

Bacillus subtilis 발효대두박의 사료 내 첨가가 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)의 성장, 면역력 및 질병저항성에 미치는 영향

김수환 · 이초롱 · 장경훈¹ · 배준영¹ · 조성준¹ · 임세진² · 이경준*

제주대학교 해양생명과학과, ¹CJ BLOSSOM PARK 소재연구소, ²네오엔비즈

Effect of Fermented Soybean Meal by *Bacillus subtilis* in Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Diets on Growth Performance, Innate Immunity and Disease Resistance

SooHwan Kim, Chorong Lee, Kyunghoon Chang¹, Junyoung Bae¹, Seong-Jun Cho¹, Se-Jin Lim² and Kyeong-Jun Lee*

Department of Marine Life Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

¹CJ BLOSSOM PARK, Life Ingredient and Material Institute, Suwon 63243, Korea

²Neo Environmental Business Co., Dangjin 16495, Korea

A feeding trial was conducted to evaluate the effect of dietary supplementation with fermented soybean meal by *Bacillus subtilis* (BFSBM) on growth performance, feed utilization, innate immunity, water quality, and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. A basal fish meal-based diet was regarded as a control and two other diets were prepared by replacing 30% fish meal with either soybean meal (SBM) or BFSBM. Triplicate groups of shrimp (0.80 ± 0.010 g) were fed one of the experimental diets for 6 weeks. No differences were found in final body weight, feed conversion ratio, or survival among all dietary treatments after the feeding trial. Shrimp fed the BFSBM diet had significantly higher phagocytic and phenoloxidase activities than those of shrimp fed the SBM diet. Total ammonia concentrations in culture water during a zero water exchange test tended to decrease in tanks where BFSBM diet was provided. Disease resistance of shrimp to *Vibrio harveyi* tended to increase in the BFSBM group during 14 days of challenge compared to that in the control (CON) and SBM groups. These results show that dietary supplementation with BFSBM can enhance the innate immunity of Pacific white shrimp and replace at least 30% of dietary fish meal.

Key words: Pacific white shrimp, Fermented soybean meal, *Bacillus subtilis*

서론

세계 수산양식 생산량은 지속적으로 증가하고 있으며, 새우 양식 생산량 또한 급속한 증가 추세를 보이고 있다. 그 중 흰다리새우는 가장 많이 양식되는 주요 양식 종으로 전세계적으로 양식 생산량은 2004년에 15만 4천여톤에서 2013년도에는 331만 4천톤으로 10년 만에 약 2,200%의 성장률을 기록하였다(FAO, 2013). 국내 흰다리새우 양식 생산량은 2006년 661톤에서 2014년도에는 4,488톤으로 8년 만에 약 680%의 성장률을 보이고 있다(NIFS, 2015).

흰다리새우의 양식 생산량이 증가함에 따라 새우사료 내 주요

단백질원인 어분(fish meal)의 수요량 또한 급속하게 증가하였다(Sookying and Davis, 2011). 어분은 높은 함량의 조단백질과 균형있는 필수아미노산 조성으로 새우사료에서 주 단백질원으로 사용되고 있다(Davis and Arnold, 2000). 그러나, 자원 남획으로 인하여 어분의 공급량이 침체되고, 수요와 가격은 급격하게 상승하여, 어분을 대체할 수 있는 대체단백질원의 발굴이 시급한 상황에 이르렀다(Kureshy and Davis, 2002; Amaya et al., 2007).

사료 내 어분 첨가량을 최소화하기 위한 식물성 단백질원에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 대두박은 어분에 비해 값이 1/4정도로 저렴할 뿐만 아니라, 비교적 고단백과 적절한 아미노

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2017.0008>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 50(1) 008-014, February 2017

