

사료 내 Prebiotic과 Probiotics의 첨가가 참돔(*Pagrus major*)의 성장, 면역력, 항산화력, 장내 미생물 조성 변화에 미치는 영향

임종호 · 엄건호 · 노충환¹ · 이경준^{2*}

제주대학교 해양생명과학과, ¹한국해양과학기술원, ²제주대학교 해양과학연구소

Effects of Dietary Prebiotics and Probiotics on Growth, Immune Response, Anti-oxidant Capacity and Some Intestinal Bacterial Groups of the Red Seabream *Pagrus major*

Jongho Lim, Gunho Eom, 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

We evaluated the effects of prebiotic (mannan oligosaccharides, Mos) and probiotic diet supplements on growth performance, innate immunity, antioxidant activity, and intestinal changes in the microbial flora of red seabream *Pagrus major*. A basal diet (Con) was formulated to meet the nutrient requirement of red seabream. The dietary starch in Con was replaced with 0.6% Mos, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* and probiotic mixture (labeled as Mos, Pro-LP, Pro-BS, Pro-BL and Pro-Mix, respectively). We stocked 450 fish in 18 polypropylene tanks (400 L) in triplicate groups per dietary treatment. The fish were fed one of the diets twice (08:30, 18:30 h) a day for 63 days. Lysozyme activity was significantly higher in all the supplemented groups than that of the Con group. The immunoglobulin level of Pro-Mix, anti-protease activity of Pro-BL, and glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity of Pro-BS, Pro-BL and Pro-Mix groups were significantly higher than those of the Con group. The ratio of total *Vibrio*/heterotrophic marine bacteria counts was significantly lower in Pro-LP, Pro-BL and Pro-Mix groups than that of the Con group. Therefore, dietary supplementation of Mos and probiotics to improves immune response and antioxidant enzyme activity and inhibits *Vibrio* bacteria in the intestine.

Keywords: Prebiotics, Probiotics, *Bacillus*, *Lactobacillus*, Red sea bream

서론

양식 어류에서 prebiotics의 사용은 주로 사료를 통해 이루어지며, 장내 미생물의 성장과 조성에 영향을 주어 어류의 성장과 사료효율 및 면역력을 향상시키는 것으로 보고되었다(Yukgehnaish et al., 2020). 장에서 증식된 유용 미생물은 여러 소화효소를 생산하고 이를 통해 영양소의 소화와 흡수를 향상시킴으로써 숙주 동물의 성장과 사료효율을 개선하는 것으로 알려졌다(Ringø et al., 2016). Mannan oligosaccharides (Mos)는 *Saccharomyces cerevisiae*와 같은 효모류의 세포벽을 구성

하는 prebiotic으로 어류 사료의 첨가제로 사용했을 경우 성장뿐만 아니라 면역력을 크게 향상시키는 것으로 최근 보고되고 있다(Dawood et al., 2020a). Magouz et al. (2021)은 사료 내 Mos의 첨가는 thinlip grey mullet *Liza ramada*에서 비특이적 면역력과 항산화능력을 향상시키고, 장내 유용 미생물의 번식을 용이하게 한다고 보고하였으며, Genc et al. (2007)은 hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*의 장 용모 발달을 돕는다고 보고하였다. 그러나 참돔(*Pagrus major*)에서의 Mos 연구는 미흡한 실정이다. 어류의 장은 병원성 미생물에 대한 면역 반응이 가장 활발한 기관이며, 장내 미생물의 조성에 따라 면역

*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.2023.0089>

Korean J Fish Aquat Sci 56(1), 89-98, February 2023

Received 22 September 2022; Revised 18 November 2022; Accepted 8 February 2023

저자 직위: 임종호(대학원생), 엄건호(대학원생), 노충환(책임연구원), 이경준(교수)

반응 활성이 크게 영향을 받는다고 알려져 있다(Dawood et al., 2020a). 동물의 장에는 *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Proteobacter*와 같은 장 건강에 매우 유익한 미생물뿐만 아니라 *Vibrio*, *Edwardsiella*와 같은 병원성을 띠는 미생물도 같이 서식한다. Prebiotics와 probiotics는 양식생물의 장에서 유용 미생물의 성장을 돕고 병원성 미생물을 억제하여 장내 면역력을 증진시키기 위한 천연 면역 증강제로써 널리 이용되고 있다(Dawood et al., 2018). 이러한 이유로 최근 어류를 대상으로 prebiotics와 probiotics에 대한 연구는 성장뿐만 아니라 면역력과 건강도 및 장내 유용 미생물의 조성변화에 초점을 두고 이루어지고 있다(Munir et al., 2016).

*Lactobacillus*와 *Bacillus*는 양식생물의 면역력과 항산화능력을 향상시키기 위한 probiotics로써 주목받고 있다(Giri et al., 2014). 어류를 대상으로 한 사료 내 probiotics 첨가에 대한 연구는 넙치(*Paralichthys olivaceus*; Ye et al., 2011), 병어(*Pampus argenteus*; Gao et al., 2016), tilapia *O. niloticus* (Liu et al., 2017) 등을 대상으로 수행되었다. Tilapia (Taoka et al., 2006), 잿방어(*Seriola dumerili*; Dawood et al., 2015), 참돔(Dawood et al., 2016b)을 대상으로 한 연구에서 사료 내 probiotics의 첨가는 성장과 사료효율 뿐만 아니라 비특이적 면역력과 질병 저항성을 향상시킨다고 보고되었다.

