

사료의 어분함량대체가 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 간과 근육 내 인슐린유사성장인자의 발현과 체성장에 미치는 영향

박수진 · 문지성 · 서진송 · 남택정¹ · 이경준² · 임상구³ · 김강웅⁴ · 이봉주³ · 허상우³ · 최윤희*

부경대학교 수산생물학과, ¹부경대학교 식품영양학과, ²제주대학교 해양생명과학과, ³국립수산과학원 사료연구센터, ⁴국립수산과학원 양식관리과

Effect of Fish Meal Replacement on Insulin-like Growth Factor-I Expression in the Liver and Muscle and Implications for the Growth of Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*

Su-Jin Park, Ji-Sung Moon, Jin-Song Seo, Taek-Jeong Nam¹, Kyeong-Jun Lee², Sang-Gu Lim³, Kang-Woong Kim⁴, Bong-Joo Lee³, Sang-Woo Hur³ and Youn Hee Choi*

Department of Fisheries Biology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

¹Department of Food Science & Nutrition, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

²Department of Marine Life Science, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

³Aquafeed Research Center, National Institute of Fisheries Science, Pohang 37517, Korea

⁴Aquaculture Management Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

This study examined the effect of insulin-like growth factor (IGF)-I expression in the liver and muscle on the growth of *Paralichthys olivaceus* fed diets low in fish meal. A feeding experiment was conducted at Jeju National University, Jeju Island, Korea. Groups of *P. olivaceus* (total initial weight: 200 g) were maintained for 20 weeks on one of five experimental diets containing different proportions of fish meal. Diets containing 0%, 20%, 30%, 40%, and 50% fish meal were labeled FM0, FM20, FM30, FM40, and FM50, respectively. Fish growth was observed every 4 weeks during the feeding experiment, and plasma and liver and muscle tissues were sampled. Plasma IGF-I levels were analyzed using an ELISA kit. The mechanism of IGF-I receptor signaling was examined using immunoblotting and reverse transcription-polymerase chain reaction. The greatest total weight increase was observed in the FM30 group. In parallel, plasma levels of IGF-I and IGF-binding protein were highest in the FM30 group, and mRNA and protein expression were also significantly higher in this group. The first step in the IGF-I signaling pathway, tyrosine-phosphorylation checking, occurred smoothly until 20 weeks. These results suggest that a dietary ratio of 30% fish meal best promotes growth in this species. The IGF-I signaling pathway in the liver and muscle is associated with growth in *P. olivaceus*.

Key words: Olive flounder, Insulin-like growth factor I, Growth, Low-fish meal diet

서론

어류는 단백질 요구량이 높아 사료원가 중 단백질원이 차지하는 비중이 높다(Wilson and Halver, 1986; Hardy, 2010). 또한 육식성 어류는 잡식성이나 초식성 어류처럼 식물성 단백질의 이용성이 높지 않기 때문에 배합사료에 어분이 주 단백질원

으로 사용되고 있다(Wilson and Halver, 1986; Hevroy et al., 2005). 사료 내 어분의 첨가비율은 사료가격을 결정하는데 매우 중요한 요인으로 작용한다(Sissener et al., 2013; Hatlen et al., 2015). 어분은 여러가지 영양소 균형이 잘 갖춰진 양질의 사료 단백질원으로 보고되고 있으나(Dabrowski and Kozak, 1979), 지난 30년간 가격이 계속적으로 증가하고 있고, 어획량

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5915 Fax: +82. 51. 629. 590

E-mail address: unichoi@pknu.ac.kr



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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0141>

Korean J Fish Aquat Sci 52(2), 141-148, April 2019

Received 19 February 2019; Revised 7 March 2019; Accepted 19 March 2019

저자 직위: 박수진(대학원생), 문지성(대학원생), 서진송(대학원생), 남택정(교수), 이경준(교수), 임상구(센터장), 김강웅(해양수산연구원), 이봉주(해양수산연구원), 허상우(해양수산연구원), 최윤희(교수)

변동이 심해서 공급이 다소 불안정한 상태에 있으므로, 어분의 사용이 제한적일 수밖에 없다(Wilson and Halver, 1986; McCoy, 1990; Rodriguez-Serna et al., 1996; Naylor et al., 2000; Duarte et al., 2009; Hardy, 2010; FAO, 2017). 따라서 사료의 경제적이고 안정적인 공급을 위해서는 사료 중의 어분 첨가비율을 감소시킬 필요가 있다.

단백질은 어류의 성장에 가장 큰 영향을 미치는 필수영양소이다. 단백질 35-60%가 사료를 통해 공급되어 어체 내 새로운 조직을 만들고 손상된 조직을 회복시키면서 성장하게 되는데, 어류의 최적 성장을 위해 필요한 단백질량은 종, 크기, 식이조건 및 사료 내 에너지원에 따라 다르다(Oginio, 1980; Lovell, 1984; Wilson and Halver, 1986; Nam et al., 2001).

