

진피(*Citrus unshiu* Peel)추출물이 첨가된 사료의 급이가 넙치의 성장률 및 항스쿠티카충 효과에 미치는 영향

방석진 · 최재혁 · 정상목 · 강인성 · 이찬흔* · 박관하 · 최상훈†

군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과
*(유)금성상공

Effects of *Citrus unshiu* Peel extracts on growth performance and anti-scudicociliates activity of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

Seok Jin Bang, Jae Hyeok Choi, Sang Mok Jung, In Sung Kang,
Chan Heun Lee*, Kwan Ha Park and Sang Hoon Choi†

Department of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science and Technology, Kunsan National University, 558 Daehak-ro, Gunsan-si, Jeonbuk, Korea

*Geum Sung Sang Gong co., Ltd., 102, 2-gil Bong Hwanggongdan Gimje-si, Jeonbuk, Korea

In an attempt to find a feed additive showing an anti-scudicociliate effect, extracts from *Citrus unshiu* Peel were tested against virulent scudicociliate infection. The most effective anti-scudicociliate killing activity *in vitro* was observed in the extract squeezed from homogenizing water-soaked dried tangerine peel (DTP). In addition, we have investigated the effect of DTP as a feed additive on growth rate and anti-parasitic activity of olivaceous flounder. DTP extract added diets (0.1, 0.5, 1, and 5%/feed weight) were fed to flounder for 7 days for checking a growth rate and 14 days for a challenging test. As a result, the feed conversion rate was significantly improved only in 1% DTP extract group compared to the control and 0.5% DTP extract fed group showed 100% of survival rate in the challenge test, all of which indicating that DTP extract would be a potential feed additive against scudicociliatosis.

Key words: *Citrus unshiu* Peel extracts, scudicociliates, olive flounder, growth performance

스쿠티카충(Scudicociliatosis)은 Scudicociliatida목에 속하는 섬모충에 의해 발생 되는 감염증을 말하며 치료대책이 없고 폐사율이 높아 우리나라의 넙치양식에서 심각한 문제로 대두되는 기생충성 질병이다. 스쿠티카충의 대표적인 원인충인 *Mia-*

*miensis avidus*는 감염어의 체표와 지느러미, 아가미에 기생하여 피사를 유발하고 대부분의 체외기생성 섬모충과는 달리 혈류를 타고 장, 신장, 생식소, 비장 및 뇌 조직까지 침투하여 높은 폐사를 유발한다 (Harikrishnan et al., 2010).

현재 스쿠티카충에 대한 대책으로는 포르말린(37% formaldehyde solution)이 유일하게 스쿠티카충 구제제로 승인되어 사용되고 있으나 식품으로서의 안전성과 환경오염을 일으키는 문제가 보고

†Corresponding author: Sanghoon Choi
Tel: +82-63-469-1886, Fax: +82-63-463-9493
E-mail: shchoi@kunsan.ac.kr

되고 있다 (Kang et al., 2014). 현재까지 스쿠티카충 구제물질에 관한 연구로는 기생충 구제제를 포함한 다양한 화학요법제 (Kim et al., 2001; Park et al., 2014; Lee et al., 2017) 그리고 천연유래물질 등 (Kang et al., 2014; Mallo et al., 2016)을 이용한 항스쿠티카충 효과에 관한 연구 결과가 보고되었으나 in vivo 및 현장실험에서의 효과가 부족하여 현재까지 상용화되지 않고 있는 실정이다.

스쿠티카충은 넙치의 면역기전 중 여러 세포성 면역 기전을 저해하는 물질을 분비하는 것으로 밝혀졌으며 넙치는 스쿠티카충에 대한 저항력이 다른 어종에 비해 떨어지는 것으로 나타났다 (Kim et al., 2004). 실제로 조피볼락 양식장은 스쿠티카충에 대한 피해가 거의 없지만 유독 넙치 양식장에서 심각한 피해를 보고 있는 것도 이러한 스쿠티카충의 면역기전 억제능력 그리고 넙치의 스쿠티카충에 대한 낮은 저항성에 의한 결과라 할 수 있다. 이러한 스쿠티카충의 감염을 막기 위하여 백신 개발이 국내외에서 활발히 진행되고 있다. *M. avidus*의 불활화백신을 넙치에 접종하면 특이 면역이 증강되는 사실이 알려져 있으며 (Jung et al., 2006) 또한 DNA 재조합 백신 (Kim et al., 2006) 및 스쿠티카충 백신에 효과적인 adjuvant (Sitjà-Bobadilla et al., 2008)도 개발되었으나 현장에서의 성공적인 사용 결과는 보고되고 있지 않다.

