



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](#)

석사학위논문

치어기 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의

사료 내 어분 대체를 위한

곤충박 평가

제주대학교 대학원

해양생명과학과

임 현 운

2021년 2월


치어기 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)
의 사료 내 어분 대체를 위한
곤충박 평가


지도교수 이 경 준
임현운


이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2020 년 11 월

임현운의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 박 상 른 

위 원 이 경 준 

위 원 송 진 우 

제주대학교 대학원

2020 년 11 월

Contents

Introduction	1
CHAPTER 1.	5
Abstract	5
1.1 재료 및 방법	6
1.1.1 실험사료.....	6
1.1.2 실험어 및 사육관리	11
1.1.3 실험어 무게측정	11
1.1.3 샘플수집.....	12
1.1.4 일반성분분석.....	13
1.1.5 혈액분석.....	13
1.1.6 아미노산 분석.....	13
1.1.7 지방산 분석.....	14
1.1.8 소화율 분석.....	14
1.1.9 통계학적 분석.....	14
1.2 결과	15
1.3 결론	16
CHAPTER 2.	29
Abstract	29
2.1 재료 및 방법	30
2.1.1 실험사료.....	30
2.1.2 실험어 사육관리	35
2.1.3 실험어 무게측정	36
2.1.4 샘플수집.....	36
2.1.5 일반성분 분석.....	37
2.1.6 혈액 분석.....	37
2.1.7 아미노산 분석.....	38
2.1.8 지방산 분석.....	38
2.1.9 통계학적 분석.....	38
2.2 결과	39
2.3 결론	40
요약문	49
Reference	51
감사의 말	63

LIST OF TABLES

Table 1. Proximate, amino acid and fatty acid composition of MW (mealworm), WSFC (white-spotted flower chafer), BSF (black soldier fly), TSC (two-spotted cricket), DB (dynastid beetle) for juvenile olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i>	8
Table 2. Dietary formulation of the experimental diets for juvenile olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i>	9
Table 3. Proximate, amino acid and fatty acid composition of the experimental diets for juvenile olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i>	10
Table 4. Growth performance, feed utilization and biological indices of the juvenile olive flounder (initial mean body weight: 11.0±0.15g) fed the experimental diets for 8 weeks.	20
Table 5. Proximate contents of growing olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> fed the experimental diets for 15 weeks (% of wet basis).	21
Table 6. Hematological parameters of juvenile olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> fed the experimental diets for 8 weeks.	22
Table 7. Non-specific immune responses of juvenile olive flounder fed the experimental diets for 8 weeks.	23
Table 8. Proximate and fatty acid composition of black soldier fly (BSF), mealworm (MW) for juvenile olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i>	32
Table 9. Dietary formulation of the experimental diets for juvenile olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i>	33
Table 10. Proximate, amino acid and fatty acid composition of the experimental diets for juvenile olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i>	34
Table 11. Growth performance, feed utilization and biological indices of the juvenile olive flounder (initial mean body weight: 34.3±0.05g) fed the experimental diets for 15 weeks.	43
Table 12. Proximate contents of juvenile olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> fed the experimental diets for 15 weeks (% of wet basis).	44
Table 13. Hematological parameters and non-specific immune responses of juvenile olive flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> fed the experimental diets for 15 weeks.	45

LISF OF FIGURES

- Figure 1. Five insect meals (mealworm, white-spotted flower chafer, black soldier fly, two-spotted cricket, dynastid beetle) as the alternative protein source in diet for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*..... 7
- Figure 2. Experimental system for juvenile olive flounder, experimental fish in tank. 11
- Figure 3. Apparent digestibility coefficient of dry matter and protein in the experimental diet. Con, contain the 45% of fish meal; MW, contain the 35% of fish meal and 4.6% of mealworm; WSFC, contain the 35% of fish meal and 6.6% of white-spotted flower chafer; BSF, contain the 35% of fish meal and 8.95% of black soldier fly; TSC, contain the 35% of fish meal and 5.55% of two-spotted cricket; DB, contain the 35% of fish meal and 6.7% of dynastid beetle. 24
- Figure 4. Growth performance, feed utilization and survival of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 8 weeks. Con, contain the 45% of fish meal; MW, contain the 35% of fish meal and 4.6% of mealworm; WSFC, contain the 35% of fish meal and 6.6% of white-spotted flower chafer; BSF, contain the 35% of fish meal and 8.95% of black soldier fly; TSC, contain the 35% of fish meal and 5.55% of two-spotted cricket; DB, contain the 35% of fish meal and 6.7% of dynastid beetle..... 25
- Figure 5. Biological parameters of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 8 weeks. Con, contain the 45% of fish meal; MW, contain the 35% of fish meal and 4.6% of mealworm; WSFC, contain the 35% of fish meal and 6.6% of white-spotted flower chafer; BSF, contain the 35% of fish meal and 8.95% of black soldier fly; TSC, contain the 35% of fish meal and 5.55% of two-spotted cricket; DB, contain the 35% of fish meal and 6.7% of dynastid beetle. 26
- Figure 6. Hematological parameters of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 8 weeks. Con, contain the 45% of fish meal; MW, contain the 35% of fish meal and 4.6% of mealworm; WSFC, contain the 35% of fish meal and 6.6% of white-spotted flower chafer; BSF, contain the 35% of fish meal and 8.95% of black soldier fly; TSC, contain the 35% of fish meal and 5.55% of two-spotted cricket; DB, contain the 35% of fish meal and 6.7% of dynastid beetle..... 27
- Figure 7. Non-specific immune response of juvenile olive flounder fed the experimental diets for 8 weeks. Con, contain the 45% of fish meal; MW, contain the 35% of fish meal and 4.6% of mealworm; WSFC, contain the 35% of fish meal and 6.6% of white-spotted flower chafer; BSF, contain the 35% of fish meal and 8.95% of black soldier fly; TSC, contain the 35% of fish meal and 5.55% of two-spotted cricket; DB, contain the 35% of fish meal and 6.7% of dynastid beetle. 28

Figure 8. Black soldier fly and mealworm for the alternative protein source in diet for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. 31

Figure 9. Experimental system for juvenile olive flounder, experimental fish in tank 35

Figure 10. Growth performance, feed utilization and survival of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 15 weeks. Con, contain the 45% of fish meal; F35B10, contain the 35% of fish meal and 10% of black soldier fly larvae meal; F35M10, contain the 35% of fish meal and 10% of mealworm larvae meal; F35B5M5, contain the 35% of fish meal, 5% of balck soldier larvae meal and 5% of mealworm larvae meal..... 46

Figure 11. Biological parameters of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 15 weeks. Con, contain the 45% of fish meal; F35B10, contain the 35% of fish meal and 10% of black soldier fly larvae meal; F35M10, contain the 35% of fish meal and 10% of mealworm larvae meal; F35B5M5, contain the 35% of fish meal, 5% of balck soldier larvae meal and 5% of mealworm larvae meal. 47

Figure 12. Hematological parameters and non-specific immune responses of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 15 weeks. Con, contain the 45% of fish meal; F35B10, contain the 35% of fish meal and 10% of black soldier fly larvae meal; F35M10, contain the 35% of fish meal and 10% of mealworm larvae meal; F35B5M5, contain the 35% of fish meal, 5% of balck soldier larvae meal and 5% of mealworm larvae meal. 48

Introduction

곤충(insect)은 사육이 간편하고, 음식물찌꺼기와 각 종 부산물(by-product)을 먹이로 사용할 수 있어 동물사료 내 단백질원으로써 주목받고 있다. 또한 곤충은 사료효율이 소, 돼지, 닭 등의 가축에 비해 월등히 높아 비교적 적은 양의 먹이로 사육 가능하며, 곤충의 배설물은 농업용 비료로 활용할 수 있어 환경 친화적인 원료로 평가받고 있다(Van HA, 2013; Howe et al., 2014; Makker et al., 2014). 곤충은 다양한 동물의 사료 대체품으로 직접 이용되거나, 분쇄된 형태로 배합사료 내 단백질 원료로써 사용된다(Bovera et al., 2015; Biasato et al., 2016). 곤충박(insect meal)은 단백질, 지질, 비타민, 미네랄과 같은 필수 영양소를 풍부하게 함유하고 있다(Nogales-Mérida et al., 2019). 곤충박은 어류의 필수 아미노산인 lysine (Lys)과 methionine (Met)등의 함량이 식물성 단백질 원료에 비해 높아, 새로운 어분대체원료로써 다수의 연구가 수행되었다(Spranghers et al., 2016; Nogales-Mérida et al., 2019). 곤충박은 다양한 연구를 통해 성장저하 등의 부작용 없이 어류 사료 내에 이용 가능성이 보고되었다(Henry et al., 2018; Taukef et al., 2018; Fisher et al., 2020). 또한 곤충박은 chitin 혹은 antimicrobial peptides (AMPs) 등의 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있어, 어류의 비특이적 면역력, 질병저항성 증진에도 효과가 있는 것으로 보고되었다(Harikrishnan et al., 2012).

어분(fish meal, FM)은 단백질의 함량이 높고(60-70%), 필수아미노산과 지방산, 미네랄 등이 풍부할 뿐만 아니라 미지성장인자(unknown growth factors)를 함유하고 있어 양어 사료 내 최적의 단백질 원료로 알려져 있다(Miles and Chapman, 2006). 그러나, 어분의 가격은 원료로 사용되는 어류의 어획량 감소와 어분의 수요 증가로 인해 지난 수 십년간 계속적으로 증가하고 있는 추세이다(FAO, 2014). 양식산업에서 사료에 소모되는 비용은 전체 생산단가의 40-70%를 차지한다. 특히, 육식성 어류는 사료 내 단백질의 요구량이 높아, 사료에 사용되는 단백질 원료가 어류의 성장과 면역 등 다양한 측면에

영향을 준다(Manzano-Agugliaro et al., 2012; Rana et al., 2009; Wilson, 2002). 어분은 넙치 사료에 다량(약 60-70%)으로 사용되고 있기 때문에 양식산업의 지속 가능한 발전을 위해서는 사료 내 어분의 함량이 낮은 저어분 배합사료의 개발이 필요하다(Yang et al., 2011; Kim et al., 2020b). 본 연구에 앞서, 넙치용 저어분 배합사료를 개발하고자 다양한 연구를 수행하였다. 동·식물성 원료를 혼합하여 사료 내 어분을 40-50%까지 대체 가능함을 확인하였다(Kim et al., 2020b; Lim et al., 2020). 동·식물성 원료에는 일부 필수아미노산 등의 영양소 함량이 낮아, 어분을 다량 대체하기에는 한계가 있다. 어분의 대체율을 보다 증가시키기 위해서는 새로운 원료를 이용한 연구가 필요한 실정이다.

넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 국내 양식산업의 주요 어종으로 그 생산량은 2019년도에 44,408톤으로 전체 양식 생산량의 약 51%를 차지하고 있다(KOSIS, 2020). 넙치는 단백질의 이용성이 높은 육식성 어류로 사료를 통한 단백질의 공급은 아미노산과 에너지를 충족시키기 위해 매우 중요하다(NRC, 2011; Kim et al., 2017). 그러나, 아직까지 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 사료 내 곤충박의 이용성에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 곤충의 영양소 함량은 종에 따라 큰 차이를 보일 뿐만 아니라 동일한 종이라도 사육조건(먹이 등)과 가공방법이 다를 경우에도 영양소 함량에 차이를 보여(Lock et al., 2016; Rumpold et al., 2013), 우리나라에서 생산된 곤충을 이용한 연구가 필요하다.

현재까지 전세계에 약 백만여 종의 곤충이 서식하는 것으로 알려져 있다(Erwin, 2004). 그 중 매우 일부의 곤충이 상업적 목적으로 이용되고 있다. 우리나라에서는 약 10여종의 곤충이 상업용으로 생산되고 있다. 갈색거저리(*Tenebrio molitor*, mealworm; MW)는 Tenebrionidae에 속하는 두 종류의 딱정벌레(*Tenebrio molitor* Linnaeus 1758, *Tenebrio obscurus* Fabricius 1792)의 유충을 말하며, 밀기울(wheat bran)과 같은 식물성 원료를 먹이로 한다. 갈색거저리는 한국을 비롯한 전 세계에 분포하며, 변태 기간이

짧아 연중 사육이 가능하다. 갈색거저리는 단백질(52-75%)과 지질(5-34%)의 함량이 높고(Piccolo et al., 2017; Ido et al., 2019), oleic acid 등의 불포화지방산(unsaturated fatty acid)이 지질의 75-78%를 차지한다(Sankian et al., 2018; Ido et al., 2019; Shin et al., 2020). 갈색거저리의 경우, 대량 생산기술이 확립되어 있어서 사육 농가의 수가 계속해서 증가하고 있다(Chung et al., 2013; Van Huis and Oonincx, 2017).

흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsi*, white-spotted flower chafer; WSFC)는 Coleoptera에 속하는 곤충으로 주로 한국, 일본, 대만, 중국, 유럽에 분포하고 있으며, 아시아에서는 주로 약제로 사용되어왔다(Kim and Kang, 2005; Ghosh et al., 2017). 흰점박이꽃무지의 단백질과 지방 함량은 각각 44-58%, 15-17%로 보고되었으며, 지방산 함량의 약 60% 이상을 oleic acid (C18:1n9)가 차지하고 있다(Chung et al., 2013; Ghosh et al., 2017). 흰점박이꽃무지의 경우, 어분 대체원으로써의 연구가 보고된 적은 없으며, 주로 약제로써 연구가 진행되었다. Park et al. (1994)은 흰점박이꽃무지에서 분리한 항생 활성펩타이드가 그람 양성균에 대해 항균 활성을 지닌다고 보고하였다. Choi et al. (2019)는 흰점박이꽃무지의 추출물을 흰 쥐에게 투여하였을 경우 항혈전 작용에 효과가 있다고 보고하였다. Kim et al. (2019)은 흰점박이꽃무지 유충에서 항산화 활성이 나타났다고 보고하였다.

동애등에(*Hermetia illucens*, black soldier fly; BSF)는 Stratiomyidae에 속하는 곤충으로 국내에서는 1990년대에 최초로 발견되었으며, 현재 대량생산 기술이 개발되어 있다(Kim, 1997; Makker et al., 2014; Van Huis and Oonincx, 2017). 동애등에는 대표적인 환경정화 곤충으로, 생활폐기물을 주요 먹이로 하며, 단백질(31-59%)과 지질(28-49%)의 함량이 높다(Van Huis et al., 2013; Makker et al., 2014). 동애등에는 먹이가 충분할 경우, 유충이 될 때까지 약 2개월 정도 걸리며, 그렇지 않은 경우에는 약 4개월 정도 소요된다(Makker et al., 2014). 성충이 된 이후에는 더 이상 먹이를 섭취하지 않으며 유충 단계에서 저장해 놓은 지방을 주 에너지원으로 이용한다.

쌍별귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*, two-spotted cricket; TSC)는 Orthoptera에 속하며, 단백질(55-73%) 함량이 매우 높고 필수 아미노산이 풍부하게 함유되어 있다(Finke, 2002; Barroso et al., 2014). 귀뚜라미의 경우, 주로 가금류, 관상어, 파충류의 먹이로 사용되어 왔다(Taufek et al., 2016; Ramos-Elorduy et al., 2002). 쌍별귀뚜라미에 대한 연구는 주로 향산화와 면역효과에 대해 이루어졌으며, 양식 사료 내 어분대체원으로써의 연구는 미흡한 실정이다. Kim et al. (2020a)은 쌍별귀뚜라미 내 향산화기능을 하는 페놀 화합물의 함량이 높다고 보고하였다.

장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*, dynastid beetle; DB)는 Coleoptera에 속하는 곤충으로 아시아에서는 주로 질병의 치료를 위해 약제로 사용되었다(Lee et al., 2019). 장수풍뎅이의 어분 대체원으로써의 이용성에 관한 연구는 보고된 적이 없으며, 주로 약제로써의 기능에 대한 연구가 진행되었다. Lee et al. (2019)은 장수풍뎅이에서 추출한 항균 펩타이드(allomyrinasin)가 항균과 항염증(anti-inflammatory) 활성을 갖는다고 보고하였으며, Suh et al. (2010)은 장수풍뎅이 유충의 추출물은 생물에겐 향산화 활성을 띠는 것으로 보고되었다.

본 연구는 넙치 저어분사료 내 어분대체 원료로써 곤충박의 이용 가능성을 평가하고자 수행되었다. Chapter 1에서는 어분대체원료로써 5가지 곤충박(갈색거저리, 흰점박이꽃무지, 동애등애, 쌍별귀뚜라미, 장수풍뎅이)의 이용성을 평가하였다. Chapter 2에서는 상업적으로 이용가능성이 높은 곤충인 동애등애와 갈색거저리를 이용하여 사료 내 어분을 단독 혹은 혼합대체 할 경우 나타나는 효과를 검증하였다.

CHAPTER 1.

