생약재 황금 뿌리 열수추출물의 넙치 투여시 질병저항성에 미치는 영향

지보영 · 서정수[†] · 전은지* · 이은혜* · 최희정* · 김진도* · 정승희* · 박명애*

국립수산물품질관리원 수산생물방역과 · *병리연구과

Effects of various concentrations of skullcap extract in the diets on disease resistance of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Bo Young Jee, Jung Soo Seo[†], Eun Ji Jeon*, Eun Hye Lee*, Hee Jung Choi*,
Jin Do Kim*, Sung Hee Jung* and Myoung Ae Park*

Aquatic Life Disease Control Division, National Fisheries Research and Development Institute(NFRDI),
Busan 619-902, Korea

*Pathology Division, NFRDI, Busan 619-902, Korea

Effects of various concentration of skullcap *Scutellaria baicalensis* in the diets on a nonspecific immunity and a disease resistance of olive flounder were investigated. After feeding trial, weight gain of fish fed 0.05% skullcap immersed group was higher than that of fish fed 0, 0.1 and 1% skullcap diet but no significant differences were observed among the experimental groups. Furthermore, no significant differences in hematological indices of olive flounder were found among the experimental groups. Lysozyme activity in the serum and kidney of the administrated group(0.05% skullcap immersed group) was significantly higher than the control group. In addition, the chemiluminescent(CL) responses of head kidney leucocytes from the 0.05% skullcap immersed group was significantly higher($P<0.05$) than the control group. In the histological results, the 1% skullcap immersed group appeared to have the detrimental effects for fish health. In a challenge experiment with *Edwardsiella tarda*(GY-01) and *Streptococcus iniae*(FT5228), relative percent survival (RPS) in the 0.05% skullcap immersed group was higher than the control group injected with *E. tarda*(GY-01) at 4th and 8th weeks. The results suggest that the skullcap extract (0.05%) would be effective to enhance the nonspecific immunity and protective ability of olive flounder against fish pathogen such as *E. tarda*.

Key words : Skullcap, *Scutellaria baicalensis*, Immunostimulant, Plant extract, Disease resistance, *Paralichthys olivaceus*

넙치는 한국에서 주요 양식어종으로 2009년도 전체 양식 어류생산량 109,477톤의 절반가량을 차지하는 54,675톤을 생산하고, 생산금액은 5,500억원 (2009

통계청)에 이르며 매년 생산량이 증가하고 있다. 넙치는 한국에서 주요 양식어종이나 밀식에 의한 집약적 양식방법에 따른 주요 세균성 질병 발생등으로 많은 피해를 입고 있다. 양식 넙치의 대표적 세균성 질병인 에드워드병 및 연쇄구균증은 다양한 양식 연령에서 연중 발생하여 심각한 경제적 손실을 일으키

[†]Corresponding Author: Jung Soo Seo,
Tel : +82-51-720-2495
E-mail : jsseosoo@nfrdi.go.kr

고, 치료를 위해 사용하는 항생제 내성도 높게 조사되어, 항생제 사용에 의한 사후 치료행위보다는 사전 적극적인 예방활동이 대단히 중요한 실정이다.

수산생물 질병치료를 위해 사용되는 수산용 항생제의 국내 연간 판매량이 80억원대 규모이고 전체 양식경영비 가운데 약품구입에 따른 양식어업인의 경제적인 손실도 결코 무시할 수 없는 실정이다. 따라서, 세균성 질병의 발생률을 감소시킬 수 있는 천연생약재를 이용한 사료첨가제의 개발은 항생제 사용저감과 안전한 양식수산물의 안정적인 생산을 위한 효과적인 대처방안이 될 수 있다. 최근, 여러 종류의 식물(herbs)추출물을 이용하여 조피볼락, 무지개송어, 틸라피아, 잉어등의 다양한 어류에 대하여 긍정적인 효과를 보는 논문이 발표 되고 있다. 국외에서는 한련초가 틸라피아 (Christyapita *et al.*, 2007), 황기와 인동은 나일틸라피아 (Ardo *et al.*, 2008), 황기와 영지버섯은 잉어 (Yin *et al.*, 2009), 벌꿀 과 음양곽은 잉어과의 연자홍 (chinese sucker)(Zhang *et al.*, 2009)에 투여하였을 때, 면역력 증강효과 및 세균감염 (에로모나스균)에 대한 저항력이 확인되었다. 이외에도 감초, 판란근 등이 효능이 있었으며, 인도산 님 나무, 홀리 바실 및 인디안 구즈베리의 열매 등도 효능이 보고되었다 (Galina *et al.*, 2009). 국내에서는 김 등 (1994)이 천연생약재의 항균활성을 어병세균에 적용을 검토하였으며, 이후, 정 등 (2001)이 삼지구엽초, 약쑥, 지유에서 추출한 물질을 대상으로 어병세균에 대한 항균력 및 어체 면역에 대한 연구를, 또한, 오배자, 칠피, 홍삼, 유자, 마늘 등의 생약재추출물의 항균 효능, 어체면역반응에 대한 보고도 이어지고 있다 (조 등, 2002; 강, 2005; 최 등, 2004; 최 등, 2005; 정 등, 2010; 이 등, 2010).

