

사료 내 Prebiotic, Probiotics와 Synbiotic의 첨가가 대왕불바리(*Epinephelus akaara* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂)의 성장, 비특이적 면역력, 항산화능, 장내 미생물 조성 및 항염증에 미치는 영향

김원훈 · 임종호 · 강민주¹ · 노충환¹ · 이경준^{2*}

제주대학교 해양생명과학과, ¹한국해양과학기술원, ²제주대학교 해양과학연구소

Effects of Dietary Prebiotic, Probiotics and Synbiotic on Growth, Non-specific Immunity, Antioxidant Capacity, Intestinal Microbiota and Anti-inflammatory Activity of Hybrid Grouper (*Epinephelus akaara* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂)

Wonhoon Kim, Jongho Lim, Minjoo Kang¹, Choong Hwan Noh¹ and Kyeong-Jun Lee^{2*}

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

¹Korea Institute of Ocean Science and Technology, Busan 49111, Republic of Korea

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

The effects of dietary mannan oligosaccharides, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus licheniformis* supplementation on hybrid grouper *Epinephelus akaara* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂ were evaluated. The fish were fed a basal diet and five other diets consisting of 0.6% mannan oligosaccharides, *L. plantarum*, *B. subtilis*, and *B. licheniformis* and mixture of each 0.15% prebiotic and all the probiotics (designated as MOS, LP, BS, BL, and SYN) for 56 days. Growth performance and feed utilization showed no significant differences among all experimental groups. Lipid level of whole-body was significantly high in MOS and BL groups. Plasma aspartate aminotransferase was significantly low in BL and SYN groups. Nitro-blue tetrazolium, lysozyme and anti-protease, and glutathione peroxidase in BS, SYN, and all probiotic groups, respectively, were significantly high. Intestinal *Vibrio* bacteria was significantly low in all probiotic and SYN groups. Gene expression of interleukin-1β and interleukin-10 in SYN group; transforming growth factor β2 in MOS and BS groups, toll-like receptor 2-2 in BS and BL groups; and C-type lectin in MOS, LP and SYN groups were significantly upregulated. Our findings indicate that mannan oligosaccharides, *L. plantarum*, *B. subtilis*, and *B. licheniformis* could improve innate immunity, antioxidant capacity, anti-inflammation, and intestinal microbiota of hybrid grouper.

Keywords: Hybrid grouper, Mannan oligosaccharide, *Lactobacillus*, *Bacillus*, Immunity

서론

불바리(*Epinephelus akaara*)는 중국, 일본을 비롯한 동남아시아 시장의 대표적인 고급 양식어종으로, 수요가 높지만 성장이 느려 최소 출하 크기인 0.6 kg까지 약 3년이 소요된다(Kang et al., 2020). 대왕바리(*Epinephelus lanceolatus*)는 부화 후 1년에 3 kg, 4년에 20 kg, 최대 400 kg까지 빠르게 성장하는 대형

어종으로, 이를 이용해 근연종과 교잡하여 성장이 빠른 교잡바리(hybrid grouper) 생산과 관련된 연구들이 활발히 진행 중이다(Kang et al., 2020; Zhu et al., 2023). 대왕불바리(*E. akaara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂)는 불바리와 대왕바리의 교잡종으로 불바리의 저조한 성장 문제를 해결하기 위해 개발되었으며, 24개월이면 최소 출하 크기에 도달할 수 있다고 보고되었다(Kang et al., 2020).

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

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



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.2023.0850>

Korean J Fish Aquat Sci 56(6), 850-860, December 2023

Received 15 September 2023; Revised 2 November 2023; Accepted 20 November 2023

저자 직위: 김원훈(대학원생), 임종호(대학원생), 강민주(연수생), 노충환(책임 연구원), 이경준(교수)

장내 미생물은 어류의 장내 점막층에 존재하는 미생물로, 숙주의 영양소 소화율, 면역력, 항산화능과 질병 저항성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Yukgehaish et al., 2020). 최근 양식 산업에서 성장과 면역에 관여할 수 있는 어류 장내 미생물의 중요성이 크게 주목받고 있으며, 장내 미생물 조성을 개선할 수 있는 prebiotics와 probiotics 제품들이 활발하게 연구 개발되고 있다(Dawood et al., 2018). Prebiotics는 숙주 생물이 소화할 수 없으나 장내 probiotics의 먹이가 되어 장내 미생물군을 개선하고 건강에 유익한 영향을 미치는 섬유질을 말한다(Davani-Davari et al., 2019). Probiotics는 장내 pH 감소, 병원균 군집 제거와 침입 방지, 면역반응 조절을 통해 체내에 유익한 영향을 미치는 살아있는 미생물로 알려져 있다(Williams, 2010). Prebiotics와 probiotics를 혼합 첨가하여 상호 보완적인 효과를 내는 synbiotics는 양어사료 내 prebiotics나 probiotics의 단독 첨가에 비해 장내 유익균 증가와 병원균 감소, 면역력 증가 효과가 뛰어나 첨가제로 이용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(Cerezuela et al., 2011). 효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 세포벽에서 추출된 prebiotics인 mannan oligosaccharides를 hybrid grouper *E. lanceolatus* ♂ × *E. fuscoguttatus* ♀ 사료 내 첨가할 경우, 항산화능과 비특이적 면역력을 강화하고 *Vibrio harveyi*에 대한 질병 저항성을 증가시켜 생존율을 높일 수 있다고 보고되었다(Ren et al., 2020; Zhu et al., 2023). 양어 사료 내 *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*와 *Lactobacillus plantarum*을 포함한 다양한 probiotics를 첨가할 경우, 갑성돔(*Acanthopagrus schlegelii*, Sagada et al., 2021), Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Han et al., 2015)와 orange spotted grouper *Epinephelus coioides* (Son et al., 2009; Liu et al., 2012)의 성장과 비특이적 면역력을 증가시킨다고 보고되었다. 그러나 현재까지 대왕붉바리 사료에 mannan oligosaccharides, *B. subtilis*, *B. licheniformis*와 *L. plantarum*의 단독 혹은 혼합 첨가에 따른 효과를 평가한 연구는 전무한 실정이다.

Prebiotics나 probiotics의 첨가가 어류에 미치는 영향은 어종에 따라 다르기 때문에, 각 어종에 따라 사료 내 첨가 효과를 평가해야 할 필요가 있다(Hai, 2015; Yukgehaish et al., 2020). 따라서 본 연구는 대왕붉바리 사료 내 mannan oligosaccharides, *L. plantarum*, *B. subtilis*와 *B. licheniformis*의 단독 혹은 혼합 첨가가 성장, 비특이적 면역력, 항산화능, 장내 미생물군 조성 및 항염증 반응에 미치는 영향을 조사하고자 수행하였다.

