

# 제주도 양식장 내 치어기 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 저어분 EP (Extruded Pellet) 사료 장기간 이용성 평가

임현운<sup>†</sup> · 김재식<sup>†</sup> · 고대현 · 송진우<sup>1</sup> · 이승한<sup>2</sup> · 허상우<sup>2</sup> · 김강웅<sup>2</sup> · 이경준<sup>3\*</sup>

제주대학교 해양생명과학과, <sup>1</sup>제주어류양식수협, <sup>2</sup>국립수산과학원 사료연구센터, <sup>3</sup>제주대학교 해양과학연구소

## Long-term Usability Evaluation of Low Fish Meal Extruded Pellet Diet for Juvenile Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* at Jeju Fish Farm

Hyunwoon Lim<sup>†</sup>, Jaesik Kim<sup>†</sup>, Daehyun Ko, Jin-Woo Song<sup>1</sup>, Seunghan Lee<sup>2</sup>, Sang-Woo Hur<sup>2</sup>, Kang-Woong Kim<sup>2</sup> and Kyeong-Jun Lee<sup>3\*</sup>

Department of Marine Life Sciences, Jeju National University, Jeju Self-Governing Province 63243, Republic of Korea

<sup>1</sup>Jeju Fish-Culture Fisheries Cooperatives, Jeju 63021, Republic of Korea

<sup>2</sup>Aquafeed Research Center, National Institute of Fisheries Science, Pohang 37517, Republic of Korea

<sup>3</sup>Marine Science Institute, Jeju National University, Jeju Self-Governing Province 63333, Republic of Korea

This study evaluated the utilization of a low fish meal (LFM) diet and black soldier fly (BSF) *Hermetia illucens* meal and oil as a fish meal (FM) substitute or functional additive for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* at the Jeju fish farm. Two experimental diets replaced FM using animal (tankage, poultry byproduct and tuna byproduct meal) and plant (wheat gluten and soy protein concentrate) protein sources, containing 45% (FM45) and 35% (FM35) of FM, respectively. One experimental diet replaced FM with animal, plant, and BSF meal, fish oil using insect meal and oil (FM35+). After the feeding trial ended, no differences in growth performance, feed utilization, survival and biological indices were observed among all experimental groups. Aspartate aminotransferase and cholesterol levels in the FM35 and FM35+ groups were significantly higher than that in the FM70 group. The linoleic acid level in the muscle was significantly higher in the fish fed with the FM70 diet than in those fed with the FM45, FM35, and FM35+ diets. Thus, the LFM diet is suitable for juvenile olive flounder farming during six months.

Keywords: Olive flounder, Extruded pellet, Fish farm, Growth performance, Low fish meal diet

### 서론

양식 산업은 지속적으로 성장하고 있으며, 전 세계에서 소비되는 어류의 약 50%를 공급하고 있다(FAO, 2022). 양식 산업이 발전함에 따라 양식 사료의 생산량은 지속적으로 증가할 것으로 보고되었다(Tacon and Metian, 2015). 양식 사료 비용은 총 양식 생산 비용의 60%를 차지하고 있다(Daniel, 2018). 양식 사료 내 주 단백질 원료로는 어분이 사용되고 있으며, 높은 단백질 함량(60~70%)과 필수 지방산, 비타민, 미네랄 등이 풍부한 것으로 알려져 있다(Daniel, 2018). 그러나, 어분의 공급량은 기후 변화, 남획, 소비량 증가와 같은 문제로 인해 불안정

하며, 가격이 지속적으로 상승하고 있다(Luthada-Raswiswi et al., 2021). 전 세계 어분 생산량의 약 68%가 양식 산업에 사용되고 있으며, 환경적, 경제적으로 지속 가능한 양식 산업의 발전을 위해서는 어분의 함량을 낮춘 저어분사료의 개발이 필수적이다(Galkanda-Arachchige et al., 2020).

어분 대체원으로써 다양한 동-식물성 단백질 원료의 이용성이 평가되었다(Daniel, 2018; Luthada-Raswiswi et al., 2021). 동물성 단백질 원료는 단백질 함량이 높고, 비타민, 미네랄, taurine 등이 다량 함유되어 있으며(NRC, 2011), 축산, 가공, 양돈 산업의 부산물을 재활용하기 때문에 친환경적인 원료로 평가 받고 있다. 식물성 단백질 원료는 경제적이고 지속 가능한 양

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

E-mail address: kjlee@jeju.ac.kr <sup>†</sup>Contributed equally.



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.2024.0023>

Korean J Fish Aquat Sci 57(1), 23-31, February 2024

Received 1 August 2023; Revised 27 September 2023; Accepted 8 November 2023

저자 직위: 임현운(대학원생), 김재식(대학원생), 고대현(대학원생), 송진우(팀장), 이승한(연구사), 허상우(연구사), 김강웅(연구관), 이경준(교수)

식을 위한 어분 대체제로 각광받고 있다(Daniel, 2018). 식물성 원료에는 phytic acid, trypsin inhibitor, soy saponin과 같은 항영양인자(antinutritional factor)가 함유되어 있지만(Novriadi, 2017), 2차 가공을 통해 항영양인자가 제거되고 단백질 함량이 높아진 식물성 단백질 농축물은 일반적인 식물성 단백질 원료에 비해 이용성이 높다(Hardy, 2010). 단일 원료를 이용하여 어분을 대체할 경우, 제한 아미노산, 영양소 결핍과 같은 이유로 어류의 성장과 사료효율의 저하가 나타나는 것으로 보고되었다(Biswas et al., 2019). 따라서, 이러한 문제점을 방지하기 위해 다양한 단백질 원료를 혼합하여 어분 대체원으로써 이용성 평가를 위한 연구가 진행되고 있다(Kim et al., 2020; Lim et al., 2020).

