

치어기 넙치 사료내 생균제 첨가효과

정창화 · 최희정¹ · 유광열¹ · 이승형¹ · 김영철¹ · Okorie Eme OKORIE¹ · 이준호¹
 전경동 · 최세민² · 김강웅² · 강용진² · 강주찬³ · 공인수⁴ · 배승철*
 (주)바이넥스 중앙연구소, ¹부경대학교 양식학과, ²국립수산과학원,
³부경대학교 수산생명의학과, ⁴부경대학교 생물공학과

Effects of Dietary Probiotics Supplementation on Juvenile Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*

Chang Wha JEONG, Hee Jung CHOI¹, Gwangyeol YOO¹, Seunghyung LEE¹,
 Young Chul KIM¹, Okorie Eme OKORIE¹, Jun Ho LEE¹, Kyoung-Dong JUN,
 Se-Min CHOI², Kang-Woong KIM², Yong-Jin KANG², Ju-Chan KANG³,
 In-Soo KONG⁴ and Sung-chul C. BAI*

¹Research and Development Center, Binex Co. Ltd., Busan, Korea

²Department of Aquaculture/Feeds and Foods Nutrition Research Center,
 Pukyong National University, Busan, Korea

³Aquafeed Research Center, East Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research and
 Development Institute, Pohang, Korea

⁴Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan, Korea

^{*}Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Busan, Korea

An 8-week feeding trial was conducted to investigate the effects of dietary supplementation with probiotics as a feed additive for juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Three experimental diets supplemented with *Bacillus polyfermenticus* (BP), *Bacillus licheniformis* (BL), or *Bacillus polyfermenticus* plus *Saccharomyces cerevisiae*, (BP+SC) at 1.0×10^7 CFU/kg diet on a dry-matter basis were prepared. The basal diet was used as a control. After the 8-week feeding trial, the respiratory burst activity (NBT assay) of fish fed the BP+SC diet was significantly higher than that of fish fed the control diet. Fish fed the BP, BL and BP+SC diets had significantly lower cumulative mortality than did fish fed the control diet after the third day of the challenge test ($P < 0.05$). However, there were no significant differences among fish fed the experimental diets in weight gain, feed efficiency, protein efficiency ratio, hematomatic index, condition factor, survival rate, or lysozyme activity. Results could suggest that dietary *B. polyfermenticus*, *B. licheniformis*, and *B. polyfermenticus* + *S. cerevisiae* enhance nonspecific immunity and disease resistance in juvenile olive flounder.

Key words: Probiotics, *Bacillus polyfermenticus*, *Bacillus licheniformis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Paralichthys olivaceus*

서 론

현재까지 양식 분야의 연구 대부분이 특정 수산생물의 대량 생산을 목적으로 이루어져 왔다. 그 결과로 대부분의 양식생물은 고밀도로 사육이 되고 있으며, 인위적인 고밀도 양식 시스템에서 양식생물은 다양한 형태의 스트레스(고밀도사육, 물리적 장애, 수질악화, 항생제 및 화학약품의 남용)에 노출되어 있다(Wendelaar Bonga, 1997). 이러한 양식조건은 사육중인 어류의 최적 성장을 방해하며(Wardle, 1981), 주변 환경에 의해 체내 대사와 생리적 상태의 부정적 변화를 가져 오게 하여 커다란 문제로 대두되고 있다. 이러한 예로서, 종묘 생산 및 양성과정에 있어서 에너지 대사와 성장을 저하 및 사망 후 육질의 변성 등을 유발하여 궁극적으로는 양식 생산량의 감소를 가져온다. 또한, 어류의 면역기능을 억압함으로

