

사료 내 Silymarin의 첨가가 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)의 성장, 사료효율, 비특이적 면역력 및 항산화력에 미치는 영향

신단비[†] · Udith Wijemanna[†] · 김한세 · 윤관식¹ · 이경준^{2*}

제주대학교 해양생명과학과, ¹(주)시너젠, ²제주대학교 해양과학연구소

Effects of Dietary Silymarin on Growth Performance, Feed Utilization, Innate Immunity and Antioxidant Capacity of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*

Danbi Shin[†], Udith Wijemanna[†], Han-Se Kim, Kwan-Sik Yun¹ and Kyeong-Jun Lee^{2*}

Department of Marine Life Sciences, Jeju National University, Jeju Self-Governing Province 63243, Republic of Korea

¹Synergen Inc., Bucheon 14549, Republic of Korea

²Marine Science Institute, Jeju National University, Jeju Self-Governing Province 63333, Republic of Korea

This study was conducted to evaluate the effects of dietary silymarin supplementation on the growth performance, feed utilization, innate immunity and antioxidant capacity of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Four experimental diets were formulated to contain 0, 0.025, 0.05 and 0.1% silymarin (designated as Con, S0025, S005 and S01, respectively). Triplicate groups of shrimp (initial body weight: 0.70 g) were fed each of the diets for 6 weeks. After the feeding trial, weight gain and specific growth rate were significantly higher in silymarin-supplemented groups compared to Con group. Dietary silymarin significantly enhanced protein efficiency ratio of S01 group and reduced feed conversion ratio of S005 and S01 groups. Phenoloxidase and anti-protease activities were significantly higher in S01 group compared to Con group. Glutathione peroxidase and catalase activities were significantly higher in silymarin-supplemented groups compared to those of Con group. The results of this study indicate that dietary silymarin could improve the growth performance, feed utilization, innate immunity and antioxidant capacity of Pacific white shrimp. The optimum level of silymarin in diet for Pacific white shrimp is suggested to be $\geq 0.025\%$.

Keywords: Silymarin, Growth performance, Innate immunity, Antioxidant capacity, Pacific white shrimp

서론

Phytochemical은 과일, 채소, 곡물 등의 식물에서 유래된 물질로, 동물의 체내에서 영양소로 작용하지는 않으나 생리활성을 나타내는 화합물이다(Arts and Hollman, 2005). Phytochemical은 어류의 성장, 사료섭취율, 비특이적 면역력, 항산화력, 세균성 질병에 대한 저항성을 증진시킬 수 있다(Chakraborty and Hancz, 2011). Olusola et al. (2013)은 phytochemical이 합성 항생제와 달리 병원균에서 내성을 일으키지 않기 때문에 천연 항생제로써 이용될 수 있다고 보고했다. Sivaram et al. (2004)은 greasy grouper *Epinephelus tauvina* 사료에 phytochemical

을 첨가하면 성장과 사료효율이 증진되며, *Vibrio harveyi*에 대한 질병 저항성도 향상된다고 보고하였다. Silymarin은 milk thistle *Silybum marianum*에서 추출된 flavonolignan 계열 화합물의 복합체이다. Silymarin은 silybin, silydianin, silychristine, taxifolin 등으로 구성되며, 이 중 silybin은 silymarin 추출물의 50–60%를 차지하는 주요 활성 형태로 알려져 있다(El-Garhy et al., 2016). Silymarin은 효과적인 간보호제로 알려져 있으며, 동물의 간에서 단백질 합성에 관여함으로써 간세포의 생성과 손상된 간세포의 재생에 도움이 되는 것으로 알려져 있다(Wu et al., 2015). 또한 silymarin은 간세포의 수용체 부위에 직접 결합하여 독성물질과의 결합을 방지하고, glutathione의

*Corresponding author: Tel: +82. 64. 754. 3423 Fax: +82. 64. 756. 3493

E-mail address: kjlee@jeju.ac.kr †Contributed equally.



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.2022.0886>

Korean J Fish Aquat Sci 55(6), 886-893, December 2022

Received 1 December 2022; Revised 13 December 2022; Accepted 16 December 2022

저자 직위: 신단비(대학원생), Udith Wijemanna(대학원생), 김한세(대학원생), 윤관식(대표), 이경준(교수)

산화를 감소시킴으로써 간세포막의 지질 과산화를 억제하는 것으로 알려져 있다(Dwivedi et al., 2022). Chou et al. (2012)은 silymarin이 지방생성유전자 발현을 억제하여 쥐의 내장지방을 감소시키고, 혈장 지단백질 함량을 개선한다고 보고하였다.

