

## 사료 내 마늘 추출액 첨가가 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 비특이적 면역반응 및 질병저항성에 미치는 영향

김승민·전려진\*·여인규·전유진·이경준·정현도\*\*·정준범†

제주대학교 해양의생명과학부, \*제주대학교 해양과환경연구소

\*\*부경대학교 수산생명의학과

## Effects of Dietary Supplementation with Garlic Extract on Immune Responses and Diseases Resistance of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Seung Min Kim, Lyu Jin Jun\*, In-Kyu Yeo, You-Jin Jeon, Kyeong-Jun Lee,  
Hyun Do Jeong\*\* and Joon Bum Jeong†

Faculty of Marine Biomedical Science, Jeju National University, Jeju-do 690-756, Korea

\*Marine and Environmental Research Institute, Jeju National University, Jeju-do 690-756, Korea

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

In this study, we investigated the effects of dietary 1% garlic extract on nonspecific immune responses and fish diseases (Viral Hemorrhagic Septicemia Virus, *Vibrio anguillarum*, *Streptococcus iniae* and *Edwardsiella tarda*) resistance in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish were fed a commercial diets supplemented with 1% garlic extract for 4 weeks. After the 4 weeks feeding experiment, the artificial infection was made by *V. anguillarum*, *S. iniae*, *E. tarda* and VHSV. And the cumulative mortality was monitored for 2 weeks after artificial infection. The cumulative mortalities decreased in all experiments except for group of *E. tarda* compared to control group. We observed significantly higher levels of the hematocrit, glucose, total protein, lysozyme activity and the macrophage activity in the experimental group compared to the control group. In the experiments of drug sensitivity and MIC using the three bacteria (*V. anguillarum*, *S. iniae* and *E. tarda*), 1% garlic extract was more effective than the previously reported fermented garlic powder. These results suggested that garlic extract can increase the disease resistance of olive flounder against *V. anguillarum*, *S. iniae* and VHSV and the ability of nonspecific immune responses.

Key words: Garlic, Viral Hemorrhagic Septicemia Virus, *Vibrio anguillarum*, *Streptococcus iniae*, *Edwardsiella tarda*, Olive flounder

지난 10년간 양식 산업은 급격히 증가하였고 식

량산업으로써 그 가치가 높아지고 있으며, 현재 양식 어류에서 발생하는 세균성 질병의 치료를 위하여 많은 종류의 항생제가 사용되고 있다. 특히 국내 양식 산업에 있어서 생산성 향상을 위한 밀식

†Corresponding author: Joon Bum Jeong  
Tel: +82-64-754-3426, Fax: +82-64-756-3493  
E-mail: jeongjb@jejunu.ac.kr

및 과도한 사료 투여 등으로 인한 양식 환경의 악화, 내병성의 저하로 인한 감염기회의 증대로 다양한 어류 질병의 발생이 증가함에 따라 항생제의 사용 빈도수도 점차 증가하고 있는 추세이다. 그 결과, 항생제에 대한 내성균이 식용 어류에서의 항생제 잔류에 따른 사회적 문제가 크게 대두되면서 소비자의 불신으로까지 이어져 수산물에 대한 소비를 위축시키는 요인이 되고 있다. 따라서 최근 많은 국가에서 항생제 사용을 금지하고 있으며, 그 사용량과 식품에서의 잔류허용량 규제가 더욱 강화되어 가고, 최대잔류허용기준 (MRL, maximum residue level)을 설정하여 규제하고 있다. 이로 인한 항생제 대체방안으로 부작용이 없는 천연물질을 사료첨가제로 개발하여 양식 어류의 면역력 및 건강을 증진시키기 위한 많은 연구들이 진행되고 있다 (Kim *et al.*, 2006).

마늘, *Allium sativum*이 일반적으로 식용으로 많이 사용되고 있지만, 최근에 인간과 가축의 면역증강 물질에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다 (Chun and Lee, 1984). 다양한 연구에서 세균, 곰팡이, 원생동물 그리고 바이러스 같은 여러 미생물들이 마늘에 감수성을 나타내는 것으로 보고하였다 (Cavallito and Bailey, 1944; Hong *et al.*, 2000; Nakagawa *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2004). 또한, 마늘의 효능으로는 면역증진효과 (Mun *et al.*, 2004), 항산화효과 (Shin *et al.*, 2009; Chung and Kim, 2008), 항균효과 (Wi, 2003; Kim *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005), 항암작용 (Shon *et al.*, 2001; Mun *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005) 등이 보고되었다. 어류의 경우에도 면역증강 물질들의 투여로 인해 어류 질병에 대한 비특이적 면역인자의 활성이 증가하여 자체 방어능력을 증가시킨다는 보고가 많다 (Jung *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2005).

우리나라에서 대표적으로 양식되는 해산어종인 넙치는 고밀도 양식으로 인한 여러 질병의 발생으로 경제적 손실을 비롯한 많은 어려움을 겪고 있다. 따라서 본 연구에서는 넙치에 1% 마늘 추출액 첨가 사료를 투여한 후 혈액학적 분석, 비특이적 면역반응에 미치는 영향을 조사하였다. 그리고 넙치 질병의 주요 원인으로 알려져 있는 *V. anguillarum*, *S. iniae*, *E. tarda*, VHSV를 인위 감염시켜 질

병에 대한 저항성이 증가하는지 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험사료

실험에 사용된 1% 마늘 추출액의 제조를 위하여 제주도 서귀포시 대정읍에서 수확된 마늘을 구입하여 마늘의 껍질을 제거하고 멸균 증류수로 깨끗하게 세척한 후 마늘 시료로 사용하였다. 세척된 마늘은 분쇄기를 이용하여 으갠 후, 마늘원액을 얻기 위해 멸균 거름망을 이용해 1차적으로 분리하였고, 추출된 마늘을 원심분리한 후 상등액을 0.45 µm membrane filter (Sigma, USA)로 여과하여 순수 분리하였다. 순수 분리된 마늘원액을 일반 사료에 사료무게의 1%로 혼합한 후 자연 건조시켜 사료를 제작하였고, 대조구는 멸균 증류수를 이용하여 제조한 후 자연 건조시켰다. 자연 건조시킨 사료는 -20°C 냉동고에 보관한 후 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 일반 사료의 조성은 Table 1에 나타내었다.

