



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](#)

석사학위논문

흰다리새우 (*Litopenaeus vannamei*) 사료
내 팽생이모자반 (*Sargassum horneri*)
건조분말의 점결재 대체효과

제주대학교 대학원

해양생명과학과

엄 건 호

2022년 2월



흰다리새우 (*Litopenaeus vannamei*) 사료 내 팽생이모자반 (*Sargassum horneri*) 건조분말의 점결제 대체효과

지도교수 이 경 준

엄 건 호

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2021년 12월

엄건호의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ 임 세 진 

위 원 _____ 이 경 준 

위 원 _____ 이 봉 주 

제주대학교 대학원

2021년 12월

목차

ABSTRACT	ii
LIST OF FIGURES	iii
LIST OF TABLES	iv
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	3
2.1 실험사료.....	3
2.2 실험새우 및 사육관리.....	6
2.3 무게측정 및 샘플수집.....	9
2.4 일반성분분석.....	11
2.5 사료기호성 및 수중안정성 평가.....	11
2.6 비특이적 면역력 및 항산화능 분석.....	11
2.7 비특이적 면역 관련 유전자 발현량 분석.....	12
2.8 EMS 질병저항성 평가.....	13
2.9 통계학적 분석.....	15
III. 결과	16
IV. 고찰	25
요약문.....	28
참고문헌.....	30
감사의 글.....	37

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate dietary supplementation of *Sargassum horneri* (SH) meal on growth performance, feed utilization, innate immunity, antioxidant capacity and disease resistance of Pacific white shrimp. The diets were added with graded levels of SH meal by 0, 0.5, 1, 2, 4 and 8% (designated as Con, SH0.5, SH1, SH2, SH4 and SH8, respectively). Quadruplicate groups of shrimp were hand-fed with one of the diets five times daily for 39 days. The innate immunity and antioxidant capacity of shrimp were significantly improved by the dietary SH supplementation. The cumulative survival of shrimp exposed to *Vibrio parahaemolyticus* in a challenge was higher in shrimp group fed SH diets, except for SH8, than that of shrimp fed the control diet. Growth performance and feed utilization of the shrimp were significantly decreased with the dietary SH inclusions except for 0.5%. Results indicated that dietary SH meal could be used as a functional supplement for improvements in innate immunity, antioxidant capacity and disease resistance in Pacific white shrimp. The suggested dietary inclusion level of dried SH is approximately 0.5% for the shrimp.

LIST OF FIGURES

Figure 1. Experimental diet preparation for feeding trial	4
Figure 2. Experimental tanks (water capacity: 240L) for Pacific white shrimp and feeding the experimental diets.....	7
Figure 3. Measurement of shrimp body weight during the feeding trial.....	10
Figure 4. Collection of hemolymph and hepatopancreas of shrimp	10
Figure 5. Immersion of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> suspension in the experimental tanks for the challenge test	15
Figure 6. Cumulative survivals of <i>Litopenaeus vannamei</i> after challenged against <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	21

LIST OF TABLES

Table 1. Dietary formulation and proximate composition of the six experimental diets for shrimp (% dry matter).....	5
Table 2. Summary of the water quality parameters observed over 39 days feeding trial	8
Table 3. Non-specific immune responses and anti-oxidation enzyme activities of shrimp fed the six experimental diets for 39 days	19
Table 4. Relative gene expression levels of prophenoloxidase, crustin and penaeidine of shrimp fed the six experimental diets for 39 days.....	20
Table 5. The cycle threshold (Ct) values of the hepatopancreas of shrimp sampled at 0, 9, 152 (final) h after the acute hepatopancreas necrosis disease infection.....	22
Table 6. Growth performance and feed utilization of <i>Litopenaeus vannamei</i> (initial body weight: 0.55±0.00 g) fed the six experimental diets for 39 days	23
Table 7. Whole-body proximate composition of <i>Litopenaeus vannamei</i> fed the six experimental diets for 39 days.....	24
Table 8. Relative time to consume the feed of <i>Litopenaeus vannamei</i> and water stability of the six experimental diets	25

I. 서론

최근 양식생물의 질병을 예방하고자 사료에 다양한 천연유래물질들이 이용되고 있다 (Bricknell and Dalmo, 2005). 사료 내 해조류와 해조류 추출물의 첨가는 새우의 비특이적 면역능력을 증진시킬 수 있다고 보고되었다(Yeh and Chen, 2008; Ji et al., 2009; Immanuel et al., 2012). 해조류는 polysaccharides, terpens, phenols, polyphenols, minerals, polyunsaturated fatty acids, vitamins, carotenoids와 같은 생리활성 물질들을 다양하게 함유하고 있어, 새우의 성장과 면역능력을 증진시키기 위한 사료 첨가제로 각광받고 있다(Miyashita et al., 2013; Milledge et al., 2016; Sanjeeva et al., 2016). 해조류의 건조분말이나 그 추출물은 천연항생제로써 새우양식에 사용되는 합성항생제(oxytetracycline, enrofloxacin, florfenicol)를 효과적으로 대체할 수 있고, 바다에 배출되더라도 수질을 오염시키지 않는다는 장점을 가지고 있다(Thanigaivel et al., 2016).

팽생이모자반(*Sargassum horneri*)은 갈조식물문 모자반목에 속하는 해조류로 한국, 중국, 일본의 연안에 널리 분포한다. 팽생이모자반은 해류를 따라 먼 거리를 이동할 수 있으며 최근 중국에서 대량으로 번식하여 지속적으로 우리나라의 연안으로 유입되고 있다. 유입된 팽생이모자반은 해안가에서 부패되어 새로운 환경문제로 인식되고 있으나, 수거된 후 일부만 농업용 비료로 이용되고 있어 이를 효과적으로 처리할 수 있는 새로운 방안을 모색하는 것이 절실한 실정이다.

사료에 갈조류나 그 추출물(fucoidan, alginate)을 첨가할 경우, 새우의 비특이적 면역력(hemocytes, phenoloxidase, respiration burst activity)을 증진시키고, 흰반점바이러스(white spot syndrome virus, WSSV)에 대한 질병저항성을 향상시킬 수 있다고 보고되었다(Schleder et al., 2018; Schleder et al., 2020; Shi et al., 2020). 새우류를 대상으로 사료 내 모자반속(*Sargassum* spp.)에 속하는 해조류를 이용한 연구는 다수 진행되었지만(Yudiati et al., 2016; Giriwono et al., 2019; Yudiati et al., 2019), 팽생이모자반의 사료 내 첨가 효과를 검증한 연구는 전무한

실정이다.

흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)는 다른 새우에 비해 조기폐사증후군(early mortality syndrome, EMS)과 WSSV에 대한 질병저항성이 높을 뿐만 아니라, 성장이 빨라 전세계적으로 가장 많이 양식되고 있다. 흰다리새우는 전세계에서 연간 490만톤(FAO, 2020)이 생산되며, 국내 생산량은 8,100톤(KOSIS, 2020)으로 계속해서 증가할 것으로 예측되고 있다. 그러나, 최근 흰다리새우의 양식생산량이 증가하면서 수질(암모니아)의 악화와 수온, 염분의 변화에 대한 내성이 감소하여 각종 질병에 취약한 상태이다. *Vibrio parahaemolyticus*는 EMS를 일으키는 균으로 새우의 대량 폐사를 유발하는 가장 대표적인 전염성 질병이다.

새우 양식의 성공을 위해서는 성장률과 사료의 효율 증진 외에 비특이적 면역력을 높여 전염성 질병에 의한 대량 폐사를 줄일 필요가 있다. 따라서 이번 연구는 사료 내 팽생이모자반 분말의 첨가가 흰다리새우의 비특이적 면역력, 항산화능력, EMS에 대한 질병 저항성, 성장률, 사료효율에 미치는 영향을 평가하기 위해 실시되었다.

