

홍해삼(*Stichopus japonicus*) 치삼의 성장 및 면역증강을 위한 면역증강사료첨가제의 개발

남궁진 · 안경진¹ · 여인규*

제주대학교 해양생명과학과, ¹(주)준원지비아아이

Growth and Physiological Effects of Immunity Feed Additives on the Juvenile Red Sea Cucumber *Stichopus japonicus*

Jin Namgung, Kyoung-Jin Ahn¹ and In-Kyu Yeo*

Department of Marine Life Science, Jeju National University, Jeju 64234, Korea

¹Junwon GBI Co. Ltd., JeJu 63169, Korea

The juvenile red variant of the sea cucumber *Stichopus japonicus* is distributed worldwide. It is a valuable food source in Korea, China, and Japan. Major issues in farming the juvenile red variant sea cucumber include growth rates and disease resistance. In recent years, studies have focused on feed additives to enhance immune system and health. In this study, we used a common diet (CD), a nutritional diet (ND; mixed nutritional supplements), and an immunity diet (ID; mixed probiotics, spirulina, and levan) and compared the growth rates and immunity of juvenile red variant sea cucumbers fed the experimental diets for 12 weeks. The growth and survival rates in the ID group were significantly increased ($P>0.05$). This suggests that the feed additives positively influenced immunity and growth in the ID group. However, the immune activity was exhibit a stabilizing effect, and further investigation of immune effects is required.

Key words: Red Sea cucumber, Immunostimulant, Probiotics, Spirulina, Levan

서 론

홍해삼(*Stichopus japonicus*)은 돌기해삼과의 한 종으로서 아시아 일대에서 주로 양식 되고 있다(Choo, 2008). 해삼은 산업적으로 색에 따라 홍해삼, 청해삼 및 흑해삼으로 구분되어 왔으나 분류학상으로는 동일 종으로 인식되어왔다. 그러나 최근 연구결과 세 종간의 유전적 다형성이 존재하는 것으로 보고되었고, 그 중에서도 홍해삼은 다른 해삼에 비해 맛과 향이 뛰어나 고가에 판매되고 있다(Kan-no and Kijima, 2003; Choo, 2008). 현재 국내에서도 홍해삼의 수요가 점차 증가하고 있어 경제적 인 가치가 높으나 홍해삼 양식은 아직 제한적으로 이루어지고 있는 실정이다.

해삼은 침전물 섭식 생물로서 주로 유기물, 박테리아, 원생동물 규조류 및 해조류 등을 섭이 한다(Yang et al., 2005). 그 중에서 스피루리나는 홍해삼에게 유용한 먹이성분으로 타 미세조류에 비하여 단백질 함량이 높아 영양성분이 뛰어난 것으로 알려져 왔으나, 셀룰로오스(cellulose)성 세포벽으로 인하여 소화 시

에 영양흡수가 어려워 해삼의 성장에 크게 도움은 주지 못하는 것으로 보고되고 있다(Xia et al., 2012; Shi et al., 2013). 해조류 분말 역시 조섬유 등이 다량으로 함유되어있어 충분한 영양흡수가 어렵다고 알려졌다(Erasmus et al., 1997; Ten Doeschate and Coyne, 2008). 특히, 해삼은 소화력이 높지 않아 사료 내에 좋은 천연물질을 첨가한다고 하여도 소화흡수율이 낮아 성분을 충분히 체내로 받아들이기가 어려워 소화흡수율을 높이기 위해 분말사료의 입자분쇄, 발효 및 소화엔 좋은 기능성 물질들의 사료에 혼합을 하는 등 많은 노력이 이루어지고 있는 실정이다(Choi, 2014).

한편, 홍해삼 양식에는 소화 흡수율의 증대 이외에도 질병에 취약한 문제점을 가지고 있다. 홍해삼은 육성 시 피부궤양과 입부분 비대 등의 증상을 유발하는 유행성 질병에 특히 취약하며 이는 홍해삼의 체표면이 다른 해삼에 비하여 부드러운데 그 원인이 있다(Xitao et al., 2014). 따라서 질병이 발생하는 경우 확산이 빠르고 폐사율이 높을 뿐 아니라 지속적으로 성장이 저해되는 현상이 일어나게 되며 양식어가에 큰 경제적 피해를 주게

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2015.0466>



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

Korean J Fish Aquat Sci 48(4) 466-473, August 2015

Received 3 July 2015; Revised 8 August 2015; Accepted 11 August 2015

*Corresponding author: Tel: +82. 64.754. 3474 Fax: +82. 64. 756. 3493

E-mail address: ikyeo99@jejunu.ac.kr

된다. 최근에는 이러한 문제점을 해결하기 위해 친환경적인 양식 방법으로 사료에 프로바이오틱스 등과 같은 천연물질을 첨가하여 양식생물의 성장력 및 면역력을 증진시켜 질병으로 인한 피해를 예방하기 위한 노력이 이루어지고 있다(Zhao et al., 2010; Ma et al., 2013; Wang et al., 2014)

프로바이오틱스(probiotics)는 유용 미생물을 의미하며 숙주에 일정량을 사용하였을 때 숙주의 건강에 도움을 주는 균을 말하는 것으로서 오래 전부터 다양한 분야에서 사용되어 왔다(FAO/WHO, 2001). 프로바이오틱스는 소화 효소를 도와 소화력을 높여주는 역할을 하며(De schrijver and Ollevier, 2000; Ten Doeschate and Coyne, 2008; Yu et al., 2009; Zokaefar et al., 2012), 장 내에서 비타민과 지방산등을 생성하기도 한다(Sugita et al., 1992; Vine et al., 2006). 그러나 단일 제제만으로는 소화력을 높이는데 한계가 있기 때문에 최근에는 효능을 더욱 강화 시키기 위하여 장내에서 프로바이오틱스의 성장 및 효과를 증진시킬 수 있는 기능성 성분인 프리바이오틱스(Prebiotics)와 함께 사용되고 있다. 프로(pro)바이오틱스와 프리(pre)바이오틱스의 영양성 증진과 내재된 효과 증진을 위해 함께 사용하는 것을 신바이오틱스(synbiotics)라 하며 이를 활용한 연구가 활발히 진행되고 있다(Cross ML, 2002; Morelli et al., 2003).

