

규조류 및 유산균 첨가 사료 공급에 따른 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 성장 및 비특이적 면역 촉진 반응에 미치는 영향

노윤혜 · 김기혁 · 문혜나 · 고경민¹ · 여인규*

제주대학교 해양생명과학과, ¹어업회사법인(주) 제이앤씨(JNC bio)

Effect of Dietary Supplementation of Diatom *Melosira nummuloides* and Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus plantarum* on the Growth and Immune Stimulation Responses of Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*

Yun-Hye Noh, Ki-Hyuk Kim, Hye-Na Moon, Gyung-Min Go¹ and In-Kyu Yeo*

Department of Marine life Science, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

¹JNC Bio, Bio Convergence Center II, Jeju 63243, Korea

The diatom *Melosira nummuloides* is a microalga that is widely distributed in freshwater and seawater is used is used in the production of silicon and fucoxanthin. The objective of this experimental study was to determine the effects of diatom powder on the physiology of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. In four feeding groups consuming 0%, 1%, 2% and 3% diatom powder. After 8 weeks of feeding, we investigated *P. olivaceus* growth rate, feed efficiency rate, survival rate, anti-oxidant enzyme rate, non-specific immune activity and immune gene expression. The rates of growth rate, feed efficiency rate and survival were significantly higher for olive flounder in all diatom groups than in the control. The results for anti-oxidant enzyme, superoxide dismutase and catalase showed no significance, but glutathione was significant, depending on the concentration of diatom addition. The galectin and lysozymes of immune genes were increased in the control group. Galectin and lysozymes were thought to have increased due to infections by from pathogens during the experiment period. These results suggest that the addition of diatoms to olive flounder diets is effective in enhancing growth rate and innate immunity.

Keywords: Diatom, *Melosira nummuloides*, Olive flounder, Growth, Immune genes

서 론

현재 국내에서는 양식어류의 빠른 성장을 위한 과다한 사료 공급으로 환경악화가 초래되고, 밀식으로 인한 질병발생도 증가하고 있는 추세이다(MIFAFF, 2003). 이에 따라 양식어류의 내병성 저하와 병원체의 감염이 증가됨에 따라 항생제의 사용 빈도수가 늘어나고 있다(Smith et al., 1994; Kim et al., 2014). 최근에는 이러한 문제를 해결하기 위하여 항생제를 대체할 수 있는 친환경적인 천연물질을 이용한 사료첨가제 개발을 통하여 양식어류의 성장 및 자가 면역 증진을 위한 연구가 진행되고 있다(Adel et al., 2016; Yu et al., 2018; Hoseinifar et al., 2019). 한편, 규조류(*Bacillariophyceae*)는 미세조류(microalgae) 그

룹의 식물 플랑크톤 중 황갈조식물문(Chrysophyta)에 속하며, 바다 및 호수에서 생활, 번식한다(Li et al., 2014). 규조류는 세계적으로 탄소 고정에 기여하는 주요 종이며, 광합성을 통해 해양에서 생산되는 일차 생산량의 약 40%를 차지한다(Nelson et al., 1995). 규조는 이매패류 및 갑각류의 중차 생산시 먹이 생물로 많이 이용되고 있어 산업적으로 매우 중요한 가치를 가지고 있다(Gordon et al., 2006; Onitsuka et al., 2007). 그 중 해양 규조인 *Melosira nummuloides*는 폴리 불포화 지방산(polyunsaturated fatty acids, PUFA), 단가 불포화지방산(monounsaturated fatty acids, MUFA), 오메가-3 (ω -3), eicosapentaenoic acid (EPA) 및 폴리페놀(polyphenol)을 함유하고 있어 동물 및 어류 영양에 이용가능한 자원으로 보고되어 있다(Li et al.,

*Corresponding author: Tel: +82. 64. 754. 3474 Fax: +82. 64. 756. 3493

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



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

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0597>

Korean J Fish Aquat Sci 53(4), 597-605, August 2020

Received 28 January 2020; Revised 10 March 2020; Accepted 8 July 2020

저자 직위: 노윤혜(대학원생), 김기혁(대학원생), 문혜나(대학원생), 고경민(대표), 여인규(교수)

2016). 특히 사료 내 규조류의 첨가에 의해 *pacific red snapper Lutjanus peru* 및 *gilthead seabream Sparus aurata L.*의 성장 및 면역능 개선효과가 있는 것으로 보고되고 있으며(Cerezuela et al., 2012; Martha et al., 2014), 해양 미세 규조 (*Navicula sp.*)의 경우, 단독 첨가 보다 유산균을 혼합하여 첨가하였을 때 어류의 성장 및 면역반응이 증진되는 것으로 보고되어졌다(Martha et al., 2014). 이처럼 기존의 패류의 사료로만 사용되어졌던 해양 규조류를 이용한 양식어류의 사료첨가제로써의 가능성이 점차 높아지고 있는 실정이다.

또한 규조류는 규각을 구성하고 있는 규소(silicon) 및 fucoxanthin의 생산원료로도 주목받고 있다(Woesz et al., 2006; Guo et al., 2016). 특히 규조류의 주요 구성성분인 규소는 지구의 지각(암석권)에 산소 다음으로 가장 풍부한 원소일 뿐만이 아니라(Carlisle, 1972, 1982; Epstein, 1994), 동식물의 골격 형성에 있어 중요한 성분으로 뼈, 관절, 혈관, 피부, 모발 및 치아 등 모든 세포에 분포하여 세포막을 튼튼하게 만들고, 세포간 결합을 강력하게 유지시키는 기능을 가지는 것으로 알려져 있다(Carlisle, 1972; Schwarz et al., 1972; Rico et al., 2000; Reffitt et al., 2003). 최근에는 이러한 규소를 함유하고 있는 다양한 기능성 제품들이 출시되는 등 규소의 기능에 대한 관심도가 높아지고 있는 실정이다.

특히 *Melosira nummuloides*는 제주용암해수에서 분리되어 대량생산이 가능하며, 제주 용암해수에 용해되어 있는 규소 Si(OH)₄와 마그네슘(Mg²⁺)을 주로 이용하여 세포벽(골격)을 구성하는 규조류(Diatoms)의 규소함량은 200,000 ppm/tissue로 모든 동식물에서 가장 높은 것으로 알려져 있다(JNC, 2020). 이에 따라 기존의 다른 규조류에 비하여 규소 등에 의한 생리활성 기능이 높을 것으로 추측된다.

