

마늘, *Allium sativum*이 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 면역반응에 미치는 영향

이준희 · 우승호 · 엄용환 · 황분옥 · 권문경* · 방종득** · 박수일†
부경대학교 수산생명의학과, *국립수산과학원 병리연구과, **국립수산과학원 남동해수산연구소

Effects of garlic *Allium sativum* on the immune responses of olive flounder *Paralichthys olivaceus*

Jun Hee Lee, Sung Ho Woo, Yong Hwan Eom, Bun Ok Hwang, Mun Gyeong Kwon*,
Jong Deuk Bang** and Soo Il Park†

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea
*Pathology Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea
**Southeast Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

This study was aimed to investigate the effects of injection of garlic, *Allium sativum*, extract and immersion in garlic juice on the nonspecific immunity and the resistance against the artificial infection of *Streptococcus iniae* and *Edwardsiella tarda* of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. The nonspecific immune mechanisms were assessed in terms of lysozyme activity, nitroblue-tetrazolium (NBT) assay and superoxide dismutase (SOD) activity etc. Relative percent survival (RPS) was assessed by the challenge with *S. iniae* BS10 or *E. tarda* KE-1. Almost of the garlic extract injected groups showed the enhanced level of the tested nonspecific immune factors. In the challenge test with *S. iniae* and *E. tarda*, RPS of 5% garlic extract pre-injected group was much higher than that of any other tested groups, respectively. Almost of the garlic juice immersion tested groups exhibited strengthened nonspecific immune defence factors, lysozyme activity, the number of lymphocytes and neutrophils, NBT reduction and SOD activity in kidney. In the challenge with *S. iniae* and *E. tarda*, RPS in the 0.25 g/L of garlic juice immersed group was much higher than any other tested groups, respectively. The results suggest that the garlic extract and juice would be effective to enhance the nonspecific immunity and protective ability of olive flounder against fish disease such as *S. iniae* and *E. tarda*.

Key words: Garlic, *Allium sativum*, Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, Immune response, Immunostimulant

넙치 양식장에서는 세균, 바이러스 및 기생충 등의 병원체가 단독 혹은 혼합 감염하여 많은 폐사를 일으키고 있는 실정이다. 어류 질병이 발생하였을 때에는 일반적으로 화학 요법제로서 치료에 임하지만, 빈번한 항생제의 사용은 면역 기능을 억제 (Grondel *et al.*, 1987) 시킬 수 있을 뿐만 아니라 약물의 오남용으로 인하여 병

원체의 다재 내성이 증가하고 있다 (Aoki *et al.*, 1992).

면역 증강 물질 투여는 어류의 자체 방어 능력을 증강시킴으로써 다양한 질병에 대처할 수 있는 특징이 있어서, 다양한 생물이나 천연물로부터 분리된 면역 증강 물질들의 어류 질병에 대한 방어능 증가 효과에 대한 연구 보고는 많

†Corresponding Author : Soo Il Park, Tel : 051-629-5939
Fax : 051-629-5938 E-mail : parksi@pknu.ac.kr

다 (Sakai, 1999; Jung *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2005). 어류의 비특이적 면역 인자를 증진시키는 면역 증강 물질에는 levamisole, FK-565 (heptanoyl- γ -D-glutamyl-(L)-meso-diaminopimelyl-(D)-alanine), MDP (muramyl depeptide), LPS (lipopolysaccharide), chitosan, glucan, nisin 등의 화학화합물과 박테리아 유도물 등이 알려져 있다 (Kitao *et al.*, 1987; Siwicki *et al.*, 1990; Engstad *et al.*, 1992; Kodama *et al.*, 1994; Solem *et al.*, 1995; Kawakami *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Sakai, 1999; Villamil *et al.*, 2003). 면역 증강제는 비특이적 면역인자의 활성을 증가시켜 질병 저항성을 높일 수 있는데, 어류의 식세포 활성 (Raa *et al.*, 1993; Jørgensen *et al.*, 1993a), natural killer cell 활성 (Kajita *et al.*, 1992), 라이소자임 (Engstad *et al.*, 1992; Jørgensen *et al.*, 1993b)과 보체의 대체경로 활성 (Yano *et al.*, 1991) 등 다양한 면역 반응을 강화시키는 것으로 보고되었으며, 어류의 면역 증강을 통해 질병으로 인한 폐사 방지 및 건강한 어류의 생산성을 향상시킨다는 보고가 있다 (Chen and Ainsworth, 1992).

마늘, *Allium sativum*은 전 세계에 분포하는 식물로 식용으로도 사용되지만 수천년 전부터 상처, 감염, 인플루엔자 그리고 궤양과 같은 여러 가지 질병 치료약으로도 인간에게 사용하였다. 세균, 곰팡이, 원생동물 그리고 바이러스 같은 여러 미생물들은 마쇄된 마늘에 감수성을 나타내었다 (Cavallito & Bailey, 1944; Cavallito *et al.*, 1944; Delaha & Garagusi, 1985; Ghannoum, 1988; Soffar & Mokhtar, 1991). 또한 항암 효과, 노화 방지 그리고 항산화 효과도 가진다 (Sheen *et al.*, 1996; Hong *et al.*, 2000; Nakagawa *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2004).

본 연구에서는 넙치에 마늘 추출물의 주사 또는 착즙액의 침지 투여로 비특이적 면역 반응에 미치는 영향을 분석하고, 방어력 증강에 관여하는 마늘의 특성을 밝히는데 필요한 기초 자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

시험어

시험에 사용된 넙치, *Paralichthys olivaceus*는 전라남도 무안 소재 넙치 양식장으로부터 분양 받아 사육하였으며, 평균 체중 11 ± 3 g, 평균 체장 10 ± 2 cm이었다. 시험 기간 동안의 사육 수온은 $20 \sim 22^\circ\text{C}$ 로 유지하고, 사료 공급량은 1일 1-2회 어체중 2% 정도로 공급하였다.

시험 균주

시험 균으로는 독성 균주인 *Streptococcus iniae* BS10 (우 등, 2006)와 *Edwardsiella tarda* KE-1 (이 등, 2005)를 1.5% NaCl 첨가 Tryptic Soy Agar (TSA, Difco) 배지에 25°C , 24시간 배양한 후 시험에 사용하였다.

마늘 추출물과 착즙액 제작

주사 시험을 위한 마늘 추출물의 제조법은 다음과 같다. 무균 상태의 마늘 시료액을 추출하기 위해서 마늘의 껍질을 제거하고 증류수로 깨끗이 씻은 후 마늘 시료로 사용하였다. 세척 마늘 시료는 멸균 생리 식염수와 비율이 1:1 (w/v)이 되도록 혼합하여 으갠 후 멸균 거즈로 착즙하여 50% (w/v) 착즙액을 만들었으며, 이를 원심 분리한 후 상정액을 $0.45 \mu\text{m}$ 의 membrane filter (Sigma, USA)로 여과 멸균하여 시험용 추출물의 원액으로 정하였다. 시험용 추출물 시료 원액은 -80°C 에 동결 보존하면서 필요에 따라 해동하여 시험에 사용하였다. 침지 시험을 위한 마늘 착즙액의 제조법은 마늘의 껍질을 제거하고 증류수로 깨끗이 씻은 후 clean bench 내에서 멸균 증류수로 여러 차례 세척한 후 멸균된 거즈로 물기를 제거하였다. 그 후 시료를 마쇄하여 멸균 거즈로 착즙한 후 곧바로 착즙액을 시험구에 현탁하여 침지 시험에 사용하였다.

