

김치에서 분리한 *Lactococcus lactis* W-44에 의한 감귤발효물의 양식 넙치 성장에 미치는 영향

김민수¹ · 문상욱² · 이영돈³ · 김세재⁴ · 김영진⁵ · 이준원⁶ · 이정희⁷ · 이정숙¹ · 김보연¹ · 안종식¹ · 안순철^{5*}

¹한국생명공학연구원, ²(주)Fermentech, ³제주대학교 해양과환경연구원,
⁴제주대학교 생명과학과, ⁵부산대학교 의과대학 미생물학 및 면역학 교실,
⁶전남대학교 의과대학 유전자제어 의과학연구소, ⁷(주)일해

젓산균을 접종하여 감귤 분쇄액을 발효시켜 얻은 감귤발효물의 어류양식 사료 첨가제로의 가능성을 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 양식에서 검토하였다. 김치에서 항균활성이 우수한 젓산균 W-44를 분리한 후 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 *Lactococcus lactis* W-44로 동정하였다. *L. lactis* W-44를 이용하여 감귤 분쇄액 발효를 수행한 결과, 생리활성이 우수한 무배당체 flavonoids인 naringenin, hesperitin의 함량이 각각 약 10과 6배 증가함을 확인하였다. *L. lactis* W-44를 이용하여 발효된 감귤발효액을 양식넙치의 사료첨가제로 투여한 결과, 감귤발효액을 투여하지 않은 대조구의 평균 전장 및 체중 증가율과 현격한 차이가 있었다. 또한 0.2% (v/v)의 감귤발효액을 투여한 실험군에서 넙치의 성장이 가장 우수한 것으로 나타났다. 이러한 결과로부터 젓산균의 감귤발효산물을 넙치 양식에서 기능성 사료첨가제로 사용할 수 있는 가능성을 확인하였다.

Key words □ citrus fruit, fermentation, flounder cultivation, lactic acid bacteria

국내 양식어업은 1990년대 후반부터 국민의 소득향상을 위하여 생산규모가 대형화되고 있으며, 또한 소비자의 기호변화에 따라 부가가치가 높은 어류를 중심으로 양식품목이 다양화, 고급화되는 추세에 있다. 이 중에서 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 광염성 어류로서 우리나라 전 연안, 쿠릴열도, 일본 및 중국해 연안 등지에 널리 분포하며, 서식온도는 10-27°C 범위이고, 저서에서 서식하는 어류이다(2). 넙치는 조피볼락과 더불어 국내 주요 양식 대상어종으로서 국내 양식 생산량에 대부분을 차지하고 있으며, 2003년의 경우, 제주도의 넙치생산량은 13,000-15,000톤 정도로 추정되고 있다(2, 19). 그러나 근래의 어류 양식은 단위 면적당 생산량이 증가하면서 사육환경이 점차 악화됨에 따라 어체의 내병성 저하로 인하여 연중 질병이 발생하고 있고, 또 이를 방지하기 위해 양식현장에서는 항생물질을 과용함에 따라 그로 인한 내성균 등이 출현함으로써 항생물질의 치료효과가 경감되는 악순환을 반복하고 있는 실정이다. 또한 항생제의 남용은 어체내 흡수되지 않은 약제가 함유된 사육수의 배출과 함께 주변 수역에 대한 2차 오염의 유발 요인이 될 수 있으며, 특히 항생물질의 어체내 잔류 여부에 대한 의혹 때문에 양식 어류의 소비 감소를 초래할 여지가 있다(8). 따라서 이러한 문제점을 해소함과 동시에 양식 어류의 질병 예방, 생리 기능의 향상, 육질 개선 및 성장 촉진을 위한 사료첨가제로서 천연 물질의 발굴에 관한 많은 연구가 진행되었고(11, 13, 22, 25), 최근에는 식물성 생약

제인 구기자, 인삼, 오미자, 허수오(6, 16), 두충차(26), 그리고 한방 사료첨가제인 어보산(12, 16)을 어류에 직접 투여함으로써 면역 증강, 항병력, 성장 촉진 및 육질 개선 등의 효능이 보고되었다.

