

한인진(*Artemisia iwayomogi* Kitamura)과 참당귀(*Angelica gigas* Nakai) 추출물이 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 항병력에 미치는 영향

김나영* · 이남실 · 전은지 · 서정수¹ · 우수지 · 김명석 · 강소영² · 정승희³

국립수산과학원 병리연구과, ¹국립수산물품질관리원 수산방역과, ²전남대학교 수산생명의학과, ³국립수산과학원

Effects of Medicinal Herb Extracts of *Artemisia iwayomogi* Kitamura and *Angelica gigas* Nakai on Disease Resistance in Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*

Na Young Kim*, Nam-Sil Lee, Eun Ji Jeon, Jung Soo Seo¹, Soo Ji Woo, Myung Sug Kim, So Young Kang² and Sung Hee Jung³

Fish Pathology division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

¹National Fisheries Products Quality Management Service, Busan 49111, Korea

²Department of Aquatic Life Medicine, Cheonnam National University, Yeosu 59626, Korea

³National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

Han In-jin (*Artemisia iwayomogi* Kitamura) and Cham Dang-gwi (*Angelica gigas* Nakai) exhibit antibacterial, antiparasitic, antifungal, and antiviral properties *in vitro*. In this study, mixture of the extracts of these two medicinal plants was absorbed on pellets. Thereafter, these pellets were fed to olive flounder *Paralichthys olivaceus* for 12 weeks at laboratory (1st experiment) and 24 weeks at field test (2nd experiment), and the immune activity and disease resistance properties of the extracts were examined. It was observed that lysozyme activities of plasma, spleen, and kidney improved after 12 weeks. Furthermore, when the olive flounders were artificially infected with bacterial pathogens, their cumulative mortality decreased in the group that was fed the extracts for 12 weeks compared to that in control group, and the relative percent survival also improved. This study concluded that mixture of Han In-jin and Cham Dang-gwi extracts provides disease resistance *in vivo*.

Keywords: *Artemisia iwayomogi* Kitamura, *Angelica gigas* Radix, Disease resistance, *Paralichthys olivaceus*

서 론

우리나라의 주요 양식 생산 어종인 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 조피볼락, 송어 등과 함께 생산량이 매우 높다. 하지만, 고밀도 및 환경오염 등으로 인해 양식생물에 대한 질병 발생이 증가되고 있고(Krkošček, 2010), 이를 치료하기 위해 사용되는 항생제, 소독제와 같은 화학제제의 사용도 증가되고 있다(Jee et al., 2014; Kim et al., 2019). 잘못된 약품사용은 잔류성·안전성 문제, 환경오염 등과 같은 부정적 영향을 야기하여, 양식어류가 국민들이 안심하고 먹을 수 있는 식품으로서의 이미지 손상을 가져올 수 있다. 이런 문제를 해결하고자 2000년대부터 국내

에서 항생제 대체제의 개발 필요성이 높아졌고, 한약재(Korean traditional medicinal herbs)에 기반한 친환경적이며 치료 효과가 있는 생약재 추출물을 양식넙치의 질병치료와 면역증진에 미치는 영향을 알아보기 위하여 많은 연구가 진행되어져 왔다. 항균활성에 관하여 단삼 및 상백피(Mok et al., 2001a, 2001b), 오배자(Choi et al., 2005), 철피 등 14종(Kang, 2005), 손바닥선인장 분획물(Jung et al., 2008), 인진 등 13종(Jeon et al., 2020), 비특이적 면역반응에 관하여 약쑥, 연고 및 삼지구엽초(Jung et al., 2001), 오매(Kim et al., 2009), 면역반응·항병력에 관하여 마늘(Lee et al., 2010a; Woo et al., 2010), 항균활성·항병력에 관하여 황금 등 5종(Lee et al., 2010b), 항병력에 관하여 황금

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 720. 2491 Fax: +82. 51. 720. 2498

E-mail address: pharm001@korea.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0634>

Korean J Fish Aquat Sci 54(5), 634-643, October 2021

Received 6 September 2021; Revised 28 September 2021; Accepted 13 October 2021

저자 직위: 김나영(연구사), 이남실(연구원), 전은지(연구원), 서정수(연구관), 우수지(연구사), 김명석(연구관), 강소영(교수), 정승희(연구관)

뿌리(Jee et al., 2012), 고삼뿌리(Seo et al., 2015), 황금 등 6종(Seo et al., 2016)을 이용한 실험에서 다양한 효능에 대해서 연구가 이루어져 왔다. 하지만, 연구 결과가 바로 수산용 의약품으로 상용화되어 사용되고 있는 제품은 매우 제한적이다.

화학제제와 달리 생약재는 예전부터 사용해왔고, 안전성까지 확보되어 있어 사용에 있어서 거부감이 없는 게 가장 큰 장점이다. 하지만 생약재를 의약품으로 제품화하기 위해서 품질관리를 통한 안전성과 유효성 확보가 필수적이다. 그 중에서도 정확한 유효·지표성분에 대한 과학적 조사를 통해서 재배환경에 따른 효능성 변화를 줄일 수 있도록 해야한다.

본 연구에서 사용한 한인진(*Artemisia iwayomogi* Kitamura)은 국화과 식물로 더위지기의 지상부이고, 참당귀(*Angelica gigas* Nakai)는 미나리과 식물로 참당귀의 뿌리 부분이다. 이들의 효능은 다양한 연구를 통해 항균, 항곰팡이, 항염, 항암 등의 활성이 있다고 알려져 있으며, 의약품 개발을 위해서 필수적이며 지표물질의 후보물질로 선정 가능한 decursin과 decursinol angelate의 약리 작용도 알려져 있다(Son et al., 2009; Ahn et al., 2019). 현재 식품의약품안전처에 잔류 면제물질로 분류되어 있으며, 인체에 안전한 생약재로 확인되었다.

본 연구는 이전 연구(Jeon et al., 2020)를 통해, 수산생물병원체에 대한 항균, 항진균, 항기생충, 항바이러스 효능(*in vitro*)에 대한 높은 효능을 확인하였고, 이 2종 혼합추출물(한인진·참당귀)을 사료에 흡습시켜 투여하여(*in vivo*) 넙치의 면역활성 및 항병력에 대한 효능을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

한인진 · 참당귀(생약재) 혼합추출물 제작

한인진(*Artemisia iwayomogi* Kitamura; 더위지기)과 참당귀(*Angelica gigas* Nakai)의 건조 생약재는 국내 한약재 상사(Daehakhanyakguk, Iksan, Korea)로부터 구입하였으며, 모든 시료는 멸균증류수로 3회 씻은 후 에탄올 추출물을 제작하였다. 한인진·참당귀에 대한 에탄올 추출물의 농도별(50, 70, 100%) 및 이들 생약재의 혼합제조 비율별(1:1, 1:2, 1:5, 2:1, 5:1)로 항균활성을 조사한 사전 실험을 통해, 이들 생약재는 50% 에탄올 농도로 추출했을 때, 각 중량이 동일 비율(1:1)일 때, 가장 높은 항균활성을 나타내었다(data not shown). 따라서 각 생약재를 5 g씩 혼합한 추출물 10 g에 50% 에탄올 100 mL를 더하여 40°C에서 3시간씩 3번 초음파 추출(B3510; Branson, New York, NY, USA) 후, 감압 농축(CVE3100; EYELA, Tokyo, Japan)하여 동결 건조(FDU-2110; EYELA)를 시켜 제작하였다. 최종적으로 파우더로 제작한 혼합추출물은 습기와 변성을 막기 위해 밀봉 후 -20°C에서 실험에 사용 전까지 보관하였다.

