

해조류 유래 후코이단(Fucoidan) 경구 투여가 조피볼락(*Sebastes schlegelii*)의 고수온 내성 및 *Streptococcus iniae* 감염 저항성에 미치는 영향

송준영* · 최영준 · 이남실 · 노치원 · 김아란 · 도용현¹ · 최혜승

국립수산물품질관리원 병리연구과, ¹국립수산물품질관리원 남동해수산연구소

Effect of Oral Administration of Seaweed-derived Fucoidan on the Resistance of the Rockfish *Sebastes schlegelii* to High Temperature and *Streptococcus iniae* Infection

Jun-Young Song*, Yong-Jun Choi, Nam-Sil Lee, Chi-Won No, Ahran Kim, Yong Hyun Do¹ and Hye Sung Choi

Pathology Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Republic of Korea

¹South East Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Tongyeong 53085, Republic of Korea

Immunostimulating effects of fucoidan administration to rockfish *Sebastes schlegelii* at a concentration of 20 g/kg of diet were evaluated under high water temperature condition. The oral administration of fucoidan mixed with feed at a concentration of 20 g/kg of diet for 2 weeks increased the interleukin 1 β gene in the intestine and kidney of fish by 5.7 and 6.3 times, respectively. In addition, when the water temperature was gradually increased from 24 to 31.4°C for 2 weeks, LT₅₀ delayed by 24 h in the fucoidan treated group compared to that in the control group, and mortality also reduced. *Streptococcus iniae* infection at a concentration of 1.50 $\times$ 10⁶ CFU/fish at 28°C delayed LT₅₀ by 12 h in the fucoidan-treated group. Furthermore, the overall survival rate was 0% in the control group and 20% in the fucoidan-treated group. This study confirmed the applicability of dietary additives such as fucoidan as an immune activator of rockfish under high temperature condition.

Keywords: *Sebastes schlegelii*, Fucoidan, *Streptococcus iniae*, Immunostimulating, Water temperature

서론

조피볼락(*Sebastes schlegelii*)은 우리나라 해상 가두리 양식 어류 중 가장 높은 생산량을 차지하는 주요 양식 품종이다. 조피볼락의 양식 생산량은 2007년 35,564톤까지 증가하였으나, 최근에는 고수온, 질병 등 다양한 요인에 의해 생산량이 줄어 2020년 21,571톤으로 줄어들었다(MOF, 2021). 한국해양수산개발원 수산업관측센터(MOF, 2021)에 따르면 2021년 3분기 측정된 조피볼락 양식 물량은 전기 말 대비 11.3% 감소한 1억 5,058만마리로, 전년 동월에 비해서도 10.9%가 적었는데, 이러한 감소의 원인으로 여름철 고수온에 의해 폐사가 많았기 때문으로 추정된 바 있다. 어류의 폐사 저감을 위한 연구로 식물, 미생물 또는 이들의 추출물을 함유한 사료를 투여한 후 면역, 성

장, 사료 효율 등에 관한 연구가 다수 진행되어 왔으며(Kim et al., 2006; Li et al., 2008; Ma et al., 2008), 조피볼락을 대상으로 한 항산화 기능의 사료첨가제에 관한 연구로 베타 글루칸, 갯지렁이 항균 펩타이드, 손바닥선인장, 블루베리 등을 포함한 기능성 사료 투여에 의한 세균 감염에 대한 저항 효과, 면역 활성 효과 등의 다양한 연구가 보고되어 있다(Kwon et al., 2016; Lee et al., 2016; Kim et al., 2019). 후코이단은 sulfate, uronic acid 및 fucose, galactose, maltose와 같은 당으로 구성된 해조류 유래 황산화 다당류로 인체와 동물 등에서 항산화작용, 항염 효과, 면역 증강 효과, 항응고 및 항바이러스 효과 등 다양한 생물학적 활성효과가 있는 것으로 보고되어 있다(Lee et al., 2004; Cumashi et al., 2007; Li et al., 2008; Mak et al., 2013).

후코이단의 면역 활성에 관한 연구는 인체, 동물 뿐 아니라 수

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 720. 2481 Fax: +82. 51. 720. 2498

E-mail address: jysong2012@korea.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2022.0567>

Korean J Fish Aquat Sci 55(5), 567-574, October 2022

Received 17 August 2022; Revised 9 September 2022; Accepted 11 October 2022

저자 직위: 송준영(연구사), 최영준(연구원), 이남실(박사 후 인턴연구원), 노치원(연구원), 김아란(연구사), 도용현(연구사), 최혜승(과장)

산생물을 대상으로도 다양한 연구가 수행되었다. 갑각류인 블랙타이거새우, 보리새우 등에 대한 후코이단의 성장, 면역 기능에 대한 다양한 효능이 보고되어 있으며(Takahashi et al., 1998; Immanuel et al., 2012; Kitikiew et al., 2013; Sivagnanavelmurugan et al., 2014; Salehpour et al., 2021), 특히 이들 연구자들은 새우류 주요 병원체인 *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, white spot syndrome virus (WSSV) 감염에 대한 후코이단의 감염 내성 효과에 대하여 보고하였다. 어류를 대상으로 후코이단의 성장, 면역, 항산화 효과 등에 대한 연구로는 잉어, 참돔, 틸라피아, 메기류 등에 대해 생체 방어 능력 향상, 산화 스트레스 저감 등 다수 보고되어 있으나(Caipang et al., 2011; Yang et al., 2014; Sony et al., 2019; Purbomartono and Isnansetyo, 2019; Nadia et al., 2020), 병원체 감염에 대한 후코이단의 효능에 대한 연구는 메기(*Pangasianodon hypophthalmus*), 대구(*Gadus morhua*), 틸라피아(*Oreochromis niloticus*) 등 일부 품종에 대하여 제한적인 연구가 보고되어 있다(Caipang et al., 2011; Prabu et al., 2016; Mahgoub, 2018).

