



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

면역증강사료첨가제가 홍해삼(*Apostichopus japonicus*) 치삼의 성장 및 생리학적 변화에 미치는 영향

濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

南宮眞

2016年 2月

면역증강사료첨가제가 홍해삼(*Apostichopus japonicus*) 치삼의 성장 및 생리학적
변화에 미치는 영향


指導教授 呂寅圭


南宮眞


이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2016年 2月

南宮眞의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 허문수 

委員 정준범 

委員 여인규 

濟州大學校 大學院

2016年 2月

**Effects of Growth and Physiological responses on
Immunity Feed Additives in the Juvenile Red Sea
Cucumber, *Apostichopus japonicus***

Jin Namgung
(Supervised by professor In-Kyu Yeo)

**A thesis submitted in partial fulfillment of
the requirement for the degree of
Master of Science**

**Department of Marine Life Science
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY**

February, 2016

Abstract

The red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) is valuable food source in Korea, China and Japan. In Jeju, Korea put forth considerable effort such as supporting the red type sea cucumber farm and releasing juvenile to increased red type sea cucumber natural resources. However, these natural resources are rapidly diminishing according to the environmental changes such as high temperature and low salinity. Thus, major issues in farming the juvenile red variant sea cucumber include growth rates and environmental resistance. In recent years, studies have focused on feed additives to enhance immune system and health. In this study, we used probiotics, levan and spirulina manufactured immunity diet. And we compared the physiological activity in accordance with high temperature and low salinity in each groups which common diet (CD), nutrition diet (ND; mixed nutritional supplement) and immunity diet (ID; mixed probiotics, spirulina and levan).

The growth rate measured every 4 weeks and immune activities analyzed phenoloxidase(PO) activity, lysozyme activity and protein level in coelomic fluid after 12 weeks. As an additional experiment were analyzed the change of physiological activities in CD and ID groups on high temperature and low salinity environment. Acute environmental change stress tests divided into control group (20°C and 35‰), high temperature group (30°C) and low salinity group (25‰) for each diet groups. Sampling is 0, 1, 3, 6, 12 and 24 hour was run at the time. Coelomic fluid was sampled and analyzed the physiological activity.

As a results, the aqua farm environment had a higher survival rate in ID group compared other groups. The results of immune activities showed that protein level and PO activity were no significant differences, but lysozyme activity was significant decreased in each experimental group. The environmental stress results showed that stress index was higher in the CD group then the ID group. And we found that the each experimental group in the high temperature and low salinity environment was higher immune activities ID group then CD group. The Results indicated that the immune feed additive was enhanced resistance of acute environmental change in ID group. Thus, the Immune feed additive will have positive effect which increasing fast growth and resistance disease in Juvenile *A. japonicus*.

목차

Abstract	i
목차	ii
List of figures	v
List of table	vii
I. 종합서론.....	1
II. 면역증강사료첨가제 급이에 따른 홍해삼 치삼의 성장 및 면역 활성 변화.....	4
1. 서론.....	4
2. 재료 및 방법.....	7
2-1. 실험동물 및 실험 환경.....	7
2-2. 사료제작 및 급이.....	8
2-3. 성장도 평가.....	9
2-4. 생존율 평가.....	9
2-5. 홍해삼 내 단당류 분석.....	10
2-6. 홍해삼 체벽 구조의 조직학적 분석.....	10
2-7. 면역생리학적 분석.....	11
2-7-1. 단백질량 변화.....	11
2-7-2. Lysozyme activity 변화 분석.....	11
2-7-3. Penoloxydase activity 변화 분석.....	11
2-8. 통계처리.....	12
3. 결론.....	13
3-1. 성장도 평가.....	13

3-2. 생존율 평가.....	15
3-3. 체내 단당류 분석.....	16
3-4. 홍해삼 체벽 구조의 조직학적 분석.....	18
3-5. 사료 섭이에 따른 면역생리학적 분석.....	19
3-5-1. 단백질량 변화.....	19
3-5-2. Lysozyme activity 변화 분석.....	20
3-5-3. Penoloxydase (PO) activity 변화 분석.....	21
4. 고찰.....	22
Ⅲ. 면역증강사료첨가제를 급이한 홍해삼 치삼의 고수온 및 저염분 환경에 대한 생리학적 저항력의 변화.....	26
1. 서론.....	26
2. 재료 및 방법.....	28
2-1. 실험동물 및 실험환경.....	28
2-2. 환경스트레스에 따른 내장배출 개체수 측정.....	28
2-3. 환경스트레스에 따른 면역생리학적 분석.....	29
2-3-1. 단백질량 변화.....	29
2-3-2. Lysozyme activity 변화 분석.....	29
2-3-3. Penoloxydase (PO) activity 변화 분석.....	29
2-4. Lysozyme mRNA 발현량 분석.....	30
2-5. 통계처리.....	31
3. 결론.....	32
3-1. 환경스트레스에 따른 내장배출 개체수 측정.....	32
3-2. 환경스트레스에 따른 면역생리학적 분석.....	33
3-2-1. 단백질량 변화.....	33
3-2-2. Lysozyme activity 변화 분석.....	35
3-2-3. Penoloxydase (PO) activity 변화 분석.....	37

3-3. 유전학적 분석	39
4. 고찰.....	41
IV. 종합고찰.....	44
V. 요약	47
VI. 참고문헌.....	48
감사의 글	55

List of figures.

- Figure 1. Body weight of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) experimental diet fed after 12 weeks. Experimental groups: common diet (CD), nutrition diet (ND) and immunity diet (ID). 14
- Figure 2. Survival rate of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) experimental diet fed after 12 weeks. Experimental groups: common diet (CD), nutrition diet (ND) and immunity diet (ID). 15
- Figure 3. Concentration of (A) fructose and (B) glucose in the body wall of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Experimental groups: common diet (CD), nutrition diet (ND) and immunity diet (ID). 17
- Figure 4. Histological analysis in the body wall of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Experimental groups: (A) common diet (CD), (B) nutrition diet (ND) and (C) immunity diet (ID). 18
- Figure 5. Protein level in coelomic fluid of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Experimental Experimental groups: common diet (CD), nutrition diet (ND) and immunity diet (ID). 19
- Figure 6. Lysozyme activity in coelomic fluid of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Experimental groups: common diet (CD), nutrition diet (ND) and immunity diet (ID). 20
- Figure 7. Penoloxydase activity in coelomic fluid of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Experimental groups: common diet (CD), nutrition diet (ND) and immunity diet (ID). 21
- Figure 8. The number of individual gastrointestinal tract emissions in the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) on high temperature. Experimental groups: common diet + high temperature (CD+H), immunity diet + high temperature (ID+H). 32
- Figure 9. Protein level in coelomic fluid of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus*

japonicus) exposure to (A) high temperature and (B) low salinity for 0, 1, 3, 6, 12 and 24 hour. Experimental groups: common diet (CD), immunity diet (ID), common diet + high temperature (CD+H), immunity diet + high temperature (ID+H) common diet + low salinity (CD+S) and immunity diet + low salinity (ID+S)..... 34

Figure 10. Lysozyme activity in coelomic fluid of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) exposure to (A) high temperature and (B) low salinity for 0, 1, 3, 6, 12 and 24 hour. Experimental groups: common diet (CD), immunity diet (ID), common diet + high temperature (CD+H), immunity diet + high temperature (ID+H) common diet + low salinity (CD+S) and immunity diet + low salinity (ID+S)..... 36

Figure 11. Phenoloxidase activity (PO) in coelomic fluid of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) exposure to (A) high temperature and (B) low salinity for 0, 1, 3, 6, 12 and 24 hour. Experimental groups: common diet (CD), immunity diet (ID), common diet + high temperature (CD+H), immunity diet + high temperature (ID+H) common diet + low salinity (CD+S) and immunity diet + low salinity (ID+S). 38

Figure 12. Lysozyme mRNA expression on in body wall of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) for (A~C) 1 hour and (D~F) 24 hour. Experimental groups: common diet (CD) and immunity diet (ID). 40

List of table.

Table 1. Water environment of experiment tank for 12 weeks	7
Table 2. Proximate composition (%) of common diet (CD) for red type sea cucumber (<i>Apostichopus japonicus</i>).....	8
Table 3 Growth performance of the juvenile red type sea cucumber (<i>Apostichopus japonicus</i>) after 12 weeks	13
Table 4. Primer sequences for real-time RT-PCR analysis.	30

1. 종합 서론

해삼은 전세계적으로 1500여종이 존재하며 한국에는 14종이 서식 하는 것으로 알려졌다. 그 중 상업적인 가치가 높은 종은 돌기해삼인 해삼인 *Apostichopus japonicus* 종으로서 산업적으로 색에 따라 홍해삼, 청해삼 및 흑해삼으로 구분되지만 분류학적으로는 동일한 종으로 알려져 왔다(Choo, 2008; Choe and Oshima, 1961). 그러나 최근 연구결과 세종 간의 유전적 다형성이 존재하는 것으로 보고되었고(Kang et al., 2011; Kan-no and Kijima, 2003), 그 중에서도 홍해삼은 다른 해삼에 비해 맛과 향이 뛰어나 고가에 판매되고 있다(Kan-no and Kijima, 2003; Choo, 2008). 현재 국내에서도 홍해삼의 수요가 점차 증가하고 있어 경제적인 가치가 높으나 그에 비하여 양식은 제한적으로 이루어지고 있는 실정이다.

최근 홍해삼의 양식을 증가시키기 위하여 국가 및 지자체에서 많은 노력을 기울이고 있으며, 특히 제주도에서도 홍해삼의 경제적 가치를 높이고자 지속적으로 종묘를 방류하거나, 양식어가 지원, 양식단지 조성 등 홍해삼의 자원증가와 양식활성을 위해 많은 노력을 기울이고 있다. 그러나 홍해삼 양식의 경우 아직 기술이 정착되지 않아 양식상에 어려움이 많기 때문에 일부 어가에서만 이루어지고 있으며, 제주도 연근해의 수온 상승 및 염분저하 등으로 인하여 방류 홍해삼 치삼의 생존율 역시 낮은 것으로 알려졌다.

홍해삼 양식에서 제기되는 가장 큰 문제점으로는 불균형한 성장과 질병이 있다. 해삼의 경우 소화력이 약하기 때문에 소화흡수율이 낮아 동일한 시기에 치삼의 육성을 시작하여도 사료의 성분이나 소화력에 따라서 성장에 큰 차이가 나타나게 된다. 또한 부드러운 피부 때문에 육성 시 피부궤양과 입 부분 비대 등의 증상을 유발하는 유행성 질병에 특히 취약하며, 질병이 발생하는 경우 확산이 빠르고 폐사율이 높을 뿐 아니라 지속적으로 성장이 저해되는 현상이 일어나 양식어가에 큰 경제적 피해를 주게 된다(Xitao et

al., 2014)

최근에는 이러한 문제점을 해결하기 위하여 친환경적인 양식 방법으로 천연물질을 첨가하여 성장 및 면역을 증진시켜 안정적인 성장과 질병으로 인한 피해를 예방하기 위한 노력이 이루어지고 있다(Zhao et al., 2010; Ma et al., 2013; Wang et al., 2014)

프로바이오틱스(probiotics)는 유용 미생물을 의미하며 숙주에 일정량을 사용하였을 때 숙주의 건강에 도움을 주는 균을 말하는 것으로서(Gilliland et al., 2001), 주로 프로바이오틱스로 유산균과 *Lactobacillus* 속의 세균이 가장 많이 사용되고 있다. 프로바이오틱스는 소화 효소를 도와 소화력을 높여주는 역할을 하며(De schrijver and Ollevier, 2000; Ten Doeschate and Coyne, 2008; Yu et al., 2009; Zokaeifar et al., 2012), 장 내에서 비타민과 지방산 등을 생성하기도 한다(Sugita et al., 1992; Vine et al., 2006). 이에, 최근에는 소화력 증진과 면역증가를 위하여 해삼의 사료첨가제로 프로바이오틱스를 많이 사용하고 있으며, *Bacillus subtilis* T13 과 *Hanseniaspora opuntiae* C21 등의 프로바이오틱스의 섭취가 해삼의 성장과 면역을 증가시켜 준다고 보고되어 있다(Yancui et al., 2012; Yuexin et al., 2013).

한편, 최근에는 프로바이오틱스의 효능을 더욱 강화 시키기 위하여, 장내에서 프로바이오틱스의 성장 및 효과를 증진시킬 수 있는 프리바이오틱스(prebiotics)와 함께 사용되고 있는 추세이다. 프로바이오틱스인 *lactobacillus* 및 *bifidobacteria* 종을 프리바이오틱스로 많이 사용되는 레반성 제제인 이눌린(inulin)과 자연발생 프럭토올리고당(fructooligosaccharide)과 같은 성분을 함께 사용하였을 경우, 장내 유용세균의 수를 증가되고 대장 내의 pH가 낮아지는 효과가 보고 된 바 있다(Akin et al., 2007; El-Nagar et al., 2002; Gibson and Roberfroid, 1995; Oluwakemi, 2014). 이와 같이 프로바이오틱스와 프리바이오틱스의 영양성 증진 및 내재된 효과 증진을 위하여 함께 사용하는 것을 신바이오틱스(synbiotics)라 하며 최근 이를 활용한 연구가 활발히 진행되고 있다(Cross ML, 2002; Morelli et al., 2003).

따라서 본 연구에서는 최근에 면역증강물질로 많이 사용되고 있는 프로바이오틱스, 레

반 및 스피루리나를 혼합한 면역증강사료첨가제가 기존에 많이 사용되고 있는 해삼영양제와 비교하여 해삼의 성장과 면역에 미치는 영향을 확인하였으며 추가적인 실험을 통하여 환경스트레스 하에서 면역첨가제가 홍해삼의 생리학적 변화에 미치는 영향을 비교 분석하였다.

II. 면역증강사료첨가제 급이에 따른 홍해삼 치삼의 성장 및 면역 활성 변화

1. 서론

홍해삼은 중국, 일본 한국에서 경제적 가치가 높은 양식생물로서 고가로 판매되고 있으며 수출전략 품종으로서 상당한 가치를 가지고 있다(Yuan et al., 2006). 그러나 국내에서는 아직 청해삼 및 홍해삼의 양식기술이 아직 정착되지 않아 양식이 매우 제한적으로 이루어지고 있으며, 사료의 원료 및 양식 사료 역시 대부분이 중국에서 수입하여 이용하는 실정이다. 또한, 미세한 사료의 조성비율의 차이에도 해삼의 성장에 영향을 미치기 때문에, 해삼 전용 사료에 대한 연구가 진행되어야 한다(Choi, 2014).