최근의 연구에서 레반성 제제를 프리바이오틱스로 사용하였을 경우 장내 유용세균의 수를 높이고 대장 내의 pH를 낮추는 효과가 있으며(Gibson and Roberfroid, 1995; El-Nagar et al., 2002; Akin et al., 2007; Adebola et al., 2014), 장내 기능을 개선하는데 도움을 주고 숙주의 장내 유용세균의 수를 증가시킬 뿐더러 생육이나 활성을 촉진 함으로서 숙주의 건강을 증진시킬 수 있다고 보고되고 있다(Kang et al., 2009, Srikanth et al., 2015). 그러나 지금까지 프로바이오틱스, 레반 및 스피루리나가 각각 성장 촉진과 면역증강제로서 사용 될 수 있다는 연구는 많이 이루어지고 있으나 홍해삼에게 적용한 연구는 아직 초기 단계에 머무르고 있으며, 두 가지 이상의 유용물질을 혼합한 신바이오틱스성 사료첨가제에 대한 연구 역시 미흡한 실정이다.

이에 본 연구에서는 선행 연구들에서 면역증강제로서 효능이 입증된 프로바이오틱스, 레반을 혼합하여 신바이오틱스성 면역증강제를 제작하고, 양식어가에서 일반적으로 사용되고 있는 일반 해삼사료, 해삼용 영양제 배합사료 및 면역증강제 배합사료를 급여 하였을 경우 홍해삼 치삼의 성장율, 생존율 및 생리 활성을 각각 비교분석 하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 실험환경

실험은 2014년 10월 27일부터 2015년 1월 27일까지 총 12주간 제주도 내 홍해삼 양식장에서 진행되었으며, 양식장 내의 수조 3개를 이용하였다. 실험동물은 홍해삼(*S. japonicus*) 치삼

을 이용하였으며, 홍해삼 치삼은 각 수조 당 182마리로 평균 무게는 2.4 ± 0.1 g 이었다. 양식장의 실험수조는 $1 \times 2.4 \times 0.3$ m³ 크기로, 조도는 100 lux 이하였다. 각 실험수조에는 동일한 개수의 은신처를 설치 하였으며, 실험환경 변화를 측정하기 위하여 실험이 진행되는 동안 4주에 한 번씩 수질측정기(YSI, YSI Incorporated, Ohio, USA)를 이용하여 수온, 염분, 용존산소(Dissolved oxygen, D.O) 및 pH 변화를 측정하였다(Table 1).

사료 제작 및 급여

실험사료는 다시마를 주 원료로 한 일반 홍해삼 사료(common diet, CD)와 CD사료에 비타민 등이 포함된 중국산 일반 영양제(sanyihao/yantai, duolai feed co., Ltd.)를 1 kg당 2% 첨가한 사료(nutrition diet, ND)와 1 kg당 스피루리나 15%, 프로바이오틱스(*Bacillus polyfermenticus*) 3×10^9 CFU 및 레반 0.1%로 구성된 면역증강제를 배합한 사료(immunity diet, ID)를 사용하였다. CD사료 성분은 사료표준분석방법에 의하여 분석되었으며 그 결과는 Table 2와 같다. 각각의 실험 사료는 12주간 하루 1회 30 g씩 오전에 급여 하였다.

성장도 분석

홍해삼 치삼 성장도 분석은 사육수조로부터 개체를 전량 회수한 후 계측하였으며, 실험 시작일로부터 4주 마다 반복 측정되었다. 12주의 실험 종료 후 증체율 일간 성장률 및 생존율을 계산하였다. 일간 성장률은 Specific growth rate (%)=(log_e final wt-log_e initial wt)/days와 같이 계산되었으며, 증체율은 Weight gain (%)=(final weight-initial weight) × 100 /initial weight으로 계산되었다.

홍해삼 내 다당류 분석

다당성 물질인 레반 섭취 후 홍해삼 치삼의 체내 다당류 함

Table 1. Water environment of experiment tank for 12 weeks

Week	Water temp (°C)	Salinity (psu)	Dissolved oxygen (DO; mg/L)	pH
0	21.00±0.35	30.61±3.32	6.13±0.13	7.64±0.07
4	15.18±0.06	33.47±0.03	8.35±0.03	7.88±0.15
8	13.67±0.47	34.45±0.01	8.37±0.14	7.85±0.25
12	11.60±0.75	31.08±5.77	9.14±0.33	7.82±0.11

Table 2. Proximate composition (%) of common diet (CD) for red sea cucumber *Stichopus japonicus*

Moisture (%)	5.33
Crude protein (%)	21.07
Crude fat (%)	1.32
Crude ash (%)	34.65

량변화를 파악하기 위하여 체조직의 다당류 분석을 실시하였다. 홍해삼 치삼을 -70°C 에서 3일 이상 동결한 후 냉동건조기를 사용하여 72시간 동안 동결건조 하였다. 건조된 홍해삼 치삼은 분쇄하고 밀봉하여 분석 전까지 4°C 에서 냉장보관 하였다. 체내의 다당류 분석은 홍해삼 치삼 건조분말을 2 M TFA (trifluoroacetic acid)로 산 가수분해하고 여과($0.2\ \mu\text{m}$) 및 희석하여 전처리 한 후 HPAEC-PAD system (Dionex, USA)을 이용하여 중성당류 분리·동정을 실행하였다. 실험조건은 이동상은 18 mM NaOH, 칼럼은 CarboPac™ PA1을 사용하였다.

