



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

규조(*Melosira nummuloides*) 및 규조
유래 바이오 실리카의 급이에 따른
넙치(*Paralichthys olivaceus*)의
생리학적 변화에 관한 연구

濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

盧允慧

2021 年 02 月

구조(*Melosira nummuloides*) 및 구조
유래 바이오 실리카의 급이에 따른
넙치(*Paralichthys olivaceus*)의
생리학적 변화에 관한 연구

指導教授 呂寅圭

盧允慧

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2021 年 02 月

盧允慧의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 이 영 돈 印

委員 정 준 범 印

委員 여 인 규 印

濟州大學校 大學院

2021 年 02 月

**Study of Dietary Supplementation for Diatom
(*Melosira nummuloides*) and Diatom-derived
Bio-Silica on the Physiological Responses
of Olive Flounder(*Paralichthys olivaceus*)**

Yun-Hye Noh

(Supervised by professor In-Kyu Yeo)

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

Department of Marine life Science
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2021

목차

목차	i
Abstract.....	iv
국문 요약.....	vi
LIST OF TABLE.....	ix
LIST OF FIGURES	x
제 1 장 종합 서론	1
제 2 장 구조첨가 사료 공급에 따른 넙치의 생리적 변화	
2.1. 서론.....	3
2.2. 재료 및 방법	5
2.2.1. 실험어 및 실험 조건.....	5
2.2.2 . 실험사료 및 공급.....	6
2.2.3. 체중 및 생존율 변화 분석	8
2.2.4. Superoxide dismutase (SOD) 활성.....	9
2.2.5. Catalase (CAT) 활성	10
2.2.6. Glutathione (GSH) 활성	11
2.2.7. Lysozyme (LYS) 활성.....	12
2.2.8. Myeloperoxidase (MPO) 활성	12
2.2.9. RNA 추출	13
2.2.10. cDNA 합성	14

2.2.11. Real-time PCR (RT-qPCR)을 통한 면역 관련 유전자 발현	15
2.2.12. 현장적용 실험	17
2.2.13. 통계처리	17
2.3. 결과	18
2.3.1. 성장률 및 생존율	18
2.3.2. Superoxide dismutase (SOD) activity 분석	20
2.3.3. Catalase (CAT) activity 분석	21
2.3.4. Glutathione (GSH) activity 분석	22
2.3.5. Lysozyme activity 분석	23
2.3.6. Myeloperoxidase activity 분석	24
2.3.7. Real-time PCR(RT-qPCR)을 통한 면역 관련 유전자 발현	25
2.3.8. 양식현장 급이 실험	27
2.4. 고찰	29

제 3 장 Bio-silica 첨가 사료 공급에 따른 넙치의 생리적 변화

3.1. 서론	35
3.2. 재료 및 방법	37
3.2.1. 실험어 및 실험 조건	37
3.2.2. 실험 사료 및 공급	37
3.2.3. 계측 및 생존율 분석	39
3.2.4. Superoxide dismutase (SOD) 활성	40
3.2.5. Catalase (CAT) 활성	40
3.2.6. Glutathione (GSH) 활성	40
3.2.7. Lysozyme (LYS) 활성	41
3.2.8. Myeloperoxidase (MPO) 활성	41
3.2.9. RNA 추출	42
3.2.10. cDNA 합성	42
3.2.11. Real-time PCR (RT-qPCR)	43
3.2.12. 현장적용 실험	44

3.2.13. 통계처리	44
3.3. 결과.....	45
3.3.1. 체중 및 생존율	45
3.3.2. Superoxide dismutase (SOD) activity 분석	47
3.3.3. Catalase (CAT) activity 분석	48
3.3.4. Glutathione (GSH) activity 분석	49
3.3.5. Lysozyme activity 분석.....	50
3.3.6. Myeloperoxidase activity 분석	51
3.3.7. Real-time PCR 통한 면역 관련 유전자 발현	52
3.3.8. 양식현장 급이 실험	54
3.4. 고찰.....	56
제 4 장 종합 고찰	60
참고문헌	63
감사의 글.....	76

Abstract

Recently, the development of feed additives using natural substances has been actively progressed to increase the growth and immunity of cultured fish. The marine diatom *Melosira numuloides* are reported to contain a variety of physiological active substances and are available for animal and fish nutrition. Silicon isolated from diatoms is called bio-silica and has been extensively studied related to skeleton formation and bone regeneration in terrestrial organisms. Objective of this study was to determine the effects of diatom powder and diatom-derived bio-silica on the growth rate, feed efficiency, survival rate, anti-oxidants, non-specific immunity, immune gene expression and the physiological responses of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).

As a result of feeding with the additives containing 0% (Con), 1% (D1), 2% (D2) and 3% (D3) diatoms for 8 weeks, growth rates and feed efficiency rates were significantly increased in olive flounder in all diatom groups over the control accompanied with the higher survival rates in D1 and D2. The results for anti-oxidant enzyme such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) showed no significance difference compared to the control group; hence the glutathione (GSH) changes were also did not show a significant difference. The results in the non-specific immune activity and lysozyme (LYS) revealed that diatom supplementation possess significant effect in a concentration dependent manner while the Myeloperoxidase (MPO) showed the highest immune activity. In addition, the supplementation of diatom feed additives was found to lower the expression of galectin and c-type lysozyme in the kidney suggesting that low immune activity could be occurred due to low pathogen invasion. The supplementation of diatom feed additives to the cultured fish was also shown to effective in the growth, LYS and MPO immune activities.

Moreover, bio-silica not added control (Con), bio-silica 1% (BS), *Lactobacillus plantarum*

1% (LP), *Lactobacillus* sp. 1% added bio-silica 0.5% (BL 0.5), 1% (BL 1) and 1.5% (BL 1.5) feed additives were supplied for 8 weeks. As a result, the weight growth rates and feed efficiency were highest in BL 0.5 while the survival rate was high in LP, BL 0.5 and BL 1.5 respectively. The results for the supplementation of bio-silica feed additives in anti-oxidant enzyme, SOD showed no significant difference, but in CAT showed a significant difference between individuals, and observed that there was no significant difference between the control group and the experimental group. In addition, the changes in GSH were found to be low in the BL in which bio-silica and *Lactobacillus* sp. were mixed, and were considered effective in stress resistance. In the results for non-specific immune activity, LYS was shown to increase in a concentration-dependent manner with the addition of bio-silica, showing the highest immune activity in BL 1.5, and MPO showed the highest immune activity higher in BL 1.5 (added 1.5%). In addition, supplementation of bio-silica feed additives was found to lower the expression of galectin, indicating that the chance of pathogen infection in farmed flounders was reduced in response to the supplementation of bio-silica feed additives. It was hypothesized that high immune activity compared to low galectin occurred due to immune activity. In the breeding experiment conducted in the laboratory revealed that the supplementation of feed additives (with bio-silica 1.5% added at the farming site showed the highest immune activity and the maximum growth effect on intermediate breeding fish. The non-specific immune activity was also found to be high.

Altogether, these results suggest that the addition of 2% of the regulation in the halibut resulted in increased growth and immune activity, and in bio-silica, there was no changes in the higher value compared to the addition of diatom. Therefore, the addition of *M. numuloides* and bio-silica tested in this study is expected to contribute directly to the fish industry as a feed additive that could promotes growth of flatfish and induces birth immunity. However, since, bio-silica also has an increased immune system effect, requiring further research to investigate the role of silicon in fish.

국문 요약

최근 양식 어류의 성장 및 자가 면역 증진을 위해 천연물질을 이용한 사료첨가제의 개발이 활발히 진행되고 있다. 해양 규조인 *Melosira nummuloides*는 다양한 생리활성물질을 함유하고 있어 동물 및 어류 영양에 이용 가능한 자원으로 보고되어 있으며, 규조에서 분리한 규소는 바이오 실리카로 불리며, 육상 생물을 대상으로 뼈 재생 등 골격 형성과 관련된 연구가 활발하게 이루어져 있다.

이에 본 연구에서는 규조 및 규조에서 분리한 바이오 실리카(bio-silica)를 이용하여 양식 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 사료첨가제로서의 효능을 평가하기 위해 넙치의 성장률, 사료효율, 생존율, 항산화, 비특이적 면역, 면역 관련 유전자, 양식현장 적용 실험을 실시하였다.

규조가 0% (Con), 1% (D1), 2% (D2) 및 3% (D3) 첨가된 사료를 8주간 공급한 결과, 넙치 사료 내 규조를 첨가한 모든 실험구에서 대조구에 비해 높은 체중 성장률 및 사료효율을 나타냈으며, 생존율에 있어서도 D1 및 D2에서 대조구에 비해 높게 나타났다. 항산화 활성에서의 규조 사료첨가제 공급은 SOD 및 CAT 변화에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며, GSH 변화는 큰 차이를 나타내지 않은 것으로 나타났다. 비특이적 면역인 LYS는 규조 첨가에 따라 농도 의존적으로 증가되는 것으로 나타났으며, MPO는 규조 2% 첨가구인 D2에서 면역 활성이 가장 높게 나타났다. 또한, 규조 사료첨가제 공급은 신장에서의 galectin 및 c-type lysozyme의 발현을 낮추는 것으로 나타나, 낮은 병원체 침입에 따른 낮은 면역 활성이 일어난 것으로 판단됐다. 양식현장에서의 규조 사료첨가제 공급은 치어의 성장에 효과적인 것으로 나타났으며, LYS 및 MPO 면역 활성 또한 높은 것으로 나타났다.

바이오 실리카가 첨가되지 않은 대조구(Con), 바이오 실리카 1% 단독구(BS), 유산균 1% 단독구(LP), 유산균 1%에 바이오 실리카가 0.5%(BL 0.5), 1%(BL 1) 및 1.5%(BL 1.5) 첨가된 사료를 8주간 공급한 결과, BL 0.5에서 체중 성장률 및 사료 효율이 가장 높은 것으로 나타났으며, LP, BL 0.5 및 BL 1.5에서 높은 생존율을 나타냈다. 항산화 활성에서의 바이오 실리카 사료첨가제 공급은 SOD 변화에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며, CAT는 개체 간의 차이가 크게 나타나 대조구와 실험구에서 큰 차이를 나타내지 않은 것으로 판단됐다.. 또한, GSH 변화는 바이오 실리카와 유산균이 혼합된 BL실험구에서 낮게 나타내어 스트레스 저항에 효과적인 것으로 판단됐다. 비특이적 면역인 LYS는 바이오 실리카첨가에 따라 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타내어 BL 1.5에서 가장 높은 면역 활성을 나타냈으며, MPO에서도 바이오 실리카 1.5% 첨가구인 BL 1.5에서 면역 활성이 가장 높은 것으로 나타났다. 또한, 바이오 실리카 사료첨가제 공급은 galectin의 발현을 낮추는 것으로 나타나 바이오 실리카의 사료첨가제에 따른 양식 넙치의 병원체 감염 기회가 감소한 것으로 판단되며, c-type lysozyme은 바이오 실리카 0.5% 첨가구인 BL 0.5에서 가장 높은 면역 활성이 나타나 낮은 galectin에 대비한 높은 면역 활성이 일어난 것으로 판단됐다. 실험실에서 진행한 사육 실험에서 면역 활성이 가장 높게 나타난 바이오 실리카 1.5% 첨가구를 양식현장에 공급하였으며, 현장 실험 결과 중간육성어의 성장에 효과적인 것으로 나타났다. 또한 비특이적 면역활성인 LYS 및 MPO도 대조구에 비해 높게 나타났다.

이상에서와 같이 넙치 양식에 있어서 규조 2%첨가는 성장 및 면역 활성을 높이는 효과를 나타냈으며, 바이오 실리카에서도 성장 및 면역 활성에 효과는 있었으나 규조첨가에 비해 높은 수치의 변화는 나타내지 않았다. 따라서 본 연구에서 실험한 사료 내 규조(*M. nummuloides*) 및 바이오 실리카(bio-silica)의 첨가는 넙치

의 성장 촉진 및 선천면역을 유도하는 사료첨가제로서 양식산업에 직접적으로 기여할 수 있을 것으로 기대되며, 특히 규조를 첨가했을 경우 더 큰 효과를 나타내는 것으로 판단된다. 그러나 바이오 실리카에서도 면역력 증대 효과를 나타내어 규소가 어류 체내에서의 미치는 영향에 관한 연구가 추가적으로 필요할 것으로 여겨진다.

LIST OF TABLE

Table 1. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets for olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> (% of dry matter).....	7
Table 2. Volume of buffer for cDNA synthesis 1 step.....	14
Table 3. Volume of buffer for cDNA synthesis 2 step.....	14
Table 4. Volume of standard reaction RT-qPCR mixture.....	16
Table 5. Gene specific primers of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> β -actin and immune related genes used in this study.....	16
Table 6. Growth performance of olive flounder, <i>P. olivaceus</i> fed the experimental diets for 8 weeks.....	19
Table 7. Growth performance and nonspecific immune response of olive flounder, <i>P. olivaceus</i> fed the diatom diets for 8 weeks in aquaculture.....	28
Table 8. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets for olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> (% of dry matter).....	39
Table 9. Growth performance of olive flounder, <i>P. olivaceus</i> fed the bio-silica diets for 8 weeks.....	46
Table 10. Growth performance and nonspecific immune response of olive flounder, <i>P. olivaceus</i> fed the bio-silica diets for 8 weeks in aquaculture.....	55

LIST OF FIGURES

FIGURE 1. Changes of superoxide dismutase in liver of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> fed the experimental diets containing different levels of diatom powder 0%, 1%, 2% and 3% (Con, D1, D2 and D3) for 8 weeks	20
FIGURE 2. Catalase in liver of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> fed the experimental diets containing different levels of diatom powder 0%, 1%, 2% and 3% (Con, D1, D2 and D3) for 8 weeks.....	21
FIGURE 3. Glutathione in liver of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> fed the experimental diets containing different levels of diatom powder 0%, 1%, 2% and 3% (Con, D1, D2 and D3) for 8 weeks	22
FIGURE 4. Lysozyme activity in serum of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> fed the experimental diets containing different levels of diatom powder 0%, 1%, 2% and 3% (Con, D1, D2 and D3) for 8 weeks	23
FIGURE 5. Myeloperoxidase activity in serum of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> fed the experimental diets containing different levels of diatom powder 0%, 1%, 2% and 3% (Con, D1, D2 and D3) for 8 weeks	24
FIGURE 6. Change of Galectin expression change in kidney of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> fed the experimental diets containing different levels of diatom powder 0%, 1%, 2% and 3% (Con, D1, D2 and D3) for 8 weeks	25
FIGURE 7. Change of c-type Lysozyme expression change in kidney of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> fed the experimental diets containing different levels of diatom powder 0%, 1%, 2% and 3% (Con, D1, D2 and D3) for 8 weeks.....	26
FIGURE 8. Changes of superoxide dismutase in liver of olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> fed the experimental diets containing different levels of bio-silica powder 0% and	

1%, *Lactobacillus plantarum* 1% and mixture of silica and 1% *Lactobacillus plantarum* in different concentrations 0.5%, 1% and 1.5% (Con, BS, LP, BL 0.5, BL 1 and BL 1.5) for 8 weeks..... 47

FIGURE 9. Catalase in liver of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels of bio-silica powder 0% and 1%, *Lactobacillus plantarum* 1% and mixture of silica and 1% *Lactobacillus plantarum* in different concentrations 0.5%, 1% and 1.5% (Con, BS, LP, BL 0.5, BL 1 and BL 1.5) for 8 weeks..... 48

FIGURE 10. Glutathione in liver of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels of bio-silica powder 0% and 1%, *Lactobacillus plantarum* 1% and mixture of silica and 1% *Lactobacillus plantarum* in different concentrations 0.5%, 1% and 1.5% (Con, BS, LP, BL 0.5, BL 1 and BL 1.5) for 8 weeks..... 49

FIGURE 11. Lysozyme activity in serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels of bio-silica powder 0% and 1%, *Lactobacillus plantarum* 1% and mixture of silica and 1% *Lactobacillus plantarum* in different concentrations 0.5%, 1% and 1.5% (Con, BS, LP, BL 0.5, BL 1 and BL 1.5) for 8 weeks..... 50

FIGURE 12. Myeloperoxidase activity in serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels of bio-silica powder 0% and 1%, *Lactobacillus plantarum* 1% and mixture of silica and 1% *Lactobacillus plantarum* in different concentrations 0.5%, 1% and 1.5% (Con, BS, LP, BL 0.5, BL 1 and BL 1.5) for 8 weeks..... 51

FIGURE 13. Change of Galectin expression change in kidney of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels bio-silica powder 0% and 1%, *Lactobacillus plantarum* 1% and mixture of silica and 1%

Lactobacillus plantarum in different concentrations 0.5%, 1% and 1.5% (Con, BS, LP, BL 0.5, BL 1 and BL 1.5) for 8 weeks 52

FIGURE 14. Change of c-type Lysozyme expression change in kidney of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels of bio-silica powder 0% and 1%, *Lactobacillus plantarum* 1% and mixture of silica and 1% *Lactobacillus plantarum* in different concentrations 0.5%, 1% and 1.5% (Con, BS, LP, BL 0.5, BL 1 and BL 1.5) for 8 weeks 53

제 1장 종합 서론

어류 양식 자원은 국제 식량 확보를 위한 중요 자원 중 하나이며, 단백질, 오메가-3, 비타민 A, B, D, 칼슘, 아연, 요오드 및 철과 같은 미네랄을 풍부하게 함유하고 있다(NRC, 1993; Garcia, 1998; Mok et al., 2008). 어류 섭취는 정신 건강, 심혈관 질환 및 뇌졸중 예방에 유익한 건강식품으로 여겨지고 있어 전세계적으로 양식 어류의 소비량이 증가하는 추세이다(FAO, 2020).

넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 2019년 국내 양식 생산량 37,239톤으로 총 양식 생산량 중 약 50%를 차지해 한국 양식산업의 대표 어종으로 평가되고 있지만(KOSIS, 2019), 생산량의 증가에 따라 양식장에서의 폐사율도 상당히 높은 추세로 나타나고 있다. 양식 넙치의 연간 폐사량은 2016년 8,854톤에서 2018년 9,251톤으로 해마다 증가하고 있으며, 넙치의 속성장을 위한 과도한 사료 공급 및 밀식이 주원인으로 보고되어 있다(MIFAFF, 2003; JRI, 2019). 이는 수질 악화를 초래하여 어류의 면역력 및 내병성 또한 저하시켜, 이에 대처하기 위하여 항생제 및 화학약품의 사용이 무분별하게 늘어나고 있다(Smith et al., 1994; Kim et al., 2014a). 항생제의 무분별한 사용은 어류의 약제 내성을 증가시키며(Phearson et al., 1991; Cabello et al., 2016), 스트레스로 작용해 어류의 면역력 저하 및 폐사를 유발하여 경제적 피해를 발생시키는 것으로 보고되어졌다(Barton and Iwama, 1991; Pickering, 1992; JRI, 2019). 최근에는 이러한 문제를 해결하기 위해 천연물질을 이용한 사료첨가제 개발 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이는 양식 어류의 성장 및 면역을 향상시킬 뿐만아니라 항생제를 대체할 수 있을 것으로 기대되고 있다(Adel et al., 2016; Yu et al., 2018; Hoseinifar et al., 2019). 최근에는 해양 천연자원인 클로렐라(*Chlorella* sp.), 스피룰리나(*Spirulina* sp.), 톳(*Hizikia* sp.), 감태(*Ecklonia* sp.), 다시마(*Laminaria* sp.) 및

모자반(*Sargassum* sp.) 등 다양한 자원을 활용하여 넙치 및 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*) 등 양식 어류의 성장 및 면역 개선을 위한 사료첨가제의 개발이 활발하게 이루어지고 있으며(Bai et al., 2001; Kim et al., 2009; Jeon et al., 2013; Teimouri et al., 2013; Kim et al., 2014b), 그중 규조류는 Giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) 및 Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)의 성장 및 면역능에 개선효과가 있는 것으로 보고되어져(Khattoon et al., 2009; Ayoub et al., 2019; Saleh et al., 2020) 양식산업에서 성장 및 면역을 개선할 수 있는 사료첨가제의 소재로써 활용될 수 있을 것으로 추정된다. 따라서 본 연구에서는 제주 용암해수를 이용하여 다량 배양한 규조류를 이용하여 규조 및 규조의 주성분인 규소(바이오 실리카)의 양식 넙치 사료첨가제로서의 효능을 평가하기 위하여, 자체 제작한 사료를 이용하여 8주간 급이 후 성장률, 사료효율, 생존율, 항산화 활성, 비특이적 면역 분석, 면역 관련 유전자 분석 및 현장 적용 실험을 실시하였다.

제 2장 규조첨가 사료 공급에 따른 넙치의 생리적 변화

2.1. 서론

미세조류(microalgae)는 농업, 식품, 의약품, 대체에너지원 및 폐수처리에 이용될 수 있어 산업적으로 다양한 분야에서 활용할 수 있는 소재이다(Oh et al., 2003; Li et al., 2008). 그중 규조류(*Bacillariophyceae*)는 미세조류 그룹의 식물 플랑크톤 중 황갈조식물문(*Chrysophyta*)에 속하며, 바다 및 호수에서 생활, 번식한다(Li et al., 2014). 규조류는 매년 지구상에서 생산되는 산소의 약 20~50%를 차지하고(Mann, 1999), 해양에서는 광합성을 통해 생산되는 일차 생산량의 약 40% 이상을 차지하며(Nelson et al., 1995), 67억톤 이상의 규소를 흡수하는 것으로 알려져 있다(Treguer et al., 1995). 또한, 규조는 이매패류 및 갑각류의 종자 생산 시 먹이 생물로 많이 이용되고 있어 산업적으로 매우 중요한 가치를 가지고 있다(Gordon et al., 2006; Onitsuka et al., 2007). 특히 사료 내 규조류의 첨가에 의해 pacific red snapper (*Lutjanus peru*) 및 gilthead seabream (*Sparus aurata L.*)의 성장 및 면역능 개선 효과가 있는 것으로 보고됐으며(Cerezuela et al., 2012; Reyes-Becerril et al., 2014), 해양 미세 규조(*Navicula sp.*)의 경우, 사료 내 단독 첨가보다 유산균을 혼합하여 첨가하였을 때 어류의 성장 및 면역이 증진되는 것으로 보고됐다(Martha et al., 2014; Reyes-Becerril et al., 2014). 그중 해양 규조인 *Melosira nummuloides*는 단가 불포화 지방산(monounsaturated fatty acids; MUFA), 폴리 불포화 지방산(polyunsaturated fatty acids; PUFA), docosa hexaenoic acid (DHA) 및 eicosapentaenoic acid (EPA)을 함유하고 있어 동물 및 어류 영양에 이용 가능한 자원으로 보고되어졌다(Herber and Elswyk, 1996; Nitsan et al., 1999; Li et al., 2016). 이처럼 기존의 패류의 사료로만 사용되었던 해양 규조류를 이용한 양식 어류의 사료첨가제로서의 가능성이 점차 높아지고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 제주 해양에서 분리 배양한 규조류의 양식 넙치 사료첨가제로서의 효능을 평가하기 위해 *M. nummuloides*를 첨가하여 자체 제작한 사료를 8주간 급이 후 성장률, 사료효율, 생존율, 항산화 활성, 비특이적 면역 분석, 면역 관련 유전자 분석 및 현장적용 실험을 실시하였다.

2.2. 재료 및 방법

2.2.1. 실험어 및 실험 조건

본 실험은 제주도 함덕에 위치한 제주대학교 해양과학연구소 내 사육 수조에서 실시하였으며, 낚치는 약육 및 2주일간의 순치 기간을 가진 후 개시 평균 체중 29.79 ± 4.60 g의 개체를 그룹당 320마리씩 무작위로 배치하여 실험에 사용하였다. 사육 수조는 $1.5 \times 1.5 \times 0.7$ m³, 1,100L 용량의 일체형 수조를 이용하였으며, 실험 기간 모든 수조는 자연 수온 $23.81 \pm 2.70^\circ\text{C}$, 염분 32.37 ± 0.45 psu로 조절되었다.

2.2.2. 실험사료 및 공급

실험에 사용된 규조(*M. nummuloides*)는 어업회사법인 (주)제이앤씨에서 제공받아 실험에 사용되었다. 실험에 사용한 *M. nummuloides*의 일반성분조성은 조회분 59.24%, 조단백질 18.87%, 수분 6.26%, 조섬유 1.77% 및 조지방 1.03%이었으며(Data not shown), 이를 기초로 하여 규조 함량이 0% (대조구), 1%, 2% 및 3% (D1, D2 및 D3)로 첨가된 4개의 실험 사료를 제작하였다(Table 1).

규조는 피각이 규소로 이루어져 소화에 어려움이 있을 가능성이 있어 사료의 소화흡수율을 높이기 위하여 유산균(*Lactobacillus plantarum*) 1%를 첨가하여 사료를 제작하였다. 실험 사료는 사료원을 조성표에 따라 혼합한 후, 사료제작기(SP-50, Gungang ENG, Korea)을 이용하여 2~3 mm의 크기로 성형하였으며, 성형된 사료는 25°C에서 24시간 건조 후 사료 공급 전까지 냉동보관(-20°C) 후 공급하였다. 사료 공급은 1일 2회(09:00, 14:00 hr)에 걸쳐 반복 공급(saturation)하였으며, 공급 후 60분 뒤 환수하여 수조의 수질을 유지하였으며, 사육은 총 8주간 진행하였다.

Table 1. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets for olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (% of dry matter)

Ingredients	Experimental diets			
	Control	D1	D2	D3
Fish meal (sardine)	60	60	60	60
Soybean meal	12	12	12	12
Corn gluten meal	3	3	3	3
Soy protein concentrate	3	3	3	3
Wheat flour	11	11	11	11
Fish oil	3.5	3.5	3.5	3.5
Lecithin	0.5	0.5	0.5	0.5
Monocalcium phosphate ¹	0.5	0.5	0.5	0.5
Vitamin premix ²	1	1	1	1
Mineral premix ³	1	1	1	1
Choline	0.5	0.5	0.5	0.5
Cellulose	3	2	1	0
<i>Lactobacillus plantarum</i> ⁴	1	1	1	1
<i>Melosira nummuloides</i> ⁵	0	1	2	3

¹Mono-Calcium Phosphate (22% of phosphate). ²Vitamin premix (g/kg-1 of mixture): L-ascorbic acid, 121.2; DL- α tocopheryl acetate, 18.8; thiamin hydrochloride, 2.7; riboflavin, 9.1; pyridoxine hydrochloride, 1.8; niacin, 36.4; Ca-D-pantothenate, 12.7; myo-inositol, 181.8; D-biotin, 0.27; folic acid, 0.68; p-aminobenzoic acid, 18.2; menadione, 1.8; retinyl acetate, 0.73; cholecalciferol, 0.003; cyanocobalamin, 0.003. ³Mineral premix (g/kg-1 of mixture): MgSO₄·7H₂O, 80.0; NaH₂PO₄·2H₂O, 370.0; KCl, 130.0; Ferric citrate, 40.0; ZnSO₄·7H₂O, 20.0; Ca-lactate, 356.5; CuCl, 0.2; AlCl₃·6H₂O, 0.15; Na₂Se₂O₃, 0.01; MnSO₄·H₂O, 2.0; CoCl₂·6H₂O, 1.0. ⁴*Lactobacillus plantarum* was purchased from woojin B&G Co. Ltd., (Gyeonggi, Korea). ⁵*Melosira nummuloides* containing from JNC bio Co. Ltd., (Jeju, Korea). D1, 1% of diatom powder in diet; D2, 2% of diatom powder in diet; D3, 3% of diatom powder in diet.

2.2.3. 체중 및 생존율 변화 분석

규조의 사료 내 첨가가 실험어의 체중 및 생존율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 8주간의 사료 공급 실험 후 어류의 평균 체중을 측정하여 증체율(weight gain, %), 사료효율(feed efficiency, %) 및 생존율(survival rate, %)을 각각 계산하였다. 실험어의 어체 측정은 측정 24시간 전부터 절식시킨 후, 각 실험구에서 무작위로 65마리를 선별하여 100 ppm의 마취용액(2-phenoxy-ethanol)으로 마취시킨 후 실시하였으며, 생존율은 1일 간격으로 각 실험구에 폐사한 개체가 있는지 관찰하여 이하의 계산식으로 산출하였다.

- Weight gain (%) = $100 \times (\text{final mean body weight} - \text{initial mean body weight}) / \text{initial mean body weight}$

- Feed efficiency (%) = $\text{Weight gain of fish} \times 100 / \text{feed intake}$

- Survival rate (%) = $\text{number of fish at end of feeding trial} / \text{number of fish stocked} \times 100$

2.2.4. Superoxide dismutase (SOD) 활성

SOD는 산화스트레스에 대한 1차 방어기작으로 작용하는 항산화 효소로서, 본 실험에서는 간 조직으로부터 SOD assay kit (Sigma-Aldrich, USA)를 사용하여 분석하였다. Buffer solution로 간 조직을 균질화한 후 10,000 g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 이용하여 분석하였다. 준비된 상층액을 sample 및 blank 2 well에 20 μ L씩 분주하고, ddH₂O를 blank 1 및 blank 3 well에 20 μ L씩 분주한 뒤 멀티 피펫을 이용하여 모든 well에 WST working solution 200 μ L를 첨가하여 준다. Dilution buffer는 blank 2 및 blank 3 well에 20 μ L씩 첨가해주고, enzyme working solution는 sample 및 blank 1 well에 20 μ L씩 첨가한다. 37°C에서 20분간 반응시킨 뒤 micro plate reader를 사용하여 450 nm의 흡광도에서 측정한다.

2.2.5. Catalase (CAT) 활성

CAT는 활성산소종이 체내에 생성되면 빠르게 제거하기 위해 활성이 높아지는 것으로 알려져 있다(Barnes et al., 1999). 이에 본 실험에서는 사료첨가제 공급에 따른 체내 활성산소의 변화를 분석하기 위하여 CAT를 분석하였다. CAT의 활성은 간 조직을 Catalase activity colorimetric kit (BioVision, SanFrancisco)를 사용하여 assay buffer로 균질화한 후 10,000 g에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액을 이용하여 분석하였다. 준비된 상층액을 sample 및 HC line에 20 μ L씩 분주하고, assay buffer 58 μ L씩 첨가해준다. HC line에만 stop solution 10 μ L씩 첨가 한 뒤 standard curve line에 1mM H₂O₂ 및 assay buffer를 각각 첨가한 뒤 stop solution 10 μ L씩 첨가한다. Sample 및 HC line에 1 mM H₂O₂ 12 μ L를 첨가한 뒤 25°C에서 30분간 반응시킨 뒤 stop solution 10 μ L씩 첨가하고, 제작한 develop mix를 50 μ L씩 첨가한 뒤 25°C에서 10분간 반응 뒤 micro plate reader를 사용하여 570 nm의 흡광도에서 측정한다.

2.2.6. Glutathione (GSH) 활성

GSH는 활성산소종에 의해 유도되어 산화스트레스의 지표로 활용되고 있으며(Jee and Kang 2005), 본 실험에서 GSH 활성은 실험어의 간 조직을 GSSG/GSH Quantification kit (Dojindo, USA)를 사용하여 5% 5-sulfosalicylic acid (SSA)를 첨가하여 균질화 후 8,000 g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 이용하여 분석하였다. GSH solution 200 $\mu\text{mol/L}$ 를 100 μL 로 micro tube에 0.5% SSA 100 μL 를 연속 희석하여 사용하고, 각 well에 coenzyme working solution 20 μL , buffer solution 120 μL 및 enzyme working solution 20 μL 를 첨가한 뒤 37°C에서 5분간 반응시킨 뒤 GSH standard solution 및 sample solution을 20 μL 를 첨가한 뒤 37°C에서 10분간 반응시킨다. Substrate working solution 20 μL 를 첨가하고, plate를 상온에서 10분간 incubate 시킨 뒤 micro plate reader를 이용하여 405 nm 또는 415 nm에서 흡광도를 측정한다.

2.2.7. Lysozyme (LYS) 활성

LYS은 세균 세포벽의 펩티도글리칸층을 가수분해하여 항균 작용을 하는 효소로 감염성 질환에서 숙주 방어하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Saurabh and Sahoo, 2008). 본 실험에서의 혈장 내 LYS 활성은 혈장을 15 μ L씩 96 well plate에 분주한 후, 150 μ L *Micrococcus lysodeikticus* solution (0.2 mg/mL, 0.1 M PBS, pH= 6.8)을 첨가한 후 25°C에서 5분간 반응시킨 뒤 micro plate reader (Thermo, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정 한 후, 다시 5분간 반응 시킨 뒤 동일한 파장에서 흡광도를 측정하여 lysis 전후의 흡광도 차를 비교하여 측정하였다.

2.2.8. Myeloperoxidase (MPO) 활성

MPO는 항균효과를 가지는 과산화 효소로 식균 작용을 하는 것으로 알려져 있으며(Klebanoff, 2005), 본 실험에서의 혈장 내 MPO 활성은 96 well plate에 혈장 20 μ L를 넣은 후 HBSS (Hank 's Balanced Salt Solution, Sigma-Aldrich, USA) 80 μ L, 20 mM TMB (3, 3' 5, 5-tetramethylbenzidine hydrochloride)용액 35 μ L 및 5 mM H₂O₂를 35 μ L 첨가하고, 35°C incubator에서 2분간 반응시킨 후 4M H₂SO₄ 용액을 35 μ L 첨가한 후 micro plate reader (Thermo, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.2.9. RNA 추출

면역 관련 유전자 분석을 위한 RNA의 추출은 우선, 실험어로부터 신장(head kidney)조직을 적출하여 RNAiso Plus (Takara Bio Inc, Japan)를 첨가하여 균질화한 뒤 상온에서 5분간 반응시키고 4°C, 12,000 g로 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하여 실시하였다. 분리한 상층액은 새 micro tube에 옮긴 후, 200 µL의 chloroform을 첨가하여 inverting 시킨 다음 4°C, 12,000rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액을 새 micro tube에 옮겼다. 여기에 200 µL의 isopropanol을 첨가하여 inverting 한 후 상온에서 10분간 반응시킨 뒤 4°C, 12,000rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 75% ethanol을 700 µL 첨가한 뒤 4°C, 12,000rpm으로 10분간 원심분리하는 과정을 3번 반복하여 세척하였다. 과정 이후 ethanol을 제거하여 건조된 RNA pellet을 RNase-DNase free water (Sigma-Aldrich, USA)에 용해하고, Nano Drop (Thermo Scientific, USA)를 이용하여 순도(purity) 및 농도(concentration)를 측정하여 cDNA 합성에 사용하였다.

2.2.10. cDNA 합성

cDNA는 cDNA Synthesis kit (Takara Bio Inc, Japan)를 사용하여 합성하였다. cDNA는 cDNA synthesis 1 step (Table 2)을 PCR-tube에 첨가한 뒤 65°C에서 5분간 반응시킨 뒤 cDNA synthesis 2 step (Table 3)을 첨가한 뒤 42°C에서 30~60분, 95°C에서 5분간 증폭시켜 cDNA를 합성한 뒤 -20°C에서 보관하여 PCR 증폭에 사용하였다.

Table 2. Volume of buffer for cDNA synthesis 1 step

Reagent	Volume
Oligo dT Primer (50 µM)	1 µL
dNTP Mixture (10 mM each)	1 µL
Template RNA(<1 µg)	x µg
RNase Free dH ₂ O	x µL
Total	20 µL

Table 3. Volume of buffer for cDNA synthesis 2 step

Reagent	Volume
Template RNA Primer Mixture	10 µL
5X PrimeScript Buffer	4 µL
RNase Inhibitor (40 U/µL)	0.5 µg
PrimeScript RTase (200 U/µL)	1 µL
RNase Free dH ₂ O	4.5 µL
Total	20 µL

2.2.11. Real-time PCR (RT-qPCR)을 통한 면역 관련 유전자 발현

Real-time PCR (RT-qPCR)는 cDNA를 주형으로 SYBR Green (Enzynomics, Republic of Korea) 및 real-time PCR machine (Bio-rad, USA)를 사용하여 실험을 진행하였다(Table 4). β -actin을 내부 대조군으로 사용하여 galectin과 c-type lysozyme의 상대적 발현 수준을 RT-qPCR을 사용하여 나타냈다(Table 5). RT-qPCR은 mixture (Table 4)을 plate에 첨가한 뒤 initial denaturation 95°C에서 10~15분간 반응시킨 뒤, denaturation 95°C에서 10초, annealing 60°C에서 15초, elongation 72°C에서 15~30초간 총 35회 또는 40회에 걸쳐 서열을 증폭시키고 마지막으로 72°C에서 10분간 안정화시켜 RT-qPCR를 마무리하였다.