해삼은 침전물 섭식 생물로서 주로 유기물, 박테리아, 원생동물 규조류 및 해조류 등을 섭이하는 것으로 알려졌다(Yang et al., 2005; Yuan et al., 2006). 따라서 해삼 사료에는 미세조류 및 해조류 분말이 해삼사료의 주요 사료원으로 사용되고 있다. 그 중 미세조류인 스피루리나는 홍해삼의 유용한 먹이성분으로써 타 미세조류에 비하여 단백질 함량이 높아 영양성분이 뛰어나기 때문에 해삼의 사료에 첨가제로서 많이 사용되고 있었으나, 최근에는 셀룰로오스(cellulose)성 세포벽으로 인하여 소화 시에 영양흡수가 어려워 해삼의 성장에 크게 도움을 주지 못하는 것으로 보고되고 있다(Xia et al., 2012; Shi et al., 2013). 또한 해삼 사료내에서 가장 많은 비중을 차지하는 해조류 분말 역시 조섬유 등이 다량으로 존재하기 때문에 해삼 체내로의 충분한 영양흡수가 어렵다고 알려졌다(Erasmus et al., 1997; Ten Doeschate and Coyne, 2008).

따라서 최근에는 해삼의 소화력을 증진시키기 위한 연구가 많이 진행되고 있으며, 현재 해삼의 소화력을 높이기 위해 사료에 펄이나 모래를 혼합하는 등의 시도가 이루어지고 있다 (Yuan et al., 2006; Liu et al., 2009; Ce shi et al 2013). 또한 분말사료의 입자 역시 소

화에 중요하여 입자를 분쇄하거나(Wang et al., 2014), 사료를 발효시키기도 하며 소화율 향상에 도움이 되는 기능성 물질을 혼합 하는 등(Choi, 2014) 해삼의 성장 증진을 위한 연구가 많이 진행되고 있다.

또한 최근에는 해삼 사료에 프로바이오틱스를 혼합하여 급이하면 소화력 증가와 더불어 성장과 면역에 도움을 주는 것으로 보고되어(Yancui et al., 2012; Yuexin et al., 2013), 해삼 양식장에서 해삼의 사료첨가제로서 프로바이오틱스를 많이 사용하고 있다. 프로바이오틱스 중에서도 *Bacillus polyfermenticus*는 *Bacillus*속의 그람양성균으로, 비스판(bispan)균으로 불리우고 있으며, 다른 유산균에 비하여 활성이 오래 지속되고, 소화력을 증진시켜주며 사람의 장관에서는 vitamin B1 및 B2을 생성하는 등의 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 장관기능 개선에 효과적인 것으로 보고되었다(Lee et al., 2001).

한편, 프리바이오틱스인 레반은 그 자체로서도 항산화, 항염증 항암 등의 효능이 있다고 알려져 있으며(Dahech et al., 2011), 어류 질병에 있어서 면역체계를 작용시키는 안전하고 효과적인 면역자극제로서 효능이 있는 것으로 보고되었다(Gupta et al., 2011; Rairakhwada et al., 2007). 최근의 연구에서 프리바이오틱스로 레반을 함유한 제제를 사용하였을 경우, 장내 유용세균의 수를 높이고 대장 내의 pH를 낮추는 효과가 있으며(Gibson and Roberfroid, 1995; El-Nagar et al., 2002; Akin et al., 2007; Adebola et al., 2014), 장내 기능을 개선하는데 도움을 주고 숙주의 장내 유용세균의 수를 증가시킬 뿐만 아니라 생육이나 활성을 촉진함으로써 숙주의 건강을 증진시킬 수 있다고 보고되고 있다(Kang et al., 2009; Srikanth et al., 2015). 그러나 국내에서는 아직 해삼의 사료첨가제로서 신바이오틱스를 사용한 연구는 전무한 실정이며 신바이오틱스에 관한 연구 역시 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 해삼의 성장을 높여주는 스피루리나, 그리고 프로바이오틱스로 *Bacillus polyfermenticus*, 프리바이오틱스로는 레반을 혼합하여 신바이오틱스 면역사료첨가제로 사용하고자 하였다. 또한, 양식어가에서 일반적으로 사용되고 있는 해삼용 영양제와 비교하고자 일반 해삼사료에 시판용 영양제 및 면역증강사료첨가제 배합사료를 혼합

하여 급이하였을 경우, 홍해삼 치삼의 성장률, 생존율 및 생리 활성을 각각 비교분석하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 실험동물 및 실험 환경

실험은 2014년 10월 27일부터 2015년 1월 27일까지 총 12주 간 제주도 내 홍해삼 양식장에서 진행되었으며, 양식장 내의 수조 3개를 이용하였다. 실험동물은 홍해삼 치삼(*A. japonicus*)을 이용하였으며, 홍해삼 치삼은 각 수조 당 182마리로 평균 무게는 2.4 ± 0.1 g 이었다. 양식장의 실험수조는 $1 \times 2.4 \times 0.3$ m³으로, 조도는 100 lux 이하였다. 각 실험수조에는 동일한 개수의 은신처를 설치하였으며, 실험환경 변화를 측정하기 위하여 실험이 진행되는 동안 4주에 한 번씩 수질측정기(YSI, YSI Incorporated, USA)를 이용하여 수온, 염분, 용존산소(dissolved oxygen, DO) 및 pH 변화를 측정하였다(Tab. 1).

Table 1. Water environment of experiment tank for 12 weeks

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

2-2. 사료제작 및 급이

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

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

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

2-3. 성장도 평가

홍해삼 치삼 성장도 분석은 사육수조로부터 개체를 전량 회수한 후 계측하였으며, 실험 시작일로부터 4주 마다 반복 측정되었다. 12주의 실험 종료 후 증체율 일간 성장률 및 생존율을 계산하였다. 일간 성장률은 $\text{specific growth rate (\%)} = (\log_e \text{final wt} - \log_e \text{initial wt}) / \text{days}$ 와 같이 계산되었으며, 증체율은 $\text{weight gain (\%)} = (\text{final weight} - \text{initial weight}) \times 100 / \text{initial weight}$ 으로 계산되었다.

2-4. 생존율 평가

홍해삼 치삼 성장도 분석은 사육수조로부터 개체를 전량 회수한 후 계측하였으며, 실험 시작일로부터 4주 마다 반복 측정되었다. 12주의 실험 종료 후 증체율 및 일간 생존율을 계산하였다.

2-5. 홍해삼 내 단당류 분석

다당성 물질인 레반 성이 후 홍해삼 치삼의 체내 단당류 함량변화를 파악하기 위하여 체조직의 단당류 분석을 실시하였다. 홍해삼 치삼을 -70°C 에서 3일 이상 동결한 후 냉동건조기를 사용하여 72시간 동안 동결건조 하였다. 건조된 홍해삼 치삼은 분쇄하고 밀봉하여 분석 전까지 4°C 에서 냉장보관 하였다. 체내의 단당류 분석은 홍해삼 치삼 건조분말을 2 M trifluoroacetic acid로 산가수분해하고 여과($0.2\ \mu\text{m}$) 및 희석하여 전처리 한 후 HPAEC-PAD system (Dionex, USA)을 이용하여 중성단당류 분리·동정을 실행하였다. 실험 조건은 이동상으로 18 mM NaOH을 사용하였으며, 칼럼은 CarboPac™PA1을 사용하였다.

2-6. 홍해삼 체벽 구조의 조직학적 분석

조직학적 분석은 홍해삼 치삼의 체벽 구조의 변화를 육안으로 확인하기 위하여 실시되었다. 홍해삼 치삼의 체벽을 절개하여 Boulin's solution에 24시간 고정한 후 24시간 수세하였다. 수세된 조직은 탈수과정을 거쳐 파라핀에 포매하여 블록을 제작하였다. 제작된 블록은 마이크로톰(Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Germany)으로 $5\ \mu\text{m}$ 로 박절하여 hematoxylin-eosin (H&E)염색하여 현미경으로 관찰하였다.

2-7. 면역생리학적 분석

면역 활성 분석을 위하여 각 실험군의 홍해삼 치삼은 실험사료 급이 후 10마리씩을 무작위로 선별하여 실험에 사용하였다. 체강액은 주사기를 이용하여 채취하여 1.5 mL tube에 넣고 원심분리기를 이용하여 700 g에서 15분 간 원심분리 후 상층액을 분리하였으며 채취 후 -70°C 에서 동결하고 실험 전까지 보관하였다.

2-7-1. 단백질량 변화

홍해삼 치삼의 체강액 내 단백질 함량은 Lowry et al. (1952)의 방법에 따라 측정되었으며, bovin serum albumin (BSA, Sigma aldrich, St. Louis)을 사용하여 표준 검량선을 그린 후 750 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

2-7-2. Lysozyme activity 변화 분석

Lysozyme 활성은 체강액을 15 μL 씩 96 well plate에 분주한 후, 150 μL *Micrococcus lysodeikticus* solution (0.2 mg/mL, 0.1M PBS, pH=6.8)을 넣고 25°C 에서 5분간 반응 후 450 nm에서 흡광도를 측정 하고, 다시 5분 간 반응 시킨 뒤 동일한 파장에서 측정하여 전후의 흡광도 차를 비교하여 측정하였다.

2-7-3. Penoloxydase activity 변화 분석

Penoloxydase (PO) 활성은 Ashida and Dohke (1980)의 방법을 응용하여 측정하였다. 96 well plate에 체강액 15 μL 와 phosphate buffer (pH 6.0) 150 μL 를 넣은 후 25°C 에서 10분 동안 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하고 5분 후에 동일한 파장에서 재 측정한 후 전후 값을 비교하여 사용하였다. 각 효소의 활성 단위는 흡광도의 차이를 환산하여 효소의 양을 정량하였다.

2-8. 통계처리

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

3. 결론

3-1. 성장도 평가

본 연구에서는 프로바이오틱스와 레반의 혼합 급이가 홍해삼 치삼의 성장과 생존증진에 도움을 주는지 확인하기 위하여 신바이오틱스 면역증강사료첨가제를 제작하여 급이 후 4주 간격으로 12주 간 생존율과 성장률을 측정하였다

성장률 조사에서는 각 실험군의 초기무게는 2.4 ± 0.1 g로 유사하였으나, 최종무게는 CD군 4.6 ± 0.5 g 및 ND군 5.3 ± 0.62 g이었으며, ID군의 경우 6.1 ± 0.53 g으로 유의적으로 높게 성장하였다(Fig. 1, $P < 0.05$).

증체율은 실험시작 시에는 모든 실험군이 유사하게 2.4 ± 0.1 g 이었으나 CD군의 경우 12주 후 $91.67 \pm 17.2\%$, ND군의 경우 $118.75 \pm 35.2\%$ 및 ID군은 $155.6 \pm 31.7\%$ 으로 증가하였다(Tab. 3, $P < 0.05$). 일간 성장률 역시 CD군은 $0.21 \pm 0.03\%$, ND군은 $0.27 \pm 0.08\%$ 그리고 ID군은 $0.34 \pm 0.05\%$ 로 ID군이 성장률, 증체율 및 일간성장률에서 모두 유의적으로 높은 성장을 나타내었다(Tab. 3, $P < 0.05$).

Table 3. Growth performance of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) after 12 weeks .

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

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

²Specific growth rate (%) = $(\log_e \text{ final wt} - \log_e \text{ initial wt})/\text{days}$.

³Weight gain (%) = $(\text{final weight} - \text{initial weight}) * 100 / \text{initial weight}$.

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

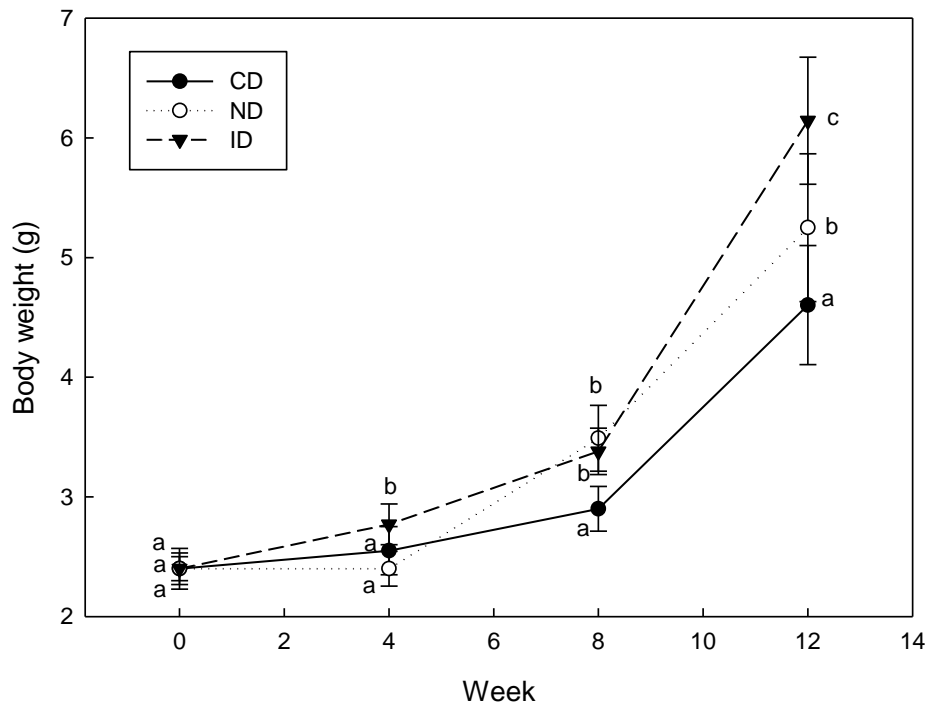


Figure 1. Body weight of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) experimental diet fed after 12 weeks. Experimental groups: common diet (CD), nutrition diet (ND) and immunity diet (ID).

3-2. 생존율 평가

본 연구에서는 프로바이오틱스와 레반의 혼합 급이가 홍해삼 치삼의 성장과 생존증진에 도움을 주는지 확인하기 위하여 신바이오틱스 면역증강사료첨가제를 제작하여 급이 후 4주 간격으로 12주 간 생존율과 성장률을 측정하였다. 생존율 실험 결과 CD군은 73.1%, ND군은 70.9% 및 ID군은 76.9%가 생존하였으며 ID군에서 가장 높은 생존율을 나타내었다(Fig. 2, $P < 0.05$).

