

ORIGINAL ARTICLE

동애등에(*Ptecticus tenebrifer*) 추출물 투여가 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*) 치하의 성장과 수질에 미치는 영향

김태훈 · 최인학¹⁾ · 정태호¹⁾*

주식회사 푸디웜, ¹⁾중부대학교 바이오융합학부

Effect of *Ptecticus Tenebrifer* Extract on The Growth of Juvenile *Litopenaeus Vannamei* and Water Quality

Tae-Hoon Kim, In-Hag Choi¹⁾, Tae-Ho Chung¹⁾*

Foodyworm Ltd. Seoul 05269, Korea

¹⁾Division of Integrated Biotechnology, Joongbu University, Geumsan 32713, Korea

Abstract

Ptecticus tenebrifer was incorporated to partially or totally replace the diets of juvenile white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Experimental groups of shrimp with an average initial body weight of 0.014 ± 0.001 g were fed each of the 5 diets formulated to include 0, 25, 50, 75, and 100% (C, T25, T50, T75, and T100, respectively) of *Ptecticus tenebrifer* powder substituted for commercial feed. After eight weeks of feeding trials, juvenile shrimp fed with diets T25 and T50 showed higher live weight gain (2.298 ± 0.405 and 2.539 ± 0.406 , respectively), and a better feed conversion ratio (1.389 ± 0.246 and 1.536 ± 0.246 , respectively) compared to those of shrimp fed a control diet. Survival rate was 98% in all experimental groups except for the T75 group ($66.67 \pm 57.73\%$ survival). The levels of immune markers such as beta-glucan binding protein, prophenoloxidase, and crustin associated with the cellular and humoral immunity of shrimp were found to be higher in 25% and 50% commercial feed replacement groups. A reduction in total nitrogen, nitrite nitrogen, and ammonia levels was greater in T25 and T50 rather than in T75 and T100. These results clearly indicate that replacement of feed with 25 to 50% *Ptecticus tenebrifer* powder in juvenile white shrimp diet was optimal in promoting the growth performance of shrimp without any adverse effects.

Key words : *Ptecticus tenebrifer*, *Litopenaeus vannamei*, Nutrition, Water quality

1. 서론

새우 양식에서 생산비의 50%를 차지하는 것은 사료로서, 영양학적 비용이 가장 중요한 요소이다(Tacon and Metain, 2008). 어분은 특히 새우 사료의 단백질원으로 사용되어 왔으며, 지구온난화와 관련된 어분의 공급 부

족과 가격 상승으로 인해 양식업에서 어분에 대한 의존도를 줄이고 새로운 단백질원을 찾는 것은 매우 중요한 과제가 되고 있다(Amaya et al., 2007). 많은 연구자들은 식물 가공 부산물, 곡물 가공 부산물, 동물 가공 부산물, 그리고 각종 식품 가공 중 발생하는 비교적 가격이 저렴한 부산물로부터 단백질을 대체하기 위해 시도해 왔

Received 22 July, 2018; Revised 5 September, 2018;

Accepted 7 September, 2018

*Corresponding author: In-Hag Choi, Division of Integrated Biotechnology, Joongbu University, Geumsan 32713, Korea
Phone : +82-41-750-6283
E-mail : taehochung@daum.net

The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.
© 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.

다(Bulbul et al., 2015).

흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)는 양식업에서 매우 중요한 종 중 하나이며, 흰다리새우의 생산량에 가장 큰 영향을 끼치는 원인은 흰반점바이러스(white spot syndrome virus)에 의한 대량폐사가 대표적으로, 흰다리새우의 면역증진을 통해 생산성을 증대시키려는 노력은 새우 양식업에서 매우 중요하다. 또한, 새우 양식의 특성상 순환식 여과를 하지 않는 호지에서 키우게 되므로, 수중의 사료 찌꺼기, 대사산물 및 배설물 등에서 유래된 많은 양의 질산, 아질산 및 암모니아와 같은 질소성분은 사육수의 부영양화와 이에 따른 수질악화를 초래하기 때문에 질병과 함께 가장 문제시되고 있다(Gross et al., 2001).

