

유산균 생산 후 폐기되는 부산물 첨가 사료의 급이가 잉어(*Cyprinus carpio*)의 성장률, 선천성 면역, 면역연관 유전자 발현 및 항균효과에 미치는 영향

최재혁 · 정상목 · 양은총 · 장태원 · 이찬흔* · 박관하 · 최상훈[†]

군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과, *(유)금성상공

Effects of dietary by-products discarded after probiotics production (BPPP) on growth performance, innate immunity, immune gene expression, and disease resistance against *Edwardsiella tarda* in carp, *Cyprinus carpio*

Jae Hyeok Choi, Sang Mok Jung, Eun Chong Yang, Tae Won Jang,
Chan Heun Lee*, Kwan Ha Park and Sanghoon Choi[†]

Department of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science and Technology,
Kunsan National University, 558 Daehak-ro, Gunsan-si, Jeonbuk, Korea

*Geum Sung Sang Gong co., Ltd., 102, 2-gil Bong Hwanggongdan Gimje-si, Jeonbuk, Korea

This study has been performed to investigate the potential effects of by-product discarded after probiotics production (BPPP) on growth performance, immune gene expression, innate-immunity status, and disease resistance of carp, *Cyprinus carpio*. For 3 weeks, carp were fed four diets containing different levels of BPPP at 0, 0.1, 0.2 and 0.5% per kg of normal diet. Every 7 days of feeding, immune-related gene expression, serum lysozyme activity and ACH₅₀ were analyzed. Growth rates and challenge test with *E. tarda* were conducted after 3 weeks of BPPP feeding. Both lysozyme activity and ACH₅₀ were significantly ($p<0.05$) increased in all BPPP supplemented groups compared to the control at every 7 day for 3 weeks of feeding trial. The gene expression of pro-inflammatory cytokines, IL-1 β and TNF- α was significantly ($p<0.05$) up-regulated until 21 days of feeding in all groups except for 0.2% group on day 7 post feeding. The anti-inflammatory cytokine IL-10 gene expression was only significantly ($p<0.05$) increased in 0.1% group on day 7 and decreased ($p<0.05$) on day 14 in all BPPP supplemented groups. On day 21, the IL-10 gene expression was augmented ($p<0.05$) in all groups. SOD gene expression was significantly ($p<0.05$) increased compared to the control on day 14 and 21 post feeding, whereas no significant difference was observed on day 7. In challenging test, 0.2%, 0.1%, 0.5% and control group showed 80%, 70%, 60% and 40% of survival rate, respectively. Feed conversion rate was only improved in 0.5% group. In conclusion, the present study indicates that dietary BPPP supplementation improved growth performance, innate immune response and bactericidal activity in carp.

Key words: *Lactobacillus*, Postbiotics, Bactericidal activity, Immune-related gene expression, Growth performance

[†]Corresponding author: Sanghoon Choi
Tel: +82-63-469-1886, Fax: +82-63-463-9493
E-mail: shchoi@kunsan.ac.kr

서 론

국내 어업 생산량은 2012년 3,183 톤에서 2019년 3,868 톤으로 증가하였으며 연간 1인당 수산물 소비량은 2012년 53.8 kg에서 2019년 69.8 kg으로 증가하였다(KOSIS, 2022). 수산 생물의 질병 발생은 양식 생산량을 감소시키는 주요 요인이며 생산량 향상을 위해 오랫동안 무분별하게 오·남용되었던 다양한 항생제로 인하여 내성균의 발생은 물론 어체 내의 잔류 위험성 등에 의해 인간의 건강에 심각한 피해가 발생 될 수 있다(Seo et al., 2013).

이 같은 문제점에 대한 해결책으로 수산용 백신의 사용과 다양한 첨가 사료의 급여가 활발하게 시도되고 있다(Song et al., 2009, Baek et al., 2013, Vinay et al., 2013, Marta et al., 2018). 백신의 투여는 질병 발생을 사전에 예방하기 위해 필수적이거나 투여과정이 번거롭고 어류에 상당한 스트레스를 유발 시킬 수 있다. 또한 수산용 백신은 바이러스 및 기생충의 특성에 따라 효율성 있는 백신의 개발이 어렵고, 세균성 질병에 대한 백신이나 산업적인 가치가 높은 어종에 한하여 백신이 제한적으로 사용되고 있는 실정이다(Han et al., 2021). 반면에 첨가 사료는 급여의 편리성과 친환경적인 장점을 바탕으로 생균제 또는 천연 물질을 포함한 다양한 면역증강 유도 물질을 사료 첨가제로 이용한 연구 결과들이 보고되고 있다(Ganguly et al., 2013, Kristina et al., 2015, Bang et al., 2019, Lopes et al., 2022).