성장인자는 세포 내 성장, 분열, 분화 및 치료를 자극할 수 있는 물질로서 일반적으로 세포사이에서 신호전달 분자로 작용한다(Duan, 1997). 특히 인슐린유사성장인자(insulin-like growth factor, IGF)는 발생과 영양 대사를 조절하는 주된 인자로 알려져 있으며, 특히 경골어류에서 성장호르몬-IGF 축이 체성장과 영양대사 조절에 관여하고 있다(Fuentes et al., 2011; Sissener et al., 2013; Coned-Sieira and Soengas, 2017; Velez et al., 2017). 또한 IGF-I은 어류 성장을 조절하는 중요한 지표로서 연어 및 무지개송어 등의 근육 성장 및 사료 효율성을 확인하기 위해 활용되고 있다(Castillo J et al., 2004; Bower et al., 2008; Sissener et al., 2013; Zheng et al., 2012a; 2013b).

IGF는 단백질의 양과 질에 의해 영향을 받기 때문에(Gill et al., 2006; Fuentes et al., 2011), 사료 내 단백질의 종류와 양을 변화시킨 저어분 사료에 의해 발현량이 달라질 것으로 예상된다.

따라서, 본 연구에서는 저어분사료를 급이한 넙치의 간과 근육에서 IGF-I의 발현을 통해 저어분 사료가 넙치의 성장에 미치는 영향을 RT-PCR과 western-blot 분석으로 연구하였다.

재료 및 방법

실험사료 및 실험어

실험에 사용된 사료는 어분을 기초로 하여 대조사료(FM0), 어분을 20, 30, 40, 50%를 대체한 4개의 실험사료(FM20, FM30, FM40, FM50)였으며 조성은 Table 1에 나타내었다. 실험에 사용된 넙치는 제주대학교 해양과학연구소에서 2000 L 사육수조에 각 실험구당 65마리씩 수용하여 사료를 1일 2회 (08:30, 17:30) 만복 공급하여 20주간 사육하였고, 모든 실험은 3반복 진행하였다. 사육수온은 자연수온($19.7 \pm 4.5^\circ\text{C}$)에 의존하였다. 4주 간격으로 각 실험구 수조당 10마리씩 무작위로 채취하여 샘플링을 실시하였다. 모든 분석에 사용된 실험어는 2-phenoxyethanol 100 ppm에서 마취시켜 전장, 체고, 전중량을 측정하여 성장률을 조사하였다. 또한 마취가 된 어류에서 간을 적출한 후 액체 질소에 고정된 다음 분석전까지 -80°C 에서

보관하였으며, 근육은 등부분을 1×1 cm 크기로 잘라 간과 동일하게 보관하였다.

혈중 IGF-I과 IGF-binding protein (IGFBP) level 분석

실험어의 미부 정맥에서 헤파린 처리한 주사기로 채혈한 혈액을 원심분리(15000 rpm, 15분)하였다. 혈중 IGF-I과 IGFBP-3 level을 측정하기 위해 fish IGF-I ELISA Kit (#MBS700712, MYBiosource)와 fish IGFBP-3 ELISA Kit (#MBS017580, MYBiosource)를 이용한 후, microplate reader (EZ Read 400, Biochrom)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

근육과 간 조직의 total RNA는 Trans Zol-up (TransGen Biotech, Beijing, China)을 이용하여 추출하였으며, 추출된 total RNA는 NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher

Table 1. Ingredients and nutrition composition of the experimental diets

Ingredients (%)	FM0	FM20	FM30	FM40	FM50
Sardine FM	32.50	26.00	22.75	19.50	16.25
Anchovy FM	32.50	26.00	22.75	19.50	16.25
Soybean meal	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
Wheat flour	14.85	12.85	12.95	12.55	12.55
Wheat gluten	1.00	3.50	4.50	5.50	6.50
SPC	0.00	3.50	5.25	7.00	8.75
Tankage meal	0.00	3.50	6.25	9.00	11.75
Poultry by-product meal	0.00	3.50	4.00	4.50	5.00
Fish oil	3.40	4.00	4.30	5.10	5.50
Lecithin	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Betain	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Taurine	0.00	0.40	0.50	0.60	0.70
MCP	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Mineral Mix	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin Mix	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Vitamin C	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Vitamin E	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Choline	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
anti-fungal agent	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

FM0, replacement ratio 0% of fish meal diet; FM 20, replacement ratio 20% of fish meal diet; FM 30, replacement ratio 30% of fish meal diet; FM 40, replacement ratio 40% of fish meal diet; FM 50, replacement ratio 50% of fish meal diet; SPC, soy protein concentrate; MCP, mono calcium phosphate.

