

사료 중 비스루트가 나일틸라피아, *Oreochromis niloticus*의 성장, 체조성 및 면역 반응에 미치는 영향

김용화 · 오승용 · 황미혜* · 조재윤 · 박수일* · 김유희 · 윤길하 · 박정환

부경대학교 양식학과

*부경대학교 수산생명의학과

Effects of Bisroot in the Diet on Growth, Body Composition, Immune Responses of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*

Yong Wha Kim, Sung-Yong Oh, Mi-Hye Hwang*, Jae-Yoon Jo, Soo-Il Park*
Youhee Kim, Gil Ha Yoon and Jeonghwan Park

Department of Aquaculture, Pukyong National University, 608-737, Korea

*Department of Aquatic life medicine, Pukyong National University, 608-737, Korea

The present study investigated the effects of Bisroot, that contains live bacteria (*Bacillus polyfermenticus*, *Bacillus mesentericus*, *Streptococcus faecalis*, & *Bifidobacterium breve*) and digestive enzymes (protease, lipase), on the growth, body composition and immune response of Nile tilapia fingerlings. One percent of the Bisroot was added to the experimental feed.

All experimental fish were fed for 60 days. The weight gains among the experimental fish were not significantly different ($P > 0.05$). Hematocrit value, hemoglobin, total protein, glucose, GOT, and GPT were unaffected by Bisroot treatment. However, it was observed that glucose, GOT, and GPT value in the fish that were fed Bisroot, were lower than the control.

The complement activity (CH_{50}) tended to be significantly increased by Bisroot treatment, but not lysozyme activity. Phagocytosis and respiratory burst activities of macrophages in the head kidney were enhanced by Bisroot. Therefore, the Bisroot diet enhances the cellular immune activities of non-specific immune responses.

When fish were challenged with a virulent strain of *Edwardsiella tarda*, the Bisroot treated fish were more resistant than the control. The present results suggest that the introduction of Bisroot into the diet of Nile tilapia could increase their resistance against bacterial infection, reduce fish mortality, and offers economic benefits.

Key words : Bisroot, *Nile tilapia*, Immune response

서 론

어류 양식 생산량을 증대시키기 위한 방안으로 사육 환경의 개선뿐만 아니라 사료 효율의 향상을 위한 많은 연구가 진행되고 있다. 특히 어류 양식 생산 경비의 대부분을 차지하고 있는 사료비 절감을 위한 연구로 어분 대체품의 개발(Dabrow-

ski and Hardy, 1994)이나 먹이유인물질(Takii et al., 1995) 등에 관한 분야는 꾸준히 이루어져 오고 있으며, 사료 내에 여러 가지 유용 물질을 첨가하여 사료 효율을 향상시키기 위한 많은 연구가 진행되어 왔다. Nematipour et al. (1988)는 은어에 *Chlorella* 추출액을 사료에 첨가하여 투여하였을 때 근육 및 복강에 과잉의 지방 축적

을 막아 성장을 촉진시키고, Yone et al. (1986a, b)은 참돔에 모자반류인 *Ascophyllum nodosum*과 미역을 첨가하면 사료 효율이 개선된다고 보고하였다. 또한 Satoh et al. (1987)은 미역을 사료에 첨가하여 공급하였을 때 *Pasteurella piscicida*에 대하여, Nakagawa et al. (1984)은 *Chlorella* 추출액을 투여하였을 때 *Vibrio anguillarum*에 대한 저항력을 증가시킨 보고가 있어, 사료 내 유용 물질의 이용은 어류의 면역력 증가 및 생리 상태를 개선시키는 잇점도 있는 것으로 나타났다. 이와 더불어 어류 체내에서 소화에 도움이 되는 여러 소화 효소를 분비하는 세균을 이용하려는 시도가 이루어지고 있다. 잘 알려진 세균은 유산균으로 동물의 장내에서 이상 발효를 억제하고 정상 작용을 하는 *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus bifidus*, 및 *Lactobacillus acidophilus* 등 장내에서 서식할 수 있는 균주들이다(허 등, 1994). 또한 이런 유산균은 길항작용의 역할까지 하는 것으로 알려져 최근에는 유산균이 생산하는 생리 활성 물질인 박테리옌에 대한 연구가 활발히 진행 중이며, 이미 *Lactococcus lactis*가 생산하는 nisin은 GRAS (General Recognized As Safe)로 인정받아 유럽 등에서는 식품 보존제로서의 첨가가 허용되어 있다(Hurst, 1981 ; Kone and Fung, 1992). 이와 같이 사료 내 유용 물질을 첨가함으로써 사료 효율의 개선뿐만 아니라 면역력의 향상을 도모할 수 있는 것으로 밝혀졌다.

