

복합 생약재 열수추출물 투여에 따른 넙치 세균성 질병에 대한 질병저항성

서정수[†] · 전은지 · 권문경 · 황지연 · 정승희 · 김나영 · 지보영 · 박명애
(국립수산과학원)

Disease Resistance against Bacterial Infection on Treatment of Hot-water Extract with 6 Herbal Mixtures in Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*

Jung Soo SEO[†] · Eun Ji JEON · Mun Gyeong KWON · Jee Youn HWANG · Sung Hee JUNG ·
Na Young KIM · Bo Young JEE · Myoung Ae PARK

(National Institute of Fisheries Science)

Abstract

The heat extracts of six kinds of medicinal herbs (*Scutellaria baicalensis*, *Sophora flavescens*, *Citrus unshiu pericarpium*, *Lonicera japonica*, *Perilla frutescens*, *Benincasa hispida*) were tested for non-specific immune response and disease resistance effects related with fish diseases on olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. The preventive effects of 6 herbal mixtures against bacterial disease on cultured flounder were examined follow as feeding EP absorbed with the heat extract of six kinds of medicinal herbs. For feeding trial for 12th week, weight gain and serum analysis of fish fed various groups were not significant differences. Lysozyme activity of the 0.01 % treated group on 4th week showed significant increase. Histopathology of the administrated group for feeding period showed no particular signs of tissue degeneration. At 0.01% oral experimental group, relative percent survival (RPS) were only 50% to 75% for four weeks and eight weeks group by intraperitoneal injection with *E. tarda*. The results suggest that heat extracts of six kinds of medicinal herbs (0.01%) would be effective to enhance the nonspecific immunity and protective ability of olive flounder against fish pathogen.

Key word : Herb extract, Immunostimulant, Disease resistance, *Paralichthys olivaceus*

I. 서론

넙치(olive flounder, *Paralichthys olivaceus*)는 한국에서 주요 양식어종으로 2015년도 전체 양식 어류생산량 85,448톤의 53%를 차지하는 45,759톤을 생산하고, 생산금액은 5,042억원(2016 통계청)으로 전체 56.2%를 차지하는 주요 어종이다. 넙치 양식은 한국에서 주요 양식어종이며, 육상 수

조식 시설에서 사육 밀도 증가 등에 의하여 주요 병원체 중 세균성질병 등으로 많은 피해를 입고 있다. 넙치의 대표적 세균성 질병 중 에드워드병 및 연쇄구균증은 사육 기간 동안 연중 발생하며 심각한 경제적 손실 등을 입혀, 예방 및 치료를 위해 항생제 및 수산용 백신을 사용하는 형편이다. 그러나, 수산용 백신의 경우는 경제적 비용 등에 따라 현장에서는 아직 항생제가 많이 사용

[†] Corresponding author : 051-720-3041, jsseosoo@korea.kr

* 이 논문은 국립수산과학원 연구비지원(R2016069)에 의해 연구되었음.

되며 이에 따른 항생제 내성도 높게 나타나므로 정부에서는 항생제 사용에 의한 치료보다 수산용 백신, 면역증강제 등의 사용을 지원하고 있다.

최근 5년간 국내 수산용 의약품의 판매량은 200억~300억원 규모이며, 전체 양식생산비 중 의약품 비용이 매우 큰 편이다(한국동물약품협회 제공). 따라서, 넙치 세균성 질병의 발생률을 감소시킬 수 있는 방안을 마련하여야 하며, 이 중 에서 생약재를 이용한 의약품 개발은 항생제 감소 및 환경 친화적인 양식수산물 생산에 있어 효과적인 방안이라고 보아진다. 양식 어류의 질병 예방과 함께 생리기능을 향상시키고 아울러 육질 개선 및 성장촉진을 도모할 수 있는 생약재에 대한 연구는 국내외에서 1990년대부터 활발히 연구되어져 왔다. 어보산, 알로에, 정유, 녹차, 구기자, 인삼, 오미자, 하수오, 단삼, 상백피, 계피, 감귤발효액, 약쑥, 연교, 삼지구엽초, 망태버섯, 오배자, 오매, 자생식물, 고삼, 황금의 추출물이 어병세균에 대하여 항균효과를 가진다고 보고하였다(Choi et al. 2004, 2005; Jee et al. 2012; Jung 2001; Lee et al. 2010; Seo et al. 2015). 국외 논문보고에서는 주로 중국과 인도의 자생 약용식물이나 생약재를 어류에 적용하여 면역력 증강 및 항병력의 향상을 확인한 경우가 대부분이다. Galina et al.(2009)이 중국, 인도산을 비롯하여 세계에서 연구되는 약용식물(생약재)의 현황을 잘 정리하여 보고하였는데, 이 논문에 의하면 중국산으로서는 *Andrographis paniculata*, *Angelica sinensis*, *Astragalus membranaceus*, *Ganoderma lecidium* 영지, *G. glabra* 민감초, *Isatis indigotica*, *I. tinctoria*, *Lonicera japonica*, *Polygonum multiflorum*, *Rheum officinale*, *Scutellaria baicalensis* 황금이 효능이 있었다. 인도산으로서는 *Azadirachta indica*, *Ocimum sanctum*, *Phyllanthus emblica*, *Solanum trilobatum*이 효능이 있었다.