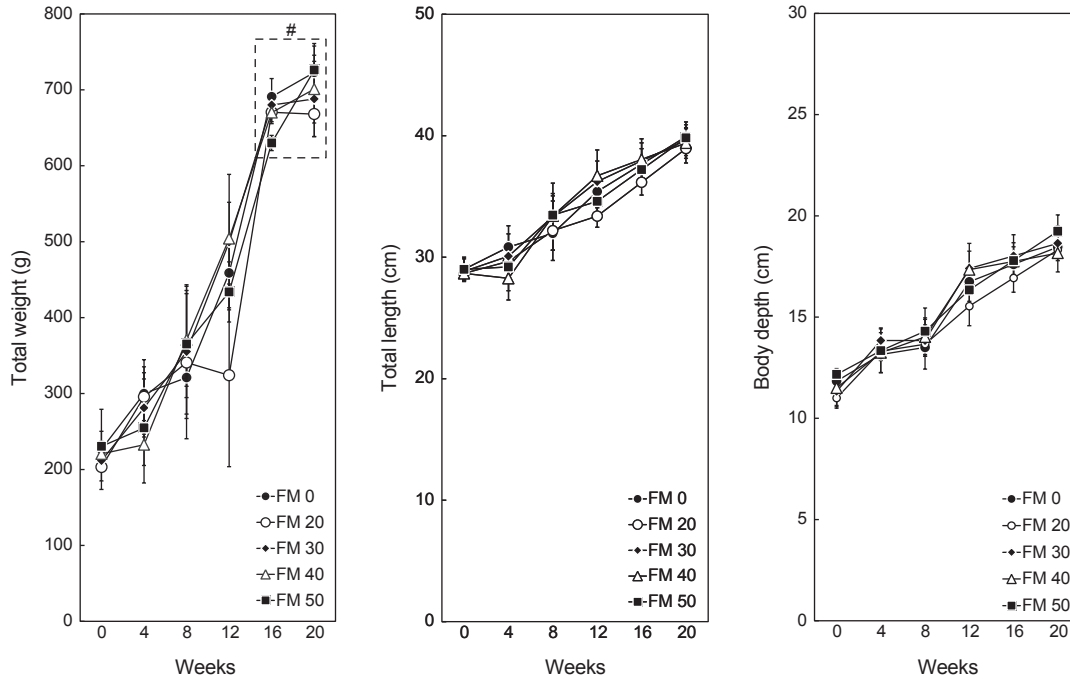


Fig. 1. The change of total weight, total length and body depth of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed experiment diets for 20 weeks. Data are presented as mean±SD. #P<0.001 compared with 0 week groups (n=10). FM0, replacement ratio 0% of fish meal diet; FM20, replacement ratio 20% of fish meal diet; FM30, replacement ratio 30% of fish meal diet; FM40, replacement ratio 40% of fish meal diet; FM50, replacement ratio 50% of fish meal diet.

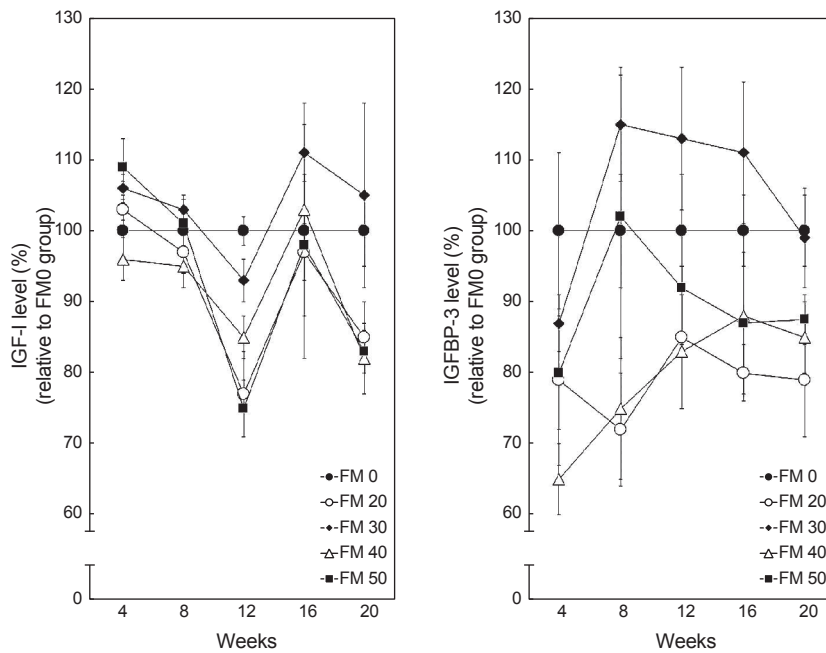


Fig. 2. A correlation of IGF-I level and IGFBP-3 level of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed experimental diets for 20 weeks (n=3). #P<0.001, *P<0.01 compared with 0 week group. FM0, replacement ratio 0% of fish meal diet; FM20, replacement ratio 20% of fish meal diet; FM30, replacement ratio 30% of fish meal diet; FM40, replacement ratio 40% of fish meal diet; FM50, replacement ratio 50% of fish meal diet.

