



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

제주산 한약재의 미생물 발효에 의한
양식어류의 기능성 사료첨가제 개발에
관한 연구



濟州大學校大學院

水產生命醫學科

康善敬

2010年 7月

제주산 한약재의 미생물 발효에 의한
양식어류의 기능성 사료첨가제 개발에
관한 연구

指導教授 許 文 洙

康 善 敬

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2010年 7月

康善敬의 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 전 유 진 (印)

委 員 김 기 영 (印)

委 員 허 문 수 (印)

濟州大學 大學院

2010年 7月

Research on development of a functional
feed additive for aquaculture fish by
bacterial fermentation of medical herbs
produced in Jeju.

Kang, Sun Kyung

(Supervised by professor Moon-soo Heo)

A thesis submitted in partial fulfillment
of the requirement for the degree of
Master of Science

Department of Aquatic life medicine
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

July, 2010

List of Tables

Table 1. Growing area of *Acanthopanax koreanum* (2006)

Table 2. List of strains used for experiment

Table 3. Sample list and quantity

Table 4. HPLC conditions for eleutheroside and acanthoic acid analysis

Table 5. HPLC gradient condition mobile phase for eleutherosides analysis

Table 6. HPLC conditions for ginsenosides analysis

Table 7. HPLC gradient condition mobile phase for ginsenosides analysis

Table 8. List of strains used of antibacterial experiment

Table 9. Colony forming unit of probacteria (CFU/ml)

Table 10. Content of Eleutherosides and Acanthoic acid from *Acanthopanax koraenum* extract and liquid sample (ppm)

Table 11. Ginsenosides analysis result (ppm)

Table 12. Compounds of liquid sample+EP and liquid sample

Table. 13. Antibiotic susceptibility test of oriental medicine extract and probiotic mixed extract

Table 14. Effect of the culture broth of LAB cultured in herb extract on weight gain, feed efficiency and survival of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and parrot fish(*Opelegnathus fasciatus*)

Table 15. Hematological changes of olive flounder(*Paralichthys olivaceus*) and parrot fish(*Opelegnathus fasciatus*) fed with the LAB culture broth for 12weeks



List of Figures

Fig. 1. Eleutheroside B,E standard by HPLC chromatogram

Fig. 2. Eleutheroside B,E HPLC chromatogram of *Acanthopanax koraenum* extract

Fig. 3. Eleutheroside B,E HPLC chromatogram of *Acanthopanax koraenum* liquid sample

Fig. 4. Chromatogram of Acanthoic acid standard

Fig. 5. Acanthoic acid HPLC chromatogram of *Acanthopanax koraenum* extract

Fig. 6. Acanthoic acid HPLC chromatogram of *Acanthopanax koraenum* liquid sample

Fig. 7. Ginsenoside standard by HPLC chromatogram

Fig. 8. Ginsenoside HPLC chromatogram of *Acanthopanax koraenum* extract

Fig. 9. Ginsenoside HPLC chromatogram of *Acanthopanax koraenum* liquid sample

Fig. 10. DPPG radical scavenging activity of the 9brix extracts, 4brix extracts, 5 strains mixed extract

Fig. 11. Hydroxyl radical scavenging activity of the 9brix extracts, 4brix extracts, 5 strains mixed extract

Fig. 12. Hydrogen peroxide scavenging activity of the 9brix extracts, 4brix extracts, 5 strains mixed extract

Fig. 13. Serum NBT activity of olive flounder(*Paralichthys olivaceus*) and parrot fish(*Opelegnathus fasciatus*) fed with the LAB culture broth for 12weeks

Fig. 14. Serum lysozyme activity of olive flounder(*Paralichthys olivaceus*) and parrot fish(*Opelegnathus fasciatus*) fed with the LAB culture broth for 12weeks

Fig. 15. Cumulative mortality(%) of olive flounder by 10days feeding of the LAB broth after challenge with *V.anguillarum* and *S.iniae* (n=30)

Fig. 16. Cumulative mortality(%) of parrot fish by 10days feeding of the LAB broth after challenge with *V.anguillarum* and *S.iniae* (n=30)



ABSTRACT

The purpose of this study is to provide environmental friendly, low-cost, and high quality product through development of feed additive containing antibiotics alternative which has antibacterial activity with methods such as biological contact and immune enhancer by preparing *Acanthopanax koreanum Nakai* derived saponin extract and saponin extract added liquid media, performing mixed culture of superior lactic acid bacteria and useful microorganisms which are reported to have effects on growth promotion, physiological activity increase, and water quality improvement, and isolating physiological activators.

Certain ratio of *Acanthopanax koreanum Nakai*, ginseng, *Opuntia Ficus-Indica*, molasses, and kito-oligosaccharide were mixed and used as samples of this study after grasping the temperature, time, and volume proper to growth of lactic acid bacteria and useful microorganisms. The growth, immune force, and resistance against disease of aquaculture fish were studied through biological contact experiment.

The concentration of medical herb where the lactic acid bacteria can grow was grasped and it was identified that there were more than 10^8 CFU/ml of lactic acid bacteria. In addition, anti-oxidizing activity and antibacterial effect against fish pathogenic bacteria were investigated. It was found that for the anti-oxidizing activity, more than 80% of radical removal activity was shown and there were positive antibacterial activity against *Vibrio* and streptococcus symptom known as a representative fish disease. As the results of culture experiment with flatfish and parrot fish, it was shown that it had higher growth and immune force increase than that of control group and a positive effect was shown in even pathogen attack experiment.

It is expected that the growth and feed efficiency will be enhanced by raising immune force of aquaculture fish and survival rate increase through healthy fish culture and environmental friendly aquaculture by antibiotics alternation will be realized.

The feed additive developed in this research is considered to have high applicability as a feed additive for aquaculture fish in Jeju-island and it is expected that its use as a feed additive will be possible by local adaptation test and grasping and providing accurate demand of medical herbs.

목 차

List of Table	I
List of Figures	II
Abstract	III
1. 서론	6
1.1. 연구의 중요성(필요성)	6
1.2. 국내외 관련기술의 현황	7
1.3. 예상되는 파급효과 및 활용방안	9
2. 재료 및 방법	11
2.1. 시료의 제조	11
2.1.1. 연구에 사용된 시료	11
2.1.2. 유용미생물의 배양	12
2.1.3. 시료의 성분분석	12
2.1.3.1. Eleutheroside B,E 와 Acanthoic acid 분석	12
2.1.3.2. Ginsenosides 분석	13
2.1.3.3. 일반성분 분석	14
2.2. 시료의 in vitro 활성평가	15
2.2.1. 항산화 활성 측정	15
2.2.1.1. DPPH free radical scavenging activity	15
2.2.1.2. Hydroxyl radical scavenging activity	15
2.2.1.3. Hydrogen peroxide scavenging activity	15
2.2.2. 어병세균에 의한 항균 활성 측정	16
2.3. 생물접촉실험	17
2.3.1. 실험어 사육관리	17
2.3.2. 실험사료 및 투여방법	17
2.3.3. 성장도 조사 및 혈액학적 분석	17
2.3.4. 어류면역 활성 측정	18
2.3.4.1. 어류식세포의 활성산소 측정	18
2.3.5. 어병세균에 의한 공격실험	18

3. 결과 및 고찰	19
3.1. 유용미생물의 성장 과 개발제품의 성분	19
3.1.1. 유용미생물의 성장조건 확립	19
3.1.2. Eleutheroside B,E 와 Acanthoic acid 분석	20
3.1.3. Ginsenosides 분석	24
3.1.4. 일반성분 분석	27
3.2. 개발제품의 In vitro 활성도	28
3.2.1. DPPH free radical scavenging activity	28
3.2.2. Hydroxyl radical scavenging activity	29
3.2.3. Hydrogen peroxide scavenging activity	31
3.2.4. 어병세균에 의한 항균 활성 결과	32
3.3. 생물접촉실험 결과	33
3.3.1. 성장도 조사	33
3.3.2. 혈액학적 분석	34
3.3.3. 어류식세포의 활성산소 측정	37
3.3.4. 어병세균에 의한 공격실험	39
3.4. 결론	41
Reference	42
Acknowledgement	46



1. 서 론

1. 연구의 중요성

현재 우리나라 해산어류 양식은 1970년대부터 각종 어류에 대한 양식기술이 개발되면서 어종별 양식 생산량은 지금까지 지속적으로 증가하고 있으며, 현재 어류양식 생산량은 39,121톤에 달하며 국민의 단백질 식량산업으로 자리를 굳히고 있다. 일본 중국 등과 함께 최근에는 미국을 비롯한 유럽 등지의 선진국에서도 성인병의 예방방지를 위한 식생활 개선을 위하여 육상동물보다 어류단백질의 우수성이 인정되는 어류양식 생산량이 급증하고 있어 국제사회의 경쟁이 날로 심각해지고 있다.

또한 우리나라 국민의 식생활 패턴과 삼면이 바다인 우리나라의 입지적 여건으로 보아 수산물 생산에 있어 수요가 공급을 초과하고 있는 실정이다. 따라서, 해수어류양식에 의한 공급 외에는 달리 선택의 여지가 없는 실정이다. 이에 우리나라의 국토해양부에서는 기르던 어업의 장기발전계획에서 어류양식에 중점투자를 계획하고 있어, 해수어류양식은 날로 증가할 추세에 있다. 특히 최근에 와서는 대규모 임해공업 단지의 조성 및 생활폐수의 방출에 의한 연안 어장 환경의 오염이 심각해지고 있어 대규모의 적조의 발생과 양식생물의 질병의 빈발로 생산성은 날로 떨어지는 반면 국민경제의 발전에 따른 고급어류의 수요는 날로 증가하고 있는 실정이다.

따라서 첨단 양식공학기법에 의한 어장의 확장과 함께 생산성향상을 위한 대책수립이 시급한 실정이다. 최근 양식어류의 생산성향상을 위하여 많은 연구가 시작되고 있지만 생물공학적 측면에서 염색체 조작기법에 의한 3배체의 생산은 아직까지 산업화 단계에 들어가지 못하고 있으며 성장호르몬에 의한 성장촉진이 일부에서 상품화되고 있지만 호르몬 사용식품의 안정성시비로 수요자의 관심을 끌지 못하고 있는 실정이다. 이 밖에 구기자, 인삼, 오미자 등의 식물성 약제 및 게 껍질에서 추출한 키토산의 사료첨가를 통한 생산성 향상 등이 보고되고 있다. 그러나, 아직까지 양식에 사용되고 있는 사료의 대부분은 자연에서 어획되는 전갱이, 고등어 등의 생사료를 그대로 사용하거나 생사료에 배합사료를 혼합한 모이스트 펠릿을 사용함으로써 사료의 효율성 저하 및 환경오염 등 많은 문제를 안고 있으며, 이러한 문제를 해결할 수 있는 획기적인 사료의 개발은 이루어지고 있지 않은 실정이다.

따라서 해수어류 양식경영비의 절반이상을 차지하고 있는 사료의 양적인 면과 질

적인 면에서 개선을 통한 값싸고 질 좋은 사료의 개발이 현실적으로 타 연구에 비하여 시급하다.

본 연구에서는 유산균 및 유용미생물 균주를 이용하여 한약재가 첨가된 추출물에 배양하여 한약재의 입증된 효능과 유용미생물이 어우러져 어류면역력 증대에 효과가 있는 새로운 사료첨가제를 개발하는 것을 목적으로 한다. 이 연구에 개발된 사료첨가제 함유사료를 양식 넙치, 돌돔에 공급함으로써 넙치의 성장에 미치는 영향과 면역에 미치는 효과를 조사하여 새로운 사료첨가제의 성능을 판별하였다.