면역 활성 분석

면역 활성 분석을 위하여 각 실험군의 홍해삼 치삼을 실험사료 급이 후 10마리씩 무작위로 선별하여 실험에 사용하였다. 체강액은 1 mL 주사기로 채취하여 1.5 mL tube에 넣고 원심분리기를 이용하여 700 g에서 15분간 원심분리 후 상층액을 분리하였으며, 절개한 몸체는 내장을 제거한 후 보관하였다. 두 샘플은 채취 후 -70°C 에서 동결하고 실험 전까지 보관하였다.

홍해삼 치삼의 체강액 내 단백질 함량은 Lowry et al. (1952)의 방법에 따라 측정되었으며, Bovin serum albumin (BSA, sigma, USA)을 사용하여 standard 검량선을 그린 후 750 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. Lysozyme 활성은 체강액을 15 μL 씩 96 well plate에 분주한 후, 150 μL *Micrococcus lysodeikticus* solution (0.2 mg/mL, 0.1M PBS, pH=6.8)를 넣고 25°C 에서 5분간 반응 후 540 nm에서 흡광도를 측정하고, 다시 5분간 반응시킨 뒤 동일한 파장에서 흡광도를 측정하여 lysis 전 후의 흡광도 차를 비교하여 측정하였다. Penoloxydase (PO) 활성은 Ashida and Dohke (1980)의 방법을 응용하여 측정하였다. 96 well plate에 체강액 15 μL 와 phosphate buffer (pH 6.0) 150 μL 를 넣고, 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA, sigma, USA)를 150 μL 넣어준 후 25°C 에서 25분 동안 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하고 5분 후에 동일한 파장에서 재 측정한 후 전후 값을 비교하여 사용하였다. 각 효소의 활성 단위는 분당 0.001의 흡광도 감소를 나타내는 효소의 양으로 정의하였다.

통계처리

결과의 통계처리는 SPSS version 12 (SPSS Inc., USA)를 활용하여 One-way ANOVA- test 로 통계 분석되었으며 데이터 값의 평균 유의차는 Duncan's multiple test 사후분석을 통해 $P<0.05$ 에서 각 그룹간 유의성을 판단하였다.

결과 및 고찰

생존율 및 성장률 측정

프로바이오틱스와 레반의 혼합 급이가 홍해삼 치삼의 성장과

생존증진에 도움을 주는지 확인하기 위하여 신바이오틱스성 면역강제제를 제작하여 급이 후 4주 간격으로 12주간 생존율과 성장률을 측정하였다. 생존율 실험 결과 CD군은 $73.1\pm 0.84\%$, ND군은 $70.9\pm 0.32\%$, ID군은 $76.9\pm 0.5\%$ 가 생존하였으며 ID군에서 가장 높은 생존율을 나타내었다(Fig. 1A, $P<0.05$). 성장률 조사에서는 각 실험군의 초기무게는 2.4 ± 0.1 g로 유사하였으나, 최종무게는 CD군 4.6 ± 0.5 g, ND군 5.3 ± 0.62 g이었으며 ID군의 경우 6.1 ± 0.53 g으로 유의적으로 높게 성장하였다(Fig. 1B, $P<0.05$). 증체율은 실험시작 시에는 모든 실험군이 유사하게 2.4 ± 0.1 g 이었으나 CD군의 경우 12주 후 $91.67\pm 17.2\%$, ND군의 경우 $118.75\pm 35.2\%$ 및 ID군은 $155.6\pm 31.7\%$ 으로 증가하였다(Table 3, $P<0.05$). 일간 성장률 역시 CD군은 $0.21\pm 0.03\%$, ND군은 $0.27\pm 0.08\%$, ID군은 $0.34\pm 0.05\%$ 로 ID군이 성장률, 증체율, 일간성장률에서 모두