Received 22 December 2016; Revised 13 February 2017; Accepted 16 February 2017

*Corresponding author: Tel: +82. 64. 754. 3423 Fax: +82. 64. 756. 3493

E-mail address: kjlee@jejunu.ac.kr

산 균형으로 대부분의 양식 사료에 사용되고 있다(Suárez et al., 2009). 그러나, 대두박은 어분과 비교하였을 때, 필수아미노산인 메티오닌과 라이신의 함량이 매우 낮고, 트립신 저해인자와 같은 항영양 인자가 다량 함유되어 있다는 단점이 있다(Zhou et al., 2011). 이러한 대두박의 단점을 보완하기 위해 최근에는 분리대두단백(soy protein isolate), 농축대두단백(soy protein concentrate), 발효대두박과 같은 식물성단백질 사료원의 가공 방법에 관한 연구가 진행되고 있다(Paripatananont et al., 2001; Alam et al., 2005; Shiu et al., 2015). 특히, 발효대두박은 프로바이오틱(probiotics) 식품으로써 된장, 낫토(Natto) 등으로 널리 알려져 있다. 프로바이오틱은 유용 균주를 이용하여 숙주의 성장, 사료효율, 소화율 및 면역력에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며(Ziaei-Nejad et al., 2006; Chiu et al., 2007), 트립신 저해인자 감소 등의 영양학적인 이점이 있는 것으로 보고되었다(Kiers et al., 2003; Feng et al., 2007). *B. subtilis*는 프로바이오틱 균주 중 하나로써, 새우의 성장률, 항산화 효과, 비특이적 면역력 및 *Vibrio* 균에 대한 질병저항성을 높이는 것으로 보고되었다(Balcázar and Rojas-Luna, 2007; Liu et al., 2009; Tseng et al., 2009). 따라서 본 연구에서는 *B. subtilis*로 발효시킨 대두박의 새우 사료 내 사용 가능성을 알아보기 위해 흰다리새우를 대상으로 성장률, 사료효율, 비특이적면역력 및 *V. harveyi*의 인위적 감염에 대한 질병저항성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험사료

사양시험을 위하여 총 3개의 시험사료가 제작되었으며(Table 1), 실험에 사용된 발효대두박은 CJ제일제당주식회사 소재연구팀으로부터 제공받았다. 실험구의 비교 차이를 높이기 위해 실험사료 내 어분의 함량을 28%로 줄이면서, 대두박과 *B. Subtilis* 발효대두박을 각각 20.1, 17.5% 함량으로 첨가하여 실험 사료를 제작하였다(CON, SBM, BFSBM). 실험사료는 사료원들을 혼합기에 넣어 섞은 다음, 어유를 첨가한 뒤 사료원 총 중량의 10%에 해당하는 증류수를 첨가하여 모든 사료원을 상업용 믹서기(NVM-14-2P, Gyeonggido, Korea)를 사용하여 혼합 후 펠렛 성형기(SP-50, Daegu, Korea)를 사용하여 직경 2-3 mm 크기로 압출 성형하였다. 제작된 실험 사료는 동결건조기로 -40°C에서 24시간 건조시킨 후, 사료공급 전까지 -20°C 냉동고에 보관한 후 실험에 사용하였다.

실험생물 및 사육 관리

실험에 사용된 흰다리새우는 당진에 위치한 새우양식장에서 제공받아 제주대학교 양어사료영양학연구실 내 새우전용 사양 실험 시설에서 진행하였다. 실험 새우는 실험환경 적응을 위해 시판되는 배합사료를 공급하면서 2주간 순치시킨 후 사양실험에 사용되었다. 예비사육 후 새우(초기평균무게: 0.80 ± 0.010

Table 1. Formulation and proximate composition of the experimental diets for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (% of DM basis)

| Ingredients | Experimental diets | | |
|---------------------------------------|--------------------|------|-------|
| | CON | SBM | BFSBM |
| Anchovy fish meal (Peru) | 42.4 | 28.0 | 28.0 |
| SBM ¹ | 0.0 | 20.1 | 0.0 |
| BFSBM ² | 0.0 | 0.0 | 17.5 |
| Wheat gluten | 2.0 | 3.0 | 3.0 |
| Squid liver meal | 12.0 | 12.0 | 12.0 |
| Wheat flour | 27.0 | 19.0 | 19.0 |
| Starch | 11.2 | 11.1 | 13.6 |
| Fish oil | 1.4 | 2.8 | 2.9 |
| Mineral mix ³ | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Vitamin mix ⁴ | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Choline chloride | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| Calcium phosphate | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| Proximate composition (dry matter, %) | | | |
| Crude protein | 40.4 | 40.9 | 40.9 |
| Crude lipid | 8.5 | 8.9 | 8.8 |
| Crude ash | 11.7 | 10.4 | 10.2 |
| Moisture | 8.3 | 8.4 | 8.3 |

