

불가사리 (*Asterias amurensis*) 추출물을 첨가한 사료의 급이가 조피볼락 (*Sebastes schlegeli*)의 성장, 혈액성상 및 식세포 활성산소 생산에 미치는 효과

박희연* · 임치원 · 김연계 · 최태진 · 윤호동 · 이가정 · 서연경 · 김지영 · 박기의

국립수산과학원 생명공학연구소

Effects of Supplemental *Asterias amurensis* Extract in the Experimental Diets on Growth, Blood Chemistry and Superoxide Production of Kidney Phagocytes of *Sebastes schlegeli*

Hee-Yeon Park*, Chi-Won Lim, Yeon-Kye Kim, Tae-Jin Choi, Ho-Dong Yoon, Ka-Jung Lee, Yeon Kyung Seo, Ji Yeong Kim and Ki Eui Park

Biotechnology Research Center, National Fisheries Research & Development Institute, Busan 619-902, Korea

Received November 28, 2007; Accepted December 11, 2007

This study was conducted to examine the effects of *Asterias amurensis* prethanol extract on growth performance, serum traits, and superoxide production of phagocytes in *Sebastes schlegeli*. The effects of *Asterias amurensis* extract on growth performance, specific growth rate (SGR), feed concentration ratio (FCR), coefficient of fatness (CF), and survival rate (SR) of fish fed diets containing various concentrations of *Asterias amurensis* extract were measured. There were no significant differences in SGR, FCR, CF, and SR among the experimental groups. This result was produced because experimental diets were coated to prevent repellent action of fish. To investigate the effects of *Asterias amurensis* extract on the metabolism, the contents of glucose, glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), and total cholesterol in serum were measured. The contents of glucose and total cholesterol in serum increased dose-dependently and serum GOT content showed no significant difference among the experimental groups, suggesting that *Asterias amurensis* extract was non-toxic material. To confirm the effects of *Asterias amurensis* extract on the immune system of fish, superoxide production of phagocytes was measured. *Asterias amurensis* extract caused a dose-dependent increase of superoxide production of phagocytes. When considering these results, *Asterias amurensis* extract could be utilized as an additive to augment immune function in diets.

Key words: *Asterias amurensis*, *Sebastes schlegeli*, superoxide production, growth

서 론

우리나라는 고밀도 집약적인 어류양식으로 인하여 해양환경을 악화시킬 뿐만 아니라 어류에게도 여러 가지 스트레스 요인으로 작용하여 각종 질병을 유발시키고 있다.¹⁾ 그간, 어류의 양식과정에서 발생하는 다양한 질병을 예방 및 치료하기 위해 항생물질 등 화학적요법이 널리 활용되고 있으나 오남용으로 의한 질병내성의 증가, 잔류에 따른 인체 안전성 우려 등이 있다.^{2,3)} 따라서 이에 대한 해결책으로 어류의 면역력을 증강시켜

질병을 예방 및 치료하고자하는 연구가 세계적으로 활발하게 진행되고 있다. Nakagawa 등⁴⁾은 양식산 은어의 사료에 클로렐라 추출물을, Satoh 등⁵⁾은 참돔의 사료에 파래추출물을, Matuso and Miyazono⁶⁾는 무지개 송어의 사료에 peptidoglycan을 투여하여 어류의 면역력에 미치는 효과를 보고하였으며 Jang 등⁷⁾은 saponin의 일종인 glycyrrhizin을 감초에서 분리하여 나일틸라피아의 성장과 질병저항성에 대하여 보고하였다. 한편, 불가사리 (*Asterias amurensis*)는 수산업에 많은 피해를 주는 해적생물이나 그 내장에는 다른 생물에 독성을 나타내는 saponin, lectin 등 다양한 생리활성물질이 존재하는 것으로 알려져 있다.^{8,9)} 특히, saponin과 lectin은 자기보호를 위하여 생물에 함유되어있는 천연 독성물질로서 저 농도에서 타 생물체의 면역계를 활성화하는 기능을 보유하고 있다. 불가사리를 사료로 이용하기 위한

*Corresponding author
Phone: +82-51-720-2457; Fax: +82-51-720-2456
E-mail: hypark@nfrdi.re.kr

연구로는 불가사리 효소 가수분해물을 흰쥐의 사료에 첨가하여 그 사료효과를 분석한 보고가 있으나 그 생리활성에 관한 보고는 찾아볼 수 없다.¹⁰⁾ 따라서 본 연구에서는 불가사리 내장 추출물을 첨가한 사료를 제작하여 조피볼락(*Sebastes schlegeli*)에 투여한 다음, 성장, 혈액성상 및 식세포 활성산소 생산에 미치는 효과에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

불가사리. 2005년 10월에 부산광역시 기장군 송정인근 해역에서 장어통발로 포획한 아무르불가사리(*Asterias amurensis*)를 실험실까지 저온상태로 운반하여 실험에 사용하였다.