참돔은 국내 주요 양식어종으로서 2021년도 국내 생산량은 8,313톤에 이르며, 그 생산량은 지속적으로 증가할 것으로 전망된다(KOSIS, 2022). 그러나 최근 양식 산업에서는 대상 생물을 주로 고밀도로 양식하기 때문에 스트레스로 인한 면역력이 저하되어 질병이 자주 발생하고, 그로 인해 경제적 피해가 증가하고 있는 실정이다(Hasan et al., 2019). 국내의 어류 양식에서는 질병을 예방하거나 치료하기 위해 주로 약제나 항생제를 많이 사용한다(Kim et al., 2022). 전염성 질병을 억제하기 위한 항생제와 화학약품의 사용은 내성균의 출현, 유용 미생물의 사멸, 인체 내 축적과 같은 여러 부작용들을 유발할 수 있다(Banerjee and Ray, 2017). 따라서, 어류의 면역력과 질병 저항성을 향상시키기 위한 양식 사료 내 천연 면역증강제의 발굴과 개발이 절실히 필요하다(Dawood et al., 2018). 어류 사료 내 probiotics의 첨가 효과에 대한 연구는 대부분 치어기 어류를 대상으로 8주 미만으로 단기간 동안 수행되었으며, 260–390 g 참돔을 대상으로 수행된 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 이번 연구는 사료 내 prebiotic과 probiotics의 단독 또는 혼합 첨가가 참돔의 성장과 사료효율 뿐만 아니라 비특이적 면역력, 항산화 활성, 장내 미생물 조성에 미치는 영향을 조사하기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

실험사료

본 실험에 사용된 Bio-Mos (Alltech, Nicholasville, KY, USA), *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* (FNCbio CO., Ltd.,

Daejeon, Korea), *B. licheniformis* (KCCM11751P; Woogene B&G CO., Ltd., Seoul, Korea)는 국내 회사에서 구입하여 사용하였다. Probiotics의 균 농도는 1×10^{10} CFU (colony forming unit)/g으로 각 첨가구에 0.6%씩 첨가되었다. 대조사료는 조단 백질 58.8%, 조지질 12.7%, 회분 10.8%가 되도록 조성되었다. 실험사료는 Mos를 0.6% (Mos), *L. plantarum*을 0.6% (Pro-LP), *B. subtilis*를 0.6% (Pro-BS), *B. licheniformis*를 0.6% (Pro-BL), Probiotics 혼합구는 3가지 probiotics를 각각 0.2%씩(Pro-Mix) 첨가하였다. Probiotics는 동결건조 상태에서 밀봉된 상태로 보관되었으며, 사료 제작 당시 개봉하였다. 실험사료는 원료를 혼합한 뒤, 어유와 증류수(15%)를 혼합하였다. 실험사료는 펠렛성형기(SP-50; Kumkang ENG, Daegu, Korea)를 이용하여 직경 5 mm 크기로 성형하였다. 실험사료는 건조(25°C, 8 h)시킨 후 사료공급 전까지 냉장보관(4°C)하였다. 실험사료의 조성은 Table 1에 나타내었다.

실험어 및 사육관리

실험에 사용된 넙치는 전남 고흥군에 위치한 양식장에서 구입하여 제주대학교 해양연구소에서 예비사육 후 실험에 사용하였다. 실험어(초기평균무게, 263±3.90 g)는 총 18개의 400 L 원형 polypropylene 수조에 수조 당 25마리씩, 실험구 당 3반복으로 배치되었다. 광주시는 형광등을 이용하여 12 light: 12 dark로 유지되었다. 실험사료는 1일 2회(08:00, 18:00 h)에 걸쳐 9주간 공급하였다. 사육수는 모래여과해수를 사용하여 18 L/min 만큼 공급되었고 모든 실험수조에 용존산소(dissolved oxygen, DO) 농도 유지를 위해 에어스톤을 설치하였다. 각 수조의 DO와 수온은 Pro20 Dissolved Oxygen Instrument (YSI, Yellow Springs, OH, USA)를 이용하여 1일 1회 측정되었다. 실험기간 동안 모든 실험수조의 수온은 17.5–24.4°C, DO는 8.54–9.14 mg/L로 유지되었다.

Sampling과 분석

사육실험 종료 후, 실험어는 성장률(weight gain, WG)과 사료 효율, 일간성장률(specific growth rate, SGR)과 생존율(survival)을 측정하기 위해 24 h 절식 후 최종무게(final body weight, FBW)와 실험어의 수를 측정하였다. 무게 측정 후 사료섭취량(feed intake, FI)을 측정하여 사료계수(feed conversion ratio, FCR)와 단백질이용효율(protein efficiency ratio)을 계산하였다. FBW 측정 후, 수조 당 3마리(실험구 당 9마리)의 실험어를 무작위로 선별하여 100 ppm의 2-phenoxyethanol (Sigma, St. Louis, MO, USA)로 마취시켰다. 혈액은 혈청과 혈장으로 나누었으며, 혈장은 heparin (Sigma)이 처리된 주사기로 미병부에서 채혈하여 대식세포 활성(nitro-blue tetrazolium, NBT), hemoglobin과 hematocrit 분석에 사용하였다. Hemoglobin은 5 mL의 hemoglobin reagent (Yeongdong Pharmaceutical Co., Seoul, Korea)에 전혈 20 µL를 반응시킨 후 자동생화학분석기(CH 100^{plus}; RADIM Company, Firenze, Italy)를 이용하여 측

Table 1. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets for red sea bream *Pagrus major* (% of dry matter)

Ingredients (%)	Experimental diets					
	Con	Mos	Pro-LP	Pro-BS	Pro-BL	Pro-Mix
Fish meal (Sardine) ¹	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
Soybean meal	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
Tankage meal	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Wheat flour	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
Soy protein concentrate	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50
Poultry byproduct meal	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Wheat gluten	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
Fish oil	4.40	4.40	4.40	4.40	4.40	4.40
Starch	3.70	3.10	3.10	3.10	3.10	3.10
Mos ²	-	0.60	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> ³	-	-	0.60	-	-	0.20
<i>Bacillus subtilis</i> ³	-	-	-	0.60	-	0.20
<i>B. licheniformis</i> ⁴	-	-	-	-	0.60	0.20
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	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Choline	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
Lecithin	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
Methionine	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Mineral premix ⁵	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin premix ⁶	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin C ⁷	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamin E ⁷	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Proximate compositions (%)						
Crude protein	57.8	59.0	58.7	59.0	57.7	59.0
Crude lipid	12.4	12.2	12.6	12.4	12.0	12.2
Ash	11.3	11.5	11.5	11.5	11.0	11.4
Moisture	9.48	8.78	8.74	8.10	7.84	8.11

¹Orizon S.A, Chile. ²Alltech, Kentucky, USA. ³Fnbio CO., LTD, Daejeon, Korea. ⁴WOOGENE B&G CO., LTD, Hwaseong, Korea. ⁵Mineral 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.

