



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

박사학위논문

흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*) 사료  
내 곤충의 이용성에 관한 연구

제주대학교 대학원

해양생명과학과

신재형

2022년 2월

# 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*) 사료 내 곤충의 이용성에 관한 연구

지도교수 이 경 준

신 재 형

이 논문을 이학 박사학위 논문으로 제출함

2021년 12월

신재형의 이학 박사학위 논문을 인준함

심사위원장 이 봉 주 ① 이봉주

위 원 여 인 규 ① 여인규

위 원 이 경 준 ① 이경준

위 원 임 세 진 ① 임세진

위 원 송 진 우 ① 송진우

제주대학교 대학원

2021년 12월

A DISSERTATION  
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY

Studies on the utilization of insects in diets for Pacific white  
shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Jaehyeong Shin  
(Supervised by professor Kyeong-Jun Lee)

Department of Marine Life Science  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

December, 2021

# 목 차

ABSTRACT .....	iv
LIST OF FIGURES .....	vii
LIST OF TABLES .....	ix

## CHAPTER 1. Digestibility of insect meals for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and their performance for growth, feed utilization and immune responses

1.1 서론 .....	1
1.2 재료 및 방법 .....	3
1.3 결과 .....	13
1.4 고찰 .....	14

## CHAPTER 2. Replacing fish meal with black soldier fly larvae and mealworm larvae in diets of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

2.1 서론 .....	27
2.2 재료 및 방법 .....	28
2.3 결과 .....	35

2.4 고찰 .....	36
--------------	----

**CHAPTER 3. 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**

3.1 서론 .....	44
3.2 재료 및 방법 .....	45
3.3 결과 .....	53
3.4 결론 .....	54

**CHAPTER 4. Utilization of black soldier fly oil and mealworm oil in diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)**

4.1 서론 .....	65
4.2 재료 및 방법 .....	66
4.3 결과 .....	76
4.4 결론 .....	78

요 약 문 .....	93
참고문헌 .....	96
감사의 글 .....	110
<b>LIST OF PUBLICATION</b> .....	<b>111</b>

## ABSTRACT

Insects have recently become an attractive alternative protein and lipid source for the production of sustainable aquaculture feeds. In addition to their high protein levels, insects are also rich in lipids, minerals and vitamins that support growth of shrimp and fish. Insects have been found to possess antifungal and antibacterial properties. Compared to most protein sources, insects farmed under controlled conditions could be a more viable protein source than fish meal in aquaculture feeds. Insects are rich in essential amino acids making them highly desirable as an excellent protein source for aquaculture. Therefore, insects can be a promising protein source for the production of aquaculture feed. Several insect species used in fish feeds have also been reported to improve the immune response, antioxidant activity and disease resistance of aquatic animals. Nonetheless, very few studies have assessed the benefits of using insect meals as a protein source for shrimps. Therefore, this study was conducted to examine the potential use of the insects as protein and lipid sources for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) feed.

Study in Chapter 1 was conducted to examine digestibility of insect meals for Pacific white shrimp and their utilization as fish meal substitutes. The tested insect meals were meal worm, silk worm, black soldier fly, rice grasshopper, two-spotted cricket, dynastid beetle and white-spotted flower chafer. Apparent digestibility coefficients of the tested insect meals were 83–89% for protein, 91–98% for lipid, 84–90% for energy, 77–81% for dry matter, 28–36% for chitin, 76–96% for amino acids and 89–93% for fatty acids. The amino acid availability of the insect meals was high in taurine (93–96%), arginine (91–95%) and lysine (90–95%). Availability of fatty acids were 89–93% for saturated fatty acids, 90–93% for monounsaturated fatty acids and 88–93% for polyunsaturated fatty acids. For a feeding trial, a control diet was formulated using 27% tuna byproduct meal as a fish meal source and seven other diets were prepared replacing 10% tuna byproduct meal in the control diet with each insect meal (10%). Triplicate groups of shrimp (0.17 g) were fed the diets for 65 days. The growth performance

was significantly improved when the shrimp were fed black soldier fly or dynastid beetle included diet. Dietary supplementation of insect meals significantly improved non-specific immune responses and antioxidant enzyme activity in the shrimp.

Study in the Chapter 2 was conducted to partially replace fish meal with black soldier fly (BSF) or mealworm (MW) larvae in diets for Pacific white shrimp. A tuna by-product meal (27%) was used as fish meal in a control (Con) diet, which was replaced with 20%, 40%, or 60% BSF or MW, respectively. The shrimp (0.09 g) were randomly stocked in 28 acrylic tanks and quadruplicate groups per dietary treatment were fed one of the diets six times daily. After 57 days of the feeding trial, growth and feed utilization were significantly higher in shrimp fed BSF40 and BSF60 diets than those in shrimp fed Con diet. Phenoloxidase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and gene expression of crustin were significantly higher in shrimp fed BSF or MW diet than those in shrimp fed Con diet.

Study in Chapter 3 was conducted to determine the supplemental effects of two insect meals, MW and BSF, with high or low lipid levels in diets for Pacific white shrimp. Sardine and tuna by-product meals were used as the fish meal sources in a Con diet. The fish meals were replaced with MW, defatted MW (deMW), BSF or defatted BSF (deBSF), respectively. The shrimp (0.47 g) were stocked into 20 acryl tanks (215 L) and fed the diets six times a day. After 45 days of the feeding trial, the shrimp fed insect meals had significantly higher phenoloxidase and superoxide dismutase activities than the shrimp fed Con diet. The gene expressions of prophenoloxidase, crustin and penaeidine-3c in shrimp hepatopancrease were also higher in shrimp fed the insect diets, regardless of defatting than those in shrimp fed Con diet. The survival during a *Vibrio parahaemolyticus* challenge test was higher in shrimp fed the diets containing defatted insect meals than in shrimp fed Con diet.

In Chapter 4, we investigated the effects of dietary fish oil replacement with mealworm oil (MO) or black soldier fly oil (BO) for Pacific white shrimp. Cod liver oil was used as the fish oil source in a Con diet. The fish oil was replaced with MO or BO by 25, 50, 75 or 100%,

respectively. The shrimp (0.89 g) were stocked into 36 acryl tanks (215 L) and fed the diets six times a day. After 58 days of the feeding trial, the shrimp fed both insect oils had relatively higher growth performance and feed utilization than the shrimp fed Con diet. Phenoloxidase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities were increased by dietary insect oil supplementations. The survival during a *Vibrio parahaemolyticus* challenge test was higher in shrimp fed the diets containing both insect oils than in shrimp fed Con diet.

In summary, we investigated (1) the nutrient profile, ingredient digestibility and growth performance of domestic insect meals, (2) the optimum fish meal replacement level with black soldier fly and mealworm, (3) the effects of dietary supplementation of insect meal as a feed additive and (4) the dietary utilization of insect oils as a lipid source. We suggested that insects can be used as a promising ingredient for shrimp feed.

## LIST OF FIGURES

<b>Figure 1.</b> The tested seven insect meals and proximate composition analysis.....	3
<b>Figure 2.</b> Preparation of the experimental diets for Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ).....	4
<b>Figure 3.</b> The fecal collection from Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) and dried shrimp feces .....	5
<b>Figure 4.</b> Setting of the feeding trial and sampling the hemolymph from shrimp .....	6
<b>Figure 5.</b> Innate immune responses and antioxidant enzyme activities in shrimp hemolymph .....	7
<b>Figure 6.</b> Setting the feeding trial.....	29
<b>Figure 7.</b> Preparation of the experimental diets for Pacific white shrimp.....	30
<b>Figure 8.</b> The measurement of shrimp body weight.....	30
<b>Figure 9.</b> The preparation of experimental diets .....	46
<b>Figure 10.</b> The sampling the hemolymph and hepatopancreas from shrimp .....	48
<b>Figure 11.</b> The preparation of the bacteria for challenge test.....	50
<b>Figure 12.</b> Survival of Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) fed the experimental diets for 45 days during the challenge with <i>Vibrio parahaemolyticus</i> . The shrimp were immersed with <i>V. parahaemolyticus</i> suspension containing $2 \times 10^6$ colony forming unit/mL. The water in each tank was exchanged 6 h after immersion challenge. Triplicate groups of shrimp were fed one of the experimental diets three times a day during the challenge period. The experimental diets were prepared by replacing fish meal in the control diet (Con) with mealworm (MW), defatted MW (deMW), black soldier fly (BSF) or defatted BSF (deBSF) .	64

<b>Figure 13.</b> Preparation of experimental diets .....	67
<b>Figure 14.</b> Setting the feeding trial.....	68
<b>Figure 15.</b> Sampling the shrimp .....	68
<b>Figure 16.</b> Analyses of innate immune responses and antioxidant capacity .....	69
<b>Figure 17.</b> Analysis of qPCR.....	70
<b>Figure 18.</b> Challenge test.....	70
<b>Figure 19.</b> Relative gene expression of carnitine palmitoyl transferase-1 (A) and ATPase- $\alpha$ (B) in Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) fed the experimental diets for 58 days. The expression of three genes was normalized to $\beta$ -actin and expressed relative to control. Values are mean of quadruplicates, and different letters denote significant difference (P<0.05) .....	91
<b>Figure 20.</b> Survival of Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) fed the experimental diets for 58 days during the challenge with <i>Vibrio parahaemolyticus</i> . The shrimp emerged with <i>V. parahaemolyticus</i> suspension containing $2 \times 10^6$ colony forming unit/mL. The water was exchanged after 7 h of emulsion. Triplicate groups of shrimp were fed with one of the experimental diets three times a day during the challenge period. Values are mean of triplicate, and different letters denote significant difference (P<0.05). The experimental diets were prepared by replacement fish oil (control, Con) with mealworm oil (MO) or black soldier fly oil (BO) at each level, respectively (Con, MO25–100 or BSF25–100) .....	92

## LIST OF TABLES

<b>Table 1.</b> Nutrient compositions of the seven insect meals and tuna byproduct meal for Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ).....	9
<b>Table 2.</b> Dietary formulation and proximate composition of reference diet (% , dry matter) for Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ).....	10
<b>Table 3.</b> Nutrients compositions of reference diet (Ref) and test diet for Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ).....	11
<b>Table 4.</b> Formulation and proximate composition (% , dry matter) of the experimental diets for Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ).....	12
<b>Table 5.</b> Apparent digestibility coefficients (ADCs, %) of protein, lipid, energy, dry matter and chitin in reference (Ref) diet and insect meals for Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ).....	20
<b>Table 6.</b> Apparent digestibility coefficients (ADCs, %) of essential and non-essential amino acid in the tested insect meals for Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) .....	21
<b>Table 7.</b> Apparent digestibility coefficients (ADCs, %) of fatty acids in tested insect meals for Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ).....	22
<b>Table 8.</b> Growth performance, feed utilization and survival of Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) (initial body weight: $0.17 \pm 0.00$ g) fed the experimental diets for 65 days.....	23
<b>Table 9.</b> Whole-body proximate composition of Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) fed the experimental diets for 65 days (% , wet basis) .....	24
<b>Table 10.</b> Fatty acid composition of muscle of Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) fed the experimental diets for 65 days (% of lipid) .....	25

<b>Table 11.</b> Innate immune responses and antioxidant enzyme activities of Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) fed the experimental diets for 65 days .....	26
<b>Table 12.</b> Nutrient contents (% , dry matter) of black soldier fly (BSF), mealworm (MW) and tuna by-product meal (TM) for Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) .....	33
<b>Table 13.</b> Dietary formulation and proximate compositions (% , dry matter) of the experimental diets for Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ).....	34
<b>Table 14.</b> Growth performance and feed utilization of Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> fed the experimental diets for 57 days (initial body weight: 0.09 ± 0.00 g). The experimental diets were prepared by replacement fish meal with black soldier fly (BSF) and mealworm (MW) at each level, respectively (Con, BSF20, BSF40, BSF60, MW20, MW40 and MW60) .....	41
<b>Table 15.</b> Proximate composition of Pacific white shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> fed the experimental diets for 57 days (% of wet basis). The experimental diets were prepared by replacement fish meal with black soldier fly (BSF) and mealworm (MW) at each level, respectively (Con, BSF20, BSF40, BSF60, MW20, MW40 and MW60).....	42
<b>Table 16.</b> Immune response and anti-oxidation of Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) fed the experimental diets for 56 days. The experimental diets were prepared by replacement fish meal with black soldier fly (BSF) and mealworm (MW) at each level, respectively (Con, BSF20, BSF40, BSF 60, MW20, MW40 and MW60) ..	43
<b>Table 17.</b> Nutrient composition of the insect meals and fish meals for Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) .....	51
<b>Table 18.</b> Formulation and proximate composition (% , dry matter) of the experimental diets for Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ).....	52

**Table 19.** The cycl threshold (Ct) values of hepatopancrease for *Photorhabdus* insect-related (PirA) toxin-like gene levels in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at 0, 12, 96 h after *Vibrio parahaemolyticus* ( $2 \times 10^6$  colony forming unit/ml) infection challenge. The experimental diets were prepared by replacing fish meal in the control diet (Con) with mealworm (MW), defatted MW (deMW), black soldier fly (BSF) or defatted BSF (deBSF) ..... 59

**Table 20.** Innate immune response and anti-oxidant enzyme activity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets for 45 days. The experimental diets were prepared by replacing fish meal in the control diet (Con) with mealworm (MW), defatted MW (deMW), black soldier fly (BSF) or defatted BSF (deBSF)..... 60

**Table 21.** Growth performance, feed utilization and survival of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) (initial body weight,  $0.47 \pm 0.00$  g) fed the experimental diets for 45 days. The experimental diets were prepared by replacing fish meal in the control diet (Con) with mealworm (MW), defatted MW (deMW), black soldier fly (BSF) or defatted BSF (deBSF) ..... 61

**Table 22.** Proximate composition (% , wet basis) of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets for 45 days. The experimental diets were prepared by replacing fish meal in the control diet (Con) with mealworm (MW), defatted MW (deMW), black soldier fly (BSF) or defatted BSF (deBSF) ..... 62

**Table 23.** Fatty acid composition (% , lipid) of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) muscle fed the experiment diets for 45 days. The experimental diets were prepared by replacing fish meal in the control diet (Con) with mealworm (MW), defatted MW (deMW), black soldier fly (BSF) or defatted BSF (deBSF)

.....	63
<b>Table 24.</b> Proximate composition (% , dry matter) and fatty acid profile (% in lipid) of the fish oil (FO), mealworm oil (MO) and black soldier fly oil (BO) for Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ).....	72
<b>Table 25.</b> Formulation and proximate composition (% , dry matter) of the experimental diets for Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ). The experimental diets were prepared by replacement fish oil (control, Con) with mealworm oil (MO) or black soldier fly oil (BO) at each level, respectively (Con, MO25–100 or BSF25–100).....	73
<b>Table 26.</b> Fatty acid composition (% in lipid) of the experimental diets for Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ). The experimental diets were prepared by replacement fish oil (control, Con) with mealworm oil (MO) or black soldier fly oil (BO) at each level, respectively (Con, MO25–100 or BSF25–100).....	74
<b>Table 27.</b> Growth performance, feed utilization and survival of Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) (initial body weight: $0.89 \pm 0.00$ g) fed the experimental diets for 58 days. The experimental diets were prepared by replacement fish oil (control, Con) with mealworm oil (MO) or black soldier fly oil (BO) at each level, respectively (Con, MO25–100 or BSF25–100).....	75
<b>Table 28.</b> Proximate composition (% , wet basis) of Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) fed the experimental diets for 58 days. The experimental diets were prepared by replacement fish oil (control, Con) with mealworm oil (MO) or black soldier fly oil (BO) at each level, respectively (Con, MO25–100 or BSF25–100).....	82
<b>Table 29.</b> Fatty acid profile (% in lipid) of Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) of muscle fed the experimental diets for 58 days. The experimental diets were	

prepared by replacement fish oil (control, Con) with mealworm oil (MO) or black soldier fly oil (BO) at each level, respectively (Con, MO25–100 or BSF25–100) ..... 83

**Table 30.** Fatty acid profile (% in lipid) of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) of hepatopancreas fed the experimental diets for 58 days. The experimental diets were prepared by replacement fish oil (control, Con) with mealworm oil (MO) or black soldier fly oil (BO) at each level, respectively (Con, MO25–100 or BSF25–100).. 84

**Table 31.** Innate immune responses and anti-oxidant enzyme capacity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets for 58 days. The experimental diets were prepared by replacement fish oil (control, Con) with mealworm oil (MO) or black soldier fly oil (BO) at each level, respectively (Con, MO25–100 or BSF25–100) ..... 85

**Table 32.** The concentration of cholesterol, triglycerides, total protein and glucose in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemolymph fed the experimental diets for 58 days. The experimental diets were prepared by replacement fish oil (control, Con) with mealworm oil (MO) or black soldier fly oil (BO) at each level, respectively (Con, MO25–100 or BSF25–100) ..... 86

**Table 33.** The cycle threshold (Ct) values of hepatopancrease of *Litopenaeus vannamei* at 6, 12 and 72 h after *Vibrio parahaemolyticus* ( $2 \times 10^6$  colony forming unit/mL) infection challenge. The experimental diets were prepared by replacement fish oil (control, Con) with mealworm oil (MO) or black soldier fly oil (BO) at each level, respectively (Con, MO25–100 or BSF25–100) ..... 87

**Table 34.** Apparent digestibility coefficients (ADC, %) of protein, lipid, energy and dry matter in experimental diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The experimental diets were prepared by replacement fish oil (control, Con) with

mealworm oil (MO) or black soldier fly oil (BO) at each level, respectively (Con, MO25–100 or BSF25–100).....	88
<b>Table 35.</b> Apparent digestibility coefficients (ADCs, %) of fatty acids in tested insect meals for Pacific white shrimp ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) .....	89
<b>Table 36.</b> The cycle threshold (Ct) values of hepatopancrease of <i>Litopenaeus vannamei</i> at 6, 12 and 72 h after <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ( $2 \times 10^6$ colony forming unit/mL) infection challenge. The experimental diets were prepared by replacement fish oil (control, Con) with black soldier fly oil (BO) or mealworm oil (MO) at each level, respectively (Con, BO25–100 or MO25–100).....	90

## CHAPTER 1.

# Digestibility of insect meals for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and their performance for growth, feed utilization and immune responses

### 1.1 서론

곤충박(insect meals)은 단백질과 지질의 함량이 높고, 새우와 어류의 성장에 필요한 비타민, 미네랄이 풍부하게 함유하고 있어, 새로운 사료 원료로 주목 받고 있다(Nogales-Mérida et al., 2019; Sánchez-Muros et al., 2020). 곤충은 음식물 찌꺼기 혹은 농업부산물 등을 질 좋은 비료로 만들어 낼 수 있고, 항균 물질을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다(van Huis, 2013; Jozefiak and Engberg, 2017). 일반적으로 곤충은 50-80%의 조단백질을 함유하고 있으며, 종과 사육환경이 체조성에 큰 영향을 미치는 것으로 보고되었다(Sánchez-Muros et al., 2014). 곤충은 다른 단백질원료에 비해 생산하기 쉽고, 쌀겨와 같은 여러 부산물을 먹이로 활용할 수 있어 양식 사료 분야에 새로운 어분 대체원료로써 그 이용가치가 높다(Nogales-Mérida et al., 2019). 곤충박은 양식생물의 필수아미노산이 적절하게 함유되어 있을 뿐만 아니라 식물성 원료에 결핍되어 있는 타우린과 hydroxyproline의 함량이 높은 것으로 보고되었다(Makkar et al., 2014). 최근 연구에서 양어사료 내 어분 대체원료로써 곤충박을 이용할 경우, 어류의 비특이적 면역력, 항산화력, 질병저항성 증진에 도움을 줄 수 있다고 보고되었다(Nogales-Mérida et al., 2019). 그러나, 새우를 대상으로 곤충박의 이용성을 평가한 연구는 미흡한 실정이다.

곤충은 절지동물문(Arthropoda phylum)을 대표하는 생물로써, 현재까지 지구상에 약 100만 종이 넘는 종이 서식하는 것으로 알려져 있다(Erwin, 2004). 그러나 그 중 극히 일부만 상업적인 목적으로 사육되고 있다. 장수풍뎡이(dynastid beetle, DB) (*Allomyrina dichotoma*)는 장수풍뎡이아과(rhinoceros beetle)에 속하는 종으로, 유충 시기에는 대부분을 땅 속에서 생활하는 것으로 알려져 있다(Suh et al., 2010). 장수풍뎡이는 동아시아에 서식하며, 여러 질병에 대한 치료에 사용되어 왔다(Kim et al., 2016). 벼메뚜기(rice grasshopper, RG) (*Oxya chinensis*)는 벼와 같이 특정 식물만 먹는 해충으로, 오랜 기간 동안 아시아 지역에서 음식으로 이용되어 왔다(Cui et al., 2019; Ghosh et al., 2017). 동애등애(black soldier fly, BSF) (*Hermetia illucens*)는 동애등애과(Stratiomyidae)에 속하는 곤충으로 유충시기에는 음식물 찌꺼기와 농업부산물 등을 섭취할 수 있다고 알려져 있다(Wang and Shelomi, 2017). 흰점박이꽃무지(white-spotted flower chafer, WFC) (*Protaetia brevitarsis*)는 풍뎡이과(Scarabaeidae)에 속하는 곤충으로, 향균물질을 함유하고 있어 동아시아 지역에서 약으로 사용되고 있다(Lee et al., 2017; Wang et al., 2019). 갈색거저리(meal worm beetle, MW) (*Tenebrio molitor*)는 여러 농산물에서 발견되며, 세대주기와 먹이를 고려 하였을 때 상업용으로 사용하기 가장 적합한 종으로 알려져 있다(Rumbos et al., 2020). 쌍별귀뚜라미(two-spotted cricket, TSC) (*Gryllus bimaculatus*)는 특정한 시기에 발생하는 해충으로, 오래 전부터 약재로 사용되어 왔다(Hwang et al., 2019).

소화율은 특정 원료의 안전성과 그 이용성을 검증할 수 있는 가장 중요한 수단으로 알려져 있다(NRC, 2011). 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)는 성장이 빠르고, 다른 새우류에 비해 질병저항성이 비교적 강해 전세계에서 다량 양식되고 있는 종이다(FAO, 2020). 그러나, 특정 원료에 대한 흰다리새우의 소화율에 관한 연구는 매우 미흡한 실정이다. 따라서, 이번 연구에서는 위에서 언급한 7종의 곤충

박에 대한 흰다리새우의 소화율과 사료 내 어분대체원으로써의 이용성을 평가하였다.

## 1.2 재료 및 방법

### 1.2.1 실험원료와 실험사료

흰다리새우 사료 내 국산 곤충박의 이용성을 평가하기 위해 총 7종의 곤충을 선정하였다. 선정된 곤충은 갈색거저리 유충, 누에, 동애등에, 벼메뚜기, 쌍별귀뚜라미, 장수풍뎅이, 흰점박이꽃무지 유충으로, 모두 국내 기업 또는 농가에서 생산된 제품을 실험에 사용하였다. 곤충박의 일반성분, 아미노산, 지방산, 키틴의 함량을 분석하였다(Fig. 1 & Table 1). 곤충박의 조단백질(42–74%), 조지질(6.2–31%), 조회분(3.61–18.7%)의 함량은 원료에 따라 큰 차이를 보였다. 곤충박 내 필수아미노산 분석결과 7가지 곤충박 종류에 따른 아미노산 함량의 큰 차이는 관찰되지 않았다. 곤충박의 지방산 함량은 불포화 지방산인 oleic acid (C18:1)와 linoleic acid (C18:2)가 높게 나타났고, eicosapentaenoic acid (EPA)와 docosahexaenoic acid (DHA)는 BSF와 WFC에서 소량 검출되었다. 키틴의 함량은 원료 내 3.11–10.6%로 나타났다. 곤충박 내 영양소의 함량은 곤충의 종류에 따라 차이를 보였다.



**Figure 1.** The tested seven insect meals and proximate composition analysis

사육실험에 앞서, 선정된 7종의 곤충박에 대한 흰다리새우의 소화율을 평가하고자 소화율 실험을 실시하였다. 소화율 평가에 사용된 reference 사료의 조성은 Table 2에 나타내었다. Reference 사료의 주 단백질원으로 어분과 대두박이

사용되었고, 조단백질과 지질의 함량은 흰다리새우의 요구량을 충족시키도록 구성하였다. 모든 사료원은 파쇄기로 분쇄한 후 사용되었다. 실험사료는 reference 사료와 곤충박 원료를 7:3 비율로 혼합되었다. 지시제(indicator)는 산화크롬(chromium oxide, Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)이 사료 내 1% 사용되었다. 실험사료는 펠릿사료 제조기(SP-50, Gunmgang Engineering, Daegu, Korea)를 이용하여 총 2 가지 크기(1, 2 mm)로 제조하였다. 완성된 실험사료는 건조 후(24 h, 20°C), 사료공급 전까지 냉동(-20°C) 보관하였다. 완성된 사료의 영양소 함량은 Table 3 에 나타내었다.

사육실험에서는 총 8가지 실험사료를 이용하였다. 실험사료는 어분과 대두박을 주요 단백질원으로 배합된 대조사료와 7종의 곤충박을 이용하여 대조사료 내 어분을 37%(사료 내 10%) 대체한 7가지 실험사료가 사육실험에 사용되었다 (Table 4). 실험사료는 사료조성표에 따라 각각의 원료를 측량하여 혼합한 후, 혼합물 중량의 12%에 해당하는 양의 증류수와 어류를 첨가하였다(Fig. 2). 혼합물은 소형 사료제조기(SP-50, Gunmgang Engineering, Daegu, Korea)를 이용하여 1-2 mm 크기의 펠릿 형태의 사료로 성형하였다. 완성된 사료는 건조(25°C, 11 h)후 사용 전까지 냉동보관(-25°C) 하였다.



**Figure 2.** Preparation of the experimental diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

### 1.1.2 분수집

흰다리새우는 제주대학교 동물실험윤리위원회의 동물생명윤리 규정을 준수하며 실험에 이용 하였다. 원료소화율 평가는 새우 종묘장(제주도 소재 탐라새우)에서 인공부화된 흰다리새우를 사용하였다. 흰다리새우는 3주 동안 배합사료를 공급하면서 실험 환경에 적응 할 수 있도록 순치시킨 후 사용하였다. 흰다리새우(평균무게: 7.15 g)는 총 8개의 수조(210 L)에 각 35마리씩 배치하였다. 수조 내 용존산소는 공기발생기(aeration)를 이용하여 일정 수준으로 유지하였다. 실험 기간 내 평균 사육수온은 27.8°C, 용존산소는 5.04 mg/L으로 측정되었다. 실험사료는 새우체중의 6-8%를 1일 2회(08:30, 15:00 h)에 나누어 공급되었다. 새우의 분(feces)은 1일 2회(10:00, 17:00 h)에 걸쳐 Pasteur-pipette을 이용하여 21일 동안 수집하였다(Fig. 3). 수집된 분은 각 7일씩 3개의 반복구로 나누어 분석에 사용하였다.



**Figure 3.** The fecal collection from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and dried shrimp feces

### 1.1.3 사육실험 관리와 sampling

흰다리새우는 제주대학교 동물실험윤리위원회의 동물생명윤리 규정을 준수하며 실험에 이용 하였다. 실험새우는 제주도에 위치한 새우종묘장에서 구매하였고, 적정크기까지 성장하도록 사육하였다. 사육실험에 사용된 실험새우는 평균무게 0.17 g 내외의 흰다리새우를 30마리씩 총 24개의 전용수조(215 L)에 무작위로 배치되었다(Fig. 4). 실험사료는 새우체중의 5-15%를 1일 5회(08:30, 11:30, 14:00, 16:30, 19:00 h)에 나누어 65일간 공급되었다. 실험기간 동안 사육수 내 용존산소는

5.04 mg/L, 수온은 27.8°C, 염분은 31‰, pH는 7.82, 암모니아 농도는 0.041 mg/L 수준으로 유지되었다. 실험새우의 최종무게는 실험 종료 후 측정되었고, 측정 12시간 전부터 사료공급을 중단하였다. 수조 당 8 마리의 실험새우를 얼음물로 마취시켜 hemolymph를 채취하였다. Hemolymph는 원심분리 후 냉동보관(-80°C) 하였다. 전하체는 일반성분분석을 위해 냉동보관(-20°C) 하였다.



**Figure 4.** Setting of the feeding trial and sampling the hemolymph from shrimp

실험새우의 성장률과 사료전환효율 관련 항목의 계산식은 다음과 같다.

- (1) 성장률(weight gain, WG, %) =  $100 \times (\text{final mean body weight} - \text{initial mean body weight}) / \text{initial mean body weight}$
- (2) 일간성장률(specific growth rate, SGR, %) =  $[(\log_e \text{ final body weight} - \log_e \text{ initial body weight}) / \text{days}] \times 100$
- (3) 사료전환효율(feed conversion ratio, FCR) =  $\text{dry feed fed} / \text{wet weight gain}$
- (4) 단백질이용효율(protein efficiency ratio, PER) =  $\text{wet weight gain} / \text{total protein given}$
- (5) 사료섭취량(feed intake, FI, g) =  $\text{dry feed fed} / \text{shrimp}$ .

#### 1.1.4 분석방법

실험사료와 분 내 산화크롬의 함량은 Divakaran et al. (2002)의 방법을 토대로 분

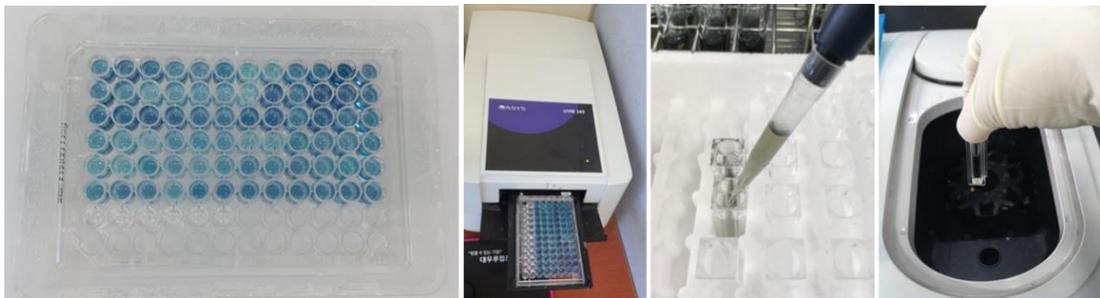
석되었다. 각 사료에 대한 소화율은 Pond et al. (1995)의 방법에 따라 다음과 같이 계산하였다.

Apparent digestibility coefficients (ADCs, %) = 100 - [% indicator in diet / % indicator in feces × % nutrient in feces / % nutrient in diet X 100]

각 곤충박의 원료소화율은 reference 사료와 원료의 혼합비율(7:3)을 이용하여, Cho et al. (1982)의 방법에 따라 계산하였다.

ADCs (%) = (100/30) × {ADC of test diet - [(70/100) × ADC of reference diet]}

실험사료, 분(feces), 새우의 일반성분은 AOAC (2005) 방법에 따라 분석되었다. Chitin의 함량은 Song et al. (2018)의 방법에 따라 측정되었다. 아미노산은 Rosen et al. (1957)의 방법을 기초로 아미노산분석기(S433, Sykam GmbH, Fuerstenfeldbruck, Germany)를 이용하여 측정되었다. 지방산은 Garces and Mancha (1993)의 방법에 따라, gas chromatography (6800GC, Agilent, San Francisco, USA)를 이용하여 분석되었다.