2. 국내 외 관련기술 현황

해산어류에 있어서 세균성 질병으로 인한 피해 원인 중 가장 주된 것으로 유결절증, 비브리오병, 연쇄구균증, 활주세균증, 에드워드병 등을 들 수 있다. 비브리오병의 원인균인 비브리오속 세균들은 최근에 17종이 더 보고 되어서 현재는 37종이 되었는데 양식어류에 있어 계절에 상관없이 많은 피해를 준다. 일반적으로 양식생물의 질병 제어는 1차적인 예방과 질병이 유발되었을 때 항생제투여를 통한 치료가 이루어진다. 그러나 항생제의 오남용으로 인하여 약제 내성균의 증가와 더불어 치료 효과가 감소하고 수질오염등과 같은 2차적인 문제점들을 야기 시키고 있으며, 또한 세균의 약제 내성화가 매우 빨라 약제의 사용에 있어서 충분한 주의를 요하고 있다. 그리고 항생제 상시 투여로 인한 어체 내 항생물질 잔존 등의 식품안전성 문제로 양식 어류의 소비를 위축시키고 있어 양식 어가에 큰 경제적 손실을 안겨주고 있다. 따라서 위생 문제나 환경오염의 우려가 없으며 경제적으로도 도움이 되는 예방법의 개발이 필요하다. 질병제어와 치료를 위해 사용해 왔던 항생제, 항균제의 사용이 대폭적으로 제한을 받게되는 국제적 추세와 더불어 국내에서는 동물용의약품으로 분류되던 생균제, 효소제, 항곰팡이제, 항산화제 등이 보조 사료로 변경되면서 사료 관리법 안으로 들어오게 됨에 따라 사료용 첨가제의 시장은 새로운 변화를 맞고 있다. 그중의 생균제(probiotics)는 1992년 Fuller는 항생제 사용과 vaccination의 대체제로서의 probiotics의 이용에 대하여 고찰한 바 있으며, 주로 사용되는 미생물은 *Lactobacillus* 속, *Streptococcus* 속, *Lactococcus* 속 및 *Bifidobacterium* 속을 단독 또는 혼합사용하고 있으며, 서방국가 및 일본 등에서 파우더 형태, 펠렛형태, 그라놀 및 반죽 형태로 주로 가축을 대상으로 축종별 상품을 개발 시판하고 있다. 이

런 해산어의 probiotics의 보고가 몇몇 보고 되어지고 있는데, 그중에 그람 음성 균에 생육억제능이 있는 bacteriocin 생산균주, 즉 lactic acid bacteria(LAB)가 건강어체의 천연장내 균총의 일부이며 자치어 단계를 벗어나 사료 공급 시 장내 우점화되는 것이 밝혀짐에 따라 새로운 분류체계에 의한 유산균인 *Carnobacterium*을 발견하였으며 사료첨가로 급이 하였을 때 *Aeromonas salmonicida*에 의한 감염을 예방할 수 있었으며 이와 유사하게 대구의 장에서 분리된 *Carnobacterium divergens*를 첨가된 사료를 대서양대구에 급이 하였을 경우 일반적인 비브리오 균주의 감염방지 결과를 얻었음이 보고된 바 있다. Gilberd 등은 어분단백질과 유산균을 사료에 급이 하였을 때 대서양연어의 치어에 대한 성장촉진 효과를 연구한 바 있으며, 또한 대서양대구의 치어에 대한 유산균의 probiotic 효과를 검증한 바 있다. 아울러 패류의 경우, Riquelme(1996) 등은 가리비로부터 분리한 *Alteromonas haloplanktis* 균주가 병원성 비브리오 균주에 대한 강력한 생육저해 효과를 나타남을 보고 하였으며 Douillet(1993) 등은 굴 유생 생존 및 생육을 촉진시키는 CA2라는 균주를 발견한 바 있다. 이와 같이 여러나라에서 probiotics의 개념도입이 양식어의 방향으로 관심이 활발해 지고 있으며 어류에서 어패류까지 확산되고 있다.

본 연구에서 사용된 사료첨가제의 주재료인 탐라(섬)오갈피는 제주에서만 자생하며 다른 어느 지역에서 자라는 어떤 오갈피 품종보다도 생육이 왕성하고 전체적인 기능성 성분이 많다고 알려져 있다. 2002년부터 재배면적이 급격히 늘기 시작한 탐라오갈피는 2006년 제주도 재배면적이 320ha로 우리나라 전체 재배면적 724ha의 절반가까이를 차지하고 있다 (Table 1).

Table 1. Growing area of *Acanthopanax koreanum* (2006)

구 분	농가수	재배면적	수확면적	생산량
전 국	1,530	724	433	2,090
제 주	264	320	43	258

농업과학기술 연구개발결과, 농촌지도사업 활용자료, 농촌진흥청

오갈피 뿌리는 5년생 이상, 줄기는 2년생 이상이 가능하며 수확연수에 이른 면적은 제주에 43ha, 전국에 433ha이며, 2002년도에 오갈피 원료 수입량은 한약제로서 중국, 북한에서 2,747톤에 이른다. 식품원료로서의 수입량은 파악되지 않고 있으나, 관련가공회사의 추산으로는 5000톤 이상 될 것으로 추정하고 있다. 값이 싸다는 이

유로 우리나라에 수입하고 있는 북한산 또는 중국산 오갈피는 1년생으로 기능성 성분함량이 매우 낮아 약재로 문제가 있다.

따라서 탐라오갈피가 다른 지역에서 재배되는 오갈피 보다 우수한 성분을 지니고 있으며, 현재 제주도의 오갈피 재배능가는 많지만 값싼 외국산으로 인해 수요보다 생산이 적어 제주도 내 문제점을 나타내고 있기 때문에 이를 해결하기 위함으로 사료첨가제로의 개발은 획기적인 것이라 사료된다.

3. 예상되는 파급효과 및 활용방안

세균성 질병은 병원성 세균에서부터 다른 원인에 의한 2차적인 감염으로 어류를 죽게 하는 조건적 병원체에 의해 발생한다. 양식장의 사육수에는 유기질이 많기 때문에 많은 세균이 번식 할 수 있는 환경임으로 어류가 건강하지 못하거나 방어력이 약해졌을 때 질병을 일으킨다. 발생빈도가 높고 전염성이 강하며 일단 감염이 되면 누적폐사량이 많기 때문에 양식장에서는 경제적 손실이 크게 된다.

따라서 대체 항균활성 및 면역증강 물질을 함유한 보조사료의 개발은 기존의 항생제의 사용을 최소화 하여 지역이 갖고 있는 청정이미지를 더욱 확고히 할 것이며, 기존 항생제를 사용할 수 없는 경우에서도 생산성 향상에 크게 기여할 수 있다.

사포닌에 대한 연구는 대부분 인간의 건강에 관련되어져서 많은 연구가 이루어져 왔지만 본 연구에서는 양식어류의 사료첨가제로서 응용을 함으로써 건강하고, 제주 브랜드의 이미지에 맞는 웰빙 수산식품의 생산이 가능 할 것으로 사료된다. 사포닌의 밝혀진 약리작용들은 어류의 면역체계를 보다 향상시켜주어, 건강하고 쉽게 병원성 세균에 감염되지 않는 건강한 어류의 생산이 가능하며, 어민들의 경제적으로 생산비의 절감효과를 가능하게 할 것이다.

또한 유산균은 항균작용 및 소화촉진 작용을 한다는 보고가 있으며, 유산균을 이용한 면역증강물질이 함유된 건강보조식품으로 응용이 되어 지고 있다. 이러한 유용미생물을 사료에 접목시킴으로서 친환경적인 양식어류 생산을 위한 어류사육에 많은 도움이 될 것이고, 새로운 형태의 상품화가 가능해 질 것이다. .

또한 본 연구는 미생물의 2차 대사산물을 이용한 연구이기에 새로운 기능성 물질의 개발 가능성을 확인할 수 있으며, 새로운 기능을 갖는 유산균을 이용한 다양한 사료첨가제가 계속해서 개발될 것이고, 또한 보다 세분화된 건강증진 사료개발에도

상당한 과급효과가 있을 것이다.

현재 년 간 1200톤에 달하는 국내 사료용 항생물질 및 합성 의약품시장에서 새로운 천연항생 물질 대체제의 개발은 수입 대체효과를 유발시켜 외화절감에 기여한다.

기존의 세균성 질병에 의한 병어의 치료 방법은 감수성이 있는 항생제에 의존하여온 것과는 달리, 본 연구를 통해서 개발되어진 사포닌물질 첨가 유산균 배양추출물 제품은 양식어류의 항균활성과 면역증강 및 소화촉진에 도움을 주며, 인체에 무해하고 대량생산을 통한 저비용 효과 및 원활한 공급이 가능할 것으로 사료된다.

면역활성물질을 함유한 사료첨가제를 대량생산하게 됨으로 양식어류의 영양적인 측면에서 대단한 효과를 기대할 수 있으며, 이는 바로 수산물의 질과 양에 지대한 영향을 주는 어류의 활력에 큰 영향을 미치고 어류의 질병을 획기적으로 감소시켜 양식 어류의 증체율을 증가 시키게 된다.



2. 재료 및 방법

2.1. 시료의 제조

2.1.1. 연구에 사용된 시료

Table 3의 모든 시료를 물 1500ml와 혼합하여 12시간 끓여 열수추출물을 얻어내고 Table 2에 나타난 유용 미생물과 열수추출물을 혼합하여 4brix의 추출물을 농축기로 이송한다. 이송 후, 9brix로 농축하여 추출물 70ml를 제조하였다. 이 실험재료를 4℃에서 보관하면서 사용하였다.

Table 2. List of strains used for experiment

	Strains	Number
Bacteria	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KCCM 11322
	<i>Lactobacillus brevis</i>	KCCM 11904
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	KCCM 40265
	<i>Bacillus subtilis</i>	KCCM 11316
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KCCM 11201

Table 3. Sample list and quantity

Sample list	Quantity
<i>Acanthopanax koreanum</i>	120g
Licorice	80g
Ginseng	40g
Opuntia Ficus-Indica(jeju)	20g
Syrup	30g
Oigosaccharide	4g
Total	294g

2.1.2. 유용미생물의 배양

본 실험에 사용된 유용미생물은 Table 2와 같으며, 한약재 추출물 4, 9brix의 농도 별로 유용미생물을 첨가하였다. 유용미생물 중 *Lactobacillus* 속은 MRS medium(Difco)에 30℃ 배양을 하였으며, *Bacillus subtilis*는 Nutrient medium(Difco)에 30℃에 배양을 하였고, *Saccharomyces cerevisiae* 는 Yeast Extract medium(Difco)에 26℃ 배양을 하였다.

배양된 유용미생물을 10^7 CFU/ml의 농도로 하여 한약재 추출물에 2% 첨가 후에 48시간 30~35℃로 배양하였다. 균체수 측정은 단계희석법으로 하여 각 agar medium에 100 μ l 접종하여 균체수를 확인하였다.

2.1.3. 시료의 성분분석

2.1.3.1. Eleutheroside B,E 와 Acanthoic acid 분석

본 실험에 사용된 HPLC는 Wasters 2690 Alliance(waters, USA), Detector는 996 Photo Diode Array를 사용하였고, Eleutheroside B,E의 표준품은 Chromadex Inc.(USA)제품을 사용하였으며, Acanthoic acid는 한국생명공학연구원 항암연구실에서 분리·정제한 것을 분양 받아 사용하였으며, 그 밖에 실험에 이용한 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

Table 4. HPLC conditions for eleutheroside and acanthoic acid analysis

Parameters	Conditions	
	Eleutheroside	Acanthoic acid
Column	Symmetry C ₁₈ , 3.9×150 mm(waters)	Luna C ₁₈ (2), 4.6×250 mm(phenomenex)
Mobile phase	Water : ACN = 90 : 10	Buffer complex* : ACN = 20 : 80
wavelength	210nm	210nm
Flow rate	0.7 ml/min	1.0 ml/min
Injection volume	10 μ l	10 μ l

*Buffer complex : 50nM sodium acetate(pH 5.5) : ACN = 90 : 10

Table 5. HPLC gradient condition mobile phase for eleutherosides analysis

Time(min)	Water(%)	Acetonitrile(%)
0	90	10
15	80	20
25	50	50
26	90	10
30	90	10

Eleutheroside 와 Acanthoic acid 정량은 오갈피 10g과 분말시료 5g을 300ml 플라스크에 넣고, 80% MeOH를 200ml를 첨가한 후 100℃에서 3시간 동안 환류냉각추출한 후 여과하여 50℃ 수조에서 감압 농축 한 후 10ml MeOH에 녹인 후 0.2 μ m membrane filter로 여과 한 후 HPLC로 분석하였다. 액상시료인 경우 시료 1ml를 80% MeOH로 10배 희석 한 후 0.2 μ m membrane filter로 여과한 후 HPLC로 분석하였다.