동애등에(*Ptecticus tenebrifer*, 파리목 동애등에과) 유충은 커피콩 펄프, 채소, 솔지게미 및 생선 내장(생선 가공 부산물)과 같은 유기 폐기물에서도 아주 높은 밀도로 발생하며, 유충을 상업적으로 사용하면 분뇨 및 기타 유기 폐기물과 관련된 여러 환경 문제를 해결할 수 있을 뿐 아니라, 사료원료로서의 영양학적 가치와 경제성이 다른 곤충보다 뛰어난 것으로 알려져 있다(Amaya et al., 2007). 동애등에 유충은 잔류 분뇨 단백질과 기타 영양분을 더 가치 있는 바이오매스(예: 가축 사료)로 변환할 수 있을 뿐 아니라, 고부가가치의 소, 돼지, 가금 및 양어용 사료를 제공할 수 있으며, 기름 회수 이후 다양한 부가가치 창출의 가능성도 탐구되고 있다(Newton et al., 2005). 현재까지 흰다리새우 치하 단계에서 사료 또는 사료첨가제 형태로 동애등에를 사용한 예는 없으며, 관련 연구 데이터의 확보가 시급하다 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 흰다리새우(*L. vannamei*) 치하를 대상으로 동애등에(*P. tenebrifer*) 추출 분말의 농도별 투여 시 성장촉진, 면역증강, 그리고 수질환경에 미치는 영향을 평가하고 분석하는데 그 목적을 두었다.

2. 연구방법

2.1. 치하 사양시험 및 설계

시험에 사용한 치하는 국내 새우 치하를 공급하는 용수신(충남 태안)에서 제공하였으며, 구입 당시 알에서 부화 후 40일령이었고, 체중은 평균 약 0.013그램이었다. 치하 도입 후 2주간은 실험수조에서 예비 사육한 후 1주

차 실험부터 처리구별로 다른 사료를 투여하였다. 체중 측정과 면역학적 효능 분석은 각 군별로 무작위로 표본 추출하여 사용하였다. 새우 치하의 사육은 일반적인 치하의 사육조건을 적용하여 폭기 조건 하에서 사육 온도는 25℃~32℃로 유지하였다. 동애등에 추출물의 분말은 주식회사 푸디웍에서 사육된 동애등에를 세척 후 가열 건조하여 분말 형태로 가공하였다. 실험사료는 전체 실험구의 성장 비교를 위하여 시판되는 치하사료(흰다리 Win, 동아원 주식회사)를 주령별로 맞추어 적용하였으며, 권장 급여량의 무게(%)를 동애등에 분말로 대체하는 방식으로 처리구를 구성하였다. 대조구는 동애등에 분말을 첨가하지 않은 100% 시판사료를 투여하였고(C), 실험구1은 권장급여량의 25%를 동애등에 추출분말로 대체(T25), 실험구2는 권장급여량의 50%를 동애등에 추출분말로 대체(T50), 실험구3은 권장급여량의 75%를 동애등에 추출분말로 대체(T75), 실험구4는 권장급여량의 100%를 동애등에 추출분말로 대체하여 투여하였다(T100).

2.2. 성장률 측정

8주간의 시험기간 동안, 매 주 수요일 09:00시에 각 군별 3반복 설정된 수조에서 무작위 표본 추출을 실시하였고, Weight Gain (WG), Feed Conversion Ratio (FCR), Specific Growth Rate (SGR), and survival rate (%)값을 다음과 같이 산출하였다.

$$WG = W2 - W1$$

$$FCR = \text{Dry feed offered} / \text{live weight gain}$$

$$\text{Survival (\%)} = F2 (\text{number of fish at the end of the experiment}) / F1 (\text{number of fish at the beginning of experiment}) \times 100$$

2.3. 면역학적 지표 측정

흰다리새우 치하의 면역학적 지표를 측정하기 위해, 시험 종료 후 각 군별로 여섯마리의 치하로부터 간췌장(hepatopancreas)을 적출하였으며, 액체질소로 동결시킨 후 RNA 추출 전까지 -70℃의 초저온 냉동고에 보관하였다. 액체질소를 이용하여 곱게 마쇄한 시료 0.1g에 Trizol reagent 1 ml를 첨가하여 잘 혼합한 후 10분간 13,000 rpm에서 원심분리한 후 상등액을 취하였다. 얻어진 상등액에 chloroform 0.2 ml를 첨가하고 혼합한 후