Evaluation of insect meals for fish meal replacement in diets for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*

Abstract

This study was conducted to investigate the effects of insect meals as fish meal (FM) substitutes in low-fish meal diets on juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. The low-fish meal diet with animal and plant protein sources (tankage meal, poultry by-product meal, soy protein concentrate and wheat gluten) was used as a control diet and Con was formulated to contain 45% of sardine and anchovy fish meal at the same ratio. The diets were formulated to replace FM with mealworm, white-spotted flower chafer, black soldier fly, two-spotted cricket or dynastid beetle by 10% (designated MW, WSFC, BSF, TSC or DB, respectively). The experimental diets were added methionine to meet the requirement of olive flounder. Olive flounder (initial average weight: 11.0 g) were distributed into 18 tanks (170 L) at a density of 20 fish per tank. Three replicate groups of fish were fed one of the diets two times daily for 8 weeks. In the feeding trial, no significant differences were found among all the experimental groups in growth performance, feed utilization and hematological parameters. In the digestibility test, there are no significant differences in all the treatment groups. In the innate immune responses, immunoglobulin and anti-protease activity were significantly higher in fish fed BSF and MW than that of Con group. Therefore, this result indicates that the dietary inclusion of insect meals can replace the fish meal up to 10% in diets for juvenile olive flounder.

1.1 재료 및 방법

1.1.1 실험사료

실험사료의 조성표는 Table 2에 나타내었다. 주단백질원으로 정어리와 멸치어분을 동일한 비율(1:1)로 혼합하여 사용하였다. 대조사료(control, Con)는 동·식물성 단백질원료(수지박, 가금부산물분, 대두농축단백, 밀글루텐)으로 어분의 함량을 45%까지 낮춘 제어분사료를 사용하였다. 5종의 실험사료는 갈색거저리(MW), 흰점박이꽃무지(WSFC), 동애등애(BSF), 쌍별귀뚜라미(TSC), 장수풍뎅이(DB)을 이용하여 사료 내 어분을 22% 대체하도록 조성하였다. 실험사료에 대한 넙치의 기호성을 향상시키기 위해 betaine과 taurine을 첨가하였다. 어분대체에 따른 methionine의 결핍을 막기 위해 사료 내 methionine을 첨가하였다. 모든 실험사료 내 인의 함량을 동일하게 맞추기 위해 일인산칼슘을 첨가하였다. 실험사료는 사료원료에 어유와 증류수를 첨가한 후, 사료제작기(SP-50, Geumgang engineering, Daegu, Korea)를 이용하여 2가지 크기(3, 5 mm)로 제작하였다. 사출된 실험사료는 건조(25°C, 24시간) 후 사용 전까지 냉동보관(-20°C)되었다.



Figure 1. Five insect meals (mealworm, white-spotted flower chafer, black soldier fly, two-spotted cricket, dynastid beetle) used in this study as alternative protein sources in diet for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*.

Table 1. Proximate, amino acid and fatty acid composition of mealworm (MW), white-spotted flower chafer (WSFC), black soldier fly (BSF), two-spotted cricket (TSC) and dynastid beetle (DB) for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*.

	Insect meals				
	MW	WSFC	BSF	TSC	DB
Proximate composition (% of dry matter)					
Crude protein	69.8	53.1	41.7	60.8	51.5
Crude lipid	7.24	17.6	17.4	20.1	22.9
Crude ash	8.34	4.17	18.7	4.99	3.61
Moisture	5.39	4.46	4.39	9.46	6.46
Essential amino acid (% of protein)					
Arginine	5.23	1.95	1.95	3.27	2.18
Histidine	7.84	3.26	3.05	2.88	2.94
Isoleucine	5.00	2.05	1.74	2.31	2.48
Leucine	7.92	2.84	2.63	3.99	3.48
Lysine	5.83	0.14	1.98	0.13	0.14
Methionine	0.23	2.74	0.10	2.80	2.87
Phenylalanine	4.25	2.14	1.44	1.83	1.90
Threonine	4.12	1.92	1.51	1.93	1.99
Valine	7.09	2.59	2.44	3.33	3.14
Fatty acid (% of lipid)					
12:0	0.14	0.08	36.7	0.05	0.03
14:0	1.06	0.50	5.57	0.58	0.45
16:0	20.8	13.4	17.1	25.4	37.8
16:1	1.44	13.4	2.39	1.03	6.51
18:0	12.9	2.69	3.53	10.4	2.75
18:1n9	36.1	62.4	20.6	27.6	50.0
18:2n6	27.5	6.92	14.1	35.0	2.47

Table 2. Dietary formulation of the experimental diets for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*

Ingredients	Experimental diets					
	Con	MW	WSFC	BSF	TSC	DB
Sardine, FM ¹	22.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5
Anchovy, FM ¹	22.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5
Soy protein concentrate ²	5.50	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50
Tankage meal ³	8.00	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Poultry by-product meal ⁴	4.50	5.50	5.50	5.50	5.50	5.50
Wheat gluten ⁵	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
Starch	3.80	3.30	3.30	3.30	3.30	3.30
Soybean meal ⁵	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
Wheat flour	7.00	8.30	6.05	4.05	7.05	6.30
MW ⁶	-	4.60	-	-	-	-
WSFC ⁷	-	-	6.60	-	-	-
BSF ⁸	-	-	-	8.95	-	-
TSC ⁹	-	-	-	-	5.55	-
DB ¹⁰	-	-	-	-	-	6.70
Fish oil ¹¹	4.30	3.35	3.60	3.25	3.65	3.25
Lecithin	0.50	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Betaine	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Taurine	0.50	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
Methionine ¹²	-	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Mono-calcium phosphate	-	1.10	1.10	1.10	1.10	1.10
Mineral mix ¹³	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin mix ¹⁴	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin C	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamin E	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Choline chloride	0.50	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70

¹Fish meal, Orizon S.A Co., Ltd, Santiago, Chile.

²Solae LLC Inc., Saint Luis, U.S.A.

³Hanla Industrial Co., Ltd, Jeju, South Korea.

⁴Woosin Food Co., Ltd, Pocheon, South Korea.

⁵CJ CheilJedang, Co., Ltd, Seoul, South Korea.

⁶Mealworm, KEIL, Co. Ltd, Seoul, South Korea.

⁷White-spotted flower chafer, Corp. Mohyun, South Korea.

⁸Black soldier fly, Corp. Entomo, Siheung, South Korea.

⁹Two-spotted cricket, Corp. Bury, South Korea.

¹⁰Dynastid beetle, Corp. Mohyun, South Korea.

¹¹Corp. E-wha oil Industry, Busan South Korea.

¹²Methionine, Corp. Evonic rexim pharmaceutical.

¹³Mineral mixture contained the following ingredients (g/kg, mixture): MgSO₄, 80.2; C₄H₂FeO₄, 12.5; KCl, 130; FeSO₄·H₂O, 20; CuSO₄·5H₂O, 1.25; CoSO₄, 0.75; Ca(IO₃)₂, 0.75; Al(OH)₃, 0.75; ZnSO₄·7H₂O, 13.75; MnSO₄, 11.25; CoCl₂·6H₂O, 1.

¹⁴Vitamin mixture contained the following amount which were diluted in cellulose (g/ kg, mixture): L-ascorbic acid, 6.4; DL- α tocopheryl acetate, 37.5; thiamin hydrochloride, 5.0; riboflavin, 10.0; pyridoxine hydrochloride, 5.0; niacin, 37.5; Ca-D-pantothenate, 17.5; myo-inositol, 75.0; D-biotin, 0.05; folic acid, 2.5; menadione, 2.5; retinyl acetate, 1.72; cholecalciferol, 0.025; cyanocobalamin, 0.025.

Con, contain the 45% of fish meal; MM, contain the 35% of fish meal and 4.6% of mealworm; WSFC, contain the 35% of fish meal and 6.6% of white-spotted flower chafer; BSF, contain the 35% of fish meal and 8.95% of black soldier fly; TSC, contain the 35% of fish meal and 5.55% of two-spotted cricket; DB, contain the 35% of fish meal and 6.7% of dynastid beetle.

Table 3. Proximate, amino acid and fatty acid composition of the experimental diets for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*.

	Experimental diets					
	Con	MW	WSFC	BSF	TSC	DB
Proximate composition (% of dry matter)						
Crude protein	60.3	59.3	59.7	61.1	59.4	60.0
Crude lipid	12.4	11.9	13.1	11.9	12.6	13.5
Crude lipid	11.5	10.4	10.4	12.0	9.94	9.96
Moisture	6.37	6.47	6.46	6.80	6.31	6.50
Essential amino acid (% of protein)						
Arginine	9.26	8.45	9.99	8.86	8.72	10.5
Histidine	2.66	2.38	2.88	2.49	2.44	3.07
Isoleucine	4.42	4.42	4.13	4.40	4.37	4.19
Leucine	8.67	8.22	8.25	8.39	8.34	8.43
Lysine	3.63	4.27	4.30	3.89	4.16	3.44
Methionine	3.56	3.41	3.73	3.31	3.55	3.95
Phenylalanine	4.68	4.50	4.59	4.58	4.54	4.69
Threonine	5.09	4.96	4.91	5.20	5.00	4.99
Valine	4.83	4.89	4.51	4.85	4.89	4.56
Fatty acid (% of lipid)						
12:0	ND ¹	ND ¹	ND ¹	2.35	ND ¹	ND ¹
14:0	3.56	3.14	2.80	3.31	2.75	2.54
16:0	24.8	24.2	23.2	24.3	24.6	27.6
16:1	4.35	3.82	5.19	3.95	3.65	4.45
18:0	9.91	9.88	9.82	9.88	9.75	9.01
18:1n9	30.1	30.3	33.6	29.0	29.8	33.5
18:2n6	14.5	17.7	15.2	16.1	19.2	14.1
18:3n3	3.64	3.49	3.23	3.42	3.39	2.28
20:5n3	5.62	4.59	4.33	4.85	4.23	4.05
22:6n3	3.48	2.86	2.68	2.87	2.64	2.45

¹Not detected. Con, contain the 45% of fish meal; MM, contain the 35% of fish meal and 4.6% of mealworm; WSFC, contain the 35% of fish meal and 6.6% of white-spotted flower chafer; BSF, contain the 35% of fish meal and 8.95% of black soldier fly; TSC, contain the 35% of fish meal and 5.55% of two-spotted cricket; DB, contain the 35% of fish meal and 6.7% of dynastid beetle.

1.1.2 실험어 및 사육관리

본 실험은 제주대학교 동물실험윤리위원회(2019-0031)의 승인을 받아 진행하였다. 실험에 사용된 넙치는 제주도 제주시 구좌읍에 위치한 진영수산에서 구입하여 제주대학교 해양과학연구소로 운송하였다. 어류는 실험환경에 적응시키기 위해 넙치용 상업사료(Suhyup, Bogeurak #3)를 공급하면서 순치하였다. 예비사육 후, 넙치($11.0 \pm 0.0\text{g}$)는 18개의 실험수조(3반복, 170 L 원형 polypropylene)에 각각 20마리씩 무작위로 배치하였다. 실험사료는 1일 2회(08:00, 18:00), 8주간 반복 공급되었다. 환수는 사료공급 30분 후에 진행하였다. 사육수는 모래여과하여 사용되었고, 유수량은 $2 - 3 \text{ L / min}$ 으로 유지하였다. 수조 내 용존산소(dissolved oxygen)는 공기발생기(aeration)를 설치하여 조절하였다. 수조 내 수온은 자연수온에 의존하였고, 1일 2회(09:00, 16:00) 측정하였다.



Figure 2. Experimental tanks for the rearing of juvenile olive flounder

1.1.3 실험어 무게측정

사육 실험 후, 성장률과 사료효율 그리고 생존율을 측정하기 위해 실험어를 24시간 절식시킨 후, 실험어의 무게를 측정하였다. 무게 측정 후 성장률, 일간성장률, 사료섭이량, 사료전환효율, 단백질이용효율, 생존율을 계산하였으며, 실험어의 간, 위, 장을 각각 적출하여 간중량지수, 장중량지수를 조사하였다. 체중과 전장을 이용해 비만도를 계산하였다. 계산식은 다음과 같다.

- 성장률(WG; weight gain, %) = $100 \times (\text{final mean body weight} - \text{initial mean body weight}) / \text{initial mean body weight}$
- 일간성장률(SGR; specific growth rate, %) = $[(\log_e \text{ final body weight} - \log_e \text{ initial body weight}) / \text{days}] \times 100$
- 사료섭이량(FI; feed intake, g) = dry feed fed/fish
- 사료전환효율(FCR; feed conversion ratio) = dry feed fed/wet weight gain
- 단백질이용효율(PER; protein efficiency ratio) = wet weight gain/total protein given
- 생존률(Survival, %) = number of fish at end of feeding trial / number of fish stocked $\times 100$
- 간중량지수(HSI; hepatosomatic index, %) = $100 \times (\text{live weight} / \text{body weight})$
- 장중량지수(VSI; visceralsomatic index, %) = $100 \times (\text{visceral weight} / \text{body weight})$
- 비만도(CF; condition factor) = fish weight \times total body length³

1.1.3 샘플수집

최종무게 측정 후, 실험어를 각 수조마다 3마리를 무작위로 선별하여 2-phenoxyethanol 용액(200ppm)으로 마취시켰다. 일회용 주사기로 마취된 어류의 미부동맥에서 채혈하였다. 채취된 혈액은 헤파린이 20 μ L씩 처리된 1.5mL Eppendorf tube에 넣어 hematocrit과 hemoglobin 측정에 사용되었다. 혈장(plasma)은 원심분리(5,000rpm, 15 분, Micro 17TR, Hanil Science, Korea)되었으며, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), glucose, total protein 분석에 사용되었다. 혈청(serum)은 원심분리(5,000rpm, 15분, Micro 17TR, Hanil Science, Korea)되었으며, lysozyme activity, myeloperoxidase (MPO), total immunoglobulin(Ig), anti-protease 분석에 사용되었다. 실험어는 전어체 분석을 위해 -20 $^{\circ}$ C 냉동보관 되었다.

1.1.4 일반성분분석

사료원, 실험사료, 전어체에 대한 일반성분분석은 AOAC (1995) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125 °C, 3 h), 조회분은 직접회화로법(550 °C, 6 h), 단백질은 자동 조단백분석기 (Kjeltec System 2300, Sweden)로 분석되었으며, 지방은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 Soxhlet 추출장치(Soxhlet Heater System C-SH6, Korea)를 이용하여 분석하였다.

1.1.5 혈액분석

채취된 혈액에 헤파린을 처리한 후 hematocrit과 hemoglobin을 측정하였다. Hematocrit은 micro hematocrit 방법으로 측정하였다. 15분간 원심분리(5,000 rpm)하여 혈장을 분리한 후 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total protein, glucose 를 분석하였다. Hemoglobin, AST, ALT, total protein, glucose 분석은 각각의 시판 kit시약과 반응시킨 후 혈액생화학분석기(ch 100plus, RADIM company, Firenze, Italy)를 이용하여 분석하였다. 혈청 내 lysozyme 활성은 Sankaran and Gurnani (1972)의 방법으로 분석하였다. 혈청 내 myeloperoxidase (MPO)활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 방법으로 분석하였다. Total immunoglobulin은 Siwicki and Anderson (1993)의 방법으로 분석하였다. Anti-proteases 분석은 Lange et al. (2001)의 방법으로 분석하였다.

1.1.6 아미노산 분석

전처리된 시료를 0.5 mm 이하로 분쇄하고 6N HCl 15 ml 를 첨가 후 dry oven (110°C, 24 h)에서 반응시켰다. 분해된 시료는 water bath (55°C)를 이용하여 2 회 감압농축 시킨 후, 25 ml volumetric flask 에 정용 하였다. 0.45 ul membrane filter 로 여과 후 희석하여 아미노산 분석기(Sykam amino acid analyzer S433, Germany)를 이용하였다.

1.1.7 지방산 분석

지방산은 Garces and Mancha (1993)의 방법에 따라 추출하였다. 분리된 지방산은 capillary column (112-88A7, 100m×0.25 mm, film thickness 0.20 μm, Agilent Technologies, USA)이 장착된 gas chromatography (6800GC, Agilent, San Francisco, USA)를 통해 분석되었다. Carrier gas는 수소를 사용하였고, oven의 온도는 140°C에서 240°C까지 4°C/min으로 증가시켰다. Inject의 온도는 240°C, detector의 온도는 240°C로 설정하였다. Standard sample은 PUFA 37 component FAME Mix (Supelco, Bellefonte, USA)를 사용하였다.

1.1.8 소화율 분석

소화율 실험사료 내 지시제로 chromium oxide (Cr_2O_3 , DaeJung, Siheung, Korea)를 사용하였다. 실험사료(99%)와 지시제(1%)를 혼합한 후, 혼합물 총 중량의 10%에 해당하는 증류수를 첨가하였다. 사료는 펠렛 성형기 (SP-50, Geumgang, Daegu, Korea)를 사용하여 5mm의 펠렛사료를 제작하였다. 제작된 실험사료는 건조기를 이용하여 25°C에서 24시간 건조시킨 후, 냉동고(-20 °C)에서 사용 전까지 보관되었다.

