



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

사료 내 황토 첨가가  
흰다리새우 (*Litopenaeus vannamei*) 에  
미치는 영향

제주대학교 대학원

해양생명과학과

조 세 희

2022년 2월



사료 내 황토 첨가가  
흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)에  
미치는 영향

지도교수 이 경 준

조 세 희

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2021년 12월

조세희의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장            임 세 진 

위       원            이 경 준 

위       원            송 진 우 

제주대학교 대학원

2021년 12월

# 목차

ABSTRACT .....	iv
LIST OF FIGURE .....	v
LIST OF TABLES .....	vii
I. 서론.....	1
II. 흰다리새우 사료 내 황토의 이용성 평가	
1. 재료 및 방법	
1) 실험사료.....	4
2) 실험새우와 사육관리 .....	7
3) 성장조사와 sampling.....	8
4) 일반성분 분석.....	10
5) 면역 분석.....	10
6) 통계학적 분석.....	12
2. 결과.....	13
III. 흰다리새우 사료 내 황토의 적정 첨가함량에 관한 연구	
1. 재료 및 방법	

1) 실험사료.....	20
2) 실험새우와 사육관리 .....	22
3) 성장조사와 sampling.....	23
4) 일반성분 분석 .....	23
5) 면역 분석 .....	23
6) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> 에 대한 질병저항성 평가: 공격실험 .....	23
7) qPCR에 의한 유전자 발현분석 .....	23
8) 통계학적 분석.....	25
<b>2. 결과 .....</b>	<b>26</b>
<b>IV. 고찰 .....</b>	<b>36</b>
<b>V. 요약문 .....</b>	<b>40</b>
<b>VI. 참고문헌 .....</b>	<b>43</b>
<b>VIII. 감사의 글 .....</b>	<b>54</b>

## ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the supplemental effects of loess on growth performance, innate immunity and disease resistance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Two feeding trials (EXP-1 and EXP-2) were conducted. In EXP-1, four experimental diets were formulated to contain 0.0, 0.5, 1.0 and 2.0% loess (designated as CON, L0.5, L1.0 and L2.0, respectively) and were fed to the shrimp groups in four replicates. After a feeding trial, growth performance, feed utilization and innate immunity were significantly improved in shrimp fed diets containing loess than those of shrimp fed CON (no supplementation). In EXP-2, six experimental diets were formulated to contain 0.0, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4 and 4.8% loess (designated as CON, L0.3, L0.6, L1.2, L2.4 and L4.8, respectively). Quadruplicate groups of shrimp were hand-fed one of the diets four times daily for 57 days. After the second feeding trial, growth performance, feed utilization, phenoloxidase and lysozyme activities of shrimp were significantly increased by dietary loess supplementations compared to those fed CON. After a challenge test with  $1.0 \times 10^9$  CFU ml<sup>-1</sup> *Vibrio parahaemolyticus* solution for 288h, cumulative survival of shrimp were significantly enhanced in shrimp fed L0.3 and L1.2 diets compared to fed CON diets. This study indicates that loess can improve growth performance, feed utilization, innate immunity and disease resistance of *Litopenaeus vannamei* and the optimum supplemental level is suggested as 0.3% in diets for *Litopenaeus vannamei*.

## LIST OF FIGURE

### [EXP-1]

<b>Figure 1.</b> Preparation of the experimental diet.....	5
<b>Figure 2.</b> Experimental rearing tank for Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	8
<b>Figure 3.</b> Measurement of shrimp body weight in every 2 weeks during 42 days feeding trial .....	9
<b>Figure 4.</b> Hemolymph and hepatopancreas collections from the shrimp .....	9
<b>Figure 5.</b> Proximate analysis for experimental diets and whole-body samples.....	10
<b>Figure 6.</b> mRNA extraction and cDNA synthesis for the qPCR analysis.....	12
<b>Figure 7.</b> Growth performance, feed utilization and survival of Pacific white shrimp <i>Li- topenaeus vannamei</i> fed the experimental diets for 42 days.....	15
<b>Figure 8.</b> Phenoloxidase activity (PO) and lysozyme activity of Pacific white shrimp <i>Li- topenaeus vannamei</i> fed the experimental diets for 42 days.....	17
<b>Figure 9.</b> Relative mRNA gene expression of proPO and crustin in hepatopancreas of Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> fed the experimental diets for 42 days.....	19

### [EXP-2]

<b>Figure 1.</b> Experimental rearing tank for Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	23
---	----

<b>Figure 2.</b> <i>V. parahaemolyticus</i> immersion for the challenge test .....	24
<b>Figure 3.</b> DNA extraction for the qPCR analysis .....	25
<b>Figure 4.</b> Growth performance, feed utilization and survival of Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> fed the experimental diets for 57 days .....	28
<b>Figure 5.</b> Phenoloxidase activity (PO) and lysozyme activity of Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> fed the experimental diets for 57 days.....	30
<b>Figure 6.</b> Relative mRNA expression of Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> fed the experimental diets for 57 days. ....	32
<b>Figure 7.</b> Survival of Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> after challenged against <i>Vibrio parahaemolyticus</i> . The shrimp were immersed with <i>V. parahaemolyticus</i> containing $1.01 \times 10^9$ CFU mL <sup>-1</sup> . ....	33

## LIST OF TABLE

### [EXP-1]

<b>Table 1.</b> Loess proximate composition (% dry matter) .....	5
<b>Table 2.</b> Dietary formulation and proximate composition of the basal diet (% dry matter basis) .....	6
<b>Table 3.</b> Growth performance, feed utilization and survival of Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> fed the experimental diets for 42 days .....	14
<b>Table 4.</b> Phenoloxidase activity (PO) and lysozyme activity of Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> fed the experimental diets for 42 days .....	16
<b>Table 5.</b> Relative mRNA gene expression of proPO and crustin in hepatopancreas of Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> fed the experimental diets for 42 days.....	18

### [EXP-2]

<b>Table 1.</b> Dietary formulation and proximate composition of the basal diet (% dry matter basis) .....	21
<b>Table 2.</b> Growth performance, feed utilization and survival of Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> fed the experimental diets for 57 days.....	27
<b>Table 3.</b> Phenoloxidase activity (PO) and lysozyme activity of Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> fed the experimental diets for 57 days.....	29
<b>Table 4.</b> Relative gene expression of Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> fed the experimental diets for 57 days .....	31

<b>Table 5.</b> The threshold cycle (Ct) values of the hepatopancreas of shrimp sampled at 0, 6, 24 and 288 (final) h after the AHPND infection .....	34
<b>Table 6.</b> Whole-body composition of Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> fed the experimental diets for 56 days .....	35

## I. 서론

세계 양식사료 생산량이 증가함에 따라 천연유래물질(Bricknell and Dalmo, 2005), yeast products (Tacon, 2012), probiotics (Wang, 2006; 2007), 점토광물(Ghasemi et al., 2018) 등의 사료첨가제에 대한 연구가 진행되고있다(Encarnaçao, 2016). 점토광물에는 kolin, silicate, zeolite, bentonite를 포함해서 전 세계적으로 40여종이 존재한다. Zeolite는 농수산업에서 첨가제로 널리 활용되고 있으며, 사료에 첨가했을 경우, 어류의 성장과 사료 효율이 증가된다고 보고되었다(Papaioannou et al., 2005). 송어(*Oncorhynchus masou*)에서는 성장뿐만 아니라 체조직의 단백질 함량도 증가시킨다고 보고되었다(Eya et al., 2008). 점토광물은 가축용 사료(Indresh et al., 2013; Carraro et al., 2014)에서 뿐만 아니라 양식사료에서도 장 내 유해세균의 증식을 억제하고 영양소 소화율을 향상시킨다고 보고되었다. 또한 사육수에 점토광물을 첨가하였을 때, 내성독소(endotoxin)을 지니고 있는 *Prymnesium parvum*의 독소 제거 효과가 있다고 보고되었습니다(Jung et al., 2016).

황토는 점토광물의 한 종류로 zeolite와 화학적 조성이 비슷하며 SiO<sub>2</sub> 49.8%, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 27.5%, FeO<sub>3</sub> 8.33% 로 구성되어있다(Kang et al., 2000a; 2000b). Lee et al. (2016)은 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*) 사료 내 항생제 대체제로서 황토를 사용했을 때, 성장 증가, 항산화 면역 기능 개선과 *Aeromonas salmonicida*의 질병저항성을 향상시키는 것으로 보고되었다. 가축사료용으로서 황토의 사용은 일반적으로 미량 미세알의 형태로 이용되고 있으며 육계의 성장과 사료 효율 개선시킨다고 보고되

었다(Park et al., 2010). 또한 소와 돼지에 사료 내 황토와 광물질을 혼합하여 첨가할 경우, 성장 증가, 장 내 암모니아 형성 억제 및 면역력 향상과 같은 긍정적인 영향을 준다고 보고되었다(Kim et al., 2000; Kang et al., 2002). 황토는 잔류성 유기오염 물질(persistent organic pollutants)을 제거하여 수질정화에 긍정적인 영향을 미친다고 보고되었다(Undabeytia et al., 2008). 그러나 양식사료 내 황토의 사용에 대한 연구는 일부 보고되었을 뿐, 흰다리새우에서 선행된 연구는 알려진 바 없다. 따라서 황토에 대한 과학적 규명과 흰다리새우 사료 내 황토의 이용성 평가 연구가 필요하다.

우리나라의 새우양식은 축제식 양식장에서 준집약적으로 이루어지고 있지만 이는 외부로부터 유입되는 병원체의 감염 가능성이 높으며 급격한 수질 변화로 인해 새우의 생리적 변화에 악영향을 끼칠 수 있다. 이를 해결하기 위해 바이오플락, 사육수 비교환 양식 또는 저교환 양식의 실내 양식기술 등 새로운 양식기술이 개발되고있다(Browdy et al., 2001; Samocha et al., 2002). 사육수의 비교환 혹은 저교환 방식은 병원체의 유입과 환경오염의 문제를 해결하는 근본적인 방법이지만, 사육수 내의 영양염, 특히 질소노폐물을 축적하기 때문에 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 그렇기 때문에 사육수 내 수질정화물질을 첨가하면 부정적인 영향을 해결할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 새로운 양식기술은 high density polyethylene 또는 콘크리트 수조를 기본으로 사용되므로 축제식 양식 방법으로 생산되는 흰다리새우의 서식 환경과는 다르다. 그러므로 실내 양식 수조에서 새우를 사육하였을 때에 대한 황토의 필요성 연구가 필요하다.

흰다리새우는 환경요소에 대한 저항성이 높으며(Ponce-palafox et al., 1997; Davis et al., 2004), 성장이 빠르기 때문에 고부가가치 양식새우 종으로 각광 받고 있다.

흰다리새우는 지난 10년동안 생산량이 약 2배 증가하여 총 갑각류 생산량에 53%를 차지했다(FAO, 2020). KOSIS (2021)에서 보고된 국내 흰다리새우 생산량은 2018년에는 5,492톤, 2019년에는 7,542톤 그리고 2020년에는 8,124 톤이다. 하지만 새우 양식은 지수식으로 이루어져 배설물이나 찌꺼기로 인해 사육수가 오염되며, 외부로부터 사육수가 유입되어 질병에 대한 노출 위험성이 높다. 또한 급성간췌장괴사병(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND) 또는 조기폐사증후군(early mortality syndrome, EMS)과 흰반점바이러스(white spot syndrome virus, WSSV)등은 새우 양식산업에 막대한 경제적 손실을 끼치고 있다. 조기폐사증후군은 *Vibrio parahaemolyticus*에 의해 발병되며, 흰다리새우의 간췌장을 손상시켜 감염 후 30이내에 조기 폐사를 유발하여, 치사율이 100%에 달하는 질병으로 막대한 피해를 입히고 있다(Flegel, 2012; De et al., 2014). 따라서 흰다리새우의 지속적인 양식을 위해 성장, 면역력 및 질병저항성에 대한 전문적인 양식기술 개발과 추가적인 연구가 필요하다. 새우사료 내 황토 첨가제 사용에 관한 연구는 진행된 바 없으며 본 연구는 사료 내 황토를 첨가하여 흰다리새우의 성장, 면역력 및 질병저항성에 미치는 영향을 조사하였다.

