

## 두메꿀풀 (*Prunella vulgaris*) 열수추출액과 미생물 (*Lactobacillus rhamnosus*) 배양액의 사료 내 첨가가 넙치 치어의 성장과 면역반응에 미치는 영향

김성삼 · German Bueno GALAZ · 허문수 · 김기영 · 최광식 · 이기완 · 여인규 · 이경준\*  
제주대학교 해양과학대학 해양과학부

### Effects of Dietary Selfheal (*Prunella vulgaris*) Water Extracts and Its Culture Fluid with *Lactobacillus rhamnosus* on Growth and Immune Responses of Juvenile Olive Flounder

Sung-Sam KIM, German Bueno GALAZ, Moon-Soo HEO, Gi-Young KIM,  
Kwang-Sik CHOI, Ki-Wan LEE, In-Kyu YEO and Kyeong-Jun LEE\*  
Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

This study investigated the effects of dietary supplementation with hot water extracts (HE) of selfheal (*Prunella vulgaris*) and *Lactobacillus rhamnosus* culture fluid (LF) on the growth and non-specific immune responses of juvenile olive flounder. A total of 270 fish (5.07±0.01 g, average weight±SD) were divided randomly into nine groups, and three groups were fed one of three isonitrogenous (51% crude protein) and isocaloric (17.6 MJ/kg) diets. The diets contained no supplement, 50 mL hot water extract, or 50 mL *L. rhamnosus* fluid (designated as diets CON, HE and LF, respectively). During the 8-week feeding trial, the growth, feed utilization and survival of the fish were not significantly affected by the experimental diets. There were no significant differences in the hematocrit and hemoglobin of fish fed each of the experimental diets. However, the serum alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase activity were lower with the dietary supplements containing HE and LF. The alanine aminotransferase activity of fish fed the HE diet was significantly lower than that of fish fed the control diet. The hematocrit, hemoglobin, and nitroblue tetrazolium (NBT) activity were higher 3 hr after feeding than 24 hr afterwards. The NBT activity of fish fed the HE and LF diets were significantly higher than that of fish fed the control diet 3 hr after feeding. The findings suggest that dietary supplementation with HE and LF could enhance the nonspecific immune responses of juvenile olive flounder.

Key words: Olive flounder, *Prunella vulgaris*, *Lactobacillus rhamnosus*, NBT activity

#### 서 론

우리나라에서 가장 많이 양식되고 있는 해산어종의 하나인 넙치는 고밀도 양식으로 인한 여러 질병의 발생으로 경제적 손실을 비롯한 많은 어려움을 겪고 있다. 이러한 여러 질병 치료대책으로 대부분의 양식장에서는 oxytetracycline과 같은 합성항생제를 무분별하게 사용하고 있다. 합성항생제의 무분별한 사용은 어류에 대한 약제 내성을 증가시켜 (McPhearson et al., 1991), 어류의 면역력을 저하시킨다 (Heo et al., 1992; Pickering, 1992). 최근에는 여러 국가에서 항생제 사용을 금하고 그 사용량과 식품에서의 잔류 허용량 규제가 더욱 엄격해지고 있으며, 국제식품규격위원회 (CODEX) 등에서 최대잔류 허용기준 (MRL, maximum residue level)을 설정하여 규제하고

있다. 따라서 항생제 대체방안으로 부작용이 없는 천연물질 또는 미생물첨가제의 개발로 양식 어류의 건강증진과 성장을 촉진시키기 위한 양식 산업의 기능적 브랜드화가 시도되고 있는 실정이다. 이와 관련하여 최근 양어사료에 키틴 (Sakai et al., 1992), 키토산 (Gopalakannan and Arul, 2006), 대두단백질 (Rumsey et al., 1994), 톳 (Pham et al., 2006), 스피룰리나 (Kim et al., 2006; Watanuki et al., 2006) 및 β-1,3 글루칸 (Kim et al., 2006) 등을 이용한 연구결과들이 보고되었다.

자생식물에서 다양한 생리활성 효능이 밝혀지면서 식품, 의약품, 화장품, 축산업 및 양식업 등 관련 분야에서 자생식물에 대한 관심이 높아졌고 이에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다. Yu et al. (2003)은 총 224종의 국내 자생식물을 이용하여 동맥경화의 위험인자인 lipoprotein-associated phospholipase A2의 저해활성에 대한 연구를 하였고, Moon

\*Corresponding author: kjlee@cheju.ac.kr

et al. (2003)은 195종의 자생식물로부터 새로운 항염증 작용을 나타내는 자생식물을 발굴하기도 하였다. 이러한 자생식물은 동맥경화 발병의 초기 단계인 fatty streak의 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었고 (Kwon et al., 2002), 총 534종의 자생식물에서 메타놀 추출물을 사용하여 세포분산 활성을 갖는 물질을 조사하여 3종의 활성추출물들이 발굴되기도 하였다 (Cho et al., 2004). 이외에도 살초활성물질 함유 자생식물의 탐색에 관한 연구 (Kim et al., 2006), 항산화 및 항균활성에 관한 연구 (Yang et al., 1995; Min et al., 2004), 살균활성에 관한 연구 (Kim and Kim, 2005) 및 발아억제 활성 탐색연구 (Son et al., 2005) 등이 보고되었다.