재료 및 방법

실험사료

사육실험에는 분말 형태의 mannan oligosaccharides (Alltech, Lexington, KY, USA), *L. plantarum* (FNCbio Co. Ltd., Daejeon, Korea), *B. subtilis* (FNCbio Co)와 *B. licheniformis* (Woogene B&G Co. Ltd., Seoul, Korea)를 사용하였고, 첨

가한 probiotics의 균 농도는 1.0×10^{10} CFU (colony forming unit)/g으로 동일하였다. 대조사료(CON)는 어분(sardine meal)과 대두박을 주 단백질원으로 사용하였고, 조단백질과 조지질의 함량은 각각 58.8%와 12.0%로 조성하였다(Table 1). Prebiotic 첨가구는 mannan oligosaccharides를 0.6% 첨가하였으며(MOS), probiotics 첨가구는 *L. plantarum*, *B. subtilis*와 *B. licheniformis*를 각각 0.6%씩 첨가하였다(LP, BS, BL). Synbiotic 실험구는 mannan oligosaccharides와 3가지 probiotics를 각각 0.15%씩 총 0.6% 첨가하였다(SYN). 실험사료에 첨가된 mannan oligosaccharides와 probiotics는 CON의 starch를 대체하여 첨가하였다. 실험사료는 원료를 혼합한 후, 어유와 증류수(원료 총 중량의 13%)를 첨가하여 펠릿 성형기(SP-50; Kumkang ENG, Daegu, Korea)를 이용해 직경 7 mm 크기로 제작하였다. 실험사료는 건조(25°C, 8 h) 후 냉장(4°C) 보관하였다.

실험어와 사육관리

사육실험에 사용된 대왕붉바리는 전라남도 무안군에 위치한 양식장에서 구입하여 제주대학교 해양과학연구소로 이송 후, 실험 환경 적응을 위해 1.2톤 수조에서 2주 동안 순치하였다. 총 234마리의 실험어(초기 평균 무게, 183.95 ± 4.43 g)를 원형 polypropylene 수조(300 L)에 수조당 13마리씩, 실험구당 3반복으로 18개 수조에 배치하였다. 사육실험은 총 8주간 진행하였으며 실험기간 동안 사료는 1일 2회(08:30, 18:30 h)에 걸쳐 반복 공급하였다. 모든 실험수조의 사육수는 자연 해수를 모래 여과하여 수조에 3 L/min으로 동일하게 공급하였으며, 용존산소량을 유지하기 위해 공기 발생기(aeration)를 설치하였다. 각 수조의 용존산소량과 수온은 Pro20 Dissolved Oxygen Instrument (6050020; YSI, Yellow Springs, OH, USA)를 사용하여 1일 1회 측정하였다. 실험기간 동안 모든 실험수조의 용존산소량과 수온은 각각 8.24–9.05 mg/L와 $24.4 \pm 2.3^\circ\text{C}$ 로 유지하였다. 실험기간 동안 광주기는 12 light: 12 dark를 유지하였다.

Sampling과 분석

실험어를 24 h 절식한 후 최종무게(final body weight, FBW)를 측정하였다. 무게 측정 후 일간성장률(specific growth rate, SGR)과 생존율(survival)을 조사하였으며, 사료섭취량(feed intake, FI)을 사용하여 사료계수(feed conversion ratio, FCR)와 단백질 이용효율(protein efficiency ratio, PER)을 계산하였다. FBW 측정 후 모든 실험 수조에서 수조당 3마리의 실험어를 무작위로 선별하였다. 선별한 실험어는 100 mg/L 농도의 MS-222 (M10521; Sigma, St. Louis, MO, USA) 수용액을 사용하여 마취하였으며, 미부정맥에서 채혈한 후 해부하여 간을 sampling 하였다. 채혈한 혈액은 혈청(serum)과 혈장(plasma)으로 분리하였으며, plasma는 heparin (H6279; Sigma) 처리 후 nitro-blue tetrazolium (NBT), hemoglobin (Hb)과 hematocrit (Ht) 분석에 사용하였다. 분석 후 남은 plasma는 원심분리(5,000 g, 5 min, 4°C)하여 상층액을 분리하였다. Serum은 원

Table 1. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets for hybrid grouper *Epinephelus akaara* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂ (% of dry matter)

Ingredients (%)	Experimental diets					
	CON	MOS	LP	BS	BL	SYN
Fish meal (sardine) ¹	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00	45.00
Soybean meal	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
Tankage meal	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Wheat flour	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
Soy protein concentrate	5.50	5.50	5.50	5.50	5.50	5.50
Poultry byproduct meal	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
Wheat gluten	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
Fish oil ²	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30
Starch	3.80	3.20	3.20	3.20	3.20	3.20
Mannan oligosaccharides	-	0.60	-	-	-	0.15
<i>Lactobacillus plantarum</i> ⁴	-	-	0.60	-	-	0.15
<i>Bacillus subtilis</i> ⁴	-	-	-	0.60	-	0.15
<i>B. licheniformis</i> ⁵	-	-	-	-	0.60	0.15
Betaine	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Taurine	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Mono-calcium phosphate	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70
Choline	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Lecithin	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Mineral premix ⁶	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin premix ⁷	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin C ⁸	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamin E ⁸	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Proximate composition (%)						
Crude protein	58.80	59.48	58.37	58.97	58.52	59.63
Crude lipid	12.04	12.25	12.13	12.14	12.49	12.19
Ash	11.58	11.49	11.47	11.48	11.54	11.49
Moisture	10.45	8.54	8.27	8.30	7.57	8.21

¹Orizon S.A., Las Condes, Chile. ²E-wha Oil Co. Ltd., Busan, Korea. ³Alltech, Kentucky, USA. ⁴FNCbio Co. Ltd., Daejeon, Korea. ⁵Woogene B&G Co. Ltd., Hwaseong, Korea. ⁶Mineral 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. ⁷Vitamin premix (g/kg of mixture): DL- α tocopherol 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. ⁸AlphaAqua Co., Busan, Korea. CON, Control; MOS, Mannan oligosaccharides; LP, *Lactobacillus plantarum*; BS, *Bacillus subtilis*; BL, *Bacillus licheniformis*; SYN, Synbiotic, mixture of each 0.15% mannan oligosaccharides, *L. plantarum*, *B. subtilis* and *B. licheniformis*.

심분리(5,000 g, 5 min, 4°C) 후 상층액을 분리하여 면역분석에 사용하였다. 간 sample은 액체질소를 이용하여 급속 냉동 후 serum, plasma와 함께 분석 전까지 초저온 냉동고(-80°C)에서 냉동 보관하였다. 전어체(whole-body)는 일반성분 분석을 위해 냉동(-24°C) 보관하였다.

Ht은 모세관 내 plasma를 원심분리기(Hematospin II; Hanil Science Co, Daejeon, Korea)를 사용하여 원심분리(12,000 g, 15 min, 4°C) 후 측정하였다. 자동생화학분석기(CH 100^{plus}; RADIM Company, Firenze, Italy)를 이용하여 Hb, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), cholesterol (Chol)과 triglyceride (TG) 농도를 측정하였다. NBT와 myeloperoxidase (MPO) 활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 방법으로 분석하였다. Lysozyme 활성, anti-protease 활성과 immunoglobulin (Ig) 함량은 각각 Mohammed et al. (2018)과 Ellis (1990), Siwicki and Anderson (1993)의 방법에 따라 분석하였다. 항산화능 분석인 glutathione peroxidase (GPx) 활성과 superoxide dismutase (SOD) 활성은 GPx assay kit (703102; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)와 SOD assay kit (19160; Sigma)를 사용하여 분석하였다. 실험재료와 전어체의 일반성분 조성 중 수분, 회분, 조단백질 함량은 AOAC (2005)의 방법을, 조지질의 함량은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 분석을 진행하였다.

