KFAS 한국수산과학회지 Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences
한수지 56(4), 532-540, 2023

Original Article
Korean J Fish Aquat Sci 56(4),532-540,2023

저수온기 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 사료 내 가수분해 혈분(Hydrolyzed Blood Meal)의 이용성 평가

임종호 · 고대현 · 조화정[1] · 이경준[2]*

제주대학교 해양생명과학과, [1]㈜아미노랩, [2]제주대학교 해양과학연구소

Evaluation of Dietary Supplementation with Hydrolyzed Blood Meal for Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*, in Low Water Temperature Conditions

Jongho Lim, Daehyun Ko, Whajung Cho and Kyeong-Jun Lee[2]*

Department of Marine Life Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Republic of Korea
[1]AminoLab Co., Ltd., Sejong 30007, Republic of Korea
[2]Marine Science Institute, Jeju National University, Jeju 63333, Republic of Korea

This study aimed to evaluate the effects of dietary supplementation with two different types of hydrolyzed blood meal (HBM) on the growth performance, feed utilization, digestibility and innate immunity of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. A control diet (Con) consisting of 60% fish meal was formulated and four diets containing two different types of HBM at varying concentrations were prepared 2.5 and 5.0% liquid HBM (L2.5 and L5.0) and 0.5 and 1.0% powdered HBM (P0.5 and P1.0). A total of 450 olive flounder (average body weight: 50±0.07 g) were distributed in 15 tanks (240 L), with three replicate groups per diet. The fish were fed the diets to apparent satiation for 9 weeks and subsequently exposed to *Edwardsiella tarda*. The results showed that fish fed L2.5, L5.0 and P0.5 diets exhibited significantly higher lysozyme activity compared to those fed the Con and P1.0 diets. During the challenge test against *E. tarda*, the L5.0 and P0.5 fish groups exhibited higher disease resistance than that of the Con group. These findings indicate that dietary supplementation with HBM could positively effect the innate immunity and disease resistance of olive flounder.

Keywords: Olive flounder, Hydrolyzed blood meal, Innate immunity, Disease resistance

서 론

혈분(blood meal, BM)은 주로 돼지나 소의 피를 열처리 건조시켜 생산한 것으로 친환경적인 동물성 단백질원료로 알려져 있다(Twahirwa et al., 2021). 사료 내 BM의 첨가는 틸라피아(*Oreochromis niloticus*; Aladetohun and Sogbesan, 2013), gilthead sea bream *Sparus aurata* (Gisbert et al., 2015), African catfish *Clarias gariepinus* (Ogunji and Iheanacho, 2021)의 성장을 증진시키는 효과가 있다고 보고되었다. BM은 *Vibrio anguillarum*과 *Pseudomonas anguilliseptica*에 대한 gilthead sea bream의 질병저항성을 향상시키는 것으로 보고되었다(Gisbert et al., 2021). 그러나, 사료에 BM을 다량 사용할 경우 단백질 소화율의 저하와 아미노산의 불균형으로 인해 어류의 성장, 비특이적 면역력, 항산화 및 소화효소 활성의 감소와 같은 부작용이 발생할 수 있다(Twahirwa et al., 2021). 최근 들어, 이러한 부작용을 줄이기 위한 방안으로 BM을 발효하거나 가수분해 시켜 이용효율을 높이는 방법이 주목받고 있다. BM 가수분해물(hydrolyzed blood meal, HBM)은 BM을 가수분해한 형태를 말하며, 어류 사료에 첨가할 경우 사료효율과 면역력을 향상시켜주는 것으로 알려져 있다(Gisbert et al., 2021). 일반적으로 가수분해물은 체내 이용률이 높은 저분자 펩타이드를 다량 함유하고 있으며, 어류의 항균, 항산화, 비특이적 면역력을 향상

***Corresponding author:** Tel: +82. 64. 754. 3423 Fax: +82. 64. 756. 3493
E-mail address: kjlee@jejunu.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.2023.0532
Korean J Fish Aquat Sci 56(4), 532-540, August 2023
Received 11 May 2023; **Revised** 15 June 2023; **Accepted** 29 June 2023
저자 직위: 임종호(대학원생), 고대현(대학원생), 조화정(연구소장), 이경준(교수)

시키는 생리활성펩타이드(bioactive peptide)를 함유하고 있다(Kim and Wijesekara, 2010). 어류단백질 가수분해물(Siddik et al., 2021), 크릴 가수분해물과 참치 가수분해물(Khosravi et al., 2015), 틸라피아 가수분해물(Gunathilaka et al., 2020) 등의 가수분해한 단백질원료는 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 소화율을 증진시켜 성장, 비특이적 면역력, 질병저항성을 향상시키는 것으로 보고되었다. 그러나, 넙치 사료 내 HBM의 첨가에 따른 이용성 평가는 미흡한 실정이다.

넙치는 우리나라의 대표적인 양식어종으로, 2021년 국내 양식생산량은 41,777톤으로 전체 어류양식생산량의 약 46%를 차지한다(KOSIS, 2023). 국내 넙치 양어장에서는 병원균에 의한 질병을 통제하기 위해 항생제를 자주 사용하며 이러한 항생제의 광범위한 사용은 내성균의 발생, 어체 내 항생제의 잔류 및 환경오염과 같은 많은 문제를 초래한다(Kim et al., 2022). 양식산업에서 항생제의 사용을 줄일 수 있는 방안으로 배합사료 내 기능성 첨가제에 관한 연구가 최근 수행되고 있다(Gunathilaka et al., 2020; Siddik et al., 2021). 양식산업에서 주요 세균성 질병인 Edwardsiellosis는 *Edwardsiella tarda*가 원인균이다. *E. tarda*는 수온이 15℃ 이상이면 감염이 일어날 수 있고, 25–30℃ 사이에서 높은 발병을 일으킨다(Jin et al., 2022). 또한 체색흑화, 출혈, 복부팽만, 탈장, 간, 장 복부 궤양 등의 증상을 나타내며 잉어(*Cyprinus carpio*; Sae-Dui et al., 1984), 틸라피아(Clavijo et al., 2002)와 같은 담수어는 물론 해수어인 넙치(Kim et al., 2022)를 감염시켜 막대한 경제적 손실을 일으키고 있다(Li et al., 2020).