¹SBM, Soybean meal. ²BFSBM, fermented SBM with *B. subtilis*. ³Mineral premix (g kg⁻¹ of mixture): MgSO₄·7H₂O, 80.0; NaH₂PO₄·2H₂O, 370.0; KCl, 130.0; Ferric citrate, 40.0; ZnSO₄·7H₂O, 20.0; Ca-lactate, 356.5; CuCl, 0.2; AlCl₃·6H₂O, 0.15; Na₂Se₂O₃, 0.01; MnSO₄·H₂O, 2.0; CoCl₂·6H₂O, 1.0. ⁴Vitamin premix (g kg⁻¹ of mixture): L-ascorbic acid, 121.2; DL- α tocopheryl acetate, 18.8; thiamin hydrochloride, 2.7; riboflavin, 9.1; pyridoxine hydrochloride, 1.8; niacin, 36.4; Ca-D₃-pantothenate, 12.7; myo-inositol, 181.8; D₇-biotin, 0.27; folic acid, 0.68; p-aminobenzoic acid, 18.2; menadione, 1.8; retinyl acetate, 0.73; cholecalciferol, 0.003; cyanocobalamin, 0.003.

g)는 총 9개의 96 L 수조에 각 20마리씩 무작위로 선택하여 배치하였다. 사료공급 실험은 실험구당 3반복구를 두었으며, 모든 실험수조에 용존산소 유지를 위하여 에어스톤을 설치하였다. 사양실험 기간의 광주기는 형광등을 이용하여 12L:12D 조건으로 유지되었고, 모든 실험은 지수식 시스템을 이용하여 실시되었으며 사육수는 4-5일마다 환수하였다. 사육수온은 29-32°C, 평균 용존산소량은 6.6 ± 0.4 mgL⁻¹, pH는 6.3 ± 1.0 , 염분은 30 psu 범위로 유지되었다. 사료공급은 1일 3회(08:30, 14:30, 20:30)에 나누어 6주 동안 새우 체중의 8-14%로 제한 공급을 하였다.

성장조사 및 샘플수집

무게 측정은 매 2주마다 실시하였으며, 성장도를 조사하기 위

하여 18시간 절식시킨 후 전체 새우 무게를 측정하였다. 최종 무게측정 후, 혈액분석을 위해 각 수조당 8마리의 새우를 무작위로 선별하여 얼음물에 마취시킨 후, Alsever's 용액(Alsever's solution, Sigma)이 처리된 주사기를 이용하여 hemolymph를 채혈하였다. 채혈된 hemolymph는 대식세포활성(NBT; nitroblue-tetrazolium)을 분석한 후, 원심분리기(Micro 17 TR; HanilBioMed Inc., Gwangju, Korea)를 이용하여 800 g로 10분간 혈장을 분리하여 비특이적 면역분석(PO; phenoloxidase)을 실시하였다.

일반성분 분석

실험사료의 일반성분 분석은 AOAC (2000) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125°C, 3 h), 회분은 직접회화로법(550°C, 12 h)으로 측정하였고, 조단백질은 자동 조단백분석기(Kejltec system 2300, Sweden)로 분석하였으며, 지방은 Soxhlet 추출장치(Soxhlet heater system C-SH6, Korea)를 이용하여 분석되었다.

면역분석

혈액 내의 대식세포 활성은 NBT 분석방법을 통해 호중구의 oxidative radical 생성량을 측정하였다(Zhang et al., 2013). PO 활성분석은 Hernandez-Lopez et al. (1996)의 방법을 기초로 분석하였다.

사육수 비교환 실험

사육수 비교환(no water change)방식으로 평균체중 0.80 (± 0.00)g의 흰다리새우(*L. vannamei*)를 총 6개의 96 L 수조에 각 수조당 25마리씩 무작위로 배치하였다. 실험구당 2반복구를 두었고, 1일 3회(08:30, 14:30, 20:30)에 나누어 체중 10%의 실험사료를 급이하였다. 매일 1회 채수하여 Verdouw et al. (1978)의 방법으로 사육수의 총 암모니아 농도를 2주간 측정하였다.

공격실험

6주간의 사양실험 종료 후, 각 수조 당 8미씩(실험구 당 24미) 무작위로 선별하여 *V. harveyi* 현탁액을 체내에 주입하여 약 110 L 크기의 아크릴 수조로 옮긴 후, 공격실험을 실시하였다(3반복, 9개 수조). 병원성 세균은 TCBS 배지를 사용하여 25°C에서 24시간 배양한 후 집균하였고, *V. harveyi* 현탁액을 새우 등 근육 2번째 마디에 10 μ L (10^5 CFU mL⁻¹)를 주입하였다. 공격 실험은 세균 공격실험 전용 사육시설에서 실시하였으며, 균 주입 후 28-30°C 수온과 충분한 용존산소를 유지하였으며, 총 21일간 누적 폐사를 관찰하였다.

