



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](#)

석사학위논문

Carnosine을 이용한

흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)

사료 내 histidine 요구량

제주대학교 대학원

해양생명과학과

신재범

2021년 2월



# 목 차

<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>LIST OF FIGURES</b> .....	vi
<b>LIST OF TABLES</b> .....	ix

## 실험-1 : 흰다리새우 사료 내 histidine의 형태(dipeptide, crystalline AA)에 따른 이용성 연구

<b>1.1. 서론</b> .....	1
<b>2.1. 재료 및 방법</b>	
2.1.1. 실험사료 .....	3
2.1.2. 실험새우 및 사육관리 .....	7
2.1.3. 실험새우 무게측정 .....	8
2.1.4. 일반성분분석 .....	9
2.1.5. 사료의 외관상 소화율 측정 .....	9
2.1.6. RNA 추출 및 cDNA 합성 .....	11
2.1.7. qPCR (quantitative real-time PCR)에 의한 유전자 발현 분석 .....	11
2.1.8. 통계학적 분석 .....	12

3.1. 결과 ..... 13

4.1. 고찰 ..... 14

**실험-2 : Carnosine 을 이용한 흰다리새우 사료 내 histidine**

**요구량 연구**

1.2. 서론 ..... 25

**2.2. 재료 및 방법**

2.2.1. 실험사료 ..... 27

2.2.2. 실험새우 및 사육관리 ..... 30

2.2.3. 실험새우 무게측정 ..... 31

2.2.4. 일반성분분석 ..... 31

2.2.5. RNA 추출 및 cDNA 합성 ..... 31

2.2.6. qPCR (quantitative real-time PCR)에 의한 유전자 발현 분석 ..... 31

2.2.7. 통계학적 분석 ..... 32

3.2. 결과 ..... 33

4.2. 고찰 ..... 45

5. 요약문 .....	49
6. 참고문헌 .....	51
7. 감사의 글 .....	61

## Abstract

This study was conducted to evaluate the optimum dietary histidine requirement using two molecular forms (dipeptide or crystalline amino acid) of histidine and different levels of L-carnosine in diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) (Exp 1 and 2). In this study, growth performance, feed utilization, diet digestibility, non-specific immunity and qPCR analysis were examined.

In the Exp-1, five experimental diets were prepared. The control (Con) diet was prepared without histidine and other diets were with 0.3 and 1.2% addition of histidine in the form of crystalline AA or dipeptides (Con, C-0.3, C-1.2, D-0.3 and D-1.2). Experimental diets were kept isonitrogenous and isocaloric by decreasing alanine while increasing histidine levels. Pacific white shrimp (body weight: 0.15 g) were randomly stocked into twenty tanks (96 L) in quadruplicate groups per dietary treatment and fed one of the diets for 62 days. Final mean body weight, weight gain and specific growth rate were significantly higher in shrimp fed D-0.3 and D-1.2 than those of shrimp fed the Con diet. No significant differences were observed in feed utilization and survivals by experimental diets. Analysis of whole body composition and amino acid profile were not significantly different among all the groups. Apparent digestibility coefficient of dry matter was significantly higher in shrimp fed C-1.2 and D-1.2 than those of shrimp fed the Con. Apparent digestibility coefficient of protein was significantly higher in shrimp fed C-1.2, D-0.3 and D-1.2 than those of shrimp fed the Con. The relative gene expression of IGF-BP mRNA was significantly higher in shrimp fed D-1.2 than those of shrimp fed the Con.

In the Exp-2, a control diet contained a minimum level of His (0.05% in diet from the dietary ingredients). Carnosine was gradually added to the control diet to contain 0, 0.26, 0.69, 1.11, 1.53, 1.95 or 2.37% histidine (designated as 0.05, 0.24, 0.40, 0.62, 0.78, 0.93 or 1.13, respectively). Experimental diets were kept isonitrogenous and isocaloric by decreasing alanine while increasing carnosine levels. Pacific white shrimp (body weight: 0.28 g) were

randomly stocked into twenty-eight tanks (110 L) in quadruplicate groups per dietary treatment and fed one of the diets for 8 weeks. Final mean body weight, weight gain and specific growth rate were significantly higher in shrimp fed 0.78 and 0.93 than those of shrimp fed the Con. No significant differences were observed in feed utilization and survivals by the gradual supplementation of carnosine in diets. Phenoloxidase activity was significantly higher in shrimp fed all groups than those of shrimp fed the Con. Lysozyme activity was significantly higher in shrimp fed 0.62 and 0.78 than those of shrimp fed the Con. Anti-protease activity was significantly higher in shrimp fed 0.24, 0.4, 0.62, 0.78 and 0.93 than those of shrimp fed the Con. Total protein concentration in hemolymph was significantly higher in shrimp fed 0.78 than those of shrimp fed the Con. Muscle composition protein content of shrimp was significantly higher in shrimp fed 0.24, 0.62 and 0.78 than those of shrimp fed the Con. Prophenoloxidase (proPO) and mRNA relative gene expression of crustin was most significantly higher in shrimp fed 0.78 and 0.93 than those of shrimp fed the Con. The quadratic regression analysis indicated that the optimal dietary histidine requirement for *L. vannamei* is 0.79% of dry diet.

In conclusion of Exp-1, the availability of histidine could be better in Pacific white shrimp when they are fed with dipeptides form rather than crystalline form. Dipeptides can be used as promising amino acid source for amino acid requirement study in Pacific white shrimp.

In conclusion of Exp-2, the result from the present study indicated that dietary histidine improved growth performance and innate immunity. Based on a quadratic regression of specific growth rate, the optimal dietary histidine requirement by carnosine for Pacific white shrimp was estimated to be 0.79% in diet (2.19% of dietary protein). This information will be useful in developing amino-acid balanced diets for the intensive culture of Pacific white shrimp.



## LIST OF FIGURES

### [EXP-1]

Figure 1. Preparation of experimental diets .....	3
Figure 2. Experimental rearing tank for Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	7
Figure 3. Measurement of shrimp body in every 2 weeks during 62 days feeding trial.....	8
.....	8
Figure 4. Analysis of chromic oxide concentration in shrimp feces .....	10
Figure 5. Measurement of mRNA concentration and cDNA synthesis for the qPCR analysis .....	11
.....	11
Figure 6. Relative mRNA expression of Insulin-like growth factor binding proteins (IGF-BP) for the qPCR analysis .....	12
.....	12
Figure 7. Growth performance of Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) fed the experimental diets with different levels or molecular forms of histidine for 62 days. Values are means $\pm$ S.D. (n=3). Bars with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ). The experimental diets were prepared with supplementing different levels or molecular forms of histidine by 0, 0.3 and 1.2% (Con, C-0.3, C-1.2, D-0.3 and D-1.2). .....	18
Figure 8. Whole body composition of Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) fed the experimental diets with different levels or molecular forms of histidine for 62 days. Values are means $\pm$ S.D. (n=3). Bars with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ). The experimental diets were prepared with supplementing different levels or molecular forms of histidine by 0, 0.3 and 1.2% (Con, C-0.3, C-1.2, D-0.3 and D-1.2). .....	20
Figure 9. Apparent digestibility coefficients (% ADC) for dry matter and protein of Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) fed the experimental diets with different levels or molecular forms of histidine for 62 days. Values are means $\pm$ S.D. (n=3).	

Bars with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ). The experimental diets were prepared with supplementing different levels or molecular forms of histidine by 0, 0.3 and 1.2% (Con, C-0.3, C-1.2, D-0.3 and D-1.2). ..... 23

Figure 10. Relative mRNA expression of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets with different levels or molecular forms of histidine for 62 days. Values are means  $\pm$  S.D. (n=3). Bars with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ). The experimental diets were prepared with supplementing different levels or molecular forms of histidine by 0, 0.3 and 1.2% (Con, C-0.3, C-1.2, D-0.3 and D-1.2). ..... 24

**[EXP-2]**

Figure 1. Experimental rearing tank for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* ..... 30

Figure 2. Growth performance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets with different levels of histidine for 56 days. Values are means  $\pm$  S.D. (n=3). Bars with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ). The experimental diets were prepared with supplementing different levels of histidine by 0, 0.26, 0.69, 1.11, 1.53, 1.95 and 2.37% (0.05, 0.24, 0.40, 0.62, 0.78, 0.93 and 1.13). ..... 36

Figure 3. Non specific Immune parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets with different levels of histidine for 56 days. Values are means  $\pm$  S.D. (n=3). Bars with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ). The experimental diets were prepared with supplementing different levels of histidine by 0, 0.26, 0.69, 1.11, 1.53, 1.95 and 2.37% (0.05, 0.24, 0.40, 0.62, 0.78, 0.93 and 1.13). ..... 38

Figure 4. Hemolymph analysis parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets with different levels of histidine for 56 days. Values are

means  $\pm$  S.D. (n=3). Bars with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ).

The experimental diets were prepared with supplementing different levels of histidine by 0, 0.26, 0.69, 1.11, 1.53, 1.95 and 2.37% (0.05, 0.24, 0.40, 0.62, 0.78, 0.93 and 1.13). ..... 40

Figure 5. Muscle composition of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets with different levels of histidine for 56 days. Values are means  $\pm$  S.D. (n=3). Bars with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ). The experimental diets were prepared with supplementing different levels of histidine by 0, 0.26, 0.69, 1.11, 1.53, 1.95 and 2.37% (0.05, 0.24, 0.40, 0.62, 0.78, 0.93 and 1.13). ..... 42

Figure 6. Relative mRNA expression of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets with different levels of histidine for 56 days. Values are means  $\pm$  S.D. (n=3). Bars with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ). The experimental diets were prepared with supplementing different levels of histidine by 0, 0.26, 0.69, 1.11, 1.53, 1.95 and 2.37% (0.05, 0.24, 0.40, 0.62, 0.78, 0.93 and 1.13). ..... 43

Figure 7. Based on quadratic regression analysis of the specific growth rate against the dietary histidine level, the optimal dietary histidine requirement for Pacific white shrimp was estimated to be 0.79% of the dry diet, corresponding to 21.9 g kg<sup>-1</sup> of dietary protein. .... 44

## LIST OF TABLES

### [EXP-1]

Table 1. The requirements of essential amino acids for Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	4
Table 2. Dietary formation and proximate composition of the experimental diets for Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> . ....	5
Table 3. Essential and non-essential amino acid composition of the experimental diets for Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	6
Table 4. Growth performance and feed utilization of Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> (initial mean body weight : 0.15 g) fed the experimental diets for 62 days. The experimental diets were prepared with supplementing different levels or molecular forms of histidine by 0, 0.3 and 1.2% (Con, C-0.3, C-1.2, D-0.3 and D-1.2). ....	17
Table 5. Whole body composition of Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> fed the experimental diets for 62 days (% , dry matter). The experimental diets were prepared with supplementing different levels or molecular forms of histidine by 0, 0.3 and 1.2% (Con, C-0.3, C-1.2, D-0.3 and D-1.2). ....	19
Table 6. Whole body amino acid composition of Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> fed the experimental diets for 62 days (% dry matter). The experimental diets were prepared with supplementing different levels or molecular forms of histidine by 0, 0.3 and 1.2% (Con, C-0.3, C-1.2, D-0.3 and D-1.2). ....	21
Table 7. Apparent digestibility coefficients (% , ADC) for dry matter and protein of Pacific white shrimp <i>L. vannamei</i> fed the experimental diets for 62 days. The experimental diets were prepared with supplementing different levels or molecular forms of histidine by 0, 0.3 and 1.2% (Con, C-0.3, C-1.2, D-0.3 and D-1.2). ....	22

## [EXP-2]

Table 1. Dietary formation and proximate composition of the experimental diets for Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> . .....	28
Table 2. Essential and non-essential amino acid composition of the experimental diets for Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> . .....	29
Table 3. Growth performance and feed utilization of Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> (initial mean body weight : 0.28 g) fed the experimental diets for 56 days. The experimental diets were prepared with supplementing different levels of histidine by 0, 0.26, 0.69, 1.11, 1.53, 1.95 and 2.37% (0.05, 0.24, 0.40, 0.62, 0.78, 0.93 and 1.13). .....	35
Table 4. Non specific Immune parameters of Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> (initial mean body weight : 0.28 g) fed the experimental diets for 56 days. The experimental diets were prepared with supplementing different levels of histidine by 0, 0.26, 0.69, 1.11, 1.53, 1.95 and 2.37% (0.05, 0.24, 0.40, 0.62, 0.78, 0.93 and 1.13). .....	37
Table 5. Muscle composition of Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> (initial mean body weight : 0.28 g) fed the experimental diets for 56 days (% , wet basis). The experimental diets were prepared with supplementing different levels of histidine by 0, 0.26, 0.69, 1.11, 1.53, 1.95 and 2.37% (0.05, 0.24, 0.40, 0.62, 0.78, 0.93 and 1.13). .....	39
Table 6. Hemolymph parameters of Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> (initial mean body weight : 0.28 g) fed the experimental diets for 56 days. The experimental diets were prepared with supplementing different levels of histidine by 0, 0.26, 0.69, 1.11, 1.53, 1.95 and 2.37% (0.05, 0.24, 0.40, 0.62, 0.78, 0.93 and 1.13). .....	41

## [실험 1]

# 흰다리새우 사료 내 histidine 의 형태(dipeptide, crystalline AA)에 따른 이용성 연구

### 1.1. 서론

흰다리새우는 사료 내 단백질을 주요 에너지원으로 이용하기 때문에 단백질과 아미노산(amino acid, AA)의 조성은 새우의 성장과 번식 등에 중요한 요소로 알려져 있다. 특히 사료 내 AA 의 균형은 새우의 영양에 있어 단백질 합성 뿐만 아니라 에너지원으로써 중요한 요소로 알려져 있다(Rønnestad and Conceição, 2005). 사료 섭이에 의해 섭취된 단백질은 새우의 체내에서 소화효소에 의해 가수분해되어, peptide (mono-, di-peptides) 또는 free AA 로 장에서 흡수된다(NRC, 2011). Senegal sole (*Solea senegalensis*)를 대상으로 한 연구에서 Free AA 는 dipeptide 에 비해 체내에서 비교적 빠르게 흡수되어, 혈액 내 AA 의 균형을 무너뜨려 단백질의 이용효율을 저하시킨다고 보고되었다(Rønnestad et al., 2000). 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서도 사료에 dipeptides (Leu-Gly, 5-15 g/kg<sup>-1</sup>)의 첨가는 crystalline AA (L-Leu, 5-15 g/kg<sup>-1</sup>)의 첨가에 비해 단백질의 이용효율이 높다고 보고되었다(Kim and Lee, 2013). 사료 내 dipeptide 의 첨가는 치어기 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)의 성장을 증진시키며, crystalline AA 보다 이용성이 높은 것으로 보고되었다(Terjesen et al., 2006). Dabrowski et al. (2003)은 치어기 무지개송어(*O. mykiss*) (0.79 g)를 대상으로 사료 내 dipeptide 와 crystalline AA 의 이용성을 비교한 결과, dipeptide 가 crystalline AA 에 비해 높은 성장을 보였으며, crystalline AA 가 dipeptide 에 비해 수질 암모니아성 질소(NH<sub>3</sub>-N)

농도를 높인다고 보고하였다. Crystalline AA 는 Dipeptide 보다 흡수와 대사가 빠르게 일어나기 때문에 비효율적이며, crystalline AA 를 이용하여 도출된 아미노산의 요구량은 실제 적정 요구량보다 높게 측정되었다고 보고되었다(Dabrowski et al., 2010). 기존의 어류 및 새우 사료 내 아미노산 요구량에 관한 연구들은 모두 crystalline AA 를 사용하였으며 이를 통해 규명된 요구량은 과대측정 되었을 가능성이 높다.

흰다리새우는 수온과 염분에 대한 내성이 강하고 단위 면적당 생산성이 높아 전 세계적으로 각광받고 있는 양식대상종이다. 흰다리새우는 배합사료만을 공급하여 단기간 사육(5-6 개월)으로도 출하할 수 있어, 그 생산량이 급속하게 증가하고 있다. 흰다리새우의 세계 양식 생산량은 2016 년도에 약 4,156 천 톤으로, 흰다리새우에 대한 수요가 높아, 그 생산량은 계속해서 증가할 것으로 예상되고 있다(FAO, 2018). 국내에서도 흰다리새우의 생산량은 2019 년도에 7,542 톤으로, 최근 7 년간 약 171% 증가하였다(KOSIS, 2020).

