한국어병학회지 제 17 권 제 1 호 (2004)
J. Fish Pathol., 17(1) : 29 ~ 38 (2004)

β-1,3/1,6-linked glucan 첨가사료가 넙치의 비특이적 면역반응에 미치는 영향

원경미 · 김수미 · 박수일*†
부경대학교 수산과학연구소, *부경대학교 수산생명의학과

The Effects of β-1,3/1,6-linked Glucan in the Diet on Immune Responses of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus* by Oral Administration

Kyoung-Mi Won, Su-mi Kim and Soo-Il Park*†

Institute of Fisheries Science, Pukyong National University, Busan 612-021, Korea
**Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*

The effects of dietary β-1,3/1,6-linked glucan administration on nonspecific immune responses, hematology and disease resistance against *Edwardsiella tarda* in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* were evaluated. Fish were fed the experimental diets supplemented with 0 %, 0.01 %, 0.05 %, 0.1 %, and 0.5 % of β-glucan to a commercial diet for 7 weeks. The test was performed in two ways such as fed on each β-glucan concentrations daily and every other week alternately. The body weight gain from the fish fed on daily the 0.05 % supplemented diet and fed on alternately the 0.1 % supplemented diet of β-glucan were significantly higher than the control. Both lysozyme activity and intracellular superoxide anion production of kidney phagocytes were higher in the all experimental groups than in the control. But there was no large difference in hematology among each group. The relative percent survival rate (RPS) after an artificial challenge with 4×10^6 cells of *E. tarda* per fish was higher than the control, except for that fed on daily the 0.01 % supplemented diet.

Key words : β-glucan, Olive flounder, Oral administration, NBT, Nonspecific immune

어류 양식장에서 필연적으로 발생하는 질병에 대한 치료 방법으로 과거에는 질병 발생 후 항생제 등으로 치료하는 방법이 일반적이었으나, 항생제의 오 · 남용으로 인한 내성균 증가와 치료 효과 감소 및 환경에 미치는 영향 등으로 인해 항생제 사용은 한계에 이르렀다. 뿐만 아니라, 바이러스성 질병이나 2가지 이상의 질병이 함께 감염되는 복합 감염, 원인 불명의 질병 등 난치성 질병에 의한 피해가 늘어나고 있는 추세이어서 화학요법제에 의존한 사후 치료법의 한계는 더욱 극명해지고 있다. 이러한 과정에서 자연히 치료법보다 예방법으로 눈을 돌리게 되었고, 특정 질병에 대해 높은 효과를 보이는 백신 뿐만 아니라 불특정 질병에 저항할 수 있는 면역증강제에 관한 연구도 폭넓게 추진되고 있다 (Anerson, 1992). 이러한 연구 결과, 구충제로 널리 알려진 levamisole (Kajita *et al.*, 1990), 달걀 유래 산생물인 EF203 (Yoshida *et al.*, 1993), 갈조류 유래의 laminaran (Samuel *et al.*, 1996), 균류인 *Schizophyllum commune* 유래의 schizophyllan (Matsuyama *et al.*, 1992), yeast 유래의 glucan (Brattgjerd *et al.*, 1994) 등이 알려지게 되었다.

이 중에서도 β-glucan의 투여 효과에 관한 연구가 많은데, 특히 yeast, *Saccharomyces cerevisi-*

†Corresponding Author : Soo-Il Park, Tel : 051-620-6141, Fax : 051-620-6141, E-mail : parksi@mail.pknu.ac.kr

*ae*의 세포 내벽에서 분리한 β-1,3/1,6-linked glucan (MacroGard®)을 주사한 Atlantic salmon은 여러 가지 세균성 감염에 대한 저항성이 증가되었으며, 혈청 내의 lysozyme과 보체 매개성 용혈능이 증가하고 (Engstad *et al.*, 1992), 전신 macrophages의 식작용 능력이 증강된다고 보고되었다. 그러나, 이들 연구의 대부분이 담수어류, 특히 연어과 어류에 집중되어 있을 뿐만 아리나, 고급 어종이나 대형 어류에 국한되어 사용되는 주사법으로 투여한 결과이므로, 우리 나라 양식 현장에서 그대로 적용하기에는 곤란한 점이 많다.

따라서, 본 연구에서는 비특이적 면역 기구에 효과적인 자극제로 알려진 yeast 유래의 β-1,3/1,6-linked glucan을 우리 나라 양식 넙치에 경구투여하여 비특이적 면역과 혈청 성분에 미치는 영향을 조사하고, 나아가 양식 넙치에 많은 피해를 입히는 *Edwardsiella tarda* 균을 인위 감염시켜, 항병력의 증강효과를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험어

경남 통영 소재 육상 수조식 양어장에서 분양받은 평균 어체중 60 g의 넙치를 25 ton 용량의 트랙식 수조내에 가로 1 m, 세로 2 m, 깊이 40 ㎝의 실험용 가두리를 띄워 각 가두리 당 35 마리씩 수용하고 2주간 순치시킨 후 실험에 사용하였다. 모든 실험구는 2반복으로 시행하였으며, 매주 각 실험구에서 3마리씩 선택하여 실험에 사용하였다. 공격실험은 실험이 종료된 7주째에 반복구 없이 실시하였다. 실험 기간 동안의 사육 수온은 18~22 ℃ 이였으며, 사육수는 1일 환수량 6회전으로 조절하였다.

