



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

마늘첨가 사료가 넙치(*Paralichthys
olivaceus*)의 비특이적 면역반응에
미치는 영향

濟州大學校 大學院

水産生命醫學科

金承鐸

2012年 2月

마늘첨가 사료가 넙치(*Paralichthys
olivaceus*)의 비특이적 면역반응에
미치는 영향

指導教授 鄭 竣 範

金 承 鐸

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2012 年 2 月

左 旻 昔의 理學碩士 學位論文을 認准함


審査委員長 허문수 (印)

委 員 여인규 (印)

委 員 정준범 (印)

濟州大學校 大學院

2012 年 2 月



Effects of Dietary Supplementation of Garlic
on Non-Specific Immune Responses of Olive
Flounder(*Paralichthys olivaceus*)

Seung-Min Kim

(Supervised by professor Joon-Bum Jeung)

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

Department of Aquatic Marine life Science
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

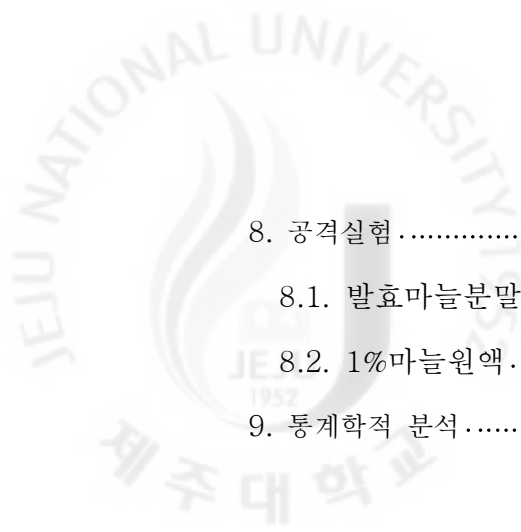
February, 2012





목 차

목 차.....	i
Abstract.....	iii
I. 서 론.....	1
II. 재료 및 방법	5
1. 사료 제작	5
1.1. 발효마늘분말 제조.....	5
1.2. 1%마늘원액 제조.....	5
2. 실험어 및 사육관리.....	6
3. Cell line 및 Virus.....	7
4. Bateria 균주.....	8
5. 항균제 감수성 검사법.....	8
5.1. 약제감수성 시험.....	8
5.2. 최소억제농도 측정.....	8
6. 혈액 채취와 분석.....	9
7. 면역학적 분석.....	9
7.1. 체표 점액 라이소자임.....	9
7.2. 혈청 라이소자임 분석.....	10
7.3. 대식세포 활성 분석.....	10



8. 공격실험	11
8.1. 발효마늘분말	11
8.2. 1%마늘원액	11
9. 통계학적 분석	12
Ⅲ. 결 과	13
1. 항균제 감수성 검사법	13
1.1. 약제감수성 시험	13
1.2. 최소억제농도 측정	17
2. 혈액분석	17
2.1. 발효마늘분말 혈액분석	17
2.2. 1%마늘원액 면역분석	20
3. 면역학적 분석	23
3.1. 발효마늘분말 면역분석	23
3.2. 1%마늘원액 면역분석	25
4. 공격실험	27
4.1. 발효마늘분말 공격실험	27
4.2. 1%마늘원액 공격실험	33
Ⅳ. 고 찰	40
Ⅴ. 요약	49
Ⅵ. 감사의 글	50
Ⅶ. 참고 문헌	52



Abstract

The objective of this experimental study is to determine the effects of fermented garlic Powder(0%, 0.5, 1%, 2%) in the feed on the drug sensitivity, MIC, blood analysis, nonspecific immune responses resistance to fish disease (VHS, *V. anguillarum*, *S. iniae*, *E. tarda*). The amount of fermented garlic Powder was gradually increased in the feed and were analysed for 5 week. The effect was observed at 1% garlic undiluted in the feed, thus the fish were fed for 4 week with 1% of garlic undiluted in the feed, and was performed. For the experiment of challenge property, the disease resistance of fishes was determined at the time of finishing fermented garlic Powder and 1% garlic undiluted feeding through intraperitoneal injection of three bacterial suspensions and one virus suspension (1 ml each). The fermented garlic Powder and 1% garlic undiluted were serially diluted to estimated drug sensitivity and MIC, revealing that fermented garlic Powder had no effect 1% garlic undiluted was effective on the fish-borne bacteria.

Hematocrit, glucose, total protein, lysozyme, and the macrophage activity significantly high activities were observed in fermented garlic Powder 1% group and garlic undiluted 1% group compared to the control group.

The cumulative death rate showed decreased trend at all attacking experiments except the fermented garlic Powder of *E. tarda* than that of control group. Seeing the result of this study, it is strongly suggested that all additives improve disease resistance and nonspecific immune response, and that it is strongly suggested that all additives improve disease resistance and nonspecific immune response, and that 1% garlic undiluted has more effect than fermented garlic Powder.



I. 서론

지난 10년간 양식산업은 급격히 증가하였고 식량산업으로써 그 가치가 높아지고 있으며, 현재 양식 어류에서 발생하는 세균성 질병의 치료를 위하여 많은 종류의 항생제가 사용되며, 특히 국내 양식 산업에 있어서 생산성 향상을 위한 밀식 및 과다한 사료 투여 등으로 인한 양식 환경의 악화, 내병성의 저하로 인한 감염병의 증대로 다양한 어류 질병의 발생이 증가함에 따라 항생제의 사용 빈도수도 점차 증가하고 있는 추세이다. 그 결과 항생제에 대한 내성균이 식용 어류에서의 항생제 잔류에 따른 사회적 문제가 크게 대두되면서 소비자의 불신으로까지 이어져 수산물에 대한 소비를 위축시키는 요인이 되고 있다. 따라서 최근 많은 국가에서 항생제 사용을 금지하고 있으며, 그 사용량과 식품에서의 잔류허용량 규제가 더욱 강화되어지고, 최대잔류허용기준(MRL, maximum residue level)을 설정하여 규제하고 있다. 이로 인한 항생제 대체방안으로 부작용이 없는 천연물질을 사료첨가제로 개발하여 양식어류의 면역력 및 건강증진시키기 위한 양식산업의 기능적 브랜드화가 시도되고 있다(Kim et al., 2006). 마늘, *Allium sativum*은 전 세계에 분포하는 식물로 식용으로 사용되지만 수천년 전부터 상처, 감염, 인플루엔자 그리고 궤양과 같은 여러 가지 질병 치료약으로도 인간에게 사용하였다. 세균, 곰팡이, 원생동물 그리고 바이러스 같은 여러 미생물들은 마쇄된 마늘에 감수성을 나타내었다 (Cavallito & Bailey, 1944; Cavallito et al., 1944; Hong et al., 2000; Nakagawa et al., 2001; Wu et al., 2004). 또한 마늘의 효능으로는 면역증진효과(Mun et al., 2004), 항산화효과(Shin et al., 2009; Chung

and Kim, 2008), 항균효과(Wi,2003; Kim et al., 2004; Kim et al., 2005), 항암작용 (Shon et al., 2001; Mun et al., 2004; Kim et al., 2005; Park et al., 2005) 등이 보고 되었다.

우리나라의 대표적 양식 어종인 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 고밀도 양식으로 인한 여러 질병의 발생으로 경제적 손실을 비롯한 많은 어려움을 겪고 있다. 넙치 양식산업에서 대표적인 주요 바이러스와 세균성 질병에는 Viral Hemorrhagic Septicemia Virus(VHSV), *Vibrio anguillarum*, *Streptococcus iniae* 및 *Edwardsiella tarda* 등이 있다(Edward, 2000).

2005년부터 2006년사이 우리나라 양식 넙치에서 분리된 바이러스와 세균성 질병을 조사한 결과 VHSV 63.6% *Vibro* spp. 42.1%, *Streptococcus* spp. 16.9%, *Edwardsiella tarda* 12.3%의 검출률을 보였다.

VHSV는 주로 유럽의 담수 무지개송어(*On-corhynchus mykiss*)에 심각한 바이러스성 질병이었지만, 담수어류 뿐만아니라 해산어류에도 감염을 일으켰으며 (Mortensen et al., Smail,1999), 자연산 대구(*Gadus morlwa*), 청어(*Clupea harengus*)와 양식된 터봇 (*Scophthalmus maximus*) 등 다양한 해산어류에서도 VHSV가 분리되었다(Schlotfeldt et al., 1991; Ross et al., 1994; Mortenson et al., 1999; Meyers et al., 1999). 최근에는 일본과 우리나라 양식된 넙치에서 VHS에 의한 대량 폐사가 발생하였다 (Isshiki et al., 2001). Takano et al., (2000,2001)은 자연산 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서 MABV와 VHSV 분리를 보고하였다. 따라서 병원성 바이러스인 VHSV가 넓은 숙주역을 가지고 있으며 유럽 뿐만 아니라 아시아의 다양한 해산어류에 발병의 가능성을 내재하고 있다.

Vibrio 원인균을 포함하는 *Vibrio*속은 최근까지 전 세계적으로 약 65종이 분리되어 보고되고 있으며 계속적으로 새로운 종이 보고되어 그 수가 증가하는 추세이다 (Thompson et al., 2004). *Vibrio*속은 음성, 호염기성 간균으로 해수, 기수, 담수 지역에 널리 분포하는 상재 세균으로서 어류, 갑각류 및 연체동물에 이르는 다양한 수산 생물에 감염을 일으킨다(Kim et al., 2005). 기회 감염성 세균으로서 *Vibrio*는 해수 어류의 정상 세균 총을 이루기도 하지만 때로는 질병의 원인체로서 수산 생물의 대량 폐사를 유발시키기도 한다.

Streptococcus 원인균은 *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus* sp. 등으로 알려져 있다. *Streptococcus*은 담수, 기수, 해수 및 양식장의 저질에 상재하는 세균으로(Kitao, 1979) 수중 원인균이 질병을 유발할 정도로 대량 증식하였을 때 양식 어류의 상처를 통해 감염되거나 산패된 생사료를 투여할 경우 소화관을 통해서 감염된다 (Rasheed and Plumb, 1984; Minami, 1979; Nagatsugawa, 1983). *Streptococcus iniae* 인위 감염 실험에서 해수에 침지시키거나 사료에 투여할 경우에도 감염이 일어났다 (Nguyen, 2001). 따라서 어류의 방어력을 저하시키는 스트레스 요인 즉, 나쁜 사육 환경과 저조한 영양 상태와 감염된 사료 투여가 연쇄구균증의 발병에 영향을 미치는 것으로 보고 있다.

*Edwardsiellosis*의 원인균인 *Edwardsiella tarda*는 잉어(Sae-Dui et al., 1977), 뱀장어(Horiuohi et al., 1980) 참돔(Nakatsugawa, 1983), 넙치(Bang et al., 1992) 등 여러 가지 경골어류에 감염하여 질병을 일으킨다. 감염시 일반적인 임상 증상으로는 복수에 의한 복부팽만, 복부괴양, 안구백탁, 체색흑화, 탈장, 항문 돌출, 그

리고 간, 신장, 비장이나 아가미에 작은 흰색결절 형성 등으로 알려져있다 (Kubota et al., 1981). *E. tarda*는 어떤 stress 조건하에서 발병하는 병원체로서 수중이나 정상어의 장내에 상재해 있을 수 있으므로 양식 어류에 대한 감염의 기회도 항상 존재한다고 볼 수 있다.

본 연구에서는 마늘을 효과적으로 이용하기 위해서 착즙하고 남은 마늘고형물 잔사를 고온발효균주를 이용하여 발효시켰다. 발효마늘분말이 가지는 다양한 약리효능이 넙치의 면역증강 및 주요 어병세균 및 바이러스에 대한 저항성을 높일 수 있을 것이라는 가설을 세웠고, 마늘분말을 사료 내 농도별로 첨가하여 어류의 면역력, 혈액성분 및 주요 어병세균과 바이러스에 대한 질병저항성에 미치는 영향을 조사하였고, 그 중, 발효마늘분말의 1%가 항병력이 증가된 것으로 사료되어 마늘원액 1%을 MP(moist pellet)에 흡착시켜 제조하여 4주에 걸쳐 주 마다 비특이적 면역력 및 혈액분석을 하였고, 어병균에 대한 질병저항성에 미치는 영향을 조사하였다.



II. 재료 및 방법

1. 사료 제작

1.1. 발효마늘분말 제조

발효마늘분말은 제주특별자치도 제주시 오등동에 위치한 아쿠아그릭텍(주)에서 자체 개발하여 제조한 것을 구입하여 사용하였다. 제조방법은 다음과 같다. 우선 서귀포시 대정읍에서 수확된 마늘을 구입하여 깨끗하게 세척한 후 착즙하였다. 그 후 착즙하고 남은 마늘고형물 잔사를 바실러스계통(*Bacillus* spp.)의 고온발효 균주를 이용하여 고온발효시켜 마늘발효분말을 제조하였다. 본 연구에 사용된 발효마늘분말의 일반조성은 Table 1에 나타내었다.

1.2. 1% 마늘원액 제조

1% 마늘원액 제조는 서귀포시 대정읍에서 수확된 마늘을 구입하여 깨끗하게 세척한 후 착즙하여 멸균증류수로 섞어 1% 마늘원액을 제조 후 시중에 판매중인 MP(moist pellet)에 흡착 시켰다. 본 연구에 사용된 MP(moist pellet) 사료의 일반조성은 Table 2에 나타내었다.

Table 1. Proximate composition of fermentation garlic powder.

Compositon	Content
Dry matter (%)	88.3
Crude protein (% , DM)	23.2
Cruded lipid (% , DM)	6.3
Crude ash (% , DM)	2.8
Carbohydrate	12.4

¹ Carohydrate = 100-(% moisture +% protein + % lipid + % ash).

2. 실험어 및 사육관리

이번 실험에 사용된 실험어류는 제주도내 양식장에서 구입하여 제주대학교 소속 해양과환경연구소로 운송되어, 4주 동안 시판 배합사료를 공급하면서 실험환경에 적응할 수 있도록 순치시킨 후 사료공급실험에 사용되었다.

예비사육 후 넙치 치어 (초기 평균체장 및 무게:17.5±0.85cm , 62±7.17g)는 총 12개의 110L 원형플라스틱 수조에 각 수조당 30마리씩 무작위로 선택되어 배치되었다. 사육수는 여과해수를 사용하여 2~3L/min의 유수량이 공급되도록 조절하였고, 모든 실험수조에 용존산소 유지와 원활한 사육수 순환을 위하여 에어스톤을 설치하였다. 광주기는 형광등을 이용하여 12L:12D 조건으로 유지되었고, 전실험기간 동안 평균수온은 16°C ~ 18°C 범위로 넙치의 적정수온에 미치지 않은 저수온기로 자연수온에 의존하였다. 실험사료는 1일 2회 (09:00와 16:00시)에 나눠서 어체중의 2~3%로 제한급이를 하였다. 발효마늘 사료공급실험은 5주간 수행

되었으며, 1%마늘원액 사료공급실험은 4주간 수행되었다.

Table 2. General composition of MP(moist pellet) feed.

Compositon	Content
Crude protein (% , DM)	47
Cruded lipid (% , DM)	6
Crude ash (% , DM)	16
Crude fiber (% ,DM)	5
Calcium (% ,DM)	1
Phosphorus (% ,DM)	2.7

3. cell line 및 Virus

병어의 조직 마쇄 여과액을 EPC cell line에 접종한 후 15°C에서 3일간 배양하여 CPE를 확인하였다. 세포 배양액은 10%Fetal Bovine Serum (FBS), 1% antibiotic-antimy-cotic (Gibco BRL)을 첨가한 Eagle's minimum essential medium (EMEM)를 사용하였다. 바이러스의 계대는 low multiplicity of infection (MOI, <0.01)으로 수행하였고 모든 실험에는 3회 이하로 계대한 바이러스액을 사용하였다.

4. Bateria 균주

병원성 세균으로는 3종의 *Vibrio anguillarum* (KCTC-2711), *Streptococcus iniae* (KCTC-3651) 및 *Edwardsiella tarda* (KCTC03657)를 1% NaCl 첨가 Tryptic soy Agar (TSA, Difco) 배지에 25°C, 24시간 배양한 후 시험에 사용하였다.

5. 항균제 감수성 검사법

5.1. 약제감수성 시험.

약제감수성 시험은 agar spotted method를 이용하여 디스크 확산법 (disc diffusion method)을 다음과 같이 실시하였다. 마늘을 추출하여 ½씩 단계희석시킨후, 50 μ l paper disk 에 떨어뜨려 자연건조 시켰다. 또한 마늘발효분말 용액을 이용하여 앞서 말한 방법으로 실시하였다. 병원성 세균 3종 *Vibrio anguillarum* (KCTC-2711), *Streptococcus iniae* (KCTC3651), *Edwardsiella tarda* (KCTC-3657)를 1x10⁵ cfu/ml의 농도로 희석시킨 후 저지환 를 확인 하였고, 마늘의 감수성을 비교 분석하기 위해서 항생제 6종류 (Penicillin, Tetracycline, Amoxicillin, Erythromycin, Rifampin, Ciploxacin) 를 테스트 하였다.

