

# 양식 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)의 혼합생약재 투여에 따른 항병력 조사

김나영\* · 전은지 · 김수경<sup>1</sup> · 이남실 · 김명석 · 조미영

국립수산과학원 병리연구과, <sup>1</sup>국립수산과학원 양식연구과

## Effects of Medicinal Herb Extracts of *Artemisia iwayomogi* Kitamura and *Angelica gigas* Nakai on Disease Resistance in Whiteleg Shrimp *Litopenaeus vannamei*

Na Young Kim\*, Eun Ji Jeon, Su Kyoung Kim, <sup>1</sup> Nam-Sil Lee, Myung Sug Kim and Mi Young Cho

Fish Pathology Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Republic of Korea

<sup>1</sup>Aquaculture research division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Republic of Korea

Although aquaculture shrimp production has increased, disease mortality has also increased. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) is an emerging disease that significantly reduces production. In this study, we have investigated the potential of medicinal herbs in enhancing the immune system of shrimp. A mixture of medicinal herb extracts (Han In-jin, *Artemisia iwayomogi* kitamura and Cham Dang-gwi, *Angelicae gigas* Nakai) was absorbed into pellets and fed to whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* for 12 weeks. The weight gain, immune activity, and disease resistance effects of the shrimp were examined. The growth performance of shrimp fed the mixture of medicinal herbal extracts was higher than that of the control group. The prophenoloxidase (proPO) activity was found to be significantly higher at 8 weeks in the 0.1% medicinal herb extract fed group. The cumulative mortality when artificially infected with AHPND pathogens commonly decreased in the 8 weeks fed group when compared with the control group. Furthermore, the RPS (relative percentage survival) was improved. This study confirmed that a mixture of medicinal herbal extracts has a positive effect on growth performance, innate immunity and disease resistance in shrimp. The optimum concentration of the medicinal herb extract for shrimp feed was 0.1% .

Keywords: Immunity, proPO activity, AHPND, Disease resistance, *Litopenaeus vannamei*

### 서 론

세계 양식새우 생산량은 증가추세로 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)의 생산량은 5.8백만톤이며, 양식새우 종 중에서 가장 생산량이 높다(FAO, 2023). 한국에서는 흰반점병(white spot disease, WSD)으로 큰 문제가 발생하기 이전에는 대하(*Fenneropenaeus chinensis*)를 양식하였으나, WSD가 전국으로 확산되어 새우 양식산업 자체가 붕괴될 수준에 이르게 되어(Jang and Jun, 2005) 대체 품종으로 WSD에 내성이 강하고 고 밀도 양식이 가능한 흰다리새우를 도입하였다. 현재 우리나라에서 판매되고 있는 대하라고 알려진 새우의 95%는 흰다리새

우로 이 종도 신종질병의 발생으로 새로운 국면을 맞이하였다. 2009년 중국에서 급성간체장괴사병(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)이 발생하여 베트남(2011년), 말레이시아(2011년), 태국(2012년)을 거쳐 2016년도에는 국내에서도 발생하여 양식새우 생산량의 저하를 가져왔다(Han et al., 2020). 이 질병으로 인해 전세계 양식새우 생산량의 19%가 감소(Thitamadee et al., 2016)하였고, 국내에서도 이 질병이 발생 후 23%의 생산량 저하를 가져왔다(KOSIS, 2017).

AHPND의 원인체는 특정 독소유전자(PirA, PirB)를 포함하는 *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp*<sub>AHPND</sub>)로 알려져 있고(Han et al., 2015), 이 원인체는 주변 온도가 28±2°C의 사육수에서 최

\*Corresponding author: Tel: +82. 51. 720. 2491 Fax: +82. 51. 720. 2498

E-mail address: pharm001@korea.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.2024.0355>

Korean J Fish Aquat Sci 57(4), 355-363, August 2024

Received 24 May 2024; Revised 12 June 2024; Accepted 6 August 2024

저자 직위: 김나영(연구사), 전은지(연구원), 김수경(연구사), 이남실(연구원), 김명석(연구관), 조미영(연구관)

대 9-18일까지 생존이 가능하므로 새우의 후기유생(post-larvae) 또는 치하(juveniles)를 입식 후 이 원인체가 감염되면 빠르면 10일, 30-35일 이내에 급격히 폐사하여 100%에 이른다(WOAH, 2023). 이 질병은 먹이, 사육수 등 새우의 경구를 통해 수평감염으로 발생되며, 감염시 면역기관인 간체장과 소화기관인 장이 비는 증상이 발생한다(Dabu et al., 2017). 우리나라는 축제식양식과 바오플락양식으로 새우를 양식하고 있고, 그 중 축제식양식방법으로 생산량이 높으며, 90% 이상이 서해안 지역을 중심으로 양식되고 있다(KOSIS, 2023b). 이 방법은 고밀도로 양식이 가능하나, 입식 후 출하시까지 환수가 어려운 개방형 양식방법으로, 질병 발생시 확산속도가 빠르며, 질병이 발생하여 치료를 위해 약품을 사용시 잔류의 문제를 야기할 수 있다. 수산양식분야에서 질병 치료에 사용되는 화학제제(항생제 등)의 사용이 식품안전성 및 내성균 발생을 야기할 수 있으므로, 백신과 면역증강제의 사용이 권장되고 있다. 하지만 새우는 일반적인 어류와 다르게 선천성 면역기관만을 가지고 있어 백신의 사용이 어렵고(Kumar et al., 2023), 필요시 처방 및 출하 제한지시서 발급을 통해 사용은 가능하나, 새우 전용으로 허가된 수산용 항생제는 없다(NFQS, 2022). 이런 이유로 새우양식에 있어서는 선천성 면역을 증대시키는 연구들이 많이 수행되었다. 비타민 C, 베타카로틴, 프로바이오틱스 등 대사를 증진시켜 면역력을 높이는 물질에 대한 연구가 많으며, 기능성 첨가제를 통한 비특이적 면역력 향상에 관한 연구가 최근에 보고되고 있다(Li et al., 2022). 하지만 이런 연구들은 비특이적 면역력에 대한 증대효과를 확인할 뿐, 새우에 대량폐사를 일으키는 병원체에 대해 항균력을 가지면서도 새우의 면역력 증대를 통한 항병력을 높일 있는 물질에 대한 연구가 적어 병원체에 대한 항병력을 가지며, 새우의 면역력을 높일 수 있는 연구가 필요하다.

