

저수온기에서의 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 사료 내 감귤착즙박(Citrus byproduct)의 L-ascorbyl-2-polyphosphate 대체 효과

엄건호[†] · 김한세[†] · 신단비 · 이연지 · 김수혁 · 송진우¹ · 김재식¹ · 이경준^{2*}

제주대학교 해양생명과학과, ¹제주어류양식수협, ²제주대학교 해양과학연구소

Dietary Replacement of L-ascorbyl-2-polyphosphate with Citrus Byproduct on the Growth, Feed Utilization, and Innate Immunity of Juvenile Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* Reared Under Low Water Temperatures

Gunho Eom[†], Hanse Kim[†], Danbi Shin, Yeonji Lee, Suhyeok Kim, Jinwoo Song¹, Jaesik Kim¹ and Kyeong-Jun Lee^{2*}

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

¹Jeju Fish-Culture Fisheries Cooperatives, Jeju 63021, Republic of Korea

²Marine Science Institute, Jeju National University, Jeju 63333, Republic of Korea

This study was conducted to evaluate the dietary supplementation of citrus byproduct (CBP) on the growth performance, feed utilization, and innate immune responses of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* under low water temperatures (11–15°C). Dietary L-ascorbyl-2-polyphosphate was replaced with graded CBP levels at 0 (Con), 25 (CBP25), 50 (CBP50), 75 (CBP75), and 100% (CBP100). Triplicate groups of juvenile olive flounder were hand-fed with one of the diets twice a day for 42 days. The growth performance and feed utilization of fish fed with diet containing levels of CBP75 or CBP100 increased significantly compared to those of fish with fed Con. Dietary CBP supplementation increased the protein efficiency ratio in fish. There was no significant differences in innate immune responses between groups, even though CBP supplementation tended to increase. These findings indicate that CBP could be used as a vitamin C source and improve the growth performance of juvenile olive flounder under low water temperatures.

Keywords: Citrus byproduct, Vitamin C, L-ascorbyl-2-polyphosphate, Olive flounder, Low water temperature

서론

감귤(*Citrus reticulata*)은 제주도의 주요 농산물로 연간 약 63만톤 가량 생산되고 있다. 감귤은 과즙, 껍과 같은 제품으로 가공되며, 이 과정에서 과피와 내피 등의 부산물이 연간 약 10만톤 가량 발생되고 있다(JCMSA, 2020). 감귤부산물(citrus byproduct, CBP)은 비타민 C, carotenoids, flavonoids와 같은 생리활성물질을 다량 함유하고 있어, 사료에 첨가할 경우 어류의 면역력과 항산화력 증진에 도움이 된다고 보고되었다(Song et al., 2013a). 국내에서도 넙치(*Paralichthys olivaceus*)와 참돔(*Pagrus major*) 사료 내 기능성 첨가제로써 CBP의 이용가능성

이 보고되었다(Lee et al., 2015; Kim et al., 2017b). 그러나 양어사료 내 합성 비타민 C의 대체원으로써 CBP를 이용한 연구는 미흡한 실정이다. 비타민 C (ascorbic acid)는 어류의 성장, 대사작용에 필수적인 물질이며 경골어류의 중요한 항산화제로 알려져 있다(Dabrowski, 2001). 경골어류는 비타민 C 합성 효소(L-gulonolactone oxidase)가 없어서 반드시 사료를 통해 비타민 C를 섭취해야 한다(Moreau and Dabrowski, 2000). 사료에 비타민 C가 결핍되면 어류의 성장지연, 사료효율 감소, 척추만곡, 상처회복 지연, 지느러미 부식, 면역력 감소와 같은 여러 결핍증이 발생한다(Zehra and Khan, 2012). 비타민 C는 열과 빛에 취약하기 때문에 양식사료에는 EP (extruded pellet) 제조

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

E-mail address: kjlee@jeju.ac.kr [†]Contributed equally.



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

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2022.0379>

Korean J Fish Aquat Sci 55(3), 379-385, June 2022

Received 6 April 2022; Revised 29 April 2022; Accepted 20 May 2022

저자 직위: 엄건호(대학원생), 김한세(대학원생), 신단비(대학원생), 이연지(대학생), 김수혁(대학생), 송진우(대학원생), 김재식(대학원생), 이경준(교수)

과정에서 안정성이 높은 L-ascorbyl-2-polyphosphate (LAPP)가 주로 사용된다(Wang et al., 2003). 최근, 양식사료 내 합성비타민을 대체하기 위한 대체원료를 개발하는 연구가 진행되고 있다(Kim et al., 2017b). 더불어 양식사료에 항생제 사용을 금지하고 있어 이를 대체할 수 있는 새로운 천연유래 물질에 대한 연구가 활발하게 수행되고 있다(Pérez-Jiménez and Saura-Calixto, 2018).