이에 본 연구는 탄수화물과 단백질 분해 효소를 생성하여 소화를 촉진시키고 다른 균에 대하여 강력한 길항작용을 나타내어 다른 세균이 번식하지 못하도록 하는 항균 작용을 하며 영양제, 정장제 및 해독제로서 탁월한 효과가 있는 것으로 알려져 있는 당화균 및 유산균 등의 생균제로 만들어진 비스루트를 사료에 첨가하여 나일틸라피아 치어의 성장과 체조성 변화 및 면역 반응의 효과를 알아보고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 실험어 및 사육 환경

평균 체중 19.0 ± 0.1 g의 틸라피아 치어(*Oreochromis niloticus*)를 4개의 유리 수조와 1개의

여과조가 한 단위로 독립적으로 구성되어 있는 순환여과장치에서 사육하였다. 이와 같은 실험 장치 3 세트를 이용하여 한 세트에 2개의 수조씩 총 3개의 여과조와 6개의 수조를 난괴법(randomized complete block design)으로 디자인하였다. 어류는 수용한 뒤 약 3일간 수조에 순치시킨 다음 모든 어류가 먹이를 잘 먹기 시작할 때 다시 체중을 측정하고 이 때부터 60일간 실험을 수행하였다. 실험 기간 중 수온과 용존산소는 DO meter (KRK, KDO-5151, Japan)로 측정하였으며, 수온은 처음 15일간은 25°C를 유지하였고 그 후 45일간은 수온을 상승시켜 27°C로 유지하였다.

2. 실험 사료 제조와 보관

실험 사료는 어분과 대두분, 콘글루텐, 효모 그리고 밀가루를 혼합한 뒤 수산용 종합 비타민과 종합 미네랄 그리고 먹이 섭취를 촉진시키기 위하여 어유 5%를 첨가하여 혼합하였으며 비스루트는 전체 사료량에 1%를 첨가하였고 대조구 사료에는 비스루트 대신에 셀룰로스를 같은 양 혼합하였다(Table 1). 실험 사료 제조에 사용된 비

Table 1. Composition and proximate analysis of the experimental diets (% of dry matter basis)

Ingredients	Diet (%)	
	Control	Bisroot
White Fish meal	20.0	20.0
Wheat meal	30.5	30.5
Soybean meal	20.0	20.0
Corn gluten meal	16.0	16.0
Yeast	1.0	1.0
Vitamin premix	3.0	3.0
Mineral premix	3.0	3.0
Fish oil	5.0	5.0
Cellulose	1.5	0.5
Bisroot*	—	1.0
Proximate analysis		
Crude protein	40.9	40.8
Crude lipid	6.8	7.9
Crude ash	9.5	9.2
Moisture	13.5	11.1

*Soon Chun Dang Pharmaceutical Co., Seoul, Korea.

스루트의 조성은 Table 2에 나타내었다. 모든 사료는 제조 후 강제 송풍 건조기에서 건조시킨 후, 밀봉하여 -30°C에서 냉동 보관하면서 소량씩 사용하였다.

Table 2. Composition of Bisroot added to the experimental diet

Ingredients	Content(%)
<i>Bacillus polyfermenticus</i>	4.2
<i>Bacillus mesentericus</i>	1.0
<i>Streptococcus faecalis</i>	1.0
<i>Bifidobacterium breve</i>	1.0
Protease	1.4
Lipase	0.6
Yeast	50.0
Wheat meal	40.8

3. 사료 공급 및 성장률 측정

대조구 사료와 비스루트 첨가 사료를 처음 2주간은 어체중의 4%로 공급하다가 그 이후에는 어체중의 3%로 공급하였으며 사료 공급량은 수분함량을 제외시킨 건조 중량으로 환산하여 공급하였다. 사육은 총 60일간으로 실험 기간 중 성장률을 조사하고 이에 따른 사료 공급량을 보정하기 위하여 매 2주 간격으로 체중을 측정하여 사료계수와 1일성장률을 알아보았다.

4. 비특이적 면역 반응 실험

60일 간의 사육 실험 후 실험 어류를 부경대학교 수산생명의학과 예방학 실험실로 옮겨 다음의 방법으로 면역 반응 실험을 하였다.

실험군주는 -80°C에서 동결 보존시킨 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Edwardsiella tarda* FSW 910410을 TSA 배지에 27°C, 24시간 배양한 후 실험에 사용하였다. 그리고 lysozyme의 활성을 알아보기 위한 실험에는 건조 *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma Co., USA)를 사용하였다.

보체의 용혈 능력의 변화는 각 실험구별 실험어의 미부정맥으로부터 채혈하여 혈청을 분리한 다음 Matsuyama et al. (1985)의 방법을 변형

하여 Sheep red blood cell (SRBC)에 대한 보체의 용혈능을 조사하였다. 그 방법을 요약하면 SRBC 항혈청을 1:400으로 희석하여 자극시킨 SRBC 용액을 만들어 실험어에서 분리한 혈청을 1:50으로 희석한 후 혼합하여 30°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 SRBC의 용혈 정도를 흡광도 (Optical density at 541nm) 측정하여 CH₅₀ units/ml로 표시하였다.

