

저수온기 치어기 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 사료 내 비타민 C 대체제로서 감귤착즙박의 이용 가능성 및 항생제 대체 효과

김유정 · 이초롱 · 신재형 · 이경준*

제주대학교 해양생명과학과

Effect of Dietary Supplementation with Citrus By-product as a Vitamin C Replacement for Juvenile Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* at Low Water Temperatures

Youjeong Kim, Chorong Lee, Jaehyeong Shin and Kyeong-Jun Lee*

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

This study examined the effects of dietary supplementation with citrus by-product (CBP) on the growth, feed utilization, innate immunity, and histology of the gills and intestine of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* during low water temperature season. A vitamin C-free basal diet was regarded as a control and five other diets were formulated that contained 30 and 300 mg of L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP) or CBP as vitamin C equivalents/kg diet, or the antibiotic oxytetracycline (OTC) (designated as control, LAPP30, LAPP300, CBP30, CBP300, and OTC, respectively). Olive flounder (initial body weight 44.6±0.32 g) were fed the six experimental diets to apparent satiation for 9 weeks. Growth and feed utilization were significantly higher in CBP30 than in the control and LAPP groups. The lysozyme activity was significantly higher in CBP30 than in LAPP300. Enterocyte height was significantly higher in CBP30 than in the control. The number of goblet cells was increased significantly with LAPP30, LAPP300, and CBP30. These results demonstrate that CBP can reduce or replace vitamin C and antibiotic in the diet of olive flounder during the low-water-temperature season. The optimal CBP supplementation level seems to be approximately 1%, which is equivalent to 30 ppm vitamin C/kg in the fish diet.

Key words: Citrus byproduct, Vitamin C, Antibiotics, Feeds, Olive flounder

서론

비타민 C (Vitamin C, L-ascorbic acid)는 대부분의 동·식물에서 정상적인 대사활동을 위한 필수 영양소 중 하나이다(Jaffe, 1984). 사람을 포함한 영장류에서는 비타민 C 합성에 필요한 효소인 L-gulonolactone oxidase가 존재하지 않아 체내 합성이 불가능하며(Woodall and Ames, 1997), 경골어류에서도 합성이 불가능한 것으로 보고되었다(Dabrowski, 1990; Moreau and Dabrowski, 2000). 또한 superoxide와 hydroperoxyl radicals, aqueous peroxy radicals, singlet oxygen, ozone, peroxy-nitrite, nitrogen dioxide, nitroxide radicals 및 hypochlorous acid와 같은 활성 산소와 질소 종을 소거하여 산화적 손상으로부터 체내 기관을 보호한다(Halliwell, 1996). 어류사료 내 비타

민 C가 결핍될 경우, 성장(Lim and Lovell, 1978; Dabrowski et al., 1990)과 면역력(Verlhac and Gabaudan, 1994) 저하는 물론 세균성질병에 대한 감수성이 증가(Durve and Lovell, 1982; Li and Lovell, 1985)된다고 보고되었다. 채널메기(*Ictalurus punctatus*) (Durve and Lovell, 1982; Li and Lovell, 1985), 대서양연어(*Salmo salar*) (Hardie et al., 1991; Waagbø et al., 1993), 무지개송어(*Onchorhynchus mykiss*) (Navarre and Halver, 1989) 및 그루퍼(*Epinephelus malabaricus*) (Lin and Shiau, 2005)에서도 비타민 C의 사료 내 첨가는 선천성 면역력과 질병저항성을 증가시킨다고 보고되었다. 비타민 C는 빛, 온도와 같은 외부 환경에 매우 불안정하기 때문에 이를 보완하기 위한 안정성 및 체내 이용률을 높일 수 있는 비타민 C 형태에 대한 연구가 진행되었고, 그 결과 인산 유도체 비타민 C가 가장 적

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2017.0015>



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 50(1) 015-024, February 2017

Received 12 January 2017; Revised 10 February 2017; Accepted 10 February 2017

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

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

절하다고 보고되었다(Waagbo et al., 1991).

감귤은 가공과정을 거쳐 주스, 잼, 과자 등 다양한 식품 형태로 생산된다(Chung et al., 2000). 최근, 국내 감귤 생산량의 10-20% (연 60,000-15,000톤)를 가공처리하고 있으며, 이에 따라 연간 30,000-80,000톤의 감귤가공부산물(감귤착즙박)이 생산된다(Korean feed association, 2016). 감귤착즙박(Citrus byproduct, CBP)은 불용성 탄수화물, flavonoids, 미네랄 및 비타민 C를 다량 함유하는 것으로 알려져 있다(Bampidis and Robinson, 2006). 감귤에 들어있는 대표적 생리활성 물질 중 하나인 flavonoids는 polyphenol계 화합물로서 항산화, 항균, 항염증, 항알레르기, 항바이러스 등의 다양한 활성을 보이며(Kawaguchi et al., 1997; Cha and Cho, 2001), T, B 림프구를 포함한 면역반응 관련 세포의 활성화에 영향을 끼친다고 보고되었다(Manthey et al., 2001). 이처럼 CBP는 이용 잠재력이 높음에도 불구하고 대부분 폐기물로 취급되어 매립되거나 소각 처리되는데 이는 환경적, 경제적으로 많은 문제가 되고 있다. 최근, CBP는 소, 양, 돼지 등과 같은 가축동물 사료원료로서의 이용가능성이 보고되었다(Yang et al., 2006; Jung et al., 2008; Yang et al., 2008). 양식어류에서는 면역증강 및 항균력의 비교를 위해 넙치(Lee et al., 2013)와 참돔(*Pagrus major*) (Song et al., 2013; Lee et al., 2015)을 대상으로 CBP의 이용가능성 연구가 수행되었다.