2.1.3.2. Ginsenosides 분석

본 실험에 사용된 HPLC는 Wasters 2690 Alliance(waters, USA), Detector는 996 Photo Diode Array를 사용하였고, ginsenosides 표준품은 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re ,Rg₁, Rg₃를 사용하였으며, BTGIN Co.Ltd.(korea)에서 구입하여 사용하였고, 그 밖에 실험에 이용한 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

사포닌추출은 오갈피와 분말시료를 각각 5g을 300ml 농축용 플라스크에 넣고, 수포화 부탄올 50ml를 첨가하여 80℃에서 환류냉각추출기에서 1시간 동안 추출한 후 여과하여 분액깔대기에 모았다. 남은 시료에 다시 수포화 부탄올 50ml를 첨가하여 두 번 더 반복 추출한 후 50ml 증류수를 첨가하여 격렬히 흔들어 부탄올층과 물층을 분리하였다. 남은 부탄올층을 농축플라스크에 모아 50℃ 수조에서 감압 농축한 후 10ml 50% MeOH에 녹여 0.2 μ m membrane filter로 여과 한 후 HPLC로 분석하였다. 액상시료인 경우 시료를 50% MeOH로 10배 희석한 후 여과하여 HPLC로 분석하였다.

Table 6. HPLC conditions for ginsenosides analysis

Parameters	Conditions
Column	YMC-Pack Pro C ₁₈ RS 150×4.6 mm, 3 μ m
Mobile phase	Water : ACN = 82 : 18 (gradient)
Wavelength	203nm
Flow rate	0.7 ml/min
Injection volume	10 μ l

Table 7. HPLC gradient condition mobile phase for ginsenosides analysis

Time(min)	Water(%)	Acetonitrile(%)
0	82	18
22	70	30
32	55	45
50	50	50
55	82	18
60	82	18

2.1.3.3. 일반성분 분석

완성된 액상시료와 액상시료를 어류EP사료에 첨가하여 10일간 혐기 발효 숙성시켜 전체적인 단백질, 지방, 회분, 탄수화물 및 무기질을 과학기술분석센터에 분석의뢰를 하였다.

2.2 시료의 *in vitro* 활성평가

2.2.1. 항산화 활성 측정

2.2.1.1. DPPH free radical scavenging activity

각 추출물의 DPPH free radical 소거활성은 Nanjo 등의 방법에 의하여 측정하였다. 60 μ l 시료용액에 60 μ l DPPH (60 μ M) 용액을 첨가하여 10초 동안 교반한 다음 혼합용액을 quartz capillary tube에 옮긴 후 2분 후에 ESR (JEOL, Japan)로 측정하였다.

스펙트럼은 scan time : 30s, field : 336 \pm 5mT, time constant : 0.3s, power : 5mW, amplitude : 1 \times 500 의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한 DPPH radical의 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

DPPH free radical scavenging activity (%) = (ESR signal intensity for medium containing the additives of concern/ESR signal intensity for the control medium) \times 100.

2.2.1.2. Hydroxyl radical scavenging activity

각 추출물의 hydroxyl radical 소거활성은 Rosen 등의 방법에 의하여 측정하였다. 20 μ l 시료용액에 0.3M DMPO 20 μ l, 10mM FeSO₄ 20 μ l, 10mM H₂O₂ 20 μ l을 혼합한 다음 quartz capillary tube에 옮긴 후 2.5분 후에 ESR로 측정하였다. 스펙트럼은 scan time : 30s, field : 336 \pm 5 mT, time constant : 0.3s, power : 1mW, amplitude : 1 \times 100 의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한 hydroxyl radical의 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

Hydroxyl radical scavenging activity (%) = (ESR signal intensity for medium containing the additives of concern/ESR signal intensity for the control medium) \times 100.

2.2.1.3. Hydrogen peroxide scavenging activity

Hydrogen peroxide 소거활성은 Müller 등(1985)의 방법에 따라 수행하였다. 즉, 0.1M phosphate buffer (pH 5.0) 100 μ l와 sample을 96well plate에서 혼합시킨 후

다시 20 μ l의 Hydrogen peroxide를 첨가하고 37 °C에서 5분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 1.25M 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS, Sigma)와 peroxidase (1 unit/ml, Sigma)를 각각 30 μ l 첨가하여 최종적으로 37°C에서 10분간 반응시켜 ELISA reader (Sunrise, TecanTM, Austria)를 사용해 405nm에서 활성도를 측정하였다.

2.2.2. 어병세균에 의한 항균 활성 측정

본 실험에 사용된 균주는 어류 질병 미생물로서 한국유전자은행인 KCTC 또는 KCCM에서 분양 받아(Table 11) -70°C Deep freezer에서 보관 (50% 글리세롤)하여 실험에 사용하였다. 분양받은 세균은 배양조건에 맞게 진 배양 하였다. 항균활성 실험은 McFarland No 0.5로 희석된 각 각의 세균 현탁액을 멸균된 면봉을 사용하여 준비되어진 Muller Hinton Agar(MHA) plate에 골고루 도말하고, 건조 후 멸균된 paper disc (직경 8mm, Advantec, Japan)에 추출물의 농도 별로 적하하여 풍건한 후 MHA plate에 얹어서 각 배양온도에 맞춰 24시간 배양하여 clear zone을 caliper로 측정하였다. caliper로 측정된 clear zone은 paper disc의 직경도 포함 하였다.

Table 8. List of strains used of antibacterial experiment

Bacteria name	Strain No.
<i>Edwardsiella tarda</i>	KCTC 12267
<i>Streptococcus iniae</i>	KCTC 3657
<i>Vibrio alginolyticus</i>	KCCM 40513
<i>Vibrio anguillarum</i>	KCTC 2711
<i>Vibrio compbellii</i>	KCCM 41986
<i>Vibrio harvey</i>	KCTC 2717
<i>Vibrio furnissii</i>	KCCM 41679
<i>Vibrio salmonicida</i>	KCCM 41663
<i>Streptococcus parauberis</i>	KCTC 3651

2.3. 생물집축실험

2.3.1. 실험어 사육관리

제주도 조천읍 함덕리에 위치한 해양과환경연구소에서 넙치를 분양받았으며, 구좌읍에 위치한 해연수산에서 돌돔을 분양받았다. 실험어는 함덕리에 위치한 해양과환경연구소로 운반하였으며, 환경에 적응시키기 위해 2주일동안 기초사료를 공급하였다. 넙치의 평균무게는 163 ± 5.8 g, 돌돔은 140 ± 5.6 g 이었으며, 1000L 원형수조에 각 실험구당 70마리씩 2박복으로 배치하였다. 실험기간 동안 수온은 11.8-21°C, 염분은 33.64-35.01‰, pH는 7.97-8.45, DO는 6.78-9.26 이었다. 실험사료는 1일 2회 어체중의 2%씩 총 12주간 공급하였다.

2.3.2. 실험사료 및 투여방법

사료 제작을 위하여 시판하고 있는 넙치용 배합사료 (조단백질 52%, 조지방 11%, 조섬유 3%, 조회분 14%, 인 2.7%, 칼슘 1.5%, Suhyup Co, KOREA)와 돌돔용 배합사료 (조단백질 45%, 조지방 16%, 조섬유 3%, 조회분 17%, 인 2.7%, 칼슘 1.5%)에 한약재와 유용미생물이 혼합된 배양액을 각각 10%씩 첨가한 후, 발효용기를 사용하여 30~35 °C의 상온에서 10일간 혐기 발효 시킨 후, 밀봉하여 4°C 냉장보관 하면서 실험구용 사료로서 사용하였다. 대조구인 사료에는 한약재와 유용미생물이 첨가하지 않은 시중에서 판매되는 사료 (Suhyup Co)를 사용하였다. 사료의 투여는 매일 2회 (AM 9h, PM 6h) 12주 동안 어체중의 2%를 투여하였다.

2.3.3. 성장도 조사 및 혈액학적 분석

실험어의 성장도조사와 채혈은 2주 간격으로 실시하였으며, 측정 24시간 전에 절식시킨 후 2-phenoxyethanol (Sigma. USA)로 마취시켜 측정하였다. 성장도조사방법은 각 실험구에서 무작위로 20마리를 선발하여 실험어의 전장, 무게를 측정하여 평균을 내었다.

성장도 조사와 함께 혈액성분 분석을 위하여 실험어를 채혈하기 24시간 전 동안 절식하였으며 각 수조당 3마리씩 무작위로 선발하여 미부에서 혈액을 채혈한 후, 혈청성분 분석을 위하여 항응고제가 처리되지 않은 원심분리관에 넣고 실온에 30분간 방치 후에 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 분석하였다. 혈청성분은 자동 혈

액 분석 장치(Ch100 plus, Deawang meditecq., KOREA)를 사용하여 GOT (glutamic oxaloacetic acids), GPT (glutamic pyruvic acid), 총단백질 (total protein), 글루코스 (glucose)를 측정하였다.

2.3.4. 어류면역 활성 측정

2.3.4.1. 어류식세포의 활성산소 측정

어류 식세포 작용을 알아보기 위하여 respiratory burst activity를 Anderson과 Siwicki (1996) 실험법에 따라 분석하였다. 실험어의 미부에서 채취한 전혈을 1.5ml 마이크로튜브에 넣고 0.2% NBT (Nitroblue tetrazolium, Sigma)를 전혈과 1:1로 되게하여 30분간 상온에서 반응시킨 후, 1ml dimethyl foramide를 넣고 반응을 정지시킨다. 그런 다음 2000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후 상층액을 수거하여 540nm에서 micro-reader (Packard SpectrocountTM)로 흡광도 값을 측정한다. Blank는 dimethyl foramide로 하고, Control은 NBT시약을 사용하였다.

2.3.5. 어병세균에 의한 공격실험

넙치와 돌돔의 항병력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 현재 양식장에 발병 빈도가 가장 높은 그람양성 세균인 *Streptococcus iniae* (KCTC 3657) 와 그람음성 세균인 *Vibrio anguillarum* (KCTC 2711)을 이용하여 공격실험을 실시하였다. 균액은 10^7 CFU/ml의 농도가 되도록 멸균 생리식염수에 현탁한 후, 공격 실험용액으로 사용하였다.

공격실험은 사료투여 후 12주 후에 실시하였으며 대조구를 비롯하여 실험구에서 무작위로 30마리씩 선정하여 1ml 주사기를 이용하여 각 마리당 $200\mu\text{l}$ 씩 복당 주사한 후 18일 동안 누적 폐사율을 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 유용미생물의 성장 과 개발제품의 성분

3.1.1. 유용미생물의 성장조건 확립

한약재 추출물에 유용미생물을 배양한 결과는 Table 9와 같다. 한약재 추출물은 4brix와 9brix로 하여 미생물을 배양하였다.

Table 9. Colony forming unit of probacteria (CFU/ml)

Bacteria	4brix	9brix
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2.3×10^8	4.2×10^8
<i>Lactobacillus brevis</i>	8.0×10^8	6.0×10^8
<i>Lactobacillus plantarum</i>	7.8×10^8	2.2×10^8
<i>Bacillus subtilis</i>	3.3×10^7	1.2×10^4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.0×10^5	1.2×10^5

추출물의 농도 별로 미생물을 배양한 결과 *Bacillus subtilis*를 제외하고 모든 유용미생물이 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 유용미생물을 첨가하지 않은 4brix, 9brix의 추출물의 건조중량을 알아본 결과, 4brix는 44 mg/ml, 9brix는 70mg/ml, 유용미생물을 9brix에 혼합시킨 추출물에서는 96 mg/ml를 나타내었다. 이 결과로 보아 유용미생물을 혼합한 시료가 수율이 높은 것으로 보아 유용미생물이 추출물에 저해되지 않고 성장이 이루어 짐을 알 수 있다.