따라서, 본 연구는 넙치 사료 내 HBM의 첨가량과 첨가 형태(액상, 분말)에 따른 넙치의 성장, 비특이적 면역력, 항산화능력, 소화율 및 장 조직 변화에 미치는 영향 뿐만 아니라 *E. tarda*에 대한 질병저항성에 효과를 조사하고자 수행되었다.

재료 및 방법

실험사료

실험에 사용된 액상과 분말형태의 HBM은 ㈜아미노랩(Sejong, Korea)에서 제공받아 실험에 사용되었다. 액상 HBM은 조단백질이 85%, 조지질이 0.38%, 수분이 80%였으며, 분말 HBM은 조단백질이 92.0%, 조지질이 0.74%이었다. 대조사료(control)는 어분과 대두박을 기초로 조성되었고, 조단백질이 55.8%, 조질이 11.9%로 분석되었다(Table 1). 대조사료에 액상 HBM을 각각 2.5%, 5% 첨가한 실험구(L2.5, L5.0), 분말 HBM를 각각 0.5, 1.0% 첨가한 실험구(P0.5, P1.0)로 총 5개의 실험사료를 제작하였다. 분말형태의 HBM는 함량에 따라 각 사료원에 혼합되었고, 액상 HBM은 증류수와 혼합한 후 사료원과 혼합되었다. 사료원을 혼합한 후, 어유와 증류수(15%)를 첨가하여 펠렛성형기(SP-50; Kumkang ENG, Daegu, Korea)를 이용하여 5 mm 크기로 성형되었다. 실험사료는 건조(24℃, 8 h)시켜 사료 공급 전까지 냉동보관(-20℃)하여 사용하였다.

실험어와 사육관리

사육실험에 사용된 넙치는 제주특별자치도 소재의 양식장에서 구입하여 제주대학교 해양과학연구소로 이송되었다. 실험어는 실험환경 적응을 위해 2주간 순치되었다. 예비사육 후 넙치(50±0.07 g)는 총 15개(5개 실험구, 3반복)의 polypropylene 수조(240 L)에 각 수조 당 30마리씩 무작위로 선택하여 배치되었다. 사육수는 모래여과해수를 사용하여 3 L/min의 유수

Table 1. Dietary formulation and proximate composition of experimental diets for olive flounder *Paralichthys olivaceus* (%, dry matter)

Ingredients (%)	Experimental diets				
	Con	L2.5	L5.0	P0.5	P1.0
Fish meal, sardine[1]	60.0	60.0	60.0	60.0	60.0
Tankage meal	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Soybean meal	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
HBM (powder)[2]	0.00	0.00	0.00	0.50	1.00
HBM (liquid)[2]	0.00	2.50	5.00	0.00	0.00
Wheat flour	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Starch	7.00	4.50	2.00	6.50	6.00
Fish oil[3]	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
MCP	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Lecithin[4]	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Choline chloride	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Taurine	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Mineral premix[5]	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin premix[6]	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Proximate composition (%)					
Moisture	7.97	6.75	7.82	8.48	8.01
Crude protein	55.8	56.5	57.1	56.2	56.1
Crude lipid	11.9	12.5	13.1	11.8	12.2
Ash	12.5	12.6	13.0	12.3	12.5

[1]Orizon S.A, CO., Ltd., Chile. [2]HBM, Porcine blood meal hydrolysate; Aminolab Co., Ltd., Seoul, Korea. [3]E-wha oil Co., Ltd., Busan, Korea. [4]Lysoforte™ Dry, Kemin Korea Co. Ltd., Seongnam, Korea. [5]Mineral mixture contained the following ingredients (g/kg, mixture): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 80.0; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 370.0; KCl, 130.0; Ferric citrate, 40.0; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 20.0; Ca- lactate, 356.5; CuCl, 0.2; $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.15; $Na_2Se_2O_3$, 0.01; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2.0; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 1.0. [6]Vitamin mixture contained the following amount which were diluted in cellulose (g/ kg, mixture): L-ascorbic acid, 121.2; DL-α tocopheryl acetate, 18.8; thiamin hy- drochloride, 2.7; riboflavin, 9.1; pyridoxine hydrochloride, 1.8; nia- cin, 36.4; Ca-D-pantothenate, 12.7; myo-inositol, 181.8; D-biotin, 0.27; folic acid, 0.68; p-aminobezoic acid, 18.2; menadione, 1.8; retinyl acetate, 0.73; cholecalficerol, 0.003; cyanocobalamin, 0.003.

량이 되도록 조절하였고, 모든 실험수조의 충분한 용존산소 유지를 위해 공기발생기(aeration)가 설치되었다. 사육기간 동안 수온은 11.2–18.4℃로 자연수온에 의존하였다. 광주기는 형광등을 이용하여 12L:12D로 유지되었다. 실험사료는 1일 2회(08:00, 17:30 h)에 걸쳐 만복공급되었고, 사육실험은 제주대학교 동물실험윤리위원회의 윤리규정(2022-0009)를 준수하며 총 9주간 진행되었다.

Sampling과 분석

사육실험 종료 시 실험어의 증체율(weight, WG), 일간성장률(specific growth rate, SGR)과 생존율(survival)을 측정하기 위해 무게 측정 16시간전부터 실험사료의 공급을 중단하였다 사료공급량을 조사하여 사료섭취량(feed intake, FI), 사료전환효율(feed conversion ratio; FCR)과 단백질이용효율(protein efficiency ratio, PER)을 계산하였다. 무게측정 후, 수조당 3마리의 실험어를 무작위로 선별하여 2-phenoxyethanol 용액(100 ppm)으로 마취시킨 후, 내장중량지수(viscerosomatic index, VSI), 간중량지수(hepatosomatic indexes, HSI), 위중량지수(stomachsomatic indexes, SSI), 장중량지수(intestinesomatic indexes, ISI)와 비만도(condition factor, CF)를 측정하기 위해 실험어를 해부하여 간, 위, 장과 내장의 무게를 측정하였다. 위와 장은 액체질소를 이용하여 급속 냉동한 다음 냉동보관(-80℃) 하였다. 전장(foregut) 조직은 70% formalin으로 24시간 동안 고정되었으며, 이후 분석 시까지 70% ethyl alcohol에 보관되었다. 전어체는 일반성분 분석을 위해 수조당 3마리의 실험어를 무작위로 선별하여 냉동보관 하였다(-20℃). 혈액은 마취된 실험어의 미부동맥에서 채혈하였다. 전혈은 헤파린을 처리하여 hematocrit, hemoglobin, nitro-blue tetrazolium (NBT)을 측정하는데 사용되었다. 남은 혈액은 원심분리(5,000 *g*, 10 min, 4℃)후 혈장(plasma)을 이용하여 aspertate aminotransferase (AST), alanine aminotransferse (ALT)와 total protein 분석에 사용되었다. 나머지 혈액은 상온에서 30분동안 응고시켜 원심분리(5000 *g*, 15 min, 4℃)후 혈청(serum)을 이용하여 비특이적 면역력과 항산화 활성 분석에 사용되었다.