통계학적 분석

실험사료군의 배치는 완전확률계획법(Completely randomized design)에 따라 실시하였고, 모든 결과는 SPSS (Version

12.0)프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석되었다. 실험의 데이터 값의 유의차는 Tukey's HSD test ($P < 0.05$)로 비교되었다. 데이터는 평균값 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 나타내었다. 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석하였다.

결과 및 고찰

발효대두박 첨가에 따른 흰다리새우의 성장률, 사료효율 및 비특이적 면역 결과는 Table 2에 나타내었다. 6주간의 사료공급 후 최종무게, 사료전환효율, 생존율은 모든 그룹에서 유의적인 차이가 없었다. 징거미새우(*Macrobrachium nipponense*)를 대상으로 한 연구에서도 *Pediococcus acidilactic*, *Enterococcus faecalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Rhodospseudomonas palustris* 균주로 발효시킨 대두박을 8주간 공급하였을 때, 본 실험 결과와 동일하게 새우의 성장에는 영향을 주지 않았다고 보고되었다(Ding et al., 2015). 그루퍼(*Epinephelus coioides*)를 대상으로 *B. subtilis*로 발효시킨 대두박을 10%, 20%, 30%, 40%로 첨가하여 어분을 대체한 결과에서도 성장과 사료효율에서 유의적인 차이가 없었다(Shiu et al., 2015). 반면, Liu et al. (2009)은 *L. vannamei*를 대상으로 사료에 낫토로부터 분리된 *B. subtilis*를 10^8 CFU kg⁻¹ 농도로 첨가하여 98일 동안 공급하였을 때 첨가하지 않은 대조구에 비해 유의적으로 높은 성장률을 나타내었다고 보고하였다. 피클에서 분리된 *B. subtilis*를 *L. vannamei*를 대상으로 사료에 각 10^5 CFU g⁻¹과 10^8 CFU g⁻¹ 농도로 첨가하여 8주간 공급하였을 때 무첨가구인 대조구에 비해 유의적으로 높은 성장률과 사료효율을 보였다고 보고하였다(Zokaeifar et al., 2012). 발효시킨 대두박을 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)에 공급하였을 때, 담즙산(bile acid)의 생성이 감소하게 되어 콜레스테롤의 흡수가 감소될 수 있다고 보고되었다

Table 2. Growth performance, feed utilization and non-specific immune response parameters of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (0.80 \pm 0.010 g; mean initial weight) fed the three experimental diets for 6 weeks¹

| | CON | SBM | BFSBM |
|------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| FBW ² | 4.74 \pm 0.06 | 4.96 \pm 0.09 | 5.03 \pm 0.30 |
| FCR ³ | 1.93 \pm 0.06 | 1.89 \pm 0.07 | 1.88 \pm 0.10 |
| Survival (%) | 88.9 \pm 7.70 | 91.1 \pm 3.85 | 84.4 \pm 3.85 |
| NBT ⁴ | 2.04 \pm 0.41 ^{ab} | 1.57 \pm 0.48 ^b | 2.30 \pm 0.62 ^a |
| PO ⁵ | 0.09 \pm 0.02 ^{ab} | 0.08 \pm 0.01 ^b | 0.10 \pm 0.02 ^a |

¹Values are mean of triplicate groups and presented as mean \pm SD. Values in the same row having different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$). ²Final Mean Body Weight (g). ³Feed Conversion Ratio=dry feed fed/wet weight gain. ⁴Nitro blue tetrazolium (absorbance). ⁵Phenoloxidase (absorbance).

(Yamamoto et al., 2010). 콜레스테롤은 *L. vannamei*의 성장에 반드시 필요한 영양인자로서 대두박을 기본으로 한 저콜레스테롤 사료를 *L. vannamei*가 섭취할 경우 성장이 저하된다고 보고되었다(Duerr and Walsh, 1996). 그러나 본 연구에서는 대조구인 어분구에 비해 대두박 또는 발효대두박의 첨가 사료에서 성장저하 효과가 나타나지 않았다. 이는 위에서 언급한 저콜레스테롤 사료를 섭취한 새우의 성장저하 현상과는 상반된 결과이다. 따라서 발효첨가물에 따른 성장과 콜레스테롤과의 상관관계에 대해서는 보충 연구가 이루어져야 한다고 사료된다.