혈청의 라이소자임 활성 조사는 분리한 혈청을 Parry et al. (1965)의 Turbidimetric assay로 조사하였으며, 어류 식세포의 활성 산소량 변화는 Secombes (1988)의 방법을 변형하여 수행하였다. 즉 신장에서 식세포를 분리한 후 세포수를 2×10⁶ cells/ml로 조정하고, NBT 용액을 첨가한 후 20°C에서 30분 동안 반응시킨 후 흡광도(OD at 630nm)를 측정하여 NBT가 환원된 양을 활성 산소량으로 하였다.

식세포에 의한 식작용 실험을 위해서 헤파린을 처리한 주사기로 채혈한 혈액 0.5 ml를 실리콘 처리한 유리 시험관에 옮긴 후 *E. Coli* 세균 부유액(습중량 100 mg/ml 생리 식염수) 0.25 ml를 넣어 27°C에서 반응시키고, 15분, 1시간이 경과할 때마다 슬라이드 글라스에 혈액을 도말하여 May-Giemsa 염색법으로 혈액 표본을 염색하였다. 식균 정도는 식세포 100 세포에 대해 식균율을 구하였다. 식포를 형성한 식세포라도 식포 내에 세균이 관찰되지 않으면 식균 작용을 인정하지 않았다.

$$\text{식균율}(\%) = \frac{\text{세균을 식균한 식세포의 수}}{\text{관찰한 식세포의 수}} \times 100$$

전혈 중의 적혈구 용적은 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 측정하고, 전혈 중의 hemoglobin은 cyanmethemoglobin 법으로 측정하였다. 혈청 중의 성분을 조사하기 위해서는 먼저 혈액을 응고시킨 후 원심분리(6,000 rpm, 5 min)하여 혈청을 분리하였다. 혈청 중의 총단백질 양은 biuret 법, glutamic pyruvic transaminase (GPT)와 glutamic oxalacetic transaminase

(GOT)는 Reitman Frankel 법 및 glucose는 효소법으로 시판 kit (Asan Pharm, Co., LTD)를 이용하여 측정하였다.

병원성 세균 *E. tarda* FSW 910410 균주를 TSA (tryptic soy agar) 배지에서 27°C, 24시간 배양한 후 원심분리하여 집균하고 생리식염수로 3회 세척한 다음 흡광도가 OD₆₀₀=0.3 이 되도록 생리식염수에 현탁시킨 후, 실험어 20개체에 각각 0.1ml 씩 복강 주사하여 병원성 세균에 대한 저항력을 조사하였다. 이 실험을 2 반복하고 결과는 누적 폐사율로 나타내었다.

결 과

1. 사육 실험

나일틸라피아 치어에 비스루트 첨가 사료를 8 주간 공급한 성장 결과는 Table 3에 나타내었다. 비스루트 첨가구의 성장은 평균 19.0±0.04 g에서 66.4±2.02 g으로 성장하였으며 1일 성장률은 2.08%였다. 대조구의 성장은 18.9±0.09 g에서 60.7

±3.93 g으로 성장하였으며 1일 성장률은 1.94%로 비스루트 첨가구에 비해 약간 낮았으나 유의적인 차이(P>0.05)는 없었다. 이 때 비스루트 첨가구와 대조구의 사료계수는 각각 1.19과 1.24로 비스루트 첨가구가 좋았으나 역시 유의적인 차이는 보이지 않았다(P>0.05).

2. 어체 분석

비스루트 첨가 사료를 공급하여 사육 실험을 끝낸 후 어체 분석한 결과를 Table 4에 나타내었다. 어체 내 단백질 함량은 실험 초기와 종료 시 유의적인 차이를 나타내지 않았지만 조지방의 경우 유의적으로 증가하였고 조회분의 경우 종료 시 유의적인 감소를 나타내었다(P<0.05). 사육 실험 후 대조구와 비스루트 첨가구 사이에 조회분과 수분 함량에는 유의적인 차가 없었으나(P>0.05), 단백질 함량은 대조구가 유의적으로 높았고, 조지방 함량은 비스루트 첨가구가 유의적으로 높았다(P<0.05).