## II. 흰다리새우 사료 내 황토의 이용성 평가

### 1. 재료 및 방법

#### 1) 실험사료

실험에 사용된 분말형태의 황토(loess)는 전라북도 고창에서 구입하여 사용하였다. 황토의 일반성분 분석 결과는 Table 1 에 나타내었다. 실험사료는 흰다리새우의 영양소 요구량을 충족시키도록 조성하였고, 주요 단백질원으로 어분(20%), 대두박(34%), 오징어간분(5%)을 사용하였다. 대조구(control, CON)을 제외한 실험사료는 총 3 종류로 사료에 황토를 각각 0.5, 1.0, 2.0% 첨가하였다(L0.5, L1.0, L2.0) (Table 2). 실험사료의 제조는 모든 사료원을 사료조성표에 따라 측량한 후 혼합하였다. 사료원 총 중량의 8%에 해당하는 증류수를 첨가하였고 사료성형기(SP-50, KumKang ENG, Daegu, Korea)를 사용하여 2mm 크기의 펠렛사료를 제작하였다(Figure 1). 제작된 실험사료는 건조(12h, 25°C)하여 실험기간동안 냉장보관(3°C)하였다.

Table 1. Loess proximate composition (% dry matter).

Composition (%)	Loess
Mositure	0.83
Protein	0.56
Lipid	0.53
Ash	94.7



Figure 1. Preparation of the experimental diet

Table 2. Dietary formulation and proximate composition of the basal diet (% dry matter basis).

Ingredients	Experimental diets			
	CON	L0.5	L1.0	L2.0
Fish meal (sardine)	10.0	10.0	10.0	10.0
Fish meal (tuna)	10.0	10.0	10.0	10.0
Soybean meal	34.0	34.0	34.0	34.0
Squid liver powder	5.00	5.00	5.00	5.00
Wheat flour	21.8	21.3	20.8	19.8
Loess	0.00	0.50	1.00	2.00
Starch	8.00	8.00	8.00	8.00
Cod liver oil	3.00	3.00	3.00	3.00
Mineral premix <sup>1</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00
Vitamin premix <sup>2</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00
Cholie chloride	1.00	1.00	1.00	1.00
Lecithin	1.00	1.00	1.00	1.00
Cholesterol	0.20	0.20	0.20	0.20
Mono-calcium phosphate	3.00	3.00	3.00	3.00
<i>Proximate composition (% dry matter)</i>				
Crude protein	39.4	38.9	38.9	39.4
Crude lipid	9.07	8.53	8.27	8.54
Crude ash	10.9	11.1	11.8	12.6

<sup>1</sup>Mineral premix contains (g/kg): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 80; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 370; KCl, 130; Ferric citrate, 40; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 20 Ca-lactate, 356.5; CuCl, 0.2; AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.15; Na<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0.01; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.

<sup>2</sup>Vitamin premix contains (g/kg): L-ascorbic acid, 121.2; DL- $\alpha$  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-amino benzoic acid, 18.2; menadione, 1.8; retinyl acetate, 0.73; cholecalciferol, 0.003; cyanocobalamin, 0.003.

## 2) 실험새우와 사육관리

실험새우는 흰다리새우로 제주특별자치도 서귀포시 소재의 탐라새우에서 구입하였다. 실험새우는 예비사육기간동안 상업사료(CJ Cheiljedang, Seoul, Korea)를 공급하여 실험환경에 적응할 수 있도록 순치시켰다. 흰다리새우(초기평균무게:  $0.34 \pm 0.00$  g)는 총 15 개의 acryl 96-L 수조에 각 15 마리씩 무작위로 배치하여 42 일간 사육하였다(Figure 2). 사료공급은 1 일 5 회(08:30, 11:00, 13:30, 16:00, 18:30 h)로 나누어 새우 체중의 8-12%로 제한공급하였다. 모든 사육수조에 충분한 용존산소를 유지하기위해 aeration 를 설치하였고, 사육실험기간동안 사육수온은 자동수중온도조절기에 의해 유지되었다. 사육실험기간동안 각 수조의 수온은 매일 측정하였으며, 5 일에 한 번씩 수질분석을 진행하였다. 평균수온은  $28.0 \pm 2.40^\circ\text{C}$ , 용존산소량은  $5.53 \pm 1.32$  ppm, pH 는  $7.47 \pm 0.61$ , 염분은  $30.0 \pm 3.00$  psu, 암모니아는  $0.04 \pm 0.02$  ppm 으로 나타났다. 용존산소량은 Pro20 Dissolved Oxygen Instrument (YSI, Yellow Springs, OH, USA), pH 는 Seven Compact (METTLER TOLEDO, Columbus, OH, USA)기기를 사용하여 측정하였다. 염분은 Master Refractometer-S28M (ATAGO, Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였으며, 암모니아는 Verdouw et al. (1978)의 방법에 따라 분석하였다. 광주기는 형광등을 이용하여 조절(12 light: 12 dark)하였다. 사육수조의 환수는 실험사료의 공급량에 따라 2-3 일에 한 번(80%)씩 진행되었다.

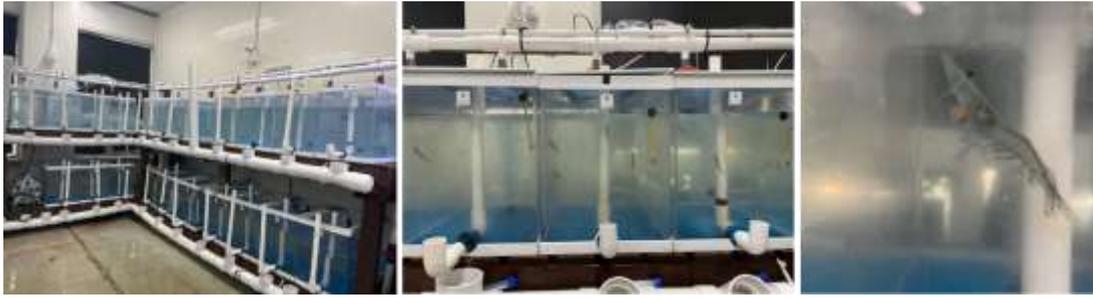


Figure 2. Experimental rearing tank for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*

### 3) 성장조사와 sampling

사육실험 종료 후, 실험새우의 최종무게(final body weight, FBW), 증체율(weight gain, WG), 일간성장률(specific growth ratio, SGR), 사료 계수(feed conversion rate, FCR), 생존율(survival)을 조사하였다(Figure 3). 각 수조 당 3 마리의 실험새우를 sampling 하였으며 얼음물에 의해 마취되었다(Figure 4). 실험새우의 hemolymph 채취는 hemolymph 응고를 방지하기 위해서 ALSEVER'S 용액(Sigma, St. Louis, MO, USA)이 처리된 주사기(25G)를 사용하였으며 원심분리(800g, 15min)하여 hemocyte 를 분리하였다. 채취된 hemolymph 는 phenoloxidase activity (PO)와 lysozyme activity 에 사용되었다. 간체장은 세포의 파괴를 방지하기 위해 액체질소로 급속냉동하였다. 간체장은 prophenoloxidase (proPO)와 crustin 의 유전자 발현 분석에 사용되었다. 모든 sample 은 분석 전까지 초저온 냉동고(-80°C)에서 보관되었다. 실험새우의 성장률과 사료효율 관련 조사항목과 계산식은 다음과 같다.

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

사료효율(feed conversion ratio, FCR) =  $\text{dry feed fed} / \text{wet weight gain}$

단백질이용효율(protein efficiency ratio, PER) =  $\text{wet weight gain} / \text{total protein given}$

일간성장률(specific growth rate, SGR, %) =  $[(\log_e \text{ final body weight} - \log_e \text{ initial body weight})/\text{days}] \times 100$



Figure 3. Measurement of shrimp body weight in every 2 weeks during 42 days feeding trial

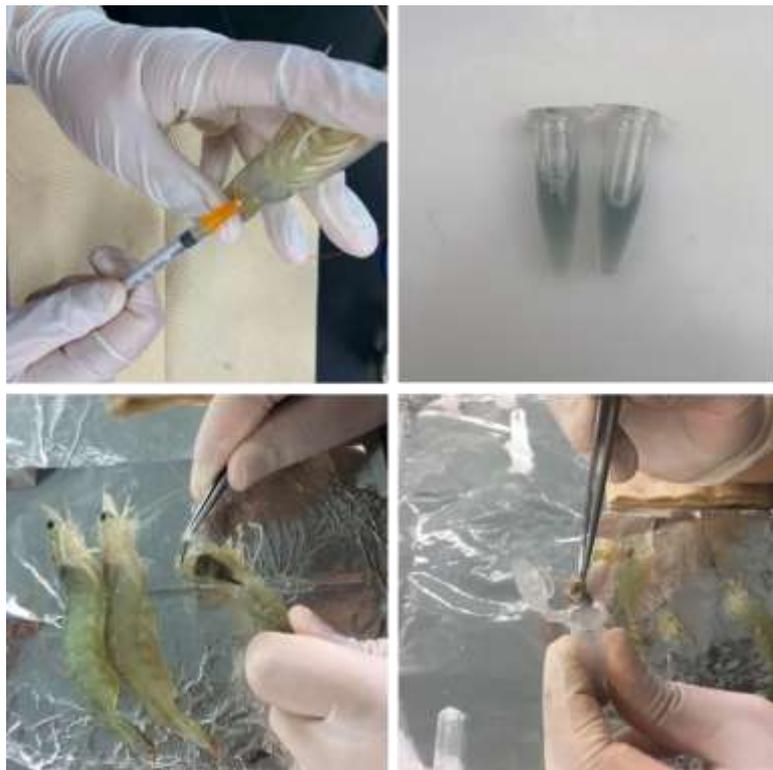


Figure 4. Hemolymph and hepatopancreas collections from the shrimp

#### 4) 일반성분분석

사료원, 실험사료에 대한 일반성분분석은 AOAC (1995) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125°C, 3 h), 조회분은 직접회화로법(550°C, 6 h), 조단백질은 자동 조단백분석기(Kejlttec system 2300, Foss, Hillerød, Denmark)로 분석하였으며, 지방은 Folch et al. (1957)의 방법으로 분석하였다(Figure 5).



Figure 5. Proximate analysis for experimental diets and whole-body samples

#### 5) 면역분석

##### (1) Hemolymph 를 이용한 분석

① PO activity 은 Hernandez-Lopez et al. (1996)의 방법으로 분석하였다. 96-well plate 에 hemolymph 와 trypsin 을 각각 50 $\mu$ l 씩 첨가하고 10 분간 반응 후 L-DOPA 를 50 $\mu$ l 씩 넣어준다. 10 분간 반응 후, microplate reader 를 이용하여 492 nm 에서 흡광도를 측정한다.

② Lysozyme activity 는 Paglia and Valentine (1967)의 방법으로 분석하였다. *Micrococcus lysodeikticus* (0.75 mg/ml)를 phosphate buffer (pH 6.4)에 현탁하고 96-well plate 에 균 200  $\mu$ l 와 hemolymph 20  $\mu$ l 를 각각 첨가한다. Microplate reader 를 이용하여 570 nm 에서 0, 30, 60 분 후에 각각 흡광도를 측정한다.

##### (2) 간체장을 이용한 분석

① RNA 추출과 cDNA 합성

액체질소로 인해 급속냉동된 간체장을 균질화하고 TRI-zol<sup>®</sup> (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 RNA 를 추출하였다. RNA purity ( $OD_{260}/OD_{280}$ )는  $\mu$ Drop-TMplate (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA)를 이용하여 측정하였다. cDNA 는 분리한 RNA 2.5 $\mu$ g 과 reaction mixture 를 총 볼륨 20 $\mu$ L 로 맞추어 Prime-Script<sup>™</sup> first-strand cDNA synthesis kit (TaKaRa, Shiga, Japan)를 이용하여 대량 증폭시키고 합성되었다.

② Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) 에 의한 유전자 발현 분석

Reference gene 으로는  $\beta$ -actin 을 사용하였고 forward (5'-CGCGAC-CTCACAGACTACCT -3') & reverse (5'-GTGGTCATCTCCTGCTCGAA-3')의 oligonucleotide primer 를 사용하였다. proPO 의 oligonucleotide primer 는 forward (5'-TCCATTCCGTCCGTCTG-3') & reverse (5'-GGCTTCGCTCTGGTTAGG-3'), crustin 의 oligonucleotide primer 의 forward (5'-GAGGGTCAAGCCTACTGCTG-3') & reverse (5'-ACTTATCGAGGCCAGCACAC-3)를 사용하였다. qPCR 은 Real Time System TP 950 Thermal Cycler Dice<sup>™</sup> (TaKaRa)를 사용하였다. qPCR 은 Real Time System TP 950 Thermal Cycler Dice<sup>™</sup> (TaKaRa)를 사용하였고, 샘플 당 cDNA 2 $\mu$ L, TaqTMSYBR premix 12.5 $\mu$ L, forward & reverse primer 각각 0.5 $\mu$ L, DEPC water 9.5 $\mu$ L 를 넣어(total volume: 25 $\mu$ L) 분석을 진행하였다(Figure 6).