5.2. 최소억제농도(MIC)측정

액체배지에 2배수씩 연속적으로 희석한 시료를 가하여 최종균수가 1x10⁵ cfu/ml이 되도록 조절하여 25°C에서 24시간 동안 배양하였다. 균의 증식여부는 육안으로 배양액의 혼탁을 확인하였다.

6. 혈액 채취와 분석

혈액은 heparin 처리 주사기 2종(1 mL, 3 mL)을 사용하여 포획 후 마취하지 않고 미부혈관에서 30초 이내에 채취하였다. 채취한 전혈은 빙냉상태를 유지하면서 자동혈액분석기(SEAC H5.m, Italy)로 Ht를 분석하였다. 나머지 혈액을 원심분리(6,500 rpm, 5분)하여 얻은 혈장은 분석 전까지 -74°C에 보관하였다. 헤모글로빈, 중성지방, 콜레스테롤 및 HDL-cholesterol 분석은 각각의 시판 시약과 반응시킨 후 혈액생화학분석기 (Express plus system, Bayer, USA)를 이용하여 분석하였다. 중성지질, 콜레스테롤은 Kinetic 방법으로 분석되었다.

7. 면역학적 분석

7.1. 체표 점액 라이소자임

체표표면의 라이소자임 활성은 Takahashi et al. (1986)의 방법에 따라 *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, USA) 균 현탁액에 대한 흡광도의 감소량을 측정함으로써 평가하였다. 먼저 시료의 2배의 0.1M PBS(7.2)를 첨가한 다음 점액을 균질화 시킨 후, 원심분리 (10,000 ×g, 4°C, 20분)한 다음 상정액을 용균 활성 측정용 시료로 사용하였다.

7.2. 혈청 라이소자임 분석

혈청 내 lysozyme의 활성은 Yeh et al. (2008)의 분석방법을 바탕으로 분석하였다. 먼저 0.05 M sodium phosphate acid buffer (pH 6.2)에 동결 건조된 *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, USA)를 첨가하여 0.2mg/ml 농도의 현탁액을 만든다. 현탁액 200 μ l를 96-well plates에 분주하고, 어류에서 분리한 혈청 10 μ l를 혼합시킨 후, microplate reader(Thermo, USA)를 이용하여 530nm에서 1분과 5분에 흡광도 값을 측정하였다. Lysozyme의 활성단위는 분당 0.001의 흡광도 감소를 나타내는 양으로 정의하였다.

7.3. 대식세포 활성 분석

혈액내의 대식세포 활성은 Kumari and sahu (2005)의 분석방법을 이용하여 호흡폭발 동안의 호중구(Neutrophils)에 의한 oxidative radical 생성량을 측정하였는데 분석방법은 다음과 같다. 우선 혈액(전혈)과 NBT solution (0.2%)을 1:1의 비율로 각각 50 μ l를 glass tube에 옮긴 후, formazon 생성을 감소시키기 위해 dimethylformamide를 1ml씩 넣는다. 그 후 2,000 X g에서 5분 동안 원심분리를 하여 최종적으로 상층액을 취한 후, NBT의 감소되는 범위를 분광광도계 (Genesys 10 UV, Rochester, NY, USA)를 사용하여 최적의 흡광도인 540nm에서 측정하였다. Blank는 dimethylformamide를 사용하였다.

8. 공격실험

8.1. 발효마늘분말

5주간의 사료공급 종료 후, 발효마늘분말을 첨가한 넙치의 항병력에 미치는 영향을 조사하기 위해 혈액샘플을 하고 남은 어류를 대상으로 바이러스와 세균성 질병 VHSV은 PBS로 10^5 TCID시켜 사용하였고, *V. anguillarum*, *S. iniae* 및 *E. tarda*은 각각 PBS로 1×10^5 cfu/ml이 되도록 현탁하여 복강주사를 통해 공격실험을 실시하였다. 발효마늘분말을 첨가한 사료를 사육 후 실험구 당 넙치 13마리씩을 실험구로 사용하였고, 그 중 10마리는 폐사율을 관찰하였고, 그 중 3마리씩 1일째 혈액을 채취하여 비특이적인 면역반응인 라이소자임 활성을 관찰하였으며, VHSV은 18°C, 나머지 그룹은 24°C로 수온을 유지하였으며, 23일간 폐사를 관찰하였다.

8.2 1%마늘원액

4주간의 사료공급 종료 후, 1%의 마늘원액을 첨가한 넙치의 항병력에 미치는 영향을 조사하기 위해 혈액샘플을 하고 남은 어류를 대상으로 바이러스와 세균성 질병 VHSV은 PBS로 10^5 TCID 희석시켜 사용하였고, *V. anguillarum*, *S. iniae*, 1×10^5 cfu/ml, *E. tarda*은 1×10^5 cfu/ml이 되도록 현탁하여 복강주사를 통해 공격실험을 실시하였다. 1%마늘원액을 첨가한 사료를 사육 후 실험구 당 넙치 21마리씩을 실험구로 사용하였고, 그 중 12마리는 폐사율을 관찰하였고, 9마리는 1일째, 3일째 3마리씩 혈액을 채취하였으며, 이전실험에서는 비특이적인 면역반응 실험으로써 혈청,점액 라이소자임방법을 사용하였는데, 이번실험에서는 비특이적

인 면역반응을 확인하는 또 다른 방법으로써 NBT activity을 추가하여 비특이적인 면역반응 실험을 관찰하였으며, VHSV은 18°C, 나머지 그룹은 24°C로 수온을 유지하였으며, 2주간 폐사를 관찰하였다.

9. 통계학적 분석

실험사료군의 배치는 완전확률계획법(Completely randomized design)에 따라 실시하였고, 분석결과는 SPSS (Statistical package for the social sciences, Version 12.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석되었다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's multiple test($P \leq 0.05$)로 비교되었다.

III. 결 과

1. 항균제 감수성 검사법

1.1. 약제감수성 시험

각 균종의 항균제 감수성 결과, 마늘원액을 착즙하여 희석시킨 그룹 중 *E. tarda* 가 32배까지 저지대를 확인하였으나, 64배에서는 저지대를 관찰할수 없었다 (Fig. 1). *V. anguillarum*, *S. iniae* 모두 16배까지 저지환이 관찰되었다 (Table 3) and (Fig. 2). 하지만, 마늘발효분말 용액을 이용하여 희석시킨 그룹에서는 감수성을 관찰할 수 없었다 (Fig. 3). 항생제 감수성 결과, *E. tarda*에서 모든 항생제에서 감수성을 관찰하였고, *V. anguillarum*에서는 Penicillin (10 μ g)을 제외한 모든 항생제에서 감수성을 관찰하였다. *Streptococcus iniae*에서는 Penicillin (10 μ g)와 Erythromycin(15 μ g)을 제외한 모든 항생제에서 감수성을 관찰하였다. 모든 그룹에서 높은 항생제 감수성을 보인 항생제는 Ciploxacin (5 μ g)과 같은 fluoroquinolone계의 항생제에 감수성을 보였다 (Table 4) and (Fig. 5).

Table 3. Garlic susceptibility test of Inhibition zone (CM).

Bacteria	원액	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>E.tarda</i>	4.4	3.3	3	2.5	2	1.5
<i>V.anguillarum</i>	4.2	3.1	2.7	2	1.3	-
<i>S.iniae</i>	2.3	1.9	1.4	1.2	1	-

¹⁾ *E. tarda*, *V. anguillarum*, *S. iniae* : 1x10⁵ cfu/ml.

Table 4. Antibiotic susceptibility test of Inhibition zone (CM)

Bacteria	P (10 μ g)	Cip (5 μ g)	TE (30 μ g)	RD (5 μ g)	AM (10 μ g)	Ery (15 μ g)
<i>E.tarda</i>	1.6	3.5	3.4	1.8	3	1.3
<i>V.anguillarum</i>	-	4.5	3.5	3	2	1.6
<i>S.iniae</i>	-	3	2.5	2	1.5	-

¹⁾ P: Penicillin, Cip: Ciploxacin, TE: Tetracycline, RD: Rifampin, AM: Amoxicillin, Ery: Erythromycin.

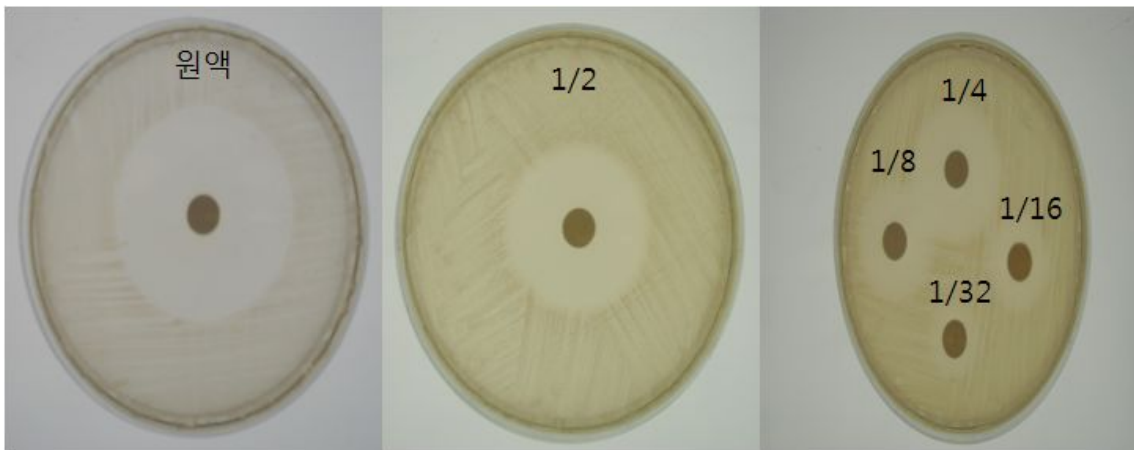


Fig. 1. Antibacterial activity of the isolated garlic serial dilution against *E. tarda*.

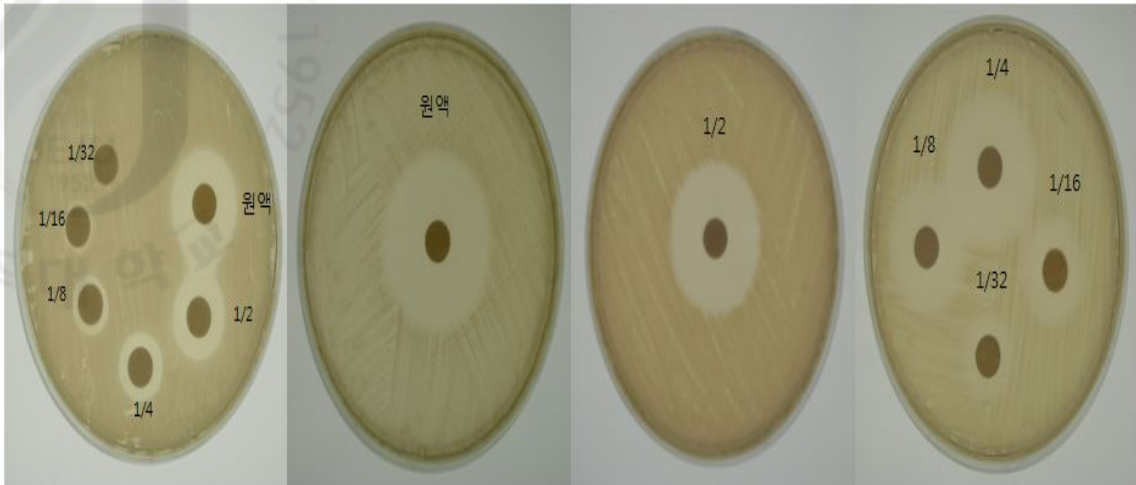


Fig. 2. Antibacterial activity of the isolated garlic serial dilution against *S. iniae* (left) and *V. anguillarum* (right).

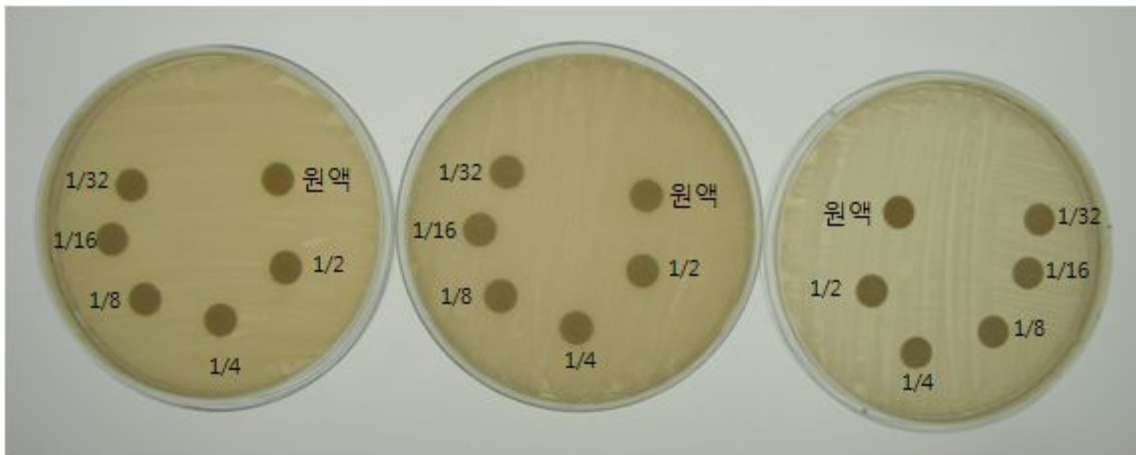


Fig. 3. Antibacterial activity of the isolated garlic powder serial dilution against *E. tarda* (left), *S. iniae* (medium) and *V. anguillarum* (right).

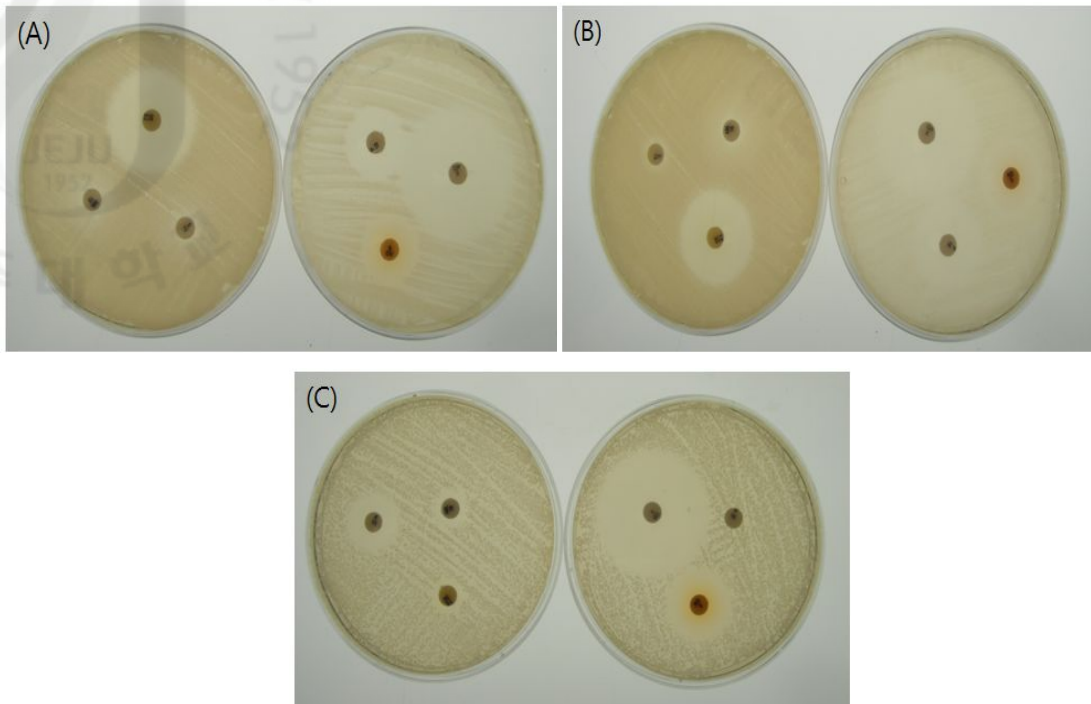


Fig. 4. Antibacterial activity of the isolated antibiotics against *E. tarda* (A), *S. iniae* (B) and *V. anguillarum* (C).