본 연구에서는 우리나라에서 고수온에 의한 피해가 가장 큰 품종인 조피볼락에 대상으로 미역(*Undaria pinnatifida*) 유래의 후코이단 투여에 의한 면역 활성 효과를 조사하기 위하여 후코이단 흡착 사료를 경구투여 하고, 고수온에 대한 내성 효과와 세균성 병원체 *Streptococcus iniae*에 대한 방어 효과를 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

조피볼락에 대한 후코이단 투여 안전성 조사

본 연구에서 조피볼락의 면역 활성 조사를 위해 사용한 후코이단은 미역 유래의 후코이단(Fucoidan, ≥90%, Haerim Fucoidan Co., Ltd., Wando, Korea) 제품을 구입하여 사용하였다. 후코이단 10 g, 20 g, 40 g을 멸균 증류수 200 mL에 각각 녹여 후코이단 용액 제조 후, 각 농도의 후코이단 용액 200 mL을 배합

사료 1 kg에 각각 골고루 흡착한 후 무균대에서 2시간 이상 건조시켜 후코이단 흡착 사료(최종농도 10, 20, 40 g/kg of diet)를 제작하였다. 대조구는 후코이단을 넣지 않은 200 mL의 증류수를 사료에 흡착하여 같은 조건으로 건조하였다. 제작된 후코이단 흡착 사료는 냉동보존하면서 각 실험에 사용하였다. 조피볼락에 안전한 투여 농도를 결정하기 위하여, 조피볼락 성어(평균 체중 229.4±23.5 g)를 10마리씩 400 L 유수식 수조에 순치한 후 제작한 후코이단 사료를 조피볼락에 2주간(수온 24–25.5°C) 경구투여하였다(일 사료공급량, 어체중의 3%). 조피볼락 치어(14.96±1.78 g)의 경우 10마리씩 40 L의 수조에 순치하여 같은 방법으로 후코이단 사료를 투여하였다. 모든 실험은 duplicate로 진행하였으며 2주간의 사료 투여 후, 조피볼락(성어) 10마리(duplicate 수조에서 5마리씩 임의로 채취)의 미병부에서 혈액을 채취하여 5000 rpm에서 10분(4°C) 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈액분석장비 DRI-CHEM NX500I (Fujifilm, Tokyo, Japan)를 이용하여 매뉴얼에 따라 혈액 생화학적 지표인 alanine transaminase, blood urea nitrogen, glucose, glutamate pyruvate transaminase (GPT), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), magnesium (Mg), sodium (Na), chloride (Cl)을 분석하였다. 또한, 병리학적 병변을 조사하기 위하여 간, 신장, 비장 및 소화관 조직을 채취하여 10% 중성 포르말린에 고정하였으며, 일반적인 조직 시료 처리절차를 통하여 조직 절편을 제작하여 분석하였다. 혈액생화학적 지표의 결과와 조직병리학적 분석 결과에 따라, 이후의 실험에 대한 투여 농도를 결정하였다.

후코이단 투여에 따른 조피볼락의 면역 유전자 발현 분석

조피볼락(평균체중 229.4±23.5 g)을 10마리씩 400 L 유수식 수조에 순치한 후, 20 g/kg of diet 농도의 후코이단 흡착사료를 2주간 경구투여 하였다(일 사료공급량, 어체중의 3%). 이때의 수온은 24–25.5°C를 유지하였으며, 투여기간 종료 1일 후에 조피볼락의 신장, 비장, 장 조직을 채취하여 드라이아이스

Table 1. Primers used in this study

Target gene	Primer	Sequence	Reference
G-type lysozyme 1&2 gene (lyg)	Sch-lyg-265f	TGGGGACTGATGCAGGTTGA	This study
	Sch-lyg-528r	TGTACCACTGAGCTCTGGCA	
Interleukin-1 beta gene (il1β)	Sch-il1b-389f	ACCTGAACATGTCGACCTAC	This study
	Sch-il1b-495r	AGGTTGGATTGGCACCATTTC	
Heat shock protein 70 gene (hsp70)	Sch-hsp70-948f	AGAGCCGGTGGAGAAAGC	Mu et al. (2013)
	Sch-hsp70-1091r	CCTCGTCTGGGTTGATGC	
Thioredoxin-like gene (txn1)	Sch-txn1-691f	ATTCCACTGCGCTACGTCAA	modified from Kugapreethan et al. (2017)
	Sch-txn1-791r	TACCGGAGTGCCTATGAATG	
Ribosomal protein L17 gene (rpl17)	Sch-rpl17-376f	AGGCGACGCACCTACCG	Liman et al. (2013)
	Sch-rpl17-467r	CCTCTGGTTTGGGGACGA	

에 넣어 동결하였다. RNeasy mini kit (Qiagen, Amtsgericht Düsseldorf, German)을 사용하여 매뉴얼에 따라 각 샘플조직으로부터 total RNA (ribonucleic acid)를 추출하여 Nano Vue (GE, USA)에서 RNA 농도와 순도를 확인하였다. 총 RNA 농도가 100 ng/μL가 넘는 표본들을 대상으로 RNase-free DEPC-treated water를 사용하여 100 ng/μL의 농도로 희석하였다. Quant-iT™ RiboGreen® RNA Assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)의 제조사에서 제공한 프로토콜에 따라 100 ng/μL로 희석한 총 RNA 시료들의 형광값을 확인 후 DEPC-treated water를 이용하여 25 ng/μL로 희석하여 다시 최종 농도를 확인하여 사용전까지 -20°C에 보관하였다. 조피볼락 조직시료에서 추출한 RNA를 대상으로 실시간 역전사 PCR을 수행하기 위해 AccuPower® GreenStar™ RT-qPCR Master Mix (Bioneer Co. Ltd., Daejeon, Korea)를 이용하여 PCR 증폭반응액을 만들었으며, Applied Biosystems QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 PCR을 수행하였다. 정량 분석에 사용한 유전자 정보는 Table 1에, PCR 반응 조건은 Table 2에 나타내었다.