Hematocrit은 혈액진단원심분리기(Micro Hematocrit VS-12000; Vision Scientific, Daejeon, Korea) (12,000 rpm, 10 min)를 이용하여 측정하였고, hemoglobin, AST, ALT, total protein은 혈액생화학분석기(CH 100^{plus}; RADIM company, Firenze, Italy)를 이용하여 분석되었다. NBT 활성은 Kumari and Sahoo (2006)의 방법을, immunoglobulin (Ig) 수치는 Siwicki and Anderson (1993)의 방법을, anti-protease 활성은 Ellis (1990)의 방법을, lysozyme 활성은 Mohammed et al. (2018)의 방법으로 분석하였다. Superoxide dismutase (SOD) 활성은 SOD assay kit (DoGenBio, Seoul, Korea)를, glutathione peroxidase (GPx) 활성은 GPx kit (Biovision, Milpitas, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

실험사료, 전어체 및 분(feces)의 일반성분은 AOAC (2005) 방법으로 분석되었다. 수분은 상압가열건조법(125℃, 3 h), 회분은 직접회화법(550℃, 4 h), 조단백질은 자동조단백질분석기(Kejltec system 2300; FOSS Analytical, Hillerød, Denmark)로 분석되었고, 조지방은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 분석되었다.

조직은 단계별 알코올(70–100%)에서 탈수과정과 xylene에서 투명화 과정을 거쳐 paraffin으로 포매한 후 microtome을 이용하여 7 μm 두께의 조직 절편을 제작하였다. 조직절편은 hematoxylin & eosin (H&E) 염색 및 봉입 후 광학현미경(DM750; Leica, Bensheim, Germany)으로 관찰되었다.

위는 pepsin 활성을, 장은 amylase, trypsin, lipase와 chymotrypsin 활성 분석에 사용되었다. 적출된 장기는 증류수와 혼합 후, 조직균질기(tissure grinder)를 이용하여 분쇄되었다. 분쇄된 장기는 원심분리(10,000 *g*, 15 min) 후 상층액을 분리하여 분석에 사용되었다. 단백질 총량(total protein)은 Bradford. (1976)의 방법을 기초로 분석되었으며, pepsin과 amylase 활성은 Worthington (1991)의 방법을, trypsin과 chymotrypsin 활성은 Erlanger et al. (1961)의 방법을, lipase 활성은 Borlongan (1990)의 방법으로 분석되었다.

소화율 평가

평균무게 117 g 내외의 넙치를 이용하여 외관상 소화율을 조사하였다. 소화율사료는 실험사료에 chromium oxide (Cr_2O_3; DaeJung Chemicals&Metals Co. Ltd., Siheung, Korea)를 1% 첨가하여 제조하였다. 실험어의 분은 소화율 전용 분수집수조(Guelph system)를 이용하여 수집되었다. 넙치는 수조 당 20마리씩 배치되었고, 실험사료는 분수집 8시간 전에 만복 공급되었다. 사료공급 30분 후, 환수를 통해 수조에 남아있는 사료찌꺼기와 이물질을 제거하였다. 수집된 분은 동결 건조 후 분석에 사용하였다. 실험사료와 분의 산화크롬의 함량은 Divakaran et al. (2002)의 방법으로 분석되었다. 실험사료에 대한 소화율은 아래의 식에 따라 계산되었다.

Apparent digestibility coefficient of protein (%)
=100-100 × (% of Cr2O3 in diet/% of Cr2O3 in feces) × (% of protein in feces/% of protein in diet)

Apparent digestibility coefficient of lipid (%)
=100-100 × (% of Cr2O3 in diet/% of Cr2O3 in feces) × (% of lipid in feces/% of lipid in diet)

Apparent digestibility coefficient of dry matter (%)
= 100-100 × (% of Cr_2O_3 in diet / % of Cr_2O_3 in feces)

인위감염 실험

사육실험 종료 후, 120 L 수조에 각 15마리(사료구 당 45미)

의 실험어를 배치하였다(3반복). *E. tarda*는 Tryptic Soy Broth (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany)를 사용하여 28°C에서 24시간동안 배양되었다. *E. tarda* 현탁액(1×10^6 CFU/mL)은 넙치의 복강 내에 100 μL씩 주입되었다. 공격실험 6일차까지 폐사가 관찰되지 않아 *E. tarda* 접종농도를 높힌 현탁액(8.4×10^8 CFU/mL) 100 μL를 재 주사하였다. 인위감염 실험 기간 내 수온은 20°C로 유지되었으며, 총 16일간 진행되었다.

통계학적 분석

실험사료의 배치는 완전확률계획법(completely randomized design)으로 실시하였다. 모든 분석결과들은 SPSS (version 24.0; International Business Machines Co., New York, NY, USA) 프로그램을 이용하여 one-way ANOVA로 통계 분석하였다. Tukey's HSD로 데이터 평균 간의 유의성($P<0.05$)을 비교하였다. 데이터는 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었으며, 모든 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석하였다.