우리는 국내 한방에서 세균성 질병에 주로 사용되는 30여종의 생약재를 대상으로 어병세균에 대한 시험관내(*in vitro*) 항균활성을 측정하였으며,

이 중에서 6종의 생약재 후보(황금, 고삼, 굴피, 금은화, 자소엽, 동과자)를 선택하였다. 개별의 생약재 중에는 단독 투여시에 간독성 등의 영향이 나타나므로(Jee et al. 2012) 본 연구에서는 6종의 생약재를 혼합하여 열수 추출물을 제작하였으며 이를 사료에 혼합 투여하는 방법으로 넙치의 면역 활성 및 질병저항성에 대한 효능 효과를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 복합생약재 추출물

6종의 생약재(황금, 고삼, 굴피, 금은화, 자소엽, 동과자)는 국내 한약재상사를 통하여 2011년 5월에 구매하였으며, 모든 시료는 멸균증류수로 3회 이상 세척 후 열수 추출에 이용하였다. 열수 추출법은 Seo et al.(2015)등의 방법에 따라 수행하였으며, 동량의 6종 생약재 (200 g)의 열배 볼륨(volume)에 해당하는 3차 증류수(2 L)를 첨가하여 동남자동고압추출기(동남산업)에서 8시간동안 추출하였다. 열수 추출액은 여과 및 진공원심분축기(rotary vacuum evaporator)를 사용하여 진공농축 후, 최종 잔류물이 100 ml로 맞추어 투여 시료 원액으로 보관하였다.

2. 시험어

시험어는 국립수산과학원 육종연구센터로부터 분양받았으며, 시험어는 3톤 크기의 FRP 수조(fiber reinforced plastic tanks)에서 적정 수온을 22±2℃ 내외로 유지하면서 여과 해수를 계속 공급하였다. 각 시험그룹 당 최초 시험어는 200마리(최초 평균 무게 90±11 g)를 사용하였다.

3. 사료 혼합 제조 및 투여

사료는 일반적으로 판매되는 시판 배합사료(수협, EP)에 생약재 추출물을 사료 무게에 대하여 최종 0.01%, 0.05% 및 0.1%의 농도가 되도록 흡

습시킨 뒤에 그늘에서 충분히 건조시켜 생약재 첨가사료를 만들었다. 대조구는 생약재 추출물을 흡습시키지 않은 EP사료만 공급하였으며, 생약재 첨가사료는 하루에 한번 오전 중 넙치가 포만감을 느끼도록 여분의 사료가 바닥에 떨어지지 않도록 눈으로 확인하면서 공급하였다.

4. 실험어의 생체 및 생리변화 측정

시험어의 생체 측정은 이전의 방법(Jee et al. 2012; Seo et al. 2015)에 따라 수행하였으며, 각 시기별 0, 2주, 4주, 8주 및 12주차에 그룹별로 각각 10마리씩 무작위로 선택하여 생체 변화를 측정하였다. 그룹별 시험어의 생리생화학적 변화를 측정하기 위하여 임상해부 시 각 개체별로 미부정맥에서 혈액을 채혈 후 Hematocrit(Ht), Hemoglobin 측정 후 원심분리(15,000 rpm, 10분)에 의하여 혈청을 얻어 냉동보관(-80℃)하였다. 혈청 분석은 혈액화학분석기(FUJI DRY CHEM 4500i)를 사용하여 분석하였으며, 조사항목은 다음과 같다. 포도당(glucose, mg/dl), 총콜레스테롤(TCHO, mg/dl), 요소질소(BUN, mg/dl), 젖산탈수소효소(LDH, U/L), 글루탐산 옥살로아세트산 트랜스아미나아제(GOT, U/L), 글루탐산 피루빈산 트랜스아미나제(GPT, U/L), 총단백(TP, g/dl) 및 알칼리성포스파타제(ALP, U/L)는 측정되었다.