분 수집을 위해 소화율 사료는 분 수집 8 시간 전에 반복 공급되었다. 반복공급 8 시간 후, 실험어의 장을 적출하여 장 내 분을 수집하였다. 수집된 분 샘플은 증류수를 이용하여 분순물을 제거한 후 -50°C 저온냉장고에 보관되었다. 수집된 분은 동결냉동건조기를 이용하여 동결건조 시킨 후 분석에 사용되었다. 실험사료와 분에서의 chromium oxide 함량은 Divakaran et al. (2002)의 방법을 토대로 분석되었다. 실험사료의 단백질소화율은 Bui et al. (2014)의 방법으로 계산되었다

1.1.9 통계학적 분석

실험사료의 배치는 완전확률계획법(completely randomized design)을 실시하였고, 성장률, 사료효율, 생존율 및 분석결과들은 SPSS (version 18.0) 프로그램을 이용하여 one-way ANOVA 로 통계 분석되었다. 데이터 값의 유의차는 Tukey's HSD 로 평균 간의

유의성($P \leq 0.05$)을 비교하였다. 데이터는 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었으며, 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석되었다.

1.2 결과

사육 실험의 결과는 Table 4에 나타내었다. 최종무게, 성장률, 일간성장률, 사료섭취량, 사료전환효율, 단백질이용효율, 생존율은 모든 실험구가 대조구와 유의적인 차이가 없었다. MW (100 g)구와 BSF (106 g)구의 최종무게는 Con구(97.1 g)에 비해 높은 경향을 보였다.

생물지표 측정 결과, 비만도와 간중량 지수는 모든 실험구가 대조구에 비해 유의적인 차이가 없었다. 장중량 지수는 MW (4.24), WSFC (4.02), DB (4.27)구가 대조구(5.01)에 비해 유의적으로 낮았다.

전어체 일반성분분석 결과는 Table 5에 나타내었다. 수분, 조단백질 함량은 모든 실험구와 대조구 사이에 유의적인 차이가 없었다. 조지방 함량은 MW, DB구가 대조구에 비해 유의적으로 낮았고, 조회분 함량은 WSFC구가 대조구에 비해 유의적으로 낮았다.

혈액 분석 결과는 Table 6에 나타내었다. Hemoglobin, hematocrit, AST, ALT, total protein, glucose의 농도는 모든 실험구가 대조구와 유의적인 차이가 없었다.

면역 분석 결과는 Table 8에 나타내었다. Lysozyme, myeloperoxidase의 활성은 모든 실험구가 대조구에 비해 유의적인 차이가 없었다. Total immunoglobulin의 활성은 BSF구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. Anti-protease의 활성은 MW구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다.

실험사료에 대한 소화율 분석결과는 Fig 3에 나타내었다. 소화율 분석 결과, 건물 소화율과 단백질 소화율은 모든 실험구가 대조구와 유의적인 차이가 없었다.

1.3 결론

이번 연구에서 사료 내 어분을 곤충박으로 대체하더라도 성장 저하 등의 부작용을 일으키지 않는 것으로 보아, 5 종의 곤충박은 치어기 넙치사료 내 어분대체원으로써 이용 가능하다고 판단된다. 갈색거저리와 동애등에는 다른 곤충에 비해 성장이 빨라, 대량생산에 적합한 종으로 평가받고 있다. 어류 사료 내 갈색거저리와 동애등에를 이용한 연구는 다수 진행되었다. Gasco et al. (2016)은 European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) (5.22g) 사료 내 어분(Chile)을 갈색거저리 유충으로 36%까지 대체 하여도, 어류의 성장에 감소가 일어나지 않았다고 보고하였다. 갈색거저리 유충 분말은 쏘가리(*Siniperca scherzer*) (20.8g) 사료 내 어분(pompano)을 32%까지 대체할 수 있다고 보고되었다. 참돔(*Pagrus major*), European seabass, gilthead seabream 사료 에서도 갈색거저리는 어분을 29-35%까지 대체할 수 있다고 보고되었다(Jeong et al., 2017; Gasco et al., 2016; Piccolo et al., 2017). 동애등에의 경우 갈색거저리에 비해 어분대체율이 대체로 높은 것으로 알려져 있다. 동애등에 유충(탈지)은 European seabass (12.1 g) 사료 내 어분을 50%까지 대체하여도 어류의 성장과 사료효율에 영향을 미치지 보고되었다(Abdel-Tawwab et al., 2020). Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) (5.7 g)를 이용한 연구에서도 동애등에 유충은 사료 내 어분을 70%까지 대체할 수 있다고 보고되었다(Devic et al., 2016). 갈색거저리와 동애등에를 제외한 나머지 곤충의 이용성에 관한 연구는 일부 진행되었다. 쌍별귀뚜라미는 African catfish (*Clarias gariepinus*) 사료 내 어분을 100% 대체 가능하다고 보고되었다(Taufek et al., 2018). 흰점박이꽃무지와 장수풍뎅이의 경우에는 주로 약제로써의 이용 효과가 보고되었으나 (Ghosh et al., 2017, Lee et al., 2019), 어류 사료 내 단백질원으로 이용된 연구는 진행되지 않았다. 이번 연구에서 5종의 곤충박은 넙치 치어분사료 내 어분을 22%까지 대체할 수 있음을 확인하였다. 후속 연구에서는 각 곤충박의 최대 어분 대체율의 규명이

요구된다.

곤충박은 어분에 비해 Met, Lys와 같은 일부 필수아미노산의 함량이 낮다고 알려져 있다(Miles and Chapman, 2006; Ghosh et al., 2017; Nogales-Mérida et al., 2019). 본 연구에서는 사료 내 어분을 곤충박으로 대체함에 따라 실험구에 Met을 추가로 첨가하였다(Table 2). 넙치 사료 내 Met이 결핍될 경우 성장과 사료효율이 저하되는 것으로 알려져 있다(Alam et al., 2000). 사육실험에서 곤충박 실험구의 성장이 저하되지 않는 것으로 보아, 넙치의 Met 요구량은 충족시킨 것으로 판단된다. 그러나, 사료 내 곤충을 다량으로 사용할 경우, 사료 내 Met의 함량이 감소될 수 있기 때문에 Met을 추가로 첨가하는 등의 실험이 요구된다.

이번 연구에서 실험사료 내 일부 지방산의 함량은 차이를 보였다. 사료 내 지방산의 함량은 어류의 성장과 발달에 직접적으로 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Miles and chapman, 2006). 본 연구에서 실험 사료 내 지방산 함량의 차이는 실험에 사용된 원료가 원인으로 사료되며, 성장에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 보아, 넙치의 요구량은 충족된 것으로 판단된다.

본 연구에서 사료 내 곤충박의 첨가는 넙치의 장중량지수를 감소시키는 것으로 나타났다. 어류의 내장과 간 중량 지수는 어류의 전반적인 에너지 대사를 평가하는 지표로 사용된다(McLaughlin, 1983). Piccolo et al. (2017)은 갈색거저리로 gilthead sea bream (*Sparus aurate*) 사료 내 어분을 대체할 경우, 어분의 대체율이(>74%) 증가할수록 어류의 장중량지수와 간중량지수가 증가한다고 보고하였다. 그러나, Abdel-Tawwab et al. (2020)은 European sea bass 사료 내 어분을 동애등어로 대체하여도(>50%) 어류의 장중량지수와 간중량지수에 영향이 없었다고 보고하였다. 어류의 내장지수는 사료 내 영양소의 함량, 어류의 크기, 사육조건 등 다양한 요소에 영향을 받을 수 있기 때문에 후속 연구가 요구된다.

이번 연구에서 사료 내 곤충박의 첨가는 넙치의 일반성분 조성에 영향을 주는

것으로 나타났다. African catfish 사료 내 어분을 갈색거저리로 대체하였을 때, 어류의 조지질의 함량이 증가하였다고 보고되었다(Ng et al., 2001). 쏘가리 사료에서도 갈색거저리로 어분을 대체할 경우 어류의 회분 함량이 증가하였다고 보고되었다(Gasco et al., 2016). 쌍별귀뚜라로 African catfish 사료 내 어분을 대체할 경우(>100%), 대체율이 증가할수록 어류의 회분 함량이 증가하였다고 보고되었다(Taufek et al., 2018). 반면, Nile tilapia 사료 내 어분을 갈색거저리를 이용하여 대체하였을 때(>50%), 어체 일반 성분에 영향이 없었다고 보고되었다(Sánchez-Muros et al., 2016). 어체의 일반성분 조성은 사료의 배합비, 사료공급, 크기, 수온 등 다양한 요인에 영향을 받는다고 알려져 있다(Zeitler et al., 1984; Nandeeshya et al., 1995). 본 연구에서 곤충박 내 아미노산과 지방산과 같은 영양소의 함량이 어류의 체조성 변화에 영향을 주었다고 판단된다.

이번 연구에서 사료 내 어분을 곤충박으로 대체하여도 넙치의 혈액성분에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 혈액학적 지표는 어류의 생리적, 병리학적 변화를 평가하는 지표로 사용된다(Hrubec et al., 2000; Rainza-Paiva et al., 2000). 어류 사료 내 어분대체율으로써 일부 동·식물성 원료를 이용할 경우, 어류의 혈액성분에 부정적인 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Ye et al., 2011). 참돔 사료 내 갈색거저리를 단백질원(>32%)으로 이용할 경우, 어류의 혈액 내 ALT, AST, total protein, glucose 의 농도에 아무런 영향을 주지 않았다고 보고되었다(Jeong et al., 2017). European seabass 사료에서도 동애등에(>19.5%)를 단백질원으로 이용할 경우, glucose 와 total protein 에는 영향을 주지 않는다고 보고되었다(Magalhães et al., 2017). 따라서, 곤충박은 넙치 사료 내 어분대체율로 사용도 어류의 혈액성분에는 문제가 없을 것으로 판단된다.

이번 연구에서 사료 내 어분을 곤충박으로 대체할 경우, 치어기 넙치의 비특이적 면역력 증진에 도움을 주는 것으로 나타났다. Anti-protease 는 세균성 병원체의 단백질 분해 효소를 불활성화 시키는 작용을 한다(Bowden et al., 1997; Magnadóttir, 2006).

Immunoglobulin 은 면역 반응의 주요 구성 요소로 알려져 있다(Uribe et al., 2011). Sankian et al. (2018)은 쏘가리 사료 갈색거저리로 어분을 대체하였을 경우, 어류의 비특이적 면역능(lysozyme)과 항산화능(GPx)을 증진시킨다고 보고하였다. 곤충의 체내에는 여러 병원체에 항균활성을 띠는 antimicrobial peptides (AMPs)가 함유되어 있다고 알려져 있다(Choi et al., 2012). AMPs 는 병원균의 내부로 침투하여 RNA 와 DNA 의 정상적인 발현을 억제한다(Nicolas, 2009; Fozefiak and Engberg, 2017). 동애등에도 AMPs 의 일종인 defensin-like peptides 를 함유하고 있다고 보고되었다(Hwang et al., 2008). Lee et al. (1998)은 갈색거저리에서 추출한 tenecin 이 항균 활성을 갖는다고 보고하였다. 따라서, 곤충박은 넙치의 비특이적 면역력 향상에 간접적으로 도움을 주었다고 판단된다.

이번 연구에서 사료 내 곤충박은 넙치의 소화율을 저하시키지 않는 것으로 나타났다. 어류 사료 내 어분대체원으로써 일부 동·식물성 원료를 이용할 경우, 항영양인자 등 여러 이유로 인해 어류의 소화율을 감소시키는 것으로 나타났다(Yang et al., 2011). Gilthead sea bream 사료 내 어분을 갈색거저리로 대체(>30%)하여도 어류의 건물과 단백질 소화율에 저하를 일으키지 않았다고 보고되었다(Piccolo et al., 2017). 유럽 농어 사료에서도 동애등에의 사용은(>19.5%)은 어류의 소화율에 영향이 미치지 않았다고 보고되었다(Magalhães et al., 2017). 아프리카 메기와 같은 일부 어종에서는 사료 내 곤충박으로 어분을 대체할 경우, 어류의 소화율을 증진시키는 것으로 나타났다(Taufek et al., 2016). 따라서, 치어기 넙치 사료 내 어분을 갈색거저리, 흰점박이꽃무지, 동애등에, 쌍별귀뚜라미, 장수풍뎅이로 대체하더라도 건물소화율과 단백질소화율에는 부정적인 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

결론적으로, 갈색거저리, 흰점박이꽃무지, 동애등에, 쌍별귀뚜라미, 장수풍뎅이는 성장, 사료계수, 소화율 등을 고려하였을 때, 치어기 넙치 저어분사료 내 어분 대체원으로써 이용 가능성이 높다고 판단된다.

Table 4. Growth performance, feed utilization and biological indices of the juvenile olive flounder (initial mean body weight: 11.0±0.15g) fed the experimental diets for 8 weeks.

Dietary treatment	FBW ¹	WG ²	SGR ³	FI ⁴	FCR ⁵	PER ⁶	Survival (%)	CF ⁷	HSI ⁸	VSI ⁹
Con	97.1±5.61	782±43.2	4.18±0.09	63.0±5.08	0.73±0.07	2.27±0.19	98.3±2.89	1.02±0.10 ^{ab}	1.33±0.25	5.01±0.20 ^a
MW	100±3.54	820±42.3	4.27±0.09	67.3±0.82	0.84±0.02	2.24±0.06	100±0	1.08±0.09 ^{ab}	1.41±0.33	4.24±0.53 ^b
WSFC	95.9±8.63	773±75.2	4.16±0.17	65.6±5.84	0.77±0.02	2.17±0.06	100±0	0.98±0.07 ^b	1.25±0.31	4.02±0.49 ^b
BSF	106±6.97	867±73.7	4.36±0.14	69.9±2.23	0.74±0.05	2.22±0.15	100±0	1.05±0.09 ^{ab}	1.34±0.25	4.44±0.40 ^{ab}
TSC	96.8±6.94	789±80.8	4.20±0.17	69.1±10.2	0.80±0.08	2.11±0.20	100±0	1.11±0.09 ^a	1.45±0.22	4.33±0.32 ^{ab}
DB	97.2±6.29	785±64.2	4.19±0.14	66.1±5.54	0.77±0.09	2.19±0.27	98.3±2.89	1.04±0.03 ^{ab}	1.42±0.31	4.27±0.39 ^b

Values are mean of triplicates and presented as mean ± SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments.

¹FBW (final mean body weight, g/fish).

²WG (weight gain, %)=(final weight-initial weight)×100/initial weight.

³SGR (Specific growth rate, %/day)=[(log_efinal weight-log_einitial weight)/days].

⁴FI (feed intake, g/fish)=dry feed consumed (g)/fish.

⁵FCR (feed conversion ratio)=dry feed intake/wet weight gain.

⁶PER (protein efficiency ratio)=wet weight gain/protein intake.

⁷Condition factor=fish weight × total body length³.

⁸HSI (hepatosomatic index)=100 × (live weight / body weight).

⁹VSI (viscerosomatic index)=100 × (visceral weight / body weight).

Con, contain the 45% of fish meal; MW, contain the 35% of fish meal and 4.6% of mealworm; WSFC, contain the 35% of fish meal and 6.6% of white-spotted flower chafer; BSF, contain the 35% of fish meal and 8.95% of black soldier fly; TSC, contain the 35% of fish meal and 5.55% of two-spotted cricket; DB, contain the 35% of fish meal and 6.7% of dynastid beetle.

Table 5. Proximate contents of growing olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 15 weeks (% of wet basis).

Dietary treatment	Moisture (%)	Protein (%)	Lipid (%)	Ash (%)
Con	74.1±0.30	18.1±0.01	3.71±0.46 ^{ab}	3.11±0.09 ^{ab}
MW	73.4±0.04	19.5±1.05	2.70±0.05 ^c	3.11±0.19 ^{ab}
WSFC	75.1±0.39	20.3±0.04	3.46±0.16 ^{bc}	2.48±0.10 ^c
BSF	73.7±0.36	19.3±0.22	4.25±0.05 ^{ab}	3.38±0.12 ^a
TSC	74.1±0.82	19.2±0.56	4.38±0.23 ^a	3.27±0.06 ^{ab}
DB	75.3±0.84	20.2±0.62	2.79±0.07 ^c	2.79±0.20 ^{bc}

Values are mean of triplicates and presented as mean ± SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments. Con, contain the 45% of fish meal; MW, contain the 35% of fish meal and 4.6% of mealworm; WSFC, contain the 35% of fish meal and 6.6% of white-spotted flower chafer; BSF, contain the 35% of fish meal and 8.95% of black soldier fly; TSC, contain the 35% of fish meal and 5.55% of two-spotted cricket; DB, contain the 35% of fish meal and 6.7% of dynastid beetle.