넙치는 우리나라에서 가장 많이 생산되는 해산양식 어종이다. 일반적으로 국내 넙치 양식은 고밀도 양식으로 행해지기 때문에 이로 인한 질병에 매우 취약하다(MIFAFF, 2003). 따라서 대부분의 넙치양식장에서는 질병치료와 예방을 위해 항생제를 무분별하게 사용하고 있다. 무분별한 항생제 사용은 병원균의 항생제에 대한 내성을 증가시키고, 어류의 면역력을 저하시키는 결과를 초래한다(Smith et al., 1994). 이를 해결하기 위해 probiotics와 식물을 기반으로 한 천연 면역증강제 개발연구가 증가하고 있는 추세다(Kim et al., 2007; Aly et al., 2008; Kim et al., 2010). 국내 넙치양식에서는 VHSV(viral hemorrhagic septicemia virus)와 같은 저수온기 질병으로 인한 경제적 손해가 큰 것으로 보고되었다(Kim et al., 2003; Kim et al., 2009).

본 연구는 양어 사료 내 감귤착즙박의 합성 비타민 C와 항생제 대체제로써 이용 가능성을 조사하기 위해 저수온기의 넙치 치어를 대상으로 성장률, 사료효율, 비특이적 면역력 및 아가미와 장의 조직학적 분석을 실시하였다.

재료 및 방법

실험사료

실험사료의 조성은 Table 1에 나타내었다. 단백질원으로 탈지어분(extracted fish meal)과 casein을 사용하였고 지질원으로 오징어간유를 사용하였으며, 조단백질과 조지방이 각각 48%, 13%가 되도록 조성하였다. 비타민 C를 첨가하지 않은 대조사

료와 합성 비타민 C 인 LAPP (L-ascorbyl-2-polyphosphate)와 CBP를 각각 30 ppm (저농도), 300 ppm (고농도)으로 첨가한 실험사료구, OTC를 0.5% 첨가한 실험사료구로 총 6개의 실험사료를 제작하였다(Con, LAPP30, LAPP300, CBP30, CBP300 and OTC). 실험사료의 제조는 분쇄기를 이용하여 모든 사료원을 일정하게 분쇄한 후, 각 사료원을 사료조성표에 따라 혼합하였다. 혼합 후 사료원 총량의 약 30%에 해당하는 증류수를 첨가하여 사료혼합기(NVM-14-2P, Gyeonggi-do, Korea)로 혼합, 반죽하였다. 혼합반죽물은 소형 펠렛제조기(SMC-12, Korea)를 이용하여 직경 3 mm 크기로 펠렛 성형하였다. 제작된 펠렛 실험사료는 동결건조기에서 건조시켜 적당한 크기로 가공한 후 사료공급실험에 사용하였다.

실험어 및 사육관리

실험어(넙치 치어)는 제주도에 위치한 종묘배양장에서 구입하여 제주대학교 소속 해양과학연구소로 이송하였다. 이송된 치어는 약 3주 동안 시판 배합사료를 공급하면서 실험환경에 적응할 수 있도록 순치시킨 후 실험에 사용하였다. 넙치 치어(초기평균무게: 44.6 ± 0.32 g)는 총 18개의 150 L 원형 폴리프로필렌 수조에 각 수조당 30마리씩 무작위로 배치하였다. 사육수는 모래여과해수를 사용하여 2 L/min의 유수량이 공급되도록 조절하였고 모든 실험수조에 용존산소 유지를 위하여 에어스톤을 설치하였다. 저수온기 실험기간 동안 사육수온은 자연수온(13-15°C)에 의존하였다. 실험사료 공급은 1일 2회(08:00, 17:00)에 나누어서 9주 동안 매일 반복공급을 실시하였다.

성분 분석

실험사료의 일반성분 분석은 AOAC (1995) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125°C, 3시간), 조회분은 직접회화법(550°C, 6시간), 단백질은 자동조단백질 분석기로 분석하였으며, 조지방은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 Soxhlet 추출장치를 이용하여 분석하였다. 실험사료의 비타민 C 분석은 Lee and Dabrowski (2004)의 방법으로 분석하였다.

어체측정 및 혈액샘플

실험종료 후 성장률, 사료전환효율, 일간성장률, 단백질전환효율 및 생존율을 계산하였다: 성장률(WG, %)= $100 \times (\text{final mean body weight} - \text{initial mean body weight}) / \text{initial mean body weight}$; 사료전환효율(FCR)= $\text{dry feed fed} / \text{wet weight gain}$; 일간성장률(SGR, %)= $[(\log_e \text{ final body weight} - \log_e \text{ initial body weight}) / \text{days}] \times 100$; 단백질전환효율(PER)= $\text{wet weight gain} / \text{total protein given}$.

각 수조당 8마리의 어류를 무작위로 선별하여 2-phenoxyethanol 용액(200 mg/L)으로 마취시킨 후, 일회용 주사기를 사용하여 미부정맥에서 혈액을 채혈하였다. 8 마리 중 4 마리 어류의 혈액은 헤파린을 처리하여 hematocrit, hemoglobin 및 대식세포(nitroblue tetrazolium, NBT)를 측정하였다. 분석 후, 남

Table 1. Formulation and proximate composition of six experimental diets for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* (% , dry matter basis)

Ingredients	Experimental diets					
	Con	LAPP 30	LAPP 300	CBP 30	CBP 300	OTC
Extracted fish meal ¹	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00
Casein ²	31.00	31.00	31.00	31.00	31.00	31.00
Dextrin ²	16.00	16.00	16.00	16.00	16.00	16.00
Squid liver oil	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00	11.00
Vitamin Mix ³	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Mineral Mix ⁴	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
LAPP ⁵	0.0000	0.0086	0.0860	0.0000	0.0000	0.0000
CBP ⁶	0.0000	0.0000	0.0000	0.8824	8.8824	0.0000
Antibiotic ⁷	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00
Taurine	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cellulose	11.0000	10.9914	10.9140	10.1176	2.1177	10.0000
Dietary nutrient composition (%)						
Protein	47.7	47.7	47.7	47.7	48.2	47.7
Lipid	13.1	13.4	14.9	13.0	13.1	12.7
Ash	7.19	6.71	7.15	6.72	6.82	7.53
Total ascorbic acid ⁸	10.9	28.6	302	29.8	310	9.40

¹White fish meal (vitamin C free), 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 (vitamin C free, 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, DSM Nutrition Korea Ltd, Seoul, South Korea. ⁶Citrus by-product: ILHAE Corporation, Jeju, South Korea. ⁷Aqua OTC 250, Ewha pharmtek, Kyeonggido, South Korea. ⁸Total ascorbic acid (TAA, mg/kg) was determined by dinitrophenyl hydrazine spectrophotometric method described Lee and Dabrowski (2004).

