

치어기 대서양 참다랑어(*Thunnus thynnus*) 사료 내 효소처리 어분과 DHA유의 이용성

지승철 · 신재형¹ · 김대중 · 정민환 · 김정현 · 이경준^{1,2*}

국립수산과학원 제주수산연구소, ¹제주대학교 해양생명과학과, ²제주대학교 해양과학연구소

Utilization of Enzyme-treated Fish Meal and DHA Oil in Diets for Juvenile Atlantic Bluefin Tuna *Thunnus thynnus*

Seung-Cheol Ji, Jaehyeong Shin¹, Dae-Jung Kim, Minhwan Jeong, Jung-hyun Kim and Kyeong-Jun Lee^{1,2*}

Marine Science Institute, Jeju National University, Jeju 63333, Korea

¹Department of Marine Life Science, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

²Marine Science Institute, Jeju National University, Jeju 63333, Korea

This study was conducted to estimate the optimum dietary DHA oil level and replacement level of enzyme treated fish meal (EFM) with sardine fish meal for juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus*. Four diets were used: 1) EFM75 in which 75% EFM and 4% DHA oil were applied, 2) EFM60, with 60% EFM and 15% sardine fish meal, 3) DHA2 with 2% of DHA oil, and 4) SL as a raw fish feed. In a feeding trial, juvenile bluefin tuna (body weight 30.1 g) were randomly stocked into four experimental tanks (69 tones) and fed the experimental diets for 13 days. Fish weight gain was higher in the EFM75 and SL groups than in the DHA2 and EFM60 groups. The feed conversion ratio was lower in the EFM75 and DHA2 groups than in the EFM60 and SL groups. Survival was higher in fish fed the formulated diet groups (EFM75, EFM60 and DHA2) than in fish fed SL. This study clearly indicates that up to 10% dietary sardine fish meal can be used in juvenile *T. thynnus* diets, with an optimum dietary DHA oil level of approximately 3%.

Keywords: Enzyme-treated fish meal, DHA, Tuna, Protein source, Feeds

서론

참다랑어(bluefin tuna)는 대표적인 회유성 어종으로, 우리나라의 동해와 남해, 일본 전역과 태평양, 대서양 등 전 세계 해역에 널리 분포한다. 참다랑어는 최대 500 kg 전-후까지 빠르게 성장 할 뿐만 아니라 맛이 좋아, 수요가 높은 고부가가치 어종이다(Kumai, 1998). 참다랑어는 분포위치와 형태에 따라 대서양 참다랑어(*Thunnus thynnus*), 태평양참다랑어(*Thunnus orientalis*), 남방참다랑어(*Thunnus maccoyii*)로 분류된다. 세계 연간 대서양참다랑어의 어획량은 22,117톤으로, 양식생산량인 6,909톤에 비해 높아 어획에 대한 의존도가 높다(FAO, 2019). 대서양참다랑어는 스페인, 크로아티아, 몰타 등에서 생산되며

(Van Beijnen, 2017), 대부분 성어와 자-치어를 채포하여 양성한다(Benetti et al., 2016). ICCAT (international commission for the conservation of Atlantic tunas)는 참다랑어의 남획을 막기 위해 연간 대서양참다랑어의 어획량을 규제하고 있다(FAO, 2011). 한국의 어획할당량은 2018년도 기준 210톤이다(MOF, 2017). 참다랑어에 대한 어획규제는 앞으로 계속될 것으로 예상되고 있어 참다랑어 양식에 대한 중요성이 대두되었다.

참다랑어의 최대 소비국인 일본은 가장 먼저 북태평양참다랑어 양식을 연구하기 시작했다. 1970년도에 시작된 연구는 1979년도에 자연산 친어로부터 채란에 성공하였고(Miyashita, 2002), 2002년도에 산란유도와 종묘생산기술을 확보하며 참다랑어의 완전양식을 가능하게 하였다(Sawada et al., 2005). 태

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

E-mail address: kjlee@jeju.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.2020.0181>

Korean J Fish Aquat Sci 53(2), 181-190, April 2020

Received 27 December 2019; Revised 24 February 2020; Accepted 28 February 2020

저자 직위: 지승철(연구사), 신재형(대학원생), 김대중(연구관), 정민환(연구사), 김정현(연구사), 이경준(교수),

평양참다랑어의 경우, 배합사료 내 조단백질과 조지질(Biswas et al., 2009b), 탄수화물(Biswas et al., 2009a), vitamin C 요구량(Biswas et al., 2013)과 사료 내 단백질원에 관한 연구가 일부 진행되었다(Biswas et al., 2011; Ji et al., 2017). 그러나, 대서양참다랑어를 대상으로 진행된 연구는 미흡한 실정이다. 배합사료 연구의 부재로 인해 참다랑어 양식에는 아직까지 생사료를 주로 사용하고 있다. 친환경적이고 지속 가능한 양식을 위해 참다랑어용 배합사료의 개발이 절실하다. 참다랑어용 배합사료를 개발에 있어 가장 큰 문제는 ‘어분의 낮은 이용효율’이다. 어분은 조단백질함량이 60-75%로 높고 필수아미노산과 필수지방산이 골고루 함유되어 있다. 뿐만 아니라 미지성장인자(unknown growth factors)로 인해 대부분의 어류에서 유인성이 뛰어나 양어 사료 내 주단백질원으로 사용된다(Miles and Chapman, 2015). 그러나, 참다랑어는 어분에 대한 소화율이 타 어종에 비해 낮은 것으로 알려져 있다(Carter et al., 1999). 치어기 참다랑어(0.46 g)를 대상으로 한 연구에서 어분이 53% 사용된 배합사료가 생사료보다 유의적으로 낮은 성장률을 보였고, 어분의 가공과정에서 발생하는 ‘단백질의 변성’이 원인이라고 보고되었다(Takii et al., 2007a; 2007b). 참다랑어 배합사료 연구는 어분의 대체원료를 찾는데 초점을 두고 진행되었다. Ji et al. (2008)은 치어기 참다랑어를 대상으로 주단백질원이 ‘효소처리어분(enzyme-treated fish meal)’인 실험사료와 생사료(냉동 까나리)의 사육 효능을 비교한 결과, 두 실험구의 성장률은 유사하여 단백질원으로 이용가능함을 보고하였다. 효소처리어분은 어류가공과정에서 발생하는 부산물을 papain, pepsin, trypsin 등의 효소와 반응시켜 제조된다(Je et al., 2009; Hsu, 2010; Ngo et al., 2010). 효소처리어분은 저분자 peptide의 함량이 많아, 체내 이용률이 높을 뿐만 아니라 다양한 생리활성물질 함유하고 있어 양어사료 내 주단백질원으로 높은 효율을 보였다(Neklyudov et al., 2000; Chalamaiah et al., 2012).