어류 사료 내 silymarin의 첨가는 gibel carp *Carassius auratus gibelio* (Yi et al., 2012), grass carp *Ctenopharyngodon idellus* (Xiao et al., 2017), turbot *Scophthalmus maximus L.* (Wang et al., 2019)의 성장과 사료효율을 증진시키고, 항산화 활성을 촉진한다고 보고되었다. Jia et al. (2013)에 따르면 silymarin을 급이한 common carp *Cyprinus carpio*에서 사염화탄소(CCl₄)에 의한 간손상이 효과적으로 줄었다고 보고했다. 무지개 송어 (*Oncorhynchus mykiss*)에서는 silymarin을 급여했을 때 면역력이 증가하는 것으로 관찰되었으며(Ahmadi et al., 2012), 대서양 연어(*Salmo salar*)에서는 항산화력을 증진시키는 것으로 보고되었다(Sanchez et al., 2016). 이처럼 silymarin은 여러 어종에서 활발히 연구가 이루어졌으나, 갑각류를 대상으로 한 연구는 드물다.

흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)는 환경 적응력이 강하고, 고밀도 양식과 단기간 사육으로 출하가 가능하여 세계적으로 가장 각광받는 양식 새우 중이다. FAO (2020)에 따르면 흰다리새우는 총 갑각류 생산량 중 약 53%를 차지하며, 국내 생산량은 5,492톤(2018), 7,542톤(2019), 8,124톤(2020)으로 매년 증가하고 있다(KOSIS, 2021). 흰다리새우는 대부분 지수식으로 양식되고 있어서 사육 수질이 쉽게 악화되고 질병에 노출되기 쉽다. 갑각류의 질병 방어기작에 대한 연구는 활발히 진행되어 왔다(Tassanakajon et al., 2013). 최근 들어 지속적으로 증가하고 있는 흰다리새우의 높은 폐사율을 줄이기 위한 방편으로 사료 내 기능성 첨가제를 통한 비특이적 면역력 향상에 관한 연구가 보고되고 있다(Li et al., 2022). 따라서 본 연구에서는 사료 내 silymarin의 첨가가 흰다리새우의 성장, 사료효율, 비특이적 면역력과 항산화력에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

실험사료

사육실험에 사용된 silymarin (순도 20%)은 (주)시너젠(Bucheon, Korea)에서 제공받았다. 대조구사료는 대두박, 참치부산물분(tuna byproduct meal)과 정어리 어분(sardine meal)을 주요 단백질원으로 사용하여 조단백질 35%와 조지질 7%가 되도록 조성되었다. 실험사료는 대조구사료의 wheat flour를 대체 하면서 silymarin (S)을 각각 0.025, 0.05, 0.1% (S0025, S005, S01) 첨가하여 대조구 포함 총 4개의 실험사료를 제작하였다 (Table 1). 모든 사료원료는 사료혼합기에서 골고루 혼합되었으며, 사료혼합물은 펠릿제조기(SP-50; KumKang ENG, Daegu, Korea)를 통해 2 mm 크기로 압출성형되었다. 성형된 실험사료는 24°C에서 8시간 동안 건조시킨 후 사료 공급 전까지 냉장

(4°C) 보관되었다.

실험새우 및 사육관리

흰다리새우는 제주특별자치도 서귀포시 소재의 탐라새우에서 구입하였고, 사육실험은 제주대학교 해양과학연구소 내 새우 전용 사육시설에서 진행되었다. 실험새우는 2주 동안 조단백질 38%와 조지질 7%로 구성된 상업사료(새우용 이코노미 사료; CJ Cheiljedang, Seoul, Korea)를 공급하며 실험환경에 순치시켰다. 순치 후 흰다리새우(0.70±0.01 g)는 각 수조 당 20마리씩, 실험구 당 3반복으로 총 12개의 원형 수조(170 L)에 무작위로 배치되었다. 수조 내 충분한 용존산소(dissolved oxygen, DO)를 공급하기 위해 공기발생기(aeration)를 설치하

Table 1. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets for the feeding trial of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (% dry matter basis)

Ingredients	Experimental diets			
	Con	S0025	S005	S01
Sardine meal ¹	5.00	5.00	5.00	5.00
Tuna byproduct meal ²	10.0	10.0	10.0	10.0
Soybean meal	35.0	35.0	35.0	35.0
Squid liver powder	5.00	5.00	5.00	5.00
Wheat flour	25.80	25.775	25.75	25.70
Silymarin ³	0.00	0.025	0.05	0.10
Starch	8.00	8.00	8.00	8.00
Cod liver oil ⁴	3.00	3.00	3.00	3.00
Mineral premix ⁵	2.00	2.00	2.00	2.00
Vitamin premix ⁶	1.00	1.00	1.00	1.00
Choline 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
MCP ⁷	3.00	3.00	3.00	3.00
Proximate composition (% dry matter)				
Moisture	8.88	9.37	9.86	9.56
Crude protein	35.3	35.2	36.1	35.6
Crude lipid	7.43	8.13	7.60	7.48
Ash	10.5	10.5	10.6	10.6

