한국어병학회지 제32권 제2호 (2019)
J. Fish Pathol., 32(2) : 105~111

www.ksfp.org
pISSN 1226-0819, eISSN 2233-5412
http://dx.doi.org/10.7847/jfp.2019.32.2.105

진피(*Citurs unshiu* Markovich)추출물이 틸라피아(*Oreochromis niloticus*)의 성장률 및 항균효과에 미치는 영향

방석진 · 이찬흔* · 강태윤 · 최재혁 · 정상목 · 강인성 · 박관하 · 최상훈†

군산대학교 해양과학대학 해양생명의학과
*(유)금성상공

Effects of *Citurs unshiu* Markovich on growth performance and bactericidal activity of nile tilapia *Oreochromis niloticus*

Seok Jin Bang, Chan Heun Lee*, Tae Yun Kang, Jae Hyeok Choi, Sang Mok Jung, In Sung Kang, Kwan Ha Park and Sang Hoon 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*

Citurs unshiu Markovich is a medicinal product of dried tangerine peel (DTP). It is effective on antioxidation, and getting fame as a medicine and functional food. By utilizing DTP as a feed additive, we aim to enhance the growth rate, innate immunity, and bacterial infection resistance to Tilapia. The DTP extract was added to the feed weight by 0.1, 0.5, 1, 5% and then fed to tilapia for 7 days to evaluate the innate immunity parameter, growth rate and anti-bacterial activity. Innate immunity parameter results showed that the ROI was significantly higher in the 5% group added at high concentration, while showing decrease or no differences in other experimental groups. In other parameters, all the experimental groups showed no significant difference or decreased compared to the control group. The challenge test showed a high survival rate of 71% in the 0.5% group and the lowest in the control group (36%). For the growth rate, the feed efficiency was improved in all groups except for the 0.1% group compared to the control group. In conclusion, DTP extract has bacterial resistant effect in while not affecting innate immune system of fish. Also, it has shown the potential as a possible feed additive as it has brought the improvement on feed efficiency ratio.

Key words: *Citurs unshiu Markovich*, *Oreochromis niloticus*, ROI, Bactericidal activity

서 론

우리나라 어류 양식의 문제점으로 고밀도 사육에 따른 사육환경 악화와 질병 등에 의해 단위면적당 생산량이 감소하고 있으며, 항생제 오남용에 의한 체내 잔류와 내성균의 출현으로 항생제 사용은 한계에 이르고 있다. 이를 해결 하기위한 방법의 하나로 사료 내에 각종 생리활성 및 면역증강 물질을 첨가하여 급여함으로써 불특정 질병에 대해 광

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

범위한 방어력을 증강 시키고자 하는 시도가 많이 이루어지고 있다 (Baek et al., 2013).

진피 (dried tangerine peel, DTP)는 대한약전에 귤나무 (*Citrus unshiu* Markovich) 열매껍질의 건조물로 정의되어 있는 약재이다. 정량할 때 환산한 건조물에 대하여 Hesperidin ($C_{28}H_{34}O_{15}$:610.56)이 4% 이상을 함유하도록 대한약전에 규정되어 있다 (Kim et al., 2007; Moon et al., 2012). Hesperidin은 폴리페놀의 일종인 flavonoid glycoside로서 심장의 수축력을 증강 시키며, 혈압강하 작용, 장관·기관·자궁의 평활근에 대한 이완작용, 항산화 작용, 항암작용, 항염작용, 항 궤양 작용, 항바이러스 작용, 이담작용, 항균작용, 악취 제거작용 등이 보고되었다 (Ham et al., 2008). 또한 폴리페놀류, 비타민류, limonoid류 등의 다양한 화합물을 함유하고 있는데 과일의 질병 억제 기능이 최근 연구에서 폴리페놀 및 플라보노이드 등의 기능성 성분이 많이 밝혀지고 있어 의약품 소재 및 기능성 식품으로의 가능성을 인정받고 있다 (Park et al., 2011). 이러한 감귤류를 이용하여 양식 넙치가 질병 저항성을 갖추도록 하기 위해 추출물을 사료첨가제로 사용하려는 시도가 있었으며 유자가 많은 양으로 함유된 사료를 먹인 넙치 혈청의 항균활성이 유의적으로 높게 나온 것으로 나타났다 (Jung et al., 2010). 감귤류의 여러 성분 중에 비타민 C가 특히 높은 비중을 차지하는 것으로 알려져 있으며 (Lim et al, 2005) 항산화 효과 및 면역력 증진효과를 기대할 수 있을 것으로 본다. 본 연구는 세균성 질병에 대한 대책의 일환으로 틸라피아를 대상으로 진피추출물을 첨가한 사료를 급여하여 성장률을 측정하고 선천성 면역지표 및 항균능을 평가하였다.