본 연구에서는 흰다리새우를 대상으로 사료 내 필수아미노산인 histidine 을 crystalline 과 dipeptide 형태로 첨가(0.3, 1.2%)하여 성장, 체조성, 소화율 및 비특이적 면역력에 미치는 영향을 평가하였다.

## 2.1. 재료 및 방법

### 2.1.1. 실험사료

실험사료는 아미노산 mixtures (histidine free)를 주단백질 원료로 사용한 반정제(semi-purified)사료를 이용하였고, 사료의 기호성을 증진시키기 위해 오징어간분말을 첨가해주었다. Histidine 을 첨가하지 않은 대조구(control, Con)에 2 가지 형태(crystalline, dipeptides)의 histidine 이 각각 0.3, 1.2%(C-0.3, C-1.2, D-0.3, D-1.2) 첨가된 실험구로, 총 5 개의 실험사료를 이용하였다. 실험사료의 조성표와 일반성분 함량은 Table 2 에 나타내었다. 실험사료는 아미노산을 제외한 사료원료를 혼합한 후, 500ml 크기의 플라스틱 통에 혼합된 사료원을 넣고, 4 회에 걸쳐 나누어 소량씩 다시 혼합해 주었다. 사료원 총 중량의 10%에 해당하는 증류수를 혼합물에 첨가한 후, 펠릿성형기(SP-50, 금강 ENG, Daegu, Korea)를 이용하여 실험사료를 제작하였다(Figure 1). 제작된 사료는 건조 후(24 시간), 사료공급 전까지 냉동 보관(-20°C)하였다. 실험사료 내 AA 의 조성은 Table 3 에 나타내었다.



Figure 1. Preparation of the experimental diets



Table 1. The requirements of essential amino acids in diet for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*.

EAA Studied <sup>1</sup>	IBW <sup>2</sup>	Diet CP <sup>3</sup>	EAA Level (% of diet) <sup>4</sup>	Estimated EAA Requirement <sup>5</sup>	Response variable	Reference
	0.10	35	1.2-2.3	1.6% of diet 4.5% of CP	Weight Gain	Fox et al. (1995)
Lysine	0.10	45	1.5-3.0	2.1% of diet 4.7% of CP	Weight gain	Fox et al. (1995)
	0.52	41.5	1.44-2.49	1.6% of diet 4.0% of CP	SGR <sup>6</sup>	Xie et al. (2012)
Arginine	0.50	41	1.44-2.74	2.0% of diet 4.8% of CP	SGR	Zhou et al. (2012)
	0.53	43	1.07-2.30	2.1% of diet 4.7% of CP	Weight gain	Zhou et al. (2013)
Threonine	0.48	36	0.99-1.90	1.4% of diet 3.8% of CP	SGR	Huai et al. (2009)
Isoleucine	0.43	41	0.96-2.20	1.6% of diet 3.9% of CP	Weight gain	Liu et al. (2014)
Leucine	0.38	41	1.67-3.02	2.4% of diet 5.8% of CP	Weight gain	Liu et al. (2014)
	0.43	40.5	0.26-0.51	0.37% of diet 0.89% of CP	Weight gain	Jin et al. (2016)
Tryptophan	0.63	46	0.43-1.03	0.36% of diet 1.72% of CP	Weight gain	Sun et al. (2016)
	0.55	40	0.7-1.23	0.91% of diet 2.3% of CP	Weight gain	Lin et al. (2015)
Methionine	1.97±0.14	36	0.48-0.94	0.72-0.81% of diet	Weight gain	Facanha et al. (2016)

<sup>1</sup>Essential amino acid studied.

<sup>2</sup>Initial body weight (g/shrimp).

<sup>3</sup>Diet crude protein (%).

<sup>4</sup>Essential amino acid level.

<sup>5</sup>Estimated essential amino acid requirement.

<sup>6</sup>Specific growth rate.

Table 2. Dietary formation and proximate composition of the experimental diets for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*.

Ingredients	Experimental diets				
	Con	C-0.3	C-1.2	D-0.3	D-1.2
FAA mix	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
Squid liver meal	5.31	5.31	5.31	5.31	5.31
Dextrin	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0
Starch	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0
His-Ala <sup>1</sup>	0.00	0.00	0.00	0.56	2.24
Histidine <sup>2</sup>	0.00	0.30	1.20	0.00	0.00
Alanine <sup>3</sup>	3.00	2.70	1.80	2.44	0.76
Fish oil	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
Mineral mix <sup>4</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Vitamin mix <sup>5</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Choline chloride	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Lecithin	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
MCP <sup>6</sup>	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
<i>*Proximate composition (% of dry matter)</i>					
Crude protein, %	36.5	36.3	37.0	36.6	36.7
Crude lipid, %	5.33	5.38	5.61	5.91	5.62
Crude ash, %	4.17	3.81	4.13	4.20	4.54
Moisture, %	8.87	8.74	8.74	9.57	9.69

<sup>1</sup>Histidine: Sigma Chemicals, L-Histidine

<sup>2</sup>Alanine: Sigma Chemicals, L-Alanine

<sup>3</sup>His-Ala : Swanson health products, L-Carnosine.

<sup>4</sup>Mineral premix (g kg<sup>-1</sup>of mixture): MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 80.0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 370.0; KCl, 130.0; Ferric citrate, 40.0; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 20.0; Ca-lactate, 356.5; CuCl<sub>2</sub>, 0.2; AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0.15; Na<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0.01; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 2.0; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 1.0

<sup>5</sup>Vitamin premix (g kg<sup>-1</sup>of mixture): L-ascorbic acid, 121.2; DL- $\alpha$  tocopheryl acetate, 18.8; thiamin hydrochloride, 2.7; riboflavin, 9.1; pyridoxine hydrochloride, 1.8; niacin, 36.4; Ca-D-pantothenate, 12.7; myo-inositol, 181.8; D-biotin, 0.27; folic acid, 0.68; p-aminobenzoic acid, 18.2; menadione, 1.8; retinylacetate, 0.73; cholecalciferol, 0.003; cyanocobalamin, 0.003. <sup>6</sup>MCP: monocalcium phosphate

Table 3. Essential and non-essential amino acid composition of the experimental diets for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*.

Ingredient	Experimental diets				
	Con	C-0.3	C-1.2	D-0.3	D-1.2
<i>EAA</i> <sup>1</sup>					
Histidine	0.04	0.26	1.01	0.32	1.08
Arginine	2.48	2.62	2.76	2.80	2.63
Isoleucine	0.83	0.97	1.24	1.33	0.99
Leucine	1.71	2.05	2.36	2.45	2.09
Lysine	0.29	0.57	0.78	1.64	0.43
Phenylalanine	0.94	1.18	1.29	1.37	0.99
Threonine	0.92	1.15	1.29	1.33	1.05
Valine	1.08	1.39	1.70	1.72	1.37
<i>NEAA</i> <sup>2</sup>					
Alanine	3.71	4.31	4.33	4.85	2.76
Aspartic acid	1.42	2.21	2.76	3.51	1.98
Glycine	2.35	2.70	2.96	3.27	2.46
Glutamic acid	3.95	5.50	6.25	5.95	5.00
Proline	0.02	0.04	0.07	0.14	0.05
Serine	0.08	0.10	0.11	0.11	0.10
Tyrosine	0.05	0.07	0.07	0.07	0.06

<sup>1</sup>Essential amino acid

<sup>2</sup>Non-essential amino acid

### 2.1.2. 실험새우 및 사육관리

실험에 사용된 흰다리새우는 충남 서산에 위치한 새우양식장에서 구입하여 제주대학교 양어사료영양학연구실 내 새우전용 사양실험 시설에서 실험을 진행하였다. 실험용 새우는 2 주 동안 시판 배합사료를 공급하면서 실험환경에 적응할 수 있도록 순치시킨 후 사료공급 실험에 사용하였다. 예비사육 후 흰다리새우(초기평균무게: 0.15 g)는 총 20 개의 96 L 수조에 각 15 마리씩 무작위로 선택하여 배치되었다(Figure 2). 모든 실험수조에 용존산소 유지를 위하여 에어스톤을 설치하였고, 62 일간의 실험기간 동안 사육수온은 27-29°C 범위로 유지되었다. 광주기는 형광등을 이용하여 12L:12D 로 유지하였다. 사료공급은 1 일 4 회(08:30, 11:30, 15:00, 18:00 h)에 나누어 제한공급(새우 체중의 8%)하였다.



Figure 2. Experimental rearing tank for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*

### 2.1.3. 실험새우 무게측정

실험새우의 무게측정은 사육실험 종료 후 실시하였고, 사료공급은 실험새우의 스트레스를 최소화 하기 위해 측정 18 시간 전부터 절식시켰다. 최종무게 측정 후(Figure 3), 수조 당 3 마리(실험구 당 12 마리)의 실험새우를 무작위로 선별하여, 얼음물에 마취 시킨 후, 간체장을 적출하였다. 간체장은 액체질소에 넣어 급속 냉동 시킨 후, IGF-BP (insulin-like growth factor binding proteins) 유전자발현 분석에 사용되기 전까지 초저온냉동고(-80°C)에 보관되었다. 실험새우의 성장률과 사료효율 관련 조사항목과 계산식은 다음과 같다.

성장률(weight gain, WG, %) =  $100 \times (\text{final mean body weight} - \text{initial mean body weight}) / \text{initial mean body weight}$ ; 사료효율(feed conversion ratio, FCR) =  $\text{dry feed fed} / \text{wet weight gain}$ ; 단백질이용효율(protein efficiency ratio, PER) =  $\text{wet weight gain} / \text{total protein given}$ ; 일간성장률(specific growth rate, SGR, %) =  $[(\log_e \text{ final body weight} - \log_e \text{ initial body weight}) / \text{days}] \times 100$ .



Figure 3. Measurement of shrimp body weight in every 2 weeks during 62 days feeding trial

#### 2.1.4. 일반성분분석

사료원료, 실험사료, 분(feces), 전하체에 대한 일반성분분석은 AOAC (1995) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125°C, 3 h), 조회분은 직접회화로법(550°C, 6 h), 단백질은 자동 조단백분석기(Kejltac system 2300, Sweden)로 분석하였으며, 지방은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 Soxhlet 추출장치(Soxhlet Heatersystem C-SH6, Korea)를 이용하여 분석하였다.

#### 2.1.5. 사료의 외관상소화율 측정

특수실험 사료는 각 실험사료에 지시제인 산화크롬(chromium oxide, Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)를 1% 첨가하여 제조하였다. 실험사료는 사료원들을 혼합기에 넣어 혼합 후, 사료원 총 중량의 약 15%에 해당하는 증류수를 첨가하였다. 혼합반죽물은 펠렛성형기(SP-50, Gungang ENG, Daegu, Korea)를 이용하여 알맞은 크기(2 mm)로 성형하였다. 성형된 사료는 건조기로 24 h 건조시킨 후 사료공급 전까지 -20°C에 냉동 보관하여 사용하였다.

흰다리새우의 분은 총 5 개의 acrylonitrile butadiene styrene (ABS) 수조(215 L)에 각 30 마리씩 배치하여 수집되었다. 사료공급은 1 일 3 회(08:30, 13:00, 17:30 h), 분(feces) 수집은 1 일 2 회(11:30, 16:00 h) 실시하였다. 사료공급 30 분 후, 수조 내 남은 사료와 찌꺼기는 siphoning 을 이용하여 제거 되었다. 수집된 분은 여과지를 이용하여 해수를 제거하고 냉동보관(-80°C)되었다.

실험사료와 분에서의 지시제로 사용된 chromium oxide 함량은 Divakaran et al. (2002)의 방법을 토대로 분석하였다(Figure 4). 실험사료 및 분 샘플은 회화로(550°C)에서 3 h 동안 회화한 후 얻어진 시료를 분석에 사용하였다. Chromium oxide 를 mono-chromate 형태로 산화시키기 위해 샘플 5-10 mg 을

측량하여 glass test tube 에 옮긴 후, perchloric reagent (HClO<sub>4</sub>) 4 ml 를 첨가하였다. 시료와 perchloric reagent 가 첨가된 tube 를 가열판에 넣고 320°C에서 15 min 간 가열한 후 유리플라스크에 옮겨 3 차 증류수를 이용하여 25 ml 가 되도록 정량하였다. 그 후 분광광도계(Beckman DU-730, USA)를 이용하여 350 nm 에서 흡광도를 측정하여 시료의 chromium oxide 함량을 계산하였다. 실험사료 내 영양소의 소화율은 다음과 같은 식에 의해 계산하였다.

Apparent digestibility coefficient of dry matter (% , ADCd) = 100-100×(% of Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in diet / % of Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in feces); Apparent digestibility coefficient of protein (% , ADCp) = 100-100×(% of Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in diet / % of Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in feces) ×(% of protein in feces / % of protein in diet).

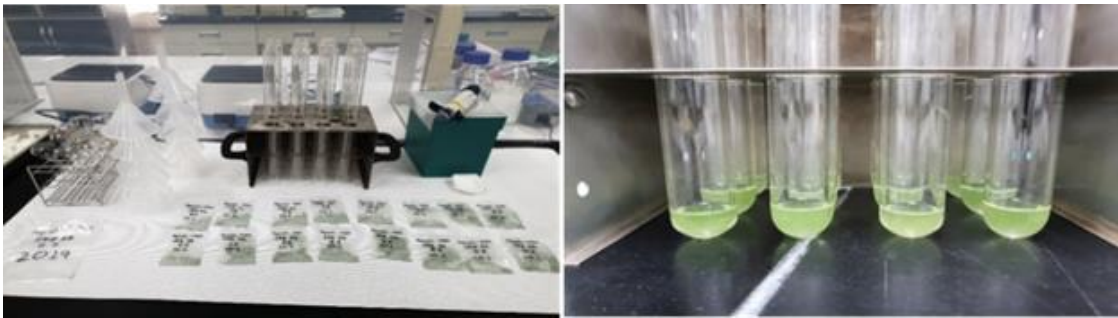


Figure 4. Analysis of chromic oxide concentration in shrimp feces



### 2.1.6. RNA 추출 및 cDNA 합성

RNA는 TRIzol® (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 추출하였다. RNA purity는  $\mu$ Drop™Plate (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 측정하여 확인하였다. cDNA는 분리한 RNA 2.5 $\mu$ g과 reaction mixture를 총 볼륨 20 $\mu$ L로 맞추어 PrimeScript™ first-strand cDNA synthesis kit (TaKaRa, Shiga, Japan)를 이용하여 합성하였다. 합성한 cDNA는 nuclease free water에 100배로 희석하여 IGF-BP 분석을 수행하기 전까지 -80°C 초저온냉동고에 보관하였다(Figure 5).



Figure 5. Measurement of mRNA concentration and cDNA synthesis for the qPCR analysis

### 2.1.7. qPCR (quantitative real-time PCR)에 의한 유전자 발현 분석

qPCR을 수행하여 간척장에서 흰다리새우의 IGF-BP의 발현량을 알아보하고자 하였다. Reference gene으로는  $\beta$ -actin을 사용하였고 forward (5'-GAGCAACACGGAGTTCGTTGT-3'), reverse (5'-CATCACCAACTGGGACGACATGGA-3')의 oligonucleotide primer를 사용하였다. IGF-BP의 oligonucleotide primer는 forward (5'-GTGGGCAGGGACCAAATC-3') & reverse (5'-TCAGTTACCACCAGCGATT-3')를 사용하였다. qPCR은 Real Time System



TP 950 Thermal Cycler Dice™ (TaKaRa)를 이용하여 진행하였고, 3 $\mu$ l의 cDNA, 5 $\mu$ l의 TaKaRa Ex Taq™SYBR premix, 0.4 $\mu$ l의 forward & reverse primer, 1.2 $\mu$ l H<sub>2</sub>O를 넣어 총 볼륨을 10 $\mu$ l로 맞추어 분석을 진행하였다(Figure 6).

