

한약재 추출물에 배양된 유산균 배양액이 양식어류의 사료첨가제로서 성장과 비 특이적 면역에 미치는 영향

전봉근 · 김만철 · 김영후¹ · 허문수*

제주대학교 해양과학대학 수산생명의학과, ¹(주)제주축산연구소

Received October 14, 2008 / Accepted January 8, 2009

Effects of the Culture Broth of Lactic Acid Bacteria Cultured in Herb Extracts on Growth Promotion and Nonspecific Immune Responses of Aquacultured Fish. Bong-Kun Jhon, Man-Chul Kim, Young-Hoo Kim¹ and Moon-Soo Heo*. *Department of Aquatic Life Medicine, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea, ¹Jewoo corporation LTD., 944-2 Hwabuk 2dong, Jeju 690-062, Korea* - We have investigated the effects of the culture broth of lactic acid bacteria (LAB) cultured in herb extract on growth, hematological parameter, nonspecific immune responses and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*) for 12 weeks. Weight gain of olive flounder fed diet with mixture was not significant among the control group. But In parrot fish, was significantly higher 20g than control group. The feed efficiency of olive flounder were 25% higher in the experimental groups than in the control. There were no significant differences in feed efficiency among each group on parrot fish. Treatment of olive flounder contents of GOT and GPT in serum decreased after 8 weeks. But there were no significant differences in GLU and TP among each group. Also, there was no significant of NBT reduction. The activities of lysozyme were higher in experimental group of olive flounder than in the control after 8 weeks. On the other hand, activities of lysozyme were triple higher in the experimental group of parrot fish than in the control after 12 weeks. In the olive flounder case, the survival rate (%) after an artificial challenge with 10⁷ CFU/ml of *Vibrio anguillarum* and *Streptococcus iniae* per fish, was 18% higher in the experimental groups than the control. The higher survival rate of parrot fish were 17% and 16% in the experimental groups than the control respectively.

Key words : Lactic acid bacteria, herb extracts, non-specific immune, *Paralichthys olivaceus*, *Oplegnathus fasciatus*

서 론

현재 우리나라 해산어류 양식은 1970년대부터 각종 어류에 대한 양식기술이 개발되면서 어종별 양식 생산량은 지금 까지 약 250%의 증가를 보이고 있으며, 2003년 기준으로 어류양식 생산량은 72,393톤에 달하며 국민의 단백질 식량산업으로 자리를 굳히고 있다[16]. 일본 중국 등과 함께 최근에는 미국을 비롯한 유럽 등지의 선진국에서도 성인병의 예방방지를 위한 식생활 개선을 위하여 육상동물보다 어류단백질의 우수성이 인정되는 어류양식 생산량이 급증하고 있어 국제사회의 경쟁이 날로 심각해지고 있다. 또한 우리나라의 식생활 패턴과 삼면이 바다인 우리나라의 입지적 여건으로 보아 수산물 생산에 있어 수요가 공급을 초과하고 있는 실정이다. 그러나 생산량을 높이기 위한 양식장의 밀식과 열악한 사육수 등은 양식어류의 항병력을 약화시켜 어류질병이 빈번히 나타나며 치료나 예방이 힘든 실정이기 때문에 이에 따

른 경제적 손실이 높아지고 있다[15].

현재 해산어류 양식장에서 발생하는 질병에 대한 예방 및 치료방법에는 항생제요법이 가장 많이 이루어지고 있으나, 항생제의 오남용으로 인한 내성균의 출현[21] 과 체내잔류[8] 및 주변의 수질 오염 등의 문제로 인해서 항생제의 사용은 한계에 이르고 있다.

이에 대한 대처방안으로 백신요법이 사용되고 있는데 양식어류는 군집을 대상으로 투여하고 면역력이 약한 치어를 대상으로 사용하기 때문에 백신투여가 번거로우며 스트레스를 유발시킨다. 또한 세균성 질병의 복합적인 감염에 따른 효과적인 백신의 개발이 없어 질병 예방을 위한 대책으로서 한계에 와 있다고 할 수 있다. 따라서 기존의 문제점에 대한 대책으로 식물 자원의 유용 물질 및 유산균을 이용한 Probiotics 를 양어사료에 첨가한 친환경적인 요법에 관심과 연구가 최근 많아지고 있다.

