -glucan 첨가 사료를 투여한 뱀장어에서 혈청 내 lysozyme의 활성이 확인되었다. Glucan 첨가 사료가 점액 내 lysozyme의 활성에 영향을 미치는지에 대해 연구된 바가 거의 없었으나, yeast  $\beta$ -glucan 첨가 투여구의 점액 내 lysozyme 활성 증가는 피하 조직 내의 식세포가 분비하는 것으로 밝혀져 있는 lysozyme의 생성량의 증가로 추측되나 실제로 식세포의 수가 증가된 것인지 식세포에 의해서 생성된 lysozyme의 절대량이 증가한 것인지에 대해서는 본 연구에서 밝히지 못 하였으나, Robertsen *et al.* (1994)는 lysozyme의 활성도가 식작용 및 두신 백혈구의 ROIs 생성과 상응하여 일어난다고 보고 하였으며 이는 본 연구에서 나타

난 두신 식세포의 활성 산소 생성능의 증가와 일치하는 결과라 할 수 있겠다. 혈청의 살균능 시험 결과 2 주째에는 0.5% 첨가 시험구, 4 주째에는 0.1% 첨가 시험구 및 6 주째에는 0.1%와 0.5% 첨가 시험구에서 유의적으로 높은 혈청의 살균능을 나타내어 뱀장어의 방어에 관여할 것으로 사료된다. 두신 식세포의 살균 작용의 지표로 잘 알려져 있는 활성 산소의 활성에 관하여 조사한 결과, 모든 yeast  $\beta$ -glucan 첨가 시험구에서 유의적으로 높은 식세포 활성을 나타내었다.  $\beta$ -glucan을 첨가한 사료를 투여한 catfish (Yoshida *et al.*, 1995)에서 NBT 환원량의 증가를 보고하였고,  $\beta$ -glucan을 주사한 Atlantic salmon (Jørgensen *et al.*, 1993)에서 2 주째에 NBT 환원량이 증가하다가 3 주째에 대조구 수준으로 다시 감소하는 결과를 보고하였으며,  $\beta$ -glucan을 200 ug/ml 첨가한 배지에서 배양한 Atlantic salmon (Jørgensen *et al.*, 1995)의 식세포가 가장 높은 NBT 환원량을 나타낸다고 보고하였다. 그러나 NBT 환원량과 병원체에 대한 방어능의 직접적인 상관 관계를 보고한 연구는 드물지만 Won *et al.* (2004)는 0.1%, 0.05%의  $\beta$ -1,3/1,6-linked glucan 첨가 사료를 7 주간 투여한 넙치 시험에서도 대조구 보다 높은 NBT 환원량을 나타내고, 0.5% 첨가 사료에서 NBT의 환원량의 증가는 약하였으나, *E. tarda*에 대한 방어능이 증가하는 것으로 보고하였지만 NBT 환원량과 방어능의 비례 관계는 나타나지 않았다. 본 연구에서도 이들 연구와 유사하게 시험 기간동안 유의적으로 높은 수준의 NBT 환원량을 나타내는 것으로 밝혀져 뱀장어의 두신 식세포의 살균 작용이 증가 되어 방어능도 높일 것으로 사료된다.

0.1% yeast  $\beta$ -glucan 첨가 시험구에서 상대 생존율이 67%로 가장 높게 나타났고 0.5% 첨가 시험구에서는 33%의 상대 생존율을 나타내어 대조구와 큰 차이를 나타내지 않았다. 박 등. (2001)은 0.1%  $\beta$ -glucan을 투여한 넙치와 잉어를 *E. tarda*와 *Aeromonas hydrophila*로 공격 시험한 결과 각각  $10^5$  cells/fish과  $10^6$  cells/fish에서 높