황금 (skullcap)은 속썩은 풀 (*Scutellaria baicalensis* Georgi)의 주피를 벗긴 뿌리를 말린 것으로서, 한국,

중국, 일본 등지에서 주로 사용하는 생약재로 그 주성분은 baicalein, wogonin, baicalin 등으로 알려져 있으며, 소염, 진통, 항알러지, 항균 그리고 항암작용 등의 효능을 가지고 있어 이들 물질의 다양한 효능에 대한 연구가 이루어지고 있다 (Chou *et al.*, 2003, Taira *et al.*, 2004).

우리는 이전 연구에서 한국에서 주로 사용되는 한약재를 대상으로 *in vitro* 상의 어병 세균에 대한 항균활성이 높은 황금을 선택하여 넙치에 대한 항균 효능을 수행하였으나 (이 등, 2010), 효과적인 결과를 얻지 못하였다. 따라서, 본 연구에서는 황금의 열수추출물을 다시 얻어 사료에 흡습하는 방법으로 주요 양식 어종인 넙치에 투여 후, 어류의 비특이 면역의 증진 및 질병저항성에 대한 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

어류

양식 넙치는 국립수산물과학원 육종연구센터로부터 얻었다. 어류는 2.5 ton 크기의 FRP 수조 (fiber reinforced plastic tanks)에서 수온이 20℃가 유지되도록 유지하면서 유수식으로 해수를 계속 공급하면서 유지하였다. 각 실험그룹 당 어류는 120마리 (평균 무게 70±12 g)를 수용하여 실험에 임하였다.

식물추출물(Herbal extract)

황금의 뿌리는 2009년 3월에 국내의 한약재상사 (대창 생약)를 통하여 구입하였다. 뿌리는 멸균증류수로 2번을 씻은 후 추출에 이용하였다. 열수추출은 뿌리 중량 (200g) 의 열배에 해당하는 증류수(2 L)를 첨가한 후 고압추출기 (90-120℃, 압력 0.2 kgf/cm²)에서 6시간동안 끓였다. 얻어진 액은 여과지로 여과하여, 감압농축기 (rotary vacuum evaporator)를 이용하여

농축하였다. 농축된 잔류물 (100 ml)은 냉장보관 (4°C)하면서 사료첨가용 stock solution으로 사용하였다.

사료 제조 및 투여

실험용 사료는 일반적으로 판매되는 수협사료에 사료 무게 (kg) 당 원액추출물을 0.05%, 0.1%, 1%되게 습윤 시켜 제조하였다. 대조구 사료는 일반 사료를 사용하였다. 제조된 사료는 -20°C에 보관하면서 매일 일정분량의 사료를 사용 전에 꺼내어 4°C에서 보관하면서 동일한 양을 하루 한번 반복 급여하였다.

실험어의 생체 및 생리변화 측정

0, 4주, 8주 및 12주차에 실험구와 대조구에서 각각 10마리씩 무작위로 선택하여 어체중 및 간중지수 (Hematosomatic index; HSI; 간중량/체중×100)를 측정하여 10마리의 평균값을 구하였다. 실험구별 어체의 생체, 생리활성을 조사하기 위하여 부검 시 개체마다 미부정맥에서 채혈하여 원심 (12,000 rpm, 15분)분리한 후 얻어낸 혈장을 냉동보관 (-80°C)하였다가 3일 이내에 혈액화학분석기 (FUJI DRY CHEM3500i)를 사용하여 혈액생화학적변화를 측정하였다. 혈장화학성분은 글루코즈 (mg/dl), 총콜레스테롤 (mg/dl), 요소질소 (mg/dl), 젖산탈수소효소 (U/L), GOT (U/L), GPT (U/L), 총단백 (g/dl), 알칼리성포스파타제 (U/L) 등 8개 항목을 측정하였다.