써 질병에 대한 감수성을 증가시키며 낮은 성장률을 유발하는데 직접적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Pickering, 1992). 또한, 이러한 양식조건은 비특이적 면역조절 능력을 저하시키고 병원균으로부터 감염을 일으킨다. 척추동물에 있어 비특이적 방어는 병원균의 감염시 첫 번째 방어선으로 알려져 있으며, 선천적인 면역시스템의 활성화에 의해 병원균으로부터 저항할 수 있는 능력이 강화될 수 있음이 보고되고 있다(Anderson and Siwicki, 1994). 따라서, 최근 많은 연구자들에 의해 성장촉진 및 사료효율을 개선하거나 어류의 비특이적 면역반응 및 항산화능을 증강시켜 생산성 향상 및 양식어류의 질병을 예방할 수 있는 사료첨가제를 개발하기 위한 많은 연구들이 진행되고 있다. 특히, 어류에 효과적으로 작용하는 면역증강 및 성장촉진 물질은 성장호르몬, 박테리아구생소, 다당류, 동·식물 추출물 및 영양성 요인 등으로 알려져 있다(Chen and Ainsworth, 1992; Sakai et al., 1996a, b). 그리고

*Corresponding author: scbai@pknu.ac.kr

생균제 또한 최근 틸라피아, 무지개송어 및 새우류 등에서 성장촉진 및 면역증강 효과가 입증되었다 (Lin et al., 2004; Lara-Flores et al., 2003).

넙치는 일찍부터 종묘생산 기술이 확립되었고, 질병에 대한 내성이 강하며, 광온·광염성 어종으로 사육관리가 용이하여 국내 주요 양식 대상종으로 각광받는 종이다. 이러한 넙치 양식은 1980년대 말부터 시작하여 꾸준한 생산 증대로 2005년에는 국내 해산양식어류 총생산량 64,500톤 중 약 40%를 차지하여 가장 많이 생산되고 있는 어종이다.

따라서 본 실험은 국내 주요 양식 대상종인 넙치를 대상으로 사료내 생균제 첨가시에 따른 성장 및 비특이적 면역반응에 미치는 영향을 평가하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

실험어 및 사육관리

실험어는 경상북도 포항에 위치한 양식장에서 구입한 후, 국립수산물과학원 양식사료연구센터로 운반하였다. 실험사료 및 환경에 적응시키기 위해 2주일간 기초사료를 공급하면서 예비사육을 하였다. 실험어는 평균무게 18.0±0.2 g (mean±SD)인 넙치를 사용하였으며 150 L 원형수조에 각 실험구 당 각각 20마리씩 3반복으로 무작위 배치하였다. 각 실험수조는 유수식으로 유수량은 2-4 L/min으로 조절하였다. 충분한 산소 공급을 위해 에어스톤을 설치하였으며, 실험기간 동안 평균 수온은 15±2°C로 전 실험기간 동안 자연수온에 의존 하였다. 실험사료를 1일 2회 어체중의 1.8±0.5% (오전 10시, 오후 4시) 씩 총 8주간 공급하였다.

실험사료 및 실험설계

실험에 사용된 실험사료의 조성표와 일반성분은 Table 1에 나타내었다. 실험사료의 단백질원으로 북양어분 (white fish meal), 콘글루텐밀 (corn gluten meal), 탈피대두박 (dehulled soybean meal)을 사용하였으며, 탄수화물원으로는 밀가루 (wheat flour)를, 지질원으로는 고도불포화지방산 (n-3 HUFA) 이 다량 함유된 오징어간유 (squid liver oil)를 사용하였다. 생균제의 첨가효과를 확인하기 위하여 *Bacillus polyfermenticus* (BP), *Bacillus licheniformis* (BL) 및 복합종균 (*Bacillus polyfermenticus* + *Saccharomyces cerevisiae*; BL+SC)을 실험사료 내에 각각 10⁷ CFU/kg diet 수준으로 첨가하였다. 실험사료의 조단백질 함량은 50.0%, 가용에너지는 16.4 kJ/g (단백질, 16.7 kJ/g; 지질, 37.7 kJ/g; 탄수화물, 16.7 kJ/g)으로 조절하였다 (NRC, 1993). 그리고 각 실험사료별 생균제의 첨가량에 따른 가용에너지의 차이는 셀룰로오스 (cellulose)를 첨가하여 동일하게 맞추어 주었다. 모든 실험사료는 원료를 혼합한 후 펠릿 제조기로 압출·성형하여 제작되었다. 실험사료는 밀봉하여 -20°C에 냉동 보관하면서 사용하였다.