최근에 식물추출물을 활용한 몇몇 연구들이 수행되어 항균효과에 대해서 보고되고 있으나, 식물추출물이 가지고 있는 부위별 또는 농도별 독성으로 인해 사용에 주의가 필요하다(Kumar et al., 2021). 그 중 생약재는 오랜 기간에 걸친 사용경험과 안전성이 있는 것으로 알려져 있어 사용이 용이하고, 항생제가 가지고 있는 거부감이 없다는 장점을 가지고 있다. 본 연구에서 사용된 한인진(*Artemisia iwayomogi* Kitamura)과 참당귀(*Angelicae gigas* Nakai)로 한인진은 국화과 식물로 더위지기의 지상부이고, 참당귀는 미나리과 식물로 참당귀의 뿌리이며, 항균, 항곰팡이, 항염, 항암 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Jeon et al., 2020). 참당귀의 지표성분은 쿠마린계열의 decursin으로 안전하고 항응고, 신경보호, 항암, 항염증, 항균효과 등의 다양한 효능을 가지고 있다(Kim et al., 2011). 이 혼합추출물은 이전 연구(Jeon et al., 2020; Kim et al., 2021)를 통해, 수산생물병원체에 대한 항균, 항진균, 항기생충, 항바이러스 효능(*in vitro*)이 매우 높게 나타났고, 특히 어류에 적용실험을 통해 항생제 대체제로의 활용가능성을 확인하였다. 본 연구에서 한인진, 참당귀 혼합추출물을 사료에 흡습시켜 경구투여하여 흰다리새우의 성

장, 비특이적 면역력 및 항병력에 미치는 효능에 대해서 조사하여 새우에서 항생제 대체제로의 가능성을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험생물

흰다리새우(5.91 ± 1.64 g, 7.85 ± 0.65 cm)는 서해수산연구소 태안센터에서 사육 중인 개체를 국립수산물품질관리원과 수조동으로 이송하여 실험에 사용하였다. 모든 실험개체는 수온 26.5 ± 1.0°C를 유지하여 사육하였으며, 사료는 상업용사료(CJ CheilJedang, Seoul, Korea)를 매일 3회, 체중의 10%로 투여하였다. 사육수는 매일 1회 50%를 환수하여 2주간 순치 후, 각 수조당 무작위로(N=300) 분배하여 실험에 사용하였다. 흰다리새우는 본 실험에 사용하기 전에 질병에 감염을 확인하기 위해 간체장 등 내부장기를 해부하여 세균, 바이러스, 기생충 감염여부를 확인하였다. 특히 Vp<sub>AHPND</sub> 감염은 Han et al. (2015)의 방법에 따라(PirA, PirB) 검출하였다.

### 생약재 첨가사료 제조 및 경구투여

본 실험에 사용된 한인진과 참당귀의 건조 생약재는 국내 한약재 상사(Daehak Korean Pharmacy, Iksan, Korea)로부터 구입하였으며, 모든 시료는 멸균증류수로 3회 씻은 후 한인진·참당귀 5 g씩 혼합한 추출물 10 g에 50% 에탄올 100 mL를 더하여 초음파 추출(3시간 씩 3회 반복)한 후, -80°C에서 동결건조(FDU-1100; Eyela, Tokyo, Japan)시켜서 완전한 분말상태로 제작하였다.

새우EP사료(CJ CheilJedang)를 어체중(kg) 당 50% 에탄올 생약재(인진·당귀) 혼합추출물을 저농도(0.1%), 중농도(0.5%) 및 고농도(1%) 되게 흡습시켜 그늘에서 잘 건조시켜 제조하였다. 대조구는 생약재 혼합추출물을 처리하지 않은 새우EP사료만 공급하였고, 제조한 생약재 첨가사료는 실험에 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였다. 실험의 투여기간은 12주로 하였으며, 실험구는 50% 에탄올 생약재 혼합추출물을 0.1, 0.5, 1% 농도로 처리한 3개로 설정하여 생약재 첨가사료를 경구투여하였다. 투여 시작 후 4, 8, 12주째에 성장률, 비특이적 면역활성, 항병력(질병 저항성)을 조사하였다.

### 성장률 및 비특이적 활성 측정

경구투여 기간(총 12주) 동안 4, 8, 12주째 마다 대조구와 실험구 그룹별로 각 10마리씩 무작위로 채취하여 길이와 무게를 측정하여 성장률의 차이를 비교하였고, 비특이적 활성(prophe-noloxidase activity, proPO activity) 측정을 위해 흰다리새우의 헤모리프를 채취하여 조사하였다. Jang et al. (2011)에 따라 헤모리프는 항응고버퍼(113 mM glucose, 27.2 mM sodium citrate, 2.8 mM citric acid and 71.9 NaCl)를 hemocytometer를 이용하여 전체 혈구수(total hemocyte count)를 hemocytes형

태를 granular cell, hylaine cell로 구분하여 계산하였다. proPO activity는 700 g로 4°C에서 15분 동안 원심분리 한 후, 항응고 버퍼로 2번 워싱 후 재부유시켜서 마쇄하였다. 이후 700 g로 4°C에서 15분 동안 원심분리하여 분리된 상층액에 trypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)과 L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine; Sigma-Aldrich)를 첨가하여 25°C에서 10분간 배양하여 반응 후 마쇄버퍼를 첨가하여 O.D. 490 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

항병력 조사

새우의 질병에 대한 항병력을 확인하기 위해 인위감염 실험에 사용된 균주는 국립수산물품질관리원 수산방역과에서 보유 중인 *Vibrio parahaemolyticus* (SM-3) 균주를 사용하였다. 먼저 대조구(일반사료)와 실험구(0.1, 0.5, 1% 농도별 투여구)로 나누어 1일 2회 경구투여를 실시하고, 농도별로 제작된 사료는 먹이통에 두고 섭취량을 확인하고 1일 1회 환수를 하였다. 복강주사 전에 멸균생리식염수를 이용해서 현탁해서 *V. parahaemolyticus*  $2.5 \times 10^3$ – $5.5 \times 10^3$ /CFU mL<sup>-1</sup>, 0.1 mL/shrimp 농도로 복강주사하였다. 생약재 추출물 경구투여 중 4, 8, 12주에 실험구별로 인위감염 실험을 통해 2주 동안의 폐사율을 조사하고, 항병력 효능을 확인을 위해 상대생존율(relative percent survival, RPS)을 측정하였다. 인위감염 실험의 정확도를 위하여, 감염개체의 내·외부 장기조직을 검경하고, 간체장을 분리하여 Han et al. (2015)의 방법에 따라 PCR검사로 감염균을 재검출하였다.

