



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

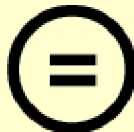
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



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](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

마늘, *Allium sativum*이 넙치,
*Paralichthys olivaceus*의 면역반응에
미치는 영향



2009년 2월

부경대학교 대학원

수 산 생 명 의 학 과

이 준 희

이 학 석 사 학 위 논 문

마늘, *Allium sativum*이 넙치,
*Paralichthys olivaceus*의 면역반응에
미치는 영향

지도교수 박 수 일

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.



2009년 2월

부경대학교 대학원

수 산 생 명 의 학 과

이 준 희

이준희의 이학석사 학위논문을 인준함.

2009년 2월 25일



주 심 이 학 박 사 정 준 기 인

위 원 농 학 박 사 허 민 도 인

위 원 농 학 박 사 박 수 일 인

목 차

목 차	i
Abstract	iii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 어류	4
2. 시험 균주	4
3. 마늘 추출물과 착즙액 제작	4
4. 마늘 추출물과 착즙액 투여 방법	5
5. 생균 공격 주사 후 마늘 착즙액의 침지	6
6. 넙치의 체표 점액 lysozyme 활성 조사	6
7. 시험어의 혈청 lysozyme 활성 조사	7
8. 시험어의 혈청 내 살균 능력 시험	7
9. 시험어의 혈액 세포 수 변화 조사	8
10. 시험어의 조직 내 균수 변화 조사	8
11. 시험어의 SOD activity 조사	9
12. 시험어의 신장 대식세포 NBT 환원 시험	9
13. 공격 실험	11
14. 통계학적 분석	11
III. 결 과	12
1. 마늘 추출물 복강 투여 후 넙치의 면역 반응 활성 조사	12
1.1. 넙치의 체표 점액 lysozyme 활성 조사	12

1.2. 시험어의 혈청 lysozyme 활성 조사	14
1.3. 시험어의 혈청 내 살균 능력 시험	15
1.4. 시험어의 혈액 내 세포 수 변화 조사	16
1.5. 시험어의 SOD activity 조사	17
1.6. 시험어의 NBT 환원 시험	18
1.7. 공격 시험	19
2. 마늘 착즙액 침지 후 넙치의 면역 반응 활성조사	21
2.1. 넙치의 체표 점액 lysozyme 활성 조사	21
2.2. 시험어의 혈청 lysozyme 활성 조사	22
2.3. 시험어의 혈청 내 살균 능력 시험	23
2.4. 시험어의 혈액 내 세포 수 변화 조사	24
2.5. 시험어의 SOD activity 조사	25
2.6. 시험어의 NBT 환원 시험	26
2.7. 공격 시험	27
3. 공격 시험한 넙치의 마늘 착즙액 침지 효과 시험	29
3.1. 넙치의 체표 점액 lysozyme 활성 조사	29
3.2. 시험어의 조직 내 균수 변화 조사	31
3.3. 시험어의 혈액 내 세포 수 변화 조사	33
3.4. 시험어의 SOD activity 조사	35
3.5. 생존율 조사	37
IV. 고 찰	39
V. 요 약	46
VI. 감사의 글	48
VI. 참고문헌	49

Effects of Garlic, *Allium sativum*, on the Immune Responses of Olive
Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Jun Hee Lee

Department of Aquatic Life Medicine, Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

This study was aimed to investigate the effects of injection garlic, *Allium sativum*, extract and immersion in garlic juice to modulate the nonspecific immunity of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, and its resistance to *Streptococcus iniae* and *Edwardsiella tarda*. One group of fish were intraperitoneally injected with different doses of 1, 3, 5, 7 and 10 % of garlic extract and immersed different doses of 0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 g L⁻¹ of garlic juice. Another group of fish were immersed in different doses of 0.25, 0.5 and 1.0 g L⁻¹ of garlic juice after *S. iniae* BS10 or *E. tarda* KE-1 challenged, respectively. The nonspecific immune mechanisms were assessed in terms of skin mucus lysozyme activity, serum lysozyme activity, bactericidal activity of serum, the number of lymphocytes and neutrophils in blood, NBT assay, SOD activity and the number of bacteria in organs. RPS was assessed by the challenge with *S. iniae* BS10 or *E. tarda* KE-1. Almost all the doses of injected garlic extract enhanced skin mucus lysozyme activity, serum lysozyme activity, bactericidal activity of serum at 12 hour, the number of neutrophils, NBT reduction and SOD activity in kidney. In the challenge with *S. iniae* BS10 and *E. tarda* KE-1 RPS 5 % of garlic extract injected group was much higher than in any other tested groups, respectively. Almost all the doses of

immersed in garlic juice enhanced skin mucus lysozyme activity, serum lysozyme activity, bactericidal activity of serum at 12 hour, the number of lymphocytes and neutrophils, NBT reduction and SOD activity in kidney. In the challenge with *S. iniae* BS10 and *E. tarda* KE-1, RPS in the 0.25 g L⁻¹ of garlic juice immersed group was much higher than in other tested groups, respectively. Almost all the doses of immersed in garlic juice post *S. iniae* BS10 or *E. tarda* KE-1 challenged enhanced skin mucus lysozyme activity, the number of neutrophils in blood and SOD activity in kidney. All groups showed the decreased number of bacteria in surveyed organs. In the fish of immersion in different doses of garlic juice post challenged with *S. iniae* BS10 or *E. tarda* KE-1, RPS in the 0.25 g L⁻¹ of garlic juice immersed group was much higher than in any other tested groups, respectively. The results suggest that the garlic extract and juice would be effective to enhance nonspecific immunity and protective ability of olive flounder against fish disease such as *S. iniae* and *E. tarda*.

I. 서 론

우리 나라 해산 양식 넙치 생산량은 41,171 M/T으로 어류 천해양식 총 생산량의 42.2 %, 생산금액의 54.7 %를 차지하는 중요한 어종이다 (농림수산식품부, 2008). 그러나 양식 산업의 발달로 인하여 생산량이 급속히 늘어나는 반면, 과밀양식과 수질환경 악화로 여러 가지 질병에 노출되고 질병 발생으로 인한 생산성이 줄어들고 있다.

넙치 양식장에서는 세균, 바이러스, 진균 및 기생충 등의 병원체가 단독 혹은 혼합 감염으로 많은 어류가 폐사하고 있는 실정이다. 어류 질병이 발생하였을 때에는 일반적으로 화학 요법제로서 치료에 임하지만, 예방적인 방법으로는 vaccine이나 면역증강제 등을 사용하고 있다. 그러나 빈번한 항생제의 사용은 면역 기능을 억제시킬 수 있을 뿐만 아니라 (Rijkers et al., 1980; Grondel et al., 1987) 약물의 오남용으로 인하여 병원체의 약제에 대한 다제 내성이 증가하고 있는 실정이다 (Aoki et al., 1981, 1987, 1989; Sugita et al., 1989). 약제 내성균의 증가는 환경오염을 유발하고, 여러 양식어가에서도 약제 내성균에 대한 우려를 하고 있다. 대안의 하나인 면역 증강 물질은 어류의 자체 방어 능력을 증강시킴으로써 다양한 질병에 대처할 수 있는 특징을 갖고 있으며, 다양한 생물로부터 분리한 천연물을 이용하여 많은 연구가 진행되고 있고 분리된 물질들에 의해서 어류 질병에 대한 방어 능력이 증가되었다는 연구 보고가 있다 (Sakai, 1999; Jung et al., 2002; Choi et al., 2005). 더욱 폭 넓게 어류의 방어 능력을 자극시킬 수 있는 여러 가지 유용 물질의 투여로 어류의 면역 반응을 증강시켜 질병을 예방하고자 하는 분야에서 연구가 이루어지고 있다. 이와 같은 면역 증강 물질은 어류의 비특이적 면역 인자를 증진시키는 화학화합물과 박테리

아 유도물 등이 있으며, levamisole, FK-565 (Heptanoyl- γ -D-glutamyl-(L)-meso-diaminopimelyl-(D)-alanine), MDP (Muramyl depeptide), LPS (Lipopolysaccharide), 키토산 (Chitosan), glucan, nisin 등은 어류의 비특이적 면역인자를 증강시켜 질병에 대한 저항성을 증강시켜 준다 (Kitao et al., 1987; Siwicki et al., 1990; Engstad et al., 1992; Kodama et al., 1994; Solem et al., 1995; Kawakami et al., 1998; Kim et al., 1998; Sakai, 1999; Villamil et al., 2003). 어류의 비특이적 면역인자로는 세포성 면역인자인 macrophage, granulocyte, neutrophil 등이 있고, 체액성 면역인자로는 lysozyme, complement, interferon, transferrin 등이 있다. 면역 증강제는 이러한 비특이적 면역인자의 활성을 증가시켜 질병 저항성을 높일 수 있는데, 어류에 면역 증강제를 이용한 실험 결과 어류의 식세포 활성 (Raa et al., 1992; Jørgensen et al., 1993a), natural killer cell 활성 (Kajita et al., 1992), 라이소자임 (Engstad et al., 1992; Jørgensen et al., 1993b)과 보체의 대사 경로 활성 (Yano et al., 1991) 등 다양하게 면역 반응을 강화시키는 것으로 보고되었으며 어류의 면역 증강을 통해 질병으로 인한 폐사 방지 및 건강한 어류의 생산성을 향상시킨다는 보고가 있다 (Siwicki, 1987; Chen et al., 1992).

마늘은 전 세계에 분포하는 식물로 식용으로도 사용되지만 수천년 전부터 상처, 감염, 인플루엔자 그리고 궤양과 같은 여러 가지 질병 치료약으로도 인간에게 사용되었다. 현대 과학적 연구에서 Louis Pasteur가 최초로 마늘의 항균 작용을 발견한 후 (Michael & Reese, 1969), Albert Schweitzer는 아프리카인의 아메바성 이질 치료에 마늘을 임상적으로 사용하였다 (Block, 1944). 그 후 현재까지 이어지는 많은 연구자들이 마늘의 항균작용 뿐만 아니라 여러 가지 특성에 대하여 연구하였다. 세균, 곰팡이, 원생동물 그리고 바이러스 같은 여러 미생물들은 마쇄된 마늘에 감수성을

나타내었다 (Cavallito & Bailey, 1944; Cavallito et al., 1944; Delaha & Garagusi, 1985; Ghannoum, 1988; Soffar & Mokhtar, 1991; Deshpande et al., 1993). 또한 혈장 내 cholesterol 수치를 낮추고, 혈압 감소, 혈소판 응집 저해와 같은 효과가 있다 (Mayeux et al., 1998; Sterling & Eagling, 2001). 뿐만 아니라 항암 효과, 노화 방지 그리고 항산화 효과도 가진다 (Sheen et al., 1996; Hong et al., 2000; Nakagawa et al., 2001; Wu et al., 2004). 림프구 자극, 항체 생산과 확산 (Zhang et al., 1997) 등과 같은 면역 자극 효과와 화학요법, UV 조사 (Reeve et al., 1997) 그리고 생리적 스트레스 (Kyo et al., 2001)로 인한 면역 억제에 대해 방어 효과도 나타낸다고 보고하였다.

본 연구에서는 넘치에 비경구적으로 마늘 추출물을 주사 또는 착즙액을 침지 투여하여 비특이적 면역 반응에 미치는 영향을 분석하고 방어력 증강에 관여하는 마늘의 특성을 밝히는데 필요한 기초 자료를 얻고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 어류

시험에 사용된 넙치, *Paralichthys olivaceus*는 전라북도 소재 넙치 양식장으로부터 시험 2 개월 전에 분양받았다. 평균 체중은 11 ± 3 g, 평균 체장은 10 ± 2 cm의 넙치를 시험에 사용하였다. 시험 기간 동안의 사육 수온은 $20 \sim 22$ °C로 유지하였다.

2. 시험 균주

시험 균주로는 독성이 강한 것으로 밝혀져 있는 1998년 제주도 소재 양식장의 넙치에서 분리한 *Streptococcus iniae* BS10 (우, 2006) 균주와 2000년 포항 소재 양식장의 넙치에서 분리한 *Edwardsiella tarda* KE-1 (이, 2005) 균주를 Tryptic Soy Agar (TSA, Difco)에 1.5% NaCl을 첨가한 배지에 25 °C, 24 시간 배양한 후 시험에 사용하였다.

3. 마늘 추출물과 착즙액 제작

주사 시험을 위한 마늘 추출물의 제조법은 다음과 같다. 무균 상태의 마늘 시료액을 추출하기 위해서 마늘의 껍질을 제거하고 증류수로 깨끗이 씻

은 후 clean bench 내에서 멸균 증류수로 여러 차례 세척한 다음 멸균된 거즈로 물기를 제거하였다. 세척된 마늘 시료는 멸균 생리 식염수와 비율이 1:1 (w/v)이 되도록 혼합하여 으갠 후 멸균 거즈로 착즙하여 50 % (w/v) 착즙액을 만들었으며 이를 원심 분리한 후 상정액을 0.45 μm 의 membrane filter로 여과 멸균하여 시험용 추출물의 원액으로 정하였다. 시험용 추출물 시료 원액은 -80 $^{\circ}\text{C}$ 에 동결 보존하면서 시험에 사용하였다.

침지 시험을 위한 마늘 착즙액의 제조법은 마늘의 껍질을 제거하고 증류수로 깨끗이 씻은 후 clean bench 내에서 멸균 증류수로 여러 차례 세척한 후 멸균된 거즈로 물기를 제거하였다. 그 후 시료를 마쇄하여 멸균 거즈로 착즙한 후 그 착즙액을 현탁하여 침지 시험에 사용하였다.

4. 마늘 추출물과 착즙액 투여 방법

주사 시험을 위한 마늘 추출물의 투여 방법은 마늘 추출물을 멸균 생리 식염수에 1, 3, 5, 7 및 10 %로 용해시킨 후 0.1 ml/fish의 농도로 어체 내에 복강 주사하였다. 대조구는 멸균 생리 식염수만 0.1 ml/fish로 복강 주사하였다. 복강 주사는 2 일 간격으로 3 회 주사하였다.

침지 시험을 위한 마늘 착즙액의 투여 방법은 마늘 착즙액을 0.1, 0.25, 0.5 및 1.0 g/L의 농도로 현탁하여 2 일 간격으로 3 회 20 분간 침지하였다.

5. 생균 공격 주사 후 마늘 착즙액의 침지

시험어에 *Streptococcus iniae* BS10 균주와 *Edwardsiella tarda* KE-1 균주를 각각 복강 주사한 다음, 1 일 후 마늘 착즙액에 침지하여 반응을 살펴보았다.

Streptococcus iniae BS10 균주는 1.0×10^6 Colony Forming Unit (CFU)/ml, *Edwardsiella tarda* KE-1 균주는 1.0×10^4 CFU/ml의 농도로 각각 공격 주사하였다. 공격 주사 1 일 후, 마늘 추출물 현탁액은 마늘 시료를 멸균 증류수로 깨끗이 씻은 후 세척한 시료를 마쇄하여 멸균 거즈로 착즙한 다음 20 L 해수에 0.25, 0.5 및 1.0 g/L의 농도로 현탁하여 2 일 간격으로 3 회 20 분간 침지하였다.

6. 넙치의 체표 점액 lysozyme 활성 조사

대조구와 각 시험구의 시험어 체표 점액은 마늘 추출물의 주사 시험, 마늘 착즙액의 침지 시험과 공격 주사 후 침지 시험을 모두 마친 다음 2 일째에 분리하였다. 점액을 분리한 후 lysozyme 활성을 측정하였다. 점액 lysozyme 용균능을 측정하기 위하여 slide glass로 시험어의 체표 점액을 pooling하고, 시료 5 배양의 0.005 M PBS (pH 7.4)를 첨가하여 균질화한 후 원심 분리 (12,000 ×g, 20 분, 4 °C)한 뒤 상정액을 사용하였다. 이 시료와 미리 PBS에 현탁하여 흡광도 530 nm에서 0.6이 되도록 조정해둔 *Micrococcus lysodeikticus* 균을 혼합하였다. 측정용 시료 0.5 ml에 *M. lysodeikticus* 균 액 2.5 ml를 첨가하여 25 °C에서 20 분간 반응시킨 후 흡

광도 530 nm에서 흡광도 감소량을 측정하였으며 흡광도 값이 0.001 감소한 것을 1 unit로 나타내었다.