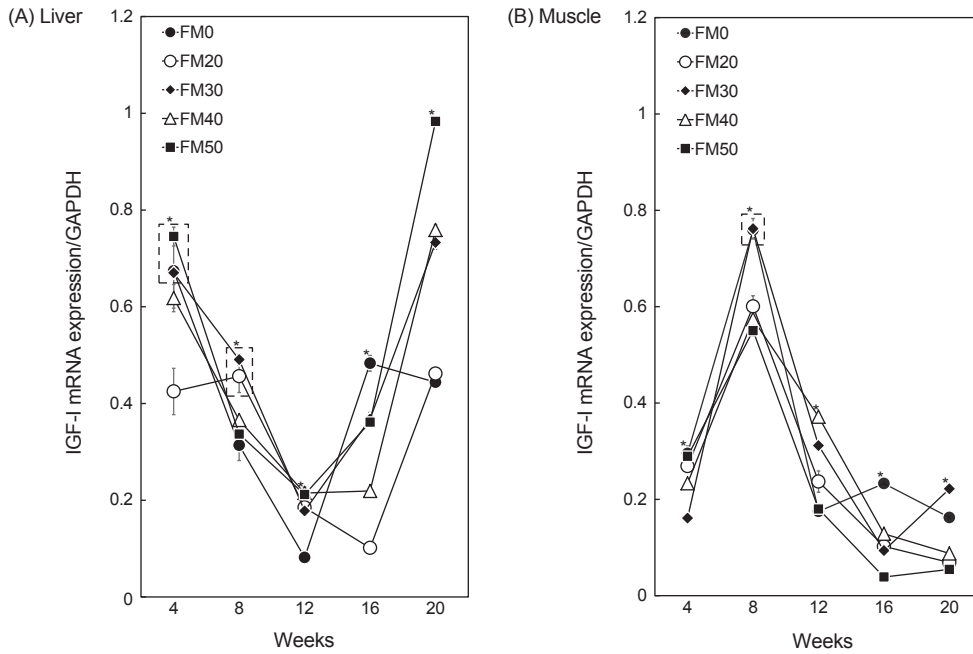


Fig. 3. RT-PCR results revealed an IGF-I mRNA expression in liver of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 20 weeks. IGF-I mRNA expression for each diet group expressed as a ratio to GAPDH (n=3). Expression of the housekeeping gene GAPDH served as control. (A) Liver. (B) Muscle. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *P<0.01 compared with 0 week group. FM0, replacement ratio 0% of fish meal diet; FM20, replacement ratio 20% of fish meal diet; FM30, replacement ratio 30% of fish meal diet; FM40, replacement ratio 40% of fish meal diet; FM50, replacement ratio 50% of fish meal diet.

Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 정량·정성 분석하였다. cDNA 합성은 primescript first strand cDNA synthesis kit (TaKaRa Bio, Shiga, Japan)를 이용해 합성하였다. IGF-I 유전자는 PCR thermal cycler dice gradient를 이용하여 증폭하였으며, emeraldamp GT PCR master mix (TaKaRa Bio, Shiga, Japan)와 제작된 프라이머를 사용하였다(Table 2). PCR 조건은 initial denaturation, 95°C 5분 수행한 후, denaturation 95°C, 30초; annealing 55°C, 30초; extension 72°C, 30초로 총 30회 반복하여 각 유전자를 증폭하였다. 증폭된 산물은 1.5% agarose gel을 사용하여 전기영동으로 확인하였다.

Western blot 분석

근육과 간조직 내 IGF-I의 발현을 확인하기 위해 immunob-

lot 분석을 실행하였다. 각각의 조직(n=10)을 RIPA buffer 1 mL에 넣고 균질화한 다음, 12,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 분리하였다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit (#23225, Thermo)를 사용하여 microplate reader (EZ Read 400, Biochrom)에서 562 nm로 측정하였다. 단백질(50 µg)을 10-15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리하고, polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane으로 옮겼다. PVDF membrane은 tris buffered saline with Tween-20 (TBST)에 용해된 10% bovine serum albumin (BSA)에서 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 1차 항체로는 IGF-I, IGF-I receptor (IGF-IR), tyrosine-phosphorylation (PY99), α-tubulin을 사용하였으며, 실험에 사용한 항체는 Santa Cruz Biotechnology 제품이며, IGF-I 항

Table. 2 Oligonucleotide sequences of primers for the real-time qPCR assay

Identification	Primer name	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	GenBank#
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH_F	AAACCTGCCAGCTACGAAAA	166	AB029337.1
	GAPDH_R	GGTCATTAAGAGCGATGCCA		
Insulin-like growth factor-I	IGF-I_F	CGGCGCCTGGAGATGTACTG	144	AF016922.2
	IGF-I_R	TGTCCTACGCTCTGTGCCCT		

PCR, polymerase chain reaction; F, forward; R, reverse.

