

치어기 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 저어분사료와 첨가제로서의 동애 등에(*Hermetia illucens*) 이용성 평가

이연지 · 임현운 · 송진우¹ · 김재식¹ · 이승한² · 김강웅² · 이경준^{3*}

제주대학교 해양생명과학과, ¹제주어류양식수협, ²국립수산과학원 사료연구센터, ³제주대학교 해양과학연구소

Evaluation of the Utility of Low Fish Meal Diet, and Black Soldier Fly *Hermetia illucens* as an Additive for Juvenile Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*

Yeonji Lee, Hyunwoon Lim, Jin-Woo Song¹, Jaesik Kim¹, Seunghan Lee², Kang-Woong Kim² and Kyeong-Jun Lee^{3*}

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

¹Jeju Fish-Culture Fisheries Cooperatives, Jeju 63021, Republic of Korea

²Aquafeed Research Center, National Institute of Fisheries Science, Pohang 37517, Republic of Korea

³Marine Science Institute, Jeju National University, Jeju 63333, Republic of Korea

This study aimed to evaluate the utilization of low fish meal (LFM) diet and black soldier fly (BSF) *Hermetia illucens* meal supplementation in LFM diet as a fish meal (FM) replacer or functional additive for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Three LFM diets were prepared to contain 30, 25, and 20% FM, respectively (designated as F30, F25, and F20). Three BSF diets were prepared by adding 2.0, 2.5, and 3.0% BSF in the LFM diets, respectively (designated as F30B2.0, F25B2.5, and F20B3.0). A total of 540 fish (initial mean body weight: 22.3±0.01g) were randomly distributed into 18 tanks (240 L) in triplicate groups and fed the experimental diets twice daily for 12 weeks. Results showed that there were no significant differences in the growth performance, feed utilization and survival among all the groups. Lysozyme activity significantly increased in F30B2.0 and F25B2.5 groups compared to their respective LFM groups. Total immunoglobulin was significantly higher in F30 group than in F20 group. Anti-protease and myeloperoxidase activities were significantly higher in F30B2.0 group than in F20 group. Innate immunity gradually decreased with decreasing FM level in all the groups. BSF supplementation significantly improved immunity compared to their respective LFM diets. Therefore, BSF could be used as an immuno-stimulant supplement in LFM diets for *P. olivaceus*.

Keywords: Low fish meal diet, Black soldier fly, Immunity, Olive flounder, Additive

서론

어분(fish meal)은 단백질 함량(60~70%)이 높고 비타민과 미네랄, taurine이 풍부하며 항영양인자가 없기 때문에 양식 사료의 주 단백질원으로 이용되고 있다(Kim et al., 2019). 그러나, 어분의 원료가 되는 잡어류의 어획량 감소와 지속적으로 증가하는 국제적 수요는 어분의 단가 상승으로 이어져 양식 사료

의 가격을 높이는 원인이 되고 있다. 양식 산업에서 사료는 전체 양식 비용의 약 50~70%를 차지하기 때문에 지속 가능한 양식 산업 발전을 위해서는 어분을 대체할 수 있는 대체원료의 탐색이 시급하다. 오랫동안 양식 사료의 어분대체원료로서 가격이 저렴하고 수급이 안정적인 다양한 동물성, 식물성 원료들의 이용성이 평가되고 있다(Kim et al., 2020). 동애등에(black soldier fly *Hermetia illucens*, BSF)는 파리로 동애등에과에 속

*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.2023.0300>

Korean J Fish Aquat Sci 56(3), 300-308, June 2023

Received 26 April 2023; Revised 11 May 2023; Accepted 14 June 2023

저자 직위: 이연지(대학원생), 임현운(대학원생), 송진우(이학박사), 김재식(대학원생), 이승한(연구사), 김강웅(연구관), 이경준(교수)

하는 곤충으로, 음식 폐기물류의 섭취를 통해 사육할 수 있기 때문에 친환경적이고 미래지향적인 사료원료로써 평가되고 있다(Nogales-Mérida et al., 2019). 유생 단계의 BSF는 단백질(40–44%)함량이 높으며, 먹이원에 따른 약간의 차이가 존재하나 지질(15–25%)의 함량이 높아 양식 사료에서도 어분 대체원료로써 활발하게 연구되고 있다(Makkar et al., 2014). BSF는 필수아미노산 중 histidine, tryptophan, valine의 함량이 높고 미네랄에서는 칼슘과 철의 함량이 높아 여러 어종에서 그 이용성이 높은 것으로 보고되었다(Spranghers et al., 2017). BSF와 같은 곤충의 외골격에는 키틴이 함유되어 있으며, 키틴은 어류에서 면역력을 향상시키는 것으로 보고되어 양식 사료 내 면역증강제로도 연구되고 있다(Wu et al., 2018).

넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 우리나라의 대표 양식 어종으로 총 양식 생산액의 약 50% 이상을 차지한다(KOSIS, 2021). 넙치는 육식성 어종으로 단백질 요구량이 높아 유통되고 있는 상업사료에는 어분의 함량이 약 65% 이상으로 매우 높은 실정이다. 넙치 사료 내 어분의 사용을 줄이기 위한 연구들이 많이 진행되고 있으며, 최근 연구에서 수지박, 가금부산물, 대두농축단백을 혼합하여 넙치 사료 내 어분을 30%까지 낮출 수 있다고 보고되었다(Kim et al., 2020). 넙치 사료 내 어분 대체원료로써 BSF의 이용성에 관한 연구가 보고되었으나(Hur et al., 2022), 저어분사료 내 BSF의 첨가 효과에 대한 연구는 보고되지 않았다. 따라서, 본 연구는 이전의 연구를 기반으로 저어분사료와 BSF의 첨가가 치어기 넙치의 성장과 건강도, 면역력, 지방산, 아미노산 조성에 미치는 영향을 평가하고자 수행되었다.