본 연구의 실험 재료로 사용된 탐라오가피(*Acanthopanax koreanum*)는 제주도에서만 자생하는 식물로 다른 지역에서 재배되는 오가피보다 그 유용성분이 많이 함유되어있다[7]. 또한 수확기간이 짧고 재배관리가 쉬워 새로운 소득작물로 재배면적이 늘어나고 있다. 하지만 현재 수요가 없어 어려움

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3473, Fax : +82-64-756-3493

E-mail : msheo@cheju.ac.kr

을 겪고 있기 때문에 양식어류의 사료첨가제의 원료로 사용하여 효능을 입증하면 이 문제점을 해결할 수 있다고 생각하며 탐라오가피를 주원료로 한 사료첨가제의 연구가 이루어지지 않았기 때문에 이용 가능성이 높다고 할 수 있다.

본 실험의 한약재 추출물에 포함된 감초(*Glycyrrhiza vralensis*)는 사료첨가제로 이용하여 그 효과를 조사한 바 있다. 감초의 triterpenoid saponin 계의 일종인 glycyrrhizin은 사료첨가제로 이용하여 어류의 성장과 질병 저항성을 향상시키며, 특히 넙치에 있어 한약재를 혼합한 시판용 사료첨가제는 어체의 성장 및 생리적 활성 증강 등의 효과 있음을 보고한 바 있다[11].

본 연구에서는 생균제로서 이용을 하고 있는 유산균 3종을 한약재 추출물에 배양한 후, 배양액을 첨가한 넙치와 돌돔 사료가 어류의 성장, 혈액학적 정상, 비 특이적 면역반응 및 어병 세균의 공격실험에 따른 생존율을 조사하여 사료첨가제로서의 효용성을 확인한 후, 그 이용 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

실험어 사육 관리

제주도 조천읍 함덕리에 위치한 제주대 해양과환경연구소에서 넙치를 분양받았으며, 구좌읍에 위치한 해연수산에서 돌돔을 분양받았다. 실험어는 함덕리에 위치한 해양과환경연구소로 운반하였으며, 환경에 적응시키기 위해 2주일 동안 기초사료를 공급하였다. 넙치의 평균무게는 163±5.8 g, 돌돔은 140±5.6 g이었으며, 1,000 l 원형수조에 각 대조구 및 실험구를 70마리씩 2반복으로 배치하였다. 실험기간 동안 수온은 11.8-21°C, 염분은 33.64-35.01‰, pH는 7.97-8.45, DO는 6.78-9.26 이었다. 실험사료는 1일 2회 어체중의 2%씩 총 12주간 공급하였다.

실험사료 및 투여 방법

실험사료는 시판하고 있는 넙치용 배합사료(조단백질 52%, 조지방 11%, 조섬유 3%, 조회분 14%, 인 2.7%, 칼슘 1.5%, Suhyup Co, KOREA)와 돌돔용 배합사료(조단백질 45%, 조지방 16%, 조섬유 3%, 조회분 17%, 인 2.7%, 칼슘 1.5%, Suhyup Co, KOREA)를 사용하였다. 사료에 첨가된 한약재와 유산균은 Table 1에 나타내었다. 한약재와 증류수가 1:5의 비율로 열수추출을 하여 한약재 추출물을 조제하고 MRS (Difco, USA) 배지를 이용하여 유산균을 각각 배양한 뒤 한약재 추출물에 각각 2%씩 첨가한 후, 30°C에서 48시간 발효 배양하여 생균수를 단계희석법을 통해 조사하였다. 그 결과 *L. acidophilus* 4.2×10⁸, *L. brevis* 6.0×10⁸, *L. plantarum*이 2.2×10⁸ CFU/ml로 나타났다. 사료의 제작은 한약재와 유산균의 혼합물을 10% 사료에 첨가하여 발효용기(150 l)에 담아 밀봉하여 30°C에서 24시간 방치한 후, 4°C 냉장보관 하면서

Table 1. Composition of feed additives

Materials		Ingredients (% weight)
Extracts	<i>Acanthopanax koreanum</i> stem	32.7
	<i>Acanthopanax koreanum</i> root	8.1
	<i>Glycyrrhiza vralensis</i>	27.2
	<i>Panax ginseng</i>	13.6
	<i>Opunita ficusindica</i>	6.8
	Molasses	10.2
Chitooligosaccharides		1.4
Strains		Number
Bacteria	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	KCCM 40265
	<i>Lactobacillus brevis</i>	KCCM 11904
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KCCM 11322

사용하였다. 대조구인 사료에는 한약재와 유산균이 첨가하지 않은 시중에서 판매되는 사료(Suhyup Co, KOREA)를 사용하였다. 사료의 투여는 매일 2회(9 AM and 6 PM) 12주 동안 어체중의 2%를 투여하였다.