후코이단 투여에 따른 조피볼락의 고수온 내성 효과 시험

조피볼락(평균체중 14.96±1.78 g)을 10마리씩 40 L 사각 유리수조에 순치 한 후, 20 g/kg of diet 농도의 후코이단 흡착사료를 2주간 경구투여 하였으며(일 사료공급량, 어체중의 3%), 사료 투여시기의 수온은 24–25.5°C를 유지하였다. 대조구 또한 같은 조건으로 사료를 투여하였으며, duplicate로 실험을 수행하였다. 2주간의 사료 투여 후, 사료 공급을 중단하고 매일 1°C정도 수온을 점진적으로 상승하여 폐사가 발생할 때까지 (31.4°C) 수온을 올렸으며, 폐사율을 관찰하여 후코이단 투여에 의한 고수온 내성 효과를 확인하였다.

Streptococcus iniae 감염 방어 효과

조피볼락 치어에 대한 *S. iniae* 적정 감염 농도 결정을 위해 농도별 감염 실험을 수행하였다. 본 연구에서 사용한 *S. iniae* 균주는 2018년 8월 통영의 가두리양식장에서 폐사한 조피볼락에서 분리하여 한국수산미생물자원은행에 보존하고 있는 균주 (KoCAM ID: 18FBSIn0001)를 사용하였다. 조피볼락(평균체중 14.96±1.78 g)을 10마리씩 40 L 사각 유리수조에 순치한 후(수온 24–25.5°C), *S. iniae*를 1.46×10^0 – 1.46×10^2 CFU/fish 농도로 복강주사하고 폐사율을 관찰하였다. 실험은 duplicate로

진행하였으며, 대조구는 PBS를 100 μL 복강주사 하였다.

후코이단 투여에 의한 *S. iniae* 감염 방어 효과 검증을 위하여, 조피볼락(평균체중 14.96±1.78 g)을 10마리씩 40 L 사각 유리수조에 순치 한 후(수온 24–25.5°C), 20 g/kg of diet 농도의 후코이단 흡착 사료를 2주간 경구투여 한 후(일 사료공급량, 어체중의 3%), 1주일간 절식하였다. 대조구는 후코이단이 포함되지 않은 사료를 공급하였다. 사료투여 기간의 온도는 24–25.5°C를 유지하였으며 duplicate로 실험하였다. 절식기간 동안 수온을 28°C로 올려, 고수온 조건으로 *S. iniae*를 1.50×10^0 CFU/fish의 농도로 복강 주사하고 폐사율을 관찰하였다.

통계 분석

모든 데이터의 통계 처리는 Graphpad Prism 9을 사용하여 분석하였다.

결 과

후코이단 투여 농도 결정

후코이단의 안전한 투여 농도 결정을 위해 0, 10, 20, 40 g/kg of diet 농도로 사료에 혼합하여 2주간 경구투여하고 혈액생화학적 지표의 변화를 분석한 결과, 후코이단 40 g/kg of diet의 투여 그룹에서 대조구 또는 다른 그룹과 비교하여 혈액의 GOT, GPT, Mg, Na의 값이 유의하게 감소함을 확인하였다(Fig. 1). 또한, 병리조직학적 검사 결과, 후코이단 투여구(10, 20, 40 g/kg of diet)에서 간혈관 주위 면역세포 침윤이 다소 관찰되었으나, 신장 세뇨관, 사구체, 비장, 소화관(장)의 특이적 병변은 나타나지 않아 후코이단 투여에 따른 조직병리학적 독성은 나타나지 않는 것을 확인하였다(data not shown).

혈액생화학적 분석과 조직병리학적 검사를 통하여, 후코이단의 안전한 투여 농도는 20 g/kg of diet 이하로 확인하였으며, 후코이단 20 g/kg of diet의 농도를 면역활성 효과와 질병방어 효과 실험을 위한 투여 농도로 결정하였다.

후코이단 투여에 의한 조피볼락의 면역 활성 효과

조피볼락에 후코이단(20 g/kg of diet)을 2주간 경구투여한 결과, 대조구와 비교하여 신장과 소화관(장)에서 interleukin-1β (IL-1β)의 발현량이 유의적으로 증가함을 확인하였다(P<0.05). 후코이단 투여 그룹의 신장에서는 6.3배, 장에서는 5.7배 이상 IL-1β의 발현량이 증가하였다. Lysozyme, thioredoxin-like gene, heat-shock protein 70의 발현량은 비장, 신장, 장에서 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 2).