폐기부산물로 처리되는 감귤의 과피를 완전 건조시켜 한약재로 쓰는 진피 (*Citrus unshiu* Peel)는 대한약전에 귤나무 (*Citrus unshiu* Markovich)의 건조된 잘 익은 열매껍질로 정의되어 있으며, 정량할 때 환산한 건조물에 대하여 폴리페놀의 일종인 hesperidin ($C_{28}H_{34}O_{15}$: 610.56)이 4% 이상을 함유하도록 대한약전에 규정되어 있다 (Kim et al., 2007; Moon et al., 2012). 진피는 기능성 성분을 많이 포함하고 있는 폴리페놀류, 비타민류, limonoid류 등의 다양한 천연화합물을 함유하고 있어 의약품 소재 및 기능성 식품으로의 가능성을 인정받고 있다 (Park et al., 2011). 예를 들어 Jung et al. (2010)은 감귤류 중 유자를 첨가한 사료를 넙치에 급여했을 시 혈청 내 항균활성이 유의적으로 높게 나온다고 보고하였다. 또한, 한약재 추출물의 항원충 효과의 가능성을 제시하는 사례도 보고되고 있으며 (Youn

et al., 2003; Park et al., 2005), 한약재 추출물이 사람에게 기생하는 병원성 원충뿐만 아니라 어류에 기생하는 스쿠티카충에서도 효과가 있는 것으로 보고되어 있다 (Lee et al., 2010).

본 연구에서는 항스쿠티카충 효과가 있는 사료 첨가제를 개발하고자 다양한 방법으로 추출한 진피추출물을 대상으로 사료에 첨가하여 넙치에 급여한 후 성장률 및 항스쿠티카충을 조사하였다. 스쿠티카충의 분리를 위해 완도의 육상수조 양식장에서 스쿠티카충을 나타내는 넙치를 실험실 내로 이동하여 최종 감염 기관인 뇌를 적출 하였다. 적출한 뇌조직을 phosphate buffer saline (PBS)에 1% penicillin-streptomycin (p/s)를 첨가한 용액으로 3회 세척 후 25 cm² polystyrene culture flask (SPL, Pocheon, Korea)를 이용하여 25°C에서 12시간 배양하였다. 이후 감염 조직액 1 mL를 PBS로 2배 단계 희석하여 순수 분리하였다. 분리한 스쿠티카충은 1651 MA medium (ATCC, Virginia, USA)에서 배양하였으며 25°C에서 7일마다 계대배양 하여 유지하였다 (Soldo et al., 1972; Gomez-Saladin et al., 1993). 순수 분리한 스쿠티카충의 동정을 위해 배양액 1 mL를 원심분리하여 상층액을 제거한 후 DNA 정제 kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 DNA를 분리하였다. 18S rRNA 염기서열분석을 위한 PCR은 eukaryotic universal primers A (5'-ACC TGG TTG ATC CTG CCA GT-3')와 B (5'-TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC-3') (Medlin et al. 1988)를 사용하여 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 2분씩 총 30회 실시하였고, *cox1* gene 염기서열분석을 위한 PCR은 F199d-B2 (5'-TCA GGA GCT GCM TTA GCH ACY ATG-3')와 R1143d (5'-TAR TAT AGG ATC MCC WCC ATA AGC-3') (Jung et al., 2011)를 사용하여 94°C에서 45초, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 45초씩 총 40회 실시하였다. PCR로 획득한 증폭 산물은 1.5% agarose gel (Sigma, St. Louis, MO, USA)에서 전기영동 후 목적 DNA의 증폭 여부를 gel documentation system (Wisd, Wertheim, Germany)상에서 확인하였다. 그 후 target band를 잘라내고 AccuPrep gel extraction kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 PCR product를 추출하였다. 정제된 PCR product는 pGEM-T Easy

Vector (Promega, Madison, USA)에 TA cloning한 다음 *Escherichia coli* DH5 α competent cell (TaKaRa, Kyoto, Japan)에 형질 전환하였으며 plasmid DNA는 AccuPrep plasmid purification kit (Bioneer, Daejeon, Korea)로 정제하여 염기서열을 결정하였다. DNA 염기서열 결정은 ABI Prism BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 ABI 3130xl Genetic Analyzers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 클로닝된 유전자의 확인은 SP6 (5'-TAT TTA GGT GAC ACT ATA G-3')와 T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') primer를 사용하였다. 유전자 염기서열 분석은 DNASIS MAX v3.0 program (Hitachi Software, Tokyo, Japan)을 사용하였으며, 유전자 염기서열의 상동성은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)를 통하여 검색하였다.

