

# 효소처리어분에 대한 치어기 대서양 참다랑어(*Thunnus thynnus*)의 *in vivo* 및 *in vitro* 소화율 평가

신재형<sup>†</sup> · 지승철<sup>1†</sup> · 이경준<sup>2\*</sup>

제주대학교 해양생명과학과, <sup>1</sup>국립수산과학원 제주수산연구소, <sup>2</sup>제주대학교 해양과학연구소

## *In vivo* and *In vitro* Digestibility of Enzyme-treated Fish Meal for Juvenile Atlantic Bluefin Tuna *Thunnus thynnus*

Jaehyeong Shin<sup>†</sup>, Seung-Cheol Ji<sup>1†</sup> and Kyeong-Jun Lee<sup>2\*</sup>

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

<sup>1</sup>Jeju Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Jeju 63068, Korea

<sup>2</sup>Marine Science Institute, Jeju National University, Jeju 63333, Korea

This study was conducted to investigate *in vivo* and *in vitro* digestibility in juvenile Atlantic Bluefin tuna *Thunnus thynnus*. *In vivo* digestibility was compared between four experimental diets to determine the optimum dietary inclusion level of an enzyme-treated sardine fish meal (EFM) and sardine fish meal (FM). The experimental diets were as follows; EFM75 (75% EFM), EFM60 (60% EFM and 15% FM), FM75 (75% FM) and SL (frozen sand lance) as a raw fish feed. Feces of Bluefin tuna (90.3 g) were collected both by siphoning from a 700 L cage and by dissection in 69 ton concrete rearing tanks. For the siphoning method, protein digestibility was higher in the tuna fed SL diet than that of other groups. The lowest protein digestibility was observed in FM75. For the dissection method, protein digestibility was higher in tuna fed EFM75 diet than that of other groups. The lowest protein digestibility was observed in the EFM60 group. *In vitro* digestibility was compared in six protein sources to find an alternative source of EFM for the tuna feed. The highest *in vitro* digestibility was observed in EFM (92%) followed by low temperature FM (72%), meat meal (65%), feather meal (60%), sardine fish meal (57%) and poultry by-product meal (55%).

Keywords: Digestibility, Bluefin tuna, Enzyme-treated fish meal, Ingredient, Fish meal

### 서론

대서양참다랑어(*Thunnus thynnus*)는 성장이 빠르고 맛이 좋아 상업적 가치가 높은 어종으로 알려져 있다(Koven et al., 2018). 참다랑어는 주로 어획을 통해 공급되는데, 최근 대서양 참다랑어보존위원회(International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas, ICCAT)의 어획규제로 인해 공급이 제한적으로 이루어지고 있다(FAO, 2011). 참다랑어의 양식에 관한 연구는 일본, 한국, 스페인 등의 여러 국가에서 진행되어왔다. 참다랑어의 주요 소비국가인 일본은 1970년대부터 참다랑어 양식을 연구하기 시작하였고(Harada, 1971), 2005년도에 참다랑어 완전양식에 성공하였다(Sawada et al., 2005). 양

식생산의 효율을 높이기 위한 연구는 활발하게 진행되었으나(Ohnishi et al., 2016; Betancor et al., 2017), 참다랑어용 배합사료에 관한 연구는 조단백질과 조지질, 탄수화물, vitamin C의 요구량 외에는 전반적으로 미흡한 실정이다(Biswas et al., 2009a; 2009b; 2013). 배합사료 연구의 부재로 인해 현재까지도 까나리와 같은 생사료가 참다랑어 양식에 주로 사용되고 있다. 따라서 참다랑어를 시장에 안정적으로 공급하기 위해서는 배합사료의 개발이 절실한 실정이다. 어분은 조단백질함량(60-75%)이 높을 뿐만 아니라 필수아미노산과 지방산이 골고루 함유되어 있어, 양어사료에 최적의 단백질원으로 알려져 있다(NRC, 2011). 하지만 참다랑어는 배합사료에 대한 기호성이 타 어종에 비해 낮을 뿐만 아니라 어분에 대한 이용률이 특히 낮

\*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.2020.0423>

Korean J Fish Aquat Sci 53(3), 423-431, June 2020

Received 10 March 2020; Revised 10 April 2020; Accepted 8 May 2020

저자 직위: 신재형(대학원생), 지승철(연구사), 이경준(교수)

은 것으로 보고되었다(Carter et al., 1999). Takii et al. (2007b)은 치어기 참다랑어(0.46 g)를 대상으로 어분이 53% 포함된 배합사료를 공급한 결과, 성장률은 생사료구에 비해 유의적으로 낮았고, 참다랑어가 어분에 대한 낮은 이용성을 보이는 이유는 어분을 가공하는 과정에서 열에 의해 단백질이 변성되기 때문인 것으로 보고하였다. 따라서 어분을 대신할 수 있는 단백질 원료를 찾는 연구가 진행되었다. Ji et al. (2008)은 치어기 참다랑어를 대상으로 효소처리어분(enzyme-treated fish meal)이 주단백질원으로 사용된 실험사료와 생사료(까나리)의 사육효능을 비교한 결과, 효소처리어분구의 성장률이 생사료구와 유사하였다고 보고하였다. 효소처리어분은 어류의 가공과정에서 발생하는 부산물에 papain, pepsin, trypsin 등의 소화효소를 반응시켜 제조된다(Je et al., 2009; Hsu, 2010; Ngo et al., 2010). 효소처리어분은 저분자 peptide의 함량이 높아 생체 이용률이 높을 뿐만 아니라 다양한 생리활성물질을 함유하고 있다(Neklyudov et al., 2000; Chalamaiah et al., 2012). 국내에서 진행된 연구에서도 효소처리어분이 참다랑어 사료에 주단백질원으로 이용가능함이 보고되었다(Ji et al., 2017; 2019). 그러나, 효소처리어분은 일반 어분보다 비싸기 때문에 사료의 경제성을 고려하여 사료 내 적정함량과 대체원료를 찾는 연구가 필요하다. 사료원료의 소화율 측정은 원료의 질을 평가하는데 가장 우선적으로 고려되는 요소이다(Allan et al., 2000; Lee, 2002). 그러나, 참다랑어의 소화율에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서, 본 연구는 다양한 단백질원료에 대한 참다랑어의 소화율을 측정 하고자 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 소화율 실험사료