따라서 본 연구에서는 다양한 성분을 함유하고 있는 규조류의 양식넙치 사료첨가제로서의 효능을 평가하기 위하여, 제주 용암해수에서 분리 배양한 *M. nummuloides* 및 유산균(*Latobacillus plantarum*)을 사료에 첨가하여 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 치어의 성장률, 사료효율, 폐사율, 항산화 활성, 비특이적 면역 분석 및 면역관련 유전자 분석을 실시하였다.

재료 및 방법

실험어 및 실험조건

본 실험은 제주도 함덕에 위치한 제주대학교 해양과학연구소 내 사육수조에서 실시하였으며, 넙치는 약육 및 2주일간의 순화 기간을 가진 후 개시 평균 무게, 29.79 ± 4.60 g의 개체를 그룹당 320마리씩 무작위로 배치되어 실험에 사용하였다. 사육 수조는 1.5 × 1.5 × 0.7 m³, 1,100 L 용량의 일체형 수조를 이용하여 3반복 실험을 실시하였다.

모든 실험구는 8주간의 사료 공급 실험 후 무작위로 각 실험구에서 65마리를 선별하여 혈액, 간 및 신장을 채취하였으며,

이 중 각 그룹의 평균 무게와 근사한 값을 가지는 어체에서 샘플링한 시료 10개로 분석이 진행되었다. 또한, 실험 기간 동안 모든 수조는 자연 수온 23.81 ± 2.70°C, 염분 32.37 ± 0.45 psu로 조절되었다.

실험사료 및 공급

실험에 사용된 규조(*M. nummuloides*)는 어업회사법인 (주)제이앤씨(Jeju, Korea)에서 제공받아 실험에 사용되었다. 실험에 사용한 *M. nummuloides*의 일반성분조성은 조회분 59.24%, 조단백질 18.87%, 수분 6.26%, 조섬유 1.77% 및 조지방 1.03%이었으며(data not shown), 이를 기초로 하여 규조 함량이 0% (대조구), 1%, 2% 및 3% (D1, D2 및 D3)로 첨가된 4개의 실험 사료를 제작하였고, 규조의 소화흡수를 높이기 위하여 유산균인 *L. plantarum*을 첨가하였다(Table 1). 실험사료는 사료원을 조성표에 따라 혼합한 후, 사료제작기(SP-50, Gumgang ENG, Daegu, Korea)을 이용하여 2-3 mm의 크기로 성형하였다. 성형된 사료는 24시간 건조 후 사료공급 전까지 냉동보관(-20°C) 후 공급하였다. 사료 공급은 1일 2회(09:00, 14:00 h)에 걸쳐 만복공급(saturation)하였으며, 공급 후 60분 뒤 환수를 실시하여 수조의 수질을 유지하였으며, 사육은 총 8주간 진행하였다.

계측 및 생존율 분석

규조의 사료 내 첨가가 실험어 체중 변화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 8주간의 사료공급 실험 후 어류의 평균 체중을 측정하여 성장률, 사료효율 및 생존율을 각각 계산하였다. 생존율은 1일 간격으로 각 실험구에 폐사한 개체가 있는지 관찰하여 상법으로 산출하였다. 실험어의 어체 측정은 측정 24시간 전부터 절식시킨 후, 각 실험구에서 무작위로 65마리를 선별하여 100 ppm의 마취용액(2-phenoxy-ethanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 마취시킨 후 실시하였다.

항산화 활성 분석

항산화 활성은 8주간의 사료 공급 실험 후 0.01%의 마취용액(2-phenoxy-ethanol)으로 마취시킨 후, 간을 적출하여 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) 및 glutathione (GSH)의 활성을 분석하였다. SOD 활성은 간 조직을 SOD assay kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 buffer solution로 균질화 한 후 10,000 g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 이용하여 분석하였다. CAT 활성은 간 조직을 catalase activity colorimetric kit (BioVision, San Francisco, CA, USA)를 사용하여 assay buffer로 균질화 한 후 10,000 g에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액을 이용하여 분석하였다. GSH 활성은 실험어의 간 조직을 GSSG/GSH Quantification kit (Dojindo, Rockville, MD, USA)를 사용하여 5% 5-sulfosalicylic acid (SSA)를 첨가하여 균질화 후 8,000 g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 Dojindo사의 kit를 이용하여 분석하였다.

비특이적 면역 반응 분석

비특이적 면역은 lysozyme (LYS) 및 myeloperoxidase (MPO) 활성을 통하여 비교 분석하였다. 혈액의 채취는 8주간의 사료 공급 실험 후 0.01%의 마취용액(2-phenoxy-ethanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 마취시킨 후, 헤파린(Heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 4.69 mg/mL, sterile distilled water) 처리된 일회용주사기를 사용하여 미부정맥으로 실시하였다. 채취한 혈액은 원심분리기를 이용하여 8,000 g에서 10분동안 원심분리하여 혈장(plasma)을 분리한 뒤 분석 전까지 -55°C에서 보관하였다. 혈장 내 LYS 활성은 혈장을 15 µL씩 96 well plate에 분주한 후, 150 µL *Micrococcus lysodeikticus*

solution (0.2 mg/mL, 0.1 M PBS, pH=6.8)를 첨가한 후 25°C에서 1분간 반응 후 microplate reader (Thermo, Waltham, MA USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고, 다시 5분간 반응시킨 뒤 동일한 파장에서 흡광도를 측정하여 lysis 전후의 흡광도 차를 비교하여 측정하였다.

혈장 내 MPO 활성은 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 96 well plates에 80 µL씩 분주한 후 혈장 20 µL를 넣은 후 20 mM TMB (3, 3', 5, 5-tetramethylbenzidine hydrochloride)용액과 5 mM H₂O₂용액을 첨가하고, 2분간 반응시킨 후 4 M H₂SO₄용액을 35 µL 첨가한 후 microplate reader (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

면역관련 유전자 분석

규조 첨가사료의 공급에 따른 면역 관련 유전자의 변화는 galectin 및 c-type lysozyme을 분석하였다. 먼저, 면역 관련 유전자들의 발현을 확인하기 위해 total RNA는 실험어로부터 신장(head kidney)조직을 적출하여 RNAiso Plus (Takara Bio Inc, Kusatsu, Japan)를 사용하여 추출 하였다. 건조 된 RNA pellet을 RNase-DNase free water (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 용해시키고, NanoDrop (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 순도(purity) 및 농도(concentration)를 측정하여 cDNA 합성에 사용하였다. cDNA는 cDNA Synthesis kit (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan)를 사용하여 합성한 뒤 -20°C에서 보관하여 PCR 증폭에 사용하였다.