Lysozyme 활성 측정

면역증강 효과를 나타내는 라이소자임 활성은 혈액과 조직으로 나누어서 실시하였다. 혈장 (Plasma) lysozyme activity는 Parry의 방법 (1965)을 변경하여 측정하였다. 간단히 설명하면, 발색법 (Turbidimetric assay)은 0.05mM sodium phosphate buffer (pH6.2)에 미리 녹여둔 *Micrococcus lysodeikticus* (0.2 mg/ml)를 기

질로 사용하였다. 어류의 혈장을 원액 (100 µl) 및 10배 희석한 액을 기질 100 µl와 혼합하여 마이크로플레이트 리더 (microplate reader)기에서 37°C에서 0.5분 및 5분 간 600 nm에서 측정하여 흡광도의 감소율을 측정하였다. 각 조직 (간, 신장 및 비장) lysozyme activity는 상기의 방법을 약간 변형하여 분석하였다. 0.1g의 조직을 10배 volume의 0.05 mM sodium phosphate buffer (pH6.2)로 충분히 균질화(homogenize)한 후, 원심분리 (12,000 rpm, 4°C, 10 min)하여 상등액을 얻은 후, 상등액을 흡광도 600nm에서 O.D 1.0으로 보정하여 상기와 같은 방법으로 측정하였다.

식세포 활성 조사

4, 8, 12주차에 실험구와 대조구에서 넙치 (각 그룹 별 4마리)의 각 개체별로 두신을 무균적으로 절취하여 2% penicillin/streptomycin solution (Difco, Fracne)과 1% heparin 이 함유된 L-15 medium (Sigma)을 소량 분주한 소형 페트리디쉬에서 nylon mesh에 통과시킨 세포 현탁액을 준비하였다. 준비된 세포현탁액은 percoll gradient (54%) centrifuge 방법에 의하여 leucocytes를 분리하였다. 분리한 leucocyte는 0.1% trypan blue를 이용하여 세포수를 1×10^6 cells/ml로 조정한 후, 96 well plate에 분주 하여 부착시켰다. 부착된 leucocyte에 70 µl luminol solution (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazineedione, Sigma)을 넣어 10분 간 반응 시킨 후, 넙치 혈청으로 감작한 zymosan (30 µl)을 첨가한 다음 well의 phagocytic activity을 luminescence counter (Perkin elmer, USA)를 이용하여 밀리볼트 (milivolt)로 측정하였다.

병리조직학적 조사

병리조직학적 검사를 위하여 각 기간별로 간, 비장 및 신장 조직을 채취하여 10% 중성완충포르말린에

고정하고 상법에 따라 조직절편을 만들고, Hematoxyline and Eosin (H&E) 염색을 하여 광학현미경하에서 조직학적 관찰을 실시하였다.

항병력 조사

Edwardsiella tarda (GY-01) 및 *Streptococcus iniae* (FT5228)는 국립수산물학원에서 보관하는 균주를 이용하였다. 각 균주는 MH (Muller Hinton) agar배지에서 계대 배양하였다. 세균을 복강 주사하기전에 멸균생리식염수를 이용하여 평판배지위의 세균을 모은 후 4℃, 원심분리기에서 3회 세척 후 멸균생리식염수에 현탁하여 *E. tarda* (GY-01)와 *S. inae* (FT5228)를 각각 어체 당 $0.99 \times 10^6 \sim 2.8 \times 10^6$ CFU와 $1.15 \times 10^6 \sim 1.27 \times 10^6$ CFU로 복강 주사하였다. 대조구에는 생리식염수를 동량 주사한 후 21일 후의 생존율을 조사하여 대조구에 대한 상대생존율로 평가하였다.

통계학적 분석

대조구와 시험구 간의 통계학적 유의성은 Student's t-test로 비교하였다 ($P < 0.05$).

