

# 흰다리새우(*Penaeus vannamei*) 사료 내 갯생이모자반(*Sargassum horneri*) Celluclast 가수분해물 이용성 평가

김수아<sup>1</sup> · 최인하<sup>1</sup> · 김수혁<sup>1</sup> · 이경준<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>제주대학교 해양생명과학과, <sup>2</sup>기당해양과학원 수산생물연구소

## Evaluation of Dietary Supplementation of *Sargassum horneri* Celluclast Hydrolysate for Pacific White Shrimp *Penaeus vannamei*

Sua Kim<sup>1</sup>, Inha Choe<sup>1</sup>, Suhyeok Kim<sup>1</sup> and Kyeong-Jun Lee<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Marine Life Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea

<sup>2</sup>Marine Life Research Institute, Kidang Marine Science Institute, Jeju National University, Jeju 63333, Republic of Korea

This study investigated the effects of dietary supplementation with *Sargassum horneri* celluclast hydrolysate (SHCH) on the growth performance, feed utilization, non-specific immunity and antioxidant capacity of the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. Six diets were prepared by SHCH supplementation levels of 0, 5, 10, 20, 40 and 80 g/kg (designated as Con, S5, S10, S20, S40 and S80, respectively). A total of 540 shrimp were randomly distributed in triplicate across 18 tanks and fed one of the diets for five weeks. Weight gain did not differ significantly among the groups except for S80. The feed conversion ratio was significantly lower in S10 than in S80. Phenoloxidase and nitro-blue tetrazolium activities were significantly higher in S5 than in Con. The prophenoloxidase gene was significantly upregulated in S10 compared to that in Con. The gene expression of crustin, glutathione peroxidase, lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-glucan-binding protein were significantly upregulated in S5 compared to Con. The superoxide dismutase gene was significantly upregulated in S20 and S80 compared to Con. Supplementing shrimp diets with up to 8% of SHCH did not impair non-specific immunity or antioxidant capacity. However, based on growth results, supplementation up to 4% was considered appropriate.

Keywords: *Sargassum horneri*, Feed additive, Non-specific immunity, Antioxidant capacity, Pacific white shrimp

### 서론

흰다리새우(*Penaeus vannamei*)는 성장이 빠르고 고밀도 양식이 가능하다. 전 세계적으로 가장 널리 양식되는 새우로 2010년 264만 8,500톤에서 2022년에는 581만 2,200톤으로 증가하는 추세이다(FAO, 2022). 고밀도 새우양식은 새우의 면역체계에 부정적인 영향을 미치기 때문에 병원성 세균의 감염에 취약하다고 보고되었다(Tong et al., 2022). 최근 전염성 질병에 의한 피해가 지속적으로 발생하고 있다. 이를 예방하고 치료하기 위해 oxytetracycline, ampicillin과 같은 항생제가 무분별하게 사용되고 있다. 항생제 오남용은 새우 소비의 안전성 문제와 주변 수계의 오염을 야기시킬 수 있기 때문에 많은 국가에서 사용

을 제한하고 있다(Lulijwa et al., 2020). 따라서, 면역력을 개선하는 친환경적인 기능성 사료첨가제의 연구가 필요한 실정이다(Kumar et al., 2023). 해조류에는 폴리페놀 유도체, 항산화 다당류, 다중 불포화 지방산이 풍부하여 동물의 면역력 향상에 효과적인 것으로 보고되었다(Fernando et al., 2020). 갈조류는 phlorotannin, fucoxanthin, fucoidan, alginate, laminarin과 같은 생리활성 물질이 다른 해조류에 비해 상대적으로 풍부하여 기능성 사료 첨가제로써 주목받고 있다(Shao et al., 2015). 대서양연어(*Salmo salar*)와 잉어(*Cyprinus carpio*) 사료에 갈조류를 첨가할 경우, 성장, 소화효소 활성, 비특이적 면역력, 항산화력을 촉진한다고 보고되었다(Kamunde et al., 2019; Sheikhzadeh et al., 2022).

\*Corresponding author: Tel: +82. 64. 754. 3423 Fax: +82. 64. 756. 3493

E-mail address: kjlee@jeju.ac.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.2024.0497>

Korean J Fish Aquat Sci 57(4), 497-504, August 2024

Received 13 May 2024; Revised 12 June 2024; Accepted 10 July 2024

저자 직위: 김수아(대학원생), 최인하(대학원생), 김수혁(대학원생), 이경준(교수)

갈조식물문 모자반목에 속하는 팽생이모자반(*Sargassum horneri*)은 중국 연안에서 국내 해안으로 유입되어 축적되고 있다. 이는 지역 관광산업의 피해, 해상 안전사고, 양식장 시설 피해 등과 같은 환경적 문제와 이를 폐기하기 위한 경제적 부담을 야기하고 있다(Hwang et al., 2016). 따라서 팽생이모자반을 효과적으로 처리할 수 있는 방안을 모색하는 것이 필요하다. 팽생이모자반은 여러 갈조류와 유사하게 phenolic acid와 flavonoid와 같은 면역 자극제로서 기능하는 페놀화합물이 풍부하여 사료 첨가제로서 사용하려는 시도가 이루어지고 있다. Eom et al. (2020)은 사료 내 팽생이모자반 건조 분말의 첨가가 흰다리새우의 비특이적 면역력과 항산화력을 증진시켜 *Vibrio parahaemolyticus* 감염으로부터 생존율을 높인다고 보고하였다. Lee et al. (2020)은 흰다리새우 사료 내 팽생이모자반 열수추출물의 첨가가 성장과 비특이적 면역력을 향상시켜 기능성 첨가제로서 활용이 가능한 것으로 평가하였다.