결 과

넙치의 최종평균무게와 WG는 L5.0구가 P0.5구에 비해 유의적으로 높았다(Table 2). FI는 대조구와 실험구 사이에 유의적인 차이는 없었다. FCR, PER, SGR과 생존율은 모든 실험구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다. CF, VSI, HSI, SSI와 ISI는 모든 실험구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 3). 전어체의 조단백질, 조지질과 회분 함량은 실험구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 4). 혈액 내 hematocrit, hamoglobin, AST, ALT, total protein의 농도는 모든 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다(Table 5). Lysozyme 활성은 L2.5구와 P0.5구가 대조구와 P1.0구에 비해 유의적으로 높았다(Table 6). Anti-protease 활성은 L2.5구가 P1.0구에 비해 유의적으로 높았다. SOD 활성은 L2.5구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. NBT, Ig, GPx 활성은 모든 실험구간에 유의적인 차이가 없었다. Pepsin, trypsin, chymotrypsin, amylase, lipase의 활성은 모든 실험구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 7). 건물, 단백질, 지질소화율은 실험구 사이에 유의적

Table 2. Growth performance, feed utilization and survival of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* (initial body weight, 50.0±0.07 g; average BW, 50.0±0.07 g) fed the experimental diets for 9 weeks

Treatment	FBW[1]	WG[2]	FI[3]	FCR[4]	PER[5]	SGR[6]	Survival[7]
Con	118±0.30^{ab}	135±1.03^{ab}	44.1±1.58^{ab}	0.65±0.02^{ab}	2.76±0.09	2.04±0.01	100±0.0
L2.5	119±4.82^{ab}	140±9.65^{ab}	48.1±2.56^{a}	0.70±0.02^{ab}	2.50±0.05	2.06±0.09	100±0.0
L5.0	127±3.93^{a}	153±7.50^{a}	48.8±0.85^{a}	0.64±0.03^{b}	2.73±0.12	2.22±0.07	100±0.0
P0.5	111±1.01^{b}	125±2.18^{b}	47.0±1.37^{ab}	0.77±0.01^{a}	2.30±0.04	1.89±0.22	100±0.0
P1.0	112±11.6^{ab}	124±22.9^{ab}	42.6±2.58^{b}	0.70±0.10^{ab}	2.60±0.36	1.92±0.25	100±0.0

[1]Final body weight (g). [2]Weight gain (%)=[(final body weight - initial body weight)/ initial body weight]×100. [3]Feed intake (g/fish)=dry feed consumed (g)/fish. [4]Feed conversion ratio=dry feed fed/wet weight gain. [5]Protein efficiency ratio=fish weight gain (g)/total protein given (g). [6]Specific growth ratio (%)=[($\log_e$ final body weight - $\log_e$ initial body weight)/days]×100. Values are mean of triplicate groups and presented as mean±SD. Values with different superscripts in the same row are significantly different ($P<0.05$). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments. The test diets were prepared to contain 2.5 and 5.0% liquid hydrolyzed blood meal (HBM) (L2.5 and L5.0) and 0.5 and 1.0% powder HBM (P0.5 and P1.0) in the control (Con) diet.

Table 3. Morphological assessment of digestive organs and condition factor of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 9 weeks

Treatments	CF[1]	VSI[2]	HSI[3]	SSI[4]	ISI[5]
Con	1.09±0.07	5.38±0.81	2.44±0.64	0.78±0.15	2.07±0.30
L2.5	1.12±0.08	5.47±0.56	2.55±0.38	0.74±0.10	2.18±0.35
L5.0	1.12±0.06	5.40±0.54	2.54±0.30	0.78±0.10	2.07±0.35
P0.5	1.15±0.06	5.87±0.57	2.62±0.35	0.81±0.10	2.44±0.42
P1.0	1.03±0.29	5.36±0.66	2.91±0.83	0.92±0.66	2.48±0.32

[1]Condition factor=(fish body weight/fish body length^3)×100. [2]Viscerasomatic index=(viscera weight×100)/fish body weight (g). [3]Hepatosomatic index=(liver weight×100)/fish body weight (g). [4]Stomachsomatic index=(stomach weight×100)/fish body weight (g). [5]Intestinesomatic index=(intestine weight×100)/fish body weight (g). Values are mean of triplicate groups and presented as mean±SD. The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments. The test diets were prepared to contain 2.5 and 5.0% liquid hydrolyzed blood meal (HBM) (L2.5 and L5.0) and 0.5 and 1.0% powder HBM (P0.5 and P1.0) in the control (Con) diet.

인 차이를 보이지 않았다(Table 8). 장 내 융모의 길이와 배상세포의 분포는 모든 실험구에서 유의적인 차이가 발견되지 않았다(Table 9, Fig. 1). *E. tarda*에 대한 넙치의 생존율은 L5.0구(42.2%)와 P0.5구(51.1%)가 대조구(4.44%)에 비해 유의적으로 높았다(Fig. 2).

Table 4. Whole body proximate composition of olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 9 weeks (% of wet basis)

Treatments	Crude protein	Crude lipid	Ash
Con	18.4±0.29	4.43±0.18	3.40±0.11
L2.5	18.7±0.87	4.71±0.23	2.95±0.10
L5.0	18.9±0.39	4.78±0.20	3.22±0.32
P0.5	17.9±0.24	4.44±0.24	2.84±0.22
P1.0	18.1±0.91	4.70±0.48	3.01±0.33

Values are mean of triplicate groups and presented as mean±SD. The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments. The test diets were prepared to contain 2.5 and 5.0% liquid hydrolyzed blood meal (HBM) (L2.5 and L5.0) and 0.5 and 1.0% powder HBM (P0.5 and P1.0) in the control (Con) diet.

고 찰

본 연구에서 사료 내 HBM의 첨가는 넙치의 혈중 lysozyme, anti-protease, SOD의 활성을 향상시키는 것으로 나타났다. 효소를 이용해 단백질을 가수분해하면 생체 내에서 생리활성펩타이드가 생성된다(Kim and Wijesekara, 2010). 크릴 가수분해물과 참치 가수분해물(Khosravi et al., 2015), 틸라피아 가수분해물(Gunathilaka et al., 2020)은 넙치의 비특이적 면역력, 항산화효소 활성을 향상시키는 것으로 보고되었다. 본 연구에서도 HBM의 첨가는 넙치의 비특이적 면역력과 항산화능력을 향상시켰다.