마늘 추출물과 착즙액 투여 방법

주사 시험을 위한 마늘 추출물의 투여 방법은 마늘 추출물을 멸균 생리 식염수에 1, 3, 5, 7 및 10%로 용해시킨 후 0.1 mL/fish의 농도로 어체 내에 복강 주사하였다. 대조구는 멸균 생리 식염수만 0.1 mL/fish로 복강 주사하였다. 복강 주사는 2일 간격으로 3회 주사하였다. 침지 시험을 위한 마늘 착즙액의 투여 방법은 마늘 착즙액을 0.1, 0.25, 0.5 및 1.0 g/L의 농도로 해수에 현탁하여 2일 간격으로 3회 20분 동안 침지하였다.

체표 점액 및 혈청 lysozyme 활성 조사

각 시험구의 넙치 체표 점액과 혈청은 마늘 추출물 및 착즙액의 최종 투여 후 2일째에 분리하였다. 각 시험구 별로 3마리씩 임의로 잡아낸 넙치를 대상으로 김 (1992)의 방법에 따라 각각 체표 점액을 취하였다. 채취된 시료에 5배 양의 0.005M PBS (pH 7.4)를 첨가하여 균질화한 후 원심 분리 (12,000×g, 4°C, 20분)한 다음 상정액을 용균 활성 측정용 시료로 사용하였다. 체표 점액의 lysozyme 활성은 Takahashi *et al.* (1986)의 방법에 따라 *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, USA) 균 현탁액에 대한 흡광도의 감소량을 측정함으로써 평가하였다. 시험용 균액은 *M. lysodeikticus*를 0.005M PBS (pH 7.4)에 현탁시켜 530 nm에서 흡광도가 0.6이 되게 조정하여 준비하였다. 측정용 시료 500 μ L에 균 현탁액 2.5 mL를 첨가하여 25°C에서 0분 및 20분간 반응시킨 후 530 nm에서 흡광도의 감소량을 측정하였으며, 용균 활성은 20분간 반응 후 흡광도를 0.001 감소시키는 값을 1 unit로 나타내었다. 시험구 별로 넙치를 3마리씩 임의로 잡아내어 MS-222 (Sigma, USA) 50 ppm으로 마취시킨 후, 미부정맥에서 채혈하였다. 채혈한 혈액을 60분간 실온에 방치한 후 4°C에서 1시간 정도 두어 혈병을 수축시킨 다음 6,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청은 48°C, 30분간 비동화시켜 바로 사용하거나 -20°C에 보관하며 필요에 따라 해동하여 혈청 내 lysozyme의 용균 활성 실험에 사용하였다. 혈청 lysozyme의 활성

은 Parry *et al.* (1965)의 turbidimetric method를 이용하여 측정하였다. 즉 실험용 균액은 *M. lysodeikticus*를 0.05M PBS (pH 7.4)에 현탁시켜 530 nm에서 흡광도가 0.7이 되게 조정하여 준비하였다. 이 현탁액 1.8 mL와 넙치 비동화 혈청 200 μ L를 혼합하여 25°C에서 반응시킨 다음 30초 및 4분 30초 경과 후, 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. lysozyme의 활성은 unit/mL로 나타내었으며, 흡광도 값이 0.001 감소한 값을 1 unit로 정의하였다.

혈청의 살균 능력 시험

각 시험구별 넙치의 혈청은 마늘 추출물 및 마늘 착즙액의 투여 후 2일째에 3마리씩 임의로 잡아낸 시험어에서 각각 분리하여 유 등 (1992)의 방법에 따라 살균 능력 시험에 사용하였다. 혈청의 분리 및 보존은 혈청 lysozyme의 방법과 동일하게 하였으며, 비동화 시키지 않은 신선 혈청을 사용하였다. 살균능의 변화 정도를 알기 위하여 시험균인 *Escherichia coli* (ATCC 25922)를 TSA에 27°C에서 24시간 배양하여 준비하였다. 혈청은 gelatin veronal buffer (GVB²⁺)에 1:4로 희석하였으며, *E. coli*는 멸균 생리식염수를 이용하여 1 μ g/mL로 맞춘 후 혈청 희석액과 1:1로 혼합하였다. 이 혼합액을 25°C로 교반 배양기에서 반응시키면서 0, 1, 3, 6 및 12시간 경과할 때마다 단계 희석하여 Miles and Misra (1938)에 따라 생존수를 계수하였다.

혈액 세포 수 변화 조사

혈액 중에 있는 각종 혈액 세포의 수적 변화는 마늘 추출물 및 마늘 착즙액의 투여 후 2일째에 시험구 별로 3마리씩 잡아낸 시험어에서 채혈한 혈액을 도말 표본법으로 조사하였다. 즉, 미부 정맥에서 채혈한 혈액을 곧 바로 2장의 슬라이드 글라스에 현적 도말하였다. 도말 표본은 May-grunwald Giemsa 염색법으로 염색한 후 광학 현미경 하에서 적혈구 5,000 세포 당 림프구

수와 호중구 수의 변화를 조사하였다.

Superoxide dismutase (SOD) activity 조사

시험구별로 마늘 추출물 또는 마늘 착즙액을 투여한 후 2일째에 임의로 잡아낸 3마리의 시험어 미부정맥에서 각각 채혈하여 얻은 혈액, 신장과 간 조직을 대상으로 SOD Assay Kit-WST (Dojindo, Japan)를 이용하여 SOD activity를 측정하였다. SOD 활성은 대조구인 평균 증류수의 water-soluble tetrazolium salt가 감소한 값에 각 sample의 water-soluble tetrazolium salt가 감소한 값을 뺀 후 대조구가 감소한 값을 나누어 백분율로 나타내었다.

신장 대식세포 Nitroblue-tetrazolium (NBT) 환원 시험

마늘 추출물 및 착즙액을 투여한 시험구에서 임의로 잡아낸 넙치의 미부 정맥에서 채혈하여 가능한 한 순환 혈액을 제거한 뒤 복강을 해부하여 두신을 무균적으로 분리하였다. 이것을 2% penicillin/streptomycin (Difco, France)과 1% heparin이 함유된 L-15 medium (Sigma, USA)을 소량 분주한 소형 disposable petridish에서 nylon mesh에 통과시킨 세포 현탁액을 준비하였다. 이 세포 현탁액을 34-51% percoll 용액이 들어있는 시험관에 조심스럽게 중층시킨 후 600×g에서 30분간 원심 분리하여 백혈구를 분리하였다. 분리된 백혈구는 2% fetal bovine serum (FBS, Sigma)이 함유된 L-15 medium으로 3회 세척한 다음 0.1% FBS에 세포를 재현탁하여 0.1% trypan blue에서 viability를 관찰한 후 1×10^6 cells/ml의 농도로 조정하였다. 조정된 세포액을 96-well cell culture plate에 각각 100 μ l 씩 분주한 다음 20°C에서 2시간 부착시킨 후 각 well의 상정액을 조심스럽게 제거하고, 0.1% FBS가 함유된 L-15 medium으로 2회 세척하여 식세포 단층을 만들었다. NBT 환원 시험에 사용되는 자극물은 zymosan (Sigma, USA)을 사용하였다. Zymosan 0.02 g에 FBS 1ml 을 첨가하여 25°C에서 30분간