결과 및 고찰

넙치의 성장 및 혈액학적 성상

일반적으로 천연물을 이용한 생약제제는 주로 복합제제로 제형이 불규칙하고, 함량이나 제조법등이 일반 의약품에 비해 복잡하고 불규칙하므로 생약 성분 추출물의 사용에 대한 주의가 필요하다고 알려져 있다. 이전의 연구(이 등, 2010)에서 우리는 황금을 중탕의 방법(3시간, heating)으로 추출물을 얻어 넙치에 대한 성장 및 항병력등을 측정하였다. 이번 연구에

서는 고압추출기(90-120℃, 압력 0.2 kgf/cm²)를 사용하여 추출물을 얻은 후 넙치의 성장, 면역 및 질병저항성을 조사하였으며, 중탕 및 고압추출기를 이용하여 추출물을 얻었을 경우 *in vitro* 상의 항균활성등이 또한 차이가 남을 알 수 있었다.

황금 추출물의 첨가량에 따른 넙치의 체중 및 간중지수는 대조구와의 차이에서 0.05% 첨가그룹에서 약간 높았으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Table 1). 그러므로 대조구에 비해 낮은 농도의 황금 추출물의 첨가가 넙치의 성장률에 약간 영향을 미치나 성장도 개선에는 효과가 없을 것으로 보아졌다. 그러나 이전의 손바닥선인장 줄기 가수분해물, 유자 추출물 및 한양탕제 부산물등의 결과에서도 체중의 유의적인 증가는 없으나 건강도가 향상된다고 보고한 결과(우 등, 2010; 이 등, 2010) 아마도 사료에 첨가되는 생약추출물의 경우 공통적으로 넙치의 면역력은 증가될 수 있으나 체중의 증가는 크게 나타나지 않는 것으로 사료된다.

혈액생화학적 결과 대조구와 황금 추출물의 농도 그룹간에는 별다른 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 1). 이는 중탕 및 고압추출기로 얻어 넙치에 농도별로 투여시에 넙치의 혈액생화학적 영향에는 별다른 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다(이 등, 2010). 다양한 식물추출물의 어류에 대한 혈액화학적 영향에 대한 논문을 조사하면 자운영과 인동을 먹인 틸라피아(*Oreochromis niloticus*)의 전체 단백질 등의 혈액화학적 결과에 영향을 미치지 않으며(Ardo *et al.*, 2008), 금붕어에 3종류(메타리카, 홀리바질, 울금)의 식물잎을 추출한 것을 먹였을 경우에도 혈액화학 성상에 별다른 영향을 미치지 않는다고 알려져 있다(Harikrishnan *et al.*, 2010).

Table 1. Physiological and hematological changes in flounders fed commercial EP(control) and skullcap absorbed EP (0.05%, 0.1%, 1%) for 12th weeks

Duration	Con.	Body weight	*HSI	GLU (mg/dl)	TCHO (mg/dl)	BUN (mg/dl)	LDH (U/l)	GOT (U/l)	GPT (U/l)	TP (g/dl)	ALP (U/l)
0	0%	70±12	1.1±0.2	20±2.7	207±37	1.7±0.5	160±32.1	22±2.9	1.2±0.2	4.1±0.1	203±26
4 ^{wks}	0%	103±18	1.1±0.3	17±2.2	157±9.1	1.0±0.1	270±64.6	22±2.6	1.1±0.1	4.0±0.2	200±28
	0.05%	111±24	1.5±0.3	23±5.8	241±19	2.0±0.2	373±102	35±4.4	6.0±0.7	5.1±0.2	252±18
	0.1%	109±11	1.2±0.3	13±3.2	137±12	1.1±0.3	213±62.0	22±3.0	1.3±0.2	3.8±0.1	163±23
	1%	100±19	1.5±0.2	11±2.5	167±8.8	3.0±0.5	113±31.2	28±7.5	1.7±0.4	2.8±0.3	164±17
8 ^{wks}	0%	147±20	1.2±0.4	16±1.5	222±11	5.4±0.8	126±67.7	15±4.3	2.6±0.7	4.1±0.2	233±21
	0.05%	157±16	1.7±0.3	15±0.9	242±11	2.3±0.2	178±60.7	14±0.7	2.6±0.2	4.2±0.1	181±17
	0.1%	139±25	1.1±0.2	16±1.4	219±6.8	1.0±0.1	244±71.8	35±8.9	9.8±7.9	5.1±0.1	352±19
	1%	155±18	1.4±0.3	17±4.5	199±16	1.7±0.2	238±99.1	37±5.1	3.9±1.1	5.0±0.1	356±26
12 ^{wks}	0%	182±18	1.2±0.2	21±3.8	262±23	2.0±0.3	222±160	24±7.6	5.4±0.7	4.9±0.2	227±54
	0.05%	193±24	1.5±0.3	15±2.4	293±22	1.4±0.1	276±159	30±9.9	6.2±1.71	5.6±0.2	190±25
	0.1%	192±11	1.2±0.3	17±1.7	234±20	0.3±0.2	160±66.8	17±2.2	2.6±0.5	4.5±0.2	272±22
	1%	178±12	1.3±0.3	16±1.0	180±8.7	0.3±0.1	157±44.7	15±1.2	4.2±0.3	4.3±0.1	258±13