감귤은 한정된 계절에 생산되어 장기 보존에 많은 경비가 소요되며, 감귤가공 음료나 식품 등의 생산 공정 중에는 상당량의 폐기 부산물이 발생하여 그 처리에도 많은 경비가 소요된다. 감귤 중 과피 부분이 20%를 차지하여 가공 및 생과 이용시 막대한 양의 과피가 나오지만 일부만 사료 또는 한약재로 쓰이고 있을 뿐 대부분은 폐기되는 실정으로 이를 처리해야 하는 문제로서의 활용에 대한 필요성이 대두되고 있는 실정이다(3). 감귤에는 주요 flavonoid 화합물로서 naringin과 hesperidin 그리고 이들의 무배당체인 naringenin과 hesperetin이 있으며 그밖에도 rutin, diosmine, nobiletin, tangeretin 등 약 60여 종의 flavonoid가 함유되어 있다(10, 20, 23). 이들의 생리활성으로는 항산화 작용, 순환기계 질환의 예방, 항염증 작용, 항알레르기 작용, 항암 작용, 항균 작용, 항바이러스 작용, 지질저하 작용, 면역증강 작용, 모세혈관 강화작용 등이 보고되어 있다(1, 4, 9, 18, 24). 식물에 존재하는 대부분의 flavonoid 화합물은 배당체의 형태로서 전체 flavonoid의 50-80%를 차지하며 배당체를 구성하는 당으로는 glucose, arabinose, galactose, rhamnose, xylose 등이 있으며, 대부분 황성물질과 α -1,4나 β -1,4 결합을 하고 있다. 실제 감귤에는 naringin과 hesperidin 등의 배당체 형태로 대부분 존재하며 (3), 이러한 배당체 형태의 naringin과 hesperidin은 무배당체 화합물인 naringenin과 hesperetin에 비해 항산화, 소염, 항암 활성

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-51-240-7735, Fax: 82-51-243-2259
E-mail: ahnsc@pusan.ac.kr

등이 떨어지는 것으로 알려져 있다.

그러나 체내 대사과정을 모방(Microbial Models of Mammalian Metabolism)한 형태로서 *in vitro*에서 효소나 이를 생산하는 미생물을 이용하여 배당체 형태의 생리활성물질 처리할 경우, 무배당체로 전환되어 흡수율과 생리활성을 증가하거나 화학합성이 어려운 화합물이나 전구체를 전환하여 수율을 향상시킬 수 있다는 점을 토대로 하여 감귤에 함유되어 있는 이러한 배당체 형태의 활성물질을 효소 및 효소를 생산하는 생균체를 이용하여 무배당체로 전환시킬 수 있다. 따라서 유용 생균체를 이용하여 천연물을 발효하고 발효산물을 건조분말화 하여 특정 성분의 함량을 증가하거나 추출능을 증가시키고 장내 효과 개선 및 소화 흡수율 등을 높일 수 있을 뿐만 아니라 발효를 통해 원래의 천연물 보다 항산화 활성이 증가되거나 새롭게 생합성된 대사산물의 생리활성을 기대할 수 있다(7). 일반적으로 젖산균들은 식용 가능하고, 항균활성과 면역증강, 소화력 증진 등의 다양한 생리활성이 있음이 밝혀지면서 생균제로서 축산이나 어류 양식에 광범위하게 사료첨가제로 이용되고 있으며 젖산균들의 사료첨가제로서의 성장촉진이나 질병의 예방에 대한 다양한 생리적 효과들이 입증되고 있다. 또한 젖산균은 당쇄분해효소를 분비하여 식물체의 배당체 생리활성물질을 무배당체로의 전환시켜 동물체 내에서 이러한 생리활성물질의 흡수와 생리활성의 증진을 촉진한다는 보고가 되면서 젖산균 생균제로 사료첨가제의 활용성과 젖산균을 이용한 과채류 발효산물의 사료첨가제로의 이용성이 증가하고 있다(19, 25).