5. Lysozyme 활성 분석

시료내의 라이소자임 활성은 각 조직별(혈청, 간, 비장, 신장)로 구분하여 조사하였다. 혈청 및 조직 lysozyme activity은 이전의 Parry et al.(1965) 및 Seo et al.(2015) 방법에 따라 분석하였다.

6. 병리조직학적 분석

병리조직학적 검사는 이전의 Seo et al.(2015) 방법으로 수행하였으며, 각 그룹 및 시기별로 어류 내부기관인 간, 비장 및 신장에 대하여 병리

조직학적 관찰을 실시하였다.

7. 항병력 조사

항병력 조사는 이전의 Jee et al.(2012) 방법에 따라 수행하였으며, 어병 균주는 국립수산물과학원에서 보관하는 *Edwardsiella tarda* (GY-01) 및 *Streptococcus iniae* (FT5228) 균주를 사용하였다. 각 균주는 BHIA 배지를 이용하여 계대 배양하였으며, 어병세균 *E. tarda*와 *S. iniae*의 어체 당 세균 수는 $0.99 \times 10^5 \sim 2.8 \times 10^5$ CFU 및 $1.15 \times 10^5 \sim 1.17 \times 10^5$ CFU 로 조정하였고, 희석한 세균은 어체 당 0.1 mL 씩 복강 주사하였다. 대조구는 생리식염수를 어체 복강에 동량 주사하였으며, 3주 동안 생존율을 매일 측정 후, 대조구에 비례한 상대생존율을 조사하였다.

8. 통계학적 분석

통계학적 유의성은 Student's t-test로 비교하였다 (P<0.05).

III. 결과 및 고찰

1. 시험어의 성장 및 혈액학적 성장

생약재 추출물은 다양한 유효성분을 함유하고 있어 함량이나 제조법에 따라 일반 의약품에 비해 제형이 복잡하고 불규칙하므로 생약 추출물의 의약품 개발에 많은 단점 및 어려움이 있다. 이전 연구결과(Jee et al. 2012)를 바탕으로 고압 열수 추출기를 이용하여 열수 추출물을 얻은 후, 14종의 어병세균에 대하여 *in vitro* 항균 활성 측정시에 개별 생약재 열수 추출물보다 복합 생약재 열수 추출물(6종)이 항균활성이 뛰어나다는 사실을 확인하였다(data not shown). 이를 바탕으로 장기간 넙치 투여에 따른 성장도, 비특이적 면역활성 등을 조사하였다.

복합 생약재 열수 추출물의 농도별 투여기간에 따른 넙치의 체중, 간중지수, 헤모글로빈량(Hb),

<Table 1> Physiological and hematological changes in olive flounders fed 6 herbal mixtures diets for 12th weeks

Duration	Concentration	Body weight (g)	HSI	Ht(%)	Hb(g/dL)	MCHC(%)
0 ^{wks}	0%	90±11	1.40±0.18	33±4.9	6.9±0.60	21.02±4.3
	0%	126±26	1.49±0.15	32±5.9	6.8±0.70	22.03±5.3
2 ^{wks}	0.01%	145±22	1.51±0.25	35±3.1	6.3±0.98	18.26±3.9
	0.05%	127±18	1.31±0.25	39±4.7	6.6±0.72	17.22±1.6
	0.10%	149±26	1.34±0.19	35±3.2	6.6±0.81	18.80±3.9
4 ^{wks}	0%	171±28	1.00±0.23	38±4.7	6.6±1.34	17.40±2.4
	0.01%	195±33	1.19±0.32	41±3.5	7.0±0.66	17.40±2.9
	0.05%	162±28	1.06±0.11	32±4.1	7.1±1.32	18.40±9.3
	0.10%	203±41	1.11±0.11	36±7.5	8.2±0.67	24.04±6.0
8 ^{wks}	0%	194±25	0.88±0.19	34±4.2	6.7±0.80	20.19±3.1
	0.01%	195±27	0.99±0.19	30±2.5	6.3±0.98	21.21±4.0
	0.05%	215±22	0.80±0.16	33±7.3	6.6±0.72	20.76±4.1
	0.10%	257±39	0.74±0.09	33±5.8	6.6±0.81	20.60±4.5
12 ^{wks}	0%	247±28	1.77±0.49	34±6.4	6.6±1.34	19.51±1.1
	0.01%	275±27	1.43±0.37	30±5.2	7.0±0.66	23.41±2.5
	0.05%	268±39	1.29±0.09	37±4.5	7.1±1.32	16.34±8.1
	0.10%	286±39	1.56±0.22	47±4.5	8.5±0.58	18.26±1.7

