

## 어류 병원성 세균 공격 후 마늘, *Allium sativum* 착즙액의 침지가 넙치, *Paralichthys olivaceus* 의 면역반응에 미치는 영향

우승호 · 이준희 · 김이경 · 조미영\* · 정승희\*\* · 김진우\* · 박수일†

부경대학교 수산생명의학과, \*국립수산과학원 수산생물방역과, \*\*국립수산과학원 병리연구과

### Effects of garlic *Allium sativum* extract immersion on the immune responses of olive flounder *Paralichthys olivaceus* prechallenged with pathogenic bacteria

Sung Ho Woo, Jun Hee Lee, Yi Kyung Kim, Mi Young Cho\*, Sung Hee Jung\*\*, Jin Woo Kim\* and Soo Il Park

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

\*Aquatic life Disease Control Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

\*\*Pathology Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

This study was aimed to investigate the effects in different immersion doses of garlic, *Allium sativum*, juice to modulate on the nonspecific immune responses of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, artificially prechallenged with *Streptococcus iniae* BS10 and *Edwardsiella tarda* KE-1, respectively. The nonspecific immune responses of the tested fish were assessed in term of skin mucus lysozyme activity, the change of bacterial cell counts in organs, the number of lymphocytes and neutrophils in blood, and SOD activity. Almost groups of the prechallenged with either *S. iniae* BS10 or *E. tarda* KE-1 fish which had been immersed in garlic juice showed the enhanced skin mucus lysozyme activity, the number of lymphocytes and neutrophils in blood, and SOD activity in the kidney but the decreased the number of bacterial cell in surveyed organs. RPS in the group immersed in 0.25 g/L of garlic juice was much higher than in other immersed test groups. These results suggested that the garlic juice immersion can be effective on enhancement of the nonspecific immune responses and the protective ability of olive flounder to the artificial challenge with *S. iniae* BS10 and *E. tarda* KE-1.

*Key words* : Garlic, *Allium sativum*, Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, Immune response, Immunostimulant

넙치 양식장에서는 세균, 바이러스, 진균 및 기생충 등의 병원체가 단독 혹은 혼합 감염으로 어류 질병이 발생하였을 때는 일반적으로 화학 요법제로서 치료를 한다. 그러나 빈번한 항생제의 사용은 면역 기능

을 억제할 뿐만 아니라 (Grondel *et al.*, 1987) 약물의 오남용으로 인하여 병원체의 약제에 대한 다재 내성이 증가하고 있는 실정이다 (Aoki *et al.*, 1992).

대안의 하나인 비특이적 면역 증강 물질은 어류의 자체 방어 능력을 증강하여 다양한 질병에 대처할 수 있는 특징을 갖고 있으며, 다양한 생물에서 분리한 천

†Corresponding Author: Soo Il Park, Tel: 051-629-5939,

Fax: 051-629-5938, E-mail: parksi@pknu.ac.kr

연물을 이용하여 많은 연구가 진행되고 있다. 이와 같은 면역 증강 물질로는 갈조류 유래의 laminaran, 균류인 *Schizophyllum commune* 유래의 schizophyllan, Lipopolysaccharide (LPS), levamisole, chitosan, glucan, nisin,  $\beta$ -glucan 등이 이에 해당하며, 어류의 비특이적 면역인자를 증강시켜 질병에 대한 저항성을 높여준다 (Kitao *et al.*, 1987; Siwicki *et al.*, 1990; Engstad *et al.*, 1992; Kodama *et al.*, 1994; Solem *et al.*, 1995; Kawakami *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Sakai, 1999; Villamil *et al.*, 2003). 어류의 비특이적 면역인자로는 세포성 면역인자인 macrophage, granulocyte 등이 있고, 체액성 면역인자로는 lysozyme, complement, interferon, transferrin 등이 있다. 면역 증강제는 이러한 비특이적 면역인자의 활성을 증가시켜 질병 저항성을 높일 수 있는데, 어류에 면역 증강제를 이용하면 어류의 식세포 활성화 (Raa *et al.*, 1992; Jørgensen *et al.*, 1993a), natural killer cell 활성화 (Kajita *et al.*, 1992), 라이소자임 (Engstad *et al.*, 1992; Jørgensen *et al.*, 1993b)과 보체의 대사 경로 활성화 (Yano *et al.*, 1991) 등 다양하게 면역 반응을 강화하는 것으로 밝혀져 있다.

마늘의 생리 활성은 주로 유황 화합물에 의한 것이며, 마늘을 마쇄하였을 때 생성되는 alliin은 곧 alliinase에 의해 분해되어 allicin으로 변한다. Allicin은 비타민 B1과 같은 생리 작용을 가질 뿐만 아니라, *Helicobacter pylori*의 번식 억제 (O'Gara *et al.*, 2001), 이질의 원인균인 *Entameba histolytica*의 독성 인자 억제 (Ankri *et al.*, 1997), 항균 작용, 방부 효과가 있으며, 특히 항암, 혈청 콜레스테롤 감소, 혈소판 응집 억제, 항산화제로서의 기능 (Schwartz *et al.*, 2002)이 밝혀져 있다. 그리고 림프구 자극, 항체 생산과 확산 등과 같은 면역 자극 효과와 화학요법, UV 조사 (Reeve *et al.*, 1993) 그리고 생리적 스트레스 (Kyo *et al.*, 2001)로 인한 면역 억제에 대해 방어 효과도

나타낸다고 보고하였다.