Table 1. Primer sequences for semi-quantitative RT-PCR analysis

Target gene	GenBank #	Forward/reverse sequence	Products (bp)
b-actin	AF300705	5'-TGTGTGACGACGAAGTAGCC-3' 5'-TGGTCGTGAAGGTGTAACCA-3'	605 bp
Beta-glucan binding protein	AY249858	5'-CGTGAGGTTCCCCAGTATGG-3' 5'-TTCGGTTTGGATGGCTAAAAG-3' 5'-TCGTCAGCATTGTGGAATC-3' 5'-GAAGTCGTAGCCGTAAGC-3'	1002 bp 583 bp
Prophenoloxidase	AY723296	5'-GGAATTGTTTACTACATGCATCAGC-3' 5'-GGAACAAGTCATCCACGAGCTT-3'	563 bp
Crustin	AF430076	5'-ATTCTGTGCGGCCTCTTTAC-3' 5'-ATCGGTCGTTCTTCAGATGG-3'	539 bp

13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 다시 상등액을 취하고, 상등액에 동량의 isopropanol 첨가 후 원심분리하여 RNA pellet를 획득하였다. 획득된 RNA pellet은 70% 에탄올을 이용하여 세척한 후 건조하고, DEPC를 처리한 멸균증류수에 녹여 사용하였다. 유전자 발현분석을 위하여 추출된 총 RNA는 RNeasy Mini Elute cleanup kit (Qiagen Co., Ltd., USA)을 이용하여 정제 후 cDNA 합성에 이용하였다. NanoDrop 1000 Spectrophotometer(Thermo Scientific, USA)로 농도를 확인하고 모든 시료를 동일한 농도로 정량하였다. cDNA 합성은 Quanti Tect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Duesseldorf, Germany)를 이용하였다. 흰다리새우 치하의 면역력과 관련된 주요 지표 유전자들의 발현 변화를 검토하기 위하여 total RNA를 추출한 후, 역전사중합효소(reverse transcriptase)를 사용하여 complementary DNA(cDNA)를 만들고 합성된 cDNA와 primer로 semi-quantitative RT-PCR을 이용하여 유전자의 발현정도를 측정하였다. 주요 유전자의 primer 및 sequence는 Table 1과 같다. RT-PCR 산물은 1% 한천(agarose) 겔에서 전기영동 후 EtBr(ethidium bromide)로 염색하여 UV에서 증폭된 DNA band를 확인하였다. DNA band는 Carestream MI SE 프로그램을 이용하여 band intensity로 수치화하여 나타내었다.

2.4. 수질 측정

수질측정은 8주 뒤 각 군별 3반복 설정된 수조에서 채취하여 수질 APHA(1985) 방법에 준하여 총 질소(total

nitrogen), 아질산성 질소(nitrite nitrogen), 및 암모니아(ammonia)를 측정하였다.

2.5. 통계처리

모든 자료의 통계분석은 SAS(SAS Institute, 2002) 프로그램에 준하여 분산분석(ANOVA)이 실시되었다. 처리구 간의 유의성은 Tukey's honest significant difference test를 이용하여 5% 수준에서 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 동애등에 분말의 치하 성장촉진 효과

열풍 건조 후 분말 처리한 동애등에 추출물을 g %로 25%, 50%, 75%, 100% 대체하여 시험구에 급여한 결과(Table 2), 시판사료의 권장급여율에서 25%를 동애등에 생사료로 대체한 T25그룹과 50%를 동애등에 생사료로 대체한 T50 그룹의 성장률이 각각 2.284±0.040와 2.525±0.548(g)으로 대조군 1.765±0.178, T75그룹

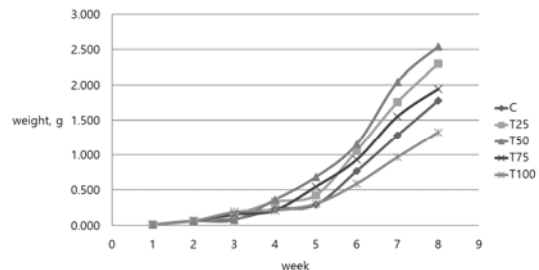


Fig. 1. Growth performance of test feed groups compared to the control group.

