

사료 내 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 유충과 동애등애(*Hermetia illucens*) 유충의 첨가에 따른 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)의 비특이적 면역력, 항산화력, *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 저항성 및 성장 효과

신재형 · 신재범 · 엄건호 · 이경준^{1*}

제주대학교 해양생명과학과, ¹제주대학교 해양과학연구소

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

Jaehyeong Shin, Jaebeom Shin, Gunho Eom and Kyeong-Jun Lee^{1*}

Department of Marine Life Science, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

¹Marine Science Institute, Jeju National University, Jeju 63333, Korea

This study was conducted to determine the supplemental effects of two insect meals, mealworm (MW) and black soldier fly (BSF), with high or low lipid levels in diets, on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Sardine and tuna by-product meals were used as the fish meal source in a control (Con) diet. The fish meals were replaced with MW, defatted MW (deMW), BSF or defatted BSF (deBSF), respectively. The shrimp (body weight: 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 that were 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 hepatopancreas were also higher in shrimp that were fed the insect diets, regardless of defatting than those in shrimp that were fed Con diet. The survival against *Vibrio parahaemolyticus* was higher in shrimp that were fed the diets containing defatted insect meals than in shrimp that were fed Con diet. These results indicate that MW and BSF, regardless of lipid levels, could be good protein sources for the enhancement of innate immunity and anti-oxidant capacity of the shrimp.

Keywords: Insect meal, Black soldier fly, Mealworm, Pacific white shrimp, Protein source

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 1,680억원에서 2018년 2,648억원으

로 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 동애등애(*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

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

E-mail address: kjlee@jejunu.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2021.0624>

Korean J Fish Aquat Sci 54(5), 624-633, October 2021

Received 5 August 2021; Revised 6 September 2021; Accepted 24 September 2021

저자 직위: 신재형(대학원생), 신재범(대학원생), 엄건호(대학원생), 이경준(교수)

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(7.4-40%)은 대체로 높아 부패가 쉽게 일어나고 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.

재료 및 방법

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 1에 나타내었다. 대조사료(control, Con)에는 두 종류의 어분(정어리 어분, 참치부산물분)과 대두박이 주요 단백질원으로 사용되었다(Table 2). 실험사료는 총 5종으로 대조사료의 어분단백질을 비탈지 혹은 탈지갈색거저리와 동애등에 분말로 각각 20% 대체한 4종의 사료(MW, deMW, BSF, deBSF)로 구성하였다. 사료원료는 분쇄기를 이용하여 분쇄한 후 조성표에 따라 혼합되었다. 혼합된 원료는 소형 사료제조기(SP-50; Gumgang ENG, Daegu, Korea)를 이용하여 2가지 크기(1, 2 mm)로 성형되었다. 완성된 사료는 건조 후(22°C, 13시간) 사료공급 전까지 냉동보관(-30°C) 되었다.

실험새우와 사육관리

Table 1. 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
ΣSFA ¹	24.6	29.8	65.4	63.4	45.2	51.3
ΣMUFA ²	42.4	33.7	16.7	18.4	9.21	4.50
ΣPUFA ³	31.1	35.2	13.3	14.2	38.4	21.8
Σn-3 ⁴	1.33	0.98	1.53	1.42	27.5	20.4
Σn-6 ⁵	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	-	-

¹Sum of saturated fatty acids. ²Sum of monounsaturated fatty acids. ³Sum of polyunsaturated fatty acids. ⁴Sum of n-3 polyunsaturated fatty acids. ⁵Sum 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 2. 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 ¹	10.0	8.00	8.00	8.00	8.00
Fish meal, sardine ²	10.0	8.00	8.00	8.00	8.00
Mealworm, whole ³	-	5.47	-	-	-
Mealworm, defatted ³	-	-	3.60	-	-
Black soldier fly, whole ⁴	-	-	-	6.55	-
Black soldier fly, defatted ⁴	-	-	-	-	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 ⁵	3.00	1.68	3.03	1.16	3.00
Mineral mixture ⁶	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Vitamin mixture ⁷	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Lecithin ⁸	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cholesterol	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Monocalcium 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