1.2 최소억제농도(MIC)측정

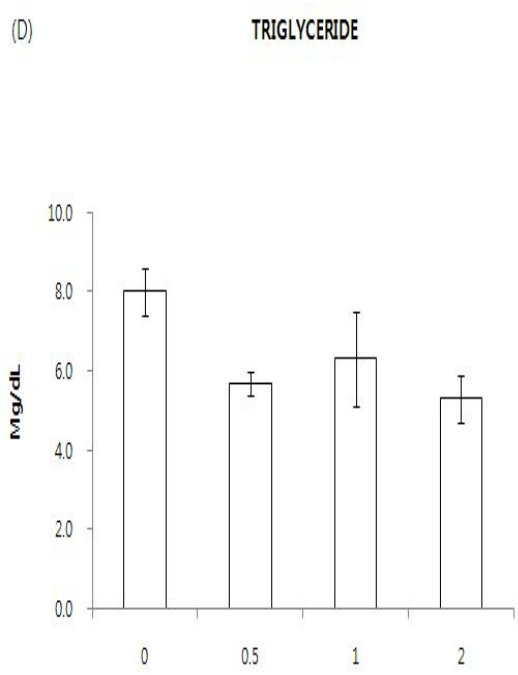
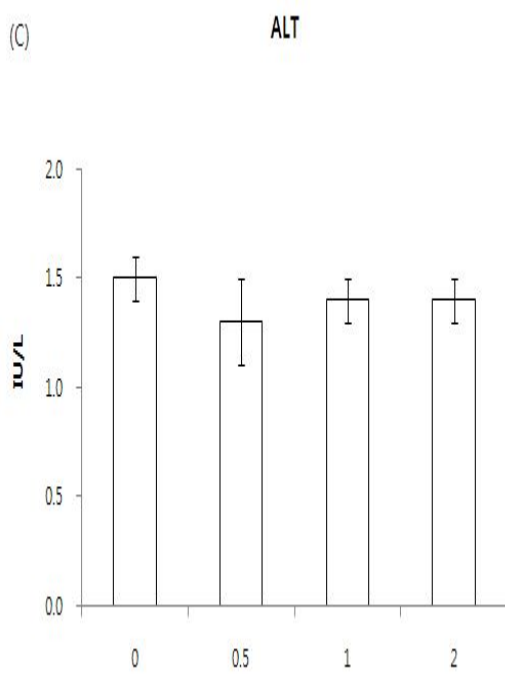
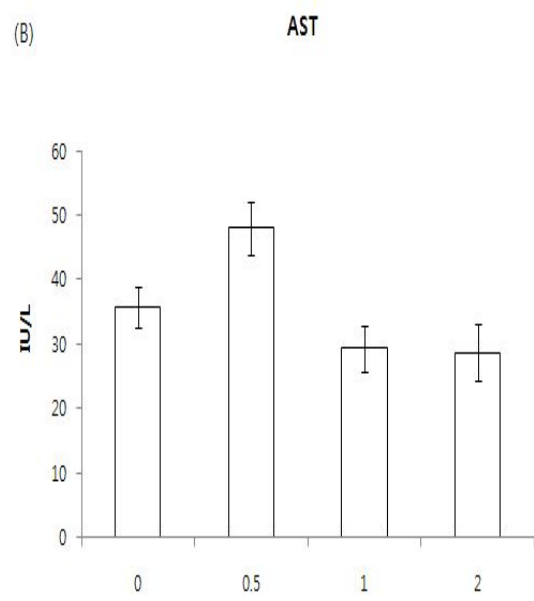
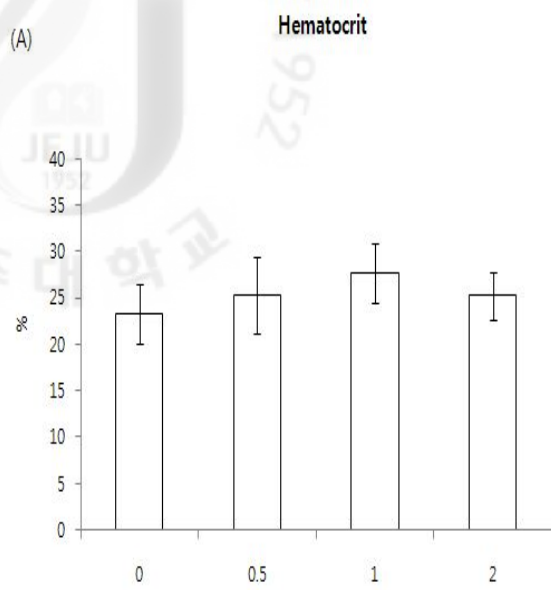
최소억제농도측정 결과, *E. tarda*는 1/8, *V. anguillarum*, *S. iniae* 1/16까지 관찰되었다 (Table 5). 하지만 마늘발효분말 용액에서는 최소억제농도의 결과가 나오지 않았다.

Table 5. Minimum inhibition concentration (MIC) of Garlic against *E. tarda*, *V. anguillarum*, *S. iniae*

Bacteria	원액	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>E.tard</i>	o	o	o	o	-	-
<i>V.anguillarum</i>	o	o	o	o	o	-
<i>S.iniae</i>	o	o	o	o	o	-

2-1 발효마늘분말 혈액 분석

5주간 발효마늘분말 사료공급 후의 혈액을 채취하여 혈액성분의 비교결과는 Fig. 5에 나타내었다. 헤마토크릿은 모든 마늘분말 첨가구에서 대조구보다 높았으며, 그 중 1%첨가구에서 높은 함량을 보였지만 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. AST은 0.5% 첨가구를 제외한 1%와 2%에서 대조구보다 낮은 함량을 보였으며, ALT은 모든 마늘분말 첨가구에서 대조구보다 유의적으로 낮은 함량을 보였다. 혈장 내 중성지방은 모든 마늘분말 첨가구에서 대조구와 비교하여 낮은 함량을 보였으며, 2% 첨가구에서 대조구와 비교하여 높은 함량을 보였다. 글루코스에서는 마늘분말 첨가구에서 대조구보다 유의적으로 높은함량을 보였다. 총콜레스테롤은 모든 실험구에서 유의적인 차이가 없었다. 총단백질은 대조구와 2%을 제외한 0.5%, 1%에서 높은 함량을 보였다.



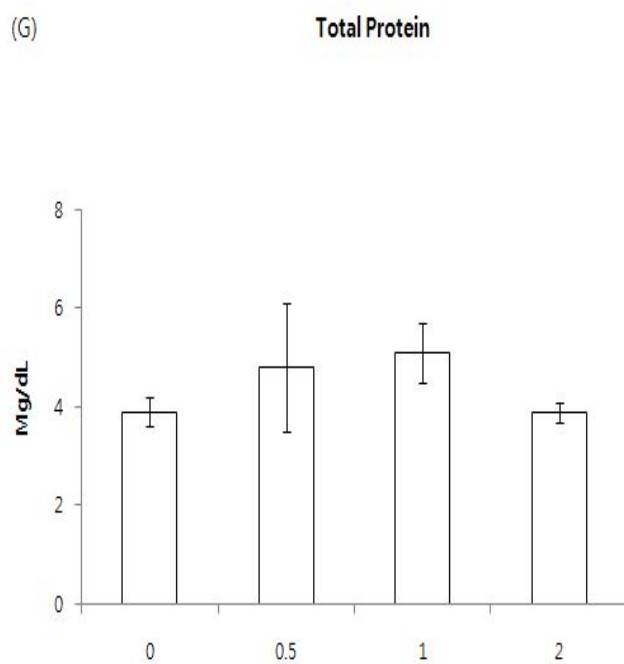
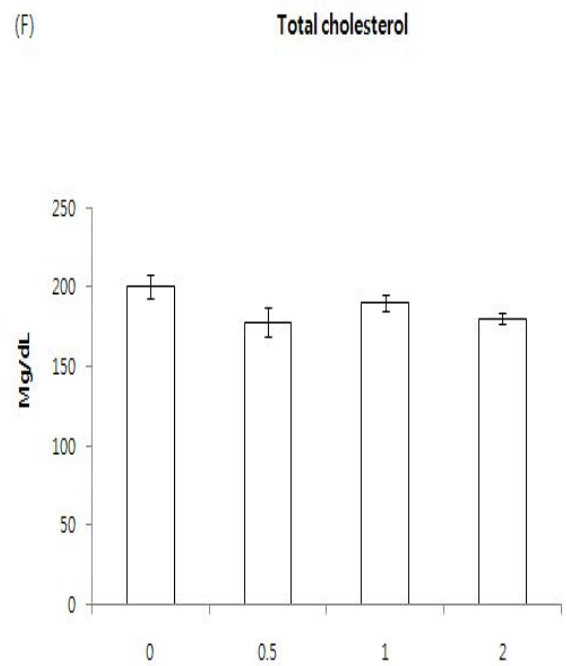
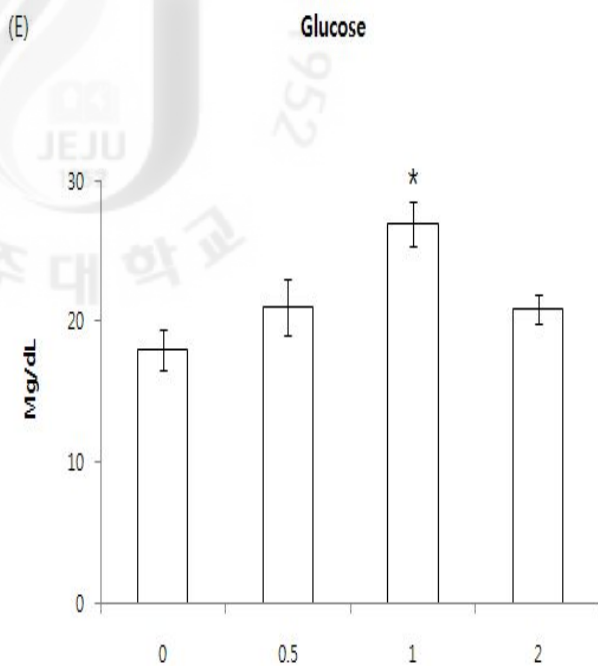
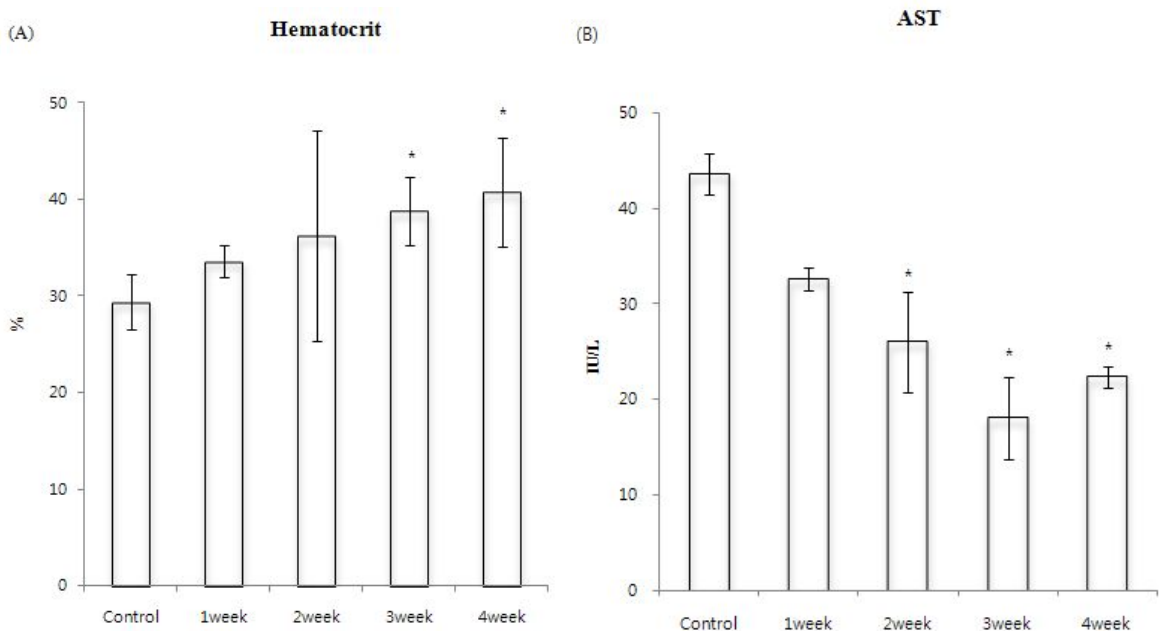
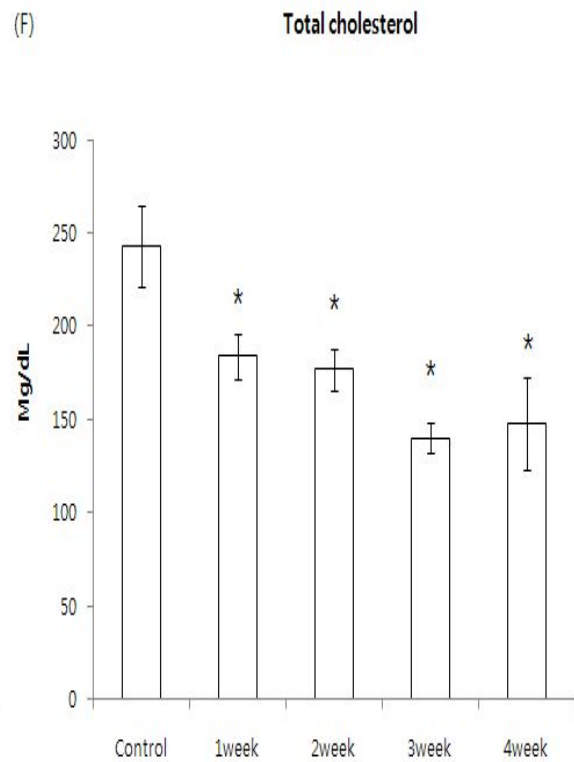
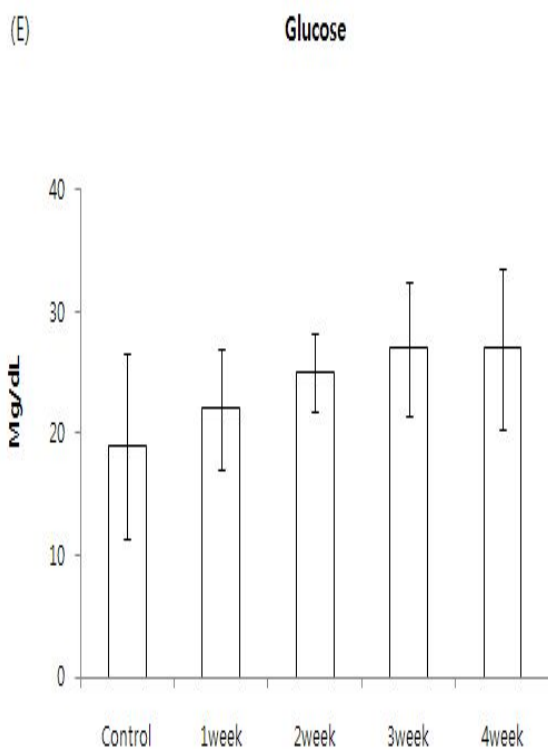
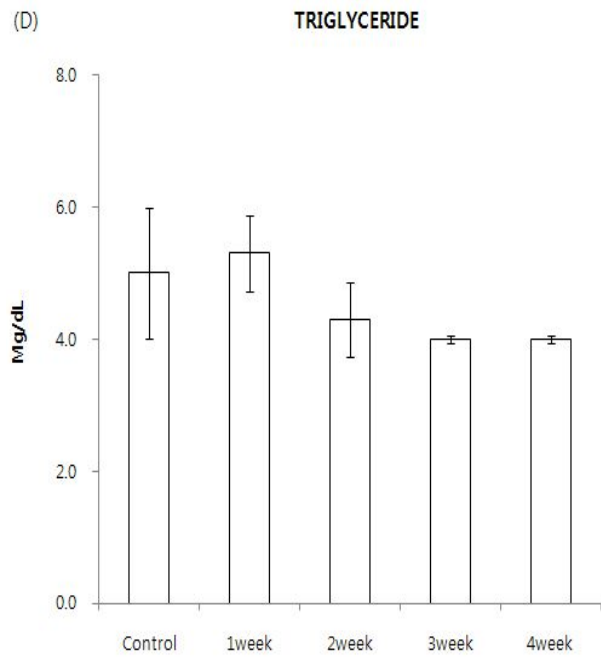
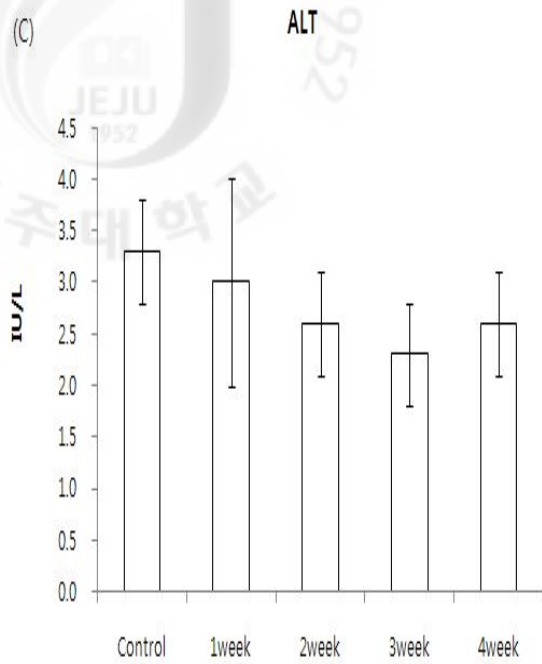


Fig 5. Hematocrit (A), AST (B), ALT (C), triglyceride (D), glucose (E), total cholesterol (F) and total protein (G) in fish the experimental diets containing different levels of fermentation garlic 0%, 0.5%, 1% and 2% for 5weeks. Values are means of triplicate per treatment. Bars with different letters are significantly different (P<0.05).