이 실험에 사용된 자생식물 두메꿀꿀 (*Prunella vulgaris*) 추출액은 *in vitro*에서 어류 질병미생물에 대한 항균활성과 항산화 효과를 보였고, hydroxyl radical 소거활성도 BHA (Butylated hydroxyanisole) 및 BHT (Butylated hydroxytoluene)와 비교하여 높거나 유사한 것으로 나타났다 (Moon et al., 2006).

Probiotic (생균제)은 일반적으로 숙주에 정착하여 유해 세균을 억제하고, 산을 생성하며, 병원체의 생장에 항균적 작용을 하는 과산화수소나 박테리옉신을 생산하는 능력을 가지고 있으며, 위장질환의 예방 (Tannock et al., 1988), 항 돌연변이 및 항암활성 (Fuller and Gibson, 1997) 그리고 면역증강 (Kimura et al., 1997) 등의 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 이 실험에서 사용된 *Lactobacillus rhamnosus*는 amylase와 xylanase에 대한 비활성이 비교적 높고 내산성, 내담즙산성 및 열 안정성이 우수하며 높은 항균활성을 함유하고 있다고 보고되었다 (You et al., 2005). 그러나 자생식물의 열수추출액과 미생물배양액이 어류의 면역증강과 어병 세균에 대한 저항성을 높일 수 있을 것이라는 가설에 대한 *in vivo* 실험은 행해진 바가 없다.

따라서 이번 연구는 제주도에 자생하는 두메꿀꿀의 열수추출물과 그 열수추출물을 첨가하여 배양된 미생물 (*L. rhamnosus*) 배양액을 사료 내에 첨가하여 넙치 치어에 공급하였을 때의 성장효과, 생존율 및 비 특이적 면역반응을 조사하고자 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 미생물 및 자생식물 채집

본 연구에 사용된 미생물은 한국중균협회 (KCCM, Korean Culture Center of Microorganism)에서 *L. rhamnosus* (KCCM 32826)를 분양받아 MRS agar (Difco, USA)에서 stab culture하여 4°C에 보관하면서 계대배양 하였다.

자생식물 두메꿀꿀은 제주도 서부지역과 동부지역의 목초지 및 농지 주변 길가에서 흔히 자라는 식물로 2005년 8월부터 10월에 채집하였으며, 한국식물도감 (Lee, 2002)과 한국의 자원식물 I (Kim, 1996)을 참고하여 식물을 분류하였다.

### 사료 추출방법 및 미생물 배양

채집된 두메꿀꿀은 물을 이용하여 흙과 같은 이물질을 제거

한 후 바람이 잘 통하는 음지에서 3일 이상 건조하여 수분을 제거 하였다. 건조 후 꽃술 부위만 자른 다음 분쇄기를 이용하여 미세하게 분쇄한 후 실험에 사용하였다. 증류수 400 mL 당 40 g의 식물시료를 혼합하여 100°C 수욕상에서 약 30분간 증탕한 다음 Whatman No. 2 여과지를 사용하여 1차 여과과정을 거친 후 0.45 µm 주사기용 멸균 필터를 사용하여 무균적으로 식물 열수추출액을 조제 하였다. 조제된 시료는 4°C에 냉장 보관하여 실험사료 제작 시에 첨가되었다.

미생물 *L. rhamnosus*는 MRS broth (Difco, USA)에 3.0×10<sup>8</sup> CFU/mL 농도로 접종하여 37°C에서 48시간 정치배양 되었다. 배양하는 동안 12시간마다 UV/VIS spectrophotometer (Hanson OPRON-3000, Korea)를 사용하여 660 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여 생육을 조사하였고, 그 후 다시 MRS broth에 *L. rhamnosus*를 5% 접종한 후 자생식물 열수추출액을 5% 첨가하여 37°C에서 48시간 배양한 후 실험사료 제작 시에 첨가되었다.

### 실험사료

총 3개의 실험사료는 51%의 조단백질과 17.6 MJ/kg의 에너지함량을 갖도록 동일하게 조성되었다 (Table 1). 실험사료의 단백질원으로 어분, 대두박 및 콘글루텐밀을 사용하였으며, 탄수화물원으로는 밀가루, 지질원으로는 오징어간어유를 사용하였다. 3개의 실험사료는 기초사료를 이용한 대조구 (CON), 기초사료에 50 mL의 열수추출액을 첨가한 HE 사료 및 50 mL의 미생물 (*L. rhamnosus*) 배양액을 첨가한 LF 사료로 열수추출액과 미생물배양액을 액상형태로 첨가하여 제작되었다. 실험사료 제조는 우선 모든 사료원들을 파쇄기를 이용하여 분말형태로 일정하게 만들고, 각 사료원들을 사료조성표에 따라 정확히 무게를 잰 후, 잘 섞은 다음 사료원 총량의 30-40%에 해당하는 증류수를 첨가하여 사료혼합기 (NVM-14-2P, KOREA)로 혼합, 반죽시켰다. 혼합반죽물은 소형초파기 (SMC-12, KOREA)를 이용하여 직경 3 mm 크기로 성형되었다. 성형된 실험사료는 -70°C 동결냉동 건조기에서 건조시켜, 시브 (Sieve)를 이용하여 적당한 크기의 사료로 가공되었으며, 사료 공급 전까지 -20°C 냉동고에 보관되었다.