소화율 실험사료는 사료 내 효소처리어분이 각각 75, 60% 첨가된 2종의 사료(EFM75, EFM60)와 정어리어분이 75% 사용된 사료(FM75), 그리고 까나리(sand lance, SL) 생사료를 사용하였다(Table 1). 실험사료의 영양소 함량은 참다랑어의 영양소 요구량(조단백질 62%; 조지질 18%)을 토대로 작성하였다(Biswas et al., 2009b). Mineral과 vitamin premix는 방어(*Seriola quinquevadiata*) 등의 영양소 요구량을 기초로 제작하였다(La Roche et al., 1966; Halver, 1972; Ketola, 1975; Sakamoto and Yone, 1978; Hilton et al., 1980; Ogino and Yang, 1980; Barnett et al., 1982; Robinson et al., 1984; Julshamn et al., 1988; Shearer, 1989; Shimeno, 1991; Shiao and Hsieh, 2001; Krossøy et al., 2009). 소화율을 분석하기 위한 지시제(indicator)로 chromium oxide ( $Cr_2O_3$ , DaeJung Chemicals & Metals Co. Ltd., Siheung, Korea)를 사용하였으며, 실험사료에 1%가 포함되도록 설계하였다. 사료의 제조는 사료원을 분쇄하여 분말형태로 만든 후, 사료조성표에 따라 측량하여 혼합하였다. 혼합물은 사료제작기(SP-50, Gumgang Engineering, Daegu,

Korea)를 이용하여 펠렛형태로 성형(2 mm)하였다. 까나리 생사료는 정어리어분 15%와 지시제 1%를 혼합하여 성형되었다. 모든 실험사료는 냉동(-30°C) 보관 후 실험에 사용하였다.

### 실험어 사육관리, 분수집 및 소화율 측정

실험용 참다랑어는 제주대학교 동물실험윤리위원회의 실험 동물윤리규정(승인번호, 2019-0032)을 준수하여 실험에 이용하였다. 정확한 분수집을 위해 참다랑어의 소화시간을 조사하

Table 1. Dietary formulation and proximate composition of the experimental diets for juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* (% of dry matter)

Ingredients	Experimental diets			
	EFM75	EFM60	FM75	Sand lance
Enzyme-treated fish meal <sup>1</sup>	75.0	60.0	0.00	-
Fish meal, sardine <sup>2</sup>	0.00	15.0	75.0	15.0
Soy protein concentrate <sup>3</sup>	8.00	8.00	8.00	-
DHA oil <sup>4</sup>	4.00	4.00	4.00	-
Cod liver oil <sup>5</sup>	4.00	4.00	4.00	-
Vitamin premix <sup>6</sup>	1.00	1.00	1.00	-
Mineral premix <sup>7</sup>	1.00	1.00	1.00	-
Taurine	1.00	1.00	1.00	-
Starch	1.50	1.50	1.50	-
Lecithin <sup>8</sup>	4.50	4.50	4.50	-
Chromium oxide <sup>9</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00
Sand lance	-	-	-	84.0
Proximate composition				
Crude protein	57.7	58.9	57.7	65.2
Crude lipid	17.1	17.3	17.1	10.3
Crude ash	8.17	7.87	8.17	7.53
Moisture	4.94	5.15	3.95	77.9

<sup>1</sup>CPSP, Sopropêche, Wimille, France. <sup>2</sup>Orizon S.A., Santiago, Chile. <sup>3</sup>Corp. Korea flavor, Cheongju, Korea. <sup>4</sup>DHA concentrate oil (DHA 80%), corp. Chemport, Naju, Korea. <sup>5</sup>Corp. E-wha oil & fat industry, Busan, Korea. <sup>6</sup>Vitamin premix contains (g kg<sup>-1</sup>): vitamin A acetate, 1.70; thiamine hydrochloride, 3.63; riboflavin 5'-phosphate sodium, 5.10; niacinamide, 28.1; calcium D-pantothenate, 12.1; pyridoxine hydrochloride, 4.01; vitamin, 0.01; ascorbic acid, 222; vitamin D3, 5.00; DL- $\alpha$ -tocopherol, 114; vitamin K1, 1.50; D-biotin, 0.39; folic acid, 1.38; myo-inositol, 115; cellulose, 484. <sup>7</sup>Mineral premix contains (g kg<sup>-1</sup>): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 60.0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 390; KCl, 207; Ferric citrate, 19.9; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3.00; Ca-lactate, 319; CuCl, 0.33; KI, 0.09; Na<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0.27; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 1.3; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.06. <sup>8</sup>Lysoforte™ Dry, KEMIN Korea Co. Ltd., Seongnam, Korea. <sup>9</sup>DaeJung Chemicals & Metals Co. Ltd., Siheung, Korea. EFM75, including 75% of enzyme-treated fish meal; EFM60, including 60% of enzyme-treated fish meal; FM75, including 75% of sardine fish meal.

였다. 소화시간은 사료 급이 후 경과 시간에 따라 참다랑어의 위와 장 내 사료의 체류시간을 측정을 통해 조사하였다. 실험에 사용된 참다랑어(부화 후 75일)는 전용 사육시설에서 인공 부화된 치어를 이용하였다. 참다랑어(90.1 ± 10.3 g)는 2개의 콘크리트 수조(69 tones)에 각 20마리씩 배치되었다. 배합사료(EFM75)와 생사료(SL)를 각각 공급한 후 총 6회(2, 4, 6, 8, 10, 12 h)에 걸쳐 매 회 수조 당 3마리의 참다랑어를 얼음물에 마취시킨 후 소화기관을 적출하였다. 적출된 위와 장에 잔존해 있는 사료의 양을 측정하였다. 계산식은 다음과 같다.

$$\text{위·장 내 사료량(\%)} = (\text{stomach or intestine content weight} / \text{body weight}) \times 100$$