본 연구에서는 인체에 여러 가지 생리 활성을 가진 마늘을 어류의 질병 예방에 활용하는 방안의 하나로, 어류의 대표적인 병원성 세균인 *Streptococcus iniae*와 *Edwardsiella tarda*를 각각 넙치에 생균 주사한 후 마늘 착즙액을 침지 투여하여 넙치의 비특이적 면역 반응에 미치는 영향을 분석하고 방어력 증강에 관여하는 마늘의 특성을 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험어

시험에 사용된 넙치, *Paralichthys olivaceus*는 전라남도 무안 소재 넙치 양식장으로부터 분양 받아 3주간 순치하며 시험에 사용하였다. 평균 체중은  $11 \pm 3$  g, 평균 체장은  $10 \pm 2$  cm의 넙치를 시험에 사용하였으며, 시험 기간 동안의 사육 수온은  $20 \sim 22^\circ\text{C}$ 로 유지하였고, 사료 공급량은 1일 1~2회 어체중 2% 정도로 공급하였다.

### 시험 균주

시험 균주로는 넙치에 병원성이 알려져 있는 1998년 제주도 소재 양식장의 넙치에서 분리한 *S. iniae* BS10 (우, 2006) 균주와 2000년 포항 소재 양식장의 넙치에서 분리한 *E. tarda* KE-1 (이, 2005) 균주를 Tryptic Soy Agar (TSA, Difco)에 1.5% NaCl을 첨가한 배지에  $25^\circ\text{C}$ , 24시간 배양한 후 시험에 사용하였다.

### 생균 공격 주사 후 마늘 착즙액의 침지

생균 공격 주사 후 마늘 착즙액 시험구는 핸들링 스트레스를 감안하여 단독 시험구로 준비하여 실험을 행하였다. 시험구에서는 시험어에 *S. iniae* BS10 균주와 *E. tarda* KE-1 균주를 각각 복강 주사한 다음,

1일 후 마늘 착즙액에 침지하여 반응을 살펴보았다.

*S. iniae* BS10 균주는  $1.0 \times 10^6$  Colony Forming Unit (CFU)/ml, *E. tarda* KE-1 균주는  $1.0 \times 10^4$  CFU/ml의 농도로 각각 100  $\mu$ L씩 공격 주사하였다. 공격 주사 1일 후, 간마늘 시료를 멸균 증류수로 깨끗이 씻은 후 세척한 시료를 마쇄하여 멸균 거즈로 착즙한 다음 20 L 해수에 0.25, 0.5 및 1.0 g/L의 농도로 현탁하여 2일 간격으로 3회 20분간 침지하였다.

침지 반응의 방어력 결과는 3회의 착즙액 침지 시험을 마친 후 2주일간의 누적 폐사율과 상대 생존율 (RPS, Relative percent survival)로 나타내었다.

$$\text{상대생존률} = \left(1 - \frac{\text{시험구의 폐사율}}{\text{대조구의 폐사율}}\right) \times 100$$

#### 넙치의 체표 점액 lysozyme 활성 조사

대조구와 각 시험구의 시험어 체표 점액은 공격 주사 후 착즙액 침지 시험을 모두 마친 다음 2일째에 분리하였다. 시험구별로 3마리의 시험어에서 점액을 분리한 후 lysozyme 활성을 측정하였다. 점액 lysozyme 용균능을 측정하기 위하여 slide glass로 시험어의 체표 점액을 pooling하고, 시료의 5배로 0.005 M PBS (pH 7.4)를 첨가하여 균질화한 후 원심 분리 (12,000  $\times$ g, 20분, 4 $^{\circ}$ C)한 뒤 상정액 분리하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하며 사용하였다. 이 시료와 미리 PBS에 현탁하여 흡광도 530 nm에서 0.6이 되도록 조정해둔 *Micrococcus lysodeikticus* 균을 혼합하였다. 측정용 시료 0.5 ml에 *M. lysodeikticus* 균액 2.5 ml를 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시킨 후 흡광도 530 nm에서 흡광도 감소량을 측정하였으며 흡광도 값이 0.001 감소한 것을 1 unit로 나타내었다.

#### 시험어의 조직 내 균수 변화 조사

공격 주사 후 착즙액 침지 시험 후 *in vivo* 항균 작용을 알아보기 위해 시험어의 조직 내 균수 변화를 확인하였다. 침지 시험 종료 2일 후 시험구별로 시험

어를 3마리씩 무균적으로 해부하여 간, 비장 및 신장을 0.1 M PBS (pH 7.2)에 0.1 g/ml로 되도록 pooling한 후 균질화하였다. 균질화한 조직액을 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 1.5% NaCl이 첨가된 TSA 배지에 배양 용액을 단계 희석하여 적하하고 25 $^{\circ}$ C, 24시간 배양한 후 세균 집락수를 계수하였다.

#### 시험어의 혈액 내 세포 수의 변화 조사

혈액 중에 있는 각종 혈액 세포의 수적 변화는 공격 주사 후 착즙액 침지 시험을 마친 후에 채혈한 혈액을 도말 표본법으로 조사하였다. 즉, 각각의 시험어의 미부 정맥에서 주사기로 시험구별로 3마리의 시험어에서 채혈한 다음 곧 바로 슬라이드 글라스에 각각 2반복으로 도말하였다. 도말 표본은 May-grünwald Giemsa 염색법으로 염색한 후 광학 현미경 하에서 적혈구 5,000 세포 당 림프구 수와 호중구 수의 변화를 조사하였다.