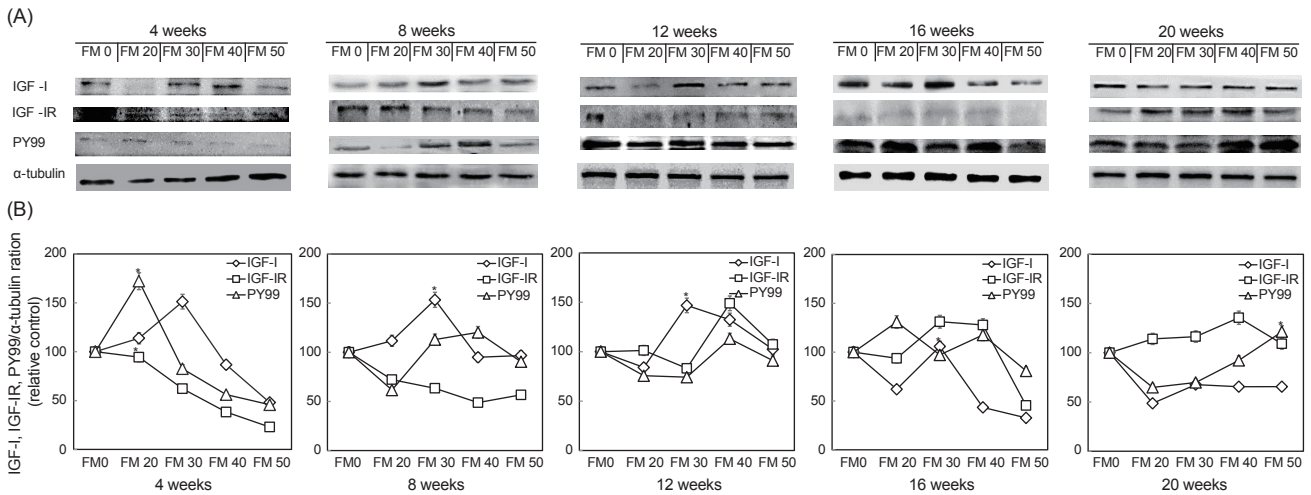


Fig. 4. Protein expression in liver of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 20 weeks. (A) Western blot analysis of IGF-I signaling pathway. (B) Expression of IGF-I, IGF-IR and PY99 activity. Each expression level is presented as a ratio against α -tubulin. * $P < 0.01$ compared with 0 week group. FM0, replacement ratio 0% of fish meal diet; FM20, replacement ratio 20% of fish meal diet; FM30, replacement ratio 30% of fish meal diet; FM40, replacement ratio 40% of fish meal diet; FM50, replacement ratio 50% of fish meal diet.

체는 실험실에서 직접 제작하여 분석하였다. Densitometry는 Gene Tools version 4.03 (SYNGENE, Cambridge, UK)을 이용하여 확인하였다.

통계처리

실험의 분석결과는 SPSS 프로그램(Statistical Package for Social Science, SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 이용하여 처리하였고, one-way ANOVA test를 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

성장

20주간 사육실험 결과(Fig. 1), 넙치 육성어의 체중은 12주까지 급속하게 증가하였으며, 이후 16주와 20주에서는 모든 실험구에서 유의하게 높은 값을 나타내었으나($P < 0.001$), 이 두 기간 사이에서의 유의성은 나타나지 않았다($P > 0.001$). 한편, 실험구별 성장을 4주 간격으로 조사하여 비교해 보면, 실험 종료일까지 FM30 실험구(어분 대체 비율 30% 실험구)에서 체중이 증가할수록 성장도 유의하게 증가하는 것으로 나타났다($P < 0.001$). 이 결과는 실험사료에서 어분의 함량을 낮추고 식물성 단백질인 밀글루텐과 농축콩단백을 중심으로 대체한 결과로 보인다. 현재까지 어분은 배합사료에 사용되는 값비싼 원료 중의 하나로서 공급의 불안정으로 인해 가격이 계속해서 증가하고 있기 때문에 어분을 대체하려는 연구가 활발히 진행되고 있다(Kikuchi, 1999; Chou et al., 2004; Gomez-Requeni et al., 2004;

Tacchi et al., 2012; Apper-Bossard et al., 2013; Khosravi et al., 2015; Bu et al., 2018). 그 중에서도 경제적인 식물성 단백질 원료 중 밀글루텐은 높은 공급성과 낮은 가격이 특징이며 글루타민이 풍부하여 면역에 좋다고 알려져 있다(Tusche et al., 2012; Apper-Bossard et al., 2013). 대서양넙치(*Hippoglossus hippoglossus*)와 대서양연어(*Salmo salar*)에서 어분대체 원료로 밀글루텐을 사용한 결과, 밀글루텐이 어분을 대체할 수 있는 비율이 약 20%까지 가능하였다(Storebakkena et al., 2000; Helland and Grisdale-Helland, 2006). 본 연구 결과에서도 밀글루텐을 어분 대체원으로 사용할 경우, 밀글루텐의 함량이 대조사료보다 약 3배 높은 FM30 실험구의 비율이 적절하다고 판단된다.

혈중 IGF-I과 IGFBP level 분석

IGF-I은 간에서 생성되어 혈액을 통해 전신으로 운반되어, 근육조직의 형성에 중요한 역할을 한다고 알려진 성장인자이다(Wood et al., 2005). IGF-I은 혈액 내에서 IGFBP-3와 결합하여 존재하고 있으며, 이 결합단백질은 IGFs의 반감기를 연장시켜 준다(Nam et al., 1996). 본 연구 결과, 혈중 IGF-I level는 어분 대체 단백질의 함량에 따라 다르게 나타났다. 한편 IGF-I과 가장 많이 결합하여 존재하고, 식이 단백질과 밀접한 관계가 있는 IGFBP-3 level는 20주 사육기간동안 FM30 실험구가 대조구와 유사한 값을 보였고($P < 0.01$, Fig. 2), 이 결과는 혈액 중의 IGF-I level의 경향과 유사하였다. 혈중 IGF-I level과 혈중 IGFBP-3 level은 실험시작부터 실험종료시점인 20주까지 비슷한 경향으로 발현이 되는 것을 확인하였으며, 모두 동일하게 어분 대체 비율이 30%인 FM30에서 높은 값이 나타났다. 이리