재료 및 방법

실험사료

실험에 사용된 저어분사료는 Kim et al. (2020)을 참고로 제작하였다(Table 1). 저어분사료의 주 단백질원으로는 두 종류의 어분(정어리, 멸치), 수지박, 가금부산물분, 참치부산물분, 대두농축단백, 밀글루텐을 사용하였으며, 어분의 함량은 각각 30%, 25%, 20%로 설정하였다(F30, F25, F20). BSF(조단백질, 39.5%; 조지질, 37.4%)는 유충 단계를 사용하였으며, 실험구는 각각의 저어분 실험구에 BSF를 어분 함량에 따라 2.0%, 2.5%, 3.0%씩 첨가하였다(F30B2.0, F25B2.5, F20B3.0). 실험사료 내 BSF 유충의 첨가량에 따라 어유(fish oil)와 밀가루의 양을 조절하였다. 저어분사료에 대한 넙치의 사료 기호성을 향상시키기 위해 betaine과 taurine을 첨가하였으며, 어분 대체에 따른 필수 아미노산의 결핍을 방지하고자 실험 사료에 methionine과 lysine을 첨가하였다. 모든 실험 사료의 조지질과 인 함량을 동일하게 조성하기 위해 어유와 일인산칼슘(mono-calcium phosphate)을 첨가하였다. 실험 사료는 어유와 증류수를 넣어 혼합하였으며, 사료펠렛기(SP-50; KumKang ENG, Daegu, Korea)를 이용하여 2가지 크기(3, 5 mm)로 제작하였다. 성형된

Table 1. Dietary formulation of the experimental diets for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*

Ingredients (%)	Dietary treatments					
	F30	F25	F20	F30B2.0	F25B2.5	F20B3.0
Fish meal (Chile) ¹	15.0	12.5	10.0	15.0	12.5	10.0
Fish meal (Peru) ¹	15.0	12.5	10.0	15.0	12.5	10.0
Tankage meal ²	14.0	16.5	19.0	14.0	16.5	19.0
Poultry byproduct meal ³	7.25	8.00	8.75	7.25	8.00	8.75
Wheat gluten ⁴	4.80	4.90	5.00	4.80	4.90	5.00
Soy protein concentrate ⁵	8.50	9.00	9.50	8.50	9.00	9.50
Black soldier fly ⁶	0.00	0.00	0.00	2.00	2.50	3.00
Tuna byproduct meal ⁷	2.00	3.00	4.00	2.00	3.00	4.00
Starch	3.60	3.45	3.30	3.60	3.45	3.30
Soybean meal	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
Wheat flour	7.00	7.00	7.00	5.50	5.00	4.50
Fish oil ⁸	4.06	3.92	3.78	3.56	3.42	3.28
Lecithin	0.80	0.90	1.00	0.80	0.90	1.00
Betaine	0.60	0.70	0.80	0.60	0.70	0.80
Taurine	0.55	0.60	0.65	0.55	0.60	0.65
Lysine	0.40	0.50	0.60	0.40	0.50	0.60
Methionine	0.29	0.33	0.37	0.29	0.33	0.37
Mono-calcium phosphate	1.25	1.20	1.15	1.25	1.20	1.15
Mineral Mix ⁹	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin Mix ¹⁰	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin C	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamin E	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Choline chloride	0.70	0.80	0.90	0.70	0.80	0.90
Total	100	100	100	100	100	100

¹FM, Orizon S.A., CO., Ltd, Chile. ²Hanla Industrial Co., Ltd, Jeju, Korea. ³Woosin Food Co., Ltd, pocheon, Korea. ⁴Solae LLC Inc., Saint Luis, USA. ⁵CJ CheilJedang Co., Ltd, Seoul, Korea. ⁶Entomo, Siheung, South Korea ⁷Wooginfeed Industry Co. Ltd, Incheon, Korea. ⁸Fish oil, E-wha oil Industry, Busan, Korea. ⁹Mineral mixture contained the following amount which were diluted in cellulose (g/kg, mixture): MgSO₄, 80.2; C₄H₂FeO₄, 12.5; KCl, 130; FeSO₄·H₂O, 20; CuSO₄·5H₂O, 1.25; CoSO₄, 0.75; Ca(IO₃)₂, 0.75; Al(OH)₃, 0.75; ZnSO₄·7H₂O, 13.75; MnSO₄, 11.25; CoCl₂·6H₂O, 1. ¹⁰Vitamin mixture contained the following amount which were diluted in cellulose (g/kg, mixture): L-ascorbic acid, 6.4; DL-α tocopheryl acetate, 37.5; thiamin hydrochloride, 5.0; riboflavin, 10.0; pyridoxine hydrochloride, 5.0; niacin, 37.5; Ca-D-pantothenate, 17.5; myo-inositol, 75.0; D-biotin, 0.05; folic acid, 2.5; menadione, 2.5; retinyl acetate, 1.72; cholecalciferol, 0.025; cyanocobalamin, 0.025.

사료는 건조(12 h, 25°C) 후, 공급 전까지 냉동보관(-20°C)하였다. 실험 사료의 일반성분과 지방산 조성, 필수 아미노산 조성 결과는 각각 Table 2, Table 3에 제시하였다.

실험어와 사육관리

사육실험은 제주대학교 동물실험윤리위원회의 윤리규정(2022-0028)을 준수하며 진행되었다. 넙치는 제주도 구좌읍에 위치한 평농수산에서 구입하여 제주대학교 해양과학연구소로 운송하였다. 어류는 상업사료(보그락 3호; Suhyp, Jeju, Korea)를 공급하며 실험 환경에 순치하였다. 예비사육 후 총 540마리의 넙치 치어(22.3±0.01 g)를 총 18개의 acrylonitrile butadiene styrene (ABS) 원형수조(240 L)에 수조 당 30마리씩, 실험구 당 3반복으로 무작위 배치하였다. 형광등을 이용해 12L:12D로 광주기를 조절하였다. 사육수는 모래 여과되었으며, 유수량은 2-3 L/min이 되도록 조절하였다. 용존산소(dissolved oxygen)를 유지하기 위해 모든 실험수조에 aeration을 설치하였다. 실험 사료는 1일 2회(9:00, 16:30 h), 12주 동안 만

복으로 공급하였다. 실험기간 동안 수온은 24.6±2.17°C 범위로 자연 수온에 의존하였다. 용존산소는 Pro20 Dissolved Oxygen Instrument (YSI, Yellow Springs, OH, USA), pH는 Seven Compact (METTLER TOLEDO, Columbus, OH, USA), 염분은 Master Refractometer (ATAGO, Tokyo, Japan) 기기를 사용하여 측정하였다. 실험기간 중 용존산소는 8.14±0.83 mg/L, pH는 7.65±0.25, 염분은 30.4±2.03 psu로 유지되었다.

