

넙치 및 조피볼락 면역 활성화에 대한 사료첨가제로서 갯지렁이 항균펩타이드의 효과

권문경 · 서정수 · 황지연 · 박찬일* · 정지민* · 배진솔*
(국립수산과학원 · **경상대학교)

Effect of the Polychaete Antimicrobial Peptide as feed Additives on Olive Flounder and Black Rockfish Immune Activity

Mun-Gyeong KWON · Jung Soo SEO · Hwang Jee YOUN ·
Chan-Il PARK* · Ji-Min JEONG* · Jin-Sol BAE*

(National Institute of Fisheries Science · *Gyeongsang National University)

Abstract

In this study, the effect of the polychaete antimicrobial peptide as feed additives on fish, olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and black rockfish (*Sebastes schlegelii*), immune activity was described. The antimicrobial peptide of the polychaete was induced by peptidoglycan from *Micrococcus luteus*. The fish were fed an experimental diet supplemented with 0%, 0.05%, 0.1%, 0.5% or 1% of immune induced the polychaete to a commercial diet. Haematological parameters, nonspecific immunes and stress were evaluated 2, 4, 6 and 8 weeks during fed. The resistance against bacteria, *Edwardsiella tarda* and *Streptococcus iniae*, were analysed on after 8 weeks. The haematological parameters were not significantly changed among tested groups. But the lysozyme activities were significantly high in the 0.1% and 0.5% supplement group of olive flounder and black rockfish, respectively. Additionally, cortisol in plasma was low in the 0.1% and 0.5% supplement group of olive flounder and black rockfish, respectively. And resistance of these supplement groups were significantly induced against bacterial injection.

Key words : Polychaete, Antimicrobial peptide, Feed additives, EF feed, Antibiotics

I. 서론

양식 기술이 확립되면서 우리나라의 양식 산업은 급격히 발달하였으며 식량산업으로써의 가치가 높아지고 있다. 하지만 어류 양식장에서의 고밀도 집약적 양식은 어류에 스트레스로 작용하여 많은 질병을 발생시키고 있으며, 특히 양식 넙치

의 경우 수온과 상관없이 연중 다양한 병원체가 혼합감염의 형태로 질병을 일으키고 있다(Cho et al., 2008). 이러한 어류의 질병 치료를 위해 수산용뿐만 아니라 축산용 항생제가 무분별하게 사용되고 있으며 항생제의 오남용에 의한 항생제 내성균의 출현은 양식 어류를 위협하는 심각한 문제로 대두되고 있다(Smith et al., 1994; Lalumera

† Corresponding authors : 055-772-9153, vinus96@hanmail.net

* 이 논문은 2016년도 국립수산과학원(R2016069) 및 경상대학교 갯지렁이를 활용한 사료첨가제용 항균펩타이드 개발 (2015년)의 지원으로 수행된 연구입니다.

et al., 2004). 뿐만 아니라 양식생물의 안전성 및 수산식품의 공중위생학적 안전성에까지 심각한 문제를 야기한다(Karunasagar et al., 1994). 이런 문제들은 소비자의 불신으로까지 이어져 수산물에 대한 소비를 위축시키는 요인이 되고 있으며 (Kim et al., 2010), 그로 인해 최근 많은 국가에서 항생제 사용을 금지하고 있다. European Union (EU)에서는 항생제 사용을 금지하려는 취지에서 최대잔류허용기준(MRL, maximum residue level)을 설정하여 항생제 및 화학약품에 대한 법적인 규제를 더욱 강화하였지만 여전히 수산양식에는 수많은 항생제가 사용되고 있다(Vanbelle, 1989; Avella et al., 2010). 그로 인해 최근 이에 대한 항생제 대체방안으로써 부작용이 없는 천연물질을 사료첨가제로 개발하여 어류의 성장, 사료효율 및 항병력을 향상시키려는 노력이 활발하게 이루어지고 있으며, 다양한 식물 광물, 미생물 또는 이들의 추출물을 각종 어류에 투여하여 사료첨가제로서의 효과를 알아보려는 연구가 진행되고 있다(Kim et al., 2006; Fenandez-Navarro et al., 2008; Li et al., 2008; Ma et al., 2008).

최근 기존의 항생제의 대체물질로서 숙주의 선천방어 기작 중 하나인 항균 펩타이드(AMPs, Antimicrobial peptides)가 많은 관심을 받고 있다. 항균 펩타이드는 포유류에서 곤충, 식물까지 지구상 거의 모든 생물체에 존재하며 다양한 병원성 미생물에 대한 숙주의 일차방어수단으로서 세균과 진균뿐만 아니라 바이러스를 포함한 다양한 병원체에 대하여 항균활성을 가진다고 알려져 있는 천연의 항생제이다(Zasloff, 2002; Patrzykat & Douglas, 2003).