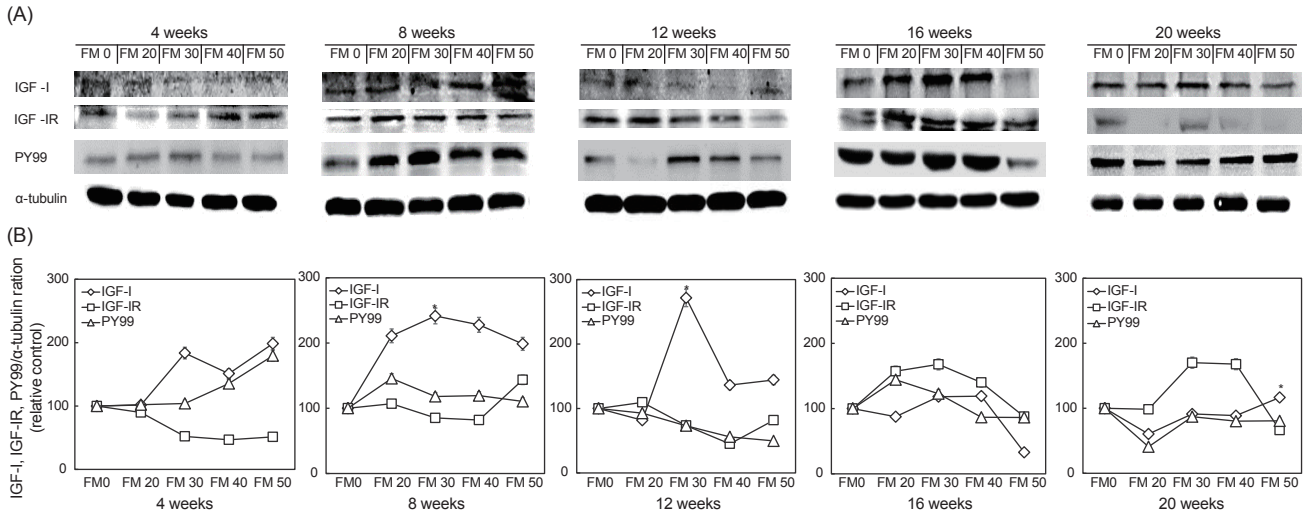


Fig. 5. Protein expression in muscle of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 20 weeks. (A) Western blot analysis of IGF-I signaling pathway. (B) Change of IGF-I, IGF-IR and PY99 expression rate. Each expression level is presented as a ratio against α -tubulin. * $P < 0.01$ compared with 0 week group. FM0, replacement ratio 0% of fish meal diet; FM20, replacement ratio 20% of fish meal diet; FM30, replacement ratio 30% of fish meal diet; FM40, replacement ratio 40% of fish meal diet; FM50, replacement ratio 50% of fish meal diet.

한 결과를 통해, 넙치 육성어 사육 시 공급하는 어분 대체 사료의 적정 비율이 30%가 적합하다고 판단된다.

IGF-I mRNA의 발현

IGF-I mRNA의 발현량은 간에서 유의적으로 높게 나타났다 ($P < 0.01$, Fig. 3). 이 결과는 IGF-I의 주된 생산이 간에서 이루어지고 있다는 결과를 확인시켜준다(Kumar et al., 2016). 대조구와 비교해 볼 때, 어분대체 30%의 실험구인 FM30에서 IGF-I의 발현량이 높았으며, 이러한 경향은 간과 근육에서 동일하게 나타났다.

IGF-I, IGF-IR과 tyrosine-phosphorylation의 발현

넙치의 간과 근육조직에서 IGF-I의 발현을 확인하기 위해 western blot으로 분석한 결과, Fig. 3과 같이 넙치의 근육과 간에서 IGF-I이 모두 존재하고 있는 것을 확인하였으며, 혈중 IGF-I level과 유사하게 FM30 실험구에서 발현이 높게 나타났다. 실험 종료 시기인 20주까지의 사육기간 동안 대체로 성장이 빠른 초기단계인 4-8주 근육에서 IGF-I의 단백질 발현량이 높았으며, 그 이후에는 간과 근육에서 비슷한 결과를 나타내고 있는 것을 알 수 있었다(Fig. 4, 5). IGF-I 신호전달 체계의 첫 번째 단계인 인산화 유무를 판단하기 위해 PY99의 활성을 확인하였으며, 그 결과 20주까지 원활하게 IGF-I 신호 전달이 진행되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4, 5). 간과 근육 내 IGF-I의 발현은 영양 상태와 관련되어 있으며(Duan, 1997; Ohlsson et al., 2009; Fuentes et al., 2013), 본 연구에서도 어분 대체 실험구 내 IGF-I 활성이 다르게 나타났으며, 그 중에서도 어분대체 30%

실험구의 IGF-I 활성이 12주를 제외하고 높게 나타났다. 12주째 FM30 실험구가 낮은 발현을 보인 것은 고수온에 의한 수온 변화 및 질병에 의한 폐사로 개체 간의 차이가 큰 이유였을 것으로 생각된다.