곤충은 다른 동물성 단백질 원료에 비해 사료효율이 높고 탄소 배출이 적으며, 배설물을 농업용 비료로 활용할 수 있기 때문에 친환경적인 단백질 원료로 평가받고 있다(Makkar et al., 2014). 동애등에는 고밀도 사육을 통한 대량생산과 건조과정을 통해 장기 보관이 가능하여 산업적 이용성이 크다(Makkar et al., 2014). 동애등에는 조단백질(36–65%)과 조지질(4.6–38.6%)의 함량이 높고 아미노산 조성이 우수하여 다양한 어종에서 어분 대체원으로써 평가가 이루어지고 있다(Mohan et al., 2022). 또한, 동애등에의 지질에는 불포화지방산의 함량이 높아 사료 내 지질원으로써의 이용 가능성이 보고되었다(Li et al., 2016).

넙치의 2022년 총 생산량은 45,801톤으로 우리나라 전체 어류 양식 생산량의 약 50% 이상을 차지하는 대표적인 양식 어종이다(KOSIS, 2023). 넙치는 육식성 어종이며 단백질 요구량이 50.1–50.9%로 높기 때문에 사료 내 어분이 다량 사용되고 있다(Kim et al., 2017; Hamidoghli et al., 2020). 현재까지 넙치 사료에 어분을 대체하기 위해 다양한 동·식물성 단백질 원료를 이용한 연구가 진행되었다(Kim et al., 2020; Lim et al., 2020). 대부분의 연구들은 실험실 규모로 사육 실험이 진행되었다. 따라서, 본 연구는 다양한 동·식물성 단백질 원료와 곤충 유래 원료를 사용하여 제작한 extruded pellet (EP) 사료를 이용하여 실제 양식장에서 장기간 사육 실험을 통해 저어분사료의 이용성을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 실험사료

대조군(FM70)은 어분의 함량을 70%로 설정하였고, 주 단백질원으로는 어분(sardine:anchovy=1:1)과 대두박을 사용하였다. 저어분 실험군은 대조군 내 어분을 밀글루텐(wheat gluten), 대두농축단백(soy protein concentrate), 수지박(tankage meal), 가금부산물(poultry byproduct meal), 참치부산물(tuna byproduct meal)을 이용하여 대체하였으며, 어분 함량은 각각 45%, 35% (FM45, FM35)로 설정되었다(Table 1). 동애

Table 1. Dietary formulation of the experimental diets of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* (% of dry matter)

Ingredients	Diets			
	FM70	FM45	FM35	FM35+
Sardine, FM <sup>1</sup>	35.00	22.50	17.50	17.50
Anchovy, FM <sup>1</sup>	35.00	22.50	17.50	17.50
Soybean meal <sup>2</sup>	12.00	12.00	12.00	8.00
Starch	4.00	3.80	3.25	3.80
Wheat flour	7.00	7.00	7.00	7.00
Wheat gluten <sup>2</sup>	-	4.50	4.50	4.50
Soy protein concentrate <sup>3</sup>	-	5.50	8.00	5.50
Tankage meal <sup>4</sup>	-	8.00	11.50	13.45
Poultry byproduct meal <sup>5</sup>	-	4.50	5.50	4.50
Tuna byproduct meal <sup>6</sup>	-	-	2.00	0.00
Black soldier fly larvae meal <sup>7</sup>	-	-	-	7.00
Black soldier fly larvae oil <sup>7</sup>	-	-	-	1.00
Fish oil <sup>8</sup>	3.30	4.30	4.60	3.60
Lecithin	0.50	0.50	0.70	0.70
Betaine	-	1.00	1.00	1.00
Taurine	-	0.50	0.80	0.80
Methionine	-	-	0.15	0.15
Mono calcium phosphate	0.50	0.70	1.10	1.10
Mineral mixture <sup>9</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin mixture <sup>10</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin C	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamin E	0.10	0.10	0.10	0.10
Choline	0.50	0.50	0.70	0.70
Proximate composition				
Crude protein (%)	58.7	59.0	58.6	56.5
Crude lipid (%)	9.80	10.2	11.2	10.6
Ash (%)	14.0	12.4	11.9	12.6
Moisture (%)	8.39	7.74	7.79	7.17

<sup>1</sup>Fish meal, Orizon S.A Co., Ltd, Santiago, Chile. <sup>2</sup>CJ CheilJedang, Co., Ltd, Seoul, Korea. <sup>3</sup>Solae LLC Inc., Saint Luis, U.S.A. <sup>4</sup>Hanla Industrial Co., Ltd, Jeju, Korea. <sup>5</sup>Woosin Food Co., Ltd, Pocheon, Korea. <sup>6</sup>Wooginfeed Industry Co., Ltd, Incheon, Korea. <sup>7</sup>CIEF Co., Ltd, Gimje, South Korea. <sup>8</sup>Fish oil, E-wha oil Industry, Busan, Korea. <sup>9</sup>Mineral mixture contained the following ingredients (g/kg, mixture): MgSO<sub>4</sub>, 80.2; C<sub>4</sub>H<sub>2</sub>FeO<sub>4</sub>, 12.5; KCl, 130; FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 20; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 1.25; CoSO<sub>4</sub>, 0.75; Ca(IO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.75; Al(OH)<sub>3</sub>, 0.75; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 13.75; MnSO<sub>4</sub>, 11.25; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1. <sup>10</sup>Vitamin mixture contained the following amount which were diluted in cellulose (g/kg, mixture): L-ascorbic acid, 6.4; DL- $\alpha$  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.

등에 실험구는 FM35 실험구에 동애등에 분말 7%와 동애등에 유 1%를 첨가하였다(FM35+). 저어분사료의 기호성 향상을 위해 betaine과 taurine을 첨가하였으며, 아미노산 결핍을 방지하기 위해 methionine을 첨가하였다. 실험구 간의 동일한 조질과 인 조성을 위해 어유와 일인산칼슘(mono calcium phosphate)을 사용하였다. 실험사료 제조시의 배럴 온도(barrel temperature, 142–143°C), 컨디셔너 온도(conditioner temperature, 98–99°C)는 일정하게 유지되었다. 스팀(steam, 617–659 kg/h)과 원료 공급량(feed rate, 3,285–3,590 kg/h)은 사료의 물성에 따라 조절되었다. 실험사료는 제주어류양식수협에서 EP 사료로 제조되었다. 성형된 사료는 건조(12 h, 25°C) 후, 공급 전까지 냉동보관(-20°C)하였다. 실험사료의 아미노산 함량은 Table 2에 나타내었다.