#### 시험어의 SOD activity 조사

공격 주사 후 착즙액 침지 시험을 마친 후, 각 구간의 시험어의 미부정맥에서 채혈하여 얻은 혈액, 신장과 간 조직으로부터 SOD activity를 측정하였다. 측정 방법은 SOD Assay Kit-WST (Dojindo Co., Japan)를 이용하여 측정하였다. 시험에 나타난 SOD 활성은 superoxide anion이 감소하는 비율과 동일하다. SOD 활성은 대조구인 멸균 증류수의 water-soluble tetrazolium salt가 감소한 값에 각 sample의 water-soluble tetrazolium salt가 감소한 값을 뺀 후 대조구가 감소한 값을 나누어 백분율로 나타내었다.

#### 통계학적 분석

대조구와 각 시험구 사이의 유의차는 Student's *t*-test로 검정하였다 ( $P < 0.05$ ).

Table 1. Cumulative mortality and relative percentage of survival (RPS) of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* prechallenged with either *Streptococcus iniae* BS10 or *Edwardsiella tarda* KE-1 followed immersion in garlic, *Allium sativum* juice, for 14 days

<i>Streptococcus iniae</i> BS10			<i>Edwardsiella tarda</i> KE-1		
Group	Cumulative mortality (%)	RPS (%)	Group	Cumulative mortality (%)	RPS (%)
0.25 g/L	42%	50%	0.25 g/L	42%	58%
0.5 g/L	58%	30%	0.5 g/L	67%	33%
1.0 g/L	83%	0%	1.0 g/L	67%	33%
Control	83%	-	Control	100%	-

### 결 과

생균 주사 후 마늘 착즙액 침지한 시험어의 생존율 조사 병원균으로 공격 주사한 시험어를 각 농도별 마늘 착즙액에 침지하여 생존율을 조사하였다. Table. 1에 는 누적 폐사율과 상대생존율을 나타내었고, 누적 폐사율을 따로 Fig. 1에 나타내었다. *S. iniae* BS10 공격 시험 후 침지구에서는 0.25 g/L구간에서 42%의 누적폐사율과 50%의 상대생존율을 나타내어 대조구의 누적폐사율 83%와 비교하여 방어력이 증강된 것으로 나타났고, *E. tarda* KE-1 공격 시험 후 침지구 에서도 0.25 g/L구간에서 42%의 누적폐사율과 58%의 상대생존율을 보여 대조구의 누적폐사율 100%와 비교하여 방어력이 증강된 것으로 나타났다.

#### 넙치의 체표 점액 lysozyme 활성 조사

병원균으로 공격 주사한 넙치를 각 농도별 마늘 착즙액에 침지한 다음 시험구와 대조구의 넙치 체표 점액 lysozyme의 활성을 조사한 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

*S. iniae* BS10으로 공격 주사한 뒤, 마늘 착즙액에 침지한 시험어의 점액 lysozyme 활성은 대조구에 비 해서 0.25 g/L와 0.5 g/L의 침지 시험구 (31.0±1.41와 28.5±0.71 unit/ml)에서 유의적인 증가가 나타났으나 1.0 g/L 시험구 (27.0±2.83 unit/ml)에서는 유의적인

증가를 나타내지 않았다. 그 중 0.25 g/L 시험구 (31.0±1.41 unit/ml)가 대조구 (16.0±5.66 unit/ml)와 가장 큰 차이를 나타내었다.

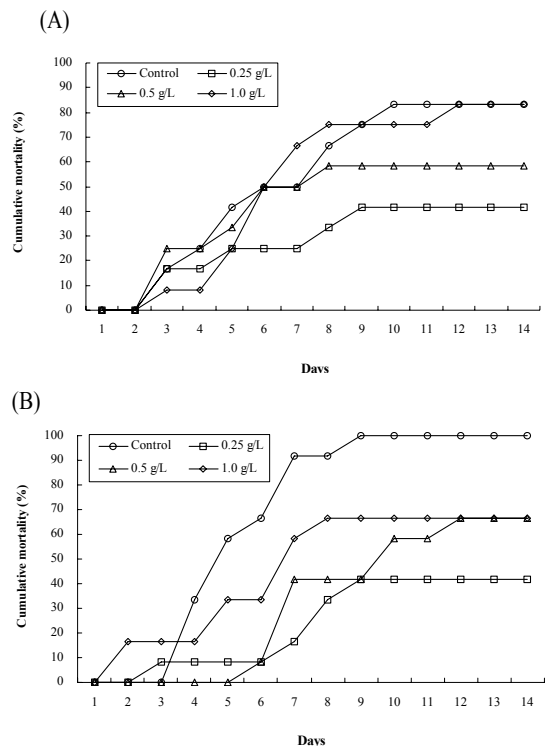


Fig. 1. Cumulative mortality of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* prechallenged with either *Streptococcus iniae* BS10 (A) or *Edwardsiella tarda* KE-1 (B) followed immersion in garlic, *Allium sativum* juice.

*E. tarda* KE-1으로 공격 주사한 뒤, 마늘 착즙액에

침지한 시험어의 점액 lysozyme 활성은 대조구에 비해서 모든 농도 시험구 (30.0±0.03~58.0±1.41 unit/ml)에서 유의적인 증가를 나타냈으며 특히 0.5 g/L 시험구 (58.0±1.41 unit/ml)에서 대조구 (5.0±2.83 unit/ml)에 비하여 큰 증가를 나타내었다.