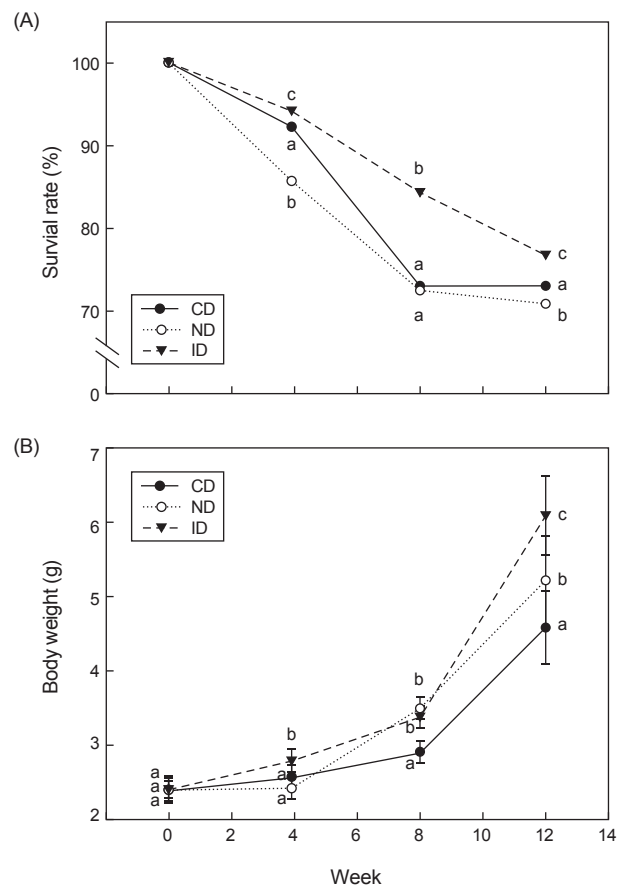


Fig. 1. Survival rate (A) and body weight (B) of the juvenile red type sea cucumber *Stichopus japonicus* experimental diet fed after 12 weeks. Experimental groups: common diet (CD), nutrition diet (ND) and immunity diet (ID). Data are expressed as mean \pm SE, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P<0.05$).

유의적으로 높은 성장을 나타내었다($P<0.05$, Table 3).

이전의 연구보고에 따르면, 프로바이오틱스, 미세조류, 황기 추출다당류(*astragalus membranaceus polysaccharides*), 효모 다당류(*yeast polysaccharide*), 베타글루칸(β -glucans) 및 비타민(vitamin)등의 물질들이 해삼의 비 특이적인 면역과 성장을 증가시키는 것으로 보고되고 있다(Sun et al., 2008; Gu et al., 2010; Zhao et al., 2010; Ma et al., 2013; Wang et al., 2014; Srikanth et al., 2015). 그러나 해삼은 소화능력이 좋지 않기 때문에 기능성 물질을 사료에 배합하여 급이 한다고 하여도 사료의 소화율에 따라 많은 영향을 받으며, 해삼의 성장에 많은 영향을 미치는 해조류와 미세조류분말을 최대한으로 배합하면서 해삼의 소화율을 올리는 것은 해삼사료에서 매우 중요한 요소이다(Xia et al., 2012; Shi et al., 2013; Choi, 2014).

해삼과 같이 주로 해조류를 섭취하는 전복 *Haliotis midae* 또한 프로바이오틱스를 사용 하였을 경우 해조류의 소화를 도와 성장을 증진시키는 것으로 나타났다. 이것은 프로바이오틱스가 해조류의 복잡한 다당류 성분을 빠르게 흡수가능 한 작은 단위로 가수분해 해주는 역할을 하기 때문으로 보고되어졌다(Erasmus et al., 1997; Ten Doeschate and Coyne, 2008; A. Newaj-Fyzul, 2014). 또한, 선행 연구들에서 신바이오틱스를 양식 대상의 먹이에 혼합하여 급이 하였을 시 프로바이오틱스 단일 제제만을 사용한 실험군에 비하여 성장과 소화력을 더욱 높여주는 결과를 나타낸다고 알려졌다(Gibson and Roberfroid, 1995; Kontula et al., 1999; Saarela et al., 2003; Gu et al., 2011; Boonanuntasarn et al., 2015). 본 연구에서도 신바이오틱스를 사용한 ID군에서 성장율 및 생존율이 모두 높게 관찰되었으며, 이는 레반이 프로바이오틱스의 활성을 증진시키는 것을 돕고 이를 통하여 스피루리나와 해조류 분말과 같은 섬유성 물질의 장내 소화와 흡수에 기인했기 때문이라고 여겨진다. 따라서 홍해삼 치삼에게 신바이오틱스성 면역증강제를 첨가하여 급이하게 되면 생존율과 성장률을 높여줄 것으로 판단된다.

Table 3. Growth performance of red sea cucumber *Stichopus japonicus* after 12 weeks

	CD	ND	ID
Initial weight (g/fish) ¹	2.4±0.1 ^a	2.4±0.17 ^a	2.4±0.13 ^a
Final weight (g/fish) ¹	4.6±0.5 ^a	5.3±0.62 ^b	6.1±0.53 ^c
Weight gain (%) ²	91.6±17.2 ^a	118.8±35.2 ^b	156.0±31.7 ^c
Specific growth rate (%) ³	0.21±0.03 ^a	0.27±0.08 ^b	0.34±0.05 ^c

¹Standard weight = total weight (g)/ fish.

²Specific growth rate (%) = (log_e final wt-log_e initial wt)/days.

³Weight gain (%) = (final weight-initial weight)*100 /initial weight.

CD=common diet. ND= nutrition diet. ID= immunity diet.

Mean within each line followed by the different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P<0.05$).

홍해삼 내 다당류 분석

홍해삼에는 다당류가 많이 함유되어 있는 것으로 알려졌으며 (Mourão et al., 1996; Yu et al., 2015) 실험에 사용된 레반이 체내 다당류성분에 영향을 미치는지 확인하기 위해 홍해삼을 동결 건조하여 체벽 내에 존재하는 fructose와 glucose의 함량을 분석하였다. Fructose 분석결과 CD군은 8.84 ± 1.35 mg/100 mL, ND군은 8.06 ± 2.07 mg/100 mL 및 ID군은 9.25 ± 3.14 mg/100 mL로 측정되었다(Fig. 2A). Glucose 분석결과 CD군은 9.20 ± 2.0 mg/100 mL, ND군은 8.21 ± 0.95 mg/100 mL 및 ID군은 10.04 ± 1.85 mg/100 mL로 나타났다(Fig. 2B). 이와 같이 각 실험구 별로 측정 된 fructose와 glucose의 함량은 유의적인 차이는 나타내지 않았지만($P>0.05$), ID군에서 다소 높은 함량 차이를 나타내었다. 이러한 결과는 홍해삼 체벽 내의 fructose와 glucose의 함량이 기본적으로 높기 때문에 모든 실험구의 fructose와 glucose 체내 함량이 크게 차이를 나타내지 않은 것으로 보이며, 치삼의 초기 양성 시 같은 그룹 내에서도 개체간