수온은 어류의 생존과 성장에 있어서 가장 중요한 요소 중 하나로 사료섭취와 소화효소 활성과 같은 대사활동에 직접적인 영향을 미친다(Glencross, 2008). 어류는 수온이 낮은 환경에서 사육될 경우 장내 용모의 길이와 넓이가 감소하여 소화율에 부정적인 영향을 받는다고 알려져 있다(Miegel et al., 2010). 적정 수온보다 낮거나 높은 환경에서 사육된 어류는 면역력과 항산화 효소 활성이 크게 감소한다고 알려져 있다(Raida and Buchmann, 2007; Lu et al., 2020). 이에 따라, 수온 스트레스에 대한 저항성을 향상시킬 수 있는 양식사료 내 천연물질에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있다(Zhou et al., 2021).

넙치는 우리나라에서 가장 많이 양식되는 어종으로 2021년

도 국내 생산량은 41,776톤이었으며 그 생산량이 지속적으로 증가할 것으로 전망된다(KOSIS, 2022). 넙치는 온수성 어류로 겨울철 저수온기에는 체내 소화효소와 물질대사 활성이 저하되어 사료섭취량과 성장이 감소하는 것은 이미 잘 알려져 있다(Iwata et al., 1994). 어류는 환경에 의한 스트레스를 받는 상황에서 비타민 C를 항산화제로 이용하기 때문에 사료 내 요구량이 증가한다(Nandi et al., 1997). 따라서 이번 연구는 저수온기 넙치 사료 내 LAPP 대체원료로서 CBP의 이용가능성을 조사하기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

실험사료

본 실험에 사용된 CBP는 (주)일해공장(Jeju, Korea)에서 제공받아 동결건조 후 사용하였다. 실험에 사용된 CBP는 조단백질 5.6%, 조지방 1.7%, 조회분 2.6%와 수분 7.8%를 함유하였고 비타민 C 함량은 2,000 mg/kg이었다. 대조사료(control, Con)는 어분과 대두박, 옥수수 글루텐을 단백질원으로 사용하였

Table 1. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* (% of dry matter)

Ingredients (%)	Experimental diets				
	Con	CBP25	CBP50	CBP75	CBP100
White fish meal	48.0	48.0	48.0	48.0	48.0
Soybean meal	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Corn gluten meal	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
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 premix ¹	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Vitamin premix ² (vitamin C free)	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
LAPP ³	0.029	0.021	0.014	0.007	0.00
CBP ⁴	0.00	1.25	2.50	3.75	5.00
Cellulose	4.971	3.729	2.486	1.243	0.000
Nutrient compositions					
Total ascorbic acid (mg/kg)	108	93.7	107	111	99.3
Crude protein	46.4	46.6	46.8	47.1	47.3
Crude lipid	13.0	12.8	13.6	13.0	12.9
Ash	9.60	9.70	9.60	9.80	9.90
Moisture	7.40	8.20	8.70	9.80	9.60

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; Starch, 0.14. ²Vitamin premix (g/kg of mixture): DL- α 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; menadione, 0.2; retinyl acetate, 1.0; cholecalciferol, 0.05; cyanocobalamin, 0.01; Starch, 881.16. ³L-ascorbyl-2-polyphosphate (Sigma, St. Louis, MO, USA). ⁴Citrus byproduct (ILHAE Corporation, Jeju, Korea). The vitamin C (L-ascorbyl-2-polyphosphate) in the experimental diets was replaced with graded levels of citrus byproduct (CBP) by 0, 25, 50, 75 or 100% (Con, CBP25, CBP50, CBP75 and CBP100).

고, 오징어간유를 지질원으로 사용하여 조단백질 48%, 조지방 15%를 함유하도록 조성되었다. 4개의 실험사료는 대조사료의 LAPP를 25, 50, 75, 100%만큼 CBP로 대체하여 사료 내 비타민 C의 농도가 각각 100 mg/kg이 되도록 제작하였다(CBP25, CBP50, CBP75 및 CBP100). 원료들을 혼합하고 오징어간유와 사료원 총량의 30%에 해당하는 증류수를 첨가한 후, 펠렛 성형기(SP-50; Kumkang ENG, Daegu, Korea)를 이용하여 직경 2-3 mm 크기로 실험사료를 성형하였다. 실험사료는 건조(25°C, 24 h)시킨 후 사료공급 전까지 냉동보관(-20°C)하였다. 실험사료의 조성과 측정된 비타민 C 함량은 Table 1에 나타내었다.