*HSI (Hepatosomatic Index) = (whole liver wight/whole body weight)×100

넙치 면역 활성

황금 투여에 따른 넙치에 비특이적 면역활성을 측정하기 위하여 혈장 및 조직내의 lysozyme 활성과 식세포활성을 측정하였다. 먼저 혈장내의 lysozyme 활성은 0.05%, 0.1% 및 1%의 황금을 흡습시킨 사료를 섭취한 시험구와 대조구의 혈장내의 lysozyme 활성값을 조사하였을시에 0.1%, 1% 투여그룹에서는 투여기간별로 넙치의 혈장 라이소자임 활성의 변화는 유의적인 차이가 거의 없었다. 그러나 0.05% 황금을 흡습시킨 넙치의 혈장내 lysozyme 활성을 측정하였을시에 모든 기간 대조구에 비하여 혈장내 lysozyme 활성이 높으며, 특히 8주째에는 유의성 있는 결과를 얻었다 (Table 2). 조직내의 lysozyme 활성을 측정하기 위하여 4, 8 및 12주차에 각 시험구별로 넙치의 간, 비장 및 신장조직을 절취하여 활성을 측정하였다. 4주 및 8주 동안 0.05%의 황금을 흡습시킨 넙치의 신장 및 비장조직의 lysozyme 활성은 유의성

있게 증가하였다. 그러나, 12주째 및 다른 농도 (0.1% 및 1% 황금 투여구)를 흡습시킨 경우에는 조직내의 lysozyme 활성이 유의적으로 증가하지는 않았다 (Table 2). 이와 같이 라이소자임 활성이 시험구가 대조구에 비해 크다는 것은 양식 사료를 섭취한 넙치의 비특이적 면역 반응을 증가시켰다는 것을 의미한다. 이는 이전의 이 등(2010)의 결과와는 차이가 있는데 아마도 농도 및 추출방법에 따른 차이로 판단된다.

넙치의 식세포활성에 있어서의 1%, 0.1% 및 0.05% 황금 농도로 흡습시킨 양식사료를 투여한 넙치의 4주 및 8주차 0.05% 황금농도 그룹에서만 식세포활성이 대조구에 비해 유의적으로 증가함을 알 수 있었다 (Fig. 1). Robertsen *et al.* (1994)는 lysozyme의 활성도가 식작용 및 두신 백혈구의 ROIs 생성과 상응하여 일어난다고 보고하고 있어 0.05% 농도의 고삼 투여가 넙치 신장 조직의 lysozyme 활성과 연관관계가 있을 것으로 판단된다.

Table 2. Lysozyme activity (mean±SD unit/ml) in olive flounder fed commercial EP and skullcap absorbed EP for 12th weeks

Tissue	Duration (Weeks)	Control (unit/ml)	Diet(%) (unit/ml)		
			0.05%	0.1%	1%
Plasma	0	71±17	-	-	-
	4th	77±12	83±12	72±8	56±6
	8th	60±12	94±7*	51±12	48±10
	12th	64±15	71±11	57±5	44±6
Liver	0	7.02±5.12	-	-	-
	4th	6.97±2.19	6.44±2.06	5.24±8.06	7.64±3.26
	8th	5.39±1.60	5.93±2.52	6.43±6.55	8.95±5.83
	12th	8.52±4.45	9.38±2.90	8.35±8.93	5.38±9.90
Spleen	0	7.04±4.62	-	-	-
	4th	6.82±1.49	7.39±1.53	5.83±5.49	9.59±9.58
	8th	6.72±1.80	9.75±3.91	5.42±5.80	9.75±5.95
	12th	16.45±5.89	14.68±5.14	12.45±8.99	18.68±9.16
Body kidney	0	5.45±2.22	-	-	-
	4th	4.08±1.73	7.38±1.85*	6.58±2.73	6.35±1.25
	8th	4.26±1.77	9.20±1.84*	8.26±5.97	5.28±6.24
	12th	13.20±2.17	18.6±2.97*	13.20±2.17	13.6±2.97

*, significant difference form control, $p<0.05$

Fig. 1. Effect of the different doses of skullcap extracts on the CL response of head kidney leucocytes from olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Values are mean±SEM, n=5 fish per group. * Significant difference ($P<0.05$).