### 실험어 및 사육관리

본 실험에 사용된 실험어류는 제주도에 창해수산에서 종묘 생산된 넙치 치어로 제주대학교 소속 해양과환경연구소로 운송되어, 4주 동안 시판 배합사료를 공급하면서 실험환경에 적응할 수 있도록 순치시킨 후 사료공급실험에 사용되었다.

예비사육 후 넙치치어 (초기 평균무게: 5.07±0.01 g)는 총 9개의 100 L 원형수조에 각 수조 당 30 마리씩 무작위로 선택되어 배치되었다. 사료공급실험은 사료실험구당 3 반복구를 두었으며, 사육수는 여과해수를 사용하여 2-3 L/min 의 유수량이 공급되도록 조절되었고, 모든 실험수조에 용존산소 유지와 원활한 사육수 순환을 위하여 에어스톤을 설치하였다. 광주기는 자동타이머가 설치된 형광등을 이용하여 12L:12D 조

Table 1. Composition and proximate analysis of the basal diet (% of dry matter basis)

| Ingredients                              | %    |
|--|------|
| White fish meal <sup>1</sup>             | 54.0 |
| Soybean meal <sup>1</sup>                | 6.0  |
| Corn gluten meal <sup>1</sup>            | 6.0  |
| Wheat flour                              | 22.0 |
| Vitamin mixture <sup>2</sup>             | 0.5  |
| Mineral mixture <sup>3</sup>             | 0.5  |
| Squid liver oil <sup>4</sup>             | 10.0 |
| Carboxymethyl cellulose <sup>5</sup>     | 1.0  |
| Proximate composition                    |      |
| Dry matter (%)                           | 5.6  |
| Crude protein (% DM)                     | 50.6 |
| Crude lipid (% DM)                       | 15.3 |
| Crude ash (% DM)                         | 9.3  |
| Estimated energy (MJ/kg DM) <sup>6</sup> | 17.6 |

<sup>1</sup>Provided by Suhyup Feed Co. Ltd., Uiryeong, Korea.

<sup>2</sup>Vitamin premix (g/kg of mixture): L-ascorbic acid mono-phosphate, 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.

<sup>3</sup>Mineral mixture (g/kg of mixture): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 80.0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 370.0; KCl, 130.0; Ferric citrate, 40.0; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 20.0; Ca-lactate, 356.5; CuCl, 0.2; AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.15; Na<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0.01; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2.0; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.0.

<sup>4</sup>Squid liver oil was purchased from E-Wha oil Co. Ltd., Busan, Korea.

<sup>5</sup>Sigma, USA.

<sup>6</sup>Estimated energy was determined by using values of 16.7 KJ/g protein or carbohydrate and 37.6 KJ/g fat for dietary ingredients (Garling and Wilson, 1976).

건으로 유지되었고, 전 실험기간 동안 평균 수온은 15°C에서 19°C 범위로 자연수온에 의존되었다. 실험사료는 1일 2회 (09:00와 16:00시) 최초 어체중의 4% (dry matter basis)를 매일 공급 하였고, 성장해 감에 따라 3%로 감소시키면서 제한급이를 하였다. 성장률 측정은 매 2주마다 실시되었고, 측정 24시간 전에 모든 실험어류를 절식시켰다. 사료공급실험은 총 8주간 수행되었다.

#### 샘플수집 및 분석

8주간의 사료공급 실험 후, 어류의 최종 평균무게를 측정하여 증체율 (Weight gain), 사료섭취율 (Feed intake), 사료전환효율 (Feed conversion ratio), 일간성장률 (Specific growth rate), 단백질전환효율 (Protein efficiency ratio) 및 생존율 (Survival)을 계산하였다. 최종 무게측정 2일 후 마지막 사료 공급을 한 후 3시간과 24시간 후에 각 수조마다 12마리씩의 어류를 무작위로 선별하여 tricaine methanesulfonate (MS-222, 100 mg/L) 용액으로 마취시켜 헤파린 처리가 된 주사기를 사용하여 미부동맥에서 채혈을 한 후, Hematocrit, Hemoglobin 및 Nitroblue tetrazolium (NBT) activity를 측정하였다. 분석

후, 남은 혈액은 Alanine aminotransferase (ALT)와 Aspartate aminotransferase (AST) 분석을 위해 원심분리기 (Micro 17TR, Hanil Science, Korea)를 이용하여 5,000 rpm으로 10분간 원심분리 하여 혈장을 분리하였다.

#### 혈액분석

Hematocrit은 헤파린이 처리된 미세혈관채혈튜브 (Micro-Hematocrit Capillary Tubes)에 혈액을 채운 다음 고무판 (Wax plates)에 세운 후, 혈액진단원심분리기 (Micro Hematorit VS-12000, Vision Scientific, Korea)에서 10분간 원심분리 하여 값을 측정하였다.

헤모글로빈, ALT 및 AST 분석은 각각의 시약과 반응 시킨 후 혈액생화학분석기 (Express plus system, Bayer, USA)를 이용하여 분석하였다. 헤모글로빈은 end point, ALT와 AST는 kinetic방법으로 분석되었다.