불가사리추출물의 제조. 불가사리추출물은 불가사리 내장에 10배량의 주정(prethanol, Duksan)을 첨가하여 실온에서 12시간 동안 진탕하면서 추출한 다음 원심분리하여 침전물을 제거하고 회전식진공농축기를 이용하여 주정을 제거한 후 동결건조하는 방법으로 제조하였다.

실험어. 실험에 사용한 조피볼락(*Sebastes schlegeli*)은 경남 거제에 소재한 H수산에서 구입하여 온도조절장치가 부착된 수조운반차량으로 사육실까지 운반하였으며 실험어를 수조에 넣고 항생제로 소독한 다음 15일간 일반사료를 주어서 적응시킨 후 실험을 시작하였다. 실험직전 실험어의 체중은 356.1-407.6 g 범위이었다.

실험사료의 제조. 실험용 사료의 제조는 불가사리추출물, 분말사료(사료주식회사, 대한민국), 전분 및 물을 혼합하여 습사료 제조기(대구상공사, 대한민국)로 1차 성형한 다음 불가사리 추출물이 들어있지 않은 사료를 이용하여 코팅하였다. 최종 배합비율을 Table 1과 같게 제조하였으며 -18°C의 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

사육실험. 실험어의 사육은 총 28마리를 대조군, 실험군 A, 실험군 B, 실험군 C 등 4개군으로 구분하여 원형수조(1톤, FRP제)에서 8주간 사육하였으며 사료는 1일 2회 충분히 먹을 때까지 공급하였다. 사육기간동안 수온은 18.3~21.1°C, 염분은 31.9~34.5‰ 그리고 DO는 6.5~7.1 mg/l 범위이었다.

성장 및 생존율. 1일 성장률, 사료계수, 비만도는 다음과 같은 공식으로 계산하였으며 생존율은 실험 종료 시까지 생존한 개체수를 최초 개체수에 대한 백분율로 표시하였다.

$$1일\ 성장률 = [(ln\ W2 - ln\ W1) / (T2 - T1)] \times 100$$

(W, 평균체중; T, 측정일자)

사료계수 = 사료공급량/체중 증가량

$$비만도 = (체중/전장^3) \times 10^3$$

혈액성분분석. 혈액성분은 어체의 꼬리정맥에서 채혈한 혈액으로부터 혈청을 분리하여 glucose, glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) 및 total cholesterol을 자동혈액분석기(FUJI FILM, DRI-CHEM 3500, Japan)로 측정하였다.

식세포 활성산소 측정. 시험어의 면역력은 NBT법에 의해 조피볼락 식세포의 활성 산소를 측정하였다. 즉, 주사기를 이용하여 조피볼락의 미부혈관에서 순환혈액을 가능한 전부 제거한 후에 해부하여 두신을 무균적으로 절취하고 petridish에 RPMI

Table 1. Composition of basal diet used to examine the effectiveness of starfish extract concentrations

Ingredient	Control	1%	3%	5%
Starfish guts extract	0.0%	1.0%	3.0%	5.0%
Commercial bind meal	64.9%	64.9%	64.9%	64.9%
Starch	2.6%	2.6%	2.6%	2.6%
Water	32.5%	31.5%	29.5%	27.5%

Table 2. Effects of different concentrations of dietary starfish extract on specific growth rate (SGR), feed conversion ratio (FCR), condition factor (CF) and survival rate (SR) of *Sebastes schlegeli*

Experimental group	SGR	FCR	CF	SR
Control	0.18	95.8	15.89 ± 0.31 ^a	100
1%	0.18	95.6	15.70 ± 0.29 ^a	100
3%	0.17	95.9	15.91 ± 0.52 ^a	100
5%	0.18	96.1	15.90 ± 0.58 ^a	100

Values are mean ± S.D. (n = 7).