재료 및 방법

실험어 및 실험수조

실험어는 평균 체중 67±2.5g의 틸라피아 (*Oreochromis niloticus*)로 200 미를 군산대학교 양어장에서 분양받아 실험수조에 순치시켰다. 실험에 사용된 수조는 200 ℓ 원형수조로 수온은 25±1℃로 유지하였으며 순환여과식 사육법을 사용하였다. 순치 전 틸라피아는 50 ppm 의 oxytetracycline으로 1시간 동안 약욕하였다. 환수는 3일에 한번 80%씩 sodium thiosulfate를 이용하여 염소를 제거한 수돗물을 사용하였다.

병원성 균주

실험에 사용된 병원성 균주는 *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*, KCTC 12267)로 Korean Collection for Type Culture (KCTC)에서 분양받은 후 -80℃에서 보관 중인 균주를 사용하였다. 실험 전 균주를 해동하여 brain heart infusion (BHI, BD, New Jersey, US) broth에 접종하고 25℃에서 24시간 배양 후 *Salmonella Shigella* (SS, BD, New Jersey, US) agar로 계대하였다. 이 후 형성된 흑색 집락을 취하여 BHI broth로 계대배양 함으로써 균주를 유지하였다.

진피 추출물 첨가사료 및 급여

본 연구에 사용된 진피는 (유)금성상공(김제시 소재)으로부터 기증받았으며 진피추출물을 제작하기 위해 D.W. 100 ml당 진피 10 g을 수분이 충분히 흡수되도록 overnight 침지 한 후 균질화시켜 멸균된 천으로 착즙 하였다. 진피추출물을 사료 중량 대비 각각 0.1%, 0.5%, 5% 만큼 첨가하였다. 제작 시 각 사료 100 g 당 D.W. 39.9 ml에 진피추출물 0.1 ml를 첨가한 군, D.W. 39.5 ml에 진피추출물 0.5 ml를 첨가한 군 및 D.W. 35 ml에 진피추출물 5 ml를 첨가한 군을 각각 0.1%, 0.5% 및 5%군으로 명명하였다. 진피추출물 없이 D.W. 40 ml을 사료 100 g에 흡착시킨 군을 대조군으로 하였다. 플라스틱 통에 사료를 넣고 각각의 방법으로 진피추출물을 첨가한 후 골고루 흔들어주어 사료 전체에 흡착이 되게 한 후 tray에 넓게 펼쳐서 건조 시켰다. 제작한 사료는 사용할 때까지 -20℃에 보관하였다. 진피추출물의 적정 첨가농도를 알아내기 위해 대조군을 포함한 진피추출물 0.1%, 0.5% 및 5%로 각각 첨가된 사료를 각 실험군 당 틸라피아 20 미를 대상으로 7일간 급여 후 성장률을 측정하였다. 각 실험군 총 20 미 중 6 미를 선천성 면역지표 측정에 사용하였고 14 미를 항균능 평가에 사용하였다.