은 혈액은 immunoglobulin (Ig) 분석을 위해 5,000 g로 10 분간 원심분리하여 혈장(plasma)을 분리하였다. 나머지 4 마리 어류의 혈액은 상온에서 30분 동안 응고시킨 후 비특이적 면역 분석 항목인 lysozyme activity, superoxide dismutase (SOD), myeloperoxidase (MPO) 분석을 위해 5,000 g로 10분간 원심분리하여 혈청(serum)을 분리하였고, 분리된 혈장 및 혈청은 분석시까지 -70°C 에서 보관되었다.

혈액분석 및 비특이적 면역 분석

Hematocrit은 원심분리기(Micro hematocrit VS-12000, Korea)에서 10 분간 원심분리하여 측정하였고, hemoglobin 분석은 생화학분석기(SLIM, SEAC Inc, Florence, Italy)를 이용하여 분석하였다. Hematocrit과 hemoglobin은 일반적으로 어류 사육실험에 있어서 건강지표를 측정하는 분석항목으로서 사료 섭취에 따른 어류의 건강상태를 간접적으로 확인하기 위해 측정하였다.

혈청 내 lysozyme activity는 Hultmark et al. (1980)의 방법으로, SOD 활성은 Superoxide dismutase kit (Cayman, Ann

Arbor, USA)를 이용하여 분석하였다. 혈장 내 Ig 분석은 Siwicki and Anderson (1993)의 분석방법으로, 혈청 내 MPO 활성은 Quade and Roth (1997)의 방법으로 분석하였다. NBT는 Anderson and Siwicki (1995)의 방법을 기초로 분석하였다.

조직형태학적 분석

조직형태학적 분석을 위해 각 수조당 실험어류 3 마리를 무작위로 선별하여 2-phenoxyethanol (200 mg/L) 용액으로 마취시킨 후, 각 어류의 전장, 체중, 간중량 및 장 중량을 측정하여 다음의 항목을 계산하였다: Hepatosomatic index=100×(liver weight/body weight); Relative intestine length=100×(intestine length/total length); Viscerasomatic index=100×(viscera weight/body weight); Condition factor=100× fish weight (g)/ fish length³ (cm).

소화기관의 조직학적 관찰은 전장부의 점막주름에 나타나는 배상세포(Goblet cell)의 수를 측정하였다. 먼저 마취가 된 어류의 장을 적출한 후, bouin's solution을 이용하여 고정하였고, 70% ethanol로 탈수시킨 후, 파라핀으로 봉입시켜 5 μm로 절

편하여 슬라이드에 부착시켰다. 조직이 부착된 슬라이드는 일반적인 조직학적 관찰을 위해 harris hematoxylin과 0.5% eosin 으로 염색하였고, 배상세포를 관찰하기 위하여 pH 2.5인 alcian blue (AB)와 periodic acid-Schiff (PAS)로 염색한 후 광학현미경(Olympus CKX41, Tokyo, Japan)으로 표본을 관찰하였다. 장의 직경(intestinal diameter), 융모 길이(villus length), enterocyte height의 형태학적 분석을 위해 Image J 1.44 software를 이용하여 측정하였다.

통계학적 분석

실험사료의 배치는 완전확률계획법(Completely randomized design)을 실시하였고, 결과는 SPSS (Version 12.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석되었다. 데이터 값의 유의차는 Tukey's HSD ($P<0.05$)로 비교하였다. 데이터는 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 백분율데이터는 arcsine 변형 값으로 통계분석 하였다.

결 과

9 주간의 사양실험 결과(최종무게, 성장률, 사료전환효율, 일

간성장률, 단백질전환효율, 생존율)는 Table 2에 나타내었다. 성장률은 CBP30 실험구가 대조구, LAPP를 첨가한 실험구와 비교하여 유의적으로 높았다. 사료전환효율은 CBP30 실험구가 LAPP300 실험구와 비교하여 유의적으로 낮았다. 일간성장률은 CBP30, CBP300 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높았으며, LAPP와 OTC실험구를 비교할 경우 OTC 실험구가 높은 경향을 보였다. CBP30 실험구가 나머지 모든 실험구와 비교하여 유의적으로 높은 단백질전환효율을 보였다. 일일섭이량은 유의적인 차이가 없었으며 0.7-0.8 g의 값을 보였다(결과생략).

혈액분석과 비특이적 면역분석 결과(Table 3), lysozyme 활성에서 CBP30을 첨가한 실험구가 LAPP300 실험구와 비교하여 유의적으로 높은 값을 보였다. 그 외 혈액분석과 비특이적 면역분석 결과에서는 유의적인 차이가 없었다. 조직학적 변화를 관찰하기 위한 간중량지수, 장중량지수 및 비만도에서(Table 4) 모든 실험구 간에 유의적인 차이가 없었다.

비타민 C 결핍증상 중의 하나인 아가미 조직의 변성을 알아보기 위한 아가미 조직분석(Fig. 1)에서는 대조구에서 아가미 새변의 탈락과 변형 현상이 보였다. 다른 실험구에서는 이상 현상이 발견되지 않았다.