식물성 단백질을 이용한 Torstensen et al. (2008)의 결과, 대서양연어의 성장률이 어분 대체 40%의 실험구가 적절하였고, Zheng et al. (2012)은 넙치 단백질수분해물을 이용해 어분을 대체하는 경우 11%가 적합하였으며, Gomes et al. (1995)은 어분대체 66%를 식물성단백질로 대체가 가능하였다. 이러한 결과는 어종마다 적정 어분대체비율이 다르지만, 본 연구 결과를 포함하여 어종별 대체 단백질의 유효성을 판단할 수 있는 자료로 사용될 것이다.

결론적으로, 어분대체 30%가 기존 넙치 배합사료를 대체할 수 있을 것으로 판단되며, 추후에는 IGF-I signal의 하위인자들과 조직학적 발달에 관한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 국립수산물과학원(2019-013) 연구개발비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

Apper-Bossard E, Feneuil A, Wagner A and Respomdek F. 2013. Use of viral wheat gluten in aquaculture feeds. *Aquatic Bio-*

- syst 16, 9-21. <https://doi.org/10.1186/2046-9063-9-21>.
- Bower NI, Li X, Taylor R and Johnston IA. 2008. Switching to fast growth: the insulin-like growth factor (IGF) system in skeletal muscle of Atlantic salmon. *Experimental Biol* 211, 3859-3870. <https://doi.org/10.1242/jeb.024117>.
- Bu X, Lian X, Zhang Y, Chen F, Tang B, Ge X and Yang Y. 2018. Effect of replacing fish meal with corn gluten meal on growth, feed utilization, nitrogen and phosphorus excretion and IGF-I gene expression of juvenile *Pseudobagrus ussuriensis*. *Aquac Res* 49, 977-987. <https://doi.org/10.1111/are.13545>.
- Castillo J, Codina M, Martinez ML, Navarro I and Gutierrez J. 2004. Metabolic and mitogenic effects of IGF-I and insulin on muscle cells of rainbow trout. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286, 935-941. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00459.2003>.
- Chou RL, Her BY, Su MS, Hwang G, Wu YH and Chen HY. 2004. Substituting fish meal with soybean meal in diets of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* 229, 325-333. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00395-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00395-8).
- Coned-Sieira M and Soengas JL. 2017. Nutrient sensing systems in fish: Impact on food intake regulation and energy homeostasis. *Front Neurosci* 10, 603. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00603>.
- Dabrowski K and Kozak B. 1979. The use of fish meal and soybean meal as a protein in the diet of grass carp. *Aquaculture* 18, 107-114. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(79\)90023-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(79)90023-1).
- Duan C. 1997. The insulin-like growth factor system and its biological action in fish. *Amer Zool* 37, 491-503. <https://doi.org/10.1093/icb/37.6.491>.
- Duarte CM, Holmer M, Olsen Y, Soto D, Maeba N, Guiu J, Black K and Karakassis I. 2009. Will the oceans help feed humanity?. *Bioscience* 59, 967-976. <https://doi.org/10.1525/bio.2009.59.11.8>.
- Duncan DB. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11, 1-42. <http://dx.doi.org/10.2307/3001478>.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2017. An overview of recently published global aquaculture statistics. *FAO Aquaculture newsletter* 56, 6-8.
- Fuentes EN, aldes JA, Molina A and Bjoensson BT. 2013. Relation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone - Insulin-like growth factor system. *Gen Comp Endocrinol* 192, 136-148. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.06.009>.
- Fuentes EN, Bjornsson BT, Valdes JA, Einarsdottir IE, Lorca B, Alvarez M and Molina A. 2011. IGF-I/PI3K/Akt and IGF-I/MAPK/ERK pathways in vivo in skeletal muscle are regulated by nutrition and contribute to somatic growth in the fine flounder. *Amer Physiol Soc* 6, 1532-1542. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00535.2010>.
- Gill N, Higgs DA, Skura BJ, Rowshandeli M, Dosanjh BS, Mann J and Gannam AL. 2006. Nutritive value of partially dehulled and extruded sunflower meal for post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) in sea water. *Aquac Res* 37, 1348-1359. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01567.x>.
- Gomes EF, Rema P and Kaushik SJ. 1995. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): digestibility and growth performance. *Aquaculture* 130, 177-186. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00211-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00211-6).
- Gomez-Requeni P, Mingarro M, Caldach-Giner JA, Medale F, Martin SAM, Houlihan DF, Kaushik S and Perez-Sanchez J. 2004. Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotrophic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232, 493-510. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00532-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00532-5).
- Hardy RW. 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquac Res* 41, 770-776. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02349.x>.
- Hatlen B, Jakobsen JV, Crampton V, Alm M, Langmyhr E, Espe M, Hevroy EM, Torstensen EB, Liland N and Waagbo R. 2015. Growth, feed utilization and endocrine responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets added poultry by-product meal and blood meal in combination with poultry oil. *Aquac Nutr* 21, 714-725. <https://doi.org/10.1111/anu.12194>.
- Helland SJ and Grisdale-Helland B. 2006. Replacement of fish meal with wheat gluten in diets for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): Effect on whole-body amino acid concentrations. *Aquaculture* 261, 1363-1370. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.025>.
- Hevroy EM, Espe M, Waagbo R, Sandnes K, Ruud M and Hemre GI. 2005. Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. *Aquac Nutr* 11, 301-313. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2005.00357.x>.
- Khosravi S, Rahimnejad S, Herault M, Fournier V, Lee CR, Bui HTD, Jeong JB and Lee KJ. 2015. Effects of protein hydrolysates supplementation in low fish meal diets on growth performance, innate immunity and disease resistance of red sea bream *Pagrus major*. *Fish shellfish Immunol* 45, 858-868. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.039>.
- Kikuchi K. 1999. Use of defatted soybean meal as a substitute for fish meal in diets of Japanese flounder (*Paealichthys olinaceus*). *Aquaculture* 179, 3-11. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00147-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00147-7).
- Kumar S, Zs JS, Nagy Z, Fazekas G, Hanasi M, Sinha AK, Boeck GD and Gal D. 2016. Potential of processed animal protein versus soybean meal to replace fish meal in practical diets for European catfish (*Silurus glanis*): growth response and liver gene expression. *Aquac Nutr* 23, 1179-1189. <https://doi.org/10.1111/anu.12487>.