**Figure 5.** Innate immune responses and antioxidant enzyme activities in shrimp hemolymph

사육수의 암모니아 농도는 Strickland and Parsons (1972)의 방법에 따라 분석되었다. Hemolymph의 glutathione peroxidase (GPx)와 superoxide dismutase (SOD) 활성은 각각 kit (K762-100, Biovision, San Francisco, USA; 19160, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 이용하여 분석되었다. Phenoloxidase (PO)와 대식세포(nitro-blue tetrazolium, NBT) 활성은 각각 Hernández-López et al. (1996)과 Zhang et al. (2013)의 방법에 따라 분석되었다(Fig. 5).

### 1.1.5 통계학적 분석

분석결과는 SPSS (Version 12.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석 되었다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's multiple test를 사용하여 평균간의 유의성( $P < 0.05$ )을 비교하였다. 데이터는 평균값±표준편차(mean± standard deviation, SD)로 나타내었다. 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석하였다.

**Table 1.** Nutrient compositions of the seven insect meals and tuna byproduct meal for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Nutrient contents	Ingredients							
	DB	RG	BSF	WFC	MW	TSC	SW	TM
<i>Proximate composition (% dry matter)</i>								
Crude protein	51.5	73.8	41.7	53.1	47.5	60.8	42.7	65.0
Crude lipid	22.9	6.19	17.4	17.6	30.8	20.1	7.53	9.24
Crude ash	3.61	7.76	18.7	4.17	4.27	4.99	11.5	15.4
Moisture	6.46	1.95	4.39	4.46	7.07	9.46	4.15	7.00
<i>Essential amino acids (% protein)</i>								
Methionine	0.30	0.16	0.27	0.30	0.23	0.27	0.26	1.35
Lysine	6.24	5.84	5.93	5.93	5.83	5.75	5.75	5.89
Arginine	4.74	6.58	5.36	4.22	5.23	6.71	5.02	4.71
Histidine	6.39	6.09	8.38	7.06	7.84	5.91	4.01	3.15
Isoleucine	5.39	4.79	4.78	4.44	5.00	4.74	4.50	3.64
Leucine	7.57	8.43	7.23	6.15	7.92	8.19	6.42	5.79
Phenylalanine	4.13	3.42	3.96	4.63	4.25	3.76	4.35	3.09
Threonine	4.33	3.89	4.15	4.16	4.12	3.96	4.18	3.42
Valine	6.83	6.93	6.70	5.61	7.09	6.84	5.66	4.11
EAA/NAA <sup>1</sup>	0.85	0.85	0.88	0.74	0.99	0.85	0.67	0.54
<i>Fatty acids (% lipid)</i>								
C12:0	-	-	23.2	-	0.41	-	-	0.10
C16:0	38.1	8.80	19.0	13.1	16.7	18.3	23.5	40.3
C18:0	1.93	15.4	4.82	1.30	-	5.26	11.3	10.9
C18:1n-9	48.9	21.3	23.4	60.3	43.4	28.9	26.3	4.50
C18:2n-6	2.70	16.2	16.3	7.82	31.7	36.1	6.81	0.30
C18:3n-3	-	33.5	2.18	0.30	1.36	9.60	29.5	0.30
C20:5n-3	-	-	1.32	0.10	-	-	-	12.2
C22:6n-3	-	-	0.26	-	-	-	-	7.90
∑SFA <sup>2</sup>	41.0	29.0	52.8	15.9	21.5	24.7	36.4	66.6
∑MUFA <sup>3</sup>	56.2	21.3	26.0	75.8	45.6	29.6	27.3	9.60
∑PUFA <sup>4</sup>	2.87	49.7	20.3	8.38	33.1	45.7	36.3	21.8
∑PUFA n-3 <sup>5</sup>	0.00	33.5	3.76	0.40	1.36	9.60	29.5	20.4
∑PUFA n-6 <sup>6</sup>	2.87	16.2	16.6	7.98	31.7	36.1	6.81	1.40
n-3/n-6	0.00	2.07	0.23	0.05	0.04	0.27	4.33	14.6
<i>Chitin</i>	9.83	10.6	5.11	6.29	3.24	6.53	4.93	-

Ingredients are abbreviated as: dynastid beetle (DB), rice grasshopper (RG), black soldier fly (BSF), white-spotted flower chafer (WFC), mealworm (MW), two-spotted cricket (TSC), silkworm (SW) and tuna byproduct meal (TM).

<sup>1</sup>Essential amino acid/non-essential amino acids.

<sup>2</sup>Sum of saturated fatty acids.

<sup>3</sup>Sum of monounsaturated fatty acids.

<sup>4</sup>Sum of polyunsaturated fatty acids.

<sup>5</sup>Sum of n-3 polyunsaturated fatty acids.

<sup>6</sup>Sum of n-6 polyunsaturated fatty acids.

**Table 2.** Dietary formulation and proximate composition of reference diet (% , dry matter) for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

<b>Ingredients</b>	<b>g/kg</b>
Tuna by-product meal (60% CP) <sup>1</sup>	250.0
Soy bean meal (47% CP)	200.0
Squid liver meal (45% CP)	50.0
Wheat flour <sup>2</sup>	317.0
Starch	70.0
Cod liver oil <sup>3</sup>	30.0
Mineral premix <sup>4</sup>	20.0
Vitamin premix <sup>5</sup>	10.0
Mono-calcium phosphate	30.0
Lecithin <sup>6</sup>	10.0
Cholesterol	3.0
Chromium oxide <sup>7</sup>	10.0
<i>Proximate composition</i>	
Crude protein	319.0
Crude lipid	78.9
Crude ash	125.0

<sup>1</sup>60% crude protein, Woogin Feed Industry Co. Ltd., Incheon, Korea.

<sup>2</sup>Deahan Flour Co. Ltd., Incheon, Korea.

<sup>3</sup>E-wa oil & fat Industry Corp., Busan, Korea.

<sup>4</sup>Mineral premix contains (1 kg) 80 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 370 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 130 g KCl, 40 g Ferric citrate, 20 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 356.64 g Ca-lactate, 0.2 g CuCl, 0.15 g AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.01 g Na<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 2 g MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O and 1 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O.

<sup>5</sup>Vitamin premix contains (1 kg) 121 g L-ascorbic acid, 19 g DL- $\alpha$  tocopheryl acetate, 2.7 g thiamin hydrochloride, 9.1 g riboflavin, 1.8 g pyridoxine hydrochloride, 36 g niacin, 12.7 g Ca-D-pantothenate, 182 g myo-inositol, 0.27 g D-biotin, 0.68 g folic acid, 18 g p-aminobenzoic acid, 1.8 g menadione, 0.73 g retinyl acetate, 0.003 g cholecalciferol, 0.003 g cyanocobalamin and 594 g starch.

<sup>6</sup>Lysoforte™ Dry, KEMIN Korea Co. Ltd., Seongnam, Korea.

<sup>7</sup>DaeJung Chemicals & Metals Co. Ltd., Siheung, Korea.

**Table 3.** Nutrients compositions of reference diet (Ref) and test diet for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Nutrient contents	Test diets (70% reference diet + 30% test ingredient)							
	Ref	DB	RG	BSF	WFC	MW	TSC	SW
Proximate composition (%)								
Dry matter	94.4	94.7	94.2	94.4	94.6	94.9	94.9	94.4
Crude protein	31.9	39.7	45.4	36.4	40.8	38.7	42.5	37.4
Crude lipid	7.89	13.9	9.74	11.0	12.3	12.6	14.0	9.47
Crude ash	12.5	10.0	11.0	14.0	10.1	10.7	10.3	12.4
Gross energy (kJ/g)	16.3	18.0	16.9	16.7	17.6	17.6	17.9	16.6
Amino acids (%)								
Methionine	0.65	0.77	0.87	0.69	0.79	0.72	0.83	0.69
Lysine	1.39	1.94	2.17	1.83	1.76	1.75	1.80	1.53
Arginine	2.15	2.81	3.59	2.82	2.79	3.04	3.01	2.68
Histidine	0.79	1.00	1.08	1.01	1.08	0.93	0.99	0.91
Isoleucine	1.29	1.68	1.83	1.51	1.55	1.54	1.70	1.47
Leucine	2.36	2.87	3.49	2.71	2.87	2.85	3.27	2.70
Phenylalanine	1.47	1.79	1.87	1.63	1.83	1.63	1.77	1.69
Threonine	1.32	1.69	1.93	1.59	1.75	1.57	1.79	1.63
Valine	1.48	2.00	2.27	1.88	1.92	1.93	2.20	1.81
Fatty acids (%)								
C12:0	0.00	0.00	0.19	1.08	0.00	0.00	0.00	0.00
C14:0	0.20	0.32	0.19	0.40	0.14	0.36	0.16	0.17
C16:0	1.82	3.05	1.88	2.46	2.30	2.43	2.84	2.17
C16:1	0.25	0.42	0.24	0.30	0.86	0.30	0.24	0.21
C18:0	0.72	1.04	1.01	0.92	0.73	0.83	1.13	0.98
C18:1n-9	2.27	4.53	2.84	3.22	5.34	4.82	4.29	3.04
C18:2n-6	1.69	3.02	1.90	1.93	2.21	3.20	3.90	1.66
C18:3n-3	0.30	0.50	1.01	0.35	0.42	0.27	1.01	0.86
C20:5n-3	0.19	0.31	0.15	0.14	0.10	0.13	0.13	0.11
C22:6n-3	0.44	0.70	0.34	0.20	0.19	0.28	0.29	0.27
Chitin (%)	0.00	1.31	1.04	0.85	1.85	2.00	0.69	2.18

Test diets are abbreviated as: dynastid beetle (DB), rice grasshopper (RG), black soldier fly (BSF), white-spotted flower chafer (WFC), mealworm (MW), two-spotted cricket (TSC) and silkworm (SW).

**Table 4.** Formulation and proximate composition (% dry matter) of the experimental diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Ingredients	Experimental diets							
	FM	DB	RG	BSF	WFC	MW	TSC	SW
FM	27.0	17.0	17.0	17.0	17.0	17.0	17.0	17.0
DB	-	10.0	-	-	-	-	-	-
RG	-	-	10.0	-	-	-	-	-
BSF	-	-	-	10.0	-	-	-	-
WFC	-	-	-	-	10.0	-	-	-
MW	-	-	-	-	-	10.0	-	-
TSC	-	-	-	-	-	-	10.0	-
SW	-	-	-	-	-	-	-	10.0
Casein	0.70	2.60	0.00	4.20	2.40	2.90	1.50	4.10
Soybean meal	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
Squid liver meal	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Starch	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Wheat flour	23.1	23.2	23.8	19.6	23.1	23.9	23.3	19.7
Soybean oil	2.00	1.00	2.00	1.50	1.15	0.50	1.50	2.00
Cod liver oil	2.00	1.00	2.00	1.50	1.15	0.50	1.50	2.00
Mineral mixture <sup>1</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Vitamin mixture <sup>2</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Lecithin <sup>3</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cholesterol	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Mono-calcium phosphate	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
<i>Proximate composition</i>								
Crude protein	38.5	38.5	38.7	38.3	38.2	38.5	38.9	38.7
Crude lipid	9.62	9.03	9.33	9.30	9.42	9.80	9.71	9.34
Crude ash	11.4	9.79	10.0	11.3	9.16	10.0	9.75	10.7

Experimental diets are abbreviated as: fish meal (FM), dynastid beetle (DB), rice grasshopper (RG), black soldier fly (BSF), white-spotted flower chafer (WFC), mealworm (MW), two-spotted cricket (TSC) and silkworm (SW).

<sup>1</sup>Mineral premix contains (1 kg) 80 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 370 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 130 g KCl, 40 g Ferric citrate, 20 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 356.64 g Ca-lactate, 0.2 g CuCl, 0.15 g AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.01 g Na<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 2 g MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O and 1 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O.

<sup>2</sup>Vitamin premix contains (1 kg) 121 g L-ascorbic acid, 19 g DL- $\alpha$  tocopheryl acetate, 2.7 g thiamin hydrochloride, 9.1 g riboflavin, 1.8 g pyridoxine hydrochloride, 36 g niacin, 12.7 g Ca-D-pantothenate, 182 g myo-inositol, 0.27 g D-biotin, 0.68 g folic acid, 18 g p-aminobenzoic acid, 1.8 g menadione, 0.73 g retinyl acetate, 0.003 g cholecalciferol, 003 g cyanocobalamin and 594 g starch.

## 1.2 결과

21일간 진행된 분수집 결과, 곤충박의 단백질 소화율은 83-89%로 나타났다 (Table 5). DB가 89%로 가장 높았고, RG, BSF, WFC, MW, TSC, SW 순으로 낮았다. 곤충박의 지질 소화율은 91-98%로 대체로 높았다. 지질소화율 또한 DB가 가장 높았고, MW, BSF, TSC, RG, WFC, SW 순으로 낮았다. 곤충박의 에너지 소화율은 84-90%로 나타났다. DB가 90%로 가장 높았고, MW, RG, BSF, TSC, WFC, SW 순으로 낮았다. 건물소화율은 77-81%로 나타났다. 키틴 소화율은 28-36%로 측정되었고, BSF가 36%로 가장 높았다. 아미노산 소화율의 경우에는 DB구가 methionine을 제외한 아미노산 소화율이 모든 실험구 중에 가장 높았다(Table 6). RG의 methionine 소화율이 실험구 중에 가장 높았다. SW구는 methionine, leucine, lysine, phenylalanine, threonine 소화율이 모든 실험구 중에 가장 낮았다. 흥미롭게도 모든 곤충박 실험구의 taurine, arginine, lysine 소화율은 각각 93-96%, 91-95%, 90-95%로 높았다. 지방산 소화율의 경우에는 포화지방산(saturated fatty acids, SFA)이 89-93%, 단일불포화지방산(monounsaturated fatty acids, MUFA)이 90-93%, 다중불포화지방산(polyunsaturated fatty acids, PUFA)이 88-93%로 측정되었다(Table 7).

65일 동안 진행된 사육실험 결과, 실험새우의 최종평균무게와 일간성장률은 BSF구와 DB구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다(Table 8). 두 실험구를 제외한 곤충박 실험구의 성장률은 9.69-10.3 g으로 대조구(8.56 g)와 비교하여 높은 경향을 보였다. 사료전환효율은 WFC와 SW구를 제외한 곤충박 실험구가 1.36-1.50으로 대조구(1.56)에 비해 낮은 경향을 보였다. 단백질이용효율은 DB, BSF, MW구가 1.83-1.92로 대조구(1.75)와 비교하여 높은 경향을 나타냈다. 사료섭취량은 MW구를 제외한 곤충박 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. 생존율은 모든 실험구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 실험새우의 일반성분 함량은 조단

백질, 조지질, 조회분, 수분 모두 실험구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table 9). 실험새우의 지방산 함량은 DB, WFC, MW구의 단일불포화지방산의 함량이 대조구에 비해 높은 경향을 보였다(Table 10). 곤충박 실험구의 omega-3와 omega-6의 함량은 대조구에 비해 낮은 경향을 보였다. 실험새우의 hemolymph 내 PO 활성은 BSF, WFC, MW구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다(Table 11). GPx의 활성은 DB, BSF, MW, SW구가 대조구와 비교하여 유의적으로 높았다. NBT 활성은 WFC, MW, TSC, SW구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. SOD의 활성은 모든 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다.

### 1.3. 고찰

이번 실험에서는 여러 곤충박에 대한 흰다리새우의 소화율을 처음으로 규명하였다. 곤충박 소화율은 단백질이 83-89%, 지질이 91-98%, 에너지가 84-90%, 건물이 77-81%, 아미노산이 76-96%, 지방산이 89-98%로 나타났다. Panini et al. (2017a)은 흰다리새우의 MW 소화율은 단백질이 76.1%, 에너지가 66.5%, 건물이 72-86%, 아미노산이 72-86%라고 보고하였다. DB구는 단백질(84-92%), 지질(92%), 에너지(87-97%)소화율이 다른 곤충에 비해 가장 높게 나타났다. 곤충박의 지질 소화율은 앞서 보고된 어분에 대한 소화율보다 비교적 높았다(Yang et al., 2009; Terrazas-Fierro et al., 2010; Liu et al., 2013). 식물성 원료에서 가장 흔하게 결핍되는 lysine과 methionine의 소화율은 각각 84-92%, 87-97%로, 어분과 유사한 결과를 보였다(Yang et al., 2009; Liu et al., 2013). 흥미롭게도 taurine 소화율은 모든 곤충박에서 높았고, taurine은 식물성 원료에 결핍되거나 매우 낮은 양이 함유되어 있기 때문에 곤충박 이용에 따른 또 다른 장점이 될 수 있다. 이번 연구에서 곤충박에 대한

흰다리새우의 소화율은 앞서 연구된 여러 동·식물성 원료에 비해 비교적 높았다. 소화율 결과를 통해 곤충박은 새우 사료에 충분히 사용가능 할 뿐만 아니라 식물성 원료에 부족한 필수영양소의 함량과 그 소화율이 높아, 사료 내 단백질원으로써의 이용가능성이 높다고 판단된다.

이번 연구에서 곤충박 내 키틴의 소화율은 28-36%로 다른 영양소에 비해 낮았다. 키틴은 polysaccharide의 일종으로 곤충의 외골격의 구성성분으로 알려져 있다(Nogales-Mérida et al., 2019). Clark et al. (1993)은 새우를 대상으로 갑각류에서 추출한 키틴의 소화율을 측정한 결과, 흰다리새우(17 g)가 36%, Atlantic white shrimp (*L. setiferus*) (35 g)가 33%, pink shrimp (*Farfantepenaeus duorarum*)가 52%라고 보고하였다. 키틴에 대한 흰다리새우의 소화율이 낮은 이유는 체내에서 키틴분해효소인 chitinase가 제한적으로 분비되기 때문이라고 생각된다. Rocha et al. (2012)은 흰다리새우의 간체장에서 두 종의 chitinase isoenzyme을 검출했다고 보고하였다. Tzuc et al. (2014)은 흰다리새우의 소화관에서 chitinase를 분비하는 미생물이 존재함을 확인하였고, 이를 통해 사료 내 chitin의 소화에 해당 효소가 관여한다고 보고하였다. 따라서, chitin은 새우의 소화관 존재하는 chitinase에 의해 부분적으로 소화되었다고 판단된다. Chitin은 곤충 체내에 존재하는 생리활성 물질로 알려져 있다. 갑각류에서 추출된 chitin을 사료에 첨가할 경우, black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) (Akiyama et al., 1992)와 giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) (Shiau and Yu, 1998)의 성장과 *Vibrio alginolyticus*에 대한 shore crab (*Carcinus maenas*) (Powell and Rowley, 2007)의 질병저항성, *P. monodon*의 항산화능(Niu et al., 2013)을 증진시킨다고 보고되었다. 곤충에서 추출된 chitin의 구조는 갑각류 chitin와 유사하며, 일부 곤충 chitin의 경우에는 chitinase에 의한 분해도가 갑각류 chitin에 비해 높다고 보고되었다(Zhang et al., 2000). Henry et al. (2018)은 사료에 단백질원으로 곤충박을

이용할 경우, European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)의 비특이적 면역력을 증진시키며, 곤충 내 chitin의 면역증진 효과가 이에 기여하였다고 보고하였다. 이번 실험에서도 곤충에 함유되어 있는 chitin이 새우의 면역력 증진에 직·간접적으로 도움을 주었다고 판단된다. 그러나, 사료에 chitin을 10%이상 다량 첨가할 경우에는 *P. monodon*의 성장과 사료계수, 단백질과 지질 소화율을 저하 시킨다고 보고되어 (Shiau and Yu, 1998), 이에 대한 주의가 요구된다.

이번 실험에서 사료 내 어분을 각 곤충박을 이용하여 부분적으로 대체할 경우에 새우의 성장을 증진시키는 것으로 나타났다. Cummins et al. (2017)은 동태등에 분말은 흰다리새우(1.2-16 g) 사료 내 어분을 25%까지 대체할 수 있다고 보고하였다. Motte et al. (2019)은 사료 내 어분을 탈지 갈색거저리 분말로 50% 대체할 경우, 흰다리새우의 성장과 사료계수를 증진시킨다고 보고하였다. 탈지 처리를 하지 않은 갈색거저리 분말 또한 아무런 악영향 없이 흰다리새우 사료 내 어분을 50%까지 대체할 수 있다고 보고되었다(Panini et al., 2017a; Choi et al., 2018). Rahimnejad et al. (2019)은 사료에 누에를 첨가할 경우, 흰다리새우의 단백질과 건물 소화율을 증진시킨다고 보고하였다. 어류를 대상으로 진행된 연구에서 연구자들은 chitin 외에도 곤충박에 함유되어 있는 항균펩타이드(antimicrobial peptide, AMPs)와 아직까지 그 존재와 효과가 규명되지 않은 미지성장인자(unknown growth factors)가 어류의 성장과 사료계수 증진에 도움을 주었다고 보고하였다(Henry et al., 2018; Nogales-Mérida et al., 2019). 최근 연구에서 곤충박의 첨가는 여러 어류의 장 내 미생물 균 총과 항염증반응 인자, 소화효소 활성 증진에 도움을 준다고 보고되었다(Bruni et al., 2018; Antonopoulou et al., 2019; Li et al., 2019). 따라서, 이번 실험에 사용된 곤충박은 흰다리새우의 영양소 요구량을 충족시켰고, 소화에 아무런 문제가 없어 아무런 문제 없이 어분을 대체할 수 있었다고 판단된다. 사육실험에서 흰다

리새우의 일반성분은 대조구에 비해 아무런 차이가 없었다. 누에와 동애등애를 이용한 연구에서도 이와 유사한 결과가 보고되었다(Cummins et al., 2017; Rahimnejad et al., 2019). 반면, Panini et al. (2017a)은 비탈지 갈색거저리를 사료에 이용할 경우에는 흰다리새우의 지방 함량을 증진시킨다고 보고하였다. 곤충은 증과 가공방법, 생활사와 같은 여러 요인에 의해 체조성에 차이를 보여(Barroso et al., 2014), 위와 같이 다양한 결과가 도출되었다고 생각된다.

이번 연구에서 사료 내 곤충박의 사용은 흰다리새우의 비특이적 면역력과 항산화력을 증진시키는 것으로 나타났다. 곤충은 항균활성을 띄는 여러 종류의 항균펩타이드를 함유하고 있다고 알려져 있다(Yi et al., 2014). Jozefiak and Engberg (2017)은 곤충은 항균펩타이드를 함유하고 있어, 향후 동물사료에 중요한 단백질 원으로 사용될 것이라고 보고하였다. 갈색거저리는 tenascin 1 (Maistrou et al., 2018), 동애등애와 흰점박이꽃무지유충은 defensin-like peptide (Lee et al., 2009; Park et al., 2015), 장수풍뎅이는 defensin (Lee et al., 2019), 누에는 moricin (Nesa et al., 2020)과 sericin (Rocha et al., 2017). 곤충의 항균펩타이드는 균의 세포벽을 파괴시키는 것으로 알려져 있다(Jozefiak and Engberg, 2017). 일부 항균펩타이드는 세포벽을 뚫고 들어가 DNA 혹은 RNA의 합성을 저하시키는 것으로 알려져 있다(Nicolas, 2009). 흰다리새우 사료에 갈색거저리를 사용할 경우, 비특이적 면역력 지표인  $\beta$ -1, 3-glucan binding protein과 prophenoloxidase, crustin의 발현량(Choi et al., 2018)과, early mortality syndrome를 일으키는 *V. parahaemolyticus*에 대한 새우의 질병저항성(Motte et al., 2019)을 증진시키는 것으로 보고되었다. Motte et al. (2019)은 곤충박에 함유되어 있는 항균펩타이드가 새우의 질병저항성 향상에 도움을 주었다고 보고하였다. 따라서, 곤충박 내 항균펩타이드는 새우의 비특이적 면역력과 항산화력을 증진시킨 것으로 생각된다.

이번 연구에서 사료에 곤충박을 사용할 경우, 새우의 지방산 함량을 변화시키는 것으로 나타났다. 곤충박의 지방산 함량은 어분과 비교하여 단일불포화지방산(18:1n9)과 다가불포화지방산(DHA, EPA)의 함량이 높고, 고도불포화지방산의 함량이 낮은 것으로 나타났다(Table 1). 사료에 어분대체원으로써 곤충박을 이용할 경우, 어류와 새우의 단일불포화 지방산 함량을 증가시키고, DHA와 EPA의 함량을 감소시킨다고 보고되었다(Sánchez-Muros et al., 2016; Panini et al., 2017a). 육상에 서식하는 곤충은 DHA와 EPA를 생합성 할 수 있는 효소의 활성이 낮아 체내에 결핍되거나 매우 낮은 농도로 함유하고 있다(Mba et al., 2017). 그러나, 곤충의 지방산 함량은 곤충을 사육하는 과정에서 이용되는 사료 혹은 먹이의 구성에 따라 쉽게 변화하는 것으로 알려져 있다(Henry et al., 2015). Liland et al. (2017)은 곤충 사료에 omega-3 지방산을 첨가할 경우에는 동애등에의 DHA와 EPA의 함량을 증가시킨다고 보고하였다. 곤충의 지방산 함량은 사료 혹은 먹이를 통해 쉽게 조절할 수 있어, 동물사료에 곤충박을 사용하는데 또 다른 장점이 될 수 있다고 생각된다. Lauric acid는 동애등에의 지방산 중 두 번째로 높은 함량을 차지하는 것으로 나타났다(Table 1). Belghit et al. (2019)은 사료에 동애등에유를 첨가할 경우, Atlantic salmon (*Salmo salar*) 간 내 triacylglycerol의 농도를 감소시켰다고 보고하였다. Lauric acid는 medium-chain fatty acid (MCFA)로 분자량이 상대적으로 낮아, 동물의 체내에 빠르게 흡수되어 주로 에너지원으로 사용되고 축적되는 정도가 매우 낮다는 특성을 보인다. MCFA는 여러 균과 바이러스의 증식을 억제하는 활성을 지닌 것으로 알려져 있다(St-Onge et al., 2008; Sado-Kamdem et al., 2009; Dayrit, 2015). 지방산은 에너지 대사 기관인 미토콘드리아로 이동하는 과정에서 막수송체계를 거친다. 긴사슬지방산의 경우에는 에너지를 사용하여 chylomicrons 혹은 lipoproteins를 통해 내부로 이동한다. 그러나, MCFA는 긴사슬지방산에 비해 극성이 높아, 세포벽을

통과할 때 별도의 에너지를 소모하지 않고 내부로 이동하기 때문에 빠른 시간 안에 흡수되어 대부분 에너지로 사용된다. 따라서, 동애등에에 함유되어 있는 유지 성분 혹은 생리활성 물질이 새우의 성장과 면역력 향상에 도움을 주었다고 판단된다.

**Table 5.** Apparent digestibility coefficients (ADCs, %) of protein, lipid, energy, dry matter and chitin in reference (Ref) diet and insect meals for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*).

<b>Ingredients</b>	<b>Protein ADC</b>	<b>Lipid ADC</b>	<b>Energy ADC</b>	<b>Diet digestibility</b>	<b>Chitin digestibility</b>
Ref	89.2±1.62	91.7±2.29	88.2±2.61	78.1±4.20	-
DB	89.0±1.79 <sup>a</sup>	98.0±2.18 <sup>a</sup>	90.3±1.84	81.0±2.35 <sup>a</sup>	30.3±4.15
RG	86.3±2.80 <sup>ab</sup>	94.5±2.28 <sup>ab</sup>	87.5±4.08	80.7±1.77 <sup>a</sup>	33.1±7.39
BSF	85.1±5.58 <sup>ab</sup>	95.2±2.43 <sup>ab</sup>	87.1±6.08	78.5±3.52 <sup>ab</sup>	35.5±6.44
WFC	84.4±1.45 <sup>ab</sup>	94.0±2.00 <sup>ab</sup>	85.4±1.92	77.4±0.98 <sup>ab</sup>	28.3±5.66
MW	84.2±2.56 <sup>ab</sup>	97.5±1.02 <sup>ab</sup>	90.1±2.80	80.8±1.55 <sup>a</sup>	28.0±3.55
TSC	83.7±0.58 <sup>ab</sup>	95.0±3.62 <sup>ab</sup>	86.6±1.86	79.1±1.04 <sup>ab</sup>	30.3±4.15
SW	82.8±2.35 <sup>b</sup>	91.2±2.30 <sup>b</sup>	83.6±3.08	76.6±2.25 <sup>b</sup>	35.3±4.74

Values are mean of triplicates (n=3) and presented as mean ± standard deviation. Different superscripts in each column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

Ingredients are abbreviated as: dynastid beetle (DB), rice grasshopper (RG), black soldier fly (BSF), white-spotted flower chafer (WFC), mealworm (MW), two-spotted cricket (TSC) and silkworm (SW).

**Table 6.** Apparent digestibility coefficients (ADCs, %) of essential and non-essential amino acid in the tested insect meals for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*).

<b>Amino acids</b>	<b>DB</b>	<b>RG</b>	<b>BSF</b>	<b>WFC</b>	<b>MW</b>	<b>TSC</b>	<b>SW</b>
<i>Essential amino acids</i>							
Methionine	91.9±2.15	93.0±1.51	88.6±1.01	90.1±1.22	90.6±0.84	91.5±1.12	87.0±0.48
Arginine	94.6±1.02	94.3±1.49	94.2±2.18	93.2±1.69	90.6±1.52	93.4±1.54	91.8±2.18
Histidine	91.7±1.56	89.0±0.86	91.1±1.69	88.8±1.02	90.3±2.09	87.9±2.50	89.1±1.25
Isoleucine	92.0±2.10	89.2±1.60	89.3±0.88	88.3±2.16	88.4±1.20	89.0±0.36	87.3±1.05
Leucine	92.1±0.61	89.5±2.04	89.9±1.44	89.5±1.29	88.4±2.49	89.3±1.16	88.4±2.82
Lysine	94.9±1.25	94.4±1.29	92.2±2.98	92.2±0.45	92.2±0.72	94.2±2.44	90.2±1.46
Phenylalanine	91.7±1.89	91.3±1.36	88.6±1.40	89.5±1.36	88.2±1.50	89.8±1.02	86.7±0.52
Threonine	90.0±2.06	89.6±0.76	87.1±2.23	87.6±0.98	84.8±2.43	87.4±2.17	84.8±1.69
Valine	89.0±0.84	83.0±1.67	87.2±1.99	84.1±2.42	85.2±1.45	83.6±0.63	84.4±2.41
<i>Non-essential amino acids</i>							
Taurine	95.0±0.15	96.4±1.42	94.1±1.58	94.8±1.11	94.1±0.29	96.2±1.01	92.8±1.25
Alanine	84.6±1.08	75.7±0.87	86.3±2.16	80.7±2.08	85.5±1.22	78.8±2.84	81.6±2.59
Aspartic acid	91.3±2.10	91.1±1.63	89.2±1.89	89.0±1.29	88.1±2.01	89.7±1.59	86.7±1.06
Glycine	87.7±1.01	84.5±0.49	84.2±0.78	85.6±0.71	85.3±1.68	84.1±0.65	81.1±0.42
Glutamic acid	93.5±0.59	93.5±2.46	91.4±1.46	92.2±1.52	89.6±2.89	92.5±1.49	89.8±1.14
Proline	94.4±1.42	85.8±1.65	91.2±2.03	90.6±0.88	88.5±1.49	87.9±2.57	89.2±2.18
Serine	90.9±1.39	89.2±2.07	87.5±1.52	89.1±1.23	83.7±2.12	86.9±1.23	84.5±1.69
Tyrosine	91.5±2.07	80.9±1.36	87.4±1.63	89.9±2.41	85.4±1.04	80.8±3.06	83.5±0.80

Values are mean of duplicates (n=2) and presented as mean ± standard deviation.