Real-time PCR (qPCR)는 cDNA를 주형으로 SYBR Green (Enzynomics, Daejeon, Korea) 및 real-time PCR machine (Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 실험을 진행하였다. β-actin을 내부 대조군으로 사용하여 c-type lysozyme과 galectin의 상대적 발현 수준을 qPCR을 사용하여 나타내었다 (Table 2).

통계처리

본 실험의 모든 결과값은 평균 표준편차로 나타내었으며, IBM SPSS Statistics 24 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 활용하여 One-way ANOVA-test로 통계 분석을 실시하였다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's multiple test 사후분석을 실시하여

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

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

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

Table 2. Primer sequences used in the study

Primer	Direction	Sequences(5'- 3')
β-actin	Forward	TTCCTCGGTATGGAGTCCTG
	Reverse	AGCACAGTGTGGCGTACAG
c-type lysozyme	Forward	CTGTGGCAGGAAAGACTTC
	Reverse	GGAAGTGTGGTGGAGAGGA
galectin	Forward	TGTTGAGTCACGGAGACGAG
	Reverse	ACCTCCATCCAGATCAGTGC

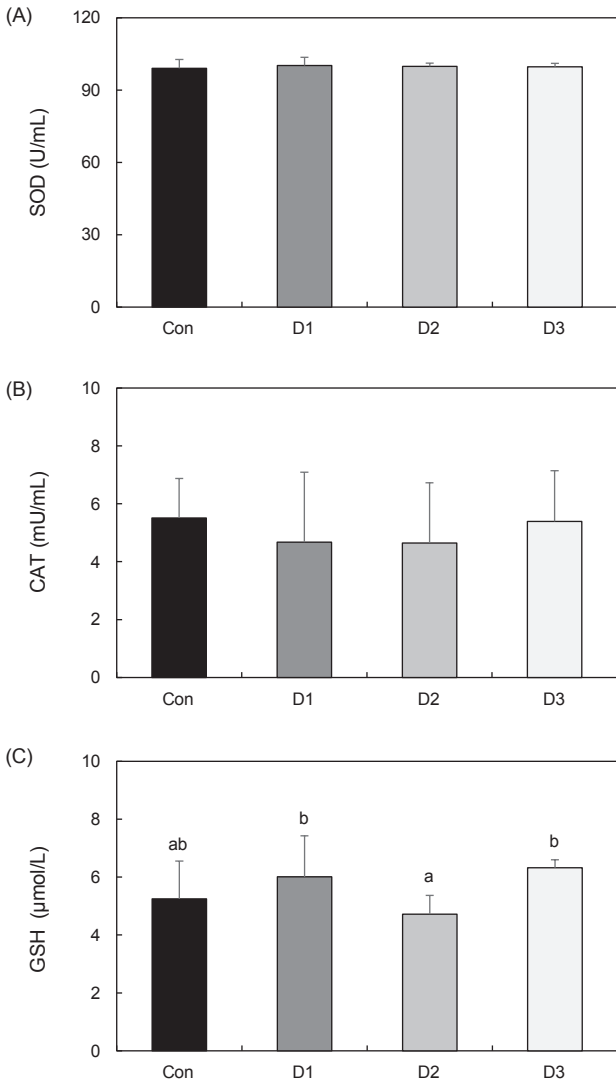


Fig. 1. Changes of superoxide dismutase (SOD; A), catalase (CAT; B) and glutathione (GSH; C) in liver of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels of diatom powder 0%, 1%, 2% and 3% (Con, D1, D2 and D3) for 8 weeks. Values (means of duplicate \pm SD) in the same column sharing a common superscript are not significantly different ($P < 0.05$).

측정하였으며, $P < 0.05$ 에서 유의성을 판단하였다.

결 과

체중 및 생존율

규조 사료첨가제 공급에 따른 넙치의 성장률, 사료효율 및 생존율의 변화 결과는 Table 2에 나타내었다. 실험 개시 전 체중은 평균 29.79 ± 4.60 g로 8주간의 사료공급 결과, 최종 성장 체중은 대조구에서 64.76 ± 9.93 g, D1에서 81.61 ± 15.02 g, D2

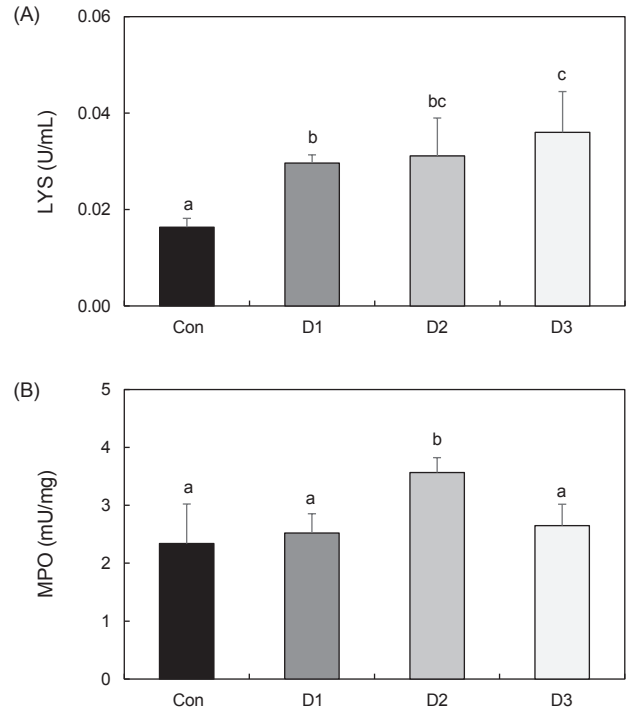


Fig. 2. Lysozyme activity (LYS; A) and myeloperoxidase activity (MPO; B) in serum of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels of diatom powder 0%, 1%, 2% and 3% (Con, D1, D2 and D3) for 8 weeks. Values (means of duplicate \pm SD) in the same column sharing a common superscript are not significantly different ($P < 0.05$).