반응시켰다. 반응시킨 zymosan을 3,000 rpm에 10분간 원심 분리하여 상정액을 제거하였다. 흡소된 zymosan을 L-15 medium으로 2회 세척한 후 상정액을 버리고 NBT (Sigma, USA) 1 mg/L-15 medium ml 로 조정된 NBT 용액을 넣어 총 10 ml 이 되게 하였다. 식세포가 부착된 cell culture plate의 각 well에 blank로는 zymosan이 첨가되지 않은 100 μ l 의 NBT 용액을, 시험 sample에는 zymosan이 첨가된 NBT 용액을 100 μ l 씩 첨가하여 25°C에서 30분 동안 반응시켰다. 반응시킨 후 상정액을 버리고 5% FBS가 첨가된 L-15 medium으로 세척한 다음 100% methanol로 10분간 고정하였다. 고정된 세포를 70% methanol로 2회 세척한 후 건조하여 각 well에 2 M KOH 용액 120 μ l 와 dimethyl sulfoxide (Sigma, USA) 용액 140 μ l 를 첨가한 후 630 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

공격 시험

각 농도의 마늘 추출액 및 마늘 착즙액 투여 2일 후, 시험구별로 *S. iniae*는 1.0×10^6 CFU/ml, *E. tarda*는 1.0×10^4 CFU/ml 농도의 균액을 0.1 ml/fish로 각각 공격 주사하였다. 주사한 시험어의 수는 각 구간별 12 마리씩이었다. 공격 시험의 결과는 2주일간의 누적 폐사율과 상대 생존율 (Relative percent survival, RPS)로 나타내었다.

$$\text{상대생존율} = \left(1 - \frac{\text{시험구의 폐사율}}{\text{대조구의 폐사율}} \right) \times 100$$

통계학적 분석

대조구와 각 시험구 사이의 통계학적 유의성은 Student's *t*-test로 비교하였다 ($p < 0.05$).

결 과

체표 점액 lysozyme 활성 조사

각 농도별 마늘 추출물 주사 및 마늘 착즙액 침

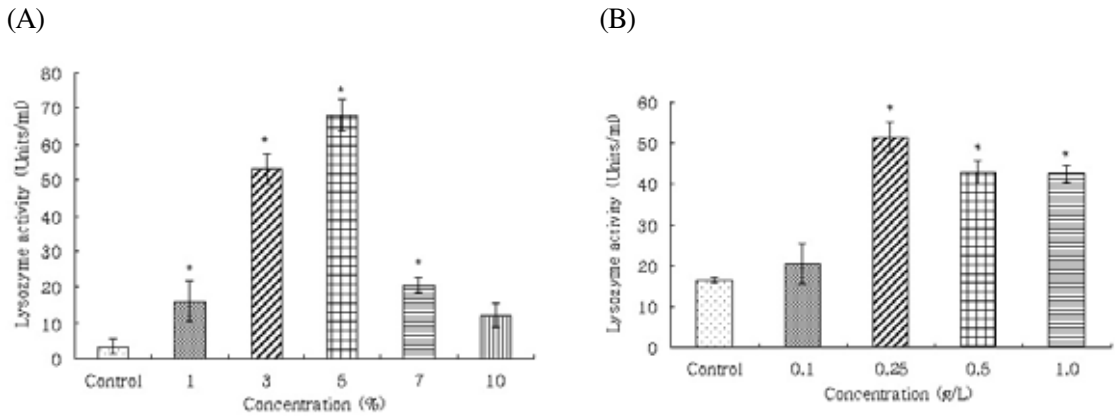


Fig. 1. Changes of lysozyme activity in skin mucus of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intraperitoneally with various concentration (0, 1, 3, 5, 7 and 10%) of physiological saline extracted garlic, *Allium sativum* and immersed in various juice concentration (0, 0.25, 0.5 and 1.0 g/L) of garlic, respectively. *, significant difference from control, $p < 0.05$.

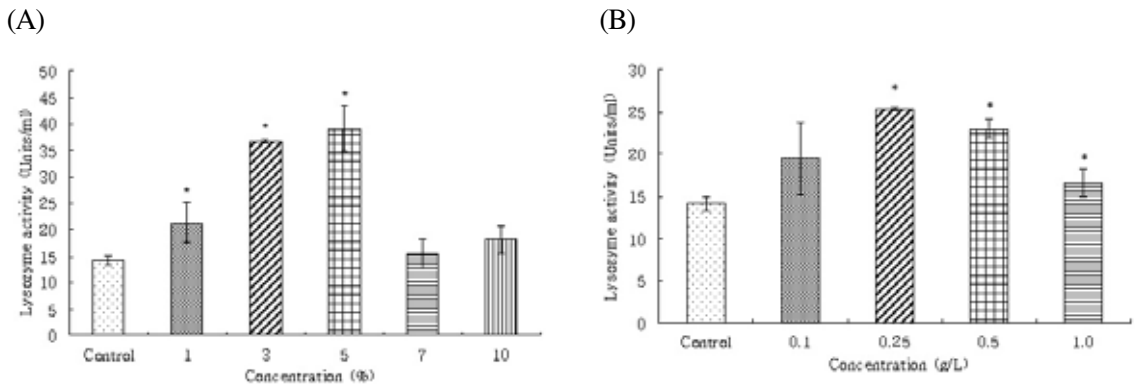


Fig. 2. Changes of lysozyme activity in serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intraperitoneally with various concentration (0, 1, 3, 5, 7 and 10%) of physiological saline extracted garlic, *Allium sativum* (A) and immersed in various juice concentration (0, 0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 g/L) of garlic (B), respectively. *, significant difference from control, $p < 0.05$.

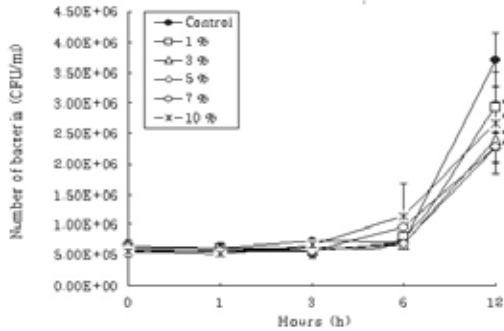
지 시험어의 체표 점액 lysozyme 활성을 조사한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 마늘 추출물 1, 3, 5, 및 7%로 주사한 시험어의 체표 점액 lysozyme 활성 ($16.0 \pm 5.66 \sim 68.0 \pm 4.36 \text{ unit/ml}$)이 대조구 ($3.3 \pm 2.08 \text{ unit/ml}$)에 비해서 유의적인 증가를 나타내었다 ($p < 0.05$). 그 중 5%의 마늘 추출물 주사 시험구 ($68.0 \pm 4.36 \text{ unit/ml}$)에서 가장 높은 체표 점액 lysozyme 활성을 나타내었다. 마늘 착즙액 0.25, 0.5 및 1.0 g/L에 침지한 시험어 체표 점액 lysozyme 활성 ($20.5 \pm 4.95 \sim 51.5 \pm 3.54 \text{ unit/ml}$)이 대조구 ($16.5 \pm 0.71 \text{ unit/ml}$)에 비해서 유의

적인 증가를 나타내었다 ($p < 0.05$). 그 중 0.25 g/L의 마늘 착즙액 침지 시험구에서 가장 높은 체표 점액 lysozyme 활성 ($51.5 \pm 3.54 \text{ unit/ml}$)을 나타내었다.