Table 3. Growth performance of Nile tilapia fingerling fed the diet with or without Bisroot for 60 days*

Diets	Av. body wt. (g)		Weight gain (g)	FC ¹	DGR (%) ²
	Initial	Final			
1st trial, Oct. 19~Nov. 2, '97(15 days) ³					
Control	18.9±0.09 ^a	28.2±0.24 ^a	9.3±0.29 ^a	1.14±0.04 ^a	2.90±0.07 ^a
Bisroot	19.0±0.04 ^a	29.0±0.34 ^a	10.0±0.42 ^a	1.07±0.04 ^a	3.06±0.12 ^a
2nd trial, Nov. 3~Nov. 17, '97(15 days) ³					
Control	28.2±0.24 ^a	39.0±0.46 ^a	10.8±0.61 ^a	1.37±0.14 ^a	2.36±0.13 ^a
Bisroot	29.0±0.34 ^a	41.7±1.08 ^b	12.7±0.88 ^a	1.22±0.07 ^a	2.63±0.15 ^a
3rd trial, Nov. 18~Dec. 2, '97(15 days) ³					
Control	39.0±0.46 ^a	51.1±1.56 ^a	12.1±1.74 ^a	1.11±0.11 ^a	1.94±0.26 ^a
Bisroot	41.7±1.08 ^b	53.8±2.45 ^a	12.1±1.73 ^a	1.25±0.08 ^a	1.83±0.19 ^a
4th trial, Dec. 3~Dec. 17, '97(15 days) ³					
Control	51.1±1.56 ^a	60.7±3.93 ^a	9.6±2.40 ^a	1.40±0.18 ^a	1.23±0.24 ^a
Bisroot	53.8±2.45 ^a	66.4±2.02 ^a	12.6±0.82 ^a	1.21±0.07 ^a	1.53±0.17 ^a
Whole period, Oct. 19~Dec. 17, '97(60 days) ³					
Control	18.9±0.09	60.7±3.93	41.8±3.95 ^a	1.24±0.07 ^a	1.94±0.11 ^a
Bisroot	19.0±0.04	66.4±2.02	47.4±2.08 ^a	1.19±0.03 ^a	2.08±0.06 ^a

*The mean in each column with a same superscript are not significantly different (P>0.05).

¹Feed efficiency: feed intake/wet weight gain.

²Daily growth rate: (log.final wt.-log.initial wt.)/days. ×100

³Means of triplicate tries.

사료 중 비스루트가 나일틸라피아, *Oreochromis niloticus*의 성장, 체조성 및 면역 반응에 미치는 영향

Table 4. Results of proximate analysis of whole-body of Nile tilapia fed with or without Bisroot for 60 day (% of dry matter basis)¹

Ingredient	Initial	Final	
		Control	Bisroot
Crude protein	54.14±0.16	56.47±0.78 ^a	53.40±0.39 ^b
Crude lipid	19.46±1.56	23.23±0.95 ^b	27.90±0.76 ^a
Crude ash	15.01±0.43	11.89±0.81 ^a	12.91±0.29 ^a
Moisture	69.73±0.51	70.48±0.93 ^a	70.24±0.95 ^a

¹Means of triplicate groups values in the same row with different superscripts are significantly different (P<0.05).

3. 비스루트 첨가 사료 공급에 따른 면역 반응

3.1 보체의 용혈 능력 조사

보체의 용혈 능력은 비스루트 첨가구가 전반적으로 대조구에 대하여 높은 용혈 능력을 나타냈으며, 대조구가 평균 26.3 CH₅₀ units/ml인데 비하여 비스루트 첨가구는 평균 29.4 CH₅₀ units/ml로 조사되었다.

3.2 혈청의 라이소자임 활성 조사

라이소자임의 *M. lysodeikticus* 에 대한 용균 능력은 비스루트 첨가구가 대조구에 비해 높게 나타났다. 대조구가 167.5 units/ml, 비스루트는 230.0 units/ml로 조사되었다.

3.3 어류 식세포의 활성 산소 측정

두신의 식세포를 zymosan으로 자극하여 O₂⁻의 생성량을 NBT 환원법을 이용하여 흡광도를 측정하여 조사한 결과 흡광도가 대조구는 0.40, 비스루트는 0.98로 대조구에 비해 비스루트 첨가구가 매우 높은 결과를 나타내어 식세포의 활성이 매우 높게 나타났다.

3.4 순환 혈액의 식세포에 의한 식작용 시험

반응 시작 후 15분, 1시간 째에 식균율을 조사한 결과, 시간이 지남에 따라 순환 혈액 식세포의 식균 능력이 증가하는 것을 볼 수 있다. 비스루트 첨가구는 식균 시작 후 15분 째에 식균율은 52%이고, 1시간 째에 식균율이 70%로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 그러나 대조구는 15분 째에 식균율이 48%이고, 1시간 째에는 식균율이 38%로 조사되어 식작용이 증가하는 것을 볼 수 없었다.