국내의 경우, 참다랑어용 배합사료를 자체적으로 개발하기 위한 일부 연구가 수행되었다. Ji et al. (2019)은 효소처리어분과 DHA유를 사용한 배합사료의 사육효능을 생사료(까나리)와 비교한 결과, 두 실험구 사이에 유사한 성장을 보여 주단백질원과 지질원으로 사용가능함을 보고하였다. 그러나, 효소처리어분과 DHA유는 비교적 높은 가격에 거래되는 원료로 다량 사용할 경우, 사료의 제조 단가를 증가시킬 수 있다. DHA는 해산어의 필수지방산으로 어류의 성장과 생존율에 중요한 요소로 알려져 있다(NRC, 2011a). 참다랑어의 체내 DHA함량은 다른 어종에 비해 비교적 높은 것으로 보고되었다(Aubourg et al., 1990; Sawada et al., 1993; Saito et al., 1995). 참다랑어의 정확한 DHA 요구량은 규명되지 않았으나 일반적으로 참다랑어용 배합사료에는 DHA 함량이 높은 고가의 연어난유(salmon egg oil)와 가다랑어유(bonito oil)가 지질원으로 사용된다(Ji et al., 2008). DHA유는 순도가 80% 이상인 고농축유로 명태간유(cod liver oil)와 비교하여 약 100배 정도 비싼 가격에 거래되는

고가의 원료이다. 과학적이고 경제적인 사료를 만들기 위해 사료 내 두 원료의 적정함량에 대한 연구는 필수적이다. 따라서, 본 연구는 치어기 참다랑어 사료 내 효소처리어분과 DHA유의 적정 첨가비율을 조사하고자 수행되었다.

재료 및 방법

실험사료

실험사료는 효소처리어분이 75% 포함된 사료(EFM75), 효

Table 1. Dietary formulation and proximate compositions of the experimental diets for juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus*

Ingredients	Experimental diets			
	EFM75	EFM60	DHA2	SL ¹
Enzyme treated fish meal ²	75.0	60.0	75.0	-
Fish meal ³	-	15.0	-	-
Soy protein concentrate ⁴	8.00	8.00	8.00	-
DHA oil ⁵	4.00	4.00	2.00	-
Cod liver oil ⁶	4.00	4.00	6.00	-
Vitamin premix ⁷	1.00	1.00	1.00	-
Mineral premix ⁸	1.00	1.00	1.00	-
Taurine	1.00	1.00	1.00	-
Starch	1.50	1.50	1.50	-
Lecithin	4.50	4.50	4.50	-
<i>Proximate composition (% of dry matter)</i>				
Crude protein	57.7	58.9	57.7	65.2
Crude lipid	17.1	17.3	17.1	10.3
DHA	2.72	3.02	2.10	1.36
EPA	0.82	0.96	0.97	0.33
Ash	8.17	7.87	8.17	7.53
Moisture	4.94	5.15	3.95	77.9

¹Sand lance, China. ²CPSP, Sopropeche, France. ³Sardine, Orizon S.A., Chile. ⁴Corp. Korea flavor, Korea. ⁵Corp. Comport, Korea (DHA concentration: 80%). ⁶Corp. E-wha oil & fat industry, Korea. ⁷Vitamin premix (g/ kg of mixture): L-ascorbic acid, 121.2; DL- α tocopheryl acetate, 18.8; thiamine hydrochloride, 2.7; riboflavin, 9.1; pyridoxine hydrochloride, 1.8; niacin, 36.4; Ca-D-pantothenate, 12.7; myo-inositol, 181.8; D-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. ⁸Mineral premix (g/ kg of mixture): MgSO₄·7H₂O, 80; NaH₂PO₄·2H₂O, 370; KCl, 130; Ferric citrate, 40; ZnSO₄·7H₂O, 20; Ca-lactate, 356.5; CuCl, 0.2; AlCl₃·6H₂O, 0.15; Na₂Se₂O₃, 0.01; MnSO₄·H₂O, 2.0; CoCl₂·6H₂O, 1.0; EFM75, including 75% of enzyme-treated fish meal; EFM60, including 60% of enzyme-treated fish meal; DHA2, including 2% of DHA oil; SL, sand lance.

소처리어분을 일반어분으로 20% (사료 내 15%) 대체한 사료(EFM60), DHA유를 기존의 4%에서 2%로 감소시킨 사료(DHA2)와 대조구로 생사료인 까나리(sand lance, SL)가 사용되었다(Table 1). 비타민과 미네랄 혼합물(premix)은 방어 등의 해산어류의 요구량을 토대로 제작하여 사용되었다. 실험사료의 영양소 함량은 참다랑어의 조단백질과 조지질 요구량을 기초로 조성되었다(Biswas et al., 2009b). 실험사료는 파쇄기를 이용하여 모든 사료원을 미세한 분말로 만든 후, 사료조성표에 따라 측량 및 혼합되었다. 혼합물은 사료제작기(SP-50, Gungang engineering, Daegu, Korea)를 이용하여 총 2가지 크기 (2, 3 mm)로 성형되었다. 완성된 사료는 건조 후(24 h, 20°C), 사료 공급 전까지 냉동보관(-20°C)되었다. 실험사료에 대한 아미노산과 지방산 조성은 Table 2와 Table 3에 각각 나타내었다.