NBT, PO 분석 결과 BFSBM 실험구에서 SBM 실험구보다

유의적으로 높은 결과를 나타냈다(Table 2). Xie et al. (2016)은 대두박으로 어분을 대체하여 실험한 결과, 새우의 면역력 감소는 식물성 단백질로 어분을 대체하면서 발생한 항영양인자 또는 영양적 불균형으로 인한 면역력의 저하 때문이라고 설명하고 있다. 혈액내의 대식세포활성은 새우의 비특이적면역력의 중요한 지표로서 호흡 폭발 동안의 활성산소종의 증가량을 확인함으로써 대식세포활성을 확인할 수 있다(Guertler et al., 2010; Nayak, 2010). Indian carp (*Labeo rohita*)과 나일틸라피아(*Oreochromis niloticus*)를 대상으로 *B. subtilis*가 첨가된 사료를 2주간 혹은 2개월간 공급했을 때, 본 연구결과와 동일하게

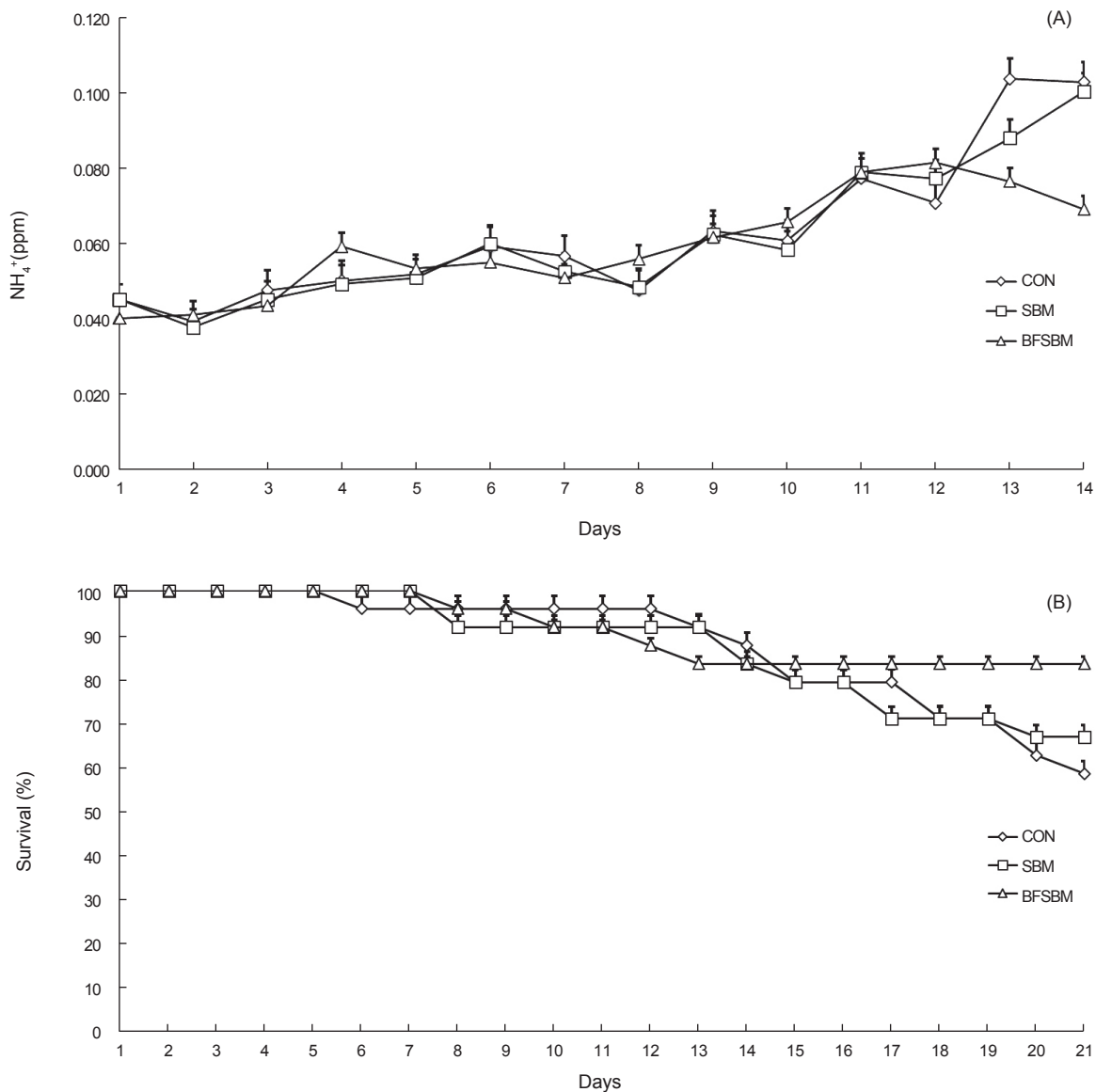


Fig. 1. Ammonium (NH₄⁺) concentration of non-exchanged water tanks of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the three experimental diets during 14 days (A), and survival rate of Pacific white shrimp fed the three experimental diets after challenge with *Vibrio harveyi* during 21 days (B).

무첨가구인 실험구에 비해 대식세포활성이 유의적으로 증가된다는 것이 보고되었다(Aly et al., 2008; Kumar et al., 2008). 또한 징거미새우를 대상으로 60일 동안 *Bacillus* NL110을 공급하였을 때, 대식세포 및 페놀산화효소(phenoloxidase) 활성이 증가하였다고 보고되었다(Rahiman et al., 2010). 