

## 나일틸라피아, *Oreochromis niloticus*의 비특이적 면역반응에 대한 생약재 투여 효과

황미혜 · 박수일<sup>†</sup> · 김이철\*

부경대학교 수산생명의학과, \*국립수산진흥원 병리과

본 연구는 어류에 각종 생약재를 투여하였을 때 나타나는 방어 능력의 변화와 질병에 대한 예방 효과를 밝히고자 수행되었다. 실험의 내용은 인삼(*Panax ginseng*), 구기자(*Lycium chinense*), 하수오(*Polygonum multiflorum*), 오미자(*Schizandra chinensis*)의 첨가 사료를 나일틸라피아에 일정 기간 투여한 후 실험어의 성장, 비특이적 방어 능력 및 생리학적 기능에 미치는 영향을 조사한 것이다. 실험에 사용한 각종 생약재 중에서 체중의 증가는 구기자 3% 투여구가 가장 높게 나타났다. 보체의 살균 능력은 모든 실험구에서 살균력이 12주째에 증강되었고 보체의 용혈 능력도 모든 생약재 투여구에서 대조구 보다 높고 특히 인삼 2% 투여구에서 가장 높게 나타났다. 그러나 라이소자임의 용균능력과 신장의 부착 식세포 활성 산소 생성 능력은 구기자 3% 투여구가 가장 높았다. 그리고 나일틸라피아에 병원성을 지닌 *Edwardsiella tarda* 균주로 공격 실험한 결과 구기자 3% 투여구가 생존율이 85%로 가장 높았다. Hematocrit, hemoglobin, total protein, glucose, GOT, GPT와 같은 혈액의 생리학적 지표 성분을 분석한 결과 생약재를 첨가한 사료를 먹인 실험어는 대조구와 차이가 없으며 생리학적 기능 면에서 나쁜 영향을 주지 않는 것으로 조사되었다. 따라서 인삼, 구기자, 하수오, 오미자 등과 같은 생약재는 그 종류에 따라 나일틸라피아의 성장률, 각종 비특이적 면역력을 증강시키는 능력과 병원성 세균에 대한 저항력의 증강 효과에 차이가 있지만 장기간 투여하여도 생리 기능에 문제를 야기하지 않는 것을 알 수 있었다. 모든 실험 결과를 종합해 보면, 실험에 사용한 각종 생약재 중에서 구기자는 가장 경제적이며, 각종 면역 기능 증강 효과가 뛰어나므로 새로운 사료내 첨가물로서의 충분한 가치가 있으며, 양식 어가에 많은 도움을 줄 것으로 생각된다.

**Key words:** Non-specific immune response, Nile-tilapia, Complement, Lysozyme, Phagocyte, Herbal medical stuff

일반적으로 나일틸라피아를 기르는 곳에서는 다른 어종보다 비교적 높은 수온을 연중 유지시켜 주어야 하므로 순한 여과식 양식 방법을 사용하는 것이 대부분이다. 이러한 양식 조건에서는 자칫하면 환경이 악화되거나 각종 스트레스가 발생하여 양식 어류의 저항력을 저하시켜 여러 가지 질병이 발생하므로 양식 어가에 큰 경제적 손실을 안겨주게 된다(조 및 전, 1990; Nakagawa and Kasahara, 1986; Satoh *et al.*, 1989). 따라서 위생 문제나 환경 오염의 우려가 없으며 경제적으로도 도움이 되는 예방법의 개발이 필요하다(MacFarlane and Path, 1987). 이러한 예방법의 하나로 vitamins(Hilton, 1989; 조 및 전, 1990), irons(Kelley and Easter, 1987; Satoh *et al.*, 1987)과 selenium(Lorentzen *et al.*, 1994) 같은

각종 유용 물질을 첨가한 사료의 투여로 어류의 면역 반응을 증강시키고자 하는 연구가 여러 국가에서 활발히 진행되고 있으며 최근에는 한약재 등과 같은 천연 식물 중에도 상당한 항균성 물질이 존재하며, 이들 천연 항균성 물질을 검색하는 것에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다(목 등, 1994).

본 연구는 이러한 한약재를 양식 어류의 사료에 첨가함으로써 어류의 면역 반응을 증강시키고자 하였다. 박 등(1992)의 연구에서 항균성이 있다고 조사된 각종 한약재 중 인삼, 구기자, 하수오, 오미자 등을 시판용 나일틸라피아의 사료에 일정량씩 첨가한 후 84일 동안 투여하면서 나일틸라피아의 성장, 비특이적 방어 인자와 생리적 기능에 미치는 영향을 조사함으로써 양식 어류의 면역능을 증강시키는 사료내 첨가물로서의 효능을 검토하고자 하였다.