유산균은 단순한 배지에서는 증식이 어렵고 복합 영양소가 구비된 배지에서 정상적인 생육을 하는 영양요구성이 까다로운 균으로 알려져 있다(강국희, 1980). 유산균 생육의 여러 연구가 이루어져 한국에서는 인삼, 영지, 울무, 화분, 생강, 마늘, 고추, 양파, 등의 추출물이 유산균의 생육에 미치는 영향에 대한 연구가 있었다(정진모 1982; 박달선, 1982; Yoo, J.Y., 1980). 따라서 오갈피, 인삼 등이 첨가된 추출물에 유산균의 증식이 가능하였다고 생각되어진다.

3.1.2. Eleutheroside B,E 와 Acanthoic acid 분석

탐라오갈피의 주요 성분은 분포지역 및 식물종간에 따라 다소 차이가 있지만 eleutheroside, 리그난 배당체, 면역성 다당류, 사포닌(saponin), 플라보노이드, chlorogenic acid, sesamin, terpenoid, cumarin 유도체 등이며 향피로, 항스트레스, 항염증 작용, 간기능 보전과 해독작용 면역기능 및 생체 저항력 강화, 근육강화 등 생체기관의 전반적인 기능을 증진시키는 생리활성이 알려져 있다(Shin, H.K and Lee, S.H. ,2002). 특히 탐라오갈피로부터 분리된 물질 중에 acanthoic acid 성분은 현재까지 탐라오갈피 뿌리에서만 대량으로 분리되며, 패혈증, 관절염, 염증, 간경변, 규폐증 간기능 보전, 진통소염작용 등 면역기능 향진에 뛰어난 약리작용이 있다는 연구와 Interleukin-1과 TNF- α 의 생성억제, TNF- α 유전자 발현억제, collagen 합성의 억제, 간독성의 억제 등이 보고되었다(Lee, E.B. ,2001).

Fig. 1은 Eleutheroside B, E의 표준품을 나타낸 그림이며, Fig .2는 오갈피샘플의 Eleutheroside B, E 성분의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 그림이다. Eleutheroside B, E의 표준품을 근거로 하여 액상시료를 분석한 결과는 Table 13과 같으며, Fig. 3의 HPLC 크로마토그램을 분석하여 Eleutheroside B, E임을 확인하였다. Acanthoic acid의 분석은 Fig. 4의 표준품과 비교하여 오갈피의 Acanthoic acid의 함량을 분석하였다(Fig. 5).

본 실험의 결과 개발제품인 액상시료는 오갈피의 Eleutheroside B 함량이 약 4배 적으며, Eleutheroside E의 함량은 약 6배가 낮게 검출됨을 확인할 수 있었다. 탐라오갈피만이 함유하고 있는 Acanthoic acid는 검출 되지 않았다. 결과적으로 액상시료를 조제 시, 탐라오갈피 120g을 100%로 볼 때 줄기가 80%, 뿌리가 20%의 첨가량이 상대적으로 적었다는 것을 고찰할 수 있었다. 또한 줄기에 비해 뿌리의 첨가량이 적어 Acanthoic acid 성분이 검출되지 않았을 것이라 사료된다.

Table 10. Content of Eleutherosides and Acanthoic acid from *Acanthopanax koraenum* extract and liquid sample (ppm)

Sample	Eleutheroside B	Eleutheroside E	Acanthoic acid
extract	497	3925	194.45
liquid sample	117.8	685.2	-

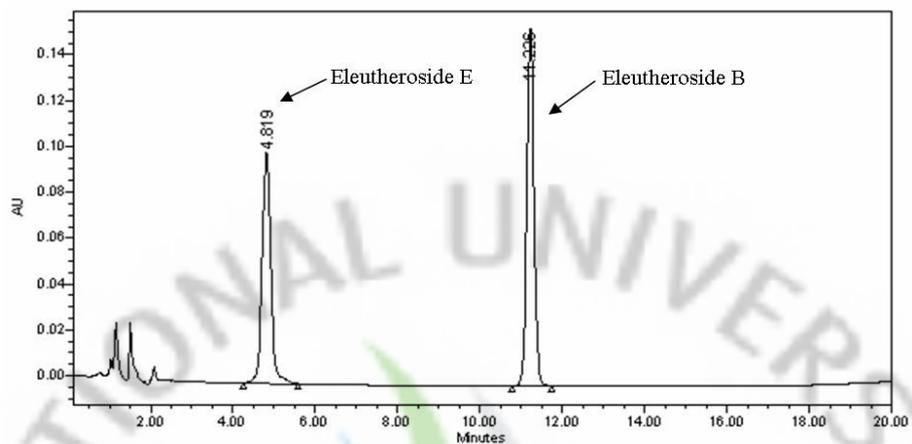


Fig. 1. Eleutheroside B,E standard by HPLC chromatogram

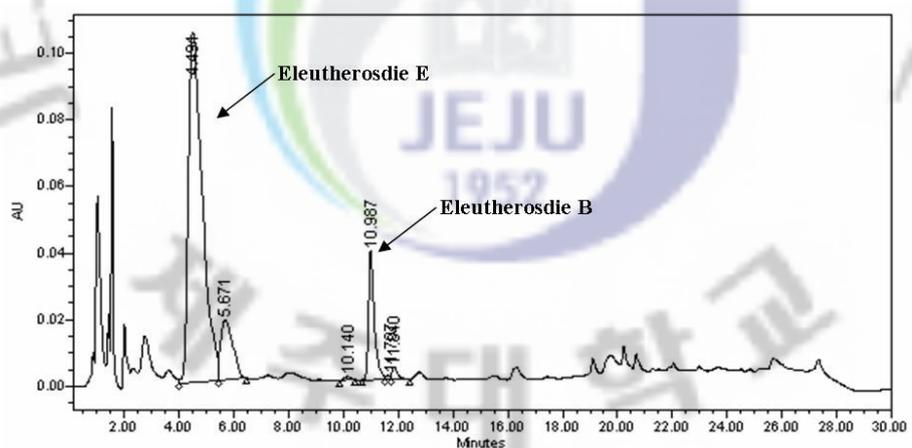


Fig. 2. Eleutheroside B,E HPLC chromatogram of *Acanthopanax koraenum* extract

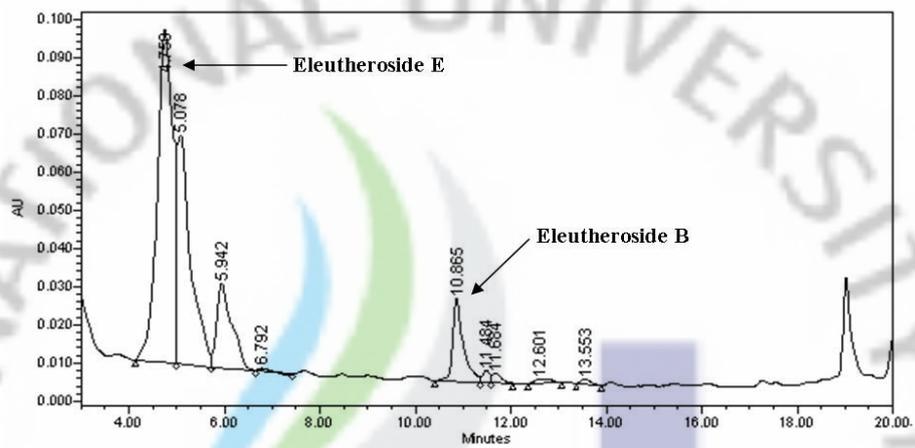


Fig. 3. Eleutheroside B,E HPLC chromatogram of *Acanthopanax koraenum* liquid sample

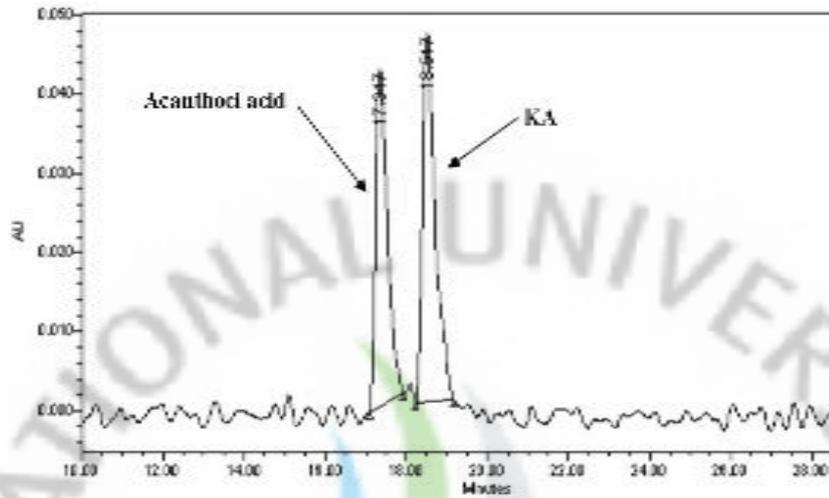


Fig. 4. Chromatogram of Acanthoic acid standard

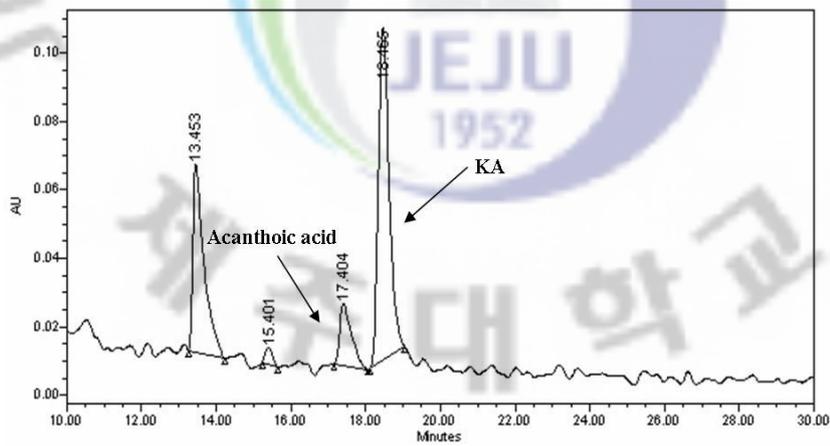


Fig. 5. Acanthoic acid HPLC chromatogram of *Acanthopanax koraenum* extract

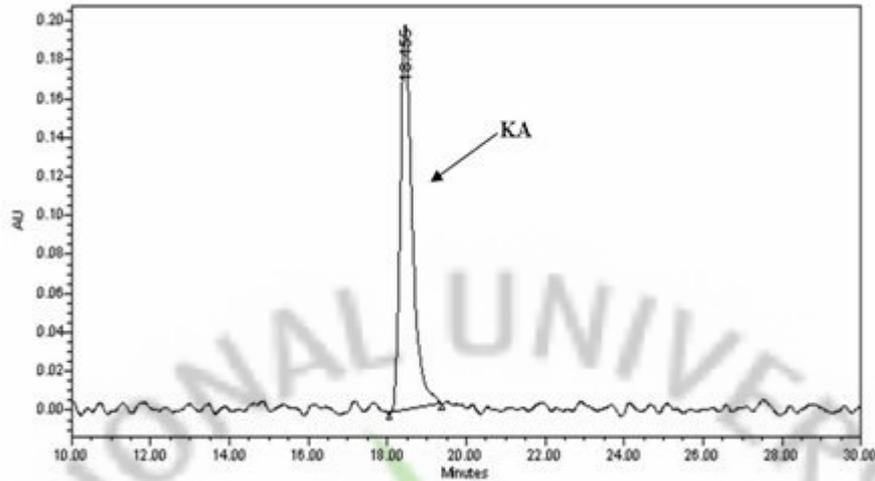


Fig. 6. Acanthoic acid HPLC chromatogram of *Acanthopanax koraenum* liquid sample

3.1.3. Ginsenosides 분석

Ginsenosides 분석결과는 Fig. 7의 표준품을 근거로 하여 오갈피와 액상시료의 Ginsenosides를 분석 하였으며 Fig. 8,9에 나타나 있으며, 각 성분의 함량은 Table 11에 나타나 있다.