소화율의 측정은 해부법(dissection)과 siphoning 방법을 통해 수집된 분을 이용하였다. 해부법의 경우, 참다랑어를 4개의 콘크리트 수조(69 tones, 지름 7 m × 높이 1.8 m)에 각각 20마리씩 배치하였다. 실험사료는 참다랑어의 소화시간을 고려하여, 배합사료구가 해부 8시간 전, 생사료가 해부 5시간 전에 반복 공급되었다. 사료 공급 후 얼음물을 이용하여 참다랑어를 마취시켰고, 장(항문 끝에서부터 전체 장 길이의 2/3 부위)을 절개하였다. 참다랑어의 분(feces)은 전장에서 항문 방향으로 압력을 가해 수집되었다. 분은 동결건조하여 분석에 이용되었다. Siphoning 방법의 경우, 참다랑어를 2개의 가두리(cage) (700 L)에 각각 15마리씩 배치하였다. 실험사료는 반복 공급되었고, 사료를 공급한지 30분이 경과한 시점에서 siphon을 이용하여 가두리 바닥에 남아 있는 실험사료와 이물질을 제거하였다. 참다랑어의 분은 배합사료구가 사료 공급 10시간 후에, 생사료는 사료 공급 6시간 후에 가두리 바닥에서 수집되었다. 분은 각 실험사료 당 5일간 수집되었고, 수집된 분은 동결건조 하여 분석에 이용되었다. 분수집 중 수조 내 용존산소(dissolved oxygen, DO)는 산소발생기(aeration)와 액화산소 주입기를 통해 조절되었다. 사육실험 기간 내 평균 사육수온은 24.7°C, 용존산소는 10.4 mg/L로 유지되었다. 실험사료와 분 내 산화크롬의 함량은 Divakaran et al. (2002)의 방법을 토대로 분석되었다. 실험사료에 대한 소화율은 아래의 식에 따라 계산되었다.

$$\begin{aligned} &\text{Apparent digestibility coefficient of protein (\%)} \\ &= 100 - 100 \times (\% \text{ of Cr}_2\text{O}_3 \text{ in diet} / \% \text{ of Cr}_2\text{O}_3 \text{ in feces}) \times \\ &\quad (\% \text{ of protein in feces} / \% \text{ of protein in diet}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} &\text{Apparent digestibility coefficient of dry matter (\%)} \\ &= 100 - 100 \times (\% \text{ of Cr}_2\text{O}_3 \text{ in diet} / \% \text{ of Cr}_2\text{O}_3 \text{ in feces}) \end{aligned}$$

### In vitro 소화율 측정

6가지 단백질사료원에 대한 in vitro 소화율은 Eid and Matty (1989)의 방법에 따라 분석하였다. In vitro 소화율 결과는 다음

과 같은 식으로 계산되었다.

$$\text{In vitro digestibility} = [\text{protein in diet (g)} - \text{undigested protein (g)}] / \text{protein in diet (g)} \times 100$$

### 일반성분

사료원, 실험사료, 분에 대한 일반성분분석은 AOAC (2005) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125°C, 3 h), 조지방은 직접회화로법(550°C, 6 h), 단백질은 자동 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.

### 소화효소 활성

실험어의 소화기관 내 총 5가지의 효소활성(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 상층액(supernatant)이 분석에 사용되었다. 각 시료의 단백질 총량(total protein)은 Bradford (1976)의 방법에 따라 Kit (Protein Assay kit II, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 분석되었다. Pepsin과 amylase의 활성은 Worthington (1991)의 방법에 따라, trypsin과 chymotrypsin의 활성은 Erlanger et al. (1961)의 방법에 따라, lipase의 활성은 Borlongan (1990)의 방법에 따라 분석 되었다.

### 통계학적 분석

분석결과는 SPSS (Version 12.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석 되었다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's multiple range test를 사용하여 평균간의 유의성(P<0.05)을 비교하였다. 데이터는 평균값 ± 표준편차(mean ± SD)로 나

Table 2. Proximate composition of the feed ingredients for in vitro pepsin digestibility of juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* (% of dry matter)

Ingredients	Crude protein	Crude lipid	Crude ash	Moisture
Enzyme-treated fish meal <sup>1</sup>	70.2	12.0	8.50	2.31
Fish meal, sardine <sup>2</sup>	68.0	8.60	17.1	9.01
Low temperature fish meal <sup>3</sup>	78.0	9.62	13.7	9.32
Meat meal <sup>4</sup>	80.3	12.9	6.82	2.72
Feather meal <sup>5</sup>	74.5	10.3	2.55	5.79
Poultry by-product meal <sup>5</sup>	63.2	12.4	12.5	5.92

<sup>1</sup>CPSP, Sopropêche, Wimille, France. <sup>2</sup>Orizon S.A., Santiago, Chile. <sup>3</sup>FF Skagen, Skagen, Denmark. <sup>4</sup>Daekyoung O&T Co. Ltd, Busan, Korea. <sup>5</sup>Harim Co. Ltd. Iksan, Korea.