어류 사료에 BM을 적정량으로 사용하면 성장과 사료 섭취율을 높혀주지만, 다량으로 사용하게 되면 부정적인 영향을 미칠 수 있다(Edeh and Gbagi, 2013). 어린 African catfish 사료에 BM을 적정량으로 첨가(7–17%)했을 때는 성장과 단백질이용효율의 저하를 유발하지 않았지만, 과잉 첨가(25–30%)했을 때는 성장이 감소하는 것으로 보고되었다(Ogunji and Iheanacho, 2021). 치어기 gilthead sea bream (1.3–33.8 g)의 연구에서도 HBM을 사료에 적정량 첨가(3–6%)할 경우 성장을 증진시켜주는 것으로 보고되었다(Gisbert et al., 2015). Silver pompano

Table 5. Hematological parameters of olive flounder *Paralichthys olivaceus* (average BW, 50.0±0.07 g) fed the experimental diets for 9 weeks

Treatments	Hematocrit (%)	Hemoglobin (g/dL)	AST[1]	ALT[2]	Total protein[3]
Con	24.8±1.02	4.54±0.20	44.5±5.41	10.9±0.68	3.54±0.08
L2.5	27.0±4.68	4.92±0.21	44.2±1.43	9.57±0.90	3.73±0.12
L5.0	25.7±1.22	4.98±0.30	53.9±1.55	9.29±2.20	3.88±0.44
P0.5	26.1±1.23	4.91±0.14	51.5±2.98	10.1±1.92	4.01±0.70
P1.0	25.8±1.81	4.80±0.30	52.4±6.11	9.79±1.99	3.70±0.59

[1]Aspartate aminotransferase (U/L). [2]Alanine aminotransferase (U/L). [3]Total protein (g/dL). Values are mean of triplicate groups and presented as mean±SD. The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments. The test diets were prepared to contain 2.5 and 5.0% liquid hydrolyzed blood meal (HBM) (L2.5 and L5.0) and 0.5 and 1.0% powder HBM (P0.5 and P1.0) in the control (Con) diet.

Table 6. Non-specific immune responses and anti-oxidant enzyme activity of olive flounder *Paralichthys olivaceus* (average BW: 50.0±0.07 g) fed the experimental diets for 9 weeks

Treatments	NBT[1]	Lysozyme[2]	IG[3]	Anti-protease[4]	SOD[5]	GPx[6]
Con	0.71±0.03	29.3±2.96^{b}	26.6±0.60	33.9±1.59^{ab}	53.5±3.46^{b}	118±2.49
L2.5	0.74±0.02	34.6±0.62^{a}	27.1±1.51	42.8±2.22^{a}	70.6±6.11^{a}	132±7.39
L5.0	0.75±0.03	30.8±2.30^{ab}	27.8±0.84	36.4±5.78^{ab}	63.1±4.58^{ab}	134±15.6
P0.5	0.76±0.02	34.8±1.40^{a}	26.8±1.45	39.6±3.08^{ab}	64.1±5.89^{ab}	135±6.93
P1.0	0.74±0.01	27.1±1.30^{b}	27.0±1.50	33.1±1.97^{b}	63.2±1.33^{ab}	134±12.7

[1]Nitro-blue tetrazolium activity (absorbance). [2]Lysozyme activity (μg/mL). [3]Immunoglobulin level (mg/mL). [4]Anti-protease activity (% inhibition). [5]Superoxide dismutase activity (% inhibition). [6]Glutathione peroxidase activity (mU/mL). Values are mean of triplicate groups and presented as mean±SD. Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P<0.05$). The test diets were prepared to contain 2.5 and 5.0% liquid hydrolyzed blood meal (HBM) (L2.5 and L5.0) and 0.5 and 1.0% powder HBM (P0.5 and P1.0) in the control (Con) diet.

Table 7. Digestive enzyme activities of olive flounder *Paralichthys olivaceus* (average BW, 50.0±0.07 g) fed the experimental diets for 9 weeks

Treatments	Pepsin (stomach)[1]	Trypsin[2]	Chymotrypsin[3]	Amylase[4]	Lipase[5]
Con	1.36±0.40	0.060±0.01	0.00047±0.0001	24.2±0.97	11.2±0.95
L2.5	1.13±0.42	0.049±0.00	0.00052±0.0003	22.3±4.90	11.0±0.46
L5.0	1.47±0.32	0.059±0.01	0.00042±0.0001	23.7±4.42	11.6±0.84
P0.5	1.78±0.15	0.065±0.01	0.00046±0.0001	24.0±2.71	11.7±0.23
P1.0	1.11±0.17	0.062±0.01	0.00033±0.0002	23.5±4.80	10.8±1.35

[1]Pepsin activity (U/mg protein). [2]Trypsin activity (BAPNA units/mg protein). [3]Chymotrypsin (SAPNA units/mg protein). [4]Amylase activity (U/mg enzyme). [5]Lipase (units/mg protein). Values are mean of triplicate groups and presented as mean±SD. 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. The test diets were prepared to contain 2.5 and 5.0% liquid hydrolyzed blood meal (HBM) (L2.5 and L5.0) and 0.5 and 1.0% powder HBM (P0.5 and P1.0) in the control (Con) diet.

Table 8. Apparent digestibility coefficients (ADC) of protein, lipid, dry matter in the experimental diets for olive flounder *Paralichthys olivaceus* (average BW, 50.0±0.07 g) fed the experimental diets for 9 weeks (% of ADC)

Treatments	ADCp[1]	ADCl[2]	ADCd[3]
Con	90.6±0.64	83.8±0.85	62.1±5.04
L2.5	90.5±0.96	83.7±1.99	64.6±4.47
L5.0	90.6±1.19	84.5±1.80	65.8±4.94
P0.5	90.4±1.48	83.2±2.28	63.7±5.10
P1.0	89.0±1.05	83.5±1.19	63.7±0.66

[1]Apparent digestibility coefficient of protein (%)=100-100×(% of Cr2 O3 in diet/% of Cr2 O3 in feces)×(% of protein in feces/% of protein in diet). [2]Apparent digestibility coefficient of lipid (%)=100-100×(% of Cr2 O3 in diet/% of Cr2 O3 in feces)×(% of lipid in feces/% of lipid in diet). [3]Apparent digestibility coefficient of dry matter (%)=100-100×(% of Cr2 O3 in diet/% of Cr2 O3 in feces). Values are mean of triplicate groups and presented as mean±SD. The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments. The test diets were prepared to contain 2.5 and 5.0% liquid hydrolyzed blood meal (HBM) (L2.5 and L5.0) and 0.5 and 1.0% powder HBM (P0.5 and P1.0) in the control (Con) diet.

