

사료 내 발효마늘분말과 발효마늘착즙액의 첨가가 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 성장, 면역반응, 혈액성분 및 어병세균(*Edwardsiella tarda* 및 *Streptococcus iniae*)에 대한 질병저항성에 미치는 영향

김강웅 · 김성삼¹ · 정준범¹ · 전유진¹ · 김경덕 · 안철민 · 이경준^{1,2*}

국립수산과학원 사료연구센터, ¹제주대 해양생명과학과, ²제주대 해양과환경연구소

Effects of Dietary Supplementation of Fermented Garlic Powder and Fluid on Growth Performance, Immune Responses, Blood Components, and Disease Resistance against *Edwardsiella tarda* and *Streptococcus iniae* in Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*

Kang-Woong Kim, Sung-Sam Kim¹, Joon-Bum Jeong¹, You-Jin Jeon¹,
Kyoung-Duck Kim, Cheul-Min An and Kyeong-Jun Lee^{1,2*}

Aquafeed Research Center, NFRDI, Pohang 791-802, Korea

¹Department of Marine Life Science, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

²Marine and Environmental Research Institute, Jeju National University, Jeju 695-814, Korea

Two consecutive studies were conducted to evaluate the effects of dietary supplementation with fermented garlic powder (FGP) or fermented garlic fluid (FGF) on growth performance, immune responses, and disease resistance of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. In experiment I, olive flounder (BW: 65 g) were fed four experimental diets formulated to contain 0%, 0.5%, 1%, and 1.5% FGP (designated as FGP-0, FGP-0.5, FGP-1, and FGP-1.5, respectively). After the 10-weeks feeding trial, feed intake was significantly lower in fish fed the FGP-0.5 and FGP-1.0 diets, as compared to those fed the control diet. Fish fed the FGP-0 and FGP-0.5 diets showed significantly lower survival, as compared to the other treatments. Dietary supplementation with FGP resulted in higher non-specific immune responses than the FGP-0 group. Plasma cholesterol and triglyceride levels decreased as dietary FGP level increased. In experiment II, olive flounder (BW: 65 g) were fed four experimental diets for 10 weeks. The diets were prepared with a commercial expanded pellet to have 0%, 0.25%, 0.5%, and 1% FGF (designated as FGF-0, FGF-0.25, FGF-0.5, and FGF-1, respectively) by adsorption. At the end of the second feeding trial, feed intake was significantly lower in fish fed the FGF-0 diet, as compared to other treatments. Fish fed the FGF-0.25 and FGF-0.5 diets exhibited significantly lower cholesterol levels, as compared to other treatments. Lysozyme activity significantly increased with increases in dietary FGF. Cumulative mortality in a challenge test with *Streptococcus iniae* was significantly lower in the fish groups fed FGF-supplemented diets than in fish fed the control diet. The results of this study indicated that dietary supplementation with FGP or FGF can enhance the non-specific immune responses and disease resistance of olive flounder against *S. iniae*.

Key words: Olive flounder, Fermented garlic powder, Fermented garlic fluid, Challenge test, Non-specific immune response

서론

우리나라의 대표적 양식어종인 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 고밀도 양식으로 인해 *Vibrio anguillarum*, *Streptococcus iniae* 및 *Edwardsiella tarda* 등과 같은 세균성 질병이 빈번하게 발생하고 있으며, 이에 대한 치료를 위해 여러 종류의 항생제가

사용되고 있다. 그 결과 항생제에 대한 내성균의 출현이 양식현장에서 가장 큰 문제로 나타나고 있으며, 어류에서의 항생제 잔류에 따른 사회적 문제가 대두된다. 또한 불신으로까지 이어져 수산물에 대한 소비를 위축시키는 요인이 되고 있다(Kim et al., 2010). 따라서 항생제의 부정적인 요인들을 배제시키는 동시에 기존 항생제를 대체할 수 있는 천연물질을 개발하고자 최근 많은 연구들이 발표되고 있다(Kim et al., 2006; Pham et al., 2006; Kim and Lee, 2008; Kim et al., 2009; Kim et al., 2010).

*Corresponding author: kjlee@jejunu.ac.kr

Table 1. Proximate composition of fermented garlic powder

| Composition | Content |
|----------------------------------|---------|
| Dry matter (%) | 88.3 |
| Crude protein (% DM) | 23.2 |
| Crude lipid (% DM) | 6.3 |
| Crude ash (% DM) | 2.8 |
| Carbohydrate (% DM) ¹ | 12.4 |

¹Carbohydrate = 100-(% moisture+% protein+% lipid+% ash).

마늘은 백합과에 속하는 식물로서 다양한 생리활성을 가지고 있다. 생리활성을 발현하는 대표적 유효성분으로는 alllicine 이 있으며, 포도상구균 및 콜레라균의 증식을 억제하고, 그람 음성균의 살균작용이 있다고 보고되었다(Cavallito et al., 1945; Yamata and Azuma, 1977). 이외에도 마늘의 약리효능으로는 면역증진효과, 항산화효과, 아질산염 소거능, 항균효과, 항암작용, 항고혈압, 항공황이 및 저혈당작용 등이 보고되었다(Chi et al., 1982; Chun et al., 1997; Mun et al., 2004; Kim et al., 2005; Park et al., 2005; Chung et al., 2008; Shin et al., 2009).

발효는 오래전부터 식품에 행해져온 가공공정의 일환으로 좋은 맛과 향, 조직감 등을 부여하고 유용성분 및 영양성을 증진시키는 작용을 하며, 저장성을 높이는 등 다양한 장점을 가지고 있다(Park et al., 2010). 발효에 이용된 미생물이 발효과정을 통해 다른 형태로 전환시키거나, 분해효소를 분비함으로써 2차 대사과정을 통한 새로운 형태의 물질을 생산하기 때문이다. 따라서 단백질, 필수아미노산, 필수지방산 및 비타민이 풍부한 식품의 제조에 다양하게 활용되고 있으며, 발효과정을 통한 독성물질 파괴, 생리활성물질 생산 및 소화증진에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Park et al., 2009).

Kim et al. (2010)은 저수온기에 넙치치어를 대상으로 사료 내 발효마늘분말을 단계적으로 첨가하였을 때 비특이적 면역반응 및 *V. anguillarum* 세균에 대한 질병저항성을 높일 수 있다고 보고하였다. 그러나 어류의 생리기능은 사육수온의 영향을 받아 효소활성이 변화되며(Pelletier et al., 1995), 사육수온이 낮아지면 어류 체내의 소화효소 활성 및 대사율이 감소하고(Fauconneau et al., 1983), 수온이 상승하면 활동성 및 대사율이 증가한다(NRC, 1993). 이것은 같은 물질이라도 사육수온에 따라 그 효과가 달라질 수 있음을 의미한다.