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

Dietary treatment	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	AST ¹	ALT ²	Total protein ³	Glucose (mg/dL)
Con	5.89±0.89	22.0±1.73	37.8±9.53	9.40±2.56	2.90±0.57	15.6±2.32
MW	5.71±1.24	24.3±1.77	32.2±8.57	10.4±3.28	3.26±0.65	15.8±2.23
WSFC	6.66±1.47	23.1±3.15	32.2±10.3	8.80±2.12	3.21±0.84	15.9±0.95
BSF	6.75±0.21	24.1±1.80	40.5±10.3	9.70±2.95	3.29±0.71	18.1±3.54
TSC	5.94±1.01	21.8±2.33	32.8±8.19	10.6±2.47	2.88±0.90	17.7±2.04
DB	6.45±1.15	21.7±2.25	36.2±7.67	11.9±3.96	3.27±0.71	15.9±1.77

Values are mean of triplicates and presented as mean ± SD. The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments. ¹Aspartate aminotransferase (U/L), ²Alanine aminotransferase (U/L), ³Total protein (g/dL). Con, contain the 45% of fish meal; MW, contain the 35% of fish meal and 4.6% of mealworm; WSFC, contain the 35% of fish meal and 6.6% of white-spotted flower chafer; BSF, contain the 35% of fish meal and 8.95% of black soldier fly; TSC, contain the 35% of fish meal and 5.55% of two-spotted cricket; DB, contain the 35% of fish meal and 6.7% of dynastid beetle.

Table 7. Non-specific immune responses of juvenile olive flounder fed the experimental diets for 8 weeks.

Dietary treatment	Lysozyme activity ($\mu\text{g/mL}$)	MPO ¹ (absorbance)	Ig ² (mg/mL)	Anti-protease (%)
Con	29.6 \pm 2.69	2.07 \pm 0.53	11.8 \pm 2.61 ^b	33.2 \pm 2.04 ^b
MW	47.6 \pm 13.7	2.01 \pm 0.21	13.2 \pm 3.49 ^b	38.1 \pm 2.71 ^a
WSFC	36.3 \pm 16.5	2.04 \pm 0.14	13.5 \pm 2.68 ^b	35.5 \pm 1.98 ^{ab}
BSF	34.6 \pm 9.05	2.23 \pm 0.15	30.8 \pm 7.64 ^a	36.5 \pm 0.75 ^{ab}
TSC	34.7 \pm 8.79	2.14 \pm 0.19	19.7 \pm 3.74 ^b	37.3 \pm 1.79 ^{ab}
DB	38.8 \pm 10.3	2.30 \pm 0.37	18.5 \pm 0.83 ^b	32.8 \pm 2.71 ^b

Values are mean of triplicates and presented as mean \pm SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments. ¹Myeloperoxidase, ²Total immunoglobulin. Con, contain the 45% of fish meal; MW, contain the 35% of fish meal and 4.6% of mealworm; WSFC, contain the 35% of fish meal and 6.6% of white-spotted flower chafer; BSF, contain the 35% of fish meal and 8.95% of black soldier fly; TSC, contain the 35% of fish meal and 5.55% of two-spotted cricket; DB, contain the 35% of fish meal and 6.7% of dynastid beetle.

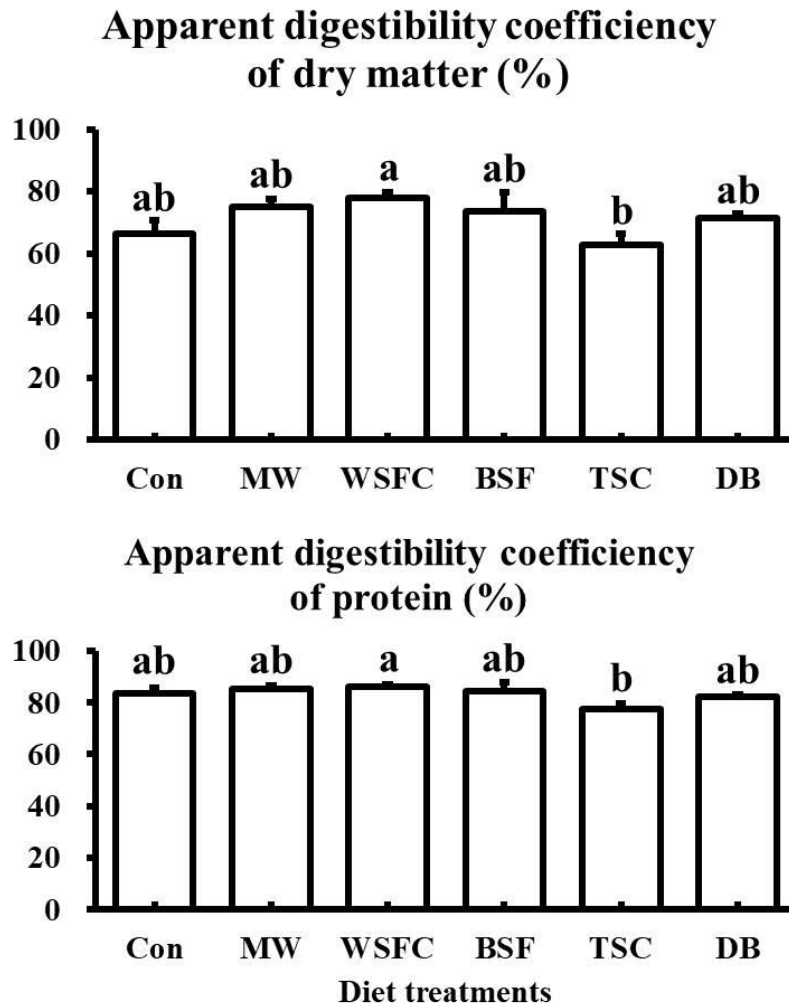


Figure 3. Apparent digestibility coefficient of dry matter and protein in the experimental diet. Con, contain the 45% of fish meal; MW, contain the 35% of fish meal and 4.6% of mealworm; WSFC, contain the 35% of fish meal and 6.6% of white-spotted flower chafer; BSF, contain the 35% of fish meal and 8.95% of black soldier fly; TSC, contain the 35% of fish meal and 5.55% of two-spotted cricket; DB, contain the 35% of fish meal and 6.7% of dynastid beetle. Values on the bars having different letters are significantly different ($P < 0.05$).

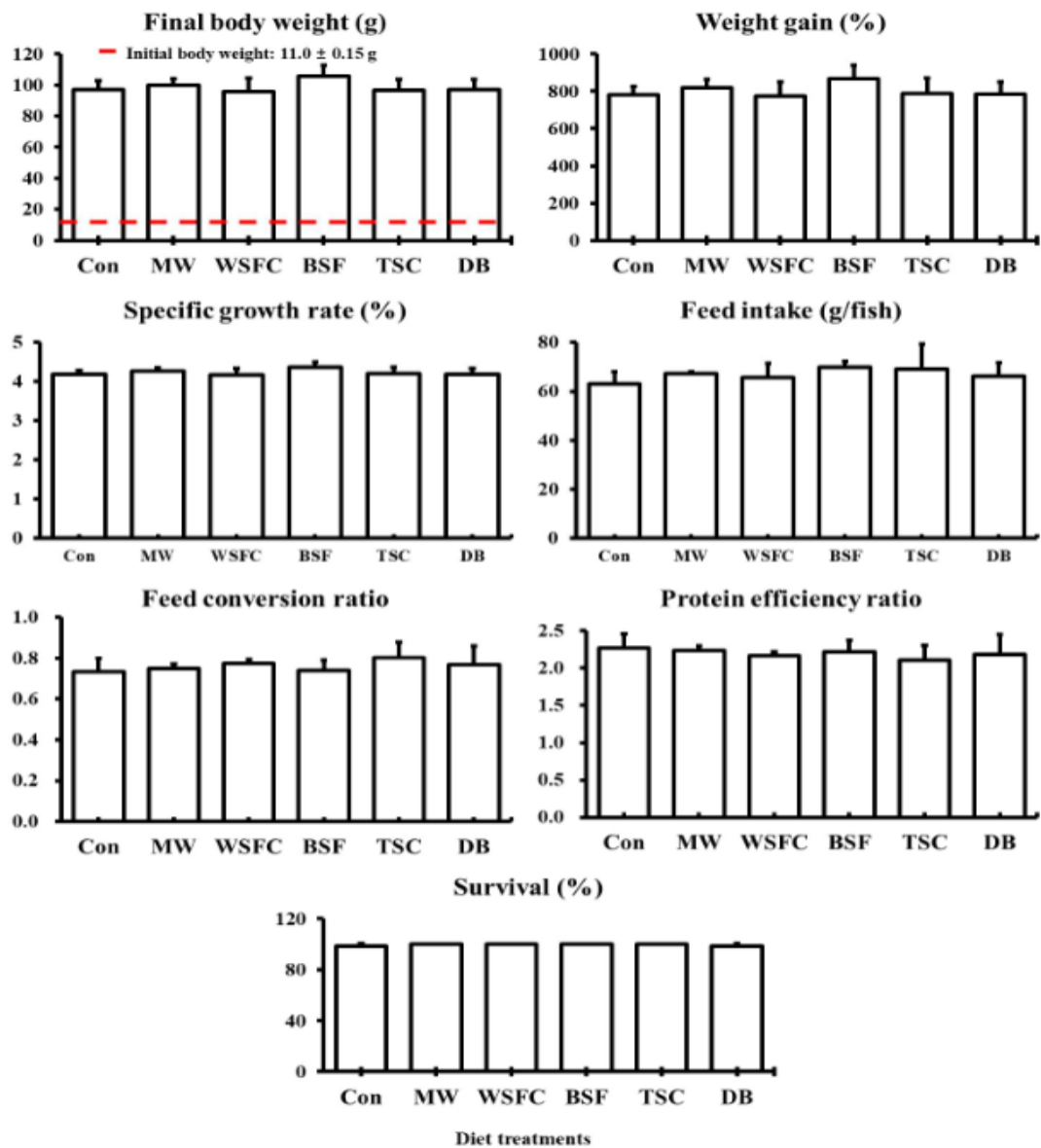


Figure 4. Growth performance, feed utilization and survival of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 8 weeks. Con, contain the 45% of fish meal; MW, contain the 35% of fish meal and 4.6% of mealworm; WSFC, contain the 35% of fish meal and 6.6% of white-spotted flower chafer; BSF, contain the 35% of fish meal and 8.95% of black soldier fly; TSC, contain the 35% of fish meal and 5.55% of two-spotted cricket; DB, contain the 35% of fish meal and 6.7% of dynastid beetle. Values on the bars having different letters are significantly different ($P < 0.05$).

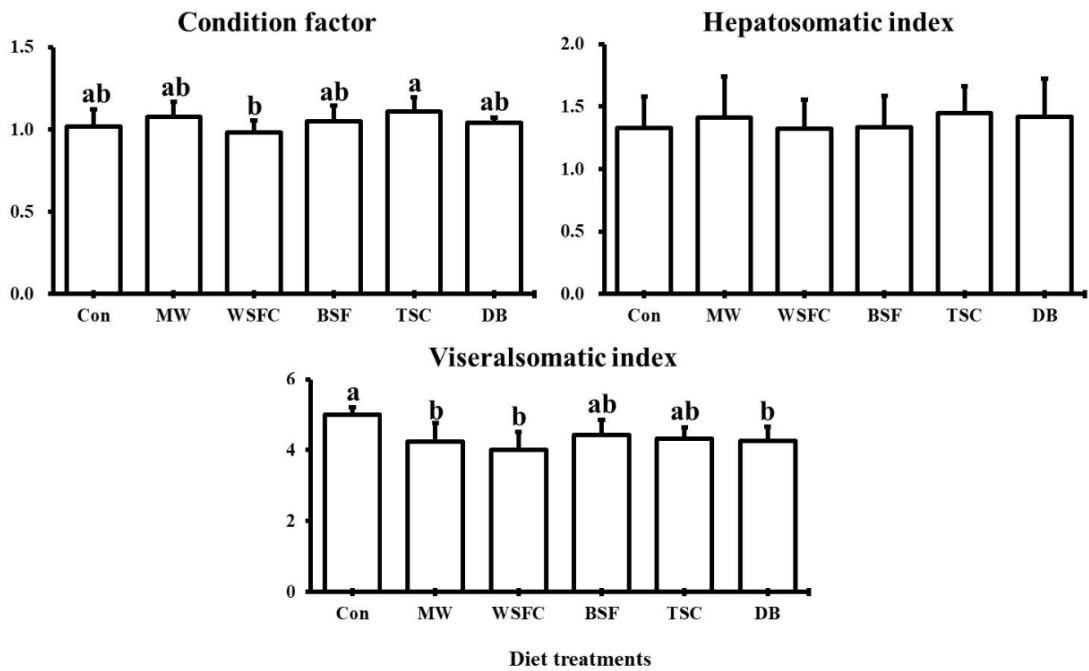


Figure 5. Biological indices of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 8 weeks. Con, contain the 45% of fish meal; MW, contain the 35% of fish meal and 4.6% of mealworm; WSFC, contain the 35% of fish meal and 6.6% of white-spotted flower chafer; BSF, contain the 35% of fish meal and 8.95% of black soldier fly; TSC, contain the 35% of fish meal and 5.55% of two-spotted cricket; DB, contain the 35% of fish meal and 6.7% of dynastid beetle. Values on the bars having different letters are significantly different ($P < 0.05$).

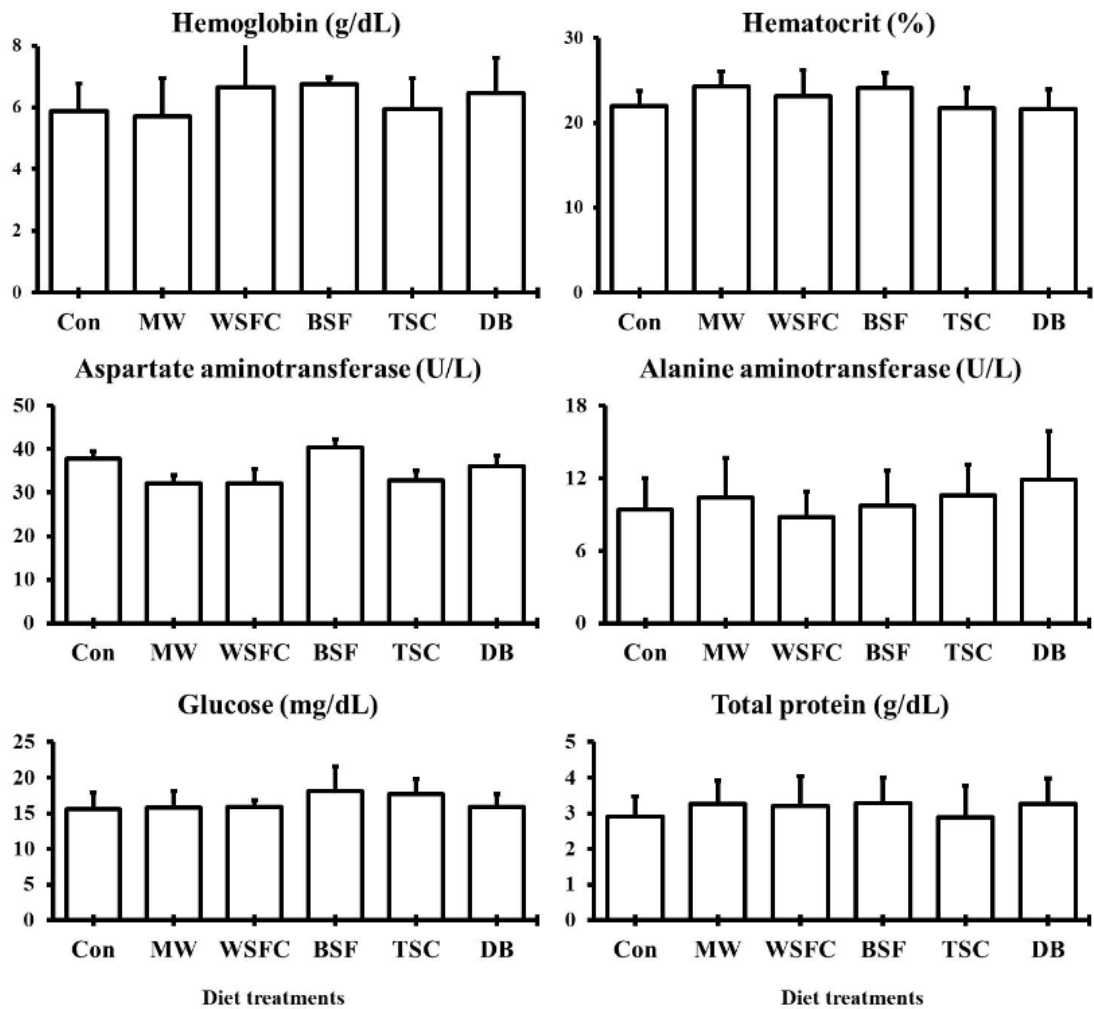


Figure 6. Hematological parameters of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 8 weeks. Con, contain the 45% of fish meal; MW, contain the 35% of fish meal and 4.6% of mealworm; WSFC, contain the 35% of fish meal and 6.6% of white-spotted flower chafer; BSF, contain the 35% of fish meal and 8.95% of black soldier fly; TSC, contain the 35% of fish meal and 5.55% of two-spotted cricket; DB, contain the 35% of fish meal and 6.7% of dynastid beetle. Values on the bars having different letters are significantly different ($P < 0.05$).