병리조직학적 분석

혼합생약재 투여에 따른 조직내 안전성을 확인하기 위해 투여기간(4, 8, 12주)동안 실험구와 대조구에서 각 10마리씩, 항병력 조사를 위해 실시한  $Vp_{AHPND}$  인위감염실험에서는 복강주사 후 14일째 간체장 조직 일부를 hartman's (modified davidson's) fixative solution (polyscience Inc.)을 사용하여 고정 및 블록을 제작하였다. 이후 마이크로톰(histoCore Multicut; Leica, Nussloch, Germany)으로 박절하고, hematoxylin & eosin (H&E) 염색하여 광학현미경(Axio Imager. A1, Zeiss, NewYork, USA)으로 관찰하였다.

통계학적 분석

모든 데이터의 통계학적 유의성은 ANOVA (SPSS versin 20, IBM)로 분석하였다. 데이터 값의 유의차는 turkey's multiple range test (P<0.05)로 비교하였다.

결과 및 고찰

체중증가율 조사

생약재 혼합추출물을 농도별로 투여한 모든 실험구에서 성장도, 섭식활동 및 생존율은 대조구와 비교한 결과, final body

weight (FBW), weight gain (WG)가 생약재 추출물 투여구가 대조구 대비 50% 이상 높게 나타남을 확인하였고, 농도별 투여구 구간내에서 유의적인 차이가 없었다(Table 1).

생약재 또는 파이토바이오틱스는 사료에 첨가함으로써 어류 또는 새우의 성장률, 면역력 및 질병 저항성을 개선하는데 도움이 되며(Li et al., 2022), 특히 어류에서는 사료소화율과 사료효율을 높이고 단백질 합성을 증진시킬수 있는 중요한 역할을 한다(Citarasu, 2010). 대황(*Rheum officinale* Bail)에서 anthraquinone 추출물을 투여한 큰장거미새우(*Macrobrachium rosenbergii*)에서 높은 성장속도를 유발하며(Su et al., 2008), 흰다리새우에 silymarin을 첨가해서 사료에 투여시 성장과 면역력을 높인데 효과가 있다(Shin et al., 2022). 그 중에서도 한인진은 항균효력(Choi et al., 2013,)이 장내미생물 개선에도 효과적이며(Lee et al., 2017), 항산화효과가 높은 플라보노이드 생리활성 물질을 가지고 있어(Ahn and Jung, 2011) 지질대사를 조절함으로써 염증을 줄이고, 면역기능을 향상시키는데 기여해서 성장과 면역을 향상시킨다(Lee et al., 2017). 참당귀는 소화관 및 소화기계 보호작용이 뛰어나므로(Kim et al., 2011), 이 혼합생약재가 새우의 소화율 증대에 효과를 높여 성장 및 체중증가에 도움이 된 것으로 사료된다.

비특이적 면역(proPO system activity) 조사

새우의 세포성 면역능평가를 위해서 총혈구 활성변화를 조사하였다. 총혈구 변화조사에서는 농도별(0, 0.1, 0.5, 1%) 및 기간별(0, 2, 4, 8, 12주)로 혼합생약재 투여에 따라 8주째부터 0.1% 혼합추출물 투여구에서 총혈구 수가 유의적으로 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 1). 비특이적 면역활성을 분석 결과에서는 혼합추출물 경구투여 2주째부터 0.5와 1% 투여구에서 활성이 증가하기 시작했고, 8주째에 0.1% 저농도 혼합추출물 투여한 그룹에서 가장 면역활성이 높게 나타났다(Fig. 2). 이는 혼합추출물의 경구투여가 농도의존적으로 증가하지 않고, 가장 최적의 농도에서 활성이 높게 나타남을 확인하였고, 혼합생약재 추출물 경구투여는 면역력 증대에 효과가 있는 것으로 나타

Table 1. Growth performance and feed utilization for whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (initial body weight, 5.91 g) fed the 4 group experimental diets for 12 weeks

Group	FBW <sup>1</sup>	WG <sup>2</sup>	P-value
Control group	11.60±0.58 <sup>a</sup>	96.31	-
0.1% Treatment group	14.40±0.62 <sup>b</sup>	143.69	0.002
0.5% Treatment group	14.67±0.55 <sup>b</sup>	148.21	0.002
1% Treatment group	14.75±0.73 <sup>b</sup>	149.62	0.002

<sup>1</sup>FBW, Final body weight (g). <sup>2</sup>Weight gain (WG; %)=[(final body weight (g)-initial body weight (g) / initial body weight (g)]×100. The diets were added with graded level of 50% EtOH medicine herb (Han In-jin and Cham Dang-gwi) extract by 0.1, 0.5 and 1% to the control diet.

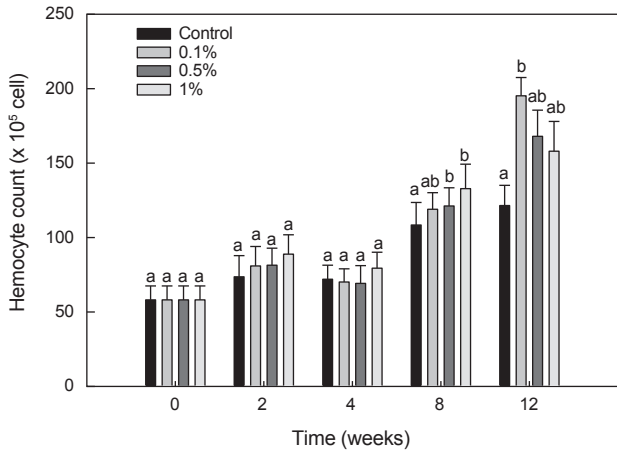


Fig. 1. Total hemocyte cell in plasma of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* of 4 group experimental diets for 12 weeks. The diets were added with graded level of 50% EtOH medicine herb (Han In-jin and Cham Dang-gwi) extract by 0.1, 0.5 and 1% to the control diet. Data are means ± SD and the n=10 (P>0.05).

