

치어기 조피볼락 *Sebastes schlegeli* 사료내 생균제 첨가효과

이승형, 유광열¹, 최세민², 김강웅², 강용진², 배승철*
부경대학교 양식학과, ¹충남 수산연구소, ²국립수산과학원 양식사료연구센터

Effects of Dietary Probiotics Supplementation on Juvenile Korean Rockfish *Sebastes schlegeli*

Seunghyung Lee, Gwangyeol Yoo¹, Se-Min Choi², Kang Woong Kim², Yong Jin Kang² and Sungchul C. Bai*

Department of Aquaculture / Feeds and Foods Nutrition Research Center,
Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

¹Fishery Research Center, 654-4 Gwandang-Ri, Boryeong-City, Chungnam 355-851, Korea

²Aquafeed Research Center, East Sea Fisheries Research Institute,
National Fisheries Research and Development Institute, Pohang 791-802, Korea

A 12-week feeding trial was conducted to investigate the effects of dietary supplementation of probiotics as a feed additive for juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegeli*. Four experimental diets supplemented with no probiotic (Control), *Bacillus polyfermenticus* (BP), *Bacillus licheniformis* (BL) or *Bacillus polyfermenticus* plus *Saccharomyces cerevisiae* (BP+SC) at 1.0×10^7 CFU/kg diet as a dry-matter (DM) basis were prepared by mixing with a basal diet. After 12 weeks of the feeding trial, fish fed BP+SC diet showed significantly higher weight gain (WG), feed efficiency (FE), specific growth rate (SGR) and protein efficiency ratio (PER) than those of fish fed control diet ($P < 0.05$), however there were no significant differences in WG, FE, SGR and PER among fish fed the BP, BL and BP+SC diets. Fish fed BP and BP+SC diets showed significantly higher condition factor (CF) than that of fish fed control and BL diets. Fish fed BP, BL, BP+SC diets showed significantly higher hepatosomatic index (HSI) than that of fish fed control diet, however there was no significant difference in HSI among fish fed BP, BL and BP+SC diets. Fish fed BP+SC diet showed significantly lower serum glucose than that of fish fed control diet, however there was no significant difference in serum glucose among fish fed BP, BL and BP+SC diets. Fish fed BP+SC diet showed significantly higher respiratory burst activity (NBT assay) than that of the fish fed control and BL diets, however there was no significant difference in NBT assay between fish fed BP and BP+SC diets. Fish fed BP and BL diets showed significantly higher lysozyme activity than that of the fish fed control diet, however there was no significant difference in lysozyme activity among fish fed BP, BL and BP+SC diets. Fish fed BP and BP+SC diets showed significantly lower cumulative mortality than that of the fish fed control diet, however there was no significant difference in cumulative mortality among fish fed BP, BL and BP+SC diets after the challenge test. From these results, dietary *B. polyfermenticus*, *B. licheniformis* and *B. polyfermenticus* plus *S. cerevisiae* supplementation in juvenile Korean rockfish diet could enhance growth performances, non-specific immunities and a higher resistance against the specific pathogen.

Keywords: *Paralichthys olivaceus*, probiotics, growth performances, non-specific immune responses, challenge test, Korean rockfish

서론

양식어류의 종묘생산 및 양성과정에서 고밀도 사육과 영양공급의 불균형 문제로 인하여 생산성저하, 수많은 세균성 질병, 바이러스성 질병 및 기생충성 질병의 발생이 커다란 문제

로 대두되고 있다. 특히, 양식어류의 질병 대책으로서는 미연 방지보다 질병 발생 후에 항생제 및 여러 종류의 화학약품을 사용하고 있으며, 이와 같은 약제의 남용으로 어류에게 스트레스를 주어 면역반응을 감소시킬 뿐만 아니라 환경오염 및 병원체의 내성 증가 문제와 나아가서는 인체에도 영향을 줄 수 있는 가능성 등 많은 문제점을 야기하고 있다(Park, 2004). 이에 국

*Corresponding author: scbai@pknu.ac.kr

내에서는 성장촉진 및 사료효율을 개선하거나 어류의 비특이적 면역반응 및 항산화능을 증강시켜 생산성 향상 및 양식어류의 질병을 예방할 수 있는 사료첨가제의 현장수요가 급증하고 있다. 현재까지 어류에서 연구되어진 면역증강 및 성장촉진 물질로는 성장호르몬, 박테리아구성소, 다당류, 동·식물 추출물, 영양성 요인 등으로 알려져 있다(Chen and Ainsworth, 1992; Sakai et al., 1996; Yoo et al., 2007a, b).