II. 재료 및 방법

2.1 실험사료

실험에 사용된 팽생이모자반 분말은 (주)네오엔비즈(Bucheon, Korea)에서 제공받았다. 실험에 사용된 팽생이모자반 분말은 조단백질 12.4%, 조회분 19.3%, 조지질 1.97%와 수분 10.8%를 함유하였다. 대조사료(Con)는 어분, 대두박, 오징어간분을 주 단백질원으로 사용하여 조단백질이 33.3%, 조지질이 9.6%가 되도록 조성되었다(Table 1). 5개의 실험사료는 대조사료에 밀가루를 대체하여 팽생이모자반 분말을 각각 0.5, 1, 2, 4, 8% 첨가하여 제작하였다(SH0.5, SH1, SH2, SH4, SH8). 실험사료는 원료를 혼합한 후, 연어유(salmon oil)와 증류수(사료원 총 중량의 15%)를 첨가하면서 펠렛성형기(SP-50, KumKang ENG, Daegu, Korea)를 이용하여 2 mm 크기로 성형되었다. 제작된 실험사료는 건조(25℃, 17 h) 후, 사료공급 전까지 냉장보관(4℃)하였다. 실험사료의 조성 및 일반성분함량은 Table 1에 나타내었다.



Figure 1. Experimental diet preparation for feeding trial

Table 1. Dietary formulation and proximate composition of the six experimental diets for *Litopenaeus vannamei* (% , dry matter). The diets were added with graded levels of *Sargassum horneri* by 0, 0.5, 1, 2, 4 and 8% (Con, SH0.5, SH1, SH2, SH4 and SH8)

Ingredients (%)	Experimental diets					
	Con	SH0.5	SH1	SH2	SH4	SH8
Fish meal (sardine) ¹	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Tuna by-product meal ²	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Soybean meal	42.3	42.3	42.3	42.3	42.3	42.3
Squid liver powder	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
Wheat flour	20.0	19.5	19.0	18.0	16.0	12.0
<i>Sargassum horneri</i> ³	0.00	0.50	1.00	2.00	4.00	8.00
Starch	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Fish oil	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Vitamin & Mineral mix ⁴	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Lecithin	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
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
<i>Proximate composition (% , dry matter)</i>						
Crude protein	36.9	36.8	35.9	36.9	35.9	35.6
Crude lipid	7.91	8.80	8.91	9.10	9.33	9.37
Crude ash	9.00	9.50	9.50	9.80	10.1	10.8
Moisture	7.40	7.00	6.70	6.30	6.30	6.90

¹Orizon Co. Ltd, Santiago, Chile.

²Wooginfeed Industry Co. Ltd, Incheon, Korea.

³NeoENbiz Co. Ltd, Bucheon, Korea.

⁴Vitamin & Mineral premix (g kg⁻¹ of mixture): retinol, 3.0; cholecalciferol, 1.0; ascorbic acid, 20.0; tocopherol, 20.0; menadione, 2.0; thiamine, 4.0; riboflavin, 6.0; pyridoxine, 5.0; cobalamin, 6.0; inositol, 54.0; panthothenic acid, 12.0; biotin, 0.2; niacin amide, 40.0; folic acid, 2.0; ferrous sulfate, 10.0; copper sulfate, 1.0; zinc sulfate, 30; manganous sulfate, 2.0; cobalt chloride, 10.; potassium iodide, 1.0; potassium, 6.0; sodium selenite, 0.01.

2.2 실험새우와 사육관리

제주도 성산읍에 위치한 종묘장에서 구입한 Post-larvae 새우는 사육 실험 전 6 주 동안 상업사료(CJ Cheiljedang, Seoul, Korea)를 공급하며 실험환경에 순치되었다. 실험에 사용된 새우(초기평균무게, 0.55 ± 0.00 g)는 총 24 개의 acrylic 수조(215 L)에 수조 당 30 마리씩, 실험구 당 4 반복으로 배치되었다. 사육실험은 총 39 일간 진행되었다. 사육수는 모래여과해수를 사용하였고, 수조의 용존산소 농도를 유지하기 위해 공기발생기(aeration)를 설치하였다. 광주기는 형광등을 이용하여 12 light: 12 dark 로 유지되었다. 실험사료는 1 일 5 회(09:00, 11:30, 14:00, 16:30, 19:00 h)에 걸쳐 제한공급(새우 체중의 3-10%) 하였다. 사육실험 기간 중 각 수조의 수온, 용존산소(dissolved oxygen, DO), 염분(salinity)은 1 일 1 회 측정하였으며, pH 와 암모니아 농도(NH_4^+)는 매주 1 회 분석하였다. DO 는 Pro20 Dissolved Oxygen Instrument (YSI, Yellow Springs, OH, USA), pH 는 Seven Compact (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA) 기기를 사용하여 측정하였다. 암모니아 농도는 Verdouw et al. (1978)의 방법에 따라 분석하였고, 염분은 Master Refractometer-S28M (ATAGO, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다. 사육실험 기간 동안 모든 실험수조의 DO 는 6.47 ± 0.12 ppm, pH 는 7.50 ± 0.13 , 암모니아 농도는 0.11 ± 0.02 ppm, 수온은 $29.7\pm 0.43^\circ\text{C}$, 염분은 36.1 ± 1.26 psu 로 유지되었다.



Figure 2. . Experimental tanks (water capacity: 240L) for Pacific white shrimp and feeding the experimental diets

Table 2. Summary of water quality parameters observed over the 39 days growing period.

	Dissolved oxygen (ppm)	pH	Ammonia (ppm)	Temperature (°C)	Salinity (psu)
Mean	6.47±0.12	7.50±0.13	0.11±0.02	29.7±0.43	36.1±1.26
Max	6.79±0.19	7.76±0.11	0.14±0.08	30.5±0.35	37.5±0.58
Min	6.22±0.06	7.36±0.24	0.08±0.04	29.1±0.67	34.5±1.08

Values are mean of quadruplicate groups and presented as mean ± S.D.

2.3 무게측정 및 샘플수집

사육실험 종료 후, 새우의 증체율(weight gain, WG)과 생존율(survival) 조사를 위해 전체 무게와 마릿수를 측정하였다. 실험새우에서 사료계수(feed conversion ratio, FCR)와 단백질이용효율(protein efficiency ratio, PER)은 사료 공급량을 바탕으로 계산하였다. 최종무게측정 후, 수조 당 4마리(실험구 당 16마리)의 새우를 무작위로 선별하여 얼음물에 마취시키고 Alsever's solution (Sigma, St. Louis, MO, USA)이 처리된 주사기를 이용하여 hemolymph를 채취하고 간췌장(hepatopancreas)을 적출하였다. 채혈된 hemolymph는 원심분리기로(800 g, 20 min) 혈장을 분리하였다. 분리된 hemolymph와 간췌장은 비특이적 면역력 분석과 qPCR 분석에 사용되기 전까지 냉동(-80°C)보관 되었다.

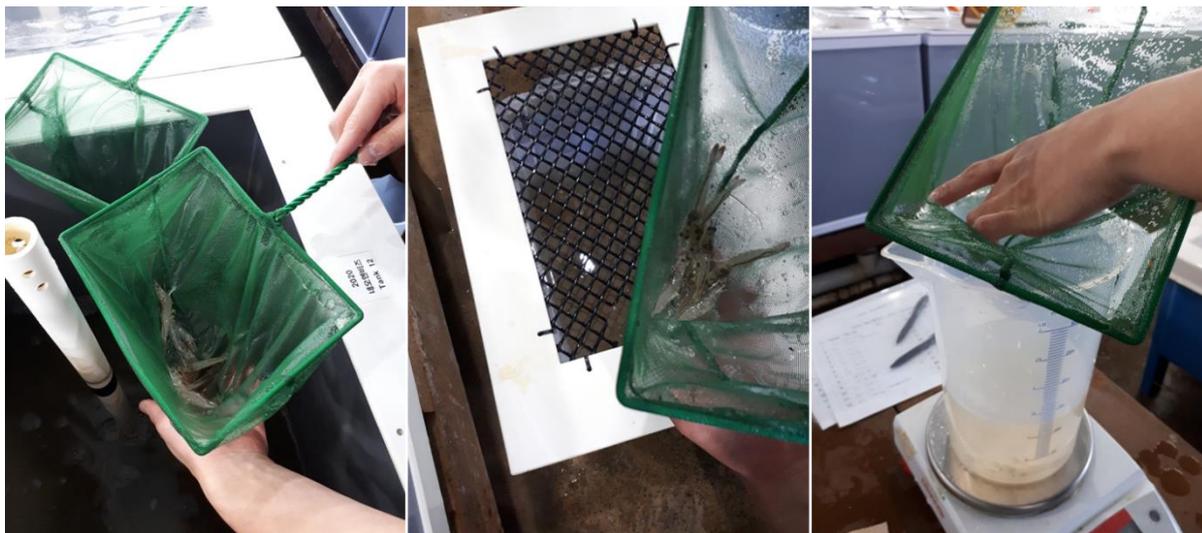


Figure 3. Measurement of shrimp body weight during the feeding trial.