장내 미생물 조성은 Silva et al. (2013)과 Safari et al. (2022)의 방법에 따라 분석하였다. 수조당 3마리의 실험어를 무작위로 선별하여 무게 측정 후, 얼음물에서 5분간 마취를 진행하여 마취된 실험어의 장을 sampling 하였다. 장 sample은 2 mL의 sodium chloride (0.9%) 용액에 넣고 1 min간 균질한 후, 원심분리(5,000 g, 5 min, 4°C)하여 상층액을 분리하였다. 상층액은 농도에 따라 희석하였으며, 실험어당 3반복으로 marine agar (2124239; BD DifcoTM, Dickinson, ND, USA), lactobacilli MRS agar (2047688; BD DifcoTM)와 thiosulfate citrate bile salt sucrose (TCBS) agar (1173733; BD DifcoTM)에 100 μ L씩 도말하였다. Marine agar, lactobacilli MRS agar, TCBS agar를 사용하여 각각 total heterotrophic bacteria (THB), total lactic acid bacteria (TLB), total *Vibrio* bacteria (TVB)를 관찰하였으며, incubator (27°C)에서 최소 48 h에서 최대 72 h까지 배양하였다. 각 lactobacilli MRS agar와 TCBS agar는 colony의 형태를 확인하여 LAB와 *Vibrio*를 구분하였고, colony의 개수가 30–300개가 관찰되는 agar를 선별하여 CFU를 측정하였다.

대왕붉바리의 간 sample을 TRIzol (T9424; Sigma)에 넣고 균질하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA 농도는 μ DropTMPlate (N12391; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)로 측정하였고, 모든 OD₂₆₀/OD₂₈₀의 RNA 순도가 1.8–2.0임을 확인하였다. PrimeScriptTM first-strand cDNA synthesis kit (6110A; Takara, Shiga, Japan)를 사용하여 cDNA를 합성하였고, nuclease free water에 100배로 희석하여 분석 전까지 초저온 냉동

고(-80°C)에 냉동 보관하였다. qPCR 분석에는 Thermal Cycle Dice Real Time System III (TP 950; Takara) 기기를 이용하였다. Reference gene으로는 β -actin을, target gene으로는 interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 10 (IL-10), transforming growth factor β 2 (TGF- β 2), toll-like receptor 2-2 (TLR 2-2)와 C type lectin을 사용하여 분석을 진행하였다. PCR 반응은 95°C에서 30 s (initial denaturation) 후 95°C에서 15 s (denaturation), 50°C에서 30 s (annealing), 72°C에서 45 s (extension) cycle을 총 45회 진행하였다. 분석에 사용한 유전자의 primer sequences는 Table 2에 나타내었다.

통계학적 분석

실험은 완전확률계획법(completely randomized design)에 따라 실험구를 배치하였다. 모든 데이터들은 SPSS (Version 24.0; International Business Machines Co., NY, USA) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석하였고, 백분율 데이터는 통계 분석 전에 arcsine값으로 변형하여 분석하였다. 분석 후 결과의 유의차는 Duncan's multiple range test (P<0.05)로 사후검정을 하여 결과 값의 유의차를 비교하였고, 모든 데이터는 평균값±표준편차(mean±standard deviation)로 나타내었다.

결 과

성장과 사료 이용

8주간의 사육실험 후 성장 지표(FBW, SGR), 사료 이용 지표(FCR, PER)와 survival은 모든 실험구 사이에서 유의한 차이가 없었다(P>0.05) (Table 3). FI는 MOS 그룹과 BS 그룹에 비

해 SYN 그룹에서 유의적으로 높았다(P<0.05). 전어체 일반성분 분석 결과, MOS 그룹에서 CON 그룹에 비해 지질 함량이 유의적으로 높게 나타났다(P<0.05) (Table 4).

비특이적 면역력과 항산화능

혈액의 MPO, SOD 활성과 Ig 농도는 모든 실험구 사이에 유의한 차이를 보이지 않았다(P>0.05) (Table 5). NBT 활성은 BS 그룹이 CON 그룹, LP 그룹, BL 그룹과 SYN 그룹에 비해 유의적으로 높은 결과를 보였다(P<0.05). Lysozyme 활성은 CON 그룹에 비해 BS 그룹과 SYN 그룹에서 유의하게 높았다(P<0.05). Anti-protease 활성은 BL 그룹, SYN 그룹이 CON 그룹, MOS 그룹, BS 그룹에 비해 유의적으로 높게 나타났다(P<0.05). GPx 활성은 LP 그룹, BS 그룹, BL 그룹이 CON 그룹, MOS 그룹, SYN 그룹에 비해 유의하게 높았다(P<0.05).

혈액학적 지표

Hb, Chol, TG와 ALT는 모든 실험구 사이에 유의한 차이가 없었다(P>0.05) (Table 6). Ht은 BS 그룹, SYN 그룹이 BL 그룹에 비해 유의적으로 높게 나타났다(P<0.05). AST는 BL 그룹, SYN 그룹이 CON 그룹에 비해 유의하게 낮았다(P<0.05).

장내 미생물 조성

대왕붉바리의 장내 TLB/THB 비율은 모든 실험구 사이에 유의한 차이가 없었다(P>0.05) (Fig. 1). TVB/THB 비율은 MOS 그룹을 제외한 모든 실험구에서 CON 그룹에 비해 유의하게 낮았다(P<0.05).

항염증 유전자 발현

간 내 IL-1 β 와 IL-10의 유전자 발현은 SYN 그룹에서 CON

Table 2. Primer sequences of target genes used in real-time quantitative PCR of hybrid grouper *Epinephelus akaara* ♀×*Epinephelus lanceolatus* ♂

Target Gene	Primer sequences	Accession number
β -Actin	Forward: 5'-TGCGTGACATCAAGGAGAAG-3'	HQ007251.1
	Reverse: 5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG-3'	
IL-1 β	Forward: 5'-CCTGCTCTATGAAAGACGAC-3'	XM_033647455.1
	Reverse: 5'-ACCTTACACAGTTCACAGG-3'	
IL-10	Forward: 5'-GTTAGTCTCCTCCCTCAGGT-3'	XM_033625798.1
	Reverse: 5'-CTTCAGGAGTGGAGATGC-3'	
TGF- β 2	Forward: 5'-GTTAGTCTCCTCCCTCAGGT-3'	XM_033638913.1
	Reverse: 5'-CTTCAGGAGTGGAGATGC-3'	
TLR 2-2	Forward: 5'-GGATGTCAGACTCCAGATTG-3'	OM023893.1
	Reverse: 5'-GATTAGAGCTGGGAAGAGGT-3'	
C type lectin	Forward: 5'-CAGTGTGCACAAGTGAGTGT-3'	FJ410923.1
	Reverse: 5'-ACAGATGTCTGTAGCGATCC-3'	

IL-1 β , interleukin 1 β ; IL-10, interleukin 10; TGF- β 2, transforming growth factor β 2; TLR 2-2, toll-like receptor 2-2.