인삼 성분 중 특히 saponin류가 유효성분으로 주목되어 주로 saponin류의 구조와 효능에 관한 연구가 많이 진행되어 왔다. 예로부터 신비의 영약으로 당뇨, 암, 혈압, 간 및 심장 질환 등 각종 성인병 예방은 물론 신진대사 촉진 작용, 저항력 증가 및 면역기능 향상을 나타낸다고 알려져 있다(Nam, 1996) Shibata 등(1996)은 인삼에 함유된 배당체란 뜻으로 ginsenoside라 명명하였으며 thin-layer chromatography(TLC)에서 분리된 이동거리 순으로 oleananer saponin인 ginsenoside-Ro와 diol/triol계 saponin인 ginsenoside-Ra, -Rb₁, Rb₂, -Rc, -Re, Rf, -Rg₂, Rg₃ 및 -Rh 등으로 명명하였다. saponin은 중추신경계의 강화, 체내 단백질 합성 촉진효과, 항산화 효과 및 혈압 조절 등의 효능이 알려져 있다(Matsuta 등, 1987; 한국인삼연초연구원, 1996)

본 결과를 살펴보면 오갈피 보다 액상시료의 ginsenosides의 함량이 높음을 확인할 수 있었다. 오갈피와 액상시료에서 가장 많이 함유되어 있는 Re는 Rb₂, Rg₁에 더불어 골수 세포의 DNA 생합성, 단백질생합성, 지질생합성을 촉진 시킨다고 보고되

어 있다. Park, H.Y (2007) 등에 대한 보고에 의하면 어류에 있어서 saponin은 먹이 기피 현상이 나타날 수 있지만, 이 문제점을 극복하면 어류의 대식세포 활성의 증가를 나타내어 사료첨가제로서 사용가능하다고 보고되고 있다. 따라서 본 연구에서도 saponin이 넙치와 돌돔의 면역력을 증강시켜 줄 것으로 사료된다.

Table 11. Ginsenosides analysis result (ppm)

Sample	Ginsenosides							Total
	Rb ₁	Rb ₂	Rc	Rd	Re	Rg ₁	Rg ₃	
extract	3.12	15.86	5.76	5.00	167.09	115.06	-	311.89
liquid sample	20.35	9.36	5.17	7.83	256.96	103.13	-	402.80

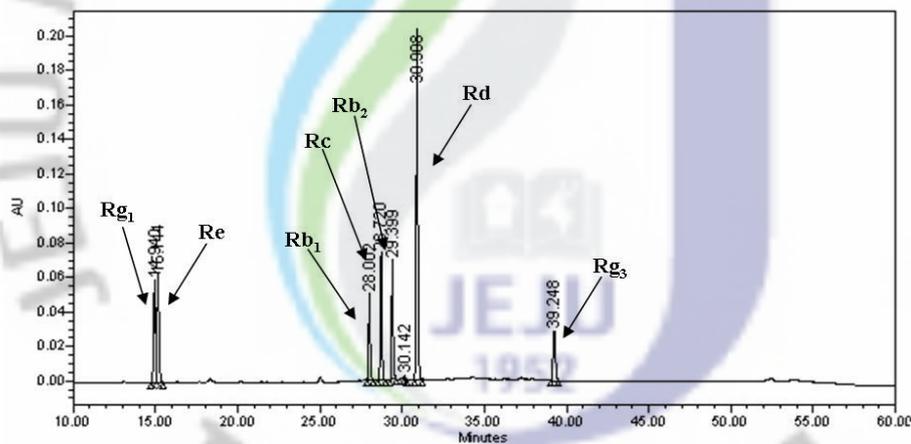


Fig. 7. Ginsenoside standard by HPLC chromatogram

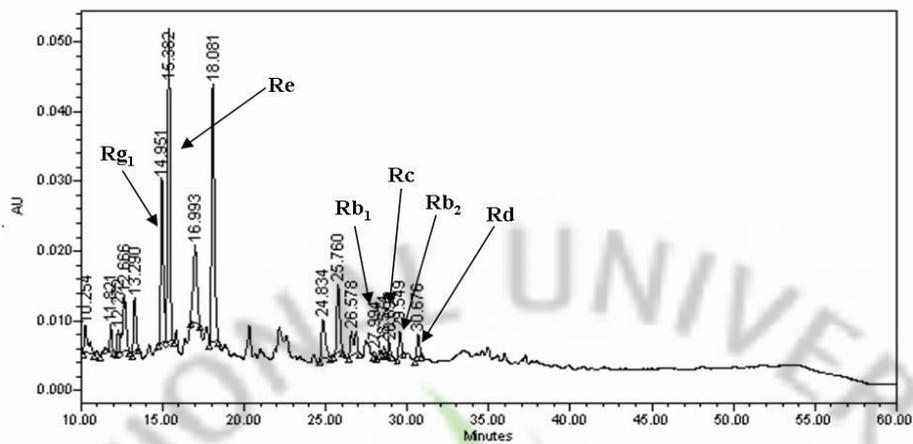


Fig. 8. Ginsenoside HPLC chromatogram of *Acanthopanax koraenum* extract

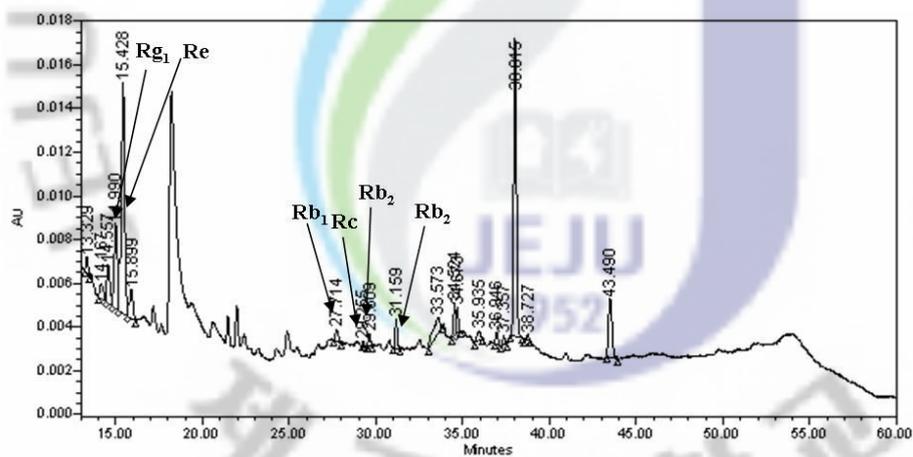


Fig. 9. Ginsenoside HPLC chromatogram of *Acanthopanax koraenum* liquid sample

3.1.4. 시료의 일반성분 분석

본 연구에서 사용되어진 액상시료와 EP사료에 액상시료를 혼합시킨 시료의 분석 결과를 Table 12에 나타내었다. 액상시료는 그 대부분이 수분으로 탄수화물과 철이 소량 포함되어 있었으며, 액상시료에 EP사료를 혼합시킨 시료는 전체적인 조단백질, 조지방, 회분, 탄수화물 및 무기질은 일반EP사료와 비슷하였다.

Table 12. Compounds of liquid sample+EP and liquid sample

분석항목	단위	분석결과		
		액상시료	액상시료+EP사료	EP사료(Suhyup)
수분	%	97.08	13.71	10.02
조단백질	%	0.34	40.19	40.86
조지방	%	0.10	5.67	5.71
조회분	%	0.25	9.17	9.25
탄수화물	%	2.23	31.26	34.16
칼슘	%	0.02	1.87	1.95
인	%	0.01	1.21	1.27
철	ppm	25.44	485.65	519.44
망간	ppm	1.43	43.10	41.77
아연	ppm	1.45	139.70	149.58
구리	ppm	0.46	13.56	14.97

3.2. 시료의 *In vitro* 활성도

3.2.1. DPPH free radical scavenging activity

일반적으로 특정 물질에 대한 항산화 활성을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있으나 그 중에서 DPPH radical 소거 활성법은 비교적 간단하면서 대량으로 측정이 가능한 방법으로 흔히 이용되고 있다. 항산화 물질은 free radical에 전자나 수소를 공여하여 복합체를 만들고, DPPH는 항산화 물질로부터 전자, 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하여, 전자공여능으로부터 항산화 활성을 측정할 수 있다. 전장공여 작용은 활성 radical에 전자를 공여하여 지방질 산화를 억제 시키는 척도로 사용되고 있을 뿐만 아니라 인체 내에서 활성 radical에 의한 노화를 억제하는 작용의 척도로 이용되고 있다(Choi, J.H and Oh, S.K., 1985)

DPPH법은 항산화 활성을 나타내는 생리활성 물질에 의해 환원됨으로서 짙은 자색이 탈색이 되는 정도에 따라 항산화 효과를 전자공여능으로 측정하는 방법이다. 각각의 추출물(4, 9brix)과 유용미생물이 포함된 추출물(5 strains mixed extract)의 수율을 측정하여 희석한 후 DPPH에 의한 활성을 측정한 결과는 Fig.10과 같다.

모든 시료가 1mg/ml와 0.5mg/ml의 농도에서 80%가 넘는 활성을 보였으며, 0.1mg/ml의 농도에서는 4brix의 추출물만 80%가 넘는 활성을 보였다.

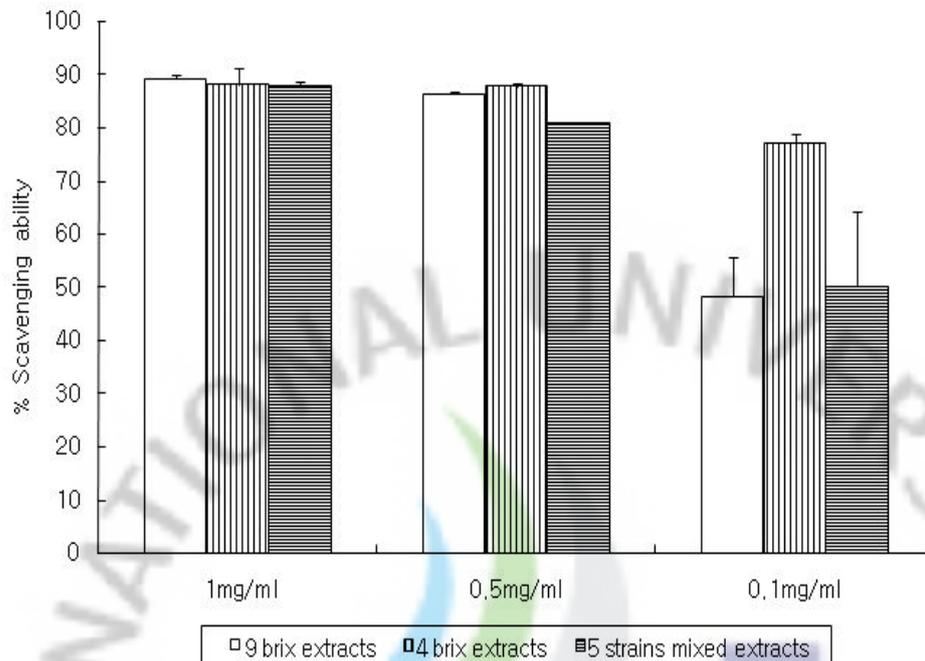


Fig. 10. DPPG radical scavenging activity of the 9brix extracts, 4brix extracts, 5 strains mixed extract

3.2.2. Hydroxyl radical scavenging activity

Free radical이란 제일 바깥쪽 전자각에 짝지어지지 않은 전자(unpaired electron)를 포함하는 화학종으로 대체로 강한 반응성을 나타낸다. 이들은 탐식작용, prostaglandin 합성과 같은 생리적 과정에서 뿐만 아니라 많은 효소촉매반응의 중간 물질로서 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 강한 반응성 때문에 인접한 세포성분들을 무차별 공격하여 손상을 일으킬 수 있다.