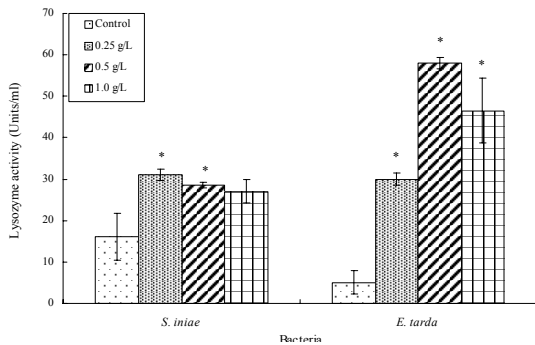


Fig. 2. Lysozyme activity in skin mucus of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* prechallenged with either *Streptococcus iniae* BS10 or *Edwardsiella tarda* KE-1 followed immersion in garlic, *Allium sativum* juice. \*, significant difference from control,  $P<0.05$ .

### 시험어의 조직 내 균수 변화 조사

병원균으로 공격 주사한 시험어를 각 농도별 마늘 착즙액에 침지한 다음 시험구의 어체별 조직 내 균수 변화를 조사한 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

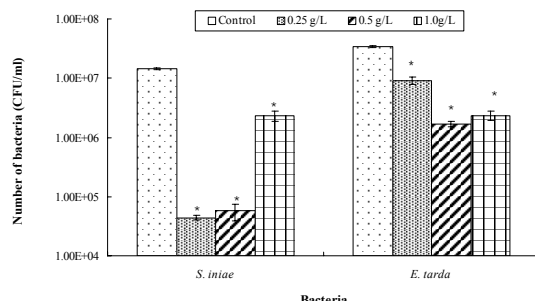


Fig. 3. Changes of number of bacteria in organs of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* prechallenged with either *Streptococcus iniae* BS10 or *Edwardsiella tarda* KE-1 followed immersion in garlic, *Allium sativum* juice. \*, significant difference from control,  $P<0.05$ .

*S. iniae* BS10로 공격 주사한 뒤 마늘 착즙액 침지

시험구의 각 조직 내 균수 변화는 대조구 ( $1.43 \times 10^7$  CFU/ml)에 비해서 모든 농도 시험구 ( $4.40 \times 10^4 \sim 2.31 \times 10^6$  CFU/ml)에서 유의적인 감소가 나타났으며, 특히 0.25 g/L와 0.5 g/L 구간 ( $4.40 \times 10^4$ 와  $5.73 \times 10^4$  CFU/ml)에서 대조구 ( $1.43 \times 10^7$  CFU/ml)에 비해 큰 감소를 나타내었다.

*E. tarda* KE-1로 공격 주사한 뒤 마늘 착즙액 침지 시험구의 각 조직 내의 균수 변화는 대조구 ( $3.43 \times 10^7$  CFU/ml)에 비해서 모든 농도 침지 시험구 ( $1.69 \times 10^6 \sim 9.20 \times 10^6$  CFU/ml)에서 유의적인 감소를 나타내었다. 그 중 0.5 g/L 시험구 ( $1.69 \times 10^6$  CFU/ml)가 대조구 ( $3.43 \times 10^7$  CFU/ml)에 비해서 가장 큰 감소를 나타내었다.

### 시험어의 혈액 내 세포 수의 변화 조사

시험어에 병원균 공격 주사 후, 각 농도별 마늘 착즙액에 침지한 시험구 어체별 순환 혈액 내에 출현하는 적혈구 5,000 세포 당 림프구와 호중구의 수를 조사한 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

*S. iniae* BS10을 공격 주사한 뒤, 마늘 착즙액에 침지한 시험어의 혈액 내 림프구는 대조구 ( $37.0 \pm 1.00$  cells)에 비해서 0.25 g/L와 0.5 g/L 시험구 ( $48.3 \pm 5.50 \sim 50.6 \pm 2.50$  cells)에서 유의적인 증가가 나타났으며 호중구도 0.25 g/L와 0.5 g/L 시험구 ( $27.3 \pm 1.50 \sim 28.7 \pm 2.50$  cells)에서 대조구 ( $22.0 \pm 2.00$  cells)에 비해 유의적인 증가를 나타내었다. 그러나 1.0 g/L 시험어의 혈액에서는 림프구 ( $47.7 \pm 9.00$  cells)와 호중구 ( $26.0 \pm 3.00$  cells)의 수가 대조구에 비해 유의적인 증가는 나타나지 않았다.

*E. tarda* KE-1을 공격 주사한 뒤, 마늘 착즙액에 침지한 시험어의 혈액 내 림프구 수가 대조구 ( $27.6 \pm 6.10$  cells)에 비해서 0.25 g/L와 1.0 g/L 시험구 ( $44.7 \pm 2.10 \sim 49.3 \pm 12.1$  cells)에서 유의적인 증가를 나

타내었으나, 호중구에서는 모든 시험구 (24.3±4.20 ~ 29.0±4.00 cells)에서 대조구 (13.7±3.80 cells)에 비해 유의적인 증가를 나타내었다.

89.9±1.02%)에 비해서 유의적인 증가가 나타났다. 그러나 간에서는 대조구에 비해 유의적인 증가를 보이지 않았다.