혈청 lysozyme 활성 조사

각 농도별 마늘 추출물 주사 및 마늘 착즙액 침지 시험어의 혈청 lysozyme 활성을 조사한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 마늘 추출물 1, 3, 및 5%로 주사한 시험어의 혈청 lysozyme의 활성 ($21.4 \pm 3.77 \sim 39.0 \pm 4.24 \text{ unit/ml}$)이 대조구 (14.1

(A)



(B)

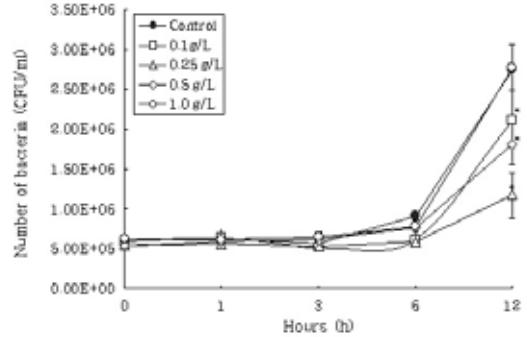
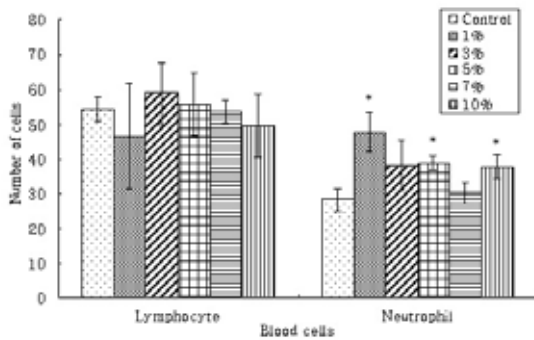


Fig. 3. Changes of bactericidal reaction against *Escherichia coli* ATCC 25922 in serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intraperitoneally with various concentration (0, 1, 3, 5, 7 and 10%) of physiological saline extracted garlic, *Allium sativum* (A) and immersed in various juice concentration (0, 0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 g/L) of garlic (B), respectively. *, significant difference from control, $p < 0.05$.

(A)



(B)

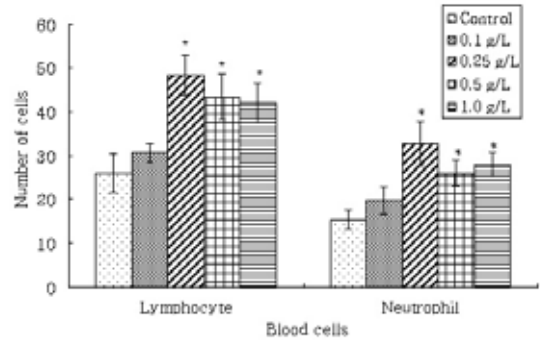


Fig. 4. Changes in number of lymphocytes and neutrophils per 5,000 red blood cells in peripheral blood of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intraperitoneally with various concentration (0, 1, 3, 5, 7 and 10%) of physiological saline extracted garlic, *Allium sativum* (A) and immersed in various juice concentration (0, 0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 g/L) of garlic (B), respectively. *, significant difference from control, $p < 0.05$.

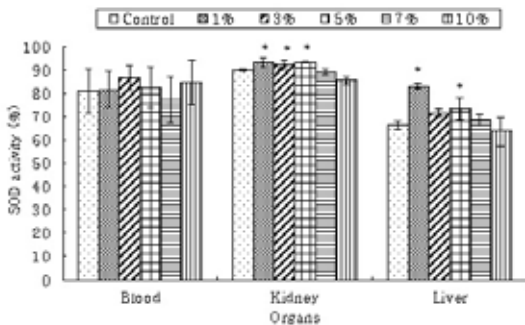
$\pm 0.89 \text{ unit/ml}$)에 비해서 유의적인 증가를 나타내었다 ($p < 0.05$). 그 중 5%의 마늘 추출물 주사 시험구에서 가장 높은 체표 점액 lysozyme 활성 ($39.0 \pm 4.24 \text{ unit/ml}$)을 나타내었다. 마늘 착즙액 0.25, 0.5 및 1.0 g/L에 침지한 시험구의 혈청 lysozyme 활성 ($16.6 \pm 1.59 \sim 25.4 \pm 0.18 \text{ unit/ml}$)이 대조구 ($14.1 \pm 0.88 \text{ unit/ml}$)에 비해서 유의적인 증가를 나타내었다 ($p < 0.05$). 그 중 0.25 g/L의 마늘 착즙액 침지 시험구에서 가장 높은 혈

청 lysozyme 활성 ($25.4 \pm 0.18 \text{ unit/ml}$)을 나타내었다.

혈청의 살균 능력 시험

각 농도별 마늘 추출물 주사 및 마늘 착즙액 침지 시험어의 혈청의 살균 능력을 조사한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 추출물 복강 투여구에서는 0, 1, 3 및 6시간까지의 시험구는 대조구와 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 12

(A)



(B)

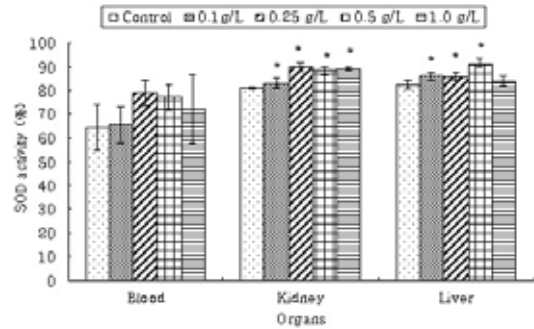


Fig. 5. SOD activity of blood, kidney and liver of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intraperitoneally with various concentration (0, 1, 3, 5, 7 and 10%) of physiological saline extracted garlic, *Allium sativum* (A) and immersed in various juice concentration (0, 0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 g/L) of garlic (B), respectively. *, significant difference from control, $p < 0.05$.

시간에서는 3, 5, 7 및 10% 투여한 시험구에서 대조구에 비하여 유의적인 감소를 나타내었다 ($p < 0.05$). 착즙액 침지구에서는 0, 1, 3 및 6시간에서는 대조구와 비교하여 각 구간별 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 12시간에서는 0.1, 0.25 및 0.5 g/L의 농도에 침지한 시험구에서 대조구와 비교하여 유의적인 감소를 나타내었다 ($p < 0.05$).

혈액 내 세포 수 변화 조사

각 농도별 마늘 추출물 주사 및 착즙액 침지 시험어의 순환 혈액 내에 출현하는 림프구와 호중구의 수를 조사한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 추출물 복강 투여구에서의 림프구 수는 추출물 투여 후 각 시험구마다 유의적인 차이는 없었다. 그러나 호중구의 수에서 1, 5 및 10%의 추출물 투여구 ($37.7 \pm 3.51 \sim 47.7 \pm 5.50$)가 대조구 (28.3 ± 3.21)에 비해서 유의적인 증가를 나타내었다 ($p < 0.05$). 그 중 1%의 마늘 추출물 투여구 (47.7 ± 5.50)가 대조구와 비교해서 가장 높은 증가를 나타내었다. 착즙액 침지구에서는 림프구와 호중구의 수는 착즙액 0.25, 0.5 및 1.0 g/L에 침지한 시험구 ($42.0 \pm 4.58 \sim 48.3 \pm 4.51$ 와 $26.0 \pm 3.00 \sim 32.7 \pm 5.03$)가 대조구 (26.0 ± 4.58

와 15.3 ± 2.08)와 비교하여 유의적인 증가를 나타내었다 ($p < 0.05$). 그 중 0.25 g/L의 마늘 착즙액 침지 시험구에서 림프구 (48.3 ± 4.51)와 호중구 (32.7 ± 5.03)의 수가 가장 크게 증가하였다.