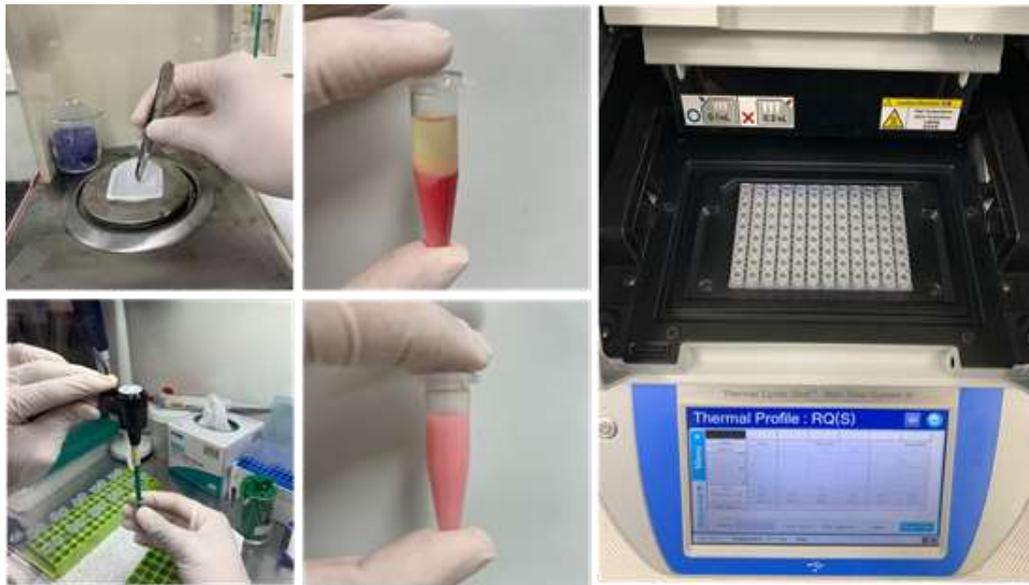


Figure 6. mRNA extraction and cDNA synthesis for the qPCR analysis

#### 6) 통계학적 분석

실험 수조 내 실험사료의 배치는 완전임의배치법(Randomized complete block design)을 실시하였고, 성장 및 분석결과는 SPSS (Version 18.0;SPSS, Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석되었다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's test ( $P < 0.05$ )로 비교하였다. 데이터는 평균값  $\pm$  표준편차(mean  $\pm$  SD)로 나타내었다. 백분율 데이터는 arcsine 변형값으로 계산하여 통계 분석하였다.

## 2. 결과

성장률(FBW, WG, SGR)은 황토 첨가구가 CON구에 비해 유의적으로 높았다 ( $P>0.05$ ) (Table 3, Figure 7). 단백질전환효율(PER)은 L1.0구가 CON구에 비해 유의적으로 높았다( $P>0.05$ ). 사료계수(FCR)는 실험구간의 유의적인 차이는 없었으나 첨가 함량이 증가할수록 낮아지는 경향을 보였으며, 고농도로 첨가하면 증가하는 경향을 보였다. 생존율(91.1-95.6%)은 CON구와 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다.

Hemolymph 내 PO 활성은 L1.0 실험구가 다른 실험구에 비해 유의적으로 높았다( $P>0.05$ ) (Table 4, Figure 8). Lysozyme 활성은 CON구와 실험구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았지만 수치상으로 모든 실험구가 CON구보다 높았다(Table 4). 간체장 내 proPO와 crustin의 상대 발현량은 Table 5와 Figure 9에 나타내었다. proPO의 발현량은 L2.0구가 CON구와 다른 실험구에 비해 유의적으로 높았다 ( $P>0.05$ ). Crustin의 발현량은 L1.0구와 L2.0구가 CON 구에 비해 유의적으로 높게 나타났었다( $P>0.05$ ).

Table 3. Growth performance, feed utilization and survival of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets for 42 days.

Diets	FBW <sup>1</sup>	WG <sup>2</sup>	SGR <sup>3</sup>	FCR <sup>4</sup>	PER <sup>5</sup>	Survival (%)
CON.	5.05±0.16 <sup>b</sup>	1386±51.9 <sup>b</sup>	6.42±0.08 <sup>b</sup>	1.26±0.04	2.02±0.06 <sup>b</sup>	95.6±3.85
L0.5	5.81±0.13 <sup>a</sup>	1609±36.8 <sup>a</sup>	6.76±0.05 <sup>a</sup>	1.18±0.04	2.19±0.07 <sup>ab</sup>	93.3±6.67
L1.0	5.86±0.28 <sup>a</sup>	1617±81.5 <sup>a</sup>	6.77±0.11 <sup>a</sup>	1.16±0.07	2.23±0.13 <sup>a</sup>	91.1±7.70
L2.0	5.82±0.44 <sup>a</sup>	1613±128 <sup>a</sup>	6.76±0.18 <sup>a</sup>	1.21±0.05	2.19±0.00 <sup>ab</sup>	93.3±9.43

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

<sup>1</sup>FBW, final body weight (g)

<sup>2</sup>WG, weight gain (%) = [(final body weight - initial body weight) / initial body weight] x 100

<sup>3</sup>SGR, specific growth rate (%) = [(log<sub>e</sub> final body weight - log<sub>e</sub> initial body weight) / days] x 100

<sup>4</sup>FCR, feed conversion ratio = dry feed fed/wet weight gain

<sup>5</sup>PER, protein efficiency ratio = wet weight gain/ total protein given.

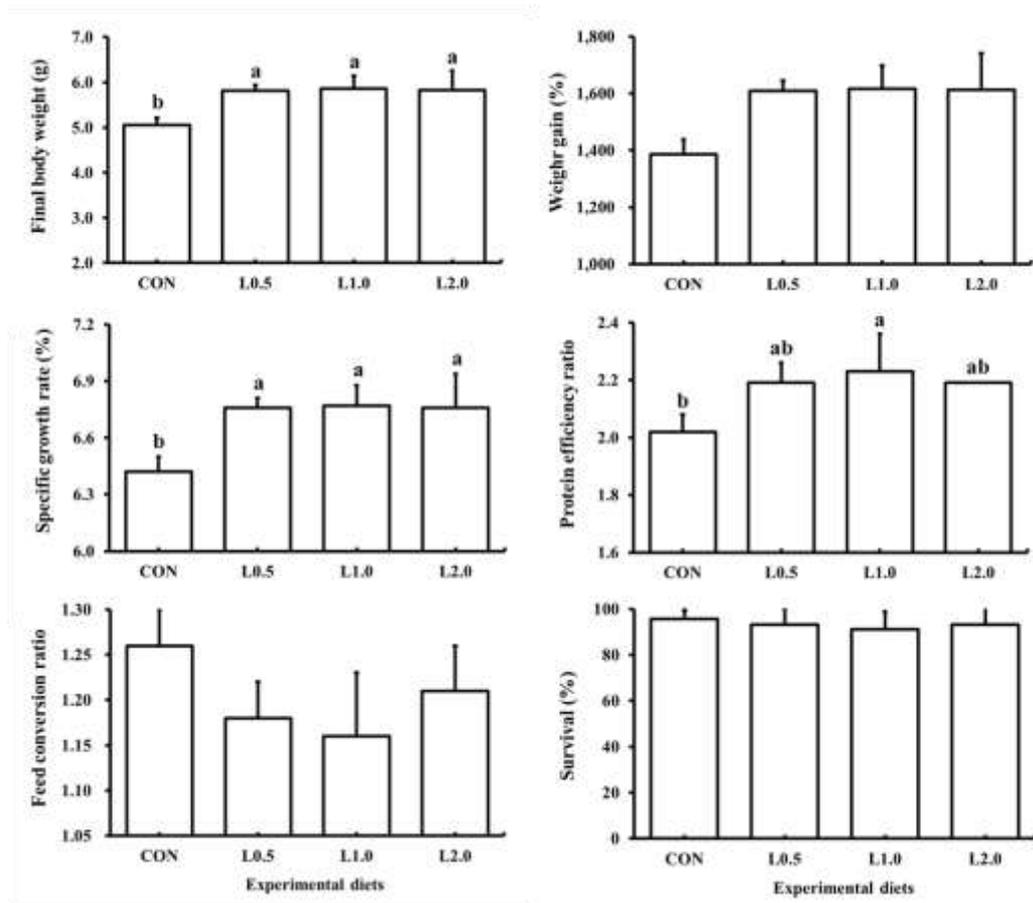


Figure 7. Growth performance, feed utilization and survival of Pacific white shrimp *Li-topenaeus vannamei* fed the experimental diets for 42 days.

Table 4. Phenoloxidase activity (PO) and lysozyme activity of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets for 42 days.

Diets	PO <sup>1</sup>	Lysozyme <sup>2</sup>
CON	0.16±0.02 <sup>bc</sup>	4.18±0.35
L0.5	0.19±0.01 <sup>b</sup>	4.41±0.08
L1.0	0.27±0.01 <sup>a</sup>	4.35±0.49
L2.0	0.16±0.00 <sup>c</sup>	4.51±0.64

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

<sup>1</sup>Phenoloxidase activity (absorbance)

<sup>2</sup>Lysozyme activity (µg mL<sup>-1</sup>)

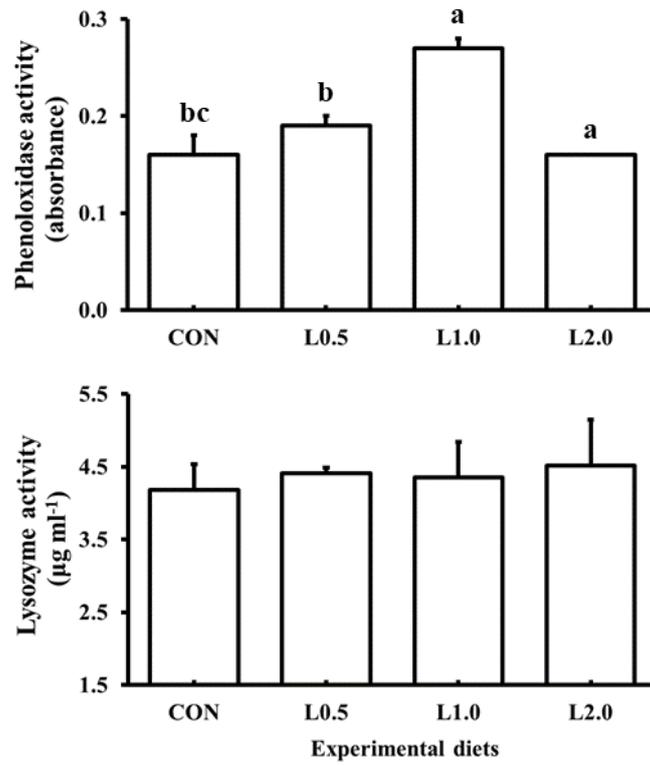


Figure 8. Phenoloxidase activity (PO) and lysozyme activity of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets for 42 days.

Table 5. Relative mRNA gene expression of proPO and crustin in hepatopancreas of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets for 42 days.