에서 79.30 ± 16.24 g, D3에서 75.16 ± 11.06 g으로 나타나, 규조 첨가구가 대조구에 비교하여 유의하게 높게 나타났으며, D1 실험구에서 실험 개시전에 비해 173.94%의 증체율을 나타내어 가장 빠른 성장을 나타냈다(Table 2, $P < 0.05$). 사료효율에 있어서도 대조구에서 0.303%, D1에서 0.411%, D2에서 0.369%, D3에서 0.356%로, D1에서 가장 높게 나타났다(Table 2). 반면, 생존율은 대조구에서 $98.13 \pm 2.65\%$, D1에서 $98.75 \pm 1.77\%$, D2에서 $99.06 \pm 1.33\%$, D3에서 $98.13 \pm 2.65\%$ 로 D2에서 가장 높게 나타났다(Table 2).

항산화 활성 분석

규조 사료첨가제 공급에 따른 넙치의 생체 내 항산화 활성을 조사하기 위한 SOD, CAT 및 GSH의 분석 결과는 Fig. 1와 같다. SOD는 대조구에서 99.06 ± 3.67 U/mL, D1에서 100.14 ± 3.46 U/mL, D2에서 99.85 ± 1.33 U/mL, D3에서 99.63 ± 1.42 U/mL로 모든 실험구에서 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Fig. 1, $P > 0.05$). CAT 또한 대조구에서 5.51 ± 2.29 mU/mL, D1에서 4.67 ± 2.42 mU/mL, D2에서 4.64 ± 2.08 mU/mL, D3에서 5.39 ± 1.75 mU/mL로 모든 실험구에서 유의적인 차이는 없었

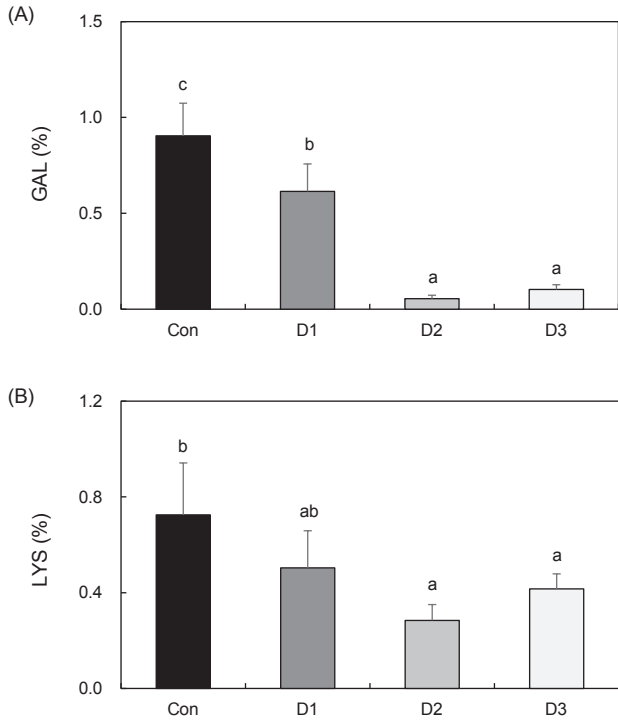


Fig. 3. Change of galectin (GAL; A) and lysozyme (LYS; B) expression change in kidney of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets containing different levels of diatom powder 0%, 1%, 2% and 3% (Con, D1, D2 and D3) for 8 weeks. Expression levels were normalized against the internal control, β -actin. Expression levels between the two groups were compared by real-time PCR. Values (means of duplicate \pm SD) in the same column sharing a common superscript are not significantly different ($P < 0.05$). PCR, polymerase chain reaction.

다(Fig. 1, $P > 0.05$). GSH는 대조구에서 $5.25 \pm 1.30 \mu\text{mol/L}$, D1에서 $6.01 \pm 1.42 \mu\text{mol/L}$, D2에서 $4.72 \pm 0.65 \mu\text{mol/L}$, D3에서 $6.32 \pm 0.27 \mu\text{mol/L}$ 로 나타나 D1 및 D3의 실험구에서 대조구에 비해 높게 나타나는 경향을 보였으나, D2에서는 유의하게 낮았다(Fig. 1, $P < 0.05$).

비특이적 면역 분석

규조류 사료첨가제 공급에 따른 넙치 혈장에서의 비특이적 방어 기작을 조사하기 위하여 LYS 및 MPO 활성을 각각 분석하였다(Fig. 2).

LYS은 대조구에서 $0.016 \pm 0.002 \text{ U/mL}$, D1에서 $0.029 \pm 0.002 \text{ U/mL}$, D2에서 $0.031 \pm 0.008 \text{ U/mL}$, D3에서 $0.036 \pm 0.008 \text{ U/mL}$ 로 모든 규조류 사료첨가제의 급이 실험구에서 대조구에 비해 유의하게 높은 수치를 나타내었으며, 특히 D3 실험구에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 2, $P < 0.05$). MPO는 대조구에서 $2.37 \pm 0.65 \text{ mU/mg}$, D1에서 $2.54 \pm 0.32 \text{ mU/mg}$, D2에서 $3.59 \pm 0.24 \text{ mU/mg}$, D3에서 $2.69 \pm 0.33 \text{ mU/mg}$ 로 D2가 다른 실험구에 비해 유의적으로 높게 나타났다(Fig. 2, $P < 0.05$).

면역관련 유전자 분석

규조류 사료첨가제 급이에 따른 넙치 신장에서의 면역관련 유전자를 조사하기 위하여 galectin 및 c-type lysozyme 활성을 각각 분석하여 나타내었다(Fig. 3). Galectin은 대조구에서 $0.904 \pm 0.169\%$, D1에서 $0.614 \pm 0.144\%$, D2에서 $0.055 \pm 0.018\%$, D3에서 $0.103 \pm 0.024\%$ 로, 대조구에서 가장 높은 수치를 나타내었으며, D2 및 D3 실험구에서 매우 낮은 수치를 나타내었다(Fig. 3, $P < 0.05$). c-type lysozyme은 대조구에서 $0.725 \pm 0.177\%$, D1에서 $0.504 \pm 0.155\%$, D2에서 $0.284 \pm 0.066\%$, D3에서 $0.416 \pm 0.062\%$ 로 나타나 galectin과 유사하게 대조구가 가장 높고 D2 및 D3 실험구에 유의적으로 낮았다(Fig. 3, $P < 0.05$).