### 실험어와 사육관리

사육실험은 제주도 구좌읍에 위치한 명숙수산에서 진행되었다. 넙치 치어(19.3 g)는 총 8개의 사각 콘크리트수조(10×10 m)에 수조 당 17,000마리씩 2반복으로 배치되었다. 실험사료는 1일 2회(07:30 h, 16:30 h)에 나누어 6개월 동안 만복 공급하였다. 사육수는 지하해수와 자연해수를 3:7 비율로 혼용하여 사용하였다. 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. 실험 기간 동안 평균수온은 16.8–17.8°C, 염분은 32–34 psu, pH는 7.9–8.5, 용존산소는 9.07–9.98 mg/L으로 측정되었다.

### 어체측정

실험 종료 후, 무게와 마리수를 측정하여 어체증증가(weight gain, WG), 사료전환효율(feed conversion ratio, FCR), 생존율

(survival)을 계산하였다. 무게 측정 후, 수조당 10마리의 실험어를 무작위로 선별하였다. 선별된 실험어는 2-phenoxyethanol (200 mg/L)을 사용하여 안락사 시킨 후, 무게와 길이를 측정하여 비만도(condition factor, CF)를 측정하였다. 무게 측정 후 해부하여 간, 내장, 가식부위의 무게를 측정하였으며 간중량지수(hepatosomatic index, HSI), 내장중량지수(viscerosomatic index, VSI), 가식부위비율(edible part rate, EPR)를 계산하였다.

### Sampling과 분석

수조 당 10마리의 실험어를 무작위로 선별하였으며, 혈액은 주사기를 이용하여 미부동맥에서 채혈하였다. 전혈은 헤파린을 처리하여 hemoglobin (Hb)과 hematocrit (Ht)을 측정하는데 사용되었다. 남은 혈액은 원심분리(5,000 rpm, 10 min, 4°C)하여 혈장(plasma)으로 분리한 후, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), glucose, cholesterol, total immunoglobulin (TIg) 분석에 사용하였으며, 사용 전까지 냉동보관(-80°C) 되었다. 혈청(serum)은 채혈된 혈액을 실온에서 30 min 응고시킨 후, 혈장과 동일하게 원심분리하여 lysozyme, anti-protease, myeloperoxidase (MPO) 분석에 이용하였다. 실험어 전어체는 일반성분 분석을, 등근육은 일반성분, 아미노산, 지방산 분석을 위해 사용 전까지 냉동보관(-24°C) 되었다.

Ht은 모세관(micro-hematocrit capillary tubes)을 사용하여 혈액진단원심분리기(Micro 17 TR; HanilBioMed Inc., Gwangju, Korea) (10 min)로 측정하였다. Hb, AST, ALT, glucose, cholesterol은 STANBIO kit (Stanbio Laboratory, Boerne, TX, USA)를 이용하였으며, TIg는 Siwicki et al. (1994)의 방법으로 측정하였다.

Lysozyme 활성은 Hultmark et al. (1980)의 방법을, anti-protease 활성은 Sharifuzzaman and Austin (2009)의 방법을, 그리고 MPO는 Quade and Roth (1997)의 방법으로 분석하였다.

실험사료, 전어체, 등근육은 AOAC (2000) 분석법에 따라 분석을 진행하였다. 수분은 상압가열건조법(125°C, 3 h), 조회분은 직접회화법(550°C, 4 h)으로 분석하였다. 지방은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 분석되었다. 단백질은 자동조단백질 분석기(Kjeltec system 2300, FOSS, Sweden)로 분석되었다.

등근육의 유리 아미노산분석을 하기 위해 균질화 된 고체상의 시료(3–5 mg)를 일정량 취하여 75% EtOH에 혼합한 후 초음파추출(1 h)을 진행한 후, 상온에서 24 h 동안 추출하였다. 이후, 0.2 µm의 syringe filter로 filtering하였다. Filtering된 시료는 HPLC (Dionex Ultimate 3000 stadard system; Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)를 이용하여 분석하였다.

실험사료의 구성 아미노산 분석은 Rosen (1957)의 방법에 따라 전처리 하였다. 균질화 된 고체상의 시료(단백질량 3–5 mg)를 일정량 취하여 6N HCl 30 mL에 혼합한 후, 130°C에서 24

Table 2. Essential amino acid profile of experimental diets for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* (% of diets)

Amino acid	Diets			
	FM70	FM45	FM35	FM35+
Arginine	3.23	3.30	3.33	3.19
Histidine	1.30	1.23	1.21	1.47
Isoleucine	2.47	2.34	2.28	2.24
Leucine	4.04	3.96	3.89	3.82
Lysine	3.98	3.40	3.21	3.14
Methionine	1.46	1.21	1.27	1.25
Phenylalanine	2.30	2.35	2.33	2.25
Threonine	2.23	2.07	2.01	1.99
Tryptophan	0.62	0.57	0.55	0.60
Valine	2.76	2.61	2.54	2.55

h 가수분해하였다. 가수분해가 끝난 뒤 초순수로 100 mL가 되도록 희석한 후, 0.4 µm 수용성 syringe filter로 filtering하였다. Filtering된 시료를 다시 1:1로 희석한 후 HPLC 로 아미노산 분석기(Amino Acid Analyzer; Sykam GmbH, Eresing, Germany)를 이용하여 분석하였다.