어체측정

사육실험 종료 후, 성장률(weight gain, WG), 일간성장률(specific growth rate, SGR), 사료이용효율(feed conversion ratio, FCR), 단백질전환효율(protein efficiency ratio, PER), 생존율(survival), 비만도(condition factor, CF)를 측정하기 위해 실험어를 24시간 절식시킨 후 마릿수와 최종 무게(final body weight, FBW), 길이를 측정하였다. 무게 측정 후, 수조 당 3마리의 실험어를 무작위로 선별하여 100 ppm의 2-phenoxyethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액으로 마취시킨 후, 간중량지수(hepatosomatic index, HSI)와 내장중량지수(viscerosomatic index, VSI)를 측정하기 위해 실험어를 해부하여 간과 내장의 무게를 측정하였다.

Sampling과 분석

혈액은 마취된 실험어의 미부동맥에서 채혈하였으며, 혈액 응고를 방지하기 위해 20 µL의 heparin (Sigma-Aldrich)을 혼합하였다. Hematocrit (Ht)은 전혈(whole blood)을 사용하여 Micro-hematocrit (VS-12000; Vision Scientific, Daejeon, Korea) 장비로 측정하였으며, hemoglobin (Hb)은 혈액생화학분석기(CH 100^{plus}; RADIM company, Firenze, Italy)를 통해 분석되었다. Heparin이 처리된 혈액은 원심분리기(Micro 17 TR; HaniBioMed Inc., Gwangju, Korea)를 통해 원심분리(10 min, 5000 g, 4°C)되었으며, 분리된 혈장(plasma)은 glucose, cholesterol, total immunoglobulin (Ig) 측정에 사용되었다. Glucose,

Table 2. Proximate composition and fatty acid profiles of the experimental diets for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* (% of lipid)

	Dietary treatments					
	F30	F25	F20	F30B2.0	F25B2.5	F20B3.0
Proximate composition (% of dry matter)						
Crude protein	57.4	57.4	57.3	58.6	58.2	58.1
Crude lipid	10.2	10.6	11.2	10.9	11.2	11.5
Crude Ash	13.1	12.8	12.7	13.0	13.1	13.0
Fatty acid (% of lipid)						
C12	-	-	-	2.76	3.16	4.13
C14	3.79	3.47	3.09	3.81	3.53	3.59
C16	25.4	26.2	26.0	25.6	25.6	24.7
C16:1	5.35	5.08	4.90	4.75	4.52	4.56
C18	8.21	9.92	9.92	9.11	11.0	10.0
C18:1n9	22.2	22.8	24.6	21.3	22.2	24.3
C18:2n6	13.6	14.2	12.9	14.3	14.3	13.6
C18:3n3	3.42	2.96	3.16	2.46	2.31	2.47
C20:4n6	5.47	4.62	5.38	4.00	3.30	3.62
C20:5n3	7.54	6.37	6.25	6.79	5.86	5.44
C22:6n3	5.02	4.39	3.84	5.10	4.28	3.56
MUFA ¹	27.6	27.9	29.5	26.0	26.7	28.9
PUFA ²	29.6	27.9	26.1	28.6	26.7	25.1
∑n-3 ³	16.0	13.7	13.2	14.4	12.4	11.5
∑n-6 ⁴	13.6	14.2	12.9	14.3	14.3	13.6
SAF ⁵	37.4	39.5	39.0	41.3	43.3	42.4

¹Monounsaturated fatty acids. ²Polyunsaturated fatty acids. ³Omega-3 fatty acids. ⁴Omega-6 fatty acids. ⁵Saturated fatty acids.

Table 3. Essential amino acids profiles of the experimental diets for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* (% of protein)

Essential amino acid	Dietary treatments					
	F30	F25	F20	F30B2.0	F25B2.5	F20B3.0
Arginine	6.76	6.77	6.70	6.80	6.82	6.76
Histidine	2.87	2.80	2.70	2.93	2.88	2.80
Isoleucine	4.14	4.08	4.03	4.18	4.12	4.09
Leucine	7.29	7.17	7.22	7.34	7.24	7.30
Lysine	7.02	6.86	6.58	7.06	6.91	6.64
Methionine	2.66	2.63	2.38	2.66	2.63	2.68
Threonine	4.01	3.88	3.82	4.04	3.91	3.87
Phenylalanine	4.34	4.27	4.35	4.37	4.31	4.39
Valine	4.74	4.71	4.68	4.79	4.78	4.75

cholesterol은 STANBIO kit를 이용해 혈액생화학분석기를 통해 분석되었다. Ig는 Siwicki et al. (1994)의 방법으로 측정하였다. 혈청(serum)은 채혈 된 혈액을 실온에서 30분간 응고시킨 후 혈장과 동일하게 원심분리하였으며, lysozyme, anti-protease, myeloperoxidase (MPO) 분석에 이용하였다. Lysozyme 활성은 Hultmark et al. (1980)의 방법을, anti-protease 활성은 Sharifuzzaman and Austin (2009)의 방법을 MPO는 Quade and Roth (1997)의 방법으로 분석하였다. 혈장과 혈청은 분석에 사용되기 전까지 냉동보관(-80°C) 되었다.

실험 사료와 등근육의 일반성분분석은 AOAC (2000)의 방법에 따라 분석되었다. 수분은 상압가열건조법(125°C, 3 h), 조회분은 직접회화법(550°C, 4 h), 단백질은 자동조단백질분석기(Kjeltec™ system 2300; FOSS analytical, Hillerød, Denmark)로 분석하였으며, 지방은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 분석하였다. 실험 사료와 전어체의 지방산 조성은 Metcalfe and Schmitz (1961)의 방법에 따라 전처리 하였다. 분리된 지방산은 capillary column (112-88A7, 100 m×0.25 mm, film thickness 0.20 µm; Agilent Technologies, San Francisco, CA, USA)이 장착된 gas chromatography (6800GC; Agilent Technologies)를 통해 분석되었다. Carrier gas는 수소를 사용하였고, oven의 온도는 140°C에서 240°C까지 4°C/min으로 증가시켰다. Injection 온도는 240°C, 검출기의 온도는 240°C로 설정하였다. 표준물질은 37 Component FAME Mix (Supelco, Bellefonte, PA, USA)를 사용하였다. 실험어의 등근육 아미노산 함량은 Rosen (1957)의 방법에 따라 분석되었다. 등근육은 동결건조(LP20; ilShinBioBase, Dongducheon, Korea)하였으며, 각 샘플은 30 mL의 6 N HCl과 혼합하여 24시간(130°C)동안 가수분해하였다. 이후, 중류수를 첨가하여 100 mL로 만든

후, syringe filter (0.4 µm)로 filtering하였다. 준비된 시료는 희석한 후, 아미노산 분석기(Amino acid analyzer S433; Sykam Chromatography, Eresing, Germany)로 분석되었다.