후코이단 투여에 의한 조피볼락의 고수온 내성 효과

조피볼락에 20g/kg of diet 농도의 후코이단 경구투여 후 수온을 하루 약 1°C씩 2주간 점진적으로 상승(24°C→31.4°C)시킨 결과, 대조구에서의 폐사 발생 시점은 온도 상승 후 8일째, 수온이 이틀동안 29°C를 유지하던 시점이었으며, 후코이단 투

Table 2. RT-qPCR condition for quantification of gene expression

Stage	Temperature	Time	No. cycles
Reverse transcription	60°C	15 min	1
Initial denaturation	95°C	5 min	1
Denaturation	95°C	15 sec	40
Annealing/Extension	60°C	1 min	1

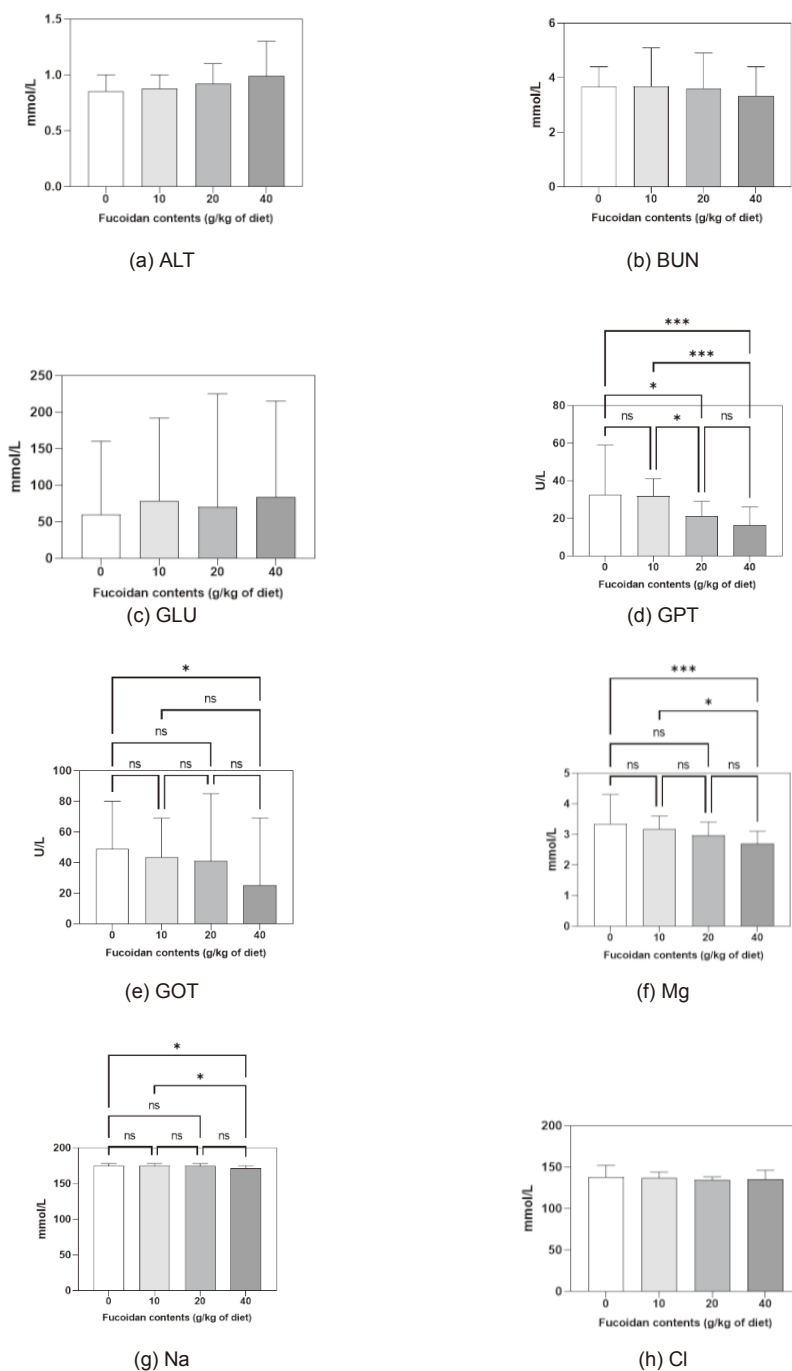


Fig. 1. Concentration of blood biochemical indicators in the fish administrated with fucoidan (20 g/kg of diet). ALT, Alanine transaminase; BUN, Blood urea nitrogen; GLU, Glucose; GPT, Glutamate pyruvate transaminase; GOT, Glutamic oxaloacetic transaminase; Mg, Magnesium; Na, Sodium; Cl, Chloride.

여구의 폐사 발생 시점은 이보다 5일 이후인 13일 째, 수온이 31.4°C 이상까지 도달한 시점으로 나타났다. 두 그룹 모두 31°C 이상의 수온에서 폐사량이 급격하게 증가하여 수온을 31°C 이하로 낮추었으나 대조구에서는 모든 실험어가 폐사하였으며,

후코이단 투여 그룹에서는 80%의 폐사가 발생하였다. 50%의 폐사가 발생할 때까지의 시간(LT_{50})은 후코이단 투여 그룹(336 h)에서 대조구(312 h)에 비하여 24시간이 지연됨을 확인하였다. 실험 종료시(후코이단 투여 종료 후 20일째)까지 후코이단