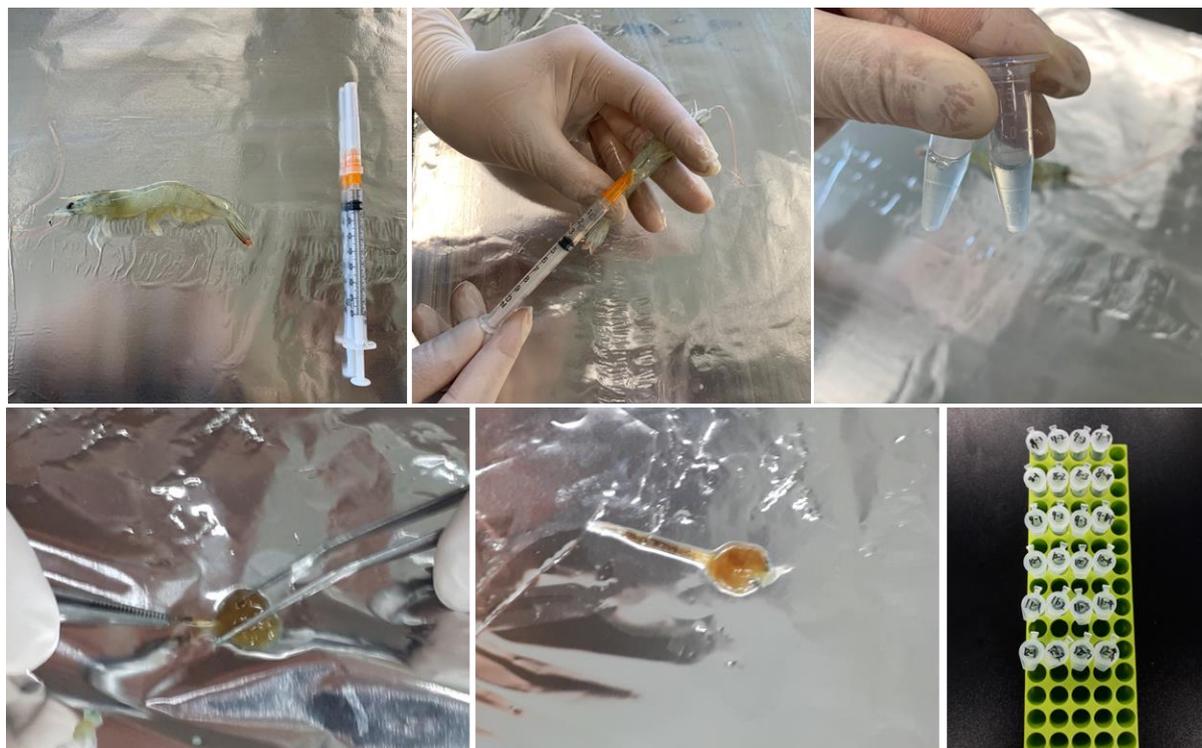


Figure 4. Collection of hemolymph and hepatopancreas of shrimp after the feeding trial.

2.4 일반성분분석

실험사료와 전하체의 일반성분은 AOAC (2005) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125°C, 3 h), 조회분은 직접회화법(550°C, 4 h), 단백질은 자동조단백질분석기(Kjeltec system 2300, FOSS, Hillerød, Denmark)를 이용하여 분석되었고, 지방은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 분석되었다.

2.5 사료기호성 및 수중안정성 평가

사료기호성을 평가하기 위해 총 6개의 acrylic 수조(240 L)에 새우를 수조 당 10마리씩 배치하였다. 실험사료를 1일 3회(08:30, 13:00, 17:00 h)에 걸쳐 제한공급(새우 체중의 6%) 하면서 새우가 사료를 모두 섭취하기까지 걸린 시간을 측정하였다.

사료의 수중안정성을 평가하기 위해 총 18개의 비커에 28-30°C의 해수(700 mL)를 넣고 실험사료(1.00 g)를 3반복으로 침지하였다. 침지된 실험사료는 동일한 시간(15 min, 30 min, 60 min)에 수거하여, 건조(125°C, 2 h)시킨 후 무게를 측정하여 수중으로 용출된 실험사료의 양을 계산하였다.

2.6 비특이적 면역력 및 항산화능 분석

비특이적 면역력과 항산화능 분석을 위해 총 6가지 항목을 조사하였다. Nitro-blue tetrazolium (NBT) 활성은 Zhang et al. (2013)의 방법을, lysozyme 활성은 Paglia and Valentine (1967)의 방법을, phenoloxidase (PO) 활성은 Hernández-López et al. (1996)의 방법을, anti-protease 활성은 Ellis (1990)의 방법을 기초로 분석하였다. Superoxide dismutase (SOD) 활성은 SOD assay kit (DoGenBio, Seoul, Korea)를, glutathione peroxidase (GPx) 활성은 GPx kit (Biovision, Milpitas, CA, USA)를 사용하여 분석하였다.

2.7 비특이적 면역 관련 유전자 발현량 분석

실험새우의 간체장 RNA는 TRIzol® (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하여 추출하였다. RNA purity는 µDrop™Plate (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. cDNA는 분리된 RNA (2.5 µg)와 reaction mixture를 총 볼륨 20 µL로 맞추어 PrimeScript™ first-strand cDNA synthesis kit (TaKaRa Bio, Kusatsu, Japan)를 사용하여 합성하였다. 합성한 cDNA는 nuclease free water에 40배로 희석하여 qPCR 분석(prophenoloxidase, crustin, penaeidin)에 사용되었다.

qPCR 분석을 통해 실험새우 간체장의 prophenoloxidase (proPO), crustin, penaeidin의 발현량을 조사하였다. β-actin을 reference gene으로 사용하였고 forward (5'-GAGCAACACGGAGTTCGTTGT-3'), reverse (5'-CATCACCAACTGGGACGACATGGA-3')의 oligonucleotide primer를 사용하였다. proPO의 oligonucleotide primer는 forward (5'-TCCATTCCGTCCGTCTG-3'), reverse (5'-GGCTTCGCTCTGGTTAGG-3')를, crustin의 oligonucleotide primer는 forward (5'-GAGGGTCAAGCCTACTGCTG-3'), reverse (5'-ACTTATCGAGGCCAGCACAC-3')를, penaeidin의 oligonucleotide primer는 forward (5'-CACCTTCGTGAGACCTTTG-3'), reverse (5'-AATATCCCTTCCCACGTGAC-3')를 사용하였다. qPCR은 Real Time System TP 950 Thermal Cycler Dice™ (TaKaRa Bio, Kusatsu, Japan)를 이용하여 진행하였고, 2µL의 cDNA, 10µL의 TaKaRa Ex Taq™SYBR premix (TaKaRa Bio, Kusatsu, Japan), 각각 0.4µL의 forward & reverse primer, 7.2µL의 H₂O를 넣어 총 볼륨을 20µL로 맞추어 분석을 진행하였다.

