

飼料의 n-3系 高度不飽和脂肪酸 含量에 따른 조피볼락  
*Sebastes schlegeli*의 成長 및 生化學的 變化  
II. 血液成分 變化 및 肝細胞 性狀

李尚旻 · 李鍾允 · 姜龍珍 · 許聖範\*

國立水產振興院 魚類養殖科 · 釜山水產大學校 養殖學科\*

Effects of Dietary n-3 Highly Unsaturated Fatty Acids on Growth and  
Biochemical Changes in the Korean Rockfish *Sebastes schlegeli*  
II. Changes of Blood Chemistry and Properties of Liver Cells

Sang-Min LEE, Jong Yun LEE, Young Jin KANG, and Sung Bum HUR\*

Fish Culture Division, National Fisheries Research  
and Development Agency, Yangsan-gun,  
Kyongsangnam-do 626-900, Korea

\*Department of Aquaculture, National Fisheries University of Pusan,  
Nam-gu, Pusan 608-737, Korea

ABSTRACT

To define the effects of various levels (0~1.5%) of dietary n-3HUFA on the physiological changes in the Korean rockfish, variations in blood variables and hepatocytes were studied. Biochemical serum analyses, lactate dehydrogenase (LDH) activity of the liver cytosol and ATPase activity of the liver microsomal membrane were also studied.

The haematological values (red blood cell, hemoglobin, hematocrit, MCHC, MCV and MCH) were not significantly different in the experimental groups ( $P \geq 0.05$ ). The total protein and glucose levels in the serum were affected by dietary n-3HUFA levels. These levels in groups fed n-3HUFA insufficient diets were significantly lower than those of n-3HUFA sufficient groups ( $P < 0.05$ ). Serum levels of total cholesterol, free cholesterol, glutamic pyruvic transaminase (GPT) and glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) showed significantly higher values in the fish fed n-3HUFA deficient diets ( $P < 0.05$ ). The LDH in the serum was dropped with increasing dietary n-3HUFA levels, but the LDH activity of the liver cytosol was elevated.

Histologically, the hepatic cell in the fish fed n-3HUFA free diet was abnormal and showed a necrotic condition.  $Ca^{2+}$ -ATPase activities of the liver microsomal membrane were significantly lower in the fish fed n-3HUFA deficient diets than in those fed n-3HUFA sufficient diets ( $P < 0.05$ ).

These results suggested that the liver cell membrane was affected by dietary fatty acid compositions and cell membrane of the fish fed n-3HUFA insufficient diets showed abnormalities.

## 緒 論

體內代謝 障礙를 診斷하는 수단으로 사용되고 있는 가장 일반적인 방법은 그 동물의 血液成分의 변화를 조사하는 것이다. 이러한 방법이 魚類에도 적용될 수 있다는 연구가 일부 수행되어 있어(Inui 1969 ; Inui and Yokote 1977 ; Munkittrick and Leatherland 1983 ; Lemaire et al. 1991), 各 魚種의 정상 혈액 성분치만 조사되어 있으면, 血液成分의 변화로 어체의 健康狀態를 어느 정도 판단할 수 있을 것으로 생각된다. 또한, 많은 연구자들은 飼料의 必須營養素 缺乏이나(Barnhart 1969 ; Kawatsu 1972, 1975 ; Murai and Andrews 1974 ; Poston et al. 1976 ; Hung et al. 1981 ; Watanabe et al. 1981 ; Shimma et al. 1982 ; Murai et al. 1982 ; Cowey et al. 1981, 1983 ; Wilson et al. 1984 ; Mosconi-Bac 1987), 그 魚種이 처해있는 서식 환경 및 성장 상태에 따라서도(Cameron 1970 ; Nelson and Shore 1974 ; Lane 1979 ; Munkittrick and Leatherland 1983 ; Eaton et al. 1984 ; Rogie and Skinner 1985 ; Babin 1987a, b ; Garrido et al. 1990) 組織이나 血液成分이 변화된다고 발표하였다.

체내 기관들 중 특히, 肝은 物質代謝에 중추적인 역할을 하는 기관으로서 肝機能이 저하되면 체내에 많은 변화가 초래되므로, 肝機能의 評價는 그 동물의 健康狀態를 판단할 수 있는 중요한 수단이다. 어류도 飼料의 必須脂肪酸(essential fatty acid, EFA)이 결핍되면 肝과 같은 중요한 대사 기관에 이상 증세가 초래된다고 보고되어 있다(Castell et al. 1972a, b ; Watanabe et al. 1989 ; Bell et al. 1991 ; Lemaire et al. 1991). 이러한 현상은 生體膜을 구성하는 극성 지질의 脂肪酸組成에 따라 細胞內 代謝가 변화되었기 때문으로 해석된다(Stubbs and Smith 1984). Holmes and Kummerow (1985), Conroy et al. (1986)과 Lee et al. (1986)은 肝細胞의 microsomal membrane의 ATPase 활성이 細胞膜의 脂肪酸組成에 따라 변화된다고 육상 동물을 대상으로 보고하였는데, microsomal membrane은 脂質代謝와 細胞內의  $Ca^{2+}$  濃度を 조절하는 기능을 가지고 있다. 魚類에서의 기본적인 代謝經路는 육상 동물과 같을 것으로 판단되는데, 즉 위에서 언급한 細胞膜의 物質輸送 能力 등에 관련된 細胞膜 性狀이 飼料나 體構成 EFA 組成비에 따라서 매우 달라질 것이 충분히 추측된다. 하지만 魚類를 대상으로 이에 대해 수행된 연구가 거의 없으므로, EFA 缺乏에 따른 症狀를 生化學的으로 접근하기에는 기초적인 지식이 매우 부족한 실정이다.

앞 實驗(李 等 1993)에서 n-3系 高度不飽和脂肪酸(n-3 highly unsaturated fatty acids, n-3HUFA)이 조피볼락의 EFA임을 밝혀 適正成長을 위해서는 飼料脂質 중에 適正量(1.2% 전후)의 n-3HUFA가 함유되어야 할 것으로 밝혔고, n-3HUFA가 부족한 實驗區에서는 成長 및 營養素 蓄積效率이 低下되었다. 하지만 EFA 부족으로 타 어종에서 흔히 발생하는 외적인 副作用 즉, 폐사, 지느러미 부식 및 표피 탈색 등의 症狀(Higashi et al. 1966 ; Pacha 1968 ; Castell et al. 1972a)은 관찰되지 않았고, 단지 肝의 退色 및 中性脂質이 증가되어 있어 飼料의 n-3HUFA 부족이 肝機能을 저하시킬 수 있는 가능성을 지적한 바 있다. 이와 같은 징후가 飼料 n-3HUFA 부족으로 인한 肝代謝 障礙로 여겨지나 조피볼락의 경우 이를 뒷받침할 수 있는 정보가 없다. 그래서 本研究은 조피볼락의 EFA인 飼料의 n-3HUFA가 어체에 미치는 生化學的인 영향을 검토하기 위해 飼料의 n-3HUFA 含量이 각각 다른 實驗飼料로 飼育한 조피볼락의 血液性狀, 血清成分, 肝組織과 細胞膜에 존재하는 酵素活性의 변화를 조사하였다.

## 材料 및 方法

飼料의 n-3HUFA 含量이 0~1.5% 되도록 製造한 6종의 實驗飼料로 10週間 飼育한 조피볼락(平均體重 16~34 g)을 대상으로 實驗을 실시하였으며, 各 實驗區에서 60마리(血液, 血清成分 및 肝組

織用: 15 마리×3 반복, 肝 cytosol 및 microsomal membrane 추출용: 5 마리×3 반복)씩 추출하여 分析에 사용하였다.