성장도 조사 및 혈액 성분 분석

실험어의 성장도 조사와 체형은 2주 간격으로 실시하였으며, 측정 24시간 전에 절식시킨 후 2-phenoxyethanol (Sigma, USA)로 마취시켜 측정하였다. 성장도 조사방법은 각 실험구에서 무작위로 20마리를 선발하여 실험어의 무게를 측정하여 평균을 내었다.

성장도 조사와 함께 혈액성분 분석을 위하여 실험어를 체혈하기 24시간 전 동안 절식시켰으며, 각 수조당 3마리씩 무작위로 선발하여 미부에서 혈액을 채혈한 후, 항응고제가 처리되지 않은 원심 분리관에 넣고 실온에 30분간 방치 후에 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 분석하였다. 혈청성분은 자동 혈액 분석 장치(Ch100 plus, Deawang meditec., KOREA)를 사용하여 Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), Glutamic pyruvic transaminase (GPT), Total protein, Glucose를 측정하였다.

어류 식세포의 활성산소 측정

어류 식세포 작용을 알아보기 위하여 respiratory burst activity를 Anderson과 Siwicki [1] 실험법에 따라 분석하였다. 실험어의 미부에서 채취한 전혈을 1.5 ml 마이크로튜브에 넣고 0.2% Nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma)를 전혈과 1:1로 되게하여 30분간 상온에서 반응시킨 후, 1 ml dimethylformamide를 넣고 반응을 정지시킨다. 그런 다음 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후 상층액을 수거하여 540 nm에서 micro-reader (Packard Spectrocount™)로 흡광도 값을 측정한다. Blank는 dimethylformamide로 하고, 대조구는 NBT 시약을 사용하였다.

혈청의 Lysozyme 활성 측정

혈청의 Lysozyme 활성 측정은 Kumari와 Sahoo [10]에 따라서 분석하였다. Lysozyme 활성을 측정하기 위해 각각의 실험구 미부에서 채혈한 혈액의 혈청 50 μ l와 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.2)에 *Micrococcus lysodeikticus* (0.2 mg/mL)를 부유시킨 solution 1 ml을 96 well plate에 혼합시킨다. 20°C 조건에서 micro-reader를 이용하여 530 nm에서 0.5분과 4.5분에 흡광도를 측정하였다. Lysozyme의 활성 단위는 분당 0.001의 흡광도 감소를 나타내는 효소의 양으로 정의하였다.

인위감염에 의한 생존율

사료첨가제 투여가 넙치와 돌돔의 항병력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 현재 양식장에 발병 빈번도가 가장 높은 그람양성 세균인 *Streptococcus iniae* (KCTC 3657)와 그람음성 세균인 *Vibrio anguillarum* (KCTC 2711)을 이용하여 공격실험을 실시하였다. 균액은 10^7 CFU/ml의 농도가 되도록 멸균 생리식염수에 현탁한 후, 공격 실험용액으로 사용하였다.

공격실험은 사료투여 12주 후에 실시하였으며 대조구를 비롯하여 실험구에서 무작위로 30마리씩 선정하여 700 l 수조에 각각 배치하였다. 1 ml 주사기를 이용하여 각 마리당 200 μ l씩 복강 주사한 후, 10일 동안 누적 폐사율을 조사하였다.

결과 및 고찰

성장도 조사

사료의 한약제 추출물에 배양한 유산균 첨가구(실험구)와 비첨가구(대조구)를 양식넙치와 돌돔에 12주 투여한 후 체중 변화, 사료효율, 생존율에 대한 결과를 Table 2에 나타내었다. 넙치의 증중량은 대조구와 실험구가 비슷한 경향을 보였으나, 돌돔의 증중량은 실험구가 81.2 g으로 대조구보다 약 20 g 높은 성장을 나타냈다.

김 등[11]은 한약제를 넙치 사료에 첨가하여 한약제 첨가구가 대조구에 비해 일일 성장률이 4.8%, 사료효율이 13.6% 더 향상되었다는 보고가 있으며, 김 등[12]은 돌돔 사료에 지질과 한약제 첨가가 성장개선에 좋은 효과가 있다고 보고한 바 있다. 또한 어류성장에 미치는 유산균 첨가효과에 대해서는 변

등[12]이 *Lactobacillus sp.* DS-12라는 균원료를 넙치에 투여하여 넙치의 체중을 약 60% 증가시킨 보고와 백 등[12]은 Probiotics의 균주를 넙치에 50일 투여 결과 첨가구가 대조구에 대해 약 50% 정도의 증체율을 나타내었다고 보고하였다. 위의 보고와 같이 본 실험에 사용된 한약제와 유산균이 어체의 장내에 유익한 세균총을 형성하고 어류 질병 유발세균의 증식을 억제하여 성장촉진 효과를 나타낸 것이라 사료된다.