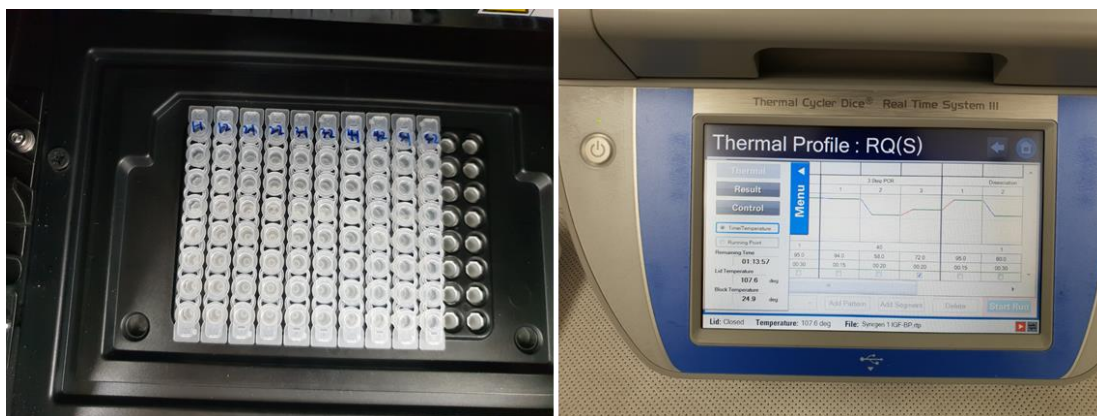


Figure 6. Relative mRNA expression of Insulin-like growth factor binding proteins (IGF-BP) for the qPCR analysis.

### 2.1.8. 통계학적 분석

실험사료의 배치는 완전확률계획법(Completely randomized design)을 실시하였고, 성장 및 분석결과는 SPSS (Version 11.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA 로 통계 분석되었다. 데이터 값의 유의차는 Tukey's HSD test ( $P < 0.05$ )로 비교하였다. 데이터는 평균값  $\pm$  표준편차(mean  $\pm$  SD)로 나타내었다. 백분율 데이터는 arcsine 변형값으로 계산하여 통계 분석하였다.

### 3.1. 결과

62 일 동안의 사육실험 결과, 실험새우의 최종평균무게, 성장률, 일간성장률은 dipeptide 구(D-0.3, 1.2)가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. 특히 D-1.2 실험구가 대조구에 비해 각 14.9, 16.8, 7.0% 증가하여 가장 높은 차이를 나타내었다(Table 4, Figure 7) ( $P < 0.05$ ).

사료전환효율, 단백질이용효율, 생존율은 실험구와 대조구 사이에 유의적인 차이가 없었지만 D-0.3 실험구가 대조구에 비해 각 15.4, 14.8, 10.4% 증가하여 가장 높은 차이를 나타내었다( $P > 0.05$ ).

Crystalline 구는 모든 성장결과에서 대조구와 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다( $P > 0.05$ ).

실험새우의 구성 아미노산의 조성, 조단백질, 조지질, 조회분 함량은 모든 실험구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 5, 6, Figure 8) ( $P > 0.05$ ).

실험새우의 건물소화율은 D-1.2, C-1.2 구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. 단백질소화율은 D-0.3, 1.2, C-1.2 구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. 특히 D-1.2 실험구가 대조구에 비해 각 6.2, 6.9% 증가하여 가장 높은 차이를 나타내었다(Table 7, Figure 9) ( $P < 0.05$ ).

실험새우 간체장의 IGF-BP 발현량은 D-1.2 구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. 특히 D-1.2 실험구가 대조구에 비해 234% 증가하여 가장 높은 차이를 나타내었다(Figure 10) ( $P < 0.05$ ).

## 4.1. 고찰

본 연구에서 dipeptide 형태의 histidine은 crystalline AA보다 이용성이 높았다. 일반적으로 단백질은 소화효소의 작용을 통해 free 혹은 peptide (di-, tri-)형태로 가수분해 된 후, Na<sup>+</sup>-dependent amino acid transporter system (Na<sup>+</sup> transporter system)을 통해 장 내에 흡수되거나 방출된다(Zhang et al., 2006). Peptide transporter-1 (PepT-1)은 주로 소장 내 Na<sup>+</sup> transporter system에서 dipeptide와 tripeptide의 흡수를 주로 담당하는 수송체이다(Daniel and Kottra, 2004; Bröer, 2008; Verri et al., 2017). 어류의 경우 PepT-1는 소장의 근위부(proximal)에서 원위부(distal region)까지 넓은 범위에 걸쳐 분포하고 있어, 장 전체 에서 peptide를 효과적으로 흡수할 수 있다고 보고되었다(Rønnestad et al., 2010; Terova et al., 2013; Xu et al., 2016). 어류의 경우, crystalline AA는 peptides (intact protein)보다 빠르게 흡수되지만, 조직 내 아미노산 pool의 균형을 무너뜨려 단백질의 합성을 저하시키는 것으로 알려져 있다(Cowey and Walton, 1988; Berge et al., 1994). Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), 잉어, 넙치, 터봇(*Scophthalmus maximus*)에서도 dipeptide가 crystalline AA 보다 성장과 근육 내 단백질의 합성면에서 이용성이 높다고 보고되었다(Tesser et al., 2005; Kwasek et al., 2010; Kim and Lee, 2013; Wei et al., 2020). 따라서, dipeptide는 crystalline AA에 비해 소화기관에서의 흡수되는 범위가 넓기 때문에 흰다리새우 사료에서 이용성이 비교적 높게 나타난 것으로 판단된다.

본 연구에서 사료 내 두 종의 histidine 첨가는 새우의 일반 성분과 아미노산 조성에 영향을 미치지 않았다. 어류 및 새우의 whole-body 내 AA 조성은 일반적으로 사료 내 AA 요구량을 나타내는 지표로 사용되어 왔다(Bicudo and Cyrino, 2009). 이번 연구결과와 유사하게 common carp 를 대상으로 아미노산과 dipeptide의 이용성을 비교한 연구에서도 이와 유사한 결과를 나타냈다(Zhang et al.,

2006).

본 연구에서 사료 내 dipeptide의 첨가는 crystalline AA 보다 효율적으로 체내에 흡수되어 새우의 소화율을 증진시키는 것으로 나타났다. Peptides는 섭취된 단백질이 내강(lumen) 또는 위장관 세포에서 빠르게 분해되어 아미노산의 형태로 흡수된다(NRC, 2011). 어류의 경우, 체내에 PepT-1의 활성을 띄는 것으로 확인되어, free 아미노산 뿐만 아니라, peptide와 같은 intact protein 이 다른 대사경로를 통해 체내로 흡수되는 것으로 알려져 있다(Verri et al., 2011). 무지개송어와 차널메기를 대상으로한 연구에서 crystalline AA는 peptides (intact protein)보다 소화관에서 비교적 빠르게 흡수 된다고 보고되었다(Murai et al., 1987; Cowey and Walton, 1988; Tantikitti and March, 1995; Zarate and Lovell, 1997; Zarate et al., 1999). Luo et al. (2005)은 crystalline AA는 어류의 조직에서 빠르게 흡수되나, 조직 내 아미노산 pool의 불균형을 초래하기 때문에 intact protein에서 분해된 아미노산보다 이용효율이 낮다고 보고하였다.

이번 연구에서 사료 내 dipeptide 의 첨가는 새우의 IGF-BP 의 발현을 증진시키는 것으로 나타났다. insulin-like growth factor-I (IGF-I)은 70 개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드로서 척추동물의 성장호르몬을 매개로 간에서 생성된다(Nam et al., 2001). IGF-I은 세포의 대사와 단백질 합성을 촉진하여 포유동물의 성장에 중요한 역할을 한다(Baxter, 1993; Cohich and Clemmons, 1993). IGF-BP 는 IGF-I을 조직 내 표적세포까지 운반해줄 뿐만 아니라, IGF-I과 결합하여 다른 세포의 수용체와 부착하는데 중요한 역할을 한다(Nam et al., 2001). Wilson-Arop et al. (2018)은 blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) 사료 내 histidine 의 첨가(1.1%)는 IGF-I의 발현을 증진시킨다고 보고하였다. 어류 사료 내 필수아미노산의 함량은 IGF-I 발현에 직·간접적으로 영향을 미친다고 보고되었다(Dyer et al., 2004; Li et al., 2006). 흰다리새우에서도 사료 내 tryptophan 이

결핍될 경우, IGF-I의 합성을 감소시킨다고 보고하였다(Jin et al., 2017). 따라서 흰다리새우 사료 내 dipeptide 는 아미노산으로써 그 요구량 충족시킬 수 있을 뿐만 아니라, crystalline AA 보다 그 이용성이 높은 것으로 판단된다. 그러나, dipeptide 에 대한 정확한 작용기전이 밝혀지지 않아 이에 대한 보충연구가 요구된다.

Table 4. Growth performance and feed utilization of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (initial mean body weight: 0.15 g) fed the experimental diets for 62 days. The experimental diets were prepared with supplementing different levels or molecular forms of histidine by 0, 0.3 and 1.2% (Con, C-0.3, C-1.2, D-0.3 and D-1.2)

Dietary treatment	FBW <sup>1</sup>	WG <sup>2</sup>	SGR <sup>3</sup>	FCR <sup>4</sup>	PER <sup>5</sup>	Survival
Con	1.01±0.06 <sup>b</sup>	595±33.4 <sup>b</sup>	3.28±0.08 <sup>b</sup>	1.95±0.25	1.42±0.19	80.0±23.7
C-0.3	1.07±0.07 <sup>ab</sup>	632±54.4 <sup>ab</sup>	3.37±0.13 <sup>ab</sup>	1.70±0.07	1.62±0.06	83.3±17.6
C-1.2	1.09±0.03 <sup>ab</sup>	644±14.4 <sup>ab</sup>	3.40±0.03 <sup>ab</sup>	1.80±0.07	1.51±0.06	86.7±9.43
D-0.3	1.15±0.06 <sup>a</sup>	689±36.8 <sup>a</sup>	3.50±0.08 <sup>a</sup>	1.69±0.13	1.63±0.13	88.3±3.33
D-1.2	1.16±0.06 <sup>a</sup>	695±41.2 <sup>a</sup>	3.51±0.09 <sup>a</sup>	1.87±0.22	1.47±0.18	85.0±11.4

<sup>1</sup>FBW: final body weight (g)

<sup>2</sup>Weight gain (%) = 100 x (final mean body weight – initial mean body weight)/initial mean body weight,

<sup>3</sup>Specific growth ratio (% day<sup>-1</sup>) = [(loge final body weight - loge initial body weight)/days] x 100

<sup>4</sup>Feed conversion ratio = dry feed fed (g) / wet weight gain (g)

<sup>5</sup>Protein efficiency ratio = wet weight gain /total protein given.

Values are mean of triplicate groups and presented as mean ± S.D. Values with different superscripts in the same column are significantly different ( $P<0.05$ ). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

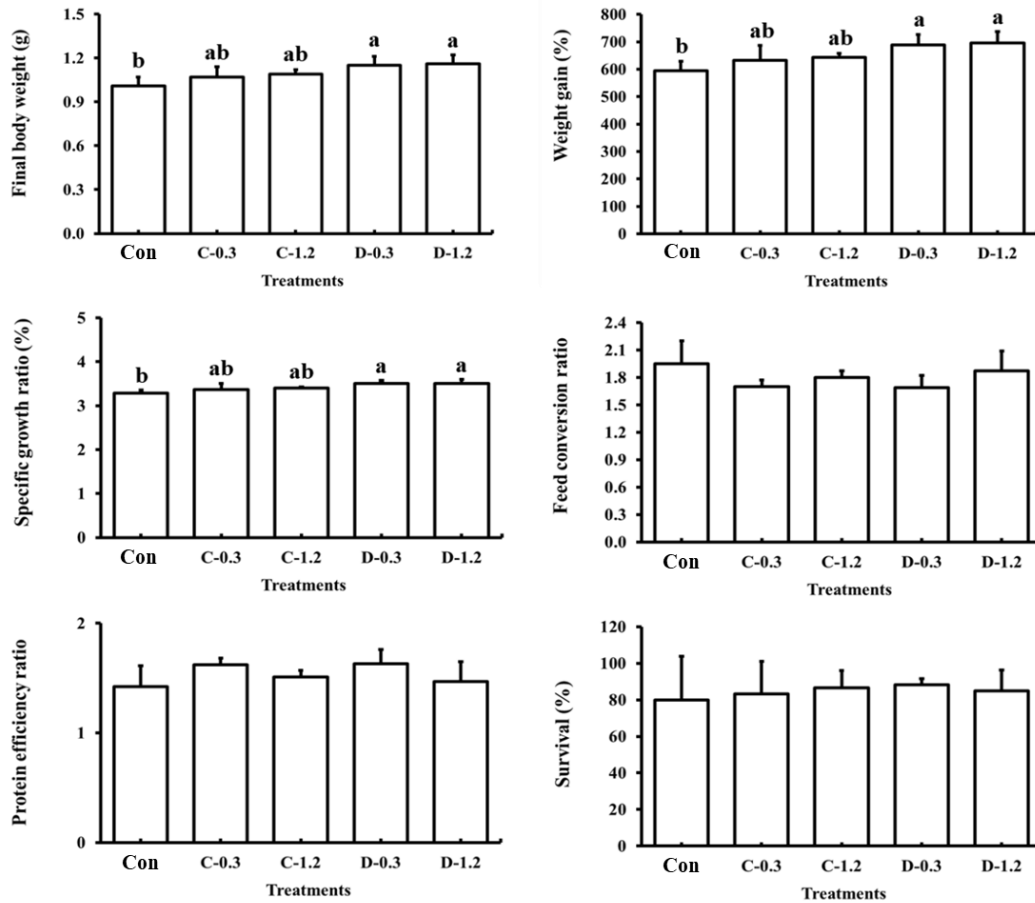


Figure 7. Growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets with different levels or molecular forms of histidine for 62 days. Values are mean of triplicate groups and presented as mean  $\pm$  S.D. Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). The experimental diets were prepared with supplementing different levels or molecular forms of histidine by 0, 0.3 and 1.2% (Con, C-0.3, C-1.2, D-0.3 and D-1.2)

Table 5. Whole body composition of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets for 62 days (% of dry matter). The experimental diets were prepared with supplementing different levels or molecular forms of histidine by 0, 0.3 and 1.2% (Con, C-0.3, C-1.2, D-0.3 and D-1.2).

Dietary treatment	Crude protein	Crude lipid	Crude Ash
Con	69.9±3.83	3.08±0.26	18.0±2.48
C-0.3	74.0±0.03	2.85±0.18	15.7±1.45
C-1.2	71.4±1.81	3.23±0.20	16.8±0.48
D-0.3	72.3±2.46	3.12±0.21	16.5±0.21
D-1.2	72.0±2.36	3.24±0.30	16.0±0.42

Values are mean of triplicate groups and presented as mean ± S.D. Values with different superscripts in the same column are significantly different ( $P<0.05$ ). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.