<sup>†</sup>Corresponding author

## 재료 및 방법

실험어인 나일틸라피아(20-25 g)는 외관상 질병의 증세가 나타나지 않는 건강한 개체로서 0.5 ton 용량의 순환여과식 사육조에 수조별로 50마리씩 수용하여 2주 동안 순치 시킨 후 실험에 사용하였다. 각 실험은 3회 반복 실시하였으며 실험시의 수온은 21-25°C, 용존 산소는 5.3-5.5 ppm으로 유지하였다. 실험에 사용한 균주는 -80°C에서 동결 보존시킨 *Escherichia coli* ATCC25922와 *E. tarda* FSW-910410을 사용하였다. 혈청 내 lysozyme activity를 알아보기 위한 실험에는 건조 *Micrococcus lysodeikticus*(Sigma)를 사용하였다.

실험에 사용한 생약재는 인삼(*Panax ginseng*), 하수오(*Polygonum multiflorum*)의 건조된 뿌리와 구기자(*Lycium chinense*), 오미자(*Schizandra chinensis*)의 건조된 열매이었으며 이들을 미세한 분말로 만들어 사료의 조성이 조단백 42% 이상, 조지방 3.0% 이상, 조섬유 4.0% 이하, 조회분 17.0% 이하, Ca 0.8% 이상, P 1.8% 이하인 시판 분말 사료에 혼합한 후 사용하였다. 실험용 생약재는 인삼 2%, 구기자 3%, 하수오 3%, 오미자 2%를 시판 분말 사료에 각각 첨가하여 제작하였다. 제작된 사료는 하루에 어체중의 2%를 4회에 나누어 84일 동안 투여하였다. 성장에 미치는 효과를 보기 위하여 생약재 첨가 사료를 먹인 후 2, 4, 6, 8, 10, 12주째에 각 수조별로 모든 수용 어체를 잡아내어 아미노 안식향산 에틸 50 ppm으로 마취시킨 후 체중과 전장을 측정하고 다음 평균치를 통계적 분석하였다. lysozyme activity와 신장 부착 식세포의 활성 조사에는 예비 실험 결과 경제적으로 효과적이라고 생각되어 인삼 1%와 오미자 1%를 제작하여 부가적으로 실험을 실시하였다.

비특이적 면역 반응 중 보체의 용혈 능력의 변화는 각 실험구별 실험어의 미부정맥으로부터 채혈하여 혈청을 분리한 다음 Matsuyama *et al.* (1985)의 방법을 변형하여 Sheep red blood cell(SRBC)에 대한 보체의 용혈능을 조사하였다. 그 방법을 요약하면 다음과 같다. 나일틸라피아에 대한 SRBC 항혈청(1:400으로 희석)과 SRBC를 30°C에서 30분간 반응시켜 자극시킨 SRBC 용액을 만든다. 이 용액과 실험어에서 분리한 혈청(1:50으로 희석)을 혼합하여 30°C에서 1시간 동안 반

응시킨 후 SRBC의 용혈 정도는 흡광도(OD at 541 nm)를 측정하여 CH<sub>50</sub> units/ml로 표시하였다. 또한 각 실험구의 혈청내 보체에 의한 살균 작용은 유(1992)의 방법과 같다. 실험어에서 분리한 혈청은 1:4로 희석하고, 10<sup>-3</sup> mg/ml로 조정된 *E. coli* 세균 부유액과 1:1로 혼합하여 27°C에서 반응시킨 후 반응 시간별 세균수의 변동을 기준으로 조사하였다. 세균수의 변화는 Miles and Misra (1938)의 균 집락수 계산 방법에 따라 조사하였다.

혈청의 라이소자임 활성 조사는 Parry *et al.* (1965)의 turbidimetric assay로 조사하였으며, 신장 부착 식세포의 활성 산소량 변화는 Secombes (1988)의 방법을 변형하여 수행하였다. 즉, 신장은 두신을 사용하여 세포를 분리하여 96 well culture plate에 부착 식세포 수를 2×10<sup>6</sup> cells/ml로 조정하여 배양하였다. 여기에 NBT 용액을 첨가한 후 20°C에서 30분 동안 반응시켰다. 그 이후에 KOH/DMSO 혼합 용액을 첨가하여 환원된 NBT를 용해시켜 흡광도(OD at 630 nm) 값을 측정하여 그것을 활성 산소 생성량으로 하였다.

혈액 성분의 변화 hemoglobin, total protein, glucose, glutamate oxaloacetate transaminase(GOT), glutamate pyruvate transaminase(GPT)에 대한 조사는 아산 제약 Kit를 사용하였으며, hematocrit 값의 변화는 미부 정맥에서 채혈하여 hematocrit 용 capillary tube에 넣어 12,000 rpm으로 5분 동안 원심 분리한 후 측정하였다.

생약재를 첨가한 사료를 먹인 실험어의 병원성 세균에 대한 저항력의 변화를 조사하기 위하여 나일틸라피아의 병원성 세균인 *E. tarda* 균주를 TSA 배지에서 27°C, 24시간 배양한 후 원심 분리하여 집균하고 생리식염수로 3회 세척한 다음 평균 농도를 1×10<sup>8</sup> cell/ml(OD at 600=0.3)가 되도록 현탁시킨 실험 균액을 복강내에 0.1 ml씩 주사하여 공격 실험 하였다. 사육 수온은 27°C이었으며 10일 동안 누적폐사율을 조사하고 상대생존율(RPS, relative percent survival)로 나타내었다.