실험용 사료 제작 및 투여 방법

실험용 사료는 β-1,3/1,6-linked glucan (glucan)이 25 % 함유된 발효 사료 (*Saccharomyces cerevisiae* 유래, MarcroGard-S)를 0.01 %, 0.05 %, 0.1 %, 0.5 %가 되도록 넙치용 분말 사료에 첨가하여 펠렛으로 제작하였다 (Table 1). 각 실험구는 다시 2개의 구간으로 나누어, 한 실험구는 7주간 연속적으로 투여하고, 다른 실험구는 대조용 사료 (glucan 미첨가 펠렛 대조 사료)와 실험용 사료를 격주 간격으로 투여하였다. 제작한 사료는 일일 투여량을 어체중의 2 %로 조절하여 매일 2회에 나누어 7주 동안 투여하였다.

Table 1. Composition of fermentative food (MarcroGard-S) used for this experiment

Ingredient	Percentage
crude protein	8.0% up
crude fiber	10.0% up
crude ash	30.0% down
water	10.0% down
glucan(β-1,3/1,6-linked glucan)	25.0% up

성장도 조사

실험용 사료와 대조 사료를 7주간 투여한 후 각 시험구별 어체중을 측정하여 각각의 평균치로 나타내었다.

혈액 생화학적 성분 분석

혈액의 생화학적 성분 분석에는 넙치의 미부정맥에서 얻은 전혈 (whole blood)과 혈청을 이용하였다. 전혈을 이용한 조사 항목인 Hematocrit치는 heparin 처리된 capillary tube에 혈액을 채운 후 5,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 측정하였다. 혈청 중의 성분에 대해서는 4가지 항목을 조사하였는데, Total protein은 Biuret법, Glucose는 효소법, Glutamic oxalacetic transaminase (GOT)와 Glutamic pyruvic transaminase (GPT)는 Reitman-Frankel법으로 측정하였으며 모두 시판되는 kit (Asan Pharm Co., Ltd)를 이용하였다.

어류 두신 식세포의 활성 산소 측정

넙치의 두신을 무균적으로 분리하여 2 % fetal calf serum (FCS), 1 % penicillin/streptomycin 및 0.2 % heparin이 함유된 L-15 medium에서 nylon mesh를 통과시켜 세포 현탁액을 준비하였다. 준비된 세포 현탁액을 27 %, 36 %, 45 % 및 54 % 농도의 Percoll에 중층시킨 후, 450 g에서 30분간 원심 분리하여 백혈구를 분리하였다. 분리된 백혈구는 0.1 % tryphan blue로 viability를 확인한 후 2×10^6 cells/mL 농도로 조정하여 96 well tissue culture plate에 분주한 다음, 18 ℃에서 2시간 부착시켜 상징액을 제거한 후 3회 세척하여 식세포를 준비하였다. FCS로 옵소닌화된 zymosan을 nitroblue tetrazolium (NBT) 용액에 현탁시킨 후 식세포가 부착된 well에 100 μL씩 첨가하고 18 ℃에서 30분간 반응시킨 다음 100 % methanol로 세포를 고정시켰다. 각 well에 2M KOH 용액 120 μL와 dimethyl sulphoxide (DMSO) 140 μL를 첨가한 후 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 blank는 2M KOH와 DMSO 혼합액을 사용하였다.

혈청 라이소자임 활성 조사

라이소자임 활성은 Parry *et al.* (1995)의 turbidimetric method를 이용하여 측정하였다. 즉, *Micrococcus lysodeikticus* (0.2 mg/mL) 현탁액 950 μL와 혈청 50 μL를 혼합하여 25 ℃에서 30초 및 4분 30초간 반응시킨 후 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 라이소자임 활성은 units/mL로 나타내었으며, 1 unit는 흡광도 값이 0.001 /min 감소한 값으로 표시하였다.