¹Woogin Feed Industry Co. Ltd., Incheon, Korea. ²Orizon S.A., Corp., Santiago, Chile. ³KEIL, Seoul, Korea. ⁴Entomo, Cheongju, Korea. ⁵E-wha oil & fat Industry Corp., Busan, Korea. ⁶Mineral premix contains (1 kg) 80 g MgSO₄·7H₂O, 369.64 g NaH₂PO₄·2H₂O, 130 g KCl, 40 g Ferric citrate, 20 g ZnSO₄·7H₂O, 357 g Ca-lactate, 0.2 g CuCl, 0.15 g AlCl₃·6H₂O, 0.01 g Na₂Se₂O₃, 2 g MnSO₄·H₂O and 1 g CoCl₂·6H₂O. ⁷Vitamin premix contains (1 kg) 121 g L-ascorbic acid, 19 g DL- α 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. ⁸Lysoforte™ Dry, KEMIN Korea Co. Ltd., Seongnam, Korea. Con, control; MW, mealworm; deMW, defatted mealworm; BSF, black soldier fly; deBSF, defatted black soldier fly.

실험새우(0.47±0.03 g)는 총 20개의 수조(210 L)에 23마리씩 무작위로 사료구 당 4반복으로 배치되었다. 사육실험 중 수

질은 1일 1회 측정되었으며, 평균 수온은 28.2±1.25°C, 용존산소는 5.15±1.09 mg/L, pH는 7.25±0.25, 염분은 29.1±19 psu, 암모니아는 0.021±0.01 mg/L로 유지되었다. 실험사료는 새우 체중의 4-8%를 1일 6회(08:30, 10:30, 12:30, 14:30, 16:30, 18:30)에 걸쳐 총 45일간 공급되었다. 실험수조의 광주기는 형광등을 통해 조절되었고, 사육수는 수질을 고려하여 2-3일 간격으로 환수하였다. 사육실험은 제주대학교 동물실험윤리위원회의 윤리규정(승인번호, 2019-0039)을 준수하며 실시되었다.

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 실험새우를 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°C)하였다. Hemolymph는 비특이적 면역력 지표인 대식세포(nitroblue 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°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 Garcés and Mancha (1993)의 방법을 기초로 전처리 한 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.

TRIzol® (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 실험새우의 간체장 내 RNA를 추출하였다. Nano drop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, NC, USA)를 이용하여 RNA의 순도 (OD₂₆₀/OD₂₈₀, 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 β-actin (F-5'-GAGCAACACGGAGTTTCGTTGT-3', R-5'-CATCACCAACTGGGACGACATGGA-3')을 이용하였다. 새우의 면역에 관련된 인자인 penaeidine (F-5'-CACCTTCGTGAGACCTTTG-3', R-5'-AATATCCCTTTCCACGTGAC-3'), crustin (F-5'-GAGGGTCAAGCCTACTGCTG-3', R-5'-ACTTATCFAFFCCAFCACAC-3'), proPO (F-5'-TCATTCCGTCCTGCTG-3', R-5'-GGCTTCGCTCTGGT-TAGG-3')의 발현량을 측정하였다. 발현량은 thermal cycler dice (real time system III; Takara, Shiga, Japan)를 이용하여 측정하였다.

침지감염실험

사육실험 종료 후, 급성간체장괴사병(acute hepatopancreatic necrosis disease)의 원인균으로 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 수조 당 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 × 10⁶ colony forming unit (CFU)/mL 농도가 되도록 계산하여 각 수조에 침지하였다. 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)에 나누어 공급하였다. 침지감염실험은 총 4일(96시간) 동안 진행되었고, 1시간 간격으로 수조 내 폐사를 관찰하고 기록하였다. 폐사 개체를 뜯개를 이용하여 수조에서 제거하였다. 실험새우 간체장 내 *V. parahaemolyticus*의 독소로 알려져 있는 *Photobacterium* insect-related (*PirA*) toxin gene의 함량을 분석하였다. 실험새우의 간체장은 실험구 당 3마리씩 균 침지 전(0시간)과 균 침지 후 경과 시간(12, 96시간)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)와 혼합하였고, thermal cycler dice (real time system III; Takara, Shiga, Japan)를 이용하여 발현량을 측정하였다. Primer

는 VpPirA-F (5'-TTGGACTGTCTGAACCAAACG-3'), VpPirA-R (5'-GCACCCCATTTGGTATTGAATG-3')를 이용하였다(Han et al., 2015a). qPCR은 denaturation (95°C, 20초), 40 cycle (95°C, 1초, 60°C, 20초) 조건하에 분석되었다.

통계 분석

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.