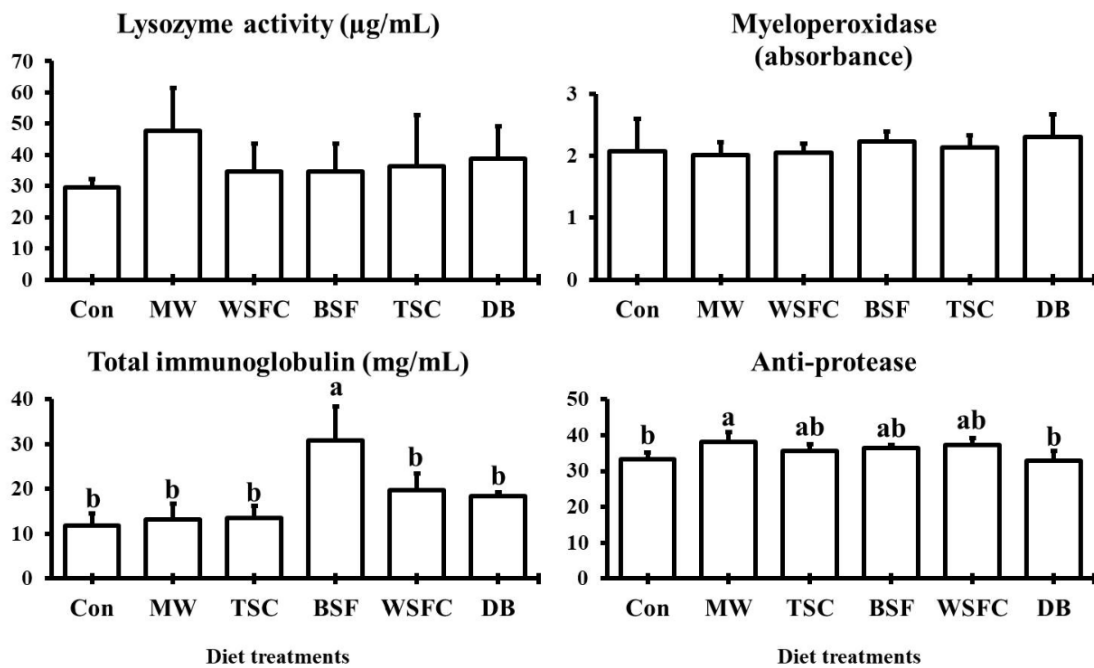


Figure 7. Non-specific immune response of juvenile olive flounder fed the experimental diets for 8 weeks. Con, contain the 45% of fish meal; MW, contain the 35% of fish meal and 4.6% of mealworm; WSFC, contain the 35% of fish meal and 6.6% of white-spotted flower chafer; BSF, contain the 35% of fish meal and 8.95% of black soldier fly; TSC, contain the 35% of fish meal and 5.55% of two-spotted cricket; DB, contain the 35% of fish meal and 6.7% of dynastid beetle. Values on the bars having different letters are significantly different ($P < 0.05$).

CHAPTER 2.

Evaluation of black soldier fly and mealworm meals for fish meal replacement in diets for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*

Abstract

This study was conducted to replace fish meal (FM) with two insect meals (black soldier fly, mealworm) in low-fish meal diets for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. The control diet used the low-fish meal diet with animal and plant protein sources (tankage meal, poultry by-product meal, soy protein concentrate, wheat gluten). Con was formulated to contain 45% of FM mixture (sardine, anchovy; 1:1). The replacement diets were formulated to replace FM with each insect meal and/or insect meal mixture (black soldier fly, mealworm; 1:1) by 10% (designated F35B10, F35M10, F35B5M5). The replacement diets were added methionine to meet the nutritional requirement of flounder. Olive flounder (initial average weight: 34.3g) were distributed into 12 tanks (425 L each) at a density of 37 fish per tank. Three replicate groups of fish were fed one of the diets two times daily for 15 weeks. At the end of the feeding trial, no significant differences were found among all the fish groups in growth performance, feed utilization, biological indices and non-specific responses. In hematological parameters, hemoglobin and alanine aminotransferase were significantly higher in fish fed the F35M10 than that of Con group. Total cholesterol was significantly lower in F35M10 group than fish fed the Con. Thus, this result indicates that the black soldier fly and mealworm with methionine could replace the FM up to 10% in diets for juvenile olive flounder. The availability of black soldier fly seems to be better than mealworm on olive flounder feed.

2.1 재료 및 방법

2.1.1 실험사료

실험사료 조성표는 Table 9에 나타내었다. 주단백질원으로 정어리와 멸치어분이 동일한 비율(1:1)로 혼합하여 사용되었다. 대조사료(control, Con)로는 동·식물성 단백질 원료(수지박, 가금부산물분, 대두농축단백, 밀글루텐)를 사용하여 어분 함량을 45%까지 낮춘 저어분사료를 사용하였다. 실험 사료는 총 3종으로 어분의 함량을 35%로 설정하였으며, 동애등애, 갈색거저리, 동애등애와 갈색거저리(1:1) 혼합물을 이용하여 저어분사료 내 어분을 22% 대체하였다(F35B10, F35M10, F35B5M5). 실험사료에 대한 실험어의 기호성을 향상시키기 위해 betaine과 taurine이 첨가되었다. 어분대체에 따른 methionine의 결핍을 막기 위해 사료 내 methionine을 첨가하였다. 모든 실험사료 내 인의 함량을 동일하게 맞추기 위해 일인산칼슘을 첨가하였다. 실험사료는 사료원료에 어유와 증류수를 첨가한 후, 사료제작기(SP-50, Geumgang engineering, Daegu, Korea)를 이용하여 3가지 크기(3, 5, 7mm)로 제작하였다. 사출된 실험사료는 건조(25°C, 24시간) 후 사용 전까지 냉동보관(-20°C)되었다.



Figure 8. Black soldier fly and mealworm for the alternative protein source in diet for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*.

Table 8. Proximate and fatty acid composition of black soldier fly (BSF), mealworm (MW) for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*.

	Ingredients	
	BSF	MW
Proximate composition (% of dry matter)		
Crude protein	42.6	67.3
Crude lipid	32.8	7.24
Crude ash	9.04	8.34
Moisture	2.77	7.07
Fatty acid (% of lipid)		
12:0	45.6	0.12
14:0	5.90	0.93
16:0	14.6	21.8
16:1	1.75	1.41
18:0	4.34	14.4
18:1n9	15.5	33.7
18:2n6	12.3	27.7

Table 9. Dietary formulation of the experimental diets for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*.

Ingredients	Experimental diets			
	Con	F35 B10	F35 M10	F35 B5M5
Sardine, FM ¹	22.5	17.5	17.5	17.5
Anchovy, FM ¹	22.5	17.5	17.5	17.5
Tankage meal ²	8.00	9.50	9.50	9.5
Poultry by-product meal ³	4.50	4.50	4.50	4.5
Soy protein concentrate ⁴	5.50	6.00	4.60	4.60
Wheat gluten ⁵	4.50	4.70	3.30	3.30
Tuna by-product meal ⁶	-	1.00	1.00	1.00
Starch	3.80	2.63	2.63	2.63
Soybean meal ⁴	12.0	12.0	12.0	12.0
Wheat flour	7.00	7.00	7.00	7.00
Black soldier fly larvae ⁷	-	10.0	-	5.00
Mealworm larvae ⁸	-	-	10.0	5.00
Fish oil ⁹	4.30	1.30	4.10	2.70
Lecithin	0.50	0.70	0.70	0.70
Betaine	1.00	1.20	1.20	1.20
Taurine	0.50	0.80	0.80	0.80
Methionine ¹⁰	-	0.07	0.07	0.07
Monocalcium phosphate	0.70	0.70	0.70	0.70
Mineral mix ¹¹	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin mix ¹²	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin C	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamin E	0.10	0.10	0.10	0.10
Choline chloride	0.50	0.70	0.70	0.70

¹Fish meal (sardine, anchovy), Orizon S.A., CO., Ltd, Chile.

²Hanla Industrial Co., Ltd, jeju, South Korea.

³Woosin Food Co., Ltd, pocheon, South Korea.

⁴Solae LLC Inc., Saint Louis, U.S.A.

⁵CJ CheilJedang Co., Ltd, Seoul, Korea.

⁶Wooginfeed Industry Co. Ltd, Incheon, Korea

⁷Black soldier fly, Corp. Entomo, Siheung, South Korea.

⁸Mealworm, KEIL, Co. Ltd, Seoul, South Korea.

⁹Fish oil, E-wha oil Industry, Busan, South Korea.

¹⁰Methionine, Corp. Evonic rexim pharmaceutical.

¹¹Mineral mixture contained the following ingredients (g/kg, mixture): MgSO₄, 80.2; C₄H₂FeO₄, 12.5; KCl, 130; FeSO₄·H₂O, 20; CuSO₄·5H₂O, 1.25; CoSO₄, 0.75; Ca(IO₃)₂, 0.75; Al(OH)₃, 0.75; ZnSO₄·7H₂O, 13.75; MnSO₄, 11.25; CoCl₂·6H₂O, 1.

¹³Vitamin mixture contained the following amount which were diluted in cellulose (g/ kg, mixture): L-ascorbic acid, 6.4; DL- α tocopheryl acetate, 37.5; thiamin hydrochloride, 5.0; riboflavin, 10.0; pyridoxine hydrochloride, 5.0; niacin, 37.5; Ca-D-pantothenate, 17.5; myo-inositol, 75.0; D-biotin, 0.05; folic acid, 2.5; menadione, 2.5; retinyl acetate, 1.72; cholecalciferol, 0.025; cyanocobalamin, 0.025.

Con, contain the 45% of fish meal; F35B10, contain the 35% of fish meal and 10% of black soldier fly larvae meal; F35M10, contain the 35% of fish meal and 10% of mealworm larvae meal; F35B5M5, contain the 35% of fish meal, 5% of balck soldier larvae meal and 5% of mealworm larvae meal.

Table 10. Proximate, amino acid and fatty acid composition of the experimental diets for juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*.

Ingredients	Experimental diets			
	Con	F35 B10	F35 M10	F35 B5M5
Proximate composition (% of dry matter)				
Crude protein	58.7	59.4	57.7	59.3
Crude lipid	12.5	12.3	12.8	12.2
Crude ash	10.0	10.3	9.09	9.80
Moisture	8.61	11.2	10.5	11.8
Essential amino acid (% of protein)				
Arginine	6.62	6.88	6.97	6.94
Histidine	2.80	2.74	2.84	2.82
Isoleucine	4.45	4.33	4.37	4.39
Leucine	7.57	7.34	7.42	7.40
Lysine	6.95	6.60	6.62	6.57
Methionine	2.50	2.38	2.33	2.37
Phenylalanine	4.43	4.36	4.33	4.35
Threonine	4.14	3.98	4.04	4.02
Valine	5.21	5.13	5.28	5.26
Fatty acid (% of lipid)				
12:0	0.07	13.6	0.22	6.96
14:0	4.67	4.65	4.26	4.53
16:0	24.7	22.4	24.4	24.0
16:1	5.67	3.80	4.74	4.23 ^b
18:0	8.30	7.19	8.87	8.78
18:1n9	19.1	19.0	19.5 \pm	19.2
18:2n6	9.98	14.6	12.4	13.2
18:3n3	5.42	3.17	5.17	3.69
20:4	7.77	2.56	7.40	4.86
20:5n3	9.46	5.85	8.31	6.83
22:6n3	5.70	3.23	4.79	3.68

Values are mean of triplicates and presented as mean \pm SD. Values in the same row having different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$). Con, contain the 45% of fish meal; F35B10, contain the 35% of fish meal and 10% of black soldier fly larvae meal; F35M10, contain the 35% of fish meal and 10% of mealworm larvae meal; F35B5M5, contain the 35% of fish meal, 5% of black soldier larvae meal and 5% of mealworm larvae meal.

2.1.2 실험어 사육관리

본 연구는 제주대학교 동물실험윤리위원회(승인번호: 2020-0035)의 승인을 받아 진행하였다. 실험에 사용된 넙치는 제주도 제주시 구좌읍에 위치한 동림수산에서 구입하여 제주대학교 해양과학연구소로 운송하였다. 어류는 실험환경에 적응시키기 위해 넙치용 상업사료(Suhyup, Bogeurak #3)를 공급하면서 순치하였다. 예비사육 후, 넙치($34.3 \pm 0.05\text{g}$)는 12 개의 실험수조(3 반복, 425L 원형 polypropylene)에 각각 37 마리씩 무작위로 배치하였다. 실험사료는 1 일 2 회(08:00, 17:00), 15 주간 반복 공급되었다. 환수는 사료공급 30 분 후에 진행하였다. 사육수는 모래여과된 해수를 사용하였고, 유수량은 4-5 L/min 로 조절하였다. 용존산소를 유지하기 위해, 모든 실험수조에 공기발생기(aeration)를 설치하였다. 사육수온은 자연수온에 의존하였으며, 1 일 1 회 수질을 측정(용존산소, pH, 염분, 수온)하였다. 실험기간 중 평균용존산소는 8.67 mg/L, pH 는 8.49, 염분은 34.6‰, 수온은 21.5°C로 나타났다.



Figure 9. Experimental system for juvenile olive flounder, experimental fish in tank

2.1.3 실험어 무게측정

사료 공급 실험 후, 성장률과 사료효율 그리고 생존율의 측정을 위해 실험어를 24시간 절식시킨 후 실험어류의 수와 무게를 측정하였다. 무게 측정 후 성장율, 일간성장률, 사료섭이량, 사료전환효율, 단백질이용효율, 생존율을 측정하였으며, 실험어의 간, 위, 장을 각각 분리하여 간중량지수, 장중량지수를 계산하였고, 체중과 전장을 이용해 비만도를 계산하였다. 계산식은 다음과 같다.

- 성장률(WG; weight gain, %) = $100 \times (\text{final mean body weight} - \text{initial mean body weight}) / \text{initial mean body weight}$
- 일간성장률(SGR; specific growth rate, %) = $[(\log_e \text{ final body weight} - \log_e \text{ initial body weight}) / \text{days}] \times 100$
- 사료섭이량(FI; feed intake, g) = dry feed fed / fish
- 사료전환효율(FCR; feed conversion ratio) = dry feed fed / wet weight gain
- 단백질이용효율(PER; protein efficiency ratio) = wet weight gain / total protein given
- 생존률(Survival, %) = number of fish at end of feeding trial / number of fish stocked \times 100
- 간중량지수(HSI; hepatosomatic index, %) = $100 \times (\text{live weight} / \text{body weight})$
- 장중량지수(VSI; visceralsomatic index, %) = $100 \times (\text{visceral weight} / \text{body weight})$
- 비만도(CF; condition factor) = fish weight \times total body length³

2.1.4 샘플수집

최종무게 측정 후, 실험어를 각 수조마다 3마리를 무작위로 선별하여 2-phenoxyethanol 용액(200ppm)으로 마취시켰다. 일회용 주사기로 마취된 어류의 미부동맥에서 채혈하였다. 채취된 혈액은 헤파린이 20 μ L씩 처리된 1.5mL

Eppendorf tube에 넣어 hematocrit과 hemoglobin 측정에 사용되었다. 혈장(plasma)은 원심분리(5,000rpm, 15 분, Micro 17TR, Hanil Science, Korea)되었으며, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), glucose, total cholesterol 분석에 사용되었다. 혈청(serum)은 원심분리(5,000rpm, 15분, Micro 17TR, Hanil Science, Korea)되었으며, lysozyme activity, myeloperoxidase (MPO) 분석에 사용되었다. 실험어는 전어체 분석을 위해 -20°C 냉동보관 되었다.

2.1.5 일반성분 분석

사료원료, 실험사료, 어체 등근육에 대한 일반성분분석은 AOAC (1995) 방법에 따라 수분은 상압가열건조법(125 °C, 3 h), 조회분은 직접회화로법(550 °C, 4 h), 단백질은 자동 조단백분석기 (Kjeltec System 2300, Sweden)로 분석되었으며, 지방은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 Soxhlet 추출장치(Soxhlet Heater System C-SH6, Korea)를 이용하여 분석하였다.