Table 4. Volume of standard reaction RT-qPCR mixture

Reagent	Volume
TOPreal qPCR 2X PreMIX (SYBR Green with low ROX)	10 μ L
Template DNA	1 μ L
Primers F	1 μ L
Primers R	1 μ L
Sterile water (RNase free)	up to 20 μ L

Table 5. Gene specific primers of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* β -actin and immune related genes used in this study

Primer	Direction	Sequences(5' - 3')
β -actin	Forward	TTCTCGGTATGGAGTCCTG
	Reverse	AGCACAGTGTTGGCGTACAG
c-type lysozyme	Forward	CTGTGGGCAGGAAAGACTTC
	Reverse	GGAAGTGTTGGTGGAGAGGA
galectin	Forward	TGTTGAGTCACGGAGACGAG
	Reverse	ACCTCCATCCAGATCAGTGC

2.2.12. 현장적용 실험

현장 적용 실험은 제주도 내 양식장에서 치어(A 양식장) 및 중간육성어(B 양식장)를 대상으로 진행되었으며, A 양식장에서는 개시 평균 체중 10.24 ± 2.55 g의 넙치를 사용하였으며, B 양식장에서는 개시 평균 체중 376.65 ± 79.34 g의 넙치를 사용하였다.

실험실에 사육 실험의 결과 성장 및 면역 활성이 가장 높게 나타난 사료 첨가제 농도를 기준(규조 2% 첨가구, D2)으로 현장에서 제작된 습사료(MP)에 규조 2%를 첨가한 후 8주간 급이하여 대조구와 비교 분석하였다. 그 후 각 실험구의 어체 평균 체중을 측정하여 증체율(weight gain, %)을 계산하였으며, 면역 생리활성을 측정하기 위해 실험어의 미부정맥으로부터 혈액을 채취하여 lysozyme activity (LYS) 및 myeloperoxidase activity (MPO)를 각각 분석하였다.

2.2.13. 통계처리

모든 분석 결과는 IBM SPSS Statistics 24 (SPSS Inc, USA) 프로그램을 이용하여 통계 처리하였으며, 일원 배치 분산분석(One-way ANOVA-test)으로 통계 분석을 하였다. 데이터값의 유의차는 Duncan's multiple test ($P < 0.05$)를 사용하여 대조구와 실험구의 평균을 비교하였으며, 평균값 \pm 표준편차(mean \pm SE)로 나타냈다.

2.3. 결과

2.3.1. 성장률 및 생존율

규조 사료첨가제 공급에 따른 넙치의 성장률, 사료효율 및 생존율의 변화 결과는 Table 6에 나타냈다. 실험 개시 전 체중은 평균 29.79 ± 4.60 g로 8주간의 사료 공급 결과, 최종 성장 체중은 대조구에서 64.76 ± 9.93 g, D1에서 81.61 ± 15.02 g, D2에서 79.30 ± 16.24 g, D3에서 75.16 ± 11.06 g로 나타나 대조구에 비교하여 규조 첨가구가 높게 나타났으며, D1 실험구에서 실험 개시 전에 비해 173.94%의 증체율을 나타내어 가장 빠른 성장을 나타냈다. 사료효율에 있어서도 대조구에서 0.303%, D1에서 0.411%, D2에서 0.369%, D3에서 0.356%로, D1에서 가장 높게 나타났다. 반면, 생존율은 대조구에서 98.13%, D1에서 98.75%, D2에서 99.06%, D3에서 98.13%로 D2에서 가장 높게 나타났다. 이러한 결과로 규조의 사료첨가제 공급에 따라 규조 1% 첨가구인 D1에서 증체율 및 사료효율이 가장 높고, 규조 2% 첨가구인 D2에서 생존율이 가장 높은 것으로 나타나 규조의 사료첨가제는 양식 넙치의 성장 및 생존률 향상에 효과적인 것으로 판단된다.

Table 6. Growth performance of olive flounder, *P. olivaceus* fed the diatom diets for 8 weeks

Growth performances	Experimental diets			
	Control	D1	D2	D3
Final body weight (g)	64.76±9.93	81.61±15.02	79.30±16.24	75.16±11.06
Weight gain (%) ¹	117.40	173.94	166.21	152.31
Feed efficiency (%) ²	0.303	0.411	0.369	0.356
Survival rate (%) ³	98.13	98.75	99.06	98.13

¹Weight gain (%)=100×(final mean body weight–initial mean body weight)/initial mean body weight.

²Feed efficiency (%) = Weight gain of fish×100/feed intake (dry matter). ³Survival rate (%) = number of fish at end of feeding trial / number of fish stocked × 100. D1, 1% of diatom powder in diet; D2, 2% of diatom powder in diet; D3, 3% of diatom powder in diet.

2.3.2. Superoxide dismutase (SOD) activity 분석

SOD는 산화스트레스에 대한 1차 방어기작으로 superoxide radical을 과산화수소(H_2O_2)와 산소(O_2)로 분해하는 효소이며(Forman and Fridovich, 1973), 이 과산화수소는 CAT와 GSH를 만나 물(H_2O)로 변환 후 배출하여 산화 손상으로부터 유기체를 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Giulio et al., 1989). SOD는 대조구에서 99.06 ± 3.67 U/mL, D1에서 100.14 ± 3.46 U/mL, D2에서 99.85 ± 1.33 U/mL, D3에서 99.63 ± 1.42 U/mL로 모든 그룹에서 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Fig. 1, $p > 0.05$). 이러한 결과로 규조 사료첨가제 공급은 SOD 변화에 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

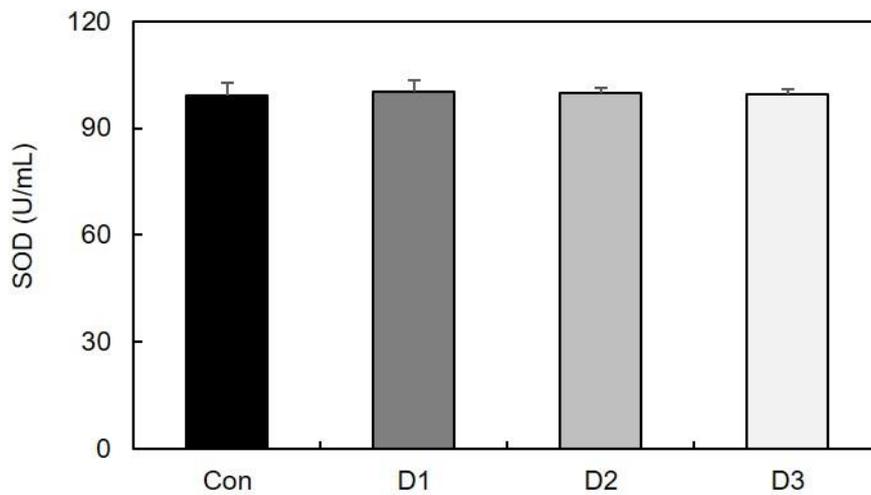


Figure 1. Changes of superoxide dismutase in liver of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels of diatom powder 0%, 1%, 2% and 3% (Con, D1, D2 and D3) for 8 weeks

2.3.3. Catalase (CAT) activity 분석

CAT는 SOD가 분해한 과산화수소(H_2O_2)를 생체에 무해한 인자인 O_2 와 H_2O 로 분해하여 활성산소의 유해성을 저해 및 제거하는 효소로 알려져 있다(Giulio et al., 1989). CAT는 대조구에서 5.51 ± 2.39 mU/mL, D1에서 4.67 ± 2.42 mU/mL, D2에서 4.64 ± 2.08 mU/mL, D3에서 5.39 ± 1.75 mU/mL로 모든 그룹에서 유의적인 차이는 없었다(Fig. 2, $p > 0.05$). 이에 본 실험에서의 결과로 규조 사료첨가제 공급은 CAT 변화에 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

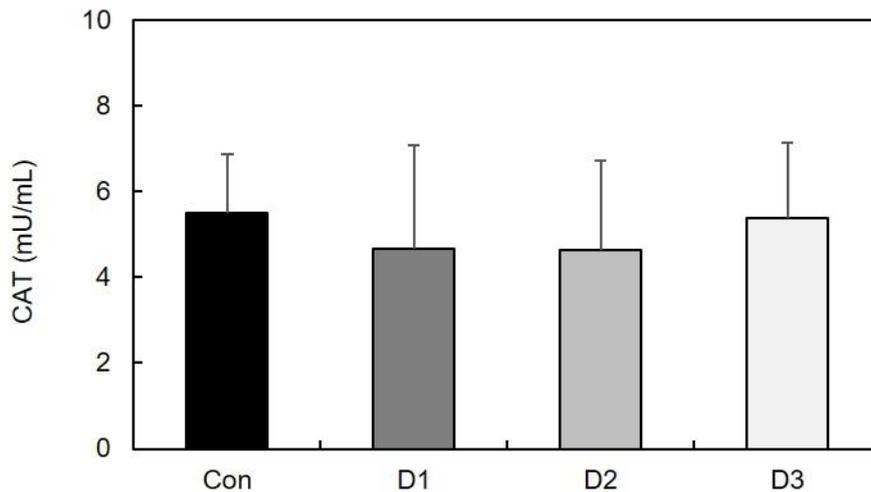


Figure 2. Catalase in liver of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels of diatom powder 0%, 1%, 2% and 3% (Con, D1, D2 and D3) for 8 weeks

2.3.4. Glutathione (GSH) activity 분석

GSH, glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), 및 glutathione sulfotransferase (GST)를 포함한 글루타티온의 의존성 방어 시스템은 비생물적 스트레스요인하에서 어류의 세포 산화 환원 항상성을 유지하는 것으로 알려져 있다(Srikanth and Gwack, 2013). GSH는 대조구에서 $5.25 \pm 1.30 \mu\text{mol/L}$, D1에서 $6.01 \pm 1.42 \mu\text{mol/L}$, D2에서 $4.72 \pm 0.65 \mu\text{mol/L}$, D3에서 $6.32 \pm 0.27 \mu\text{mol/L}$ 로 나타나 D1 및 D3에서 대조구에 비해 높게 나타났으며, D2에서는 유의하게 낮게 나타났다(Fig. 3, $p < 0.05$). 이에 본 실험에서의 대조구(시판사료)와 규조 사료첨가제 공급에 따른 GSH 변화는 큰 차이를 나타내지 않은 것으로 판단된다.

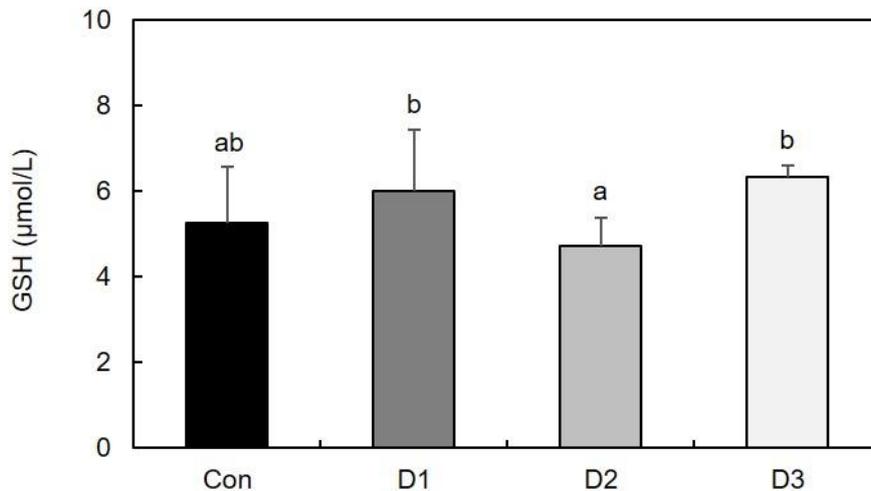


Figure 3. Glutathione in liver of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels of diatom powder 0%, 1%, 2% and 3% (Con, D1, D2 and D3) for 8 weeks

2.3.5. Lysozyme activity 분석

혈장 내 LYS 활성은 어류에서 비특이적 면역능(innate immunity)의 척도로써 사용되며, 세균 세포벽의 구성성분인 peptidoglycan의 β -1, 4 결합을 가수분해하여 항균 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다(Grinde, 1989). LYS은 대조구에서 0.016 ± 0.002 U/mL, D1에서 0.029 ± 0.002 U/mL, D2에서 0.031 ± 0.008 U/mL, D3에서 0.036 ± 0.008 U/mL로 모든 실험구에서 대조구보다 유의하게 높은 수치를 나타냈으며, 특히 D3에서 유의적으로 가장 높은 활성을 나타냈다(Fig. 4, $p < 0.05$). 이러한 결과로 LYS 면역 활성은 규조 첨가에 따라 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타나 규조 사료첨가제가 양식 넙치의 면역 활성 증대에 효과적인 것으로 판단된다.

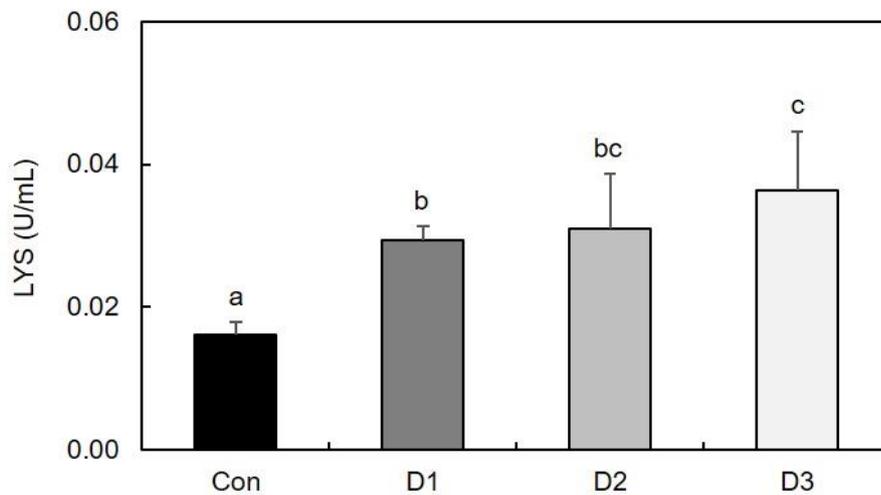


Figure 4. Lysozyme activity in serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels of diatom powder 0%, 1%, 2% and 3% (Con, D1, D2 and D3) for 8 weeks

2.3.6. Myeloperoxidase activity 분석

생체 내 MPO활성 증가는 병원체에 대한 항균효과를 증폭시켜 면역반응을 증가시키는 역할을 한다고 알려져 있다(Palic et al., 2005). MPO는 대조구에서 2.37 ± 0.65 mU/mg, D1에서 2.54 ± 0.32 mU/mg, D2에서 3.59 ± 0.24 mU/mg, D3에서 2.69 ± 0.33 mU/mg로 D2가 다른 그룹에 비해 유의적으로 높게 나타났다(Fig. 5, $p < 0.05$). 이러한 결과로 MPO는 규조 2% 첨가구인 D2에서 면역 활성이 가장 높게 나타나 양식 넙치의 면역 활성 증대에 효과적인 것으로 판단된다.

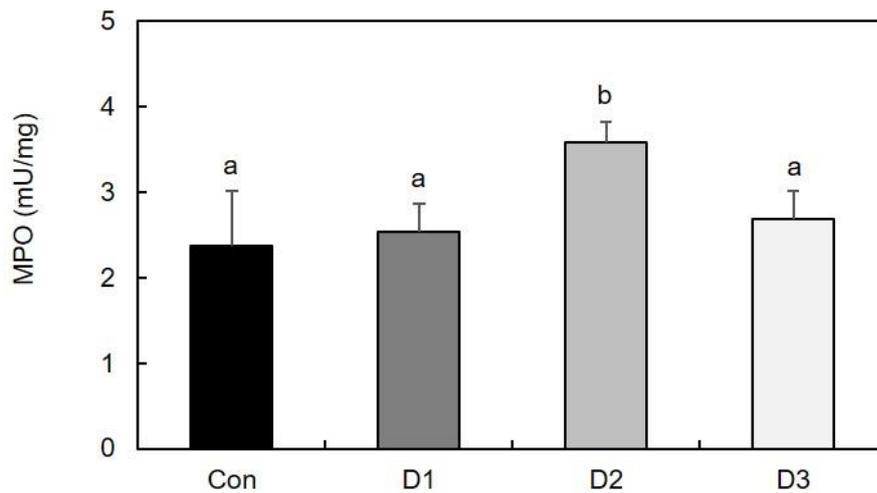


Figure 5. Myeloperoxidase activity in serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels of diatom powder 0%, 1%, 2% and 3% (Con, D1, D2 and D3) for 8 weeks

2.3.7. Real-time PCR(RT-qPCR)을 통한 면역 관련 유전자 발현

Galectin은 원생생물, 무척추동물, 척추동물 및 어류의 피부 점액에 존재하며, 병원체에 의해 발현된다고 알려져 있다(Suzuki et al., 2003). Galectin은 대조구에서 $0.904 \pm 0.169\%$, D1에서 $0.614 \pm 0.144\%$, D2에서 $0.055 \pm 0.018\%$, D3에서 $0.103 \pm 0.024\%$ 로, 대조구에서 가장 높은 수치를 나타냈으며, 대조구에 비해 D1, D2 및 D3에서 유의적으로 낮은 수치를 나타냈다(Fig. 6, $p < 0.05$). 이러한 결과로 규조 사료첨가제 공급은 galectin의 발현을 낮추는 것으로 나타나, 규조의 사료첨가에 의해 양식 넙치의 병원체 감염 기회를 감소시키는 결과를 유도하는 것으로 추정된다.