한편, 사료효율은 넙치의 경우 실험구가 대조구에 비해 20% 높았으며, 돌돔의 경우 유의적 차이가 없었다. 양식넙치 생존율은 대체적으로 낮은 경향을 보였으며, 그 중에서 한약제 첨가구가 더 낮은 생존율을 보였다. 이러한 이유는 사육장소의 수질이 파도가 높은 시기에 악화되는 현상을 보여 넙치 실험구의 수조 한 곳이 영향을 받아 개체가 사망하였기 때문이다. 어류질병 검사를 하여 보았으나 기생충 및 세균성 질병감염현상을 찾아 볼 수 없었다. 돌돔의 경우, 실험 4~10주 사이에 11~14°C의 저수온의 해수가 공급되어 낮은 사료효율을 보였다고 사료된다. 돌돔의 경우, 해수의 온도가 18°C 이상에서 활발하게 섭식하여 성장하는 고수온 어종으로[9], 사료효율이 낮은 이유는 저수온에 의한 스트레스 반응 때문일 것이라 사료된다.

혈액 성분 분석

한약제를 기질로 유산균을 배양한 배양액의 사료 첨가 투여가 넙치와 돌돔에 미치는 생리적 반응을 알아보기 위해 GPT, GOT, Total protein 그리고 Glucose 변화를 생리적 지표로 하여 혈액분석 결과를 Table 3, 4에 나타내었다.

일반적으로 GOT와 GPT는 혈장 전이 효소로 간손상을 감지할 수 있는 지표로 사용되고 있는데 정상적인 상태에서는 세포 내에서 발견되지만, 간세포 손상을 입었을 때, 세포가 파괴되면서 혈액으로 빠져나온다고 알려져 있다.[20].

그 결과 본 연구에서는 GOT와 GPT의 상관성을 나타내지 않았으며, 0~2주에 측정된 결과 값이 2~8주 사이에 증가하면서 비교적 높은 수치를 유지하다가 실험 종료 되는 12주의 측정값이 0~2주와 비슷한 측정결과로 감소하는 경향을 보였다.

혈액 내의 Total protein의 경우 대조구와 실험구간의 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이는 세포의 항상성을 유지하

Table 2. Effects of the culture broth of LAB cultured in herb extract on weight gain, feed efficiency and survival of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and parrot fish (*Opelegnathus fasciatus*)

Group		Initial weight (g)	Final weight (g)	Weight gain (g)	Feed efficiency*	Survival (%)
Olive flounder	Control	188.4±7.2	280.3±18.8	91.9	61.0±3.0	54.3
	Treatment	197.0±1.3	295.0±6.0	98.0	86.3±9.4	27.1
Parrot fish	Control	145.6±16.5	200.5±2.0	61.2	32.1±0.6	100.0
	Treatment	156.6±16.7	232.0±10	81.2	37.8±0.8	98.6

*, Feed efficiency: (weight gain/feed intake)×100

Table 3. Hematological changes of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and parrot fish (*Opelegnathus fasciatus*) fed with the LAB culture broth for 12 weeks

Weeks		GOT (U/l)		GPT (U/l)	
		Olive flounder	Parrot fish	Olive flounder	Parrot fish
0	Con	45±33	42.5±0.5	12±3	24.5±1.5
	Tre	4±1	24±0	21.5±12.5	37±6
2	Con	17±7	46.5±1.5	3.5±0.5	38.5±4.5
	Tre	32.5±15.5	61.5±0.5	29±11	22.5±1.5
4	Con	18±7	47±2	20.5±2.5	47±2
	Tre	22.5±1.5	55.5±3.5	33±4	55.5±3.5
6	Con	12.5±1.5	72.5±0.5	31±15	26±3
	Tre	19±2	65.5±0.5	32.5±3.5	25.5±3.5
8	Con	14.5±0.5	58.5±0.5	15±13	47.5±0.5
	Tre	12.5±0.5	34±1	11±9	39.5±2.5
10	Con	37±0	59.5±1.5	20±2	24.5±0.5
	Tre	11.5±1.5	37±13	1.5±0.5	33.5±0.5
12	Con	8.5±3.5	32.5±2.5	17.5±0.5	46±8
	Tre	8±0	29±1	8±2	60±1

Table 4. Hematological changes of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and parrot fish (*Opelegnathus fasciatus*) fed with the LAB culture broth for 12 weeks