고찰

본 연구에서 나타난 규조류 사료첨가제 공급에 따른 넙치의 성장 변화에서 사료 내 규조류의 첨가는 성장 및 생존율에 긍정적인 영향을 끼치는 것으로 추정된다. 본 사육실험에서 대조사료를 8주간 섭취한 실험어(최초 무게 $29.79 \pm 4.60 \text{ g}$)의 최종 무게는 $64.76 \pm 9.93 \text{ g}$ 이었으며, 사료효율은 0.303%로 나타났으며, 사료 내 규조류를 첨가한 모든 그룹에서 대조구보다 유의적

Table 3 Growth performance of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 8 weeks

Growth performances	Experimental diets			
	Control	D1	D2	D3
Final body weight (g)	64.76 \pm 9.93 ^a	81.61 \pm 15.02 ^c	79.30 \pm 16.24 ^{bc}	75.16 \pm 11.06 ^b
Weight gain (%) ¹	117.40	173.94	166.21	152.31
Feed efficiency (%) ²	0.303	0.411	0.369	0.356
Survival rate (%)	98.13 \pm 2.65	98.75 \pm 1.77	99.06 \pm 1.33	98.13 \pm 2.65

¹Weight gain (%)=100×(final mean body weight-initial mean body weight)/initial mean body weight. ²Feed efficiency (%)=Weight gain of fish×100/feed intake (dry matter). Values (means of duplicate \pm SD) in the same column sharing a common superscript are not significantly different ($P < 0.05$). D1, 1% of diatom powder in diet; D2, 2% of diatom powder in diet; D3, 3% of diatom powder in diet.

으로 높은 무게성장 및 사료 이용률을 보였다. Pacific red snapper (*L. peru*) 을 대상으로 한 연구 Martha et al. (2014)에서는 구조 및 유산균을 혼합하여 첨가한 사료(대조구, *Navicula* sp.+*Lactobacillus sakei*, *Navicula* sp., *L.sakei*)를 첨가하여 8주간 공급한 후 성장률을 측정하였다. 그 결과, 대조구에 비해 *Navicula* sp.와 *L.sakei*를 혼합한 실험구가 유의적으로 가장 높은 성장률을 보였으며, *Navicula* sp. 단독구 및 *L.sakei* 단독구 또한 대조구에 비해 높은 성장률을 나타내어 본 연구와 유사한 결과를 보였다. 구조는 단독으로 사용하였을 때보다 유산균 (probiotic)를 첨가하였을 때 사육 개선 효과가 크게 작용할 수 있는 것으로 판단된다. 이러한 결과는 프리바이오틱스 및 프로바이오틱스의 혼합하여 첨가하였을 때 나타난 효과로 판단되며, 이처럼 혼합하였을 때 유익균을 증가시켜, 숙주의 위장관의 기능을 증진시키는데 효과를 발휘하여, 소화 흡수를 개선시킨다고 보고되어 있어(Gibson and Roberfroid, 1995) 현재 어류 양식 산업에서 친환경 사료 첨가제로 다양하게 사용되는 것으로 보고된다.

미세 조류 중에서도 구조는 다양한 종에서 먹이 생물로 활용되고 있으며(Kang et al., 2011), 사료 내 구조의 첨가는 이매패류의 무게, 각장 및 각고의 성장을 증가시킨다는 것으로 보고되어 있다(Chen, 2007). 또한 새우인 black tiger prawn *Penaeus monodon*에 여러 종의 미세조류(*Nannochloropsis* sp., *Melosira* sp., *Entomoneis* sp., *Chlorella* sp., *Stauroneis* sp. 및 *Dunaliella* sp.)를 4주간 공급한 결과, 구조류인 *Melosira* sp.의 공급이 다른 미세조류의 공급에 비해 생존율에 있어 유의적으로 높은 수치를 나타냈으며, 성장률에 있어서도 유의적인 차이는 없었으나, 가장 높은 수치를 나타내었다고 보고되어졌다(Li et al., 2016). 본 연구결과에서도 구조인 *M. nummuloides*의 사료 첨가제 공급으로 인해 성장 및 사료효율이 높아지는 것으로 나타나, 양식어류의 사료첨가제로서의 구조의 활용 가능성이 매우 높다고 판단된다.

한편, 일반적으로 어류에 가해지는 독성 및 염분 등과 같은 외부 인자에 의한 스트레스는 체내에서 활성산소(oxygen free radical, ROS)의 생성을 증가시켜 산화 스트레스를 유발한다(Dalton et al., 1993). 생물체는 활성산소에 의한 산화 스트레스로부터 자신을 보호하고 항상성을 유지하기 위하여 항산화 방어기작을 가지고 있으며, 활성산소를 공격성이 없는 물질로 전환하거나(유해성을 저해하거나) 제거하는 존재로 항산화 효소와 항산화 물질로 나누어진다(Martinez-Alvarez et al., 2005). 해양 생물에서 항산화 방어기작에 관여하는 대표적인 항산화 효소로는 SOD, CAT 및 glutathione peroxidase (GPx) 등이 있으며, 항산화 물질에는 GSH, ascorbic acid 및 metallothionein (MT) 및 α -tocopherol 등이 존재하며, 해양 생물의 간에서 생성되는 것으로 알려져 있다(Basha and Rani, 2003). 그 중 SOD는 산화스트레스에 대한 1차 방어기작으로 superoxide radical을 과산화수소(H_2O_2)와 산소(O_2)로 분해시키는 효소이며, 이

과산화수소는 CAT와 GSH를 만나 물(H_2O)로 변환 후 배출하여 산화 손상으로부터 유기체를 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Forman et al., 1973; Di Giulio et al., 1989). 또한 GSH, glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), 및 glutathione sulfotransferase (GST)를 포함한 글루타티온의 의존성 방어 시스템은 비생물적 스트레스 요인하에서 어류의 세포 산화 환원 항상성을 유지하는데 있어 그 중요성이 입증된 바 있다(Srikanth and Gwack, 2013). 본 연구에서 구조 사료 첨가를 통한 사료 내 구조의 첨가에 따른 SOD 및 CAT 활성은 유의적인 차이를 보이지 않았으며, GSH 활성 결과 D2가 대조구에 비해 유의하게 낮고 D1 및 D3에서 유의하게 높은 수치를 나타내었다. 이는 환경에 적응하면서 모든 그룹에서 SOD 및 CAT를 이용하여 산화스트레스 낮추는 과정을 지나 GSH를 이용하여, 과산화수소를 물로 변화시켜 더욱 안정화시키는 과정으로 진입하여, GSH의 활성이 높아진 것으로 여겨진다. 이러한 결과는 본 실험에서의 구조 첨가제의 공급은 사육 법칙의 활성산소 변화에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단되나, GSH의 경우 D2의 실험구에서 대조구에 비해 낮은 수치를 나타내어 체내 활성산소의 저하 요인으로 작용했을 가능성이 있으나, D1 및 D3 실험구에서는 오히려 높게 나타나 체내 활성산소변화에 미치는 구조의 사료첨가 효과에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