- Lovell RT. 1984. Use of soybean products in diet for aquaculture species. *Anim Nutr Bull* 2, 1-6.
- McCoy HD. 1990. The critical ingredient in aquaculture feeds. In: *Fishmeal*. *Aquac Mag* 16, 43-50.
- Nam TJ, Kwon MJ, Lee SM, Park KY, Kim Y, Park SR and Pyeun JH. 2001. Effect of dietary proteins on serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-Binding protein-3 in Korean Rockfish, *Sebastes schlegeli*. *J Korean Fish Soc* 34, 550-555.
- Nam TJ, Park KY, Lee YD and Kim YU. 1996. Serum levels of insulin-like growth factor-I in Flounder, *Parlichthys olivaceus*. *J Korean Fish Soc* 29, 150-156.
- Naylor RL, Goldburg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MCM, Clay J, Folke C, Lubchenco J, Mooney H and Troell M. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405, 1017-1024.
- Oginio C. 1980. Requirements of carp and rainbow trout for essential amino acids. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 46, 171-174. <https://doi.org/10.2331/suisan.46.171>.
- Ohlsson C, Mohan S, Sjogren K, Tivesten A, Isgaard J, Isaksson O, Jansson JO and Svensson J. 2009. The Role of Liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocr Rev* 30, 494-535. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0010>.
- Rodriguez-Serna M, Olvera-Novoa MA and Carmona-Osalde C. 1996. Nutritional value of animal by-product meal in practical diets for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) fry. *Aquac Res* 27, 67-73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1996.tb00967.x>.
- Sissener NH, Hemre GI, Espe M, Sanden M, Torstensen BE and Hevroy EM. 2013. Effects of plant-based diets on glucose and amino acid metabolism, leptin, ghrelin and GH-IGF system regulation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac Nutr* 19, 399-412. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00971.x>.
- Storebakkena T, Shearerb KD, Baeverfjorda G, Nielsenc BG, Asgarda T, Scottb T and Laported AD. 2000. Digestibility of macronutrients, energy and amino acids, absorption of elements and absence of intestinal enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with wheat gluten. *Aquaculture* 184, 115-132. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00316-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00316-6).
- Tacchi L, Seconbes CJ, Bickerdike R, Adler MA, Venegas C, Takle H and Martin SAM. 2012. Transcriptomic and physiological responses to fishmeal substitution with plant proteins in formulated feed in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMG Genomics* 13, 363. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-363>.
- Torstensen BE, Espe M, Sanden M, Stubhaug I, Waagbo R, Hemre GI, Fontanillas R, Nordgarden U, Hevroy EM, Olsvik P and Bermtssen MHG. 2008. Novel production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) protein based on combined replacement of fish meal and fish oil with plant meal and vegetable oil blends. *Aquaculture* 285, 193-200. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.025>.
- Tusche K, Arning S, Wuertz S, Susenbeth A and Schulz C. 2012. Wheat gluten and potato protein concentrate-Promising protein sources for organic farming of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 21, 120-125. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.03.009>.
- Velez EJ, Lutffi E, Azizi S, Perello M, Salmeron C, Riera-Codina M, Ibaez A, Fernandez-Borras J, Blasco J, Capilla E, Navarro I and Guterrez J. 2017. Understanding fish muscle growth regulation to optimize aquaculture production. *Aquaculture* 467, 28-40. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.004>.
- Wilson RP and Halver JE. 1986. Protein and amino acid requirements of fishes. *Annu Rev Nutr* 6, 225-244. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.06.070186.001301>.
- Wood AW, Duan C and Bern HA. 2005. Insulin-like growth factor signaling in fish. *Int Rev Cytol* 243, 215-285. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)43004-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)43004-1).
- Zheng K, Liang M, Yao H, Wang J and Chang Q. 2012. Effect of dietary fish protein hydrolysate on growth, feed utilization and IGF-I levels of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquac Nutr* 18, 297-303. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00896.x>.
- Zheng K, Xu T, Qian C, Liang M and Wang X. 2013. Effect of low molecular weight fish protein hydrolysate on growth performance and IGF-I expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed high plant protein diets. *Aquac Nutr* 20, 372-380. <https://doi.org/10.1111/anu.12090>.