Weeks		TP (g/dl)		GLU (mg/dl)	
		Olive flounder	Parrot fish	Olive flounder	Parrot fish
0	Con	4.4±0.1	4.35±0.05	23.5±0.5	96±7
	Tre	5.75±0.15	4.8±0.2	51±3	116.5±3.5
2	Con	5.1±0.8	5.6±0.2	84.5±2.5	177.5±6.5
	Tre	3.8±0.1	6.3±0.5	83.5±7.5	135.5±10.5
4	Con	5±0.2	5.35±0.25	92±4	108.5±2.5
	Tre	4.2±0.2	5.55±0.15	94±5	114±6
6	Con	6.95±3.35	6.3±0.2	65±35	145.5±10.5
	Tre	4.6±0.4	5.65±0.15	30±7	74.5±6.5
8	Con	4.0±0.1	4.4±1.1	28.5±2.5	80.0±0
	Tre	3.45±0.05	5.2±0.6	21.5±1.5	129.0±7
10	Con	3.6±0.2	5.3±0.1	18±0	91±1
	Tre	4.05±0.05	4.3±0.1	14±0	101.5±1.5
12	Con	4.25±0.05	5.65±0.15	22±1	106±10
	Tre	4.1±0.1	5.5±0.1	39±14	109±0

는 역할을 하고 있는 혈청 내 단백질의 농도 변화가 없다는 것으로 생리적으로 넙치와 돌돔의 부정적인 영향을 주지 않은 것으로 사료된다.

Glucose의 경우 외인성 화합물질과 같은 독성물질에 대하여 증가하는 경향을 나타내는데, 이것은 아드레날린의 과분비에 의해서 과혈당 조건을 유발할 수 있으며 체내 glycogen을 분해하여 혈장 glucose가 증가하게 된다[4].

본 실험에서 측정된 glucose의 함량은 돌돔의 경우, 대조

구와 비교하여 유의적인 차이와 시간에 따른 상관성은 보이지 않았으며, 넙치의 경우 2~6주에서 높은 농도를 나타내었지만 시간이 지남에 따라 서서히 줄어들어 0주와 비슷한 경향을 보였다.

혈액학적 분석을 종합하여 보면, 4개의 항목 모두 대조구와 실험구 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이는 본 실험에 사용된 사료첨가제가 간세포의 손상과 독성물질에 대한 반응을 나타내지 않는다고 사료되어진다. 한편, 돌돔의 glucose의 경우, 실험 기간에 높은 경향을 보였는데 수질악화와 저수온에 의한 스트레스 반응 때문이라고 사료되며, 이러한 glucose의 증가경향은 참돔을 이용한 수온변화 연구를 통하여 보고되고 있다[5].

어류식세포의 활성산소 측정

식세포의 활성산소 측정은 병원체 침입 등에 의해 자극된 전신 식세포의 활성산소(O₂)와 같은 산소라디칼(ROS)을 측정하는 시험으로 잘 알려진 NBT 환원법으로 식세포 활성을 측정하였다.

한약재를 기질로 유산균을 배양한 배양액의 사료 첨가 투여에 대한 식세포의 활성산소 측정 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 넙치의 경우, 대조구에서는 0~8주까지 유의적인 증가를 보이다가 10~12주는 감소현상을 보였으며 실험구에서는 8주까지 유의성을 나타내지 않았다가 10~12주에 대조구보다 조금 더 높은 활성을 나타내었다. 돌돔의 경우, 8주까지 대조구와 실험구의 활성이 비슷한 경향을 보이다가 10~12주에서 넙치의 측정치와 마찬가지로 대조구보다 실험구가 좀 더 높은 활성을 나타내었다. 이는 2~8주 사이에 사육지 수질악화에 따른 사료효율 감소와 스트레스로 인해 대조구와 실험구 간의 뚜렷한 식세포활성이 나타나지 않았다고 예상되어진다.

장 등[12]은 감초추출물을 rainbow trout에 투여하여 백혈구의 증식을 증가 시켰다는 보고가 있었으며, 구기자를 첨가한 틸라피아(*Oreochromis niloticus*)가 높은 NBT 활성을 보였다는 보고가 있다[14]. 또한 Nikoskelainen 등[12]은 rainbow trout에 *Lactobacillus rhamnosus*을 투여하여 식세포 활성 결과, 미첨가구보다 유산균 첨가구가 높은 활성을 보였다.