### 실험어

실험에 사용된 실험어는 제주도내 양식장에서 어류질병에 대한 이력이 없는 넙치를 구입하여, 제주대학교 해양과학환경연구소로 운송시켜, 1주 동안 시판 배합사료를 공급하면서 실험환경에 적응할 수 있도록 순치하였다. 넙치 치어 (평균체장 및 무게: 17.5±0.8 cm, 62±7.17 g)는 총 4개의 110 L 원형플라스틱 수조에 각 수조당 50마리씩 나누어 주었다. 광주기는 형광등을 이용하여 12L:12D 조건으로 유지되었고, 실험기간 동안의 사육 수온은 5월의 해수 평균수온인 16~18°C이었다. 1% 마늘

Table 1. Ingredients and nutrient contents of the basal diet

Ingredients	% (DM)
Crude protein	47.8
Crude lipid	6.3
Crude ash	16.1
Crude fiber	5.4
Calcium	1.7
Phosphorus	2.7

추출액이 첨가된 사료는 2개의 수조를 대상으로 1일 2회에 나누어서 어체중의 2~3%로 제한급이를 하면서 4주간 수행되었다. 나머지 2개의 수조에는 멸균 증류수가 첨가된 사료를 공급하고, 대조구로 사용하였다.

### 시료채취 및 혈액학적 분석

마늘 추출액 첨가 사료를 공급하기 전에 샘플의 혈액을 채취하여 첫 대조구로 사용하였고, 일주일 간격으로 4주 동안 어류의 평균무게 및 성장률을 관찰하였으며, 무게 측정 후 1% 마늘 추출액이 첨가된 시험구와 대조구에서 3마리의 어류를 무작위로 선별하여 2-Phenoxyethanol 용액 (100 ppm)으로 마취시킨 후 헤파린이 처리된 주사기를 사용하여 미부정맥에서 채혈한 후 실험구별로 혈액을 취합하였다. 채혈된 혈액은 microhematocrit법으로 Hematocrit (Ht)치를 측정하고 Nitroblue-tetrazolium (NBT) activity를 측정하는데 이용되었다. 남은 혈액은 lysozyme activity 및 혈액학적 분석을 위해 5,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 혈장을 분리한 후 사용하였으며, 모든 실험은 3회 반복하여 실시하였다. 얻은 혈장은 분석 전까지 -70°C에 보관하였다가 혈액생화학분석기(Express plus system, Bayer, USA)를 이용하여 혈액생화학적 변화를 측정하였다. 측정항목은 GPT (ALT-P<sub>III</sub>), GOT (AST-P<sub>III</sub>), 중성지방 (triglyceride: TG), 글루코스 (glucose: GLU), 총콜레스테롤 (total cholesterol: Tchol), 총단백질 (total protein: TP) 등 총 6항목으로 하였다.

### 면역학적 분석

#### 1) 체표 점액의 lysozyme 활성 조사

체표 표면의 lysozyme 활성은 Takahashi *et al.* (1986)의 방법에 따라 *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, USA) 균 현탁액에 대한 흡광도의 감소량을 측정함으로써 평가하였다. 먼저 시료에 2배의 0.1 M PBS (pH 7.2)를 첨가한 다음 점액을 균질화시킨 후, 원심분리 (10,000 × g, 4°C, 20분)한 다음 상등액을 용균 활성 측정용 시료로 사용하였다.

#### 2) 혈청의 lysozyme 활성 조사

혈청 내 lysozyme의 활성은 Yeh *et al.* (2008)의

방법을 바탕으로 분석하였다. 먼저 0.05 M sodium phosphate acid buffer (pH 6.2)에 동결 건조된 *M. 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 reader (Thermo, USA)를 이용하여 530 nm에서 1분 및 5분에 흡광도 값을 측정하였다. Lysozyme의 활성은 unit/ml로 나타내었으며, 흡광도 값이 0.001 감소한 값을 1 unit로 정의하였다.

### 3) 대식세포의 활성 조사

혈액 내의 대식세포 활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 방법을 이용하여 호흡폭발 동안의 호중구 (Neutrophils)에 의한 oxidative radical 생성량을 측정하였는데 분석방법은 다음과 같다. 우선 혈액과 NBT solution (0.2%)을 1:1의 비율로 각각 50 µl를 glass tube에 옮긴 후, formazon 생성을 감소시키기 위해 dimethylformamide를 1 ml씩 넣는다. 그 후 2,000 × g에서 5분 동안 원심분리를 하여 최종적으로 상등액을 취한 후, NBT의 감소되는 범위를 분광광도계 (Genesys 10 UV, Rochester, NY, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank는 dimethylformamide를 사용하였다.

### 항균성 시험

마늘 추출액의 효능을 시험하기 위하여 디스크 확산법 (disc diffusion method)과 액체 단계희석법 (broth dilution method)을 이용하여 다음과 같이 실시하였다. 마늘 추출액 500 µl와 멸균 증류수 500 µl를 혼합하여 1/2씩 단계 희석시킨 후, 50 µl paper disc에 떨어뜨려 자연 건조시켰다. Disc당 추출물의 함유량은 1,260 µg이었다. *V. anguillarum* (KCTC-2711), *S. iniae* (KCTC-3651), *E. tarda* (KCTC-3657) 등의 병원성 세균은 1×10<sup>5</sup> CFU/ml의 농도로 희석시켜 Mueller Hinton Agar (MH agar, Difco)에 도말한 후 disc를 놓고 25°C에서 18~20시간 배양한 후 저지대를 측정하여 효능 여부를 판단하였다. 효능 비교를 위하여 Penicillin (10 µg), Tetracycline (30 µg), Amoxicillin (10 µg), Erythromycin (15 µg), Rifampin (5 µg) 및 Ciprofloxacin (5 µg) 등 6종류의

항생제를 사용하였다. Minimum Inhibition Concentration (MIC) 값을 확인하기 위해 먼저 96 wells plate에 멸균된 Mueller Hinton Broth (MH broth, Difco)를 160  $\mu$ l, 각 농도로 희석된 마늘 추출액을 20  $\mu$ l, MH broth에  $1 \times 10^5$  CFU/ml로 현탁시킨 균액을 20  $\mu$ l 넣고, 25°C에서 18시간 배양 후 세균의 증식에 따른 액체 배지의 혼탁도를 관찰하여 세균이 자라지 않는 항생제의 최저 농도를 MIC값으로 결정하였다.