병리조직학적 특성

0.05%, 0.1% 및 1% 농도로 황금을 흡습시킨 사료를 넙치에 투여시 4주, 8주 및 12주에 간, 신장 및 비장조직의 병리조직학적 특성을 조사하였다. 전 기간 동안 비장 및 신장 조직의 병리조직학적 병변은 관찰되지 않았다 (data not shown). 그러나, 1% 농도로 황금을 흡습시킨 사료를 투여한 넙치의 간조직에서 4주째에 간조직에 비구역성 괴사가 관찰되었으며 (Fig. 2B), 8주째는 혈관을 중심으로 정상적인 부위와 명확하게 구분되는 괴사소가 관찰되었다 (Fig. 2C). 이는 황금추출물 농도가 1% 이상이 되면 넙치 간 실질세포의 괴사 및 지방변성의 스트레스(간독성과 유사)를 유발하며, 이러한 괴사정도는 황금 추출물의 농도에 비례할 것으로 예상되었다. 게다가 5% 이상

Fig. 2. Histological changes of the liver of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* at 4th and 8th weeks feeding by 1% skullcap extracts immersed diets. (H&E stain, ×400).

의 고농도로 사료를 흡습시켜 투여시 2주 이내에 간 조직내에 공포화 및 지방변성이 나타남을 알 수 있었다 (data not shown). 이전 논문에 따르면 황금은 skullcap diterpenoid (SCD) 성분이 있으며 이로 인한 간 손상 기작이 자세히 밝혀져 있다 (Haouzi *et al.*, 2000). 즉, SCD가 다양한 대사과정을 거쳐 세포손상을 예방하거나 혹은 caspases system을 활성화시켜 세포 자멸사 (cell apoptosis)나 세포괴사의 과정에 이르게 한다. 이번 연구에서 황금 추출물 농도 0.1% 이하에서는 넙치의 간 조직에 무독한 물질로 인식이 되나, 1% 이상에서는 넙치 간 실질세포의 괴사 및 지방변성을 유발함을 알 수 있었다. 이는 일반적으로 천연물을 이용한 생약제제는 주로 복합제제로 제형이 불규칙하고, 함량이나 제조법등이 일반 의약품에 비해 복잡하고 불규칙하므로 생약 성분 추출물의 사용에 대한 주의가 필요하다고 보아진다.

병원성 세균에 의한 질병저항성

0.05%, 0.1% 및 1% 황금농도로 양식 사료를 흡습시킨 넙치의 어병 세균인 *E. tarda* 및 *S. iniae*에 대한 질병 저항성 (disease resistance)를 측정하기 위해 각각

4주, 8주 및 12주차에 세균공격실험을 하였다. 모든 기간 동안 *S. iniae*에 대하여서는 유의적인 효과를 얻지는 못하였으나 (data not shown), 12주째 0.1% 농도로 황금을 흡습시킨 사료를 섭취한 시험구는 어병 세균인 *E. tarda* 및 *S. iniae*에 비해 질병 예방효과가 어느 정도 있음을 알 수 있으나 상대생존율의 값인 50% 선을 넘지는 못하였다 (Table 3). 그에 반해 0.05% 농도로 황금을 흡습시킨 사료를 먹인 넙치의 4주 및 8주차에 어병 세균인 *E. tarda*의 공격에 대하여 넙치의 누적 폐사율이 대조구에 비하여 낮게 나타남을 알 수 있었다 (Fig. 3). 게다가, 4주 및 8주차의 상대생존율을 조사하였을시에 70-80% 이상의 높은 상대생존율을 나타낼 수 있었다. 상대생존율을 조사시 연쇄구균 *S. iniae*의 넙치에 대한 질병저항성이 높게 나타나지 않은 경우는 아마도 단일 농도의 세균 공격실험으로 인한 상대생존율의 차이로 이런 결과가 나오지 않았는가 보아진다. 다양한 식물 추출물의 세균 공격에 따른 상대생존율을 조사한 논문에서 따르면 *Aeromonas hydrophila* 인위 공격 실험에 대한 자운영과 인동을 먹인 틸라피아 (*Oreochromis niloticus*)의 상대생존율은 대략 45% (Ardo *et al.*, 2008), 국화과의 인도초 (*Eclipta alba*)를