실험에 사용된 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)는 평균체중 37 \pm 1.3 g으로 전남 고흥 소재의 양식장에서 분양받아 비슷한 중량의 넙치로 선별하여 원형수조에 약 1주일 동안 순치시켰다. 순치 전 넙치는 100 ppm 농도의 포르말린(37% Formaldehyde)으로 30분 동안 약욕하였다. 실험에 사용된 사각 유리수조 (900 \times 450 \times 450 mm)에 해수를 수심 400 mm만큼 채운 후 수온은 20 \pm 3 $^{\circ}$ C로 유지하였으며 순환 여과식 사육법을 사용하였다. 순치기간 중 그룹을 나누기 전 무작위로 10미를 샘플링하여 입식된 실험넙치가 스쿠티카충에 감염되지 않았음을 확인하였으며 환수는 일주일에 1회씩 100% 실시하였다. 환수에는 과산화수소 100 ppm으로 소독된 해수를 사용하였다. 스쿠티카충에 의한 공격실험 전까지 일반 사료 및 첨가사료를 공급한 그룹에서 스쿠티카충은 물론 바이러스 등에 의한 넙치의 주요 질병이 전혀 관찰되지 않았다.

본 연구에서 사용된 진피 (dried tangerine peel, *Citrus unshiu* Peel, DTP)는 군산에 위치한 한약방에서 구매하였으며 가장 효과적인 추출물을 확보하고자 5가지의 추출방법을 사용하였다. 첫째, 진피를 분쇄하여 가루로 제작한 후 증류수 100 mL에 진피가루 10 g을 넣고 overnight을 하여 수분을 흡수시킨 후 부직포로 압착하여 착즙하였다. 둘째, 증류수 100 mL에 진피 10 g을 넣고 overnight 하여

수분을 흡수시킨 후에 균질화하고 부직포로 압착하여 착즙하였다. 셋째, 증류수 100 mL에 진피를 10 g을 넣고 overnight 하여 수분을 흡수시킨 후에 균질화 하였고 600 \times g에 15분간 원심분리 후 상층액을 분리하였다. 넷째, 진피 10 g을 증류수 100 mL에 넣고 hot plate를 이용하여 100, 90, 80, 70, 60 $^{\circ}$ C에서 각각 boiling하여 열수 추출하였다. 마지막으로 다섯 번째, 진피 10 g을 70% 에탄올에 넣고 Branson Bransonic $^{\circ}$ CPX Digital bath 8800 (EMERSON, St. Louis, US)으로 1시간 동안 sonication 하였으며 600 \times g으로 10분간 원심분리를 하여 수집한 상층액을 감압농축플라스크에 취하여 50 $^{\circ}$ C 이하의 수욕 상에서 감압 농축하여 에탄올을 모두 증발시켰다. 진피 추출물에는 다양한 생리활성 물질이 복합적으로 포함되어 있으므로 추출 방법에 따라 절대적 희석농도인 %로 표기하였다. 각각의 추출물들은 스쿠티카충에 대한 최소치사농도 (Minimal lethal concentration, MLC)를 측정하는데 사용하였다.

여과된 멸균해수에 각각의 추출물들을 40%부터 1.25%까지 2배 단계 희석하여 96 well plate의 각 well에 200 μ l씩 희석단계 별로 3반복으로 넣고 well 당 4 \times 10 3 cells/100 μ l로 스쿠티카충을 노출시켰다. 대조군은 멸균해수에 증류수를 40%부터 1.25%까지 2배 단계 희석하여 실험군과 동일한 조건으로 수행하였다. 추출 방법에 따라 스쿠티카충에 대한 MLC를 알아보기 위해 18 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 전체 스쿠티카충의 운동성이 없어졌을 때 또는 충체가 완전히 터진 상태를 사멸로 간주하여 MLC를 측정하였다 (Iglesias et al., 2002).

가장 효과적인 MLC를 나타낸 진피추출물을 각각 사료 중량 대비 0.1, 0.5, 1 및 5% 씩 첨가하여 첨가사료를 제작하였다. 제작 시 사료 100 g 당 D.W. 39.9 mL에 진피 추출물 0.1 mL를 넣은 후 첨가한 균을 0.1%군, 사료 100 g당 D.W. 39.5 mL에 진피 추출물 0.5 mL를 첨가한 균을 0.5%군, 사료 100 g당 D.W. 39 mL에 진피 추출물 1 mL를 첨가한 균을 1%군, 사료 100 g당 D.W. 35 mL에 진피 추출물 5 mL를 첨가한 균을 5% 군으로 하고 D.W. 40 mL을 사료 100 g에 흡착시킨 균을 대조군으로 하였다. 플라스틱 통에 사료를 넣고 각각의 방법으로 진피추출물을 첨가한 후 골고루 흔들어주어 사료 전

체에 흡착이 되게 한 후 균일하게 건조 시켰다. 제작한 사료는 사용할 때까지 -20℃에서 보관하였다.