실험 I 은 발효마늘분말의 첨가가 넙치의 성장과 비특이적 면역반응에 미치는 영향을 알아보고, 실험 II 는 효과가 검증되지 않은 발효마늘착즙액을 사료에 농도별로 첨가하여 넙치의 성장, 면역반응, 혈액성분 및 어병세균(*S. imiae* 및 *E. tarda*)에 대한 질병 저항성을 알아보기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

시험물질(발효마늘분말과 발효마늘착즙액 제조)

발효마늘분말과 발효액은 제주특별자치도 제주시 오등동에

Table 2. Formulation and proximate composition of diets used in experiment I (% of dry matter basis)

| Ingredients | Diets | | | |
|---|-------|---------|-------|---------|
| | FGP-0 | FGP-0.5 | FGP-1 | FGP-1.5 |
| White fish meal ¹ | 45.0 | 45.0 | 45.0 | 45.0 |
| Soybean meal ¹ | 15.0 | 15.0 | 15.0 | 15.0 |
| Fermentation garlic powder ² | 0.0 | 0.5 | 1.0 | 2.0 |
| Wheat flour | 23.0 | 23.0 | 23.0 | 23.0 |
| Yeast | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| Vitamin mixture ³ | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Mineral mixture ⁴ | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Squid liver oil ⁵ | 8.0 | 8.0 | 8.0 | 8.0 |
| Starch | 5.0 | 4.5 | 4.0 | 3.0 |
| Proximate composition | | | | |
| Dry matter (%) | 83.4 | 82.1 | 79.3 | 78.1 |
| Crude protein (% DM) | 45.1 | 45.5 | 45.3 | 45.8 |
| Crude lipid (% DM) | 10.3 | 10.4 | 10.5 | 10.3 |
| Crude ash (% DM) | 12.4 | 12.5 | 12.3 | 12.5 |
| Estimated energy (MJ/kg DM) | 17.1 | 17.1 | 17.1 | 17.1 |

¹Provided by Suhyup Feed Co. Ltd., Uiryeong, Korea.

²Provided by Aqua Green Technology Co. Ltd., Jeju, Korea.

³Vitamin premix (g/kg of mixture): L-ascorbic acid monophosphate, 100.0; DL-tocopheryl acetate, 20.0; thiamin hydrochloride, 4.0; riboflavin, 4.4; pyridoxine hydrochloride, 4.0; niacin, 30.0; D-pantothenic acid hemicalcium salt, 14.5; myo-inositol, 40.0; D-biotin, 0.2; folic acid, 0.48; menadione, 0.2; retinyl acetate, 1.0; cholecalciferol, 0.05; cyanocobalamin, 0.01.

⁴Mineral mixture (g/kg of mixture): MgSO₄·7H₂O, 80.0; NaH₂PO₄·2H₂O, 370.0; KCl, 130.0; Ferric citrate, 40.0; ZnSO₄·7H₂O, 20.0; Ca-lactate, 356.5; CuCl₂, 0.2; AlCl₃·6H₂O, 0.15; Na₂Se₂O₃, 0.01; MnSO₄·H₂O, 2.0; CoCl₂·6H₂O, 1.0.

⁵Squid liver oil was purchased from E-Wha oil Co. Ltd., Pusan, Korea.

⁶Estimated energy was determined by using values of 16.7 KJ/g protein or carbohydrate and 37.6 KJ/g fat for dietary ingredients.

위치한 아쿠아그린텍(주)에서 자체 개발하여 제조한 것을 구입하여 사용하였다. 제조방법은 다음과 같다. 우선 서귀포시 대정읍에서 수확된 마늘을 구입하여 깨끗하게 세척한 후 마늘착즙액과 마늘고형 잔사로 제조한다. 그 후 마늘고형물 잔사에 대해서는 *Bacillus* spp. 계통의 고온발효균주를 이용하여 고온발효에 의하여 마늘발효분말을 제조하였으며, 마늘착즙액은 발효효모를 이용하여 상온에서 발효시켜 마늘발효액을 제조하였다. 본 연구에 사용된 발효마늘분말의 일반성분 조성은 Table 1에 나타내었다.

실험사료

발효마늘분말을 이용한 실험 I 의 실험사료는 총 4개로 조단백질 함량과 에너지 수준이 각각 45%와 17.1 MJ/kg를 갖도록 동일하게 조성되었다. 본 실험에 사용된 실험사료의 조성구분과 일

Table 3. Formulation and proximate composition of diets used in experiment II

| Ingredients | Commercial expanded pellets | | | |
|---|-----------------------------|----------|---------|-------|
| | FGF-0 | FGF-0.25 | FGF-0.5 | FGF-1 |
| Fermented garlic fluid ¹ | 0 | 0.25 | 0.5 | 1 |
| Distilled water | 0 | 119.75 | 119.5 | 119 |
| Chitosan-coating solution ¹⁾ | 0 | 50 | 50 | 50 |
| Proximate composition | | | | |
| Dry matter (%) | 91.3 | 74.2 | 73.7 | 73.6 |
| Crude protein (% DM) | 57.7 | 57.4 | 57.5 | 57.4 |
| Crude lipid (% DM) | 10.6 | 12.9 | 12.3 | 12.3 |
| Crude ash (% DM) | 12.4 | 12.5 | 12.3 | 12.5 |

¹Provided by Aqua Green Technology Co. Ltd., Jeju, Korea.

반성분 분석은 Table 2에 나타내었다. 발효마늘분말의 사료 내 첨가함량이 각각 0%, 0.5%, 1% 및 1.5%가 되도록 첨가하여(G-0, G-0.5, G-1 및 G-1.5) 실험사료를 제조하였다. 실험사료 제조는 모든 사료원들을 파쇄기를 이용하여 분말형태로 일정하게 만든 후, 각 사료원들을 사료조성표에 따라 무게를 재고 혼합하였다. 혼합 후 사료원 총량의 30-40%에 해당하는 증류수를 첨가하여 사료혼합기(NVM-14-2P, KOREA)로 혼합 및 반죽하였다. 혼합반죽물은 소형초파기(SMC-12, Korea)를 이용하여 직경 3 mm 크기로 압출 성형되었다. 제작된 실험사료는 -70°C 동결냉동 건조기에서 건조시켜, 시브(Sieve)를 이용하여 적당한 크기의 사료로 가공되었다.