먹인 톨라피아 (*O. mossabicus*)가 상대생존율이 57% (Christyapita *et al.*, 2007), *Azadirachta indica*, *Ocimum sanctum* 등을 용매로 추출하여 먹인 금붕어 (*Carassius auratus*)에 대한 상대생존율은 75% 이상 (Harikrishnan *et al.*, 2009; 2010)으로 나타나며, *E. tarda* 인위 공격실험에 대한 마늘 (*Allium sativum*) 추출물의 넘치에 대한 상대생존율은 10%~55%로 나타나며 (Cho *et al.*, 2010; 이 등, 2010, 우 등, 2010), 유자 (*Citrus junos*)추출물의

경우는 상대생존율이 30% (정 등, 2010)로 다양하게 나타났다. 이러한 상대생존율의 차이는 아마도 대상 어종, 생약 추출 방법 및 투여 농도의 차이에 따른 것으로 판단된다. 그러므로, 황금을 추출한 시료원액을 일반 시판용 배합사료에 첨가하여 0.05% 농도로 양식어류에게 투여할 경우, 일반 시판용 배합사료만 섭취한 대조구에 비하여 성장도 및 면역활성 증가로 인한 세균에 대한 방어 능력이 향상됨을 알 수 있다

Table 3. Relative percent survival (RPS)¹ of experimentally *E. tarda*² or *S. iniae*³ infected flounders fed skullcap adsorbed EP for 12th weeks.

Strain		4 weeks			8 weeks			12 weeks		
		0.05%	0.10%	1%	0.05%	0.10%	1%	0.05%	0.10%	1%
R P S	<i>E.tarda</i>	88	0	0	66	0	0	10	10	0
	<i>S.iniae</i>	0	0	0	0	0	0	0	10	0

¹ 1-(mortality of test group (%) / mortality of control group (%))× 100

² *E. tarda* ($0.99 \times 10^6 \sim 2.8 \times 10^6$ CFU/fish, 0.1ml/fish)

³ *S. iniae* ($1.15 \times 10^6 \sim 12.7 \times 10^6$ CFU/fish, 0.1ml/fish)

Fig. 3. Cumulative mortality rate (%) of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* given different experimental diets during the experimental period (4th week(A) and 8th week(B)).

요 약

넙치 사료에 열수 추출한 황금을 0, 0.05, 0.1, 1% 흡습시켜 12주동안 사육하는 동안 어류의 비특이면역의 증진 및 질병저항성에 대한 효과를 알아보았다. 황금을 첨가한 사료에서 성장의 유의적인 증가는 없었으나, 초기 4주간 증가하는 경향은 있었다. 혈액화적인 조사 결과에서도 황금 첨가로 인한 넙치의 생리 생태에 부정적인 영향을 나타내지 않았다. 혈청 및 각 조직의 라이소자임 활성은 0.05%의 황금 농도로 흡습시킨 사료 그룹에서 유의적으로 라이소자임 활성이 증가되었다. 백혈구의 식활성을 측정하였을시에 0.05%의 황금 농도로 흡습시킨 사료 그룹에서 유의적으로 백혈구의 식활성이 증가되었다. 병리조직학적 결과에 따르면 넙치 사료에 열수 추출한 황금을 1% 이상 흡습시켜 투여시에는 간 조직에서 괴사가 진행됨을 알 수 있었다. 어류병원세균의 인위감염에 대한 넙치의 질병저항성은 0.05%의 황금 농도로 흡습시킨 사료 그룹에서 *E. tarda* (GY-01)균에 대하여 상대생존율이 높게 나타났다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 황금 열수 추출물의 넙치에 대한 면역능 향상과 어류 질병의 저항성 증강에 효과가 있는 것으로 사료되나, 1% 이상 첨가시에는 어류생리학적으로 부정적인 영향이 나타나므로 0.05%이하로 투여하여야 할 것으로 판단되었다.

감사의 글

이 연구는 국립수산물과학원의 연구비 지원에 의해 운영되었습니다.