어체측정 및 성분분석

모든 실험에 있어 어체 측정은 2주 간격으로 실시하였으며,

Table 1. Composition of the basal diet for olive flounder (% of dry matter basis)

Ingredients	%
White fish meal ¹	40.0
Corn gluten meal ²	17.0
Soybean meal ³	18.0
Wheat meal ⁴	9.0
Squid liver oil ⁵	9.0
Vitamin premix ⁶	1.0
Mineral premix ⁷	3.0
Cellulose	3.0

¹Suhyup Co. Pusan, Korea.

²Jeil feed Co. Haman, Korea.

³American Soybean Association.

⁴Young Nam Flourmills Co., Pusan, Korea.

⁵E-Wha oil Co., Ltd., Pusan, Korea.

⁶Contains (as mg/kg in diets): Ascorbic acid; 300, dl-Calcium pantothenate; 150, Choline bitartrate; 3000, Inositol; 150, Menadione; 6, Niacin; 150, Pyridoxine·HCl; 15, Riboflavin; 30, Thiamine mononitrate; 15, dl- α -Tocopherol acetate; 201, Retinyl acetate; 6, Biotin; 1.5, Folic acid; 5.4, B₁₂, 0.06.

⁷Contains (as mg/kg in diets): NaCl, 437.4; MgSO₄·7H₂O, 1379.8; NaH₂P₄ 2H₂O, 877.8; Ca(H₂PO₄)₂·2H₂O, 1366.7; KH₂PO₄, 2414; ZnSO₄·7H₂O, 226.4; Fe-Citrate, 299; Ca-lactate, 3004; MnSO₄, 0.016; FeSO₄, 0.0378; CuSO₄, 0.00033; Calcium iodate, 0.0006; MgO, 0.00135; NaSeO₃, 0.00025.

성장률을 측정하기 위하여 24시간 절식시킨 후 MS222 (100 ppm)로 마취시켜 어체무게를 측정하였다. 실험종료 후, 증체를, 사료효율, 일간성장률, 단백질전환효율, 간중량지수, 비만도 및 생존율을 조사하였다. 간중량지수를 구하기 위해 각 수조별로 3마리씩 간의 무게를 측정하였다.

실험사료 및 전어체의 일반성분은 실험사료와 각 수조별로 3마리씩 무작위로 추출하여 분쇄한 전어체를 분석하였으며, AOAC (2000) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법 (125°C, 3시간), 조단백질은 Kjeldahl 질소정량법 (N×6.25), 조지방은 직접회화법으로 분석하였다. 조지방은 샘플을 12시간 동결건조한 후 Soxtec system 1046 (Tacator AB, Sweden)을 사용하여 soxhlet 추출법으로 분석하였다.

각각의 실험종료 후, 증체를 조사와 함께 혈액성분 분석을 위하여 실험어를 채혈하기 전까지 약 24시간 동안 절식시킨 실험어를 각 수조당 3마리씩 무작위로 추출하여 실험어의 미부정맥에서 혈액을 채혈한 후, micro-hematocrit 방법 (Brown, 1980)에 의해 헤마토크리트 (hematocrit, PCV)를 측정하고, 동시에 Drabkin's 용액을 사용하여 cyan-methemoglobin 방법 (Sigma Chemical, St. Louis MO; total hemoglobin procedure No. 525)으로 헤모글로빈 (hemoglobin, Hb)을 측정하였다. 혈청성분의 분석을 위하여 채혈한 혈액을 항응고제가 처리되지 않은 원심분리관에 넣고 실온에 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 냉장보관하면서 16시간 이내에 분석하였다. 혈청성분은 임상용 kit (아산제약주식회사, 대한민국)를 사용하여 총단백질 (total protein)은 biuret법으로, 트라이글라이세라이드 (triglyceride)와 글루코스 (glucose)

는 효소법으로 그리고 GOT (glutamic oxaloacetic acids)와 GPT (glutamic pyruvic acid)는 Reitman-Frankel법으로 분석하였다.