발효마늘추출액을 이용한 실험 II의 실험사료는 총 4개로 실험사료의 조성 및 반성분 분석은 Table 3에 나타내었다. 상업용 배합사료(수협사료)에 액체형태의 마늘액상을 각각 0%, 0.25%, 0.5% 및 1%가 되도록 첨가하여(GF-0, GF-0.25, GF-0.5 및 GF-1) 흡착시킨 후 유실을 막기 위해 키토산코팅제로 코팅처리 하였다. 실험사료 제조는 적당량의 마늘액상과 증류수를 혼합하여 상업사료에 뿌려 충분히 흡착시킨 후, 다시 키토산코팅제(1% chitosan, 1% tamarind gum, 0.5% vitamin C, 0.3% glucosamin sulfate, 0.1% chitoooligosaccharide, 0.5% asthaxanthin)로 실험사료를 코팅시켰다. 두 실험의 실험사료는 공급 전까지 -20°C 냉동고에 보관 후 실험에 사용되었다.

실험동물 및 사육환경

이번 실험에 사용된 실험어류는 제주도내 양식장에서 구입하여 제주대학교 소속 해양과환경연구소로 운송되어, 2주 동안 시판 배합사료를 공급하면서 실험환경에 적응할 수 있도록 순치시킨 후 사료공급실험에 사용되었다. 실험 I 과 II에서의 넙치 치어(초기 평균무게: 65.0 g)는 각각 총 12개의 150 L 원형 플라스크 수조에 각 수조당 30마리씩 무작위로 선택되어 배치되었다. 두 실험 모두 실험구당 2반복구를 두었으며, 사육수는 여과해수를 사용하여 3 L/min의 유수량이 되도록 조절하였고, 모든

Table 4. Effects of dietary supplementation of fermented garlic powder and fluid on growth performance of olive flounder *P. olivaceus* fed the experimental diets for 10 weeks¹

| Experiment I (fermented garlic powder) | | | | |
|--|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Diets | FGP-0 | FGP-0.5 | FGP-1 | FGP-1.5 |
| IMW ² | 64.8±0.35 | 65.1±0.80 | 64.7±0.24 | 65.3±0.42 |
| FMW ³ | 110.8±5.9 | 106.4±17.2 | 103.1±1.5 | 106.4±5.1 |
| Weight gain ⁴ | 71.0±10.0 | 63.7±28.4 | 59.4±2.8 | 62.9±6.8 |
| FI ⁵ | 65.7±1.38 ^b | 60.5±1.38 ^a | 61.0±0.02 ^a | 66.7±2.20 ^b |
| SGR ⁶ | 0.89±0.10 | 0.81±0.29 | 0.78±0.03 | 0.81±0.07 |
| FCR ⁷ | 1.44±0.17 | 1.61±0.67 | 1.59±0.07 | 1.63±0.13 |
| PER ⁸ | 1.59±0.18 | 1.55±0.64 | 1.43±0.06 | 1.40±0.11 |
| Survival | 46.7±28.3 ^a | 46.7±0.0 ^a | 96.7±0.0 ^b | 98.3±2.4 ^b |
| Experiment II (fermented garlic fluid) | | | | |
| Diets | FGF-0 | FGF-0.25 | FGF-0.5 | FGF-1 |
| IMW ² | 65.0±0.14 | 65.2±0.68 | 65.0±0.14 | 65.2±0.24 |
| FMW ³ | 120.3±1.5 | 106.2±10.8 | 106.7±5.6 | 120.8±3.2 |
| Weight gain ⁴ | 85.2±2.65 | 62.9±18.27 | 64.1±9.01 | 85.2±4.21 |
| FI ⁵ | 50.0±0.97 ^a | 59.3±0.47 ^b | 59.6±4.33 ^b | 63.1±1.17 ^b |
| SGR ⁶ | 1.03±0.02 | 0.81±0.19 | 0.82±0.09 | 1.03±0.04 |
| FCR ⁷ | 0.90±0.01 ^a | 1.51±0.41 ^b | 1.43±0.09 ^{ab} | 1.14±0.04 ^{ab} |
| PER ⁸ | 2.28±0.02 ^b | 1.42±0.39 ^a | 1.44±0.09 ^a | 1.81±0.06 ^{ab} |
| Survival | 100 | 100 | 100 | 100 |

¹Means of duplicate groups. Values are presented as mean ± SD. Values in the same row having different superscript letters are significantly different (P≤0.05).

²IMW=Initial mean body weight.

³FMW=Final mean body weight.

⁴Weight gain (%) = 100 × (final mean body weight - initial mean body weight) / initial mean body weight.

⁵Feed intake (g/g body weight) = dry feed fed (g) / body weight (g).

⁶Specific growth rate (%) = [(log_e final body weight - log_e initial body weight) / days] × 100.

⁷Feed conversion ratio = dry feed fed / wet weight gain.

⁸Protein efficiency ratio = wet weight gain / total protein fed.

실험수조에 용존산소 유지와 원활한 사육수 순환을 위하여 에어스톤을 설치하였다. 광주기는 형광등을 이용하여 12L:12D 조건으로 유지되었고 전 사육실험기간 동안의 평균수온은 20°C-26°C 범위로 자연수온에 의존하였다. 실험사료는 1일 2회(09:00와 16:00시)로 어체중의 1-1.5%로 제한급이를 하였다. 성장률 측정은 매2주마다 실시되었고 측정 24시간 전에 모든 실험어류를 절식시켰다. 실험 I 과 II의 사료공급실험은 각각 10주간씩 수행되었다.

