



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

Thesis for Degree of Master of fisheries science

Effect of single/combined dietary
supplementation of host-associated
probiotics and prebiotics on temperature
stress tolerance in juvenile olive flounder
(*Paralichthys olivaceus*)

by

Hyuncheol Jeon

Department of Fisheries Biology

The Graduate School

Pukyong National University

February 2024

Effect of single/combined dietary
supplementation of host-associated
probiotics and prebiotics on temperature
stress tolerance in juvenile olive flounder
(*Paralichthys olivaceus*)

치어기 넙치 사료 내 숙주 유래 프로바이오틱
스와 프리바이오틱스 단독/복합 첨가가 수온
스트레스 내성에 미치는 영향

Advisor : Prof. Seunghyung Lee

by

Hyuncheol Jeon

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement
for the Degree of

Master of Fisheries Science

in the Department of Fisheries Biology, Graduate School
Pukyong National University

February 2024

전현철의 수산학석사 학위논문을 인준함

2024년 2월 16일



위원장 이학박사 김종명 (인)

위원 수산학박사 최윤희 (인)

위원 이학박사 이승형 (인)

Effect of single/combined dietary supplementation of host-associated probiotics and prebiotics on temperature stress tolerance in juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

A dissertation

By

Hyuncheol Jeon

Approved by:

(Chairman) Prof. Jong-Myoung Kim

(Member) Prof. Youn Hee Choi

(Member) Prof. Seunghyung Lee

February 16, 2024

Contents

List of tables	iv
List of figures	vi
Abstract	viii
Abstract (Korean)	x
I. Introduction	1
II. Materials and methods	4
1. Ethics Statement.....	4
2. Availability of prebiotics.....	5
3. Experimental diets preparation.....	7
4. Experimental fish and temperature exposure.....	10
4.1. Experimental fish and feeding trial.....	10
4.2. Lethal exposure temperature experiment (Experiment II).....	13
4.3. Acute temperature stress exposure experiment (Experiment III).....	15
5. Sample collection and analysis.....	17
5.1. Growth performance.....	17
5.2. Diet and fish whole body proximate composition analysis.....	19
5.3. Plasma metabolites analysis.....	20
5.4. Antioxidant reaction, immune responses and stress responses.....	22
5.5. Histological analysis.....	23

5.6. Gene expression.....	25
6. Statistical analysis.....	28
III. Results	29
1. Feeding trial with synbiotics	29
1.1. Availability of prebiotics	29
1.2. Growth performance.....	31
1.3. Fish whole body proximate composition analysis.....	33
1.4. Plasma metabolites analysis	35
1.5. Antioxidant reaction, immune responses and stress responses.....	37
1.6. Histological analysis	39
2. Lethal exposure temperature experiment	42
2.1. Survival rate analysis.....	42
3. Acute temperature stress	44
3.1. Plasma metabolites analysis	44
3.2. Plasma metabolites Two-way analysis	46
3.3. Stress response.....	48
3.4. Stress response Two-way analysis.....	50
3.5. Gene expression.....	52
IV. Discussion	54

V. Conclusion	59
VI. Reference	60



List of tables

Table 1. Formulation and proximate composition of the experimental diets for juvenile olive flounder	8
Table 2. Water quality parameters	12
Table 3. List of primers used for gene expression.....	27
Table 4. Growth performance and morphological changes of olive flounder fed 9 experimental diets for 9 weeks	32
Table 5. Whole-body proximate compositions of juvenile olive flounder	34
Table 6. Plasma metabolites of olive flounder fed 9 experimental diets for 9 weeks.....	36
Table 7. Immune responses, antioxidants and stress responses of olive flounder fed 9 experimental diets for 9 weeks	38

Table 8. Villus length and muscle thickness in the intestine of Olive flounder fed the experimental diets for 9 weeks.....	40
Table 9. Hematocrit and plasma metabolites of olive flounder fed 9 experimental diets for acute (31 °C)	45
Table 10. Plasma metabolites of olive flounder fed 9 experimental diets for acute (31 °C) test Two-way statistical analysis.....	47
Table 11. Stress responses of olive flounder fed 9 experimental diets for acute (31 °C).....	49
Table 12. Stress response of olive flounder fed 9 experimental diets for acute (31 °C) test Two-way statistical analysis	51
Table 13. Expression genes of olive flounder fed 9 experimental diets for acute (31 °C) test	53

List of figures

Figure 1. Culture and counting in petri dishes (A), (B) and (C) measure OD value by culturing in culture medium (D) and (E)..... 6

Figure 2. Added of prebiotics (FOS, fructo oligosaccharide) (A), added of probiotics (B), process of making experimental diet feed (C), (D), (E) and (F) 8

Figure 3. Water temperature change during lethal exposure temperature experiment..... 14

Figure 4. Water temperature change during acute temperature stress exposure experiment..... 16

Figure 5. Sampling of olive flounder fed 9 experimental diets for 9 weeks 18

Figure 6. Blood collection from olive flounder (A), separate plasma by centrifuge (B) and plasma metabolites analysis using Fuji DRI-CHEM 4000i (C) 21

Figure 7. Sample dehydration, transparency, and embedding process (A), make a histology block (B), sectioning using a microtome (C) and staining with Harris hematoxylin-eosin (D) 24

Figure 8. Selection of the best prebiotics for three selected probiotics through in-vitro multi-analysis 30

Figure 9. Histological structure (representative micrographs of H&E stain image magnification, x100) of the intestine (A: CON, B: AF, C: BF, D: CF, E: ABF, F: BCF, G: ACF, H: ABCF, I: F) of olive flounder fed the experimental diets for 9 weeks. VH and MT represents villus height and muscular thickness, respectively..... 41

Figure 10. Survival rate of olive flounder fed 9 experimental diets under Lethal exposure (31 °C) 43

Effect of single/combined dietary supplementation of host-associated
probiotics and prebiotics on temperature stress tolerance in juvenile olive
flounder
(*Paralichthys olivaceus*)

Hyuncheol Jeon

Department of Fisheries Biology, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

It is known that the gut microbiota-brain axis plays a role in feeding behavior, digestive/absorptive processes, metabolism, and immune responses. Little is known about effects of dietary supplementation of synbiotics in the regulation of host physiology in response to temperature stress. Therefore, the current study was conducted to evaluate effects of synbiotics, consisting of a single or mixture of host-associated probiotics isolated from olive flounder and fructo-oligosaccharides (FOS) as a prebiotic on lethal and acute temperature stress responses in juvenile olive flounder. Four hundred eighty-six juveniles (initial body weight: 7.26 ± 0.04 g) were randomly distributed into 27 rectangular tanks (18 fish per tank; N=3 tanks per treatment). Three HAPs, including *Bacillus sonorensis*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus velezensis* and one prebiotic, FOS were supplemented in a basal diet to prepare for nine experimental diets as follows: no addition of probiotic and prebiotic as a control diet; prebiotic only; three different synbiotics with single addition of each probiotics with FOS; three different synbiotics with mixed addition of two or three probiotics with FOS. The concentration of each probiotic and FOS was 1×10^7 CFU/g and 5g/kg basal diet, respectively. Following the 8-week growth trial, the juveniles were subjected to temperature stress exposures: 1) lethal test: gradual increase in water temperature (0.5 °C increment every 30 m) until reaching 30.5 °C and 2) acute test: 2-h heat shock at 30 °C followed by 2-h recovery at 19.7 °C. The lethal exposure test result demonstrated that the relatively higher survival rate (16.4 %) of the juveniles fed the synbiotics diets (FOS+*B. sonorensis*+*B. velezensis*, FOS+*B. sonorensis*+*B. subtilis*+*B. velezensis*) than that (4.2 %) of those fed the other diets although no significant difference was detected among the diets. In the acute temperature stress test, there was no significant effect of dietary supplementation of the synbiotics on the plasma metabolites (GOT, GPT, glucose, total protein, total cholesterol, and triglyceride) as well as on the relative gene expression levels of heat shock proteins 60, 70, and 90, glucose 6-phosphatase, and activated protein kinase-beta in brain, gill, kidney, and liver tissues. These preliminary results can be used in future studies to elucidate interaction between

microbiota and temperature stress responses in fishes.



치어기 넙치 사료 내 숙주 유래 프로바이오틱스와 프리바이오틱스 단독/복합 첨가
가 수온 스트레스 내성에 미치는 영향

전현철

부경대학교 대학원 수산생물학과

요약

장내 미생물총-뇌 축은 섭식 행동, 소화/흡수 과정, 대사 및 면역 반응에 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 온도 스트레스에 반응하는 숙주 생리 조절에 있어 신바이오틱스의 식이 보충 효과에 대해서는 알려진 바가 거의 없다. 따라서 본 연구는 넙치에서 분리한 숙주 관련 프로바이오틱스(Host-associated probiotics, HAPs)와 프락토올리고당(FOS)의 단일 또는 혼합물로 구성된 신바이오틱스가 치어의 치사 및 급성 온도 스트레스 반응에 미치는 영향을 평가하기 위해 수행되었다. 486마리의 치어기 넙치(초기 체중: 7.26 ± 0.04 g)를 27개의 직사각형 수조에 무작위로 분배했다(수조당 물고기 18마리, 실험구당 3반복). *Bacillus sonorensis*, *Bacillus subtilis* 및 *Bacillus velezensis*를 포함한 세 가지 HAP와 하나의 프리바이오틱스, FOS를 대조구에 첨가하여 다음과 같이 9가지 실험구 사료를 준비했다. 대조구에는 프로바이오틱스와 프리바이오틱스를 첨가하지 않았다. 프리바이오틱스만; FOS가 포함된 각 프로바이오틱스를 단일 첨가한 세 가지 다른 신바이오틱스; 2~3가지 프로바이오틱스와 FOS를 혼합한 3가지 다른 신바이오틱스이다. 프로바이오틱스와 FOS의 농도는 각각 1×10^7 CFU/g, 기본사료 5 g/kg이었다.

8주간의 사육 실험 후, 실험어는 수온 스트레스 노출을 받았다: 1) 치사 테스트: 30.5°C 에 도달할 때까지 수온을 점진적으로 증가(30 min 마다 0.5°C 씩 증가) 및 2) 급성 테스트: 2시간 30°C 에서 열 충격을 가한 후 19.7°C 에서 2시간 동안 회복하였다. 치사노출시험 결과, 신바이오틱스 사료(FOS+B. *sonorensis*+B. *velezensis*, FOS+B. *sonorensis*+B. *subtilis*+B. *velezensis*)를 급여한 치어의 생존율(16.4 %)이 다른 식단(4.2 %)에 비해 상대적으로 높은 것으로 나타났다. 식단 간에는 유의미한 차이가 발견되지 않았다. 급성 수온 스트레스 테스트에서는 신바이오틱스의 사료 내

첨가가 혈장 대사산물(GOT, GPT, glucos, total protein, total cholesterol 및 triglyceride) 및 뇌, 아가미, 신장 및 간 조직의 heat shock protein 60, 70 및 90, glucose 6-phosphatase 및 AMP-activated protein kinase- β 의 상대적인 유전자 발현 수준에 미치는 유의한 효과는 나타나지 않았다. 이러한 예비 결과는 향후 연구에서 미생물군과 넙치의 온도 스트레스 반응 사이의 상호 작용을 밝히는 데 사용될 수 있다.



I. Introduction

프로바이오틱스(probiotics)는 숙주의 건강에 유익한 미생물 전체 또는 구성 요소의 적용으로 정의된다(Irianto et al., 2002). 이러한 프로바이오틱스는 영양, 면역 및 환경 조절 능력을 포함하여 수많은 유익한 효과를 제공하므로, 질병 예방제로서 큰 경쟁 우위를 가지고 있다(Lazado et al., 2015; Ohashi and Ushida, 2009). 프리바이오틱스(prebiotics)는 숙주의 유익한 장내 세균을 증가시키는 비소화성 섬유질이다(Roberfroid, 2005). 프로바이오틱스가 프리바이오틱스를 발효할 때 생성되는 부산물은 숙주의 건강 개선에 중요한 역할을 한다고 알려져있다(Song et al., 2014). 신바이오틱스(synbiotics)라고 불리는 프로바이오틱스와 프리바이오틱스의 결합 사용은 생존율과 장내 미생물의 조절을 향상시킬 수 있다(Gibson and Roberfroid, 1995; Cavalcante et al., 2020). 이는 장내 미생물총, 면역학적 반응, 성장률 및 전반적인 건강 개선과 같이 어류에 수많은 이점을 가지고 있다(Huynh et al., 2017). 그러나, 수산 양식분야에서 사용되어지고 있는 대부분의 프로바이오틱스는 수생 동물이 사는 환경이나 숙주 동물이 아닌 육상 공급원에서 파생되며, 숙주의 방어 시스템 내에 정착하고 유익한 효과를 제공하는 능력이 제한된다(Gatesoupe et al., 2008; Van Doan et al., 2020; Jang et al., 2023).

숙주 유래 프로바이오틱스(host-associated probiotics, HAPs)는 숙주의 성장과 건강을 개선하기 위해 숙주의 사육수 또는 위장관에서 분리한 박테리아로 정의된다(Van Doan et al., 2020). 이러한 숙주 유래 프로바이오틱스는 미생물이 원래 적용된 환경에서 분리되어 사용함으로써, 물리화학적 매개변수로 인해 발생하는 병목현상을 제거할 수 있다(Vadstein et al., 2013; Verschuere et al., 2000). 또한, 미생물의 가장 높은 생리활성은 자연 서식지에서 얻어지기 때문에, 같은 조건에서 적용할 때 최대의 효율을 나타낼 수 있을 것이라 사료된다(Ibrahem, 2015)

기후변화로 인해 지구의 온도 패턴은 크게 변했으며, 변화가 더욱

커지고 확대될 것으로 예상된다(Islam et al., 2022). 수온은 수생 생물의 성장과 발달에 중요한 역할을 한다(Ngoan, 2018). 특히, 어류는 변온성 동물이므로 기후 변화로 인한 온도 변화에 민감하게 반응한다(Sae-Lim et al., 2017; Adhikari et al., 2018). 수온의 변화는 사료 섭취, 생존, 성장, 번식, 행동, 분포, 에너지 획득 및 생체 분자의 물리적 특성을 포함하여 어류의 생리 여러 측면에 영향을 미친다(Islam et al., 2022). 특히, 극심한 일일 수온 변화는 생리적 항상성을 방해하고 스트레스로 작용해 전반적인 어류 건강에 부정적인 영향을 준다(Pickering, 1998).

미생물군(microbiome)은 특정 환경에 서식하는 박테리아, 고세균, 곰팡이, 바이러스 및 원생동물로 구성된 미생물 군집으로 정의할 수 있다(Infante-Villamil et al., 2021). 장내 미생물총(gut microbiota)은 동물의 장내에 서식하는 미생물군으로 영양, 면역, 생리, 병원체로부터 보호 및 신경학적 기능에 기여한다(Egerton et al., 2018; Flint et al., 2012; Lee and Hase, 2014). 장내 미생물 총의 불균형은 어류의 장 상피세포 기능 장애, 영양흡수 장애, 대사 변화, 면역력 억제, 병원균에 취약한 장벽, 성장 감소, 행동 장애 및 사망률 증가로 이어진다(Nayak, 2010; Wang et al., 2018). 장-뇌 축(gut-brain axis)은 신경, 내분비 및 면역 체계를 포함하는 중추신경계와 위장관 사이의 양방향 상호 작용 시스템이다(Ding et al., 2020). 장내 미생물총은 신경전달물질(γ -aminobutyric acid, GABA; dopamine, DA; noradrenaline, NA), 단쇄지방산(shorts chain fatty acid, SCFA) 등을 생산하여, 장-뇌 축의 신호에 관여한다. 대표적으로 단쇄지방산은 순환계로 들어가 장-뇌 축을 통해 뇌에 신호를 보내는 동시에 시상하부-뇌하수체-부신 축(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA axis) 또는 점막 면역체계에 직접적으로 영향을 미칠 수 있다(Sarkar et al., 2016). 최근 제브라피쉬를 대상으로 진행된 연구에 따르면, 제브라피쉬에 신바이오틱스를 공급하였을 때, 코르티코트로핀 방출 호르몬(corticotropin-releasing hormone, CRH) 발현과 코르티졸 수치를 낮춰 불안과 반복되는 행동을 줄이고 스트레스 반응을 감소하였다(Davis et al., 2016; Forsatkar et al., 2017).