Free radical 중에 생체 내에서 가장 빈번히 출현하고 따라서 중요하게 취급되는 것이 산소 radical 이다. 주요 산소 radical으로는 superoxide(O_2^-), hydroxyl($\bullet OH$), perhydroxyl($HO_2\bullet$), alkoxy($RO\bullet$), peroxy($ROO\bullet$) radical 등이 있다. 그 외 radical은 아니지만 반응성이 강한 산소종으로 과산화수소(H_2O_2)와 singlet oxygen이 있다. Singlet oxygen은 분자산소와 달리 외각의 전자 2개의 spin방향이 서로 반대로 되어 있어 불안정하다. 이상에서 열거한 여러 형태의 산소를 가르켜 흔히 reactive oxygen species(활성산소)라 부르는데 그 중에서도 hydroxyl radical 과

signlet oxygen이 수용액중에서 가장 강한 반응성을 나타내어 지질산화를 개시하고 DNA에 손상을 주거나 돌연변이를 유발하는 물질로 알려져 있고, 생체의 대사과정에서 생성되는 지질의 과산화물이나 과산화수소가 Fe^{2+} 나 Cu^{2+} 이온의 존재 하에서 생산되며 가장 독성이 강한 free radical이므로 이 radical을 소거하는 정도를 측정한다.

본 연구의 결과를 보면(Fig. 11) 10mg/ml의 농도에서 유용미생물을 혼합한 추출물이 가장 높은 반면에 9brix의 추출물은 낮은 활성을 보였다. 5mg/ml의 농도에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 가장 낮은 농도인 2mg/ml의 농도에서는 유용미생물을 혼합한 처리구가 가장 높은 활성을 보였다. 기존의 합성 항산화제인 BHA(butylated hydroxyanisole)와 BHT(butylated hydroxytoluene)는 결과에 나타내지는 않았지만, 약 60%의 소거활성을 보였다. 이는 본 실험의 5mg/ml의 농도와 비슷한 활성을 보인다고 할 수 있다. 결과적으로 미생물을 이용하여 발효시킨 추출물이 좀 더 높은 항산화 활성 효과를 기대해 볼 수 있다.

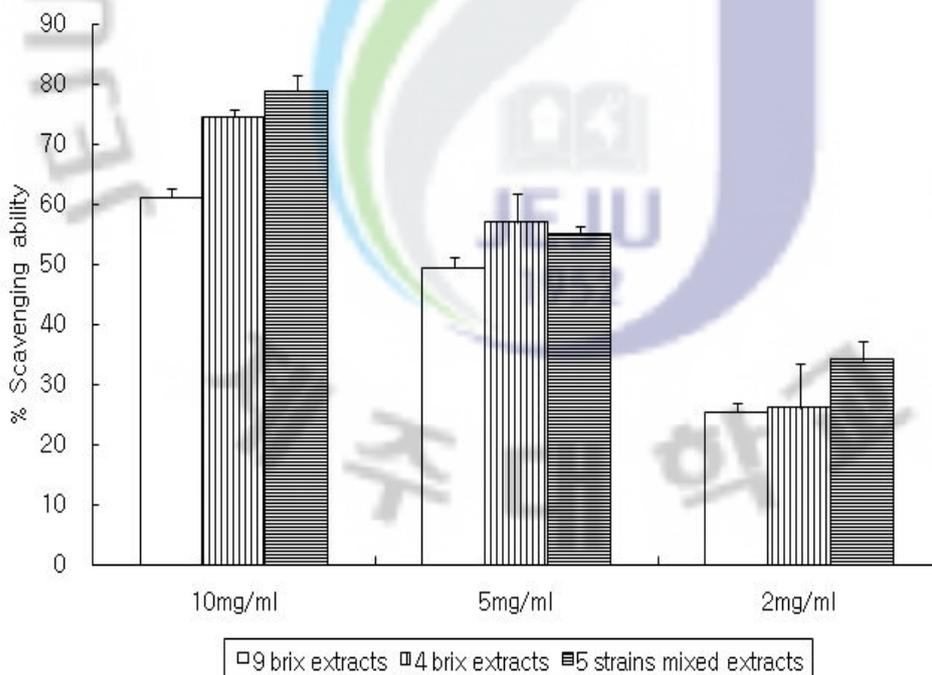


Fig. 11. Hydroxyl radical scavenging activity of the 9brix extracts, 4brix extracts, 5 strains mixed extract

3.2.3. Hydrogen peroxide scavenging activity

Hydrogen peroxide 소거 활성은 발색시약인 ABTS와 hydrogen peroxide가 반응하여 전자 하나를 잃게 되어 $ABTS^+$ 가 되게 된다. 이 때, ABTS 시약은 청색을 띄게 되는데, 추출물이 hydrogen peroxide를 제거해 줌으로서 옅은 청색을 띄게 된다.

Hydrogen peroxide 소거활성 결과는 Fig. 12에 그래프로 나타내었다. 이 실험에서는 10mg/ml의 농도에서는 90%소거 활성을 보였지만, 농도가 낮아지면서 활성이 낮아지는 경향을 보였다. 하지만 이 중에서 4brix 추출물이 모든 농도에서 높은 활성을 나타내었다.

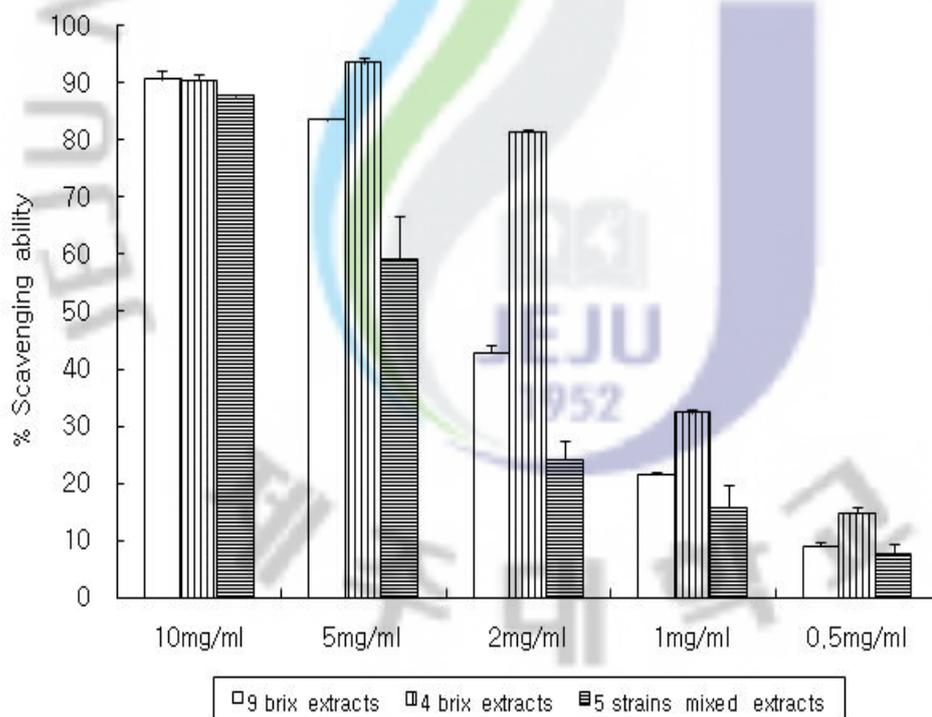


Fig. 12. Hydrogen peroxide scavenging activity of the 9brix extracts, 4brix extracts, 5 strains mixed extract

3.2.4. 어병세균에 의한 항균 활성 결과

어류질병세균 9종에 대한 항균실험결과는 Table 13과 같다. 9brix 추출물은 모든 농도에서 항균활성이 거의 없는 것을 확인하였고, 4brix 추출물은 높은 농도에서 *Vibrio anguillarum* 과 *V. harvey*가 가장 높은 활성을 나타냈다. 하지만 넙치의 복수증을 일으키는 유발균인 *Edwardsiella tarda*는 활성을 나타내지 않았다.

반면 유용미생물을 첨가한 추출물은 두 개의 추출물에 비해 높은 항균활성을 나타내었다. 이러한 결과는 각각 첨가시킨 미생물에 의하여 한약재 추출물에 의하여 유용성분들의 발효과정을 거치면서 그 기능성이 증가하여 어병세균에 대하여 저해 효과를 가져온다는 것을 알 수 있다. 특히 여름철 고수온기에 넙치의 탈장, 복부팽만, 창자의 출혈, 복수 저류를 일으키는 원인균인 *V. harvey*가 높은 항균활성을 나타냈으며, 체색흑화, 안구돌출, 안구출혈, 아가미뚜껑 출혈의 증상을 나타내는 *Streptococcus* 속의 세균 또한 높은 항균활성을 나타내었다.

Table. 13. Antibiotic susceptibility test of oriental medicine extract and probiotic mixed extract

	(mg/ml)	Pathogenic bacteria(clear zone on plate(mm))								
		A	B	C	D	E	F	G	H	I
9 brix extracts	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	9	-	-	-	-	12	-
4 brix extracts	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	8	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	9	11.5	11	-	-	11	-	13	12
	20	13	18	19	10	12	14	-	21	18
5 strains mixed extract	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	13	11	12	-	-	15	-	12	-
	10	17	17	19.5	12	12	18.5	9	17	18.5
	20	19	19	27.5	16	15	21	11.5	20	20

항산화 활성 결과와 항균 활성 결과를 종합해 보면, 항산화 활성 결과 가장 높은 농도에서 80~90% 가까운 활성을 보였다. DPPH 소거 활성과 Hydrogen peroxidase 소거 활성을 살펴보면 4brix의 시료가 높은 활성을 나타냈으며, 가장 강력한 radical 인 hydroxyl radical 소거활성은 유용미생물을 첨가한 추출물이 가장 높은 활성을 보였다. 항균활성도 마찬가지로 유용미생물 첨가구인 추출물이 미생물 미첨가구보다 높은 활성을 보였다. 유용미생물 중 유산균이 높은 비중으로 차지하고 있는데 이러한 유산균의 항균능력을 나타내는 물질로는 유기산(Rosenquist, 1998)과 과산화수소 및 bacteriocin(Bruno 등, 1993; Jack 등, 1995; Poard, 1992) 등이며, 또한 유산균은 장 상피세포에 부착하여 정착함으로써 (Joborn 등, 1997) 병원균의 감염과 성장을 억제하게 된다고 보고되어있다. 따라서 한약재의 단독적인 효과 보다는 유용미생물에서 생성되는 물질이 radical 소거와 어류질병 유발세균의 항균능력을 높여 준다고 사료된다.

3.3. 생물접촉실험 결과

3.3.1. 성장도 조사

사료의 개발제품(액상사료) 첨가구와 비첨가구를 양식넙치와 돌돔에 12주 투여한 후 체중변화, 사료효율, 생존율에 대한 결과를 Table 14에 나타내었다. 양식넙치의 증중량은 대조구와 실험구가 비슷한 경향을 보였으나, 돌돔은 실험구가 더 큰 증중량을 나타내었다. 사료효율은 유의적 차이가 없었으며, 양식넙치 생존율은 대체적으로 낮은 경향을 보였다. 이러한 이유는 사육지장소의 수질이 파도가 높은 시기에 악화되는 현상을 보여 사료투여를 하지 않았기 때문에 낮은 사료효율을 보였으며, 실험 4~10주 사이에 12~14℃의 저수온의 해수가 공급되어 낮은 사료효율을 보였다고 사료된다. 돌돔의 경우, 해수의 온도가 18℃ 이상에서 활발하게 섭식하여 성장하는 고수온 어종으로 (Kumai, 1984), 사료효율이 낮은 이유는 저수온에 의한 스트레스 반응 때문일 것이라 사료된다.

Table 14. Effect of the culture broth of LAB cultured in herb extract on weight gain, feed efficiency and survival of olive flounder(*Paralichthys olivaceus*) and parrot fish(*Opelegnathus fasciatus*)

Group		Initial weight(g)	Final weight(g)	Weight gain(g)	Feed efficiency	Survival (%)
Olive flounder	Con.	188.4±7.2	280.3±18.8	91.9	20.5	54.3
	Tre.	197.0±1.3	295.0±6.0	98.0	22.3	57.1
Parrot fish	Con.	145.6±16.5	200.5±2.0	61.2	27.4	100.0
	Tre.	156.6±16.7	232.0±10	81.2	29.7	98.6

3.3.2. 혈액학적 분석

실험구과 대조구의 혈액학적 분석결과를 Table 15에 나타내었다. 혈장 전이효소인 GOT와 GPT는 간 손상을 감지할 수 있는 지표로 사용되고 있다. 어체가 정상적인 상태에서는 세포내에서 발견 되지만, 간세포가 손상을 입었을 때, 세포가 파괴되면서 혈액으로 빠져 나오게 된다(Smith and Ramos, 1980).