¹Orizon S.A., Corp., Santiago, Chile. ²WooGINfeed Industry Co. Ltd., Incheon, Korea. ³Product purity 20%, Synergen Inc., Bucheon, Korea. ⁴E-wha oil & fat Industry Corp., Busan, Korea. ⁵Each kg of premix contains 12.0 g manganous sulfate, 20.0 g ferrous sulfate, 6.00 g copper sulfate and 25.0 g zinc sulfate. ⁶Each kg of premix contains 1.65 g retinol, 0.025 g ergocalciferol, 20.0 g tocopherol, 5.00 g menadione, 20.0 g ascorbic acid, 2.00 g thiamine, 20.0 g riboflavin, 15.0 g pyridoxine, 4.00 g folic acid, 0.01 g cobalamin, 54.0 g inositol, 40.0 g nicotinic acid, 30.0 g calcium pantothenate and 0.30 g biotin. ⁷Mono-calcium phosphate

였으며, 사육수온은 자동수중히터기(200 W)에 의해 일정하게 유지되었다. 광주기는 형광등에 의해 12 light:12 dark로 조절되었다. 실험사료는 1일 6회(08:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00, 18:00 h)에 나누어 총 6주간 제한공급(새우체중의 6–12%) 되었다. 사육실험 동안 각 수조의 수온, DO, 염분은 매일 측정되었으며, pH는 매주 1회 측정되었다. 수질 암모니아 농도는 Verdouw et al. (1978)의 방법에 따라 매주 1회 분석되었다. 사육실험은 지수식 환경에서 진행되었으며, 수온은 $28.8 \pm 0.26^\circ\text{C}$, DO는 $6.70 \pm 0.14 \text{ mg/L}$, 염분은 31.0 psu, pH는 6.83 ± 0.55 , 암모니아 농도는 $0.016 \pm 0.00 \text{ ppm}$ 으로 유지되었다.

Sampling과 분석

사육실험 종료 후, 흰다리새우의 증체율(weight gain, WG)과 생존율(survival)을 조사하기 위해 수조 당 실험새우의 무게와 마릿수를 측정하였다. 사료 공급량은 사육기간동안 제한공급된 사료의 총량이며, 사료계수(feed conversion ratio, FCR)와 단백질이용효율(protein efficiency ratio, PER)은 성장률과 사료 공급량을 바탕으로 계산되었다. 무게 측정 후, 수조당 3마리(실험구 당 9마리)의 흰다리새우를 무작위로 선별하여 얼음물로 마취시킨 후, Alsever's solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 주입된 주사기를 이용하여 hemolymph를 채취하였다. 채취된 hemolymph는 원심분리 후 비특이적 면역력과 항산화력 분석에 사용되기 전까지 냉동(-80°C) 보관되었다.

실험사료와 전하체의 일반성분은 AOAC (2005) 방법에 따라서 수분은 상압가열건조법(125°C , 3 h), 회분은 직접회화법(550°C , 4 h)으로 분석되었으며, 조단백질은 조단백분석기(Kjeltec system 2300; Foss, Hillerød, Denmark)를 이용하여 분석되었다. 조지방은 속실렛 추출장치(SOX406 fat analyzer; Jinan Hanon Instruments, Shandong, China)를 이용하여 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 분석되었다.

비특이적 면역력은 총 4가지 항목에서 조사되었다. Phenoloxidase (PO) 활성은 Hernández-López et al. (1996), lysozyme 활성은 Paglia and Valentine (1967)의 방법을 기초로 분석되었다. Anti-protease 활성은 Ellis (1990), nitro-blue tetrazolium

(NBT) 활성은 Zhang et al. (2013)의 방법을 기초로 분석되었다. 항산화력은 상업용 kit를 이용하여 superoxide dismutase (SOD) (S311; Dojindo Molecular Technologies Inc., Kumamoto, Japan), glutathione peroxidase (GPx) (703102; Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA), catalase (DG-CAT400; DoGenBio, Seoul, Korea)의 활성 분석을 통해 조사되었다. 기초건강도 조사를 위해 total protein, glucose, triglyceride, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT)는 자동 생화학분석기(SLIM; SEAC Inc, Florence, Italy)를 통해 분석되었다.

통계학적 분석

실험수조는 완전확률계획법(completely randomized design)에 따라 배치되었으며, 모든 데이터는 SPSS Version 24.0 (International Business Machines Co., New York, NY, USA) 프로그램을 사용하여 One-way ANOVA로 통계 분석되었다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's multiple range test ($P < 0.05$)로 비교되었다. 백분율 데이터는 arcsine 값으로 변형하여 통계 분석에 사용되었다. 모든 데이터는 평균값 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 표기되었다.

결 과

Final body weight, WG, specific growth rate는 모든 silymarin 첨가 실험구에서 대조구에 비해 유의적으로 높았다(Table 2). FCR은 S005와 S01 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 낮았다. PER은 S01 실험구가 대조구보다 유의적으로 높았다. 생존율은 모든 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다. 전하체 일반성분분석 결과, 조단백질, 조지방, 회분, 수분은 대조구와 silymarin 첨가 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다(Table 3). 기초 건강도 분석 결과(Table 4), total protein은 대조구와 silymarin 첨가 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다. Glucose는 S01 실험구가 대조구보다 유의적으로 높았다. Triglyceride는 S005와 S01 실험구가 대조구보다 유의적으로 낮았다. AST