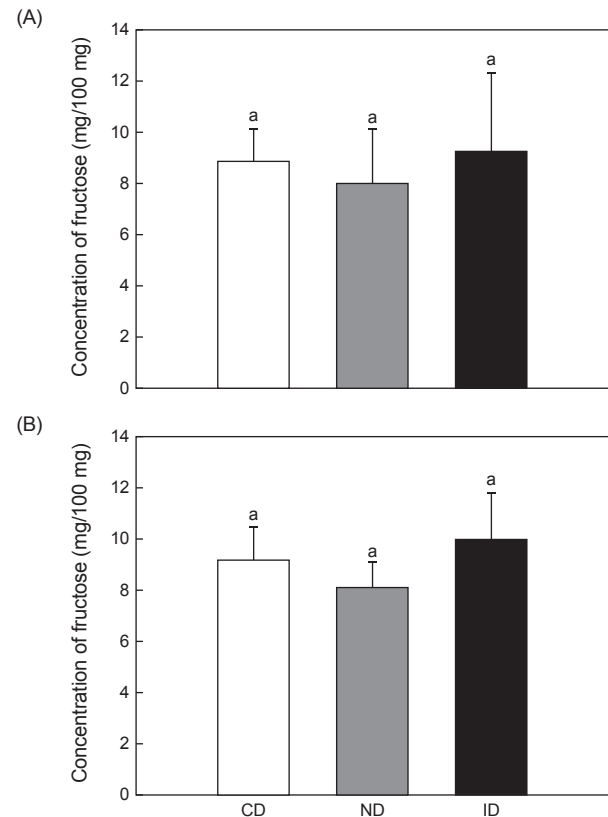


Fig. 2. Glucose (A) and fructose (B) concentration in body wall of the juvenile red type sea cucumber *Stichopus japonicus*. Experimental groups: common diet (CD), nutrition diet (ND) and immunity diet (ID). Data are expressed as mean±SE, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P<0.05$).

의 편차가 크기 때문에 각 그룹간 유의한 차이가 나타나지 않은 것으로 판단 된다($P>0.05$). 일반적으로 레반을 섭취하였을 경우 혈장내의 레반 함량이 올라 감으로서 fructose 및 glucose 함량이 증가하는 것으로 보고되어있어(Rairakhwada et al., 2007; Rehm, 2009), 본 연구결과에서 ID군에서 다소 높은 수치를 나타낸 것은 장내에서 체벽으로 흡수되는 양이 미미하여도 체내 성분에 영향을 미친 것으로 추정된다. 이러한 레반의 급이와 홍해삼 체내의 다당류 변화에 대한 상관관계는 성장의 편차가 적어지는 시기인 중간양성시기의 홍해삼을 대상으로 추가적인 실험이 진행되면 보다 명확하게 밝혀질 것으로 기대된다.

면역 활성 분석

레반을 섭취한 홍해삼의 면역 활성을 확인하기 위해 체강액 내 단백질 함량, lysozyme 및 penoloxydase (PO) 활성을 측정하였다. 체강액 내의 단백질 측정결과 CD군은 56.0 ± 10 mg/mL, ND군은 66.1 ± 24 mg/mL 및 ID군은 66.5 ± 19 mg/mL로 나타났으며(Fig. 3), CD군에 비하여 ND군과 ID군에서 높아지는 경향성을 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다($P>0.05$). 해삼과 같은 극피동물의 체강액은 체강소체(coelomocytes) 및 그 외의 효소가 혼합된 액체로 이루어져 있으며, 초기 면역 활성을 수행하는 것으로 알려져 있다(Glinski and Jarosz., 2000; Ramírez-Gómez et al., 2010). 해삼의 체강액 내에는 다양한 단백질성 면역 요소들이 포함되어 있으며, 주요 면역활성을 수행하는 체강소체를 제외한 체강액에서도 보체 C3, AMP (Antimicrobial Peptides), Toll like receptors, lectins, PO, lysozyme 등의 면역을 유발하는 효소들이 존재하고 있음이 보고되었다(Jiang et al., 2014; Xue et al., 2015). 또한 해삼과 같은 극피동물의 체강액 내 단백질 중에는 척추동물의 면역 보조 단백질인 cytokine IL-1 및 IL-6 등과 유사한 단백질이 이

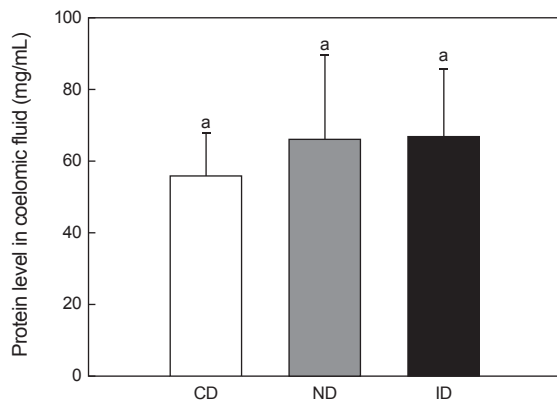


Fig. 3. Protein level in coelomic fluid of the juvenile red type sea cucumber *Stichopus japonicus*. Experimental groups: common diet (CD), nutrition diet (ND) and immunity diet (ID). Data are expressed as mean \pm SE, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P<0.05$).