세균 공격 실험

glucan 첨가 사료 투여가 넙치의 항병력에 미치는 영향을 조사하기 위하여 병원성 세균인 *Edwardsiella tarda* FSW910410 균주로 공격실험을 하였다. 즉, 시험 균주는 TSA 배지에서 27 ℃, 24 시간 배양한 후 집균하여, 멸균 생리 식염수로 4×10^7 cfu/mL이 되도록 조절하여 0.1 mL씩 복강 주사하였다. 공격실험은 각 실험구당 10 마리씩 시행하였으며, 결과는 상대 생존율로 나타내었다.

$$\text{상대 생존율} = (1-\frac{\text{glucan 투여구의 폐사율}}{\text{대조구의 폐사율}})\times100$$

통계학적 분석

대조구와 각 실험구 사이의 통계학적 유의성은 Student's t-test로 비교하여 P값이 0.05 미만일 때 유의성이 있는 것으로 처리하였다.

결 과

성장도 조사

glucan 첨가 사료와 대조 사료를 7주 동안 투여한 후 넙치의 체중 변화를 측정한 결과, glucan 0.05 % 첨가사료를 연속 투여한 실험구 (Fig.

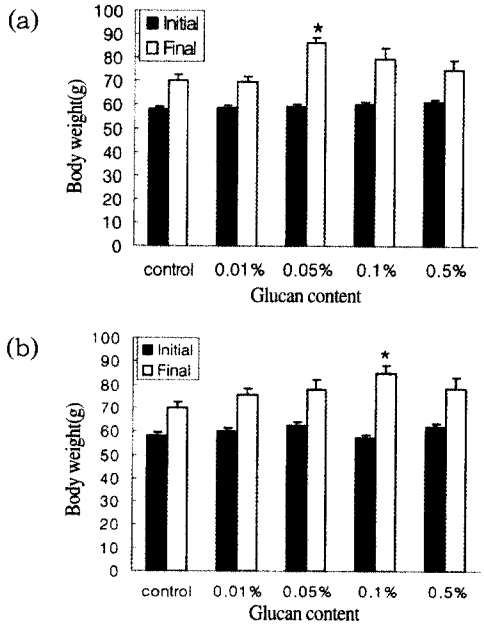

Fig. 1. Comparison of the body weight of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, fed a commercial diet supplemented with various amount of β-1,3/1,6-linked glucan for 7 weeks. (a) fed on daily, (b) fed on every other week.
*, significant difference from control, $p < 0.05$.

1a)와 0.1 % 첨가사료를 격주 간격으로 투여한 실험구 (Fig. 1b)에서 유의적으로 높은 성장도를 보였다.

두신 식세포의 활성 산소 측정

glucan 첨가 사료를 7주간 투여하면서 어류의 비특이적 면역계 중 세포성 면역을 담당하는 식세포의 활성 산소를 측정하였다. 그 결과, 실험 사료를 연속적으로 투여한 실험구 중 glucan 0.05 %와 0.1 % 첨가구가 다른 실험구에 비해 비교적 높은 활성을 유지하였으며, 이 활성은 7주째까지 유지되었다 (Fig. 2a). 격주 간격으로 투여한 실험구에서는 모든 실험구가 대조구보다 높은 활성을 보였으나, 0.05 % 첨가구에서 비교적 높은 활성이 실험 기간 내내 지속되었다 (Fig. 2b).

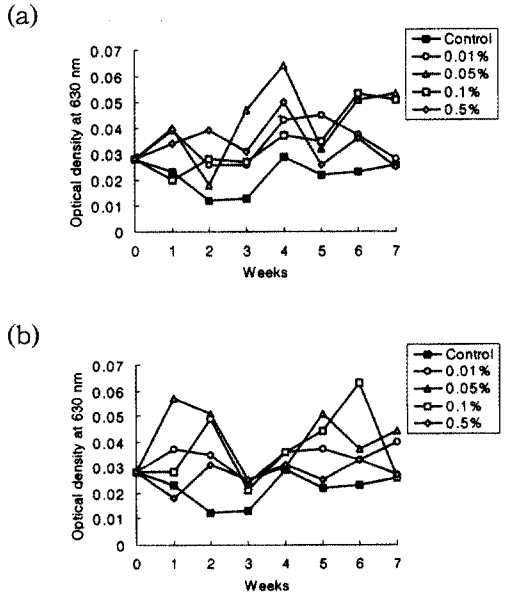

Fig. 2. NBT reduction of phagocytes in the head kidney of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, fed a commercial diet supplemented with various amount of β-1,3/1,6-linked glucan for 7 weeks. (a) fed on daily, (b) fed on every other week.

혈청의 라이소자임 활성 조사

glucan 첨가 사료를 7주간 투여하면서 어류의 비특이적 면역계 중 체액성 면역의 일종인 라이소자임의 활성을 측정하였다. 그 결과, glucan 첨가 사료의 연속 투여구에서는 1주째부터 증가하기 시작한 이후 지속적으로 증가하여 5주째에 최고치를 보인 다음, 7주째에는 대조구와 유사한 수치로 감소하였으며, glucan 첨가 농도간의 유의차는 없었다. 그러나 0.5 % 첨가구의 6주째 결과는 대조구보다 낮은 수치를 보였다 (Fig. 3a). glucan 첨가 사료의 격주 투여구에서는 실험 기간 내내 대조구보다 높은 활성을 유지했으며, 최고치는 3주째에 나타났고 glucan 0.05 %와 0.1 % 첨가구에서 비교적 높은 수치를 보였다. 단, 0.5 % 첨가구의 5주째 결과는 대조구보다 낮은 수치를 보였다 (Fig. 3b).