Table 2. Growth performance, feed utilization and survival of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (initial body weight: 0.70 g) fed the experimental diets for 6 weeks. The diets were added with graded levels of silymarin (S) by 0.025, 0.05 and 0.1% to the control diet (Con) (designated as Con, S0025, S005 and S01, respectively)

Diets	FBW ¹	WG ²	SGR ³	PER ⁴	FCR ⁵	Survival (%)
Con	8.12 \pm 0.19 ^b	1,063.2 \pm 29.3 ^b	5.98 \pm 0.06 ^b	2.24 \pm 0.06 ^b	1.26 \pm 0.03 ^a	98.3 \pm 2.89
S0025	8.92 \pm 0.06 ^a	1,182.4 \pm 26.0 ^a	6.21 \pm 0.07 ^a	2.29 \pm 0.05 ^{ab}	1.21 \pm 0.03 ^{ab}	93.3 \pm 2.89
S005	9.17 \pm 0.43 ^a	1,215.3 \pm 67.6 ^a	6.27 \pm 0.05 ^a	2.32 \pm 0.09 ^{ab}	1.19 \pm 0.05 ^b	95.0 \pm 0.00
S01	9.23 \pm 0.10 ^a	1,217.2 \pm 6.30 ^a	6.29 \pm 0.06 ^a	2.38 \pm 0.04 ^a	1.19 \pm 0.02 ^b	98.3 \pm 2.89

¹FBW, Final body weight (g). ²Weight gain (WG; %)=[(final body weight (g)-initial body weight (g))/initial body weight (g)] \times 100. ³Specific growth rate (SGR; %)=[(log_e final body weight (g)-log_e initial body weight (g))/days] \times 100. ⁴Protein efficiency ratio (PER)=wet body weight gain (g)/total protein given (g). ⁵Feed conversion ratio (FCR)=dry feed intake (g)/wet body weight gain (g). Values are mean of triplicate groups and presented as mean \pm SD. Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

는 모든 silymarin 첨가 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 낮았다. ALT는 S005와 S01 실험구가 대조구보다 유의적으로 낮았다.

사료 내 silymarin의 첨가는 흰다리새우의 비특이적 면역력을 향상시키는 것으로 나타났다(Table 5). PO 활성은 S01 실험구가 대조구보다 유의적으로 증가하였다. Lysozyme 활성은 대조구와 silymarin 첨가 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었으나, silymarin 첨가 실험구에서 경향적으로 증가하였다. Anti-protease 활성은 S01 실험구가 대조구보다 유의적으로 증가하였다. NBT 활성은 모든 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다.

본 연구에서 사료 내 silymarin의 첨가는 흰다리새우의 항산화력을 향상시키는 것으로 나타났다(Table 6). SOD 활성은 대조구와 silymarin 첨가 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었으나, silymarin 첨가 실험구에서 경향적으로 증가하였다. GPx 활성은 모든 silymarin 첨가 실험구에서 대조구에 비해 유의적으로 높았으며, 첨가 농도가 높아질수록 증가하였다. Catalase 활성은 모든 silymarin 첨가 실험구에서 대조구에 비해 유의적으로 증가하였다.

고 찰

본 연구에서 사료 내 silymarin의 첨가는 흰다리새우의 성장률과 사료효율을 향상시키는 것으로 나타났다(Table 2). 사

료 내 phytochemical의 첨가는 어류의 사료소화율과 사료효율을 높이고, 단백질 합성을 증진시킬 수 있는 것으로 보고되었다(Citarasu, 2010). Abdel-Latif et al. (2023)은 silymarin이 striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus*의 소화효소 활성과 단백질 합성을 촉진시킨다고 보고했다. Hassaan et al. (2019)은 silymarin이 Nile tilapia *Oreochromis niloticus*의 성장 관련 유전자의 발현을 향상시킨다고 보고했다. 또한, Wang et al. (2019)은 silymarin의 간보호와 면역증진 효과가 turbot의 성장에 긍정적인 영향을 줄 수 있다고 보고하였으며, Wei et al. (2020)은 silymarin이 grass carp의 장 구조와 기능을 향상 시킴으로써 성장률과 사료효율의 증진에도 효과적일 수 있다고 보고했다.

본 연구에서 흰다리새우 사료 내 silymarin 첨가는 기초건강도를 개선시키는 것으로 나타났다(Table 4). Hemolymph 내 total protein, glucose, triglyceride는 흰다리새우의 건강지표로서 활용된다(Mercier et al., 2006). 척추동물을 대상으로 한 연구에서는 silymarin이 혈중 glucose 수치를 낮출 수 있다고 보고되었으나(Khazaei et al., 2022), 본 연구에서는 silymarin이 흰다리새우의 glucose를 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났다. 새우를 대상으로 한 선행연구(Galindo et al., 2009)와 비교하여 이번 연구에서 glucose 수치가 전반적으로 높은 경향을 보였는데, 이는 실험사료 내 탄수화물원의 함량에 의해 영향을 받은 것으로 판단된다. AST와 ALT는 간과 신장이 손상될 경우 증가하는 것으로 알려져 있으며, 동물의 건강과 스트레스를 조사하는 지표로 사용된다(Inyang et al., 2010). Silymarin은 간세포의 세포막 수용체에 결합하여 세포 내 유해물질의 침투나 영양물질의 유출을 방지함으로써 간세포를 보호하고(Vargas-Mendoza et al., 2014), 간 내 단백질의 생합성에 관여하여 손상된 간세포의 재생을 효과적으로 돕는다고 보고되었다(Schümann et al., 2003). Banaee et al. (2011)은 무지개송어 사료 내 silymarin의 첨가는 AST와 ALT를 유의적으로 감소시킨다고 보고하였다. 본 연구에서도 사료 내 silymarin의 첨가는 흰다리새우의 AST와 ALT를 유의적으로 감소시켰는데, 이는 silymarin의 간보호 작용에 의한 것으로 사료된다.