샘플수집 및 분석

10주간의 사료공급 실험 후, 어류의 최종평균무게를 측정하여 증체율(Weight gain), 사료섭취율(Feed intake), 사료전환효율(Feed conversion ratio), 일간성장률(Specific growth rate),

Table 5. Hematological parameters of olive flounder *P. olivaceus* fed the experimental diets for 10 weeks¹

| Experiment I (fermented garlic powder) | | | | |
|--|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Diets | FGP-0 | FGP-0.5 | FGP-1 | FGP-1.5 |
| Hematocrit (%) | 33.8±2.47 | 33.2±0.71 | 33.7±1.94 | 33.3±2.12 |
| Hemoglobin (g/dL) | 5.74±0.27 | 5.30±0.21 | 5.78±0.25 | 5.62±1.02 |
| Cholesterol (mg/dL) | 256.4±13.1 ^b | 226.2±12.0 ^{ab} | 180.8±29.1 ^a | 200.2±1.4 ^a |
| HDL-cholesterol (mg/dL) | 86.39±19.0 | 125.73±15.8 | 107.88±1.6 | 105.98±28.3 |
| Triglyceride (mg/dL) | 14.33±0.20 ^b | 13.34±0.47 ^{ab} | 13.24±0.50 ^a | 12.96±0.04 ^a |
| Experiment II (fermented garlic fluid) | | | | |
| Diets | FGF-0 | FGF-0.25 | FGF-0.5 | FGF-1 |
| Hematocrit (%) | 37.6±1.24 | 37.4±0.18 | 39.3±0.06 | 40.1±3.36 |
| Hemoglobin (g/dL) | 6.59±0.24 | 6.30±0.71 | 6.88±0.34 | 7.08±0.74 |
| Cholesterol (mg/dL) | 195.4±25.4 ^b | 146.3±0.3 ^a | 152.7±4.2 ^a | 163.4±11.1 ^{ab} |
| HDL-cholesterol (mg/dL) | 73.12±8.17 | 73.65±5.23 | 72.88±3.26 | 77.47±2.49 |
| Triglyceride (mg/dL) | 15.51±0.28 | 15.90±0.54 | 15.59±0.25 | 15.84±0.18 |

¹Means of duplicate groups. Values are presented as mean ± SD. Values in the same row having different superscript letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

단백질전환효율(Protein efficiency ratio) 및 생존율(Survival)을 계산하였다. 최종무게 측정 후 각 수조마다 6마리의 어류를 무작위로 선별하여 2-phenoxyethanol용액(100 ppm)으로 마취시켜 헤파린이 처리된 주사기를 사용하여 미부동맥에서 채혈을 하였다. 채혈 즉시 hematocrit, hemoglobin 및 nitroblue tetrazolium(NBT) activity를 측정하였다. 분석 후, 남은 혈액은 myeloperoxidase (MPO) activity, lysozyme activity, triglycerol, cholesterol 및 HDL-cholesterol 분석을 위해 원심분리기(Micro 17TR, Hanil Science, Korea)를 이용하여 5,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 혈액을 채취하고 남은 어류는 일반성분 분석을 위해 -50°C 저온냉동고에 보관되었다.

실험사료 분석

실험사료원 및 실험사료의 일반성분 분석은 AOAC (1995) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125°C, 3시간), 조회분은 직접회화법(550°C, 12시간), 단백질은 자동 조단백 분석기(Kejltac System 2300, Sweden)로 분석되었으며, 지방은 Folch et al. (1959)의 방법에 따라 Soxhlet 추출장치(Soxhlet Heater System C-SH6, Korea)를 이용하여 분석되었다.

혈액분석

Hematocrit은 헤파린이 처리된 미세혈관채혈튜브(Micro-hematocrit Capillary Tubes)에 혈액을 채운 다음 고무판(Wax plates)에 세운 후, 혈액진단원심분리기(Micro Hematocrit VS-12000, Vision Scientific, Korea)에서 10분간 원심분리하여 값을 측정하였다. Hemoglobin, triglyceride, cholesterol 및 HDL-cholesterol 분석은 각각의 시판 시약과 반응시킨 후 혈액생화학분석기(Express plus system, Bayer, USA)를 이용하여 분석하였다. Hemoglobin은 end point, triglyceride, cholesterol 및

HDL-cholesterol은 kinetic방법으로 kit를 이용하여 분석되었다.

면역학적 분석

혈액내의 대식세포 활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 분석방법을 응용하여 호흡폭발 동안의 호중구(Neutrophils)에 의한 oxidative radical 생성량을 측정하였는데 분석방법은 다음과 같다. 우선 혈액(전혈)과 NBT solution (0.2%)을 1:1의 비율로 각각 50 µL씩 섞은 후 25°C에서 30분 동안 반응시킨 후, 50 µL를 glass tube에 옮긴 후, formazon 생성을 감소시키기 위해 dimethyl formamide를 1 mL씩 넣는다. 그 후 2,000×g에서 5분 동안 원심분리를 하여 최종적으로 상층액을 취한 후, NBT의 감소되는 범위를 분광광도계(Genesys 10 UV, Rochester, NY, USA)를 사용하여 최적의 흡광도인 540 nm에서 측정하였다. Blank는 dimethyl formamide를 사용하였다.

혈청 내 myeloperoxidase 활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 방법을 기초로 분석하였다. 먼저 HBSS (Hanks balanced salt solution)를 96-well plates에 80 µL씩 분주한 다음 혈청 20 µL를 넣는다. 그 후 20 mM TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine hydrochloride) 용액과 5 mM H₂O₂ 용액을 넣는다. 2분간 반응시킨 후 4 M H₂SO₄ 용액을 35 µL 첨가한 후 microplate reader (Thermo, USA) 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈청 내 lysozyme 활성은 Yeh et al. (2008)의 분석방법을 바탕으로 분석하였다. 먼저 0.05 M sodium phosphate acid buffer (pH 6.2)에 동결 건조된 *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, USA)를 첨가하여 0.2 mg/ml 농도의 현탁액을 만든다. 현탁액 200 µL를 96-well plates에 분주하고, 어류에서 분리한 혈청 10 µL를 혼합시킨 후, microplate reader를 이용하여 530 nm에서 1분과 6분에 흡광도 값을 측정하였다. Lysozyme 활성단위는 분당 0.001의 흡광도 감소를 나타내는 양으로 정의하였다.