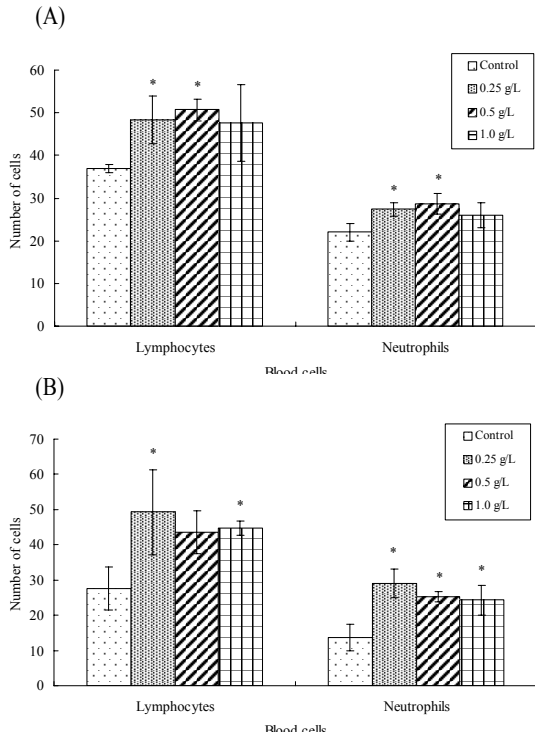


Fig. 4. Number of lymphocytes and neutrophils per 5,000 red blood cells in peripheral blood of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* prechallenged with either *Streptococcus iniae* BS10 (A) or *Edwardsiella tarda* KE-1 (B) followed immersion in garlic, *Allium sativum* juice. \*, significant difference from control,  $P<0.05$ .

시험어의 SOD activity 조사

병원균으로 공격 주사한 시험어를 각 농도별 마늘 착즙액에 침지하여 어체별 혈액, 신장 및 간에서 SOD activity를 조사한 결과를 Fig. 5에 나타내었다.

*S. iniae* BS10을 공격 주사한 후, 마늘 착즙액에 침지한 시험어의 혈액, 신장 및 간의 SOD 활성 중, 혈액 (70.6±1.94 ~ 76.1±11.74%)과 신장 (92.4±1.02 ~ 93.4±0.83%)의 SOD 활성이 대조구 (52.0±9.15%와

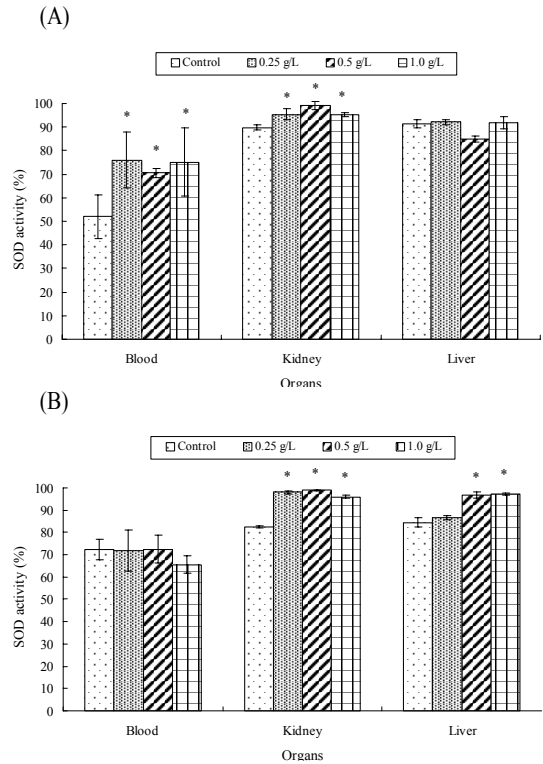


Fig. 5. SOD activity of blood, kidney and liver of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* prechallenged with either *Streptococcus iniae* BS10 (A) or *Edwardsiella tarda* KE-1 (B) followed immersion in garlic, *Allium sativum* juice. \*, significant difference from control,  $P<0.05$ .

*E. tarda* KE-1을 공격 주사한 후, 마늘 착즙액에 침지한 시험어의 혈액, 신장 및 간의 SOD 활성 중, 혈액 (65.6±3.77 ~ 72.6±6.04%)에서는 대조구 (72.4±4.78%)에 비해서 SOD 활성의 유의적인 증가가 나타나지 않았다. 반면 신장에서는 대조구 (82.6±0.53%)에 비해서 SOD 활성이 모든 시험구 (96.0±0.59 ~ 98.0±0.81%)에서 유의적인 증가가 나타났으며 간에서는 대조구 (84.5±1.91%)에 비해 0.5 g/L와 1.0 g/L

시험구 (96.8±1.37~97.3±0.41%)에서 유의적인 증가를 나타내었다.

## 고 찰

시험어에 병원체 공격 후 마늘 착즙액 침지 효과를 생존율로 살펴보면 *S. iniae* BS10 공격 주사 후 0.25 g/L 시험구의 상대생존율이 50%로 가장 높았다. *E. tarda* KE-1 공격 후 마늘 착즙액 침지 시험구에서도 0.25 g/L 시험구의 상대생존율이 58%로 가장 높았다. Lactoferrin과  $\beta$ -glucan을 무지개송어 자어에 연속 침지 투여하였을 때 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$  등의 인터루킨의 발현이 증가되었고 (Zhang *et al.*, 2009), red alga, *Gelidium amansil*, 열수 추출물을 흰다리새우에 침지 투여한 후 THC의 증가, PO (phenoloxidase)의 활성이 증가되었다는 연구 (Fu *et al.*, 2007)가 있으나, 어종이 달라 직접적인 비교는 어렵지만 침지 투여한 각 면역 증강제가 방어력 증강에 기여한다는 본 연구의 결과와 유사하였다.