2.1.6 혈액 분석

채취된 혈액에 헤파린을 처리한 후 hematocrit과 hemoglobin을 측정하였다. Hematocrit은 micro hematocrit 방법으로 측정하였다. 15분간 원심분리(5,000 rpm)하여 혈장을 분리한 후 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total cholesterol, glucose 를 분석하였다. Hemoglobin, AST, ALT, total cholesterol, glucose 분석은 각각의 시판 kit시약과 반응시킨 후 혈액생화학분석기(ch 100plus, RADIM company, Firenze, Italy)를 이용하여 분석하였다. 혈청 내 lysozyme 활성은 Sankaran and Gurnani (1972)의 방법으로 분석하였다. 혈청 내 myeloperoxidase (MPO)활성은 Kumari and Sahoo (2005)의 방법으로 분석하였다.

2.1.7 아미노산 분석

전처리는 시료를 0.5 mm 이하로 분쇄하고 6N HCl 15 ml 를 첨가 후 dry oven (110 °C, 24 h)에서 반응시켰다. 분해된 시료는 water bath (55 °C)를 이용하여 2 회 감압농축 시킨 후, 25 ml volumetric flask 에 정용 하였다. 0.45 ul membrane filter 로 여과 후 희석하여 아미노산 분석기(Sykam amino acid analyzer S433, Germany)를 이용하였다.

2.1.8 지방산 분석

지방산은 Garces and Mancha (1993)의 방법에 따라 추출하였다. 분리된 지방산은 capillary column (112-88A7, 100m×0.25 mm, film thickness 0.20 µm, Agilent Technologies, USA)이 장착된 gas chromatography (6800GC, Agilent, San Francisco, USA)를 통해 분석되었다. Carrier gas는 수소를 사용하였고, oven의 온도는 140°C에서 240°C까지 4°C/min으로 증가시켰다. Inject의 온도는 240°C, detector의 온도는 240°C로 설정하였다. Standard sample은 PUFA 37 component FAME Mix (Supelco, Bellefonte, USA)를 사용하였다.

2.1.9 통계학적 분석

분석결과는 SPSS (Version 12.0) 프로그램을 이용하여 One-way ANOVA로 통계 분석하였다. 데이터 값의 유의차는 Tukey's HSD를 사용하여 평균 간의 유의성($P < 0.05$)을 비교하였다. 데이터는 평균값±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 백분율 데이터는 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계 분석하였다.

2.2 결과

15주 동안의 사육실험 결과는 Table 11에 나타내었다. 최종무게, 성장율, 일간성장율, 사료섭취량, 사료전환효율, 단백질이용효율, 생존율은 모든 실험구 사이에 유의한 차이가 없었다. 그러나 최종무게의 경우 F35B10 (214 g), F35M10 (195 g), F35B5M5 (205 g)으로 갈색거저리의 함량이 증가할수록 감소하는 경향을 확인할 수 있었다.

생물학적지표 측정 결과, 비만도, 장중량지수, 간중량지수는 모든 실험구가 대조구와 유의적인 차이가 없었다. 그러나 장중량지수의 경우 F35B10 (2.90), F35M10 (3.24), F35B5M5 (3.06)으로 갈색거저리의 함량이 증가할수록 증가하는 경향을 확인할 수 있었다.

등근육 일반성분분석 결과는 Table 12에 나타내었다. 수분, 조단백질, 조지질, 조회분 함량은 모든 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다.

혈액분석과 비특이적 면역분석 결과는 Table 13에 나타내었다. Hematocrit, AST, glucose 분석 결과 모든 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다. Hemoglobin 분석 결과, F35M10 실험구가 대조구, F35B10 실험구에 비해 유의적으로 높았다. ALT 분석 결과, F35M10, F35B5M5 실험구가 대조구에 비해 유의적으로 높았다. Cholesterol 분석 결과, F35M10실험구가 대조구에 비해 유의적으로 낮았다. Lysozyme activity, myeloperoxidase 분석 결과, 모든 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다.

2.3 결론

이번 연구에서 동애등애와 갈색거저리는 성장과 사료계수 저하 등의 부정적인 효과를 나타내지 않는 것으로 보아, 넙치 저어분사료에 어분대체원으로써 이용가능성이 높다고 판단된다. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (55 ~ 141 g) 사료 내 어분을 동애등애와 갈색거저리로 각각 30%까지 대체하여도 어류의 성장과 사료계수에 아무런 영향이 없었다고 보고하였다(Melenchón et al., 2020). Yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) 사료 내 어분을 동애등애로 48%까지 대체 가능하다고 보고되었다(Xiao et al., 2018). Gilthead sea bream (105 ~ 294g) 사료 내 어분을 갈색거저리를 25%까지 대체 가능하다고 보고되었다(Piccolo et al., 2017). European seabass, 쏘가리, Nile tilapia 에서도 동애등애와 갈색거저리는 32 - 70%까지 어분을 대체할 수 있다고 보고되었다(Devic et al., 2016; Gasco et al., 2016; Sankian et al., 2018). 결론적으로, 동애등애와 갈색거저리는 넙치 사료 내 10%까지 이용 가능하고, 동애등애가 갈색거저리 보다는 이용성이 높다고 사료된다. 후속 연구에서는 각 곤충의 최대 어분대체율에 대한 규명이 요구된다.

필수 아미노산은 어류의 성장과 생존율에 직접적으로 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Hamidoghil et al., 2020). 곤충박은 어분에 비해 필수 아미노산인 Met의 함량이 비교적 낮은 것으로 보고되었다(Ghosh et al., 2017; Nogales-Mérida et al., 2019). 본 연구에서 실험사료에는 곤충박 첨가에 따라 Met을 첨가하였다. 본 연구의 실험 사료의 Met의 함량은 넙치의 아미노산 요구량(2.88-2.98%)을 충족시켜 주어, 필수 아미노산 결핍에 의한 성장 저하는 없었던 것으로 판단된다(Alam et al., 2000). 그러나 곤충박은 Met의 함량이 어분에 비해 낮아, 대체율이 증가할 수록 사료 내 Met의 함량이 감소된다고 보고되었다(Cummins

et al., 2017; Panini et al., 2017; Rahimnegad et al., 2019). 따라서 사료 내 어분 대체율이 증가하면, Met은 사료 내 제한요소로 작용할 가능성이 높다고 판단된다.

Lauric acid (LA) 는 동애등에의 주요 지방산으로 알려져 있다(Diclaro and kaufman, 2009; Nogales-Mérida et al., 2019). LA는 중쇄지방산의 일종으로 긴사슬지방산에 비해 빠르게 산화되는 것으로 알려져있다(Stubbs and Harbron, 1996). Belghit et al. (2019)은 LA의 산화가 빠르고 체내에 저장되는 정도가 긴사슬지방산에 비해 매우 낮다고 보고하였다. 또한, LA는 세균의 세포벽을 파괴하거나, 항균활성 물질로 전환되어 면역기능에 도움을 주는 것으로 보고되었다(Schlievert et al., 1992; Dayrit, 2015). 따라서, 동애등에 내 LA는 다양한 작용을 통해 간접적으로 어류의 성장, 면역 증진에 도움을 주었다고 판단된다.

이번 연구에서 사료 내 동애등에와 갈색거저리는 어류의 기초 건강도에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 혈액학적 분석은 어류의 생리활성과 건강상태를 조사하는 지표로 이용된다(Song and Lee, 2013). ALT 는 어류의 간과 신장이 물리적 혹은 병리적인 손상을 입을 경우에 증가하는 것으로 알려져 있어 어류의 건강도와 스트레스를 조사하는 지표로 사용된다(Kristofferson et al., 1974). 조피볼락(*Sebastes schlegeli*) 사료 내 갈색거저리(>32%)까지 대체하였어도 사용하였어도, ALT 에는 영향이 없었다고 보고되었다(Khosravi et al., 2018). European seabass 사료 내 동애등에(>19.5%)를 사용하여 대체하였을 때, Cholesterol 의 농도가 저하되었다고 보고되었다(Magalhães et al., 2017). Cholesterol 은 담즙산의 주요 구성성분으로 지질소화에 직접적으로 연관되어 있다. 이러한 건강도는 어류의 영양상태,

어종, 실험환경 등 여러 외적요인에 의해 영향을 받는다고 보고되었다(Jang et al., 2003; Choi et al., 2004). 곤충의 chitin 은 지질과 담즙 등의 이온성 물질에 결합하여 지질의 흡수를 저해할 수 있는 것으로 알려져 있다(Tharanathan and Kittur, 2003). 그러나, 넙치의 성장이 저하되지 않는 것으로 보아, 그 영향이 크게 발현되지 않았다고 판단된다.

결론적으로, 동애등애와 갈색거저리는 넙치 사료 내 어분 대체원으로써 이용 가능하다고 판단된다. 동애등애가 갈색거저리 보다 이용성이 더 높을 것으로 사료된다. 갈색거저리는 장기간(15주 이상) 사용할 경우, 넙치의 성장을 저해할 가능성이 높다고 판단된다. 후속 연구에서는 각 곤충박의 최대 어분 대체율 규명이 요구된다.

Table 11. Growth performance, feed utilization and biological indices of the juvenile olive flounder (initial mean body weight: 34.3±0.05g) fed the experimental diets for 15 weeks.

Dietary treatment	FBW ¹	WG ²	SGR ³	FI ⁴	FCR ⁵	PER ⁶	Survival (%)	CF ⁷	HSI ⁸	VSI ⁹
Con	218±14.2	537±41.7	1.80±0.06	139±2.96	0.76±0.04	2.25±0.13	94.6±0.00	0.93±0.12	0.77±0.13	2.91±0.25
F35B10	214±15.5	524±43.6	1.78±0.07	145±3.26	0.81±0.07	2.08±0.17	92.8±3.12	0.92±0.07	0.75±0.11	2.90±0.32
F35M10	195±5.56	468±16.9	1.69±0.03	140±0.52	0.87±0.03	1.99±0.06	93.7±1.56	0.88±0.06	0.79±0.13	3.24±0.20
F35B5M5	205±8.92	499±25.9	1.74±0.04	142±8.53	0.83±0.02	2.03±0.05	93.7±1.56	0.89±0.06	0.79±0.08	3.06±0.39

Values are mean of triplicates and presented as mean ± SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments. ¹FBW (final mean body weight, g/fish). ²WG (weight gain, %)=(final weight-initial weight)×100/initial weight. ³SGR (Specific growth rate, %/day)=[(log_e final weight-log_e initial weight)/days]. ⁴FI (feed intake, g/fish)=dry feed consumed (g)/fish. ⁵FCR (feed conversion ratio)=dry feed intake/wet weight gain. ⁶PER (protein efficiency ratio)=wet weight gain/protein intake. ⁷Condition factor=fish weight×total body length³. ⁸HSI (hepatosomatic index)=100×(live weight/body weight). ⁹VSI (viscerosomatic index)=100×(visceral weight/body weight). Con, contain the 45% of fish meal; F35B10, contain the 35% of fish meal and 10% of black soldier fly larvae meal; F35M10, contain the 35% of fish meal and 10% of mealworm larvae meal; F35B5M5, contain the 35% of fish meal, 5% of balck soldier larvae meal and 5% of mealworm larvae meal.

Table 12. Proximate contents of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 15 weeks (% of wet basis).

Dietary treatment	Moisture (%)	Protein (%)	Lipid (%)	Ash (%)
Con	76.9±0.17	21.2±0.56	0.73±0.10	1.26±0.02
F35B10	77.3±0.03	21.6±0.70	0.95±0.11	1.44±0.10
F35M10	77.4±0.43	21.7±0.20	1.06±0.04	1.45±0.07
F35B5M5	77.3±0.65	20.5±0.22	0.78±0.09	1.45±0.15

Values are mean of triplicates and presented as mean ± SD. The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments. Con, contain the 45% of fish meal; F35B10, contain the 35% of fish meal and 10% of black soldier fly larvae meal; F35M10, contain the 35% of fish meal and 10% of mealworm larvae meal; F35B5M5, contain the 35% of fish meal, 5% of balck soldier larvae meal and 5% of mealworm larvae meal.

Table 13. Hematological parameters and non-specific immune responses of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 15 weeks.

Dietary treatment	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	AST ¹	ALT ²	Glucose (mg/dL)	Total Cholesterol ³	Lysozyme Activity (µg/mL)	MPO ⁴ (Absorbance)
Con	3.62±0.38 ^b	32.4±1.90	20.8±8.01	44.6±7.58 ^c	57.8±7.50	116±14.0 ^a	29.6±10.8	1.30±0.23
F35B10	3.92±0.34 ^{ab}	35.6±2.92	25.9±7.70	59.0±7.59 ^{bc}	48.5±5.03	103±13.4 ^{ab}	28.6±11.1	1.32±0.24
F35M10	4.44±0.31 ^a	36.2±2.68	20.5±7.59	76.4±5.11 ^a	51.0±7.74	95.5±9.65 ^b	28.9±8.50	1.30±0.22
F35B5M5	3.98±0.68 ^{ab}	34.1±3.72	28.5±5.29	66.9±9.82 ^{ab}	52.2±8.68	107±16.9 ^{ab}	28.6±8.92	1.27±0.30

Values are mean of triplicates and presented as mean ± SD. Values in the same column having different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$). The lack of superscript letter indicates no significant differences among treatments. ¹Aspartate aminotransferase (U/L), ²Alanine aminotransferase (U/L), ³Total cholesterol (mg/dL), ⁴Myeloperoxidase. Con, contain the 45% of fish meal; F35B10, contain the 35% of fish meal and 10% of black soldier fly larvae meal; F35M10, contain the 35% of fish meal and 10% of mealworm larvae meal; F35B5M5, contain the 35% of fish meal, 5% of black soldier larvae meal and 5% of mealworm larvae meal.

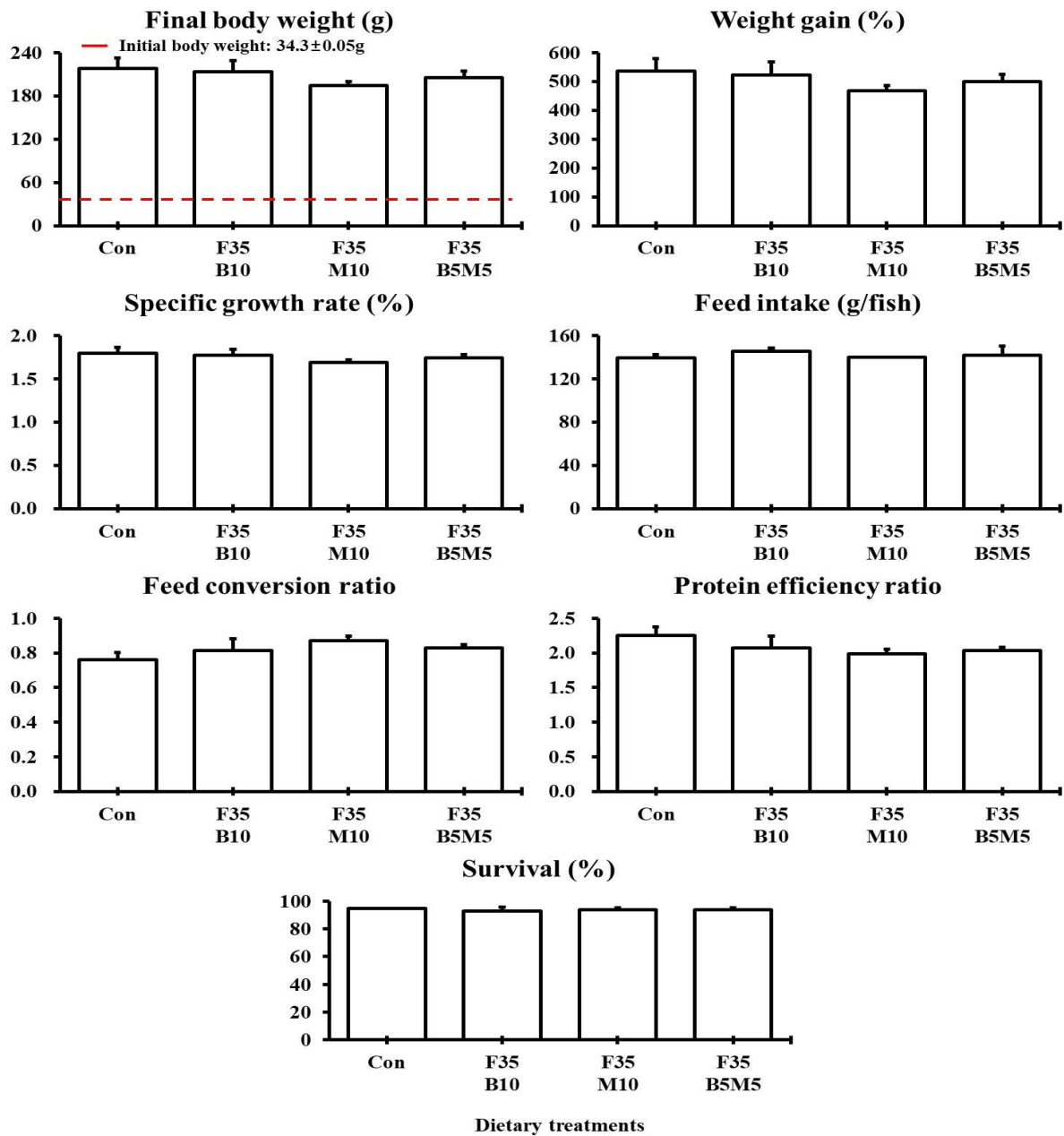


Figure 10. Growth performance, feed utilization and survival of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 15 weeks. Con, contain the 45% of fish meal; F35B10, contain the 35% of fish meal and 10% of black soldier fly larvae meal; F35M10, contain the 35% of fish meal and 10% of mealworm larvae meal; F35B5M5, contain the 35% of fish meal, 5% of balck soldier larvae meal and 5% of mealworm larvae meal. Values on the bars having different letters are significantly different ($P < 0.05$).