Table 6. Immunological parameters of olive flounder *P. olivaceus* fed the experimental diets for 10 weeks¹

| Experiment I (fermented garlic powder) | | | | |
|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Diets | FGP-0 | FGP-0.5 | FGP-1 | FGP-1.5 |
| NBT activity (540 nm) ² | 0.923±0.07 | 0.937±0.02 | 0.969±0.04 | 0.968±0.00 |
| Lysozyme activity (Unit/mL) | 33.8±1.18 ^a | 36.3±1.89 ^a | 43.3±0.47 ^b | 38.0±2.83 ^a |
| MPO activity (450 nm) ³ | 2.85±0.07 | 2.97±0.02 | 2.96±0.09 | 3.01±0.17 |
| Experiment II (fermented garlic fluid) | | | | |
| Diets | FGF-0 | FGF-0.25 | FGF-0.5 | FGF-1 |
| NBT activity (540 nm) ² | 0.921±0.03 | 0.957±0.00 | 0.955±0.04 | 0.951±0.00 |
| Lysozyme activity (Unit/mL) | 19.7±12.73 ^a | 28.8±3.18 ^{ab} | 46.7±4.24 ^b | 47.1±6.54 ^b |
| MPO activity (450 nm) ³ | 2.95±0.04 ^a | 3.28±0.09 ^b | 3.16±0.17 ^{ab} | 3.12±0.12 ^{ab} |

¹Means of duplicate groups. Values are presented as mean ± SD. Values in the same row having different superscript letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

²Nitro-blue tetrazolium (NBT) activity.

³Myeloperoxidase activity.

공격실험

실험 II의 성장실험 종료 후, 발효마늘착즙액이 넙치의 항병력에 미치는 영향을 조사하기 위해 병원성 세균 2종 *S. iniae* (KCTC-3651) 및 *E. tarda* (KCTC-3657)로 각각 공격실험을 실시하였다. 병원성 세균 2 균주는 각각 TSA 배지에서 25°C에서 24시간 배양한 후 집균하였고, 해수에 1×10^6 cfu/mL 농도가 되도록 현탁하여 침지 공격실험에 사용되었다. 공격실험에 사용된 균의 적정농도는 사육실험이 종료되기 2주 전에 같은 크기의 넙치를 대상으로 예비실험을 하여 결정하였다. 10주간의 사육실험 후 실험구 당 넙치 10마리씩을 실험구로 사용하였으며, 세균을 현탁시킨 24°C 해수에 1시간 동안 침지시켰다. 모든 그룹은 24°C로 수온을 유지하였으며, 23일간 폐사를 관찰하였다.

통계학적 분석

실험사료군의 배치는 완전확률계획법(Completely randomized design)에 따라 실시하였고, 분석결과는 SPSS (Statistical package for the social sciences, Version 12.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석되었다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's multiple test ($P \leq 0.05$)로 비교되었다.

결과 및 고찰

발효마늘분말과 발효마늘착즙액 처리가 성장 및 사료효율에 미치는 영향

Table 4에는 발효마늘분말과 발효액에 의한 실험 I 과 II의 10주간 성장실험 결과를 나타내었다. 실험 I의 성장실험 결과, 사료 내 발효마늘분말의 첨가에 따른 성장률, 일간성장률, 사료 전환효율 및 단백질전환효율에서는 모든 실험구에서 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다. 사료섭취율에서는 마늘분말이 0.5% 및 1% 첨가된 실험구에서 대조구와 비교하여 유의적으로 낮은

값을 보였으며, 가장 높은 실험구인 1.5% 실험구에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 저수온기에 넙치 치어를 대상으로 수행한 선행연구(Kim et al., 2010)에서도 이와 비슷하게 사료섭취율을 제외하고 모든 실험구에서 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다. 선행연구에서 사료섭취율은 마늘분말 첨가함량이 증가함에 따라 유의적으로 감소하였는데, 본 연구에서는 가장 높은 1.5% 실험구에서 대조구와 유의적인 차이를 보이지 않고 다른 첨가실험구 보다는 유의적으로 높은 값을 보였다. 그 이유는 사육수온 및 어체크기의 차이로 판단된다. 선행연구는 넙치 치어(23.5 g)를 대상으로 수온이 16°C에서 18°C 범위인 저수온기에 수행되었으며, 본 연구는 넙치 65 g 사이즈를 대상으로 20°C에서 26°C 범위인 적수온기에 수행되었다. 수온은 어류의 성장에 영향을 미치는 중요한 환경인자의 하나이며(Brett and Higgs, 1970), 사육수온이 증가함에 따라 사료섭취율은 증가하는 경향을 보인다(Iwata et al., 1994). 따라서 본 연구에서 가장 높은 첨가구인 1.5% 실험구에서 대조구와 유의적인 차이를 보이지 않은 것은 사육수온, 어체 크기, 발효마늘분말에 포함된 생리활성 물질 및 마늘의 향 등이 복합적으로 작용한 것으로 판단된다. 생존율에서는 마늘분말 첨가함량이 증가함에 따라 유의적으로 높은 생존율을 보였다. 본 연구를 수행하는 과정에서 모든 수조에서 자연적으로 질병이 발병하였다. 발효마늘분말이 첨가되지 않는 대조구와 가장 낮은 함량인 0.5% 첨가구의 생존율은 46.7%, 고농도인 1% 및 1.5% 첨가구는 각각 96.7%와 98.3%의 생존율을 보였다. 이것은 발효마늘분말이 어병세균에 대한 질병저항성을 높일 수 있음을 간접적으로 증명한다. 따라서 마늘분말에 포함된 생리활성 물질이 어류에 효과적으로 전달되어 비특이적 면역반응을 증가시켜 어병세균에 대한 질병저항성을 높인 것으로 판단된다.

실험 II의 성장실험 결과, 사료 내 발효마늘착즙액의 첨가에 따른 성장률, 일간성장률 및 생존율에서는 모든 실험구에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 사료섭취율에서는 발효마늘액상

Table 7. Whole-body composition of olive flounder *P. olivaceus* fed the experimental diets for 10 weeks¹

| Experiment I (fermented garlic powder) | | | | |
|--|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| Diets | FGP-0 | FGP-0.5 | FGP-1 | FGP-1.5 |
| Crude protein (% DM) | 70.6±2.98 | 67.2±3.93 | 69.3±1.63 | 69.6±3.77 |
| Crude lipid (% DM) | 10.7±0.93 | 11.6±1.95 | 10.9±2.75 | 10.8±3.63 |
| Crude ash (% DM) | 14.4±1.16 | 15.1±1.07 | 13.1±1.50 | 16.4±1.00 |
| Dry matter (%) | 73.4±0.57 ^a | 72.0±0.61 ^a | 73.4±0.28 ^a | 74.7±0.04 ^b |
| Experiment II (fermented garlic fluid) | | | | |
| Diets | FGF-0 | FGF-0.25 | FGF-0.5 | FGF-1 |
| Crude protein (% DM) | 73.6±2.23 | 77.2±3.44 | 72.4±2.70 | 75.2±1.57 |
| Crude lipid (% DM) | 8.6±0.78 | 7.1±1.61 | 8.4±1.28 | 7.8±2.29 |
| Crude ash (% DM) | 15.7±1.27 | 16.6±2.13 | 15.3±1.67 | 13.3±1.05 |
| Dry matter (%) | 74.2±0.53 ^{ab} | 75.8±0.47 ^b | 73.5±0.27 ^a | 74.3±0.92 ^{ab} |