실험어

생약재 혼합추출물의 효능을 검증하기 위해, 연구시설 내 수조

실험(1차 실험)과 양식장 현장실험(2차 실험)으로 나누어 실시하였다. 1차 실험(평균체장 12.2±3.8 cm, 평균체중 17.8±5.6 g)에는 포항소재 넙치 양식장에서 구입한 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 2.5톤 크기의 4개 FRP수조(200마리 수용/수조)에 나누어 순치시켰으며, 실험기간 동안 적정수온(20.5±1.5°C)을 유지하면서 해수를 공급(18-24회전/일 환수)하였다. 2차 실험(평균체장 13.3±0.7 cm, 평균체중 20.7±4.3 g)에는 포항소재의 넙치양식장 1개소를 선정하여, 2개 수조(1,400마리 수용/수조)를 지정 및 관리하면서 실험에 사용하였다. 1차와 2차 실험기간 중에 수산용 의약품은 사용하지 않았고, 현미경 검경을 통한 기생충 검사와 주요 어병세균 및 바이러스를 PCR (polymerase chain reaction)로 검사하여 질병 감염여부를 확인하였으며, 최종적으로 실험어의 무병상태를 확인하였다.

생약재 첨가사료 제조 및 경구투여

1차 실험을 위해서 넙치EP(extruded pellet) 사료(Sajodongane, Seoul, Korea)를 어체중(kg) 당 50% 에탄올 생약재 혼합추출물을 저농도(0.01%), 중농도(0.05%) 및 고농도(0.1%)로 흡습시켜 그늘에서 잘 건조시켜 제조하였다. 대조구는 생약재 혼합추출물을 처리하지 않은 넙치EP사료만 공급하였다. 제조한 생약재 첨가사료는 실험에 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였다. 1차 실험의 투여기간은 12주로 하였고, 실험구는 50% 에탄올 생약재 혼합추출물을 0.01%, 0.05%, 0.1% 농도로 처리한 3개 실험구로 설정하여 생약재 첨가사료를 경구투여 하였다. 2차 실험에는 1차 실험의 결과, 최적농도로 선정된 50% 에탄올 생약재 혼합추출물의 0.01% 농도로 제조한 사료를 경구투여 하였다. 2차 실험의 투여기간은 입식 이후 출하 전까지 24주(6개월)로 하였다. 1차 실험에서는 투여 시작 후 4, 8, 12주째에, 2차 실험에서는 4, 8, 12, 16, 20, 24주째에 혈액생화학적 특성, lysozyme 활성, 병리조직학적 변화 및 항병력(질병 저항성)을 조사하였다. 추가적으로 1차 및 2차 실험을 통해 실험어의 성장도(중체율)를 조사하였다.

혈액생화학적 분석

1차(4, 8, 12주) 및 2차 실험(4, 8, 12, 16, 20, 24주)에서 설정한 투여기간에 따라, 대조구와 실험구마다 10마리씩 무작위로 선택하여 어체의 길이와 무게를 측정하였다. 실험구별로 해부시 개체마다 넙치의 미부정맥에서 채혈하여, capillary tube (heparin treated, 11000 rpm, 5분)로 헤모글로빈(Hb) 농도를 측정하고, 나머지 혈액은 원심(12,000 rpm, 15분)하여 혈장을 분리하여 냉동보관(-80°C)하였다가 3일 이내에 혈액화학분석기(DRY CHEM3500i; FUJI, Tokyo, Japan)를 사용하여 혈액생화학적 성분변화를 측정하였다. 혈장화학성분은 total cholesterol (TCHO; mg/dL), glucose (GLU; mg/dL), glutamic oxalacetic transaminase (GOT; U/L), glutamic pyruvate transaminase (GPT; U/L), alanine aminotransferase (ALP; U/L), total protein (TP; g/dL), triglyceride (TG; mg/dL), blood urea

nitrogen (BUN; mg/dL) 등 8개 항목을 측정하였다.

Lysozyme 활성 분석

1차(4, 8, 12주) 및 2차 실험(4, 8, 12, 16, 20, 24주)에서 설정한 투여기간에 따라, 실험구와 대조구마다 10마리씩 무작위로 선택하여 혈액, 비장, 신장조직으로 나누어서, lysozyme 활성을 분석하였다. Lysozyme 활성분석에는 Parry et al. (1965)의 분석법을 적용하였다. 본 분석에 적용되는 발색법(turbidimetric assay)은 0.05 mM sodium phosphate buffer (pH 6.2)에 미리 녹여둔 *Micrococcus lysodeikticus* (0.2 mg/mL)를 기질로 사용하였다. 혈장을 원액(100 µL) 및 10배 희석한 액을 기질 100 µL와 혼합하여 microplate reader (Sunrise; TECAN, Mannedorf, Switzerland)에서 37°C에서 30초 및 5분 동안 600 nm에서 흡광도의 감소율을 측정하였다. 비장과 신장의 lysozyme 활성은 상기의 방법의 변형으로, 조직 무게의 10 volume의 0.05 mM sodium phosphate buffer (pH 6.2)를 더해 마쇄(homogenize)하여 균질화한 후, 원심분리(12,000 rpm, 4°C, 10분)하여 상등액을 털어내어 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 파장 600 nm에서 OD (optical density)값을 1.0으로 보정하여 상기와 같은 방법으로 측정하였다.

병리조직학적 분석

1차(4, 8, 12주) 및 2차 실험(4, 8, 12, 16, 20, 24주)에서 설정한 투여기간에 따라, 실험구와 대조구에서 각 5마리씩 무작위로 채취하여, 10% 중성포르말린에 아가미, 간, 비장, 신장, 심장, 소화관을 고정하였다. 24시간 후 세절, 수세, 탈수, 투명화, 파라핀 침투의 처리과정을 거쳐 파라핀 조직 블록을 제작하고, 박절기

(HistoCore MULTCUT; Leica, Nussloch, Germany)를 사용하여 박절한 후 슬라이드글라스에 부착시켜 Hematoxylin and Eosin (H&E) 염색하였다. 만들어진 염색조직표본은 광학현미경(Axio Imager A1; ZEISS, Goettingen, Germany)으로 병리조직학적 변화를 관찰하였다.

항병력 조사

넙치 질병에 대한 저항성을 알아 보기 위한 인위감염 실험에 사용한 균주는 국립수산과학원의 한국수산미생물자원은행(Korean Culture Collection of Aquatic Microorganisms, KOCAM)에서 보관중인 *Edwardsiella tarda* (GY10), *Streptococcus iniae* (FT5228)를 사용하였다. 이들 균주는 BHIA배지에서 계대배양 하였으며, 복강주사 전에 멸균생리식염수를 이용해서 현탁해서 접종농도를 조정하였다. 1차 실험의 인위감염에는 *E. tarda*의 접종농도를 0.99×10^5 ~ 2.99×10^5 CFU/fish, 0.1 mL/fish로 조정했으며, 2차 실험의 인위감염에는 *E. tarda*와 *S. iniae*의 접종농도를 2.5×10^5 ~ 5.0×10^5 CFU/fish, 0.1 mL/fish로 조정하였다. 한편, 대조구는 생리식염수를 복강에 동량 주사하였다. 1차(4, 8, 12주) 및 2차 실험(4, 8, 12, 16, 20, 24주)의 각 투여기간이 종료된 이후에, 실험구별로 인위감염 실험을 통해 2주 동안 누적폐사율을 조사하였다. 감염 실험의 정확도를 위하여, 감염개체의 내·외부 장기조직을 검경 후, 신장과 비장을 분리해서 PCR검사로 감염균을 검출하였다.