대조구의 실험어는 생약재 투여 실험어와 같은 조건으로 유지된 수조에서 사육하였으며 시판용 분말 사료로 제작된 펠릿 사료를 실험용 생약재 첨가 사료와 동일한 방법으로 실험 기간 동안 투여하였다. 대조구와 각 실험구 사이의 통계학적 유의성은 ANOVA test와 Student's t-test로 비교하여

**Table 1.** Change of body length (cm) in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, after 84 days feeding

Herb medical stuff in diet	2% Ginseng	3% Hasuo	3% Kugija	2% Omija	Control
Initial	12.47	12.84	12.61	13.00	12.73
Final	15.06	15.45	15.55	15.38	15.50
Increase	2.59	2.61	2.94	2.38	2.77

P 값이 0.05 미만일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

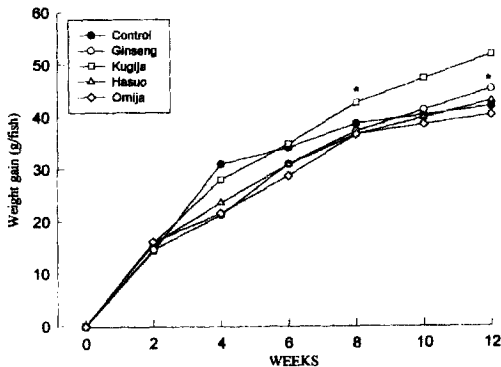
**결 과**

**성장도**

실험어에 대한 실험 기간 중의 전장 변화를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 그리고, 12주일 동안의 체중 변화를 측정하여 평균 증중량으로 계산한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 생약제 실험구의 성장은 4주째 이후부터 크게 증가하기 시작하여 실험 종료시의 평균 체중은 대부분의 생약제 실험구가 대조구에 비하여 전반적으로 높게 나타났으며, 그 중에서도 구기자 3% 실험구는 대조구와 유의적으로 가장 큰 차이(P<0.05)가 있다(Table 1, Fig. 1).

**보체의 활성**

보체의 살균 능력 조사 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 모든 생약제 실험구가 전반적으로 대조구에 비해 살균 능력이 뛰어난 것으로 나타났다. 12주째에 보체의 살균 능력은 첨가 사료 별로 인삼 2%, 구기자 3%, 하수오 3%, 오미자 2%의 순



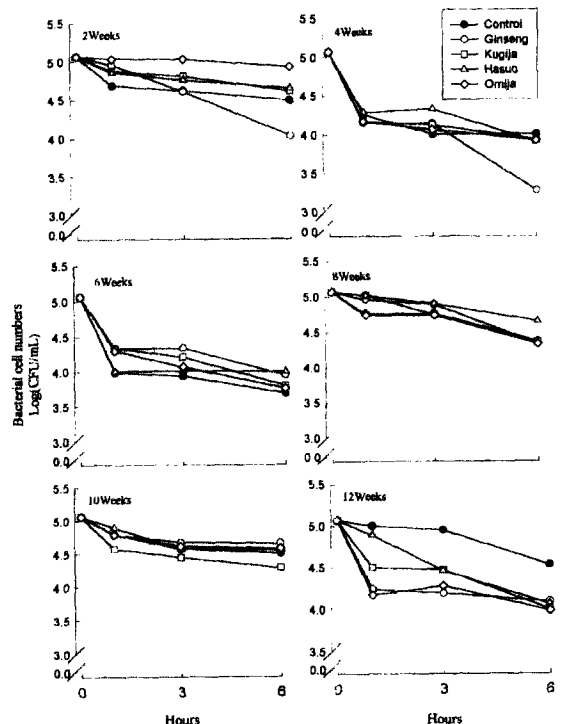
**Fig. 1.** Change of the body weight in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fed on different herb medical stuff in diet. \*significant difference from control (p<0.05).

서로 좋게 나타났다.

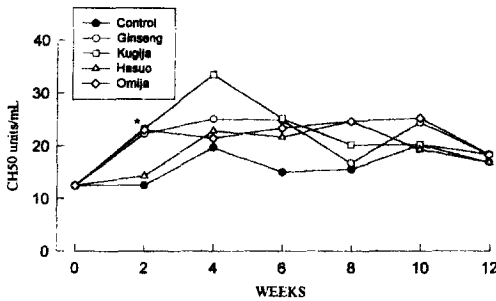
보체의 용혈 능력을 조사한 결과는 Fig. 3에 나타내었으며 생약제 첨가 사료 투여 후 2주일째 부터 시험기간 동안 생약제 실험구가 대조구에 대하여 유의성 있게(P<0.05) 높은 용혈 능력을 나타내었다. 인삼 2% 첨가 실험구가 22.2-25.0 CH<sub>50</sub> units/ml로 가장 높은 용혈 능력을 보였으며 다음으로 구기자 3%, 하수오 3%, 오미자 2%의 순으로 보체의 용혈 능력이 뛰어난 것으로 조사되었다 (Fig. 2, 3).