이번 연구는 낚시의 미끼로 많이 이용되는 두토막눈썹참갯지렁이(*Perinereis aibuhitensis*; 이하 갯지렁이)로부터 항균 펩타이드의 생산을 유도하여 사료 첨가제로써의 가능성을 분석하기 위해 수행되었다. 이를 위하여 먼저 갯지렁이의 항균 펩타이드 생성을 유도하기 위한 면역 유도제를 선정하였으며, 선정된 유도제로 면역 유도된 갯

지렁이가 사료에 다양한 비율로 첨가되어 우리나라 주요 양식어종인 넙치(*Paralichthys olivaceus*)와 조피볼락(*Sebastes schlegelii*)에 공급되었을 때, 넙치와 조피볼락의 면역활성 및 에드워드 감염증을 유발하는 *Edwardsiella tarda*와 연쇄구균증을 유발하는 *Streptococcus iniae*에 대한 항병성에 미치는 영향에 대해 연구하였다.

II. 조사방법 및 내용

1. 갯지렁이의 면역유도

실험에 사용된 갯지렁이는 중국 산둥성 동영시 인근에서 수입된 것을 (주)블루오션피아(전남 신안군)에서 구매하였다. 갯지렁이의 체내에서 항균 펩타이드 생성을 유도하기 위한 면역유도제로써 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Methanobacterium sp.*, *Streptomyces sp.*, *Saccharomyces cerevisiae* 유래의 펩티도글리칸(Sigma-Aldrich, MO, USA)과 Shrimp와 Crab유래의 키토산(Sigma-Aldrich, MO, USA)을 이용하였다. 8종의 면역 유도제는 10 ppm이 되도록 해당 용매에 용해시킨 후(<Table 1>), 100 μ l/개체가 되도록 갯지렁이 체내에 3-4군데 분할하여 주사하였다. 각 면역유도제 주사 18시간 후 갯지렁이로부터 절피원심법(1000 rpm, 30분)으로 체액을 추출하였다. 추출된 체액으로부터 TRizol 법(Invitrogen, Carlsbad, USA)으로 total RNA를 분리하였으며, cDNA 합성을 위하여 first-strand cDNA synthesis kit (Takara, Shiga, Japan)를 이용하였다. 갯지렁이 항균 펩타이드의 유도를 확인하기 위하여 SYBR green mater mix (Takara, Shiga, Japan)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 수행하였다. 즉 cDNA template 1 μ l, forward와 reverse primer 각각 1 μ l, SYBR green 12.5 μ l, 멸균증류수 9.5 μ l를 혼합하였으며, 분석에 사용된 primer는 기존에 알려진 갯지렁이 항균 펩타이드인 arenicin-1 (Accession no.

<Table 1> Peptidoglycan and chitosan used in this study

No.	Ingredient	Origin	Solvent
1	peptidoglycan	<i>Bacillus subtilis</i>	PBS
2	peptidoglycan	<i>Methanobacterium</i> sp.	PBS
3	peptidoglycan	<i>Micrococcus luteus</i>	PBS
4	peptidoglycan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PBS
5	peptidoglycan	<i>Staphylococcus aureus</i>	PBS
6	peptidoglycan	<i>Streptomyces</i> sp.	PBS
7	chitosan	Shrimp	0.1 M acetic acid
8	chitosan	Crab	0.1 M acetic acid

Q5SC60)의 염기서열에 기초하여 디자인되었다(F: 5'-GCCAGGGCAAAT CAGTGT-3', R: 5'-GTAAC GCACCAGCACACCT -3'). 증폭조건은 50°C 4분, 95°C 10분간 initial denaturation한 후, 95°C 20초, 60°C 1분을 1회로 하여 45회 반응시켰으며, 95°C 15초, 60°C 30초, 95°C 15초 final dissociation 하였다. 실험의 정확성을 위해 각 실험구 당 3반복 수행하였으며, 유전자의 발현 정도는 2- $\Delta\Delta$ CT method에 의해 계산되었다(Livak & Schmittgen, 2001).

2. 실험물질(면역 유도된 갯지렁이 분말 제조) 및 실험사료

선택된 면역유도제로 위에서 설명한 것과 같은 방법으로 갯지렁이의 면역반응을 유도하였으며, 18시간동안 면역 유도된 갯지렁이는 멸균증류수를 이용하여 3회 세척하여 염분을 제거하였다. 세척된 갯지렁이는 ALPHA 1-2 LD plus (Christ, Germany)와 Vacuum pump RZ 2.5 (Vacuubrand, Germany)에서 48시간 이상 동결 건조하였다. 동결 건조된 갯지렁이는 후드믹서 BL3051 (Tefal, France)을 이용하여 분말화하였다.

실험에 사용된 5가지의 실험사료는 사료 내 주요 단백질원으로 어분과 발효대두박을 공급하였으며, 주요 탄수화물원으로는 소맥분을, 주요 지질원으로는 오징어 간유와 대두유를 공급하였다.

이 때, 면역 유도된 갯지렁이 분말의 사료 내 첨가 효과를 조사하기 위하여 갯지렁이 분말을 첨가하지 않은 무첨가(0%) 사료를 대조구로 사용하였으며, 각 실험구는 갯지렁이 분말을 각각 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1% 첨가한 실험사료로 하였다. 실험사료의 제조를 위하여 각 사료원을 사료 조성표(<Table 2>)에 따라 정량적으로 혼합하여 가공되었다. 제작된 실험사료는 사료공급 전까지 -20°C 냉동고에 보관하였다.