따라서 이러한 특성을 갖는 젖산균을 김치에서 분리하여 확보하고 이 젖산균을 이용하여 감귤의 분쇄물을 발효시켜 이를 양식 넘치의 사육시 사료첨가제로 사용하여 넘치의 성장률에 미치는 영향을 조사함으로써 젖산균에 의한 감귤발효물의 사료첨가제로서의 가능성을 확인하고자 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

항균활성을 갖는 젖산균의 분리 및 동정

전국 각지에서 여러 종류의 김치 및 기타 전통 발효식품 등의 시료를 수집하고 밀봉하여 냉장 운반하였다. 수집 후, 24시간 이내에 멸균된 생리식염수로써 10배수로 연속 희석한 시료 100 μ l를 항진균제인 nystatin을 함유한 배지에 도말하여 균체가 나타날 때까지 30°C 항온기에서 배양하였다. 젖산균을 다양하게 분리하기 위해 젖산균 배지인 MRS agar 배지와 젖산균 선택배지(17)를 사용하였다. 분리된 젖산균 중에서 항균활성이 우수한 젖산균을 선별한 후에 생리학적 특성과 16S rDNA의 28에서 1,524번 염기까지의 1,497 bp 염기서열을 분석한 후 CLUSTAL W software (EBI, UK)로 비교하고 최종 동정하였다(27).

항균활성 조사 및 항균력 측정

일차적으로 분리된 젖산균의 배양액을 대상으로 변형된 spot-on-the-lawn method (5)를 사용하여 항균활성 여부를 조사하였다. 분리된 균주를 MRS 액체 배지에 2회 계대하여 30°C에서 16-18

시간 배양한 후 배양액을 고체배지에 3 μ l 점적하고 30°C에서 18시간 배양하였다. Colony가 형성되면 액체배지에서 배양한 시험균을 5×10^6 - 5×10^7 CFU/ml로 접종한 MRS soft agar (MRS+ agar 0.7%) 배지 8 ml을 부어 균한 다음 지시균에 따른 적정 배양온도에서 배양한 후, spot 주위에 발생하는 생육 저지환의 크기로써 항균활성을 여부를 조사하였다.

선정된 젖산균의 항균력은 well-diffusion assay 방법으로 조사하였다(5). 시험균이 1% 함유된 MRS soft agar (0.7%) 배지에 직경 8 mm의 well을 만들고 일차적으로 분리된 젖산균의 배양액 100 μ l를 가하여 각 시험균의 최적온도에서 18시간 배양하여 well 주위의 나타나는 생육 저지환의 크기에 따라 젖산균의 항균활성을 조사하였다. 또한, 항균활성을 나타내는 젖산균의 배양상등액에 1 N NaOH를 가하여 중화하거나 α -chymotrypsin, trypsin, protease type IX 및 type XIV 등의 단백질을 분해효소를 처리한 뒤, 시험균에 대한 항균활성을 조사하여 항균활성 물질이 젖산, 유기산 또는 단백질성 여부를 확인하였다.

미생물 발효에 의한 감귤 발효물 제조

제주도 남제주군 가시리 소재(23년생 일반조생, 궁천)에서 무농약 재배법에 의해 재배된 감귤을 구입하여 사용하였다. 이 때, 감귤의 평균 당도는 11.0 Brix, 산도는 0.85이었으며, 감귤은 미생물 발효에 적합하도록 분쇄기로 완전 분쇄하고, 실험에 사용될 때 까지 -20°C에서 보관하였다. 젖산균 발효를 위한 기본 배지로는 MRS (Difco, USA)배지를 사용하였고, 감귤 분쇄액은 필요에 따라 농도를 조절하여 첨가하였다. *L. lactis* W-44의 배양은 50 ml의 MRS가 첨가된 250 ml Erlenmeyer flask에서 18시간 중배양한 후, 이를 200 ml MRS가 첨가된 250 ml Erlenmeyer flask에서 28°C에서 150 rpm으로 진탕 배양하였으며, 세포의 성장은 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 나타내었다. 젖산균의 보관용 배지는 agar 1.5% (w/v)가 포함된 MRS 한천고체배지를 사용하였고, 4주마다 동일한 배지를 이용하여 계대 배양하였다.