생균제(Probiotics)란 살아있는 미생물 균체를 섭취함으로써 미생물이 분비하는 효소, 유기산, 비타민 및 무독성 항균물질 등에 의한 장내 균총의 정상화는 물론 장질환 치료 및 개선을 목적으로 생산되는 제품을 말하며(Jun et al., 2002), 최근 양식어류의 증육, 사료효율 개선 및 질병예방의 목적으로 사료첨가제로써 많이 연구되고 있다(Shiri Harzevili et al., 1998; Gatesoupe, 1999; Maurilio Lara-Flores et al., 2003; Jeong et al., 2006; Taoka et al., 2006).

조피볼락 *Sebastes schlegeli*은 종묘생산 기술이 확립되고, 질병에 대한 내성이 강하며, 사육관리가 용이하여 국내 주요 양식 대상종으로 각광받는 종이다. 이러한 조피볼락 양식은 1980년대 말부터 시작하여 꾸준한 생산 증대로 국내 해산양식어류 총생산량 91,123톤 중 약 30%를 차지하고 있다(Statistical Year Book of Maritime Affairs and Fisheries, 2005).

본 연구는 국내 주요 양식 대상종인 조피볼락을 대상으로 사료내 생균제 첨가시에 따른 성장, 비특이적 면역반응 및 특정 질병저항성에 미치는 영향을 평가하였다.

재료 및 방법

실험어 사육관리

실험어는 경상북도 포항에 위치한 양식장에서 구입한 후, 국립수산과학원 양식사료연구센터로 운반하였다. 실험사료 및 환경에 적응시키기 위해 2주일간 기초사료를 공급하면서 예비사육을 하였다. 실험어는 평균무게 12.0±0.1g (mean±SD)인 조피볼락을 사용하였으며 500 L 원형수조에 각 실험구 당 각각 20마리씩 3반복으로 무작위 배치하였다. 각 실험수조는 유수식으로 유수량은 2~4 L/min으로 조절하였다. 충분한 산소 공급을 위해 에어스톤을 설치하였으며, 실험기간 동안 평균 수온은 14.5±1.8°C로 전 실험기간 동안 자연수온에 의존 하였다. 실험사료를 1일 2회 여체중의 1.7±0.6%(오전 10시, 오후 4시)씩 총 12주간 공급하였다.

실험사료 및 설계

실험에 사용된 실험사료의 조성표와 일반성분은 Table 1에 나타내었다. 실험사료의 단백질원으로 북양어분(white fish meal), 콘글루텐밀(corn gluten meal), 탈피대두박(dehulled soybean meal)을 사용하였으며, 탄수화물원으로는 밀가루(wheat flour)를, 지질원으로는 고도불포화지방산(n-3 HUFA)이

Table 1. Composition of the basal experimental diets for the Korean rockfish *Sebastes schlegeli* (% of dry-matter basis)

Ingredients	%
White fish meal ¹	35.0
Corn gluten meal ²	15.0
Soybean meal ³	18.0
Wheat meal ⁴	18.0
Squid oil ⁵	7.0
Vitamin premix ⁶	1.0
Mineral premix ⁷	3.0
Cellulose ⁸	3.0
Proximate analysis (% of dry matter basis)	
Moisture	20.5
Crude protein	49.6
Crude lipid	19.1
Crude ash	9.2

¹Suhyup Co. Pusan, Korea.

²Jeil feed Co. Haman, Korea.

³American Soybean Association.

⁴Young Nam Flourmills Co., Pusan, Korea.

⁵E-Wha oil Co., Ltd., Pusan, Korea.

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

⁷Contains(as mg/kg in diets) : NaCl, 437.4; MgSO₄·7H₂O, 1379.8; NaH₂P₄·2H₂O, 877.8; Ca(H₂PO₄)₂·2H₂O, 1366.7; KH₂PO₄, 241.4; ZnSO₄·7H₂O, 226.4; Fe-Citrate, 299; Ca-lactate, 3004; MnSO₄, 0.016; FeSO₄, 0.0378; CuSO₄, 0.00033; Calcium iodate, 0.0006; MgO, 0.00135; NaSeO₃, 0.00025.

⁸United States Biochemical, Cleveland, OH, USA.

다량 함유된 오징어간유(squid liver oil)를 사용하였다. 생균제의 첨가효과를 확인하기 위하여 *Bacillus polyfermenticus* (BP), *Bacillus licheniformis* (BL) 및 복합생균(*Bacillus polyfermenticus* + *Saccharomyces cerevisiae*, BP+SC)을 실험사료 내에 각각 1.0×10⁷ CFU/kg diet 수준으로 첨가하였다. 실험사료의 조단백질 함량은 46.2%, 가용에너지는 16.1 kJ/g(단백질, 16.7 kJ/g; 지질, 37.7 kJ/g; 탄수화물, 16.7 kJ/g)으로 조절하였다(NRC, 1993). 그리고 각 실험사료별 생균제의 첨가량에 따른 가용에너지의 차이는 셀룰로오스(cellulose)를 첨가하여 동일하게 맞추어 주었다. 모든 실험사료는 원료를 혼합한 후 펠렛제조기로 압출성형하였으며, 강제 통풍식 건조기로 건조(15°C, 24시간)시킨 다음 실험어의 크기에 맞도록 입자크기를 1,500 μ m 및 2,000 μ m 표준체(sieve)를 이용하여 고르게 친 후, 밀봉하여 4°C에 냉장보관하면서 사용하였다.