3. 실험어 및 사육관리

실험어로 사용된 넙치[시작시 평균무게 (mean \pm SD): 6.7 \pm 0.4 g]와 조피볼락[시작시 평균무게 (mean \pm SD): 19.2 \pm 0.9 g]은 경남 통영시에 위치한 개인 양식장에서 구입하여 사용하였다. 실험어는 2주간 시판 배합사료를 공급하면서 실험 환경에 순치시킨 후, 총 15개의 250 L 원형 아크릴 수조에 80마리씩 수용하여 사육실험에 이용되었다. 사육수는 여과해수를 이용하여 1.44 L/min의 유수량이 되도록 조절되었고 모든 실험수조에 충분한 포기를 위하여 에어스톤을 설치하였다. 사육기간 동안 수온은 18-24°C 범위로 자연수온에 의존하였다. 실험사료는 1일 2회(09:00, 16:00)로 육안관찰에 의한 반복 공급하였다. 사육실험은 총 8주간 수행되었다.

<Table 2> Formulation and proximate composition of the experimental diets used for this study

Olive flounder	Experimental diets				
	LAP 0	LAP 0.05	LAP 0.1	LAP 0.5	LAP 1
Ingredients (% DM)					
Fish meal ¹	60	60	60	60	60
Fermented soybean meal ²	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
Wheat flour	24	23.95	23.9	23.5	23
Polychaete antimicrobial peptide (LAP) ³	0	0.05	0.1	0.5	1
Squid liver oil	4	4	4	4	4
Soybean oil	2	2	2	2	2
Vitamin premix ⁴	1	1	1	1	1
Mineral premix ⁵	1	1	1	1	1
Choline	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Nutrients (% DM)					
Dry matter	98.0	96.8	95.7	97.4	96.1
Crude protein	49.9	51.0	50.9	50.1	50.1
Crude lipid	10.9	11.1	10.9	10.5	11.7
Ash	10.8	10.7	10.6	10.8	10.7
Black rockfish					
Ingredients (% DM)					
Fish meal ¹	58	58	58	58	58
Fermented soybean meal ²	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5
Wheat flour	25	24.95	24.9	24.5	24
Polychaete antimicrobial peptide (LAP) ³	0	0.05	0.1	0.5	1
Squid liver oil	2	2	2	2	2
Soybean oil	2	2	2	2	2
Vitamin premix ⁴	1	1	1	1	1
Mineral premix ⁵	1	1	1	1	1
Choline	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Nutrients (% DM)					
Dry matter	98.9	98.0	98.5	98.4	98.2
Crude protein	50.2	50.2	50.0	50.0	50.1
Crude lipid	9.7	9.5	9.6	9.6	9.7
Ash	9.1	9.4	9.2	9.1	9.5

¹Fish meal was purchased from Abank Co Ltd. (Seoul, Korea).

²Fermented soybean meal was supplied by CJ CheilJedang Corp. (Seoul, Korea).

³Polychaete antimicrobial peptide (LAP) was made in this study.

⁴Vitamin premix contained the following amount which were diluted in cellulose (g/kg mix): L-ascorbic acid, 121.2; DL- α -tocopheryl acetate, 18.8; thiamin hydrochloride, 2.7; riboflavin, 9.1; pyridoxine hydrochloride, 1.8; niacin, 36.4; Ca-D-pantothenate, 12.7; myo-inositol, 181.8; D-biotin, 0.27; folic acid, 0.68; p-aminobenzoic acid, 18.2; menadione, 1.8; retinyl acetate, 0.73; cholecalciferol, 0.003; cyanocobalamin, 0.003.

⁵Mineral premix contained the following ingredients (g/kg mix): MgSO₄·7H₂O, 80.0; NaH₂PO₄·2H₂O, 370.0; KCl, 130.0; ferric citrate, 40.0; ZnSO₄·7H₂O, 20.0; Ca-lactate, 356.5; CuCl, 0.2; AlCl₃·6H₂O, 0.15; KI, 0.15; Na₂Se₂O₃, 0.01; MnSO₄·H₂O, 2.0; CoCl₂·6H₂O, 1.0.

4. 샘플수집 및 분석

8주간의 사육기간 중 2, 4, 6, 8주차에 각 수조에서 무작위로 3마리의 실험어를 선별하여 미부

정맥으로부터 채혈하였다. 채혈된 혈액은 7000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였으며, 분리된 혈청은 혈액 생화학적 성분 분

석, 라이소자임(lysozyme) 활성 분석 및 코르티졸(cortisol) 분석에 이용되었다.

실험어의 혈액 생화학적 성분분석을 위하여 혈액자동분석기 DRI-CHEM 4000i (Fujifilm, Japan)와 FUJI DRI-CHEM slide (Fujifilm, Japan)를 사용하여 혈당(GLU, glucose), GOT (glutamate oxalacetate transaminase), GPT (glutamate pyruvate transaminase), 총콜레스테롤(TCHO, total cholesterol) 농도를 분석하였다.

라이소자임 활성은 Lange et al.(2001)의 방법에 따라 측정하였다. *Microrococcus lysodeikticus* (0.4 mg/ml) 현탁액 50 μ l와 혈청 50 μ l를 혼합하여 25°C에서 0-60분 동안 5분마다 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 라이소자임 활성은 units/ml로 나타내었으며, 1 unit은 흡광도 값이 0.001/min 감소한 값으로 표시하였다.