실험어 및 사육관리

실험에 사용된 넙치는 제주도에 위치한 종묘장에서 구입하여 사육 실험 전 5주 동안 상업사료(CJ Cheil Jedang Co. Ltd., Seoul, Korea)를 공급하면서 실험환경에 순치시켰다. 실험어(초기평균무게, 46.4±0.70 g)는 총 15개의 150 L 원형 polypropylene 수조에 수조 당 25마리씩, 실험구 당 3반복으로 배치되었다. 광주기는 형광등을 이용하여 12 light: 12 dark로 유지되었다. 실험사료는 1일 2회(08:00, 17:00 h)에 걸쳐 6주간 공급하였다. 사육수는 모래여과해수를 사용하여 2 L/min만큼 공급되었고 모든 실험수조에 용존산소 농도 유지를 위해 에어스톤을 설치하였다. 실험기간 동안 모든 실험수조의 수온은 11-15°C, 용존산소 농도는 8.86-9.35 mg/L로 유지되었고, 저수온 환경에서 실험을 진행하였다. 사육실험은 제주대학교 동물실험윤리위원회의 윤리규정(승인번호, 2021-0069)을 준수하면서 진행되었다.

Sampling과 분석

사육실험 종료 후, 실험어의 최종무게(final body weight, FBW)와 사료섭취량(feed intake, FI)을 측정하여 사료계수(feed conversion ratio, FCR), 단백질이용효율(protein efficiency ratio, PER), 생존율(survival)을 조사하였다. FBW 측정

후, 수조 당 8마리(실험구 당 24마리)의 실험어를 무작위로 선별하여 100 ppm의 2-phenoxyethanol (Sigma, St. Louis, MO, USA)로 마취시켰다. 8마리 중 4마리는 heparin (Sigma)이 처리된 주사기로 미병부에서 채혈하였으며, 전혈(whole-blood)은 대식세포 활성(nitro-blue tetrazolium, NBT) 분석과 hemoglobin, hematocrit 측정에 사용하였다. Hematocrit은 모세관 내에 전혈을 채운 후 원심분리기(Hematospin II; Hanil Science Co., Daejeon, Korea)로 원심분리(5,000 g, 15 min)하여 측정하였다. Hemoglobin은 5 mL의 hemoglobin reagent (Yeongdong Pharmaceutical Co., Seoul, Korea)에 전혈 20 µL를 반응시킨 후 자동생화학분석기(SLIM; SEAC Inc., Florence, Italy)를 이용하여 측정하였다. 남은 4마리의 혈액은 heparin이 처리되지 않은 주사기로 채혈하여 원심분리기로(5,000 g, 5 min) 혈청(serum)을 분리하였다. 분리된 혈청은 면역분석에 사용되기 전까지 냉동(-80°C)보관되었다. 실험어의 내장 무게와 체장을 측정하여 간중량지수(hepatosomatic index, HSI)와 내장중량지수(viscerosomatic index, VSI), 비만도(condition factor, CF)를 측정하였다. 면역력 분석을 위해 총 5가지 항목을 조사하였다. NBT, myeloperoxidase (MPO) 활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 방법을, lysozyme 활성은 Hultmark et al. (1980)의 방법을, immunoglobulin (Ig) 함량은 Siwicki and Anderson (1993)의 방법을, superoxide dismutase (SOD) 활성은 SOD assay kit (19160; Sigma)를 사용하여 분석하였다.

실험사료의 일반성분 분석은 AOAC (2005) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125°C, 3 h), 조회분은 직접회화법(550°C, 4 h), 조단백질은 자동조단백질 분석기(Kjeltec system 2300; FOSS, Hillerød, Denmark)로 분석하였고, 조지방은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 Soxhlet 추출장치(SOX406; Hanon Group Inc, Shandong, China)로 분석하였다.

통계학적 분석

완전확률계획법(completely randomized design)으로 실험구를 배치하였고, 모든 분석결과는 SPSS (Version 24.0; Interna-

Table 2. Growth performance and feed utilization of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* (initial body weight, 46.4±0.70 g) fed the experimental diets for 6 weeks

Treatments	FBW ¹	FCR ²	PER ³	FI ⁴	Survival (%)
Con	95.1±4.67 ^b	1.25±0.11 ^a	1.73±0.15 ^b	56.7±5.33	86.7±2.31
CBP25	99.3±3.53 ^{ab}	1.09±0.13 ^{ab}	1.98±0.25 ^{ab}	56.7±3.10	71.3±11.5
CBP50	99.1±3.38 ^{ab}	1.16±0.03 ^{ab}	1.84±0.05 ^{ab}	54.4±2.48	76.0±0.00
CBP75	105±1.63 ^a	1.03±0.11 ^{ab}	2.07±0.21 ^{ab}	54.3±0.89	82.7±4.62
CBP100	107±2.31 ^a	0.93±0.63 ^b	2.27±0.16 ^a	53.2±3.57	71.3±12.9