Flavonoid의 분석 및 정량

효소 전처리액에서 제주감귤의 주요 생리활성 성분인 flavonoid의 함량을 비교하기 위하여 동량의 methanol (MeOH)을 넣어 2시간 동안 초음파로 추출한 뒤, 진공 건조기로 건조하였다. MeOH 추출물을 증류수에 현탁한 후 chloroform, butanol로 순차적으로 추출하여 분획하고 각 분획물을 완전히 건조시킨 후 MeOH을 이용하여 5 mg/ml, 1 mg/ml의 용액을 만들고 일정량을 취하여 high performance liquid chromatography (HPLC)하였다. 무배당체의 naringenin과 hesperetin의 함량을 측정하기 위한 HPLC 분석조건으로는 Shimadzu LC-6A (Shimadzu, Japan), YMC ODS-18 (4.6 \times 250 mm, S-4 μ m, YMC, Japan) column, 0.01% trifluoroacetic acid (Sigma Co., USA)가 함유된 30% acetonitrile (Merck Co., Germany) 수용액, 유속 1.0 ml/min이었으며 photodiode array (Shimadzu, Japan)가 장치된 검출기로 분석하였다(21). 무배당체 flavonoid 표준 시료로 naringenin (Sigma Co., USA)과 hesperetin (Sigma Co., USA)을 구입하여 위와 같

은 HPLC 조건에서 분석하였다. HPLC 검출기를 통해 얻은 flavonoid의 농도에 따른 peak의 면적을 측정하여 분석한 시료의 수치와 비교하여 그 함량을 환산하였다.

실험어 및 사육환경

실험에 사용된 넙치 치어는 제주도 내 넙치양식장에서 종묘 생산한 치어로 제주대학교 해양과환경연구소로 운반한 후 실험에 사용하였다. 실험어는 실험개시 전, 평균 전장 8.94±1.04 cm, 체중 8.5±2.94 g을 사용하였다. 실험어는 각 115 마리씩 약 2 ton (φ 150×100 cm) 규모의 원뿔형 FRP 수조에서 7일간 순치시킨 다음 사용하였다. 실험용 사료는 시판의 넙치용 배합사료에 감귤 발효액을 0.02-10% 첨가하여 혼합시켜 제조하였다. 일간 사료 투여량은 어체중의 1.0%를 2-3회/일 공급하면서 16주 간 투여하였다. 감귤 발효액을 첨가하지 않은 사료를 같은 방법으로 투여하여 대조군으로 하였다. 수조 내 수량은 1 ton이었으며, 1일 15-18회 환수시켰다. 실험 기간 중에 수온, 용존산소량(DO-meter, DO-14P), pH (pH-meter, HM-12P), 염분은 광학염분계(S/Mill-E, ATAGO)를 사용하여 1일 간격으로 측정하였다.

결과 및 고찰

항균활성을 갖는 젖산균의 분리 및 동정

김치에서 젖산균 배지인 MRS agar를 사용하여 분리한 총 600주의 젖산균의 배양액을 대상으로 변형된 spot-on-the-lawn method (5)를 사용하여 항균활성을 조사하여 항균활성이 가장 강한 균주인 W-44를 최종 선정하였다. 최종 선정된 균주 W-44는 구균으로, 크기는 0.6-0.7×1.1-1.55 μm 이었다. 또한 W-44의 16S rDNA의 28에서 1524번 염기까지의 1,497 bp의 염기서열을 분석하여 이를 젖산균 16S rDNA 염기서열과 CLUSTAL W software (EBI, UK)로 비교한 후, evolutionary distance 및 phylogenetic tree를 작성한 결과 *Lactococcus lactis* ATCC19435 및 *Lactococcus lactis* ATCC19257과 각각 100, 99.4% 일치하는 것을 확인하고, 최종적으로 *L. lactis* W-44로 명명하였다(Fig. 1).

***L. lactis* W-44의 항균활성**

L. lactis W-44 균주가 생산하는 항균활성 범위를 조사하기 위해 well-diffusion assay 방법으로 배양 상등액을 시험균에 대한 항균작용을 조사하여 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 조사된 시험균 중에서 *Lactobacillus* 중 8개 균주, *Leuconostoc* 중 5개 균주 및 *Pediococcus* 중 한 균주가 상등액에 의해 생육이 억제되었다. 조사된 병원성균과 부패균 중 *Listeria monocytogenes* KCTC 3710을 제외한 *Candida albicans* KCTC 1940, *Bacillus subtilis* KCTC 1013 및 *Staphylococcus aureus* KCTC 1928에 대해서는 항균활성이 없는 것으로 나타나 그람 양성세균에만 항균활성을 있음을 확인하였다. 또한 *L. lactis* W-44 배양액을 단백질 분해효소인 α-chymotrypsin을 처리하여 항균활성을 조사한 결과, 항균활성이 사라지는 것으로 보아 *L. lactis* W-44가 생산하는 항균물질은 peptide 계열로 예상된다.