### 血液性狀

血液은 測定前日 絶食시킨 실험어의 미부동맥에서 일회용 주사기로 채혈하였다. 採血한 血液 중 일부는 血液性狀을 조사하기 위해서 항응고제인 heparin-Na (Sigma, 100,000 units)을 血液 1 cc당 0.05 cc로 처리한 complete blood cell count 병 (녹십자사)에 넣어 red blood cell (RBC) 수, hemoglobin (Hb) 量과 hematocrit (Ht) 치를 測定하고, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) 및 mean corpuscular hemoglobin (MCH)을 계산하였다. 赤血球性狀을 조사하기 위해 헤파린처리 血液을 즉시 혈구염색 (Wright-Giemsa stain)하여 현미경으로 관찰하였다. RBC 수는 Hayem 씨액 (Ishisu)으로 血液을 희석시켜 Thoma 혈구 계산판과 red cell pipet를 사용하여 계수하였으며, Hb는 cyanmethemoglobin 법으로, Ht는 모세관법으로 microhematocrit 법을 사용하여 각각 測定하였다. MCV, MCHC, MCH는 다음과 같은 계산식으로 하였다.

$$MCV (\mu\text{m}^3, \text{平均赤血球 容積}) = \text{Ht} (\%) \times 10^7 / \text{RBC}$$

$$MCHC (\%, \text{平均赤血球 헤모글로빈 濃度}) = \text{Hb} \times 100 / \text{Ht}$$

$$MCH (\text{pg} = 10^{-12}\text{g}, \text{平均赤血球 헤모글로빈 量}) = \text{Hb} \times 10^7 / \text{RBC}$$

### 血清成分

血清成分은 채혈한 血液을 실온에 30 分間 방치한 후 3,000 rpm에서 10 分間 원심 분리하여 상층액을 -70 °C에 동결 보존하면서 1 주 이내에 分析하였다. 血清分析은 臨床用 kit (아산제약)를 사용하여 total protein은 biuret 법으로, glucose, total cholesterol 및 free cholesterol은 酵素法으로, GPT (glutamic pyruvatic transaminase)와 GOT (glutamic oxaloacetic transaminase)는 Reitman-Frankel 法으로, LDH (lactate dehydrogenase)는 酵素法(젖산기질법)으로 分析하였다.

### 肝組織

實驗區別로 3尾씩 肝을 제거하여 Bouin's solution에 고정한 후 70~100% 알콜에 탈수하고, paraffin으로 포매하여 4 μm씩 절편한 것을 hematoxylin-eosin 염색하여 관찰하였다.

### 肝의 cytosol 및 microsomal membrane 酵素活性

肝의 cytosol과 microsomal membrane은 Lowrey et al. (1981)이 사용했던 방법을 응용하여 추출하였다. 즉, 저온실(4 °C)에서 어체의 머리에 충격을 가하여 즉사시킨 후, 肝을 즉시 분리, 각각 모은 후 ice-cold 3 mM EDTA, 154 mM KCl (pH 7.4)의 완충액으로 2~3 회 세척하여 불순물을 제거한 肝을 9 배의 동일 완충액으로 Teflon-glass Potter-Elvehjem homogenizer (Pyrex)에서 파쇄 혼합하였다. 이 혼합액을 600 xg, 10 분간 원심 분리 (Sorvall RC5C centrifuge, HS-4 rotor, 4 °C)한 후, 상등액을 9,000 xg, 15 분간 원심 분리 (Sorvall RC5C, SS-34 rotor, 4 °C)하여 남은 상등액을 105,000 xg, 60 분간 원심 분리 (Beckman L8-80M ultra centrifuge, 80TI rotor, 4 °C)시켰다. 여기서 얻은 상등액을 cytosol로 취해, LDH 活性 측정용으로 즉시 -70 °C에 보관 후 cytosol의 LDH 活性를 측정하였다. 침전물은 적당량의 ice-cold Tris-maleate (50 mM Tris, 50 mM maleate, 100 mM KCl, pH 7.4) 완충액으로 희석시켜 재차

105,000 xg, 60 분간 다시 원심 분리한 후, 일부는 脂肪酸 分析用으로 -70°C에 냉동 보관하고, 나머지는 즉시 Tris-maleate 완충액으로 적당히 희석시켜 protein 량을 bovine albumin (Sigma)을 標準品으로 하여 Lowry et al. (1951) 方法에 따라 측정된 후, ATPase 活性을 측정하였다.

肝의 microsomal membrane의  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性은 Hwang (1990)이 사용했던 방법을 다소 변형시켜 측정하였다. 즉,  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性測定의 경우, 1.0 mg protein/ml microsomal membrane의 crude protein, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 2 mM ATP (sigma), 50 mM KCl과 5 mM의  $CaCl_2$ 를 혼합하여 shaking water bath로 25°C에서 30 분간 incubation 시킨 후, 2 ml를 취하여 15% TCA 용액으로 반응을 정지시켰다. 이것을 3,000 rpm, 10 분간 원심 분리시켜 상등액 1 ml를 취하여 유리되어 나오는 Pi를 Fiske and Subbarow (1925)의 방법으로 측정하여 계산하였다.

脂肪酸 分析을 위한 總脂質의 추출은 Folch et al. (1957)의 방법에 준하여 하였고, 극성 지질의 分劃은 Juaneda and Rocquelin (1985)의 방법에 따랐다. 분리한 극성 지질은 14%  $BF_3$ -methanol로 methylation시킨 후, gas chromatography (Varian 3400)로 脂肪酸을 分析하였으며 分析條件은 前報(李等 1993)와 같다.

### 統計處理

모든 結果는 ANOVA-test를 실시하여 Duncan's Multiple Range Test (Duncan 1955)로 平均間의 有意性을 검정하였고, 回歸分析을 실시하여 相關關係를 표시하였다.

## 結 果

### 血液性狀

血液性狀(RBC 184~245  $10^4/mm^3$ , Hb 9.3~10.2 g/100 ml, Ht 28.1~32.4%, MCHC 29.8~34.6 g/100 ml, MCV 128~155  $\mu m^3$ 와 MCH 40~54  $10^{-9}$  mg)은 各 實驗區間에서 有意인 차이를 보이지 않아 사료의 n-3HUFA 含量과 血液性狀과의 相關性을 確實히 밝힐 수 없었다(Table 1과 Fig. 1).

### 血清成分

血清成分은 Table 1과 Fig. 2에 나타낸 바와 같다. 먼저 血清蛋白質濃度(2.76~3.63 g/100 ml)를 살펴보면, 飼料 n-3HUFA 0.9%까지는 증가하다가 그 이상에서는 일정한 값(3.45~3.63 g/100 ml)을 유지하였다.

血糖量(36~71 mg/100 ml)은 飼料의 n-3HUFA 含量이 增加할수록 有意인 차이를 보이면서 增加하였으나 ( $p < 0.05$ ), n-3HUFA 0.9% 이상의 實驗區間에서는 67.07~70.63 mg/100 ml 범위로 有意인 차이가 없었다.

Total cholesterol 濃度(137~86 mg/100 ml)는 n-3HUFA 含量이 높은 實驗區에서 낮아지는 경향을 나타내다가 n-3HUFA 0.9% 이상인 實驗區에서는 97~86 mg/100 ml로 더 이상 감소하지 않았다. Free cholesterol 濃度(84.2~63.8 mg/100 ml)는 total cholesterol 농도 변화와 유사한 경향을 보였는데, 飼料 1과 5 이외의 實驗區間에서는 변화폭이 적어 有意인 차이를 보이지 않았다 ( $p \geq 0.05$ ).

血清 GOT 및 GPT은 각각 159.7~47.0 (Karmen unit), 28.0~11.1 (Karmen unit)의 범위로 實驗區間에 有意인 차이를 나타내면서 飼料의 n-3HUFA 含量이 높을수록 減少하여 飼料 5에서 가장 낮았다 ( $p < 0.05$ ). LDH도 3888~1539 (W-unit)의 범위에서 GOT와 GPT의 변화 경향과 비슷하게 나타났으나 統計學的으로 有意인 차이는 없었다.