통계 분석

모든 실험구는 완전확률계획법(completely randomized design)을 통해 무작위로 배치하였다. 분석결과는 SPSS (Version 24.0; International Business Machines Co., NY, USA) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석되었다. 데이터 값의 유의차는 Tukey's HSD multiple range test (P<0.05)로 나타내었다. 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하였으며, 모든 데이터는 평균값±표준편차(mean±standard deviation)로 나타내었다. Two-way ANOVA 방법으로 어분의 함량과 BSF의 첨가 유무 사이의 관계를 분석하였다.

결 과

12주간의 사육실험 후, FBW, WG, SGR, FCR, PER, survival은 모든 실험구 사이에는 유의적인 차이가 없었다(Table 4). 생물지표 측정 결과, CF, HSI, VSI는 모든 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다(Table 5). 등근육의 일반성분과 지방산 조성 결과는 Table 6에 나타내었다. 등근육의 조단백질 함량은 F20B3.0 실험구가 F30 실험구보다 유의적으로 높았으며, 조지질 함량의 경우 F25B2.5와 F20B3.0 실험구가 F30 실험구보다 유의적으로 높았다. 조회분의 경우 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다. 등근육의 지방산 함량 분석 결과, 어분의 함량이 감소함에 따라 linoleic acid (C18:2n6)와 Omega-6 fatty acids (Σn-6)의 함량이 증가하였으며, lauric acid (C12)는 모든 실험구에서 검출되지 않았다. 등근육의 구성 아미노산 분

Table 4. Growth performance, feed utilization and survival of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 12 weeks

Dietary treatments	FBW ¹	WG ²	SGR ³	FCR ⁴	PER ⁵	Survival (%)
F30	160±5.67	619±25.8	2.43±0.04	0.67±0.01	2.62±0.03	98.9±1.92
F25	157±11.5	603±51.8	2.41±0.09	0.69±0.01	2.53±0.02	98.9±1.92
F20	157±1.60	605±7.04	2.40±0.01	0.67±0.01	2.59±0.04	97.8±1.92
F30B2.0	159±5.86	612±26.3	2.42±0.05	0.68±0.02	2.52±0.08	97.8±1.92
F25B2.5	152±3.81	584±16.6	2.37±0.03	0.68±0.01	2.53±0.06	98.9±1.92
F20B3.0	154±2.37	591±10.9	2.39±0.02	0.69±0.02	2.50±0.06	97.8±1.92
Two-way ANOVA						
FM	0.333	0.344	0.338	0.273	0.407	0.619
BSF	0.403	0.401	0.420	0.445	0.033	0.690
FM×BSF	0.907	0.910	0.927	0.286	0.229	0.848

¹Final body weight (g). ²Weight gain (%)=100×(final body weight–initial body weight)/(initial body weight). ³Specific growth rate (%)=100×[ln(final body weight)-ln(initial body weight)]/experiment days. ⁴Feed conversion ratio=dry feed fed (g)/wet weight gain (g). ⁵Protein efficiency ratio=wet weight gain (g)/total protein given (g). FM, Fish meal; BSF, Black soldier fly. Values are mean of triplicates (n=3) and presented as mean±SD. The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

Table 5. Biological assessments of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 12 weeks

Dietary treatments	HSI ¹	VSI ²	CF ³
F30	1.31±0.23	3.83±0.27	0.93±0.03
F25	1.07±0.02	3.50±0.12	0.95±0.08
F20	1.19±0.03	3.68±0.39	0.95±0.04
F30B2.0	1.25±0.26	3.23±0.74	0.94±0.06
F25B2.5	1.18±0.07	3.54±0.19	0.96±0.05
F20B3.0	1.24±0.05	3.88±0.17	1.00±0.02
Two-way ANOVA			
FM	0.156	0.306	0.319
BSF	0.816	0.345	0.282
FM × BSF	0.737	0.184	0.785

¹Hepatosomatic index=[liver weight (g)/fish weight (g)]×100.

²Viscerosomatic index=[viscera weight (g)/fish weight (g)]×100.

³Condition factor=[body weight (g)/body length (cm)³]×100. FM, Fish meal; BSF, Black soldier fly. Values are mean of triplicate (n=3) and presented as mean±S.D. The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

식 결과는 Table 7에 제시하였으며, 어분 대체율과 BSF의 첨가 유무와 상관없이 모든 실험구 사이에 차이가 없었다. 혈액학적 지표 분석 결과는 Table 8에 나타내었으며, Hb, Ht, glucose, cholesterol 수치는 모든 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다. 면역분석 결과는 Table 9에 제시하였다. Ig 결과 F30 실험구가 F20 실험구에 비해 유의적으로 높았으며, Lysozyme 활성은 BSF 무첨가 실험구들이 F30B2.0, F25B2.5 실험구보다 유의적으로 낮았다. Anti-protease의 활성은 F20 실험구에 비해 F30B2.0, F25B2.5 실험구가 유의적으로 높았으며, MPO 수치는 F30B2.0 실험구가 F20 실험구보다 유의적으로 높았다. Anti-protease를 제외하고는 저어분 실험구간에 유의적인 차이가 없었다. 저어분사료 내 BSF를 첨가하였을 때, 동일 함량의 저어분 실험구보다 lysozyme 활성과 Ig 농도가 유의적으로 증가하였다.