어체측정 및 성분분석

모든 실험에 있어 어체 측정은 2주 간격으로 실시하였으며, 성장률을 측정하기 위하여 24시간 절식시킨 후 MS-222(100 ppm)로 마취시켜 전체무게를 측정하였다. 실험종료 후, 증체율, 사료효율, 일간성장률, 단백질전환효율, 간중량지수, 비만도 및

생존율을 조사하였다. 간중량지수를 구하기 위해 각 수조별로 3마리씩 간의 무게를 측정하였다.

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

각각의 실험종료 후, 증체율 조사와 함께 혈액성분 분석을 위하여 실험어를 채혈하기 전까지 약 24시간 동안 절식시킨 실험어를 각 수조당 3마리씩 무작위로 추출하여 실험어의 미부정맥에서 혈액을 채혈한 후, Micro-hematocrit 방법(Brown, 1980)에 의해 헤마토크리트(hematocrit, PCV)를 측정하고, 동시에 Drabkin's 용액을 사용하여 Cyan-methemoglobin method(Sigma Chemical, St. Louis MO; total hemoglobin procedure No. 525)으로 헤모글로빈(hemoglobin, Hb)을 측정 하였다. 혈청성분의 분석을 위하여 채혈한 혈액을 항응고제가 처리되지 않은 원심분리관에 넣고 실온에 30분간 방치한 후 3,000 g에서 10분간 원심분리하여 냉장보관하면서 16시간 이내에 분석하였다. 혈청 성분은 임상용 kit(아산제약 주식회사, 대한민국)를 사용하여 총단백질(total protein)은 뷰렛법으로, 트라이글라이세라이드(triglyceride)와 글루코스(glucose)는 효소법으로 그리고 GOT (glutamic oxaloacetic acids)와 GPT (glutamic pyruvic acid)는 Reitman-Frankel method로 분석하였다.

비특이적 면역반응

Respiratory burst activity는 Secombes (1990) 방법에 따라 분석하였다. 실험 종료 후 각 수조당 24시간 절식시킨 실험어 3마리를 무작위로 추출하여 측정하였다. 먼저 실험어의 head kidney를 무균적으로 적출하고 teflon-glass homogenizer (099C K4424, Glas-Col, USA)로 분쇄하여 단일 세포 현탁액을 준비하였다. 세포 현탁액은 51% percoll (Sigma Aldrich Co. Ltd) density gradient에 중층하여 4°C, 600 g에서 30분간 원심분리하였다. 실험어의 macrophage 층을 털어내어 5,000 g에서 2분간 원심 분리하여 L-15 medium으로 washing한 다음 최종적으로 L-15 medium에 적정 농도로 현탁시켰다. 96-well culture plate에 세포 현탁액 100 μ L (5×10^5 cells/well)를 각 well에 첨가한 후, NBT (nitroblue tetrazolium, Sigma-Aldrich) 1 mg/mL 첨가하고 PMA (phorbol myristate acetate) 1 μ g/mL로 자극시켜 25°C에서 20분간 반응시켰다. 그 뒤 상등액을 제거하고 well을 70% methanol로 washing 한 뒤 상온에서 자연 건조시켰다. 그 후 2M KOH 120 μ L/mL을 첨가하여 insoluble blue formazan을 수용성으로 변화시키고 DMSO (dimethyl sulphoxide, Sigma-Aldrich) 140 μ L/well를 첨가하였다. 최종적으로 그 plate를 OD 620 nm에서 micro-reader (Packard Spectrocount™)로 측정하

여 실험어의 respiratory burst activity를 분석하였다.

Lysozyme activity를 평가하기위해 24시간 절식시켜 각 수조당 3마리씩 무작위로 추출된 실험어로부터 분리한 혈청 0.1 mL와 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.2)에 *Micrococcus lysodeikticus* (0.2 mg/mL)를 부유시킨 suspension 2 mL와 혼합하였다. 반응은 20°C 조건에서 분광 흡광도계의 흡광도 530 nm에서 0.5분과 4.5분에 측정하였다. Lysozyme의 활성 단위는 분당 0.001의 흡광도 감소를 나타내는 효소의 양으로 정의하였다.