Table 1. Hematological changes of the Korean rockfish fed diets with various levels of n-3HUFA for the test of the changes of blood chemistry and liver cell properties

Diet	1	2	3	4	5	6	SEM <sup>1</sup>
n-3HUFA level (%)	0.0	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5	
RBC (10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> )	245 <sup>a</sup>	222 <sup>a</sup>	258 <sup>a</sup>	212 <sup>a</sup>	193 <sup>a</sup>	184 <sup>a</sup>	28.13
Hb (g/100 ml)	9.3 <sup>a</sup>	9.9 <sup>a</sup>	10.2 <sup>a</sup>	9.7 <sup>a</sup>	9.5 <sup>a</sup>	9.3 <sup>a</sup>	0.40
Ht (%)	29.5 <sup>a</sup>	29.5 <sup>a</sup>	31.6 <sup>a</sup>	28.1 <sup>a</sup>	32.4 <sup>a</sup>	28.2 <sup>a</sup>	2.78
MCHC (g/100 ml)	32.0 <sup>a</sup>	33.8 <sup>a</sup>	32.5 <sup>a</sup>	34.6 <sup>a</sup>	29.8 <sup>a</sup>	34.4 <sup>a</sup>	2.53
MCV (μm <sup>3</sup> )	128 <sup>a</sup>	134 <sup>a</sup>	136 <sup>a</sup>	133 <sup>a</sup>	189 <sup>a</sup>	155 <sup>a</sup>	28.59
MCH (10 <sup>-9</sup> mg)	39.7 <sup>a</sup>	45.3 <sup>a</sup>	44.0 <sup>a</sup>	45.7 <sup>a</sup>	54.3 <sup>a</sup>	51.0 <sup>a</sup>	6.82
Total protein (g/100 ml)	2.76 <sup>a</sup>	2.76 <sup>a</sup>	3.06 <sup>ab</sup>	3.45 <sup>bc</sup>	3.63 <sup>c</sup>	3.54 <sup>bc</sup>	0.16
Glucose (mg/100 ml)	43.12 <sup>ab</sup>	36.03 <sup>a</sup>	50.77 <sup>abc</sup>	67.07 <sup>bc</sup>	70.63 <sup>c</sup>	67.13 <sup>bc</sup>	7.70
Total cholesterol (mg/100 ml)	137 <sup>a</sup>	130 <sup>a</sup>	105 <sup>ab</sup>	97 <sup>b</sup>	86 <sup>b</sup>	89 <sup>b</sup>	10.10
Free cholesterol (mg/100 ml)	84.2 <sup>a</sup>	81.4 <sup>ab</sup>	75.4 <sup>ab</sup>	65.5 <sup>ab</sup>	63.8 <sup>b</sup>	65.6 <sup>ab</sup>	5.59
GOT (Karmen unit)	159.7 <sup>a</sup>	114.8 <sup>ab</sup>	122.4 <sup>ab</sup>	103.0 <sup>bc</sup>	47.0 <sup>d</sup>	58.2 <sup>cd</sup>	16.45
GPT (Karmen unit)	28.0 <sup>a</sup>	20.5 <sup>b</sup>	16.2 <sup>bc</sup>	18.1 <sup>b</sup>	11.1 <sup>c</sup>	14.9 <sup>bc</sup>	1.90
LDH (W-unit)	3888 <sup>a</sup>	3050 <sup>a</sup>	2286 <sup>a</sup>	2508 <sup>a</sup>	1539 <sup>a</sup>	1801 <sup>a</sup>	1109

Values are means from replicate groups of fish, and the means in each row with a different superscript are significantly different (p<0.05).

<sup>1</sup> Standard error of the mean, n=3.

### 肝組織 性狀

Fig. 3에 나타난 바와 같이 n-3HUFA 無添加 飼料로 사육한 實驗區의 肝組織은 飼料 6 (n-3HUFA 1.5%)에 비해, 細胞素의 構造崩壞 및 부분적인 세포 溶해가 관찰되었다.

### 肝 cytosol과 microsomal membrane의 酵素活性

肝 Cytosol의 LDH 活性은 n-3HUFA 含量이 높은 實驗區에서 높게 나타나고 있다(Fig. 4). Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性(Fig. 5)도 飼料의 n-3HUFA가 증가할수록 높아져서 n-3HUFA 1.2%에서 가장 높았다. 또한 microsomal membrane의 극성 지질 중 脂肪酸組成(Table 2)은 飼料 脂肪酸組成의 영향을 받아 n-3HUFA 含量이 높은 實驗區에서 역시 n-3HUFA가 증가하였는데, EPA (0~2.7%)보다 DHA (0~7.2%)의 증가폭이 더 높았다.

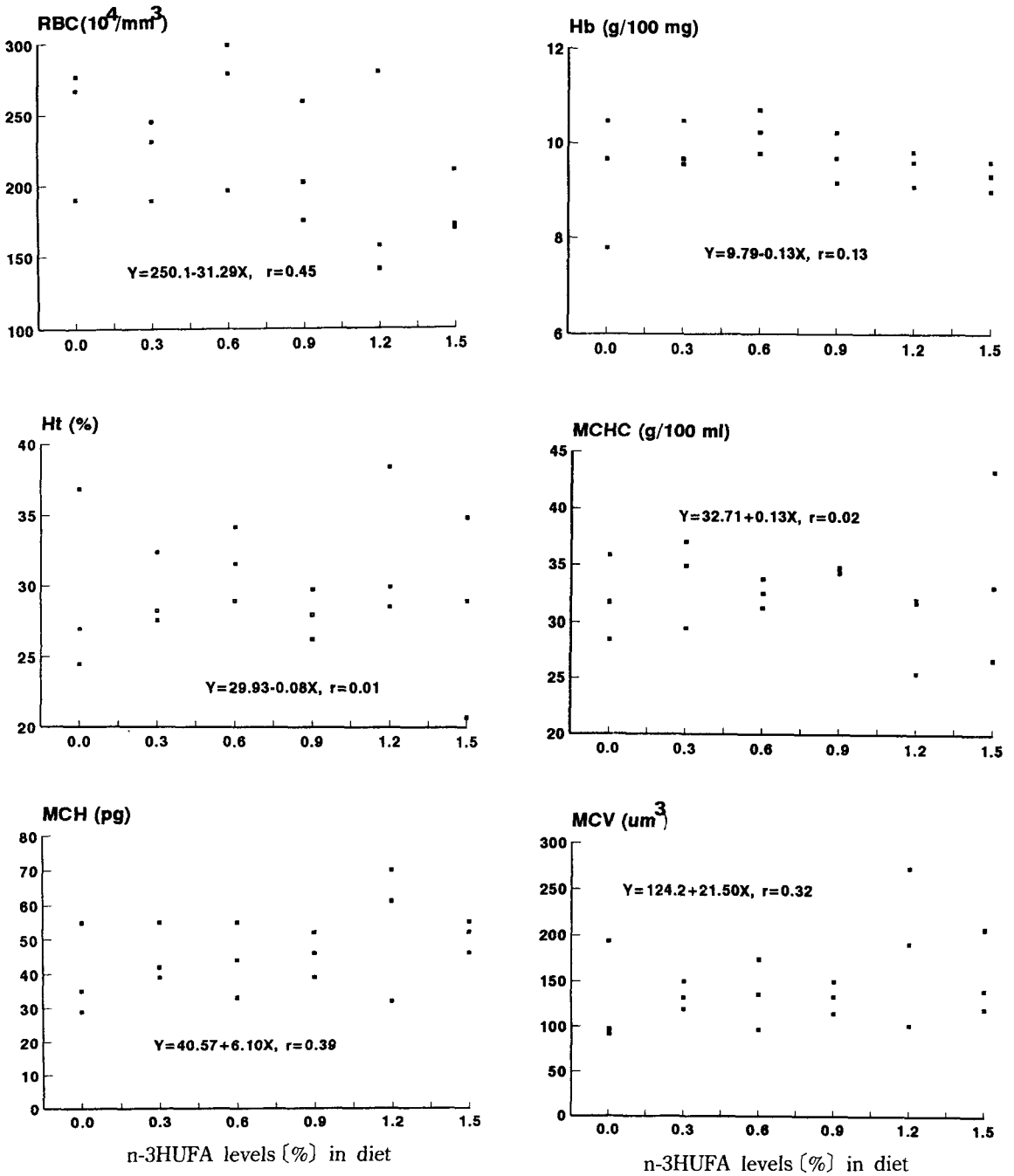


Fig. 1. Relationships between dietary n-3HUFA levels and those of RBC, hemoglobin, hematocrit, MCHC, MCV and MCH in the Korean rockfish fed diet with 6 different levels of n-3HUFA.