Diets	proPO <sup>1</sup>	Crustin <sup>2</sup>
CON	1.00±0.23 <sup>b</sup>	1.00±0.18 <sup>b</sup>
L0.5	1.47±0.20 <sup>b</sup>	1.77±0.25 <sup>ab</sup>
L1.0	1.44±0.43 <sup>b</sup>	2.27±0.54 <sup>a</sup>
L2.0	2.54±0.26 <sup>a</sup>	2.23±0.25 <sup>a</sup>

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

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

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

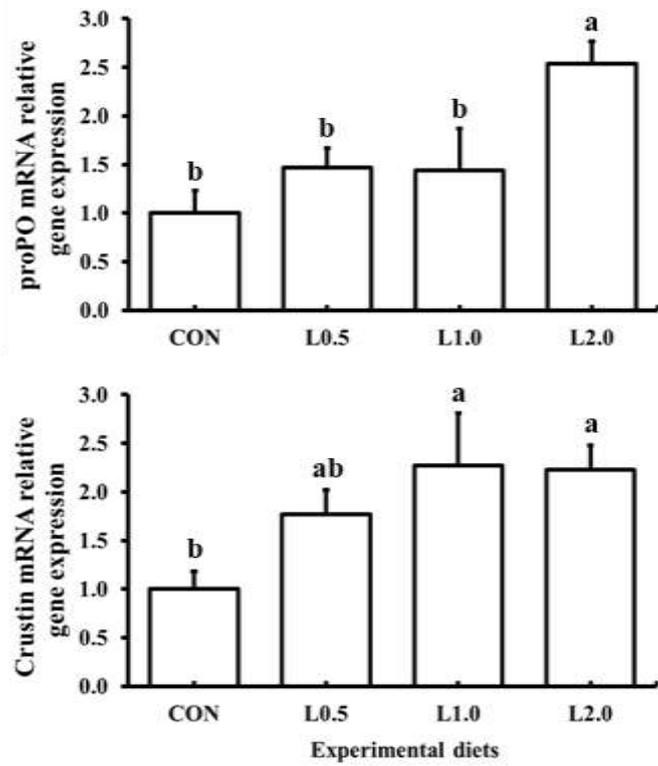


Figure 9. Relative mRNA gene expression of proPO and crustin in hepatopancreas of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets for 42 days.

### Ⅲ. 흰다리새우 사료 내 황토의 적정 첨가함량에 관한 연구

#### 1. 재료 및 방법

##### 1) 실험사료

실험 1 과 동일한 황토 원료와 사료원을 사용하여 실험사료를 제작하였다. 또한 사료조성표도 동일하며 황토의 첨가 비율만 달리하여 실험사료를 제작하였다(Table 1). 주단백질원으로 대두박(34%), 어분(20%), 오징어간분(5%)을 사용하였다. 대조구(control, CON)을 제외한 실험사료는 총 5 종류로 사료에 황토를 각각 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8% 첨가하였다(L0.3, L0.6, L1.2, L2.4, L4.8). 실험사료의 제조는 모든 사료원을 사료조성표에 따라 측량한 후 혼합하였다. 사료원 총 중량의 8%에 해당하는 증류수를 첨가하였고 사료성형기(SP-50, KumKang ENG, Daegu, Korea)를 사용하여 2mm 크기의 펠렛사료를 제작하였다. 제작된 실험사료는 건조(12h, 25°C)하여 실험기간동안 냉장보관(3°C)하였다.

Table 1. Dietary formulation and proximate composition of the basal diet (% dry matter basis).

Ingredients	Experimental diets					
	CON	L0.3	L0.6	L1.2	L2.4	L4.8
Fish meal (sardine)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Fish meal (tuna)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Soybean meal	34.0	34.0	34.0	34.0	34.0	34.0
Squid liver powder	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Wheat flour	21.8	21.5	21.2	20.6	19.4	17.0
Starch	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Cod liver oil	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Mineral premix <sup>1</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Vitamin premix <sup>2</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cholie chloride	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Lecithin	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cholesterol	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Mono-calcium phosphate	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Loess	0.00	0.30	0.60	1.20	2.40	4.80
<i>Proximate composition (% dry matter)</i>						
Crude protein	38.4	37.9	37.7	37.6	37.6	36.9
Crude lipid	9.07	8.73	8.90	8.44	8.84	8.81
Crude ash	10.9	11.0	11.2	11.8	13.1	15.2

<sup>1</sup>Mineral premix contains (g/kg): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 80; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 370; KCl, 130; Ferric citrate, 40; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 20 Ca-lactate, 356.5; CuCl, 0.2; AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.15; Na<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0.01; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O.

<sup>2</sup>Vitamin premix contains (g/kg): L-ascorbic acid, 121.2; DL- $\alpha$  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-amino benzoic acid, 18.2; menadione, 1.8; retinyl acetate, 0.73; cholecalciferol, 0.003; cyanocobalamin, 0.003. 7Lysoforte<sup>TM</sup> Dry, Kemin Korea Co. Ltd., Korea.

## 2) 실험새우와 사육관리

실험새우(초기평균무게: 0.48 g)는 총 24 개(4 반복구)의 acryl 110-L 수조에 각 20 마리씩 무작위로 배치하여 57 일간 사육하였다(Figure 1). 사료공급은 1 일 5 회(08:30, 11:00, 13:30, 16:00, 18:30 h)로 나누어 새우 체중의 8-12%로 제한공급하였다. 모든 사육수조에 충분한 용존산소를 유지하기 위해 aeration 를 설치하였고, 사육실험기간동안 사육수온은 자동수중온도조절기에 의해 유지되었다. 사육실험기간동안 각 수조의 수온은 매일 측정하였으며, 5 일에 한 번씩 수질분석을 진행하였다. 평균수온은  $29.4 \pm 1.50^{\circ}\text{C}$ , 용존산소량은  $6.01 \pm 1.03$  ppm, pH 는  $7.17 \pm 0.35$ , 염분은  $31.1 \pm 2.00$  psu, 암모니아는  $0.024 \pm 0.02$  ppm 으로 나타났다. 용존산소량은 Pro 20 Dissolved Oxygen Instrument (YSI, Yellow Springs , OH, USA), pH 는 Seven Compact (METTLER TOLEDO, Columbus, OH, USA)기기를 사용하여 측정하였다. 염분은 Master Refractometer-S28M (ATAGO, Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였으며, 암모니아는 Verdouw et al. (1978)의 방법에 따라 분석하였다. 광주기는 형광등을 이용하여 조절(12 light: 12 dark)하였다. 사육수는 실험사료의 공급량과 수질을 고려하여 2-3 일에 한 번(80%)씩 진행되었다.



Figure 1. Experimental rearing tank for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*

### 3) 성장조사와 sampling

실험-1 과 동일하게 진행되었다.

### 4) 일반성분분석

실험-1 과 동일하게 진행되었다.

### 5) 면역분석

실험-1 과 동일하게 진행되었다.

### 6) *Vibrio parahaemolyticus* 에 대한 질병저항성 평가

#### (1) 공격실험

사육실험 종료 후, 급성간췌장괴사병(acute hepatopancreatic necrosis disease)의 원인균인 *V. parahaemolyticus*에 대한 질병저항성 평가를 실시하였다. *V. parahaemolyticus*는 2013년도 베트남 새우양식장의 새우에서 분리된 균을 사용하였다(Han et al., 2015). *V. parahaemolyticus*는 Tryptic soy broth (TSB<sup>+</sup>)에서 16시간 배양하였다(30°C, 200rpm) (Figure 2). 실험새우(초기평균무게: 8.15 g)는 총 18개의 acryl 120-L 수조(working volume:80ml)에 각 13 마리씩 (3 반복) 무작위로 배치하였다. 공격실험동안의 사료공급은 1일 3회(08:30, 13:30, 18:30 h)로 나누어 새우 체중의 8-12%로 제한공급하였다. 모든 사육수조에 충분한 용존산소를 유지하기 위해 aeration를 설치하였고, 사육실험기간동안 사육수온은 자동수중온도조절기에 의해 유지되었다. 배양된 균( $1.01 \times 10^9$  CFU/ml)은 각 수조에 30ml씩 침지하였다. Positive control은 TSB<sup>+</sup> 30ml 침지하였다. 침지 후, 1시간마다 새우의 폐사와 유영 상태를 확인하였으며, 공격실험은 288시간동안 진행되었다.



Figure 2. *V. parahaemolyticus* immersion for the challenge test

## (2) Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)에 의한 독소 발현량 분석

EMS toxin 분석을 위한 간체장 적출 개체는 공격실험 감염 전(0h), 감염(6h&24h), 종료시점(288h)의 폐사 새우에서 간체장을 분리 후 DNA 를 추출하였다(DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Hidden, Germany) (Figure 3). 사용된 primer 는 VpPirA-F (5'-TTG GAC TGT CGA ACC AAA CG-3'), VpPirA-R (5'-GCACCCATTGGTATTGAATG-3')이다. qPCR 분석은 TaqMan Probe (5'-FAM-AGA-CAGCAAACA TACACCTATCATCCCGGA-TAMRA-3')를 사용하여 95°C 20 초 1 cycle, 95°C 1 초, 60°C 20 초를 40cycle 로 반응하였고, Real Time System TP 950 Thermal Cycler Dice™ (TaKaRa) 기기로 분석하였다.

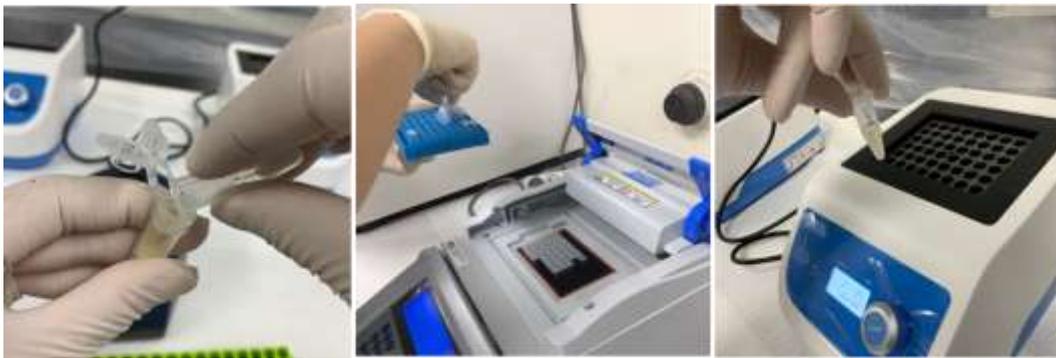


Figure 3. DNA extraction for the qPCR analysis

#### 8) 통계학적 분석

실험 수조 내 실험사료의 배치는 완전임의배치법(Randomized complete block design)을 실시하였고, 성장 및 분석결과는 SPSS (Version 18.0;SPSS, Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA 로 통계 분석되었다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's test (P<0.05)로 비교하였다. 데이터는 평균값 ± 표준편차(mean ± SD)로 나타내었다. 백분율 데이터는 arcsine 변형값으로 계산하여 통계 분석하였다.

## 2. 결과

실험 2 의 성장률(FBW, WG)은 L0.3 구가 CON 구, L2.4 구, L4.8 구에 비해 유의적으로 높았다( $P>0.05$ ) (Table 2, Figure 4). 단백질전환효율과 생존율은 CON 구와 실험구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다. Hemolymph 내 PO 활성은 L0.3 구가 L2.4 구를 제외한 loess 첨가구와 CON 구에 비해 유의적으로 높게 나타났다( $P>0.05$ ) (Table 3, Figure 5). Lysozyme 활성은 L0.6 구와 L1.2 구가 CON 구에 비해 유의적으로 높았다. proPO 발현량은 L0.3 구가 L0.6 구를 제외한 실험구와 CON 구에 비해 유의적으로 높았다( $P>0.05$ ) (Table 4, Figure 6). L0.3 구와 L0.6 구는 CON 구, L2.4 구와 L4.8 구에 비해 crustin 발현량이 유의적으로 높게 나타났다. *V. parahaemolyticus* 에 대한 새우의 생존율은 L0.3 구와 L1.2 구가 CON 구에 비해 높은 경향을 보였다(Figure 7). 그러나 간체장 내 EMS 독소 유전자의 DNA 발현량은 대조구와 모든 실험구에서 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 5). 전하체의 일반성분분석 결과, 조단백질은 모든 실험구간에 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 조지질은 모든 실험구가 CON 에 비해 유의적인 차이를 보였다( $P>0.05$ ). 조회분은 L1.2 구, L2.4 구를 제외한 모든 실험구가 CON 구에 비해 유의적인 차이를 보였다( $P>0.05$ ) (Table 6).

Table 2. Growth performance, feed utilization and survival of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets for 57 days.