2-2 1%마늘원액 혈액 분석

총 4주간 1%마늘원액 사료공급 하였고, 1주마다 혈액을 채취하여 혈액성분을 비교하였다. 비교결과는 Fig. 6에 나타내었다. 헤마토크리트는 1주째를 제외한 1%마늘원액 첨가구(2~4주)에서 대조구보다 유의적으로 높았다. AST는 모든 1%마늘원액 첨가구(1~4주)에서 대조구보다 유의적으로 낮은 함량을 보였다. ALT은 모든 1%마늘원액 첨가구(1~4주)에서 대조구보다 낮은 함량을 보였다. 혈장 내 중성지방은 1주째를 제외한 모든 1%마늘원액 첨가구(2~4주)에서 대조구와 비교하여 낮은 함량을 보였다. 글루코스에서는 마늘분말 첨가구(1~4주)에서 대조구보다 높은 함량을 보였다. 총콜레스테롤은 1~4주째까지 1%마늘원액 첨가구에서 대조구보다 유의적으로 낮았다. 총단백질은 4주째를 제외한 모든 1%마늘원액 첨가구에서 대조구보다 유의적으로 높았다.





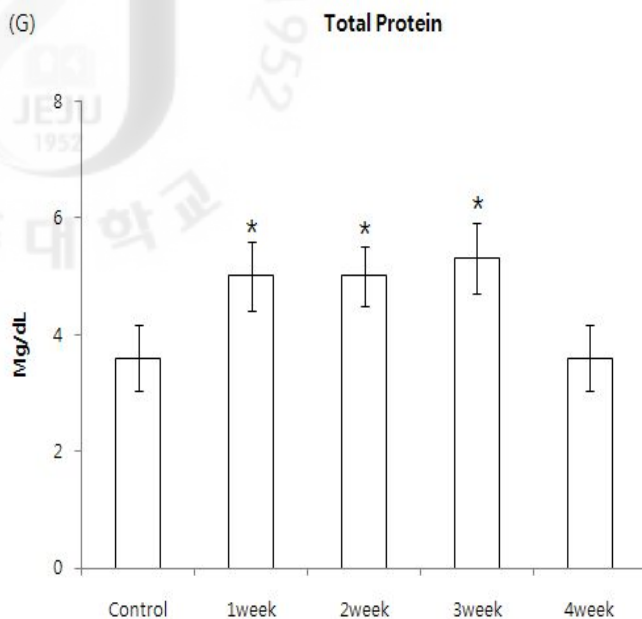
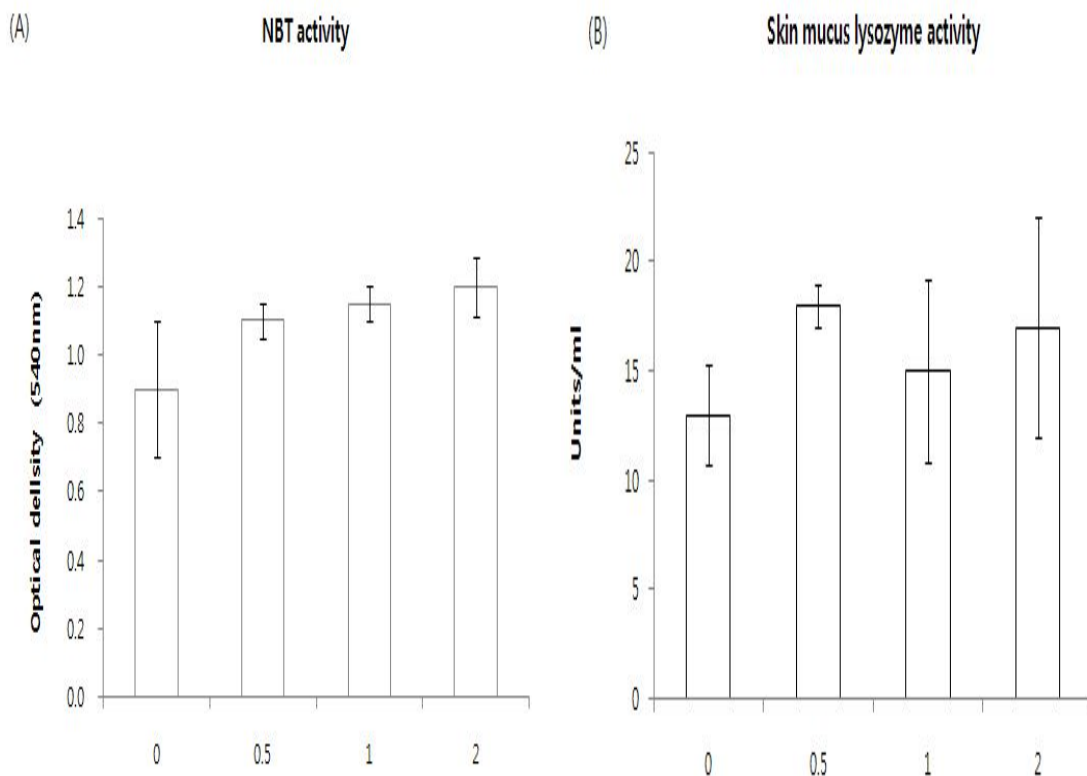


Fig 6. Hematocrit (A), AST (B), ALT (C), triglyceride (D), glucose (E), total cholesterol (F) and total protein (G) in fish the experimental diets containing different levels of fermentation 1% garlic Control, 1week, 2week, 3week and 4week for 4weeks. Values are means of triplicate per treatment. Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

3-1. 발효마늘분말 면역학적 분석

발효마늘분말 사료 5주간 공급 후, 혈액을 채취하여 비특이적 면역반응을 분석한 결과 (Fig. 7), 대식세포활성 및 점액, 혈청 라이소자임은 모든 마늘분말 첨가구에서 대조구보다 높은 활성을 보였고, 그 중 체표점액 라이소자임 결과, 0.5%에서 높은 활성을 보였지만 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 혈청라이소자임은 1%에서 유의적으로 높은 활성을 보였다.



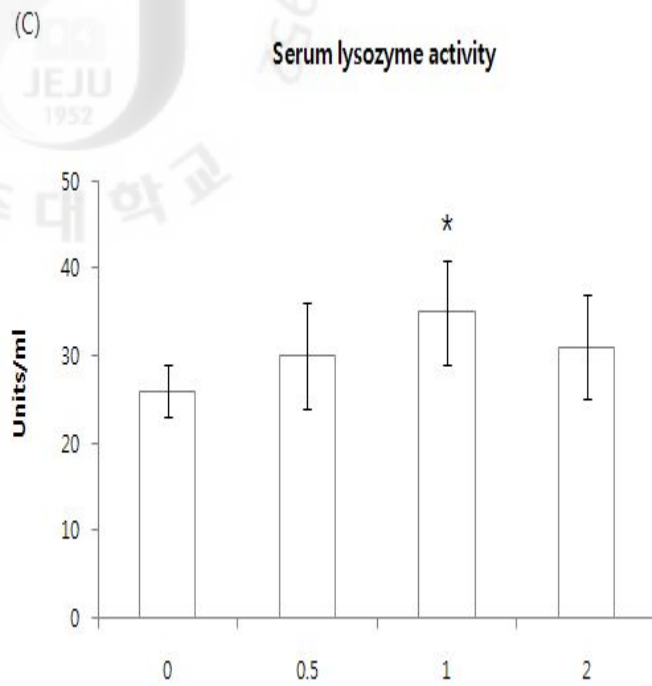
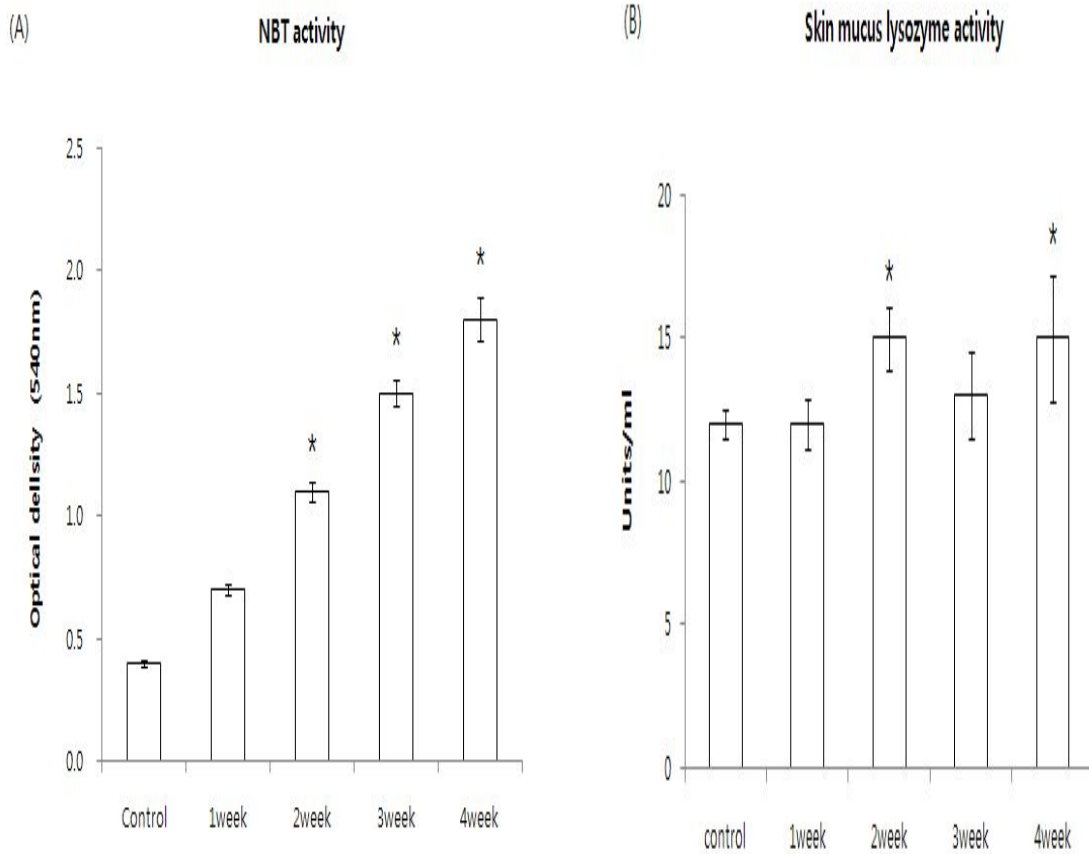


Fig 7. Nitroblue tetrazolium (NBT) activity (A), serum lysozyme activity (B), skin mucus lysozyme activity (C) in fish the experimental diets containing different levels of fermentation garlic powder 0%, 0.5%, 1% and 2% for 5weeks. Values are means of triplicate per treatment. Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

3-2. 1% 마늘원액 면역학적 분석

1%마늘원액 사료를 4주간 공급 하였고, 1주마다 혈액을 채취하여 비특이적 면역 반응을 분석한 결과 (Fig. 8), 대식세포활성 및 점액, 혈청 라이소자임은 모든 1%마늘원액 첨가구(1~4주)에서 대조구보다 유의적으로 높은 활성을 보였다.



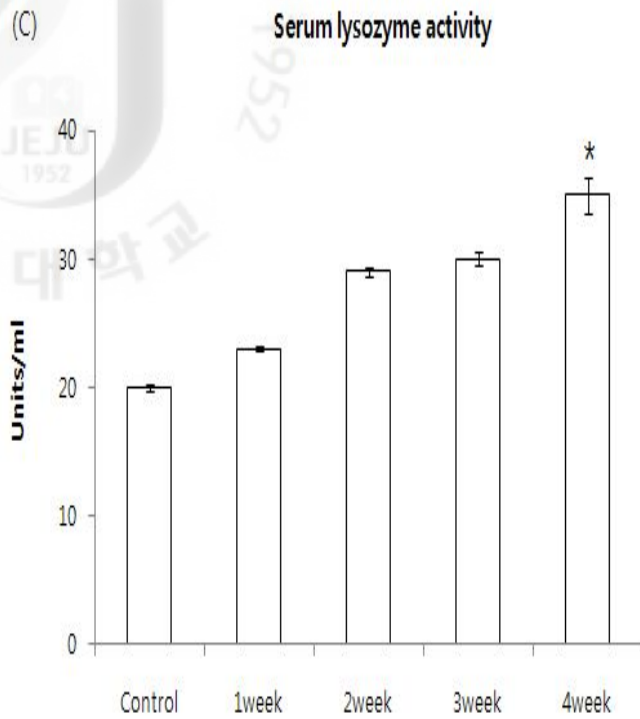


Fig 8. Nitroblue tetrazolium (NBT) activity (A), lysozyme activity (B) in fish the experimental diets containing different levels of fermentation garlic Control, 1week, 2week, 3week and 4week for 4weeks. Values are means of triplicate per treatment. Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

4-1. 발효마늘분말 공격실험

공격실험 결과, **VHSV**을 사용하여 감염시킨 경우, 발효마늘분말을 첨가하지 않은 대조구에서는 감염 후 23일째까지 60%의 누적폐사율을 보였으며, 발효마늘분말 0.5%, 1%, 2% 그룹에서는 각각 30%, 40%, 50%의 누적폐사율을 보였다 (Fig. 9).

V. anguillarum을 사용하여 감염시킨 경우, 발효 마늘분말을 첨가하지 않은 대조구에서 감염 후 9일째에 100%의 누적폐사율을 보였지만, 발효마늘분말첨가 실험구 (0.5%, 1%, 2% groups)에서는 각각 50%, 30%, 20%의 누적폐사율을 나타내었다 (Fig. 10). **S. iniae**를 사용하여 감염시킨 경우, 대조구에서는 감염 후 3일째 100%의 누적폐사율 보였으며, 발효마늘분말 0.5%, 1% 2% 그룹에서는 각각 30%, 30%, 50%의 누적폐사율 보였고, 모든 그룹에서 대조구보다 낮은 폐사율을 보였다 (Fig. 11). **E. tarda**를 사용하여 감염시킨 경우, 감염 후 7일 이내에 모든 실험구에서 100% 누적 폐사하였으며, 대조구와 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Fig. 12).

체표 점액라이소자임 활성 결과, **V. anguillarum**은 1%, **S. iniae**, **VHSV** 2%에서 유의적으로 높은 활성을 보였고, **E. tarda**은 다른 그룹에 비해 유의적으로 낮은 활성을 보였다. 혈청라이소자임 활성 결과, **V. anguillarum** 및 **S. iniae**은 1, 2%에서 유의적으로 높은 활성을 보였고, **E. tarda**은 2%에서 유의적으로 높은 활성을 보였지만, 0.5%에서는 유의적으로 낮은 활성을 보였다. **VHSV**은 2%에서 유의적으로 높은 활성이 관찰되었다 (Fig. 13).

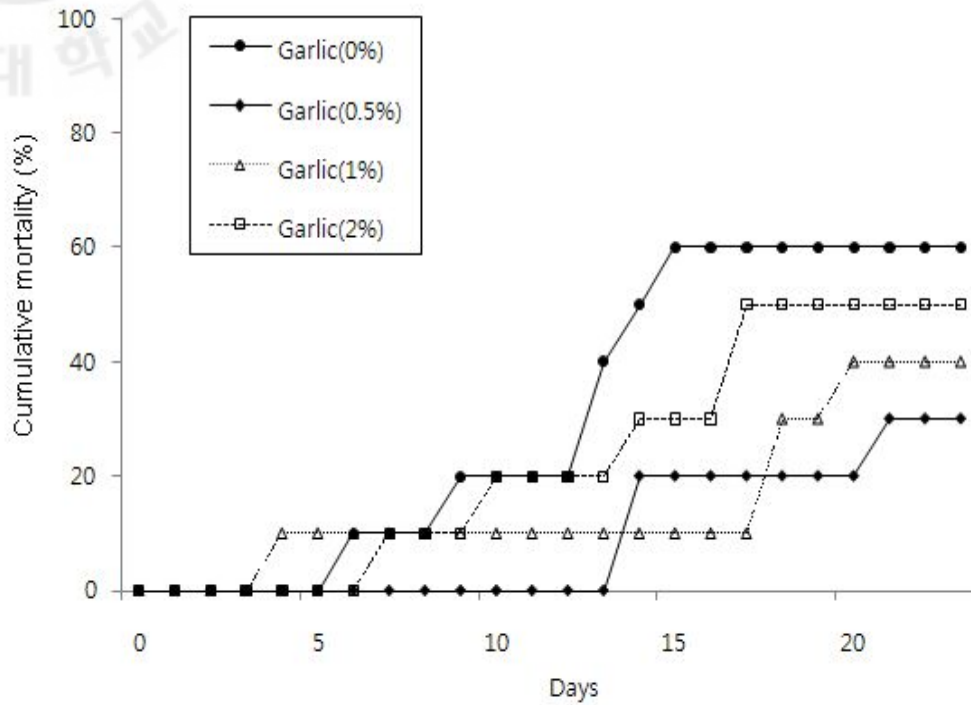


Fig 9. Cumulative mortality of olive flounder fed the experimental diets containing 0%, 0.5%, 1%, and 2% of fermentation garlic powder after challenge with (A) VHSV by intraperitoneal injection.