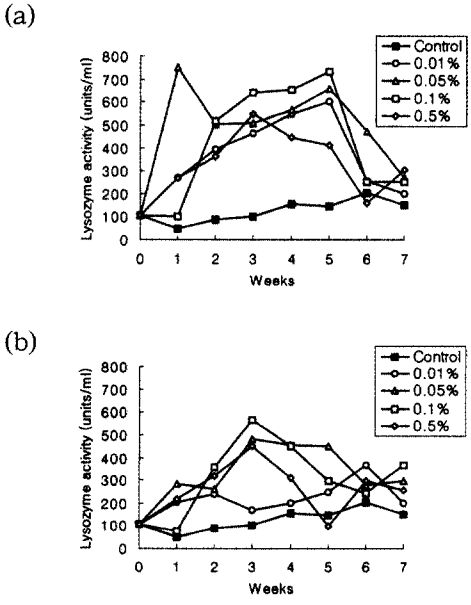

Fig. 3. Lysozyme activity in the serum from the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, fed a commercial diet supplemented with various amount of β-1,3/1,6-linked glucan for 7 weeks. (a) fed on daily, (b) fed on every other week.

혈액의 생화학적 성분 분석

glucan 첨가 사료를 7주 동안 투여하면서 혈액 성분 (GOT, GPT, Glucose, Total protein, Hematocrits) 분석을 한 결과는 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Hematolobical changes of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, fed a commercial diet supplemented with various amount of β-1,3/1,6-linked glucan for 7 weeks

			TP(g/dL)	GLU(mg/dL)	GOT(U/L)	GPT(U/L)	Ht(%)
0 W			4.4	65±7	10±4	10±2	33±1.2
1W	control		7.2±0.41	65±9	24±8	15±3	30±2.2
	D	0.01%	7.9±0.50	70±5	15±5	13±1	30±0.9
	D	0.05%	6.6±0.20	68±2	15±1	14±4	30±1.2
	D	0.1%	3.8±0.96*	67±9	13±1	12±1	28±2.0
	D	0.5%	4.0±1.52*	63±9	15±3	10±2	30±0.4
	A	0.01%	6.3±0.44	65±3	20±5	14±3	29±0.9
	A	0.05%	9.1±0.37*	63±3	15±3	15±5	35±2.5
	A	0.1%	9.2±0.24*	65±7	15±2	16±4	33±0.2
	A	0.5%	5.7±0.91	65±5	20±6	15±5	32±0.8
3W	control		9.2±0.52	54±5	33±2	11±1	32±1.9
	D	0.01%	9.2±0.78	57±1	24±6	20±3*	28±2.2
	D	0.05%	8.6±0.56	65±6	45±4*	23±1*	31±0.8
	D	0.1%	9.2±0.61	65±8	38±5	33±9*	32±0.5
	D	0.5%	8.5±0.38	63±7	40±10	28±2*	32±1.1
	A	0.01%	9.3±0.42	56±2	28±4	20±2*	29±1.8
	A	0.05%	10.1±0.75	59±7	36±2	19±1*	33±0.5
	A	0.1%	9.0±0.22	68±8	33±1	18±4*	33±1.3
	A	0.5%	10.2±0.43	56±8	30±3	20±7*	29±2.4
5W	control		7.2±1.76	68±4	11±4	5±1	27±2.5
	D	0.01%	4.8±0.95	63±7	8±1	8±2	32±2.2
	D	0.05%	4.5±1.18	63±3	10±6	9±4	33±2.9
	D	0.1%	4.0±1.12	63±4	19±3	9±3	32±3.0
	D	0.5%	3.9±1.05	66±7	9±1	9±4	32±2.5
	A	0.01%	5.0±0.64	68±1	14±5	5±1	28±1.7
	A	0.05%	4.7±1.15	61±8	12±1	6±1	29±1.2
	A	0.1%	6.0±0.25	62±11	12±4	8±2	30±0.4
	A	0.5%	7.2±0.29	65±7	11±3	10±4	30±1.9
7W	control		4.0±0.52	63±7	15±2	8±1	33±2.2
	D	0.01%	3.8±0.27	64±2	5±1*	10±1	35±0.6
	D	0.05%	5.0±0.67	64±3	5±1*	8±2	28±2.3
	D	0.1%	4.7±0.54	75±11	5±2*	8±1	32±1.2
	D	0.5%	5.7±0.94	75±13	13±2	9±1	30±0.9
	A	0.01%	4.2±0.08	67±5	16±2	13±3	28±2.5
	A	0.05%	4.4±0.19	60±5	16±1	8±3	27±3.1
	A	0.1%	4.6±0.18	54±9	14±5	8±1	30±1.6
	A	0.5%	5.1±0.49	75±11	11±3	9±1	33±1.1

D, fed on daily; A, fed on every other week.