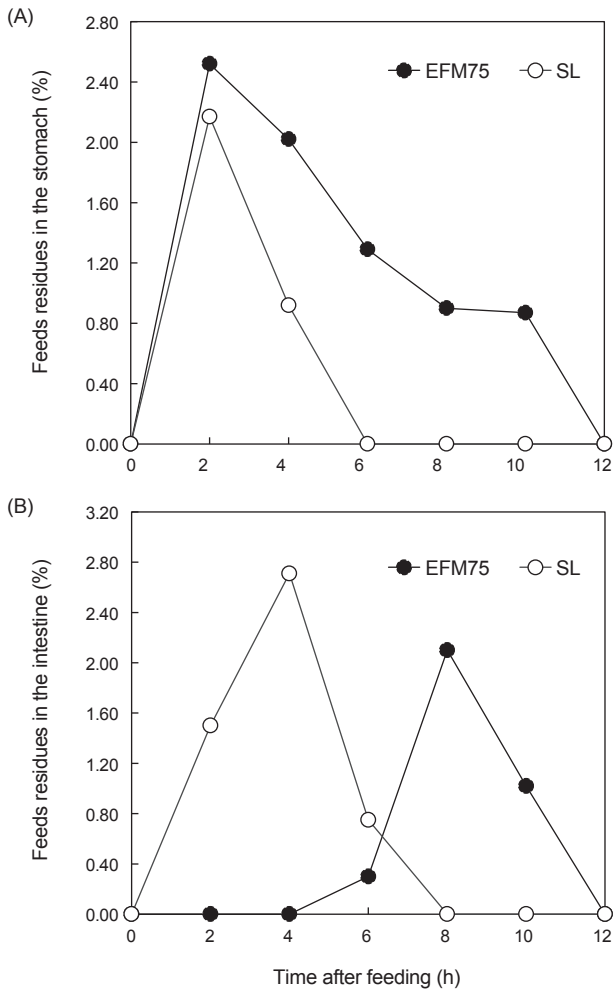


Fig. 1. The feeds residues in the (A) stomach and (B) intestine of juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the EFM75 or SL (% of dry matter). Feed residues of stomach (%)=dry feed residues in stomach (g)/ body weight (g) $\times$ 100, Feed residues of intestine (%)=dry feed residues in intestine (g)/body weight $\times$ 100. EFM75, including 75% of enzyme-treated fish meal diet; SL, sand lance as a raw fish feed.

타내었다. 백분을 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석하였다.

## 결 과

참다랑어의 위 내 배합사료의 체류시간은 사료 공급 후 10시간으로, 사료의 잔존량은 시간 경과에 따라 감소하였다(Fig. 1). 장의 경우 사료 공급 6시간 후부터 사료가 관찰되었고, 이 후 4시간 가장 잔존해 있었다. 사료의 잔존량은 사료 공급 8시간 후까지 증가하다가 10시간 후에 감소하는 것으로 나타났다. 사료 공급 12시간 이후에는 위와 장에서 사료가 관찰되지 않았

다. 생사료는 위에서 사료 공급 4시간 후까지 체류하는 것으로 관찰되었고, 잔존량은 시간 경과에 따라 감소하였다. 장의 경우 사료 공급 2시간 후부터 사료가 관찰되었고, 이 후 4시간 가장 잔존하는 것으로 나타났다. 사료의 양은 사료 공급 2시간 후부터 4시간 후까지 증가하다가, 6시간 후에 감소되었다. 사료 공급 8시간 후에는 소화기관에서 사료가 관찰되지 않았다. 해부를 통해 수집된 분의 단백질과 건물소화율은 EFM75구가 가장 높았고, SL, EFM60 순으로 낮았다(Table 3). Siphoning을 통해 수집된 분의 단백질과 건물소화율은 SL구가 가장 높았고, EFM75, EFM60, FM75 순으로 낮았다. *In vitro* 펩신 소화율은 효소처리어분(92%), 저온처리어분(72%), 육분(65%), 우모분(60%), 정어리어분(57%), 가금부산물(55%) 순으로 나타났다(Table 4). 참다랑어(2-600 g)의 소화기관 내 효소활성(U/mg protein)은 pepsin의 활성(1.52-40.2)이 26.4배, trypsin의 활성(1.11-25.5) 23배, chymotrypsin의 활성(0.31-15)이 48.4배, amylase의 활성(1.29-7.25)이 5.6배, lipase의 활성(19-67.1)이 3.5배 증가하는 것으로 나타났다(Table 5).

## 고 찰

본 연구에서 효소처리어분의 소화율은 *in vitro* (92%)와 *in vivo* 실험에서 모두 높게 나타났다. 효소처리어분은 저분자 단백질의 함량이 일반어분에 비해 많아(Aguila et al., 2007), 비교적 쉽게 소화되는 것으로 판단된다. 효소처리어분(CPSP)의 원료 소화율은 농어(*Dicentrarchus labrax*), 역돔(*Oreochromis niloticus*), silverside *Chirostoma estor* 사료에서도 높은 것으로 보고되었다(Oliva-Teles, 1998; Davies et al., 2011; Ospina-Salazar et al., 2016). 효소처리어분은 참다랑어 사료에 주단백

Table 3. Apparent digestibility coefficient (ADC) of protein and dry matter for experimental diets on juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* by siphoning and dissection methods (% of ADC)

Diets	Siphoning		Dissection
	Protein <sup>1</sup>	Dry matter <sup>2</sup>	Protein <sup>1</sup>
EFM75	82.5 $\pm$ 1.90 <sup>b</sup>	72.5 $\pm$ 1.68 <sup>b</sup>	75.2 $\pm$ 1.82 <sup>a</sup>
EFM60	76.5 $\pm$ 2.15 <sup>c</sup>	64.2 $\pm$ 0.82 <sup>c</sup>	64.2 $\pm$ 0.48 <sup>c</sup>
FM75	57.2 $\pm$ 0.27 <sup>d</sup>	53.3 $\pm$ 0.89 <sup>d</sup>	-
Sand lance	89.2 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>	80.2 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	70.2 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Apparent digestibility coefficient of protein (%)=100-100 $\times$ (% of Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in diet/% of Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in feces) $\times$ (% of protein in feces/% of protein in diet). <sup>2</sup>Apparent digestibility coefficient of dry matter (%)=100-100 $\times$ (% of Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in diet/% of Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in feces). Mean values of triplicate groups. Values are presented as mean $\pm$ SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different (P<0.05). EFM75, including 75% of enzyme-treated fish meal; EFM60, including 60% of enzyme-treated fish meal; FM75, including 75% of sardine fish meal.



질원료로 이용할 경우 생사료와 유사한 성장을 보여 이용성이 높은 것으로 보고되었다(Ji et al., 2008; 2017; 2019). 본 소화율 실험에 앞서 진행된 사육실험에서도 효소처리어분이 주요 원료로 사용된 EFM75구의 성장률은 생사료구와 유사하여 이용성이 높은 것으로 나타났다(Ji et al., 2020). 따라서 효소처리어분은 치어기 참다랑어의 소화율과 성장효과를 고려하였을 때 사료에 주단백질원으로써의 이용가능성이 높다고 판단된다.