ㄴ백혈구 수집

백혈구 수집 방법은 Santarem et al. (1997)의 방법을 사용하였다. 틸라피아를 해부하여 신장을 적출한 뒤 4 ml의 Dulbeco's modified eagle's medium (DMEM, Sigma, St. Louis, USA)+10% fetal bovine serum (FBS)+1% penicillin-streptomycin solution (Sigma)에 넣었다. 적출한 신장은 10^4 μm Spectra/Mesh Woven Filgers stainless steel mesh (Spectrum Laboratory, Inc., LA, USA)에 올려놓고 압착시켜 백혈구를 방출시킨 후 histopaque-1077 (Sigma)을 이용하여 2500×g, 4℃에서 40분간 원심분리한 후 형성된 buffy-coat층에서 백혈구를 수집하였다. 수집한 백혈구는 DMEM으로 220×g, 4℃에서 5분간 2회 세척한 후 hematocytometer (Fortuna, Germany)를 이용하여 세포수를 확인하였고 동일한 세포 수 (1×10^6 cell/ml)가 되도록 희석하여 실험에 사용하였다.

혈청 수집

혈청 수집을 위해 틸라피아의 미병부에서 26 G needle을 부착한 1 ml 주사기로 채혈하였다. 채취한 혈액은 4℃에서 overnight한 후 1200×g로 10분간 원심 분리하여 혈청을 수집하였으며 실험에 사용할 때까지 –20℃에 보관하였다.

호흡폭발능

선천성 면역반응의 일종인 활성산소 생성 수준을 비교하기 위해 Nitroblue tetrazolium (NBT)의 환원 능력을 조사하였다 (Secombes et al., 1988). 백혈구 200 μl를 96 well plate에 넣고 220×g, 4℃에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. PBS로 washing하고 1 μg/ml의 phorbol myristate acetate (PMA)를 첨가한 1 μg/ml의 NBT를 각각 100 μl씩 첨가하여 상온의 암실에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 220×g, 4℃에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 PBS로 2회 washing 하였다. KOH 120 μl와 140 μl dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma)를 첨가한 후 Sunrise micro plate reader (TECAN, Männedorf, Swiss)로 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Phagocytosis 활성

Phagocytic activity (PA)는 Pulsford et al., (1994)의 방법으로 측정하였다. Chamber slide (Thermo scientific, Nunc, Waltham, US)에 분리한 백혈구를 200 μl씩 분주한 후 상온의 암실에서 overnight 배양하였다. 배양 후에 zymosan (1×10^6 cell/ml, Sigma)을 well당 10 μl씩 분주한 후 상온의 암실에서 overnight 배양하였다. 배양 후 220×g, 4℃에서 5분간 원심분리하고 상층액을 제거하여 PBS로 2회 washing 하였다. 70% methanol로 고정하고 220×g, 4℃에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. Chamber slide의 덮개와 well을 분리하여 상온.에서 건조 시킨 후 고무를 제거하여 다시 건조 시켰다. 건조 후에 Wright giemsa stain을 첨가하여 2분간 염색하고, Wright giemsa stain이 있는 상태에서 완충액을 같은 양을 첨가하여 4분간 처리한 후 D.W.로 세척하고 건조 시켰다. 광학현미경 (CX-41, Olympus, Tokyo, Japan)으로 검경 하여 무작위로 100개의 백혈구 숫자를 센 후 zymosan을 잡아먹은 백혈구의 수를 세어 아래와 같은 공식을 이용하여 PA를 구하였고 식세포 작용을 한 백혈구의 숫자를 zymosan의 수로 나누어 phagocytic index (PI)를 구하였다.

PA = 탐식 세포 수 / 세포 100개 × 100 (%)

PI = zymosan의 수 / 탐식 세포 수

Lysozyme 활성

Micrococcus lysodeikticus (Sigma)를 0.2 M citrate phosphate buffer (pH 5.8)에 2 mg/ml 농도로 부유시킨 용액을 96 well plate 각 well 당 70 μl을 넣고 채취한 혈청을 30 μl씩 분주한 후 30초부터 4분 30초까지 반응시켜 감소하는 흡광도의 양을 Sunrise micro plate reader (TECAN)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit는 분당 0.001의 흡광도가 감소하는 양으로 나타내었다.