통계학적 분석

모든 자료의 통계처리는 IBM SPSS 10 software package를 이용하여 분석하였으며, 1차 실험에서는 실험구와 대조구 사이

Table 1. Physiological and hematological changes in olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed with diet supplemented medicinal herb extracts of *Artemisia iwayomogi* Kitamura and *Angelica gigas* Nakai (0.01, 0.05 and 0.1%) for 12 weeks (n=10/group)

WKS	Diet (%)	BW (g)	BL (cm)	Hb (g/dL)	TCHO (mg/dL)	GLU (mg/dL)	GOT (U/L)	GPT (U/L)	ALP (U/L)	TP (g/dL)	TG (mg/dL)	BUN (mg/dL)
4	0	45.7±14.4	17.0±5.4	7.7±1.1	185.5±30	32.3±21	34.1±22	2.3±2.5	122.0±31.0	4.8±0.5	338.0±90	4.6±0.3
	0.01	56.6±18.0	18.8±6.0	8.6±3.2	177.1±14	32.2±17	37.2±16	2.0±1.9	105.7±31.0	4.7±0.3	315.7±21	5.3±0.7
	0.05	50.0±16.0	18.1±5.7	6.7±1.7	160.3±8	36.0±18.0	25.3±15	2.0±0.5	101.5±28.7	4±0.27	350.0±29	5.8±1.0
	0.1	49.0±15.5	17.6±5.6	6.4±1.7	170±10.5	23.5±15.5	35.4±11.7	2.0±0.3	117.0±24.0	4.1±0.4	303.0±22	5.7±0.7
8	0	97.7±30.0	21.0±6.6	5.5±3.3	234.3±45	45.1±13.5	48.1±10.5	2.8±1.6	126.1±27.0	4.2±0.6	274.0±32	4.6±0.6
	0.01	95.8±30.0	21.8±6.9	6.5±1.3	230.0±21	37.4±11.3	47.9±11.3	2.4±2.0	124.5±30.0	5±0.5	250.0±54	4.5±0.6
	0.05	90.8±25.0	20.6±6.5	6.2±1.2	223.1±29	33.4±19.8	38.6±6.8	2.8±1.2	119.5±28.1	4.3±0.4	238.3±58	3.8±1.1
	0.1	90.4±25.0	20.7±6.6	6.5±0.4	243.0±32	38.2±10.0	36.1±8.8	2.6±1.3	113.0±31.2	4.1±0.6	236.0±58	4.0±1.0
12	0	140.6±44.0	22.3±7.0	6.3±1.7	250.0±79	38.7±18.0	36.7±8.4	2.2±0.7	143.0±45.0	4.9±1.6	251.4±79	4.2±1
	0.01	147.0±59.0	22.5±7.6	6.2±2.6	245.3±71	37.7±6.0	33.7±7.5	2.5±0.5	113.5±36.0	4.4±1.4	256.5±81	3.6±0.8
	0.05	142.7±42.0	23.3±7.4	6.3±2.3	240.4±76	38.2±5.8	36.1±8.3	2.7±8.3	123.8±39.0	4.4±1.4	248.1±71	3.8±0.9
	0.1	132.5±42.0	22.8±7.2	6.4±2.3	247.3±78	27.3±23.0	33.4±7.4	2.1±0.6	105.9±33.5	4.3±1.4	265.0±83	3.3±0.7

WKS, weeks; BW, body weight; BL, body length; Hb, Hemoglobin; TCHO, total cholesterol; GLU, glucose; GOT, glutamic oxalacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvate transaminase; ALP, alanine aminotransferase; TP, total protein; TG, triglyceride; BUN, blood urea nitrogen.

의 통계학적 유의성 분석을 위해 One-way ANOVA test를 실시하였고, 2차 실험에서는 대조구와 단일실험구의 비교를 위해 Students's t-test로 분석하였다(P<0.05).

결과 및 고찰

성장도

1차 및 2차 실험에서 생약재 혼합추출물을 농도별로 투여한 모든 실험구에서 성장도, 섭식활동 및 생존율은 대조구와 비교해본 결과, 1차와 2차 모두 대조구 대비 유의적인 차이가 나타나지 않았다(data not shown). 반면, 신곡(*Massa medicata fermentata*), 산사자(*Crataegi fructus*), 사철쭉(*Artemisia capillaries*), 천궁(*Cnidium officinale*)의 혼합추출물 투여는 넙치의 체중증가와 사료효율을 높이는 효과를 나타냈고(Ji et al.,

Table 2. Physiological and hematological changes in olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed diet supplemented with medicinal herb extracts of *Artemisia iwayomogi* Kitamura and *Angelica gigas* Nakai (0.01%) for 24 weeks (n=10/group)

WKS	Diet (%)	BW (g)	BL (cm)	Hb (g/dL)	TCHO (mg/dL)	GLU (mg/dL)	GOT (U/L)	GPT (U/L)	ALP (U/L)	TP (g/dL)	TG (mg/dL)	BUN (mg/dL)
0	0	20.7±4.3	13.3±0.7	5.0±1.4	152.7±34.4	14.7±4.6	23.5±13.1	4.4±1.3	166.3±14.3	3.6±0.4	116.0±19.3	3.4±0.7
	0.01	58.6±13.5	18±1.6	7.5±1.3	221.5±63	11.0±7.9	28.0±7.1	3.5±1.6	164.5±39.5	5.0±0.7	186.5±37.0	5.3±1.5
4	0	58.6±12.3	18.2±1.4	7.7±1.8	234.5±36.8	14.4±6.9	29.0±6.3	4.5±2.8	187.7±38.3	5.1±0.4	242.0±77.4	5.4±0.9
	0.01	117.8±27.1	22.3±1.8	9.8±1.5	176.4±45.3	22.3±5.4	25.5±10.0	2.8±2.3	271.6±65.3	4.4±0.6	215.7±61.5	3.2±0.8
8	0	109.9±11.6	22.2±1.2	9.1±1.4	219.3±71.2	19.4±9.4	32.9±13.6	3.8±2.3	251.2±39.0	5.3±0.8	247.0±77.2	3.6±0.7
	0.01	119.4±29.4	23.35±1.9	9.9±1.8	201.8±27.7	12.1±6.3	13.3±4.4	2.1±0.3	197.5±23.7	3.72±0.5	195.4±39.8	2.5±0.3
12	0	141.4±26.0	24.8±1.9	10.1±2.0	161.3±59.7	9.9±4.0	13.3±4.6	2.0±0.0	188.6±47.8	3.8±0.5	228.7±34.9	3.2±0.6
	0.01	292.1±49.8	29.9±1.5	8.6±1.7	240.1±46.1	11.3±3.3	18.9±9.7	4.5±6.5	220.7±49.3	4.9±0.5	172.4±38.1	2.8±0.5
16	0	322.0±56.7	30.6±2.0	9.5±1.2	262.0±28.0	11.2±3.9	16.9±10.6	3.1±1.8	229.4±37.7	5.0±0.6	143.6±37.4	2.7±0.7
	0.01	308.4±56.0	30.6±1.4	10.0±2.3	247.9±59.5	12.7±6.5	15.9±4.0	3.4±1.6	224.9±63.8	7.0±2.2	99.1±26.8	6.2±0.6
20	0	321.6±36.9	31.5±0.8	10.4±2.0	251.0±56.7	10.1±4.0	14.1±2.6	2.3±0.8	214.1±52.0	5.3±0.5	103.1±31.9	3.8±0.6
	0.01	336.1±62.8	32.2±2.2	10.5±2.9	245.2±33.0	15.0±7.8	20.3±6.7	4.3±3.1	208.6±62.2	6.1±2.1	151.1±59.7	6.3±1.6
24	0	352.4±43.7	31.5±1.7	10.6±2.6	257.4±29.3	13.7±7.3	18.7±4.1	1.7±0.5	223.7±56.6	6.1±1.1	168.0±26.6	3.5±1.2
	0.01											

WKS, weeks; BW, body weight; BL, body length; Hb, Hemoglobin; TCHO, total cholesterol; GLU, glucose; GOT, glutamic oxalacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvate transaminase; ALP, alanine aminotransferase; TP, total protein; TG, triglyceride; BUN, blood urea nitrogen.