넙치 *Paraluchthys olivaceus*는 국내 주요 양식어종 중 하나로, 우리

나라 어류 생산량의 50 % 이상을 차지(Korean Statistics Information Service; KOSIS, 2023)하는 경제적으로 매우 중요한 종이다. 또한, 넙치는 광온성 어류(Cho et al., 2012)임에도 불구하고 기후변화와 여름철 고수온으로 인한 여름철 대량폐사가 발생하고 있다. 지속가능한 넙치 양식을 이루기 위해서는 수온 변화에 따른 어류의 생리적 반응에 대한 연구가 필요하다. 따라서, 본 연구는 치어기 넙치 사료 내 숙주 유래 프로바이오틱스와 프리바이오틱스 단독/복합 첨가가 수온 스트레스 내성에 미치는 영향을 평가하고자 수행되었다.



II. Materials and methods

1. Ethics Statement

본 실험은 대한민국 부산 부경대학교 동물실험윤리위원회에서 규정한 PKNUIACUC - 2022 - 48의 지침에 따라 수행하였으며, 실험어의 고통을 최소화하기 위하여 모든 노력을 기울였다.



2. Availability of prebiotics

실험에 사용된 프로바이오틱 박테리아는 건강한 자연산 넙치의 장 내에서 분리되었다. 16S rDNA 서열에 대한 클러스터 분석을 통해 *Bacillus sonorensis*, *B. subtilis*, *B. velezensis*로 동정되었으며, 미생물 배양액은 부경대학교 수산생물학과(부산, 대한민국) 분자 생화학 실험실에서 제공받았다. 동의대학교 수해양동물실험실의 도움을 받아 다양한 종류의 프리바이오틱스에 의한 *B. sonorensis*, *B. subtilis*, *B. velezensis* 성장을 평가하였다. LB broth는 조성(De Man et al., 1960)에 따라 필터(0.2 μ m) 멸균된 MRS Broth와 MRS Broth without Glucose으로 구성하였으며, 대조구와 포도당(Glucose), 베타-글루칸(β -glucan), 프락토 올리고당(Fructo oligosaccharide)을 5 g/L를 첨가한 후 각 플레이트 디쉬에 프로바이오틱 박테리아를 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^7$ CFU/mL를 접종하였다. 접종한 플레이트 디쉬는 37 °C에서 24시간동안 배양하며, 콜로니를 계수하였다. 추가적으로 각 프리바이오틱스를 5 g/L를 첨가한 배양액에 프로바이오틱 박테리아를 1×10^7 접종하고 shaking incubator에서 37 °C에 배양하며 4시간 간격으로 UV Spectro photometer (Shimadzu, Japan)를 이용해 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.



Figure 1. Culture and counting in petri dishes (A), (B) and (C) measure OD value by culturing in culture medium (D) and (E)

3. Experimental diets preparation

실험에 사용된 실험사료 배합표와 일반성분 조성은 Table 1에 나타내었다. 9가지 실험 사료의 isonitrogenous (55 %, 조단백)과 isolipidic (8 %, 조지질) 함량은 넙치의 영양소 요구량을 충족시키도록 제작하였다. 대조구는 프리/프로바이오틱스가 없는 실험사료로 구성하였고 실험구는 단일 프로바이오틱스(1×10^7 , 배양액)와 프리바이오틱스(FOS, 사료원료의 5%)를 첨가한 *B. sonorensis* + FOS (AF), *B. subtilis* + FOS (BF)와 *B. velezensis* + FOS (CF) 복합 프로바이오틱스와 단일 프리바이오틱스를 첨가한 *B. sonorensis* + *B. subtilis* + FOS (AF), *B. subtilis* + *B. velezensis* + FOS (BCF), *B. sonorensis* + *B. velezensis* + FOS (ACF)와 *B. sonorensis* + *B. subtilis* + *B. velezensis* + FOS (ABCF) 프리바이오틱스만 첨가한 FOS (F)로 구성하였다. 단백질 공급원은 어분(fish meal), 오징어 간분(squid liver meal), 대두박(soybean meal)을 사용하였다. 지질 공급원으로는 어유(fish oil)를 사용하였고, 탄수화물 공급원은 밀가루(wheat flour), 전분(starch)을 사용하였다. 모든 사료원료를 사료 배합표에 따라 측정하여 전동 혼합기(HYVM-1214, Hanyoung Food Machinery, 대한민국)를 이용하여 혼합하였다. 혼합한 사료원료에 물(건조 중량의 45 %)을 첨가하고 15분간 혼합한 후, 어유를 첨가하고 15분간 혼합하였다. 혼합물은 직경 약 2 mm의 평판형 펠렛 성형기(SFD-GT, Shinsung, 대한민국)를 사용하여 제작하였다. 사료는 수분함량이 10 % 미만이 될 때까지 농산물 건조기(KE-010, Dongwon, Korea)를 사용하여 40 °C에서 14시간동안 건조한 후 -20 °C에 냉동 보관하였다.



Figure 2. Added of prebiotic (FOS, fructo oligosaccharide) (A), added of probiotics (B), process of making experimental diet feed (C), (D), (E) and (F)

Table 1. Formulation and proximate composition of the experimental diets for juvenile olive flounder (g kg⁻¹)

	CON	AF	F
Fishmeal(Anchovy)¹	600	600	600
Starch	50	50	50
Wheat flour	121	121	121
Squid liver powder	50	50	50
Soybean meal	100	100	100
Fish oil	30	30	30
Lecithin	3	3	3
Betain	3	3	3
Taurine	3	3	3
MCP	3	3	3
Methionine	1	1	1
Lysine	1	1	1
Mineral mix²	12	12	12
Vitamin mix³	12	12	12
Vitamin C	2	2	2
Choline	5	5	5
α-cellulose	5	0	0
FOS	0	5	5
Probiotics	0	1 x 10 ⁷	0
Proximate analysis (% of dry matter basis)			
Moisture		9.67	
Crude Protein		57.35	
Crude Lipid		8.28	
Crude Ash		14.23	
Energy (KJ/KG)		3949.2	

¹ The feed Co. Goyang, Korea

² Mineral mix (as g/kg premix): Ferrous fumarate, 12.50; Manganese sulfate, 11.25; Dried ferrous sulfate, 20.0; Dried cupric sulfate, 1.25; Cobaltous sulfate, 0.75; Zinc sulfate KVP, 13.75; Calcium iodate, 0.75; Magnesium sulfate, 80.20; Aluminum Hydroxide, 0.75.

³ Vitamin mix (as mg/kg premix): A, 1,000,000 IU; D, 200,000 IU; E, 10,000; B1, 2,000; B6, 1,500; B12, 10; C, 10,000; Calcium pantothenic acid, 5,000; Nicotinic acid 4,500; B-Biotin 10; Choline chloride, 30,000; Inositol, 5,000.

4. Experimental fish and temperature exposure

4.1 Experimental fish and feeding trial

실험에 사용한 넙치는 대한민국 충청북도 보령에 위치한 넙치 종자 생산장에서 구입하여 부산시 사료영양연구소(Feeds & Foods Nutrition Research Center, FFNRC)로 이송하였다. 실험어는 수산용 포르말린을 사용하여 200 ppm에서 1시간 약욕 후 2주간 실험실 환경에서 순치시켰다. 순치기간 동안 옥시테트라사이클린(OTC)처리 대조구 사료를 급이하였다. 순치사육 후 29 L 아크릴 수조에 평균 무게 7.26 ± 0.04 g (mean \pm SEM)의 넙치를 실험구당 18마리씩 3반복으로 무작위 입식하였다. 사육실험은 총 9주 동안 진행하였다. 사육실험 시 히트펌프(DOV-887, Daeil, 부산, 대한민국)를 이용하여 적정 사육수온을 유지하였으며, 사육 수조에 충분한 용존산소를 유지하기 위하여 air blower를 설치하여 산소를 공급해주었다. 사육실험 기간 동안 적절한 사육환경을 제공하기 위하여 간이 수질키트를 사용하여 pH, NH₃, NO₂ 및 NO₃ (API fish care, Chalfont, PA, USA)를 측정하였고, YSI DO meter (ProDPD/T, Yellow springs, OH, USA)를 사용하여 용존산소 및 수온을 측정하였다. 사육실험 기간 동안의 수질 측정 결과는 Table 2에 나타내었다. 모든 실험 수조의 유량은 2.7 L/min이 유지되었으며, 여과솥과 스키머를 설치하여 물리적 여과를 통해 사육수 내 고형물을 거르고 용존 암모니아를 제거하였다. 실험사료는 1일 2회(09:00 및 17:00) 실험어의 성장과 폐사에 따라 조정하였으며, 넙치 체중의 3%에 맞춰 공급하였다. 분변 및 이물질을 제거

하기 위해 1일 2회 사이펀을 수행하였으며, 매일 전체 사육수의 50 %를 환수하였다.



Table 2. Water quality parameters (mean \pm SEM)

Water quality during feeding trial	
Ammonia ¹ (mg/L)	0.51 \pm 0.03
Nitrite ¹ (mg/L)	1.09 \pm 0.08
Nitrate ¹ (mg/L)	47.0 \pm 3.5
pH ¹	7.49 \pm 0.02
DO ² (mg/L)	7.32 \pm 0.02
Temperature ($^{\circ}$ C)	19.7 \pm 0.1

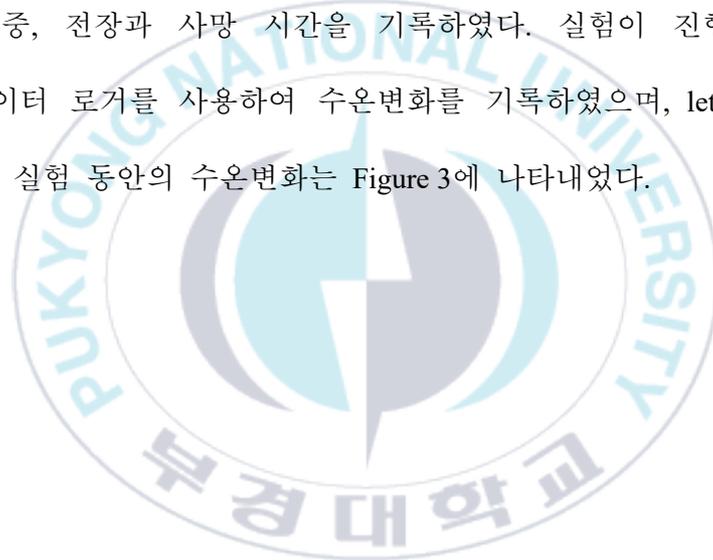
¹ Tested by saltwater master test kit (API fish care)

² Dissolved oxygen tested by YSI DO meter (ProODO/T)



4.2. Lethal exposure temperature experiment (Experiment II)

9주간의 사육실험 종료 후, 각 수조에서 넙치 7~10마리를 무작위로 선별하여 lethal exposure temperature 실험에 사용하였다. 실험은 27 L 아크릴 수조로 기존에 사용하던 수조를 동일하게 사용하였다. 수온은 히트펌프를 사용해 1 °C/30 min씩 31 °C까지 서서히 올린 후, 6시간마다 육안으로 확인하여 각 개체의 아가미 뚜껑 운동의 정지를 사망으로 간주해 사망한 개체를 건져내 체중, 전장과 사망 시간을 기록하였다. 실험이 진행되는 동안 HOBO 데이터 로거를 사용하여 수온변화를 기록하였으며, lethal exposure temperature 실험 동안의 수온변화는 Figure 3에 나타내었다.



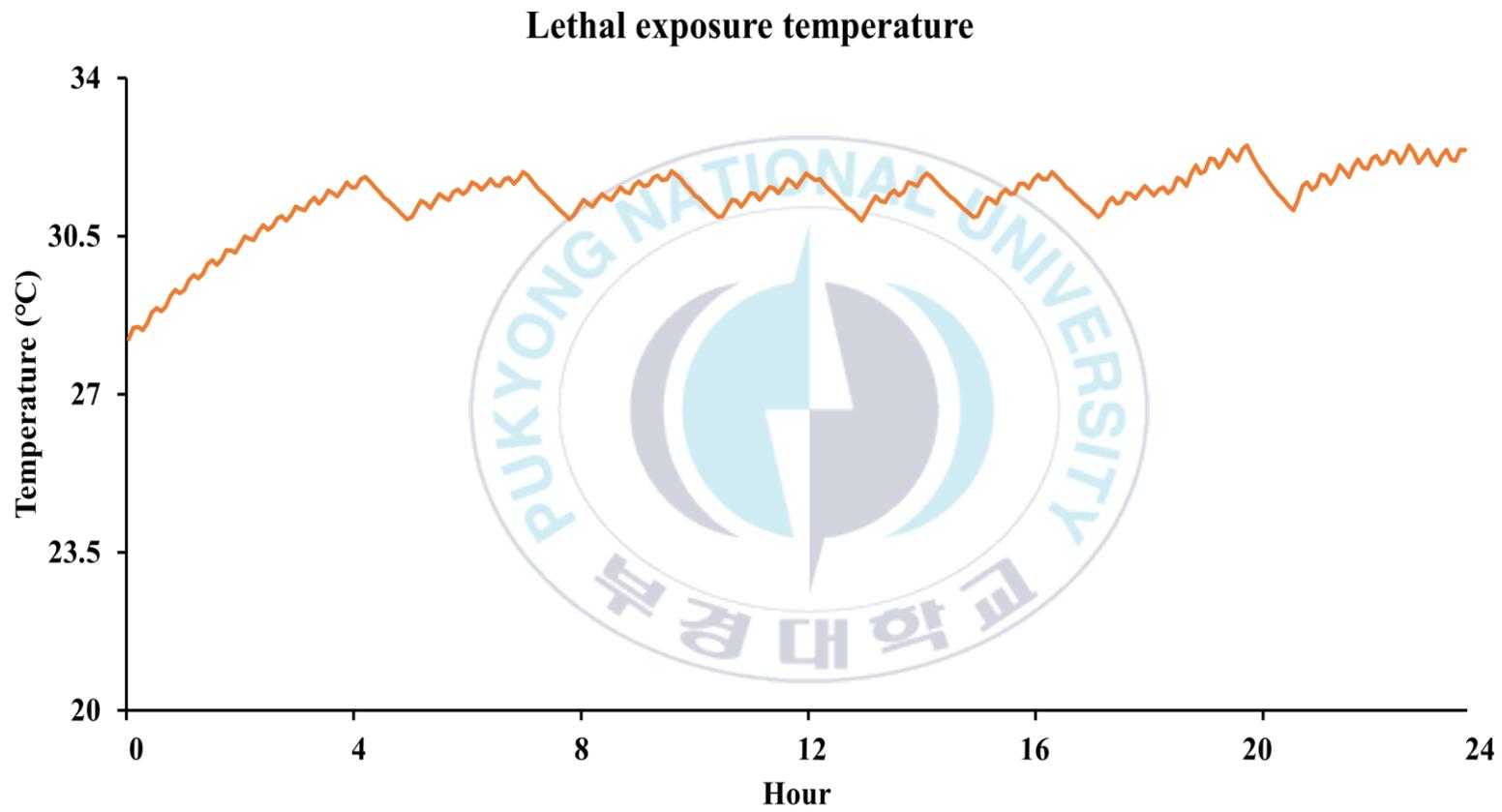


Figure 3. Water temperature change during lethal exposure temperature experiment

4.3. Acute temperature stress exposure experiment (Experiment III)

9주간의 사육실험 후 각 수조에서 넙치 3마리를 4칸으로 나누어진 플라스틱 용기(다공성, $30 \times 30 \times 30 \text{ cm}^3$)에 담아 216 L 급성 수온 스트레스 전용 수조에 옮겼다. 급성 수온 스트레스 온도는 2 kW 티타늄 수중 전용 히터(Unitech, Korea)를 사용하여 31 °C에서 2시간 동안 급성 수온 스트레스에 노출시켰다. 수중 전용 히터는 실험 전 예비 테스트를 거쳐 설정 수온(31 °C)에 최대한 가까운 값을 설정하였고, 실험이 진행되는 동안 HOBO 데이터 로거(HOBO water temperature Pro v2 data logger U22-001, Onset, Bourne, MA, USA)를 사용하여 수온변화를 기록하였다. 급성 수온 노출에 노출시킨 넙치를 19.7 °C로 옮기고 2시간 동안 회복 후 sample을 채취하였다. 급성 수온 스트레스 노출 실험 동안의 수온 변화는 Figure 4에 나타내었다.