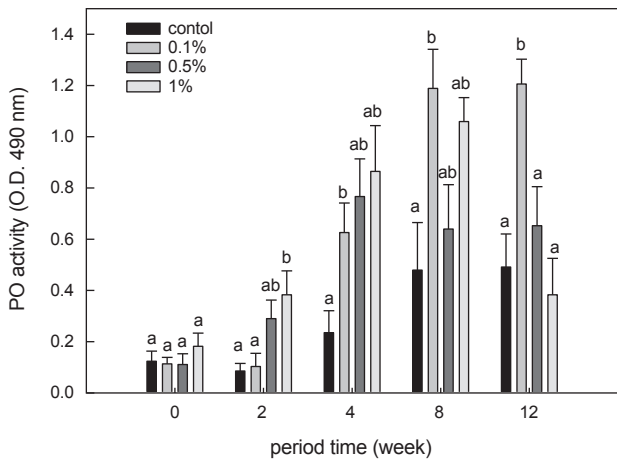


Fig. 2. PO activity of plasma in whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* fed extract (0.1, 0.5 and 1%) diet for 12 weeks. The diets were added with graded level of 50% EtOH medicine herb (Han In-jin and Cham Dang-gwi) extract by 0.1, 0.5 and 1% to the control diet. Data are means ± SD and the n=10 (P>0.05).

났다.

새우는 질병으로부터 자신을 방어하기 위해서 후천성 면역체계가 아니라 선천성 면역체계가 발달을 통해 자연 방어 메커니즘을 가지고 있다. 미생물인식 시스템, proPO 시스템, 응고시스템, 식세포, 캡슐화 등 이런 선천성면역시스템 중에서 proPO 시스템활성화 cascade에 의해 제어되는 멜라닌화는 무척추동물 면역에서 병원체를 제거하기 위해 가장 중요한 역할을 하며, 숙주의 질병에 의한 저항력을 높인다(Kumar et al., 2023).

Hemolymph 내 PO 활성은 음식소닌화(opsonization)를 통해 혈구의 식세포 작용을 촉진시키고, 혈액응고에 관여하므로 갑각류의 선천성 면역에서 매우 중요한 지표로 사용된다. 이런 면역 체계에서 가장 기본적으로 각 혈구세포(투명구, 반과립구, 과립구)에 따라 역할이 다르고, 투명구는 주로 식세포작용을 하며 반과립구는 결절형성, 세포독성기능, 페놀산화효소 활성(phenoloxidase activity) 등을 수행하고, 과립구는 페놀산화효소 활성이 매우 강해 혈구세포의 증가가 면역활성이 높아짐을 의미한다(Zhang et al., 2006). 그 중에서도 페놀산화효소 활성에 영향을 주는 과립구와 반과립구의 증가는 특히나 비특이적 면역 증가에 중요한 역할을 한다. 이런 혈구세포의 증가와 함께 페놀산화효소 활성의 증가는 면역력 증대로 이어진다. 대하(Luo, 1997), 흰다리새우(Lawhavit et al., 2011), 큰장거미새우(El-Desouky et al., 2012), 홍다리얼룩새우(*Penaeus monodon*) (Chandran et al., 2016)에 phytochemical을 투여시 비특이적 면역력을 높이는 것으로 보고되었다. 이는 본 연구결과와도 동일하게 phytochemical의 첨가가 비특이적 면역력(PO activity)을 향상시키는데 효과적임을 나타낸다. 새우의 proPO계는 과립구에 있으며, 베타글루칸이나 그람음성균에서 분비되는 지질다당류에 의해 활성화되는데, 이 물질은 면역체계를 자극하고 체액성 및 세포성 면역을 조절함으로써 다양한 병원체 감염을 방어하는데 효과가 높다(Mantovani et al., 2008; Chen et al., 2013; Ina et al., 2013; Vetvicka et al., 2014).

질병 예방을 위해서 식품으로 섭취하며, 우리가 많이 섭취하는 곡물에서 베타글루칸의 함량을 조사한 결과, 보리(20%), 귀리(8%) 이외 0.6–3% 내외로 포함되어 있다(Bashir and Choi, 2017). 반면, 혼합생약재(인진, 당귀 추출물)의 경우 베타글루칸의 함량을 분석한 결과, 7.54% (충남대학교 농업과학연구소, data not shown)가 함유되어 있었고, 이는 다른 곡물류에 비해 혼합생약재의 베타글루칸 함량이 충분히 높아 비특이적 면역을 높이는데 충분히 효과가 있음을 의미한다. 베타글루칸은 흰다리새우 유생에 투여시 WG, SGR (specific growth rate) 및 PO 활성을 크게 증가시키고, 베타글루칸이 소화능력과 영양소의 흡수 및 축적을 높여 성장을 개선할 수 있다(Qiao et al., 2022). 베타글루칸 등은 면역자극제로써 새우의 비특이적 면역력을 증가시키는데 효과적이나, 이런 물질은 새우 체내에 들어오게 되면 이물질로 감지된다. 새우의 혈구세포의 pattern recognition proteins이 면역자극제의 pathogen-associated molecular patterns을 식별하여 식세포 작용 등 일련의 작용을 발생하게 되며, 이는 과도한 농도의 자극제가 아닌 적정농도 이상이 효과적으로 비특이적 면역을 자극하는데 도움이 된다(Lee et al., 2020). 본 실험에서도 혼합추출물에 포함된 베타글루칸 및 지표물질이 면역력을 높이는데 효과적이며, 특히, 8주간 새우 체내에 자극된 베타글루칸이 새우의 비특이적 면역력에서 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다. 체내에 들어온 베타글루칸이 새우의 식세포 작용을 증가시켜 면역력 상승으로 이어져 항병력에 영향

을 친 것으로 추정된다(Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000).

세균 인위감염에 따른 항병력

생약재 혼합추출물의 농도별(0.1, 0.5, 1%) 투여기간에 따라, *V. parahemolyticus*로 인위감염 실험을 실시한 결과, 4주째 폐사율은 0.1% 실험구에서 가장 낮게 나타났고, 8주째에는 가장 높게 나타났으며, 그다음 0.5% 투여구가 높게 나타났다. 그리고 12주째에도 역시 0.1%가 가장 폐사율이 낮게 나타났다(Fig. 3). AHPND 병원균에 대한 RPS로 확인한 결과, 0.1% 투여구에서 4주째 15%의 RPS를 나타냈으나, 8주째에 70%의 RPS를 나타냈다(Table 2). 이는 PO 활성조사에서도 실험기간 동안 8, 12주째 0.1% 생약재 투여구에서 활성이 가장 높게 나타났고, 이는 항병력 결과와도 동일하게 나타나 혼합생약재 투여가 비특이적 면역을 증대시키면서 동시에 질병에 대한 저항력도 높이는 것으로 나타났다.