고 찰

Kim et al. (2020)의 연구에서 가금부산물분, 수지박, 대두농축단백, 밀글루텐을 혼합 이용하여 어분을 대체하였으며, 사료

Table 6. Proximate composition and fatty acid profiles in muscle of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 12 weeks

	Dietary treatments					
	F30	F25	F20	F30B2.0	F25B2.5	F20B3.0
Proximate composition (% wet basis)						
Moisture	75.7±0.21 ^{ab}	75.6±0.37 ^{ab}	75.2±0.16 ^{ab}	76.0±0.34 ^a	76.0±0.34 ^a	74.9±0.63 ^b
Crude protein	22.6±0.38 ^b	23.1±0.40 ^{ab}	23.2±0.13 ^{ab}	23.0±0.53 ^{ab}	23.6±0.65 ^{ab}	24.8±1.30 ^a
Crude lipid	0.38±0.04 ^c	0.51±0.10 ^{bc}	0.53±0.08 ^{bc}	0.69±0.18 ^{abc}	0.85±0.23 ^{ab}	0.97±0.19 ^a
Crude Ash	1.45±0.11	1.35±0.11	1.33±0.13	1.16±0.10	1.32±0.30	1.09±0.02
Fatty acid (% of lipid)						
C14	2.33±0.51	1.73±0.05	1.62±0.40	2.34±0.42	2.05±0.63	2.59±0.24
C16	27.5±1.63	27.7±0.34	28.2±2.19	28.6±0.87	28.7±1.46	27.6±0.60
C16:1	3.50±0.69	3.03±0.18	2.81±0.52	3.46±0.51	2.80±0.73	3.55±0.28
C18	11.0±2.04	10.7±1.30	10.7±0.24	10.0±0.78	11.3±1.31	9.59±1.16
C18:1n9	20.9±3.68	19.6±1.40	20.5±0.64	21.1±1.47	20.0±0.62	23.2±2.61
C18:2n6	9.90±0.60 ^d	10.4±0.52 ^{cd}	11.6±0.50 ^{abc}	10.8±0.12 ^{bcd}	12.1±0.38 ^{ab}	12.7±0.71 ^a
C18:3n3	3.26±0.92	4.28±1.94	2.57±0.81	2.83±0.49	2.75±0.89	3.63±1.90
C20:5n3	8.80±0.26	8.83±0.59	8.88±0.61	8.44±0.80	8.09±0.25	7.35±0.81
C22:6n3	12.8±2.05 ^{ab}	13.7±0.54 ^a	13.1±0.09 ^{ab}	12.5±0.82 ^{ab}	12.2±0.66 ^{ab}	9.88±2.23 ^b
MUFA ¹	24.4±4.11	22.7±1.52	23.3±1.15	24.6±1.32	22.8±1.36	26.7±2.83
PUFA ²	34.7±1.21	37.2±1.08	36.1±1.22	34.5±0.18	35.2±0.88	33.6±2.34
∑n-3 ³	24.8±1.53 ^{ab}	26.8±1.46 ^a	24.6±0.77 ^{ab}	23.8±0.28 ^{abc}	23.1±0.51 ^{bc}	20.9±1.77 ^c
∑n-6 ⁴	9.90±0.60 ^d	10.4±0.52 ^{cd}	11.6±0.50 ^{abc}	10.8±0.12 ^{bcd}	12.1±0.38 ^{ab}	12.7±0.71 ^a
SAF ⁵	40.9±3.09	40.2±1.04	40.6±2.12	40.9±1.43	42.1±1.92	39.7±1.41

¹Monounsaturated fatty acids. ²Polyunsaturated fatty acids. ³Omega-3 fatty acids. ⁴Omega-6 fatty acids. ⁵Saturated fatty acids. Values are mean of triplicate (n=3) and presented as mean±S.D. Values with different superscripts in the same row are significantly different (P<0.05).

내 어분의 함량을 32.5%까지 낮추어도 성장 저하가 나타나지 않았다. Kim et al. (2022)은 넙치 사료 내 참치부산물분을 이용하여 어분을 50%까지 대체하였을 때, 넙치의 성장을 유의적으로 증진시킨다고 보고하였다. 육골분, 가금부산물분 등의 동물성 단백질원은 양어사료에서 좋은 어분 대체원으로 보고되었으며, 성장에 부정적인 영향이 없는 것으로 밝혀졌다(Kim et al., 2021). 본 연구에서 어분 대체원으로 사용한 수지박, 가금부산물분, 참치부산물분, 대두농축단백, 밀글루텐은 선행 연구를 통해 넙치에게 부정적인 영향을 주지 않고 어분 대체가 가능한 원료들로 평가되었다.

고도불포화 지방산(high unsaturated fatty acid)인 eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5n3), docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n3), arachidonic acid (C20:4n6)는 해산어류의 성장과 생존, 세포막의 구성과 기능을 위한 필수지방산으로 보고되었다(Sargent et al., 1999). 필수지방산이 결핍될 경우 어류는 사료 섭취 저하, 성장부진, 대량 폐사와 같은 증상을 보인다(Glencross, 2009). Jang et al. (2019)은 치어기 넙치 사료 내 EPA의 요구량은 1.1–1.25%이며, 0.75%의 DHA를 첨가할 경우 EPA의 요구량이 0.75%까지 감소한다고 보고하였다. 본 연구에서 실험 사료의 EPA와 DHA의 함량은 어분 대체율이 증가할수

록 감소하였다. 사육실험 기간에 넙치에서 결핍 증상이 관찰되지 않았으나, 장기간 사용을 고려하였을 때는 EPA, DHA의 첨가가 필요할 것으로 사료된다. 넙치 등근육 지방산 조성에서는 lauric acid가 검출되지 않았는데, lauric acid는 중쇄지방산의 일종으로 긴사슬지방산보다 체내에 빠르게 흡수되는 특징이 있다(Stubbs and Harbron, 1996). 중쇄지방산은 대부분 에너지 대사과정에 바로 사용되기 때문에 다른 지방산들보다 체내에 축적되는 정도가 낮은 것으로 보고되었다(Garlid et al., 1996). 본 연구에서는 사료 내 BSF의 첨가량이 과도하지 않아 lauric acid가 에너지로 모두 이용되었거나 극히 적은 양이 축적되어 검출되지 않았을 것으로 추측된다.