흰다리새우와 같은 갑각류는 후천면역체계가 결핍되어 있으

Table 3. Whole-body proximate composition (% wet basis) of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (initial body weight: 0.70 g) fed the experimental diets for 6 weeks. The diets were added with graded levels of silymarin (S) by 0.025, 0.05 and 0.1% to the control diet (Con) (designated as Con, S0025, S005 and S01, respectively)

Diets	Crude protein	Crude lipid	Ash	Moisture
Con	19.5±0.05	1.33±0.01	3.57±0.13	75.2±0.47
S0025	19.8±0.73	1.28±0.15	3.43±0.25	75.1±1.38
S005	19.8±0.87	1.23±0.02	3.69±0.47	73.7±0.85
S01	19.5±0.26	1.39±0.11	3.22±0.45	74.9±0.34

Values are mean of triplicate and presented as mean±SD.

Table 4. Hematological parameters of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (initial body weight: 0.70 g) fed the experimental diets for 6 weeks. The diets were added with graded levels of silymarin (S) by 0.025, 0.05 and 0.1% to the control diet (Con) (designated as Con, S0025, S005 and S01, respectively)

Diets	Total protein (g/dL)	Glucose (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	AST (U/L) ¹	ALT (U/L) ²
Con	4.39±0.16	654.4±12.5 ^b	138.2±8.33 ^a	82.0±9.70 ^a	138.2±8.33 ^a
S0025	4.54±0.49	658.8±4.20 ^b	135.6±4.58 ^a	69.2±3.61 ^b	134.7±3.85 ^a
S005	4.51±0.19	648.4±6.02 ^b	119.0±10.5 ^b	64.0±1.68 ^b	119.0±10.5 ^b
S01	4.40±0.28	675.4±4.10 ^a	83.1±3.87 ^c	65.4±7.45 ^b	83.6±4.38 ^c

¹AST, Aspartate aminotransferase. ²ALT, Alanine aminotransferase. Values are mean of triplicate groups and presented as mean±SD. Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05).

므로 병원균의 침입 시 비특이적 면역체계에 크게 의존한다. 본 연구에서 흰다리새우 사료 내 silymarin의 첨가는 비특이적 면역력을 향상시키는 것으로 나타났다(Table 5). 사료 내 phytochemical 은 대하(*Fenneropenaeus chinensis*) (Luo, 1997), 흰다리새우(Lawhavit et al., 2011), 큰징거미새우(*Macrobrachium rosenbergii*) (El-Desouky et al., 2012)의 비특이적 면역력을 향상시킨다고 보고되었다. Hemolymph 내 PO 활성은 옵소닌화(opsonization)를 통해 혈구의 식세포 작용을 촉진시키고, 혈액응고에 관여하므로 갑각류의 선천성 면역에서 매우 중요한 지표로 사용된다. Chandran et al. (2016)은 사료 내 phytochemical의 첨가는 홍다리얼룩새우(*Penaeus monodon*)의 비특이적 면역력(lysozyme, PO)을 향상시킨다고 보고하였다. 본 연구에서도 silymarin의 첨가는 흰다리새우의 PO 활성을 증진시키는 것으로 보아 면역증강제로써의 이용가능성이 높다고 판단된다. Lysozyme은 갑각류의 선천성 면역에서 중요한 항균 효소 중의 하나로써, 비특이적으로 다양한 균에 대한

항균작용을 나타낸다. 사료 내 silymarin의 첨가는 무지개송어(Ahmadi et al., 2012)와 turbot (Wang et al., 2019)의 lysozyme 활성을 유의적으로 증진시킨다고 보고되었다. 그러나, 본 연구에서는 사료에 silymarin을 첨가했을 때 lysozyme 활성에는 유의미한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. Anti-protease는 protease를 불활성화 시킴으로써 체내에 침입한 병원균의 성장을 억제하는 선천면역 관련 효소이다. 어류와 갑각류의 사료 내 silymarin 첨가가 anti-protease 활성에 미치는 영향에 대해서는 보고된 바가 없으나, 본 연구에서 사료 내 silymarin의 첨가는 흰다리새우의 anti-protease 활성을 증진시켰다. NBT는 대식세포 활성을 평가하기 위한 선천면역 지표로써 백혈구 내 호흡 폭발에서 발생하는 superoxide anion의 생성량을 기반으로 측정된다. 어류와 갑각류 사료 내 silymarin 첨가에 따른 NBT 활성에 관한 연구는 보고된 바가 없으며, 본 연구에서는 흰다리새우 사료 내 silymarin 첨가가 NBT 활성에 유의미한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Table 5. Innate immune responses of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (initial body weight: 0.70 g) fed the experimental diets for 6 weeks. The diets were added with graded levels of silymarin (S) by 0.025, 0.05 and 0.1% to the control diet (Con) (designated as Con, S0025, S005 and S01, respectively)