### 공격실험 및 비특이적 면역반응 분석

4주간 사료 급여 후, 시험구와 대조구는 각각 16 마리씩 수용하여 4종류의 병원체 및 PBS에 대하여 공격실험을 실시하였다. VHSV에 감염된 넙치의 신장 조직 마쇄 여과액을 *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line에 접종한 후 18°C에서 7일간 배양하여 cytopathic effect (CPE)를 확인하였다. 세포 배양액은 10% fetal bovine serum (FBS), 1% antibiotic-antimycotic (Gibco, BRL)을 첨가한 Eagle's minimum essential medium (EMEM)을 사용하였고, 모든 실험에는 3회 이하로 계대한 바이러스 배양액을 사용하였다. VHSV는  $10^5$  TCID<sub>50</sub> fish<sup>-1</sup>로 희석시켜 복강 주사하였다. 공격실험을 위하여 *V. anguillarum* (KCTC-2711), *S. iniae* (KCTC-3651), *E. tarda* (KCTC-3657) 등 3종의 세균 각각을 1% NaCl 첨가 tryptic soy agar (TSA, Difco) 배지에 도말한 후 25°C, 24시간 배양하여  $1 \times 10^5$  CFU/ml의 농도가 되도록 PBS로 희석하여 위와 동일한 방법으로 공격실험에 사용하였다. 대조구는 PBS를 0.1 ml씩 복강 주사하였다. 총 16마리 중 10마리는 폐사율을 관찰하였고, 나머지 6마리를 사용하여 1일째, 5일째 각각 3마리씩 혈액을 채취하여 상기의 비특이적인 면역반응 실험을 실시하였다. VHSV는 18°C, 나머지 그룹들은 24°C로 수온을 유지하였으며, 2주간 폐사율을 관찰하였다. 폐사어는 폐사된 즉시 해부하고 신장과 비장조직을 무균적으로 절취하여 선택배지에 도말한 후 균을 재분리하였고, VHSV의 감염은 PCR을 이용하여 확인하였다.

### 통계학적 분석

대조구와 각 시험구 간의 통계학적 유의성은

Student's t-test로 비교하였다 ( $P < 0.05$ ).

## 결 과

### 성장률 측정

4주간의 섭이 기간동안 각 주마다 성장률을 측정하였으며, 1% 마늘 추출액 첨가 사료 시험구와 대조구를 비교한 결과, 유의적인 차이가 관찰되지 않았으며 (data not shown), 모든 시험구에서 폐사가 나타나지 않았다.

### 혈액의 생화학적 성분 분석

1% 마늘 추출액을 첨가한 사료를 공급하면서 1주마다 혈액 성분 분석을 한 결과, Ht는 4주째를 제외한 모든 기간 동안 1% 마늘 추출액 첨가 시험구가 대조구보다 유의적인 증가를 보였다 (Table 2). 간 질환의 간접적인 판단근거로 사용되고 있는 GOT와 GPT는 대조구에 비하여 1% 마늘 추출액 첨가 시험구에서 낮은 수치가 관찰되었으며, GLU 함량은 대조구에 비해 시험구의 수치가 감소하는 양상을 보였다. Total cholesterol은 1% 마늘 추출액 첨가 사료를 섭취한 시험구가 대조구에 비해 유의적으로 낮은 값을 보였으나, 3주째에는 대조구에 비해 높은 수치가 관찰되었다. Total glucose는 실험기간 동안 대조구와 시험구 모두에서 유의적인 차이가 나타나지 않았고, total protein에서는 1~3주 때 대조구에 비해 유의적으로 높은 수치가 관찰되었지만, 4주째에는 대조구에 비해 낮은 수치가 관찰되었다 (Table 2).

### Lysozyme과 대식세포의 활성 변화

체표의 점액을 이용한 lysozyme 활성을 조사한 결과, 1% 마늘 추출액 첨가 사료를 공급한 시험구가 기간별로 유의적 차이를 보이지 않았으며, 대조구와 비교하였을 때도 유의성은 나타나지 않았다. 혈청의 lysozyme 결과, 시험구가 실험기간 동안 대조구에 비해 면역 활성이 증가하는 양상을 나타냈으며, 그 중 4주째에 시험구 ( $35 \pm 1.41$ )가 대조구 ( $20 \pm 0.196$ )와 가장 큰 차이를 나타내었다 (Fig. 1A). 또한, 비특이적 면역계 중 세포성 면역의 역할을 하는 대식세포의 활성 산소를 조사하였다. 그 결

Table 2. Hematological changes of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, fed a commercial diet supplemented with 1% garlic extract for 4 weeks

	Group	Ht (%)	ALT (U/L)	AST (U/L)	TG (g/dL)	GLU (mg/dL)	Tchol (mg/dL)	TP (mg/dL)
0week	Cont	29.4±3	3.3±1	43±1	4.9±1	19.3±8	243±22	3.6±1
1week	Cont	30±1	3.8	45.5±4	4.6±1	43.1±9*	220±19	4.1
	1%	33.6±2	2.9±1	32±2	5.2±1	22±4	184±12	5±1*
2week	Cont	32.7±2	3.8	39±5	5	35±2	252±14	4.3
	1%	36.2±11	2.6±1	26±4*	4.2	25±3	117±11*	5±1*
3week	Cont	29.5±4	5.8±1	46.5±4	4.2±1	19.8±3	253±32	4.3
	1%	38.8±4*	2.3±1	19±5*	3.9	27±5	140±8*	5.3±1*
4week	Cont	42±4	4±1	61±5	4±1	35.5±2	215±40	4.2±1
	1%	40.8±6	2.6±1	21±2*	3.9	27±8	148±25*	3.6±1

Significant difference from control,  $P < 0.05$ . Cont : control.

Ht, Hematocrit; GPT, Glutamicpyruvic transninas; GOT, Gulutamicoxaloacetic transninas; TG, Triglyceride; GLU, Glucose; Tchol, Total cholesterol; TP, Total protein.