결 과

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. 1). 새우의 간체장 내 *V. parahaemolyticus* 독소의 양은 침지 12시간 후에 탈지 여부에 상관없이 곤충박 실험구가 대조구에 비해 낮았다(Table 3). 사육실험의 경우, 새우 간체장의 proPO 발현량은 탈지갈색거저리구가 대조구에 비해 유의적으로 높았고, 그 외 곤충박 실험구에서도 높은 경향을 보였다(Table 4). 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 탈지곤충박 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. 탈지

Table 3. 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 × 10⁶ colony forming unit/ml) infection challenge

Dietary treatments	0 h	12 h	96 h
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). 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). nd, not detected.

갈색거저리구의 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 5). 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. 실험새우의 일반성분과 근육 내 지방산의 조성은 모든 실험구 사이에 유의적인 차이가 없었다(Table 6, Table 7).

고 찰

이번 연구에서 탈지곤충박은 탈지 처리를 하지 않은 곤충박에 비해 *V. parahaemolyticus*에 대한 저항성 증진에 보다 높은 효과를 보였다(Fig. 1). 탈지곤충박은 원료를 가공하는 과정에서 지질을 제외한 물질의 함량(단백질, chitin, 미지성장인자 등)이 비탈지곤충박에 비해 상대적으로 증가하였고, chitin과 같은 생리활성 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 탈지동애등에가 비탈지갈색거저리와 비탈지동애등에에 비해 높았다(Table 1). 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

Table 4. Innate immune response and anti-oxidant enzyme activity of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets for 45 days

Parameters	Con	MW	deMW	BSF	deBSF
PO ¹	0.23±0.02 ^b	0.29±0.02 ^a	0.27±0.02 ^a	0.28±0.01 ^a	0.29±0.02 ^a
SOD ²	82.8±1.29 ^b	86.7±2.41 ^a	87.1±2.17 ^a	88.5±1.65 ^a	87.5±0.97 ^a
GPx ³	3.52±0.28	3.74±0.51	4.23±0.86	4.10±0.68	4.54±0.33
NBT ⁴	2.70±0.09	2.97±0.15	2.91±0.43	2.68±0.49	3.07±0.12
Anti-protease ⁵	19.0±4.53	20.4±4.74	19.7±4.49	20.1±1.27	21.3±3.46
Cholesterol ⁶	10.7±2.15 ^a	9.29±2.03 ^b	9.75±1.52 ^{ab}	9.20±3.21 ^b	9.54±3.84 ^{ab}
Triglyceride ⁶	10.9±2.70	11.0±1.99	10.8±2.48	11.1±2.94	10.6±2.13
Prophenoloxidase ⁷	1.00±0.71 ^b	3.98±0.95 ^{ab}	4.21±0.24 ^a	3.41±0.44 ^{ab}	3.34±0.21 ^{ab}
Crustin ⁷	1.00±0.37	3.48±0.64	2.45±0.84	2.15±0.76	2.49±0.62
Penaedine-3c ⁷	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). ¹Phenoloxidase activity (absorbance). ²Superoxide dismutase (% inhibition). ³Glutathione peroxidase (mU/mL). ⁴Nitro-blue tetrazolium activity (absorbance). ⁵(% inhibition). ⁶(mg/dL). ⁷The expression of three genes in shrimp hepatopancreas were normalized to β-actin and expressed relative to control. 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).

Table 5. Growth performance, feed utilization and survival of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (initial body weight, 0.47±0.03 g) fed the experimental diets for 45 days

Dietary treatments	FBW ¹	SGR ²	FCR ³	PER ⁴	FI ⁵	Survival (%)
Con	6.66±0.22	5.89±0.07	1.40±0.06 ^{ab}	1.81±0.07 ^{ab}	8.66±0.13	87.6±9.54
MW	6.87±0.53	5.96±0.17	1.44±0.06 ^a	1.75±0.08 ^b	9.19±0.40	92.4±6.52
deMW	7.03±0.36	6.01±0.12	1.38±0.02 ^{ab}	1.83±0.03 ^{ab}	9.02±0.47	91.3±3.55
BSF	7.10±0.42	6.03±0.13	1.36±0.06 ^b	1.90±0.08 ^a	8.98±0.29	93.5±5.61
deBSF	7.06±0.35	6.02±0.11	1.38±0.03 ^{ab}	1.86±0.04 ^{ab}	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). ¹Final body weight (g)=final mean body weight-initial mean body weight. ²Specific growth rate (%)=[(log₁₀ final body weight-log₁₀ initial body weight)/days]×100. ³Feed conversion ratio=feed intake/wet weight gain. ⁴Protein efficiency ratio=wet weight gain/total protein given. ⁵Feed intake (g)=dry feed consumed (g)/the number of shrimp. 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).