¹Final body weight (g). ²Feed conversion ratio=dry feed fed (g)/wet weight gain (g). ³Protein efficiency ratio=wet weight gain (g)/total protein given (g). ⁴Feed intake=feed consumption (g)/number of fish. The vitamin C (L-ascorbyl-2-polyphosphate) in the diets were replaced with graded levels of citrus byproduct (CBP) by 0, 25, 50, 75 and 100% (Con, CBP25, CBP50, CBP75 and CBP100). Values are mean of triplicates and presented as mean±S.D. Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

tional Business Machines Co., New York, NY, USA) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석되었다. 데이터 값의 유의차는 Tukey's HSD multiple range test ($P < 0.05$)로 비교하였다. 백분율 데이터는 arcsine 변형값으로 통계분석 하였으며, 모든 데이터는 평균값 \pm 표준편차(mean \pm standard deviation)로 나타내었다.

결 과

성장률은 CBP를 첨가한 실험구에서 높은 경향이 나타났다. 고농도 첨가구인 CBP75와 CBP100 실험구는 Con 실험구에 비해 유의적으로 높았으나(Table 2) ($P < 0.05$), 저농도 첨가구인 CBP25와 CBP50 실험구는 Con 실험구와 유의적인 차이가 없었다($P > 0.05$). FI는 CBP의 첨가량에 영향을 받지 않아 실험구와 Con 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다($P > 0.05$). FCR는 CBP100 실험구가 Con 실험구에 비해 유의적으로 낮았으나($P < 0.05$), CBP25, CBP50, CBP75 실험구는 Con 실험구와 유의적인 차이가 없었다($P > 0.05$). PER은 CBP100 실험구가 Con 실험구에 비해 유의적으로 높았으나($P < 0.05$), CBP25, CBP50, CBP75 실험구는 Con 실험구와 유의적인 차이가 없었다($P > 0.05$). 생존율에서는 모든 실험구 사이에 유의적인 차이

가 없었다($P > 0.05$). Hemoglobin, hematocrit, HSI, VSI, CF는 모든 실험구에서 유의적인 차이가 없었다(Table 3) ($P > 0.05$). 혈액 내 NBT, lysozyme, SOD 활성은 모든 실험구에서 유의적인 차이가 없었다(Table 4) ($P > 0.05$). Ig와 MPO 활성은 사료 내 CBP의 첨가량과 함께 증가하는 경향을 보였으나, 모든 실험구 사이에 유의적인 차이는 없었다($P > 0.05$).

고 찰

이번 연구는 넙치의 적수온(15–20°C)보다 낮은 저수온(11–15°C) 환경에서 실시되었다. 어류는 적정수온보다 낮은 온도에서 사육될 경우, 소화기관 내 여러 효소활성이 저하되어 FI와 성장이 감소한다고 알려져 있다(Azaza et al., 2008; Handeland et al., 2008). CBP에는 hesperidin, naringin, didymin과 같이 분자량이 비교적 낮은 생리활성물질이 풍부하며 동물의 체내에서 그 이용성이 높다고 알려져 있다(Pérez-Jiménez and Saura-Calixto, 2018; Zema et al., 2018). Kim et al. (2017b)은 저수온기(13–15°C) 넙치 치어(44.6 g, 9주) 사료 내 LAPP (30 ppm)를 CBP로 모두 대체할 경우, 어류의 성장과 사료효율이 증진되었다고 보고하였다. Lee et al. (2015)은 저수온기(13–15°C) 참돔 치어(116 g, 8주) 사료 내 LAPP (100 ppm)를 CBP와 발

Table 3. Hematological and biological assessments of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 6 weeks

Treatments	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	HSI ¹	VSI ²	CF ³
Con	4.17 \pm 0.16	32.2 \pm 1.04	1.26 \pm 0.17	3.25 \pm 0.15	0.72 \pm 0.05
CBP25	4.26 \pm 0.38	33.9 \pm 3.98	1.18 \pm 0.14	2.65 \pm 0.36	0.66 \pm 0.05
CBP50	4.29 \pm 0.12	32.6 \pm 0.77	1.16 \pm 0.24	2.89 \pm 0.06	0.71 \pm 0.02
CBP75	4.02 \pm 0.30	30.9 \pm 1.84	1.47 \pm 0.10	2.75 \pm 0.11	0.72 \pm 0.02
CBP100	4.01 \pm 0.07	31.8 \pm 1.42	1.61 \pm 0.20	2.97 \pm 0.51	0.71 \pm 0.01