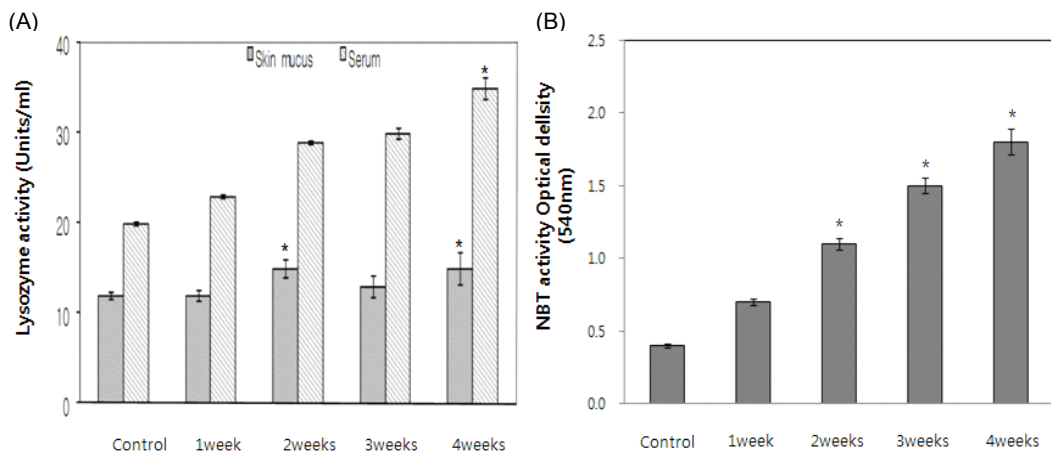


Fig. 1. Lysozyme activity (A) and NBT activity (B) of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, fed a diets supplemented 1% garlic extract for 4 weeks. \*, significant difference from control,  $P < 0.05$ .

과, 1% 마늘 추출액 첨가 사료를 지속적으로 공급한 시험구가 대조구에 비해 유의적으로 높은 활성을 유지하였으며, 이 활성은 4주째까지 유지되었다 (Fig. 1B).

#### 마늘 추출액의 항균활성 분석

마늘 추출액을 함유한 disc의 어병세균에 대한 항균활성 결과는 Table 3에 나타내었다. *V. anguillarum*과 *S. iniae*는 78.75 µg/disc의 농도까지 10~13 mm, *E. tarda*는 630 µg/disc의 농도까지 17 mm

저지대를 나타냈다. *V. anguillarum*과 *S. iniae* 균주에 대한 마늘 추출물의 저지대가 *E. tarda*보다 높게 나타났다. 마늘 추출액은 그람 음성, 양성균 모두에 저지대를 나타내어 항균력이 있는 것으로 판단되었다. 마늘과의 항균력을 비교하기 위해 6종의 항생제를 사용하여 저지대를 조사한 결과, *V. anguillarum*은 Penicillin(10 µg)을 제외한 그 외 항생제에서 16 mm 이상, 45 mm 이하의 감수성 양상을 보였으며, *S. iniae*는 Penicillin (10 µg)과 Erythromycin (15 µg)에서 내성을 보이는 것으로 나타났다. 그러

Table 3. The mean of the Diameters of inhibition zone (mm) of bacterial growth inhibited by different concentrations of garlic extract concentrations and standard antibiotics

Bacteria	Garlic concentrations (µg/disc)						Antibiotics					
	1260	630	315	157.5	78.75	39.375	P (10 µg)	Cip (5 µg)	TE (30 µg)	RD (5 µg)	AM (10 µg)	Ery (15 µg)
<i>V. anguillarum</i>	4.2	3.1	2.7	2	1.3	-	-	4.5	3.5	3	2	1.6
<i>S. iniae</i>	4.4	3.5	2.4	1.2	1	-	-	3	2.5	2	1.5	-
<i>E. tarda</i>	3.2	2.5	1.7	-	-	-	1.6	3.5	3.4	1.8	3	1.3

Values expressed are averages of three replicates.

P, Penicillin; Cip, Ciprofloxacin; TE, Tetracycline; RD, Rifampin; AM, Amoxicillin; Ery, Erythromycin.

나 *E. tarda*는 모든 항생제에서 13 mm 이상, 35 mm 이하의 감수성을 보였다 (Table 3). 마늘 추출물의 *V. anguillarum*과 *S. iniae*에 대한 MIC 값은 78.75 µg/ml이었으며, *E. tarda*는 157.5 µg/ml로 나타나 저지대의 결과와 유사한 양상을 보였다.

**공격 실험 및 비특이적인 면역 반응**

공격 실험 결과는 Fig. 2에서 나타내고 있으며, VHSV를 사용하여 감염시킨 경우, 대조구에서는 감염 후 9일째 100%의 누적 폐사율을 보였지만, 1% 마늘 추출액 첨가 시험구에서는 14일째까지