실험어와 사육관리

실험에 사용된 참다랑어(부화 후 60일)는 국립수산과학원 제주수산연구소에서 인공부화된 치어를 이용하였고, 사양실험은 연구소 내 참다랑어 전용 사육시설에서 진행되었다. 참다랑어는 3일간 생사료와 배합사료를 교차로 공급하여 실험환경에 적

Table 2. Essential and non-essential amino acid composition of the experimental diets for Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* (% of protein)

AAs	EFM75	EFM60	DHA2	SL
EAA¹				
Arginine	7.59	7.45	7.53	7.01
Histidine	3.16	3.25	3.14	3.93
Isoleucine	4.30	4.44	4.34	4.82
Leucine	7.23	7.45	7.26	8.03
Lysine	7.94	8.04	7.90	8.78
Phenylalanine	4.02	4.13	4.03	4.51
Threonine	4.61	4.63	4.55	4.97
Valine	4.99	5.12	4.97	5.31
NEAA²				
Alanine	6.98	6.93	7.01	6.41
Aspartic acid	10.2	10.2	10.1	11.4
Glycine	9.86	9.23	9.87	6.23
Glutamic acid	15.7	15.7	15.7	15.9
Proline	5.77	5.79	5.98	4.90
Serine	5.00	4.92	4.97	4.90
Tyrosine	2.63	2.74	2.71	2.94
Total	100	100	100	100

¹Essential amino acids. ²Non-essential amino acids. EFM75, including 75% of enzyme-treated fish meal; EFM60, including 60% of enzyme-treated fish meal; DHA2, including 2% of DHA oil; SL, sand lance.

응 시킨 후, 사육실험에 이용되었다. 예비사육 후, 참다랑어(평균무게, 30.1 g)는 총 4개의 원형 콘크리트 수조(용량, 69톤; 지름 7 m×높이 1.8 m)에 각 30마리씩 배치되었다. 수조 내 용존산소(dissolved oxygen, DO)는 산소발생기(aeration)와 액화산소 주입기를 통해 조절되었다. 실험사료는 1일 4회(08:00, 11:00, 14:00, 17:00 h)에 나누어 총 13일간 반복 공급되었다. 수조 바닥의 이물질은 4일 1회 siphon을 사용하여 제거되었다.

성장률 측정

실험어의 최종무게는 사육실험 종료 후 측정되었고, 소화기관의 음식물을 제거하기 위해 무게 측정 17시간 전부터 사료

Table 3. Fatty acids composition of the experimental diets for Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* (% of lipid)

Fatty acids	EFM75	EFM60	DHA2	SL
12:0	0.10	0.10	0.10	0.13
14:0	8.30	8.80	9.19	9.08
14:1	0.10	0.10	0.10	0.00
15:0	0.70	0.60	0.70	0.38
16:0	27.4	27.5	28.6	33.6
16:1	4.18	4.26	4.67	2.94
17:0	0.40	0.40	0.40	0.26
17:1	0.10	0.10	0.10	0.00
18:0	6.00	5.82	6.30	9.85
18:1n9 (OA)	17.3	15.5	16.8	12.8
18:2n6 (LA)	5.47	4.77	5.23	1.47
18:3n3 (LNA)	2.10	1.82	2.06	2.67
18:3n6	0.10	0.10	0.10	1.32
20:0	0.36	0.35	0.39	0.28
20:1	5.04	4.64	5.42	1.14
20:3n3	0.08	0.08	0.09	0.41
20:3n6	0.19	0.17	0.20	0.24
20:4n6 (AA)	0.38	0.45	0.44	0.96
20:5n3 (EPA)	4.82	5.60	5.71	3.86
22:0	0.14	0.12	0.13	0.24
22:1n9	0.75	0.72	0.87	1.43
22:6n3 (DHA)	16.0	18.0	12.4	16.9
DHA/EPA	3.31	3.21	2.17	4.37
∑n-3 ¹	22.9	25.4	20.1	23.4
∑n-6 ²	5.86	5.22	5.67	2.43
n-3/n-6	3.91	4.86	3.55	9.64
Total	100	100	100	100

¹Omega-3 fatty acids: 18:3n3, 20:5n3, 22:6n3. ²Omega-6 fatty acid: 18:2n6, 20:4n6. EFM75, including 75% of enzyme-treated fish meal; EFM60, including 60% of enzyme-treated fish meal; DHA2, including 2% of DHA oil; SL, sand lance.

공급을 중단하였다. 10마리의 실험어를 무작위로 선별하여 얼음물에 마취시킨 후, 소화기관을 적출하였다. 적출된 소화기관은 증류수와 혼합되어 분쇄 후, 원심분리를 거쳐 소화효소 활성 분석에 사용되었다. 기관 적출 후, 남은 어체(carass)는 일반성분분석에 사용되었다. 실험어의 성장률과 사료전환효율 등에 대한 계산식은 다음과 같다. 성장률(weight gain, WG; %)= $100 \times (\text{final mean body weight} - \text{initial mean body weight}) / \text{initial mean body weight}$; 일간성장률(specific growth rate, SGR; %)= $[(\log_e \text{ final body weight} - \log_e \text{ initial body weight}) / \text{days}] \times 100$; 사료계수(feed conversion ratio, FCR) = dry feed fed/wet weight gain; 단백질이용효율(protein efficiency ratio, PER)=wet weight gain/total protein given; 사료공급량(feed intake, FI)=dry feed fed/fish.

일반성분

원료, 실험사료, 어체(각 수조 당 5마리)에 대한 일반성분분석은 AOAC (2000)의 방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125°C, 3 h), 조회분은 직접회화로법(550°C, 6 h), 단백질은 조단백분석기(Kjeltec™ 2300, FOSS analytical, Hilleroed, Denmark)로 분석되었으며, 지방은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 Soxhlet 추출장치(SOX406 fat analyzer, Jinan Hanon Instruments, Shandong, China)를 이용하여 분석되었다.

간·위·장중량과 비만도

실험어(각 수조 당 10마리)의 간, 위, 장을 각각 분리하여 체질량 대비 무게를 계산하였고, 체중과 전장을 이용해 비만도를 계산하였다. 조사항목의 계산식은 다음과 같다. 간중량지수(hepato-somatic indexes, HSI)=(liver weight × 100)/fish body weight; 위중량지수(stomach-somatic indexes, SSI)=(stomach weight × 100)/fish body weight; 장중량지수(intestine-somatic indexes, ISI)=(intestine weight × 100)/fish body weight; 비만도(condition factor, CF; %)=(fish body weight / fish body length³) × 100.