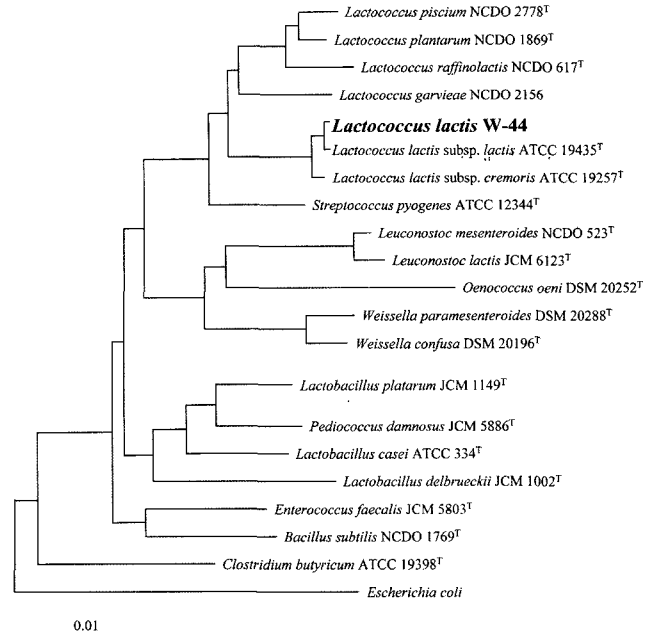


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the position of *L. lactis* W-44. Scale bar represents 0.01 substitution per nucleotide position.

Table 1. Antimicrobial spectrum of *L. lactis* W-44

| Test microorganisms | Antimicrobial activity |
|--|------------------------|
| <i>Lactobacillus brevis</i> subsp. <i>brevis</i> KCTC 3498 | + |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3099 | +++ |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> MT-13 | + |
| <i>Lactobacillus viridescens</i> KCTC 3504 | ++ |
| <i>Lactobacillus parabuchineri</i> KCTC 3503 | +++ |
| <i>Lactobacillus vaginalis</i> KCTC 3515 | + |
| <i>Lactobacillus confusus</i> KCTC 3499 | ++ |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> KCTC 3510 | +++ |
| <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> KCTC 3531 | ++ |
| <i>Leuconostoc carnosum</i> KCTC 3525 | + |
| <i>Leuconostoc lactis</i> KCTC 3528 | ++ |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC 3100 | +++ |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> supsp. <i>dextranicum</i> KCTC 3530 | ++++ |
| <i>Pediococcus dextrinicus</i> KCTC 3506 | ++++ |
| <i>Listeria monocytogenes</i> KCTC 3710 | ++ |
| <i>Staphylococcus aureus</i> R209 KCTC 1928 | - |
| <i>Escherichia coli</i> KCTC 1924 | - |
| <i>Bacillus cereus</i> KCTC 1013 | - |
| <i>Candida albicans</i> KCTC 1940 | - |

+, weak; ++, middle; +++, strong; +++++, very strong; -, none

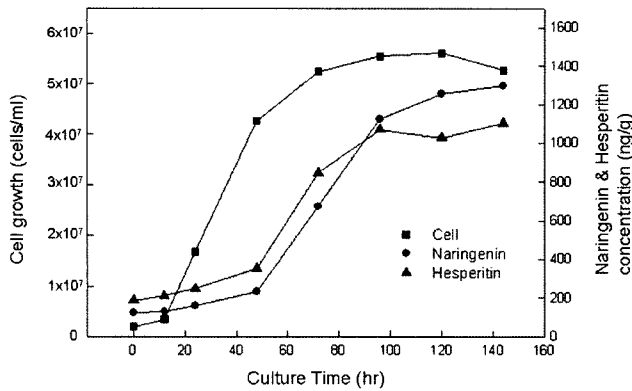


Fig. 2. Changes in the composition of naringenin and hesperitin in the citrus (*Citrus sinensis*) fruit fermented by *L. lactis* W-44.