(B)

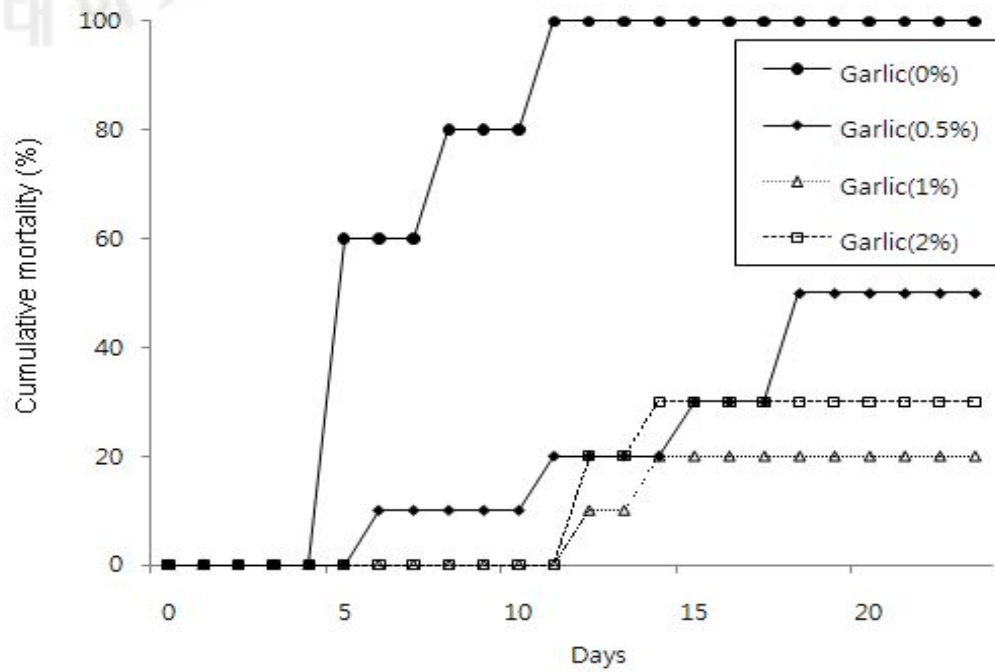


Fig 10. Cumulative mortality of olive flounder fed the experimental diets containing 0%, 0.5%, 1%, and 2% of fermentation garlic powder after challenge with (B) *V. anguillarum* by intraperitoneal injection.

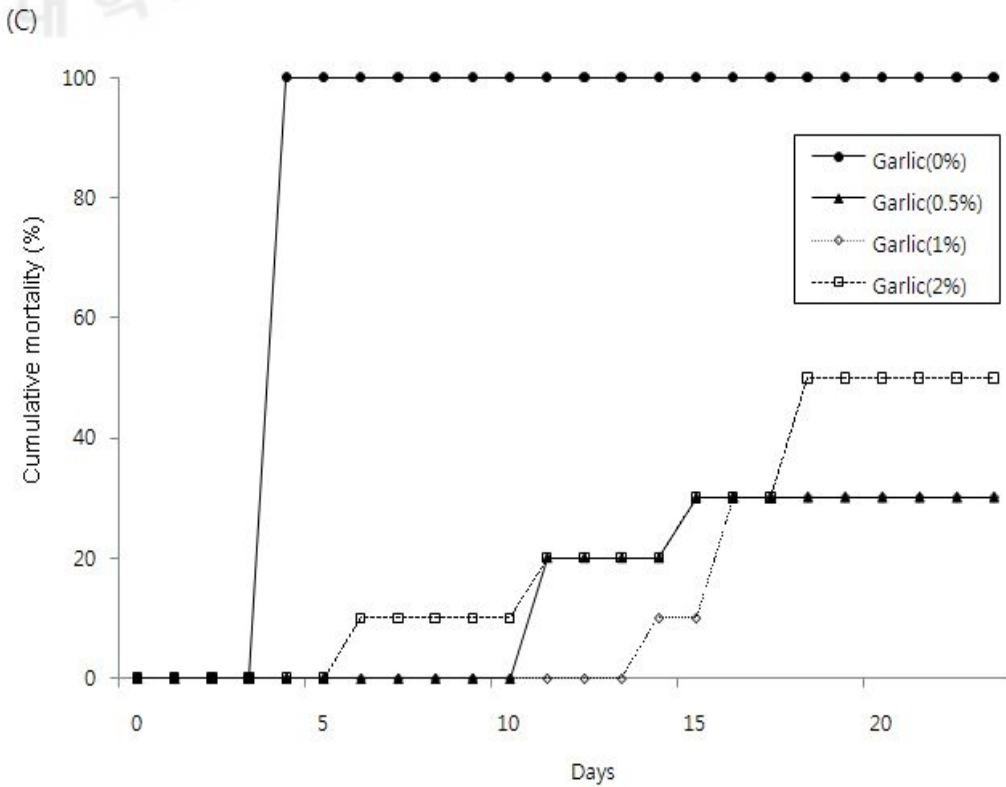


Fig 11. Cumulative mortality of olive flounder fed the experimental diets containing 0%, 0.5%, 1%, and 2% of fermentation garlic powder after challenge with (C) *S. iniae* by intraperitoneal injection.

(D)

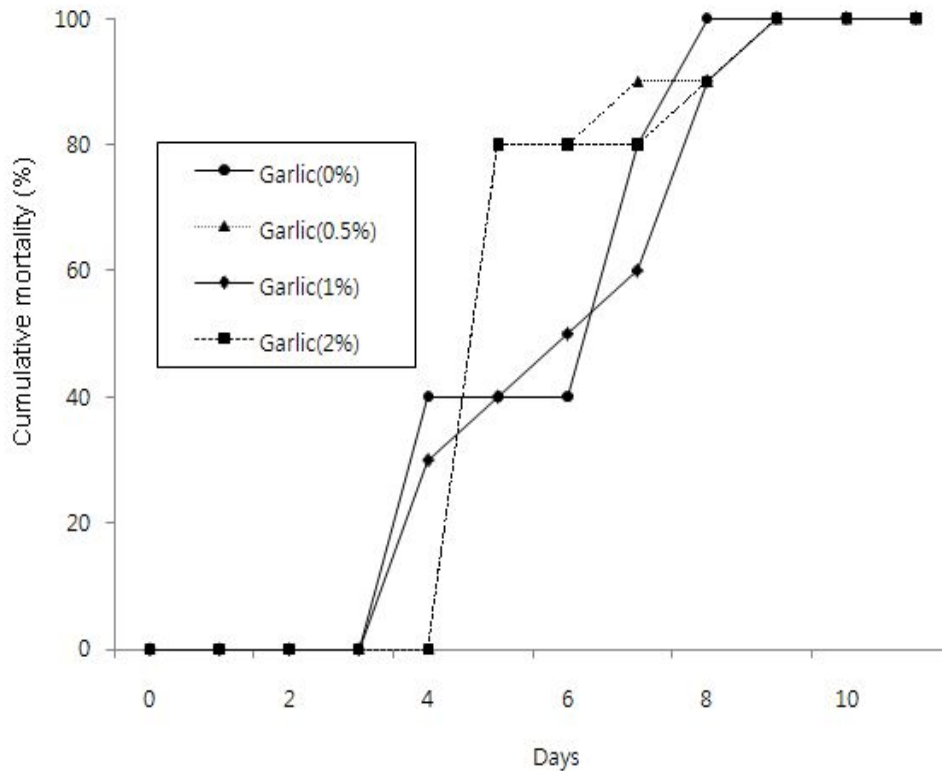


Fig 12. Cumulative mortality of olive flounder fed the experimental diets containing 0%, 0.5%, 1%, and 2% of fermentation garlic powder after challenge with (D) *E. tarda* by intraperitoneal injection.

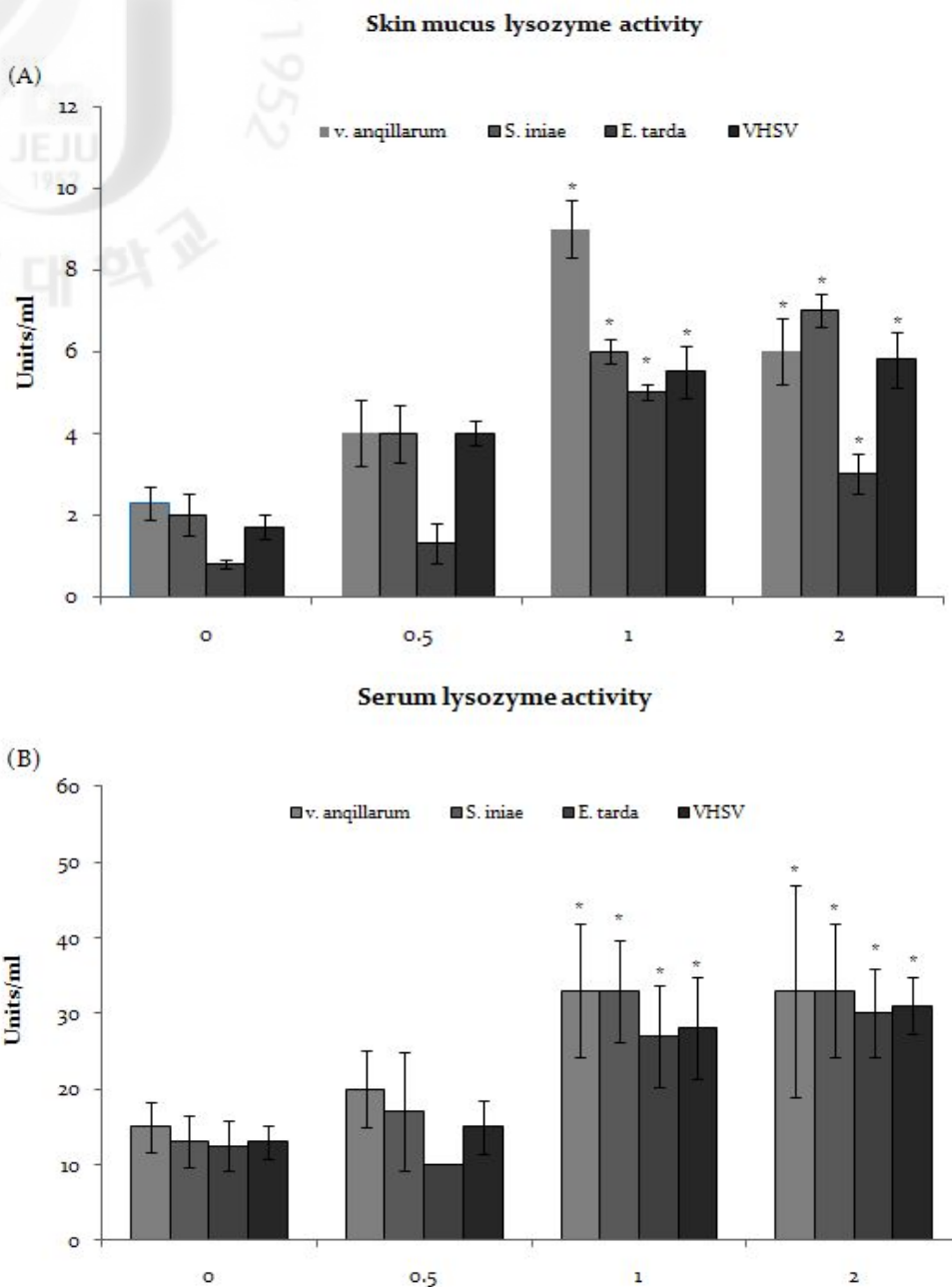


Fig 13. Changes of lysozyme activity in skin mucus, serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intraperitoneally with various concentration (*V. anguillarum*, *S. iniae*, *E. tarda*, VHSV) of 1day (A) and (B). Values are means of triplicate per treatment. Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

4-2. 1% 마늘원액 공격실험

공격실험 결과, **VHSV**을 사용하여 감염시킨 경우, 1% 마늘원액을 첨가하지 않은 대조구에서는 감염 후 9일째 100%의 누적폐사율 보였지만, 1% 마늘원액 첨가구에서는 14일째까지 20%의 누적 폐사율이 관찰되었다(Fig. 14). **V. anguillarum**을 사용하여 감염시킨 경우, 1% 마늘원액을 첨가하지 않은 대조구에서 감염 후 14일째에 50%의 누적폐사율을 보였지만, 1% 마늘원액첨가 실험구에서는 각각 20%의 누적폐사율을 나타내었다 (Fig. 15). **S. iniae**를 사용하여 감염시킨 경우, 대조구에서는 감염 후 14일째까지 60%의 누적폐사율 보였으며, 1% 마늘원액 그룹에서는 30%의 누적폐사율이 나타났다 (Fig. 16). **E. tarda**를 사용하여 감염시킨 경우, 감염 후 7일 이내에 모든 실험구에서 100% 누적 폐사하였으며, 1% 마늘원액첨가 실험구에서는 80% 누적폐사율이 관찰되었다(Fig. 17). **VHSV, V. anguillarum, S. iniae, E. tarda** 폐사어의 내부 장기를 해부하여 감염되었음을 확인하였고, 체색흑화, 궤양형성, 지느러미 출혈, 복부팽만 등의 전형적인 증상을 보였다. (Fig. 18).

대식세포활성 결과, **E. tarda**을 제외한 모든 그룹에서 유의적 차이는 관찰되지 않았고, **E. tarda**에서는 1일째 유의적차이가 나타나지 않은 반면, 3일째 낮은 활성을 보였다. (Fig. 19). 점액라이소자임 활성 결과, 1, 3일째 **V. anguillarum** 1%에서 유의적으로 높은 활성을 보였으며, 3일째 모든 그룹에서 0%보다 1%가 유의적으로 높은 활성을 보였다 (Fig. 20). 혈청라이소자임 활성 결과 1, 3일째 모든 그룹에서 0%보다 1%가 유의적으로 높은 활성을 보였으며, 3일째에 1일째보다 모든 그룹에서 유의적으로 낮은 활성이 관찰되었다. (Fig. 21).

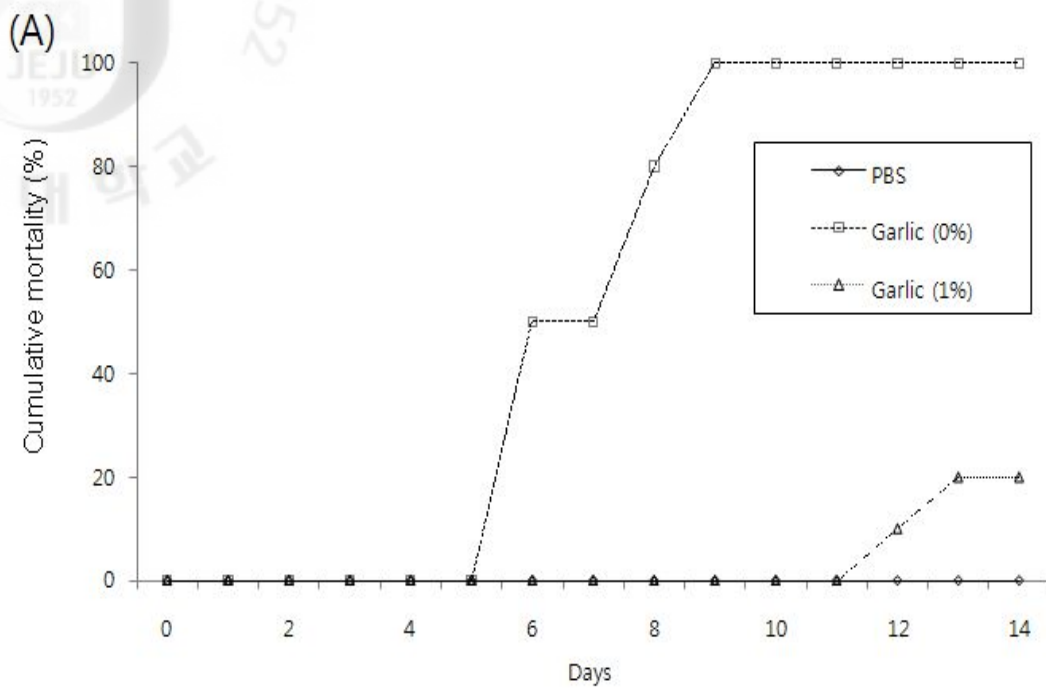


Fig 14. Cumulative mortality of olive flounder fed the experimental diets containing of 1% garlic undiluted after challenge with (A) VHSV by intraperitoneal injection.