¹Hepatosomatic index=(liver weight/fish weight) \times 100. ²Viscerosomatic index=(viscera weight/fish weight) \times 100. ³Condition factor=[body weight (g)/{body length (cm)}³] \times 100. The vitamin C (L-ascorbyl-2-polyphosphate) in the diets was replaced with graded levels of citrus byproduct (CBP) by 0, 25, 50, 75 and 100% (Con, CBP25, CBP50, CBP75 and CBP100). Values are mean of triplicate groups and presented as mean \pm S.D. The lack of superscript letter in the same column indicates no significant differences among treatments.

Table 4. Innate immune responses and antioxidant enzyme activity of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 6 weeks

Treatments	NBT ¹	Lysozyme ²	MPO ³	Ig ⁴	SOD ⁵
Con	1.01 \pm 0.14	35.3 \pm 12.0	0.93 \pm 0.10	20.1 \pm 6.69	85.8 \pm 1.99
CBP25	1.03 \pm 0.08	29.8 \pm 4.03	0.99 \pm 0.18	22.7 \pm 4.14	85.0 \pm 4.73
CBP50	1.05 \pm 0.08	34.8 \pm 10.2	0.95 \pm 0.15	22.8 \pm 3.33	79.9 \pm 1.73
CBP75	1.01 \pm 0.01	33.6 \pm 12.0	1.01 \pm 0.04	23.7 \pm 2.93	83.1 \pm 2.91
CBP100	0.96 \pm 0.09	23.8 \pm 5.29	1.04 \pm 0.18	25.3 \pm 2.02	83.1 \pm 5.50

¹Nitro-blue tetrazolium activity (absorbance). ²Lysozyme activity (μ g/mL). ³Myeloperoxidase activity (absorbance). ⁴Immunoglobulin level (mg/mL). ⁵Superoxide dismutase activity (% inhibition). The vitamin C (L-ascorbyl-2-polyphosphate) in the control diet was replaced with graded levels of citrus byproduct (CBP) by 0, 25, 50, 75 and 100% (Con, CBP25, CBP50, CBP75 and CBP100). Values are mean of triplicate groups and presented as mean \pm S.D. The lack of superscript letter in the same column indicates no significant differences among treatments.

효감귤착즙박으로 모두 대체하여도 성장과 사료이용성에 부정적인 영향이 없었다고 보고하였다. 이번 연구에서는 CBP를 이용하여 사료 내 LAPP를 단계적(0, 25, 50, 75, 100%)으로 대체하였고 대체율이 높아질수록 넙치의 성장이 증가하는 것으로 나타났다. 이는 CBP가 함유한 생리활성물질(carotenoids, flavonoids)들이 넙치의 사료 내 영양소 이용성을 증진시켰기 때문이라고 판단된다. 사료 내 LAPP와 같은 비타민 C의 첨가는 차벌메기(*Ictalurus punctatus*) (El and Lovell, 1991), 넙치(Teshima et al., 1991), 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*) (Miyasaki et al., 1992), gilthead seabream *Sparus aurata* (Ortuno et al., 1999), 농어(*Lateolabrax japonicus*) (Ai et al., 2004)를 포함한 대부분의 어류가 정상적으로 성장하고 생리활동을 유지하기 위해 필수적이다. 넙치는 체내에 비타민 C 합성 효소인 L-gulonolactone oxidase가 없기 때문에 반드시 사료를 통해 비타민 C 요구량을 충족해야 한다(Fracalossi et al., 2001). 이번 연구에서 CBP로 사료 내 LAPP를 모두 대체하여도 넙치의 성장과 사료이용성에 부정적인 영향이 관찰되지 않아 비타민 C 요구량을 충족시킬 수 있는 것으로 사료된다. 따라서 CBP는 넙치 치어 사료 내 LAPP를 효과적으로 대체할 수 있을 뿐만 아니라 여러 기능성 물질을 함유하고 있어 그 이용성이 매우 높을 것으로 추측된다.