*, significant difference from control, $p < 0.05$.

세균 공격 실험

glucan 첨가사료를 7주간 투여한 다음 병원성 세균에 대한 항병력을 조사하기 위하여 *E. tarda*를 복강 주사한 후 상대 생존율을 조사하였다. glucan 0.01 % 첨가구는 방어력의 증가 현상을 보이지 않았다. 실험 사료의 연속 투여구는 glucan 0.5 % 첨가구의 상대 생존율이 50 %로 가장 높았고, 0.01 % 첨가구에서는 2일째에 100 % 폐사하여 방어 효과를 보이지 않았다. 격주 투여구는 glucan의 0.01 % 첨가구에서 50 %의 상대 생존율을 보여 가장 높은 방어효과를 보인 반면, 나머지 실험구에서는 초기 폐사가 일어나는 기간이 현저하게 지연되는 효과를 나타내었으나, 실험 종료 시점에서의 최종 생존율에는 큰 차이가 없었다.

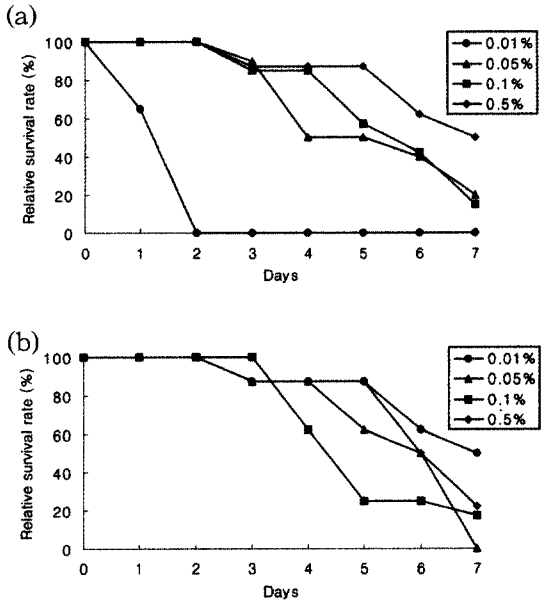

Fig. 4. Relative percent survival (RPS) of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, challenged intraperitoneally with *E. tarda* (4×10^6 cells/fish) for 7 weeks after administration of β-1,3/1,6-linked glucan supplemented diet. (a) fed on daily, (b) fed on every other week.

고 찰

β-glucan은 효모, 사상균, 버섯 등의 세포벽에 있는 점액성의 주요 구조 다당체로서, 이들 진균성 β-glucan의 면역 자극 효과는 쥐에서 항암 효과를 보인 이후 (Di Luzio, 1983), 세균성, 진균성, 바이러스성 및 원충성에 의한 병원체 감염에 대한 포유류의 저항성을 증가시킨다는 보고로 주목받기 시작하였다 (Williams *et al.*, 1983). 특히, *Lentinus edodes* 유래의 lentinan, *Schizophyllum commune*의 schizophyllan, *Sclerotium glucanicum*의 scleroglucan, 그리고 *Saccharomyces cerevisiae* 유래의 yeast glucan 등은 포유류에서 그 효과가 잘 입증되고 있으며, 최근에는 어류에서도 비특이적 면역능 증가와 항병력 증가에 있어 동일하게 작용한다고 보고되고 있다 (Robertsen *et al.*, 1994; Figueras *et al.*, 1997). 이 중 포유류 뿐 아니라, 연어과 어류에서도 활발히 연구되고 있는 yeast glucan은 생물학적 활성에서 중요한 역할을 하는 glycosidic linkage의 위치가 분리 과정에 따라 달라지므로, glucan의 구조를 분명히 한 다음 실험에 사용할 필요가 있다. 본 연구에 사용된 β-glucan은 약 83 %의 β-1,3-linked glucosyl residues, 5 %의 β-1,3,6-linked branch points, 6 %의 β-1,6-linkages, 그리고 5 %의 non-reducing 말단기를 가진 분자로 이루어져 있다.

