



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](#)

博士學位論文

양어사료 내 비타민 C 대체제로서
감귤착즙박 이용성에 관한 연구

濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

宋 眞 禹

2015年 8月

양어사료 내 비타민 C 대체제로서 감귤착즙박 이용성에 관한 연구

指導教授 李 炘 峻

宋 眞 禹

이 論文을 理學 博士學位 論文으로 提出함

2015年 6月

宋眞禹의 理學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長 한 현 섭 印

委 員 김 정 대 印

委 員 박 상 루 印

委 員 김 성 삼 印

委 員 이 경 준 印

濟州大學校 大學院

2015年 6月

Study on the utilization of citrus by-product
as an alternative to vitamin C for marine fishes

Jin-Woo Song

(Supervised by professor Kyeong-Jun Lee)

A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of

DOCTOR OF PHILOSOPHY

Department of Marine Life Science

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

ABSTRACT.....	V
LIST OF FIGURES.....	IX
LIST OF TABLES.....	XI

CHAPTER 1: 문헌조사

1.1 비타민 C.....	1
1.2 제주감귤산업.....	5
1.3 감귤부산물.....	7
1.4 발효 및 발효균주.....	11
1.5 양식현황.....	12
1.6 어류질병.....	14
1.7 기대효과 및 실험내용.....	16

CHAPTER 2: 사료 내 감귤착즙박 및 발효감귤착즙박 첨가가 저수온에서 사육된 참돔 (*Pagrus major*)의 성장, 비특이적 면역반응 및 수온자극 스트레스에 미치는 영향

2.1 서론.....	19
2.2 재료 및 방법.....	21
2.2.1 CBP 수집 및 전처리.....	21
2.2.2 CBP의 발효 및 추출.....	21

2.2.3 실험사료.....	21
2.2.4 성장실험.....	22
2.2.5 어체측정 및 혈액샘플.....	22
2.2.6 성분분석.....	24
2.2.7 혈액 및 면역분석.....	24
2.2.8 수온 스트레스 내성.....	25
2.2.9 통계분석.....	26
2.3 결 과.....	27
2.4 고 찰.....	32

**CHAPTER 3: 저수온기에서 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 사료 내 감귤착즙박 첨가에 따른
합성 비타민 C 대체율 조사**

3.1 서론.....	37
3.2 재료 및 방법.....	38
3.2.1 CBP 수집 및 전처리.....	38
3.2.2 실험사료.....	38
3.2.3 실험어 및 사육관리.....	38
3.2.4 어체측정 및 혈액샘플.....	39
3.2.5 성분분석.....	41
3.2.6 혈액 및 면역분석.....	41
3.2.7 조직형태학적 분석.....	42
3.2.8 통계분석.....	42
3.3 결과 및 고찰.....	44

CHAPTER 4: 조피볼락(*Sebastes schlegeli*) 사료 내 감귤착즙박 첨가에 따른 합성 비타민 C

대체효과 및 소화율 평가

4.1 서론.....	52
4.2 재료 및 방법.....	53
4.2.1 실험사료.....	53
4.2.2 실험어 및 사육관리.....	56
4.2.3 분석항목.....	56
4.2.4 인위감염실험.....	58
4.2.5 사료원료의 외관상 소화율 측정.....	58
4.2.6 영양소별 소화율 분석.....	59
4.2.7 통계학적 분석.....	60
4.3 결 과.....	62
4.4 고 찰.....	70

CHAPTER 5: 조피볼락(*Sebastes schlegeli*) 사료 내 감귤착즙박과 발효감귤착즙박 첨가에 따

른 합성 비타민 C 대체효과

5.1 서론.....	76
5.2 재료 및 방법.....	78
5.2.1 CBP 수집 및 전처리.....	78
5.2.2 CBP의 발효 및 추출.....	78
5.2.3 실험사료.....	78

5.2.4 실험어 및 사육관리.....	79
5.2.5 분석항목.....	82
5.2.6 인위감염실험.....	84
5.2.7 통계학적 분석.....	84
5.3 결 과.....	85
5.4 고 찰.....	90
요 약 문.....	93
참 고 문 헌.....	97
감 사 의 글.....	111

ABSTRACT

Chapter 1

Effects of dietary supplementation of a citrus by-product on growth performance, innate immunity and tolerance of low water temperature in red sea bream *Pagrus major*

Our aim was to determine the effects of a citrus by-product (CBP) and CBP fermented by *Lactobacillus palntarum* (LP-CBP), provided as dietary supplements, on the growth performance, feed utilization, innate immunity and temperature tolerance of red sea bream. A diet without inclusion of CBP or LP-CBP was used as a control and four other experimental diets were formulated to replace wheat flour by 4% and 8% of either CBP or LP-CBP (designated as Con, LP-CBP4%, LP-CBP8%, CBP4% and CBP8%, respectively). Experimental diets were fed to triplicate groups of 25 fish (initial body weight, 55.0 g) for 9 weeks. Growth performance and feed utilization were not significantly different among all the groups. Bone collagen content was significantly increased by supplementation with CBP and LP-CBP. Vitamin C concentration tended to be higher in livers of fish fed the supplements than in those of the control group. Myeloperoxidase, lysozyme and superoxide dismutase activities were higher in fish fed CBP or LP-CBP than in those fed the control diet. When fish were exposed to low water temperature, cumulative mortalities of those fed CBP or LP-CBP supplemented diets were lower (29%, 33%, 34% and 33% mortalities for LP-4%, LP-8%, CBP4% and CBP8%, respectively) than the control group (58%). Therefore, inclusion of either CBP or LP-CBP at up to 8% in red sea bream diet brings benefits through enhanced innate immunity and better tolerance of low water temperature.

Chapter 2

Evaluation of dietary citrus by-product as an L-ascorbyl-polyphosphate substitute for juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

This study investigated the effect of partial and/or whole replacement of dietary l-ascorbly-polyphosphate (LAPP) by citrus by-product (CBP) on growth performance of the juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Triplicate groups of juvenile olive flounder (initial weight of 46.4 g) were fed one of five experimental diets which were formulated to replace LAPP by CBP at 0%, 25%, 50%, 75% or 100% (designated as LAPP100/CBP0, LAPP75/CBP25, LAPP50/CBP50, LAPP25/CBP75 or LAPP0/CBP100). During 6 weeks of the feeding trial, feed intake and survival were not significantly different among all the fish groups. However, fish fed LAPP0/CBP100 group had significantly higher final body weight and feed conversion ratio than the LAPP100/CBP0 group. Immune response and histological parameters were not significantly different among all the groups. The results suggest that LAPP can be replaced in diet for the olive flounder by eco-friendly CBP to maintain their normal growth and health status.

Chapter 3

Replacing vitamin C source, L-ascorbyl-polyphosphate, with citrus by-product and digestibility in diets of Korean rockfish *Sebastes schlegeli*

The present study examined the effects of replacement of dietary vitamin C (VC) source (l-ascorbyl-polyphosphate, LAPP) by citrus by-product (CBP) on growth performance, feed utilization, innate immunity and disease resistance of juvenile Korean rockfish. A diet without LAPP and CBP was used as a control diet. Four other experimental diets containing two different levels of either LAPP or CBP equivalents of 90 and 360 mg/kg diet (designated as Con, LAPP90, LAPP360, CBP90 and CBP360 respectively). At the end of 13 week feeding trial, growth performance, feed utilization and survival rate of fish fed LAPP and/or CBP supplemented diets were significantly higher than fish fed the control diet. The VC concentration in the liver and bone collagen content were correlated positively with the dietary VC levels. Fish fed LAPP and/or CBP supplemented diets were significantly higher lysozyme and total immunoglobulin activities than those fed the control diet. In the challenge test against *Streptococcus iniae*, cumulative mortality of fish fed LAPP and/or CBP supplemented diets were significantly lower (8-40%) than the control group (61%). The findings in this study show that the CBP can be promising VC source for LAPP replacement in diet for Korean rockfish.

Chapter 4

Replacing vitamin C source with citrus by-product or fermented citrus by-product in diets of Korean rockfish *Sebastes schlegeli*

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

LIST OF FIGURES

Figure 1-1. A process of citrus by-product pre-treatment.

Figure 2-1. Myeloperoxidase (MPO) activity (A), lysozyme activity (B), superoxide dismutase (SOD) activity (C), Nitro blue-tetrazolium (NBT) assay (D) and anti-protease activity (E) of red sea bream (*Pagrus major*) fed five experimental diets containing two different levels of either citrus by-product (CBP) or citrus by-product fermented with *Lactobacillus plantarum* (LP-CBP) for 9 weeks. Values are mean of triplicate groups and presented as mean±SD.

Figure 2-2. Cumulative mortality of red sea bream (*Pagrus major*) fed five experimental diets containing two different levels of either citrus by-product (CBP) or citrus by-product fermented with *Lactobacillus plantarum* (LP-CBP) after exposure by low temperature for 15 days.

Figure 3-1. Histopathological analysis of the olive flounder fed five experimental diets.

Figure 3-2. Changes in number of goblet cells in the intestine of olive flounder fed the five experiment diets for 12 weeks; (A)LAPP100/CBP0, (B)LAPP75/CBP25, (C)LAPP50/CBP50, (D)LAPP25/CBP75, and (E)LAPP0/CBP100.

Figure 4-1. Feces collection tanks (Guelph system) used for the apparent digestibility test of citrus by-product containing diets.

Figure 4-2. Feces collection for the apparent digestibility test of citrus by-product containing diets.

Figure 4-3. Vitamin C deficiency symptoms (cataract) of fish fed control diet without vitamin C sources.

Figure 4-4. Cumulative mortality of Korean rockfish (*Sebastes schlegelii*) juvenile fed the 5 experimental diets containing two different levels of either L-ascorbyl-2-polyphosphate

(LAPP) or citrus by-product (CBP) after challenge with *Streptococcus iniae* by immersion.

Figure 5-1. Cumulative mortality of Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*) fed the 5 experimental diets containing L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP), citrus by-product (CBP), *Bacillus subtilis* fermented CBP (BS-CBP) and *B. pumilus* fermented CBP (BP-CBP) after challenge with *Edwardsiella tarda* by immersion. Data represents the average \pm SD from triplicate groups.

LIST OF TABLES

- Table 1-1.** Historical vitamin C diagnostic signs reported in fish.
- Table 1-2.** Vitamin C requirements for growing fish with chemically defined diets in a controlled environment.
- Table 1-3.** Chemical composition of some citrus by-product I.
- Table 1-4.** Chemical composition of some citrus by-product II.
- Table 2-1.** Formulation and proximate composition of experimental diets for red sea bream, *Pagrus major* (% DM)
- Table 2-2.** Growth performance of red sea bream (initial body weight, 55.0±0.5 g) fed five experimental diets containing two different levels of either citrus by-product (CBP) or citrus by-product fermented with *Lactobacillus plantarum* (LP-CBP) for 9 weeks.
- Table 2-3.** Bone collagen and total ascorbic acid concentration in the liver of red sea bream (*Pagrus major*) fed the experimental diets containing two different levels of either citrus by-product (CBP) or citrus by-product fermented with *Lactobacillus plantarum* (LP-CBP) for 9 weeks.
- Table 3-1.** Composition and proximate analysis of the experimental diets (% dry matter)
- Table 3-2.** Growth performance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) (initial body weight 46.4±0.7 g) fed the 5 experimental diets for 6 weeks.
- Table 3-3.** Morphological parameters of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed the experimental diets for 6 weeks.
- Table 3-4.** Nitro blue tetrazolium (NBT), lysozyme, myeloperoxidase (MPO), superoxide dismutase (SOD) and total immunoglobulin (Ig) of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed the experimental diets for 6 weeks.
- Table 4-1.** Formulation of the experimental diets (% DM).

Table 4-2. Proximate analysis of the experimental diets (% DM).

Table 4-3. Growth performance of Korean rockfish (initial body weigh 4.5 ± 0.01 g) fed 5 experimental diets containing two different levels of either L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP) or citrus by-product (CBP) for 13 weeks.

Table 4-4. Liver ascorbic acids and vertebral collagen concentrations of Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*) juvenile fed the 5 experimental diets containing two different levels of either L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP) or citrus by-product (CBP) for 13 weeks.

Table 4-5. Lysozyme and immunoglobulin (Ig) activities of Korean rockfish (*Sebastes schlegelii*) juvenile fed the 5 experimental diets containing two different levels of either L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP) or citrus by-product (CBP) for 13 weeks.

Table 4-6. Apparent digestibility of coefficient (% ADC) of dry matter and protein in the test diets determined by fecal collection method (Guelph system) for Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*).

Table 5-1. Formulation of the experimental diets (% DM).

Table 5-2. Proximate composition of the experimental diets (% DM).

Table 5-3. Growth performance of Korean rockfish (initial body weigh 22.9 ± 0.01 g) fed the 5 experimental diets containing L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP), citrus by-product (CBP), *Bacillus subtilis* fermented CBP (BS-CBP) and *B. pumilus* fermented CBP (BP-CBP) for 13 weeks.

Table 5-4. Hematological parameters of Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*) fed the 5 experimental diets containing L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP), citrus by-product (CBP), *Bacillus subtilis* fermented CBP (BS-CBP) and *B. pumilus* fermented CBP (BP-CBP) for 13 weeks.

Table 5-5. Nitro-blue tetrazolium (NBT), lysozyme and total immunoglobulin (Ig) activities of Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*) fed the 5 experimental diets containing L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP), citrus by-product (CBP), *Bacillus subtilis* fermented CBP (BS-CBP) and *B. pumilus* fermented CBP (BP-CBP) for 13 weeks.

CHAPTER 1. 문헌조사

1.1 비타민 C

대부분의 동물들은 체내에서 비타민 C (L-ascorbic acid)를 합성할 수 있지만 인간, 설치류 및 어류는 체내에서 비타민 C 합성을 위한 효소가 결핍되어 반드시 먹이로부터 섭취해야 한다(Wilson, 1973). 비타민 C 는 콜라겐 생성에 중요한 역할을 한다. 3 가 철 이온은 비타민 C 로부터 전자를 전달받아 2 가 철 이온으로 변환되고, 변환된 2 가 철 이온이 콜라겐 생성에 사용된다. 즉, 전자를 공급받지 못한 3 가 철 이온은 콜라겐을 생성하지 못하기에 충분한 양의 비타민 C 가 공급되지 않는다면 괴혈병과 같은 결핍증상이 발생된다. 또한, 비타민 C 는 강력한 환원제로 유해산소에 전자를 내주어 인체를 보호하는 항산화 작용에 중요한 역할을 한다. 육체적 스트레스가 지속되면 비타민 C 가 항산화제로 소모되면서 콜라겐 생성에 쓰일 양을 충분히 공급하지 못하게 되어 노화가 촉진된다(Wilson and Poe, 1973; Lovell and Lim, 1978; Sato et al., 1982).

비타민 C 는 가격이 비쌀 뿐만 아니라 빛, 수분, 온도와 같은 환경 조건에 매우 불안정하여 사료 압출과정 동안 상당량이 파괴됨으로 황(S), 마그네슘(Mg), 칼슘(Ca), 인(P) 등을 결합시킨 안정한 유도체 형태(L-ascorbyl-2-sulfate, L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg, L-ascorbyl-2-monophosphate-Ca 및 L-ascorbyl-2-polyphosphate)로 사료에 첨가하거나 코팅된 형태의 비타민 C 를 사용하고 있다(El Nagggar and Lovell, 1991). 압출성형 후 사료 내 적정 비타민 C 요구량을 충족시키기 위해 적정량 이상으로 비타민 C 를 첨가하기도 하지만 경제적 손실이 발생한다. 따라서 가격이 저렴하고 안정적인 형태의 비타민 C 원료가 사용되어야 한다.

양어사료 내 비타민 C 첨가는 콜라겐 합성 뿐만 아니라 어류의 성장, 면역활성, 질병저항성 및 스트레스 내성을 향상시키는 것으로 보고되었다(Eo and Lee, 2008; Zhou et al., 2012). 양어사료 내 비타민 C가 결핍되면 식욕저하로 인해 빈혈증상이 발생하고 이는 사료효율 및 성장률을 감소시키는 원인이 되며, 면역력을 저하시켜 생존율에도 악영향을 미치게 된다(Table 1-1). 비타민 C가 결핍된 사료를 연어와 송어에 공급했을 경우 척추만곡, 척추전만 및 안구돌출과 같은 구조적 기형과 혈장 내 트리글리세라이드 및 콜레스테롤 증가와 같은 내부증상이 관찰되었다(Halver et al., 1969; Hilton et al., 1978; Tsujimura et al., 1978; Sato et al., 1983). 이 외에도 차널메기(Lovell and Lim, 1978; Wilson et al., 1989), 잉어(Dabrowski et al., 1989), 틸라피아(Stickney et al., 1984; Soliman et al., 1986), 넙치(Wang et al., 2002) 및 조피볼락(Wang et al., 2003a,b)에서도 비타민 C가 결핍 되었을 때 성장저하 및 구조적 기형과 같은 결핍증상이 관찰되었다. 연어 및 차널메기의 경우 간과 신장에서 비타민 C 농도가 20-26 $\mu\text{g/g}$ 이하일 때 위와 같은 비타민 C 결핍 증상이 관찰되었고(Hilton et al., 1977; Sato et al., 1983; Lovell and Lim, 1978), 가물치에서는 신장에서 100 $\mu\text{g/g}$ 보다 훨씬 높은 농도일 때에도 비타민 C 결핍증상이 관찰되었다(Mahajan and Agrawal, 1979). 어류의 비타민 C 요구량 및 체내 축적률은 어종, 크기, 수온, 사육환경 및 비타민 C 원료 등 여러 환경에 의해 달라질 것으로 판단된다(Table 1-2).

Table 1-1. Historical vitamin C diagnostic signs reported in fish.

Deficiency signs	Species
Abnormal swimming (ataxia)	Korean rockfish
Dark skin coloration	Korean rockfish, Yellowtail
Deformities (spinal, jaws, or snout)	Olive flounder, Korean rockfish, parrotfish
Eye pathological changes (cataract)	Olive flounder
Hemorrhage	Olive flounder, Korean rockfish, yellowtail
Poor appetite (anorexia)	Olive flounder, Korean rockfish, parrotfish
Scoliosis	Olive flounder, Korean rockfish

(Source: NRC, 2011)

Table 1-2. Vitamin C requirements for growing fish with chemically defined diets in a controlled environment.

Species	Vitamin C source	Requirement (mg/kg diet)	Response Criteria	Reference
Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	AA	250-500	WG, ADS	McLaren et al. (1947)
		100	WG, ADS	Halver et al. (1969)
		40	WG, ADS	Hilton et al. (1978)
		20	WG, ADS	Sato et al. (1982)
		5-100	C/H	Sato et al. (1982)
		500	MLS	Sato et al. (1982)
		20	WG, ADS	Grant et al. (1989)
Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	AA	50	WG, ADS	Lall et al. (1990)
	C2MP-Ca	10	WG, ADS	Sandnes et al. (1992)
Parrot fish (<i>Oplegnathus fasciatus</i>)	AA	250	WG, ADS	Ishibashi et al. (1992)
	C2MP	118	WG	Wang et al. (2003a)
Korean rockfish (<i>Sebastes schlegeli</i>)	AA	144	WG	Lee et al. (1998)
		100-102	WG, SGR, PER	Bai (2001)
	C2MP-Ca	112	WG	Wang et al. (2003b)
	C2MP-Na/Ca	101	WG	Wang et al. (2003b)
	C2D	50	WG, ADS	Wang et al. (2003c)
Olive flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	C2MP-MG	28-47	WG	Teshima et al. (1991)
	C2PP	91-93	WG, PER	Wang et al. (2002)
Tiger puffer (<i>Takifugu rubripes</i>)	C2MP	29	WG, SGR	Eo and Lee (2008)
Cobia (<i>Rachycentron canadum</i>)	C2PP	44.7-53.9	WG, MLS	Xiao et al. (2010)
Grouper (<i>Epinephelus spp.</i>)	AA	45.3	WG	Lin and Shiau (2005a)
	C2MP-Mg	17.9	WG	Lin and Shiau (2004)
	C2PP	17.8	WG	Lin and Shiau (2005b)

(출처: NRC, 2011)

AA: L-ascorbic acid; ADS, absence of deficiency signs; C2D, L-ascorbyl-2-glucose; C2MP, ascorbyl-2-monophosphate; C2PP, L-ascorbyl-2-phosphosphate; C/H, collagen or hydroxyproline concentration; MLS, maximum liver storage; SGR, specific growth rate; PER, protein efficiency ratio; WG, weight gain.

1.2 제주감귤산업

제주경제의 핵심은 감귤산업이다. 1965년 재배를 시작으로 현재까지 급속도로 성장하였고, 제주도내 감귤 재배 농가 수는 제주지역 전체 농가의 80% 이상을 차지하고 있으며 전국 감귤 재배면적의 95% 이상을 차지하고 있다. 2013년 제주지역 감귤 재배면적은 17,530ha로 1993년 22,230ha에 비해 4,700ha 감소하여 약 20%의 감소율을 보였지만, 감귤 생산량은 2013년 682,282톤으로 1993년 619,106톤에 비해 63,176톤 증가하여 약 10%의 증가율을 보였다(Statistic Korea, 2014). 하지만 오렌지 수입과 대체 작물 등 농산물 수입 개방 및 소비형태 변화로 감귤에 대한 소비자의 기호도는 점차 낮아지고 있으며 이는 가격하락의 큰 원인으로 작용하고 있다.

감귤에는 비타민 C, carotenoid, flavonoids, pectin 과 같은 유용성분들이 다량으로 함유되어 기능성 식품으로 인정받고 있다(Bampidis and Robinson, 2006). 감귤 생산량 중 80~85%는 생식용으로 이용되고 있으며, 감귤 가공산업이 활성화되어 감귤 가공비율은 약 20% 내외로 최근 상승하였다. 현재 제주지역에서의 감귤 가공은 제주도개발공사와 민간기업 2 개소에서 주스와 통조림으로 생산되며, 가공처리 후 원료감귤의 50% 정도가 부산물로 배출되고 있는 실정이다(Lee et al., 1987). 감귤 가공과정에서 발생하는 감귤착즙박(Citrus by-product, CBP)의 효과적인 이용방법이 없어 현재까지 대부분이 버려지고 있는 실정이다. 이를 처리하기 위해 대단위 감귤 가공공장에서는 폐과피의 효과적인 재사용 방안을 찾고 있다(Figure 1-1).



원과 수매



세척기 이동



세척과정



스콜더로 투입



자동박피



과피 배출

Figure 1-1. A process of citrus by-product pre-treatment.

1.3 감귤부산물

환경변화 및 자원소비가 증가함에 따라 사료원료 가격이 상승하고 원료량도 한정되어 있어 이를 대체할 수 있는 연구들이 진행되고 있다. 식품 및 농수산 재료의 가공 목적이 다양해지고 가공 기술도 새롭게 개발됨에 따라 사료원료(단미사료, Feed ingredients)의 범위는 점차 확대되고 있으며, 사용방법 및 첨가함량에 따라 최종 제품의 품질에 결정적인 영향을 미치게 된다. 최근 폐기물을 최소화하고 오염물질 배출량을 감소시키기 위한 친환경 제조방법이 도입되고, 위생적이고 안전한 농수산물을 생산하려는 노력이 제도화 됨에 따라 신물질 개발이 필요하게 되었다. 이러한 연구는 앞으로도 더욱 활발히 진행될 것으로 판단된다. 또한 단미사료와 배합사료를 한 단계 발전시켜 추후에는 농수축산물의 품질을 결정하는 중요한 요인으로 작용될 것으로 기대된다.

CBP는 목적 제품에 비해 중요성이 낮고 효과적인 이용 방법이 없어 대부분 땅에 매립되거나 버려져 심각한 환경문제를 유발한다. 현재 CBP의 일부가 한약재로 쓰이고 있지만 그 양이 매우 소량으로 이를 활용하기 위한 연구들이 진행되고 있다. CBP의 사료화 연구는 젖소를 대상으로 시작되었고, 그 후 다양한 영양학적 성분분석을 통해 양계 및 양돈 사료에서도 사료 원료로서의 이용 가능성이 밝혀졌다(Mead and Guilbert, 1926; Cullen et al., 1986). 하지만 양어사료의 원료 이용성에 관해서는 넙치를 대상으로만 연구되었고(Song et al., 2002; Seo et al., 2010; Lee et al., 2013), 그 외 양식어종에서는 전무한 실정이다. 육상동물을 대상으로 진행된 CBP의 첨가효과를 바탕으로 양어사료에 첨가제로 사용하기에는 기초 자료가 부족할 뿐만 아니라 경제성 측면에서 문제점이 대두될 수 있다. 최근 들어, 감귤과피 추출법에 따른 항균활성 연구 및 생리활성 효과, 향산화 저해 활성 효과에 대한 연구결과들이 보고되었다(Moon et al., 2004, 2007). 이에 대한 응용 연구로는 감귤 농축액으로 제조한 감귤 젤리의 특성 평가(Jeong and Kim, 2008),

감귤 분말을 첨가한 감귤인절미의 품질 특성(Kim and Song, 2010) 등 몇몇 연구가 진행되었지만 CBP를 이용한 양어사료의 첨가제 및 합성 비타민 C 대체에 관한 연구는 전무한 실정이다. 따라서, CBP를 이용하여 양어용 배합사료 내 값비싼 원료인 합성 비타민 C를 대체함으로써 사료비용을 절감하고 기능성 어류의 생산을 기대할 수 있다.