어류는 수온과 같은 사육환경이 적합하지 않거나, 사료를 통해 영양소와 비타민을 충분히 섭취하지 못할 경우에는 성장과 에너지 대사에 문제가 발생하여 혈액학적 지표(hemoglobin, hematocrit)와 건강도 지표(HSI, VSI, CF)에 변화가 나타난다고 알려져 있다(Song and Lee, 2013; Kim et al., 2017a). 사료 내 비타민 C는 어류가 환경으로부터 받는 스트레스에 대한 저항성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Merchie et al., 1995). Kim et al. (2017b)은 저수온기(13–15°C)에서 넙치 치어 사료에 LAPP를 CBP로 대체하여도 건강도 지표(HSI, VSI, CF)에 영향을 미치지 않았다고 보고하였다. Lee et al. (2013)은 넙치 사료에 발효감귤착즙박을 첨가하였을 때, 혈액학적 지표(hemoglobin, hematocrit)에 부정적인 영향이 없었다고 보고하였다. 이번 연구에서도 저수온기(11–15°C)에 치어기 넙치 사료 내 LAPP를 CBP로 100%까지 대체하여도 모든 실험구와 대조구 사이에 혈액학적 지표(hemoglobin, hematocrit)와 건강도 지표(HSI, VSI, CF)에 유의적인 차이가 없었다. 따라서 넙치 치어 사료 내 LAPP를 CBP로 대체하는 것은 어류의 정상적인 생리작용과 건강에 부정적인 영향을 미치지 않는다고 판단된다. 이번 연구의 사육실험은 6주간의 짧은 저수온기(11–15°C)에 진행되었다. CBP의 대체효율에 대한 보다 정확한 데이터를 확보하기 위해서는 적수온기에서 장기간의 사육실험을 통한 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

어류는 수온, 수질과 같은 요인으로 인해 스트레스를 받을 경우, 체내에 발생하는 활성산소를 제거하기 위해 SOD, GPx와 같은 항산화 효소를 이용한다(Parihar et al., 1997). 어류는 적

정 수온보다 낮은 온도에서 사육될 경우, 면역력과 항산화 효소의 활성이 크게 감소하는 것으로 알려져 있다(Shin et al., 2018). 무지개송어, 차벌메기, 터봇(*Scophthalmus maximus*)과 같은 어류의 면역력(NBT, opsonization)은 저수온이나 고수온에서는 크게 감소한다고 알려져 있다(Nikoskelainen et al., 2004; Huang et al., 2011; Martines et al., 2011). 이번 연구에서 넙치의 면역력(NBT, lysozyme, Ig)과 항산화 효소(MPO, SOD) 활성은 실험구와 대조구 사이에 유의적인 차이가 없었다. Kim et al. (2017b)의 연구에서도 저수온기 넙치 사료에 LAPP를 CBP로 모두 대체하더라도 어류의 면역력(NBT, MPO, Ig)과 항산화 효소 활성(SOD)이 저하되지 않았다고 보고하였다. Lee et al. (2015)은 저수온기(13–15°C) 참돔 치어(116 g, 8주) 사료 내 LAPP를 CBP, 발효 CBP로 대체하여도 면역력(NBT, Ig)과 항산화 효소 활성(SOD, MPO)에 부정적인 영향이 없었다고 밝혔다. Song et al. (2013a)은 저수온기(13–16°C) 참돔 치어(55 g, 9주) 사료에 CBP, 발효 CBP를 첨가하여도 면역력(NBT, MPO, lysozyme, anti-protease)과 항산화 효소(SOD) 활성이 감소하지 않았다고 보고하였다. 이번 연구에서도 넙치 사료 내 LAPP를 CBP로 100%까지 대체하여도 면역력과 항산화 효소 활성에 부정적인 영향이 없었다. 따라서, CBP는 넙치 사료 내 LAPP의 대체원료로써 그 이용성이 높을 것으로 판단된다. CBP와 같은 가공부산물의 생리활성물질의 함량과 조성은 그 생산 방법과 가공 과정에 따라 크게 달라질 수 있다(Song et al., 2013b). 비타민 C뿐만 아니라 가공 방법에 따른 CBP 내 생리활성물질의 조성 및 함량에 대한 후속 연구가 필요하다고 사료된다.

결론적으로, 이번 연구를 통해 넙치 치어 사료에 LAPP를 대체하기 위한 천연 비타민 C 원료로써 CBP의 높은 이용가능성을 확인하였다. 어류의 비타민 C 요구량과 그 이용성은 어체의 크기, 사료조성, 사육 환경과 같은 다양한 요인의 영향을 받는다(Ai et al., 2006). 배합사료 내 비타민 C는 가공온도에 민감하기 때문에 LAPP가 주로 사용된다(Wang et al., 2003). CBP와 같은 천연 물질의 비타민 C는 고온의 성형과정에서 파괴될 가능성이 있다. 따라서, 넙치의 성장단계, 사료조성, 사육기간, 수온과 같은 여러 조건에서의 사료 내 CBP의 이용성과 생리활성물질들의 조성, 작용 기전 그리고 고온의 펠렛성형 과정에서 CBP에 함유된 비타민 C의 안정성에 대한 추가적인 연구가 요구된다.