Tested insect meals are abbreviated as: dynastid beetle (DB), rice grasshopper (RG), black soldier fly (BSF), white-spotted flower chafer (WFC), mealworm (MW), two-spotted cricket (TSC) and silkworm (SW).

**Table 7.** Apparent digestibility coefficients (ADCs, %) of fatty acids in tested insect meals for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*).

<b>Fatty acids</b>	<b>DB</b>	<b>RG</b>	<b>BSF</b>	<b>WFC</b>	<b>MW</b>	<b>TSC</b>	<b>SW</b>
Saturated fatty acids							
C14:0	89.5±1.25	92.2±2.35	91.7±2.58	89.9±2.40	91.2±1.44	88.9±1.70	93.2±1.19
C16:0	91.1±1.49	91.3±1.63	90.5±3.02	90.4±1.82	89.9±2.12	91.0±3.14	91.6±3.21
C18:0	90.3±3.59	92.8±2.04	91.2±1.21	91.0±3.28	90.4±2.60	92.0±1.12	92.6±0.45
Monounsaturated fatty acids							
C16:1	93.1±2.11	91.0±1.22	90.2±2.63	92.2±0.65	89.5±1.80	89.8±0.92	91.6±2.03
C18:1n-9	91.7±1.30	90.8±3.16	90.7±1.47	92.0±1.55	91.7±3.15	91.5±1.86	91.8±3.20
Polyunsaturated fatty acids							
C18:2n-6	89.8±0.71	90.8±1.77	89.5±2.42	89.7±2.22	90.9±1.41	91.5±2.77	91.2±1.85
C18:3n-3	90.0±2.20	92.0±1.06	91.1±1.22	90.3±1.36	88.1±2.09	92.7±3.22	92.1±2.77

Values are mean of duplicates (n=2) and presented as mean ± standard deviation.

Tested insect meals are abbreviated as: dynastid beetle (DB), rice grasshopper (RG), black soldier fly (BSF), white-spotted flower chafer (WFC), mealworm (MW), two-spotted cricket (TSC) and silkworm (SW).

**Table 8.** Growth performance, feed utilization and survival of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) (initial body weight:  $0.17 \pm 0.00$  g) fed the experimental diets for 65 days.

Dietary treatments	FBW <sup>1</sup>	SGR <sup>2</sup>	FCR <sup>3</sup>	PER <sup>4</sup>	FI <sup>5</sup>	Survival (%)
FM	8.56±0.91 <sup>b</sup>	6.04±0.17 <sup>b</sup>	1.56±0.22	1.75±0.25	13.0±0.91 <sup>c</sup>	93.3±11.5
DB	11.1±1.26 <sup>a</sup>	6.41±0.16 <sup>a</sup>	1.36±0.17	1.92±0.23	14.8±0.88 <sup>ab</sup>	87.8±6.94
RG	9.71±0.08 <sup>ab</sup>	6.23±0.06 <sup>ab</sup>	1.50±0.06	1.72±0.07	14.3±0.71 <sup>ab</sup>	98.3±2.36
BSF	11.1±0.55 <sup>a</sup>	6.45±0.09 <sup>a</sup>	1.43±0.08	1.83±0.10	15.6±0.80 <sup>a</sup>	96.7±5.77
WFC	9.79±0.21 <sup>ab</sup>	6.23±0.02 <sup>ab</sup>	1.56±0.06	1.68±0.06	15.0±0.33 <sup>ab</sup>	93.3±3.33
MW	10.3±1.77 <sup>ab</sup>	6.31±0.27 <sup>ab</sup>	1.41±0.19	1.87±0.27	14.1±0.91 <sup>bc</sup>	92.2±10.7
TSC	10.3±0.82 <sup>ab</sup>	6.32±0.12 <sup>ab</sup>	1.45±0.12	1.78±0.14	14.6±0.37 <sup>ab</sup>	87.8±3.85
SW	9.69±0.57 <sup>ab</sup>	6.22±0.08 <sup>ab</sup>	1.58±0.08	1.64±0.08	15.0±0.13 <sup>ab</sup>	94.4±5.09

Values are mean of triplicates (n=3) and presented as mean ± standard deviation. Different superscripts in each column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

Dietary treatments are abbreviated as: fish meal (FM), dynastid beetle (DB), rice grasshopper (RG), black soldier fly (BSF), white-spotted flower chafer (WFC), mealworm (MW), two-spotted cricket (TSC) and silkworm (SW).

<sup>1</sup>Final body weight (g) = final mean body weight – initial mean body weight.

<sup>2</sup>Specific growth rate (%) =  $[(\log_e \text{final body weight} - \log_e \text{initial body weight}) \div \text{days}] \times 100$ .

<sup>3</sup>Feed conversion ratio = feed intake ÷ wet weight gain.

<sup>4</sup>Protein efficiency ratio = wet weight gain ÷ total protein given.

<sup>5</sup>Feed intake (g) = dry feed consumed (g) ÷ the number of fish.

**Table 9.** Whole-body proximate composition of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets for 65 days (% wet basis).

<b>Dietary treatments</b>	<b>Crude protein</b>	<b>Crude lipid</b>	<b>Crude ash</b>	<b>Moisture</b>
FM	18.9±0.31	1.34±0.40	3.78±0.13	76.2±0.64
DB	19.3±0.12	1.33±0.18	3.56±0.25	77.0±0.42
RG	19.7±0.30	1.27±0.11	3.53±0.15	76.2±0.25
BSF	19.5±0.15	1.35±0.13	3.40±0.23	76.5±0.37
WFC	19.4±0.35	1.37±0.10	3.59±0.28	76.7±0.65
MW	19.5±0.83	1.44±0.14	3.35±0.28	76.3±0.40
TSC	19.0±0.19	1.37±0.15	3.63±0.15	76.2±0.21
SW	19.4±0.20	1.40±0.12	3.53±0.16	76.5±0.27

Values are mean of triplicates (n=3) and presented as mean ± standard deviation. Different superscripts in each column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

Dietary treatments are abbreviated as: fish meal (FM), dynastid beetle (DB), rice grasshopper (RG), black soldier fly (BSF), white-spotted flower chafer (WFC), mealworm (MW), two-spotted cricket (TSC) and silkworm (SW).

**Table 10.** Fatty acid composition of muscle of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets for 65 days (% of lipid).

Fatty acids	FM	DB	RG	BSF	WFC	MW	TSC	SW
Saturated fatty acids (SFA)								
C16:0	25.0±2.12	29.8±1.44	25.2±1.23	25.4±2.88	25.2±1.58	25.8±1.52	25.9±2.10	25.5±2.22
C18:0	19.6±3.01	15.8±2.87	19.8±2.27	20.5±1.23	16.6±2.36	17.7±2.55	18.0±1.26	21.1±1.10
Monounsaturated fatty acids (MUFA)								
C18:1n-9	17.5±2.44	26.8±2.36	18.0±3.10	18.5±2.24	22.9±3.00	23.0±2.10	19.2±2.03	18.5±2.14
Polyunsaturated fatty acids (PUFA)								
C18:2n-6	17.6±1.17	13.7±2.02	18.8±2.33	17.5±3.25	18.0±2.19	18.2±1.01	20.5±1.28	17.7±2.42
C20:5n-3	10.8±2.39	7.89±1.42	10.4±1.14	10.4±0.65	9.18±1.41	8.19±0.84	9.02±1.20	9.96±1.03
C22:6n-3	9.47±1.21	5.96±1.66	7.70±0.67	7.73±1.56	8.03±1.88	7.21±1.11	7.38±0.68	7.27±1.23
∑SFA <sup>1</sup>	44.6±3.10	45.6±2.18	45.0±3.58	45.9±2.46	41.9±2.36	43.5±3.25	43.9±2.86	46.6±3.02
∑MUFA <sup>2</sup>	17.5±2.44	26.8±2.36	18.0±3.10	18.5±2.24	22.9±3.00	23.0±2.10	19.2±2.03	18.5±2.14
∑PUFA <sup>3</sup>	37.9±3.12	27.6±2.55	37.0±1.15	35.6±2.12	35.2±3.02	33.6±2.48	36.9±1.63	34.9±2.06
∑PUFA n-3 <sup>4</sup>	20.3±2.56	13.8±1.56	18.1±2.48	18.1±1.85	17.2±2.69	15.4±1.21	16.4±2.16	17.2±1.85
∑PUFA n-6 <sup>5</sup>	17.6±1.17	13.7±2.02	18.8±2.33	17.5±3.25	18.0±2.19	18.2±1.01	20.5±1.28	17.7±2.42
n-3/n-6	1.15±0.16	1.01±0.18	0.96±0.08	1.04±0.18	0.96±0.16	0.85±0.12	0.80±0.16	0.98±0.17

Values are mean of duplicates (n=2) and presented as mean ± standard deviation.

Dietary treatments are abbreviated as: fish meal (FM), dynastid beetle (DB), rice grasshopper (RG), black soldier fly (BSF), white-spotted flower chafer (WFC), mealworm (MW), two-spotted cricket (TSC) and silkworm (SW).

<sup>1</sup>Sum of saturated fatty acids.

<sup>2</sup>Sum of monounsaturated fatty acids.

<sup>3</sup>Sum of polyunsaturated fatty acids.

<sup>4</sup>Sum of n-3 polyunsaturated fatty acids.

<sup>5</sup>Sum of n-6 polyunsaturated fatty acids.

**Table 11.** Innate immune responses and antioxidant enzyme activities of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets for 65 days.

Dietary treatments	PO <sup>1</sup> (absorbance)	SOD <sup>2</sup> (% inhibition)	GPx <sup>3</sup> (mU/ml)	NBT <sup>4</sup> (absorbance)
FM	0.17±0.01 <sup>c</sup>	99.8±0.47	80.2±4.91 <sup>b</sup>	0.55±0.04 <sup>b</sup>
DB	0.18±0.01 <sup>bc</sup>	96.4±4.25	106±9.21 <sup>a</sup>	0.64±0.06 <sup>ab</sup>
RG	0.19±0.02 <sup>abc</sup>	99.3±1.73	96.0±6.05 <sup>ab</sup>	0.61±0.08 <sup>b</sup>
BSF	0.21±0.03 <sup>ab</sup>	100±0.20	105±3.34 <sup>a</sup>	0.64±0.08 <sup>ab</sup>
WFC	0.21±0.02 <sup>ab</sup>	99.0±1.82	85.3±1.42 <sup>ab</sup>	0.74±0.02 <sup>a</sup>
MW	0.22±0.03 <sup>a</sup>	98.7±1.63	104±6.75 <sup>a</sup>	0.72±0.14 <sup>a</sup>
TSC	0.19±0.01 <sup>bc</sup>	99.9±1.29	82.3±1.71 <sup>b</sup>	0.72±0.10 <sup>a</sup>
SW	0.21±0.03 <sup>abc</sup>	99.0±0.43	99.6±4.77 <sup>ab</sup>	0.74±0.12 <sup>a</sup>

Values are mean of triplicates (n=3) and presented as mean ± standard deviation. Different superscripts in each column indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

Dietary treatments are abbreviated as: fish meal (FM), dynastid beetle (DB), rice grasshopper (RG), black soldier fly (BSF), white-spotted flower chafer (WFC), mealworm (MW), two-spotted cricket (TSC) and silkworm (SW).

<sup>1</sup>Phenoloxidase.

<sup>2</sup>Super oxide dismutase.

<sup>3</sup>Glutathione peroxidase.

<sup>4</sup>Nitro-blue tetrazolium.

## CHAPTER 2.

# Replacing fish meal with black soldier fly larvae and mealworm larvae in diets of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

### 2.1 서론

곤충박(insect meal)은 단백질(39–62%)과 지질(10–34%)의 함량이 높을 뿐만 아니라 양식생물의 필수아미노산인 lysine, methionine, leucine 등의 함량이 식물성 원료에 비해 높아, 최근 양식사료의 어분대체원료로써 주목 받고 있다(Nogales-Mérida et al., 2019; Rahimnejad et al., 2019). 곤충의 사육에는 음식물 찌꺼기와 밀기울(wheat bran) 등의 생활·농업부산물을 먹이로 이용할 수 있어 경제적이며, 곤충의 배설물은 질 좋은 비료로 사용되기 때문에 곤충은 친환경적인 사료 원료로 평가 받고 있다(van Huis et al., 2013). 최근 전세계적으로 곤충의 산업화를 위해 대규모 생산설비를 구축하고 있으며, 식용·약용 등 다양한 분야에서 곤충을 이용한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Nogales-Mérida et al., 2019). 국내 곤충 시장의 규모도 2011년 1680억원에서, 2018년 2648억원으로 크게 증가하였다(MAFRA, 2019). 곤충은 체내에 다양한 항균펩타이드를 함유하고 있어(Ravi et al., 2011), 사료에 첨가할 경우 새우와 어류의 비특이적 면역력과 질병저항성을 향상시킬 수 있다고 보고되었다(Motte et al., 2019; Nogales-Mérida et al., 2019). 동애등에(black soldier fly, BSF; *Hermetia illucens*)와 갈색거저리(mealworm, MW; *Tenebrio molitor*)는 고밀도로

사육이 가능하며, 세대 주기가 다른 곤충에 비해 짧아 대량생산에 적합한 종으로 평가 받고 있다(Kroeckel et al., 2012; Lock et al., 2016; Magalhães et al., 2017). 새우 사료 내 어분대체에 관한 연구는 다양한 원료를 이용하여 수행되었다(Pakravan et al., 2017; He et al., 2020; McLean et al., 2020). 그러나, 갈색거저리와 동애등애를 이용하여 흰다리새우 사료 내 어분을 대체한 연구는 아직까지 미흡한 실정이다. 특히, 곤충의 체성분은 먹이, 사육환경, 가공 방법 등에 따라 큰 차이를 보이기 때문에 원산지에 따른 곤충 원료의 이용성 평가가 필요하다(Henry et al., 2015).

흰다리새우는 다른 새우류와 비교하여 성장이 빠르고 여러 질병에 대한 내병성이 높아 전세계에서 주요 양식 대상종으로 각광받고 있다. 흰다리새우는 전세계에서 연간 생산되는 전체 새우류 중 53%를 차지하며, 생산량은 계속해서 증가할 것으로 예상되고 있다(FAO, 2018). 흰다리새우의 연간 국내 생산량 또한 2012년도에 2,784톤에서 2019년도에 7,542톤으로 계속해서 증가하고 있다(KOSIS, 2020). 따라서, 본 연구에서는 흰다리새우 사료에 어분대체원으로써 국내에서 생산된 동애등애와 갈색거저리의 이용가능성을 조사하고자 수행되었다.

## 2.2 재료 및 방법

### 2.2.1 실험새우와 사육관리

실험새우는 제주대학교 동물실험윤리위원회의 윤리규정(승인번호, 2019-0039)을 준수하며 실험에 이용하였다. 실험새우는 제주도 성산읍에 위치한 종묘장에서 post-larvae 시기의 흰다리새우를 구입하여 약 0.1 g 크기가 될 때까지 실험용 수조에서 사육한 후 실험에 이용하였다. 흰다리새우(0.09 g)는 총 28 개의 acrylic 수조(210 L)에 25 마리씩 배치하였다(Fig. 6). 사육실험 중 수질은 1 일 1 회

측정되었으며, 평균 수온은 27.8°C, 용존산소는 5.04 ppm, pH는 7.82, 염분은 31 ppt, 암모니아는 0.041 ppm 으로 나타났다. 실험사료는 새우 체중의 6-8%를 1 일 6 회(08:30, 10:30, 12:30, 14:30, 16:30, 18:30 h)에 나누어 총 57 일간 공급하였다. 광주기는 형광등을 이용하여 조절(12 light: 12 dark)하였다. 사육수조의 환수는 실험사료의 공급량에 따라 2 일에 한 번(80%)씩 진행되었다.



**Figure 6.** Setting the feeding trial

### 2.2.2 실험사료

사육실험에 사용된 분말 형태의 동애등에(비탈지) 유충과 갈색거저리(탈지) 유충은 (주)CIEF (Gimje, Korea)와 (주)KEIL (Seoul, Korea)에서 각각 구매하였고, 원료 내 일반성분, 아미노산, 지방산, chitin의 함량은 Table 12에 나타내었다. 대조사료 (control, Con)는 어분과 대두박을 기초로 조성되었고, 조단백질과 조지질의 함량은 흰다리새우의 영양소 요구량을 충족시키도록 구성하였다(Table 13). 실험사료는 총 7종으로, 대조사료 내 어분을 동애등에와 갈색거저리 분말로 각각 20, 40, 60% 대체하였다(BSF20, BSF40, BSF60, MW20, MW40, MW60). 실험사료는 펠릿사료 제조기(SP-50, Gumgang ENG, Daegu, Korea)를 이용하여 총 2가지 크기(1, 2 mm)로 성형되었고, 건조 후(15 h, 20°C) 사료공급 전까지 냉동보관(-20°C) 되었다(Fig. 7).



**Figure 7.** Preparation of the experimental diets for Pacific white shrimp

### 2.2.3 Sampling과 분석

실험새우의 무게는 2주 간격으로 측정되었고, 스트레스를 최소화 하기 위해 무게 측정 24시간 전부터 사료의 공급을 중단하였다. 사육실험 종료 후, 실험새우의 최종무게(final body weight, FBW), 일간성장률(specific growth ratio, SGR), 사료계수(feed conversion ratio, FCR), 단백질이용효율(protein efficiency ratio, PER), 생존율(survival)을 조사하였다(Fig. 8). 수조당 8 마리의 실험새우를 얼음물로 마취시켜 hemolymph와 간체장을 적출하였다. Hemolymph는 원심분리 후 냉동보관(-80°C) 하였다. 간체장은 액체질소를 이용하여 급속 냉동한 다음 냉동보관(-80°C) 하였다. 간체장을 적출한 후 남은 carcass는 일반성분분석을 위해 냉동보관 되었다(-20°C).



**Figure 8.** The measurement of shrimp body weight

사육수의 암모니아 농도는 Strickland and Parsons (1972)의 방법에 따라 분석되었

다. 실험사료와 새우의 일반성분은 AOAC (2005) 방법에 따라 분석되었다. 원료의 chitin함량은 Song et al. (2018) 의 방법에 따라 측정되었다. 아미노산은 Rosen (1957) 의 방법을 기초로 아미노산분석기(S433, Sykam GmbH, Fuerstenfeldbruck, Germany)를 이용하여 측정되었다. 지방산은 Garces and Mancha (1993)의 방법에 따라, gas chromatography (6800GC, Agilent, San Francisco, CA, USA)를 이용하여 분석되었다. Hemolymph의 glutathione peroxidase (GPx)와 superoxide dismutase (SOD) 활성은 각각 kit (K762-100, Biovision, San Francisco, CA, USA; 19160, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 분석되었다. Phenoloxidase (PO)와 대식세포(nitro-blue tetrazolium, NBT) 활성은 각각 Hernández-López et al. (1996)과 Zhang et al. (2013)의 방법에 따라 분석되었다. 실험새우의 간체장 RNA는 TRI-zol® (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 추출하였다. RNA purity는  $\mu$ Drop™Plate (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 를 측정하여 모든 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>의 RNA 순도(1.8–2.0)를 확인하였다. cDNA의 합성은 PrimeScript™ first-strand cDNA synthesis kit (TaKaRa, Shiga, Japan)를 이용하였다.  $\beta$ -actin (F-5`-GAG CAA CAC GGA GTT CGT TGT-3`, R-5`-CAT CAC CAA CTG GGA CGA CAT GGA-3`)은 reference gene으로 사용되었고, crustin (F-5`-GAG GGT CAA GCC TAC TGC TG-3`, R-5`-ACT TAT CFA FFC CAF CAC AC-3`) 측정에 이용되었다. qPCR은 Real Time System TP 950 Thermal Cycler Dice™ (TaKaRa, Shiga, Japan)를 이용하여 측정되었다.

#### 2.2.4 통계분석

실험사료의 배치는 완전확률계획법(completely randomized design)을 실시하였으며, 분석결과는 SPSS (Version 24.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석하였다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's multiple test 로 비교하였다. 데이터는 평균값±표준편차(mean ± standard deviation)로 나타내었다. 백분율데이터는 arcsine 변형 값으로 통계분석 하였다. Two-way ANOVA 방법을 이용하여 곤충박의 종류 (insects)와 대체율(inclusion ratio) 사이의 관계를 통계 분석하였다.

**Table 12.** Nutrient contents (% , dry matter) of black soldier fly (BSF), mealworm (MW) and tuna by-product meal (TM) for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Nutrient contents	Ingredients		
	BSF	MW	TM
<i>Proximate contents</i>			
Crude protein	41.7	69.8	60.0
Crude lipid	17.4	7.24	9.24
Ash	18.7	8.34	21.5
Moisture	4.39	5.39	7.00
<i>Essential amino acids</i>			
Methionine	0.27	0.23	1.35
Lysine	5.93	5.83	5.89
Arginine	5.36	5.23	4.71
Histidine	8.38	7.84	3.15
Isoleucine	4.78	5.00	3.64
Leucine	7.23	7.92	5.79
Phenylalanine	3.96	4.25	3.09
Threonine	4.15	4.12	3.42
Valine	6.70	7.09	4.11
EAA/NAA	0.88	0.99	0.54
<i>Fatty acids</i>			
12:0	23.2	0.41	0.10
14:0	5.30	4.17	14.9
16:0	19.0	16.7	40.3
16:1	2.42	2.04	4.80
18:0	4.82	-	10.9
18:1n9	23.4	43.4	4.50
18:2n6	16.3	31.7	0.30
18:3n3	2.18	1.36	0.30
20:0	0.26	0.18	0.40
20:1	0.17	0.13	0.30
20:4n6	0.28	-	1.10
20:5n3(EPA)	1.32	-	12.2
22:0	0.18	-	0.10
22:6n3(DHA)	0.26	-	7.90
SFA <sup>1</sup>	52.8	21.5	66.6
MUFA <sup>2</sup>	26.0	45.6	9.60
PUFA <sup>3</sup>	20.3	33.1	21.9
∑n-3 <sup>4</sup>	3.76	1.36	20.4
∑n-6 <sup>5</sup>	16.6	31.7	1.40
n-3/n-6	0.23	0.04	14.6
<i>Chitin</i>	5.11	3.24	-

<sup>1</sup>Saturated fatty acids.

<sup>2</sup>Monounsaturated fatty acids.

<sup>3</sup>Polyunsaturated fatty acids.

<sup>4</sup>Omega-3 fatty acids.

<sup>5</sup>Omega-6 fatty acids.

**Table 13.** Dietary formulation and proximate compositions (% , dry matter) of the experimental diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Ingredients	Experimental diets						
	Con	BSF 20	BSF 40	BSF 60	MW 20	MW 40	MW 60
Tuna by-product meal <sup>1</sup>	27.0	20.1	15.7	11.8	21.6	16.2	10.8
Black soldier fly <sup>2</sup>	-	8.50	17.0	25.5	-	-	-
Mealworm <sup>3</sup>	-	-	-	-	5.00	10.0	15.0
Soybean meal	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0
Squid liver meal	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Starch	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Wheat flour <sup>4</sup>	21.8	20.8	18.1	14.5	22.2	22.6	22.5
Soybean oil	3.00	2.40	1.00	0.00	3.00	3.00	3.50
Cod liver oil <sup>5</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Mineral premix <sup>6</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Vitamin premix <sup>7</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Choline chloride	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Lecithin <sup>8</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cholesterol	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
MCP <sup>9</sup>	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
<i>Proximate composition</i>							
Crude protein	37.1	36.0	37.1	38.0	37.8	38.0	38.0
Crude lipid	9.29	9.84	9.87	9.60	8.59	8.66	9.12
Crude ash	12.1	12.3	12.9	13.3	11.4	10.7	9.70

<sup>1</sup>Wooginfeed Industry Co. Ltd, Incheon, Korea.

<sup>2</sup>CIEF Co. Ltd, Gimje, Korea.

<sup>3</sup>KEIL Co. Ltd, Seoul, Korea.

<sup>4</sup>Deahan Flour Co. Ltd, Incheon, Korea.

<sup>5</sup>Corp. E-wha oil & fat Industry Corp, Busan, Korea.

<sup>6</sup>Mineral premix contains (g/kg): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 80; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 370; KCl, 130; Ferric citrate, 40; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 20 Ca-lactate, 356.5; CuCl, 0.2; AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.15; Na<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0.01; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.

<sup>7</sup>Vitamin premix contains (g/kg): L-ascorbic acid, 121.2; DL- $\alpha$  tocopheryl acetate, 18.8; thiamin hydrochloride, 2.7; riboflavin, 9.1; pyridoxine hydrochloride, 1.8; niacin, 36.4; Ca-D-pantothenate, 12.7; myo-inositol, 181.8; D-biotin, 0.27; folic acid, 0.68; p-amino benzoic acid, 18.2; menadione, 1.8; retinyl acetate, 0.73; cholecalciferol, 0.003; cyanocobalamin, 0.003.

<sup>8</sup>Lysoforte™ Dry, Kemin Korea Co. Ltd., Korea.

<sup>9</sup>Mono-calcium phosphate.

Con, control; BSF, black soldier fly; MW, mealworm.

### 2.3 결과

동애등에 실험구의 경우, 실험새우의 최종평균무게(FBW)와 일간성장률(SGR)은 BSF40, BSF60구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다(Table 14). 사료계수(FCR)는 BSF40, BSF60 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 낮았다. 단백질이용효율(PER)은 모든 동애등에 실험구(BSF20, 40, 60)가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. 생존율은 실험구와 대조구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 실험새우 가식부(muscle)의 조단백질, 조지질, 조회분, 수분 함량은 모든 실험구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 15). 실험새우 hemolymph의 PO 활성은 BSF40구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다(Table 16). SOD와 GPx 활성은 BSF20, BSF40, BSF60구가 대조구에 비해 유의적으로 높게 나타났다. NBT 활성은 대조구와 실험구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 실험새우 간체장의 crustin 발현량은 BSF 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다.

갈색거저리 실험구의 경우, 최종평균무게는 MW20, MW40구가 대조구와 유의적인 차이를 보이지 않았고, MW60구는 대조구에 비해 유의적으로 낮았다(Table 14). 사료계수는 실험구와 대조구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 일간성장률, 단백질이용효율, 생존율은 실험구와 대조구 사이에 유의적인 차이가 없었다. 실험새우 가식부의 조단백질, 조지질, 조회분, 수분 함량은 모든 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다(Table 15). 실험새우 hemolymph의 PO 활성은 MW20, MW40구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다(Table 16). SOD 활성은 MW20, MW40, MW60구가 대조구에 비해 유의적으로 높게 나타났다. GPx 활성은 MW40구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. NBT 활성은 대조구와 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다. 간체장의 crustin 발현량은 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다.

## 2.4 고찰

이번 연구에서 동애등에와 갈색거저리는 흰다리새우 사료 내 어분대체원으로써의 이용가능성을 보여주었다. 특히, 동애등에는 사료의 어분을 60%까지 대체 가능할 뿐만 아니라 오히려 새우의 성장을 촉진시키는 것으로 나타났다. Cummins et al. (2017)은 흰다리새우(1.24 g) 사료 내 menhaden 어분을 탈지(defatted) 동애등에 유충으로 대체하여 63일간 사육한 결과, 71%까지 대체 가능함을 보고하였다. Panini et al. (2017a)은 흰다리새우(4.42 g) 사료 내 연어부산물(salmon processing waste meal) 어분을 갈색거저리 유충으로 대체하여 42일간 사육한 결과, 100%까지 대체하여도 성장률에 아무런 영향이 없었다고 보고하였다. Choi et al. (2018)은 흰다리새우(2.39 g) 사료에 어분을 갈색거저리 유충으로 대체한 사료를 56일간 공급한 결과, 50%까지 대체 가능하다고 보고하였다. 동일한 곤충을 이용하였음에도 새우 사료 내 어분의 대체율에서 차이를 보이는 이유는 사료의 조성, 사용된 어분의 종류, 사육환경, 곤충의 영양상태, 원료의 가공 방법 및 영양소 함량에 의한 것이라 판단된다. 이번 연구에서 동애등에와 갈색거저리는 사료 내 tuna by-product meal을 각각 60%, 40%까지 성장과 사료효율 저하 등의 부작용 없이 대체 가능할 것으로 사료된다. 동애등에의 최대 어분대체율은 후속연구를 통해 보다 자세한 규명이 요구된다.

본 연구에서 동애등에와 갈색거저리의 아미노산 조성은 methionine (Met)을 제외하고 어분과 유사하거나 높았다(Table 12). 필수아미노산인 Met은 사료에 결핍될 경우, 흰다리새우의 성장과 생존율이 감소하는 것으로 알려져 있다(Richard et al., 2010). 대부분의 어분 대체 원료 내 Met의 함량은 어분보다 낮아 제한아미노산으로 인식되고 있다(Gatlin et al., 2007). 본 연구에서도 동애등에와 갈색거저리의 Met 함량(0.23-0.27%)은 어분(1.35%)에 비해 낮았다(Table 12). 흰다리새우를 대상

으로 진행된 연구에서 사료 내 어분을 동애등에, 갈색거저리, 누에 등의 곤충으로 대체할 경우, 대체율이 증가함에 따라 사료와 새우의 Met 함량이 감소되는 것으로 보고되었다(Cummins et al., 2017; Panini et al., 2017a; Rahimnegad et al., 2019). 따라서 동애등에와 갈색거저리를 사료에 어분대체원으로써 다량 사용할 경우, Met 이 제한 아미노산으로 작용할 가능성이 높다고 판단된다.

이번 연구에서 사료 내 곤충박의 첨가는 새우 가식부(근육)의 일반성분조성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. Panini et al. (2017a)은 흰다리새우 사료에 갈색거저리(지질함량 30%)의 어분대체율이 증가할수록 새우의 지질 함량이 증가한다고 보고하였다. 일반적으로 곤충의 지질 함량은 15-30%로, 변태기에 가까워 질수록 증가하는 경향을 보인다(Barroso et., 2014). 곤충을 사육하는데 사용되는 먹이는 곤충의 체성분을 변화시키는 주된 요소로 알려져 있다(Barroso et al., 2014). 이번 연구에 사용된 동애등에의 지질함량(17.4%)은 어분(7%)에 비해 매우 높아 어분대체율이 증가할 경우 지방산 함량의 차이에 의해 새우의 체조성에 영향을 미칠 가능성이 높다고 판단된다. 사료 원료의 지질 함량이 높으면 원료 뿐만 아니라 사료도 산패되기 쉽다. 곤충박의 지질은 monounsaturated fatty acids (MUFA)의 함량이 높아(20-50%) 사료에 곤충박을 다량 사용할 경우, 지방산의 불균형으로 인해 어류의 성장과 사료 섭취의 감소와 같은 부작용을 초래할 수 있다(Nogales-Mérida et al., 2019). 따라서, 새우 사료 내 곤충박의 이용효율을 높이기 위해서는 탈지 혹은 발효 등의 가공을 거친 곤충박을 이용하는 것이 보다 효율적일 것으로 판단된다. 그러나, 곤충박의 가공처리에 따른 이용효과를 검증한 연구가 미흡하여, 이에 대한 보충 연구가 요구된다.

