

## 조피볼락(*Sebastes schlegelii*) 사료 내 합성 비타민C 대체원으로써의 감귤부산물과 발효 감귤부산물의 첨가 효과

신재형 · 송진우<sup>1</sup> · 김민기<sup>2</sup> · 임현운 · 임종호 · 이경준<sup>3\*</sup>

제주대학교 해양생명과학과, <sup>1</sup>제주어류양식수협, <sup>2</sup>국립수산과학원 사료연구센터, <sup>3</sup>제주대학교 해양과학연구소

## Replacement of Dietary Vitamin C with Citrus and Fermented Citrus By-products in Korean Rockfish *Sebastes schlegelii*

Jaehyeong Shin, Jin-Woo Song<sup>1</sup>, Min-Gi Kim<sup>2</sup>, Hyunwoon Lim, Jongho Lim and Kyeong-Jun Lee<sup>3\*</sup>

Department of Marine Life Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

<sup>1</sup>Jeju Fish-Culture Fisheries Cooperatives, Jeju 63021, Korea

<sup>2</sup>Aquafeed Research Center, National Institute of Fisheries Science, Pohang 37517, Korea

<sup>3</sup>Marine Science Institute, Jeju National University, Jeju 63333, Korea

The study was conducted to investigate the dietary supplementation of citrus by-product (CBP) and CBP fermented with *Bacillus subtilis* (BS) or *B. pumilus* (BP) on growth performance, feed utilization, innate immune responses and disease resistance of Korean rockfish *Sebastes schlegelii*. Triplicate groups of juvenile fish (initial weight of 22.9 g) were fed one of five experimental diets which were formulated to replace a synthetic vitamin C (L-ascorbyl-2-polyphosphate, LAPP) with CBP or fermented CBP. A basal diet without LAPP and CBP was used as the control diet (Con). At the end of the 13 weeks feeding trial, growth performance, feed utilization and survival of fish fed the Con were significantly lower than those of fish fed the LAPP, CBP and fermented CBP diets. Fish fed the Con were significantly lower in lysozyme activity than fish fed LAPP, CBP and fermented CBP diets. In a challenge test against *Edwardsiella tarda*, cumulative mortality of fish fed LAPP, CBP and fermented CBP diets was significantly lower (20-30%) than that of the Con (60%). The findings in this study indicate that the CBP and/or fermented CBP can be a promising vitamin C source for LAPP replacement in diet for Korean rockfish.

Keywords: Citrus by-product, Vitamin C, Korean rockfish, Fermentation, Immune response

### 서론

감귤은 국내 과일 생산량의 약 25%를 차지하는 주요 작물로, 연간 63만톤이 생산된다(JCMSA, 2020). 감귤부산물(citrus by-product, CBP)은 감귤을 음료와 같은 가공제품으로 제조하는 과정에서 발생하는 감귤의 내피와 외피, 씨앗 등을 말하며, 감귤 생산량의 약 30-40% 가량이 부산물의 형태로 배출되고 있다. CBP는 주로 비료로 이용되거나 폐기되고 있어, 이를 처리하기 위한 새로운 방안의 모색이 필요한 실정이다. CBP는 비타민C (460 mg/kg), carotenoids (512 mg/kg), pectin (1.49%), flavonoids와 같은 다양한 생리활성 물질을 풍부하게 함유하고

있어, 천연 기능성 첨가제로써의 이용가치가 높다고 알려져 있다(Yang et al., 2008). 반추동물 사료에 CBP를 첨가할 경우, 소, 돼지, 염소의 성장과 사료효율 증진에 도움을 줄 수 있다고 보고되었다(Bampidis and Robinson, 2006). 어류의 경우에도 사료 내 CBP의 첨가는 참돔 치어의 비특이적 면역력과 뼈 내 콜라겐의 함량을 증진시키며, 어류의 폐사를 감소시킬 수 있다고 보고되었다(Song et al., 2013). CBP는 양식사료 내 합성 비타민C를 대체할 수 있는 새로운 원료로 최근 주목 받았다(Lee et al., 2013; Song et al., 2013). 비타민C는 경골어류에서 체내 합성이 되지 않아 반드시 사료를 통해 섭취되어야 하는 필수영양소로 알려져 있다(Dabrowski et al., 1990). 비타민C는 어류의 체

\*Corresponding author: Tel: +82. 64. 754. 3423 Fax: +82. 64. 756. 3493

E-mail address: kjlee@jeju.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0617>

Korean J Fish Aquat Sci 54(5), 617-623, October 2021

Received 9 July 2021; Revised 11 September 2021; Accepted 22 September 2021

저자 직위: 신재형(대학원생), 송진우(팀장), 김민기(연구원), 임현운(대학원생), 임종호(대학원생), 이경준(교수)