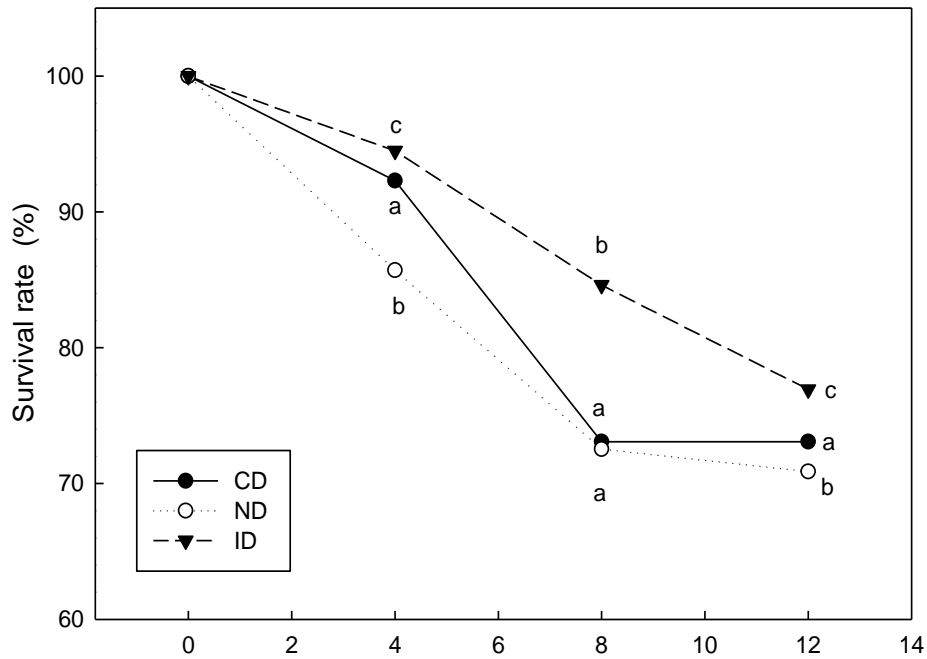


Figure 2. Survival rate of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) experimental diet fed after 12 weeks. Experimental groups: common diet (CD), nutrition diet (ND) and immunity diet (ID).

3-3. 체내 단당류 분석

홍해삼에는 다당류가 많이 함유되어 있는 것으로 알려졌으며(Mourão et al., 1996; Yu et al., 2015), 실험에 사용된 레반이 체내 단당류성분에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 홍해삼 치삼을 동결 건조하여 체벽 내에 존재하는 fructose와 glucose의 함량을 분석하였다. Fructose 분석결과 CD군은 8.84 ± 1.35 mg/100 mL, ND군은 8.06 ± 2.07 mg/100 mL 및 ID군은 9.25 ± 3.14 mg/100 mL로 측정되었다(Fig. 3A). Glucose 분석결과 CD군은 9.20 ± 2.0 mg/100 mL, ND군은 8.21 ± 0.95 mg/100 mL 및 ID군은 10.04 ± 1.85 mg/100 mL로 나타났다(Fig. 3B).

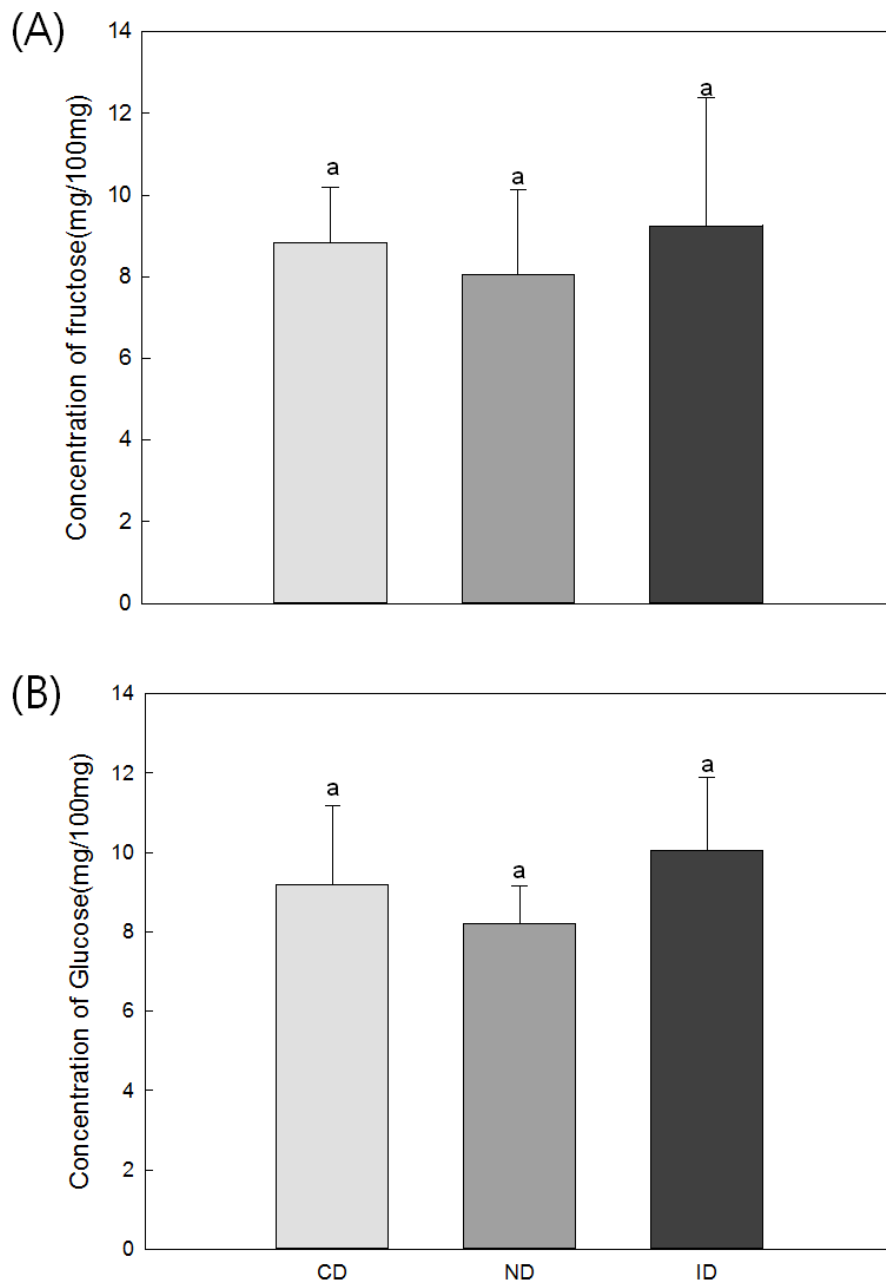


Figure 3. Concentration of (A) fructose and (B) glucose in the body wall of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Experimental groups: common diet (CD), nutrition diet (ND) and immunity diet (ID).

3-4. 홍해삼 체벽 구조의 조직학적 분석

실험에 사용된 면역첨가제에 함유된 레반이 홍해삼 치삼의 체벽 구성에 직접적인 영향을 미치는지 확인하기 위하여 조직학적 방법으로 염색하여 확인하였으나, 각 그룹간의 차이는 나타나지 않았다(Fig.4).

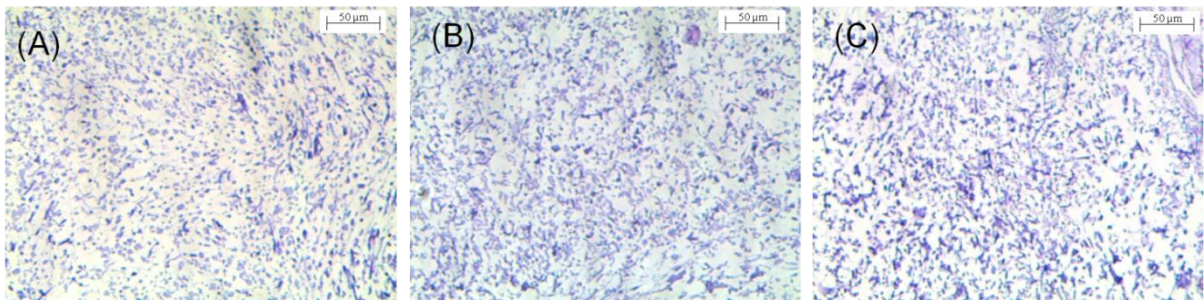


Figure 4. Histological analysis in the body wall of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Experimental groups: (A) common diet (CD), (B) nutrition diet (ND) and (C) immunity diet (ID).

3-5. 사료 섭이에 따른 면역생리학적 분석

3-5-1. 단백질량 변화

레반을 섭이한 홍해삼 치삼의 면역 활성을 확인하기 위하여 체강액 내 단백질 함량, lysozyme 및 PO 활성을 측정하였다. 체강액 내의 단백질 측정결과 CD군은 56.0 ± 10 mg/mL, ND군은 66.1 ± 24 mg/mL 및 ID군은 66.5 ± 19 mg/mL로 나타났으며(Fig. 5), CD군에 비하여 ND군과 ID군에서 높아지는 경향성을 보였으나 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다(Fig. 5, $P>0.05$).

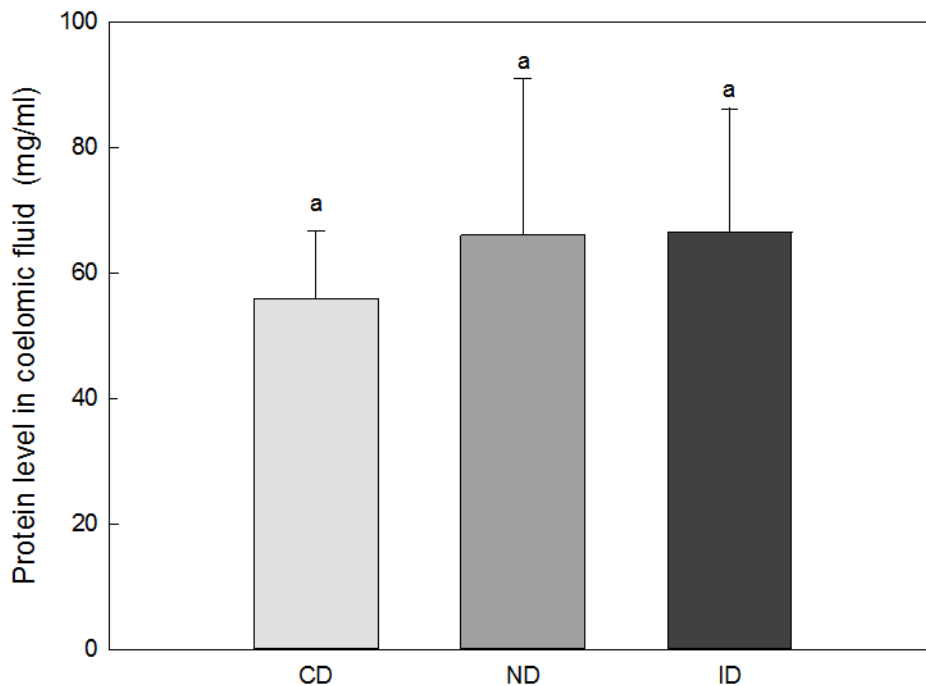


Figure 5. Protein level in coelomic fluid of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Experimental groups: common diet (CD), nutrition diet (ND) and immunity diet (ID).

3-5-2. Lysozyme activity 변화 분석

홍해삼 치삼 체강액 내의 lysozyme 활성 실험 결과 CD군은 29.54 ± 9.2 U/mg, ND군은 49.52 ± 7.2 U/mg, ID군은 14.09 ± 3.2 U/mg으로 ID군에서 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다(Fig.6, $P < 0.05$).

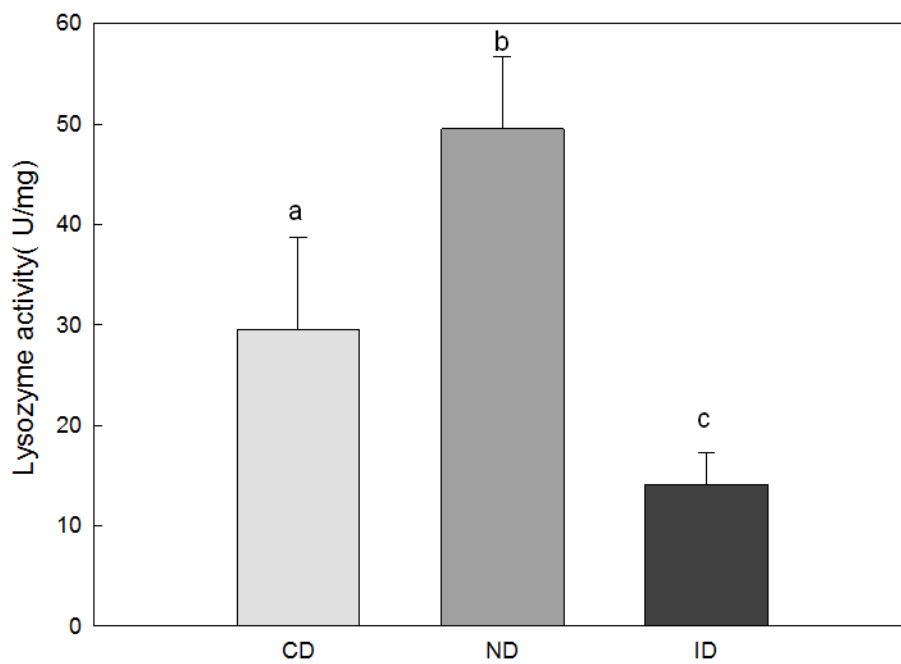


Figure 6. Lysozyme activity in coelomic fluid of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Experimental groups: common diet (CD), nutrition diet (ND) and immunity diet (ID).

3-5-3. Penoloxydase (PO) activity 변화 분석

PO 활성을 측정한 결과, CD군에서 14.7 ± 6.5 U/mg, ND군은 17.2 ± 8.0 U/mg 및 ID군은 16.2 ± 3.8 U/mg로 CD군에 비하여 ND군과 ID군에서 약간의 차이는 나타났으나 유의적인 차이는 없었다(Fig. 7, $P > 0.05$).