Probiotics는 적절한 양을 섭취했을 때 숙주의 건강에 이익을 제공하는 살아있는 유용 미생물로 가장 많이 사용되는 종은 *Lactobacillus* spp.와 *Bifidobacterium* spp. 이다(Bermudez-Brito et al., 2012). Prebiotics는 probiotics에 의해 대사되며 probiotics의 성장과 활성을 자극하여 장내 미생물 총을 *Lactobacillus* spp. 또는 *Bifidobacterium* spp. 과 같은 유익한 박테리아로 바꿔 체내 건강을 도모할 수 있는 비소화성 식품 성분으로 잘 알려져 있다(Ganguly et al., 2013). Probiotics와 prebiotics의 섭취에 의한 건강상의 이점 중 대부분은 short-chain fatty acids (SCFAs), 균체 성분 그리고 probiotics가 생성하는 기능성 단백질, 다당류 등으로 알려져 있다(Nazhand et al., 2020). 이는 probiotics가 위산과 면역반

응에 의해 많은 양이 사멸되지 않고 주 활동 무대인 소장과 대장에 잘 도달했을 때 뚜렷하게 나타나며, 이러한 효과는 probiotics 자체 및 probiotics의 대사산물 등에 의한 것이라 할 수 있다(Tsililingiri and Rescigno, 2013).

Postbiotics는 probiotics가 prebiotics를 섭취하여 대사할 때 생산하는 대사산물이자 사멸한 probiotics의 균체 성분이다. SCFAs, enzymes, polysaccharides, organic acids, cell surface proteins, peptidoglycans, teichoic acid 및 vitamins 등은 postbiotics에 포함된 성분들로 섭취 시 장내 미생물과 면역계의 상호작용으로 숙주의 건강 기능 개선 및 면역력 강화의 효과가 있다고 보고된 바 있다(Klemashevich et al., 2014). SCFAs는 장 상피 세포를 위한 중요한 에너지원이고 장벽 기능 강화에 도움이 되며 enzymes은 고분자 물질 분해와 장내세균이 형성하는 biofilm을 제거한다고 알려져 있으며, 또한 peptidoglycan, teichoic acid, antimicrobial peptides (AMPs) 등과 같은 postbiotics의 구성 성분들은 직접적으로 장내 유해균을 사멸하거나 면역계를 자극하는 immunostimulant로서 작용한다(Maria José and Elena, 2020). Wegh 등 (2019)은 postbiotics에 대한 연구가 probiotics와 prebiotics에 비해 상대적으로 적지만 증가세에 있다고 보고하였으며, Ang 등 (2020)의 리뷰에서는 위에서 언급한 다양한 probiotics의 대사산물인 postbiotics가 양식 산업에서 항생제 대체제로서의 잠재적인 가치가 있다고 보고하였다. 이렇듯 postbiotics는 기능성 식품으로서의 가능성이 있음에도 불구하고 어류를 대상으로 한 postbiotics 첨가 사료에 대한 국내 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 유산균(*L. plantarum*) 생산 후 폐기되는 부산물(by-product discarded after probiotics production, BPPP)을 postbiotics로서 사료 첨가제로 활용하여 잉어에 급여한 후 성장률, 면역 연관 유전자 발현, 선천성 면역지표 및 항균능을 평가하였다.

재료 및 방법

실험어 및 실험 수조

실험어는 평균 체중 41.5 ± 0.5 g의 잉어(*Cyprinus*

carpio) 400 미를 전북 완주 소재의 양식장에서 구매하여 2주간 실험수조에 순치시켰다. 실험에 사용된 수조는 사각 유리수조(900×450×450 mm)로 수심 400 mm만큼 채운 후 수온은 25±1°C로 유지하였으며 순환여과식 사육법을 사용하였다. 순치 전 잉어는 50ppm의 oxytetracycline으로 1시간 동안 약욕하였다. 환수는 하루에 한번 15%씩 sodium thiosulfate를 이용하여 염소를 제거한 지하수를 사용하였다.

BPPP 첨가사료 제작 및 급여

본 연구에 사용된 BPPP는 *L. plantarum*을 대량 배양하면서 발생한 부산물로서 (유)금성상공(김제시 소재)으로부터 기증받았다. BPPP를 사료 중량 대비 0.1%, 0.2% 및 0.5%씩 각각 첨가하여 전 실험에 사용된 첨가사료를 제조하였다. 플라스틱 통에 100 g의 사료를 넣고 각 농도 별의 BPPP와 D.W. 30 ml를 각각의 spray에서 혼합한 뒤 골고루 분무하면서 사료 전체에 흡착이 되게 하였다. 이후 각 농도 별의 첨가사료를 37°C에서 24시간 동안 숙성 발효시켰다. 제작된 사료는 사용할 때까지 4°C에 보관하였다. 대조군을 포함한 BPPP 0.1%, 0.2%, 0.5% 첨가군은 어체중당 1%씩 각 실험군 당 잉어 25 미를 대상으로 매일 2회(10시 및 18시)씩 총 21일간 급여하였다. 각 실험군 총 25 미 중 15 미를 급여 7 일째마다 5 미씩 선천성 면역지표 및 면역연관 유전자 측정에 사용하였고 나머지 10 미를 대상으로 성장률 측정 및 공격실험에 사용하였다.