지방산은 Metcalfe and Schmitz (1961)의 방법으로 추출하였다. 표준물질은 PUFA 37 component FAMEMix (Supelco, Bellefonte, PA, USA)를 사용하였다. Gas chromatography (6800GC; Agilent Technologies, San Francisco, CA, USA)에 capillary column (112-88A7, 100 m × 0.25 mm, film thickness 0.20 µm; Agilent Technologies,)을 사용하여 지방산 함량을 측정하였다. Carrier gas는 수소를 사용하였고, oven의 온도는 140°C에서 240°C까지 4°C/min으로 증가시켰다. Injection과 detector의 온도는 240°C로 설정하였다.

### 통계분석

모든 실험구는 완전확률계획법(completely randomized design)으로 배치되었다. 모든 분석결과들은 SPSS (version 24.0) 프로그램을 이용하여 one-way ANOVA로 통계 분석되었다. 데이터 값의 유의차는 Tukey's HSD로 평균 간의 유의성(P<0.05)을 비교하였다. 데이터는 평균값 ± 표준편차(mean ± SD)로 나타내었으며, 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석되었다.

### 결 과

6개월 동안의 사육실험 결과, 최종 무게(final body weight, FBW), WG, 사료 섭취량(feed intake, FI), FCR, 생존율은 모든 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다(Table 3). 생물지표 측정 결과, CF, HSI, VSI, EPR도 모든 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다(Table 4). 전어체와 등근육에서의 일반성분분석 결과, 모든 항목에서 유의적인 차이가 없었다(Table 5). 등근육의 유리 아미노산은 Table 6에 나타내었다. Histidine, lysine, threonine 함량은 FM45, FM35, FM35+ 실험구가 FM70 실험구에 비해 수치적으로 낮았다. 등근육 지방산 조성은 Table 7에 나타내었으며, C18:2n6 함량은 FM45, FM35, FM35+ 실험구가 FM70 실험구에 비해 유의적으로 높았다. 혈액학적 분석 결

과는 Table 8에 나타내었으며, Hb, Ht, AST, glucose의 수치는 모든 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다. ALT, cholesterol 수치는 FM35와 FM35+ 실험구가 FM70 실험구 보다 비해 유의적으로 높았다. 면역분석 결과는 Table 9에 나타내었으며, 모든 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다.

### 고 찰

치어기 넙치 사료 내 어분을 동물성(수지박, 가금부산물, 참치 부산물), 식물성(밀글루텐, 대두농축단백) 단백질 혼합물로 대체한 저어분사료는 성장과 FCR에 문제가 없음을 확인하였다. 어분을 단일 원료로만 대체할 경우 제한 아미노산(methionine, lysine)이 발생할 수 있으며, 식물성 단백질 원료는 phytic acid, protease inhibitor와 같은 항영양인자를 함유하고 있어 이용성이 낮다(Francis et al., 2001; Nunes et al., 2014). 이전의 연구에서 96.8 g의 치어기 넙치를 대상으로 사료 내 어분을 식물성 단백질원(밀글루텐, 대두농축단백, 대두박)을 혼합하여 대체하였을 때, 40%까지 대체하였어도 성장과 사료효율에 차이가 없다고 보고되었다(Lim et al., 2020). 또한, 196 g의 육성기 넙치 사료 내 어분을 동·식물성 단백질 원료(밀글루텐, 대두농축단백, 수지박, 가금부산물) 혼합물로 50%까지 대체하였어도 성장을 과 생존율에 차이가 없다고 보고하였다(Kim et al., 2019). 사료 내 어분을 대체할 경우, 원료에 따라 필수 아미노산이 결핍될 수 있기 때문에 이를 방지하기 위해 아미노산을 첨가해 주어야 한다(Gómez-Requeni et al., 2004). 본 연구에서 어분 대체원으로 사용했던 원료들은 어분에 비해 lysine, threonine 함량이 낮다고 보고되었다(NRC, 2011). 넙치의 lysine, threonine 요구량은 각각 1.5–2.1%, 1.03%로 알려져 있다(Forster and Ogata, 1998; Hasanthi et al., 2023). 일반적으로 사료 내 아미노산이 결핍될 경우 어류의 성장, 사료효율, 사료섭취량 감소 등 부작용이 발생한다(Biswas et al., 2019). 본 연구에서 대조구와 비교하였을 때, 저어분사료는 전혀 넙치의 성장과 사료효율을 감소시키지 않았으며, 이는 단일 원료로만 대체할 경우 부족할 수 있는 영양소를 서로 보완해 줄 수 있었을 뿐만 아니라 methionine을 첨가해 주었기 때문이라고 사료된다. 따라서 치어기 넙치 사료 내 어분 함량을 35%까지 낮추어도 넙치의 성장에 부정적인 영향이 없기 때문에, 상업적으로 사용하는데 문제가 없을 것이

Table 3. Growth performance and feed utilization of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* (initial mean body weight, 19.3 g) fed the experimental diets for 6 months

Diets	FBW <sup>1</sup> (g)	WG <sup>2</sup> (%)	FI <sup>3</sup> (g/fish)	FCR <sup>4</sup>	Survival (%)
FM70	259±23.3	1,239±121	251±14.1	1.05±0.04	57.0±0.62
FM45	256±5.66	1,226±29.3	260±4.95	1.10±0.01	54.7±1.80
FM35	252±29.7	1,206±154	255±1.41	1.10±0.13	51.9±2.71
FM35+	239±6.36	1,141±33.0	240±14.9	1.09±0.10	45.6±5.49

<sup>1</sup>Final mean body weight (g). <sup>2</sup>Weight gain (%)=(final weight-initial weight)×100/initial weight. <sup>3</sup>Feed intake (g/fish)=dry feed consumed (g)/fish. <sup>4</sup>Feed conversion ratio=dry feed intake/wet weight gain. Values are mean of duplicates and presented as mean±SD.

라고 사료된다.