Table 2. Growth performance of juvenile *L. vannamei* fed with the experimental diets

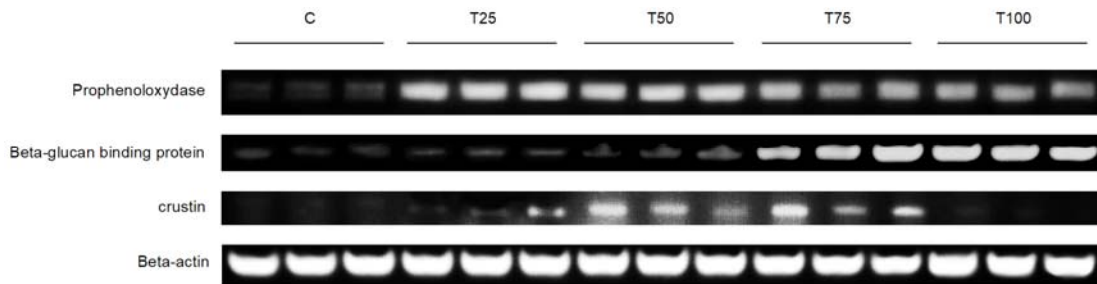
Parameter	Control	T25	T50	T75	T100
Initial weight (g)	0.014±0.001	0.014±0.001	0.014±0.001	0.014±0.001	0.014±0.001
Final weight (g)	1.779±0.179	2.298±0.405	2.539±0.406	1.943±0.549	1.323±0.248
WG (Weight Gain, g)	1.765±0.178	2.284±0.040	2.525±0.548	1.929±0.548	1.309±0.247
FCR (Feed Conversion Ratio)	1.073±0.108	1.389±0.246	1.536±0.246	1.174±0.333	0.796±0.150
Survival, %	>98.00±0.0	>98.00±0.0	>98.00±0.0	66.67±57.73	>98.00±0.0

WG = W2 - W1, where W2 = mean final weight, W1 = mean initial weight.

FCR = Feed offered / live weight gain.

Survival (%) = F2 / F1 x 100; F1 = number of fish at the beginning of experiment, and F2 = number of fish at the end of the experiment.

All calculations were based on the triplicate tank treatment (x, inter variance exists)

**Fig. 2.** Semi-quantitative RT-PCR results of prophenoloxdase, beta-glucan binding protein, and crustin.

(1.929±0.548) 및 T100그룹(1.309±0.247)보다 우수한 성장률을 보였다($p < 0.05$). Fig. 1에서 나타난 바와 같이, 각 그룹의 성장 곡선은 새우의 초기 성장곡선의 형태 중 치하시기의 시그모이드 곡선의 시작 패턴을 나타내었고, 특히 5주령 이후, 즉 PL75 이후부터 T25와 T50 그룹의 성장곡선이 대조구와 다른 시험구의 성장률을 상회하는 결과가 관찰되었다. 이는 기존 곤충원료를 투여한 여타의 연구결과와도 일맥상통하며, 특히 곤충원료의 소화 흡수율이 우수하고, 단백질과 지질의 조성이 다른 사료 원료보다 우수하기 때문이다. 75% 이상 과도하게 시판 사료를 대체할 경우 역시 기존 연구결과들과 동일하게 성장률이 되려 정체되는 결과도 확인할 수 있었다. 즉, 성장률에 대한 실험 결과를 고찰하면 동태등에의 흰다리새우 치하 사료첨가는 25%에서 50% 수준의 첨가가 최적

의 성장촉진 효과를 누릴 수 있을 것으로 기대되며, 치하 성장률을 강화시키는 최적의 비율 산출을 위해 추가적으로 좀 더 세분화된 첨가 수준 구간을 설정하고 후속실험을 수행할 경우 동태등에의 치하 사료첨가제로서의 효과에 가치를 증대시킬 수 있을 것이다.