생물체에서 가지는 선천적인 비특이적 방어 기작은 면역 자극에 의해 신속하게 활성화되며, 병원균에 대항하여 어류를 보호하기 위해 빠르게 동원되는 것으로 알려져 있다(Smith and Lumsden, 1983). 그 중 LYS는 어류의 1차 방어선으로 비특이적 면역능(innate immunity)의 척도로서 사용되어 왔으며(Bols et al., 2001), 다양한 균에 항균작용을 나타내는 효소로서, 세균 세포벽의 구성성분인 peptidoglycan의 β -1,4 결합을 가수분해하여 항균작용을 나타낸다(Grinde, 1989). MPO의 경우에는 호중구, 호염기구, 호산구에 존재하는 과산화효소이며, 과산화수소를 hypochlorous acid (HClO)로 전환시켜 병원성 미생물을 사멸시키는 작용이 있는 것으로, 생체 내 MPO활성 증가는 병원체에 대한 항균효과를 증폭시켜 면역반응(감염과 염증 반응에 작용)을 증가시키는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Palic et al., 2005). Martha et al. (2014)은 pacific red snapper (*L. peru*)을 이용하여 구조류의 일종인 *Navicula* sp.와 유산균인 *L. sakei*를 사료에 첨가하여 공급한 결과, 대조구에 비해 *Navicula* sp.+*L. sakei*를 첨가한 실험구가 유의적으로 높은 LYS 활성을 보였으며, *Navicula* 단독구 및 *L. sakei* 단독구 또한 대조구에 비해 높은 경향을 나타낸 것으로 보고하고 있다. 본 연구에서 있어서도 구조인 *M. nummuloides*를 사료에 첨가하여 공급한 결과, LYS 활성이 구조를 첨가한 실험구에서 대조구보다 유의적으로 높은 경향을 보였으며, 농도 의존적으로 증가하는 결과를 나타내었다. 또한 본 연구에서 MPO 활성에 있어서도 D2 사료첨가 실험구에서 유의하게 높은 MPO 활성을 나타

내었으며, D1 및 D3 실험구도 유의한 차이는 없었으나 높은 경향을 나타내었다. Cerezuela et al. (2012)은 gilthead seabream *Sparus aurata* L.에 규조를 첨가한 결과 선천성 면역을 자극하여 어류에서 비특이적 방어능을 증가시킨다고 보고하고 있다. 따라서 본 연구에서 나타난 LYS 및 MPO 활성의 증가는 규조 첨가 사료 공급을 통하여 양식어류의 비특이적 면역 반응의 활성 증대를 유도하는 것으로 추정된다.

Jin et al. (2018)은 규조에 존재하는 규소가 체액성 및 세포성 면역 반응을 증가시키는 것으로 보고하고 있으며, 이외에도 규조에 다량 함유된 규소의 면역 증가에 대한 결과는 많은 연구를 통하여 밝혀지고 있다(Seaborn et al., 2002; Russell et al., 2016). 포유류에서도 규소는 면역계에 긍정적인 영향을 미치고 림프구 증식에 필요한 것으로 보고되어 있다(Seaborn et al., 2002). 또한 쥐에서 규소를 면역 보조제로 이용할 경우 IgG 및 IgA 항체 수준을 증가시킨다고 보고되고 있다(Russell et al., 2016). 따라서 본 연구에서 나타난 비특이적 면역 활성은 규조에 포함되어 있는 다량의 규소에 의해 유도된 가능성이 있는 것을 판단되지만, 추후 연구로 규소만을 분리 정제하여 공급하는 실험이 필요할 것으로 판단된다.

면역관련 유전자의 변화는 규조 첨가 그룹에 비해 대조구에서 유의적으로 높은 수치를 나타내었다(Fig. 3). 일반적으로 선천 면역관련 유전자는 숙주에 외부로부터 병원체가 유입되면 급격히 증가하는 것으로 보고되고 있는데(Magnadóttir, 2006), 그 중 lectin은 선천성 면역반응에 속하며, 주로 단백질과 탄수화물 상호작용을 통한 병원균(PAMPs)의 인식에 관여하고 있으며(Robinson et al., 2006), lectin의 한 종류인 galectin (GAL)은 원생생물, 무척추동물 및 어류의 피부 점액에 존재하며, 병원체에 의해 발현된다고 보고되어 있다(Suzuki et al., 2003; Rabinovich and Gruppi, 2005). 본 연구에서 나타난 대조구의 높은 galectin의 농도는 실험수조에서 사육기간 중 외부의 병원체로부터의 감염에 의한 증가로 여겨지며, 규조 첨가 실험구에서는 체액성 면역 등 비특이적 면역에 의해 어체에서의 기본적인 항병 능력이 높아진 결과로 인해 대조구에 비해 낮은 유전자 발현 양을 나타낸 것으로 추정된다. Mistry et al. (2001)에 따르면, 뱀장어(*Anguilla japonica*)에 있어서 해수에서 담수로의 이동에 의한 아가미에서의 c-type lectins의 발현이 현저히 증가하는 것으로 보고하고 있는데, 이러한 결과는 염분스트레스 및 전염성 박테리아에 의한 스트레스에 의한 결과라고 보고하고 있다. 또한 Manila clams *Ruditapes philippinarum*을 대상으로 한 연구에서는 *Perkinsus olseni*에 감염된 조개에서 모두 galectin이 발현되었으며, 감염되지 않은 대조그룹에서는 galectin이 발현되지 않아 이는 박테리아가 렉틴의 발현을 유도했다고 보고하고 있다(Kang et al., 2006). 본 연구의 추가적인 연구로, 항병성 실험을 1 반복에 걸쳐 실험을 실시한 결과에서도 *Vibrio anguillarum* (KCTC 2711) 및 *Streptococcus parauberis* (KCTC 3651)의 병원균을 감염에 의해 규조 첨가구에서 대조구에 비해 높은

생존율을 나타내었다(data not shown). 이와 같은 병원균 감염 시 나타난 높은 생존율은 규조의 사료 첨가 공급에 의한 면역력의 증대의 결과로 규조를 이용한 사료첨가제가 어류의 스트레스 및 항병성에 높은 효과를 유도할 것으로 기대된다.