혈청 내 코르티졸 농도 조사는 Cortisol EIA kit (Oxford Biomedical Research, Rochester Hills, USA)를 이용하여 수행되었다. 즉 혈청으로부터 코르티졸을 추출하기 위하여 Ethyl ether로 전처리를 하였으며 Extraction buffer를 이용하여 최종 농도가 100 ng/ml가 되도록 추출하였다. 추출된 샘플 50 μ l와 Cortisol-HRP conjugate 50 μ l를 96-well plate상에서 혼합하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, wash buffer 300 μ l/well로 5회 세척하였다. TMB 기질을 각 well에 150 μ l씩 첨가하여 상온에서 30분간 반응 후 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. 코르티졸 농도는 제공되는 standard curve를 참고하여 계산하였다.

5. 세균 공격 실험

면역 유도된 갯지렁이 분말이 첨가된 사료를 8주간 급여한 후 병원성 세균에 대한 실험어의 항병력을 조사하기 위하여, 사육 8주 후 대조구와 각 실험구의 넙치에 *E. tarda*를 조피볼락에는 *S. iniae*를 인위 감염시켰다. 즉 시험 균주 *E. tarda*와 *S. iniae*는 BHI (Brain Heart Infusion) broth에서

27°C, 24시간 배양한 후 집균하여, 멸균생리식염수로 5×10^5 cfu/ml이 되도록 현탁시켜 실험어에 100 μ l/fish 복강 주사하였다. 병원체 인위 감염 후에는 10일간 누적폐사율을 확인하였다.

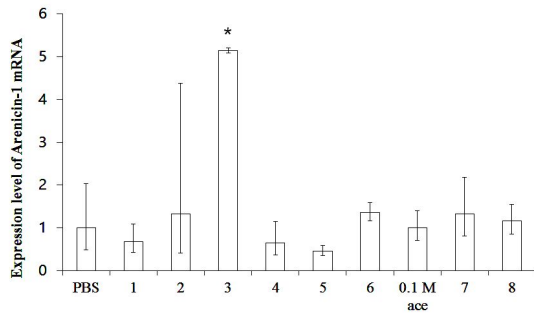
6. 통계 분석

모든 결과값은 평균값 \pm 표준편차로 나타내었다. 통계적 분석은 SPSS program ver. 18로 one-way ANOVA-test와 Duncan' multiple range test를 실시하여 $p < 0.05$ 일 때, 유의적 차이가 있는 것으로 간주하였다(*).

III. 결과 및 고찰

갯지렁이 체내의 항균 펩타이드를 유도하는데 있어서 최적의 면역 유도제를 선정하기 위하여 6종의 peptidoglycan과 2종의 chitosan을 갯지렁이 체내에 주사하였다. 각 면역 유도제 주사 18시간 후에 갯지렁이로부터 체액을 추출하여 이전에 보고된 갯지렁이 항균 펩타이드인 arenicin-1 mRNA 발현을 분석하였다. 그 결과 *M. luteus* 유래의 peptidoglycan으로 면역 유도하였을 때 대조구(PBS)와 비교하여 5.15배로 유의적으로 높은 arenicin-1의 발현이 유도되었으며 그 외 다른 면역 유도제를 주사한 갯지렁이에서는 대조구와 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다([Fig. 1]). 따라서 사육실험에 사용될 갯지렁이 분말은 *M. luteus* 유래의 peptidoglycan으로 면역 유도한 갯지렁이를 분말화 하여 사용하였다.

8주간 면역 유도된 갯지렁이 분말이 첨가된 사료를 공급받은 넙치와 조피볼락의 혈청화학성분으로써 혈당, 2종의 트랜스아미나제 및 총콜레스테롤을 2주마다 총 4회 분석하였다(<Table 3, 4>). Kang et al.(2004)는 혈당(GLU)의 안정값이 2.71 - 2.86 g/dl으로 제시하였으며 이번 연구에서는 GLU가 모두 안정값보다 높게 나타났다.



[Fig. 1] The expression of Arenicin-1 mRNA from polychaete after immune-induction by peptidogycans and chitosans. (*, $p < 0.05$)

또한 GOT와 GPT는 생체 내에서 중요한 당, 지질, 단백질 대사에 관여하는 효소로서 어체의 생리상태가 나빠질수록 혈중 농도가 증가하는 것으로 보고되었다(Gordon, 1968; Davis & Parker, 1990). 이번 연구에서 모든 실험구의 GOT와 GPT가 대조구(무첨가구)와 비교하여 유의적인 차이

를 보이지 않았다. 그러므로 면역 유도된 갯지렁이 분말이 첨가된 사료를 급여하는 것은 실험어의 혈장화학성분 변화에 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다.