어류의 1차 방어선으로서 점액, lysozyme, 항체, 보체, 대식세포 등이 알려져 있으며 이들은 감염을 일으킬 수 있는 미생물들의 침입과 부착을 막는다. 어류의 lysozyme은 점액, 혈청 등에 들어있으며 특히 백혈구와 백혈구가 풍부한 조직인 신장, 비장, 장 등에 포함되어 있고 macrophage와 호중구가 주된 생산 세포이다 (Murray & Fletcher, 1976). 본 연구에서 *S. iniae*와 *E. tarda* 공격 주사 후 마늘 착즙액을 침지한 결과 각 각 0.25 g/L 시험구 (31.0±1.41 unit/ml)와 0.5 g/L 시험구 (58.0±1.41 unit/ml)에서 점액 lysozyme의 활성에 있어 가장 유의적인 증가를 나타내었다. 이전 연구에서 carp를  $\beta$ -glucan으로 복강주사 하였을 때와는 달리 침지시켰을 때 RPS, SOD와 TLC (Total Leucocytes Counts) 등에 영향을 미치지 않았다는 보

고 (Selvaraj *et al.*, 2005)가 있으며, 흰다리새우에 red alga, *Gelidium amansil* 열수추출물로 침지하였을 때 THC, PO (phenoloxidase) 및 *V. alginolyticus*에 대한 저항성을 증가 시켰다고 보고하고 있으나 (Fu *et al.*, 2007), 어종과 면역 기전의 차이로 본 연구의 결과와 직접적인 상관관계를 찾을 수는 없었다. 그렇지만 넙치에 마늘 착즙액을 침지한 후 lysozyme의 활성이 증가하였다는 보고 (이 등, 2010)와 일치하였다. 또한 본 연구에서 어병 세균 공격 후 마늘 착즙액에 침지하였을 때 lysozyme의 활성이 증가하였으며, 이는 lysozyme 생성 세포의 하나로 알려져 있는 호중구의 수가 증가하는 현상과 관련시켜볼 때 마늘 성분의 자극 효과를 배제할 수 없을 것으로 사료된다.

시험구의 조직 내 균수 변화를 살펴보면 *S. iniae* BS10과 *E. tarda* KE-1으로 공격 주사한 뒤 마늘 착즙액 침지 시험구 ( $4.40 \times 10^7 \sim 2.31 \times 10^6$  CFU/ml)와  $1.69 \times 10^6 \sim 9.20 \times 10^6$  CFU/ml)의 모든 구간에서 대조구 ( $1.43 \times 10^7$  CFU/ml)와  $3.43 \times 10^7$  CFU/ml)에 비해 세균 수가 유의적으로 감소하는 결과가 나타났다. Benkeblia (2004)가 마늘 추출물이 *in vitro*에서 *Staphylococcus aureus*에 항균작용, Arora & Kaur (1999)의 *in vitro*에서 *Staphylococcus epidermidis*와 *Salmonella typhi*에 대해서 살균작용을 나타내었다는 보고와 일치하였으며, 본 연구에서는 *in vivo*에서도 마늘 착즙액이 항균작용을 나타내는 것으로 나타났다.

혈액세포의 변화를 보면 *S. iniae* BS10로 공격 주사한 후 0.25 g/L와 0.5 g/L의 농도에 침지하였을 때 림프구와 호중구의 수가 유의적으로 증가하였다. *E. tarda* KE-1을 공격 주사한 후에 침지하였을 때 림프구 수의 변화는 0.25 g/L와 1.0 g/L 시험구에서 증가하였고 호중구의 수는 대조구와 비교하여 모든 시험구에서 유의적인 증가를 보였다. 마늘 착즙액을 침지하

면 대체적으로 호중구의 수가 증가함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Jeney (1993)가 무지개송어에  $\beta$ -glucan을 침지하거나 복강 주사하였을 때 96 시간째까지 백혈구와 호중구의 수가 지속적으로 증가하다가 이후 감소한다는 보고와 유사한 결과를 나타내었으며, 어류 병원성 세균 공격 후 면역증강제를 투여한 시도는 거의 없어 직접적으로 비교할 수는 없지만 대조구에 비해 면역 증강 효과가 있을 것으로 사료된다.

대식세포에 의해 방출되는 산소 대사물은 매우 반응성이 높기 때문에 조절되어야 한다 (Song & Hsieh, 1994). ROIs의 효과적이고 빠른 제거는 생물의 생존에 필수적인 대사 과정이다. 이것은 SOD와 같은 항산화 방어 기작과 연관되어 일어난다. 병원균을 공격 시험한 후 마늘 착즙액에 침지한 구간에서, *S. iniae* BS10 공격 시험 구간의 혈액과 신장에서 모두 대조구와 유의적인 증가를 보였지만 간에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. *E. tarda* KE-10 공격 시험 구간의 혈액은 대조구에 비해 유의적인 증가를 보이지 않았으나 신장에서는 모든 시험구에서, 간에서는 0.5 g/L와 1.0 g/L 시험구에서 대조구에 비해 유의적인 증가를 나타내었다. Grouper에 sodium alginate를 경구 투여 하였을 때, respiratory bursts와 SOD 활성이 증가하였다는 보고가 있으며 (Yeh *et al.*, 2008), 호흡 폭발로 인한 phagocyte의 활성 증가는 NBT 활성과 Chemiluminescence response의 증가로 알 수 있다. 하지만 superoxide anion이 항상 호흡 폭발에 의해서만 발생하는 것이 아니라 여러 다른 대사 작용에서도 발생하며, 세포에서 NADH oxidase를 가지고 있고 SOD 활성에 의해서 macrophage의 호흡 폭발을 측정하는 CL response의 결과가 다양하게 나오기 때문에 CL response에서 소실되는 superoxide anion 양까지 알 수 있는 SOD 활성이 중요하다는 보고도 있다 (Ordas *et al.*, 2000). 이전 연구 (Lee *et al.*, 2010, In