7. 시험어의 혈청 lysozyme 활성 조사

대조구와 각 시험구별 시험어의 혈청은 마늘 추출물의 주사 시험, 마늘 착즙액의 침지 시험을 모두 마친 후 2 일째에 분리한 다음 lysozyme 활성을 측정하였다. 혈청 lysozyme의 용균능을 측정하기 위하여 미부정맥으로부터 혈액을 채혈한 뒤 pooling하여 실온에 30 분간 방치하고 1 시간 동안 4 °C에서 냉장 보관하여 혈병을 수축시킨 다음 6000 rpm에서 15 분간 원심 분리하여 얻은 상정액을 혈청 시료로 사용하였다. 혈청 시료 200 μ l에, 530 nm에서 흡광도 0.7이 되도록 0.05 M PBS (pH 6.2)로 조정해둔 *Micrococcus lysodeikticus* 군 현탁액 1800 μ l를 첨가하여 최종 농도가 2 ml이 되도록 한 뒤 25 °C에서 반응시켰다. 반응시킨 후, 30 초와 4 분 30 초에 흡광도 530 nm에서 측정하여 1분 동안 0.001의 흡광도 감소값을 1 unit으로 나타내었다.

8. 시험어의 혈청 내 살균 능력 시험

대조구와 각 시험구별 시험어의 혈청은 마늘 추출물의 주사 시험, 마늘 착즙액의 침지 시험을 모두 마친 후 2 일째에 분리한 후 혈청 내 살균 능력을 조사하였다. 대조구, 마늘 추출물의 주사 시험 및 마늘 착즙액의 침지

시험구의 시료로부터 분리한 혈청은 4 °C에 보관하며 시험에 사용하였다. 각 혈청의 희석은 GVB²⁺ (Gelatin veronal buffer: VB 200 ml, 0.03 M CaCl₂ · 2H₂O 5 ml, MgCl₂ · 6H₂O 5 ml, 2 % gelatin 50 ml, DW 740 ml, pH 7.4)를 사용하였다. 모든 시료는 GVB²⁺로 5배 희석한 후, *Escherichia coli* ATCC 25922를 6×10⁵ CFU/PS (Physiological saline solution) ml의 농도로 조정된 균주와 동량 혼합하여 20 °C에서 배양하였다. 배양 후 0, 1, 3, 6 및 12 시간 켜에 Miles and Misra (1938)의 방법에 따라 TSA 배지에 배양 용액을 단계 희석하여 적하하고 25 °C, 24 시간 배양한 후 세균 집락 수를 계수하였다.

9. 시험어의 혈액 세포 수 변화 조사

혈액 중에 있는 각종 혈액 세포의 수적 변화는 마늘 추출물 주사 시험, 마늘 착즙액의 침지 시험 및 공격 주사 후 침지 시험을 마친 후에 채혈한 혈액을 도말 표본법으로 조사하였다. 즉, 각각의 시험어를 주사기로 미부 정맥에서 채혈한 다음 곧 바로 슬라이드 글라스에 도말하였다. 도말 표본은 May-grünwald Giemsa 염색법으로 염색한 후 광학 현미경 하에서 적혈구 5,000 세포 당 림프구 수와 호중구 수의 변화를 조사하였다.

10. 시험어의 조직 내 균수 변화 조사

공격 주사한 뒤 마늘 착즙액의 침지 시험 실시 후 시험어의 조직 내 균

수 변화를 확인하였다. 침지 시험 종료 2일 후 시험구별 시험어를 무균적으로 해부하여 간, 비장 및 신장을 0.1 M PBS (pH 7.2)에 0.1 g/ml로 되도록 한 후 균질화하였다. 균질화 된 조직액을 TSA에 1.5 % NaCl이 첨가한 배지에 단계 희석 후 적하하여 25 °C에서 24 시간 배양한 다음 생균 집락수를 측정하였다.

11. 시험어의 SOD activity 조사

마늘 추출물 주사 시험, 마늘 착즙액 침지 시험과 공격 주사 후 침지 시험을 마친 후, 각 구간의 시험어의 미부정맥에서 채혈하여 얻은 혈액, 신장과 간 조직으로부터 SOD activity를 측정하였다. 측정 방법은 SOD Assay Kit-WST (Dojindo Co., Japan)를 이용하여 측정하였다. 시험에 나타난 SOD 활성은 superoxide anion이 감소하는 비율과 동일하다. SOD 활성은 대조구인 멸균 증류수의 water-soluble tetrazolium salt가 감소한 값에 각 sample의 water-soluble tetrazolium salt가 감소한 값을 뺀 후 대조구가 감소한 값을 나누어 백분율로 나타내었다.

12. 시험어의 신장 대식세포 NBT 환원 시험

마늘 추출물 주사 시험과 마늘 착즙액 침지 시험을 실시한 후, 시험어의 미부 정맥에서 채혈하여 가능한 한 순환 혈액을 제거한 뒤 복강을 해부하여 두신을 무균적으로 분리하였다. 이것을 2 % penicillin/streptomycin과 1

% heparin이 함유된 L-15 medium을 소량 분주한 소형 disposable petri dish에서 nylon mesh에 통과시킨 세포 현탁액을 준비하였다. 이 세포 현탁액을 34, 51 % percoll 용액을 중층시켜 놓은 시험관에 조심스럽게 중층시킨 후 600 g에서 30분간 원심 분리하여 백혈구를 분리하였다. 분리된 백혈구는 2 % fetal bovine serum (FBS)가 함유된 L-15 medium으로 3회 세척한 다음 0.1 % FBS에 세포를 재현탁하여 0.1 % trypan blue에서 viability를 관찰한 후 1×10^6 cells/ml의 농도로 조정하였다. 조정된 세포액을 96-well cell culture plate에 각각 100 μ l씩 분주한 다음 20 $^{\circ}$ C에서 2시간 부착시킨 후 각 well의 상정액을 조심스럽게 제거하고 0.1 % FBS가 함유된 L-15 medium으로 2회 세척하여 식세포를 준비하였다. NBT 환원 시험에 사용되는 자극물은 zymosan을 사용하였다. Zymosan 0.02 g에 FBS 1 ml를 첨가하여 23 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 반응시킨 zymosan을 3,000 rpm에 10분간 원심 분리하여 상정액을 제거하였다. 옅소닌화된 zymosan을 L-15 medium으로 2회 세척한 후 상정액을 버리고 nitroblue tetrazolium (NBT) 1 mg/L-15 medium ml로 조정된 NBT 용액을 넣어 총 10 ml이 되게 하였다. 식세포가 부착된 cell culture plate의 각 well에 blank로는 zymosan이 첨가되지 않은 100 μ l의 NBT 용액을, 시험 sample에는 zymosan이 첨가된 NBT 용액을 100 μ l씩 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 반응시켰다. 반응시킨 후 상정액을 버리고 5 % FBS가 첨가된 L-15 medium으로 세척한 다음 100 % methanol로 10분간 고정시켰다. 고정된 세포를 70 % methanol로 2회 세척한 후 건조하여 각 well에 2 M KOH 용액 120 μ l와 dimethyl sulfoxide (DMSO) 용액 140 μ l를 첨가한 후 630 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

13. 공격 시험

각 농도의 마늘 추출액을 주사한 시험어와 마늘 착즙액을 침지한 시험어의 병원성 세균에 대한 저항력을 조사하기 위하여 병원성 세균 *Streptococcus iniae* BS10 균주와 *Edwardsiella tarda* KE-1 균주를 복강 주사하였다. *S. iniae* BS10 균주와 *E. tarda* KE-1 균주의 LD₅₀ 값은 각각 $1 \times 10^{5.5}$ CFU/ml과 1.0×10^3 CFU/ml 이었다. 각 농도의 마늘 추출액 주사 시험과 마늘 착즙액 침지 시험 종료 2일 후, 각 구간별로 *S. iniae* BS10 균주는 1.0×10^6 CFU/ml, *E. tarda* KE-1 균주는 1.0×10^4 CFU/ml 으로 0.1 ml/fish로 각각 공격 주사하였다. 주사한 시험어의 수는 각 구간별 12 마리 씩이었다.

공격 시험의 결과는 2 주일간의 누적 폐사율과 상대 생존율 (RPS, Relative percent survival)로 나타내었다 (RPS = $(1 - \% \text{ Mortality in experimental group} / \% \text{ Mortality in control group})$).

각각 두 균주로 공격 시험한 후 마늘 착즙액 침지 시험 역시 동일한 균주와 생균농도로 동일량을 공격 주사 하였으며 침지 실험 종료 후 2주일간의 누적폐사율과 상대생존율을 나타내었다.

14. 통계학적 분석

대조구와 각 시험구 사이의 통계학적 유의성은 Student's *t*-test로 비교하여 p값이 0.05 미만일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

III. 결 과

1. 마늘 추출물 복강 투여 후 넙치의 면역 반응 활성 조사

1.1. 넙치의 체표 점액 lysozyme 활성 조사

각 농도별 마늘 추출물로 주사한 시험어의 체표 점액 lysozyme 활성을 조사한 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

마늘 추출물 1, 3, 5, 및 7 %로 주사한 시험어의 체표 점액 lysozyme 활성이 대조구에 비해서 유의적인 증가를 나타내었다. 그 중 5 %의 마늘 추출물 주사 시험구에서 가장 높은 체표 점액 lysozyme 활성을 나타내었다.

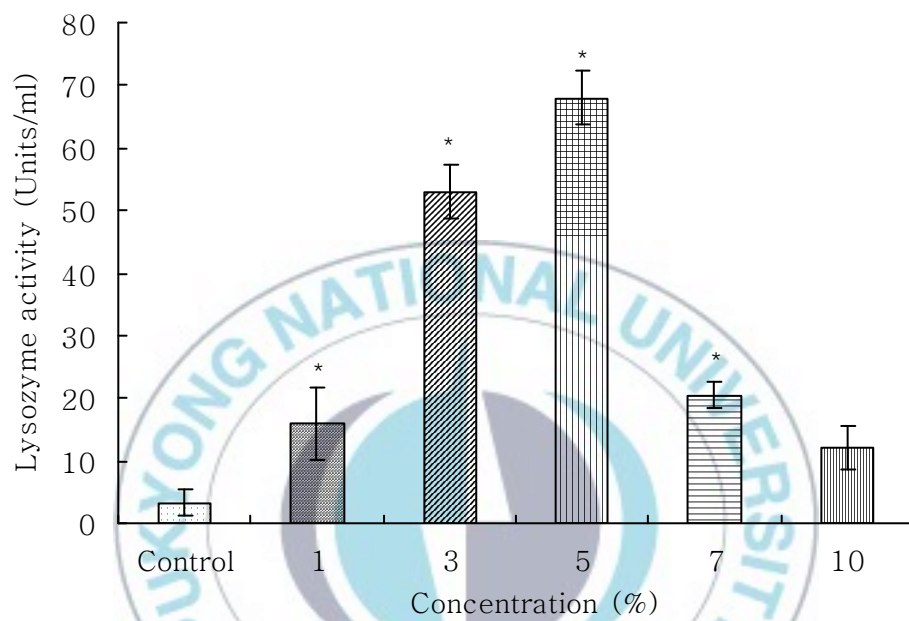


Fig. 1. Changes of lysozyme activity in skin mucus of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, injected intraperitoneally with various concentration (0, 1, 3, 5, 7 and 10 %) of physiological saline extracted garlic, *Allium sativum*, respectively.

1.2. 시험어의 혈청 lysozyme 활성 조사

각 농도별 마늘 추출물로 주사한 시험어의 혈청 lysozyme 활성을 조사한 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

마늘 추출물 1, 3, 및 5 %로 주사한 시험어의 혈청 lysozyme의 활성이 대조구에 비해서 유의적인 증가를 나타내었다. 그 중 5 %의 마늘 추출물 주사 시험구에서 가장 높은 체표 점액 lysozyme 활성을 나타내었다.

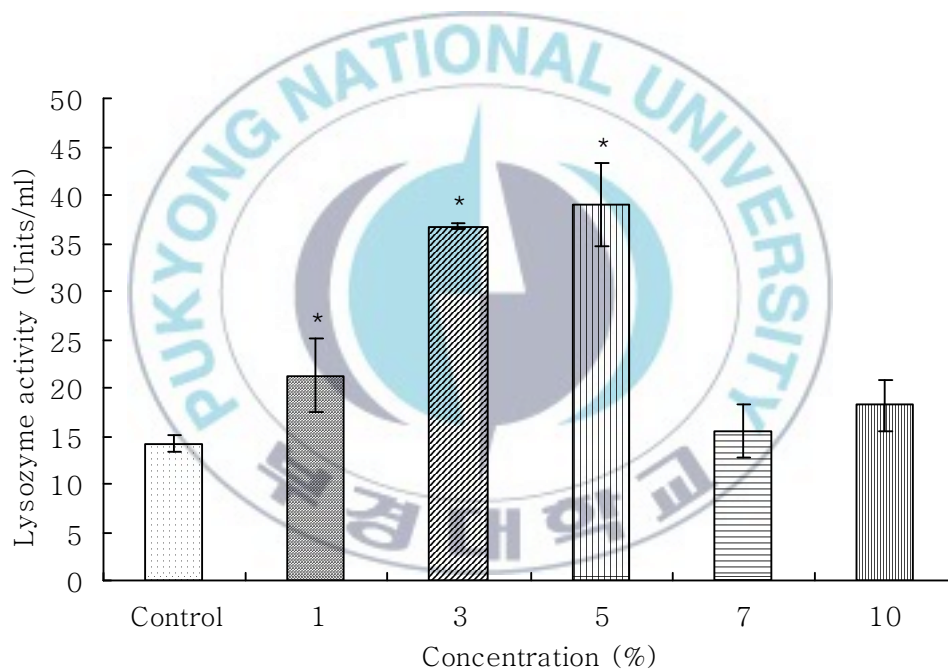


Fig. 2. Changes of lysozyme activity in serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, injected intraperitoneally with various concentration (0, 1, 3, 5, 7 and 10 %) of physiological saline extracted garlic, *Allium sativum*, respectively.

1.3. 시험어의 혈청 내 살균 능력 시험

각 농도별 마늘 추출물로 주사한 시험어의 혈청 내 살균 능력을 조사한 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

0, 1, 3 및 6 시간까지의 시험구는 대조구와 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 12 시간에서는 3, 5 및 7 % 투여한 시험구에서 대조구에 비하여 유의적인 감소를 나타내었으나 6 시간째에 비해 세균수가 증가한 것으로 보아 살균 작용보다는 정균작용이 일어났음을 알 수 있었다.

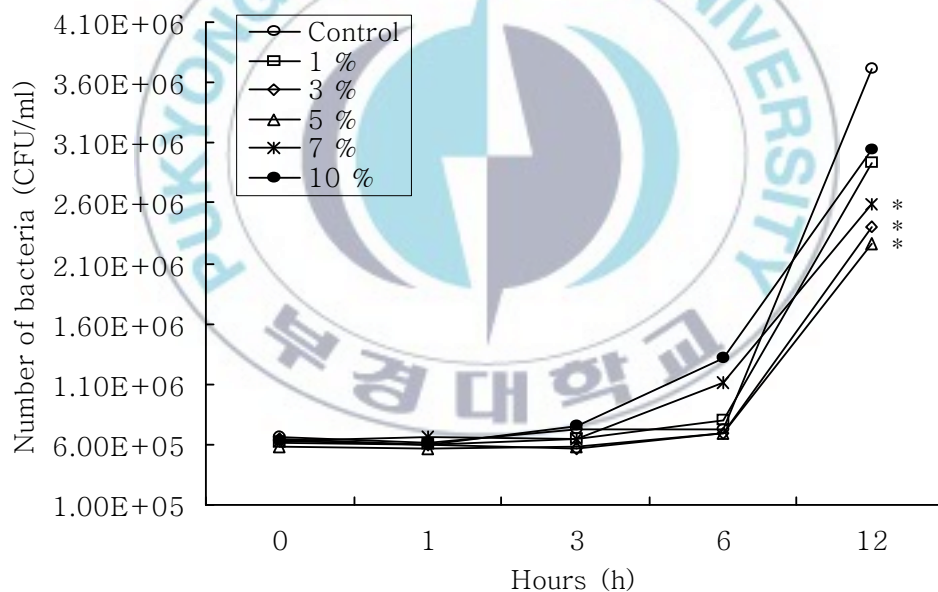


Fig. 3. Changes of bactericidal reaction against *Escherichia coli* ATCC 25922 in serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, injected intraperitoneally with various concentration (0, 1, 3, 5, 7 and 10%) of physiological saline extracted garlic, *Allium sativum*, respectively.