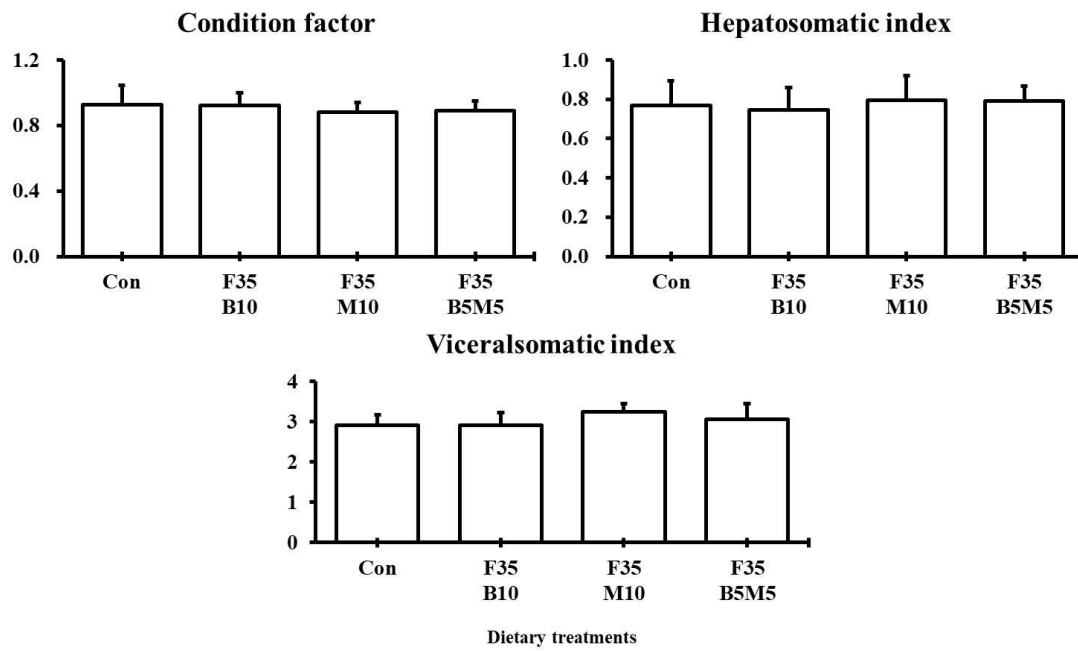


Figure 11. Biological indices of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 15 weeks. Con, contain the 45% of fish meal; F35B10, contain the 35% of fish meal and 10% of black soldier fly larvae meal; F35M10, contain the 35% of fish meal and 10% of mealworm larvae meal; F35B5M5, contain the 35% of fish meal, 5% of balck soldier larvae meal and 5% of mealworm larvae meal. Values on the bars having different letters are significantly different ($P < 0.05$).

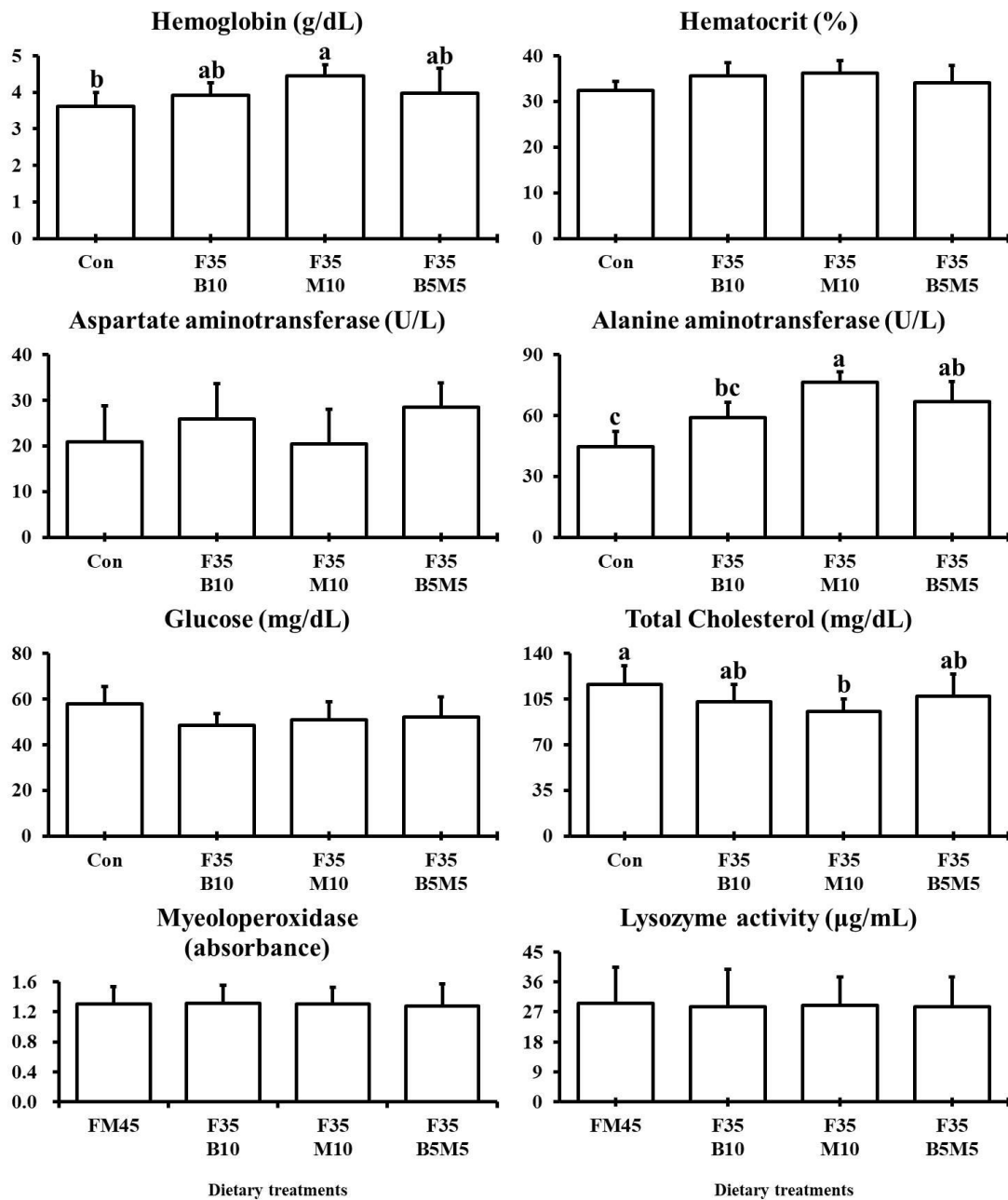


Figure 12. Hematological parameters and non-specific immune responses of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* fed the experimental diets for 15 weeks. Con, contain the 45% of fish meal; F35B10, contain the 35% of fish meal and 10% of black soldier fly larvae meal; F35M10, contain the 35% of fish meal and 10% of mealworm larvae meal; F35B5M5, contain the 35% of fish meal, 5% of black soldier larvae meal and 5% of mealworm larvae meal. Values on the bars having different letters are significantly different ($P < 0.05$).

요약문

이번 연구는 넙치 저어분사료 내 곤충박의 이용성을 입증하여 경제적이고 기능적인 양어용 배합사료의 기초자료를 제시하였다.

1 차 실험(Chapter 1)에서는 치어기 넙치를 대상으로 저어분사료 내 곤충박의 어분 대체원으로써의 이용성을 확인하고자 사육실험을 진행하였다. 사육실험은 대조구로 4 종의 동·식물성(수지박, 가금부산물분, 대두농축단백, 밀글루텐)을 사용하여 어분 함량을 45%까지 낮춘 저어분사료를 사용하였다. 실험구는 5 종의 곤충박(갈색거저리, 흰점박이꽃무지, 동애등에, 쌍별귀뚜라미, 장수풍뎅이)를 사용하여 대조구 사료 내 어분 함량의 10%를 대체하였다. 평균 무게 11.0 g의 치어기 넙치를 총 18 개 수조(170 L)에 각 20 마리씩 무작위로 배치하여 8 주간 진행하였다. 사육실험 결과, 모든 실험구가 대조구와 성장, 사료계수의 차이가 없었다. Chapter 1의 사육실험의 결과를 통해 5 종의 곤충박은 치어기 넙치 내 어분 대체원으로써 사용 가능함을 확인할 수 있었다.

2 차 실험(Chapter 2)은 치어기 넙치를 대상으로 저어분사료 내 곤충박의 어분 대체원으로써의 이용성을 확인하고자 사육실험을 진행하였다. 사육실험은 대조구로 4 종의 동·식물성(수지박, 가금부산물분, 대두농축단백, 밀글루텐)을 사용하여 어분 함량을 45%까지 낮춘 저어분사료를 사용하였다. 곤충박은 Chapter 1의 결과와 가격, 시장성을 고려하여 동애등에와 갈색거저리로 선정하였다. 실험구는 동애등에, 갈색거저리, 동애등에와 갈색거저리의 혼합물(1:1)을 사용하여 대조구 사료 내 어분 함량의 10%를 대체하였다. 평균 무게 34.3 g의 치어기 넙치를 총 12 개 수조(425 L)에 37 마리씩 무작위로 배치하여 15 주간 진행하였다. 사육실험 결과, 모든 실험구가 대조구와 성장, 사료계수의 차이가 없었다. 그러나, 실험사료 내 갈색거저리의 함량이 증가할수록 성장과 사료계수의 감소하는 경향을 확인할 수 있었다. Chapter 2의 실험

결과를 바탕으로, 동애등애와 갈색거저리 모두 치어기 사료 내 10%까지 사용 가능하다는 것을 증명하였다. 또한, 실험 결과를 고려하였을 때, 동애등애가 갈색거저리 보다 이용성이 높다고 판단된다.

결론적으로 이번 연구를 통해 곤충박은 넙치 사료 내 어분대체원으로써의 이용가능성이 높다고 판단된다. 그러나, 현재까지 곤충박은 생산단가가 어분보다 높기 때문에 대량생산을 통한 단가의 개선이 필요하며, 후속 연구를 통해 어류 사료 내 곤충박의 효과에 대한 다양한 실험이 요구된다.

Reference

- Abdel-Tawwab M, Khalil RH, Metwally AA, Shakweer MS, Khallaf MA and Abdel-Latif HMR. 2020. Effects of black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal on growth performance, organs-somatic indices, body composition, and hematobiochemical variables of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 522, 735136. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.041>
- Adams SM, Han KD, Greeley MS, Lehew RF, Hinton DE and Saylor CF. 1996. Downstream gradients in bioindicator responses: point source contaminant effects on fish health. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53(10), 2177-2187. <https://doi.org/10.1139/f96-191>
- Ahmed M, Liang H, Kasiya HC, Ji K, Ge X, Ren M, Liu B, Zhu X and Sun A. 2019. Complete replacement of fish meal by plant protein ingredients with dietary essential amino acids supplementation for juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Aquac Nutr* 25, 205–214. <https://doi.org/10.1111/anu.12844>
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2000. Official methods of analysis of AOAC International (17th, Edn.). AOAC, Gaithersburg MD, U.S.A.
- Barroso FG, Haro CD, 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* 422-423, 193-201. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.024>
- Belghit I, Waagbø, Lock EJ and Liland NS. 2019. Insect-based diets high in lauric acid reduce liver lipids in freshwater Atlantic salmon. *Aquac Nutr* 25(2), 343-357. <https://doi.org/10.1111/anu.12860>
- Biasato I, Marco MD, Rotolo L, Renna M, Lussiana C, Dabbou S, Capucchio MT, Biasibetti E, Costa P, Gai F, Pozzo L, Dezzutto D, Bergagna S, Martínez S, Tarantola M, Gasco and Schiavone A. 2016. Effects of dietary *Tenebrio molitor* meal in inclusion in free-range chickens. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 100(6), 1104-1112. <https://doi.org/10.1111/jpn.12487>

- Biswas A, Araki H, Sakata T, Nakamori Y and Takii K. 2019. Optimum fish meal replacement by soy protein concentrate from soymilk and phytase supplementation in diet of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 506, 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.023>
- Bovera F, Piccolo G, Gasco L, Marono S, Loponte R and Vassalotti G. 2015. Yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*, L.) as a possible alternative to soybean meal in broiler diets. *Nutr Metab (Lond)*, 569-575. <https://doi.org/10.1080/00071668.2015.1080815>
- Bowden TJ, Butler R, Bricknell IR and Ellis AE. 1997. Serum trypsin-inhibitory activity in five species of farmed fish. *Fish Shellfish Immunol* 7, 377-385. <https://doi.org/10.1006/fsim.1997.0092>
- Choi IH, Yu R, Lim YJ, Choi GS, Choi SU, Hwang JI, Son JS and Chung TH. 2019. Antithrombotic efficacy of *Protaetia brevitarsis* Extract. *Journal of Environmental Science International* 28(7), 639-643. <https://doi.org/10.5322/JESI.2019.28.7.639>
- 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. <https://doi.org/10.1080/00071668.2013.838746>.
- Choi SM, Wang X, Park GJ, Lim SR, Kim KW, Bai SC and Shin IS. 2004. Dietary dehulled soybean meal as a replacement for fish meal in fingerling and growing olive flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquac Res* 35(4), 410-418. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01046.x>
- Choi WH, Yun JH, Chu JP and Chu KB. 2012. Antibacterial effect of extracts of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae against Gram-negative bacteria. *Entomol Res* 45 (5), 219-226. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5967.2012.00465.x>
- Chung MY, Hwang JS, Goo TW and Yun EY. 2013. Analysis of general composition and harmful material of *Protaetia breviarsis*. *J Life Sci* 23(5), 664-668. <https://dx.doi.org/10.5352/JLS.2013.23.5.664>

- Chung MY, Kwon EY, Hwang JS, Goo TW and Yun EY. 2013. Pre-treatment conditions on the powder of *Tenebrio molitor* for using as a novel food ingredient. J Seric Entomol Sci 51, 9-14. <https://doi.org/10.7852/jses.2013.51.1.9>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.022>.
- Dayrit FM. 2015. The properties of lauric acid and their significance in coconut oil. J Am Oil Chem Soc 92, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2562-7>.
- Diclaro IJW and Kaufman PE. 2009. Black soldier fly *Hermetia illucens* Linnaeus (Insecta: Diptera: Stratiomyidae). In: EENY-461, Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- FAO. 2014. In: Graziano da Silva, J. (Ed.), The state of World Fisheries and Aquaculture, Opportunities and Challenges. FAO, Rome, pp. 3.
- Finke MD. 2002. Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. Zoo Biol 21(3), 269-285. <https://doi.org/10.1002/zoo.10031>
- Finke MD. 2007. Estimate of chitin in raw whole insects. Zoo Biol 26, 105-115. <https://doi.org/10.1002/zoo.20123>
- Fisher HJ, Collins SA, Hanson C, Mason B, Colombo SM and Anderson DM. 2020. Black soldier fly larvae meal as a protein source in low fish meal diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture 521, 734978. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734978>
- Folch J, Lees M and Sloane-Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem 226, 497-509.
- 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. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1244>
- Gasco L, Henry M, Piccolo G, Marono S, Gai F, Renna M, Lussiana C, Antonopoulou E, Mola P and Chatzifotis S. 2016. *Tenebrio molitor* meal in diets for European sea bass (*Dicentrarchus*