ACH50 측정

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)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 washing한 후 1×10^8 cells/ml의 농도로 희석하여 사용하였다. 틸라피아 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℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 220×g, 4℃에서 5분간 원심 분리하였다. 형성된 상층액 100 µl을 취하여 Sunrise micro plate reader (TECAN)를 이용하여 405 nm에서 측정하였다. 용혈된 적혈구 (Y)는 Y/(1−Y) 공식을 이용하여 50%의 용혈을 계산한 뒤 unit/ml를 산출하였다.

성장률 측정

틸라피아를 수조에 순치시킨 후 실험사료를 급여하기 전 최초무게를 측정하였고 7일간 첨가 사료 급여 후 공격실험 전에 최종무게를 측정하여 성장률을 측정하였다. 첨가 사료는 하루에 어체 중량의 2%만큼 급여하였다. 섭취한 사료양은 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.

항균능 평가

항균능 평가에 사용된 균주는 *E. tarda*로 공격접종 전 SS agar에서 형성된 흑색 집락을 취하여 10 ml의 BHI broth에 계대배양하고 25℃에서 24시간 배양하였다. 공격접종은 2×10^8 CFU/ml 균주를 100 µl씩 복강 주사하였다. 접종 이후에 실험 사료 각각을 계속해서 급여해 주면서 각 군 별로 9일 간 생존한 마리 수를 생존율로 환산하였다.

통계분석

데이터를 평균과 표준편차 (mean±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 연구에서 사용된 진피는 다량의 비타민 C와 폴리페놀 및 플라보노이드를 함유하여 천연 항산화제로 활용되고 있으며 한의학에서는 건강보조식품이나 감기 예방의 목적으로 활용되고 있다. 이러한 진피의 강력한 항산화능을 이용하면 어류양식에서 면역증강 효과를 기대할 것이라는 예상과는 달리 진피추출물 첨가 사료를 급여한 틸라피아를 대상으로 선천성 면역지표의 하나인 호흡폭발능(ROI)을 측정한 결과 고농도 진피를 첨가한 5% 군에서 대조군에 비해 유의적인 증가가 있었으나 그 이외 다른 군에서는 대조군과의 유의적 차이가 관찰되지 않았다 (Fig. 1a).

대식세포의 활성 정도를 알아보기 위해 phagocytic activity (PA)와 phagocytic index (PI)를 측정해 본 결과 ROI의 경우와 마찬가지로 0.1%와 0.5% 군에서는 대조군과 유의적인 차이가 없었으나 오히려 5%군에서는 대조군에 비해 식세포 활성이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 1b & c). 또한 lysozyme 활성 및 ACH50의 면역지표 측정 결과 대조군에 비해 모든 군에서 유의적인 차이가 관찰되지 않았다 (Fig. 1d & 1e). Jung et al. (2010)에 따르면 유자 첨가 사료를 넙치에 급여한 후 선천성 면역지표인 lysozyme 활성을 측정한 결과 모든 실험군에서 대조군과 비교하였을 때 유의적인 차이가 나타나지 않았다고 보고하고 있다. 또한 canosina red grape의 폴리페놀 추출물을 농어에 급여하여 신장의 melanomacrophages에서 면역반응을 측정한 결과 특정농도의 군에서 항산화 효소의 활성 감소와 세포독성이 나타났다(Marcella et al., 2017). 이러한 결과를 고려해 볼 때 본 연구에서 사용된 진피추출물은 어류의 선천성 면역 지표에는 영향을 주지 않으나 고농도에서는 오히려 세포독성을 유발 시킬 수 있을 것으로 추정된다.

Fig. 2는 대조군을 포함한 각 실험군의 틸라피아에 복강으로 *E. tarda*를 인위감염 시킨 후 7일간의 생존율을 보여주고 있다. 진피추출물 첨가 사료를