어분을 다른 단백질 원료로 대체하였을 경우, 불균형한 영양소 조성으로 인해 성장, 사료효율, 기호성 등이 낮아질 수 있다(Daniel, 2018; Luthada-Raswiswi et al., 2021). Taurine과 betaine은 어류의 생리조절에 관여하며 성장, 사료효율, 소화율 및 사료 기호성을 향상시키는 것으로 알려져있다(Lunger et al., 2007; Ghosh et al., 2019). Lunger et al. (2007)은 cobia *Rachycentron canadum* 사료 내 taurine을 첨가하였을 때, 성장률과 사료효율이 증가하였다고 보고하였다. Ghosh et al. (2019)은 *Labeo bata*의 사료 내 betaine을 첨가하였을 때 어류의 성장률 및 사료효율이 증가한다고 보고하였다. 본 연구에서도 사료 내 50%까지 어분을 대체하였어도 사료섭이량에 차이가 없었으며, 이는 taurine과 betaine의 첨가로 인해 사료의 기호성이 향상된 것으로 사료된다.

본 연구에서 동애등에 유래 물질은 넙치의 성장과 사료효율을 감소시키지 않는 것으로 나타났다. 많은 연구에서 동애등에는

Table 4. Biological indices and edible part rate of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 6 months

Diets	CF <sup>1</sup>	HSI <sup>2</sup> (%)	VSI <sup>3</sup> (%)	EPR <sup>4</sup> (%)
FM70	1.11±0.07	1.99±0.31	5.18±0.65	46.7±1.96
FM45	1.08±0.11	2.01±0.30	5.27±0.60	45.8±1.52
FM35	1.02±0.07	2.23±0.50	5.51±0.67	45.0±2.04
FM35+	1.03±0.03	2.17±0.16	5.42±0.31	44.2±1.70

<sup>1</sup>Condition factor=fish weight×total body length<sup>3</sup>. <sup>2</sup>Hepatosomatic index (%)=100×(liver weight/body weight). <sup>3</sup>Viscerosomatic index (%)=100×(visceral weight/body weight). <sup>4</sup>Edible portion rate (%)=100×muscle/fish weight (g). Values are mean of triplicates and presented as mean±SD.

Table 5. Whole body and muscle composition of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 6 months (% of wet basis)

Diets	Moisture (%)	Crude protein (%)	Crude lipid (%)	Ash (%)
<b>Whole body</b>				
FM70	75.8±0.64	16.4±1.18	4.33±0.25	2.60±0.27
FM45	76.7±0.49	17.1±1.28	3.54±1.22	3.36±0.34
FM35	73.7±1.84	18.2±0.90	3.70±0.45	3.04±0.18
FM35+	76.9±0.07	19.2±1.37	3.48±0.08	2.65±0.05
<b>Muscle</b>				
FM70	76.4±0.21	21.1±0.44	0.60±0.01	1.24±0.04
FM45	76.5±0.16	21.8±0.18	0.89±0.02	1.33±0.06
FM35	76.5±0.09	21.0±0.24	0.78±0.23	1.34±0.03
FM35+	76.5±0.01	20.9±0.16	0.84±0.05	1.39±0.04

Values are mean of triplicates and presented as mean±SD.

어분 대체원으로써의 이용성이 평가되었으며, 어분과 유사한 아미노산 조성을 갖는 것으로 보고되었다(Henry et al., 2015). 또한, 동애등에유는 lauric acid가 다량 함유되어 있는 것으로 보

Table 6. Free amino acid profiles in muscle of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 6 months (% of protein)

Amino acid	Diets			
	FM70	FM45	FM35	FM35+
<b>Essential amino acid</b>				
Arginine	1.10	0.92	1.37	0.68
Histidine	9.77	6.97	3.99	6.94
Isoleucine	0.30	0.28	0.24	0.30
Leucine	0.59	0.56	0.47	0.53
Lysine	2.09	1.51	1.52	0.66
Methionine	0.93	0.88	0.95	1.16
Phenylalanine	0.35	0.38	0.29	0.32
Threonine	2.67	1.91	1.74	1.93
Valine	0.40	0.38	0.36	0.45
<b>Non-essential amino acid</b>				
Aspartic acid	0.22	0.20	0.17	0.24
Glutamic acid	1.81	1.49	1.30	1.24
Glycine	3.03	3.62	2.90	2.90
Serine	7.18	7.60	6.96	8.08
Taurine	59.9	64.0	68.8	67.3
Tyrosine	0.37	0.37	0.30	0.33
Proline	0.86	0.69	0.12	0.23

Table 7. Fatty acid profiles in muscle of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 6 months (% of lipid)

Fatty acid	Diets			
	FM70	FM45	FM35	FM35+
C14	3.49±0.66	2.94±0.27	3.37±0.40	2.54±0.52
C16	25.2±0.19	25.5±0.39	24.6±0.28	25.9±0.75
C16:1	4.81±1.01	4.05±0.50	4.90±0.58	3.59±0.66
C18	17.1±2.68	18.7±2.33	13.8±0.51	16.4±3.22
C18:1n9	15.6±1.51	15.3±1.20	18.7±1.42	16.1±0.87
C18:2n6	8.51±0.12 <sup>c</sup>	9.35±0.22 <sup>b</sup>	10.0±0.2 <sup>ab</sup>	10.4±0.1 <sup>a</sup>
C18:3n3	3.12±0.34	3.19±0.17	3.52±0.02	2.77±0.29
C20:5n3	8.58±0.36	7.83±0.62	8.49±0.46	8.01±0.77
C22:6n3	13.6±0.88	13.2±0.25	12.6±2.39	14.3±3.98

Value in same row having different superscript letters are significantly different (P<0.05). Values are mean of triplicates and presented as mean ± SD.

Table 8. Hematological parameters of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 6 months

Diets	Hb <sup>1</sup>	Ht <sup>2</sup>	AST <sup>3</sup>	ALT <sup>4</sup>	Glucose (mg/dL)	Cholesterol (mg/dL)
FM70	4.58±0.80	25.6±3.13	26.4±10.5	77.5±20.2 <sup>b</sup>	47.4±9.92	68.1±7.36 <sup>c</sup>
FM45	5.11±0.81	29.3±3.40	21.0±4.36	102±13.7 <sup>ab</sup>	45.7±5.68	82.2±19.5 <sup>c</sup>
FM35	4.90±0.85	27.0±5.37	21.8±6.19	113±13.7 <sup>a</sup>	52.1±9.39	110±10.0 <sup>b</sup>
FM35+	4.56±0.71	25.1±2.23	20.2±4.40	121±19.8 <sup>a</sup>	47.7±2.87	138±6.20 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Hemoglobin (g/dL). <sup>2</sup>Hematocrit (%). <sup>3</sup>Aspartate aminotransferase (U/L). <sup>4</sup>Alanine aminotransferase (U/L). Values are mean of triplicates and presented as mean±SD. Value in same column having different superscript letters are significantly different (P<0.05).