Table 3. Lysozyme activity (mean±SD, unit/mL) of plasma, spleen and kidney in olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed diet with supplemented medicinal herb extracts of *Artemisia iwayomogi* Kitamura and *Angelica gigas* Nakai (0.01%) for 12 weeks (n=10/group)

Tissue	Weeks	Control	Extract diet (%)		
			0.01	0.05	0.1
Plasma (U/mL)	0	346.0±17.4	-	-	-
	4	442.5±46.0	432.5±48.0	465.5±29.0	430.0±53.0
	8	486.2±41.6	486.2±61.0	475.1±76.5	431.1±40.0
	12	512.5±33.0	465.0±67.0	483.0±51.0	491.1±55.0
	0	653.5±76.3	-	-	-
Spleen (U/mL)	4	594.9±56.8	708.3±74.5	793.9±70.8	690.3±97.7
	8	778.9±51.1	753.9±44.4	765.5±75.6	744.5±68.4
	12	636.4±165.3	635.8±161.1	651.6±164.3	647.6±179.1
	0	528.4±67.0	-	-	-
	4	576.2±65.5	605.2±54.1	744.1±65.1	681.0±51.8
Kidney (U/mL)	8	648.6±51.4	1479.0±226.6 ^b	881.1±93.64	968.6±107.4 ^{ab}
	12	715.0±94.6	733.3±186.1	786.4±268.8	719.9±131.6

Values with different letters are significantly different (P<0.05).

2007), 개똥썩, 오배자, 헛개 및 6종(황금, 고삼, 굴피, 금은화, 동과자, 자소엽) 혼합추출물을 투여가 높은 증체율을 나타냈으며(Hwang et al., 2015), 참돔(*Pagrus major*)에서는 4종(산사자·신곡·사철썩·천궁) 생약재의 혼합추출물을 투여 결과 초기에 성장 촉진효과를 나타냈다(Takaoka et al., 2016). 이는 생약재 추출물이 어류의 성장도에 미치는 효과가 생약재의 종류와 어종에 따라 다른 결과를 나타낼 수 있으므로, 어류의 성장에 미치는 효과에 대해서 앞으로 더 많은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

혈액생화학적 특성

1차 실험에서 대조구와 실험구(0.01%, 0.05%, 0.1%)의 투여기간에 따른 혈액생화학적 분석 항목에 대한 결과를 Table 1에 나타내었다. 9개 항목의 측정값은 대조구와 3개 실험구 사이에 유의적인 차이를 확인할 수 없었다. 2차 실험에서 대조구와 실험구(0.01%)의 투여기간별에 따른 혈액생화학적 결과에서도 1차 실험과 마찬가지로 대조구와 실험구 사이에 유의적 차이가 없었다(Table 2). 1차 및 2차의 혈액생화학적 결과들로 양식 넙치에 시험 농도(0.01-0.1%)로 12주 이상 투여 시, 넙치의 혈액생화학적 변화에서 유의적인 차이를 나타내지 않아, 어체에 부작용을 나타내지 않음을 확인 할 수 있었다. 본 연구결과와 유사하게 황기(*Astragalus membranaceus*) 및 인동(*Lonicera japonica*) 추출물을 투여한 틸라피아(Ardo et al., 2008), 울금 등의 3종 복합추출물을 먹인 금붕어(Harikrishnan et al., 2010), 약썩과 삼지구엽초의 혼합추출물 및 9종 혼합추출물(Jung et al., 2002), 마늘 추출물(Cho et al., 2010), 고삼뿌리 추출물(Seo et al., 2015), 신곡·산사자·사철썩·천궁(Ji et al., 2007)을 투여한 넙치의 혈액분석 결과와 유사한 결과로, 생약재 추출물 투여가 수산생물에 혈액생화학적 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

Lysozyme 활성

1차 실험에서 대조구와 실험구(0.01%, 0.05%, 0.1%)의 투여기간별 lysozyme 활성을 분석한 결과, 3개 실험구 가운데 저농도(0.01%)의 혼합추출물을 투여한 그룹에서 8주째 신장 조직에서의 lysozyme 활성이 증가되는 것을 확인하였다(Table 3). 따라서 한인진과 참당귀 추출물을 8주 이상 투여 시 비특이적 면역을 증가시키는 것을 확인하였다. 2차 실험에서 대조구와 실험구(0.01%)의 투여기간별 lysozyme 활성을 분석한 결과, 실험구의 혈액 및 조직은 혈액에서는 12주째부터, 신장과 비장은 16주째에 lysozyme 활성이 증가하여(Table 4), 12주 이상의 장기간 투여가 넙치의 비특이적 면역활성의 증가에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 본 연구결과 한인진과 참당귀 혼합추출물 투여는 8주 이상 투여시 비특이적 면역을 증가시키며, 장기간 투여할수록 효과적임을 확인하였다.

어류의 다양한 비특이적 방어기작 중 lysozyme 활성의 증가는 식세포 활성화 및 백혈구 활성산소를 생성시켜 비특이적 면

력을 증가시키므로(Robertsen et al., 1994; Wu et al., 2013) 생약재 추출물 투여에 따른 비면역력 증대를 확인하기 위해 lysozyme 활성을 측정하였다. 틸라피아에 고삼 추출물 투여와(Wu et al., 2013), 넙치에 6종의 생약재(황금·고삼·굴피·금은화·자소엽·동과자) 추출물을 투여시 혈장 lysozyme 활성이 유의적으로 증가하였고(Seo et al., 2016), 넙치에 고삼 추출물 투여시 혈장과 조직(간, 비장, 신장)에서 lysozyme 활성 및 식세포 활성화에서도 유의적인 증가를 나타냈다(Seo et al., 2015). 하지만 생약재 추출물은 다양한 유효성분들이 포함되어 있어 이 성분들이 모두 넙치의 면역기전에 정확한 차이를 유발하는지 밝히기 어려우며, 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

병리조직학적 관찰

1차 및 2차 실험에서 투여기간에 따른 대조구와 실험구의 내부장기(아가미, 간, 비장, 신장, 심장 및 소화관)에서 모두 유의적인 조직변성이 나타나지 않음을 확인하였고(Fig. S1, Fig. S2), 생약재 혼합추출물을 장기간 투여하더라도 넙치에 독성 영향은 발생하지 않음을 확인 할 수 있었다. 유사하게 일본당귀

Table 4. Lysozyme activity (mean±SD, unit/mL) of plasma, spleen and kidney in olive flounder fed diet supplemented with medicinal herb extracts of *Artemisia iwayomogi* Kitamura and *Angelica gigas* Nakai (0.01%) for 24 weeks (n=10/group)

Tissue	Weeks	Control	0.01% Extract diet
Plasma (U/mL)	0	405.9±138.3	-
	4	1284.7±496.6	1229.3±218.3
	8	1551.3±280.3	1365.2±641.1
	12	1663.0±57.3	1822.7±259.2*
	16	1720.0±249.2	2214.1±285.4
	20	1470.0±345.4	1749.3±314.5
	24	1331.0±256.4	1723.8±221.2
Spleen (U/mL)	0	304.0±127.0	-
	4	1185.9±307.8	1621.6±205.9
	8	1681.8±288.8	1578.3±272.6
	12	1886.9±283.7	2378.2±187.0
	16	1617.2±263.2	2945.5±147.7*
	20	1721.3±331.8	2791.4±281.7*
	24	1475.3±378.4	2177.0±195.9
Kidney (U/mL)	0	511.1±143.1	-
	4	2206.5±1138.9	1800.7±424.4
	8	2208.5±1046.0	1793.6±572.4
	12	3369.1±1438.2	2799.4±1379.3
	16	3136.0±1159.0	4095.8±1076.0*
	20	2681.1±799.8	2880.4±486.3
	24	2042.4±385.9	2481.9±407.1

*Significant difference at P<0.05 compared to control.