Values with a common superscript letter within the same column are not significantly different (p < 0.05).

SGR = [(ln W2 - ln W1)/(T2 - T1)] × 100, where W1 and W2 are mean body weight at times when the first and second samples were taken (T1 and T2).

FCR = Wet feed intake/ wet weight gain.

CF = (wet weight/total length³) × 10³

SR = Survival Rate.

1640 배지를 소량 넣어 신장을 핀셋으로 으갠 후 그 현탁액을 40% percoll에 조심스럽게 중층한 다음 원심분리하여 백혈구 층을 분리하고, 0.1% trypan blue에 염색하여 생존력을 관찰하였다. 세포수를 2 × 10⁶ cells/ml로 조정하여 96 well plate에 100 μl 씩 분주하고 20°C에서 3시간 동안 배양하여 부착시킨 후 각 well 내의 상등액을 조심스럽게 제거한 뒤, 각 well에 음소닌화된 zymosan을 첨가한 NBT 용액을 100 μl 씩 분주하여 20°C에서 30분간 반응시켰다. 그 후 상등액을 버리고 RPMI 1640 배지로 1회 세척한 다음, 100% MeOH로 고정시키고 실온에서 풍건한 후 각 well에 DMSO 140 μl와 2 M KOH 120 μl를 첨가하여 formazan을 녹여서 ELISA reader(BIO-TEK, 한국)로 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리. 실험결과와 통계처리는 Computer program statistix 3.1 (Analytical Software, St. Paul, MN, USA)를 이용하여 ANOVA test를 실시하고 최소 유의차검정(Least significant difference, LSD)으로 평균간의 유의성(p < 0.05)을 검정하였다.

결과 및 고찰

성장 및 생존율. 불가사리추출물의 첨가량을 달리하여 제조한 사료를 8주간 급여한 조피볼락의 1일성장률(SGR), 사료계수(FCR), 비만도(CF), 생존율(SR)을 Table 2에 나타내었다. 각 시험군의 1일성장률, 사료계수, 비만도는 각각 0.17~0.18, 95.6~96.1, 15.70~15.91로 큰 차이를 보이지 않았으며 생존율은 100%이었다. 이는 조피볼락의 사료에 대한 선호 및 기피도가 시험군별로 차이가 나지 않는 것으로 분석된다. 불가사리의 saponin은 어류 기피물질로 알려져 있으며 본 연구진의 코팅을

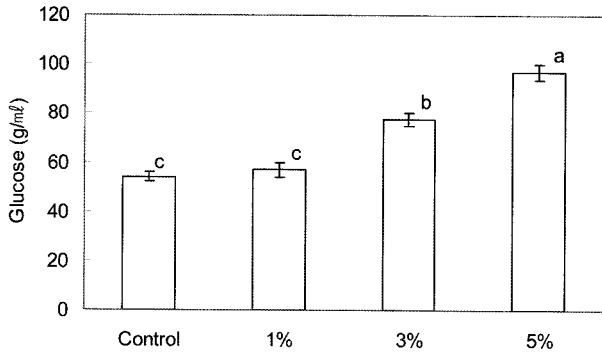


Fig. 1. Content of glucose in the serum of starfish extract administered *Sebastes schlegeli*. Values are mean \pm S.D. (n=7). Values with a common superscript letter within the same column are not significantly different ($p < 0.05$).

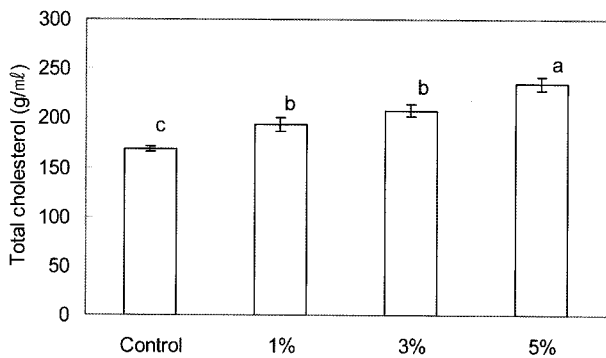


Fig. 2. Content of total cholesterol in the serum of starfish extract administered *Sebastes schlegeli*. Values are mean \pm S.D. (n=7). Values with a common superscript letter within the same column are not significantly different ($p < 0.05$).