3.2. 동태등에 추출 분말의 치하 면역증진 효과

흰다리새우의 면역력과 관련된 지표로는 대표적으로 선천면역을 관장하는 것으로 알려진 prophenoloxdase (ProPO)와 그 아래 하위 레벨에서 외부물질에 대한 방어를 직접 담당하는 Beta-Glucan Binding Protein (BGBP)과 LPS-binding protein, 그리고, 바이러스 방어에 관여하는 것으로 알려진 crustin이 대표적인 면역지표이다(Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000). 본 연구결과에서도 Fig. 2에서와 같이 동태등에 추출물을

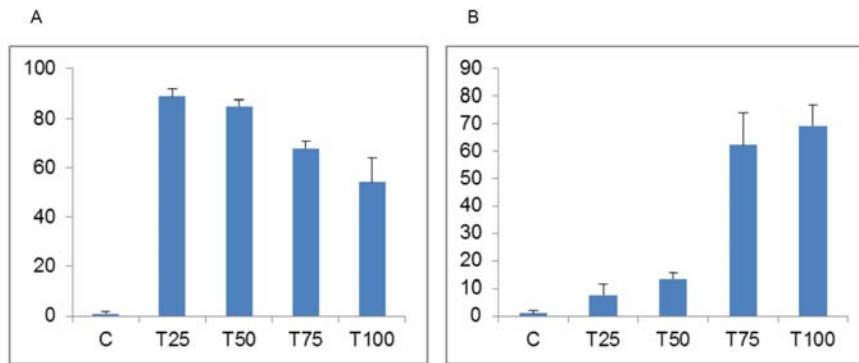


Fig. 3. Relative mRNA expression of ProPO (A) and BGBP (B) compared to the control group ($p < 0.05$).

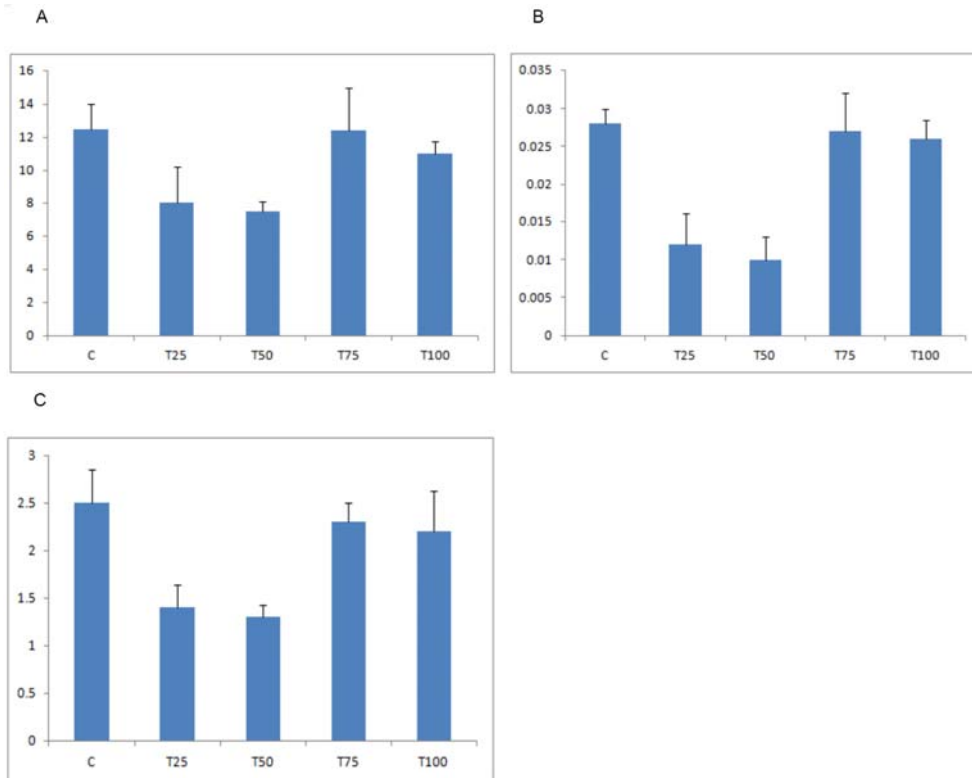


Fig. 4. Effects of juvenile *L. vannamei* on total nitrogen (A), nitrite nitrogen (B) and (C) ammonia levels ($p < 0.05$).