Table 2. Growth performance of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* (initial BW: 44.6 g) fed the six experimental diets for 9 weeks

	FBW ¹	WG ²	FCR ³	SGR ⁴	PER ⁵	Survival (%)
Con	56.5±0.81 ^a	25.6±3.52 ^a	2.12±0.14 ^{ab}	0.32±0.04 ^a	0.99±0.06 ^a	90.2±2.29
LAPP30	55.8±0.15 ^a	25.4±3.05 ^a	2.22±0.08 ^{ab}	0.32±0.03 ^a	0.95±0.04 ^a	83.1±2.66
LAPP300	56.1±0.44 ^a	25.6±1.66 ^a	2.26±0.30 ^a	0.32±0.02 ^a	0.94±0.14 ^a	85.0±13.2
CBP30	64.3±5.93 ^b	42.6±12.8 ^b	1.24±0.16 ^b	0.50±0.12 ^b	1.72±0.24 ^b	86.5±12.6
CBP300	59.3±0.48 ^{ab}	33.7±2.53 ^{ab}	2.09±0.76 ^{ab}	0.41±0.03 ^b	1.09±0.36 ^a	79.7±17.6
OTC	58.8±1.79 ^{ab}	32.4±5.90 ^{ab}	1.88±0.26 ^{ab}	0.39±0.06 ^{ab}	1.13±0.15 ^a	93.3±11.5

Mean values of triplicate groups, values are presented as mean±SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P<0.05$). ¹Final body weight (g). ²Weight gain (%)=100×(final mean body weight–initial mean body weight)/initial mean body weight. ³Feed conversion ratio (%/day)=dry feed fed/wet weight gain. ⁴Specific growth rate (%)=[(log final body weight–log initial body weight)/days]×100. ⁵Protein efficiency ratio=wet weight gain/total protein given.

Table 3. Hematological and non-specific immune parameters of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* (initial BW: 44.6 g) fed the six experimental diets for 9 weeks

	Hematocrit (%)	Hemoglobin (g/dL)	Lysozyme (µg/mL)	SOD ¹	Ig ²	MPO ³	NBT ⁴
Con	22.8±3.53	5.11±1.07	44.5±8.73 ^{ab}	75.2±3.93	12.0±8.88	1.91±0.17	0.23±0.05
LAPP30	24.5±1.39	5.07±1.71	38.0±16.3 ^{ab}	71.3±7.76	13.9±1.75	1.84±0.24	0.21±0.02
LAPP300	22.9±2.13	4.04±0.41	29.8±4.20 ^a	76.9±6.30	10.8±4.58	2.04±0.12	0.19±0.01
CBP30	22.6±3.91	4.32±0.95	62.2±9.46 ^b	72.9±4.92	11.1±2.73	1.73±0.15	0.20±0.05
CBP300	23.4±3.61	4.50±0.98	55.5±10.4 ^{ab}	74.1±16.0	11.1±2.59	1.86±0.17	0.23±0.10
OTC	24.5±4.82	4.27±1.03	47.1±10.6 ^{ab}	70.1±3.38	11.0±3.03	1.68±0.20	0.23±0.04

Mean values of triplicate groups are presented as mean ± SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P<0.05$). ¹Superoxide dismutase (% inhibition). ²Total immunoglobulin (mg/mL). ³Myeloperoxidase. ⁴Nitro blue tetrazolium activity.

Table 4. The morphological indices of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the six experimental diets for 9 weeks

	Liver weight (g)	HSI ¹	Intestine length (cm)	RIL ²	VSI ³	CF ⁴
Con	1.37±0.28	1.85±0.21	14.4±1.46	71.0±2.59	6.13±0.15	0.89±0.03
LAPP30	1.52±0.30	2.21±0.28	16.2±2.52	81.1±10.1	6.66±0.46	0.87±0.10
LAPP300	1.30±0.22	1.95±0.28	15.0±1.28	75.6±5.43	6.32±0.57	0.86±0.02
CBP30	1.67±0.10	2.11±0.21	14.7±0.81	72.3±4.70	6.09±0.17	0.93±0.04
CBP300	1.18±0.19	1.84±0.21	13.3±1.33	68.8±5.57	6.05±0.23	0.86±0.08
OTC	1.22±0.33	1.79±0.23	15.4±0.95	77.4±5.90	5.84±0.18	0.85±0.09

Mean values of triplicate groups, values are presented as mean±SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P<0.05$). ¹Hepatosomatic index (%)=100×(liver weight/body weight). ²Relative intestine length (%)=100×(intestine length/total length). ³Viscerosomatic index (%)=100×(visceral weight/body weight). ⁴Condition factor=100×(body weight/total length³).

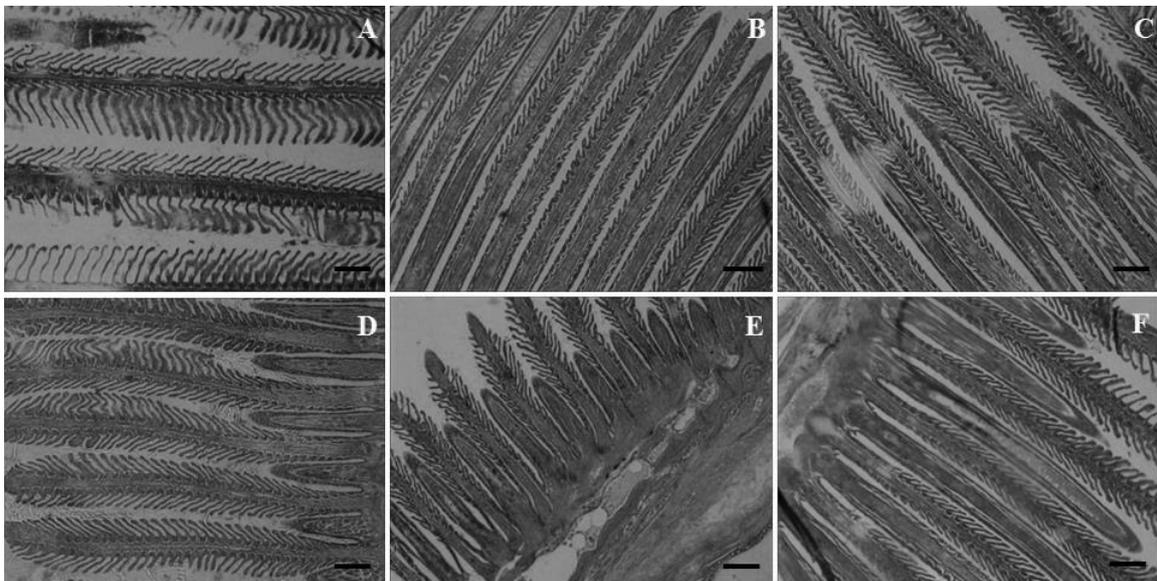


Fig. 1. Gill histology of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the six experimental diets for 9 weeks; Con (A), LAPP30 (B), LAPP300 (C), CBP30 (D), CBP300 (E) and OTC (F); Bar: 100 μm.