사 사

이 논문은 2022학년도 제주대학교 교육·연구 및 학생지도비 지원에 의해서 연구되었음.

References

- Ai Q, Mai K, Zhang C, Xu W, Duan Q, Tan B and Liufu Z. 2004. Effects of dietary vitamin C on growth and immune

- response of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture* 242, 489-500. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.08.016>.
- Ai Q, Mai K, Tan B, Xu W, Zhang W, Ma H and Liufu Z. 2006. Effects of dietary vitamin C on survival, growth, and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture* 261, 327-336. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.027>.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2005. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, U.S.A. <https://doi.org/10.1002/0471740039.vec0284>.
- Azaza MS, Dhraïef MN and Kraïem MM. 2008. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. *J Therm Biol* 33, 98-105. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2007.05.007>.
- Dabrowski K. 2001. History, present and future of ascorbic acid research in aquatic organisms. In: *Ascorbic Acid in Aquatic Organisms-status and Perspectives*. Dabrowski K, ed. CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A., 255-257.
- El Naggari 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. <https://doi.org/10.1093/jn/121.10.1622>.
- Folch J, Lees 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.
- Fracalossi DM, Allen ME, Yuyama LK and Oftedal OT. 2001. Ascorbic acid biosynthesis in Amazonian fishes. *Aquaculture* 192, 321-332. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00455-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00455-5).
- Glencross BD. 2008. A factorial growth and feed utilization model for barramundi, *Lates calcarifer*, based on Australian production conditions. *Aquac Nutr* 14, 360-373. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00543.x>.
- Handeland SO, Imsland AK and Stefansson SO. 2008. The effect of temperature and fish size on growth, feed intake, food conversion efficiency and stomach evacuation rate of Atlantic salmon post-smolts. *Aquaculture* 283, 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.042>.
- Huang ZH, Ma AJ and Wang XA 2011. The immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), skin to high water temperature. *J Fish Dis* 34, 619-627. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01275.x>.
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb05991.x>.
- Iwata N, Kikuchi K, Honda H, Kiyono M and Kurokura H. 1994. Effects of temperature on the growth of Japanese flounder. *Fish Sci* 60, 527-531. <https://doi.org/10.2331/fishsci.60.527>.
- JCMSA (Jeju Special Self-governing Province Citrus Marketing and Shipping Association). 2020. Citrus Distribution Processing Analysis Data of 2019. Retrieved from <http://www.citrus.or.kr/board/view.php?btable=bbs&bno=254&p=1&cate=0> on Mar 24, 2021.
- Kim JH, Park HJ, Kim KW, Hwang IK, Kim DH, Oh CW, Lee JS and Kang JC. 2017a. Growth performance, oxidative stress, and non-specific immune responses in juvenile sablefish, *Anoplopoma fimbria*, by changes of water temperature and salinity. *Fish Physiol Biochem* 43, 1421-1431. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0382-z>.
- Kim YJ, Lee CR, Shin JH and Lee KJ. 2017b. Effect of dietary supplementation with citrus by-product as a vitamin C replacement for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* at low water temperatures. *Korean J Fish Aquat Sci* 50, 15-24. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0015>.
- KOSIS (Korea Statistical Information Service). 2022. Survey in the Status of Aquaculture. Retrieved from https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=101&tblId=DT_1EZ0008 on Mar 31, 2022.
- Kumari J and Sahoo PK. 2005. Effects of cyclophosphamide on the immune system and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus*. *Fish Shellfish Immunol* 19, 307-316. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.01.008>.
- 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. <https://doi.org/10.1111/jfd.12035>.
- Lee CR, Kim YJ and Lee KJ. 2015. Dietary supplementation of citrus and fermented citrus by-product for juvenile red seabream *Pagrus major* at low water temperature. *Korean J Fish Aquat Sci* 48, 454-458. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2015.0454>.
- Lu KL, Cai LS, Wang L, Song K, Zhang CX and Rahimnejad S. 2020. Effects of dietary protein/energy ratio and water temperature on growth performance, digestive enzymes activity and non-specific immune response of spotted seabass (*Lateolabrax maculatus*). *Aquac Nutr* 26, 2023-2031. <https://doi.org/10.1111/anu.13143>.
- Martins ML, Xu DH, Shoemaker CA and Klesius PH. 2011. Temperature effects on immune response and hematological parameters of channel catfish *Ictalurus punctatus* vaccinated with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish Shellfish Immunol* 31, 774-780. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.07.015>.
- Merchie G, Lavens P, Radull J, Nelis H, De Leenheer A and Sor-