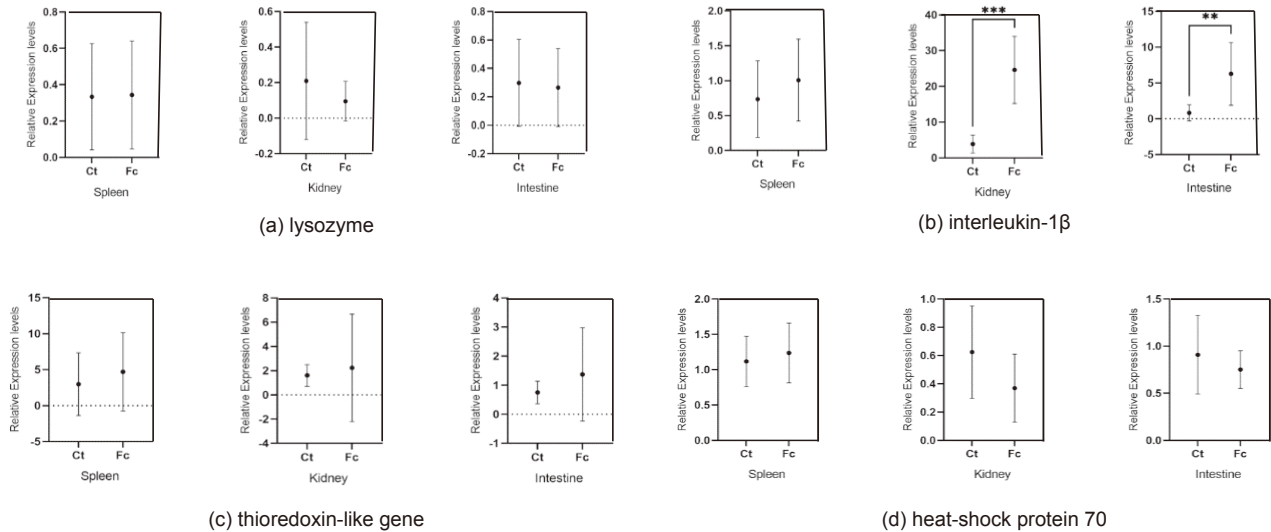


Fig. 2. The expressions of immune related genes in spleen, kidney and intestine of rockfish *Sebastes schlegelii* fed the experimental diets containing 20 g/kg of diet of fucoidan.

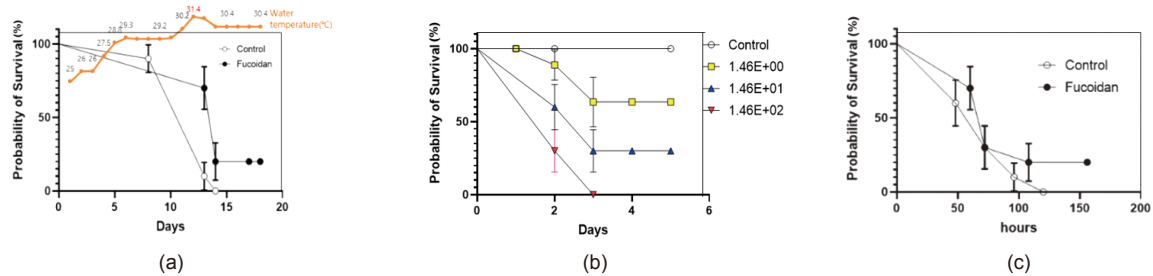


Fig. 3. Survival rates of rockfish *Sebastes schlegelii*. a, Survival rates of the fish exposed to high water temperature up to 31.4°C after administration of fucoidan (20 g/kg of diet); b, Survival rates of the fish experimentally infected with various concentrations of *Streptococcus iniae*; c, Survival rates of the fish experimentally infected with *S. iniae* (1.46×10^9 CFU/fish) after administration of fucoidan (20 g/kg of diet).

투여 그룹에서 폐사 저감(20% 생존) 효과가 있음을 확인하였다(Fig. 3a).

후코이단 투여에 의한 *Streptococcus iniae* 감염 방어 효과

*S. iniae*의 농도별 감염 실험을 통해, 본 실험에 사용하는 조피볼락 대상 적정 감염 농도는 30%의 폐사를 일으킨 농도인 1.46×10^9 CFU/fish로 결정하였으며(Fig. 3b), 후코이단 투여 후 감염실험에 사용한 세균의 농도 계산 결과 1.50×10^9 CFU/fish로 검증됨을 확인하였다. 조피볼락에 후코이단을 20 g/kg of diet 농도로 2주간 투여 후 고수온(28°C)에서의 세균의 방어 효과를 조사한 결과, 후코이단 투여그룹에서 폐사가 발생하는 시점(60 h)이 대조구(48 h)에 비하여 12시간 지연되었으며, 최종 생존률은 대조구 0%, 후코이단 투여그룹에서 20%로 나타났다(Fig. 3c).

고찰

후코이단은 인체, 동물 등에서 면역 상승 효과, 항산화 효과, 항균 및 항바이러스 효과 등 면역학적 효능이 있는 것으로 알려져 있으나, 어류에 대한 면역 활성 효능에 관하여는 연구가 많이 이루어져 있지 않다. 이에 따라, 본 연구에서는 후코이단을 조피볼락에 투여하여 고수온기 면역 증강 및 세균 감염에 대한 폐사 저감 효과를 조사하였다.

조피볼락에 대한 후코이단의 안전한 투여 농도를 결정하기 위하여 0, 1, 2, 4% 농도(0, 10, 20, 40 g/kg of diet)의 후코이단 함량 사료에 대하여 안정성을 조사하였다. 어류와 갑각류를 이용한 후코이단의 생리 활성에 관한 이전의 연구들에서 후코이단 투여 농도는 0.01%에서 6%까지 다양한 농도와 기간으로 실험하였으며, 이들 농도에 대한 독성에 관하여는 보고되어 있지 않았다(Chotigeat et al., 2004; Traifalgar et al., 2012; Sony et al.,