조피볼락의 脂肪酸 함량에 따른 血液 및 肝細胞 性状

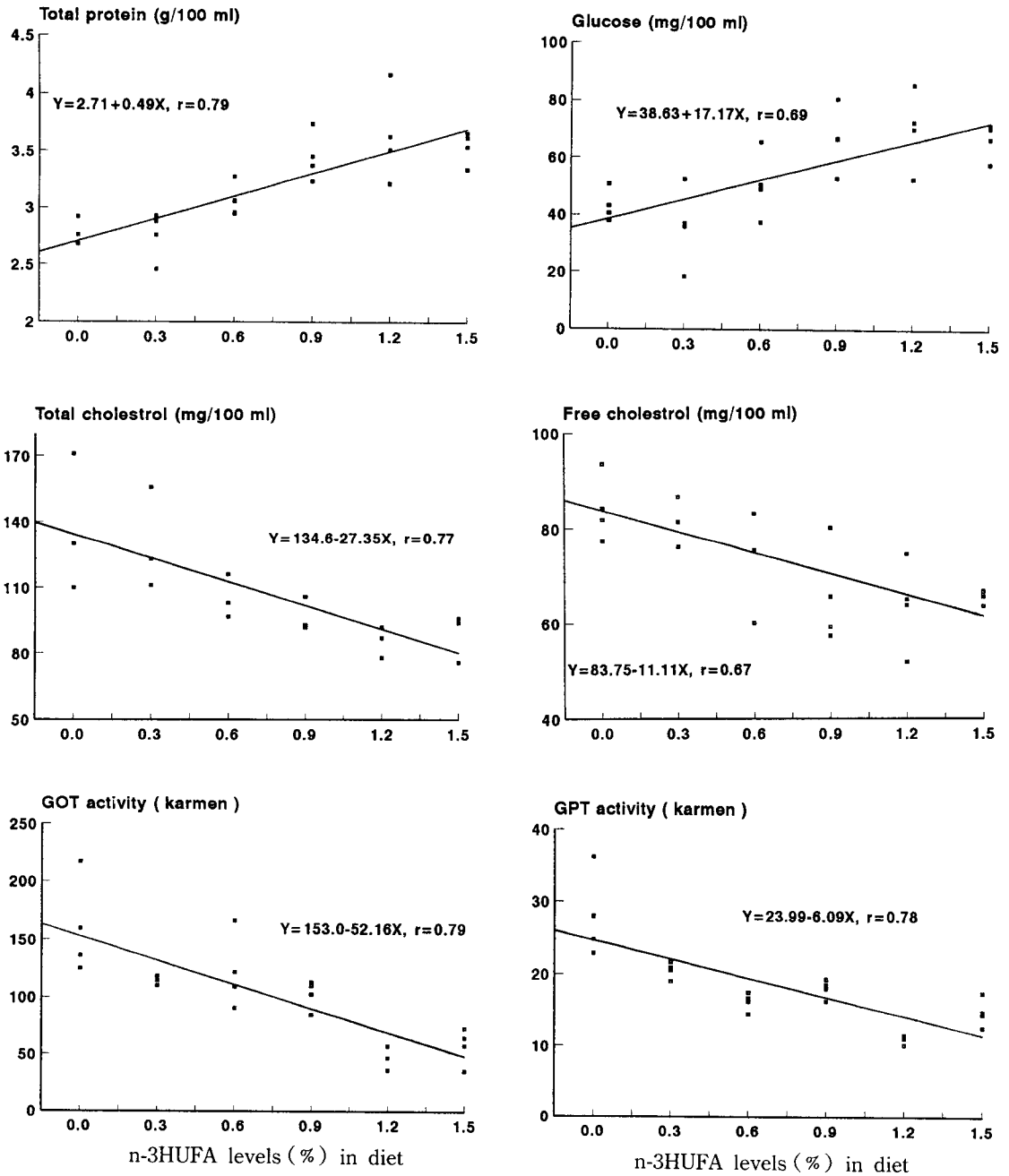


Fig. 2. Relationships between dietary n-3HUFA levels and those of total protein, glucose, total cholesterol, free cholesterol, GOT and GPT in the Korean rockfish fed diet with 6 different levels of n-3HUFA.

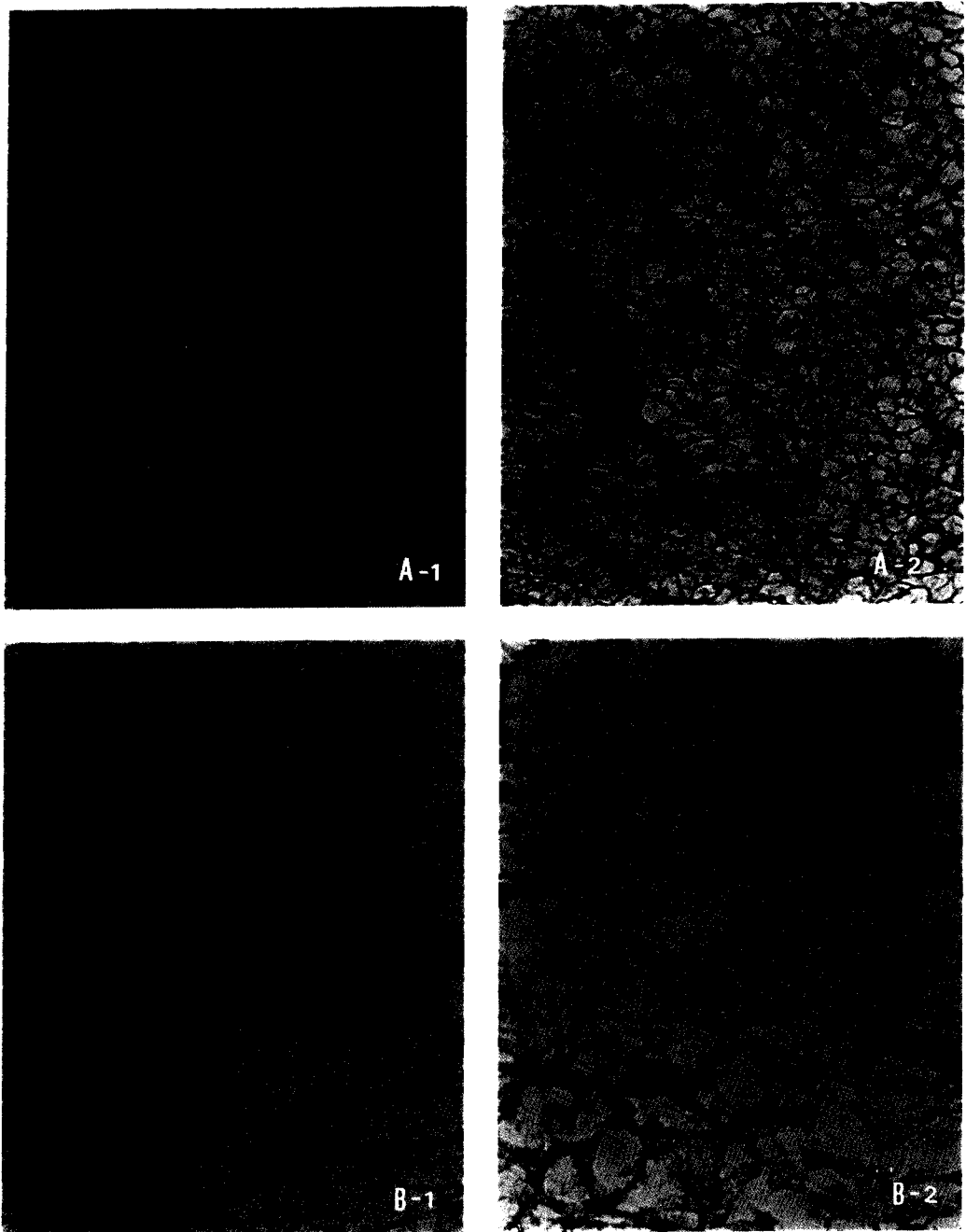


Fig. 3. Hepatocytes of the Korean rockfish fed 1.5% (A) and 0.0% n-3HUFA level (B) in the diet (A-1), x40 : (A-2), x200 : (B-1), x200 : (B-2), x400.