은 생존율을 나타내었고, 시험어의 크기에 따라 방어능에 차이가 나타났고, 공격 시험 농도가 이보다 높은 경우에는 대조구와 비교해 차이가 없는 것으로 보고하였다. 또한 Won *et al.* (2004)은 0.5%  $\beta$ -1,3/1,6-linked glucan 첨가 사료를 7주간 투여한 넙치를  $4 \times 10^6$  cells/fish의 *E. tarda*로 공격 시험한 결과 50%의 상대 생존율을 나타낸다고 보고하여 본 연구의 결과도 위의 두 연구의 결과와 유사하게 나타났지만, 첨가 물질의 성분, 첨가량 및 시험 어종 등에 차이가 있어 직접적인 비교를 하기는 곤란하나 성장률과 비특이적 면역 반응을 증가시키고 방어능도 가장 우수한 0.1% yeast  $\beta$ -glucan 첨가가 뱀장어의 성장과 질병 저항성 증가에 도움에 될 것으로 사료된다.

## 요 약

Yeast  $\beta$ -glucan 첨가 사료가 뱀장어의 성장을, 비특이적 면역 반응 및 방어능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 뱀장어에 yeast  $\beta$ -glucan 0.1% 및 0.5% 첨가 사료를 시험구로 비첨가 사료를 대조구로 나누어 6주간 공급하면서 성장, 점액 내 lysozyme과 혈청 내 lysozyme의 용균 활성, 혈청의 살균능 및 식세포 활성 산소의 생성능 같은 비특이적 면역에 관여하는 인자와 *Edwardsiella tarda* 균의 공격 실험에 대한 방어능을 조사하였다. Yeast glucan 첨가 사료의 투여가 뱀장어의 증체율을 높여 성장에 도움이 되는 것으로 나타났는데 0.1% 보다는 0.5%가 유의적으로 높은 성장을 나타내었다.

비특이적 면역 반응에 미치는 영향을 조사하기 위해 혈청 내 lysozyme과 점액 내 lysozyme 활성을 측정된 결과, 0.1% 첨가 시험구의 혈청 내 lysozyme의 활성이 2주째에 대조구 보다 낮은 것을 제외하고는 2, 4 및 6주째에 0.1%와 0.5% 첨가 시험구 모두에서 유의적으로 높은 활성을 나타내었다. 0.5% 보다는 0.1% 첨가 시험구에서 활성이 더 높게 나타났다. 혈청의 살균능은 6주째에 0.1%와 0.5% 투여구에서 대조구에 비

해 유의적으로 높은 활성을 나타내었다. NBT를 이용한 세포내 활성 산소의 생성능의 측정 결과 2, 4 및 6주째 모두에서 대조구 보다 유의적으로 높은 활성을 나타내었다. 마지막으로 yeast  $\beta$ -glucan 첨가 사료를 투여한 뱀장어의 방어력을 *Edwardsiella tarda* ( $1 \times 10^7$  cells/fish) 균의 공격 시험으로 알아본 결과, 0.1% 첨가 시험구에서 67%의 높은 상대 생존율을 나타내었다.

성장, 비특이적 면역 반응 및 공격 시험에 대한 방어력을 종합해 보면 yeast  $\beta$ -glucan 0.1% 첨가가 가장 효과적일 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 국립수산과학원 연구비 지원 사업에 의해 일부 수행되었음을 밝힙니다.

## 참 고 문 헌

- Baulny, M.O.D., Quentel, C., Fournier, V., Lamour, F. and Gouvello, R.L. (1996) : Effect of long-term oral administration of  $\beta$ -glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. Dis. Aquat. Org., 26 : 139-147.
- Brattgjerd, S., Evensen, O. and Lauve, A. (1994) : Effect of injected yeast glucan on the activity of macrophages in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., as evaluated by in vitro hydrogen peroxide production and phagocytic capacity. Immunol., 83 : 288-294.
- Chen, D. and Ainsworth, A.J. (1992) : Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafineque. J. Fish Dis., 15 : 295-304.
- Di Luzio, N.R. (1983) : Immunopharmacology of glucan : a broad spectrum enhancer of host