넙치의 선별 과정에서 실험어의 최초 무게를 측정하고 어체 중량의 3%에 해당되는 첨가 사료 및 일반사료를 매일 2회(10시 및 18시)씩 총 7일 동안 각 군당 10미를 대상으로 급여하였다. 급여 후 공격실험 전 최종무게를 측정하여 성장률을 측정하였다. 실험어가 섭취한 사료량은 사료를 공급한 지 30분 후에 섭취하지 않은 사료를 전부 채취하여 건조 시킨 후 전체 공급량에서 제외하여 측정하였다. 최종무게 측정 후 아래와 같은 공식을 이용하여 증체량, 증체율, 일일 성장률 및 사료계수를 산출하였다.

$$\text{Weight gain (g)} = \text{Final weight (g)} - \text{Initial weight (g)}$$

$$\text{Percent weight gain (PWG)} = [100 \times (\text{Final weight} - \text{Initial weight}) / \text{Initial weight}]$$

$$\text{Specific growth rate (SGR)} = \{[\text{LNFinal weight (g)} - \text{LNInitial weight (g)}] / \text{DAY}\} \times 100$$

$$\text{Feed conversion ratio (FCR)} = \text{Total feed taken (g)} / \text{Weight gain (g)}$$

스쿠티카충을 대량배양하기 위해 2 L medium bottle에 1651 MA medium 1 L를 넣고 스쿠티카충을 2×10^3 cells/mL 만큼 접종하였다. 접종 후 shaking incubator에서 130 rpm, 25℃로 진탕 배양하였다. 접종 4일 후 2×10^5 cells/mL에 도달하였을 때 공격실험에 사용하였다. 공격실험을 위해 각 군의 10미씩의 넙치를 10 L 아크릴 수조에 수용한 뒤 스쿠티카충의 최종 농도가 2×10^3 cells/mL이 되도록 사육수에 접종하여 48시간 동안 침지 감염시켰다. 스쿠티카충의 침지 접종농도는 선행 실험들의 농도를 참고하여 예비실험을 통해 최종 결정하였다 (Jung et al., 2006; Lee et al., 2017). 침지 감염

후 넙치를 원래의 본 수조로 환원한 뒤 200 L 외부 여과기를 사용하여 독립된 순환 여과식 사육법을 사용하였다. 다음 날부터 사료를 공급하고 공격실험 기간 동안 폐사한 개체는 즉시 폐사원인을 분석하였다. 스쿠티카충으로 인한 폐사는 스쿠티카충 감염증상인 체표괴사, 체색흑화, 괴사 부위 및 뇌에서 충의 분리를 통해 판단하였다. 공격실험과 성장실험을 제외한 모든 실험은 3 반복으로 수행하였으며 데이터를 평균과 표준편차 (mean±S.D.)로 표현하고 각 그룹 간의 유의성 검정을 위해 ANOVA 분석 후 Newman-Keuls 검정을 사후비교로 사용하였다. 유의성의 판단 기준은 $P < 0.05$ 일 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 공격실험은 넙치의 미수를 10미와 6미씩 각각 달리하면서 2 반복을 하였으나 폐사율에 대한 결과는 유사하였으며 본 연구에서는 10미에 대한 결과를 대표적으로 제시하였다. 성장실험은 단 회 그룹 당 10미씩 수행하였다.

본 연구에서는 항스쿠티카충 효과를 낼 수 있는 사료 첨가제를 개발하고자 진피 추출물이 첨가된 사료를 넙치에 급여한 후에 성장률과 함께 항스쿠티카충을 평가하였다. 실험에 사용된 스쿠티카충은 동정 결과 *Miamiensis avidus*로, serotype은 type II로 나타났으며, 종 동정 결과는 Table 1에 나타내었다. Fig. 1은 다양한 추출 방법을 통해 수집된 진피 추출물의 스쿠티카충에 대한 MLC 결과를 보여주고 있다. 진피를 분쇄한 후 수분을 흡수시킨 군 (A)과 진피에 수분을 흡수시킨 다음 분쇄한 군 (B)의 MLC는 각각 40%와 5%로 큰 차이를 보였으며 진피에 수분을 흡수시킨 후 분쇄하여 수집한 상층액 (C)과 B를 비교하였을 때에도 각각 40%와 5%의 큰 차이를 보였다. 열수 추출하였을 때 (D-100, 90, 80, 70, 60)에는 100℃를 제외한 모든 추출온도에서 20%로 나타났으며 100℃에서는 살충효과가 전혀 관찰되지 않았다. 진피를 70% ethyl alcohol에