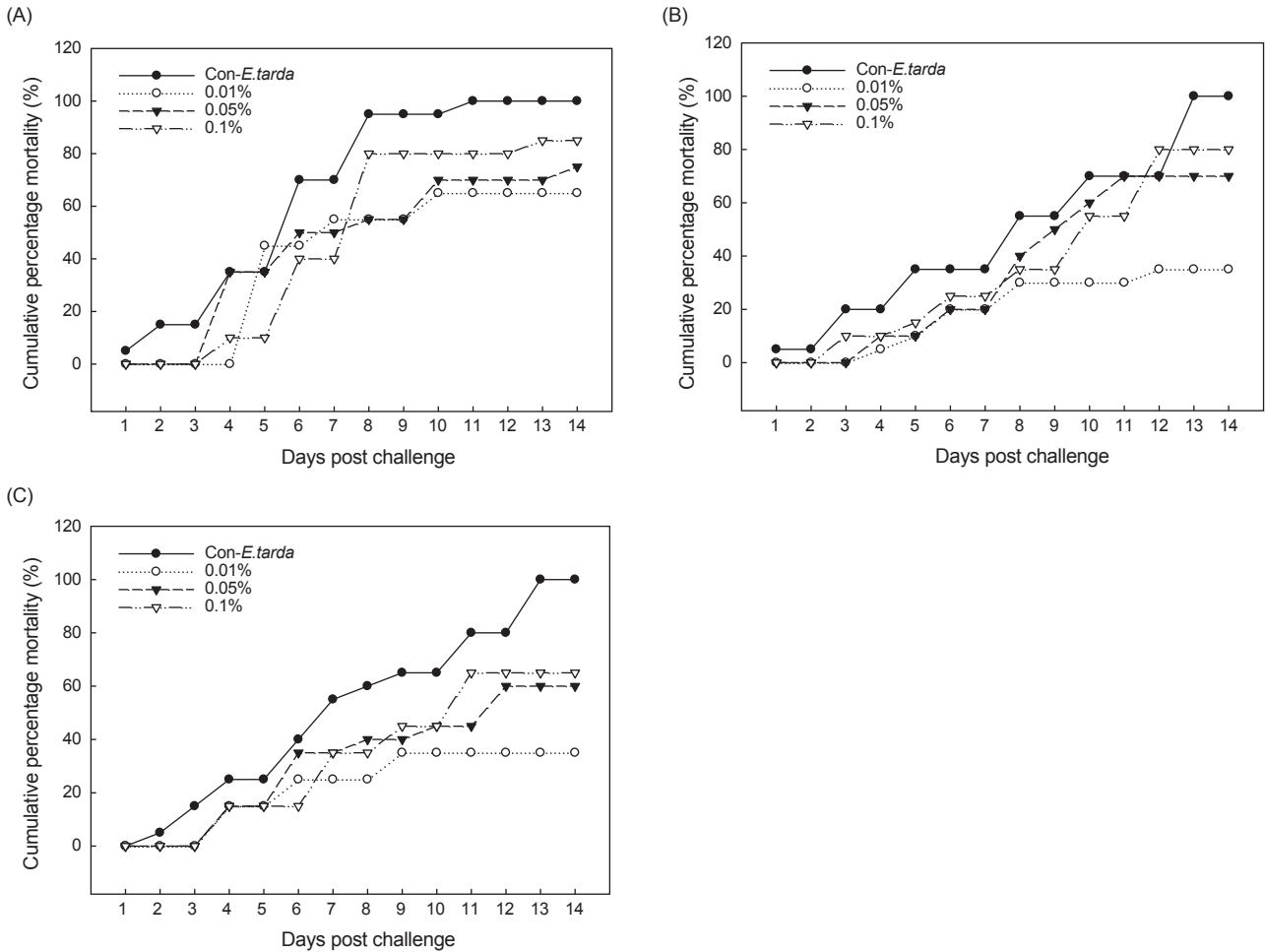


Fig. 1. Cumulative mortality rate (%) of olive flounder *Paralichthys olivaceus* in which artificially infected with *Edwardsiella tarda* after fed diet supplemented medicinal herb extracts of *Artemisia iwayomogi* Kitamura and *Angelica gigas* Nakai (0.01, 0.05, 0.1%) for 4 to 12 weeks. A, 4 weeks; B, 8 weeks; C, 12 weeks; ●, control; ○, 0.01%; ▼, 0.05%; △, 0.1%.

(*Angelica acutiloba*)를 투여한 랫드의 병리조직학적 검경에서 특이한 병변은 관찰되지 않아 독성반응이 없는 것으로 나타났지만(MFDS, 2005), 한인진과 참당귀를 단일 또는 혼합하여 투여한 어종별 연구결과는 확인할 수 없었다.

어병세균 인위감염에 따른 항병력

1차 실험에서 생약재 혼합추출물의 실험구별(0.01%, 0.05%, 0.1%) 투여기간에 따라, *E. tarda*로 인위감염 실험을 실시한 결과, 누적폐사율은 0.01% 실험구에서 가장 낮았으며, 다음으로 0.05%, 0.1% 실험구의 순서로 나타났고, 기간별 누적폐사율을 비교한 결과, 12주째 실험구가 낮은 폐사율을 나타냈다(Fig. 1). 그 결과, 0.01% 생약재 혼합추출물을 12주이상 장기간 생약재 혼합추출물 투여가 인위감염 실험에서 폐사율을 낮추는 효과를 확인하였다.

2차 실험에서는 실험구(0.01%)의 투여기간에 따라, *E. tarda*

와 *S. iniae*로 인위감염 실험을 한 결과, 실험구는 누적폐사율이 12주째 이후부터 현저히 낮아지는 것을 확인 할 수 있었으며, 이러한 결과는 1차 실험의 결과와 유사한 것으로 나타났다(Fig. 2). 그러나 12주보다 더 장기간(24주까지) 투여하여도 폐사율이 유의적으로 변화하지 않았으며, 생약재 혼합추출물 투여 12주째와 유사한 누적폐사율 결과를 나타냈다. 12주째 두 어병세균에 대한 인위감염 실험 결과, 가장 낮은 누적폐사율(55%)로 나타났고, 이후 16주와 20주째에는 55-60%의 누적폐사율을 나타냈으며, 24주째 2종 세균에 대한 누적폐사율이 모두 55%를 나타내는 것을 알 수 있었다. 따라서, 생약재 혼합추출물을 12주까지 먹인 넙치와 그 이상(16, 20, 24주) 먹인 넙치는 세균에 대한 항병력에서 유의적인 차이를 나타내지 않으며, 12주 투여가 가장 효과적임을 확인하였다. 당귀 유래 다당류를 첨가한 사료를 투여시 홍기흑점바리(*Epinephelus malabricus*)의 *E. tarda*에 대한 저항성이 증진(Wang et al., 2011), 틸라피아를 대