Table 3. Growth performance, feed utilization and survival of hybrid grouper *Epinephelus akaara* ♀×*Epinephelus lanceolatus* ♂ (initial body weight: 183.95±4.43 g) fed the experimental diets for 8 weeks

Diets	FBW (g) ¹	SGR (%/day) ²	FCR ³	PER ⁴	FI (g/fish) ⁵	Survival (%)
CON	254.5±39.8	0.59±0.23	2.00±1.29	0.52±0.26	123.8±6.2 ^{ab}	97.4±4.4
MOS	260.1±31.3	0.56±0.18	1.64±0.58	0.63±0.31	109.8±9.3 ^b	92.3±7.7
LP	267.5±26.6	0.60±0.10	1.62±0.21	0.50±0.13	129.3±29.4 ^{ab}	100±0.0
BS	276.2±5.6	0.73±0.10	1.20±0.07	0.73±0.08	116.1±13.0 ^b	94.9±4.4
BL	285.4±48.4	0.72±0.29	1.52±0.78	0.58±0.21	129.6±10.1 ^{ab}	100±0.0
SYN	317.0±30.6	0.87±0.15	1.17±0.19	0.59±0.05	146.6±11.2 ^a	97.4±4.4

¹Final body weight (g). ²Specific growth rate (%/day)={log_e [final mean body weight (g)]-log_e [initial mean body weight (g)]}/days×100. ³Feed conversion ratio=dry feed intake (g)/wet weight gain (g). ⁴Protein efficiency ratio=wet weight gain (g)/total protein intake (g). ⁵Feed intake (g/fish)=feed consumption (g)/number of fish. CON, Control; MOS, Mannan oligosaccharides; LP, *Lactobacillus plantarum*; BS, *Bacillus subtilis*; BL, *Bacillus licheniformis*; SYN, Synbiotic, mixture of each 0.15% mannan oligosaccharides, *L. plantarum*, *B. subtilis* and *B. licheniformis*. 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.

Table 4. Whole body proximate composition of hybrid grouper *Epinephelus akaara* ♀×*Epinephelus lanceolatus* ♂ fed the experimental diets for 8 weeks (% wet basis)

Diets	Crude protein	Crude lipid	Ash	Moisture
CON	15.22±0.53	4.88±0.35 ^{bc}	3.61±0.32	75.99±3.91
MOS	15.12±1.79	5.45±0.03 ^a	4.57±0.73	71.93±1.26
LP	14.22±0.53	4.92±0.37 ^{bc}	3.59±0.66	76.71±0.70
BS	15.45±0.70	5.30±0.07 ^{abc}	4.40±0.79	75.96±1.27
BL	16.13±0.53	5.37±0.32 ^{ab}	3.81±0.75	75.73±0.05
SYN	14.97±0.18	4.80±0.16 ^c	3.32±0.52	77.02±1.30

CON, Control; MOS, Mannan oligosaccharides; LP, *Lactobacillus plantarum*; BS, *Bacillus subtilis*; BL, *Bacillus licheniformis*; SYN, Synbiotic, mixture of each 0.15% mannan oligosaccharides, *L. plantarum*, *B. subtilis* and *B. licheniformis*. 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.

그룹에 비해 유의적으로 높은 결과를 보였다(P<0.05) (Fig. 2). TGF-β2의 발현은 MOS 그룹과 BS 그룹에서 CON 그룹에 비해 유의하게 높았다(P<0.05). TLR 2-2 유전자는 BS 그룹과 BL 그룹에서 CON 그룹에 비해 유의적으로 높게 나타났다(P<0.05). C type lectin은 MOS 그룹, LP 그룹과 SYN 그룹에서 CON 그룹에 비해 유전자 발현량이 유의하게 높았다(P<0.05).

고 찰

양어사료 내 prebiotics, probiotics와 synbiotics 첨가는 장에서 소화효소(protease, amylase, lipase) 활성을 촉진하여 영양소 소화율과 성장을 증가시킬 수 있다(Wang et al., 2017a; Adorian et al., 2019). Orange spotted grouper (초기 무게, 2.8

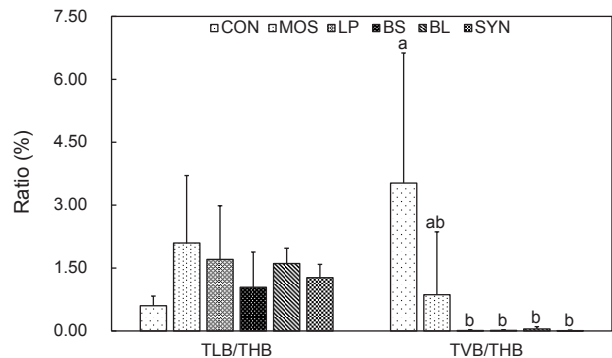


Fig. 1. Intestinal microbiota ratio of total lactic acid bacteria (TLB) and total *Vibrio* bacteria (TVB) to total heterotrophic bacteria (THB) of hybrid grouper *Epinephelus akaara* ♀×*E. lanceolatus* ♂ fed the experimental diets for 8 weeks. CON, Control; MOS, Mannan oligosaccharides; LP, *Lactobacillus plantarum*; BS, *Bacillus subtilis*; BL, *Bacillus licheniformis*; SYN, Synbiotic, mixture of each 0.15% mannan oligosaccharides, *L. plantarum*, *B. subtilis* and *B. licheniformis*. Values are mean of triplicates and bars with different letters are significantly different (P<0.05).

g) 사료에 *B. subtilis* 혹은 *L. plantarum*을 1×10^8 CFU/g 이상의 농도로 첨가할 경우, 성장이 유의하게 증가하였다고 보고되었다(Son et al., 2009; Liu et al., 2012). Sun et al. (2010)은 orange spotted grouper (초기 무게, 45 g) 사료 내 *B. pumilus*와 *B. clausii*를 각각 1×10^8 CFU/g 농도로 단독 첨가하여 60일간 공급했을 때, *B. clausii* 실험구에서 *B. pumilus* 실험구에 비해 성장 증가 효과가 나타났으며, 이는 첨가된 *B. clausii*가 단백질 소화율을 개선시킨 결과라고 보고하였다. 이에 더해, Hybrid grouper *E. fuscoguttatus* ♀×*E. lanceolatus* ♂ (초기 무게, 28 g) 사료 내 0.2%의 mannan oligosaccharides를 첨가하여 4주간 공급했을 때, 성장률이 유의하게 증가하였다고 보고되었다

(Zhu et al., 2023). Kang et al. (2022)은 대왕불바리(초기 무계, 12–13 g)를 대상으로 각각 19°C, 23°C, 27°C와 31°C의 수온에서 사육실험을 진행한 결과, 수온이 증가함에 따라 성장이 증가하였으며 31°C에서 가장 높게 나타났다고 보고하였다. Prebiotics와 probiotics는 어종, 성장 단계, 사육수온과 첨가 함량에 따라 이용성이 달라진다(Torrecillas et al., 2011; Yang et al., 2016). 따라서, 대왕불바리 사료에 mannan oligosaccharides, *B. subtilis*, *B. licheniformis*와 *L. plantarum*의 단독 혹은 혼합 첨가가 성장에 미치는 효과의 검증을 위해서는 성장단계, 첨가 함량, 첨가된 균주의 종류, 사육 수온 등 다양한 조건에서의 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