Diets	FBW <sup>1</sup>	WG <sup>2</sup>	SGR <sup>3</sup>	FCR <sup>4</sup>	PER <sup>5</sup>	Survival (%)
CON	8.00±0.20 <sup>b</sup>	1567±41 <sup>b</sup>	4.93±0.04	1.17±0.06	2.24±0.11	97.5±6.45
L0.3	8.54±0.29 <sup>a</sup>	1682±59 <sup>a</sup>	5.05±0.06	1.14±0.08	2.33±0.16	95.0±7.07
L0.6	8.21±0.40 <sup>ab</sup>	1612±86 <sup>ab</sup>	4.98±0.09	1.16±0.09	2.29±0.18	97.5±2.89
L1.2	8.28±0.39 <sup>ab</sup>	1632.6±98 <sup>ab</sup>	4.99±0.08	1.15±0.06	2.31±0.11	96.3±4.79
L2.4	7.85±0.14 <sup>b</sup>	1535±28 <sup>b</sup>	4.90±0.03	1.19±0.03	2.25±0.07	98.8±2.50
L4.8	8.06±0.14 <sup>b</sup>	1578±21 <sup>b</sup>	4.95±0.03	1.19±0.09	2.22±0.17	95.0±4.08

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

<sup>1</sup>Final body weight (g).

<sup>2</sup>Weight gain (%) = [(final body weight - initial body weight)/ initial body weight] x 100.

<sup>3</sup>Specific growth rate (%) = [(log<sub>e</sub> final body weight - log<sub>e</sub> initial body weight)/days] x 100.

<sup>4</sup>Feed conversion ratio = dry feed fed/wet weight gain.

<sup>5</sup>Protein efficiency ratio = wet weight gain/ total protein given.

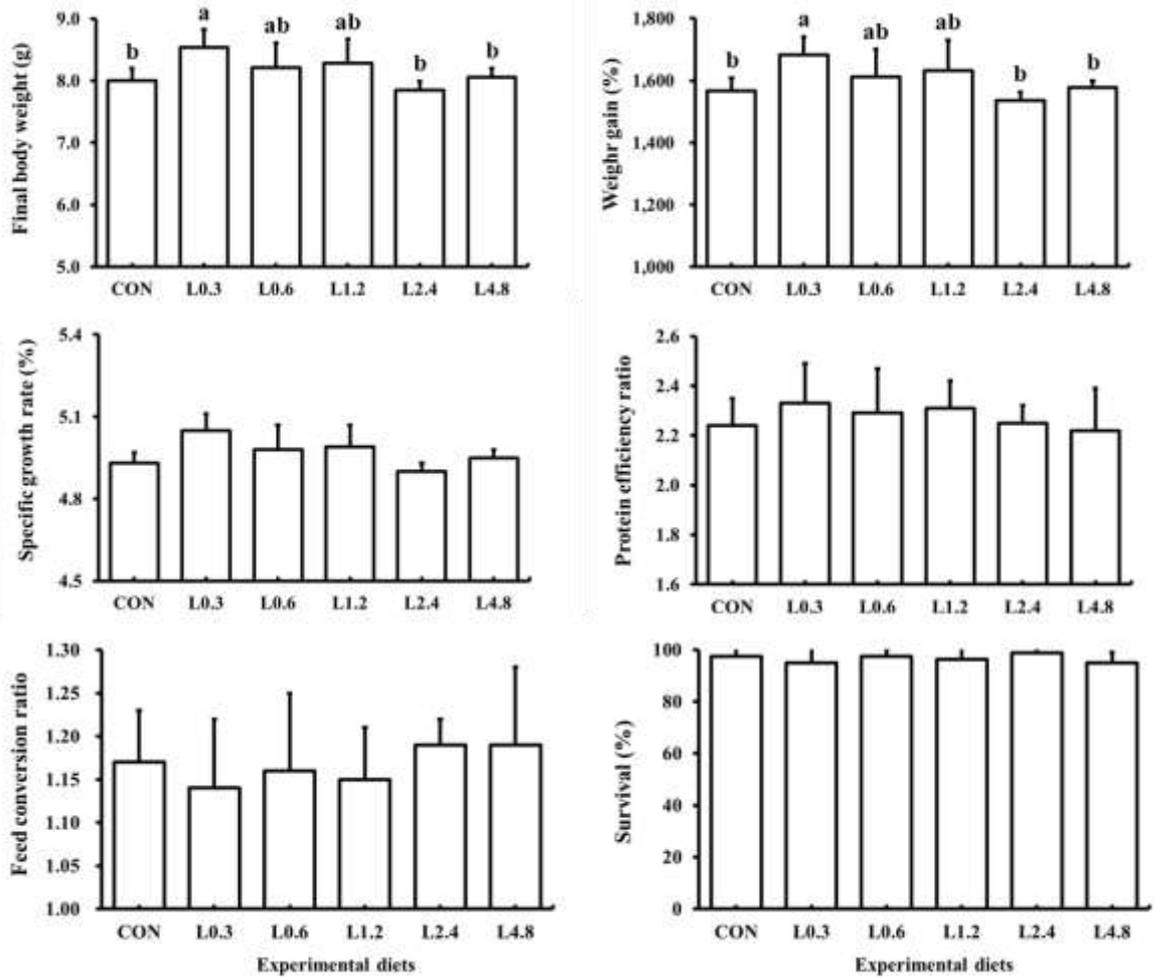


Figure 4. Growth performance, feed utilization and survival of Pacific white shrimp *Li-topenaeus vannamei* fed the experimental diets for 57 days.

Table 3. Phenoloxidase activity (PO) and lysozyme activity of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets for 57 days.

Diets	PO <sup>1</sup>	Lysozyme <sup>2</sup>
CON	0.22±0.05 <sup>b</sup>	5.28±0.60 <sup>c</sup>
L0.3	0.40±0.10 <sup>a</sup>	5.64±0.41 <sup>bc</sup>
L0.6	0.28±0.12 <sup>ab</sup>	6.82±0.16 <sup>a</sup>
L1.2	0.23±0.07 <sup>b</sup>	6.11±0.26 <sup>b</sup>
L2.4	0.29±0.11 <sup>ab</sup>	5.76±0.54 <sup>bc</sup>
L4.8	0.17±0.05 <sup>b</sup>	5.83±0.44 <sup>bc</sup>

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

<sup>1</sup>Phenoloxidase activity (absorbance)

<sup>2</sup>Lysozyme activity (µg mL<sup>-1</sup>)

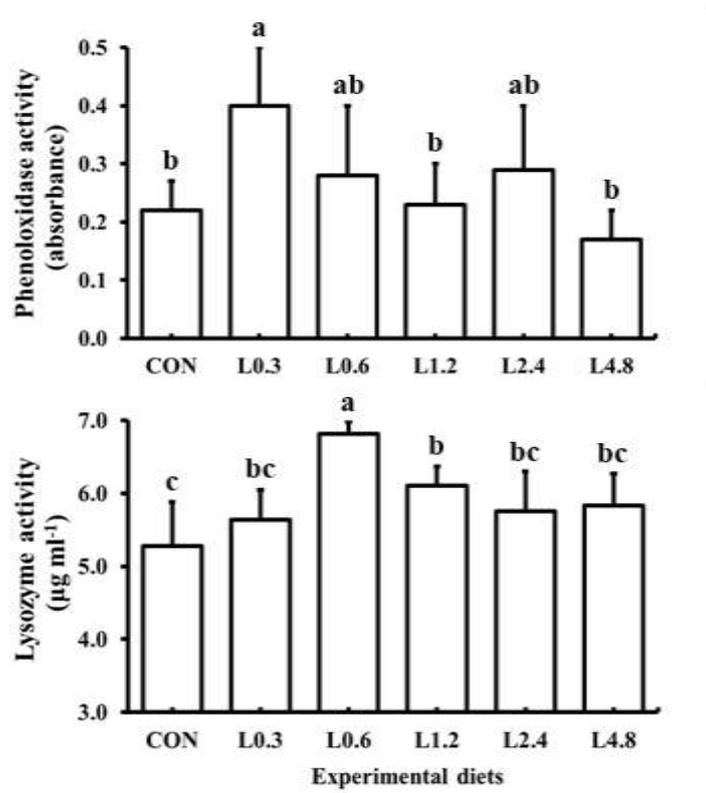


Figure 5. Phenoloxidase activity (PO) and lysozyme activity of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets for 57 days.

Table 4. Relative gene expression of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets for 57 days.

Diets	proPO <sup>1</sup>	Crustin <sup>2</sup>
CON	1.00±0.42 <sup>b</sup>	1.00±0.21 <sup>c</sup>
L0.3	3.44±0.62 <sup>a</sup>	2.27±0.06 <sup>a</sup>
L0.6	2.41±1.00 <sup>ab</sup>	2.24±0.23 <sup>a</sup>
L1.2	1.08±0.49 <sup>b</sup>	1.95±0.19 <sup>ab</sup>
L2.4	1.08±0.63 <sup>b</sup>	1.84±0.07 <sup>b</sup>
L4.8	1.04±0.39 <sup>b</sup>	1.30±0.02 <sup>c</sup>

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).

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

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

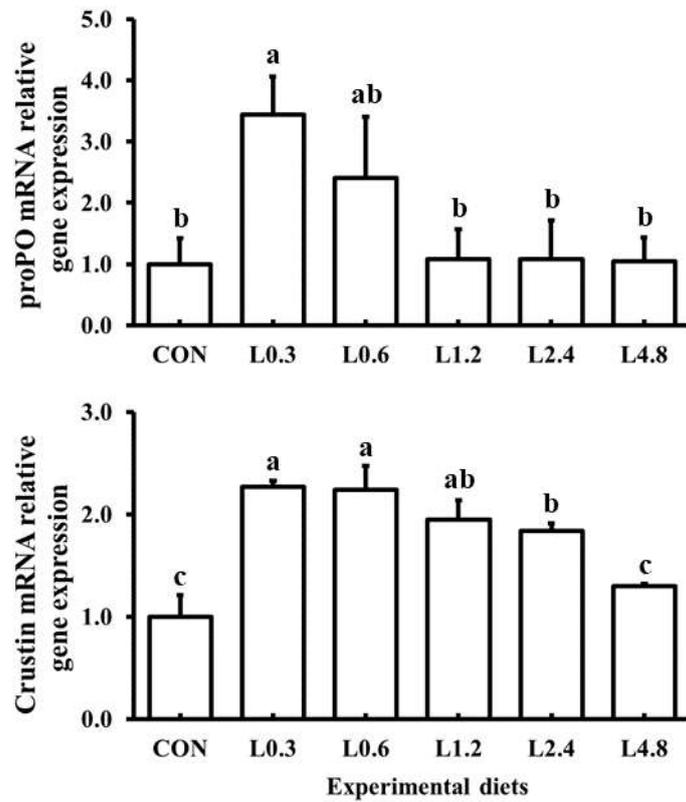


Figure 6. Relative gene expression of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets for 57 days.