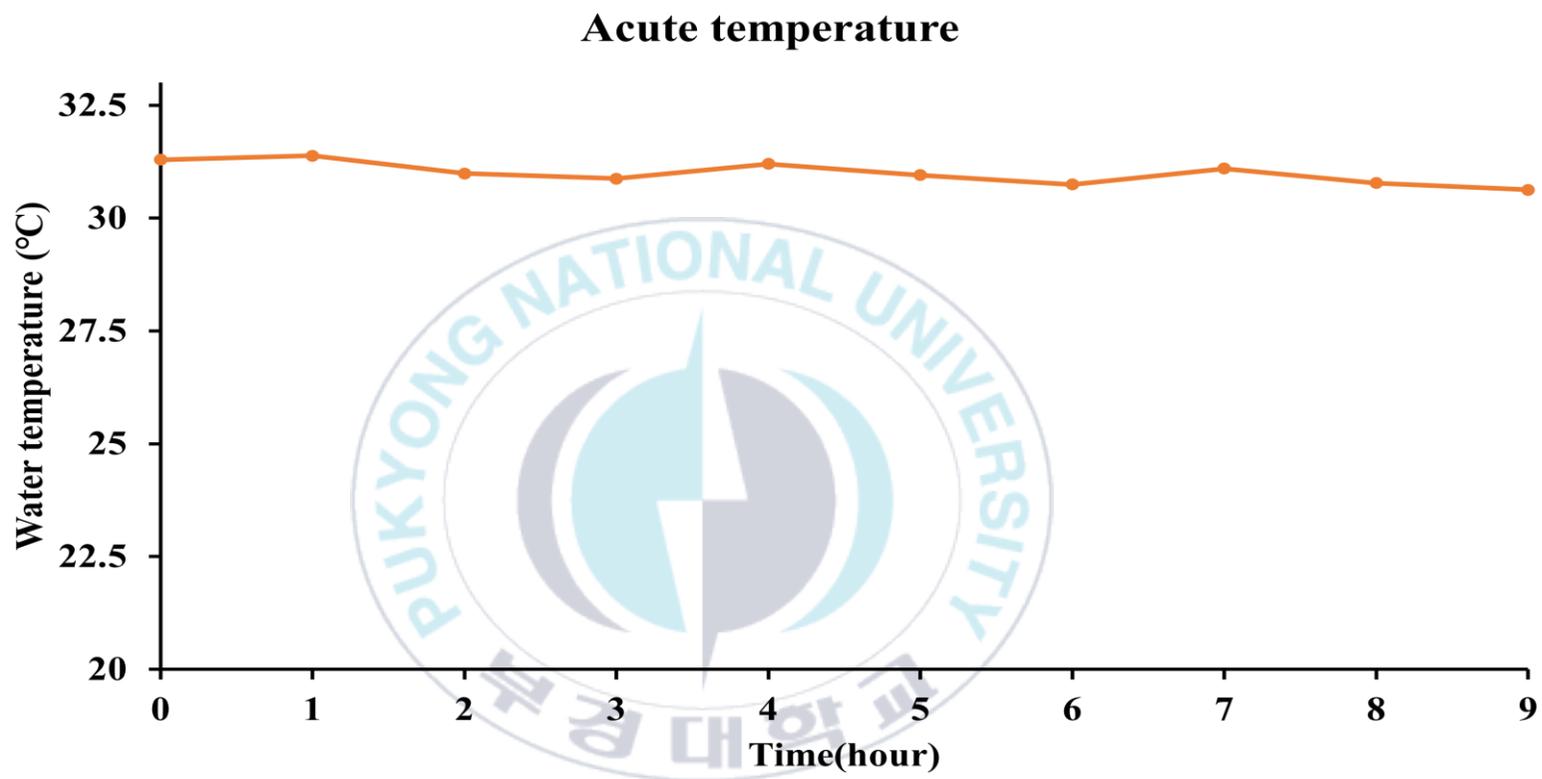


Figure 4. Water temperature change during acute temperature stress exposure experiment

5. Sample collection and analysis

5.1. Growth performance

사육 실험 종료 후 실험어를 24시간 절식시킨 후, 최종 체중(final body weight, FBW), 증체율(weight gain, WG), 일간 성장률(specific growth rate, SGR), 사료 효율(feed efficiency, FE), 생존율(survival rate, SR)을 계산하기 위해 각 수조의 모든 실험어의 전체 마릿수와 무게를 측정하였다. 수조당 실험어 3마리를 무작위로 선별하여 2-phenoxy ethanol (5분, 200 ppm)에 마취한 후, 각각의 전장과 무게를 측정하였으며, 해부를 통하여 전장과 무게를 측정한 다음 해부하여 뇌, 아가미, 간, 신장, 장, 유문수를 채취하였다. 간 중량 지수(hepatosomatic index, HSI), 내장 중량 지수(viscerosomatic index, VSI) 및 비만도(condition factor, CF)를 다음 식에 따라 계산하였다.

$$WG (\%) = [\text{final weight (g)} - \text{initial weight (g)}] / \text{initial weight (g)} \times 100.$$

$$SGR (\%/day) = [\ln \text{ final weight (g)} - \ln \text{ initial weight (g)}] / \text{days} \times 100.$$

$$FE (\%) = (\text{final weight (g)} - \text{initial weight (g)}) / \text{feed consumed (g)} \times 100.$$

$$SR (\%) = (\text{final number of fish} / \text{initial number of fish}) \times 100.$$

$$HSI (\%) = \text{liver weight (g)} / \text{body weight (g)} \times 100.$$

$$VSI (\%) = \text{viscera weight (g)} / \text{body weight (g)} \times 100.$$

$$CF = \text{wet weight (g)} / \text{total length (cm)}^3 \times 100$$

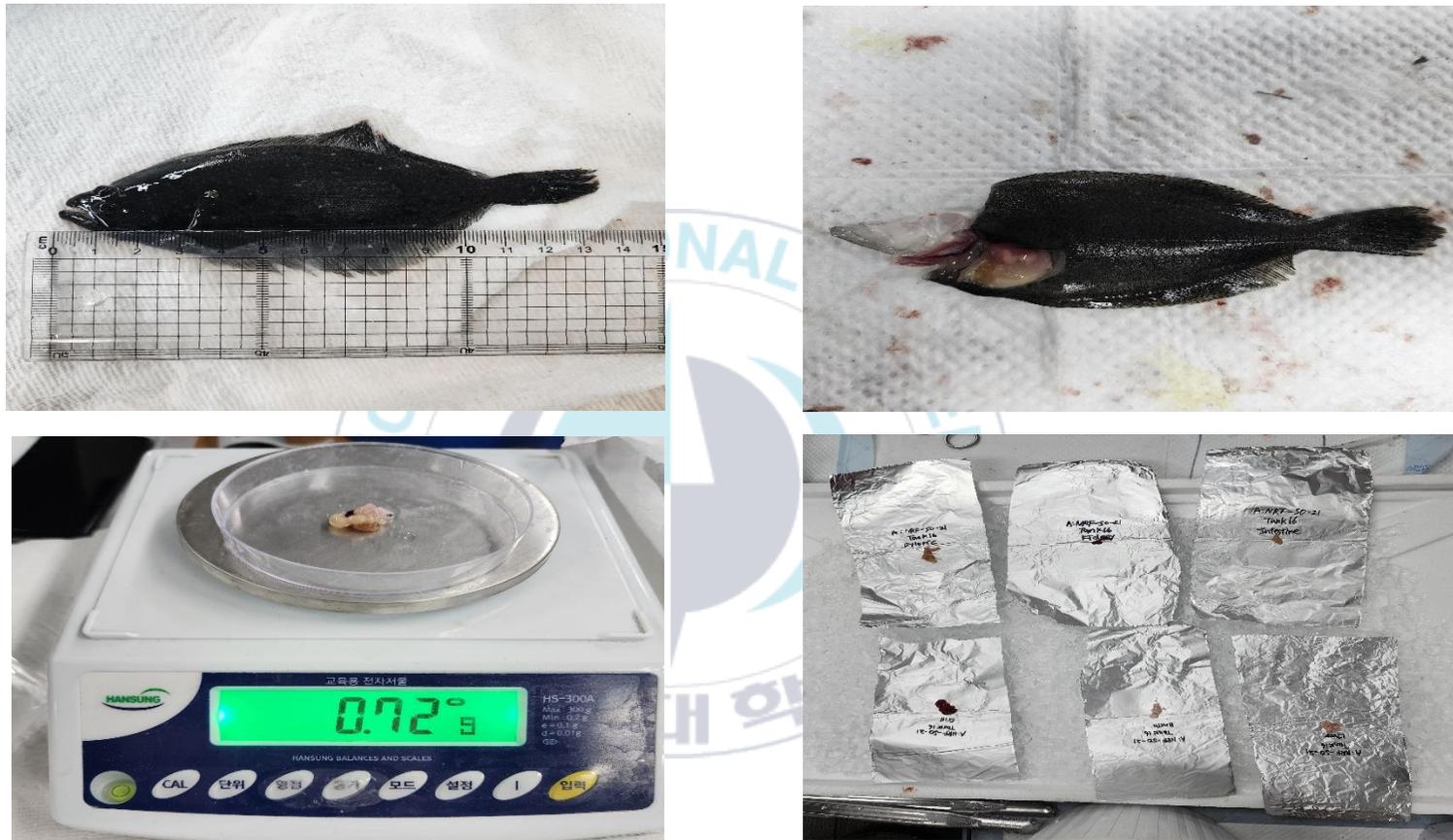


Figure 5. Sampling of olive flounder fed 9 experimental diets for 9 weeks

5.2. Diet and fish whole body proximate composition analysis

일반성분은 본 실험에 사용한 9종류의 사료와 실험 종료 후 실험 넙치 3마리를 무작위로 선별하여 전어체를 분석하였다. AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 2005) 방법에 따라 일반성분 분석을 진행하였으며, 모든 sample은 3일간의 동결건조(Advantage 2.0, VirTis, New York, USA) 후 분쇄하였다. 조회분은 약 1 g 정도 무게의 sample을 550 °C의 회화로(YJ-8500D, Korea)에 3시간 동안 연소하여 측정하는 직접회화법을 사용하여 분석하였다. 수분은 sample의 약 1 g 정도의 무게를 135 °C의 dry over에서 3시간 동안 가열하는 상압가열건조법을 통하여 분석하였다. 조단백질은 단백질분석기(Buchi B324/435/412, Switzerland; Metrohm 8-719/806, Switzerland)를 이용하여 Kjeldahl 질소정량법(Nitrogen \times 6.25)으로, 조지방은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 soxhlet 추출장치(Soxtec system 1046, Tecator AB, Sweden)를 사용하여 분석하였다.

5.3. Plasma metabolites analysis

사육실험 종료 후 건강도 분석을 위하여 각 수조에서 넙치 3마리를 무작위로 선별하여 항응고제(dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA) 처리된 1 mL 주사기를 사용하여 마취된 넙치의 미부정맥에서 혈액을 채취하였다. 각 실험구의 혈액 1 mL를 5.4 mg K₂ EDTA (Becton Dickinson and Company, USA)가 처리된 3 mL 실리콘 진공관에 모은 후, 1.5 mL micro tube에 나누어 11,000 × g에서 5분간 원심분리하여 혈장(plasma)을 분리하였다. 분리한 혈장은 분석 전까지 -84 °C에 냉동 보관하였으며, Glucose (GLU), total cholesterol (TCHO), triglyceride (TG), total protein (TP), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) 및 glutamic pyruvic transaminase (GPT)는 FujiFilm DRI-CHEM SLIDE로 건식 생화학 분석기(Fuji DRI-CHEM 4000i, Fuji Photo Film, Tokyo, Japan)를 사용하여 분석하였다.



Figure 6. Blood collection from olive flounder (A), separate plasma by centrifuge (B) and plasma metabolites analysis using Fuji DRI-CHEM 4000i (C)

5.4. Antioxidant reaction, immune responses and stress responses

실험어에서 채취한 plasma는 항산화, 면역 반응 및 스트레스 반응을 분석하는데 사용하였다. 글루타치온 퍼옥시다제(glutathione peroxidase, GPX), 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase, SOD), 혈장 면역글로불린 M (plasma Immunoglobulin M, IgM), 리소자임(lysozyme, LZM), 코르티솔(cortisol) 및 열 충격 단백질 70 (heat shock protein 70)의 농도는 효소결합 면역 흡착 반응 분석(ELISA) 정량 키트(CUSABIO, Huston, TX, USA)를 사용하여 분석하였다. 각 표준 시약과 혈장 시료는 제조사의 지침에 따라 수동 방법으로 분석하였다. 분석 과정이 완료 후, 마이크로 플레이트 리더기 (AMR-100, Allsheng, Hangzhou, China)를 사용하여 5분 이내 450 nm의 파장에서 측정하였다. 분석은 각 수조당 2반복으로 수행하였다.

5.5. Histological analysis

각 실험 수조당 3마리의 넙치에서 약 1 cm 크기의 중장(midgut) 표본을 채취해 10% neutral buffered formalin에 14일간 고정 후, 70% ethanol에 보관하였다. 부경대학교 생리학 연구실의 도움을 받아 조직학 분석을 진행하였으며, 조직 내 수분 제거를 위하여 ethanol을 70, 80, 90, 95 및 100% 순으로 1시간씩 저농도에서 고농도로 높여 단계적 탈수를 진행하였다. 탈수 과정 이후의 표본을 xylene에 넣어 투명화 후에 파라핀 친화과정을 거쳐 포매를 진행하였다. Microtome (CUT 4055, MicroTec, Germany)을 사용하여 4-5 μm 의 두께로 박절하여 슬라이드 글라스에 부착하고 heating plate (50°C)에 건조하여 조직표본을 제작하였다. 이후 Harris hematoxylin-eosin (H&E)으로 염색하였으며, 염색완료 후 Canada balsam을 사용하여 봉입하였다. 염색이 완료된 후 현미경용 과학 디지털 카메라(DIXI Optics, Daejeon, Republic of Korea)가 장착된 광학현미경(OLYMPUS BX41, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다. 이미지 촬영장치(Motic Image Plus 2.0, Motic Instruments Inc, China)를 통하여 현미경 사진을 촬영하고, 해당 소프트웨어를 사용하여 용모의 길이 (villus length, VL)와 근육층의 두께(muscular thickness, MT)를 측정하였다. VL (μm)은 용모의 상단에서 하단까지의 길이에 해당하고, MT (μm)는 원형 근육층에서 장 상피층까지의 두께를 나타낸다. 각 표본에 대해 단면 당 10개의 측정을 수행하여 평균값을 구하였다.