1.4. 시험어의 혈액 내 세포 수 변화 조사

각 농도별 추출물로 주사한 시험어의 순환 혈액 내에 출현하는 림프구와 호중구의 수를 조사한 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

림프구의 수는 추출물 투여 후 각 시험구마다 유의적인 차이는 없었다. 그러나 호중구의 수에서 1, 5 및 10 %의 추출물을 주사한 시험구에서 대조구에 비해서 유의적인 증가를 나타내었다. 그 중 1 %의 마늘 추출물 주사 시험구에서 대조구와 비교해서 가장 높은 유의적인 증가를 나타내었다.

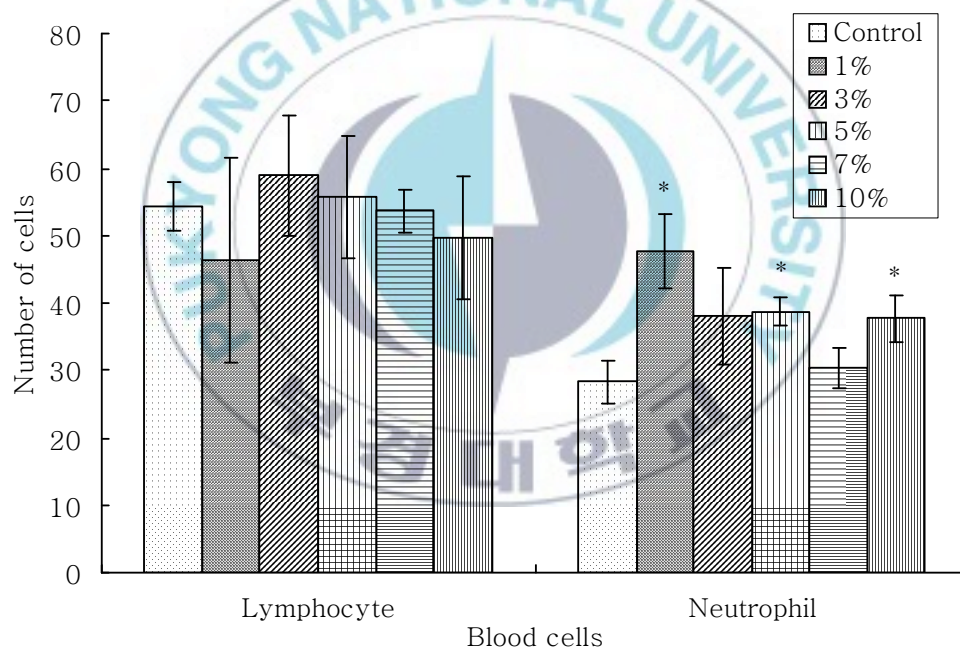


Fig. 4. Changes in number of lymphocytes and neutrophils per 5,000 red blood cells in peripheral blood of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, injected intraperitoneally with various concentration (0, 1, 3, 5, 7 and 10 %) of physiological saline extracted garlic, *Allium sativum*, respectively.

1.5. 시험어의 SOD activity 조사

각 농도별 마늘 추출물로 주사한 시험어의 혈액, 신장 및 간에서 SOD activity를 조사한 결과를 Fig. 5에 나타내었다.

혈액에서는 각 농도별 시험구의 SOD 활성이 유의적인 증가를 나타내지 않았으나 신장에서는 1, 3 및 5 % 시험구에서 대조구와 비교하여 SOD 활성이 유의적인 증가를 나타내었고, 1 % 시험구에서 가장 높은 유의적인 증가를 나타내었다. 간에서는 1 및 3 % 시험구에서 대조구와 비교하여 SOD 활성이 유의적인 증가를 나타내었으며 1% 시험구에서 가장 높은 유의적인 증가를 나타내었다.

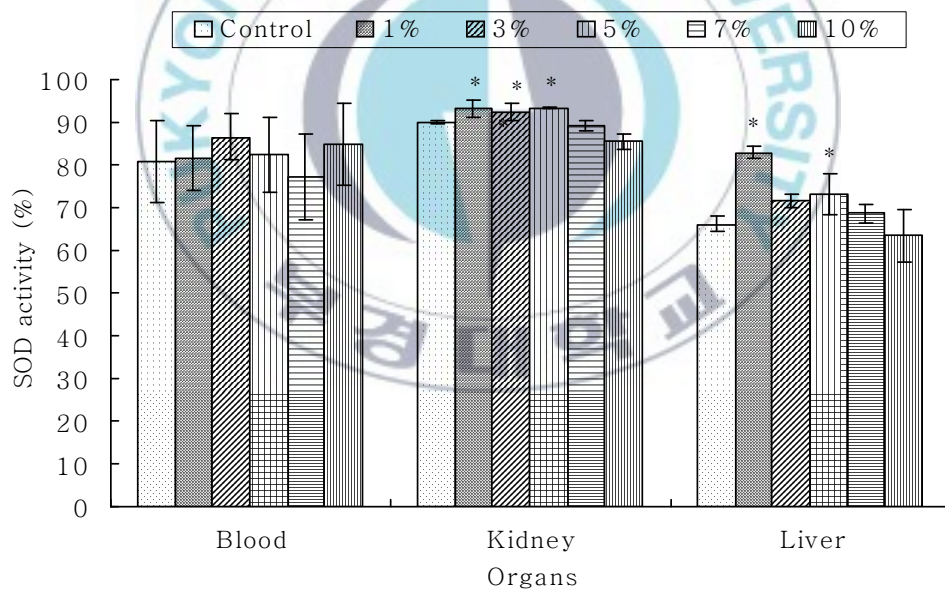


Fig. 5. SOD activity of blood, kidney and liver of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, injected intraperitoneally with various concentration (0, 1, 3, 5, 7 and 10 %) of physiological saline extracted garlic, *Allium sativum*, respectively.

1.6. 시험어의 NBT 환원 시험

각 농도별 마늘 추출물로 주사한 시험어의 신장에서 분리한 대식세포의 NBT 환원량을 조사한 결과를 Fig. 6에 나타내었다.

마늘 추출물 3 %와 5 %를 투여한 시험어의 신장 대식세포의 NBT 환원량이 대조구에 비해서 유의적인 증가를 나타내었다. 그 중 5 %의 마늘 추출물 주사 시험구에서 가장 높은 신장 대식세포의 NBT 환원량을 나타내었다.

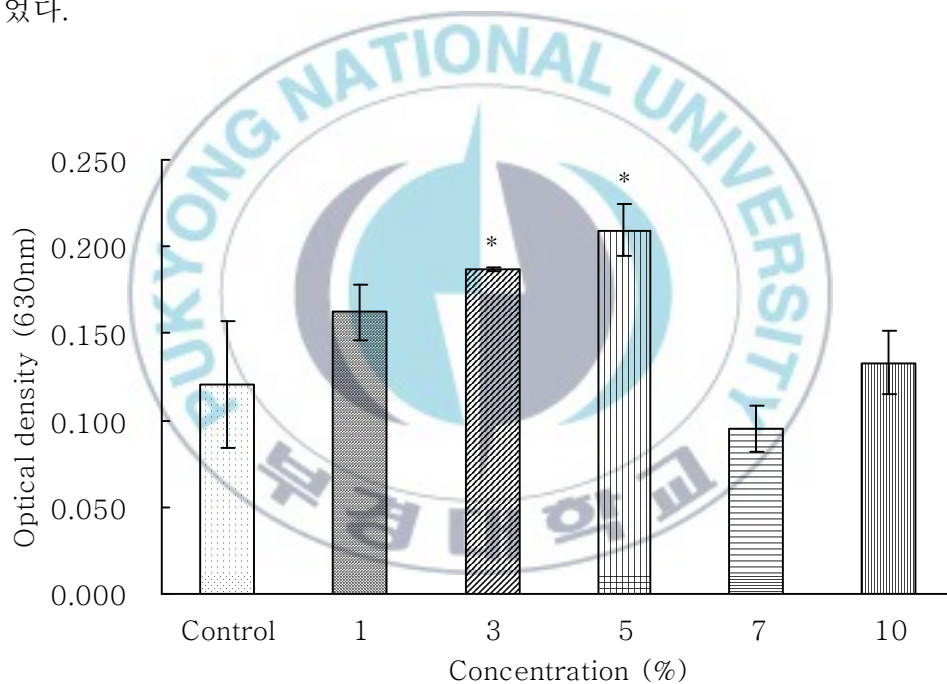


Fig. 6. NBT reduction of phagocytes in head kidney of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, injected intraperitoneally with various concentration (0, 1, 3, 5, 7 and 10 %) of physiological saline extracted garlic, *Allium sativum*, respectively.

1.7. 공격 시험

마늘의 각 농도별 추출물 주사 시험구 넙치의 병원성 세균에 대한 저항력을 조사하기 위하여 병원성 세균 *Streptococcus iniae* BS10 균주와 *Edwardsiella tarda* KE-1 균주를 넙치에 복강 주사하였다. 각 농도의 마늘 추출물 주사 2 일 후, 각 구간별 시험어에 *S. iniae* BS10 균주는 1.0×10^6 CFU/ml, *E. tarda* KE-1 균주는 1.0×10^4 CFU/ml 으로 각각 공격 주사 하였다.

공격 시험 후 14 일간 누적 폐사율과 상대 생존율을 조사하여 그 결과를 Table 1과 Fig. 7에 나타내었다.

Table 1. Cumulative mortality and relative percentage of survival (RPS) of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, injected intraperitoneally with various concentration of physiological saline extracted garlic, *Allium sativum*, 2 days after following intraperitoneal injection with *Streptococcus iniae* BS10 and *Edwardsiella tarda* KE-1, for 14 days

<i>Streptococcus iniae</i> BS10			<i>Edwardsiella tarda</i> KE-1		
Group	Cumulative mortality (%)	RPS (%)	Group	Cumulative mortality (%)	RPS (%)
1 %	83 %	9 %	1 %	75 %	18 %
3 %	58 %	36 %	3 %	58 %	36 %
5 %	50 %	45 %	5 %	42 %	55 %
7 %	83 %	9 %	7 %	75 %	18 %
10 %	83 %	9 %	10 %	92 %	0 %
Control	92 %	-	Control	92 %	-

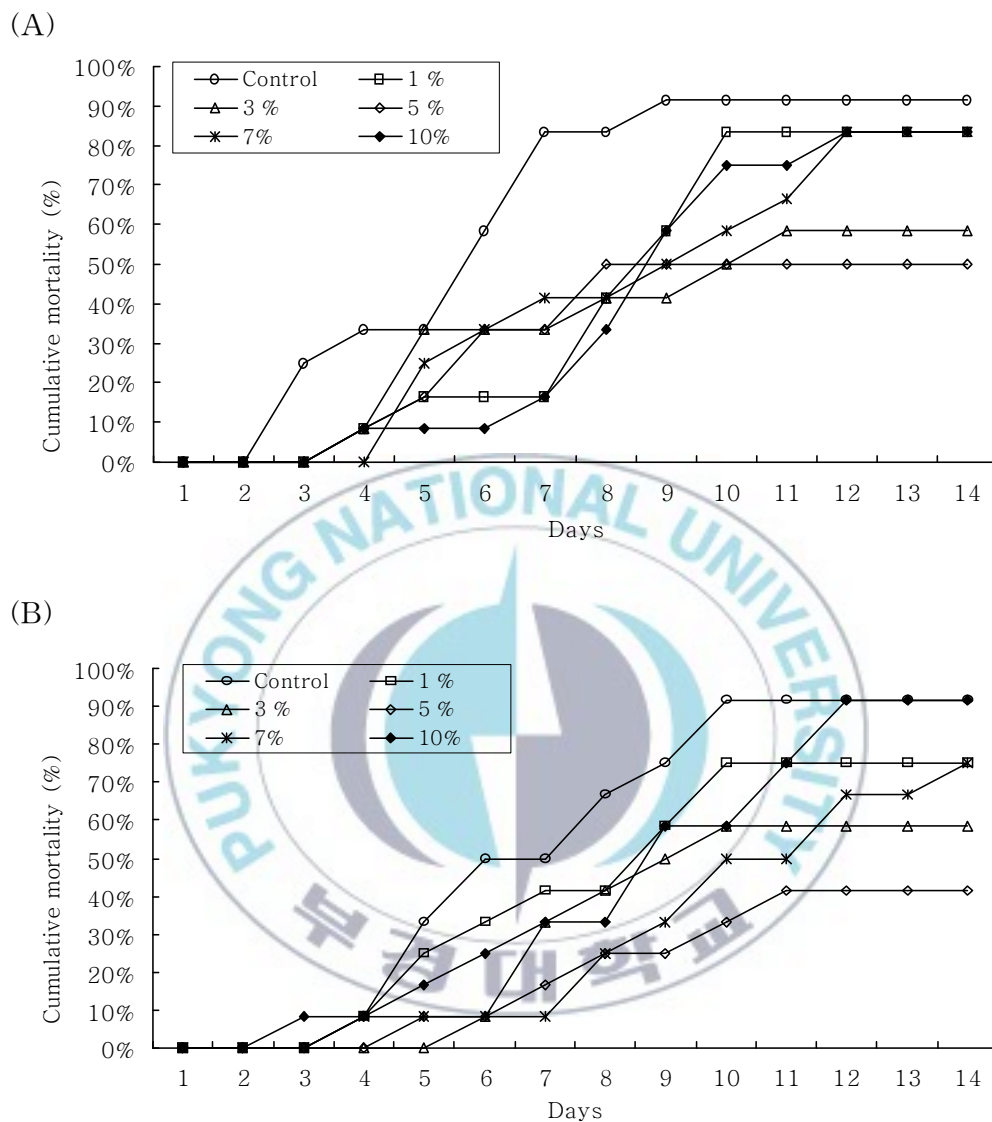


Fig. 7. Cumulative mortality of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, injected intraperitoneally with various concentration (0, 1, 3, 5, 7 and 10 %) of physiological saline extracted garlic, *Allium sativum*, 2 days after following intraperitoneal injection with *Streptococcus iniae* BS10 (A) and *Edwardsiella tarda* KE-1 (B), for 14 days.

2. 마늘 착즙액 침지 후 넙치의 면역 반응 활성 조사

2.1. 넙치의 체표 점액 lysozyme 활성 조사

각 농도별 마늘 착즙액에 침지한 넙치의 체표 점액 lysozyme 활성을 조사한 결과를 Fig. 8에 나타내었다.

마늘 착즙액 0.25, 0.5 및 1.0 g/L에 침지한 시험구별 시험어 체표 점액 lysozyme 활성이 모두 대조구에 비해서 유의적인 증가를 나타내었다. 그 중 0.25 g/L의 마늘 착즙액 침지 시험구에서 가장 높은 체표 점액 lysozyme 활성을 나타내었다.