공격실험

12주간의 사육실험 종료 후 24시간 절식시킨 조피볼락 치어 8마리를 사용하였다. 독성이 있는 *Edwardsiella tarda* 부유액 (1.0×10^7 CFU/mL)을 1.5% NaCl이 첨가된 trypticase soy agar (TSA)에 27°C에서 48시간 배양하여 준비하였다. 어류당 박테리아 부유물을 0.1 mL씩 복강주사한 후 폐사를 기록하였다. 폐사어의 폐사원인을 확인하기 위해 매일 폐사된 어체로부터 신장을 채취하여 TSA에 배양하여 *E. tarda*의 존재를 확인하였다.

통계처리

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

결과 및 고찰

12주간의 조피볼락 사육실험 결과(Table 2), 증체율(WG), 사료효율(FE), 일간성장율(SGR) 및 단백질 전환효율(PER)에 있어서 BP+SC를 공급한 실험구가 대조구(Control)에 비하여 유의하게 높게 나타났지만($P < 0.05$), BP, BL 및 BP+SC를 공급한 실험구간에는 증체율, 사료효율, 일간성장율 및 단백질 전환효율에 있어서 유의한 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 사료내 *Streptococcus* spp. 또는 *Bacillus* spp.의 첨가가 무지개 송어, common snook, 틸라피아 및 잉어의 성장을 증가시켰다는 보고와 일치하며(Vaquez-Juarez et al., 1993; Mohanty et al., 1996; Bogut et al., 1998; Kennedy et al., 1998), 그리고 *Saccharomyces cerevisiae*의 첨가가 넙치에 있어 성진촉진 효과가 있다는 연구결과 보고와 일치한다(Taoka et al., 2006). 또한, 터봇 및 틸라피아 사료에 생균제 첨가가 사료효율을 증가시킨다는 보고와도 일치하였다(Naik et al., 1999; De Schrijver and Ollevier, 2000). Bougon et al. (1988) 및 Rychen and Nunes (1994)은 사료내 생균제를 첨가하면 동물에 있어 소화율을 증가시킨다고 보고하였으며, 그 결과로 단백질전환효율, 사료효율 및 성장이 증가한다고 Maurilio Lara-Flores et al. (2003)은 설명하였다. 생존율에 있어서는 모든 실험구간에 있어 유의한 차이가 나타나지 않았다. 한편, 본 실험의 연구결과에 있어 증체

Table 2. Weight gain (WG), feed efficiency (FE), specific growth rate (SGR), protein efficiency rate (PER) and survival for the juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegeli* fed experimental diet for 12 weeks of feeding period¹

	Diets				Pooled SEM ⁸
	Control	BP	BL	BP+SC	
WG(%) ²	86.6 ^b	109 ^{ab}	101 ^{ab}	124 ^a	5.48
FE(%) ³	59.1 ^b	68.0 ^{ab}	66.8 ^{ab}	80.5 ^a	3.17
SGR(% ⁴)	0.74 ^b	0.87 ^{ab}	0.83 ^{ab}	0.96 ^a	0.03
PER(% ⁵)	1.28 ^b	1.47 ^{ab}	1.45 ^{ab}	1.74 ^a	0.07
CF(% ⁶)	1.56 ^c	1.80 ^a	1.69 ^b	1.82 ^a	0.02
HSI(% ⁷)	2.26 ^b	2.43 ^a	2.37 ^a	2.56 ^a	0.15
Survival(%)	91.7	91.7	93.3	91.7	1.31

¹Values are means from triplicate groups of fish where the means in each row with a different superscript are significantly different ($P < 0.05$).

²Weight gain : [(final wt. - initial wt.) / initial wt.] × 100.

³Feed efficiency : (wet weight gain / dry feed intake) × 100.

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

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

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

⁷Hepatosomatic index : (liver weight / body weight) × 100.

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

울과 사료효율은 다른 연구결과(이와 이, 1994)와 비교하여 대체적으로 낮은 증체율과 사료효율을 나타냈다. 이는 사육실험기간 동안 자연수온(14.5±1.8°C)에 의존한 사육수를 사용하므로써 조피볼락의 최적성장에 필요한 사육수온을 제공하지 못하여 위와 같이 비교적 낮은 증체율과 사료효율의 결과를 얻은 것으로 사료된다. 전어체의 일반성분 분석결과 실험사료를 공급한 전 실험구의 전어체내 단백질(58.0±0.17 %, mean±SD of dry matter basis), 지방(21.7±0.05%), 회분(17.8±0.05 %) 및 수분함량(70.1±0.15 %)에 있어 유의한 차이가 나타나지 않았다.