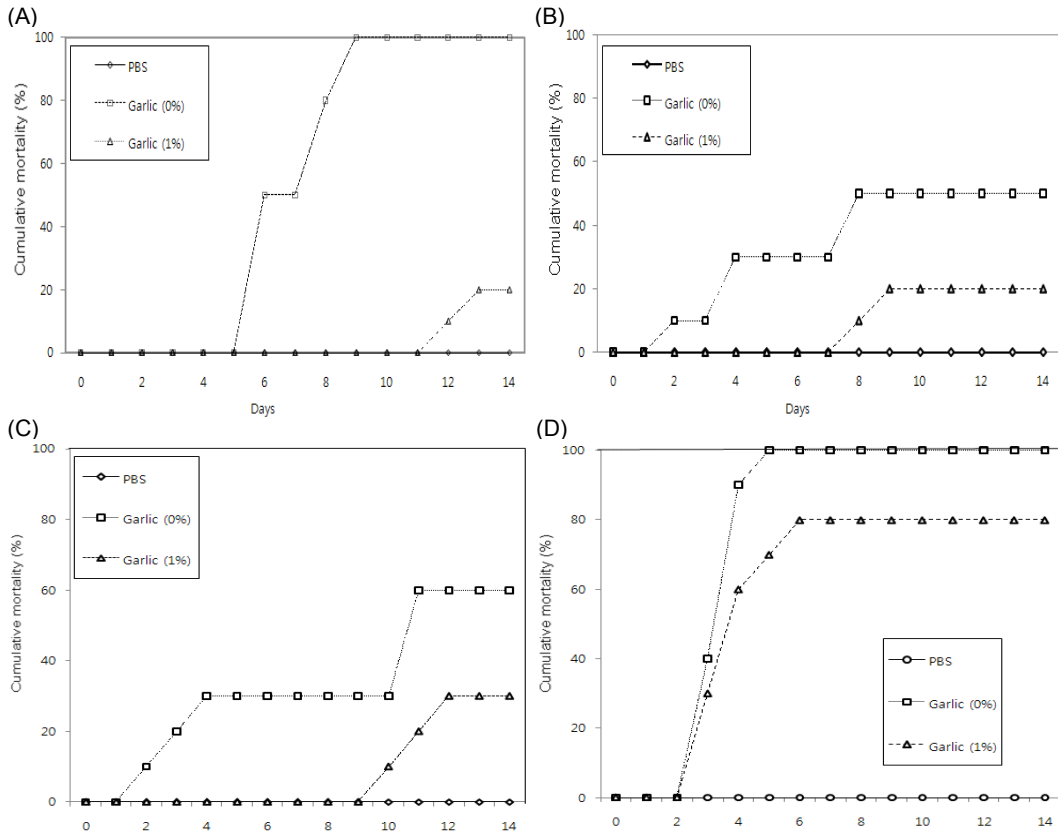


Fig. 2. Cumulative mortality of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, challenged intraperitoneally with pathogens after fed a experimental diets supplemented 1% garlic extract for 4 weeks. (A) VHSV (B) *V. anguillarum*, (C) *S. iniae*, (D) *E. tarda*.

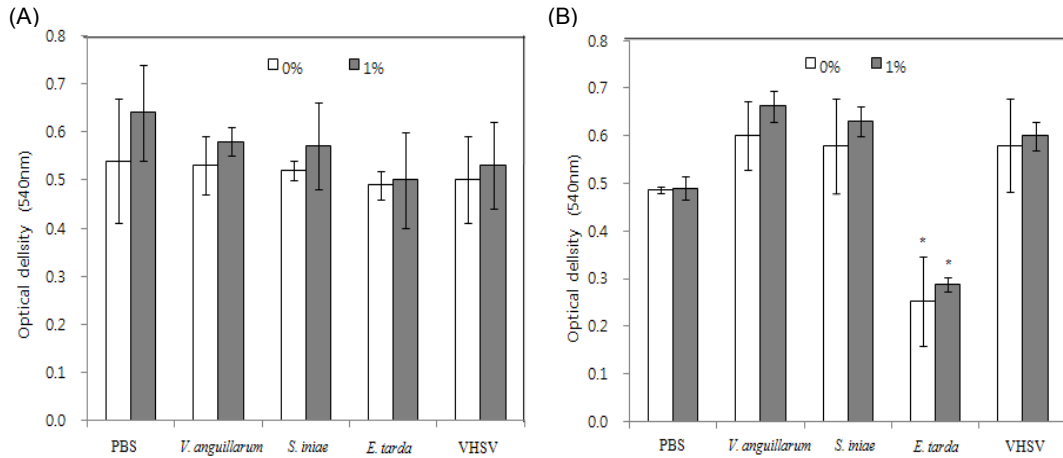


Fig. 3. NBT reduction of phagocytes in blood serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intraperitoneally with various concentration (PBS, *V. anguillarum*, *S. iniae*, *E. tarda*, VHSV) of 1day(A) and 3day(B). \*, significant difference from control,  $P < 0.05$ .

20%의 누적 폐사율이 관찰되었다. 세균의 공격 실험 결과, *V. anguillarum*과 *S. iniae*를 접종한 실험에서 대조구는 감염 후 14일째에 50~60%의 누적 폐사율을 보였지만, 1% 마늘 추출액 첨가 시험구에서는 각각 20~30%의 누적 폐사율을 나타내었다. *E. tarda*를 사용하여 감염시킨 경우, 감염 후 7일 이내에 대조구에서 100% 누적 폐사하였으며, 시험구에서는 80%의 누적 폐사율이 관찰되었다.

대식세포 활성 결과, *E. tarda*를 제외한 모든 그룹에서 유의적 차이는 관찰되지 않았고, *E. tarda*에서는 1일째에 유의적 차이가 나타나지 않은 반면, 3일째에 낮은 활성을 보였다 (Fig. 3). 혈청의 lysozyme 활성 결과, 1일과 3일째 모든 그룹에서 대조구보다 시험구가 유의적으로 높은 활성을 보였으며, 1% 마늘 추출액 첨가 사료를 공급한 후 공격실험을 실시한 시험구간에는 3일째가 1일째보다 모든 그룹에서 유의적으로 낮은 활성을 나타내었다 (Fig. 4).

### 고 찰

마늘은 모든 배재식물 가운데서 가장 오래된 것 중 하나로 4000년 이상 음식과 민간요법에 주로 사용되어 왔으며 가장 다양하게 연구되어 온 약물 식물이다 (Rivlin, 2001). 또한, 항균제나 항생물질

이 나오기 전, 동양에서는 마늘을 감기예방 및 치료에 사용한다고 보고하였다 (Katsuzi *et al.*, 2000). 어류에서도 발효시킨 마늘을 복강 및 경구로 투여 하였을 시, 어류의 식세포 활성 (Jorgensen *et al.*, 1993a), natural killer cell 활성 (Kajita *et al.*, 1991), 라이소자임 활성 (Engstad *et al.*, 1992; Jorgensen *et al.*, 1993b) 등의 다양한 면역 증강을 통해 질병으로 인한 폐사가 감소하였으며, 건강한 어류의 생산을 향상시킨다는 보고가 있다 (Chen and Ainsworth, 1992). 이전의 발효 마늘을 이용한 연구를 바탕으로 본 연구에서는 마늘의 주요 성분인 alliin과 ajoene의 파괴가 적을 것으로 생각되는 사료 제조 방법을 적용하고자 하였다.