소화효소 활성

실험어(각 수조 당 5마리)의 소화기관 내 5가지 종류의 효소활

성(pepsin, trypsin, chymotrypsin, amylase, lipase)이 분석되었다. 적출된 장기는 증류수와 혼합되어 조직균질기(tissue grinder)를 이용해 분쇄되었다. 분쇄된 샘플은 원심분리(4°C, 10,000 g, 15 min)후 상층액이 분석에 사용되었다. 각 시료의 단백질 총량(total protein)은 Bradford (1976)의 방법에 따라 kit를 이용하여 분석되었다. Pepsin과 amylase의 활성은 Worthington (1991)의 방법에 따라, trypsin의 활성은 Erlanger et al. (1961)의 방법에 따라, chymotrypsin의 활성은 Erlanger et al. (1961)의 방법에 따라, lipase의 활성은 Borlongan (1990)의 방법에 따라 분석되었다.

아미노산

시료는 0.5 mm 이하로 분쇄되었고, 6N HCl 15mL를 첨가하여 건조오븐(110°C)에서 24 h 반응시켰다. 분해된 시료는 항온수조(55°C)를 이용하여 2회 감압농축시킨 후, 25 mL volumetric flask에 정용되었다. 0.45 µL membrane filter로 여과 후, 아미노산 분석기(S433, Sykam GmbH, Fuerstenfeldbruck, Germany)를 통해 분석되었다.

지방산

지방산은 Metcalfe and Schmitz (1961)의 방법에 따라 추출되었다. 분리된 지방산은 capillary column (112-88A7, 100 m × 0.25 mm, film thickness 0.20 µm, Agilent Technologies, USA)이 장착된 gas chromatography (6800GC, Agilent, San Francisco, USA)를 통해 분석되었다. Carrier gas는 수소를 사용하였고, oven의 온도는 140°C에서 240°C까지 4°C/min으로 증가시켰다. Inject의 온도는 240°C, detector의 온도는 240°C로 설정하였다. Standard sample은 PUFA 37 component FAME Mix (Supelco, USA)를 사용하였다.

수질

사육실험 기간 동안 수조 내 수온과 용존산소를 1일 2회 측정하였다. 측정은 동일한 위치에서 진행되었으며, 용존산소측정기(YSI 600QS, YSI, Yellow Springs, USA)를 이용하였다. 사육실험 기간 내 평균 사육수온은 24.7°C, 용존산소는 10.3 mg/L로 유지되었다.

Table 4. Growth performance and feed utilization of juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 13 days

Dietary treatment	FBW ¹	WG ²	SGR ³	FCR ⁴	PER ⁵	FI ⁶	Survival (%)
EFM75	93.8±18.8 ^a	202	7.38	0.57	2.78	35.9	52.0
EFM60	63.1±19.7 ^c	103	4.73	1.07	1.49	34.2	48.0
DHA2	75.7±20.2 ^b	144	5.95	0.86	1.84	38.5	52.0
SL	101±20.9 ^a	226	7.89	1.38	1.15	96.6	36.0

¹Final mean body weight (g). ²Weight gain (%). ³Specific growth rate (%). ⁴Feed conversion ratio. ⁵Protein efficiency ratio. ⁶Feed intake (g). EFM75, including 75% of enzyme-treated fish meal; EFM60, including 60% of enzyme-treated fish meal; DHA2, including 2% of DHA oil; SL, sand lance. Mean values of FBW are presented as mean±standard deviation. Values in the same column having different superscript letters are significantly different (P<0.05). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

통계분석

분석결과는 SPSS (Version 12.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석 되었다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's multiple range test로 평균 간의 유의성(P<0.05)을 비교 하였다. 데이터는 평균값±표준편차(mean±standard deviation)로 나타내었으며, 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계분석 되었다.

결 과

실험어의 최종평균무게는 EFM75구와 SL구가 유사하였고, DHA2, EFM60 순으로 낮았다(Table 4). 흥미롭게도 사료전환

효율은 EFM75구가 가장 낮았고, DHA2, EFM60, SL 순으로 높았다. 사료공급량은 SL구가 가장 높았고, DHA2, EFM75, EFM60 순으로 낮았다. 생존율은 배합사료 실험구(EFM75, EFM60, DHA2)가 SL구 보다 높은 경향을 나타냈다. 실험어(carcass)의 일반성분조성(조단백질, 조지질, 조회분 함량)과 간, 위, 장중량, 비만도는 실험구간 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 5, 6). 흥미롭게도 실험어의 소화기관 내 pepsin과 lipase의 활성은 배합사료구(EFM75, EFM60, DHA2)가 생사료구(SL)에 비해 유의적으로 낮았다(Table 7). Trypsin과 amylase 활성은 배합사료구가 생사료구 보다 유의적으로 높았다. 실험어의 아미노산 조성은 실험구간 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 8). 실험어의 DHA 함량은 배합사료구가 생사료구와 비교하여 유의적으로 높았다.

Table 5. Carcass proximate compositions of juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 13 days (% of wet basis)

Dietary treatment	Crude protein	Crude lipid	Crude ash	Moisture
EFM75	18.9±0.45	3.60±0.93	5.09±0.60	72.2±3.99
EFM60	19.0±0.75	3.62±0.39	5.20±0.35	73.4±4.35
DHA2	18.5±0.32	3.56±0.51	4.95±0.71	72.5±2.48
SL	18.3±0.63	3.50±0.42	5.03±0.83	73.5±5.10

EFM75, including 75% of enzyme-treated fish meal; EFM60, including 60% of enzyme-treated fish meal; DHA2, including 2% of DHA oil; SL, sand lance. Mean values of five samples are presented as mean±standard deviation. Values in the same column having different superscript letters are significantly different (P<0.05). The lack of superscript letter indicates no significant differences among the treatments.

Table 6. Biological assessment of digestive organs of juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 13 days

Dietary treatment	HSI ¹	SSI ²	ISI ³	CF ⁴
EFM75	1.77±0.40	1.37±0.10	0.64±0.04	1.36±0.09
EFM60	2.04±0.56	1.38±0.16	0.58±0.22	1.29±0.14
DHA2	2.44±0.55	1.37±0.24	0.47±0.16	1.28±0.16
SL	2.44±0.40	1.27±0.13	0.56±0.18	1.29±0.12

¹Hepato-somatic index=(liver weight×100)/fish body weight. ²Stomach-somatic index=(stomach weight×100)/fish body weight. ³Intestine-somatic index=(intestine weight×100)/fish body weight. ⁴Condition factor=(fish body weight/fish body length³)×100. EFM75, including 75% of enzyme-treated fish meal; EFM60, including 60% of enzyme-treated fish meal; DHA2, including 2% of DHA oil; SL, sand lance. Mean values of ten samples are presented as mean±standard deviation. Values in the same column having different superscript letters are significantly different (P<0.05). The lack of superscript letter indicates no significant differences among the treatments.