병원성 균주

실험에 사용된 병원성 균주는 *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*, KCTC 12267)로 생물자원센터(KCTC)에서 분양받은 후 -80°C에서 보관 중인 균주를 사용하였다. 실험 전 균주를 해동하여 brain heart infusion (BHI, BD, USA) broth에 접종하고 25°C에서 24시간 배양 후 *Salmonella Shigella* (SS, BD, USA) agar로 계대하였다. 이후 형성된 흑색 집락을 취하여 BHI broth로 계대배양 함으로써 균주를 유지하였다.

혈청 수집

혈청 수집을 위해 잉어의 미병부에서 26 G nee-

dle을 부착한 1 ml 주사기로 채혈하였다. 채취한 혈액은 상온에서 30분간 응고시킨 후 4°C에서 24시간 보관하였다. 이후 1,200 × g로 10분간 원심 분리하여 혈청을 수집하였으며 실험에 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다.

Lysozyme activity

Micrococcus lysodeikticus (Sigma, USA)를 0.2 M citrate phosphate buffer (pH 5.8)에 2 mg/ml 농도로 부유시킨 용액을 96 well plate 각 well 당 250 µl을 넣고 채취한 잉어 혈청을 10 µl씩 분주한 후 30초부터 4분 30초까지 반응시켜 감소하는 흡광도의 양을 Sunrise micro plate reader (TECAN, Swiss)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분당 0.001의 흡광도가 감소하는 양을 1 unit로 나타내었다.

ACH₅₀

Alternative pathway complement hemolysis 50 (ACH₅₀) 측정은 Yano (1992)의 방법을 이용하여 분석하였다. 토끼의 혈액을 채취하기 위해 23 G needle을 부착한 5 ml 주사기에 500 IU의 헤파린을 처리하고 이개정맥에서 혈액을 채취하여 histopaque-1077 (Sigma, USA)을 이용하여 적혈구를 분리하였다. 분리된 토끼의 적혈구(rabbit red blood cell, RaRBC)를 0.01 M ethylene glycol tetraacetic acid-Mg-gelatin veronal buffer (EGTA-Mg-GVB)로 2회 세정한 후 1 × 10⁸ cells/ml의 농도로 희석하여 사용하였다. 잉어 혈청을 PBS로 12배 희석한 후 96 well plate에 well 당 200, 150, 100, 50 µl씩 분주하고 EGTA-Mg-GVB를 각각의 well에 총량이 200 µl가 되도록 분주하였다. RaRBC를 각각의 well에 100 µl씩 분주하여 25°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 220 × g, 4°C에서 5분간 원심 분리하였다. 형성된 상층액 100 µl을 취하여 Sunrise micro plate reader (TECAN, Swiss)를 이용하여 405 nm에서 측정하였다. 용혈된 적혈구 (Y)는 Y/(1-Y) 공식을 이용하여 50%의 용혈을 계산한 뒤 unit/ml을 산출하였다.

Quantitative PCR (qPCR) analysis of gene expression

Interleukin (IL)-1β, IL-10, tumor necrosis factor

(TNF)- α , superoxide dismutase (SOD), β -actin의 유전자 발현 분석은 Exicycler™96 (Bioneer, Korea)을 이용하여 확인하였다. 잉어의 두신에서 total RNA를 분리하였으며, M-MLV cDNA Synthesis kit (Enzynomics, Korea)의 방법에 따라 cDNA를 제작하였다. Total volume이 20 μ l가 되도록 제작된 cDNA 2 μ l, AccuPower® 2X GreenStar™ qPCR Master mix (Bioneer, Korea) 10 μ l, forward primer와 reverse primer를 각각 1 μ l 그리고 DEPC water 6 μ l를 잘 혼합하였다. qPCR은 95°C (10 min) 그리고 95°C (30s), 60°C (30s), 72°C (30s)의 조건으로 40 cycle을 실시하였다. PCR이 끝난 뒤 melting curve를 분석하여 단일 산물이 생성되었음을 확인하였으며 각각의 유전자 발현은 β -actin의 발현량으로 보정하여 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method로 측정하였다. qPCR에 사용된 primer는 Table 1에 제시하였다.

성장률 측정

잉어를 수조에 순치시킨 후 실험사료를 급여하기 전 최초무게를 측정하였고 21일간 첨가 사료 급여 후 공격실험 전에 최종무게를 측정하여 성장률을 측정하였다. 첨가 사료는 하루에 어체 중량의 1%씩 2회 총 2%를 급여하였다. 섭취한 사료량은 사료를 공급한 지 30분 후에 섭취하지 않은 사료를 전부 채취하여 건조 시킨 후 전체 공급량에서 제외하여 측정하였다. 최종무게 측정 후 증체량, 증체율, 일일 성장률 및 사료계수를 산출하였다.