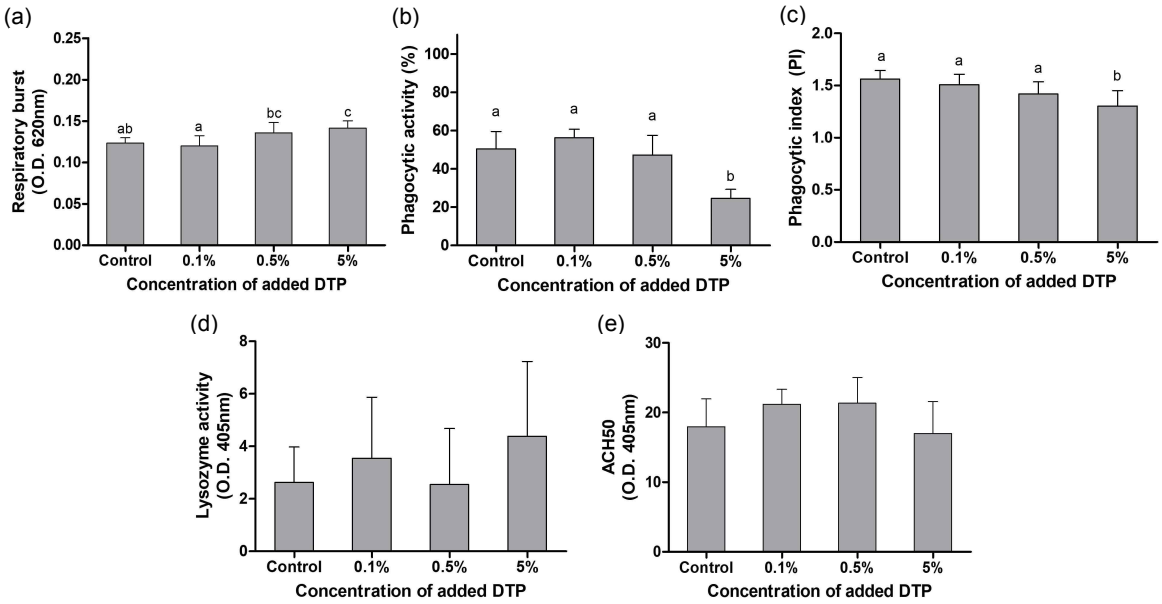

Fig. 1. Effects of dietary dried tangerine peel (DTP) on ROI. (a), phagocytic activity (b), phagocytic index (c), lysozyme activity (d) and ACH50 (e) in nile tilapia. Data represent the mean±S.D. (n=6). Different letters above the bars indicate significant differences ($p<0.05$) in different groups.

틸라피아에 급여 시 선천성 면역 지표에는 영향을 주지 않는 실험결과에도 불구하고 0.5%군에서 다른 실험군은 물론 대조군에 비해 월등히 우수한 71%의 생존율을 보였다. 이에 비해 0.1%군 및 5% 군에서는 각각 50%와 43%의 생존율을 보였으며 대조군은 36%로 가장 낮았다.

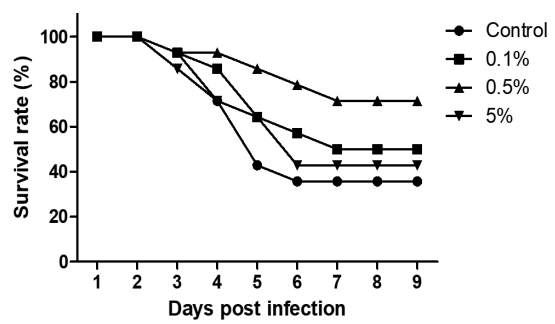

Fig. 2. Survival rates of Nile tilapia for 7 days following *Edwardsiella tarda* (2×10^8 CFU/mL) challenge. Nile tilapia were fed 0.1, 0.5 and 5% DTP added diet for 7 days, respectively followed by immersion infection with *E. tarda*. Normal diet was fed as a control. This is the representative of three repeated experiments.

Antonio et al. (2010)에 따르면 감귤류의 추출물이 *in vitro*에서 항균능을 나타내었는데 이러한 효과는 추출물 성분 중 가장 많은 함유량을 가진 limonene에 의한 것이라고 밝히고 있다. Kim et al. (2009)은 유자 첨가 사료로 사육된 넙치의 조직에 limonene 함유량이 대조군에 비해 유의적으로 많은 것으로 보고하고 있다. 이러한 결과들을 고려해 볼 때 진피 추출 성분 중 limonene 등과 같은 오일 성분의 천연물질이 틸라피아의 선천성 면역에는 영향을 주지 않으면서 직접적으로 병원균에 작용하여 질병이 예방된 것으로 보인다.