⁶Vitamin 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. ⁷AlphaAqua Co., Busan, Korea. Con, Control; Mos, Mannan oligosaccharides; Pro-LP, Probiotic-*Lactobacillus plantarum*; Pro-BS, Probiotic-*Bacillus subtilis*; Pro-BL, Probiotic-*Bacillus licheniformis*; Pro-Mix, Probiotic-mixture. Starch in the basal diet was replaced with 0.6% Mos, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* and probiotics mixture (designated as Con, Mos, Pro-LP, Pro-BS, Pro-BL and Pro-Mix, respectively).

정하였다. Hematocrit은 모세관 내에 전혈을 채운 후 원심분리기(Hematospin II; Hanil Science Co., Daejeon, Korea)로 원심분리(12,000 g, 15 min)하여 측정하였다. 분석 후 혈장은 원심분리(5,000 g, 5 min, 4°C)하여 상층액을 분리하였다. 혈청은 원심분리(5,000 g, 5 min, 4°C) 후 상층액을 분리하여 면역분석에 사용되기 전까지 냉동(-80°C) 보관하였다. 전어체는 냉동(-20°C) 후, 믹서기로 분쇄하여 일반성분분석 하였다.

면역력 분석은 총 5가지 항목을 조사하였다. NBT와 myeloperoxidase (MPO) 활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 방법을, lysozyme 활성은 Mohammed et al. (2018)의 방법을, immunoglobulin (Ig) 함량은 Siwicki and Anderson (1993)의 방법을, anti-protease 활성은 Ellis (1990)의 방법에 따라 분석하였다. Glutathione peroxidase (GPx) 활성은 GPx assay kit (703102; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)를, superoxide dismutase (SOD) 활성은 SOD assay kit (19160; Sigma)를 사용하여 분석하였다. 혈액학적 지표는 시판 kit를 이용하여 혈액생화학분석기(CH 100plus; RADIM Company)를 통해 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total protein, glucose, cholesterol과 triglyceride 함량을 분석하였다.

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

장내 미생물 조성은 Silva et al. (2013)과 Safari et al. (2020)의 방법으로 분석되었다. 실험어를 얼음물에서 5분간 마취한 뒤, 해부하여 장을 적출하여 무게를 측정하였다. 무게 측정 후, 장 조직을 sodium chloride (0.9%) 용액 2 mL에 넣고 균질하였다. 균질액은 원심분리(5,000 g, 5 min, 4°C)하여 상층액을 분리한 후, 농도에 따라 희석하여 배지에 100 μ L를 도말하였다. Total heterotrophic marine bacteria (THB)는 marine agar (212185; BD Difco™, Dickinson, ND, USA)를, lactic acid bacteria (LAB)는 lactobacilli MRS agar (288210; BD Difco™)를, total *Vibrio* bacteria (TVB)는 thiosulfate citrate bile sucrose agar (213400, BD Difco™, Dickinson, USA)를 사용하여 최대 72 h까지 배양(27°C)하였다. 각 THB, LAB, TVB는 3반복으로 측정하였으며, lactobacilli MRS agar와 thiosulfate citrate bile sucrose agar는 colony의 형태를 관찰하여 *Vibrio* spp.와 LAB가 아닌 colony를 배제하였을 때 30-300개의 colony가 관찰되는 배지의 CFU를 측정하였다.

통계학적 분석

완전확률계획법(completely randomized design)으로 실험

Table 2. Growth performance and feed utilization of red sea bream *Pagrus major* (initial body weight, 264±3.90 g) fed the experimental diets for 9 weeks

Dietary treatments	FBW ¹	WG ²	SGR ³	FCR ⁴	PER ⁵	FI ⁶	Survival (%)
Con	381±1.78 ^b	44.8±0.17 ^b	0.59±0.00 ^b	1.09±0.01 ^a	1.58±0.01	91.4±0.53 ^{ab}	91.3±6.15
Mos	404±13.5 ^{ab}	53.2±2.36 ^a	0.68±0.02 ^a	0.92±0.01 ^b	1.85±0.02	109±1.43 ^{ab}	93.5±3.07
Pro-LP	392±6.12 ^{ab}	49.0±4.42 ^{ab}	0.63±0.05 ^{ab}	0.96±0.04 ^{ab}	1.77±0.07	124±4.61 ^b	95.7±6.10
Pro-BS	400±5.13 ^{ab}	50.2±1.49 ^{ab}	0.65±0.02 ^{ab}	1.01±0.07 ^{ab}	1.69±0.12	135±5.39 ^a	97.8±3.07
Pro-BL	413±13.1 ^a	53.3±4.76 ^a	0.68±0.05 ^a	0.96±0.10 ^{ab}	1.82±0.19	137±2.33 ^a	93.5±3.07
Pro-Mix	387±15.6 ^{ab}	52.3±1.38 ^{ab}	0.67±0.01 ^{ab}	0.96±0.07 ^{ab}	1.77±0.12	131±1.51 ^{ab}	93.5±3.07

¹Final body weight (g). ²Weight gain (%)=[final weight (g) - initial weight (g)]/final weight (g)×100. ³Specific growth rate (%)={log_e [final weight (g)]-log_e [initial weight (g)]}/days×100. ⁴Feed conversion ratio=dry feed fed (g)/wet weight gain (g). ⁵Protein efficiency ratio=wet weight gain (g)/total protein given (g). ⁶Feed intake=feed consumption (g)/number of fish. Con, Control; Mos, Mannan oligosaccharides; Pro-LP, Probiotic-*Lactobacillus plantarum*; Pro-BS, Probiotic-*Bacillus subtilis*; Pro-BL, Probiotic-*Bacillus licheniformis*; Pro-Mix, Probiotic-mixture. 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.

구를 배치하였고, 모든 분석결과는 SPSS (Version 24.0; International Business Machines Co., NY, USA) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석되었다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's HSD (P<0.05)로 비교하였다. 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 통계분석 하였으며, 모든 데이터는 평균값±표준편차(mean±standard deviation)로 나타내었다.

결 과

참돔의 FBW는 Pro-BL구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다(Table 2) (P<0.05). WG, SGR은 Mos구와 Pro-BL구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다(P<0.05). FCR은 Mos구가 대조구에 비해 유의적으로 낮았다(P<0.05). FI는 첨가구와 대조구 사이에 유의적인 차이는 나타나지 않았다(P>0.05). 전어체의 조단백, 조지질, 조회분 함량은(Table 3) 대조구와 첨가구 간에 유의적인 차이가 없었다(P>0.05).