참다랑어는 어분에 대해 낮은 이용성을 보이는 것으로 알려져 있다(Takii et al., 2007a; 2007b). Carter et al. (1999)은 치어기 참다랑어를 대상으로 *in vitro* 소화율을 분석한 결과, 어분에 대한 소화율이 낮다고(55%) 보고하였다. 본 연구에서도 어분의 *in vitro* 소화율은 낮게(57%) 나타났으며, *in vivo* 소화율 또한 사료 내 어분의 함량이 증가할수록 감소하는 것으로 나타났다. Takii et al. (2007b)은 치어기 참다랑어(0.46 g)를 이용한 연구에서 일반어분이 53% 사용된 배합사료와 생사료를 공급한 결과, 배합사료구의 성장률은 생사료에 비해 유의적으로 낮았다고 보고하였다. 참다랑어가 어분에 대한 낮은 이용성을 보이는 이유는 어분의 가공과정 중 열에 의해 단백질이 변성되어 소화율을 감소시키기 때문인 것으로 보고되었다. 사육실험에서 EFM60구의 성장률은 EFM75구에 비해 다소 감소되는 것으로 나타났다(Ji et al., 2020). 따라서, 치어기 참다랑어(2-35 g) 사료에 일반어분은 다량 사용되기 어려울 것으로 생각되며, 적정 첨가량에 대한 세부 연구가 요구된다.

저온처리어분은 일반어분(90°C 이상)에 비해 낮은 온도(60°C

이하)에서 제조된다. 어분에 대한 참다랑어의 소화율은 제조과정에서 발생하는 단백질의 변성에 영향을 받아 낮은 것으로 알려져 있다(Takii et al., 2007b). Gilthead seabream *Sparus aurata*의 저온처리어분에 대한 소화율은 일반어분에 비해 높다고 보고되었다(Vergara et al., 1999). 본 연구에서 저온처리어분의 *in vitro* 펩신 소화율(72%)은 정어리어분(57%)보다 높게 나타나, 참다랑어 사료에 단백질원료로서의 이용가능성이 어느 정도 있을 것으로 판단된다. 그러나 *in vivo* 소화율 실험을 통해 보다 자세한 규명이 요구된다. 어류의 소화율은 분수집 방법에 따라 차이를 보인다. 일반적으로 siphoning (혹은 Guelf system)을 통해 얻어진 분의 소화율은 분 내에 영양소가 사육수에 분해되어 비교적 높게 나타난다(Vandenberg and De, 2001; Førde-Skjærvik et al., 2006). 본 연구에서도 siphoning을 통해 얻어진 배합사료구의 소화율은 해부법에 비해 높게 나타났다.

본 연구에서 생사료는 배합사료에 비해 빠르게 소화되는 것으로 나타났다. 생사료의 소화시간은 4-8시간, 배합사료는 8-12시간으로 나타났다. 소화시간은 장의 사료 잔존량이 감소하는 시점부터 관찰되지 않을 때까지를 기준으로 계산하였다. 장에서 사료의 잔존량이 감소되는 것은 배설에 의한 것으로 판단하였다. 다른 어종의 소화시간은 역돔(30 g, 배합사료)이 7.15시간, tiger grouper *Epinephelus fuscoguttatus* (7-10 g, 배합사료)가 8-10시간, burbot *Lota lota* (176 g, 생사료)이 5-17시간, Northern pike *Esox lucius* (60-210 g, 생사료)가 36-48시간으로 보고되었다(Pääkkönen and Marjomäki, 1997; Nilsson and Brönemark, 2000; Uscanga et al., 2010; Muhammadar al., 2012). 어류의 소화시간은 식성과 사료의 형태에 영향을 받는다. 참다랑어는 단백질 요구량이 높은 육식성 어종으로, 소화시간이 다른 육식성 어종과 유사한 것으로 나타났다. Kondo et al. (2016)은 태평양참다랑어(*Thunnus orientalis*)의 생사료 소화시간은 배합사료보다 빠르다고 보고하였다. 어류는 섭이한 음식물을 원활히 소화하기 위해 위에서 일정량의 수분을 필요로 한다(Hughes, 1989). 어류사료의 수분함량이 비교적 높은 경우 위에서의 체류시간을 단축시키는 것으로 보고되었다(Grove et al., 1978). Kim et al. (2011)은 수분함량(9, 21, 30, 40%)이 다른 사료를 넘치게 공급한 결과, 위 내 수분의 함량(75%)은 사료 급이 3시간 후 모두 유사하게 나타났다고 보고하였다. Dentex *Dentex dentex*를 대상으로 진행된 연구에서도 이와 유사한 결

Table 4. *In vitro* pepsin digestibility of protein ingredients for juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* (% of digestibility)

Ingredients	Pepsin digestibility (%)
Enzyme-treated fish meal <sup>1</sup>	92.0±0.56
Low temperature fish meal <sup>2</sup>	72.1±2.10
Meat meal <sup>3</sup>	65.1±0.58
Feather meal <sup>4</sup>	60.2±2.58
Fish meal, sardine <sup>5</sup>	56.7±1.56
Poultry by-product meal <sup>4</sup>	55.2±1.25

<sup>1</sup>CPSP, Sopropeche, Wimille, France. <sup>2</sup>FF Skagen, Skagen, Denmark. <sup>3</sup>Daekyoung O&T Co. Ltd, Busan, Korea. <sup>4</sup>Harim Co. Ltd. Iksan, Korea. <sup>5</sup>Orizon S.A., Santiago, Chile. Mean values of triplicate groups. Values are presented as mean±SD.

Table 5. Digestive enzyme activities of juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* fed the EFM75 (U/mg protein)

DAH <sup>1</sup>	Weight (g)	Pepsin	Trypsin	Chymotrypsin	Amylase	Lipase
30	2	1.52±0.25 <sup>d</sup>	1.11±0.39 <sup>d</sup>	0.31±0.08 <sup>d</sup>	1.29±0.31 <sup>c</sup>	19.0±1.25 <sup>d</sup>
60	35	17.4±2.42 <sup>c</sup>	6.27±0.28 <sup>c</sup>	2.17±0.87 <sup>c</sup>	3.27±0.59 <sup>b</sup>	48.8±5.21 <sup>c</sup>
90	160	28.5±2.31 <sup>b</sup>	12.1±1.52 <sup>b</sup>	6.30±1.68 <sup>b</sup>	3.92±0.39 <sup>b</sup>	59.2±4.25 <sup>b</sup>
120	600	40.2±1.52 <sup>a</sup>	25.5±2.62 <sup>a</sup>	15.0±0.85 <sup>a</sup>	7.25±0.25 <sup>a</sup>	67.1±4.05 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Day after hatch. Mean values of triplicate groups. Values are presented as mean±SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different (P<0.05). EFM75; including 75% of enzyme-treated fish meal.