(B)

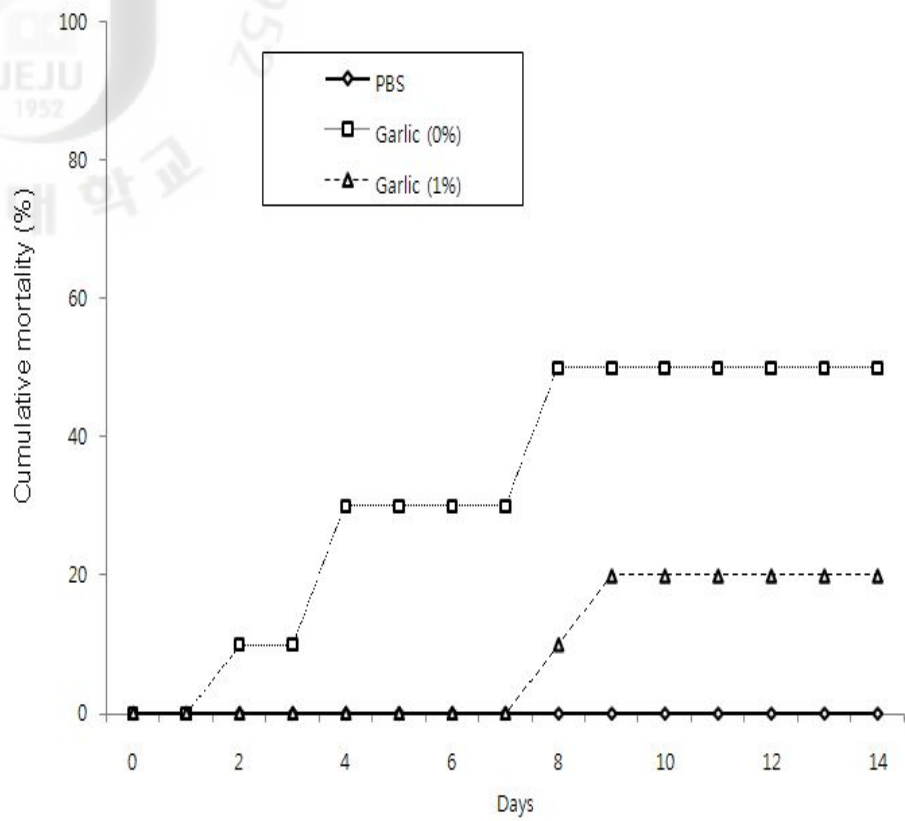


Fig 15. Cumulative mortality of olive flounder fed the experimental diets containing of 1% garlic undiluted after challenge with (B) *V. anguillarum* by intraperitoneal injection.

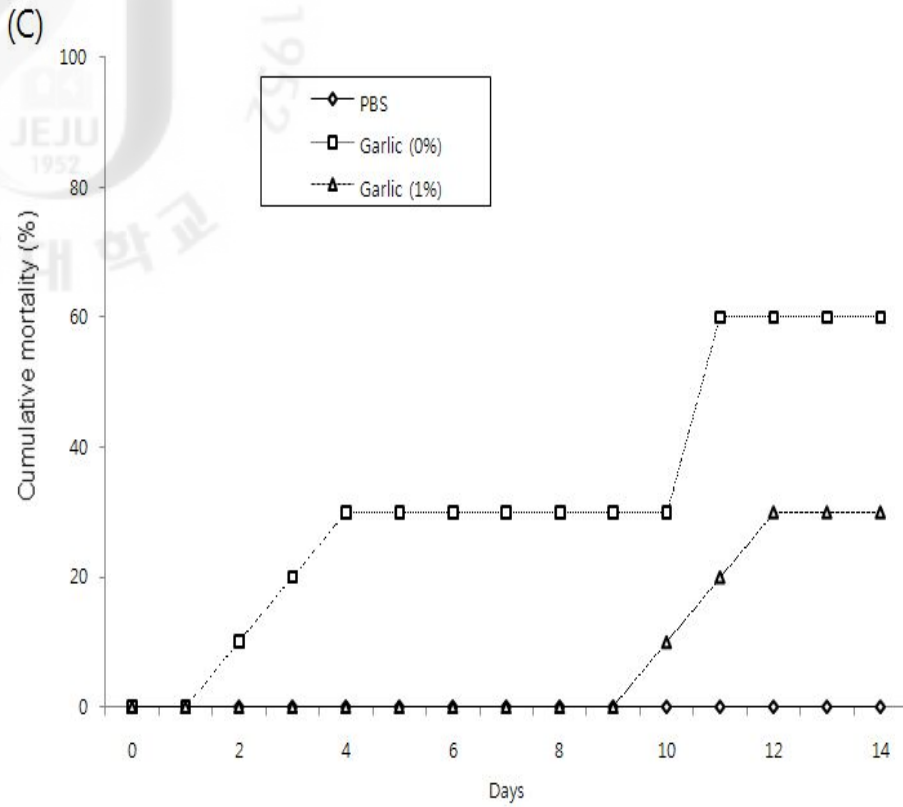


Fig 16. Cumulative mortality of olive flounder fed the experimental diets containing of 1% garlic undiluted after challenge with (C) *S. iniae* by intraperitoneal injection.

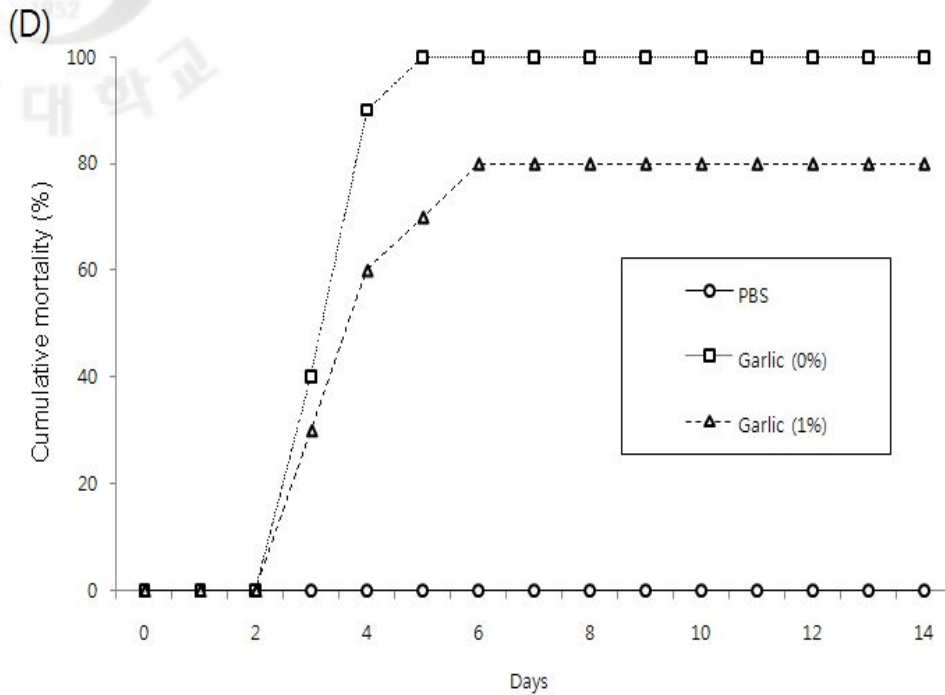


Fig 17. Cumulative mortality of olive flounder fed the experimental diets containing of 1% garlic undiluted after challenge with (D) *E. tarda* by intraperitoneal injection.



Fig. 18. An outbreak of (A) VHSV, (B) *V. anguillarum*, (C) *S. iniae*, (D) *E. tarda* infection of olive flounder from this study.

NBT activity

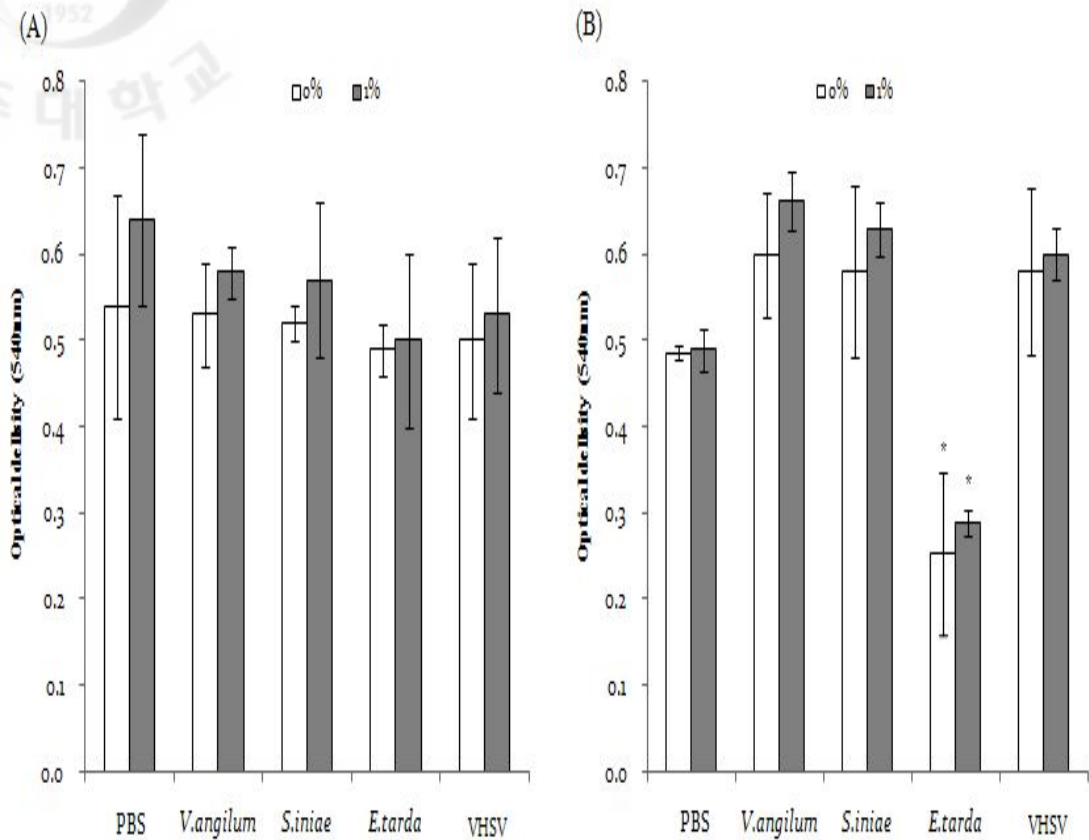


Fig 19. NBT reduction of phagocytes in blood serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intraperitoneally with various concentration (PBS, *V. anguillarum*, *S. iniae*, *E. tarda*, VHSV) of 1day (A) and 3day (B). Values are means of triplicate per treatment. Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Skin mucus lysozyme activity

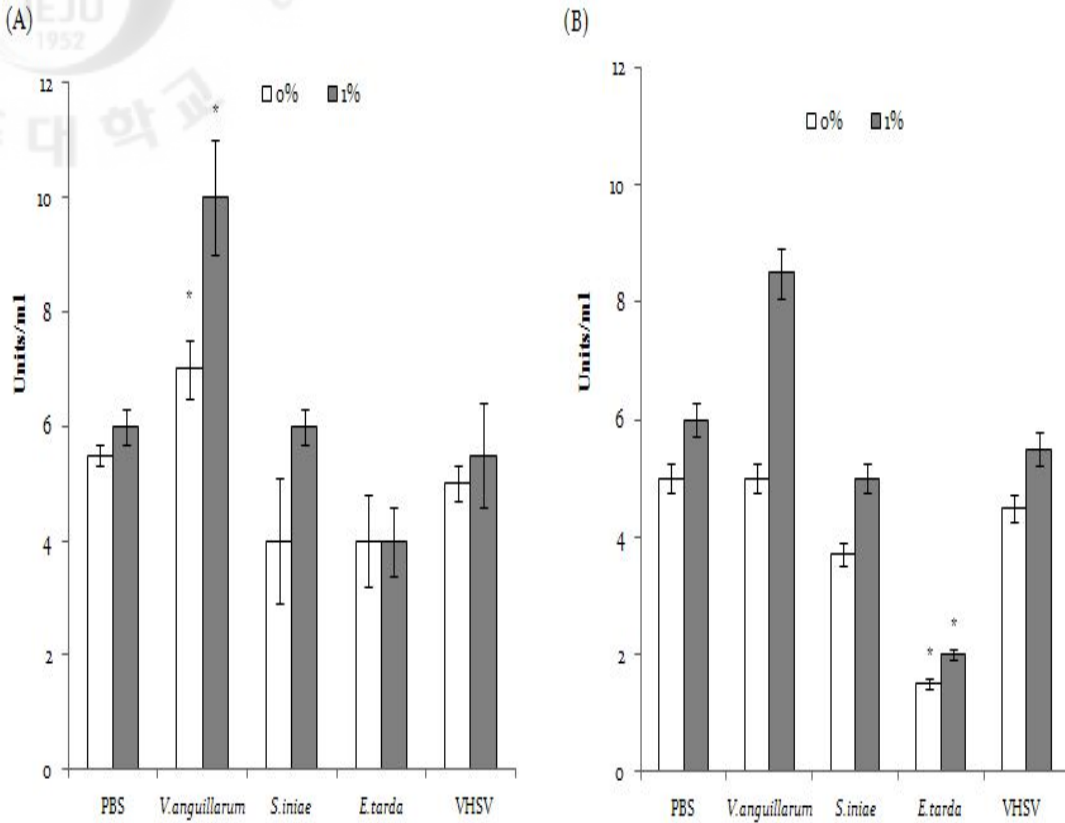


Fig 20. Changes of lysozyme activity in skin mucus of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intraperitoneally with various concentration (PBS, *V. anguillarum*, *S. iniae*, *E. tarda*, VHSV) of 1day (A) and 3day (B). Values are means of triplicate per treatment. Bars with different letters are significantly different (P<0.05).

Serum mucus lysozyme activity

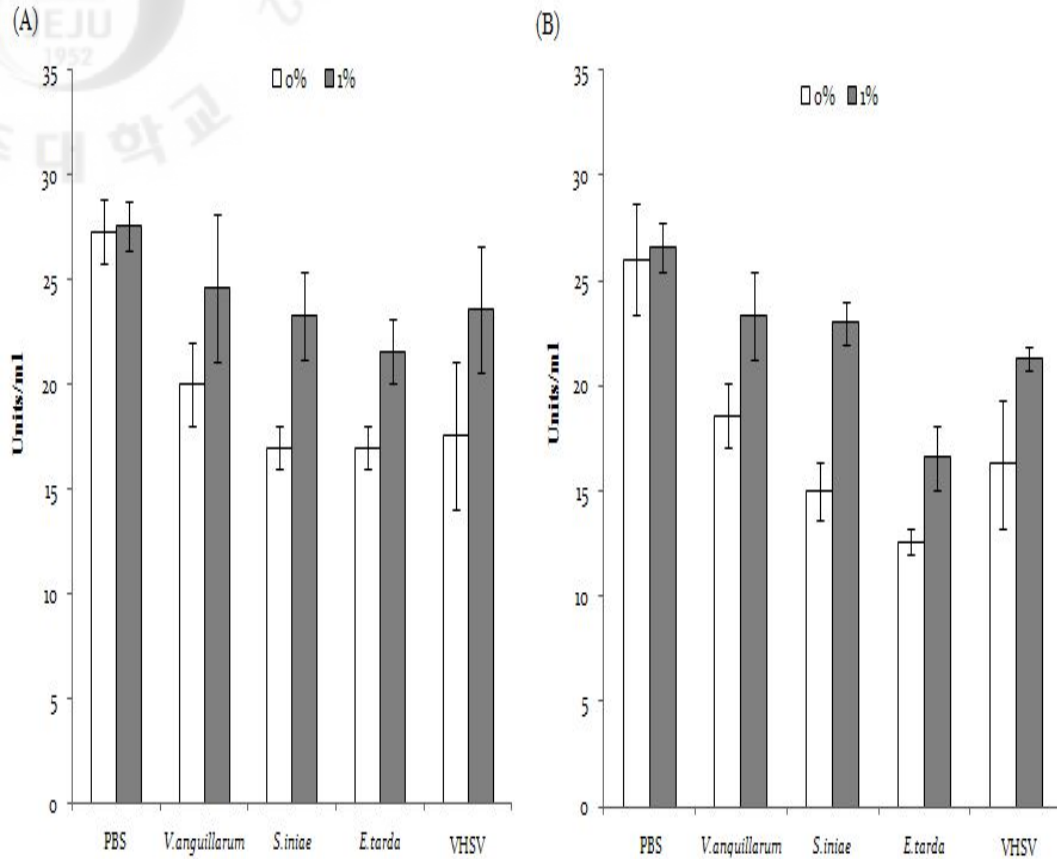


Fig 21. Changes of lysozyme activity in serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* injected intraperitoneally with various concentration (PBS, *V. anguillarum*, *S. iniae*, *E. tarda*, VHSV) of 1day (A) and 3day (B). Values are means of triplicate per treatment. Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

IV. 고 찰

양식 산업에서 VHSV, Lymphocystis disease virus (LCDV) *E. tarda*, *Vibrio* sp, *Streptococcus* sp. *Aeromonas hydrophila*, 등 바이러스 및 세균성 질병으로 인한 경제적 손실은 심각한 상태이다. 이로인해, 항생제 남용 및 오염으로 세균의 내성이 증가하여 질병 치료에 어려움을 겪고 있다. 마늘은 모든 배재식물 가운데서 가장 오래된 것 중 하나로 4000년이상 음식과 민간요법에 주로 사용되어 왔으며 가장 다양하게 연구되어 온 약물식물이다(J Nutr et al., 2001). 또한 항균제나 항생물질이 나오기 전에 동서양에서 전염병 치료에 사용되었다는 기록이 있으며, Albert Schweitzer는 아프리카에서 마늘을 사용하여 이질을 치료했다는 보고가 있다. 어류에서도 마늘을 추출하여 복강 내의 투여 및 경구투여 하였을 시, 어류의 식세포 활성화(Raa et al., 1993; Jørgensen et al., 1993a), natural killer cell 활성화 (Kajita et al., 1991) 라이소자임(Engstad et al., 1992; Jørgensen et al.,1993b) 등 다양한 면역 증강을 통해 질병으로 인한 폐사 방지 및 건강한 어류의 생산을 향상시킨다는 보고가 있다(Chen and Ainsworth, 1992). 따라서 본 연구에서는 사료 내의 발효마늘원액을 단계별로 첨가(0, 0.5, 1, 2%) 및 1%마늘원액을 사료에 첨가하여 비특이적인 면역력 및 혈액성분 분석, 공격실험 등을 통해 알아보았다.