SOD activity 조사

각 농도별 마늘 추출물 복강 투여 및 착즙액 침지 시험어의 혈액, 신장 및 간의 SOD activity를 조사한 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 추출물 투여구에서는 혈액에서 각 농도별 시험구의 SOD 활성이 유의적인 증가를 나타내지 않았으나 신장에서는 1, 3 및 5% 시험구에서 대조구와 비교하여 SOD 활성이 유의적으로 증가하였고, 1% 시험구에서 가장 높은 유의적인 증가를 나타내었다 ($p < 0.05$). 간에서는 1 및 3% 시험구에서 대조구와 비교하여 SOD 활성이 유의적인 증가를 나타내었으며 1% 시험구에서 가장 높은 유의적 증가가 관찰되었다 ($p < 0.05$). 착즙액 침지구의 혈액에서는 각 농도별 구간에서 SOD 활성의 유의적인 증가를 나타내지 않았으나, 신장에서는 0.1, 0.25, 0.5 및 1.0 g/L 침지 시험구 모두 SOD 활성이 대조구와 비교하여 유의적인 증가를 나타내었으며, 0.25 g/L로 침지한 시험구에서 가장 높은 유의적인 증가를 나타내었다

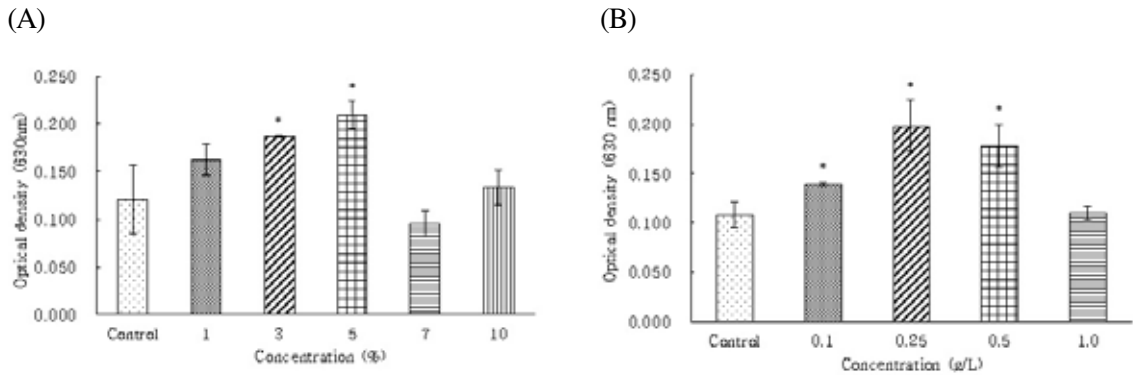


Fig. 6. NBT reduction of phagocytes in head kidney of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intraperitoneally with various concentration (0, 1, 3, 5, 7 and 10%) of physiological saline extracted garlic, *Allium sativum* (A) and immersed in various juice concentration (0, 0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 g/L) of garlic (B), respectively. *, significant difference from control, $p < 0.05$.

($p < 0.05$). 간에서도 0.1, 0.25 및 0.5 g/L 침지 시험구에서 SOD 활성이 대조구와 비교하여 유의적인 증가를 나타내었으며 ($p < 0.05$), 0.5 g/L로 침지한 시험구에서 가장 높은 증가를 나타내었다.

신장 대식세포 NBT 환원 시험

각 농도별 마늘 추출물 복강 투여 및 착즙액 침지 시험어의 신장에서 분리한 대식세포의 NBT 환원량을 조사한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 마늘 추출물 3%와 5%를 투여한 시험어의 신장 대식세포의 NBT 환원량 ($0.187 \pm 0.001 \sim 0.209 \pm 0.015$)이 대조구 (0.120 ± 0.036)에 비해서 유의적인 증가를 나타내었다 ($p < 0.05$). 그 중 5%의 마늘 추출물 투여구에서 가장 높은 신장 대식세포의 NBT 환원량 (0.209 ± 0.015)을 나타내었다. 마늘 착즙액 0.1, 0.25 및 0.5 g/L에 침지한 시험어 신장 대식세포의 NBT 환원량 ($0.139 \pm 0.002 \sim 0.198 \pm 0.026$)은 대조구 (0.108 ± 0.012)에 비해서 유의적인 증가를 나타내었다 ($p < 0.05$). 그 중 0.25 g/L의 마늘 착즙액 침지 시험구에서 가장 높은 신장 대식세포의 NBT 환원량 (0.198 ± 0.026)을 나타내었다.

공격 시험

공격 시험 후 14일간 누적폐사율과 상대생존율을 조사하여 그 결과를 Table 1에 나타내었다. *S. iniae* BS10 균주에 대한 공격 시험 결과, 추출물 복강 투여구에서는 5% 투여구가 착즙액 침지구에서는 0.25 및 0.5 g/L 침지구가 각각 45%와 36%로 가장 높은 상대생존율을 나타내었고, 누적폐사율은 각각 50%와 58%로 가장 낮게 나타났다. *E. tarda* KE-1 균주에 대한 공격 시험 결과, 추출물 복강 투여구에서는 5% 투여구가 착즙액 침지구에서는 0.25 g/L 침지구가 각각 55%와 50%로 가장 높은 상대생존율을 나타내었고, 누적폐사율은 두 시험구 모두 42%로 가장 낮게 나타났다.

고 찰

어류의 lysozyme은 점액, 혈청 등에 들어있으며 macrophage와 호중구가 주된 생산 세포로 알려져 있다 (Murray and Fletcher, 1976). 이 효소는 Gram 양성 및 음성균에 작용하여 용균하는 능력을 가지고 있는 염기성의 단백 효소로서 그람 음성균에 대한 항체와 보체의 작용을 증강시켜

준다. 김 등 (1992)은 넙치의 lysozyme이 *M. lysodeikticus* 이외에도 *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus epidermidis*에 대하여 높은 정균 효과를 나타내었다고 보고하였다. *Eclipta alba* leaf를 틸라피아에 경구 투여하였을 때 혈청 lysozyme의 활성이 높아진 보고가 있으며 (Christybapita *et al.*, 2007), *Solanum trilobatum* leaf 추출물을 틸라피아에 복강 주사하였을 때에도 lysozyme 활성이 높아졌다는 보고가 있다 (Divyagnaneswari *et al.*, 2007). 0.5%의 levan을 잉어에 경구 투여하였을 때 혈청 lysozyme이 대조구에 비해 1.56 배 증가한다는 보고도 있다 (Dina *et al.*, 2007). 본 연구에서 넙치의 체표 점액 및 혈청 lysozyme 활성이 마늘 추출물을 주사하였을 때에 1, 3, 5 및 7%의 시험구에서, 마늘 착즙액을 침지하였을 때에 0.25, 0.5 및 1.0 g/L의 모든 시험구에서 대조구에 비해 활성이 높았음을 알 수 있었다. 본 실험에 사용한 마늘 추출물과 다른 면역 증강제와의 직

접적인 비교는 할 수 없지만, 다른 면역 증강제와 유사하게 마늘 추출물을 주사하였을 때와 마늘 착즙액에 침지하였을 때 lysozyme의 활성이 증가하였으며, 이는 호중구의 수가 증가하는 현상과 관련시켜볼 때 마늘 성분에 의한 자극 효과로 생각한다.