미 확인되었으며, 보체와 유사한 역할을 하는 면역성 단백질 집단(protein family) 역시 존재하고 있다고 알려졌다(Gross PS et al., 1999; Ramírez-Gómez and García-Arrarás., 2010). 이와 같은 선행연구들로부터 체강액 내 단백질 증가는 비특이적 면역 반응과 연관되어 있을 것이라 추정되나, 본 연구결과 각 그룹간의 단백질 변화에는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 실험에 사용된 홍해삼 치삼의 경우에 초기 같은 무게로 시작하였으나 양성과정에서 같은 그룹 내에서도 개체간의 차이가 크게 나타났기 때문으로 여겨진다. 추후 보다 큰 개체인 중간양성단계의 홍해삼을 이용하여 면역증강제 섭취에 따른 체강액 내의 단백질 함량을 분석하게 되면 더욱 명확히 면역증강제와 체강액 내 단백질의 상관관계를 파악할 수 있을 것이라 사료된다. 따라서 본 실험 결과에서 각 실험군의 체강액 내 단백질 함량이 유의적으로 증가하지는 않았지만($P>0.05$) ND군과 ID군에서 다소의 높은 수치를 나타낸 것은 이러한 비특이적 면역 활성과 관계 및 생존율과 연관이 있을 것으로 여겨진다.

한편, 해삼 체강액 내의 lysozyme 활성 실험 결과 CD군은 29.54 ± 9.2 U/mg, ND군은 49.52 ± 7.2 U/mg, ID군은 14.09 ± 3.2 U/mg로 ID군에서 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다(Fig. 4A, $P<0.05$). Lysozyme은 점액, 눈물 등에 포함된 선천면역 효소 중 하나로서 병원성 미생물에 대항하기 위한 초기 면역요소이며 무척추동물의 비특이적 면역시스템에서 중요한 역할을 수행한다(Saurabh and Sahoo, 2008; Nayak, 2010). 해삼은 수온이나 염분 스트레스가 있을 경우에 lysozyme 활성이 증가되며(Wang et al., 2008), 면역증강제에 첨가된 레반을 섭취하였을 경우 체강액 내 lysozyme 및 기타 비특이적 면역을 증가시킨다고 하였다(Rairakhwada et al., 2007; Dahech et al., 2011; Xue et al., 2015). 그러나 본 연구에서는 면역증강제 배합사료를 급이 한 ID군이 가장 좋은 성장율과 생존율을 나타냈음에도 불구하고 12주 후 측정된 lysozyme 활성은 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다. 이와 같은 현상을 이전의 연구들에서는 면역증강제에 의한 lysozyme 활성이 초기에 증가하였다가 지속적인 면역 자극이 오지 않는 경우에는 시간이 지날수록 체내에서 안정화 되는 현상을 나타내는 것으로 추정하고 있다. Ma et al. (2013)의 연구에서 본 연구 결과와 유사하게 실험 시 사용한 프로바이오틱스의 농도에 따라 lysozyme 활성이 농도의존적으로 변화하지만, 지속적인 면역 활성을 측정할 결과 어느 정도 시간이 지난 후에는 오히려 초기보다 활성이 낮아지는 결과를 나타내었다. 또한, Tian et al. (2015)의 연구에서도 마찬가지로 염분스트레스에 따른 c-type lysozyme 유전자 발현 역시 초기에는 증가하다가 시간이 지난 후에는 낮은 경향을 나타내었다. 따라서 본 실험에서 ID군에서 장기간의 사육에 따라 lysozyme이 낮은 수치를 나타낸 결과와 ID군에서 높은 생존율과 성장율을 보인 결과를 종합하여 보면, ID군의 낮은 수치의 lysozyme은 해삼의 사육 안정화에 따른 결과로 보인다. 추후 외부스트레스 자극에 의한 lysozyme 활성변화 등의 연구를 통해

여 경시적인 변화를 분석하게 되면 보다 정확한 상관관계를 파악할 수 있을 것으로 기대된다.

PO 활성을 측정한 결과, CD군에서 14.7 ± 6.5 U/mg, ND군은 17.2 ± 8.0 U/mg 및 ID군은 16.2 ± 3.8 U/mg로 CD군에 비하여 ND군과 ID군에서 약간의 차이는 나타났으나 유의적인 차이는 없었다(Fig. 4B, $P > 0.05$). PO 활성은 해삼의 면역 활성화에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있으며 lysozyme과 마찬가지로 주로 체강액 내에서 발견된다(Jiang et al., 2014). Magnadóttir et al. (2006)에 의하면 일반적으로 PO 활성과 같은 혈장내의 anti-protease 활성은 α_1 -antiprotease, α_2 -antiprotease 및 α_2 -macroglobulin에 의하여 활성화 된다고 하였으나 이러한 효소들은 일반적으로 세균이 침입 하였을 때만 응답하는 효소들로서 PO 활성을 위한 전구효소의 활성은 개체의 감염이나 면역자극에 의해서만 활성화된다고 보고하였다(Magnadóttir et al., 2006). 따라서 본 실험에서는 면역자극을 유발하는 요인이 적어 PO 활성이 실험군간 유사한 수치를 나타낸 것으로

판단된다.

이상의 연구의 결과를 종합 해보면, 신바이오틱스성 면역증강제 급이를 통해 홍해삼 치삼의 증체율, 일간 성장률 및 생존율이 증가됨을 확인하였으며, 면역 활성화의 경우 안정화 되는 경향을 나타내었으나 추가 실험을 통해 면역 활성을 검증해 볼 필요가 있을 것으로 판단된다. 이후 추가적인 보충실험을 통하여 본 연구에서 개발된 면역증강제가 홍해삼의 성장증대와 친환경적인 질병제어에 있어 양식어가에 도움을 줄 수 있을 것으로 여겨진다.