**라이소자임 활성**

혈청 내 라이소자임의 용균 활성은 Table 2에서



**Fig. 2.** Change of bactericidal reaction of complement in serum against *E. coli* in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed on different herb medical stuff in diet.



**Fig. 3.** Change of the complement titer (CH<sub>50</sub>) in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed on different herb medical stuff in diet. \*significant difference from control (p<0.05).

보는 것과 같이 생약재 실험구가 대조구 보다 높고, 용균 활성은 사료 투여 기간이 지날수록 향상되는 것을 볼 수 있다. 구기자 3%와 인삼 1% 투여구는 실험기간 동안 지속적으로 증가하여 라이소자임 활성이 가장 높았다.

**부착 식세포의 활성**

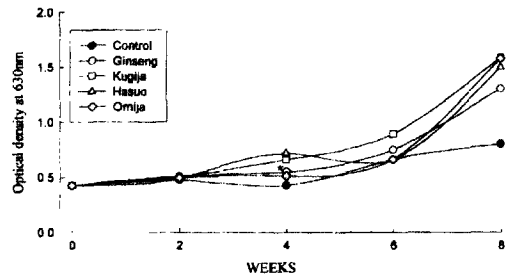
신장 유래 부착 식세포의 활성 산소 생성량은 Fig. 4에 나타내었다. 생약재를 첨가한 사료를 투여한 실험구는 4주째 이후부터 대조구에 비하여 높고, 그 값이 지속적으로 증가하고, 구기자 3%, 인삼 1%, 하수오 3%, 오미자 1%의 순서로 활성 산소량이 많이 생성되었다. 특히, 구기자 3%, 하수오 3% 투여구는 활성 산소량의 생성 능력이 가장 높았다(Fig. 4).

**생리적 기능 변화**

실험 기간 동안의 혈액 성분의 변화를 분석한 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 생약재 실험구와 대조구의 hematocrit 변화는 35-45%이며 실험구와

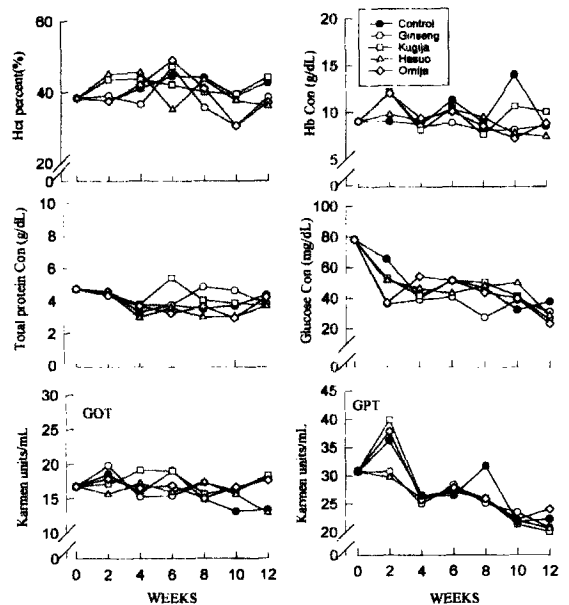
**Table 2.** Lysozyme activity (units/ml) of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed on different herb medical stuff in diet

Herb medical stuff in diet	Weeks after administration			
	2	4	6	8
1% Ginseng	445	519	588	871
3% Hasuo	385	479	560	610
3% Kugija	487	496	705	822
1% Omija	565	500	571	577
Control	485	531	548	591



**Fig. 4.** The NTB reduction of pronephros phagocytes in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed on different herb medical stuff in diet. \*significant difference from control (p<0.05).

대조구 사이에 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다. Hemoglobin은 대조구가 10.04 g/d이며, 생약재 투여구는 9.14-9.18 g/d로 조사되었다. 그 중 오미자 2% 실험구가 9.78 g/d로 가장 높았다. 혈청내의 total protein 변화는 대조구의 3.86 g/dl에 비하여 인삼 2%는 4.33 g/dl, 구기자 3%는 4.01 g/dl로 높고, 하수오 3%는 3.32 g/dl, 오미자 2%는 3.44 g/dl로 대조구에 비해 혈청내의 total protein 양이 낮았다. 혈청내의 glucose 농도는 전반적으로 30-70 mg/dl이고, 실험 기간이 지남에 따라 감소하



**Fig. 5.** Change of physiological response in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed on different herb medical stuff in diet. Hct: hematocrit; Hb: hemoglobin; Con: concentration.