NBT activity 분석은 Anderson and Siwicki (1995)의 방법을 응용하여 호흡폭발 동안의 neutrophils에 의한 oxidative radical 생산 측정으로 분석되었다. 분석방법은 혈액과 0.2% NBT 용액을 1:1의 비율로 각각 50 µL씩 혼합한 후, 25°C에서 30분 동안 반응시킨 후, 50 µL을 취하여 유리튜브에 옮긴다. 그 후, Formazon 생성을 감소시키기 위해 1 mL의 dimethyl formamide를 첨가한 후, 2000×g에서 5분 동안 원심분리를 하여 최종적으로 상층액을 취한 후, NBT의 감소되는 범위를 spectrophotometer (Genesys 10 UV, Rochester, NY, USA)를 사용하여 최적의 흡광도인 540 nm에서 측정하였다. Blank는 dimethyl formamide를 사용하였다.

#### 일반성분 분석

실험사료의 일반성분은 AOAC (1995) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법 (125°C, 3 hr), 조회분은 직접회화법 (550°C, 12 hr), 단백질은 자동 조단백분석기 (Kejlttec system 2300, Sweden)로 분석되었으며, 지방은 Folch et al. (1959)의 방법에 따라 Soxhlet 추출장치 (Soxhlet heater system C-SH6, Korea)를 이용하여 분석되었다.

#### 폴리페놀 분석

실험사료에서의 총 폴리페놀 함량은 Skerget et al. (2005)의 방법을 기초로 약간 수정하여 비색 정량하였다. 먼저, 사료를 분쇄시킨 다음 각 사료의 1 g을 메타놀 50 mL에 넣은 후 40°C에서 2시간 동안 추출하였다. 추출된 용액은 상온에서 식힌 후, 0.45 µm 주사기용 여과필터 (Whatman Inc., Clifton, NJ)로 여과시켰다. 그런 다음 2.5 mL의 Folin-Ciocalteu (0.2 N, Sigma) 시약을 첨가한 후에 상온에서 5분 동안 반응시킨 후, 2 mL의 sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 포화용액 (75 g/L)을 첨가하였다. 혼합된 샘플을 50°C에서 5분간 반응시킨 다음 상온에서 식힌 후, 분광광도계 (Genesys 10 UV, Rochester, NY, USA)를 사용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 gallic acid를 사용하였다.

Table 2. Growth performance of juvenile olive flounder fed the experimental diets for 8 weeks<sup>1</sup>

| Diet             | WG (%) <sup>2</sup> | SGR (%) <sup>3</sup> | FCR <sup>4</sup> | FI <sup>5</sup> | PER <sup>6</sup> | Survival (%) |
|------------------|---------------------|----------------------|------------------|-----------------|------------------|--------------|
| CON <sup>7</sup> | 155±13              | 1.87±0.10            | 1.46±0.01        | 0.63±0.05       | 1.35±0.01        | 93.3±8.8     |
| HE <sup>8</sup>  | 144±8               | 1.78±0.07            | 1.59±0.03        | 0.62±0.01       | 1.24±0.02        | 100±0.0      |
| LF <sup>9</sup>  | 136±20              | 1.71±0.17            | 1.62±0.15        | 0.62±0.02       | 1.22±0.11        | 98.9±1.9     |

<sup>1</sup>Means of triplicate groups; values are presented as mean±SD.

<sup>2</sup>Weight gain (%)=100×(final mean body weight—initial mean body weight)/initial mean body weight.

<sup>3</sup>Specific growth rate (%)=[(log<sub>e</sub> final body weight—log<sub>e</sub> initial body weight)/days]×100.

<sup>4</sup>Feed conversion ratio=dry feed fed/wet weight gain.

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

<sup>6</sup>Protein efficiency ratio=wet weight gain/ total protein fed.

<sup>7</sup>CON=control group.

<sup>8</sup>HE=hot water extracts group.

<sup>9</sup>LF=Lactobacillus rhamnosus fluid group.

통계학적 분석

실험사료군의 배치는 완전확률계획법 (Completely randomized design)에 따라 실시하였고, 성장 및 분석결과는 SPSS (Version 12.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석되었다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's multiple test (P<0.05)로 비교되었다. 데이터는 평균값±표준편차 (mean±SD)로 나타내었다. 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석되었다.

결 과

8주간의 성장실험 결과, 사료 내 자생식물 두메꿀풀의 열수추출액 (HE)과 미생물배양액 (LE) 첨가에 따른 성장률, 일간 성장률, 사료전환효율, 사료섭취율, 단백질전환효율 및 생존율에서는 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다 (Table 2). 비록 유의적인 차이는 관찰할 수 없었지만 HE와 LE 첨가구가 대조구에 비해 성장률과 단백질전환효율에서 낮은 경향을 보였다. 실험사료를 섭취한 넙치 치어의 혈장성분의 변화는 Table 3에 나타내었다. ALT와 AST의 분석결과, HE와 LF 실험사료를 섭취한 실험구가 대조구와 비교하여 뚜렷하게 낮은 경향을 관찰할 수 있었으며, ALT의 값에서는 HE를 섭취한 실험구가 대조구보다 유의적으로 낮은 값을 보였다 (P<0.05).