내에서 콜라겐의 합성, 단백질 대사, 면역조절, 항산화 반응 등에 관여한다(Dawood and Koshio, 2018). 어류의 경우, 비타민 C가 결핍되면 콜라겐의 합성이 저하되어 척추만곡과 연골 조직에 변형을 일으킬 뿐만 아니라 면역력과 사료섭취의 감소에 따른 폐사율을 증가시키는 것으로 알려져 있다(NRC, 2011). 사료 내 비타민C는 주로 L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP), L-ascorbyl-2-sulphate와 같은 화학적으로 안정된 형태의 화합물이 주로 첨가된다. 최근 들어, 비타민을 제조하는 과정에서 다량의 환경오염 물질이 발생하여, 각종 산업규제가 신설됨에 따라 생산량이 감소하면서 가격은 계속해서 증가하고 있다(KO-TRA, 2020). 비타민은 양어용 배합사료에 이용되는 원료 중에서 단가가 가장 높아, 천연자원을 이용한 합성비타민 대체 연구가 필요한 실정이다(Dawood and Koshio, 2018). 이전 연구에서 참돔과 넙치 치어 사료 내 합성 비타민C인 LAPP의 대체 원료로써 CBP의 이용성을 검증하였지만(Lee et al., 2013, 2015), 다른 어종에 대한 연구는 전반적으로 미흡한 실정이다.

조피볼락(*Sebastes schlegelii*)은 국내 어류 양식생산량의 23.8% (20,300톤, 2019년)를 차지하는 주요 양식대상 종이다(KOSIS, 2020). 최근 양어장에서는 질병을 예방하기 위해 항생제를 무분별하게 사용하고 있어 항생제에 대한 내성의 증가와 생물농축과 같은 문제가 발생하고 있다. 천연유래 물질을 이용한 어류의 면역증진 효과에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 따라서 본 연구는 질병저항성 평가와 사육실험을 통해 조피볼락 사료 내 천연 비타민 C 원료로써 CBP와 발효 CBP의 첨가효과를 조사하고자 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 실험사료

CBP는 (주)일해(Jeju, Korea; 2013년 10월)에서 감귤에 압력을 가해 즙을 분리해내고 남은 감귤의 내피와 외피를 제공받아 실험에 이용하였다. CBP는 동결건조 후 분쇄하여 사용하였고, CBP의 영양소 함량을 분석하였다(조단백질, 5.6%; 조지질, 1.7%; 조회분, 2.6%; 비타민C, 910-1,500 mg/kg). CBP 발효에는 *Bacillus subtilis*와 *B. pumilus*를 이용하였다. 두 균은 nutrient broth (BD Difco, Dickinson, ND, USA)에서 각각 3일간 교반 배양(30°C)한 후, 감귤배지에 접종하였다. 멸균 생리식염수를 이용하여 균의 농도가  $1.0 \times 10^3$  colony forming unit (CFU)/mL가 되도록 희석한 후, 감귤배지에 2.5%가 되도록 접종하였다. 접종 후, 균의 적정 생육환경(30°C)에서 72 h 동안 발효시켜 발효CBP를 제작하였다. 발효CBP는 동결건조 한 후 분쇄하여 실험에 사용하였다.

탈지어분과 casein을 사료의 주요 단백질원료로 사용하였고, 지질원료로는 오징어간유를 이용하였다(Table 1). 사료의 영양소 함량은 조피볼락의 영양소 요구량을 충족시키도록 조성하였다. 대조사료(control, Con)는 비타민C가 결핍되도록 설정하였

고, 4개의 실험사료는 LAPP, CBP, 2종의 발효CBP (*B. subtilis*, BS; *B. pumilus*, BP)를 첨가하여 비타민C의 함량이 100 mg/kg 이 되도록 조성하였다(Con, LAPP, CBP, BS-CBP, BP-CBP). 실험사료는 각 사료원료를 조성표에 따라 측량한 후, 사료원료 총량의 30%에 해당되는 증류수를 넣고 혼합하였다. 혼합된 원료는 소형사료제작기(SP-50; Gumgang ENG, Daegu, Korea)

Table 1. Dietary formulation and proximate composition (% of dry matter) of the experimental diets for juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegelii*

Ingredients	Experimental diets				
	Con	LAPP	CBP	BS -CBP	BP -CBP
Defatted fish meal <sup>1</sup>	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0
Casein <sup>2</sup>	30.0	30.0	30.0	30.0	30.0
Dextrin	16.3	16.3	16.3	16.3	16.3
Squid liver oil	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8
Vitamin Mix <sup>3</sup> (vitamin C free)	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Mineral Mix <sup>4</sup>	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
LAPP <sup>5</sup> (mg/100 g)	0.00	0.28	0.00	0.00	0.00
CBP <sup>6</sup>	0.00	0.00	6.67	0.00	0.00
BS-CBP <sup>7</sup>	0.00	0.00	0.00	10.1	0.00
BP-CBP <sup>8</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00	10.9
Carboxymethylcellulos	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Taurine	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cellulose	10.9	10.9	4.23	0.80	0.00
Proximate composition					
Crude protein	46.8	46.4	47.1	48.3	48.4
Crude lipid	12.8	12.7	12.8	13.8	13.7
Ash	5.69	5.63	5.82	5.91	6.06
Moisture	7.70	7.00	7.40	7.50	7.10
Total ascorbic acid (mg/kg)	11.9	110	90.1	100	103