Table 7. Digestive enzyme activities of juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 13 days (U / mg protein)

Dietary treatment	Pepsin	Trypsin	Chymo-trypsin	Amylase	Lipase
EFM75	28.5±2.32 ^b	12.1±1.52 ^a	6.30±1.68	3.92±0.39 ^a	130±4.25 ^b
EFM60	26.2±1.08 ^b	13.1±2.02 ^a	5.98±0.59	4.17±0.57 ^a	120±6.05 ^b
DHA2	27.2±2.02 ^b	12.5±0.28 ^a	5.53±0.23	4.09±0.55 ^a	128±3.08 ^b
SL	35.7±1.62 ^a	9.15±1.46 ^b	7.32±1.25	1.49±0.48 ^b	149±7.48 ^a

EFM75, including 75% of enzyme-treated fish meal; EFM60, including 60% of enzyme-treated fish meal; DHA2, including 2% of DHA oil; SL, sand lance. Mean values of five samples are presented as mean±standard deviation. Values in the same column having different superscript letters are significantly different (P<0.05). The lack of superscript letter indicates no significant differences among the treatments.

고 찰

참다랑어는 빛, 진동 등의 외부자극에 민감해 사육실험의 생존율이 다른 어류에 비해 낮게 나타난다(Miyashita, 2002). 본 연구에서도 참다랑어의 생존율(36-52%)은 낮았다. 이전의 참다랑어 연구에서도 낮은 생존율을 보여 사육실험에는 특별한 문제가 없었던 것으로 판단된다(Ji et al., 2008, 2017, 2019).

본 연구의 사육실험 결과, 정어리어분은 참다랑어 사료에 다량으로 사용하기에는 어려울 것으로 판단된다. Ji et al. (2017)은 치어기 참다랑어(2.36 g)를 대상으로 어분이 32% 포함된 배합사료와 생사료의 사육효능을 비교하였다. 실험결과, 배합사료구는 생사료구 대비 23% 낮은 성장을 보여 주단백질원으로 사용하기에는 어렵다고 보고하였다. 참다랑어는 어분의 이용효율이 낮은 것으로 알려져 있다(Takii et al., 2007a, 2007b). Carter et al. (1999)은 치어기 참다랑어를 대상으로 *in vitro* 소화율을 분석한 결과, 참다랑어는 대서양연어보다 어분에 대한

소화율이 낮다고 보고하였다. 본 연구의 사육실험 결과를 고려하였을 때, 치어기 참다랑어 사료 내 어분의 적정 사용함량은 10% 이하라고 판단된다. 어류의 소화효소 활성은 체중과 함께 증가하는 것으로 알려져 있다. 어류의 소화율은 소화기관 내 효소의 활성에 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Manjappa et al., 2002; Tibaldi et al., 2006; Lin and Luo, 2011; Li et al., 2014). 치어기 참다랑어(0.68-10.7 g)를 대상으로 진행된 연구에서도 성장함에 따라 소화효소 활성이 증가된다고 보고되었다(Ji et

Table 8. Essential and non-essential amino acids composition of juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 13 days (% of protein)

Amino acids	EFM75	EFM60	DHA2	SL
EAA¹				
Arginine	7.01	7.12	6.96	7.20
Histidine	6.55	6.15	6.08	6.09
Isoleucine	4.94	4.88	5.09	5.08
Leucine	7.85	7.77	7.90	7.86
Lysine	9.33	8.81	9.06	9.00
Phenylalanine	3.70	4.17	4.27	4.21
Threonine	4.94	4.86	4.84	4.82
Valine	5.72	5.66	5.88	5.87
NEAA²				
Alanine	6.45	6.56	6.51	6.44
Aspartic acid	9.90	9.92	9.96	9.94
Glycine	6.64	6.87	6.56	6.44
Glutamic acid	14.8	14.8	14.8	14.8
Proline	4.93	5.30	5.10	5.37
Serine	4.21	4.19	4.04	3.99
Tyrosine	3.00	2.94	2.99	2.90
Total	100	100	100	100

¹Essential amino acids. ²Non-essential amino acids. EFM75, including 75% of enzyme-treated fish meal; EFM60, including 60% of enzyme-treated fish meal; DHA2, including 2% of DHA oil; SL, sand lance. Mean values of three samples are presented. Values in the same row having different superscript letters are significantly different. The lack of superscript letter indicates no significant differences among the treatments (P<0.05).

Table 9. Fatty acids composition of juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the experimental diets for 13 days (% of lipid)

Fatty acids	EFM75	EFM60	DHA2	SL
12:0	0.11	0.11	0.12	0.13
14:0	4.69 ^b	4.45 ^b	4.80 ^b	9.08 ^a
14:1	0.56	0.23	0.62	0.00
15:0	0.35	0.17	0.29	0.38
16:0	18.6 ^b	18.0 ^b	19.5 ^b	33.6 ^a
16:1	6.43 ^a	5.57 ^a	5.77 ^a	2.94 ^b
17:0	1.10	1.02	1.77	0.26
17:1	1.17	1.24	1.14	0.00
18:0	5.67 ^b	5.60 ^b	4.96 ^b	9.85 ^a
18:1n9 (OA)	18.3 ^a	17.4 ^a	17.5 ^a	12.8 ^b
18:2n6 (LA)	6.58 ^a	5.55 ^a	5.74 ^a	1.47 ^b
18:3n3 (LNA)	1.08	2.24	1.75	2.67
18:3n6	1.17	0.94	1.19	1.32
20:0	0.19	0.83	0.79	0.28
20:1	1.21	1.22	1.77	1.14
20:3n3	0.00	0.33	0.82	0.41
20:3n6	0.16	0.28	0.17	0.24
20:4n6 (AA)	1.08	0.45	0.58	0.96
20:5n3 (EPA)	5.42 ^a	4.57 ^a	5.34 ^a	3.86 ^b
22:0	0.22	0.23	0.14	0.24
22:1n9	5.52 ^b	7.90 ^a	6.04 ^b	1.43 ^c
22:6n3 (DHA)	20.4 ^a	21.6 ^a	19.2 ^a	16.9 ^b
DHA/EPA	3.76	4.73	3.60	4.37
∑n-3 ¹	26.9	28.5	26.3	23.4
∑n-6 ²	7.66	6.00	6.32	2.43
n-3/n-6	3.51	4.74	4.17	9.64
Total	100	100	100	100