장의 직경, 융모길이, enterocyte height, 배상세포 수 측정 결과는 Table 5에 나타내었다. 장 직경에서는 LAPP, CBP, OTC를 첨가한 실험구가 대조구에 비해 높은 값을 나타내었지만 유의적인 차이는 없었다. 장 내 융모길이는 LAPP300, CBP30 실험구가 CBP300, OTC 실험구와 비교하여 유의적으로 높은 값을 보였다. Enterocyte height에서는 CBP30 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높은 값을 보였다. 특히, 장 내 배상세포 (Fig. 2)의 수는 CBP300을 제외한 LAPP, CBP, OTC를 첨가한 실험구가 대조구와 비교하여 유의적으로 높은 값을 보였다.

고 찰

저수온기에서의 사양실험 결과, 사료 내 LAPP, CBP, OTC의 첨가는 넙치 치어의 성장률, 사료전환효율, 단백질전환효율에

Table 5. Morphometric parameters of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* intestine fed the six experimental diets for 9 weeks

	ID ¹	VL ²	EH ³	GC ⁴
Con	983±88.7	134±6.93 ^{abc}	19.2±2.14 ^a	402±57.7 ^a
LAPP30	1157±174	137±7.40 ^{bc}	23.3±2.67 ^{ab}	636±69.8 ^c
LAPP300	1214±170	146±9.77 ^c	22.4±1.22 ^{ab}	595±26.0 ^c
CBP30	1077±199	140±2.97 ^c	23.6±0.48 ^b	641±26.4 ^c
CBP300	1091±57.6	128±0.91 ^{ab}	22.0±0.60 ^{ab}	452±32.0 ^{ab}
OTC	1175±33.5	123±2.33 ^a	21.2±1.15 ^{ab}	586±70.0 ^{bc}

Mean values of triplicate groups, values are presented as mean±SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P<0.05$). ¹Intestinal diameter (μm). ²Villus length (μm). ³Enterocyte height (μm). ⁴Goblet cell.

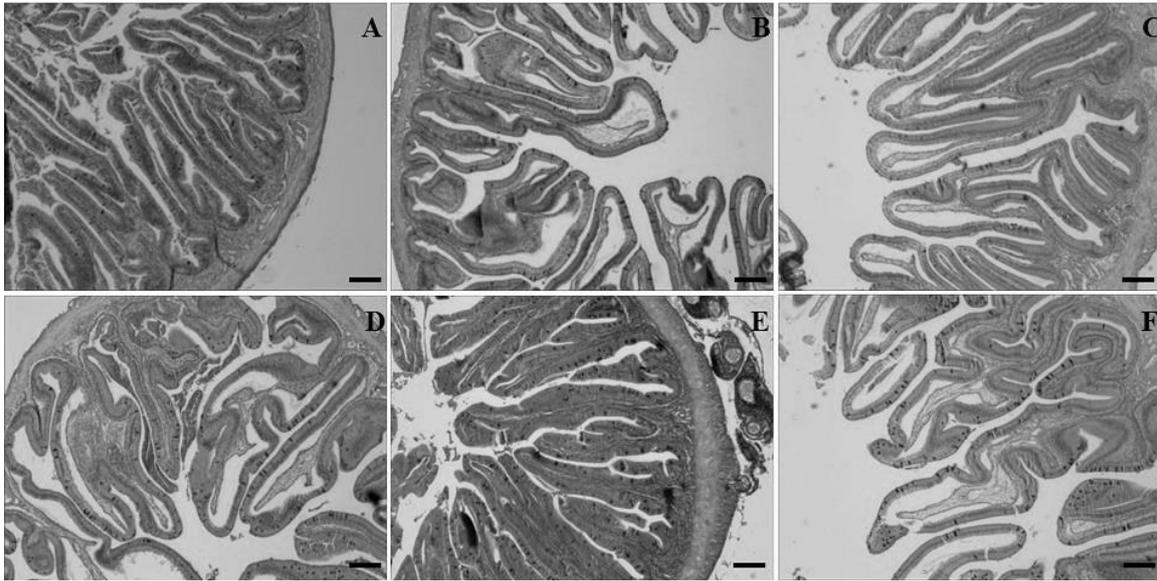


Fig. 2. Changes in number of goblet cells in the intestine of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the six experimental diets for 9 weeks; Con (A), LAPP30 (B), LAPP300 (C), CBP30 (D), CBP300 (E) and OTC (F); Bar: 100 μ m .

유의적으로 영향을 끼쳤다. 본 연구에서의 대체적으로 낮은 성장률 결과는 저수온기에 진행되었던 이전의 실험 결과들과 유사하였다(Kim et al., 2008; Lee et al., 2015). 수온은 어류의 성장에 있어 가장 중요한 요인 중 하나이며, 수온에 따라 사료의 섭취활동이 결정된다(Choi et al., 2002). Song et al. (2013)은 저수온 환경에서는 전체적인 사료섭취량이 감소하여 감귤착즙박의 첨가 효능이 참돔의 성장률에 영향을 미치지 못하였다고 보고하였다. 하지만, 본 연구에서는 CBP30 사료를 섭취한 넙치에서 대조구나 LAPP30, LAPP300 사료를 섭취한 넙치에 비해 유의적으로 높은 성장률과 단백질전환효율을 보였다. 비록 낮은 성장률이지만 CBP30 실험구에서 유의적으로 높은 성장률을 보인 이유는 CBP 내에 다량 존재하는 생리활성 polyphenol 계 화합물 때문인 것으로 사료된다. Song et al. (2002)에 의하면 감귤발효액을 첨가한 실험구에서 첨가하지 않은 대조구에 비해 유의적으로 높은 성장률을 보였다. Lee et al. (2015)은 참돔을 대상으로 한 실험에서 LAPP 혹은 CBP가 첨가된 실험구가 대조구보다 유의적으로 높은 성장률을 보였다고 보고하였다. 하지만, 본 연구 결과로는 알 수 없는 CBP 내 생리활성 물질 효과의 메커니즘에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 사료전환효율에서는 CBP 실험구가 LAPP 실험구에 비해 높은 효율을 보였다. 이는 합성 비타민 C인 LAPP 첨가에 비해 CBP에 다량 포함되어 있는 천연 비타민 C의 첨가가 어류의 성장과 사료효율에 더 유리할 것이라는 가설을 증명할 결과라 사료된다.