<sup>1</sup>Fish meal were extracted by 70% aqueous ethanol (water: ethanol=3:7) for 48 h. <sup>2</sup>United States Biochemical (USB), Cleveland, OH, USA. <sup>3</sup>Vitamin premix contains (1 kg) 1 g retinyl acetate, 0.05 g cholecalciferol, 0.2 g menadione, 4 g thiamine hydrochloride, 4.4 g riboflavin, 14.5 g D-pantothenic acid hemicalcium, 4 g pyridoxine hydrochloride, 0.01 g cyanocobalamin, 30 g niacinamide, 0.48 g folic acid, 0.2 g D-biotin, 40 g myo-inositol, 10 g  $\alpha$ -tocopherol and 891 g starch. <sup>4</sup>Mineral Premix contains (1 kg) 80 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 370 g  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , 130 g KCL, 40 g Ferric citrate, 20 g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 356.5 g Ca-lactate, 0.2 g  $CuCl_2$ , 0.15 g  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ , 0.01 g  $Na_2SeO_3$ , 2 g  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 1 g  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  and 0.14 g starch. <sup>5</sup>L-ascorbyl-2-polyphosphate. <sup>6</sup>Citrus by-product: ILHAE Corporation, Jocheon, Jeju, Korea. <sup>7</sup>Citrus by-product fermented with *Bacillus subtilis*. <sup>8</sup>Citrus by-product fermented with *Bacillus pumilus*. Con, control.

를 이용하여 2가지 크기(3, 5 mm)의 펠렛사료로 제작되었다. 완성된 사료는 비타민C의 파괴를 막기 위해 동결건조 하여, 냉동보관(-30°C)하여 사육실험에 사용하였다.

실험어와 사육관리

조피볼락 치어는 경상남도 고성군에 위치한 종묘장에서 구입하여 2주간의 예비 사육 후 사육실험에 사용되었다. 조피볼락 치어(평균무게, 22.9 g)는 총 15개의 원형 플라스틱 수조(150 L)에 수조 당 30마리씩 배치되었다. 사육수는 모래 여과해수를 사용하였고, 유수량은 2 L/min가 되도록 조절하였다. 용존산소를 유지하기 위해 사육수조에 에어스톤을 설치하였다. 사육실험 동안 평균수온은 21.5±2.50°C, 용존산소는 5.68±1.02 mg/L, 염분은 30.2±1.12 psu로 측정되었다. 실험사료는 1일 3회에 나누어 13주 동안 만복공급 하였다.

Sampling과 분석

실험어류의 무게는 4주 간격으로 측정하였고, 실험 종료 후 사료전환효율(feed conversion ratio, FCR), 단백질이용효율(protein efficiency ratio, PER), 생존율(survival)을 계산하였다. 실험사료의 일반성분은 AOAC (2005)의 방법에 따라 분석되었다. 실험사료와 실험어 간 내 비타민 C의 함량은 Dabrowski and Hinterleitner (1989)의 방법을 기초로 분석하였다. 콜라겐 함량은 Wilson and Poe (1973)의 방법으로 분석하였다. 실험어의 면역반응을 조사하기 위해 각 수조당 3마리씩 무작위로 선별하여 2-phenoxyethanol (100 ppm) 용액으로 마취시킨 후, 꼬리 미병부에서 채혈하였다. 혈액(whole-blood)은 원심분리기로(5000 g, 15 min) 혈청(serum)을 분리하여, 비특이적 면역분석에 사용하였다. Lysozyme 활성은 Sankaran and Gurnani (1972)의 방법으로 분석하였다. Immunoglobulin (Ig) 함량은 Siwicki and Anderson (1993)의 방법을 분석하였다. 혈액 내 대식세포의 활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 방법을 기초로 nitro-blue tetrazolium (NBT) 분석방법을 통해 호중구의 oxidative radical 생성량을 측정하였다. Myeloperoxidase (MPO) 활성은 Quade and Roth (1997)의 방법을 이용하여 분석하였다.

인위감염(공격) 실험

사육실험 종료 후, 실험어를 총 15개의 수조(64 L, 3반복)에 15마리씩 배치하였다. *Edwardsiella tarda*는 제주도 내 넙치 양식장에서 분리된 균주를 제주대학교 해양바이러스학 연구실에서 제공받아 사용하였다. 균주는 salmonella-shigella (BD Difco) 배지를 이용하여 25°C에서 48 h 동안 배양되었다. Colony는 tryptic soy agar (BD Difco) 배지에서 배양한 후(27°C, 24 h) 인위감염 실험에 이용하였다. *E. tarda*는 Kit (Higene genomic DNA prep kit; Bio-Fact, Daegu, Korea)를 통해 종을 재확인하였다. 준비된 균을 적정 농도(1×10<sup>8</sup> CFU/mL)가 되도록 희석하여 각 수조에 침지하였으며, 침지 1 h 후에 바로 환수하였고,