페놀산화효소는 갑각류 방어 기작에 중요한 역할을 하는 효소로서 활성화된 페놀산화효소는 옴소닌을 생산하여 혈구의 식세포 활동과 혈액응고 반응에 참여함으로써 새우의 비특이적 면역을 높이는 것으로 알려졌다(Hernandez-Lopez et al., 1996; Nayak, 2010). *B. subtilis*를 사료에 첨가하여 *L. vannamei*에 공급했을 경우에도 무첨가구인 실험구에 비해 페놀산화효소 활성이 유의적으로 증가됨으로서 본 실험과 유사한 경향을 보였다(Gullian et al., 2004; Tseng et al., 2009; Shen et al., 2010). *B. subtilis*는 새우의 장내에서 비특이적 면역력의 개선 효과와 장내 유해세균의 저감에 효과가 있다고 알려져 있다(Li et al., 2009; Tseng et al., 2009). 따라서 *B. subtilis*로 발효시킨 대두박을 사료에 첨가하여 새우에 공급할 경우 장내에 유용균체를 형성하여, 장내 비특이적 면역계의 활성을 통해 병원체의 활성을 억제할 수 있을 것으로 사료된다.

사육수 비교환시의 발효대두박 첨가에 따른 총암모니아 농도 비교 결과는 Fig. 1A에 나타내었다. 2주간의 총암모니아 농도에서는 사료에 따른 유의적인 차이가 없었지만, 발효대두박 첨가사료를 공급한 실험구에서 12일째부터 대조구와 대두박구에 비해 비교적 낮은 농도가 측정되었다. 일반적인 새우양식에서는 낮은 환수율로 인해 수질이 빈번하게 저하되는 현상이 있으므로 새우 양식에서의 사육수 관리의 매우 중요하다(Zokaeifar et al., 2014). 블랙 타이거 새우(*Penaeus monodon*)를 대상으로 사료 내 *Bacillus* S11을 첨가하여 100일간 공급하였을 때 총암모니아 농도에서는 무첨가 대조구와 유의적인 차이가 없었다(Rengpipat et al., 1998). 반면, *L. vannamei* post-larva를 대상으로 *Bacillus* sp.를 사육수에 첨가했을 경우 무첨가 대조구에 비해 총암모니아 농도가 유의적으로 감소하는 결과를 보였다(Nimrat et al., 2012). *B. subtilis*와 같은 그람양성균에 의한 유기물 전환을 통해 유기탄소의 농도가 최소화됨으로서 수질이 향상되는 것으로 보고되었으나(Balcázar et al., 2006), *B. subtilis*로 발효시킨 대두박 첨가 사료에 의한 수질 향상에 대한 정확한 원인은 알려지지 않았으므로, 이에 관련된 보충연구가 필요하다고 사료된다.