2.8 EMS 질병저항성 평가

사육실험 종료 후, 새우(평균무게, 5.18 g)를 총 18개의 acrylic 수조에 9마리씩 3반복으로 배치하였다. EMS 균(*V. parahaemolyticus*)을 TSB⁺ 배지에 배양(30°C, 150 rpm, 24 h)한 후, 각 수조(80 L)에 *V. parahaemolyticus* 현탁액(5.80×10^5 CFU/mL)을 침지하였다. 침지 후 총 152 시간 동안 실험사료를 1일 3회(09:00, 13:00, 18:00 h)에 걸쳐 제한공급(새우체중의 5%) 하면서 새우의 누적생존율을 관찰하였다. 공격실험의 EMS 균 침지 전(0 h), 침지 후(9 h), 종료(152 h) 시점에 실험구별로 간체장을 적출하여 EMS 독소 유전자의 발현량을 비교하였다. DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 간체장 조직의 DNA를 추출하였다. 분석에 사용된 primer는 VpPirA-F (5'-TTGGACTGTCGAACCAAACG-3'), VpPirA-R (5'-GCACCCCATTTGGTATTGAATG-3')이다. qPCR 분석은 SYBR Premix Ex Taq™ Perfect Real-Time Kits (TaKaRa Bio, Kusatsu, Japan)를 사용하였고, Real Time System TP 950 Thermal Cycler Dice™ (TaKaRa Bio, Kusatsu, Japan)을 이용하여 분석하였다.

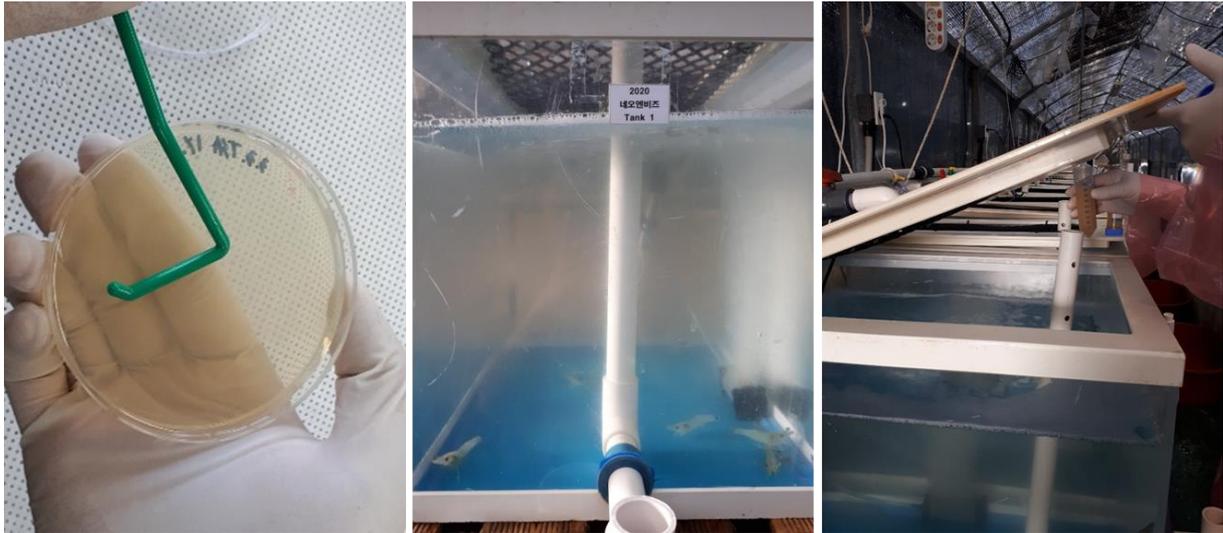


Figure 5. Immersion of *Vibrio parahaemolyticus* suspension in the experimental tanks for the challenge test.

2.9 통계학적 분석

사육실험을 위해 Randomized complete block design으로 실험사료를 배치하였고 모든 결과는 SPSS (Version 24.0, International Business Machines Co., NY, USA) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석되었다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's multiple test ($P < 0.05$)로 비교하였다. 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 통계분석 하였으며, 모든 데이터는 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었다.

III. 결과

Hemolymph 의 NBT 활성은 SH2 구가 대조구에 비해 유의적으로 높았으며 나머지 실험구에서는 대조구와 비교하여 유의적인 차이가 없었다(Table 3). Lysozyme 활성은 SH8 실험구를 제외한 모든 실험구(SH0.5, SH1, SH2, SH4)에서 대조구에 비해 유의적으로 높게 나타났다. PO 와 SOD 활성은 SH2, SH4 구에서 대조구에 비해 유의적으로 높게 나타났다. GPx 와 anti-protease 활성은 모든 팽생이모자반 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다.

간체장의 proPO 발현은 SH1, SH2, SH4, SH8 구가 대조구에 비해 유의적으로 높았으며 SH0.5 구는 유의적인 차이가 없었다(Table 4). Crustin 발현은 SH2, SH4 구가 대조구에 비해 유의적으로 높게 나타났다. Penaeidin 발현은 SH4, SH8 구에서 대조구에 비해 유의적으로 높게 나타났다.

V. parahaemolyticus 에 대한 공격실험의 결과, 흰다리새우의 누적 생존율은 SH4 구(48.1%)가 대조구(22.1%)에 비해 유의적으로 높았다(Fig. 6). 침지 후 9 h 에 흰다리새우 간체장에서 EMS 독소 유전자(VpPir A)가 확인되었다(Table 5). 침지 후 152 h 에 흰다리새우 간체장의 EMS 독소는 SH1, SH2, SH4 구에서 검출되지 않았다. 대조구, SH0.5, SH8 구에서는 152 h 에 EMS 독소가 미량 확인되었지만, 점차적으로 회복되는 경향을 보였다.

성장률은 SH0.5 구가 대조구와 비교하여 유의적인 차이가 없었다. SH1, SH2, SH4, SH8 구는 대조구에 비해 유의적으로 낮았고 팽생이모자반 첨가량이 증가할수록 성장률이 낮아지는 경향을 보였다(Table 6). 사료계수는 SH0.5, SH1, SH2 까지 대조구와 비교하여 유의적인 차이가 없었지만, SH4, SH8 에서는 대조구에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 생존율은 SH8 구가 대조구에 비해 유의적으로 감소하였지만, 나머지 팽생이모자반 첨가구에서는 대조구와 유의적인 차이를 보이지 않았다.

전어체 일반성분분석 결과, 조단백질, 조지질, 조회분 및 수분은 대조구와 팽생이모자반 첨가구 사이에 유의적인 차이가 없었다(Table 7). 사료기호성은 SH0.5 구를 제외한 모든 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높았고 SH4 구에서 가장 높게 나타났다(Table 8). 사료의 수중안정성은 15 min 에 SH2, SH4, SH8 구가 대조구에 비해 유의적으로 낮았고 30, 60 min 에 SH4, SH8 구에서 유의적으로 낮게 나타났다. 유의적인 차이는 아니지만 SH0.5, SH1 구에서도 대조구에 비해 수중안정성이 낮은 경향을 보였다.

Table 3. Non-specific immune responses and anti-oxidation enzyme activities of *Litopenaeus vannamei* fed the six experimental diets for 39 days. The diets were added with graded levels of *Sargassum horneri* by 0, 0.5, 1, 2, 4 and 8% (Con, SH0.5, SH1, SH2, SH4 and SH8)

	NBT ¹	Lysozyme ²	PO ³	Anti-protease ⁴	SOD ⁴	GPx ⁶
Con	1.23±0.09 ^b	3.77±0.28 ^b	0.13±0.01 ^b	11.0±2.30 ^b	46.6±1.15 ^b	3.12±0.02 ^c
SH0.5	1.24±0.11 ^b	4.14±0.41 ^a	0.14±0.01 ^{ab}	19.0±4.84 ^a	57.1±2.45 ^b	4.84±0.09 ^a
SH1	1.27±0.12 ^b	4.16±0.20 ^a	0.13±0.01 ^b	18.9±4.91 ^a	56.7±3.17 ^b	3.83±0.30 ^b
SH2	1.57±0.04 ^a	4.41±0.13 ^a	0.14±0.01 ^a	24.3±4.28 ^a	75.7±12.6 ^a	3.92±0.21 ^b
SH4	1.39±0.08 ^b	4.32±0.33 ^a	0.14±0.00 ^a	22.1±2.90 ^a	70.7±6.36 ^a	3.84±0.09 ^b
SH8	1.32±0.16 ^b	3.62±0.08 ^b	0.13±0.00 ^{ab}	20.1±3.82 ^a	54.1±8.48 ^b	3.82±0.79 ^b

Values are mean of quadruplicate groups and presented as mean±S.D. Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05).