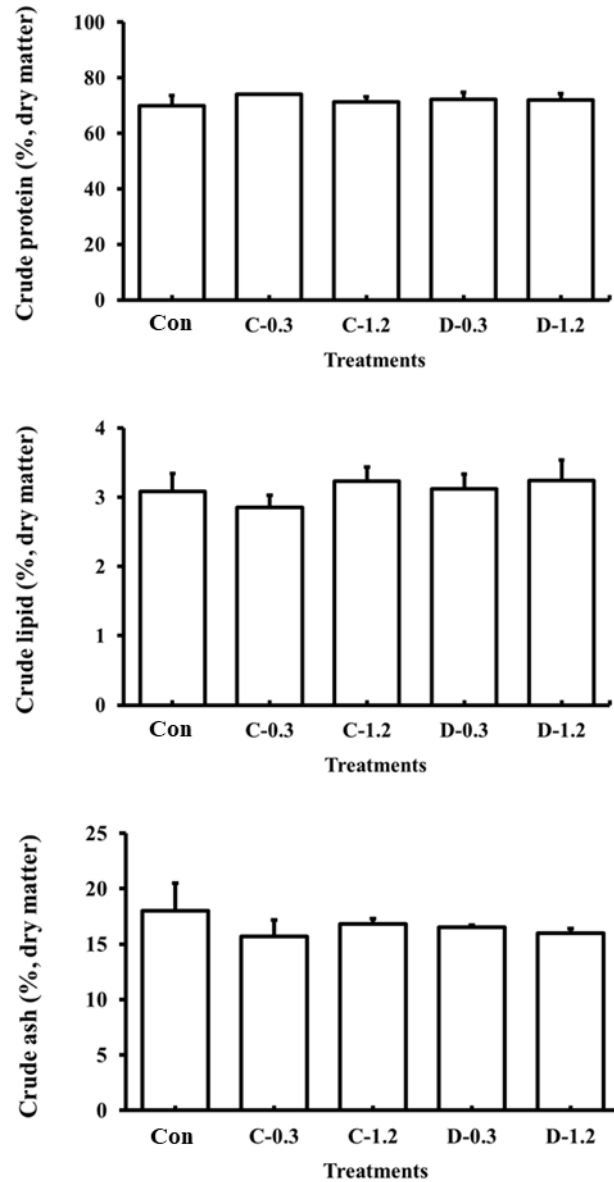


Figure 8. Whole body composition of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets with different levels or molecular forms of histidine for 62 days. Values are mean of triplicate groups and presented as mean  $\pm$  S.D. Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). The experimental diets were prepared with supplementing different levels or molecular forms of histidine by 0, 0.3 and 1.2% (Con, C-0.3, C-1.2, D-0.3 and D-1.2).

Table 6. Whole body amino acid composition of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets for 62 days (% dry matter). The experimental diets were prepared with supplementing different levels or molecular forms of histidine by 0, 0.3 and 1.2% (Con, C-0.3, C-1.2, D-0.3 and D-1.2).

Essential amino acids	Experimental diets (added histidine level, %)				
	Con	C-0.3	C-1.2	D-0.3	D-1.2
Arginine	6.24	6.15	6.08	6.27	6.34
Lysine	4.40	4.38	4.37	4.56	4.49
Threonine	2.44	2.50	2.47	2.52	2.48
Phenylalanine	2.72	2.74	2.75	2.87	2.79
Isoleucine	2.54	2.57	2.56	2.68	2.64
Leucine	4.30	4.30	4.26	4.44	4.37
Histidine	2.96	3.23	3.13	3.02	2.91
Valine	2.89	2.92	2.89	3.03	2.98

Values are mean of triplicate groups and presented as mean  $\pm$  S.D. Values with different superscripts in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

Table 7. Apparent digestibility coefficients (% ADC) for dry matter and protein of Pacific white shrimp *L. vannamei* fed the experimental diets for 62 days. The experimental diets were prepared with supplementing different levels or molecular forms of histidine by 0, 0.3 and 1.2% (Con, C-0.3, C-1.2, D-0.3 and D-1.2).

Dietary treatment	ADC <sub>d</sub> <sup>1</sup>	ADC <sub>p</sub> <sup>2</sup>
Con	72.8±0.53 <sup>c</sup>	82.4±0.35 <sup>c</sup>
C-0.3	74.6±1.23 <sup>bc</sup>	83.1±0.82 <sup>c</sup>
C-1.2	75.5±1.25 <sup>ab</sup>	86.0±0.71 <sup>b</sup>
D-0.3	75.0±2.08 <sup>abc</sup>	84.8±1.27 <sup>b</sup>
D-1.2	77.3±0.91 <sup>a</sup>	88.1±0.48 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Apparent digestibility coefficient of dry matter (%)

<sup>2</sup>Apparent digestibility coefficient of protein (%)

Values are mean of triplicate groups and presented as mean ± S.D. Values with different superscripts in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

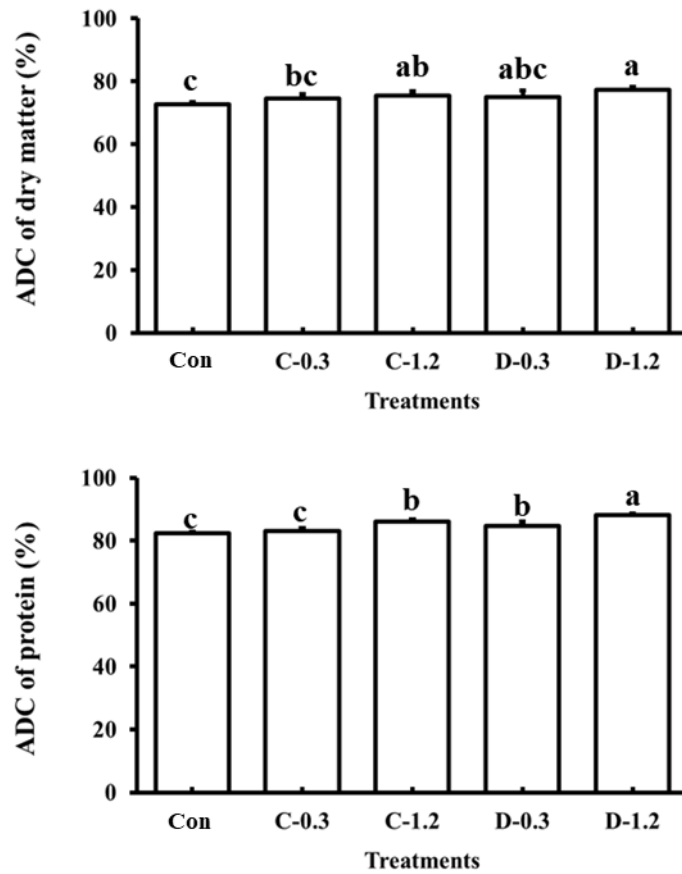


Figure 9. Apparent digestibility coefficients (% ADC) for dry matter and protein of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets with different levels or molecular forms of histidine for 62 days. Values are mean of triplicate groups and presented as mean  $\pm$  S.D. Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). The experimental diets were prepared with supplementing different levels or molecular forms of histidine by 0, 0.3 and 1.2% (Con, C-0.3, C-1.2, D-0.3 and D-1.2).

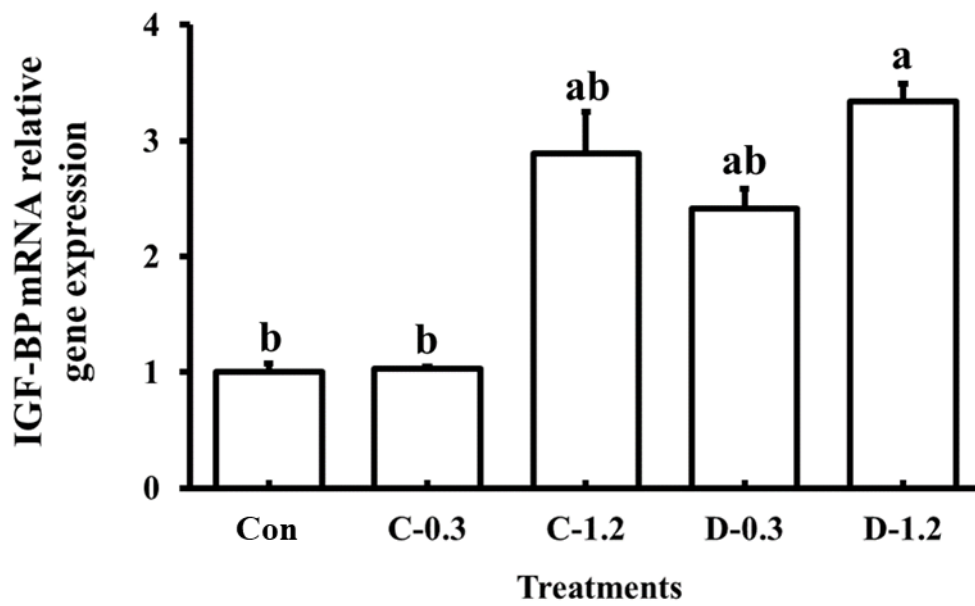


Figure 10. Relative mRNA expression of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets with different levels or molecular forms of histidine for 62 days. Values are mean of triplicate groups and presented as mean  $\pm$  S.D. Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). The experimental diets were prepared with supplementing different levels or molecular forms of histidine by 0, 0.3 and 1.2% (Con, C-0.3, C-1.2, D-0.3 and D-1.2).

## [실험 2]

# Carnosine 을 이용한 흰다리새우 사료 내 histidine 요구량 연구

### 1.2. 서론

Histidine 은 생물의 체내에서 합성되지 않아 반드시 먹이를 통해 섭취해야만 하는 필수아미노산 중 하나이다(NRC, 2011). Histidine 은 어류 체내 근육의 pH 완충 및 삼투압을 조절하는 역할을 하며, 사료 내 적절한 histidine 의 첨가는 체내 단백질 합성과 성장 증진, 근육 내의 histidine 함량 증진에 도움을 주는 것으로 알려져 있다(Forde-Skjaevik et al., 2006; Waagbo et al., 2010; Farhat, 2013). Glover et al. (2003)은 무지개송어(*O. mykiss*) 사료 내 적절한 histidine 첨가는 장 내에 아연(zinc)의 흡수를 증진시켜 소화효소(amylase, protease, lipase)의 촉진에 도움을 준다고 보고하였다. Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) 사료 내 histidine 첨가는 간채장과 근육 내 glutamate pyruvate transaminase (GPT) 함량을 증진시킨다고 보고되었다(Zhao et al., 2012). GPT 는 주로 간과 근육에서 histidine 의 신진대사 생성물인 carnosine ( $\beta$ -alanine-L-histidine)의 합성에 관여하는 물질이다(Stifel and Herman, 1971). 어류 및 새우 사료 내 histidine 이 결핍 될 경우, 성장 감소, 척추 전만(lordosis), 식욕 부진, 백내장(cataract)을 일으킨다고 보고되었다(Breck et al., 2005; NRC, 2011; Michelato et al., 2017). 사료 내 histidine 의 요구량에 관한 연구는 어류의 경우, 차넬메기(*Ictalurus punctatus*) (1.54%, Wilson et al., 1980), chum salmon (*Oncorhynchus keta*) (1.6%, Akiyama et al., 1985), 잉어 (2.1%, Nose, 1979), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (3.1%, Michelato et al., 2017),

무지개송어 (1.1%, Rodehutschord et al., 1997), gilthead sea bream (*Sparus auratus*) (1.7%, Kaushik, 1998), african catfish (*Clarias gariepinus*) (1.0%, Khan and Abidi, 2009)를 대상으로 진행되었다. 그러나, 새우의 경우에는 kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*) (0.5-0.7%, Teshima et al., 2002), 홍다리얼룩새우(*P. monodon*) (0.8%, Millamena et al., 1999)를 대상으로 일부 연구만 진행되었고, 흰다리새우를 이용한 연구는 전무한 실정이다(Table 1).

Carnosine 은  $\beta$ -alanine 과 L-histidine 이 결합된 dipeptide 이며 동물의 두뇌, 신경, 근육에 많이 함유되어 있다(Sale et al., 2013). Caronsine 은 근육 내 지방과 단백질의 산화를 억제하며(Nagasawa et al., 2001), 장 내에 pro-inflammatory cytokines 를 제거하여 염증반응을 감소시킨다고 보고되었다(Shimizu, 2004; Son et al., 2008). Karabulut-Bulan et al. (2017)은 흰 쥐(albino mice)에 canosine (250 mg/kg<sup>-1</sup>)을 정맥 주사(intravenous injection, IV)하면 장 내 염증반응을 감소시킨다고 보고하였다. 무지개송어(79.1 g $\pm$ 1.15 g)의 경우, 사료 내 carnosine (3.9 g/kg<sup>-1</sup>)의 첨가는 무첨가구에 비해 성장률과 사료효율을 유의적으로 증가시키지 못한 것으로 보고되었다(Snyder et al., 2015).

대두박(soybean meal)은 단백질 함량이 높고(40-60%), 가격이 어분(fish meal)에 비해 저렴하여 새우 양식 사료에 주 단백질원료로 사용되고 있다(Amaya et al., 2007; Suárez et al., 2009). 그러나, 대두박은 제한아미노산의 부족으로 어분에 비해 사료에 대량으로 첨가(45-55%)할 경우, 새우의 성장률을 저하시키는 것으로 보고되었다(Lim and Dominy, 1990). 사료의 부적합한 AA 조성은 새우의 성장을 감소시키거나 사료비용을 증가시키는 결과를 초래한다. 단백질은 양식 사료에 있어 감안하여야 할 가장 중요한 영양소로써 이러한 단백질을 구성하는 각 AA 의 조성 및 각 요구량 설정은 새우의 성장과 배합사료의 비용 절감을 위해

매우 중요하다. 따라서 흰다리새우 양식산업의 지속 가능한 개발을 위해서는 정확한 영양소 요구량 자료를 기반으로 만들어진 사료의 개발이 요구된다(Peres and Oliva-Teles, 2006).

## 2.2. 재료 및 방법

### 2.2.1. 실험사료

실험사료는 아미노산 mixtures (histidine free)를 주단백질 원료로 사용한 반정제(semi-purified)사료를 이용하였고, 기호성을 증진시키기 위해 오징어간분말을 첨가해주었다. Histidine 을 첨가하지 않은 대조구(Control, 0.05)에 dipeptides 형태의 histidine 을 각 0, 0.26, 0.69, 1.11, 1.53, 1.95, 2.37%(0.05, 0.24, 0.40, 0.62, 0.78, 0.93, 1.13) 첨가된 실험구로 총 7 개의 실험사료를 이용하였다. 실험사료 조성표와 일반성분 함량은 Table 1 에 나타내었다. 실험사료는 아미노산을 제외한 사료원료를 혼합한 후, 500 ml 크기의 플라스틱 통에 혼합된 사료원을 넣고, 4 회에 걸쳐 나누어 소량씩 다시 혼합해 주었다. 사료원 총 중량의 10%에 해당하는 증류수를 첨가 한 후, 펠릿성형기(SP-50, 금강 ENG, Daegu, Korea)를 이용하여 실험사료를 제작하였다. 제작된 사료는 건조 후(24 시간), 사료공급 전까지 냉동 보관(-20°C)하였다. 실험사료 내 AA 의 조성은 Table 2 에 나타내었다.



Table 1. Dietary formation and proximate composition of the experimental diets for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*.

Ingredients	Diets (added histidine level %)						
	0.05	0.24	0.40	0.62	0.78	0.93	1.13
FAA mix	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0	33.0
Squid liver meal	5.31	5.31	5.31	5.31	5.31	5.31	5.31
Dextrin	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0
Starch	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0
His-Ala <sup>1</sup>	0.00	0.26	0.69	1.11	1.53	1.95	2.37
Alanine <sup>2</sup>	3.00	2.74	2.31	1.89	1.47	1.05	0.63
Fish oil	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
Mineral mix <sup>3</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Vitamin mix <sup>4</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Choline chloride	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Lecithin	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
MCP <sup>5</sup>	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
<i>*Proximate composition result (% DM)</i>							
Crude protein, %	35.7	35.7	35.5	36.0	35.8	36.4	36.4
Crude lipid, %	6.00	5.88	6.19	6.65	6.69	6.77	6.42
Crude ash, %	4.72	4.67	4.71	4.69	4.75	4.78	4.74
Moisture, %	10.5	10.4	9.60	9.90	9.48	9.91	9.48

<sup>1</sup>His-Ala : Swanson health products, L-Carnosine

<sup>2</sup>Alanine: Sigma Chemicals, L-Alanine

<sup>3</sup>Mineral premix (g kg<sup>-1</sup> of mixture): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 80.0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 370.0; KCl, 130.0; Ferric citrate, 40.0; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 20.0; Ca-lactate, 356.5; CuCl<sub>2</sub>, 0.2; AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.15; Na<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0.01; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2.0; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.0

<sup>4</sup>Vitamin premix (g kg<sup>-1</sup> of mixture): L-ascorbic acid, 121.2; DL- $\alpha$  tocopheryl acetate, 18.8; thiamin hydrochloride, 2.7; riboflavin, 9.1; pyridoxine hydrochloride, 1.8; niacin, 36.4; Ca-D-pantothenate, 12.7; myo-inositol, 181.8; D-biotin, 0.27; folic acid, 0.68; p-aminobenzoic acid, 18.2; menadione, 1.8; retinylacetate, 0.73; cholecalciferol, 0.003; cyanocobalamin, 0.003

MCP<sup>5</sup> : Monocalcium phosphate

Table 2. Essential and non-essential amino acid composition of the experimental diets for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*.