3.5 혈액 성분 분석

실험어의 hemoglobin, hematocrit 변화와 total protein, glucose의 serum level 과 GOT, GPT의 변화를 조사하였다. 평균 hematocrit는 대조구가 38.67%이며, 비스루트 첨가구가 35.00%로 비스루트 첨가구가 낮게 나타났다. 전반적인 hemoglobin양은 8.00~11.53 g/dl로 나타났다. 평균 hemoglobin은 대조구가 8.22 g/dl, 비스루트 첨가구는 7.93 g/dl로 대조구와 비스루트 첨가구는 유의적 차이는 없었다 (P>0.05). 혈청내의 total protein은 대조구가 3.54 g/dl이고, 비스루트 첨가구는 3.66 g/dl로 대조구와 비스루트 첨가구는 유의적 차이가 나타나지 않았다(P>0.05).

실험어의 혈청 내 glucose의 전반적인 값의 범위는 100~150 mg/dl이고, 대조구의 평균값은 130.22 mg/dl, 비스루트 첨가구는 115.63 mg/dl로 나타나 대조구에 비하여 실험구가 전반적으로 낮은 것을 볼 수 있었다. GOT는 대조구가 16.47 karmen/ml, 비스루트 첨가구는 14.70 karmen/ml로 비스루트 첨가구가 낮았으며, 혈청 내 GPT는 대조구가 32.35 karmen/ml, 비스루트 첨가구는 29.12 karmen/ml로 조사되어 비스루트 첨가구가 전반적으로 낮았다.

3.6 공격 실험

비스루트를 투여한 나일틸라피아에게 병원성 세균 *E. tarda* FSW 910410을 OD₆₀₀=0.3 (5.7 × 10⁸ CFU/ml) 농도로 맞추어 실험어에 0.1 ml씩 복강 주사하여 공격 실험한 결과를 누적 폐사율로 나타내었다(Fig. 1). 비스루트 첨가구

는 누적 폐사율이 59%이고, 대조구 80%로 비스루트 첨가구가 상대적으로 폐사율이 낮게 나타났다($P < 0.05$). 따라서 비스루트의 투여가 나일틸라피아의 병원성 세균에 대한 방어력을 증강시킨 것으로 생각된다.

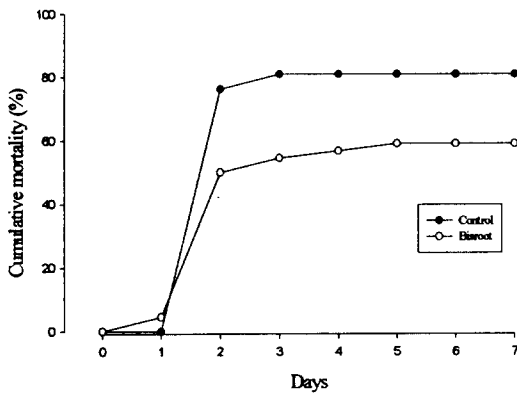


Fig. 1. Cumulative mortality of Bisroot fed Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, challenged with 5.7×10^7 cells/ml *Edwardsiella tarda* FSW 910410 (n=20).

고찰

생균과 소화 효소를 함유하고 있는 비스루트를 사료에 첨가하여 먹인 나일틸라피아 치어의 성장은 대체로 대조구보다 높은 성장을 보였다. 어류의 사료 섭취에 따른 소화 흡수는 어종에 따라 달라지지만 보통 식도를 거쳐 위와 장을 통해 이루어진다(Lovell, 1989). 위에서는 염산과 주요 단백질 분해 효소인 펩신이 분비되어 단백질을 짧은 사슬의 폴리펩티드로 분해한다. 위에서 일부 소화된 폴리펩티드 형태의 단백질이 장으로 유입되면 트립신, 키모트립신, carboxypeptidase, aminopeptidase와 같은 단백질 분해 효소에 의해 유리 아미노산으로 분해된다. 또한 장에서는 체장에서 분비된 아밀라제와 같은 탄수화물 분해 효소와 지방 분해 효소에 의해 사료 내 탄수화물과 지방의 흡수가 일어난다(Lovell, 1989). 이와