버려지는 CBP를 양식산업을 위한 사료자원으로 활용하는 기술을 개발하여 양어장 및 감귤산업에 경제적 이익 창출과 더불어 청정 제주지역의 환경보존 차원에서도 매우 바람직한 연구분야라 할 수 있다. CBP의 영양성분 및 주요 기능성 성분을 분석하여 부가가치 향상을 위한 산업화 소재로 활용하여, 제주 감귤산업의 안정적 발전을 위한 새로운 수요창출 및 산업화를 촉진하는데 보탬이 될 것으로 기대된다(Table 1-3).

Table 1-3. Chemical composition of some citrus by-product I.

Citrus by-product	Dried citrus pulp	Dried citrus ammoniated	Citrus seed meal
Calcium(g/kg DM)	20.7	19	12.5
Phosphorus (g/kg DM)	1.3	1.4	7.5
Magnesium (g/kg DM)	1.6	0.8	6.8
Potassium (g/kg DM)	7.7	-	14.9
Sodium (g/kg DM)	1.0	-	-
Chlorine (g/kg DM)	-	-	-
Sulfur (g/kg DM)	0.7	-	-
Cobalt (mg/kg DM)	0.155	-	-
Copper (mg/kg DM)	6.3	-	7.5
Iron (mg/kg DM)	170	-	330
Magnaease (mg/kg DM)	7.2	-	8.5
Zinc (mg/kg DM)	14.4	-	8.0
Arginine (g/kg DM)	2.5	-	-
Cystein (g/kg DM)	1.2	-	-
Lysine (g/kg DM)	2.2	-	-
Methionine Lysine (g/kg DM)	1.0	-	-
Tryptophan Lysine (g/kg DM)	0.7	-	-
Vitamin A (IU/kg DM)	400	-	-
Choline (mg/kg DM)	884	-	-

(Source: Ensminger and Olentine, 1978)

Table 1-4. Chemical composition of some citrus by-product II.

Citrus by-product	Citrus pulp	Citrus pulp dried
DM ^a (g/kg)	183	900
OM (g/kg DM)	923	930
CP (g/kg DM)	66	69
Crude fat (g/kg DM)	33	38
ADF (g/kg DM)	160	230
NE _l (MJ/kg DM)	7.91	7.36
NE _g (MJ/kg DM)	6.65	4.89
NE _m (MJ/kg DM)	8.28	7.36
Calcium (g/kg DM)	-	20.7
Phosphorus (g/kg DM)	-	1.3
Magnesium (g/kg DM)	-	1.6
Potassium (g/kg DM)	-	6.2

(Source: Bath et al., 1980)

1.4 발효 및 발효균주

발효(fermentation)란 미생물이 가지고 있는 효소를 이용해 유용물질을 만드는 과정을 의미한다. 미생물의 발효작용으로 제조된 식품을 발효식품이라 하며, 이런 발효식품들은 미생물의 존재를 알지 못했던 오래 전부터 식품에 이용해 왔다. 최근 들어 발효식품에 대한 우수성이 입증되고 건강에 대한 관심이 높아지면서 발효 및 발효식품에 관한 소비가 늘어나고 있다. 발효라는 숙성과정을 거치면서 영양학적 가치뿐만 아니라 생리활성 물질이 생성되어 식품의 저장 및 가공 수단으로 우수성이 보고되었다(Scerra et al., 1999; Aregheore 2000).

쥬스 가공 후 버려지는 CBP 를 유용균주로 발효시켜 사용한다면 그 이용 효과는 더욱 클 것이다(Taoka et al., 2006; Panigrahi et al., 2007; Aly et al., 2008). 발효물질에는 폴리페놀계 화합물인 isoflavone 이 높은 함량으로 존재하여 항산화 및 비특이적 면역반응을 촉진시킨다고 보고되었다(Bae et al., 1997; Salinas et al., 2005; Nayak et al., 2007; Panigrahi et al., 2007). 또한 CBP 에 최적 발효미생물을 이용하여 발효기술을 활용한다면 경제적이며 고효율적인 양어사료 개발에 크게 이바지 할 것으로 판단된다. 즉, CBP 를 유용균주로 발효시켜 사용한다면 기능성 사료 첨가제로써의 효과가 있을 것으로 사료된다.

1.5 양식현황

수산물 소비량은 지난 수십 년간 증가하고 있다. 1인당 연간 수산물 소비량이 54 kg으로 십여 년 전에 비해 2배 이상 증가하였고 평균 동물성 단백질 섭취량의 15%를 차지하고 있다. 이처럼 수산물 소비가 늘어난 것은 국민소득 향상과 건강에 대한 사회적 관심이 높아졌기 때문이다. 최근 웰빙(well-being) 식품에 대한 수요가 늘어나고 있다. 수산물은 건강식품으로 인식되어 수산물 소비는 계속해서 늘어날 것으로 전망된다. 이렇게 폭발적인 수산물 소비량을 감당할 수 있었던 원인 중 하나는 양식업이 계속해서 발전해 왔기 때문이다.

넙치(*Paralichthys olivaceus*)양식은 생산기술(종묘, 사료, 육종 등)이 확립됨에 따라 급격한 발전을 거듭하여 국내의 대표적인 양식산업으로 발전하였다(KOSIS 2013). 넙치는 종묘부터 출하까지의 사육기간이 1년 정도로 다른 양식어종에 비해 성장이 빠르고 양식생산량이 높다. 또한, 영양성분이 풍부하여 미래의 중요한 단백질 식품으로서 가치가 높다. 제주도의 경우 대규모 기업형 양식시설이 도입되어 안정적인 생산을 이끌어 산업적 중요성도 높은 어종이다.

육식성 해산어종인 조피볼락(*Sebastes schlegeli*)은 넙치와 다르게 육상수조 방식이 아닌 해상가두리 방법으로 양식하고 있으며 국내에서 넙치 다음으로 많이 생산되는 어종이다. 조피볼락은 질병저항성이 강하여 사육관리가 용이하지만 고밀도 사육, 수질, 항생제 남용과 같은 인위적인 외부환경 변화로 상당한 스트레스에 노출되면 양식 생산량이 감소한다(Wendelaar Bonga, 1997). 현재까지 조피볼락을 대상으로 한 연구는 대부분 사료 첨가제 및 배합비를 대상으로 이루어졌다(Lee et al., 2008; Seo et al., 2009; Kim et al., 2009). 따라서, 조피볼락 양식산업의 경쟁력을 강화시키기 위해서는 양식 기술적 측면과 양식 경영의 측면을 파악하는 것이 무엇보다도 중요하다.

우리나라의 해산어류 양식은 넙치와 조피볼락이 90% 내외를 차지하고 있어 이를 대체할 수 있는 새로운 양식어종에 초점을 돌리고 있다. 그 중 참돔(*Pagrus major*)은 횡감으로써 고급어종에 속하며 맛이 뛰어나 소비자들에 대한 인식이 좋고 가격 또한 높아 양어가들이 선호하는 어종이다(Watanabe and Vassallo-Agius, 2003). 참돔은 성장률이 빠르고 다양한 환경 변화에 내성이 높은 어류로 알려져 있지만, 성장단계에 맞는 영양소 제공과 양식환경이 적절치 못하면 성장률이 감소하고 질병이 발병하게 된다. 참돔의 적정 사육수온은 20-26℃ 내외이지만 주로 해상가두리에서 양식을 하기 때문에 출하를 위해서는 겨울철 저수온기를 견뎌내야 한다.

1.6 어류질병

어류는 물이라는 특수한 서식환경에 의해 병원성 미생물에 감염될 확률이 높다. 최근 들어 병원성 미생물에 의한 어류질병은 제주도 양식산업에 막대한 피해와 손실을 가져오고 있다(Oh et al., 1998; Cho et al., 2007; Cho et al., 2008; Kim et al., 2012; Jee et al., 2014). 국내 대부분의 경우 고밀도 양식을 하고 있어서 감염되는 확률도 증가하고, 전염 속도가 빨라 피해가 막대하다. 양식 대상어종이 병원성 질병에 감염되었을 때 가장 문제가 되는 것이 바로 폐사량 증가이다. 폐사의 원인은 감염에 의한 폐사, 외부 스트레스(선별작업, 항생제 남용 등)에 의한 폐사, 환경요인(태풍, 적조, 수온변화)에 의한 비감염성 폐사로 나눌 수 있다. 폐사량은 양어장의 경제성을 결정짓는 가장 큰 요인으로 폐사량의 증가는 생산원가를 높일 뿐만 아니라 양식산업의 안정적 발전을 저해하는 요인으로 작용한다.

질병발병을 예방하기 위해 항생제를 과다하게 사용하거나 백신요법에 의존하고 있다. 과다한 항생제의 사용은 새로운 내성균들로 인해 치료를 더욱 어렵게 만들고 어체 내 항생물질의 잔류로 보건상의 문제가 대두되고 있다(Lee, 2003; Rodriguez et al., 2007). 항생물질이 함유된 사육수의 배출은 주변 해역의 오염 및 인근 양어장으로 약제 내성균의 확산을 초래하여 악순환이 반복되고 있다. 백신요법은 주로 면역체계가 확립되지 않은 치어기를 대상으로 진행되기 때문에 번거롭고 많은 인력과 비용이 발생한다. 또한 세균성 질병에 의한 단독 발병이 아닌 2가지 이상의 세균에 혼합 감염되기 때문에 복합적 감염에 따른 효과적인 백신은 현재까지 연구단계에 머물러 있어 예방과 치료를 위한 대책으로서는 아직까지 부족한 단계이다. 이에 따라 항생제 대체방안으로 부작용이 없는 천연물질을 사료첨가제로 개발하여 양식어류의 면역력을 증진시키고 양식생물의 항생제 잔류에 따른 문제점을 해결할 수 있는 효과적인 대처방안이 제시되어 양식산업의 기능적 브랜드화가 시도되어야 한다(Kim et al., 2009; Kim et al., 2010; Song et al., 2011). 또한 양식생물을 섭취한 사람에게 피해가 없고 자연

생태계로 배출되었을 때 자연분해가 쉬워 수질환경 오염과 같은 2차적인 문제가 없는 천연항생제 대체제 개발이 절실히 필요한 상황이다. 따라서 사료단가의 절감을 위해서는 면역력을 향상시키는 동시에 경제적으로 사용할 수 있는 사료원료가 개발되어야 한다.

1.7 기대효과 및 실험내용

이번 학위 연구를 통해 첫째, CBP의 영양학적 우수성을 입증하여 경제적이고 기능적인 양어용 배합사료 원료로서의 가치를 제시하고, 둘째, CBP 첨가에 따른 값비싼 합성 비타민 C의 부분 혹은 완전대체 가능성을 조사하고자 한다. 셋째, CBP의 영양학적 우수성을 근거로 여러 유용균주를 이용하여 발효시킨 발효감귤착즙박(fermented citrus by-product, F-CBP)의 제조와 그 기능을 검증하여 F-CBP가 해산 양어용 배합사료 내 면역증강 첨가제로 사용 가능하도록 하는 과학적 근거를 제시하고자 한다. 이러한 연구결과를 바탕으로 제주도의 근간산업인 감귤산업 및 양식산업의 환경친화적 결부를 통해 21세기형 그린산업에 일조하기 위함이다. 즉, 해양생물 산업에 기능성 사료원료를 사용함으로써 향후 고부가가치의 기능성 양식어류 생산을 위한 참고 자료로 활용 가능할 것으로 예측된다.

Chapter 2에서는 가공공정에서 발생하는 CBP의 사료원료로서의 이용 가능성을 제시하기 위해, 사료 내 일반 CBP와 *Lactobacillus plantarum*에 의해 발효된 F-CBP의 첨가가 저수온기에서 사육된 참돔의 성장, 사료효율, 비특이적 면역반응 및 저수온 스트레스 내성에 미치는 영향을 조사하였다.

Chapter 3에서는 경제적이고 기능적인 양어용 배합사료 원료로서 이용 가능성을 평가하기 위해 넙치를 대상으로 CBP의 영양학적 우수성을 입증하고 값비싼 합성 비타민 C의 부분 혹은 완전대체 비율을 조사하였다.

Chapter 4 에서는 조피볼락을 대상으로 합성 비타민 C 대체 사료원료로 사용 가능한 CBP 의 이용성을 평가하고, 비타민 C 농도에 따른 성장, 사료효율, 비특이적 면역반응, 질병저항성 및 소화율에 미치는 영향을 조사하였다.

Chapter 5 에서는 조피볼락을 대상으로 CBP 와 여러 유용균주에 의해 발효시킨 F-CBP 첨가에 따른 성장, 사료효율, 비특이적 면역반응과 질병저항성에 미치는 영향을 조사하였다.

CHAPTER 2

사료 내 감귤착즙박 및 발효감귤착즙박 첨가가 저수온에서 사육된

참돔(*Pagrus major*)의 성장, 비특이적 면역반응 및 수온자극

스트레스에 미치는 영향

Effects of Dietary Supplementation of a Citrus By-product on Growth

Performance, Innate Immunity and Tolerance of Low Water

Temperature in Red Sea bream *Pagrus major*

2.1 서론

대부분의 동물들은 체내에서 비타민 C를 합성할 수 있지만 인간, 설치류, 어류는 비타민 C 합성을 위한 효소가 결핍되어 반드시 먹이로부터 섭취해야 한다(Wilson, 1973). 양어사료 내 비타민 C 첨가는 어류의 성장, 콜라겐 합성, 면역활성, 질병저항성 및 스트레스 내성을 향상시키는 것으로 보고되었다(Eo and Lee, 2008; Zhou et al., 2012). 비타민 C는 가격이 비쌀 뿐만 아니라 빛, 수분, 온도와 같은 환경조건에 매우 불안정하여 사료 압출과정 동안 상당량이 파괴된다(El Naggar and Lovell, 1991). 따라서 가격이 저렴하고 안정적인 형태의 비타민 C 원료가 사용되어야 한다.

부산물이란 제품 생산과정에서 발생하는 원료로 목적제품에 비해 중요성이 낮아 대부분 땅에 매립되거나 버려져 심각한 환경문제를 유발시킨다. 버려지는 부산물을 양식산업에 이용한다면 경제적이고 효과적인 사료원료로 사용 가능할 것이다. 국내의 경우 감귤주스 가공과정에서 상당량의 감귤착즙박(citrus by-product, CBP)이 발생되고 있다. CBP는 비타민, 미네랄, 당, 지방, 카로테노이드 및 플라보노이드 등 여러 생리활성 물질을 함유하고 있어(Bampidis and Robinson, 2006), 가공식품의 원료와 한약재로 사용되고 있다(Braddock, 1983). CBP의 사료화 연구는 젓소를 대상으로 시작되었고, 그 후 다양한 영양학적 성분분석을 통해 양계 및 양돈 사료에서도 사료 원료로서의 이용 가능성이 밝혀졌다(Mead and Guilbert, 1926; Cullen et al., 1986). 하지만 양어사료의 원료 이용성에 관해서는 넓치를 대상으로만 연구되었고, 그 외 양식어종에서는 전무한 실정이다(Song et al., 2002; Seo et al., 2010; Lee et al., 2013).

실험에 사용된 *Lactobacillus plantarum*은 대표적인 김치 발효균주이다. 인간을 대상으로 *L. plantarum*을 섭취시킨 결과 장내에서 유용균주의 수가 증가하였다. 또한, 양돈사료에 첨가할 경우 성장률과 사료효율이 개선되었고(Han, 2006), 그 외 육상동물에서는 혈청 내 콜레스테롤 수치가 감소하는 경향을 보였다(Nobaek et al., 2000;

Wang et al., 2009).

본 연구에서는 가공공정에서 발생하는 CBP의 사료원료로서의 이용 가능성을 제시하기 위해, 사료 내 일반 CBP와 *L. plantarum*에 의해 발효된 CBP (LP-CBP)의 첨가가 저수온에서 사육된 참돔의 성장, 사료효율, 비특이적 면역반응 및 저수온 스트레스 내성에 미치는 영향을 조사하였다.

2.2 재료 및 방법

2.2.1. CBP 수집 및 전처리

본 실험에 사용된 CBP 시료는 (주)일해공장(제주도 조천읍 와흘리)에서 주스 착즙 후 배출되는 부산물을 제공받아 제주대학교 양어사료영양학연구실로 운반하여 동결건조 후 분쇄하여 사용하였다. 실험에 사용된 분말형태의 CBP 는 8.2%의 조단백질 함량, 3.2%의 조지방 함량, 1.5%의 회분함량과 6.0%의 수분을 함유하였다.

2.2.2. CBP 의 발효 및 추출

CBP 를 발효시키기 위하여 *L. plamtarum* 균주를 Nutrient broth(NB, Difco, USA)에 30°C에서 3 일간 호기적 조건으로 배양하였다. 배양된 *L. plamtarum* 는 감귤배지에 접종하고 균 농도는 1.0×10^3 CFU/ml 가 되도록 멸균 생리식염수를 이용하여 단계희석 하였다. 그 후 감귤배지에 2.5%가 되게 접종하여 *L. plamtarum* 의 최적 생육 온도인 30°C에서 72 시간 동안 발효시켰다. 발효과정이 완료된 후 발효산물의 pH 는 4.0 부근까지 도달하였다. 발효된 LP-CBP 시료는 동결건조 후 분쇄하여 실험에 사용하였다.

2.2.3. 실험사료

실험사료는 47%의 조단백질과 13%의 조지방을 함유토록 설계하여 제조하였다(Table 2-1). CBP와 LP-CBP의 효능을 알아보기 위하여 비타민 C 요구량을 충족시킨 대조사료에 소맥분 함량을 감소시켜 CBP와 LP-CBP를 각각 4%와 8%씩 첨가한 5종류의 실험사료를 제조하였다(Con, LP-CBP4%, LP-CBP8%, CBP4%, CBP8%). 실험사료 제조를 위해서 분말형태의 각 사료원을 사료조성표에 따라 정확히 무게를 측정된 후, 사료원 총량의 30%에 해당하는 증류수를 첨가하여 혼합하였다. 혼합물은 소형육절기(SMC-12, Korea)로 직경 2-3 mm 크기로 성형하였다. 제작된 실험사료는 동결건조기에서 건조시킨 후,

사료공급 전까지 -20℃ 냉동고에 보관한 후 실험에 사용하였다.

2.2.4. 성장 실험

참돔 치어는 경상남도 고성군에 위치한 종묘장에서 구입하여 제주대학교 소속 해양과학연구소로 운송하였다. 2주간의 예비사육 후, 실험어(초기평균무게: 55.0±0.5 g)는 총 15개의 150 L 원형 플라스틱 수조에 25마리씩 무작위로 배치하였다. 사료공급은 실험구당 3반복구를 두었으며, 사육수는 모래 여과해수를 사용하여 3 L/min의 유수량이 공급되도록 조절하였고 모든 실험수조에 용존산소 유지를 위하여 에어스톤을 설치하였다. 사육실험은 저수온에서 실시하였고(12℃-16℃), 실험사료는 9주 동안 1일 2회로 반복공급을 하였다.

2.2.5. 어체 측정 및 혈액 샘플

사육실험 종료 후 실험어의 최종무게와 사료공급량을 측정하여 사료전환효율, 단백질이용효율 및 생존율을 계산하였다. 최종무게 측정 후, 각 수조당 8마리의 실험어를 무작위로 선별하여 2-phenoxyethanol 용액(100 ppm)으로 마취시킨 후 8마리 중 4마리는 헤파린이 처리된 주사기로 꼬리 미병부에서 채혈하였다. 채혈된 전혈은 대식세포활성 분석에 이용하였다. 남은 4마리의 혈액은 헤파린이 처리되지 않은 주사기로 채혈하여 상온에서 60분간 방치시킨 후 원심분리기로(5000 × g) 혈청을 분리하여 면역분석을 실시하였다.

Table 2-1. Formulation and proximate composition of experimental diets for red sea bream, *Pagrus major* (% , DM)

Ingredients	Experimental diets				
	Con	LP-CBP 4%	LP-CBP 8%	CBP 4%	CBP 8%
White fish meal	49.0	49.0	49.0	49.0	49.0
Soybean meal	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Wheat flour	23.0	19.0	15.0	19.0	15.0
Squid liver oil	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Vitamin mix ¹	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Mineral mix ²	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
LP-CBP ³	0.0	4.0	8.0	0.0	0.0
CBP ⁴	0.0	0.0	0.0	4.0	8.0
CMC ⁵	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Proximate composition (%)					
Moisture	21.5	23.6	25.4	24.1	24.8
Crude protein	47.0	46.9	46.7	45.1	47.6
Crude lipid	13.3	12.6	13.6	13.7	13.6
Crude ash	12.8	13.1	14.0	12.8	13.2
TAA(mg/kg) ⁶	64±0.1 ^a	98±0.3 ^b	149±1.9 ^c	111±0.3 ^b	146±6.8 ^c

¹L-ascorbic acid, 121.2; DL- α 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-aminobezoic acid, 18.2; menadione, 1.8; retinyl acetate, 0.73; cholecalciferol, 0.003; cyanocobalamin, 0.003.

²MgSO₄.7H₂O, 80.0; NaH₂PO₄.2H₂O, 370.0; KCl, 130.0; Ferric citrate, 40.0; ZnSO₄.7H₂O, 20.0; Ca-lactate, 356.5; CuCl₂, 0.2; AlCl₃. 6H₂O, 0.15; Na₂Se₂O₃, 0.01; MnSO₄.H₂O, 2.0; CoCl₂.6H₂O, 1.0.

³Citrus by-product fermented with *Lactobacillus plantarum*.

⁴Citrus by-product: ILHAE Corporation.

⁵Carboxymethyl cellulose (Sigma, USA).

⁶Total ascorbic acid.

2.2.6. 성분분석

실험사료의 일반성분 분석은 AOAC (1995) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125°C, 3h), 조회분은 직접회화법(550°C, 12h), 조단백질은 자동조단백질 분석기(Kejltec system 2300, Sweden)로 분석하였고, 지방은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 Soxhelt 추출장치(Soxhlet heater system C-SH6, Korea)로 분석하였다.

실험사료와 실험어 간에서의 비타민 C 분석은 Dabrowski and Hinterleitner (1989)의 방법으로 분석하였다. 시료와 precipitation solution 을 혼합하여 2분간 균질화한 후 원심분리기(15,000 rpm, 4°C, 30분)를 이용하여 상층액을 추출하였다. 추출된 상층액을(250 μ l) 유리튜브에 옮긴 후 0.2% dichlorophenolindophenol (Sigam, USA)과 증류수를 25 μ L씩 첨가하여 상온에서 20분간 반응시켰다. 반응시킨 혼합물에 2% thiourea (Sigma, USA)와 5% metaphosphoric acid (Sigm, USA)을 250 μ L 넣고 2% 2,4-dinitrophenyhydrazine (Sigma, USA)을 250 μ L 넣은 후, 60°C 항온수조에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 혼합물을 냉각시켜 18 M H₂SO₄를 넣고(500 μ L) 524 nm에서 흡광도를 측정하였다.

콜라겐 함량은 Wilson and Poe (1973)의 방법으로 분석하였다. 전어체 시료는 끓는 물에 12분간 담근 후 척추주변의 근육을 제거하여 남아있는 뼈를 0.1 M NaOH용액에 24시간 반응시켜 건조하였다. 그 후 0.5 M EDTA 용액(pH 7.5)에 반응시켜 남아있는 무게를 측정하여 collagen 함량을 계산하였다.

2.2.7. 혈액 및 면역분석

혈액 내 대식세포 활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 분석방법을 토대로 Nitro-blue tetrazolium (NBT)분석방법을 통해 호중구의 oxidative radical 생성량을 측정하였다. 전혈과 NBT solution (0.2%)을 50 μ L씩 유리튜브에 옮긴 후, formazon 생성을 감소시키기 위해 1 ml의 dimethyl formamide를 첨가하여 2000 \times g 에서 5분동안 원심분리하였다. 이때 형성된 상층액을 수집하여 spectrophotometer (Genesys 10UA, USA)로 540 nm에서 NBT의 감소

범위를 측정하였다. Blank는 dimethyl formamide를 사용하였다.

혈청 내 lysozyme 분석은 Sankaran and Gurnani (1972)의 방법으로 분석하였다. Sodium citrate buffer (0.02 M, pH 5.52)에 동결건조된 *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, USA)를 첨가하여 0.2 mg/mL 농도의 현탁액을 제조한 후, 현탁액과 혈청을 10:1 의 비율로 혼합하여 24°C에서 60 분간 반응시킨 후, 450 nm 에서 흡광도 값을 측정하였다. Hen egg white lysozyme (HEWL; sigma, USA)을 이용하여 standard curve 를 구하고 ug/mL 로 표시하였다.