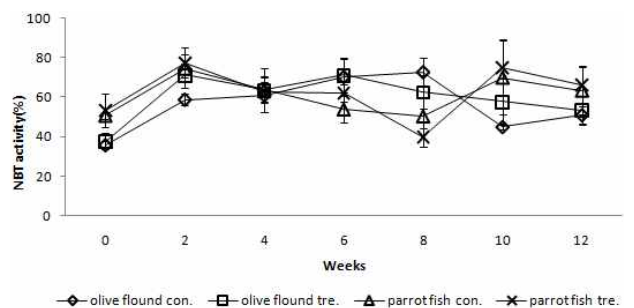


Fig. 1. Serum NBT activity of olive flounder and parrot fish fed with the LAB culture broth for 12 weeks.

혈청의 Lysozyme 활성 측정

Lysozyme은 세균벽의 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglucosamine 사이의 β-1,4 결합을 분해하여 세균을 사멸시키는 효소로 그람 양성균의 세포벽에는 직접작용하고, 그람 음성균에 대해서는 항체와 보체의 작용을 증가시켜준 후에 펩티도글리칸 층을 분해시키는 작용을 가지고 있으며, 이외에 항암, 항바이러스, opsonin 작용에 관여 한다.

넙치의 lysozyme 활성은 유의적인 차이는 보이지 않았지만, 2~6주 사이에 실험구가 낮아지는 경향을 보였지만, 8주부터 실험구가 더 높은 활성을 보였다. 돌돔의 경우, 실험종료 되던 12주에 돌돔 실험구의 활성이 250 U/ml 이었으며, 대조구는 80.3 U/ml를 나타내어 약 3배정도 실험구가 활성이 높음을 확인하였다(Fig. 2). 따라서 한약재를 기질로 배양한 유산균 첨가사료가 식균능을 나타내는 체액성 방어인자인 lysozyme 활성을 증가시키는 것으로 보아 면역기능 향상에 효과가 있을 것으로 생각된다.

Pirarat 등[12]은 틸라피아에 Probiotic 균주인 *Lactobacillus rhamnosus*를 사료에 첨가하여 *Edwardsiella tarda*를 복강에 주사한 결과 유산균 첨가구가 높은 lysozyme 활성을 나타내어 어병세균의 방어력을 증강시킨다고 보고하였다.

돌돔과 넙치의 lysozyme 활성을 비교해 보면, 실험이 종료되던 12주에 돌돔이 넙치보다 약 3배 높은 활성을 보였다. 비 특이적인 면역계 중 lysozyme은 담수어 및 해산어의 점액 및 혈중에 존재하는 성분으로 lysozyme 활성은 가자미 (*Pleuronectes platessa*), 농어류(*Linanda limnanda*)와 대서양연어(*Salmo salar*)에서 수온과 염분농도에 따라 활성이 다르다는 보고가 있어 사육환경 요소 및 어중에 따라 면역반응이 다르게 나타나는 것을 알 수 있다[22].

인위감염에 의한 생존율

한약재 추출물에 배양된 유산균 첨가사료를 투여한 실험구와 대조구의 어류질병 유발세균에 대한 공격실험의 결과를 Fig. 3, 4에 나타내었다.

넙치의 경우, *V. anguillarum*을 인위 감염 시켰을 때, 대조

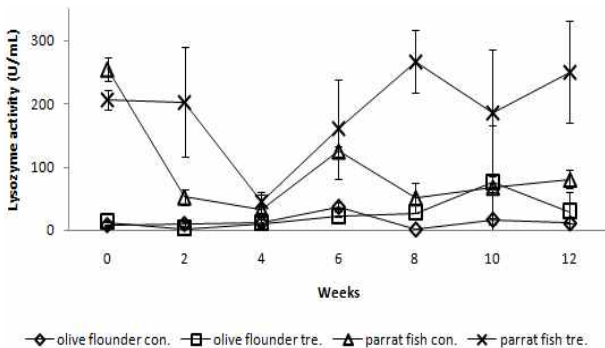


Fig. 2. Serum lysozyme activity of olive flounder and parrot fish fed with the LAB culture broth for 12 weeks.

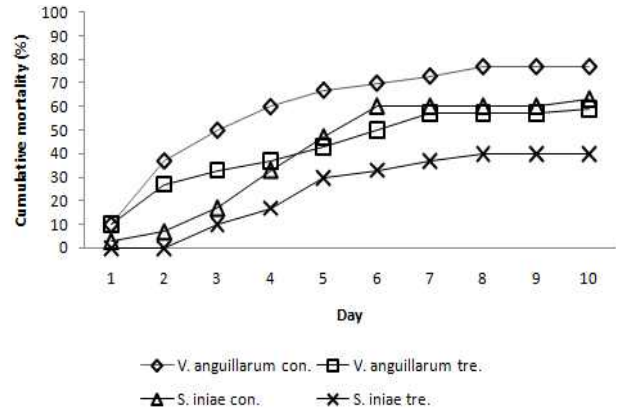


Fig. 3. Cumulative mortality (%) of olive flounder by 10 days feeding of the LAB broth after challenge with *V. anguillarum* and *S. iniae* (n=30)