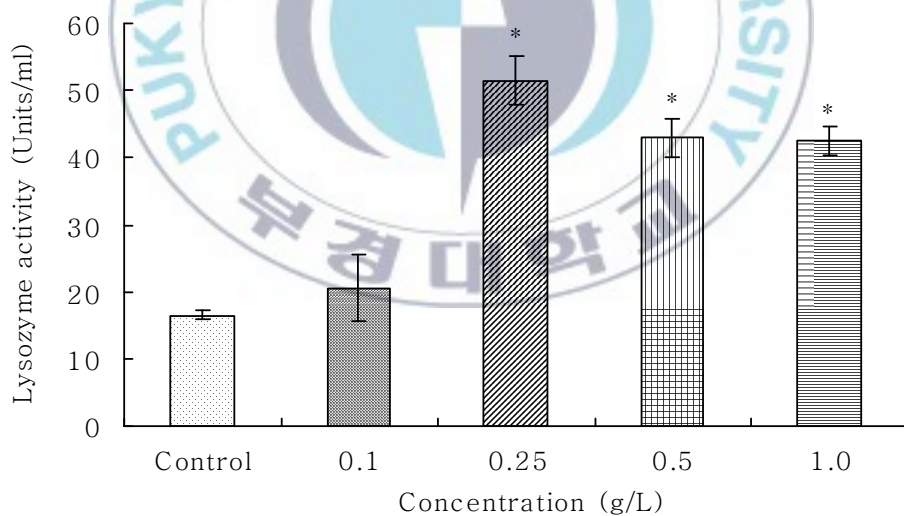


Fig. 8. Changes of lysozyme activity in skin mucus of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, immersed in various juice concentration (0, 0.25, 0.5 and 1.0 g/L) of garlic, *Allium sativum*, respectively.

2.2. 시험어의 혈청 lysozyme 활성 조사

각 농도별 마늘 착즙액에 침지한 시험어의 혈청 lysozyme의 활성을 조사한 결과를 Fig. 9에 나타내었다.

마늘 착즙액 0.25, 0.5 및 1.0 g/L에 침지한 시험구의 혈청 lysozyme 활성이 모두 대조구에 비해서 유의적인 증가를 나타내었다. 그 중 0.25 g/L의 마늘 착즙액 침지 시험구에서 가장 높은 혈청 lysozyme 활성을 나타내었다.

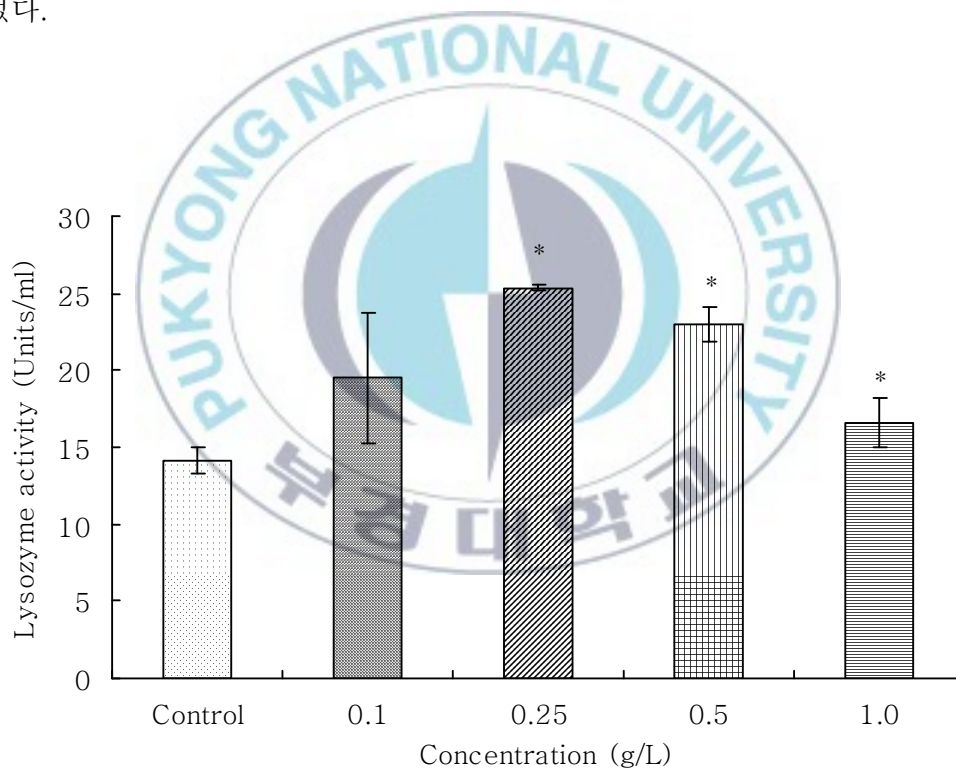


Fig. 9. Changes of lysozyme activity in serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, immersed in various juice concentration (0, 0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 g/L) of garlic, *Allium sativum*, respectively.

2.3. 시험어의 혈청 내 살균 능력 시험

각 농도별 마늘 착즙액에 침지한 시험어의 혈청 내 살균 능력을 조사한 결과를 Fig. 10에 나타내었다.

0, 1, 3 및 6 시간에서는 대조구와 비교하여 각 구간별 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 12 시간에서는 0.1, 0.25 및 0.5 g/L의 농도에 침지한 시험구에서 대조구와 비교하여 유의적인 감소를 나타내었으나 6 시간째에 비해 세균수가 증가한 것으로 보아 살균 작용보다는 정균작용이 일어났음을 알 수 있었다.

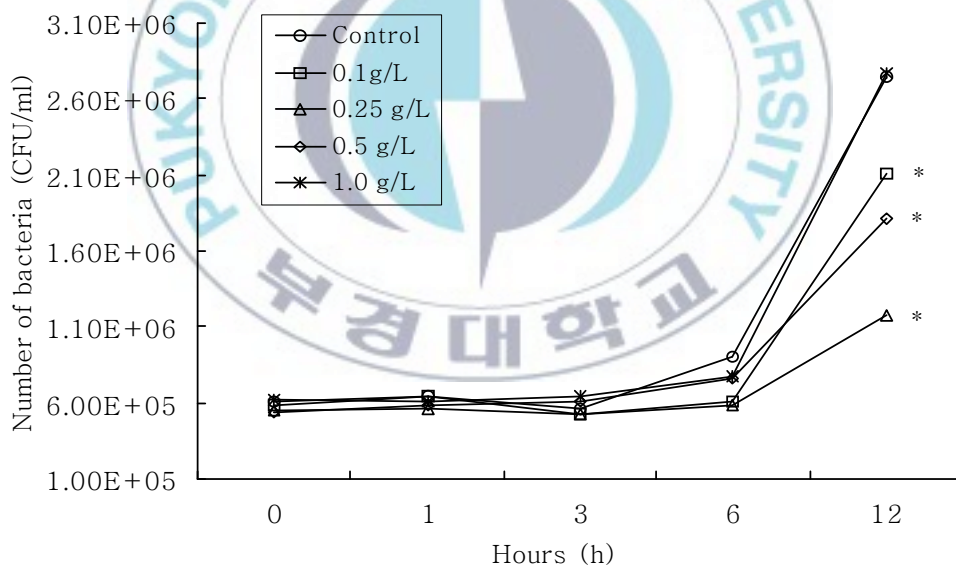


Fig. 10. Changes of bactericidal reaction against *Escherichia coli* ATCC 25922 in the serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, immersed in various juice concentration (0, 0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 g/L) of garlic, *Allium sativum*, respectively.

2.4. 시험어의 혈액 내 세포 수 변화 조사

각 농도별 마늘 착즙액에 침지한 시험어의 순환 혈액 내에 출현하는 림프구와 호중구의 수를 조사한 결과를 Fig. 11에 나타내었다.

림프구와 호중구의 수는 착즙액 0.25, 0.5 및 1.0 g/L에 침지한 시험구가 대조구와 비교하여 유의적인 증가를 나타내었다. 그 중 0.25 g/L의 마늘 착즙액 침지 시험구에서 lymphocyte와 neutrophil의 수가 가장 증가하였다.

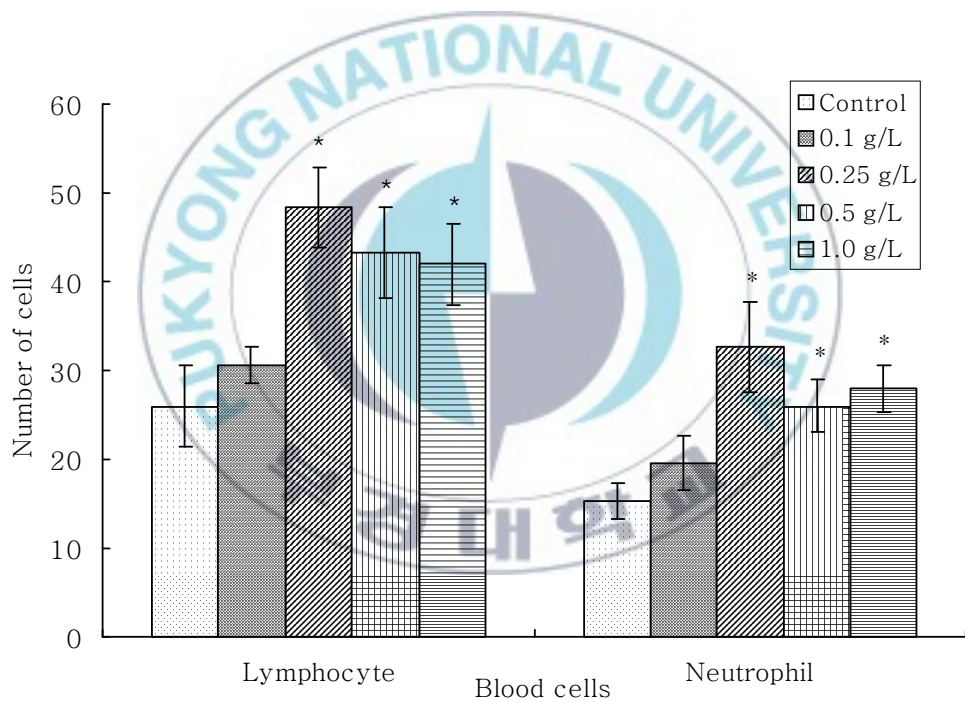


Fig. 11. Changes in number of lymphocytes and neutrophils per 5,000 red blood cells in peripheral blood of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, immersed in various juice concentration (0, 0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 g/L) of garlic, *Allium sativum*, respectively.

2.5. 시험어의 SOD activity 조사

각 농도별 마늘 착즙액에 침지한 시험어의 혈액, 신장 및 간에서 SOD activity를 조사한 결과를 Fig. 12에 나타내었다.

혈액에서는 각 농도별로 침지한 구간에서 SOD 활성이 유의적인 증가를 나타내지 않았으나 신장에서는 0.1, 0.25, 0.5 및 1.0 g/L 침지 시험구 모두 SOD 활성이 대조구와 비교하여 유의적인 증가를 나타내었으며, 0.25 g/L로 침지한 시험구에서 가장 높은 유의적인 증가를 나타내었다. 간에서도 0.1, 0.25 및 0.5 g/L 침지 시험구에서 SOD 활성이 대조구와 비교하여 유의적인 증가를 나타내었으며, 0.5 g/L로 침지한 시험구에서 가장 높은 유의적인 증가를 나타내었다.

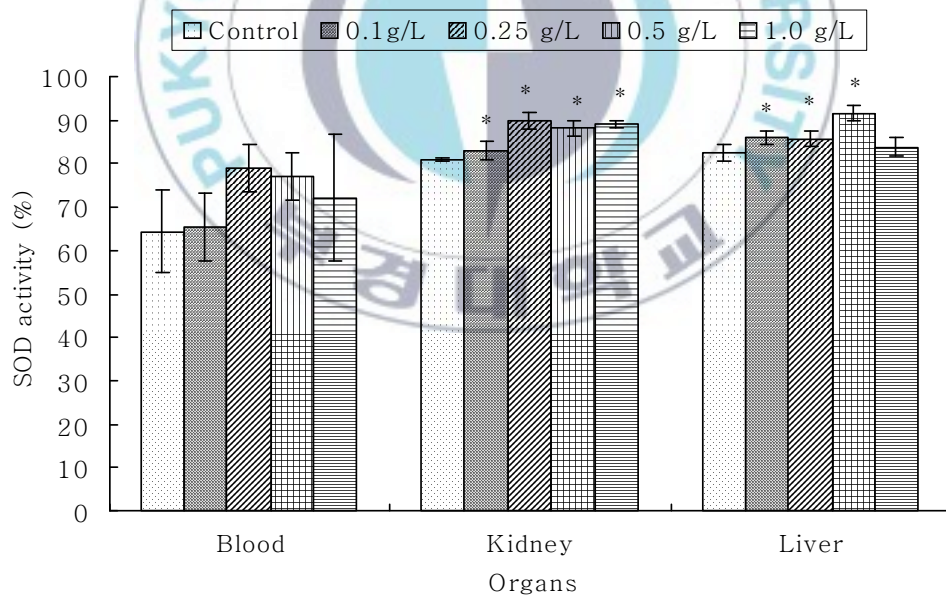


Fig. 12. SOD activity of blood, kidney and liver of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, immersed in various juice concentration (0, 0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 g/L) of garlic, *Allium sativum*, respectively.

2.6. 시험어의 NBT 환원 시험

각 농도별 마늘 착즙액에 침지한 시험어의 신장에서 분리한 대식세포의 NBT 환원량을 조사한 결과를 Fig. 13에 나타내었다.

마늘 착즙액 0.1, 0.25 및 0.5 g/L에 침지한 시험어 신장 대식세포의 NBT 환원량은 대조구에 비해서 유의적인 증가를 나타내었다. 그 중 0.25 g/L의 마늘 착즙액 침지 시험구에서 가장 높은 신장 대식세포의 NBT 환원량을 나타내었다.

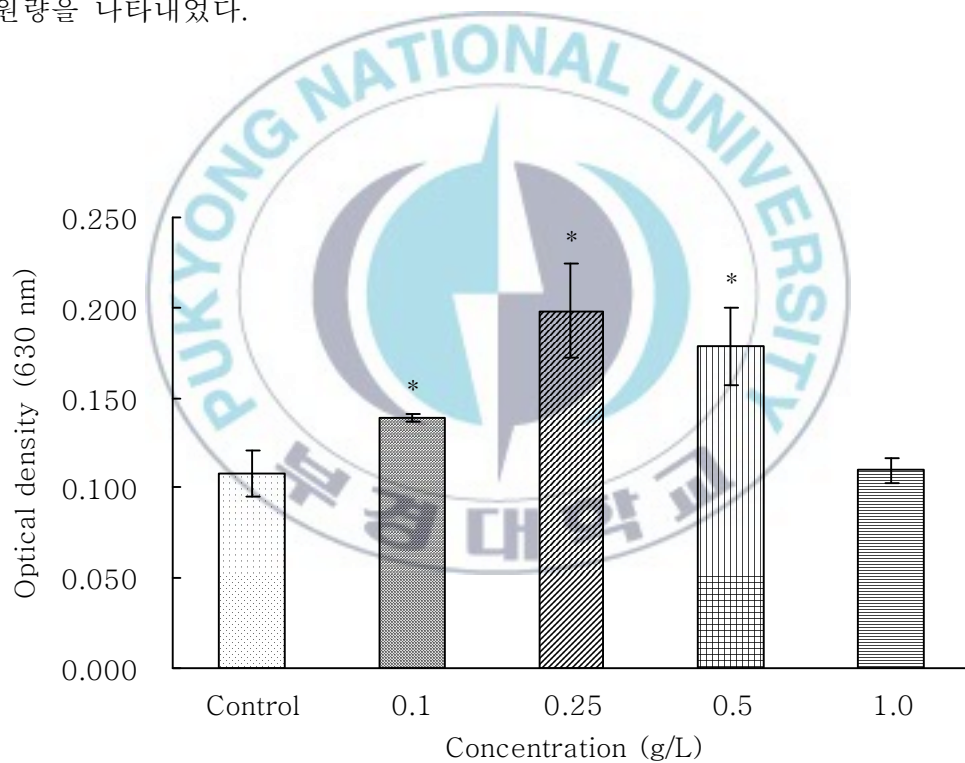


Fig. 13. NBT reduction of head kidney phagocytes of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, immersed in various juice concentration (0, 0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 g/L) of garlic, *Allium sativum*, respectively.