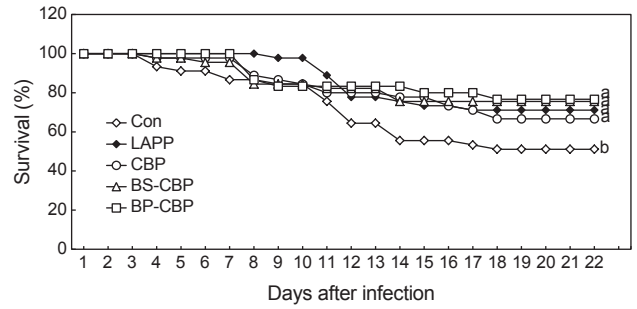


Fig. 1. Cumulative survival of juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegelii* fed the experimental diets for 13 weeks during the challenge with *Edwardsiella tarda*. The fish were immersed with *E. tarda* suspension containing 1×10<sup>8</sup> colony forming unit/mL. Triplicate groups of fish were fed with one of the experimental diets two times a day during the challenge period. The experimental diets were prepared with supplementing L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP), citrus by-product (CBP), CBP fermented with *Bacillus subtilis* (BS-CBP) or *B. pumilus* (BP-CBP), respectively. Con, control.

총 22일 동안 누적 폐사율을 관찰하였다.

통계학적 분석

실험사료의 배치는 완전확률계획법(completely randomized design)을 실시하였고, 사육실험(성장, 사료계수, 생존율)과 인위감염 실험(생존율), 각 종 분석결과(일반성분, 혈액, 콜라겐)는 SPSS (Version 11.0, International Business Machines Co., New York, NY, USA) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석되었다. 각 사료 실험구의 유의차는 Tukey's HSD로 비교되었다(P<0.05). 퍼센트 데이터는 arcsin 값으로 변형한 후 통계에 사용하였고, 모든 데이터는 평균값±표준편차(mean±standard deviation)로 나타내었다.

결 과

*E. tarda*를 이용한 인위감염 실험 결과, 실험어의 생존율은 CBP (63%), BS-CBP (72%), BP-CBP (77%), LAPP (67%)구가 대조구(40%)에 비해 유의적으로 높았다(Fig. 1). 발효 CBP구의 생존율은 72-77%로, CBP와 LAPP구에 비해 유의적인 차이는 없었지만 수치상으로 높은 경향을 보였다. 초기 폐사는 균침지 4일 후에 발생하였고, 이후 실험어의 탈장이 관찰되었다. 13주 동안 진행된 사육실험의 결과, 혈액 내 lysozyme 활성은 CBP 첨가구(CBP, BS-CBP, BP-CBP)와 LAPP구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다(Table 2). MPO 활성은 발효 CBP 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. NBT 활성과 Ig 함량, hemoglobin, hematocrit는 대조구와 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다. 실험어의 최종무게는 CBP와 BS-CBP구가 대

조구에 비해 유의적으로 높았다(Table 3). BP-CBP와 LAPP구의 성장률은 대조구에 비해 높은 경향을 보였다. 사료계수에서는 CBP, BS-CBP, LAPP구가 대조구에 비해 유의적으로 낮았다. 단백질이용효율에서는 CBP와 BS-CBP구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. 사료섭취량과 생존율은 대조구와 실험구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 뼈 내 콜라겐의 함량은 CBP 첨가구와 LAPP구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다(Table 4). 간중량지수는 실험구와 대조구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

## 고 찰

사료 내 CBP의 첨가는 조피볼락의 질병저항성과 비특이적 면역력을 향상시키는 것으로 나타났다(Fig. 1; Table 2). 비타민C는 동물의 체내에서 활성산소를 제거할 수 있어 강력한 항산화제로 알려져 있다(Dabrowski et al., 2004). 사료에 비타민 C를 첨가할 경우, 어류의 질병저항성과 비특이적 면역력을 증진시킨다고 보고되었다(Dawood and Koshio, 2018). 또한 CBP는 carotenoids, flavonoids와 같은 생리활성 물질을 함유하고 있어서 면역증강제로써의 이용가능성이 높은 것으로 보고되었다

(Bampidis and Robinson, 2006). Yang et al. (2008)은 CBP 내 flavonoids의 구성성분을 분석한 결과, hesperidin과 narirutin이 주요 성분이며, rutin, neohesperidin, hesperetin도 소량 함유되어 있다고 보고하였다. Hesperidin은 *Citrus* 속 과일에 함유되어 있는 대표적인 flavonoids로 항산화, 항염증, 항균활성, 상처 치유능과 같은 다양한 효과를 가지고 있으며, 다량 사용하더라도 생물에게 독성을 띄지 않는다고 알려져 있다(Garg et al., 2001; Wilmsen et al., 2005). Narirutin과 그 외 flavonoids 또한 다양한 생리활성을 지닌 것으로 보고되었다(Barreca et al., 2017). 감귤 외에도 오렌지(*C. sinensis*), 레몬(*C. aurantifolia*)과 같은 *Citrus* 속 과일의 부산물과 그 추출물을 사료에 첨가할 경우, 틸라피아, 잉어(*Cyprinus carpio*)와 같은 여러 어류의 질병저항성과 비특이적 면역능을 증진시키는 것으로 보고되었다(Acar et al., 2015; Sadeghi et al., 2021). 최근 다양한 연구를 통해 *Citrus* 속 과일은 limonene,  $\alpha$ -pinene, camphene과 같은 essential oil을 함유하고 있으며, 이 물질들은 항산화와 항염증 활성뿐만 아니라 여러 균에 대한 항균작용을 하는 것으로 보고되었다(Bora et al., 2020). 이번 연구의 인위감염 실험에서도 CBP 첨가구와 LAPP구의 생존율이 유사한 것으로 보아, CBP 내 비타민 C가 LAPP를 효과적으로 대체할 수 있을 것으로 판단된