본 연구에서는 GOT와 GPT의 상관성을 나타내지 않았으며, 0~2주에 측정된 결과 값이 2~8주 사이에 증가하면서 비교적 높은 수치를 유지하다가 실험 종료 되는 12주의 측정값이 0~2주와 비슷한 측정결과로 감소하는 경향을 보였다.

어류의 total protein 농도의 변화는 최근환경 오염의 지표로 사용되고 있으며 (Ito and Murata, 1990; Hodson *et al.*, 1992), 일반적으로 오염물질에 의해 감소하며, 그 원인중의 하나는 장관 손상에 따른 흡수장애를 들 수 있다(Mayer, 1985; Yamawaki *et al.*, 1986; khattak *et al.*, 1996).

모든 실험구에서 총단백질의 농도는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Glucose의 경우 외인성 화합물질과 같은 독성물질에 대하여 증가하는 경향을 나타내는데, 이것은 아드레날린의 과분비에 의한 과혈당 조건을 유발할 수 있으며 체내 glycogen을 분해하여 혈장 glucose가 증가하게 된다(Gupta, 1974).

본 실험에서 측정된 glucose의 함량은 돌돔의 경우, 대조구와 비교하여 유의적인 차이와 시간에 따른 상관성은 보이지 않았으며, 넙치의 경우 2~6주에서 높은 농도를 나타내었지만 시간이 지남에 따라 서서히 줄어들어 0주와 비슷한 경향을 보였다.

Table 15. Hematological changes of olive flounder(*Paralichthys olivaceus*) and parrot fish(*Opelegnathus fasciatus*) fed with the LAB culture broth for 12weeks

week	Group	GOT (U/L)		GPT (U/L)	
		Olive flounder	Parrot fish	Olive flounder	Parrot fish
0	Con.	45±33	42.5±0.5	12±3	24.5±1.5
	Tre.	4±1	24±0	21.5±12.5	37±6
2	Con.	17±7	46.5±1.5	3.5±0.5	38.5±4.5
	Tre.	32.5±15.5	61.5±0.5	29±11	22.5±1.5
4	Con.	18±7	47±2	20.5±2.5	47±2
	Tre.	22.5±1.5	55.5±3.5	33±4	55.5±3.5
6	Con.	12.5±1.5	72.5±0.5	31±15	26±3
	Tre.	19±2	65.5±0.5	32.5±3.5	25.5±3.5
8	Con.	14.5±0.5	58.5±0.5	15±13	47.5±0.5
	Tre.	12.5±0.5	34±1	11±9	39.5±2.5
10	Con.	37±0	59.5±1.5	20±2	24.5±0.5
	Tre.	11.5±1.5	37±13	1.5±0.5	33.5±0.5
12	Con.	8.5±3.5	32.5±2.5	17.5±0.5	46±8
	Tre.	8±0	29±1	8±2	60±1

week	Group	TP (g/dL)		GLU (mg/dL)	
		Olive flounder	Parrot fish	Olive flounder	Parrot fish
0	Con.	4.4±0.1	4.35±0.05	23.5±0.5	96±7
	Tre.	5.75±0.15	4.8±0.2	51±3	116.5±3.5
2	Con.	5.1±0.8	5.6±0.2	84.5±2.5	177.5±6.5
	Tre.	3.8±0.1	6.3±0.5	83.5±7.5	135±10.5
4	Con.	5±0.2	5.35±0.25	92±4	108.5±2.5
	Tre.	4.2±0.2	5.55±0.15	94±5	114±6
6	Con.	6.95±3.35	6.3±0.2	65±35	145±10.5
	Tre.	4.6±0.4	5.65±0.15	30±7	74.5±6.5
8	Con.	4.0±0.1	4.4±1.1	28.5±2.5	80±0
	Tre.	3.45±0.05	5.2±0.6	21.5±1.5	129.0±7
10	Con.	3.6±0.2	5.3±0.1	18±0	91.0±1
	Tre.	4.05±0.05	4.3±0.1	14±0	101.5±1.5
12	Con.	4.25±0.05	5.65±0.15	22±1	106±10
	Tre.	4.1±0.1	5.5±0.1	39±14	109±0

혈액학적 분석을 종합하여 보면, 4개의 항목 모두 대조구와 실험구 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이는 액상사료를 사료에 발효시킨 사료가 간세포의 손상과 독성물질에 대한 반응을 나타내지 않는다고 사료되어진다. Glucose의 경우, 2~8주의 기간에 가장 높은 경향을 보였는데 수질악화의 반복현상과 저수온에 의한 스트레스 반응 때문이라고 생각되어진다. 이러한 glucose의 증가경향은 참돔, striped bass, chinook salmon 등을 이용한 수온변화 연구를 통하여 보고되고 있다 (Ishioka, 1980; Barton and Schreck, 1987; Davis and Parker, 1990).

3.3.3. 어류식세포의 활성산소 측정

어류에 있어 비특이적인 면역반응이 얼마나 증대 되었는지를 가장 잘 반영할 수 있는 필수적인 척도로서 식세포활성 측정이 많이 사용된다. Professional phagocytes (granulocytes, monocytes, macrophage)의 호흡급증은 $\bullet O_2^-$ 의 감소를 의미한다. 혈장과 phagosomal membranes에 있는 NADPH oxidase에 의해 O_2 가 $\bullet O_2^-$ 로 변한다. 이 후에 superoxide는 자연유발적인 효소로 hydrogen peroxide (H_2O_2), hypochlorous acid (HOCl), hydroxyl radical ($\bullet OH$), singlet oxygen (O_2) 등의 다른 종류의 ROS로 전환된다. 포유동물에서는 숙주방어에 있어 respiratory burst의 중요한 점은 NADPH oxidase의 결점에 의해 만성 육아종을 앓는 숙주는 NADPH 산화 효소가 없기 때문에 respiratory burst를 일으킬 수 없는 것으로 알려져 있다.

어류 식세포도 respiratory burst 반응을 할 수 있는 NADPH 산화효소의 활동결과 포유동물과 유사하게 나타났으며, respiratory burst는 어류 건강상태를 확인할 수 있는 bioindicator 중 하나이다. 현재까지 식세포의 활성을 측정하기 위해 사용되어진 방법은 식균율의 변화, 화학주성 변화 및 호흡폭발의 변화 등이다. Respiratory burst 란 식세포가 식작용 동안 혹은 다른 물질에 의해서 자극받았을 때 산소 소비량이 증가함과 동시에 O_2^- , OH , H_2O_2 와 같은 산소라디칼(ROS)을 다량으로 방출하는 현상을 말하며, 이러한 ROS는 병원체를 죽이는데 매우 중요한 역할을 한다(Siwicki, 1994). 이러한 호흡폭발을 측정하는 방법으로 NBT법이 많이 사용되어져 왔으며, 최근 Chemiluminescence (CL)법이 일부 사용되고 있다.

본 실험에서는 NBT법을 사용하였으며, 대조구와 실험구간의 유의적인 차이가 없었

다(Fig. 13). 사료를 투여하고 0~2주에는 활성이 높아졌지만 2~8주 사이에 돌돔은 감소 현상을 보였고, 8~12주에서 다시 높아짐을 확인 할 수 있었다. 이는 2~8주 사이에 사육지 수질악화에 따른 사료효율 감소와 오염물질에 유입으로 인해 면역력이 낮아 졌다고 사료되어진다.

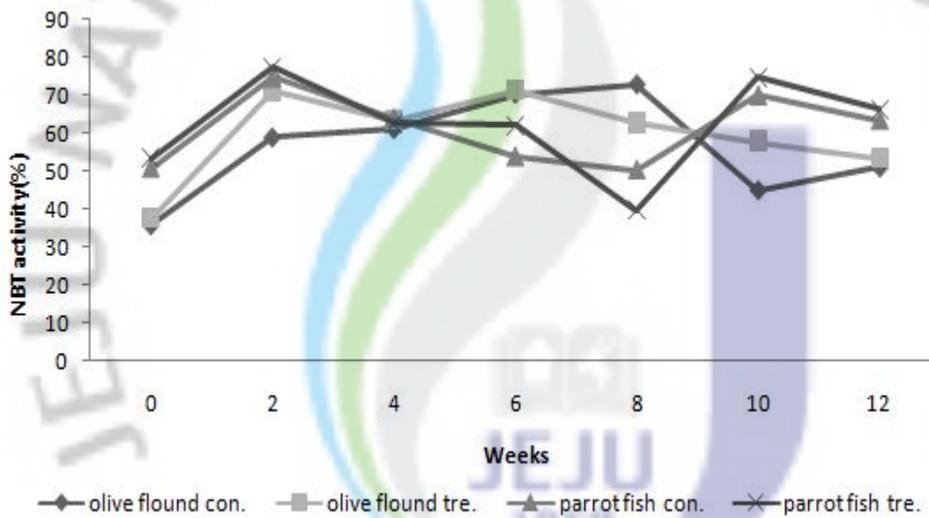


Fig. 13. Serum NBT ativity of olive flounder(*Paralichthys olivaceus*) and parrot fish(*Opelegnathus fasciatus*) fed with the LAB culture broth for 12weeks

3.3.4. 어병세균에 의한 공격실험

제작 시료를 첨가한 사료를 투여한 실험구와 대조구의 어병세균에 대한 공격실험의 결과를 Fig.15,16에 나타내었다. 넙치의 경우, *V. anguillarum*을 접종하여 대조구는 8일째에 77%의 폐사율을 보였으며, 실험구는 59%의 폐사율을 나타내었다. *S. iniae* 접종 결과는 대조구가 63%를 나타내었으며, 실험구는 40%의 폐사율을 나타내었다. 돌돔의 공격실험 결과의 경우, *V. anguillarum*을 접종하여 대조구는 7일째에 100% 폐사하였으며, 실험구는 8일에서 실험 종료 시까지 83%의 폐사율을 보였다. *S. iniae* 접종 결과는 실험종료 시에 대조구는 63%, 실험구는 47%를 보였다. 위 결과로 보아 한약재와 유산균 첨가 투여구인 실험구가 대조구 보다 약 20% 높은 생존율을 보여 양식넙치와 돌돔에 대한 사료 첨가제로서 질병 저항성을 높여주는 사료첨가제가 될 것이라 사료된다.