대부분의 질병 예방을 목적으로 하는 사료 첨가제는 면역력을 증강 시켜서 병을 예방하는 형태로 개발되었다. 사료 첨가제로 널리 알려진 것으로 효모의 세포벽 유래의 β-1,3-glucan (Zhu and Wu, 2018; Marta et al., 2018), 항산화제로 glutathione (Xiaoxia et al., 2018), 생균제로 *Bacillus subtilis* (Nayak, 2007; Kumar et al., 2008; Aly et al., 2008; Baek et al., 2013; Lee et al., 2017, Choi et al., 2018), *Lactobacillus plantarum* (Son et al., 2009; Geovana et al., 2011), *Saccharomyces cerevisiae* (Mohamed et

Table 1. Effects of dietary dried tangerine peel (DTP) extract on weight gain, percent weight gain, specific growth rate and feed conversion rate in tilapia 7 days post feeding

Parameters	Types of feed			
	Control	0.1%	0.5%	5%
Initial body weight (g)	69.9±2.2	68.6±1.1	69.0±0.5	68.6±0.3
Final body weight (g)	76.8±1.7	75.7±0.7	77.9±0.7	78.2±0.6
Weight gain (g)	6.9±0.4[a]	7.1±0.4[a]	8.9±0.2[b]	9.6±0.4[c]
Weight gain (%)	9.9±0.9[a]	10.4±0.7[a]	12.9±0.2[b]	14.0±0.5[c]
Specific growth rate (%)	0.7±0.1[a]	0.7±0.1[a]	0.9±0.01[b]	0.9±0.03[c]
Feed conversion rate	2.4±0.2[a]	2.4±0.1[a]	2.0±0.1[b]	1.8±0.1[c]

The numerical numbers in initial and final body weight (g) represent an average weight of 20 fish per each group from three repeated experiments.
Weight gain (g) = Final weight (g) − Initial weight (g)
Percent weight gain = [100×(Final weight − Initial weight)/ Initial weight]
Specific growth rate = [{Final weight (g) − Initial weight (g)}/ DAY] × 100
Feed conversion ratio = Total feed given (g) / Weight gain (g)
Different superscript letters indicate significant differences ($p<0.05$) in different groups.

al., 2010; Marina et al., 2015) 등이 있으며 이러한 첨가제들은 외부에서 침투해 오는 세균을 숙주의 면역력 증진을 통해 예방시키는 것으로 알려져 있다.

한편으로 첨가 사료를 7일 동안 공급한 후 나타난 틸라피아의 성장률 및 사료계수를 Table 1에 나타내었다. 대조군에 비해 0.1%군에서 증체량, 증체율 및 일일 성장률에서 개선되는 것으로 보였으나 사료계수는 동일한 수치로 나타났다. 하지만 나머지 0.5% 및 5%군에서는 모든 지표에서 대조군보다 개선되는 것으로 나타났다. 특히 0.5%군은 선천성 면역지표에서 대조군과 유의적인 차이를 보이진 않았지만 항균능이 월등히 뛰어나고 사료 효율 또한 우수하게 개선 시키는 것으로 나타나 가장 안전하면서 이상적인 사료 첨가농도로 판단된다.

결론적으로 본 연구에서 사용된 0.5% 농도의 진피추출물은 그 자체로도 우수한 사료 첨가제로 사용될 수 있으나 더욱 효과적인 항 질병 사료 첨가제를 개발하기 위해서는 기존의 면역증강 물질과의 혼합 사용에 대한 연구가 요구된다.

References

Secomebes, C. J., Chung, S. and Jeffries, A. H.: Superoxide anion production by rainbow trout macrophages detected by the reduction of ferricytochrome C. Dev. Comp. Immunol., 12: 201-206, 1988.