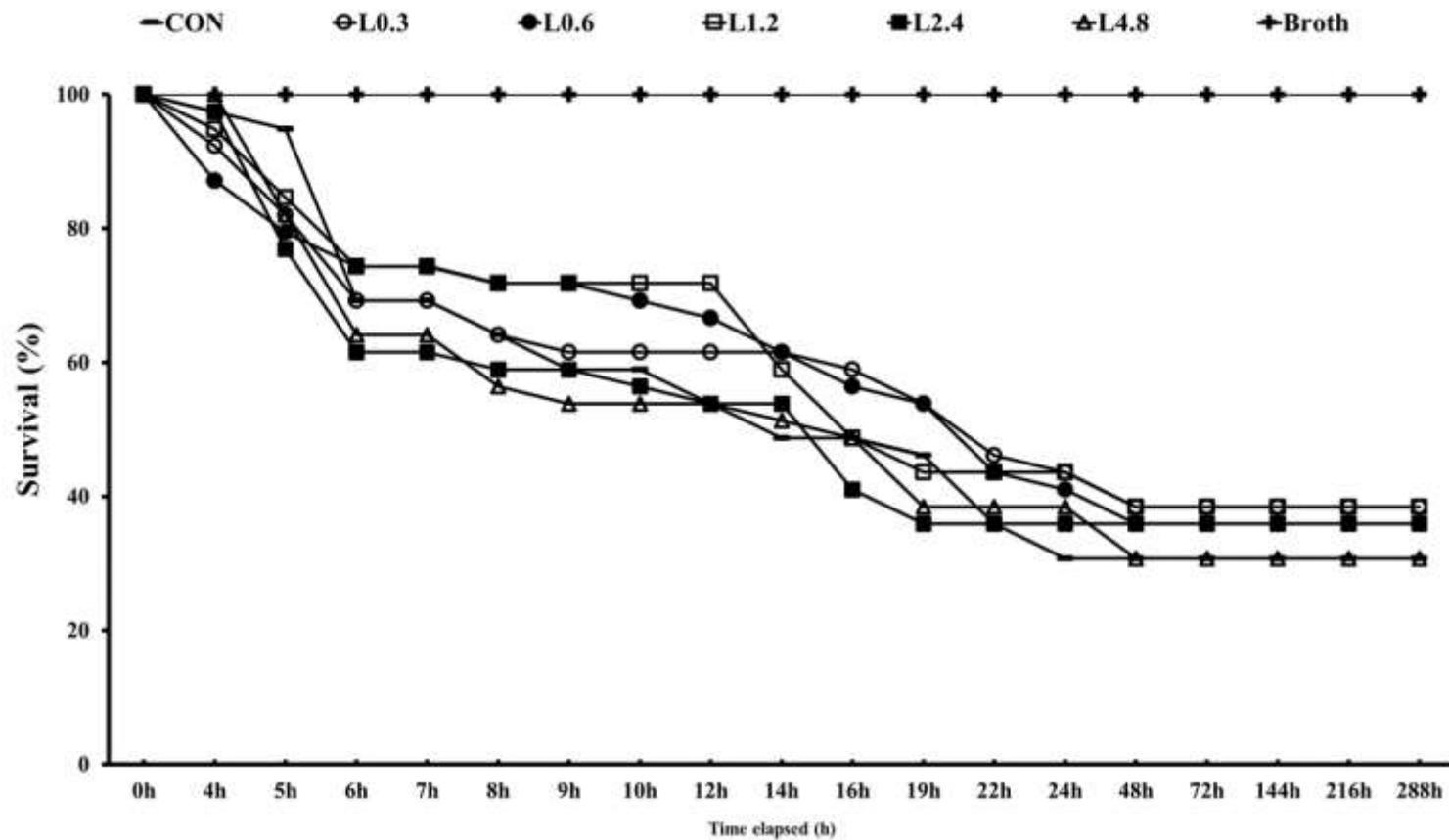


Figure 7. Survival of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* after challenged against *Vibrio parahaemolyticus*. The shrimp were immersed with *V. parahaemolyticus* suspension containing  $1.01 \times 10^6$  CFU/mL.

Table 5. The threshold cycle (Ct) values of the hepatopancreas for toxin levels of Pacific white shirmp *Litopenaeus vannamei* after *Vibrio parahaemolyticus* immersion challenge ( $1.01 \times 10^6$  CFU/mL).

Diets	Ct values			
	0h	6h	24h	288h
CON	n.d <sup>1</sup>	29.2±1.30	20.4±3.06	26.4±6.93
L0.3	n.d <sup>1</sup>	29.9±1.41	18.7±0.11	28.7±7.26
L0.6	n.d <sup>1</sup>	30.5±0.56	19.1±1.27	24.6±7.81
L1.2	n.d <sup>1</sup>	29.6±1.91	21.0±4.15	27.0±4.77
L2.4	n.d <sup>1</sup>	30.4±1.45	19.8±1.17	24.3±7.54
L4.8	n.d <sup>1</sup>	30.5±1.52	19.0±1.68	29.6±5.05

Values are mean of triplicates and presented as mean±S.D.

<sup>1</sup>nd, not detected of toxin.

Table 6. Whole-body composition of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets for 57 days.

Diets	Crude protein	Crude lipid	Ash
CON	19.6±0.55	1.12±0.01 <sup>b</sup>	3.41±0.30 <sup>cd</sup>
L0.3	20.7±1.60	1.38±0.02 <sup>a</sup>	4.32±0.15 <sup>a</sup>
L0.6	21.4±0.49	1.34±0.13 <sup>a</sup>	4.09±0.05 <sup>ab</sup>
L1.2	20.9±0.17	1.32±0.02 <sup>a</sup>	3.68±0.27 <sup>bc</sup>
L2.4	20.5±0.32	1.34±0.01 <sup>a</sup>	3.25±0.06 <sup>cd</sup>
L4.8	20.2±0.67	1.38±0.03 <sup>a</sup>	3.02±0.08 <sup>d</sup>

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). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

## IV. 고찰

본 연구에서 황토는 흰다리새우 사료 내 첨가제로써의 이용가능성을 보여주었다. 어류 사료 내 미네랄의 첨가는 성장과 사료효율을 위해 필수적이며, 갑각류에서는 성장, 조직, 효소 반응의 기질 역할을 한다고 보고하였다(Davis and Gatlin, 1996). Kang et al. (2000a) 은 조피볼락(*Sebastes schlegeli*) (176 g) 사료 내 황토를 5~10%를 첨가했을 때, 황토를 구성하고 있는 무기질이 효소와 조효소의 보조인자로 작용함으로써 조피볼락의 성장과 사료효율을 증진시킨다고 보고하였다. 가축용 사료에 황토의 사용은 성장 촉진, 장 내 암모니아 형성과 유해 미생물 증식 억제, 면역력 향상 등 긍정적인 영향을 미친다고 보고되었다(Kim et al., 2000; Kang et al., 2002; Park et al., 2010). 육계 사료 내 황토를 첨가할 경우, 성장 증진 효과가 있었으며 근육과 지방의 체조성에 긍정적인 영향을 준다고 보고하였다(Yang et al., 2006). Zeolite는 장 내 독성물질과 유해 세균을 흡수하여 소화에 도움을 주어 성장과 사료 기호성을 증진시킨다(Zhou et al., 2014). 무지개 송어(104.2 g) (Lanari et al., 1996; Eya et al., 2008)와 틸라피아(*Tilapia zillii*) (1.08 g) (Yildirim et al., 2009) 사료 내 zeolite를 적정량 첨가할 경우 성장과 사료효율을 향상시킨다고 보고되었다. zeolite는 어류의 장 내 소화시간을 길게 하여, 영양소 흡수를 용이하게 한다(Yildirim et al., 2009). 무지개 송어 사료 내 zeolite (1%) 첨가한 사료를 급여했을 때, 사료계수가 13.6% 감소했으며(Obradovic et al., 2006), 유럽 농어(*Dicentrarchus labrax*) 사료 내 zeolite (10-20%) 첨가했을 때, 성장, 단백질전환효율 및 기호성에 악영향을 끼치지 않았다(Dias et al., 1998). 어류 사료 내 점토광물의 사용은 점결제 역할을 하기 때

문에 사료의 점결력이 높아져 사료가 장 내에 머무르는 시간이 길어져 소화되지 않은 장 내 사료는 영양소 흡수력을 높이며 사료효율을 극대화시킨다고 보고되었다(Olver, 1997; Amirkolaie et al., 2006). 가축 사료 내 zeolite의 사용은 장 내 사료가 머무르는 시간을 길게하여 소화율을 향상시킴에 따라 성장과 사료 효율을 증진시킨다고 보고되었다(Subramaniam and Kim, 2015). 황토를 제외한 다른 점토광물은 성장 증진에 긍정적인 영향 미치며 소, 돼지, 닭에서 광범위하게 사용되고 있다(Olver, 1997; Kyriakis et al., 2002; Karamanlis et al., 2008; Incharoen et al., 2009; Parizadian Kavan et al., 2013). 또한 반추동물 사료 내 점토광물의 사용은 pH저하를 방지하는 완충역할을 하고, 위 내에 사료가 머물러 있는 시간이 연장됨으로써 사료이용성과 성장이 증진된다(Kirk, 1956; Ivan et al., 1992). 새우 여러종의 성장능에 대한 황토의 영향에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 본 연구에서 황토가 새우의 여러 성장능에 어떠한 영향을 미치는지 분석하였고, 결과는 긍정적으로 나타났다.

황토의 첨가는 새우의 성장을 촉진시킬 뿐만 아니라 비특이적면역력(PO, proPO, lysozyme, crustin)도 증진키는 것으로 나타났다. 새우양식이 각광받음에 따라, 갑각류의 방어 기작에 대한 많은 연구가 진행되고 있다(Johansson and Söderhäll, 1989). 갑각류는 방어기작에서 후천면역계가 없기 때문에 선천면역계(proPO계, lysozyme, crustin)가 중요하다(Söderhäll, 1999; Li et al., 2019). 조피볼락 사료 내 황토를 적정량(5~10%) 첨가하여 7주간 사육한 결과, 혈액 성분 중 총 단백질과 Albumin 함량이 대조구에 비해 황토 첨가구가 높게 나타났으며 중성지방과 콜레스테롤 함량은 황토 첨가구에서 낮게 나타났다(Kang et al., 2000b). Kang et al. (2000b)는 황토의 함량이 증가할수록 사료 내 단백질 함량이 감소함에도 불구하고 총 단백질과 Albumin 함량이 높게 나타난 것은 황토에 함유된 무기질이 체내의 신진대

사료를 촉진했기 때문이라고 추정했다. 무지개송어와 뱀장어(*Anguilla japonica*) 사료 내 항생제(oxytetracycline, amoxicillin)를 황토(2%)로 대체했을 때 비특이적 면역력(lysozyme, superoxide dismutase)이 증진한다고 보고되었다(Lee et al., 2016; Lee et al., 2018). 본 연구에서도 황토의 첨가는 흰다리새우의 비특이적 면역력을 증진시키는 것으로 보아 사료 내 면역증강제로써의 이용 가능성이 높다고 사료된다. 이는 황토 내에 oxytetracycline과 같은 항생제의 잔류물이 미생물의 조성에 영향을 미쳐 인(phosphorus)의 흡수에 도움을 주고 면역력 증진에 도움이 된 것으로 추측된다(Zhang et al., 2021). 그러나, 황토를 과잉 첨가(2% 이상)하면 비특이적 면역력이 감소하기 때문에, 후속연구를 통해 보다 명확한 규명이 요구된다.

본 연구에서 사료 내 황토의 첨가는 *V. parahaemolyticus*에 대한 흰다리새우의 질병저항성을 향상시키는 것으로 나타났다. AHPND는 OIE (World organization for animal health)에 질병으로 등재되어있으며(OIE, 2018), *V. parahaemolyticus*에 의해 감염되어 아시아 새우 양식생산에 매년 약 10억 달러의 손실을 입히는 것으로 보고되었다(FAO, 2013; Dong et al., 2019). 양식장에서는 AHPND를 치료하거나 예방하는 목적으로 항생제와 같은 화학 물질을 무분별하게 사용하고 있다(Serrano, 2005; Lazado et al., 2015). 그러나, 항생제와 같은 화합물을 지속적으로 사용할 경우 새우의 내성을 증가시키며, 화학 잔류물은 사람에게 흡수될 수 있어 잠재적인 문제를 일으킬 수 있다(Baticados et al., 1990). 황토는 생체에 독성을 나타내지 않고 체내 유래의 독성물질을 흡착하는 역할 때문에 질병을 예방하거나 개선하는 것으로 알려져 있다(Heimann, 1984; Kasi et al., 1995; Gebesh et al., 1999; Trckova et al., 2004). 많은 연구결과에서도 황토는 체내에서 mycotoxins (Marroquín-Cardona et al., 2009), 중금속(Yu et al., 2009)과 VX (O-ethyl S-2 diisopropylaminoethyl methylphosphonothioate)

(Knezevich and Tadic, 1994) 독소의 오염을 제거한다고 보고되었다. 또한 황토는 사람과 동물 생체 내에서 해독작용을 통하여, aflatoxin으로 인해 유발되는 질병을 예방할 수 있다고 보고되었다(Philips, 1999). Nichols et al. (2013)은 흰꼬리사슴 (*Odocoileus virginianus*)에게 황토를 경구투여 뿐만 아니라 비강투여 할 경우 Chronic wasting disease에 대한 질병저항성을 증진시킨다고 보고하였다. 어류의 경우, 무지개송어에서도 황토가 첨가된 사료를 공급했을 때, *Aeromonas salmonicida*에 대한 질병저항성이 증가되었다고 보고되었다(Lee et al., 2016). Lysozyme, crustin과 같은 항균 효소는 비특이적으로 다양한 균에 항균작용을 나타낸다(Li et al., 2019). 본 연구에서 황토는 흰다리새우의 항균활성을 증가시키는 것으로 나타나 질병저항성 향상에 간접적으로 도움을 주었다고 판단된다. 본 연구 외에 현재까지 새우 사료 내 황토 첨가에 따른 질병저항성에 관한 연구는 보고되지 않았다. 하지만, 황토는 건강 관련 제품으로 사용되고 있으며, 최근 첨가제로 많은 연구가 진행되고 있다(Uddin, 2008). 따라서 사료 내 황토의 첨가는 흰다리새우의 *V. parahaemolyticus*에 대한 질병저항성 향상에 도움을 주었다고 판단된다. 흰다리새우 사료 내 황토의 적정 첨가 함량은 사료 내 0.3%로 판단된다.