Table 9. Histological villus length and goblet cell counting of olive flounder *Paralichthys olivaceus* (average BW, 50.0±0.07 g) fed the experimental diets for 9 weeks

Treatments	Villus length (μm)	Goblet cell
Con	915±37.7	73±2.65
L2.5	974±154	78±9.29
L5.0	980±11.4	76±8.33
P0.5	993±36.6	80±4.51
P1.0	1011±45.4	78±3.61

Values are mean of triplicate groups and presented as mean±SD. The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments. The test diets were prepared to contain 2.5 and 5.0% liquid hydrolyzed blood meal (HBM) (L2.5 and L5.0) and 0.5 and 1.0% powder HBM (P0.5 and P1.0) in the control (Con) diet.

Trachinotus blochii (10.9–88.1 g)의 경우에서는 사료 내 어분을 BM으로 35%까지 대체가 가능하다고 보고되었다(Hamed et al., 2017). 본 연구에서도 HBM의 첨가(0.5–5%, 9주)는 넙치(50–127 g)의 성장과 건강도(hematocrit, hemoglobin, AST, ALT, total protein)에 부정적인 영향을 미치지 않았다. 넙치는 온수성 어류로 저수온기에는 체내 소화효소와 물질대사의 활성이 저하되어 어류의 성장과 사료 섭취량이 감소한다(Iwata et al., 1994). 본 연구에서는 넙치의 적수온(21–24°C)보다 낮은 수온(11.2–18.4°C)에서 사육실험이 진행되었다. 따라서, 넙치 사료 내 HBM의 이용효율을 높이기 위해서는 적수온기의 넙치사료에 첨가하는 것이 보다 효율적일 것으로 예측된다. 하지만, 보다 정확한 HBM의 적정 첨가 함량을 알기 위해서는 적수온기의 넙치를 대상으로 한 보충 연구가 요구된다.

소화율과 소화효소 활성은 어류의 건강도, 성장, 대사능력을 분석하는 지표로 사용되고 있다(Hidalgo et al., 1999). Usman et al. (2007)은 tiger grouper 사료 내 어분을 HBM으로 30%까지 대체하여도 사료 소화율에서 차이가 없다고 보고하였다. Ogunji et al. (2020)은 사료에 당나귀 BM이나 소의 BM을 첨가(7%)했을 때 African catfish의 장 내 소화효소(amylase, lipase)의 활성이 증가했다고 보고하였다. 본 연구에서는 액상 HBM을 5%, 분말 HBM은 1%까지 사료에 첨가하여도 소화율과 소화효소 활성에서 차이가 나타나지 않았다. 배상세포(goblet cell)는 점액의 합성과 분비를 통해 소화 과정을 돕고 영양소의 흡수를 용이하게 할 뿐만 아니라 장 표피를 보호하는 역할을 한다(Cerezuela et al., 2013). Kasun et al. (2020)은 배상세포의 수와 융모의 길이가 소화율과 성장에 영향을 준다고 보고하였다. 본 연구에서 HBM은 넙치의 배상세포와 장 융모 길이에 영향을 미치지 않았으며 조직 내 염증반응도 관찰되지 않았다. 따

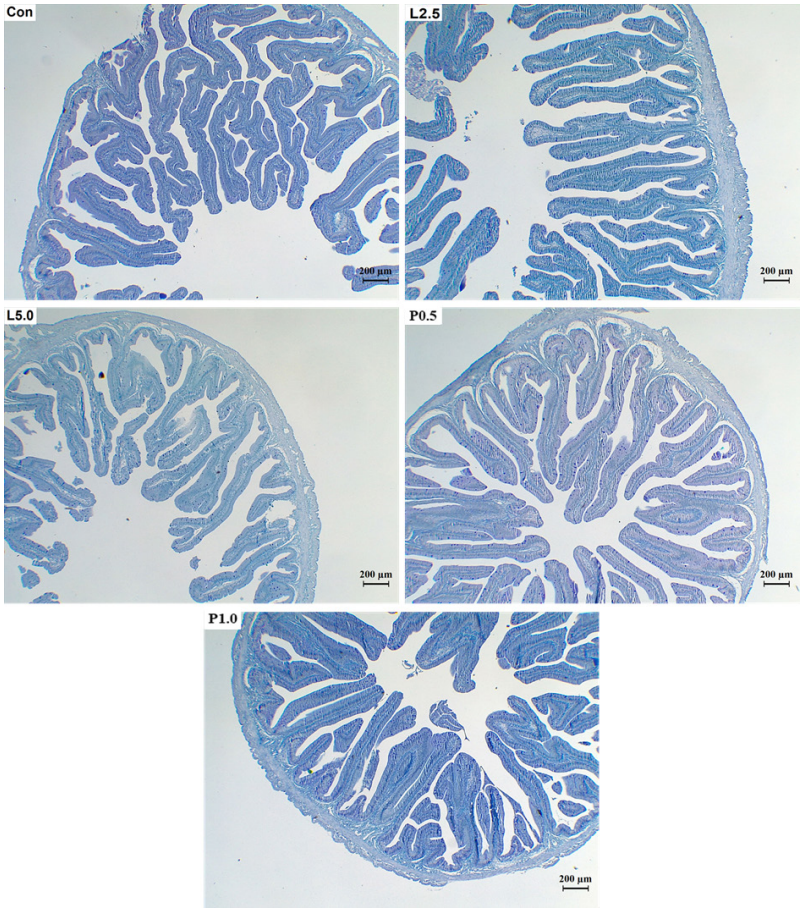

Fig. 1. Intestinal histology of olive flounder *Paralichthys olivaceus* (average BW, 50.0±0.07 g) fed the experimental diets for 9 weeks. Bar=200 μm. The test diets were prepared to contain 2.5 and 5.0% liquid hydrolyzed blood meal (HBM) (L2.5 and L5.0) and 0.5 and 1.0% powder HBM (P0.5 and P1.0) in the control (Con) diet.