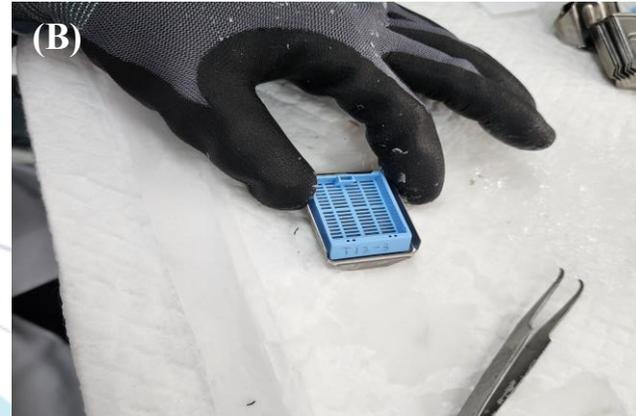
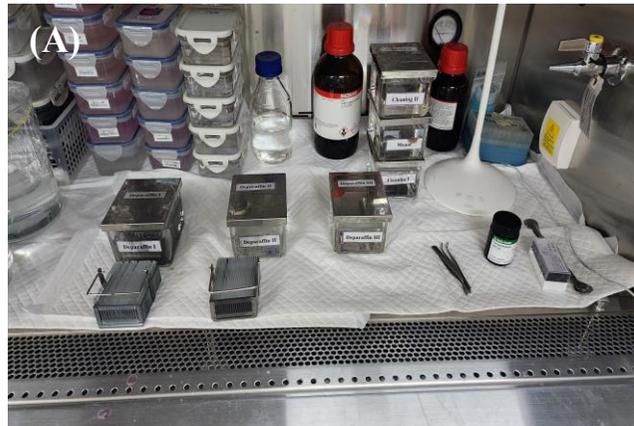


Figure 7. Sample dehydration, transparency, and embedding process (A), make a histology block (B), sectioning using a microtome (C) and staining with Harris hematoxylin-eosin (D)

5.6. Gene expression

사육실험 종료 후 실험어의 뇌, 아가미, 간 및 신장을 채취하여 -84 °C에 냉동 보관하였다. 100 mg 이하의 sample을 RiboEx™에서 5분간 균질화 한 후, Hybrid-R™ (GeneAll, Seoul, Korea)을 사용하여 실험어에서 채취한 뇌, 아가미, 간 및 신장에서 RNA를 추출하였다. RNA의 농도와 순도는 Thermo Scientific™ NanoDrop Lite Plus Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)를 사용하여 확인하였다. 정제된 RNA에는 DNA와 단백질이 없으며 뇌, 아가미, 간 및 신장에서 추출한 각각의 순도는 A 260/A 280의 분광도에서 측정된 결과, 2.15 ± 0 , 2.18 ± 0 , 2.15 ± 0.01 , 2.15 ± 0 (mean \pm SEM)으로 나타났다.

상보성 DNA (cDNA)는 PrimeScript™ 1st strand cDNA합성키트(Takara Bio, Kusatsu, Shiga, Japan)를 사용하여 합성하였다. 합성된 cDNA는 Real-time PCR분석 전까지 -20 °C에 냉동 보관하였다. 합성한 cDNA는 heat shock protein 60 (HSP 60), heat shock protein 70 (HSP 70), heat shock protein 90 α (HSP90 α), heat shock protein 90 β (HSP 90 β), glucose 6-phosphatase (G6pase) 및 AMP-activated protein kinase- β (AMPK- β)의 mRNA발현 수준을 평가하기 위하여 Real-time PCR (qPCR)에 사용되었다. 내부 대조유전자로는 넙치에서 안정성 및 효율성이 검증된 β -actin을 사용하였다. Real-time PCR은 TB Green©Premix EX Taq™II (Tli RNaseH Plus) (Takara Bio, Kusatsu, Shiga, Japan)의 지침에 따라 StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA)을 사용하여 수행하였다. 본 연구에서 사용된 유전자의 프라이머 염기서열

은 Table 4에 나타내었다. qPCR 프로그램은 95°C에서 30초 후, 95°C에서 4초를 진행하였고, 60 °C에서 30초를 40회 반복해서 진행하였다. 반응 후, 생성물의 특이성을 검증하기 위하여 용해 곡선 분석을 실시하였다. 선택된 각 유전자에 대한 qPCR 반응은 3반복으로 수행하였다. 유전자의 mRNA 수준을 해당 β -actin 값으로 정규화하고 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 방법을 사용하여 분석하였다. PCR 분석 후 StepOne Software version 2.0 (Applied Biosystems, USA)을 사용하여 데이터 분석을 진행하였다.



Table 4. List of primers used for gene expression

Genes	Primer sequences (5'>3')	Product size (bp)	Accession number
β -actin	F: GGAATCCACGAGACCACCTACA R: CTGCTTGCTGATCCACATCTGC	264	XM_020109620.1
AMPK β ¹	F: CCGGGCCATATCATCAGGAC R: TTGTAGCGATGTGTGCACT	223	XM_020103523.1
G6pase ²	F: GGGAGCCGCTGGTGTCTAC R: GGCCTTCAGGTACCACTCTTTG	112	XM_020109321.1
HSP60 ³	F: TGA CTTCGGGAAAGTCCGGTG R: ACGATCTCCAGTGCACGTTT	105	XM_020105844.1
HSP70 ⁴	F: TTCAATGATTCTCAGAGGCAAGC R: TTATCTAAGCCGTAGGCAATCGC	113	XM_020089177.1
HSP90- α ⁵	F: GAGCGAGACAAGGAGGTGAG R: CTGGCTTGTCTTCGTCCTTC	100	XM_020091873.1
HSP90- β ⁶	F: GGAGCTGAACAAGACCAAGC R: CAGATGATCCTCCCAGTCGT	109	XM_020097585.1

¹Adenosine monophosphate-activated protein kinase beta (AMPK β)

²Glucose 6-phosphatase (G6pase)

³Heat shock protein 60 (HSP60)

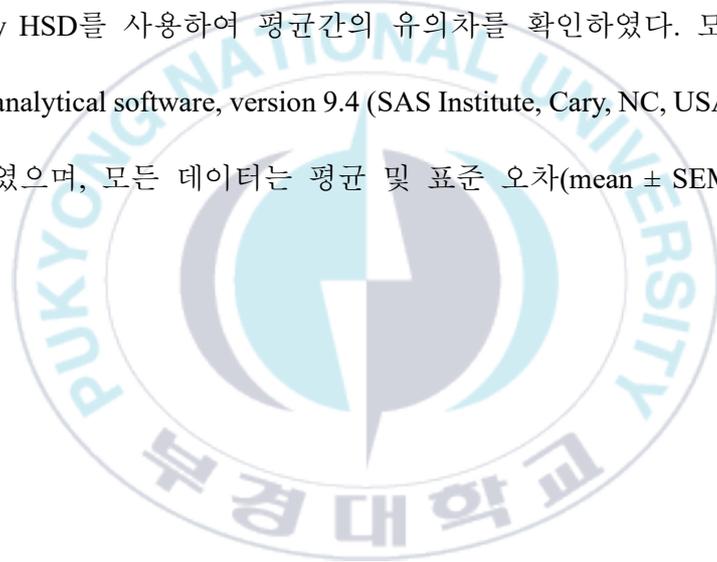
⁴Heat shock protein 70 (HSP70)

⁵Heat shock protein 90-alpha (HSP90- α)

⁶Heat shock protein 90-beta (HSP90- β)

6. Statistical analysis

실험수조의 배치는 완전임의배치법(randomized complete block design)에 따라 실시하였고, 신바이오틱스(대조구, AF, BF, CF, ABF, BCF, ACF, ABCF, F) 분석 결과는 일원배치 분산분석(One-way ANOVA)을 진행하였다. 건강도 분석 결과는 신바이오틱스와 수온 스트레스(NS, TS) 변수 간의 상호작용을 확인하기 위해 이원배치 분산 분석(Two-way ANOVA)을 진행하였다. 사후검정은 Tukey HSD를 사용하여 평균간의 유의차를 확인하였다. 모든 통계 분석은 SAS analytical software, version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA)를 사용하여 진행하였으며, 모든 데이터는 평균 및 표준 오차(mean \pm SEM)로 나타내었다.



III. Results

1. Feeding trial with synbiotics

넙치 사료 내 synbiotics 단일, 복합 첨가한 9주간의 사육실험

1.1. Availability of prebiotics

적정 프리바이오틱스 선정 결과는 Figure 8에 나타내었다. 스크리닝을 통해 선별된 각각의 토착 프로바이오틱스에 6가지 prebiotics 중 *in-vitro* 다중분석을 통해 적정 prebiotics를 선정한 결과, FOS(Fructooligosaccharide)를 첨가한 실험구가 토착 probiotics의 안정적인 성장을 나타내었다.

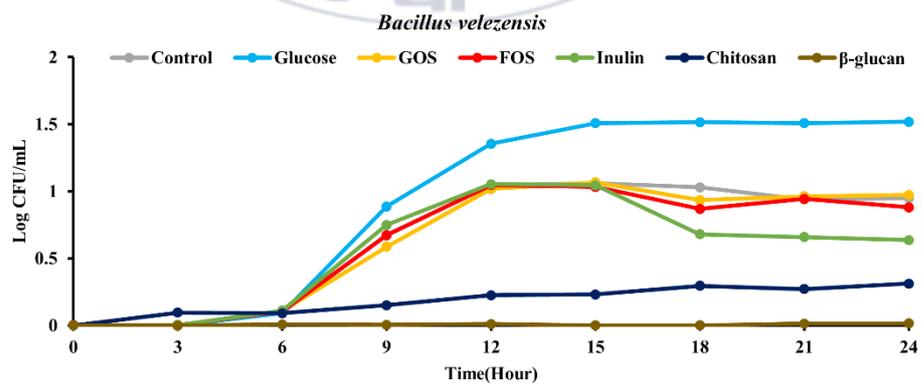
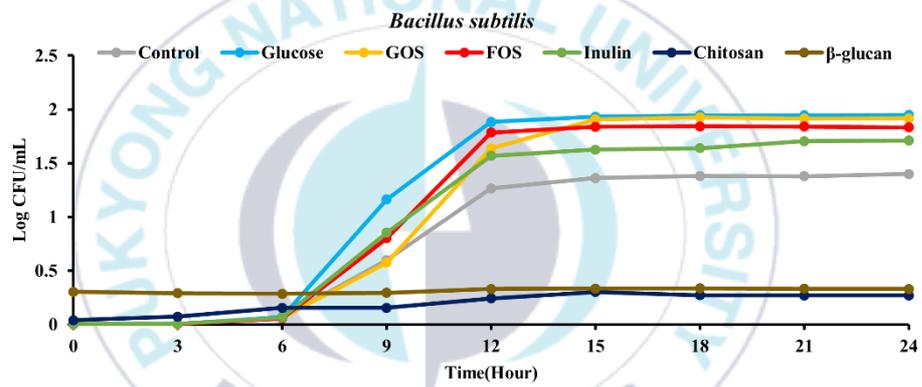
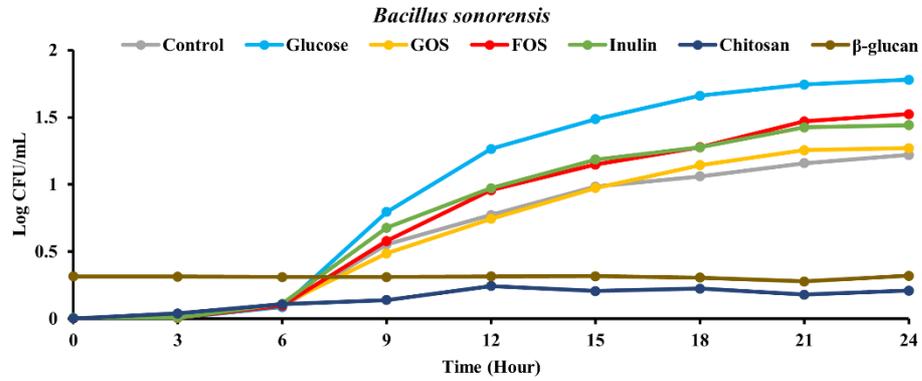


Figure 8. Selection of the best prebiotics for three selected probiotics through *in-vitro* multi-analysis

1.2. Growth performance

넙치 사료 내 synbiotics 단일, 복합 첨가한 9주간의 사육실험 후 성장도를 분석한 결과는 Table 4에 나타내었다. 모든 실험구에서 최종 무게(FBW), 증체율(WG), 일간성장률(SGR), 사료효율(FE) 및 생존율(SR)에서 유의한 관찰되지 않았다($P > 0.05$). 또한, 형태학적 변화를 측정된 결과 간 중량 지수(HIS), 내장 중량 지수(VSI) 및 비만도(CF)에는 유의적인 차이가 관찰되지 않았다($P > 0.05$).



Table 4. Growth performance and morphological changes of olive flounder fed 9 experimental diets for 9 weeks ¹

	Diets								
	CON	AF	BF	CF	ABF	BCF	ACF	ABCF	F
Initial mean weight (g olive flounder⁻¹)	7.24 ± 0.21 ^{ns}	7.26 ± 0.09	7.28 ± 0.15	7.00 ± 0.03	7.18 ± 0.06	7.35 ± 0.13	7.28 ± 0.15	7.37 ± 0.18	7.32 ± 0.16
Final mean weight (g olive flounder⁻¹)	40.7 ± 0.6 ^{ns}	41.1 ± 0.6	41.8 ± 0.8	42.5 ± 0.1	39.6 ± 1.5	42.0 ± 1.7	41.2 ± 0.6	40.3 ± 0.62	39.8 ± 1.1
WG (%)²	462 ± 12 ^{ns}	467 ± 15	475 ± 22	506 ± 1	452 ± 20	470 ± 14	466 ± 16	448 ± 22	444 ± 25
FE (%)³	126 ± 2 ^{ns}	126 ± 2	129 ± 3	135 ± 0	124 ± 5	130 ± 6	128 ± 3	123 ± 3	122 ± 5
SGR (%/day)⁴	2.78 ± 0.03 ^{ns}	2.80 ± 0.04	2.82 ± 0.06	2.91 ± 0	2.75 ± 0.06	2.81 ± 0.04	2.79 ± 0.05	2.74 ± 0.06	2.73 ± 0.07
Survival (%)⁵	98.1 ± 1.9 ^{ns}	90.7 ± 1.9	98.1 ± 1.9	100 ± 3.2	94.4 ± 3.2	94.4 ± 0	96.3 ± 1.9	94.4 ± 0	96.3 ± 3.7
CF⁶	1.19 ± 0.02 ^{ns}	1.20 ± 0.03	1.26 ± 0.04	1.18 ± 0.02	1.18 ± 0.03	1.11 ± 0.04	1.19 ± 0.04	1.16 ± 0.05	1.16 ± 0.06
HSI (%)⁷	1.54 ± 0.05 ^{ns}	1.70 ± 0.07	1.36 ± 0.15	1.52 ± 0.06	1.42 ± 0.05	2.11 ± 0.72	1.38 ± 0.11	1.48 ± 0.11	1.48 ± 0.11
VSI (%)⁸	3.57 ± 0.25 ^{ns}	3.88 ± 0.08	3.72 ± 0.21	3.48 ± 0.07	3.52 ± 0.08	2.86 ± 0.67	3.71 ± 0.13	3.58 ± 0.07	3.58 ± 0.07

¹ Values are means from triplicate groups of olive flounder where the values in each row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

² Weight gain (WG, %) = (final weight - initial weight) × 100 / initial weight.