흰다리새우 사료 내 곤충박의 첨가는 새우의 비특이적 면역력(crustin, PO)과 항산화력 (SOD, GPx)을 증진시키는 것으로 나타났다. 곤충은 종에 따라 차이를

보이나 대체로 체내에 antimicrobial peptides (AMPs)를 함유하고 있다. 곤충의 AMPs는 병원균의 세포벽을 뚫고 세포 내로 침투하여 RNA와 DNA의 정상적인 발현을 억제한다(Nicolas, 2009; Jozefiak and Engberg, 2017). 사료 내 AMPs의 첨가는 닭, 돼지 등의 면역력을 증진시킬 수 있으며, 병원균의 내성을 일으키지 않기 때문에 천연항생제로도 주목 받고 있다(Wu et al., 2012; Choi et al., 2013; Jozefiak and Engberg, 2017). Lee et al. (1998)은 갈색거저리에서 추출한 tenecin이 항균 활성을 띤다고 보고하였다. 동애등에도 AMPs의 일종인 defensin-like peptides를 함유하고 있다고 보고되었다(Hwang et al., 2008). Choi et al. (2018)은 흰다리새우 사료에 갈색거저리를 첨가할 경우, 실험새우의  $\beta$ -1, 3-glucan binding protein (BGBP), prophenoloxidase (proPO), crustin 의 발현량을 증가시켜 새우의 면역력을 증진시킨다고 보고하였다. Motte et al. (2019)의 연구에서도 흰다리새우 사료에 갈색거저리를 첨가할 경우, 조기폐사증후군(early mortality syndrome)의 원인균인 *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 질병저항성을 향상시킨다고 보고하였다. 따라서, 동애등에와 갈색거저리를 사료 내 단백질원으로 이용할 경우, 흰다리새우의 면역력과 항산화력 증진에 일조할 것으로 판단된다.

Chitin은 곤충의 갑각을 구성하는 물질로써 대부분의 곤충에는 약 4-25% 정도 포함되어 있다(Henry et al., 2015). 이번 연구에 사용된 동애등에와 갈색거저리의 chitin 함량은 각각 5.11%와 3.24%로 나타났다(Table 1). Shiau and Yu (1998)는 grass shrimp *Penaeus monodon* 사료에 chitin (5%)을 첨가 했을 때 새우의 성장률이 대조구에 비해 유의적으로 높았다고 보고하였다. Akiyama et al. (1992)는 새우의 원활한 성장을 위해서는 사료에 최소 0.5% 이상의 chitin이 첨가되어야 한다고 보고하였다. 갑각류와 어류 사료 내 chitin의 첨가는 성장률, 질병저항성, 소장 용모의 기능을 향상시키는 것으로 보고되었다(Kumar et al., 2006; Powell and Rowley, 2007; Zaki

et al., 2015). Tzuc et al. (2014)에 따르면, 흰다리새우는 소화관에 chitin 분해효소인 chitinase를 분비하는 미생물이 존재한다고 보고하였다. 닭에서도 chitinase의 활성은 장 내 *Lactobacillus*의 수를 증가시키고 *Escherichia coli*와 *Salmonella spp.*의 증식을 억제한다고 보고되었다(Khempaka et al., 2011). 이번 연구에서도 곤충박의 chitin이 흰다리새우의 성장과 면역력 증진에 직·간접적으로 영향을 끼쳤을 것으로 판단된다. 새우사료 내 chitin의 직접적인 첨가 효과에 대한 작용기전이 밝혀지지 않아 이에 관한 후속 연구가 요구된다.

Lauric acid (LA)는 동애등에의 지질 중 21-50%를 차지하는 주요 지방산으로 알려져 있다(Sealey et al., 2011; Kroeckel et al., 2012; Li et al., 2016). 이번 연구에 사용된 동애등에의 LA함량은 23%로 어분(0.1%)과 갈색거저리(0.41%)에 비해 매우 높았다(Table 12). LA는 중쇄지방산의 일종으로 긴사슬지방산에 비해 빠르게 체내로 흡수된다(Stubbs and Harbron, 1996). 중쇄지방산은 지방산이 미토콘드리아의 막을 통과할 때 필요한 carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1)과의 작용을 거치지 않으며, 대부분 에너지 대사과정에 바로 이용되어 다른 지방산에 비해 체내에 축적되는 정도가 비교적 낮은 것으로 알려져 있다(Garlid et al., 1996). Belghit et al. (2019)은 사료에 동애등에 오일을 첨가할 경우, 대서양연어의 간 내 triacylglycerol의 농도가 감소된다고 보고하였다. LA는 그람양성균과 일부 바이러스의 세포벽과 결합하여 이를 파괴시키며, 병원체의 신호 전달과 전사를 억제하여 항균 활성을 띄는 것으로 알려져 있다(Dayrit, 2015). 또한, LA는 생체 내에서 lipase 효소와 반응하여 강한 항균 활성을 가지는 monolaurin, 1-monolaurin (MLG) 등으로 전환된다(Schlievert et al., 1992). 이번 연구에서 동애등에의 첨가에 따른 새우의 성장과 면역력의 증진은 동애등에 분말에 다량 포함되어 있는 LA의 역할이 컸을 것으로 추측된다.

따라서 두 곤충박을 사료에 적정량으로 첨가하면 흰다리새우의 성장, 사료효

을, 비특이적 면역력, 항산화력을 증진시킬 수 있으며, 악영향 없이 사료 내 어분을 동애등에는 60%, 갈색거저리는 40%까지 대체 할 수 있을 것으로 판단된다. 갈색거저리보다는 동애등에의 이용 효과가 더 클 것으로 생각되며, 갈색거저리의 다량 사용은 오히려 흰다리새우의 성장을 방해할 수 있을 것으로 사료된다. 현재 곤충박은 대량생산 체계와 연구개발의 부재, 낮은 수요로 인해 어분에 비해 비싼 가격에 거래되고 있다. 그러나, 위와 같은 산업적·경제적 문제가 해결된다면, 가까운 미래에 사료 내 주요 단백질원으로써의 이용가치가 매우 높다고 판단된다.

**Table 14.** Growth performance and feed utilization of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets for 57 days (initial body weight:  $0.09 \pm 0.00$  g). The experimental diets were prepared by replacement fish meal with black soldier fly (BSF) and mealworm (MW) at each level, respectively (Con, BSF20, BSF40, BSF60, MW20, MW40 and MW60)

Dietary treatment	FBW <sup>1</sup>	SGR <sup>2</sup>	FCR <sup>3</sup>	PER <sup>4</sup>	Survival (%)
Con	5.28±0.22 <sup>b, x</sup>	7.14±0.10 <sup>c, xy</sup>	1.42±0.05 <sup>a</sup>	1.90±0.06 <sup>c</sup>	92.0±2.00 <sup>xy</sup>
BSF20	5.54±0.29 <sup>b</sup>	7.18±0.12 <sup>bc</sup>	1.36±0.03 <sup>a</sup>	2.04±0.04 <sup>b</sup>	94.0±6.93
BSF40	6.40±0.17 <sup>a</sup>	7.46±0.04 <sup>a</sup>	1.16±0.04 <sup>b</sup>	2.33±0.07 <sup>a</sup>	95.0±2.00
BSF60	6.17±0.69 <sup>a</sup>	7.41±0.22 <sup>ab</sup>	1.17±0.07 <sup>b</sup>	2.26±0.12 <sup>a</sup>	93.0±6.83
MW20	5.06±0.11 <sup>xy</sup>	7.06±0.12 <sup>xy</sup>	1.36±0.04	1.95±0.06	98.0±2.31 <sup>x</sup>
MW40	5.39±0.33 <sup>x</sup>	7.17±0.11 <sup>x</sup>	1.33±0.04	1.98±0.07	90.0±7.66 <sup>y</sup>
MW60	4.67±0.53 <sup>y</sup>	6.93±0.20 <sup>y</sup>	1.41±0.09	1.88±0.11	94.0±2.31 <sup>xy</sup>
Two-way ANOVA					
Insects	.000	.000	.000	.000	NS
Inclusion ratio	NS	NS	.002	NS	NS
Insects×Inclusion ratio	NS	NS	.001	NS	NS

Values are mean of quadruplicates and presented as mean ± SD. Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05).

<sup>1</sup>Final body weight (g) = final mean body weight - initial mean body weight.

<sup>2</sup>Specific growth rate (%) =  $[(\log_e \text{ final body weight} - \log_e \text{ initial body weight}) / \text{days}] \times 100$ .

<sup>3</sup>Feed conversion ratio= feed intake / wet weight gain.

<sup>4</sup>Protein efficiency ratio = wet weight gain / total protein given.

Con, control; NS, not significant.

**Table 15.** Proximate composition of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets for 57 days (% of wet basis). The experimental diets were prepared by replacement fish meal with black soldier fly (BSF) and mealworm (MW) at each level, respectively (Con, BSF20, BSF40, BSF60, MW20, MW40 and MW60)

<b>Dietary treatment</b>	<b>Protein</b>	<b>Lipid</b>	<b>Ash</b>	<b>Moisture</b>
Con	21.0±1.26	0.89±0.06	1.50±0.07	76.3±0.74
BSF20	21.1±0.43	0.80±0.12	1.54±0.04	77.1±0.52
BSF40	21.4±0.34	0.86±0.11	1.52±0.11	77.0±0.35
BSF60	21.5±0.24	0.80±0.20	1.57±0.03	76.6±0.47
MW20	20.5±0.62	0.84±0.21	1.51±0.03	76.8±0.75
MW40	20.6±2.57	0.85±0.19	1.56±0.10	76.2±0.50
MW60	20.6±0.69	1.04±0.06	1.59±0.05	76.1±0.20
Two-way ANOVA				
Insects	NS	NS	NS	NS
Inclusion ratio	NS	NS	NS	NS
Insects × Inclusion ratio	NS	NS	NS	NS

Values are mean of quadruplicates 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. Con, control; NS, not significant.

**Table 16.** Immune response and anti-oxidation of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets for 56 days. The experimental diets were prepared by replacement fish meal with black soldier fly (BSF) and mealworm (MW) at each level, respectively (Con, BSF20, BSF40, BSF60, MW20, MW40 and MW60)

Dietary treatment <sup>1</sup>	PO <sup>1</sup> (absorbance)	SOD <sup>2</sup> (% inhibition)	GPx <sup>3</sup> (mU/ml)	NBT <sup>4</sup> (absorbance)	Crustin <sup>5</sup>
Con	0.12±0.01 <sup>b, z</sup>	93.7±0.12 <sup>c, y</sup>	74.7±1.51 <sup>b, y</sup>	0.93±0.12	1.00±0.13 <sup>b, y</sup>
BSF20	0.14±0.02 <sup>b</sup>	98.3±0.39 <sup>a</sup>	93.1±7.14 <sup>a</sup>	0.92±0.25	5.31±0.78 <sup>a</sup>
BSF40	0.16±0.02 <sup>a</sup>	98.1±0.91 <sup>a</sup>	96.1±1.15 <sup>a</sup>	0.93±0.24	6.15±0.14 <sup>a</sup>
BSF60	0.14±0.01 <sup>ab</sup>	96.4±1.01 <sup>b</sup>	95.8±1.43 <sup>a</sup>	0.96±0.21	6.77±1.69 <sup>a</sup>
MW20	0.15±0.01 <sup>x</sup>	97.8±0.10 <sup>x</sup>	85.8±2.40 <sup>xy</sup>	1.06±0.15	4.67±1.88 <sup>x</sup>
MW40	0.14±0.01 <sup>xy</sup>	98.4±0.66 <sup>x</sup>	99.5±8.11 <sup>x</sup>	0.92±0.22	4.15±1.10 <sup>x</sup>
MW60	0.13±0.01 <sup>yz</sup>	98.0±0.89 <sup>x</sup>	86.1±5.33 <sup>xy</sup>	1.02±0.19	4.52±1.54 <sup>x</sup>
Two-way ANOVA					
Insects	NS	NS	NS	NS	NS
Inclusion ratio	NS	NS	NS	NS	NS
Insects×Inclusion ratio	NS	NS	NS	NS	NS

Values are mean of quadruplicates 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.

<sup>1</sup>Phenoloxidase activity.

<sup>2</sup>Superoxide dismutase.

<sup>3</sup>Glutathione peroxidase.

<sup>4</sup>Nitro-blue tetrazolium.

<sup>5</sup>Crustin gene expression in shrimp hepatopancreas were normalized to β-actin and expressed relative to control.

Con, control; NS, not significant.

## CHAPTER 3.

# 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

### 3.1 서론

곤충(insects)은 체내 단백질(20–76%)의 함량이 높고, 밀기울(wheat bran)과 음식물 찌꺼기 등의 산업·생활부산물을 먹이로 활용할 수 있어 미래의 식량자원으로 주목 받고 있다(Tzompa-Sosa et al., 2019). 최근 전세계적으로 곤충의 산업화를 위해 동물의 사료원료와 같은 여러 분야에서 곤충의 이용성에 관한 연구가 다수 수행되고 있다(Nogales-Mérida et al., 2019). 국내 곤충시장의 규모는 2011년 1680억 원에서 2018년 2648억 원으로 크게 증가하였지만(MAFRA, 2019), 식용곤충에 대한 수요는 아직까지 높지 않아 사료 분야에 대한 연구가 필요한 실정이다. 현재 약 300종 이상의 곤충이 산업적인 목적으로 사육되고 있다. 그 중 동애등에(*Hermetia illucens* black soldier fly, BSF)와 갈색거저리(*Tenebrio molitor* mealworm, MW)는 다른 곤충에 비해 성장이 빠르고, 고밀도로 사육할 수 있어 대규모 생산에 주로 이용되고 있다(Vargas-Abúndez et al., 2019). 곤충은 항균펩타이드(antimicrobial peptides, AMPs), chitin과 같은 여러 생리활성 물질을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다

(Ravi et al., 2011). 사료 내 곤충박의 첨가는 어류의 면역력, 질병에 대한 저항성, 장 내 유익균의 수를 증가시킬 수 있다고 보고되었다(Bruni et al., 2018; Henry et al., 2018; Nogales-Mérida et al., 2019). 새우의 경우에는 동애등에, 갈색거저리, 누에 (*Bombyx mori*)를 이용한 연구가 일부 진행되었으나(Cummins et al., 2017; Panini et al., 2017a; Rahimnejad et al., 2019), 전반적으로 미흡한 실정이다. 또한, 곤충의 체조성과 이용성은 먹이, 사육환경, 처리 공정에 따라 차이를 보여(Henry et al., 2015), 이에 대한 세부적인 연구가 필요하다.

양식사료 내 곤충의 이용성을 평가한 연구에는 주로 탈지(defatted) 곤충박이 이용되고 있다(Renna et al., 2017). 곤충의 지질 함량(16–40%)은 대체로 높아 원료의 산패를 일으킬 수 있고, 어분을 대체하는데 있어서 제한요소로 작용 할 수 있다. 특히, 곤충의 지질에는 단일불포화지방산(monounsaturated fatty acid, MUFA)의 함량이 높기 때문에 곤충을 사료에 다량 사용할 경우에는 지방산의 불균형에 따른 사료의 기호성을 저하시킬 수 있다(Barroso et al., 2017; Nogales-Mérida et al., 2019). 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)는 여러 질병에 대한 저항성이 높고 타 새우류와 비교하여 성장이 빨라 전세계에서 다량 사육되고 있다. 흰다리새우는 전세계 새우류 생산량의 53%를 차지하고 있으며, 생산량은 지속적으로 증가할 것으로 예측되고 있다(FAO, 2018). 따라서, 본 연구는 흰다리새우를 대상으로 동애등에와 갈색거저리의 탈지 유무에 따른 사료 내 첨가가 새우의 비특이적 면역력, 항산화력, *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 저항성, 성장에 미치는 영향을 평가하고자 수행되었다.

### 3.2 재료 및 방법

### 3.2.1 실험사료

갈색거저리, 탈지갈색거저리(defatted mealworm, deMW), 동애등에, 탈지동애등에(defatted black soldier fly, deBSF)가 실험에 사용되었다. 갈색거저리 유충 분말은 (주)KEIL (Seoul, Korea)에서, 동애등에 유충 분말은 (주)Entomo (Cheongju, Korea)에서 구매하였다. 원료의 일반성분, 아미노산, 지방산, chitin의 함량은 Table 17에 나타내었다. 대조사료(control, Con)에는 두 종류의 어분(정어리 어분, 참치부산물분)과 대두박이 주요 단백질원으로 사용되었다(Table 18). 실험사료는 총 5종으로 대조사료의 어분단백질을 비탈지 혹은 탈지갈색거저리와 동애등에 분말로 각각 20% 대체한 4종의 사료(MW, deMW, BSF, deBSF)로 구성하였다. 사료원료는 분쇄기로 이용하여 분쇄한 후 조성표에 따라 혼합되었다(Fig. 9). 혼합된 원료는 소형 사료 제조기(SP-50; Gungang ENG, Daegu, Korea)를 이용하여 2가지 크기(1, 2 mm)로 성형되었다. 완성된 사료는 건조 후(22°C, 13 h) 사료공급 전까지 냉동보관(-30°C) 되었다.



Figure 9. The preparation of experimental diets

### 3.2.2 실험새우와 사육관리

실험새우( $0.47 \pm 0.03$  g)는 총 20 개의 수조(210 L)에 23 마리씩 무작위로 사료구당 4 반복으로 배치되었다. 사육실험 중 수질은 1 일 1 회 측정되었으며, 평균

수온은  $28.2 \pm 1.25^{\circ}\text{C}$ , 용존산소는  $5.15 \pm 1.09 \text{ mg/L}$ , pH 는  $7.25 \pm 0.25$ , 염분은  $29.1 \pm 1.19\%$ , 암모니아는  $0.021 \pm 0.01 \text{ mg/L}$  로 유지되었다. 실험사료는 새우 체중의 4-8%를 1 일 6 회(08:30, 10:30, 12:30, 14:30, 16:30, 18:30 h)에 걸쳐 총 45 일간 공급되었다. 실험수조의 광주기는 형광등을 통해 조절되었고, 사육수는 수질을 고려하여 2-3 일 간격으로 환수하였다. 사육실험은 제주대학교 동물실험 윤리위원회의 윤리규정(승인번호, 2019-0039)을 준수하며 실시되었다.

### 3.2.3 Sampling과 분석

실험새우의 최종무게(final body weight, FBW)와 생존율(survival)을 조사하기 위해 새우를 20시간 동안 절식시켰다. 실험새우의 무게와 사료공급량을 이용하여 일간성장률(specific growth ratio, SGR), 단백질이용효율(protein efficiency ratio, PER), 사료계수(feed conversion ratio, FCR)를 계산하였다. 각 실험 수조에서 8마리의 실험 새우를 무작위로 선정하여 얼음물로 마취시켰다. Alsever's solution (A3551; Sigma, St. Louis, MO, USA)이 담긴 주사기를 이용하여 마취된 새우의 hemolymph를 채혈하였고, 원심분리 후 냉동보관( $-80^{\circ}\text{C}$ )하였다(Fig. 10). Hemolymph는 비특이적 면역력 지표인 대식세포(nitro-blue tetrazolium, NBT), phenoloxidase (PO), anti-protease 활성과 항산화 효소 활성 지표인 superoxide dismutase (SOD)와 glutathione peroxidase (GPx) 활성, 그 외 cholesterol, triglyceride, total protein의 농도를 분석하는데 사용되었다. 해부를 통해 새우의 간체장을 적출하였고, 액체질소로 급속냉동 후 냉동보관( $-80^{\circ}\text{C}$ )하였다. 간체장은 qPCR (real-time polymerase chain reaction)을 통해 비특이적 면역 지표인 penaeidine, crustin, prophenoloxidase (proPO) 유전자 발현 분석에 사용되었다. Sampling 후 남은 carcass는 일반성분분석에 사용되었다.

실험새우와 사료의 일반성분은 AOAC (2005) 방법을 토대로 분석하였다.

Strickland and Parsons (1972)의 방법을 기초로 수조 내 암모니아의 농도를 분석하였다. Song et al. (2018)의 방법을 기초로 곤충박 내 chitin를 추출하고, 함량을 측정하였다. 원료 내 아미노산은 Rosen et al. (1957)의 방법을 토대로 전처리 하였고, sample은 아미노산분석기(S433, Sykam GmbH, Fuerstenfeldbruck, Germany)를 이용하여 측정되었다. 지방산 함량은 Garces and Mancha (1993)의 방법을 기초로 전처리한 후, gas chromatography (6800GC; Agilent, San Francisco, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. Hemolymph내 NBT와 PO 활성은 Zhang et al. (2013)과 Hernández-López et al. (1996)의 방법을 이용하여 분석하였다. SOD와 GPx 활성은 상업용 kit (19160; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; K762-100; Biovision, San Francisco, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. Anti-protease 활성은 Ellis (1990)의 방법에 따라 분석되었다. 자동생화학분석기(SLIM; SEAC Inc., Florence, Italy)를 이용하여 hemolymph내 cholesterol, triglyceride, total protein의 농도를 분석하였다.



**Figure 10.** The sampling the hemolymph and hepatopancreas from shrimp

TRIzol® (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 실험새우의 간췌장 내 RNA를 추출하였다. Nano drop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, NC, USA)를 이용하여 RNA의 순도( $OD_{260}/OD_{280}$ , 1.8–2.0)를 측정하였다. PrimeScript™ first-strand cDNA

synthesis kit (Takara, Shiga, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 완성된 cDNA는 40배로 희석한 후 각 인자의 발현량 측정에 사용되었다. Reference gene으로  $\beta$ -actin (F-5'-GAG CAA CAC GGA GTT CGT TGT-3', R-5'-CAT CAC CAA CTG GGA CGA CAT GGA-3')을 이용하였다. 새우의 면역에 관련된 인자인 penaeidine (F-5'-CAC CCT TCG TGA GAC CTT TG-3', R-5'-AAT ATC CCT TTC CCA CGT GAC-3'), crustin (F-5'-GAG GGT CAA GCC TAC TGC TG-3', R-5'-ACT TAT CFA FFC CAF CAC AC-3'), proPO (F-5'-TCC ATT CCG TCC GTC TG-3', R-5'-GGC TTC GCT CTG GTT AGG-3')의 발현량을 측정하였다. 발현량은 thermal cycler dice (real time system III; Takara, Shiga, Japan)를 이용하여 측정하였다.

### 3.2.4 침지감염실험

사육실험 종료 후, 급성간췌장괴사증(acute hepatopancreatic necrosis disease)의 원인으로 알려져 있는 *V. parahaemolyticus*에 대한 실험새우의 저항성 평가를 실시하였다. 실험에 사용된 *V. parahaemolyticus* (13-028/A3)는 베트남 양식장 내 흰다리새우의 위에서 분리된 균주를 이용하였다(Han et al., 2019). 흰다리새우는 수조당 16마리씩 총 15개의 아크릴 수조(110 L, 지수식)에 배치되었다. *V. parahaemolyticus*는 NaCl이 첨가된 tryptic soy broth (TSB) (211825; BD Difco, Dickinson, ND, USA)를 이용하여 17시간 동안 배양(30°C, 150 rpm)되었다. 배양된 균은  $2 \times 10^6$  colony forming unit (CFU)/mL 농도가 되도록 계산하여 각 수조에 침지하였다(Fig. 11). Positive control로는 TSB 배지를 이용하였고, 침지 6시간 후에 환수(90%)를 진행하였다. 실험사료는 침지 직후 1회 급이 하였고, 이후 새우 체중의 3%에 해당되는 양을 1일 3회(08:00, 13:00, 18:00 h)에 나누어 공급하였다. 침지감염실험은 총 4일(96 h) 동안 진행되었고, 1시간 간격으로 수조 내 폐사를 관찰하고 기록하였다.

폐사 개체는 뜰채를 이용하여 수조에서 제거하였다. 실험새우 간체장 내 *V. parahaemolyticus*의 독소로 알려져 있는 *Photorhabdus* insect-related (*PirA*) toxin gene의 함량을 분석하였다. 실험새우의 간체장은 실험구 당 3마리씩 균 침지 전(0 h)과 균 침지 후 경과 시간(12, 96 h)에 따라 총 3회 적출되었다. 독소는 Han et al. (2015a)의 방법을 기초로 분석되었다. 간체장 내 DNA는 Kit (69504; Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 추출되었다. 추출된 DNA는 SYBR Green premix (Takara, Shiga, Japan)과 혼합하였고, thermal cycler dice (real time system III; Takara, Shiga, Japan)를 이용하여 발현량을 측정하였다. Primer는 Vp*PirA*-F (5'-TTG GAC TGT CGA ACC AAA CG-3'), Vp*PirA*-R (5'-GCA CCC CAT TGG TAT TGA ATG-3')를 이용하였다(Han et al., 2015a). qPCR은 denaturation (95°C, 20 s), 40 cycle (95°C, 1 s, 60°C, 20 s) 조건하에 분석되었다.



**Figure 11.** The preparation of the bacteria for challenge test

### 3.2.5 통계분석

실험 수조 내 사료의 배치는 완전임의배치법(randomized complete block design)을 이용하였다. 사육실험과 침지감염실험의 결과는 SPSS (Version 18.0; SPSS, Chicago, IL, USA)를 이용하여 통계 분석되었다(One-way ANOVA). 각 항목의 결과는 Duncan's multiple test를 이용하여 유의성( $P < 0.05$ )을 검증하였고, 백분율데이터는

arcsine 변형 값으로 통계분석 하였다.

**Table 17.** Nutrient composition of the insect meals and fish meals for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Nutrient contents	Ingredients					
	MW	deMW	BSF	deBSF	FM-S	FM-T
Proximate contents (% dry matter)						
Crude protein	47.5	63.0	38.8	61.1	71.0	65.0
Crude lipid	30.8	13.0	32.9	5.50	9.21	9.24
Ash	4.27	6.57	13.8	18.5	13.2	15.4
Moisture	7.07	4.12	3.70	5.39	6.25	7.00
Essential amino acids (% protein)						
Methionine	0.27	0.29	0.24	0.23	2.21	1.35
Lysine	5.93	5.73	5.72	5.83	8.00	5.89
Arginine	5.36	5.46	5.12	5.23	6.48	4.71
Histidine	8.38	8.18	7.65	7.84	5.13	3.15
Isoleucine	4.78	4.88	5.12	5.00	4.71	3.64
Leucine	7.23	7.13	8.03	7.92	7.77	5.79
Phenylalanine	3.96	3.56	4.06	4.25	4.31	3.09
Threonine	4.15	4.25	4.21	4.12	4.57	3.42
Valine	6.70	6.49	7.12	7.09	5.62	4.11
EAA/NAA	0.88	0.85	0.90	0.99	0.94	0.54
Fatty acids (% lipid)						
8:0	0.44	1.60	0.76	2.04	-	-
10:0	0.31	1.15	1.84	1.71	-	-
12:0	0.34	-	37.9	30.8	0.40	0.10
14:0	3.85	2.84	5.64	4.58	-	-
16:0	16.4	16.4	15.2	17.3	30.1	40.3
18:0	3.22	7.85	4.03	6.98	8.52	10.9
18:1n9(OA)	42.4	33.7	16.7	18.4	9.21	4.50
18:2n6(LA)	29.8	34.2	11.8	12.8	10.9	0.30
18:3n3(LNA)	1.33	0.98	1.53	1.42	4.52	0.30
20:5n3(EPA)	-	-	-	-	14.1	12.2
22:6n3(DHA)	-	-	-	-	8.90	7.90
∑SFA <sup>1</sup>	24.6	29.8	65.4	63.4	45.2	51.3
∑MUFA <sup>2</sup>	42.4	33.7	16.7	18.4	9.21	4.50
∑PUFA <sup>3</sup>	31.1	35.2	13.3	14.2	38.4	21.8
∑n-3 <sup>4</sup>	1.33	0.98	1.53	1.42	27.5	20.4
∑n-6 <sup>5</sup>	29.8	34.2	11.8	12.8	10.9	1.30
n-3/n-6	0.04	0.03	0.13	0.11	2.52	15.4
Chitin	5.10	6.15	3.12	4.54	-	-

<sup>1</sup>Sum of saturated fatty acids.

<sup>2</sup>Sum of monounsaturated fatty acids.

<sup>3</sup>Sum of polyunsaturated fatty acids.

<sup>4</sup>Sum of n-3 polyunsaturated fatty acids.

<sup>5</sup>Sum of n-6 polyunsaturated fatty acids.

Ingredients are abbreviated as: mealworm (MW), defatted mealworm (deMW), black soldier fly (BSF), defatted black soldier fly (deBSF), sardine fish meal (FM-S) and tuna fish meal (FM-T).

**Table 18.** Formulation and proximate composition (% , dry matter) of the experimental diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Ingredients	Experimental diets				
	Con	MW	deMW	BSF	deBSF
Fish meal, tuna <sup>1</sup>	10.0	8.00	8.00	8.00	8.00
Fish meal, sardine <sup>2</sup>	10.0	8.00	8.00	8.00	8.00
Mealworm, whole <sup>3</sup>	-	5.47	-	-	-
Mealworm, defatted <sup>3</sup>	-	-	3.60	-	-
Black soldier fly, whole <sup>4</sup>	-	-	-	6.55	-
Black soldier fly, defatted <sup>4</sup>	-	-	-	-	4.67
Soybean meal	31.0	31.0	31.0	31.0	31.0
Soy protein concentrate	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Squid liver meal	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Starch	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Wheat flour	21.8	21.6	21.9	21.1	21.1
Fish oil, cod liver <sup>5</sup>	3.00	1.68	3.03	1.16	3.00
Mineral mixture <sup>6</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Vitamin mixture <sup>7</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Lecithin <sup>8</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cholesterol	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Mono-calcium phosphate	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Proximate composition					
Crude protein	39.6	39.8	39.6	38.9	39.0
Crude lipid	8.48	8.21	8.31	8.43	8.43
Crude ash	10.0	9.42	9.35	10.3	10.2
Energy (kcal/kg)	3947	3972	3942	3948	3941
Moisture	7.70	7.30	7.18	7.29	7.13

<sup>1</sup>Wogin Feed Industry Co. Ltd., Incheon, Korea.

<sup>2</sup>Orizon S.A., Corp., Santiago, Chile.

<sup>3</sup>KEIL, Seoul, Korea.

<sup>4</sup>Entomo, Cheongju, Korea.

<sup>5</sup>E-wha oil & fat Industry Corp., Busan, Korea.

<sup>6</sup>Mineral premix contains (1 kg) 80 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 369.64 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 130 g KCl, 40 g Ferric citrate, 20 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 357 g Ca-lactate, 0.2 g CuCl, 0.15 g AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.01 g Na<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 2 g MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O and 1 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O.

<sup>7</sup>Vitamin premix contains (1 kg) 121 g L-ascorbic acid, 19 g DL- $\alpha$  tocopheryl acetate, 2.7 g thiamin hydrochloride, 9.1 g riboflavin, 1.8 g pyridoxine hydrochloride, 36 g niacin, 12.7 g Ca-D-pantothenate, 182 g myo-inositol, 0.27 g D-biotin, 0.68 g folic acid, 18 g p-aminobenzoic acid, 1.8 g menadione, 0.73 g retinyl acetate, 0.003 g cholecalciferol, 0.003 g cyanocobalamin and 594.214g starch.