비특이적 면역반응

Respiratory burst activity는 Secombes (1990) 방법에 따라 분석하였다. 먼저 실험어의 head kidney를 무균적으로 적출하고 teflon-glass homogenizer (099C K4424, Glass-Col Ltd., Germany)로 분쇄하여 단일 세포 현탁액을 준비하였다. 세포 현탁액은 51% percoll (Sigma Aldrich Co. Ltd) density gradient에 중층하여 4°C, 600 g에서 30분간 원심분리하였다. 실험어의 macrophage 층을 덜어내어 5,000 rpm에서 2분간 원심 분리하여 L-15 medium으로 washing한 다음 최종적으로 L-15 medium에 적정 농도로 현탁하였다. 96-well culture plate에 세포 현탁액 100 μ L (5×10^5 cells/well)를 각 well에 첨가한 후, NBT (nitroblue tetrazolium, Sigma-Aldrich) 1 mg/mL를 첨가하고 PMA (phorbol myristate acetate) 1 μ g/mL로 자극시켜 25°C에서 20분간 반응시켰다. 그 뒤 상등액을 제거하고 well을 70% methanol로 washing 한 뒤 상온에서 자연 건조시켰다. 그 후 2 M KOH 120 μ L/mL을 첨가하여 insoluble blue formazan을 수용성으로 변화시키고 DMSO (dimethyl sulphoxide, Sigma-Aldrich) 140 μ L/well를 첨가하였다. 최종적으로 그 plate를 OD 620 nm에서 micro-reader (Packard Spectrocount TM)로 측정하여 실험어의 respiratory burst activity를 분석하였다.

Lysozyme의 활성을 평가하기 위해 각각의 실험구 어류에서 분리한 혈청 0.1 mL과 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.2)에 *Micrococcus lysodeikticus* (0.2 mg/mL)를 부유시킨 suspension 2 mL과 혼합하였다. 반응은 20°C 조건에서 분광 흡광도계의 흡광도 530 nm에서 0.5분과 4.5분에 측정하였다. Lysozyme의 활성 단위는 분당 0.001의 흡광도 감소를 나타내는 효소의 양으로 정의하였다.

공격실험

사육실험 종료 후 24시간 절식시킨 넙치 치어를 사용하였다. 독성이 있는 *Edwardsiella tarda* 부유액 (1×10^6 CFU/mL)을 1.5% NaCl이 첨가된 trypticase soy agar (RSA)에 27°C에서 48시간 배양하여 준비하였다. 어류당 박테리아 부유물을 0.1 mL씩 복강주사한 후 폐사를 기록하였다. 폐사어의 폐사원인을 확인하기 위해 매일 폐사된 어체로부터 신장을 채취하여 TSA에 배양하여 *E. tarda*의 존재를 확인하였다.

통계처리

모든 자료의 통계처리는 Computer Program Statistix 3.1 (Analytical Software, St. Paul MN, USA)로 분산분석 (ANOVA test)을 실시하여 최소유의차검정 (LSD: Least Significant Difference)으로 평균간의 유의성 ($P < 0.05$)을 검정하였다.

결과 및 고찰

실험 8주간의 성장 실험 결과는 Table 2에 나타내었다. 미생물 균체인 생균제 첨가에 따른 증체율 (WG), 일간성장율

Table 2. Weight gain, feed efficiency, specific growth rate and protein efficiency ratio for oliver flounder fed experimental diet for the eight-weeks of feeding period¹

	Diets				Pooled SEM ⁶
	Control	BP	BL	BP+SC	
WG (%) ²	96.3	111	127	130	6.7
FE (%) ³	61.0	60.1	67.2	74.1	5.0
SGR (%) ⁴	1.22	1.20	1.34	1.48	0.10
PER (%) ⁵	1.19	1.33	1.45	1.48	0.06
CF (%) ⁶	1.15	1.18	1.17	1.19	0.01
HSI (%) ⁷	2.52	2.51	2.47	2.39	0.20

¹Means of triplicate groups; Values in the same row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

²Weight gain: [(final wt.-initial wt.) / initial wt.] $\times 100$.