본 연구에서 yeast 유래의 β-1,3/1,6-linked glucan을 첨가하여 제작한 사료를 7주 동안 경구 투여한 실험구의 성장은 대조구에 비해 전반적으로 높거나 유사하게 나타났다. 그 중 glucan 0.05 % 첨가 사료를 연속 투여한 실험구와 0.1 % 첨가 사료를 격주 투여한 실험구에서의 성장이 가장 좋은 것으로 나타났다. Sung *et al.* (1994)은 보리새우를 4가지의 농도가 다른 glucan액에 3일간 침지하여, 40일간 관찰한 결과 0.5, 1, 5 mg/mL의 실험구에서는 대조구에 비하여 빠른 성장을 나타내었으나, 낮은 농도인 0.25 mg/mL의 실험구에서는 대조구와 유의차가 없었다고 보고하였다. 이들의 실험 내용과 본 실험은 양식 대상 생물이 서로 다르기 때문에 직접적인 비교는 불가능하지만 적정 농도의 glucan 경구 투여가 넙치의 성장에도 도움이 되는

것으로 생각된다.

β-1,3/1,6-linked glucan 첨가 사료의 투여가 넙치의 비특이적 면역 기능에 미치는 효과를 조사한 결과, 세포성 면역의 지표인 식세포의 O_2^- 생성능과 액성 면역의 지표인 lysozyme 활성능 모두 향상되는 것으로 나타났다. 먼저, 두신 식세포의 살균 작용의 지표로 널리 이용되고 있는 O_2^- 생성능의 변화에 관하여 조사한 결과, 모든 β-glucan 첨가 사료 투여구에서 높은 식세포 활성을 보이는 것으로 나타났다. 이와 유사한 결과로, Jørgensen *et al.* (1993)은 무지개송어에 glucan을 주사하여, 2주째에 NBT 환원량이 증가하였다가 3주 째에 다시 대조구 수준으로 감소한다고 보고하였고, Samuel *et al.* (1996)은 blue gourami에 주사하여 4일 째와 10일 째에 유의하게 높은 NBT 환원능을 나타내었다는 연구가 있다. 또한 Baulny *et al.* (1996)은 yeast glucan을 35일간 경구 투여한 turbot에서도 1일 째와 14일 째에 NBT 환원능이 유의하게 향상된다고 하였다. 비특이적 체액성 면역의 지표로써 lysozyme 활성을 조사한 결과, 활성 정도의 차이는 있었으나 모든 실험구에서 대조구보다 높은 수치를 보였다. 이는 Santarem *et al.* (1997)이 β-1,3 glucan을 주사한 turbot (*Scophthalmus maximus*)에서 처리 7일 후부터 21일 까지 지속적으로 높은 수치를 보인 것과 일치한다. 더욱이 경구 투여법으로 glucan을 투여한 연구에서도 동일한 결과를 보였는데, Jeney *et al.* (1997)은 무지개송어에 glucan을 4주간 경구 투여한 후 수송 스트레스를 주었을 때, 스트레스 전과 후 모두 대조구보다 높은 lysozyme 활성을 보였다고 하였으며, 박 등 (2001)은 잉어와 넙치에 *Schizophillum commune* 유래의 β-glucan을 5주간 투여한 결과, 증가된 lysozyme 활성을 관찰하였다고 보고하였다. 또한, 본 연구에서 lysozyme 활성이 최대 7 배 이상 증가되어 일반적인 상승폭보다 매우 높았지만, Jeney and Jeney (2002)가 고농도의 Vitamin C (1000 mg/kg)를 철갑상어 hybrid에 20주 동안 경구투여한 결과에서도 약 9배 높은 lysozyme 활성을 보고하였으므로, 적정한 면역 증강제에 의해 높은 수치의 lysozyme 활성을 유도할 수 있는 것으로 생각된다. 이상에서, glucan 첨가 사료 투여구에서 lysozyme의 활성이 높게 나타난 것은 lysozyme을 분비하는 식세포의 수가 증가하였거나, 이들 각 세포에 의해 합성되는 lysozyme의 양이 증가한 결과로 추측할 수 있다. 본 연구에서는 이 두 가지 기작 중에서 어느 것에 의한 것인지 혹은 이 둘의 상호 작용에 의한 것인지는 밝히지 못하였으나, Robertsen *et al.* (1994)에 의하면 lysozyme의 활성도는 식작용 및 전신 백혈구의 살균 작용과 상응하게 일어난다고 보고하였고, 이는 본 연구의 증강된 전신 식세포의 O_2^- 생성능과 일치하는 결과이다.

glucan 첨가 사료 투여가 넙치의 생리 상태에 미치는 영향을 조사하기 위해, hematocrit (Ht), 혈청내 total protein, glucose, GOT, GPT의 변화를 생리적 지표로 하여 조사하였다. 그 결과, 1주째의 total protein에서 유의한 증감이, 3주째의 GPT에서 유의한 증가가, 7주째의 GOT에서 유의한 감소를 보인 것을 제외하고는 대조구와 유사한 경향을 보였다. 이 중 3주째의 GPT 증가는 β-glucan이 넙치의 간에 무리를 주었을 가능성이 있으나, 지속적인 현상이 아닌 1회성으로 그쳤고, 심 (1993)이 정상 넙치의 수치로 보고한 24±3 unit보다 낮았으므로 넙치의 생리적인 기능에 큰 영향을 미치지는 않았을 것으로 생각한다. 그러나 대조구에 비해 명확한 유의차를 보였으므로, 이에 대한 조사가 더 이루어져야 할 것으로 생각된다.