과를 나타냈다(Chatzifotis et al., 2005). 본 연구에서 생사료는 수분의 함량이 높아 위 내 체류시간을 단축시켜 전체 소화시간을 감소시킨 것으로 판단된다. 본 연구에서 생사료는 위 내 체류시간이 사료 섭취 후 6시간으로 배합사료(12시간)에 비해 짧았고, 사료의 장 내 체류시간은 생사료와 배합사료가 8시간으로 유사하게 나타났다(Fig. 1). 생사료는 수분의 함량(70-80%)이 배합사료(4-7%)에 비해 높아 참다랑어의 위를 비교적 빠르게 통과하여 배설된 것으로 판단된다.

치어기 참다랑어는 공식으로 인해 폐사율이 높게 나타난다. 방어, 농어, Atlantic cod *Gadus morhua*, African catfish *Clarias gariepinus*, European eel *Anguilla Anguilla* L.은 사료 공급 후 공복시간 증가에 따라 다른 개체를 공격하거나 공식현상이 증가한다고 보고되었다(Degani and Levanon, 1983; Katavić et al., 1989; Folkvord, 1991; Hecht and Pienaar, 1993; Sakakura and Tsukamoto, 1998). 본 실험에 사용된 사료를 이용하여 사육실험을 진행한 결과, 배합사료구의 생존율(48-52%)은 생사료(36%) 보다 높게 나타났다(Ji et al., 2020). 실험사료는 1일 4회(08:00, 11:00, 14:00, 17:00 h) 공급되었고, 마지막 사료공급 시간(17:00 h)과 다음날 첫 번째 공급시간(08:00 h) 사이에 15시간의 공백이 발생한다. 참다랑어의 소화시간을 고려하여 예상 공복시간을 계산하면 생사료(7-11시간)와 배합사료(3-7시간) 사이에 차이가 발생하며, 실험어의 공식은 대부분 공복시기에 집중되어 나타났다. 대서양참다랑어(0.68 g)를 대상으로 진행된 이전의 연구에서도 배합사료구의 생존율(56%)은 생사료구(46%)에 비해 높다고 보고되었다(Ji et al., 2019). 생사료는 배합사료에 비해 소화시간이 짧아 배합사료를 공급한 참다랑어에 비해 빠른 시간 안에 공복감을 불러일으켜 공식현상의 빈도를 증가시키는데 간접적으로 영향을 미칠 수 있다고 판단된다. 배합사료와 생사료의 공급이 치어기 참다랑어의 생존율에 미치는 영향에 관한 세부연구를 통해 보다 명확한 규명이 요구된다.

본 연구에서 참다랑어(2-600 g)의 소화효소활성은 어체의 크기와 함께 증가하는 것으로 나타났다. Parra et al. (2007)은 성장단계(0.68-10.7 g)에 따른 참다랑어의 소화효소활성을 분석한 결과, 성장함에 따라 효소활성이 계속해서 증가한다고 보고하였다. 황다랑어(*Thunnus albacares*), gilthead seabream 또한 이와 유사한 결과를 나타냈다(Moyano et al., 1996; Buentello et al., 2011). 어류의 소화효소는 소화효소의 활성에 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Li et al., 2014; Deng et al., 2015). 어류는 성장함에 따라 장이 길어지며, 사료가 소화관에 체류하는 시간을 늘려 소화효율이 증가하는 것으로 알려져 있다(Ferraris et al., 1986). 무지개송어(*Salmo gairdneri*), gibel carp *Carassius auratus gibelio*, milkfish *Chanos chanos*의 단백질 소화효율은 어류의 크기와 함께 증가하는 것으로 보고되었다(Windell et al., 1978; Ferraris et al., 1986; Usmani and Jafri, 2002; Liu et al., 2016). 어류의 소화효소 활성은 크기와 비례하여 증가하는 경향을 보임으로, 성장단계에 따라 원료에 대한 소화효율에 차이

가 있을 것으로 판단된다. 사료의 단백질원료에 대한 이용가능성을 평가한 연구는 모두 치어기 참다랑어(0.38-5 g)를 대상으로 진행되었고, 치어기 참다랑어는 공통적으로 일반어분에 대한 이용성이 낮다고 보고되었다(Ji et al., 2008; Biswas et al., 2009b; Biswas et al., 2011). 그러나 비교적 크기가 큰 태평양참다랑어(83 g)를 이용한 연구에서는 일반어분이 사료에 주단백질원으로써 이용가능함이 보고되었다(Biswas et al., 2016). 참다랑어는 사료원료에 대한 이용성이 어류의 크기에 따라 다를 것이라 판단된다. 따라서 참다랑어의 소화효소 활성과 소화율 연구를 통해 성장단계에 따른 적정 배합비의 규명이 요구된다.

본 연구에서 참다랑어는 효소처리어분에 대한 소화효율이 높게 나타나 사료에 주단백질원으로써의 이용가능성이 높다고 판단된다. 일반어분은 소화효율이 낮게 나타나 사료에 다량 사용하기에는 어려울 것으로 보인다. 참다랑어의 소화효소활성은 어체의 크기와 함께 증가하는 경향을 보여 각 성장단계에 따른 배합비 연구가 요구된다.