## V. 요약문

이 연구는 흰다리새우 사료 내 황토의 첨가가 흰다리새우의 성장, 면역력, 질병저항성에 미치는 영향에 대해 조사하고자 실시되었다.

실험 1에서는 흰다리새우를 대상으로 사료 내 황토의 효과를 확인하기 위해 사육실험을 진행하였다. 실험사료는 총 4종으로 되도록 설계하였으며 황토를 첨가하지 않은 대조구(CON)를 제외한 3개의 실험사료에는 황토를 단계별(0.5, 1.0, 2.0%)로 첨가하였다. 사양실험은 총 16개(4반복)의 acrlly-96L 수조에서 진행되었으며, 실험새우의 초기 평균무게는  $0.34 \pm 0.00$  g으로 수조 당 15씩 무작위로 배치하여 42일간 진행되었다. 사료공급은 1일 5회(08:30, 11:00, 13:30, 16:00, 18:30 h)로 나누어 새우 체중의 7-12%로 제한공급하였다. 성장 결과, 실험새우의 최종 평균무게는 5.64 g이었으며, 최종무게와 일간성장률은 모든 실험구가 CON구에 비해 유의적으로 높은 성장을 보였다. 단백질전환효율은 L1.0구가 CON구에 비해 유의적으로 높았으며 사료계수는 첨가 함량이 증가할수록 낮아지는 경향을 보였으며, 고농도로 첨가하면 증가하는 경향을 보였다. 생존율(91.1-95.6%)은 CON구와 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다. 면역력 분석 결과, PO 활성은 L1.0 실험구가 다른 실험구에 비해 유의적으로 높았다. Lysozyme 활성은 실험구가 CON구에 비해 증가하는 경향을 보였다. 간체장 내 proPO의 발현량은 L2.0구가 CON구와 다른 실험구에 비해 유의적으로 높았다. Crustin의 발현량은 L1.0구와 L2.0구가 CON구에 비해 유의적으로 높게 나타났다.

실험 2의 실험사료는 총 6종이 되도록 설계하였다. 6종의 실험사료 중 황토가 첨가되지 않은 대조구(CON)를 제외한 실험사료에는 황토를 단계별(0.3, 0.6, 1.2, 2.1, 4.8%)로 첨가하였다. 사양실험은 총 24개(4반복)의 acryl 110-L 수조에 각 20마리씩 무작위로 선출하여 57일간 사육하였으며, 실험새우의 초기 평균무게는  $0.48 \pm 0.00$ g으로 수조 당 20씩 무작위로 배치하여 57일간 진행되었다. 사료공급은 1일 5회(08:30, 11:00, 13:30, 16:00, 18:30 h)로 나누어 새우 체중의 7-12%로 제한공급하였다. 실험 2의 성장 결과, L0.3구가 CON구, L2.4구, L4.8구에 비해 유의적으로 높았다. 단백질전환효율과 생존율은 CON구와 실험구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 면역력 분석 결과, PO활성은 L0.3구가 L2.4구를 제외한 황토 첨가구와 CON구에 비해 유의적으로 높게 나타났다. Lysozyme활성은 L0.6구와 L1.2구가 CON구에 비해 유의적으로 높았다. proPO발현량은 L0.3구가 L0.6구를 제외한 실험구와 CON구에 비해 유의적으로 높았다. L0.3구와 L0.6구는 CON구, L2.4구와 L4.8구에 비해 crustin 발현량이 유의적으로 높게 나타났다. *V. parahaemolyticus*를 이용한 공격실험 결과, 실험새우의 생존율은 L0.3구와 L1.2구가 CON구에 비해 높은 경향을 보였다. 그러나 간체장 내 EMS독소 유전자의 DNA 발현량은 대조구와 모든 실험구에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 전하체의 일반성분분석은 모든 실험구와 대조구간에 유의적인 차이가 없었다. 본 연구의 결과, 실험 1에서는 흰다리새우 사료 내 황토 첨가가 성장, 사료효율, 면역력을 개선시킬 수 있음을 확인할 수 있었다. 실험 2에서는 실험 1과 다르게 L0.3구에서 가장 높은 성장을 보였으며 L2.4구에서 CON에 비해 낮은 성장을 보였다. 하지만 흰다리새우 사료 내 황토의 첨가는 비특이적면역력과 질병저항성에 대한 긍정적인 효과를 확인했으며 흰다리새우의

크기, 양식환경, 황토의 mineral 조성차이와 대사과정 등에 따라 달라질 수 있기 때문에 앞으로 다양한 연구가 부가적으로 필요할 것으로 사료된다.

## VI. 참고문헌

- Ahmed I and Khan MA. 2005. Dietary histidine requirement of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Aquaculture Nutrition*, 11(5), 359-366. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2005.00358.x>.
- Amirkolaie AK, Verreth JAJ and Schrama JW. 2006. Efect of gelatinization degree and inclusion level of dietary starch on the characteristics of digesta and faeces in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* (L.)). *Aquaculture* 260, 194-205. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.039>.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2005. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, U.S.A. <https://doi.org/10.1002/0471740039.vec0284>.
- Baticados MCL, Lavilla-Pitogo CR, Cruz-Lacierda ER, de la Peña LD and Suñaz NA. 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Dis Aquat Org* 9, 133-139.
- 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>.
- Browdy CL, Bratvold D, Hopkins JS, Stokes AD and Sandifer PA. 2001. Emerging technologies for mitigation of environmental impact assoxiated with shirmp aquaculture pond effluents. *Asian Fisheries Science*, 14 255-267.

- Carraro A, Giacomo AD, Giannossi ML, Medici L, Muscarella M, Plazzo L, Quaranta V, Summa V and Tateo F. 2014, Clay minerals as adsorbents of aflatoxin M<sub>1</sub> from contaminated milk and effects on milk quality. *Appl Clay Sci* 88, 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2013.11.028>.
- Cho DW, Chon CM, Jeon BH, Kim Y, Khan MA and Song H. 2010. The role of clay mineral in the reduction of nitrate in groundwater by zero-valent iron. *Chemosphere* 81, 611-616. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.08.005>.
- Davis DA and Gatlin DM. 1996. Dietary mineral requirements of fish and marine crustaceans. *Rev Fish Sci* 4, 75-79. <https://doi.org/10.1080/10641269609388579>.
- Davis DA, Samocha TM and Boyd CE. 2004. Acclimating pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, to in-land, low-salinity waters. Southern Regional Aquaculture Center, Publication No. 2601.
- Dias J, Huelvan C, Dinis MT and Métailler R. 1998. Influence of dietary bulk agents (silica, cellulose and natural zeolite) on protein digestibility, growth, feed intake and feed transit time in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquat Living Resour* 11, 219-226. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(98\)89004-9](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(98)89004-9).
- Dong X, Chen J, Song J, Wang H, Wang W, Ren Y, Guo C, Wang X, Tang KFJ and Huang J. 2019. Evidence of the horizontal transfer of pVA1-type plasmid from AHPND-causing *V. campbellii* to non-AHPND *V. owensii*. *Aquaculture* 503, 396-402. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.016>.
- Encarnação P. 2016. Functional feed additives in aquaculture feed. *Aquafeed Formulation*, 217-237. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800873-7.00005-1>.

- Eya JC, Parsons A, Haile I, Gagidi P and Virginia W. 2008. Effects of dietary zeolites (Bentonite and Mordenite) on the performance Juvenile rainbow trout *Onchorhynchus myskis*. *Australian. Aust J Basic and Appl Sci* 2, 961-967.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2013. Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPND) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304). FAO Fisheries and Aquaculture Report ,1053, 1-53.
- 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> in 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.
- García-Ortega A, Verreth J, Vermis K, Nelis HJ, Sorgeloos P and Verstegen M. Laboratory investigation of daily food intake and gut evacuation in larvae of African catfish *Clarias gariepinus* under different feeding conditions. *Aquacult Int* 18, 119-134. <http://dor.org/101007/s10499-008-9230-6>.
- Gebesh VV, Ianchenko VI and Sukhov IA. 1999. Kaopectate in the combined treatment of patients with intestinal infection. *Lik Sprava* 3, 140-142.
- Ghasemi Z, Sourinejad I, Kazemian H and Rohani S. 2018. Application of zeolites in aquaculture industry: a review. *Reviews in aquaculture* 10, 75-95. <https://doi.org/10.1111/raq.12148>.
- Han JE, Tang KFJ, Tran LH and Lighter DV (2015). Photorhabdus insect-related (Pir) toxin-

- like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Diseases of Aquatic organisms* 113, 33-40. <https://doi.org/10.3354/dao02830>.
- Heimann G. 1984. Pharmacotherapy of acute infant enteritis. *Montsschr Kinderheilkd* 132, 303-305.
- Hernández-López J, Gollas-Galván T and Vargas-Albores F. 1996. Activation of the phenoloxidase 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).
- Incharoen T, Khambualai O and Yamauchi K. 2009. Performance and histological changes of the intestinal villi in chickens fed dietary natural zeolite including plant extract. *Asian J Poult Sci* 3, 42-50. <https://10.3923/ajpsaj.2009.42.50>.
- Indresh H, Devegowda G, Ruhan S and Shivakumar M. 2013. Effects of high grade bentonite on performance, organ weights and serum biochemistry during aflatoxicosis in broilers. *Veterinary World* 6, 313-317. <https://doi.org/105455/vetworld.2013.313-317>.
- Ivan M, Dayrell M and Hidiroglou SM. 1992. Effects of bentonite and monensin on selected elements in the stomach and liver of fauna-free and faunated sheep. *J Dairy Sci* 75, 201-208.
- Johansson MW and Söderhäll K. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitol Today* 5, 171-176. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(89\)90139-7](https://doi.org/10.1016/0169-4758(89)90139-7).
- Kang DS and Bae TG. 2000a. Effects of dietary yellow loess on growth in Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Bull Fish Sci* 9, 104-108.

- Kang DS, Cho YC, Choi OS, Lee YJ, Kin HS and Bai TJ. 2000b. Effects of dietary yellow loess on serum constituents in Korean rockfish, *Senastes schiegeli*. Kor J of Life Sci 10, 286-291.
- Kang SW, Cho CY, Kim JS, Ahn BS, Chung HY and Seo KH. 2002. Effect of Hwangto, illite, oligosacarides, charcoal powder and chromium picolinate on the growth performance and immunity in early weaned Hanwoo calves. Kor J Ani Technol 44, 531-540. <https://doi.org/10.5187/JAST.2002.44.5.531>.
- Karamanlis X, Fortomaris P, Arsenos G, Dosis I, Papaioannou D and Batzios C. 2008. The effect of a natural zeolite (Clinoptilolite) on the performance of broiler chickens and the quality of their litter. Asian-australas. J Anim Sci 21, 1642-1650. <https://doi.org/10.5713/ajas.2008.70652>.
- Kasi M, Kausar P, Naz R and Miller LC. 1995. Treatment of diarrhoea in infants by medical doctors in Balochistan, Pakistan. J Diarrhoeal Dis Res 13, 238-241.
- Kim CJ, Lee ES, Song MS and Cho JK. 2000. Effects of illite supplementation on the meat quality of finishing pigs. Korean J Food Sci Ani Resour 20, 152-158.
- Kirk RE. 1956. Encyclopedia of chemical Technology. The International Encyclopedia, Inc., New York, NY, USA 12, 295-299.
- Knezevich DL and Tadic V. 1994. Decontamination with clay or alcoholate of pigs percutaneously poisoned with VX and soman. Vojnosanit Pregl 51, 488-491.
- KOSIS (Korea Statistical Information Service). 2021. Survey on the status of aquaculture. Retrieved from [http://kostat.go.kr/portal/korea/kor\\_nw/1/1/index.board?bmode=read&aSeq=380812](http://kostat.go.kr/portal/korea/kor_nw/1/1/index.board?bmode=read&aSeq=380812) on Dec 8, 2020.