¹Nitro-blue tetrazolium activity (absorbance).

²Lysozyme activity ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

³Phenoloxidase activity (absorbance).

⁴Anti-protease activity (% inhibition).

⁵Superoxide dismutase activity (% inhibition).

⁶Glutathione peroxidase activity (mU mL^{-1}).

Table 4. Relative mRNA gene expression of proPO, crustin, penaeidin in hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei* fed the six experimental diets for 39 days. The diets were added with graded levels of *Sargassum horneri* by 0, 0.5, 1, 2, 4 and 8% (Con, SH0.5, SH1, SH2, SH4 and SH8).

	proPO ¹	Crustin ²	Penaeidin ³
Con	1.00±0.07 ^c	1.00±0.66 ^c	1.00±0.70 ^c
SH0.5	1.10±0.11 ^c	0.75±0.31 ^c	1.41±0.41 ^c
SH1	2.68±0.64 ^a	1.84±0.76 ^{bc}	0.53±0.22 ^c
SH2	2.29±0.30 ^b	4.23±1.90 ^a	1.51±0.99 ^c
SH4	2.33±0.26 ^b	3.15±1.02 ^{ab}	2.80±1.00 ^b
SH8	2.86±0.15 ^a	2.18±1.84 ^{bc}	4.09±3.20 ^a

Values are mean of quadruplicate groups and presented as mean±S.D. Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05).

¹proPO relative gene expression in shrimp hepatopancreas were normalized to β-actin and expressed relative to control.

²Crustin relative gene expression in shrimp hepatopancreas were normalized to β-actin and expressed relative to control.

³Penaeidin relative gene expression in shrimp hepatopancreas were normalized to β-actin and expressed relative to control.

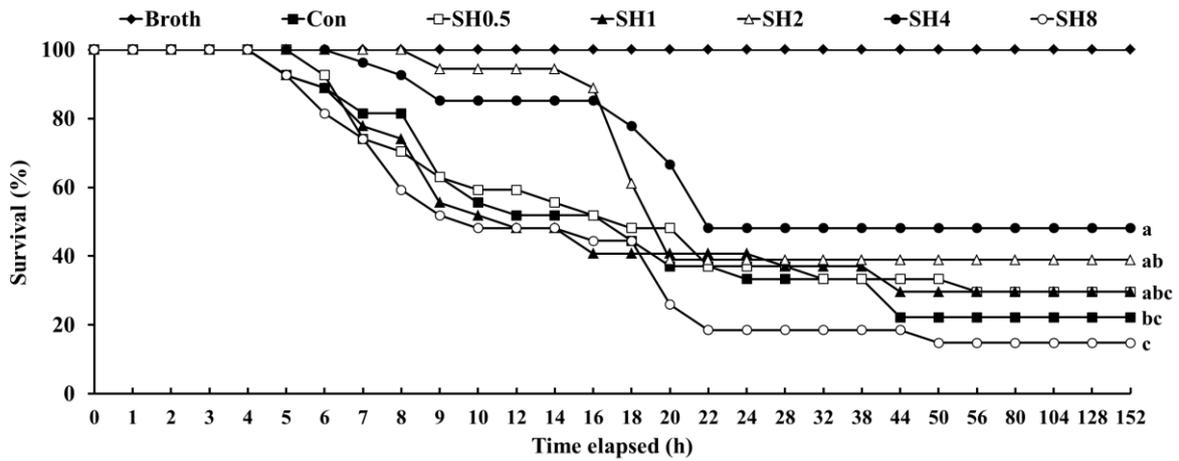


Figure 6. Cumulative survivals of *Litopenaeus vannamei* after challenged against *Vibrio parahaemolyticus*. The shrimp were immersed with *V. parahaemolyticus* suspension containing 5.80×10^5 CFU mL⁻¹. Triplicate groups of shrimp were hand-fed with one of the diets three times a day during the challenge period. The diets were added with graded levels of *Sargassum horneri* by 0, 0.5, 1, 2, 4 and 8% (Con, SH0.5, SH1, SH2, SH4 and SH8). Broth treatment was a positive control. Values are mean of triplicate and different superscripts denote significant difference (P<0.05).

Table 5. The cycle threshold (Ct) values of the hepatopancreas of shrimp sampled at 0, 9 and 152 (final) h after the *Vibrio parahaemolyticus* suspension immersion. The diets were added with graded levels of *Sargassum horneri* by 0, 0.5, 1, 2, 4 and 8% (Con, SH0.5, SH1, SH2, SH4 and SH8)

Treatments	Ct values		
	0 h	9 h	152 h
Con	n.d. ¹	24.8	34.1
SH0.5	n.d. ¹	26.8	33.8
SH1	n.d. ¹	29.3	n.d. ¹
SH2	n.d. ¹	24.1	n.d. ¹
SH4	n.d. ¹	28.7	n.d. ¹
SH8	n.d. ¹	23.7	31.9

¹nd, not detected of toxin

Table 6. Growth performance and feed utilization of *Litopenaeus vannamei* (initial body weight: 0.55 ± 0.00 g) fed the six experimental diets for 39 days. The diets were added with graded levels of *Sargassum horneri* by 0, 0.5, 1, 2, 4 and 8% (Con, SH0.5, SH1, SH2, SH4 and SH8)

	FBW ¹	WG ²	SGR ³	FCR ⁴	PER ⁵	Survival (%)
Con	5.82±0.23 ^a	957±44.6 ^a	6.05±0.11 ^a	1.39±0.09 ^b	1.96±0.12 ^a	97.5±3.19 ^a
SH0.5	5.66±0.17 ^a	927±30.8 ^a	5.97±0.08 ^a	1.44±0.10 ^b	1.89±0.12 ^a	92.5±7.39 ^{ab}
SH1	5.19±0.19 ^b	846±36.9 ^b	5.76±0.10 ^b	1.56±0.16 ^{ab}	1.79±0.18 ^{ab}	92.5±6.87 ^{ab}
SH2	5.19±0.32 ^b	844±58.8 ^b	5.76±0.16 ^b	1.52±0.09 ^{ab}	1.79±0.11 ^{ab}	94.2±4.19 ^{ab}
SH4	4.64±0.16 ^c	742±32.0 ^c	5.46±0.10 ^c	1.72±0.09 ^a	1.62±0.08 ^b	90.0±3.85 ^{ab}
SH8	4.61±0.26 ^c	738±47.9 ^c	5.45±0.15 ^c	1.77±0.16 ^a	1.60±0.14 ^b	87.5±1.67 ^b

Values are mean of quadruplicate groups and presented as mean±S.D. Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

¹Final body weight (g).

²Weight gain (%)=[(final body weight - initial body weight)/initial body weight]×100.

³Specific growth rate (%)=[(log_e final body weight-log_e initial body weight)/days]×100

⁴Feed conversion ratio=dry feed fed (g)/wet weight gain (g).

⁵Protein efficiency ratio=wet weight gain (g)/total protein given (g).