Diets	PO (absorbance) ¹	Lysozyme (µg/mL)	Anti-protease (% inhibition)	NBT (absorbance) ²
Con	0.22±0.02 ^b	5.51±0.07	11.3±1.23 ^b	0.90±0.10
S0025	0.26±0.03 ^{ab}	6.06±0.36	12.0±0.21 ^b	0.98±0.10
S005	0.25±0.01 ^{ab}	6.12±0.12	12.4±0.46 ^{ab}	0.98±0.01
S01	0.28±0.01 ^a	5.62±1.15	13.6±0.36 ^a	0.95±0.09

¹PO, Phenoloxidase. ²NBT, Nitro-blue tetrazolium. Values are mean of triplicate groups and presented as mean±SD. Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05).

Table 6. Antioxidant capacities of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (initial body weight: 0.70 g) fed the experimental diets for 6 weeks. The diets were added with graded levels of silymarin (S) by 0.025, 0.05 and 0.1% to the control diet (Con) (designated as Con, S0025, S005 and S01, respectively)

Diets	SOD (% inhibition) ¹	GPx (mU/mL) ²	Catalase (mU/mL)
Con	62.5±9.56	189.5±5.29 ^b	186.1±2.93 ^b
S0025	71.8±5.28	219.9±3.07 ^a	215.7±0.69 ^a
S005	75.1±7.95	239.1±15.2 ^a	216.0±9.06 ^a
S01	75.3±6.16	241.1±19.0 ^a	211.3±4.33 ^a

¹SOD, Superoxide dismutase activity. ²GPx, Glutathione peroxidase activity. Values are mean of triplicate groups and presented as mean±SD. Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05).

Silymarin은 reactive oxygen species 생성 효소를 억제시킴으로써 free radical의 형성을 방지하거나 직접적으로 제거할 수 있다(Yin et al., 2011). Silymarin은 간에서 cysteine 합성을 유도함으로써 glutathione 생성을 향상시키며, 이를 통해 항산화 반응에 기여하는 것으로 알려져 있다(Vargas-Mendoza et al., 2014). Abenavoli et al. (2018)은 silymarin이 장내 이온의 chelation, heat shock protein 합성 촉진을 통해 항산화 효과를 증진시킨다고 보고하였다. SOD는 체내 독성 대사 산물인 superoxide ion (O₂⁻)을 hydrogen peroxide (H₂O₂)로 전환하고, catalase는 H₂O₂를 H₂O로 분해함으로써 세포를 독성으로부터 보호한다(Nordberg and Arner, 2001). GPx는 식세포 작용과 생리 활동에서 생성되는 lipid hydroperoxide와 free hydrogen peroxide를 제거하는데 중요한 역할을 한다(Muthukumar et al., 2011). Jia et al. (2013)은 사료 내 silymarin 첨가가 잉어의 SOD 활성을 유의적으로 증가시킨다고 보고하였으며, Wang et al. (2019)은 사료 내 silymarin 첨가가 turbot의 SOD, GPx, catalase 활성을 유의적으로 증진시킨다고 보고하였다. Hassaan et al. (2019)은 Nile tilapia 사료 내 silymarin 첨가는 SOD, catalase 활성을 유의적으로 증진시킨다고 보고하였다. 본 연구에서도 흰다리새우 사료 내 silymarin 첨가는 SOD 활성을 경향적으로 증진시켰으며, GPx와 catalase의 활성을 유의적으로 증진시키는 것으로 나타났다.

결론적으로 사료 내 silymarin을 0.025% 이상 첨가하면 흰다리새우의 성장, 사료효율, 비특이적 면역력과 항산화력을 유의적으로 증진시킬 수 있으며, silymarin은 사료 첨가제로써 흰다리새우의 성장 촉진과 면역 증진에 효과적일 것으로 사료된다.

사 사

이 연구는 (주)시너젠과 한국연구재단의 기초연구사업(2019R1A6A1A03033553 & 2021R1A2C2008384)의 지원을 받았다.