L. lactis W-44 발효에 의한 감귤 내 naringenin과 hesperetin 함량 변화

감귤 분쇄액을 MRS 배지에 10% (v/v) 되도록 첨가하여, 가압 멸균한 후, 종배양된 *L. lactis* W-44를 접종하여 28°C에서 150 rpm으로 진탕 배양하여 감귤 발효를 수행하였다. Naringenin과 hesperitin의 함량은 *L. lactis* W-44의 접종 시점에서 124, 188 ng/g였으나, 배양 7일 후에는 1295, 1105 ng/g으로 기존의 함량보다 10.4배, 5.9배 증가하였다(Fig. 2). 또한 naringenin과 hesperitin의 함량은 *L. lactis* W-44의 세포 성장이 끝나는 exponential phase 말기부터 증가하기 시작하였으며, 이는 배지내 존재하는 탄소원이 고갈되고 동시에 배당체 flavonoid에 결합되어 있는 당류를 탄소원으로 사용하기 때문인 것으로 예상된다.

감귤발효물 첨가사료의 양식넙치 성장 효과

L. lactis W-44로 발효된 감귤발효물(0.02-10%, v/w)을 첨가한 사료를 투여하여 16주간 사육하면서 매 4주 간격으로 체중 및 전장을 측정하여 Table 2와 3에 표시하였다. Table 2의 결과에 나타난 바와 같이 실험 종료 후, 감귤발효물을 첨가하지 않은 대조구의 전장은 15.9±1.8 cm로 177%의 성장률을 나타낸 반면, 0.2%의 감귤발효물을 첨가한 실험구에서는 15.8±1.9-16.6±1.8 로서 178-186%의 성장률을 나타냄으로써 대조구에 비해 4.5% 정도 더 높은 성장효과를 나타내었다. 또한 체중의 경우, Table 3에 표시한 것처럼 대조구는 최종 50.5±16.9 g으로 579%의 성장을 나타낸 반면, 0.2%의 감귤발효물을 첨가한 실험구에서는 최대 700%의 넙치 성장률을 나타냄으로써 대조구에 비해 20.9% 정도 더 높은 성장효과를 나타내었다. 한편, 어체 폐사율의 경우 실험시작시 사용한 치어수에 대비하여 대조구는 13%, 각 실험구에서는 9-15%로 각 실험구 별로 약간의 차이는 있었으나(자료 미제시), 대조구에 비해 큰 차이가 없는 것으로보아 감귤발효물의 투여로 인한 독성 여부는 없는 것으로 사료된다. 이와 같이 감귤발효물에 의한 양식넙치의 생육 촉진효과는 *L. lactis* W-44의 균체와 이 균에 의한 항균활성, 감귤 과피내 활성형 flavonoids 및 다량의 비타민 등에 기인한 것으로 예상되며, 이러한 결과는 본 실험에 사용된 감귤발효물이 양식넙치의 성장에 우수한 기능성 사료첨가제라는 사실을 시사하고 있다.

따라서 본 실험에서 넙치 양식실험을 통하여 검증된 젖산균에 의해 발효된 감귤 발효물을 사용하여 넙치 양식어를 생산하는 경우, 현행 양식업 기술의 향상 및 경제적 가치의 증가에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

Table 2. Changes of total length of *Paralichthys olivaceus* by oral administration of citrus fruit fermented by *L. lactis* W-44

| Treatment concentration (%) | Total length (cm) | | Growth rate (%) | Relative growth rate (%) |
|-----------------------------|-------------------|------------|-----------------|--------------------------|
| | Initial | Final | | |
| Control | 9.00±1.01 | 15.94±1.85 | 177 | 100.0 |
| 0.02 | 8.87±1.05 | 15.79±1.89 | 178 | 100.6 |
| 0.1 | 8.98±1.05 | 16.42±1.88 | 183 | 102.8 |
| 0.2 | 8.92±1.00 | 16.61±1.75 | 186 | 104.5 |
| 10 | 8.92±1.10 | 15.94±1.72 | 178 | 100.6 |