사 사

본 "생균제와 미세조류 및 다당류를 함유한 홍해삼 양식용 면역증강제 개발"은 중소기업청에서 지원하는 2014년도 산학협력 기술개발사업(No.C0208090)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

References

- Adebola OO, Corcoran O and Morgan WA. 2014. Synbiotics: The impact of potential prebiotics inulin, lactulose and lactobionic acid on the survival and growth of lactobacilli probiotics. *J Funct Foods* 10, 75-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.05.010>.
- Akin MB, Akin MS and Kirmaci Z. 2007. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice cream. *Food Chem* 104, 93-99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.030>.
- Boonanuntanasarn S, Wongsasak U, Pitaksong T and Chaijamrus S. 2015. Effects of dietary supplementation with β -glucan and synbiotics on growth, haemolymph chemistry, and intestinal microbiota and morphology in the Pacific white shrimp. *Aquac NutArticle* first published online. <http://dx.doi.org/10.1111/anu.12302>.
- Choi GS. 2014. Effects of Experimental formulated diets mixture ratio on growth and body composition of sea cucumber *Stichopus japonicus*. Master Theses, Inha University, Incheon, Korea.
- Choo P S. 2008. Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in Asia. *Sea Cucumbers*. A Global Rev Fish Trade 516, 81-118.
- Cross ML. 2002. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic *lactobacilli* and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34, 245-253. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2002.tb00632.x>.
- Dahech I, Belghith KS, Hamden K, Feki A, Belghith H and Mejdoub H. 2011. Oral administration of levan polysaccharide reduces the alloxan-induced oxidative stress in rats. *Int J Biol Macromol* 49, 942-947. [Figure 4 consists of two bar charts, \(A\) and \(B\), showing enzyme activity in U/mg for three experimental groups: CD \(Common Diet\), ND \(Nutrition Diet\), and ID \(Immunity Diet\). Error bars represent standard error \(SE\). Different superscript letters \(a, b, c\) indicate significant differences \(P < 0.05\).

Group	Mean Activity \(U/mg\)	Significance
CD	~29	a
ND	~49	b
ID	~14	c

Group	Mean Activity \(U/mg\)	Significance
CD	~14.7	a
ND	~17.2	a
ID	~16.2	a
</div>
<div data-bbox=)

Fig. 4. Lysozyme activity (A) and penoxlydase activity (B) in coelomic fluid of the juvenile red type sea cucumber *Stichopus japonicus*. Experimental groups: CD; common diet, ND; nutrition diet and ID; immunity diet. Data are expressed as mean \pm SE, different superscript letters (a, b, c) indicate, significant difference between the values ($P < 0.05$).

- ijbiomac.2011.08.011.
- De Schrijver R and Ollevier F. 2000. Protein digestion in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. *Aquaculture* 186, 107-116. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00372-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00372-5).
- El-Nagar G, Clowes G, Tudorica CM and Kuri V. 2002. Rheological quality and stability of yog-ice cream with added inulin. *Int J Dairy Technol* 55, 89-93 <http://dx.doi.org/1046/j.1471-0307.2002.00042.x>.
- Erasmus JH, Cook PA and Coyne VE. 1997. The role of bacteria in the digestion of seaweed by the abalone *Haliotis midae*. *Aquaculture* 155, 377-386. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00112-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00112-9).
- Glinski Z and Jarosz J. 2000. Immune phenomena in echinoderms. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 48, 189-193.
- Gibson GR and Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125, 1401-1412.
- Gilliland SE, Morelli L, Reid G. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. In: *FAO/WHO Expert Consultation On Evaluation Of Health And Nutritional Properties Of Probiotics in Food Including Powdered Milk*. Cordoba, Argentina.
- Gross PS, Al-Sharif WZ, Clow LA and Smith LC. 1999. Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. *Dev Comp Immunol* 23, 429-442.
- Gu M, Ma H, Mai K, Zhang W, Bai N and Wang X. 2011. Effects of dietary β -glucan, mannan oligosaccharide and their combinations on growth performance, immunity and resistance against *Vibrio splendidus* of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol* 31, 303-309. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2011.05.018>.
- Gu M, Ma HM, Mai KS, Zhang WB, Ai QH, Wang XJ and Bai N. 2010. Immune response of sea cucumber *Apostichopus japonicus* coelomocytes to several immunostimulants in vitro. *Aquaculture* 306, 49-56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.05.024>.
- Jiang J Zhou Z, Dong Y, Guan X, Wang B, Jiang B and Sun H. 2014. Characterization of phenoloxidase from the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Immunobiology* 219, 450-456. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2014.02.006>.
- Kan-no M and Kijima A. 2003. Genetic differentiation among three color variants of Japanese sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Fish Sci* 69, 806-812. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1444-2906.2003.00690.x>.
- Kang SA, Jang KH, Seo JW, Kim KH, Kim YH, Rairakhwada D and Rhee SK. 2009. Levan: applications and perspectives. Microbial production of biopolymers and polymer precursors. Caister Academic Press, Norwich, 145-161.
- Kontula P, Suihko ML, Von Wright A and Mattila-Sandholm T. 1999. The effect of lactose derivatives on intestinal lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 82, 249-256. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75230-6](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75230-6).
- Magnadóttir B, Gudmundsdóttir BK, Lange S, Steinarsson A, Oddgeirsson M, Bowden T and Gudmundsdóttir S. 2006. Immunostimulation of larvae and juveniles of cod, *Gadus morhua*. *L J Fish Dis* 29, 147-155.
- Ma Y, Liu Z, Yang Z, Li M, Liu J and Song J. 2013. Effects of dietary live yeast *Hanseniaspora opuntiae* C21 on the immune and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol* 34, 66-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.10.005>.
- Morelli L, Zonenschain D, Callegari ML, Grossi E, Maisano F and Fusillo M. 2003. Assessment of a new synbiotic preparation in healthy volunteers: survival, persistence of probiotic strains and its effect on the indigenous flora. *Nutr J* 2, 1-11. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2891-2-11>.
- Mourão PA, Pereira MS, Pavão MS, Mulloy B, Tollefsen DM, Mowinckel MC and Abildgaard U. 1996. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action. *J Food Biochem* 271, 23973-23984.
- Newaj-Fyzul A, Al-Harbi AH and Austin B. 2014. Review: developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture* 431, 1-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.026>.
- Nayak SK. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shellfish Immunol* 29, 2-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.017>.
- Ramírez-Gómez F, Aponte-Rivera F, Méndez-Castaner L and García-Arrarás J E. 2010. Changes in holothurian coelomocyte populations following immune stimulation with different molecular patterns. *Fish Shellfish Immunol* 29, 175-185. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.03.013>.
- Ramírez-Gómez F and García-Arrarás J E. 2010. Echinoderm immunity. *Invert Survival J* 7, 211-220.
- Rairakhwada D, Pal AK, Bhatena ZP, Sahu NP, Jha A and Mukherjee SC. 2007. Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp, *Cyprinus carpio* juveniles. *Fish Shellfish Immunol* 22, 477-486. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2006.06.005>.
- Rehm BH. 2009. Microbial production of biopolymers and polymer precursors: Applications and perspectives. Horizon Scientific Press, Norfolk, UK.
- Saarela M, Hallamaa K, Mattila-Sandholm T and Mättö J. 2003. The effect of lactose derivatives lactulose, lactitol and lactobionic acid on the functional and technological properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *International Dairy J* 13, 291-302. [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00158-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00158-9).
- Srikanth R, Reddy CHS, Siddartha G, Ramaiah MJ and Uppu-