팽생이모자반의 세포벽을 구성하는 cellulose는 불용성이며, 수소결합 섬유로 존재하기 때문에 장내 영양소 흡수를 방해하여 영양소 소화율을 감소시킨다(Doi and Kosugi, 2004). 이러한 문제점을 해결하기 위해 해조류의 cellulose를 효소로 분해하여 소화에 용이한 형태로 사용하기 위한 연구가 수행되고 있다(Wijesinghe and Jeon, 2012). Celluclast는 cellulose를 glucose와 cellobiose 또는 더 큰 분자의 glucose polymers 형태로 분해하는 효소이다(Park et al., 2014). 팽생이모자반 celluclast 가수분해물(*S. horneri* celluclast hydrolysate, SHCH)을 양식 사료 첨가제로 이용한 연구는 전무하다. 따라서, 본 연구에서는 흰다리새우 사료 내 SHCH를 농도 별로 첨가하여 성장과 사료 효율, 비특이적 면역력, 항산화력에 미치는 영향을 조사하기 위해 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 실험사료

실험에 사용된 SHCH는 제주대학교 해양과학대학 해양생물자원 이용공학연구소(Jeju, Korea)에서 제공받았다. SHCH는 20 µm 크기의 균일한 입자로 구성된 분말 형태이며, 성분조성은 조단백질 9.8%, 조지질 3.5%, 조회분 27.2%, 수분 10.8%로 구성되었다. 대조사료(control, Con) 내 주요 단백질원으로 어분과 대두박을 사용하였으며, 주요 지질원으로 대구간유를 사용하였다. Con과 실험사료의 조성과 일반성분은 Table 1에 나타내었다. 5개의 실험사료는 Con에 SHCH를 각각 5, 10, 20, 40, 80 g/kg 첨가하여 제작하였다(S5, S10, S20, S40, S80). 실험사료는 사료 조성표에 따라 원료를 혼합한 후 사료원 총 중량의 12%의 증류수를 첨가하였다. 사료는 펠렛성형기(SP-50; KumKang ENG, Daegu, Korea)를 사용하여 압출하였으며 사료의 크기는 2 mm로 성형하였다. 성형된 실험사료는 (25°C, 17 h) 건조 후 냉장(4°C) 보관하였다.

### 실험새우와 사육관리

실험에 사용된 흰다리새우는 전라남도 무안군의 종묘장에서 구입하였다. 구입한 새우는 사육 실험 전까지 4주간 실험환경에 순치하였으며, 순치기간 동안 조단백질 53%, 조지질 7%로 구성된 상업사료(CJ Feed & Care. Co., Ltd, Seoul, Korea)를 공급하였다. 총 540마리의 실험새우(초기 무게, 1.01 ± 0.01 g)는 18개의 acrylic 수조(180 L)에 수조 당 30마리씩 실험구 당 3반복으로 배치되었다. 형광등을 이용하여 광주기를 12 light: 12 dark로 유지하였다. 1일 6회(08:00, 10:00, 12:00, 14:00,

Table 1. Dietary formulation of the experimental diets (% dry matter basis) for Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*

Ingredients (%)	Experimental diets					
	Con	S5	S10	S20	S40	S80
Fish meal, anchovy <sup>1</sup>	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Tuna by-product meal <sup>2</sup>	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Starch	12.0	11.5	11.0	10.0	8.00	4.00
SHCH <sup>3</sup>	0.00	0.50	1.00	2.00	4.00	8.00
Soybean meal	42.0	42.0	42.0	42.0	42.0	42.0
Wheat flour	19.8	19.8	19.8	19.8	19.8	19.8
Squid liver meal	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Cod liver oil <sup>4</sup>	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Lecithin	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cholesterol	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Monocalcium phosphate	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Mineral mix <sup>5</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Vitamin mix <sup>6</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Proximate composition (% dry matter)						
Crude protein	33.3	35.1	35.5	35.8	34.9	35.0
Crude lipid	8.10	8.56	8.29	8.45	8.34	8.95
Ash	8.94	9.59	9.74	10.0	10.5	11.4
Moisture	6.01	5.88	5.75	5.74	5.84	5.93

<sup>1</sup>Orizon SA., CO., Ltd, Santiago, Chile. <sup>2</sup>Wooginfeed Industry Co. Ltd, Incheon, Korea. <sup>3</sup>*Sargassum horneri* celluclast hydrolysate, Department of Marine Biomedical Sciences, Jeju National University, Korea. <sup>4</sup>E-wha oil & fat Industry Corp., Busan, Korea. <sup>5</sup>Mineral mixture contained the following ingredients (g/kg, mixture): MgSO<sub>4</sub>, 80.2; C<sub>4</sub>H<sub>2</sub>FeO<sub>4</sub>, 12.5; KCl, 130; FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 20; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 1.25; CoSO<sub>4</sub>, 0.75; Ca(IO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.75; Al(OH)<sub>3</sub>, 0.75; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 13.75; MnSO<sub>4</sub>, 11.25; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1. <sup>6</sup>Vitamin mixture contained the following amount which were diluted in cellulose (g/kg, mixture): L-ascorbic acid, 6.4; DL-α-tocopheryl acetate, 37.5; thiamine hydrochloride, 5.0; riboflavin, 10.0; pyridoxine hydrochloride, 5.0; niacin, 37.5; Ca-D-pantothenate, 17.5; myo-inositol, 75.0; D-biotin, 0.05; folic acid, 2.5; menadione, 2.5; retinyl acetate, 1.72; cholecalciferol, 0.025; cyanocobalamin, 0.025.