공격실험

공격실험에 사용된 균주는 *E. tarda*로 공격 접종 전 SS agar에서 형성된 흑색 집락을 취하여 10 ml의 BHI broth에 계대배양하고 25°C에서 24시간 배양하였다. 공격 접종은 2×10^8 CFU/ml 균주를 100 μ l씩 복강 주사하였다. 접종 이후에 실험사료 각각을 계속해서 급여해 주면서 각 군 별로 10일간 생존한 마리 수를 생존율로 환산하였다.

통계분석

데이터를 평균과 표준편차(mean $\pm$ S.D.)로 표현하고 각 그룹 간의 유의성 검정을 위해 ANOVA 분석 후 Newman-Keuls 검정을 사후비교로 사용하였다. 유의성의 판단 기준은 $P < 0.05$ 일 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 유산균(*L. plantarum*) 대량생산 후 전량 폐기되는 배양부산물을 활용하여 양식 어류의 면역증강은 물론 장내 환경개선을 통한 양어용 기능성 사료 첨가제를 개발하고자 하였다. 유산균의 다양한 대사산물 등이 포함되어 있는 것으로 보고된(Cho et al., 2021), 유산균 배양부산물(BPPP)을 사료 kg 당 0.1%, 0.2% 및 0.5%씩 각각 첨가하여 24시간 발효시킨 후 잉어에 급여한 후 선천성 면역 반응, cytokine profiles, 성장률 및 항균능을 평가하였다. 본 연구에서 사용된 BPPP 첨가사료는 BPPP

Table 1. Primers used for amplification of specific transcripts by quantitative PCR

Target		Sequence(5' to 3')	Product size (bp)	Accession number
IL-1 β	F	AAGGAGGCCAGTGGCTCTGT	69	AB010701
	R	CTGAAGAAGAGGAGGCTGTCA		
IL-10	F	GCTGTACGTCATGAACGAGAT	132	AB110780
	R	CCCGCTTGAGATCCTGAAATAT		
TNF- α	F	GCTGTCTGCTTCACGCTCAA	106	AJ311800
	R	CCTTGGAAGTGACATTTGCTTTT		
SOD	F	TGGCGAAGAAGGCTGTTTGT	91	JF342355
	R	TTCACCTGGAGACCCGTCACCT		
β -actin	F	GCTATGTGGCTCTTGACTTCGA	89	M24113
	R	CCGTCAGGCAGCTCATAGCT		

첨가 후 37°C에서 24시간 동안 발효시킨 것으로서 예비실험의 각 측정지표에서 가장 효과가 좋은 것으로 나타났다(미계제). 또한 발효 24시간 후 BPPP 첨가 사료에 존재하는 유산균의 수는 발효 전과 비교 시 변화가 없었다. 이러한 결과는 발효 효과가 미량으로 존재하는 유산균에 의한 것이 아니라 유산균 배양액의 다양한 대사산물 등에 의한 것임을 암시한다.

Fig. 1A와 B는 0.1%, 0.2% 및 0.5% BPPP 첨가사료를 총 21일간 급여하면서 7일째마다 측정한 lysozyme activity 및 ACH₅₀의 결과를 각각 보여주고 있다. Jorge 등 (2006)과 Mohammadian 등 (2022)은 선천성 면역지표의 일종인 lysozyme과 보체의 활성이 postbiotics 중 peptidoglycan, 다양한 세포표면 단백질 및 대사산물 등과 같은 pathogen associated molecular patterns (PAMPs)에 의해 유의성 있게 상승 되는 것으로 보고하였다. 본 연구에서도 이전 결과와 유사하게 Fig. 1에서 보이는 것처럼 급여 7일부터 21일 제까지 BPPP의 첨가 농도에 상관없이 모든 첨가군에서 라이소자임과 보체의 활성이 대

조군 대비 유의성($p<0.05$) 있게 증가 되었다. 그러나 농도별 첨가군 간의 유의성은 관찰되지 않았다.