- Kyriakis SC, Papaioannou DS, Alexopoulos C, Polizopoulou Z, Tzika ED and Kyriakis CS. 2002. Experimental studies on safety and efficacy of the dietary use of clinoptilolite-rich tuff in sows: a review of recent research in Greece. *Microporous Mesoporous Mater* 51, 65-74. [https://doi.org/10.1016/S1387-1811\(01\)00475-9](https://doi.org/10.1016/S1387-1811(01)00475-9).
- Lanari D, Agara E and Turri C. 1996. Use of Cuban zeolites in trout diets. *Riv Ital Aquaculture* 31, 23-33.
- Lazado CC, Caipang CMA and Estante EG. 2015. Prospects of host-associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions. *Fish Shellfish Immunol* 45, 2-12. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.023>.
- Lee SH, Lee YK, Katya K, Park JK and Bai SC. 2018. Natural dietary additive yellow loess as potential antibiotic replacer in Japanese eel, *Anguilla japonica*: Effects on growth, immune responses, serological characteristics and disease resistance against *Edwardsiella tarda*. *Aquac Nutr* 24, 1034-1040. <https://doi.org/10.1111/anu.12641>.
- Lee YK, Katya K, Yun HH, YOON MY, Park JK, SUNG JS, Shin HS and Bai SC. 2016. Evaluation on dietary yellow loess as an antibiotic replacer on growth, immune response, serological characteristics and disease resistance in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquac Nutr* 22, 1018-1025. <https://doi.org/10.1111/anu.12348>.
- Li M, Ma C, Zhu P, Yang Y, Lei A, Chen X, Liang W, Chen M, Xiong J and Li C. 2019. A new crustin is involved in the innate immune response of shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 94, 398-406. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.028>.
- Li M, Ma C, Zhu P, Yang Y, Lei A, Chen X, Liang W, Chen M, Xiong J and Li C. 2019. A new crustin is involved in the innate immune response of shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 94, 398-406. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.028>.

- Marroqui'n-Cardona A, Deng Y, Taylor JF, Hallmark CT, Johnson NM and Philips TD. 2009. *In vitro* and *in vivo* characterization of mycotoxin-binding additives used for animal feeds in Mexico. *Food Addit Contam: Part A* 26, 733-743. <https://doi.org/10.1080/02652030802641872>.
- Mumpton FA and Fishman PH. 1977. The application on natural zeolite in animal science and aquaculture. *J. Anim. Sci*, 45, 1188-1203. <https://doi.org/10.2527/jas1977.4551188x>.
- Nichols TA, Spraker TR, Rigg TD, Meyerett-Reid C, Hoover C, Michel B, Bian J, Hoover C, Michel B, Bian J, Hoover E, Gidlewski T, Balachandran A, O'Rourke K, Telling GC, Bowen R, Zabel MD and VerCauteren KC. 2013. Intranasal Inoculation of White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) with Lyophilized Chronic Wasting Disease Prion Particulate Complexed to Montmorillonite Clay. *PLoS One* 8, e62455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062455>.
- Obradovic S, Adamovic M, Vukasinovic M, Jovanovic R, Levic J. 2006. The application effects of natural zeolite in feed and water on production results of *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Rom Biotechnol Lett* 11, 3005–3013.
- OIE. 2018. Chapter 2.2.1 Acute hepatopancreatic necrosis disease. In: *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*.
- Olver MD. 1997. Effect of feeding clinoptilolite (zeolite) on the performance of three strains of laying hens. *Br. Poult. Sci*, 38, 220-222. <https://doi.org/10.1080/00071669708417973>.
- Pack SB, Kang HK, Bang HT, Kim MJ, Choi HC, Chae HS, Yu DJ, Suh OS and Na JC. 2010. Effect of dietary supplementation of yellow loess on performance, blood component profile and concentration in feces in broiler chickens. *Korean J Poult Sci* 37, 9-13. <https://doi.org/10.5536/KJPS.2010.37.1.009>.

- Paglia DE and Valentine WN. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70, 158-169.
- Papaioannou D, Katsoulos PD, Panousis N and Karatzias H. 2005. The role of natural and synthetic zeolites as feed additives on the prevention and/or the treatment of certain farm animal diseases: A review. *Microporous Mesoporous Mater* 84, 161-170. <http://10.1016/j.micromeso.2005.05.030>.
- Papaioannou D, Katsoulos PD, Panousis N and Karatzias H. The role of natural and synthetic zeolite as feed additives on the prevention and/or the treatment of certain farm animal diseases: A review. *Microporous and Mesoporous Materials* 84, 161-170. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2005.05.030>.
- Parizadian Kavan B, Shams Shargh M, Hassni S and Mostafalo Y. 2013. Effects of physical size of clinoptilolite on growth performance, serum biochemical parameters and litter quality of broiler chickens in the growing phase. *J Poult Sci* 1, 93-104. <http://doi.org/10.22069/PSJ.2013.1481>.
- Park SB, Kang HK, Bang HT, Kim MJ, Choi HC, Chae HY, Yu DJ, Suh OS and Na JC. 2010. Effect of dietary supplementation of yellow loess on performance, blood component profile and concentration in feces in Broiler chickens. *Kor J Poult Sci* 37, 9-13. <https://doi.org/10.5536/KJPS.2010.37.1.009>.
- Philips TD. 1999. Dietary clay in the chemoprevention of aflatoxin-induced disease. *Toxicol Sci* 52, 118-126.
- Ponce-Palafox J, Martinez-Palacios CA and Ross LG. 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture* 157, 107-115. <https://doi.org/10.1016/S0044->

8486(97)00148-8.

Samocha TM, Hanper L, Emberson CR, Davis DA, McIntosh D, Lawrence AL. 2002. Review of some recent developments in sustainable shrimp farming practices in Texas, Arizona, and Florida. *Journal of Applied Aquaculture* 12, 1-30. [https://doi.org/10.1300/J028v12n01\\_01](https://doi.org/10.1300/J028v12n01_01).

Segar A, Dorantes-Aranda JJ, Müller MN, Body A, Peristyy Am, Place AR and Hallegraef G. 2015. Mitigating fish-killing *Prymnesium parvum* algal blooms in aquaculture ponds with clay: the importance of pH and clay type. *Journal of Marine Science and Engineering*, 3, 154-174. <https://doi.org/10.3390/jmse3020154>.

Serrano PH. 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. <http://www.fao.org/3/a-a0282e.pdf>. Accessed 15 Feb 2018.

Söderhäll K. 1999. Editorial. Invertebrate immunity. *Dev Comp Immunol* 23, 263–266. [10.1016/s0145-305x\(99\)00009-9](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(99)00009-9).

Subramaniam MD and Kim IH. 2015. Clay as dietary supplements for swine: A review. *J Anim Sci Biotechnol* 28, 1-9. <http://doi.org/10.1186/s40104-015-0037-9>.

Suzer C, Çoban D, Kamaci HO, Saka Ş, Firat K, Otgucuoğlu Ö and Küçükasri H. 2008. *Lactobacillus* spp. Bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 280, 140-145. <http://10.1016/j.aquaculture.2008.04.0203>.

Tacon P. 2012. Yeast in aquaculture. *international aquafeed*. 14-18.

Trckova M, Matlova L, Dvorska L and Pavlik I. 2004. Kaolin, bentonite, and zeolites as feed supplements for animals: health advantages and risks. *Vet Med-Czech* 49, 389-399.

- Uddin F. 2008. Clays, nanoclays, and montmorillonite minerals. *Metall Mater Trans A* 39, 2805-2814. <https://doi.org/10.1007/s11661-008-9603-5>.
- Undabeytia T, Nir S, Sánchez-Verdejo T, Villaverde J, Maqueda C, Morillo E. 2008. A clay-vesicle system for water purification from organic pollutants. *Water Research* 42, 1211-1219. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.09.004>.
- 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).
- Wang YB and Zirong X. 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Anim Feed Sci Technol* 127, 289-292. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.09.003>.
- Wang YB. 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 269, 259-264. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.035>.
- Williford CW, Reynold WR and Quiros M. 1992. Clinoptilolite removal of ammonia from simulated and natural catfish pond water. *Applied Clay Science* 6, 277-291. [https://doi.org/10.1016/S0169-1317\(09\)90003-5](https://doi.org/10.1016/S0169-1317(09)90003-5).
- Yang CJ, Oh JI, Choi YJ, Kim CB, Kim ST, Mun ST and Han SG. 2006. Effects of dietary yellow clay on growth performance and body composition in broiler chicks. *Korean J Poultr Sci* 33, 263-271.
- Yildirim ö, Türker A and Şenel B. 2009. Effects of natural zeolite (clinoptilolite) levels in the fish diet on water quality, growth performance and nutrient utilization of *Tilapia zillii* fry. *Fresen Environ Bull* 8, 1567-1571.

- Yu DY, Song WH, Zhou B and Li WF. 2009. Assessment of Cu (II)-bearing montmorillonite on Cd adsorption. *Biol Trace Elem Res* 130, 185-192. <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8327-8>.
- Zhang Z, Su R, Chang C, Cheng X, Peng Q, Lambers H and Honghua H. 2021. Effects of oxytetracycline on plant growth, phosphorus uptake, and carboxylates in the rhizosphere of alfalfa. *Plant Soil* 461, 501-515. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-04840-0>.
- Zhou P, Tan YQ, Zhang L, Zhou YM, Gao F and Zhou GH. 2014. Effects of dietary supplementation with the combination of zeolite and attapulgite on growth performance, nutrient digestibility, secretion of digestive enzymes and intestinal health in broiler chickens. *Asian Australas J Anim Sci* 27, 1311-1318. <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.2014.14241>.

## VII. 감사의 글

먼저 이 글을 보고계시는 모든 분들께 감사 인사를 드립니다. 이제는 석사과정  
정이 아닌 석사가 되었습니다. 석사과정 2년이라는 시간은 짧지만 단단하고 굵  
게 흘러갔습니다. 2년이라는 시간동안 다양한 사고 방식으로 생각할 수 있는 사  
람이 되었고, 주어진 일에 책임을 다하고 이를 위해 노력하는 사람이 되었습니다.

공부할 수 있도록 기회를 주신 이경준 지도교수님께 감사의 인사를 드립니다.  
교수님을 통해 연구자로서의 역할과 책임감을 알게되었고, 문제를 해결해 나아가  
는 과정을 가르쳐주시고 이끌어주셔서 감사합니다. 그리고 이 모든 과정에 있어  
성실하고 단단한 사람으로 키워주신 없어서는 안될 부모님, 하고자 하는 일에 항  
상 믿어주시고 사랑으로 키워주신 부모님께 감사드리고 표현은 못하지만 사랑합  
니다.

저의 첫 시작을 정말 잘 알려준 선배이자 가장 애정하는 초롱언니, 외적으로  
나 내적으로나 든든한 민기오빠, 후배들이 편하게 연구할 수 있도록 만들어주신  
재형오빠. 언니, 오빠들이 있어 실험실 생활을 편하고 더 열심히 할 수 있었습니  
다. 우리 AFNL의 대장이자 대학원생의 길을 알려준 재범오빠, 현운오빠. 무엇이  
든 함께 해주고 도움을 아낌없이 주는 가장 편한 대현코, 누구보다 감정이 섬세  
한 중호오빠, 우리 4명 중에서 가장 무뚝뚝하지만 따뜻한 배려가 있는 건호오빠.  
오빠들이 있어서 난 정말 좋았고 고마워. 그리고 후배이지만 친구 같은 우리 동  
생들 한세, 연지, 수혁, 원훈, 단비. 두 손이 못했던 일을 열 손이 되어서 편하게

생활했고, 곳은 일에도 마다하지 않고 열심히 해줘서 고마워. 그리고 항상 본인은 늦었다고 젊어서 부럽다고 말하는 예나언니. 언니, 제가 항상 응원합니다.

Buddhi, rasha sister, Nalin, kokila thank you.

가장 좋아하고 보고싶은 우리 언니&형부, 매번 연락오는 패턴은 갖지만 애정하는 우리 오빠. 가족들 모두 감사합니다. 영원한 약리방 리정원, 항상 시간 없다고 말하는 나에게 항상 먼저 찾아와주는 나의 친구들. 규량, 인희, 가현, 미성, 예린, 은지, 효빈, 나연, 지은 모두들 땡큐?

이 글에 모두 답을 순 없지만 도움을 주신 분들 모두 감사합니다. 앞으로 받은 도움으로 베풀 수 있는 사람이 될 수 있도록 계속해서 발전하고 노력하겠습니다. 감사합니다.

2022년 2월

조세희