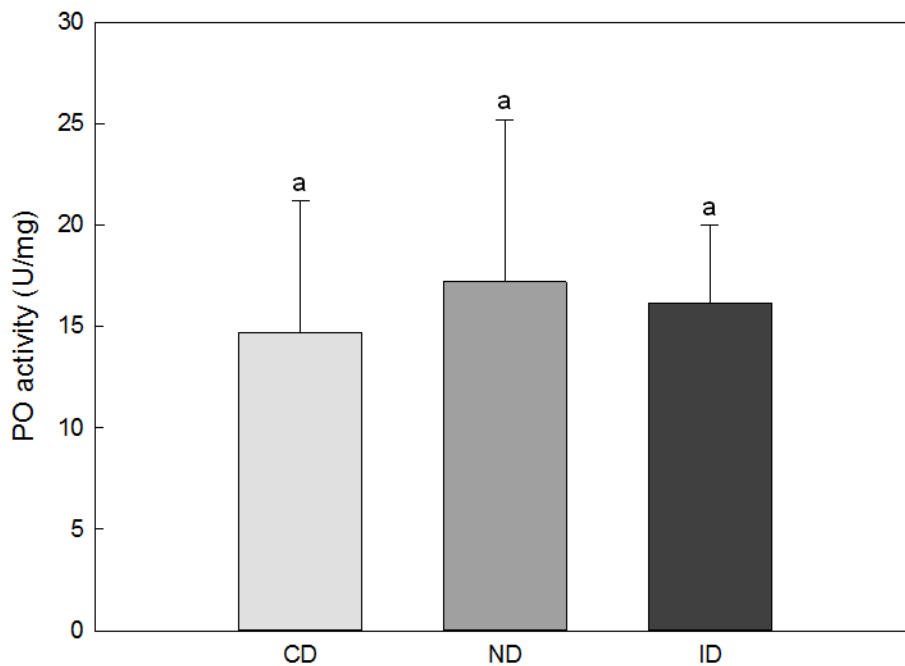


Figure 7. Penoloxydase activity in coelomic fluid of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Experimental groups: common diet (CD), nutrition diet (ND) and immunity diet (ID).

4. 고찰

본 연구에서는 양식어가에서 일반적으로 사용되고 있는 일반 해삼사료(common diet, CD)에 해삼용 영양제 (nutrition diet, ND) 배합사료 및 면역증강사료첨가제 배합사료 (immunity diet, ID)를 12주간 홍해삼 치삼 에게 급이한 후 성장률, 생존율 및 생리 활성을 각각 비교분석 하였다. 해삼은 소화율이 낮은 것으로 알려졌으며 해삼사료의 주 원료로 사용되는 미세조류 및 해조류는 해삼이 소화하기 어려워 해삼이 고루 성장하지 못하는 문제점이 있는 것으로 보고되었다(Xia et al., 2012; Shi et al., 2013). 해삼과 같이 주로 해조류를 섭취하는 전복(*Haliotis midae*)에게 프로바이오틱스를 사용 하였을 경우 해조류의 소화를 도와 성장을 증진시키는 것으로 알려졌는데, 이것은 프로바이오틱스가 해조류의 복잡한 다당류 성분을 빠르게 흡수가능 한 작은 단위로 가수분해 해주는 역할을 하기 때문으로 보고되었다(Erasmus et al., 1997; Ten Doeschate and Coyne, 2008; A. Newaj-Fyzul, 2014). 그뿐만 아니라, 신바이오틱스를 양식 대상의 먹이에 혼합하여 급이한 경우 프로바이오틱스 단일 제제만을 사용한 실험군에 비하여 성장과 소화력을 더욱 높여주는 결과가 보고되었다(Gibson and Roberfroid, 1995;Kontula et al., 1999; Saarela et al., 2003; Gu et al., 2011; Boonanuntanasarn et al., 2015).

이와 마찬가지로, 본 연구에서도 신바이오틱스를 사용한 ID군에서 성장률 및 생존율이 모두 높게 관찰되었으며, 이는 레반이 프로바이오틱스의 활성을 증진시키는 것을 돕고 이를 통하여 스피루리나와 해조류 분말과 같은 섬유성 물질의 장내 소화와 흡수에 기인했기 때문이라고 여겨진다. 홍해삼 치삼에게 신바이오틱스 면역증강사료첨가제를 첨가하여 급이하게 되면 생존율과 성장률을 높여줄 것으로 판단된다.

또한 각 실험군 별로 측정 된 홍해삼 치삼의 체벽 내 fructose와 glucose의 함량은 유의적인 차이는 나타내지 않았지만, ID군에서 다소 높은 함량 차이를 나타내었다. 이러한 결과는 홍해삼 치삼 체벽 내의 fructose와 glucose의 함량이 기본적으로 높기 때문에 모든

실험군의 fructose와 glucose의 체내 함량이 크게 차이를 나타내지 않은 것으로 보이며, 치삼의 초기 양성 시 같은 그룹 내에서도 개체 간의 편차가 크기 때문에 각 그룹 간 유의한 차이가 나타나지 않은 것으로 판단 된다($P>0.05$). 일반적으로 레반을 섭취하였을 경우 혈장 내의 레반 함량이 올라 감으로서 fructose 및 glucose 함량이 증가하는 것으로 알려져 있으나(Rairakhwada et al., 2007; Rehm, 2009), 본 연구결과에서 ID군에서 다소 높은 fructose 및 glucose 함량을 나타낸 것은 장내에서 체벽으로 흡수되는 양이 미미하여도 체내 성분에 영향을 미친 것으로 추정된다. 이러한 레반의 급이와 홍해삼 치삼 체내의 당당류 변화에 대한 상관관계는 성장의 편차가 적어지는 시기인 중간양성시기의 홍해삼을 대상으로 추가적인 실험이 진행되면 보다 명확하게 밝혀질 것으로 기대된다.

한편, 해삼과 같은 극피동물의 체강액은 체강소체(coelomocytes) 및 그 외의 효소가 혼합된 액체로 이루어져 있으며, 초기 면역 활성을 수행하는 것으로 알려져 있다(Glinski and Jarosz., 2000; Ramírez-Gómez et al., 2010). 해삼의 체강액 내 단백질에는 다양한 면역 요소들이 존재하며, 혈구를 제외한 체강액에서 보체 C3, antimicrobial peptides, toll-like receptors, lectin, PO 및 lysozyme 활성 등의 면역을 유발하는 효소들이 확인되었다(Jiang et al., 2014; Xue et al., 2015). 이와 같은 연구들로부터 체강액 내 단백질 증가는 비특이적 면역반응과 연관이 있을 것으로 추정되나, 본 연구결과, 각 그룹 간의 단백질 변화에는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 그러나, 각 실험군의 체강액 내 단백질 함량이 유의적으로 증가하지는 않았지만($P>0.05$), ND군과 ID군에서 다소의 높은 수치를 나타낸 것은 이러한 비특이적 면역 활성화와 관계 및 생존율과 연관이 있을 것으로 여겨진다.

Lysozyme은 점액 및 눈물 등에 포함된 선천면역 효소 중 하나로서 병원성 미생물에 대항하기 위한 초기 면역요소이며 무척추동물의 비특이적 면역시스템에서 중요한 역할을 수행한다(Saurabh and Sahoo, 2008; Nayak, 2010). 해삼은 수온이나 염분 스트레스가 있을 경우에 lysozyme 활성이 증가되며(Wang et al., 2008), 면역증강사료첨가제에 첨가된 레반을 섭취하였을 경우 체강액 내 lysozyme 활성 및 기타 비특이적 면역이 증가되는 것으로 보

고 되었다(Rairakhwada et al., 2007; Dahech et al., 2011; Xue et al., 2015). 그러나 본 연구에서는 면역증강사료첨가제 배합사료를 급이한 ID군이 가장 좋은 성장률과 생존율을 나타냈음에도 불구하고, 12주 후 측정된 lysozyme 활성은 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다 ($P<0.05$). 이러한 결과는 기존에 보고된 연구와 동일한 결과로써, 이전의 연구에서는 면역증강사료첨가제에 의한 lysozyme 활성이 초기에 증가하였다가 지속적인 면역 자극이 오지 않는 경우에는 시간이 지날수록 체내에서 안정화 되는 현상을 나타내는 것으로 추정하고 있다. Ma et al. (2013)의 연구에서 역시 본 연구 결과와 유사하게 실험 시 사용한 프로바이오틱스의 농도에 따라 lysozyme 활성이 농도의존적으로 변화하지만, 지속적인 면역 활성을 측정한 결과 어느 정도 시간이 지난 후에는 오히려 초기보다 활성이 낮아지는 결과를 나타내었다. 또한, Wang et al.(2014)의 연구에서도 면역증강물질을 해삼에게 급이 했을 경우에 lysozyme 활성이 증가되는 것으로 나타났으나, 지속적인 lysozyme 활성의 증가는 어렵다고 하였으며, 이는 체강액 내의 렉틴과 같은 비세포성 면역 활성 시스템의 증가와 관련이 있는 것으로 나타났다. 따라서 본 실험에서 ID군에서 장기간의 사육에 따라 lysozyme 활성이 낮은 수치를 나타낸 결과와 ID군에서 높은 생존율과 성장률을 보인 결과를 종합하여 보면, ID군의 낮은 수치의 lysozyme 활성은 홍해삼 치삼의 사육 안정화에 따른 결과로 보인다. 따라서 추후 외부스트레스 자극에 의한 lysozyme 활성변화 등의 연구를 통하여 경시적인 변화를 분석하게 되면 보다 정확한 상관관계를 파악할 수 있을 것으로 기대된다.

PO 활성은 해삼의 면역 활성에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있으며 lysozyme 활성과 마찬가지로 주로 체강액 내에서 발견된다(Jiang et al., 2014). Magnadóttir et al. (2006)에 의하면 일반적으로 PO 활성과 같은 혈장 내의 anti-protease 활성은 α_1 -antiprotease, α_2 -antiprotease 및 α_2 -macroglobulin에 의하여 활성화 되지만, 이러한 효소들은 일반적으로 세균이 침입 하였을 때만 응답하는 효소들로서 PO 활성을 위한 전구효소의 활성은 개체의 감염이나 면역자극에 의해서만 활성화된다고 보고하였다(Magnadóttir et al.,

2006). 따라서 본 실험에서는 면역자극을 유발하는 요인이 적어 PO 활성이 실험군 간 유사한 수치를 나타낸 것으로 판단된다.

실험결과를 요약해보면 생존율과 성장률이 증가한 것은 면역증강사료첨가제에 포함된 프리바이오틱스인 레반이 프로바이오틱스의 활성을 증가시켰고, 이를 통해 소화율이 증가됨으로서 스피루리나 및 해조류 분말의 장내 소화와 흡수에 기인하였기 때문으로 판단된다. 또한 면역활성에서는 단백질 함량 및 PO함량에는 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, lysozyme 활성의 경우 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다. 이와 같이 ID군이 가장 좋은 성장률과 생존율을 나타냈음에도 불구하고 lysozyme 활성 외의 면역활성에서 큰 변화가 나타나지 않은 것은 시간이 지남에 따라 면역이 안정화되는 현상을 나타내었기 때문으로 추정된다.

III. 면역증강사료첨가제를 급이한 홍해삼 치삼의 고수온 및 저염분 환경에 대한 생리학적 저항력의 변화

1. 서론

해양 환경의 변화는 해양 생물의 생육에 있어 매우 중요한 요소이다(Dong et al., 2008). 그 중에서도 수온 또는 염분의 변화는 해양 생물의 생리구조 또는 변화에 영향을 미치는 주요 요인으로, 그 외의 요소와 복합적으로 작용하여 생물에게 영향을 미치게 된다(Kinne, 1963).

최근 지구 온난화에 따라서 점차 해수온이 증가하고 있으며, 장마나 댐의 방류 등으로 인해서 연안지역에 저염분 현상이 많이 일어나 연근해에 서식하는 해양생물들에게 많은 영향을 미치고 있다. 특히, 연안 지역은 여름에는 수온이 20 ~ 30℃로 증가하고 장마 시기에는 염분이 20 ‰ 이하로 떨어지는 등 수온 및 염분의 환경변화가 더욱 크게 일어나는 것으로 알려졌다(Dong et al., 2008). 국내에서도 매년 연안지역에 해삼 종묘를 방류하고 있고, 연안 지역에 주로 분포하는 양식장 또한 대부분이 유수식으로 인근해역에서 해수를 끌어와 사용하기 때문에 이러한 고수온 및 저염분의 환경변화로 인하여 많은 영향을 받게 된다(Kim et al., 2011)

일반적으로 해삼의 성장은 주로 10 ~ 20℃ 사이에서 이루어지며 16 ~ 18℃가 가장 적정 수온으로 알려지고 있고(Dong et al., 2006), 해수의 온도가 20℃ 이상이 되면 해삼이 서식하기에는 고수온으로 분류되어지며, 26℃ 이상이 되면 해삼이 하면(aestivation)을 하는 등 생태에 큰 영향을 받는 것으로 보고되었다(Ji et al., 2008). 또한 해삼의 최적 염도는 29 ~ 32 ‰으로 알려졌으나(Tian et al., 2015) 개방형 혈관계를 가지고 있으며 삼투 조절기관이 없기 때문에 삼투 조절능력이 낮아 주변 염도 변화가 체강액 내 삼투압 변화를 가져오는

것으로 보고되었다(Fankboner, 2002; Ruppert and Barnes, 1994; Dong et al., 2006). 특히, 해삼이나 전복과 같이 움직임이 적고 일정지역에서 고착하여 생활하는 생물의 경우에는 환경변화에 더욱 민감하게 반응하기 때문에(Kim et al., 2006; Park et al., 2013), 급격한 고수온 또는 저염분의 환경변화는 해삼의 주된 환경스트레스의 원인으로 작용하여 해삼의 성장과 생리활성 변화에 영향을 미치게 된다(Yang et al., 2005; Dong et al., 2008; Tian et al., 2015).

이에, 본 연구에서는 면역을 증진시켜주는 것으로 알려진 신바이오틱스 면역사료첨가제사료를 홍해삼 치삼에게 급이하고, 고수온 또는 저염분 환경과 같은 급격한 환경변화에 대한 저항력을 생리학적인 연구방법을 통해 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 실험동물 및 실험환경

실험동물은 II 절의 실험과 동일하게 12주간 일반사료인 CD군과 면역사료첨가제가 혼합된 ID 사료를 섭취한 홍해삼 치삼 중 유사한 크기($4.66 \text{ g} \pm 0.25$)로 사용하였다. 환경조건은 일반 환경($17^\circ\text{C}/34\%$), 고수온 환경($30^\circ\text{C}/34\%$) 및 저염분 환경($17^\circ\text{C}/25\%$)으로 나누었다. 각 환경스트레스를 주기 위해 실험을 진행하는 동안 고수온군은 30°C , 저염분 군은 25% 를 유지하였으며, 각 환경에 대한 설정은 선행연구를 참고하여 50% 폐사율을 나타내는 환경스트레스로 적용하였다(Dong et al., 2008).

실험군은 일반환경에서의 일반사료실험군(CD) 및 면역첨가제사료실험군(ID) 그리고 고수온 환경에서의 일반사료실험군 (CD+H) 및 면역첨가제사료실험군(ID+H), 저염분 환경에서의 일반사료실험군 (CD+S) 및 면역첨가제사료실험군(ID+S)으로 나누어 각각 설정하였다. 홍해삼 치삼은 각 환경 실험군 당 25마리씩 사용하였으며 검체 채취는 실험을 시작한 시간을 0시간으로 설정하여 각각 0, 1, 3, 6, 12 및 24시간에 실시되었으며 시간당 각 실험군당 5마리씩 채취 하였다.