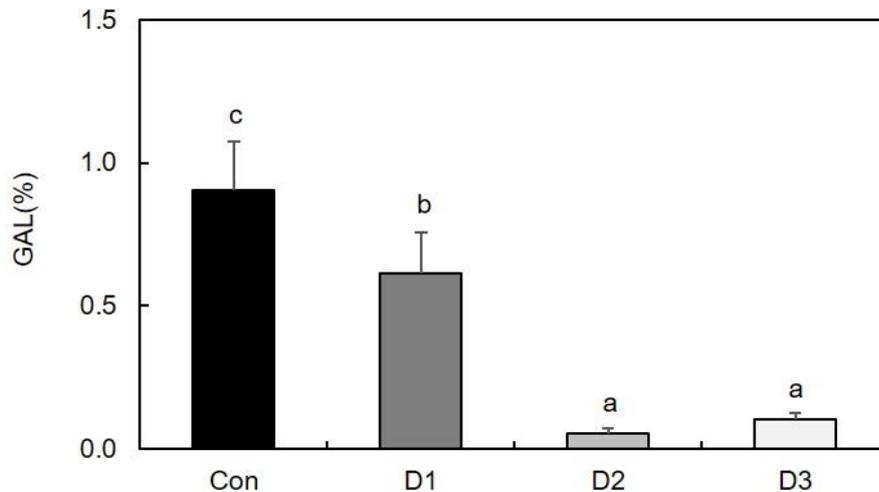


Figure 6. Change of Galectin expression change in kidney of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels of diatom powder 0%, 1%, 2% and 3% (Con, D1, D2 and D3) for 8 weeks. Expression levels were normalized against the internal control, β -actin. Expression levels between the two groups were compared by real-time PCR

C-type lysozyme은 감염을 일으킬 수 있는 미생물들의 침입과 부착을 막는 것으로 알려져 있다. C-type lysozyme은 대조구에서 $0.725 \pm 0.177\%$, D1에서 $0.504 \pm 0.155\%$, D2에서 $0.284 \pm 0.066\%$, D3에서 $0.416 \pm 0.062\%$ 로 나타나 galectin과 유사하게 대조구가 가장 높고 D2 및 D3에서 유의적으로 낮게 나타났다(Fig. 7, $p < 0.05$). 이러한 규조 사료첨가제 공급에 의해 신장에서의 galectin 및 lysozyme의 낮은 발현 결과는 병원체 침입을 감소시켜 두 물질의 발현을 낮추는 것으로 추정된다.

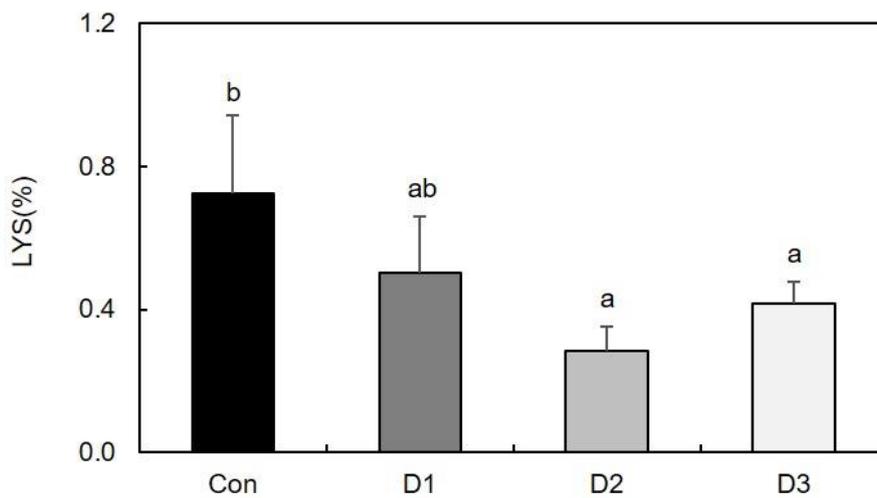


Figure 7. Change of c-type Lysozyme expression change in kidney of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels of diatom powder 0%, 1%, 2% and 3% (Con, D1, D2 and D3) for 8 weeks. Expression levels were normalized against the internal control, β -actin. Expression levels between the two groups were compared by real-time PCR

2.3.8. 양식현장 급이 실험

양식현장에서의 규조 사료첨가제 급이에 따른 넙치의 성장률, 비특이적 면역 활성 분석 결과는 Table 7에 나타냈다. 실험 개시 전 체중은 A 양식장에서 평균 10.24 ± 2.55 g로 나타났으며, B 양식장에서 평균 376.65 ± 79.34 g로 나타났다. 8주간의 사료 공급 결과, 최종 성장 체중(final body weight)은 A 양식장에서 A0는 54.21 ± 9.51 g, A2는 66.75 ± 15.28 g로 나타났으며, B 양식장에서 B0는 715.94 ± 97.52 g, B2는 715.82 ± 140.01 g로 나타났다.

Lysozyme activity은 A 양식장의 A0는 0.019 ± 0.009 U/mL, A2는 0.028 ± 0.012 U/mL로 나타났으며, B 양식장에서 B0는 0.027 ± 0.010 U/mL, B2는 0.034 ± 0.014 U/mL로 나타났다. Myeloperoxidase activity은 A 양식장에서 A0는 1.90 ± 0.34 mU/mg, A2는 20.19 ± 0.62 mU/mg로 나타났으며, B 양식장에서 B0는 2.37 ± 0.74 mU/mg, B2는 2.72 ± 0.65 mU/mg로 나타났다.

이러한 결과로 양식현장에서의 규조사료첨가제 공급에 따른 성장은 치어 대상인 A 양식장에서 규조 2% 첨가구인 A2가 대조사료보다 증체율이 높은 것으로 나타났으며, 중간육성어 대상인 B 양식장에서는 큰 차이를 나타내지 않아 치어 단계의 양성어에 규조 사료첨가제 공급에 따른 성장 효과가 높은 것으로 판단된다. 한편, lysozyme 및 myeloperoxidase 활성은 A 양식장 및 B 양식장 모두 규조 2% 첨가구인 A2 및 B2가 대조사료에 비해 높은 것으로 나타나 규조의 사료첨가제에 따른 양식 넙치의 면역에 효과적인 것으로 판단된다.

Table 7. Growth performance and nonspecific immune response of olive flounder, *P. olivaceus* fed the diatom diets for 8 weeks in aquaculture

Growth performances	Experimental diets			
	A0	A2	B0	B2
Final body weight (g)	54.21±9.51	66.75±15.28	715.94±97.52	715.82±140.01
Weight gain (%) ¹	429.55	551.96	90.08	90.05
Lysozyme activity (U/mL)	0.019±0.009	0.028±0.012	0.027±0.010	0.034±0.014
Myeloperoxidase activity (mU/mg)	1.90±0.34	2.19±0.62	2.27±0.74	2.72±0.65

¹Weight gain (%)=100×(final mean body weight–initial mean body weight)/initial mean body weight. A2, B2, 2% of diatom powder in diet.

2.4. 고찰

미세조류 중에서도 규조는 다양한 종에서 먹이 생물로 활용되고 있으며(Kang et al., 2011), 사료 내 규조의 첨가는 이매패류의 체중, 각장 및 각고의 성장을 증가시킨다는 것으로 보고됐다(Chen, 2007). 또한, 새우인 black tiger prawn *Penaeus monodon*에 여러 종의 미세조류(*Nannochloropsis* sp., *Melosira* sp., *Entomoneis* sp., *Chlorella* sp., *Stauroneis* sp. 및 *Dunaliella* sp.)를 4주간 공급한 결과, 규조류인 *Melosira* sp.의 공급이 다른 미세조류의 공급에 비해 생존율에 있어 유의적으로 높은 수치를 나타냈으며, 성장률에서도 유의적인 차이는 없었으나 가장 높은 수치를 나타냈다고 보고됐다(Li et al., 2016). 또한, Pacific red snapper (*L. peru*)을 대상으로 연구한 Reyes-Becerril et al. (2014)에서는 규조 및 유산균을 혼합하여 첨가한 사료(대조구, *Navicula* sp. + *Lactobacillus sakei*, *Navicula* sp., *L. sakei*)를 첨가하여 8주간 공급한 후 성장률을 분석한 결과 대조구에 비해 *Navicula* sp. 및 *L. sakei*를 혼합한 실험구가 유의적으로 가장 높은 성장률을 보였으며, *Navicula* sp. 단독구 및 *L. sakei* 단독구 또한 대조구에 비해 높은 성장률을 나타냈다. 따라서 본 실험에 사용한 *M. nummuloides*를 비롯한 해양 미세조류가 어류 양식에 있어서 사료첨가제로서의 활용 가능성이 높은 것으로 판단된다. 본 사육 실험에서 대조사료를 8주간 섭취한 실험어(최초 체중 29.79 ± 4.60 g)의 체중은 64.76 ± 9.93 g이었으며, 사료효율은 0.303%로 나타냈으며, 사료 내 규조를 첨가한 모든 그룹에서 대조구보다 높은 체중 성장 및 사료 이용률을 나타냈다. 이러한 결과는 규조 사료첨가제 공급에 따른 넙치의 성장 변화에서 사료 내 규조의 첨가가 성장 및 생존율에 긍정적 영향을 끼치는 것으로 추정된다.

수질오염 및 환경변화 등 외부 인자에 의한 스트레스는 어류의 체내에서

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성을 증가시켜 산화스트레스를 유발하는 것으로 보고됐다(Dalton et al., 1993). 생물은 활성산소에 의한 산화스트레스로부터 자신을 보호하고 항상성을 유지하기 위하여 항산화 방어기작을 가지고 있으며, 활성산소를 감소시키거나 제거하는 존재로 항산화 효소와 항산화 물질로 나뉜다(Martinez-Alvarez et al., 2005). 해양 생물에서 항산화 방어기작에 관여하는 대표적인 항산화 효소로는 SOD, CAT 및 glutathione peroxidase (GPx) 등이 있으며, 항산화 물질에는 GSH, ascorbic acid, metallothionein (MT) 및 α -tocopherol 등이 존재하며, 해양 생물의 간에서 생성되는 것으로 보고됐다(Basha and Rani, 2003). 그중 SOD는 산화스트레스에 대한 1차 방어기작으로 superoxide radical을 과산화수소(H_2O_2)와 산소(O_2)로 분해하는 효소이며, 이 과산화수소는 CAT와 GSH를 만나 물(H_2O)로 변환 후 배출하여 산화 손상으로부터 유기체를 보호하는 역할을 하는 것으로 보고됐다(Forman and Fridovich, 1973; Giulio et al., 1989). 또한 GSH, glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), 및 glutathione sulfotransferase (GST)를 포함한 글루타티온의 의존성 방어 시스템은 비생물적 스트레스 요인 하에서 어류의 세포 산화 환원 항상성을 유지하는데 있어 그중요성이 입증된 바 있다(Srikanth and Gwack, 2013). 본 연구에서 사료 내 규조의 첨가에 따른 SOD 및 CAT 활성은 모든 그룹에서 유의적인 차이를 보이지 않았으며, GSH 활성 결과 대조구에 비해 전 실험구에서 유의차가 없는 것으로 나타났으며, 그중 D2가 유의적으로 가장 낮은 수치를 나타냈다. 이러한 결과는 본 실험에서의 규조 첨가제 공급은 양식 넙치의 활성산소 변화에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단되나, GSH의 경우 D2의 실험구에서 대조구에 비해 낮은 수치를 나타내어 외부 스트레스에 대한 내성 효과가 가장 큰 것으로 추정된다.

한편, 생물체에서 가지는 선천적인 비특이적 방어 기작은 면역 자극제에 의해 신속하게 활성화되며, 병원균에 대항하여 어류를 보호하기 위해 빠르게 동원되는 것으로 보고됐다(Smith and Lumsden, 1983). 그중 LYS는 어류의 1차 방어선으로 비특이적 면역능(innate immunity)의 척도로써 사용되어 왔으며(Bols et al., 2001), 다양한 균에 항균 작용을 나타내는 효소로서 세균 세포벽의 구성성분인 peptidoglycan의 β -1, 4 결합을 가수분해하여 항균 작용을 나타내는 것으로 보고됐다(Grinde, 1989). MPO의 경우에는 호중구, 호염기구 및 호산구에 존재하는 과산화 효소이며, 과산화수소를 hypochlorous acid (HClO)로 전환해 병원성 미생물을 사멸시키는 작용이 있는 것으로, 생체 내 MPO활성 증가는 병원체에 대한 항균효과를 증폭시켜 면역반응을 증가시키는 역할을 하는 것으로 보고됐다(Palic et al., 2005). Reyes-Becerril et al. (2014)은 pacific red snapper (*L. peru*)을 이용하여 규조류의 일종인 *Navicula* sp.와 유산균인 *L. sakei*를 사료에 첨가하여 공급한 결과, 대조구에 비해 *Navicula* sp.+*L. sakei*를 첨가한 실험구가 유의적으로 높은 LYS 활성을 보였으며, *Navicula* 단독구 및 *L. sakei* 단독구 또한 대조구에 비해 높은 경향을 나타낸 것으로 보고됐다. 또한 Cerezuela et al. (2012)은 gilthead seabream *Sparus aurata* L.에 규조를 급이한 결과 선천성 면역을 자극하여 어류에서 비특이적 방어능을 증가시킨다고 보고하고 있다. 본 연구에서도 규조인 *M. nummuloides*를 사료에 첨가하여 공급한 결과, LYS 활성이 규조를 첨가한 실험구에서 대조구보다 유의적으로 높은 경향을 보였으며, 농도 의존적으로 증가하는 결과를 나타냈다. 또한 MPO 활성에서도 2%의 규조를 첨가한 D2에서 유의하게 높은 MPO 활성을 나타냈으며, D1 및 D3 실험구도 유의한 차이는 없었으나 높은 경향을 나타냈다(Fig. 5). 따라서 본 연구에서 나타난 LYS 및 MPO 활성의 증가는 규조 첨가 사료 공급을 통하여 양식 어류의 비특이적 면역반응의

활성 증대를 유도하는 것으로 추정된다.

일반적으로 선천면역 관련 유전자는 숙주에 외부로부터 병원체가 유입되면 급격히 증가하는 것으로 보고됐다(Magnadóttir, 2006). 그중 lectin은 선천성 면역반응에 속하며, 주로 단백질과 탄수화물 상호작용을 통한 병원균(PAMPs)의 인식에 관여하고 있으며(Robinson et al., 2006), lectin의 한 종류인 galectin (GAL)은 원생생물, 무척추동물 및 어류의 피부 점액에 존재하며, 병원체에 의해 발현된다고 보고됐다(Suzuki et al., 2003; Rabinovich and Gruppi, 2005). Mistry et al. (2001)에 따르면 뱀장어(*Anguilla japonica*)에 있어서 해수에서 담수로의 이동에 의한 아가미에서의 c-type lectins의 발현이 현저히 증가하는 것으로 보고하고 있는데, 이러한 결과는 염분 스트레스 및 전염성 박테리아에 의한 스트레스에 의한 결과로 보고됐다. 또한 Manila clams(*Ruditapes philippinarum*)을 대상으로 한 연구에서는 *Perkinsus olseni*에 감염된 조개에서 모두 galectin이 발현되었으며, 감염되지 않은 대조그룹에서는 galectin이 발현되지 않아 이는 박테리아가 렉틴의 발현을 유도한 것으로 보고되어졌다(Kang et al., 2006). 본 연구에서 면역 관련 유전자의 변화는 규조 첨가 그룹보다 대조구에서 유의적으로 높은 수치를 나타냈다(Fig. 6). 대조구의 높은 galectin의 농도는 실험수조에서 사육 기간 중 외부의 병원체로부터의 감염에 의한 증가로 여겨지며, 규조 첨가 실험구에서는 체액성 면역 등 비특이적 면역에 의해 어체에서의 기본적인 항병 능력이 높아진 결과로 대조구에 비해 낮은 유전자 발현량을 나타낸 것으로 추정된다. 이처럼 사료내 규조 첨가 공급에 의한 면역력 증대의 결과로 규조를 이용한 사료첨가제가 어류의 스트레스 및 항병성에 높은 효과를 유도할 것으로 추정된다. 또한 LYS에 있어서도 본 실험에서는 galectin의 결과와 유사한 결과를 나타냈다. GAL의 발현대비 LYS의 발현은 대조구에서 비교적 낮은 발현율을

나타냈으며, 구조 첨가에 따라 발현량이 높아지는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 사료 내 구조의 첨가가 어체에 면역능을 부여하여 기본적인 항병 능력이 높아진 것으로 추정된다. 결과적으로 본 연구에서 나타난 LYS의 발현 저하는 외부의 생물학적 병원성 침범에 대한 내병성의 결과로 낮은 발현을 유지하는 것으로 추정된다.

본 실험과 마찬가지로 양식현장에서 치어를 대상으로 실험한 A 양식장에서는 구조를 첨가한 A2에서 대조구인 A0보다 높은 체중증가율을 나타냈으며, 비특이적 면역 활성인 LYS 및 MPO에서도 A0보다 높은 활성을 나타내어, 양식현장에서의 체중 성장 및 면역 활성 또한 구조를 첨가한 사료가 대조구보다 넙치의 성장 및 면역 활성을 유도하는 것으로 나타났다(Table 7). 하지만 중간육성어를 대상으로 실험한 B 양식장에서는 체중 성장에서 큰 효과를 나타내지 않아 이러한 결과는 구조 첨가 사료가 초기 체중 성장에 효과가 있을 것으로 추정된다.

Jin et al. (2018)은 구조에 존재하는 구조가 체액성 및 세포성 면역 반응을 증가시키는 것으로 보고하고 있으며, 이외에도 구조에 다량 함유된 구조의 면역 증가에 관한 결과는 많은 연구를 통하여 밝혀지고 있다(Seaborn et al., 2002; Russell et al., 2016). 포유류에서도 구조는 면역계에 긍정적인 영향을 미치고 림프구 증식에 필요한 것으로 보고되어졌으며(Seaborn et al., 2002), 마우스에서도 구조를 면역 보조제로 이용할 경우 IgG 및 IgA 항체 수준을 증가시킨다고 보고되어졌다(Russell et al., 2016). 따라서 본 연구에서 나타난 비특이적 면역 활성은 구조에 포함된 다량의 구조에 의해 유도된 가능성이 있는 것을 판단되지만, 추가적인 연구로 구조만을 분리 정제하여 공급하는 실험이 필요할 것으로 판단된다. 이에 따라 제 3장에서 구조의 첨가에 따른 넙치의 성장 및

면역 관련 유전자의 발현에 대하여 추가적인 실험을 실시하고자 하였다.