Macrophage, lymphocyte, granulocyte, dendritic cell 및 mast cell 등에서 생성되는 다양한 cytokine 들은 서로 간의 유전자 발현조절을 통해 면역 반응의 유도, 분화 및 활성화 과정에 관여한다(Reyes-Cerpa et al., 2012). 본 연구에서는 서로 다른 농도로 제조된 BPPP 첨가사료를 총 21일간 급여하면서 7일째마다 pro-inflammatory cytokine의 일종인 IL-1 β 와 TNF- α 그리고 anti-inflammatory cytokine의 일종인 IL-10 및 항산화 작용을 하는 superoxide dismutase (SOD)에 대한 유전자 발현추이를 조사 하였다. 선천성면역이 활성화 되었을 시 초기에 나타나는 염증 관련 IL-1 β 와 TNF- α 의 유전자 발현은 7일째의 0.2% BPPP 첨가군을 제외한 모든 군에서 급여 후 21일째까지 대조군에 비해 유의성 있게 증가($p<0.05$)하는 것으로 관찰되었다(Fig. 2). 항염증 작용을 하는 IL-10의 발현은 7일째의 0.1% BPPP 첨가군에서 대조군에 비해 유의적으로 증가($p<0.05$)하였으나 14일째에는 모든 BPPP 첨가군들에 있어서 대조군 대비 유의적으로 감소($p<0.05$)하는 것으로 나타났다. 그러나 최종 21일째에는 BPPP 첨가군 모두에서 유의적으로 상승($p<0.05$)하였으며 또한 0.1% 첨가군 보다 고농도의 첨가군에서 유의성($p<0.05$) 있게 증가하는 것으로 관찰되었다. SOD 유전자 발현은 급여 7일째에선 모든 첨가그룹에서 대조군과 비교하여 유의적 차이가 없었지만 14일째와 21일째에는 대조군 대비 유의성($p<0.05$) 있게 증가하였다(Fig. 2). 본 연구의 결과는 pro- 및 anti-inflammatory cytokine들이 postbiotics에 의해 상승 발현됨으로써 면역기능 이 활성화 된다는 보고와 일치하였다(Aguilar-Toalá et al., 2018, María José and Elena, 2020).

BPPP 첨가사료의 급여가 잉어의 항균력에 미치는 영향을 알아보기로 21일간 급여한 잉어를 대상으로 *E. tarda*를 공격 접종 시킨 후 나타나는 누적 생존율을 10일간 관찰하였다(Fig. 3). 대조군의 누적 폐사율이 60%일 때, 0.1%, 0.2% 및 0.5% 군의 relative percent survival (RPS)는 각각 50%, 66.7% 및 33.3%로 나타났다. 이러한 결과는 postbiotics 중 short-chain fatty acids (SCFAs)가

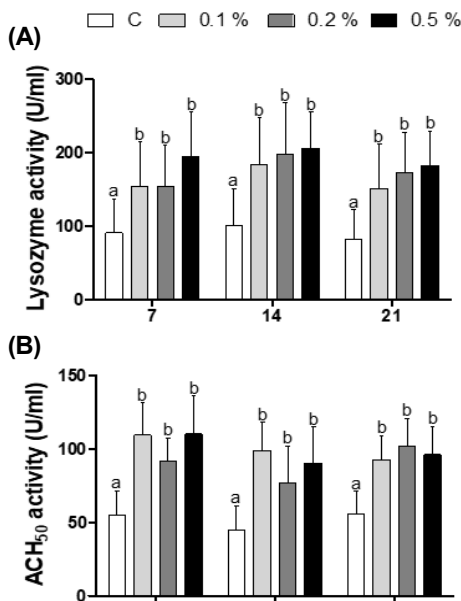


Fig. 1. Effects of dietary BPPP on lysozyme activity (A) and ACH₅₀ (B) of carp. Data represent the mean±S.D. (n=5). Different letters above the bars indicate significant differences ($p<0.05$) in different groups.