Table 1. Output of BLAST for scuticociliate

Accession No.	Description	Score (bits)	Identities (%)	E value
AY550080	<i>Miamiensis avidus</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1319	100	0
EU831214	<i>Miamiensis avidus</i> strain A3 cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial	1663	100	0

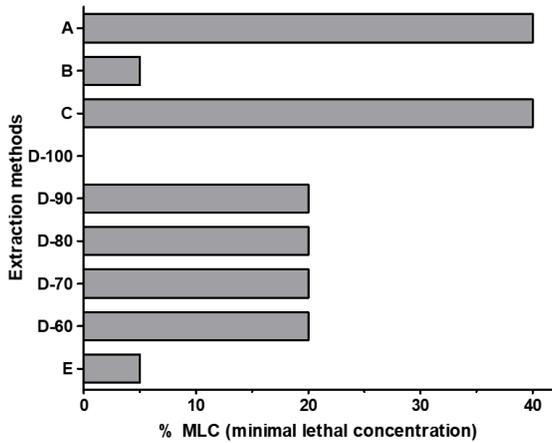


Fig. 1. The parasite killing effects of dried tangerine peel (DTP) by five different extraction methods. A, extract squeezed from water soaked ground DTP; B, extract squeezed from homogenizing water soaked DTP; C, supernatant extract centrifuged from homogenizing water soaked DTP; D, hot water extracts at 60, 70, 80, 90 and 100 °C; E, 70% ethanol extract.

서 sonication한 후 감압 농축한 군 (E)에서는 B와 같은 5%의 MLC를 보였다. 열수 추출하는 방법 (D-100)에서 살충효과가 전혀 나타나지 않은 반면에 나머지 60~90°C에서 열수 추출한 방법 (D-60~90)에서는 20%의 MLC가 관찰되었다. 이러한 결과로 스쿠티카충을 살충시키는 진피의 물질이 열에 대한 어느 정도의 내성을 가지고 있지만 boiling에서는 약한 것으로 나타났다. 진피를 분쇄시켜 가루로 만든 뒤 수분을 흡수시켜 착즙한 경우 (A)에 40%의 MLC가 나타난 반면 진피에 수분을 흡수시키고 분쇄한 다음 착즙한 경우 (B)에 5%의 MLC가 나타난 결과를 미루어 볼 때 스쿠티카충을 살충시키는 진피의 물질이 물리적 충격에 파괴되는 물질이며 먼저 수분을 흡수시킨 후 분쇄했을 경우 그 충격이 완화될 수 있는 것으로 판단되었다. 또한 70% ethanol에서 sonication을 한 다음 감압농축을 한 경우 (E)에 B와 마찬가지로 5%의 결과가 나타난 것으로 보아 살충효과가 있는 천연물질이 수용성인 것으로 생각된다. 하지만 E의 방법으로 제작된 추출물은 보관과정에서 경화되는 현상이 나타났다. 따라서 추출방법이나 보관상의 문제를 고려해 보았을 때 B의 추출방법이 가장 효율적이라고

판단된다.

진피의 대표적인 성분인 hesperidin은 flavanone에 속하는 폴리페놀로 감귤류 및 진피에 다량 함유되어있는 것으로 알려져 있다 (Ham et al., 2008). 진피 추출물이 스쿠티카충에 대한 직접적인 살충효과를 나타내는 이유로 폴리페놀 성분이 작용한 것으로 추측되는 바 본 연구의 선행실험으로 폴리페놀의 표준물질인 gallic acid와 protocatechuic acid를 이용하여 스쿠티카충에 대한 MLC를 조사한 결과 0.1%와 0.4%로 나타났으며 고분자 폴리페놀인 tannic acid에서는 0.06%의 MLC를 나타내었다(논문 준비 중). 그러나 진피 추출물의 어떠한 성분이 스쿠티카충에 직접적인 살충작용을 하는지에 관한 연구, 또한 해당 물질이 체내에 흡수된 후 대사과정을 거쳐 배설될 때까지의 약동학적인 연구가 추후 진행 되어야 할 것으로 생각된다.