References

- Abdel-Latif HM, Shukry M, Noreldin AE, Ahmed HA, El-Bahrawy A, Ghetas HA and Khalifa E. 2023. Milk thistle (*Silybum marianum*) extract improves growth, immunity, serum biochemical indices, antioxidant state, hepatic histoarchitecture, and intestinal histomorphometry of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. *Aquaculture* 562, 738761. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738761>.
- Abenavoli L, Izzo AA, Milić N, Cicala C, Santini A and Capasso R. 2018. Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. *Phytother Res* 32, 2202-2213. <https://doi.org/10.1002/ptr.6171>
- Ahmadi K, Banaee M, Vosoghei AR, Mirvaghefi AR and Ataimehr B. 2012. Evaluation of the immunomodulatory effects of silymarin extract (*Silybum marianum*) on some immune parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Actinopterygii: Salmoniformes: Salmonidae). *Acta Ichthyol Piscat* 42, 113-120. <https://doi.org/10.3750/AIP2011.42.2.04>.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2005. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, U.S.A., <https://doi.org/10.1002/0471740039.vec0284>.
- Arts IC and Hollman PC. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 81, 317S-325S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.317S>.
- Banaee M, Sureda A, Mirvaghefi AR and Rafei GR. 2011. Effects of long-term silymarin oral supplementation on the blood biochemical profile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol Biochem* 37, 885-896. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9486-z>.
- Chakraborty SB and Hancz C. 2011. Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. *Rev Aquac* 3, 103-119. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2011.01048.x>.
- Chandran MN, Moovendhan S, Suganya AM, Tamilselvi A, Immanuel G and Palavesam A. 2016. Influence of polyherbal formulation (AquaImmu) as a potential growth promotor and immunomodulator in shrimp *Penaeus monodon*. *Aquac Rep* 4, 143-149. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.10.002>.
- Chou CH, Chen YC, Hsu MC, Tsai WL, Chang CY and Chiu CH. 2012. Effect of silymarin on lipid and alcohol metabolism in mice following long-term alcohol consumption. *J Food Biochem* 36, 369-377. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2011.00543.x>.
- Citarasu T. 2010. Herbal biomedicines: A new opportunity for aquaculture industry. *Aquac Int* 18, 403-414. <https://doi.org/10.1007/s10499-009-9253-7>.
- Dwivedi PS, Patil VS, Khanal P, Bhandare VV, Gurav S, Harish DR, Patil BM and Roy S. 2022. System biology-based investigation of Silymarin to trace hepatoprotective effect. *Comput Biol Med* 142, 105223. <https://doi.org/10.1016/j.compbio.2022.105223>.
- El-Desouky TA, Sharoba AMA, El-Desouky AI, El-Mansy HA and Naguib K. 2012. Effect of ozone gas on degradation of aflatoxin B1 and *Aspergillus flavus* fungal. *J Environ Anal Toxicol* 2, 128. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000128>.
- El-Garhy HA, Khattab S, Moustafa MM, Abou Ali R, Azeiz AZA, Elhalwagi A and El Sherif F. 2016. Silybin content and overexpression of chalcone synthase genes in *Silybum marianum* L. plants under abiotic elicitation. *Plant Physiol Biochem* 108, 191-202. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.07.011>.
- Ellis AE. 1990. Serum antiprotease in fish. In: Tech Fish Immunol. Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson WB and Van Muiswinkel WB, eds. SOS Publication, Fair Haven, CT, U.S.A., 95-99.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2020. Statics for Fisheries and Aquaculture in the World. Retrieved from <http://www.fao.org/fishery/en> 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. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5).
- Galindo C, Gaxiola G, Cuzon G and Chiappa-Carrara X. 2009. Physiological and biochemical variations during the molt cycle in juvenile *Litopenaeus vannamei* under laboratory conditions. *J Crustac Biol* 29, 544-549. <https://doi.org/10.1651/08-3094.1>.
- Hassaan MS, Mohammady EY, Soaudy MR, El-Garhy HA, Moustafa MM, Mohamed SA and El-Haroun ER. 2019. Effect of *Silybum marianum* seeds as a feed additive on growth performance, serum biochemical indices, antioxidant status, and gene expression of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. *Aquaculture* 509, 178-187. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.006>.
- Hernández-López J, Gollas-Galván T and Vargas-Albore F. 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp *Penaeus californiensis* Holmes. *Comp Biochem Physiol Part 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).
- Inyang IR, Daka ER and Ogamba EN. 2010. Effects of sublethal concentrations of diazinon on total protein and transaminase activities in *Clarias gariepinus*. *Curr Res J Biol Sci* 2, 390-395.
- Jia R, Cao L, Du J, Xu P, Jeney G and Yin G. 2013. The protective effect of silymarin on the carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver injury in common carp (*Cyprinus carpio*). *In Vitro Cell Dev Biol Animal* 49, 155-161. <https://doi.org/10.1007/s11626-013-9587-3>.
- Khazaei R, Seidavi A and Bouyeh M. 2022. A review on the mechanisms of the effect of silymarin in milk thistle (*Sily-*