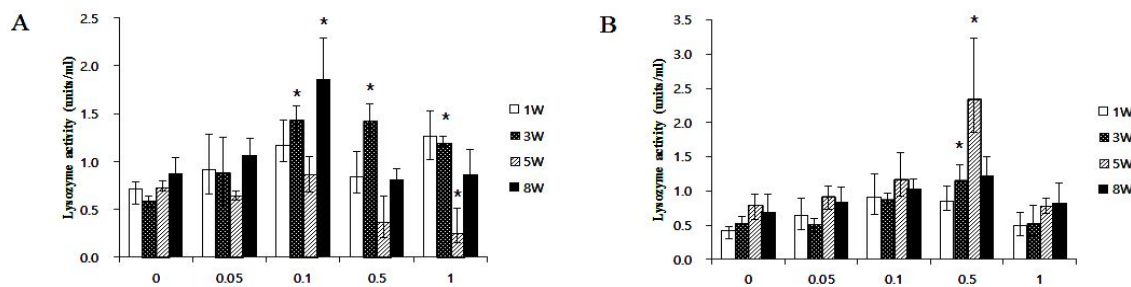
어류 혈청 내의 라이소자임은 세균 세포벽의 삼투압 작용에 손상을 주어 용균시키며 많은 어류에서 정균효과가 있다고 알려져 있다(Grinde, 1989). 이번 연구에서는 면역 유도된 갯지렁이 분말이 첨가된 사료를 급여하였을 때 실험어의 라이소자임 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. 넙치의 경우([Fig. 2-A]) 0.1%, 0.5%, 1%의 실험구에서 사료 급여 후 3주차에 각각 라이소자임 활성이 1.16, 1.16, 1.20으로 대조구(0.59)와 비교하여 유의적인 차이를 보였으며, 특히 0.1%의 실험구에서는 8주차(1.86)에서도 유의적으로 높을 활성을 유지하였다. 반면 1%의 첨가구에서는 5주차에 0.26으로 오히려 대조구와 비교하여 유의적으로 낮은 라이소자임 활성을 나타내었다.

<Table 3> Blood chemistry of olive flounder fed polychaete antimicrobial peptide supplemented feeds

	LAP 0	LAP 0.05	LAP 0.1	LAP 0.5	LAP 1
GLU					
1 W	2.8±0.6	2.8±0.6	3.0±0.5	2.8±0.4	3.2±0.6
3 W	4.0±0.7	3.8±0.4	3.1±0.3	3.8±0.7	3.4±0.5
5 W	3.6±0.5	4.2±0.7	3.6±0.5	3.8±0.7	3.8±0.4
8 W	3.3±0.5	3.5±0.5	3.9±0.6	3.2±0.4	3.6±0.5
GPT					
1 W	6.5±1.1	7.0±1.6	7.3±1.4	7.1±1.8	6.9±1.4
3 W	5.4±0.5	5.3±0.5	6.1±0.6	5.2±1.1	5.4±1.0
5 W	5.8±1.0	5.5±0.5	5.8±0.6	5.0±0.8	6.4±0.5
8 W	5.3±0.7	5.7±0.7	5.7±0.8	5.8±0.7	5.9±0.6
GOT					
1 W	13.3±1.5	16.8±1.5	11.5±1.7	14.8±0.7	13.5±2.3
3 W	7.5±1.5	8.8±2.0	9.5±1.7	8.6±1.6	9.8±2.7
5 W	11.2±1.9	10.0±0.0	12.2±1.1	10.3±2.2	12.3±1.5
8 W	7.1±1.2	7.6±0.8	8.3±1.5	7.5±1.0	7.5±1.3
TCHO					
1 W	17.6±1.6	17.3±0.5	14.4±1.4	14.1±1.9	14.9±1.7
3 W	21.4±1.8	24.2±1.2	25.4±0.5	21.3±1.6	19.1±2.0
5 W	19.7±1.2	15.7±2.1	19.7±4.2	12.0±2.4	19.0±1.6
8 W	19.6±2.0	20.0±1.9	18.4±1.3	23.3±0.9	20.0±1.6

<Table 4> Blood chemistry of black rockfish fed polychaete antimicrobial peptide supplemented feeds

	LAP 0	LAP 0.05	LAP 0.1	LAP 0.5	LAP 1
GLU					
1 W	2.9±0.6	3.0±1.1	2.9±0.9	2.9±0.6	2.7±0.7
3 W	3.0±0.9	2.8±0.6	3.7±1.1	3.1±0.9	3.2±0.8
5 W	2.1±0.3	3.0±0.7	2.9±1.0	3.2±1.1	2.9±1.0
8 W	3.1±0.6	2.8±0.6	2.6±0.5	3.7±1.2	3.3±1.4
GPT					
1 W	6.4±1.5	5.4±1.3	5.3±1.3	6.9±1.2	5.8±1.3
3 W	6.1±1.0	7.3±1.6	7.8±1.3	6.7±1.7	7.4±1.9
5 W	5.9±0.7	9.0±1.8	6.4±0.9	7.4±1.8	8.3±1.6
8 W	5.8±0.8	5.8±0.8	6.4±1.0	6.4±0.9	7.7±1.2
GOT					
1 W	20.4±4.5	19.0±2.4	18.0±7.4	18.0±2.8	15.3±5.2
3 W	20.0±2.4	20.3±5.4	26.3±4.2	20.4±3.6	21.4±3.3
5 W	18.4±3.4	17.3±2.9	18.4±4.1	25.5±4.4	25.5±1.8
8 W	16.0±1.6	19.6±2.1	26.9±6.2	25.7±5.2	25.7±3.9
TCHO					
1 W	17.8±1.9	19.5±1.7	21.0±1.7	17.6±1.2	19.5±1.5
3 W	18.2±1.7	18.6±1.6	24.0±1.4	19.3±1.3	17.9±1.8
5 W	18.9±1.7	21.2±2.8	19.7±1.2	18.4±1.9	17.0±1.1
8 W	18.8±1.9	17.0±1.6	20.7±0.5	13.8±0.7	15.1±2.0