투여한 T25, T50, T75 그리고 T100 모두에서 ProPO 발현량이 모두 골고루 증가하는 것으로 확인되었다. 그러나, BGBP의 경우 동애등에 추출물이 투여된 모든 군에서 동일하게 증가한 것이 아니라, 수질 악화가 발생한 T75 그룹과 T100 그룹에서만 급격하게 증가하였고, T25

와 T50에서는 미약하게 증가한 것만 확인되었다. 이는, 수질악화가 발생한 T75 또는 시판사료 없이 동애등에만 투여된 T100의 경우 성장률 뿐 아니라 개체별 성장 차이가 크게 벌어진 것과 관련이 있다고 사료된다. 즉, 동애등에 추출물이 최적의 농도에 근접하게 투여된 T25와

T50의 경우는 성장률과 면역증진 모두가 확인되었으나, T75와 T100은 동물성 생사료만 과도하게 투입되어 수질악화와 개체 스트레스 유발로 인해 폐사된 개체가 늘어났을 것이며 수질악화와 수생환경 문제를 유발하여 성장률의 저하와 이물질에 반응하는 BGBP 발현량의 급격한 증가를 초래하였을 것으로 사료된다(Fig. 3). 성장률과 함께 innate immunity, adaptive immunity에 대한 추가 연구와 real time PCR을 이용한 정량분석, 그리고 mass study를 통한 실험 데이터를 확보하여, 동애등에 유충 추출물질이 어떤 경로로 새우의 면역력을 증가시키는지, 그리고 공격접종을 통한 항병원성 증진에 대한 효능 검증이 필요할 것으로 사료된다. 특히, 항균펩타이드 단일물질 투여 시 새우의 성장곡선과 면역증진, 그리고 항병원성에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

3.3. 동애등에 추출 분말의 수질환경 영향분석

동애등에 추출 분말의 수질환경 즉 총 질소, 아질산성 질소, 및 암모니아 함량은 통계적 유의성이 있었으며 ($p < 0.05$), T25와 T50은 수질에 미치는 영향은 거의 없지만 T75와 T100은 대조구와 비교할 때 수질환경 악화에 크게 영향을 미치는 것으로 보인다. 특히 T75는 Table 2의 생존율(survival ratio) 감소에 반영되어 동애등에 추출 분말의 치하 면역증진 효과(Fig. 2와 3)가 감소되는 것으로 추측할 수 있다.

4. 결론

흰다리새우 치하 육성기에 사용되는 시판사료의 25%에서 50% 급여 수준은 동애등에 추출물을 혼합하여 급여할 경우 성장률촉진 및 면역증진 효과를 기대할 수 있었지만, 수질환경에는 영향이 주지 않는 것으로 확인되었다.

REFERENCES

- Amaya, E. A., Davis, D. A., Rouse, D. B., 2007, Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions, *Aquacult.*, 262, 393-401.
- APHA, American Public Health Association, 1985, Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA, N. V.
- Bulbul, M., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Kader, Md. A., 2015, Growth performance of juvenile kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* (Bate) fed diets replacing fishmeal with soybean meal, *Aquacult. Res.*, 46, 572-580.
- Diener, S., Zurbrugg, C., Roa-Gutiérrez, R., Dang, H. N., Morel, A., Koottatep, T., Tockner, K., 2011, Black soldier fly larvae for organic waste treatment - prospects and constraints, *Proceedings of the WasteSafe, 2nd International Conference on Solid Waste Management in Developing Countries*, 13-15 February 2011, Khulna, Bangladesh.
- Gross, P. S., Bartlett, T. C., Browdy, C. L., Chapman, R. W., Warr, G. W., 2001, Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*, *Dev. Comp. Immunol.*, 25, 565-77.
- Newton, G. L., Sheppard, C., Watson, D. W., Burtle, G., Dove, R., 2005, Using the black soldier fly, *Hermetia illucens*, as a value-added tool for the management of swine manure. Report for Mike Williams, Director of the Animal and Poultry Waste Management Center, North Carolina State University.
- SAS., 2002, SAS/STAT Software for PC, Release 9.1, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
- Tacon, A. G. J., Metian, M., 2008, Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects, *Aquacult.*, 285, 146-158.
- Vargas-Albores, F., Yepiz-Plascencia, G., 2000, Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response, *Aquacult.*, 191, 13-21.
- 김태훈, 주식회사 푸디웜 대표이사
foodyworm@naver.com
- 최인학, 중부대학교 애완동물자원학과 교수
wicw@chol.com
- 정태호, 중부대학교 애완동물자원학과 교수
tahochung@joongbu.ac.kr