Table 9. Immune responses of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 6 months

Diets	Tlg <sup>1</sup>	MPO <sup>2</sup>	Lysozyme (µg/mL)	Anti-protease (%)
FM70	14.0±2.49	0.23±0.03	31.1±1.79	22.8±3.00
FM45	12.7±3.06	0.22±0.04	31.1±1.59	23.5±2.74
FM35	11.4±1.42	0.25±0.06	31.0±1.17	22.2±3.33
FM35+	12.0±1.27	0.27±0.04	29.9±3.21	25.3±3.35

<sup>1</sup>Total immunoglobulin (µg/mL). <sup>2</sup>Myeloperoxidase (absorbance). Values are mean of triplicates and presented as mean±SD.

고되었다(Shin et al., 2021). Lauric acid는 중쇄지방산의 일종으로 체내에 빠르게 흡수되어(Stubbs and Harbron, 1996) 바로 사용되기 때문에 다른 지방산들보다 체내에 축적되는 정도가 낮은 것으로 보고되었다(Garlid et al., 1996). 키틴은 곤충의 외골격을 구성하는 요소로서 N-acetyl-D-glucosamine 이 β-1,4 결합으로 중합된 다당류이다. 어류는 소화관 내 키틴분해효소가 없거나 부족하여 사료 내 키틴 함량이 증가할 경우 어류의 성장, 소화율, 사료섭이에 부정적인 영향을 준다고 보고되었다(Eggink et al., 2022). Kroeckel et al. (2012)은 turbot *Psetta maxima* 사료에 동애등에 분말을 16.5% 이상 첨가하였을 때, 성장과 사료효율이 감소하였으며, 이는 곤충분에 함유된 키틴에 의한 영향일 것이라 보고하였다. 결과적으로 본 연구에서 필수 아미노산을 보충해주었고 lauric acid가 에너지원으로 사용되어 성장의 감소를 방지한 것으로 사료되며, 동애등에 유래 물질을 이용하여 어류 유래 물질을 일부 대체할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나, 다량 첨가 시 키틴에 의한 성장과 사료효율에 부정적인 영향이 있을 수 있기 때문에 적정 첨가량의 규명이 필요할 것으로 사료된다.

Linoleic acid는 주로 식물성 기름과 육류에 다량 함유 되어있으나 어분과 어유에는 비교적 적다(NRC, 2011; Whelan and Fritsche, 2013). 본 연구에서 어분을 대체하기 위해 사용된 tankage meal과 poultry byproduct meal에는 linoleic acid 함량이 어분과 어유에 비해 높게 함유하고 있다(NRC, 2011). 따라서, 어분 대체원료로 사용한 원료에 포함된 linoleic acid 함량에 의해 저어분사료를 공급한 실험어 근육 내 linoleic acid 함량이 증가한 것으로 판단된다.

ALT는 간의 손상을 나타내는 대표적인 지표로 사용된다(Biswas et al., 2019). Soltan et al. (2008)은 사료 내 어분 대체율이 증가할수록 ALT의 수치가 증가되었다고 보고하였다. 혈중 cholesterol 변화는 신체 지질 대사의 지표로 사용된다(Wu et al., 2022). Wu et al. (2022)는 spotted knifejaw *Oplegnathus punctatus*를 대상으로 사료 내 어분을 대두박으로 50% 이상 대체하였을 때 혈중 cholesterol이 감소하였으나 taurine을 1.2% 첨가할 경우 혈중 cholesterol이 증가하였다고 보고하였다. Taurine은 담즙산 대사에 관여하며, 어류의 지질대사를 촉진하고 혈중 cholesterol 수치에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Salze and Davis, 2015; Gunathilaka et al., 2019). 본 연구에서 혈중 ALT와 cholesterol의 수치가 상승한 것은 어분대체와 그에 따른 taurine의 첨가가 원인인 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 과산화소로 호중구, 호염기구, 호산구에서 과산화수소를 hypochlorous acid로 변환시켜 병원성 미생물을 사멸시키는 역할을 한다(Palić et al., 2005). Anti-protease는 protease를 불활성화 시킴으로써 체내에 침입한 병원균의 성장을 억제하는 선천면역 관련 효소이다. Li et al. (2019)의 연구에서 largemouth bass *Micropterus salmoides*에서 어분 대체율이 상승하였을 때, lysozyme의 활성이 낮아졌다고 보고하였다. Moniruzzaman et al. (2018)은 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)에서 어분 대체율이 상승하였을 때, MPO의 수치가 낮아졌다고 보고하였다. 참돔(*Pagrus major*) 사료 내 어분을 유채박으로 50%까지 대체해도 anti-protease 수치는 차이가 없었다(Dossou et al., 2018). Sunshine bass *Morone chrysops* × *M. saxatilis* 사료 내 어분을 가금부산물분과 대두박을 이용하여 대체하였을 때, Tlg 수치의 차이가 없었다고 보고되었다(Rawles et al., 2011). 본 연구에서도 동·식물성 단백질 원료를 혼합하여 어분을 대체하였음에도 면역력의 저하는 나타나지 않았으며, 저어분사료의 사용은 문제가 없을 것이라 판단된다.