Table 2. Hematological and non-specific immune responses of juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegelii* fed the experimental diets for 13 weeks

Dietary treatment	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	NBT <sup>1</sup> (absorbance)	Lysozyme ( $\mu$ g/mL)	Ig <sup>2</sup> (mg/mL)	MPO <sup>3</sup> ( $\mu$ g/mL)
Con	6.81 $\pm$ 0.43	50.0 $\pm$ 5.0	1.10 $\pm$ 0.05	60.4 $\pm$ 5.57 <sup>b</sup>	23.0 $\pm$ 7.05	2.15 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>
LAPP	7.17 $\pm$ 0.31	50.7 $\pm$ 3.0	1.11 $\pm$ 0.07	119.8 $\pm$ 12.7 <sup>a</sup>	23.9 $\pm$ 2.84	2.21 $\pm$ 0.52 <sup>ab</sup>
CBP	7.55 $\pm$ 0.27	51.8 $\pm$ 1.4	1.08 $\pm$ 0.09	114.7 $\pm$ 12.0 <sup>a</sup>	25.6 $\pm$ 2.58	2.44 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>
BS-CBP	6.89 $\pm$ 0.41	49.2 $\pm$ 1.4	1.08 $\pm$ 0.08	115.7 $\pm$ 8.55 <sup>a</sup>	27.6 $\pm$ 1.86	2.45 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
BP-CBP	7.57 $\pm$ 1.50	51.1 $\pm$ 1.4	1.08 $\pm$ 0.04	107.5 $\pm$ 23.1 <sup>a</sup>	25.8 $\pm$ 3.46	2.62 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Nitro-blue tetrazolium. <sup>2</sup>Immunoglobulin. <sup>3</sup>Myeloperoxidase. Mean values of triplicate groups. Values are presented as mean $\pm$ SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different (P<0.05). The experimental diets were prepared with supplementing L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP), citrus by-product (CBP), CBP fermented with *Bacillus subtilis* (BS-CBP) or *B. pumilus* (BP-CBP), respectively. Con, control.

Table 3. Growth performance and feed utilization of juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegelii* (initial body weight, 22.9 g) fed the experimental diets for 13 weeks

Dietary treatment	FBW <sup>1</sup>	FCR <sup>2</sup>	PER <sup>3</sup>	FI <sup>4</sup>	Survival (%)
Con	52.6 $\pm$ 0.77 <sup>b</sup>	1.08 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.98 $\pm$ 0.04 <sup>bc</sup>	31.8 $\pm$ 0.95	92.2 $\pm$ 5.09
LAPP	59.0 $\pm$ 1.65 <sup>ab</sup>	0.98 $\pm$ 0.03 <sup>bc</sup>	2.19 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	33.6 $\pm$ 0.93	90.0 $\pm$ 5.77
CBP	60.9 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	0.91 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	2.32 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	34.0 $\pm$ 0.88	94.4 $\pm$ 5.09
BS-CBP	59.9 $\pm$ 5.18 <sup>a</sup>	0.92 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	2.26 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	32.8 $\pm$ 1.30	83.3 $\pm$ 5.77
BP-CBP	56.9 $\pm$ 1.32 <sup>ab</sup>	1.06 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	1.94 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	34.5 $\pm$ 1.66	84.4 $\pm$ 12.6

<sup>1</sup>Final body weight (g)=final mean body weight-initial mean body weight. <sup>2</sup>Feed conversion ratio=feed intake/wet weight gain. <sup>3</sup>Protein efficiency ratio=wet weight gain/total protein given. <sup>4</sup>Feedintake (g). Values are mean of triplicates and presented as mean $\pm$ SD. Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05). The experimental diets were prepared with supplementing L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP), citrus by-product (CBP), CBP fermented with *Bacillus subtilis* (BS-CBP) or *B. pumilus* (BP-CBP), respectively. Con, control.