Ingredients	Diets (added histidine level %)						
	0.05	0.24	0.40	0.62	0.78	0.93	1.13
<i>EAA</i> <sup>1</sup>							
Arginine	2.29	2.15	2.15	2.11	2.18	2.11	2.33
Histidine	0.05	0.24	0.40	0.62	0.78	0.93	1.13
Isoleucine	1.65	1.63	1.58	1.58	1.61	1.58	1.69
Leucine	2.64	2.63	2.63	2.60	2.64	2.60	2.75
Lysine	2.09	2.11	2.10	2.08	2.08	2.08	2.16
Phenylalanine	1.81	1.79	1.79	1.77	1.79	1.77	1.86
Threonine	1.35	1.33	1.37	1.32	1.34	1.32	1.37
Valine	1.79	1.77	1.70	1.72	1.73	1.72	1.82
<i>NEAA</i> <sup>2</sup>							
Alanine	3.62	3.61	3.59	3.61	3.58	3.61	2.66
Aspartic acid	3.49	3.46	3.48	3.50	3.48	3.50	3.65
Glycine	1.67	1.69	1.69	1.77	1.66	1.77	1.71
Glutamic acid	7.53	7.34	7.38	7.30	7.36	7.30	7.72
Proline	2.11	1.98	2.12	2.15	2.05	2.15	2.16
Serine	1.59	1.57	1.67	1.58	1.63	1.58	1.69
Tyrosine	1.09	1.10	1.14	1.08	1.17	1.08	1.15
Total (%)	34.8	34.4	34.8	34.8	35.1	35.1	35.8

<sup>1</sup>Essential amino acid

<sup>2</sup>Non-essential amino acid

### 2.2.2. 실험새우 및 사육관리

실험에 사용된 흰다리새우는 제주도 서귀포시 표선면에 위치한 새우양식장에서 구입하여 제주대학교 양어사료영양학연구실 내 새우전용 사양실험 시설에서 실험을 진행하였다. 실험용 새우는 4 주 동안 시판 배합사료를 공급하면서 실험환경에 적응할 수 있도록 순치시킨 후 사료공급 실험에 사용하였다. 예비사육 후 흰다리새우(초기평균무게: 0.28 g)는 총 28 개의 110 L 수조에 각 25 마리씩 무작위로 선택하여 배치되었다(Figure 1). 모든 실험수조에 용존산소 유지를 위하여 에어스톤을 설치하였고, 56 일간의 실험기간 동안 사육수온은 28-30°C 범위로 유지되었다. 광주기는 형광등을 이용하여 12L:12D 로 유지하였다. 사료공급은 1 일 5 회(08:45, 11:15, 13:45, 16:15, 18:45 h)에 나누어 제한공급(새우체중의 8%)을 하였다.



Figure 1. Experimental rearing tank for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*

### 2.2.3. 실험새우 무게측정

실험새우의 무게측정은 사육실험 종료 후 실시하였고, 사료공급은 실험새우의 스트레스를 최소화 하기 위해 측정 18 시간 전부터 절식시켰다. 최종무게 측정 후, 수조 당 5 마리(시험구 당 20 마리)의 실험새우를 무작위로 선별하여, 얼음물에 마취 시킨 후, Alsever's 용액(Alsever's solution, Sigma, St. Louis, MO, USA)이 처리된 주사기를 이용하여 hemolymph 를 채혈하였다. Hemolymph 는 비특이적 면역분석, 혈액분석을 위해 원심분리(800 g, 20 min)하여 혈장(plasma)을 분리하였다. Hemolymph 채혈 후, 해부를 통해 간체장을 적출하였다. 분리된 간체장은 액체질소에 넣어 급속 냉동 시킨 후, proPO (prophenoloxidase), crustin 유전자발현 분석에 사용되기 전까지 초저온냉동고(-80°C)에 보관되었다. 간체장 적출 후 남은 tail muscle 은 일반성분분석에 사용되었다. 실험새우의 성장률과 사료효율 관련 조사항목과 계산식은 실험-1 과 같다.

### 2.2.4. 일반성분분석

실험-1 과 동일하게 진행되었다.

### 2.2.5. RNA 추출 및 cDNA 합성

실험-1 과 동일하게 진행되었다.

### 2.2.6. qPCR (quantitative real-time PCR)에 의한 유전자 발현분석

$\beta$ -actin (F-5'-GAGCAACACGGAGTTCGTTGT-3', R-5'-CATCACCAACTGGGACGACATGGA-3')은 reference gene 으로 사용되었고, proPO (F-5'-TCCATTCCGTCCGTCTG-3', R-5'-GGCTTCGCTCTGGTTAGG-3'), crustin (F-5'-GAGGGTCAAGCCTACTGCTG-3', R-5'-ACTTATCFAFFCCAFCACAC-3') 측정에

이용되었다. qPCR 은 Real Time System TP 950 Thermal Cycler Dice™ (TaKaRa)를 이용하여 진행하였고, 3 $\mu$ l 의 cDNA, 5 $\mu$ l 의 TaKaRa Ex Taq™SYBR premix, 0.4 $\mu$ l 의 forward & reverse primer, 1.2 $\mu$ l H<sub>2</sub>O 를 넣어 총 볼륨을 10 $\mu$ l 로 맞추어 분석을 진행하였다.

### 2.2.7. 통계학적 분석

실험사료의 배치는 완전확률계획법(completely randomized design)을 실시하였으며, 분석결과는 SPSS (Version 18.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA 로 통계 분석하였다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's multiple test 로 비교하였다. 데이터는 평균값 $\pm$ 표준편차(mean $\pm$ SD)로 나타내었다. 백분율데이터는 arcsine 변형 값으로 통계분석 하였다. 사료의 histidine 의 적정 함량은 실험새우의 일간성장률을 기준으로 quadratic regression model (Sigma plot, Systat Software, San Jose, CA, USA)을 이용하여 산출되었다.

### 3.2. 결과

56 일 동안의 사육실험 결과, 실험새우의 최종평균무게와 성장률, 일간성장률은 0.78, 0.93 실험구가 대조구(0.05)에 비해 유의적으로 높았다. 특히 0.78 실험구가 대조구에 비해 각각 15.9, 18.3, 7.8% 증가하여 가장 높은 차이를 나타내었다(Table 3 & Figure 2) ( $P<0.05$ ).

사료전환효율(FCR), 단백질이용효율(PER), 생존율은 실험구와 대조구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않지만 단백질이용효율에서 0.93 실험구가 대조구에 비해 12.3% 증가하여 가장 높은 차이를 나타내었다( $P>0.05$ ).

실험새우 비특이적 면역력에서 PO 활성은 대조구를 제외한 모든 실험구가 대조구 에 비해 유의적으로 높았다. Lysozyme 활성은 0.62, 0.78 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. 특히, 0.78 실험구가 대조구에 비해 각각 27.5, 17.6% 증가하여 가장 높은 차이를 나타내었다( $P<0.05$ ). Anti-protease 활성은 0.24, 0.4, 0.62, 0.78, 0.93 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. 특히 0.93 실험구가 대조구에 비해 31.5% 증가하여 가장 높은 차이를 나타내었다(Table 4 & Figure 3) ( $P<0.05$ ).

실험새우 혈액분석에서 Total protein 의 농도는 0.78 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. 특히 0.78 실험구가 대조구에 비해 45.1% 증가하여 가장 높은 차이를 나타내었다( $P<0.05$ ). Cholesterol 의 농도는 실험구와 대조구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않지만 특히 1.13 실험구가 대조구에 비해 25.6% 증가하여 가장 높은 차이를 나타내었다(Table 5 & Figure 4) ( $P>0.05$ ).

실험새우 전하체의 muscle composition 에서 조단백질은 0.24, 0.62, 0.78 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. 특히 0.78 실험구가 대조구에 비해 5.4% 증가하여 가장 높은 차이를 나타내었다( $P<0.05$ ). 조희분은 0.78 실험구가

대조구에 비해 유의적으로 높았다( $P<0.05$ ). 조지질 함량은 모든 실험구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않지만 특히 0.62 실험구가 대조구에 비해 26.3% 증가하여 가장 높은 차이를 나타내었다(Table 5 & Figure 5) ( $P>0.05$ ).

실험새우 간체장의 proPO 발현량은 0.24, 0.62, 0.78, 0.93 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. 특히 0.93 실험구가 대조구에 비해 95% 증가하여 가장 높은 차이를 나타내었다( $P<0.05$ ). Crustin 발현량은 0.4, 0.62, 0.78, 0.93% 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. 특히 0.62 실험구가 대조구에 비해 282% 증가하여 가장 높은 차이를 나타내었다(Figure 6) ( $P<0.05$ ).

흰다리새우 사료 내 histidine 적정 첨가 함량은 일간성장률을 고려하였을 때 quadratic regression 분석을 통해 0.79% 인 것으로 판단된다(Figure 7).

Table 3. Growth performance and feed utilization of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (initial mean body weight : 0.28 g) fed the experimental diets for 56 days. The experimental diets were prepared with supplementing different levels of histidine by 0, 0.26, 0.69, 1.11, 1.53, 1.95 and 2.37% (0.05, 0.24, 0.40, 0.62, 0.78, 0.93 and 1.13).

Dietary treatment	FBW <sup>1</sup>	WG <sup>2</sup>	SGR <sup>3</sup>	FCR <sup>4</sup>	PER <sup>5</sup>	Survival
0.05	1.82±0.15 <sup>b</sup>	551±51.5 <sup>b</sup>	3.34±0.14 <sup>b</sup>	2.60±0.29	0.57±0.08	75.0±8.25
0.24	1.78±0.10 <sup>b</sup>	535±38.5 <sup>b</sup>	3.30±0.11 <sup>b</sup>	2.70±0.24	0.63±0.09	83.0±12.8
0.40	1.95±0.18 <sup>ab</sup>	597±65.3 <sup>ab</sup>	3.46±0.17 <sup>ab</sup>	2.70±0.25	0.64±0.11	84.0±8.64
0.62	1.98±0.08 <sup>ab</sup>	604±31.7 <sup>ab</sup>	3.48±0.08 <sup>ab</sup>	2.83±0.14	0.62±0.07	86.0±6.93
0.78	2.11±0.21 <sup>a</sup>	652±78.4 <sup>a</sup>	3.60±0.18 <sup>a</sup>	2.72±0.34	0.63±0.09	82.0±5.16
0.93	2.09±0.15 <sup>a</sup>	644±50.4 <sup>a</sup>	3.58±0.12 <sup>a</sup>	2.72±0.18	0.64±0.06	85.0±3.83
1.13	1.89±0.12 <sup>ab</sup>	577±44.7 <sup>ab</sup>	3.41±0.12 <sup>ab</sup>	2.71±0.27	0.56±0.08	77.0±7.57

<sup>1</sup>FBW: final body weight (g)

<sup>2</sup>Weight gain (%) = 100 x (final mean body weight – initial mean body weight)/initial mean body weight

<sup>3</sup>Specific growth ratio (% day<sup>-1</sup>) = [(loge final body weight - loge initial body weight)/days] x 100

<sup>4</sup>Feed conversion ratio = dry feed fed (g) / wet weight gain (g), <sup>5</sup>Protein efficiency ratio = wet weight gain /total protein given.

Values are mean of triplicate groups and presented as mean ± S.D. Values with different superscripts in the same column are significantly different ( $P<0.05$ ). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.



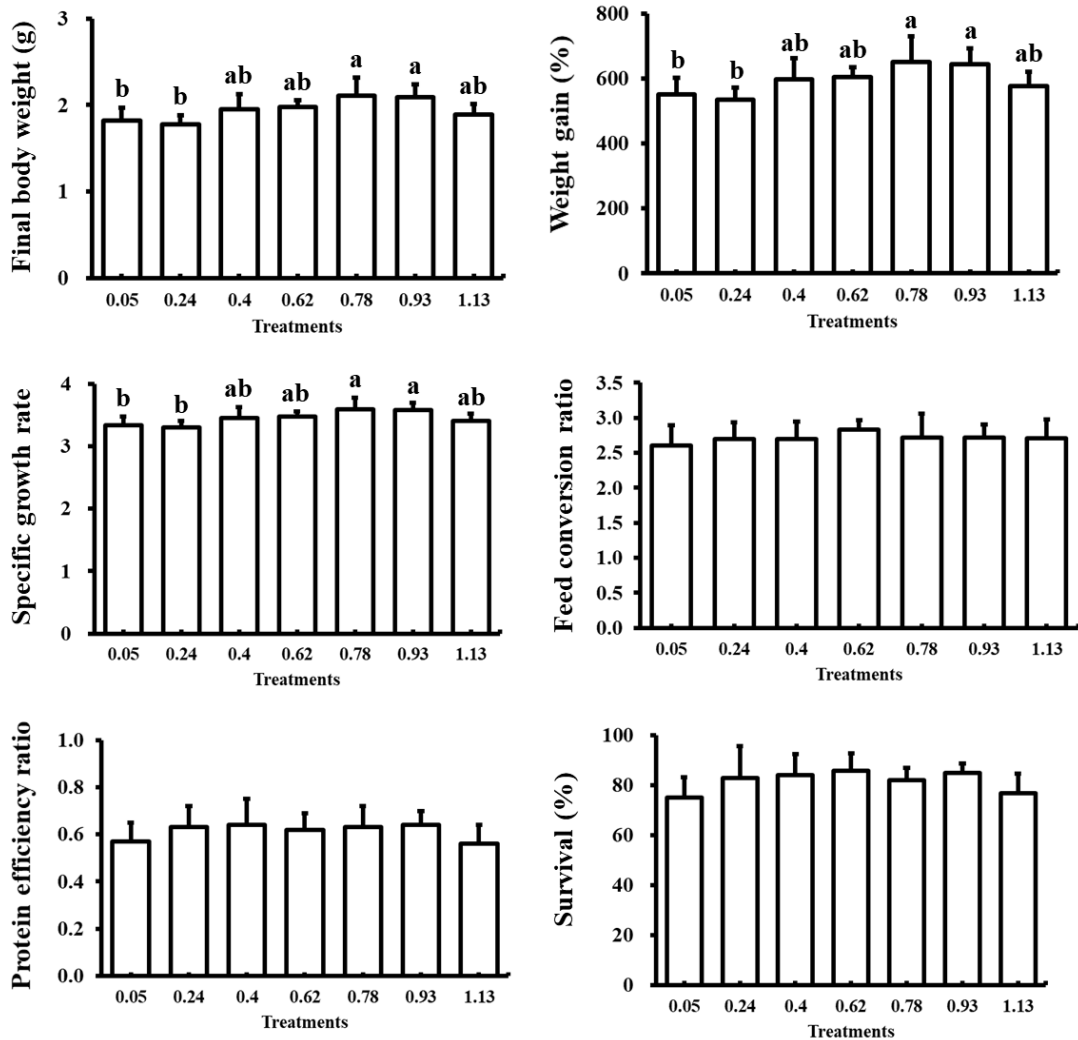


Figure 2. Growth performance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets with different levels of histidine for 56 days. Values are mean of triplicate groups and presented as mean  $\pm$  S.D. Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). The experimental diets were prepared with supplementing different levels of histidine by 0, 0.26, 0.69, 1.11, 1.53, 1.95 and 2.37% (0.05, 0.24, 0.40, 0.62, 0.78, 0.93 and 1.13).

Table 4. Non specific Immune parameters of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (initial mean body weight : 0.28 g) fed the experimental diets for 56 days. The experimental diets were prepared with supplementing different levels of histidine by 0, 0.26, 0.69, 1.11, 1.53, 1.95 and 2.37% (0.05, 0.24, 0.40, 0.62, 0.78, 0.93 and 1.13).