³Feed efficiency: (wet weight gain / dry feed intake) $\times 100$.

⁴Specific growth rate: [(log final wt.-log initial wt.) / days] $\times 100$.

⁵Protein efficiency ratio: wet wt. gain / protein intake.

⁶Condition factor: {fish wt. (g) / fish length (cm)³} $\times 100$.

⁷Hepatosomatic index: (liver weight / body weight) $\times 100$.

⁸Pooled standard error of mean: SD / \sqrt{n} .

(SGR), 사료효율 (FE) 및 단백질 전환효율 (PER)에 있어서 모든 실험구간에 유의한 차이가 나타나지 않았다.

생균제는 살아있는 미생물 균체이며, 어류가 이들을 섭취함으로써 분비효소, 유기산, 비타민 및 무독성 항균물질 등의 작용에 의해 어류의 성장, 사료섭취 및 비특이적 면역반응을 증대시키는 효과를 준다 (Irianto & Austin, 2002; Gatesoupe, 1999). 이러한 효과로 새우, 차넬메기, 무지개송어 및 나일틸라피아에 있어 *Bacillus* spp.와 *Streptococcus* spp.의 공급으로 성장률과 사료효율이 증가한다고 보고되어 있으나 (Maurilio et al., 2003; Raida et al., 2003; Porubcan, 1991; Queiroz & Boyd, 1998), 본 실험에 있어서 유의한 차이가 없는 관계로 사육한 수온이 $15 \pm 2^\circ\text{C}$ 인 점과 염분이 34.2 ± 0.2 ppt로 세균들의 발육에 부적합하였을 것으로 판단되어진다. Paek et al. (2001)의 보고에서 사람 및 가축에 사용되는 probiotics의 최적 온도가 37°C 로 보고하였으며, 양식어의 사육 수온이 $15-25^\circ\text{C}$ 인점을 감안하면 양식어에 사용하기에는 부적절하다고 생각되어진다. 따라서 해수 양식어에서 사용을 하고자 하면, 높은 염분 농도에도 견딜 수 있는 probiotics의 개발이 필요하다고 생각되어 지며, 이러한 결과는 이스라엘 잉어에서 효소제, 효모제 및 생균제를 첨가하였을 때 성장속도와 사료효율 개선에 효과가 없었다는 보고와 일치하였다 (Noh et al., 1994).

생균제를 첨가한 실험사료를 넙치 치어의 혈액 및 혈청 성분변화는 Table 3에 나타내었다. 혈청의 GOT에 있어서 BL을 첨가하여 공급한 실험구가 BP와 BP+SC를 복합 첨가하여 공급한 실험구보다 유의하게 높은 값을 나타내었으며 ($P < 0.05$), 대조구와는 유의한 차이가 없었다. Hemoglobin, Hematocrit, Serum Total protein, Serum glucose 및 Serum GPT는 모든 실험구간에 유의한 차이가 없었다. 어류의 혈액성분은 영양, 건강상태 및 스트레스 해석의 차원으로 사용이 가능하고, 사료의 필수영양소의 결핍이나 그 어종이 처해있는 서식

Table 3. Hematological and serological characteristics of olive flounder fed experimental diets for the eight-weeks¹

	Diets				Pooled SEM ⁴
	Control	BP	BL	BP+SC	
Hemoglobin (g/dL)	6.23	6.15	5.94	6.11	0.07
Hematocrit (%)	27.8	28.2	28.7	26.9	0.54
Serum GOT (IU/L) ²	48.8 ^{ab}	46.7 ^b	52.0 ^a	46.4 ^b	0.87
Serum GPT (IU/L) ³	10.1	10.2	10.4	9.67	0.45
Serum Total protein (g/dL)	3.63	3.60	3.33	3.20	0.16
Serum glucose (mg/dL)	47.4	46.1	46.2	46.5	1.08

¹Means of triplicate groups; Values in the same row with different superscripts are significantly different (P<0.05).

²Glutamic oxaloacetic transaminase. One unit is defined as the amount of enzyme causing the transamination of 1.0 μmol of L-aspartate per minute at 25°C and pH 7.4.