*V. harveyi*의 인위적 공격실험에 대한 질병저항성 결과는 Fig. 1B에 나타내었다. 21일간의 공격실험 기간 동안 생존율에서는 모든 그룹에서 유의적인 차이가 없었다. 복합 균주로 발효시킨 발효대두박 첨가사료를 징거미새우를 대상으로 공급한 후, *Aeromonas hydrophila*에 대한 인위적 공격실험 결과, 발효대두박의 첨가함량이 높아질수록 폐사율이 높아지는 경향을 보였다고 보고하였다(Ding et al., 2015). 반면, *B. subtilis*를 사료 내에 직접 첨가해서 공급한 결과, *V. harveyi*와 같은 병원균에 대

한 *L. vannamei*의 질병저항성에는 긍정적인 영향을 미친다고 보고되었다(Balcazar and Rojas-Luna, 2007; Zokaeifar et al., 2012). 따라서 발효에 사용된 균주의 종과 발효방법에 따라, 혹은 직접적인 사육수에 첨가하거나 사료에 첨가하는 급여 방법에 따라 그 결과는 상반되게 나타날 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과로 볼 때, *B. subtilis* 발효대두박으로 *L. vannamei* 새우 사료 내 어분을 약 30%까지는 대체할 수 있을 것으로 사료되며, 그에 따라 비특이적 면역력을 높이고, 사육수의 암모니아 농도를 낮춤으로서 질병예방에도 긍정적인 효과가 있을 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2015년 CJ제일제당 주식회사의 지원을 받아 수행된 연구임. 그리고 2015년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(양식장 사육수 내 유용유기물을 활용한 기능성 사료 첨가제 개발).

References

- Alam MD, Teshima S, Koshio S, Ishikawa M, Uyan O, Hernandez LHH and Michael FR. 2005. Supplemental effects of coated methionine and/or lysine to soy protein isolate diet for juvenile kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture* 248, 13-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.015>.
- Aly SM, Ahmed YA, Ghareeb AA and Mohamed MF. 2008. 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, 128-136. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.013>.
- Amaya EA, Davis DA and Rouse DB. 2007. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared under pond conditions. *Aquaculture* 262, 393-401. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.015>.
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 17th Edition. Cunniff P, ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc, Arlington, VA, U.S.A.
- Balcázar JL, Blas Id, Ruiz-Zarzuola I, Cunningham D, Vendrell D and Múzquiz JL. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiol* 114, 173-186. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>.
- Balcázar JL and Rojas-Luna T. 2007. Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against Vibriosis in juvenile shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Current Microbiol* 55, 409-412. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-007-9000-0>.
- Chiu CH, Guu Yk, Liu CH, Pan TM and Cheng W. 2007. Im-

- immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. Fish Shellfish Immunol 23, 364-377. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2006.11.010>.
- Davis DA and Arnold CR. 2000. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 185, 291-298. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00354-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00354-3).
- Ding Z, Zhang Y, Ye J, Du Z and Kong Y. 2015. An evaluation of replacing fish meal with fermented soybean meal in the diet of *Macrobrachium nipponense*: Growth, nonspecific immunity, and resistance to *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immunol 44, 295-301. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.024>.
- Duerr EO and Walsh WA. 1996. Evaluation of cholesterol additions to a soybean meal-based diet for juvenile Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone), in an outdoor growth trial. Aquacult Nutri 2, 111-116. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2095.1996.tb00017.x>.
- FAO. 2013. Statistic for fisheries and aquaculture in the world[Internet]. Retrieved from <http://www.fao.org/fishery/en>.
- Feng J, Liu X, Xu ZR, Liu YY and Lu YP. 2007. Effects of *Aspergillus oryzae* 3.042 fermented soybean meal on growth performance and plasma biochemical parameters in broilers. Animal Feed Sci Technol 134, 235-242. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.08.018>.
- Guertler C, Schleder DD, Barracco MA and Perazzolo LM. 2010. Comparative study of the intracellular superoxide anion production in different *penaeid* species through the NBT-reduction assay. Aquacult Res 41, 1082-1088. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02393.x>.
- Gullian M, Thompson and Rodriguez J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. Aquaculture 233, 1-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.013>.
- Hernández-López J, Gollas-Galván T and Vargas-Albores F. 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp, *Penaeus californiensis* Holmes. Comparative Biochem Physiol 113, 61-66. [http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413\(95\)02033-0](http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413(95)02033-0).
- Kiers JL, Meijer JC, Nout MJR, Rombouts FM, Nabuurs MJA and Meulen JVD. 2003. Effect of fermented soya beans on diarrhoea and feed efficiency in weaned piglets. Applied Microbiol 95, 545-552. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02011.x>.
- Kumar R, Mukherjee SC, Ranjan R and Nayak SK. 2008. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. Fish Shellfish Immunol 24, 168-172. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2007.10.008>.
- Kureshy N and Davis DA. 2002. Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 204, 125-143. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00649-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00649-4).
- Li J, Tan B and Mai K. 2009. Dietary probiotic *Bacillus OJ* and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 291, 35-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.03.005>.
- Liu CH, Chiu CS, Ho PL and Wang SW. 2009. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. Applied Microbiol 107, 1031-1041. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04284.x>.
- Nayak SK. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. Fish Shell Immunol 29, 2-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.017>.
- NIFS. 2015. National Institute of Fisheries Science[Internet]. Retrieved from <http://www.nifs.go.kr>.
- Nimrat S, Suksawat S, Boonthai T and Vuthiphandchai V. 2012. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Veterinary Microbiol 159, 443-450. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.029>.
- Paripatanont T, Boonyaratpalin M, Pengseng P and Chotipuntu P. 2001. Substitution of soy protein concentrate for fish meal in diets of tiger shrimp *Penaeus monodon*. Aquacult Res 32, 369-374. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1355-557x.2001.00045.x>.
- Rahiman KMM, Jesmi Y, Thomas AP and Hatha AAM. 2010. Probiotic effect of *Bacillus* NL110 and *Vibrio* NE17 on the survival, growth performance and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquacult Res 41, 120-134. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02473.x>.
- Rengpipat S, Phianphak W, Piyatiratitivorakul S and Menasveta P. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture 167, 301-313. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00305-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00305-6).
- Shen WY, Fu LL, Li WF and Zhu YR. 2010. Effect of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* on the growth, performance, immune response and antioxidant activities of the shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquacult Res 41, 1691-1698. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02554.x>.
- Shiu YL, Hsieh SL, Guei WC, Tsai YT, Chiu CH and Liu CH. 2015. Using *Bacillus subtilis* E20-fermented soybean meal as replacement for fish meal in the diet of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* Hamilton. Aquacult Res 46, 1403-1416. <http://dx.doi.org/10.1111/are.12294>.
- Sookying D and Davis DA. 2011. Pond production of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed high levels of soybean meal in various combinations. Aquaculture 319, 141-149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.049>.