비특이적 면역력은 Table 4에 나타내었다. NBT와 MPO

Table 3. Whole body proximate composition of red sea bream *Pagrus major* (initial body weight, 264±3.90 g) fed the experimental diets for 9 weeks (%; wet basis)

Dietary treatments	Crude protein	Crude lipid	Ash
Con	19.8±6.10	10.9±0.47	5.1±0.46
Mos	19.7±1.81	10.4±0.88	5.8±0.81
Pro-LP	18.0±1.78	10.5±0.41	5.1±0.83
Pro-BS	17.6±1.36	11.9±1.67	5.5±0.85
Pro-BL	19.2±1.01	11.9±2.14	5.3±0.55
Pro-Mix	17.9±0.82	11.9±1.53	5.0±0.86

Con, Control; Mos, Mannan oligosaccharides; Pro-LP, Probiotic-*Lactobacillus plantarum*; Pro-BS, Probiotic-*Bacillus subtilis*; Pro-BL, Probiotic-*Bacillus licheniformis*; Pro-Mix, Probiotic-mixture. Values are mean of triplicates and presented as mean±S.D. The lack of superscript letter in the same column indicates no significant differences among treatments.

Table 4. Immune responses of red sea bream *Pagrus major* fed the experimental diets for 9 weeks

Dietary treatments	NBT ¹	Lysozyme ²	MPO ³	Ig ⁴	Anti-protease ⁵
Con	1.52±0.02 ^{ab}	23.2±1.30 ^c	1.21±0.09	17.0±3.69 ^b	14.0±0.57 ^b
Mos	1.64±0.11 ^{ab}	35.2±3.42 ^a	1.31±0.12	24.2±3.45 ^{ab}	15.2±0.47 ^{ab}
Pro-LP	1.51±0.12 ^b	30.8±4.58 ^{ab}	1.29±0.09	22.8±2.74 ^{ab}	14.3±0.81 ^{ab}
Pro-BS	1.66±0.05 ^{ab}	34.5±3.98 ^a	1.29±0.10	20.4±3.55 ^{ab}	15.3±2.49 ^{ab}
Pro-BL	1.64±0.07 ^{ab}	29.0±3.51 ^b	1.24±0.11	22.5±4.43 ^{ab}	18.1±1.28 ^a
Pro-Mix	1.67±0.09 ^a	34.0±1.83 ^a	1.20±0.02	26.4±1.83 ^a	15.3±1.67 ^{ab}

¹Nitro-blue tetrazolium activity (absorbance). ²Lysozyme activity (µg/mL). ³Myeloperoxidase activity (µg/mL). ⁴Immunoglobulin level (mg/mL). ⁵Anti-protease activity (% inhibition). Con, Control; Mos, Mannan oligosaccharides; Pro-LP, Probiotic-*Lactobacillus plantarum*; Pro-BS, Probiotic-*Bacillus subtilis*; Pro-BL, Probiotic-*Bacillus licheniformis*; Pro-Mix, Probiotic-mixture. 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 in the same column indicates no significant differences among treatments.

활성도는 대조구와 첨가구 사이에 유의적인 차이가 없었다 ($P>0.05$). Lysozyme 활성도는 모든 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다($P<0.05$). Ig 수준은 Pro-Mix 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다($P<0.05$). Anti-protease 활성도는 Pro-BL 단독 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다 ($P<0.05$). 항산화 효소 활성은 Table 5에 나타내었다. GPx와 SOD 활성도는 Pro-BS, Pro-BL, Pro-Mix 첨가구에서 대조구에 비해 유의적으로 높았다($P<0.05$).

혈액분석 결과는 Table 6에 나타내었다. Hemoglobin 농도는 Pro-BS 첨가구에서 대조구에 비해 유의적으로 높았다 ($P<0.05$). 혈장의 total protein 농도는 Pro-BL과 Pro-Mix 첨가구에서 대조구에 비해 유의적으로 높았다($P<0.05$). Glucose 농도는 Mos와 Pro-BS 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 낮았다($P<0.05$). Hematocrit과 혈장의 AST, ALT, cholesterol, triglyceride 농도는 대조구와 첨가구 간에 유의적인 차이가 없었다

Table 5. Anti-oxidant enzyme activities of red sea bream *Pagrus major* fed the experimental diets for 9 weeks

Dietary treatments	GPx ¹	SOD ²
Con	224±18.4 ^b	30.3±4.00 ^b
Mos	244±8.10 ^{ab}	43.4±8.62 ^{ab}
Pro-LP	250±9.68 ^{ab}	41.5±7.21 ^{ab}
Pro-BS	258±15.5 ^a	51.8±8.18 ^a
Pro-BL	253±16.4 ^a	55.5±8.13 ^a
Pro-Mix	259±9.56 ^a	54.0±14.8 ^a

¹GPx (Glutathione peroxidase activity)=(mU/mL). ²SOD (Superoxide dismutase activity)=(% inhibition). Con, Control; Mos, Mannan oligosaccharides; Pro-LP, Probiotic-*Lactobacillus plantarum*; Pro-BS, Probiotic-*Bacillus subtilis*; Pro-BL, Probiotic-*Bacillus licheniformis*; Pro-Mix, Probiotic-mixture. Values are mean of triplicate groups and presented as mean±S.D. Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P<0.05$).

Table 6. Hematological parameters of red sea bream *Pagrus major* fed the experimental diets for 9 weeks.