살충효과가 가장 좋았던 B 방법으로 얻은 진피 추출물을 기본사료 중량의 0.1, 0.5, 1 및 5%만큼 각각 첨가하여 제작한 사료를 7일간 녀치에 급여한 후 성장률 및 스쿠티카충 공격실험에서 항스쿠티카충을 평가하였다. 그 결과 진피 추출물을 첨가한 사료를 공급하여 7일간 사육한 결과 폐사한 개체는 없었으며 Table 2에 제시된 것처럼 최초 무게는 평균 37 g 내외로 비슷하였으며 모든 군에서 대조군에 비해 최종무게, 증체량, 증체율 및 일일 성장률에 있어서는 유의적 및 평균적으로 차이가 없었으나 사료계수에 있어서는 1% 그룹에서만 유의성 있게 ($p < 0.05$) 개선되었다.

Fig. 2는 진피 추출물을 사료 중량의 0.1, 0.5, 1 또는 5%만큼 각각 첨가한 사료를 10 미의 녀치에게 각 그룹 당 7일 동안 공급한 후 스쿠티카충을 감염시켰을 때 2주간에 걸친 누적 폐사율을 보여주고 있다. 공격 3일째부터 폐사가 나타나기 시작하여 6일째 이후로 폐사한 녀치가 더 이상 나타나지 않았다. 공격실험 기간 동안 0.5% 군의 경우 100% 생존하였으며 5% 군의 경우 5일째에 전량 폐사하였다. 대조군과 1% 군에서는 6일째에 40%의 생존율을 보였다. 시간 차이를 두고 각 6 미씩을 대상으로 한 반복 공격실험에서도 유사한 결과도 출되었으며 폐사한 개체는 모두 체표괴사 및 새변의 곤봉화, 빈혈 등의 전형적인 스쿠티카충을 보

Table 2. Effects of dietary dried tangerine peel (DTP) extract on weight gain, percent weight gain, specific growth rate and feed conversion rate in Olive flounder after 7 days. Data represent mean±S.D. (n=10/group).

Parameters	Conc. of DTP extract (%)				
	0	0.1	0.5	1	5
Initial body weight (g)	38.5±1.1	37.3±0.9	38.3±0.7	36.2±1.7	38.6±1.3
Final body weight (g)	49.0±4.1	50.9±0.9	50.8±1.2	52.3±0.5	52.6±0.1
Weight gain (g)	10.5±5.2	13.6±1.7	12.5±0.5	16.1±2.2	14.1±1.4
Weight gain (%)	2.8±1.4	3.7±0.5	3.2±0.1	4.5±0.8	3.7±0.5
Specific growth rate (%)	0.2±0.1	0.2±0.0	0.2±0.1	0.3±0.1	0.2±0.1
Feed conversion rate	1.5±0.6 ^a	0.9±0.0 ^{ab}	1.0±0.1 ^{ab}	0.8±0.1 ^b	0.9±0.1 ^{ab}

Weight gain (g) = Final weight (g) - Initial weight (g)

Percent weight gain (PWG) = $[100 \times (\text{Final weight} - \text{Initial weight}) / \text{Initial weight}]$

Specific growth rate (SGR) = $[\{\text{LNFinal weight (g)} - \text{LNInitial weight (g)}\} / \text{DAY}] \times 100$

Feed conversion ratio (FCR) = Total feed taken (g) / Weight gain (g)

Different superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$) in different groups.

였으며 병변에서 동일한 스쿠티카충이 분리되었다. 이러한 결과는 유자첨가사료를 넙치에 급여하여 어류병원세균에 대한 저항성을 조사한 연구에서 높은 농도의 유자를 첨가한 사료군이 대조군보다 빠른 폐사를 보인 것과 유사하다 (Jung et al., 2010).

하지만, 선천성 면역능력의 지표 중 하나인 라이소자임 활성을 측정된 결과, 높은 농도에서도 대조군과 유의한 차이는 없었으며, 이러한 결과는 생략제 첨가 사료를 넙치에게 급여하여 다양한 선천성

면역 능력을 측정된 다른 연구에서 나타난 결과와 유사하였다 (Harikrishan et al., 2012; Hwang et al., 2015; Bang et al., 2019). 이처럼 선천성 면역지표에 영향을 주지 않은 상태에서 진피 추출물 5% 첨가군이 전량 폐사한 것은 고농도의 진피 추출물이 생체 독성으로 작용했을 것이라 생각되며 선천성 면역지표가 대조군과 유사함에도 불구하고 0.5%군에서 가장 생존율이 높게 나온 이유로 진피 추출물의 폴리페놀 성분이 생체 내에서 직접적으로 스쿠티카충에 대해 살충작용을 했을 것으로 추정한다.

결론적으로 진피 추출물 1% 첨가사료는 넙치의 사료계수를 높여 성장률을 향상시키고 사료 중량의 0.5%를 첨가하였을 때 스쿠티카충 감염으로부터 가장 높은 생존율을 보여주었다. 본 연구에서 확립된 방법으로 얻어진 진피 추출물은 넙치의 사료 효율 개선과 스쿠티카충에 대한 예방효과가 있는 것으로 확인되었다.