2.7. 공격 시험

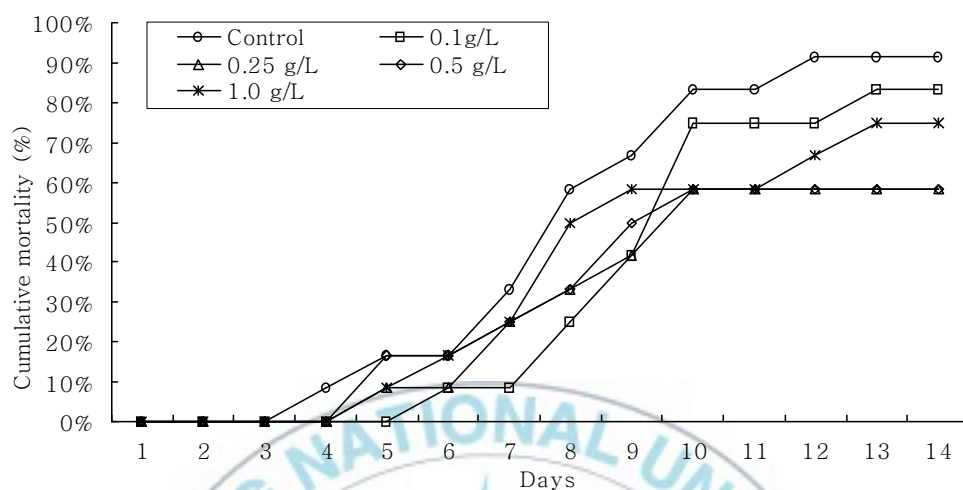
각 농도별 마늘 착즙액 침지 시험구 넙치의 병원성 세균에 대한 저항력 변화를 조사하기 위하여 병원성 세균 *Streptococcus iniae* BS10 균주와 *Edwardsiella tarda* KE-1 균주를 각각 시험어에 복강 주사하였다. 각 농도의 마늘 착즙액 침지 2일 후, 각 구간별로 *S. iniae* BS10 균주는 1.0×10^6 CFU/ml, *E. tarda* KE-1 균주는 1.0×10^4 CFU/ml 으로 각각 공격 주사 하였다.

공격 시험 후 14 일간 누적 폐사율과 상대 생존율을 조사하여 그 결과를 Table 2과 Fig. 14에 나타내었다.

Table 2. Cumulative mortality and relative percentage of survival (RPS) of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, immersed in various juice concentration of garlic, *Allium sativum*, 2 days after following intraperitoneal injection with *Streptococcus iniae* BS10 and *Edwardsiella tarda* KE-1, for 14 days

<i>Streptococcus iniae</i> BS10			<i>Edwardsiella tarda</i> KE-1		
Group	Cumulative mortality (%)	RPS (%)	Group	Cumulative mortality (%)	RPS (%)
0.1 g/L	83 %	9%	0.1 g/L	83 %	0 %
0.25 g/L	58 %	36 %	0.25 g/L	42 %	50 %
0.5 g/L	58 %	36 %	0.5 g/L	50 %	40 %
1.0 g/L	75 %	18 %	1.0 g/L	58 %	30 %
Control	92 %	-	Control	83 %	-

(A)



(B)

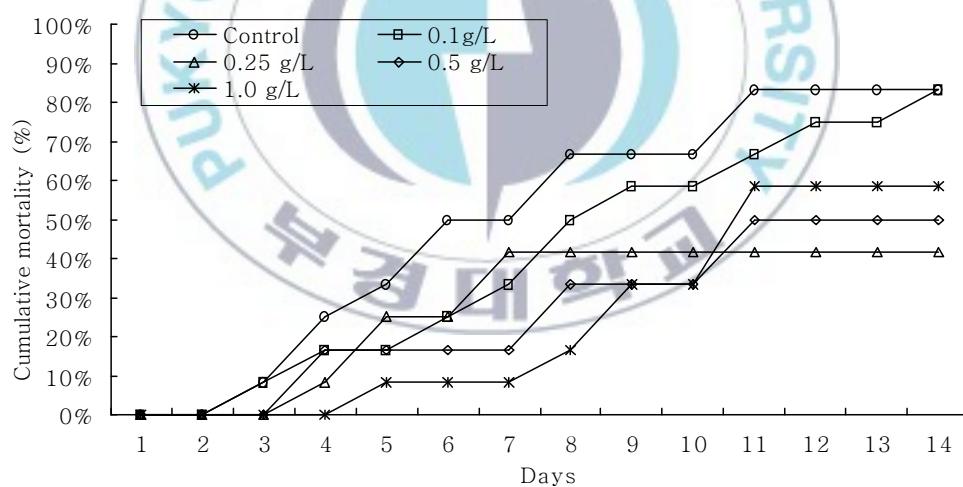


Fig. 14. Cumulative mortality of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, immersed in various juice concentration (0, 0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 g/L) of garlic, *Allium sativum*, 2 days after following intraperitoneal injection with *Streptococcus iniae* BS10 (A) and *Edwardsiella tarda* KE-1 (B), for 14 days.

3. 공격 시험한 넙치의 마늘 착즙액 침지 효과 시험

3.1. 넙치의 체표 점액 lysozyme 활성 조사

병원균으로 공격 주사한 넙치를 각 농도별 마늘 착즙액에 침지한 다음 시험구의 어체별 체표 점액 lysozyme의 활성을 조사한 결과를 Fig. 15에 나타내었다.

S. iniae BS10으로 공격 주사한 뒤, 마늘 착즙액에 침지한 시험어의 점액 lysozyme 활성은 대조구에 비해서 0.25 g/L와 0.5 g/L의 침지 시험구에서 유의적인 증가가 나타났으나 1.0 g/L 시험구에서는 유의적인 증가를 나타내지 않았다. 그 중 0.25 g/L 시험구가 대조구와 가장 큰 차이를 나타내었다.

E. tarda KE-1으로 공격 주사한 뒤, 마늘 착즙액에 침지한 시험어의 점액 lysozyme 활성은 대조구에 비해서 모든 농도 시험구에서 유의적인 증가를 나타냈으며 특히 0.5 g/L 시험구에서 대조구에 비하여 큰 증가를 나타내었다.

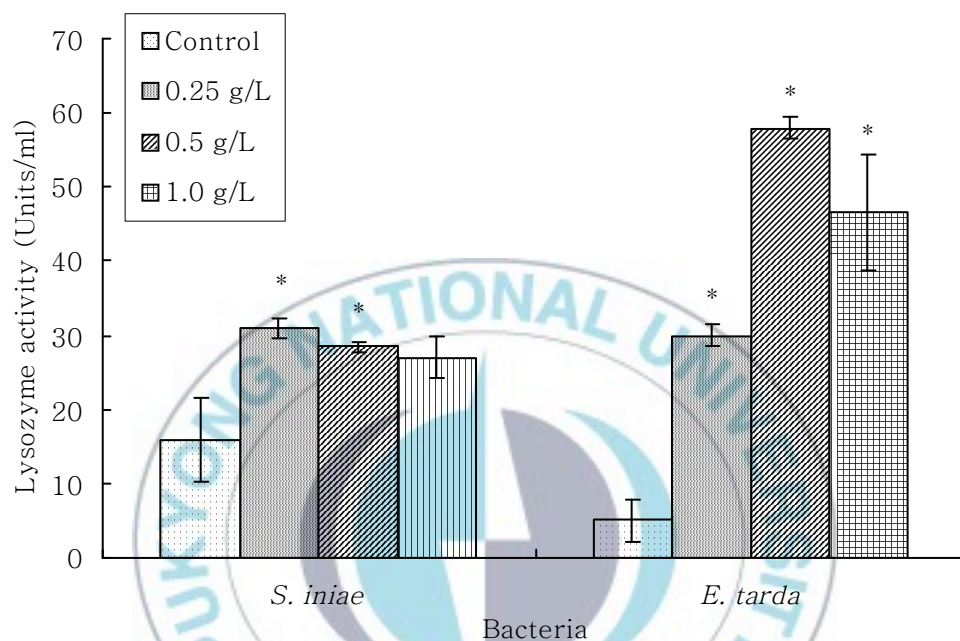


Fig. 15. Changes of lysozyme activity in skin mucus of challenged separately with *Streptococcus iniae* BS10 and *Edwardsiella tarda* KE-1 on olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, following immersion in various juice concentration (0, 0.25, 0.5 and 1.0 g/L) of garlic, *Allium sativum*, respectively.

3.2. 시험어의 조직 내 균수 변화 조사

병원균으로 공격 주사한 시험어를 각 농도별 마늘 착즙액에 침지한 다음 시험구의 어체별 조직 내 균수 변화를 조사한 결과를 Fig. 16에 나타내었다.

S. iniae BS10로 공격 주사한 뒤 마늘 착즙액 침지 시험구의 각 조직 내 균수 변화는 대조구에 비해서 모든 농도 시험구에서 유의적인 감소가 나타났으며 특히 0.25 g/L와 0.5 g/L 구간에서 대조구에 비해 큰 감소를 나타내었다.

E. tarda KE-1로 공격 주사한 뒤 마늘 착즙액 침지 시험구의 각 조직 내의 균수 변화는 대조구에 비해서 모든 농도 침지 시험구에서 유의적인 감소를 나타내었다. 그 중 0.5 g/L 시험구가 대조구와 비교하여 가장 큰 감소를 나타내었다.

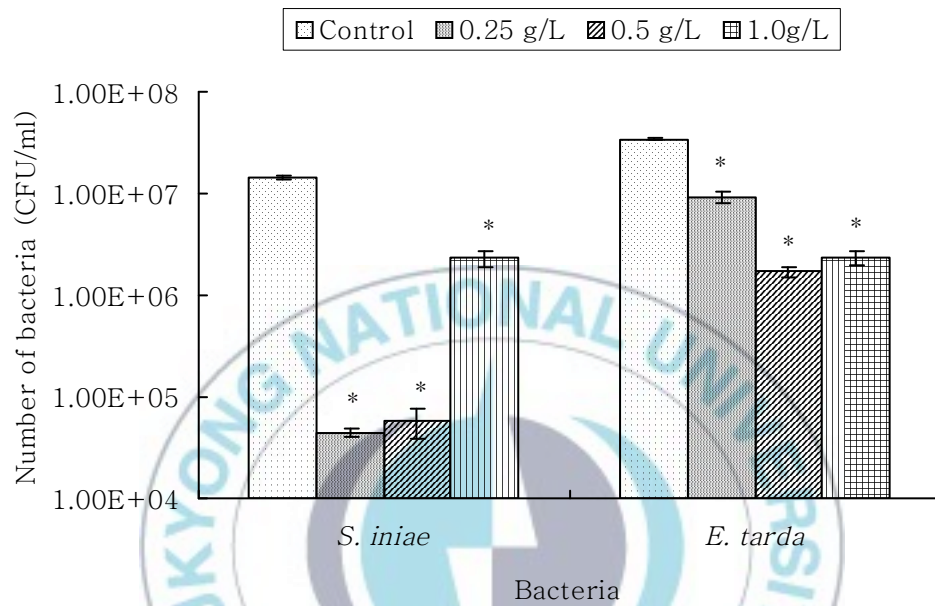


Fig. 16. Changes of number of bacteria in organs of challenged separately with *Streptococcus iniae* BS10 and *Edwardsiella tarda* KE-1 on olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, following immersion in various juice concentration (0, 0.25, 0.5 and 1.0 g/L) of garlic, *Allium sativum*, respectively.

3.3. 시험어의 혈액 내 세포 수의 변화 조사

시험어에 병원균 공격 주사 후, 각 농도별 마늘 착즙액에 침지한 시험구 어체별 순환 혈액 내에 출현하는 림프구와 호중구의 수를 조사한 결과를 Fig. 17에 나타내었다.

S. iniae BS10을 공격 주사한 뒤, 마늘 착즙액에 침지한 시험어의 혈액 내 림프구는 대조구에 비해서 0.25 g/L와 0.5 g/L 시험구에서 유의적인 증가가 나타났으며 호중구도 0.25 g/L와 0.5 g/L 시험구에서 대조구에 비해 유의적인 증가를 나타내었다. 그러나 1.0 g/L 시험어의 혈액에서는 림프구와 호중구의 수가 대조구에 비해 유의적인 증가는 나타나지 않았다.

E. tarda KE-1을 공격 주사한 뒤, 마늘 착즙액에 침지한 시험어의 혈액 내 림프구 수가 대조구에 비해서 0.25 g/L와 1.0 g/L 시험구에서 유의적인 증가를 나타내었으나, 호중구에서는 모든 시험구에서 대조구에 비해 유의적인 증가를 나타내었다.

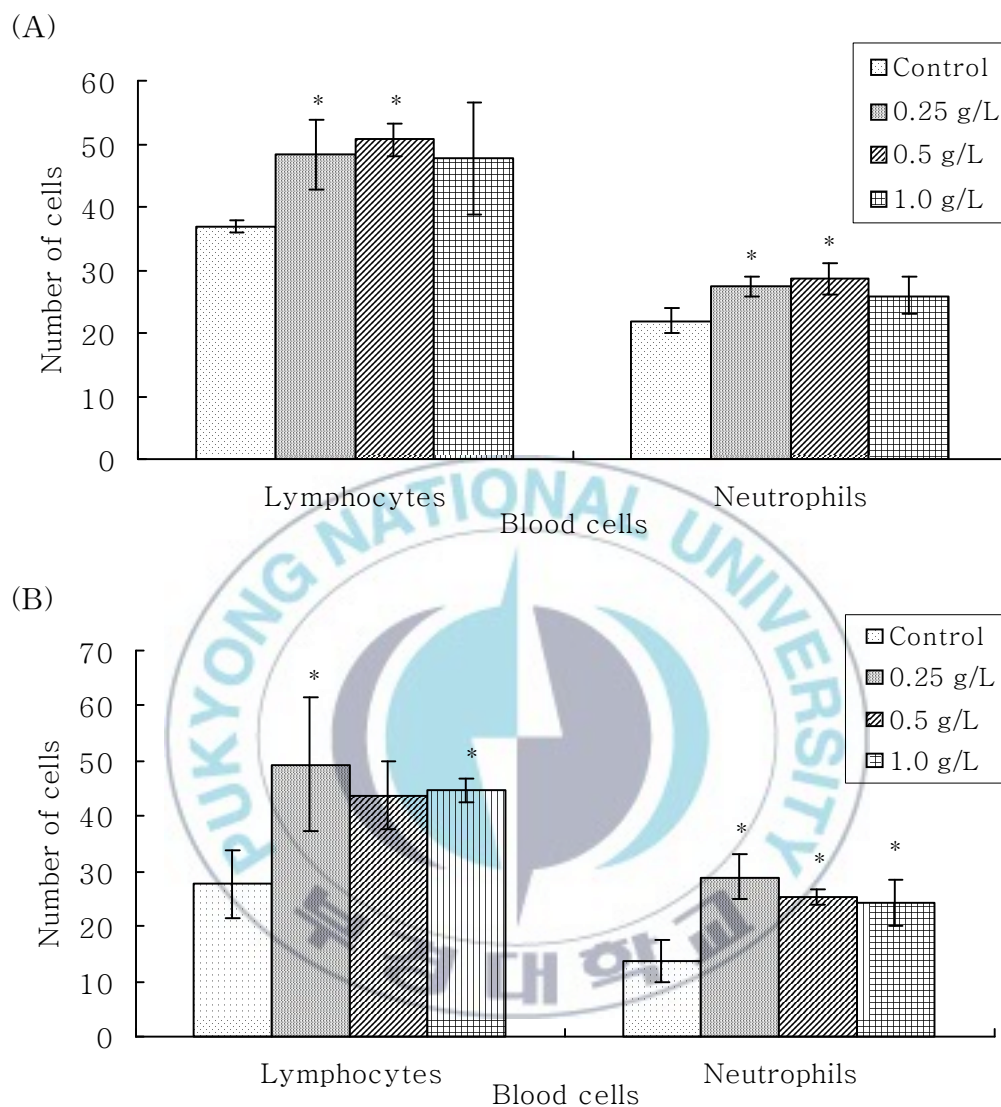


Fig. 17. Changes in number of lymphocytes and neutrophils per 5,000 red blood cells in peripheral blood of challenged separately with *Streptococcus iniae* BS10 (A) and *Edwardsiella tarda* KE-1 (B) on olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, following immersion in various juice concentration (0, 0.25, 0.5 and 1.0 g/L) of garlic, *Allium sativum*, respectively.