- geloos P. 1995. Evaluation of vitamin C enriched *Artemia nauplii* for larvae of the giant freshwater prawn. *Aquac Int* 3, 355-363. <https://doi.org/10.1007/BF00121623>.
- Miegel RP, Pain SJ, van Wettere WHEJ, Howarth GS and Stone DAJ. 2010. Effect of water temperature on gut transit time, digestive enzyme activity and nutrient digestibility in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Aquaculture* 308, 145-151. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.07.036>.
- Miyasaki T, Sato M, Yoshinaka R and Sajaguchi M. 1992. Conversion of ascorbyl-2-polyphosphate to ascorbic acid in rainbow trout. *Nippon Suisan Gakk* 58, 2101-2104. <https://doi.org/10.2331/suisan.58.2101>.
- Moreau R and Dabrowski K. 2000. Biosynthesis of ascorbic acid by extant actinopterygians. *J Fish Biol* 57, 733-745. <https://doi.org/10.1006/jfbi.2000.1350>.
- Nandi A, Mukhopadhyay CK, Ghosh MK, Chattopadhyay DJ and Chatterjee IB. 1997. Evolutionary significance of vitamin C biosynthesis in terrestrial vertebrates. *Free Radic Biol Med* 22, 1047-1054. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(96\)00491-1](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(96)00491-1).
- Nikoskelainen S, Bylund G and Lilius EM. 2004. Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. *Dev Comp Immunol* 28, 581-592. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2003.10.003>.
- Ortuno J, Esteban MA and Meseguer J. 1999. Effect of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol* 9, 429-443. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0201>.
- Parihar MS, Javeri T, Hemnani T, Dubey AK and Prakash P. 1997. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. *J Therm Biol* 22, 151-156. [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(97\)00006-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(97)00006-5).
- Pérez-Jiménez J and Saura-Calixto F. 2018. Fruit peels as sources of non-extractable polyphenols or macromolecular antioxidants: Analysis and nutritional implications. *Food Res Int* 111, 148-152. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.023>.
- Raida MK and Buchmann K. 2007. Temperature-dependent expression of immune-relevant genes in rainbow trout following *Yersinia ruckeri* vaccination. *Dis Aquat Organ* 77, 41-52. <https://doi.org/10.3354/dao01808>.
- Shin YK, Kim YD and Kim WJ. 2018. Survival and physiological responses of red sea bream *Pagrus major* with decreasing sea water temperature. *Korean J Ichthyol* 30, 131-136.
- 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. In: *Fish Disease Diagnosis and Prevention Methods*. Wydawnictwo Instytutu Rybactwa Strodładowego, Olsztyn, Poland, 105-112.
- Song JW and Lee KJ. 2013. Effects of dietary nucleotide supplementation on the growth performance, feed utilization, hematological parameters and innate immunity in red seabream *Pagrus major*. *Korean J Fish Aquat Sci* 46, 785-792. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2013.0785>.
- Song JW, Park SH, Lee CR and Lee KJ. 2013a. Effects of dietary supplementation of a citrus by-product on growth performance, innate immunity and tolerance of low water temperature in red seabream *Pagrus major*. *Korean J Fish Aquat Sci* 46, 399-406. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2013.0399>.
- Song YW, Moon KS and Kim SM. 2013b. Antioxidant activity and nutrient content of ethanol and hot-water extracts of *Citrus unshiu* pomace. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42, 1345-1350. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2013.42.9.1345>.
- 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*). In: *Fish Nutrition in Practice*. Kanshik SJ and Luquet P, eds. Biarritz, France, INRA 157-166.
- Wang XJ, Kim KW, Bai SC, Huh MD and Cho BY. 2003. Effects of the different levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid changes in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Aquaculture* 215, 203-211. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00042-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00042-X).
- Zehra S and Khan MA. 2012. Dietary vitamin C requirement of fingerling, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton), based on growth, feed conversion, protein retention, hematological indices, and liver vitamin C concentration. *J World Aquacult Soc* 43, 648-658. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2012.00597.x>.
- Zema DA, Calabrò PS, Folino A, Tamburino V, Zappia G and Zimbone SM. 2018. Valorisation of citrus processing waste: A review. *Waste Manage* 80, 252-273. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.09.024>.
- Zhou W, Liu B, Li Y, Zhan H, Liu Y, Xiao S, Zhao Q and Wang J. 2021. Dietary supplementation with *Sporosarcina aquimarina* MS4 enhances juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) growth, immunity and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection at low temperature. *Aquac Nutr* 27, 918-926. <https://doi.org/10.1111/anu.13236>.