

# 저수온기(13-15°C) 치어기 참돔(*Pagrus major*) 사료 내 비타민 C 대체제로써의 감귤착즙박 및 발효감귤착즙박의 이용 가능성

이초롱 · 김유정 · 이경준\*

제주대학교 해양생명과학과

## Dietary Supplementation of Citrus and Fermented Citrus By-product for Juvenile Red Seabream *Pagrus major* at Low Water Temperature

Chorong Lee, Youjeong Kim and Kyeong-Jun Lee\*

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

This study compared the effects of dietary supplementation of citrus by-product (CBP) and CBP fermented with *Bacillus subtilis* (F-CBP) on growth performance, feed utilization, intestinal histology and innate immunity of red seabream *Pagrus major* with three commercial immune-boosting products. The six experimental diets were supplemented with L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP; the control diet), CBP or F-CBP at a concentration of 100 mg vitamin C equivalent/kg diet or one of three commercial immune boosters. The Experimental diets were fed to triplicate groups of 17 fish (initial body weight, 116 g) for 8 weeks. The water temperature during the feeding trial was maintained at 13-15°C. Growth and feed utilization did not differ significantly among the six dietary treatments, nor did the phagocytic activity, superoxide dismutase or total immunoglobulin concentrations. However, myeloperoxidase activity was significantly higher in the CBP groups. For the intestinal histology, the intestine diameter, villi and enterocyte heights and number of goblet cells did not differ significantly among groups. Therefore, CBP or F-CBP can be used as a valuable eco-friendly byproduct in diets for fishes including red seabream to maintain their normal growth and health.

Key words: Citrus byproduct, Fermented citrus byproduct, Immunity, Red seabream, Vitamin C

### 서론

비타민C(L-ascorbic acid, AA)는 어류를 포함한 대부분의 동물 성장에 매우 중요한 역할을 한다(Lin and Shiau, 2005). 비타민C는 온도, 산소, 빛과 같은 환경조건에 매우 불안정하여 사료 압출과정 동안 상당량이 파괴되기 때문에(Soliman et al., 1987), 인산염이나 황산염과 결합된 안정적인 형태의 비타민 C 원료에 대한 연구가 오랫동안 진행되어 오고 있다(Lim et al., 2000).

감귤착즙박(Citrus byproduct, CBP)이란 감귤 가공과정에서 생겨나는 부산물로, 감귤과피나 내피 등의 찌꺼기로 구성된다. 국내에서의 감귤은 연간 75만 톤이 생산되고 15만 톤이 음료가 공용으로 가공되며, 그 중 50%가 부산물로 발생되어 폐기처분

됨에 따라 경제적, 환경적 측면에서 문제점이 야기되고 있다. CBP는 비타민 C (>50 mg AA/100 g), carotenoids (500 mg carotenoid/kg), bioflavonoids 및 pectin이 풍부하게 함유되어 있어 면역증강 및 항산화제로써의 이용가치가 높다고 보고되었으며(Rural development administration, 2012), 심장 질환 및 항염증에 대한 개선효과 등 다양한 생리적 작용이 보고되고 있다(Kim et al., 1999). 따라서 CBP를 이용하여 배합사료 내 값 비싼 원료인 비타민 C를 부분 혹은 완전 대체함으로써 양식생산 비용의 60%에 이르는 양어사료 비용을 절감할 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

병원성 미생물에 의한 어류 질병의 발병은 국내 전체 양식 산업에 막대한 피해와 손실을 가져오는 요인이 되고 있어, 최근에는 병원생물에 대한 자체방어능력을 향상시키기 위해 비특이

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2015.0454>



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

Korean J Fish Aquat Sci 48(4) 454-458, August 2015

Received 8 June 2015; Revised 13 August 2015; Accepted 17 August 2015

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

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

적 면역증강을 위한 사료첨가제에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Khosravi et al., 2015). 양어사료에서는 면역증강용으로 CBP 를 사용한 연구결과가 겨우 몇 편 보고되었을 뿐(Lee et al., 2013) 비타민 C 대체제로써의 CBP에 대한 연구는 전무한 실정이다.