다. 더불어 CBP는 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있어서 어류의 질병저항성과 비특이적 면역능 증진에 간접적으로 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

조피볼락 사료에 CBP를 소량 첨가할 경우, 어류의 성장과 사료효율을 증진시키는 것으로 나타났다(Table 3). 비타민 C는 어류의 필수영양소로 결핍될 경우 어류의 성장과 사료효율이 저하되는 것으로 알려져 있다(NRC, 2011). 이번 연구에서 실험어의 성장률은 CBP를 첨가한 실험구가 LAPP구와 유사한 것으로 보아, CBP에 함유되어 있는 비타민C는 어류의 체내에서도 효과적으로 이용되었다고 판단된다. 또한 CBP는 비타민 C 외에 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있어서 LAPP에 비해 실험어의 성장과 사료섭취량 증진에 보다 나은 효과를 내었을 것으로 사료된다. Lee et al. (2013)은 사료에 *B. subtilis*로 발효시킨 CBP를 2-6% 첨가했을 때, 넙치(*Paralichthys olivaceus*; 2.19 g, 10주)의 성장과 사료효율 증진에 효과가 있었다고 보고하였다. 참돔(*Pagrus major*; 116 g, 8주) (Lee et al., 2015)과 넙치(44.6 g, 9주) (Kim et al., 2017)를 이용한 연구에서도 사료에 CBP를 첨가했을 때, 어류의 장 내 배상세포(goblet cell)의 수를 증가시켰다고 보고하였다. 배상세포는 장의 상피에 점액질을 분비하여 병원균과 각종 독소로부터 장을 보호하고 영양소의 이동에 도움을 주는 역할을 한다(Ellis, 2001). Langhout et al. (1999)은 사료에 citrus pectin을 첨가할 경우, 닭의 장 내 배상세포의 수를 증가시킨다고 보고하였다. 따라서, CBP에 함유되어 있는 여러 생리활성 물질이 어류의 영양소 소화와 간접적으로 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

사료 내 CBP의 첨가는 조피볼락 뼈의 콜라겐 함량을 증가시키는 것으로 나타났다(Table 4). 비타민 C는 동물의 콜라겐 합성에 필수적인 영양소로, 비타민 C의 결핍은 콜라겐의 합성을 저하시켜 어류의 뼈 마디에 위치한 연골조직과 근육을 약화시키는 것으로 알려져 있다(Darias et al., 2011). 틸라피아(*Oreo-*

*chromis niloticus*), 부세(*Larimichthys crocea*), 대서양연어(*Salmo salar*)를 대상으로 진행된 연구에서는 사료에 비타민 C를 충분히 첨가하면 어류의 근육 내 콜라겐의 함량이 증가한다고 보고하였다(Li et al., 2007; Huang et al., 2016; Wei et al., 2020). Song et al. (2013)은 사료에 비타민 C원료로 CBP를 첨가할 경우, 참돔 치어의 뼈 내 콜라겐의 함량이 증가한다고 보고하였다. 이번 연구에서 나타난 CBP구의 콜라겐 함량 증가는 CBP에 함유되어 있는 비타민 C가 어류의 체내 콜라겐 합성에 효율적으로 사용되었다는 것을 입증한 결과로 판단된다.

이번 연구에서 발효CBP는 조피볼락의 질병저항성과 비특이적 면역능에 대한 증진효과가 CBP에 비해 다소 높은 것으로 나타났다. *Bacillus*속 균주는 포자(spore)를 형성하여 열에 안정적일 뿐만 아니라, 위(stomach)에서 강산에 의해 파괴되는 정도가 비교적 낮아 장까지 도달하여 생균제로써의 역할을 할 수 있는 유용균주로 알려져 있다(Guo et al., 2016). 사료 내 *Bacillus*의 첨가는 어류의 비특이적 면역력, 항산화력, 질병저항성을 증진시키는 것으로 보고되었다(Kuebutornye et al., 2019). 또한 *Bacillus* 속 균은 대사과정에서 subtilin, mycosubtilin, rhizocitins과 같은 여러 항생물질을 분비하여 발효물질의 이용성을 향상시키는 것으로 알려져 있다(Stein et al., 2002; Fickers et al., 2009; Kino et al., 2009). CBP를 발효시키면 단백질과 지질의 함량이 증가하고, 탄수화물의 구조가 소화하기 용이한 형태로 변해 CBP 원료의 이용효율을 증진시킬 수 있는 것으로 보고되었다(Bampidis and Robinson, 2006). Noh et al. (2014)은 *B. subtilis*로 감귤 껍질과 어류가공부산물을 발효시켜 사료에 첨가했을 때, 돼지의 소화율과 사료효율을 증진시키고 배설물 내 균총에도 변화를 일으킨다고 보고하였다. 따라서, 발효 CBP는 발효과정에서 다양한 유용물질이 생성되어 그 이용성을 증진시켰다고 추측되며, 사육실험의 결과를 고려했을 때, *B. subtilis*가 *B. pumilus*보다 이용효율이 보다 높다고 판단된다. 후속연구에서는 균에 따른 발효 CBP의 효능에 대한 세부적인 연구가 요구된다.

결론적으로, 사료 내 CBP의 소량 첨가는 조피볼락 치어의 성장, 비특이적 면역력, 질병저항성을 높일 수 있을 것으로 판단된다. 발효 CBP의 경우, 질병저항성과 비특이적 면역력에서 CBP에 비해 효과가 더 좋을 것으로 사료된다.

## 사 사

이 논문은 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(2019R1A6A1A03033553)입니다.