Ht 인자는 생체의 산소운반능력 (Chang *et al.*, 1999)을 가지며, 스트레스와 생리활성 지표로 사용된다. 본 연구에서는 1% 마늘 추출액 첨가 사료를 섭취시킨 후, 2주째부터 유의적으로 증가하였고, 29~39%로 정상 수치가 관찰되었다 (Table 2). Davis와 Parker (1990)에 따르면 GOT와 GPT는 생체 내에서 중요한 당, 지질, 단백질 대사에 관여하는 효소로서, 어체의 생리상태가 좋지 않을수록 간에 장애가 일어나고 활성이 높아져 혈중 농도가 증가하는 것으로 보고되었다 (Gordon, 1968; Casillas and Ames, 1985; Rao *et al.*, 1990). 본 연구에서는 1% 마늘 추출액 첨가 시험구가 1-4주 동안

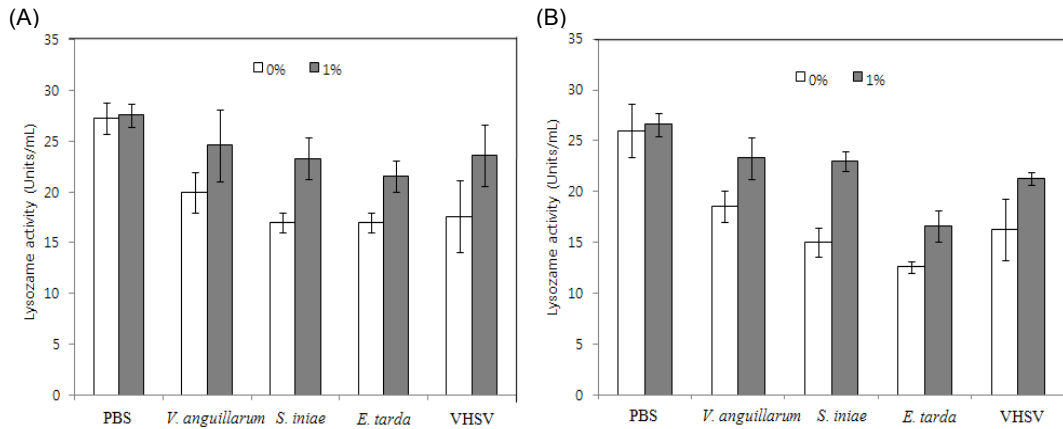


Fig. 4. Changes of lysozyme activity in serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intraperitoneally with various concentration (PBS, *V. anguillarum*, *S. iniae*, *E. tarda*, VHSV) of 1day (A) and 3day (B). \*, significant difference from control,  $P < 0.05$ .

대조구보다 낮은 수치를 보여, 마늘 추출액 섭취가 GOT, GPT를 감소시키는 것으로 생각된다. 마늘 추출액 첨가에 의한 혈청 콜레스테롤과 중성지방의 저하효과도 이전의 연구에서 증명되었다 (Sharma *et al.*, 1976). Hur (2002)는 넙치 글루코스 농도의 평균은 30.3 mg/dl라 하였는데, 본 연구에서는 1% 마늘 추출액을 첨가한 모든 시험구에서 22~27 mg/dl 범위로 낮은 값이 나타났지만, 넙치는 운동성이 낮은 어종으로 안정성 수치에 포함되는 것으로 추정하였다. Total glucose에서는 1% 마늘 추출액 첨가 시험구에서 Kang *et al.* (2004)이 제시한 안정값 2.71~2.86 g/dl 보다 높게 나타남으로써, 사용된 실험어는 단백질 대사에 문제가 없는 것으로 판단되었다. 본 연구의 실험 결과 대식세포 활성화 및 라이소자임 활성이 유의적으로 증가하였고, 호중구의 수가 증가한 것으로 보아 마늘 성분에 의한 자극 효과로 사료된다.

1% 마늘 추출액을 사료에 첨가하여 넙치에 섭이시킨 후 비특이적인 면역능 증가와 항병력 증가를 분석하고자 하였다. 이전의 보고에 의하면 (Yoon, 2009), 마늘 추출액을 희석시켜 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* 등의 식중독 균들에 대한 항균력 검사의 경우, 원액에서만 항균력이 나타났고, 희석한 농도에서는 항균력이 나타나지 않았다고 보고하였다. 본 연구에서 마늘 추출액을 희석시켜 실험을 해 본 결과, *V.*

*anguillarum*과 *S. iniae*는 78.75  $\mu\text{g}/\text{disc}$ , *E. tarda*는 630  $\mu\text{g}/\text{disc}$ 까지 저지대가 관찰되었고 (Table 3), 양성 대조구인 6종의 항생제 감수성과 비교하면, 모든 그룹에서 높은 감수성을 보인 Ciprofloxacin과 유사한 저지대를 관찰할 수 있었다 (Table 3). 상백 피로부터 항균성 물질을 추출하여 어류질병 세균 (*S. iniae*, *E. tarda*, *Listonella anguillarum*)에 대한 항균력 시험을 실시한 Mok *et al.* (2001)의 연구에 따르면, *E. tarda*에서 가장 낮은 항균활성이 보고되었다. 본 연구에서도 MIC 측정 결과, 마늘 추출액에 대하여 *V. anguillarum*과 *S. iniae*에 대한 MIC는 78.75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었으며, *E. tarda*는 157.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 이전의 보고와 유사하게 *E. tarda*에서 가장 낮은 항균활성을 나타냈고, *V. anguillarum*과 *S. iniae*은 디스크 확산법의 결과와 유사한 항균활성이 관찰되었다. 따라서 본 연구에서 사용된 마늘 추출액은 더 많은 어병세균에 대한 조사가 이루어져야 하겠지만 대표적인 3종의 그람 음성, 양성균에 대해 항균활성이 확인되었으므로 광범위 항균력을 지닌 물질로 판단된다.

공격실험 결과, VHSV를 사용해 감염시킨 경우, 1% 마늘 추출액 첨가 시험구가 대조구에 비해 낮은 폐사율이 관찰되어 바이러스에 대해 높은 활성을 보였다. 이미 인체의 경우, 감염되는 바이러스에 대한 항바이러스성 천연물질을 찾는 연구가 많이 이루어지고 있으며, Katsuzi *et al.* (2000)의 연구