최근 양어사료 내 식물성단백질 원료의 발효효과에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Ding et al., 2015). 발효물질에서는 분해작용으로 생산된 폴리페놀계 화합물인 isoflavone이 높은 함량으로 존재하게 되는데, 이는 미생물의 분해 작용으로 isoflavone이 다당체로부터 유리되어 그 이용 흡수가 용이하기 때문이라고 보고되었다(Lee et al., 2005). 이러한 장점으로 일반 감귤착즙박을 여러 유용균주로 발효시켜 사용한다면 항산화 및 비특이적 면역력과 같은 생리활성을 촉진시키는 기능성 첨가제로써의 이용효과가 더욱 클 것으로 추측된다(Lim and Lee, 2011). 따라서 이 연구는 사료섭이가 떨어지는 저수온기에서의 참돔을 대상으로 사료 내 감귤착즙박과 발효감귤착즙박의 비타민 C 대체제로서의 첨가 가능성과 그 효능을 알아보고자 실시되었다. 양어사료에 일반적으로 사용되는 비타민 C 및 시판용 면역증강 사료첨가제들과의 직접적인 비교를 위해 성장률, 사료효율, 비특이적 면역력 및 조직학적 분석을 실시 하였다.

### 재료 및 방법

#### 감귤착즙박 및 실험사료

실험사료의 동물성 단백질원으로는 Brown Fish meal (Prime grade, Chile)을, 식물성 단백질원으로는 콘글루텐밀과 탈지대두박을 사용하였으며, 지질원으로 오징어간유를 사용하였다. 본 실험에 사용된 감귤착즙박 시료는 (주)일해공장(제주도 조천읍 와흘리)에서 주스 착즙 후 배출되는 감귤부산물을 제공받아 제주대학교 양어사료영양학연구실로 가져와 동결건조 후 분쇄하여 사용하였다. 감귤착즙박의 발효에는 *Bacillus subtilis* 균주가 사용되었다. *B. subtilis* 균주를 Nutrient borth (NB, Difco, USA) 에 30℃에서 3일간 호기적 조건으로 교반 배양한 후 감귤배지에 접종하고 균 농도가  $1.0 \times 10^3$  CFU/mL가 되도록 멸균 생리식염수를 이용하여 단계희석 하였다. 그 후 감귤배지에 2.5%가 되게 접종하여 *B. subtilis*의 최적 생육온도인 30℃에서 72시간 동안 발효시켜 발효감귤착즙박(fermented CBP, F-CBP)을 제조 하였다. 이렇게 발효된 발효감귤착즙박을 24시간 동안 동결건조 한 후 분쇄하여 실험에 사용하였다. 사양실험에 사용된 감귤착즙박 및 발효감귤착즙박의 비타민 C 함량은 각각 3,400과 3,000 µg AA/g diet으로 나타났으며, 실험사료 내 비타민 C 함량은 100 µg AA/g diet 이 되도록 설계하였다. 세가지 시판용 면역증강 첨가제품들의 첨가함량은 제품회사의 제안 첨가량에 맞추어 첨가하였다.

사양실험을 위한 실험사료(Table 1)는 비타민 C, CBP, F-CBP, 시판제품 A, 시판제품 B 및 시판제품 C를 적정량 첨가하

Table 1. Formulation and proximate composition of experimental diets for red seabream *Pagrus major* (% dry matter)

Ingredient	Experiment diets					
	LAPP	CBP	F-CBP	COM-A	COM-B	COM-C
Brown fish meal	45.0	45.0	45.0	45.0	45.0	45.0
Corn gluten meal	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Soybean meal	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00
Wheat flour	26.0	23.1	22.7	25.9	25.5	25.7
Squid liver oil	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Vitamin Mix <sup>1</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Mineral Mix <sup>2</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
LAPP <sup>3</sup>	0.0285	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
CBP <sup>4</sup>	0.00	2.90	0.00	0.00	0.00	0.00
F-CBP <sup>5</sup>	0.00	0.00	3.30	0.00	0.00	0.00
COM-A <sup>6</sup>	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00
COM-B <sup>7</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	0.00
COM-C <sup>8</sup>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.30
Dietary nutrient composition (%)						
Protein	46.9	46.8	46.5	46.9	46.8	46.9
Lipid	14.7	14.8	14.7	14.7	14.7	14.7
Ash	9.60	9.80	9.30	9.60	9.60	9.60
Energy, MJ/kg diet	17.9	17.9	18.0	17.9	17.9	17.9
Total ascorbic acid (mg/kg) <sup>9</sup>	115	105	112	21.4	20.9	123

<sup>1</sup>Vitamin 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.