최종 사료공급 3시간 후와 24시간 후의 혈액을 채취하여

Table 3. Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) of juvenile olive flounder fed the experimental diets for 8 weeks<sup>1</sup>

| Diet             | ALT (U/L) <sup>2</sup> | AST (U/L) <sup>2</sup> |
|------------------|------------------------|------------------------|
| CON <sup>3</sup> | 19.7±0.6 <sup>a</sup>  | 80.0±8.8               |
| HE <sup>4</sup>  | 17.3±0.5 <sup>b</sup>  | 71.1±2.2               |
| LF <sup>5</sup>  | 18.5±1.2 <sup>ab</sup> | 73.4±1.9               |

<sup>1</sup>Means of triplicate groups; values are presented as mean±SD. Values in the same column having different superscripts are significantly different (P<0.05).

<sup>2</sup>Unit per liter (U/L) is the amount of enzyme which oxidizes one μmol/L of NADH per minute.

<sup>3</sup>CON=control group.

<sup>4</sup>HE=hot water extract group.

<sup>5</sup>LF=Lactobacillus rhamnosus fluid group.

hematocrit, hemoglobin 및 NBT activity를 분석한 결과 (Table 4), 3시간 후의 혈액에서 hematocrit, hemoglobin 및 NBT activity가 24시간 후의 결과보다 높은 값을 보였다. 먹이공급 3시간 후의 혈액에서 분석한 NBT activity는 HE와 LF를 섭취한 실험구에서 대조구와 비교하여 유의적으로 높은 값을 보였다 (P<0.05). 실험사료 내 폴리페놀 함량을 측정된 결과, 모든 실험사료에서 0.2±0.03%로 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다.

고 찰

본 연구에서 사료 내 자생식물 두메꿀풀의 열수추출액과 미생물 배양액을 첨가하여 넙치 치어에 공급한 결과, 성장률, 일간성장률, 사료전환효율, 사료섭취율, 단백질전환효율 및 생존율에 아무런 영향을 미치지 않았다. 식물체에서의 생리활성물질은 주로 대사과정 중에 생합성 되는 2차 대사산물로 식물체가 생존과정 중에 함유하면서 생체대사에 유용하게 사용하거나, 외부로 분비되어 다른 식물의 생장에 직접 또는 간접적으로 영향을 미칠 수 있다고 보고되었다 (Rice, 1984; Kim et al., 1993; Chung, 1994). 타 식물에 억제작용을 일으키는 물질은 주로 phenolic 화합물로 알려져 있고, tannin 또는 alkaloid 화합물도 비슷한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다 (Bhowmik and Doll, 1984). 이 연구에서도 자생식물 열수추출액의 성분 중 억제작용을 일으키는 물질이 비록 유의적인 차이는 없었지만 성장률에 영향을 끼친 것으로 사료된다. 하지만 보다 더 구체적인 메커니즘은 장기간의 성장실험과 자생식물 추출물의 성분분석을 통한 충분한 해석이 필요할 것으로 판단된다. 생존율에서는 HE와 LF 첨가구에서 대조구보다 높은 경향을 보였고, HE 첨가구에서는 100%의 생존율을 보였다. 이 결과는 자생식물 두메꿀풀에서의 항균, 항산화 효과에 기인된 것으로 사료된다 (Moon et al., 2006). 이 외에도 천궁 (Jung and Lee, 2007), 목초액 (Jeong et al., 2007) 및 여러 자생식물 (Yang et al., 1995; Min et al., 2004; Moon et al., 2006)을 대상으로 항균 실험을 한 결과, 대부분의 자생식물들이 뛰어난 항균 활성을 나타내는 것으로 보고되었다.

ALT와 AST의 활성에서는 HE와 LF 사료를 섭취한 실험구

Table 4. Hemoglobin, hematocrit, and nitroblue tetrazolium activity of juvenile olive flounder at 3 and 24 hours after the last feeding<sup>1</sup>

| Diet             | Hemoglobin (g/dL) |           | Hematocrit (%) |          | Nitroblue tetrazolium activity (optical density) |           |
|------------------|-------------------|-----------|----------------|----------|--|-----------|
|                  | 3 hr              | 24 hr     | 3 hr           | 24 hr    | 3 hr   | 24 hr     |
| CON <sup>2</sup> | 3.86±0.29         | 3.68±0.04 | 22.9±0.4       | 21.3±0.3 | 0.74±0.01 <sup>a</sup>                           | 0.53±0.07 |
| HE <sup>3</sup>  | 3.99±0.36         | 3.64±0.48 | 23.5±1.3       | 22.6±2.6 | 0.77±0.02 <sup>b</sup>                           | 0.52±0.06 |
| LF <sup>4</sup>  | 3.88±0.53         | 3.59±0.25 | 23.6±1.1       | 21.4±0.8 | 0.79±0.00 <sup>b</sup>                           | 0.57±0.07 |

<sup>1</sup>Means of triplicate groups; values are presented as mean±SD. Values in the same column having different superscripts are significantly different (P<0.05).

<sup>2</sup>CON=control group.

<sup>3</sup>HE=hot water extracts group.