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

헤마토크릿치(Ht), 평균적혈구헤모글로빈농도(MCHC)를 조사하였다(<Table 1>).

<Table 1>에서 보는 바와 같이는 대조구와 시험 그룹간에는 유의적인 차이가 없었다. 복합 생약재 열수추출물을 먹인 경우 넙치의 성장은 대조구와 비교하여 크게 차이가 없어 생약재가 넙치 성장에는 영향을 미치지 않는 것으로 생각되었다. 혈액화학적 특성인 적혈구와 관련된 혈액지수(Ht, Hb, MCHC)는 대조구와 시험그룹 간에는 유의적이 차이가 없어 복합 생약재 열수추출물은 적혈구의 생성에 영향을 미치지 않는 것으로 추정되었다. 국내외의 다양한 생약재 추출물의 양식 어류 투여에 대한 생체 물리적 성장도 조사 결과에 따르면 어체의 체중증가에는 아무런 영향을 미치지 아니한다고 보고하였다(Woo et al. 2010; Lee et al. 2010; Jee et al. 2012). 이런 결과들로 미루어서, 본 연구에서 얻은 복합 생약재 열수추출물은 체중의 변화에는 관여하지 않음을 알 수 있었다. 게다가, 복합 생약재 열수추출물 농도별 기간별로 투여한 그룹간의 혈액생화학

결과를 조사하였다(<Table 2>). 영양 상태 지표인 포도당(GLU)은 2주째에 모든 투여구가 대조구에 비해 높은 값을 나타내어 복합 생약재 열수추출물 투여에 따른 일반적인 초기 증상을 보였으며, 4주부터 0.01%와 0.05% 투여구는 대조구와 유사한 수치로 안정되었으며 0.1% 투여구는 12주째에도 유의적인 높은 값을 나타내었다(<Table 2>).

영양 상태의 지표인 총단백(TP)은 12주째 모든 생약재 투여구에서 대조구와 비교하여 유의적인 높은 값을 나타내었다. 간 기능의 지표인 총콜레스테롤(TCHO), 트란스아미나제 GOT와 GPT는 4주 이상 투여 시 0.1% 복합 생약재 열수추출물 투여구는 대조구와 비교하여 유의적인 높은 값을 나타내었다. 신장 기능의 지표인 젖산탈수소효소(LDH)는 4주 이상 투여할 때 0.05% 복합 생약재 열수추출물 투여구는 대조구와 비교하여 유의적인 높은 값을 나타내었다. 이로써 0.01% 투여구가 다른 농도에 비하여 8주 동안의 투여에서 대조구와 비교하여 매우 안정적이었으며 혈액생화학 특성 나쁜 영향을 미치지 않는 것으로 나

타났다. 그러므로 복합 생약재 열수추출물을 양식 넙치에 시험 농도(0.01~0.1%)로 12주 장기간 투여시에는 어체의 혈액생화학적 변화에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있고, 어체의 부작용이 없음을 알 수 있었다(Lee et al. 2010; Jee et al. 2012; Seo et al. 2015). 생약재 추출물을 이용하여 어류에 대한 혈액생화학적 영향을 조사한 논문 등에 따르면 자운영 및 인동 추출물, 울금등의 3종 복합 추출물등을 틸라피아(*Oreochromis niloticus*), 금붕어 등에 투여시에는 혈액학적 성상에는 별다른 영향을 미치지 않는다고 보고하였다 (Ardo et al. 2008; Harikrishnan et al. 2010; Hwang et al. 2015).