3.4. 시험어의 SOD activity 조사

병원균으로 공격 주사한 시험어를 각 농도별 마늘 착즙액에 침지한 시험구 어체별 혈액, 신장 및 간에서 SOD activity를 조사한 결과를 Fig. 18에 나타내었다.

S. iniae BS10을 공격 주사한 뒤, 마늘 착즙액에 침지한 시험어의 혈액, 신장 및 간의 SOD 활성 중, 혈액에서는 대조구에 비해서 SOD 활성이 모든 시험구에서 유의적인 증가가 나타났다. 신장 역시 대조구에 비해서 SOD 활성이 모든 시험구에서 유의적인 증가가 나타났다. 그러나 간에서는 대조구에 비해 유의적인 증가를 보이지 않았다.

E. tarda KE-1을 공격 주사한 뒤, 마늘 착즙액에 침지한 시험어의 혈액, 신장 및 간의 SOD 활성 중, 혈액에서는 대조구에 비해서 SOD 활성의 유의적인 증가가 나타나지 않았다. 반면 신장에서는 대조구에 비해서 SOD 활성이 모든 시험구에서 유의적인 증가가 나타났으며 간에서는 대조구에 비해 0.5 g/L와 1.0 g/L 시험구에서 유의적인 증가를 나타내었다.

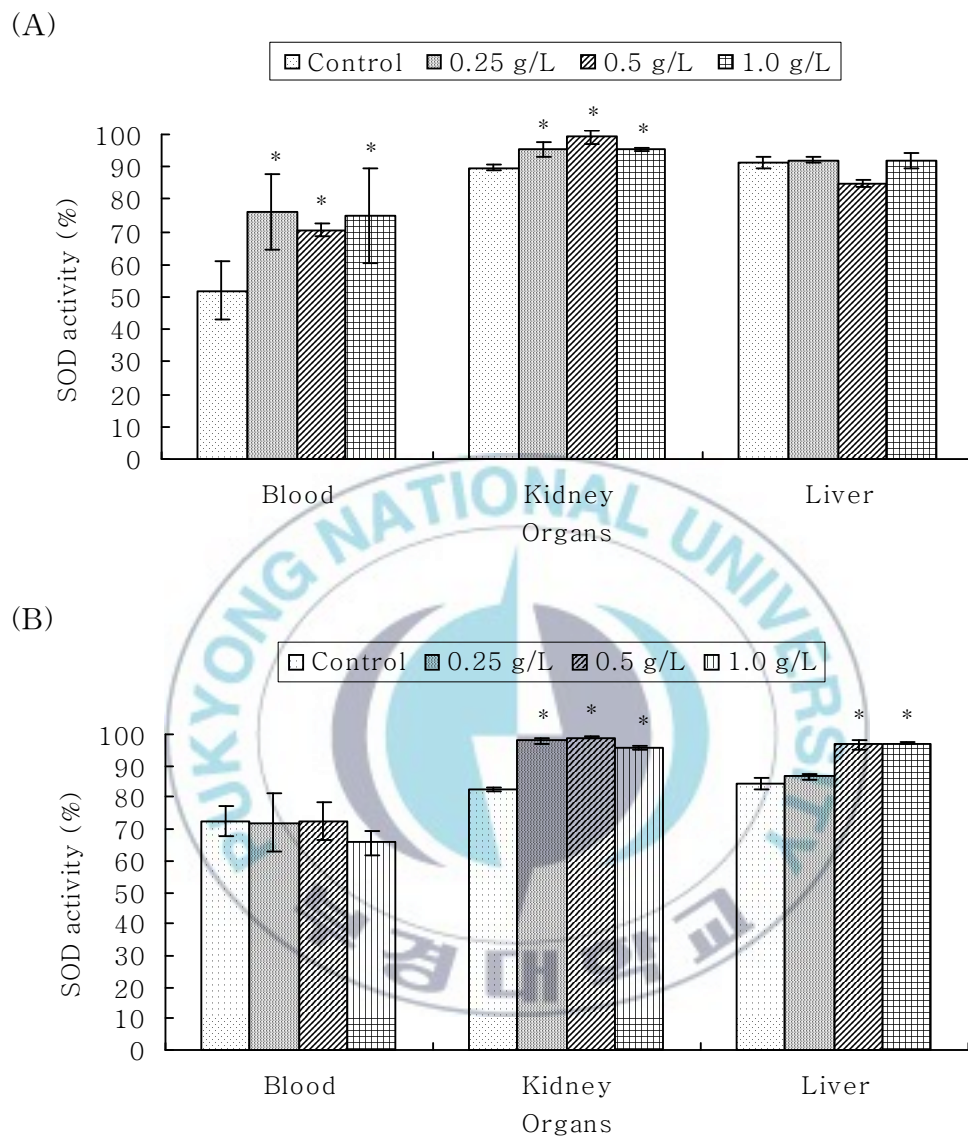


Fig. 18. SOD activity of blood, kidney and liver of challenged separately with *Streptococcus iniae* BS10 and *Edwardsiella tarda* KE-1 on olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, following in immersion various juice concentration (0, 0.25, 0.5 and 1.0 g/L) of garlic, *Allium sativum*, respectively.

3.5. 생존율 조사

병원균으로 공격 주사한 시험어를 각 농도별 마늘 착즙액에 침지한 시험구 어체별 생존율을 조사하고 그 결과를 Table 3과 Fig. 19에 나타내었다.

Table 3. Cumulative mortality and relative percentage of survival (RPS) of challenged separately with *Streptococcus iniae* BS10 and *Edwardsiella tarda* KE-1 on olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, following immersion in various juice concentration (0, 0.25, 0.5 and 1.0 g/L) of garlic, *Allium sativum*, juice, for 14 days, respectively.

<i>Streptococcus iniae</i> BS10			<i>Edwardsiella tarda</i> KE-1		
Group	Cumulative mortality (%)	RPS (%)	Group	Cumulative mortality (%)	RPS (%)
0.25 g/L	42 %	50 %	0.25 g/L	42 %	58 %
0.5 g/L	58 %	30 %	0.5 g/L	67 %	33 %
1.0 g/L	83 %	0 %	1.0 g/L	67 %	33 %
Control	83 %	-	Control	100 %	-

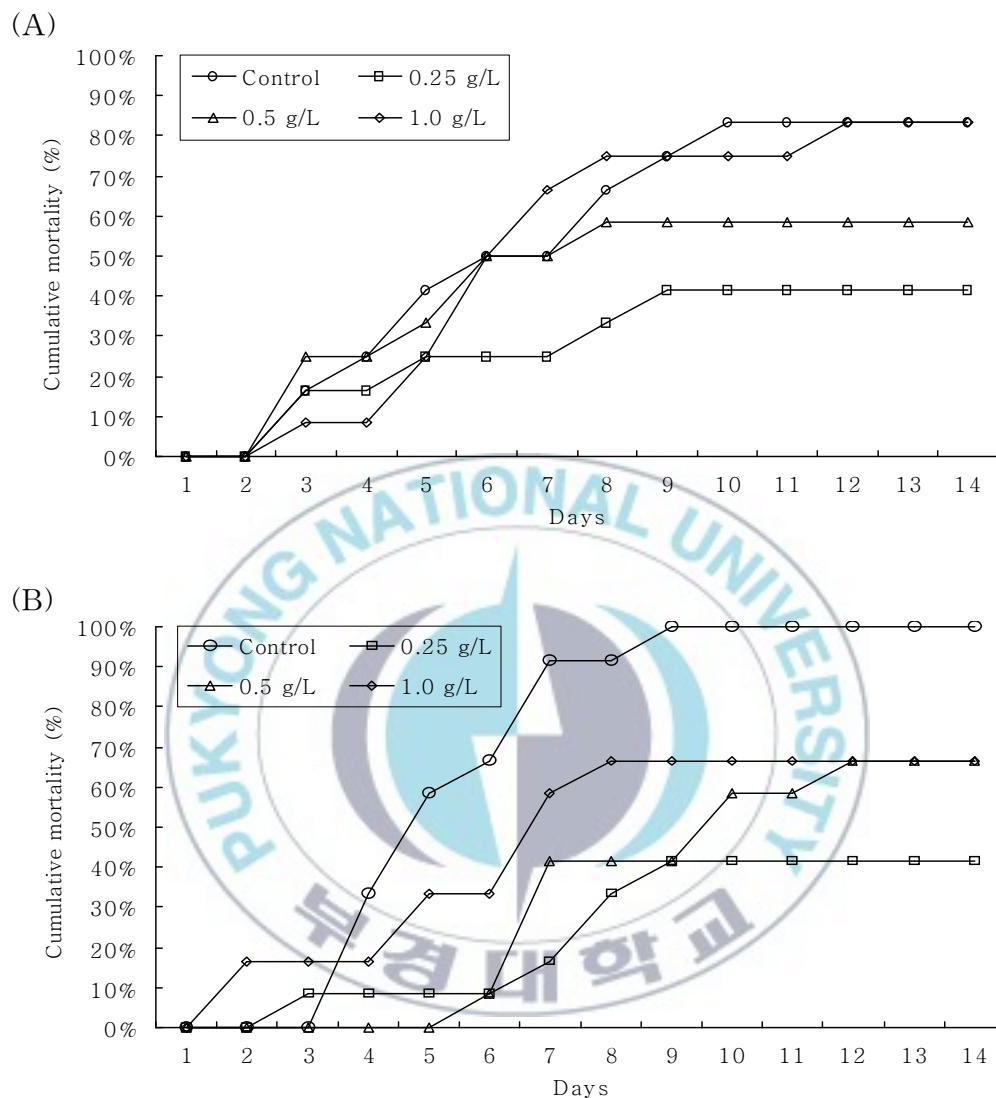


Fig. 19. Cumulative mortality of challenged separately with *Streptococcus iniae* BS10 and *Edwardsiella tarda* KE-1 on olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, following immersion in various juice concentration (0, 0.25, 0.5 and 1.0 g/L) of garlic, *Allium sativum*, respectively.

(A): *Streptococcus iniae* BS10; (B): *Edwardsiella tarda* KE-1

IV. 고 찰

본 연구에서는 마늘 추출물의 비경구적 투여와 마늘 착즙액의 침지를 통해 넙치의 비특이적 면역 반응에 미치는 영향을 분석하고 병원체에 대한 저항력을 알아봄으로써 유효한 추출물의 농도와 방어력 증강에 관여하는 마늘의 효능을 밝히는데 필요한 기초 자료를 얻고자 하였다.

마늘의 생리 활성은 주로 유황 화합물에 의한 것이며, 마늘을 마쇄하였을 때 생성되는 alliin은 곧 alliinase에 의해 분해되어 allicin으로 변한다. Allicin은 비타민 B₁과 같은 생리 작용을 가질 뿐만 아니라 체내에서 흡수가 빠르고 thiamin의 체내 이용율을 높여준다 (Stoll & Seedback, 1949). 그 외에도 *Helicobacter pylori*의 번식 억제 (O'Gara et al., 2001), 이질의 원인균인 *Entameba histolytica*의 독성 인자 억제 (Ankri et al., 1997), 항균 작용, 방부 효과가 있으며, 특히 항암, 혈청 콜레스테롤 감소, 혈소판 응집 억제, 항산화제로서의 기능 (Schwartz et al., 2002)이 우수한 것으로 알려져 있다.

어류의 1차 방어선으로서 점액, lysozyme, 항체, 보체, 대식세포 등이 알려져 있으며 이들은 감염을 일으킬 수 있는 미생물들의 침입과 부착을 막는다. 본 연구에서 넙치의 체표 점액 및 혈청 lysozyme 활성이 마늘 추출물을 주사하였을 때에 1, 3, 5 및 7 %의 시험구에서, 마늘 착즙액을 침지하였을 때에 0.25, 0.5 및 1.0 g/L의 모든 시험구에서 대조구에 비해 활성이 높았음을 알 수 있었다. 어류의 lysozyme은 점액, 혈청 등에 들어있으며 특히 백혈구와 백혈구가 풍부한 조직인 신장, 비장, 장 등에 포함되어 있고 macrophage와 호중구가 주된 생산 세포로 알려져 있다 (Murray &

Fletcher, 1976). 이 효소는 gram 양성 및 음성균에 작용하여 용균하는 능력을 가지고 있는 염기성의 단백 효소로서 세균벽의 peptidoglycan을 구성하고 있는 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglucosamine 사이의 β -1,4 결합을 분해하는 기작을 가지며 그람 음성균에 대한 항체와 보체의 작용을 증강시켜준다. 또한 단핵 식세포와 다형핵세포의 식작용을 증강시켜준다 (Jolles & Jolles, 1984; Grinde, 1989). 김 등 (1992)은 넙치의 lysozyme이 *Micrococcus lysodeikticus* 이외에도 *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus epidermidis*에 대하여 높은 정균 효과를 나타내었다고 보고하였다. *Eclipta alba* leaf를 톨라피아에 경구 투여하였을 때 혈청 lysozyme의 활성이 높아진 보고가 있으며 (Christyapita et al., 2007), *Solanum trilobatum* leaf 추출물을 톨라피아에 복강 주사하였을 때에도 lysozyme 활성이 높아졌다는 보고가 있다 (Divyagnaneswari et al., 2007). 0.5 %의 levan을 잉어에 경구 투여하였을 때 혈청 lysozyme이 대조구에 비해 1.56 배 증가한다는 보고도 있다 (Dina et al., 2007). 본 실험에 사용한 마늘 추출물과 다른 면역 증강제와의 직접적인 비교는 할 수 없지만, 다른 면역 증강제와 유사하게 마늘 추출물을 주사하였을 때와 마늘 착즙액에 침지하였을 때 lysozyme의 활성이 증가하였으며, 이는 neutrophil의 수가 증가하는 현상과 관련시켜볼 때 마늘 성분의 자극 효과를 배제할 수 없을 것으로 생각한다.

본 연구에서 *E. coli*에 대한 살균 반응을 지표로 혈청의 살균능을 조사한 결과, 마늘 추출물 3, 5 및 7 %를 주사한 시험구가 대조구에 비해 유의적인 증가를 나타내었고 마늘 착즙액의 0.25 g/L와 0.5 g/L 침지 시험구가 대조구에 비해 효과가 좋은 것으로 나타났다. Tuftsin을 indian major carp에 경구 투여하였을 때 혈청 내 살균능이 높았으며 (Misra et al., 2006), β -glucan을 indian major carp fingerling에 복강 주사하였을 때에도 혈청

내 살균능이 높게 나온 보고가 있다. 하지만 본 실험 결과에서 12 시간째 대조구에 비해 유의적인 차이를 나타내었으나 6 시간째와 비교하여 세균수가 증가하였다. 이는 혼합 생약재 첨가사료를 넙치에 투여 하였을 때 보체의 살균능이 대조구에 비해 유의적인 차이를 나타내지 않는다는 보고 (정 등, 2002)가 있어, 혈청의 살균작용, 특히 보체의 작용보다는 혈청 내 다른 물질로 인한 정균작용으로 생각된다.