³ Feed efficiency rates (FE, %) = (wet weight gain / dry feed intake) × 100.

⁴ Specific growth rates (SGR, %/day) = (log_e final weight - log_e initial weight) × 100 / days.

⁵ Survival rate (%) = (initial number of fish - dead fish) × 100 / initial number of fish

⁶CF: Condition factor = (wet weight (g) / total length (cm)³) × 100

⁷Hepatosomatic index (HSI, %) = liver weight (g) × 100/ body weight (g)

⁸Visceralsomatic index (VSI, %) = Viscera weight (g) × 100/ body weight (g)

1.3. Fish whole body proximate composition analysis

9주간의 사육실험 종료 후, 넙치 전어체 분석 결과는 Table 5에 나타내었다. 분석 결과 수분, 조단백질, 조지질 및 회분 함량에서 실험구 간 유의한 차이가 관찰되지 않았다($P > 0.05$).



Table 5. Whole-body proximate compositions¹ (% As-is) of juvenile olive flounder²

	Diets								
	CON	AF	BF	CF	ABF	BCF	ACF	ABCF	F
Moisture	72.9 ± 0.5 ^{ns}	73.7 ± 1.1	73.5 ± 1.1	73.9 ± 0.5	73.7 ± 0.6	72.4 ± 0.3	74.1 ± 1.5	74.6 ± 0.6	73.8 ± 1.0
Crude protein	20.5 ± 0.4 ^{ns}	19.9 ± 1.0	20.1 ± 0.8	19.9 ± 0.3	19.9 ± 0.5	20.7 ± 0.9	19.7 ± 1.1	18.9 ± 0.6	19.9 ± 0.9
Crude lipid	3.00 ± 0.14 ^{ns}	2.89 ± 0.27	2.76 ± 0.22	2.71 ± 0.29	2.86 ± 0.10	2.77 ± 0.10	2.80 ± 0.32	2.82 ± 0.13	2.83 ± 0.01
Crude ash	4.09 ± 0.10 ^{ns}	3.95 ± 0.16	3.95 ± 0.20	3.97 ± 0.01	4.01 ± 0.15	4.12 ± 0.02	3.89 ± 0.17	3.82 ± 0.13	3.59 ± 0.41

¹After the 9-week feeding experiment was over, 9 fish per experimental group were analyzed (3 fish per tank).

²Values are means from triplicate groups of olive flounder where the values in each row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

1.4. Plasma metabolites analysis

9주간의 사육실험 후, 혈장 내 대사물질인 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvate transaminase (GPT), total protein (TP), total cholesterol (TCHO), glucose (GLU) 및 triglycerides (TG) 차이를 분석한 결과에 서는 사료 내 probiotics 단일, 복합 첨가에 따른 실험구 간 유의한 차이가 관찰되지 않았다($P > 0.05$) 혈장 내 대사물질 차이를 분석한 결과는 Table 6 에 나타내었다.



Table 6. Plasma metabolites of olive flounder fed 9 experimental diets for 9 weeks¹

	Diets								
	CON	AF	BF	CF	ABF	BCF	ACF	ABCF	F
GOT (U/l) ²	19.7 ± 0.9 ^{ns}	22.0 ± 2.0	18.0 ± 1.0	17.0 ± 1.0	21.7 ± 3.0	18.0 ± 0.6	19.3 ± 1.5	19.3 ± 1.3	19.7 ± 1.7
GPT (U/l) ³	19.0 ± 0 ^{ns}	20.3 ± 2.2	19.0 ± 1.7	17.3 ± 1.5	21.7 ± 2.3	17.7 ± 0.3	18.7 ± 2.3	19.0 ± 1.2	19.7 ± 2.2
GLU (mg/dl) ⁴	19.7 ± 2.9 ^{ns}	28.7 ± 5.6	20.7 ± 2.9	24.0 ± 3.2	30.0 ± 15.2	22.7 ± 3.5	25.7 ± 6.3	26.3 ± 8.6	39.0 ± 13.1
TCHO (mg/dl) ⁵	126 ± 13 ^{ns}	140 ± 5	124 ± 3	116 ± 5	126 ± 11	129 ± 8	124 ± 2	138 ± 8	130 ± 11
TP (g/dl) ⁶	3.13 ± 0.20 ^{ns}	3.23 ± 0.07	3.00 ± 0.10	2.97 ± 0.09	3.00 ± 0.31	3.00 ± 0.06	3.03 ± 0.09	3.20 ± 0.15	3.13 ± 0.18
TG (mg/dl) ⁷	255 ± 72 ^{ns}	272 ± 35	195 ± 8	200 ± 5	210 ± 19	208 ± 22	180 ± 5	235 ± 55	269 ± 55

¹Values are presented as mean ± SEM (Tukey test at alpha=0.05)²GOT: Glutamic oxaloacetic transaminase (=AST)³GPT: Glutamic pyruvate transaminase (=ALT)⁴GLU: Glucose⁵TCHO: Total cholesterol⁶TP: Total protein⁷TG: Triglycerides

1.5. Antioxidant reaction, immune responses and stress responses

넙치 사료 내 synbiotics 단일, 복합 첨가에 따른 plasma 내 항산화, 면역 반응 및 스트레스 반응을 분석한 결과는 Tabel 7에 나타냈다. 면역효소 Immunoglobulin M (IgM), cortisol, lysozyme (LZM) 및 heat shock protein 70 (HSP 70)과 항산화효소 glutathione peroxidase (GPX), superoxide dismutase (SOD) 반응에 미친 차이를 분석한 결과에서 사료 내 synbiotics 단일, 복합 첨가에 따른 실험구 간 유의적인 차이가 관찰되지 않았다($P > 0.05$).



Table 7. Immune responses, antioxidants and stress responses of olive flounder fed 9 experimental diets for 9 weeks¹

	Diets								
	CON	AF	BF	CF	ABF	BCF	ACF	ABCF	F
GPx (mU/ml) ²	253 ± 29 ^{ns}	322 ± 27	208 ± 45	216 ± 37	290 ± 55	204 ± 32	197 ± 51	235 ± 10	370 ± 95
SOD (ng/ml) ³	553 ± 38 ^{ns}	639 ± 70	521 ± 62	640 ± 59	524 ± 38	604 ± 63	538 ± 41	539 ± 40	512 ± 28
IgM (µg/ml) ⁴	1.57 ± 0.09 ^{ns}	1.48 ± 0.04	1.51 ± 0.12	1.52 ± 0.11	1.44 ± 0.07	1.55 ± 0.05	1.57 ± 0.05	1.45 ± 0.05	1.42 ± 0.02
Cortisol (ng/ml)	3.24 ± 0.3 ^{ns}	3.26 ± 0.3	3.55 ± 0.24	4.03 ± 0.38	2.97 ± 0.32	3.02 ± 0.15	3.42 ± 0.08	3.11 ± 0.29	2.70 ± 0.13
LZM (µg/ml) ⁵	7.35 ± 1.16 ^{ns}	7.90 ± 0.80	7.16 ± 1.28	9.32 ± 1.25	4.72 ± 2.55	7.02 ± 0.44	7.29 ± 1.00	9.73 ± 1.11	9.09 ± 0.64
HSP70 (pg/ml) ⁶	26.8 ± 6.0 ^{ns}	33.5 ± 10.2	23.2 ± 1.0	25.0 ± 4.2	27.4 ± 10.9	19.8 ± 4.8	28.6 ± 8.6	29.3 ± 8.8	24.1 ± 4.1

¹Values are presented as mean ± SEM (Tukey test at alpha=0.05)

²Glutathione peroxidase (mU/ml)

³Superoxide dismutase (ng/ml)

⁴Immunoglobulin M (µg/ml)

⁵Lysozyme (µg/ml)

⁶Heat shock protein 70 (pg/ml)

1.6. Histological analysis

넙치 사료 내 synbiotics 단일, 복합 첨가에 따른 장 조직학적 분석 결과는 Table 8과 Figure 9에 나타내었다. 장 조직학적 분석 결과 사료 내 synbiotics 단일, 복합 첨가에 따른 실험구 간 유의한 차이가 관찰되지 않았다($P > 0.05$).



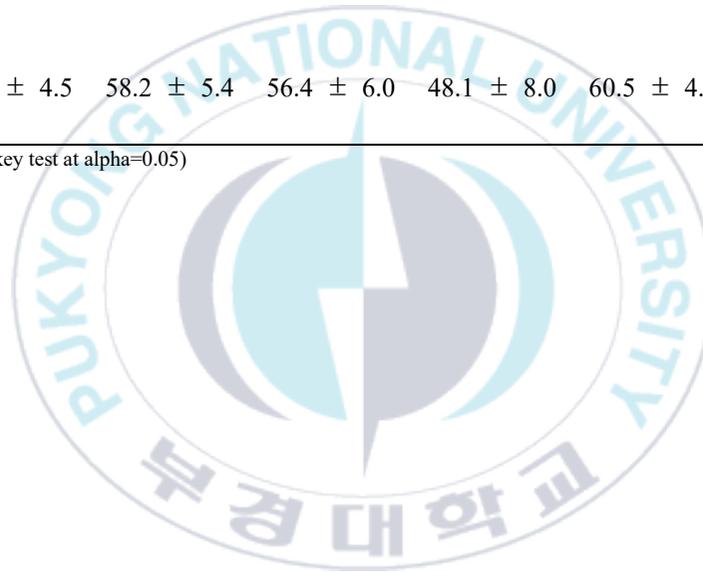
Table 8. Villus length and muscle thickness in the intestine of Olive flounder fed the experimental diets for 9 weeks¹

	Diets								
	CON	AF	BF	CF	ABF	BCF	ACF	ABCF	F
VH (μm)²	776 \pm 18 ^{ns}	898 \pm 95	862 \pm 26	734 \pm 246	906 \pm 30	792 \pm 34	783 \pm 84	829 \pm 65	793 \pm 120
MT (μm)³	59.9 \pm 3.5 ^{ns}	56.6 \pm 4.5	58.2 \pm 5.4	56.4 \pm 6.0	48.1 \pm 8.0	60.5 \pm 4.8	63.6 \pm 3.7	59.3 \pm 5.1	48.1 \pm 5.9

¹Values are presented as mean \pm SEM (Tukey test at $\alpha=0.05$)

²VH: Villus height (μm)

³MT: Muscular thickness (μm)



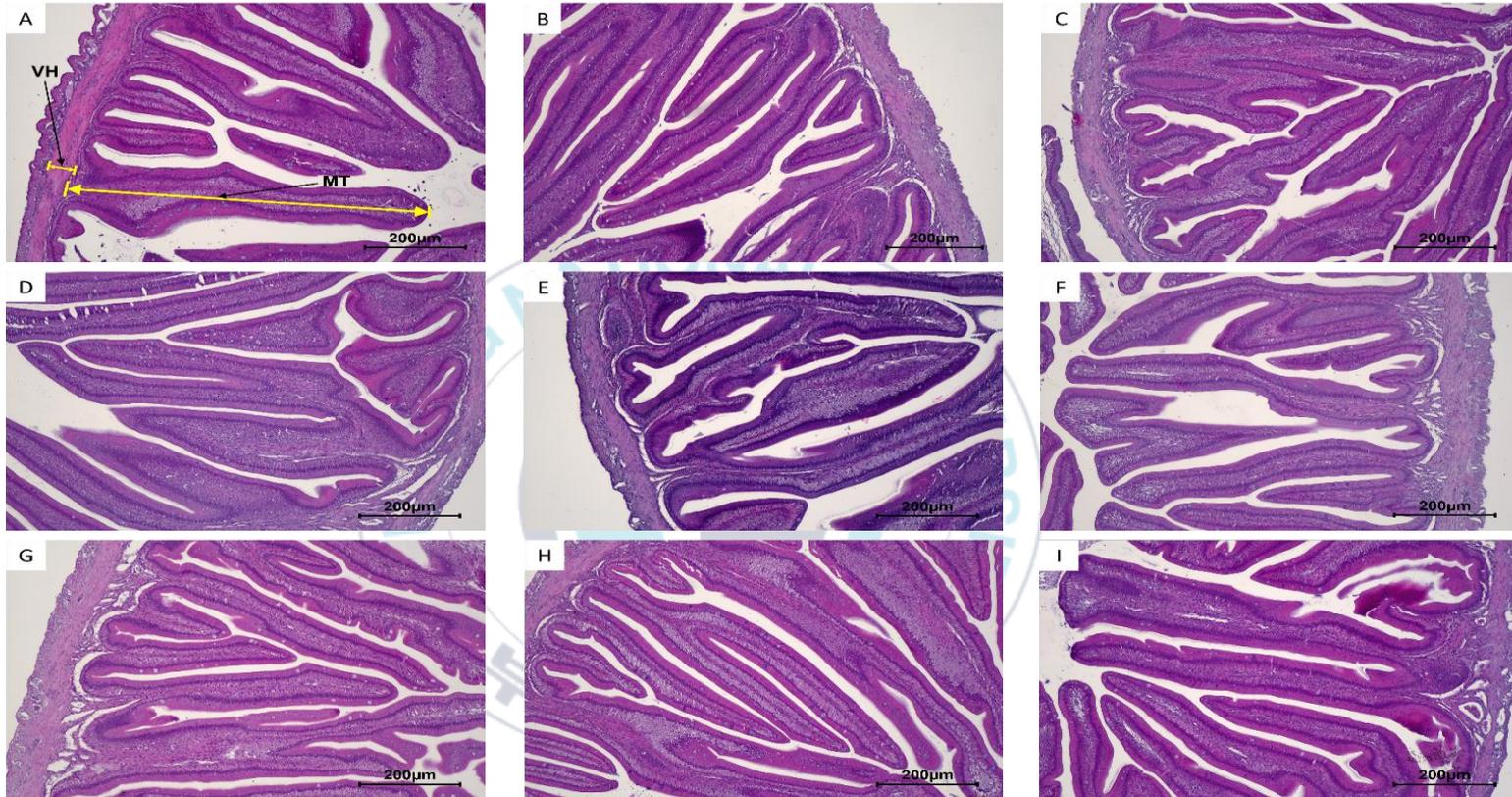


Figure 9. Histological structure (representative micrographs of H&E stain image magnification, x100) of the intestine (A: CON, B: AF, C: BF, D: CF, E: ABF, F: BCF, G: ACF, H: ABCF, I: F) of olive flounder fed the experimental diets for 9 weeks. VH and MT represents villus height and muscular thickness, respectively.

2. Lethal exposure temperature experiment

넙치 사료 내 synbiotics 단일, 복합 첨가하여 9주간의 사육 실험 후, 치사 수온(31 °C/24 hr)에 노출시켜 누적 생존율 측정

2.1. Survival rate analysis

넙치 사료 내 Synbiotics 단일, 복합 첨가하여 공급한 넙치를 대상으로 치사 수온에 노출시켜 누적 생존율을 분석한 결과에 실험구간 유의한 차이는 관찰되지 않았다($P > 0.05$). 하지만, 노출 24시간째 복합 첨가구인 ACF와 ABCF 실험구에서 상대적으로 높은 생존율이 관찰되었다. 실험어를 치사 수온에 노출시켜 누적 생존율을 분석한 결과는 Figure 10에 나타내었다.