그리고 lysozyme (LYS)에 있어서도 본 실험에서는 galectin의 결과와 유사한 결과를 나타내었다. GAL의 발현대비 LYS의 발현은 대조구에서 비교적 낮은 발현율을 나타내었으며, 규조 첨가에 따라 발현량이 높아지는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 사료 내 규조의 첨가가 어체에 면역능을 부여하여, 기본적인 항병 능력이 높아진 것으로 추정된다. LYS는 무척추 동물, 척추 동물, 식물 및 파지(phage) 등 생물체에 널리 분포하며, 박테리아 세포벽에서 peptidoglycan의 N-acetylglucosamine과 N-acetylmuramic acid 사이의 β -1,4-glycosidic 결합의 가수 분해를 촉진하여 세균성 병원균의 침입에 대한 타고난 면역에서 생물 방어 분자로서의 역할을 한다(Minagawa et al., 2001; Ye et al., 2010). 따라서 lysozyme은 환경의 미생물과 지속적으로 접촉하는 무척추동물인 해양 동물에게 특히 중요한 면역 관련 물질로 알려져 있다(Minagawa et al., 2001). 본 연구의 결과에서 나타난 LYS의 발현 저하는 외부의 생물학적 병원성 침범에 대한 내병성의 결과로 낮은 발현을 유지하는 것으로 추정된다.

이상의 결과를 종합해보면, 본 연구에서 넙치 사료 내 규조의 첨가는 유의적으로 높은 체중 성장률을 보였으며, 사료효율 또한 높게 나타났다. 생존율에 있어서도 D1 및 D2에서 대조구에 비해 높게 나타났다. 면역 반응의 지표인 LYS는 규조 첨가에 따라 농도 의존적으로 증가하는 결과를 나타내었으며, MPO 또한 규조 첨가 실험구에서 대조구에 비해 높은 수치를 나타내었다. 따라서 성장에 있어서는 D1이 가장 효과가 높았고, 면역에 있어서는 고농도의 규조첨가구에서 효과가 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 사료 내 규조 첨가가 양식 넙치의 사료효율을 증가시킬 뿐만 아니라 성장을 촉진시키고 선천적 면역 관련 물질들의 발현을 촉진시켜 외부로부터의 세균 등에 대한 감염율을 낮추는 작용에 의해 유도된 것으로 추정된다. 이에 따라 본 연구에서 실험한 사료 내 규조인 *M. nummuloides*의 첨가는 넙치의 성장 촉진 및 선천면역을 유도하는 사료첨가제로서의 양식산업에 직접적으로 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

이 논문은 2018학년도 제주 지역 사업 평가단의 지역주력 산업육성(R&D) 기술개발 지원사업(과제번호 P0003142) 및 2020학년도 제주대학교 교원성과지원사업에 의하여 연구되었습니다.

References

Adel M, Yeganeh S, Dadar M, Sakai M and Dawood MA. 2016. Effects of dietary *Spirulina platensis* on growth per-

- formance, humoral and mucosal immune responses and disease resistance in juvenile great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1754). *Fish Shellfish Immunol*, 56, 436-444. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.08.003>.
- Basha PS and Rani AU. 2003. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicol Environ Saf* 56, 218-221. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00028-9](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00028-9).
- Bols NC, Brubacher JL, Ganassin RC and Lee LE. 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev Comp Immunol* 25, 853-873. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00040-4](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00040-4)
- Carlisle EM. 1972. Silicon: an essential element for the chick. *Science* 178, 619-621. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1982.tb05313.x>.
- Carlisle EM. 1982. The nutritional essentiality of silicon. *Nutr Rev* 40, 193-198. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1982.tb05307.x>.
- Chen YC. 2007. Immobilization of twelve benthic diatom species for long-term storage and as feed for post-larval abalone *Haliotis diversicolor*. *Aquaculture* 263, 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.12.008>.
- Cerezuela R, Guardiola FA, González P, Meseguer J and Esteban MÁ. 2012. Effects of dietary *Bacillus subtilis*, *Tetraselmis chuii*, and *Phaeodactylum tricornutum*, singularly or in combination, on the immune response and disease resistance of sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol* 33, 342-349. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.004>.
- Dalton DA, Langeberg L and Treneman NC. 1993. Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules. *Physiol Plant* 87, 365-370. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01743.x>.
- Giulio RT, Washburn PC, Wenning RJ, Winston GW and Jewell CS. 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ Toxicol Chem* 8, 1103-1123. <https://doi.org/10.1002/etc.5620081203>.
- Epstein E. 1994. The anomaly of silicon in plant biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.1.11>.
- Forman HJ and Fridovich I. 1973. Superoxide dismutase: a comparison of rate constants. *Arch Biochem Biophys* 158, 396-400. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(73\)90636-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(73)90636-X).
- Gordon N, Neori A, Shpigler M, Lee J and Harpaz S. 2006. Effect of diatom diets on growth and survival of the abalone *Haliotis discus hannai* postlarvae. *Aquaculture* 252, 225-233. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.06.034>.
- Gibson GR and Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125, 1401-1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>.
- Grinde B. 1989. Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. *J Fish Dis* 12, 95-104. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1989.tb00281.x>.
- Guo B, Liu B, Yang B, Sun P, Lu X, Liu J and Chen F. 2016. Screening of diatom strains and characterization of *Cyclotella cryptica* as a potential fucoxanthin producer. *Mar Drugs* 14, 125. <https://doi.org/10.3390/md14070125>.
- Hoseinifar SH, Zou HK, Doan HV, Harikrishnan R, Yousefi M, Paknejad H and Ahmadifar E. 2019. Can dietary jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit extract alter cutaneous mucosal immunity, immune related genes expression in skin and growth performance of common carp *Cyprinus carpio*?. *Fish Shellfish Immunol* 94, 705-710. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.016>.
- Jin XH, Zheng LL, Song MR, Xu WS, Kou YN, Zhou Y, Zhang LW, Zhu YN, Wan B, Wei ZY and Zhang GP. 2018. A nano silicon adjuvant enhances inactivated transmissible gastroenteritis vaccine through activation the Toll-like receptors and promotes humoral and cellular immune responses. *Nanomedicine* 14, 1201-1212. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.02.010>.
- Kang KH, Qian ZJ, Ryu BM and Kim SK. 2011. Characterization of growth and protein contents from microalgae *Navicula incerta* with the investigation of antioxidant activity of enzymatic hydrolysates. *Food Sci Biotechnol* 20, 183-191. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0025-6>.
- Kang YS, Kim YM, Park KI, Cho SM, Choi KS and Cho MJ. 2006. Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. *Dev Comp Immunol* 30, 1119-1131. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.03.005>.
- Kim JH, Jeong MH, Jun JC and Kim TI. 2014. Changes in hematological biochemical and non-specific immune parameters of olive flounder *Paralichthys olivaceus*, following starvation. *Asian-Australas J Anim Sci* 27, 1360-1367. <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.2014.14110>.
- Li A, Cai J, Pan J, Wang Y, Yue Y and Zhang D. 2014. Multi-layer hierarchical array fabricated with diatom frustules for highly sensitive bio-detection applications. *J Micromech Microeng* 24. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/24/2/025014>.
- Li Y, Xiao G, Mangott A, Kent M and Pirozzi I. 2016. Nutrient efficacy of microalgae as aquafeed additives for the adult black tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Aquac Res* 47, 3625-3635. <https://doi.org/10.1111/are.12815>.
- Magnadóttir B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol* 20, 137-151. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>.
- Martha RB, Carlos A, Norma E, Ylenia M and Felipe AV. 2014. Dietary administration of microalgae alone or supplemented with *Lactobacillus sakei* affects immune response and intestinal morphology of Pacific red snapper *Lutjanus peru*. *Fish Shellfish Immunol* 40, 208-216. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.006>.