혈청 내 myeloperoxidase (MPO)활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 방법으로 분석하였다. HBSS (Hanks balanced salt solution)용액을 96-well plates에 80 µL씩 분주한 후 혈청 20 µL를 넣고 20 mM TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine hydrochloride)용액과 5 mM H₂O₂용액을 넣었다. 2분간 반응시킨 후 4 M H₂SO₄용액을 35 µL 첨가하여 microplate reader (Thermo, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈청 내 anti-protease 활성은 Ellis (1990)의 방법으로 분석하였다. 혈청 20 µL를 trypsin 용액 20 µL와 혼합한 후 22°C에서 10분간 반응하였다. 그 후 200 µL phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0)와 250 µL azocasein (2%)을 혼합하여 22°C에서 30분간 반응시킨 후 원심분리 하였다(6000 × g). 원심분리 후 상층액 100 µL를 100 µL NaOH (1 N)와 함께 96 well-plate에 분주하고 430 nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈청 내 superoxide dismutase (SOD)활성은 SOD assay kit (Sigma, USA)로 분석하였다.

2.2.8. 수온 스트레스 내성

9주간의 성장실험 종료 후, 총 15개의 100 L 사각 플라스틱 수조에 각 수조당 15마리씩 무작위로 배치하였다. 스트레스 자극은 순환여과시스템에서 실험구당 3반복구를 두었고, 수온조절장치(SunCool DA-1500B, Korea)를 이용하여 수온을 12°C에서 6°C까지 하루에 0.4°C씩 저하시켜 15일간 폐사율을 측정하였다. 폐사는 실험어가 수면에

힘없이 떠올라 6시간 동안 뒤집혀있는 개체까지 포함하였다.

2.2.9. 통계학적 분석

실험구의 배치는 완전 확률계획법(Completely randomized design)으로 실시하였고, 성장 및 분석결과는 SPSS (Version 12.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석하였다. 데이터 값의 유의차는 Tukey's HSD로 비교하였다. 데이터는 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었다.

2.3 결 과

사료 내 CBP 및 LP-CBP 첨가에 따른 참돔의 성장결과는 Table 2-2에 나타내었다. 9주간의 사료공급 후 최종무게, 사료전환효율, 단백질이용효율 및 생존율은 모든 그룹에서 유의적인 차이가 없었다.

콜라겐 함량은 CBP 또는 LP-CBP가 첨가된 모든 그룹이 대조구에 비해 유의적으로 높은 함량을 보였다($P<0.05$)(Table 2-3). 실험어 간에서의 비타민 C 함량은 모든 그룹에서 유의적인 차이가 없었다(Table 2-3).

실험사료 공급에 따른 참돔의 비특이적 면역반응 결과는 Figure 2-1에 나타내었다. MPO와 SOD활성에서는 CBP 또는 LP-CBP가 첨가된 그룹이 대조구에 비해 유의적으로 높은 활성을 보였다($P<0.05$). Lysozyme 활성에서는 LP-CBP4% 그룹이 대조구에 비해 유의적으로 높은 활성을 보였다($P<0.05$). 대식세포활성 및 anti-protease 활성에서는 모든 그룹에서 유의적인 차이가 없었다.

수온 저하에 따른 실험구별 폐사율 측정 결과는 Figure 2-2에 나타내었다. 스트레스 자극 2일째(11.6°C) 대조구가 10%, LP-CBP를 첨가한 그룹은 5%, CBP를 첨가한 그룹은 12-18%의 폐사율을 보였다. 스트레스 자극 12-14일째($7.6-6.8^{\circ}\text{C}$)에는 대조구에서 급격한(55.7%) 폐사율이 관찰되어 LP-CBP4% (19.8%)를 첨가한 그룹에 비해 유의적으로 높은 폐사율을 보였다.

Table 2-2. Growth performance of red sea bream (initial body weight, 55.0±0.5 g) fed five experimental diets containing two different levels of either citrus by-product (CBP) or citrus by-product fermented with *Lactobacillus plantarum* (LP-CBP) for 9 weeks.

	FBW ¹ (g)	FCR ²	PER ³	Survival (%)
Con	83.3±1.5	1.29±0.15	1.66±0.20	89.3±10.1
LP-CBP4%	85.5±1.8	1.21±0.05	1.76±0.07	96.0±4.0
LP-CBP8%	87.7±3.4	1.14±0.11	1.89±0.19	93.3±2.3
CBP4%	86.3±1.9	1.24±0.15	1.80±0.20	90.7±8.3
CBP8%	86.5±1.0	1.20±0.04	1.75±0.06	86.0±8.5

Values are means of triplicate groups and presented as mean±SD.

¹Final body weight (g).

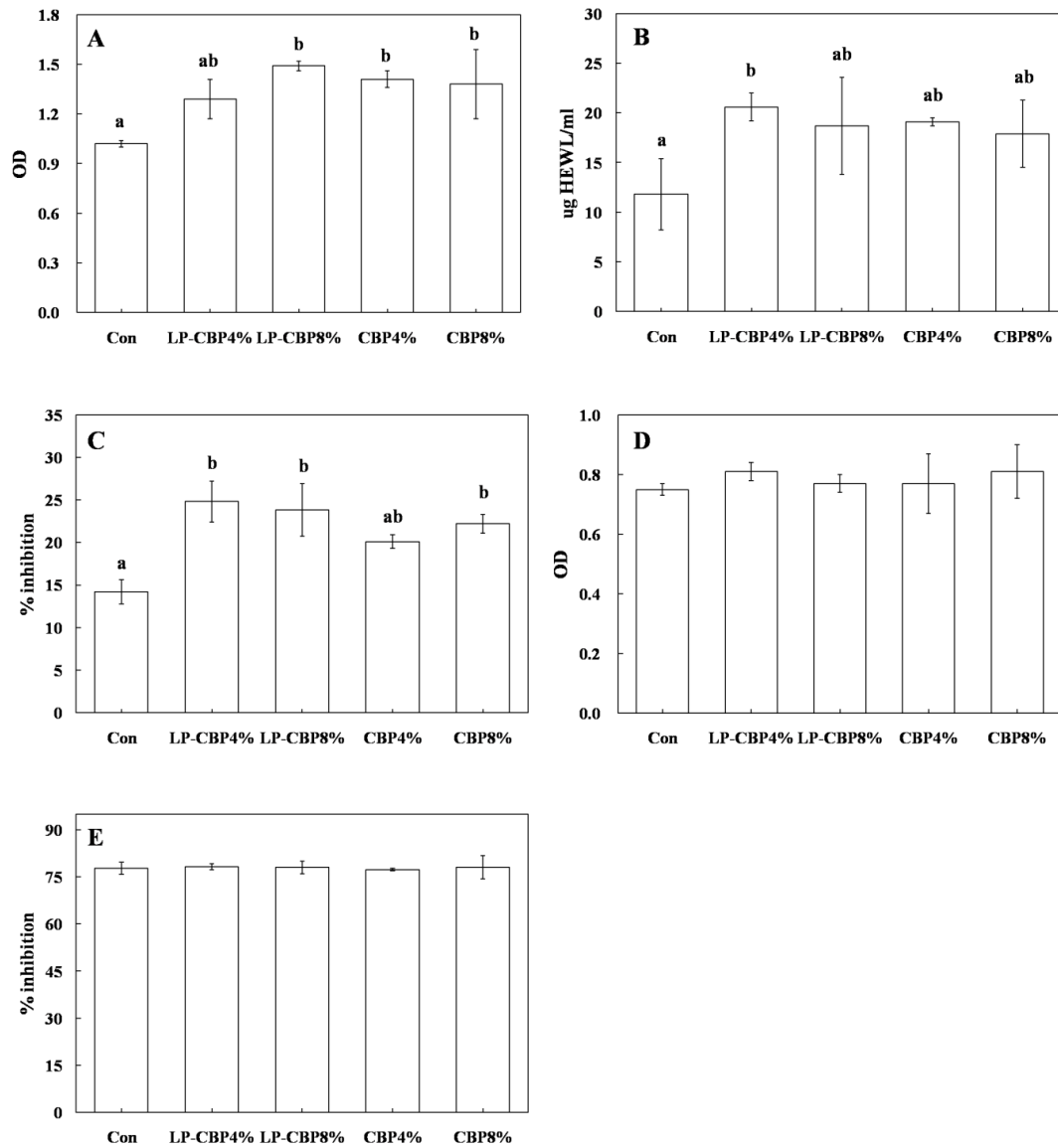
²Feed conversion ratio = dry feed fed/wet weight gain.

³Protein efficiency ratio = wet weight gain/total protein given.

Table 2-3. Bone collagen and total ascorbic acid concentration in the liver of red sea bream (*Pagrus major*) fed the experimental diets containing two different levels of either citrus by-product (CBP) or citrus by-product fermented with *Lactobacillus plantarum* (LP-CBP) for 9 weeks.

	Bone collagen (%)	Total ascorbic acid (mg/kg)
Con	19.6±1.0 ^a	43.6±7.2
LP-CBP4%	26.6±0.9 ^{bc}	54.9±16.7
LP-CBP8%	30.3±2.9 ^c	58.3±5.9
CBP4%	22.4±2.5 ^{ab}	50.5±7.9
CBP8%	25.2±2.3 ^{bc}	55.7±5.2

Values are mean of triplicate groups and presented as mean±SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P<0.05$).



Experimental diets

Figure 2-1. Myeloperoxidase (MPO) activity (A), lysozyme activity (B), superoxide dismutase (SOD) activity (C), Nitro blue-tetrazolium (NBT) assay (D) and anti-protease activity (E) of red sea bream (*Pagrus major*) fed five experimental diets containing two different levels of either citrus by-product (CBP) or citrus by-product fermented with *Lactobacillus plantarum* (LP-CBP) for 9 weeks. Values are mean of triplicate groups and presented as mean±SD.

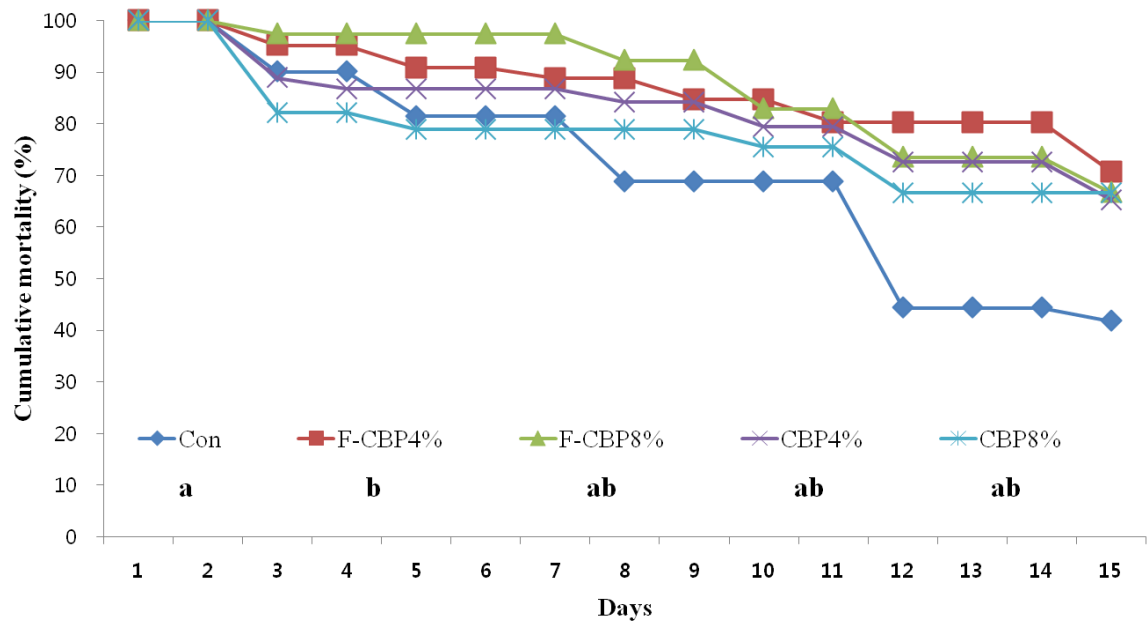


Figure 2-2. Cumulative mortality of red sea bream (*Pagrus major*) fed five experimental diets containing two different levels of either citrus by-product (CBP) or citrus by-product fermented with *Lactobacillus plantarum* (LP-CBP) after exposure by low temperature for 15 days.

2.4 고찰

본 연구에서 참돔의 성장은 CBP 및 LP-CBP 첨가에 영향을 받지 않았다. 넙치를 대상으로 한 Lee et al. (2013)의 연구에서도 *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* 균주로 발효시킨 CBP를 3%씩 첨가하여 10주간 공급하였을 때, 본 실험과 동일하게 모든 그룹에서 성장차이가 없다고 보고하였다. 반면, Song et al. (2002)은 넙치사료에 감귤발효액을 0.2% 첨가하여 16주간 공급하였을 때 감귤발효액이 첨가되지 않은 대조구에 비해 유의적으로 높은 성장률, 사료계수(feed coefficient) 및 일일먹이섭취율(daily feeding rate, %)을 보고하였다. Seo et al. (2010)은 CBP, 크릴, 켈프, 마늘분말을 넙치사료에 각각 첨가하여 15주간 공급하였을 때, CBP 첨가 그룹이 크릴 첨가그룹에 비해 유의적으로 높은 성장률을 보였다고 기록하였다. 본 연구와 Lee et al. (2013)의 경우 저수온기(12-16°C) 환경에서 실험이 진행되었고, 후자의 경우 적정수온(20°C 내외)에서 실험이 진행되었다. 적정수온에서는 사료 섭취량이 증가하여 성장률이 향상되지만, 수온이 낮아지면 사료 섭취량이 줄어들어 성장률이 감소하게 된다(Iwata et al., 1994). 따라서, 본 실험에서는 CBP 또는 LP-CBP에 의한 효능보다는 저수온 환경에 의해 사료 섭취량이 감소하여 참돔의 성장률에 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다.

비타민 C는 콜라겐 합성에 중요한 필수 영양소이다(Chatterjee, 1978). 비타민 C가 부족하면 콜라겐 합성과정이 차단되어 출혈 및 뼈의 연화와 같은 괴혈병 증상이 나타난다(Lovell, 1973; Wilson, 1973). Yellow croaker와 자주복을 대상으로 사료 내 비타민 C 함량을 농도별로 공급한 후 체내 콜라겐 함량을 분석하였을 때, 20-30%의 함량을 보여 본 실험과 유사한 경향을 보였다(Ai et al., 2006; Eo and Lee, 2008). 따라서 CBP 또는 LP-CBP는 참돔 체내에서 콜라겐 합성에 효율적으로 이용되는 것으로 사료된다. 사료를 통해 공급된 비타민 C는 장을 통해 간에 저장된다(Xiao et al., 2010). 간은 비타민 C

대사에 매우 중요한 역할을 하며, 어류의 건강상태 지표로 이용된다(Dabrowski et al., 1994; Gouillou-Coustans et al., 1998). Cobia를 대상으로 비타민 C (35% ascorbic acid equivalent, China)를 농도별(0, 10, 30, 90, 270, 810 mg/kg)로 첨가한 사료를 10주간 공급한 결과, 간 내 비타민 C 함량도 유의하게 증가하는 결과를 보였다(Xiao et al., 2010). 반면, 본 실험에서는 CBP 또는 LP-CBP 첨가에 따른 간 내 비타민 C 함량에서는 유의한 차이는 없었지만 증가하는 경향을 보였다. 따라서 CBP 또는 LP-CBP에 함유된 비타민 C가 참돔의 장에서 효율적으로 흡수되어 간에 저장되었을 것으로 사료된다.

Lysozyme은 다양한 균에 항균작용을 나타내는 효소로서, 세균 세포벽의 구성성분인 peptidoglycan의 β -1,4 결합을 가수분해하여 항균작용을 나타낸다(Grinde, 1989). Cobia를 대상으로 사료 내 비타민 C를 농도별(0, 12.5, 25.0, 50, 100, 200, 400 mg/kg)로 8주간 공급하여 lysozyme 활성을 측정하였을 때, 적정농도(100 mg/kg)까지는 무첨가 그룹인 대조구에 비해 유의적으로 높은 활성을 보여 본 실험과 동일한 경향을 보였다(Zhou et al., 2012). 또한 넙치를 대상으로 유자(*Citrus junos* Siebold ex Tanaka)첨가사료를 3개월간 공급한 후 lysozyme 활성을 조사하였을 때, 5% 유자첨가 사료를 섭취한 그룹이 대조구에 비해 경향적으로 높은 활성이 보였고, 항균활성을 측정하였을 때에도 5% 첨가 그룹이 다른 그룹에 비해 유의적으로 높은 활성을 보였다고 보고하였다. 항균활성이 증가한 이유는 유자에 포함된 비타민 C에 의해 보체 활성이 유도된 것으로 판단하였으며, 유자 섭취에 따른 비타민 C 섭취증가와 혈청 내 항균활성 간에 상관관계가 있을 것으로 추측하였다(Jung et al., 2010).

SOD는 과산화이온을 산소와 과산화수소로 바꿔주는 효소로서, 항산화 활성뿐만 아니라 여러 질병에 대한 감염률을 감소시켜 면역력을 알아보는 지표로서 이용되고 있다(Fattman et al., 2003). 비타민 C는 대표적인 항산화 물질로 hydroxyl radical, superoxide, singlet oxygen과 직접 반응하면서 항산화제로 작용한다(Vatassery et al., 1989; Padh, 1990). CBP는 비타민 C 뿐만 아니라 항산화 활성에 영향을 미치는 비타민 E와 플라보노이드

같은 물질을 다량 함유하고 있다(Cha and Cho, 2001). 자주복과 cobia을 대상으로 사료 내 비타민 C 함량을 농도별로 공급한 후 SOD 활성을 측정하였을 때, 무첨가 그룹인 대조구에 비해 비타민 C가 첨가된 그룹에서 유의적으로 높은 활성을 보였다(Eo and Lee, 2008; Zhou et al., 2012). 본 실험에서도 CBP 또는 LP-CBP이 첨가된 그룹은 대조구에 비해 많은 양의 비타민 C와 항산화 물질을 함유하고 있어 SOD활성이 증진된 것으로 사료된다. MPO는 호중구, 호염기구, 호산구에 존재하는 과산화효소이며, 과산화수소를 hypochlorous acid (HClO)로 전환시켜 병원성 미생물을 사멸시킨다(Palić et al., 2005). 그러므로 생체 내 MPO활성 증가는 병원체에 대한 항균효과를 증폭시켜 면역반응을 증가시키는 역할을 한다. 대부분의 비타민 C 요구량 실험은 성장률에 초점을 두어 정량화 되지만, 적정량 이상의 비타민 C 공급은 어류의 면역반응과 질병저항성을 증가시킨다고 알려졌다(Lin et al., 2011). 본 실험에서도 대조구에 CBP 또는 LP-CBP를 첨가하였을 때 사료 내 비타민 C 함량이 증가되었다. 즉, CBP 자체에 함유하고 있는 비타민 C가 참돔의 면역반응을 향상시킨 것으로 판단된다.

냉수대 현상은 국내에 자주 발생하고 있으며 이에 따른 피해도 속출하고 있다. 참돔의 특성상 겨울철 저수온기에는(10℃이하) 사료섭이율과 활동량이 감소한다(Choi et al., 2002). 또한, 급격한 수온변화(냉수대)는 참돔에 스트레스로 작용하여 성장률을 감소시키고 집단폐사와 같은 문제점을 일으킨다. 이러한 스트레스 환경에서 사료 내 고농도의 비타민 C 공급은 어류의 스트레스 내성을 증가시킨다고 많은 연구결과를 통해 보고되었다(Navarre and Halver, 1989; Hardie et al., 1991). 본 연구에서도 참돔 사료 내 CBP 또는 LP-CBP 첨가는 사료 내 비타민 C 함량을 높여 저수온 스트레스에 대한 내성을 증가시킨 것으로 판단된다. 하지만, CBP 또는 LP-CBP 효과에 대한 정확한 원인은 밝혀지지 않았으며 이와 관련된 연구도 미비한 실정이다.

이상의 결과로 볼 때, CBP 또는 LP-CBP를 첨가한 실험사료의 공급은 저수온기에서 사육된 참돔의 비특이적 면역반응 및 저수온 스트레스 저항력을 높이는 효과를 보였다.

즉, CBP 또는 LP-CBP가 첨가될수록 실험사료 내 비타민 C 함량이 증가하여 양어사료 내 비타민 C 대체 원료로써 이용 가능성이 밝혀져 효율적인 친환경 사료첨가제로써 사용 가능할 것으로 판단된다. 하지만, CBP의 성분분석 결과(비타민 C 함량)는 가공공정, 품종 및 수확시기에 따라 달라질 수 있으므로 정기적인 분석이 진행되어야 한다. 또한 과도한 수분함량(80%)으로 저장 및 취급이 어렵고 겨울철에 일시적으로 생산되고 있어서 연중 균형적인 사용이 어렵다. 따라서 CBP의 건조 및 저장과 같은 합리적인 연구방안이 개발된다면 양어사료 내 합성 비타민 C 대체원료 및 면역 증강제로 사용 가능할 것으로 판단된다.

CHAPTER 3

저수온기에서 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 사료 내 감귤착즙박

첨가에 따른 합성 비타민 C 대체율 조사

**Evaluation of dietary citrus by-product as an L-ascorbyl-
polyphosphate substitute of low water temperature
for juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)**

3.1 서론

식품가공 산업은 많은 양의 부산물을 생산하는데 생물학적 산소요구량 때문에 처리하기가 어렵다. 특히 식물소재 폐기물에는 높은 수준의 페놀 화합물을 함유하고 있어 환경적인 측면에서도 부정적인 영향을 끼친다. 최근에는 이를 가공하여 재활용하는 ‘그린산업’이 진행되고 있다.

비타민 C (ascorbic acid)는 동물의 정상적인 생리기능 유지를 위한 필수 미량원소이며 식물이나 동물조직에 널리 분포한다. 비타민 C 는 강력한 항산화제(antioxidant)로서 가역적인 산화환원 반응을 통해 수소와 전자의 이동에 관여하며 수용성 환경에서 환원제로 작용한다. 효소의 활성을 위해 요구되는 비타민 B 복합체와 달리 조효소로서가 아니라 간접적으로 효소를 활성화하는 것으로 알려졌다. 또한 비타민 E, 셀레늄, 베타카로틴 등 여러 항산화물질과 상호작용하여 시너지 효과를 일으키기도 한다(Gatlin et al., 1986; Chan, 1993; Sealey and Gatlin, 2002a,b; Shiau and Hsu, 2002; Cavalli et al., 2003; Lee and Dabrowski, 2004; Yildirim-Aksoy et al., 2008). 비타민 C 결핍증상으로는 성장저하를 비롯하여 척추변형, 상처회복 지연, 지느러미 부식 등이 보고되었다.

본 연구의 목표는 감귤착즙박(Citrus by-product, CBP)의 영양학적 우수성을 입증하고 값비싼 합성 비타민 C 의 부분 혹은 완전대체 비율을 조사하여 경제적이고 기능적인 양어용 배합사료 원료로써 이용 가능성을 평가하기 위함이다.

3.2 재료 및 방법

3.2.1. CBP 수집 및 전처리

본 실험에 사용된 CBP 시료는 (주)일해공장(제주도 조천읍 와흘리)에서 쥬스 착즙 후 배출되는 부산물을 제공받아 제주대학교 양어사료영양학연구실로 운반하여 동결건조 후 분쇄하여 사용하였다. 실험에 사용된 분말형태의 CBP 는 5.6%의 조단백질 함량, 1.7%의 조지방 함량, 2.6%의 회분함량과 7.8%의 수분을 함유하였고 CBP 내 비타민 C 함량은 2,000 mg/kg 이다.

3.2.2. 실험사료

실험사료의 조성은 Table 3-1에 나타내었다. 단백질원은 어분과 대두박, 옥수수 글루텐을 사용하였고 지질원은 오징어간유를 사용하여 48%의 조단백질과 15%의 조지방을 함유토록 설계하여 제조하였다. 사료 내 CBP 첨가에 의한 합성 비타민 C (L-ascorbyl-polyphosphate, LAPP) 대체율은 0%, 25%, 50%, 75%, 100%의 비율로 총 100 mg/kg이 되도록 5개의 실험사료를 제작하였다(LAPP100/CBP0, LAPP75/CBP25, LAPP50/CBP50, LAPP25/CBP75, LAPP0/CBP100). 실험사료 제조를 위해서 분말형태의 각 사료원을 사료조성표에 따라 정확히 무게를 측정 후, 사료원 총량의 30%에 해당하는 증류수를 첨가하여 혼합하였다. 혼합물은 소형육절기(SMC-12, Korea)로 직경 2-3 mm 크기로 성형하였다. 제작된 실험사료는 동결건조기에서 건조시킨 후, 사료공급 전까지 -20℃ 냉동고에 보관한 후 실험에 사용하였다.