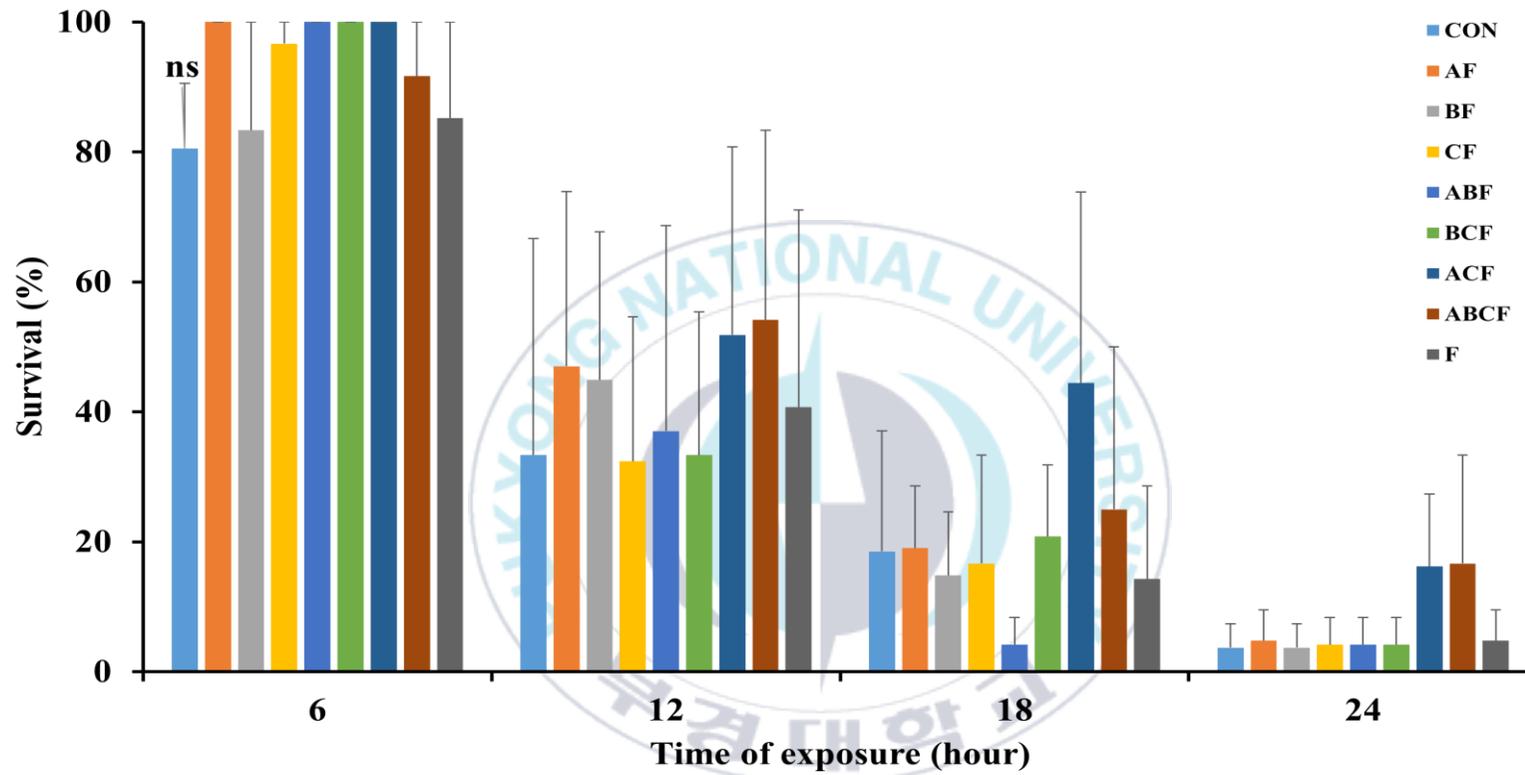


Figure 10. Survival rate of olive flounder fed 9 experimental diets under Lethal exposure (31 °C). Values are presented as mean \pm SEM (Tukey test at alpha = 0.05).

3. Acute temperature stress

넙치 사료 내 synbiotics 단일, 복합 첨가하여 9주간의 사육 실험 후, 급성 수온 스트레스 노출(31 °C/2 hr) 및 회복 (19.7 °C/2 hr)에 따른 스트레스 반응

3.1. Plasma metabolites analysis

넙치 사료 내 synbiotics 단일, 복합 첨가 실험구를 대상으로 급성 수온 스트레스 노출 후 회복시간(31 °C/2 hr 19.7 °C/2 hr)을 가진 실험어의 혈장 내 대사물질 차이를 분석한 결과는 Table 9에 나타났다. 분석 결과 사료 내 synbiotics 단일, 복합 첨가에 따른 실험구 간 유의한 차이가 관찰되지 않았다($P > 0.05$).

Table 9. Hematocrit and plasma metabolites of olive flounder fed 9 experimental diets for acute (31 °C)¹

	Diets								
	CON	AF	BF	CF	ABF	BCF	ACF	ABCF	F
Hematocrit (%)	18.3±0.6 ^{ns}	18.3±0.7	18.7±0.4	19.2±0.5	17.8±0.4	19.2±0.6	18.8±1.0	19.2±0.5	19.0±0.4
GOT (U/l) ²	32.0 ± 7.5 ^{ns}	24.0 ± 1.7	37.3 ± 4.9	50.7 ± 23.3	38.3 ± 11.6	26.3 ± 8.9	43.3 ± 17.4	35.0 ± 7.1	21.7 ± 5.7
GPT (U/l) ³	25.7 ± 4.1 ^{ns}	20.0 ± 2.6	22.7 ± 2.2	21.7 ± 3.2	20.7 ± 2.6	20.7 ± 3.7	27.3 ± 6.9	24.3 ± 5.4	18.7 ± 0.9
GLU (mg/dl) ⁴	47.0 ± 12.5 ^{ns}	31.3 ± 5.9	25.3 ± 6.4	24.0 ± 2.1	43.7 ± 10.9	55.3 ± 5.2	41.7 ± 10.2	34.0 ± 10.2	28.7 ± 9.7
TCHO (mg/dl) ⁵	84.0 ± 12.1 ^{ns}	100 ± 5	111 ± 6	97.7 ± 4.3	104 ± 2	101 ± 1	101 ± 5	110 ± 5	97.0 ± 3.0
TP (g/dl) ⁶	2.50 ± 0.21 ^{ns}	2.73 ± 0.17	2.93 ± 0.17	2.80 ± 0.15	3.00 ± 0.15	2.83 ± 0.09	2.87 ± 0.20	2.93 ± 0.12	3.00 ± 0
TG (mg/dl) ⁷	119 ± 15 ^{ns}	130 ± 14	158 ± 8	140 ± 9	161 ± 4	124 ± 9	128 ± 7	160 ± 27	147 ± 3

¹Values are presented as mean ± SEM (Tukey test at alpha=0.05)

²GOT: Glutamic oxaloacetic transaminase (=AST)

³GPT: Glutamic pyruvate transaminase (=ALT)

⁴GLU: Glucose

⁵TCHO: Total cholesterol

⁶TP: Total protein

⁷TG: Triglycerides

*: No significant

3.2. Plasma metabolites Two-way analysis

넙치 사료 내 synbiotics 단일, 복합 첨가 실험구를 대상으로 급성 수온 스트레스 노출(31 °C/2 hr, 19.7 °C/2 hr)후 어류의 혈장 내 대사물질 차이를 Two-way ANOVA로 분석할 결과는 Table 10에 나타났다. 혈장 내 대사물질 분석 결과, synbiotics 첨가에 따른 유의한 영향은 없었으나 수온 스트레스에 따른 혈장 내 대사물질에 유의한 영향이 관찰되었다. 수온 스트레스에 노출된 실험구의 혈장 내 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase(GPT) 및 glucose (GLU) 농도가 수온 스트레스에 노출되지 않은 실험구에 비해 유의적으로 높게 나타났으며($P < 0.05$), total cholesterol (TCHO), total protein (TP) 및 triglyceride (TG)의 농도는 수온 스트레스에 노출되지 않은 실험구에 비해 유의하게 낮게 나타났다($P > 0.05$).

Table 10. Plasma metabolites of olive flounder fed 9 experimental diets for acute (31 °C) test Two-way statistical analysis¹

Diets	GOT (U/l) ²	GPT (U/l) ³	GLU (mg/dl) ⁴	TCHO (mg/dl) ⁵	TP (g/dl) ⁶	TG (mg/dl) ⁷
NS-CON	19.7 ± 0.9 ^{ns}	19.0 ± 0 ^{ns}	19.7 ± 2.9 ^{ns}	126 ± 13 ^{abc}	3.13 ± 0.2 ^{ns}	255 ± 72 ^{ab}
NS-AF	22.0 ± 2.0	20.3 ± 2.2	28.7 ± 5.6	140 ± 5 ^a	3.23 ± 0.07	272 ± 35 ^a
NS-BF	18.0 ± 1.0	19.0 ± 1.7	20.7 ± 2.9	124 ± 3 ^{abc}	3.00 ± 0.10	195 ± 8 ^{ab}
NS-CF	17.0 ± 1.0	17.3 ± 1.5	24.0 ± 3.2	116 ± 5 ^{abcd}	2.97 ± 0.09	200 ± 5 ^{ab}
NS-ABF	21.7 ± 3.0	21.7 ± 2.3	30.0 ± 15.2	126 ± 11 ^{abc}	3.00 ± 0.31	210 ± 19 ^{ab}
NS-BCF	18.0 ± 0.6	17.7 ± 0.3	22.7 ± 3.5	129 ± 8 ^{abc}	3.00 ± 0.06	208 ± 22 ^{ab}
NS-ACF	19.3 ± 1.5	18.7 ± 2.3	25.7 ± 6.3	124 ± 2 ^{abc}	3.03 ± 0.09	180 ± 5 ^{ab}
NS-ABCF	19.3 ± 1.3	19.0 ± 1.2	26.3 ± 8.6	138 ± 8 ^{ab}	3.20 ± 0.15	235 ± 55 ^{ab}
NS-F	19.7 ± 1.7	19.7 ± 2.2	39.0 ± 13.1	130 ± 11 ^{abc}	3.13 ± 0.18	269 ± 55 ^{ab}
TS-CON	32.0 ± 7.5	25.7 ± 4.1	47.0 ± 12.5	84.0 ± 12.1 ^d	2.50 ± 0.21	119 ± 15 ^b
TS-AF	24.0 ± 1.7	20.0 ± 2.6	31.3 ± 5.9	100 ± 5 ^{cd}	2.73 ± 0.17	130 ± 14 ^{ab}
TS-BF	37.3 ± 4.9	22.7 ± 2.2	25.3 ± 6.4	111 ± 6 ^{abcd}	2.93 ± 0.17	158 ± 8 ^{ab}
TS-CF	50.7 ± 23.3	21.7 ± 3.2	24.0 ± 2.1	97.7 ± 4.3 ^{cd}	2.80 ± 0.15	140 ± 9 ^{ab}
TS-ABF	38.3 ± 11.6	20.7 ± 2.6	43.7 ± 10.9	104 ± 2 ^{abcd}	3.00 ± 0.15	161 ± 4 ^{ab}
TS-BCF	26.3 ± 8.9	20.7 ± 3.7	55.3 ± 5.2	101 ± 1 ^{bcd}	2.83 ± 0.09	124 ± 9 ^{ab}
TS-ACF	43.3 ± 17.4	27.3 ± 6.9	41.7 ± 10.2	101 ± 5 ^{bcd}	2.87 ± 0.20	128 ± 7 ^{ab}
TS-ABCF	35.0 ± 7.1	24.3 ± 5.4	34.0 ± 10.2	110 ± 5 ^{abcd}	2.93 ± 0.12	160 ± 27 ^{ab}
TS-F	21.7 ± 5.7	18.7 ± 0.9	28.7 ± 9.7	97.0 ± 3.0 ^{cd}	3.00 ± 0	147 ± 3 ^{ab}
Main effect of temperature						
NS	19.4 ± 0.5 ^b	19.1 ± 0.4 ^b	26.3 ± 2.0 ^b	128 ± 2 ^a	3.08 ± 0.03 ^a	225 ± 5 ^a
TS	34.3 ± 3.1 ^a	22.4 ± 1.0 ^a	36.8 ± 3.6 ^a	101 ± 3 ^b	2.81 ± 0.05 ^b	141 ± 5 ^b
Main effect of diet						
CON	25.8 ± 6.2 ^{ns}	22.3 ± 3.3 ^{ns}	33.3 ± 13.7 ^{ns}	105 ± 21 ^{ns}	2.82 ± 0.32 ^{ns}	187 ± 68 ^{ns}
AF	23.0 ± 1.0	20.2 ± 0.2	30.0 ± 1.3	120 ± 20	2.98 ± 0.25	201 ± 71
BF	27.7 ± 9.7	20.8 ± 1.8	23.0 ± 2.3	118 ± 6	2.97 ± 0.03	177 ± 19
CF	33.8 ± 16.8	19.5 ± 2.2	24.0 ± 0	107 ± 9	2.88 ± 0.08	170 ± 30
ABF	30.0 ± 8.3	21.2 ± 0.5	36.8 ± 6.8	115 ± 11	3.00 ± 0	186 ± 25
BCF	22.2 ± 4.2	19.2 ± 1.5	39.0 ± 16.3	115 ± 14	2.92 ± 0.08	166 ± 42
ACF	31.3 ± 12.0	23.0 ± 4.3	33.7 ± 8.0	112 ± 12	2.95 ± 0.08	154 ± 26
ABCF	27.2 ± 7.8	21.7 ± 2.7	30.2 ± 3.8	124 ± 14	3.07 ± 0.13	198 ± 38
F	20.7 ± 0.5	19.2 ± 0.5	33.8 ± 5.2	113 ± 17	2.90 ± 0.23	208 ± 61
Two-way ANOVA (p-value)						
Temp	0.0005	0.0273	0.0121	<.0001	0.0008	<.0001
Diet	0.8021	0.8957	0.5938	0.2023	0.8935	0.6366
Temp*Diet	0.6408	0.7204	0.2782	0.5077	0.5011	0.4816

¹Values are presented as mean ± SEM (Tukey test at alpha=0.05)

²GOT: Glutamic oxaloacetic transaminase (=AST)

³GPT: Glutamic pyruvate transaminase (=ALT)

⁴GLU: Glucose

⁵TCHO: Total cholesterol

⁶TP: Total protein

⁷TG: Triglycerides

*: No significant

3.3. Stress response

넙치 사료 내 Synbiotics 단일, 복합 첨가구를 대상으로 급성 수온 스트레스 노출(31 °C/2 hr, 19.7 °C/2 hr) 후 plasma 내 스트레스 반응을 분석한 결과는 Table 11에 나타냈다. Cortisol 반응에 미친 차이를 분석한 결과에서 사료 내 synbiotics 단일, 복합 첨가에 따른 실험구 간 유의적인 차이가 관찰되지 않았다($P > 0.05$).



Table 11. Stress responses of olive flounder fed 9 experimental diets for acute (31 °C)¹

	Diets								
	CON	AF	BF	CF	ABF	BCF	ACF	ABCF	F
Cortisol ² (ng/ml)	7.58 ± 0.28 ^{ns}	8.56 ± 0.73	10.4 ± 1.7	8.33 ± 0.31	7.00 ± 0.80	7.89 ± 1.43	11.3 ± 2.5	8.61 ± 2.37	9.58 ± 0.69

¹Values are presented as mean ± SEM (Tukey test at alpha=0.05)



3.4. Stress response Two-way analysis

넙치 사료 내 synbiotics 단일, 복합 첨가 실험구를 대상으로 급성 수온 스트레스 노출(31 °C/2 hr, 19.7 °C/2 hr) 후 plasma 내 스트레스 반응 차이를 Two-way ANOVA로 분석할 결과는 Table 12에 나타냈다. Plasma 내 cortisol 분석 결과, synbiotics 첨가에 따른 유의한 영향은 없었으나 수온 스트레스에 노출된 실험구의 plasma 내 cortisol의 농도가 수온 스트레스에 노출되지 않은 실험구에 비해 유의적으로 높게 나타났다($P < 0.05$).