## 사 사

본 연구는 국립수산과학원(R2020005)과 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>.
- Allan GL, Parkinson S, Booth MA, Stone DA, Rowland SJ, Frances J and Warner-Smith R. 2000. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: I. Digestibility of alternative ingredients. *Aquaculture* 186, 293-310. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(99\)00380-4](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(99)00380-4).
- AOAC (Association of official analytical chemists). 2005. Official methods of analysis. AOAC, Arlington, VA, U.S.A.
- Barnett BJ, Cho CY and Slinger SJ. 1982. Relative biopotency of dietary ergocalciferol and cholecalciferol and the role of and requirement for vitamin D in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Nutr J* 112, 2011-2019.
- Betancor MB, Ortega A, de la Gándara F, Tocher DR and Mourente G. 2017. Molecular aspects of lipid metabolism, digestibility and antioxidant status of Atlantic bluefin tuna (*T. thynnus* L.) larvae during first feeding. *Aquaculture* 479, 357-369. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.06.011>.
- 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*. Aquacult 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 135, 3020-3038. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.100>.
- Chatzifotis S, Papadakis IE and Divanach P. 2005. Effect of dietary water on growth of dentex *Dentex dentex*. Fish Sci 71, 1243-1248. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2005.01089.x>.
- Davies SJ, Abdel Warith AA and Gouveia A. 2011. Digestibility characteristics of selected feed ingredients for developing bespoke diets for Nile tilapia culture in Europe and North America. J World Aquac Soc 42, 388-398. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00478.x>.
- Degani G and Levanon D. 1983. The influence of low density on food adaptation, cannibalism and growth of eels *Anguilla Anguilla* (L.). Bamidgeh 35, 53-60.
- Deng J, Mai K, Chen L, Mi H and Zhang L. 2015. Effects of replacing soybean meal with rubber seed meal on growth, antioxidant capacity, non-specific immune response, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. Fish Shellfish Immunol 44, 436-444. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.018>.
- Divakaran S, Obaldo, LG and Forster IP. 2002. Note on the methods for determination of chromic oxide in shrimp feeds. J Agric Chem 50, 464-467. <https://doi.org/10.1021/jf011112s>.
- Eid AE and Matty AJ. 1989. A simple *in vitro* method for measuring protein digestibility. Aquaculture 79, 111-119. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90451-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90451-1).
- 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 paper 569, 49-66.
- Ferraris RP, Catacutan MR, Mabelin RL and Jazul AP. 1986. Digestibility in milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal): effects of protein source, fish size and salinity. Aquaculture 59, 93-105. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(86\)90123-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90123-7).
- 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.
- Folkvord A. 1991. Growth, survival and cannibalism of cod juveniles *Gadus morhua*: effects of feed type, starvation and fish size. Aquaculture 97, 41-59. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90278-f](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90278-f).
- Førde-Skjærvik O, Refstie S, Aslaksen MA and Skrede A. 2006. Digestibility of diets containing different soybean meals in Atlantic cod *Gadus morhua*; comparison of collection methods and mapping of digestibility in different sections of the gastrointestinal tract. Aquaculture 261, 241-258. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.009>.
- Grove DJ, Loizides LG and Nott J. 1978. Satiation amount, frequency of feeding gastric emptying rate in *Salmo gairdneri*. J Fish Biol 12, 507-516. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1978.tb04195.x>.
- Halver JE. 1972. The vitamins. In: Fish nutrition. Halver JE, ed. Academic Press, New York, NY, U.S.A., 29-103.
- Harada T. 1971. On the artificial fertilization and rearing of larvae in yellowfin tuna. Mem Fac Agric Kinki Univ 4, 145-151.
- Hecht T and Pienaar AG. 1993. A review of cannibalism and its implications in fish larvae culture. J World Aquac Soc 24, 246-261. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1993.tb00014.x>.