## References

Acar Ü, Kesbiç OS, Yılmaz S, Gültepe N and Türker A. 2015. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel *Citrus sinensis* on growth rate of tilapia

Table 4. Biological assessment of digestive organ and vertebral collagen concentrations of juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegelii* fed experimental diets for 13 weeks

Dietary treatment	HSI <sup>1</sup> (%)	Bone collagen (%)
Con	3.51±0.32	26.7±0.93 <sup>b</sup>
LAPP	3.60±0.14	33.9±1.63 <sup>a</sup>
CBP	3.60±0.10	32.3±2.89 <sup>a</sup>
BS-CBP	3.81±0.08	31.8±2.63 <sup>a</sup>
BP-CBP	3.70±0.47	30.1±1.81 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Hepatosomatic index=(liver weight/fish weight)×100. Mean values of triplicate groups. Values are presented as mean±SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different (P<0.05). The experimental diets were prepared with supplementing L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP), citrus by-product (CBP), CBP fermented with *Bacillus subtilis* (BS-CBP) or *B. pumilus* (BP-CBP), respectively. Con, control.

- Oreochromis mossambicus* and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. *Aquaculture* 437, 282-286. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.015>.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2005. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, U.S.A. <https://doi.org/10.1002/0471740039.vec0284>.
- Bampidis VA and Robinson PH. 2006. Citrus by-products as ruminant feeds: A review. *Anim Feed Sci Tech* 128, 175-217. <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2005.12.002>.
- Barreca D, Gattuso G, Bellocchio E, Calderaro A, Trombetta D, Smeriglio A and Nabavi SM. 2017. Flavanones: Citrus phytochemical with health-promoting properties. *BioFactors* 43, 495-506. <https://doi.org/10.1002/biof.1363>.
- Bora H, Kamle M, Mahato DK, Tiwari P and Kumar P. 2020. Citrus essential oils (CEOs) and their applications in food: An overview. *Plants* 9, 357. <https://doi.org/10.3390/plants9030357>.
- Dabrowski K and Hinterleitner S. 1989. Applications of a simultaneous analysis of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and ascorbic sulfate in biological material. *Analyst* 114, 83-87. <https://doi.org/10.1039/AN9891400083>.
- Dabrowski K, Kock G, Frigg M and Wieser W. 1990. Requirement and utilization of ascorbic acid and ascorbate sulfate in juvenile rainbow trout. *Aquaculture* 91, 317-337. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90197-u](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90197-u).
- Dabrowski K, Lee KJ, Guz L, Verlhac V and Gabaudan J. 2004. Effects of dietary ascorbic acid on oxygen stress (hypoxia or hyperoxia), growth and tissue vitamin concentrations in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 233, 383-392. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.047>.
- Darias MJ, Mazurais D, Koumoundouros G, Cahu CL and Zambonino-Infante JL. 2011. Overview of vitamin D and C requirements in fish and their influence on the skeletal system. *Aquaculture* 315, 49-60. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.12.030>.
- Dawood MAO and Koshio S. 2018. Vitamin C supplementation to optimize growth, health and stress resistance in aquatic animals. *Rev Aquac* 10, 334-350. <https://doi.org/10.1111/raq.12163>.
- Ellis AE. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol* 25, 827-839. [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(01\)00038-6](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(01)00038-6).
- Fickers P, Guez JS, Damblon C, Leclère V, Béchet M, Jacques P and Joris B. 2009. High-level biosynthesis of the anteiso-C17 isoform of the antibiotic mycosubtilin in *Bacillus subtilis* and characterization of its candidacidal activity. *Appl Environ Microbiol* 75, 4636-4640. <https://doi.org/10.1128/AEM.00548-09>.
- Garg A, Garg S, Zaneveld LJD and Singla AK. 2001. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother Res* 15, 655-669. <https://doi.org/10.1002/ptr.1074>.
- Guo X, Chen DD, Peng KS, Cui ZW, Zhang XJ, Li S and Zhang YA. 2016. Identification and characterization of *Bacillus subtilis* from grass carp *Ctenopharyngodon idellus* for use as probiotic additives in aquatic feed. *Fish Shellfish Immunol* 52, 74-84. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.017>.
- Huang F, Jiang M, Wen H, Wu F, Liu W, Tian J and Shao H. 2016. Dietary vitamin C requirement of genetically improved farmed tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquac Res* 47, 689-697. <https://doi.org/10.1111/are.12527>.
- JCMSA (Jeju special self-governing province citrus marketing and shipping association). 2020. Citrus distribution processing analysis data of 2019. Retrieved from <http://www.citrus.or.kr/board/view.php?btable=bbs&bno=254&p=1&cate=0> on Mar 24, 2021.
- Kim YJ, Lee CR, Shin JH and Lee KJ. 2017. Effect of dietary supplementation with citrus by-product as a vitamin C replacement for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* at low water temperatures. *Korean J Fish Aquat Sci* 50, 15-24. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0015>.
- Kino K, Kotanaka Y, Arai T and Yagasaki M. 2009. A novel L-amino acid ligase from *Bacillus subtilis* NBRC3134, a microorganism producing peptide-antibiotic rhizocitcin. *Biosci Biotechnol Biochem* 73, 901-907. <https://doi.org/10.1271/bbb.80842>.
- 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) on Mar 24, 2021.
- KOTRA (Korea Trade-Investment Promotion Agency). 2020. The market trends of vitamins in China. Retrieved from <https://news.kotra.or.kr/user/globalBbs/kotranews/783/globalBbsDataView.do?setIdx=254&dataIdx=182465&pageViewType=&column=&search=&searchAreaCd=&searchNationCd=&searchTradeCd=&searchStartDate=&searchEndDate=&searchCategoryIdxs=&searchIndustryCateIdx=&searchItemCode=&searchItemName=&page=1&row=10> on Mar 24, 2021.
- Kuebutornye FK, Abarike ED and Lu Y. 2019. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish Shellfish Immunol* 87, 820-828. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.010>.
- Kumari J and Sahoo PK. 2005. Effects of cyclophosphamide on the immune system and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus*. *Fish Shellfish Immunol* 19, 307-316. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.01.008>.
- Langhout DJ, Schutte JB, Van Leeuwen P, Wiebenga J and Tamminga S. 1999. Effect of dietary high- and low-methylated citrus pectin on the activity of the ileal microflora and morphology of the small intestinal wall of broiler chicks. *Br Poult Sci* 40, 340-347. <https://doi.org/10.1080/00071669987421>.
- Lee BJ, Kim SS, Song JW, Oh DH, Cha JH, Jeong JB and Lee