Dietary treatments	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	AST ¹	ALT ²	Total protein ³	Glucose ⁴	Cholesterol ⁵	Triglyceride ⁶
Con	5.40±0.34 ^b	31.3±1.21	21.7±1.11	3.71±0.41	3.10±0.30 ^b	191±27.5 ^a	187±8.00	271±20.1
Mos	5.87±0.65 ^{ab}	31.8±2.04	19.1±5.04	2.75±0.11	3.60±0.28 ^{ab}	130±16.8 ^c	213±26.8	284±15.7
Pro-LP	5.46±0.64 ^{ab}	32.2±1.32	17.9±4.21	2.84±0.35	3.46±0.18 ^{ab}	169±23.2 ^{ab}	192±13.9	311±49.4
Pro-BS	6.23±0.21 ^a	32.9±1.62	21.6±2.49	3.30±1.03	3.62±0.30 ^{ab}	151±12.5 ^{bc}	202±5.97	273±19.6
Pro-BL	5.75±0.36 ^{ab}	30.3±1.05	24.7±3.30	3.44±0.85	4.02±0.52 ^a	163±16.8 ^{abc}	188±14.3	285±15.4
Pro-Mix	5.90±0.27 ^{ab}	31.7±0.75	21.8±6.00	3.39±0.46	3.78±0.31 ^a	155±12.2 ^{abc}	210±25.2	291±16.8

¹AST (Aspartate aminotransferase)=(U/L). ²ALT (Alanine aminotransferase)=(U/L). ³Total protein=(U/L). ⁴Glucose=(mg/dL). ⁵Cholesterol=(mg/dL). ⁶Triglyceride=(mg/dL). Con, Control; Mos, Mannan oligosaccharides; Pro-LP, Probiotic-*Lactobacillus plantarum*; Pro-BS, Probiotic-*Bacillus subtilis*; Pro-BL, Probiotic-*Bacillus licheniformis*; Pro-Mix, Probiotic-mixture. 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 in the same column indicates no significant differences among treatments.

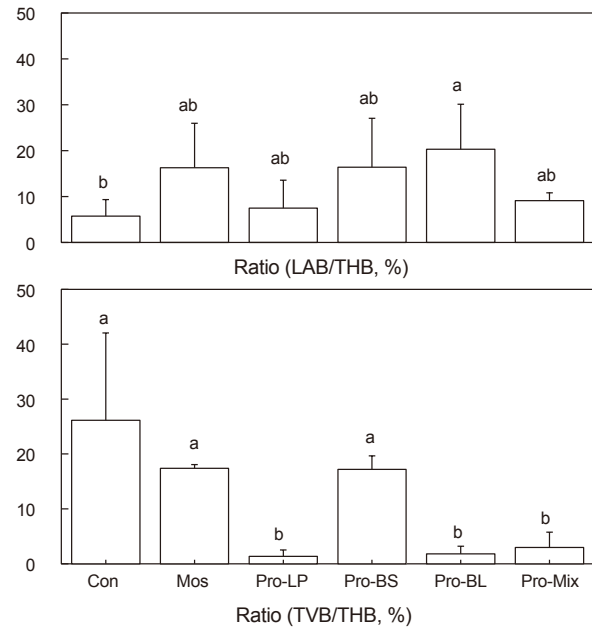


Fig. 1. Intestinal microbiota ratio of lactic acid bacteria (LAB) and total *Vibrio* bacteria (TVB) to total heterotrophic marine bacteria (THB) of red sea bream *Pagrus major* (initial body weight, 264±3.90 g) fed the experimental diets for 9 weeks. Bars with different letters are significantly different ($P<0.05$). Con, Control; Mos, Mannan oligosaccharides; Pro-LP, Probiotic-*Lactobacillus plantarum*; Pro-BS, Probiotic-*Bacillus subtilis*; Pro-BL, Probiotic-*Bacillus licheniformis*; Pro-Mix, Probiotic-mixture.

다($P>0.05$).

참돔의 장내 미생물 조성 분석 결과는 Fig. 1에 나타내었다. THB에 대한 LAB의 비율은 Pro-BL 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다($P<0.05$). THB에 대한 TVB의 비율은 Pro-LP, Pro-BL, Pro-Mix 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 낮았다($P<0.05$).

고 찰

Dawood et al. (2020b) 치어기 참돔(7 g) 사료에 Mos를 첨가할 경우 소화효소의 생산과 장내 유익균의 성장을 자극하여 WG와 사료효율을 증진시킨다고 보고하였으며, Wang et al. (2019)은 probiotics의 단일 혹은 혼합 첨가는 다양한 어종의 성장을 향상시킨다고 보고하였다. 9주간의 사육실험 결과 WG와 SGR은 Mos구와 Pro-BL구가 대조구에 비해 유의적으로 높게 나타났으며 다른 첨가구도 대조구에 비해 높은 경향을 나타내었다. Mos구는 대조구에 비해 FCR이 유의적으로 낮게 나타났기 때문이다. 따라서 Mos의 단독 첨가와 probiotics 단독 혹은 혼합 첨가는 참돔(260–390 g)의 성장을 증진시키며, Mos는 성장뿐만 아니라 사료효율을 증진시킬 수 있을 것으로 판단된다.

어류의 비특이적 면역체계는 병원성 미생물의 감염을 억제하기 위한 핵심적인 역할을 한다(Lieschke and Trede, 2009). 사료에 Mos 또는 probiotics의 첨가는 동물의 장내 면역반응을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Jang et al., 2019; Lu et al., 2019). Dawood et al. (2020b)의 연구에서는 사료 내 Mos의 첨가가 참돔의 비특이적 면역력을 향상시킨다고 보고하였다. Heo et al. (2013)은 넙치 사료에 *L. lactis*를 첨가하였을 때, 비특이적 면역력이 크게 향상되었다고 보고하였다. 이번 연구에서도 anti-protease와 lysozyme 활성도 및 Ig 농도는 모든 첨가구에서 대조구에 비해 유의적으로 높거나 경향적으로 높았다. 이러한 면역력 증강 효과는 사료에 단독 첨가된 Mos와 단독 또는 혼합 첨가된 probiotics에 의해 장내 미생물 조성과 장 건강이 개선되었기 때문인 것으로 판단된다(Dimitroglou et al., 2010; Ringø et al., 2016). 이번 연구에서는 probiotics 단독 첨가구와 혼합 첨가구 사이에 면역력 향상 효과의 뚜렷한 차이가 관찰되지 않았다. Giri et al. (2014)은 Rohu *Labeo rohita* 사료에 probiotics의 혼합 첨가는 단독 첨가구에 비해 어류의 비특이적 면역력을 증진시킨다고 보고하였다. 어류의 경우, 사료 내 prebiotics 또는 probiotics의 첨가는 어종, 성장 단계, 사육수온, 첨가 함량과 형태에 따라 효과가 다를 수 있다(Torrecillas et al., 2014; Yang et al., 2016). 따라서 다양한 조건에서 참돔을 대상으로 한 probiotics의 단독 또는 혼합 첨가 효과에 대한 추가적인 연구가 요구된다.