<sup>8</sup>Lysoforte™ Dry, KEMIN Korea Co. Ltd., Seongnam, Korea.

### 3.3 결과

침지감염실험의 경우, *V. parahaemolyticus*에 대한 새우의 생존율은 두 종의 탈지곤충박 실험구(74.4%)가 대조구(56.4%)와 비탈지곤충박 실험구(51.3–53.8%)에 비해 높았다(Fig. 12). 새우의 간체장 내 *V. parahaemolyticus* 독소의 양은 침지 12 시간 후에 탈지 여부에 상관없이 곤충박 실험구가 대조구에 비해 낮았다(Table 19). 사육실험의 경우, 새우 간체장의 proPO 발현량은 탈지갈색거저리구가 대조구에 비해 유의적으로 높았고, 그 외 곤충박 실험구에서도 높은 경향을 보였다(Table 20). Crustin과 penaeidine-3c 발현량은 두 종의 곤충박 실험구가 탈지 유무에 상관 없이 대조구에 비해 높은 경향을 보였다. Hemolymph 내 PO와 SOD 활성은 모든 곤충박 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. Cholesterol 농도는 탈지 곤충박 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 낮았고, 일반 곤충유 실험구에서도 낮은 경향을 보였다. GPx, NBT, anti-protease 활성과 triglyceride 농도는 모든 실험구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 탈지갈색거저리구의 최종평균무게(7.03 g)와 일간성장률(6.01%)은 일반 갈색거저리구(6.87 g, 5.96%)와 대조구(6.66 g, 5.89%)에 비해 높은 경향을 보였다(Table 21). 탈지갈색거저리구의 사료계수(1.38)는 일반 갈색거저리구(1.44)에 비해 낮은 경향을 보였고, 단백질이용효율은 반대의 경향을 보였다. 생존율은 실험구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 탈지동애등에구와 일반 동애등에구의 최종평균무게(7.06–7.10 g)와 일간성장률(6.02–6.03%)은 대조구(6.66 g, 5.89%)에 비해 높은 경향을 보였다. 동애등에 실험구의 사료계수(1.36–1.38)와 단백질이용효율(1.86–1.90)은 대조구(1.40, 1.81)에 비해 낮았다. 실험 새우의 일반성분과 근육 내 지방산의 조성은 모든 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다(Table 22 & Table 23).

### 3.4 고찰

이번 연구에서 탈지곤충박은 탈지 처리를 하지 않은 곤충박에 비해 *V. parahaemolyticus*에 대한 저항성 증진에 보다 높은 효과를 보였다(Fig. 12). 탈지곤충박은 원료를 가공하는 과정에서 지질을 제외한 물질의 함량(단백질, chitin, 미지 성장인자 등)이 비탈지곤충박에 비해 상대적으로 증가하였고, chitin과 같은 생리 활성 물질 혹은 미지성장인자가 균에 대한 새우의 생존율 향상에 도움을 주었다고 생각한다. Chitin은 곤충 갑각의 주요 구성성분으로 약 4-25% 정도 함유되어 있다(Henry et al., 2015). 실험에 사용된 곤충박의 chitin 함량은 탈지갈색거저리와 탈지동애등애가 비탈지갈색거저리와 비탈지동애등애에 비해 높았다(Table 17). Chitin은 병원균의 세포벽과 직접 결합하여 구조를 파괴시키거나, 균의 내부로 침투해 DNA에 손상을 줄 수 있고, 균의 성장에 필요한 금속이온과 결합하여 직·간접적으로 균의 증식을 억제 할 수 있다고 보고되었다(Abdel-Ghany and Salem, 2020). 또한 chitin은 활성산소(free radical)와 결합하여 이를 불활성화 시키는 것으로 알려져 있다(Ngo and Kim, 2014). 사료 내 chitin의 첨가는 갑각류의 성장, 항산화 효소 활성화, 여러 질병에 대한 저항성 향상에 도움을 주는 것으로 보고되었다(Akiyama et al., 1992; Shiau and Yu, 1998; Powell and Rowley, 2007; Niu et al., 2013). 흰다리새우의 소화기관에는 chitin 분해효소인 chitinase를 분비하는 균이 일부 존재한다고 보고되었다(Tzuc et al., 2014). Chitinase의 활성화는 닭의 장에서 소화에 도움을 주는 유인균인 *Lactobacillus*의 수를 증가시키고 *Escherichia coli*와 *Salmonella*와 같은 유해균의 증식을 억제시킨다고 보고되었다(Khempaka et al., 2011). Bruni et al. (2018)은 사료 내 동애등애의 첨가는 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)의 장 내 유익균(*Shewanella* spp., *Pseudomonas stutzeri*, *Acinetobacter radioresistens*, *Carnobacterium divergens*)의 수를 증가시킨다고 보고하였다. 그 중 *Acinetobacter* spp.는 chitinase,

amylase, cellulose, phytase 활성을 띄는 것으로 알려져 있다(Askarian et al., 2012). 뿐만 아니라 chitin은 유산균(lactic acid bacteria)의 성장에 필요한 물질로써, 사료 내 섬유소의 소화 증진에 도움을 주는 것으로 보고되었다(Gajardo et al., 2016; Bruni et al., 2018). 새우사료에는 섬유소가 함유된 식물성원료가 다량 사용되기 때문에 곤충박 내 chitin은 사료의 전반적인 소화에도 도움을 줄 수 있다고 생각된다. Chitin 외에도 아직까지 그 존재와 효과가 밝혀지지 않은 여러 생리활성 물질이 탈지곤충박의 비교적 높은 이용성에 직·간접적으로 영향을 주었다고 생각된다. 후속 연구를 통해 곤충박 내 생리활성 물질에 대한 세부적인 연구가 요구된다.

PirA는 흰다리새우에게 병증을 유발하는 독성 인자로 *V. parahaemolyticus* 내 plasmid에 존재하며, 출처가 다른 여러 *V. parahaemolyticus* 중에 병증 발현의 유무를 판단하는 지표로 이용된다(Han et al., 2015b). Han et al. (2015a)에 따르면, pirA의 함량은 *V. parahaemolyticus*의 농도와 함께 증가(threshold cycle 값 감소)한다고 보고하였다. 침지감염실험에서 새우 간체장 내 pirA는 침지 12시간 후에 모든 실험구에서 검출되었고(Table 19), 이는 병원성을 지닌 *V. parahaemolyticus*에 의해 새우가 폐사하였음을 입증한 결과라고 판단된다. 반면, 침지 96시간 후에 pirA는 모든 실험구에서 검출되지 않았다. 새우의 면역체계가 활성화 되어 간체장 내 *V. parahaemolyticus*의 증식이 억제 혹은 감소되었기 때문에 침지 96시간 후에는 pirA가 검출되지 않았다고 판단된다.

이번 연구에서 두 종의 곤충박은 탈지 유무에 상관없이 사료 내 어분을 부분적으로 대체(20%)할 수 있을 뿐만 아니라 새우의 비특이적 면역력(PO, proPO, crustin, penaeidine-3c)과 항산화 효소(SOD)의 활성 증진에 도움을 주는 것으로 나타났다(Table 4). PO 는 균의 세포벽 내 lipopolysaccharides와  $\beta$ -1, 3-glucan에 의해 활성화 되며, proPO와 같은 면역체계 활성화에 직접적으로 관여하여, 무척추동물의

면역력 조절에 중추적인 역할을 담당하는 인자로 알려져 있다(Cerenius and Söderhäll, 2004). proPO는 polysaccharides와 결합할 수 있는 단백질로 구성되어 있어, 병원체를 인식하며(Amparyup et al., 2013), crustin과 penaeidine-3c는 갑각류에 존재하는 항균펩타이드로 그람음성균과 그람양성균에 대한 항균활성을 지닌 것으로 보고되었다(Song and Li, 2014; Yang et al., 2015). SOD는 대사과정에서 발생하는 활성산소(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)를 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 변환시켜 활성산소에 의한 세포의 손상을 막는데 중요한 역할을 한다(Fridovich, 1998). 곤충은 체내에 여러 종류의 항균펩타이드를 함유하고 있다. 곤충의 항균펩타이드는 병원균의 세포벽에 부착하여 이를 파괴시키거나, 세포 내로 침투하여 RNA와 DNA의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다(Nicolas, 2009; Jozefiak and Engberg, 2017). 항균펩타이드는 가축 사료에 첨가할 경우, 동물의 비특이적 면역력과 여러 질병에 대한 저항성 증진에 도움을 줄 수 있고, 병원균에 대한 내성을 일으키지 않는다는 장점을 가지고 있다(Wu et al., 2012; Choi et al., 2013; Jozefiak and Engberg, 2017). 갈색거저리와 동애등에는 항균펩타이드의 일종인 tenecin과 defensin-like peptides를 함유하고 있고, 여러 균에 대한 항균활성을 지닌 것으로 알려져 있다(Lee et al., 1998; Hwang et al., 2008). 본 연구에 앞서 진행된 실험에서 사료 내 단백질원으로써 갈색거저리와 동애등에 유충 분말을 사용할 경우, 흰다리새우(0.09 g, 57일)의 비특이적 면역력(PO, crustin)과 항산화 효소 활성(SOD, GPx)을 증진시키는 것으로 나타났다(Shin et al., 2020). 그 외 연구에서도 사료 내 갈색거저리의 첨가는 흰다리새우의 비특이적 면역력( $\beta$ -1,3-glucan binding protein, proPO, crustin)과 *V. parahaemolyticus*에 대한 저항성을 증진시킨다고 보고되었다(Choi et al., 2018; Motte et al., 2019). 동애등에 또한 사료에 첨가할 경우, 가재의 일종인 marron *Cherax cainii*의 lysozyme 활성과 장 내 항염증(anti-inflammatory)에 관여하는 cytokine인 interleukin-10의 발현을 증가시키는 것으로 보고되었다(Foysal

et al., 2019). 어류를 대상으로 진행된 연구에서도 사료 내 갈색거저리와 동애등을 단백질원으로 사용할 경우, yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* (Xiao et al., 2018), 대서양연어(*Salmo salar*) (Li et al., 2019), 참돔(*Pargus major*) (Ido et al., 2019)의 비특이적 면역력, 항산화력, 감염증에 대한 저항성을 향상시키는 것으로 보고되었다. 따라서, 동애등과 갈색거저리를 사료 내 단백질원 혹은 기능성 첨가제로 이용할 경우 흰다리새우의 면역력과 항산화력 증진에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

이번 연구에서 곤충박은 탈지 유무에 상관 없이 새우의 성장과 일반성분, 지방산 함량에 부정적인 영향을 끼치지 않았다(Table 21, Table 22, Table 23). 곤충은 지질의 함량이 대체로 높아 어분대체원으로 사용할 경우에는 사료 내 최대 이용 함량을 제한하는 요소로 작용할 수 있다(Nogales-Mérida et al., 2019). 연구에 사용된 곤충박의 지질 함량(30-33%)은 탈지 곤충박(5.5-13%)과 어분(9.24%)에 비해 높았다(Table 17). Panini et al. (2017a)은 사료 내 어분을 지질의 함량이 30%인 갈색거저리로 모두 대체할 경우, 흰다리새우의 지질 함량이 증가된다고 보고하였다. 이와는 반대로 탈지동애등과 탈지누에를 이용하여 사료 내 어분을 모두 대체하더라도 흰다리새우의 지질 함량에 영향을 미치지 않는다고 보고되었다(Cummins et al., 2017; Rahimnejad et al., 2019). 곤충유(insect oils) 내 포화지방산(saturated fatty acids) 혹은 단일불포화지방산의 함량은 어분에 비해 높아 사료에 비탈지 곤충박을 다량 사용할 경우에는 지방산의 불균형을 초래하여 어류의 성장을 저하시키거나 사료섭취를 감소시킬 수 있다고 보고되었다(Nogales-Mérida et al., 2019; Panini et al., 2017b). 이번 연구에서는 실험사료 내 어분이 2종의 곤충박으로 소량 대체(20%)되었기 때문에 새우의 성장과 체조성에 큰 영향을 미치지 않았다고 생각된다. 그러나 일반 곤충박을 이용하여 어분을 다량 대체할 경우에는 새우의 체조성

에 변화를 일으킬 가능성이 높다고 사료된다. 따라서, 탈지 곤충박은 비탈지곤충박에 비해 지질의 함량이 낮아 새우 사료에 단백질원료로써 보다 많은 양을 사용할 수 있을 것이라고 생각된다.

이번 연구에서 사료 내 어분을 곤충박으로 부분 대체할 경우 흰다리새우의 비특이적 면역력, 항산화 효소의 활성화, *V. parahaemolyticus*에 대한 저항성 증진에 도움을 주는 것으로 나타났다. 곤충박을 어분대체원으로 사용할 경우에는 탈지곤충박이 비탈지곤충박에 비해 그 이용성이 비교적 높을 것으로 판단된다.

**Table 19.** The cycle threshold (Ct) values of hepatopancrease for *Photobacterium* insect-related (PirA) toxin-like gene levels in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at 0, 12, 96 h after *Vibrio parahaemolyticus* ( $2 \times 10^6$  colony forming unit/mL) infection challenge. The experimental diets were prepared by replacing fish meal in the control diet (Con) with mealworm (MW), defatted MW (deMW), black soldier fly (BSF) or defatted BSF (deBSF)

<b>Dietary treatments</b>	<b>0 h</b>	<b>12 h</b>	<b>96 h</b>
Con	nd	29.3±1.53	nd
MW	nd	35.3±0.04	nd
deMW	nd	34.5±5.16	nd
BSF	nd	33.0±2.72	nd
deBSF	nd	36.5±1.37	nd

Values are mean of triplicates and presented as mean ± standard deviation. Values with different superscripts in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ). nd, not detected

**Table 20.** Innate immune response and anti-oxidant enzyme activity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets for 45 days. The experimental diets were prepared by replacing fish meal in the control diet (Con) with mealworm (MW), defatted MW (deMW), black soldier fly (BSF) or defatted BSF (deBSF)

Parameters	Con	MW	deMW	BSF	deBSF
PO <sup>1</sup>	0.23±0.02 <sup>b</sup>	0.29±0.02 <sup>a</sup>	0.27±0.02 <sup>a</sup>	0.28±0.01 <sup>a</sup>	0.29±0.02 <sup>a</sup>
SOD <sup>2</sup>	82.8±1.29 <sup>b</sup>	86.7±2.41 <sup>a</sup>	87.1±2.17 <sup>a</sup>	88.5±1.65 <sup>a</sup>	87.5±0.97 <sup>a</sup>
GPx <sup>3</sup>	3.52±0.28	3.74±0.51	4.23±0.86	4.10±0.68	4.54±0.33
NBT <sup>4</sup>	2.70±0.09	2.97±0.15	2.91±0.43	2.68±0.49	3.07±0.12
Anti-protease <sup>5</sup>	19.0±4.53	20.4±4.74	19.7±4.49	20.1±1.27	21.3±3.46
Cholesterol <sup>6</sup>	10.7±2.15 <sup>a</sup>	9.29±2.03 <sup>b</sup>	9.75±1.52 <sup>ab</sup>	9.20±3.21 <sup>b</sup>	9.54±3.84 <sup>ab</sup>
Triglyceride <sup>6</sup>	10.9±2.70	11.0±1.99	10.8±2.48	11.1±2.94	10.6±2.13
Prophenoloxidase <sup>7</sup>	1.00±0.71 <sup>b</sup>	3.98±0.95 <sup>ab</sup>	4.21±0.24 <sup>a</sup>	3.41±0.44 <sup>ab</sup>	3.34±0.21 <sup>ab</sup>
Crustin <sup>7</sup>	1.00±0.37	3.48±0.64	2.45±0.84	2.15±0.76	2.49±0.62
Penaedine-3c <sup>7</sup>	1.00±0.38	3.14±0.48	2.90±0.77	1.81±0.63	3.20±0.59

Values are mean of triplicates and presented as mean ± standard deviation. Values with different superscripts in the same row are significantly different (P<0.05).

<sup>1</sup>Phenoloxidase activity (absorbance).

<sup>2</sup>Superoxide dismutase (% inhibition).

<sup>3</sup>Glutathione peroxidase (mU/mL).

<sup>4</sup>Nitro-blue tetrazolium activity (absorbance).

<sup>5</sup>(% inhibition).

<sup>6</sup>(mg/dL).

<sup>7</sup>The expression of three genes in shrimp hepatopancreas were normalized to β-actin and expressed relative to control.

**Table 21.** Growth performance, feed utilization and survival of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) (initial body weight,  $0.47 \pm 0.00$  g) fed the experimental diets for 45 days. The experimental diets were prepared by replacing fish meal in the control diet (Con) with mealworm (MW), defatted MW (deMW), black soldier fly (BSF) or defatted BSF (deBSF)

Dietary treatments	FBW <sup>1</sup>	SGR <sup>2</sup>	FCR <sup>3</sup>	PER <sup>4</sup>	FI <sup>5</sup>	Survival (%)
Con	6.66±0.22	5.89±0.07	1.40±0.06 <sup>ab</sup>	1.81±0.07 <sup>ab</sup>	8.66±0.13	87.6±9.54
MW	6.87±0.53	5.96±0.17	1.44±0.06 <sup>a</sup>	1.75±0.08 <sup>b</sup>	9.19±0.40	92.4±6.52
deMW	7.03±0.36	6.01±0.12	1.38±0.02 <sup>ab</sup>	1.83±0.03 <sup>ab</sup>	9.02±0.47	91.3±3.55
BSF	7.10±0.42	6.03±0.13	1.36±0.06 <sup>b</sup>	1.90±0.08 <sup>a</sup>	8.98±0.29	93.5±5.61
deBSF	7.06±0.35	6.02±0.11	1.38±0.03 <sup>ab</sup>	1.86±0.04 <sup>ab</sup>	9.07±0.31	91.3±7.94

Values are mean of quadruplicates and presented as mean ± standard deviation. Values with different superscripts in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>Final body weight (g) = final mean body weight - initial mean body weight.

<sup>2</sup>Specific growth rate (%) =  $[(\log_e \text{ final body weight} - \log_e \text{ initial body weight}) / \text{days}] \times 100$ .

<sup>3</sup>Feed conversion ratio = feed intake / wet weight gain.

<sup>4</sup>Protein efficiency ratio = wet weight gain / total protein given.

<sup>5</sup>Feed intake (g) = dry feed consumed (g) / the number of shrimp.

**Table 22.** Proximate composition (% , wet basis) of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets for 45 days. The experimental diets were prepared by replacing fish meal in the control diet (Con) with mealworm (MW), defatted MW (deMW), black soldier fly (BSF) or defatted BSF (deBSF)

<b>Dietary treatments</b>	<b>Crude protein</b>	<b>Crude lipid</b>	<b>Crude ash</b>	<b>Moisture</b>
Con	21.0±1.26	0.89±0.06	1.50±0.07	76.3±0.74
MW	21.1±0.43	0.80±0.12	1.54±0.04	77.1±0.52
deMW	21.4±0.34	0.86±0.11	1.52±0.11	77.0±0.35
BSF	20.5±0.62	0.97±0.06	1.51±0.03	76.8±0.75
deMW	20.7±1.25	0.98±0.12	1.56±0.10	76.2±0.50

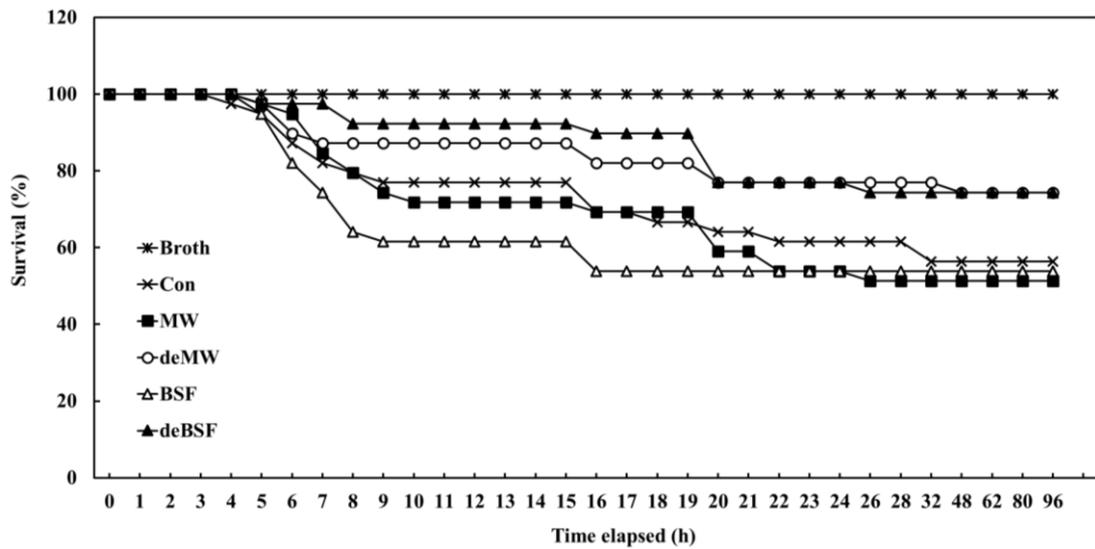
Values are mean of triplicates and presented as mean ± standard deviation. Values with different superscripts in the same column are significantly different (P<0.05).

**Table 23.** Fatty acid composition (% lipid) of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) muscle fed the experiment diets for 45 days. The experimental diets were prepared by replacing fish meal in the control diet (Con) with mealworm (MW), defatted MW (deMW), black soldier fly (BSF) or defatted BSF (deBSF)

Fatty acids	Con	MW	deMW	BSF	deBSF
16:0	31.3	33.2	34.1	33.5	31.8
18:0	10.6	10.2	10.6	10.2	10.4
18:1n9 (OA)	15.6	17.0	16.7	14.6	16.2
18:2n6 (LA)	11.9	13.4	13.2	13.5	12.9
20:5n3 (EPA)	6.76	6.63	6.83	6.86	6.77
22:6n3 (DHA)	7.43	7.16	6.94	7.38	7.58
DHA/EPA	1.10	1.08	1.02	1.08	0.82
$\sum$ n-3 <sup>1</sup>	14.2	13.8	13.8	14.2	12.4
$\sum$ n-6 <sup>2</sup>	11.9	13.4	13.2	13.5	12.9
n-3/n-6	1.19	1.03	1.04	1.05	0.96

<sup>1</sup>Sum of n-3 polyunsaturated fatty acids.

<sup>2</sup>Sum of n-6 polyunsaturated fatty acids.



**Figure 12.** Survival of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets for 45 days during the challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. The shrimp were immersed with *V. parahaemolyticus* suspension containing  $2 \times 10^6$  colony forming unit/mL. The water in each tank was exchanged 6 h after immersion challenge. Triplicate groups of shrimp were fed one of the experimental diets three times a day during the challenge period. The experimental diets were prepared by replacing fish meal in the control diet (Con) with mealworm (MW), defatted MW (deMW), black soldier fly (BSF) or defatted BSF (deBSF).

## CHAPTER 4.

### Utilization of black soldier fly oil and mealworm oil in diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

#### 4.1 서론

최근 곤충과 곤충유래 물질은 친환경적이고 지속 가능한 개발에 최적화된 원료로 주목 받고 있다(Sogari et al., 2019). 곤충은 음식물찌꺼기, 쌀겨와 같은 각종 산업부산물을 먹이로 활용할 수 있고, 생산된 곤충은 가축을 포함한 동물사료에 원료로 사용할 수 있다(Gasco et al., 2020). 뿐만 아니라 곤충의 배설물은 질 좋은 비료로 활용할 수 있다. 곤충은 위와 같은 다양한 이점을 가지고 있어서, 동물사료에 이용성에 관한 연구가 활발하게 수행되고 있다(Gasco et al., 2019a, b). 수생동물 사료에 곤충의 이용성에 관한 연구도 주목 받고 있다. 동애등에(black soldier fly *Hermetia illucens*)와 갈색거저리(mealworm *Tenebrio molitor*)는 음식물찌꺼기, 쌀겨와 같은 산업부산물을 먹이로 활용할 수 있고, 다른 곤충에 비해 성장이 빨라, 대규모 생산에 적합한 종으로 알려져 있다(Vargas-Abúndez et al., 2019). 동애등에유와 갈색거저리유는 생물의 성장과 면역활성에 도움을 줄 수 있는 oleic acid (OA)와 lauric acid (LA)를 다량 함유하고 있어, 새로운 지질원료로 주목 받고 있다(Benzertiha et al., 2020). 육계(broiler)와 토끼 사료에 지질원으로써 곤충유를 이용할 경우, 성장과 사료효율, 소화율, 기초건강도에 아무런 악영향을 끼치지 않는다고 보고되었다(Benzertiha et al., 2019a, b). 어류와 새우 사료에 단백질원료로써 곤충박을 이용한 연구는 일부 보고되었다. 그러나,

사료에 어유 대체원으로써 곤충유의 이용성에 관한 연구는 전무한 실정이다.

새우를 포함한 갑각류는 다가불포화지방산을 자체적으로 합성하는 능력이 제한적이기 때문에 사료를 통해 질 좋은 지질원료를 공급해줘야 한다. 어유(fish oil, FO)는 양식생물의 성장에 필요한 영양소를 다량 함유하고 있어, 사료에 주요 지질원으로 사용되어 왔다. 어유의 가격은 수요의 증가와 어획 규제로 인해 계속해서 상승하고 있다. 양식사료에 어유 대체원으로써 여러 원료가 연구되었으나, 아직까지 어유를 효율적으로 대체할 수 있는 원료는 규명되지 않았다.

흰다리새우(Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*)는 전 세계에서 가장 많이 양식되고 있는 갑각류이며, 연간 약 400만톤인 생산되고 있다(FAO, 2020). 그 생산량은 계속해서 증가할 것으로 예상되고 있어, 흰다리새우 사료에 관한 연구가 필요한 실정이다. 따라서, 이번 연구에서는 사료에 어유대체원으로써 동애등에유와 갈색거저리유의 이용성을 평가하고자 수행되었다.

## 4.2 재료 및 방법

### 4.2.1 실험원료와 실험사료

사육실험에 사용된 갈색거저리 오일과 동애등에 오일의 일반성분과 지방산 함량은 Table 24에 나타내었다. 대조사료(control, Con)는 2종의 어분(sardine, tuna)과 대두박을 주단백질원으로 사용하였고, 주지질원으로 명태간유(cod liver oil)를 이용하였다. 조단백질과 조지질의 함량은 흰다리새우의 영양소 요구량을 충족시키도록 구성하였다(Table 25). 실험사료는 총 9종으로 대조사료의 명태간유(어유)를 갈색거저리 오일과 동애등에 오일로 각각 25, 50, 75, 100% 대체하였다(Con, MO25,

MO50, MO75, MO100, BO25, BO50, BO75, BO100). 실험사료는 펠릿사료 제조기(SP-50, Gungang ENG, Daegu, Korea)를 이용하여 총 2가지 크기(1, 2 mm)로 성형되었고, 건조 후(15 h, 20°C) 사료공급 전까지 냉동보관(-20°C) 되었다(Fig. 13). 실험사료의 지방산 함량은 Table 26에 나타내었다.



**Figure 13.** Preparation of experimental diets

#### 4.2.2 사육실험 관리와 sampling

실험새우는 제주대학교 동물실험윤리위원회의 윤리규정을 준수하며 실험에 이용하였다. 실험새우는 제주도 성산읍에 위치한 종묘장에서 post-larvae 시기의 흰다리새우를 구입하여 실험에 이용하였다. 흰다리새우(0.90 g)는 총 42개의 acrylic 수조(210 L)에 24마리씩 배치하였다(Fig. 14). 사육실험 중 수질은 1일 1회 측정되었으며, 평균 수온은 28.2°C, 용존산소는 5.12 mg/L, pH는 7.52, 염분은 30‰, 암모니아는 0.040 mg/L으로 나타났다. 실험사료는 새우 체중의 6–12%를 1일 6회(08:30, 10:30, 12:30, 14:30, 16:30, 18:30 h)에 나누어 총 58일간 공급하였다. 광주기는 형광등을 이용하여 조절(12 light: 12 dark)하였다. 사육수조의 환수는 실험사료의 공급량에 따라 2–3일에 한 번(80%)씩 진행되었다.



**Figure 14.** Setting the feeding trial

#### 4.2.3 분석항목

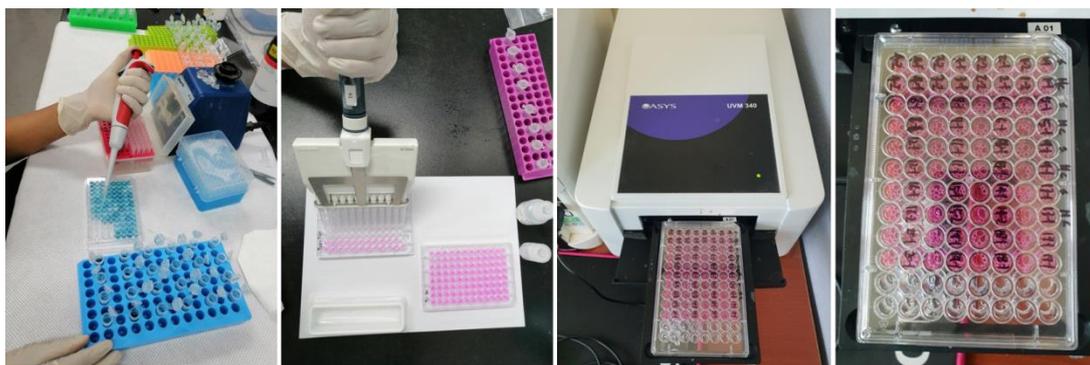
실험새우의 무게는 실험시작 3, 8주에 측정되었고, 스트레스를 최소화하기 위해 무게 측정 16시간 전부터 사료의 공급을 중단하였다. 사육실험 종료 후, 실험새우의 최종무게(final body weight, FBW), 성장률(weight gain, WG), 일간성장률(specific growth ratio, SGR), 사료계수(feed conversion ratio, FCR), 단백질이용효율(protein efficiency ratio, PER), 생존율(survival)을 조사하였다. 수조당 8 마리의 실험새우를 얼음물로 마취시켜 hemolymph와 간채장을 적출하였다. Hemolymph는 원심분리 후 냉동보관(-80°C) 하였다. 간채장은 액체질소를 이용하여 급속 냉동한 다음 냉동보관(-80°C) 하였다. 장기 적출 후 남은 carcass는 일반성분분석을 위해 냉동보관 되었다(-20°C) (Fig. 15).



**Figure 15.** Sampling the shrimp

사육수의 암모니아 농도는 Strickland and Parsons (1972)의 방법에 따라 분석되었다. 실험사료와 새우의 일반성분은 AOAC (2005) 방법에 따라 분석되었다. 지방

산은 Garces and Mancha (1993)의 방법에 따라, gas chromatography (6800GC, Agilent, San Francisco, USA)를 이용하여 분석되었다. Hemolymph의 glutathione peroxidase (GPx)와 superoxide dismutase (SOD) 활성은 각각 kit (K762-100, Biovision, San Francisco, USA; 19160, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 이용하여 분석되었다. Phenoloxidase (PO) 활성은 Zhang et al. (2013)의 방법에 따라 분석되었다(Fig. 16).