같이 사료 내 들어있는 영양소의 흡수를 위해 많은 효소들이 분비되는 것을 알 수 있다. 유용 세균으로 이용하고 있는 것들 중에서 *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*는 α -아밀라제를 형성하여 전분을 dextrin과 올리고당으로 액화 및 당화하는 기능을 가지고 있으며, *B. subtilis*는 또한 단백질 분해 효소를 형성하여 많은 나라에서 상품으로 개발되어 있다(정, 1993). 본 실험에 이용된 *Bifidobacterium breve*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus polyfermenticus*도 또한 유산 발효를 통해 당분을 분해하며, *Bacillus mesentericus*는 단백질 분해 효소를 생성하는 것으로 알려져 있으므로(駒形和男, 1994; 정, 1993) 본 실험에서 초기에 성장이 좋았던 것은 이들 유용 세균에 의해 사료의 소화 흡수에 도움을 받았던 것으로 생각된다. 실제로 Gildberg et al. (1995)은 유산균(*Lactobacillus plantarum*)을 대서양 연어의 장에서 분리하여 배양한 다음 사료에 섞어 대서양 연어에 공급한 결과 대조구 보다 장에서 유의적으로 높은 세균 군집을 형성하는 것을 관찰하였다. 또한 이들은 실험에 이용된 유산균으로 곡물의 새싹을 발효시켜 만든 물질로 S-type 로티퍼에게 공급하였다. 이 로티퍼의 먹이 생물로서의 가치를 알아보기 위해 부화 직후의 넙치 자어에게 공급한 결과 대조구에 비해 평균 체장이 유의적으로 길어지는 결과를 얻어 유산균을 이용하여 로티퍼를 배양하는 것이 먹이 생물로서의 가치를 향상시키는 결과를 얻었다.

생균제를 직접 투여하여 어류의 성장 효과를 본 연구 보고는 없지만 Gatesoupe (1989)는 살아있는 생균을 사료 첨가물로 이용해서 L-type 로티퍼와 turbot 자어의 성장률을 개선시키는 결과를 얻어 본 실험 결과와 유사하였다. 또한 Gatesoupe et al. (1989)은 S-type 로티퍼에 해산 클로렐라 *Nannochloropsis oculata*를 주 먹이로 공급하면서 *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*와 같은 유산균을 공급할 때 대조구에 비해 로티퍼의 생산율이 유의적으로 증가하는 결과를 얻어 유산균의 첨가가 로티퍼의

생산을 향상시키는 것으로 나타났다.

유산균과 같은 probiotics의 이용은 가축의 성장과 질병 저항성을 향상시키는 결과를 가져온다고 한다(Nousiainen and Setälä, 1993; Mannickam et al., 1994). 유산균은 경쟁 세균의 성장을 저해하는 젖산과 과산화수소를 포함해서 살균제와 정균제 역할을 하는 중요한 박테리오킨을 생산한다. 이와 같이 유산균은 장내 점액에서 군집을 형성함으로써 침투하는 병원성 세균에 대해 첫 번째의 방어 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Olsson et al., 1992). 대서양 연어 *Salmo salar*의 장내 미생물상 중의 하나인 *Lactobacillus plantarum*도 시험관 내 실험에서 병원성 미생물의 성장을 저해하는 박테리오킨을 생산하는 것으로 보고되었다(Strøm, 1988).

어류의 비특이적 면역의 중요한 방어 기작은 혈청이 관여하는 비특이적 면역(serum-mediated killing)과 식세포가 관여하는 비특이적 면역(phagocyte-mediated killing) 두가지가 있다. 본 연구에서는 혈청이 관여하는 비특이적 면역에 의한 방어력은 혈청의 용혈 능력과 라이소자임의 활성을 조사하고, 식세포가 관여하는 비특이적 면역반응은 순환 혈액의 식세포의 식작용과 두신의 식세포의 활성 산소를 측정하므로써 조사하였다. 이전의 많은 연구에서 보체의 용혈능력이 사료 내 첨가물에 의해 향상된 결과를 볼 수 있었고, 본 연구에서도 실험 사료를 먹인 어류에서 용혈 능력이 높은 결과를 나타내었다.

어류 혈청의 라이소자임은 여러 종류의 세균성 병원체에 대하여 정균 효과가 있으며(Grinde, 1989), 그람 양성 구균에서는 세포벽 성분 중 peptidoglycan의 g-1,4-glycoside 결합을 가수 분해하여 그람 양성 구균을 용해시킨다. 라이소자임은 호중구와 대식세포에 존재하며 혈액으로 흘러나와 방어 작용을 한다(Murray and Fletcher, 1976). 하등 동물에 속하는 어류는 고등 동물에 비하여 항체의 유전자 수가 적기 때문에(Ellis, 1982), 항체의 class 및 항체가 주축이 되는 면역반응 만으로는 충분한 방어 기작을 유

지하기 어렵다. 따라서 라이소자임과 같은 효소에 의한 비특이 방어 기작들이 이를 보완하여 주는 것으로 생각된다.

본 연구에서 조사한 혈청의 라이소자임 활성은 대조구와 비스루트 첨가구 간의 차이는 볼 수 없었으나 두신에서 분리한 식세포를 zymosan으로 자극하여 O_2^- 생성능을 NBT 환원을 이용하여 흡광도로 측정하였을 때, 평균 흡광도가 대조구 사료를 투여한 시험구에서는 평균 0.4, 비스루트 첨가 사료 첨가구에서는 0.98 로 아주 높게 나타났다. 이것은 권(1998)의 연구에서 사료에 구기자 3%를 투여하였을 때 흡광도 값이 0.49로 대조구의 흡광도 0.4에 비해 높게 나타난 것과 일치하는 결과를 보이고 있고, 각종 백신을 처리한 이후에 FKC (formalin killed cell) 주사구에서는 0.942, FKC 침지구에서는 0.773, FKC와 ECP (extra cellular product)를 혼합 처리한 구에서는 1.08로 나타나 식세포의 활성이 증가하는 결과와도 일치하는 것을 볼 수 있다.