2. 넙치의 면역 활성화

복합 생약재 열수 추출물의 어류에 대한 비특이적 면역 활성을 측정하기 위하여 혈청 및 조직

(간, 비장, 신장)내의 lysozyme 활성을 조사하였다. 혈청 lysozyme 활성은 기간별, 농도별 복합 생약재 열수 추출물을 투여한 시험 그룹과 대조구의 혈청 lysozyme 활성값을 조사하였다. 0.01% 투여구는 8주째에 혈청라이소자임 활성이 대조구에 비해 크게 유의적으로 증가하였다. 0.01% 복합 생약재 열수 추출물 투여구는 2주와 4주째에 신장, 비장 및 간 조직 내의 라이소자임 활성이 대조구에 비하여 증가하였다. 따라서 0.01% 복합 생약재 열수 추출물 투여구에 있어서 투여 2주부터 8주째까지 혈액과 조직에서 면역력이 증강되는 효과를 확인하였다(<Table 3>). 그러므로, 8주 가량 복합 생약재 열수 추출물을 넙치에 먹일 경우 라이소자임 활성의 증가를 통한 넙치 비특이적 면역 반응을 증가시킨다는 사실을 알 수 있었다.

<Table 2> Hemochemical changes in flounders fed 6 herbal mixtures diets for 12th weeks

Duration	Concentration	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 ^{wks}	0%	18±3.1	185±21	1.5±0.2	152±135	18±9.5	1.6±0.4	4.5±0.1	235±70
	0%	9.8±1.5	187±24	1.7±0.3	148±163	16±8.0	1.7±0.5	4.6±0.2	240±80
2 ^{wks}	0.01%	29±5.3*	140±74	1.8±0.2	179±63	19±6.3	1.5±0.8	4.4±0.8	207±64
	0.05%	49±24.1	162±47	1.7±0.1	258±149	24±4.8	2.7±1.6	4.2±0.6	209±60
	0.10%	32±15.2	167±34	1.7±0.2	342±322	21±11	2.8±0.4	4.4±0.4	207±60
4 ^{wks}	0%	7.2±6.2	208±41	2.8±0.6	230±131	43±30	8.0±2.9	5.3±0.5	211±53
	0.01%	29±5.3*	140±74	1.8±0.2	179±63	19±6.3	1.5±0.8	4.4±0.8	207±64
	0.05%	11±3.7	194±23	1.6±0.7	554±269	42±31	4.6±1.8	4.6±0.3	150±13
	0.10%	32±13	171±87	1.7±0.2	200±115	42±84	4.8±3.1	4.7±0.5	195±40
8 ^{wks}	0%	9.6±2.7	185±37	4.0±2.4	87±52.6	11±2.9	2.4±0.9	3.9±0.9	171±51
	0.01%	10±3.0	159±69	2.9±1.6	136±168	11±7.7	2.5±0.8	3.8±0.7	177±70
	0.05%	11±2.6	166±32	3.5±1.5	133±141	9±4.6	2.8±1.8	3.9±0.5	157±46
	0.10%	13±2.5	184±16	2.0±1.2	255±192	12±5.2	5.3±1.0	3.9±0.2	173±60
12 ^{wks}	0%	1.8±0.4	159±24	2.4±0.2	233±229	22±5.8	2.5±0.8	2.0±0.7	167±87
	0.01%	2.8±1.5	165±19	2.5±0.5	178±93	15±2.4	2.2±1.9	4.9±0.7	137±36
	0.05%	2.2±0.4	180±30	2.6±0.3	105±53	22±6.5	5.7±2.3	5.0±0.6	135±30
	0.10%	7.5±7.5	214±44	2.7±0.3	237±175	49±18	14±7.5	5.9±0.5	143±30

*P<0.05

생약재 투여에 따른 어류의 면역반응을 측정하기 위하여 다양한 논문등이 보고되고 있으며 대부분 lysozyme 활성 측정으로 보고하고 있다. 이런 비특이적 면역 활성은 lysozyme 활성 증가가 식세포 활성 및 백혈구 활성산소를 생성시켜 비특이 면역력을 증가시킨다고 알려져 있다 (Robertsen et al. 1994; Wu et al. 2013).