Table 7. Whole-body proximate composition of *Litopenaeus vannamei* fed the six experimental diets for 39 days. The diets were added with graded levels of *Sargassum horneri* by 0, 0.5, 1, 2, 4 and 8% (Con, SH0.5, SH1, SH2, SH4 and SH8)

	Moisture	Crude protein	Crude lipid	Crude ash
Con	76.1±0.34	18.4±0.07	1.04±0.07	2.87±0.35
SH0.5	76.0±0.63	18.7±0.96	0.94±0.07	3.42±0.39
SH1	76.8±0.59	18.1±0.07	0.88±0.10	3.55±0.31
SH2	75.7±0.82	18.7±0.22	1.02±0.03	3.14±0.36
SH4	77.6±0.85	17.5±0.43	0.90±0.11	3.84±0.85
SH8	76.1±0.10	18.4±1.01	1.09±0.09	3.67±0.40

Values are mean of quadruplicate groups and presented as mean±S.D. Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

Table 8. Relative time to consume the feed of *Litopenaeus vannamei* and water stability of the six experimental diets. The diets were added with graded levels of *Sargassum horneri* by 0, 0.5, 1, 2, 4 and 8% (Con, SH0.5, SH1, SH2, SH4 and SH8)

	Palatability ¹	Water stability ²			
		0 min	15 min	30 min	60 min
Con	1.00±0.04 ^a	1.00±0.00	0.74±0.02 ^a	0.71±0.02 ^a	0.69±0.03
SH0.5	0.92±0.10 ^a	1.00±0.00	0.74±0.02 ^a	0.71±0.01 ^a	0.69±0.02
SH1	0.67±0.10 ^b	1.00±0.00	0.71±0.00 ^{ab}	0.71±0.01 ^a	0.69±0.02
SH2	0.72±0.09 ^b	1.00±0.00	0.69±0.02 ^{ab}	0.69±0.01 ^{ab}	0.65±0.03
SH4	0.62±0.09 ^b	1.00±0.00	0.68±0.01 ^{ab}	0.66±0.00 ^{bc}	0.64±0.01
SH8	0.70±0.04 ^b	1.00±0.00	0.67±0.00 ^b	0.65±0.01 ^c	0.63±0.01

Values are mean of triplicate groups and presented as mean±S.D. Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05).

¹Palatability (Relative time to consume the feed).

²Water stability (Relative dry weight of remaining feed).

IV. 고찰

이번 연구에서 사료 내 팽생이모자반 분말의 첨가는 흰다리새우의 비특이적 면역력을 증진시키는 것으로 나타났다. 사료 내 갈조류(*S. siliquosum*, *S. oligocystrum*) 추출물의 첨가는 흰다리새우의 비특이적 면역능력(PO, NBT)과 항산화능을 증진시킨다고 보고되었다(Yudiati et al., 2016; Shi et al., 2018; Yudiati et al., 2019). *S. hemiphylum* 분말과 그 추출물을 사육수에 침지하였을 경우에도, 흰다리새우의 비특이적 면역력(PO, NBT)이 증진되었다고 보고되었다(Huynh et al., 2011). SOD, GPx 는 phagocytosis 로 발생하는 활성산소를 제거하여 세포의 산화와 파괴를 방지한다(Nordberg and Arner, 2001). Campa-Córdova et al. (2002)은 갈조류인 *Laminaria digitata* 추출물을 사육수에 침지하면 흰다리새우의 hemolymph 내 항산화능력을 증진시킬 수 있다고 보고하였다. 새우의 proPO 체계는 PO 의 생산을 촉진하여 비특이적 면역반응에 관여하는 quinone, melanin 의 생산을 유도하는 것으로 알려져 있다(Amparyup et al., 2013). Crustin, penaeidin 은 갑각류의 anti-microbial peptide 로 병원성 미생물의 증식과 protease 활성을 억제하고 phagocytosis 를 촉진한다(Visetnan et al., 2017; Bachère et al., 2000; Lv et al., 2020). Chen et al. (2014)은 사료에 carrageenan 을 0.05% 첨가하였을 때 흰다리새우의 proPO, penaeidin 을 비롯한 비특이적 면역관련 유전자 발현이 증진되었다고 보고하였다. 이번 연구에서 사료에 팽생이모자반 분말의 2-4% 첨가하였을 때, 새우의 비특이적 면역력(PO, lysozyme, NBT, anti-protease)과 관련 유전자(proPO, crustin, penaeidin)의 발현, 항산화능력(SOD, GPx)을 유의적으로 증가시켰다. 따라서 팽생이모자반을 적정량으로 사용할 경우, 흰다리새우에서는 면역증강제로 이용 가능할 것으로 사료된다. 이는 모자반 속의 갈조류에 풍부하게 포함되어 있는 sulfated polysaccharides, vitamins 와 같은 생리활성물질들에 의한 것으로 추측된다(Damonte et al., 2004; Shao et al., 2015a, 2015b; Mayer et al., 2017). 그러나, 팽생이모자반의 과잉 첨가(8% 이상)는 새우의 비특이적 면역력과 항산화능을 오히려

감소시키는 것으로 나타나 적정 첨가량과 비특이적 면역력, 항산화능에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 판단된다.

모자반 속의 갈조류, 꼬시래기 속의 홍조류 분말이나 그 추출물을 사육수에 침지 할 경우, 흰다리새우의 비특이적 면역력을 증진시키고 나아가 *V. alginolyticus*, WSSV 에 대한 질병저항성을 높이는 것으로 보고되었다(Yeh et al., 2006; Huynh et al., 2011; Lin et al., 2011). 홍조류의 hot-water extract 와 carrageenan 은 *Vibrio* 종과 WSSV 에 대한 흰다리새우의 질병저항성을 증진시킨다고 보고되었다(Fu et al., 2007; Sirirustananun et al., 2011; Chen et al., 2014). 이번 연구에서도 사료에 팽생이모자반 분말을 4% 첨가하였을 때 흰다리새우의 EMS 감염 후의 생존율이 유의적으로 높게 나타났다. 이러한 결과는 팽생이모자반 첨가에 의한 비특이적 면역력과 항산화능의 향상 때문인 것으로 판단되어 새우 양식의 주요 전염성 질병들(EMS, WSSV)에 대한 추가적인 평가가 요구된다.

사료 내 해조류의 첨가 효과는 사용된 종, 가공 방법, 함량에 따라 크게 다를 수 있다(Pallaoro et al., 2016; Yu et al., 2016; Yang et al., 2017). 사료 내 해조류의 첨가에 따른 효과의 차이는 사용된 해조류 종의 지리적 분포와 계절에 따른 생화학적, 영양적 조성에 의한 것으로 보고되었다(Boulom et al., 2014; Thanigaivel et al., 2016). Huang et al. (2006)은 사료에 톳(*S. fusiforme*) 추출물을 0.5% 첨가하였을 때 대하(*F. chinensis*)의 PO 활성도가 대조사료를 공급한 새우보다 높았으나, 추출물을 1-2% 포함한 사료를 공급한 새우에서는 대조구보다 낮았으며, 성장률은 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다고 보고하였다. Cheng et al. (2005)은 사료에 alginate 의 첨가가 흰다리새우의 생존과 성장에 영향을 미치지 않았다고 보고하였으며, *S. cristaefolium* 분말 또는 그 추출물은 흰다리새우의 성장을 증진시키지 않았다고 보고하였다(Sudaryono et al., 2018). Schleder et al. (2018)은 사료 내 미역(*U. pinnatifida*)과 *S. filipendula* 분말의 첨가가 흰다리새우의 성장에 영향을 미치지 않았다고 보고하였다. Niu et al. (2015)은 사료에 *U. pinnatifida* 분말을 1~3% 첨가하였을 때 *P. monodon* 의 성장이 증진되었으나, 5-6%까지 첨가하였을 때는 성장이 오히려

감퇴하였다고 보고하였다. 이번 연구에서는 사료에 팽생이모자반을 1% 이상 첨가하였을 때 흰다리새우의 성장이 유의적으로 감소하였다. 그러나, 흰다리새우의 FCR, PER 은 SH4, SH8 구를 제외한 나머지 실험구와 대조구의 유의적인 차이가 없었다. 사료기호성 실험 결과, 팽생이모자반 함량에 따른 새우의 기호성 감소는 관찰되지 않았으며 반대로 기호성이 증가하는 경향을 보였다. 실험사료의 수중 안정성 평가 결과, 팽생이모자반 함량에 따라 수중 안정성이 감소하였으며 SH4, SH8 구에서 유의적으로 낮았다. 새우를 비롯한 갑각류는 부속지를 이용해 먹이를 분쇄하여 섭취하는 섭식 형태를 가지고 있어 어류에 비해 사료를 완전히 섭취하기까지 필요한 시간이 상대적으로 길다. 따라서 양식 사료의 수중 안정성이 낮은 경우, 새우는 어류에 비해 실질적으로 섭취할 수 있는 사료의 양이 크게 감소할 수 있다. Volpe et al. (2012)은 여러 점결제(alginate, pectin, chitosan)를 사용하여 사료의 수중 안정성을 평가한 결과, 해조류 추출물(alginate)을 사용한 사료의 수중 안정성이 가장 낮았다고 보고하였다. 이번 연구에서, 사료 내 팽생이모자반 함량의 증가에 따른 새우의 성장 감소와 높은 사료 계수의 원인은 팽생이모자반으로 점결제(wheat flour)를 대체할수록 실험사료의 수중안정성이 낮아져 유실되는 양이 많아졌기 때문으로 사료된다.