본 연구에서 넙치의 생존율은 45~57%로 나타났다. 연구가 진행된 2020년에는 3개의 태풍(Bavi, Maysak, Haishen)이 연이어 발생하였다(Ha, 2022). 태풍이 발생할 경우, 연안 내 침전물

및 토사가 사육수로 유입되고 탁도가 증가하여 어류의 사료 섭취를 방해하며 스트레스를 증가시켜 면역력 감소를 야기시킨다 (Bash et al., 2001). 또한 침전물 내에는 각종 병원체가 존재하여 질병 감염에 의한 폐사가 발생하게 된다(Kim et al., 2010). 현장 실험의 경우 사육환경을 조절하기에는 한계가 있어 특정 시기에 대량 폐사가 발생하였으며, 저어분 사료에 의한 폐사는 아닌 것으로 판단된다.

본 연구에서는 치어기부터 중성어기까지 넙치를 대상으로 사료 내 어분을 동·식물성 단백질 원료들을 혼합 사용하여 대체한 저어분사료(어분 함량 35-45%)를 장기간 사육실험을 통해 검증하며, 저어분사료의 사용 가능성을 확인하였다. 또한, 동애등에 유래 물질도 어분, 어유 대체원으로써의 이용가능성을 확인하였다. 본 연구를 통해 실제 시판되는 배합사료의 형태로 저어분사료를 제작 및 공급하여도 성장과 FCR에 문제가 없음을 확인하였다. 그러나, 어분 대체율이 증가함에 따라 혈액성상의 변화가 확인되었으며, 추가적인 연구를 통해 원인을 분석하고 해결해 나가야 할 것으로 사료된다.

## 사 사

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

## References

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2000. Official Methods of Analysis of AOAC International (17th, Edn.). AOAC, Gaithersburg, MD, U.S.A.

Bash J, Berman CH and Bolton S. 2001. Effects of Turbidity and Suspended Solids on Salmonids. University of Washington, Seattle, WA, U.S.A.

Biswas A, Araki H, Sakata T, Nakamori T and Takki K. 2019. Optimum fish meal replacement by soy protein concentrate from soymilk and phytase supplementation in diet of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 506, 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.023>.

Daniel N. 2018. A review on replacing fish meal in aqua feeds using plant protein sources. *Int J Fish Aquat Stud* 6, 164-179.

Dossou S, Koshio S, Ishikawa M, Yokoyama S, Basuini MFEI, Zaineldin AI, Mzengereza K, Moss A and Dawood MAO. 2018. Effects of replacing fishmeal with fermented and non-fermented rapeseed meal on the growth, immune and antioxidant responses of red sea bream (*Pagrus major*). *Aquac Nutr* 25, 508-517. <https://doi.org/10.1111/anu.12876>.

Eggink KM, Pedersen PB, Lund I and Dalsgaard J. 2022. Chitin digestibility and intestinal exochitinase activity in Nile tilapia and rainbow trout fed different black soldier fly larvae meal size fractions. *Aqua Res* 53, 5536-5546. <https://doi.org/10.1111/are.16035>.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2022. Towards blue transformation. In: The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. FAO, Rome, Italy, 1-236. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>.

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.

Forster I and Ogata HY. 1998. Lysine requirement of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* and juvenile red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture* 161, 131-142. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00263-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00263-9).

Francis G, Makkar HPS and Becker K. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 197-227. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00526-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00526-9).

Galkanda-Arachchige HSC, Wilson AE and Davis DA. 2020. Success of fishmeal replacement through poultry by-product meal in aquaculture feed formulations: A meta-analysis. *Rev Aquac* 12, 1624-1636. <https://doi.org/10.1111/raq.12401>.

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>.

Ghosh TK, Chauhan YH and Mandl RN. 2019. Growth performance of *Labeo bata* (Hamilton, 1822) in freshwater and its acclimatization in brackish water with betaine as feed additive. *Aquaculture* 501, 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.020>.

Gómez-Requeni P, Mingarro M, Caldach-Giner JA, Médale F, Martin SAM, Houlihan DF, Kaushik S and Pérez-Sánchez J. 2004. Protein growth performance, amino acid utilization and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232, 493-510. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00532-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00532-5).

Gunathilaka GLBE, Kim MG, Lee C, Shin J, Lee BJ and Lee KJ. 2019. Effects of taurine supplementation in low fish meal diets for red seabream (*Pagrus major*) in low water temperature season. *Fish Aquac Sci* 22, 23. <https://doi.org/10.1186/s41240-019-0138-z>.

Ha KM. 2022. Short communication: Predicting typhoon tracks around Korea. *Nat Hazards* 113, 1385-1390. <https://doi.org/10.1007/s11069-022-05335-6>.

Hamidoghli A, Won SH, Lee SH, Lee SH, Farris NW and Bai SC. 2020. Nutrition and feeding of olive flounder *Paralichthys olivaceus*: A review. *Rev Fish Sci Aquac* 28, 340-357. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1740166>.

Hardy RW. 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquac Res* 41, 770-776. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02349.x>.