16:00, 18:00 h)에 걸쳐 5주간 실험사료를 제한공급(새우 체중의 4-6%)하였다. 실험수조의 수온, pH, 용존산소, 염분을 매일 측정하였다. 사육수 내 암모니아 농도를 측정하기 위해 매주 1회 채수하여 분석하였다. 사육에 적절한 수질 조건을 유지하기 위해, 매주 2회 수조 용량의 80% 환수를 진행하였으며, 에어 펌프를 이용하여 산소를 공급하였다. 수온과 용존산소는 Pro20 Dissolved Oxygen Instrument (YSI, Yellow Springs, OH, USA) 기기를 사용해 측정하였으며, 염분은 Master Refractometer-S28M (ATAGO, Tokyo, Japan), pH는 Seven Compact (METTLER TOLEDO, Columbus, OH, USA)를 사용하여 측정하였다. 암모니아 농도는 Verdouw et al. (1978)의 방법을 기초로 분석하였다. 사육실험 기간동안 용존산소는  $7.83 \pm 0.45$  mg/L, pH는  $7.50 \pm 1.12$ , 수온은  $29.9 \pm 0.8^\circ\text{C}$ , 암모니아 농도는  $0.02 \pm 0.00$  ppm, 염분은  $32.1 \pm 1.1$  psu로 유지하였다.

Sampling과 분석

사육실험 종료 후, 모든 새우의 최종 무게(final body weight, FBW)와 마릿수를 측정하여 생존율(survival), 증체율(weight gain, WG), 일간성장률(specific growth rate, SGR), 사료계수(feed conversion ratio, FCR)와 단백질이용효율(protein efficiency ratio, PER)을 계산하였다. 실험새우의 간체장과 hemolymph를 채취하기 위해 각 수조에서 무작위로 선별된 4마리의 새우를 얼음물에 마취하였다. 마취된 새우의 hemolymph를 채취하고 항응고제(Alsever's solution; Sigma, St. Louis, MO, USA)를 1:2 비율로 혼합하여 냉동(-80°C) 보관하였다. 채혈을 완료한 후 멸균된 해부도구를 이용하여 간체장을 적출하여 액

체질소를 이용하여 급속 냉동하였다.

실험사료와 전하체의 일반성분분석은 AOAC (2005) 방법에 따라 진행되었다. 조단백질은 자동조단백질분석기(Kjeltec™ system 2300; FOSS, Hillerød, Denmark)로 분석하였다. 수분은 상압가열건조법(125°C, 3 h), 조지질은 Folch et al. (1957)의 방법으로 분석하였으며, 조회분은 직접회화법(550°C, 4 h)으로 분석하였다. Phenoloxidase (PO)와 nitro-blue tetrazolium (NBT) 활성도는 각각 Hernández-López et al. (1996)과 Zhang et al. (2013)의 방법으로 분석하였다. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)와 ferric reducing antioxidant power (FRAP)는 각각 Shimada et al. (1992)과 Benzie and Strain (1996)의 방법을 기초로 분석하였다.

RNA는 TRI-zol® (Sigma)을 사용하여 당사의 지침을 준수하여 추출하였다. RNA 순도는 µDrop™ Plate (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. Complementary deocyribo nucleic acid (cDNA)는 추출된 RNA를 PrimeScript™ first-strand cDNA synthesis kit (TaKaRa Bio, Shiga, Japan)를 사용하여 합성하였다. 합성한 cDNA는 nuclease free water를 이용해 2배로 희석하여 qPCR (quantitative polymerase chain reaction) 분석에 이용하였다. Reference gene으로 β-actin을 사용하였다. 비특이적 면역력을 평가하기 위해 prophenoloxidase (proPO), crustin, lipopolysaccharide and β-1,3-glucan-binding protein (LGBP)의 상대적 발현량을 측정하였다. 항산화력을 평가하기 위해 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase의 상대적 발현량을 측정하였다. qPCR은 Real Time System TP 950 Thermal Cycler Dice™ (TaKaRa Bio)를 이용하여 측정하였으며,

Table 2. Primers used for real-time quantitative PCR

Gene	Sequence (5'-3')	Accession number/ References
proPO-F	CGGTGACAAAGTTCCTCTTC	AY723296
proPO-R	GCAGGTCGCCGTAGTAAG	
Crustin-F	ACGAGGCAACCATGAAGG	AF430076
Crustin-R	AACCACCACCAACACCTAC	
LGBP-F	CATGTCCAACCTTCGCTTTTCAGA	Zokaeifar et al. (2012)
LGBP-R	ATCACCGCGTGGCATCTT	
SOD-F	TGCCACCTCTCAAGTATGATTTTC	AY486424.1
SOD-R	TCAACCAACTTCTTCGTAGCG	
GPx-F	TCGGCAAAGTCGACGTCAA	AY973252
GPx-R	GCAGTCGCTCCTTCAGGTACTTA	
Catalase-F	TACTGCAAGTTCCATTACAAGACG	AY518322.1
Catalase-R	GTAATTCCTTGGATTGCGGTCA	
β-actin-F	CCACGAGACCACCTACAAC	AF300705.2
β-actin-R	AGCGAGGGCACTGATTTTC	

proPO, Prophenoloxidase; LGBP, Lipopolysaccharide and β-1,3-glucan-binding protein; SOD, Superoxide dismutase; GPx, Glutathione peroxidase.