³Glutamic pyruvic transaminase. One unit is defined as the amount of enzyme causing the transamination of 1.0 μmol of L-alanine per minute at 25°C and pH 7.4.

⁴Pooled standard error of mean : SD/√n.

환경 및 성장에 따라서도 변화된다고 보고되었다 (Siddiqui, 1977; Garrido et al., 1990).

비특이적 면역반응의 결과는 Table 4에 나타내었다. 비특이적 면역반응 분석 방법으로 NBT법과 혈청내 lysozyme 활성을 확인하였으며, BP+SC를 공급한 실험구의 NBT 활성이 대조구에 비해 유의하게 높은 값을 보였으나 (P<0.05), BP, BL 및 BP+SC를 공급한 실험구간에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 그러나 혈청의 lysozyme 활성에 있어서는 전 실험구간에 있어서 유의한 차이가 없었다 (Table 5). 하지만, 넙치 사료내 *B. polyfermenticus*와 *S. cerevisiae*의 혼합 첨가시 비특이적 면역반응을 증가시키는 결과를 확인할 수 있었다. Taoka et al. (2006)의 보고에 따르면, 넙치에 있어서 *B. subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Clostridium butyricum* and *Saccharomyces cerevisiae*를 복합첨가 하였을 경우 비특이적 면역반응이 증가하였음을 확인하였고, 본 실험에서도 동일한 결과를 얻었다. 또한, 새우 (*Penaeus vannamei*)에 있어서 *S. cerevisiae*의 공급이 비특이적 면역반응을 증가시키며, *Vibrio*에 대한 저항성을 증가시켰다는 보고와 일치하였다 (Scholz et al., 1999).

어류에 있어 비특이적 면역반응이 얼마나 증대 되었는지를 가장 잘 반영할 수 있는 필수적인 척도로서 식세포활성 (phagocyte activity) 측정이 많이 사용된다. 그 외 혈청내 lysozyme 활성 및 보체의 활성 등이 사용되고 있으며, 병원성

Table 4. Non sepcific immune factors of oliver flounder fed the experimental diets for the eight-weeks¹

Diets	NBT (O.D/10 ⁶ cells)	Lysozyme activity (U/mL)
Control	0.05 ^b	50.8
BP	0.08 ^{ab}	48.0
BL	0.08 ^{ab}	49.6
BP+SC	0.11 ^a	51.6
Pooled SEM ²	0.01	1.31

¹Values are means from triplicate groups; Values in the same column not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05).

²Pooled standard error of mean: SD/√n.

Table 5. Cumulative mortality (%) after intraperitoneal injection of *E. tarda* in cultured olive flounder¹

Days	Diets				Pooled SEM ²
	Control	BP	BL	BP+SC	
1	25.0 ^a	2.78 ^b	5.56 ^b	5.56 ^b	3.05
2	55.6 ^a	41.7 ^a	22.2 ^b	13.9 ^b	5.43
3	80.6 ^a	50.0 ^b	50.0 ^b	33.0 ^b	6.02
4	91.7 ^a	72.2 ^b	69.4 ^b	58.3 ^b	4.24
5	100 ^a	83.3 ^b	86.1 ^b	69.4 ^c	3.53
6	100 ^a	88.9 ^b	91.7 ^b	77.8 ^c	2.54

¹Means of triplicate groups; Values in the same row with different superscripts are significantly different (P<0.05).

²Pooled standard error of mean: SD/√n.

세균을 실제로 어류에 접근하여 저항성을 평가한다. 현재까지 식세포의 활성을 측정하기 위해 사용되어진 방법은 식균율의 변화, 화학주성 변화 및 호흡폭발의 변화 등이다. 호흡폭발이란 식세포가 식작용 동안 혹은 다른 물질들에 의해서 자극받았을 때 산소 소비량이 증가함과 동시에 O₂, OH, H₂O₂와 같은 산소라디칼 (reactive oxygen intermediates, ROIs)을 다량으로 방출하는 현상을 말하며, 이러한 ROIs는 병원체를 죽이는데 매우 중요한 역할을 한다 (Siwicki and Dunier, 1993).