하지 않은 사료를 이용한 예비실험에서도 먹이기피 현상이 발생하였다. 따라서 본 연구에서는 불가사리추출물을 첨가한 사료를 일반사료로 코팅한 결과 먹이기피 현상을 개선할 수 있었다. 그리고 주정을 이용하여 추출한 불가사리추출물은 단백질, 지방, 탄수화물 등의 열량소가 함유되어 있지 않기 때문에 성장에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 추정되며 조피볼락의 식이를 촉진하는 물질이나 성장 호르몬을 활성화하는 성분도 없는 것으로 추정된다.

혈액성상의 변화. 불가사리추출물의 급여가 조피볼락의 체내 대사계에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈청 중의 glucose, total cholesterol 함량 및 GOT를 측정하여 Fig. 1~3에 나타내었다. 조피볼락의 혈청 glucose함량은 대조군이 54.01 ± 2.0 g/100 ml이었으나 불가사리첨가물의 함량이 증가할수록 glucose함량도 증가하여 불가사리추출물 5%시험군은 96.9 ± 3.1 g/100 ml에 달하였다. 총 콜레스테롤 함량은 대조군의 경우 168.9 ± 3.2 g/100 ml이었고, 불가사리추출물 1%, 3%, 5%의 비율로 공급받은 실험군은 각각 193.6 ± 7.1 g/100 ml, 208.0 ± 6.3 g/100 ml, 235.2 ± 7.2 g/100 ml로 측정되어 불가사리추출물의 급여량이 증가할수록 총 콜레스테롤 함량도 높아지는 경향을 보였다. Glucose는 생체 내에서 glycogen 및 지방의 대사에 밀접하게 관여하는 물질이며 cholesterol은 세포막의 주요 구성성분으로서 비타민 D,

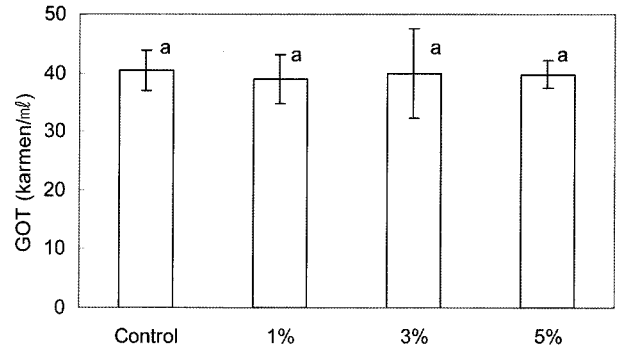


Fig. 3. Activities of GOT in the serum of starfish extract administered *Sebastes schlegeli*. Values are mean \pm S.D. (n=7). Values with a common superscript letter within the same column are not significantly different ($p < 0.05$).

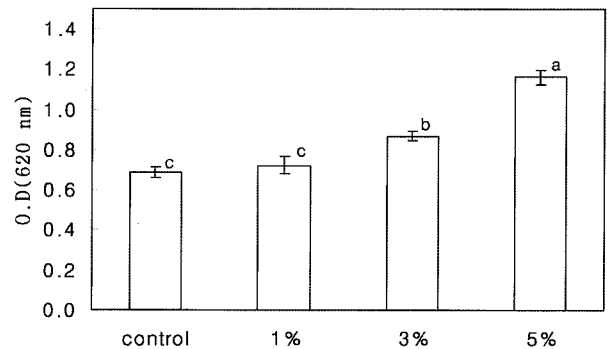


Fig. 4. Content of superoxide in kidney phagocytes of starfish extract administered *Sebastes schlegeli*. Values are mean \pm S.D. (n=7). Values with a common superscript letter within the same column are not significantly different ($p < 0.05$).