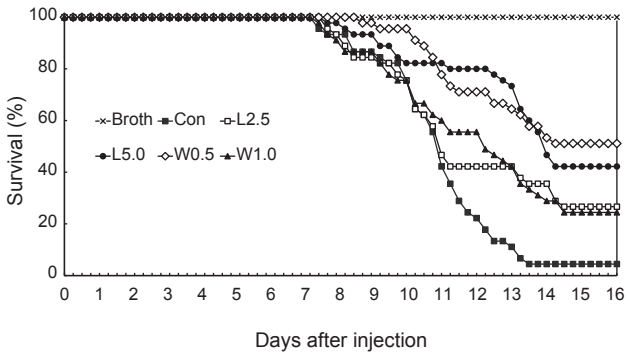

Fig. 2. Cumulative survival of olive flounder *Paralichthys olivaceus* (average BW, 50.0±0.07 g) during the challenge with *Edwardsiella tarda* after feeding the experimental diets for 9 weeks. The test diets were prepared to contain 2.5 and 5.0% liquid hydrolyzed blood meal (HBM) (L2.5 and L5.0) and 0.5 and 1.0% powder HBM (P0.5 and P1.0) in the control (Con) diet.

라서 사료 내 HBM의 첨가는 소화율과 성장, 장 염증반응에 어떠한 부정적인 영향을 미치지 않았을 것으로 판단된다.

넙치 사료 내 크릴 가수분해물, 참치 가수분해물, 틸라피아 가수분해물의 첨가는 *E. tarda*에 대한 질병저항성을 높여주며, 이는 단백질을 가수분해하며 생성되는 생리활성 펩타이드의 영향인 것으로 보고되었다(Khosravi et al., 2015; Gunathilaka et al., 2020). 단백질 가수분해물은 참돔(*Pagrus major*, Bui et al., 2014), 농어(*Lateolabrax japonicus*; Liang et al., 2006), 부세(*Pseudosciaena crocea* R.; Tang et al., 2008)의 질병저항성을 높혀주는 것으로 보고되었다. BM에 포함되어 있는 heme은 H0-1의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있으며, H0-1은 대식세포의 식균작용을 촉진시켜 병원성세균의 증식을 억제하는 것으로 보고되었다(Canesin et al., 2020). HBM에는 혈액 내 hemoglobin이 가수분해되면서 생성되는 antimicrobial peptide가 함유되어있다(Martínez-Alvarez et al., 2015). Antimicrobial peptide는 어류의 항균과 항산화 활성을 증진시킨다(Nedjar-Arroume et al., 2006). Gilthead sea bream 사료 내 HBM의 첨

가는 병원균(*V. anguillarum*, *P. anguilliseptica*)에 대한 저항성을 향상시키는 것으로 보고되었다(Gisbert et al., 2021). 본 연구에서도 HBM 첨가구에서 *E. tarda*에 대한 질병저항성이 향상되었다. 이는 HBM에 함유된 antimicrobial peptide와 생리활성펩타이드가 넙치의 비특이적 면역력, 항산화능력을 향상시켜 *E. tarda*에 대한 질병저항성을 높였을 것으로 판단된다.

결론적으로, 사료 내 액상 HBM은 5%, 분말 HBM은 1%로 첨가할 경우 넙치의 비특이적 면역력과 항산화능력을 향상시켜 *E. tarda*에 대한 질병저항성을 어느 정도 높일 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2021년도 정부(산업통상자원부)의 재원으로 한국산업기술진흥원의의 지원을 받아 수행된 연구임(P0018265, 2021년 범부처연계형기술사업화이어달리기).

References

Aladetohun NF and Sogbesan OA. 2013. Utilization of blood meal as a protein ingredient from animal waste product in the diet of *Oreochromis niloticus*. Int J Fish Aquac 5, 234-237. https://doi.org/10.5897/IJFA10.031.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2005. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, U.S.A. https://doi.org/10.1002/0471740039.vec0284.

Borlongan IG. 1990. Studies on the digestive lipase of milkfish *Chanos chanos*. Aquaculture 89, 315-325. 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.

Bui HTD, Khosravi S, Fournier V, Herault M and Lee KJ. 2014. Growth performance, feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red sea bream (*Pagrus major*) fed diets supplemented with protein hydrolysates. Aquaculture 418-419, 11-16. https://doi.org/.10.1016/j.aquaculture.2013.09.046.

Canesin G, Hejazi SM, Swanson KD and Wegiel B. 2020. Heme-derived metabolic signals dictate immune responses. Front Immunol 11, 66. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00066.

Cerezuela R, Fumanal M, Tapia-Paniagua ST, Meseguer J, Moriñigo MÁ and Esteban MÁ. 2013. Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens. Fish Shellfish Immunol 34, 1063-1070. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.015.

Clavijo AM, Conroy G, Conroy DA, Santander J and Aponte F. 2002. First report of *Edwardsiella tarda* from tilapias in Venezuela. Bull Eur Assoc Fish Pathol 22, 280-282.

Divakaran S, Obaldo, LG and Forster IP. 2002. Note on the methods for determination of chromic oxide in shrimp feeds. J Agric Food Chem 50, 464-467. https://doi.org/10.1021/jf011112s.

Edeh B and Gbagi A. 2013. Blood meal as protein ingredient from animal waste product in the diet of (*Oreochromis niloticus*). Adv Aquacult Fish Manage 2, 098-101.

Ellis AE. 1990. Serum antiprotease in fish. In: Techniques in Fish Immunology. Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson WB and Van Muiswinkel WB, eds. SOS Publication, Fair Haven, CT, U.S.A., 95-99.

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.

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.

Gisbert E, Ibarz A, Firmino JP, Fernandez-alacid L, Salomon R, Vallejos-Vidal E, Ruiz A, Polo J, Sanahuja I, Reyes-Lopez FE, Tort L and Andree KB. 2021. Porcine protein hydrolysates (PEPTEIVA) promote growth and enhance systemic immunity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Animals 11, 2122. https://doi.org/10.3390/ani11072122.

Gisbert E, Skalli A, Campbell J, Solovyev MM, Rodriguez C, Dias J and Polo J. 2015. Spray-dried plasma promotes growth, modulates the activity of antioxidant defenses, and engances the immune status of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fingerlings. J Anim Sci 98, 278-286. https://doi.org/10.2527/jas.2014-7491.