양어사료 내 *Bacillus*의 첨가는 넙치(*Paralichthys olivaceus*, Ye et al., 2011), 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*, Bagheri et al., 2008)와 barramundi *Lates calcarifer* (Adorian et al., 2019)의 전어체 조직질 함량을 감소시킨다고 보고되었다. Adorian

et al. (2019)은 barramundi 사료 내 *Bacillus* 첨가가 소화효소 (protease, lipase, amylase)의 활성을 증가시켜 이용 가능한 영양소 사용을 최적화하고, 지질 저장보다 단백질 저장을 우선하여 전어체 조직질 함량이 감소되었다고 보고하였다. Dawood et al. (2016)은 참돔(*Pagrus major*) 사료에 *L. rhamnosus*와 *L. lactis*를 첨가하였을 때 전어체의 조직질 함량이 유의하게 증가하였고, 이는 사료 내 *Lactobacillus*가 체내 지질 소화율을 증가시켰기 때문이라고 보고하였다. 반면, Amoah et al. (2023)은 hybrid grouper *E. fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂ 사료에 *Bacillus*를 첨가하였을 때, 전어체의 조직질 함량에는 유의한 차이가 없었다고 보고하였다. 본 실험의 경우, 대왕불바리 사료 내 mannan oligosaccharides의 단독 첨가가 지질 소화율을 향상시켜 전어체의 지질 함량이 증가한 것으로 사료된다.

어류의 비특이적 면역은 항상성 유지와 병원균 제거에 중추적인 역할을 하며, SOD와 GPx는 항산화효소로서 면역반응 과정

Table 5. Non-specific immune responses and antioxidant capacity of hybrid grouper *Epinephelus akaara* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂ fed the experimental diets for 8 weeks

Diets	NBT ¹	Lysozyme (µg/mL) ²	MPO (µg/mL) ³	Ig (mg/mL) ⁴	Anti-protease (% inhibition) ⁵	GPx activity (mU/mL) ⁶	SOD activity (% inhibition) ⁷
CON	1.08±0.05 ^b	18.2±0.2 ^b	0.54±0.10	15.1±0.4	26.4±1.7 ^b	67.7±5.2 ^c	65.8±5.5
MOS	1.20±0.11 ^{ab}	18.4±0.3 ^{ab}	0.70±0.14	16.8±2.7	25.3±1.1 ^b	70.3±6.2 ^c	76.1±4.4
LP	1.16±0.17 ^b	18.8±0.9 ^{ab}	0.59±0.11	18.5±0.5	27.5±0.2 ^{ab}	106.7±6.1 ^a	75.5±5.0
BS	1.36±0.16 ^a	19.4±1.0 ^a	0.52±0.10	16.3±3.1	25.6±1.7 ^b	95.7±12.9 ^{ab}	72.6±5.0
BL	1.10±0.10 ^b	18.8±0.3 ^{ab}	0.61±0.15	16.0±3.9	29.0±2.0 ^a	91.9±6.3 ^b	63.6±8.8
SYN	1.13±0.06 ^b	19.3±0.5 ^a	0.64±0.17	16.1±3.4	29.2±0.1 ^a	78.6±4.7 ^c	62.6±19.3

¹Nitro-blue tetrazolium activity (absorbance). ²Lysozyme activity (µg/mL). ³Myeloperoxidase activity (µg/mL). ⁴Immunoglobulin level (mg/mL). ⁵Anti-protease activity (% inhibition). ⁶Glutathione peroxidase activity (mU/mL). ⁷Superoxide dismutase activity (% inhibition). CON, Control; MOS, Mannan oligosaccharides; LP, *Lactobacillus plantarum*; BS, *Bacillus subtilis*; BL, *Bacillus licheniformis*; SYN, Synbiotic: mixture of each 0.15% mannan oligosaccharides, *L. plantarum*, *B. subtilis* and *B. licheniformis*. Values are mean of triplicate groups 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.

Table 6. Hematological parameters of hybrid grouper *Epinephelus akaara* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂ fed the experimental diets for 8 weeks

Diets	Hb (g/dL) ¹	Ht (%) ²	AST (U/L) ³	ALT (U/L) ⁴	Chol (mg/dL) ⁵	TG (mg/dL) ⁶
CON	6.71±0.95	30.4±4.2 ^{ab}	73.6±8.9 ^a	23.8±6.8	80.7±5.2	237.9±5.3
MOS	6.78±0.78	29.2±2.4 ^{ab}	58.3±16.6 ^{ab}	20.9±10.3	96.9±16.7	243.6±7.5
LP	6.99±0.97	26.1±3.8 ^{ab}	52.3±15.8 ^{ab}	20.0±4.6	92.8±17.4	255.8±11.5
BS	7.45±1.12	31.2±4.0 ^a	58.9±12.2 ^{ab}	12.1±1.8	95.1±9.0	261.1±11.8
BL	5.93±0.81	25.7±2.5 ^b	35.7±7.0 ^b	12.6±4.1	96.7±15.5	250.9±16.1
SYN	7.23±0.10	31.3±1.9 ^a	50.0±3.8 ^b	22.1±2.8	95.6±11.4	240.4±9.5

¹Hemoglobin (g/dL). ²Hematocrit (%). ³Aspartate aminotransferase (U/L). ⁴Alanine aminotransferase (U/L). ⁵Cholesterol (mg/dL). ⁶Triglyceride (mg/dL). CON, Control; MOS, Mannan oligosaccharides; LP, *Lactobacillus plantarum*; BS, *Bacillus subtilis*; BL, *Bacillus licheniformis*; SYN, Synbiotic, mixture of each 0.15% mannan oligosaccharides, *L. plantarum*, *B. subtilis* and *B. licheniformis*. Values are mean of triplicate groups 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.

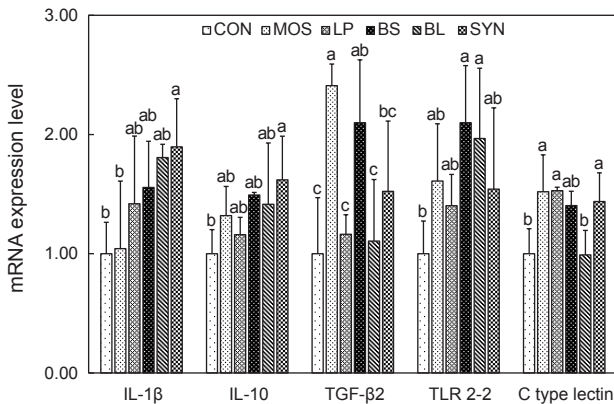


Fig. 2. Relative mRNA expression of IL-1 β , IL-10, TGF- β 2, TLR 2-2 and C type lectin in the liver of hybrid grouper *Epinephelus akaara* ♀ × *E. lanceolatus* ♂ fed the experimental diets for 8 weeks. IL-1 β , interleukin 1 β ; IL-10, interleukin 10; TGF- β 2, transforming growth factor beta 2; TLR 2-2, toll-like receptor 2-2. CON, Control; MOS, Mannan oligosaccharides; LP, *Lactobacillus plantarum*; BS, *Bacillus subtilis*; BL, *Bacillus licheniformis*; SYN, Synbiotic, mixture of each 0.15% mannan oligosaccharides, *L. plantarum*, *B. subtilis* and *B. licheniformis*. Values are mean of triplicates and bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