3.2.3. 실험어 및 사육관리

넙치 치어는 제주도에 위치한 종묘배양장에서 구입하여 제주대학교 소속 해양과학연구소로 운송하였다. 5주 동안 시판 배합사료를 공급하면서 실험환경에 적응할

수 있도록 순치시킨 후 실험에 사용하였다. 실험어류(초기평균무게: 46.4 ± 0.7 g)는 총 15개의 150 L 원형 플라스틱 수조에 각 수조당 25마리씩 무작위로 선택하여 배치하였다. 사육수는 모래여과해수를 사용하여 2 L/min의 유수량이 공급되도록 조절하였고 모든 실험수조에 용존산소 유지를 위하여 에어스톤을 설치하였다. 수온은 실험기간 동안 11°C에서 15°C범위로 저수온 환경에서 실험을 진행하였다. 실험사료 공급은 1일 2회(08:00와 17:00)에 나누어서 6주 동안 매일 반복공급을 하였다.

3.2.4. 어체측정 및 혈액샘플

사육실험 종료 후 실험어의 최종무게와 사료공급량을 측정하여 사료섭이율, 일간성장률, 사료전환효율, 단백질이용효율 및 생존율을 계산하였다. 최종무게 측정 후, 각 수조당 8마리의 실험어를 무작위로 선별하여 2-phenoxyethanol 용액(100 ppm)으로 마취시킨 후 8마리 중 4마리는 헤파린이 처리된 주사기로 꼬리 미병부에서 채혈하였다. 채혈된 전혈은 대식세포활성 분석에 이용하였다. 남은 4마리의 혈액은 헤파린이 처리되지 않은 주사기로 채혈하여 상온에서 60분간 방치시킨 후 원심분리기로($5000 \times g$) 혈청을 분리하여 면역분석을 실시하였다.

Table 3-1. Composition and proximate analysis of the experimental diets (% dry matter)

Ingredients	Experimental diets (LAPP / CBP)				
	100/0	75/25	50/50	25/75	0/100
White FM	48.0	48.0	48.0	48.0	48.0
Soybean meal	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
Corn gluten meal	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
Wheat flour	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Squid liver oil	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Mineral Mix ¹	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Vitamin Mix (Vit C free) ²	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
LAPP ³	0.02857	0.02143	0.01429	0.00714	0.0
CBP ⁴	0.0	1.25	2.50	3.75	5.00
Cellulose	4.971	3.728	2.485	1.242	0.0
<i>Composition analysis</i>					
Crude protein	46.4	46.6	46.8	47.1	47.3
Crude lipid	13.0	12.8	13.6	13.0	12.9
Crude ash	9.6	9.7	9.6	9.8	9.9
Moisture	7.4	8.2	8.7	9.8	9.6
Total ascorbic acid(mg/kg)	108.2	93.7	106.8	111.1	99.3

¹Mineral Premix (g/kg of mixture): MgSO₄·7H₂O, 80.0; NaH₂PO₄·2H₂O, 370.0; KCL, 130.0; Ferric citrate, 40.0; ZnSO₄·7H₂O, 20.0; Ca-lactate, 356.5; CuCl₂, 0.2; AlCl₃·6H₂O, 0.15; Na₂SeO₃, 0.01; MnSO₄·H₂O, 2.0; CoCl₂·6H₂O, 1.0.

²Vitamin Premix (g/kg of mixture): DL-tocopheryl acetate, 20.0; thiamin hydrochloride, 4.0; riboflavin, 4.4; pyridoxine hydrochloride, 4.0; niacin, 30.0; D-pantothenic acid hemicalcium salt, 14.5; myo-inositol, 40.0; D-biotin, 0.2; folic acid, 0.48; menadion, 0.2; retinyl acetate, 1.0; cholecalciferol, 0.05; cyanocobalamin, 0.01.

³L-ascorbic acid: Sigma Chemicals.

⁴Citrus by-product: ILHAE Corporation.

3.2.5. 성분분석

실험사료의 일반성분 분석은 AOAC (1995) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125°C, 3h), 조회분은 직접회화법(550°C, 12h), 조단백질은 자동조단백질 분석기(Kejlttec system 2300, Sweden)로 분석하였고, 지방은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 Soxhelt 추출장치(Soxhlet heater system C-SH6, Korea)로 분석하였다.

3.2.6. 혈액 및 면역분석

혈액 내 대식세포 활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 분석방법을 토대로 Nitro-blue tetrazolium (NBT)분석방법을 통해 호중구의 oxidative radical 생성량을 측정하였다. 전혈과 NBT solution (0.2%)을 50 µL씩 유리튜브에 옮긴 후, formazon 생성을 감소시키기 위해 1 ml의 dimethyl formamide를 첨가하여 2000 × g 에서 5분 동안 원심분리 하였다. 이때 형성된 상층액을 수집하여 spectrophotometer (Genesys 10UA, USA)로 540 nm에서 NBT의 감소 범위를 측정하였다. Blank는 dimethyl formamide를 사용하였다.

혈청 내 lysozyme 분석은 Sankaran and Gurnani (1972)의 방법으로 분석하였다. Sodium citrate buffer (0.02 M, pH 5.52)에 동결건조된 *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, USA)를 첨가하여 0.2 mg/mL 농도의 현탁액을 제조한 후, 현탁액과 혈청을 10:1 의 비율로 혼합하여 24°C에서 60 분간 반응시킨 후, 450 nm 에서 흡광도 값을 측정하였다. Hen egg white lysozyme (HEWL; sigma, USA)을 이용하여 standard curve 를 구하고 ug/mL 로 표시하였다.

혈청 내 myeloperoxidase (MPO)활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 방법으로 분석하였다. HBSS (Hanks balanced salt solution)용액을 96-well plates에 80 µL씩 분주한 후 혈청 20 µL를 넣고 20 mM TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine hydrochloride)용액과 5 mM H₂O₂용액을 넣었다. 2분간 반응시킨 후 4 M H₂SO₄용액을 35 µL 첨가하여 microplate reader (Thermo, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈청 내 superoxide dismutase (SOD)활성은 SOD assay kit (Sigma, USA)로 분석하였다.

혈청 내 immunoglobulin 함량분석은 Siwicki and Anderson (1993)의 방법을 토대로 분석하였다. 혈청내 단백질 함량을 측정 한 후 12% polyethylene glycol 용액으로 단백질에 함유된 immunoglobulin 함량을 침전시켜 값을 측정하였다.

3.2.7. 조직형태학적 분석

실험종료 후 소화기관의 조직상 관찰을 위해 실험구 당 3 마리의 어류를 2-phenoxyethanol (200mg/L) 용액으로 마취시키고 표본을 추출한 후, Bouin's solution 에 고정하였고 paraffin 절편법에 의해 3-4mm 의 두께로 절편하였다. Alcian blue periodic acid-Schiff (AB-PAS), 0.5% eosin 의 비교염색 후 광학 현미경으로 표본을 관찰하였다. 소화기관의 조직학적 관찰은 전장(anterior intestine)의 점막주름에 나타나는 배상세포(goblet cell)의 분포 및 수를 검경하였다(Figure 3-1). 또한 간 무게, 소화기관의 길이를 측정하여 간중량지수(hepatosomatic index, HIS)와 장중량지수(viseralsomatic index, VSI), 비만도(condition factor, CF)를 측정하였다.

3.2.8. 통계학적 분석

실험구의 배치는 완전확률계획법(Completely randomized design)으로 실시하였고, 성장 및 분석결과는 SPSS (Version 12.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석하였다. 데이터 값의 유의차는 Tukey's HSD로 비교하였다. 데이터는 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었다.

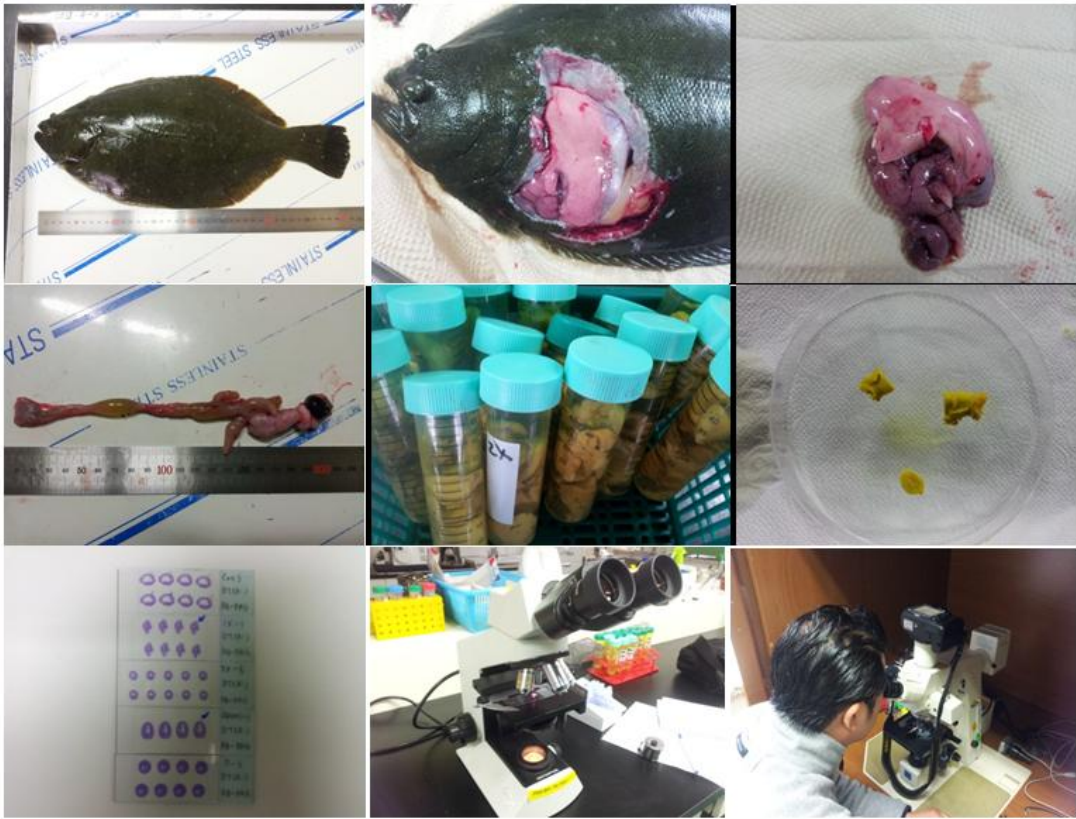


Figure 3-1. Histopathological analysis of the olive flounder fed five experimental diets.

3.3 결과 및 고찰

6주간의 성장실험 결과는 Table 3-2에 나타내었다. LAPP100 그룹은 LAPP25/CBP75, LAPP0/CBP100에 비해 유의적으로 낮은 성장률을 보였다. 사료전환효율과 단백질이용효율에 있어서도 LAPP 단일 첨가보다 CBP가 고농도로 대체된 그룹이 유의적으로 높은 값을 보였다. 생존율은 모든 그룹에서 유의적인 차이가 없었다. 성장결과를 바탕으로 합성 비타민 C인 LAPP를 CBP로 부분 또는 완전대체 할 경우 저수온기(11-15℃)에 사육된 넙치 성장에 전혀 문제가 없는 것을 확인하였다. 오히려 저수온기에 사육실험이 진행되었을 때 CBP의 첨가로 인해 저수온 스트레스를 극복할 수 있을 것으로 판단된다. 변온동물인 어류는 수온변화에 의해 체내 소화효소 및 대사활성에 영향을 받는다(Pelleiter et al., 1995). 이로 인해 수온이 낮아지는 저수온기에는 먹이섭취량이 감소하여 성장이 저하된다(Fauconneau et al., 1983). 모든 실험사료 내 비타민 C 함량은 100 mg/kg으로 넙치의 적정 요구량을 충족시켜 주었지만, LAPP0/CBP100 그룹이 LAPP100/CBP0 그룹에 비해 경향적으로 높은 사료섭이율을 보였다. CBP가 고농도로 대체된 그룹에서 성장 및 사료효율에 경향적 또는 유의적으로 증가한 원인은 CBP에 포함된 비타민, 베타카로틴 및 플라보노이드 등 여러 생리활성 물질에 의해 어체내에서 효율적으로 이용되었을 것으로 판단된다. 본 실험은 사육기간도 짧고(6주) 저수온 상태에서 사육실험을 진행하였지만 CBP의 대체 효과를 확인 할 수 있는 결과를 보여주었다.

간중량지수(HIS), 장중량지수(VSI), 비만도(CF) 및 배상세포(goblet cell)는 LAPP를 CBP로 대체함에 있어서 아무런 영향을 미치지 않았다(Table 3-3, Figure 3-2). 간중량지수는 어체 무게에 따른 간무게의 비율을 나타내는 수치로 동물의 건강상태(간 내 에너지 저장상태)를 알아보는 지표로 이용되고 있다. 변온동물인 어류의 경우 수온 및

사육환경이 적절하지 않거나 영양적인 사료급여가 이루어지지 않을 경우 간에 저장할 수 있는 에너지 함량이 감소하게 되어 간중량지수가 감소하게 된다. 반면, 간은 해독작용을 담당하는 기관으로 독성물질에 노출될 경우 이를 해독하기 위해 간 기능이 발달하여 간중량지수가 증가될 수 있다. 장중량지수는 체내 지방저장 상태를 알아보는 지표로 이용되고, 비만도는 어류의 비만화정도, 먹이 이용상태, 성장률 등을 평가할 수 있는 지표로 사용되고 있다. 배상세포(goblet cell)는 어류의 소화관 점막표면에 분포하여 물리적 또는 화학적 작용에 대해 장 점막을 보호하고 장 활성을 촉진하여 소화기능을 돕는 역할을 한다(Allen et al., 1986). 이번 연구결과를 통해 모든 그룹에서 유의적인 차이를 보이지 않아 양어사료 내 합성 비타민 C 원료로 이용되고 있는 LAPP를 CBP로 대체하여도 어류의 성장 및 건강에 아무런 영향을 주지 않을 것으로 판단된다.

면역학적 분석 결과는 Table 3-4에 나타내었다. 모든 항목에서 유의적인 차이는 없었지만 Ig과 MPO 활성에서는 LAPP에 대한 CBP 대체율이 높아질수록 증가하는 경향을 보였다. 이는 CBP의 첨가로 인해 폴리페놀 함량이 증가하여 항산화 효과와 같은 다양한 생리활성에 영향을 주었을 것으로 사료된다. 이번 실험은 저수온기에서 단기간 실험이 진행되어 넙치의 비특이적 면역반응에는 큰 영향을 끼치지 못했지만 적수온기에서 장기간의 사육실험이 진행된다면 분명한 효과를 보일 것으로 판단된다. 6주간의 사료공급량을 일주일 별로 비교하였을 때, 사육실험 3주까지는 수온변동이 적어(14°C-15°C) 적정량의 사료를 섭취할 수 있었지만, 나머지 3주(실험 4주-6주) 동안에는 수온변동이 심해(11°C-14°C) 실험어가 스트레스를 받아 사료 섭취량이 많이 감소하였다. 따라서 혈액을 채취할 시기에는 영양소 공급이 충분하지 못하여 비특이적 면역반응에 아무런 영향을 미치지 못한 것으로 판단된다. 현재까지 비타민 C 적정 요구량 및 형태에 따른 이용 활성도에 관한 연구결과들은 각 어종별로 보고되었지만 비타민 C를 부분 또는 완전대체한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 지속적인 연구를 진행하여 부분 또는 완전대체가 가능한지를 재조명하고 경제적인 부분에서도 다시 한번

검토해야 할 것으로 판단된다.

배합사료 내 값비싼 원료인 합성 비타민 C를 부분 혹은 완전 대체용으로 CBP가 사용될 것으로 가설을 세우고 증명함으로써 양식생산의 60%에 이르는 사료비용을 절감할 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 또한, CBP를 양어사료에 적용한다면 양식어류의 면역력을 증강시켜 도내 양어장에서 사용하는 기존 항생제의 과다 사용도 줄이고, “감글넵치”와 같은 기능성어류의 생산은 물론 버려지는 폐기물을 재활용 할 수 있는 기초자료가 될 것으로 판단된다.

Table 3-2. Growth performance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) (initial body weight 46.4±0.7 g) fed the 5 experimental diets for 6 weeks.

LAPP/CBP	FBW ¹	FI ²	FCR ³	PER ⁴	Survival (%)
100/0	95.1±4.7 ^a	57.9±6.8	1.25±0.11 ^a	1.73±0.15 ^a	86.7±2.31
75/25	99.3±3.5 ^{ab}	63.8±3.4	1.09±0.13 ^{ab}	1.98±0.25 ^{ab}	69.3±11.5
50/50	99.1±3.4 ^{ab}	61.6±2.9	1.16±0.03 ^{ab}	1.84±0.05 ^{ab}	76.0±0.00
25/75	105±1.6 ^b	60.9±1.7	1.03±0.11 ^{ab}	2.07±0.21 ^{ab}	82.7±4.62
0/100	107±2.3 ^b	67.9±8.0	0.93±0.06 ^b	2.27±0.16 ^b	69.3±12.9

Values are means of triplicate groups and presented as mean±SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different (P<0.05).

¹Final body weight (g).

²Feed intake.

³Feed conversion ratio = dry feed fed/wet weight gain.

⁴Protein efficiency ratio = wet weight gain/total protein given.

Table 3-3. Morphological parameters of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed the experimental diets for 6 weeks.

LAPP/CBP	HSI ¹	VSI ²	CF ³ (%)	Goblet cell
100/0	1.26±0.17	3.25±0.15	0.72±0.05	1271±712
75/25	1.18±0.14	2.65±0.36	0.66±0.05	1996±437
50/50	1.16±0.24	2.89±0.06	0.71±0.02	1434±142
25/75	1.47±0.10	2.75±0.11	0.72±0.02	1206±304
0/100	1.61±0.20	2.97±0.51	0.71±0.01	1763±328

Values are mean of triplicate groups and presented as mean±SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different (P<0.05).

¹Hepatosomatic index (liver weight × 100/body weight).

²Visceralsomatic index (viscera weight × 100/body weight).

³Condition factor (fish weight × 100/total body length³).

Table 3-4. Nitro blue tetrazolium (NBT), lysozyme, myeloperoxidase (MPO), superoxide dismutase (SOD) and total immunoglobulin (Ig) of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed the experimental diets for 6 weeks.

LAPP/CBP	NBT	Lysozyme	MPO	SOD	Ig
100/0	1.01±0.14	35.3±12.0	0.93±0.10	85.8±1.99	20.1±6.69
75/25	1.03±0.08	29.8±4.03	0.99±0.18	85.0±4.73	22.7±4.14
50/50	1.05±0.08	34.8±10.2	0.95±0.15	79.9±1.73	22.8±3.33
25/75	1.01±0.01	33.6±12.0	1.01±0.04	83.1±2.91	23.7±2.93
0/100	0.96±0.09	23.8±5.29	1.04±0.18	83.1±5.50	25.3±2.02

Values are means of triplicate groups and presented as mean ± SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different (P<0.05).

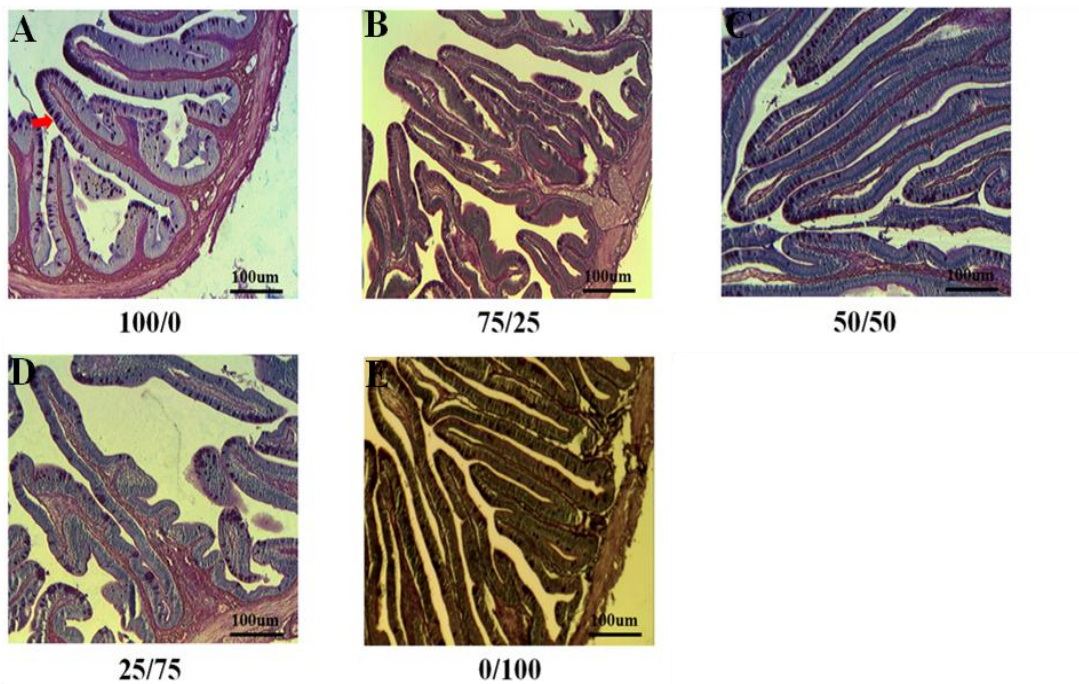


Figure 3-2. Changes in number of goblet cells in the intestine of olive flounder fed the five experiment diets for 12 weeks; (A)LAPP100/CBP0, (B)LAPP75/CBP25, (C)LAPP50/CBP50, (D)LAPP25/CBP75, and (E)LAPP0/CBP100.

CHAPTER 4

조피볼락(*Sebastes schlegeli*) 사료 내 감귤착즙박 첨가에 따른 합성
비타민 C 대체효과 및 소화율 평가

Replacing vitamin C source, L-ascorbyl-polyphosphate, with citrus by-product and digestibility in diets of Korean rockfish *Sebastes schlegeli*

4.1 서론

동물은 영양소를 획득하는데 있어서 소화, 흡수 및 배설과 같은 복합적인 생리작용을 거치게 된다. 섭취된 영양소가 원활히 이용되려면 우선적으로 사료의 소화가 이루어져야 하고(Jafri and Hassan, 1999), 소화되는 영양소 이용효율은 어류의 성장을 결정짓는다 할 수 있다. 양어용 배합사료에서 가장 효율이 높은 사료를 만들기 위해서는 우선적으로 사료원료의 소화율을 정확히 알아야 한다(Bruce et al., 1996; Sugiura et al., 1998; Lee, 2002; Tibbetts et al., 2004, 2006). 사료원료의 소화율은 같은 종류라 할지라도 생산된 지역이나 생산시기에 따라 달라질 수 있으므로 지속적인 소화율 측정이 이루어져야 한다. 어류가 섭취한 사료 영양소들이 제대로 소화되지 않는다면 이용효율이 감소되어 본래의 영양소 가치를 갖지 못하게 된다. 따라서 어류 소화율 측정은 경제적인 양어사료 설계 및 사용원료의 가치를 결정짓는 필수적 항목이다.

본 연구의 목표는 조피볼락을 대상으로 감귤착즙박(Citrus by-product, CBP)의 이용성을 평가하고 비타민 C 농도에 따른 성장, 사료효율, 비특이적 면역반응과 질병저항성에 미치는 영향과 CBP의 소화율 평가를 측정하였다.

4.2 재료 및 방법

4.2.1. 실험사료

실험에 사용된 5 개의 실험사료는 탈지어분과 casein 을 단백질원으로 사용하였고 지질원은 오징어간유를 사용하여 45%의 조단백질과 11%의 조지방을 함유토록 설계하여 제조하였다(Table 5-1, Table 5-2). 비타민 C 가 결핍된 대조사료(Control)에 L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP)와 CBP 를 이용하여 비타민 C 농도를 90 mg/kg 과 360 mg/kg 이 되도록 제작하였다(LAPP90, LAPP360, CBP90, CBP360). 실험에 사용한 CBP 의 비타민 C 함량은 4,500 mg/kg, 조단백질 함량은 4.5%이며 LAPP 의 비타민 C 함량은 35%이다. 본 실험에 사용된 CBP 는 제주시 조천읍에 위치한 가공공장에서(주식회사 일해) 쥬스 착즙 후 배출되는 부산물을 제공받아 실험원료로 사용하였다. 실험사료 제조를 위해서 분말형태의 각 사료원을 사료조성표에 따라 정확히 무게를 측정 한 후, 사료원 총량의 30%에 해당하는 증류수를 첨가하여 혼합하였다. 혼합물은 소형육절기(SMC-12, Korea)로 직경 2-3 mm 크기로 성형하였다. 제작된 실험사료는 동결건조기에서 건조시킨 후, 사료공급 전까지 -20℃ 냉동고에 보관한 후 실험에 사용하였다.

Table 4-1. Formulation of the experimental diets (% DM).