병리조직학적 조사

본 실험에서 대조구와 실험구의 간체장의 조직표본에서는 혼합생약재의 투여 기간에 따른 뚜렷한 조직 변성이 관찰되지 않아 생약재 혼합추출물을 사료의 0.1-1%의 농도로 장기간에 걸쳐 투여하더라도 새우의 간체장 조직구조에 영향을 미치는 세포독성이 없음을 확인할 수 있었다(data not shown). 또한,  $Vp_{AHPND}$ 에 감염된 개체의 조직에서는 Fig. S1 (AP inj)에 보이는 것과 같이 간체장 세관(tubule) 상피세포의 변성과 위축이 관찰되지만(Nguyen et al., 2023), 생약재 혼합추출물 투여구에서는  $Vp_{AHPND}$ 의 인위감염에도 간체장에서의 유의적인 조직변성이 관찰되지 않았다(Fig. S2).

식물추출물은 추출하는 부위와 투여농도에 따라 독성을 유발할 수 있으나, 본 실험에 사용된 혼합생약재의 경우 인체에서 안전하게 사용가능한 잔류면제 물질로 등록되어 있고, 섭취에서도 장기투여에도 안전함을 확인하였다(Kim et al., 2021). 참당귀는 상처부위에 대한 재생 효과(Kim et al., 2011)가 있으며, 지표물질인 decursin은 항염증 및 항종양 등의 효능(Zhang et al., 2012; Kim et al., 2018)을 가지고 있어 생체내 보호효과를 나타내었고 쥐에서는 궤양성 대장염 완화 및 보호효과를(Oh et al., 2017) 확인하였다. 한인진의 경우 항염증(Kim et al., 2005), 항암(Taleghani et al., 2020), 항산화효과(Sin et al., 2020)를 가

Table 2. Relative percent survival (RPS) of experimental *Vibrio parahemolyticus* infected whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* fed 50% EtOH medicine herb extract for 12 weeks (n=20)

Strain	4 weeks			8 weeks			12 weeks		
	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1
RPS <sup>1</sup> <i>V. parahemolyticus</i>	15	25	35	70	60	15	35	25	15

<sup>1</sup>RPS (Relative percent survival)=1-(Experimental group mortality/Control group mortality)X100.

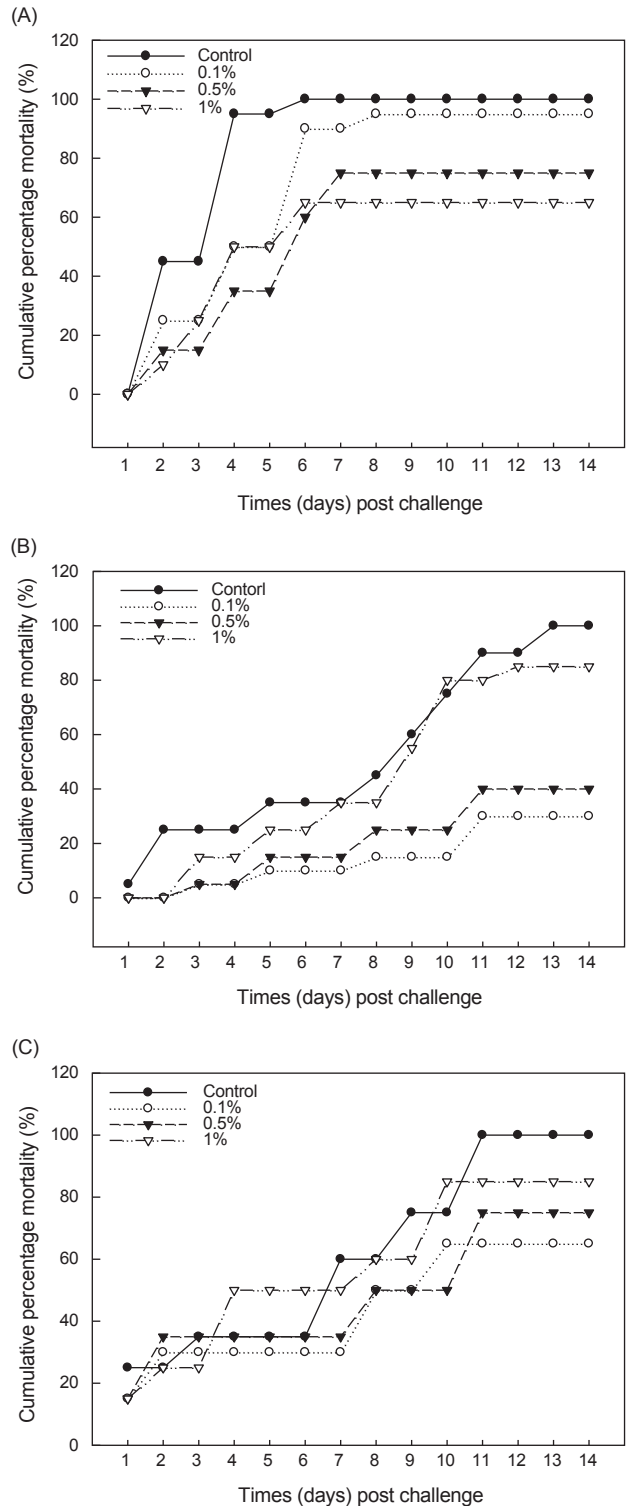


Fig. 3. Cumulative mortality rate (%) of the *Vibrio parahemolyticus* infected whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* given different concentration diets(0.1, 0.5 and 1%) . (A) 4 week, (B) 8 week and (C) 12 week. Each group n=20.

지고 있다. 이러한 혼합생약재의 효능이 새우의 세포와 조직을  $Vp_{AHPND}$ 로부터 보호하는 데에 도움이 되었음을 의미한다.

한인진은 항균효능(Choi et al., 2008), 참당귀는 세균과 기생충을 억제하는 효과(Kim et al., 2011)가 있다. Jeon et al. (2020)도 한인진·참당귀의 혼합생약재 추출물이 수산생물병원체(세균, 기생충, 바이러스)에 대한 높은 항균, 항기생충, 항바이러스 활성이 있음을 확인하였다. 특히 새우에 혼합생약재 0.1%를 사료에 섞어서 경구투여시 새우에서 문제가 되고 있는 AHPND에 대한 항병력 효과가 8주째 가장 높게 나타났다. 이는 다른 약용식물을 투여보다 훨씬 효과적으로 나타났다. 이전 연구 결과에 따르면, 후코이단 투여 새우는 식세포 활성 증가와 함께 성장, 면역력과 비브리오균 및 WSSV에 대한 저항성이 높아졌다(Chen et al., 2016). 베트남 전통 허브에 노출 후 AHPND에 대한 항균활성을 높여 AHPND 인위감염에서 생존율이 50% 높아짐을 확인하였고(Dang et al., 2019), 멕시코 가시양귀비 추출물을 경구투여시 WSSV 및 *Vibrio harveyi*의 감염을 억제하고, 면역력을 높이는 것으로 나타났다(Palanikumar et al., 2018). 인동덩쿨 꽃을 첨가한 새우에서도 성장과 생존율이 높아짐을 확인하였다(Chen et al., 2013). 구아바 잎 추출물 투여도 새우의 성장과 비특이적 면역을 증가시켰다(Yin et al., 2014). 이들 약용식물은 모두 새우의 비특이적 면역을 높여 병원체에 대한 생존율을 높이는 하나, 실제 새우에서 가장 문제가 되고 있는 AHPND에 대한 인진·당귀 혼합추출물의 항병력 및 면역력을 모두 확인한 연구는 없다. 본 연구 결과, 혼합생약재 0.1% 투여 그룹에서 최대 70%의 RPS를 확인하였고, 장기간 복용시 새우 체내에 들어온 베타글루칸 등 면역증강제 성분으로 인해 비특이적 면역력 증가 및 항병력 증가를 확인하였다. 추후 양식현장에서 입식 후 새우에 질병이 많이 발생하는 시점까지 혼합생약재를 투여한다면 충분한 항병력 효과를 얻을 수 있을 것이다.