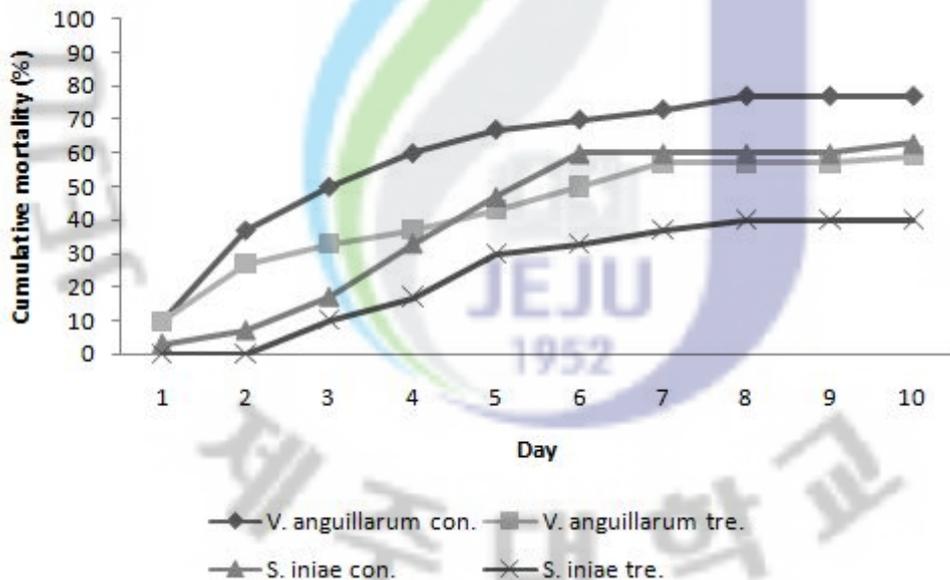


Fig. 14. Cumulative mortality(%) of olive flounder by 10days feeding of the LAB broth after challenge with *V.anguillarum* and *S.iniae* (n=30)

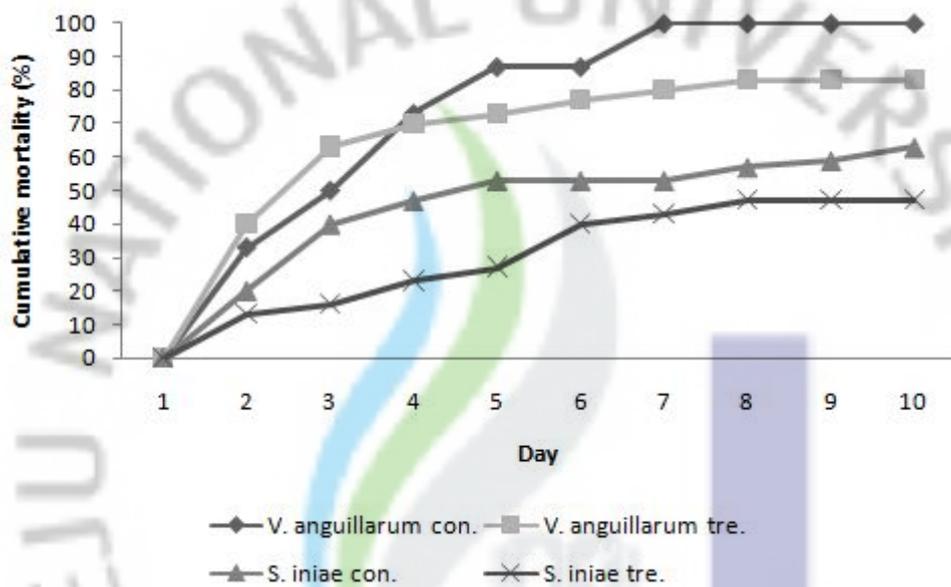


Fig. 16. Cumulative mortality(%) of parrot fish by 10days feeding of the LAB broth after challenge with *V.anguillarum* and *S.iniae* (n=30)

3.4 결론

기존의 양식 어류의 사료첨가제의 효능은 이미 다른 분야의 연구로 어느 정도 입증되어 있는 상태이다. 하지만 제주도에 자생하는 탐라오갈피를 이용하여 양식 어류를 대상으로 한 연구는 전무하였다. 현재 도내에서 잉어과실로 문제가 되고 있는 탐라오갈피를 효율적으로 활용하기 위한 일환으로 양식 어류 사료첨가제의 개발은 획기적인 연구라고 생각된다. 특히 오갈피를 비롯한 한약재의 기능과 더불어 유용미생물의 항균물질을 이용하여 사료첨가제로서의 기능을 강화시켜 항생제 대체효과를 갖추었다는 것에 가치가 있다고 할 수 있다.

본 연구에서는 5종의 유용미생물을 탐라오갈피가 포함된 한약재를 혼합하여 항산화 활성 측정, 항균 활성 측정, 생물접촉 실험을 하였다. 항산화 활성 측정에서는 전체적으로 높은 항산화 활성 결과를 가지고 있는 것으로 나타났으며, 특히 항균활성은 한약재에 유용미생물 첨가구가 미첨가구에 비해 높은 항균활성을 나타내었다. 이는 유용미생물이 분비하는 bacteriocin 이라고 사료되어지며, 유산균에서 bacteriocin이 분비된다고 보고되어있다. 유산균은 항균활성이 그람양성균에만 높은 활성을 나타낸다는 보고가 되어지고 있으며, 본 연구의 결과도 마찬가지로 *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis* 의 균주가 다른 어병세균에 비해 높은 활성을 보였다. 따라서 *Edwardsiella tarda*와 같은 그람음성세균에도 감수성이 넓은 항균 스펙트럼을 가지는 균주의 보급이 필요하다. 또한 본 사료첨가제가 어류의 성장을 증가 시키고 체액성면역에 관여하는 lysozyme의 활성을 높여주었지만, 어병세균에 대한 공격실험에서 긍정적인 효과를 보이지 않았다. 그 이유는 항균활성의 주된 역할을 하는 유산균이 해수의 염분, pH, 수온의 영향을 극복하지 못한 것이라 사료되어지고 실험 사육지의 수온이 어류가 성장하는데 적정수온이 아니었기 때문에 사료를 섭이하는데 문제가 있었을 것이라 생각된다.

따라서 사료첨가제로 사용할 균주가 넓은 항균 스펙트럼을 갖고 있으면서 광범위한 염분, pH, 수온에서도 생육할 수 있는 균주를 선발하여 어류의 성장 또는 면역을 증가시킴으로 양식산업의 효율성 증대와 항생제에 의한 문제를 해결해 나갈 수 있을 것이다.

REFERENCE

- Kang, H. S., H. K. Song, J. J. Lee, K. H. Pyun and I. Choi. 1998. Effect of acanthoic acid on TNF- α gene express haptoglobin synthesis. *Mediators Inflamm.* **7**, 257-259.
- Anderson, D. P. and A. K. Siwicki. 1994. Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion, *Progressive Fish-Culturist* **56**, 258-261.
- Kumai, H. 1984. Biological studies on culture of the Japanese parrot fish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel). *Bull. Fish. Lab. Kinki Univ.* **2**, 93-108.
- Smith, A. C. and F. Romos. 1980. Automated chemical analysis in fish health assessment. *J. Fish Biol.* **17**, 445-450.
- Gupta, P. K. 1974. Malathion induced biochemical changes in rats. *Acta Pharmac. Tox.* **35**, 191-194.
- Ishioka, H. 1980. Stress reactions in the marine fish. I. Stress reactions induced by temperature Changes. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **46**, 523-531.
- M. Fuller. 1992. A review of hospitalized patients with bacterial gastroenteritis. *Hospital Infection* **20**, 105-111
- Bruce A. Barton, Carl B. Schreck. 1987. Influence of acclimation temperature on interrenal and carbohydrate stress responses in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture.* **62**, 299-310

- Kenneh B. Davis, Nick C. Parker. 1990. Physiological stress in striped bass: effect of acclimation temperature. *Aquaculture*. **91**. 349-358
- H. Kihira, S. Ito, T. Murata. 1990. The behavior of phosphorus during passivation of weathering steel by protective patina formation. *Corrosion Science*. **31**. 383-388
- E. B. Lee. 2001. Anti-inflammatory activity of methanol extract of *Kalopanax pictus* bark and its factions. *Ethnopharmacology*, **77**. 197-201
- Ki Yeul Nam, *et al.* 1995. Blockade by ginseng total saponin of the development of cocaine induced reverse tolerance and dopamine receptor supersensitivity in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **50**. 23-27
- T. Nasu, H. Oosako, H. Shibata. 1996. Dantrolene blocks the tonic contraction and calcium influx evoked by K⁺ in real longitudinal smooth muscle. *General Pharmacology*. **27**. 513-517
- Byun, J. W., C. B. Park, Y. Beno and T. K. Oh. 1997. Probiotics effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Gen Appl. Microbiol.* **43**, 305-308.
- Choi, H. S., T. K. Kim, J. S. Lee, M. R. JO, C. H. Seo and S. I. Park. 2004. Antibacterial activities of hot-water and ethyl alcohol extracts of medicinal herbs on fish pathogenic bacteria. *J. Fish Pathol.* **17**, 39-55.
- Gupta, P. K. 1974. Malathion induced biochemical changes in rats. *Acta Pharmac. Tox.* **35**, 191-194.

- Ishioka, H. 1980. Stress reactions in the marine fish. I. Stress reactions induced by temperature Changes. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **46**, 523-531.
- Jang, S. I., M. J. Marsden, Y. G. Kim, Y. G. Choi. 1995. Secomebes CJ. The effect of glycyrrhizin on rainbow trout. *Oncorhynchus mykiss* (Walbaun). leucocyte responses. *J. Fish Dis.* **18**, 307-315
- Karunasagar, I., R. Pai, G. R. Malathi and I. Karunasagar. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquacult.* **128**, 203-209.
- Kurami, J. and P. K. Sahoo. 2005. Effects of cyclophosphamide on the immune system and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus*. *Fish and shellfish immunology* **19**, 307-316.
- Kim, D. S., J. H. Kim, C. H. Jeong, S. Y. Lee, S. M. Lee and Y. B. Moon. 1998. Utilization of Obosan (dietary herbs). I. Effects on survival, growth, feed conversion ratio and condition factor in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Aquacult.* **11**, 213-221.
- Kim, J. H., S. M. Lee, J. M. Baek, J. K. Cho and D. S. Kim, 2003. Effect of dietary lipid level and herb mixture on growth of parrot fish, *Oplegnathus fasciatus*. *J. Kor. Fish. Soc.* **36**, 113-119.
- Kim, J. W., S. I. Park and S. K. Chun. 1992. Purification and antibacterial effect of lysozyme from flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.* **5**, 87-92.

- Kwon, M. G., Y. C. Kim, Y. C. Shon and S. I. Park. 1999. The dietary supplementing effects of Kugija, *Lycium chinense*, on immune responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, to *Edwardsiella tarda*. *J. Fish Pathol.* **12**, 73–81.
- Ministry for food agriculture forestry and fisheries. 2003. Statistical year book of maritime affairs and fisheries.
- National fisheries research & development institute. 2000. Prevention of bacterial fish diseases and medical treatment for produce health fish.
- Nikoskelainen, S., A. C. Ouwehand, G. Bylund and S. Salminen. 2001. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquacult.* **198**. 229–236.
- Peak, N. S., Y. B. Lim and Y. M. Kim. 2001. Antibacterial activity and growth promotion in aquacultured fish by probiotics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 56–61.
- Pirarat, N., T. Kobayashi, T. Katagiri, M. Maita and M. Journal of Life Science 2009, Vol. 19. No. 1 93 Endo. 2006. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia
- Smith, P., M. P. Hiney and O. B. samuelsen. 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annu. Rev. Fish Dis.* **4**, 273–313.
- Zhang, D., K. Mai, S. Liu, L. Cao, Z. Liufu, W. Xu, B. Tan and W. Zhang. 2004. Effect of temperature and on virulence of *Edwardsiella tarda* to japaness flounder, *Paralichthys olivaceus* (Termminck et Schlegel). *Aquacult. Res.* **35**, 494–500.

ACKNOWLEDGEMENT

이 논문을 완성하기까지 많은 시간이 걸렸습니다. 그 시간 동안 항상 많은 격려와 조언을 아끼지 않으신 존경하는 허문수 교수님께 머리 숙여 깊은 감사를 드립니다. 논문 심사와 수정에 도움을 주신 전유진 교수님과 김기영 교수님께도 깊은 감사드리며, 학부생 때부터 대학원 까지 많은 가르침을 주신 송춘복 교수님, 여인규 교수님, 이제희 교수님께도 감사드립니다.

학업과 직장 생활을 병행할 수 있도록 배려 해 주신 제주어류양식수협 김평전 조합장님, 김광익 상임이사님, 이기연 상무님, 김남철 상무님 이하 과장님들과 직원분들께도 감사드립니다.

그리고 해양미생물학 이라는 학문으로 꿈을 가지고 학업에 길을 갈 수 있도록 오랜 시간 동안 함께 해 주신 해양수산자원연구소에 강봉조 연구사님, 김필연 연구사님, 양병규 연구사님, 장영환 연구사님, 그리고 정용욱 선배님, 강철영 선배님, 문영건 선배님, 김만철 선배님, 김민주 선배님, 김수미 선배님, 전봉근 조교님, 김주상 선배님, 장태원 선배님, 문현식 선배님, 해양미생물실험실 후배님들과 학과 선,후배님께도 감사드립니다.

마지막으로 믿음으로 지켜봐주시고, 걱정해주시고, 무한 사랑을 주시는 부모님과 가족들, 그리고 힘든 시간에 격려를 아끼지 않은 우리 친구들과 저에게 도움을 주신 모든 분들께 무한한 감사를 드립니다.