testosterone, progesterone, 부신피질 호르몬, bile acid 등 생명 유지에 중요한 물질의 합성에 이용되는 것으로 보고되어 있어 불가사리추출물의 급여가 이와 관련된 생체 대사계에 영향을 미칠 수 있을 것으로 추정된다. 또한, Kim¹¹⁾은 넙치에 면역증강제의 일종인 어보산(성암산업, 서울)을 급여한 결과, 혈청 glucose와 total cholesterol 함량이 농도 의존적으로 증가하였고 보고한 바 있어 불가사리추출물의 투여가 조피볼락의 면역력 증가과도 관련이 있을 것으로 사료된다. 조피볼락의 혈청 GOT는 $39.0 \pm 4.2 \sim 40.4 \pm 3.4$ karmen/ml로 실험군별 유의적인 차이를 보이지 않았다. 체내 대사의 80% 이상이 간장에서 이루어지며 독성물질이 체내에 과량으로 흡수되면 간장이 손상되어 혈청 GOT가 상승하게 된다.¹²⁻¹⁵⁾ 본 실험에서는 불가사리추출물 투여군의 GOT가 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않은 것으로 보아 불가사리추출물은 독성이 거의 없는 것으로 추정된다.

면역력의 변화. 불가사리 내장 주정추출물 첨가사료의 급여가 조피볼락의 면역계에 미치는 영향을 알아보기 위하여 식세포의 활성산소 생산량을 620 nm에서 흡광도로 표시하였다(Fig. 4). 시험군별 활성산소 생산량을 나타내는 흡광도는 대조군 0.688 ± 0.080 , 불가사리추출물의 비율이 1%, 3%, 5%로 증가할 경우 각각 0.723 ± 0.133 (증가율 5.1%), 0.866 ± 0.074 (증가율 25.9%), 1.161 ± 0.120 (증가율 68.8%)으로 불가사리 내장 주정추

출물의 첨가에 따라 농도 의존적으로 증가하였다. 어류의 비특이적 면역체계에 있어 중요한 역할을 수행하는 식세포는 병원체가 침입하여 면역계를 자극하면 활성산소(O₂⁻)와 같은 reactive oxygen species(ROS)를 생산하여 강력한 살균효과를 발휘하므로 식세포의 활성산소 생산량과 면역력은 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁾ 본 연구의 불가사리추출물에는 saponin과 lectin이 상당량 함유되어 있을 것으로 추정되며 이러한 성분들이 조피볼락의 면역계를 활성화하였을 것으로 추정된다. Saponin이 동물의 면역계를 활성화하였다는 다양한 보고가 있으며 lectin은 휴지기상태의 림프구를 분열 자극시키는 mitogen의 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{17,18)} Jung 등¹⁹⁾은 약썩추출물의 투여가 넙치 대식세포의 활성산소 생산을 크게 자극하는 효과가 있었으며 어병세균에 대한 항균활성도 뛰어났다고 보고하였으며 Park 등²⁰⁾은 넙치의 사료에 고추냉이 줄기와 어보산의 첨가로 식세포의 활성을 유의적으로 높일 수 있었다고 보고하였다. 이상의 결과에서 불가사리추출물은 조피볼락의 면역증강 기능성 사료첨가제로 활용할 수 있을 것으로 사료되었다.

초 록

수산 해적생물인 불가사리의 주정추출물을 농도별로 사료에 첨가하여 조피볼락의 성장, 혈액성상 및 식세포 활성산소 생산에 미치는 효과를 조사하였다. 불가사리추출물의 함량이 다른 사료를 급여한 조피볼락의 1일성장율(SGR), 사료계수(FCR), 비만도(CF), 생존율(SR)을 비교한 결과, 실험군별 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이는 불가사리추출물에 의한 먹이 기피현상을 방지하기 위해 사료를 코팅을 하였기 때문인 것으로 사료된다. 불가사리추출물이 조피볼락의 체내 대사계에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈청 중의 glucose, total cholesterol의 함량과 GOT를 측정된 결과, glucose와 total cholesterol의 함량은 불가사리추출물의 함량이 증가할수록 높아지는 경향을 보였다. 한편, 혈청 GOT는 실험군별로 유의적인 차이를 보이지 않았으며 이는 불가사리추출물이 독성이 거의 없기 때문인 것으로 추정된다. 불가사리추출물 첨가사료의 급여가 조피볼락의 면역계에 미치는 영향을 알아보기 위하여 식세포의 활성산소 생산량을 측정된 결과, 불가사리추출물의 첨가에 따라 농도 의존적으로 증가하였다. 이상의 실험결과에서 불가사리추출물은 면역증강 기능성 사료첨가제로 활용할 수 있을 것으로 사료되었다.

Key words: *Asterias amurensis*, *Sebastes schlegeli*, superoxide production, growth

감사의 글

이 연구는 국립수산물과학원(RP-2007-BT-013)의 지원에 의해 운영되었습니다.