참고문헌

- Ardo, L., Yin, G., Xu, P., Varadi, L., Szigeti, G., Jeny, Z. and Jeny, G.: 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*. *Aqua*, 275:26-33, 2008.
- Cho, S.H., Lee, S.M. and Kwon, M.G.: Effect of various concentrations of garlic powder and garlic extract in the diets on growth, serum chemistry and immune response of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish. Pathol.* 23:409-420, 2010.
- Chou, T.C., Chang, L.P., Li, C.Y., Wong, C.S. and Yang, S.P.: The antiinflammatory and analgesic effects of baicalin in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia. *Anesthesia and Analgesia*, 97: 1724-1729, 2003.
- Christyapita, D., Divyagnaneswari, M. and Michael, R.D.: Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shell. Immunol.* 23:840-852, 2007.
- Galina, J., Yin, G., Ardo, L. and Jeny, Z.: The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. *Fish Physiol. Biochem.*, 35:669-676, 2009.
- Haouzi, D., Lekehal, M., Moreau, A., Moulis, C., Feldmann, G., Robin, M.A., Letteron, P., Fau, D. and Pessayre, D.: Cytochrome P450-gene-related reactive metabolites cause mitochondrial permeability transition, caspase activation, and apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 32:303-311, 2000.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Kim, M.C., Kim, J.S., Han, Y.J. and Heo, M.S.: Innate immune response and disease resistance in *Carassius auratus* by triherbal solvent extracts. *Fish & Shell. Immunol.*

- 27:508-515, 2009.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Heo, M.S.: Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shell. Immunol. 28:354-361, 2010.
- 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.
- Robertsen, B., Engstad, R.E. and Jørgensen, J.B.: β -glucans as immunostimulants. In: Stolen, S.J. and Fletcher, T.C. (eds) Modulators of Fish Immune Response (vol 1), pp83-99 SOS publication, Fair Haven, UK, 1994.
- Taira, Z., Yabe, K., Hamaguchi, Y., Hirayama, K., Kishimoto, M., Ishida, S. and Ueda, Y.: Effects of Sho-saiko-to extraxt and its components, Baicalin, baicalein, glycyrrhizin and glycyrrhetic acid, on pharmacokinetic behavior of salicylamide in carbon tetrachloride intoxicated rats. Food Chem. Toxicol., 42:803-807, 2004.
- Yin, G., Ardo, L., Thompson, K.D., Adams, A., Jeney, Z. and Jeney, G.: Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shell. Immunol. 26:140-145, 2009.
- Zhang, G., Gong, S., Yu, D. and Yuan, H.: Propolis and herba epimedii extracts enhance the non-specific immune response and disease resistance of chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. Fish & Shell. Immunol. 26:467-472, 2009.
- 강소영: 어류병원성 그람음성세균 *Edwardsiella tarda*와 *Vibrio anguillarum*에 대한 칠피의 항균활성물질, 18:227-238, 2005
- 김영길, 노범진, 이근광: 어병 세균에 대한 쑥 정유의 항균력 검색, 한국어병학회지, 7:113-117, 1994.
- 우승호, 이준희, 김이경, 조미영, 정승희, 김진우, 박수알: 어류 병원성 세균 공격 후 마늘, *Allium sativum* 착즙액의 침지가 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 면역반응에 미치는 영향. 한국어병학회지, 23:199-209, 2010.
- 이준희, 우승호, 엄용환, 황분옥, 권문경, 방종득, 박수알: 마늘, *Allium sativum*이 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 면역반응에 미치는 영향, 한국어병학회지, 23:69-83, 2010.
- 이남실, 정승희, 지보영: 생약재 5종 열수추출물의 어류 병원체에 대한 *in vitro* 약효와 선택된 한중(황금)의 넙치에서의 항균효능과 독성시험. 한국어병학회지, 23:137-143, 2010.
- 정승희, 손영찬, 김이창: 식물성 생약재 열수추출물이 어병 원인세균에 대한 항균활성 및 넙치 식세포의 활성산소 생산에 미치는 *in vitro* 효과. 한국어병학회지, 14:3-10, 2001.
- 조미라, 김진우, 김동수: 어류질병 세균에 대한 천연식물 및 망태버섯 추출물의 항균활성. 한국수산학회지, 25:578-582, 2002.
- 최혜승, 김이청, 이주석, 조미라, 서창호, 박수알: 천연 생약재 열수 및 알콜 추출물의 어병세균에 대한 항균력. 한국어병학회지, 17:39-55, 2004.
- 최혜승, 김진숙, 장대식, 유영범, 김이청, 이주석, 오배자: 추출물의 어병세균에 대한 항균 효능. 한국어병학회지, 18:239-245, 2005.

Manuscript Received : October 10, 2011

Revised : March 23, 2012

Accepted : April 5, 2012