<sup>4</sup>LF=*Lactobacillus rhamnosus* fluid group.

가 대조구보다 낮은 값을 나타내었고 (Table 3), HE 실험구의 ALT 활성은 대조구 보다 유의적으로 낮았다 (P<0.05). ALT와 AST 효소들의 활성은 일반적으로 척추동물에서 간의 기능과 상태를 나타내는 지표로서 자주 사용되며 일반적으로 높은 ALT와 AST는 간 기능의 손상 또는 약화를 의미 한다 (Pan et al., 2003). 따라서 사료 내 두메꿀풀 열수추출액과 미생물배양액은 넙치의 간 기능을 개선시킬 수 있을 것으로 판단된다.

사료 내 열수추출액과 미생물배양액이 비 특이적 면역반응에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 시간대별 (먹이공급 후 3 hr, 24 hr 후)로 혈액을 채취하여 NBT activity를 분석한 결과, 3시간 후에 자생식물 두메꿀풀 추출액과 미생물배양액을 첨가한 실험구 (HE, LF)에서 대조구보다 유의적으로 높은 활성을 보였다. 어류의 외부 병원체에 대한 방어 시스템은 포유동물에서 설명된 것과 기본적으로 비슷하다 (Iwama and Nakanishi, 1996). 세포 내 방어시스템에 있어서 경골어류는 T lymphocytes와 B lymphocytes 뿐 아니라 macrophages, neutrophils 및 natural killer (NK) cells과 같은 식균세포들을 가지고 있고, 체액성 (humoral) 방어물질로는 complement, lysozyme, natural hemolysin, transferrin 및 C-reactive protein을 가지고 있는 것으로 알려져 있다 (Secombes et al., 1996; Watanuki et al., 2006). 또한, 글루칸 (Yano et al., 1989), lactoferrin (Sakai et al., 1993), levamisole (Kajita et al., 1990) 및 FK-565 (Kitao and Yoshida, 1986)와 같은 면역증강물질을 섭취한 어류에서는 일반적으로 식균세포의 활성이 향상되는 것으로 보고되었다. 식균세포의 활성은 phagocytosis, killing 및 chemotaxis에 의해 검출된다. Macrophages의 killing mechanism은 대체적으로 산소의존 (oxygen-dependent) 또는 산소비의존 (oxygen-independent)으로 분류된다. 활성산소 (reactive oxygen species)에 의해 전달되어지는 산소의존 killing mechanism은 화학발광 (chemiluminescence)과 NBT test (Sakai et al., 1995)에 의해 검출되어 진다. 이 연구에서 분석된 NBT activity는 neutrophils에 의한 oxidative radical 생산을 측정하는 것으로, neutrophils은 산화적 호흡폭발 또는 식세포작용 동안에 많은 양의 superoxide anion을 생산해 낸다고 알려져 있다. Kumari and Sahoo (2005)는 Asian catfish (*Clarias batrachus*)에서 cyclophosphamide를 사료 내에 첨가하여 공급한 후 NBT

activity를 분석하여 면역억제 효과를 증명하였고, Pham et al. (2006)은 넙치에서 NBT activity를 분석하여 톳의 면역증강 효과를 증명하였다. 따라서 이 연구에서 나타난 높은 NBT 활성은 사료 내 HE와 LF의 첨가가 어류의 면역력을 증강시킬 수 있음을 잘 말해준다고 할 수 있다.

Panigrahi et al. (2007)은 생균제 3종류 (*L. rhamnosus*, *Bacillus subtilis* 및 *Enterococcus faecium*)를 사료 내에 첨가하여 무지개송어에 공급한 결과 면역반응과 관련된 Cytokine 유전자의 발현을 증진시켜 면역력이 증강되었음을 증명하였고, 특히 *L. rhamnosus* 미생물은 신장과 비장에서 IL-1 $\beta$ , TNF1, TNF2 및 TGF- $\beta$  유전자의 발현이 유의적으로 높았다고 보고하였다. 효과적인 생균제는 증식이 빠르고, 내열성을 가지며, 장관을 통과하고 위산과 담즙산에 견뎌야 하며, 여러 가지 환경조건에서도 살아남아야 한다고 보고되었다 (Park et al., 1996). 유산균들의 콜레스테롤 저하성, 내산성, 내담즙성 및 항생제 내성에 대해 연구한 결과, *Lactobacillus* 균주들에서 강한 내성이 있는 것으로 보고되었다. 따라서 이 연구에서도 자생식물 추출물을 0.5% 첨가하여 배양한 미생물 *L. rhamnosus*가 사료 공급을 통해 효과적으로 생체 내에 전달되어 비 특이적 면역반응 (증가된 NBT 활성, Table 4)을 높였을 것으로 판단된다.