<Table 3> Lysozyme activity(mean±SD unit/ml) in different samples of olive flounder fed 6 herbal mixtures diets during feeding period

Tissue	Duration (Weeks)	Control (unit/ml)	Diet(%) (unit/ml)		
			0.01%	0.05%	0.1%
Serum	0	65±15	-	-	-
	2 th	50±26	63±14	50±22	50±13
	4 th	38±15	68±13	45±16	44±14
	8 th	37±6.5	79±12*	59±6.6	44±7
	12 th	35±10	46±9.8	41±6.9	28±10
Liver	0	17±5.5	-	-	-
	2 th	18±6.9	23±4.0	15±4.8	22±3.0
	4 th	44±20	64±43	70±33	62±36
	8 th	15±8.6	14±8.1	18±3.6	17±9.1
	12 th	63±51	45±18	77±59	36±22
Spleen	0	18±11	-	-	-
	2 th	20±7.0	28±5.5	18±4.0	19±3.9
	4 th	32±13	65±18*	34±13	44±18
	8 th	17±3.4	11±4.6	13±5.4	13±8.8
	12 th	43±17	18±3.4	23±8.2	21±6.2
Body kidney	0	22±11	-	-	-
	2 th	28±12	53±49	31±18	45±28
	4 th	58±39	84±44	75±43	48±19
	8 th	40±15	31±21	35±14	23±11
	12 th	82±23	90±55	60±17	50±17

*P<0.05

3. 조직학적 특성

복합 생약재 열수추출물 투여구의 장기간 투여에 따른 조직 내 독성 유무를 알아보고자 실시한 병리조직학적 관찰에서 복합 생약재 열수추출물의 농도별 투여는 2주, 4주, 8주 및 12주째에도 간, 비장, 신장 조직에서 특이적인 조직 변성이 전혀 관찰되지 않았다(data not shown). 그러므로 병리조직학적 소견으로 볼 때 복합 생약재 투여

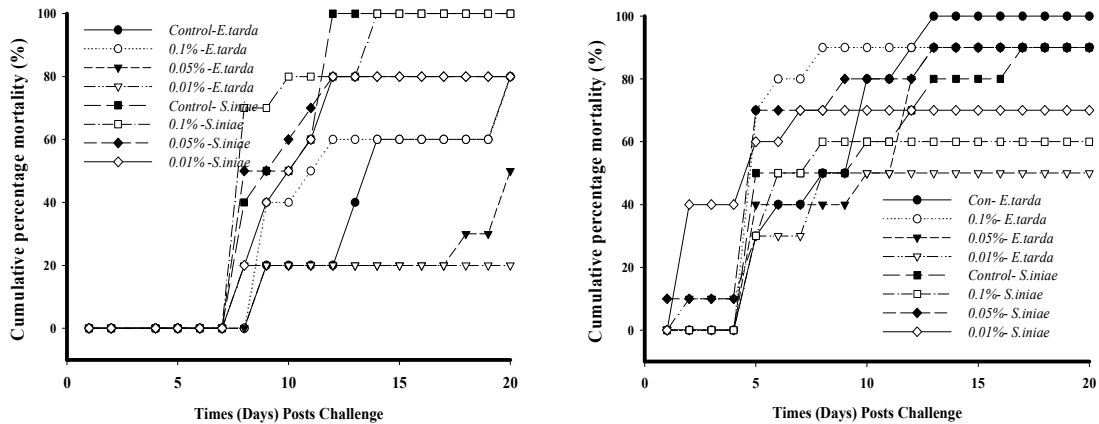
에 의한 독성으로 판단되는 조직 변성은 출현하지 않는 것으로 판단되었다. 본 결과들로 미루어 식품의약품안전처에서 운영되고 있는 생약종합정보시스템(<http://www.mfds.go.kr/hermed/index.do>)의 식품안전 데이터 중 6종 생약성분이 혼합하여 어류에 투여시 매우 안전하고 식품으로서도 문제가 없음을 암시한다.