2-2. 환경스트레스에 따른 내장배출 개체수 측정

해삼은 스트레스를 받으면 내장을 배출하는 것으로 알려져 있다(Tian et al., 2015). 고수온 또는 저염분 환경에서 받는 스트레스 차이를 확인하고자, 각 실험군에서 시간에 따른 내장 배출 개수를 세어 스트레스 지표로 삼아 누적치로 나타냄으로서 스트레스 지표를 측정하였다

2-3. 환경스트레스에 따른 면역생리학적 분석

환경스트레스에 따른 면역 활성 분석은 II 절의 2-7절과 동일하게 진행되었다. 분석을 위하여 각 실험군의 홍해삼 치삼을 10마리씩 무작위로 선별하여 실험에 사용하였다. 체강액은 주사기를 이용하여 채취하였으며 원심분리기를 이용하여 700 g에서 15분 간 원심 분리 후 상층액을 분리하여 사용하였다.

2-3-1. 단백질량 변화

II 절의 2-7-1절과 동일하게 Lowry et al. (1952)의 방법에 체강액 내 단백질을 측정하였다.

2-3-2. Lysozyme activity 변화 분석

Lysozyme 활성을 II 절의 2-7-2절과 동일하게 체강액을 사용하여 측정하였다.

2-3-3. Penoloxydase (PO) activity 변화 분석

Penoloxydase (PO) 활성 역시 II 절의 2-7-2절과 동일하게 Ashida and Dohke (1980)의 응용방법을 사용하여 측정하였다.

2-4. Lysozyme mRNA 발현량 분석

홍해삼 치삼의 체벽 내 lysozyme mRNA 발현량 분석을 위하여 CD군과 ID군의 일반환경, 고수온 및 저염분 환경에서의 1시간과 24시간 실험개체의 체벽을 채취하여 quantitative real-time PCR을 실시하였다.

Total RNA는 홍해삼 치삼의 체벽 20 mg을 1 mL trizol과 함께 MagNA lyser Instrument (Roche, Germany) 분쇄기에서 20초간 분쇄한 후 Trizol 법을 사용하여 추출하였다. cDNA 합성은 추출된 total RNA와 Transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche, USA) 를 사용하여 합성 하고, 총 20 μ L 반응액에 80 μ L nuclease-free water를 첨가하여 희석하여 사용하였다.

그 후 홍해삼 치삼의 β -actin mRNA (GenBank: EU668024.1)와 lysozyme mRNA (GenBank: EF036468.2)에 특이적인 oligonucleotide primer (Tab. 4)를 제작하고 합성한 홍해삼 치삼 체벽의 cDNA를 사용하여 quantitative real-time PCR을 실시하였다. SYBR (eva green qPCR master mix, abm, Canada)과 실시간 유전자 분석기(CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Bio red)를 사용하여 각 실험군의 1시간과 24시간의 lysozyme 유전자 발현량을 비교 분석 하였다.

Table 4. Primer sequences for real-time RT-PCR analysis.

mRNA name	Primer Sequences (5'-3')	Product size
β -actin mRNA	5'- tcaaccctaaagccaacagg-3'	150 bp
	3'- acacaccgtctcctgagtc-5'	
Lysozyme mRNA	5'-gctactggcaggatgctagg-3'	151 bp
	3'-taaccctgtacagcccgttc-5'	

2-5. 통계처리

결과의 통계처리는 SPSS version 12(SPSS Inc., USA)를 활용하여 One-way ANOVA- test와 Two-way ANOVA-test로 통계 분석되었으며, 데이터 값의 평균 유의차는 Student-Newman-Keuls test 사후분석을 통해 $P<0.05$ 에서 각 그룹 간 유의성을 판단하였다.

3. 결론

3-1. 환경스트레스에 따른 내장배출 개체수 측정

홍해삼 치삼이 스트레스 환경에 노출되었을 시 배출하는 내장을 스트레스 지표로서 계측한 결과, 일반환경과 저염분 환경에서는 내장을 배출하는 개체가 나타나지 않았다 (data not shown).

그러나 고수온 환경에서는 3시간째부터 내장을 배출하는 개체가 나타났으며, 최종 누적치는 CD+H군이 10개체, ID+H군이 8개체로 고수온 환경에서 ID+H군이 더 적은 스트레스를 받는 것으로 판단된다(Fig.8).

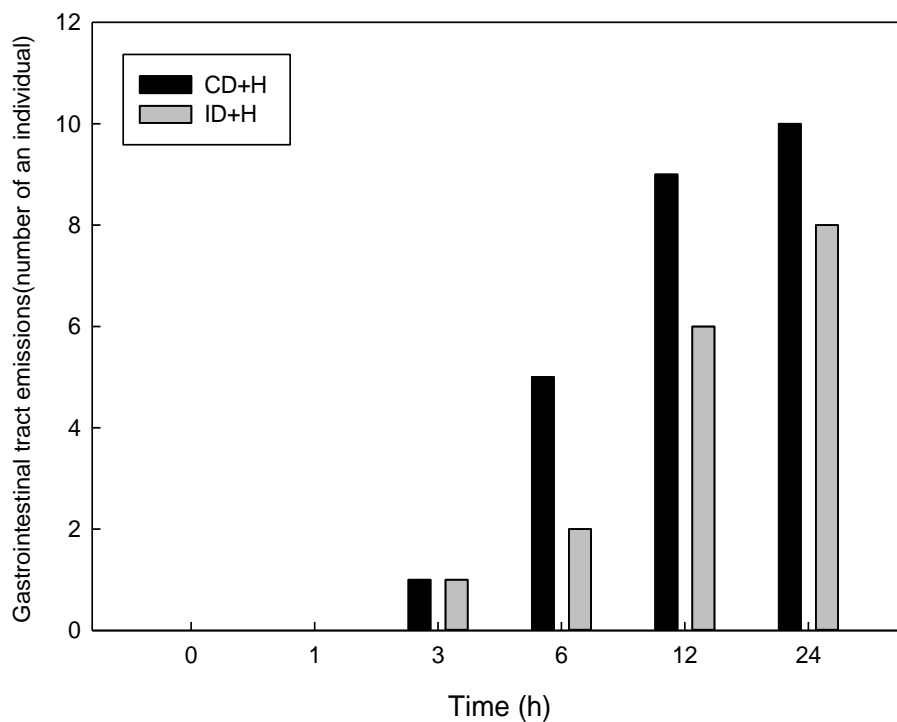


Figure 8. The number of individual gastrointestinal tract emissions in the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) on high temperature. Experimental groups: common diet + high temperature (CD+H), immunity diet + high temperature (ID+H).

3-2. 환경스트레스에 따른 면역생리학적 분석

3-2-1. 단백질량 변화

고수온 또는 저염분 환경 하에서의 CD군과 ID군의 홍해삼 치삼의 체강액 내 단백질을 측정된 결과 0시간에는 CD군과 ID군이 유사한 수치를 나타내었고, 일반환경에서는 모든 시간대에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Fig.9).

고수온 환경에서는 일반 사료를 섭취한 CD+H군은 0시간보다 단백질이 감소하였고 1시간부터 점차 증가하는 경향을 나타냈으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 또한 12시간 및 24시간에는 대부분의 개체가 폐사하거나 피부가 괴사되어 체강액 내 단백질량을 측정할 수 없었다. 면역증강사료 첨가제를 혼합한 사료를 섭취한 ID+H군 역시 1시간에 0시간보다 감소하였으며 시간에 따라 점차 증가하는 경향을 나타내었지만 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 24시간에는 대부분의 개체가 폐사하였으며 생존개체 역시 피부가 괴사되어 데이터를 얻을 수 없었다(Fig. 9A). 저염분 환경에서의 체강액 내 단백질은 모든 실험군에서 편차는 존재했지만 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다(Fig. 9B).

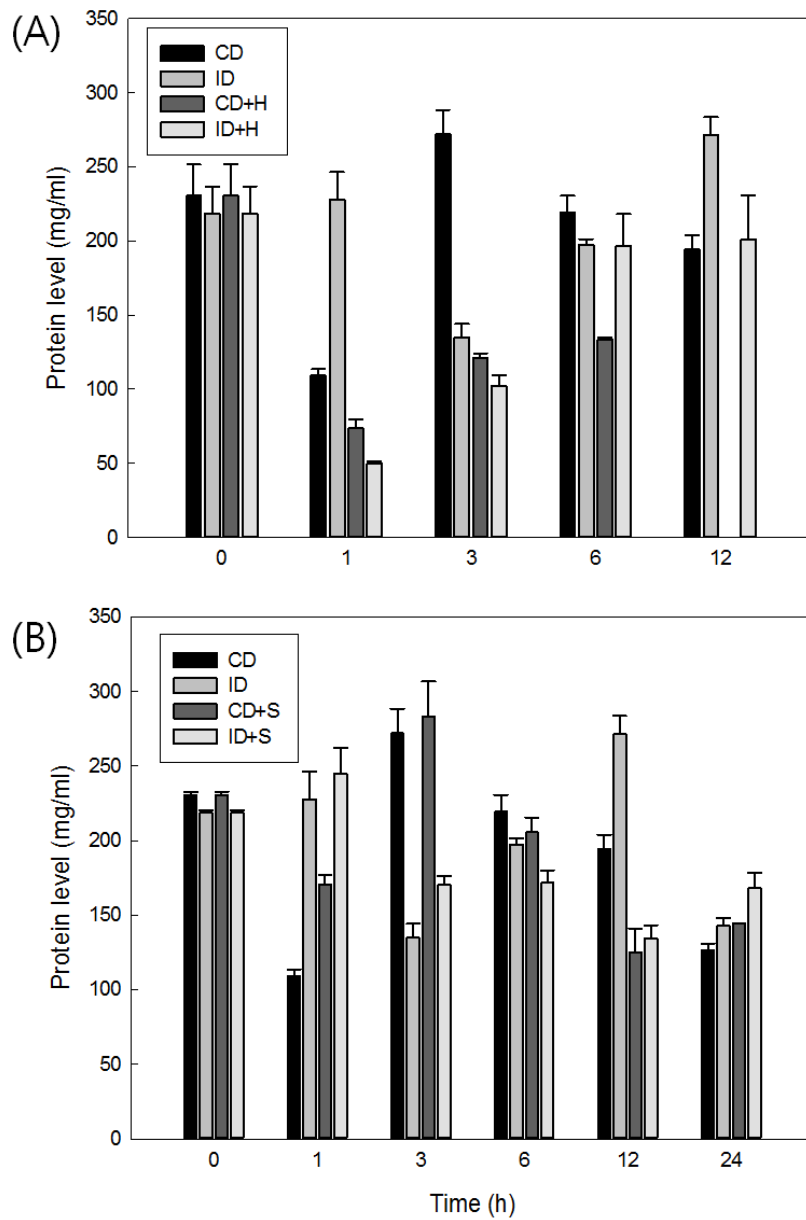


Figure 9. Protein level in coelomic fluid of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) exposure to (A) high temperature and (B) low salinity for 0, 1, 3, 6, 12 and 24 hour. Experimental groups: common diet (CD), immunity diet (ID), common diet + high temperature (CD+H), immunity diet + high temperature (ID+H) common diet + low salinity (CD+S) and immunity diet + low salinity (ID+S).

3-2-2. Lysozyme activity 변화 분석

고수온 또는 저염분 환경 하에서의 체강액 내 lysozyme 변화를 살펴보기 위하여 각 실험군의 lysozyme 활성을 측정된 결과, 0시간에서는 CD군과 ID군이 유사하게 나타났다. 일반환경하에서 CD군은 1시간 27.4 ± 1.1 U/mg, 3시간 38.5 ± 3.5 U/mg, 6시간 11.5 ± 0.3 U/mg, 12시간 5.9 ± 0.1 U/mg 및 24시간 51.5 ± 0.1 U/mg.으로 시간에 따라 점차 감소하는 것으로 나타났으며, ID군 역시 1시간 23.3 ± 1.9 U/mg, 3시간 24.4 ± 2.1 U/mg, 6시간 11.9 ± 0.2 U/mg, 12시간 14.0 ± 1.2 U/mg 및 24시간 16.9 ± 4.5 U/mg.으로 시간에 따라 유의적으로 감소하였다(Fig.10, $P < 0.05$).

고수온 환경에서는 일반환경과 비교하여 모든 실험군에서 시간에 따라 유의적으로 lysozyme 활성이 낮아지는 것이 확인되었다($P < 0.05$). CD+H 실험군은 1시간 3.06 ± 1.4 U/mg, 3시간 27.4 ± 1.1 U/mg 및 6시간 4.2 ± 0.1 U/mg으로 시간 지남에 따라 lysozyme 활성이 급격하게 감소하였고 12시간 및 24시간은 대부분의 개체가 폐사하거나 피부 괴사되어 데이터를 측정할 수 없었다. ID+H군 역시 1시간 27.5 ± 0.7 U/mg, 3시간 21.1 ± 1.7 U/mg, 6시간 7.7 ± 3.0 U/mg으로 시간에 따라 활성이 급격하게 낮아졌으나, CD군과 달리 12시간에도 생존하는 개체가 있었으며 12시간의 lysozyme 활성은 13.6 ± 0.5 U/mg으로 나타났다. ID+H군 역시 24시간에는 CD군과 동일하게 대부분의 개체가 폐사하거나 피부가 괴사되는 현상을 나타냈다. 그러나, 6시간에서 경우 CD군에 비하여 ID군이 유의적으로 높은 lysozyme 활성을 나타내었으며($P < 0.05$), 일반환경과 유의적인 차이를 나타내었다(Fig. 10A, $P < 0.05$).

저염분 환경에서 역시 일반환경에 비하여 모든 실험군에서 lysozyme 활성이 낮아지는 것으로 나타났다($P < 0.05$). CD+S군과 ID+S군 모두 12시간까지 지속적으로 감소하였다가 24시간에는 유의적으로 증가하였다($P < 0.05$). 또한 1시간에는 CD+S 및 ID+S군 모두 일반환경에 비하여 감소하였으나, 6시간에는 ID+S군의 활성이 일반환경보다 높아짐을 확인할 수 있었다(Fig. 10B, $P < 0.05$).