¹Means of duplicate groups. Values are presented as mean ± SD. Values in the same row having different superscript letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

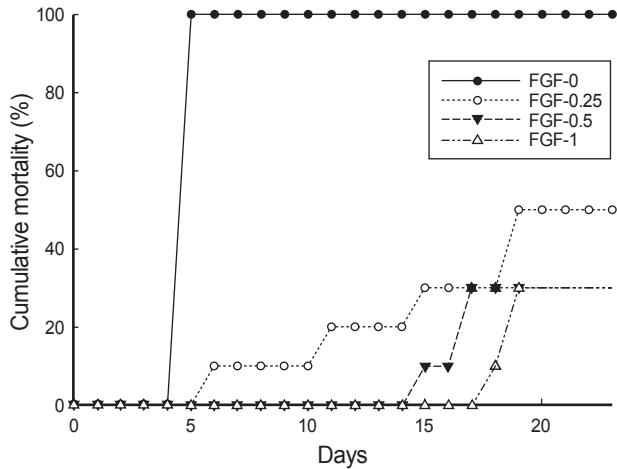


Fig. 1. Cumulative mortality of olive flounder *P. olivaceus* fed the experimental diets containing 0%, 0.25%, 0.5% and 1% of fermented garlic fluid after challenge with *Streptococcus iniae* by immersion.

을 침지시킨 모든 실험구에서 대조구보다 유의적으로 높은 섭취율을 보였다. 사료효율은 0.25% 첨가구에서 대조구보다 유의적으로 낮은 효율을 보였으며, 단백질이용효율에서는 0.25% 및 0.5% 첨가구에서 대조구 보다 유의적으로 낮은 값을 보였다. 실험기간 동안 모든 실험구의 생존율은 100%였다. 대조구는 상업용 배합사료(Expanded pellet)를 그대로 사용하였고, 첨가실험구는 발효마늘착즙액을 농도별로 침지시킨 후, 키토산코팅제로 코팅하여 실험어류에 공급하였다. 실험사료의 일반성분 분석(Table 3)을 보면 알 수 있듯이 수분과 지방의 함량이 마늘액상을 첨가한 실험사료가 일반 상업용 배합사료보다 높은 값을 보였다. Kim et al. (2011)은 넙치를 대상으로 배합사료의 수침효과 실험을 수행하였다. 그 결과, 비록 유의적인 차이는 관찰되지 않았지만, 수침을 하지 않은 비수침실험구에서 오히려 높은 성장률, 일간성장률, 사료효율 및 단백질이용효율을 보였다. 조직

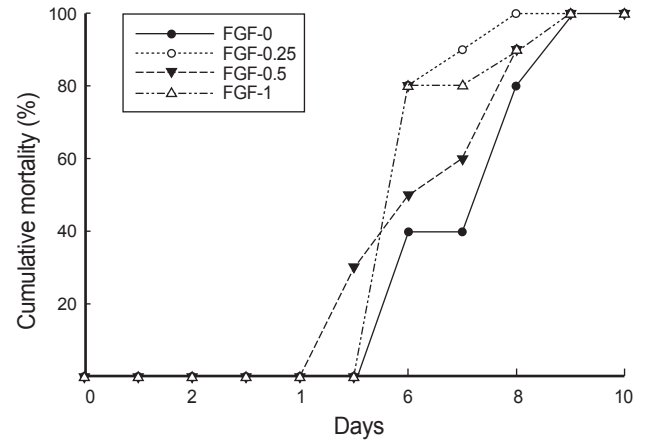


Fig. 2. Cumulative mortality of olive flounder *P. olivaceus* fed the experimental diets containing 0%, 0.25%, 0.5% and 1% of fermented garlic fluid after challenge with *Edwardsiella tarda* by immersion.

학적 분석결과도 전장의 조직상에서 수침그룹이 비수침그룹 보다 오히려 점막상피층의 핵 응축과 일부 점막층이 탈락된 점막 주름이 더 많이 관찰되었으며, 점막주름의 길이도 짧아진 것을 관찰할 수 있었다고 보고하였다. 이러한 매커니즘으로 수침과정에서 본래의 영양소함량에 영향을 미치고, 사료의 사이즈도 커지며, 사료가 물위에 잔류하는 부상시간 및 사료의 점결성에도 영향을 끼친다고 보고하였다. 또한 사료의 점결성이 약해지면 서 어류의 소화과정에서 쉽게 소화가 이루어져 전장의 점막주름의 길이가 짧아진다고 하였다. 그 결과 수침사료는 일반배합사료 보다 더 쉽고 빨리 대사와 이화작용이 이루어져 어류가 이용하기 전에 체내에서 빠져나가기 때문이라고 판단하고 있다. 따라서 본 연구에서도 사료섭취율, 사료전환효율 및 단백질이용효율이 발효마늘착즙액으로 침지시킨 그룹에서 대조구와 차이를 보인 것은 실험사료의 수분함량, 지방함량, 사료사이즈, 점결성, 마늘의 생리활성물질 및 향 등이 복합적으로 작용한 것으로 판

단된다.

발효마늘분말과 발효착즙액 처리에 의한 혈액학적 조사

실험사료를 섭취한 실험 I 과 II 의 실험어류 혈액성분 비교결과는 Table 5에 나타내었다. Hematocrit, hemoglobin 및 HDL-cholesterol의 함량은 두 실험에서 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다. 발효마늘분말을 첨가한 실험 I에서는 cholesterol 및 triglycerol 함량이 농도의존적으로 감소하였으며, 발효마늘 착즙액을 침지시킨 실험 II에서는 cholesterol 함량이 대조구보다 유의적으로 낮은 값을 보였다. 발효마늘분말을 첨가하여 수행한 선행연구에서도 이와 비슷하게 triglycerol 함량이 유의적으로 감소하였다. 이미 많은 연구자들에 의해 마늘 첨가식에 의한 혈청 cholesterol 및 triglycerol 저하효과는 증명되었다 (Sharma et al., 1976). Chun and Paik (1997)은 자발성 고혈압 쥐를 대상으로 cholesterol, triglyceride 및 HDL-cholesterol을 조사한 결과, 대조군이 마늘첨가구보다 높은 cholesterol 함량을 보였고, triglyceride은 낮은 경향은 보였으나 유의적인 차이를 보이지 않았으며, HDL-cholesterol은 유의적인 차이가 없다고 보고하였다. Qureshi (1983)는 마늘 급여에 의해 triglyceride은 감소하였으나 HDL-cholesterol 수준은 변화가 없다고 보고하였다. 본 연구결과와 지금까지 수행된 연구결과를 종합해 볼 때, 사료 내 발효마늘분말의 첨가는 cholesterol 및 triglyceride 수준을 감소시키며, 발효마늘착즙액은 cholesterol 수준을 감소시키는 것으로 판단된다.