- Suárez JA, Gaxiola G, Mendoza R, Cadavid S, Garcia G, Alanis G, Suárez A, Failace J and Cuzon G. 2009. Substitution of fish meal with plant protein sources and energy budget for white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture* 289, 118-123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.01.001>.
- Tseng DY, Ho PL, Huang SY, Cheng SC, Shiu YL, Chiu CS and Liu CH. 2009. Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish Shellfish Immunol* 26, 339-344. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2008.12.003>.
- Verdouw H, Echteld CJAV and Dekkers EMJ. 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res* 12, 399-402. [http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354\(78\)90107-0](http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(78)90107-0).
- Xie SW, Liu YJ, Zeng S, Niu J and Tian LX. 2016. Partial replacement of fish-meal by soy protein concentrate and soybean meal based protein blend for juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 464, 296-302. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.002>.
- Yamamoto T, Iwashita Y, Matsunari H, Sugita T, Furuita H, Akimoto A, Okamatsu K and Suzuki N. 2010. Influence of fermentation conditions for soybean meal in a non-fish meal diet on the growth performance and physiological condition of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 309, 173-180. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.021>.
- Zhang S, Li J, Wu X, Zhong W, Xian J, Liao S, Miao Y and Wang A. 2013. Effects of different dietary lipid level on the growth, survival and immune-relating genes expression in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 34, 1131-1138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.016>.
- Zhou F, Song W, Shao Q, Peng X, Xiao J, Hua Y, Owari BN, Zhang T and Ng WK. 2011. Partial replacement of fish meal by fermented soybean meal in diets for black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*, juveniles. *World Aquacult Soci* 42, 184-197. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00455.x>.
- Ziaei-Nejad S, Rezaei MH, Takami GA, Lovett DL, Mirvaghefi AR and Shakouri M. 2006. The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture* 252, 516-524. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.021>.
- Zokaeifar H, Balcázar JL, Saad CR, Kamarudin MS, Sijam K, Arshad A and 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 Immunol* 33, 683-689. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.027>.
- Zokaeifar H, Babaei N, Saad CR, Kamarudin MS, Sijam K and Balcázar JL. 2014. Administration of *Bacillus subtilis* strains in the rearing water enhances the water quality, growth performance, immune response, and resistance against *Vibrio* *harveyi* infection in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 36, 68-74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.007>.