먹이공급 후 3시간과 24시간 후의 혈액에서 hematocrit, hemoglobin 및 NBT activity를 비교하면, 3시간 후의 결과가 24시간 후의 결과보다 유의적으로 높았다. 이것은 어류의 대사과정에서 먹이 섭취 후 소화과정을 거쳐 3시간 후에 영양소가 장으로부터 흡수되어 혈액으로 공급되어 각 조직과 기관으로 전달되고 24시간 후에는 다시 정상으로 돌아오는 것을 나타낸다. 따라서 생리활성 물질의 구체적인 대사과정 시간과 그 효능이 미치는 시간에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이 연구결과를 요약하면, 사료 내 자생식물 두메꿀풀의 열수추출액과 미생물배양액은 넙치 치어의 성장에는 영향을 미치지 않지만 비 특이적 면역반응에 효과가 있는 것으로 사료된다. 따라서 항생제를 대체하여 어류의 질병치료제로써 사용이 가능할 것으로 판단되며, 사료첨가제로써 이용 할 수 있도록 대량 생산이 가능한 산업적인 생산 공법이 마련되어야

할 것으로 판단된다. 또한 성장률이 다소 감소하는 경향을 보임에 따라 부작용을 고려하여 보다 장기적인 사육실험과 공격실험, 장내 미생물 분석 등의 추가적인 실험이 보완되어야 할 것으로 사료된다.

## 사 사

본 연구는 2007년도 해양한국발전프로그램 (KSGP) 연구개발 사업과 한국과학재단 특정기초연구 (R01-2005-000-10982-0) 사업의 일환으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Anderson, D.P. and A.K. Siwicki. 1995. Basic haematology and serology for fish health programs. In: Diseases in Asian Aquaculture II. Shariff, M., J.R. Arthur and R.P. Subasinghe, eds. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 1-185.
- AOAC. 1995. Official methods of analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, 1-1298.
- Bhowmilk, P.C. and J.D. Doll. 1984. Allelopathic effect of annual weed residues on growth and nutrient uptake of corn and soybeans. *Agron. J.*, 76, 838-888.
- Cho, M.K., Y.J. Kim, D.Y. Shin and T.S. Choi. 2004. Cell scattering activity of natural plant extracts. *Kor. J. Pharmacogn.*, 35, 62-79.
- Chung, I.M. 1994. Allelopathy and autotoxicity studies and allelochemicals isolation and identification of alfalfa (*Medicago sativa*). Ph.D. Thesis, University of Illinois, USA.
- Folch, J., M. Lee and G.H. Sloane-Stanley, 1959. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.
- Fuller, R. and G.R. Gibson. 1997. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand. J. Gastroenterol.*, 222, 28-31.
- Garling, D.L. Jr. and R.P. Wilson. 1976. Optimum dietary protein to energy ratio for channel catfish fingerlings, *Ictalurus punctatus*. *J. Nutr.*, 106, 1368-1375.
- Gopalakannan, A. and V. Arul. 2006. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture*, 255, 179-187.
- Heo, G.J., K.S. Shin and M.H. Lee. 1992. Diseases of aquaculture animals and prevention of drug residues. *Kor. J. Food Hygiene*, 7, S7-S19.
- Iwama, G. and T. Nakanishi. 1996. Organ, Pathogen, and Environment. The Fish Immune System. Academic Press, San Diego, 1-380.
- Jung, D.S. and N.H. Lee. 2007. Antimicrobial activity of the aerial part (leaf and stem) extracts of *Cnidium officinale* Makino, a Korean medicinal herb. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 30-35.
- Jeong, J.H., D.E. Jeong, S.J. Lee, K.J. Seul, C.M. Ryu, S.H. Park and S.Y. Ghim. 2007. The effects of wood vinegar on growth and resistance of peppers. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 41-44.
- Kajita, Y., M. Sakai, S. Atsuta and M. Kobayashi. 1990. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathol.*, 25, 93-98.
- Kim, K.J., I.M. Chung, K.H. Kim and J.K. Anh. 1993. Allelopathic influence of alfalfa and residues on soybean and corn. *Kor. J. Crop Sci.*, 39, 295-305.
- Kim, K.W. and S.Y. Kim. 2005. Herbicidal and fungicidal activities of methanol extracts from native plants in Korea. *Kor. J. Weed Sci.*, 25, 221-232.
- Kim, S.M. 2006. Herbicidal activity of Korean native plants (IV). *Kor. J. Pesticide Sci.*, 10, 225-229.
- Kim, S.S., G.B. Galaz, K.J. Lee and Y.D. Lee. 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, T.J. 1996. Korean Resources Plants I. Seoul National University Press, Korea, 11-21.
- Kim, Y.C., K.W. Kim, S.H. Lee, G.J. Park, O.E. Okorie, Y.J. Kang and S.C. Bai. 2006. Effects of dietary  $\beta$ -1,3 glucan on growth and immune responses in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Aquacult.*, 19, 247-253.
- Kimura, K., A.L. McCartney, M.A. McConell and G.W. Tannock. 1997. Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological response of their human hosts to the predominant strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3394-3398.
- Kitao, T. and T. Yoshida. 1986. Effect of an immunopotentiator on *Aeromonas salmonicida* infection in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 12, 287-291.
- Kumari, J. and P.K. Sahoo. 2005. Effects of cyclophosphamide on the immune system and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batracus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 19, 307-316.
- Kwon, O.E., S.W. Lee, M.Y. Chung, Y.H. Kim, M.C. Rho, H.S. Lee and Y.K. Kim. 2002. Inhibitory effects