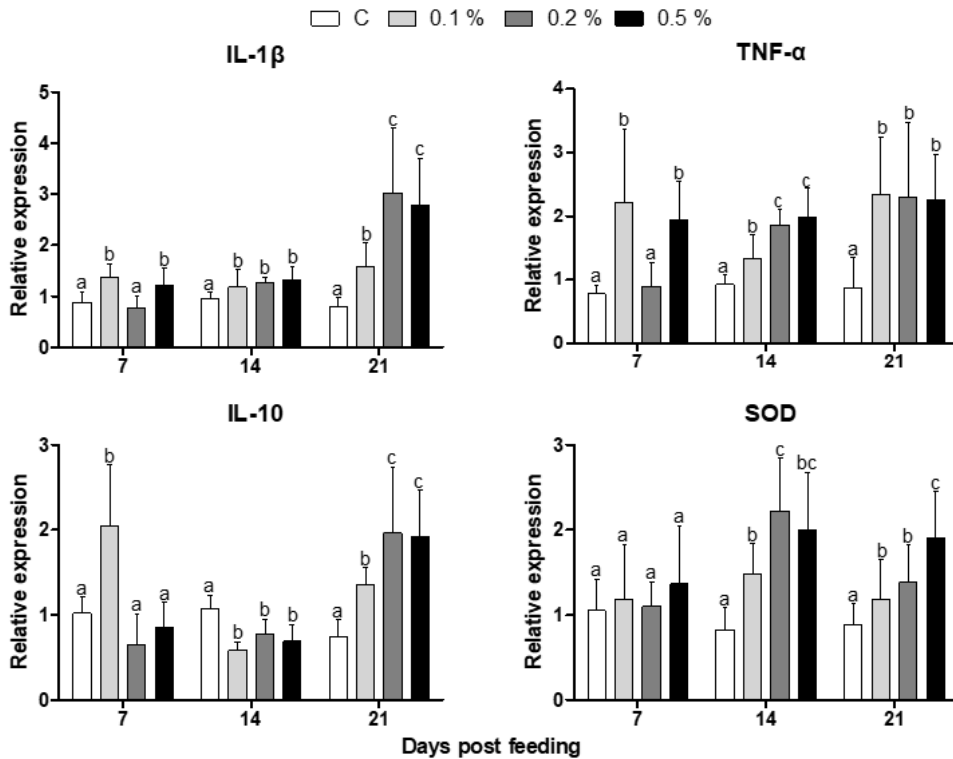


Fig. 2. Effects of BPPP on relative mRNA gene expression of IL-1 β and TNF- α , IL-10 and SOD in carp. Data represent the mean $\pm$ S.D. (n=5). Different letters above the bars indicate significant differences ($p < 0.05$) in different groups.

Aeromonas hydrophila, *Vibrio alginolyticus* 그리고 *Photobacterium damsela* spp. *piscicida*와 같은 병원성 세균의 감염력을 낮춰 폐사를 예방할 수 있다는

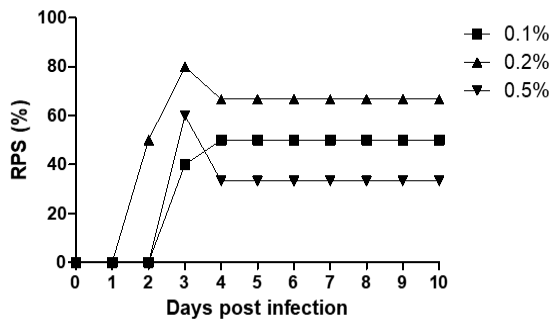


Fig. 3. Relative percent survival of carp for 10 days following *Edwardsiella tarda* (2×10^8 CFU/ml) challenge. Carp were fed 0.1, 0.2 and 0.5% BPPP added diet, respectively for 21 days followed by i. p. injection with *E. tarda*. Normal diet was fed as a control.

보고와 유사하였다(Tian et al., 2017, Ramírez et al., 2017, Piazzon et al., 2017). 또한 Fig. 1 및 2의 실험 결과에서 알 수 있듯이 BPPP 첨가 그룹의 lysozyme, ACH₅₀ 활성 및 면역 연관 유전자의 발현양이 대조군 대비 유의적으로 향상되었기 때문에 이로 인한 생존율이 높아졌을 것으로 추정된다.

한편으로 BPPP 첨가사료의 급여가 잉어의 증체량과 사료효율에 미치는 효과를 알아보기 위해 농도별의 첨가사료를 21일 동안 공급한 후 나타나는 잉어의 성장률 및 사료계수를 측정하였다. Tian 등 (2017)은 postbiotics 중 propionic acid 및 butyric acid와 같은 SCFAs를 사료에 첨가하였을 때 소화관의 지질 대사에 중요한 역할을 하고 건강한 장을 유지하는데 도움을 줌으로써 증체량과 사료효율이 개선되었다고 보고하였다. Table 2에서 제시된 것처럼 대조군에 비해 0.1% 군의 경우 모든 측정지표에서 유의적 차이가 관찰되지 않았으며 0.2%군에서

Table 2. Growth performances and feed utilization of carp fed different levels of dietary BPPP.

Parameters	Types of feed			
	Control	BPPP 0.1%	BPPP 0.2%	BPPP 0.5%
Initial body weight (g)	41.2±0.0	41.5±0.3	41.8±0.3	41.1±0.1
Final body weight (g)	49.2±0.7 ^a	49.0±1.8 ^a	50.3±2.4 ^a	52.9±0.3 ^b
Weight gain (g)	8.0±0.7 ^{ab}	7.6±2.0 ^a	8.5±2.7 ^b	11.8±0.4 ^c
Weight gain (%)	19.4±1.8 ^a	18.3±5.0 ^a	20.3±6.7 ^a	28.7±1.0 ^b
Specific growth rate (%)	0.8±0.1 ^a	0.8±0.2 ^a	0.9±0.3 ^a	1.2±0.0 ^b
Feed conversion rate	1.8±0.6 ^a	1.8±0.0 ^a	1.7±0.1 ^a	1.5±0.1 ^b

The numerical numbers in initial and final body weight (g) represent an average weight of 10 fish per each group from three repeated experiments.