Dietary treatment	PO <sup>1</sup>	Lysozyme	Anti-protease
0.05	0.182±0.02 <sup>c</sup>	4.43±0.44 <sup>c</sup>	25.4±3.89 <sup>b</sup>
0.24	0.211±0.02 <sup>b</sup>	4.79±0.51 <sup>bc</sup>	31.3±5.44 <sup>a</sup>
0.40	0.213±0.02 <sup>ab</sup>	4.74±0.39 <sup>bc</sup>	32.6±4.67 <sup>a</sup>
0.62	0.203±0.02 <sup>b</sup>	4.86±0.42 <sup>ab</sup>	31.0±2.60 <sup>a</sup>
0.78	0.232±0.02 <sup>a</sup>	5.21±0.54 <sup>a</sup>	31.9±4.82 <sup>a</sup>
0.93	0.223±0.02 <sup>ab</sup>	4.75±0.44 <sup>bc</sup>	33.4±3.63 <sup>a</sup>
1.13	0.205±0.02 <sup>b</sup>	4.38±0.63 <sup>c</sup>	29.4±7.39 <sup>ab</sup>

<sup>1</sup>PO: Phenoloxidase activity

Values are mean of triplicate groups and presented as mean ± S.D. Bars with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

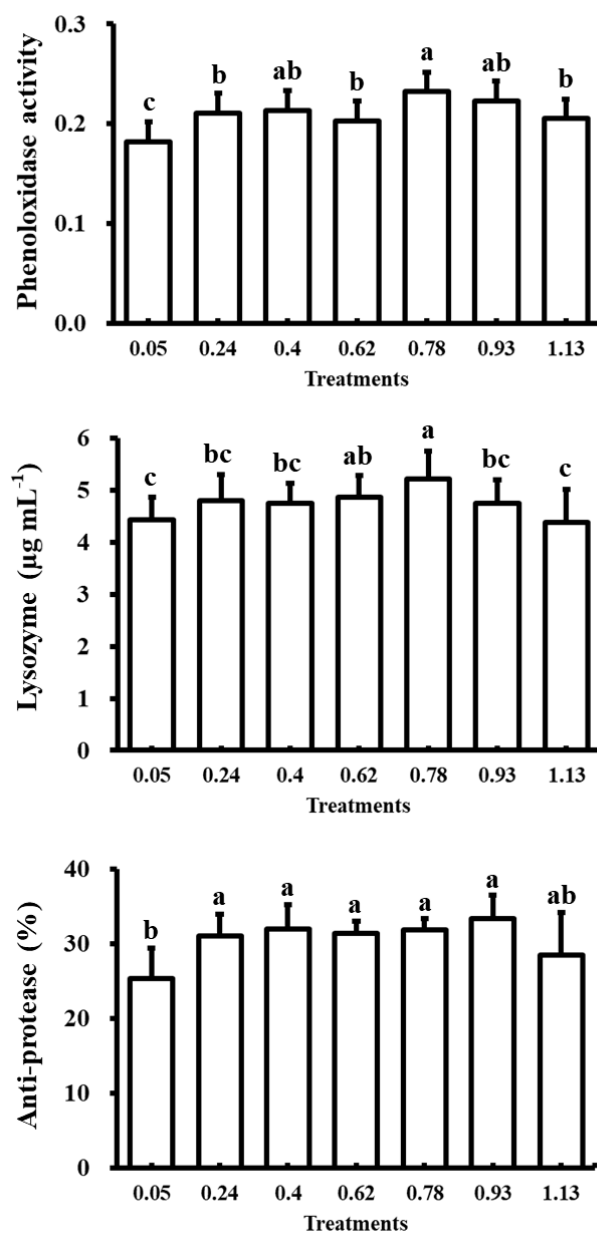


Figure 3. Non specific Immune parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets with different levels of histidine for 56 days. Values are means  $\pm$  S.D. (n=3). Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). The experimental diets were prepared with supplementing different levels of histidine by 0, 0.26, 0.69, 1.11, 1.53, 1.95 and 2.37% (0.05, 0.24, 0.40, 0.62, 0.78, 0.93 and 1.13).

Table 5. Hemolymph analysis parameters of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (initial mean body weight : 0.28 g) fed the experimental diets for 56 days. The experimental diets were prepared with supplementing different levels of histidine by 0, 0.26, 0.69, 1.11, 1.53, 1.95 and 2.37% (0.05, 0.24, 0.40, 0.62, 0.78, 0.93 and 1.13).

Dietary treatment	Total protein <sup>1</sup>	Cholesterol <sup>2</sup>
0.05	1.84±0.42 <sup>b</sup>	2.54±0.62
0.24	2.10±0.37 <sup>ab</sup>	2.54±0.69
0.40	2.35±0.32 <sup>ab</sup>	2.79±0.59
0.62	2.37±0.20 <sup>ab</sup>	2.71±0.72
0.78	2.67±0.29 <sup>a</sup>	2.97±0.86
0.93	2.13±0.40 <sup>ab</sup>	3.13±0.97
1.13	2.40±0.57 <sup>ab</sup>	3.19±0.99

<sup>1</sup>Total protein (g/dl)

<sup>2</sup>Cholesterol (mg/dl).

Values are mean of triplicate groups and presented as mean ± S.D. Bars with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

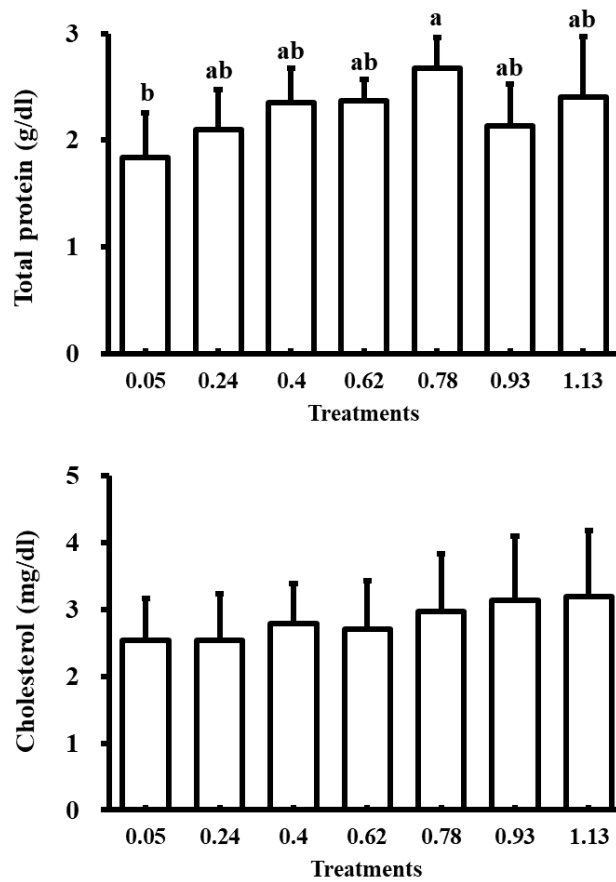


Figure 4. Hemolymph analysis parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets with different levels of histidine for 56 days. Values are means  $\pm$  S.D. (n=3). Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). The experimental diets were prepared with supplementing different levels of histidine by 0, 0.26, 0.69, 1.11, 1.53, 1.95 and 2.37% (0.05, 0.24, 0.40, 0.62, 0.78, 0.93 and 1.13).

Table 6. Muscle composition of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (initial mean body weight : 0.28 g) fed the experimental diets for 56 days (% , wet basis). The experimental diets were prepared with supplementing different levels of histidine by 0, 0.26, 0.69, 1.11, 1.53, 1.95 and 2.37% (0.05, 0.24, 0.40, 0.62, 0.78, 0.93 and 1.13).

Dietary treatment	Crude protein	Crude lipid	Ash
0.05	18.5±0.08 <sup>d</sup>	0.99±0.03	1.64±0.06 <sup>a</sup>
0.24	19.1±0.01 <sup>abc</sup>	1.14±0.38	1.51±0.11 <sup>ab</sup>
0.40	18.6±0.17 <sup>cd</sup>	1.11±0.13	1.50±0.04 <sup>ab</sup>
0.62	19.1±0.20 <sup>ab</sup>	1.25±0.09	1.57±0.08 <sup>ab</sup>
0.78	19.5±0.03 <sup>a</sup>	1.12±0.06	1.47±0.01 <sup>b</sup>
0.93	18.9±0.24 <sup>bcd</sup>	1.19±0.05	1.54±0.02 <sup>ab</sup>
1.13	18.6±0.38 <sup>cd</sup>	1.12±0.09	1.57±0.07 <sup>ab</sup>

Values are mean of triplicate groups and presented as mean ± S.D. Bars with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

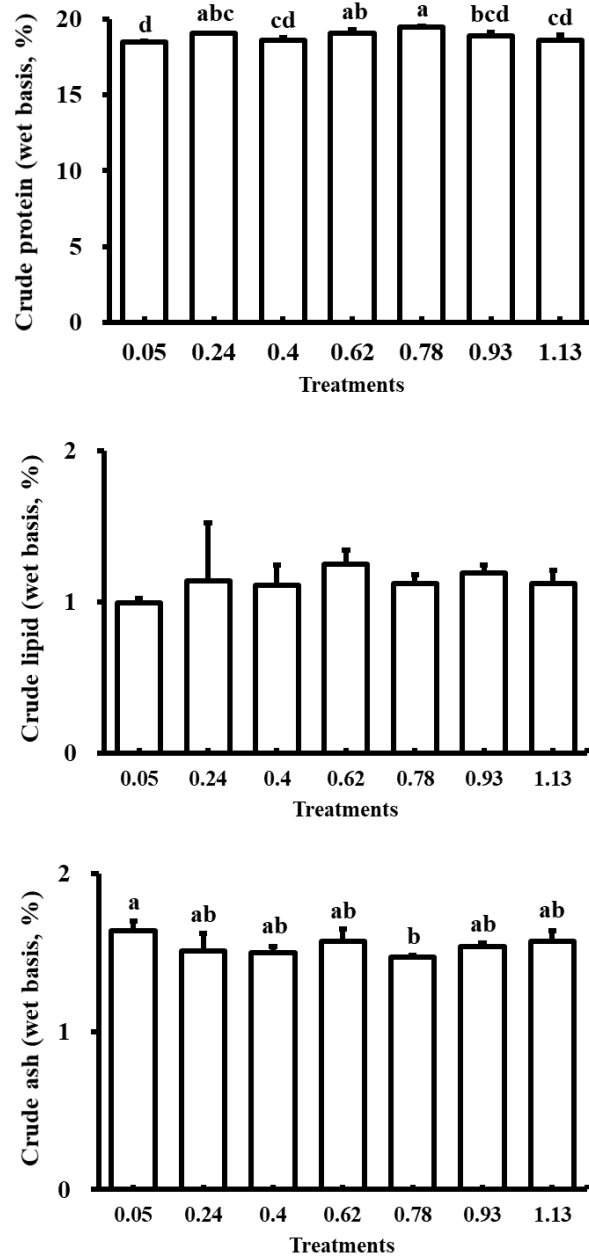


Figure 5. Muscle composition of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets with different levels of histidine for 56 days. Values are means  $\pm$  S.D. (n=3). Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). The experimental diets were prepared with supplementing different levels of histidine by 0, 0.26, 0.69, 1.11, 1.53, 1.95 and 2.37% (0.05, 0.24, 0.40, 0.62, 0.78, 0.93 and 1.13).

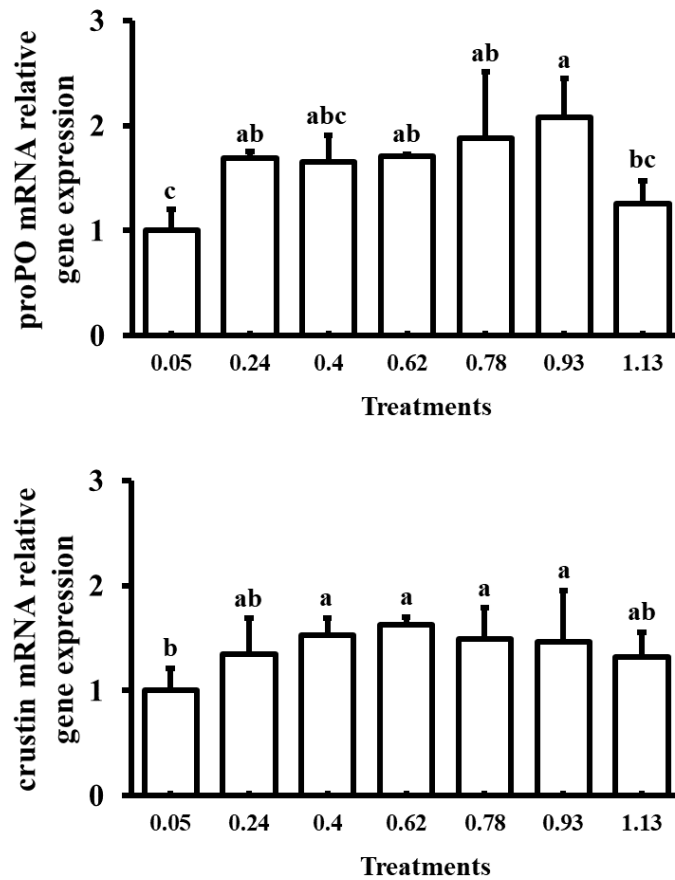


Figure 6. Relative mRNA expression of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets with different levels of histidine for 56 days. Values are means  $\pm$  S.D. (n=3). Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). The experimental diets were prepared with supplementing different levels of histidine by 0, 0.26, 0.69, 1.11, 1.53, 1.95 and 2.37% (0.05, 0.24, 0.40, 0.62, 0.78, 0.93 and 1.13).



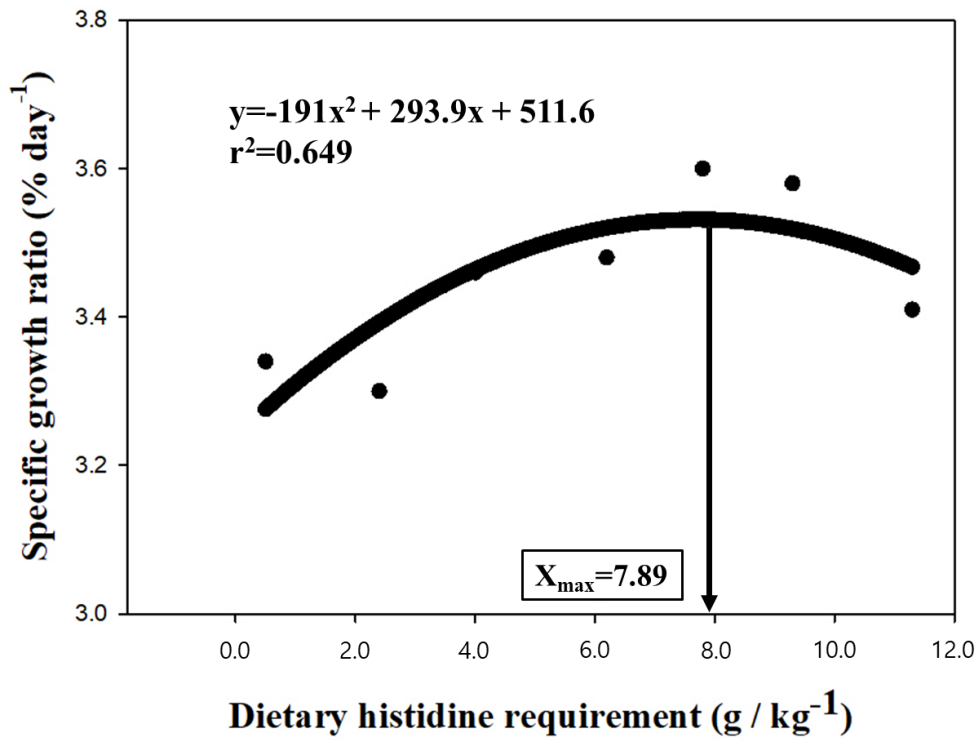


Figure 7. Based on quadratic regression analysis of the specific growth rate against the dietary histidine level, the optimal dietary histidine requirement for Pacific white shrimp was estimated to be 0.79% of the dry diet, corresponding to 21.9 g kg<sup>-1</sup> of dietary protein.