- of natural plant extracts on ICAM-1/LFA-1 mediated adhesion of HL-60 cells. *Kor. J. Pharmacogn.*, 33, 343-351.
- Lee, Y.N. 2002. *Flora of Korea*. 4th ed. Kyo-Hak Publishing Co. Ltd., Seoul, Korea.
- McPhearson, R.M., A. DePaola, S.R. Zywno, J.M.L. Motes and A.M. Guarino. 1991. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. *Aquaculture*, 99, 203-211.
- Min, S.K., Y.K. Park, J.H. Park, S.H. Jin and K.W. Kim. 2004. Screening of antibacterial activity from hot water extracts of indigenous plants. *J. Life Sci.*, 14, 951-962.
- Moon, T.C., H.J. Jung, E.K. Lee, H.Y. Park, S.J. Jeon, K.H. Son, H.P. Kim, K.H. Bae, S.S. Kang, D.Y. Kwon and H.W. Chang. 2003. Screening of arachidonic acid cascade related enzymes inhibitors from Korean indigenous plants (1). *Kor. J. Pharmacogn.*, 34, 109-117.
- Moon, Y.G., K.S. Choi, K.J. Lee, G.Y. Kim and M.S. Heo. 2006. Screening of antioxidative and antibacterial activity from hot water extracts of indigeous plants, Jeju-Island. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 21, 164-169.
- Pan, C.H., Y.H. Chien and B. Hunter, 2003. The resistance to ammonia stress of *Penaeus monodon* Fabricius juvenile fed diets supplemented with astaxanthin. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 297, 107-118.
- Panigrahi, A., V. Kiron, S. Satoh, I. Hirono, T. Kobayashi, H. Sugita, J. Puangkaew and T. Aoki, 2007. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Dev. Comp. Immunol.*, 31, 372-382.
- Park, S.Y., Y.T. Ko, H.K. Jeong, J.O. Yang, H.S. Chung, Y.B. Kim and G.E. Ji. 1996. Effect of various lactic acid bacteria on the serum cholesterol levels in rats and resistance to acid, bile and antibiotics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 304-310.
- Pham, M.A., K.J. Lee, B.J. Lee, S.J. Lim, S.S. Kim, Y.D. Lee, M.S. Heo and K.W. Lee. 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.
- Pickering, A.D. 1992. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. *Aquaculture*, 100, 125-139.
- Rice, E.L. 1984. *Allelopathy*, 2nd ed. Academic Press, Orlando, USA, 1-267.
- Rumsey, G.L., A.K. Siwicki, D.P. Anderson and P.R. Bowser. 1994. Effect of soybean protein on serological response, non-specific defense mechanisms, growth, and protein utilization in rainbow trout. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 41, 323-339.
- Sakai, M., H. Kamiya, S. Ishii, S. Atsuta and M. Kobayashi. 1992. The immunostimulating effects of chitin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In: *Diseases in Asian Aquaculture*. Shariff, M., R.P. Subasighe and J.R. Arthur, eds. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 413-417.
- Sakai, M., T. Otubo, S. Atsuta and M. Kobayashi. 1993. Enhancement of resistance to bacterial infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by oral administration of bovine lactoferrin. *J. Fish Dis.*, 16, 239-247.
- Sakai, M., S. Atsuta and M. Kobayashi. 1995. The activation of leucocytes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by oral administration of *Clostridium butyricum* bacterin. In: *Diseases in Asian Aquaculture*. Shariff, M., R.P. Subasighe and J.R. Arthur, eds. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 433-437.
- Secombes, C.J., L.J. Hardie and G. Daniels. 1996. Cytokine in fish: an update. *Fish Shellfish Immunol.*, 6, 291-304.
- Skerget, M., P. Kotnik, M. Hadolin, A.R. Hras, M. Simonic and Z. Knez. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and the antioxidant activities. *Food Chem.*, 89, 191-198.
- Son, K.H., H.J. Son, J.H. Jeong and S.T. Kwon. 2005. Screening of inhibitory activity of seed germination from wild plant extracts. *J. Kor. Flower Res. Soc.*, 13, 207-220.
- Tannock, G.W., C. Crichton, G.W. Welling, J.P. Koopman and T. Midtvedt. 1988. Reconstitution of the gastrointestinal microflora of lactobacillus-free mice. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2971-2975.
- Watanuki, H., K. Ota, A.C.M. A.R. Tassakka, T. Kato and M. Sakai. 2006. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 258, 157-163.
- Yang, M.S., Y.L. Ha, S.H. Nam, S.U. Choi and D.S. Jang. 1995. Screening of domestic plants with antibacterial activity. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.*, 38, 584-589.
- Yano, T., R.E.P. Mangindaan and H. Matsuyama. 1989. Enhancement of the resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by some  $\beta$ -1,3-glucans. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, 1815-1819.

You, S.J., J.K. Cho, S.G. Hwang and K.C. Heo. 2005. Probiotic characteristics of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from kefir. Kor. J. Food Sci. Ani. Resour., 25, 357-364.

Yu, H.N., K.H. Cho, D.E. Sok and T.S. Jeong. 2003. Inhibitory effects of natural plant extracts on

lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase. Kor. J. Pharmacogn., 34, 100-108.

---

2007년 7월 15일 접수

2007년 10월 15일 수리