4. 넙치에 대한 항병력

복합 생약재 열수추출물을 농도별로 흡수시켜 사료를 먹인 넙치에 대하여 어병 세균인 에드워드균(*E. tarda*) 및 연쇄구균(*S. iniae*)에 대한 항병력을 조사하기 위해 각각 4주, 8주 및 12주 기간에 세균 인위 감염실험을 수행하였다(Fig 1). 모든 기간 동안 *S. iniae* 균의 인위감염에 대하여서는 유의적인 효과를 얻지는 못하였으나(data not shown), 8주 및 12주에 질병 예방효과가 다소 있고 유의적인 결과는 없었다(<Table 4>). 그러나, *E. tarda* 균에 대한 상대생존율을 살펴보면, 0.01% 복합 생약재 열수추출물 투여구는 4주째 상대생존율(RPS)이 75%로 매우 높았으며 8주째에도 50%를 나타내어 에드워드균에 대해 질병 예방 효과가 매우 높았음을 확인하였다. 0.05% 복합 생약재 열수추출물 투여구는 4주째 37.5%의 상대생존율을 보였으나, 8주째는 10%, 12주째는 0%로서 거의 질병예방 효과가 없었다. 0.1% 투여구는 투여기간에 따른 질병예방 효과를 거의 확인할 수 없었다. 이로서 복합 생약재 열수추출물의 농도를 0.01%에서 증가시켰을 경우는 질병 예방 효과가 오히려 감소하였다. 넙치에 대한 연쇄구균의 상대생존율이 낮은 이유는 그람양성 세균의 생리적 차이 및 인위감염 농도의 차이등으로 추정된다(Jee et al. 2012; Seo et al. 2015).

다양한 어류에 대하여 생약 추출물의 병원체 감염에 따른 상대생존율을 조사한 논문은 국내외로 다양하게 보고되고 있다. 금붕어를 대상으로 하여 인도 녹차인 님 잎과 바질 추출물을 먹여 에

복합 생약재 열수추출물 투여에 따른 넙치 세균성 질병에 대한 질병저항성



[Fig. 1] Comparative livability (%) of experimentally infected flounders with *E. tarda* and *S. iniae*, that fed 6 herbal mixtures diets during the experimental period (4th week(A) and 8th week(B))

로모나스균의 감염에 대하여 75% 상대생존율을 나타내었다(Harikrishnan et al. 2009; 2010). 틸라피아(*O. niloticus*)를 대상으로 자운영 및 인동 추출물은 에로모나스균 감염시 45% 상대생존율을 보였고(Ardo et al. 2008), 인동초(*Eclipta alba*)는 에로모나스균에 감염시 57% 상대생존율(Christyapita et al. 2007), 고삼 추출물은 연쇄구균에 대하여 73% 상대생존율을 나타내었다(Wu et al. 2013). 넙치를 대상으로 하여 황금추출물은 에드워드균에 대하여 최대 88% 상대생존율(Jee et al. 2012), 고삼추출물은 에드워드균에 대하여 최대 78% 상대생존율을 나타내며(Seo et al. 2015), 마늘(*Allium sativum*) 추출물은 에드워드균에 대하여 상대생존율이 10%~55% (Cho et al. 2010; Lee et al. 2010; Woo et al. 2010)로 다양하게 나타났고, 유자(*Citrus junos*)추출물의 경우는 에드워드균에 대하여 30% 상대생존율로 보고하였다(Jung et al. 2001). 어병 세균에 대한 상대생존율의 차이는 대상어종, 생약 추출 방법, 병원체의 종류 및 병원체 투여 농도등의 차이에 따른 것으로 추정되었다.

따라서, 복합 생약재 열수추출물을 상기방법에 따라 추출한 시료원액을 시판용 넙치 배합사료에 0.01% 농도로 첨가하면 대조구보다 비특이적 면

역활성 증가로 어병 세균에 대한 항병력이 증강되는 것으로 추정되었다.

<Table 4> Relative percent survival¹ (RPS) of experimentally infected flounders with *E. tarda* and *S. iniae*, that fed 6 herbal mixtures diets during the experimental period

Strain	4 weeks (%)			8 weeks (%)			12 weeks (%)		
	0.01	0.05	0.1	0.01	0.05	0.1	0.01	0.05	0.1
R <i>E. tarda</i> ²	75	38	0	50	10	10	0	0	0
P <i>S. iniae</i> ³	20	20	0	22	0	33	33	0	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)

IV. 요약

복합 생약재 열수추출물(6종 혼합)을 농도별 기간별로 사료에 흡습시켜 12주 동안 넙치에 급여 후 비특이적 면역 및 질병저항성에 대한 효과를 조사하였다. 복합 생약재 열수추출물의 첨가는 어류 성장에는 아무런 영향을 미치지 않았으