<sup>2</sup>Mineral Premix (g/kg of mixture): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 80.0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 370.0; KCL, 130.0; Ferric citrate, 40.0; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 20.0; Ca-lactate, 356.5; CuCl<sub>2</sub>, 0.2; AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.15; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 0.01; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2.0; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.0.

<sup>3</sup>L-ascorbic acid: Sigma Chemicals (350,000 ppm)

<sup>4</sup>Citrus by-product: ILHAE Corporation

<sup>5</sup>Fermented CBP with *Bacillus subtilis*

<sup>6</sup>CTCbio corporation

<sup>7</sup>Samjo life science corporation

<sup>8</sup>Changjobio corporation

<sup>9</sup>Total ascorbic acid (TAA) was determined by dinitrophenylhydrazine spectrophotometric method described Dabrowski and Hinterleitner (1989).

면서 총 6 개를 제작하였다(각각 LAPP, CBP, FCBP, COM-A, COM-B and COM-C로 명명).

### 실험어 및 사육관리

참돔 치어는 경상남도 고성군에 위치한 종묘장에서 구입하여 제주대학교 소속 해양과학연구소로 운송되었다. 3주 동안 동일한 양의 시판 배합사료를 공급하면서 실험환경에 적응 할 수 있도록 순치시킨 후 실험에 사용하였다. 실험어류(초기평균무게:  $116 \pm 2.28$  g)는 총 18개의 150 L 원형 폴리프로필렌 수조에 각 수조당 17마리씩 무작위로 배치하였다. 사육수는 모래여과 해수를 사용하여 2-3 L/min의 유수량이 공급 되도록 조절하였고 모든 실험수조에 충분한 용존산소 유지를 위하여 에어스톤을 설치하였다. 사육수온은 저수온기 자연수온( $13-15^\circ\text{C}$ )에 의존하였으며, 실험사료공급은 1일 2회(08:00와 17:00)에 나누어서 8주 동안 매일 반복공급을 하였다.

### 어체측정 및 분석

실험어의 무게는 3 주마다 측정하였고, 측정 24 시간 전에 실험어류의 스트레스를 줄이기 위해 절식시켰다. 실험종료 후 어류의 최종무게와 사료공급량을 측정하여 증체율, 일간성장률, 사료전환효율, 사료섭이량, 단백질이용효율 및 생존율을 계산하였다. 최종 무게측정 후, 각 수조당 8 마리의 실험어를 무작위로 선별하여 2-phenoxyethanol 용액(200 ppm)으로 마취시킨 후 6 마리 중 3 마리는 헤파린이 처리된 주사기로 꼬리 미병부에서 채혈하였다. 채혈된 전혈은 대식세포활성(nitroblue-tetrazolium, NBT) 분석에 이용하였다. 남은 3마리의 혈액은 헤파린이 처리되지 않은 주사기로 채혈하였고, 채혈된 전혈은 상온에서 60분간 방치시킨 후 원심분리기로(5,000 g) 혈청을 분리하여 비특이적 면역력 분석을 실시하였다. 실험사료의 일반성분분석은 AOAC (1995) 방법으로 분석하였으며, 실험사료의 비타민 C 분석은 Dabrowsik and Hinterleitner (1989)

의 분석방법을 이용하였다. 혈액 내 대식세포활성(Nitro-blue tetrazolium, NBT)과 혈청 내 myeloperoxidase (MPO) 활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 분석방법으로 측정하였다. 혈청 내 superoxide dismutase (SOD)활성은 SOD assay kit (Sigma, 19160)로 분석하였다. 혈청 내 total immunoglobulin 함량분석은 Siwicki and Anderson (1993)의 방법을 토대로 분석하였다.