- defence mechanisms. Trends Pharmacol. Sci., 4 : 344-347.
- Duncan, P.L. and Klesius, P.H. (1996) : Dietary immunostimulants enhance nonspecific immune responses in channel catfish but not resistance to *Edwardsiella ictaluri*. J. Aquat. Anim. Health 8 : 241-248.
- Engstad R.E., Robertsen B., Frivold E. (1992) : Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish Shellfish Immunol., 2 : 287-297.
- Jørgensen, J.B. and Robertsen, B. (1995) : Yeast  $\beta$ -glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. Dev. Comp. Immunol., 19 : 43-57.
- Jørgensen, J.B., Sharp, G.J.E., Secombes, C.J. and Robertsen, B. (1993) : Effect of a yeast-cell wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. Fish Shellfish Immunol., 3 : 267-277.
- Matsuyama, H., Magindaan, R.E.P. and Yano, T. (1992) : Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). Aquaculture, 101 : 197-203.
- Miles, A.A. and Misra S.S. (1938) : The estimate of the bacterial power of the blood. J. Hygiene, 38 : 873-885.
- Parry, R.M., Chandau, R.C. and Shahani, R.M. (1965) : A rapid and sensitive assay of muramidase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 119 : 384-386.
- Robertsen, B., Engstad, R.E. and Jørgensen, J.B. (1994) :  $\beta$ -glucans as immunostimulants. In Modulators of Fish Immune Response, Stolen, S.J. and Fletcher, T.C. SOS Publication, Fair Haven, vol. 1 : 83-99.
- Robertsen, B., Rørstad, G., Engstad, R. and Raa, J. (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.
- Samuel, M., Lam, T.J. and Sin, Y.M. (1996) : Effect of laminaran[ $\beta$ (1,3)-D-Gulcan] on the protective immunity of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* against *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immunol., 6 : 443-454.
- Takahashi, Y, Itami, T. and Konegawa K. (1986) : Enzymatic properties of partially lysozyme from the skin mucus of carp. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 52 : 1209-1214.
- Thompson, K.D., Cachos, A. and Inglis, V. (1995) : Immunomodulating effects of glucans and oxytetracycline in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, on serum lysozyme and protection. In: Shariff, M., Subasighe, R.P. and Arthur, J.R. Eds., Diseases in Asian Aquaculture Vol. 11. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 433-439.
- Yoshida, T., Kruger, R. and Inglis, V. (1995) : Augmentation of non-specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell., by the long-term oral administration of immunostimulants. J. Fish Dis., 18 : 195-198.
- Yoshida, T., Sakai, M., Kitao, T., Khilil, S.M., Araki, S., Saitoh, R. Ineno, T. and Inglis, V. (1993) : Immunomodulatory effects of the fermented products of chicken egg, EF203, on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 109 : 207-214.
- 김진우, 박수일, 전세규 (1992) : 양식넙치로 부터의 lysozyme 정제와 어류 병원성 세균에

대한 정균작용. 한국어병학회지, 5: 87-92.

박성우, 관중기, 구재근, 조만기 (2001) : 경구투여  $\beta$ -glucan이 잉어와 넙치의 비특이적 면역 활성화에 미치는 영향. 한국어병학회지, 14 : 412-418.

원경미, 김수미, 박수일 (2004) :  $\beta$ -1,3/1,6-linked glucan 첨가사료가 넙치의 비특이적 면역 반응에 미치는 영향. 한국어병학회지, 17 :

29-38.

유병화, 박수일, 전세규 (1992) : 어류혈청의 보체에 의한 살균작용. 한국어병학회지, 5 : 9-18.

---

Manuscript Received : October 10, 2008

Revision Accepted : December 17, 2008

Responsible Editorial Member : Kitamura, Shin-Ichi  
(Ehime University, Japan)