**Table 3.** Cumulative mortality and RPS of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, challenged intraperitoneally with  $1.0 \times 10^7$  Cell/ml of *Edwardsiella tarda* FSW 910410 (n=20)

Herb medical stuff in diet	2% Ginseng	3% Hasuo	3% Kugija	2% Omija	Control
Cumulative Mortality (%)	45	35	10	20	65
RPS (%)	31	47	85	69	0

유의차는 없으며, 실험 기간 동안의 평균 농도는 대조구가 47.6 mg/dl이고, 생약제 중에서 하수오 3%가 51.9 mg/dl로 혈청내 glucose 농도가 가장 높았다. 혈청내 GOT와 GPT 변화는 생약제 투여 후에 대조구와 유의성 있는 차이는 보이지 않으며 GOT의 농도는 13-38 karmen/ml, 혈청내 GPT는 25-50 karmen/ml로 조사되었다(Fig. 5).

### 병원세균에 대한 방어능

인삼, 구기자, 하수오, 오미자를 투여하여 84일째에 병원성 세균인 *E. tarda* FSW 910410 균주로 공격 실험한 결과를 Table 3에 나타내었다. 실험 종료시의 상대생존율은 구기자 3%, 오미자 2% 투여구가 50% 이상으로 병원성 세균에 대한 방어능이 아주 높았고, 하수오 3%, 인삼 2% 또한 대조구보다 높은 생존율을 보였다. 그 중에서도 구기자 3%는 상대생존율이 85%로 *E. tarda* 균에 대한 방어능이 가장 뛰어난 것으로 조사되었다(Table 3).

## 고 찰

본 연구에서 생약제를 첨가한 사료 투여구의 성장은 4주째 이후부터 크게 증가하기 시작하고 실험 종료 시점에는 대조구에 비해 전반적으로 높았다. 그 중에서 구기자 3%, 인삼 2%, 하수오 3% 투여구가 성장이 대조구 보다 좋은 반면 오미자 2% 투여구는 대조구와 차이가 없었다. 생약제를 첨가한 사료를 먹인 실험구 가운데 구기자 3% 투여구는 4주째부터 체중이 증가하기 시작하고, 인삼 투여구는 10주 이후에 체중 증가 효과가 나타나기 시작하여 실험 종료시인 12주째까지 꾸준히 증가하므로 생약제 첨가 사료를 장기간 동안 먹이면 더욱더 좋은 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다. 대조구의 경우 다른 실험구에 비하여 4주째까지 체중 변화가 급속적으로 증가하지만 그 이후에는 뚜렷한 증가현상이 나타나지 않았다. 이것은 생약제 첨가 사료를 투여한 실험어가 실험 초기에

섭취한 사료에 대한 사료 효율이 대조구에 비해 낮아 일어나는 차이로 생각된다. 생약제 투여가 어느 정도 진행된 6주 이후에 실험어의 크기와 체중이 증가함에 따라 대조구와 실험구의 성장률이 비슷하게 되며, 구기자와 인삼 투여구는 각각 8주, 12주 이후에 뚜렷한 성장 차이를 보이는 것으로 조사되어 생약제의 장기간 투여가 효과적인 것으로 생각된다.

나일틸라피아 혈청의 *E. coli*에 대한 살균 반응을 지표로 보체의 살균능을 조사한 결과 실험 종료시인 12주째에 보체의 살균 능력은 인삼 2%, 구기자 3%, 하수오 3%, 오미자 2%의 순서로 좋게 나타나고 살균 능력이 대조구와 차이가 있는 것으로 조사되었다. 특히, 인삼 2% 투여구는 살균 능력이 뛰어나다고 생각된다.

보체의 용혈 능력은 대조구에 비해 생약제 투여구가 실험 기간 동안 높은 결과를 나타내었다. 대조구는 12.5-19.92CH<sub>50</sub> units/ml이고 생약제 투여구는 20-25CH<sub>50</sub> units/ml로 보체의 용혈능은 모든 생약제 투여구가 대조구에 비하여 뛰어나고 유의적 차이가 있었다(P < 0.05). 특히, 인삼 2% 첨가 실험구가 22.2-25.0CH<sub>50</sub> units/ml로 가장 높은 용혈 능력을 보였다. 이와 같이 사료내 첨가물을 사용하여 보체의 용혈능이 증가되는 경우는 Li and Lovell(1985)의 연구가 있다. 이 연구는 차널 메기의 사료에 비타민 C를 3,000 mg/kg 첨가하여 용혈 능력이 향상되는 것을 확인하였고, Hardie et al.(1990)은 대서양 연어의 사료에 비타민 E를 326 mg 첨가시키면 용혈 능력이 증가되고 비타민 C를 2.75 g/kg 첨가하면 보체 활성이 증가되는 것을 보였다. Obach et al.(1993)은 농어에 비타민 E 300 mg/kg와 fresh oil를 혼합 투여하였을 때 보체 용혈능이 증강된 것을 보고 하였다. 그러나 비타민 C가 결핍(0.05 g/kg 사료)되었을 때는 보체의 활성이 현저히 떨어진다(Hardie et al., 1991)는 보고가 있어 보체의 활성은 어류의 영양 상태에 많은 영향을 받는 것으로 생각된다. 따라서, 본 연

구에 사용한 생약재는 보체의 용혈능을 향상시키는 사료내 첨가물로서의 기능이 충분히 기대된다.