- luri KB. 2015. Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydr Polym* 120, 102-114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.003>.
- Saurabh S and Sahoo PK. 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquac Res* 39, 223-239. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x>.
- Shi C, Dong S, Wang F, Gao Q and Tian X. 2013. Effects of four fresh microalgae in diet on growth and energy budget of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Aquaculture* 416, 296-301. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.050>.
- Sugita H, Takahashi J and Deguchi Y. 1992. Production and consumption of biotin by the intestinal microflora of cultured freshwater fishes. *Biosci Biotechnol Biochem* 56, 1678-1679. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.56.1678>.
- Sun Y, Jin L, Wang T, Xue J, Liu G, Li X, You J, Li S and Xu Y. 2008. Polysaccharides from *Astragalus membranaceus* promote phagocytosis and superoxide anion (O_2^-) production by coelomocytes from sea cucumber *Apostichopus japonicus* in vitro. *Comp Biochem Physiol C* 147, 293-298. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.11.003>.
- Ten Doeschate KI and Coyne VE. 2008. Improved growth rate in farmed *Haliotis midiae* through probiotic treatment. *Aquaculture* 284, 174-179. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.018>.
- Tian Y, Liang XW, Chang YQ and Song J. 2015. Expression of c-type lysozyme gene in sea cucumber *Apostichopus japonicus* is highly regulated and time dependent after salt stress. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 180, 68-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.10.004>.
- Vine NG, Leukes WD and Kaiser H. 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol Rev* 30, 404-427. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00017.x>.
- Wang F, Yang H, Gao F, and Liu G. 2008. Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 151, 491-498. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.06.024>.
- Wang X, Wang L, Che J, Li X, Li J, Wang J and Xu Y. 2014. In vitro non-specific immunostimulatory effect of alginate oligosaccharides with different molecular weights and compositions on sea cucumber *Apostichopus japonicus* coelomocytes. *Aquaculture* 434, 434-441. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.021>.
- Xia S, Yang, H, Li Y, Liu S, Zhou Y and Zhang L. 2012. Effects of different seaweed diets on growth, digestibility, and ammonia-nitrogen production of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Aquaculture* 338, 304-308. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.01.010>.
- Xue Z, Li H, Wang X, Li X, Liu Y, Sun J and Liu C. 2015. A review of the immune molecules in the sea cucumber. *Fish Shellfish Immunol* 44, 1-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.026>.
- Yang H, Yuan X, Zhou Y, Mao Y, Zhang T and Liu, Y. 2005. Effects of body size and water temperature on food consumption and growth in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) with special reference to aestivation. *Aquac Res* 36, 1085-1092. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01325.x>.
- Yu MC, Li ZJ, Lin HZ, Wen GL and Ma S. 2009. Effects of dietary medicinal herbs and *Bacillus* on survival, growth, body composition, and digestive enzyme activity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquac Int* 17, 377-384. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-008-9209-3>.
- Yu L, Xue C, Chang Y, Hu Y, Xu X, Ge L and Liu G. 2015. Structure and rheological characteristics of fucoidan from sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Food Chem* 180, 71-76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.034>.
- Zhao W, Liang M and Zhang P. 2010. Effect of yeast polysaccharide on the immune function of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) under pH stress. *Aquacult Int* 18, 777-786. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-009-9300-4>.
- Zokaeifar H, Balcázar JL, Saad CR, Kamarudin MS, Sijam K, Arshad A and Nejat N. 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 33, 683-689. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.027>.