**Figure 16.** Analyses of innate immune responses and antioxidant capacity

실험새우의 간체장 RNA는 TRI-zol® (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 추출하였다. RNA purity는  $\mu$ Drop™Plate (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 RNA의 순도(OD260 / OD280, 1.8–2.0)를 확인하였다. cDNA의 합성은 Prime Script™ first-strand cDNA synthesis kit (TaKaRa, Shiga, Japan)를 이용하였다.  $\beta$ -actin은 reference gene으로 사용되었고, fatty acid binding protein (FABP), triacylglycerol lipase (TgL), carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1), ATPase- $\alpha$ , retinoid-X receptor (RXR) and ecdysteroid receptor (EcR)의 활성을 측정하였고, 각 primer의 염기서열은 Table 27에 나타내었다. qPCR은 real time system TP 950 thermal cycler dice™ (TaKaRa, Shiga, Japan)를 이용하여 측정되었다(Fig. 17).



Figure 17. Analysis of qPCR

#### 4.2.4 공격실험

사육실험 종료 후, 급성간췌장괴사증후군(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND)의 원인균인 *V. parahaemolyticus*에 대한 실험새우의 질병저항성 평가를 실시하였다. 흰다리새우는 수조 당 12마리씩 총 30개의 아크릴 수조(110 L)에 배치되었다. *V. parahaemolyticus*는 NaCl이 첨가된 TSB (211825, BD DIFCO TM, USA) 배지를 이용하여 배양(30°C, 150 rpm)되었다. 배양된 균은  $2 \times 10^6$  CFU/mL 농도로 희석하여 각 수조에 침지하였다(Fig. 18). Positive control에는 TSB 배지를 이용하였다. 침지 후 7시간 후에 환수(90%)를 진행하였다. 실험사료는 1일 3회(08:00, 13:00, 18:00 h) 공급하였다.



Figure 18. Challenge test

#### 4.2.5 통계학적 분석

실험사료의 배치는 완전확률계획법(completely randomized design)을 실시하였으

며, 분석결과는 SPSS (Version 18.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석하였다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's multiple test 로 비교하였다. 데이터는 평균값±표준편차(mean ± SD)로 나타내었다. 백분율데이터는 arcsine 변형 값으로 통계분석 하였다.

**Table 24.** Proximate composition (% , dry matter) and fatty acid profile (% in lipid) of the fish oil (FO), black soldier fly oil (BO) and mealworm oil (MO) for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*).

Nutrient contents	Oils		
	FO	BO	MO
<i>Proximate composition</i>			
Crude protein	0.81	1.39	1.39
Crude lipid	99.2	97.3	98.0
Ash	-	0.94	0.50
Moisture	0.01	0.01	0.02
<i>Fatty acids</i>			
C8:0	-	0.50	0.43
C10:0	-	2.26	0.29
C12:0	0.10	37.5	0.38
C14:0	5.00	5.65	3.84
C16:0	28.9	15.2	18.9
C18:0	10.5	3.12	2.81
C18:1n9	13.2	17.1	41.1
C18:2n6	22.9	12.7	28.7
C18:3n3	8.60	1.62	1.25
C20:5n3	3.10	-	-
C22:6n3	1.40	-	-
SFA <sup>1</sup>	44.5	64.2	26.7
MUFA <sup>2</sup>	13.2	17.1	41.1
PUFA <sup>3</sup>	36.0	14.3	30.0
$\sum$ n-3 <sup>4</sup>	13.1	1.62	1.25
$\sum$ n-6 <sup>5</sup>	22.9	12.7	28.7
n-3/n-6	0.60	0.13	0.04

<sup>1</sup>Saturated fatty acids.

<sup>2</sup>Monounsaturated fatty acids.

<sup>3</sup>Polyunsaturated fatty acids.

<sup>4</sup>Omega-3 fatty acids.

<sup>5</sup>Omega-6 fatty acids.

**Table 25.** Formulation and proximate composition (% , dry matter) of the experimental diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*).

Ingredients	Experimental diets								
	Con	BO 25	BO 50	BO 75	BO 100	MO 25	MO 50	MO 75	MO 100
Fish meal, sardine <sup>1</sup>	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
Fish meal, tuna <sup>2</sup>	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
Soybean meal	37.0	37.0	37.0	37.0	37.0	37.0	37.0	37.0	37.0
Squid liver meal	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Starch	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Wheat flour	25.8	25.8	25.8	25.8	25.8	25.8	25.8	25.8	25.8
Cod liver oil <sup>3</sup>	4.00	3.00	2.00	1.00	-	3.00	2.00	1.00	-
Black soldier fly oil <sup>4</sup>	-	1.00	2.00	3.00	4.00	-	-	-	-
Mealworm oil <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	1.00	2.00	3.00	4.00
Mineral mixture <sup>6</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Vitamin mixture <sup>7</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Lecithin <sup>8</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cholesterol	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Mono-calcium phosphate	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
<i>Proximate composition</i>									
Crude protein	38.5	38.7	38.7	38.7	38.7	38.5	38.7	38.3	38.7
Crude lipid	9.62	9.33	9.33	9.33	9.33	9.80	9.34	9.30	9.33
Crude ash	11.4	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.7	11.3	10.0

<sup>1</sup>Orizin S.A, Chile. <sup>2</sup>Woogin feed Co. Ltd., Korea. <sup>3</sup>Corp. E-wha oil & fat Industry, Korea. <sup>4</sup>Entomo, Cheongju, Korea. <sup>5</sup>Keil, Seoul, Korea. <sup>6</sup>Mineral premix (1 kg) contains 80 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 370 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 130 g KCl, 40 g Ferric citrate, 20 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 356.64 g Ca-lactate, 0.2 g CuCl, 0.15 g AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.01 g Na<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 2 g MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O and 1 g CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O. <sup>7</sup>Vitamin premix (1 kg) contains 121 g L-ascorbic acid, 19 g DL- $\alpha$  tocopheryl acetate, 2.7 g thiamin hydrochloride, 9.1 g riboflavin, 1.8 g pyridoxine hydrochloride, 36 g niacin, 12.7 g Ca-D-pantothenate, 182 g myo-inositol, 0.27 g D-biotin, 0.68 g folic acid, 18 g p-aminobenzoic acid, 1.8 g menadione, 0.73 g retinyl acetate, 0.003 g cholecalciferol, 003 g cyanocobalamin and 594 g starch. <sup>8</sup>Lysoforte™ Dry, Kemin Korea Co. Ltd., Korea. <sup>9</sup>Mono-calcium phosphate. Test diets are abbreviated as: control (Con), black soldier fly oil (BO) and mealworm oil (MO).

**Table 26.** Fatty acid composition (% in lipid) of the experimental diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The experimental diets were prepared by replacement fish oil (control, Con) with black soldier fly oil (BO) or mealworm oil (MO) at each level, respectively (Con, BO25–100 or MO25–100).

Fatty acids	Con	BO 25	BO 50	BO 75	BO 100	MO 25	MO 50	MO 75	MO 100
SFA <sup>1</sup>									
C12:0	-	3.62	6.50	10.0	13.3	-	-	-	-
C14:0	3.52	3.23	3.49	3.64	3.68	3.47	3.23	3.11	2.94
C16:0	21.0	22.4	22.1	21.9	21.9	21.3	21.4	21.4	21.5
C18:0	8.03	6.31	8.63	7.67	6.16	7.71	7.41	7.13	6.78
MUFA <sup>2</sup>									
C16:1	4.06	2.96	3.02	2.78	2.57	3.52	3.05	2.57	2.21
C18:1n9	15.2	19.5	17.1	17.8	18.8	19.1	22.6	25.8	28.7
PUFA <sup>3</sup>									
C18:2n6	21.0	27.8	23.6	24.1	25.5	23.3	26.0	28.7	31.0
C18:3n3	6.13	4.46	4.55	3.92	3.46	5.50	4.64	3.73	3.04
C20:4n6	9.53	3.05	4.14	2.59	0.65	7.06	4.61	2.44	0.47
C20:5n3	6.66	3.71	3.89	3.22	2.31	5.16	3.95	2.83	1.73
C22:6n3	4.89	3.00	3.02	2.46	1.76	3.85	3.15	2.26	1.56
∑SFA	32.6	35.6	40.7	43.2	45.0	32.5	32.0	31.6	31.2
∑MUFA	19.3	22.5	20.1	20.6	21.4	22.6	25.7	28.4	30.9
∑PUFA	48.2	42.0	39.2	36.3	33.7	44.9	42.4	40.0	37.8
∑PUFA <i>n-3</i>	17.7	11.2	11.5	9.60	7.53	14.5	11.7	8.82	6.33
∑PUFA <i>n-6</i>	30.5	30.9	27.7	26.7	26.2	30.4	30.6	31.1	31.5
<i>n-3/n-6</i>	0.58	0.36	0.41	0.36	0.29	0.48	0.38	0.28	0.20

Values are mean of duplicates (n=2) and presented as mean values.

<sup>1</sup>Saturated fatty acids.

<sup>2</sup>Monounsaturated fatty acids.

<sup>3</sup>Polyunsaturated fatty acids.

**Table 27.** Primer sequence of gene expression for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*).

Primers <sup>1</sup>	Sequences	Accession number/ References
<b>FABP</b>		
Forward	5'-CGCTAAGCCCGTGCTGGAAGT-3'	DQ398572.1
Reverse	5'-CTCCTCGCCGAGCTTGATGGT-3'	Yang et al. (2011)
<b>TgL</b>		
Forward	5'-ACAAGGTGGATAAGGAAGAG-3'	FJ619564.1
Reverse	5'-TAATCAGTAGTTGGCGAAGA-3'	Xu et al. (2018)
<b>CPT-1</b>		
Forward	5'-CAACTTCTACGGCACTGAT-3'	SRP048814
Reverse	5'-GTCGGTCCACCAATCTTC-3'	Xu et al. (2018)
<b>ATPase-<math>\alpha</math></b>		
Forward	5'-CCAAGTTCGAGCAGGAGTTC-3'	GQ848643
Reverse	5'-GGTTCCTAGCCTGTCTTCC-3'	Lage et al. (2017)
<b>RXR</b>		
Forward	5'-TCGGGTCAAGTGGTAACGTG-3'	Rahimnejad et al.
Reverse	5'-GAGGTGCTTTGAACCCGAGA-3'	(2019)
<b>EcR</b>		
Forward	5'- TTCCGGCGATCAATCACCAA-3'	Rahimnejad et al.
Reverse	5'- ACCACACATTCTGGTCGCAT -3'	(2019)
<b><math>\beta</math>-actin</b>		
Forward	5'-TGCAGAAGGAGATCACAGCC-3'	AF300705.2
Reverse	5'-ACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3'	Xu et al. (2020)

Primers are abbreviated as: fatty acid binding protein (FABP), triacylglycerol lipase (TgL), carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1), retinoid-X receptor (RXR) and ecdysteroid receptor (EcR).

### 4.3 결과

동애등에유 실험구의 경우, 최종무게, 성장률, 일간성장률은 모든 BO 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다(Table 28). 사료계수는 BO75구를 제외한 곤충유 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 낮았다. 단백질전환효율은 BO50구와 BO75구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. 새우 근육 내 조단백질, 조지질, 회분, 수분의 함량은 대조구와 실험구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 29). 새우 근육 내 OA와 linoleic acid의 함량은 사료 내 BO의 첨가량이 높아질수록 증가하였다(Table 30). Stearic acid와 EPA의 함량은 사료 내 BO의 첨가량이 높아질수록 감소하였다. 새우 간체장 내 LA 함량은 사료 내 BO의 함량이 높아질수록 증가하였고, 대조구에서는 검출되지 않았다(Table 31).  $\alpha$ -linolenic acid, arachidonic acid, EPA, DHA의 함량은 사료 내 BO 첨가량이 낮아질수록 감소하는 경향을 보였다. 실험새우의 hemolymph 내 PO와 SOD 활성은 모든 BO구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다(Table 32). GPx 활성은 BO50구를 제외한 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. Glucose의 농도는 모든 BO구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다(Table 33). Cholesterol, triglyceride, total protein의 농도는 실험구와 대조구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 새우 간체장 내 CPT-1의 발현량은 BO25, 50, 100 실험구가 대조구에 비해 높은 경향을 보였다(Fig. 19). ATPase  $\alpha$ 의 발현량은 BO75, 100 실험구가 대조구와 비교하여 높은 경향을 나타냈다. 실험사료에 대한 흰다리새우의 단백질, 지질, 에너지, 건물소화율은 모든 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다(Table 34). 지방산 소화율은 arachidonic acid, EPA, DHA가 대조구에 비해 감소하는 경향을 보였다(Table 35). *V. parahaemolyticus*를 이용한 인위감염의 결과는 Fig. 20에 나타내었다. BO구의 생존율(13.9-44.4%)은 대조구(8.33%)와 비교하여 높은 경향을 보였다. 균 침지 12시간 후 새우 간체장 내

EMS균의 독소 함량은 BO100구를 제외한 실험구가 대조구에 비해 낮은 경향을 보였다(Table 36). 균 침지 6시간 후에는 대조구와 실험구 사이에 큰 차이를 보이지 않았다.

갈색거저리유 실험구의 경우, 실험새우의 최종무게, 성장률, 일간성장률은 모든 MO 첨가구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다(Table 28). 사료계수는 MO100구를 제외한 곤충유 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 낮았다. 단백질전환효율은 MO100구를 제외한 곤충유 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. 새우 근육 내 조단백질, 조지질, 회분, 수분의 함량은 대조구와 실험구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 29). 새우 근육 내 palmitic acid, oleic acid, linoleic acid 함량은 사료 내 MO의 첨가량이 높아질수록 증가하였다(Table 30).  $\alpha$ -linolenic acid, eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) 함량은 사료 내 MO의 첨가량이 높아질수록 감소하였다. 새우 간체장 내 oleic acid와 linoleic acid의 함량은 사료 내 MO의 첨가량이 높아질수록 증가하였고,  $\alpha$ -linolenic acid, EPA, DHA의 함량은 감소하였다(Table 31). 실험새우의 hemolymph 내 PO, SOD, GPx 활성은 모든 MO실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다(Table 32). Cholesterol의 농도는 MO50, 75, 100구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다(Table 33). Glucose의 농도는 모든 MO실험구가 대조주에 비해 유의적으로 높았다. Triglyceride와 total protein의 농도는 모든 실험구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 새우 간체장 내 CPT-1 발현량은 MO100구가 대조구에 비해 높은 경향을 보였다(Fig. 19). ATPase  $\alpha$  발현량은 MO50, MO75구가 대조구에 비해 높은 경향을 보였다. 실험사료에 대한 흰다리새우의 단백질, 지질, 에너지, 건물소화율은 모든 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다(Table 34). 지방산 소화율은 MO100구의 arachidonic acid (C20:4n6), EPA (C20:5n3), DHA (C22:6n3)가 대조구에 비해 유의적으로 낮았다(Table 35). 사료

내 MO의 함량이 증가할수록 위 3개 지방산의 소화율이 감소되는 경향을 보였다. *V. parahaemolyticus*를 이용한 인위감염의 결과는 Fig. 20에 나타내었다. 실험새우의 생존율은 MO25구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. MO 실험구의 생존율(25.0-52.8%)은 대조구(8.33%)와 비교하여 높은 경향을 보였다. 침지 12시간 후 새우 간체장 내 EMS균의 독소 함량은 MO실험구가 대조구에 비해 낮은 경향을 보였다(Table 36). 균 침지 6시간 후에는 대조구와 실험구 사이에 큰 차이를 보이지 않았다.

#### 4.4 고찰

이번 연구에서는 흰다리새우 사료에 어유 대체원으로써 두 종의 곤충유의 이용가능성을 평가하였다. 새우의 성장은 곤충유를 이용하여 어유를 모두 대체하더라도 저하되지 않았고, 오히려 증가하는 경향을 보여 새로운 지질원료로써의 이용가치가 높다고 판단된다. 어유는 omega-3 지방산이 풍부하여, 대두유와 같은 식물성유지에 비해 양식생물 사료에서 이용성이 높은것으로 알려져 있다(Tacon and Metian, 2008). 위와 같은 이유로 인해 새우류 사료에는 어유와 식물성 유지를 일정한 비율로 혼합하여 사용되어 왔다(Samocho et al., 2010). 새우를 포함한 갑각류는 다가불포화지방산(polyunsaturated fatty acid, PUFA)를 EPA, DHA와 같은 고도불포화지방산(highunsaturated fatty acid, HUFA)로 전환시키는 능력이 부족한 것으로 보고되었다(Kayama et al., 1980). Xu et al. (2016)은 대두유를 이용하여 어유를 90%까지 대체하더라도 흰다리새우의 성장을 저하시키지 않았고, 10%의 어유 안에 함유되어 있는 지방산이 새우의 요구량을 충족시킬 수 있다고 보고하였다. 이번 연구에서도 곤충유를 이용하여 사료 내 어유를 모두

대체하더라도 성장이 저하되지 않는 것으로 보아, 적은량의 어유 혹은 어분에 함유되어 있는 지방산만으로도 새우의 성장에 필요한 요구량을 충족시킬 수 있다고 판단된다.

이번 연구에서 사료에 두 종의 곤충유를 어유대체원으로 사용할 경우, 흰다리새우의 근육과 간체장 내 지방산 조성에 영향을 주는 것으로 나타났다. 동애등에유와 갈색거저리유는 단일불포화지방산인 OA와 다가불포화지방산인 linoleic acid,  $\alpha$ -linolenic acid의 함량이 어유에 비해 높았고, EPA와 DHA의 함량은 낮았다(Table 24). 사료에 탈지되지 않은 곤충박을 단백질원으로 사용할 경우, 새우와 어류의 체내 단일불포화지방산의 함량을 증가하고, EPA와 DHA의 함량이 감소한다고 보고되었다(Sánchez-Muros et al., 2016; Panini et al., 2017b). 육상에서 서식하는 곤충은 다가불포화지방산 합성에 관여하는 효소의 활성이 낮아, EPA와 DHA의 함량이 낮거나 검출되지 않는다(Liland et al., 2017). 실험새우 간체장과 근육의 지방산 함량은 실험에 사용된 곤충유의 조성에 직접적인 영향을 받았다고 판단된다. 흥미롭게도 사료에 동애등에유를 첨가할 경우, LA의 함량은 새우 간체장에서만 증가하였고, 근육에서는 검출되지 않았다. LA는 중쇄지방산(medium-chain fatty acid, MCFA)으로써 생물의 체내에서 주로 에너지원으로 사용된다. MCFA는 다른 지방산에 비해 극성이 높아, 에너지대사 기관인 미토콘드리아로 이동하는 과정에서 에너지를 소모하지 않고 막을 통과할 수 있어 체내에 축적되지 않고, 에너지로 사용된다. Belghit et al. (2019)은 사료에 동애등에유를 첨가할 경우, LA가 주요 에너지 원으로 사용되어, 대서양연어(*Salmo salar*)의 간 내 triacylglycerol의 함량을 감소시킨다고 보고하였다.

이번 연구에서 사료에 두 종의 곤충유로 어유를 대체할 경우, 흰다리새우의 비특이적 면역력, 항산화력, *V. parahaemolyticus*에 대한 질병저항성을 증진시키는

것으로 나타났다. LA는 코코넛 오일(40-51%)과 palm kernel oil의 주요 지방산으로, 여러 병원성균, 바이러스, 곰팡이의 증식을 억제시키는 효능을 지닌 것으로 알려져 있다(Dayrit, 2015; Borrelli et al., 2021). 이번 실험에 사용된 동태등에유의 LA 함량은 37.5%로 분석되었다(Table 24). LA는 그람양성균과 lipid-coated viruses의 세포벽을 파괴시키거나, 막을 통과하여 RNA와 DNA의 정상적인 작용을 막는다(Dayrit, 2015; Heriyati et al., 2020). Borrelli et al. (2021)은 곤충에 함유되어 있는 LA는 강력한 항생효과를 가지고 있어서 동물사료에 지질원으로서의 이용가치 높다고 보고하였다. LA는 다른 지방산과 비교하여 *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypimurium*, *Escherichia coli*의 증식을 억제하는 활성이 높고(Nitbani et al., 2016), 염증반응에 관여하는 인자를 조절하여 생물의 장 건강에 이로운 효과를 주는 것으로 보고되었다(Yang et al., 2018). 따라서, 동태등에유에 함유되어 있는 LA가 새우의 비특이적 면역력 증진에 도움을 주었다고 판단된다. 갈색겨저리유의 경우에는 단일불포화 지방산인 OA가 주요 지방산(41%)으로 분석되었다. OA는 동물사료에 천연항균물질로써의 이용가치가 일부 보고되었고(Huang et al., 2010), *Salmonella* spp.와 *Listeria* spp.와 같은 유해균주의 증식을 억제한다고 보고되었다(Zhang et al., 2016). 사료에 OA의 함량이 높은 식물성유지를 첨가할 경우, 생물의 비특이적 면역력과 질병저항성(Carrillo Pérez et al., 2012) 뿐만 아니라 염증반응에 관여하여 피부의 상처 치유능을 향상시키는데 도움을 줄 수 있다고 보고되었다(Cardoso et al., 2011). 더불어, 곤충은 항균펩타이드(AMPs), chitin과 같은 천연 유래 기능성 물질을 함유하고 있고, 아직까지 밝혀지지 않은 미지성장인자의 효과가 새우의 비특이적 면역력 증진에 간접적으로 도움을 주었다고 생각된다. 후속연구에서는 곤충에 함유되어 있는 기능성 물질의 효과를 규명하여, 곤충의 이용성에 관한 보다 세부적인 연구가

요구된다.

이번 연구에서 곤충유는 사료 내 어유를 모두 대체하더라도 흰다리새우의 영양소 소화율에 아무런 영향을 미치지 않았다(Table 34). 그러나, EPA와 DHA의 지방산 소화율은 사료에 어유대체율이 증가할수록 감소하였다(Table 35). 사육실험에서 곤충유를 이용하여 어유를 모두 대체하더라도 성장을 저하시키지 않았지만, 새우의 체내 EPA와 DHA의 함량과 지방산 소화율을 감소시키는 것으로 보아, 장기간 사육실험을 진행할 경우 부정적인 효과를 나타낼수 있다고 생각된다. 더불어 양식생물의 omega-3 지방산의 함량은 상품의 질을 감소시킬 수 있기 때문에 곤충유의 적정 어유대체율은 75%라고 판단된다.

**Table 28.** Growth performance, feed utilization and survival of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) (initial body weight:  $0.89 \pm 0.00$  g) fed the experimental diets for 58 days. The experimental diets were prepared by replacement fish oil (control, Con) with black soldier fly oil (BO) or mealworm oil (MO) at each level, respectively (Con, BO25–100 or MO25–100).

Dietary treatments	FBW <sup>1</sup>	WG <sup>2</sup>	SGR <sup>3</sup>	FCR <sup>4</sup>	PER <sup>5</sup>	FI <sup>6</sup>	Survival (%)
Con	12.1±0.12 <sup>b</sup>	1270±14.0 <sup>b</sup>	4.51±0.02 <sup>b</sup>	1.17±0.04	2.22±0.08	13.1±0.35	86.1±8.61
BO25	13.6±0.51 <sup>ab</sup>	1443±58.1 <sup>a</sup>	4.72±0.06 <sup>a</sup>	1.13±0.04	2.31±0.08	14.3±0.40	90.6±6.25
BO50	13.5±0.91 <sup>ab</sup>	1438±104 <sup>ab</sup>	4.71±0.11 <sup>ab</sup>	1.10±0.07	2.37±0.15	13.9±0.24	93.8±5.38
BO75	13.2±0.83 <sup>ab</sup>	1400±94.8 <sup>ab</sup>	4.67±0.11 <sup>ab</sup>	1.17±0.03	2.23±0.06	14.3±0.71	90.6±2.08
BO100	13.7±0.52 <sup>a</sup>	1458±59.3 <sup>a</sup>	4.73±0.07 <sup>a</sup>	1.11±0.03	2.34±0.06	14.2±0.67	94.8±2.08
MO25	13.0±0.49 <sup>ab</sup>	1372±55.2 <sup>ab</sup>	4.64±0.07 <sup>ab</sup>	1.12±0.07	2.32±0.14	13.5±0.74	91.7±7.61
MO50	13.6±0.94 <sup>a</sup>	1448±107 <sup>a</sup>	4.72±0.12 <sup>a</sup>	1.11±0.09	2.34±0.18	14.1±0.26	90.6±3.99
MO75	13.4±0.77 <sup>ab</sup>	1425±87.7 <sup>ab</sup>	4.70±0.10 <sup>ab</sup>	1.12±0.06	2.33±0.11	14.0±0.51	90.6±3.99
MO100	13.1±0.70 <sup>ab</sup>	1394±79.9 <sup>ab</sup>	4.66±0.09 <sup>ab</sup>	1.14±0.07	2.29±0.13	13.9±0.35	92.7±5.24

Values are mean of quadruplicates (n=4) and presented as mean ± standard deviation. Different superscripts in each column indicate significant differences (P<0.05).

<sup>1</sup>Final body weight (g).

<sup>2</sup>Weight gain (%) = [(final mean body weight - initial mean body weight) / (initial body weight)] x 100.

<sup>3</sup>Specific growth rate (%) = [(log<sub>e</sub> final body weight - log<sub>e</sub> initial body weight) / days] x 100.

<sup>4</sup>Feed conversion ratio = feed intake / wet weight gain.

<sup>5</sup>Protein efficiency ratio = wet weight gain / total protein given.

<sup>6</sup>Feed intake (g) = dry feed consumed (g) / the number of shrimp.

**Table 29.** Proximate composition (% , wet basis) of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets for 58 days. The experimental diets were prepared by replacement fish oil (control, Con) with black soldier fly oil (BO) or mealworm oil (MO) at each level, respectively (Con, BO25–100 or MO25–100).

<b>Dietary treatments</b>	<b>Crude protein</b>	<b>Crude lipid</b>	<b>Crude ash</b>	<b>Moisture</b>
Con	19.8±1.15	2.09±0.35	3.24±0.46	75.8±1.00 <sup>b</sup>
BO25	18.3±0.22	1.45±0.10	3.22±0.00	76.8±0.11 <sup>ab</sup>
BO50	18.6±0.23	1.54±0.03	3.41±0.49	77.0±0.84 <sup>ab</sup>
BO75	17.7±0.19	1.80±0.44	2.94±0.42	77.5±0.06 <sup>ab</sup>
BO100	19.7±0.04	1.50±0.08	3.21±0.24	76.6±0.12 <sup>ab</sup>
MO25	18.6±0.22	1.80±0.14	3.21±0.03	77.5±0.19 <sup>ab</sup>
MO50	18.3±0.54	2.00±0.23	3.26±0.18	77.1±0.49 <sup>ab</sup>
MO75	18.5±0.39	1.36±0.05	3.00±0.50	78.1±0.14 <sup>a</sup>
MO100	18.9±0.85	1.59±0.12	3.22±0.66	76.5±0.52 <sup>ab</sup>

Values are mean of triplicate (n=3) and presented as mean ± standard deviation. Different superscripts in each column indicate differences (P<0.05).

**Table 30.** Fatty acid profile (% lipid) in muscle of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets for 58 days. The experimental diets were prepared by replacement fish oil (control, Con) with black soldier fly oil (BO) or mealworm oil (MO) at each level, respectively (Con, BO25–100 or MO25–100).

Fatty acids	Con	BO25	BO50	BO75	BO100	MO25	MO50	MO75	MO100
SFA <sup>1</sup>									
C16:0	26.3±0.62	27.0±1.14	26.9±0.82	26.4±0.21	26.4±0.65	25.8±0.11	25.6±0.19	25.4±0.28	25.7±0.56
C18:0	16.1±0.35 <sup>cd</sup>	19.4±0.22 <sup>a</sup>	16.4±0.22 <sup>cd</sup>	16.6±0.05 <sup>bcd</sup>	15.7±0.73 <sup>d</sup>	16.0±0.35 <sup>cd</sup>	17.0±0.19 <sup>bcd</sup>	17.2±0.50 <sup>bcd</sup>	18.0±0.28 <sup>ab</sup>
MUFA <sup>2</sup>									
C18:1n9	14.6±0.49 <sup>c</sup>	14.7±0.75 <sup>bc</sup>	15.6±0.84 <sup>bc</sup>	16.5±0.55 <sup>b</sup>	16.6±0.23 <sup>b</sup>	15.9±0.06 <sup>bc</sup>	16.3±0.56 <sup>bc</sup>	19.0±0.32 <sup>a</sup>	20.9±0.13 <sup>a</sup>
PUFA <sup>3</sup>									
C18:2n6	16.0±0.28 <sup>c</sup>	16.8±0.07 <sup>de</sup>	17.8±0.40 <sup>c</sup>	18.9±0.15 <sup>b</sup>	20.1±0.18 <sup>a</sup>	16.0±0.16 <sup>de</sup>	16.8±0.06 <sup>d</sup>	16.8±0.19 <sup>de</sup>	19.0±0.34 <sup>b</sup>
C18:3n3	3.75±0.08 <sup>a</sup>	2.58±0.06 <sup>d</sup>	3.09±0.04 <sup>c</sup>	2.52±0.01 <sup>d</sup>	2.01±0.08 <sup>c</sup>	3.46±0.09 <sup>b</sup>	2.77±0.03 <sup>d</sup>	2.20±0.01 <sup>e</sup>	0.83±0.06 <sup>f</sup>
C20:5n3	14.0±0.27 <sup>a</sup>	11.5±0.41 <sup>bcd</sup>	12.2±0.46 <sup>bc</sup>	11.2±0.54 <sup>cd</sup>	10.6±0.41 <sup>de</sup>	13.1±0.28 <sup>ab</sup>	12.1±0.39 <sup>bcd</sup>	11.3±0.45 <sup>cd</sup>	9.35±0.15 <sup>e</sup>
C22:6n3	9.19±0.02 <sup>a</sup>	7.82±0.55 <sup>bc</sup>	7.70±0.54 <sup>bc</sup>	7.68±0.29 <sup>bc</sup>	7.47±0.06 <sup>bc</sup>	9.23±0.15 <sup>a</sup>	8.30±0.06 <sup>ab</sup>	7.62±0.09 <sup>bc</sup>	6.80±0.07 <sup>c</sup>
∑SFA	42.5±0.96 <sup>b</sup>	46.4±1.37 <sup>a</sup>	43.3±0.59 <sup>b</sup>	43.0±0.16 <sup>b</sup>	42.0±0.08 <sup>b</sup>	41.9±0.23 <sup>b</sup>	42.7±0.38 <sup>b</sup>	42.5±0.78 <sup>b</sup>	43.7±0.84 <sup>ab</sup>
∑MUFA	14.6±0.49 <sup>c</sup>	14.7±0.75 <sup>bc</sup>	15.6±0.84 <sup>bc</sup>	16.5±0.55 <sup>b</sup>	16.6±0.23 <sup>b</sup>	15.9±0.06 <sup>bc</sup>	16.3±0.56 <sup>bc</sup>	19.0±0.32 <sup>a</sup>	20.9±0.13 <sup>a</sup>
∑PUFA	43.0±0.45 <sup>a</sup>	38.6±0.16 <sup>cd</sup>	40.8±0.57 <sup>b</sup>	40.3±0.66 <sup>bc</sup>	40.1±0.37 <sup>bc</sup>	41.8±0.50 <sup>cd</sup>	40.0±0.54 <sup>b</sup>	37.9±0.36 <sup>bc</sup>	35.9±0.06 <sup>bc</sup>
∑PUFA <i>n-3</i>	27.0±0.17 <sup>a</sup>	21.9±0.08 <sup>bc</sup>	23.0±0.97 <sup>b</sup>	21.4±0.81 <sup>bc</sup>	20.1±0.55 <sup>c</sup>	25.8±0.34 <sup>a</sup>	23.1±0.48 <sup>b</sup>	21.1±0.55 <sup>bc</sup>	17.0±0.28 <sup>d</sup>
∑PUFA <i>n-6</i>	16.0±0.28 <sup>c</sup>	16.8±0.07 <sup>de</sup>	17.8±0.40 <sup>c</sup>	18.9±0.15 <sup>b</sup>	20.1±0.18 <sup>a</sup>	16.0±0.16 <sup>de</sup>	16.8±0.06 <sup>d</sup>	16.8±0.19 <sup>de</sup>	19.0±0.34 <sup>b</sup>
<i>n-3/n-6</i>	1.68±0.02 <sup>a</sup>	1.31±0.00 <sup>b</sup>	1.29±0.08 <sup>b</sup>	1.13±0.05 <sup>cd</sup>	1.00±0.04 <sup>de</sup>	1.61±0.01 <sup>a</sup>	1.37±0.02 <sup>b</sup>	1.26±0.05 <sup>bc</sup>	0.90±0.03 <sup>e</sup>

Values are mean of quadruplicates (n=4) and presented as mean ± standard deviation. Different superscripts in each column indicate significant differences (P<0.05). <sup>1</sup>Saturated fatty acids.