2019; Purbomartono and Isnansetyo, 2019; Mahgoub et al., 2020). 본 연구에서는 조피볼락에 후코이단을 2주간 경구 투여한 결과, 가장 높은 농도인 4%의 농도에서 일부 혈액생화학적 지표(GOT, GPT, Mg, Na)의 유의한 감소가 나타났다. GOT와 GPT는 간 건강도를 나타내는 대표적 지표로 알려져 있다. 이들의 농도가 증가할 경우에는 간 조직의 괴사나 변성 등에 영향이 있을 것으로 추측할 수 있으나, 감소하는 경우에 대해서는 임상적인 의의가 없는 것으로 알려져 있다(Brusle and Anadon, 1996). 본 연구에서 병리조직학적 이상 소견은 관찰되지 않았으나 혈액의 Mg와 Na의 감소는 신장 질환과 관련 있는 혈액학적 지표임에 따라, 4% 농도의 후코이단 투여는 조피볼락에 신장 독성을 일으킬 가능성이 있는 것으로 판단되어, 본 연구의 후코이단 면역효과 조사를 위한 안전한 투여 농도는 2% (20 g/kg of diet)로 결정하였다.

후코이단을 2주간 경구투여 한 조피볼락의 면역 및 스트레스 관련 유전자의 발현량을 조사한 결과, 20 g/kg of diet의 후코이단 사료를 투여한 어류의 신장과 장에서 interleukin-1 β (IL-1 β) 유전자 발현량이 대조구에 비해 유의적으로 증가함을 확인하였다. IL-1 β 는 세균 감염, 조직 손상, 면역 반응에 대한 신체 반응의 핵심 매개체로 숙주의 반응과 병원체 감염 방위에 필수적인 면역 요소이므로(Bird et al., 2002; Lopez-Castejon and Brough, 2011; Husain et al., 2012), 20 g/kg of diet 농도의 후코이단 투여는 조피볼락의 면역 자극 효과가 있는 것으로 사료되었다. 참돔 치어(평균 체중 3.8 g)에 0.3–0.4%의 농도로 사료에 섞어 60일간 경구투여 한 결과 성장, 면역반응, 산화스트레스 저항성을 증가시켰으며(Sony et al., 2019), 틸라피아에서는 높은 농도의 후코이단(0.8%) 사료가 낮은 농도(0.4%)의 사료보다 1달 투여 결과 성장에 더 효과적임을 보고하였다(Mahgoub et al., 2020).

후코이단 투여에 따른 고수온 내성 효과를 임상적으로 검증하기 위하여, 후코이단 투여 이후 수온을 점진적으로 상승시켜 최대 31.4°C까지 도달하자 모든 그룹에서 폐사율이 급격히 증가하여 대조구에서는 100% 폐사하였으나, 후코이단 투여구에서는 20%의 어류가 생존하였다. Do et al. (2016)에 의한 고수온에서의 조피볼락의 생리적 현상에 대한 연구에 따르면, 27°C까지의 수온에서는 조피볼락의 혈액 성상의 변화가 나타나지 않았으며, 30°C의 수온에서 급격한 변화와 함께 24시간 이내에 실험어가 모두 폐사함을 보고하였다. 조피볼락 치어를 사용하여 수온을 하루에 약 1°C 점진적으로 상승시킨 본 연구에서는 대량 폐사가 일어나는 온도가 31°C 이상으로 나타난 것으로 보아, 30°C 이상의 수온은 조피볼락에 매우 치명적인 수온인 것으로 판단되며, 고수온 노출 기간, 수온 변동의 폭과 시간에 의해 여름철 고수온기에는 30°C 내외의 수온에서 대량 폐사가 발생할 수 있을 것으로 사료되었다. 본 연구에서 31°C 이상의 수온에서 모든 그룹의 급격한 폐사가 나타났으나, 수온을 30°C 수준으로 낮추자 후코이단 투여구에서는 20%의 어류가 생존하였

다. 또한, 후코이단 투여 그룹에서 폐사가 시작되는 시점도 대조구와 비교하여 5일 지연됨에 따라, 후코이단 투여에 의해 고수온에 대한 내성 효과가 있는 것으로 판단되었다. 그러나, 고수온 내성과 관련한 후코이단의 명확한 효능 검증을 위해서는, 수온의 일간 변동 폭과 고수온 노출시간 등 다양한 조건을 고려한 면밀한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

*S. iniae*는 여름철 해산어류 폐사를 일으키는 주요 원인 세균이며, 본 연구에서 조피볼락 적정 감염 농도를 결정하기 위해 조피볼락 치어(14.96 $\pm$ 1.78 g)에 감염실험을 수행하였다. 그 결과, *S. iniae* 균주는 24–25.5°C의 수온 범위에서 1.46 $\times$ 10⁶ CFU/fish의 매우 낮은 농도에서도 폐사율이 30%로 나타나 조피볼락에 매우 병독성이 강한 것을 확인하였다. 후코이단을 20 g/kg of diet 농도로 2주간 조피볼락에 투여한 후 고수온 조건(28°C)에서 *S. iniae*를 1.50 $\times$ 10⁶ CFU/fish의 농도로 감염한 결과, 대조구에서는 100% 폐사가 발생하였으며 후코이단 투여구에서는 20% 생존 효과와 함께 폐사 발생 시점이 12시간 지연되는 효과가 있었다. 틸라피아에 0.8%의 후코이단을 경구투여한 결과, *Flavobacterium columnare* 감염된 틸라피아의 치료 효과가 보고되어 있으며, 메기의 *Aeromonas hydrophila* 감염에 대한 높은 생존 효과가 보고되어 있다(Caipang et al., 2011; Mahgoub, 2018). 또한, 갑각류인 블랙타이거새우(*Panacus monodon*)에 후코이단을 100, 200 mg/kg of body weight/day 농도로 투여한 결과, 5–8 g의 어린 새우에서는 투여 농도별 생존률이 각각 4.4%와 44%로 나타났으며, 12–15 g의 새우에서는 각각 42%와 93%의 생존률을 보여 개체의 크기에 따른 효능의 차이가 나타났다. 또한, 후코이단 투여에 의해 블랙타이거새우의 white spot syndrome virus (WSSV) 감염에 대한 방어 효능이 있었으며(Chotigeat et al., 2004), 보리새우(*Panacus japonicus*) 조애아 유충 단계에서 500 mg/kg of diet 농도의 후코이단 투여로 *Vibrio harveyi* 감염 저항성 효과가 보고되었다(Traifalgar et al., 2012).