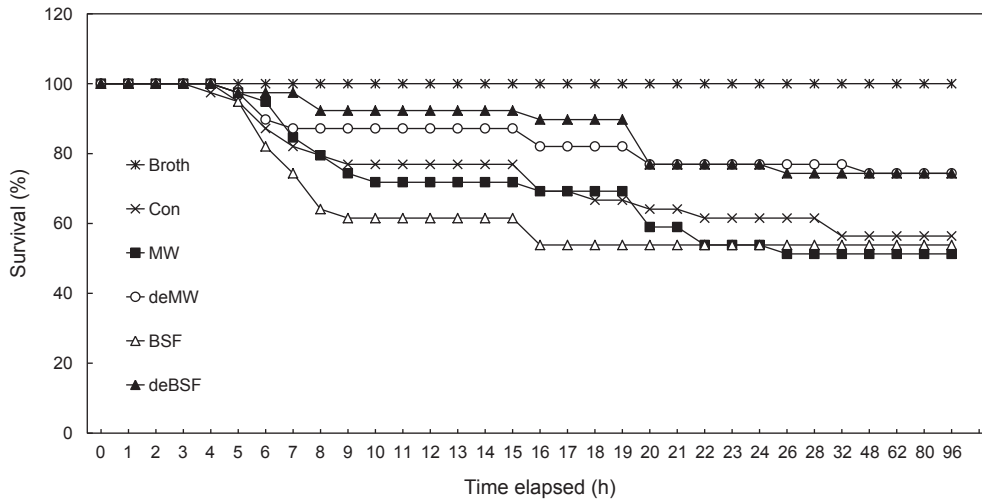


Fig. 1. Survival of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets for 45 days during the challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. The shrimp were immersed with *V. parahaemolyticus* suspension containing 2×10^6 colony forming unit/ml. The water in each tank was exchanged 6 h 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).

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 활성, 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 활성은 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 동애등예의 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 띠는 것으로 알려져 있다(Askarian et al., 2012). 뿐만 아니라 chitin은 유

Table 6. Proximate composition (% wet basis) of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed the experimental diets for 45 days

Dietary treatments	Crude protein	Crude lipid	Crude ash	Moisture
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
deBSF	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 ($P < 0.05$). 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).

Table 7. Fatty acid composition (% lipid) of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* muscle fed the experiment diets for 45 days

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
$\sum n-3^1$	14.2	13.8	13.8	14.2	12.4
$\sum n-6^2$	11.9	13.4	13.2	13.5	12.9
n-3/n-6	1.19	1.03	1.04	1.05	0.96

¹Sum of n-3 polyunsaturated fatty acids. ²Sum of n-6 polyunsaturated fatty acids. 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).

산균(lactic acid bacteria)의 성장에 필요한 물질로서, 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 3), 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). PO는 균의 세포벽 내 lipopolysaccharides와 β -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_2^-)를 H_2O_2 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 tene-

cin과 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 단백질원으로 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(β -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 동애등에를 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, 동애등에와 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 5, Table 6, Table 7). 곤충은 지질의 함량이 대체로 높아 어분대체원으로 사용할 경우에는 사료 내 최대 이용함량을 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 1). Panini et al. (2017b)은 사료 내 어분을 지질의 함량이 30%인 갈색거저리로 모두 대체할 경우, 흰다리새우의 지질 함량이 증가된다고 보고하였다. 이와는 반대로 탈지동애등에와 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(Panini et al., 2017b; Nogales-Mérida et al., 2019). 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 체조성에 변화를 일으킬 가능성이 높다고 사료된다. 따라서, 탈지 곤충박은 비탈지곤충박에 비해 지질의 함량이 낮아 새우 사료에 단백질원료로서 보다 많은 양을 사용할 수 있을 것이라고

생각된다.

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

사 사

이 논문은 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(2019R1A6A1A03033553)과 이공학개인기초연구(NRF-2018RID1A3B07046053)입니다.