사 사

본 논문은 2020학년도 군산대학교 수산과학연구소 학술경비로 지원되었음.

References

- Bang, S. J., Lee, C. H., Kang, T. Y., Choi, J. H., Jung, S. M., Kang, I. S., Park, K. H. and Choi, S. H.: Effects of *Citrus unshiu* Markovich on growth per-

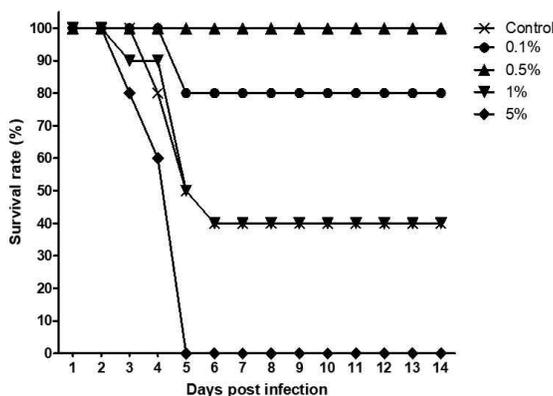


Fig. 2. Survival rate of Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) following scuticociliate (*Miamiensis avidus*, 2×10^3 cells/mL) challenge. Olive flounder (n=10) were fed 0.1, 0.5, 1 and 5% DTP added diet for 7 days, respectively, followed by immersion infection with *M. avidus*. Normal diet was fed as a control.

- formance and bactericidal activity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. J. Fish Pathol., 32(2): 105-111, 2019.
- Gomez-Saladin, E. and Small, E. B.: Oral morphogenesis of the microstome to macrostome transformation in *Miamiensis avidus* strain Ma/21. J. Euk. Microbiol., 40(3): 363-370, 1993.
- Ham, I. H., Jung, E. D., Lee, K. J., Lee, J. H., Bu, Y. M., Kim, H. C. and Choi, H. Y.: Analysis of the content of hesperidin and essential oils from the peels of various Citrus species. Kor. J. Herbology, 23: 159-170, 2008.
- Harikrishnan, R., Kim, J. S., Kim, M. C., Dharaneedharan, S., Kim, D. H., Hong, S. H., Song, C. Y., Balasundaram, C. and Heo, M. S.: Effect of dietary supplementation with *Suaeda maritima* on blood physiology, innate immune response, and disease resistance in olive flounder against *Miamiensis avidus*. Experimental Parasitology, 131: 195-203, 2012.
- Hwang, J. Y., Kwon, M. K., Seo, J. S., Kim, K. D., Lee, Y. S. and Jung, S. H.: Effect of herbs on vaccine efficacy to olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. JFMSE, 27: 1491-1498, 2015.
- Iglesias, R., Parama, A., Alvarez, F., Leiro, J. and Sanmartin, M.: Antiprotozoals effective in vitro against the scuticociliate fish pathogen *Philasterides dicentrarchi*. Dis. Aquat. Org., 49: 191-197, 2002.
- Jung, S. J., Kitamura, S. I., Aoyama, M., Song, J. Y., Kim, B. K. and Oh, M. J.: Immune Response of olive flounder *Paralichthys olivaceus* against *Miamiensis avidus* (Ciliophora : Scuticociliatida). J. Fish Pathol., 19(2): 173-181, 2006.
- Jung, S. J., Im, E. Y., Strüder-Kypke, M. C., Kitamura, S. I. and Woo, P. T. K.: Small subunit ribosomal RNA and mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene sequences of 21 strain of the parasitic scuticociliate *Miamiensis avidus* (Ciliophora, Scuticociliatida). Parasitol. Res., 108: 1153-1161, 2011.
- Jung, Y. H., Kim, D. H., Kim, H. Y., Shin, T. S., Oh, M. J., Lee, J. H., Kim, J. H., Im, S. Y. and Kim, E. H.: Effects of diets supplemented with Yuzu *Citrus Junos* Siebold ex Tanaka on disease resistance of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Fish. Pathol., 23: 389-398, 2010.
- Kang, S. Y., Lee, S. Y., Choi, J. H. and Jung, S. J.: In vitro Anti-bacterial and anti-scuticociliate activities of extract and bromophenols of the marine red alga *Polysiphonia morrowii* with structure-activity relationships. Kor. J. Fish Aquat. Sci., 47: 45-51, 2014.
- Kim, J. W., Yoo, K. J., Song, H. C. and Kim, H. K.: Antiparasitic effects of chitosan-oligosaccharides against scuticociliatids collected from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Citin and Chitosan, 6: 47-52, 2001.
- Kim, M. S., Moon, S. W., Lee, Y. D., Kim, S. J., Kim, Y. J., Lee, J. W., Lee, J. H., Lee, J. S., Kim, B. Y., Ahn, J. S. and Ahn S. C.: Effect of Citrus Fermented by *Lactococcus lactis* W-44 isolated from Kimchi on growth of cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. Kor. J. Microbiology, 43: 124-129, 2007.
- Kim, S. M., Cho, J. B., Kim, S. K., Nam, Y. K. and Kim, K. H.: Occurrence of scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus* by *Phiasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida). Dis. Aquat. Org., 62: 233-238, 2004.
- Kim, S. M., Lee, E. H., Kwon, S. R., Lee, S. J., Kim, S. K., Nam, Y. K. and Kim, K. H.: Preliminary analysis of recombinant β -tubulin of *Pseudocohnilembus persalinus* (Ciliophora: Scuticociliatida) as a vaccine antigen candidate against scuticociliatosis. Aquaculture, 260: 21-26, 2006.
- Lee, J. H., Park, J. J., Choi, J. H., Kang, S. Y., Kang, Y. J. and Park, K. H.: Effects of clioquinol on the scuticociliatosis-causing protozoan *Miamiensis avidus* in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. J. Fish dis., 1-12, 2017.
- Lee, J. H., Park, J. J., Choi, J. H., Shin, D. H. and Park, K. H.: Anti-scuticociliate effects of aquatic hydrogen peroxide preparation in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Pathol., 30(2): 107-114, 2017.
- Lee, N. S., Joeng, S. H. and Jee, B. Y.: Anti-fish pathogenic efficacy of hot water extracts obtained from 5 herbs *in-vitro*, and efficacy and toxicity in flounder of the one selected herb, skullcap. J. Fish Pathol., 23: 137-143, 2010.
- Lim, H. H.: Studies on extraction of limonene from citron and immunomodulation activity of limonene. The Graduate School of Technology, Hankyong National University, 2006.
- Mallo, N., DeFelipe, A. P., Figueira, I., Sueiro, R. A., Lamas, J. and Leiro, J. M.: Combined antiparasitic and anti-inflammatory effects of the natural polyphenol curcumin on turbot scuticociliatosis. J. fish dis., 40(2): 205-217, 2016.
- Medlin L., Elwood, H., Stickel, S. and Sogin, M.: The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. Gene, 71: 491-499, 1988.
- Moon, P. D. and Kim, H. M.: Antiinflammatory Effects