본 연구에서 *E. coli*에 대한 살균 반응을 지표로 혈청의 살균능을 조사한 결과, 마늘 추출물 3, 5, 7 및 10%를 복강 주사한 시험구가 대조구에 비해 유의적인 증가를 나타내었고 ($p < 0.05$), 마늘 착즙액 침지 시험구에서는 0.1, 0.25 및 0.5 g/L 시험구가 대조구에 비해 효과가 좋은 것으로 나타났다. Tetrapetide의 일종인 tuftsin을 indian major carp (*Labeo rohita*)에 경구 투여하였을 때 혈청의 살균능이 높았으며 (Misra *et al.*, 2006a), β -glucan을 indian major carp fingerling에 복강 주사하였을 때에도 혈청의 살균능이 높게 나타났다 (Misra *et al.*, 2006b). 그러나, 본 실험 결과에서 12시간째에는 모든 시험구의 세균 수

Table 1. Cumulative mortality and relative percent of survival (RPS) of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intraperitoneally and immersed with various concentration of physiological saline extracted garlic, *Allium sativum* 2 days after following intraperitoneal injection with *Streptococcus iniae* BS10 and *Edwardsiella tarda* KE-1, for 14 days

	<i>Streptococcus iniae</i> BS10			<i>Edwardsiella tarda</i> KE-1		
	Group	Cumulative mortality (%)	RPS (%)	Group	Cumulative mortality (%)	RPS (%)
Injection	1%	83	9	1%	75	18
	3%	58	36	3%	58	36
	5%	50	45	5%	42	55
	7%	83	9	7%	75	18
	10%	83	9	10%	92	0
	Control	92	-	Control	92	-
Immersion	0.1 g/L	83	9	0.1 g/L	83	0
	0.25 g/L	58	36	0.25 g/L	42	50
	0.5 g/L	58	36	0.5 g/L	50	40
	1.0 g/L	75	18	1.0 g/L	58	30
	Control	92	-	Control	83	-

가 6시간째와 비교하였을 때 급격하게 세균 수가 증가하는 현상이 나타나 이전 연구 결과들과는 차이가 있었다. 면역 증강 물질과 어종이 달라 직접적인 비교는 어려우나, 넙치에서는 혈청 내 살균능이 살균 작용보다는 정균 작용에 가까운 것으로 판단된다.

본 연구에서 수행된 혈액세포의 변화를 보면 마늘 추출물을 주사하였을 때에 림프구 수가 대조구와 비교하여 유의적인 증가를 보이지 않았다. 그러나 호중구 수에서는 1, 5 및 10%의 마늘 추출물을 복강 투여하였을 때 대조구와 비교하여 유의적인 증가를 나타내었다 ($p < 0.05$). 마늘 착즙액에 침지하였을 때에는 림프구와 호중구 수를 대조구와 비교하였을 때 0.25, 0.5 및 1.0 g/L 시험구에서 모두 유의적인 증가를 나타내었다 ($p < 0.05$). 마늘 추출물을 주사하거나 마늘 착즙액을 침지하였을 때 대체적으로 호중구의 수가 증가함을 알 수 있었다.

본 연구에서 마늘 추출물 5% 주사 시험구에서 그리고 0.25 g/L를 침지한 시험구에서 각각 가장 높은 NBT 환원능의 유의적인 증가가 확인되었다 ($p < 0.05$). Glucan을 turbot (*Scophthalmus maximus*)과 gilthead seabream (*Sparus aurata*)에 투여하거나 (Couso *et al.*, 2001), levan을 투여 (Rairakhwada *et al.*, 2007)하였을 때에도 높은 NBT 환원능을 나타내었다. 또한 복어 (*Takifugu rubripes*)에 L-ascorbyl-2-monophosphate를 투여하였을 때 대조구에 비해 높은 NBT 환원능을 나타내었다 (Eo & Lee, 2008). 어류의 종과 투여한 면역 증강제의 종류는 다르지만 면역 증강제를 투여하였을 때 NBT 환원능이 증가하였고, 마늘 추출물을 복강 투여하거나 마늘 착즙액을 침지하였을 때 NBT 환원능이 대조구에 비해 높게 나타난 것으로 보아 마늘 성분이 넙치의 호흡폭발 활성화에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다.

본 연구에서 마늘 추출물을 주사한 뒤 혈액, 신장, 간의 SOD 활성을 조사한 결과 혈액에서는 마늘 추출물을 3% 주사하였을 때, 신장과 간에서는 시험구 모두에서 SOD activity의 유의적

인 증가를 나타내었다 ($p < 0.05$). 마늘 착즙액 침지 시험구에서는 모든 시험구의 신장과 0.25 g/L와 0.5 g/L 시험구의 간에서 유의적인 증가를 나타내었다 ($p < 0.05$). Grouper (*Epinephelus coioides*)에 sodium alginate를 경구 투여하였을 때, respiratory bursts와 SOD 활성이 증가하였고 (Yeh *et al.*, 2008), 홍다리얼룩새우 (*Penaeus monodon*)에 β -glucan을 경구 투여하였을 때 SOD 활성이 높았으며 WSSV에 대한 폐사율이 낮았다는 보고가 있다 (Chang *et al.*, 2003). Superoxide anion이 항상 호흡 폭발에 의해서만 발생하는 것이 아니라 여러 다른 대사 작용에서도 발생하며, SOD 활성에 의해서 macrophage의 호흡 폭발을 측정하는 CL response의 결과가 다양하게 나오기 때문에 CL response에서 소실되는 superoxide anion 양까지 알 수 있는 SOD 활성의 측정은 중요하다 (Ordas *et al.*, 2000). 본 연구에서는 superoxide anion의 생성량과 SOD 활성 사이의 상관관계를 비교해보면 NBT 활성이 대조구에 비해 유의적으로 증가한 시험구와 신장에서 대조구와 비해 유의적인 증가를 나타낸 SOD 활성이 일치하였다. 다른 면역 증강제를 투여하였을 때 SOD 활성이 증가하는 것과 유사한 결과를 나타내었으며, 이는 SOD 활성 증가로 어체의 산화 스트레스를 완화시켜 준다고 생각한다.