사료 내 어분을 과도하게 대체할 경우, 필수 아미노산, 비타민, 미네랄 등의 영양소 결핍으로 인해 어류의 면역력이 저하되는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 2020). 단일 원료를 사용하여 어분을 대체할 경우, 대표적으로 methionine, lysine과 같은 제한 아미노산의 결핍이 나타날 수 있다(Li et al., 2011). 또한, 어분을 식물성 단백질원으로 대체하여 장기간 공급하게 될 경우, 성장부진, 사료 섭취 저조, 아미노산 결핍 등의 문제들이 발생하는 것으로 보고되었다(Li et al., 2011). 이를 고려하여 본 연구에서는 어분의 함량이 감소함에 따라 methionine과 lysine을 추가로

Table 7. Amino acids profiles in muscle of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 12 weeks (% of protein)

	Dietary treatments					
	F30	F25	F20	F30B2.0	F25B2.5	F20B3.0
Essential amino acid						
Arginine	5.97±0.07	6.10±0.05	5.92±0.07	6.08±0.20	6.20±0.24	6.16±0.29
Histidine	2.09±0.03	2.09±0.06	2.05±0.01	2.07±0.29	2.14±0.25	2.16±0.16
Isoleucine	4.33±0.06	4.46±0.05	4.41±0.13	4.43±0.24	4.45±0.17	4.43±0.12
Leucine	7.42±0.24	4.59±0.11	7.43±0.22	7.42±0.40	7.48±0.29	7.87±0.26
Lysine	8.28±0.00	8.44±0.23	8.21±0.12	8.12±0.96	8.54±0.59	8.35±0.41
Methionine	2.81±0.13	2.96±0.02	2.85±0.06	2.85±0.17	2.95±0.06	2.84±0.06
Threonine	4.34±0.22	4.37±0.03	4.31±0.07	4.34±0.14	4.36±0.17	4.43±0.27
Phenylalanine	3.94±0.06	4.02±0.07	3.88±0.05	3.94±0.19	3.98±0.11	3.98±0.14
Valine	4.74±0.02	4.86±0.12	4.77±0.04	4.84±0.17	4.87±0.16	4.88±0.11
Non-essential amino acid						
Alanine	5.92±0.08	6.03±0.08	5.80±0.04	5.98±0.08	6.15±0.04	6.10±0.14
Aspartate	5.87±0.16 ^{ab}	6.03±0.19 ^{ab}	5.75±0.19 ^b	5.81±0.54 ^{ab}	6.03±0.28 ^a	5.92±0.36 ^a
Glutamate	10.1±0.48	10.6±0.14	10.1±0.49	10.2±0.77	10.3±0.48	10.1±0.70
Glycine	6.54±0.79	6.34±0.26	6.29±0.66	6.29±0.49	6.68±0.50	6.60±0.18
Proline	5.68±0.37	5.52±0.05	5.34±0.11	5.34±0.36	6.11±0.03	5.79±0.13
Serine	3.37±0.12	3.56±0.02	3.44±0.07	3.44±0.17	3.54±0.15	3.42±0.21
Tyrosine	3.84±0.07	3.87±0.04	3.80±0.11	3.80±0.19	3.85±0.12	3.91±0.09
Taurine	3.14±0.16	3.19±0.30	3.03±0.18	3.03±0.15	3.13±0.17	3.09±0.06

Values are mean of triplicate (n=2) and presented as mean±S.D. Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

Table 8. Hematological parameters of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 12 weeks

Dietary treatments	Hb ¹ (g/dL)	Ht ² (%)	Glucose (mg/dL)	Cholesterol (mg/dL)
F30	6.01±0.48	36.1±3.95	88.4±3.20	172±20.6
F25	6.50±0.90	38.7±9.07	90.8±0.73	164±19.7
F20	6.96±0.72	38.9±5.54	88.3±4.95	155±17.3
F30B2.0	6.02±0.52	40.7±3.06	87.5±5.09	176±8.70
F25B2.5	6.74±0.08	44.0±3.28	88.4±5.28	154±12.4
F20B3.0	6.12±0.70	31.4±5.01	82.7±0.35	166±7.08
Two-way ANOVA				
FM	0.218	0.168	0.220	0.223
BSF	0.509	0.933	0.128	0.803
FM × BSF	0.323	0.125	0.575	0.522

¹Hemoglobin. ²Hematocrit. FM, Fish meal; BSF, Black soldier fly. Values are mean of triplicate (n=3) and presented as mean±S.D. Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

Table 9. Immune responses of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 12 weeks

Dietary treatments	Lysozyme ¹ (µg/mL)	Ig ² (µg/mL)	Anti-protease ³ (%)	MPO ⁴
F30	11.2±1.45 ^b	16.7±3.46 ^a	21.3±1.96 ^{ab}	1.83±0.19 ^{ab}
F25	11.3±1.15 ^b	12.3±2.18 ^{ab}	20.6±1.25 ^{ab}	1.78±0.12 ^{ab}
F20	11.0±2.01 ^b	9.57±1.67 ^b	18.0±1.29 ^b	1.43±0.09 ^b
F30B2.0	17.5±2.60 ^a	14.8±2.84 ^{ab}	24.1±1.64 ^a	2.03±0.29 ^a
F25B2.5	17.5±1.99 ^a	14.1±0.15 ^{ab}	23.4±2.79 ^a	1.97±0.25 ^{ab}
F20B3.0	14.3±1.33 ^{ab}	15.1±2.63 ^{ab}	20.9±0.38 ^{ab}	1.90±0.17 ^{ab}
Two-way ANOVA				
FM	0.782	0.087	0.017	0.086
BSF	0.001	0.071	0.004	0.010
FM × BSF	0.009	0.013	0.991	0.395

¹Lysozyme activity. ²Total immunoglobulin. ³Anti-protease activity (%). ⁴Myeloperoxidase (450 nm). Values are mean of triplicate (n=3) and presented as mean±S.D. Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05).

첨가해주었다. 등근육의 아미노산 조성은 섭취하는 사료와 밀접한 연관이 있으며, 본 연구의 등근육 아미노산 조성은 어분이 59% 포함된 사료를 공급한 넙치와 매우 유사한 것으로 나타났다(Jang et al., 2009). 또한, 저어분 실험구에서 어분 대체율이 증가하여도 등근육의 아미노산 조성에는 차이가 없었다. 따라서, 본 연구에서 다양한 동·식물성 단백질 원료를 혼합하여 사용하였고, 제한 아미노산을 첨가해 주었기 때문에 넙치의 성장에

부정적인 영향을 주지 않았을 것으로 사료된다.