Table 12. Stress response of olive flounder fed 9 experimental diets for acute (31 °C) test Two-way statistical analysis¹

Diets	Cortisol (ng/ml)
NS-CON	3.24 ± 0.30 ^{bcd}
NS-AF	3.26 ± 0.30 ^{bcd}
NS-BF	3.55 ± 0.24 ^{bcd}
NS-CF	4.03 ± 0.38 ^{bcd}
NS-ABF	2.97 ± 0.32 ^{cd}
NS-BCF	3.02 ± 0.15 ^{cd}
NS-ACF	3.42 ± 0.08 ^{bcd}
NS-ABCF	3.11 ± 0.29 ^{cd}
NS-F	2.70 ± 0.13 ^d
TS-CON	7.58 ± 0.28 ^{abcd}
TS-AF	8.56 ± 0.73 ^{ab}
TS-BF	10.4 ± 1.7 ^a
TS-CF	8.30 ± 0.30 ^{abc}
TS-ABF	7.00 ± 0.80 ^{abcd}
TS-BCF	7.90 ± 1.40 ^{abcd}
TS-ACF	11.3 ± 2.5 ^a
TS-ABCF	8.61 ± 2.37 ^{ab}
TS-F	9.58 ± 0.69 ^a
Main effect of temperature	
NS	3.25 ± 0.13 ^b
TS	8.81 ± 0.46 ^a
Main effect of diet	
CON	5.41 ± 2.17 ^{ns}
AF	5.91 ± 2.65
BF	6.97 ± 3.42
CF	6.18 ± 2.15
ABF	4.98 ± 2.02
BCF	5.46 ± 2.44
ACF	7.38 ± 3.96
ABCF	5.86 ± 2.75
F	6.14 ± 3.44
Two-way ANOVA (p-value)	
Temp	<.0001
Diet	0.3930
Temp*Diet	0.5360

¹Values are presented as mean ± SEM (Tukey test at alpha=0.05)

*: No significant

3.5. Gene expression

넙치 사료 내 synbiotics 단일, 복합 첨가 실험구를 대상으로 급성 수온 스트레스 노출(31 °C/2 hr, 19.7 °C/2 hr) 후 상대적 유전자 발현 결과는 Table 13과 같다. 실험어의 뇌, 아가미, 신장 및 간 내 면역과 관련된 유전자인 heat shock protein 60 (HSP 60), heat shock protein 70 (HSP 70), heat shock protein 90 α (HSP 90 α) 및 heat shock protein 90 β (HSP 90 β)와 에너지 대사와 관련된 유전자인 glucose 6-phosphatase (G6pase)와 AMP-activated protein kinase- β (AMPK- β)를 분석한 결과 뇌, 아가미, 신장에서는 유의한 차이가 관찰되지 않았다($P > 0.05$). 실험어의 간 내 molecular chaperon으로 알려진 대표적 유전자인 heat shock protein 70 (HSP 70)을 분석한 결과 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었으나($P = 0.0307$), Tukey studentized test를 사용한 사후검정에서는 실험구간 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한, 실험어의 간 내 에너지 대사와 관련된 유전자 AMP-activated protein kinase- β (AMPK- β)를 분석한 결과 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었는데($P = 0.0122$), synbiotics 복합 첨가한 실험구인 ABCF, ACF 실험구에서 가장 높은 유전자 발현 결과가 관찰되었으며, 대조구와는 통계적으로 차이는 없으나 상대적으로 높은 결과가 관찰되었다.

Table 13. Expression genes of olive flounder fed 9 experimental diets for acute (31 °C) test.¹

Diets	HSP60 ¹	HSP70 ²	HSP90 α ³	HSP90 β ⁴	G6PASE ⁵	AMPK- β ⁶
Brain						
CON	1.01±0.09 ^{ns}	1.05±0.23 ^{ns}	1.06±0.24 ^{ns}	1.08±0.30 ^{ns}	1.69±0.94 ^{ns}	1.32 ± 0.55 ^{ns}
AF	1.00±0.13	1.08±0.24	1.14±0.47	0.87±0.30	2.76 ± 2.14	1.51 ± 0.65
BF	1.02±0.12	1.27±0.27	1.01±0.19	0.91±0.17	2.03 ± 1.37	1.25 ± 0.55
CF	0.93±0.03	1.04±0.07	1.04±0.18	1.11±0.08	1.55 ± 0.67	1.26 ± 0.71
ABF	0.88±0.10	0.91±0.07	0.91±0.17	0.77±0.07	1.24 ± 0.72	0.95 ± 0.45
BCF	0.93±0.13	0.90±0.11	1.15±0.51	1.01±0.05	1.04 ± 0.17	1.07 ± 0.46
ACF	0.75±0.13	0.91±0.26	0.85±0.12	0.73±0.08	1.13 ± 0.52	0.92 ± 0.45
ABCF	0.85±0.15	1.12±0.35	0.91±0.28	0.91±0.16	1.32 ± 0.56	1.85 ± 1.30
F	0.92±0.08	1.08±0.12	0.98±0.17	0.82±0.14	6.37 ± 5.27	4.58 ± 3.11
Gill						
CON	1.08 ± 0.29 ^{ns}	1.32 ± 0.72 ^{ns}	1.03 ± 0.20 ^{ns}	1.51 ± 0.68 ^{ns}	1.41 ± 0.84 ^{ns}	1.03 ± 0.18 ^{ns}
AF	1.68 ± 0.91	2.48 ± 1.67	1.14 ± 0.59	2.25 ± 1.24	1.04 ± 0.52	1.04 ± 0.20
BF	1.28 ± 0.49	1.95 ± 1.25	1.08 ± 0.33	2.61 ± 0.51	1.41 ± 0.76	0.78 ± 0.13
CF	1.06 ± 0.24	1.83 ± 0.32	1.02 ± 0.09	0.97 ± 0.19	3.72 ± 2.60	0.66 ± 0.04
ABF	1.42 ± 0.35	1.61 ± 0.67	1.95 ± 0.56	3.65 ± 0.68	3.84 ± 2.03	0.86 ± 0.10
BCF	1.93 ± 1.26	3.58 ± 1.75	1.21 ± 0.50	1.49 ± 0.63	1.77 ± 0.52	0.90 ± 0.14
ACF	1.98 ± 0.66	3.51 ± 0.67	1.96 ± 0.63	1.77 ± 0.76	3.01 ± 1.42	0.98 ± 0.05
ABCF	1.02 ± 0.29	2.55 ± 0.66	0.98 ± 0.46	1.13 ± 0.23	1.01 ± 0.29	0.75 ± 0.09
F	1.53 ± 0.60	2.30 ± 0.62	1.12 ± 0.40	2.15 ± 1.27	7.61 ± 6.19	0.48 ± 0.07
Kidney						
CON	1.03 ± 0.2 ^{ns}	1.28 ± 0.64 ^{ns}	1.07 ± 0.29 ^{ns}	1.04 ± 0.18 ^{ns}	1.03 ± 0.18 ^{ns}	1.02 ± 0.15 ^{ns}
AF	0.76 ± 0.16	1.30 ± 0.47	0.89 ± 0.17	0.70 ± 0.18	0.90 ± 0.30	0.84 ± 0.25
BF	0.99 ± 0.05	0.73 ± 0.02	1.10 ± 0.14	1.02 ± 0.13	1.48 ± 0.16	1.00 ± 0.19
CF	0.62 ± 0.22	0.58 ± 0.32	0.79 ± 0.29	0.88 ± 0.09	0.77 ± 0.10	0.78 ± 0.07
ABF	1.06 ± 0.28	1.92 ± 0.72	1.56 ± 0.36	1.44 ± 0.45	1.88 ± 0.01	1.26 ± 0.24
BCF	0.66 ± 0.10	0.58 ± 0.06	1.12 ± 0.43	1.04 ± 0.21	1.45 ± 0.69	0.97 ± 0.07
ACF	0.58 ± 0.10	0.69 ± 0.19	1.09 ± 0.51	0.58 ± 0.15	1.22 ± 0.56	0.87 ± 0.17
ABCF	0.75 ± 0.16	1.42 ± 0.62	0.95 ± 0.24	0.94 ± 0.10	1.10 ± 0.58	0.88 ± 0.21
F	0.64 ± 0.06	0.90 ± 0.29	0.87 ± 0.14	0.76 ± 0.04	1.64 ± 0.20	0.89 ± 0.23
Liver						
CON	1.01 ± 0.12 ^{ns}	1.04 ± 0.24 ^{ns}	1.36 ± 0.75 ^{ns}	1.00 ± 0.06 ^{ns}	1.18 ± 0.5 ^{ns}	1.01 ± 0.07 ^{ab}
AF	1.26 ± 0.26	6.89 ± 1.74	0.95 ± 0.23	0.95 ± 0.25	1.13 ± 0.44	1.20 ± 0.2 ^{ab}
BF	0.77 ± 0.22	2.76 ± 1.40	0.65 ± 0.06	1.08 ± 0.23	1.04 ± 0.17	0.98 ± 0.33 ^{ab}
CF	0.88 ± 0.30	3.05 ± 0.13	1.31 ± 0.73	1.93 ± 1.11	1.01 ± 0.33	1.23 ± 0.24 ^{ab}
ABF	0.53 ± 0.22	5.17 ± 1.16	2.60 ± 1.93	2.19 ± 1.48	1.19 ± 0.24	0.64 ± 0.29 ^b
BCF	1.05 ± 0.05	2.68 ± 0.57	0.87 ± 0.49	1.25 ± 0.49	0.90 ± 0.33	1.97 ± 0.21 ^a
ACF	1.10 ± 0.14	5.70 ± 1.08	1.19 ± 0.57	1.21 ± 0.47	1.74 ± 1.20	1.95 ± 0.38 ^a
ABCF	1.26 ± 0.45	6.71 ± 0	1.44 ± 0.86	1.60 ± 0.32	0.87 ± 0.25	1.53 ± 0.12 ^{ab}
F	0.99 ± 0.28	1.63 ± 0.04	1.15 ± 0.44	1.67 ± 0.77	0.99 ± 0.45	1.02 ± 0.17 ^{ab}

¹ Values are presented as mean ± SEM (Tukey test at alpha=0.05)²HSP60: Heat shock protein 60³HSP70: Heat shock protein 70⁴HSP90 α : Heat shock protein 90 α ⁵HSP90 β : Heat shock protein 90 β ⁶G6PASE: Glucose 6-phosphatase⁷AMPK- β : Activated protein kinase- β

IV. Discussion

본 연구에 사용된 실험 사료는 넙치 배합사료의 일반적인 함량인 60%의 어분을 사용하였다(Lee J., et al., 2012; Kim H. S., et al., 2014). 실험구는 총 9가지로 건강한 넙치 장내에서 스크리닝한 숙주관련 프로바이오틱스 *Bacillus sonorensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis*와 사전에 가용성을 평가하여 선정된 프리바이오틱스 fructo oligosaccharide (FOS)를 혼합하여 단일, 복합 형태로 구성하였다. 선행 연구에 따르면, 사료 내 *Bacillus* spp.가 나일 틸라피아 *Oreochromis niloticus* (Won et al., 2020), 비단잉어 *Cyprinus rubrofasciatus* (He et al., 2011), 조피볼락 *Sebastes schlegelii* (Jang et al., 2021), 대서양 연어 *Salmo salar* (Wang et al., 2019) 큰징거미새우 *Macrobrachium rosenbergii* (Keysami and Mohammadpour, 2013), 흰다리새우 *Litopenaeus vannamei* (Zokaifar et al., 2012)와 같은 여러 어종의 성장도를 향상시킨 것으로 나타났다. 하지만, 본 연구의 성장도 분석결과 최종무게, 증체율, 일간성장률, 사료효율 및 생존율에서 실험구간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다 ($P > 0.05$). 또한, 형태학적 변화를 측정된 결과 간 중량 지수(HIS), 내장 중량 지수(VSI) 및 비만도(CF)에서 실험구간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다 ($P > 0.05$). 이는, 하이브리드 그루퍼 *pinephelus lanceolatus* ♂ × *E. fuscoguttatus* ♀ (Li et al. 2019), 나일 틸라피아 *Oreochromis niloticus* (Adeoye A. A et al. 2016)와 넙치 *Paralichthys olivaceus* (Kim et al., 2022)의 결과와 유사하다. Kim et al., (2022)은 1.0×10^7 CFU/g *Bacillus* sp. 0.4%의 혼합물을 넙치 사료 내 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 및 0.5% 첨가하여 공급하여 성장도를 분석한 결과, 0.5%

첨가 실험구를 제외한 실험구에서 대조구와 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이는 프로바이오틱스가 숙주의 성장에 영향을 미치는데 용량 의존적 경향이 있음을 나타낸다.

스트레스 요인은 혈액에 다양하고 중대한 영향을 미치며, 이는 급성 수은 노출, 오염 물질에 대한 노출, 기아, 질병, 금속 및 저산소증과 같은 다양한 스트레스 조건에 따라 생리적 변화를 나타낸다(Peres et al., 2015). 따라서, 혈장 내 대사물질 분석은 어류의 생리적 상태와 스트레스 상태를 평가하는 중요한 지표이다. 혈청 효소 활성은 동물 신체에서 진행중인 화학적 과정을 나타낸다. 손상된 조직은 세포막의 투과성 증가로 인해 효소를 혈류로 방출하여 혈청 값의 변화를 일으킨다. glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) 및 glutamic pyruvate transaminase (GPT)는 비특이적 혈청 효소 활성으로 간 염증 과정, 화학 물질 및 지질 과산화에 의해 유발되는 간 손상 지표이다. 또한, 스트레스 상황은 에너지 수요 증가로 인해 혈액 내 GOT 및 GPT 효소 활성을 일으킨다(Lemarie et al., 1991). 본 연구에서 9주간의 사육 실험 종료 후 GOT 및 GPT 분석 결과, 사료 내 신바이오틱스를 첨가한 실험구와 대조구간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이는, HAPs 기반 신바이오틱스가 넙치의 건강에 해로운 영향을 미치지 않는다는 안전성을 의미한다. 하지만, 급성 수은 스트레스를 받은 그룹에서 GOT와 GPT가 급성 수은 스트레스를 받지 않은 그룹에 비해 유의적으로 높게 나타났다($P < 0.05$), 이는 수은 스트레스로 인한 간 손상으로 사료된다. 혈청 내 포도당(glucose, GLU)은 뇌와 같은 필수 기관에 직접적으로 중요한 에너

지원이다(Mergenthaler et al., 2013). 스트레스를 받으면 증가하는 에너지 수요를 충족시키기 위해 혈류에 포도당 형태의 에너지를 공급하는 것은 필수적이며, 간은 이러한 포도당 공급을 위한 포도당 신생합성의 주요 기관이다(Rui., 2014). 본 연구에서 9주간 사육 실험 종료 후 포도당, 총 단백질(total protein, TP), 총 콜레스테롤(total cholesterol, TCHO) 및 중성지방(triglyceride, TG) 분석 결과, 실험구간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 하지만, 급성 수온 스트레스를 받은 그룹에서 GLU가 유의적으로 높게 나타났으며($P < 0.05$), TP, TCHO 및 TG는 유의적으로 낮게 나타났다($P > 0.05$). 이는, Guo et al., 2023의 바머스 잉어 *Luciobarbus capito*를 대상으로 수온 스트레스를 준 결과와 유사하다. 해당 연구에서 바머스 잉어의 수온 스트레스 후 혈장 내 대사물질을 분석한 결과, GOT, GPT 및 GLU가 수온 스트레스를 받지 않은 그룹에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 이러한 결과는 스트레스에 저항하는데 필요한 에너지를 글리코겐 분해와 포도당 대사를 통해 조절하였음을 나타낸다.