며, 혈액생화학적인 결과도 넙치의 생리에는 아무런 영향을 미치지 않았다. 라이소자임 활성은 0.01%의 복합 생약재 열수추출물 농도로 흡습시킨 사료 그룹에서 라이소자임 활성이 증가됨을 알 수 있었다. 복합 생약재 열수추출물의 투여에 따른 넙치 장기의 병리조직에 영향이 없음을 알 수 있었다. 에드워드균의 인위감염에 의한 질병 저항성은 0.01% 복합 생약재 열수추출물 농도에서 상대생존율이 높게 나타났다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 넙치에 복합 생약재 열수추출물을 투여시에는 어류의 비특이적 면역력 증강 및 질병 저항성 증강을 나타내는 것으로 사료되었다.

References

- Ardo, L. · Yin, G. · Xu, P. · Varadi, L. · Szigeti, G. · Jeny, Z. & 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.
- Cho, S. H. · Lee, S. M. & Kwon, M. G.(2010). 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*. *Journal of Fish Pathology* 23, 409~420.
- Choi, Hye-Sung et al.(2004). Antibacterial activities of hot-water and ethyl alcohol extracts of medicinal herbs on fish pathogenic bacteria, *Journal of Fish Pathology* 17, 39~55.
- Choi, Hye-Sung et al.(2005). Antibacterial activities of *Galla Rhois* extracts against fish pathogenic bacteria, *Journal of Fish Pathology* 18, 239~245.
- Christyapita, D. · Divyagnaneswari, M. & Michael, R.D.(2007). Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 23, 840~852.
- Galina, J. · Yin, G. · Ardo, L. & Jeny, Z.(2009). The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. *Fish Physiology and Biochemistry* 35, 669~676.
- Harikrishnan, R. · Balasundaram, C. · Kim, M. C. · Kim, J. S. · Han, Y. J. & Heo, M. S.(2009). Innate immune response and disease resistance in *Carassius auratus* by triherbal solvent extracts. *Fish & Shellfish Immunology* 27, 508~515.
- Harikrishnan, R. · Balasundaram, C. and Heo, M.S.(2010). Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 28, 354~361.
- Hwang, Jee-Youn et al.(2015). Effect of Herbs on Vaccine Efficacy to Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *JFMSE* 27, 1491~1498.
- Jee, Bo-Young et al.(2012). Effects of various concentrations of Skullcap extracts in the diets on disease resistance of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Fish Pathology* 25, 21~30.
- Jung, Sung-Hee et al.(2001). In vitro effect of water extract of medicinal herbs on antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and superoxide production of kidney phagocytes in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Fish Pathology* 14, 3~10.
- Lee, Jun-Hee et al.(2010). Effects of garlic *Allium sativum* on the immune responses of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Fish Pathology* 23, 69~83.
- Lee, Nam-Sil et al.(2010). 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, *Journal of Fish Pathology* 23, 137~143.
- Parry, R. M. · Chandau, R. C. & Shahani, R. M.(1965). A rapid and sensitive assay of muramidase. *Proceedings of Society for Experimental Biology Medicine* 119, 384~386.
- Robertsen, B. · Engstad, R. E. & Jørgensen, J. B.(1994). β -glucans as immunostimulants. In: Stolen, S.J. and Fletcher, T.C. (eds) *Modulators of Fish Immune Response* (vol 1), p83~99 SOS publication, Fair Haven, U.K.
- Seo, Jung-Soo et al.(2015). Effect of Disease

- Resistance on Oral Administration of Lightyellow Sophora Extract in Olive Flounder. *JFMSE* 27, 1656~1664.
- Woo, Sung-Ho et al.(2010). Effects of Galic *Allium sativum* extract immersion on the immune response of olive flounder *Paralichthys olivaceus* prechallenged with pathogenic bacteria. *Journal of Fish Pathology* 23, 199~209.
- Wu, Y. R. · Gong, Q. F. · Fang, H. · Liang, W. W. · Chen, M. & He, R. J.(2013). Effect of Sophora flavescens on non-specific immune response tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) and disease resistance against *Streptococcus agalactiae*. *Fish & Shellfish Immunology* 34, 220~227.
-
- Received : 02 September, 2016
 - Revised : 21 September, 2016
 - Accepted : 26 September, 2016