¹Omega-3 fatty acid: 18:3n3, 20:5n3, 22:6n3. ²Omega-6 fatty acid: 18:2n6, 20:4n6. EFM75, including 75% of enzyme-treated fish meal; EFM60, including 60% of enzyme-treated fish meal; DHA2, including 2% of DHA oil; SL, sand lance. Mean values of three samples are presented. Values in the same row having different superscript letters are significantly different (P<0.05).

al., 2019). 황다랑어(*Thunnus albacares*)와 gilthead seabream *Sparus aurata*도 이와 유사한 결과를 보였다(Moyano et al., 1996; Buentello et al., 2011). 본 연구에서는 치어기 참다랑어 (30.1 g)를 사용하였다. 치어기 참다랑어의 효소활성은 비교적 낮기 때문에 이용효율이 낮은 정어리어분을 사료에 다량 사용하기에는 어렵다고 판단된다. Biswas et al. (2016)은 태평양참다랑어(83 g)를 대상으로 일반어분을 78% 사용한 배합사료와 생사료(까나리)의 사육효능을 비교하였다. 35일간 진행된 사육 실험의 결과, 성장률은 두 실험구간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 치어기-육성기부터는 일반어분(정어리, 멸치)을 어느 정도 소화시킬 수 있을 것으로 사료된다. 참다랑어의 소화효소 활성을 고려하여, 성장단계에 따른 사료 내 일반어분의 적정 사용 함량에 대한 연구가 요구된다.

본 연구에서 효소처리어분은 참다랑어 사료에서 이용효율이 높은 것으로 나타났다. 참다랑어 사료 내 효소처리어분의 이용 가능성을 평가한 연구는 일부 진행되었다(Ji et al., 2008, 2017, 2019). 효소처리어분은 저분자 단백질의 함량이 일반어분에 비해 높은 것으로 알려져 있다(Aguila et al., 2007). 본 연구에서의 높은 성장률도 효소처리어분에 존재하는 다량의 저분자 단백질 때문인 것으로 사료된다. 또한 본 실험에 사용된 효소처리어분(CPSP, Sopropheche, Wimille, France)은 농어(*Dicentrarchus labrax*), 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*), 대서양연어(*Salmo salar*) 사료에서도 이용효율이 높은 것으로 보고되었다(Langar, 1992; Gomes et al., 1995; Berge and Storebakken, 1996). 효소처리어분의 종류는 가공공정과 사용되는 어종에 따라 다양하다(Kristinsson and Rasco, 2000). Ji et al. (2008)은 참다랑어 치어를 대상으로 한 연구에서 효소처리전갱이어분이 효소처리멸치어분에 비해 전반적으로 이용효율이 높았다고 보고하였다. 단백질의 평균 분자량에서는 효소처리전갱이어분(100-500 Da)이 효소처리멸치어분(5000 Da)에 비해 낮았다. 원료를 구성하는 단백질의 평균 분자량이 낮을수록 어류 체내에서의 이용효율이 높다고 알려져 있다(NRC, 2011b). 본 연구에서 사용된 효소처리어분의 평균 분자량은 3000 Da으로 일반어분에 비해 낮다. 따라서 본 연구에서 치어기 참다랑어의 성장에 긍정적인 효과를 보인 것은 효소처리어분의 저분자 펩타이드(dipeptides and oligopeptides)의 함량이 일반어분에 비해 높기 때문인 것으로 사료된다.

DHA는 해산어의 필수지방산으로 어류의 성장과 생존율에 매우 중요하다(Teshima et al., 1992). 참다랑어의 DHA 요구량은 규명되지 않았다. 본 연구의 실험사료 내 DHA 함량은 EFM75가 2.7%, DHA2가 2.1%였다. 실험어가 실제로 섭취한 DHA의 양은 1.37 g (EFM75), 1.13 g (DHA2)으로, 실험구 사이에 약간의 차이를 보였다. 실험결과에서 보였던 DHA2 실험구에서의 낮은 성장률은 사료 내 DHA함량이 참다랑어의 요구량을 충족시키지 못해 나타난 결과라 판단된다. Betancor et al. (2019)은 치어기 대서양참다랑어(2.9-3.3 g)를 대상으로 DHA

함량이 각각 3.2%, 2.3%인 배합사료를 각각 공급한 결과, 두 실험구의 성장률은 유사하였다. 따라서, 치어기 참다랑어 사료 내 DHA유(순도, 80%)의 적정 첨가량은 약 3% 이상일 것으로 판단되며 성장단계별 정확한 DHA 요구량에 관한 연구가 향후 요구된다.

본 연구에서 참다랑어의 소화효소 활성은 사료의 형태(생사료, 배합사료)에 영향을 받는 것으로 나타났다. 치어기 참다랑어를 대상으로 진행된 이전의 실험에서도 생사료를 공급한 참다랑어 내 pepsin과 lipase의 활성이 배합사료를 공급한 실험구와 비교하여 높았다(Ji et al., 2019). 본 연구에서도 소화효소의 활성도는 실험구간에 차이를 보였으나, EFM75와 생사료구의 성장률이 유사한 것으로 미루어 보아 성장에 필요한 최소한의 효소 활성은 모두 충족된 것으로 판단된다.