실험사료의 배치는 완전확률계획법(Completely randomized design)을 실시하였으며, 분석결과는 SPSS (Version 12.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석하였다. 데이터 값의 유의차는 Tukey (HSD)로 비교하였다. 데이터는 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 백분율데이터는 arcsine 변형 값으로 통계분석 하였다.

### 결과 및 고찰

8주간의 사육실험 종료 후 최종무게, 증체율, 일간성장률, 사료전환효율, 사료섭이량, 단백질이용효율, 생존율 결과에서는 모든 그룹에서 유의적인 차이가 없었다(Table 2). 이러한 성장 결과는 감귤착즙박이 양어 사료에 기존의 비타민 C의 대체재로 사용 가능함을 간접적으로 보여주는 결과라 하겠다. 참돔을 대상으로 한 9주간의 연구(Song et al., 2013)에서도 감귤착즙박과 발효감귤착즙박의 이용가능성이 제기된 바 있었다. 본 연구에서의 낮은 성장률은 저수온기( $13-15^\circ\text{C}$ ) 환경에서 사육실험이 이루어졌기 때문으로 저수온 및 고수온기에서의 사료공급 실험이 요구된다고 할 수 있겠다.

면역분석 결과, MPO를 제외한 모든 실험구에서 유의적인 차이는 없었다(Table 3). MPO는 호중구와 호중구 전구세포, 호염기구와 전구세포, 호산구와 전구세포에 존재하는 골수세포형 과산화효소로서 특히 호중구에 가장 풍부하게 존재하며, 항균작용을 지닌 효소이다. MPO는 산소소비의 일시적인 증가 과정에서 생성되는 hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )와 chloride anion

Table 2. Growth performance of red seabream (*Pagrus major*, initial BW: 116 g) fed experimental diets for 8 weeks

	FBW <sup>1</sup> (g)	SGR <sup>2</sup> (%)	FCR <sup>3</sup>	FI <sup>4</sup>	PER <sup>5</sup>	Survival (%)
LAPP	148±2.10	0.49±0.01	1.14±0.02	39.9±2.45	1.87±0.04	98.0±3.40
CBP	152±6.99	0.49±0.08	1.17±0.18	41.7±2.87	1.86±0.30	88.2±20.9
F-CBP	152±8.16	0.48±0.08	1.30±0.30	44.2±1.73	1.71±0.35	96.1±6.79
COM-A	159±6.88	0.54±0.04	1.06±0.06	45.4±1.02	2.01±0.11	92.2±6.79
COM-B	158±0.98	0.51±0.05	1.16±0.15	45.1±1.05	1.87±0.24	98.0±3.40
COM-C	160±3.23	0.54±0.03	1.02±0.05	43.4±3.30	2.09±0.11	100±0.00

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

<sup>1</sup>FBW=Final body weight

<sup>2</sup>Specific growth rate =  $[(\log_e \text{ final body weight} - \log_e \text{ initial body weight})/\text{days}] \times 100$

<sup>3</sup>Feed conversion ratio = dry feed fed/wet weight gain

<sup>4</sup>Feed intake (g/fish) = dry feed consumed (g)/ fish

<sup>5</sup>Protein efficiency ratio = fish weight gain (g)/ protein



Table 3. Nitro blue tetrazolium (NBT), myeloperoxidase (MPO), superoxide dismutase (SOD) and immunoglobulin (Ig) of fed red seabream *Pagrus major* six experimental diets for 8 weeks

	NBT (OD)	MPO	SOD	Ig
LAPP	0.87±0.17	1.17±0.08 <sup>ab</sup>	32.5±4.71	21.9±2.64
CBP	0.87±0.14	1.43±0.23 <sup>b</sup>	38.0±7.59	18.9±2.19
F-CBP	0.88±0.06	1.19±0.08 <sup>ab</sup>	37.7±8.07	25.4±3.50
COM-A	0.89±0.07	0.97±0.03 <sup>a</sup>	28.9±1.24	21.8±1.66
COM-B	0.88±0.06	1.14±0.18 <sup>ab</sup>	40.2±5.00	23.8±6.45
COM-C	0.87±0.04	1.16±0.10 <sup>ab</sup>	37.4±1.34	24.4±1.75