Gunathilaka BE, Khosravi S, Herault M, Fournier V, Lee C, Jeong JB and Lee KJ. 2020. Evaluation of shrimp or tilapia protein hydrolysate at graded dosages in low fish meal diet for olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquac Nutr 26, 1592-1603. https://doi.org/10.1111/anu.13105.

Hamed SS, Jiddawi NS and Bwathondi PO. 2017. Effects of blood meal as a substitute for fish meal in the culture of juvenile Silver Pompano *Trachinotus blochii* (Lacepède, 1801) in a circulating aquaculture system. West Indian Ocean J Mar Sci 16, 1-11.

Hidalgo MC, Urea E and Sanz A. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. Aquaculture 170, 267-283. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00413-X.

Iwata N, Kikuchi K, Honda H, Kiyono M and Kurokura H. 1994. Effects of temperature on the growth of Japanese flounder. Fish Sci 60, 527-531. https://doi.org/10.2331/fishsci.60.527.

Jin M, He J, Li J, Hu Y, Sun D and Gu H. 2022. *Edwardsiella piscicida* Ycca: A novel virulence factor essential to mem-

brane integrity, mobility, host infection, and host immune response. Fish Shellfish Immunol 126, 318-326. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.05.049.

Kasun T, Benitez-santana T, Gunathilaka BE, Kim MG, Lee CR, Shin JH and Lee KJ. 2020. Evaluation of Antarctic kirll (*Euphausia superba*) meal supplementation in diets for olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquac Res 51, 2291-2302. https://doi.org/10.1111/are.14573.

Kim YJ, Jun LJ, Lee DW, Lee YJ, Ko YJ, Oh YE, Woo SJ, Kim MS, Kim SM and Jeong JB. 2022. Antibiotic susceptibility of bacterial pathogens that infect olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) cultivated in Korea. Int J Environ Res Public Health 19, 8110. https://doi.org/10.3390/ijerph19138110.

Kim SK and Wijesekara. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. J Funct Foods 2, 1-9. https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.01.003.

Khosravi S, Bui HTD, Rahimneja S, Herault M, Fournier V, Kim SS, Jeong JB and Lee KJ. 2015. Dietary supplementation of marine protein hydrolysates in fish-meal based diets for red sea bream (*Pagrus major*) and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture 435, 371-376. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.10.019.

KOSIS (Korean Statistical Information Service). 2023. Expenditure Per Aquaculture. Retrieved from https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=101&tblId=DT_1EW0004&vw_cd=MT_ZTITLE&list_id=K2_7&scrId=&seqNo=&lang_mode=ko&obj_var_id=&itm_id=&conn_path=MT_ZTITLE&path=%252F%252520statisticsList%252FstatisticsListIndex.do on Apr 27, 2023.

Kumari J and Sahoo PK. 2006. Dietary β-1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, Clarias batrachus (L.). J Fish Dis 29, 95-101. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00691.x.

Liang M, Wang J, Chang Q and Mai K. 2006. Effects of different levels of fihs protein hydrolysate in the diet on the nonspecific immunity of Japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvieret Valenciennes, 1828). Aquac Res 37, 102-106. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01392.x.

Li Y, Wang L, Lu S, Wang S, Zhang H, Yang Y, Li M and Chen S. 2020. Heritability of disease resist- ance to *Edwardsiella tarda* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture 519, 734750. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734750.

Martínez-Alvarez O, Chamorro S and Agustín Brenes. 2015. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. Food Res Int 73, 204-212. http://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.005.

Mohammed HH, Brown TL, Beck BH, Yildirim-Aksoy M, Eljack RM and Peatman E. 2018. The effects of dietary inclusion of a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product in a commercial catfish ration on growth, immune readiness, and columnaris disease susceptibility. J Appl Aquac 31, 193-209. https://doi.org/10.1080/10454438.2018.1499576.

Nedjar-Arroume NV, Dubois-Delval V, Miloudi K, Daoud R, Krier F, Kouach M, Briand G and Guillochon D. 2006. Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. Peptides 27, 2082-2089. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.03.033.

OgunJi J and Iheanacho S. 2021. Alternative protein source: Acceptability of cow blood meal in place of fish meal assessed via growth, antioxidant enzymes functions and haematological response in *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Aquac Res 52, 2651-2661. https://doi.org/10.1111/are.15115.

Ogunji JO, Iheanacho SC, Abe GA and Ikeh OR. 2020. Assessing effects of substituting dietary fish meal with boiled donkey and cow blood meal on growth performance and digestive enzyme activities of *Clarias gariepinus* juvenile. J World Aquac Soc 51, 1066-1079. https://doi.org/10.1111/jwas.12716.

Sae-Dui D, Muroga K and Nakai T. 1984. A case of *Edwardsiella tarda* infection in cultured colored carp, *Cyprinius carpio*. Fish Pathol 19, 197-199. https://doi.org/10.3147/jsfp.19.197.

Siddik MAB, Howieson J, Fotedar R and Partridge GJ. 2021. Enzymatic fish hydrolysates in finfish aquaculture: A review. Rev Aquac 13, 406-430. https://doi.org/10.1111/raq.12481.

Siwicki AK and Anderson DP. 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum. In: Fish Disease Diagnosis and Prevention Methods. Wydawnictwo Instytutu Rybactwa Strodladowego, Olsztyn, Poland, 105-112.

Tang HG, Wu TX, Zhao ZU and Pan XD. 2008. Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). J Zhejiang Univ Sci B 9, 684-690. https://doi.org/10.1631/jzus.b0820088.

Twahirwa I, Wu C, Ye J and Zhou Q. 2021. The effect of dietary fish meal replacement with blood meal on growth performance, metabolic activities, antioxidant and innate immune responses of fingerlings black carp, *Mylopharyngodon piceus*. Aquac Res 52, 702-714. https://doi.org/10.1111/are.14927.

Usman U, Kamaruddin K, Palinggi NN, Rachmansyah R and Ahmad T. 2007. Fermented blood meal use for tiger grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* grow-out diet. Indones Aquac J 2, 1-13. http://dx.doi.org/10.15578/iaj.2.1.2007.7-13

Worthington CC. 1991. Enzyme Related Biochemical. 3rd Edition. Worthington Biochemical Corporation, Freehold, NJ, U.S.A., 38-42.