마늘추출물을 희석시켜 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* 등의 식중독균들에 대한 항균력 검사에 대하여 윤인숙 (2009)가 보고한 바에 의하면, 원액에서만 항균력이 나타났고, 희석한 농도에서는 항균력

이 나타나지 않았다. 본 연구에서는 마늘추출물을 희석시켜 실험을 해 본 결과 *E. tarda* (1/32), *V. anguillarum* (1/16), *S. iniae* (1/16) 의 희석배수에도 저지대를 관찰되었다 (Table 3). 하지만, 발효마늘분말 용액에서는 저지대이 관찰되지 않아 마늘추출물을 이용한 결과와 차이를 보였다(Fig. 3). 항생제 감수성과 마늘 추출액의 비교시, *E. tarda*, *V. anguillarum* 원액과 모든 그룹에서 높은 저지대를 보인 항생제 (Ciprofloxacin)와 유사한 저지대를 관찰하였다 (Table 4). 상백피 에탄올 추출물로부터 항균성 물질을 추출하여 어류질병(*Streptococcus iniae*, *Edwardsiella tarda*, *Listonella anguillarum* et..)에 대한 최소억제농도 측정 검사에 대하여 목종수 외(2001) 보고에 의하면 *E. tarda*에서 가장 낮은 항균활성이 보고되었다. 본 연구의 최소억제농도 실험 결과, 마늘추출물에서 *E. tarda* (1/8), *V. anguillarum* (1/16), *S. iniae* (1/16)로써 위의 논문과 유사하게 *E. tarda*에서 가장 낮은 항균활성이 보였고 (Table 5), *V. anguillarum*, *S. iniae*은 감수성 검사와 동일하게 항균활성이 관찰되었다. 이 두 측정방법을 비교해 볼 때 *E. tarda*는 액체배지상의 항균력이 떨어지는 것으로 추정된다. 발효마늘원액 실험 결과, 최소억제 농도의 항균력이 관찰되지 않았다. 발효마늘분말 용액에서 저지대와 최소억제농도에서 관찰되지 않은 것은 고온발효시켜 마늘발효분말 용액을 제조하였을때, 열을 가하면서 효소 활성도가 떨어져 알라신이 줄어들어 영향을 주는 것으로 보인다.

헤마토크릿 혈액인자는 생체의 산소운반능력(Chang et al., 1999)을 가지며, 스트레스와 생리활성 지표로 사용된다. 일반적으로 수치가 낮을때 적혈구 빈혈증이 나타나며, 수치가 높을때는 탈수증 및 적혈구 증가 현상이 나타난다. 본 연구

에서는 발효마늘분말을 첨가한 그룹에서 대조구보다 유의적으로 높은 함량이 관찰되었으나, 23~27%로 다소 낮은 수치를 보였으며, 1%마늘원액을 첨가한 그룹에서는 2주때부터 유의적으로 증가하였고, 29~39%으로 정상 수치가 관찰되었다 {Fig. 5(A) and Fig. 6(A)}.

Davis & Parker(1990)에 따르면 AST와 ALT는 생체내에서 중요한 당, 지질, 단백질대사에 관여하는 효소로서, 어체의 생리상태가 좋지 않을수록 간의 장애 (Gordon, 1968)가 일어나고 활성이 높아져 혈중 농도가 증가하는 것으로 보고 되었다(Casillas & Ames, 1985; Rao et al., 1990). 본 연구에서는 발효마늘분말 0.5%을 제외한 1%, 2%에서 대조구에 비해 낮은 함량을 보였고, 1%마늘원액 첨가제 또한 1~4주 동안 대조구보다 낮은 함량을 보여, 마늘 섭취시 AST, ALT를 감소시키는 것으로 사료된다(Fig. 5(B, C) and Fig. 6(B, C)).

마늘 첨가식에 의한 혈청 콜레스테롤과 중성지질의 저하효과는 증명되었다 (Sharma et al., 1976). Qureshi(1983)은 마늘이 중성지질은 감소하였으나 콜레스테롤 수준은 변화가 없다고 보고 되었다. 마늘발효분말 및 1%마늘원액 모두 대조구에 비해 유의적으로 낮은 함량을 보인 것으로 보아 마늘 섭취시 감소시키는 것으로 사료된다(Fig. 5(D, F) and Fig. 6(D, F)).

글루코스는 어류의 항상성 유지에 필요한 에너지를 필요로 하는데, 이때 신경내분비계는 당신생합성을 촉진시킨다(Munck et al., 1984). 또한 수온상승하는 여름철에는 넙치의 글루코스 농도가 증가 된다 (Chang et al., 2002). 본 연구 결과 발효마늘분말 첨가제에서 1%에서 유의적으로 가장 높은 함량을 보였고, 1%마늘원액 첨가제에서는 대조구 보다 유의적으로 높은 함량을 보였다. Hur(2002)는

넙치의 글루코스 농도의 평균은 30.3 mg/dl이라 하였는데, 본 연구에서는 발효 마늘분말첨가제 및 1%마늘원액 첨가제 모두 19mg/dl~27mg/dl범위로 낮은 값이 나타났다. 하지만 넙치는 운동성이 낮아 본 넙치가 안정성 수지에 포함될 것으로 추정하였다. {Fig. 5(E) and Fig. 6(E)}.

어류의 총단백질 농도는 일반적으로 오염물질에 의해 감소하는데, 그 원인 중 하나는 장관 손상에 따른 흡수 장애를 들 수 있다(Mater et al., 1985; Yamawaki et al., 1986). 본 연구에서 발효마늘분말 첨가제 및 1%마늘원액 첨가구에서 Kang et al. (2004)이 제시한 안정값 2.71~2.86 g/dl보다 높게 나타남으로써, 오염물질에 의한 영향을 받지 않으며 사용된 실험어는 단백질대사에 문제가 없는 것으로 추정된다 {Fig. 5(G) and Fig. 6(G)}.

어류의 표피점액층은 세균 침입에 대한 초기방어역할을 수행하게 되므로, 어류에 있어서 체표점액의 항균능력을 라이소자임과 관련하여 많은 연구가 시도되었다 Lie et al.(1989). 호중구와 대식세포는 살균과 식균작용을 하는 많은 면역세포 중 60~70%를 차지하는 면역 세포로 외부 침입 세균에 대해 1차적인 방어막이 된다. 이들은 항원이 침입하면 섭식하거나 독소를 분비하여 파괴, 항원을 제거하여 면역반응을 일으킨다. Lysozyme은 세균벽의 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglucosamine 사이의 β -1,4 결합을 분해하여 세균을 사멸시키는 효소이며, 그람 음성균에 대해서는 항체와 보체의 작용을 증가시킨 후 Peptidoglycan layer을 분해시키며, 그람 양성균은 세포벽에 직접작용한다. 본 연구의 실험 결과, 발효마늘분말 및 1%마늘원액을 첨가구 모두 비특이적인 면역반응을 증진시키는 것으로 나타났으며, 그 중 1%마늘원액이 발효마늘분말 보다 NBT에서 유의적으

로 높은 활성이 나타났지만 점액, 혈청라이소자임에서는 항병력이 관찰되었지만, 발효마늘분말 1%와 1%마늘원액에서의 유의적인 차이는 나타나지 않았다 (Fig. 7 and Fig. 8). 황(1990)은 흰쥐 복수육종암을 대상으로 항암효과 및 in vivo에서의 면역증강효과에 대한 수행 결과, 마늘 추출물의 농도가 높을수록 세포의 증식이 억제될 뿐만 아니라 암세포가 사멸되는 현상을 보고하였다. 따라서 본 연구에서 발효마늘분말을 제조할 때 열을 가하면서 효소 활성도가 떨어져 1%마늘원액보다 유의적으로 낮은 활성을 보인 것으로 사료되며, 두 실험 모두 마늘을 사료로 통하여 효과적으로 전달됨으로써 어류의 면역체계를 활성화 시킨 것으로 판단된다.

발효마늘분말 및 1%마늘원액 첨가의 항병력에 미치는 영향을 분석하기 위한 공격실험 결과, 발효마늘분말 VHSV에서는 대조구에 비해 약 20~40%정도의 낮은 폐사율이 관찰되었고(Fig. 9), 1%마늘원액 첨가구에서는 대조구에 비해 약 80%의 낮은 폐사율이 관찰되었다(Fig. 10). 마늘에 대한 다양한 실험에 의하면 인플루엔자백신과 함께 면역을 증강시켜 항체를 다량 생산하여 바이러스의 증식을 억제한다는 보고가 있다. 본 연구에서 비특이적인 면역반응을 분석한 결과, NBT activity와 lysozyme activity가 유의적으로 증가함에 따라 호중구의 수가 증가한 것으로 보아 마늘 성분에 의한 자극 효과로 사료된다(Fig. 7 and Fig. 8). 라이소자임은 많은 어류에 정균 효과가 있으며, Kim et al.(1992)은 넙치의 라이소자임이 *Streptococcus epidermis*, *Pseudomonas fluorescens* 등 높은 정균효과가 있으며, 보체나 식세포 등과 협력하여 훨씬 높은 용균 효과를 보인다고 보고 하였다. *V. anguillarum*을 사용해 감염시킨 경우, 발효마늘분말 및 1%마늘원액 첨가구 모

두 대조구에 비해 낮은 폐사율이 관찰되었다. 이것은 마늘의 포함된 유용 생리활성물질에 의한 면역시스템의 활성화로 lysozyme 및 phagocyte의 활성이 증강되어 병원성 세균에 대한 방어에 중요한 역할을 한 것으로 사료된다. *S. iniae*의 경우, 발효마늘분말 실험 결과, 대조구에서는 공격 실험 후 3일째 대량 폐사가 난데 비해, 0.5, 1%, 2%은 10~16일 사이에 대부분 폐사가 발생하였으며, 1%마늘원액 첨가구 실험 결과, 대조구에서 1~11일째 사이에 폐사가 집중적으로 일어났으며, 1% 그룹에서는 9~12일째 폐사가 발생하여, 두 그룹 모두 대조구에 비해 폐사율이 지연 되는 것을 확인하였다. (Christyapita et al., 2007)은 틸라피아에 *Eclipta alba* leaf 추출물을 0.1%를 2주간 경구투여 하였을 때 75%의 상대 생존율을 나타내었다. 마늘을 경골어류에 투여한 연구는 많지 않아 직접적인 비교는 확인하기 어렵지만 폐사율의 감소가 본 연구 결과와 유사하였다. *E. tarda*를 사용하여 감염시킨 경우, 발효마늘분말에서는 모든 실험구가 8일 이내에 100%의 폐사율이 관찰되었고, 1%마늘원액 첨가구에서 대조구는 3일째 100% 폐사율에 비해 실험구에서는 실험이 끝날 무렵까지 80%의 폐사율이 관찰되었다. 김(1999)은 구기자 열수 추출물 나일 틸라피아에 투여하여 *E. tarda*를 주사한 실험구에서 저항성을 나타냄을 밝혔고, 김 등(2009)은 오매 추출물 투여 후 뱀장어의 병원성 세균 *E. tarda*와 *A. hydrophila* 균에 대한 저항성 실험에서 오매 추출물을 첨가한 실험구가 대조구에 비해 병원성 세균에 대한 저항성이 높은걸 보고 하였다. 따라서 1%의 마늘원액첨가구에서는 대조구에 비해 병원성 세균에 대한 저항성확인 하였으나, 다른 그룹에 비해 높은 폐사율을 관찰하였다. Park et al.(1997)은 β -glucan을 투여한 조피볼락이 *Staphylococcus epidermidis* 및 *Vibrio ordalii*에는

방어효과가 인정되었지만, *E. tarda*에는 방어효과가 전혀 관찰되지않았다. Cho et al.(2006)은 넙치에게 녹차를 사료에 첨가하여 공급 한 후, *E. tarda*로 공격 실험한 결과, 발효마늘분말과 같은 유의적 차이를 보이지 않았다. 두 그룹 모두 높은 폐사율이 발생한 것으로 보아, *E. tarda*에 대한 항병력 효과가 없거나 주사농도가 적절하지 않았다고 추측된다. 위와 같은 결과에서 알 수 있듯이 마늘에 함유되어 있는 여러 가지 유용 생리활성물질에 의해서 항산화효과가 증가하여 넙치의 비특이적 면역기구인 NBT와 라이소자임 활성이 혈청의 살균능력을 크게 자극하는 기능을 가지고 있어 넙치의 체내 자연 저항성을 증강시켜 질병의 감염에 대한 유효한 방어력을 가질 수 있다고 판단된다.

병원체가 숙주 내에 감염이 되면 초기 면역을 담당하는 대식세포는 병원체를 비특이적으로 식작용하여 살해할 수 있고, 면역반응 초기에 부세포로 작용함으로써 어류의 비특이적인 면역반응에 중요한 역할을 담당한다(Secombes, 1996).

바이러스 및 세균을 복강주사 후, 비특이적인 면역반응을 분석한 결과, 발효마늘 분말에서는 1%, 2%에서 점액, 혈청라이소자임 모두 높게 관찰되었고, *V. anguillarum*, *S. iniae*, VHSV, *E. tarda* 순으로 높은 활성이 관찰되었으며(Fig 10), 1%마늘원액 첨가한 그룹에서 *E. tarda*은 1일째 보다 3일째 유의적으로 낮은 활성이 관찰되었고 비특이적 면역반응에서 0%보다 1%에서 유의적으로 높은 활성이 관찰되었다(Fig 14, 15). 두 실험 모두 공격실험의 폐사율과 유사하게 활성이 관찰되었고, 대조구보다 높은 활성이 관찰 된 것으로 보아, 발효마늘분말 및 1% 마늘원액 그룹에서 항산화효과가 증가한 것으로 판단된다.

이상의 모든 실험결과를 종합하여 볼 때, 1%마늘원액이 발효마늘분말 보다 비특

이적인 면역반응을 향상시켜 주었으나, 두 그룹모두 어병세균인 *E. tarda*에 대한 항병력의 효과가 나타나지 않았다. 하지만, *V. anguillarum*, *S. iniae*, 및 VHS에 대한 항병력을 향상시켰다. 따라서 마늘을 양식 넙치의 사료내에 첨가하면 면역 증강물질로서 기능한다는 사실을 입증하였다. 그러나 선 연구에서 마늘을 섭취시킨 넙치에서 성장률에는 아무런 영향을 미치지 못해 단백질전환효율에 대한 재 조명이 필요할 것으로 판단되며, 현장에서 실제로 사용하기 위해 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

V . 요 약

본 실험의 목적은 사료내의 5주간 발효마늘분말(0%, 0.5%, 1%, 2%)을 단계별로 첨가하여 억제감수성, 최소억제농도, 혈액분석, 비특이적 면역반응, 어병균(VHS, *V. anguillarum*, *S. iniae*, *E. tarda*)에 대한 질병저항성에 대해 수행 한 결과 1%에서 효과를 관찰하여, 4주간 1%마늘원액을 사료에 첨가하여 비교하였다.