- Hasanthi M, Kim MG, Lim HW, Lim JH, Hur SW, Lee SH, Lee BJ, Kim KW and Lee KJ. 2023. The dietary requirement for threonine in juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Aquat Sci* 26, 58-68. <https://doi.org/10.47853/FAS.2023.e5>.
- Henry M, Gasco L, Piccolo G and Fountoulaki E. 2015. Review on the use of insects in the diet of farmed fish: Past and future. *Anim Feed Sci Technol* 203, 1-22. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.03.001>.
- 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>.
- Kim JW, Pachepsky YA, Shelton DR and Coppock C. 2010. Effect of streambed bacteria release on *E. coli* concentrations: Monitoring and modeling with the modified SWAT. *Ecol Modell* 221, 1592-1604. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2010.03.005>.
- Kim KW, Kim KD, Han HS, Won S, Moniruzzaman M, Lee JH, Choi YH and Bai SC. 2017. Evaluation of the dietary protein requirement of a selectively bred (F-5 Generation) strain of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Turk J Fish Aquat Sci* 17, 1009-1016. [https://doi.org/10.4194/1303-2712-v17\\_5\\_16](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v17_5_16).
- Kim MG, Lee C, Shin J, Lee BJ, Kim KW and Lee KJ. 2019. Effects of fish meal replacement in extruded pellet diet on growth, feed utilization and digestibility in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Korean J Fish Aquat Sci* 52, 149-158. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0149>.
- Kim MG, Lim H, Lee BJ, Hur SW, Lee S, 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>.
- KOSIS (Korean Statistical Information Service). 2022. Survey on the Status of Fish Culture. Retrieved from [https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=101&tblId=DT\\_1EZ0008&vw\\_cd=MT\\_ZTITLE&list\\_id=K2\\_4&scrId=&seqNo=&lang\\_mode=ko&obj\\_var\\_id=&itm\\_id=&conn\\_path=MT\\_ZTITLE&path=%252FstatisticsList%252FstatisticsListIndex.do](https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=101&tblId=DT_1EZ0008&vw_cd=MT_ZTITLE&list_id=K2_4&scrId=&seqNo=&lang_mode=ko&obj_var_id=&itm_id=&conn_path=MT_ZTITLE&path=%252FstatisticsList%252FstatisticsListIndex.do) on Jul 13, 2023.
- Kroeckel S, Harjes AGE, Roth I, Katz H, Wuertz H, Susenbeth A and Schulz C. 2012. When a turbot catches a fly: Evaluation of a pre-pupae meal of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) as fish meal substitute - Growth performance and chitin degradation in juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 364-365, 345-352. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.041>.
- Li S, Ding G, Wang A, Sang C and Chen N. 2019. Replacement of fishmeal by chicken plasma powder in diets for large-mouth bass (*Micropterus salmoides*): Effects on growth performance, feed utilization and health status. *Aquac Nutr* 25, 1431-1439. <https://doi.org/10.1111/anu.12963>.
- Li S, Ji H, Zhang B, Tian J, Zhou J and Yu H. 2016. Influence of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae oil on growth performance, body composition, tissue fatty acid composition and lipid deposition in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture* 465, 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.020>.
- Lim HW, Kim MG, Shin JH, Shin JB, Hur SW, Lee BJ and Lee KJ. 2020. Evaluation of three plant proteins for fish meal replacement in diet for growing olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Korean J Fish Aquat Sci* 53, 464-470. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0464>.
- Lunger AN, McLean E, Gaylord TG, Kuhn D and Craig SR. 2007. Taurine supplementation to alternative dietary proteins used in fish meal replacement enhances growth of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 271, 401-410. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.006>.
- Luthada-Raswiswi R, Mukaratirwa S and O'Brien G. 2021. Animal protein sources as a substitute for fish meal in aquaculture diets: A systematic review and meta-analysis. *Appl Sci* 11, 3854. <https://doi.org/10.3390/app11093854>.
- Makkar HPS, Tran G, Heuzé V and Ankers 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>.
- Metcalf LD and Schmitz AA. 1961. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal Chem* 33, 363-364. <https://doi.org/10.1021/ac60171a016>.
- Mohan K, Rajan DK, Muralisankar T, Ganesan AR, Sathishkumar P and Revathi N. 2022. Use of black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry: A review of past and future need. *Aquaculture* 553, 738095. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738095>.
- Moniruzzaman M, Bae JH, Won SH, Cho SJ, Chang KH and Bai SC. 2018. Evaluation of solid-state fermented protein concentrates as a fish meal replacer in the diets of juvenile rainbow trout, *Onchrhynchus mykiss*. *Aquac Nutr* 24, 1198-1212. <https://doi.org/10.1111/anu.12658>.
- Novriadi R. 2017. A meta-analysis approach toward fish meal replacement with fermented soybean meal: Effects on fish growth performance and feed conversion ratio. *Asian Fish Sci* 30, 227-244. <https://doi.org/10.33997/j.afs.2017.30.4.002>.
- NRC (National Research Council). 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. The National Academy Press, Washington DC, U.S.A.
- Nunes AJP, Sá MVC, Browdy CL and Vazquez-Anon M. 2014. Practical supplementation of shrimp and fish feeds with crystalline amino acids. *Aquaculture* 431, 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.003>.
- Palić D, Andreasen CB, Menzel BW and Roth JA. 2005. A rap-



- id, 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).
- Rawles SD, Thompson KR, Brady YJ, Metts LS, Aksoy MY, Gannam AL, Twibell RG, Ostrand S and Webster CD. 2011. Effects of replacing fish meal with poultry by-product meal and soybean meal and reduced protein level on the performance and immune status of pond-grown sunshine bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*). *Aquac Nutr* 17, 708-721. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00831.x>.
- 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).
- Salze GP and Davis DA. 2015. Taurine: A critical nutrient of future fish feeds. *Aquaculture* 437, 215-229. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.006>.
- 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 SM 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 meal worm *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>.
- 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).
- Soltan MA, Hanafy MA and Wafa MIA. 2008. Effect of replacing fish meal by a mixture of different plant protein sources in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) diets. *Global Veterinaria* 2, 157-164.
- 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 Relat Metab Disord* 20, 435-444.
- Tacon AGJ and Metian M. 2015. Feed matters: Satisfying the feed demand of aquaculture. *Rev Fish Sci Aquac* 23, 1-10. <https://doi.org/10.1080/23308249.2014.987209>.
- 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>.
- Whelan J and Fritsche K. 2013. Linoleic acid. *Adv Nutr* 4, 311-312. <https://doi.org/10.3945/an.113.003772>.
- Wu D, Xu H, Yang Y, Feng W, Han T and Wang J. 2022. Can taurine supplementation in a diet with soybean meal instead of fish meal improve the growth performance, feed utilization, and antioxidant capacity of spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*)?. *Water* 14, 3393. <https://doi.org/10.3390/w14213393>.
- Xu W, Xu L, Liu X, He S, Ji Y, Wang W and Wang F. 2021. An effective strategy for the production of lauric acid-enriched monoacylglycerol via enzymatic glycerolysis from black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae (BSFL) oil. *Appl Biochem Biotechnol* 193, 2781-2792. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03565-1>.