본 연구에서 수행된 혈액세포의 변화를 보면 마늘 추출물을 주사하였을 때에는 림프구 수에서는 대조구와 비교하여 유의적인 증가를 보이지 않았다. 그러나 호중구 수에서는 1, 5 및 10 %의 마늘 추출물을 투여하였을 때 호중구 수의 변화가 대조구와 비교하여 유의적인 증가를 나타내었다. 마늘 착즙액에 침지하였을 때에는 림프구와 호중구 수에서 대조구와 비교하여 0.25, 0.5 및 1.0 g/L 시험구에서 모두 유의적인 증가를 나타내었다. *S. iniae* BS10로 공격 주사한 후 0.25 g/L와 0.5 g/L의 농도에 침지하였을 때 림프구와 호중구의 수가 증가하였다. *E. tarda* KE-1을 공격 주사 한 후에 침지하였을 때 림프구 수의 변화는 0.25 g/L와 1.0 g/L 시험구에서 증가하였고 호중구의 수는 대조구와 비교하여 모든 시험구에서 유의적인 증가를 보였다. 실험 결과에서도 알 수 있듯이 마늘 추출물을 주사하거나 마늘 착즙액을 침지하였을 때 대체적으로 호중구의 수가 증가함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 쥐에게 마늘 추출물을 림프구에 자극하였을 때 나타나는 면역 증강 효과와도 유사한 것으로 나타났다 (전과 백, 1997).

어떠한 자극 후에 phagocytes는 호흡폭발이라고 불리는 격렬한 산소 소비 기간 동안에 superoxide anion (O_2^-)과 이 반응의 유도물인 hydrogen peroxide와 hydrogen radical들을 활성화시킨다. 이 반응성의 산소는 즉시 어류 세균성 병원체에 대항하여 강력한 bactericidal activities를 나타낸다 (Secombes et al., 1992). 호흡폭발 활성의 증가는 phagocytes의 세균성 병

원체 사멸 활동과 관련이 있다 (Sharp et al., 1993). NBT 환원 시험은 호흡폭발 활성을 확인하기 위해 사용된다 (Schiffrin et al., 1997). 본 연구에서 마늘 추출물 3 %와 5 %를 각각 주사하였을 때 대조구에 비해 NBT 환원량이 유의적인 증가를 나타내었으며 특히 5 % 시험구에서 가장 높은 차이를 나타내었다. 마늘 착즙액을 침지한 시험구에서는 0.1, 0.25 및 0.5 g/L의 마늘 착즙액 침지 시험구에서 대조구와 비교하여 유의적인 증가를 나타내었고, 그 중 0.25 g/L를 침지한 시험구에서 가장 높은 유의적인 증가를 나타내었다. Glucan을 turbot과 gilthead seabream에 투여하였을 때 높은 NBT 활성을 나타내었고 (Castro et al., 1999), levan을 투여하였을 때에도 높은 NBT 활성을 나타내었다 (Rairakhwada et al., 2007). 또한 복어에 L-ascorbyl-2-monophosphate를 투여하였을 때 대조구에 비해 높은 NBT 활성을 나타내었다 (Eo & Lee, 2008). 어류의 종과 투여한 면역 증강제의 종류는 다르지만 면역 증강제를 투여하였을 때 NBT 활성이 증가하였고 마늘 추출물을 투여하거나 마늘 착즙액을 침지하였을 때 NBT 활성이 대조구에 비해 높게 나타난 것으로 보아 마늘 성분이 넙치의 호흡폭발 유도에 관여하였을 것으로 생각된다.

대식세포에 의해 방출되는 산소 대사물은 매우 반응성이 높기 때문에 조절되어야한다 (Song & Hsieh, 1994). ROIs의 효과적이고 빠른 제거는 생물 생존에 필수적이다. 이것은 SOD와 같은 항산화 방어 기작에 의해 일어난다. 마늘 추출물을 주사한 뒤 혈액, 신장, 간의 SOD 활성을 조사한 결과 혈액에서는 마늘 추출물을 3% 주사하였을 때 SOD activity가 대조구에 비해 유의적인 증가를 나타내었다. 그리고 신장과 간에서는 대조구에 비해 마늘 추출물을 투여한 시험구 모두 SOD activity가 유의적인 증가를 나타내었다. 마늘 착즙액을 침지한 시험구에서는 혈액에서는 대조구와 유의적인 증가를 나타내지 않았으나 신장에서는 0.25, 0.5 및 1.0 g/L 등 모든 시

혈구에서 유의적인 증가를 나타내었으며 간에서도 0.25 g/L와 0.5 g/L 시험구에서 유의적인 증가를 나타내었다. 병원균을 공격 시험한 후 마늘 착즙액에 침지한 구간에서, *Streptococcus iniae* BS10 공격 시험 구간의 혈액과 신장에서 모두 대조구와 유의적인 증가를 보였지만 간에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. *Edwardsiella tarda* KE-10 공격 시험 구간의 혈액은 대조구에 비해 유의적인 증가를 보이지 않았으나 신장에서는 모든 시험구에서, 간에서는 0.5 g/L와 1.0 g/L 시험구에서 대조구에 비해 유의적인 증가를 나타내었다. Grouper에 sodium alginate를 경구 투여 하였을 때, respiratory bursts와 SOD 활성이 증가하였고 (Yeh et al., 2007), white shirimp에 β -glucan을 경구 투여하였을 때 SOD 활성이 높았으며 WSSV에 대한 폐사율이 낮았다는 보고가 있다 (Chang et al., 2003). 호흡 폭발로 인한 phagocyte의 활성 증가는 NBT 활성과 Chemiluminescence response의 증가로 알 수 있다. 하지만 superoxide anion이 항상 호흡 폭발에 의해서만 발생하는 것이 아니라 여러 다른 대사 작용에서도 발생하며, 세포에서 NADH oxidase를 가지고 있고 SOD 활성에 의해서 macrophage의 호흡 폭발을 측정하는 CL response의 결과가 다양하게 나오기 때문에 CL response에서 소실되는 superoxide anion 양까지 알 수 있는 SOD 활성이 중요하다는 보고도 있다 (Ordas et al., 2000). 본 연구에서는 superoxide anion의 생성량과 SOD 활성 사이의 상관관계를 비교해보면 NBT 활성이 대조구에 비해 유의적으로 증가한 시험구와 신장에서 대조구와 비해 유의적인 증가를 나타낸 SOD 활성이 일치하였다. 다른 면역 증강제를 투여 하였을 때 SOD 활성이 증가하는 것과 유사한 결과를 나타내었으며, 이는 SOD 활성 증가로 어체의 산화 스트레스 감소와 면역력 증가를 나타낸다고 생각한다.

Streptococcus iniae BS10과 *Edwardsiella tarda* KE-1을 공격한 뒤 마

를 착즙액으로 침지한 시험구의 조직 내 균수 변화를 살펴보면 대조구에 비해서 모든 구간에서 세균 수가 줄어들었다. 특히 *Streptococcus iniae* BS-10 시험구에서는 0.25 g/L와 0.5 g/L의 시험어 조직 내 균수가 대조구에 비해 크게 줄어든 결과를 나타내었다.

공격 시험에서는 마늘 추출물을 5 % 주사한 후 *Streptococcus iniae* BS10 공격 시험구의 상대생존율이 45 %로 가장 높았다. *Edwardsiella tarda* KE-1을 공격 주사하였을 때에는 마늘 추출물 5 % 주사 시험구의 상대생존율이 55 %로 가장 높았다. 마늘 착즙액을 침지한 뒤 *Streptococcus iniae* BS10을 공격 시험 하였을 때 마늘 착즙액 0.25 g/L와 0.5 g/L 침지 시험구의 상대생존율이 각각 36 %로 가장 높았고 *Edwardsiella tarda* KE-1 공격 주사에서는 마늘 착즙액 0.25 g/L 침지 시험구 상대생존율이 50 %로 가장 높았다. 시험어에 병원체 공격 후 마늘 착즙액 침지 효과를 생존율로 알아보았을 때에는 *Streptococcus iniae* BS10 공격 주사 후 0.25 g/L 시험구의 상대생존율이 50 %로 가장 높았다. *Edwardsiella tarda* KE-1 공격 후 마늘 착즙액 침지 시험구에서도 0.25 g/L 시험구의 상대생존율이 58 %로 가장 높았다. Indian major carp 에 *Solanum trilobatum* leaf 열수 추출물 400 mg/kg을 복강 주사하였을 때 *Aeromonas hydrophila*에 대해 상대 생존율이 70.84 %로 나타났으며 (Divyagnaneswari et al., 2006), Tilapia에 *Eclipta alba* leaf 열수 추출물 0.1 %를 2주간 경구 투여 하였을 때 75 %의 상대 생존율을 나타내었다 (Christybapita et al., 2007). 0.5 %의 levan을 잉어에 경구 투여 하였을 때에도 *Aeromonas hydrophila*에 대해서 100 % 생존율을 나타내었으며 (Dina et al., 2007), tuftsin을 고농도로 4회 주사 하였을 때 *Aeromonas hydrophila*와 *Edwardsiella tarda*에 대해서 저항력이 높게 나타난 보고가 있다 (Misra et al., 2006). 마늘을 경골어류에 투여한 연구는 많지 않아 직

접적인 비교는 어렵지만 투여한 각 면역 증강제의 면역 증강 패턴과 폐사율의 감소가 본 연구의 결과와 유사하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 마늘 추출물이 대조구에 비하여 높은 방어력을 나타냄으로써 생리활성 물질의 유용성을 밝힐 수 있었다. 마늘 추출물을 주사 또는 마늘 착즙액을 침지 했을 때 neutrophil를 자극하여 lysozyme 활성이 증가함을 알 수 있었다. 혈청 내 살균능은 12 시간째 대조구에 비해 유의적인 증가를 나타내었으나 6 시간째보다 증가하는 경향을 보여 혈청 내 물질이 살균 효과 보다는 정균 효과가 있을 것으로 생각한다. 또한 NBT 활성의 증가와 면역 관련 효소 중 하나인 SOD 활성이 신장에서 활성화되는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 마늘이 어류에 미치는 생리학적 영향을 조사해보지는 못하였지만 투여 간격, 횟수 및 투여 시기에 따라 마늘이 어류에 미치는 영향이 각기 다를 것으로 생각하며, 마늘 추출물의 적정 투여 간격, 횟수 및 투여 시기별 영향에 대하여 더 조사할 필요가 있다. 또한 마늘 추출물을 복강에 주사함에 있어서 핸들링에 의한 스트레스 반응을 고려해 보아야 할 것이다. 그리고 추출물에 대해서 경구적으로 투여하는 방법과 *in vitro* 환경에 적용하여 면역기구에 미치는 작용에 대해서도 좀 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각한다. 어병 세균에 대한 증식 억제 작용에 대한 연구와 각 마늘 추출물의 농도에 따른 면역 반응에 관여하는 요소의 활성 차이도 발생하였기 때문에 마늘 추출물의 유효 성분과 농도별 영향 역시 조사할 필요가 있을 것으로 사료된다.

V. 요 약

본 연구에서는 마늘 추출물과 착즙액이 넙치의 면역력에 미치는 영향과 투여 방법에 따른 효과를 밝히고자 하였다. 마늘 추출물의 투여는 복강 주사법을, 마늘 착즙액은 침지법을 사용하였으며, 전자는 마늘 추출물 주사와 착즙액 침지 후에 병원균을 공격하였고, 후자는 병원균 공격 후 마늘 착즙액을 침지하였다. 마늘 추출물의 복강 주사법은 어체 당 추출물의 1, 3, 5, 7 및 10 %를 2 일 간격으로 3회 주사한 다음 2 일 쯤에 병원균의 공격 시험을 하였다. 마늘 착즙액 침지법은 어체당 추출물의 0.1, 0.25, 0.5 및 1.0 g/L의 농도에 2 일 간격으로 3 회 침지하였다. 주사 후 마늘 착즙액 침지법은 시험균을 공격 주사한 1 일 후 마늘 추출물 0.25, 0.5 및 1.0 g/L의 농도에 2 일 간격으로 3 회 침지하였다. 면역력 변화의 지표로서는 체표 점액 lysozyme, 혈청 lysozyme, 혈청 내 살균능, 혈중 림프구와 호중구 수 변화, 혈액, 신장 및 간의 SOD activity와 NBT 활성 등을 조사하였다. 그 결과, 마늘 추출물의 복강 주사 시험구에서는 5 % 시험구에서 점액 lysozyme 활성과 혈청 lysozyme 활성이 가장 높은 유의적인 증가를 하였고 혈청 내 살균능은 12 시간째 3, 5 및 7 % 시험구에서 유의적인 감소를 나타내었다. 호중구의 수는 1, 5 및 10 %를 주사하였을 때 유의적인 증가를 보였다. SOD activity는 신장에서는 1, 3 및 5% 시험구에서, 간에서는 1 및 5 % 시험구가 대조구에 비해 유의적인 증가를 나타내었다. NBT 환원 시험은 3 및 5 % 시험구에서 높은 NBT 환원량을 나타내었다. *Streptococcus iniae* BS10과 *Edwardsiella tarda* KE-1을 공격 주사한 후 상대 생존율은 두 병원체 시험구 모두 5 % 시험구에서 가장 높았다. 마늘

추출물의 침지 시험에서는 0.25 g/L 시험구에서 체표 점액 lysozyme 활성과 혈청 lysozyme 활성이 가장 높은 유의적인 증가를 하였고, 혈청 내 살균능은 12 시간째 0.25 g/L 시험구에서 대조구와 비교하여 가장 많은 유의적인 감소를 나타내었다. 림프구와 호중구의 수는 0.25, 0.5 및 1.0 g/L 시험구에서 대조구에 비해 유의적인 증가를 보였다. SOD activity는 신장에서는 모든 시험구에서, 간에서는 0.1, 0.25 및 0.5 g/L 시험구에서 대조구에 비해 유의적인 증가를 나타내었다. NBT 환원 시험은 0.1, 0.25 및 0.5 % 시험구에서 대조구와 비교하여 유의적인 증가를 나타내었다. *S. iniae* BS10과 *E. tarda* KE-1을 공격 주사한 후 상대 생존율은 병원체 시험구 모두 0.25 g/L 시험구에서 가장 높은 상대 생존율을 나타내었다. 마늘 착즙액의 공격 후 침지 시험구에서는 0.25 g/L 시험구에서 체표 점액 lysozyme 활성이 가장 높은 유의적인 증가하였고 호중구의 수는 *S. iniae* BS10 공격 후 침지한 시험에서는 0.25 및 0.5 g/L 시험구에서, *E. tarda* KE-1 공격 후 침지한 시험에서는 모든 시험구에서 대조구에 비해 유의적인 증가를 나타내었다. SOD activity는 신장에서 대조구에 비해 유의적인 증가를 나타내었다. 조직 내 균수 변화를 살펴보면 대조구에 비해 모든 시험구에서 세균 수가 줄어들었다. 시험구의 생존율은 *S. iniae* BS10과 *E. tarda* KE-1의 공격에 대하여 0.25 g/L 침지 시험구의 상대생존율이 가장 높았다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 마늘 추출물과 착즙액이 넙치에 면역능 향상과 어류 질병에 저항성 증강에 효과가 있는 것으로 사료된다.

VI. 감사의 글

이 논문이 완성될 수 있도록 많은 조언과 격려를 해 주신 박수일 교수님께 감사의 말씀을 올립니다. 항상 바쁘신 중에도 저의 논문을 지도해주신 정준기 교수님과 허민도 교수님께 감사드립니다. 그리고 항상 관심 가져 주신 정현도 교수님, 김기홍 교수님, 강주찬 교수님께 감사드립니다.

논문을 쓰는 동안 실험에 있어 전반적인 조언과 지도를 해주신 우승호 선배님께 감사드리며, 실험을 하는 동안 많은 도움을 주신 어병예방학 실험실원 김이경 선배님, 원경미 선배님, 엄용환 학형님, 하수진 학형님, 손새봄, 서미영, 김지원, 황분옥, 김전진, 김민철, 오상현 후배님께 감사드립니다. 또한 어병예방학 실험실에서 같이 생활하면서 많은 가르침을 주셨던 이덕찬, 김도형, 김수미, 최광진, 김은전, 황성돈 선배님께 감사드리며, 실험실 생활하면서 많은 도움을 주었던 정영은, 김수현, 한상윤, 박효진, 조교회, 최민지, 강예지 후배님께도 감사드립니다.