본 연구에 사용한 *S. iniae* 균주의 농도는 25°C 내외의 수온에서 조피볼락 치어에 30%의 폐사를 일으키는 것으로 확인된 농도였으나, 28°C의 수온에서 실험한 결과 100%의 높은 폐사가 발생한 것으로 보아 고수온에 의한 조피볼락의 스트레스와 면역 저하로 세균의 병독성이 더욱 증가한 것으로 추측되었다. 고수온 조건에서 *S. iniae*의 강한 병원성으로 인하여 후코이단 투여그룹에서도 조피볼락 치어의 높은 폐사가 나타났으나, 대조구와 비교하여 20% 높은 생존 효과를 보였으므로 조피볼락의 성장 단계별 후코이단의 효능에 관한 연구가 더 필요한 것으로 사료된다.

우리나라는 여름철 고수온과 적조 등으로 인해 해마다 양식수산물의 피해가 발생함에 따라, 본 연구에서는 고수온 피해가 가장 큰 품종인 조피볼락을 대상으로 후코이단을 이용한 면역활성 효과에 관하여 조사하였다. 후코이단의 면역 활성 효과는 다양한 연구에 의해 검증되었으며, 본 연구를 통해 후코이단 투여

가 조피볼락의 고수온 내성 및 세균 감염에 대한 저항성에 효과가 있는 것으로 판단됨에 따라 고수온 대응을 위한 면역활성제로서의 가능성을 검증하였다.

사 사

본 연구는 국립수산물과학원 수산생물 질병 특성 연구(R2022070)의 지원에 의해서 운영되었습니다.

References

- Bird S, Zou J, Wang T, Munday B, Cunningham C and Secombes CJ. 2002. Evolution of interleukin-1 β . Cytokine Growth Factor Rev 13, 483-502. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(02\)00028-X](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(02)00028-X).
- Bruslé J and Anadon GG. 1996. The structure and function of fish liver. In: Fish Morphology. Datta-Munshi JS and Dutta HM, eds. Science Publishers Inc., New York, NY, U.S.A., 77-93.
- Caipang CM, Lazado CC, Berg I, Brinchmann MF and Kiron V. 2011. Influence of alginic acid and fucoidan on the immune responses of head kidney leukocytes in cod. Fish Physiol Biochem 37, 603-612. <https://doi.org/10.1007/s10695-010-9462-z>.
- Chotigeat W, Tongsupa S, Supamataya K and Phongdara A. 2004. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. Aquaculture 233, 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.025>.
- Cumashi A, Ushakova NA, Preobrazhenskaya ME, D'incecco A, Piccoli A, Totani L, Tinari N, Morozovich GE, Berman AE and Bilan MI. 2007. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. Glycobiology 17, 541-552. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm014>.
- Do YH, Min BH, Kim YD and Park MS. 2016. Change on hematological factors and oxygen consumption of Korean rockfish *Sebastes schlegeli* in high water temperature. J Fish Mar Sci Edu 28, 738-745. <https://doi.org/10.13000/JFMSE.2016.28.3.738>.
- Husain M, Bird S, van Zwieteren R, Secombes CJ and Wang T. 2012. Cloning of the IL-1 β gene and IL-1 β pseudogene in salmonids uncovers a second type of IL-1 β gene in teleost fish. Dev Comp Immunol 38, 431-446. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.07.010>.
- Immanuel G, Sivagnanavelmurugan M, Marudhupandi T, Radhakrishnan S and Palavesam A. 2012. The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). Fish Shellfish Immunol 32, 551-564. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.01.003>.
- Kim KD, Seo JS, Hur SW, Kim KW, Lee BJ and Bae KM. 2019. Effects of dietary supplementation of cactus *Opuntia ficus-indica* on growth, flesh quality, lysozyme activity and histological change of growing Korean rockfish *Sebastes schlegeli*. Korean J Fish Aquatic Sci 52, 358-365. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0358>.
- Kim SS, Galaz GB, Lee KJ and Lee YD. 2006. Effects of dietary supplementation of Spirulina and Astaxanthin for juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in low temperature season. Fish Aquatic Sci 19, 57-63.
- Kitikiew S, Chen JC, Putra DF, Lin YC, Yeh ST and Liou CH. 2013. Fucoidan effectively provokes the innate immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against experimental *Vibrio alginolyticus* infection. Fish Shellfish Immunol 34, 280-290. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.016>.
- KMI (Korea Maritime Institute). 2021. KMI Weekly Seafood Supply and Demand Report. KMI, Busan, Korea, 42-44.
- Kugapreethan R, Umasuthan N, Wan Q, Thulasitha WS, Kim C and Lee J. 2017. Comparative analysis of two thioredoxin-like genes in black rockfish *Sebastes schlegelii* and their possible involvement in redox homeostasis and innate immune responses. Dev Comp Immunol 67, 43-56. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.10.012>.
- Kwon MG, Seo JS, Youn HJ, Park CI, Jeong JM and Bae JS. 2016. Effect of the polychaete antimicrobial peptide as feed additives on olive flounder and black rockfish immune activity. J Fish Mar Sci Edu 28, 1640-1650. <https://doi.org/10.13000/jfmse.2016.28.6.1640>.
- Lee JB, Hayashi K, Hashimoto M, Nakano T and Hayashi T. 2004. Novel antiviral fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu). Chem Pharm Bull 52, 1091-1094. <https://doi.org/10.1248/cpb.52.1091>.
- Lee KW, Kim HS, Cho SH, Park CI and Ha MS. 2016. Effect of dietary inclusion of Yacon, ginger and blueberry on growth, feed utilization, serum chemistry and challenge test against *Streptococcus iniae* of juvenile rockfish *Sebastes schlegeli*. Korean J Fisher Aquat Sci 49, 823-829. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2016.0823>.
- Li B, Lu F, Wei X and Zhao R. 2008. Fucoidan: Structure and bioactivity. Molecules 13, 1671-1695. <https://doi.org/10.3390/molecules13081671>.
- Liman M, Wenji W, Conghui L, Haiyang Y, Zhigang W, Xubo W and Quanqi Z. 2013. Selection of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in black rockfish (*Sebastes schlegeli*). Mar Genomics 11, 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2013.08.002>.
- Lopez-Castejon G and Brough D. 2011. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. Cytokine Growth Factor Rev 22, 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>.
- Ma JJ, Xu ZR, Shao QJ, Xu JZ, Hung SS, Hu WL and Zhuo LY. 2008. Effect of dietary supplemental L-carnitine on growth performance, body composition and antioxidant