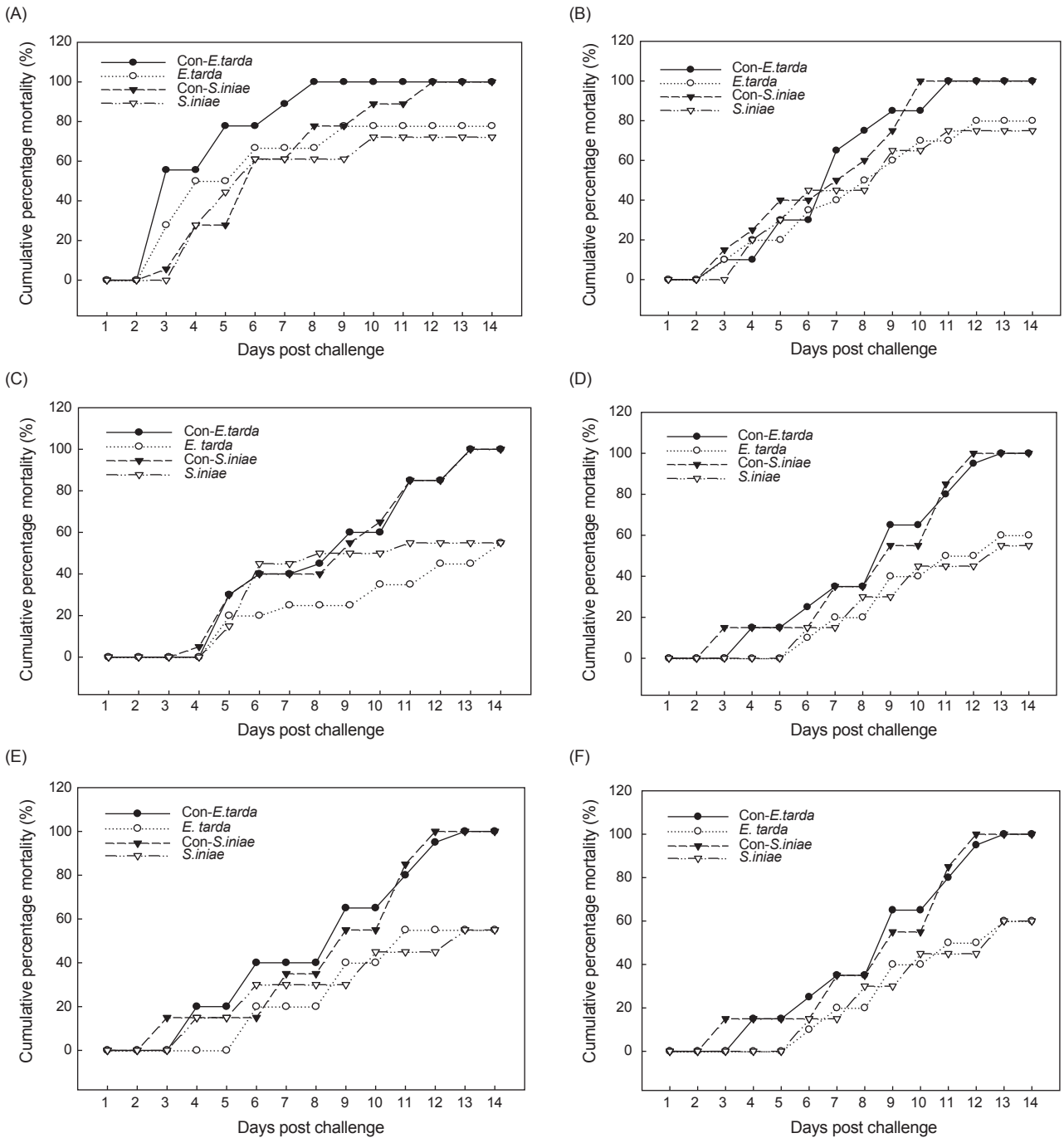


Fig. 2. Cumulative mortality rate (%) of olive flounder *Paralichthys olivaceus* in which artificially infected with *Edwardsiella tarda* after fed diet supplemented medicinal herb extracts of *Artemisia iwayomogi* Kitamura and *Angelica gigas* Nakai (0.01%) for 4 to 24 weeks. A, 4 weeks; B, 8 weeks; C, 12 weeks; D, 16 weeks; E, 20 weeks; F, 24 weeks; ●, control *E. tarda*; ○, 0.01% *E. tarda*; ▼, control *S. iniae*; △, 0.01% *S. iniae*.

상으로 생약재 추출물을 투여한 후 인위감염 실험한 결과, 황기 및 인동 추출물은 에로모나스균에 대하여 45% 상대생존율 (Ardo et al., 2008), 한련초(*Eclipta alba*) 추출물은 에로모나스

균에 대하여 57% 상대생존율(Christyapita et al., 2007), 고삼 추출물은 연쇄구균에 대하여 73% 상대생존율(Wu et al., 2013)을 나타냈다. 넙치에 생약재 추출물을 투여한 후 인위감염 실험

결과에서는 황금 추출물은 에드워드균에 대하여 최대 88% 상대생존율(Jee et al., 2012), 고삼 추출물은 에드워드균에 대하여 최대 78% 상대생존율(Seo et al., 2015), 마늘 추출물은 에드워드균에 대하여 10-55% 상대생존율(Lee et al., 2010a; Woo et al., 2010), 유자(*Citrus junos*) 추출물은 에드워드균에 대하여 30% 상대생존율(Jung et al., 2001)을 나타냈다. 이와 같이 어병 세균에 대한 상대생존율의 차이는 대상어종, 생약재의 종류와 추출방법, 공격대상 병원체의 종류와 접종농도 등의 다양한 차이에 따른 것으로 추정된다.

양식산업은 바이러스성 및 세균성 질병의 발생으로 큰 피해를 받아왔고, 치료를 위해 사용하는 화학약품과 항생제가 독성 및 내성균 발생 우려가 있다. 이런 부작용을 저감하기 위해서 생약재를 활용한 연구를 진행해왔고, 생약재는 수생동물의 비특이적 면역기능 강화에 중요한 역할을 하며, 면역체계의 항바이러스, 항균, 항기생충성 활동을 효과적으로 촉진한다고(Zhu, 2020) 알려져 있다. 그 중 개똥쑥·오배자·헛개 및 6종(황금·고삼·굴피·금은화·동과자·자소엽) 혼합 생약재 추출물을 투여한 넙치에서 *E. tarda* 백신 효능 증진에 대한 효과도 확인하였다(Hwang et al., 2015).

생약재 기반의 면역자극제는 식세포의 세포기능을 활성화하고, 살균 및 살진균 활성을 높이기 때문에, 화학제 치료와 백신 접종의 효과를 높이기 위한 가장 최적의 친환경적인 방법이다(Newaj-Fyzul and Austin, 2015; Van, 2015). 생약재 유래 면역증강제 또한 이와 동일한 작용을 하며, 화학물질 및 백신을 대체할 수 있는 효과적인 대체제로 제시되고 있다(Van, 2015). 식물 유래 천연제품인 이러한 첨가제는 높은 관심을 받고 있으며, 면역조절 물질원으로써 안전성이 더 높아, 양식장의 항생제 사용을 대체할 수 있는 보다 확실한 대안으로 선택할 수 있다(Hoseinifar et al., 2020).