조피볼락 사료내 생균제 첨가가 실험어의 생리 상태에 미치는 영향을 평가하기 위해 혈액성분을 조사하였다(Table 3). 헤모글로빈, 헤마토크리트, GOT, GPT 및 TP는 모든 실험구간에서 유의한 차이가 나타나지 않았다. 그러나 혈청내 glucose (TG)의 함량은 BP+SC를 공급한 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 낮게 나타났으나, BP, BL 및 BP+SC를 공급한 실험구간에는

는 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

조피볼락 사료내 생균제 첨가는 비특이적 면역반응의 평가 척도인 NBT 및 혈청내 lyszyme 활성에 유의하게 높은 결과를 나타내었다(Table 4). Respiratory burst activity (NBT assay)에 있어서 BP+SC를 공급한 실험구가 대조구와 BL 실험사료를 공급한 실험구에 비해 유의하게 높게 나타났으며, BP 및 BP+SC를 공급한 실험구간에는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 혈청의 lysozyme 활성에 있어서는 BP와 BL을 공급한 실험구가 대조구에 비해 유의하게 높게 나타났으며, BP, BL 및 BP+SC를 공급한 실험구간에는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 무지개송어, 터봇 및 유럽산 뱀장어에게 *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Yersinia* spp., *Streptococcus* spp. 및 *Saccharomyces cerevisiae*를 공급하였을 때 비특이적 면역반응을 증가시킨다는 보고와 일치한다(Anderson et al., 1979; Griffin, 1983; Olesen, 1991; Ringø et al., 1996; Austin, 1998;

Table 3. Hematological and serological characteristics of the juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegeli* fed experimental diets for 12 weeks¹

	Diets				Pooled SEM ⁴
	Control	BP	BL	BP+SC	
Hemoglobin (g/dL)	13.9	13.7	13.5	14.0	0.11
Hematocrit (%)	31.8	30.5	31.0	30.8	0.26
Serum GOT (IU/L) ²	16.2	16.1	16.4	15.2	0.44
Serum GPT (IU/L) ³	11.4	10.2	11.2	10.4	0.25
Serum Total protein (g/dL)	4.71	4.85	4.73	4.91	0.06
Serum glucose (mg/dL)	61.3 ^a	48.7 ^{ab}	50.2 ^{ab}	38.8 ^b	2.80

¹Values are means from triplicate groups of fish where the means in each row with a different superscript are significantly different ($P < 0.05$).

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

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

⁴Pooled standard error of mean: SD/ \sqrt{n} .

Table 4. Non-specific immune factors of the juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegeli* fed the experimental diets for 12 weeks¹

Diets	NBT (O.D/10 ⁶ cells)	Lysozyme activity (U/mL)
Control	0.19 ^b	54.5 ^b
BP	0.30 ^{ab}	98.7 ^a
BL	0.26 ^b	97.2 ^a
BP+SC	0.40 ^a	75.2 ^{ab}
Pooled SEM ²	0.03	9.61

¹Values are means from triplicate groups of fish where the means in each column with a different superscript are significantly different ($P<0.05$).
²Pooled standard error of mean: SD/\sqrt{n}

Table 5. Cumulative mortality (%) after intraperitoneal injection of *Edwardsiella tarda* in cultured the juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegeli*¹

Days	Diets				Pooled SEM ²
	Control	BP	BL	BP+SC	
6	50.0 ^a	38.9 ^{ab}	36.1 ^{ab}	25.0 ^b	3.91
7	61.1 ^a	41.7 ^a	44.4 ^a	33.3 ^a	5.18
8	66.7 ^a	47.2 ^{ab}	50.0 ^{ab}	36.1 ^b	5.13
9	77.8 ^a	55.6 ^{ab}	50.0 ^{ab}	36.1 ^b	6.19
10	91.7 ^a	66.7 ^{ab}	55.6 ^b	47.2 ^b	6.14
11	100 ^a	72.2 ^b	75.0 ^{ab}	55.6 ^b	5.84

¹Values are means from triplicate groups of fish where the means in each row with a different superscript are significantly different ($P<0.05$).
²Pooled standard error of mean: SD/\sqrt{n} .

O'Sullivan, 1999; Chang and Liu, 2002; Jeong et al., 2006; Taoka et al., 2006). 이것은 아마도 여체내에서 생균제가 항산화와 관련된 효소의 활성화에 직간접적으로 영향을 끼쳐, 이를 통해 산소 래디칼을 중화시키는 것으로 여겨지며, 이로 인해 식세포의 호흡폭발시 발생하는 ROIs (reactive oxygen intermediates)의 생성에도 영향을 미친 것으로 사료된다. 그리고 어류의 lysozyme은 항생물질과 같은 성상을 나타내는 임파구 유래의 점액 용균성 효소로 혈청과 점액 및 특정한 조직 안에서 발견되고 있으며 호중구 및 단구에서 주로 생산되고 macrophage에서는 소량밖에 검출되지 않는다(Hansen, 1974). 그러므로 lysozyme은 어류에 있어 기생성, 세균성 및 바이러스성 감염에 대하여 내인성 방어기구의 일부가 된다(Ingram, 1980). 이러한 생균제의 비특이적 면역 반응 증대 효과가 공격실험에서 낮은 폐사율을 나타내는데 기인하는 것으로 사료된다.