- KJ. 2013. Effects of dietary supplementation of citrus by-products fermented with a probiotic microbe on growth performance, innate immunity and disease resistance against *Edwardsiella tarda* in juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). J Fish Dis 36, 617-628. <https://doi.org/10.1111/jfd.12035>.
- Lee CR, Kim YJ and Lee KJ. 2015. Dietary supplementation of citrus and fermented citrus by-product for Juvenile red seabream *Pagrus major* at low water temperature. Korean J Fish Aquat Sci 48, 454-458. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2015.0454>.
- Li X, Bickerdike R, Nickell D, Campbell P, Dingwall A and Johnston IA. 2007. Investigations on the effects of growth rate and dietary vitamin C on skeletal muscle collagen and hydroxylysyl pyridinoline cross-link concentration in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. J Agric Food Chem 55, 510-515. <https://doi.org/10.1021/jf062251i>.
- Noh HS, Ingale SL, Lee SH, Kim KH, Kwon IK, Kim YH and Chae BJ. 2014. Effects of citrus pulp, fish by-product and *Bacillus subtilis* fermentation biomass on growth performance, nutrient digestibility, and fecal microflora of weanling pigs. J Anim Sci Technol 56, 1-7. <https://doi.org/10.1186/2055-0391-56-10>.
- NRC (National Research Council). 2011. Chapter 9. Vitamins. In: Nutrient requirements of fish and shrimp. The National Academies Press, New York, NY, U.S.A., 207-209.
- Quade MJ and Roth JA. 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. Vet Immunol Immunopathol 58, 239-248. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(97\)00048-2](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(97)00048-2).
- Sadeghi F, Ahmadifar E, Shahriari Moghadam M, Ghiyasi M, Dawood MA and Yilmaz S. 2021. Lemon, *Citrus aurantifolia*, peel and *Bacillus licheniformis* protected common carp, *Cyprinus carpio*, from *Aeromonas hydrophila* infection by improving the humoral and skin mucosal immunity, and antioxidative responses. J World Aquac Soc 52, 124-137. <https://doi.org/10.1111/jwas.12750>.
- Sankaran K and Gurnani S. 1972. On the variation in catalytic activity of lysozyme in fishes. Indian J Biochem Bio 9, 162-165.
- Siwicki AK and Anderson DP. 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and monocytes, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum. In: Fish disease diagnosis and prevention methods. Wydawnictwo Instytutu Rybactwa Strodładowego, Olsztyn, Poland, 105-112.
- Song JW, Park SH, Lee CR and Lee KJ. 2013. Effects of dietary supplementation of a citrus by-product on growth performance, innate immunity and tolerance of low water temperature in red seabream *Pagrus major*. Korean J Fish Aquat Sci 46, 399-406. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2013.0399>.
- Stein T, Borchert S, Kiesau P, Heinzmann S, Klöss S, Klein C and Entian KD. 2002. Dual control of subtilin biosynthesis and immunity in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol 44, 403-416. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02869.x>.
- Wei Z, Deng K, Zhang W and Mai K. 2020. Interactions of dietary vitamin C and proline on growth performance, anti-oxidative capacity and muscle quality of large yellow croaker *Larimichthys crocea*. Aquaculture 528, 735558. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735558>.
- Wilmsen PK, Spada DS and Salvador M. 2005. Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. J Agric Food Chem 53, 4757-4761. <https://doi.org/10.1021/jf0502000>.
- Wilson RP and Poe WE. 1973. Impaired collagen formation in the scorbutic channel catfish. J Nutr 103, 1359-1364. <https://doi.org/10.1093/jn/103.9.1359>.
- Yang YT, Kim MS, Hyun KH, Kim YC and Koh JS. 2008. Chemical constituents and flavonoids in citrus pressed cake. Korean J Food Preser 15, 94-98.