- fsi.2014.06.032.
- Martinez-Alvarez RM, Morales AE and Sanz A. 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Rev Fish Biol Fish* 15, 75-88. <https://doi.org/10.1007/s11160-005-7846-4>.
- MIFAFF (Ministry for Food Agriculture Forestry and Fisheries). 2003. Statistical yearbook of maritime affairs and fisheries. Ministry for Food Agriculture Forestry and Fisheries Report, MIFAFF, Gwacheon, Korea.
- Minagawa S, Hikima JI, Hirono I, Aoki T and Mori H. 2001. Expression of Japanese flounder c-type lysozyme cDNA in insect cells. *Dev Comp Immunol* 25, 439-445. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00013-1](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00013-1).
- Mistry AC, Honda S and Hirose S. 2001. Structure, properties and enhanced expression of galactose-binding C-type lectins in mucous cells of gills from freshwater Japanese eels (*Anguilla japonica*). *Biochem J* 360, 107-115. <https://doi.org/10.1042/bj3600107>.
- Nelson DM, Treguer P, Brzezinski MA, Leynaert A and Queguiner B. 1995. Production and dissolution of biogenic silica in the ocean - revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochem Cycles* 9, 359-372. <https://doi.org/10.1029/95GB01070>.
- Onitsuka T, Kawamura T, Ohashi S, Horii T and Watanabe Y. 2007. Dietary value of benthic diatoms for post-larval abalone *Haliotis diversicolor* associated with feeding transitions. *Fish Sci* 73, 295-302. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01335.x>.
- Palic D, Andreassen CB, Menzel BW and Roth JA. 2005. A rapid, direct assay to measure degranulation of primary granules in neutrophils from kidney of fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Fish Shellfish Immunol* 19, 217-227. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.12.003>.
- Reffitt DM, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung HFJ, Evans BAJ, Thompson RPH, Powell JJ and Hampson GN. 2003. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone* 32, 127-135. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(02\)00950-X](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(02)00950-X).
- Rabinovich GA and Gruppi A. 2005. Galectins as immunoregulators during infectious processes: from microbial invasion to the resolution of the disease. *Parasite Immunol* 27, 103-114. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2005.00749.x>.
- Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, Landmann SL and Sousa CR. 2006. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol* 7, 1258. <https://doi.org/10.1038/ni1417>.
- Russell RF, McDonald JU, Lambert L and Tregoning J. S. 2016. Use of the microparticle nanoscale silicon dioxide as an adjuvant to boost vaccine immune responses against influenza virus in neonatal mice. *J Virol* 90, 4735-4744. <https://doi.org/10.1128/JVI.03159-15>.
- Rico H, Lago JL, Hernandez E, Villa LF, Atrio AS, Seco C and Gervas JJ. 2000. Effect of silicon supplement on osteopenia induced by ovariectomy in rats. *Calcif Tissue Int* 66, 53-55. <https://doi.org/10.1007/s002230050010>.
- Schwarz K and Milne DB. 1972. Growth-promoting effects of silicon in rats. *Nature* 239, 333. <https://doi.org/10.1038/239333a0>.
- Seaborn CD, Anderson MB and Nielsen FH. 2002. An interaction between dietary silicon and arginine affects immune function indicated by con-A-induced DNA synthesis of rat splenic T-lymphocytes. *Biol Trace Elem Res* 87, 133-142. <https://doi.org/10.1385/BTER:87:1-3:133>.
- Smith GS and Lumsden JH. 1983. Review of neutrophil adherence, chemotaxis, phagocytosis and killing. *Vet Immunol Immunopathol* 4, 177-236. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(83\)90058-2](https://doi.org/10.1016/0165-2427(83)90058-2).
- Smith P, Hiney MP and Samuelsen OB. 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annu Rev Fish Dis* 4, 273-313. [http://dx.doi.org/10.1016/0959-8030\(94\)90032-9](http://dx.doi.org/10.1016/0959-8030(94)90032-9).
- Srikanth S and Gwack Y. 2013. Molecular regulation of the pore component of CRAC channels, Orai1. *Curr Top Membr* 71, 181-207. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407870-3.00008-1>.
- Suzuki Y, Tasumi S, Tsutsui S, Okamoto M and Suetake H. 2003. Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol* 136, 723-730. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(03\)00178-7](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00178-7).
- Woesz A, Weaver JC, Kazanci M, Dauphin Y, Aizenberg J, Morse DE and Fratzl P. 2006. Micromechanical properties of biological silica in skeletons of deep-sea sponges. *J Mater Res* 21, 2068-2078. <https://doi.org/10.1557/jmr.2006.0251>.
- Ye X, Zhang L, Tian Y, Tan A, Bai J and Li S. 2010. Identification and expression analysis of the g-type and c-type lysozymes in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *Dev Comp Immunol* 34, 501-509. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.12.009>.
- Yu W, Wen G, Lin H, Yang Y, Huang X, Zhou C, Zhang Z, Duan Y and Li T. 2018. Effects of dietary *Spirulina platensis* on growth performance, hematological and serum biochemical parameters, hepatic antioxidant status, immune responses and disease resistance of Coral trout *Plectropomus leopardus* (Lacepede, 1802). *Fish Shellfish Immunol* 74, 649-655. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.01.024>.