공격실험 결과(Table 5, Fig. 1), 폐사는 *Edwardsiella tarda*를 접종한지 1일 후부터 시작하여 11일째 종료 하였다. 생균제를 투여한 모든 실험구가 대조구에 비해 초기폐사율이 낮게 나타났다. 공격실험을 실시한 후 8일째부터 종료시까지는 BP+SC를 공급한 실험구가 대조구에 비해 유의하게 낮게 나타났으며, BP, BL 및 BP+SC를 공급한 실험구간에는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 치어기 넙치 사료내 *S. cerevisiae*를 첨가하여 50일 동안 사육한 실험구에 *Vibrio anguillarum* (2×10^7 CFU/mL)

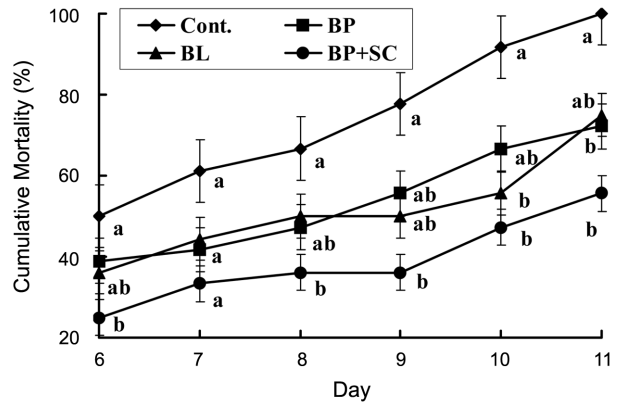


Fig. 1. Cumulative mortality (%) after intraperitoneal injection of *Edwardsiella tarda* in cultured Korean rockfish *Sebastes schlegeli*.

를 접종 하여 공격실험을 수행한 결과 생균제를 첨가하지 않은 대조구보다 유의하게 낮은 폐사율을 보였으며(Taoka et al., 2006) 또한, 치어기 넙치 사료내 *Bacillus* spp. 와 *S. cerevisiae*를 첨가하여 8주 동안 사육한 실험구에 *E. tarda*를 접종 후 누적폐사율은 생균제를 첨가하지 않은 대조구보다 유의하게 낮은 결과를 나타내어(Jeong et al., 2006), 본 연구결과와 매우 유사한 결과를 보여주었다.

본 실험의 결과를 통해 *B. polyfermenticus*, *B. licheniformis* 및 *B. polyfermenticus* 와 *S. cerevisiae*의 혼합첨가는 조피볼락의 성장 및 사료효율을 증가 시키며 또한, 비특이적 면역반응을 증가시켜 *E. tarda*에 대한 질병저항성을 향상시켜 사료첨가제로 사용이 가능함을 보여주었다. 그러나, 상기 실험은 실험어 및 미생물들의 활성이 가장 낮은 시기(겨울-저수온기)에 국한이 되어, 앞으로 사육수온별 실험 또는 장기 사육 실험이 수행되고 사료내 적정 첨가량을 규명하여 첨가제로써 사용한다면 고품질 배합사료 개발 및 양식생산성 향상에 크게 기여할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 치어기 조피볼락 *Sebastes schlegeli* 사료내 생균제 첨가가 넙치의 성장 및 면역반응에 미치는 영향을 평가하였다. 실험사료는 주 단백질원으로 북양어분(white fish meal), 콘글루텐밀(corn gluten meal), 탈피대두박(dehulled soybean meal)을 사용하였으며, 탄수화물원으로는 밀가루(wheat flour)를, 지질원으로는 고도불포화지방산(n-3 HUFA)이 다량 함유된 오징어간유(squid liver oil)를 사용하였다. 생균제의 첨가효과를 확인하기 위하여 *B. polyfermenticus* (BP), *Bacillus licheniformis* (BL) 및 복합종균(*B. polyfermenticus* + *Saccharomyces cerevisiae*; BP+SC)을 실험사료 내에 각각 1.0×10^7 CFU/kg diet 수준으로 첨가하였다. 2주간의 예비사육 후, 평균무게 12.0 ± 0.1 g (mean \pm SD)인 조피볼락을 500 L 원형수조에 각 실험구 당 각각 20마리씩

3반복으로 무작위로 배치하였고, 실험사료는 1일 2회 어체중의 1.7±0.6%(오전 10시, 오후 4시)씩 12주간 공급 하였다.