이상의 본 연구결과를 종합하면, 12주 동안 투여한 1차 실험의 결과, 한인진·참당귀 혼합추출물의 농도 설정에서 0.01%의 흡습농도가 적당하며, 더 높은 농도로 투여는 가능하나 넙치의 세균성 질병에 대한 방어력을 높이는 데 효과적이지 않음을 확인하였다. 24주 동안 투여한 2차 실험의 결과, 양식 넙치의 항병력을 높이기 위해서 12주 이상은 지속적으로 투여시 효과적이며, 12주 이상 24주까지 투여하여도 넙치에 혈액생화학적 및 병리조직학적인 독성을 나타내지 않고 (Fig. S1, Fig. S2) lysozyme 활성이 12주째 이후로 더 크게 향상되지 않아, 12-18주 정도의 혼합추출물 투여가 넙치 면역력 증대와 항병성 향상에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 한인진·참당귀 혼합추출물은 장기간 투여에도 독성이 나타나지 않고, 비특이적 면역력을 높일 수 있어 항생제 대체제로서 개발 가능성이 높을 것으로 판단된다.

사 사

이 논문은 국립수산과학원 “수산용 포르말린 대체 천연물 유래 스쿠티카병 치료제 개발(R2021067)” 연구개발비 지원에 의

해 수행되었습니다.

References

- Ahn JM, Ahn MJ, Chin YW and JW Kim. 2019. Pharmaceutical studies on “Dang-Gui” in Korean journals. *Nat Prod Sci* 25, 285-292. <https://doi.org/10.20307/nps.2019.25.4.285>.
- Ardo L, Yin G, Xu P, Varadi L, Szigeti G, Jeny Z and Jeny G. 2008. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 275, 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.12.022>.
- Choi HS, Kim JS, Yu YB, Kim YC and Lee JS. 2005. Antibacterial activities of *Galla Rhois* extracts against fish pathogenic bacteria. *J Fish Pathol* 18, 239-245.
- Christyapita D, Divyagnaneswari M and Michael RD. 2007. Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol* 23, 840-852. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.03.010>.
- Harikrishnan R, Balasundaram C and Heo MS. 2010. Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol* 28, 354-361. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.013>.
- Hoseinifar SH, Sun YZ, Zhou Z, Doan HV, Davies SJ and Harikrishnan R. 2020. Boosting immune function and disease bio-control through environment-friendly and sustainable approaches in finfish aquaculture: Herbal therapy scenarios. *Rev Fish Sci Aquac* 28, 303-321. <https://doi.org/10.1080/2308249.2020.1731420>.
- Hwang JY, kwon MK, Seo JS, Kim KD, Lee YS and Jung SH. 2015. Effect of herbs on vaccine efficacy to olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *J Fish Mar Sci Edu* 27, 1491-1498. <https://doi.org/10.13000/JFMSE.2015.27.5.1491>.
- Jee BY, Seo JS, Jeon EJ, Lee EH, Choi HJ, Kim JD, Jung, SH and Park MA. 2012. Effect of various concentrations of skullcap extract in the diets on disease resistance of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *J Fish Pathol* 25, 21-30. <https://doi.org/10.7847/jfp.2012.25.1.021>.
- Jee BY, Shin KW, Lee DW, Kim YJ and Lee MK Lee. 2014. Monitoring of the mortalities and medications in the inland farms of olive flounder *Paralichthys olivaceus*, in South Korea. *J Fish Pathol* 27, 77-83. <https://doi.org/10.7847/jfp.2014.27.1.077>.
- Jeon EJ, Lee MS, Seo JS, Jung SH, Kim MS, Kang SY and Kim NY. 2020. Study of anti-pathogenic herbal materials for the eco-friendly drugs in aquaculture. *J Fish Mar Sci Edu* 32, 980-987. <https://doi.org/10.13000/JFMSE.2020.8.32.4.980>.
- Ji SC, Jeong GS, Im GS, LEE SW, Yoo JH and Takii K. 2007. Dietary medicinal herbs improve growth performance,

- fatty acid utilization, and stress recovery of Japanese flounder. *Fish Sci* 73, 70-76. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01303.x>.
- Jung SH, Son YC and Kim YC. 2001. Effect of oral administration by medicinal herb-extracts to non-specific immunity of olive flounder *paralichthys olivaceus*. *Bull Nat Fish Res Dev Inst Korea* 60, 38-44.
- Jung SH, Lee JS, Han HK, Jun CY and Lee HY. 2002. Effects of medicinal herb on non-specific immune responses, hematology and disease resistance on olive flounder *Paralichthys olivaceus* by oral administration. *J Fish Pathol* 15, 25-35.
- Jung SH, Lee NS, Jee BY and Park MS. 2008. Antimicrobial activity of hydrolysis compound of cactus stem (*Opuntia ficus-indica* var. *saboten* Makino) against fish pathogenic bacteria. *J Fish Pathol* 21, 29-34.
- Kang SY. 2005. The antimicrobial compound of *Rhus vernici-flua* barks against fish pathogenic Gram-negative bacteria, *Edwardsiella tarda* and *Vibrio anguillarum*. *J Fish Pathol* 18, 227-238.
- Kim JD, Kim LC, Kim KS, Woo SH and Park SW. 2009. The effect of omae *Prunus mume* extract on the immune response and growth rate of Japanese eel *Anguilla japonica*. *J Fish Pathol* 22, 367-374.
- Kim YJ, Seo, JS, Park JO, Jeong AR and JH Lee. 2019. Monitoring of aquatic medicine managements in South Korea. *J Fish Pathol* 32, 37-43. <https://doi.org/10.7847/jfp.2019.32.1.037>.
- Krkošek M. 2010. Host density thresholds and disease control for fisheries and aquaculture. *Aquac Environ Interact* 1, 21-32. <https://doi.org/10.3354/aei0004>.
- Lee JH, Woo SH, Eom YH, Hwang BO, Kwon MG, Bang JD and Park SI. 2010a. Effect of garlic *Allium sativum* on the immune response of olive flounder *Paralichthys olivaveus*. *J Fish Pathol* 23, 69-83.
- Lee NS, Jung SH and Jee BY. 2010b. Anti-fish pathogenic efficacy of hot water extracts obtained from 5 herbs *in-vitro*, and efficacy and toxicity in flounder of the one selected herb, skullcap. *J Fish Pathol* 23, 137-143.
- MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). 2005. 13-week repeated dose toxicity and genotoxicity study of angelicae radix 2005. MFDS, Osong, Korea, 1-77.
- Mok JS, Song KC and Choi NJ. 2001a. Antibacterial effect of fish diet soaked in *Salvia miltiorriza* extract. *Korean J Fish Aquat Sci* 14, 157-163.
- Mok JS, Song KC, Choi NJ and Yang HS. 2001b. Antibacterial activity of ethanol extract of root bark of *Morus alba* against selected fish pathogenic bacteria. *Korean J Fish Aquat* 14, 221-226.
- Newaj-Fyzul A, Austin B. 2015. Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases. *J Fish Dis* 38, 937-955. <https://doi.org/10.1111/jfd.12313>.
- Parry RM, Chandau RC and Shahani RM. 1965. A rapid and sensitive assay of muramidase. *Proc Soc Exp Biol Med* 119, 384-386. <https://doi.org/10.3181/00379727-119-30188>.
- Robertsen B, Engstad R E and Jørgensen J B. 1994. β -glucans as immunostimulants. In: *Modulators of fish immune response* (vol 1). Stolen SJ and Fletcher TC, eds. SOS Publication, Fair Haven, U.K., 83-99.
- Seo JS, Jeon EJ, Kwon MG, Hwang JY, Kim JD, Jung SH, Kim NY, Jee BY and Park MA. 2015. Effect of disease resistance on oral administration of light yellow sophora extract in olive flounder. *J Fish Mar Sci Edu* 27, 1656-1664. <https://doi.org/10.13000/JFMSE.2015.27.6.1656>.
- Seo JS, Jeon EJ, Kwon MG, Hwang JY, Kim JD, Jung SH, Kim NY, Jee BY and Park MA. 2016. Disease resistance against bacterial infection on treatment of hot-water extract with 6 herbal mixtures in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *J Fish Mar Sci Edu* 27, 1715-1723. <https://doi.org/10.13000/JFMSE.2016.28.6.1715>.
- Son CY, Baek IH, Song GY, Kang JS and Kwon KI. 2009. Pharmacological effect of decursin and decursinol angelate from *Angelica gigas* Nakai. *Yakhak Hoeji* 53, 303-313.
- Takaoka O, Lee SW, Jeong GS, Biswas A and Takii K. 2016. Dietary medicinal herbs and enzyme treated fish meal improve stress resistances and growth performance at early juvenile stage of red sea bream *Pagrus major*. *Aquac Res* 47, 390-397. <https://doi.org/10.1111/are.12506>.
- Van Hai N. 2015. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: a review. *Aquaculture* 446, 88-96. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.03.014>.
- Wang QK, Chen CX, Guo YJ, Zhao HY, Sun JF, Ma S and Xing KZ. 2011. Dietary polysaccharide from *Angelica sinensis* enhanced cellular defence responses and disease resistance of grouper *Epinephelus malabaricus*. *Aquacult Int* 19, 945-956. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9412-x>.
- Woo SH, Lee JH, Lim, YK, Cho, MY, Jung SH, Kim JW and Park SI. 2010. Effects of galic *Allium sativum* extract immersion on the immune response of olive flounder *Paralichthys olivaceus* prechallenged with pathogenic bacteria. *J Fish Pathol* 23, 199-209.
- Wu YR, Gong QF, Fang H, Liang WW, Chen M and He RJ. 2013. Effect of *Sophora flavescens* on non-specific immune response tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) and disease resistance against *Streptococcus agalactiae*. *Fish Shellfish Immunol* 34, 220-227. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.10.020>.
- Zhu F. 2020. A review on the application of herbal medicines in the disease control of aquatic animals. *Aquaculture* 526, 735422. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735422>.