<sup>2</sup>Monounsaturated fatty acids. <sup>3</sup>Polyunsaturated fatty acids.

**Table 31.** Fatty acid profile (% lipid) in hepatopancreas of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets for 58 days. The experimental diets were prepared by replacement fish oil (control, Con) with black soldier fly oil (BO) or mealworm oil (MO) at each level, respectively (Con, BO25–100 or MO25–100).

Fatty acids	Con	BO25	BO50	BO75	BO100	MO25	MO50	MO75	MO100
SFA <sup>1</sup>									
C12:0	0.00±0.00	0.00±0.00	2.03±0.07	3.53±0.17	3.71±0.38	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
C14:0	1.99±0.43 <sup>bc</sup>	2.24±0.48 <sup>abc</sup>	2.82±0.24 <sup>ab</sup>	3.12±0.09 <sup>a</sup>	2.94±0.14 <sup>ab</sup>	1.72±0.35 <sup>c</sup>	1.58±0.53 <sup>c</sup>	1.32±0.28 <sup>c</sup>	1.45±0.18 <sup>c</sup>
C16:0	21.3±0.55 <sup>b</sup>	24.0±2.27 <sup>ab</sup>	25.8±1.62 <sup>a</sup>	23.2±1.57 <sup>ab</sup>	25.6±0.92 <sup>ab</sup>	22.8±1.64 <sup>ab</sup>	21.6±0.91 <sup>ab</sup>	22.5±2.94 <sup>ab</sup>	22.3±1.18 <sup>ab</sup>
C18:0	9.55±1.77	8.12±0.16	7.26±0.80	8.02±2.12	10.8±3.07	8.41±1.67	7.10±2.88	8.75±1.90	9.00±1.27
MUFA <sup>2</sup>									
C16:1	3.02±0.42 <sup>a</sup>	2.66±0.39 <sup>ab</sup>	2.83±0.16 <sup>ab</sup>	2.51±0.77 <sup>ab</sup>	2.32±0.21 <sup>ab</sup>	2.41±0.23 <sup>ab</sup>	2.11±0.53 <sup>ab</sup>	1.72±0.28 <sup>b</sup>	1.75±0.16 <sup>b</sup>
C18:1n9	18.0±1.80 <sup>b</sup>	22.0±2.16 <sup>ab</sup>	21.6±1.02 <sup>ab</sup>	21.3±5.39 <sup>ab</sup>	22.1±1.50 <sup>ab</sup>	20.9±2.89 <sup>ab</sup>	25.1±1.56 <sup>ab</sup>	24.5±5.56 <sup>ab</sup>	29.1±3.35 <sup>a</sup>
PUFA <sup>3</sup>									
C18:2n6	17.8±1.50 <sup>c</sup>	19.4±1.70 <sup>bc</sup>	19.4±0.19 <sup>bc</sup>	25.4±0.48 <sup>a</sup>	23.5±1.42 <sup>ab</sup>	18.4±1.02 <sup>c</sup>	20.8±2.53 <sup>abc</sup>	21.6±2.78 <sup>abc</sup>	24.5±1.67 <sup>a</sup>
C18:3n3	7.03±1.10 <sup>a</sup>	5.33±1.26 <sup>abc</sup>	4.80±0.28 <sup>abcd</sup>	3.44±1.28 <sup>bcde</sup>	1.81±0.51 <sup>e</sup>	5.67±0.70 <sup>ab</sup>	3.87±0.96 <sup>bcde</sup>	2.87±0.73 <sup>cde</sup>	2.50±1.30 <sup>de</sup>
C20:4n6	12.6±1.37 <sup>a</sup>	8.55±1.20 <sup>bc</sup>	8.78±0.78 <sup>c</sup>	4.18±0.85 <sup>d</sup>	1.51±0.58 <sup>e</sup>	9.42±0.32 <sup>b</sup>	7.21±0.44 <sup>c</sup>	3.64±0.22 <sup>d</sup>	3.39±0.01 <sup>d</sup>
C20:5n3	6.61±0.17 <sup>a</sup>	6.25±1.19 <sup>b</sup>	3.15±0.70 <sup>c</sup>	2.93±0.90 <sup>e</sup>	3.18±0.19 <sup>f</sup>	5.83±2.92 <sup>bc</sup>	5.38±0.04 <sup>c</sup>	4.42±2.14 <sup>d</sup>	3.28±0.92 <sup>ef</sup>
C22:6n3	5.08±1.41 <sup>a</sup>	4.52±2.13 <sup>a</sup>	3.40±0.21 <sup>ab</sup>	2.97±0.64 <sup>ab</sup>	2.24±0.39 <sup>b</sup>	4.18±1.56 <sup>a</sup>	3.57±0.70 <sup>ab</sup>	1.79±0.33 <sup>b</sup>	1.85±0.27 <sup>b</sup>
∑SFA	32.8±1.11 <sup>ab</sup>	32.2±2.84 <sup>ab</sup>	36.7±1.56 <sup>a</sup>	34.3±1.82 <sup>ab</sup>	35.5±3.35 <sup>ab</sup>	32.9±1.00 <sup>ab</sup>	30.3±3.42 <sup>b</sup>	32.6±2.56 <sup>ab</sup>	32.8±2.13 <sup>ab</sup>
∑MUFA	21.0±2.21 <sup>c</sup>	24.7±2.03 <sup>abc</sup>	24.5±0.68 <sup>abc</sup>	26.8±1.26 <sup>abc</sup>	24.4±1.39 <sup>bc</sup>	23.3±3.11 <sup>bc</sup>	27.2±1.62 <sup>ab</sup>	26.2±4.76 <sup>abc</sup>	30.8±3.28 <sup>a</sup>
∑PUFA	49.1±0.55 <sup>a</sup>	44.0±3.45 <sup>b</sup>	39.5±1.00 <sup>b</sup>	38.9±1.81 <sup>b</sup>	32.2±1.16 <sup>c</sup>	43.5±2.38 <sup>b</sup>	40.8±3.45 <sup>b</sup>	34.3±1.27 <sup>c</sup>	35.5±0.42 <sup>c</sup>
∑PUFA <i>n</i> -3	18.7±0.35 <sup>a</sup>	16.1±3.68 <sup>ab</sup>	11.3±0.45 <sup>bc</sup>	9.33±2.43 <sup>cd</sup>	7.23±0.90 <sup>e</sup>	15.7±3.02 <sup>ab</sup>	12.8±1.18 <sup>bc</sup>	9.08±1.63 <sup>d</sup>	7.63±1.52 <sup>de</sup>
∑PUFA <i>n</i> -6	35.5±1.24 <sup>a</sup>	32.5±1.69 <sup>ab</sup>	31.5±0.44 <sup>bc</sup>	32.5±1.18 <sup>ab</sup>	27.2±0.79 <sup>c</sup>	32.0±1.02 <sup>ab</sup>	31.6±2.50 <sup>b</sup>	27.0±2.33 <sup>c</sup>	29.7±1.63 <sup>bc</sup>
<i>n</i> -3/ <i>n</i> -6	0.53±0.01 <sup>a</sup>	0.49±0.10 <sup>ab</sup>	0.36±0.01 <sup>abc</sup>	0.29±0.08 <sup>def</sup>	0.27±0.03 <sup>f</sup>	0.49±0.09 <sup>ab</sup>	0.41±0.01 <sup>bcd</sup>	0.34±0.08 <sup>cde</sup>	0.26±0.06 <sup>ef</sup>

Values are mean of quadruplicates (n=4) and presented as mean ± standard deviation. Different superscripts in each column indicate significant differences (P<0.05). <sup>1</sup>Saturated fatty acids.

<sup>2</sup>Monounsaturated fatty acids. <sup>3</sup>Polyunsaturated fatty acids.

**Table 32.** Innate immune responses and anti-oxidant enzyme capacity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets for 58 days. The experimental diets were prepared by replacement fish oil (control, Con) with black soldier fly oil (BO) or mealworm oil (MO) at each level, respectively (Con, BO25–100 or MO25–100).

<b>Dietary treatments</b>	<b>PO<sup>1</sup> (absorbance)</b>	<b>SOD<sup>2</sup> (% inhibition)</b>	<b>GPx<sup>3</sup> (mU/mL)</b>
Con	0.15±0.01 <sup>c</sup>	84.7±1.43 <sup>b</sup>	62.7±2.60 <sup>b</sup>
BO25	0.17±0.01 <sup>a</sup>	98.5±0.93 <sup>a</sup>	77.9±6.31 <sup>a</sup>
BO50	0.18±0.02 <sup>a</sup>	98.8±1.06 <sup>a</sup>	69.6±13.6 <sup>b</sup>
BO75	0.19±0.02 <sup>a</sup>	98.3±0.24 <sup>a</sup>	76.3±3.90 <sup>a</sup>
BO100	0.19±0.02 <sup>a</sup>	97.8±0.53 <sup>a</sup>	73.2±10.8 <sup>a</sup>
MO25	0.18±0.01 <sup>b</sup>	98.1±2.32 <sup>a</sup>	74.1±7.03 <sup>a</sup>
MO50	0.19±0.02 <sup>a</sup>	98.7±0.71 <sup>a</sup>	75.9±4.75 <sup>a</sup>
MO75	0.18±0.01 <sup>a</sup>	99.2±0.63 <sup>a</sup>	79.0±5.09 <sup>a</sup>
MO100	0.19±0.03 <sup>a</sup>	98.4±2.59 <sup>a</sup>	76.1±7.43 <sup>a</sup>

Values are mean of quadruplicate (n=4) and presented as mean ± standard deviation. Different superscripts in each column indicate significant differences (P<0.05)

<sup>1</sup>Phenoloxidase activity.

<sup>2</sup>Superoxide dismutase.

<sup>3</sup>Glutathione peroxidase.

**Table 33.** The concentration of cholesterol, triglycerides, total protein and glucose in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemolymph fed the experimental diets for 58 days. The experimental diets were prepared by replacement fish oil (control, Con) with black soldier fly oil (BO) or mealworm oil (MO) at each level, respectively (Con, BO25–100 or MO25–100).

Dietary treatments	Cholesterol (mg/dL)	Triglycerides (mg/dL)	Total protein (g/dL)	Glucose (mg/dL)
Con	10.5±0.35 <sup>c</sup>	31.3±3.40	3.11±0.65	268±19.2 <sup>b</sup>
BO25	12.1±2.74 <sup>c</sup>	32.7±2.94	3.34±0.65	415±77.4 <sup>a</sup>
BO50	11.7±2.35 <sup>c</sup>	32.2±2.52	4.08±1.12	470±37.4 <sup>a</sup>
BO75	10.6±0.32 <sup>c</sup>	29.4±9.59	2.94±0.42	506±47.6 <sup>a</sup>
BO100	12.1±0.20 <sup>c</sup>	34.1±0.75	3.39±0.20	457±110 <sup>a</sup>
MO25	12.0±0.39 <sup>c</sup>	28.8±3.34	3.52±0.60	425±89.3 <sup>a</sup>
MO50	14.5±0.85 <sup>ab</sup>	31.1±3.94	2.93±0.45	473±94.0 <sup>a</sup>
MO75	15.9±0.48 <sup>a</sup>	31.9±1.18	3.01±0.32	473±150 <sup>a</sup>
MO100	15.1±1.22 <sup>a</sup>	28.6±3.59	3.33±0.60	429±133 <sup>a</sup>

Values are mean of quadruplicate (n=4) and presented as mean ± standard deviation. Different superscripts in each column indicate significant differences (P<0.05).

**Table 34.** Apparent digestibility coefficients (ADC, %) of protein, lipid, energy and dry matter in experimental diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The experimental diets were prepared by replacement fish oil (control, Con) with black soldier fly oil (BO) or mealworm oil (MO) at each level, respectively (Con, BO25–100 or MO25–100).

<b>Dietary treatments</b>	<b>Protein ADC</b>	<b>Lipid ADC</b>	<b>Energy ADC</b>	<b>Diet digestibility</b>
Con	92.2±2.69	95.0±1.38	90.8±2.06	86.4±3.20
BO25	92.1±0.11	95.5±0.40	91.3±0.31	86.9±0.51
BO50	91.7±1.89	95.4±0.85	90.6±0.89	86.1±1.29
BO75	90.7±1.67	95.4±0.28	90.7±1.61	85.6±2.71
BO100	91.3±0.70	94.2±1.67	90.2±0.72	85.1±0.85
MO25	91.6±0.90	95.4±0.14	90.5±0.49	85.5±0.74
MO50	92.1±0.73	95.5±0.53	90.8±1.09	85.9±1.92
MO75	91.2±1.32	94.6±0.67	90.1±1.11	85.6±1.61
MO100	91.2±0.53	94.7±0.87	90.3±0.71	85.6±0.88

Values are mean of triplicates (n=3) and presented as mean ± standard deviation. Different superscripts in each column indicate significant differences (P<0.05).

**Table 35.** Apparent digestibility coefficients (ADCs, %) of fatty acids in experimental diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The experimental diets were prepared by replacement fish oil (control, Con) with black soldier fly oil (BO) or mealworm oil (MO) at each level, respectively (Con, BO25–100 or MO25–100).

Dietary treatments	Con	BO25	BO50	BO75	BO100	MO25	MO50	MO75	MO100
SFA <sup>1</sup>									
C12:0	-	97.2±0.67	97.8±0.41	97.5±1.26	98.3±0.33	-	-	-	-
C14:0	94.4±0.31	94.3±0.56	94.6±0.86	95.2±0.94	94.5±1.68	94.4±0.52	94.4±0.52	93.2±1.07	93.4±0.64
C16:0	93.7±0.57	94.4±0.50	93.8±0.91	93.8±0.69	91.7±2.66	93.9±0.13	93.8±0.82	92.6±0.15	92.8±0.54
C18:0	93.8±0.45 <sup>a</sup>	92.2±1.03 <sup>a</sup>	93.6±1.51 <sup>a</sup>	92.9±0.83 <sup>a</sup>	84.4±5.86 <sup>b</sup>	93.8±1.40 <sup>a</sup>	91.9±1.77 <sup>a</sup>	92.4±1.19 <sup>a</sup>	92.0±0.33 <sup>a</sup>
MUFA <sup>2</sup>									
C16:1	94.7±0.99	93.7±0.56	92.9±0.36	93.0±1.45	91.1±3.64	93.9±0.29	94.3±0.81	91.6±1.00	91.7±0.73
C18:1n9	95.2±0.68	96.2±0.19	96.1±0.51	96.4±0.45	95.6±1.55	96.2±0.13	96.7±0.54	95.9±0.27	96.2±0.70
PUFA <sup>3</sup>									
C18:2n6	95.5±0.71	96.9±0.19	96.7±0.47	96.6±0.64	96.1±1.43	96.3±0.16	96.8±0.56	95.9±0.38	96.1±0.78
C18:3n3	97.3±0.20	97.9±0.26	97.9±0.16	97.2±0.86	96.5±1.42	97.4±0.15	97.9±0.47	97.6±0.79	95.8±1.00
C20:4n6	97.0±0.34 <sup>a</sup>	94.8±0.41 <sup>a</sup>	95.5±0.46 <sup>a</sup>	95.8±0.44 <sup>a</sup>	88.6±4.76 <sup>b</sup>	96.4±0.27 <sup>a</sup>	96.3±0.84 <sup>a</sup>	94.9±0.39 <sup>a</sup>	91.3±1.37 <sup>b</sup>
C20:5n3	96.3±0.67 <sup>a</sup>	95.0±0.53 <sup>ab</sup>	95.7±0.62 <sup>a</sup>	94.9±1.37 <sup>ab</sup>	93.2±2.62 <sup>ab</sup>	95.6±0.47 <sup>a</sup>	95.7±0.74 <sup>a</sup>	93.7±0.71 <sup>ab</sup>	92.1±0.79 <sup>b</sup>
C22:6n3	94.9±1.39 <sup>a</sup>	93.3±0.64 <sup>ab</sup>	93.7±1.08 <sup>ab</sup>	92.1±2.31 <sup>abc</sup>	93.2±1.55 <sup>ab</sup>	94.1±1.21 <sup>ab</sup>	94.4±1.23 <sup>ab</sup>	90.9±0.60 <sup>bc</sup>	88.4±0.45 <sup>c</sup>

Values are mean of triplicates (n=3) and presented as mean ± standard deviation. Different superscripts in each row indicate significant differences (P<0.05).

<sup>1</sup>Saturated fatty acid.

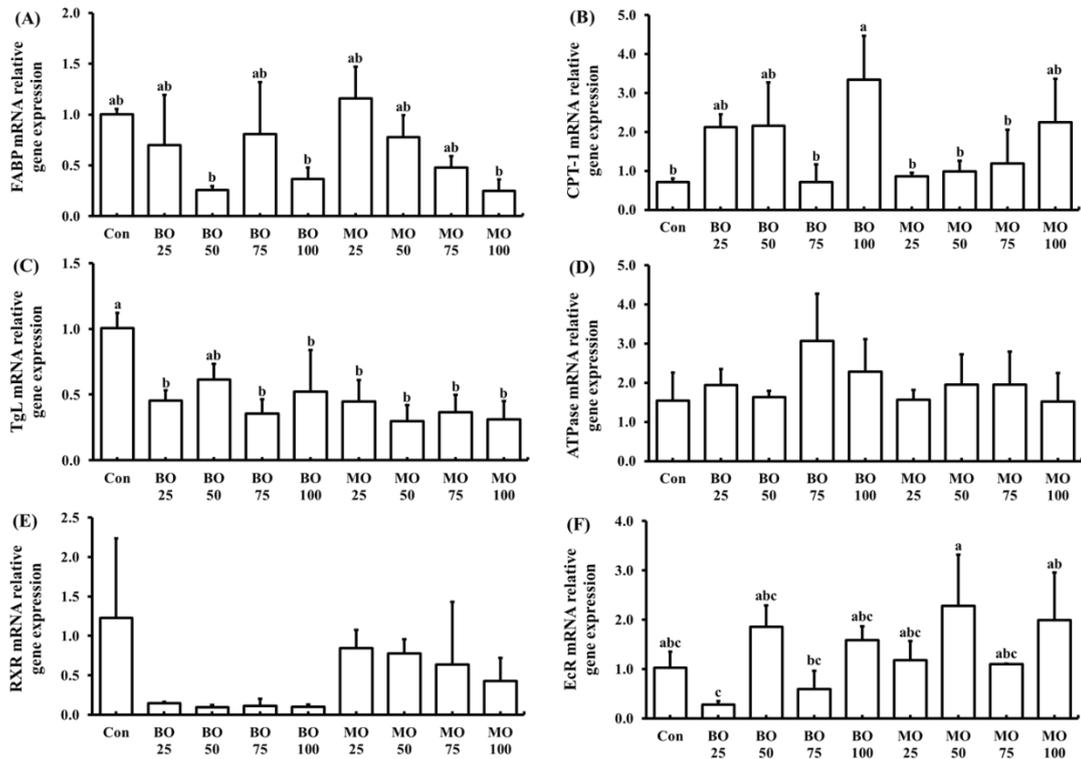
<sup>2</sup>Monounsaturated fatty acid.

<sup>3</sup>Polyunsaturated fatty acid.

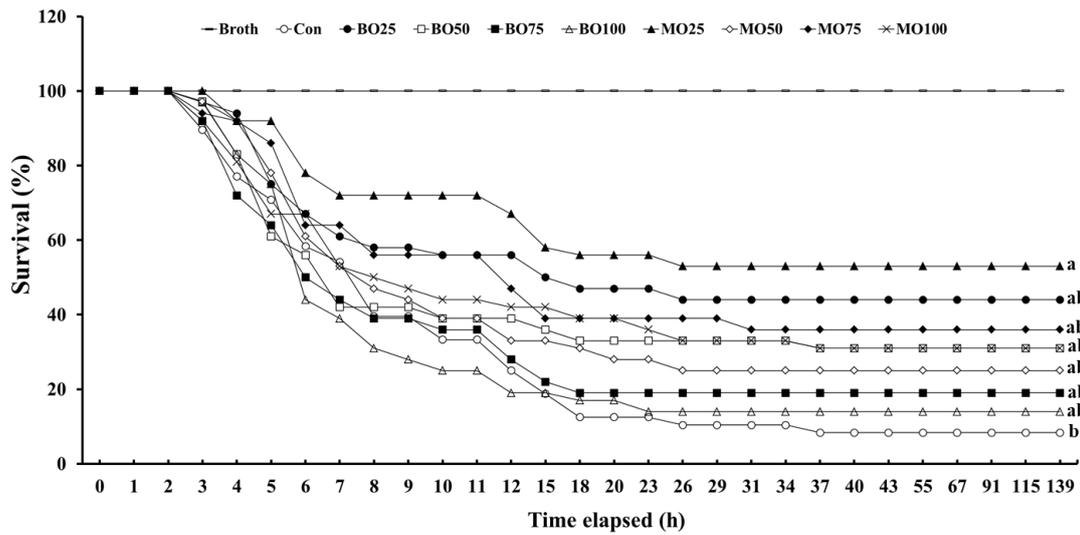
**Table 36.** The cycl threshold (Ct) values of hepatopancrease of *Litopenaeus vannamei* at 6, 12 and 72 h after *Vibrio parahaemolyticus* ( $2 \times 10^6$  colony forming unit/mL) infection challenge. The experimental diets were prepared by replacement fish oil (control, Con) with black soldier fly oil (BO) or mealworm oil (MO) at each level, respectively (Con, BO25–100 or MO25–100).

<b>Dietary treatments</b>	<b>0 h</b>	<b>6 h</b>	<b>12 h</b>	<b>72 h</b>
Con	nd	26.6±0.49	21.3±2.62	nd
BO25	nd	26.5±3.19	24.3±3.09	nd
BO50	nd	26.3±0.68	23.2±1.97	nd
BO75	nd	27.4±1.02	25.3±0.92	nd
BO100	nd	25.1±2.57	21.3±0.86	nd
MO25	nd	26.6±0.96	23.4±4.17	nd
MO50	nd	27.4±0.64	23.0±3.56	nd
MO75	nd	26.6±0.84	23.1±3.36	nd
MO100	nd	27.2±2.87	26.6±2.96	nd

Values are mean of triplicates and presented as mean ± standard deviation. 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. nd; not detected.



**Figure 19.** Relative gene expression of (A) fatty acid binding protein (FABP), (B) carnitine palmitoyl transferase-1 (CTP-1), (C) triacylglycerol lipase (TgL), (D) ATPase- $\alpha$ , (E) retinoid-X receptor (RXR) and (F) ecdysteroid receptor (EcR) in hepatopancreas of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets for 58 days. The expression of three genes was normalized to  $\beta$ -actin and expressed relative to control. Values are mean of quadruplicates ( $n=4$ ) and different letters denote significant difference ( $P < 0.05$ ).



**Figure 20.** Cumulative survival of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the experimental diets for 58 days during the challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. The shrimp emerged with *V. parahaemolyticus* suspension containing  $2 \times 10^6$  colony forming unit/mL. The water was exchanged after 7 h of emulsion. Triplicate groups of shrimp were fed with one of the experimental diets three times a day during the challenge period. Values are mean of triplicate (n=3) and different letters denote significant difference (P<0.05). The experimental diets were prepared by replacement fish oil (control, Con) with black soldier fly oil (BO) or mealworm oil (MO) at each level, respectively (Con, BO25–100 or MO25–100).

## 요 약 문

이번 연구에서는 흰다리새우 사료에 새로운 단백질·지질원료로써 곤충박과 곤충유의 이용성을 평가하였다.

Chapter 1에서는 국내에서 생산된 7 가지 곤충박을 이용하여, 영양소 함량 분석과 원료소화율, 어분대체원으로써의 이용가능성을 조사하였다. 동애등에, 갈색거저리, 쌍별귀뚜라미, 벼메뚜기, 흰점박이꽃무지 유충, 장수풍뎅이, 누에가 실험에 사용되었다. 곤충박에 대한 새우의 외관상소화율은 단백질이 83-89%, 지질이 91-98%, 에너지가 84-90%, 건물이 77-81%, 키틴이 28-36%, 아미노산이 76-96%, 지방산이 89-93%로 측정되었다. Taurine (93-96%), arginine (91-95%), lysine (90-95%) 소화율은 대체로 높았다. 지방산 소화율은 포화지방산이 89-93%, 단일불포화지방산이 90-93%, 다가불포화지방산이 88-93%으로 측정되었다. 사육실험에서는 참치부산물 27% 사용된 대조구와 이를 각 곤충박을 이용하여 37% 대체(사료 내 10%)한 7 개의 실험사료가 이용되었다. 사육실험에는 0.17 g 내·외의 흰다리새우를 이용하여 실험구 당 3 반복으로 배치하였고, 총 65 일간 사료를 공급하였다. 성장률은 동애등에구와 장수풍뎅이구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. 새우의 비특이적 면역력과 항산화력은 모든 실험구에서 대조구에 비해 높았다.

Chapter 2에서는 동애등에와 갈색거저리를 이용하여 새우사료에서의 적정 어분대체율을 조사하였다. 참치부산물 27% 함유된 대조구와 이를 두 종의 곤충박으로 각각 20, 40, 60% 대체하도록 실험사료를 조성하였다. 사육실험에는 0.09 g 내·외의 흰다리새우를 이용하여 실험구 당 4 반복으로 배치하였다. 사육실험은 총 57 일 동안 진행되었고, 새우의 성장률과 단백질이용효율은 동애등에 20, 40%구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. 갈색거저리구의 경우,

60%의 어분을 대체한 실험구에서 성장이 대조구에 비해 감소되었다. 새우의 비특이적 면역력과 항산화력은 곤충박의 종류와 어분대체 비율과 상관없이 대조구에 비해 증가하였다.

Chapter 3에서는 기능성 첨가제로써 곤충박의 이용성을 조사하였다. 정어리어분과 참치부산물인 주요 단백질 원으로 사용된 대조구와 이를 비탈지 혹은 탈지 동애등에와 갈색거저리를 이용하여 어분의 10% 대체하도록 실험사료를 조성하였다. 사육실험에는 0.47 g 내·외의 흰다리새우가 실험구 당 4 반복으로 배치되었고, 사료는 총 45 일 동안 공급하였다. 사육실험 결과, 새우의 비특이적 면역력과 항산화력은 곤충박 첨가구가 대조구에 비해 높았다. *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 새우의 질병저항성은 탈지 곤충박구가 대조구에 비해 높은 경향을 보였다. 성장과 사료효율은 모든 실험구 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Chapter 4에서는 어유대체원으로써 동애등에유와 갈색거저리유의 이용가치를 평가하였다. 대조구에는 명태간유가 주요 지질원으로 사용되었고, 실험사료에는 두 종의 곤충유를 이용하여 어유를 각각 25, 50, 75, 100% 대체하도록 설계하였다. 사육실험에는 0.89 g 내·외의 흰다리새우가 사용되었고, 실험구 당 4 반복으로 배치되었다. 사육실험은 총 58 일 동안 수행되었고, 성장률과 사료효율은 곤충유 실험구가 대조구에 비해 높은 경향을 보였다. 흰다리새우의 비특이적 면역력, 항산화력, *V. parahaemolyticus*에 대한 질병저항성은 곤충유 실험구가 대조구에 비해 높은 경향을 보였다.

총 4 차례에 걸친 실험을 통해 (1) 국산 곤충박의 영양소 함량과 원료소화율, 사육효능, (2) 상업적으로 이용가치 높은 동애등에와 갈색거저리의 적정 어분대체율, (3) 기능성 첨가제로써의 곤충박의 이용가치, (4) 어유 대체원으로써

곤충유의 이용성을 성공적으로 규명하였다. 곤충은 친환경적이고 지속가능한 개발에 최적화된 원료로써 가까운 미래에 양식사료에 주요 원료로써의 이용가치 매우 높다고 판단된다. 후속연구를 통해 곤충 유래 생리활성 물질의 효과에 대한 평가가 요구된다.

## 참고문헌

- Abdel-Ghany HM and Salem MES. 2020. Effects of dietary chitosan supplementation on farmed fish; a review. *Rev Aquac* 12, 438–452.
- Akiyama DM, Dominy WG and Lawrence AL. 1992. Penaeid shrimp nutrition. In: *Marine shrimp culture principles and practice*. Fast AW and Lester LJ, 1<sup>st</sup> ed, Elsevier Science Publishers, New York, NY, U.S.A., 535–568.
- Amparyup P, Charoensapsri W and Tassanakajon A. 2013. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish Shellfish Immunol* 34, 990–1001.
- Antonopoulou E, Nikouli E, Piccolo G, Gasco L, Gai F, Chatzifotis S, et al. Reshaping gut bacterial communities after dietary *Tenebrio molitor* larvae meal supplementation in three fish species. *Aquaculture* 2019, 503:628–635.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2005. *Official methods of analysis*. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, U.S.A.
- Askarian F, Zhou Z, Olsen RE, Sperstad S and Ringø E. 2012. Culturable autochthonous gut bacteria in Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed diets with or without chitin. Characterization by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and *in vitro* growth inhibition of four fish pathogens. *Aquaculture* 326–329: 1–8.
- Barroso FG, de Haro C, Sánchez-Muros MJ, Venegas E, Martínez-Sánchez A and Pérez-Bañón C. 2014. The potential of various insect species for use as food for fish. *Aquaculture* 422, 193–201.
- Barroso FG, Sánchez-Muros MJ, Segura M, Morote E, Torres A, Ramos R and Guil JL. 2017. Insects as food: Enrichment of larvae of *Hermetia illucens* with omega 3 fatty acids by means of dietary modifications. *J Food Compost Anal* 62, 8–13.
- Belghit I, Waagbø R, Lock E J and Liland NS. 2019. Insect-based diets high in lauric acid

- reduce liver lipids in freshwater *Atlantic salmon*. *Aquac Nutr* 25, 343–357.
- Benzertiha A, Kierończyk B, Rawski M, Mikołajczak Z, Urbański A, Nogowski L and Józefiak D. 2020. Insect fat in animal nutrition—a review. *Annals of Animal Science* 20: 1217–1240.
- Borrelli L, Varriale L, Dipineto L, Pace A, Menna LF and Fioretti, A. 2021. Insect Derived Lauric Acid as Promising Alternative Strategy to Antibiotics in the Antimicrobial Resistance Scenario. *Frontiers in Microbiology* 12, 330.
- Bruni L, Pastorelli R, Viti C, Gasco L, 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.
- Cardoso CR, Favoreto Jr S, Oliveira LL, Vancim JO, Barban GB, Ferraz DB and Silva JS. 2011. Oleic acid modulation of the immune response in wound healing: a new approach for skin repair. *Immunobiology* 216:409–415.
- Carrillo Pérez C, Cavia Camarero MDM and Alonso de la Torre S. 2012. Role of oleic acid in immune system; mechanism of action; a review. *Nutrición Hospitalaria* 27:978–990.
- Choi IH, Kim JM, Kim NJ, Kim JD, Park C, Park JH and Chung TH. 2018. Replacing fish meal by mealworm *Tenebrio molitor* on the growth performance and immunologic responses of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Acta Sci* 40, e39077.
- Choi SC, Ingale SL, Kim JS, Park YK, Kwon IK and Chae BJ. 2013. An antimicrobial peptide-A3: effects on growth performance, nutrient retention, intestinal and faecal microflora and intestinal morphology of broilers. *Br Poult Sci* 6:738–746.
- Clark DJ, Lawrence AL and Swakon DHD. 1993. Apparent chitin digestibility in penaeid shrimp. *Aquaculture* 109:51–57.
- Cui Y, Kang C, Wu Z and Lin J. 2019. Identification and Expression Analyses of Olfactory Gene Families in the Rice Grasshopper, *Oxya chinensis*, From Antennal Transcriptomes. *Front Physiol.* 10:1223.