참다랑어는 배합사료에 대한 기호도가 낮기 때문에 사료에 섭이촉진제(feeding stimulants)가 첨가된다(Ji et al., 2008; Biswas et al., 2009a, 2009b). 섭이촉진제는 methionine을 비롯한 유리아미노산을 혼합하여 제조되어 사료의 비용을 증가시킬 수 있다. 효소처리어분은 여러 어류에 대한 유인효과가 높아 주로 섭이촉진제로 사용되었다(Kristinsson and Rasco, 2000; Liaset et al., 2000). 사료 내 효소처리어분을 첨가 할 경우, 대서양연어의 사료공급량을 증가시킨다고 보고되었다(Gildberg et al., 1996; Refstie et al., 2004). 본 연구에서는 효소처리어분 고유의 높은 유인효과를 고려하여 실험사료에 섭이촉진제를 첨가하지 않았다. EFM75구의 사료공급량은 생사료구에 비해 낮았으나 성장은 유사하였다. 따라서, 효소처리어분을 주단백질원으로 사용한 배합사료에서는 섭이촉진제의 중요성이 낮다고 판단된다.

사 사

본 연구는 국립수산과학원(R2019005)에 의해 지원되었습니다. 본 연구는 2019년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(2019R1A6A1A03033553)입니다.

References

Aguila J, Cuzon G, Pascual C, Domingues PM, Gaxiola G, Sánchez A and Rosas C. 2007. The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (Voss and Solis) diet: digestive enzyme activity, blood metabolites, and energy balance. *Aquaculture* 273, 641-655. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.010>.

AOAC (Association of official analytical chemists). 2000. Official methods of analysis. 17th edition. Washington DC, U.S.A.

Aubourg SP, Sotelo CG and Gallardo JM. 1990. Changes in flesh lipids and fill oils of albacore (*Thunnus alalunga*) dur-

- ing canning and storage. *J Agric Food Chem* 38, 809-812. <https://doi.org/10.1021/jf00093a047>.
- Benetti D, Partridge GJ and Buentello A. 2016. Chapter 8. Tuna Farming in Japan and Mexico In: *Advances in tuna aquaculture*. Zohar Y, 1st eds. Academic Press, Cambridge, MA, U.S.A., 189-215.
- Berge GM and Storebakken T. 1996. Fish protein hydrolysate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. *Aquaculture* 145, 205-212. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01355-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01355-5).
- Betancor MB, Ortega A, de la Gándara F, Tocher DR and Mourente G. 2019. Performance, feed utilization, and hepatic metabolic response of weaned juvenile Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.): effects of dietary lipid level and source. *Fish Physiol Biochem* 45, 697-718. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0587-9>.
- Biswas A, Biswas BK, Ito J, Takaoka O, Yagi N, Itoh S and Takii K. 2011. Soybean meal can partially replace enzyme-treated fish meal in the diet of juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fish Sci* 77, 615-621. <https://doi.org/10.1007/s12562-011-0363-6>.
- Biswas A, Nakajima M, Nakao T, Takaoka O and Takii K. 2016. Determination of suitable protein and lipid levels in diets for Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* at grow-out stage. *Aquacult Sci* 64, 281-288. <https://doi.org/10.11233/aquaculturesci.64.281>.
- Biswas BK, Biswas A, Junichi I, Kim YS and Takii K. 2013. The optimal dietary level of ascorbic acid for juvenile Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *Aquac Int* 21, 327-336. <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9555-z>.
- Biswas BK, Ji SC, Biswas AK, Seoka M, Kim YS and Takii K. 2009a. A suitable dietary sugar level for juvenile Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *Aquacult Sci* 57, 99-108. <https://doi.org/10.11233/aquaculturesci.57.99>.
- Biswas BK, Ji SC, Biswas AK, Seoka M, Kim YS, Kawasaki KI and Takii K. 2009b. Dietary protein and lipid requirements for the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* juvenile. *Aquaculture* 288, 114-119. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.11.019>.
- Borlongan IG. 1990. Studies on the digestive lipases of milkfish, *Chanos chanos*. *Aquaculture* 89, 315-325. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90135-a](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90135-a).
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- Buentello JA, Pohlenz C, Margulies D, Scholey VP, Wexler JB, Tovar-Ramírez D and Gatlin DM. 2011. A preliminary study of digestive enzyme activities and amino acid composition of early juvenile yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Aquaculture* 312, 205-211. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.12.027>.
- Carter CG, Bransden MP, Van Barneveld RJ and Clarke SM. 1999. Alternative methods for nutrition research on the southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*: in vitro digestibility. *Aquaculture* 179, 57-70. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00152-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00152-0).
- Chalamaiah M, Hemalatha R and Jyothirmayi T. 2012. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food Chem X* 135, 3020-3038. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.100>.
- Erlanger B, Kokowsky N and Cohen W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys* 95, 271-278. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90145-x](https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90145-x).
- FAO (Food and Agriculture Organization of the united nations). 2011. Review of the state of world marine fishery resources. Fisheries and aquaculture technical 569, 49-66.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the united nations). 2019. FAO fish finder, species fact sheets. Retrieved from <http://www.fao.org/fishery/species/3296/en> on Mar 19, 2020.
- Folch J, Lee M and Sloane-Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497-509.
- Gildberg A, Bøgwald J, Johansen A and Stenberg E. 1996. Isolation of acid peptide fractions from a fish protein hydrolysate with strong stimulatory effect on Atlantic salmon (*Salmo salar*) head kidney leucocytes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 114, 97-101. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(96\)00011-9](https://doi.org/10.1016/0305-0491(96)00011-9).
- Gomes EF, Rema P, Gouveia A and Oliva-Teles A. 1995. Replacement of fish meal by plant proteins in diets for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: effect of the quality of the fishmeal based control diets on digestibility and nutrient balances. *Water Sci Technol* 31, 205-211. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00440-X](https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00440-X).
- Hsu KC. 2010. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chem X* 122, 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.013>.
- Je JY, Lee KH, Lee MH and Ahn CB. 2009. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Res Int* 42, 1266-1272. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.06.013>.
- Ji SC, Kim BS, Lim SG, Kim KW, Shin JH and Lee KJ. 2017. Effects of dietary utilization enzyme treated fish meal for juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *JFMSE* 29, 1365-1372. <http://dx.doi.org/10.13000/JFMSE.2017.29.5.1365>.
- Ji SC, Shin JH, Kim DJ, Yang SG, Jeong MH, Kim JH and Lee KJ. 2019. Effects of dietary utilization enzyme treated fish meal for juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *JFMSE* 29, 1365-1372. <https://doi.org/10.13000/JFMSE.2019.29.5.1365>.