press)에서 마늘 착즙액에 침지한 넙치 신장에서의 superoxide anion 생성량과 SOD 활성 사이의 상관관계가 관찰되었다. 또한 Campa-Cordova *et al.* (2002)은 흰다리새우에  $\beta$ -glucan을 침지하였을 때 SOD가 48 시간째까지 SOD 활성이 증가됨을 보고하였다. 이러한 SOD 활성의 증가는 어체의 산화 스트레스 감소와 면역력 증가에 기여하는 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 어류 병원성 세균에 감염된 넙치에 있어서도 마늘 추출물이 대조구에 비하여 높은 면역 반응을 유도하여 방어력 증강에 도움을 주는 것으로 관찰되었고 이로써 마늘의 생리활성 물질의 유용성을 확인할 수 있었다.

## 요약

본 연구에서는 마늘 착즙액이 어병세균으로 질병에 인위 감염시킨 넙치의 비특이적 면역 반응에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 건강한 넙치를 어류 병원성 세균인 *Streptococcus iniae* BS10과 *Edwardsiella tarda* KE-1으로 공격 주사한 후 1일 뒤에 마늘 착즙액을 0.25, 0.5 및 1.0 g/L의 농도로 해수에 현탁하여 2일 간격으로 3회 침지하였다. 공격 주사한 넙치의 면역 반응을 알아보기 위해 체표 점액 lysozyme의 활성, 조직 내 균수의 변화, 혈액 내 세포수의 변화, SOD 활성 및 생존율을 조사하였다. 그 결과, *S. iniae* BS10으로 공격 주사 후 0.25와 0.5 g/L의 침지 시험구에서 대조구에 비해 lysozyme의 활성이 유의적인 증가를 나타내었고, *E. tarda* KE-1으로 공격 주사 후 모든 침지 시험구에서 대조구에 비해 lysozyme의 활성이 유의적인 증가를 나타내었다. 조직 내 균수에 있어서는 모든 시험구에서 유의적인 감소를 나타내었다. 혈액 내 세포수의 변화를 관찰한 결과, *S. iniae* BS10으로 공격 주사 후 마늘 착즙액



0.25와 0.5 g/L의 침지 시험구에서 림프구와 호중구의 유의적인 증가와 함께 모든 시험구에서 호중구의 유의적인 증가가 나타났다.

*E. tarda* KE-1으로 공격 주사 후 0.25와 1.0 g/L의 침지 시험구에서 림프구의 유의적인 증가, *E. tarda* KE-1으로 공격 주사 후 마늘 착즙액 0.25와 1.0 g/L의 침지 시험구에서 림프구의 유의적인 증가와 함께 모든 시험구에서 호중구의 유의적인 증가가 나타났다. 침지 시험구 시험어의 혈액, 신장 및 간에서 SOD 활성을 측정 한 결과, *S. iniae* BS10으로 공격 주사 후 침지 시험구에서 혈액과 신장에서 유의적인 증가가 나타났고, *E. tarda* KE-1으로 공격 주사 후 침지 시험구에서 신장과 간에서 유의적인 증가가 나타났다. 생존율 시험 결과, *S. iniae* BS10와 *E. tarda* KE-1으로 공격 주사 후 0.25 g/L 침지 시험구에서 모두 58%의 상대생존율을 나타내어 마늘 착즙액 침지가 넙치의 방어능에 기여하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 마늘 착즙액의 유효 성분이 건강한 넙치뿐만 아니라 질병에 걸린 넙치에 대해서도 면역증강제로서의 효과가 있을 것으로 사료되었다.

### 감사의 글

이 연구는 국립수산물과학원(양식생물 질병 방제 연구, RP-2010-AQ-050)의 지원에 의해 운영되었습니다.

### 참고문헌

Ankri, S., Miron, T. and Rabinkov, M.: Allicin from garlic strongly inhibits cysteine proteinases and cytopathic effects of *Entamoeba histolytica*.

Antimicrob. Agents Chemother., 41:2286-2288, 1997.

Aoki, T.: Present and future problems concerning the development of drug resistance in Aquaculture, In Chemotherapy in Aquaculture : From Theory to Reality, Office International Des Epizooties. Paris, France, 254-262, 1992.

Arora, D.S. and Kaur, J.: Antimicrobial activity of spices. Intern. J. Antimicrob. Agents, 12:257-262, 1999.

Benkeblia, N.: Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). Lebensm.-Wiss. + Technol., 37:263-268, 2004.

Campa-Córdova, A.I., Hernández-Saavedra, N.Y., De Philippis, R. and Ascencio F.: Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to  $\beta$ -glucan and sulphated polysaccharide. Fish Shellfish Immunol., 12: 353-366, 2002.

Engstad, R.E., Robertson, B. and Frivold, E.: Yeast glucan induce increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish Shellfish Immunol., 2:287-297, 1992.

Fu, Y.W., Hou, W.Y., Yeh, S.T, Li, C.H. and Chen, J.C.: The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*, Fish Shellfish Immunol., 25:673-685, 2007.