공격 시험에서는 마늘 추출물을 5% 주사한 후 *S. iniae* BS10과 *E. tarda* KE-1로 공격 주사한 시험구의 상대생존율이 각각 45%와 55%로 가장 높았다. 마늘 착즙액 침지 후 *S. iniae* BS10와 *E. tarda* KE-1을 공격 시험 하였을 때 각각 0.25 g/L와 0.5 g/L, 0.25 g/L 침지 시험구의 상대생존율이 각각 36%와 50%로 가장 높았다. Indian major carp에 *Solanum trilobatum* leaf 열수 추출물 400 mg/kg을 복강 주사하였을 때 *A. hydrophila*에 대해 상대 생존율이 70.84%로 나타났으며 (Divyagnaneswari *et al.*, 2007), Tilapia에 *Eclipta alba* leaf 열수 추출물 0.1%를 2주간 경구 투여하였을 때 75%의 상대 생존율을 나타내었다 (Christybapita *et al.*, 2007). 0.5%의 levan을 잉어

에 경구 투여 하였을 때에도 *A. hydrophila*에 대해서 100% 생존율을 나타내었으며 (Dina *et al.*, 2007), tuftsin을 고농도로 4회 주사 하였을 때 *A. hydrophila*와 *E. tarda*에 대해서 저항력이 높게 나타난 보고가 있다 (Misra *et al.*, 2006a). 마늘을 경골어류에 투여한 연구는 많지 않아 직접적인 비교는 어렵지만 투여한 각 면역 증강제의 면역 증강 패턴과 폐사율의 감소가 본 연구의 결과와 유사하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 마늘 추출물이 대조구에 비하여 높은 방어력을 나타냄으로써 생리활성 물질의 유용성을 밝힐 수 있었다. 마늘 추출물을 주사하거나 마늘 착즙액을 침지 했을 때 호중구를 자극하여 lysozyme 활성이 증가함을 알 수 있었다. 혈청 내 살균능은 12시간째 대조구에 비해 유의적인 증가를 나타내었으나 6시간째보다 증가하는 경향을 보여 혈청 내 물질이 살균 효과보다는 정균 효과가 있을 것으로 생각한다. 또한 NBT 환원능의 증가와 면역 관련 효소 중 하나인 SOD 활성이 신장에서 활성화되는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 마늘이 어류에 미치는 생리학적 영향을 조사해보지는 못 하였지만 투여 간격, 횟수 및 투여 시기에 따라 마늘이 어류에 미치는 영향이 각기 다를 것으로 생각하며, 마늘 추출물의 적정 투여 조건과 방법에 대하여 더 연구할 필요가 있을 것으로 사료된다. 또한 Sprague-Dawley rats에 50 mg/kg (weight)의 농도로 복강 투여시 폐와 간 조직의 손상이 보고 (Alnaqeeb *et al.*, 1996)되어 있어 적정 농도를 잘 준수하여야 할 것이다.

요 약

본 연구에서는 마늘 추출물과 착즙액이 낚치의 비특이적 면역력에 미치는 영향과 투여 방법에 따른 효과를 밝히고자 하였다. 마늘 추출물의 투여는 복강 주사법을, 마늘 착즙액은 침지법을 사용하였다. 마늘 착즙액 침지법은 일정 농도의 착즙액을 해수에 현탁하여 2일 간격으로 3회 침

지하였다. 병원균의 공격 시험은 시험어에 마늘 추출물의 일정량을 2일 간격으로 3회 주사한 지 2일 후에 실시하였다. 그 결과, 마늘 추출물의 복강 주사 시험구 중 5% 투여구에서 lysozyme의 활성이 가장 유의적인 증가를 나타내었다. 호중구의 수는 1, 5 및 10%를 주사하였을 때 유의적인 증가를 보였다 ($p < 0.05$). SOD activity는 신장에서는 1, 3 및 5% 시험구에서, 간에서는 1 및 5% 시험구가 대조구에 비해 유의적인 증가를 나타내었다 ($p < 0.05$). NBT 환원 시험은 3 및 5% 시험구에서 높은 NBT 환원량을 나타내었다. 마늘 착즙액의 침지 시험에서는 0.25 g/L 시험구에서 체표 점액 lysozyme 활성과 혈청 lysozyme 활성이 가장 높은 유의적인 증가를 하였다. 림프구와 호중구의 수는 0.25, 0.5 및 1.0 g/L 시험구에서 대조구에 비해 유의적인 증가를 보였다 ($p < 0.05$). SOD activity는 신장에서는 모든 시험구에서, 간에서는 0.1, 0.25 및 0.5 g/L 시험구에서 대조구에 비해 유의적인 증가를 나타내었다 ($p < 0.05$). NBT 환원 시험은 0.1, 0.25 및 0.5% 시험구에서 대조구와 비교하여 유의적인 증가를 나타내었다 ($p < 0.05$). 시험구의 생존율은 *S. iniae* BS10과 *E. tarda* KE-1의 공격에 대하여 5% 마늘 추출물 복강 투여와 0.25 g/L 마늘 착즙액 침지 시험구의 상대생존율이 가장 높았다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 마늘 추출물과 착즙액이 낚치에 면역능 향상과 어류 질병에 저항성 증강에 효과가 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 국립수산물품질관리원 (수산물품질병모니터링 및 진단연구, RP-2010-AQ-010)의 지원에 의해 운영되었습니다.

참 고 문 헌

Alnaqeeb, M.A., Thomson, M., Bordia, T. and Ali, M.: Histopathological effects of garlic on

- liver and lung of rats. *Toxicol. Lett.* 85:157-164, 1996.
- Aoki, T.: Present and future problems concerning the development of drug resistance in Aquaculture, In *Chemotherapy in Aquaculture : From Theory to Reality*, Office International Des Epizooties. pp.254-262, Paris, France, 1992.
- Cavallito, C.J., Buck, S.J. and Suter, C.M.: Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *J. Am. Chem. Soc.*, 66:1950-1951, 1944.
- Cavallito, C.J. and Bailey, J.H.: Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. II. Determination of the chemical structure. *J. Am. Chem. Soc.*, 66:1952-1954, 1944.
- Chang, C.F., Su, M.S., Chen, H.Y. and Liao, I.C.: Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.*, 15:297-310, 2003.
- Chen, D. and Ainsworth, A.J.: Glucan administration potentiates immune defense mechanism of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish Dis.*, 15:295-304, 1992.
- Choi, M.S., Park, S.W. and Park, K.H.: Effect of red ginseng extract on immune function of israeli carp, *Cyprinus carpio*. *J. Fish Pathol.*, 18:277-285, 2005.
- Chrisyapita, D., Divyagnaneswari, M. and Dinakaran, M.R.: Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 23:840-852, 2007.
- Couso, N., Castro, R., Noya, M., Obach, A. and Lamas, J.: Location of superoxide production sites in turbot neutrophils and gilthead seabream acidophilic granulocytes during phagocytosis of glucan particles. *Develop. Comp. Immunol.*, 25:607-618, 2001.
- Delaha, E.C. and Garagusi, V.F.: Inhibition of mycobacteria by garlic extract (*Allium sativum*). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 27:485-486, 1985.
- Dina, A.K., Bhatena, Z.P., Sahu, N.P, Jha, A. and Mukherjee, S.C.: Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish Shellfish Immunol.*, 22:477-486, 2007.
- Divyagnaneswari, M., Christyapita, D. and Dinakaran, M.R.: Enhancement of nonspecific immunity and disease resistance in *Oreochromis mossambicus* by *Solanum trilobatum* leaf fractions. *Fish Shellfish Immunol.*, 23:249-259, 2007.
- Ellis, A.E.: Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 9:291-308, 1999.
- Engstad, R.E., Robertson, B. and Frivold, E.: Yeast glucan induce increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish Shellfish Immunol.*, 2:287-297, 1992.
- Eo, J and L. K.J.: Effect of dietary ascorbic acid on growth and non-specific immune responses of tiger puffer, *Takifugu rubripes*. *Fish Shellfish Immunol.*, 25:611-616, 2008.
- Ghannoum, M.A.: Studies on the anticandidal mode of action of *Allium sativum* (garlic). *J. Gen. Microbiol.*, 134:2917-2924, 1988.
- Grondel, J.L., Nouws, J.F.M., DeJong M., Schutte, A.R., and Driessens, F.: Pharmacokinetics and tissue distribution of oxytetracycline in carp, *Cyprinus carpio* L., following different routes of administration. *J. Fish Dis.*,