- JFMSE.2019.6.31.3.741.
- Ji SC, Takaoka O, Biswas AK, Seoka M, Ozaki K, Kohbara J and Takii K. 2008. Dietary utility of enzyme-treated fish meal for juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fish Sci* 74, 54-61. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01475.x>.
- Kristinsson HG and Rasco BA. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Crit Rev Food Sci Nutr* 40, 43-81. <https://doi.org/10.1080/10408690091189266>.
- Kumai H. 1998. Studies on bluefin tuna artificial hatching, rearing and reproduction. *Nippon Suisan Gakkaishi* 64, 601-605. <https://doi.org/10.2331/suisan.64.601>.
- Langar H. 1992. Effets physiologiques et metaboliques de la qualite nutritionnelle des proteines chez le jeune alevin de bar (*Dicentrarchus labrax*). Ph.D. Dissertation, University of Bretagne Occidentale, Brest, France.
- Li Y, Ai Q, Mai K, Xu W, Deng J and Cheng Z. 2014. Comparison of high-protein soybean meal and commercial soybean meal partly replacing fish meal on the activities of digestive enzymes and aminotransferases in juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvier, 1828). *Aquac Res* 45, 1051-1060. <https://doi.org/10.1111/are.12042>.
- Liaset B, Lied E and Espe M. 2000. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation. *J Sci Food Agric* 80, 581-589. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0010\(200004\)80:5<581::aid-jsfa578>3.3.co;2-9](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0010(200004)80:5<581::aid-jsfa578>3.3.co;2-9).
- Lin S and Luo L. 2011. Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fish meal on growth, digestive enzymes and transaminase activities in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Anim Feed Sci Technol* 168, 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2011.03.012>.
- Manjappa K, Keshavanath P and Gangadhara B. 2002. Growth performance of common carp, *Cyprinus carpio* fed varying lipid levels through low protein diet, with a note on carcass composition and digestive enzyme activity. *Acta Ichthyol Piscat* 2. <https://doi.org/10.3750/aip2002.32.2.05>.
- Metcalf LD and Schmitz AA. 1961. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal Chem* 33, 363-364. <https://doi.org/10.1021/ac60171a016>.
- Miles RD and Chapman FA. 2015. University of florida-fish meal is recognized by nutritionists as a high-quality, very digestible feed ingredient that is favored for addition to the diet of most farm animals, especially fish and shrimp. Retrieved from <http://edis.ifas.ufl.edu> on Mar 19, 2020.
- Miyashita S. 2002. Studies on the seedling production of the Pacific bluefin tuna, *Thunnus thynnus orientalis*. *Bull Fish Lab Kinki Univ* 8, 1-171.
- MOF (Ministry of Oceans and fisheries). 2017. Press release. Retrieved from <http://www.mof.go.kr/article/view.do?menuKey=971&boardKey=10&articleKey=18058> on May 3, 2019.
- Moyano FJ, Diaz M, Alarcon FJ and Sarasquete MC. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol Biochem* 15, 121-130. <https://doi.org/10.1007/bf01875591>.
- Neklyudov AD, Ivankin AN and Berdutina AV. 2000. Properties and uses of protein hydrolysates. *Appl Biochem Microbiol* 36, 452-459. <https://doi.org/10.1007/bf02731888>.
- Ngo DH, Qian ZJ, Ryu B, Park JW and Kim SK. 2010. In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. *Funct Foods* 2, 107-117. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.02.001>.
- NRC (National Research Council). 2011a. 6 Lipids. National research council. In: *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. The National Academies Press, New York, NY, U.S.A., 102-134
- NRC (National Research Council). 2011b. 5 Protein and amino acids. National research council. In: *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. The National Academies Press, New York, NY, U.S.A., 57-101
- Refstie S, Olli JJ and Standal H. 2004. Feed intake, growth, and protein utilisation by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. *Aquaculture* 239, 331-349. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.06.015>.
- Saito H, Watanabe T and Murase T. 1995. The fatty acid composition characteristic of a highly migratory fish, with seasonal variation of docosahexaenoic acid content in lipid of bonito (*Euthynnus pelamis*). *Biosci Biotechnol Biochem* 59, 2186-2188. <https://doi.org/10.1271/bbb.59.2186>.
- Sawada T, Takahashi K and Hatano M. 1993. Molecular species analysis of fish oil triglyceride by light scattering mass detector equipped liquid chromatograph II, triglyceride composition of tuna and bonito orbital fats. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56, 285-290. <https://doi.org/10.2331/suisan.59.285>.
- Sawada Y, Okada T, Miyashita S, Murata O and Kumai H. 2005. Completion of the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck et Schlegel) life cycle. *Aquac Res* 36, 413-421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01222.x>.
- Takii K, Seoka M, Izumi M, Hosokawa H, Shimeno S, Ukawa M and Kohbara J. 2007a. Apparent digestibility coefficient and energy partition of juvenile Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* and chub mackerel, *Scomber japonicus*. *Aquacult Sci* 55, 571-577. <https://doi.org/10.1123/aquaculturesci.1953.55.571>.
- Takii K, Seoka M, Ohara N, Nasu T, Oda S, Miyashita S and Hosokawa H. 2007b. Dietary utility of Chilean fish meal and pollack liver oil for juvenile Pacific bluefin tuna. *Aquacult Sci* 55, 579-585. <https://doi.org/10.1123/aquaculturesci.1953.55.571>.

ci1953.55.579.

- Teshima S, Kanazawa A and Koshio S. 1992. Ability for bioconversion of n-3 fatty acids in fish and crustaceans. *Oceanis* 17, 67-75.
- Tibaldi E, Hakim Y, Uni Z, Tulli F, de Francesco M, Luzzana U and Harpaz S. 2006. Effects of the partial substitution of dietary fish meal by differently processed soybean meals on growth performance, nutrient digestibility and activity of intestinal brush border enzymes in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 261, 182-193. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.06.026>.
- Van Beijnen J. 2017. The closed cycle aquaculture of atlantic bluefin tuna in Europe: current status, market perceptions and future potential. Technical Report 95, 18-26
- Worthington CC. 1991. Pepsin and amylase. In: Worthington CC enzyme manual: enzymes and related bio chemicals. Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey, NJ, U.S.A., 179-180.