양식산업에서 질병은 가장 취약한 부분으로 질병 발생이 가장 먼저 고려되는 것이 항생제 사용이다. 하지만, 항생제는 항생제 잔류 등 부작용으로 인해 안전한 이미지를 저하시켜 왔다. 특히 새우는 양식방법(축제식 및 고밀도 양식)으로 인해서 입식 이후에 출하시까지 사육수의 환수가 쉽지 않아 항생제를 사용시 잔류문제가 발생할 가능성이 높아 사용에 유의가 필요하다. 이런 문제들로 인해 전세계적으로 항생제보다는 약용식물을 사용한 지속가능한 양식방법에 대해 관심이 높아지고 연구를 많이 진행하고 있다. 약용식물(herbal compounds)은 안전성, 저독성, 최소한의 환경영향을 미치며(Zhu, 2020), 특히 사료에 섞어서 경구로 투여할 경우 스트레스를 최소화하여 투여하므로 비특이적 면역을 높일 수 있는 가장 효과적인 방법이다(Harichrisnan et al., 2011). 이는 면역력 증대와 항병력 향상을 기대해 향후 새우의 항생제 대체제 효과를 보여주는 기초자료로 활용 될 수 있다.

이상의 본 연구결과를 종합해보면, 한인진·참당귀 혼합추출

물을 사료에 흡습시켜 0.1% 농도로 8주간 경구투여시 비특이적 면역력 증대와 함께 AHPND에 대한 항병력에 효과를 높음을 확인하였고, 더 높은 농도로 투여는 가능하나, AHPND에 대한 방어력을 높이는데 효과적이지 않음을 확인하였다. 그리고 12주간 혼합추출물 투여에도 독성이 나타나지 않고, 비특이적 면역력을 높일 수 있었다. 이를 통해 혼합추출물을 8주간 경구투여시 AHPND의 예방효과를 확인하였고, 항생제 대체제로의 개발 가능성을 높일 기초자료로 활용 될 수 있을 것이다. 추가적으로 수산용의약품으로 제품화를 고려한다면, 현장 효능을 확인하는 후속 연구를 통해 양식장 대상의 실험이 추후 수행되어야 한다.

## 사 사

이 논문은 국립수산물학원 “수산생물 질병 특성 연구 (R2024054)” 연구개발비 지원에 의해 수행되었습니다.

## References

- Ahn BY and Jung MY. 2011. Antioxidative and protective activity of polysaccharide extract from *Artemisia iwayomogi* Kitamura stems on UVB-damaged mouse epidermis. *J Appl Biol Chem* 54, 184-189. <http://doi.org/10.3839/jabc.2011.031>.
- Bashir KMI and Choi JS. 2017. Clinical and physiological perspectives of  $\beta$ -Glucans: The past, present, and future. *Int J Mol Sci* 18, 1906. <https://doi.org/10.3390/ijms18091906>.
- Chandran MN, Moovendhan S, Suganya AM, Tamilselvi A, Bebin, 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>.
- Chen X, Lin HZ, Jiang SG, Wu KC, Liu YJ, Tian LX, Zhang YQ and Niu J. 2013. Dietary supplementation of honeysuckle improves the growth, survival and immunity of *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol* 35, 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.020>.
- Chen YY, Chen JC, Kuo YH, Lin YC, Chang YH, Gong HY and Huang CL. 2016. Lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-glucan-binding protein (LGBP) bind to seaweed polysaccharides and activate the prophenoloxidase system in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Dev Comp Immunol* 55, 144-151. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.10.023>.
- Choi SR, You DH, Kim JY, Park CB, Ryu J, Kim DH and Eun JS. 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of *Artemisia capillaris* Thunbergii. *Kor J Med Crop Sci* 16, 112-117.
- Choi Y, Yanagawa Y, Kim S, Whang WK and Park TS. 2013. *Artemisia iwayomogi* extract attenuates high-fat diet-induced obesity by decreasing the expression of genes associated