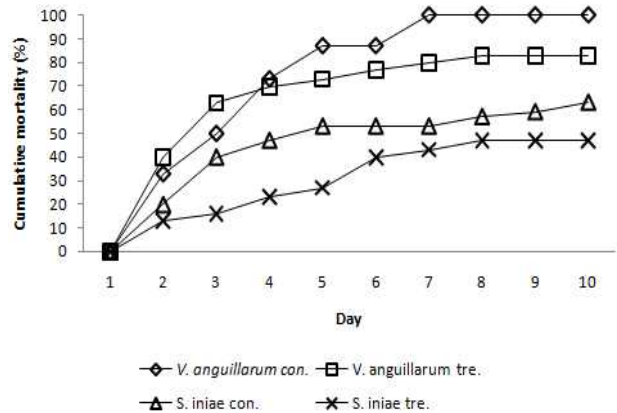


Fig. 4. Cumulative mortality (%) of parrot fish by 10 days feeding of the LAB broth after challenge with *V. anguillarum* and *S. iniae* (n=30)

구는 8일째에 77%의 폐사율을 보였으며, 실험구는 59%의 폐사율을 나타내었다. 또한 *S. iniae* 인위감염결과는 대조구가 63%의 폐사율을 보였으며, 실험구는 40%의 폐사율을 나타내었다.

돌돔의 공격실험 결과의 경우, *V. anguillarum*을 접종하여 대조구는 7일째에 100% 폐사하였으며, 실험구는 8일에서 실험 종료 시까지 83%의 폐사율을 보였다. *S. iniae* 접종 결과는 실험종료 시에 대조구는 63%, 실험구는 47%를 보였다.

이러한 결과는 한약재에 포함된 성분이 넙치의 비 특이적 면역계 중 세포성 면역을 담당하는 식세포의 활성과 체액성 면역계를 담당하는 라이소자임 활성에 영향을 준 것으로 사료 된다. 최 등[12]은 감초를 포함한 생약재료부터 열수, 알콜 추출물에 대한 어병세균의 항균활성을 조사한 결과, *Vibrio* sp., *Streptococcus* sp.에서 활성이 나타났다고 보고 하였으며, 어류의 혈청중의 라이소자임은 세균 세포벽의 삼투압 작용에 손상을 주어 용균시키며, lysozyme은 많은 어류에 정균 효과가 있다고 보고하였다. 또한 김 등[12]은 넙치의 lysozyme이

Micrococcus luteuse, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus epidermis*에 대해서 높은 정균 효과가 있으며, 실제 생체 내에서는 보체나 식세포 등과 협력하여 높은 용균 효과를 보일 것이라고 하였다.

위 결과로 보아 한약재와 유산균 첨가 투여구인 실험구가 대조구 보다 약 20% 높은 생존율을 보여 어류 질병을 유발시키는 병원성 세균에 대한 저항성을 높여주는 천연 사료첨가제가 될 가능성이 높다고 사료된다.

요 약

양식 어류의 항생제 투여의 문제점을 해결하기 위하여 한약재 추출물을 기질로 한 유산균 배양액을 양식 넙치와 돌돔의 사료에 첨가하여 성장, 혈액학적 분석, 식세포 활성, lysozyme 활성 및 어류질병세균에 대한 공격실험을 실시하였다. 성장의 결과 넙치는 실험구와 대조구간의 유의성을 보이지 않았으며, 돌돔의 경우 대조구에 비해 실험구가 약 20 g 높은 어체중 증가를 보였다. 넙치의 사료효율은 실험구가 대조구에 비해 약 25% 높았으며, 돌돔은 사료효율은 두 그룹 간에 유의성을 보이지 않았다. 어류의 혈액학적 분석 결과, GOT와 GPT는 8주 이후에 감소현상을 보였으나 glucose와 total protein은 두 그룹 간에 유의성을 보이지 않았다. 식세포 활성 또한 유의적인 차이가 없었다. lysozyme 활성은 넙치의 경우 8주부터 실험구가 대조구보다 높은 활성을 보였으며, 돌돔은 실험 12주에 대조구보다 약 3배 높은 활성을 보였다. 어류 질병 유발세균에 대한 공격실험은 넙치의 복강에 *V. anguillarum*을 투여하였을 시, 실험구가 대조구에 비해 18%, *S. iniae*을 투여하였을 시, 실험구가 23% 높은 생존율을 보였다. 돌돔의 경우, *V. anguillarum*의 투여결과 대조구의 비해 17%, *S. iniae*의 투여결과 대조구의 비해 16% 높은 생존율을 나타냈다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 산업자원부에서 시행한 지역산업기술 개발사업(지역산업공동기술개발)의 지원을 받아 수행된 연구결과이며 이에 감사를 드립니다.