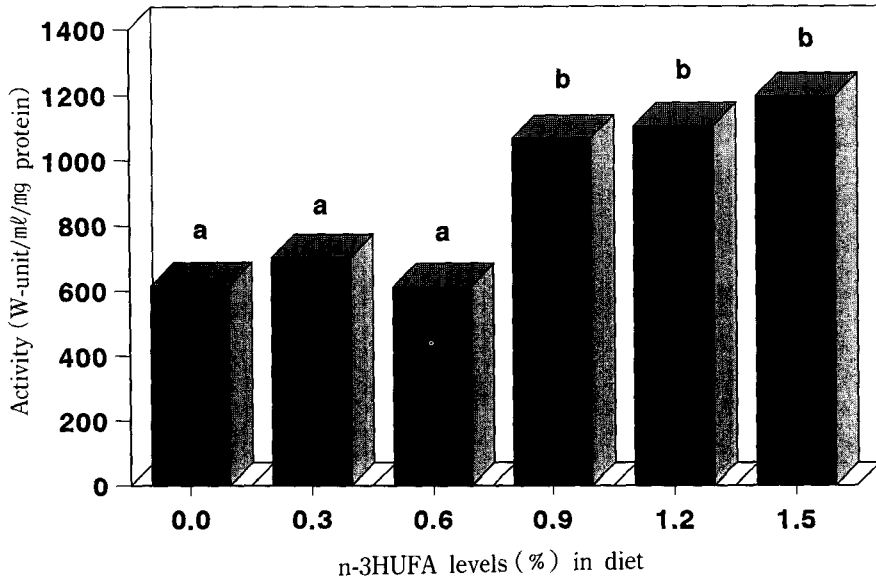


Fig. 4. LDH activity of the liver cytosol of the Korean rockfish fed diet with 6 different levels of n-3HUFA.

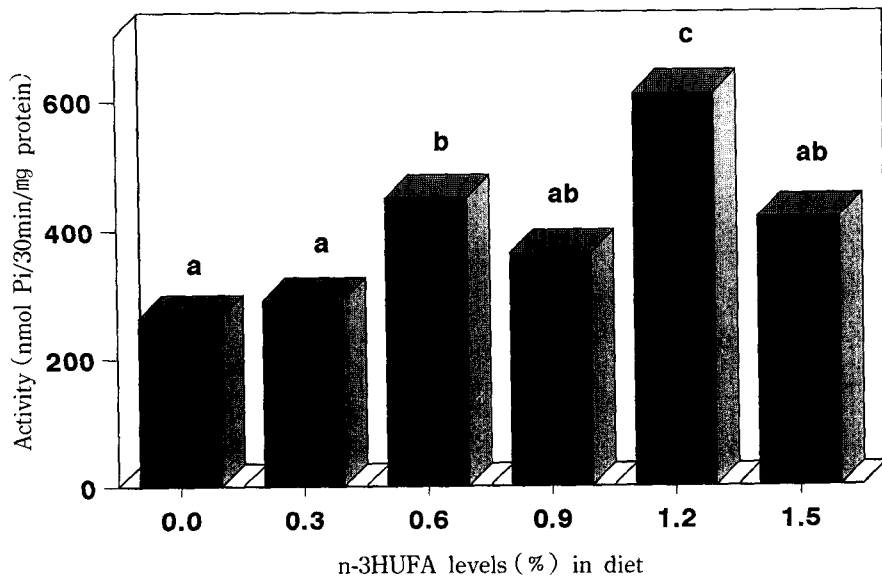


Fig. 5. Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity of the liver microsomal membrane of the Korean rockfish fed diet with 6 different levels of n-3HUFA.

Table 2. Fatty acid composition (area %) of polar lipid fractions in the liver microsomal membrane of the Korean rockfish fed various levels of n-3HUFA in the diets

Diet	1	2	3	4	5	6
n-3HUFA level (%)	0.0	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5
Fatty acids						
14:0	5.0	4.7	4.2	5.7	6.7	6.9
16:0	8.9	8.4	8.3	10.1	14.8	13.8
16:1n-7	4.8	14.3	11.3	10.8	10.0	12.3
18:0	6.9	6.5	6.8	6.7	5.3	5.8
18:1n-(7+9)	15.2	11.8	17.5	19.2	12.4	15.4
18:2n-6	11.5	9.0	10.5	9.2	5.1	4.3
18:3n-3	10.1	11.5	10.9	8.9	9.6	7.8
18:4n-6	4.3	2.6	5.6	2.3	2.8	2.1
18:4n-3	2.4	2.8	0.4	0.2	2.2	1.6
20:0	3.3	—	—	—	—	—
20:1n-9	—	—	—	0.9	1.4	1.0
20:2n-6	1.8	2.5	1.3	2.7	2.0	1.6
20:4n-6	—	—	0.4	0.2	2.4	0.6
20:4n-3	—	—	—	—	0.1	1.3
20:5n-3	—	—	0.3	0.9	1.9	2.7
22:4n-6	0.6	0.7	0.3	0.2	0.5	0.6
22:5n-6	2.7	3.7	2.9	2.7	3.4	3.1
22:6n-3	—	0.1	1.2	2.7	6.9	7.2
24:0	0.4	1.3	0.5	0.8	1.4	0.9
Σ(n-3)	12.5	15.4	12.8	11.7	20.7	20.6
Σ(n-6)	20.9	18.5	21.0	19.3	16.2	12.3
n-3HUFA <sup>1</sup>	—	0.1	1.5	3.6	8.9	11.2
(n-3)/(n-6)	0.6	0.8	0.6	0.6	1.3	1.7

<sup>1</sup> Highly unsaturated fatty acids (C≥20).

## 考 察

本實驗 結果, 血液性狀은 각 항목 별로 특별한 경향을 보이지 않았는데, 참돔(Fujii et al. 1976)과 무지개송어(Castell et al. 1972b; Greene and Selivonchick 1990)에서도 飼料의 EFA 함량에 따른 Hb 및 Ht 값의 큰 차이를 찾아볼 수가 없어 本實驗과 유사하였다. Hb와 Ht 같은 血液性狀의 변화로 정상어와 비정상어를 구별하기에는 모순이 있을 만큼 그 변화 폭이 크며, 주위 조건이나 처리 방법 등에 따라서도 아주 민감하게 변화된다고 Barham et al.(1980)이 지적하였듯이, 血液性狀으로 魚類의 健康狀態를 판단할 때에는 신중히 검토하여야 할 것으로 생각된다. 반면, EFA 외의 營養成分 缺乏이 血液性狀에 영향을 미친다는 보고로는 Brook trout (Kawatsu 1972, 1975)의 미네랄 不足 實驗區와

망어(窪田 1987)의 histidine 不足 實驗區에서 지적되고 있다. 이러한 結果들로 미루어 보아, 飼料의 EFA는 血液性狀에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 판단되나 금후 상세한 검토가 필요할 것으로 판단된다.

血液性狀과는 달리, 血清成分 및 肝細胞 性狀은 各 區間別로 뚜렷한 차이를 보였다. 血中 蛋白質濃度는 n-3HUFA 含量이 낮은 실험구일수록 낮게 나타났고, 血糖量의 변화도 같은 경향이었다. 血清成分 中 蛋白質濃度와 血糖量 저하는 기아, 영양 실조, 소화 기관 장애나 간 기능 장애로 인한 供給不足과 合成低下에 원인이 있다고 보고되어 있다(池田等 1986). 또한, 窪田(1987)는 絶食實驗에서 絶食期間이 길어짐에 따라 蛋白質의 供給이나 合成이 되지않아 血清蛋白質의 濃도가 급격히 低下된다고 보고하였다. 本實驗에서 飼料의 n-3HUFA 含量이 낮을수록 血清 蛋白質濃도와 血糖量이 낮은 것은 n-3HUFA 부족에서 초래된 體內 代謝機能의 장애로 인해 정상 血中濃도를 조절하지 못한 결과로 생각된다. 즉, 이러한 기능을 주로 담당하는 肝의 대사 기능이 저하되어 蛋白質의 合成이나 glycogen 分解에 관련된 대사 경로에 문제가 생긴 것 때문으로 추정된다. 후술한 바와 같이, 飼料의 n-3HUFA 含量이 낮을수록 肝 細胞膜의  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性도 낮아져 이같은 추정이 어느 정도 뒷받침되는 것으로 나타났으며, 細胞內的 酵素活性이 n-3HUFA의 충족 여부와 깊이 관련되어 있는 것으로 판단된다.