에서는 마늘이 인플루엔자 바이러스 감염방어에 상당한 효과가 증명되었다고 보고하였다. 그러므로, 마늘 추출액의 VHSV에 대한 항바이러스성 물질로써의 가능성이 있을 것으로 추정되며, 향후 이에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료된다. *V. anguillarum*을 접종한 결과, 모든 1% 마늘 추출액 첨가 시험구에서 대조구에 비해 낮은 누적 폐사율이 관찰되었다. 이것은 마늘에 포함된 유용 생리활성물질에 의한 면역시스템의 활성화로 lysozyme 및 식세포의 활성이 증강되어 병원성 세균에 대한 방어에 중요한 역할을 한 것으로 생각되며, *S. iniae*를 사용한 공격실험에서는 대조구에서 1~11일째 사이에 폐사가 집중적으로 일어났으며, 시험구에서는 9~12일째 폐사가 발생하여, 두 군주의 경우는 대조구에 비해 폐사율이 지연되는 것을 확인하였다. Christyapita *et al.* (2007)은 틸라피아에 0.1% *Eclipta alba* leaf 추출물을 2주간 경구투여 하였을 때, 75%의 상대 생존율을 나타내었다고 보고하였으며, 마늘을 경골어류에 투여한 연구는 많지 않아 직접적인 비교는 확인하기 어렵지만 폐사율의 감소가 본 연구 결과와 유사하였다. *E. tarda*를 접종한 결과, 1% 마늘 추출액 첨가 시험구에 비해 대조구에서는 3일째 100% 폐사율이 나타났으며, 시험구에서는 실험이 끝날 무렵까지 80%의 폐사율이 관찰되었지만 다른 두 군주에 비해 높은 폐사율이 관찰되었다 (Fig. 2). Kim (1999)은 구기자 열수 추출물을 나일 틸라피아에 투여한 후 *E. tarda*를 주사하여 시험구에 저항성이 나타남을 보고하였고, Kim *et al.* (2009)은 오미자 추출물을 투여한 후 뱀장어의 병원성 세균 *E. tarda*와 *Aeromonas hydrophila* 균에 대한 저항성 실험에서 오미자 추출물을 첨가한 시험구가 대조구에 비해 병원성 세균에 대한 저항성이 높은 것을 보고하였다. 본 연구에서도 1%의 마늘 추출액 첨가 시험구가 대조구에 비해 병원성 세균에 대한 저항성이 높게 관찰되는 것을 확인하였다. 공격실험 후, 비특이적인 면역반응을 분석한 결과, *E. tarda*를 제외한 다른 모든 시험구에서 1% 마늘 추출액 첨가 시험구의 면역활성이 1일째보다 3일째 유의적으로 증가하였다. 그러나, *E. tarda*를 접종한 시험구에서는 lysozyme 및 식세포의 활성이 3일째 떨어지는 양상

을 나타낸 것으로 보아 이른 폐사율과 연관성이 있는 것으로 추정된다.

본 연구에서는 양식 넙치에 대한 마늘 추출액 첨가 사료의 투여가 넙치의 비특이적 면역 반응을 자극하여 병원체에 대한 항병력을 증가시키는 것으로 나타났으며, 마늘을 사료 내에 첨가하면 면역 증강물질로서 기능한다는 사실을 입증하였다.

## 요 약

본 연구에서는 1% 마늘 추출액을 사료에 첨가하여 항균력 시험, 혈액학적 분석 및 어류질병 원 인체들 (Viral Hemorrhagic Septicemia Virus, *Vibrio anguillarum*, *Streptococcus iniae*, *Edwardsiella tarda*)에 대한 비특이적 면역반응을 조사하였다. 사료에 1% 마늘 추출액을 첨가하여 4주간 넙치에 섭이시킨 후 *V. anguillarum*, *S. iniae*, *E. tarda*을 인위 감염시켜 2주간 누적 폐사율을 관찰하였다. 공격 실험 결과 *E. tarda*를 제외한 모든 시험구에서 대조구에 비해 낮은 누적 폐사율이 관찰되었다. Hematocrit, glucose, total protein, lysozyme activity 및 macrophage activity에서는 대조구에 비해 유의적으로 높은 수치를 관찰하였다. 3가지 어병세균 (*V. anguillarum*, *S. iniae*, *E. tarda*)을 이용하여 마늘 항균력 및 MIC를 측정된 결과, 이전에 보고된 마늘 분말보다 1% 마늘 추출물에서 더 효과적인 결과를 관찰하였다. 이러한 결과는 마늘 추출물이 넙치의 *V. anguillarum*, *S. iniae*, *E. tarda*에 대한 비특이적 면역반응 및 질병저항력을 증가시키는 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2014학년도 제주대학교 학술진흥연구비 지원사업에 의하여 연구되었습니다.

## References

- Casillas, E., Ames, W.: Serum chemistry of diseased English sole, *Parophrys vetulus* Girard, from polluted areas of Puget Sound, Washington. Journal of

- Fish Diseases 8: 437-449, 1985.
- Cavallito, C.J., Bailey, J.H.: Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. II. Determination of the chemical structure. Journal of American Chemical Society 66: 1950-1951, 1944.
- Chang, Y.J., Park, M.R., Kang, D.Y., Lee, B.K.: Physiological responses of cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) on series of lowering seawater temperature sharply and continuously. Journal-Korean Fisheries Society 32: 601-606, 1999.
- Chen, D., Ainsworth, A.J.: Glucan administration potentiates immune defense mechanism of channel catfish, *Ictalurus punctatus Rafinesque*. Journal of Fish Diseases 15: 295-304, 1992.
- Choi, M.S., Park, S.W., Park, K.H.: Effect of red ginseng extract on immune function of israeli carp, *Cyprinus carpio*. Journal of Korea Fish Pathology 18: 277-285, 2005.
- Chrisyapita, D., Divyagnaneswari, M., Dinakaran, M.R.: Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. Fish & Shellfish Immunology 23: 840-852, 2007.
- Chun, H.J., Lee, S.W.: Studies on antioxidative action of garlic components isolated from garlic (*Allium sativum* L). Part 1. Effects of garlic components on electron donating ability and inhibitory effect of lipoperoxide formation. Journal of Korea Home Economics Association 24: 43-51, 1984.
- Chung, J.Y., Kim, C.S.: Antioxidant activities of domestic garlic (*Allium sativum* L.) stems from different areas. Journal of the Korea Society Food Science and Nutrition 37: 972-978, 2008.
- Davis, K.B., Parker, N.C.: Physiological stress in striped bass: Effect of acclimation temperature. Aquaculture 91: 349-358, 1990.
- Engstad, R.E., Robertson, B., Frivold, E.: Yeast glucan induce increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish & Shellfish Immunology 2(4): 287-297, 1992.
- Gordon, R.B.: Distribution of transaminases (Aminotransferases) in the tissue of the Pacific salmon (*Oncorhynchus*) with emphasis on the properties and diagnostic use of glutamic oxaloacetic transaminase. Journal of the Fisheries Board of Canada 25: 1247-1268, 1968.
- Hong, Y.S., Ham, Y.A., Choi, J.H., Kim, J.: Effects of allylsulfur compounds and garlic extract on the expression of Bcl-2, Bax, and p53 in non small cell lung cancer cell lines. Experimental and Molecular Medicine 32: 127-134, 2000.
- Hur, J.W.: Physiological responses of fishes to the artificial stresses in the process of aquaculture. A Doctor's Thesis, Pukyong National University, Busan, 2002.
- Jorgensen, J.B., Lunde, H., 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
- Jorgensen, N., Glwercman, A., Muller, J.: Immunohistochemical markers of carcinoma of the testis also expressed in normal infantile germ cells. Histopathology 4: 373-378, 1993b.
- Jung, S.H., Lee, J.S., Han, H.K., Jun, C.Y., Lee, H.Y.: Effects of medical herb extract on non specific immune response, haematology and disease resistance on Olive flounder, *Paralichthys olivaceus* by oral administration. Journal of Korea Fish Pathology 15: 25-35, 2002.
- Kajita, Y., Sakai, M., Kobayashi, M., Kawaushi, H.: Enhancement of non-specific cytotoxic activity of leucocytes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* injected with growth hormone. Fish & Shellfish Immunology 2: 155-157, 1991.
- Kang, J.C., Jee, J.H., Song, S.Y., Moon, S.W.: Effects of oral administration with fermented product from sewage in land-based seawater fish farm on haematological factors of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Journal of Korea Fish Pathology 17: 57-66, 2004.
- Katsuzi, N., Park, M.H., Ha, S.D., Kim, G.H.: Effects of Garlic Extract for Protecting the Infection of Influenza Virus. Journal of Korean Society Food Science and Nutrition 29: 128-133, 2000.
- Kim, J.D., Kim, Y.C., Kim, K.S., Woo, S.H., Park, S.W.: The effect of omae Prunus mume extract on the immune response and growth rate of Japanese eel *Anguilla japonica*. Journal of Korea Fish Pathology. 367-374, 2009.
- Kim, K.J., Do, J.R., Kim, H.K.: Antimicrobial, anti-hypertensive and anticancer activities of garlic extracts. Journal of Korea Food Science and Technology 37: 228-232, 2005.
- Kim, S.S., Galaz, G.B., Lee, Y.D.: Effects of dietary supplementation of *spirulina* and as taxanthin for juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in low temperature season. Journal of Aquaculture 19, 57-63, 2006.
- Kim, Y.C.: The dietary supplementing effects of Kugija,