Lysozyme은 세균의 세포벽을 구성하는 peptidoglycan의 β-1, 4 결합을 가수분해함으로써 항균 작용을 한다(Saurabh and Sahoo, 2008). Ig는 면역 단백질로 어류의 면역 반응의 주요 구성 요소 가운데 하나이며(Urbe et al., 2011), MPO는 과산화효소로 호중구, 호염기구, 호산구에서 과산화수소를 hypochlorous acid로 변환시켜 병원성 미생물을 사멸시키는 역할을 한다(Palić et al., 2005). 여러 어종에서 사료 내 BSF를 첨가하였을 때, 면역력과 질병저항성이 증가되었다고 보고되었다. 나일틸라피아(*Oreochromis niloticus*) (Tippayadara et al., 2021)와 yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* (Xiao et al., 2018)를 대상으로 한 연구에서는 사료에 BSF를 첨가하였을 때, lysozyme의 활성이 향상되었다고 보고되었다. 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*) (Melenchón et al., 2021)와 meagre *Argyrosomus regius* (Couto et al., 2022)에서는 사료의 어분을 전지(full-fat) BSF와 탈지(defatted) BSF로 각각 15%, 52% 대체하였을 때, anti-protease의 활성이 유의적으로 증가하였다. 무지개송어 사료 내 BSF의 첨가는 probiotics로 알려진 *Campylobacterium* 속 박테리아의 수를 증가시켜 질병저항성과 비특이적 면역력을 향상시켰으며(Bruni et al., 2018), black sea bream *Acanthopagrus schlegelii* 사료에 BSF를 첨가하였을 때, 항산화 능력(catalase, total antioxidant, MDA)이 향상되었다고 보고되었다(Ullah et al., 2022). Shin et al. (2021)은 흰다리새우 (*Litopenaeus vannamei*) 사료 내 BSF의 첨가는 급성간췌장괴사(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND) 병을 일으키는 *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 질병저항성을 향상시키는 것으로 보고하였다. European seabass *Dicentrarchus labrax*를 대상으로 사료 내 어분 대체 단백질원으로 BSF를 공급하였을 때, *V. alginolyticus* 세균에 대한 질병저항성이 향상되었다고 보고되었다(Abdel-Latif et al., 2021). BSF와 같은 곤충단백질원료에서 항균작용을 하는 항균 펩타이드(antimicrobial peptides)와 키틴과 같은 생리활성 물질은 동물의 면역 반응에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Wu et al., 2018). 항균 펩타이드는 5-100개 이상의 아미노산으로 구성되어 있는 oligopeptide로 바이러스에서 기생충까지 다양한 형태의 병원체를 인식하고 반응한다(Bahar and Ren, 2013). BSF에서 유래된 항균 펩타이드는 광범위한 항균 특성을 갖고 내성균의 출현을 유발하는 경향이 낮아 축산 업계에서 동물의 질병 예방과 치료를 위한 항생제 대체물질로서 각광받고 있을 뿐만 아니라(Xia et al., 2021) 양식 사료 내 어분의 대체 단백질원으로 어류의 비특이적 면역력을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Tippayadara et al., 2021). 키틴은 병원균의 세포벽과 직접적으로 결합하여 병원균의 구조를 파괴하거나 균의 내부로 침투해 DNA에 손상을 주며, 균이 증식하는데 필요한 금속이온과 결합하여 균의 성장을 억제한다(Abdel-Ghany and Salem, 2020). 본 연구에서 저어분 실험구 사이에 어분 대체율이 증가할수록 면역력이 전

반적으로 감소하였으나, BSF를 첨가함으로써 향상되는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구 결과 BSF가 치어기 넙치의 면역증강제로써 사용 가능할 것으로 사료된다.

결론적으로, 5종의 동·식물성 단백질원(참치부산물분, 가금부산물분, 수지박, 대두농축단백, 밀글루텐)을 이용하여 치어기 넙치 사료의 어분 함량을 20%까지 감소시켜도 넙치의 성장과 면역력, 지방산 조성, 등근육 아미노산 조성에 영향을 미치지 않을 것으로 사료된다. 저어분사료 내 BSF의 첨가는 넙치의 비특이적 면역력을 증진시킬 수 있을 것으로 사료된다. BSF는 저어분 넙치 사료에서 단백질 원료로써뿐만 아니라 면역증강 기능성 첨가제로써 이용 가능할 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 국립수산물과학원(R2023036) 연구개발비 지원과 2019년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(2019R1A6A1A03033553)입니다.

References

- Abdel-Ghany HM and Salem MES. 2020. Effects of dietary chitosan supplementation on farmed fish; a review. *Rev Aquac* 12, 438-452. <https://doi.org/10.1111/raq.12326>.
- Abdel-Latif HM, Abdel-Tawwab M, Khalil RH, Metwally AA, Shakweer MS, Ghetas HA and Khallaf. 2021. Effects on antioxidative capacity, non-specific immunity, transcriptomic responses, and resistance to the challenge with *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol* 111, 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.01.013>.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2000. Official Methods of Analysis of AOAC International (17th, Edn.). AOAC, Gaithersburg, MD, U.S.A.
- Bahar AA and Ren D. 2013. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals* 6, 1543-1575. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>.
- Bruni L, Pastorelli R, Viti C, Gasco L and Parisi G. 2018. Characterisation of the intestinal microbial communities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with *Hermetia illucens* (black soldier fly) partially defatted larva meal as partial dietary protein source. *Aquaculture* 487, 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.006>.
- Couto A, Serra CR, Guerreiro I, Coutinho F, Castro C, Rangel F and Enes P. 2022. Black soldier fly meal effects on meagre health condition: Gut morphology, gut microbiota and humoral immune response. *J Insects Food Feed* 8, 1281-1295. <https://doi.org/10.3920/JIFF2021.0082>.
- Folch J, Lees 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. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)64849-5).
- Garlid KD, Orosz DE, Modrianský M, Vassanelli S and Jezek P. 1996. On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. *J Biol Chem* 271, 2615-2620. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.5.2615>.
- Glencross BD. 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Rev Aquac* 1, 71-124. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2009.01006.x>.
- Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T and Boman HG. 1980. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem* 106, 7-16. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb05991.x>.
- Hur SW, Lee JH, Lee SH, Jeong SM and Kim KW. 2022. Effects of worm-based extruded pellets on growth performance of olive flounder *Paralichthys olivaceus* in commercial aquafarms. *Korean J Fish Aquat Sci* 55, 533-540. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2022.0533>.
- Jang MS, Kang YJ, Kim KW, Kim KD, MoonLee HY and Heo SB. 2009. Quality characteristics of cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed with extruded pellets; I. Comparison of fatty acid and amino acid contents. *Korean J Food Sci Technol* 41, 42-49.
- Jang JW, Kim YC, Kim KD, Kim KW, Lim SG and Bai SC. 2019. The optimum dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid levels for growth of juvenile flounder, *Paralichthys olivaceus*. *KSFME* 30, 35-42. <https://doi.org/10.13000/JFMSE.2019.2.31.1.35>.
- Kim MG, Shin JH, Lee CR, Lee BJ, Hur SW, Lim SG and Lee KJ. 2019. Evaluation of mixture of plant protein source as a partial fish meal replacement in diets for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Korean J Fish Aquat Sci* 52, 374-381. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0374>.
- Kim MG, Lim HW, Lee BJ, Hur SW, Lee SH, Kim KW and Lee KJ. 2020. Replacing fish meal with a mixture of plant and animal protein sources in the diets of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Korean J Fish Aquat Sci* 53, 577-582. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0577>.
- Kim J, Baek SI, Cho SH and Kim TH. 2022. Evaluating the efficacy of partially substituting fish meal with unfermented tuna by-product meal in diets on the growth, feed utilization, chemical composition and non-specific immune responses of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquac Rep* 24, 101150. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101150>.
- Kim J, Cho SH, Kim TH and Hur SW. 2021. Substitution effect of fish meal with various sources of animal by-product meals in feed on growth, feed utilization, body composition, haematology and non-specific immune response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*, Temminck & Schlegel, 1846). *Aquac Res* 52, 2802-2817. <https://doi.org/10.1111/are.15132>.
- KOSIS (Korean Statistical Information Service). 2021. Expenditure Per Aquaculture. Retrieved from https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=101&tblId=DT_1EW0001&vw_