그리고 학교 생활을 하면서 정신적으로 많이 지쳐있을 때 많은 격려와 힘을 주신 박봉환 선배님, 이우승 학형님, 오현창, 조기택, 김진수, 최강, 천은오, 박창준, 이석진 후배님께도 감사드리며 그 외 수산생명의학과 선후배님께도 감사드립니다.

항상 말썽만 부리는 하나밖에 없는 아들이지만 언제나 저의 편에서 제 이야기를 들어주시며, 추운 곳에서도 쉬는 날 없이 묵묵히 일하시며 제 뒷바라지 해 주신 아버지, 어머니께 진심으로 존경과 감사의 말씀을 올립니다.

VII. 참고문헌

- Al-Delaimy, K.S. and Barakat, M.M.. (1971). Antimicrobial and preservative activity of garlic on fresh ground camel meat-1. Effect of fresh ground garlic segments. J. Sci. Food. Agric., 22, 96-98.
- Ankri, S., Miron, T. and Rabinkov, M. (1997). Allicin from garlic strongly inhibits cysteine proteinases and cytopathic effects of *Entamoeba histolytica*. Antimicrob. Agents Chemother., 41, 2286-2288.
- Byun, P.H., Jung, J.H., Kim, W.J. and Yoon, S.K. (2001). Effects of garlic addition on lipid oxidation of ground pork during storage. J. Korean. Food. Cookery. Sci., 17, 117-122.
- Castro, R., Couso, N., Obach, A. and Lamas, J. (1999). Effect of different β -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. Fish Shellfish Immunol., 9, 529-541.
- Cavallito, C.J., Buck, S.J. and Suter, C.M. (1944). Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. J. Amer. Chem. Soc., 66, 1950-1951.
- Cavallito, C.J. and Bailey, J.H. (1944). Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. II. Determination of the chemical structure. J. Amer. Chem. Soc., 66, 1952-1954.

- Chang, C.F., Su, M.S., Chen, H.Y. and Liao, I.C. (2003). Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. Fish Shellfish Immunol., 15, 297-310.
- Chen, D. and Ainsworth, A.J. (1992). Glucan administration potentiates immune defense mechanism of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. J. Fish Dis., 15, 295-304.
- Chi, M.S., Koh, E.T. and Stewart, T.J. (1982). Effect of garlic on lipid metabolism in rats fed cholesterol or lard. J. Nutr., 112, 241-248.
- Choi, M.S., Park, S.W. and Park, K.H. (2005). Effect of red ginseng extract on immune function of israeli carp, *Cyprinus carpio*. J. Fish Pathol., 18(3), 277-285.
- Chrisyapita, D., Divyagnaneswari, M. and Dinakaran, M.R. (2007). Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. Fish Shellfish Immunol., 23, 840-852.
- Chun, H.J. (1987). Function of effective components in garlic and their pharmacological effect. J. Nutr. Mange., 1, 67-75.
- Dalal, J.H., Joseph, H.M. and Dalal, Y. (1987). Antioxidant activity of onion and garlic juices in stored cooked ground lamb. J. Food., 50, 411-413.
- Delaha, E.C. and Garagusi, V.F. (1985). Inhibition of mycobacteria by garlic extract (*Allium sativum*). Antimicrob. Agents Chemother., 27, 485-486.
- Deshpande, R.G., Khan, M.B., Bhat, D.A. and Navalkar, R.G. (1993).

- Inhibition of *Mycobacterium avium* complex isolates from AIDS patients by garlic (*Allium sativum*). J. Antimicrob. Chemother., 32, 623-626.
- Dina, A.K., Bhathena, Z.P., Sahu, N.P, Jha, A. and Mukherjee, S.C. (2007). Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. Fish Shellfish Immunol., 22, 477-486
- Divyagnaneswari, M., Christyapita, D. and Dinakaran, M.R. (2007). Enhancement of nonspecific immunity and disease resistance in *Oreochromis mossambicus* by *Solanum trilobatum* leaf fractions. Fish Shellfish Immunol, 23, 249-259.
- Ellis, A.E. (1999). Immunity to bacteria in fish. Fish Shellfish Immunol., 9, 291-308.
- Engstad, R.E., Robertson, B. and Frivold, E. (1992). Yeast glucan induce increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish Shellfish Immunol., 2, 287-297.
- Eo, J. and Lee, K.J. (2008). Effect of dietary ascorbic acid on growth and non-specific immune responses of tiger puffer, *Takifugu rubripes*. Fish Shellfish Immunol., 25, 611-616.
- Fietta, A., Fortunato, A., Santors, C.D., Grassi, F. and Siccardi, A.G. (1981). Potentiation by target multiplicity and modulation by serum factors. Infect. Immun., 33, 704-709.
- Ghannoum, M.A. (1988). Studies on the anticandidal mode of action of *Allium sativum* (garlic). J. Gen. Microbiol., 134, 2917-2924.

- Jeney, G. and Anderson, D.P. (1993). Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 116, 315-329.
- Jung, S.H., Lee, J.S., Han, H.K., Jun, C.Y. and Lee, H.Y. (2002). Effects of medical herb extract on non specific immune response, haematology and disease resistance on Olive flounder, *Paralichthys olivaceus* by oral administration. *J. F. Pathol.*, 15(1), 25-35.
- Grinde, B. (1989). Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. *J. Fish Dis.*, 12, 95-104.
- Hong, Y.S., Ham, Y.A., Choi, J.H., and Kim, J. (2000). Effects of allylsulfur compounds and garlic extract on the expression of Bcl-2, Bax, and p53 in non small cell lung cancer cell lines. *Exp. Mol. Med.*, 32, 127-134.
- Hwang, W.I., Lee, S.D., Son, H.S., Baik, N.G. and Ji, R.H. (1990). Effect of fresh garlic extract on the tumor cell growth and immunopotentiating activity. *J. Korean. Soc. Food. Nutr.*, 19, 494-508.
- Iida, T. and Wakabayashi, H. (1983). Bactericidal reaction by the alternative pathway of fish complement. *Fish. Pathol.*, 18(2), 77-83
- Jolles, P. and Jolles, J. (1984). What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Mol. Cell. Biochem.*, 63, 165-189.
- Jørgensen, J.B., Lunde, H. and Robertsen, B. (1993a). Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan

- in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J. Fish Dis., 16, 313-325.
- Jørgensen, J.B., Sharp, G.J.E., Secombes, C.J. and Robertsen, B. (1993b). Effect of a yeast-cell wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. Fish Shellfish Immunol., 3, 267-277.
- Kajita, Y., Sakai, M., Kobayashi, M. and Kawaushi, H. (1992). Enhancement of non-specific cytotoxic activity of leucocytes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* injected with growth hormone. Fish Shellfish Immunol., 2, 155-157.
- Kamanna, V.S. and Chandrasekhara, N. (1984). Hypocholesterolemic activity of different fractions of garlic. Indian J. Med. Res., 79, 580-583.
- Kannar, D., Wattannapenpaiboon, N., Savige, G.S. and Wahlqvist, M.L. (2001) Hypocholesterolemic effect of an entericcoated garlic supplement. J. Amer. Coll. Nutr., 20, 225-231.
- Kawakami, H., Hiratsuka, M. and Dosako, S. (1998). Effects of iron-saturated lactoferrin on iron absorption. Agri. Biol. Chem., 52, 903-908.
- Kitao, T., Yoshida, T., Anderson, D.P., Dixon, O.W. and Blanch, A. (1987). Immuno-stimulation of antibody-producing cells and humoral antibody to fish bacterins by a biological response modifier. J. Fish Biol., 31, 87-91.
- Kim, K.H., Hwang, Y.J. and Bai, S.C. (1998). Enhancement of chemiluminescent response of phagocytic cells from juvenile Rockfish, *Sebastes schlegeli*, by oral administration of levamisole. J. Fish Sci. Tech., 1, 42-47.

- Kim, K.M., Chun, S.B., Koo, M.S., Choi, W.J., Kim, T.W., Kwon, Y.G., Chung, H.T., Timothy, R.B. and Kim, Y.M. (2001). Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine. *Free Radic. Biol. Med.*, 30, 747-756.
- Kodama, H., Mukamoto, N., Baba, T. and Mule, D.M. (1994). Macrophage-colony stimulating activity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* serum. (in) J.S. Stolen and T.C. Fletcher(eds), *Modulators of fish Immune Responses*, Vol. 1, SOS Publication, Fair Haven, NJ, 59-66.
- Kurita, N., Miyaji, M., Kurane, R. and Takahara, Y. (1981). Antifungal activity of components of essential oils. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 945-952.
- Mayeux, P.R., Agrawal, K.C., Tou, J.S.H., King, B.T., Lippton, H.L., Hyman, A.L., Kadowiz, P.J. and McNamara, D.B. (1998). The pharmacological effects of allicin, a constituent of garlic oil. *Agents Actions*, 25, 182-190.
- Miles, A.A. and Misra, S.S. (1938). The estimate of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg.*, 38, 873-885.
- Misra, C.K., Das, B.K., Mukherjee, S.C. and Meher, P.K. (2006). The immunomodulatory effects of tuftsin on the non-specific immune system of indian major carp, *Labeo rohita*. *Fish Shellfish Immunol.*, 20, 728-738.
- Nakagawa, H., Tsuta, K., Kiuchi, K., Senzaki, H., Tanaka, K. and Hioki, A. (2001). Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human

- breast cancer cell lines. *Carcinogenesis*, 22, 891-897
- O'Gara, E.A., Hill, D.J. and Maslin, D.J. (2001). Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2269-2273.
- Ordas, M.C., Novoa, B. and Figueras, A. (2000). Modulation of the chemiluminescence response of mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 10, 611-622.
- Raa, J., Tørstad, G., Engstad, R. and Robertsen, B. (1992). The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. (in) M. Sharif, R. P. Subasighe and Arthur, J. R. (eds.), *Dis. Asian A. Vol. 1. Fish Health Section*, Asian Fish. Soc. Manila, Philippines, 39-50.
- Rain, R.C. (1982). Effect of garlic on serum lipids-coagulability and fibrinolytic activity of blood. *Am. J. Clin. Nutr.*, 112, 241-248.
- Raikhakhwada, D., Pal, A.K., Bhathena, Z.P., Sahu, N.P., Jha, A. and Mukherjee, S.C. (2007). Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish Shellfish Immunol.*, 21, 346-356.
- Saito, Y., Kimura Y. and Sakamoto, T. (1976). Studies on the antioxidative properties of spices III. The antioxidative effects of petroleum ether soluble and insoluble fraction from spices. *Eiyo. To. Shokuryo.*, 29, 505-512.
- Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172, 63-92.
- Schffrin, E.J., Brassart, D., Servin, A.L., Rochat, F. and Donnet-Hughes,

- A. (1997). Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am. J. Clin. Nutr.*, 66, 515-520.
- Schulz, V. (1998). Garlic. In: Hansel, R., Tayler, V.E. (Eds.), *Rational Phytotherapy. A Physicians' Guide to Herbal Medicine*. 3rd ed. Springer, Berlin, 107-125.
- Schwartz, I.F., HersHKovitz, R., Iaina, A., Gnessin, E., Wollman, Y., Chenichowski, T., Blum, M., Levo, Y. and Schwartz, D. (2002). Garlic attenuates nitric oxide production in rat cardiac myocytes through inhibition of inducible nitric oxide synthase and the arginine transporter CAT-2 (cationic amino acid transporter-2). *Clin. Sci.*, 102, 487-493.
- Secombes, C.J. and Fletcher, T.C. (1992). The role of phagocytes in protective mechanism of fish, *Annu. Rev. Fish Dis.*, 2, 53-71.
- Sharma, K.K., Sharma, A.L., Dwivedi, K.K. and Sharma, P.K. (1976). Effect of raw and boiled garlic on blood cholesterol in butter fat lipaemia. *Ind. J. Nutr. Dietet.*, 13, 7-10.
- Sharp, G.J.E. and Secombes, C.J. (1993). The role of reactive oxygen species in the killing of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* by rainbow trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol.*, 3, 119-129.
- Sheen, L.Y., Li, C.K., Sheu, S.F., Meng, R.H.C. and Tsai, S.J. (1996). Effect of the active principle of garlic-diallyl sulfide- on cell viability, detoxification capability and the antioxidation system of primary rat hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 971-978.

- Siwicki, A.K., Anderson, D.P. and Dixon, O.W. (1990). *In vitro* immunostimulation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spleen cells with lavamisole. Dev. Comp. Immunol., 14, 231-237.
- Sodimu, O., Joseph, P.K. and Augusti, K.T. (1984). Certain biochemical effects of garlic oil on rats maintained on high fat-high cholesterol diet. Experientia, 40, 78-80.
- Soffar, S.A. and Mokhtar, G.M. (1991). Evaluation of the antiparasitic effect of aqueous garlic (*Allium sativum*) extract in Hymenolepiasis nana and giardiasis. J. Egypt. Soc. Parasitol., 21, 497-502.
- Solem, S.T., Jørgensen, J.B. and Robertsen, B. (1995). Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon *Salmo salar* L. macrophages by lipopolysaccharide. Fish Shellfish Immunol., 5, 475-491.
- Song, K. and Milner, J.A. (1999). Heating garlic inhibits its ability to suppress 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene-induced DNA adduct formation in rat mammary tissue. Nutrition, 129, 336-342.
- Song, Y.L. and Hsieh, Y.T. (1994) Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. Dev. Comp. Immunol., 18, 201-209.
- Sterling, S.J. and Eagling, R.D., (2001). Agronomic and allicin yield of Australian grown garlic (*Allium sativum*). Acta. Hort., 555, 63 - 73.
- Stoll, A. and Seebeck, E. (1949). Über den enzymatischen abbau des alliins und die eigenschaften der allinase. Helv. Chem. Acta., 32, 197-203.

- Uchida, Y., Takehaski, T. and Sato, N. (1976). The characteristics of the antibacterial activity of garlic. Japan J. Antibiot., 84, 111547-111551.
- Villamil, L., Figueras, A. and Novoa, B. (2003). Immunomodulatory effects of nisin in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Fish Shellfish Immunol., 14, 157-69.
- Wu, C.C., Chung, J.G., Tsai, S.J., Yang, J.H. and Sheen, L.Y. (2004). Differential effects of allyl sulfides from garlic essential oil on cell cycle regulation in human liver tumor cells. Food and Chemical Toxicology, 42, 1937-1947.
- Yamata, Y. and Azuma, K. (1977). Evaluation of the in vitro antifungal activity of allicin. Antimicrob. Agents Chemother., 11, 743-746.
- Yano, T., Mangindaan, R.E.P. and Matsuyama, H. (1991). Enhancement of the resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by some β -1,3 glucans. Nippon Suisan Gakkaishi, 55, 1815-1819.
- Yeh, S.P., Chang, C.A., Chang, C.Y., Liu, C.H. and Cheng, W. (2008). Dietary sodium alginate administration affects fingerling growth and resistance to *Streptococcus* sp. and iridovirus, and juvenile non-specific immune responses of the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Fish Shellfish Immunol., 25, 19-27.
- 김진우, 박수일, 전세규 (1992). 양식 넙치로부터의 lysozyme 정제와 어류 병원성 세균에 대한 정균 작용. 한국어병학회지, 5(2), 87-92
- 농림수산식품부 (2008). 2008년도 농림수산식품 주요통계. 한라인쇄.
- 우승호 (2006). 해수 양식 어류에서 분리된 연쇄상구균의 종류와 병원성.

한국어병학회지, 19(1), 17-33.

이덕찬 (2005). *Edwardsiella tarda* extracellular products (ECPs)의 인위
투여에 따른 넙치, *Paralichthys olivaceus*의 생체 반응. 한국어병학회
지, 18(3), 215-225.

정승희, 이주석, 한형균, 전창영, 이해영 (2002). 생약재 첨가 사료를 투여한
넙치 (*paralichthys olivaceus*)의 비특이적 면역반응, 혈액성분 및 항병
력 효과. 한국 어병학회지, 15(2), 25-35.

전희정, 백재은 (1997). 처리법을 달리한 마늘 첨가식이 자발성 고혈압 쥐
의 혈액에 미치는 영향. 한국 식품영양과학회지, 26, 103-108.