생약재를 투여한 나일틸라피아의 라이소자임의 활성은 시간이 지날수록 증가하며 대조구보다 활성이 높다. 그 중 구기자 3% 투여구는 실험 초기의 활성이 487 units/ml였으나 실험 종료 시에는 822 units/ml로 약 2배 정도 향상되었다. 인삼 1% 투여구는 실험 초기에 445 units/ml에서 871 units/ml로 향상되었다. 이러한 생약재의 반응은 투여 기간 동안 지속적으로 증가하는 것으로 보아 장기적으로 투여하여도 나일틸라피아의 면역 기능 향상 효과가 있을 것으로 생각된다. 면역 기능 증강 효과는 Obach *et al.*(1993)이 농어에 비타민 E 300 mg/kg과 fresh oil을 35주 동안 투여하여 라이소자임 활성의 증강 효과가 나타나는 것을 보고하기도 하였다. 어류의 라이소자임은 여러 종류의 세균성 병원체에 대하여 정균 효과가 있으며(Grinde, 1989; 김, 1992), 그람 양성 구균에서는 세포벽 성분중 peptidoglycan의  $\beta$ -1,4-glycoside 결합을 가수 분해하여 그람 양성 구균을 용해시키는 효소이다. 라이소자임은 호중구와 대식세포에 존재하며 혈액으로 흘러나와 방어 작용을 한다(Murray and Fletcher, 1976). 따라서 생약재를 투여하여 라이소자임의 활성이 증가되면 어류 병원성 세균에 대한 방어능이 증가될 것으로 기대된다. 하등 동물에 속하는 어류는 고등 동물에 비하여 항체의 유전자 수가 적기 때문에 항체가 주축이 되는 면역 반응만으로는 충분한 방어 기작을 유지하기 어렵다(Tonegawa, 1983; Matsunaga, 1985). 따라서 라이소자임이나 보체와 같은 비특이적 방어 기작에 의해 이를 보완하여 주기때문에 어류에 있어서는 매우 중요한 면역 기구라고 생각된다.

생약재 투여구의 신장 부착 식세포의 활성 산소 생성량은 생약재 투여 후, 4주째부터 대조구에 비해 유의성 있는 증가를 보인다. 특히, 구기자 3% 투여구와 인삼 1% 투여구는 8주째까지 지속적으로 증가하여 면역 기능 향상 효과를 보이므로 본 연구에 사용한 생약재는 나일틸라피아의 부착 식세포의 기능을 향상시켜 활성 산소를 많이 생성할 수 있도록 도와준다고 생각된다. 면역 기능 증강 효과는 생약재의 투여가 어느 정도 진행된 6-8주 이후에 현저하게 나타나며, 예비 실험 결과 8주 이후에 생약재의 효과가 지속되므로, 라이소자임과

식세포의 활성은 8주 이후에도 지속될 것으로 추측된다. 이와 같은 면역 증강 물질에 대한 연구는 Mulero *et al.*(1998)이 levamisole을 gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)에 투여한 후 부착 식세포의 활성 산소 생성량이 증가되는 효과를 본 것이 있다. 따라서 본 연구에 사용한 각종 생약재는 활성 산소 생성량을 증가시키는 어류의 면역 증강제로서의 역할이 충분히 기대된다. 신장의 부착 식세포는 혈액, 림프 조직, 복강 등에 분포하여 세균이나 바이러스와 같은 각종 병원체나 노화 세포를 포식하고 소화하는 기능을 갖는 대형의 아메바형 세포이다(Iwama and Nakanishi, 1996). 따라서 세포성 면역을 담당하는 면역 기구 중에서 가장 중요한 기능을 한다고 생각되며, 이러한 부착 식세포의 활성을 증강시키는 것은 어류의 면역 기능을 증강시키는데 매우 중요한 요소인 것으로 생각되므로 생약재는 면역 기능을 증강시키는 사료내 첨가물로서의 이용가치가 기대된다.

본 연구에서 각종 생약재를 투여하여 비특이적 면역 기구의 활성을 조사한 결과, 면역 기능 증강 효과가 조사되었다. 이러한 면역 기능 증강이 어류 병원성 세균에 대한 저항력을 증가시키는지 조사하기 위해 나일틸라피아의 병원성 세균인 *E. tarda*로 공격 실험하였다. 생존율을 조사한 결과 모든 생약재 투여구가 대조구 보다 생존율이 높으며 특히, 구기자 3% 투여구의 상대 생존율이 85%로 가장 좋았다. 사료내 첨가물을 투여한 실험 중에서도 클로렐라 추출물을 방어에 투여하여 생리 기능의 활성과 병원성 세균에 대한 저항력이 증강하는 연구가 있다(Nakagawa *et al.*, 1982, 1983; Nematipour *et al.*, 1987, 1988).