결론적으로, 팽생이모자반 분말을 사료에 적정량으로 첨가할 경우, 흰다리새우의 비특이적 면역력과 항산화능력을 증진시키고, EMS 에 의한 대량 폐사를 어느 정도 줄일 수 있을 것으로 사료되어 이용 가능성과 생리활성 기전에 대한 후속 연구가 필요하다. 사료에 팽생이모자반 분말의 적정 첨가량은 성장 결과를 고려하였을 때 0.5%로 사료되며 추가적으로 제조 공정에 따른 수중 안정성의 평가가 필요할 것으로 판단된다.

요 약 문

이번 연구를 통해 팽생이모자반(*Sargassum horneri*) 건조분말의 흰다리새우 사료 내 이용가능성을 조사하였다.

흰다리새우(초기평균무게: 0.55g)를 대상으로 사료에 점결제를 팽생이모자반 건조분말로 0, 0.5, 1, 2, 4, 8%씩 대체하여 총 6개의 실험사료를 제작하였다. 6주간의 사육실험을 종료하였을 때, 비특이적 면역력(NBT, Lysozyme, PO, Anti-protease) 활성, 항산화능(SOD, GPx) 그리고 비특이적 면역관련 유전자(proPO, Crustin, Penaeidin)의 발현량은 팽생이모자반 건조분말이 첨가구에서 대조구에 비해 경향적 또는 유의적으로 향상되었다. 성장률 및 사료효율은 팽생이모자반의 점결제 대체량이 증가할수록 감소하는 것으로 나타났다. 사료기호성은 사료에 팽생이모자반의 점결제 대체량이 증가할수록 경향적 또는 유의적으로 높았다. 사료의 수중안정성은 사료에 팽생이모자반의 점결제 대체량이 높을수록 경향적 또는 유의적으로 감소하였다. 따라서, 팽생이모자반 건조분말은 흰다리새우 사료에 비특이적 면역, 항산화능을 향상시키기 위한 기능성 첨가제로 이용할 수 있을 것으로 판단된다. 추가적으로, 사료 내 팽생이모자반의 이용성을 향상시킬 수 있는 발효와 같은 가공처리방법을 개발하여 가공처리 팽생이모자반을 이용한 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Vibrio parahaemolyticus (A3/Vietnam)를 배양한 현탁액을 수조에 5.80×10^9 CFU/mL로 침지하여 152시간에 걸쳐 EMS 질병저항성을 평가하였다. 사료에 팽생이모자반을 4% 첨가한 실험구에서 대조구에 비해 생존율이 유의적으로 향상되었으며 8% 첨가한 실험구를 제외한 다른 실험구에서도 경향적으로 높은 생존율이 관찰되었다. 따라서, 사료에 팽생이모자반을 적정량 첨가하는 것은 흰다리새우의 EMS 질병저항성을 크게 향상시킬 수 있는 천연 원료로 이용할 수 있을 것으로 판단된다. 추가적으로, 팽생이모자반에 함유된 생리활성물질의 조성, 함량과 새우의 면역체계에 작용하는

구체적인 기전에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로 이번 연구를 통해 흰다리새우 사료 내 팽생이모자반 건조분말의 첨가는 비특이적 면역력, 항산화능 그리고 EMS 에 대한 질병저항성을 크게 높여줄 수 있다고 판단된다. 팽생이모자반 건조분말은 섬유질이 매우 많아 점결성이 낮기 때문에 점결제 대체제로써는 적합하지 않다고 판단된다. 따라서 팽생이모자반의 사료 내 이용성을 증진시킬 수 있는 가공처리방법 개발과 첨가사료의 장기간 사용에 따른 효과에 대한 후속 연구들이 요구된다.

참고 문헌

- 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. <http://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>.
- Bachère E, Destoumieux D and Bulet P. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture* 191, 71-88. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00419-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00419-1).
- Boulom S, Robertson J, Hamid N, Ma Q and Lu J. 2014. Seasonal changes in lipid, fatty acid, α -tocopherol and phytosterol contents of seaweed, *Undaria pinnatifida*, in the Marlborough Sounds, New Zealand. *Food Chem* 161, 261-269. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.007>.
- Bricknell I and Dalmo RA. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol* 19, 457-472. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.03.008>.
- Campa-Córdova AI, Hernandez-Saavedra NY, De Philippis R and Ascencio F. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish Shellfish Immunol* 12, 353-366. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0377>.
- Chen YY, Chen JC, Lin YC, Putra D, Kitikiew S, Li CC, Hsieh JF, Liou CH and Yeh ST. 2014. Shrimp that have received carrageenan via immersion and diet exhibit immunocompetence in phagocytosis despite a post-plateau in immune parameters. *Fish Shellfish Immunol* 36, 352-366. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.004>.
- Cheng W, Liu CH, Kuo CM and Chen JC. 2005. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol* 18, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.03.002>.
- Damonte EB, Matulewicz MC and Cerezo AS. 2004. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral

- agents. *Curr Med Chem* 11, 2399-2419. <https://doi.org/10.2174/0929867043364504>.
- Ellis AE. 1990. Serum antiprotease in fish. In: *Techniques in Fish Immunology*, (ed. by JS Stolen, TC Fletcher, DP Anderson, WB Roberson and WB Van Muiswinkel), SOS Publication, Fair Haven, CT, U.S.A., 95-99.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2020. Statics for fisheries and aquaculture in the world. Retrieved from <http://www.fao.org/fishery/en> on Oct 19, 2020.
- 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.
- Fu YW, Hou WY, Yeh ST, Li CH and Chen JC. 2007. The Immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol* 22, 673-685. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.08.014>.
- Giriwono PE, Iskandriati D, Tan CP and Andarwulan N. 2019. *Sargassum* seaweed as a source of anti-inflammatory substances and the potential insight of the tropical species: a review. *Mar Drugs* 17, 590. <https://doi.org/10.3390/md17100590>.
- Hernández-López J, Gollas-Galván T and Vargas-Albores F. 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp *Penaeus californiensis* Holmes. *Comp Biochem Physiol 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).
- Huang X, Zhou H and Zhang H. 2006. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol* 20, 750-757. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.09.008>.
- Huynh TG, Yeh ST, Lin YC, Shyu JF, Chen LL and Chen JC. 2011. White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing *Sargassum hemiphyllum* var. *chinese* powder and its extract showed increased immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol* 31, 286-293. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.05.014>.
- Immanuel G, Sivagnanavelmurugan M, Marudhupandi T, Radhakrishnan S and Palavesam A. 2012. The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune

- activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). Fish Shellfish Immunol 32, 551-564.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.01.003>.
- Ji PF, Yao CL and Wang ZY. 2009. Immune response and gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns. Fish Shellfish Immunol 27, 563-570. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.08.001>.
- KOSIS (Korea Statistical Information Service). 2020. Survey on the status of fish culture. Retrieved from
<http://kosis.kr/search/search.do?query=%EC%96%B4%EB%A5%98%EC%96%91%EC%8B%9D>
- Lin YC, Yeh ST, Li CC, Chen LL, Cheng AC and Chen JC. 2011. An immersion of *Gracilaria tenuistipitata* extract improves the immunity and survival of white shrimp *Litopenaeus vannamei* challenged with white spot syndrome virus. Fish Shellfish Immunol 31, 1239-1246.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.07.021>.
- Lv X, Li S, Yu Y, Zhang X and Li F. 2020. Characterization of a gill-abundant crustin with microbiota modulating function in *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol 105, 393-404.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.07.014>.
- Mayer AMS, Rodríguez AD, Tagliatalata-Scafati O and Fusetani N. 2017. Marine pharmacology in 2012-2013: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. Mar Drugs 15, 273.
<https://doi.org/10.3390/md15090273>.
- Milledge JJ, Nielsen BV and Bailey D. 2016. High-value products from macroalgae: the potential uses of the invasive brown seaweed, *Sargassum muticum*. Rev Environ Sci Biotechnol 15, 67-88.
<https://doi.org/10.1007/s11157-015-9381-7>.
- Miyashita K, Mikamia N and Hosokawaa M. 2013. Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids: a review. J Funct Foods 5, 1507-1517. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.09.019>.
- Niu J, Chen X, Lu X, Jiang SG, Lin HZ, Liu YZ, Huang Z, Wang J, Wang Y and Tian LX. 2015.

- Effects of different levels of dietary wakame *Undaria pinnatifida* on growth, immunity and intestinal structure of juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 435, 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.013>.
- Nordberg J and Arner ESJ. 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).
- Paglia DE and Valentine WN. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70, 158-169.
- Pallaoro MF, do Nascimento Viera F and Hayashi L. 2016. *Ulva lactuca* (Chlorophyta Ulvales) as co-feed for Pacific white shrimp. *J Appl Phycol* 28, 3659-3665. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0843-2>.
- Sanjeeva KKA, Kim EA, Son KT and Jeona YJ. 2016. Bioactive properties and potentials cosmeceutical applications of phlorotannins isolated from brown seaweeds: a review. *J Photochem Photobiol B* 162, 100-105. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.06.027>
- Schleder DD, Peruch LGB, Poli MA, Ferreira TH, Silva CP, Andreatta ER, Hayashi L and Nascimento Vieira F. 2018. Effect of brown seaweeds on Pacific white shrimp growth performance, gut morphology, digestive enzymes activity and resistance to white spot virus. *Aquaculture* 495, 359-365. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.020>.
- Schleder DD, Blank M, Peruch LGB, Poli MA, Gonçalves P, Rosa KV, Fracalossi DM, Nascimento Vieira F, Andreatta ER and Hayashi L. 2020. Impact of combinations of brown seaweeds on shrimp gut microbiota and response to thermal shock and white spot disease. *Aquaculture* 519, 734779. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734779>.
- Shao P, Liu J, Chen X, Fang Z and Sun P. 2015a. Structural features and antitumor activity of purified extracted from *Sargassum horneri*. *Int J Biol Macromol* 73, 124-130. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.056>.
- Shao P, Chen X and Sun P. 2015b. 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>.

Shi YZ, Chen JC, Chen YY, Kuo YH and Li HF. 2018. Endogenous molecules released by haemocytes receiving *Sargassum oligocystum* extract lead to downstream activation and synergize innate immunity in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 76, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.02.033>.

Shi YZ, Kitikiew S, Chen YY, Hsu CH and Chen JC. 2020. White shrimp *Litopenaeus vannamei* hemocytes receiving fucoidan release endogenous molecules that activate and synergize innate immunity in the presence of fucoidan. *Aquaculture* 519, 734720. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734720>.

Sirirustananun N, Chen JC, Lin YC, Yeh ST, Liou CH, Chen LL, Sim SS and Chiew SL. 2011. Dietary administration of a *Gracilaria tenuistipitata* extract enhances the immune response and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 31, 848-855. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.07.025>.

Sudaryono A, Sukardi P, Yudiati E, Hardi EH, Hastuti S and Susilowati T. 2018. Potential of using tropical brown macroalgae *Sargassum cristaefolium* meal in the diets for juvenile white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *IOP Conf Ser Earth and Environ Sci* 144, 012049. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/144/1/012049>.

Thanigaivel S, Chandrasekaran N, Mukherjee A and Thomas J. 2016. Seaweeds as an alternative therapeutic source for aquatic disease management. *Aquaculture* 464, 529–536. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.001>.

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).

Visetnan S, Supungul P, Tassanakajon A, Donpuksa S and Rimphanitchayakit V. 2017. A single WAP domain-containing protein from *Litopenaeus vannamei* possesses antiproteinase activity against subtilisin and antimicrobial activity against AHPND-including *Vibrio parahaemolyticus*.

- Fish Shellfish Immunol 68, 341-348. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.07.046>.
- Volpe MG, Varricchio E, Coccia E, Santagata G, Di Stasio M, Malinconico M and Paolucci M. 2012. Manufacturing pellets with different binders: Effect on water stability and feeding response in juvenile *Cherax albidus*. *Aquaculture* 324-325, 104-110. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.029>
- Wang X, Li E, Xu Z, Li T, Xu C and Chen L. 2017. Molecular response of carbohydrate metabolism to dietary carbohydrate and acute low salinity stress in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Turk J Fish Aquat Sci* 17, 153-169. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v17_1_18.
- Yang F, Xie S, Niu J, Liu Y and Tian L. 2017. Effect of dietary macro-algae in diet of juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J Appl Phycol* 30, 1335-1344. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1323-z>.
- Yeh ST, Lee CS and Chen JC. 2006. Administration of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 20, 332-345. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.05.008>.
- Yeh ST and Chen JC. 2008. Immunomodulation by carrageenans in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture* 276, 22-28. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.01.034>.
- Yu YY, Chen WD, Liu YJ, Niu J, Chen M and Tian LX. 2016. Effect of different dietary levels of *Gracilaria lemaneiformis* dry powder on growth performance, hematological parameters and intestinal structure of juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 450, 356-362. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.037>.
- Yudiati E, Isnansetyo A, Murwantoko, Ayuningtyas, Triyanto and Handayani CR. 2016. Innate immune-stimulating and immune genes up-regulating activities of three types of alginate from *Sargassum siliquosum* in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 54, 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.022>.
- 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 34, 1131-1138. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.016>.

감사의 글

석사과정 2년의 기간 동안 도움을 주신 모든 분들께 감사의 인사를 전합니다. 연구실 안팎으로 부족한 제자를 인내심을 가지고 물심양면 지도해주신 이경준 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 항상 저의 연구를 스스로의 일처럼 아낌없이 도와주었던 대현, 종호, 세희와 오늘도 연구실의 보이지 않는 부분에서 부지런히 애쓰고 있는 후배들 한세, 예나누나, 단비, 수혁, 연지 그리고 조연과 격려를 아끼지 않고 술선수범하는 재형이형, 묵묵히 자신의 역할에 최선을 다하는 민기형, 초롱누나, 재범이형, 현운이형 모두에게 감사드립니다.

이번 연구를 가능하게 해 주신 임세진 박사님과 (주)네오엔비즈 그리고 바쁘신 와중에도 심사를 위해 자리를 빛내주신 이봉주 박사님께 깊이 감사드립니다.

항상 같은 자리에서 변함없이 응원해주신 아버지, 어머니 그리고 동생과 전국 각지에서 활약하고 있는 자랑스러운 친구들에게도 감사의 인사를 전합니다. 학위기간 동안 연구와 학업에 큰 도움을 주신 송춘복 교수님, 최광식 교수님, 이제희 교수님, 허문수 교수님, 여인규 교수님, 전유진 교수님, 김기영 교수님, 정석근 교수님, 박상률 교수님, 정준범 교수님, 이승헌 교수님께도 감사드립니다.

마지막으로 여러모로 관심과 도움을 주신 모든 여러분께 더욱 발전하는 모습으로 보답하겠습니다.

2021년 12월 27일

엄건호 올림