참고문헌

1. Lee, S. M., Park, C. S. and Bang, J. C. (2002) Dietary protein

- requirement of young Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed isocaloric diets. *Fisheries Science* **68**, 158-164.
2. Aoki, T., Kanazawa, T. and Kitao, T. (1985) Epidemiological surveillance of drug resistant *Vibrio anguillarum* strains. *Fish Pathol.* **29**, 199-208.
3. Kwon, M. G., Kim, Y. C., Shon, Y. C. and Park, S. I. (1999) The dietary supplementing effects of Kugija, *Lycium chinense*, on immune responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, to *Edwardsiella tarda*. *J. Fish Pathol.* **12**, 73-81.
4. Nakagawa, H., Kasahara, S., Uno, E., Minami, T. and Akira, K. (1981) Effect of *Chlorella*-extract supplement in diet on resisting power against disease of cultured ayu. *Aquaculture* **29**, 109-116.
5. Satoh, K. I., Nakagawa, H. and Kasahara, S. (1987) Effect of *Ulva* meal supplementation on disease resistance of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi* **53**, 1115-1120.
6. Matuso, K. and Miyazano, I. (1993) The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi* **59**, 1377-1379.
7. Jang, S. I., Jo, J. Y. and Lee, J. S. (1992) Effects of vitamins and glycyrrhizin added to oxidized diets on the growth and on the resistance to *Edwardsiella* infection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Aquacult.* **5**, 143-155.
8. Yasumoto, T., Watanabe, T. and Hashimoto, Y. (1964) Physiological activities of starfish saponin. *Nippon Suisan Gakkaishi* **30**, 357-364.
9. Hashimoto, Y. and Yasumoto, T. (1960) Confirmation of saponin as a toxic principle of starfish. *Nippon Suisan Gakkaishi* **26**, 1132-1138.
10. Higashi, H., Murayama, S., Yanase, M. and Tabei, K. (1955) Studied on utilization of worthless marine animals for feed-I. Production of starfish solubles for feed. *Nippon Suisan Gakkaishi* **21**, 271-279.
11. Kim, J. H. (1998) Effects of Obosan (dietary herbs) on growth, body compositions, hematological characteristics and textural properties in all-female olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Ph. D. Thesis, Pukyong National University, Busan.
12. Rubin, E. and Lieber, C. S. (1974) Fatty liver, alcoholic hepatitis and cirrhosis produced by alcohol in primate. *N. Engl. J. Med.* **290**, 128-135.
13. Lieber, C. S., DeCarli, L. and Rubin, E. (1975) Sequential production of fatty liver hepatitis, and cirrhosis in sub-human primates fed ethanol with adequate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 437-441.
14. Allgen, L. G., Izikowitz, S., Nauckhoff, B., Ordell, I. B. and Salum, I. (1958) Serum diphosphopyridine nucleotide linked enzymes in delirium tremens and allied conditions. *Science* **128**, 304-305.
15. Bang, N. U., Iverson, K., Jagt, T. and Madson, S. (1958) Serum glutamic oxaloacetic transaminase activity in acute and chronic alcoholism. *JAMA* **168**, 156.
16. Ellis, A. E. (2000) Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol.* **9**, 291-308.
17. Park, K. U., Wee, J. J., Kim, J. Y., Jeong, C. H., Kang, K. S., Cho, Y. S. and Seo, K. I. (2005) Anticancer and immunological activities of edible crude saponin from soybean cake. *J. Koean*

- Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 1509-1513.
18. Liener, I. E., Sharon, N. and Goldstein, I. J. (1986) Biological properties of Lectins. In *The Lectin*, pp. 266, Academic Press, New York.
19. Jung, S. H., Shon, Y. C. and Kim, Y. C. (2001) *In vitro* effect of water extract of medical herbs on antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and superoxide production of kidney phagocytes in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.* **14**, 3-10.
20. Park, S. U., Kwon, M. G., Lee, Y. H., Kim, K. D., Shin, I. S. and Lee, S. M. (2003) Effects of supplemental *Undaria*, *Obosan* and *Wasabi* in the experimental diets on growth, body composition, blood chemistry and non-specific immune response of juvenile flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Aquacult.* **16**, 210-215.