순환 혈액 식세포의 식작용 능력을 측정한 결과 비스루트 첨가구의 식균율이 대조구에 비해 높게 나타났는데, 이는 나일틸라피아 순환 혈액 식세포의 활성은 빠른 시간 내에 일어나므로(서, 1995), 비스루트 첨가가 식세포의 활성을 더욱 증가시켰다고 생각된다.

실험 사료를 투여한 이후에 병원성 세균에 대한 방어력을 조사하기 위하여 나일틸라피아에 병원성 세균인 *E. tarda*로 공격 실험하여 생존율을 조사한 결과, 시험 사료 첨가구에서 생존율이 높게 나타났으며, 특히 비스루트 첨가구는 누적폐사율이 59%로 대조구의 80%에 비해 유의성 있는 좋은 결과를 얻었다($P < 0.05$). 이 결과는 비스루트의 투여로 인해 나일틸라피아의 장 조직의 활성이 강화되어 병원성 세균의 침입에 대한 저항력이 증강된 것으로 생각된다.

본 실험의 결과 비스루트를 사료에 첨가하여 투여하면 나일틸라피아의 생리적 기능에 장애를 주지 않고, 각종 면역 기능을 향상시킨다. 특히 감염성 질병에 대한 저항력을 증강시키기 때문에

사료 내 첨가물로서의 역할이 충분히 기대된다. 비스루트 첨가 어류는 비특이적 면역 방어 기구 중 세포성 면역 기능을 활성화 시키는 것이 상당히 높은 것으로 관찰되었고, 병원 세균에 대한 방어력이 매우 뛰어난 것을 알 수 있었다.

요 약

생균(*Bacillus polyfermenticus*, *Bacillus mesentericus*, *Streptococcus faecalis*, *Bifidobacterium breve*)과 소화 효소(protease, lipase)를 함유한 비스루트의 효과를 알아보기 위해 사료 내 1% 첨가하여 나일틸라피아 치어(19.0±0.07 g)에게 60일간 공급한 다음 성장률, 체조성 및 면역 반응의 효과를 조사하였다.

60일간 사육한 결과 비스루트 첨가구와 대조구 사이에 유의적인 성장 차이를 보이지 않았지만(P>0.05), 보체의 용혈 능력은 비스루트 첨가구가 대조구에 비해 용혈능이 높은 것으로 조사되고, 라이소자임의 용균 효과는 대조구와 비슷하였다. 식세포의 식작용 능력과 신장 마크로파지의 respiratory burst activity는 비스루트 첨가구가 대조구에 비해 활성이 매우 높았다. 따라서 비스루트 사료 내 첨가가, 어류의 비특이적 면역 기능 중에서 세포성 면역 기능을 활성화하는데 기여하였다.

병원성 세균 *Edwardsiella tarda* FSW 9104 10 균주로 공격 실험 결과 비스루트 첨가구가 누적폐사율이 59%, 대조구가 80%로 조사되었고, 그 결과 비스루트 첨가구는 병원성 세균에 대한 저항력을 증가시켰다(P<0.05). Hematocrit, hemoglobin, total protein, glucose, GOT, GPT 와 같은 혈액 성분을 분석한 결과 비스루트 첨가구와 대조구 간의 유의차는 없었지만(P>0.05), glucose, GOT, GPT는 비스루트 첨가구가 대조구에 비해 낮게 나타났다.

이상의 결과로 비스루트는 나일틸라피아의 생리 기능에 문제를 야기시키지 않고, 비특이적 면역 기능 중 세포성 면역 기능을 증강시키는 효과

가 있으며, 병원성 세균에 대한 저항력의 증강 효과도 높다. 따라서, 비스루트는 나일틸라피아의 사료 첨가물로서의 역할이 충분히 기대된다.