- Lycium chinense, on immune responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, to *Edwardsiella tarda*. Pukyong university Journal of Korea Fish pathology 12: 73-81, 1999.
- Kim, Y.D., Kim, K.M., Hur, C.K., Kim, E.S., Cho, I.K., Kim, K.: Antimicrobial activity of garlic extracts according to different cooking methods. Journal of Korea Food Preservation. 11, 400-404, 2004.
- Kumari, J., Sahoo, P.K.: Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asian catfish *Clarias batrachus*. Aquaculture 252: 121-127, 2005.
- Mok, J.S., Song, K.C., Choi, N.J., Yang, H.S.: Antibacterial Activity of Ethanol Extract of Root bark of *Morus alba* against Selected Fish pathogenic Bacteria. 12: 211-226, 2001.
- Mun, H.Y., Lee, H.S., Park, J.H., Kim, D.H., Lee, S.Y., Seong, N.S., Bang, J.K., Jung, H.G., Lee, H.Y.: Enhancement of immune activities of *Ganoderma lucidum* mycelium cultured with garlic enriched medium. Journal of Korea Medicinal Crop. Science 12: 24-30, 2004.
- Nakagawa, H., Tsuta, K., Kiuchi, K., Senzaki, H., Tanaka, K., and Hioki, A.: Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. Carcinogenesis 22: 891-897, 2001.
- Park, K.Y., Lee, S.J., Lee, K.I., Rhee, S.H.: The anti-tumor effect in Sarcoma-180 tumor cell of mice administered with Japanese apricot, garlic or ginger Doenjang. Journal of Korea Food Cookery Science 21: 599-606, 2005.
- Rao, P.P., Joseph, K.V., Rao, K.J.: Histopathological and biochemical change in the liver of a fresh water fish exposed to heptachlor. Journal of Naturalist Conserv 2: 33-137, 1990.
- Rivlin, R.S.: Historical perspective on the use of garlic. Journal of nutrition 131: 951-954, 2001.
- Sharma, K.K., Sharma, A.L., Dwivedi, K.K., Sharma, P.K.: Effect of raw and boiled garlic on blood cholesterol in butter fat lipidemia. The Ind. Journal of Nutrition Dieter 13: 7-11, 1976.
- Shin, J.H., Jung, K.M., Lee, S.J., Yang, S.M., Rue, G.H., Sung, N.J.: Biological activities of dried garlic, red ginseng and their mixture. Journal of Korea Society Food Science Nutrition 38: 1633-1639, 2009.
- Shon, H.E., Lee, J.Y., Kim, D.C., Hwang, W.I.: Enhancement of anticancer activity by combination of Shon HE, Lee JY, Kim DC and Hwang WI. 2001. Enhancement of anticancer activity by combination of 38: 1633-1639, 2001.
- Takahashi, Y., Itami, T., Konegawa, K.: Enzymatic properties of partially lysozyme from the skin mucus of carp. Bulletin of the Japanese Society Fisheries 52: 1209-1214, 1986.
- Wi, S.U.: Isolation of allicin in garlic and its quantitative determination by high performance liquid chromatography and studies on the antimicrobial effects of allicin and ethanol extracts from Korean garlic (*Allium sativum* L.) Journal of Korean Society Food Science Nutrition 16: 296-302, 2003.
- Wu, C.C., Chung, J.G., Tsai, S.J., Yang, J.H., Sheen, L.Y.: Differential effects of allyl sulfides from garlic essential oil on cell cycle regulation in human liver tumor cells. Food and Chemical toxicology: an international Journal published for the British Industrial Biological Research Association 42: 1937, 2004.
- Yeh, S.P., Chang, C.A., Chang, C.Y., Liu, C.H., Cheng, W.: Dietary sodium alginate administration affects fingerling growth and resistance to *Streptococcus* and iridovirus, and juvenile non-specific immune responses of the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Fish & Shellfish Immunology 25: 19-27, 2008.
- Yoon, I.S.: Sensitivity Test on the Food Poisoning Bacteria of the Garlic Extract. Journal of Korea Contents Association 2: 339-349, 2009.

Manuscript Received : October 11, 2013

Revised : November 01, 2013

Accepted : March 25, 2014