이상의 결과를 종합해보면, 본 연구에서 넙치 사료 내 규조의 첨가는 높은 체중 성장률 및 사료효율을 나타냈으며, 생존율에서도 D1 및 D2에서 대조구에 비해 높게 나타났다. 면역반응의 지표인 LYS는 규조 첨가에 따라 농도의존적으로 증가하는 결과를 나타냈으며, MPO 또한 규조 첨가 실험구에서 대조구에 비해 높은 수치를 나타냈다. 따라서 성장에 있어서는 1% 첨가구가 가장 효과가 높았고, 면역에서는 고농도의 규조첨가구에서 효과가 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 사료 내 규조 첨가가 양식 넙치의 사료효율을 증가시킬 뿐만 아니라 성장을 촉진하고 선천적 면역 관련 물질들의 발현을 촉진해 외부로부터의 세균 등에 대한 감염률을 낮추는 작용에 의해 유도된 것으로 추정된다. 이에 따라 본 연구에서 실험한 사료 내 규조인 *M. nummuloides*의 첨가는 양식 넙치의 성장 촉진 및 선천면역을 유도하는 사료첨가제로서의 양식산업에 직접적으로 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

제 3장 Bio-silica 첨가 사료 공급에 따른 넙치의 생리적 변화

3.1. 서론

규소는 자연 상태에서 원소 상태로 존재하지 않고 이산화규소(silica, SiO₂)의 형태를 이루거나 지각을 형성하는 광물(규산염)에 포함되어 있다(Staffan, 1996; Exley, 1998). 규소는 인간의 결합조직, 뼈, 치아 및 피부 등 장기를 구성하는 성분 중 하나이며(Lassus, 1993; Martin, 2013), 결핍 시 골다공증, 탈골, 탈회 및 심혈관 질환을 유발하는 것으로 보고되어졌다(Reffitt et al., 2003; Nielsen, 2014).

암석 및 토양에서 추출된 실리카의 경우 결정형으로(Martinovic et al., 2006), 지구의 고열과 고압을 받아 유리물성화되어 있고(Inglethorpe et al., 1993), 대부분 석영에서 얻을 수 있으며(Kadey, 1975), 일반 규조토에서 생산되는 피각의 경우 단일 종(species)으로부터 생산되지 않아 피각(frustule)의 형태 및 silica 골격 등 형태가 일정하지 않은 점에서 산업계에서 제한적으로 이용되고 있다(Yilmaz and Ediz, 2008; Ergün, 2011). 생물에서 유래된 규소는 바이오 실리카(bio-silica)로 불리며, 우수한 흡혈성을 가지고, 그 자체로 세균의 번식을 억제하고 유기오염물을 효과적으로 제거하는 기능이 있다는 것으로 보고됐으며(Lee et al., 2020), 육상 생물을 대상으로 뼈 재생 등 골격 형성과 관련된 연구가 활발하게 이루어져 있다(Wee et al., 2005; Bariana et al., 2013; Li et al., 2014). 또한 산란기 메추라기(quail)에 규소 급이시 난의 무게 및 껍질의 무게를 증가시키는 것으로 보고되어졌으며(Faryadi S and Sheikhahmadi, 2017), 마우스 실험에서도 콜레스테롤 사료에 규소를 혼합 급이한 결과 세포 사멸로부터의 간 손상에 보호 효과 나타내고 지방간 질환(NASH) 발병의 위험을 낮추는 것으로 보고되어졌다(Garcimartín et al., 2017).

따라서 본 연구에서는 기존 육상 생물을 대상으로만 사용되었던 바이오 실

리카를 이용하여 양식 넙치의 사료첨가제로서의 효능을 평가하기 위하여 바이오 실리카 첨가 사료를 제작하여 8주간 급이 후 성장률, 사료효율, 생존율, 항산화 활성, 비특이적 면역 분석, 면역 관련 유전자 분석 및 현장 적용 실험을 수행하였다.

3.2. 재료 및 방법

3.2.1. 실험어 및 실험 조건

본 실험은 제주대학교 해양과학연구소 내 사육 수조에서 실시하였으며, 실험에 사용된 넙치는 그룹당 300마리씩 무작위로 배치한 뒤 약육 및 2주일간의 순치 기간을 가진 후 실험에 사용되었다. 사육 수조는 $1.5 \times 1.5 \times 0.7 \text{ m}^3$, 1,100 L 용량의 일체형 수조를 이용하여 실험을 실시하였으며, 실험 기간 모든 수조는 자연 수온 $18.75 \pm 2.11^\circ\text{C}$, 염분 $33.67 \pm 1.11 \text{ psu}$ 로 조절되었다.

3.2.2. 실험 사료 및 공급

실험에 사용된 바이오 실리카(bio-silica)는 어업회사법인 (주)제이앤씨에서 제공받아 실험에 사용되었다. 실험구는 bio-silica 및 *L. plantarum*이 첨가되지 않은 Control (Con)과 bio-silica 1% 첨가구(BS), *L. plantarum* 1% 첨가구(LP), bio-silica 분말 각 0.5%, 1% 및 1.5%에 *L. plantarum* 1% (BL 0.5, BL 1 및 BL 1.5)가 첨가된 6종의 사료를 자체 제작하여 실험에 사용하였다(Table 8). 사료 공급은 1일 2회(09:00, 14:00 hr)에 걸쳐 만복 공급하였으며, 공급 후 60분 뒤 환수를 하여 수조의 수질을 유지하였으며, 사육은 총 8주간 진행하였다.

Table 8. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets for olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (% of dry matter)

Ingredients	Experimental diets					
	Con	BS	LP	BL 0.5	BL 1	BL 1.5
Fish meal (sardine)	60	60	60	60	60	60
Soybean meal	12	12	12	12	12	12
Corn gluten meal	3	3	3	3	3	3
Soy protein concentrate	3	3	3	3	3	3
Wheat flour	11	11	11	11	11	11
Fish oil	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Lecithin	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Monocalcium ¹ phosphate	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Vitamin Mix ²	1	1	1	1	1	1
Mineral Mix ³	1	1	1	1	1	1
Choline	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Cellulose	4	3	3	2.5	2	1.5
<i>L. plantarum</i> ⁴	0	0	1	1	1	1
Bio-silica ⁵	0	1	0	0.5	1	1.5

¹Mono-Calcium Phosphate (22% of phosphate). ²Vitaminpremix(g/kg-1ofmixture):L-ascorbicacid,121.2;DL-*α*-tocopherylacetate,18.8;thiaminhydrochloride,2.7;riboflavin,9.1;pyridoxinehydrochloride,1.8;niacin,36.4;Ca-D-pantothenate,12.7;myo-inositol,181.8;D-biotin,0.27;folicacid,0.68;p-aminobezoicacid,18.2;menadione,1.8; retinylacetate,0.73;cholecalciferol,0.003; cyanocobalamin,0.003.³Mineralpremix(g/kg-1ofmixture): MgSO₄·7H₂O,80.0;NaH₂PO₄·2H₂O,370.0;KCl,130.0;Ferricitrate,40.0;ZnSO₄·7H₂O,20.0;Ca-lactate,356.5; CuCl,0.2;AlCl₃·6H₂O,0.15;Na₂Se₂O₃,0.01;MnSO₄·H₂O,2.0;CoCl₂·6H₂O,1.0.⁴*Lactobacillus plantarum* was purchased from woojin B&G Co. Ltd., (Gyeonggi, Korea). ⁵Bio-silica containing from JNC bio Co. Ltd., (Jeju, Korea).

3.2.3. 계측 및 생존율 분석

바이오 실리카의 사료 내 첨가가 실험어 체중 변화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 8주간의 사료 공급 실험 후 어류의 평균 체중을 측정하여 증체율, 사료효율 및 생존율을 각각 계산하였다. 모든 그룹은 8주간의 사료 공급 실험 후 각 그룹에서 65마리를 선별하여 마취용액(2-phenoxy-ethanol) 100ppm으로 마취시킨 후 어체를 측정하였으며, 생존율은 1일 간격으로 각 실험구에 폐사한 개체가 있는지 관찰하여 이하의 계산식으로 산출하였다.

- Weight gain (%) = $100 \times (\text{final mean body weight} - \text{initial mean body weight}) / \text{initial mean body weight}$

- Feed efficiency (%) = $\text{Weight gain of fish} \times 100 / \text{feed intake}$

- Survival rate (%) = $\text{number of fish at end of feeding trial} / \text{number of fish stocked} \times 100$

3.2.4. Superoxide dismutase (SOD) 활성

SOD 활성은 SOD assay kit (Sigma-Aldrich, USA)를 사용하여 분석하였으며, 간 조직을 Buffer solution으로 균질화한 후 상층액을 얻어 분석에 사용하였다. 분석은 2장의 진행한 방법과 동일하게 실험하였다.

3.2.5. Catalase (CAT) 활성

CAT 활성은 간 조직을 Catalase kit (BioVision, SanFrancisco)를 사용하여 분석되었다. Assay buffer로 실험어의 간 조직을 균질화한 후 10,000 g, 15분, 4°C 원심분리하여 얻은 상층액을 이용하여 분석하였다. 분석은 BioVision에서 제시한 protocol과 동일하게 실험하였다.

3.2.6. Glutathione (GSH) 활성

GSH 활성은 GSSG/GSH Quantification kit (Dojindo, USA)를 사용하여 분석되었으며, 실험어의 간 조직에 5% 5-sulfosalicylic acid (SSA)를 첨가하여 균질화 후 8,000 g, 10분, 4°C 원심분리하여 얻은 상층액을 이용하여 분석하였으며, 분석은 2장에서 진행한 방법과 동일하게 실험하였다.

3.2.7. Lysozyme (LYS) 활성

혈장 내 LYS 활성은 96 well plate에 혈장을 15 μ L씩 분주한 뒤 *Micrococcus lysodeikticus* solution (0.2 mg/mL, 0.1 M PBS, pH= 6.8) 150 μ L를 첨가한 후 25°C에서 1분간 반응시킨 뒤 micro plate reader (Thermo, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이후 5분간 반응 시킨 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하여 lysis 전후의 흡광도 차를 비교하여 측정하였다.

3.2.8. Myeloperoxidase (MPO) 활성

혈장 내 MPO 활성은 96 well plates에 혈청 20 μ L를 첨가 후 HBSS (Hank 's Balanced Salt Solution, Sigma-Aldrich, USA) 80 μ L, 20 mM TMB(3, 3' 5, 5-tetramethylbenzidine hydrochloride) 35 μ L 및 5 mM H₂O₂를 35 μ L 첨가한 후 35°C incubator에서 2분간 반응시킨다. 이후 4 M H₂SO₄을 35 μ L 첨가하여 micro plate reader (Thermo, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3.2.9. RNA 추출

Total RNA 추출은 실험어의 신장(head kidney)조직을 적출하여 RNAiso Plus (Takara Bio Inc, Japan)를 첨가한 뒤 상온에서 5분간 반응시킨 후 균질화하였다. 이후 12,000 g, 10분, 4°C 원심분리하여 상층액을 분리하였고, 새 micro tube에 옮긴 후 200 μ L의 chloroform을 첨가하여 inverting 시킨 다음 12,000 g, 15분, 4°C 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 상층액을 새 micro tube에 옮긴 후 isopropanol 200 μ L을 첨가하여 inverting 한 후 상온에서 10분간 반응시킨 뒤 12,000 g, 10분, 4°C 원심분리하였다. 700 μ L의 75% ethanol을 첨가한 뒤 12,000 g, 10분, 4°C 원심분리하는 과정을 3번 반복하여 세척한 뒤 ethanol을 제거한 뒤 건조된 RNA pellet에 RNase-DNase free water (Sigma-Aldrich, USA)를 첨가하여 용해시켰다.

3.2.10. cDNA 합성

cDNA는 cDNA Synthesis kit (Takara Bio Inc, Japan)를 사용하여 합성하였으며, 2장에서 진행한 방법과 동일하게 실험하였다.

3.2.11. Real-time PCR (RT-qPCR)

Real-time PCR (qPCR)는 cDNA를 주형으로 SYBR Green (Enzymomics, Republic of Korea) 및 real-time PCR machine (Bio-rad, USA)를 사용하여 실험을 진행하였다. β -actin을 내부 대조군으로 사용하여 galectin 및 c-type lysozyme의 상대적 발현 수준을 RT-qPCR을 사용하여 내었으며, β -actin의 primer는 forward 5'-TTCCTCGGTATGGAGTCCTG-3', reverse 5'-AGCACAGTGTGGCGTACAG-3'를 galectin의 primer는 forward 5'-TGTTGAGTCACGGAGACGAG-3', reverse 5'-ACCTCCATCCAGATCAGTGC-3'를 c-type lysozyme의 primer는 forward 5'-CTGTGGGCAGGAAAGACTTC-3', reverse 5'-GGAAGTGTGGTGGAGAGGA-3'를 제작하여 사용하였으며(Table 5), 2장에서 진행한 방법과 동일하게 실험하였다.

3.2.12. 현장적용 실험

현장그후적용 실험은 제주도 내 양식장에서 실시되었으며, 사육 실험은 개시 평균 체중 139.56 ± 3.87 g의 넙치를 사용하였다.

실험실에 사육 실험의 결과 생존율 및 면역 활성이 가장 높게 나타난 사료 첨가제 농도를 기준(바이오 실리카 1.5% 첨가구, BL 1.5)으로 습사료(MP)에 바이오 실리카 1.5%를 첨가한 후 8주간 급이하여 대조 실험구와 비교 분석하였다. 이후 각 실험구의 어체 평균 체중을 측정하여 증체율(weight gain, %)을 계산하였으며, 면역 생리활성을 분석하기 위해 실험어의 미부정맥에서 혈액을 채취하여 Lysozyme activity (LYS) 및 Myeloperoxidase activity (MPO)를 각각 분석하였다.

3.2.13. 통계처리

모든 분석 결과는 IBM SPSS Statistics 24 (SPSS Inc, USA) 프로그램을 이용하여 통계 처리하였으며, 통계 분석은 일원 배치 분산분석, Duncan's multiple test ($P < 0.05$)을 사용하여 데이터값의 유의차를 나타냈다. 또한 대조구와 실험구의 평균은 평균값 \pm 표준편차(mean \pm SE)로 나타냈다.

3.3. 결과

3.3.1. 체중 및 생존율

바이오 실리카 사료첨가제 공급에 따른 넙치의 성장률, 사료효율 및 생존율의 변화 결과는 Table 9에 나타났다. 8주간의 사료 공급 결과, 최종 성장률은 대조구에서 80.97%, BS에서 103.62%, LP에서 98.85%, BL 0.5에서 111.53%, BL 1에서 83.16%, BL 1.5에서 89.39%로 나타나 모든 실험구에서 대조구보다 높은 체중 증가율을 나타냈다. 사료효율에 있어서도 대조구에서 0.14%, BS에서 0.17%, LP에서 0.18%, BL 0.5에서 0.20%, BL 1에서 0.17%, BL 1.5에서 0.17%로 나타났으며, 그중 BL 0.5에서 가장 높게 나타났다. 반면, 생존율은 Con, BS, LP, BL 0.5, BL 1 및 BL 1.5에서 86.7 %, 83.3%, 93.3%, 90.0 %, 83.3 % 및 90.0 %로 LP에서 가장 높게 나타났다. 이러한 결과로 바이오 실리카 사료첨가제 공급에 따라 BL 0.5에서 체중 성장률 및 사료효율이 가장 높은 것으로 나타났으며, LP에서 생존율이 가장 높은 것으로 나타나, 양식 넙치의 성장에 바이오 실리카 사료첨가제가 효과적인 것으로 판단된다.

Table 9. Growth performance of olive flounder, *P. olivaceus* fed the bio-silica diets for 8 weeks

Growth performances	Experimental diets				
	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Weight gain (%)	Feed efficiency (%)	Survival rate (%)
Control	55.54±11.42	100.51±20.0	80.97	0.14	86.7
BS	48.71±12.50	99.18±22.65	103.62	0.17	83.3
LP	54.33±12.06	108.04±20.97	98.85	0.18	93.3
BL 0.5	49.84±13.30	105.43±25.24	111.53	0.20	90.0
BL 1	48.87±11.10	89.50±22.03	83.16	0.17	83.3
BL 1.5	51.33±13.31	97.21±28.02	89.39	0.17	90.0

3.3.2. Superoxide dismutase (SOD) activity 분석

SOD는 산화스트레스에 대한 1차 방어기작으로 작용하는 항산화 효소로서, 본 실험에서 SOD는 대조구에서 36.16 ± 8.44 U/mL, BS에서 38.92 ± 8.44 U/mL, LP에서 42.78 ± 7.38 U/mL, BL 0.5에서 40.74 ± 8.91 U/mL, BL 1에서 37.57 ± 7.62 U/mL, BL 1.5에서 34.69 ± 8.18 U/mL로 모든 그룹에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다(Fig. 8, $p > 0.05$). 이러한 결과로 바이오 실리카 사료첨가제 공급은 SOD 변화에 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

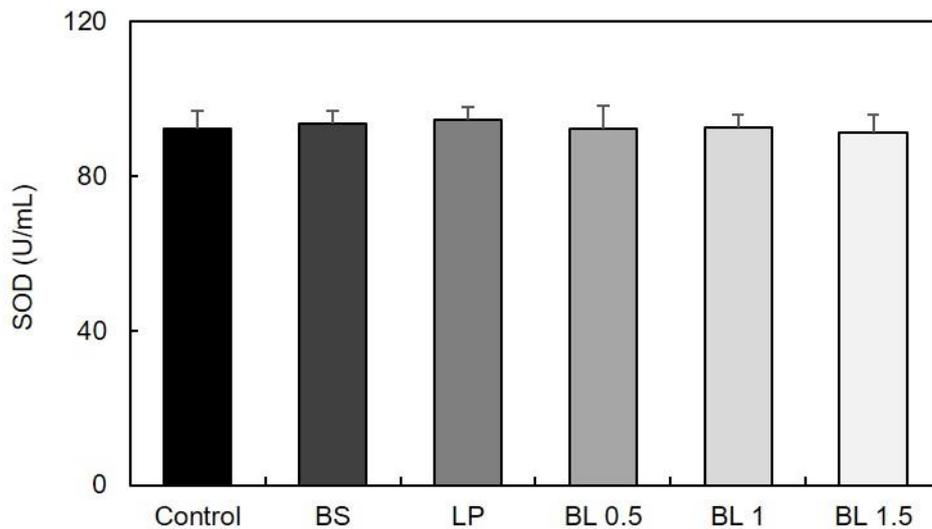


Figure 8. Changes of superoxide dismutase in liver of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels of bio-silica powder 0% and 1%, *Lactobacillus plantarum* 1% and mixture of silica and 1% *Lactobacillus plantarum* in different concentrations 0.5%, 1% and 1.5% (Con, BS, LP, BL 0.5, BL 1 and BL 1.5) for 8 weeks

3.3.3. Catalase (CAT) activity 분석

CAT는 활성산소종이 체내에 생성되면 빠르게 제거하기 위해 활성이 높아지는 것으로 알려져 있으며, 본 실험에서 CAT는 대조구에서 7.43 ± 2.50 mU/mL, BS에서 6.53 ± 1.93 mU/mL, LP에서 7.57 ± 0.38 mU/mL, BL 0.5에서 8.98 ± 0.95 mU/mL, BL 1에서 7.00 ± 1.14 mU/mL, BL 1.5에서 7.72 ± 1.79 mU/mL로 BL 0.5에서 유의적으로 가장 높게 나타났다(Fig. 9, $p < 0.05$). 이러한 결과로 개체 간의 차이가 크게 나타나 대조구(시판사료)와 바이오 실리카 사료첨가제 공급에 따른 CAT 변화는 큰 차이를 나타내지 않은 것으로 판단된다.