코르티졸(cortisol)은 경골어류의 급성 수온 노출에 대한 스트레스 반응으로, 시상하부-교감신경-크로마핀 세포 축(hypothalamic-sympathetic-chromaffin cell axis)과 시상하부-뇌하수체-신장 축(hypothalamic-pituitary-interrenal axis)을 통해 혈류를 통해 방출되어 1차 스트레스 반응을 조율한다(Alfonso et al., 2021). 방출된 코르티졸은 포도당 생성을 통한 에너지 비축량 활용을 통해 어류의 혈당 수치를 증가시키고 필요한 에너지 수요를 제공하여 스트레스 상황에 대처하는데 도움을 준다. 때문에, 코르티졸은 어류의

환경 스트레스에 대한 지표로 광범위하게 사용된다(Gandar et al., 2017). 본 연구에서 9주간의 사육 실험 종료 후 코르티졸 분석 결과, 사료 내 신바이오틱스를 첨가한 실험구와 대조구간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 하지만, 급성 수온 스트레스를 받은 그룹의 코르티졸이 받지 않은 그룹에 비해 유의적으로 높게 나타났다($P < 0.05$). 이는 Zarantoniello et al. 2021의 결과와 유사하다. 도미 *Sparus aurata*를 대상으로 수온 스트레스를 주었을 때, 도미의 코르티졸 농도는 수온 스트레스를 받지 않은 그룹에 비해 유의적으로 높아졌다. 사료 내 미생물 첨가와 수온 스트레스의 상관관계가 어류에게 미치는 영향에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.

상대적 유전자 발현은 사료 내 synbiotics 첨가 사육 실험 종료 후, 수온 스트레스에 노출된 그룹을 대상으로 실시하였다. 분자 질량(kDa)에 따라 명명되는 Heat shock protein (HSP)은 세포의 항상성 유지와 스트레스에 대한 보호를 포함한 다양한 기능을 가지고 있다(Basu et al., 2002). Glucose 6-phosphatase (G6pase)는 주로 간에서 발견되는 효소로 글리코젠 분해과정에서 포도당을 공급하는데 중요한 역할을 한다(Lin et al., 2019). AMP-activated protein kinase (AMPK)는 고도로 보존된 대사의 주요 조절자로서, 세포 및 전체 유기체 모두에서 대사 스트레스 동안의 에너지 균형을 회복한다(Hardie et al., 2016). 본 연구 결과, 수온 스트레스에 노출된 그룹 내 HSP와 G6pase의 상대적 유전자 발현량 분석 결과에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 하지만 AMPK에서는 실험구내에서 유의적인 차이가 나타났는데, 이는 어류 장내 미생물에 의한 식이 지질 대사 조절에 의한 것으로 사료된

다. 해당 조절은 리파제 생산, 담즙산 생산 및 단쇄지방산(shorts chain fatty acid, SCFA) 생산의 세 가지 주요 매커니즘을 통해 이루어지는데, 이 중 단쇄지방산은 장내 미생물에 의한 혐기성 발효의 주요 최종 대사 산물이다. 단쇄지방산은 지질 대사를 조절하는 신호분자이기도 하여, 간의 AMPK 활성화를 나타냈다고 사료된다(Xu et al., 2022; Wu et al., 2023). 현재까지 장내 미생물이 어류의 수온스트레스에 노출되었을 때, 발현하는 유전자에 대한 연구는 부족한 실정이며, 추가적인 연구가 필요하다.



V. Conclusion

본 연구를 통해 치어기 넙치 사료 내 HAPs 기반 신바이오틱스 단일, 복합 첨가가 넙치의 성장 및 생리학적 반응에 부정적인 영향을 미치지 않았음을 확인하였다. 급성 수온 스트레스 노출에서의 상대적 유전자 발현량 분석 결과를 통해 HAPs 기반 신바이오틱스는 AMPK- β 를 제외한 어류의 유전자 발현량에 영향을 미치지 않았다. 하지만, 치명적 수온 노출 결과를 통해 HAPs 기반 신바이오틱스는 어류의 수온 스트레스에 대한 내성을 높여주는 데 잠재적 가능성이 있을 것으로 사료된다. 현재까지 미생물총이 어류의 에너지 항상성과 수온 스트레스에 미치는 영향에 대한 연구는 상대적으로 거의 수행되지 않았다. 향후 연구에서는 미생물총이 어류의 항상성과 수온 스트레스에 미치는 영향 관련 연구 진행시 장내 총균 조사를 제안한다.

VI. Reference

- Adeoye, A. A., Yomla, R., Jaramillo-Torres, A., Rodiles, A., Merrifield, D. L., & Davies, S. J. (2016). Combined effects of exogenous enzymes and probiotic on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth, intestinal morphology and microbiome. *Aquaculture*, 463, 61-70.
- Adhikari, S., Keshav, C. A., Barlaya, G., Rathod, R., Mandal, R. N., Ikmail, S., ... & Sundaray, J. K. (2018). Adaptation and mitigation strategies of climate change impact in freshwater aquaculture in some states of India. *Journal of FisheriesSciences.com*, 12(1), 16-21.
- Alfonso, S., Gesto, M., & Sadoul, B. (2021). Temperature increase and its effects on fish stress physiology in the context of global warming. *Journal of Fish Biology*, 98(6), 1496-1508.
- AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis* (18th ed.), Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
- Basu, N., Todgham, A. E., Ackerman, P. A., Bibeau, M. R., Nakano, K., Schulte, P. M., & Iwama, G. K. (2002). Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, 295(2), 173-183.
- Cavalcante, R. B., Telli, G. S., Tachibana, L., de Carla Dias, D., Oshiro, E., Natori, M.

- M., ... & Ranzani-Paiva, M. J. (2020). Probiotics, Prebiotics and Synbiotics for Nile tilapia: Growth performance and protection against *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture Reports*, 17, 100343.
- Davis, D. J., Bryda, E. C., Gillespie, C. H., & Ericsson, A. C. (2016). Microbial modulation of behavior and stress responses in zebrafish larvae. *Behavioural brain research*, 311, 219-227.
- Ding, J. H., Jin, Z., Yang, X. X., Lou, J., Shan, W. X., Hu, Y. X., ... & Xu, J. Y. (2020). Role of gut microbiota via the gut-liver-brain axis in digestive diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 26(40), 6141.
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The gut microbiota of marine fish. *Frontiers in microbiology*, 9, 873.
- Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P., & Duncan, S. H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 9(10), 577-589.
- Forsatkar, M. N., Nematollahi, M. A., Rafiee, G., Farahmand, H., & Lawrence, C. (2017). Effects of the prebiotic mannan-oligosaccharide on the stress response of feed deprived zebrafish (*Danio rerio*). *Physiology & Behavior*, 180, 70-77.
- Gandar, A., Laffaille, P., Canlet, C., Tremblay-Franco, M., Gautier, R., Perrault, A., ...

& Jean, S. (2017). Adaptive response under multiple stress exposure in fish: from the molecular to individual level. *Chemosphere*, 188, 60-72.

Gatesoupe, F. J. (2007). Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *Microbial Physiology*, 14(1-3), 107-114.

Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, 125(6), 1401-1412.

Guo, K., Zhang, R., Luo, L., Wang, S., Xu, W., & Zhao, Z. (2023). Effects of Thermal Stress on the Antioxidant Capacity, Blood Biochemistry, Intestinal Microbiota and Metabolomic Responses of *Luciobarbus capito*. *Antioxidants*, 12(1), 198.

Hardie, D. G., Schaffer, B. E., & Brunet, A. (2016). AMPK: an energy-sensing pathway with multiple inputs and outputs. *Trends in cell biology*, 26(3), 190-201.

Huynh, T. G., Shiu, Y. L., Nguyen, T. P., Truong, Q. P., Chen, J. C., & Liu, C. H. (2017). Current applications, selection, and possible mechanisms of actions of synbiotics in improving the growth and health status in aquaculture: A review. *Fish & shellfish immunology*, 64, 367-382.

Ibrahem, M. D. (2015). Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the

current status in Egypt and recent prospectives. *Journal of advanced research*, 6(6), 765-791.

Infante-Villamil, S., Huerlimann, R., & Jerry, D. R. (2021). Microbiome diversity and dysbiosis in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 13(2), 1077-1096.

Irianto, A., & Austin, B. (2002). Probiotics in aquaculture. *Journal of fish diseases*, 25(11), 633-642.

Islam, M. J., Kunzmann, A., & Slater, M. J. (2022). Responses of aquaculture fish to climate change-induced extreme temperatures: A review. *Journal of the World Aquaculture Society*, 53(2), 314-366. Pickering, A. D. (1998). Stress responses of farmed fish. *Biology of farmed fish*, 222, 255.

Jang, W. J., Lee, K. B., Jeon, M. H., Lee, S. J., Hur, S. W., Lee, S., ... & Lee, E. W. (2023). Characteristics and biological control functions of *Bacillus* sp. PM8313 as a host-associated probiotic in red sea bream (*Pagrus major*) aquaculture. *Animal Nutrition*, 12, 20-31.

Jang, W. J., Lee, S. J., Jeon, M. H., Kim, T. Y., Lee, J. M., Hasan, M. T., ... & Lee, E. W. (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 Immunology*, 119, 182-192.

- Keysami, M. A., & Mohammadpour, M. (2013). Effect of *Bacillus subtilis* on *Aeromonas hydrophila* infection resistance in juvenile freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture International*, 21, 553-562.
- Kim, H. S., Jung, W. G., Myung, S. H., Cho, S. H., & Kim, D. S. (2014). Substitution effects of fish meal with tuna byproduct meal in the diet on growth, body composition, plasma chemistry and amino acid profiles of juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 431, 92–98.
- Kim, M. G., Gunathilaka, B. E., Shin, J., Lim, H., Lim, J., Lee, S., ... & Lee, K. J. (2022). Evaluation of *Bacillus* sp. SW1-1 as a dietary additive in diets for olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Animal Feed Science and Technology*, 290, 115367.
- Lazado, C. C., Caipang, C. M. A., & Estante, E. G. (2015). Prospects of host-associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions. *Fish & shellfish immunology*, 45(1), 2-12.
- Lee, J., Choi, I. C., Kim, K. T., Cho, S. H., & Yoo, J. Y. (2012). Response of dietary substitution of fish meal with various protein sources on growth, body composition and blood chemistry of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*, Temminck & Schlegel, 1846). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(3), 735–744.
- Lee, W. J., & Hase, K. (2014). Gut microbiota-generated metabolites in animal health

and disease. *Nature chemical biology*, 10(6), 416-424.

Lemaire, P., Drai, P., Mathieu, A., Lemaire, S., Carriere, S., Giudicelli, J., & Lafaurie, M. (1991). Changes with different diets in plasma enzymes (GOT, GPT, LDH, ALP) and plasma lipids (cholesterol, triglycerides) of sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 93(1), 63-75.

Li, J., Wu, Z. B., Zhang, Z., Zha, J. W., Qu, S. Y., Qi, X. Z., ... & Ling, F. (2019). Effects of potential probiotic *Bacillus velezensis* K2 on growth, immunity and resistance to *Vibrio harveyi* infection of hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus*♂ × *E. fuscoguttatus*♀). *Fish & Shellfish Immunology*, 93, 1047-1055.

Lin, Y. S., Saputra, F., Chen, Y. C., & Hu, S. Y. (2019). Dietary administration of *Bacillus amyloliquefaciens* R8 reduces hepatic oxidative stress and enhances nutrient metabolism and immunity against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae* in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & shellfish immunology*, 86, 410-419.

Llewellyn, M. S., Boutin, S., Hoseinifar, S. H., & Derome, N. (2014). Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Frontiers in microbiology*, 5, 207.

Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G. A., & Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in*

neurosciences, 36(10), 587-597.

Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture research*, 41(11), 1553-1573.

Ngoan, L. D. (2018). Effects of climate change in aquaculture: Case study in Thua Thien Hue Province, Vietnam. *Biomed. J. Sci. Tech. Res*, 10, 2018.

Ohashi, Y., & Ushida, K. (2009). Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Animal Science Journal*, 80(4), 361-371.

Peres, H., Costas, B., Perez-Jimenez, A., Guerreiro, I., & Oliva-Teles, A. (2015). Reference values for selected hematological and serum biochemical parameters of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles under intensive aquaculture conditions. *Journal of Applied Ichthyology*, 31(1), 65-71.

Ringø, E. (2011). Evaluation of probiotic strain *Bacillus subtilis* C-3102 as a feed supplement for koi carp (*Cyprinus carpio*).

Roberfroid, M. B. (2005). Introducing inulin-type fructans. *British journal of nutrition*, 93(S1), S13-S25.

Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Comprehensive physiology*, 4(1), 177.

- Sae-Lim, P., Kause, A., Mulder, H. A., & Olesen, I. (2017). Breeding and genetics symposium: Climate change and selective breeding in aquaculture. *Journal of animal science*, 95(4), 1801-1812.
- Sarkar, A., Lehto, S. M., Harty, S., Dinan, T. G., Cryan, J. F., & Burnet, P. W. (2016). Psychobiotics and the manipulation of bacteria–gut–brain signals. *Trends in neurosciences*, 39(11), 763-781.
- Song, S. K., Beck, B. R., Kim, D., Park, J., Kim, J., Kim, H. D., & Ringø, E. (2014). Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. *Fish & shellfish immunology*, 40(1), 40-48.
- Vadstein, O., Bergh, Ø., Gatesoupe, F. J., Galindo-Villegas, J., Mulero, V., Picchiatti, S., ... & Bossier, P. (2013). Microbiology and immunology of fish larvae. *Reviews in Aquaculture*, 5, S1-S25.
- Van Doan, H., Hoseinifar, S. H., Ringø, E., Angeles Esteban, M., Dadar, M., Dawood, M. A., & Faggio, C. (2020). Host-associated probiotics: a key factor in sustainable aquaculture. *Reviews in fisheries science & aquaculture*, 28(1), 16-42.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4), 655-671.

- Wang, C., Liu, Y., Sun, G., Li, X., & Liu, Z. (2019). Growth, immune response, antioxidant capability, and disease resistance of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed *Bacillus velezensis* V4 and *Rhodotorula mucilaginosa* compound. *Aquaculture*, 500, 65-74.
- Won, S., Hamidoghli, A., Choi, W., Park, Y., Jang, W. J., Kong, I. S., & Bai, S. C. (2020). Effects of *Bacillus subtilis* WB60 and *Lactococcus lactis* on growth, immune responses, histology and gene expression in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Microorganisms*, 8(1).
- Wu, S., Pan, M., Zan, Z., Jakovlić, I., Zhao, W., Zou, H., ... & Wang, G. (2023). Regulation of lipid metabolism by gut microbiota in aquatic animals. *Reviews in Aquaculture*.
- Xu, R., Li, M., Wang, T., Zhao, Y. W., Shan, C. J., Qiao, F., ... & Zhang, M. L. (2022). *Bacillus amyloliquefaciens* ameliorates high-carbohydrate diet-induced metabolic phenotypes by restoration of intestinal acetate-producing bacteria in Nile Tilapia. *British Journal of Nutrition*, 127(5), 653-665.
- Zarantoniello, M., Bortoletti, M., Olivotto, I., Ratti, S., Poltronieri, C., Negrato, E., ... & Bertotto, D. (2021). Salinity, temperature and ammonia acute stress response in seabream (*Sparus aurata*) juveniles: A multidisciplinary study. *Animals*, 11(1), 97.
- Zokaeifar, H., Balcázar, J. L., Saad, C. R., Kamarudin, M. S., Sijam, K., Arshad, A., &

Nejat, N. (2012). Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 33(4), 683-689.