Grondel, J.L., Nouws, J.F.M., DeJong M., Schutte, A.R.,

- and Driessens, F.: Pharmacokinetics and tissue distribution of oxytetracycline in carp, *Cyprinus carpio* L., following different routes of administration. *J. Fish Dis.*, 10:153-163, 1987.
- Jeney, G. and Anderson, D.P.: Enhanced immune response and protection in rainbow trout to *Aeromonas salmonicida* bacterin following prior immersion in immunostimulants. *Fish Shellfish Immunol.*, 3:51-8, 1993.
- Jørgensen, J.B., Lunde, H. and Robertsen, B.: Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 16:313-325, 1993a.
- Jørgensen, J.B., Sharp, G.J.E., Secombes, C.J. and Robertsen, B.: Effect of a yeast-cell wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol.*, 3:267-277, 1993b.
- Kajita, Y., Sakai, M., Kobayashi, M. and Kawaushi, H.: Enhancement of non-specific cytotoxic activity of leucocytes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* injected with growth hormone. *Fish Shellfish Immunol.*, 2:155-157, 1992.
- Kawakami, H., Hiratsuka, M. and Dosako, S.: Effects of iron-saturated lactoferrin on iron absorption. *Agri. Biol. Chem.*, 52:903-908, 1998.
- Kitao, T., Yoshida, T., Anderson, D.P., Dixon, O.W. and Blanch, A.: Immuno-stimulation of antibody-producing cells and humoral antibody to fish bacterins by a biological response modifier. *J. Fish Biol.*, 31:87-91, 1987.
- Kim, K.H., Hwang, Y.J. and Bai, S.C.: Enhancement of chemiluminescent response of phagocytic cells from juvenile Rockfish, *Sebastes schlegeli*, by oral administration of levamisole. *J. Fish Sci. Tech.*, 1:42-47, 1998.
- Kodama, H., Mukamoto, N., Baba, T. and Mule, D.M.: 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, 59-66, 1994.
- Kyo, E., Naoto Uda, N., Kasuga, S. and Itakura, Y.: Immunomodulatory Effects of Aged Garlic Extract. *J. Nutr.*, 131:1075S-9S, 2001.
- Miles, A.A. and Misra, S.S.: The estimate of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg.*, 38:873-885, 1938.
- Murray, C.K. and Fletcher, T.C.: The immunohistochemical location of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissue. *J. Fish. Biol.*, 9: 329-334, 1976.
- O'Gara, E.A., Hill, D.J. and Maslin, D.J.: Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:2269-2273, 2001.
- Ordas, M.C., Novoa, B. and Figueras, A.: Modulation of the chemiluminescence response of mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 10:611-622, 2000.
- Raa, J., Tørstad, G., Engstad, R. and Robertsen, B.: 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, 39-50, 1992.
- Reeve, V.E., Bosnic, M., Rozinova, E. and Boehm-Wilcox, C.: A garlic extract protects from ultraviolet B (280-320 nm) radiation-induced suppression of

- contact hypersensitivity. *Photochem. Photobiol.*, 58:813-817, 1993.
- Sakai, M.: Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172:63-92, 1999.
- Schwartz, I.F., Hershkovitz, R., Iaina, A., Gnessin, E., Wollman, Y., Chenichowski, T., Blum, M., Levo, Y. and Schwartz, D.: Garlic attenuates nitric oxide production in rat cardiac myocytes through inhibition of inducible nitric oxide synthase and the arginine transporter CAT-2 (cationic amino acid transporter-2). *Clin. Sci.*, 102:487-493, 2002.
- Selaraj, V., Sampath, K. and Sekar, C.: Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.*, 19:293-306, 2005.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P. and Dixon, O.W.: In vitro immunostimulation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spleen cells with lavamisole. *Dev. Comp. Immunol.*, 14:231-237, 1990.
- Solem, S.T., Jørgensen, J.B. and Robertsen, B.: Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon *Salmo salar* L. macrophages by lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.*, 5:475-491, 1995.
- Song, Y.L. and Hsieh, Y.T.: Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Dev. Comp. Immunol.*, 18:201-209, 1994.
- Villamil, L., Figueras, A. and Novoa, B.: Immunomodulatory effects of nisin in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 14:157-69, 2003.
- Yano, T., Mangindaan, R.E.P. and Matsuyama, H.: Enhancement of the resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by some  $\beta$ -1,3 glucans. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55:1815-1819, 1991.
- Yeh, S.P., Chang, C.A., Chang, C.Y., Liu, C.H. and Cheng, W.: Dietary sodium alginate administration affects fingerling growth and resistance to *Streptococcus* sp. and iridovirus, and juvenile non-specific immune responses of the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol.*, 25:19-27, 2008.
- Zhang, Z., Swain, T., Bogwald, J., Dalmo, R.A. and Kumari, J.: Bath immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry induces enhancement of inflammatory cytokine transcripts, while repeated bath induce no changes. *Fish Shellfish Immunol.*, 26:677-684, 2009.
- 우승호 해수 양식 어류에서 분리된 연쇄상구균의 종류와 병원성. *한국어병학회지*, 19:17-33, 2006.
- 이덕찬 *Edwardsiella tarda* extracellular products (ECPs)의 인위 투여에 따른 넙치, *Paralichthys olivaceus* 의 생체 반응. *한국어병학회지*, 18:215-225, 2005.
- 이준희, 우승호, 엄용환, 황분옥, 권문경, 방중득, 박수알 마늘, *Allium sativum*이 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 면역반응에 미치는 영향. *한국어병학회지*, 23:69-83, 2010.

---

Manuscript Received : August 15, 2010

Revision Accepted : August 15, 2010

Responsible Editorial Member : Sung-Ju Jung  
(Chonnam Univ.)