- bum marianum*) on some laboratory animals. *Vet Med Sci* 8, 289-301. <https://doi.org/10.1002/vms3.641>.
- KOSIS (Korea Statistical Information Service). 2021. Survey on the Status of Aquaculture. Retrieved from https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=101&tblId=DT_1EW0004&vw_cd=MT_ZTITLE&list_id=K2_7&scrId=&seqNo=&lang_mode=ko&obj_var_id=&itm_id=&conn_path=MT_ZTITLE&path=%252FstatisticsList%252FstatisticsListIndex.do on Oct 8, 2022.
- Lawhavinit OA, Sincharoenpoka P and Sunthornandh P. 2011. Effects of ethanol tumeric (*Curcuma longa* Linn.) extract against shrimp pathogenic *Vibrio* spp. and on growth performance and immune status of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Kasetsart J Nat Sci* 45, 70-77.
- Li M, Wei D, Huang S, Huang L, Xu F, Yu Q, Liu M and Li P. 2022. Medicinal herbs and phytochemicals to combat pathogens in aquaculture. *Aquac Int* 30, 1239-1259. <https://doi.org/10.1007/s10499-022-00841-7>.
- Luo R. 1997. Induction of immunity substance in *Penaeus chinensis* by Chinese herbal medicine. *Oceanol Limnol Sinica* 28, 577-585.
- Mercier L, Palacios E, Campa-Córdova ÁI, Tovar-Ramírez D, Hernández-Herrera R and Racotta IS. 2006. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. *Aquaculture* 258, 633-640. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.036>.
- Muthukumar K, Rajakumar S, Sarkar MN and Nachiappan V. 2011. Glutathione peroxidase3 of *Saccharomyces cerevisiae* protects phospholipids during cadmium-induced oxidative stress. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99, 761-771. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9550-9>.
- Nordberg J and Arnér ES. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biol Med* 31, 1287-1312. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00724-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00724-9).
- Olusola SE, Emikpe BO and Olaifa FE. 2013. The potentials of medicinal plant extracts as bio-antimicrobials in aquaculture. *Int J Med Aromat Plants* 3, 404-412.
- Paglia DE and Valentine WN. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70, 158-169. <https://doi.org/10.5555/uri:pii:0022214367900765>.
- Sanchez R, Olivares P, Carmona E, Astuya A, Herrera H and Parodi J. 2016. Fish nutrition additives in SHK-1 cells: Protective effects of silymarin. *Adv Biosci Biotechnol* 7, 55-62. <https://doi.org/10.4236/abb.2016.72007>.
- Schümann J, Prockl J, Kiemer AK, Vollmar AM, Bang R and Tiegs G. 2003. Silibinin protects mice from T cell-dependent liver injury*. *J Hepatol* 39, 333-340. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(03\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(03)00239-3).
- Sivaram V, Babu MM, Immanuel G, Murugadass S, Citarasu T and Marian MP. 2004. Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. *Aquaculture* 237, 9-20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.03.014>.
- Tassanakajon A, Somboonwivat K, Supungul P and Tang S. 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish Shellfish Immunol* 34, 954-967. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.021>.
- Vargas-Mendoza N, Madrigal-Santillán E, Morales-González Á, Esquivel-Soto J, Esquivel-Chirino C, y González-Rubio MGL, Gayosso-de-Lucio JA and Morales-González JA. 2014. Hepatoprotective effect of silymarin. *World J Hepatol* 6, 144-149. <https://doi.org/10.4254/wjh.v6.i3.144>.
- 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 J, Zhou H, Wang X, Mai K and He G. 2019. Effects of silymarin on growth performance, antioxidant capacity and immune response in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *J World Aquac Soc* 50, 1168-1181. <https://doi.org/10.1111/jwas.12614>.
- Wei L, Wu P, Zhou XQ, Jiang WD, Liu Y, Kuang SY, Tang L and Feng L. 2020. Dietary silymarin supplementation enhanced growth performance and improved intestinal apical junctional complex on juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture* 525, 735311. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735311>.
- Wu JP, Tsai CC, Yeh YL, Lin YM, Lin CC, Day CH, Shen CY, Padma VV, Pan LF and Huang CY. 2015. Silymarin accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. *Evid-Based Complement Alternat Med* 2015, 603529. <https://doi.org/10.1155/2015/603529>.
- Xiao P, Ji H, Ye Y, Zhang B, Chen Y, Tian J, Liu P, Chen L and Du Z. 2017. Dietary silymarin supplementation promotes growth performance and improves lipid metabolism and health status in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fed diets with elevated lipid levels. *Fish Physiol Biochem* 43, 245-263. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0283-6>.
- Yi D, Gu L, Ding B, Li M, Hou Y, Wang L and Gong J. 2012. Effects of dietary silymarin supplementation on growth performance and oxidative status in *Carassius auratus gibelio*. *J Animal Vet Adv* 11, 3399-3404. <https://doi.org/10.3923/javaa.2012.3399.3404>.
- Yin F, Liu J, Ji X, Wang Y, Zidichouski J and Zhang J. 2011. Silibinin: A novel inhibitor of A β aggregation. *Neurochem Int* 58, 399-403. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.12.017>.
- Zhang SP, Li JF, Wu XC, Zhong WJ, Xian JA, Liao SA, Miao YT and Wang AL. 2013. Effects of different dietary lipid level on the growth, survival and immune-relating genes expression in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*.

mei. Fish Shellfish Immunol 34, 1131-1138. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.016>.