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

(Cl)에서부터 hypochlorous acid를 생산하며, hydrogen peroxide를 이용하여 tyrosine을 tyrosyl radical로 산화시킨다. 이렇게 생산된 hypochlorous acid와 tyrosyl radical은 세포독성을 가지고 있어, 과립백혈구들은 이러한 물질들을 이용하여 병원체 균들을 사멸시키게 된다(Kumari and Sahoo, 2005). 그러므로 생체 내 높은 함량의 MPO는 hypochlorous acid 과 tyrosyl radical 생산을 통해 병원체에 대한 항균효과를 증폭시켜 비특이적 면역반응을 증가시키게 된다. 분석결과, CBP 실험구에서 COM-A 실험구와 비교하여 유의적으로 높은 MPO 활성을 보였고, CBP, F-CBP 실험구에서 COM-A 실험구보다 경향적으로 높은 SOD 활성을 보였다. 이는 CBP, F-CBP에 함유되어있는 비타민C가 참돔의 면역반응을 향상시킨 것으로 사료된다. 따라서 감귤착즙박은 양어사료 면역증강용 첨가제로도 사용할 것으로 판단된다. 하지만 감귤착즙박을 발효 처리한 효과는 본 연구에서 나타나지 않았다.

8주간의 사육실험 종료 후의 장 상피조직상의 배상세포(goblet cell)의 수 변화를 관찰한 결과(Fig. 1), 유의적인 차이가 없었으며, CBP 및 F-CBP 실험구에서 LAPP 실험구와 비교하여 경향적으로 많은 수의 배상세포 수가 발견되었다(data not provided). 배상세포는 소화기관의 점막주름에 분포하여 점액 물질을 분비하고, 분비된 점액은 소화관 표면에 윤활작용을 하여 음식물을 식도에서 위, 장으로의 이동을 용이하게 하며, 외막과 소화시에 일어날 수 있는 화학적인 손상과 소화효소에 의한 장관벽의 손상을 보호하는 역할을 한다(Allen et al., 1986). 따라서 감귤착즙박을 발효할 때 사용된 대표적인 probiotics인 *B. subtilis*에 의해 장내 유익균의 증식과, 유해세균에 대한 항균력이 활발해져 경향적이지만 높은 수의 배상세포가 발견된 것으로 추측된다.

결론적으로 일반적으로 양어사료에 사용되는 비타민C 및 시판용 세가지 면역증강용 사료첨가제들과 비교해 보았을 때, 성장률, 사료효율, 생존율 및 비특이적 면역력과 조직적 변화에서 감귤착즙박과 발효감귤착즙박 사용상의 아무런 문제점이 발