에서 발생하는 활성산소를 제거하여 산화스트레스를 방지한다 (Toppo et al., 2009; Wang et al., 2018). 참돔 사료 내 mannan oligosaccharides, *L. rhamnosus*와 *L. lactis*를 단독 혹은 혼합 첨가하여 공급할 경우, lysozyme, 대식세포 활성과 SOD 활성이 증가한다고 보고되었다 (Dawood et al., 2016; 2020). 넙치 사료에 mannan oligosaccharides, *B. subtilis*와 *B. clausii*를 단독 혹은 혼합 첨가하여 공급할 경우, lysozyme과 antiprotease의 활성이 증가하였다고 보고되었다 (Ye et al., 2011; Lee et al., 2020). Jang et al. (2021)은 조피볼락 (*Sebastes schlegelii*) 사료에 mannan oligosaccharides를 첨가할 경우 lysozyme, MPO, SOD 활성과 Ig 농도를 증가시킨다고 보고하였으며, Giri et al. (2013)은 rohu *Labeo rohita* 사료 내 *L. plantarum* 첨가가 lysozyme, 대식세포와 SOD 활성을 증가시킨다고 보고하였다. Orange spotted grouper에서도 mannan oligosaccharides, *L. plantarum*, *B. pumilus*와 *B. clausii*의 단독 혹은 혼합 첨가가 비특이적 면역력 (lysozyme과 phagocyte)과 항산화 효소 (SOD와 GPx) 활성을 증가시킨다고 알려져 있다 (Son et al., 2009; Sun et al., 2010; Liu et al., 2012; Wang et al., 2017a). Torrecillas et al. (2011)은 유럽 농어 (*Dicentrarchus labrax*) 사료에 첨가된 mannan oligosaccharides가 체내의 패턴 인식 수용체 (pattern recognition receptor, PRR)에 의해 인식되어 대식세포와 lysozyme 활성을 증가시킨다고 보고하였다. 사료에 첨가된 *L. plantarum*과 *Bacillus* 균주는 식세포 작용, 대식세포, lysozyme과 complement 활성을 통해 세포와 체액의 면역능을 자극하

고, 체내 glutathione과 folate 생성, 항산화 효소 활성 증가를 통해 숙주의 면역능을 증가시킬 수 있다 (Son et al., 2009; Nayak, 2010; Sun et al., 2010; Liu et al., 2012; Wang et al., 2017b). 선행 연구들과 같이 본 실험에서 사료에 첨가된 mannan oligosaccharides, *L. plantarum*, *B. subtilis*와 *B. licheniformis*가 체내 대식세포와 lysozyme 활성, glutathione 생성 증가에 관여하여 비특이적 면역력을 강화했다고 생각된다. 그러나 NBT와 GPx의 경우, 각각 *B. subtilis* 단독 첨가나 probiotics를 단독 첨가한 경우에만 활성이 증가하여 나타났으므로, 이와 관련된 후속 연구가 필요하다고 생각된다. 따라서 *L. plantarum*, *B. subtilis*와 *B. licheniformis*는 기능성 사료 첨가제로써, 대왕붉바리 사료에 첨가할 경우 체내 lysozyme, anti-protease 활성과 GPx 활성을 증가시킬 것으로 사료된다.

어류의 혈액학적 지표는 건강도 (Hb, Ht), 물질 대사 (Chol, TG), 간 손상에 의한 스트레스 (AST, ALT) 등을 확인하기 위해 사용된다 (Casanovas et al., 2021). Dawood et al. (2016)은 참돔 사료 내 *L. rhamnosus*와 *L. lactis*를 첨가하여 공급할 경우, 장에서 짧은 사슬 지방산 생성을 촉진하여 혈중 지질 수치인 Chol과 TG를 감소시켰다고 보고하였다. 이에 더해, 사료 내 *Lactobacillus* 첨가가 참돔의 조직 손상이나 외부 감염으로부터 회복을 돕고 항상성 유지에 기여하여 Ht 수치를 증가시킨다고 보고되었다 (Dawood et al., 2016). Adorian et al. (2019)은 barramundi 사료 내 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*의 첨가가 AST, ALT 수치를 감소시킨다고 보고하였다. 따라서 대왕붉바리 사료 내 mannan oligosaccharides, *L. plantarum*, *B. subtilis*와 *B. licheniformis*의 혼합 첨가 혹은 *B. licheniformis*의 단독 첨가는 스트레스에 의한 간 손상을 감소시켜주는 것으로 판단된다.

어류의 장내 유익균의 증식은 병원균을 억제하여 장내 미생물군 구성을 개선하여 숙주의 건강, 면역능 강화와 소화 개선을 통하여 숙주에 긍정적인 영향을 미칠 수 있다 (Liu et al., 2012). *Bacillus*는 장내에서 증식할 경우, 장내 산소 농도를 감소시켜 호기성 병원균의 성장을 억제하고, 혐기성 유익균의 성장을 촉진하여 장내 미생물군 구성을 개선한다고 보고되었다 (Timmerman et al., 2004; Kuebutornye et al., 2019). Son et al. (2009)은 orange spotted grouper 사료 내 *L. plantarum*의 첨가가 장내 LAB의 증식을 촉진하여 장내 미생물 구성을 개선한다고 보고하였다. Yang et al. (2014)은 orange spotted grouper 사료 내 *B. pumilus*를 첨가하였을 때, 장내 *Psychroserpens burtonensis*, *Pantoea agglomerans*와 같은 병원균들의 증식을 억제하여 질병 저항성을 높일 수 있다고 보고하였다. 이에 더해, Yang et al. (2011)은 *Psychrobacter*를 orange spotted grouper에 첨가하여 공급할 경우, 장내 병원균이 감소하고 LAB를 포함한 유익균이 증가하여 장내 미생물 구성이 개선되었다고 보고하였다. Dawood et al. (2016)은 참돔 사료 내 *L. rhamnosus*와 *L. lactis*를 첨가하여 공급할 경우, 장에서 LAB가 유의적으로 증가한다고 보고하였다. 따라서, 대왕붉바리 사료 내 mannan

oligosaccharides, *L. plantarum*, *B. subtilis*와 *B. licheniformis*의 단독 혹은 혼합 첨가는 장내에서 *Vibrio* 균의 증식을 억제하고 LAB의 성장을 촉진하여 장내 미생물군 조성을 개선할 수 있는 사료 첨가제로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

Cytokine은 다양한 세포의 발달과 기능을 조절하는 중추적인 역할을 하는 단백질이다(O'shea et al., 2019). Probiotics는 여러 유형의 cytokine 발현을 조절하여 잉어(*Cyprinus carpio*)의 비특이적 면역반응을 활성화할 수 있다고 보고되었다(Biswas et al., 2012). IL-1 β 와 IL-10은 각각 염증 반응 유도와 항염증 반응을 통해 면역 체계에 관여한다(Secombes et al., 2011). TNF- β 는 체내 면역계에서 림프구, natural killer cells, 수지상 세포와 대식세포 활성을 조절하여 체내 항상성을 유지하고 염증반응을 제어한다(Li et al., 2006).