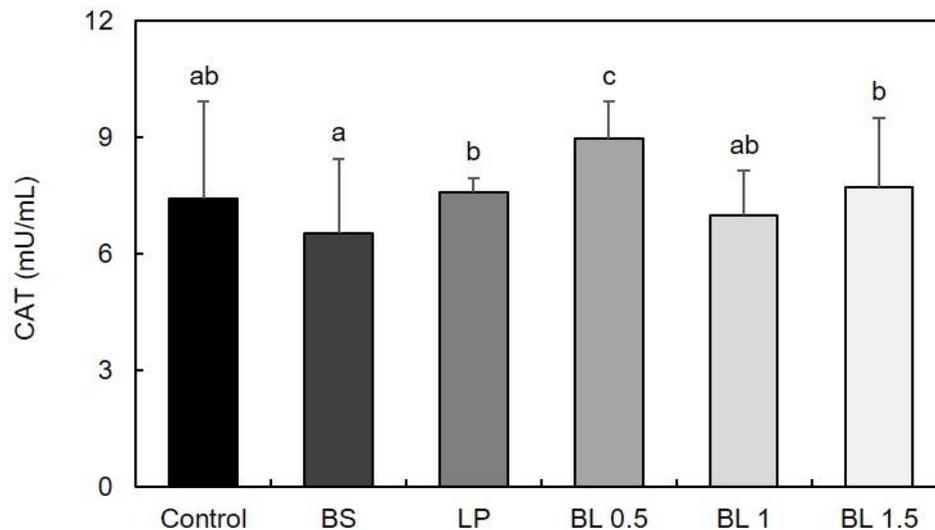


Figure 9. Catalase in liver of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels of bio-silica powder 0% and 1%, *Lactobacillus plantarum* 1% and mixture of silica and 1% *Lactobacillus plantarum* in different concentrations 0.5%, 1% and 1.5% (Con, BS, LP, BL 0.5, BL 1 and BL 1.5) for 8 weeks

3.3.4. Glutathione (GSH) activity 분석

GSH는 활성산소종에 의해 유도되어 산화스트레스의 지표로 활용되고 있으며, 본 실험에서 GSH는 대조구에서 $2.22 \pm 0.34 \mu\text{mol/L}$, BS에서 $2.14 \pm 0.25 \mu\text{mol/L}$, LP에서 $2.24 \pm 0.46 \mu\text{mol/L}$, BL 0.5에서 $1.74 \pm 0.36 \mu\text{mol/L}$, BL 1에서 $1.68 \pm 0.28 \mu\text{mol/L}$, BL 1.5에서 $1.79 \pm 0.46 \mu\text{mol/L}$ 로, BL 1에서 유의적으로 낮게 나타났다(Fig. 10, $p < 0.05$). 이에 본 실험에서의 바이오 실리카의 사료첨가제 공급에 따른 GSH 변화는 바이오 실리카와 유산균이 혼합된 BL실험구에서 낮게 나타내어 스트레스 저항에 효과적인 것으로 판단된다.

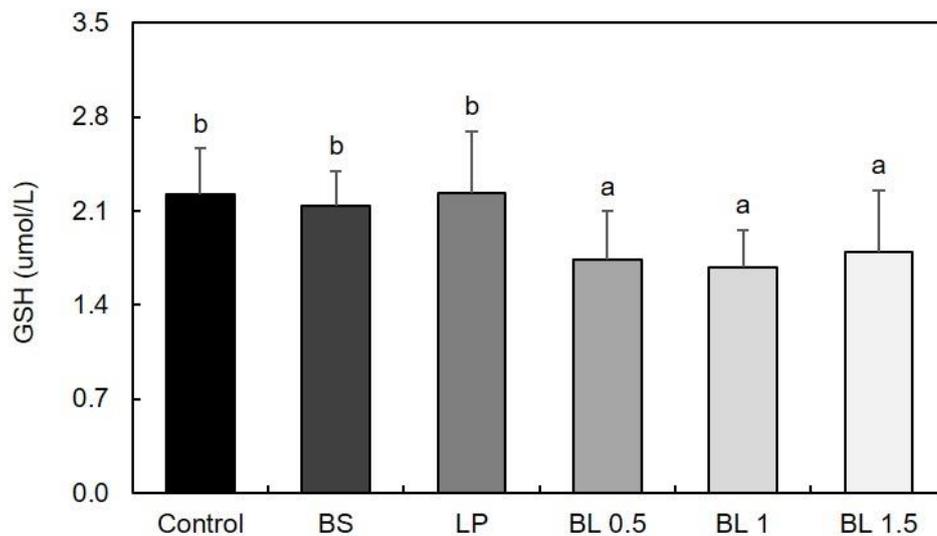


Figure 10. Glutathione in liver of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels of bio-silica powder 0% and 1%, *Lactobacillus plantarum* 1% and mixture of silica and 1% *Lactobacillus plantarum* in different concentrations 0.5%, 1% and 1.5% (Con, BS, LP, BL 0.5, BL 1 and BL 1.5) for 8 weeks

3.3.5. Lysozyme activity 분석

LYS은 비특이적 면역 활성화 중 하나로 항균 작용을 하여 숙주에 방어능을 부여하는 것으로 알려져 있다. LYS은 대조구에서 0.009 ± 0.002 U/mL, BS에서 0.013 ± 0.003 U/mL, LP에서 0.014 ± 0.003 U/mL, BL 0.5에서 0.018 ± 0.005 U/mL, BL 1에서 0.021 ± 0.007 U/mL, BL 1.5에서 0.021 ± 0.007 U/mL로, 모든 실험구에서 대조구에 비해 유의하게 높은 수치를 나타냈으며, 특히 BL 1.5에서 가장 높은 활성을 나타냈다(Fig. 11, $p < 0.05$). 이러한 결과로 LYS 면역 활성화는 바이오 실리카첨가에 따라 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타나 바이오 실리카의 사료첨가제는 양식 넙치의 면역 활성화에 효과적인 것으로 판단된다.

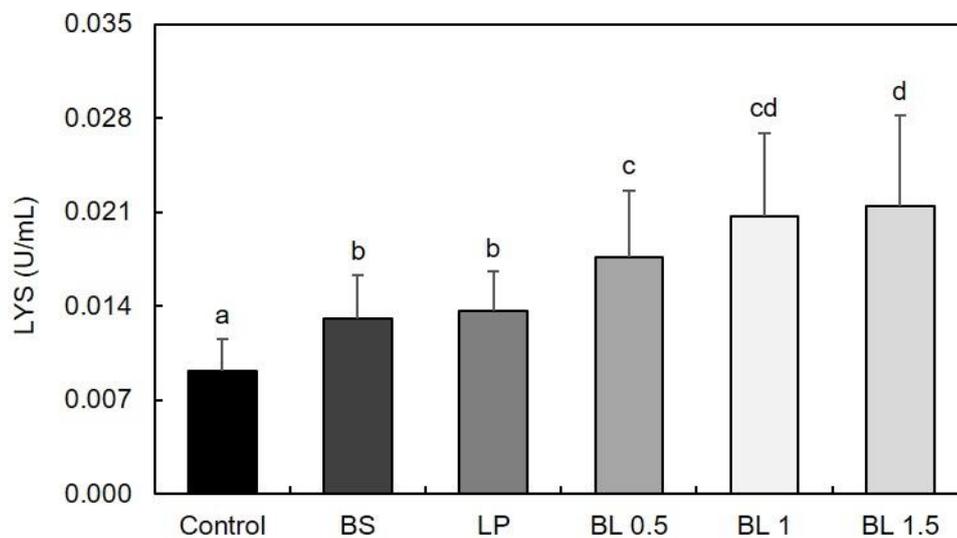


Figure 11. Lysozyme activity in serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels of bio-silica powder 0%, 1%, *Lactobacillus plantarum* 1%, mixture of 1% of *Lactobacillus plantarum* and bio-silica in different concentrations 0.5%, 1% and 1.5% (Con, BS, LP, BL 0.5, BL 1 and BL 1.5) for 8 weeks

3.3.6. Myeloperoxidase activity 분석

MPO는 항균효과를 가지는 과산화 효소로 식균 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 본 실험에서 MPO는 대조구에서 1.41 ± 0.27 mU/mg, BS에서 1.46 ± 0.27 mU/mg, LP에서 1.67 ± 0.27 mU/mg, BL 0.5에서 1.42 ± 0.26 mU/mg, BL 1에서 1.53 ± 0.31 mU/mg, BL 1.5에서 1.79 ± 0.25 mU/mg로 나타났으며, 특히 BL 1.5에서 가장 높은 활성을 나타냈다(Fig. 12, $p < 0.05$). 이러한 결과로 MPO는 바이오 실리카 1.5% 첨가구인 BL 1.5에서 면역 활성이 가장 높게 나타나 바이오 실리카의 사료첨가제는 양식 넙치의 면역 활성화에 효과적인 것으로 판단된다.

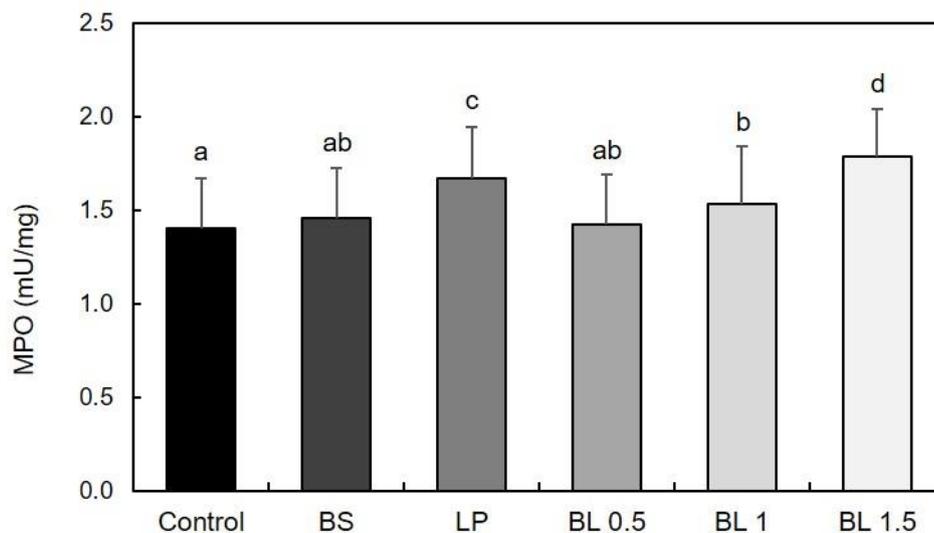


Figure 12. Myeloperoxidase activity in serum of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels of bio-silica powder 0% and 1%, *Lactobacillus plantarum* 1% and mixture of silica and 1% *Lactobacillus plantarum* in different concentrations 0.5%, 1% and 1.5% (Con, BS, LP, BL 0.5, BL 1 and BL 1.5) for 8 weeks

3.3.7. Real-time PCR 통한 면역 관련 유전자 발현

galectin은 병원체에 의해 발현된다고 알려져 있으며, 본 실험에서의 Galectin은 대조구에서 $0.87\pm 0.06\%$, BS에서 $0.35\pm 0.03\%$, LP에서 $0.48\pm 0.06\%$, BL 0.5에서 $0.45\pm 0.05\%$, BL 1에서 $0.40\pm 0.06\%$, BL 1.5에서 $0.06\pm 0.01\%$ 로 발현량을 나타내어 대조구에서 유의적으로 가장 높은 수치를 나타냈다(Fig. 13, $p < 0.05$). 이러한 결과로 바이오 실리카 사료첨가제 공급은 galectin의 발현을 낮추는 것으로 나타나 바이오 실리카의 사료첨가제에 따른 양식 넙치의 병원체 감염 기회가 감소한 것으로 판단된다.

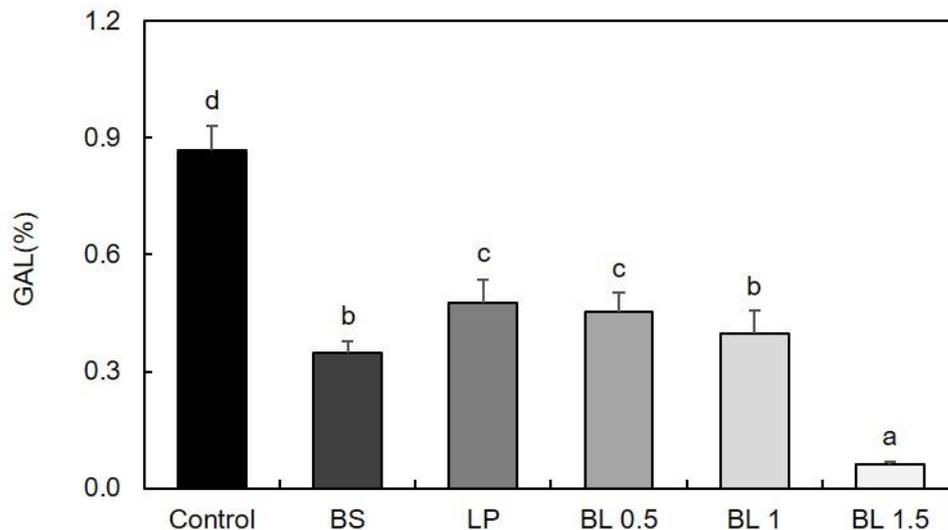


Figure 13. Change of Galectin expression change in kidney of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels bio-silica powder 0% and 1%, *Lactobacillus plantarum* 1% and mixture of silica and 1% *Lactobacillus plantarum* in different concentrations 0.5%, 1% and 1.5% (Con, BS, LP, BL 0.5, BL 1 and BL 1.5) for 8 weeks

C-type lysozyme은 세균 세포벽의 펩티도글리칸층을 가수분해하여 항균 작용을 하는 효소로 감염성 질환에서 숙주 방어하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 C-type lysozyme은 대조구에서 $0.79\pm 0.06\%$, BS에서 $0.64\pm 0.04\%$, LP에서 $0.56\pm 0.06\%$, BL 0.5에서 $1.02\pm 0.09\%$, BL 1에서 $0.56\pm 0.08\%$, BL 1.5에서 $0.33\pm 0.03\%$ 로 발현량을 나타내어 BL 0.5에서 유의적으로 가장 높은 수치를 나타냈다(Fig. 14, $p<0.05$). 이러한 결과로 바이오 실리카 사료첨가제 공급은 바이오 실리카 0.5% 첨가구인 BL 0.5에서 가장 높은 면역 활성이 나타나 낮은 galectin에 대비한 높은 면역 활성이 일어난 것으로 판단된다.

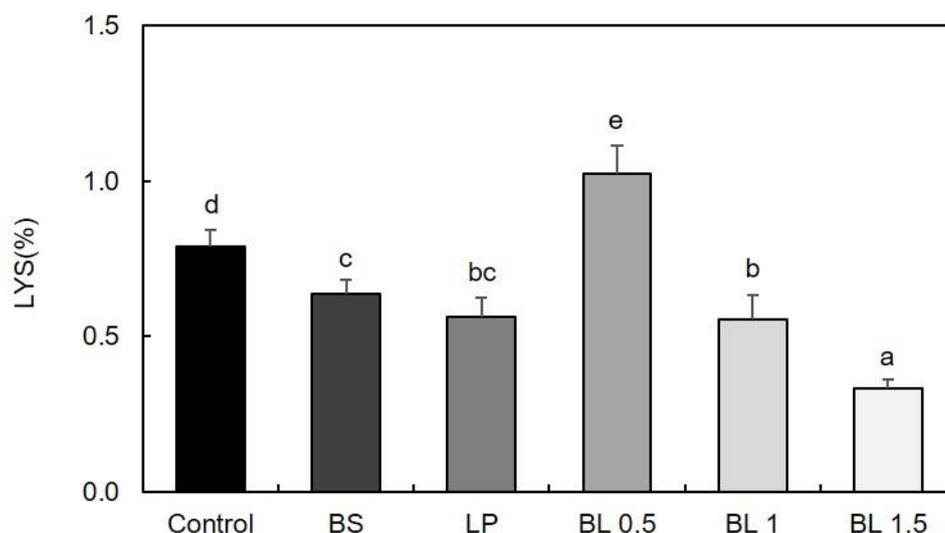


Figure 14. Change of c-type Lysozyme expression change in kidney of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels of bio-silica powder 0% and 1%, *Lactobacillus plantarum* 1% and mixture of silica and 1% *Lactobacillus plantarum* in different concentrations 0.5%, 1% and 1.5% (Con, BS, LP, BL 0.5, BL 1 and BL 1.5) for 8 weeks

3.3.8. 양식현장 급이 실험

양식현장에서의 바이오 실리카 사료첨가제 급이에 따른 8주간의 사료 공급 결과, 실험 개시 전 체중은 139.56 ± 3.87 g로 나타났으며, 평균 최종 성장 체중(final body weight)은 대조구(C0)에서 187.82 ± 16.29 g, C1.5에서 213.17 ± 19.47 g로, 나타내어 증체율이 각각 31.99% 및 55.80%로 대조구보다 바이오 실리카 첨가구(C1.5)에서보다 높은 성장을 나타냈다(Table 10).