본 연구에서 혈청 성분의 변화를 조사한 결과 생약재 첨가 사료를 먹인 나일틸라피아는 대조구와 비슷한 경향을 보이고 이전의 연구와도 유사하여 생리적 기능 장애를 주지 않았다고 생각된다. 池田 等(1986)의 보고에서 *Tilapia nilotica*의 적혈구 용적 백분율은  $23.1 \pm 1.3\%$ , hemoglobin은  $6.6 \pm 1.3$  g/dl, 총단백은  $2.10 \pm 0.30$  g/dl, glucose 농도는  $239 \pm 103.7$  mg/dl, GOT, GPT는 각각  $89.3 \pm 51.3$  karmen,  $38.2 \pm 17.3$  karmen로 조사되었다. 모든 혈액 성분 지표는 池田 等(1986)의 연구와 유사하고, glucose 농도에 있어서만 30-70 mg/dl로 상당히 낮았다. Glucose는 어류의 스트레스 지표이

므로 그 농도가 낮을수록 좋을 것으로 생각된다. 혈청내 단백질은 세포내 항상성 유지를 하는 역할을 하고 있으므로 그것의 농도에 변화가 있다면 어류의 체내 항상성 유지가 되지 않으므로 생리적으로 나쁜 영향을 주지만 본 실험에서는 그러한 장애는 없는 것으로 생각된다. GOT와 GPT는 간세포 속에 함유되어 있는 효소로서 간세포의 손상이 있으면 혈액 속에 유출되어 증가하는 효소이다. 본 실험에서 이런 치료의 수치의 변화가 없으므로 생약제를 투여하여도 간 기능의 손상이나 혈액 내의 생리 기능에 장애가 없는 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에 사용한 각종 생약제는 비타민이나 glucan과 같은 각종 사료내 첨가물과 같이 어류의 성장과 면역 방어력을 증강시키는 사료내 첨가물로서 충분한 가치를 지니고 있다고 생각되며 경제적으로도 효과적일 것으로 기대된다. 그 중에서도 특히 구기자 3%를 먹인 실험어는 체중 증가량이 가장 높고, 보체의 살균능과 용혈능 및 라이소자임 용균 능력과 부착 식세포의 활성 산소 생성량을 증강시키는 등 각종 면역 기능 향상에 매우 중요한 역할을 한다고 생각된다.

### 감사의 말씀

이 연구는 1996년도 해양수산부에서 시행한 수산특정연구과제의 연구비 지원으로 수행되었으며 감사의 마음을 전합니다. 또한 실험어와 실험장소를 제공해주신 진해내수면연구소 소장님과 직원 여러분들에게 진심으로 감사드립니다.

### 참고문헌

- Grinde, B.: Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial against fish pathogens. *J. Fish Dis.*, 12: 95-104, 1989
- Hardie, L. J., Fletcher, T. C. and C. J. Secombes: The effect of Vitamin E on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 87: 1-13, 1990.
- Hardie, L. J., T. Fletcher and C. J. Secombes: The effect of vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 95: 201-214, 1991.
- Hilton, J. W.: The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish. *Aquaculture*, 79: 223-244, 1989.
- Iwama, G. and T. Nakanishi: The fish immune system. Academic press. pp. 64-65, 1996.
- Kelly, K. and R. Easter: Nutritional factors can influence immune response of swine. *Feedstuffs*, June: 14-17, 1987.
- Li, Y. and R. T. Lovell: Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses. *J. Nutr.*, 115: 123-131, 1985.
- Lorentzen M., A. Maage and K. Julshamn: Effects of dietary selenite or selenomethionine on tissue selenium levels of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 121: 359-367, 1994.
- MacFarlane, H and M. R. C. Path: Malnutrition and immunity. In : N. Catsimpoilas (Editors), *Fish Immunology*. Academic Press, New York, NY., pp. 29-43, 1987.
- Matsuyama H. A. Hirata, M. Nakao and T. Yano: Optimum conditions for the assay of hemolytic complement titer of Porgy (*Pagrus major*) serum. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, 30(2·3): 149-158, 1985.
- Matsunaga, T. : Evolution of antibody repertoire somatic mutation as a late comer. *Dev. Comp. Immunol.*, 9: 585-596, 1985.
- Miles, A. A. and S. S. Misra: The estimate of the bactericidal power of the blood. *J. Hygiene*, 38: 732-749, 1938.
- Mulero, V., M. A. Esteban, J. Munoz and J. Meseguer : Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunol.*, 8: 49-62, 1998.
- Murray, C. K. and T. C. Fletcher: The immunohistochemical localisation of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. *J. Fish Biol.*, 9: 329-334, 1976.
- Nakagawa, H., H. Kumai, M. Nakamura and S. Kasahara: Effect of feeding of chlorella-extract supplement in diet on cultured yellow tail-II. *Aquaculture*, 30(2): 76-83, 1982.
- Nakagawa, H., S. Kasahara, E. Uno, T. Minami and K. Akira: Effect of chlorella-extract supplement on blood properties and body composition of Ayu. *Aquaculture*, 30(4): 192-201, 1983.
- Nakagawa, H. and S. Kasahara: Effect of *Ulva* meal supplement to diet on the lipid metabolism of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53(11): 1887-1893, 1986.
- Nematipour, G., H. Nakagawa, S. Kasahara, K. Nanba, A. Tsujimura and K. Akira: Effect of chlorella-extract and *Ulva* supplement to diet on lipid accumulation of Ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53(9): 1687-1692, 1987.
- Nematipour, G., H. Nakagawa, S. Kasahara and S. Ohya: Effect of dietary lipid level and *chlorella*-