本實驗의 血液成分 값을 養殖産과 비교하기 위해 生飼料(전갱이)+粉末飼料(넙치육성용)를 혼합한 moist pellet으로 사육한 조피블락(60~90 g)의 혈청 단백질(3.7±0.24 g/100 ml)과 혈당(70.6±14.41 mg/100 ml)을 분석한 결과, 이 값과 비교하여 보아도, 本實驗의 n-3HUFA 不足區의 蛋白質濃度(2.76~3.06 g/100 ml)와 血糖量(36.03~50.77 mg/100 ml)은 매우 낮은 값이며, n-3HUFA 充足區의 이러한 값들은 위의 값과 거의 유사한 수준이었다.

體內 cholesterol은 飼料를 통한 攝取나 肝에서 合成되어 담즙산, 性 호르몬, vitamin D 및 細胞 構成成分에 필수적이지만, 육상 동물에서 혈액에 cholesterol이 과다하게 존재하면 여러가지 副作用을 초래한다고 밝혀져 있다. Larsson and Pagnar (1977)는 포획한 대부분의 정상적인 海産魚類 血漿 cholesterol 농도가 육상 동물보다 2~6 배 정도 높게 나타난다고 보고하여 이러한 높은 수치와 어류의 건강 상태와는 특별한 관계가 없을 것이라고 추측하였으며, Lemaire et al. (1991)은 EFA 부족 실험구에서 농어 血清 cholesterol 농도가 현저히 낮았다고 보고하였다. Flier et al. (1985)과 Lokesh et al. (1984)에 의하면 육상 동물의 경우 飼料의 脂肪酸組成, 즉 飽和脂肪酸에 대한 不飽和脂肪酸의 비와 (n-3/n-6)HUFA 比가 體內의 cholesterol 濃도와 細胞膜의 性狀에 영향을 미친다고 하였다. 또한 HUFA는 血清 cholesterol 濃도를 低下시키는 효과가 있다고 報告되었는데(Adelman et al. 1984; Connor and Conner 1982; Ramesha et al. 1980; Taussant et al. 1981), 특히 n-3HUFA는 n-6HUFA보다 cholesterol 低下 효과가 크다고 하였다(Kobatake et al. 1984; Balasubramaniam et al. 1985; Herold and Kinsella 1986; Haug and Hostmark 1987). 本實驗 結果, 조피블락의 血清 cholesterol 濃度 變化는 陸上動物과 유사한 경향을 보여, 飼料의 脂肪酸組成에 영향을 받아 n-3HUFA가 높을수록 낮게 나타났다. 血中 cholesterol ester의 濃度(total cholesterol-free cholesterol, mg/100 ml)도 역시 n-3HUFA가 높을수록 낮게 나타났으며, 그 변화가 현저하여 n-3HUFA는 血中 cholesterol ester를 저하시키는 효과가 있음을 알 수 있다.

血清의 transaminase와 alkaline phosphatase의 변화는 細胞機能에 반영되어 있는 것으로 밝혀져 있어(Lemaire et al. 1991; Michael et al. 1987; Tandon and Chandra 1976), 이러한 효소의 혈청 농도가 높아지는 것은 肝 細胞膜의 이상으로 인해 組織에 함유되어 있던 酵素가 血液中으로 放出됨을 의미한다. 本實驗 結果에서도 血清 GOT, GPT 및 LDH의 增加는 肝細胞의 崩壞 혹은 細胞膜 透過性的 變化로 인해 細胞質에 존재하는 酵素가 血液中으로 放出되어 血中濃도가 增加된 것으로 보인다.

Lemaire et al. (1991)과 Watanabe et al. (1989)은 EFA 不足實驗區 경우, 농어와 white fish의 成長이 低下될 뿐 아니라 肝組織의 異常症勢, 즉 肝細胞의 肥大, 核의 萎縮과 혈관 주위의 괴사 등 全般的으로 細胞質에 異常症勢가 나타났음을 보고했다. 必須脂肪酸이 不足한 飼料로 사육된 무지개송어는 肝組織 이외에도 지느러미 부식과 심근염(Castell et al. 1972a)의 症勢가 나타났고, 대서양 연어에서도 심장 조직에 異常症勢(Bell et al. 1991)가 초래되었다. 本實驗에서도 飼料의 n-3HUFA가 缺乏된 實驗區의 肝細胞는 n-3HUFA 1.5% 實驗區에 비해 肝 細胞索의 構造崩壞 및 부분적인 세포 용해가 관찰되었다. 이러한 退行性 病變은 炎症性 細胞浸潤 등의 所見이 없어 感染에 의한 것으로 보이지 않고, 飼料 脂肪酸의 영향으로 細胞膜의 중요한 構成成分인 n-3HUFA가 缺乏되어 細胞膜에 이상이 초래된 것으로 생각된다.

細胞內的 物質輸送 能力은 細胞膜의 流動性이나 透過性에 관련되어 있으며, ATPase 活性의 변화로도 그 정도를 추측할 수 있고, 이러한 변화는 細胞膜의 脂肪酸組成에 따라 변화된다고 보고되었다(Holmes and Kummerow 1985 ; Lee et al. 1986 ; Conroy et al. 1986). 肝細胞內的  $Ca^{2+}$  濃度의 중요성은 이미 잘 알려져 있는데, 細胞質의  $Ca^{2+}$  濃度는 glucagon이나 insulin 같은 호르몬 분비와 膜 透過性,  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性 등에 복합적으로 관련되어 조절된다고 보고되어 있다(Andia-Waltenbaugh et al. 1980 ; Lotersztajn et al. 1981 ; Reinhart and Bygrave, 1981 ; Iwasa et al. 1982 ; Charest et al. 1983 ; Joseph and Williamson 1983 ; Boyle et al. 1984). 本實驗의 microsomal membrane의  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性은 飼料의 n-3HUFA 含量이 감소할수록 그 활성이 감소하고 있으며(Fig. 5), microsomal membrane의 중요 구성 물질인 극성 지질 중 n-3HUFA도 감소하여(Table 2), 細胞膜의 物質輸送에 n-3HUFA와 같은 脂肪酸이 깊히 관련하고 있음을 시사하고 있다. 특히, 극성 지질 중 EPA보다 DHA의 증가 폭이 더 큰 것으로 보아, 膜 蛋白質의 酵素活性에 DHA가 매우 중요한 역할을 담당하는 것으로 추정된다. 이와 관련하여, 細胞質의  $Ca^{2+}$  濃度는 mitochondria 內的 glycogen 분해에 매우 중요한 역할을 할 뿐 아니라 血糖量 調節에 직접적으로 관련되어 있다. 本實驗에서와 같이, 飼料 n-3HUFA 含量의 감소와 더불어 血糖量이 낮은 것은 細胞質에  $Ca^{2+}$  濃度의 不均衡에도 그 원인이 있을 것으로 간주된다.

이와 같이, 飼料 n-3HUFA 含量에 따라 肝 細胞膜의 脂肪酸組成, 酵素活性 및 組織性狀이 變化되고, 이로 인해 血清成分이 變化되는 것으로 판단된다. 飼料의 n-3HUFA가 부족하면 前報(李等 1993)에서와 같이 成長 등의 효과가 저하되며, 代謝機能을 정상으로 유지하기 위해서는 細胞膜의 필수 성분인 n-3HUFA가 飼料로 부터 필히 공급되어야 할 것이다.