- Cummins Jr, VC, Rawles SD, Thompson KR, Velasquez A, Kobayashi Y, Hager J and Webster CD. 2017. Evaluation of black soldier fly *Hermetia illucens* larvae meal as partial or total replacement of marine fish meal in practical diets for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 473:337–344.
- Dayrit FM. 2015. The properties of lauric acid and their significance in coconut oil. *J Am Oil Chem Soc* 92, 1–15.
- Divakaran S, Obaldo LG, Forster IP. Note on the methods for determination of chromic oxide in shrimp feeds. *J Agric Food Chem* 2002:464–467.
- Ellis AE. 1990. Serum antiproteases in fish. In: *Techniques in fish immunology*. JS Stolen, TC Fletcher, DP Anderson, BS Roberson and WB van Muiswinkel, eds. SOS publications, Fair Haven, NJ, U.S.A., 95–99.
- Erwin TL. 2004. The biodiversity question: how many species of terrestrial arthropods are there?. In: Lowman M, Brinker B, editors. *Forest canopies*: Academic Press. 259–269.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2018. The state of world fisheries and aquaculture 2018. Meeting the sustainable development goals. *FAO Report*, 227.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2020. *The State of World Fisheries and Aquaculture. Sustainability in Action*. Rome.
- Foyosal MJ, Fotedar R, Tay CY and Gupta SK. 2019. Dietary supplementation of black soldier fly *Hermetica illucens* meal modulates gut microbiota, innate immune response and health status of marron *Cherax cainii*, Austin 2002 fed poultry-by-product and fishmeal based diets. *PeerJ* 7, e6891.
- Fridovich I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 201:1203–1209.
- Gajardo K, Rodiles A, Kortner TM, Krogdahl Å, Bakke AM, Merrifield DL and Sørum H. 2016. A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon *Salmo salar*: a basis for comparative gut microbial research. *Sci Rep* 6:30893.

- Garces R and Mancha M. 1993. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Anal Biochem* 211:139–143.
- 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.
- Gasco L, Biasato I, Dabbou S, Schiavone A and Gai F. 2019a. Animals fed insect-based diets: state-of-the-art on digestibility, performance and product quality. *Animals* 9:170.
- Gasco L, Biancarosa I and Liland NS. 2020. From waste to feed: A review of recent knowledge on insects as producers of protein and fat for animal feeds. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 23:67–79.
- Gasco L, Dabbou S, Trocino A, Xiccato G, Capucchio MT, Biasato I and Gai F. 2019b. Effect of dietary supplementation with insect fats on growth performance, digestive efficiency and health of rabbits. *Journal of animal science and biotechnology* 10:1–9.
- Gatlin III DM, Barrows FT, Brown P, Dabrowski K, Gaylord TG, Hardy RW and Overturf K. 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquac Res* 38, 551–579.
- Ghosh S, Lee SM, Jung C and Meyer-Rochow VB. 2017. Nutritional composition of five commercial edible insects in South Korea. *J Asia Pac Entomol* 20:686–694.
- Han JE, Kim JE, Jo H, Eun JS, Lee C, Kim JH and Kim JW. 2019. Increased susceptibility of white spot syndrome virus-exposed *Penaeus vannamei* to *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease. *Aquaculture* 512:734333.
- Han JE, Tang KF, Pantoja CR, White BL and Lightner DV. 2015a. qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture* 442:12–15.
- Han JE, Tang KF, Tran LH and Lightner DV. 2015b. *Photorhabdus* insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute

- hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis Aquat Org* 113:33–40.
- He Y, Galagarza OA, Wang H, Taylor ZW, Ferguson CS, Ogejo JA and Wiersema BD. 2020. Protein-rich product recovered from brewer's spent grain can partially replace fishmeal in diets of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquac Res* 51:3284–3296.
- 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.
- Henry MA, Gasco L, Chatzifotis S and Piccolo G. Does dietary insect meal affect the fish immune system? The case of mealworm, *Tenebrio molitor* on European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Dev Comp Immunol* 2018:204–209.
- Heriyati Y, Astrid Y, Shadrina AAN, Wiani I, Satari MH and Kurnia D. 2020. Potential fatty acid as antibacterial agent against oral bacteria of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* from Basil (*Ocimum americanum*): *in vitro* and *in silico* studies. *Curr. Drug Discov Technol* 17.
- Hernández-López J, Gollas-Galván T and Vargas-Albores F. 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp *Penaeus californiensis* Holmes. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 113:61–66.
- Huang CB, George B and Ebersole JL. 2010. Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms. *Archives of oral biology* 55:555–560.
- Hwang BB, Chang MH, Lee JH, Heo W, Kim JK, Pan JH and Kim JH. 2019. The edible insect *Gryllus bimaculatus* protects against gut-derived inflammatory responses and liver damage in mice after acute alcohol exposure. *Nutrients* 11:857.
- Hwang JS, Kang BR, Kim SR, Yun EY, Park KH, Jeon JP and Kim IS. 2008. Molecular characterization of a defensin-like peptide from larvae of a beetle, *Protaetia brevitarsis*. *Int J Indust Entomol* 17:131–135.
- Ido A, Hashizume A, Ohta T, Takahashi T, Miura C and Miura T. 2019. Replacement of fish meal by defatted yellow mealworm *Tenebrio molitor* larvae in diet improves growth

- performance and disease resistance in red seabream *Pargus major*. *Animals* 9:100.
- Jozefiak A and Engberg RM. 2017. Insect proteins as a potential source of antimicrobial peptides in livestock production. A review. *J Ani Feed Sci* 26:87–99.
- Kayama MM, Hirata A, Kanazawa S, Tokiwa and Saito M, 1980. Essential fatty acids in the diet of prawn-III. Lipid metabolism and fatty acid composition. B. *Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46:483–488.
- Khempaka S, Chitsatchapong C and Molee W. 2011. Effect of chitin and protein constituents in shrimp head meal on growth performance, nutrient digestibility, intestinal microbial populations, volatile fatty acids, and ammonia production in broilers. *J Appl Poult Res* 20:1–11.
- Kim J, Yun EY, Park SW, Goo TW and Seo M. 2016. *Allomyrina dichotoma* larvae regulate food intake and body weight in high fat diet-induced obese mice through mTOR and Mapk signaling pathways. *Nutrients* 8:100.
- KOSIS (Korea Statistical Information Service). 2020. Survey on the status of aquaculture. Retrieved from [http://kostat.go.kr/portal/korea/kor\\_nw/1/1/index.board?bmode=read&aSeq=380812](http://kostat.go.kr/portal/korea/kor_nw/1/1/index.board?bmode=read&aSeq=380812) on Dec 08, 2020.
- Kroeckel S, Harjes AG, Roth I, Katz H, Wuertz S, 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* 364:345–352.
- Kumar P, Sahu NP, Saharan N, Reddy AK and Kumar S. 2006. Effect of dietary source and level of chitin on growth and survival of post-larvae *Macrobrachium rosenbergii*. *J Appl Ichthyol* 22, 363–368.
- Lee J, Hong HJ, Kim JK, Hwang JS, Kim Y and Lee DG. 2009. A novel antifungal analog peptide derived from protaetiamycine. *Mol Cells* 28:473–477.

- Lee J, Lee W, Kim MA, Hwang JS, Na M and Bae JS. 2017. Inhibition of platelet aggregation and thrombosis by indole alkaloids isolated from the edible insect *Protaetia brevitarsis seulensis* (Kolbe). *J Cell Mol Med* 21:1217–1227.
- Lee JH, Seo M, Lee HJ, Baek M, Kim IW, Kim SY and Hwang JS. 2019. Anti-inflammatory activity of antimicrobial peptide allomyrinasin derived from the dynastid beetle, *allomyrina dichotoma*. *J Microbiol Biotechnol* 29:687–695.
- Lee KH, Hong SY and Oh JE. 1998. Synthesis and structure-function study about tenecin 1, an antibacterial protein from larvae of *Tenebrio molitor*. *FEBS letters* 439:41–45.
- 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.
- Li X, Rahimnejad S, Wang L, Lu K, Song K and Zhang C. 2019. Substituting fish meal with housefly (*Musca domestica*) maggot meal in diets for bullfrog *Rana (Lithobates) catesbeiana*: Effects on growth, digestive enzymes activity, antioxidant capacity and gut health. *Aquaculture* 499:295–305.
- Liland NS, Biancarosa I, Araujo P, Biemans D, Bruckner CG, Waagbø R and Lock EJ. 2017. Modulation of nutrient composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae by feeding seaweed-enriched media. *PLoS One* 12:e0183188.
- Liu XH, Ye JD, Kong JH, Wang K and Wang AL. 2013. Apparent digestibility of 12 protein-origin ingredients for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *N Am J Aquac* 75:90–98.
- Lock ER, Arsiwalla T and Waagbø R. 2016. Insect larvae meal as an alternative source of nutrients in the diet of Atlantic salmon *Salmo salar* posts molt. *Aquac Nutr* 22, 1202–1213.
- MAFRA (Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs). 2019. The investigation of insects

- industry 2018. Retrieved from <https://www.mafra.go.kr/bbs/mafra/65/320711/artclView.do> on Dec 08, 2020.
- Magalhães R, Sánchez-López A, Leal RS, Martínez-Llorens S, Oliva-Teles A and Peres H. 2017. Black soldier fly *Hermetia illucens* pre-pupae meal as a fish meal replacement in diets for European seabass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 476:79–85.
- Maistrou S, Paris V, Jensen AB, Rolff J, Meyling NV and Zanchi C. 2018. A constitutively expressed antifungal peptide protects *Tenebrio molitor* during a natural infection by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Dev Comp Immunol* 86:26–33.
- Makkar HP, 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.
- Mba ARF, Kansci G, Viau M, Hafnaoui N, Meynier A, Demmano G and Genot C. 2017. Lipid and amino acid profiles support the potential of *Rhynchophorus phoenicis* larvae for human nutrition. *J Food Compost Anal.* 60:64–73.
- McLean E, Barrows FT, Craig SR, Alfrey K and Tran L. 2020. Complete replacement of fishmeal by soybean and poultry meals in Pacific whiteleg shrimp feeds: Growth and tolerance to EMS/AHPND and WSSV challenge. *Aquaculture* 527:735383.
- Motte C, Rios A, Lefebvre T, Do H, Henry M and Jintasatporn O. 2019. Replacing fish meal with defatted insect meal (Yellow Mealworm *Tenebrio molitor*) improves the growth and immunity of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Animals* 9:258.
- Nesa J, Sadat A, Buccini DF, Kati A, Mandal AK and Franco OL. 2020. Antimicrobial peptides from *Bombyx mori*: a splendid immune defense response in silkworms. *RSC Adv.* 10:512–523.
- Ngo DH and Kim SK. 2014. Antioxidant effects of chitin, chitosan, and their derivatives. *Adv Food Nutr Res* 73: 15–31.
- Nicolas P. 2009. Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. *FEBS J* 276:6483–6496.

- Nitbani FO, Siswanta D and Solikhah EN. 2016. Isolation and antibacterial activity test of lauric acid from crude coconut oil (*Cocos nucifera* L.). *Procedia Chemistry* 18:132–140.
- Niu J, Lin HZ, Jiang SG, Chen X, Wu KC, Liu YJ and Tian LX. 2013. Comparison of effect of chitin, chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-d-glucosamine on growth performance, antioxidant defenses and oxidative stress status of *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 372:1–8.
- Nogales-Mérida S, Gobbi P, Józefiak D, Mazurkiewicz J, Dudek K, Rawski M and Józefiak A. 2019. Insect meals in fish nutrition. *Rev Aquac* 11:1080–1103.
- NRC (National Research Council). 2011. Chapter 12. Digestibility and availability. In: National Research Council, editors. *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp: The National Academies Press*. pp. 253.
- Pakravan S, Akbarzadeh A, Sajjadi MM, Hajimoradloo A and Noori F. 2017. Partial and total replacement of fish meal by marine microalga *Spirulina platensis* in the diet of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Growth, digestive enzyme activities, fatty acid composition and responses to ammonia and hypoxia stress. *Aquac Res* 48:5576–5586.
- Panini RL, Freitas LEL, Guimarães AM, Rios C, da Silva MFO, Vieira FN and Amboni RD. 2017a. Potential use of mealworms as an alternative protein source for Pacific white shrimp: digestibility and performance. *Aquaculture* 473:115–120.
- Panini RL, Pinto SS, Nóbrega RO, Vieira FN, Fracalossi DM, Samuels RI and Amboni RD. 2017b. Effects of dietary replacement of fishmeal by mealworm meal on muscle quality of farmed shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Food Res Int* 102:445–450.
- Park SI, Kim JW and Yoe SM. 2015. Purification and characterization of a novel antibacterial peptide from black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Dev Comp Immunol* 52:98–106.
- Pond WG, Church DC, Pond KR. *Basic Animal Nutrition and Feeding*. 1995. 4th ed. New York: John Wiley and Sons Inc.

- Powell A and Rowley AF. 2007. The effect of dietary chitin supplementation on the survival and immune reactivity of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 147:122–128.
- Rahimnejad S, Hu S, Song K, Wang L, Lu K, Wu R and Zhang C. 2019. Replacement of fish meal with defatted silkworm (*Bombyx mori* L.) pupae meal in diets for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 510:150–159.
- Ravi C, Jeyashree A and Devi KR. 2011. Antimicrobial peptides from insects: an overview. *Res Biotechnol* 2:1–7.
- Renna M, Schiavone A, Gai F, Dabbou S, Lussiana C, Malfatto V and De Marco M. 2017. Evaluation of the suitability of a partially defatted black soldier fly *Hermetia illucens* L. larvae meal as ingredient for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum diets. *J Anim Sci Biotechnol* 8:57.
- Richard L, Blanc PP, Rigolet V, Kaushik SJ and Geurden I. 2010. Maintenance and growth requirements for nitrogen, lysine and methionine and their utilisation efficiencies in juvenile black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using a factorial approach. *Br J Nutr* 103:984–995.
- Rocha J, Garcia-Carreño FL, Muhlia-Almazán A, Peregrino-Uriarte AB, Yépez-Plascencia G and Córdova-Murueta JH. 2012. Cuticular chitin synthase and chitinase mRNA of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molting cycle. *Aquaculture* 330:111–115.
- Rocha LK, Favaro LI, Rios AC, Silva EC, Silva WF, Stigliani TP and Balcão. 2017. Sericin from *Bombyx mori* cocoons. Part I: Extraction and physicochemical-biological characterization for biopharmaceutical applications. *Process Biochem* 61:163–177.
- Rosen H. 1957. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Arch Biochem Biophys* 67:10–15.
- Rumbos CI, Karapanagiotidis IT, Mente E, Psafakis P and Athanassiou CG. 2020. Evaluation

- of various commodities for the development of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor*.  
Sci Rep 10:1–10.
- Sado-Kamdem SL, Vannini L and Guerzoni ME. 2009. Effect of  $\alpha$ -linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. Int J Food Microbiol 129:288–294.
- Samocha TM, Patnaik S, Davis DA, Bullis RA and Browdy CL. 2010. Use of commercial fermentation products as a highly unsaturated fatty acid source in practical diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquacult Res 41:961–967.
- Sánchez-Muros MJ, Barroso FG and Manzano-Agugliaro F. 2014. Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review. J Clean Prod 65:16–27.
- Sánchez-Muros MJ, De Haro C, Sanz A, Trenzado CE, Villareces S and Barroso FG. 2016. Nutritional evaluation of *Tenebrio molitor* meal as fishmeal substitute for tilapia (*Oreochromis niloticus*) diet. Aquac Nutr 22:943–955.
- Sánchez-Muros MJ, Renteria P, Vizcaino A and Barroso FG. 2020. Innovative protein sources in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) feeding. Rev Aquac 12:186–203.
- Schlievert PM, Deringer JR, Kim MH, Projan SJ and Novick RP. 1992. Effect of glycerol monolaurate on bacterial growth and toxin production. Antimicrob Agents Chemother 36:626–631.
- Sealey WM, Gaylord TG, Barrows FT, Tomberlin JK, McGuire MA, Ross C and St-Hilaire S. 2011. Sensory analysis of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed enriched black soldier fly prepupae, *Hermetia illucens*. J World Aquac Soc 42, 34–45.
- Shiau SY and Yu YP. 1998. Chitin but not chitosan supplementation enhances growth of grass shrimp, *Penaeus monodon*. J Nutr 128, 908–912.
- Sogari G, Amato M, Biasato I, Chiesa S and Gasco L. 2019. The potential role of insects as feed: A multi-perspective review. Animals 9:119.
- Song YL and Li CY. 2014. Shrimp immune system-special focus on penaeidin. J Mar Sci

- Technol 22:1–8.
- Song YS, Kim MW, Moon C, Seo DJ, Han YS, Jo YH and Jung WJ. 2018. Extraction of chitin and chitosan from larval exuvium and whole body of edible mealworm, *Tenebrio molitor*. Entomol Res 48:227–233.
- St-Onge MP, Bosarge A, Goree LLT and Darnell B. 2008. Medium chain triglyceride oil consumption as part of a weight loss diet does not lead to an adverse metabolic profile when compared to olive oil. J Am Coll Nutr 27:547–552.
- Strickland JDH and Parsons TR. 1972. Determination of ammonia In: A Practical Handbook of Seawater Analysis, 2nd eds. Fishery Research Board of Canada. Alger Press Ltd., Ottawa, Canada, 87.
- 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.
- Suh HJ, Kim SR, Lee KS, Park S and Kang SC. 2010. Antioxidant activity of various solvent extracts from *Allomyrina dichotoma* (Arthropoda: Insecta) larvae. J Photochem Photobiol B 99:67–73.
- Tacon AGJ and Metian M. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. Aquaculture 285:146–158.
- Terrazas-Fierro M, Civera-Cerecedo R, Ibarra-Martínez L, Goytortúa-Bores E, Herrera-Andrade M, Reyes-Becerra A. 2010. Apparent digestibility of dry matter, protein, and essential amino acid in marine feedstuffs for juvenile whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 308:166–173.
- Tzompa-Sosa DA, Yi L, Van Valenberg HJF and Lakemond CMM. 2019. Four insect oils as food ingredient: physical and chemical characterisation of insect oils obtained by an aqueous oil extraction. J Insects Food Feed 5:279–292.

- Tzuc JT, Escalante DR, Herrera RR, Cortés GG and Ortiz MLA. 2014. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Springerplus 3:280.
- van Huis A. 2013. Potential of insects as food and feed in assuring food security. Annu Rev Entomol 58:563–583.
- Vargas-Abúndez AJ, Randazzo B, Foddai M, Sanchini L, Truzzi C, Giorgini E and Olivotto I. 2019. Insect meal based diets for clownfish: Biometric, histological, spectroscopic, biochemical and molecular implications. Aquaculture 498:1–11.
- Wang K, Li P, Gao Y, Liu C, Wang Q, Yin J and Shu C. 2019. *De novo* genome assembly of the white-spotted flower chafer (*Protaetia brevitarsis*). Gigascience 8:giz019.
- Wang YS and Shelomi M. 2017. Review of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as animal feed and human food. Foods 6:91.
- Wu S, Zhang F, Huang Z, Liu H, Xie C, Zhang J and Qiao S. 2012. Effects of the antimicrobial peptide cecropin AD on performance and intestinal health in weaned piglets challenged with *Escherichia coli*. Peptides 2:225–230.
- 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.
- Xu Z, Wang A, Wang H and Zhang H. 2016. The effect of replacement of fish oil by soybean oil in practical diets, on tissue fatty acid and expression of related genes in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh 68:20838.
- Yang CC, Lu CL, Chen S, Liao WL and Chen SN. 2015. Immune gene expression for diverse haemocytes derived from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol 44:265–271.
- Yang Q, Zhou X, Zhou Q, Tan B, Chi S and Dong X. 2009. Apparent digestibility of selected feed ingredients for white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Boone. Aquac Res 41:78–86.

- Yang HT, Chen JW, Rathod J, Jiang YZ, Tsai PJ, Hung YP and Huang I. 2018. Lauric acid is an inhibitor of *Clostridium difficile* growth in vitro and reduces inflammation in a mouse infection model. *Frontiers in microbiology* 8:2635.
- Yi HY, Chowdhury M, Huang YD and Yu XQ. 2014. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:5807–5822.
- Zaki MA, Salem M, El-S Gaber MM and Nour AM. 2015. Effect of chitosan supplemented diet on survival, growth, feed utilization, body composition and histology of sea bass *Dicentrarchus labrax*. *World J Engin Technol* 3:38–47.
- Zhang M, Haga A, Sekiguchi H and Hirano S. 2000. Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia. *Int J Biol Macromol* 27:99–105.
- Zhang SP, Li JF, Wu XC, Zhong WJ, Xian JA, Liao SA and Wang AL. 2013. Effects of different dietary lipid level on the growth, survival and immune-relating genes expression in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 34, 1131–1138.
- Zhang X, Ashby R, Solaiman DK, Uknalis J and Fan X. 2016. Inactivation of *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. by palmitic, stearic, and oleic acid sophorolipids and thiamine dilauryl sulfate. *Frontiers in microbiology* 7:2076.

## 감사의 글

박사과정 동안 너무나 많은 분들께 도움을 받았습니다. 짧은 글로 고마움을 모두 표현할 수 없지만 대신하고자 합니다. 저를 학문의 길로 이끌어 주신 이경준 교수님께 감사의 인사를 드립니다. 심사를 위해 시간을 내어주신 여인규 교수님, 학사뿐만 아니라 박사과정 동안 많은 가르침을 주신 송춘복 교수님, 이제희 교수님, 허문수 교수님, 여인규 교수님, 전유진 교수님, 정준범교수님, 정석근 교수님, 이승헌 교수님께도 감사드립니다.

연구실의 기둥이자 힘든 일이 있을 때 항상 도움을 준 민기형과 초롱누나를 비롯하여, 산업전선에서 열심히 일하고 있는 세진이형, 봉주형, 성삼이형, 항상 칭찬과 격려로 힘을 실어주었던 대한이형, 진우형, 지훈이형, 선배들이 시키는 일 다하는 후배들 재범, 현운, 대현, 건호, 세희, 종호, 한세, 단비, 연지, 수혁이에게 너무나 고맙습니다.

그리고 항상 만날 때 많은 조언과 격려를 아끼지 않은 제주수산연구소의 지승철박사님을 비롯하여, 실험에 많은 도움을 주신 강운정 선생님, 이기표 선생님께 머리 숙여 깊이 감사드립니다.

마지막으로 지금까지 제가 공부에 매진할 수 있도록 곁에서 응원해 주신 아버지와 어머니 정말 사랑하고 존경합니다. 힘들 때 옆에서 많은 위로를 해준 소윤누나, 유정누나, 보경누나, 가족들, 그리고 항상 저를 이해해준 수연이에게 이 논문을 바칩니다. 논문을 마무리하며 많은 아쉬움이 남습니다. 부족한 부분은 앞으로 채워나가도록 노력하겠습니다. 저에게 주신 고마움은 평생 잊지 않고 간직하며 살겠습니다. 다시 한번 모든 분들께 감사드립니다.

2021년 11월 24일

신재형 올림.

## LIST OF PUBLICATIONS

### International Journals

1. **Shin JH** and Lee KJ. (2021). Digestibility of insect meals for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and their performance for growth, feed utilization and immune responses. PloS one, 16(11), e0260305.
2. **Shin JH**, Lim HW, Kim MG, Lee CR, Lee BJ, Kim KW and Lee KJ. (2021). Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients in extruded pellet for adult olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture nutrition. *In review*
3. **Shin JH**, Kim MG, Lim HW and Lee KJ. (2021). Dietary valine requirement of juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish and Shelfish immunology. *In review*
4. **Shin JH** and Lee KJ. (2021). Dietary tryptophan plays a critical role in the survival of juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture. *In review*
5. **Shin JH**, Eom GH and Lee KJ. (2021). Utilization of black soldier fly oil and mealworm oil in diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture. *In review*
6. **Shin JH**, Gunathilaka BE, Song JW, Kim MG, Medagoda N, Hasanthi M, Ji SC and Lee KJ. (2021). Animals. *In review*
7. Gunathilaka BE, **Shin JH**, Kim SS, Kim MG, Lee CR, Lee BJ, Kim KW and Lee KJ. (2021). Growth performance, feed utilization and body composition of parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*, Temminck & Schlegel 1844) fed graded levels of dietary lipid. Turkish J Fish Aqua Sci. *In review*
8. Lee CR, Shin JB, Feyaerts J, **Shin JH**, Kim MG, Gunathilaka BE, Ko DH, Jo SH, Eom GH, Ji SC, Jeong JB and Lee KJ. (2021). Effects of dietary supplementation of monobutyryn and tributyrin on growth, feed efficiency, innate immunity, digestibility and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio harveyi*. Aquaculture Nutrition, 27(3). 771-781.

9. Gunathilaka BE, Khosravi S, Shin JB, **Shin JH**, Herault M, Fournier V and Lee KJ. (2021). Evaluation of shrimp protein hydrolysate and krill meal supplementation in low fish meal diet for red seabream (*Pagrus major*). Fish Aquat Sci. 24(3). 109-120.
10. Tharaka K, Gunathilaka BE, Veille A, Kim MG, **Shin JH**, Lim Hyunwon Lim, Jeong JB, Meallet V and Lee KJ. (2020). Algae-clay powder (sea lettuce, *Ulva lactuca* and red algae, *Solieria chordalis* in exfoliated micronized montmorillonite) supplementation in a fish meal-reduced diet for olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture Reports, 18. 100498.
11. Tharaka K, Benitez-Santana T, Gunathilaka BE, Kim MG, Lee CR, **Shin JH** and Lee KJ. (2020). Evaluation of Antarctic krill (*Euphausia superba*) meal supplementation in diets for olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture Research, 51(6). 2291-2302.
12. Lee CR, Cha JH, Kim MG, **Shin JH**, Woo SH, Kim SH, Kim JW, Ji SC and Lee KJ. (2020). The effects of dietary Bacillus subtilis on immune response, hematological parameters, growth performance and resistance of juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Streptococcus iniae*. Journal of the World Aquaculture Society. 51(2). 551-562.
13. Gunathilaka BE, Kim MG, Lee CR, **Shin JH**, 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. Fisheries and Aquatic Sciences. 22:23.

## Domestic Journals

1. **Shin JH** and Lee KJ. (2021). Requirements of phenylalanine in diets for juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Korean J Fish Aquat Sci. *In review*
2. **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(5), 624-633.
3. **Shin JH**, Song JW, Kim MG, Lim HW, Lin JH and Lee KJ. (2021). Replacement of dietary vitamin C with citrus and fermented citrus by-products in Korea rockfish *Sebastes schlegelii*. Korean J Fish Aquat Sci, 54(5), 617-623.
  4. Ko DH, **Shin JH**, Kim MG, Lee CR, Kim SS, Park GH and Lee KJ. (2021). Effects of dietary supplementation of shrimp soluble extract on growth performance, innate immunity and digestibility of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Korean J Fish Aquat Sci, 54(3), 287-292.
  5. **Shin JH**, Lee CR, Kim YJ, Shin JB, Lim HW, Yun KS and Lee KJ. (2020). Dietary supplementation of phytosterol for olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Korean J Fish Aquat Sci, 53(2), 191-202.
  6. **Shin JH**, Ji SC and Lee KJ. (2020). *In vivo* and *in vitro* digestibility of enzyme-treated fish meal for juvenile Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). Korean J Fish Aquat Sci, 53(3), 423-431.
  7. **Shin JH**, Jo SH, Ko DH and Lee KJ. (2020). Replacing fish meal with black soldier fly larvae and mealworm larvae in diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Korean J Fish Aquat Sci, 53(6), 900-908.
  8. Ji SC, **Shin JH**, Kim DJ, Jeong MH, Kim JH and Lee KJ. (2020). Utilization of enzyme-treated fish meal and DHA oil in diets for juvenile Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). Korean J fish Aquat Sci, 53(2), 181-190.
  9. 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(3), 464-470.

10. Kim MG, **Shin JH**, Lee CR, Lee BJ, Kim KW and Lee KJ. (2019). Effects of extruded pellet size on growth of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) at three different growing stages. Korean J fish Aquact Sci, 52(1), 43-48.
11. Kim MG, Lee CR, **Shin JH**, 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 Aquact Sci, 52(2), 149-158.
12. Kim MG, **Shin JH**, Lee CR, Lee BJ, Hur SW, Lim SG and Lee KJ. (2019). Evaluation of a mixture plant protein sources as a partial fish meal replacement in diets for juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Korean J fish Aquact Sci, 52(4), 374-381.
13. Ji SC, **Shin JH**, Kim DJ, Yang SG, Jeong MW, Kim JH and Lee KJ. (2019). Dietary utilization of enzyme treated fish meal as the main protein source for juvenile Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). JFMSE, 31(3), 741-755.
14. Kim YJ, **Shin JH**, Kwon HW, Lee SY, Kim JM, Kim MG, Kim JD and Lee KJ. (2018). Evaluation of a hydrolyzed pig bristle meal as a partial fish meal replacer in diets for juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Korean J fish Aquact Sci, 51(2), 148-156.
15. Kim YJ, Lee CR, **Shin JH** and Lee KJ. (2017). Effects of dietary supplementation with Citrus by-product as a vitamin C replacement for juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) at low water temperature. Korean J fish Aquact Sci, 50(1), 015-024.
16. Ji SC, Kim BS, Lim SG, Kim KW, **Shin JH** and Lee KJ. (2017). Effects of dietary utilization enzyme treated fish meal for juvenile Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). JFMSE, 29(5), 1365-1372.