- status in juvenile black sea bream, *Sparus macrocephalus*. Aquac Nutr 14, 464-471. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00551.x>.
- Mahgoub HA. 2018. Can fucoidan decrease the mortalities caused by Columnaris disease in Nile Tilapia?. World J Agric Res 6, 1-4. <https://doi.org/10.12691/wjar-6-1-1>.
- Mahgoub HA, El-Adl MAM, Ghanem HM and Martyniuk CJ. 2020. The effect of fucoidan or potassium permanganate on growth performance, intestinal pathology, and antioxidant status in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish Physiol Biochem 46, 2109-2131. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00858-w>.
- Mak W, Hamid N, Liu T, Lu J and White W. 2013. Fucoidan from New Zealand *Undaria pinnatifida*: Monthly variations and determination of antioxidant activities. Carbohydr Polym 95, 606-614. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.047>.
- MOF (Ministry of Oceans and Fisheries). 2021. Statistical Yearbook of Oceans and Fisheries. MOF, Sejong, Korea, 1-239.
- Mu C, Zhang S, Yu G, Chen N, Li X and Liu H. 2013. Overexpression of small heat shock protein LimHSP16. 45 in *Ara-bidopsis* enhances tolerance to abiotic stresses. PloS One 8, e82264. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082264>.
- Nadia M, Sony M, Sakhawat H, Saichiro Y. 2020. Efficacy of mozuku fucoidan in alternative protein-based diet to improve growth, health performance, and stress resistance of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. Fish Physiol Biochem 46, 2437-2455. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00881-x>.
- Prabu, DL, Sahu NP, Pal AK, Dasgupta S and Narendra A. 2016. Immunomodulation and interferon gamma gene expression in sutchi cat fish, *Pangasianodon hypophthalmus*: effect of dietary fucoidan rich seaweed extract (FRSE) on pre and post challenge period. Aquac Res 47, 199-218. <https://doi.org/10.1111/are.12482>.
- Purbomartono and Isnansetyo A. 2019. Dietary fucoidan from *Padina boergesenii* to enhance non-specific immune of catfish (*Clarias* sp.). J Biol Sci 19, 173-180. <https://doi.org/10.3923/jbs.2019.173.180>.
- Salehpour R, Amrollahi BN, Mohammadi M, Dashtiannasab A and Ebrahimnejad P. 2021. The dietary effect of fucoidan extracted from brown seaweed, *Cystoseira trinodis* (C. Agardh) on growth and disease resistance to WSSV in shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol 119, 84-95. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.09.005>.
- Sivagnanavelmurugan M, Thaddaeus BJ, Palavesam A and Immanuel G. 2014. Dietary effect of *Sargassum wightii* fucoidan to enhance growth, prophenoloxidase gene expression of *Penaeus monodon* and immune resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. Fish Shellfish Immunol 39, 439-449. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.037>.
- Sony NM, Ishikawa M, Hossain MdS, Koshio S and Yokoyama S. 2019. The effect of dietary fucoidan on growth, immune functions, blood characteristics and oxidative stress resistance of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. Fish Physiol Biochem 45, 439-454. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0575-0>.
- Takahashi Y, Uehara K, Watanabae R, Okamura H, Yamashita T and Omura H. 1998. Efficacy of oral administration of shrimp in Japan. In: Advances in Shrimp Biotechnology. Flegel TW, ed. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand, 171-173.
- Traifalgar RFM, Koshio S, Ishikawa M, Serrano AE and Corre VL. 2012. Fucoidan supplementation improves metamorphic survival and enhances vibriosis resistance of *Penaeus japonicus* larvae. Aquac Sci 57, 167-174. <https://doi.org/10.11233/aquaculturesci.57.167>.
- Yang Q, Yang R, Li M, Zhou Q, Liang X and Elmada ZC. 2014. Effects of dietary fucoidan on the blood constituents, anti-oxidation and innate immunity of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Fish Shellfish Immunol 264-270. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.09.003>.