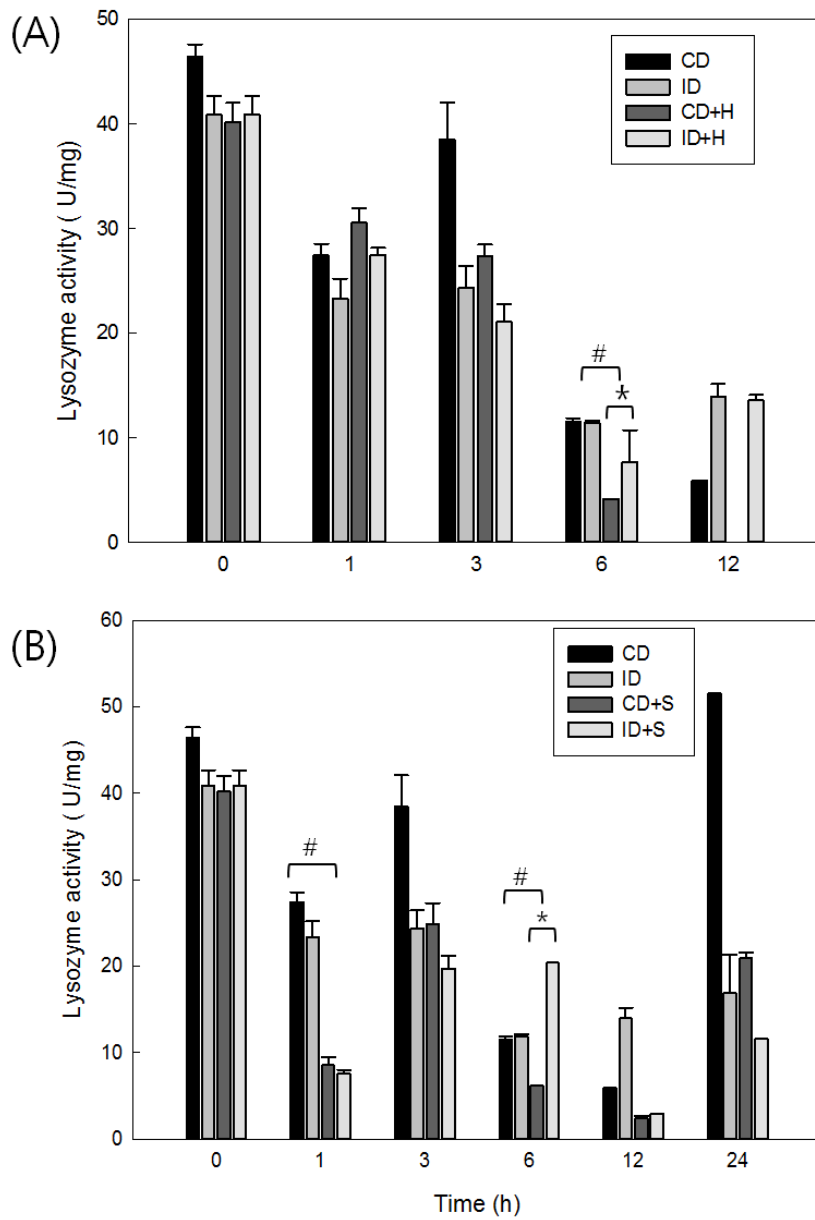


Figure 10. Lysozyme activity in coelomic fluid of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) exposure to (A) high temperature and (B) low salinity for 0, 1, 3, 6, 12 and 24 hour. Experimental groups: common diet (CD), immunity diet (ID), common diet + high temperature (CD+H), immunity diet + high temperature (ID+H) common diet + low salinity (CD+S) and immunity diet + low salinity (ID+S).

3-2-3. Penoloxydase (PO) activity 변화 분석

각 실험군의 PO 활성을 분석한 결과 0시간에는 CD군과 ID군 모두 동일하게 나타났다. 일반 환경에서 CD군은 대부분의 시간대에서 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 24시간에 유의적으로 증가하였다($P<0.05$). ID군의 경우 역시 지속적으로 유사한 수치를 나타냈으며 시간에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Fig. 11).

고수온 환경에서는 CD+H군은 3시간까지는 유사한 수치를 나타냈으나, 6시간에는 26.6 ± 1.1 U/mg으로 유의적인 증가가 나타났다($P<0.05$). 12시간 및 24시간에는 대부분의 개체가 폐사하거나 괴사되어 데이터를 얻을 수 없었다. ID+H군의 경우 6시간에 3.3 ± 0.6 U/mg으로 CD군과 유의적인 차이가 나타났다($P<0.05$). 또한, 12시간에는 CD군과는 달리 생존 개체가 존재했고 PO활성은 17.4 ± 0.6 U/mg으로 나타났다. 그러나 ID군에서 역시 24시간에는 대부분의 개체에서 폐사 및 피부괴사가 나타났다(Fig. 11A, $P<0.05$).

저염분 환경에서 CD+S군은 1시간 20.8 ± 1.3 U/mg, 3시간 6.7 ± 0.3 U/mg, 6시간 26.6 ± 3.9 U/mg, 12시간 40.0 ± 2.1 U/mg 및 24시간 16.7 ± 1.1 U/mg으로 점차 증가하는 패턴을 나타냈으며, ID+S군은 6시간까지는 감소하다가, 12시간부터는 16.7 ± 0.4 U/mg 및 24시간 20.0 ± 4.2 U/mg으로 유의적으로 증가하는 패턴을 나타냈다($P<0.05$). 또한 1시간에서 일반환경과 CD군보다 CD+S군의 활성이 유의적으로 증가하였다(Fig. 11B, $P<0.05$).

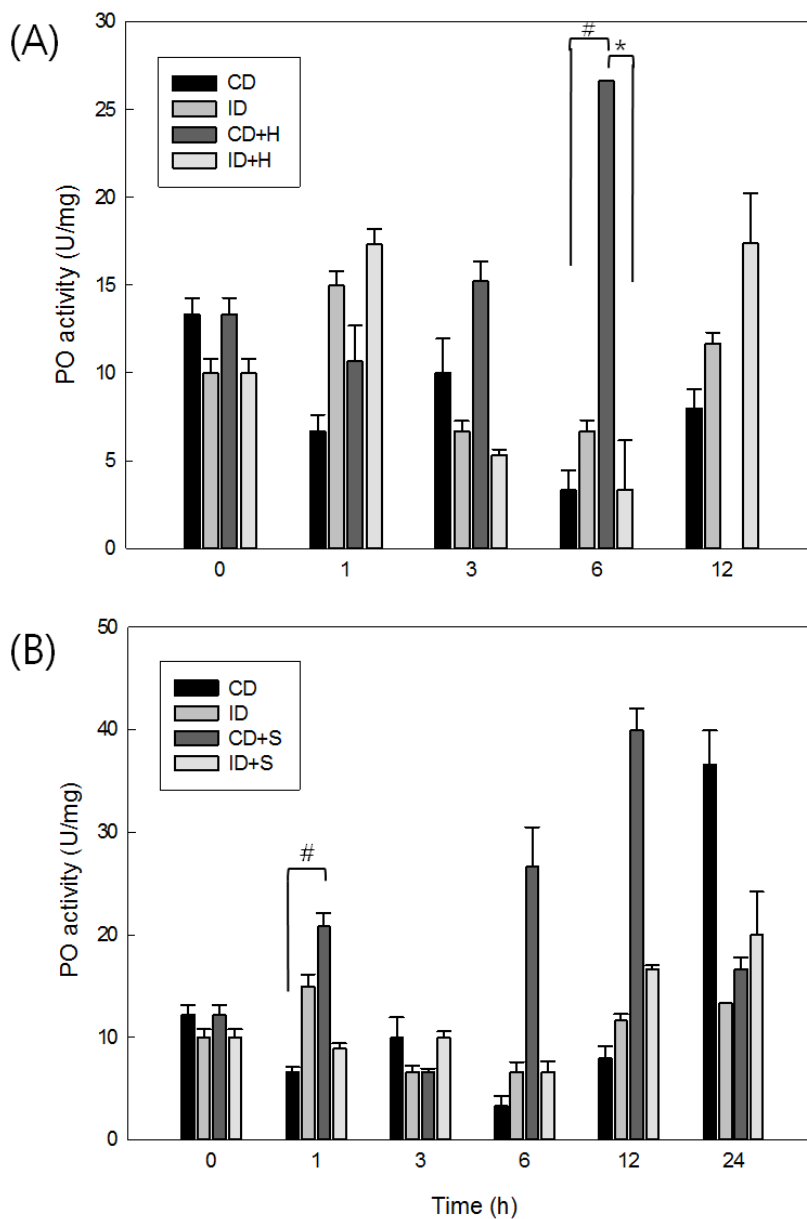


Figure 11. Phenoloxidase activity (PO) in coelomic fluid of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) exposure to (A) high temperature and (B) low salinity for 0, 1, 3, 6, 12 and 24 hour. Experimental groups: common diet (CD), immunity diet (ID), common diet + high temperature (CD+H), immunity diet + high temperature (ID+H) common diet + low salinity (CD+S) and immunity diet + low salinity (ID+S).

3-3. 유전학적 분석

홍해삼 치삼의 체벽 내 lysozyme mRNA를 측정된 결과 일반환경에서는 lysozyme mRNA가 1시간에 CD군 $1.6 \pm 0.7 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 및 ID군 $2.7 \pm 0.7 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 으로 ID군에서 유의적인 차이를 나타내었다(Fig. 12A, $P < 0.05$). 24시간의 경우 역시 CD군 $2.5 \pm 1.7 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 및 ID군 $45.3 \pm 1.4 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 으로 ID군에서 유의적으로 높게 나타났다(Fig. 12D, $P < 0.05$).

고수온 환경에서는 lysozyme mRNA가 1시간에는 CD $11.9 \pm 0.1 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 및 ID $33.5 \pm 1.6 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 으로 ID군이 높게 나타났으나(Fig. 12B, $P < 0.05$), 24시간 후에는 CD $6.9 \pm 0.9 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, ID $1.8 \pm 0.1 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 으로 lysozyme 활성이 유의적으로 낮아지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 12E, $P < 0.05$).

저염분 환경에서 역시 고수온 환경과 유사하게 1 시간에는 CD $15.8 \pm 1.7 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 및 ID $34.5 \pm 1.4 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 으로 ID 군이 유의적으로 높아졌으나(Fig. 12C, $P < 0.05$), 24 시간 CD $0.9 \pm 0.1 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 및 ID $0.2 \pm 0.0 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 으로 CD 군의 mRNA량은 증가하고 ID 군의 경우 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 12F, $P < 0.05$).

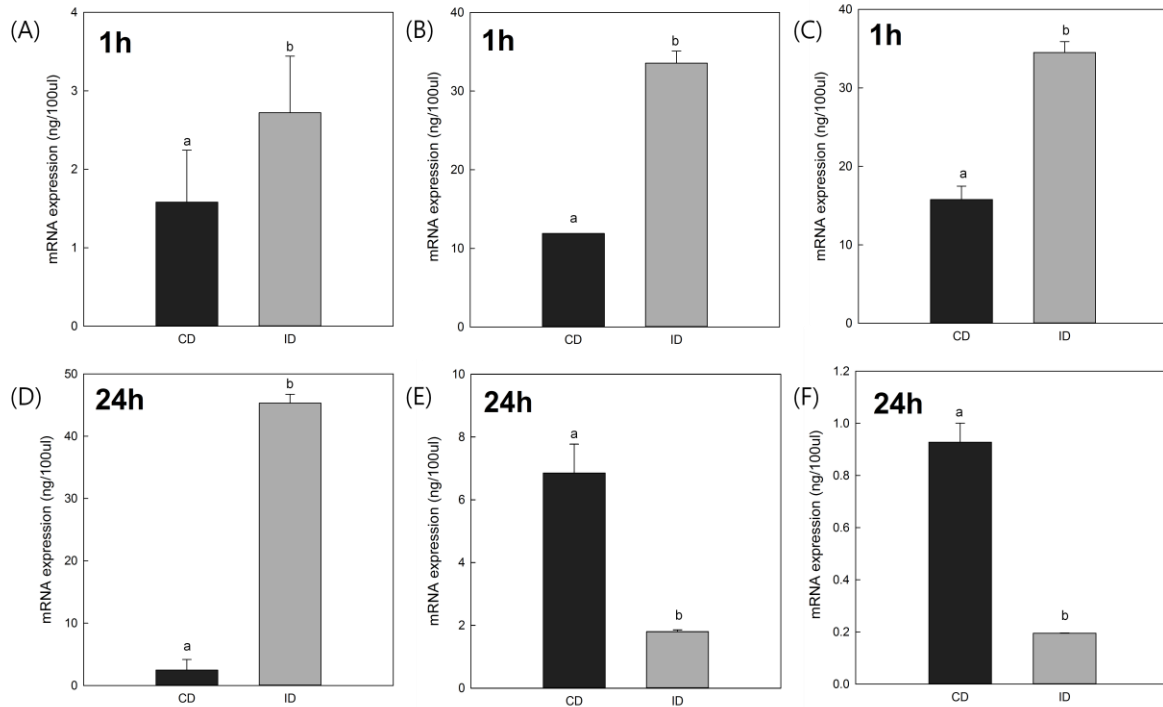


Figure 12. Lysozyme mRNA expression on in body wall of the juvenile red type sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) for (A~C) 1 hour and (D~F) 24 hour. Experimental groups: common diet (CD) and immunity diet (ID).

4. 고찰

본 연구에서는 홍해삼 치삼의 고수온 또는 저염분 환경 하에서의 환경변화 저항력 및 면역활성 변화를 측정하기 위해 CD 와 ID 사료를 섭취한 홍해삼 치삼을 대상으로 환경스트레스 실험을 진행하였다. 홍해삼은 광온성 생물이지만 26℃ 이상의 고수온에는 취약한 것으로 알려져 있다(Ji et al., 2008). 따라서 고수온 시기인 여름이 되면 해삼은 체내변화, 수온 상승 및 먹이 부족 등을 대비하기 위한 생존전략으로서 하면을 하게 된다(Pinder et al., 1992; Land and Bernier, 1995; Abe, 1995; Storey, 2001). 하면은 주로 수온에 의한 세포성 스트레스에 의한 것으로 보고되었으며(Sørensen et al., 2003; Ji et al., 2008), 하면 기간 동안 섭이 저하, 체중 저하, 내장 배출 및 생리 활성 저하 등을 동반하는 것으로 알려져 있다(Sloan, 1984; Li et al., 1996, 2002; Liu et al., 1996; Yang et al., 2005). 이에 홍해삼 치삼의 스트레스 지표로서 각 환경스트레스 하에서 내장배출 정도를 측정해 본 결과, 일반 환경이나 저염분 환경에서는 내장배출이 나타나지 않았으나 고수온 환경에서 내장배출개체가 나타났다. 또한 CD 군에서 ID 군에 비하여 더 많은 내장배출이 나타났다. 따라서 홍해삼 치삼은 고수온 환경에 더욱 스트레스를 받는 것으로 추정되며, 동일한 고수온 스트레스를 받았을 경우 상대적으로 내장배출 개체수가 적었던 ID 군이 CD 군에 비하여 더 적은 스트레스를 받은 것으로 판단된다.