- Hilton JW, Hodson PV and Slinger SJ. 1980. The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Nutr J* 110, 2527-2535. <https://doi.org/10.1093/jn/110.12.2527>.
- Hsu KC. 2010. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chem* 122, 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.013>.
- Hughes SG. 1989. Effect of dietary moisture level on response to diet by Atlantic salmon. *Prog Fish Cult* 51, 20-23. [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1989\)051<0020:EODMLO>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1989)051<0020:EODMLO>2.3.CO;2).
- 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. Dietary utilization of enzyme treated fish meal for juvenile Pacific blufin tuna *Thunnus orientalis*. *J Kor Soc Fish Mar Edu* 29, 1365-1372. <https://doi.org/10.13000/jfmse.2017.29.5.1365>.
- Ji SC, Shin JH, Kim DJ, Jeong MH, Kim JH and Lee KJ. 2020. Utilization of enzyme-treated fish meal and DHA oil in diets for juvenile Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus*. *Korean J Fish Aquat Sci* 53, 181-190. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0181>.
- Ji SC, Shin JH, Kim DJ, Yang SG, Jeong MH, Kim JH and Lee KJ. 2019. Dietary utilization of enzyme treated fish meal as the main protein source for juvenile Atlantic blufin tuna *Thunnus thynnus*. *J Kor Soc Fish Mar Edu* 31, 741-755. <https://doi.org/10.13000/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>.
- Julshamn K, Andersen KJ, Ringdal O and Brenna J. 1988. Effect of dietary copper on the hepatic concentration and subcellular distribution of copper and zinc in the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Aquaculture* 73, 143-155. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90049-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90049-X).
- Katavić I, Jug-Dujaković J and Glamuzina B. 1989. Cannibalism as a factor affecting the survival of intensively cultured sea bass *Dicentrarchus labrax* fingerlings. *Aquaculture* 77, 135-143. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90197-x](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90197-x).
- Ketola HG. 1975. Requirement of Atlantic salmon for dietary phosphorus. *Trans Am Fish Soc* 104, 548-551. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1975\)104<548:ROASFD>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1975)104<548:ROASFD>2.0.CO;2).
- Kim KD, Kim KW, Kang YJ, Son MH and Lee SM. 2011. Effects of the dietary moisture levels and feeding rate on the growth and gastric evacuation of young olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Korean J Fish Aquat Sci* 14, 105-110. <https://doi.org/10.5657/fas.2011.0105>.
- Kondo F, Iwai T, Miura C, Sakata J, Ohta T, Ido A and Miura T. 2016. Analysis of feeding effects of EP on growth and digestion in cultured bluefin tuna. *Nippon suisan Gakk* 82, 923-933. <https://doi.org/10.2331/suisan.16-00030>.
- Koven W, Nixon O, Allon G, Gaon A, El Sadin, S, Falcon J and Tandler A. 2018. The effect of dietary DHA and taurine on rotifer capture success, growth, survival and vision in the larvae of Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus*. *Aquaculture* 482, 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.039>.
- Krossøy C, Waagbø R, Fjellidal PG, Wargelius A, Lock EJ, Graff IE and Ørnsrud R. 2009. Dietary menadione nicotinamide bisulphite (vitamin K3) does not affect growth or bone health in first-feeding fry of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac Nutr* 15, 638-649. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00633.x>.
- La Roche G, Johnson CL and Woodall AN. 1966. Iodine metabolism in young chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*, Walbaum): I. Thyroidal impairment with the use of <sup>131</sup>I. *Gen Comp Endocrinol* 7, 512-524. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(66\)90073-6](https://doi.org/10.1016/0016-6480(66)90073-6).
- Lee SM. 2002. Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for juvenile and grower rockfish *Sebastes schlegeli*. *Aquaculture* 207, 79-95. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00751-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00751-7).
- 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>.
- Liu H, Zhu X, Yang Y, Han D, Jin J and Xie S. 2016. Effect of substitution of dietary fishmeal by soya bean meal on different sizes of gibel carp *Carassius auratus gibelio*: nutrient digestibility, growth performance, body composition and morphometry. *Aquac Nutr* 22, 142-157. <https://doi.org/10.1111/anu.12239>.
- Moyano FJ, Diaz M, Alarcón 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>.
- Muhammadar AA, Mazlan AG, Samat A, Simon KD, Asmawati MS, Muchlisin ZA and Rimmer M. 2012. Feed digestion rates of tiger grouper *Epinephelus fuscoguttatus* juvenile. *Aquac Aquar Conserv Legis* 5, 356-360.
- Neklyudov AD, Ivankin 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. *J Funct Foods* 2, 107-117. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.02.001>.
- Nilisson PA and Brönamark C. 2000. The role of gastric evacuation rate in handling time of equal-mass rations of different prey sizes in northern pike. *J. Fish Biol.* 57, 516-524. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2000.tb02189.x>.
- NRC (National Research Council). 2011. 16 Replacement of marine resources. In: Nutrient requirements of fish and shrimp. The National Academies Press, New York, NY, U.S.A., 305.
- Ogino C and Yang GY. 1980. Requirements of carp and rainbow trout for dietary manganese and copper. *Bull Japan Soc Sci Fish* 46, 455-458.
- Ohnishi T, Biswas A, Kaminaka K, Nakao T, Nakajima M, Sakakibara N and Takii K. 2016. Energy partitioning in cultured juvenile Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* (Temminck & Schlegel, 1844). *Aquac Res* 47, 2040-2049. <https://doi.org/10.1111/are.12658>.
- Oliva-Teles A. 1998. Apparent digestibility coefficients of feedstuffs in seabass *Dicentrarchus labrax* juveniles. *Aquat Living Resour* 11, 187-191. [https://doi.org/10.1016/s0990-7440\(98\)80115-0](https://doi.org/10.1016/s0990-7440(98)80115-0).
- Ospina-Salazar GH, Rios-Duran MG, Toledo-Cuevas EM and Martinez-Palacios CA. 2016. The effects of fish hydrolysate and soy protein isolate on the growth performance, body composition and digestibility of juvenile pike silverside, *Chirostoma estor*. *Anim Feed Sci Technol* 220, 168-179. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.08.011>.
- Pääkkönen JP and Marjomäki TJ. 1997. Gastric evacuation rate of burbot fed single-fish meals at different temperatures. *J Fish Biol* 50, 555-563. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1997.tb01949.x>.
- Parra AM, Rosas A, Lazo JP and Viana MT. 2007. Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. *Fish Physiol Biochem* 33, 223-231. <https://doi.org/10.1007/s10695-007-9134-9>.
- Robinson EH, Rawles SD, Yette HE and Greene LW. 1984. An estimate of the dietary calcium requirement of fingerling tilapia aurea reared in calcium-free water. *Aquaculture* 41, 389-393. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90206-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90206-0).
- Sakakura Y and Tsukamoto K. 1998. Effects of density, starvation and size difference on aggressive behaviour in juvenile yellowtails *Seriola quinquevadiata*. *J Appl Ichthyol* 14, 9-13. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.1998.tb00607.x>.
- Sakamoto S and Yone Y. 1978. Requirement of red sea bream for dietary iron-II. *Nippon suisan Gakk* 44, 223-225. <https://doi.org/10.2331/suisan.44.223>.
- 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>.
- Shearer KD. 1989. Whole body magnesium concentration as an indicator of magnesium status in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Aquaculture* 77, 201-210. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90202-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90202-0).
- Shiau SY and Hsieh JF. 2001. Quantifying the dietary potassium requirement of juvenile hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *Brit J Nutr* 85, 213-218. <https://doi.org/10.1079/BJN2000245>.
- Shimeno S. 1991. Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. In: Handbook of nutrition requirements of finfish, Wilson RP, ed. CRC Press, Florida, FL, U.S.A., 181-191.
- 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/10.11233/aquaculturesci1953.55.571>.
- 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/10.11233/aquaculturesci1953.55.579>.
- Uscanga A, Moyano FJ and Alvarez CA. 2010. Assessment of enzymatic efficiency on protein digestion in the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol Biochem* 36, 1079-1085. <https://doi.org/10.1007/s10695-010-9385-8>.
- Usmani N and Jafri AK. 2002. Effect of fish size and temperature on the utilization of different protein sources in two catfish species. *Aquac Res* 33, 959-967. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2002.00747.x>.
- Vandenberg GW and De La Noue J. 2001. Apparent digestibility comparison in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* assessed using three methods of faeces collection and three digestibility markers. *Aquac Nutr* 7, 237-245. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2001.00181.x>.
- Vergara JM, Lopez-Calero G, Robaina L, Caballero MJ, Montero D, Izquierdo MS and Aksnes A. 1999. Growth, feed utilization and body lipid content of gilthead seabream *Sparus aurata* fed increasing lipid levels and fish meals of different quality. *Aquaculture* 179, 35-44. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(99\)00150-7](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(99)00150-7).
- Windell JT, Foltz JW and Sarokon JA. 1978. Effect of fish size, temperature, and amount fed on nutrient digestibility of a pelleted diet by rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Trans Am Fish Soc* 107, 613-616. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1978\)107<613:EOFSTA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1978)107<613:EOFSTA>2.0.CO;2).
- 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.