Lysozyme activity은 대조구에서 0.019 ± 0.009 U/mL, C1.5에서 0.028 ± 0.012 U/mL로 나타났으며, Myeloperoxidase activity은 대조구에서 1.47 ± 0.21 mU/mg, D2에서 1.68 ± 0.25 mU/mg로 나타냈다.

이러한 결과로 양식현장에서의 바이오 실리카 사료첨가제 공급에 따른 성장은 바이오 실리카 0.5% 첨가구인 C1.5가 대조사료보다 증체율이 높은 것으로 나타났으며, 또한 Lysozyme 및 Myeloperoxidase 활성에서도 바이오 실리카 1.5% 첨가구에서 대조구에 비해 높게 나타나, 바이오 실리카 사료첨가에 따라 양식 넙치의 성장 및 면역에 효과적인 것으로 판단된다.

Table 10. Growth performance and nonspecific immune response of olive flounder, *P. olivaceus* fed the bio-silica diets for 8 weeks in aquaculture

Growth performances	Experimental diets	
	C0	C1.5
Final body weight (g)	187.82±16.29	213.17±19.47
Weight gain (%) ¹	31.99	55.80
Lysozyme activity	0.07±0.01	0.14±0.02
Myeloperoxidase activity	1.47±0.21	1.68±0.25

3.4. 고찰

규소(Si)는 뼈 재생 과정에 중요한 역할을 하며, 뼈의 미네랄 함량에 영향을 주는 것으로 보고되어졌다(Calomme and Berghe, 1997; Seaborn et al., 2002; Sripanyakorn et al., 2005). Seaborn et al. (2002)는 마우스에서 규소 결핍 시 경골(tibia) 및 척추(vertebra)의 미네랄 함량이 크게 감소한다고 보고하였으며, Calomme and Berghe (1997)는 송아지에 규소 급이 시 연골의 콜라겐 농도를 증가시켰다고 보고하고 있다. 또한 바이오 실리카의 주요성분은 규소로 다공성 구조로 되어 있어 약물 전달이 가능한 물질로서 보고되어 있으며(Uthappa et al., 2018), Cicco et al. (2016)는 규조류 유래 바이오 실리카는 세포 실험 시 골다골증이 유발된 뼈에서 세포 부착 및 증식을 증가시키는 것으로 보고하고 있다. 또한 바이오 실리카는 주로 육상 생물을 대상으로 뼈 재생 등 골격 형성과 관련된 연구가 활발히 이루어져 있으나 해양 생물에 적용한 연구는 전무후무한 실정이다. 본 사육 실험에서 사료 내 바이오 실리카를 첨가한 모든 그룹에서 대조구보다 높은 체중 성장 및 사료 이용률을 보여, 2장의 규조를 이용한 실험과 유사한 결과를 나타내어, 양식 넙치 사료 내 바이오 실리카의 첨가는 넙치의 성장 및 생존율에 긍정적 영향을 끼치는 것으로 판단된다.

산화스트레스는 활성산소종(ROS) 및 활성질소종(RNS)의 과도한 생산의 결과로 발생하며, SOD, CAT 및 GSH 등 항산화 효소 및 물질에 의해 감소되거나 제거되는 것으로 보고되며(Dalton et al., 1993; Sugino, 2007), 이들은 산화스트레스, 면역반응 및 독성 평가의 지표로 이용되고 있다(Atmaca, 2004; Ruas et al., 2008). 그중 SOD는 과산화 이온을 산소와 과산화수소로 분해해 산화 손상으로부터 유기체를 보호하는 효소이며, 항산화 활성뿐만 아니라 질병에 대한 감염률을

감소시켜 면역의 지표로도 활용되고 있다(Fattman et al., 2003). 본 연구에서 사료 내 바이오 실리카첨가에 따른 SOD 활성은 유의적인 차이를 나타내지 않았으며(Fig. 8), CAT 활성은 결과에서도 BL 0.5에서 대조구에 비해 다소 높게 나타났으나 전체적으로 실험구간의 개체 간의 차이가 크게 나타나 바이오 실리카첨가에 따른 CAT의 변화는 크지 않은 것으로 추정된다(Fig. 9). 또한 GSH 활성 결과 바이오 실리카 및 유산균 혼합 실험구가 다른 그룹에 비해 유의적으로 낮은 수치를 나타냈다(Fig. 10). 이처럼 BL의 공급을 통해서 낮아진 결과는 생체 내 다른 면역체계에서 스트레스에 대한 저항성을 높였기 때문에 항산화 효소에 대한 활성이 체내에서 낮게 유지되는 결과로 추정된다. 이러한 결과는 체내 활성산소 변화에 미치는 바이오 실리카의 사료첨가 효과에 관해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

비특이적 면역 활성은 병원체로부터 숙주를 보호하기 위해 제일 먼저 작용하는 1차 방어선으로 수중에서 생활하는 어류에 가장 중요한 요인 중 하나이다(Siwicki et al., 1994). 그중 Lysozyme은 비특이적 면역(선천) 반응에 속하는 항균 효소로서 다양한 균에 항균작용을 나타내며(Jollès and Jollès, 1984), 이러한 특성으로 lysozyme 활성은 동물 및 어류에 있어서 면역 활성의 지표로 이용되고 있다(Smith and Lumsden, 1983). MPO는 호중구에 포함된 항균효소로 병원체에 항균 작용을 나타내며(Dalmo et al., 1997), 병원체 감염 및 환경 독소의 지표로 이용되고 있다(Zelikoff et al., 2000; Bols et al., 2001). 본 연구에서 바이오 실리카를 사료에 첨가하여 공급한 결과, LYS 활성은 바이오 실리카 및 유산균 첨가 사료를 급이한 실험구에서 대조구에 비해 유의적으로 높은 활성을 나타냈으며, 농도 의존적으로 증가하는 결과를 나타냈으며, myeloperoxidase (MPO) 또한 바이오 실리카첨가에 따라 높은 면역 활성을 나타냈다(Fig. 11, 12). 이는 사료 내 바이오 실리카 및

유산균을 혼합하여 첨가할 때 LYS 및 MPO 비특이적 면역반응을 증가시켜 선천면역이 증가하는 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서는 구조에서 분리한 바이오 실리카의 사료 내 첨가는 양식 어류의 비특이적 면역반응의 활성 증대를 유도하는 것으로 추정된다.

Galectin (GAL)은 선천면역 및 후천면역에 활성화되어(Balogh et al., 2019), 면역반응에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어졌다(Díaz-Alvarez and Ortega, 2017). 또한 곰팡이, 세균, 바이러스 및 기생충 등 병원체를 인식하는 패턴 인식 수용체 (PRR)의 역할을 하는 것으로 보고되어졌다(Robinson et al., 2006; Nita-Lazar et al., 2016; Hatanaka et al., 2019). 본 연구에서 바이오 실리카를 사료에 첨가하여 공급한 결과, 면역 관련 유전자의 변화는 바이오 실리카 및 유산균 첨가 그룹보다 대조구에서 유의적으로 높은 수치를 나타냈다. 또한 c-type lysozyme (LYS)에 있어서도 본 실험에서는 GAL의 결과와 유사한 결과를 나타내었으나 BL 0.5에서 유의적으로 높은 수치를 나타내었는데, 이런 높은 부분은 정확하게 판단하기 어렵지만 앞서 실험에서의 전체적인 패턴으로써는 BL을 첨가하였을 때 혈액에 있는 lysozyme의 농도나 다른 실험구에서의 농도를 판단하였을 때 구조를 첨가하게 되면 c-type lysozyme의 발현이 감소하는 것으로 추정된다. 본 연구의 결과에서 나타낸 GAL의 발현 저하는 사료 내 바이오 실리카의 첨가가 어체에 면역능을 부여하여 기본적인 항병 능력이 높아진 것으로 추정되며, LYS에 있어서도 BL 0.5를 제외한 다른 실험구에서 GAL 발현에 대비하여 비교적 낮은 발현을 나타내어 이에 대한 상관관계에 대해서는 추후 추가적인 연구가 필요한 것으로 판단된다.

한편 양식현장에서의 중간육성어를 대상으로 바이오 실리카 사료첨가제를 공급하였을 때에는 대조구인 C0보다 높은 체중증가율을 나타냈으며, 비특이적

면역 활성인 LYS 및 MPO에서도 CO보다 높은 활성을 나타냈다. 이러한 결과는 양식현장에서 바이오 실리카를 사료에 첨가하여 공급한 결과, 체중 성장 및 면역 활성을 유도하여 일반사료(대조구)보다 넙치의 성장 및 면역 활성을 유도하는 것으로 나타내어 본 실험의 결과를 뒷받침할 수 있을 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합해보면, 본 연구에서 넙치 사료 내 바이오 실리카의 첨가는 높은 체중 성장률 및 사료효율을 나타냈으며, 생존율에서도 LP, BL 0.5 및 BL 1.5에서 대조구에 비해 높게 나타났다. 면역반응의 지표인 LYS는 바이오 실리카첨가에 따라 농도 의존적으로 증가하는 결과를 나타냈으며, MPO 또한 바이오 실리카 첨가 실험구에서 대조구보당 높은 수치를 나타냈다. 따라서 본 연구에서 실험한 사료 내 바이오 실리카의 첨가는 넙치의 성장 촉진 및 선천면역을 유도할 수 있을 것으로 판단된다.

제 4장 종합 고찰

어류 양식 자원은 국제 식량 확보를 위한 중요 자원 중 하나로 꼽히고 있으며 (FAO, 2014), 환경문제 등 한계가 있는 농업 및 축산업을 대신하여 인류의 단백질 공급을 충족시킬 수 있을 것으로 기대되어 최근 급속도로 발전되고 있다(Fischer, 2009; FAO, 2009; Pachauri et al., 2014).

최근 양식 어류의 빠른 성장을 위한 과도한 사료 공급 및 밀식으로 수질 악화가 발생하고 있으며(MIFAFF, 2003; JRI, 2019), 생리적 스트레스를 유도하여 세균, 바이러스 및 기생충성 질병 발생의 위험을 증가시키고 있다(Torrecillas et al., 2007; Park, 2009) 현재 질병 발생의 대책으로 항생제 등 화학약품을 사용하는 치료가 대부분 이루어지고 있으며(Ghittino et al., 2003), 항생제의 무분별한 사용으로 내성균의 증가 및 어류의 폐사로 경제적 피해가 유발되는 실정이다(Phearson et al., 1991; Cabello et al., 2016; JRI, 2019). 또한 항생제의 무분별한 사용은 양식 어류에 잔류하는 문제 및 환경오염 등을 야기할 수 있다(Petersen et al., 2002; Cabello, 2006; WHO, 2006). 최근 이러한 문제를 해결하기 위해 천연물질을 이용하여 양식 어류의 비특이적 면역반응을 향상시켜 질병 저항성을 높일 수 있는 사료첨가제 개발 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 유산균과 같은 미생물뿐만 아니라 해양 천연자원이 소재로써 활용되고 있다. 해양 천연자원 중 하나인 규조류(*Bacillariophyceae*)는 단가 불포화 지방산, 폴리 불포화 지방산, DHA, EPA 및 폴리페놀(polyphenol) 등 다양한 생리활성물질을 함유하고 있으며, 이전의 다양한 연구를 통해 양식 어류의 성장 및 면역증진에 도움이 되는 것으로 보고되어져(Cerezuela et al., 2012; Reyes-Becerril et al., 2014), 본 연구에서는

규조(*Melosira nummuloides*)와 규조에서 분리한 바이오 실리카(bio-silica)를 이용하여 넙치 사료첨가제 사육 실험을 실시하였다.

본 연구에서 규조 및 바이오 실리카 사료첨가제를 이용한 사육실험에서 모든 실험구에서 대조구보다 높은 체중 성장 및 사료 이용률을 나타냈다. 이러한 결과는 규조 및 바이오 실리카 사료첨가제 이용은 넙치의 성장에 긍정적 영향을 끼쳐 사료첨가제로서의 활용 가능성이 높은 것으로 판단된다.

또한 항산화 활성 분석에서 SOD는 규조 및 바이오 실리카 사료첨가제에서 대조구 및 실험구에서 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, CAT에서도 큰 차이를 나타내지 않은 것으로 추정된다. 또한 GSH는 바이오 실리카 사료첨가제에서 실험구가 대조구보다 낮은 활성을 나타냈으며, 바이오 실리카 사료첨가제가 스트레스에 대한 저항성을 높였기 때문에 활성이 낮게 유지되는 결과로 추정되며, 넙치의 사료첨가제로 사용 시 활성산소로 인한 체내 산소 변화에 긍정적 영향을 줄 수 있는 것으로 판단된다.

비특이적 면역 분석에서 LYS는 규조 및 바이오 실리카 사료첨가제에서 모두 대조구보다 실험구에서 유의적으로 높게 나타났으며, MPO에서도 실험구에서 대조구보다 높은 수치를 나타냈다. 또한 면역 관련 유전자 변화실험에서 galectin은 대조구에서 유의적으로 높게 나타났으며, lysozyme은 galectin에 대비한 높은 면역 활성을 나타내어, 이러한 결과는 규조 및 바이오 실리카 사료첨가제 이용은 넙치의 면역증진에 긍정적 영향을 끼치는 것으로 판단된다.

양식현장 급이 실험에서의 성장 및 면역은 규조 및 바이오 실리카 사료첨가제에서 모두 대조구보다 실험구에서 높은 것으로 나타내어 넙치의 사료첨가제로 사용 시 성장 및 면역증진에 긍정적 영향을 줄 수 있는 것으로 판단된다.

본 실험에서 규조의 경우 2% 농도 첨가 시 체중 증가 및 비특이적 면역에 효과가 있는 것으로 판단되며, 바이오 실리카는 1.5% 농도 첨가 시 비특이적 면역 및 항산화 활성에서 보다 더 좋은 효과를 나타낸 것으로 판단된다. 또한 규조에서는 체중 성장과 면역유전자 발현에서 더 좋은 효과를 나타낸 것으로 추정되며, 실리카에서는 비특이적 면역 활성과 항산화 활성에서 더 좋은 효과를 나타낸 것으로 추정된다.

이에 따라 본 연구에서 실험한 규조 및 바이오 실리카 사료첨가제는 양식 넙치의 성장 및 면역증진에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

Adel M, Yeganeh S, Dadar M, Sakai M and Dawood MA. 2016. Effects of dietary *Spirulina platensis* on growth performance, humoral and mucosal immune responses and disease resistance in juvenile great sturgeon (*Huso huso Linnaeus*, 1754). *Fish Shellfish Immunol* 56, 436-444.

Atmaca G. 2004. Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. *Yonsei Med J* 45, 776-788.

Ayoub H, Abdelghany M and El-Sayed AEK. 2019. Effects of Diatoms *Amphora coffeaeformis* on growth parameters, non specific immunity and protection of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Aeromonas hydrophila* infection. *Egypt J Aquat Biol Fish* 23, 413-426.

Bai SC, Koo JW, Kim K and Kim SK. 2001. Effects of Chlorella powder as a feed additive on growth performance in juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Aquac Res* 32, 92-98.

Balogh A, Toth E, Romero R, Parej K, Csala D, Szenasi NL, Hajdu I, Juhasz K, Kovacs AF, Meiri H, Hupuczi P, Tarca AL, Hassan SS, Erez O, Zavodszky P, Matko J, Papp Z, Rossi SW, Hahn S, Pallinger E and Than NG. 2019. Placental galectins are key players in regulating the maternal adaptive immune response. *Front Immunol* 10, 1240.

Bariana M, Aw MS, Kurkuri M and Losic D. 2013. Tuning drug loading and release properties of diatom silica microparticles by surface modifications. *Int J Pharm* 443, 230-241.

Barnes AC, Balebona MC, Horne MT and Ellis AE. 1999. Superoxide dismutase and

catalase in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and their roles in resistance to reactive oxygen species. *Microbiology* 145, 483-494.

Barton BA and Iwama GK. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu Rev Fish Dis* 1, 3-26.

Basha PS and Rani AU. 2003. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicol Environ Saf* 56, 218-221.

Bols NC, Brubacher JL, Ganassin RC and Lee LE. 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev Comp Immunol* 25, 853-873.

Cabello FC. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol* 8, 1137-1144.

Cabello FC, Godfrey HP, Buschmann AH and Dölz HJ. 2016. Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. *Lancet Infect Dis* 16, e127-e133.

Calomme MR and Berghe DAV. 1997. Supplementation of calves with stabilized orthosilicic acid. *Biol Trace Elem Res* 56, 153-165.

Cerezuela R, Guardiola FA, González P, Meseguer J and Esteban, MÁ . 2012. Effects of dietary *Bacillus subtilis*, *Tetraselmis chuii*, and *Phaeodactylum tricoratum*, singularly or in combination, on the immune response and disease resistance of sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol* 33, 342-349.

Chen YC. 2007. Immobilization of twelve benthic diatom species for long-term storage and as feed for post-larval abalone *Haliotis diversicolor*. *Aquaculture* 263, 97-106.

- Cicco SR, Vona D, Gristina R, Sardella E, Ragni R, Lo Presti M and Farinola GM. 2016. Biosilica from living diatoms: investigations on biocompatibility of bare and chemically modified *Thalassiosira weissflogii* silica shells. *Bioengineering* 3, 35.
- Dalmo RA, Ingebrigtsen K and Bøgvold J. 1997. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *J Fish Dis* 20, 241-273.
- Dalton DA, Langeberg L and Treneman NC. 1993. Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules. *Physiol Plant* 87, 365-370.
- Díaz-Alvarez L and Ortega E. 2017. The many roles of galectin-3, a multifaceted molecule, in innate immune responses against pathogens. *Mediators Inflamm* 2017.
- Ergün A. 2011. Effects of the usage of diatomite and waste marble powder as partial replacement of cement on the mechanical properties of concrete. *Constr Build Mater* 25, 806-812.
- Exley C. 1998. Silicon in life: a bioinorganic solution to bioorganic essentiality. *J Inorg Biochem* 69, 139-144.
- FAO. 2009. The State of World Fisheries and Aquaculture 2008. Report of the sustainability in action. *FAO Fisheries Report*, 176.
- FAO. 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Report of the sustainability in action. *FAO Fisheries Report*, 223.
- FAO. 2020. The state of world fisheries and aquaculture 2020. Report of the sustainability in action. *FAO Fisheries Report*, 244.
- Faryadi S and Sheikahmadi A. 2017. Short-term effect of Nanoparticles of silicon dioxide on the performance and egg quality traits in laying quails. *Animal Sciences*

Journal 29, 173-182.