Table 3. Growth performance, feed utilization and survival of Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* fed the six experimental diets for five weeks (initial body weight, 1.01±0.01 g)

Diets	FBW <sup>1</sup>	WG <sup>2</sup>	SGR <sup>3</sup>	FCR <sup>4</sup>	PER <sup>5</sup>	Survival (%)
Con	5.22±0.30 <sup>ab</sup>	418.8±30.1 <sup>a</sup>	4.70±0.16 <sup>a</sup>	1.11±0.08 <sup>ab</sup>	2.55±0.20 <sup>ab</sup>	94.4±1.92
S5	5.34±0.22 <sup>ab</sup>	433.1±26.0 <sup>a</sup>	4.78±0.14 <sup>a</sup>	1.12±0.09 <sup>ab</sup>	2.53±0.19 <sup>ab</sup>	92.2±13.5
S10	5.36±0.15 <sup>a</sup>	427.8±8.80 <sup>a</sup>	4.75±0.05 <sup>a</sup>	1.08±0.09 <sup>b</sup>	2.62±0.21 <sup>a</sup>	94.4±3.85
S20	5.13±0.15 <sup>ab</sup>	411.3±14.9 <sup>a</sup>	4.66±0.08 <sup>a</sup>	1.12±0.00 <sup>ab</sup>	2.53±0.00 <sup>ab</sup>	91.7±2.36
S40	5.01±0.05 <sup>b</sup>	399.6±4.96 <sup>a</sup>	4.60±0.03 <sup>a</sup>	1.14±0.01 <sup>ab</sup>	2.47±0.03 <sup>ab</sup>	92.2±1.92
S80	4.53±0.06 <sup>c</sup>	348.6±6.95 <sup>b</sup>	4.29±0.04 <sup>b</sup>	1.25±0.07 <sup>a</sup>	2.26±0.13 <sup>b</sup>	91.1±7.70

<sup>1</sup>Final body weight (g). <sup>2</sup>Weight gain (%)=(final body weight - initial body weight)/initial body weight×100. <sup>3</sup>Specific growth rate (%)={[log (final body weight)-log (initial body weight)]/days}×100. <sup>4</sup>Feed conversion ratio=dry feed fed/wet weight gain. <sup>5</sup>Protein efficiency ratio=weight gain/total protein given. The experimental diets were prepared with supplementing 0, 5, 10, 20, 40 and 80 g/kg of SHCH (designated as Con, S5, S10, S20, S40 and S80, respectively). Values are mean of triplicate groups and presented as mean±SD. Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05). SHCH, *Sargassum horneri* celluclast.

상대적 발현량은 Pfaffl (2001)에 따라 계산 $[2^{-\Delta\Delta CT}$ ; threshold cycles]하였다. 각 유전자의 프라이머 서열은 Table 2에 나타내었다.

### 통계학적 분석

모든 사육실험 결과와 분석 결과는 One-way ANOVA로 통계 분석되었으며 SPSS (Version 24.0; International Business Machines Co., NY, USA) 프로그램을 이용하였다. 모든 분석의 데이터는 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 통계 분석하였으며, 유의차는 Duncan's multiple test (P<0.05)로 비교하였다.

### 결 과

FBW는 Con에서 S10까지 증가하는 경향을 보였으나, S20에서 S40까지 감소하는 경향을 보였다. S80은 Con에 비해 유의적으로 낮았으며, S10은 S40, S80에 비해 유의적으로 높았다(P<0.05) (Table 3). WG과 SGR은 S80이 Con에 비해 유의적으로 낮았다(P<0.05). FCR은 S10이 S80에 비해 유의적으로 낮았으며(P<0.05), Con과는 차이가 없었다(P≥0.05). PER은 S10이 S80에 비해 유의적으로 높았으며(P<0.05), Con과 유의적인 차이는 없었다(P≥0.05). 생존율은 모든 실험구간에 유의적인 차이가 없었다(P≥0.05). PO 활성도는 Con에서 S20까지 증가하는 경향을 보였으나, S40에서 S80까지 감소하는 경향을 보였다 (Table 4). S80을 제외한 모든 SHCH 첨가구에서 Con에 비해 유의적으로 향상되었다(P<0.05). NBT 활성도는 S5가 S80구에 비해 유의적으로 높게 나타났으며(P<0.05), Con과는 차이가 없었다. DPPH 활성도는 S10이 S20, S80, Con에 비해 유의적으로 높았다(P<0.05). FRAP 활성도는 S40까지 높아지는 경향을 보였으나, 고농도 실험구인 S80에서는 모든 실험구에 비해 유의적으로 낮았다(P<0.05).

비특이적 면역 관련 유전자 분석결과는 Fig 1에 나타내었다.

proPO 유전자는 S5, S10, S20에서 Con에 비해 유의적으로 높게 발현되었다(P<0.05). Crustin 유전자는 S80을 제외한 모든 SHCH 첨가구가 Con에 비해 유의적으로 높게 발현되었다(P<0.05). LGBP 유전자는 S5가 Con에 비해 유의적으로 높게 발현되었다. 항산화 관련 유전자 발현 결과는 Fig 2에 나타내었다. SOD 유전자는 S20과 S80에서 Con에 비해 유의적으로 높게 발현되었다(P<0.05). GPx 유전자는 S5가 Con에 비해 유의적으로 높게 발현되었다(P<0.05). Catalase 유전자는 모든 실험구간에 유의적인 차이가 없었다(P≥0.05).