References

- Abdel-Ghany HM and Salem MES. 2020. Effects of dietary chitosan supplementation on farmed fish; a review. *Rev Aquac* 12, 438-452. <https://doi.org/10.1111/raq.12326>.
- Akiyama DM, Dominy WG and Lawrence AL. 1992. Penaeid shrimp nutrition. In: *Marine shrimp culture principles and practice*. Fast AW and Lester LJ, 1st 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. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.08.019>.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2005. *Official methods of analysis*. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, U.S.A. <https://doi.org/10.1002/0471740039.vec0284>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.016>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.04.008>.
- Bruni L, Pastorelli R, Viti C, Gasco L and Parisi G. 2018. Characterisation of the intestinal microbial communities of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fed with *Hermetia illucens* (black soldier fly) partially defatted larva meal as partial dietary protein source. *Aquaculture* 487, 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.006>.
- Cerenius L and Söderhäll K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev* 198, 116-126. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x>.
- 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, 1-9. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v40i1.39077>.
- 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* 54, 738-746. <https://doi.org/10.1080/00071668.2013.838746>.
- 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>.
- 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.
- 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, Rome, Italy, 227.
- Foysal 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. <https://doi.org/10.7717/peerj.6891/supp-1>.
- Fridovich I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 201, 1203-1209. <https://doi.org/10.1242/jeb.201.8.1203>.
- 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. <https://doi.org/10.1038/srep30893>.
- 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>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734333>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.024>.
- Han JE, Tang KF, Tran LH and Lightner DV. 2015b. *Photorehabilitation* 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. <https://doi.org/10.3354/dao02830>.
- Henry MA, Gasco L, Chatzifotis S and Piccolo G. 2018. Does dietary insect meal affect the fish immune system? The case of mealworm, *Tenebrio molitor* on European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Dev Com Immunol* 81, 204-209. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.12.002>.
- Henry MA, Gasco L, Piccolo G and Fountoulaki E. 2015. Review on the use of insects in the diet of farmed fish: past and future. *Anim Feed Sci Technol* 203, 1-22. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.03.001>.
- 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. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(95\)02033-0](https://doi.org/10.1016/0742-8413(95)02033-0).
- 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. <https://doi.org/10.3390/ani9030100>.
- 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>.
- 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. <https://doi.org/10.3382/japr.2010-00162>.
- 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 Lett* 439, 41-45. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01333-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01333-7).
- Li Y, Kortner TM, Chikwati EM, Munang'andu HM, Lock EJ and Krogdahl Å. 2019. Gut health and vaccination response in pre-smolt Atlantic salmon *Salmo salar* fed black soldier fly *Hermetia illucens* larvae meal. *Fish Shellfish Immunol* 86, 1106-1113. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.12.057>.
- 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/art-clView.do> on Aug 17, 2021.
- Motte C, Rios A, Lefebvre T, Do H, Henry M and Jintasataporn 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. <https://doi.org/10.3390/ani9050258>.
- Ng WK, Liew FL, Ang LP and Wong KW. 2001. Potential of mealworm *Tenebrio molitor* as an alternative protein source in practical diets for African catfish *Clarias gariepinus*. *Aquac Res* 32, 273-280. <https://doi.org/10.1046/j.1355-557x.2001.00024.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/B978-8-12-800268-1.00002-0>.
- 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>.
- 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* 372-375, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.10.021>.
- 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. <https://doi.org/10.1111/raq.12281>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.008>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.017>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.12.027>.
- 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>.
- 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. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0191-3>.
- Rosen H. 1957. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Arch Biochem Biophys* 67, 10-15. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(57\)90241-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(57)90241-2).
- Shiau SY and Yu YP. 1998. Chitin but not chitosan supplementation enhances growth of grass shrimp *Penaues monodon*. *J Nutr* 128, 908-912. <https://doi.org/10.1093/jn/128.5.908>.
- 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 Aquatic Sci* 53, 900-908. <https://doi.org/10.5657/kfas.2020.0900>.
- Song YL and Li CY. 2014. Shrimp immune system-special focus on penaeidin. *J Mar Sci Technol* 22, 1-8. <https://doi.org/10.6119/JMST-013-0813-1>.
- 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. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12304>.
- 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.
- 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. <https://doi.org/10.3920/JIFF2018.0020>.
- 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. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-280>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.018>.
- 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* 35, 225-230. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.03.030>.
- Xiao X, Jin P, Zheng L, Cai M, Yu Z, Yu J and Zhang J. 2018. Effects of black soldier fly *Hermetia illucens* larvae meal protein as a fishmeal replacement on the growth and immune index of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquac Res* 49, 1569-1577. <https://doi.org/10.1111/are.13611>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.001>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.016>.