각종 glucan을 주사법으로 투여한 후 방어력이 증가되었다는 연구는 잉어, 방어, 메기 등의 어종에서 실행되었으나 (Matsuyama *et al.*, 1992; Yano *et al.*, 1989; 박 등, 1996), 경구 투여에 의한 효과에 대해서는 아직 불확실하다. Baulny *et al.* (1996)은 yeast glucan을 경구 투여한 turbot이 *Vibrio anguillarum*에 대한 방어력 증강 효과를 보이지 않았다고 하였고, 박 등 (2001)은 잉어와 넙치에 *Schizophillum commune* 유래의 β-glucan

을 5주간 투여한 후, *Aeromonas hydrophila*와 *Edwardsiella tarda* 균을 농도별로 인위 감염시킨 결과, 일부 농도에서만 유의한 방어력을 보였다고 하였다. 그러나, 본 실험에서는 β-1,3/1,6-linked glucan을 7주간 경구 투여한 넙치를 대상으로 *E. tarda*에 대한 방어력을 조사한 결과, 0.01 % 연속 투여구를 제외한 모든 실험구에서 증강된 방어력을 보여, 이들의 결과와 상반되게 나타났다. 이는 어종, 연령, 환경, 투여기간 등에 따른 차이일 것으로 추측하고 있어, 본 연구에 사용된 β-1,3/1,6-linked glucan을 다른 연령이나 환경의 넙치에 투여하여 동일한 결과가 도출되는지를 측정할 필요가 있을 것으로 생각된다. 또한, 박 등 (1997)은 β-glucan을 투여한 조피볼락 (*Sebastes schlegeli*)이 *Staphylococcus epidermidis* 및 *Vibrio ordalii*에는 방어 효과가 있었으나, *E. tarda*에는 전혀 효과가 없다고 하여, 다른 병원체에 대해서도 방어 효과가 있는지에 대해서는 추가 조사가 필요할 것으로 보인다.

이상의 결과, 양식 넙치에 대한 β-1,3/1,6-linked glucan 첨가 사료의 경구 투여는 양식 넙치의 성장에 긍정적인 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 비특이적 면역 반응을 자극하여, *E. tarda*에 대한 높은 방어력을 보이는 것으로 나타났다. 따라서 β-glucan을 양식 넙치의 사료 내에 첨가하면 면역증강물질로서 기능한다는 사실을 입증하였다. 그러나, 어체중을 유의하게 증가시키는 glucan의 농도와 *E. tarda*에 대한 방어력을 증가시키는 농도가 일치하지 않아, 현장에서 실제로 사용하기 위한 추천 농도를 확정하기 위해서는 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

glucan 첨가 사료 투여가 넙치에 미치는 영향을 조사하기 위하여 넙치에 glucan 0 %, 0.01 %, 0.1 %, 0.5 % 첨가 사료를 연속 투여구와 격주 투여구로 나누어 공급하면서, 성장, 혈액 성분, 비특이적 면역능을 분석하였으며, 나아가 어병 세균인 *Edwardsiella tarda* 균의 공격 실험에 대한 방어능을 조사하였다.

glucan 첨가 사료 투여는 넙치의 성장에 긍정적인 효과를 보였는데, 특히 0.05 % 연속 투여구와 0.1 % 격주 투여구에서 대조구보다 유의하게 높은 성장을 나타내었다. glucan 첨가사료의 투여가 넙치의 비특이적 면역 반응에 미치는 영향을 조사하기 위해 혈청 lysozyme과 전신 식세포의 활성 산소를 측정한 결과, 거의 모든 실험구에서 실험 기간 내내 대조구보다 높은 활성을 보였다. glucan 첨가 사료의 투여가 넙치의 생리에 영향을 미치는 지를 조사하기 위하여, total protein, glucose, GOT, GPT, Ht를 측정한 결과, 3주째 GPT 수치가 다소 높은 것을 제외하고는 그다지 큰 변화를 보이지 않았다. 마지막으로 *Edwardsiella tarda* (4×10^6 cells/fish) 균을 공격 실험한 결과, 0.01 % 연속 투여구를 제외한 모든 실험구에서 높은 방어력을 보였다.

참 고 문 헌

Anerson, D. P. : Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish : applications to aquaculture. Annu. Rev. Fish Dis., 2 : 281-307, 1992.