## 要 約

조피볼락의 必須脂肪酸인 n-3HUFA가 魚體에 미치는 生化學的 變化를 알아보기 위하여, n-3HUFA 含量이 0.0~1.5%가 되도록 조정한 6種의 實驗飼料로 조피볼락 稚魚를 10週間 飼育하여 血液性狀, 血清成分 및 肝細胞 性狀의 變化를 檢討하였다.

血液性狀(RBC, Hb, Ht, MCV, MCHC 및 MCH)은 飼料의 n-3HUFA 含量에 따라 有意的인 차이를 나타내지는 않았다. 血清蛋白質 濃度(2.76~3.63 g/100 ml) 및 血糖量(36~71 mg/100 ml)은 n-3HUFA 0.9% 飼料까지는 增加하다가 그 이상에서는 일정한 값을 유지하였다. 血中 total cholesterol 濃度(137~86 mg/100 ml)와 free cholesterol 濃度(84.2~63.8 mg/100 ml)는 n-3HUFA 1.2% 까지 점차 감소하는 경향을 보였으며, 그 이상에서는 일정하였다. 血清 GPT (159.7~47.0 Karmen unit), GOT (28.0~11.1 Karmen unit) 및 LDH (3888~1539 W-unit)도 모두 n-3HUFA 1.2%까지는 감소 경향을 보이다가 그 이후에는 일정한 값을 유지하였다.

n-3HUFA 無添加 飼料를 먹은 實驗魚의 肝組織은 n-3HUFA 1.5% 添加 飼料를 먹은 實驗魚에 비해 細胞索의 구조 붕괴와 부분적인 세포 용해가 관찰되었다. 肝 cytosol의 LDH 活性과 microsomal membrane의  $Ca^{2+}$ -ATPase 活性도 변화되어 飼料의 n-3HUFA가 증가할수록 증가한 경향을 보였다.

### 參 考 文 獻

- Adelman, S. T., J. M. Glick, N. C. Phillips and G. H. Rothblat. 1984. Lipid composition and physical state effects on cellular cholestery ester clearance. *J. Biol. Chem.*, 259: 1344~1350.
- Andia-Waltenbaugh, A. M., A. Lam, L. Hummel and N. friedmann. 1980. Characterization of the hormone sensitive  $Ca^{++}$ -uptake activity of the hepatic endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta*, 630: 165~175.
- Babin, P. J.. 1987a. Apolipoproteins and the association of egg yolk proteins with plasma high density lipoproteins after ovulation and follicular atresia in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Biol. Chem.*, 262: 4290~4296.
- Babin, P. U.. 1987b. Plasma lipoprotein and apoprotein distribution as a function of density in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Biochem. J.*, 246: 425~429.
- Balasubramaniam, S., L. A. Simons, S. Chang and J. B. Hickie. 1985. Reduction in plasma cholesterol and increase in biliary cholesterol by a diet rich in n-3 fatty acids in the rat. *J. Lipid Res.*, 26: 684~689.
- Barham, W. T., G. L. Smit and H. J. Schoonbee. 1980. The haematological assessment of bacterial infection in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 17: 275~281.
- Barnhart, R. A.. 1969. Effects of certain variables on haematological characteristics of rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 98: 411~418.
- Bell, J. G., A. H. Mcvicar, M. T. Park and J. R. Sargent. 1991. High dietary linoleic acid affects the fatty acid compositions of individual phospholipids from tissues of atlantic salmon (*Salmo salar*): association with stress susceptibility and cardiac lesion. *J. Nutr.*, 121: 1163~1172.
- Boyle, D. M., C. P. Suarez and W. L. Dean. 1984. Effect of in vivo changes in phospholipid composition on liver microsomal calcium transport. *Cell Calcium*, 5: 475~485.
- Cameron, J. N.. 1970. The influence of environmental variables on the hematology of pinfish (*Lagodon Rhomboides*) and striped mullet (*Mugil Cephalus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 32: 175~192.
- Castell, J. D., R. O. Sinnhuber, J. H. Wales and D. J. Lee. 1972a. Essential fatty acids in the diet of rainbow trout (*Salmo gairdneri*): growth, Feed conversion and some gross deficiency symptoms. *J. Nutr.*, 102: 77~86.
- Castell, J. D., R. O. Sinnhuber, D. J. Lee and J. H. Wales. 1972b. Essential fatty acids in the diet of rainbow trout (*Salmo gairdneri*): physiological symptoms of EFA deficiency. *J. Nutr.*, 102: 87~92.

- Charest, R., P. F. Blackmore, B. Berthon and J. H. Exton. 1983. Changes in free cytosolic  $Ca^{2+}$  in hepatocytes following  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation. *J. Biol. Chem.*, 258: 8769~8773.
- Connor, W. E. and S. L. Connor, 1982. The dietary treatment of hyperlipidemia. *Med. Clin. N. Am.*, 66: 485~518.
- Conroy, D. M., C. D. Stubbs, J. Belin, C. L. Pryor and A. D. Smith. 1986. The effects of dietary (n-3) fatty acid supplementation of lipid dynamics and composition in rat lymphocytes and liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 861: 457~462.
- Cowey, C. B., J. W. Adron, M. J. Walton, J., Murray, A. Youngson and D. Knox. 1981. Tissue distribution, uptake, and requirement for  $\alpha$ -tocopherol of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed diets with a minimal content of unsaturated fatty acids. *J. Nutr.*, 111: 1556~1567.
- Cowey, B. B., J. W. Adron and A. Youngson. 1983. The vitamin E requirement of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) given diets containing polyunsaturated fatty acids derived from fish oil. *Aquaculture*, 30: 85~93.
- Duncan, C. B. 1955. Multiple-range and multiple F tests. *Biometrics*, 11: 1~42.
- Eaton, R. P., T. McConnell, J. G. Hnath, W. Black and R. E. Swartz. 1984. Coronary myointimal hyperplasia in freshwater lake Michigan salmon (*genus Oncorhynchus*). *Am. J. Pathol.*, 116: 311~318.
- Fiske, C. H. and Y. Subbarow. 1925. The colorimetric determination of phosphorous. *J. Biol. Chem.*, 66: 375~400.
- Flier, J., B. R. Lokesh and J. E. Kinsella. 1985. Enrichment of n-3 fatty acids in rat liver plasma membranes following ingestion of menhaden oil: Increased 5' nucleotidase activity. *Nutr. Res.*, 5: 277~283.
- Folch, J., M. Lees and G. H. S. Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, 226: 497~509.
- Fujii, M. and Y. Yone. 1976. Studies on nutrition of red sea bream- XIII. Effect of dietary linolenic acid and  $\omega$ 3 polyunsaturated fatty acids on growth and feed efficiency. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 42: 583~588.
- Garrido, L. G., R. M. Chapuli and A. V. Andres. 1990. Serum cholesterol and triglyceride levels in *Scyliorhinus canicula* (L.) during sexual maturation. *J. Fish Biol.*, 36: 499~509.
- Greene, D. H. S. and D. P. Selivonchick. 1990. Effects of dietary vegetable, animal and marine lipids on muscle lipid and hematology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 89: 165~182.
- Haug, A. and A. T. Hostark. 1987. Lipoprotein lipases, lipoproteins and tissue lipids in rats fed fish oil or coconut oil. *J. Nutr.*, 117: 1011~1017.
- Herold, P. M. and J. E. Kinsella. 1986. Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 43: 566~598.
- Higashi, H., T. Kaneko, S. Ishii, M. Ushiyama and T. Sugihashi. 1966. Effect of ethyl linoleate, ethyl linolenate and ethyl esters of highly unsaturated fatty acids on essential fatty acid deficiency in rainbow trout. *J. Vitaminol.*, 12: 74.
- Holmes, R. P. and F. A. Kummerow. 1985. The effect of dietary lipids on the composition and properties of biological membranes. In: G. Benga (Ed.), *Structure and Properties*