어류는 SOD와 GPx와 같은 항산화효소를 통해 면역반응에서 발생하는 활성산소를 제거하여 조직의 산화스트레스를 방지한다(Cheng et al., 2015). 사료 내 prebiotics (Lu et al., 2020), *Lactobacillus* (Nguyen et al., 2019), *Bacillus* (Lee et al., 2019)의 첨가는 어류의 항산화력을 높일 수 있다고 보고하였다. 이번 연구에서도 Mos와 probiotics 첨가구에서 대조구에 비해 SOD와 GPx 활성도가 향상되었으며, 그 중에서도 Pro-BS, Pro-BL, Pro-Mix 첨가구는 SOD와 GPx 활성도 모두 대조구에 비해 유의적으로 높았다. 따라서, 사료 내 Mos의 단독 첨가와 probiotics의 단독 또는 혼합 첨가는 참돔의 항산화효소 활성을 강화

하고 조직 내 산화스트레스를 감소시키는 효능이 있다고 사료된다.

혈액학적 지표는 어류의 건강도(hemoglobin, hematocrit), 물질 대사(total protein, cholesterol, triglyceride, glucose), 스트레스에 의한 간 손상(ALT, AST)을 판단하기 위해 이용하고 있다(Casanovas et al., 2021). 본 연구에서도 Mos와 probiotics의 첨가에 의한 참돔의 혈액 내 total protein 농도를 증진시켰다. 어류 사료 내 Mos의 단독 첨가와 *L. plantarum*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*의 단독 또는 혼합 첨가는 단백질 소화율과 효소 생산을 향상시켜 혈액 내 total protein 농도를 증진시킬 수 있다고 보고되었다(Hasan et al., 2019; Magouz et al., 2021). 따라서, 사료 내 Mos의 단독 첨가와 probiotics의 단독 또는 혼합 첨가는 단백질 이용성을 높일 수 있다고 판단된다. 사료 내 prebiotic의 단독 첨가와 probiotics의 단독 또는 혼합 첨가는 어류의 건강도(Dawood et al., 2020b)와 스트레스에 대한 저항성(Dawood et al., 2015)에 부정적인 영향이 없다고 알려져 있다. 이번 연구에서 사료 내 prebiotic의 단독 첨가와 probiotics의 단독 또는 혼합 첨가는 참돔 혈액의 hemoglobin의 수치를 향상시키는 경향을 나타내었으며, Pro-Mix 혼합 첨가구는 대조구에 비해 유의적으로 높았다. 스트레스 지표인 AST, ALT 농도는 대조구와 첨가구 사이에 유의적인 차이가 없었다. Glucose 농도는 Pro-BL과 Pro-Mix 첨가구에서 대조구에 비해 유의적으로 감소하였다. 따라서 사료에 Mos의 단독 첨가와 probiotics의 단독 또는 혼합 첨가는 참돔의 건강도를 높이고 스트레스를 감소시킬 수 있을 것으로 판단된다.

어류 사료에 probiotics의 첨가는 어류의 장에서 유용 미생물의 증식을 촉진하고(Ran et al., 2016) 병원성 미생물의 증식을 억제하여(Kesarcodi-Watson et al., 2008) 질병 저항성을 향상시킬 수 있다고 알려져 있다(Gobi et al., 2018). 넙치 사료에 *Lactococcus*와 *Bacillus*의 첨가는 장내 병원성 미생물의 증식을 억제한다고 보고되었다(Hasan et al., 2018a, 2018b). 이번 연구에서도 참돔 사료에 Mos와 probiotics의 첨가는 장내 미생물의 조성에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 참돔의 장내 THB에 대한 LAB의 비율은 모든 첨가구에서 대조구에 비해 높았으며 이는 사료에 단독 첨가된 Mos와 단독 또는 혼합 첨가된 probiotics가 유용 미생물인 LAB의 증식을 촉진하였기 때문인 것으로 추측된다. 게다가, 참돔의 장내 THB에 대한 TVB의 비율은 Mos와 모든 probiotics 첨가구에서 감소하였다. 하지만 Pro-LP구의 경우 Pro-BL구에 비해 낮은 경향을 보였다. Probiotics는 어종, 첨가함량과 형태에 따라 효과가 달라진다(Torrecillas et al., 2014; Yang et al., 2016). 본 연구의 경우 260 g 참돔 사료 내에 probiotics를 0.6% 첨가할 경우에는 *B. licheniformis*가 *L. plantarum*보다 이용성이 높아 장내 THB에 대한 LAB의 비율이 더 높게 나타나는 것으로 판단된다. Dias et al. (2018)은 tambaqui *Colossoma macropomum* 사료에 *B. cereus*의 첨가가 병원성 미생물에 대한 저항성을 향상시켜준다고 보고하였

다. Tilapia 사료에 열처리된 *B. pumilus*와 *L. plantarum*을 첨가할 경우, *Aeromonas hydrophila*와 *S. agalactiae*에 대한 저항성을 향상시킨다고 보고하였다(Aly et al., 2008; Nguyen et al., 2019). 따라서 사료에 Mos와 probiotics의 첨가는 참돔의장에서 병원성 미생물인 *Vibrio* 균의 증식을 억제하여 장 건강에 긍정적인 영향을 줄 것으로 판단되며, 이러한 효능이 참돔의 질병 저항성에 끼치는 영향에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

어류 사료에 Mos (Munir et al., 2016)와 probiotics (Park et al., 2020)의 첨가는 장내 유용 미생물의 증식과 소화효소 생산을 촉진하여(Tran et al., 2017), 숙주생물의 WG와 영양소 소화율을 높이는 것으로 알려져 있다(Hisano et al., 2018). 갑각류인 보리새우(*Marsupenaeus japonicus*) 후기 유생 사료에 probiotics를 첨가할 경우에도 WG가 증가한다고 보고되었다(Tung et al., 2009). 본 연구에서는 사료에 Mos와 probiotics의 단독 또는 혼합 첨가가 260–390 g 참돔의 WG를 약 5%가량 향상시키는 것으로 나타났으며, Mos구와 Pro-BL구는 대조구에 비해 유의적으로 높게 나타났다. Dawood et al., (2016a, 2016b)은 치어기(2–3 g) 참돔 사료에 *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. lactis*를 첨가하였을 때 사료효율, 장내 LAB 수, total protein 및 선천 면역력이 유의적으로 증가하였다고 보고하였다. 따라서, 사료에 Mos와 probiotics를 적정량으로 단독 또는 혼합 첨가하면 참돔의 성장, 사료 효율, 비특이적 면역력을 향상시킬 수 있을 것으로 판단된다.