[Fig. 2] Lysozyme activity in the serum from olive flounder (A) and black rockfish (B) fed diet supplemented with 0%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1% polychaete antimicrobial peptide for 8 weeks. (*, $p < 0.05$)

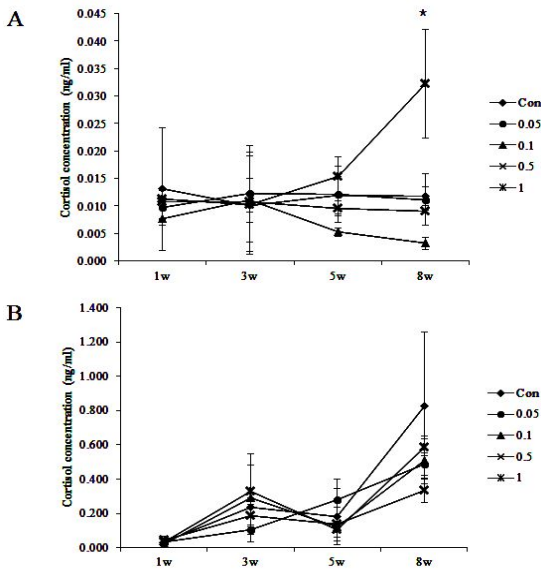
이는 면역 유도된 갯지렁이 분말이 1% 포함된 사료를 장기간 투여했을 시 오히려 넙치의 선천 면역에 부정적인 영향을 미칠 수 있는 가능성을 제시한다. 조피볼락의 경우([Fig. 2-B]) 면역유도된 갯지렁이 분말이 0.5% 첨가된 사료를 급이한 실험구에서 3주차, 5주차에서 각각 혈청 내 라이소자임 활성이 1.16, 2.34로서 대조구(3주차, 5주

차 각각 0.53, 0.80)와 비교하여 유의적으로 높게 나타났다. 그 외의 다른 실험구에서는 대조구와 비교하여 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 넙치의 경우 0.1%, 조피볼락의 경우 0.5%의 면역 유도된 갯지렁이 분말을 포함시킨 사료를 급이하였을 때 실험어의 비특이적 체액성 면역기능을 증강시킬 수 있을 것으로 생각된다.

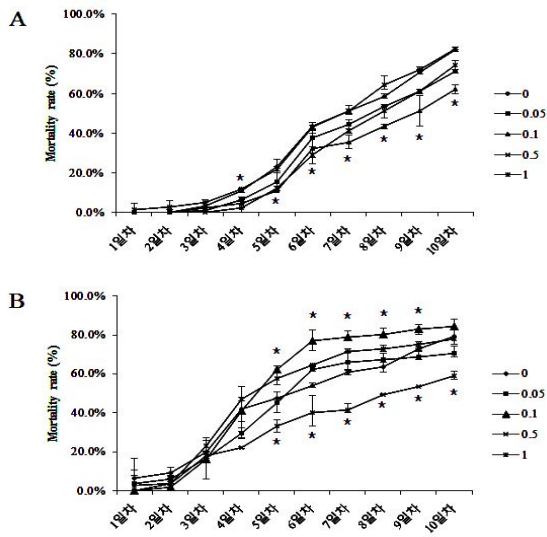
또한 면역 유도된 갯지렁이 분말을 첨가한 사료가 실험어의 스트레스에 미치는 영향을 확인하기 위하여 혈청 내 코르티졸 변화를 분석하였다. 코르티졸은 스테로이드계 호르몬으로 부신피질에서 생성된다. 부신피질은 스트레스나 혈중 당질 코르티코이드가 낮을 때 코르티졸을 분비하는데, 혈당을 높이고 면역 시스템을 저하시킨다고 알려져 있다(Ebrecht et al., 2004). 사육기간 동안 넙치의 경우([Fig. 3-A]) 0.1%의 갯지렁이 분말이 첨가된 사료를 급여한 실험구에서 5주차, 8주차에 코르티졸 농도가 각각 0.005, 0.003 ng/ml로서 대조구(0.012 ng/ml)와 비교하여 유의적으로 낮게 나타났다. 반면 1%의 분말이 첨가된 사료를 급여한 실험구에서는 8주차에 혈청 내 코르티졸 농도가 0.032 ng/ml로서 대조구와 비교하여 매우 유의적으로 높았다. 조피볼락의 경우([Fig. 3-B]) 모든 실험구에서 대조구와 비교하여 코르티졸 농도가 낮게 나타났다. 특히 0.5%의 갯지렁이 분말이 첨

가된 사료를 섭취한 실험구에서 8주차에서 혈청 내 코르티졸의 농도가 0.333 ng/ml로서 대조구(0.828 ng/ml)와 비교하여 유의적인 차이를 보였으며, 그 외 0.05%, 0.1%, 1%의 실험구에서도 각각 0.486, 0.512, 0.587 ng/ml로 대조구보다 낮았다. 따라서 면역 유도된 갯지렁이 분말의 첨가가 넙치와 조피볼락의 혈청 내 코르티졸 농도를 감소시키는데 기여할 수 있을 것이며, 특히 넙치의 경우 0.1%, 조피볼락의 경우 0.5%의 농도로 면역 유도된 갯지렁이 분말을 첨가한 사료를 급여하는 것이 가장 효과가 클 것으로 생각된다.