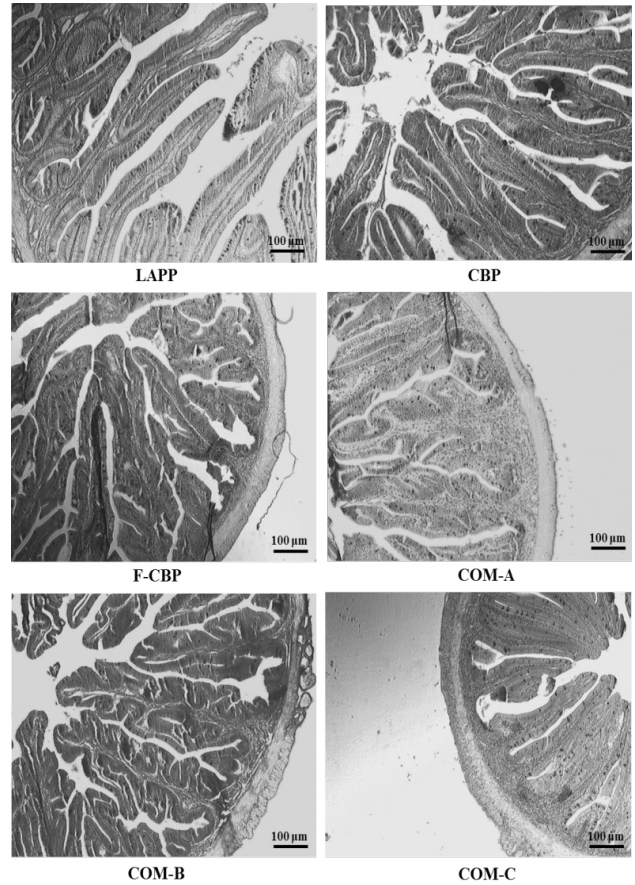


Fig. 1. Changes in number of goblet cells in the intestine of red seabream *Pagrus major* fed the six experimental diets for 8 weeks.

견되지 않았다. 따라서 감귤착즙박은 사료 내 합성 비타민C의 대체품으로 사용가능 할 뿐만 아니라 기능적 천연 면역증강 사료첨가제로 개발될 수 있는 충분한 가능성이 있다고 판단된다.

## 사 사

이 논문은 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2011-0015925).

## References

Allen A, Hutton DA, Leonard AJ, Pearson JP and Sellers LA. 1986. The role of mucus in the protection of the gastroduodenal mucosa. *Scand J Gastroenterol* 21, 71-78.

AOAC. 1995. Official methods of analysis. 16<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, U.S.A, 1298.

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.
- Ding Z, Zhang Y, Ye J, Du Z and Kong Y. 2015. An evaluation of replacing fish meal with fermented soybean meal in the diet of *Macrobrachium nipponense*: Growth, nonspecific immunity, and resistance to *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol* 44, 295-301.
- Khosravi S, Bui HTD, Rahimnejad S, Herault M, Fournier V, Kim SS, Jeong JB and Lee KJ. 2015. Dietary supplementation of marine protein hydrolysates in fish-meal based diets for red sea bream (*Pagrus major*) and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 435, 371-376.
- Kim YD, Kim YJ, Oh SW, Kang YJ and Lee YC. 1999. Antimicrobial activities of solvent extracts from citrus sudachi juice and peel. *Korean J Food Sci Technol* 31, 1613-1618.
- Kurami J and Sahoo PK. 2005. Effects of cyclophosphamide on the immune system and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus*. *Fish Shellfish Immunol* 19, 307-316.
- 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 CH, Yang L, Xu JZ, Yeung SYV, Huang Y and Chen ZY. 2005. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides. *Food Chem* 90, 735-741.
- Lim C, Klesius PH, Li MH and Robinson EH. 2000. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture* 185, 313-327.
- Lim SJ and Lee KJ. 2011. A microbial fermentation of soybean and cottonseed meal increases antioxidant activity and gossypol detoxification in diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J World Aquacult Soc* 42, 494-503.
- Lin MF and Shiau SY. 2005. Dietary L-ascorbic affects growth, nonspecific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture* 244, 215-221.
- Rural development administration. 2012. Retrieved from [http://lib.rda.go.kr/newlib/board/lib\\_board\\_R.asp?bcode=1&articleid=3175](http://lib.rda.go.kr/newlib/board/lib_board_R.asp?bcode=1&articleid=3175).
- Siwicki AK and Anderson DP. 1993. Nonspecific defence mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and monocytes, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum. *Fish Disease Diagnosis and Prevention Methods*. Wydawnictwo Instytutu Rybactwa Strodładowego, Olsztyn, Poland, 105-112.
- Soliman AK, Jauncey K and Roberts RJ. 1987. Stability of L-ascorbic acid (vitamin C) and its forms in fish feeds during processing, storage and leaching. *Aquaculture* 60, 73-83.
- Song JW, Park SH, Lee CR and Lee KJ. 2013. Effects of dietary supplementation of a citrus by-product on growth performance, innate immunity and tolerance of low water temperature in red seabream *Pagrus major*. *Korean J Fish Aquat Sci* 46, 399-406. <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2013.0399>.