결론적으로, 사료에 Mos와 3종의 probiotics를 적정량(약 0.6%)으로 첨가했을 때 260–390 g 참돔의 성장, 사료효율, 비특이적 면역력, 항산화효소 활성을 향상시켰다. 이는 Mos와 probiotics가 참돔의 장내 유용 미생물(LAB)의 증식을 촉진하고 병원성 미생물(*Vibrio* spp.)의 증식을 억제하여 참돔의 장 건강을 개선하였기 때문인 것으로 사료된다. 어류 사료에 prebiotics와 probiotics의 첨가 효과는 어류의 종, 성장 단계, 첨가량과 형태, 양식 환경에 따라 다를 수 있기 때문에 보다 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

사 사

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

References

Aly SM, Mohamed MF and John G. 2008. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). *Aquac Res* 39, 647–656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01932.x>.
 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>.
 Banerjee G and Ray AK. 2017. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Res Vet Sci* 115, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.01.016>.
 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>.
 Cheng CH, Yang FF, Ling RZ, Liao SA, Miao YT, Ye CX and Wang AL. 2015. Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Aquat Toxicol* 164, 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.04.004>.
 Dawood MAO, Koshio S, Ishikawa M and Yokoyama S. 2015. Effects of partial substitution of fish meal by soybean meal with or without heat-killed *Lactobacillus plantarum* (LP20) on growth performance, digestibility, and immune response of amberjack, *Seriola dumerili* juveniles. *Biomed Res Int* 2015, 514196. <https://doi.org/10.1155/2015/514196>.
 Dawood MAO, Koshio S, Ishikawa M and Yokoyama S. 2016a. Immune responses and stress resistance in red sea bream, *Pagrus major*, after oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* and vitamin C. *Fish Shellfish Immunol* 54, 266–275. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.017>.
 Dawood MAO, Koshio S, Ishikawa M, Yokoyama S, Basuini MFE, Hossain MS, Nhu TH, Dossou S and Moss AS. 2016b. 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, Abo-Al-Ela HG and Hasan MT. 2020a. Modulation of transcriptomic profile in aquatic animals: Probiotics, prebiotics and synbiotics scenarios. *Fish Shellfish Immunol* 97, 268–282. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.054>.
 Dawood MAO, Koshio S, Fadl SE, Ahmed HA, El Asely A, Abdel-Daim MM and Alkahtani S. 2020b 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>.
 Dias JA, Abe HA, Sousa NC, Couto MV, Cordeiro CA, Menezes JO, Cunha FS, Mouriño JLP, Martins ML, Barbas LAL, Carneiro PCF, Maria AN and Fujimoto RY. 2018. Dietary supplementation with autochthonous *Bacillus cereus* im-

- proves growth performance and survival in tambaqui *Colosoma macropomum*. *Aquac Res* 49, 3063-3070. <https://doi.org/10.1111/are.13767>.
- Dimitroglou A, Merrifield DL, Spring P, Sweetman J, Moate R and Davies SJ. 2010. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 300, 182-188. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.015>.
- 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.
- Gao QX, Xiao C, Min M, Zhang C, Peng SM and Shi ZH. 2016. Effects of probiotics dietary supplementation on growth performance, innate immunity and digestive enzymes of silver pomfret, *Pampus argenteus*. *Indian J Anim Res* 50, 936-941. <https://doi.org/10.18805/ijar.9640>.
- Genc MA, Yilmaz E, Genc E and Mevlut A. 2007. Effects of dietary mannan oligosaccharides (MOS) on growth, body composition, and intestine and liver histology of the hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *Isr J Aquac* 59, 10-16.
- Giri SS, Sukumaran V, Sen SS and Jena PK. 2014. Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Bacillus subtilis* VSG1 singularly or in combination with *Lactobacillus plantarum* VSG3 or/and *Pseudomonas aeruginosa* VSG2 on the growth, immunity and disease resistance of *Labeo rohita*. *Aquac Nutr* 20, 163-171. <https://doi.org/10.1111/anu.12062>.
- Gobi N, Vaseeharan B, Chen JC, Rekha R, Vijayakumar S, Anjugam M and Iswarya A. 2018. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Fish Shellfish Immunol* 74, 501-508. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.12.066>.
- Hasan MT, Jang WJ, Tak JY, Lee BJ, Kim KW, Hur SW, Han HS, Kim BS, Huh MD, Kim SK and Kong IS. 2018a. Effects of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I2 with β-glucooligosaccharides on growth, innate immunity and streptococcosis resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J Microbiol Biotechnol* 28, 1433-1442. <https://doi.org/10.4014/jmb.1805.05011>.
- Hasan MT, Jang WJ, Kim H, Lee BJ, Kim KW, Hur SW, Lim SG, Bai SC and Kong IS. 2018b. Synergistic effects of dietary *Bacillus* sp. SJ-10 plus β-glucooligosaccharides as a synbiotic on growth performance, innate immunity and streptococcosis resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol* 82, 544-553. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.002>.
- Hasan MT, Jang WJ, Lee JM, Lee BJ, Hur SW, Lim SG, Kim KW, Han HS and Kong IS. 2019. Effects of immunostimulants, prebiotics, probiotics, synbiotics, and potentially immunoreactive feed additives on olive flounder (*Paralichthys olivaceus*): A review. *Rev Fish Sci Aquac* 27, 417-437. <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1622510>.
- Heo WS, Kim YR, Kim EY, Bai SC and Kong IS. 2013. Effects of dietary probiotic, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I2, supplementation on the growth and immune response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 376-379, 20-24. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.11.009>.
- Hisano H, Soares MP, Luiggi FG and Arena AC. 2018. Dietary β-glucans and mannanoligosaccharides improve growth performance and intestinal morphology of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (holmberg, 1887). *Aquac Int* 26, 213-223. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0210-6>.
- Jang WJ, Lee JM, Hasan MT, Lee BJ, Lim SG and Kong IS. 2019. Effects of probiotic supplementation of a plant-based protein diet on intestinal microbial diversity, digestive enzyme activity, intestinal structure, and immunity in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol* 92, 719-727. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.056>.
- Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Latagan MJ and Gibson L. 2008. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.019>.
- Kim YJ, Jun LJ, Lee DW, Lee YJ, Ko YJ, Oh YE, Woo SJ, Kim MS, Kim SM and Jeong JB. 2022. Antibiotic susceptibility of bacterial pathogens that infect olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) cultivated in Korea. *Int J Environ Res Public Health* 19, 8110. <https://doi.org/10.3390/ijerph19138110>.
- KOSIS (Korea Statistical Information Service). 2022. Survey on the Status of Fish Culture. Retrieved from <http://kosis.kr/search/search.do?query=%EC%96%B4%EB%A5%98%EC%96%91%EC%8B%9D> on Aug 29, 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 JM, Jang WJ, Hasan MT, Lee BJ, Kim KW, Lim SG, Han HS and Kong IS. 2019. Characterization of a *Bacillus* sp. isolated from fermented food and its synbiotic effect with barley β-glucan as a biocontrol agent in the aquaculture industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 103, 1429-1439. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9480-9>.
- Lieschke GJ and Trede NS. 2009. Fish immunology. *Curr Biol* 19, R678-R682. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.068>.
- Liu H, Wang S, Cai Y, Guo X, Cao Z, Zhang Y, Liu S, Yuan W, Zhu W, Zheng Y, Xie Z, Guo W and Zhou Y. 2017. Dietary administration of *Bacillus subtilis* HAINUP40 en-