Fattman CL, Schaefer LM and Oury TD. 2003. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radical Biology and Medicine* 35, 236-256.

Fischer G. 2009. How do climate change and bioenergy alter the long-term outlook for food, agriculture and resource availability. In *Expert Meeting on How to feed the World* in.

Forman HJ and Fridovich I. 1973. Superoxide dismutase: a comparison of rate constants. *Arch Biochem Biophys* 158, 396-400.

Garcia DJ. 1998. Omega-3 long-chain PUFA nutraceuticals. *Food technology (Chicago)* 52, 44-49.

Garcimartín A, López-Oliva ME, Santos-López JA, García-Fernández RA, Macho-González A, Bastida, Juana-Benedí S and Sánchez-Muniz FJ. 2017. Silicon Alleviates Nonalcoholic Steatohepatitis by Reducing Apoptosis in Aged Wistar Rats Fed a High-Saturated Fat, High-Cholesterol Diet. *J Nutr* 147, 1104-1112.

Ghittino C, Latini M, Agnetti F, Panzieri C, Lauro L, Ciappelloni R and Petracca G. 2003. Emerging pathologies in aquaculture: effects on production and food safety. *Vet Res Commun* 27, 471-479.

Giulio RT, Washburn PC, Wenning RJ, Winston GW and Jewell CS. 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ Toxicol Chem* 8, 1103-1123.

Gordon N, Neori A, Shpigel M, Lee J and Harpaz S. 2006. Effect of diatom diets on growth and survival of the abalone *Haliotis discus hannai* postlarvae. *Aquaculture* 252, 225-233.

- Gordon R and Parkinson J. 2005. Potential roles for diatomists in nanotechnology. *J Nanosci Nanotechnol* 5, 35e40.
- Grinde B. 1989. Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. *J Fish Dis* 12, 95-104.
- Hamm CE, Merkel R, Springer O, Jurkojc P, Maier C, Prechtel K and Smetacek V. 2003. Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection. *Nature* 4216925, 841e843.
- Hatanaka O, Rezende CP, Moreno P, Fernandes FF, Brito PKMO, Martinez R and Almeida F. 2019. Galectin-3 inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* growth and impacts paracoccidioidomycosis through multiple mechanisms. *MSphere* 4.
- Herber SM and Elswyk ME. 1996. Dietary marine algae promotes efficient deposition of n-3 fatty acids for the production of enriched shell eggs. *Poult Sci* 75, 1501-1507.
- Hoseinifar SH, Zou HK, Doan HV, Harikrishnan R, Yousefi M, Paknejad H and Ahmadifar E. 2019. Can dietary jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit extract alter cutaneous mucosal immunity, immune related genes expression in skin and growth performance of common carp *Cyprinus carpio*?. *Fish Shellfish Immunol* 94, 705-710.
- Inglethorpe SDJ, Morgan DJ, Highley DE and Bloodworth J. 1993. Industrial minerals laboratory manual. Br. Geol. Surv. Tech. Rep WG/93/20
- Jee JH and Kang JC. 2005. Biochemical changes of enzymatic defense system after phenanthrene exposure in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Physiol Res*, 54. E591
- Jeon GH, Cho SH, Lee SM, Nam TJ and Kim DS. 2013. Effects of the Dietary Inclusion of *Porphyra* and Sea Tangle *Laminaria japonica* on the Growth, Feed Utilization, Body Composition, and Plasma Chemistry of Juvenile Korean Rockfish *Sebastes schlegeli*. *Fish*

Aquatic Sci 46, 546-551.

Jin XH, Zheng LL, Song MR, Xu WS, Kou YN, Zhou Y, Zhang LW, Zhu YN, Wan B, Wei ZY and Zhang GP. 2018. A nano silicon adjuvant enhances inactivated transmissible gastroenteritis vaccine through activation the Toll-like receptors and promotes humoral and cellular immune responses. *Nanomedicine* 14, 1201-1212.

Jollès P and Jollès J. 1984. What's new in lysozyme research?. *Mol Cell Biochem* 63, 165-189.

JRI(Jeju Research Institute). 2019. Current situation and economic analysis of flatfish aquaculture in Jeju.

Kadey FL. 1975. Diatomite. *Industrial minerals and rocks* 4, 605–635.

Kang KH, Qian ZJ, Ryu BM and Kim SK. 2011. Characterization of growth and protein contents from microalgae *Navicula incerta* with the investigation of antioxidant activity of enzymatic hydrolysates. *Food Sci Biotechnol* 20, 183-191.

Kang YS, Kim YM, Park KI, Cho SM, Choi KS and Cho MJ. 2006. Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams *Ruditapes philippinarum*(Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. *Dev Comp Immunol* 30, 1119-1131.

Khatoon H, Banerjee S, Yusoff FM and Shariff M. 2009. Evaluation of indigenous marine periphytic *Amphora*, *Navicula* and *Cymbella* grown on substrate as feed supplement in *Penaeus monodon* postlarval hatchery system. *Aquac Nutr* 15, 186-193.

Kim JH, Jeong MH, Jun JC and Kim TI. 2014a. Changes in hematological biochemical and non-specific immune parameters of olive flounder *Paralichthys olivaceus*, following starvation. *Asian- Australas J Anim Sci* 27, 1360-1367.

Kim KW, Kim SS, Khosravi S, Rahimnejad S and Lee KJ. 2014b. Evaluation of

sargassum fusiforme and *Ecklonia cava* as dietary additives for olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Turk J Fish Aquat Sci 14, 321-330.

Kim SS, Jang JW, Song JW, Lim SJ, Jeong JB, Lee SM, Kim KW, Son MH and Lee KJ. 2009. Effects of dietary supplementation of alga mixtures (*Hizikia fusiformis* and *Ecklonia cava*) on innate immunity and disease resistance against *Edwardsiella tarda* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish Aquatic Sci 42, 614-620.

Klebanoff SJ. 2005. Myeloperoxidase: friend and foe J Leukoc Biol 77, 598-625.

KOSIS(Korean statistical information service). 2019. Survey on the status of fish culture.

Lassus A. 1993. Colloidal silicic acid for oral and topical treatment of aged skin, fragile hair and brittle nails in females. J Int Med Res 21, 209-215.

Lee J, Lee HA, Shin M, Juang LJ, Kastrup CJ, Go GM and Lee H. 2020. Diatom Frustule Silica Exhibits Superhydrophilicity and Superhemophilicity. ACS Nano 14, 4755-4766.

Li A, Cai J, Pan J, Wang, Y, Yue Y and Zhang D. 2014. Multi-layer hierarchical array fabricated with diatom frustules for highly sensitive bio-detection applications. J Micromech Microeng 24.

Li Y, Horsman M, Wu N, Lan CQ and Dubois-Calero N. 2008. Biofuels from microalgae. Biotechnol Prog 24, 815-820.

Li Y, Xiao G, Mangott A, Kent M and Pirozzi I. 2016. Nutrient efficacy of microalgae as aquafeed additives for the adult black tiger prawn, *Penaeus monodon*. Aquac Res 47, 3625-3635.

Magnadóttir B. 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish Shellfish Immunol 20, 137-151.

Maher S, Kumeria T, Aw MS and Losic D. 2018. Diatom silica for biomedical

applications: Recent progress and advances. *Adv Healthc Mater* 7, 1800552.

Mann DG. 1999. The species concept in diatoms. *Phycologia* 38, 437-495.

Manurung AI, Pratiwi AR, Syah D and Suhartono MT. 2009. Isolation and characterization of silaffin that catalyze biosilica formation from marine diatom *Chaetoceros gracilis*. *Hayati* 14, 119-122.

Martha RB, Carlos A, Norma E, Ylenia M and Felipe AV. 2014. Dietary administration of microalgae alone or supplemented with *Lactobacillus sakei* affects immune response and intestinal morphology of Pacific red snapper *Lutjanus peru*. *Fish Shellfish Immunol* 40, 208-216.

Martin KR. 2013. Silicon: the health benefits of a metalloid. In *Interrelations between essential metal ions and human diseases*. Netherlands: Springer Netherlands, 451-473

Martinez-Alvarez RM, Morales AE and Sanz A. 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Rev Fish Biol Fish* 15, 75-88.

Martinovic S, Vlahovic M, Boljanac T and Pavlovic L. 2006. Preparation of filter aids based on diatomites. *Int J Miner Process* 80, 255-260.

MIFAFF (Ministry for Food Agriculture Forestry and Fisheries). 2003. Statistical yearbook of maritime affairs and fisheries. Ministry for Food Agriculture Forestry and Fisheries Report, MIFAFF, Gwacheon, Korea.

Mistry AC, Honda S and Hirose S. 2001. Structure, properties and enhanced expression of galactose-binding C-type lectins in mucous cells of gills from freshwater Japanese eels (*Anguilla japonica*). *Biochem J* 360, 107-115.

Mok JS, Lee DS and Yoon HD. 2008. Mineral content and nutritional evaluation of fishes from the Korean coast. *Fish Aquatic Sci* 41, 315-323.

Nelson DM, Treguer P, Brzezinski MA, Leynaert A and Queguiner B. 1995. Production and dissolution of biogenic silica in the ocean - revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochem Cycles* 9, 359-372.

Nielsen FH. 2014. Update on the possible nutritional importance of silicon. *J Trace Elem Med Biol* 28, 379-382.

Nita-Lazar M, Mancini J, Feng C, González-Montalbán N, Ravindran C, Jackson S and Wu G. 2016. The zebrafish galectins Drgal1-L2 and Drgal3-L1 bind in vitro to the infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) glycoprotein and reduce viral adhesion to fish epithelial cells. *Dev Comp Immunol* 55, 241-252.

Nitsan Z, Mokady S and Sukenik A. 1999. Enrichment of poultry products with ω 3 fatty acids by dietary supplementation with the alga *Nannochloropsis* and mantur oil. *J Agric Food Chem* 47, 5127-5132.

NRC (National Research Council). 1993. Nutrient requirements of fish. National Academies Press.

Oh HM, Choi AR and Min TI. 2003. High-Value Material from Microalgae. *J Microbiol Biotechnol* 2, 95-102.

Onitsuka T, Kawamura T, Ohashi S, Horii T and Watanabe Y. 2007. Dietary value of benthic diatoms for post-larval abalone *Haliotis diversicolor* associated with feeding transitions. *Fish Sci* 73, 295-302.

Pachauri RK, Allen MR, Barros VR, Broome J, Cramer W, Christ R and Ypserle JP. 2014. Climate change 2014: synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.

- Park SI. 2009. Disease control in Korean aquaculture. *Fish Pathol* 44, 19-23.
- Palic D, Andreasen CB, Menzel BW and Roth JA. 2005. A rapid, direct assay to measure degranulation of primary granules in neutrophils from kidney of fathead minnow(*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Fish Shellfish Immunol* 19, 217-227.
- Phearson RM, Paola A, Zywno SR, Motes JML and Guarino AM. 1991. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. *Aquaculture* 99, 203-211.
- Pickering AD. 1992. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. *Aquaculture* 100, 125-139.
- Poulsen N, Sumper M and Kröger N. 2003. Biosilica formation in diatoms: characterization of native silaffin-2 and its role in silica morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12075-12080.
- Rabinovich GA and Gruppi A. 2005. Galectins as immunoregulators during infectious processes: from microbial invasion to the resolution of the disease. *Parasite Immunol* 27, 103-114.
- Reffitt DM, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung HFJ, Evans BAJ, Thompson RPH, Powell JJ and Hampson GN. 2003. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone* 32, 127-135.
- Reyes-Becerril M, Angulo C, Estrada N, Murillo Y and Ascencio-Valle F. 2014. Dietary administration of microalgae alone or supplemented with *Lactobacillus sakei* affects immune response and intestinal morphology of Pacific red snapper (*Lutjanus peru*). *Fish Shellfish Immunol* 40, 208-216.
- Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, Landmann SL and Sousa CR. 2006. Myeloid C-type

- lectins in innate immunity. *Nat Immunol* 7, 1258-1265.
- Round FE, Crawford RM and Mann DG. 1990. *Diatoms: biology and morphology of the genera*. Cambridge university press.
- Roy SS and Pal R. 2015. Microalgae in aquaculture: a review with special references to nutritional value and fish dietetics. In *Proceedings of the Zoological Society* (Vol. 68, No. 1, pp. 1-8). Springer India.
- Ruas CBG, Carvalho C, Araújo HSS, Espíndola ELG and Fernandes MN. 2008. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. *Ecotoxicol Environ Saf* 71, 86-93.
- Russell RF, McDonald JU, Lambert L and Tregoning JS. 2016. Use of the microparticle nanoscale silicon dioxide as an adjuvant to boost vaccine immune responses against influenza virus in neonatal mice. *J Virol* 90, 4735-4744.
- Sahoo PK, Kumari J and Mishra BK. 2005. Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. *J Appl Ichthyol* 21, 151-155.
- Saleh NE, Ismail RF, Sayed AEDH, Zaghoul EH and Saleh H. 2020. Comprehensive assessment of benthic diatom (*Amphora coffeaeformis*) as a feed additive in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diet. *Aquac Res* 51, 3506-3519.
- Saurabh S and Sahoo PK. 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquac Res* 39, 223-239.
- Seaborn CD, Anderson MB and Nielsen FH. 2002. An interaction between dietary silicon and arginine affects immune function indicated by con-A-induced DNA synthesis of rat splenic T-lymphocytes. *Biol Trace Elem Res* 87, 133-142.
- Shah MR, Lutz GA, Alam, MD, Sarker P, Chowdhury MK, Parsaeimehr A, Liang Y and

Daroeh, M. 2018. Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *J Appl Psychol* 30, 197-213.

Siwicki AK, Anderson DP and Rumsey GL. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet Immunol Immunopathol* 41, 125-139.

Smith GS and Lumsden JH. 1983. Review of neutrophil adherence, chemotaxis, phagocytosis and killing. *Vet Immunol Immunopathol* 4, 177-236.

Smith P, Hiney MP and Samuelsen OB. 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annu Rev Fish Dis* 4, 273-313.

Srikanth S and Gwack Y. 2013. Molecular regulation of the pore component of CRAC channels, Orai1. *Curr Top Membr* 71, 181-207.

Sripanyakorn S, Jugdaohsingh R, Thompson RP and Powell JJ. 2005. Dietary silicon and bone health. *Nutr Bull* 30, 222-230.

Staffan S. 1996. Silica in aqueous environments. *J Non Cryst Solids* 196, 51-57.

Sugino N. 2007. The role of oxygen radical-mediated signaling pathways in endometrial function. *Placenta* 28, S133-S136.

Suzuki Y, Tasumi S, Tsutsui S, Okamoto M and Suetake H. 2003. Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 136, 723-730.

Teimouri M, Amirkolaie AK and Yeganeh S. 2013. The effects of *Spirulina platensis* meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 396, 14-19.

Treguer P, Nelson DM, Bennekom AJ, DeMaster, DJ, Leynaert A and Queguiner B. 1995.

- The silica balance in the world ocean: a reestimate. *Science* 268, 375-379.
- Uthappa UT, Brahmkhatri V, Sriram G, Jung HY, Yu J, Kurkuri N and Kurkuri MD. 2018. Nature engineered diatom biosilica as drug delivery systems. *J Control Release* 281, 70-83.
- Wee KM, Rogers TN, Altan BS, Hackney SA and Hamm C. 2005. Engineering and medical applications of diatoms. *J. Nanosci. Nanotechnol* 5, 88-91.
- WHO(World Health Organization). 2006. Report of a joint FAO/OIE/WHO Expert Consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance, Seoul, Republic of Korea.
- Wilhelm Filho D. 2007. Reactive oxygen species, antioxidants and fish mitochondria. *Front Biosci* 12, 1229-1237.
- Yilmaz B and Ediz N. 2008. The use of raw and calcined diatomite in cement production. *Cem Concr Compos* 30, 202-211.
- Yu W, Wen G, Lin H, Yang Y, Huang X, Zhou C, Zhang Z, Duan Y and Li T. 2018. Effects of dietary *Spirulina platensis* on growth performance, hematological and serum biochemical parameters, hepatic antioxidant status, immune responses and disease resistance of Coral trout *Plectropomus leopardus* (Lacepede, 1802). *Fish Shellfish Immunol* 74, 649-655.
- Zelikoff JT, Raymond A, Carlson E, Li Y, Beaman JR and Anderson M. 2000. Biomarkers of immunotoxicity in fish: from the lab to the ocean. *Toxicol Lett* 112, 325-331.

감사의 글

어느새 험난했던 2년의 석사과정을 마치고 드디어 학위 논문을 제출하게 되었습니다. 실험 데이터들이 학위 논문으로 만들어지기까지 많은 분들의 도움이 있었습니다. 항상 감사히 생각하겠습니다. 학부시절부터 지금까지 아낌 없는 조언과 지도해주신 여인규 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 논문을 완성되기까지 격려해주신 이영돈 교수님, 정준범 교수님께 감사드립니다. 그리고 학문적으로 많은 가르침을 주신 송춘복 교수님, 최광식 교수님, 이제희 교수님, 허문수 교수님, 전유진 교수님, 이경준 교수님, 김기영 교수님, 정석근 교수님, 이승현 교수님, 박상울 교수님께도 진심으로 감사의 말씀을 드립니다. 지난 2015년부터 2020년까지 곁에서 많이 도와준 실험실 식구들도 너무 감사드립니다.

항상 저에게 든든한 버팀목이 되어주는 사랑하는 우리 아빠 노형석, 항상 믿고 응원해주는 사랑하는 우리 엄마 김경애, 나보다 동생 같은 오빠 노승우, 귀여운 우리 할머니들 조경자, 김옥련 하늘에 계신 우리 할아버지들 노경욱, 김건규 외 우리 식구들 모두 사랑하고 감사합니다. 이도동 돌맹이 이태성, 알맹이 노알록, 늘 따뜻하게 맞이해주시는 탐동 엄마 노희순, 늘소담 식구들, 몽이, 뽕이, 매일 같이 점심먹는 우리 언니 영쥬, 동생들 시와니, 찌니, 코로나 때문에 못 모이는 뿌미리, 함희 그리고 석사과정 함께 달려준 봉봉이 유현이 모두 사랑하고 감사드립니다.