발효마늘분말과 발효액 처리가 비특이적 면역반응에 미치는 영향

본 연구에서는 발효마늘분말과 발효마늘착즙액에 의한 비특이적 면역반응 평가를 위해 nitro-blue tetrazolium (NBT) activity, lysozyme activity 및 myeloperoxidase (MPO) activity를 분석하였다(Table 6). NBT activity는 대식세포의 활성을 측정하는 것으로 대식세포는 병원체가 몸 조직에 침범하였을 때 면역 시스템에서 첫 번째로 작용하는 세포로 세균과 다른 미생물에 결합하여 포식작용을 수행하며, 선천면역과 적응면역 양쪽에 관여하는 포식세포이다. 대식세포가 활성화 되면 포획된 미생물의 가수분해를 촉진시키고 동시에 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생산을 증가시킨다. 따라서 대식세포활성의 증가는 미생물에 대하여 세포독성을 일으키는 superoxide anion, hydrogen peroxide 및 hydroxyl radical과 같은 ROS 생산을 증가시키게 되므로 이러한 ROS의 측정을 통해 간접적으로 대식세포의 활성을 확인할 수 있다. 실험 I 과 II 의 NBT activity 분석결과, 발효마늘분말과 발효마늘착즙액을 첨가한 실험구에서 대조구보다 높은 값을 보였으나, 유의적인 차이는 보이지 않았다.

Lysozyme activity는 비특이적 면역반응에 관여하는 항균효소 중의 하나로서 특정세균에 대한 특이적인 항균작용이 아닌 비특이적으로 다양한 균에 대한 항균작용을 나타내는 효소이다.

병원균에 대한 항균 매커니즘은 세균 세포벽의 구성성분인 peptidoglycan의 β -1,4-glucoside 결합을 가수분해하여 세균의 세포벽을 파괴함으로써 항균작용을 나타낸다. 실험 I 의 lysozyme activity 분석결과, 대조구보다 발효마늘분말을 첨가한 실험구에서 높은 값을 보였으며, 1% 첨가구에서 대조구보다 유의적으로 높은 활성을 보였다. 발효마늘착즙액을 첨가한 실험 II에서는 농도-의존적으로 증가하여 0.5% 및 1%의 고농도 첨가구에서 대조구보다 유의적으로 높은 활성을 보였다.

MPO activity는 호중구, 호염기구, 호산구에 존재하는 과산화효소로서 특히 호중구에 가장 풍부하게 존재하며 항균작용을 지닌 효소이다. 이 효소는 백혈구로부터 방출되어 박테리아 살균제인 hypochlorous acid (HOCL)을 만들어 병원체를 사멸시켜 비특이적 면역반응을 증가시킨다. 발효마늘 분말을 첨가한 실험 I에서는 농도-의존적으로 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 발효마늘착즙액을 첨가한 실험 II에서는 0.25% 첨가구에서 대조구보다 유의적으로 높은 활성을 보였으며, 0.5% 및 1% 첨가구와는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

저수온기에 넙치를 대상으로 사료 내 발효마늘분말을 첨가한 선행연구(Kim et al., 2010)의 면역반응 결과와 본 연구의 발효마늘분말의 효과를 비교해 보면, 거의 차이를 보이지 않았다. 따라서 발효마늘 분말은 저수온과 적수온 모두에서 비특이적 면역반응을 향상시킬 수 있음이 증명되었다. 추후 발효마늘분말은 고수온에 대한 효과실험이 보완되어야 할 것으로 판단되며, 발효마늘착즙액은 저수온과 고수온에 대한 효과실험이 추가적으로 수행되어야 할 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 사료 내 발효마늘분말과 발효마늘착즙액의 첨가는 대식세포, lysozyme 및 myeloperoxidase activity를 활성화시키는 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서 사용한 발효마늘분말 및 발효마늘착즙액은 넙치의 면역강화용 사료첨가제로서의 사용가능성을 보여주고 있다.

공격실험(인위감염에 의한 생존율)

발효마늘착즙액이 넙치의 항병력에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 병원성세균 2종(*S. iniae* 와 *E. tarda*)를 사용하여 침지 감염을 통한 누적폐사율을 관찰한 결과(Fig 1, 2), *S. iniae*에 대한 질병저항성이 현저히 증가하는 것으로 확인되었다. 발효마늘액상을 첨가하지 않은 대조구(FGF-0)에서는 감염 후 5일째에 100%의 누적폐사율을 보였지만, 발효마늘착즙액 첨가 실험구(0.25%, 0.5%, 1% groups)에서는 각각 50%, 30%, 30%의 누적폐사율을 나타내어 발효마늘착즙액에 대해 농도-의존적으로 폐사가 감소되는 것을 보였으며, 대조구에 비해 실험구 모두에서 생존율이 크게 향상됨을 확인할 수 있었다. 하지만 *E. tarda*을 이용하여 감염시킨 경우에는 모든 그룹에서 공격 후 9일 이내에 100% 누적폐사율을 보였으며, 대조구와 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 본 연구결과와 비슷하게 발효마늘분말을 이용하여 저수온기 넙치 치어를 대상으로 한 선행연구에서도 *V. anguilla*-

rum 및 *S. iniae*에 대한 질병저항성은 증가되었으나, *E. tarda*에 대해서는 효과가 나타나지 않았다. 첨가물질이 비특이적 면역반응을 향상시키더라도 모든 어병세균에 같은 효과를 미치는 것이 아니라 달라질 수 있음을 의미한다. 주요 어병세균인 *S. iniae*에 대한 항병력 향상 효과는 마늘이 가지는 여러 가지 유용 생리활성 물질에 의해 사료 자체의 항산화효과가 증가하여 이를 섭취한 어류에 효과적으로 전달됨으로서 어류의 면역시스템을 활성화 시킨 것으로 판단된다. 공격실험의 결과를 종합해 보면, 사료 내 발효마늘착즙액의 첨가는 *S. iniae*에 대한 항병력에는 효과가 있을 것으로 판단되나 *E. tarda*에 대한 항병력에는 효과가 없거나 침지농도가 적절하지 않았을 것으로 추측된다. 하지만 보다 더 정확한 매커니즘은 추가적인 분석이 필요할 것으로 판단된다.