체강액 내 단백질 량 측정결과 각 그룹에서 유의적인 차이는 나타나지 않았지만, 고수온 실험군의 경우 1 시간과 3 시간째에 저염분 환경이나 일반환경에 비하여 낮은 수치를 나타내었다. Wang et al. (2008)은 홍해삼의 하면에 관련된 연구를 진행하였고, 고수온기인 7-9 월 사이에 총 체강액 내 혈구수가 감소하며 이는 체강소체의 죽음과 관련이 있다고 보고하였다. 따라서 고수온 또는 저염분 환경에서 홍해삼 치삼의 체강액 내 단백질이 일반환경에 비하여 낮게 나타난 것은 체강소체의 죽음과 관련이 있으며,

이러한 체강액 내 단백질량 저하가 해삼의 주요 면역기능을 수행하는 체강소체의 죽음에 의하여 비특이적 면역의 저하 등의 영향을 미칠 것으로 판단된다.

Lysozyme 활성의 경우 모든 실험군에서 시간에 따라 점차 감소하는 패턴을 나타냈으며 고수온과 저염분 환경의 경우 일반 환경에 비하여 유의적으로 낮은 활성을 나타냈으나($P<0.05$), ID 군이 CD 군에 비하여 안정적인 활성을 나타냄을 확인하였다. PO 활성의 경우, 고수온과 저염분 환경에서는 PO 활성이 6 시간에 감소하는 경향을 나타내었지만 각 실험군간 유의적인 차이는 나타내지 않았다. 선행 연구에 따르면 수온스트레스를 해삼에게 주었을 때 16℃에서 24℃까지는 수온증가에 따라 lysozyme 활성이 증가하였으나, 32℃ 이상의 환경에서는 본 연구와 유사하게 lysozyme 활성이 시간이 지남에 따라 급격하게 감소함이 나타났으며, PO 활성에는 큰 변화가 나타나지 않았다. 그러나 12 시간에는 실험군의 50%가 폐사한 것으로 보고되었다(Wang et al., 2008; Tian et al., 2015). 이에, 본 연구에도 선행연구에 따라 50%의 폐사율을 나타낸 30℃를 고수온 환경에 사용하였다(Dong et al., 2008). 그러나 본 연구에서는 더 피부가 무른 홍해삼 치삼을 사용하였기 때문에, 고수온 환경하에서 환경 저항력이 많이 떨어져 실험시작 후 12 시간부터 많은 폐사와 피부괴사가 일어난 것으로 판단된다. 저염분 환경에서는 고수온 환경과 마찬가지로 1 시간과 6 시간에 lysozyme 활성이 감소하는 경향을 나타내었으나($P<0.05$), 일정한 패턴을 나타내지 않았다. 해삼은 개방형 혈관계를 가지고 있고 삼투 조절능력이 낮아 염도변화에 따라 해삼의 체강액 삼투압은 변화를 하게 되며, 저염분 환경에서 해삼의 체강액의 삼투압은 6 시간 이상이 지나면 안정화된다고 알려져 있다(Fankboner, 2002; Binyon, 1972; Hyman, 1955; Ruppert and Barnes, 1994). 따라서 저염분 환경에서 lysozyme 활성이 24 시간에 점차 증가하는 것은 체내 활성을 안정화시키려는 노력으로 판단되며, lysozyme 활성이 고수온 또는 저염분 자극에 의하여 자극에 의해 증가되는 것으로 알려져 있음에도, CD 군에 비하여 ID 군에서 증가하지 않은 것은 lysozyme 활성이 염분 자극에 큰 영향을 받지 않았기 때문으로 판단된다.

해삼과 같은 무척추 동물은 주요 면역시스템으로서 선천면역을 사용하는 것으로 알려져 있다. 근육과 체벽은 해삼의 방어시스템의 첫번째 라인으로 lysozyme 과 같은 효소를 포함하고 있으며, lysozyme 활성은 선천면역 중에서도 병원균에 가장 먼저 반응하는 효소성 면역이다. Lysozyme mRNA 는 해삼의 모든 조직에서 검출되며 장과 촉수 및 호흡수에서는 적게 검출되는 것으로 보고되었다(Tian et al., 2015).

본 연구에서 홍해삼 치삼의 체벽에서 lysozyme mRNA 발현량을 측정한 결과 일반 환경에서는 1 시간과 24 시간 모두 ID 군의 lysozyme mRNA 발현량이 유의적으로 높은 것을 확인할 수 있었다. 그러나 고수온 또는 저염분 환경의 경우 1 시간째에는 ID 군이 유의적으로 높게 발현되었으나 24 시간 후에는 낮게 나타났다. Tian et al. (2015)의 연구에 따르면 저염분 환경 하의 홍해삼 치삼 체강액에서 12 시간째에 down-regulation 이 나타났다가 다시 증가하는 경향을 보였는데, 본 연구에서도 이와 유사한 패턴을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

상기와 같은 결과로 미루어 보았을 때, 고수온 환경은 홍해삼 치삼에게 가장 큰 스트레스를 주는 요인으로 판단되며, 저염분 환경은 고수온 환경에 비하여 적은 스트레스를 받는 것으로 보이나 장기적인 영향을 받았을 경우 악영향을 미칠 것으로 여겨진다. 또한, 고수온과 같이 홍해삼 치삼에게 급격한 스트레스와 반응을 유발하는 환경 하에서 면역증강사료첨가제 섭취가 급격한 수온변화에 대한 생리학적 완충역할에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단되며, 저염분 환경스트레스의 경우에는 장기적인 섭취를 통해 면역 증강을 도모할 수 있으리라 판단된다. 따라서 홍해삼의 면역증강사료첨가제 섭취가 고수온 저염분 등 급작스러운 환경변화에 대한 저항력에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 여겨진다.

IV. 종합고찰

본 연구에서는 홍해삼 치삼의 성장 및 면역을 증가시키기 위하여 스피루리나와 레반 및 프로바이오틱스를 혼합하여 면역증강사료첨가제를 제작하여 홍해삼 치삼에게 급이하고 성장 및 환경저항력에 대한 생리학적 변화를 살펴보았다.

12주간 홍해삼 치삼에게 면역증강사료첨가제를 첨가한 사료를 급이하고 성장률을 확인한 결과 일반해삼사료에 비하여 64%의 증체율 증가를 나타내었으며 생존율 역시 높게 나타났다. 선행 연구에서 신바이오틱스를 양식 대상에 급이하였을 경우 프로바이오틱스만을 급이한 실험군에 비하여 성장을 높여준다고 보고되었으며(Gibson and Roberfroid, 1995; Kontula et al., 1999; Saarela et al., 2003; Gu et al., 2011; Boonanuntanasarn et al., 2015), 본 실험결과 역시 신바이오틱스 면역증강사료첨가제를 섭취한 실험군에서 높은 생존율과 성장률을 나타내었다. 이러한 결과는 프리바이오틱스인 레반이 프로바이오틱스의 활성을 증가시키고 이를 통해 홍해삼 치삼의 사료에 혼합된 스피루리나 및 해조류성 성분의 소화율을 높여주었기 때문으로 판단된다.

고수온과 저염분은 해양생물에게 중요한 환경적 요소이며, 해삼의 생리적 활성은 다른 생물들과 마찬가지로 온도 의존적이며 온도증가에 따라 면역관련 효소들의 활성이 증가된다고 알려져 있다(Coteur et al., 2004; Wang et al., 2008). 또한 해삼은 삼투 조절기관이 없기 때문에 삼투압 변화에 따라 체강액 내 삼투압에 영향을 미치는 것으로 보고되었다(Dong et al., 2008). 따라서 수온 및 염분 변화는 해삼의 섭이와 행동 등의 생태학적 변화에서부터 체강액 내 생리변화까지 영향을 미치게 된다 (Coteur et al., 2004; Wang et al., 2008; Tian et al., 2015).

해삼은 스트레스를 받으면 내장을 배출하는 것으로 알려져 있으며, 고수온과 저염분과 같은 급격한 환경변화에 노출되는 경우 극심한 스트레스를 받기 때문에 내장을 배출하는 것으로 알려졌다(Tian et al., 2015). 고수온과 저염분 환경에서 면역증강사료첨가제를

급이한 홍해삼 치삼의 면역활성 및 스트레스지표를 측정 한 결과, 실험 시 저염분 환경에서 홍해삼 치삼은 몸을 수축하는 행동을 보여 저염분 스트레스를 받는 것으로 확인되었지만 폐사는 나타나지 않았다. 반면 고수온 환경의 경우 내장을 빨거나 피부가 괴사되는 등의 스트레스 반응을 나타내었다. 또한 CD군에서 ID군에 비하여 더 많은 내장 배출을 보여, ID군이 고수온 환경에서 더 적은 스트레스 받은 것으로 판단된다. 또한, 고수온과 저염분 환경에서의 면역을 측정 한 결과, lysozyme 활성이 환경스트레스를 받으면 시간이 지남에 따라 점차 감소하는 것으로 나타났다. 체강액 내 단백질량과 PO활성의 경우 동일하게 환경스트레스에 의해 낮아지는 패턴을 보였으나, 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

해삼과 같은 극피동물의 면역은 주로 비특이적 선천면역이며 주요 면역 방어는 세포나 비세포성 체액면역에 의해 일어난다고 알려져 있다. 그러나 해삼의 경우 다른 무척추동물에 비하여 이러한 면역 기능과 면역시스템에 대하여 잘 알려지지 않은 상태이다(Wang et al., 2008). 선행연구에서 본 연구결과와 유사하게 해삼에게 환경스트레스를 주었을 때 체강액 내의 체강소체의 수는 줄어드는 반면, 그 외의 비세포성면역의 경우 증가하는 것을 확인하였는데, 이것은 체내 세포성 면역 활성의 변화를 보완하기 위해 상대적으로 에너지가 적게 들어가는 비세포성면역 면역활성이 증가되는 것이라 하였다(Fellowes and Godfray, 2000; Moret and Schmid-Hempel, 2000; Poulsen et al., 2002; Wang et al., 2008). 따라서 체강액 내 면역활성 감소는 비세포성 면역과 동조하는 것으로 판단된다.

또한, 고수온과 저염분은 해삼의 성장을 저해한다고 보고되었으며, 하면 시기에는 장관배출 및 음식과 활동 저하와 같은 변화를 나타내고 사망하지 않더라도 최소 5~50%의 체중감소가 유발된다고 하였다(Dong et al., 2007). 또한 같은 환경변화에 있어서도 개체의 크기에 따라 반응하는 정도가 다르다고 보고되었다(Tian et al., 2015; Yang et al., 2005). 본 연구의 경우 선행연구와 다르게 청해삼에 비하여 상대적으로 체적이 얇은 홍해삼 치삼을 사용하였기 때문에, 환경변화에 따른 조절능력이 낮아 체강액 내

삼투압 변화가 있었을 것으로 판단된다. 따라서 성장을 마친 홍해삼을 이용하여 동일한 실험을 진행하게 되면 면역증강사료첨가제와 해삼의 비특이적 면역의 상관관계를 파악할 수 있을 것이라 사료된다. 또한 청해삼의 비특이적 면역반응인 lysozyme 활성과 PO 는 많이 연구되고 있으나, 아직 그 매커니즘이나 기능이 정확히 밝혀지지 않았다. 따라서 청해삼의 연구방법을 홍해삼에게 직접 적용하기에는 형태적 차이가 있어 어렵다고 생각되며, 홍해삼의 생리기능을 연구하기 위하여 홍해삼에 적합한 연구방법을 찾는 것이 필요하다고 판단된다.

이상의 연구의 결과를 종합 해보면, 면역증강사료첨가제 급이를 통해 홍해삼 치삼의 증체율, 일간 성장률 및 생존율이 증가됨을 확인하였으며, 면역 활성의 경우 일반 환경에서는 안정화 되는 경향을 나타내었으나 고수온과 저염분과 같은 급작스러운 환경변화에서는 완충역할을 도와 안정적인 저항력을 나타내었다. 따라서 본 연구에서 개발된 면역 증강사료첨가제가 성장증대와 급격한 환경변화에 있어 홍해삼 치삼의 성장과 생리활성에 긍정적인 영향을 미쳐 양식어가에 도움을 줄 수 있을 것으로 여겨진다.

V. 요약

본 연구에서는 스피루리나, 프로바이오틱스 및 레반을 혼합한 신바이오틱 면역증강사료첨가제를 제작하며 12주간 급이한 홍해삼 치삼의 성장과 생리활성 및 환경변화에 따른 생리활성 변화를 측정하였다. 실험결과 면역증강사료첨가제(ID) 섭취를 통해 홍해삼 치삼의 증체율, 일간 성장률 및 생존율이 증가됨을 확인하였으며 면역 활성의 경우 안정화되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 면역증강사료첨가제의 섭취가 고수온 저염분 등 급작스러운 환경변화에 대한 저항력에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 판단된다.

또한 본 연구를 통하여 홍해삼 치삼의 성장이 사료의 소화율에 따라 많은 영향을 받기 때문에 성장에 도움이 되면서도 저렴한 조류성 분말을 최대한으로 배합하면서 적절하게 기능성 물질을 섞어 소화율을 올릴 수 있도록 하는 것은 홍해삼 치삼의 양식에 있어 매우 중요하다고 사료된다. 또한 본 연구가 추후 국내산 홍해삼 사료첨가제 개발과 홍해삼 양식에 크게 이바지할 것으로 여겨진다.

VI. 참고문헌

- Adebola OO, Corcoran O and Morgan WA. 2014. Synbiotics: The impact of potential prebiotics inulin, lactulose and lactobionic acid on the survival and growth of lactobacilli probiotics. *J Funct Foods* 10, 75-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.05.010>.
- Akin MB, Akin MS and Kirmaci Z. 2007. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice cream. *Food chem* 104, 93-99. 10.1016/j.foodchem.2006.11.030.
- Boonanuntanasarn S, Wongsasak U, Pitaksong T and Chaijamrus S. 2015. Effects of dietary supplementation with β -glucan and synbiotics on growth, haemolymph chemistry, and intestinal microbiota and morphology in the Pacific white shrimp. *Aquac Nut.* 10.1111/anu.12302.
- Coteur G, Corriere N and Dubois P. 2004. Environmental factors influencing the immune responses of the common European starfish (*Asterias rubens*). *Fish Shellfish Immunol* 16, 51-63, 10.1016/S1050-4648(03)00030-5.
- Choi GS, Master, Inha university. 2014. Effects of Experimental formulated diets mixture ratio on growth and body composition of sea cucumber *Stichopus japonicus*.
- Choo PS. 2008. Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in Asia. *Sea Cucumbers. A Global Review of Fisheries and Trade* 516, 81-118.
- Cross ML. 2002. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic *lactobacilli* and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34, 245-253. 10.1111/j.1574-695X.2002.tb00632.x.
- Dahech I, Belghith KS, Hamden K, Feki A, Belghith H and Mejdoub H. 2011. Oral administration of levan polysaccharide reduces the alloxan-induced oxidative stress in rats. *Int J Biol Macromol* 49, 942-947. 10.1016/j.ijbiomac.2011.08.011.
- De Schrijver R and Ollevier F. 2000. Protein digestion in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. *Aquaculture* 186, 107-116. 10.1016/S0044-8486(99)00372-5.