- of Cell Membranes, vol. 3, CRC press, boca raton, Fl., pp. 261~280.
- Hung, S. S. O., C. Y. Cho and S. J. Slinger. 1981. Effect of oxidized fish oil, DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate and ethoxyquin supplementation on the vitamin E nutrition of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed practical diets. J. Nutr., 111: 648~657.
- Hwang, G. -C.. 1990. Study on muscle proteins of thermally acclimated carp. Ph. D. Thesis. University of Tokyo, 172 pp.
- Inui, Y.. 1969. Mechanism of the increase of plasma glutamic oxalacetic transaminase and plasma glutamic pyruvic transaminase activities in acute hepatitis of the eel. Bull. Freshwater. Fish. Res. Lab., 19: 25~30.
- Inui, Y. and M. Yokote. 1977. Effects of glucagon on amino acid metabolism in japanese eels, *Anguilla japonica*. Genral and Comparative endocrinology, 33: 167~173.
- Iwasa, Y., T. Iwasa., K. Higashi, K. Matsui and E. Miyamoto. 1982. Demonstration of a high affinity  $Ca^{2+}$  -ATPase in rat liver plasma membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 105: 488~494.
- Joseph, J. K. and J. R. Williamson. 1983. The origin, quantitation, and kinetics of intracellular calcium mobilization by vasopressin and phenylephrine in hepatocytes. J. Biol. Chem., 258: 10425~10432.
- Juaneda, P. and G. Rocquelin. 1985. Rapid and convenient separation of phospholipids and nonphosphorous lipids from rat heart using silica cartridges. Lipids, 21, pp. 40~41.
- Kawatsu, H.. 1972. Studies on the anemia of fish V. Dietary iron deficient anemia in brook trout, *Salvelinus fontinalis*. Bull. Freshwater. Fish. Res. Lab., 22: 59~67.
- Kawatsu, H.. 1975. Studies on the anemia of fish VII. Folic acid anemia in brook trout. Bull. Freshwater. Fish. Res. Lab., 25: 21~31.
- Kobatake, Y., K. Kuroda, H. Jinnouchi, E. Nishide and S. Innami. 1984. Differential effects of dietary eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acids on lowering of triglyceride and cholesterol levels in the serum of rats on hypercholesterolemic diet. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 30: 357~372.
- Lane, H. C.. 1979. Progressive changes in haematology and tissue water of sexually mature trout, *Salmo gairdneri* Richardson during the autumn and winter. J. Fish Biol., 15: 425~436.
- Lee, A. G., J. M. East and R. J. Freud. 1986. Are essential fatty acids essential for membrane function? Prog. Lipid Res., 25: 41~46.
- Larsson A. and F. Ragnar. 1977. Cholesterol and free fatty acids (FFA) in the blood of marine fish. Comp. Biochem. Physiol., 57B: 191~196.
- Lemaire, P., P. Draï, A. Mathier, S. Lemaire, S. Carriere, J. Giudicelli and M. Lafaurie. 1991. Changes with different diets in plasma enzymes (GOT, GPT, LDH, ALP) and plasma lipids (cholesterol, triglycerides) of sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture, 93: 63~75.
- Lokesh, B. R., G. G. Bruckner and J. E. Kinsella. 1984. Reduction in thromboxane formation by n-3 fatty acids enriched lung microsomes from rat and guinea pig following the ingestion of dietary menhaden oil. Prostaglandins Leukotrienes Med., 15: 337~348.

- Lotersztajn, S., J. Ganoune and F. Pecker. 1981. A high affinity calcium-stimulated magnesium-dependent ATPase in rat liver plasma membranes. *J. Biol. Chem.*, 256:11209~11215.
- Lowrey, K., E. A. Glende and R. O. Recknagel. 1981. Destruction of liver microsomal calcium pump activity by carbon tetrachloride and bromotrichlor-omethane. *Pharmacol.*, 30:135~140.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265~275.
- Michael, M. I., A. M. Hilmy, N. A. El-Domiatiy and K. Wershana. 1987. Serum transaminases activity and histopathological changes in *Clarias lazera chronically* exposed to nitrite. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86C:255~262.
- Mosconi-Bac, N.. 1987. Hepatic disturbances induced by an artificial feed in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during the first year of life. *Aquaculture*, 67:93~99.
- Munkittrick, K. R. and J. F. Leatherland. 1983. Haematocrit values in feral goldfish, *Carassius auratus* L., as indicators of the health of the population. *J. Fish Biol.*, 23:153~161.
- Murai, T. and J. W. Andrews. 1974. Interactions of dietary  $\alpha$ -tocopherol, oxidized menhaden oil andethoxyquin on channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Nutr.*, 104:1416~1431.
- Murai, T., T. Akiyama, Y. Hirasawa, T. Oshiro, M. Okauchi and T. Nose. 1982. Blood constituent levels and body composition of wild and cultured bluefin tuna juveniles. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture*, 3:51~59.
- Nelson, G. J. and V. G. Shore. 1974. Characterization of the serum high density lipoproteins and apolipoproteins of pink salmon. *J. Biol. Chem.*, 249:536~542.
- Pacha, R. E.. 1968. Characteristics of *Cytophaga psychrophalia* (Borh) isolated during outbreaks of bacterial cold water disease. *Appl. Microbiol.*, 16:97.
- Poston, H. A., G. F. Combs and L. Leibovitz. 1976. Vitamin E and selenium interactions in the diet of Atlantic salmon (*Salmo solar*): gross, histological and biochemical deficiency signs. *J. Nutr.*, 106:892~904.
- Ramesha, C. S., R. Paul and J. Garguly. 1980. Effects of dietary unsaturated oil on the biosynthesis of cholesterol and on biliary and fecal excretion of cholesterol and bile acid in rat. *J. Nutr.*, 110:2149~2158.
- Reinhart, P. H. and F. L. Bygrave. 1981. Glucagon stimulation of ruthenium red-insensitive calcium ion transport in developing rat liver. *Biochem. J.*, 194:541~549.
- Rogie, A. and E. R. Skinner. 1985. The roles of the intestine and liver in the biosynthesis of plasma lipoproteins in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Comp. Biochem. Physiol.*, 81B:285~289.
- Shimma, Y., H. Shimma and K. Lkeda. 1982. Plasma constituents of 2-Year-old rainbow trout raised with fish meal and SCP combined feeds. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture*, 3:61~73.
- Stubbs, C. D. and A. D. Smith. 1984. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim. Biophys. Acta*, 779:89~137.



- Tandon, R. S. and S. Chandra. 1976. Serum phosphatase levels of some fresh water teleosts. *Z. Tierphysiol., Tiernahr. Futtermittelkd.*, 37:330~333.
- Taussant, M. J., M. D. Wilson and S. D. Clarks. 1981. Coordinate suppression of liver acetyl Co-A carboxylase and fatty acid synthetase by PUFA. *J. Nutr.*, 111:146~153.
- Watanabe, T., T. Takeuchi, M. Wada and R. Rehara. 1981. The relationship between dietary lipid levels and  $\alpha$ -tocopherol requirement of rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 47:1463~1471.
- Watanabe, T., S. Thongrod, T. Takeuchi, S. Satoh, S. S. Kubota, Y. Fujimaki and C. Y. Cho. 1989. Effect of dietary n-6 and n-3 fatty acids on growth, fatty acid composition and histological changes of white fish *Coregonus lavaretus maraena*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55:1977~1982.
- Wilson, R. P., R. R. Bowser and W. E. Poe. 1984. Dietary vitamin E requirement of fingerling channel catfish. *J. Nutr.*, 114:2053~2058.
- 池田彌生·尾崎久雄·瀬崎啓次郎. 1986. 魚類血液圖鑑, 綠書房, 東京, pp. 238~326.
- 窪田三朗. 1987. 養殖魚の本質と疾病との關係に関する研究. 科學研究費補助金總合研究(A) 研究成果報告書, 141 pp.
- 李尚旻·李鍾允·姜龍珍·許聖範. 1993. 飼料의 n-3系 高度不飽和脂肪酸 含量에 따른 조피볼락 *Sebastes schlegeli*의 成長 및 生化學的 變化 I. 成長效果 및 體成分의 變化. 韓國養殖學會誌, 6:89~105.