Lysozyme은 어류의 선천면역에 있어 중요한 요소 중 하나이다. Lysozyme은 세균 세포벽의 peptidoglycan의 가수 분해를

촉매하는 효소로서 세포벽을 분해하여 살균 효과를 나타낸다(Branen and Davidson, 2004). 참돔 치어를 대상으로 한 연구(Song et al., 2013)에서는 감귤착즙박과 발효감귤착즙박을 사료에 각각 4%, 8% 농도로 첨가하여 9주간 공급한 후 lysozyme 활성을 측정하였다. 그 결과, 비타민 C 요구량을 충족시킨 대조구에 비해 발효감귤착즙박을 4% 첨가한 실험구가 유의적으로 높은 lysozyme 활성을 보였으며, 일반 감귤착즙박을 첨가한 실험구에서는 유의적인 차이는 없었지만 대조구에 비해 높은 경향을 보였다. 본 연구에서는 lysozyme 활성 결과, CBP30이 LAPP300보다 유의적으로 높았으며, 대조구와 비교하여 높은 경향을 보였다. 유자와 탕자의 과피추출물에 대한 쥐의 면역활성 효과를 비교한 실험에서는 비장세포 자극을 통한 T 세포와 B 세포의 증진이 촉진되었다(Park et al., 2008). 이처럼 lysozyme 활성이 높았던 이유는 감귤박에 존재하는 flavonoids의 항산화능에 의한 것으로 사료된다. 감귤박에 다량 함유된 polyphenol의 항산화능과 면역증진 능력은 이전의 많은 연구를 통해 이미 밝혀졌다(Kim et al., 2006; Choi et al., 2010; Khan and Dangles, 2014).

비타민 C가 결핍된 연어와 무지개송어에서는 기형(측만증, 전만증, 눈, 아가미, 지느러미의 지지연골에서 비정상), 식욕 부진과 무기력, 복수와 출혈성 안구돌출, 혈장 triglycerides와 cholesterol 수치 증가와 같은 증상들을 보였다(NRC, 2011). 또한, 채널메기, 넙치, 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*) 및 농어(*Lateolabrax japonicus*)에서도 척추측만과 전만증이 보고되었다(NRC, 2011). 본 연구에서는 실험기간이 9주로 짧았지만, 대조구에서 아가미 세엽의 변형과 탈락이 관찰되었다(Fig. 1).

아가미 새엽의 왜곡과 뒤틀림 현상은 비타민 C의 여러 결핍증상 중 가장 먼저 나타나는 증상이다(Halver et al., 1975). Lim and Lovell (1978)은 채널메기를 대상으로 12주간 비타민 C 결핍 실험을 실시한 결과, 비타민 C가 결핍된 사료를 섭취한 어류의 아가미에서 새엽의 변형과 연골세포의 괴사로 인한 지지연골의 변형이 관찰되었다고 보고하였다. 본 연구에서도 비타민 C가 결핍된 대조사료를 급이한 넙치의 아가미에서 비정상적인 조직변화가 관찰되었고, LAPP와 CBP가 첨가된 실험사료를 급이한 넙치에서는 아가미조직의 변형이 발견되지 않음으로써 CBP 내에 다량 존재하는 비타민 C의 효능이 충분히 입증되었다고 생각된다.

어류는 영양과 에너지 변화에 따라 소화기관 형태에서 차이를 보이며, 그 차이는 영양상태 변화의 지표로 사용된다(Adams et al., 1996). 흔히 사용되는 지표로 HSI와 VSI 등이 있다(Odedeyi et al., 2014). Cobia를 대상으로 비타민 C의 첨가량에 따른 효과를 비교한 결과, HSI에서 유의적인 차이는 보이지 않았지만 비타민 C 첨가량이 증가할수록 낮은 값을 보였는데(Zhou et al., 2012), 이러한 결과는 본 실험결과와 유사하였다. 또한, Zhou et al. (2012)은 비만도와 VSI의 측정결과, 비타민 C를 첨가한 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높은 값을 보였다고 보고하였다.

용모의 길이 증가는 장 내 표면적을 넓혀 소화와 영양소 흡수를 용이하게 하며(Delashoub et al., 2010; El-Bakary and El-Gammal, 2010), enterocyte 길이와 수에 따라 그 흡수 능력이 결정된다고 알려져 있다(Brandão, 1998). 본 연구에서의 장 직경 측정 결과, 모든 실험구에서 유의적인 차이는 없었다. 하지만, LAPP300과 CBP30을 첨가한 실험구가 OTC첨가 실험구보다 유의적으로 높은 용모 길이를 보였다. 이는 OTC 보다 LAPP와 CBP가 어류의 소화 흡수에서 더 용이하다고 해석할 수 있겠다. 특히, 비타민 C와 같은 수용성 영양소의 경우 용모의 상피세포로부터 가장 먼저 흡수 된다(Wilson, 2005). Enterocyte 길이를 측정한 결과, 대조구가 CBP30실험구에 비해 유의적으로 낮은 결과를 보였는데, 이는 비타민 C의 결핍에 의한 결과라 사료된다.