증체율, 사료효율, 일간성장을 및 단백질 전환효율에 있어서 BP+SC를 공급한 실험구가 대조구(control)에 비하여 유의하게 높게 나타났지만($P<0.05$), BP, BL 및 BP+SC를 공급한 실험구 간에는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 생존율에 있어서는 모든 실험구간에 있어 유의한 차이가 나타나지 않았다. 전어체 지방함량에 있어서 대조구가 다른 모든 실험구에 비해 높게 나타났으며, 전어체 단백질, 회분 및 수분함량에 있어서는 모든 실험구간에 유의한 차이가 없었다. 혈액분석에 있어서 혈장내 glucose의 함량은 BP+SC를 공급한 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 낮게 나타났으나, BP, BL 및 BP+SC를 공급한 실험구간에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

Respiratory burst activity (NBT assay)에 있어서 BP+SC와 BL을 공급한 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 낮게 나타났으며, BP, BL 및 BP+SC를 공급한 실험구간에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 혈청의 lysozyme 활성에 있어서는 BP와 BL을 공급한 실험구가 대조구에 비해 높게 나타났으며, BP, BL 및 BP+SC를 공급한 실험구간에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

공격실험 결과, 폐사는 *Edwardsiella tarda*를 접종한지 1일 후부터 시작하여 11일째 종료 하였다. 생균제를 투여한 모든 실험구가 대조구에 비해 초기폐사율이 낮게 나타났다. 공격실험 후 8일째부터 종료시 까지는 BP+SC를 공급한 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 낮게 나타났으며, BP, BL 및 BP+SC를 공급한 실험구간에는 유의한 차이가 나타나지 않았다.

상기 결과를 토대로, 조피볼락 사료내 *B. polyfermenticus*, *B. licheniformis* 및 *B. polyfermenticus* 와 *S. cerevisiae*의 혼합첨가는 조피볼락의 성장 및 사료효율 증진과 항산화능 및 특정 질병저항성에 좋은 효과를 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

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

참고문헌

- Anderson, D. P., B. S. Robertson and O. W. Dickson, 1979. Cellular immune response in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson to *Yersinia ruckeri* O-antigen monitored by the passive haemolytic plaque assay test. *J. Fish Dis.*, 2(3), 169–178.
- Austin, B., 1998. Biotechnology and diagnosis and control of fish pathogens. *J. Mar. Biotechnol.* 6, 1–2.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2000. Cunniff, P.(ed.), Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 16th edition. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, VA.
- Bogut, I., Z. Milakovic, Z. Bukvic, S. Brkic and R. Zimmer, 1998. Influence of probiotic (*Streptococcus faecium* M74) on growth and content of intestinal microflora in carp (*Cyprinus carpio*). *Czech. J. Anim. Sci.*, 43, 231–235.
- Bougon, M., M. Launay and M. Le Menec, 1988. Influence d'un probiotique, l'Biocroissance, sur les performances des poudeuses. *Bull. Inf. Stn. Exp. Avicult. Ploufragan* 28, 110–115.
- Brown, B. A., 1980. Routine hematology procedures. (in) Hematology: Principles and Procedures. pp. 71–112. Lea and Febiger, Philadelphia. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.*, 12, 1–4.
- Chang, C. I. and W. Y. Liu, 2002. An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing *Edwardsiellosis* in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. *J. Fish Dis.*, 25, 311–315.
- Chen, D. and A. J. Ainsworth, 1992. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinequ. *J. Fish Dis.*, 15, 295–304.
- De Schrijver, R. and F. Ollevier, 2000. Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. *Aquaculture*, 186, 107–116.
- Gatesoupe, F. J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180, 147–165.
- Griffin, B. R., 1983. Opsonic effect of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) antibody on phagocytosis of *Yersinia ruckeri* by trout leukocytes. *Develop. and Comp. Immunol.*, 7, 253–259.
- Hansen, N. E., 1974. Plasma lysozyme a measure of neutrophil turnover. An analytical review. *Acta Haematol.*, 7, 7–87.
- Ingram, G. A., 1980. Substances involved in the natural resistance of fish to infection - a review. *J. Fish Biol.*, 16(1), 23–60.
- Jeong, C. W., H. J. Choi, G. Yoo, S. Lee, Y. C. Kim, O. E. Okorie, J. H. Lee, K. D. Jun, S. M. Choi, K. W. Kim, Y. J. Kang, J. C. Kang, I. S. Kong and S. C. Bai, 2006. Effects of dietary probiotics supplementation on juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Kor. Fish. Soc.*, 39(6), 460–465.
- Jun, K. D., H. J. Kim, K. H. Lee, H. D. Paik and J. S. Kang, 2002. Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD as a probiotic. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, 30(4), 359–366.
- Kennedy, S. B., J. W. Tucker, C. L. Neidic, G. K. Vermeer, V. R. Cooper, J. L. Jarrell and D. G. Sennett, 1998. Bacterial management strategies for stock enhancement of warm water marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). *Bull. Mar. Sci.*, 62, 573–588.
- Lee, S. M. and J. Y. Lee, 1994. Effect of dietary α -cellulose levels on the growth, feed efficiency and body composition in Korean rockfish, *Seabastes schlegeli*. *J. Aquacult.*, 7(2), 97–107.
- Maurilio, Lara-Flores, M. A. Olvera-Novoa, B. E. Guzman-Mendez and W. Lopez-Madrid. 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216, 193–201.
- Mohanty, S. N., S. K. Swain and S. D. Tripathi, 1996. Rearing of catla (*Catla catla* Ham.) spawn on formulated diets. *J. Aquac-*