- extract on Ayu. Nippon Suisan Gakkaishi, 54(8): 1395-1400, 1988.
- Obach, A., C. Quentel and F. B. Laurencin: Effects of alpha-tocopherol and dietary oxidized fish oil on the immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax*. Dis. aquat. org., 15: 175-185, 1993.
- Parry, R. M., R. C. Chandau and R. M., Shahani: A rapid and sensitive assay of muramidase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 119: 384-386, 1965.
- Sakai, D. K.: Heat inactivation of complement and immune hemolysis reactions in rainbow trout, masu salmon, coho salmon, goldfish and tilapia. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 47(5): 565-571, 1981.
- Sakai, D. K.: Spontaneous and antibody-dependent hemolysis activities of fish sera and inapplicability of mammalian complements to immune hemolysis reaction of fishes. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 47(8): 979-991, 1981.
- Satoh, K., H. Nakagawa and S. Kasahara: Effect of Ulva meal supplementation on disease resistance of red seabream. Nippon Suisan Gakkaishi, 53(7): 1115-1120, 1987.
- Satoh, S., M. Poe and M. Wilson: Effect of supplemental phytate and / or tricalcium phosphate on weight gain, feed efficiency and zinc content in vertebrate of channel catfish. Aquaculture, 80: 155-161, 1989.
- Secombes C. J., S. Chung and A. H. Jeffries: Superoxide anion production by rainbow trout macrophages detected by the reduction of ferricytochrome C. Dev. Comp. Immunol., 12: 201-206, 1988.
- Tonegawa, S.: Somatic generation of antibody diversity. Nature Lond., 302: 575-581, 1983.
- 池田彌生, 尾崎久雄, 瀬崎啓沈郎: 魚類血液圖鑑, p. 282, 線書房, 1986.
- 김진우, 박수일, 전세규: 양식 넙치로부터의 Lysozyme 정제와 어류 병원성 세균에 대한 정균작용. J. Fish. Pathol., 5(2), 87-92, 1992.
- 목종수, 박옥연, 김영목, 장동석: 용매와 추출조건에 따른 단삼(*Salvia miltorrhiza*) 추출물의 항균력. J. Korean Soc. Food Nutr., 23(6): 1001-1007, 1994.
- 박옥연, 장동석, 조화래: 한약재 추출물의 항균효과 검색. J. Korean Soc. Food Nutr., 21(1): 91-96, 1992.
- 유병화, 박수일, 전세규: 어류 혈청의 보체에 의한 살균 작용. J. Fish. Pathol., 5(1): 9-18, 1992.
- 조문규, 전세규: 산화된 pellet에 의한 나일틸라피아의 ceroid 증과 비타민 E, C의 예방효과. J. Fish. Pathol., 3(2): 69-79, 1990.



## Effect of Dietary Herb Medical Stuff on the Non-specific Immune Response of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*

Mi-Hye Hwang, Soo-Il Park<sup>†</sup> and Yi-Cheoung Kim\*

Department of Aquatic Life Medicine, College of Fisheries Sciences, Pukyong National University

\*Pathology Division, National Fisheries Research & Development Agency

In order to investigate the immune response induced by supplementation of herb medical stuff in diet on the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, experiments were performed with feeding of four different experimental diets supplemented with 2% ginseng, *Panax ginseng*, 3% Kugija, *Lycium chinense*, 3% Hasuo, *Polygonum multiflorum*, 2% Omija, *Schizandra chinensis*, respectively, for 84 days. The non-specific immune responses changed during the feeding period were investigated at 2, 4, 6, 8, 10, 12 weeks in each group. Average body weight of the Nile tilapia with supplemented diets was heavier than control group. The fish fed on diet supplemented with 3% Kugija showed the better growth than the other tested groups. Complement activity such as complete hemolytic activity ( $CH_{50}$ ) and bactericidal activity against *Escherichia coli* tended to be increased by the supplementation of herb medical stuff. The lysozyme activity of serum and adherent phagocyte activity showed higher in the fish fed on diet supplemented with 3% kugija than the other tested groups. In respect to the RPS against experimental *Edwardsiella tarda* infection, all of the group fed on the herb medical stuff in diet appeared higher response compared with control group. From these results, herb medical stuff (*Panax ginseng*, *Lycium chinense*, *Polygonum multiflorum*, *Schizandra chinensis*) might be used as additives of diet for the increasing of non-specific immune response or resistance against bacterial fish diseases.

**Key words:** Non-specific immune response, Nile-tilapia, Complement, Lysozyme, Phagocyte, Herbal medical stuff