배상세포는 장 상피세포에서 분비되는 점액을 생산하는 역할을 하며, 분비된 점액은 병원균으로부터 장내를 보호해주는 역할을 한다(Ellis, 2001). 또한 살균 효과 및 내강과 상피세포 사이의 이동을 원활하게 하는 역할을 한다(Smirnov et al., 2005). 배상세포의 수 변화를 관찰한 결과, 대조구가 다른 첨가 실험구에 비해 유의적으로 낮은 수치를 보였다. 특히, LAPP 실험구와 CBP30실험구에서 높은 수의 배상세포 수를 보였는데 이는 비타민 C 첨가가 점액분비를 유도하여 병원균으로부터 장내를 보호하는데 관여한 것으로 사료된다. 참돔을 대상으로 한 8주간의 사양실험에서는 장 상피조직상의 배상세포의 수 변화에서 유의적인 차이는 없었지만 감귤착즙박이나 발효감귤착즙박이 첨가된 실험구에서 경향적으로 많은 배상세포 수가 관찰되었다고

보고되었다(Lee et al., 2015). 따라서 사료 내 CBP의 첨가는 넙치에서의 배상세포 수를 증가시켜 면역력 증진을 기대 할 수 있고, 합성 비타민 C를 완전 대체하거나 부분 대체할 수 있을 것으로 사료된다. 항생제와 CBP를 비교했을 때도 CBP가 넙치 치어의 성장과 사료효율 및 비특이적 면역에서 비교적 높은 결과를 보임으로서 양어 사료 내 항생제의 사용을 줄이거나 완전 대체하는데 CBP가 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

결론적으로, 사료 내 감귤착즙박의 첨가는 성장률, 사료효율, 생존율, 비특이적 면역력과 조직학적 변화에서 아무런 문제가 없을 것으로 사료된다. 감귤착즙박의 다량 사용에 대한 추가적인 연구가 필요하지만 비타민 C와 항생제 대체제로써 사료 내 약 1% 내외의 소량 사용에는 전혀 문제가 없을 것으로 판단된다. 감귤착즙박은 친환경 양식사료 소재가 될 수 있으며, 특히 질병 발생이 빈번한 저수온기에서 넙치 사료 내 적정 첨가사용은 합성 비타민 C를 대체할 수 있을 뿐만 아니라 항생제 사용을 줄이고 넙치의 선천성 면역력을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2016 제주대학교 학술진흥연구비로 수행되었습니다.

References

- Adams SM, Ham KD, Greeley MS, LeHew RF, Hinton DE and Saylor CF. 1996. Downstream gradients in bioindicator responses: point source contaminant effects on fish health. *Can J Fish Aquat Sci* 53, 2177-2187. <http://dx.doi.org/10.1139/cjfas-53-10-2177>.
- Aly SM, Ahmed YAG, Ghareeb AAA and Mohamed MF. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish Shellfish Immunol* 25, 128-136. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.013>.
- Anderson DP and Siwicki AK. 1995. Basic hematology and serology for fish health programs, In: *Diseases in Asian Aquaculture II*. Shariff M, Arthur JR and Subasinghe RP Eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 185-202.
- AOAC. 1995. Official methods of analysis. 16th ed. Association of official analytical chemists, Arlington, Virginia, U.S.A., 1298.
- Bampidis VA and Robinson PH. 2006. Citrus by-products as ruminant feeds: A review. *Anim Feed Sci Technol* 128, 175-217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.12.002>.
- Brandão MCS. 1998. Análise morfoquantitativa do plexo mientérico do intestino delgado de ratos jovens submetidos à desnutrição protéica pré e pós-natal. Master's Thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

- Branen JK and Davidson PM. 2004. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *Int J Food Microbiol* 90, 63-74. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00172-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00172-7).
- Cha JY and Cho YS. 2001. Biofunctional activities of citrus flavonoids. *J Appl Biol Chem* 44, 122-128.
- Choi JW, Ra KS, Kim SY, Yoon TJ, Yu KW, Shin KS, Lee SP and Suh HJ. 2010. Enhancement of anti-complementary and radical scavenging activities in the submerged culture of *Cordyceps sinensis* by addition of citrus peel. *Biore-sour Technol* 101, 6028-6034. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.083>.
- Choi YU, Rho S and Lee YD. 2002. Effect of water temperature and stocking density on growth of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. *J Aquacult* 15, 131-138.
- Chung SK, Kim SH, Choi YH, Song EY and Kim SH. 2000. Status of citrus fruit production and view of utilization in cheju. *Food Industry Nutrition* 5, 42-52.
- 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. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90197-U](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(90)90197-U).
- Dabrowski K. 1990. Ascorbic acid status in the early life of whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). *Aquaculture* 84, 61-70. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90300-C](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(90)90300-C).
- Delashoub M, Poust I and Khojasteh B. 2010. Histology of Big-head Carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) intestines. *Glob Vet* 5, 302-306.
- Durve VS and Lovell RT. 1982. Vitamin C and disease resistance in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Can J Fish Aquat Sci* 39, 948-951. <http://dx.doi.org/10.1139/f82-129>.
- El-Bakary NER and El-Gammal HL. 2010. Comparative histological, histochemical and ultrastructural studies on the liver of flathead grey mullet (*Mugil cephalus*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Glob Vet* 4, 548-553.
- Ellis AE. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol* 25, 827-839. [http://dx.doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00038-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00038-6).
- 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. <https://dx.doi.org/10.1007/bf02534078>.
- Halliwell B. 1996. Commentary: Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radic Res* 25, 439-454. <http://dx.doi.org/10.3109/10715769609149066>.
- Halver JE, Smith RR, Tolbert BM and Baker EM. 1975. Utilization of ascorbic acid in fish. *Ann N Y Acad Sci* 258, 81-102. <http://dx.doi.org/10.1201/9781420036312.ch9>.
- 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. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90087-N](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(91)90087-N).
- Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T and Boman HG. 1980. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem* 106, 7-16. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb05991.x>.
- Jung IC, Yang JB and Moon YH. 2008. Effects of feed containing citrus byproducts on the physico-chemical characteristics and palatability of Korean native chickens. *J East Asian Soc Diet Life* 18, 524-530.
- Jaffe GM. 1984. Vitamin C. In: *Handbook of vitamins*. Machlin L, ed. Marcel Dekker Inc, New York, U.S.A., 199-244.
- Kawaguchi K, Mizuno T, Aida K and Uchino K. 1997. Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and pseudomonas. *Biosci Biotechnol Biochem* 61, 102-104. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.61.102>.
- Khan MK and Dangles O. 2014. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *J Food Compost Anal* 33, 85-104. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2013.11.004>.
- Kim JW, Jeon YJ, Lee JH and Lee SC. 2006. Effect of far-infrared irradiation and heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus pomaces. *J Appl Biol Chem* 49, 60-64.
- Kim KM, Lee JU, Kim JW, Han SJ, Kim KD and Jo JY. 2008. Daily feeding rates of parrot fish *Oplegnathus fasciatus* fed extruded pellet at the different water temperatures. *J Aquaculture* 21, 294-298.
- Kim SM, Lee JI, Hong MJ, Park HS and Park SI. 2003. Genetic relationship of the VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) isolated from cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Korea. *J Fish Pathol* 16, 1-12.
- Kim SS, Galaz GB, Heo MS, Kim GY, Choi KS, Lee KW, Yeo IK and Lee KJ. 2007. Effects of dietary selfheal (*Prunella vulgaris*) water extracts and its culture fluid with *Lactobacillus rhamnosus* on growth and immune responses of juvenile olive flounder. *Korean J Fish Aquat Sci* 40, 300-307. <http://dx.doi.org/10.5657/kfas.2007.40.5.300>.
- Kim SS, Song JW, Lim SJ, 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 Technol* 52, 337-346. <http://dx.doi.org/10.5187/jast.2010.52.4.337>.
- Kim WS, Kim SR, Kim D, Kim JO, Park MA, Kitamura SI, Kim HY, Kim DH, Han HJ, Jung SJ and Oh MJ. 2009. An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Aquaculture* 296, 165-168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.07.019>.
- Korean feed association. 2016. The dietary value of citrus by-product and feeding effect on main farm animal [Internet].