## 4.2. 고 찰

본 연구에서 사료 내 histidine이 결핍(>0.7%)될 경우 새우의 성장이 저하되는 것으로 보아, histidine은 흰다리새우 사료 내 필수아미노산임을 입증하였다. 흰다리새우 사료 내 histidine 요구량은 quadratic regression 분석을 통해 0.79% (2.19% of dietary protein)인 것으로 나타났다. 홍다리얼룩새우(*P. monodon*) (0.2 g)를 대상으로 intact protein (casein 10%, gelatin 5% of diet)과 아미노산 혼합물(20% of diet)을 주단백질원으로 사용한 실험에서 histidine의 요구량은 0.8% (2.2% of dietary protein)라고 보고되었다(Millamena et al., 1999). Teshima et al. (2002)은 kuruma prawn (0.79 g) (*M. japonicas*)을 대상으로 CS-diet (casein 50%, squid protein 5% of diet), FM-diet (white fish meal 53%, squid protein 6% of diet)를 40일간 공급했을 때, 최적의 histidine 요구량은 0.5-0.7% (1.1-1.4% of dietary protein)로 보고하였다.

홍다리얼룩새우(*P. monodon*) (0.2 g), kuruma prawn (*M. japonicas*) (0.79 g) 사료에 histidine의 결핍 혹은 과잉 첨가는 아미노산의 불균형을 초래하여 새우의 성장을 감소시킨다고 보고되었다(Millamena et al., 1999; Teshima et al., 2002). 어류 사료 내 histidine의 결핍은 Jian carp (*C. carpio* var. Jian), stinging catfish (*Heteropneustes fossilis*), blunt snout bream (*M. amblycephala*)을 대상으로 한 연구에서 성장의 감소, 백내장 (cataract) 반응을 보인다고 보고되었다(Zhao et al., 2012; Farhat, 2013; Khan and Abidi, 2014; Arop et al., 2018). Maurin et al. (2006)은 사료 내 histidine이 결핍될 경우, 어류의 사료섭이량을 감소시킨다고 보고하였다. Millamena et al. (1999)은 새우 사료 내 특정 아미노산을 과잉으로 첨가 할 경우, 새우의 성장을 저하시킨다고 보고하였다. 과도한 histidine 첨가는, 사료 내 아미노산 pool의 균형을 무너뜨려 조직에 독성을 유발하고, 어류와 새우의 성장을 저하시키며, histamine의 합성을 증가시켜 염증반응을 유발하는 pro-inflammatory cytokines의 발현을 증가시킨다고 보고되었

다(Mertz, 1972; Jiang et al., 2016). 흰다리얼룩새우(*P. monodon*) 사료 내 histidine의 과잉 첨가는 새우의 간췌장 조직에서 상피세포의 괴사(necrosis)를 일으킨다고 보고되었다(Recodo, 1991). African catfish (*Clarias gariepinus*), indian major carp (*C. catla*), rohu (*Labeo rohita*)에서도 사료 내 histidine의 과잉 첨가는 어류의 성장을 저하시킨다고 보고되었다(Ravi J and Devaraj KV, 1991; Murthy HS and Varghese TJ, 1995; Khan MA and Abidi SF, 2009).

이번 연구에서 histidine을 사료에 적정량 첨가할 경우, 새우의 비특이적 면역력(PO, lysozyme, anti-protease)을 증진 시키는 것으로 나타났다. PO는 절지동물의 중요한 방어기작인 proPO 체계의 핵심 요소로, 새우의 hemolymph 내 PO 활성 측정은 새우의 전반적인 면역력을 판단할 수 있는 지표로 사용된다(Cheng et al., 2006; Chiu et al., 2010). 본 연구결과와 유사하게 흰다리새우(0.53 g) 사료에 적정량의 threonine (1.67-1.89% of diet) 첨가는 hemolymph 내 PO 활성 증진에 도움을 준다고 보고되었다(Zhou et al., 2013). Lysozyme은 세균 세포벽의 주요 구성성분인 peptidoglycan의  $\beta$ -1,4-글루코시드 결합을 가수분해하여 이를 파괴하는 역할을 한다(Puangkaew et al., 2004; Lin and Shiau, 2005). Anti-protease는 병원균이 숙주 내로 침투할 경우, 병원균의 효소활성을 억제하여 이를 방어하는 역할을 하며, 일반적으로 anti-protease 활성의 증가는 병원체에 대한 숙주의 방어능력 증가를 나타낸다(Rao and Chakrabarti, 2004). 따라서, 흰다리새우 사료 내 적정함량의 histidine은 비특이적 면역력 증진에 관여한다고 판단된다.

이번 연구에서 실험새우의 histidine의 적정량 첨가는 새우의 total protein을 증진 시키는 것으로 나타났다. Total protein, cholesterol은 흰다리새우 hemolymph의 영양 상태와 건강을 평가할 수 있는 지표이다(Mercier et al., 2009). Total protein은 질소 대사에 있어 중요하며, cholesterol은 세포 기능과 구조를 보존하는 데 중요한 주요 생체막 구성 요소이다(De Pedro et al., 2005; Xie et al., 2012; Sajjad et al., 2019).

본 연구 결과와 유사하게 흰다리새우(0.50 g) 사료에 적정 함량의 arginine의 첨가는 새우의 total protein을 증진시키는 것으로 보고되었다(Zhou et al., 2012). Huai et al. (2009)은 흰다리새우(0.48 g) 사료에 적정량의 threonine 첨가는 새우의 total protein 농도를 증가시킨다고 보고하였다. 따라서, 흰다리새우 사료 내 적정함량의 histidine은 total protein 함량 증진에 관여한다고 판단된다.

이번 연구에서 사료 내 histidine의 적정량 첨가는 새우의 근육 내 단백질의 함량을 증진 시키는 것으로 나타났다. 수생생물의 단백질(근육)은 가식부로서 양식생물의 질을 판단하는 산업적으로 중요한 요소로 작용한다(Khan, 2018). 어류 사료 내 histidine 혹은 histidine-derivatives는 식감을 향상시켜주며, African catfish (*C. gariepinus*), Jian carp (*C. carpio*) 근육 내 단백질의 함량을 증진시킨다고 보고되었다(Ogata, 2002; Khan and Abidi, 2009; Zhao et al., 2012). 흰다리새우(0.38 g) 사료에 leucine 을 적정량 첨가할 경우, 새우의 단백질 함량이 증가한다고 보고하였다(Liu et al., 2014). 따라서, 흰다리새우 사료 내 histidine은 근육의 구성성분으로써 단백질의 합성에 직접적으로 관여한다고 판단된다.

이번 연구에서 실험새우의 histidine의 적정 함량 첨가는 새우의 간체장에 proPO, crustin의 유전자발현을 증진 시키는 것으로 나타났다. proPO (prophenoloxidase)는 선천 면역 요소이며 주로 외부 상처와 병원체에서 방출된 효소에 의해 야기되는 조직손상으로 인해 활성화가 이루어져 갑각류에서 proPO의 메커니즘에 대한 많은 연구가 수행되었다(Cerenius and Söderhäll, 2004; Galko and Krasnow, 2004; Zhou et al., 2013). Crustin은 갑각류의 혈장 및 혈구 과립에서 필수적인 항균펩타이드(antimicrobial peptides, AMPs)로 입증된 선천적 면역체계의 구성 요소이다(Vargas et al., 2004). 본 연구에서 새우 사료 내 histidine의 함량(0.24-0.93%)이 증가할때 새우의 proPO, crustin 유전자 발현이 증진되었으며, histidine의 다량

함량(1.13%) 첨가는 대조구에 비해 차이가 없었다. 따라서, 흰다리새우 사료 내 적정함량의 histidine은 새우의 면역체계에서 중요한 proPO, crustin 유전자 발현을 증진시킴으로써 비특이적 면역력 향상에 관여한다고 판단된다.

본 연구의 목적은 기존의 새우에서 crystalline 형태의 아미노산을 이용하여 보고된 필수아미노산 요구량과 흰다리새우를 대상으로 dipeptide 형태의 아미노산을 이용하여 나타난 요구량과 비교하는 것이다. Dipeptide형태인 L-carnosine을 이용하여 흰다리새우의 histidine 요구량을 연구한 결과, 흰다리새우의 histidine 요구량은 사료 내 0.79% 로 판단된다. 홍다리얼룩새우(*P. monodon*) (0.8% of dry diet)와 유사하며, kuruma prawn (*M. japonicus*) (0.5-0.7% of dry diet) 보다는 다소 높은 것으로 나타났다. 요구량의 차이는 실험에 사용된 새우의 종류, 사료의 단백질 원료, 사료조성표의 구성, 실험 환경 등 다양한 요소가 관여하였기 때문이라고 판단된다.

따라서 흰다리새우의 아미노산 요구량 연구에 있어서는 dipeptide 형태의 AA를 사용하는 것이 보다 더 정확한 요구량을 구명할 수 있을 것으로 판단된다. 본 연구의 결과를 한층 더 입증하기 위해서는 histidine 외 다른 아미노산에 대해서도 연구하여 흰다리새우 사료 내 요구량을 재평가해야 할 것으로 사료된다.

## 5. 요약문

본 연구는 흰다리새우 사료의 필수아미노산 중 하나인 histidine 의 형태(dipeptides or crystalline)에 따라 이용성을 비교 검토하여 정확한 필수아미노산 요구량을 조사하기 위해 총 2 개의 사양 실험을 실시하였다.

실험-1 의 실험사료는 histidine이 첨가되지 않은 아미노산 mixture를 주 단백질 사료원료로 사용하였다. Histidine을 첨가하지 않은 대조구(Con)와 crystalline, dipeptides 형태로 histidine이 각각 0.3, 1.2%(C-0.3, C-1.2, D-0.3, D-1.2) 첨가된 실험구로 총 5개의 실험사료를 제작하였다. 실험새우는 초기평균 무게가 0.15 g인 흰다리새우(Pacific white shrimp, *L. vannamei*)를 이용하여 각각 15마리씩 총 20개의 96 L 수조에 무작위로 배치하였다. 사육실험이 종료 된 후 성장지표 측정을 위하여 무게를 측정했으며, 실험새우의 수조 당 3마리(시험구 당 12마리)의 새우를 무작위로 선별 후 간체장을 분리하여 IGF-BP 분석을 진행하였다. 62 일간의 사양실험 결과, 성장률은 dipeptides 형태로 첨가된 모든 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. 유전자발현 분석에서 IGF-BP 호르몬은 D-1.2실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높게 발현되었다.

실험-2 의 실험사료는 histidine 이 첨가되지 않은 아미노산 mixture 를 주 단백질 사료원료로 사용하였으며, 기호성을 고려하여 오징어간분말을 최소량으로 첨가해주었다. Histidine 을 첨가하지 않은 대조구(0.05)와 dipeptides 형태의 histidine 을 각 0, 0.26, 0.69, 1.11, 1.53, 1.95, 2.37%(0.05, 0.24, 0.40, 0.62, 0.78, 0.93 and 1.13) 첨가된 실험구로 총 7 개의 실험사료를 제작하였다. 실험새우는 초기평균 무게가 0.28 g 인 흰다리새우(Pacific white shrimp, *L. vannamei*)를 이용하여 각각 25 마리씩 총 28 개의 110 L 수조에 무작위로 배치하였다. 사육실험이 종료 된 후 성장지표 측정을 위하여 무게를 측정했으며, 실험새우의 수조 당 5 마리(시험구

당 20 마리)의 새우를 무작위로 선별 후 hemolymph 채혈 후, 간체장을 분리하여 비특이적 면역과 qPCR (proPO, crustin)유전자발현 분석을 진행하였다. 8 주간의 사양실험 결과 성장률은 0.78, 0.93 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. 흰다리새우 사료 내 histidine 적정첨가 함량은 histidine 의 농도와 일간성장률 간의 관계를 기준으로 하여 quadratic regression 분석을 통해 0.79% 인 것으로 나타났다.

결론적으로 흰다리새우는 crystalline AA 보다 dipeptide를 보다 효율적으로 이용하여 성장률을 높일 수 있을 것으로 판단된다. Dipeptide는 흰다리새우의 AA 요구량 연구에 있어서 crystalline AA을 대체하여 보다 더 정확한 요구량을 알아보기 위한 아미노산 원료로 사용 가능할 것으로 판단된다. Dipeptide형태인 L-carnosine을 이용하여 흰다리새우의 histidine 요구량을 연구한 결과, 흰다리새우에 있어서 배합사료 내 histidine의 적정첨가 함량은 0.79%로 판단된다. 흰다리새우의 histidine 연구는 아직 보고된바가 없어 본 연구에서 분석된 흰다리새우의 histidine 요구량은 사료 배합에 중요한 기초자료로 이용될 것으로 사료된다.

## 6. 참고문헌

- Ahmed I and Khan MA. 2005. Dietary histidine requirement of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Aquaculture Nutrition*, 11(5), 359-366.
- Akiyama DM. 1989. Soybean meal utilization by marine shrimp. In Proceeding of the world congress, Vegetable protein utilization in human foods and animal feedstuffs. American Oil Chemists Society, Champaign, Illinois, USA, 252-265.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2005. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, U.S.A.
- Arop OMW, Liang H, Ge X, Ren M, Habte-Tsion HM and Ji K. 2018. Dietary histidine requirement of juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Aquaculture Nutrition*, 24(3), 1122-1132.
- Baxter RC. 1993. Circulating binding proteins for the insulinlike growth factors. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 4(3), 91-96.
- Berge GE, Lied E and Espe M. 1994. Absorption and incorporation of dietary free and protein bound ( $U^{14}C$ )-lysine in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 109(3), 681-688.
- Bicudo AJ and Cyrino JEP. 2009. Estimating amino acid requirement of Brazilian freshwater fish from muscle amino acid profile. *Journal of the World Aquaculture Society*, 40(6), 818-823.
- Breck O, Bjerkås E, Campbell P, Rhodes JD, Sanderson J and Waagbø R. 2005. Histidine nutrition and genotype affect cataract development in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of fish diseases*, 28(6), 357-371.
- Bröer S. 2008. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiological reviews*.
- Cerenius L and Söderhäll K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological reviews*, 198(1), 116-126.



- Cheng W, Chieu HT, Ho MC and Chen JC. 2006. Noradrenaline modulates the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 21(1), 11-19.
- Chiu CH, Guu YK, Liu CH, Pan TM and Cheng W. 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23(2), 364-377.
- Cohick WS and Clemmons DR. 1993. The insulin-like growth factors. *Annual review of physiology*, 55(1), 131-153.
- Cowey CB and Walton MJ. 1988. Studies on the uptake of (<sup>14</sup>C) amino acids derived from both dietary (<sup>14</sup>C) protein and dietary (<sup>14</sup>C) amino acids by rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 33(2), 293-305.
- Dabrowski K, Lee KJ and Rinchard J. 2003. The smallest vertebrate, teleost fish, can utilize synthetic dipeptide-based diets. *The Journal of nutrition*, 133(12), 4225-4229.
- Dabrowski K, Zhang Y, Kwasek K, Hliwa P and Ostaszewska T. 2010. Effects of protein-, peptide- and free amino acid-based diets in fish nutrition. *Aquaculture research*, 41(5), 668-683.
- Daniel H and Kottra G. 2004. The proton oligopeptide cotransporter family SLC<sub>15</sub> in physiology and pharmacology. *Pflügers Archiv*, 447(5), 610-618.
- De Pedro N, Guijarro AI, López-Patiño MA, Martínez-Álvarez R and Delgado MJ. 2005. Daily and seasonal variations in haematological and blood biochemical parameters in the tench, *Tinca tinca* Linnaeus, 1758. *Aquaculture research*, 36(12), 1185-1196.
- Divakaran S, Obaldo LG and Forster IP. 2002. Note on the methods for determination of chromic oxide in shrimp feeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(3), 464-467.
- Dyer AR, Barlow CG, Bransden MP, Carter CG, Glencross BD, Richardson N, ... and Carragher JF. 2004. Correlation of plasma IGF-I concentrations and growth rate in aquacultured finfish: a tool for assessing the potential of new diets. *Aquaculture*,

236(1-4), 583-592.

- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. Meeting the sustainable development goals. FAO Report, 227.
- Farhat KMA. 2013. Effects of varying levels of dietary L-histidine on growth, feed conversion, protein gain, histidine retention, hematological and body composition in fingerling stinging catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Aquaculture*, 404-405.
- Folch J, Lees M and Stanley GS. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 226(1), 497-509.
- Førde-Skjærviik O, Skjærviik O, Mørkøre T, Thomassen MS and Rørviik KA. 2006. Dietary influence on quality of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*): effect on glycolysis and buffering capacity in white muscle. *Aquaculture*, 252(2-4), 409-420.
- Galko MJ and Krasnow MA. 2004. Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. *PLoS Biol*, 2(8), e239.
- Glover CN, Bury NR and Hogstrand C. 2003. Zinc uptake across the apical membrane of freshwater rainbow trout intestine is mediated by high affinity, low affinity, and histidine-facilitated pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1614(2), 211-219.
- Huai MY, Tian LX, Liu YJ, Xu AL, Liang GY and Yang HJ. 2009. Quantitative dietary threonine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared in low-salinity water. *Aquaculture Research*, 40(8), 904-914.
- Jiang WD, Feng L, Qu B, Wu P, Kuang SY, Jiang J., ... and Liu Y. (2016). Changes in integrity of the gill during histidine deficiency or excess due to depression of cellular anti-oxidative ability, induction of apoptosis, inflammation and impair of cell-cell tight junctions related to Nrf2, TOR and NF-κB signaling in fish. *Fish & shellfish immunology*, 56, 111-122.

- Jin Y, Liu FJ, Liu YJ, Tian LX and Zhang ZH. 2017. Dietary tryptophan requirements of juvenile pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared in low-salinity water. *Aquaculture international*, 25(2), 955-968.
- Karabulut-Bulan O, Us H, Bayrak BB, Sezen-Us A and Yanardag R. 2017. The role of melatonin and carnosine in prevention of oxidative intestinal injury induced by gamma irradiation in rats. *Biologia*, 72(8), 935-945.
- Khan MA and Abidi SF. 2009. Optimum histidine requirement of fry African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Aquaculture Research*, 40(9), 1000-1010.
- Khan MA and Abidi SF. 2014. Dietary histidine requirement of Singhi, *Heteropneustes fossilis* fry (Bloch). *Aquaculture Research*, 45(8), 1341-1354.
- Khan MA. 2018. Histidine Requirement of Cultivable Fish Species: A Review.
- Kim SS and Lee KJ. 2013. Comparison of leucine requirement in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) by free or synthetic dipeptide forms of leucine. *Animal Feed Science and Technology*, 183(3-4), 195-201.
- Klein RG and Halver JE. 1970. Nutrition of salmonoid fishes: arginine and histidine requirements of chinook and coho salmon. *The Journal of nutrition*, 100(9), 1105-1109.
- KOSIS (Korea Statistical Information Service). 2020. Survey on the status of aquaculture. Retrieved from [http://kostat.go.kr/portal/korea/kor\\_nw/1/1/index.board?bmode=read&aSeq=380812](http://kostat.go.kr/portal/korea/kor_nw/1/1/index.board?bmode=read&aSeq=380812).
- Kwasek K, Zhang Y and Dabrowski K. 2010. Utilization of dipeptide/protein based diets in larval and juvenile Koi carp—post-prandial free amino acid levels. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 94(1), 35-43.
- Li X, Yin J, Li D, Chen X, Zang J and Zhou X. 2006. Dietary supplementation with zinc oxide increases IGF-I and IGF-I receptor gene expression in the small intestine of weanling piglets. *The Journal of nutrition*, 136(7), 1786-1791.
- Lim C and Dominy W. 1990. Evaluation of soybean meal as a replacement for marine animal

- protein in diets for shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 87(1), 53-63.
- Liu FJ, Liu YJ, Tian LX, Chen WD, Yang HJ and Du ZY. 2014. Quantitative dietary leucine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared in low-salinity water. *Aquaculture Nutrition*, 20(3), 332-340.
- Lin MF and Shiau SY. 2005. Dietary L-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*, 244(1-4), 215-221.
- Luo Z, Liu YJ, Mai KS, Tian LX, Tan XY and Yang HJ. 2007. Effects of dietary arginine levels on growth performance and body composition of juvenile grouper *Epinephelus coioides*. *Journal of Applied Ichthyology*, 23(3), 252-257.
- Maurin AC, Bruhat A, Jousse C, Cherasse Y and Fafournoux P. 2006. Cellular adaptation to amino acid availability: mechanisms involved in the regulation of gene expression. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*.
- Mercier L, Racotta IS, Yepiz-Plascencia G, Muhlia-Almazán A, Civera R, Quiñones-Arreola, MF, ... and Palacios E. 2009. Effect of diets containing different levels of highly unsaturated fatty acids on physiological and immune responses in Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to handling stress. *Aquaculture Research*, 40(16), 1849-1863.
- Mertz ET. 1972. The protein and amino acid needs. In *Fish nutrition* (pp. 105-143). Academic Press.
- Michelato M, Zaminhan M, Boscolo WR, Nogaroto V, Vicari M, Artoni RF, ... and Furuya, WM. 2017. Dietary histidine requirement of Nile tilapia juveniles based on growth performance, expression of muscle-growth-related genes and haematological responses. *Aquaculture*, 467, 63-70.
- Millamena OM, Teruel MB, Kanazawa A and Teshima S. 1999. Quantitative dietary requirements of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon*, for histidine, isoleucine,

- leucine, phenylalanine and tryptophan. *Aquaculture*, 179(1-4), 169-179.
- Murai T, Ogata H, Hirasawa Y, Akiyama T and Nose T. 1987. Portal absorption and hepatic uptake of amino acids in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) force-fed complete diets containing casein or crystalline amino acids. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*.
- Murthy HS and Varghese TJ. 1995. Arginine and histidine requirements of the Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquaculture Nutrition*, 1(4), 235-239.
- NAM TJ, KwoN MJ, LEE SM, PARK KY, KIM Y, PARK SR and PYEUN JH. 2001. Effects of Dietary Proteins on Serum Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) and IGF-Binding Protein-3 in Korean Rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 34(5), 550-555.
- Nagasawa T, Yonekura T, Nishizawa N and Kitts DD. 2001. In vitro and in vivo inhibition of muscle lipid and protein oxidation by carnosine. *Molecular and cellular biochemistry*, 225(1-2), 29-34.
- Nose T. 1979. Summary report on the requirements of essential amino acids for carp. *Finfish nutrition and fishfeed technology*, 145-156.
- NRC (National Research Council). 1993. *Nutritional requirements of fish*. National Academy of Science, Washington. D. C., 114.
- Ogata HY. 2002. Muscle buffering capacity of yellowtail fed diets supplemented with crystalline histidine. *Journal of Fish Biology*, 61(6), 1504-1512.
- Peachey BL, Scott EM and Gatlin III DM. 2018. Dietary histidine requirement and physiological effects of dietary histidine deficiency in juvenile red drum *Sciaenop ocellatus*. *Aquaculture*, 483, 244-251.
- Peres H and Oliva-Teles A. 2006. Effect of the dietary essential to non-essential amino acid ratio on growth, feed utilization and nitrogen metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 256(1-4), 395-402.

- Puangkaew J, Kiron V, Somamoto T, Okamoto N, Satoh S, Takeuchi T and Watanabe T. 2004. Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. *Fish & shellfish immunology*, 16(1), 25-39.
- Rao YV and Chakrabarti R. 2004. Enhanced anti-proteases in *Labeo rohita* fed with diet containing herbal ingredients. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 19(2), 132.
- Ravi J and Devaraj KV. 1991. Quantitative essential amino acid requirements for growth of catla, *Catla catla* (Hamilton). *Aquaculture*, 96(3-4), 281-291.
- Recodo AG. 1991. Histo- physiological effects of various histidine levels in the diet on the hepatopancreas of *Penaeus monodon Fabricius* (Doctoral dissertation, Master thesis. Institute of Biology, College of Science, UP Diliman, Quezón City, Philippines).
- Rodehutsord M, Becker A, Pack M and Pfeffer E. 1997. Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to supplements of individual essential amino acids in a semipurified diet, including an estimate of the maintenance requirement for essential amino acids. *The Journal of nutrition*, 127(6), 1166-1175.
- Rønnestad I, Conceição LE, Aragão C and Dinis MT. 2000. Free amino acids are absorbed faster and assimilated more efficiently than protein in postlarval Senegal sole (*Solea senegalensis*). *The Journal of nutrition*, 130(11), 2809-2812.
- Rønnestad I and Conceição LE. 2005. Aspects of protein and amino acids digestion and utilization by marine fish larvae. *Physiological and ecological adaptations to feeding in vertebrates*, 389-416.
- Rønnestad I, Nilsen TO, Murashita K, Angotzi AR, Moen AGG, Stefansson SO., ... and Kurokawa T. 2010. Leptin and leptin receptor genes in Atlantic salmon: cloning, phylogeny, tissue distribution and expression correlated to long-term feeding status. *General and comparative endocrinology*, 168(1), 55-70.
- Sale C, Artioli GG, Gualano B, Saunders B, Hobson RM and Harris RC. 2013. Carnosine:

- from exercise performance to health. *Amino acids*, 44(6), 1477-1491.
- Santiago CB and Lovell RT. 1988. Amino acid requirements for growth of Nile tilapia. *The journal of nutrition*, 118(12), 1540-1546.
- Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB and Tsujimoto Y. 2004. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature cell biology*, 6(12), 1221-1228.
- Snyder GS, Gaylord TG, Barrows FT, Overturf K, Cain KD, Hill RA and Hardy RW. 2012. Effects of carnosine supplementation to an all-plant protein diet for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 338, 72-81.
- Son DO, Satsu H and Shimizu M. 2005. Histidine inhibits oxidative stress-and TNF- $\alpha$ -induced interleukin-8 secretion in intestinal epithelial cells. *FEBS letters*, 579(21), 4671-4677.
- Stifel FB and Herman RH. 1971. Histidine metabolism. *The American journal of clinical nutrition*, 24(2), 207-217.
- Stipanuk MH and Watford M. 2000. Amino acid metabolism. *Biochemical and Physiological aspects of human nutrition*, 233-286.
- Suárez JA, Gaxiola G, Mendoza R, Cadavid S, Garcia G, Alanis G, ... and Cuzon G. 2009. Substitution of fish meal with plant protein sources and energy budget for white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture*, 289, 118-123.
- Tantikitti C and March BE. 1995. Dynamics of plasma free amino acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under variety of dietary conditions. *Fish Physiology and Biochemistry*, 14(3), 179-194.
- Terjesen BF, Lee KJ, Zhang Y, Failla M and Dabrowski K. 2006. Optimization of dipeptide-protein mixtures in experimental diet formulations for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) alevins. *Aquaculture*, 254(1-4), 517-525.
- Terova G, Robaina L, Izquierdo M, Cattaneo A, Molinari S, Bernardini G and Saroglia M.

2013. PepT1 mRNA expression levels in sea bream (*Sparus aurata*) fed different plant protein sources. SpringerPlus, 2(1), 17.
- Teshima S, Alam MS, Koshio S, Ishikawa M and Kanazawa A. 2002. Assessment of requirement values for essential amino acids in the prawn, *Marsupenaeus japonicus* (Bate). Aquaculture Research, 33(6), 395-402.
- Tesser MB, Terjesen BF, Zhang Y, Portella MC and Dabrowski K. 2005. Free-and peptide-based dietary arginine supplementation for the South American fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Aquaculture Nutrition, 11(6), 443-453.
- Verri T, Barca A, Pisani P, Piccinni B, Storelli C and Romano A. 2017. Di-and tripeptide transport in vertebrates: the contribution of teleost fish models. Journal of Comparative Physiology B, 187(3), 395-462.
- Waagbø R, Tröbe C, Koppe W, Fontanillas R and Breck O. 2010. Dietary histidine supplementation prevents cataract development in adult Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in seawater. British journal of nutrition, 104(10), 1460-1470.
- Wei Y, Xu H and Liang M. 2020. Amino acid absorption and protein synthesis responses of turbot *Scophthalmus maximus* to lysine and leucine in free, dipeptide and tripeptide forms. Aquaculture Nutrition, 26(2), 358-367.
- Wilson RP, Poe WE and Robinson EH. 1980. Leucine, isoleucine, valine and histidine requirements of fingerling channel catfish. The Journal of Nutrition, 110(4), 627-633.
- Wilson-Arop OM, Liang H, Ge X, Ren M, Habte-Tsion HM and Ji K. 2018. Dietary histidine requirement of juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). Aquaculture Nutrition, 24(3), 1122-1132.
- Xu D, He G, Mai K, Zhou H, Xu W and Song F. 2016. Postprandial nutrient-sensing and metabolic responses after partial dietary fishmeal replacement by soyabean meal in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). British Journal of Nutrition, 115(3), 379-388.
- Zarate DD and Lovell RT. 1997. Free lysine (l-lysine · HCl) is utilized for growth less



- efficiently than protein-bound lysine (soybean meal) in practical diets by young channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 159(1-2), 87-100.
- Zarate DD, Lovell RT and Payne M. 1999. Effects of feeding frequency and rate of stomach evacuation on utilization of dietary free and protein-bound lysine for growth by channel catfish *Ictalurus punctatus*.
- Zhang Y, Dabrowski K, Hliwa P and Gomulka P. 2006. Indispensable amino acid concentrations decrease in tissues of stomachless fish, common carp in response to free amino acid-or peptide-based diets. *Amino Acids*, 31(2), 165-172.
- Zhao B, Feng L, Liu Y, Kuang SY, Tang L, Jiang J, ... and Zhou XQ. 2012. Effects of dietary histidine levels on growth performance, body composition and intestinal enzymes activities of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture Nutrition*, 18(2), 220-232.
- Zhou QC, Zeng WP, Wang HL, Wang T, Wang YL and Xie FJ. 2012. Dietary arginine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 364, 252-258.
- Zhou QC, Wang YL, Wang HL and Tan BP. 2013. Dietary threonine requirements of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 392, 142-147.

## 7. 감사의 글

학부생 3학년 시절부터 석사과정 동안 너무나 많은 분들께 도움과 가르침을 받았습니다. 짧고 부족하지만 그 감사함을 적어보려 합니다. 먼저, 아무런 꿈과 열정이 없던 저에게 학문의 길로 이끌어 주신 이경준 교수님께 정말 머리숙여 깊은 감사의 말씀과 존경을 전합니다. 학위심사를 위해 시간을 내어주신 최광식 교수님, 바쁘신 와중에 멀리서 와주신 임세진 박사님께도 감사드립니다.

연구실의 만형이자 후배들이 편하게 연구 할 수 있게 많은 도움과 조언을 아끼지 않았던 재형이형, 항상 응원해주고 격려해주었던 민기형, 그리고 항상 어렵고 무서웠지만 끝까지 저를 이끌어주던 초롱누나, 많이 다투고 싸웠지만 둘도 없는 동기 현운이, 부족한 선배를 항상 도와주는 후배들, 힘든일이 있을 때 마다 잔소리를 들어 주었던 정원이형에게 감사의 말씀을 전합니다.

그리고 제가 공부를 할 수 있게 도와주고 항상 믿음으로 응원해주시는 아버지, 어머니 정말 사랑하고 존경합니다. 묵묵히 응원해주는 큰누나, 작은누나에게도 감사의 인사를 전합니다. 마지막으로 대학원 다니며 힘들때마다 나에게 힘이 되어 주었던 태하, 순철, 용훈, 혁진 우리 동화어린이 친구들 항상 고맙다고 전하고 싶습니다.

이 논문이 저의 배움에 시작이라 생각합니다. 앞으로 인내와 끈기, 성실함을 갖고 더 좋은 논문을 작성하기 위해 열심히 노력하려합니다.