- hances growth, digestive enzyme activities, innate immune responses and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish Shellfish Immunol 60, 326-333. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.12.003>.
- Lu J, Qi C, Limbu SM, Han F, Yang L, Wang X, Qin JG and Chen L. 2019. Dietary mannan oligosaccharide (MOS) improves growth performance, antioxidant capacity, non-specific immunity and intestinal histology of juvenile chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*). Aquaculture 510, 337-346. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.048>.
- Lu ZY, Feng L, Jiang WD, Wu P, Liu Y, Kuang SY, Tang L and Zhou XQ. 2020. Mannan oligosaccharides improved growth performance and antioxidant capacity in the intestine of on-growing grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Aquac Rep 17, 100313. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100313>.
- Magouz FI, Bassuini MI, Khalafalla MM, Abbas R, Sewilam H, Aboelenin SM, Soliman MM, Amer AA, Soliman AA, van Doan H and Dawood MAO. 2021. Mannan oligosaccharide enhanced the growth rate, digestive enzyme activity, carcass composition, and blood chemistry of Thinlip grey mullet (*Liza ramada*). Animals 2021, 3559. <https://doi.org/10.3390/ani11123559>.
- 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 Appl Aquac 31, 193-209. <https://doi.org/10.1080/10454438.2018.1499576>.
- Munir MB, Hashim R, Chai YH, Marsh TL and Nor SAM. 2016. Dietary prebiotics and probiotics influence growth performance, nutrient digestibility and the expression of immune regulatory genes in snakehead (*Channa striata*) fingerlings. Aquaculture 460, 59-68. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.041>.
- Nguyen VN, Onoda S, Khanh VT, Hai PD, Trung NT, Hoang L and Koshio S. 2019. Evaluation of dietary heat-killed *Lactobacillus plantarum* strain L-137 supplementation on growth performance, immunity and stress resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 498, 371-379. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.081>.
- Park Y, Kim H, Won S, Hamidoghli A, Hasan MT, Kong IS and Bai SC. 2020. Effects of two dietary probiotics (*Bacillus subtilis* or *licheniformis*) with two prebiotics (mannan or fructo oligosaccharide) in Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquac Nutr 26, 316-327. <https://doi.org/10.1111/anu.12993>.
- Ran C, Huang L, Liu Z, Xu L, Yang Y, Tacon P, Auclair E and Zhou Z. 2016. Correction: A comparison of the beneficial effects of live and heat-inactivated baker's yeast on Nile tilapia: suggestions on the role and function of the secretory metabolites released from the yeast. PLoS One 11, e0151207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151207>.
- Ringø E, Zhou Z, Vecino JLG, Wadsworth S, Romero J, Krog-dahl Å, Olsen RE, Dimitroglou A, Foey A, Davies S, Owen M, Lauzon HL, Martinsen LL, de Schryver P, Bossier P, Sperstad S and Merrifield DL. 2016. Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story?. Aquac Nutr 22, 219-282. <https://doi.org/10.1111/anu.12346>.
- Safari O, Paolucci M and Motlagh HA. 2020. Effect of dietary encapsulated organic salts (Na-acetate, Na-butyrate, Na-lactate and Na-propionate) on growth performance, haemolymph, antioxidant and digestive enzyme activities and gut microbiota of juvenile narrow clawed crayfish, *Astacus leptodactylus leptodactylus* Eschscholtz, 1823. Aquac Nutr 27, 91-104. <https://doi.org/10.1111/anu.13167>.
- 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.
- 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>.
- Taoka Y, Maeda H, Jo JY, Kim SM, Park SI, Yoshikawa T and Sakata T. 2006. Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. Fish Sci 72, 755-766. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2006.01215.x>.
- Torrecillas S, Montero D and Izquierdo M. 2014. Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: Potential mode of action. Fish Shellfish Immunol 36, 525-544. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.029>.
- Tran NT, Wang GT and Wu SG. 2017. A review of intestinal microbes in grass carp *Ctenopharyngodon idellus* (Valenciennes). Aquac Res 48, 3287-3297. <https://doi.org/10.1111/are.13367>.
- Tung HT, Koshio S, Teshima SI, Ishikawa M, Yokoyama S, Ren T, Hirose Y and Phuong NDT. 2009. Effects of heat-killed *Lactobacillus plantarum* supplemental diets on growth performance, stress resistance and immune response of juvenile Kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* bate. Aquac Sci 57, 175-184. <https://doi.org/10.1123/aquaculturesci.57.175>.
- Wang A, Ran C, Wang Y, Zhang Z, Ding Q, Yang Y, Olsen RE, Ringø E, Bindelle J and Zhou Z. 2019. Use of probiotics in aquaculture of China - a review of the past decade. Fish Shellfish Immunol 86, 734-755. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.026>.
- Ye J, Wang K, Li F and Sun Y. 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 *Paralichthys olivaceus*. Aquac Nutr 17, e902-e911. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00863.x>.

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>.

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>.