Ingredients	Experimental diets				
	Con	LAPP 90	LAPP 360	CBP 90	CBP 360
Defatted fish meal ¹	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Casein ²	42.00	42.00	42.00	42.00	42.00
Dextrin	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
Squid liver oil	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00
Vitamin Mix ³ (vitamin C free)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Mineral Mix ⁴	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
LAPP ⁵ (mg/100 g)	0.00	0.026	0.103	0.00	0.00
CBP ⁶	0.00	0.00	0.00	2.00	8.00
CMC ⁷	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Taurine	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cellulose	8.50	8.47	8.40	6.50	0.50

¹Fish meal were extracted by 70% aqueous ethanol (water:ethanol=3:7) for 48 h.

²United States Biochemical (USB), Cleveland, OH, USA.

³Vitamin premix (g/kg of mixture): retinyl acetate, 1.0; cholecalciferol, 0.05; menadione, 0.2; thiamine hydrochloride, 4.0; riboflavin, 4.4; D-pantothenic acid hemicalcium, 14.5; pyridoxine hydrochloride, 4.0; cyanocobalamin, 0.01; niacinamide, 30.0; folic acid, 0.48; D-biotin, 0.2; myo-inositol, 40.0; a-tocopherol, 10.0.

⁴Mineral Premix (g/kg of mixture): MgSO₄.7H₂O, 80.0; NaH₂PO₄.2H₂O, 370.0; KCL, 130.0; Ferric citrate, 40.0; ZnSO₄.7H₂O, 20.0; Ca-lactate, 356.5; CuCl₂, 0.2; AlCl₃.6H₂O, 0.15; Na₂SeO₃, 0.01; MnSO₄.H₂O, 2.0; CoCl₂.6H₂O, 1.0.

⁵L-ascorbyl-2-polyphosphate.

⁶Citrus by-product: ILHAE Corporation.

⁷Carboxymethylcellulose.

Table 4-2. Proximate analysis of the experimental diets (% DM).

Ingredients	Experimental diets				
	Con	LAPP 90	LAPP 360	CBP 90	CBP 360
Moisture	10.2	7.8	8.1	8.7	10.4
Crude protein	48.0	48.1	47.5	48.5	48.8
Crude lipid	11.1	10.2	11.0	10.4	10.2
Crude ash	4.6	4.3	4.7	6.0	6.2
Total ascorbic acid (mg/kg)	22.3	123.3	334.2	98.3	262.2

4.2.2. 실험어 및 사육관리

조피볼락 치어는 경상남도 고성군에 위치한 종묘장에서 구입하여 제주대학교 소속 해양과학연구소로 운송하였다. 2 주간의 예비사육 후, 총 15 개의 120 L 원형 플라스틱 수조에 각 수조당 40 마리씩(초기평균무게: 4.5 g) 무작위로 배치하였다. 사육수는 모래 여과해수를 사용하여 1-2 L/min 의 유수량이 공급되도록 조절하였고 모든 실험수조에 용존산소 유지를 위하여 에어스톤을 설치하였다. 수온은 실험기간 동안 18℃에서 25℃ 범위에서 실시하였다. 실험사료 공급은 1 일 3 회에 나누어서 13 주 동안 반복공급을 하였다.

4.2.3. 분석항목

-일반성분 분석 및 성장률 측정

실험사료의 일반성분 분석은 AOAC (1995) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125℃, 3 시간), 조회분은 직접회화법(550℃, 6 시간), 단백질은 자동조단백질 분석기로 분석하였으며, 지방은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 soxhlet 추출장치를 이용하여 분석하였다. 사료공급 종료 후, 어류의 최종 무게를 측정하여 사료전환효율(feed conversion ratio, FCR), 단백질이용효율(protein efficiency ratio, PER) 및 생존율(survival)을 측정하였다.

Feed conversion ratio = dry feed fed/wet weight gain

Protein efficiency ratio = wet weight gain/total protein given

-비타민 C 분석

실험사료와 실험어 간에서의 비타민 C 분석은 Dabrowski and Hinterleitner (1989)의 방법으로 분석하였다. 시료와 precipitation solution 을 혼합하여 2분간 균질화한 후 원심분리기(15,000 rpm, 4℃, 30분)를 이용하여 상층액을 추출하였다. 추출된 상층액을(250

μL) 유리튜브에 옮긴 후 0.2% dichlorophenolindophenol (Sigam, USA)과 증류수를 25 μL씩 첨가하여 상온에서 20분간 반응시켰다. 반응시킨 혼합물에 2% thiourea (Sigma, USA)와 5% metaphosphoric acid (Sigm, USA)을 250 μL 넣고 2% 2,4-dinitrophenyhydrazine (Sigma, USA)을 250 μL 넣은 후, 60°C 항온수조에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 혼합물을 냉각시켜 18 M H₂SO₄를 넣고(500 μL) 524 nm에서 흡광도를 측정하였다.

-Collagen 분석

콜라겐 함량은 Wilson and Poe (1973)의 방법으로 분석하였다. 전어체 시료를 끓는 물에 12 분간 담근 후 척추주변의 근육을 제거하여 남아있는 뼈를 0.1 M NaOH 용액에 24 시간 반응시켜 건조하였다. 그 후 0.5 M EDTA 용액(pH 7.5)에 반응시켜 남아있는 무게를 측정하여 collagen 함량을 계산하였다.

-혈액샘플

실험어의 면역반응을 알아보기 위해 각 수조당 3마리씩 무작위로 선별하여 2-phenoxyethanol (100 ppm) 용액으로 마취 시킨 후 꼬리 미병부에서 혈액을 채취하였다. 채혈된 혈액(전혈)은 헤파린이 처리되지 않은 주사기로 채혈하여 상온에서 60분간 방치시킨 후 원심분리기로(5000 × g) 혈청을 분리하여 면역분석을 실시하였다.

-Lysozyme 분석

혈청 내 lysozyme 분석은 Sankaran and Gurnani (1972)의 방법으로 분석하였다. Sodium citrate buffer (0.02 M, pH 5.52)에 동결건조된 *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, USA)를 첨가하여 0.2 mg/mL 농도의 현탁액을 제조한 후, 현탁액과 혈청을 10:1 의 비율로 혼합하여 24°C에서 60 분간 반응시킨 후, 450 nm 에서 흡광도 값을 측정하였다. Hen egg

white lysozyme (HEWL; sigma, USA)을 이용하여 standard curve 를 구하고 ug/mL 로 표시하였다.

-Total immunoglobulin (Ig) 분석

혈청 내 immunoglobulin 함량 분석은 Siwicki and Anderson (1993)의 방법을 토대로 분석하였다. 혈청내 단백질 함량을 측정한 후 12% polyethylene glycol 용액으로 단백질에 함유된 immunoglobulin 함량을 침전시켜 값을 측정하였다.

4.2.4. 인위감염실험

사료 내 비타민 C 첨가 형태 및 농도가 항병력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 최근 양어장에서 발병 빈도가 높은 그람양성 세균인 *Streptococcus iniae* 균을 이용하여 인위감염 실험을 실시하였다. 균액은 10^8 CFU/ml 의 농도가 되도록 멸균 생리식염수에 현탁한 후, 어류를 1 시간 동안 현탁액에 침지하였다. 인위감염 실험은 성장실험 종료 후 실시하였으며 각 수조당 무작위로 15 마리씩 선정하여 3 반복으로 64 L 감염실험용 수조에 각각 배치하였다. 감염실험은 제주대학교 해양과학연구소 내 어병감염실에서 실시되었으며 모든 감염 프로토콜은 제주대학교의 실험동물 관리 및 이용법에 맞도록 실시하였다.

4.2.5. 사료원료의 외관상 소화율 측정

LAPP 와 CBP 가 첨가된 실험사료의 외관상소화율을 조사하기 위해 소화율측정 특수 실험사료를 제작하였다. 일반 실험사료 제작과 동일한 방법으로 진행하였고 소화율을 분석하기 위한 지시제로(indicator) chromium oxide (Cr_2O_3 , Sigma-Aldrich)를 1.0% 첨가하여 적정 크기로 압출 성형하였다.

소화율 측정에 사용된 조피블락은 실험환경에 적응하기 위해 10 일간 실험사료를 공급하면서 순치하였다. 본 실험에 사용된 실험수조 및 외관상소화율 측정을 위한 분수집장치(Guelph system)는 Figure 4-1 에 나타내었다. 예비사육 후 총 5 개의 500 L Guelph system 분수집장치에 각 수조당 70 마리씩 무작위로 선택하여 배치하였다. 사육수는 카트리지필터가 장착된 하우징을 설치하여 1 L/min 의 매우 적은 유수량이 되도록 조절하였다. 광주기는 형광등을 이용하여 12L:12D 조건으로 유지되었고, 전 실험기간 동안 사육수온은 17-20°C 범위로 자연수온에 의존하였다. 수집된 분 샘플은 거름종이를 이용하여 해수를 제거한 후 -40°C 저온 냉동고에 보관하였다. 분수집 과정은 Figure 4-2 에 나타내었다.

실험사료와 분에서의 지시제로 사용된 chromium oxide 함량은 Divakaran et al. (2002)의 방법을 토대로 분석하였다. 실험사료 및 분 샘플은 회화로(550°C)에서 3 시간 동안 회화한 후 얻어진 시료를 분석에 사용하였다. Chromium oxide 를 mono-chromate 형태로 산화시키기 위해 샘플 5-10 mg 을 측정하여 glass test tube 에 옮긴 후 perchloric reagent (HClO₄) 4 ml 를 첨가하였다. 시료와 perchloric reagent 가 첨가된 glass test tube 를 가열판에 넣고 300°C에서 20 분간 가열한 후 실온에서 방냉 시켜 50 ml 유리 플라스크에 옮겨 3 차 증류수로 25 ml 이 되도록 정량하였다. 그 후 분광광도계(Beckman DU-730, USA)를 이용하여 350 nm 에서 흡광도를 측정하여 시료의 chromium oxide 함량을 계산하였다.

4.2.6. 영양소별 소화율 분석

실험사료의 소화율 및 영양소 소화율은 다음과 같은 식에 의해 계산하였다.

실험사료의 소화율 계산식:

ADCs of test diets (%)

$= (100 - (\% \text{ marker in diet} / \% \text{ marker in feces}) \times 100)$

실험사료의 영양소 소화율 계산식:

ADCs of nutrients in test diets (%)

=100×[100-(% marker in diet/% marker in feces)×(nutrient concentration in feces/nutrient concentration in diet)]

4.2.7. 통계학적 분석

실험사료의 배치는 완전확률계획법 (Completely randomized design)을 실시하였고, 성장 및 일반성분 분석결과는 SPSS (Version 11.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA 로 통계 분석되었다. 데이터 값의 유의차는 Tukey's HSD 로 비교하였다. 데이터는 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타낸다.



Figure 4-1. Feces collection tanks (Guelph system) used for the apparent digestibility test of citrus by-product containing diets.



Figure 4-2. Feces collection for the apparent digestibility test of citrus by-product containing diets.

4.3 결 과

13 주간의 사료공급 결과는 Table 4-3 에 나타내었다. 최종무게의 경우 비타민 C 가 결핍된 대조구(Con)가 유의적으로 가장 낮은 수치를 보였고 CBP 를 적정량 이상으로 첨가한 그룹(CBP360)이 다른 그룹에 비해 유의적으로 높은 성장률을 보였다. 사료전환효율과 단백질이용효율에서도 성장률과 비슷하게 대조구가 가장 낮은 값을 보였다. 생존율은 대조구가 52%로 유의적으로 가장 낮은 값을 보였고 적정함량의 비타민 C 가 첨가된 그룹에서는 87%(LAPP90)와 73%(CBP90)의 생존율을 보였으며 적정량 이상으로 첨가한 그룹에서는 90%(LAPP360)와 80%(CBP360)로 유의적으로 높은 수치를 보였다. 대조구를 섭취한 그룹에서는 백내장과 비슷한 안구질환이 발병하였지만 LAPP 또는 CBP 가 첨가된 모든 그룹에서는 결핍증상이 발견되지 않았다(Figure 4-3).

간에서의 비타민 C 분석결과는 Table 4-4 에 나타내었다. 대조구를 섭취한 그룹에서 간 내 비타민 C 함량은 7.2 ug/g 으로 가장 낮은 수치를 보였고 LAPP 가 첨가된 그룹은 36 ug/g(LAPP90)과 117 ug/g(LAPP360)의 함량으로 사료 내 비타민 C 농도가 증가할수록 간에서의 비타민 C 함량이 유의적으로 증가된 것을 확인하였다. 반면, CBP 를 첨가한 모든 그룹에서는 간에서의 비타민 C 함량이 14 ug/g 을 보여 CBP 첨가에 따른 간 내 비타민 C 농도 변화는 관찰되지 않았다.

콜라겐 분석결과는 Table 4-4 에 나타내었다. 대조구를 섭취한 그룹에서는 15%, LAPP 와 CBP 를 적정량 또는 적정량 이상으로 첨가한 그룹에서는 17-19%의 범위를 보여 대조구에 비해 경향적 또는 유의적으로 높은 콜라겐 함량을 보였다.

13 주간의 실험사료 공급에 따른 조피볼락의 비특이적 면역반응 결과는 Table 4-5 에 나타내었다. Lysozyme 과 Ig 활성에서는 LAPP 나 CBP 가 첨가된 모든 그룹이 대조구에 비해 유의적으로 높은 활성을 보였다.

세균성 질병에 대한 인위감염 실험 결과는 Figure 4-4 에 나타내었다. *S. iniae* 을 인위감염 시켰을 때(감염 18 일째), 대조구를 섭취한 그룹의 생존율은 38%로 유의적으로 가장 낮은 수치를 보였다. LAPP 와 CBP 가 적정량 첨가된 그룹에서는 60-75%(LAPP90, CBP90) 생존율을 보였고 적정량 이상으로 공급한 그룹에서는 84-91%(LAPP360, CBP360)의 생존율을 보였다.

조피볼락을 대상으로 한 실험사료의 외관상 소화율 측정결과는 Table 4-6 에 나타내었다. 조피볼락의 건물 소화율은 모든 실험구에서 80-85%의 범위를 보였고 단백질 소화율은 모든 실험구에서 약 96-98% 가량의 우수한 소화율을 보여 모든 그룹에서 유의적인 차이는 없었다.

Table 4-3. Growth performance of Korean rockfish (initial body weigh 4.5 ± 0.01 g) fed 5 experimental diets containing two different levels of either L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP) or citrus by-product (CBP) for 13 weeks.

	FBW ¹ (g)	FCR ²	PER ³	FI ⁴	Survival(%)
Con	10.8±0.56 ^a	1.63±0.09 ^d	1.01±0.17 ^a	9.7±0.64 ^a	52.5±2.5 ^a
LAPP90	15.0±0.37 ^b	1.21±0.09 ^{bc}	1.50±0.12 ^{bc}	12.3±0.52 ^{ab}	87.5±7.5 ^b
LAPP360	16.0±0.82 ^b	1.04±0.04 ^{ab}	1.76±0.08 ^{cd}	11.7±1.35 ^{ab}	90.8±1.4 ^b
CBP90	14.8±1.17 ^b	1.33±0.07 ^c	1.36±0.08 ^b	12.8±1.48 ^b	73.8±8.8 ^{ab}
CBP360	18.8±0.62 ^c	0.96±0.06 ^a	1.88±0.14 ^d	12.7±1.11 ^b	80.0±8.7 ^b

Values are means or triplicate groups and presented as mean±SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P<0.05$).

¹Final body weight (g).

²Feed conversion ratio=dry feed fed/wet weight gain.

³Protein efficiency ratio=wet weight/total protein given.

⁴Feed intake (g/fish).

Table 4-4. Liver ascorbic acids and vertebral collagen concentrations of Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*) juvenile fed the 5 experimental diets containing two different levels of either L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP) or citrus by-product (CBP) for 13 weeks.

	Vitamin C content in liver	Bone collagen
Con	7.2±3.4 ^a	15.7±1.65 ^a
LAPP90	36.7±10.8 ^b	18.8±1.05 ^b
LAPP360	117.3±11.5 ^c	17.8±0.88 ^{ab}
CBP90	14.2±3.9 ^a	19.0±1.01 ^b
CBP360	14.3±4.4 ^a	17.0±1.05 ^{ab}

Values are means of triplicate groups and presented as mean±SD.

Table 4-5. Lysozyme and immunoglobulin (Ig) activities of Korean rockfish (*Sebastes schlegelii*) juvenile fed the 5 experimental diets containing two different levels of either L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP) or citrus by-product (CBP) for 13 weeks.

	Ig (mg/ml)	Lysozyme (ug HEWL/ml)
Con	12.9±0.4 ^a	92.6±4.2 ^a
LAPP90	19.2±0.1 ^b	112.6±8.6 ^b
LAPP360	16.6±1.9 ^b	112.7±1.1 ^b
CBP90	16.7±1.7 ^b	115.3±7.5 ^b
CBP360	17.5±1.5 ^b	120.6±8.0 ^b

Values are means of triplicate groups and presented as mean±SD.

Table 4-6. Apparent digestibility of coefficient (% , ADC) of dry matter and protein in the test diets determined by fecal collection method (Guelph system) for Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*).

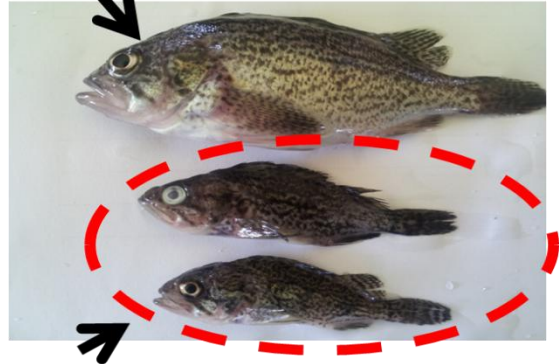
Diets	Con	LAPP90	LAPP360	CBP90	CBP360
<i>ADC of test diets</i>					
Dry matter	82.8±0.02	80.3±7.27	84.0±1.31	85.2±4.32	84.3±2.57
Protein	98.1±0.12	98.0±0.73	98.1±0.17	96.9±0.87	98.0±0.32

Values are means of triplicate groups and presented as mean±SD. Values in the same row having different superscript letters are significantly different (P<0.05).

Cataracts in the control group



CBP supplemented groups



Hemorrhage in the control group

Control group without vitamin C

Figure 4-3. Vitamin C deficiency symptoms (cataract) of fish fed control diet without vitamin C sources.

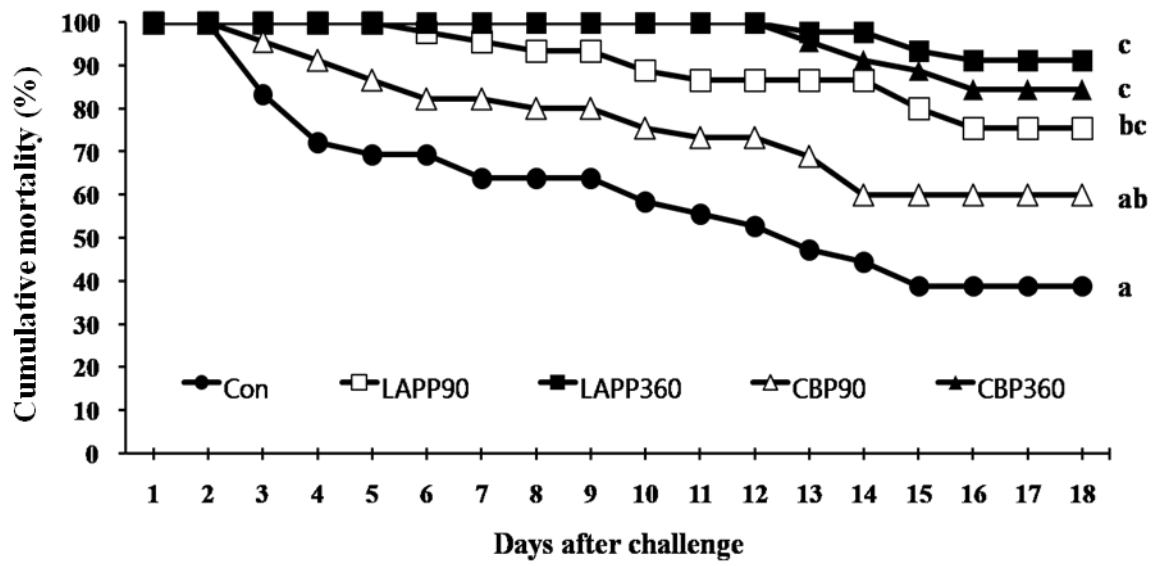


Figure 4-4. Cumulative mortality of Korean rockfish (*Sebastes schlegelii*) juvenile fed the 5 experimental diets containing two different levels of either L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP) or citrus by-product (CBP) after challenge with *Streptococcus iniae* by immersion.

4.4 고 찰

치어기 조피볼락 사료 내 CBP 를 적정량(CBP90)으로 공급하였을 때 LAPP 가 첨가된 그룹에 비해 성장률, 사료전환효율, 단백질이용효율, 생존율에 아무런 차이를 보이지 않았지만, CBP 를 적정량 이상(CBP360)으로 첨가된 그룹(CBP360)은 다른 그룹에 비해 사료전환효율 및 단백질이용효율에 더 효과적인 결과를 보였다. 조피볼락의 적정 비타민 C 요구량은 50-100 mg/kg 이다(Wang et al., a,b). 본 실험에 사용된 실험사료의 비타민 C 함량은 22 (Con), 123 (LAPP90), 334 (LAPP360), 98 (CBP90), 262 (CBP360) mg/kg 으로 대조구를 제외한 나머지 실험사료에서는 조피볼락의 비타민 C 요구량을 충족시켰다.

어류를 포함한 포유동물의 간은 비타민 C 대사에 중요한 역할을 수행한다(Dabrowski et al., 1994). 연어를 대상으로 실험한 결과, 간 및 신장에서 비타민 C 함량이 20 ug/g 이하일 경우 비타민 C 결핍증상이 나타난다고 보고되었다(Hilton et al., 1977; Sato et al., 1983; Halver et al., 1969). 본 실험에서도 대조구를 섭취한 그룹의 간내 비타민 C 함량은 7.2 ug/g 으로 상당히 낮은 수치를 보였으며 성장률 및 생존율 감소, 비정상적인 안구형태(백내장)와 같은 결핍증상이 관찰되어 위의 연구결과와 동일한 경향을 보였다(Figure 4-3). 백내장은 수정체가 혼탁해지는 것을 의미한다. 수정체가 혼탁해지면 빛이 수정체를 제대로 통과하지 못해 사물이 뿌옇게 보여 물건을 제대로 분간하지 못하게 된다. 눈과 같이 활성산소로부터 손상 받기 쉬운 조직에는 비타민 C 함량이 비교적 높아야 하지만 이번 실험에서는 대조구에 비타민 C 가 결핍됨으로 인해 충분한 양의 비타민 C 를 공급받지 못하여 안구질환이 발병한 것으로 판단된다. 인체 실험을 통해 비타민 C 를 충분히 섭취할 경우, 노인성 백내장의 원인으로 지목되는 수정체의 단백질 산화를 억제하는 효과가 있다고 보고되었다. LAPP 를 적정량(LAPP90) 또는 적정량 이상으로 첨가된 그룹(LAPP360)의 간내 비타민 C 농도는 36 ug/g, 117 ug/g 으로

대조구에 비해 5-16 배 이상의 함량 차이를 보였으며 결핍증상도 발견되지 않았다. 반면, CBP 를 적정량(CBP90) 또는 적정량 이상으로 첨가된 그룹(CBP360)의 간내 비타민 C 함량은 14 ug/g 으로 대조구에 비해 2 배 이상의 함량을 보였지만 LAPP 와 비교하였을 때에는 유의적으로 낮은 수치를 보였다. 하지만 본 실험에서 CBP 를 첨가한 그룹에서는 비타민 C 결핍증상이 발견되지 않았으며 성장률 및 생존율에 있어서도 대조구에 비해 월등히 좋은 결과를 보였다. Xiao et al. (2010)은 grouper 를 대상으로 비타민 C 가 결핍된 사료를 급여하여 간에서 비타민 C 농도를 측정하였을 때 2.70 ug/g 이지만 결핍증상은 발견되지 않았다고 보고하였다. 현재까지 사료 내 적정 비타민 C 요구량 연구는 대부분의 양식어종을 대상으로 진행되었지만, 간에서 비타민 C 함량을 기준으로 결핍증상에 관한 비교 연구는 전무한 실정이다. 이번 연구결과를 통해 치어기 조피볼락에서 간 내 비타민 C 함량이 7 ug/g 이하일 경우 결핍증상이 발생할 것으로 판단된다. 따라서 치어기 조피볼락 사료 내 합성 비타민 C 인 LAPP 를 CBP 로 완전 대체가 가능함을 보여줄 수 있는 결과를 제시하였다. 조피볼락을 대상으로 CBP 에 의한 체내 대사과정 및 활성화에 대한 정확한 메커니즘은 보고되지 않았다. 이번 연구결과를 바탕으로 어떠한 대사작용에 의해 체내에 축적 되었는지 추후 많은 연구를 통해 밝혀내야 할 것이다.