- Dong, Y., Dong, S., & Meng, X. (2008). Effects of thermal and osmotic stress on growth, osmoregulation and Hsp70 in sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka). *Aquaculture*, 276(1), 179-186.
- El-Nagar G, Clowes G, Tudorica CM and Kuri V. 2002. Rheological quality and stability of yog-ice cream with added inulin. *Int J Dairy Technol* 55, 89–93 10. 1046/j.1471-0307.2002.00042.x.
- Erasmus JH, Cook PA and Coyne VE. 1997. The role of bacteria in the digestion of seaweed by the abalone *Haliotis midae*. *Aquaculture* 155, 377-386. 10.1016/S0044-8486(97)00112-9.
- Fankboner, PV. 2002. Seasonal visceral atrophy and response to salinity by *Parastichopus californicus* (Stimpson): Osmoregulation?. *SPC Beche-demer Information*, 22.
- Fellowes MDE, Godfray HCJ. 2000. The evolutionary ecology of resistance to parasitoids by *Drosophila*. *Heredity* 84, 1–8
- Glinski Z and Jarosz J. 2000. Immune phenomena in echinoderms. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 48,189-193.
- Gibson GR and Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125, 1401–1412.
- Gilliland SE, Morelli L, Reid G. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. In: *FAO/WHO Expert Consultation On Evaluation Of Health And Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powdered Milk*. Cordoba, Argentina.
- Gu M, Ma H, Mai K, Zhang W, Bai N and Wang X. 2011. Effects of dietary β -glucan, mannan oligosaccharide and their combinations on growth performance, immunity and resistance against *Vibrio splendidus* of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol* 31, 303-309. 10.1016/j.fsi.2011.05.018.
- Gu M, Ma HM, Mai KS, Zhang WB, Ai QH, Wang XJ and Bai N. 2010. Immune response of sea cucumber *Apostichopus japonicus* coelomocytes to several immunostimulants in vitro. *Aquaculture* 306, 49–56. 10.1016/j.aquaculture.2010.05.024.

- Jiang J Zhou Z, Dong Y, Guan X, Wang B, Jiang B and Sun H. 2014. Characterization of phenoloxidase from the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Immunobiology 219, 450-456. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2014.02.006>.
- Ji T, Dong Y and Dong S. 2008. Growth and physiological responses in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka: aestivation and temperature. Aquaculture 283(1), 180-187.
- Kan-no M and Kijima A. 2003. Genetic differentiation among three color variants of Japanese sea cucumber *Stichopus japonicus*. Fish Sci 69, 806-812. 10.1046/j.1444-2906.2003.00690.x.
- Kang SA, Jang KH, Seo JW, Kim KH, Kim YH, Rairakhwada D and Rhee SK. 2009. Levam: applications and perspectives. Microbial production of biopolymers and polymer precursors. Caister Academic Press, Norwich, 145-161.
- Kim TH, Kim KJ, Choe MK and Yeo IK, 2006, Physiological Changes of Juvenile Abalone (*Haliotis sieboldii*) Exposed to Acute Water-temperature Stress. Kor Fish Aquat Sci 19, 77-83.
- Kim KW, Hwang NY, Son MH, Kim KD, Lee JH, Yi L, Yun YH, Park GH, Kim SS, Lee KJ, and Bai SC, 2011, Optimum Feeding Rates in Juvenile Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* Fed Practical Expanded Pellet at Low and High water Temperatures. Kor Fish Aquat Sci 44(4) 345-351, <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2011.0345>.
- Kinne O. 1963. The Effects of Temperature and Salinity on Marine and Brackish Water Animals-I Temperature.
- Lee KH, Jun KD, Kim WS and Paik HD. 2001. Partial characterization of polyfermenticin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. Lett Appl Microbiol 32(3), 146-151.
- Li B, Yang H, Zhang T, Zhou Y and Zhang C. 2002. Effect of temperature on respiration and excretion of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Oceanologia et Limnologia Sinica 33, 182-187 (in Chinese with English abstract).
- Kontula P, Suihko ML, Von Wright A and Mattila-Sandholm T. 1999. The effect of lactose derivatives on intestinal lactic acid bacteria. J Dairy Sci 82, 249-256. 10.3168/jds.S0022-0302(99)75230-6.

- Magnadóttir B, Gudmundsdóttir BK, Lange S, Steinarsson A, Oddgeirsson M, Bowden T and Gudmundsdóttir S. 2006. Immunostimulation of larvae and juveniles of cod, *Gadus morhua*. L J Fish Dis 29, 147-155.
- Mitsukuri K. 1903. Notes on the habits and life history of *Stichopus japonicus* Selenka. Annotation of Zoology of Japan 5, 1-21.
- Ma Y, Liu Z, Yang Z, Li M, Liu J and Song J. 2013. Effects of dietary live yeast *Hanseniaspora opuntiae* C21 on the immune and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Fish Shellfish Immunol 34, 66-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.10.005>.
- Moret Y, Schmid-Hempel P. 2000. Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers. Science 290, 1166-1168. 10.1126/science.290.5494.1166
- Morelli L, Zonenschain D, Callegari ML, Grossi E, Maisano F and Fusillo M. 2003. Assessment of a new synbiotic preparation in healthy volunteers: survival, persistence of probiotic strains and its effect on the indigenous flora. Nutr J 2, 1-11. 10.1186/1475-2891-2-11.
- Mourão PA, Pereira MS, Pavão MS, Mulloy B, Tollefsen DM, Mowinckel MC and Abildgaard U. 1996. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action. J Food Biochem 271, 23973-23984.
- Newaj-Fyzul A, Al-Harbi AH and Austin B. 2014. Review: developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. Aquaculture 431, 1-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.026>.
- Nayak SK. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. Fish Shellfish Immunol 29, 2-14. 10.1016/j.fsi.2010.02.017.
- Park MS, Kim SH, Lim HK, Min BH, Chang YJ and Jeong MH. 2013. Recovery Rate and Histological Changes in the Gills of Juvenile Abalone *Haliotis discus hannai* by Exposure Time of Different Water Temperatures and Salinities, Korean J. Malacol 29(3). 225-232. <http://dx.doi.org/10.9710/kjm.2013.29.3.225>.

- Poulsen M, Bot A and Nielsen M. 2002. Experimental evidence for the costs and hygienic significance of the antibiotic metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. *Behav Ecol Sociobiol.* 52, 151–157. 10.1007/s00265-002-0489-8.
- Ramírez-Gómez F, Aponte-Rivera F, Méndez-Castaner L and García-Arrarás J E. 2010. Changes in holothurian coelomocyte populations following immune stimulation with different molecular patterns. *Fish Shellfish Immunol* 29, 175-185. 10.1016/j.fsi.2010.03.013.
- Rairakhwada D, Pal AK, Bhathena ZP, Sahu NP, Jha A and Mukherjee SC. 2007. Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp, *Cyprinus carpio* juveniles. *Fish Shellfish Immunol* 22, 477-486. 10.1016/j.fsi.2006.06.005.
- Rehm BH. 2009. Microbial production of biopolymers and polymer precursors: Applications and perspectives. Horizon Scientific Pres, Norfolk, UK.
- Ruppert EE, Barnes RD. 1994. Invertebrate zoology. Saunders College Publishing, New York, p. 1056.
- Saarela M, Hallamaa K, Mattila-Sandholm T and Mättö J. 2003. The effect of lactose derivatives lactulose, lactitol and lactobionic acid on the functional and technological properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *International Dairy J* 13, 291-302. 10.1016/S0958-6946(02)00158-9.
- Srikanth R, Reddy CHS, Siddartha G, Ramaiah MJ and Uppuluri KB. 2015. Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydr Polym* 120, 102-114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.003>.
- Saurabh S and Sahoo PK. 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquac Res* 39, 223-239. 10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x.
- Shi C, Dong S, Wang F, Gao Q and Tian X. 2013. Effects of four fresh microalgae in diet on growth and energy budget of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Aquaculture* 416, 296-301. 10.1016/j.aquaculture.2013.09.050.
- Sugita H, Takahashi J and Deguchi Y. 1992. Production and consumption of biotin by the intestinal microflora of cultured freshwater fishes. *Biosci Biotechnol Biochem* 56, 1678-1679. 10.1271/bbb.56.1678.

- Sun Y, Jin L, Wang T, Xue J, Liu G, Li X, You J, Li S and Xu Y. 2008. Polysaccharides from *Astragalus membranaceus* promote phagocytosis and superoxide anion (O_2^-) production by coelomocytes from sea cucumber *Apostichopus japonicus* in vitro. *Comp Biochem Physiol C* 147, 293–298. [10.1016/j.cbpc.2007.11.003](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.11.003).
- Ten Doeschate KI and Coyne VE. 2008. Improved growth rate in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture* 284, 174-179. [10.1016/j.aquaculture.2008.07.018](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.018).
- Tian Y, Liang XW, Chang YQ and Song J. 2015. Expression of c-type lysozyme gene in sea cucumber *Apostichopus japonicus* is highly regulated and time dependent after salt stress. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 180, 68-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.10.004>.
- Vine NG, Leukes WD and Kaiser H. 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol Rev* 30, 404-427. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00017.x>.
- Wang F, Yang H, Gao F, and Liu G. 2008. Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 151, 491-498. [10.1016/j.cbpa.2008.06.024](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.06.024).
- Wang, F., Yang, H., Gabr, H. R., & Gao, F. (2008). Immune condition of *Apostichopus japonicus* during aestivation. *Aquaculture*, 285(1), 238-243. [10.1016/j.aquaculture.2008.08.033](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.033).
- Wang X, Wang L, Che J, Li X, Li J, Wang J and Xu Y. 2014. In vitro non-specific immunostimulatory effect of alginate oligosaccharides with different molecular weights and compositions on sea cucumber *Apostichopus japonicus* coelomocytes. *Aquaculture* 434, 434-441. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.021>.
- Xia S, Yang, H, Li Y, Liu S, Zhou Y and Zhang L. 2012. Effects of different seaweed diets on growth, digestibility, and ammonia-nitrogen production of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Aquaculture* 338, 304-308. [10.1016/j.aquaculture.2012.01.010](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.01.010).
- Xue Z, Li H, Wang X, Li X, Liu Y, Sun J and Liu C. 2015. A review of the immune molecules in the sea cucumber. *Fish Shellfish Immunol* 44, 1-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.026>.
- Yang H, Yuan X, Zhou Y, Mao Y, Zhang T and Liu, Y. 2005. Effects of body size and water

- temperature on food consumption and growth in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) with special reference to aestivation. *Aquac Res* 36, 1085-1092. 10.1111/j.1365-2109.2005.01325.x.
- Yu MC, Li ZJ, Lin HZ, Wen GL and Ma S. 2009. Effects of dietary medicinal herbs and *Bacillus* on survival, growth, body composition, and digestive enzyme activity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquac Int* 17, 377-384. 10.1007/s10499-008-9209-3.
- Yu L, Xue C, Chang Y, Hu Y, Xu X, Ge L and Liu G. 2015. Structure and rheological characteristics of fucoidan from sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Food Chem* 180, 71-76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.034>.
- Zhao W, Liang M and Zhang P. 2010. Effect of yeast polysaccharide on the immune function of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) under pH stress. *Aquacult Int* 18, 777-786. 10.1007/s10499-009-9300-4.
- Zokaeifar H, Balcázar JL, Saad CR, Kamarudin MS, Sijam K, Arshad A and Nejat N. 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 33, 683-689. 10.1016/j.fsi.2012.05.027.

감사의 글

대학에 처음 들어오겠다고 결심했던 날부터, 석사학위를 취득하기까지 많은 일들이 있었던 것 같습니다. 이 과정을 마치기까지 저에게 많은 도움 주셨던 분들께 감사의 마음을 전하고자 합니다. 가장 먼저, 지도 교수님이신 여인규 교수님께 진심으로 감사의 말씀을 드립니다. 처음 대학에 들어와 아무것도 모르던 학부생 시절부터 석사과정을 밟고 있는 지금까지 6년이라는 긴 시간 동안 교수님께서 제가 고민하며 헤메일 때는 격려와 사랑으로 올바른 길로 이끌어주시고, 학업에 있어서도 많은 가르침을 주신 덕분에 제가 지금까지 올 수 있었던 것 같습니다. 선생님의 많은 지도와 배려에 진심으로 감사 드립니다. 또한, 바쁘신 와중에도 논문이 좀 더 나은 방향으로 나아갈 수 있도록 검토 및 심사 해주신 이승현 교수님, 정준범 교수님, 허문수교수님, 그리고 학부 때부터 많은 관심과 도움주신 해양생명과학과 교수님들께 진심으로 감사 드립니다.

그리고, 실험실에서 동고동락하며 지낸 실험실 원들에게도 감사를 전하고 싶습니다. 석사 2년간 꼭 붙어 다녀 이제는 자매 같은 혜나, 언제나 든직한 천만이, 뽕뽕이 윤희, 논문 시즌에 많은 힘이 되어준 준영이에게도 고마움을 전합니다. 자주 만나지 못하는데도 언제나 한결같이 멀리서 응원해주고 도움 준 내 친구들 미선이, 현수, 슬기, 한솔이, 지은이 그리고 파르페 친구들에게도 감사 드립니다. 힘이 들 때 마다 항상 먼저 연락 주시고 많은 기도와 격려로 도움주신 경갑실 신부님과 김정희 수녀님께도 감사 드립니다. 마지막으로 부족한 딸을 언제나 자랑스럽게 여겨주시는 사랑하는 우리 엄마, 수련하고 공부하느라 힘든 와중에도 물심양면으로 도와 준 내 동생들 선이와 승민이에게 감사와 사랑을 전합니다. 지친 마음에 위안을 주던 마롱이와 블랑이에게도 사랑을 전합니다.

아마 지면을 통해 이 고마움을 표시하기엔 너무도 부족하다고 생각이 듭니다. 많은 분들의 도움이 있었기에, 제가 여기까지 올 수 있었던 것 같습니다. 진심으로 고개 숙여 감사드립니다. 앞으로 더 노력하고 열심히 정진하여 꿈을 이루는 사람 되도록 하겠습니다.