Pulsford, A. L., Lemaire-Gony, S., Tomlinson, M., Collingwood, N. and Glynnd, P. J.: Effects of acute stress on the immune system of the dab, Limanda limanda. Comp. Biochem. Physiol. Part C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol., 109: 129-139, 1994.

Jung, Y. H., Kim, D. H., Kim, H. Y., Shin, T. S., Oh, M. J., Lee, J. H., Kim, J. H., Im, S. Y. and Kim, E.: Effects of diets supplemented with Yuzu *Citrus Junos* Siebold ex Tanaka on disease resistance of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Pathol., 23(3): 389-398, 2010.

Marcella, A., Daniela, F., Sergio, F., Mattia, P. A., Maria, A. F. and Anna, G.: Administration of a polyphenol-enriched feed to farmed sea bass (Dicentrarchus labrax L.): Kidney melanomacrophages response. Fish & Shellfish Immunol., 68: 404-410, 2017.

Antonio, B., Maria, R. C. and Milena, S.: In vitro evaluation of the antimicrobial activity of eugenol, limonene, and citrus Extract against bacteria and yeasts, representative of the spoiling microflora of fruit juices. J. Food Protect., 73(5): 888-894, 2010.

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. New Jersey: SOS Publications, pp. 131-141, 1992.

Ming, Z. and Shengjun, W.: The growth performance and nonspecific immunity of loach *Paramisgurnus*

dabryanus as affected by dietary β-1,3-glucan. Fish & Shellfish Immunol., 83: 368-372, 2018.

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.

Xiaoxia, W., Wei, X., Huihui, Z., Yanjiao, Z., Weihua, G., Wenbinge, Z. and Kangsen, M.: Reduced glutathione supplementation in practical diet improves the growth, anti-oxidative capacity, disease resistance and gut morphology of shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunol., 73: 152-157, 2018.

Nayak, S. K., Swain, P., Mukherjee, S. C.: Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp. Fish & Shellfish Immunol., 23(4): 892-896, 2007.

Rajesh, K., Mukherjee, S. C., Ranjan, R. and Nayak, S. K.: Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. Fish & Shellfish Immunol., 24(2): 168-172, 2008.

Aly, S. M., Ahmed, Y. A., Ghareeb, A. A. and Mohamed, M. F.: Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish & Shellfish Immunol., 25(1-2): 128-136, 2008.

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.

Lee, J. H., Chae, Y. S., Park, J. J., Choi, J. H., Kim, D. G. and Park, K. H.: Effects of probiotic microbes on growth performance, innate immunity, and pathogen sensitivity in cultured olive flounder. J. Fish Pathol., 30(1): 41-49, 2017.

Choi, J. H., Lee, J. H., Park, J. J., Lee, M. S., Bae, J. S., Shin, D. H. and Park, K. H.: Reduction of dissolved hydrogen sulfide and mortality of white leg shrimp, Litopenaeus vannamei by Bacillus spp. microorganisms. J. Fish Pathol., 31(1): 41-48, 2018.

Son, V. M., Chang, C-C., Wu, M-C., Guu, Y-K. Chiu, C-H. and Cheng, W.: 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(5): 691-698, 2009.

Dotta, G., Mouriño, J. L. P., Jatobá, A., Morán, R. E. B. Pilati, C. and Martins, M. L.: Acute inflammatory response in Nile tilapia fed probiotic *Lactobacillus plantarum* in the diet. Acta Scientiarum. Biol. Sci., 33(3): 239-246, 2011.

Mohamed, E. E-B., Ahmed, M. E-A., Fatma, M. A. H., Hossam, A. G.: Immunomodulatory effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae*, β-glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shellfish Immunol., 28(5-6): 802-808, 2010.

Marina, K. P., Iwashita, I. B., Nakandakare, J. S., Terhune, T. W., Maria, J. T. R-P.: Dietary supplementation with *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* enhance immunity and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* infection in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. Fish & Shellfish Immunol., 43(1): 60-66, 2015.

Manuscript Received : Nov 14, 2019
Revised : Dec 3, 2019
Accepted : Dec 10, 2019