이번 실험에서 비타민 C 의 적정량 또는 적정량 이상의 첨가는 조피볼락의 비특이적 면역반응에도 긍정적인 영향을 미쳤다. Lysozyme 은 보체 및 식세포 등과 결합하여 세균 세포벽의 peptidoglycan 성분을 분해하고 삼투압작용에 손상을 준다(Jolles and Jolles, 1984; Grinde, 1989). Ig 는 동물의 체액중에 함유되는 항체 활성을 갖는 당단백질로 체내에 침입한 항원을 비활성화시키고 세포 외부자극을 유도하는 역할을 한다. 즉, 어류의 면역글로블린 수치 증가는 곧 면역력 증가를 의미한다. 이번 실험에서는 LAPP 또는 CBP 를 적정량 또는 적정량 이상으로 첨가한 그룹이 무첨가 그룹인 대조구에 비해 lysozyme 활성 및 Ig 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 원인은 비타민

C의 대표적 기능인 항산화 작용으로 인하여 체내에 들어온 비타민 C가 자기산화로부터 면역세포를 보호하면서 비특이적 면역력이 증가한 것이라 사료된다. 어류에서 고농도의 비타민 C 섭취는 비특이적 면역력을 높일 수 있다는 결과를 도출할 수 있었으며, CBP는 합성 비타민 C인 LAPP를 완전 대체할 수 있는 사료 원료라는 것도 다시 한번 증명할 수 있는 결과이다.

인위감염 실험에 이용된 연쇄구균증은 어류의 폐사량을 증가시켜 어장에 심각한 경제적 손실을 야기하는 세균성 질병이다. 주요 원인체로는 *Streptococcus iniae*, *Lactococcus garvieae*, *S. parauberis* 등이 알려져 있고 그 중 *S. iniae*는 다양한 양식어종에 발병하며 병원성도 강하다고 보고되었다(Beack et al., 2006). 감염 증상으로는 안구돌출, 백탁 및 총혈, 두부와 상하 턱의 발적, 아가미 뚜껑 하부의 출혈, 아가미 뚜껑 내측의 총혈 그리고 아가미와 체표에 점액이 많이 분비되는 것을 확인 할 수 있으며 해부시 간장의 울혈이나 퇴색, 장관의 발적, 복수 증상이 나타난다. 또한 감염어는 먹이를 잘 먹지 못하고 완만한 유영을 보이거나 바닥에 흩어져 있으며 몸체를 반대로 뒤집고 머리를 올려 수면 위로 입을 열고 있는 현상도 관찰된다. 최근 들어 인간에게도 병원성이 있는 것으로 보고되어 이 병원체에 대한 연구적 관심이 높아지고 있다(Richard et al., 2005). Ai et al. (2006)은 yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)를 대상으로 사료 내 비타민 C 농도를 0, 25, 500 mg/kg 으로 8주간 공급하여 *Vibrio harveyi*에 인위감염 시켰을 때, 비타민 C가 결핍된 대조구를 섭취한 그룹에서의 폐사율은 66%, 저농도로 첨가한 그룹(25 mg/kg)은 41%, 고농도로 첨가한 그룹(500 mg/kg)에서는 16%을 보였다고 기록하였다. Zhou et al., (2012) 또한 cobia를 대상으로 사료 내 비타민 C 함량을 13-386 mg/kg 으로 8주간 공급한 후 동일 병원성 세균으로 인위적 감염 시켰을 때 저농도 그룹에서는 약 75%의 폐사율이 관찰되었지만 비타민 C 첨가 그룹은 45-65%의 폐사율이 관찰되었다고 보고하였다. 이 두 가지 연구 모두 사료 내 적정량 또는 적정량 이상의 비타민 C 공급은 어류의 비특이적 면역력을 증가시켜 세균성 질병에 대한 생존율을

높은 것으로 보고되었다. 본 실험에서도 사료 내 LAPP 또는 CBP 를 적정량 또는 적정량 이상으로 공급했을 경우 *S. iniae* 에 대한 질병저항성이 증가되는 것을 확인하였다. 이번 연구 또한 비타민 C 원료인 LAPP 또는 CBP 의 첨가로 인해 lysozyme 과 Ig 활성을 증가시켜 인위감염 실험에서 생존율이 증가된 것으로 판단된다. 반면, Channel catfish 을 대상으로 사료 내 비타민 C 함량을 달리한 사료를 8 주간 공급한 후 *Edwardsiella ictaluri* 균으로 인위감염 시켜 21 일간 생존율을 확인한 연구에서는 모든 그룹에서 유의적인 차이가 없었다고 보고하였다. 이러한 차이는 실험에 사용된 병원성 균주와 실험조건에 따라 달라진 것으로 사료되며, 추후 많은 연구를 통해 비교분석 해야 될 것으로 판단된다.

어류의 분 수집방법에는 분수집장치(Guelph system)를 이용하거나 직접적으로 장을 압박하여 분을 수집하는 stripping 방법, 해부를 통해 배설물을 획득하는 방법이 이용된다. 각 방법마다 장단점이 있지만 육식성어류에서는 stripping 방법이 널리 이용되고 잡식성이나 초식성 어류인 경우 Guelph system 방법이 대체적으로 이용되고 있다. 양어사료에 이용되는 소화율의 의미는 외관상소화율(Apparent digestibility coefficient)로써 대부분 담수어종을 위주로 연구되었고 최근 들어 해산어를 대상으로 한 연구가 시도되고 있는 실정이다. 조피볼락의 분 수집은 사료 공급 후 16 시간 후에 진행하였다. 분 수집을 위한 시간 설정은 어종 및 사육환경에 따라 변할 수 있다. 위에 설정된 수집시간은 실험개시 전 여러 번의 예비 실험을 거쳐 실험어류와 실험환경에 가장 알맞은 시간으로 설정하였다. 사료공급(만복공급) 후, 수조에 남아있는 사료 및 이물질을 깨끗이 청소하고 환수시켜 각 수조에 분 수집관을 설치하여 익일 분을 수집하는 방식으로 수집하였다.

소화율 실험을 바탕으로 사료 내 8%의 CBP 첨가는 어류의 소화율에 있어 아무런 영향을 미치지 않았다. 이번 연구결과를 통해 양어용 배합사료 내 합성 비타민 C (LAPP)를 완전 대체 가능함을 보여 주었다. 따라서 이번 연구결과는 버려지는 여러 부산폐기물을 재활용하는 연구개발의 기초 자료가 될 수 있을 것으로 사료된다. 특히,

제주도 내 1 차 산업인 감귤산업에서 주스를 만들고 폐기되는 CBP 의 재이용 가능성을 보여주었다는 점에서 의미가 크다고 할 수 있다. 따라서, 경제적인 양어사료의 제조를 위한 비타민 C 의 안정적인 공급과 폐기 부산물의 재활용을 위해서라도 CBP 를 사용한 친환경적인 사료를 개발하는 것이 우선적으로 요구된다.

CHAPTER 5

조피블락(*Sebastes schlegeli*) 사료 내 감귤착즙박과 발효감귤착즙박
첨가에 따른 합성 비타민 C 대체효과

**Replacing vitamin C source with citrus by-product or fermented
citrus by-product in diets of Korean rockfish *Sebastes schlegeli***

5.1 서론

제주도를 포함한 국내 양어장의 경우 고밀도 양식을 하고 있어 세균성 질병에 의한 발병빈도가 높고 전염 속도가 빨라 피해가 큰 것으로 알려졌다. 양식어류의 질병치료는 항생제에 의존하고 있지만 과도한 항생제의 사용은 약제 내성균의 확산을 초래하여 치료를 어렵게 하고 어류의 면역력을 저하시킬 수 있다. 이와 같은 문제의 해결책으로 어류의 자체방어능력을 향상시키는 면역증강제의 개발과 친환경적인 항균물질이나 해양생물자원에서 유래한 기능성 천연 생리활성 물질에 관한 연구도 진행되고 있다.

어류는 정상적인 생리기능을 유지하기 위하여 적정량의 비타민 C 를 섭취해야 하는데, 비타민 C 합성을 위한 L-gulonolactone oxidase 효소가 결핍되어 반드시 먹이로부터 섭취해야 한다(Sato et al., 1982; Soliman et al., 1986; Dabrowski, 1990). 비타민 C 요구량은 어종 크기에 따라 달라지며 치어기가 성어기보다 비타민 C 요구량이 높다고 보고되었다(Dabrowski et al., 1988; Dabrowski, 1990).

생균제(probiotic)는 살아있는 미생물로서 적절한 양으로 투여되었을 때 성장률, 비특이적 면역반응 및 질병저항성에 긍정적인 영향을 미친다고 보고되었다(Gatesoupe, 1994; Robertson et al., 2000; Bakke-Mckellep et al., 2007; Lee, 2008; Nayak, 2010; Cha et al., 2012). 양식어종에 따라 생균제의 효능은 달리 나타나며 장내 병원균의 서식억제 및 면역력 증가가 대표적인 효능이다(Gildber et al., 1997; Robertson et al., 2000). 생균제에 관한 연구들은 주로 양돈사료를 대상으로 생산성을 높이기 위한 실험이 진행되었다(Pollman et al., 1980; Saartchit and Sullivan, 1990; Xuan et al., 2001). 양식어종에 있어서는 넙치를 대상으로 사료 내 *Bacillus*균주의 첨가로 인해 병원성 미생물에 대한 질병저항성이 증가되었고 보고되었다(Cha et al., 2012). 하지만 위의 연구들은 사료 내 *Bacillus* sp. 균주를 직접 첨가한 실험이지만 이번 실험에서는 *Bacillus* sp. 균주를 가지고 감귤착즙박(Citrus by-product, CBP)을 발효하였을 때의 효능을 비교하고자 하였다. 따라서 이번 연구에서는

조피볼락을 대상으로 CBP와 *B. subtilis* 또는 *B. pumilus* 균주로 발효시킨 발효 CBP 첨가에 따른 성장, 사료효율, 비특이적 면역반응과 질병저항성에 미치는 영향을 조사하였다.

5.2 재료 및 방법

5.2.1. CBP 수집 및 전처리

본 실험에 사용된 CBP 시료는 (주)일해공장(제주도 조천읍 와흘리)에서 쥬스 착즙 후 배출되는 부산물을 제공받아 제주대학교 양어사료영양학연구실로 운반하여 동결건조 후 분쇄하여 사용하였다. 실험에 사용된 분말형태의 CBP 는 5.6%의 조단백질 함량, 1.7%의 조지방 함량, 2.6%의 회분함량과 6.0%의 수분을 함유하였고 CBP 내 비타민 C 농도는 1,500 mg/kg 이다.

5.2.2. CBP 의 발효 및 추출

CBP 를 발효시키기 위하여 *B. subtilis* 균주와 *B. pumilus* 균주를 Nutrient broth(NB, Difco, USA)에 배양하여 감귤배지에 접종하여 발효시켰다. 발효된 CBP 는 동결건조 후 분쇄하여 실험에 사용하였다.

5.2.3. 실험사료

실험사료의 조성은 Table 5-1 에 나타내었다. 단백질원은 탈지어분과 casein 을 사용하였고 지질원은 오징어간유를 사용하여 46%의 조단백질과 12%의 조지방을 함유토록 설계하여 제조하였다. 비타민 C 가 결핍된 대조사료(Control)에 L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP)와 CBP 를 이용하여 100 mg/kg AA 가 되도록 설정하였다. 또한 *B. subtilis* 와 *B. pumilus* 균주로 발효시킨 발효 CBP 도 동일 농도의 비타민 C 가 되도록 첨가하여 총 5 개의 실험사료를 제작하였다(Con, LAPP, CBP, BS-CBP, BP-CBP). 실험사료 제조를 위해서 분말형태의 각 사료원을 사료조성표에 따라 정확히 무게를 측정 한 후, 사료원 총량의 30%에 해당하는 증류수를 첨가하여 혼합하였다. 혼합물은 소형육절기(SMC-12, Korea)로 직경 3-5 mm 크기로 압출 성형하였다. 제작된 실험사료는

동결건조기에서 건조시킨 후, 사료공급 전까지 -20℃ 냉동고에 보관한 후 실험에 사용하였다.

5.2.4. 실험어 및 사육관리

조피볼락 치어는 경상남도 고성군에 위치한 종묘장에서 구입하여 제주대학교 소속 해양과학연구소로 운송하였다. 2 주간의 예비사육 후, 초기평균무게 22.9 g 의 어류는 총 15 개의 150 L 원형 플라스틱 수조에 각 수조당 30 마리씩 무작위 배치하였다. 사육수는 모래 여과해수를 사용하여 1-2 L/min 의 유수량이 공급되도록 조절하였고 모든 실험수조에 용존산소 유지를 위하여 에어스톤을 설치하였다. 사육수온은 실험기간 동안 18℃에서 25℃ 범위에서 실시하였다. 실험사료 공급은 1 일 3 회에 나누어서 13 주동안 반복공급을 하였다.

Table 5-1. Formulation of the experimental diets (% DM).

Ingredients	Experimental diets				
	Con	LAPP	CBP	BS-CBP	BP-CBP
Defatted fish meal ¹	26.00	26.00	26.00	26.00	26.00
Casein ²	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00
Dextrin	16.30	16.30	16.30	16.30	16.30
Squid liver oil	11.80	11.80	11.80	11.80	11.80
Vitamin Mix ³ (vitamin C free)	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Mineral Mix ⁴	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
LAPP ⁵	0.00	0.028	0.00	0.00	0.00
CBP ⁶	0.00	0.00	6.67	0.00	0.00
BS-CBP ⁷	0.00	0.00	0.00	10.10	0.00
BP-CBP ⁸	0.00	0.00	0.00	0.00	10.90
CMC ⁹	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Taurine	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cellulose	10.90	10.88	4.23	0.80	0.00

¹White fish meal, Rukoss, Russia. Fish meal were extracted by 70% aqueous ethanol (water: ethanol = 3: 7) for 48 h.

²United States Biochemical (USB), Cleveland, OH, USA.

³Vitamin premix (g/kg of mixture): retinyl acetate, 1.0; cholecalciferol, 0.05; menadione, 0.2; thiamine hydrochloride, 4.0; riboflavin, 4.4; D-pantothenic acid hemicalcium, 14.5; pyridoxine hydrochloride, 4.0; cyanocobalamin, 0.01; niacinamide, 30.0; folic acid, 0.48; D-biotin, 0.2; myo-inositol, 40.0; α -tocopherol, 10.0.

⁴Mineral Premix (g/kg of mixture): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 80.0; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 370.0; KCL, 130.0; Ferric citrate, 40.0; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 20.0; Ca-lactate, 356.5; $CuCl_2$, 0.2; $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.15; Na_2SeO_3 , 0.01; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2.0; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 1.0.

⁵L-ascorbyl-2-polyphosphate.

⁶Citrus by-product: ILHAE Corporation.

⁷Fermented CBP with *Bacillus subtilis*.

⁸Fermented CBP with *Bacillus pumilus*.

⁹Carboxymethylcellulose.

Table 5-2. Proximate composition of the experimental diets (% DM).

Ingredients	Experimental diets				
	Con	LAPP	CBP	BS-CBP	BP-CBP
Moisture	7.7	7.0	7.4	7.5	7.1
Crude protein	46.8	46.4	47.1	48.3	48.4
Crude lipid	12.8	12.7	12.8	13.8	13.7
Crude ash	5.7	5.6	5.8	5.9	6.1
Total ascorbic acid ⁶ (mg/kg)	11.9	110.0	90.1	100.3	103.3

5.2.5. 분석항목

-일반성분 분석 및 성장률 측정

실험사료의 일반성분 분석은 AOAC (1995) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125°C, 3 시간), 조회분은 직접회화법(550°C, 6 시간), 단백질은 자동조단백질 분석기로 분석하였으며, 지방은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 soxhlet 추출장치를 이용하여 분석하였다. 사료공급 종료 후, 어류의 최종 무게를 측정하여 사료전환효율(feed conversion ratio, FCR), 단백질이용효율(protein efficiency ratio, PER) 및 생존율(survival)을 측정하였다.

Feed conversion ratio = dry feed fed/wet weight gain

Protein efficiency ratio = wet weight gain/total protein given

-비타민 C 분석

실험사료와 실험어 간에서의 비타민 C 분석은 Dabrowski and Hinterleitner (1989)의 방법으로 분석하였다. 시료와 precipitation solution 을 혼합하여 2 분간 균질화한 후 원심분리기(15,000 rpm, 4°C, 30 분)를 이용하여 상층액을 추출하였다. 추출된 상층액을(250 ul) 유리튜브에 옮긴 후 0.2% dichlorophenolindophenol (Sigma, USA)과 증류수를 25 µL 씩 첨가하여 상온에서 20 분간 반응시켰다. 반응시킨 혼합물에 2% thiourea (Sigma, USA)와 5% metaphosphoric acid (Sigm, USA)을 250 µL 넣고 2% 2,4-dinitrophenyhydrazine (Sigma, USA)을 250 µL 넣은 후, 60°C 항온수조에서 3 시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 혼합물을 냉각시켜 18 M H₂SO₄ 를 넣고(500 µL) 524 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

-Collagen 분석

콜라겐 함량은 Wilson and Poe (1973)의 방법으로 분석하였다. 전어체 시료를 끓는 물에 12 분간 담근 후 척추주변의 근육을 제거하여 남아있는 뼈를 0.1 M NaOH 용액에

24 시간 반응시켜 건조하였다. 그 후 0.5 M EDTA 용액(pH 7.5)에 반응시켜 남아있는 무게를 측정하여 collagen 함량을 계산하였다.

-혈액샘플

실험어의 면역반응을 알아보기 위해 각 수조당 3 마리씩 무작위로 선별하여 2-phenoxyethanol (100 ppm) 용액으로 마취 시킨 후 꼬리 미병부에서 혈액을 채취하였다. 채혈된 혈액(전혈)은 원심분리기로(5000 x g) 혈청을 분리하여 다음과 같은 비특이적 면역분석을 실시하였다.

-Lysozyme 분석

혈청 내 lysozyme 분석은 Sankaran and Shanto (1972)의 방법으로 분석하였다. Sodium citrate buffer (0.02 M, pH 5.52)에 동결건조된 *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, USA)를 첨가하여 0.2 mg/mL 농도의 현탁액을 제조한 후, 현탁액과 혈청을 10:1 의 비율로 혼합하여 24°C에서 60 분간 반응시킨 후, 450 nm 에서 흡광도 값을 측정하였다. Hen egg white lysozyme (HEWL; sigma, USA)을 이용하여 standard curve 를 구하고 ug/mL 로 표시하였다.

-Total immunoglobulin (Ig) 분석

혈청 내 immunoglobulin 함량분석은 Siwicki and Anderson (1993)의 방법을 토대로 분석하였다. 혈청 내 단백질 함량을 측정한 후 12% polyethylene glycol 용액으로 단백질에 함유된 immunoglobulin 함량을 침전시켜 값을 측정하였다.

-대식세포 활성 분석

혈액 내 대식세포 활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 분석방법을 토대로 Nitro-blue

tetrazolium (NBT)분석방법을 통해 호중구의 oxidative radical 생성량을 측정하였다. 전혈과 NBT solution (0.2%)을 50 μ L씩 유리튜브에 옮긴 후, formazon 생성을 감소시키기 위해 1 ml의 dimethyl formamide를 첨가하여 2000 \times g 에서 5분동안 원심분리하였다. 이때 형성된 상층액을 수집하여 spectrophotometer (Genesys 10UA, USA)로 540 nm에서 NBT의 감소 범위를 측정하였다. Blank는 dimethyl formamide를 사용하였다.

5.2.6. 인위감염실험

사료 내 CBP 또는 발효 CBP 의 첨가가 항병력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 현재 양어장에서 발병 빈도가 높은 *Edwardsiella tarda* 균주를 이용하여 인위감염 실험을 실시하였다. 균액은 10^8 CFU/ml 의 농도가 되도록 멸균 생리식염수에 현탁한 후, 어류를 1 시간 동안 현탁액에 침지하였다. 인위감염 실험은 성장실험 종료 후 실시하였으며 각 수조당 무작위로 15 마리씩 선정하여 3 반복으로 64 L 감염실험용 수조에 각각 배치하였다. 감염실험은 제주대학교 해양과학연구소 내 어병감염실에서 실시되었으며 모든 감염 프로토콜은 제주대학교의 실험동물 관리 및 이용법에 맞도록 실시하였다.

5.2.7. 통계학적 분석

실험사료의 배치는 완전확률계획법 (Completely randomized design)을 실시하였고, 성장 및 일반성분 분석결과는 SPSS (Version 11.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA 로 통계 분석되었다. 데이터 값의 유의차는 Tukey's HSD 로 비교하였다. 데이터는 평균값 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 나타낸다.

5.3. 결과

13주간의 사료공급 결과는 Table 5-3에 나타내었다. 최종무게의 경우 비타민 C가 결핍된 대조구가 유의적으로 가장 낮은 수치를 보였다. 사료전환효율과 단백질이용효율에서도 성장률과 비슷하게 대조구가 가장 저조한 값을 보였다. 생존율은 83-94%의 범위로 모든 그룹에서 유의적인 차이는 없었다.

조피볼락의 혈액분석 결과는 Table 5-4에 나타내었다. Hemoglobin과 hematocrit은 모든 그룹에서 유의적인 차이는 없었다.

실험사료 공급에 따른 조피볼락의 비특이적 면역반응 결과는 Table 5-5에 나타내었다. Lysozme 활성에서는 LAPP나 CBP 및 발효 CBP가 첨가된 그룹이 대조구에 비해 유의적으로 높은 활성을 보였다. 대식세포활성과 Ig 활성은 모든 그룹에서 유의적인 차이가 없었다.

세균성 질병에 대한 인위감염 실험 결과는 Figure 5-1에 나타내었다. *E. tarda*을 인위감염 시켰을 때, 대조구는 4일째부터 사망개체가 발견되었고 감염 25일째에는 약 40%의 낮은 생존율을 보였다. 반면, LAPP나 CBP 및 발효 CBP가 첨가된 그룹은 동일기간 동안 66-76%의 생존율을 보였으며 대조구에 비해 유의적으로 높은 생존율을 보였다.

Table 5-3. Growth performance of Korean rockfish (initial body weigh 22.9±0.01 g) fed the 5 experimental diets containing L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP), citrus by-product (CBP), *Bacillus subtilis* fermented CBP (BS-CBP) and *B. pumilus* fermented CBP (BP-CBP) for 13 weeks.

	FBW ¹ (g)	FCR ²	PER ³	Survival (%)
Con	52.6±0.8 ^a	1.08±0.02 ^c	1.98±0.04 ^{ab}	92.2±5.1
LAPP	59.0±1.7 ^b	0.98±0.03 ^{ab}	2.19±0.06 ^{bc}	90.0±5.8
CBP	60.9±0.4 ^b	0.91±0.04 ^a	2.32±0.09 ^c	94.4±5.1
BS-CBP	59.9±5.2 ^b	0.92±0.05 ^a	2.26±0.13 ^c	83.3±5.8
BP-CBP	56.9±1.3 ^{ab}	1.06±0.01 ^{bc}	1.94±0.02 ^a	84.4±12.6

Values are means or triplicate groups and presented as mean±SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different (P<0.05).

¹Final body weight (g).

²Feed conversion ratio=dry feed fed/wet weight gain.

³Protein efficiency ratio=wet weight/total protein given.

Table 5-4. Hematological parameters of Korean rockfish (*Sebastes schegeli*) fed the 5 experimental diets containing L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP), citrus by-product (CBP), *Bacillus substilis* fermented CBP (BS-CBP) and *B. pumilus* fermented CBP (BP-CBP) for 13 weeks.

	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)
Con	6.81±0.43	50.0±5.0
LAPP	7.17±0.31	50.7±3.0
CBP	7.55±0.27	51.8±1.4
BS-CBP	6.89±0.41	49.2±1.4
BP-CBP	7.57±1.50	51.1±1.4

Values are means or triplicate groups and presented as mean±SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different (P<0.05).

Table 5-5. Nitro-blue tetrazolium (NBT), lysozyme and total immunoglobulin (Ig) activities of Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*) fed the 5 experimental diets containing L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP), citrus by-product (CBP), *Bacillus subtilis* fermented CBP (BS-CBP) and *B. pumilus* fermented CBP (BP-CBP) for 13 weeks.

	NBT (absorbance)	Lysozyme (ug HEWL/ml)	Ig (mg/ml)
Con	1.10±0.05	60.4±5.6 ^a	23.0±7.1
LAPP	1.11±0.07	119±12.7 ^b	23.9±2.8
CBP	1.08±0.09	114±12.0 ^b	25.6±2.6
BS-CBP	1.08±0.08	115±8.6 ^b	27.6±1.9
BP-CBP	1.08±0.04	107±23.1 ^b	25.8±3.5

Values are means or triplicate groups and presented as mean±SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different (P<0.05).