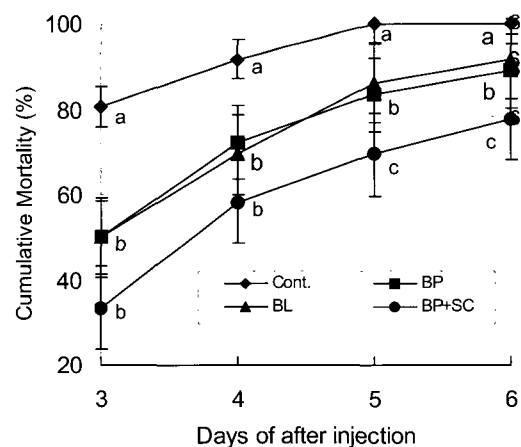


Fig 1. Cumulative mortality (%) after intraperitoneal injection of *E. tarda* in cultured olive flounder.

Table 6. Proximate analysis of whole-body composition for olive flounder fed experimental diets for the eight-weeks (% of DM basis)¹

Diet	Crude Protein	Crude Lipid	Crude Ash	Moisture
Control	65.4	19.9	13.1	73.6
BP	64.7	19.5	13.4	73.7
BL	65.1	19.4	13.4	73.8
BP+SC	65.6	19.9	13.1	74.0
Pooled SEM ²	0.04	0.06	0.07	0.33

¹Means of triplicate groups; Values in the same row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

²Pooled standard error of mean: SD/\sqrt{n} .

이러한 호흡폭발을 측정하는 방법으로 NBT법이 많이 사용되어져 왔으며, 최근 chemiluminescence (CL)법이 일부 사용되고 있다.

공격실험 (인위적 감염에 의한 누적폐사율)의 결과는 Table 5와 Fig. 1에 나타내었다. *E. tarda*균에 대한 저항성을 확인한 결과 BP+SC를 공급한 실험구가 전 실험기간동안 대조구에 비하여 폐사율이 유의하게 낮은 값을 나타내었다. 폐사 개체는 *E. tarda*를 접종한지 1일째부터 발생 하였으며, 접종후 7일째 종료 하였다. 모든 폐사된 개체로에서 *E. tarda*균에 대한 양성반응을 나타내었으며, 생균제를 첨가한 실험 사료가 대조구에 비해 초기폐사율이 낮게 나타났다. 공격실험을 실시한 5일째부터 종료시까지는 BP+SC를 공급한 실험구가 BP 및 BL을 공급한 실험구들 보다 유의하게 낮은 값을 나타내었으며, BP 및 BL을 공급한 실험구들은 대조구 (Control)에 비하여 유의하게 낮게 나타났다.

전어체 일반 성분은 Table 6에 나타내었으며, 조단백, 조지방, 조회분 및 수분 분석에 있어서 전 실험구간에 유의한 차이를 나타내지 않았다.

본 실험의 결과를 통하여 배합사료 내 *B. polyfermenticus*와 *B. licheniformis*의 단독 첨가 및 *B. polyfermenticus*와 *S. cerevisiae*의 혼합하여 각각 10^7 CFU/kg diet 수준으로 첨가하여 공급할 경우 넙치의 비특이적 면역반응 증가와 *E. tarda*균에 대한 질병 저항성에 가장 좋은 효과를 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 부경대학교 사료영양연구소와 (주)바이넥스가 산학연 컨소시엄으로 수행된 결과이며, 연구개발비 지원과 함께 시료를 제공해 주신 (주)바이넥스에 감사드립니다. 또한 본 연구 수행에 있어서 실험 장소를 제공해 주신 국립수산물학원 양식사료연구센터 및 시료 분석을 도와주신 부경대학교 사료영양연구소 연구원들에게 깊은 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