### 고 찰

팽생이모자반 건조분말을 사료 첨가제로 다량 사용했을 경우

Table 4. Non-specific immune responses and antioxidant capacities of Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* fed the six experimental diets for five weeks

Diets	PO <sup>1</sup>	NBT <sup>2</sup>	DPPH <sup>3</sup>	FRAP <sup>4</sup>
Con	0.14±0.01 <sup>c</sup>	2.65±0.37 <sup>ab</sup>	5.82±0.22 <sup>b</sup>	2.00±0.06 <sup>b</sup>
S5	0.24±0.02 <sup>ab</sup>	2.80±0.10 <sup>a</sup>	7.15±2.00 <sup>ab</sup>	2.02±0.05 <sup>b</sup>
S10	0.27±0.01 <sup>a</sup>	2.48±0.22 <sup>ab</sup>	9.21±2.36 <sup>a</sup>	2.07±0.05 <sup>ab</sup>
S20	0.31±0.08 <sup>a</sup>	2.47±0.39 <sup>ab</sup>	5.44±0.63 <sup>b</sup>	2.15±0.08 <sup>a</sup>
S40	0.22±0.02 <sup>ab</sup>	2.53±0.36 <sup>ab</sup>	7.32±1.73 <sup>ab</sup>	2.10±0.07 <sup>ab</sup>
S80	0.19±0.07 <sup>bc</sup>	2.11±0.49 <sup>b</sup>	4.85±0.79 <sup>b</sup>	1.86±0.07 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>Phenoloxidase activity (absorbance). <sup>2</sup>Nitro-blue tetrazolium activity (absorbance). <sup>3</sup>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl scavenging activity (%). <sup>4</sup>Ferric reducing ability of plasma (mol/L). The experimental diets were prepared with supplementing 0, 5, 10, 20, 40 and 80 g/kg of SHCH (designated as Con, S5, S10, S20, S40 and S80, respectively). Values are mean of triplicate groups and presented as mean±SD. Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05). SHCH, *Sargassum horneri* celluclast.

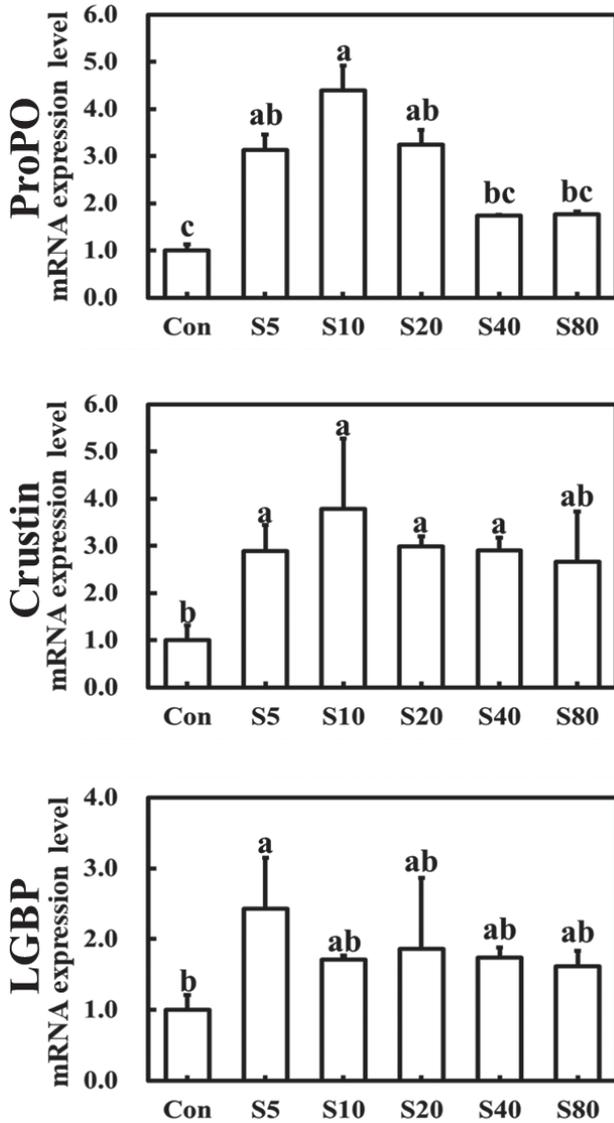


Fig. 1. Relative expression of non-specific immunity genes pro-PO, crustin and LGBP in hepatopancreas of Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. The experimental diets were prepared with supplementing 0, 5, 10, 20, 40 and 80 g/kg of SHCH (designated as Con, S5, S10, S20, S40 and S80, respectively). proPO, Prophe-noloxidase; LGBP, Lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-glucan-binding protein; SHCH, *Sargassum horneri* celluclast. Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

에 어류와 새우의 성장과 사료효율에 부정적인 영향을 미치는 것으로 보고되었다. Black seabream *Acanthopagrus schlegelii* 사료에 팽생이모자반 건조분말을 9% 첨가했을 때, 성장이 감소하였다(Shi et al., 2019). Eom et al. (2020)은 팽생이모자반 건조분말을 흰다리새우 사료에 1% 이상 첨가할 경우 성장이 감소할 수 있다고 보고하였다. 본 연구에서는 사료 내 SHCH