8주간의 사육실험 후 넙치와 조피볼락에 각각 *E. tarda*와 *S. iniae*를 복강 주사하여 10일간 누적 폐사율을 확인함으로써 이번 연구의 사료첨가제가 세균감염에 대한 실험어의 항병성에 미치는 영향을 조사하였다. 넙치는([Fig. 4-A]) 0.1%의 갯지렁이 분말이 첨가된 사료를 급여한 실험구에서 10일차 누적폐사율이 62.22%로 대조구(81.85%)와 비교하여 유의적으로 낮았다. 또한 1%의 갯지렁이 분말을 첨가할 사료를 급여한 실험구에서는 10일차 누적폐사율이 82.22%로 대조구와 유의적인 차이는 보이지 않았지만 더 높은 폐사율을 보였다. 0.1%의 실험구를 제외한 다른 실험구에서는 0.05%, 0.5%에서 각각 10일차 누적폐사율이 71.10%, 74.44%로 대조구와 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 조피볼락의 경우([Fig. 4-B]) 0.5%의 갯지렁이 분말이 첨가된 사료를 섭취한 실험구에서 10일차 누적폐사율이 58.97%로 대조구(79.24%)와 비교하여 유의적으로 낮았다. 그 외 0.05%, 0.1%, 1% 실험구의 10일차 누적폐사율은 각각 70.68%, 84.57%, 77.80%로 나타났다. 이번 연구에서 면역 유도된 갯지렁이 분말이 첨가된 사료를 급여한 실험어는 세균에 대한 항병성이 증가되었으며, 이것은 *M. luteus* 유래의 peptidoglycan으로 면역이 유도된 갯지렁이 내에서 항균 펩타이드의 합성이 증가되었고 증가된 항균 펩타이드가 어류 내에서도 세균에 대해 숙주를 보호할 수 있다는 것을 보여준다(Kim,



[Fig. 3] Cortisol concentration in the serum from olive flounder (A) and black rockfish (B) fed diet supplemented with 0%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1% polychaete antimicrobial peptide for 8 weeks. (*, $p < 0.05$)



[Fig. 4] Mortality rate of olive flounder (A) and black rockfish (B) fed diet supplemented with 0%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1% polychaete antimicrobial peptide for 8 weeks. (*, $p < 0.05$)

2014). 이전 연구에서 보고된 다양한 사료첨가제는 대상어종의 비특이적 면역반응을 자극하여 병원체에 대한 항병력을 증가시킨다고 하였다 (Kwon et al., 2002; Jeong et al., 2010; Kim et al., 2014). 이번 연구에서도 면역 유도된 갯지렁이 분말은 넙치와 조피볼락의 비특이적면역을 향상시켰을 뿐만 아니라 스트레스를 감소시키는 역할도 보여주었으며, 이러한 효과가 병원체에 대한 어류의 항병력 또한 향상시킨 것으로 생각된다. 하지만 이러한 효과를 위한 갯지렁이 분말의 사료 첨가 농도는 어종에 따라 다를 것이다. 즉 넙치의 경우 면역 유도된 갯지렁이 분말이 0.1% 첨가된 사료의 급이가 *E. tarda*에 대한 넙치의 항병성을 증가시킬 수 있지만, 그 이상의 농도로 면역 유도된 갯지렁이 분말을 첨가한 사료를 급이할 시 오히려 실험어의 스트레스를 증가시키고 이것이 병원체 감염에 대한 항병성을 감소시킬 우려가 있을 것으로 생각된다. 또한 조피볼락의 경우 *S. iniae*에 대한 항병성을 향상시킬 수 있는 면역

유도된 갯지렁이 분말의 사료 첨가 농도는 0.5%가 가장 적합하였다. 이번 연구에서는 8주간 면역 유도된 갯지렁이 분말 첨가 사료를 급이한 것에 따른 양식 어류의 면역 활성을 검증 하였으며, 이 사료첨가제는 어류의 비특이적 면역활성 증가, 스트레스 감소, 병원체에 대한 항병성 증가에 효과를 보였다. 그러므로 추후 갯지렁이 첨가 사료의 적절한 투여기간을 고려한 연구가 깊게 이루어진다면 갯지렁이 체내에서 다량 유도된 항균 펩타이드가 양식 어류의 면역력 향상과 병원체에 대한 저항력을 높이는데 효과가 있을 것으로 생각된다.