References

1. Anderson, D. P. and A. K. Siwicki. 1994. Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion, *Progressive Fish-Culturist* **56**, 258-261.
2. Byun, J. W., C. B. Park, Y. Beno and T. K. Oh. 1997. Probiotics effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Gen. Appl. Microbiol.* **43**, 305-308.

3. Choi, H. S., T. K. Kim, J. S. Lee, M. R. JO, C. H. Seo and S. I. Park. 2004. Antibacterial activities of hot-water and ethyl alcohol extracts of medicinal herbs on fish pathogenic bacteria. *J. Fish Pathol.* **17**, 39-55.
4. Gupta, P. K. 1974. Malathion induced biochemical changes in rats. *Acta Pharmac. Tox.* **35**, 191-194.
5. Ishioka, H. 1980. Stress reactions in the marine fish. I. Stress reactions induced by temperature Changes. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* **46**, 523-531.
6. Jang, S. I., M. J. Marsden, Y. G. Kim, Y. G. Choi. 1995. Secomebes CJ. The effect of glycyrrhizin on rainbow trout. *Oncorhynchus mykiss* (Walbaun). leucocyte responses. *J. Fish Dis.* **18**, 307-315.
7. Kang, H. S., H. K. Song, J. J. Lee, K. H. Pyun and I. Choi. 1998. Effect of acanthoic acid on TNF- α gene express haptoglobin synthesis. *Mediators Inflamm* **7**, 257-259.
8. Karunasagar, I., R. Pai, G. R. Malathi and I. Karunasagar. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquacult.* **128**, 203-209.
9. Kumai, H. 1984. Biological studies on culture of the Japanese parrot fish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel). *Bull. Fish. Lab. Kinki Univ.* **2**, 93-108.
10. Kurami, J. and P. K. Sahoo. 2005. Effects of cyclophosphamide on the immune system and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus*. *Fish and shellfish immunology* **19**, 307-316.
11. Kim, D. S., J. H. Kim, C. H. Jeong, S. Y. Lee, S. M. Lee and Y. B. Moon. 1998. Utilization of Obosan (dietary herbs). I. Effects on survival, growth, feed conversion ratio and condition factor in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Aquacult.* **11**, 213-221.
12. Kim, J. H., S. M. Lee, J. M. Baek, J. K. Cho and D. S. Kim, 2003. Effect of dietary lipid level and herb mixture on growth of parrot fish, *Oplegnathus fasciatus*. *J. Kor. Fish. Soc.* **36**, 113-119.
13. 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.
14. Kwon, M. G., Y. C. Kim, Y. C. Shon and S. I. Park. 1999. The dietary supplementing effects of Kugija, Lycium chinense, on immune responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, to *Edwardsiella tarda*. *J. Fish Pathol.* **12**, 73-81.
15. Ministry for food agriculture forestry and fisheries. 2003. Statistical year book of maritime affairs and fisheries.
16. National fisheries research & development institute. 2000. Prevention of bacterial fish diseases and medical treatment for produce health fish.
17. Nikoskelainen, S., A. C. Ouwehand, G. Bylund and S. Salminen. 2001. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquacult.* **198**, 229-236.
18. Peak, N. S., Y. B. Lim and Y. M. Kim. 2001. Antibacterial activity and growth promotion in aquacultured fish by probiotics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 56-61.
19. Pirarat, N., T. Kobayashi, T. Katagiri, M. Maita and M.

- Endo. 2006. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vet. Immunol. Immunop.* **113**, 339-347.
20. Smith, A. C. and F. Romos. 1980. Automated chemical analysis in fish health assessment. *J. Fish Biol.* **17**, 445-450.
21. Smith, P., M. P. Hiney and O. B. samuelsen. 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annu. Rev. Fish Dis.* **4**, 273-313.
22. Zhang, D., K. Mai, S. Liu, L. Cao, Z. Liufu, W. Xu, B. Tan and W. Zhang. 2004. Effect of temperature and on virulence of *Edwardsiella tarda* to japaness flounder, *Paralichthys olivaceus* (Terminck et Schlegel). *Aquacult. Res.* **35**, 494-500.