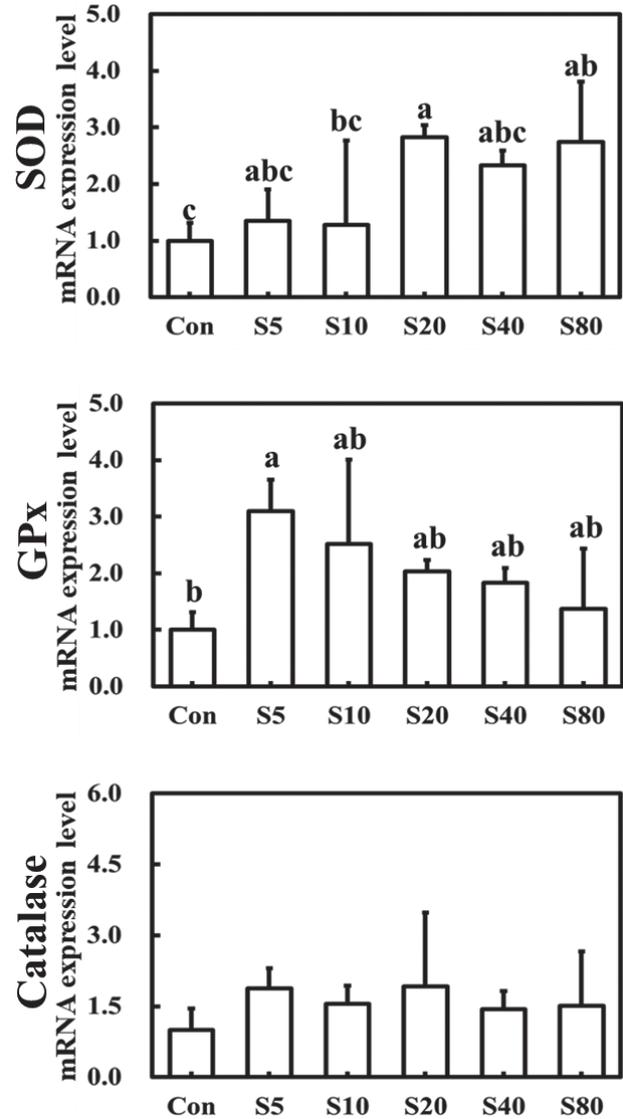


Fig. 2. Relative expression of antioxidant enzymes genes, SOD, GPx and catalase in hepatopancreas of Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. The experimental diets were prepared with supplementing 0, 5, 10, 20, 40 and 80 g/kg of SHCH (designated as Con, S5, S10, S20, S40 and S80, respectively). SOD, Superoxide dismutase; GPx, Glutathione peroxidase; SHCH, *Sargassum horneri* celluclast. Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

를 4%까지 첨가하여도 새우의 성장에 유의미한 감소가 없었다. 이러한 결과의 차이는 이전 연구에서 사용된 팽생이모자반 건조분말과 달리 SHCH에는 팽생이모자반에 다량으로 존재하는 cellulose가 효소에 의해 분해되었기 때문에 새우가 더 효과적으로 이용할 수 있었던 것으로 사료된다. Cellulose는 새우의 장 내에서 흡수되지 않으며 타 영양소의 소화를 억제한다. 사료

내 cellulose가 다량 첨가될 경우 장내 염증반응을 유발함으로써 용모의 발달을 저해하고 장 건강에 부정적인 영향을 미쳐, 결과적으로 성장에 악영향을 끼치는 것으로 보고되었다(Doi and Kosugi, 2004). 해조류 가수분해물은 해조류에 다량 포함되어 있는 폴리페놀 화합물과 같은 생리활성물질의 이용성이 높다. 이는 항염증과 항산화력을 향상시키고 장 건강을 개선하여 잠재적으로 동물의 성장을 향상시킬 수 있다고 보고되었다(Wijesinghe and Jeon, 2012). 본 연구결과에 따르면 사료 내 SHCH를 4% 이상 첨가하는 것은 새우의 성장에 부정적인 영향을 미치는 것으로 나타났다. 추가 연구를 통해 SHCH의 과잉 첨가(사료 내 8% 이상)가 성장에 부정적인 영향을 미치는 정확한 원인에 대해 조사할 필요가 있다고 판단된다.

PO는 갑각류의 면역체계에서 핵심 효소로 작용한다. PO는 침입하는 병원균을 제거하기 위해 phagocytosis와 방어 반응을 촉진하며, cuticle 경화 및 상처 회복에도 관여하는 것으로 알려져 있다(Chandran et al., 2016). NBT는 대식세포의 활성도를 평가하기 위한 생물학적 지표로써 사용된다(Munoz et al., 2000). 새우의 proPO는 세포벽 내의  $\beta$ -1,3-glucan과 lipopolysaccharides와 같은 병원체 관련 분자 패턴(pathogen-associated molecular pattern)에 의해 활성화된다. 이는 항균 펩타이드인 crustin의 생성을 촉진하며, quinone과 melanin의 생성을 유도하여 병원체에 대한 방어를 강화한다(Amparyup et al., 2013). LGBP는 lipopolysaccharide와  $\beta$ -1,3-glucan과 같은 병원체 관련 패턴을 감지하고 면역 반응을 촉진한다(Chen et al., 2016). 팽생이모자반을 비롯한 해조류 추출물은 vitamin, fucoidan, alginate, carrageenan, laminarin과 같은 생리활성 물질이 풍부하여 사료 내 천연 면역증강제로 활용될 수 있다(Shao et al., 2015). 해조류 다당류 또는 해조류 추출물이 첨가된 사료를 섭취할 경우, 흰다리새우의 haemocyte에 의해 LGBP의 인식과 결합을 유도하여 proPO 시스템을 활성화한다. 이는 PO 활성을 증가시켜 비특이적 면역을 활성화시킨다고 보고되었다(Chen et al., 2016). Yudiati et al. (2019)은 *Sargassum siliquosum*에서 추출한 alginate를 사료 내 0.6% 첨가하였을 때, 흰다리새우 hemolymph의 PO 활성이 증진되는 것을 입증하였다. 또한, 비특이적 면역의 활성화에 의해 white spot syndrome virus에 대한 저항성이 강화되어 새우의 생존율이 향상되었다고 보고되었다. Sivagnanavelmurugan et al. (2014)은 *Sargassum wightii*에서 추출한 fucoidan을 홍다리얼룩새우(*Penaeus monodon*) 사료 내 0.1–0.3% 첨가할 경우, proPO 유전자 발현과 hemolymph의 NBT 활성도가 유의미하게 증진되었으며, *V. parahaemolyticus*에 대한 저항성이 향상되었다고 보고하였다. Eom et al. (2020)은 팽생이모자반 건조 분말을 사료 내 2% 첨가할 경우, 흰다리새우의 PO, NBT 활성도와 proPO, crustin 유전자 발현이 향상되고, 이는 *V. parahaemolyticus* 감염에 대한 저항 및 회복에 효과적으로 작용하였다고 보고하였다. Lee et al. (2020)은 팽생이모자반 열수추출물을 흰다리새우 사료