- Retrieved from http://www.kofeed.org/cmm/fms/FileDown.do?jsessionid=518EC3727-4372D6D71789E146ED34752?atchFileId=FILE_00000000410273&fileSn=0.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1111/jfd.12035>.
- Lee CR, Kim YJ and Lee KJ. 2015. Dietary supplementation of citrus and fermented citrus by-product for juvenile red seabream *Pagrus major* at low water temperature. *Fish Aquat Sci* 48, 454-458. <http://dx.doi.org/10.5657/kfas.2015.0454>.
- Lee KJ and Dabrowski K. 2004. Long-term effects and interactions of dietary vitamins C and E on growth and reproduction of yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquaculture* 230, 377-389. [http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(03\)00421-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(03)00421-6).
- Li Y and Lovell RT. 1985. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. *J Nutr* 115, 123-131.
- Lim C and Lovell RT. 1978. Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J Nutr* 108, 1137-1146.
- Lin MF and Shiau SY. 2005. Dietary L-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture* 244, 215-221. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.10.026>.
- Manthey JA, Guthrie N and Grohmann K. 2001. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Curr Med Chem* 8, 135-153. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867013373723>.
- MIFAFF. 2003. Statistical yearbook of maritime affairs and fisheries. Ministry for Food Agriculture Forestry and Fisheries Report.
- Moreau R and Dabrowski K. 2000. Biosynthesis of ascorbic acid by extant actinopterygians. *J Fish Biol* 57, 733-745. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.2000.tb00271.x>.
- 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. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90462-6](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(89)90462-6).
- NRC (National National Research Council). 2011. Vitamins. In: Nutrient requirements of fish and shrimp. National Academy of Science, U.S.A., 207-209.
- Odeyeyi D, Odo E and Ajisafe J. 2014. Hepatosomatic index, intestinal length and condition factor of *Clarias gariepinus* fed *Moringa oleifera* leaf meal diets. *J New York Sci* 7. <http://dx.doi.org/10.7537/marsnys070114.01>.
- Park JH, Kang BW, Kim JE, Seo MJ, Lee YC, Lee JH, Joo WH, Choi YH, Lem HS, Jeong YK and Lee BK. 2008. Effect of ethanol extract from peel of *Citrus junos* and *Poncirus trifoliata* on antioxidant and immune activity. *J Life Sci* 18, 403-408. <http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2008.18.3.403>.
- Quade MJ and Roth JA. 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Vet Immunol Immunopathol* 58, 239-248. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2427\(97\)00048-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2427(97)00048-2).
- Siwicki AK and Anderson DP. 1993. Nonspecific defence mechanism assay in fish II; Potential killing activity of neutrophils and monocytes, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum. In: Fish Disease Diagnosis and Prevention Methods. Siwicki AK, Anderson DP and Waluga J, eds. Wydawnictwo Instytutu Rybactwa Strodładowego, Olsztyn, Poland, 105-112.
- Smirnov A, Perez R, Amit-Romach E, Sklan D and Uni Z. 2005. Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotic and antibiotic growth promoter supplementation. *J Nutr* 135, 187-192.
- Smith P, Hiney MP and Samuelsen OB. 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annu Rev Rish Dis* 4, 273-313. [http://dx.doi.org/10.1016/0959-8030\(94\)90032-9](http://dx.doi.org/10.1016/0959-8030(94)90032-9).
- 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>.
- 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.
- Verlhac V and Gabaudan J. 1994. Influence of vitamin C on the immune system of salmonids. *Aquac Res* 25, 21-36. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.1994.tb00663.x>.
- Waagbo R, Glette J, Raa-Nilsen E and Sandnes K. 1993. Dietary vitamin C, immunity and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol Biochem* 12, 61-73. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00004323>.
- Waagbo R, Oines S and Sandnes K. 1991. The stability and biological availability of different forms of vitamin C in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fiskeridirektorates Serie Ernoering* 4, 95-101.
- Wilson JX. 2005. Regulation of vitamin C transport. *Annu Rev Nutr* 25, 105-125. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.nutr.25.050304.092647>.
- Woodall AA and Ames BN. 1997. Diet and oxidative damage to DNA: the importance of ascorbate as an antioxidant. In: Vitamin C in health and disease. Packer L and Fuchs J, eds. Marcel Dekker Inc, New York, U.S.A., 193-203.
- Yang JB, Yang SJ, Koh SM, Jung IC and Moon YH. 2006. Effects of long term tangerine peel consumption on the physicochemical properties and palatability of crossbred pig

meat. Korean Journal Food Science Animal Resources 26, 290-296.

Yang SJ, Jung IC and Moon YH. 2008. Effects of feeding citrus byproducts on nutritional properties of Korean native chicken eggs. Prev Nutr Food Sci 37, 841-846. <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2008.37.7.841>.

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 Shellfish Immunol 32, 969-975. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.03.168>.