IV. 요약

본 연구에서는 다양한 면역 유도제를 주사하여 갯지렁이의 면역을 유도시킨 후, 갯지렁이의 항균 펩타이드를 가장 많이 발현시킬 수 있는 최적의 면역 유도제를 선정하였으며, 선정된 면역 유도제로 면역을 유도한 갯지렁이를 분말화 하여 사료에 첨가하였을 때 양식 어류의 면역 활성을 증가시킬 수 있는지에 대한 여부를 조사하였다. 넙치와 조피볼락은 면역활성을 위한 갯지렁이 분말의 사료 첨가율이 서로 달랐으며, 넙치의 경우 0.1%의 사료 첨가율이 넙치의 라이소자임 활성, 혈청 내 코르티졸 농도뿐만 아니라 *E. tarda*에 대한 항병성에 가장 높은 효과를 보였다. 조피볼락은 0.5%의 사료 첨가율이 조피볼락의 라이소자임 활성을 증가시키고 혈청 내 코르티졸 농도를 감소시켰으며 *S. iniae*에 대한 항병성 또한 증가시켰다. 따라서 넙치와 조피볼락은 각각 면역 유도된 갯지렁이 분말이 0.1%와 0.5% 첨가된 사료를 급이하였을 때 면역 활성을 가장 많이 유도할 수 있을 것으로 생각되지만, 반면 그 이상의 농도로 면역 유도된 갯지렁이 분말을 사료에 첨가하여 급이할 시 오히려 면역 활성에 부정적인 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각된다. 이번 연구

에서는 8주간 갯지렁이 분말 첨가 사료를 급여한 것에 대한 양식 어류의 면역 활성을 검증 하였으며, 추후 연구에서는 갯지렁이 첨가사료의 급여 기간을 고려한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

References

- Avella, Matteo Alessandro et al.(2010). Application of multi-species of *Bacillus* in sea bream larviculture. *Aquaculture*. 305, 12~19.
- Cho, Mi Young et al.(2008). A statistical study on infectious diseases of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. 21, 271~278.
- Davis, Kenneth B. Parker, Nick C.(1990). Physiological stress in striped bass: effect of acclimation temperature. *Aquaculture*. 91, 349~358.
- Ebrecht, Marcel et al.(2004). Perceived stress and cortisol levels predict speed of wound healing in healthy male adults. *Psychoneuroendocrinology*. 29, 798~809.
- Fernández-Navarro, Mónica et al.(2008). Maslinic acid added to the diet increases growth and protein-turnover rates in the white muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem and Physiol C Toxicol & Pharmacol*. 147, 158~167.
- Gang, Ju-Chan et al.(2004). Effects of oral administration with fermented product from sewage in land-based seawater fish farm on haematological factors of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J Korea fish pathology*. 17, 57~66.
- Gordon, R. Bell(1968). Distribution of transaminases (aminotransferases) in the tissues of pacific salmon (*Oncorhynchus*), with emphasis on the properties and diagnostic use of glutamic-oxalacetic transaminase. *Journal of the Fisheries Board of Canada*. 25, 1247~1268.
- Grinde, Bjørn(1989). Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. *J Fish Diseases*. 12, 95~104.
- Jeong, Yo Han et al.(2010). Effects of diets supplemented with yuzu *Citrus junos* Siebold ex Tanaka on diseases resistance of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J Korea fish pathol*. 23, 389~398.
- Karunasagar, I et al.(1994). Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*. 128, 203~209.
- Kim, Seong-Ryeol(2014). 친환경농업-누에를 이용한 사료첨가용 천연항생제 개발. *농업기술회보*. 51, 44~45.
- Kim, Seung Min et al.(2014). Effects of dietary supplementation with garlic extract on immune responses and diseases resistance of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J Korea fish pathol*. 27, 34~45.
- Kim, Sung-Sam et al.(2006). Effects of dietary supplementation of spirulina and astaxanthin for juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in low temperature season. *J Aquaculture*. 19, 57~63.
- Kim, Sung-Sam et al.(2010). Effects of dietary supplementation of fermented garlic powder on immune responses, blood components, and disease resistance against principal fish disease of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in low temperature season. *J Anim Sci & Technol* 52, 337~346.
- Kwon, Mun-Gyeong et al.(2002). The effects of charcoal in diet on the immune responses of flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J Korea fish pathol*. 15, 17~24.
- Lalumera, Giorgia Mary et al.(2004). Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere* 54, 661~668.
- Lange, Sigrun et al.(2001). Humoral immune parameters of cultured Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish & Shellfish Immunol*. 11, 523~532.
- Li, Yong et al.(2008). Influence of several non-nutrient additives on nonspecific immunity and growth of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture Nutrition*. 14, 387~395.
- Livak, Kenneth J. Schmittgen & Thomas D.(2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

- Methods. 25, 402~408.
- Ma, Jing, Jing et al.(2008). Effect of dietary supplemental l-carnitine on growth performance, body composition and antioxidant status in juvenile black sea bream, *Sparus macrocephalus*. Aquaculture Nutrition. 14, 464~471.
- Patrzykat, Aleksander & Douglas, Susan E.(2003). Gone gene fishing: how to catch novel marine antimicrobials. Trends in Biotechnology. 21, 362~369.
- Smith, Peter et al.(1994). Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. Annu. Rev. Fish Dis. 4, 273~313.
- Vanbelle, M.(1989). The European perspective on the use of animal feed additives. In: Biotechnology in the Feed Industry, T. P. Lyons (Ed.), Nottingham University Press, Nottingham, U. K., 375.
- Zasloff, Michael(2002). Antimicrobial peptides of multicellular organism. Nature 415, 389~395.
-
- Received : 25 August, 2016
 - Revised : 13 September, 2016
 - Accepted : 23 September, 2016