어류의 비특이적 면역계에서 PRR은 미생물마다 특이적인 미생물 관련 분자 패턴을 식별하여 병원균을 인식한다(Takeuchi and Akira, 2010). Ribeiro et al. (2010)은 잉어에서 TLR-2가 병원균의 침입을 인식하고, 대식세포를 활성화하여 면역체계를 강화한다고 보고하였다. Ren et al. (2020)은 hybrid grouper *E. lanceolatus* ♂ \times *E. fuscoguttatus* ♀ 사료 내 mannan oligosaccharides 첨가가 IL-8과 TGF- β 1 발현을 증가시킨다고 보고하였다. Picchietti et al. (2009)은 유럽 농어 사료 내 *Lactobacillus* 첨가가 IL-1 β 와 TGF-1 유전자 발현을 감소시켰다고 보고하였다. 이에 대조적으로, 무지개 송어에서 *Bacillus*와 *Lactobacillus*의 단독 첨가는 IL-1 β , TNF-1, TGF- β 유전자 발현을 증가시켰다고 보고되었다(Panigrahi et al., 2007). 본 연구에서 대왕붉바리 사료 내 mannan oligosaccharides, *L. plantarum*, *B. subtilis*와 *B. licheniformis*의 혼합 첨가는 항염증 cytokine의 발현을 증가시켜 체내 염증반응을 조절하고 면역체계를 강화할 수 있을 것으로 생각된다.

대왕붉바리 사료에 mannan oligosaccharides, *L. plantarum*, *B. subtilis*와 *B. licheniformis*의 단독 혹은 혼합 첨가할 경우, 비특이적 면역력, 항산화능과 항염증 유전자 발현을 증가시키는 것으로 판단된다. 이는 mannan oligosaccharides, *L. plantarum*, *B. subtilis*와 *B. licheniformis*의 단독 혹은 혼합 첨가가 대왕붉바리의 장내 유익균(TLB)을 증식시키고 병원균(TVB)을 억제하여 장내 미생물군을 개선하였기 때문이라고 생각된다. 따라서 대왕붉바리 사료에서 mannan oligosaccharides, *L. plantarum*, *B. subtilis*와 *B. licheniformis*는 장 건강 개선을 통한 기능성 사료 첨가제로서의 이용성이 높은 것으로 사료된다. 그러나 어류 사료에서 prebiotics와 probiotics의 이용성은 다양한 요인에 영향을 받기 때문에, 대왕붉바리 사료 내 mannan oligosaccharides와 3종의 probiotics의 단독 혹은 혼합 첨가에 따른 이용성을 규명하기 위해서는 성장단계, 첨가 함량, 첨가된 균주의 종류, 사육 수온 등 다양한 조건에서의 후속 연구가 필요하다.

사 사

본 연구는 “해양생물 마이크로바이옴 분석과 적용 연구를 통한 마린바이오텍스 개발” 연구의 일환으로 해양수산부와 한국해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행되었음 (20210469).

References

- Adorian TJ, Jamali H, Farsani HG, Darvishi P, Hasanpour S, Bagheri T and Roozbehfar R. 2019. Effects of probiotic bacteria *Bacillus* on growth performance, digestive enzyme activity, and hematological parameters of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Probiotics Antimicrob* 11, 248-255. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9393-z>.
- Amoah K, Tan B, Zhang S, Chi S, Yang Q, Liu H, Yang Y, Zhang H and Dong X. 2023. Host gut-derived *Bacillus* probiotics supplementation improves growth performance, serum and liver immunity, gut health, and resistive capacity against *Vibrio harveyi* infection in hybrid grouper (♀ *Epinephelus fuscoguttatus* \times ♂ *E. lanceolatus*). *Anim Nutr* 14, 163-184. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2023.05.005>.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2005. Official Methods of Analysis. AOAC, Arlington, VA, U.S.A. <https://doi.org/10.1002/0471740039.vec0284>.
- Bagheri T, Hedayati SA, Yavari V, Alizade M and Farzanfar A. 2008. Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Turk J Fish Aquat Sci* 8, 43-48.
- Biswas G, Korenaga H, Takayama H, Kono T, Shimokawa H and Sakai M. 2012. Cytokine responses in the common carp, *Cyprinus carpio* L. treated with baker's yeast extract. *Aquaculture* 356-357, 169-175. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.05.019>.
- Casanovas P, Walker SP, Johnston H, Johnston C and Symonds JE. 2021. Comparative assessment of blood biochemistry and haematology normal ranges between chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) from seawater and freshwater farms. *Aquaculture* 537, 736464. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736464>.
- Cerezuela R, Meseguer J and Esteban MA. 2011. Current knowledge in synbiotic use for fish aquaculture: A review. *J Aquac Res Dev* S1, 1-7. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.S1-008>.
- Davani-Davari D, Negahdaripour M, Karimzadeh I, Seifan M, Mohkam M, Masoumi SJ, Berenjian A and Ghasemi Y. 2019. Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods* 8, 92. <https://doi.org/10.3390/foods8030092>.
- Dawood MAO, Koshio S, Ishikawa M, Yokoyama S, El Basiuni MF, Hossain MS, Nhu TH, Dossou S and Moss AS.

2016. Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* or/and *Lactococcus lactis* on the growth, gut microbiota and immune responses of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Shellfish Immunol* 49, 275-285. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.12.047>.
- Dawood MAO, Koshio S and Esteban MÁ. 2018. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: A review. *Rev Aquac* 10, 950-974. <https://doi.org/10.1111/raq.12209>.
- Dawood MAO, Koshio S, Fadl SE, Ahmed HA, El Asely A, Abdel-Daim MM and Alkahtani S. 2020. The modulatory effect of mannanoligosaccharide on oxidative status, selected immune parameters and tolerance against low salinity stress in red sea bream (*Pagrus major*). *Aquac Rep* 16, 100278. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100278>.
- Ellis AE. 1990. Serum antiprotease in fish. In: *Techniques in Fish Immunology*. Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson WB and Van Muiswinkel WB, eds. SOS Publication, Fair Haven, CT, U.S.A., 95-99.
- 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.
- Giri SS, Sukumaran V and Oviya M. 2013. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish Shellfish Immunol* 34, 660-666. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.12.008>.
- Hai NV. 2015. The use of probiotics in aquaculture. *J Appl Microbiol* 119, 917-935. <https://doi.org/10.1111/jam.12886>.
- Han B, Long WQ, He JY, Liu YJ, Si YQ and Tian LX. 2015. Effects of dietary *Bacillus licheniformis* on growth performance, immunological parameters, intestinal morphology and resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish Shellfish Immunol* 46, 225-231. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.06.018>.
- Jang WJ, Lee SJ, Jeon MH, Kim TY, Lee JM, Hasan MT, Lee HT, Park JH, Lee BJ, Hur SW, Lee SH, Kim KW and Lee EW. 2021. Characterization of a *Bacillus* sp. KRF-7 isolated from the intestine of rockfish and effects of dietary supplementation with mannan oligosaccharide in rockfish aquaculture. *Fish Shellfish Immunol* 119, 182-192. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.09.039>.
- Kang MJ, Noh CH, KIM JH, Park JY and Park DW. 2020. The embryonic development and hatchability of two hybrids with giant grouper female: Giant grouper ♀×kelp grouper ♂ and giant grouper ♀×red-spotted grouper ♂. *Korean J Fish Aquat Sci* 53, 557-562. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0557>.
- Kang MJ, Yoon SJ and Noh CH. 2022. Growth performance of juvenile red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*)♀×giant grouper (*E. lanceolatus*)♂ hybrid across temperatures. *Ocean Polar Res* 44, 365-372. <https://doi.org/10.4217/OPR.2022029>.
- Kuebutornye FK, Abarike ED and Lu Y. 2019. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish Shellfish Immunol* 87, 820-828. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.010>.
- 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 C, Cha JH, Kim MG, Shin J, Woo SH, Kim SH, Kim JW, Ji SC and Lee KJ. 2020. The effects of dietary *Bacillus subtilis* on immune response, hematological parameters, growth performance, and resistance of juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Streptococcus iniae*. *J World Aquac Soc* 51, 551-562. <https://doi.org/10.1111/jwas.12680>.
- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AKL and Flavell RA. 2006. Transforming growth factor-β regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 24, 99-146. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737>.
- Liu CH, Chiu CH, Wang SW and Cheng W. 2012. Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol* 33, 699-706. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.06.012>.
- Mohammed HH, Brown TL, Beck BH, Yildirim-Aksoy M, El-jack RM and Peatman E. 2018. The effects of dietary inclusion of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product in a commercial catfish ration on growth, immune readiness, and Columnaris disease susceptibility. *J App Aquaculture* 31, 193-209. <https://doi.org/10.1080/10454438.2018.1499576>.
- Nayak SK. 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish Shellfish Immunol* 29, 2-14. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.017>.
- O'Shea JJ, Gadina M and Siegel RM. 2019. Cytokines and cytokine receptors. *Clin Immunol* 127-155. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00009-0>.
- Panigrahi A, Kiron V, Satoh S, Hirono I, Kobayashi T, Sugita H, Puangkaew J and Aoki T. 2007. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Dev Comp Immunol* 31, 372-382. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.07.004>.
- Picchiatti S, Fausto AM, Randelli E, Carnevali O, Taddei AR, Buonocore F, Scapigliati G and Abelli L. 2009. Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunol* 26, 368-376. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.10.008>.
- Ren Z, Wang S, Cai Y, Wu Y, Tian L, Wang S, Jiang L, Guo W, Sun Y and Zhou Y. 2020. Effects of dietary mannan