- 10:153-163, 1987.
- Hong, Y.S., Ham, Y.A., Choi, J.H., and Kim, J.: Effects of allylsulfur compounds and garlic extract on the expression of Bcl-2, Bax, and p53 in non small cell lung cancer cell lines. *Exp. Mol. Med.*, 32:127-134, 2000.
- Jørgensen, J.B., Lunde, H. and Robertsen, B.: Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 16:313-325, 1993a.
- 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, 1993b.
- Jung, S.H., Lee, J.S., Han, H.K., Jun, C.Y. and Lee, H.Y.: Effects of medical herb extract on non specific immune response, haematology and disease resistance on Olive flounder, *Paralichthys olivaceus* by oral administration. *J. F. Pathol.*, 15:25-35, 2002.
- Kajita, Y., Sakai, M., Kobayashi, M. and Kawaushi, H.: Enhancement of non-specific cytotoxic activity of leucocytes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* injected with growth hormone. *Fish Shellfish Immunol.*, 2:155-157, 1992.
- Kawakami, H., Hiratsuka, M. and Dosako, S.: Effects of iron- saturated lactoferrin on iron absorption. *Agric. Biol. Chem.*, 52:903-908, 1998.
- Kitao, T., Yoshida, T., Anderson, D.P., Dixon, O.W. and Blanch, A.: Immunostimulation of antibody-producing cells and humoral antibody to fish bacterins by a biological response modifier. *J. Fish Biol.*, 31:87-91, 1987.
- Kim, K.H., Hwang, Y.J. and Bai, S.C.: Enhancement of chemiluminescent response of phagocytic cells from juvenile Rockfish, *Sebastes schlegeli*, by oral administration of levamisole. *J. Fish Sci. Tech.*, 1:42-47, 1998.
- Kodama, H., Mukamoto, N., Baba, T. and Mule, D.M.: Macrophage-colony stimulating activity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* serum. In: J.S. Stolen and T.C. Fletcher (eds) *Modulators of fish immune responses*, Vol. 1. pp.59-66, SOS Publication, Fair Haven, NJ, 1994.
- Miles, A.A. and Misra S.S.: The estimate of the bacterial power of the blood. *J. Hygiene*, 38:873-885, 1938.
- Misra, C.K., Das, B.K., Mukherjee, S.C. and Meher, P.K.: The immunomodulatory effects of tuftsin on the non-specific immune system of indian major carp, *Labeo rohita*. *Fish Shellfish Immunol.*, 20:728-738, 2006a.
- Misra, C.K., Das, B.K., Mukherjee, S.C. and Pattnaik, P.: Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture*, 255:82-94, 2006b.
- Murray, C.K. and Fletcher, T.C.: The immunohistochemical location of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissue. *J. Fish. Biol.*, 9:329-334, 1976.
- Nakagawa, H., Tsuta, K., Kiuchi, K., Senzaki, H., Tanaka, K. and Hioki, A.: Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. *Carcinogenesis*, 22:891-897, 2001.
- Ordas, M.C., Novoa, B. and Figueras, A.: Modulation of the chemiluminescence response of mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 10:611-622, 2000.
- 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.
- Raa, J., Tørstad, G., Engstad, R. and Robertsen, B.: The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: M. Sharif, R. P. Subasighe and Arthur, J. R. (eds.), Dis. Asian A. Vol. 1. pp.39-50, Fish Health Section, Asian Fish. Soc. Manila, Philippines, 1993.
- Rairakhwada, D., Pal, A.K., Bhatena, Z.P., Sahu, N.P., Jha, A. and Mukherjee, S.C.: Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. Fish Shellfish Immunol., 21:346-356, 2007.
- Sakai, M.: Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture, 172:63-92, 1999.
- Sheen, L.Y., Li, C.K., Sheu, S.F., Meng, R.H.C. and Tsai, S.J.: Effect of the active principle of garlic-diallyl sulfide- on cell viability, detoxification capability and the antioxidation system of primary rat hepatocytes. Food Chem. Toxicol., 34:971-978.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P. and Dixon, O.W.: *In vitro* immunostimulation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spleen cells with lavamisole. Dev. Comp. Immunol., 14:231-237, 1990.
- Soffar, S.A. and Mokhtar, G.M.: Evaluation of the antiparasitic effect of aqueous garlic (*Allium sativum*) extract in Hymenolepiasis nana and giardiasis. J. Egypt. Soc. Parasitol., 21:497-502, 1991.
- Solem, S.T., Jørgensen, J.B. and Robertsen, B.: Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon *Salmo salar* L. macrophages by lipopolysaccharide. Fish Shellfish Immunol., 5:475-491, 1995.
- Takahashi, Y, Itami, T. and Konegawa K.: Enzymatic properties of partially lysozyme from the skin mucus of carp. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 52:1209-1214, 1986.
- Uchida, Y., Takehaski, T. and Sato, N.: The characteristics of the antibacterial activity of garlic. Jpn. J. Antibiot., 28:638-642, 1975.
- Villamil, L., Figueras, A. and Novoa, B.: Immunomodulatory effects of nisin in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Fish Shellfish Immunol., 14:157-69, 2003.
- Wu, C.C., Chung, J.G., Tsai, S.J., Yang, J.H. and Sheen, L.Y.: Differential effects of allyl sulfides from garlic essential oil on cell cycle regulation in human liver tumor cells. Food Chem. Toxicol., 42:1937-1947, 2004.
- Yano, T., Mangindaan, R.E.P. and Matsuyama, H.: Enhancement of the resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by some β -1,3 glucans. Nippon Suisan Gakkaishi, 55:1815-1819, 1991.
- Yeh, S.P., Chang, C.A., Chang, C.Y., Liu, C.H. and Cheng, W.: Dietary sodium alginate administration affects fingerling growth and resistance to Streptococcus sp. and iridovirus, and juvenile non-specific immune responses of the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Fish Shellfish Immunol., 25:19-27, 2008.
- 김진우, 박수일, 전세규: 양식 넙치로부터의 lysozyme 정제와 어류 병원성 세균에 대한 정균 작용. 한국어병학회지, 5:87-92, 1992
- 우승호, 김현정, 이주석, 김진우, 박수일: 해수 양식 어류에서 분리된 연쇄상구균의 종류와 병원성. 한국어병학회지, 19:17-33, 2006.
- 이덕찬, 김이청, 김진우, 박수일: *Edwardsiella tarda* extracellular products (ECPs)의 인위

투여에 따른 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 생체 반응. 한국어병학회지, 18:215-225, 2005.

유병화, 박수일, 전세규: 어류혈청의 보체에 의한

살균 작용. 한국어병학회지, 5:9-18, 1992.

Manuscript Received : February 23, 2010

Revised : April 7, 2010

Accepted : April 12, 2010