- with adipogenesis in mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013, 915953. <https://doi.org/10.1155/2013/915953>.
- 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>.
- Dabu IM, Lim JJ, Arabit PMT, Orense SJAB, Tabardillo JA, Corre VL and Maningas MBB. 2017. The first record of acute hepatopancreatic necrosis disease in the Philippines. *Aquacult Res* 48, 792-799. <https://doi.org/10.1111/are.12923>.
- Dang LT, Nguyen HT, Hoang HH, Lai HNT and Nguyen HT. 2019. Efficacy of rose myrtle *Rhodomyrtus tomentosa* seed extract against acute hepatopancreatic necrosis disease in Pacific whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. *J Aquat Anim Health* 31, 311-319. <https://doi.org/10.1002/aah.10080>.
- 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>.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2023. Fisheries and Aquaculture report. No 1053. FAO, Rome, Italy.
- Han JE, Tang KF, Tran LH and Lightner DV. 2015. *Photorhabdus* insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis Aquat Org* 113, 33-40. <https://doi.org/10.3354/dao02830>.
- Han JE, Choi SK, Han SH, Lee SC, Jeon HJ, Lee C, Kim KY, Lee YS, Park SC, Rhee GY, Park SY, Kim JS, Park S, Kim JH and Lee KJ. 2020. Genomic and histopathological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from an acute hepatopancreatic necrosis disease outbreak in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Korea. *Aquaculture* 524, 735284. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735284>.
- Harikrishnan R, Balasundaram C and Heo MS. 2011. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture* 317, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.03.039>.
- Ina K, Kataoka T and Ando T. 2013. The use of lentinan for treating gastric cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 13, 681-688. <https://doi.org/10.2174/1871520611313050002>.
- Jang IK and Jun JC. 2005. Current status of shrimp disease and its control in Korea. In: *Proceeding of the 1st Korea-US Seminar and Workshop on the Sustainable Marine Shrimp Culture*. Incheon, Korea, 27-28.
- Jang IK, Pang Z, Yu J, Kim SK, Seo HC and Cho YR. 2011. Selectively enhanced expression of prophenoloxidase activating enzyme 1 (PPAE1) at a bacteria clearance site in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *BMC Immunol* 12, 70. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-12-70>.
- Jeon EJ, Lee MS, Seo JS, Jung SH, Kim MS, Kang SY and Kim NY. 2020. Study of anti-pathogenic herbal materials for the eco-friendly drugs in aquaculture. *JFMSE* 32, 980-987. <https://doi.org/10.13000/JFMSE.2020.8.32.4.980>.
- Kim SJ, Ko SM, Choi EJ, Ham SH, Kwon YD, Lee, YB and Cho HY. 2018. Simultaneous determination of decursin, decursinol angelate, nodakenin, and decursinol of *Angelica gigas* Nakai in human plasma by UHPLC-MS/MS: Application to pharmacokinetic study. *Molecules* 23, 1019. <https://doi.org/10.3390/molecules23051019>.
- Kim NY, Lee NS, Jeon EJ, Seo JS, Woo SJ, Kim MS, Kang SY and Jung SH. 2021. Effects of medicinal herb extracts of *Artemisia iwayomogi* Kitamura and *Angelica gigas* Nakai on disease resistance in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Korean J Fish Aquat Sci* 54, 634-643. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0634>.
- Kim SA, Oh HK, Kim JY, Hong JW and Cho SI. 2011. A review of pharmacological effects of *Angelica gigas*, *Angelica sinensis*, *Angelica acutiloba* and their bioactive compounds. *J Korean Oriental Med* 32, 1-24.
- Kim SH, Choi CH, Kim SY, Eun JS and Shin TY. 2005. Anti-allergic effects of *Artemisia iwayomogi* on mast cell-mediated allergy model. *Exp Biol Med* 230, 82-88. <https://doi.org/10.1177/153537020523000111>.
- KOSIS (Korea Statistical Information Service). 2023a. Survey on the Status of Aquaculture. Retrieved from [https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=101&tblId=DT\\_1EZ0008&vw\\_cd=MT\\_ZTITLE&list\\_id=K2\\_4&scrId=&seqNo=&lang\\_mode=ko&obj\\_var\\_id=&itm\\_id=&conn\\_path=MT\\_ZTITLE&path=%252FstatisticsList%252FstatisticsListIndex.do](https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=101&tblId=DT_1EZ0008&vw_cd=MT_ZTITLE&list_id=K2_4&scrId=&seqNo=&lang_mode=ko&obj_var_id=&itm_id=&conn_path=MT_ZTITLE&path=%252FstatisticsList%252FstatisticsListIndex.do) on Jun 7, 2024.
- KOSIS(KoreaStatisticalInformationService).2023b.Surveyonthe StatusofAquaculture. Retrievedfrom [https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=146&tblId=DT\\_114\\_2013\\_S0013&vw\\_cd=MT\\_ZTITLE&list\\_id=K2\\_9&scrId=&seqNo=&lang\\_mode=ko&obj\\_var\\_id=&itm\\_id=&conn\\_path=MT\\_ZTITLE&path=%252FstatisticsList%252FstatisticsListIndex.do](https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=146&tblId=DT_114_2013_S0013&vw_cd=MT_ZTITLE&list_id=K2_9&scrId=&seqNo=&lang_mode=ko&obj_var_id=&itm_id=&conn_path=MT_ZTITLE&path=%252FstatisticsList%252FstatisticsListIndex.do) on May 10, 2024.
- Kumar V, Roy S, Behera BK, Bossier P and Das BK. 2021. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): Virulence, pathogenesis and mitigation strategies in shrimp aquaculture. *Toxins* 13, 524. <https://doi.org/10.3390/toxins13080524>.
- Kumar S, Verma AK, Singh SP and Awasthi A. 2023. Immunostimulants for shrimp aquaculture: Paving pathway towards shrimp sustainability. *Environ Sci Pollut Res Int* 30, 25325-25343. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18433-y>.
- Lawhavit O, Sincharoenpokai 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.
- Lee CL, Chang CC, Kuo HW and Cheng W. 2020. Pectin of