Table 3. Changes of body weight of *Paralichthys olivaceus* by oral administration of citrus fermented by *L. lactis* W-44

| Treatment concentration (%) | Average body weight (g) | | Growth rate (%) | Relative growth rate (%) |
|-----------------------------|-------------------------|-------------|-----------------|--------------------------|
| | Initial | Final | | |
| Control | 8.71±2.89 | 50.47±16.91 | 579 | 100.0 |
| 0.02% | 8.40±2.95 | 48.84±16.51 | 581 | 100.3 |
| 0.1% | 8.61±3.11 | 58.06±19.42 | 674 | 116.4 |
| 0.2% | 8.34±2.64 | 58.41±16.49 | 700 | 120.9 |
| 10% | 8.44±3.09 | 49.24±15.58 | 583 | 100.7 |

감사의 글

이 연구는 산업자원부 지역산업기술개발사업의 공통기술개발사업(과제번호 10021907)의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. Cha, J.Y., S.Y. Kim, S.J. Jeong, and Y.S. Cho. 1999. Effects of hesperitin and naringenin on lipid concentration in orotic acid treated mouse. *Kor. J. Life Science* 9, 389-394.
2. Chung, M.K. 1991. The fish of Korean, p. 727. Iljisa Pub. Co., Seoul.
3. Eun, J.B., Y.M. Jung, and G.J. Woo. 1996. Identification and determination of dietary fibers and flavonoids in pulp and peel of Korean tangerine (*Citrus aurantium* var.). *Kor. J. Food Sci. Technol.* 28, 371-377.
4. Frydoonfar, H.R., D.R. McGrath, and A.D. Spigelman. 2003. The variable effect on proliferation of a colon cancer cell line by the citrus fruit flavonoid naringenin. *Colorectal Dis.* 5, 149-152.
5. Harris, L.J., M.A. Daeschel, M.E. Stiles, and T.R. Klaenhammer. 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 52, 384-387.
6. Hwang, M.H., S.I. Park, and Y.C. Kim. 1999. Effect of dietary herb medicinal stuff on the non-specific immune response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Fish. Pathol.* 12, 7-14.
7. Izumi, T., M.K. Piskula, S. Osawa, A. Obata, K. Tobe, M. Saito, S. Kataoka, Y. Kubota, and M. Kikuchi. 2000. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J. Nutrition* 130, 1695-1699.
8. Jung, S.H., J.S. Lee, H.K. Han, C.Y. Jun, and H.Y. Lee. 2002. Effects of medicinal herb extract on non-specific immune response, hematology and disease resistance on olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, by oral administration. *J. Fish Pathol.* 15, 25-35.
9. Kawaguchi, K., T. Mizuno, K. Aida, and K. Uchino. 1999. Hesperidin as an inhibitor of lipase from porcine pancreas and *Pseudomonas*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 102-104.
10. Kawaii, S., Y. Tomono, E. Katase, K. Ogawa, and M. Yano. 1999. Quantification of flavonoid constituents in citrus fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3565-3571.
11. Kim, D.S., C.H. Noh, S.W. Jung, and J.Y. Jo. 1998. Effects of obosan supplemented diet on growth, feed conversion ratio and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Aquacult.* 11, 83-90.
12. Kim, D.S., J.H. Kim, C.H. Jeong, S.Y. Lee, S.M. Lee, and Y.B. Moon. 1998. Utilization of Obosan (dietary herb) I. Effects on survival, growth, feed conversion ratio and condition factor on olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Aquacult.* 11, 213-221.
13. Kim, K.H., Y.J. Hwang, and S.K. Chun. 1999. Resistance to *Vibrio alginolyticus* in juvenile rockfish (*Sebastes schlegelii*) fed diets containing different doses of aloe. *Aquaculture* 180, 13-21.
14. Kim, M.J., S.C. Chung, and C.B. Song. 2004. Effect of Salinity on Growth and survival of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Korean J. Ichthol.* 16, 100-106.
15. Kwon, M.G., Y.C. Sohn, and S.I. Park. 1999. The dietary supplementing effects of Kugija, *Lycium chinense*, on immune response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Fish. Pathol.* 12, 73-81.
16. Lee, K.H., Y.S. Lee, J.H. Kim, and D.S. Kim. 1998. Utilization of obosan (dietary herb) II. Muscle quality of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed with diet containing obosan. *J. Aquacult.* 11, 319-325.
17. Miyao, S. and T. Ogawa. 1998. Selective media for enumerating lactic acid bacteria groups from fermented pickles, Shouhin Kogyo. *Gakkaishi* 35, 610-617.
18. Monforte, M.T., A. Trovato, S. Kirjavaninen, A.M. Forestieri, and E.M. Galati. 1995. Biological effect of hesperidin, a citrus flavonoid. *Farmaco.* 50, 595-599.
19. Moon, S.W., S.H. Kang, Y.J. Jin, J.G. Park, Y.D. Lee, Y.K. Lee, D.B. Park, and S.J. Kim. 2004. Fermentation of *Citrus unshiu* Marc. and Functional Characteristics of the Fermented Products. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 36, 669-676.
20. Mouly, P.P., C.G. Arzouyan, E.M. Gaydou, and J.M. Estienne. 1994. Differentiation of citrus juices by factorial discriminant analysis using liquid chromatography of flavanone glycosides. *J. Agric. Food Chem.* 42, 70-79.
21. Oliveira, E.J. and D.G. Watson. 2000. Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of the metabolism of drugs and other xenobiotics. *Biomed. Chromatogr.* 14, 351-372.
22. Park, S.W., J.K. Kwak, J.G. Koo, and M.J. Cho. 2001. Effects of glucan from *Schizophillum commune* on non-specific immune parameters in common carp (*Cyprinus caprio*) and flounder (*Paralichthys olivaceus*) by oral administration. *J. Kor. Fish Soc.* 34, 412-418.
23. Rousff, R.I., S.F. Martin, and C.O. Youtsey. 1987. Quantitative survey of narirutin, naringin, hesperidin, and neohesperidin in citrus. *J. Agric. Food Chem.* 35, 1027-1030.
24. Sohn, J.S. and M.K. Kim. 1998. Effects of hesperidin and naringin on oxidative capacity in the rat. *Korean Nutr. Soc.* 3, 687-696.
25. Song, Y.B., S.W. Moon, and Y.D. Lee. 2002. Effect of EM-fermented orange in commercial diet on growth of juvenile flounder. *J. Aquacult.* 15, 103-110.
26. Tamimoto, S.Y., K. Koike, and S. Takahashi. 1993. Improvement of boiled meat texture of cultured eel by feeding of tochu leaf powder. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 7, 325-327.
27. Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271.