- of Traditional Korean Medicine, JinPi-tang and Its Active Ingredient, Hesperidin in HaCaT cells. *Phytotherapy Research*, 26: 657-662, 2012.
- Park, C. U., Lee, S. M., Kim, Y. C., Ryu, J. S., Kim, T. K., Kim, J. H., Kim, M. K., Song, H. C. and Park, H.: Antitrichomonas Activity of Herb-medicine Generally Used in Dong-Eui-Bo-Kham. *Kor. J. Oriental Physiology & Pathology*, 19: 191-195, 2005.
- Park, G. H., Lee, S. H., Kim, H. Y., Jeong, H. S., Kim, E. Y., Yun, Y. W., Nam, S. Y. and Lee, B. J.: Comparison in antioxidant effects of four citrus fruits. *J. Fd Hyg. Safety*, 26: 355-360, 2011.
- Park, S. B., Jang, H. B., Fagutao F. F., Kim, Y. K., Nho, S. W., Cha, I. S., Yu, J. E. and Jung T. S.: Combination treatment against scuticociliatosis by reducing the inhibitor effect of mucus in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish & Shellfish Immunol.*, 38: 282-286, 2014.
- Sitjà-Bobadilla, A., Palenzuela, O. and Alvarez-Pellitero, P.: Immune response of turbot, *Psetta maxima* (L.) (Pisces: Teleostei), to formalin-killed scuticociliates (Ciliophora) and adjuvanted formulations. *Fish & Shellfish Immunol.*, 24: 1-10, 2008.
- Soldo, A. T. and Merlin, E. J.: The cultivation of symbiote-free marine ciliates in axenic medium. *J. Protozool.*, 19(3): 519-524, 1972.
- Youn, H. J., Lakritz, J., Kim, D. Y., Rottinghaus, G. E. and Marsh, A. E.: Anti-protozoal efficacy of medicinal herb extracts against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, 116: 7-14, 2003.

Manuscript Received : Aug 20, 2020

Revised : Nov 17, 2020

Accepted : Nov 23, 2020