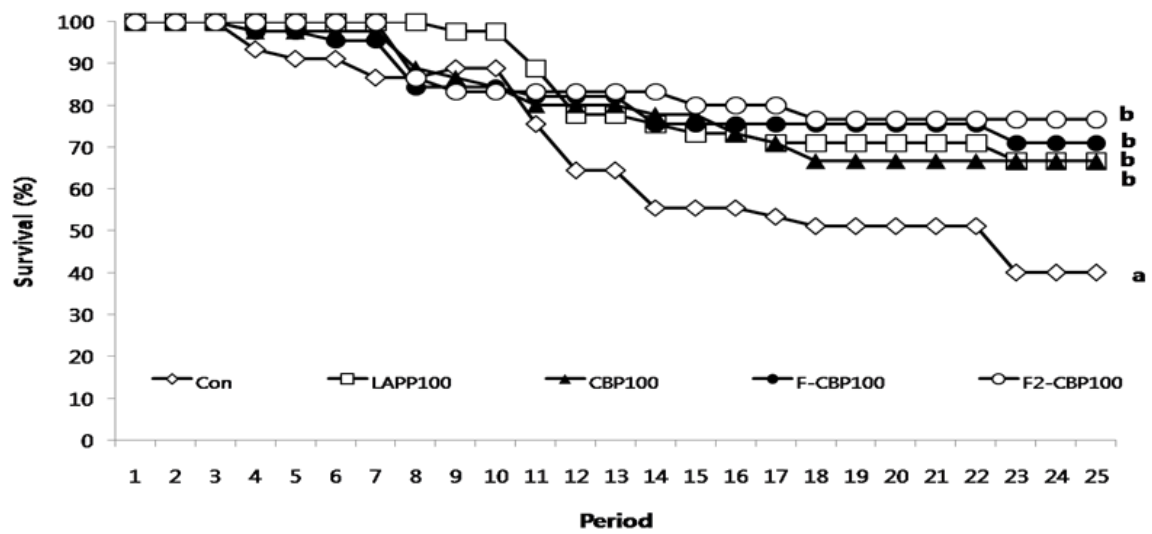


Figure 5-1. Cumulative mortality of Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*) fed the 5 experimental diets containing L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP), citrus by-product (CBP), *Bacillus subtilis* fermented CBP (BS-CBP) and *B. pumilus* fermented CBP (BP-CBP) after challenge with *Edwardsiella tarda* by immersion. Data represents the average \pm SD from triplicate groups.

5.4. 고 찰

B. subtilis 균주는 단백질 분해효소의 분비를 촉진시켜 사료의 단백질 소화율을 증진시킨다고 보고되었지만(Rychen and Nunues, 1995; De Schrijver and Ollevier, 2000; Mohanty et al., 1996; Aly et al., 2008; Zhang et al., 2010), 본 실험에서 CBP그룹과 성장률을 비교하였을 때에는 유의적인 차이가 없었다. 또한 BS-CBP그룹과 BP-CBP그룹을 비교하였을 때 유의적인 차이는 없었지만 BS-CBP를 섭취한 그룹이 경향적으로 높은 성장률을 보였다. 따라서, 우수성이 보고된 물질이라도 모든 어종에 동일하게 적용되는 것이 아니라 양식생물의 종류, 연령, 시기 및 양식환경에 따라 달라질 수 있을 것으로 사료된다(Merrifield et al., 2009; Sun et al., 2010). Jeon et al. (2013)은 넙치(16 g)를 대상으로 사료 내 김치 유산균 배양물을 0%, 0.1%, 0.2%, 0.5%씩 첨가하여 8주간 공급한 결과 성장률 및 사료효율에 아무런 효능이 없다고 보고하였고, Lee et al. (2013) 또한 동일 어종인 넙치를 대상으로 *B. subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus rhamnosus*, *L. plantarum* 균주로 발효시킨 CBP를 3%씩 첨가하여 공급하였을 때에도 성장에 아무런 영향을 미치지 않았다고 보고하였다. 이번 연구결과를 바탕으로 치어기 조피볼락 사료 내 합성 비타민 C인 LAPP를 CBP로 대체하였을 경우 오히려 성장률이 증가되는 경향을 보였으며, 발효시킨 CBP로 대체하였을 때에는 *B. pumilis*보다 *B. subtilis*로 발효시키는 것이 더 유용할 것이라 판단된다. 유용균주(probiotics)는 장내의 유해세균을 감소시키고 미생물 균형을 조절하여 성장과 사료효율을 증진시킨다(Klaenhammer, 1988; Yeo and Liong, 2009; Lauzon et al., 2010). 유용균주는 그람 음성 및 양성 세균을 저해할 수 있는 넓은 항균 스펙트럼을 지니고 pH 가 낮은 위와 같은 환경에서도 생존할 수 있어야 한다. 또한 위를 통과한다 하더라도 장내에서 생성되는 소화 효소 등의 환경조건과 어병 치료를 위한 항생제 투약 시기에도 생존할 수 있어야 한다(Verschuere et al., 2000).

혈액성분은 동일 어종이라도 먹이나 성장률에 따라 변화는 것으로 알려졌다(Garrido et al., 1990; Jeong et al., 2006). 현재까지 어종별로 혈액성상의 기준이 확립되지 않았기에 사용된 사료원료의 효능을 혈액학적 분석으로 비교하기에는 한계가 있지만, 이번 연구에 사용된 CBP 및 발효 CBP의 첨가는 조피볼락의 생리기능에 부정적인 영향을 미치지 않을 것으로 판단된다.

Lysozyme은 비특이적 (선천적) 면역 반응에 속하는 항균효소 중의 하나로서 특정세균에 대한 특이적인 항균작용이 아닌 비특이적으로 다양한 균에 항균작용을 나타내는 효소이다(Jolles and Jolles, 1984). Lysozyme은 130여개의 아미노산으로 이루어진 염기성 단백질로 동물의 침, 눈물, 위액 등 여러 조직에 함유되어 있으며 백혈구들의 세포내 과립에 존재한다. 병원균에 대한 항균 메커니즘은 세균 세포벽의 구성성분인 peptidoglycan의 N-acetylmuramic acid와 N-acetyl-D-glucosamine 잔기들 사이의 β -1,4-글루코시드 결합을 가수분해하여 세균의 세포벽을 파괴함으로써 항균작용을 나타낸다. 이러한 기작에 기인하여 lysozyme 활성은 어류를 포함한 동물에 있어서 비특이적 면역반응을 측정하는 분석요소로 이용되고 있다. 본 연구의 면역분석 결과, lysozyme 활성에서는 LAPP나 CBP 및 발효-CBP(BS-CBP, BP-CBP)가 첨가된 그룹이 비타민 C 결핍그룹에 비해 약 2배 이상의 높은 활성을 나타내었다. 가장 대표적인 이유로는 비타민 C 결핍에 의해 어류의 비특이적 면역력이 활성화 되지 않은 것으로 판단된다. 이러한 결과는 돔류(Orthuno et al., 1999)와 대서양연어(Hardie et al., 1991)에 비타민 C를 고농도로 투여하였을 때 다양한 비특이적인 면역 인자들이 활성화 된다는 결과와 일치하였다. 즉 CBP에 포함된 여러 성분 중 비타민 C 함량이 가장 높은 비중을 차지하고 있기 때문에 어류의 비특이적 면역반응을 증가시킨 것으로 판단된다(Li and Lovell, 1985). 또한, LAPP를 CBP와 발효 CBP로 대체한 그룹에서는 lysozyme활성에 유의적인 차이가 없어 합성 비타민 C인 LAPP를 CBP 또는 발효CBP로 대체하더라도 면역 활성화에 아무런 부정적인 영향이 없을 것으로 판단된다.

*E. tarda*의 감염증상은 안구 돌출 및 백탁현상이 나타나고 해부시 부패한 냄새를 동반한 출혈성 복수와 간, 비장 및 신장의 비대와 결절을 형성한다(Thune et al., 1993). 감염어는 먹이를 잘 먹지 못하고 체색이 검어지며, 미성어부터 성어 단계에서 발생하여 치료가 어렵고 장기간에 걸쳐 지속적으로 폐사가 발생하여 출하시기에 어장에 경제적으로 큰 피해를 입힌다. 국내 주요양식 어종에 감염된 연구결과가 보고될 만큼 질병 발병률이 높은 병원성 세균이다(Nakatsugawa, 1983). Jung et al. (2010)은 유자과피를 넙치사료에 공급한 후 *E. tarda*와 *Streptococcus iniae*에 인위감염 시켰을 때 넙치의 생존율이 증가되었다고 보고하였고, Taoka et al. (2006)은 15g 인 넙치치어를 대상으로 사료 내 *S. cerevisiae*를 1% 첨가하여 7주간 공급한 후 *Vibrio anguillarum*을 인위감염 시켰을 때 유용균주를 첨가하지 않은 대조구에 비해 유의적으로 생존율이 증가하였다고 보고하였다. 이러한 원인은 유용균주에 의해 어류의 생리활성을 촉진시켜 비특이적 면역반응이 증진되었다고 기록하였다. 본 실험에서도 사료 내 LAPP, CBP 또는 발효 CBP가 첨가된 그룹은 대조구에 비해 *E. tarda*에 대한 질병저항성이 증가되는 것을 확인하였다. 하지만 두 종류의 생균제(*B. subtilis* 및 *B. pumilus*)로 발효된 CBP를 일반 CBP와 비교하였을 때에는 발효균주에 의한 효능은 보이지 않았다. 발효균주가 증식하기 위해서는 수온, 수질, 삼투압, pH 등 외부환경에 영향을 받는데 어류에 있어서는 수온이 가장 중요한 요인으로 작용한다(Panigrahi et al., 2007; Das et al., 2008). 따라서 우수성이 보고된 물질이라도 모든 어종에 동일하게 적용되는 것이 아니며 생균제의 종류, 첨가방법 및 농도 그리고 발효조건에 따라 그 결과는 달라질 수 있을 것으로 사료된다.

요 약 문

이번 연구를 통해 감귤착즙박(Citrus by-product, CBP)의 영양학적 우수성을 입증하여 경제적이고 기능적인 양어용 배합사료 원료로 제시하여 값비싼 합성 비타민 C 의 부분 및 완전대체 효과를 조사하였다. 또한 CBP 의 영양학적 우수성을 근거로 여러 유용균주를 이용하여 발효시킨 발효 감귤착즙박(fermented citrus by-product, F-CBP)의 제조와 그 기능성을 검증하여 양어용 배합사료 내 면역증강 첨가제로 사용 가능하도록 하는 기본 자료를 제시하였다.

1차 실험에서는 참돔 치어(초기평균무게 55g)를 대상으로 CBP와 *Lactobacillus plantarum*균주로 발효시킨 발효 CBP의 효능을 알아보기 위하여 대조사료에 CBP와 LP-CBP를 4%와 8%씩 첨가하여 총 5개의 실험사료를 설계하여 저수온환경(12°C-16°C)에서 9주간의 사료공급 실험을 진행하였다. 9주간의 성장실험이 끝난 후 성장률 및 사료효율은 모든 그룹에서 유의적인 차이가 없었다. Lysozyme, SOD 및 MPO활성에서는 CBP와 LP-CBP가 첨가된 그룹이 대조구에 비해 경향적 또는 유의적으로 높은 수치를 보였다. 이러한 이유는 CBP와 LP-CBP에 포함된 비타민 C와 여러 생리활성 물질에 의한 것으로 판단된다. 저수온 스트레스 11일째, 대조구가 급격한 폐사율(60%)을 보였지만 CBP와 LP-CBP가 첨가된 그룹은 25% 내외의 폐사율이 관찰되었다. 이상의 결과를 통해 경제적인 양어 사료 제조를 위해 안정적인 비타민 C 공급과 폐기부산물의 재활용을 위해서라도 CBP를 사용한 친환경적인 사료를 개발하는 것이 우선적으로 요구된다.

2차 실험은 사료 내 CBP 첨가에 따른 합성 비타민 C의 대체율을 알아보기 위한 실험으로 사료 내 비타민 C 함량을 100 mg/kg으로 고정하고 합성 비타민 C(L-ascorbyl-2-

polyphosphate, LAPP)와 CBP를 이용하여 대체율을 조절하였다(LAPP100/CBP0, LAPP75/CBP25, LAPP50/CBP50, LAPP25/CBP75, LAPP0/CBP100). 실험에 사용된 넙치 치어(초기평균무게 46.4g)는 제주도에 위치한 종묘배양장에서 구입하여 제주대학교 소속 해양과학연구소로 운송하였다. 사육수온은 실험기간 동안 11°C-15°C범위로 저수온 환경에서 6주간 실험을 진행하였다. CBP함량이 75%와 100%로 대체된 그룹이 LAPP100% 그룹에 비해 유의적으로 높은 성장률 및 사료효율을 보였다. 생존율은 모든 그룹에서 유의적인 차이는 없었다. 성장결과를 토대로 합성 비타민 C를 CBP로 완전 대체할 경우 저수온기의 넙치 성장에 전혀 문제가 없을 뿐만 아니라 오히려 저수온기 환경에 대한 스트레스를 감소시켜 성장률을 높일 것으로 판단된다. 면역분석과 조직학적 분석 결과에서는 모든 그룹에서 유의적인 차이가 없었다. 배합사료 내 값비싼 합성 비타민 C의 부분 혹은 완전 대체용으로 CBP가 사용될 것으로 가설을 세우고 증명함으로써 양식생산의 60%에 이르는 사료비용을 절감할 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

3차 실험에서는 조피볼락 치어(초기평균무게 4.5g)를 대상으로 비타민 C가 결핍된 대조사료에 LAPP와 CBP를 이용하여 90 mg/kg 및 360 mg/kg이 되도록 총 5가지의 실험사료를 제작(Con, LAPP90, LAPP360, CBP90, CBP360)하여 13주간 사료공급 실험을 진행하였다(사육수온 20°C-24°C). 최종무게의 경우 비타민 C가 결핍된 대조구가 유의적으로 가장 낮은 수치를 보였고 CBP360 그룹이 다른 그룹에 비해 유의적으로 높은 성장률을 보였다. 사료전환효율과 단백질이용효율에서도 성장률과 비슷하게 대조구가 가장 낮은 값을 보였다. 생존율은 대조구가 50%로 유의적으로 낮은 값을 보였고 LAPP나 CBP가 첨가된 모든 그룹은 73-90%의 생존율을 보였다. 대조구를 섭취한 그룹에서 비정상적인 안구현상(백내장)이 관찰되었지만, LAPP 또는 CBP가 첨가된 그룹에서는 첨가량과 상관없이 결핍 증상이 발견되지 않았다. 사료 내 비타민 C 함량이 증가(LAPP90, LAPP360)할수록 간에서의 비타민 C 함량도 증가되는 것을 확인할 수 있지만, CBP가 첨가된 그룹은 농도에 상관없

이 일정한 함량을 보였다. 콜라겐 분석결과, 대조구에 비해 LAPP 또는 CBP가 적정농도 일 때 유의적으로 높은 함량을 보였지만 고농도 그룹에서는 유의적인 차이가 없었다. Lysozyme과 total immunoglobulin활성에서는 LAPP 또는 CBP가 첨가된 모든 그룹이 대조구에 비해 유의적으로 높은 활성을 보였다. 성장실험이 끝난 후, *Streptococcus iniae* 균을 이용하여 인위감염 시켰을 때(감염 18일째), LAPP와 CBP를 첨가한 그룹은 각각 75%, 91% (LAPP90, LAPP360)와 60%, 84% (CBP90, CBP360)의 생존율을 보인 반면, 대조구에서는 38%의 생존율을 보였다. 사료 내 적정함량 이상의 비타민 C 공급은 어류의 성장 및 면역반응을 증가시켰다. 따라서 CBP의 사용은 양어사료 내 여분의 비타민 C를 공급하여 잠재적인 성장 및 면역촉진제 역할을 담당할 것으로 판단되며, 양어용 배합사료 내 항생제 대체효과 또한 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

4차 실험에서는 조피볼락 치어(초기평균무게 22.9g)를 대상으로 합성 비타민 C가 결핍된 대조사료에 LAPP, CBP 그리고 *Bacillus subtilis*와 *B. pumilus* 균주를 이용하여 발효시킨 CBP (BS-CBP, BP-CBP)를 이용하여 사료 내 비타민 C 함량이 100 mg/kg이 되도록 설정하였다. 사육수온은 18°C에서 25°C인 적정수온에서 13주간 사료공급 실험을 진행하였다. 최종무게의 경우 비타민 C가 결핍된 대조구가 유의적으로 가장 낮은 수치를 보였다. 사료전환효율과 단백질이용효율에서도 성장률과 비슷하게 대조구가 가장 낮은 값을 보였다. 생존율은 83-94%의 범위로 모든 그룹에서 유의적인 차이는 없었다. Lysozyme활성에서는 대조구가 유의적으로 낮은 활성을 보였다. *Edwardsiella tarda* 균을 인위감염 시켰을 때(감염 25일째), 대조구에서는 4일째부터 폐사가 발견되었고 감염 25일째에는 약 40%의 낮은 생존율을 보였다. 반면, LAPP, CBP 및 발효CBP가 첨가된 그룹은 동일기간 동안 66-76%의 생존율을 보여 대조구에 비해 유의적으로 높은 생존율을 보였다. 양어용 배합사료에 LAPP나 CBP 및 발효CBP가 첨가된 그룹은 무첨가 그룹인 대조구에 비해 유의적으로 높은 면역활성과 질병저항성이 나타났지만, 두 종류의 생균제(*B. subtilis* 및 *B. pumilus*)

로 발효된 CBP와 일반 CBP와 비교하였을 때에는 차이가 없었다. 따라서 우수성이 보고된 물질이라도 모든 어종에 동일하게 적용되는 것이 아니며, 생균제의 종류, 첨가방법 및 농도 그리고 발효조건에 따라 그 결과는 달라질 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 연구결과를 종합해 볼 때, CBP의 양어사료 내 첨가제로써의 개발 가능성은 충분히 있을 것으로 판단된다. 특히, CBP는 양어사료 내 비타민 C의 대체제로써 손색이 없어 보이며, CBP에 다량 함유되어 있는 유용성분에 의해 어류의 비특이적 면역력 증강에도 좋은 효과가 있을 것으로 사료된다. 또한 CBP의 경제적 이용방법 활로를 개척할 수 있으며, 이는 감귤을 이용한 2차 생산제품 개발을 활성화하여 농, 어민 소득 증대뿐만 아니라 국내 양어용 배합사료의 질을 한층 높일 수 있을 것으로 사료된다. 하지만 보다 구체적이고 지속 가능한 결론을 도출하기 위해서는 타 어종에서의 장기간의 현장 실험과 EP배합사료 생산과정에서의 영양소 파괴 등에 관한 후속 연구들이 반드시 뒷받침 되어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Ai Q, Mai K, Tan B, Xu W, Zhang W, Ma H and Liufu Z. 2006. Effect of dietary vitamin C on survival, growth, and immune of large yellow croaker, *Pseudosciaena corcea*. *Aquaculture* 261, 327-336.
- Allen A, Hutton DA, Leonard AJ, Pearson JP and Seller LA. 1986. The role of mucus in the protection of the gastroduodenal mucosa, *Scan J Gastroenterol.* 21, 71-77.
- Aly SM, Ahmed YA and Mohamed MF. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 128-136.
- AOAC. 1995. Official methods of analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, U.S.A, 1298.
- Aregheore EM. 2000. Chemical composition and nutritive value of some tropical by-product feedstuffs for small ruminants *in vivo* and *in vitro* digestibility. *Animal Feed Science Technology* 85, 99-109.
- Bae EA, Kwon TW and Moon GS. 1997. Isoflavone contents and antioxidative effects of soybeans, soybean curd and their by products. *J Korean Soc Food Nutr* 26, 371-375.
- Baeck GW, Kim JH, Gomez DK and Park SC. 2006. Isolation and characterization of Streptococcus sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju island. *J Vet Sci*, 7, 53-58.
- Bai SC. 2001. Requirements of L-ascorbic acid in a viviparous marine teleost, Korean rockfish *Sebastes schlegeli* (Hulgendorf). Pp. 69-85 in *Ascorbic Acid in Aquatic Organisms*, Dabrowski K, ed Boca Raton, FL: CRC Press.
- Bake-Mckellep AM, Froystd MK, Lilleeng E, Dapra F, Refstie S and Krogdahl A. 2007. Response to soy: T-cell like reactivity in the intestine of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *J Fish Dis.* 30, 13-25.
- Bampidis VA and Robinson PH. 2006. Citrus by-products as ruminant feeds: a review. *Anim Feed Sci Tech* 128, 175-217.
- Bath DL, Dunbar JR, King JM, Berry SL, Leonard RO and Olbrich SE. 1980. By-products and

- unusual feedstuffs in livestock rations. Western Regional Extension Publication No 39, USDAARS, Washington, DC, USA.
- Braddock RJ. 1983. Utilization of citrus juice vesicle and peel fiber. *Food Technol* 37, 85-87.
- Bruce BM and Robert CR. 1996. Apparent digestibility of selected ingredients in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. *Aquaculture* 141, 233-244.
- Cavalli RO, Batista FMM, Lavens P, Sorgeloos P, Nelis HJ and De Leenheer AP. 2003. Effect of dietary supplementation of vitamin C and E on maternal performance and larval quality of the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*. 227, 131-146.
- Cha JH, Yang SY, Woo SH, Song JW, Oh DH and Lee KJ. 2012. Effects of dietary supplementation with *Bacillus* sp. on growth performance, feed utilization, innate immunity and disease resistance against *Streptococcus iniae* in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Kor J fish Aquat Sci* 45, 35-42.
- Cha JY and Cho YS. 2001. Biofunctional activities of citrus flavonoids. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 44, 122-128.
- Chan AC. 1993. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Can J Physiol Pharm.* 71, 725-731.
- Chatterjee IB. 1978. Ascorbic acid metabolism. *World Rev Nutr Diet* 30, 69-87.
- Cho MY, Kim MS, Choi HS, Park GH, Kim JW, Park MS and Park MA. 2008. A statistical study on infectious diseases of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, in Korea. *J Fish Pathol* 21, 271-278.
- Cho MY, Kim MS, Kwon MG, Jee BY, Choi HS, Choi DL, Park GH, Lee CH, Kim JD, Lee JS, Oh YK, Lee DC, Park SH and Park MA. 2007. Epidemiological study of bacterial diseases of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, from 2005 to 2006 in Korea. *J fish Pathol* 20, 61-70.
- Choi HS, Park SR and Jung CG. 2002. Biochemical analysis of blood serum from wintering sea bream with green liver syndrome. *J Fish Pathol* 15, 43-48.
- Cullen AJ, Harmon DL and Nagaraja TG. 1986. In vitro fermentation of sugars, grains, and by-product feeds in relation to initiation of ruminal lactate production. *J Dairy Sci* 69, 2616-2621.