Weight gain (g) = Final weight (g) - Initial weight (g)

Percent weight gain (PWG) = $[100 \times (\text{Final weight} - \text{Initial weight}) / \text{Initial weight}]$

Specific growth rate (SGR) = $[\{\text{LNFinal weight (g)} - \text{LNInitial weight (g)}\} / \text{DAY}] \times 100$

Feed conversion ratio (FCR) = Total feed taken (g) / Weight gain (g)

Different superscript letters indicate significant differences ($p < 0.05$) in different groups.

는 증체량만 유의적으로 개선($p < 0.05$)되는 것으로 나타났다. 이에 반해 0.5% 군에서는 모든 지표에서 대조군보다 유의성 있게 증가($p < 0.05$) 되는 것으로 관찰되었다.

궁극적으로 본 연구의 결과에서 BPPP 0.1% 낮은 농도에서도 7일째에서부터 lysozyme, ACH₅₀ 및 pro-inflammatory cytokine 발현이 활성화 되었으며 그 효과는 21일째까지도 지속됨으로써 *E. tarda*의 공격 감염에도 대조군 대비 생존율이 개선된다는 사실을 확인하였다. 또한 BPPP의 내용물로 알려진 SCFAs, enzymes, polysaccharides, organic acids, cell surface proteins, peptidoglycans, teichoic acid 및 vitamins 등의 복합적인 상호작용으로 인해 면역 반응은 물론 장내 환경개선에 의해 성장률이 개선 되었을 것으로 추정된다. 그러나 BPPP의 내용물 중 어떠한 물질 등에 의해 모든 지표가 개선 되었는 지에 대한 추가적인 연구가 요구된다.

결론적으로 본 연구에서 사용된 유산균 생산 후 폐기되는 부산물(BPPP)이 양어사료의 효율 개선은 물론 질병 예방 효과가 있는 것으로 나타남으로써 효과적인 기능성 첨가사료의 개발 가능성이 제시된다.

사 사

본 논문은 2022학년도 군산대학교 수산과학원

구소 학술경비로 지원되었음.

References

- Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B. and Hernández-Mendoza, A.: Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. Trends in Food Science & Technology, 75: 105-114, 2018.
- Ang, C. Y., Sano, M., Dan, S., Leelakriangsak, M. and Lal, T. M.: Postbiotics Applications as Infectious Disease Control Agent in Aquaculture. Biocontrol Science, 25(1): 1-7, 2020.
- Baek, M. S., Hwang, Y. S. and Choi, S. H.: The effects of a dietary *Edwardsiella tarda* specific bacteriophage and *Bacillus subtilis* mixture on innate immune responses and antibacterial activity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Kor. J. of Fisheries and Aquat. Sci., 26(3): 185-191, 2013.
- Bang, S. J., Lee, C. H., Kang, T. Y., Choi, J. H., Jung, S. M., Kang, I. S., Park, K. H. and Choi, S. H.: Effects of *Citrus unshiu* Markovich on growth performance and bactericidal activity of nile tilapia *Oreochromis niloticus*. J. Fish Pathol., 32(2): 105-111, 2019.
- Cho, K. K., Lee, S. H., Choi, I. S. and Lee, S. W.: Next-generation Probiotics, Parabiotics, and Postbiotics. J. of Life Sci., 36(6): 595-602, 2021.
- Delzenne, N. M., Daubioul, C., Neyrinck, A., Lasa, M. and Taper, H. S.: Inulin and oligofructose modulate

- lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects. *Brit. Nutr.*, 87: 255-259, 2002.
- Ganguly, S., Dora, K. C., Sarkar, S. and Chowdhury, S.: Supplementation of prebiotics in fish feed: a review. *Rev. Fish Biol. Fisheries*, 23: 195-199, 2013.
- Gao, T., Xu, Y., Wang, K., Deng, Y., Yang, Y., Lu, Q., Pan, J. and Xu, Z.: Comparative LC-MS based non-targeted metabolite profiling of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* suffering from hepatopancreatic necrosis disease (HPND). *Aquaculture*, 491: 338-345, 2018.
- Han, H. J., Kim, S. J., Kim, T. H., Kim, M. S., Cho, M. Y. and Choi, H. S.: Current Status and Future Directions of Fish Vaccines in Korea. *Korean J. Fish Aquat. Sci.*, 54(4): 369-376, 2021.
- Jorge, G. V., Toshiro, M. and Hidetsuyo, H.: Effect of Continuous and Interval Administration of Peptidoglycan on Innate Immune Response and Disease Resistance in Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Science*, 54(2): 163-170, 2006.
- Klemashevish, C., Wu, C., Howsmon, D., Alaniz, R. C., Lee, K. and Jayaraman, A.: Rational identification of diet-derived postbiotics for improving intestinal microbiota function. *Current Opinion in Biotechnology*, 26: 85-90, 2014.
- KOSIS (Korean Statistical Information Service): https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=101&tblId=DT_1EW0001&vw_cd=MT_ZTITLE&list_id=K2_7&srId=&seqNo=&lang_mode=ko&obj_var_id=&itm_id=&conn_path=MT_ZTITLE&path=%252FstatisticsList%252FstatisticsListIndex.do. 2022.
- Kristina, B., Ine, E. P. and Raimo O. H.: The use of probiotics in fish feed for intensive aquaculture to promote healthy guts. *Adv. Aquacult. Fish. Manage.*, 3(7): 264-273, 2015.
- Lopes, L. M. F., Mello, M. M. M. D. and Urbinati, E. C.: β -Glucan reduces cortisol plasma levels, enhances innate immune system after *A. hydrophila* inoculation, and has lipolytic effects on the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture*, 546, 2022.
- María José, H. G. and Elena, F. R.: Postbiotics in human health: Possible new functional ingredients?. *Food Research International*, 137, 2020.
- Marta, L. P., María, M. C., Antonio, F. and Beatriz, N.: β -glucan administration induces metabolic changes and differential survival rates after bacterial or viral infection in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish & Shellfish Immunol.*, 82: 173-182, 2018.
- Mohammadian, T., Monjezi, N., Peyhan, R. and Mohammadian, B.: Effects of dietary probiotic supplements on growth, digestive enzymes activity, intestinal histomorphology and innate immunity of common carp (*Cyprinus carpio*): a field study. *Aquaculture*, 549: 737787, 2022.
- Nazhand, A., Souto, E. B., Lucarini, M., Souto, S. B., Durazzo, A. and Santini, A.: Ready to Use Therapeutic Beverages: Focus on Functional Beverages Containing Probiotics, Prebiotics and Synbiotics. *Beverages*, 6(2): 26, 2020.
- Piazzon, M. C., Caldach-Giner, J. A., Fouz, B., Estensoro, I., Simó-Mirabet, P., Puyalto, M., Karalazos, V., Palenzuela, O., Sitjá-Bobadilla, A. and Pérez-Sánchez, J.: Under control: how a dietary additive can restore the gut microbiome and proteomic profile, and improve disease resilience in a marine teleostean fish fed vegetable diets. *Microbiome*, 5(1): 164, 2017.
- Ramírez, N. C. B., Rodrigues, M. S., Guimarães, A. M., Guertler, C., Rosa, J. R., Seiffert, W. Q., Andreatta, E. R. and do Nascimento Vieira, F.: Effect of dietary supplementation with butyrate and probiotic on the survival of Pacific white shrimp after challenge with *Vibrio alginolyticus*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46(6): 471-477, 2017.
- Reyes-Cerpa, S., Maisey, K., Reyes-López, F., Toro-Ascuy, D., Sandino, A. M. and Imarai, M.: Fish Cytokines and Immune Response. *New Advances and Contributions to Fish Biology*, Hakan Türker, IntechOpen, pp.3-58, 2012.
- Seo, J. S., Jeon, E. J., Lee, E. H., Jung, S. H., Park, M. A., Jee, B. Y. and Kim, N. Y.: The Residues of Enrofloxacin in Cultured *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.*, 26(1): 45-50, 2013.
- Song, J. Y., Sasaki, K., Okada, T., Sakashita, M., Kawakami, H., Matsuoka, S., Kang, H. S., Nakayama, K., Jung, S. J., Oh, M. J. and Kitamura, S. I.: Antigenic differences of the scuticociliate *Miamiensis avidus* from Japan. *J. Fish Dis.*, 32: 1021-1034, 2009.
- Tian, L., Zhou, X. Q., Jiang, W. D., Liu, Y., Wu, P., Jiang, J., Kuang, S. Y., Tang, L., Tang, W. N., Zhang, Y. A., Xie, F. and Feng, L.: Sodium butyrate improved intestinal immune function associated with NF- κ B and p38MAPK signalling pathways in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunol.*, 66: 548-563, 2017.
- Tsilingiri, K. and Rescigno, M.: Postbiotics: What else?. *Beneficial Microbes*, 4(1): 101-107, 2013.
- Vinay, T. N., Kim, Y. J., Jung, M. H., Kim, W. S., Kim, D. H. and Jung, S. J.: Inactivated vaccine against

viral hemorrhagic septicemia (VHS) emulsified with squalene and aluminum hydroxide adjuvant provides long term protection in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Vaccine, 31: 4603-4610, 2013.

Wegh, C. A. M., Geerlings, S. Y., Knol, J., Roeselers, G. and Belzer, C.: Postbiotics and Their Potential Applications in Early Life Nutrition and Beyond.

Int. J. Mol. Sci., 20(19): 4673, 2019.

Yano, T.: Assay of hemolytic complement activity. In: Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Hattari, S. C., Rowley, A. F., editors. Tech in fish immunol. Now Jersey: SOS Publications, pp. 131-141, 1992.

Manuscript Received : May 26, 2022

Revised : Jun 08, 2022

Accepted : Jun 09, 2022