Baulny, M. O., Quentel, C., Fournier, V., Lamour, F. and Gouvello, R. : Effect of long-term oral administration of β-glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. Dis. Aquat. Org., 26 : 139-147, 1996.

Brattgjerd, S., Evensen, O. and Lauve, A. : Effect of injected yeast glucan on the activity of macrophages in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., as evaluated by in vitro hydrogen peroxide production and phagocytic capacity. Immunol., 83 : 288-294, 1994.

Engstad, R.E., Robertson, B. and Frivold, E. : Yeast

glucan induces increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish Shellfish Immunol., 2 : 287-297, 1992.

Di Luzio, N. R. : Immunopharmacology of glucan : a broad spectrum enhancer of host defence mechanisms. Trends Pharmacol. Sci., 4 : 344-347, 1983.

Figueras A., Santarem, M.M. and Novoa, B. : In vitro immunostimulation of turbot (*Scophthalmus maximus*) leucocytes with β-glucan and/or *Photobacterium damsela* bacterin. Fish Pathol., 32(3) : 153-157, 1997.

Jeney, G., Galeotti, M., Volpatti, D., Jeney, Z. and Anderson, D.P. : Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. Aquaculture, 154 : 1-15, 1997.

Jeney G. and Jeney Zs. : Application of immunostimulants for modulation of the non-specific defense mechanisms in sturgeon hybrid: *Acipenser ruthenus*×*A. baerii*. J. Appl. Ichthyol., 18 : 416-419, 2002.

Jørgensen, J. B., Sharp, G.J.E., Secombes, C.J. and Robertsen, B. : Effect of a yeast-cell wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. Fish Shellfish Immunol., 3 : 267-277, 1993.

Kajita, Y., Sakai, M., Atuta, S. and Kobayashi, M. : The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish Pathol., 25 : 93-98, 1990.

Matsuyama, H., Magindaan, R.E.P. and Yano, T. : Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). Aquaculture, 101 : 197-203, 1992.

Parry, R. M., Chandau, R.C. and Shahani, R.M. : A rapid and sensitive assay of muramidase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 119 : 384-386, 1965.

Robertsen, B., Engstad, R.E. and Jørgensen, J.B. : β-glucans as immunostimulants. In Modulators of Fish Immune Responses, Stolen, S. J. and T. C. Fletcher, SOS Publications, Fair Haven, vol. 1, pp. 83-99, 1994.

Samuel, M., Lam, T.J. and Sin, Y.M. : Effect of laminaran [β(1,3)-D-Glucan] on the protective immunity of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* against *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immunol., 6 : 443-454, 1996.

Santarem, M., Novoa, B. and Figueras, A. : Effects of β-glucans on the non-specific immune responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Fish Shellfish Immunol., 7 : 429-437, 1997.

Sung, H.H., Kou, G.H. and Song, Y.L. : Vibriosis resistance induced by glucan treatment in Tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish Pathol., 29(1) : 11-17, 1994.

Williams, D.L., Browder, I.W. and Luzio, N.R. : Immunotherapeutic modification of *Escherichia coli*-induced experimental peritonitis and bacteremia by glucan. Surgery, 93 : 448-454, 1983.

Yano, T., Mangindaan, R.E.P. and Matsuyama, H. : Enhancement of the resistance of *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by some bata 1-3 glucan. Nippon Suisan Gakkaishi, 55 : 1815-1819, 1989.

Yoshida, T., Sakai, M., Kitao, T., Khlil, S.M., Araki, S., Saitoh, R., Ineno, T. and Inglis, V. : Immunomodulatory effects of the fermented products of chicken egg, EF203, on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 109 : 207-214, 1993.

박성우, 곽중기, 구재근, 조만기 : 경구투여 β-glu-

can이 잉어와 넙치의 비특이적 면역활성에 미치는 영향. J. Kor. Fish Soc., 34(4) : 412-418, 2001.

박성우, 김영길, 최동림 : β-glucan의 투여에 의한 조피볼락 (*Sebastes schlegeli*)의 세균성 질병에 대한 저항성 향상. J. Fish Pathol., 10(2) : 143-152, 1997.

박성우, 김영길, 최동림 : 글루칸 투여에 의한 한국산 메기 (*Silurus asotus*)의 *Edwardsiella ictaluri*와 *Aeromonas hydrophila* 감염증에 대한 저항성의 증가. J. Fish Pathol., 9(1) : 79-85, 1996.

심두생, 정승희, 박형숙, 전세규 : *Staphylococcus epidermidis*로 인위감염시킨 양식 넙치의 혈액 지수 변동. J. Fish Pathol., 6(2) : 123-131, 1993.

Manuscript Received : December 19, 2003
Revision Accepted : March 17, 2004
Responsible Editorial Member : Sang-Hun Choi (Kunsan Univ.)