감사의 글

본 실험을 위해 아낌없는 지원을 해주신 순천당 제약에 감사드리며, 사육 실험과 면역 실험에 많은 도움을 주신 부경대학교 양식공학 실험실 학생들과 수산생명의학과 학생들께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Dabrowski, K. and R. W. Hardy, 1994. The status of alternative nutrient sources of fish meal (fish meal analogs) in aquaculture diets. Proceeding of FOID' 94, pp. 93-100.
- Ellis, A. E., 1982. Differences between the immune mechanisms of fish and higher vertebrates. In *Microbial Diseases of fish*. ed. by R. J. Robert, 1-29.
- Gatesoupe, F. J., 1989. Further advances in the nutritional and antibacterial treatments of rotifers as food for turbot larvae, *Scophthalmus maximus* L. In : N. de Pauw, E. Jaspers, H. Ackerfors and N. Wilkins (Editors), *Aquaculture - a Biotechnology in Progress*. European Aquaculture Society, Bredene, Belgium.
- Gatesoupe, F., A. Toshihisa and W. Takeshi, 1989. The effect of bacterial additive on the production rate and dietary value of rotifers as food for Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, *Aquaculture*, 83 : 39-44.
- Gildberg, A., J. Audny and B. Jarl, 1995. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, 138 : 23-34.
- Grinde, B., 1989. Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial against fish pathogens. *Nat. Fish Dis.*, 12 : 95-104.
- Hurst, A., 1981. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.*, 27 : 85-123.

사료 중 비스루트가 나일틸라피아, *Oreochromis niloticus*의 성장, 체조성 및 면역 반응에 미치는 영향

- Kone, K. and D. Y. C. Fung, 1992. Understanding bacteriocins and their uses in foods. *Daily Food and Environ. Sani.*, 12 : 282-285.
- Lovell, T., 1989. Nutrition and Feeding of Fish., pp. 73-80.
- Manickam, R., K. Viswanathan and M. Mohan, 1994. Effect of probiotics in broiler performance. *Ind. Vet. J.*, 71 : 737-739.
- Matsuyama H. A. Hirata, M. Nakao and T. Yano, 1985. Optimum conditions for the assay of hemolytic complement titer of Porgy (*Pagrus major*) serum. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 30(2·3) : 149-158.
- Murray, C. K. and T. C. Flether, 1976. The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. *J. Fish Biol.*, 9 : 329-334.
- Nakagawa, H., S. Kasahara, T. Sugiyama and I. Wada, 1984. Usefulness of Ulva-meal as feed supplementary in cultured black sea bream. *Aquaculture*, 32 : 20-27.
- Nematipour, G., H. Nakagawa, S. Kasahara and S. Ohya, 1988. Effect of dietary lipid level and *Chlorella*-extract on Ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54 : 1395-1400.
- Nousiainen, J. and I. Setälä, 1993. Lactic acid bacteria as animal probiotics. In : S. Salmiinen and A. von Wright (Editors), *Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker, New York, pp. 315-356.
- Olsson, C. J., A. Westerdahl, P. L. Conway, and S. Kjellberg, 1992. Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*)- and dab (*Limanda limanda*)-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 : 551-556.
- Parry, R. M., R. C. Chandau and R. M., Shahani, 1965. A rapid and sensitive assay of muramidase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 119 : 384-386.
- Satoh, K., H. Nakagawa and S. Kasahara, 1987. Effect of Ulva meal supplementation on disease resistance of red seabream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53 : 1115-1120.
- Secombes C. J., S. Chung and A. H. Jeffries, 1988. Superoxide anion production by rainbow trout macrophages detected by the reduction of ferricytochrome C. *Dev. Comp. Immunol.*, 12 : 201-206.
- Strøm, E., 1988. Lactic acid bacteria in fish intestines. Norwegian College of Fisheries, Trom, Norway. Thesis (in Norwegian), 88 pp.
- Takii, K., M. Nakamura, Y. Tanaka, and H. Kumai, 1995. Diluted rotifer, *Brachionus plicatilis*, extract as culture medium stimulates hatching of red seabream, *Pagrus major*. *Aquacult. Res.*, 26 : 243-247.
- Yone, Y., M. Furuichi and K. Urano, 1986a. Effects of wakame *Undaria pinnatifida* and *Ascophyllum nodosum* supplements on growth, feed efficiency and proximate compositions of liver and muscle of red sea bream. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 52 : 1465-1468.
- Yone, Y., M. Furuichi and K. Urano, 1986b. Effects of wakame *Undaria pinnatifida* and *Ascophyllum nodosum* supplements on absorption of dietary nutrients, and blood sugar and plasma free amino-N levels of red seabream. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 52 : 1817-1819.
- 권문경, 1998. 구기자 투여 및 백신 처리가 나일틸라피아, *Oreochromis niloticus*의 면역 반응에 미치는 효과. 부경대학교 석사 학위 논문, 62pp.
- 서창우, 1995. 넙치와 나일틸라피아의 *Staphylococcus epidermidis*에 대한 저항력 비교. 석사 학위 논문, 부산수산대학교, 33pp.
- 정동효, 1993. 효소학개론, 대광서림, 서울, pp. 131-220.
- 허원변, 강춘기, 배정설, 조덕봉, 김영주, 1994. 식품 미생물, 지구문화사, 107pp.
- 駒形和男, 1994. 食品工業利用微生物デ タブック. 東京化學同人, 289pp.