- labrax* L.) juveniles: Growth performance, whole body composition and *in vivo* apparent digestibility. Anim Feed Sci Technol 220, 34-45.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.07.003>
- 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.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aspen.2017.04.003>
- Harikrishnan R, Kim JS, Balasundaram C and Heo MS. 2012. Dietary supplementation with chitin and chitosan on haematology and innate immune response in *Epinephelus bruneus* against *Philasterides dicentrarchi*. Exp Parasitol 131(1), 116-124.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.03.020>
- Henry MA, Gai F, Enes P, Pérez-Jiménez A and Gasco L. 2018. Effect of partial dietary replacement of fishmeal by yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae meal on the innate immune response and intestinal antioxidant enzymes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish shellfish immunol 83, 308-313. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.09.040>
- Howe ER, Simenstad CA, Toft JD, Cordell JR and Bollens SM. 2014. Macroinvertebrate prey availability and fish diet selectivity in relation to environmental variables in natural and restoring north San Francisco Bay tidal marsh channels. San Francisco Estuary and Watershed Science 12, 1. <https://doi.org/10.15447/sfews.2014v12iss1art5>
- Iaconisi V, Bonelli A, Pupino R, Gai F and Parisi G. 2017. Mealworms as dietary protein source for rainbow trout: body and fillet quality traits. Aquaculture 484, 197-204.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.11.034>
- Ido A, Hashizume A, Ohta T, Takahashi T, Miura C and Miura T. 2019. Replacements of fish meal by defatted yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae in diet improves growth performance and disease resistance in red seabream (*Pagrus major*). Animals 9(3), 100.
<https://doi.org/10.3390/ani9030100>
- Irm M, Taj S, Jin M, Luo J, Andriamialinirina HJT and Zhou Q. 2020. Effects of replacement of fish meal by poultry by-product meal on growth performance and gene expression involved in

- protein metabolism for juvenile black sea bream (*Acanthoparus schlegelii*). *Aquaculture* 528, 735544. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735544>
- Jang MS, Park HY, Nam KH, Han HS, Kim KW, Kim KD and Lee BJ. 2013. Effect of extruded pellets containing fermented soybean meal as a partial substitute for fish meal on growth performance and muscle quality of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J Agric Life Sci* 47, 203-215.
- Jeong SM, Kim E, Jang TH, Lee YS and Lee SM. 2017. Utilization of mealworm *Tenebrio molitor* as a replacement of fishmeal in the diet of juvenile rockfish *Sebastes schlegeli*. *Korean J Fish Aquat Sci* 50(4), 372-377. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0372>
- 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. <https://doi.org/10.22358/jafs/69998/2017>.
- Khosravi S, Kim E, Lee YS and Lee SM. 2018. Dietary inclusion of meal worm (*Tenebrio molitor*) meal as an alternative protein source in practical diets for juvenile rock fish (*Sebastes schlegeli*). *Entomol Res* 48, 214-221. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12306>
- Khoushab F and Yamabhai M. 2010. Chitin research revisited. *Mar Drugs* 8(7), 1988-2012. <https://doi.org/10.3390/md8071988>
- Kim HG and Kang KH. 2005. Bionomical characteristic of *Protaetia brevitarsis*. *Korean J Appl Entomol* 44(2), 139-144.
- Kim HS, Park HY, Kwon HS, Lee SH, Ha J, Lee SW and Cho SJ. 2019. Variations in antioxidant activity in *Protaetia brevitarsis* larvae depending on the feeding source. *Journal of Mushroom* 17(4), 261-267. <http://dx.doi.org/10.14480/JM.2019.17.4.261>
- Kim JI. 1997. Newly recording two exotic insects species form korea. *J Kor Biota* 2, 223-225.
- Kim KW, Kim KD, Han HS, Won SM, Moniruzzaman M, Lee JH, Choi YH and Bai SC. 2017. Evaluation of the dietary protein requirement of a selectively bred (F-5generation) strain of olive flounder, *paralichthys olivaceus*. *Turk J Fish Aquatic Sci* 17, 1009-1016. DOI : 10.4194/1303-2712-v17_5_16

- Kim MG, Lim HW, Lee BJ, Hur SW, Lee SH, Kim KW and Lee KJ. 2020b. Replacing fish meal with a mixture of plant and animal protein sources in the diets of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Korean J Fish Aquat Sci 53(4), 577-582. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0577>
- Kim SH, Kim YK and Han JS. 2020a. Antioxidant activities and nutritional components of cricket (*Gryllus bimaculatus*) powder and protein extract. Asian J Beauty cosmetol 18(2), 163-172. <https://doi.org/10.20402/ajbc.2020.0016>
- 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 Aquat Sci 51(2), 148-156. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2018.0148>
- KOSIS (Korean Statistical Information Service). 2019. Expenditure per aquaculture. Retrieved from https://kosis.kr/statisticsList/statisticsListIndex.do?menuId=M_01_01&vwcd=MT_ZTITLE&parmTabId=M_01_01#SelectStatsBoxDiv
- Kristofferson R, Broberg S, Oskari A and Pekkarinen M. 1974. Effect of a sublethal concentration of phenol on some blood plasma enzyme activities in the pike (*Esox lucius* L.) in brackish water. Ann Zool Fennici 11, 220-223.
- Kroeckel S, Harjes AGE, 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 364-365, 345-352. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.041>
- Kumari J and Sahoo PK. 2005. Effects of cyclophosphamide on the immune system and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus*. Fish Shellfish Immunol 19, 307-316. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.01.008>
- Kurokawa T, Uji S and Suzuki T. 2004. Molecular cloning of multiple chitinase genes in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 138, 255-264. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.03.015>

- Lange S, Bjarnheidur K, Gudmundsdottir and Bergljot M. 2001. Humoral immune parameters of cultured Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Fish shellfish Immunol 11, 523-535. DOI: 10.1006/fsim.2000.0333
- Lee JH, Seo M, Lee HJ, Baek M, Kim IW, Kim YS, Kim MA, Kim SH and Hwang JS. 2019. Anti-inflammatory activity of antimicrobial peptide Allomyrinasin derived from the dynastid beetle, *Allomyrina dichotoma*. J Microbial Biotechnol 29(5), 687-695. <https://doi.org/10.4014/jmb.1809.09031>
- Lee KH, Hong SY and Oh JE. 1998. Synthesis and structurefunction study about tenecin 1, an antibacterial protein from larvae of *Tenebrio molitor*. FEBS letters 439, 41-45. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01333-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01333-7).
- Lim HW, Kim MG, Shin JH, Shin JB, Hur SW, Lee BJ. 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. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0464>
- 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*) postsmolt. Aquac Nutr 22(6), 1202-1213. <https://doi.org/10.1111/anu.12343>
- Magnadóttir B. 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish shellfish immunol 20, 137-151. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>
- Makkar HPS, Tran G, Heuzé V and Ankers P. 2014. State-of-the-art-on-use of insects as animal feed. Anim Feed Sci Technol 197, 1-33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.07.008>
- Manzano-Agugliaro F, Sánchez-Muros MJ, Barroso FG, Martínez-Sánchez A, Rojo S and Pérez-Bañón C. 2012. Insects for biodiesel production. Renew Sustain Energy Rev 16, 3744-3753. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.03.017>
- Marono S, Piccolo G, Loponte R, Meo CD, Attia YA and Nizza A. 2015. *In vitro* crude protein digestibility of *Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens* insect meals and its correlation with chemical composition trait. Ital J Anim Sci 14(3), 338-349. <https://doi.org/10.4081/ijas.2015.3889>

- Melenchón F, Larrán AM, Mercado ED, Hidalgo MC, Cardenete G, Barroso FG, Fabrikov D, Lourenço HM, Pessoa MF and Tomás-Almenar C. 2020. Potential use of black soldier fly (*Hermetia illucens*) and mealworm (*Tenebrio molitor*) insectmeals in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquac Nutr* 0, 1-15. <https://doi.org/10.1111/anu.13201>
- McLaughlin PA. Internal anatomy. In: Bliss DE & Mantel TH (Eds.). *The Biology of Crustacea*. Academic Press, New York, 1983, 5, 1-52, 479.
- Miles RD and Chapman FA. 2006. Standard manual of olive flounder culture. National Institute of Fisheries Science, Busan, Republic of Korea.
- Nandeesh MC, Silva SSD and Murthy DS. 1995. Use of mixed feeding schedules in fish culture: Performance of common carp *Cyprinus carpio* on plant and animal protein based diets. *Aquac Res* 26, 1381-1385. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1995.tb00898.x>.
- Ngo DH and Kim SK. 2014. Antioxidant effects of chitin, chitosan, and their derivatives. *Adv Food Nutr Res* 73, 15-31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800268-1.00002-0>
- Nicolas P. 2009. Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. *FEBS J* 276, 6483- 6496. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07359.x>.
- Nogales-Mérida S, Gobbi P, Józefiak D, Mazurkiewicz J, Dudek K, Rawski M, Kierończyk B and Józefiak A. 2019. Insect meals in fish nutrition. *Rev Aquac* 11(4), 1080-1103. <https://doi.org/10.1111/raq.12281>
- NRC (National Research Council). 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. The National Academy Press, Washington DC, U.S.A.
- Ozovehe BN. 2013. Growth performance, haematological indices and some biochemical enzymes of juveniles *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) fed varying levels of *Moringa oleifera* leaf meal diet. *J Aquac Res* 4(2), 166
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.054>

- Panini RL, Freitas LEL, Guimarães AM, Rios C, da Silva MFO, Vieira FN and Amboni RD. 2017. Potential use of mealworms as an alternative protein source for Pacific white shrimp: digestibility and performance. *Aquaculture* 473, 115-120. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.008>
- Park HY, Park SS, Oh HW and Kim JL. 1994. General characteristics of the white-spotted flower chafer, *Protaetia brevitarsis* reared in the laboratory. *Korean J Entomol* 24(1), 1~5.
- Piccolo G, Iaconisi V, Marono S, Gasco L, Loponte R, Nizza S, Bovera F and Parisi G. 2017. Effect of *Tenebrio molitor* larvae meal on growth performance, in vivo nutrients digestibility, somatic and marketable indexes of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Anim Feed Sci Technol* 226, 12-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.02.007>
- Ramos-Elorduy J, González EA, Hernández AR and Pino JM. 2002. Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to recycle organic wastes and as feed for broiler chickens. *J Econ Entomol* 95(1), 214-220. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-95.1.214>
- Rana KJ, Siriwardena S and Hasan MR. 2009. Impact of rising feed ingredient prices on aquafeeds and aquaculture production. In: FAO (Ed.), Fisheries and Aquaculture Technical Paper. Food, Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, p. 63.
- Ravanaadii N, Kim SH, Choi WH, Hong SJ and Kim NJ. 2012. Nutritional value of mealworm, *Tenebrio molitor* as food source. *Int J Indust Entomol* 25(1), 93-98. <https://doi.org/10.7852/ijie.2012.25.1.093>
- Rumpold BA and Schlüter OK. 2013. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Mol Nutr Food Res* 57(5), 802-823. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200735>
- Sánchez-Muros MJ, Haro CDE, 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. <https://doi.org/10.1111/anu.12313>
- Sankaran K and Gurnani S. 1972. On the variation in catalytic activity of lysozyme in fishes. *Indian J Biochem Bio* 9, 162-165.
- Sankian Z, Khosravi, Kim YO and Lee SM. Effects of dietary inclusion of yellow mealworm

- (*Tenebrio molitor*) meal on growth performance, feed utilization, body composition, plasma biochemical indices, selected immune parameters and antioxidant enzyme activities of mandarin fish (*Siniperca scherzeri*) juvenile. *Aquaculture* 496, 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.012>
- Schlievert PM, Deringer JR, Kim MH, Projan SJ and Novick RP. 1992. Effect of glycerol monolaurate on bacterial growth and toxin production. *Antimicrob Agent Chemother* 36, 626-631. <https://doi.org/10.1128/aac.36.3.626>
- 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 shirimp *Litopenaeus vannamei*. *Korean J Fish Aquat Sci* 53(6), 900-908. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0900>
- Song JW and Lee KJ. 2013. Effects of dietary nucleotide supplementation on the growth performance, feed utilization, hematological parameters and innate immunity in red seabream *Pagrus major*. *Korean J Fish Aquat Sci* 46, 785- 792. <https://doi.org/10.5657/KFAS.2013.0785>.
- Spranghers T, Ottoboni M, Klootwijk C, Owyn A, Deboosere S, Meulenaer BD, Michiels J, Eeckhout M, Clercq PD and Smet SD. 2016. Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. *J Sci Food Agric* 97(8), 2594-2600. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8081>
- 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. *International journal of obesity and related metabolic disorders. Int J Obes* 20, 435-444.
- Suh HJ, Kim SR, Lee KS, Park S and Kang CS. 2010. Antioxidant activity of various solvent extracts from *Allomyrina dichotoma* (Arthropoda: Insecta) larvae. *J Photochem Photobiol B* 99(2), 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.02.005>
- Taufek NM, Muin H, Raji AA, Yusof HM, Alias Z and Razak SA. 2018. Potential of field crickets meal (*Gryllus bimaculatus*) in the diet of African catfish (*Clarias gariepinus*). *J Appl Anim Res* 46, 541-546. <https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1357560>
- Taufek NM, Simarani K, Muin H, Aspani F, Raji AA, Alias Z and Razak SA. 2016. Effect of dietary

- cricket meal, *Gryllus bimaculatus* on the growth performance and resistance against pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* in African catfish, *Clarias gariepinus* (Submitted).
- Tharanthan RN and Kittur FS. 2003. Chitin-The Undisputed biomolecule of great potential. Crit Rev Food Sci Nutr 43(1), 61-87. <https://doi.org/10.1080/10408690390826455>
- Uribe C, Folch H, Enriquez and Moran G. 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. Veterinarni Medicina 56(10), 486-503. <https://doi.org/10.17221/3294-VETMED>
- Van Huis A. 2013. Potential of insects as food and feed in assuring food security. Annu Rev Entomol 58, 563-583. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-143704>
- Van Huis A and Oonincx DGAB. 2017. The environmental sustainability of insects as food and feed. A review. Agron Sustain Dev 37. <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0452-8>
- Whitley SN and Bollens SM. 2013. Fish assemblages across a vegetation gradient in a restoring tidal freshwater wetland: diets and potential for resource composition. Environ Biol Fishes 97, 659-674. <https://doi.org/10.1007/s10641-013-0168-9>
- Wilson RP. 2002. Protein and amino acids. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), Fish Nutrition. Elsevier Science, San Diego, USA, pp. 144–179.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.03.030>.
- Yang YH, Wang YY, Lu Y and Li QZ. 2011. Effect of replacing fish meal with soybean meal on growth, feed utilization and nitrogen and phosphorus excretion on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquac Int 19, 405-419. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9359-y>
- Ye J, Liu X, Wang Z and Wang K. 2011. Effect of partial fish meal replacement by soybean meal on the growth performance and biochemical indices of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Aquac Int 19, 143-153. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9348-1>.
- Yoo JM, Hwang JS, Goo TW and Yun EY. 2013. Comparative analysis of nutritional and harmful components in Korean and Chinese mealworms (*Tenebrio molitor*). J Korean Soc Food Sci Nutr 42, 249-254. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2013.42.2.249>

Zeitler MH, Kirchgessner M and Schwarz FJ. 1984. Effects of different protein and energy supplies on carcass composition of carp *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* 36, 37-48.
[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90052-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90052-8)

Zhang YS, Feng J, Chen C, Qin H and Li W. 2012. Stimulatory effects of chitinase on growth and immune defense of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish Shellfish Immunol* 32, 844-854. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.02.009>

감사의 말

대학원에 입학한지도 벌써 2년이라는 시간이 지났습니다. 석사과정 동안에 정말 많은 분들에게 도움을 받은 것 같습니다. 먼저 저를 학문의 길로 이끌어 주신 이경준 교수님께 감사의 인사를 드립니다. 심사를 위해 시간을 내어주신 박상률 교수님, 송진우 박사님에게도 감사의 인사를 드립니다. 또한, 학사뿐만 아니라 석사과정 동안 많은 가르침을 주신 송춘복 교수님, 이제희 교수님, 여인규 교수님, 허문수 교수님, 전유진 교수님, 정준범 교수님, 이승현 교수님께도 감사의 인사를 드립니다.

처음 실험실에 들어왔을 때부터 졸업할 할 때까지 많이 가르쳐주고, 이끌어준 민기형과 초롱이 누나를 비롯하여 실험실의 기둥으로써 항상 도움을 주는 재형이형, 많이 싸우기도 했지만 항상 도움을 준 재범이, 궂은 일도 마다하지 않고 도와주는 후배들에게도 정말 고맙습니다.

석사과정을 공부하는 동안 항상 응원해주고 버팀목이 되어준 건희, 영주, 인수, 민지 정말 고맙습니다. 마지막으로, 쉽지 않은 선택이었음에도 불구하고 언제나 좋은 말씀해주시며 믿어주고 응원해주신 아버지, 어머니, 현준이 정말 감사하고 사랑합니다. 모두 다 적지는 못했지만, 석사과정동안 저를 이끌어주시고 응원해주신 모든 분들에게 이 논문을 바칩니다. 항상 응원해 주신 분들에게 직접적으로 말해본 적이 없는 것이 가장 큰 아쉬움으로 남습니다. 언제까지나 잊지 않겠습니다.

2021년 01월

-현운 올림-