에 0.25–1% 첨가하였을 때, PO 활성과 식세포작용을 증진시켜 면역력을 효과적으로 향상시킬 수 있다고 보고하였다. 이전 연구들과 유사하게 본 연구에서도 사료 내 SHCH 첨가가 PO와 NBT 활성을 증가시키고, proPO, crustin, LGBP를 상향 조절하는 것으로 나타났다. SHCH가 첨가된 사료를 섭취한 새우는 효소 처리를 통해 소화와 흡수율이 높아진 해조류의 다당류들에 의해 자극을 받는다. 이로 인해 crustin, LGBP와 같은 항균펩타이드의 생성을 촉진하고 proPO를 활성화시켜 최종적으로 PO 활성을 증가시킨 것으로 사료된다. 또한 SHCH에 함유된 fucoidan과 같은 생리활성 물질로 인해 proPO의 발현이 상향 조절되고 NBT 활성이 촉진되어 새우의 면역 자극을 유발하였을 것으로 추측된다. SHCH는 흰다리새우의 비특이적 면역력을 향상시키는 기능성 사료 첨가제로써 충분히 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

FRAP와 DPPH는 항산화력을 평가하는 지표로써 자주 사용된다(Benzie and Strain, 1996; Choi et al., 2003). SOD, GPx, catalase는 세포 손상과 산화스트레스를 유발하는 활성산소종을 중화시키는 항산화효소로 알려져 있다(Nordberg and Arner, 2001). 팽생이모자반을 포함하여 *Ecklonia cava*, *Ishige okamurae*, *S. fullvelum*, *S. coreanum*, *S. thunbergia*, *Scytosipon lomentaria*와 같은 갈조류의 celluclast 가수분해물은 carotenoids와 phenolic acid, flavonoid를 포함한 생리활성 물질이 풍부하여 천연 항산화제로써 활용될 수 있는 것으로 보고되었다(Heo et al., 2005). 팽생이모자반 건조 분말을 흰다리새우 사료 내 0.5–4% 첨가할 경우, SOD, GPx와 같은 항산화 효소 활성이 증진된다고 보고되었다(Eom et al., 2020). Lee et al. (2020)은 팽생이모자반 열수추출물을 사료 내 0.25–1% 첨가할 경우, 흰다리새우의 SOD와 GPx 유전자 발현량이 증가하여 항산화력을 향상시킨다고 보고하였다. 본 연구에서는 흰다리새우 사료 내 SHCH를 1% 첨가하였을 때, DPPH 활성도가 유의적으로 향상되었으며, 2% 첨가하였을 때는 FRAP 활성도가 유의적으로 향상되었다. SHCH를 첨가한 사료를 섭취한 새우의 간체장에서 SOD, GPX, catalase의 발현이 상향 조절되었다. SHCH에 풍부한 생리활성 물질들에 의해 항산화 효소 활성을 촉진시켜 항산화력을 증가시킨 것으로 추측된다. 따라서, SHCH는 새우의 항산화력을 증진시키는 천연 항산화제로써 기능하는 것으로 판단된다. 그러나 본 연구에서 사료 내 SHCH를 8% 이상 첨가하는 것은 오히려 흰다리새우의 항산화 활성을 감소시키는 것으로 나타났다.

결론적으로 SHCH는 흰다리새우 사료 내 비특이적 면역력과 항산화력을 향상시키는 천연 기능성 사료 첨가제로써 활용이 가능할 것으로 판단된다. 흰다리새우 사료 내 SHCH의 첨가는 비특이적 면역력과 항산화력을 기준으로 8%까지 문제가 없는 것으로 나타났으나, 성장 결과를 고려하였을 때, 4% 이내로 첨가하는 것이 적절할 것으로 판단된다.

사 사

이 논문은 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(2019R1A6A1A03033553).

References

Amparyup P, Charoensapsri W and Tassanakajon A. 2013. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish Shellfish Immunol* 34, 990-1001. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.08.019>.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2005. Official Methods of Analysis. AOAC, Arlington, VA, U.S.A. <https://doi.org/10.1002/0471740039.vec0284>.

Benzie IF and Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal Biochem* 239, 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.

Chandran MN, Moovendhan S, Suganya AM, Tamilselvi A, Immanuel G and Palavesam A. 2016. Influence of polyherbal formulation (Aqualmmu) as a potential growth promotor and immunomodulator in shrimp *Penaeus monodon*. *Aquacult Rep* 4, 143-149. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.10.002>.

Chen YY, Chen JC, Kuo YH, Lin YC, Chang YH, Gong HY and Huang CL. 2016. Lipopolysaccharide and  $\beta$ -1, 3-glucan-binding protein (LGBP) bind to seaweed polysaccharides and activate the prophenoloxidase system in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Dev Comp Immunol* 55, 144-151. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.10.023>.

Choi CS, Song ES, Kim JS and Kang MH. 2003. Antioxidative activities of *Castanea crenata* Flos. methanol extracts. *J Korean Food Sci Technol* 35, 1216-1220.