(Received March 6, 2007/Accepted April 24, 2007)

ABSTRACT : Effect of Citrus Fermented by *Lactococcus lactis* W-44 Isolated from Kimchi on Growth of Cultured Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Min Soo Kim¹, Sang Wook Moon², Young Don Lee³, Se Jae Kim⁴, Yeong Jin Kim⁵, Jun Won Lee⁶, Jeong Hee Lee⁷, Jung Sook Lee¹, Bo Yeon Kim¹, Jong Seog Ahn¹, and Soon Cheol Ahn^{5*} (¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, ²Fermentech Co., ³Marine and Environment Research Institute, Cheju National University, ⁴Department of Biological Science, Cheju National University, ⁵Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine, Pusan National University, ⁶Medical Research Center For Gene Regulation, Medical School, Chonnam National University, ⁷Il Hae Co.)

We evaluated the use of citrus fruit fermented by lactic acid bacteria, as a feed supplement for flounder (*Paralichthys olivaceus*) cultivation. For the fermentation, a lactic acid bacterial strain W-44 showing antibacterial activity was isolated from kimchi. From the phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequence, the strain W-44 was identified as *Lactococcus lactis*. After the fermentation of citrus fruit with *L. lactis* W-44, the contents of naringenin and hesperetin, bioactive flavonoid aglycones, were increased about ten-fold and six-fold, respectively. The effects of fermented citrus fruit-based feed additives (CFBFA) were tested on the growth of flounder, *Paralichthys olivaceus*. There were significant differences in average total length and body weight between the experimental and control group. The growth rate of the experimental group fed with the 0.2% CFBFA-supplemented diet was increased 4.5% and 20.9% more than the control group in total length and body weight, respectively. These results suggest that the fermented citrus fruit could be used as a functional feed additive for flounder cultivation.