부 록

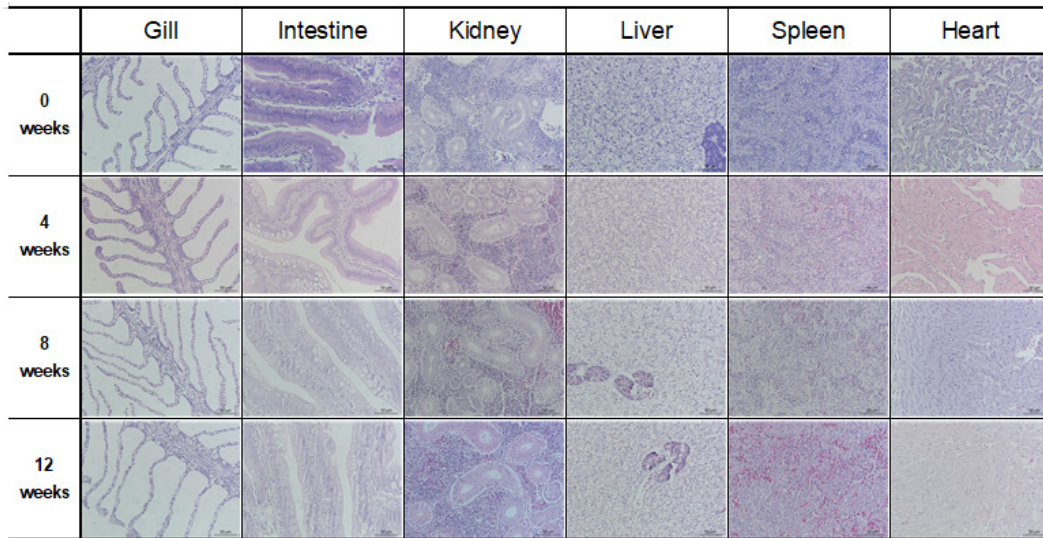


Fig. S1. Histopathological changes of olive flounder *Paralichthys olivaceus* natural products diets for 12 weeks.

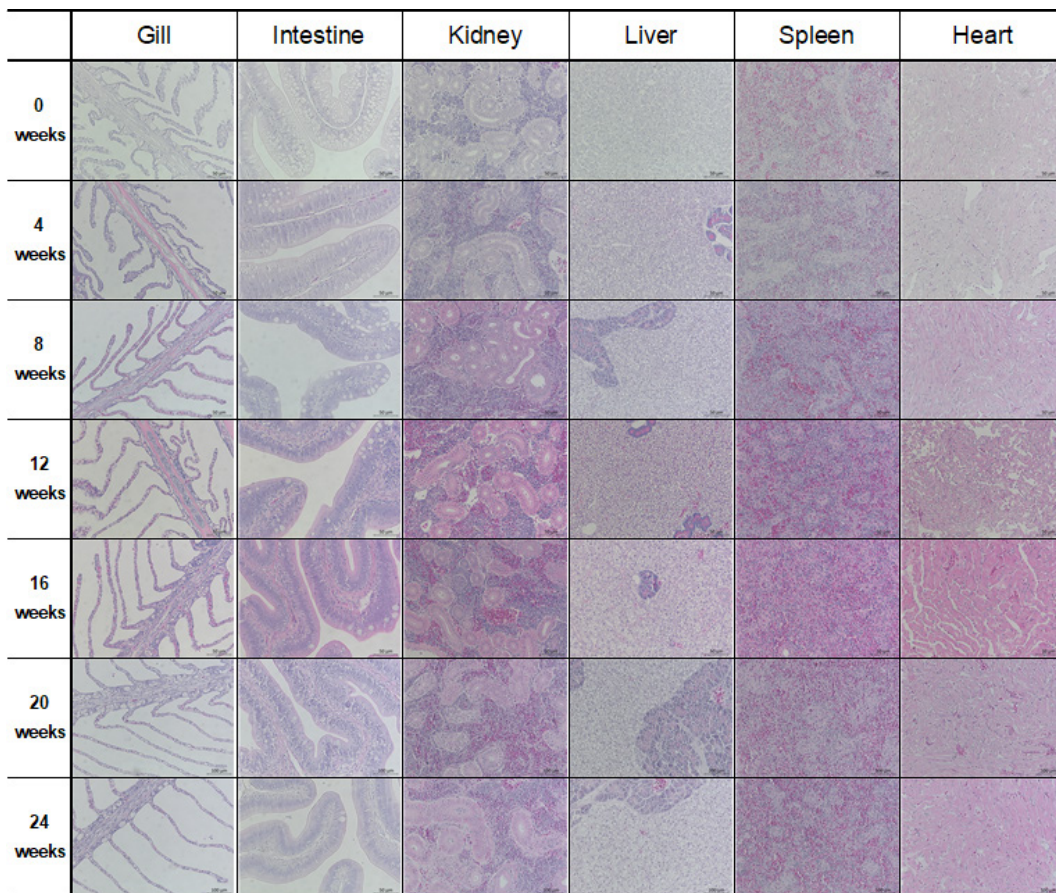


Fig. S2. Histopathological changes of olive flounder *Paralichthys olivaceus* 0.01% natural products diets for 24 weeks.