사 사

이 연구는 국립수산물품질관리원(고효율 배합사료 개발 및 실용화 연구, RP-2011-AQ-111)와 농림수산물식품부 수산기술개발사업(친환경 유기양식 생산 매뉴얼 개발을 통한 양식업자의 고품질화 및 가공기술 개발, 과제번호:108214-03-3-SB010)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- AOAC. 1995. Official methods of analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, U.S.A., 1298.
- Brett JR and Higgs DA. 1970. Effects of temperature on rate of gastric digestion in fingerling sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. J Fish Res Bd Can 27, 1767-1779.
- Cavallito CJ, Bailey JH and Buck JS. 1945. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum* L. Its precursor and essential oil of garlic. J Am Chem Soc 67, 1032-1040.
- Chi MS, Koh ET and Stewart TJ. 1982. Effect of garlic on lipid metabolism in rats fed cholesterol or lard. J Nutr 112, 241-248.
- Chun HJ and Paik JE. 1997. Effect of heat treatment of garlic added diet on the blood of spontaneously hypertension rat. J Korean Soc Food Sci Nutr 26, 103-108.
- Chung JY and Kim CS. 2008. Antioxidant activities of domestic garlic (*Allium sativum* L.) stems from different areas. J Korean Soc Food Sci Nutr 37, 972-978.
- Fauconneau BG, Choubert D, Blanc J, Breque and Luquet P. 1983. Influence of environmental temperature on flow rate of foodstuffs through the gastro-intestinal tract of rainbow trout. Aquaculture 34, 27-39.
- Folch J, Lee M and Sloane-Stanley GH. 1959. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem 226, 497-509.
- Iwata N, Kikuchi K, Honda H, Kiyono M and Kurokura H. 1994. Effects of temperature on the growth of Japanese flounder. Fish Sci 60, 527-531.
- Kim KJ, Do JR and Kim HK. 2005. Antimicrobial, antihypertensive and anticancer activities of garlic extracts. Korean J Food Sci Technol 37, 228-232.
- Kim KW, Kim SS, Kim JW, Son MH, Kim KD, Bai SC and Lee KJ. 2011. Effects of feeding rate and pellet water-soaking on growth, blood components, and histology of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Kor J Fish Aquat Sci 44, 490-498.
- Kim SS, Galaz GB, Lee KJ and Lee, YD. 2006. Effects of dietary supplementation of Spirulina and astaxanthin for juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in low temperature season. J Aquacult 19, 57-63.
- Kim SS, Galaz GB, Pham MA, Jang JW, Oh DH, Yeo IK and Lee KJ. 2009. Effects of dietary supplementation of a Meju, fermented soybean meal, and *Aspergillus oryzae* for juvenile parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). Asian-Aust J Anim Sci 22, 849-856.
- Kim SS and Lee KJ. 2008. Effects of dietary kelp (*Ecklonia cava*) on growth and innate immunity in juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquac Res 39, 1687-1690.
- Kim SS, Song JW, Lim SJ, Jeong JB, Jeon YJ, Yeo IK and Lee KJ. 2010. Effects of dietary supplementation of fermented garlic powder on immune responses, blood components, and disease resistance against principal fish disease of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in low temperature season. J Anim Sci & Technol 52, 337-346.
- Kumari J and Sahoo PK. 2005. Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asian catfish *Clarias batrachus*. Aquaculture 252, 121-127.
- Mun HY, Lee HS, Park JH, Kim DH, Lee SY, Seong NS, Bang JK, Jung HG and Lee HY. 2004. Enhancement of immune activities of *Ganoderma lucidum* mycelium cultured with garlic enriched medium. Korean J Medicinal Crop Sci 12, 24-30.
- NRC (National Research Council). 1993. Nutrient requirement of fish. National academy Press, Washington DC, U.S.A., 114.
- Park KY, Lee SJ, Lee KI and Rhee SH. 2005. The antitumor effect in Sarcoma-180 tumor cell of mice administered with Japanese apricot, garlic or ginger Doenjang. Korean J Food Cookery Sci 21, 599-606.
- Park SJ, Park DS, Kim SS, He X, Ahn JH, Yoon WB and Lee HY. 2010. The effect of fermented *Codonopsis lanceolata* on the memory impairment of mice. J Korean Soc Food Sci Nutr 39, 1691-1694.

- Park SJ, Seong DH, Park DS, Kim SS, Gou JY, Ahn JH, Yoon WB and Lee Hy. 2009. Chemical compositions of fermented *Codonopsis lanceolata*. J Korean Soc Food Sci Nutr 38, 396-400.
- Pelletier D, Blier PU, Dutil JD and Guderley H. 1995. How should enzyme activities be used in fish growth studies?. J Exp Biol 198, 1493-1497.
- Pham MA, Lee KJ, Lee BJ, Lim SJ, Kim SS, Lee YD, Heo MS and Lee KW. 2006. Effects of dietary *Hizikia fusiformis* on growth and immune responses in juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Asian-Aust J Anim Sci 19, 1769-1775.
- Qureshi A. 1983. Suppression of avian hepatic lipid metabolism by solvent extracts of garlic: Impact on serum lipids. J Nutr 113, 1746-1755.
- Sharma KK, Sharma AL, Dwivedi KK and Sharma PK. 1976. Effect of raw and boiled garlic on blood cholesterol in butter fat lipidemia. The Ind J Nutr Dietet 13, 7-11.
- Shin JH, Jung KM, Lee SJ, Yang SM, Rue GH and Sung NJ. 2009. Biological activities of dried garlic, red ginseng and their mixture. J Korean Soc Food Sci Nutr 38, 1633-1639.
- Yamata Y and Azuma K. 1977. Evaluation of the in vitro anti-fungal activity of allicin. Antimicrob Agents Chemother 1, 743-749.
- Yeh SP, Chang CA, Chang CY, Liu CH and Cheng W. 2008. 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 Immun 25, 19-27.

2011년 10월 26일 접수

2011년 11월 4일 수정

2011년 12월 7일 수리