- oligosaccharide supplementation on growth performance, antioxidant capacity, non-specific immunity and immune-related gene expression of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus*♂×*Epinephelus fuscoguttatus*♀). *Aquaculture* 523, 735195. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735195>.
- Ribeiro C, Hermesen T, Taverne-Thiele AJ, Savelkoul HF and Wiegertjes GF. 2010. Evolution of recognition of ligands from Gram-positive bacteria: similarities and differences in the TLR2-mediated response between mammalian vertebrates and teleost fish. *J Immunol* 184, 2355-2368. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900990>.
- Safari O, Paolucci M and Motlagh HA. 2022. Dietary supplementation of *Chlorella vulgaris* improved growth performance, immunity, intestinal microbiota and stress resistance of juvenile narrow clawed crayfish, *Pontastacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823. *Aquaculture* 554, 738138. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738138>.
- Sagada G, Gray N, Wang L, Xu B, Zheng L, Zhong Z, Ullah S, Tegomo AF and Shao Q. 2021. Effect of dietary inactivated *Lactobacillus plantarum* on growth performance, antioxidative capacity, and intestinal integrity of black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) fingerlings. *Aquaculture* 535, 736370. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736370>.
- Secombes CJ, Wang T and Bird S. 2011. The interleukins of fish. *Dev Comp Immunol* 35, 1336-1345. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.05.001>.
- Silva BCD, Vieira FDN, Mourino JLP, Ferreira GS and Seiffert WQ. 2013. Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. *Aquaculture* 384-387, 104-110. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.12.017>.
- Siwicki AK and Anderson DP. 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum. In: *Fish Disease Diagnosis and Prevention Methods*. Wydawnictwo Instytutu Rybactwa Strodładowego, Olsztyn, Poland, 105-112.
- Son VM, Chang CC, Wu MC, Guu YK, Chiu CH and Cheng W. 2009. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol* 26, 691-698. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.02.018>.
- Sun YZ, Yang HL, Ma RL and Lin WY. 2010. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol* 29, 803-809. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.07.018>.
- Takeuchi O and Akira S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805-820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>.
- Timmerman HM, Koning CJM, Mulder L, Rombouts FM and Beynen AC. 2004. Monostrain, multistain and multispecies probiotics-A comparison of functionality and efficacy. *Int J Food Microbiol* 96, 219-233. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.012>.
- Toppo S, Flohé L, Ursini F, Vanin S and Maiorino M. 2009. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: Variations of a basic scheme. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1790, 1486-1500. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.04.007>.
- Torrecillas S, Makol A, Caballero MJ, Montero D, Ginés R, Sweetman J and Izquierdo M. 2011. Improved feed utilization, intestinal mucus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). *Aquac Nutr* 17, 223-233. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00730.x>.
- Wang T, Cheng Y, Chen X, Liu Z and Long X. 2017a. Effects of small peptides, probiotics, prebiotics, and synbiotics on growth performance, digestive enzymes, and oxidative stress in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, juveniles reared in artificial seawater. *Chin J Oceanol Limnol* 35, 89-97. <https://doi.org/10.1007/s00343-016-5130-1>.
- Wang Y, Branicky R, Noë A and Hekimi S. 2018. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol* 217, 1915-1928. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>.
- Wang Y, Wu Y, Wang Y, Xu H, Mei X, Yu D, Wang Y and Li W. 2017b. Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients* 9, 521. <https://doi.org/10.3390/nu9050521>.
- Williams NT. 2010. Probiotics. *AM J Health Syst Pharm* 67, 449-458. <https://doi.org/10.2146/ajhp090168>.
- Yang HL, Sun YZ, Ma RL, Li JS and Huang KP. 2011. Probiotic *Psychrobacter* sp. improved the autochthonous microbial diversity along the gastrointestinal tract of grouper *Epinephelus coioides*. *J Aquac Res Dev* S1, 10-4172. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.S1-001>.
- Yang HL, Xia HQ, Ye YD, Zou WC and Sun YZ. 2014. Probiotic *Bacillus pumilus* SE5 shapes the intestinal microbiota and mucosal immunity in grouper *Epinephelus coioides*. *Dis Aquat Org* 111, 119-127. <https://doi.org/10.3354/dao02772>.
- Yang H, Han Y, Ren T, Jiang Z, Wang F and Zhang Y. 2016. Effects of dietary heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 (HKL-137) on the growth performance, digestive enzymes and selected non-specific immune responses in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka. *Aquac Res* 47, 2814-2824. <https://doi.org/10.1111/are.12731>.
- Ye JD, Wang K, Li FD and Sun YZ. 2011. Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Para-*

lichthys olivaceus. Aquac Nutr 17, e902-e911. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00863.x>.

Yukgehnash K, Kumar P, Sivachandran P, Marimuthu K, Arshad A, Paray BA and Arockiaraj J. 2020. Gut microbiota metagenomics in aquaculture: Factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish. Rev Aquac 12, 1903-1927. <https://doi.org/10.1111/raq.12416>.

Zhu L, Wang S, Cai Y, Shi H, Zhou Y, Zhang D, Guo W and Wan S. 2023. Effects of five prebiotics on growth, antioxidant capacity, non-specific immunity, stress resistance, and disease resistance of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀ × *Epinephelus lanceolatus*♂). Animals 13, 754. <https://doi.org/10.3390/ani13040754>.