- cd=MT_ZTITLE&list_id=K2_7&scrId=&seqNo=&lang_mode=ko&obj_var_id=&itm_id=&conn_path=MT_ZTITLE&path=%252FstatisticsList%252FstatisticsListIndex.do on Mar 24, 2023.
- Li X, Rezaei R, Li P and Wu G. 2011. Composition of amino acids in feed ingredients for animal diets. *Amino Acids* 40, 1159-1168. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0740-y>.
- Makkar HPS, Tran G, Heuzé V and Abjers P. 2014. State-of-the-art on use of insects as animal feed. *Anim Feed Sci Technol* 197, 1-33. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.07.008>.
- Melenchón F, Larrán AM, De Mercado E, Hidalgo MC, Cardenete G, Barroso FG and Tomás-Almenar C. 2021. Potential use of black soldier fly (*Hermetia illucens*) and mealworm (*Tenebrio molitor*) insectmeals in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac Nutr* 27, 491-505. <https://doi.org/10.1111/anu.13201>.
- Metcalfe 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>.
- Nogales-Mérida S, Gobbi P, Józefiak D, Mazurkiewicz J, Dudek K, Rawski M, Kierończyk B and Józefiak A. 2019. Insect meals in fish nutrition. *Rev Aquac* 11, 1080-1103. <https://doi.org/10.1111/raq.12281>.
- Palić D, Andreasen CB, Menzel BW and Roth JA. 2005. A rapid, direct assay to measure degranulation of primary granules in neutrophils from kidney of fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Fish Shellfish Immunol* 19, 217-227. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.12.003>.
- Quade MJ and Roth JA. 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Vet Immunol Immunopathol* 58, 239-248. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(97\)00048-2](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(97)00048-2).
- Rosen H. 1957. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Arch Biochem Biophys* 67, 10-15. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(57\)90241-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(57)90241-2).
- Sargent J, Bell G, McEvoy L, Tocher D and Estevez A. 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177, 191-199. [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(99\)00083-6](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(99)00083-6).
- Saurabh S and Sahoo PK. 2008. Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune system. *Aquac Res* 39, 223-239. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x>.
- Sharifuzzaman and Austin B. 2009. Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol* 27, 440-445. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.06.010>.
- Shin JH, Shin JB, Eom GH and Lee KJ. 2021. Effects of dietary mealworm *Tenebrio molitor* larvae and black soldier fly *Hermetia illucens* larvae on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Innate immune responses, anti-oxidant enzyme activity, disease resistance against *Vibrio parahaemolyticus* and growth. *Korean J Fish Aquat Sci* 54, 624-633. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0624>.
- Stubbs RJ and Harbron CG. 1996. Covert manipulation of the ratio of medium-to long-chain triglycerides in isoenergetically dense diets: Effect on food intake in ad libitum feeding men. *Int J Obes* 20, 435-444.
- Siwicki AK, Anderson DP and Rumsey GL. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet Immunol Immunopathol* 41, 125-139. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(94\)90062-0](https://doi.org/10.1016/0165-2427(94)90062-0).
- Sprangers T, Ottoboni M, Klootwijk C, Ovyn A, Deboosere S, De Meulenaer B, Michiels J, Eeckhout M, De Clercq P and De Smet S. 2017. Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. *J Sci Food Agric* 97, 2594-2600. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8081>.
- Tippayadara N, Dawood MAO, Krutmuang P, Hoseinifar SH, Doan HV and Paolucci M. 2021. Replacement of fish meal by black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal: Effects on growth, haematology, and skin mucus immunity of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Animals* 11, 193. <https://doi.org/10.3390/ani11010193>.
- Ullah S, Zhang J, Xu B, Tegomo AF, Sagada G, Zheng L, Wang L and Shao Q. 2022. Effect of dietary supplementation of lauric acid on growth performance, antioxidative capacity, intestinal development and gut microbiota on black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*). *PLoS ONE* 17, e0262427. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262427>.
- Uribe C, Folch H, Enriquez R and Moran G. 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: A review. *Vet Med* 56, 486-503. <https://doi.org/10.17221/3294-vetmed>.
- Wu Q, Patočka J and Kuča K. 2018. Insect antimicrobial peptides, a mini review. *Toxins* 10, 461. <https://doi.org/10.3390/toxins10110461>.
- Xia J, Ge C and Yao H. 2021. Antimicrobial peptides from black soldier fly (*Hermetia illucens*) as potential antimicrobial factors representing an alternative to antibiotics in livestock farming. *Animals* 11, 1937. <https://doi.org/10.3390/ani11071937>.
- Xiao X, Jin P, Zheng L, Cai M, Yu Z, Yu J and Zhang J. 2018. Effects of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal protein as a fishmeal replacement on the growth and immune index of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquac Res* 49, 1569-1577. <https://doi.org/10.1111/are.13611>.