- 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.
- 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.
- Dabrowski K, Matusiewicz M and Blom JH. 1994. Hydrolysis, absorption and bioavailability of ascorbic acid esters in fish. *Aquaculture* 124, 169-191.
- Das S, Ward LR and Burke C. 2008. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 81, 419-429.
- De Schrijver R and Ollevier F. 2000. Protein digestion on juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. *Aquaculture* 186, 107-116.
- Divakaran S, Leonard Go and Ian PF. 2002. Note on the methods for determination of chromix oxide in shrimp feeds. *J Agri Food Chem.* 50, 464-467.
- Dobrowski K, Hinterleitner S, Sturmhuber C, El-Fiky N and Wieser W. 1988. Do carp larvae require vitamin C? *Aquaculture* 72, 295-306.
- El Naggar GO and Lovell RT. 1991. L-ascorbyl-2-monophosphate has equal antiscorbutic activity as L-ascorbic acid but L-ascorbyl-2-sulfate is inferior to L-ascorbic acid for channel catfish. *J Nutr* 121, 1622-1626.
- Ellis AE. 1990. Serum antiprotease in fish. In: *Techniques in fish Immunology*. Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson WB and Van Muiswinkel WB, eds SOS Publication, Fair Haven, USA, 95-99.
- Ensminger ME and Olentine JCG. 1978. *Feeds and Nutrition* 1st ed. The Ensminger publishing company, Clovis, CA, USA.
- Eo J and Lee KJ. 2008. Effect of dietary ascorbic acid on growth and non-specific immune responses of tiger puffer, *Takifugu rubripes*. *Fish Shellfish Immun* 25, 611-616.
- Fattman CL, Shaefer LM and Oury TD. 2003. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radical Bio Med* 35, 236-256.
- Fauconneau B, Choubert G, Blanc D, Breque J and Lupuet P. 1983. Influence of environmental

- temperature on flow rate of foodstuffs through the gastrointestinal tract of rainbow trout. *Aquaculture* 34, 27-39.
- Folch J, Lee M and Sloane-Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497-509.
- Garrido LG, Chapuli RM and Andres AV. 1990. Serum cholesterol and triglyceride levels in *Scyliorhinus* during sexual maturation. *J Fish Biol* 36, 499-509.
- Gatesoupe FJ. 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, (*Scophthalmus maximus*) against pathogenitic vibrio. *Aquat Living Resour.* 7, 182-277.
- Gatlin III DM, Poe WE and Wilson RP. 1986. Effects of singular and combined dietary deficiencies of selenium and Vitamin E on fingerling channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J Nutr.* 116, 1061-1067.
- Gildber A, Mikkelsen H, Sandaker E and Ring E. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on the growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia* 352, 270-285.
- Gouillou-Coustans MF, Bergot P and Kaushik SJ. 1998. Dietary ascorbic acid needs of common carp (*Cyprinus carpio*) larvae. *Aquaculture* 161, 453-461.
- Grant BF, Seib PA, Liao ML and Corpron JA. 1989. Polyphosphorylated L-ascorbic acid: A stable form of vitamin C for aquaculture feeds. *J World Aquacult Soc.* 20, 143-157.
- Grinde B. 1989. Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. *J Fish Dis* 12, 95-104.
- Halver Je, Ashley LM and Smith RR. 1969. Ascorbic acid requirements of coho salmon and rainbow trout. *T Am Fish Soc.* 90, 762-771.
- Han JH. 2006. Effect of cultural materials form Kimchi lactic acid bacteria on growth performance and prevention of disease in pigs. Kangwon National Univeristy, Chuncheon, Korea.
- Hardie LJ, Fletcher TC and Secombes CJ. 1991. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquaculture.* 95, 201-214.
- Hilton JW, Cho CY and Slinger SJ. 1978. Effect of graded levels of supplemental ascorbic acid in

- practical diets fed to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J Fish Res Board Can. 35, 431-436.
- Hilton JW, Cho CY, Slinger ST. 1977. Factors affecting the atability of supplemental ascorbic acid in practical trout diets. J Fish Res Board Can 34, 683-687.
- Ishibashi YS, Ikeda S, Murata O, Nasu T and Harada T. 1992. Optimal supplementary ascorbic acid level in the Japanese parrot fish diet. Nippon Suisan Gakk. 58, 267-270.
- Iwata N, Kikuchi K, Honda H, Kiyono M and Kurokura H. 1994. Effects of temperature on the growth of Japanese flounder. Fisheries Sci 60, 527-531.
- Jafri AK and Hassan MA. 1999. Energy digestibility coefficients of commonly used feedstuffs in different size class of Indian major carps, *Labeo rohita* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). Asin Fish Sci 12, 155-163.
- Jee BY, Shin KW, Lee DW, Kim YJ and Lee MK. 2014. Monitoring of the mortalities and medications in the inland farms of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, in south Korea. J fish Pathol 27, 77-83.
- Jeong CW, Choi HJ, Yoo GY, Lee SH, Kim YC, Okorie OE, Lee JH, Jun KD, Choi SM, Kim KW, Kang YJ, Kang JC, Kong IS and Bai SC. 2006. Effects of dietary probiotics supplementation on juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J Kor Fish Soc 39, 460-465.
- Jeong JS, Kim ML. 2008. Quality evaluation of citrus jelly prepared using concentrated citrus juice. Korean J Food & Nutr. 14, 174-181.
- Jolles P and Jolles J. 1984. What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. Mol Cell Biochem 63, 165-189.
- Jung YH, Kim DH, Kim HY, Shin TS, Oh MJ, Lee JH, Kim JH, Im SY and Kim E. 2010. 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.
- Kim CW, Song E. 2010. Quality characteristics of gamgyul Injeulmi with citrus mandarin powder during storage. Korean J. Food & Nutr. 23, 247-257.
- Kim JW, Lee HN, Jee BY, Woo SH, Kim YJ and Lee MK. 2012. Monitoring of the mortalities in the aquaculture fams of Sourth Korea. J fish Pathol 25, 271-277.

- Kim SS, Jang JW, Song JW, Lim SJ, Jeong JB, Lee SM, Kim KW, Son MH and Lee KJ. 2009. Effects of dietary supplementation of alga mixtures (*Hizikia fusiformis* and *Ecklonia cava*) on innate immunity and disease resistance against *Edwardsiella tarda* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Kor J Fish Aquat Sci. 42, 614-620.
- Kim SS, Song JW, Jeong JB, Jeon YJ, Yeo IK and Lee KJ. 2010. Effects of dietary supplementation of fermented garlic powder on immune responses, blood components, and disease resistance against principal fish disease of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in low temperature season. J Anim Sci Tech 52, 337-346.
- Kim YC, Park GJ, Lee JH, Kim KW, Son MH and Bai CS. 2009. Effects of the dietary β -1,3 glucan on growth, hematological and body composition in juvenile Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*). Kor J fish Aquat Sci. 42, 609-613.
- Klaenhammer TR. 1988. Bacteriocin of lactic acid bacteria. Biochimie 70, 337-349.
- KOSIS. 2013. Korean Statistical Information Service. Korea.
- Kumari J and Sahoo PK. 2005. Effects of cyclophosphamide on the immune system and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus*. Fish Shellfish Immun 19, 307-316.
- Lall SP, Olivier G, Weerakoon DEM and Hines JA. 1990. The effect of vitamin C deficiency and excess on immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Pp. 427-441 in Proceedings of the Fish Nutrition Meeting, Toba, Japan, M. Takeda and Watanabe T, des. Tokyo, Japan: Japan Translation Center.
- Lauzon HI, Gudmundsdottir s, Steinarsson A, Oddgeirsson M, Martinsdottir E and Gudmundsdottir BK. 2010. Impact of probiotics intervention on microbial load and performance of Atlantic cod (*Gadus morhus* L.) juveniles. Aquaculture 310, 139-144.
- Lee BJ, Kim SS, Song JW, Oh DH, Cha JH, Jeong JB, Heo MS, Kim KW 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.
- Lee EY. 2008. Problems and verification system of probiotics as livestock-environment improving

- agent produced and circulated. Kor J Microbiol Biotechnol 36, 87-95.
- Lee HY, Seog HM, Nam YJ, Chung DH. 1987. Physico-chemical properties of Korean mandarin (*Citrus reticula*) orange juice. Korean J. Food Sci. Technol. 19, 338-345.
- Lee KJ and Dabrowski. 2004. Long-term effects and interactions of dietary vitamin C and E on growth and reproduction of yellow perch, *Perca flavescens*. Aquaculture. 230, 377-389.
- Lee KJ, Kim KW and Bai SC. 1998. Effects of different dietary levels of L-ascorbic acid on growth and tissue vitamin C concentration in juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). Aquac Res. 29, 237-244.
- Lee SH, Yoo GY, Choi SM, Kim KW, Kang YJ and Bai SC. 2008. Effects of dietary probiotics supplementation on juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegeli*. J Aquaculture. 21, 82-88.
- Lee SM. 2002. Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for juvenile and grower rockfish (*Sebastes schlegeli*). Aquaculture 207, 79-95.
- Lee TS. 2003. Report on the management system for the antibiotics in the aquaculture farms, National Fisheries Research and Development Institute. Pp. 17-19.
- Li Y and Lovell RT. 1985. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. Journal of Nutrition, 115, 123-131.
- Lin MF and Shiau SY. 2004. Requirements of vitamin C (L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg and L-ascorbyl-2-monophosphate-Na) and its effects on immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. Aquacult Nutr. 10, 327-333.
- Lin MF and Shiau SY. 2005a. Dietary L-ascorbic acid affects growth, non-specific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. Aquaculture. 244, 215-221.
- Lin MF and Shiau SY. 2005b. Requirements of vitamin C (L-ascorbyl-2-sulfate and L-ascorbyl-2-phosphorylphosphate) and its effects on immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. Aquacult Nutr. 11, 183-189.
- Lin YH, Lin HY and Shiau SY. 2011. Dietary folic acid requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, and its effects on non-specific immune responses. Aquaculture 317, 133-137.
- Lovell RT and Lim C. 1978. Vitamin C in pond diets for channel catfish. Trans Am Fish Soc 107,

321-325.

- Lovell RT. 1973. Essentiality of vitamin C in feeds for intensively fed caged channel catfish. *J Nutr* 103, 134-138.
- Mahajan CL and Agrawal NK. 1979. Nutritional requirements of ascorbic acid by Indian major carp *Cirrhina mrigala* during early growth. *Aquaculture* 19, 37-48.
- McLaren BA, Keller E, O'Donnell DJ and Elevehjem C. 1947. The nutrition of rainbow trout. 1. Study of vitamin requirements. *Arch Biochem Biophys*. 15, 169-178.
- Mead SW and Guilbert HR. 1926. The digestibility of certain fruit by products as determined for ruminants. Part I. Dried orange pulp and raisin pulp. *California Agr Exp Sta Bull* 409, 1-11.
- Merrifield DL, Bradley G, Baker RTM and Davies SJ. 2009. Probiotic application for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria post-antibiotic treatment. *Aquacult Nutr* 10, 1365-2095.
- Mohanty SN, Swain SK and Tripathi SD. 1996. Rearing of catla (*Catla catla* Ham) spawn on formulated diets. *J Aquacult Tripics*. 11, 253-258.
- Moon SW, Kang SH, Jin YJ, Park JG, Lee YD, Lee YK, Park DB, Kim SJ. 2004. Fermentation of citrus unshiu Marc and functional characteristics of the fermented products. *Korean J. Food Sci. Techol*. 36, 306-312.
- Moon YG, Lee KJ, Heo MS. 2007. Characteristics of citrus by-product fermente using *Bacillus subtilis* as starter extracts. *Korean J Microbiol Biotechnol*. 35, 142-149.
- Nakatsugawa T. 1983. *Edwardsiella tarda* isolated from cultured young flounders. *Fish Pathol* 18, 99-101.
- Navarre O and Halver JE. 1989. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture* 79, 207-221.
- Nayak SK, Swain P and Mukherjee SC. 2007. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian carp, *Labeo rohita* (Ham). *Fish Shellfish Immunol* 23, 892-896.
- Nobaek S, Johansson ML, Molin G, Ahrné S and Jeppsson B. 2000. Alteration of intestinal microflora

- is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 95, 1231-1238.
- NRC (Nutrient Research Council). 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. The National Academy Press, Washington DC, USA. 279.
- Oh SP, Kim DH, Lee JJ and Lee CH. 1998. Bacterial diseases in flounder farms of Cheju island. *J Fish Pathol* 11, 23-27.
- Ortuno J, Esteban MA and Meseguer J. 1999. Effect of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead sea bream *Sparus aurata* L. *Fish and Shellfish Immunol.* 9, 429-443.
- Padh H. 1990. Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem Cell Biol* 68, 1166-1173.
- Palić D, Andreassen CB, Menzel BW and Roth JA. 2005. A rapid, direct assay to measure degranulation of primary granules in neutrophils from kidney of fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Fish Shell Immun* 19, 217-227.
- Panigrahi A, Kiron V, Satoh S, Hirono I, Kobayashi T, Sugita H, Puangkaew J and Aoki T. 2007. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Dev Comp Immunol* 31, 372-382.
- Pelletier D, Blier P, Dutil JD and Guderley H. 1995. How should enzyme activities be used in fish growth studies?. *J Exp Biol* 198, 1493-1497.
- Pollman DS, Danielson DM and Peo ER. 1980. Effects of microbial feed additives on performance of starter and growing-finishing pigs. *J Anim Sci* 51, 563-577.
- Richard F, Elliott J, Shewmaker L and Reingold A. 2005. Identification and characterization of sporadic isolates of *Streptococcus iniae* isolated from humans isolated from humans. *J Clin Microbiol.* 43, 933-937.
- Robertson PAW, O'Dowd c, Burrells C, Williams P and Austin B. 2000. Use of carnobacterium sp. A probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* 185, 235-243.
- Rodriguez JC, Pastor E, Ruiz M, Flores E and Royo G. 2007. Antibiotic resistance during therapy:

- mechanisms and means of control. *Infect Dis Drug Targets* 7, 43-45.
- Rychen G and Nunues S. 1995. Effects of three microbial probiotics on postprandial concentration differences of glucose, galactose and amino-nitrogen in the young pig.
- Saartchit T and Sullivan TW. 1990. Influence of a dried *Bacillus subtilis* culture and antibiotics on performance and intestinal microflora in turkeys. *Poultry Sci* 69, 1966-1973.
- Salinas I, Cuesta A, Esteban MA and Meseguer J. 2005. Dietary administration of *Lactobacillus delbrueckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. *Fish Shellfish Immunol* 19, 67-77.
- Sandnes K, Torrissen O and Waagbo R. 1992. The minimum dietary requirement of vitamin C in Atlantic salmon *Salmo salar* fry using Ca ascorbat-2monophosphate as dietary source. *Fish Physiol Biochem.* 10, 315-319.
- Sankaran K and Gurnani S. 1972. On the variation in catalytic activity of lysozyme in fishes. *Indian J Biochem Bio.* 9, 162-165.
- Sato M, Kondo T, Yashinaka R and Ikeda S. 1982. Effect of dietary ascorbic acid levels on collagen formation in rainbow trout. *B Jpn Soc Sci Fish.* 48, 553-556.
- Sato M, Kondo T, Yashinaka R, Ikeda S. 1982. Effect of dietary ascorbic acid levels on collagen formation in rainbow trout. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 48, 553-556.
- Sato M, Kondo T, Yoshinaka R and Ikeda S. 1983. Effect of water temperature on the skeletal deformity in ascorbic acid deficient rainbow trout. *B Jpn Soc Sci Fish.* 49, 443-446.
- Scerra V, Caridi A, Foti F and Sinatra MC. 1999. Influence of dairy *Penicillium* sp. on nutrient content of citrus fruit peel. *Animal Feed Science Technology* 78, 169-176.
- Sealey WM and Gatlin III DM. 2002a. Dietary vitamin C and vitamin E interact to influence growth and tissue composition of juvenile hybrid striped bass (*Marone chrysops* x *M. saxatilis*) but have limited effects on immune responses. *J Nutr.* 132, 748-755.
- Sealey WM and Gatlin III DM. 2002b. In vitro manipulations of vitamin C and vitamin E concentrations alter intracellular O₂-production of hybrid striped bass (*Marone chrysops* x *M.*

- saxatilis*) head-kidney cells. Fish Shellfish Immun. 12, 131-140.
- Seo JY, Kim KD and Lee SM. 2009. Effects of supplemental herb medicines in the diets on growth, feed utilization and body composition of juvenile and grower rockfish *Sebastes schlegeli*. J. Aquaculture. 22, 112-117.
- Seo JY, Kim KD, Son MH and Lee SM. 2010. Growth performance, hematological parameter and fatty acid composition of growing olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) to dietary inclusion of kelp meal, krill meal, garlic powder or citrus meal. Kor J Fish Aquat Sci. 43, 557-561.
- Shiau SY and Hsu CY. 2002. Vitamin E sparing effect by dietary vitamin C in juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. Aquaculture. 201, 335-342.
- Siwicki AK, Anderson DP. 1993. Non-specific defense mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum. Fish Disease Diagnosis and Prevention Methods 105-112. Olsztyn, Poland.
- Soliman AK, Jauncey K and Roberts RJ. 1986. The effect of varying forms of dietary ascorbic acid on the nutrition of juvenile tilapias (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 59, 1-6.
- Song JW, Jang JW, Kim SS, Oh DH, Cha JH and Lee KJ. 2011. Effect of dietary supplementation with alga (*Hizikia fusiformis* and *Ecklonia cava*) on the non-specific immune responses of parrot fish *Oplegnathus fasciatus*. Kor J Fish Aquat Sci. 44, 332-338.
- Song YB, Moon SW, Kim SJ and Lee YD. 2002. Effect of EM-fermented orange in commercial diet on growth of juvenile flounder, *Paralichthys olivaceus*. J Aquacult. 15, 103-110.
- Stickney RR, McGeachin RB, Lewis DH, Marks J, Riggs A, Sis RF, Robinson EH and Wurts W. 1984. Response of *Tilapia aurea* to dietary vitamin C. J World Maricul Soc. 15, 179-185.
- Sugiura SH, Dong FM, Rathbone CK and Hardy RW. 1998. Apparent protein digestibility and mineral availabilities in various feed ingredients for salmonid feeds. Aquaculture 159, 177-202.
- Sun YZ, Yang HL, MA RL and Lin WY. 2010. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. Fish Shellfish Immunol 29, 803-809.

- Taoka Y, Maeda H, Jo JY, Jeon MJ, Bai SC, Lee WJ, Yuge K and Koshio S. 2006. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fisheries Sci* 72, 310-321.
- Teshima SI, Kanazawa A, Koshio S and Itoh S. 1991. L-ascorbyl-2-phosphate-MG as vitamin C source for the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Pp. 157-166 in *Fish Nutrition in Practice*, Coll. Les Colloq., No. 61S., Kaushik J and Lequet P, des. Paris, France: INRA.
- Thune RL, Stanley LA and Cooper RK. 1993. Pathogenesis of Gram-negative bacterial infections in warm water fish. *Annu Rev Fish Dis* 3, 37-68.
- Tibbetts SM, Lall SP and Milley JE. 2004. Apparent digestibility of common feed ingredients by juvenile haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L. *Aquac Res* 35, 643-651.
- Tibbetts SM, Milley JE and Lall SP. 2006. Apparent protein and energy digestibility of common and alternative feed ingredients by Atlantic cod, *Gadus morhua* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture* 261, 1314-1327.
- Tsujimura M, Yoshikawa H, Hasegawa T, Suzuki T, Kaisai T, Suwa T and Kitamura S. 1978. Studies on the vitamin C activity of ascorbic acid 2-sulfate on the feeding test of newborn rainbow trout. *Vitamins (Japan)* 52, 35-44.
- Vatassery GT, Smith WE and Quach HT. 1989. Ascorbic acid, glutathione and synthetic antioxidants prevents the oxidation of vitamin E in platelets. *Lipids* 24, 1043-1047.
- Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P and Verstrate W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64, 655-656.
- Wang X, Kim KW and Bai SC. 2002. Effects of different dietary levels of L-ascorbyl-2-polyphosphate on growth and tissue vitamin C concentrations in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquac Res.* 33, 261-267.
- Wang X, Kim KW, Bai SC. 2003a. Comparison of L-ascorbyl-2-monophosphate-Ca with L-ascorbyl-2-monophosphate-Na/Ca on growth and tissue ascorbic acid concentrations in Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture* 225, 387-395.
- Wang X, Kim KW, Park GJ, Choi SM, Jun HK and Bai SC. 2003c. Evaluation of L-ascorbyl-2-

- glucose as the source of vitamin C for juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). Aquac Res. 34, 1337-1341.
- Wang X, Kim KW, Park GJ, Choi SM, Jun HK, Bai SC. 2003b. Evaluation of L-ascorbyl-2-glucose as the source of vitamin C for juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). Aquac. Res. 34, 1337-1341.
- Wang Y, Xu N, Xi A, Ahmed Z, Zhang B and Bai X. 2009. Effects of *Lactobacillus plantrum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. Appl Microbiol Biotechnol 84, 341-347.
- Watanabe T and Vassallo-Agius R. 2003. Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan. Aquaculture 227, 35-61.
- Wendelaar Bonga SE. 1997. The stress response in fish. Physiol Rev. 77, 591-625.
- Wilson RP and Poe WE. 1973. Impaired collagen formation in the scorbutic channel catfish. J Nutr 103, 1359-1364.
- Wilson RP, Poe WE and Robinson EH. 1989. Evaluation of L-ascorbyl-2-polyphosphate (ASPP) as a dietary ascorbic acid source for channel catfish. Aquaculture 81, 129-136.
- Wilson RP. 1973. Absence of ascorbic acid synthesis in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, and blue catfish, *Ictalurus frucatus*. Comp biochem Physiol 46, 635-638.
- Xiao LD, Mai KS, Ai QH, Xu W, Wang XJ, Zhang WB and Liufu ZG. 2010. Dietary ascorbic acid requirement of cobia, *Rachycentron canadum* Linnaeus. Aquacult Nutr 16, 582-589.
- Xuan ZN, Kim JD, Heo KN, Jung HJ, Kee JH, Han YK, Kim YY and Han IK. 2001. Study on the development of probiotics complex for weaned pigs. Asian-Aust J Anim Sci 14, 1425-1428.
- Yeo SK and Liong MT. 2009. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. J Sci Food Agric 90, 267-275.
- Yildirim-Aksoy M, Lim C, Li MH and Klesius PH. 2008. Interaction between dietary levels of vitamin C and E on growth and immune responses in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). Aquac Res. 39, 1198-1209
- Zhang Q, Ma HM, Mai KS, Zhang WB, Liufu ZG and Xu W. 2010. Interaction of dietary *Bacillus*

subtilis and fructooligosaccharide on the growth performance, non-specific immunity of sea cucumber, *Apostichopus japonicas*. Fish Shellfish Immunol. 29, 204-211.

Zhou Q, Wang L, Wang H, Xie F and Wang T. 2012. Effect of dietary vitamin C on the growth performance and innate immunity of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). Fish Shell Immun 32, 969-975.

감사의 글

정말로 많은 분들의 도움을 받아 박사학위 논문을 완성할 수 있었습니다. 실패와 아픔, 기쁨과 즐거움 이 모든 것이 저에게는 소중한 추억으로 간진될 것입니다. 이 모든 시간을 함께해 주시고 많은 조언과 격려를 아끼지 않은 모든 분들께 감사의 인사를 드립니다.

먼저, 참으로 부족한 저를 잘 할 수 있다며 격려해 주신 이경준 지도교수님께 고개 숙여 깊은 감사를 드립니다. 교수님을 통해 겸손함을 배웠으며 인생의 즐거움을 경험할 수 있었습니다. 이 모든 것을 항상 간직하며 살도록 하겠습니다. 그리고 바쁘신 와중에도 저의 학위논문 심사를 맡아주신 국립수산과학원 한현섭 사료연구센터장님, 강원대학교 김정대 교수님, 박상률 교수님, 김성삼 박사님에게 진심으로 감사의 말씀을 드립니다. 또한, 학부부터 박사과정 동안 참된 가르침을 전해 주신 송춘복 교수님, 최광식 교수님, 이제희 교수님, 여인규 교수님, 허문수 교수님, 김기영 교수님, 전유진 교수님, 정준범 교수님, 정석근 교수님, 박상률 교수님에게 진심으로 감사의 말씀을 드립니다. 학위과정과 직장생활에 도움을 주신 국립수산과학원 김강웅 박사님, 김경덕 박사님에게도 감사의 말씀을 드립니다.

박사과정 동안 연구를 무사히 마칠 수 있게 도와주신 양어사료영양학연구실원 모두에게 감사의 말씀을 전합니다. 인생 선배로써 많은 조언을 아끼지 않으셨던 장계환 선배님과 박영준 선배님, 지금은 사회에 나가 연구자의 길을 걷고 있는 임세진 박사님, 이봉주 박사님, 김성삼 박사님, 오대한 박사님과 그리고 저와 같이 졸업한 차지훈 선배님과 Samad와 Sanaz 부부에게 감사의 말씀을 전합니다. 그리고 듬직하고 믿음이 가는 김민기 후배님, 똑소리 나는 이초룡 후배님, 뽀글뽀글하지만 할건하는 김유정 후배님, 언제나 학부생이지만 부지런한 신재형 후배님에게 감사의 말씀을 전하며 언젠가는 이 모든 것을 배풀수 있는 선배가 될 것이라고 약속드립니다.

2013년 10월 제주어류양식수협에 취업할 수 있는 기회를 주신 양용웅 조합장님, 항상 자기개발에 집중하라고 당부하신 김광익 상임이사님, 저가 더 발전할 수 있게 자극해주시는 오동훈 본부장님, 학위과정 동안 정말로 많은 배려를 해주신 홍정훈 팀장님, 회사생활에 많은 도움을 주신 김충호 팀장님과 문정만 대리님, 저 대신 많은 일을 해주신 양혁철님, 오영직님, 한현철님, 김영욱님, 고민철님과 동기인 김형석님, 김성엽님, 송성부님, 고원진님, 김수정님에게도 감사의 말씀을 드립니다.

박사과정때 결혼을 승락해주시고 부족한 저를 막내 사위로 받아주신 장인어른과 장모님에게도 감사의 마음을 전합니다. 그리고 항상 헌신적인 사랑으로 아들 하나 잘되기를 바라시던 아버지, 어머니께 깊은 감사를 드리며 평생을 갚아도 부족할 그 은혜 감사히 생각하여 지금부터라도 효도하며 열심히 살아가겠습니다. 그리고 철없는 동생 걱정해주는 누나와 매형에게도 감사의 말씀을 전합니다.

대학교 3학년 때부터 지금까지 학업과 연구에 몰두할 수 있도록 뒷바라지 하느라 너무나도 많은 고생을 시킨 나의 사랑하는 아내 강안나에게 앞으로는 더 행복하고 더 사랑하겠다는 마음을 담아 이 논문을 당신께 받치겠습니다. 단칸방에서부터 시작된 우리의 결혼생활이 앞으로는 더욱 더 빛나도록 열심히 살겠습니다. 제가 살아가는 원동력이자 전부인 사랑하는 딸 송예림과 아들 송유준에게 평생 사랑하고 존중하며, 언제 어디서나 부끄럽지 않은 아버지가 되겠다는 약속을 이 글을 통해 전하겠습니다.

마지막으로, 힘들고 지칠때마다 부담없이 술한잔 기울일 수 있는 소중한 친구들과 동기, 많은 선후배님에게 다시 한번 감사의 말을 전하며 이 글을 마칩니다.