- cacao pod husk, an efficient immunostimulant for white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol 107, 357-366. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.10.026>.
- Lee JH, Narayan VP, Hong EY, Whang WK and Park TS. 2017. *Artemisia Iwayomogi* extract attenuates high-fat diet-induced hypertriglyceridemia in mice: Potential involvement of the adiponectin-AMPK pathway and very low density lipoprotein assembly in the liver. Int J Mol Sci 18, 1762. <https://doi.org/10.3390/ijms18081762>.
- 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. <http://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, 573-578.
- Mantovani MS, Bellini MF, Angeli JPF, Oliveira RJ, Silva AF and Ribeiro LR. 2008.  $\beta$ -glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. Mutat Res 658, 154-161. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.07.002>.
- NFQS (National Fishery Products Quality Management Service). 2022. Aquatic Medicine Catalog. NFQS, Busan, Korea, 16-125.
- Nguyen TTL, Luu TTH, Nguyen TT, Pham VD, Nguyen TN, Truong QP and Hong MH. 2023. A comprehensive study in efficacy of Vietnamese herbal extracts on whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Isr J Aquac-Bamidgheh 75, 1-22. <https://doi.org/10.46989/001c.81912>.
- Oh SR, Ok S, Jung TS, Jeon SO, Park JM, Jung JW and Ryu DS. 2017. Protective effect of decursin and decursinol angelate-rich *Angelica gigas* Nakai extract on dextran sulfate sodium-induced murine ulcerative colitis. Asian Pac J Trop Med 10, 864-870. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.08.017>.
- Palanikumar P, Benitta DJD, Lelin C, Thirumalaikumar E, Michaelbabu M and Citarasu T. 2018. Effect of *Argemone mexicana* active principles on inhibiting viral multiplication and stimulating immune system in Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus. Fish Shellfish Immunol 75, 243-252. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.02.011>.
- Qiao Y, Zhou L, Qu Y, Lu K, Han F and Li E. 2022. Effects of different dietary  $\beta$ -glucan levels on antioxidant capacity and immunity, gut microbiota and transcriptome responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under low salinity. Antioxidants 11, 2282. <https://doi.org/10.3390/antiox11112282>.
- Shin D, Wijemanna U, Kim HS, Yun KS and Lee KJ. 2022. Effects of dietary silymarin on growth performance, feed utilization, innate immunity and antioxidant capacity of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Korean J Fish Aquat Sci 55, 886-893. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2022.0886>.
- Sin SM, Jeong WM, Kil YS, Lee DY, Kim SG, Goo YM. 2020. Anti-inflammatory and anti-bacterial activities of *Artemisia iwayomogi* Kitamura extract fractions. J Life Sci 30, 40-44. <https://doi.org/10.5352/JLS.2020.30.1.40>.
- Su YT, Liu B, Zhou Q, He YJ, Xie J, Xu P, Li GF and Gao QP. 2008. Influence of anthraquinones extracted from *Rheum officinale* Bail promoting *Macrobrachium rosenbergii*'s resistance to *Vibrio anguillarum*. J Fish China 32, 455-463.
- Taleghani A, Emami SA and Tayarani-Najaran Z. 2020. Artemisia: A promising plant for the treatment of cancer. Bioorg Med Chem 28, 115180. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115180>.
- Vargas-Albores F and Yepiz-Plascencia G. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. Aquaculture 191, 13-21. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00416-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00416-6).
- Vetvicka V, Pinatto-Botelho MF, Santos AAD and De Oliveira CAF. 2014. Evaluation of a special combination of glucan with organic selenium derivative in different murine tumor model. Anticancer Res 34, 6939-6944.
- WOAH (World Organisation for Animal Health). 2023. Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, chapter 2.2.1. WOA, Paris, France.
- Yin XL, Li ZJ, Yang K, Lin HZ and Guo ZX. 2014. Effect of guava leaves on growth and the non-specific immune response of *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunol 40, 190-196. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.07.001>.
- Zhang J, Li L, Cheng J, Xing C, Kim SH and Lü J. 2012. Anti-cancer and other bioactivities of Korean *Angelica gigas* Nakai (AGN) and its major pyranocoumarin compounds. Anti-Cancer Agents Med Chem 12, 1239-1254. <https://doi.org/10.2174/187152012803833071>.
- Zhang ZF, Shao M and Kang KH. 2006. Classification of haematopoietic cells and haemocytes in Chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis*. Fish Shellfish Immunol 21, 159-169. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.11.003>.
- Zhu F. 2020. A review on the application of herbal medicines in the disease control of aquatic animals. Aquaculture 526, 735422. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735422>.



부 록

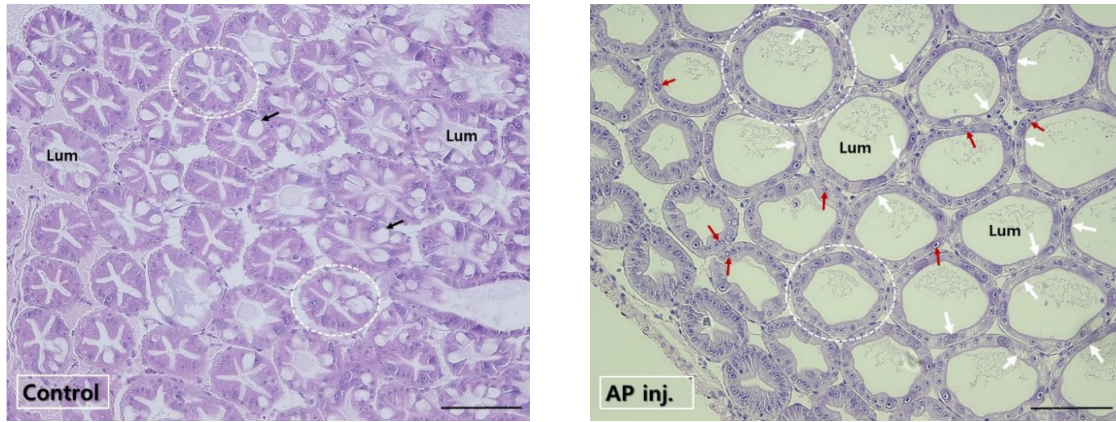


Fig. S1. Control (left): Normal hepatopancreas tissue. AP inj. (right):  $VP_{AHPND}$  infected hepatopancreas tissue. Circle: Hepatopancreatic tubule; Black arrow, Vacuole among hepatopancreatic cells; Red arrow, Hepatopancreatic cell showing pyknosis or karyorrhexis; White arrow, Hepatopancreatic cell showing cytoplasm degeneration or atrophy; Lum, Lumen of hepatopancreatic tubule. H&E stain, Bar=100  $\mu$ m.

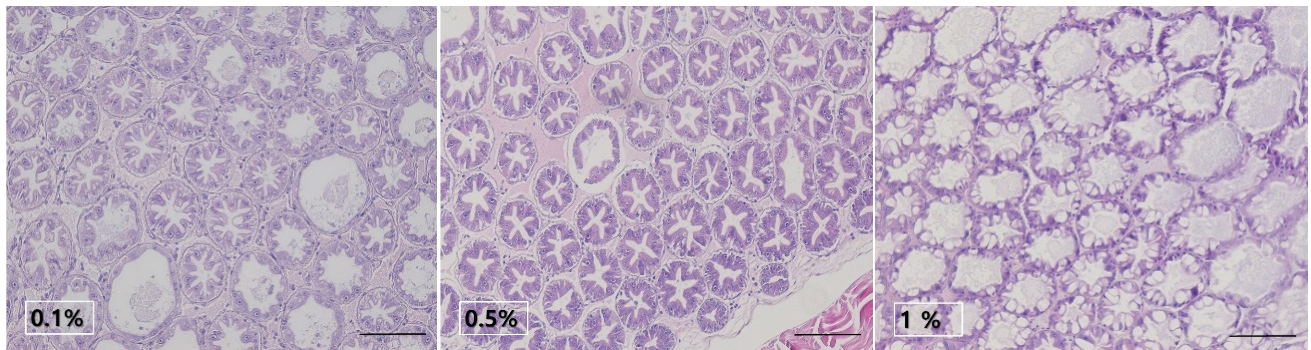


Fig. S2. The optical microscopy image of artificially infected  $VP_{AHPND}$  the hepatopancreas tissue of the whiteleg shrimp *Litopenasus vannamei* given different concentration diets(0.1, 0.5 and 1%). H&E stain, Bar=100  $\mu$ m.