Doi RH and Kosugi A. 2004. Cellulosomes: Plant-cell-wall-degrading enzyme complexes. *Nat Rev Microbiol* 2, 541-551. <https://doi.org/10.1038/nrmicro925>.

Eom GH, Shin JB, Lim SJ, Lee KT, Han YS and Lee KJ. 2020. Evaluation of dietary supplementation of *Sargassum horneri* for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Korean J Fish Aquat Sci* 53, 909-917. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0909>.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. FAO, Rome, Italy.

Fernando IPS, Ryu B, Ahn G, Yeo IK and Jeon YJ. 2020. Therapeutic potential of algal natural products against metabolic syndrome: A review of recent developments. *Trends Food Sci Technol* 97, 286-299. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.020>.

Folch J, Lees M and Sloane-Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497-509.

Heo SJ, Park EJ, Lee KW and Jeon YJ. 2005. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresour Technol* 96, 1613-1623. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.07.013>.

Hernández-López J, Gollas-Galván T and Vargas-Alboreo F. 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp *Penaeus californiensis* Holmes. *Comp Biochem Phys C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 113, 61-66. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(95\)02033-0](https://doi.org/10.1016/0742-8413(95)02033-0).

Hwang EK, Lee SJ, Ha DS and Park CS. 2016. *Sargassum* golden tides in the Shinan-gun and Jeju Island, Korea. *Korean J Fish Aquat Sci* 49, 689-693. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2016.0689>.

Kamunde C, Sappal R and Melegy TM. 2019. Brown seaweed (*AquaArom*) supplementation increases food intake and improves growth, antioxidant status and resistance to temperature stress in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *PLoS One* 14, e0219792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219792>.

Kumar S, Verma AK, Singh SP and Awasthi A. 2023. Immunostimulants for shrimp aquaculture: Paving pathway towards shrimp sustainability. *Environ Sci Pollut Res In* 30, 25325-25343. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18433-y>.

Lee PT, Tran HTQ, Huang HT, Nan FH and Lee MC. 2020. *Sargassum horneri* extracts stimulate innate immunity, enhance growth performance, and upregulate immune genes in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 102, 276-285. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.04.049>.

Lulijwa R, Rupia EJ and Alfaro AC. 2020. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: A review of the top 15 major producers. *Rev Aquac* 12, 640-663. <https://doi.org/10.1111/raq.12344>.

Munoz M, Cedeno R, Rodríguez J, van der Knaap WPW, WP Mialhe E and Bachere E. 2000. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 191, 89-107. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00420-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00420-8).

Nordberg J and Arnér ES. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31, 1287-1312. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00724-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00724-9).

Park EY, Kim JY, Jeong SM and Lee DH. 2014. Characteristics of enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose and *Laminaria japonica*. *J Korea Soc Waste Manage* 31, 820-832. <https://doi.org/10.9786/kswm.2014.31.8.820>.

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.

Shao P, Chen X and Sun P. 2015. Improvement of antioxidant and moisture-preserving activities of *Sargassum horneri* polysaccharide enzymatic hydrolyzates. *Int J Biol Macromol* 74, 420-427. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.12.021>.

Sheikhzadeh N, Ahmadifar E, Soltani M, Tayefi-Nasrabadi H,

- Mousavi S and Naiel MA. 2022. Brown seaweed (*Padina australis*) extract can promote performance, innate immune responses, digestive enzyme activities, intestinal gene expression and resistance against *Aeromonas hydrophila* in common carp (*Cyprinus carpio*). *Animals* 12, 3389. <https://doi.org/10.3390/ani12233389>.
- Shi Q, Rong H, Hao M, Zhu D, Aweya JJ, Li S and Wen X. 2019. Effects of dietary *Sargassum horneri* on growth performance, serum biochemical parameters, hepatic antioxidant status, and immune responses of juvenile black sea bream *Acanthopagrus schlegelii*. *J Appl Phycol* 31, 2103-2113. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1719-4>.
- Shimada K, Fujikawa K, Yahara K and Nakamura T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J Agric Food Chem* 40, 945-948. <https://doi.org/10.1021/jf00018a005>.
- 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>.
- Tong R, Pan L, Zhang X and Li Y. 2022. Neuroendocrine immune regulation mechanism in crustaceans: A review. *Rev Aquac* 14, 378-398. <https://doi.org/10.1111/raq.12603>.
- Verdouw H, Van Echteld CJA and Dekkers EMJ. 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res* 12, 399-402. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(78\)90107-0](https://doi.org/10.1016/0043-1354(78)90107-0).
- Wijesinghe WAJP and Jeon YJ. 2012. Enzyme-assisted extraction (EAE) of bioactive components: A useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: A review. *Fitoterapia* 83, 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.10.016>.
- Yudiati E, Isnansetyo A, Murwantoko, Triyanto and Handayani CR. 2019. Alginate from *Sargassum siliquosum* simultaneously stimulates innate immunity, upregulates immune genes, and enhances resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against white spot syndrome virus (WSSV). *Mar Biotechnol* 21, 503-514. <https://doi.org/10.1007/s10126-019-09898-7>.
- Zhang SP, Li JF, Wu XC, Zhong WJ, Xian JA, Liao SA and Wang AL. 2013. Effects of different dietary lipid level on the growth, survival and immune-relating genes expression in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol Rep* 34, 1131-1138. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.016>.
- Zokaeifar H, Balcázar JL, Saad CR, Kamarudin MS, Sijam K, Arshad A and Nejat N. 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 33, 683-689. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.027>.