- ult. Tropics, 11, 253–258.
- Naik, A. T. R., H. S. Murthy and T. J. Ramesha, 1999. Effect of graded levels of G-probiotic on growth, survival and feed conversion of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Fish. Technol., 36, 63–66.
- NRC (National Research Council), 1993. Nutrient Requirements of Warmwater Fishes and Shellfishes. National Acad. Press, Washington, D.C., 102 pp.
- Olesen, N. J., 1991. Detection of the antibody response in rainbow trout following immersion vaccination with *Yersinia ruckeri* bacterin by ELISA. J. Appl. Ichthyol., 7, 36–43.
- O'Sullivan, D. J., 1999. Methods of analysis of the intestinal microflora. (in) Tannock, G.W. (ed.), Probiotics: A critical review. Horizon Scientific Press, Wyomndham, England, pp. 23–44.
- Park, G. J., 2004. Development of the growth and immune stimulants in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Ph.D. thesis Pukyong National University, Busan, Korea.
- Ringø, E., T. H. Birkbeck, P. D. Munro, O. Vadstein, K. Hjelmeland, 1996. The effect of early exposure to *Vibrio pelagius* on the aerobic bacterial flora of turbot, *Scophthalmus maximus* L. larvae. J. Appl. Bacteriol., 81, 207–211.
- Rychen, G. and S. Nunes, 1994. Effects of three microbial probiotics on postprandial concentration differences of glucose, galactose and amino-nitrogen in the young pig. Rep. Cent. Recher. Nut. Anim. Soc. Chimi Roche, pp. 107–111.
- Sakai, M., M. Kobayashi and H. Kawauchi, 1996. Mitogenic effects of growth hormone and prolactin on chum salmon, *Onchorhynchus keta* leucocytes in vitro. Vet. Immunol. Immunopathol., 53, 185–190.
- Secombes C. J., 1990. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their Killing Activity. (in) J. S. Stolen, T. C. Fletcher, D. P. Anderson, B. S. Roberson and W. B. van Muiswinkel (eds.), Techniques in Fish Immunology, No. 1, SOS Publications, pp. 137–154.
- Shiri Harzevili, A. R., H. Van Duffel, P. Dhert, J. Swings, and P. Sorgeloos, 1998. Use of a potential probiotic *Lactococcus lactis* AR21 strain for the enhancement of growth in the rotifer *Brachionus plicatilis* Muller. Aquacult. Res., 29, 411–417.
- Statistical Year Book of Maritime Affairs and Fisheries, 2005. Statistical year book maritime affairs and fisheries. Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, Korea.
- Taoka, Y., H. Maeda, J. Y. Jo, M. J. Jeon, S. C. Bai, W. J. Lee, K. Yuge and S. Koshio, 2006. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. Fish. Sci., 72, 310–321.
- Vaquez-Juarez, R., F. Ascensio, T. Andlid, L. Gustafsson and T. Wadstrom, 1993. The expression of potential colonisation factors of yeasts isolated from fish during different growth conditions. Can. J. Microbiol., 39, 1135–1141.
- Yoo, G., S. Lee, Y. C. Kim, Y. C. Kim, O. E. Okorie, G. J. Park, Y. O. Han, S. M. Choi, J. C. Kang, M. Sun and S. C. Bai, 2007a. Effects of dietary β -1,3 glucan and feed stimulants in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. World Aquacult. Soc., 38(1), 138–145.
- Yoo, G., S. Lee, G. J. Park, S. M. Choi, O. E. Okorie, Y. C. Kim, K. W. Kim, Y. J. Kang and S. C. Bai, 2007b. Effects of dietary recombinant bovine somatotropin levels on growth, plasma recombinant bovine somatotropin concentrations, and body composition of juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. J. World Aquacult. Soc., 38(2), 200–207.

원고접수 : 2008년 3월 11일

심사완료 : 2008년 5월 7일

수정본 수리 : 2008년 5월 11일