- Anderson, D.P. and A.K. Siwicki. 1994. Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion. Prog. Fish Cult. 56, 258-261.
- AOAC. 2000. Ch. 4. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, VA, 1-54
- Brown, B.A. 1980. Routine hematology procedures. In Hematology: Principles and Procedures, 71-112. Lea and Febiger, Philadelphia. Bull. Freshwater Fish Res. Lab., 12, 1-4.
- Chen, D. and A.J. Ainsworth. 1992. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus Rafinequ*. J. Fish Dis., 15, 295-304.
- Garrido, L.G., R.M. Chapuli and A.V. Andres. 1990. Serum cholesterol and triglyceride levels in *Scyliorhinus canicula* (L.) during sexual maturation. J. Fish Biol., 36, 499-509.
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture., 180, 147-165.
- Lara-Flores, M., A.M. Olvera-Novoa, E.B. Guzman-Mendez and W. Lopez-Madrid. 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 216, 193-201.
- Lin, H.Z., Z. Guo, Y. Yang, W. Zheng and Z.J. Li., 2004. Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. Aquacult. Res., 35, 1441-1447.
- Irianto, A. and B. Austin. 2002. Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Diseases, 25, 633-642.
- Noh, H., K.I. Han, T.H. Won and Y.J. Choi. 1994. Effect of antibiotics, enzymes, yeast culture and probiotics on the growth performance of Israeli carp. Kor. J. Anim. Sci., 36, 480-486.
- NRC (National Research Council). 1993. Nutrient Requirements of Warmwater Fishes and Shellfishes. National Academy Press, Washington, D.C., 1-102.
- Paek, N.S., Y.B. Lim and Y.M. Kim. 2001. Antibacterial activity and growth promotion in aquacultured fish by probiotics. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.

- 29, 56-61.
- Pickering, A.D. 1992. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. *Aquaculture*, 100, 125-139.
- Porubcan, R.S. 1991. Reduction in chemical oxygen demand and improvement in *Penaeus monodon* yield in ponds inoculated with aerobic *Bacillus* bacteria. Program and Abstracts of the 22nd Annual Conference and Exposition, 16-20 June 1991, San Juan, Puerto Rico. World Aquaculture Society.
- Raida, M.K., J.L. Larsen, M.E. Nielsen and K. Buchmann. 2003. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). *J. Fish Dis.*, 26, 495-498.
- Queiroz, J.F. and C.E. Boyd. 1998. Effects of a bacterial inoculum in channel catfish ponds. *J. World Aquacult. Soc.*, 29, 67-73.
- Sakai, M., M. Kobayashi and H. Kawauchi. 1996a. *In vitro* activation of fish phagocytic cells by GH, prolactin and somatolactin. *J. Endocrinol.*, 151, 113-118.
- Sakai, M., M. Kobayashi, and H. Kawauchi. 1996b. Mitogenic effects of growth hormone and prolactin on chum salmon *Oncorhynchus keta* leucocytes in vitro. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 53, 185-189.
- Scholz, U., G. Garcia Diaz, D. Ricque, L.E Cruz Suarez, F. Vargas Albores and J. Latchford. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture*, 176, 271-283
- Secombes, C.J. 1990. Isolation of Salmonid Macrophages and Analysis of their Killing Activity. In: *Techniques in Fish Immunology*, No. 1. J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Roberson and W.B. van Muiswinkel ed. SOS Publication, Philadelphia, 137-154.
- Siddiqui, A.Q. 1977. Reproductive biology, length-weight relationship and relative condition of *Tilapia leucosticta* (Trewavas) in Lake Naivasha, Kenya. *J. Fish Biol.*, 10, 251-260.
- Siwicki, A.K. and M. Dunier. 1993. Quantification of antibody secreting cells to *Yersinia ruckeri* ELISPOT assay after *in vivo* and *in vitro* immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 37, 73-80.
- Taoka, Y.H. Maeda, J.Y. Cho, M.J. Jeon, S.C. Bai, W.J. Lee, K. Yuge and S. Koshio. 2006. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fish. Sci.*, 72, 310-321.
- Wardle, C.S. 1981. Physiological stress in captive fish. In: *Aquarium systems*. A.D. Hawkins, ed. Academic Press, London, U.K., 403-414.
- Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77, 591-625.

2006년 7월 14일 접수
2006년 12월 22일 수리