공격실험 실험은 발효마늘분말(5주) 및 1%마늘원액(4주) 종료 후, 어류의 항병력을 평가하기 위해 3가지 박테리아 부유액 및 1가지 바이러스 부유액을(1ml)을 복강 주사하였다. 발효마늘원액 및 마늘원액을 단계별 희석시켜 어병세균(*V. anguillarum*, *S. iniae*, *E. tarda*)의 대한 억제감수성 및 최소억제농도를 실험한 결과, 발효마늘원액에서는 효과를 볼수 없었으나, 마늘원액에서는 어병세균에 대한 효과를 관찰하였다. 헤마토크릿, 글루코스, 총단백질, 대식세포, 라이소자임 활성에서 발효마늘분말 첨가구 1%에서 대조구보다 유의적으로 높은 활성이 관찰되었고, 1%마늘원액 역시 대조구에 비해 유의적으로 높은 활성이 관찰되었다. 그중, 대식세포 활성에서는 발효마늘분말 첨가구 보다 1%마늘원액에서 높은 활성이 관찰되었다. 누적사망률은 발효마늘분말의 *E. tarda*을 제외한 모든 공격실험에서 대조구에 비해 낮은 폐사율을 관찰하였다. 이번 연구를 결과를 볼 때, 두 실험 모두 첨가구에서 항병력 및 비특이적 면역반응을 향상 시키지만, 발효마늘분말 보다 1%마늘원액에서 더 높은 항병력 및 비특이적 면역반응을 향상 시키는 것으로 사료된다.

VI. 감사의 글

저에게 2년이라는 석사과정 시간 동안 많은 것을 배우고 경험하였기에 석사가 끝나는 시점에서 너무나 뿌듯하고 즐거웠습니다. 학부시절부터 지금까지 저를 무한한 가르침과 바르게 지도해 주신 정준범 지도교수님께 감사 드리며, 더욱 발전하는 모습으로 보답하고자 합니다. 그리고 논문이 완성되기까지 부족한 부분을 보완해 주시고 진심으로 아껴주신 전려진박사님께도 감사의 말씀을 드립니다. 또한 학부시절부터 석사과정까지 많은 걸 배우고 깨달음을 주신 송춘복 교수님, 최광식 교수님, 허문수 교수님, 이제희 교수님, 여인규 교수님, 전유진 교수님, 이기완 교수님, 이경준 교수님, 이영돈 교수님, 김기영 교수님, 이승현 교수님, 정석근 교수님께 진심으로 감사드립니다. 지난 2년동안 가장 많이 나를 옆에서 봐준 나의 실험실 후배님들 천방지축 김성, 해병대 용덕, 술 좋아 승찬, 실험 좋아 정인, 게임의황제 영우, 자칭 초절정차도남 진수 필리핀 송이, 우리실험실 막내 허인에게 항상 고맙고 미안하고 사랑한다고 전하고 싶습니다. 그리고 항상 저에게 격려와 사랑으로 아껴주었던 혜진이누나, 맹진이형, 송헌이형, 주상이형, 영득이형, 준석이형, 용재형, 희중이형, 희도형, 헌기형, 상혁이형, 성삼이형, 대한이형, 지훈이형, 지혁이형, 진우형, 유철이형, 애선누나, 은영누나, 일태, 오박사 민욱, 혜선, 아름, 태수, 수아, 성도, 세라, 병주, 인국, 대중, 송식, 완재 등과 저희 석사 대학원 동기들 준상이형, 익수형, 창익이형, 헤미, 효원, 창수, 소현, 병훈, 창희에게도 고맙다는 말 전합니다. 그리고 해여남 식구들 준상이형, 익수형, 동휘, 승현, 동민, 창수, 종경, 소현와 대학교시절 나의 버팀목이 되었던 영원한 택견 식구들 태호

형, 백훈이형, 관석이형, 창수형, 시관이형, 근탁이형, 명오형, 승일이형, 병구형, 성필이형, 정보형, 영희, 해원, 희선, 현정, 민정, 성희, 안숙, 영종, 수영, 보라에게 진심으로 고맙다는말 전하고 싶습니다. 힘들고 지쳤을 때 언제나 마음의 휴식이 되어 주었던 삼재종경, 천하태평 창수, 결혼 축하 아름다슬, 사설매니아 경필에게 고맙고 사랑한다고 말을 전합니다. 그리고 20년이 가까운 시간까지 사랑으로 저를 지켜봐주신 허종옥님께서도 감사하다는 말을 드립니다. 끝으로, 항상 힘이되어주시고, 끝없는 사랑으로 저를 지켜 봐 주신 우리 가족 김경숙 여사님 (어머니), 김수정(큰누나), 김수덕(작은누나), 권유빈, 권윤선(조카)과 하늘에서 보고 계시는 우리아버지 김종철님에게 미흡하나마 이논문을 바칩니다.

VII . 참고문헌

- Amir Tukmechi, Abdolghaffar Ownagh, Ali Mohebbat.: *In vitro* antibacterial activities of ethanol extract of iranian propolis (EEIP) against fish pathocenic bacteria (*AEROMONAS HYDROPHILA*, *YERSINIA RUCKERI* & *STREPTOCOCCUS INIAE*) Brazilian Journal of Microbiology., 41: 1086-1092, 2010.
- Bang, J. D., Chun, S. K., Pa가, S. I. and Choi, Y. J. : Studies on the biochemical and serological charateristics of *Edwardsiella tarda* isolated from cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Pathol., 5(1), 29-35, 1992.
- Casillas E, Ames W (1985) Serum chemistry of diseased English sole, *Parophrys vetulus Girard*, from polluted areas of Puget Sound, Washington. J Fish Dis 8:437-449.
- Cavallito, C. J., AND BAILEY, J. H. 1944 Preliminary note on the inactivation of antibiotics. Science, 100, 390.
- Cavallito, C.J., Buck, S.J. and Suter, C.M.: Allicin, the antibacterial properties and antibacterial action. J. Am. Chem. Soc., 66:1950-1951, 1944.
- Cavallito, C.J. and Bailey, J.H.: Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. II. Determination of the chemical structure. J. Am. Chem. Soc., 66:1952-1954, 1944.
- Chang YJ, Park MR, Kang DY, Lee BK (1999) Physiological responses of cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) on series of lowering seawater temperature sharply and continuously. J Kor Fish Soc 32:601-606.
- Chang YJ, Min BH, Chang HJ, Hur JW (2002) Comparison of blood physiology in juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) reared in converted

freshwater from seawater and seawater from freshwater. J Kor Fish Soc 35:595-600.

Chen, D. and Ainsworth, A.J.: Glucan administration potentiates immune defense mechanism of channel catfish, *Ictalurus punctatus Rafinesque*. J. Fish Dis., 15:295-304, 1992.

Cho, S. H., Lee, S. M., Park, B. H., Ji, S. C., Kwon, M. G., Kim, Y. C., Lee, J. H. K. 2006. Effect of dietary inclusion of various sources of green tea on immune system and challenging test of juvenile olive flounder *paralichthys olivaceus*. J. of Aquaculture. 19, 84-89.

Chrisyapita, D., Divyagnaneswari, M. and Dinakaran, M.R.: 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, 2007.

Chung, J.Y. and Kim, C. S. 2008. Antioxidant activities of domestic garlic (*Allium sativum* L.) stems from different areas. J. Korean Soc. Food Sci Nutr. 37, 972-978.

Davis KB, Parker NC (1990) Physiological stress in striped bass: Effect of acclimation temperature. Aquaculture 91:349-358.

Edward, J. N.: Fish disease. Diagnosis and treatment. Iowa state university press, p. 367, 2000.

Engstad, R.E., Robertson, B. and Frivold, E.: Yeast glucan induce increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish Dis., 15:295-304,1992.

Gordon RB (1968) Distribution of transaminases (Aminotransferases) in the tissue of the Pacific salmon (*Oncorhynchus*) with emohasis on the properties and diagnostic use of glutamic oxaloacetic transaminase. J Fish Res Bd Can 25:1247-1268.

Hong, Y.S., Ham, Y.A., Choi, J.H., and Kim, J.: 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, 2000.

Horiuchi, M., Sato, T., Takagi, H. and Tozuka, K.: Studies on rapid diagnosis system of main bacterial diseases of Edwardsiellosis by direct immunofluorescence. *Fish Pathol.*, 15, 49-55, 1980.

Hur JW (2002) Physiological responses of fishes to the artificial stresses in the process of aquaculture. Ph.D. Thesis, Pukyong National University, Busan, Korea.

Isshiki, T., Pearson, B., Holbrook, S. and Doe, C.Q., 2001. Drosophila neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny. *Cell* 106, pp. 511-521.

Jørgensen, J.B., Lunde, H. and Robertsen, B.: Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.J. *Fish Dis.*, 16:313-325. 1993a.

Kang JC, Jee JH, Song SY, Moon SW (2004) Effects of oral administration with fermented product from sewage in land-based seawater fish farm on haematological factors of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J Fish Pathol* 17:57-66.

Kim, Y. D., Kim, K.M., Hur, C. K., Kim, E. S., Cho, I. K. and Kim, K. J. 2004. Antimicrobial activity of garlic extracts according to different cooking methods. *Korean Journal of Food Preservation*. 11, 400-404.

Kim, J. W., Park, S. I. and Chun, S. K. : Purification and antibacterial effect of lysozyme from flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.*, 5: 87-92, 1992. (in Korean)

Kim, K. J., Do, J. R. and Kim, H. K. 2005. Antimicrobial, antihypertensive and

anticancer activities of garlic extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 37, 228-232.

Kim, S.M., K.M. Won, S.H. Woo, H. Li, E.J. Kim, K.J. Choi, M.Y. Cho, M.S. Kim and S.I. Park. 2005. Vibrios isolated from diseased marine culturing fishes in Korea. J. Fish Pathol., 18(2): 133-145.

Kim, S. S., Galaz, G. B., Lee, Y. D. 2006. Effects of dietary supplementation of *Spirulina* and astaxanthin for juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in low temperature season. J. of Aquaculture. 19, 57-63.

Kajita, Y., Sakai, M., Kobayashi, M. and Kawaushi, H.: Enhancement of non-specific cytotoxic activity of leucocytes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* injected with growth hormone. Fish Shellfish Immunol., 2:155-157, 1992.

Kitao, T., T. Aoki and K. Iwata (1979). Epidemiologic study on streptococciosis of cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) 1. Distribution of *Streptococcus* sp. in sea water and muds around yellowtail farms. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 45, 567-572.

Kubota, S. S., Kaige, N., Miyazaki, T. and Miyashita, T. : Histopathological studies on Edwardsiellosis of tilapia-1. Natural infection. Bull. Fac. Fish Mie University, 9, 155-165, 1981.

Kumari, J. and Sahoo, P. K. 2005. Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asian catfish *Clarias batrachus*. Aquaculture. 252, 121-127.

Lie, O., Evensen, O., Antina, S. and Froysadal, E.(1989) : Study on lysozyme activity in some fish species. Dis. Aquat. Org., 6: 1-5.

Mater KS, Mayer FL, Witt A (1985) Waste transformer oil and PCB toxicity to rainbow trout. Am Fish Soc 114:69-886.

Meyers TR, Short S, Lipson K (1999) Isolation of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) associated with epizootic mortality

in two new host species of Alaskan marine fish. Dis Aquat Org 38: 81-86.

Minami, T (1979). Streptococcus sp., pathogenic to cultured yellowtail, isolated from fisheries for diets. Fish Pathol., 14, 15-19.

Mortensen HF, Heur OE, Lorenzen N, Otte L, Olesen NJ (1999) Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from wild marine species in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak and the North Sea. Virus Res 63:93-108.

Munck A, Guyre PM, Holbrook J (1984) Physiological functions of glucocorticoid in stress and their relationship to pharmacological action. Endocrinol Rev 5:5-34.

Mun, H. Y., Lee, H. S., Paᄁ, J. H., Kim, D. H., Lee, S. Y., Seong, N. S., Bang, J. K., Jung, H. G. and Lee, H. Y. 2004. Enhancement of immune activities of Ganoderma lucidum mycelium cultured with garlic enriched mudium. Korean J. Medicinal Crop. Sco. 12, 24-30.

Nagatsugawa, T (1983). A streptococcal disease of cultured yellowtail. Fish Pathol., 17, 281-285.

Nakatsugawa, T. : *Edwardsiella tarda* isolated from cultured young flounder. Fish Pathol. 18, 99-101, 1983.

Nakagawa, H., Tsuta, K., Kiuchi, K., Senzaki, H., Tanaka, K. and Hioki, A.: Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. Carcinogenesis, Carcinogenesis, 22:891-897, 2001.

Nguyen H. T., K. Kanai and K. Yoshikoshi (2001). Experimental *Streptococcus iniae* infection in Japanese flounder(*Paralichthys olivaceus*). Fish Pathol., 36, 40-41.

Oh, M. J. and Chun, S. K. : Characteristics and antigenicity of *Edwardsiella tarda* isolated from tilapia(*Oreochromis niloticus*). J. Fish Pathol. 1(2), 77-85, 1988.

Park, Kim, Y.G. and Choi, D.L.: Enhancement of bacterial diseases resistance in

rockfish(*Sebastes schlegeli*) by β -glucan administration. J. Fish Pathol., 10(2): 143-152, 1997.

Qureshi, A. 1983. Suppression of avian hepatic lipid metabolism by solvent extracts of garlic : Impact on serum lipids. J. Nutr. 113, 1746-1755.

Rao PP, Joseph KV, Rao KJ (1990) Histopathological and biochemical change in the liver of a fresh water fish exposed to heptachlor. J Nat Conserv 2:33-137.

Rasheed, V. and J. Plumb (1984). Pathogenicity of a non-hemolytic group B *Streptococcus* sp. in gulf killifish, *Fundulus grandis*(Baird & Girard). Aquaculture 37, 97-105.

Ross K, McCarthy U, Huntly PJ, Wood BP, Stuart D, Rough EI, Smail DA, Bruno DW (1994) An outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in turbot (*Scophthalmus maximus*) in Scotland. Bull Eur Assoc Fish Pathol 14:213-214.

R. S. Rivlin, "Historical perspective on the use of garlic," J Nutr, Vol.131, pp.951S-954S, 2001.

Sae-Dui, D., Muroga, K. and Nakai, T. : A case of *Edwardsiella tarda* in cultured colored carp, *Cyprinus carpio*. Fish Pathol. 19, 197-199, 1984.

Schlotfeldt HJ, Ahne W, Vestergård-Jørgensen PE, Glende W (1991) Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*)—a natural outbreak. Bull Eur Assoc Fish Pathol 11:105-107.

Secombes, C. J.: The nonspecific immune system: cellular defenses. In: Iwama, G. and T. Nakanishi editor. The fish immune system: organism, pathogen and environment. San Diego: Academic Press., 105-157, 1996.

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 lipidemia. The Ind. J. Nutr. Dieter. 13, 7-11.

Shin, J. H., Jung, K. M., Lee, S. J., Yang, S. M., Rue, G. H. and Sung, N. J. 2009.

Biological activities of dried garlic, red ginseng and their mixture. J. Korea Soc. Food Sci. Nutr. 38, 1633-1639.

Shon, H. E., Lee, J. Y., Kim, D. C and Hwang, W. I. 2001. Enhancement of anticancer activity by combination of garlic (*Allium sativum*) extract and vitamin C. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 38, 1633-1639.

Takahashi, Y, Itami, T. and Konegawa K.: Enzymatic properties of partially lysozyme from the skin mucus of carp. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 52:1209-1214, 1986.

Takano R, Nishizawa T, Arimoto M, Muroga K (2000) Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Bull Eur Assoc Fish Pathol 20:186-192.

Takano R, Mori K, Nishizawa T, Arimoto M, Muroga K (2001) Isolation of viruses from wild Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathol 36:153-160.

Thompson, F.L., T. Iida. and J. Swings. 2004. Biodiversity of Vibrios. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 68(3): 403-431.

Wi, S. U. 2003. Isolation of alliin in garlic and its quantitative determination by high performance liquid chromatography and studies on the antimicrobial effects of alliin and ethanol extracts from korean garlic (*Allium sativum* L.) Korean J. Food & Nutr 16, 296-302.

Wu, C.C., Chung, J.G., Tsai, S.J., Yang, J.H. and sheen, L.Y.: Differential effects of allyl sulfides from garlic essential oil on cell cycle regulation in human liver tumor cells. Food Chem. Toxicol., 42:1937-1947, 2004.

Yamawaki K, Hashimoto W, Fujii K, Koyama J, Ikeda Y, Ozaki H (1986) Hemochemical changes in carp exposed to low cadmium concentrations. Bull Jap Soc Sci Fish 52:459-466.

Yeh, S.P., Chang, C.A., Chang, C.Y., Liu, C.H. and Cheng, W.: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. 2008.

김이청: 구기자 투여가 나일틸라피아, *Oreochromis niloticus*의 면역 반응에 미치는 영향. 부경대학교 대학원 박사학위 논문, 1999.

김진도, 김이청, 김광석, 우승호, 박성우 (2009) 오미자, *Prunus mume* 추출물 투여에 따른 뱀장어, *Anguilla japonica*의 면역 반응과 성장. J. Fish Pathol. 367-374.

목종수, 송기철, 최낙중, 양호식. (2001) 일부 어병 세균에 대한 상백피 에탄올 추출물의 항균활성. p. 211-226.

윤인숙. 2009. 마늘추출물의 식중독균에 대한 항균검사. 대구보건대학 임상병리과.
(접수일자:2009. 1. 23 / 심사완료일: 2009. 2. 20)

황우익, 이성동, 손홍수, 백나경, 지유환 (1990) 마늘 성분에 의한 면역 증강 및 항암효과. J. Korean Soc. 494~508.