

영양 강화제 종류에 따른 rotifer, *Brachionus plicatilis*의 생화학적 조성

박흥기* · Joseph A. Brown¹

강릉대학교 해양생명공학부

¹Ocean Sciences Centre, Memorial University of Newfoundland

Biochemical Composition of Rotifer, *Brachionus plicatilis* Enriched with Different Commercial Enrichments

Heum Gi Park* and Joseph A. Brown¹

Faculty of Marine Bioscience & Technology, Kangnung National University, Gangneung 210-702, Korea
¹Ocean Sciences Centre, Memorial University of Newfoundland, St. John's, Newfoundland, Canada A1C 5S7

This study was carried out to investigate changes in biochemical composition of rotifer, *Brachionus plicatilis*, enriched with the commercial enrichments (Enhance, Advantage, Algamac-2000, DHA-Selco and Advantage + Chlorella) at various durations of enrichment (0, 6, 12 and 24 hr) to improve the growth and survival of marine fish larvae. Total lipid content of rotifers enriched with various enrichments tended to increase with an increase in durations of enrichment up to 6 hr, but after that, was not significantly affected by enrichment materials. However, total protein content of rotifers enriched groups except for Advantage+Chlorella decreased with the increase in duration of enrichment. The highest protein/lipid ratio showed 2.7 in rotifer enriched with the Advantage+Chlorella. The phospholipid/lipid ratio of rotifer enriched with the Enhance, Advantage and Advantage+Chlorella groups was significantly higher than that of enriched rotifer with the Algamac-2000 and DHA-Selco groups. The highest DHA level, 2.5%, of rotifer enriched for 24 hr was obtained in the Advantage, but was not significantly different among other groups, except for Algamac-2000. No significant difference in DHA level of rotifer enriched with the DHA-Selco, Algamac-2000 and Advantage+Chlorella groups was observed between 12h and 24hr of enrichment. The DHA/EPA ratio in the enriched rotifers varied among enrichment material groups, ranged from a high level of 11.1:1 in the Advantage+Chlorella group to a low level of 4.1:1 in DHA-Selco group. The results from this study indicate that rotifers enriched with Enhance, Advantage and Advantage+Chlorella seemed to be effective to improve nutritional value of rotifer for marine fish larvae because phospholipid, DHA/EPA and protein/lipid ratios of rotifer enriched with Enhance, Advantage+Chlorella were higher than those of rotifer enriched with either DHA-Selco or Algamac-2000. Especially, supplementation of the Chlorella to these enrichments would appear to be effective for improvement of fish larval performance because of no reduction of protein level in rotifer, which is critical for growth of fish larvae.

Keywords: Rotifer, Enrichments, Protein, Phospholipid, DHA, EPA and ARA

서론

지질과 단백질은 어류의 배 발달과 먹이 섭취 전 자어기 동안 신진 대사 에너지로써 매우 중요하며 이들의 함량은 외부로부터 먹이를 섭취하기 전까지 난황의 흡수와 동시에 급격히 감소하는 경향을 보인다(Evans et al., 2000). 따라서 어류 자어가 먹이를 섭취하는 시기에 공급되는 먹이내의 지질과 단백질 함량은 매우 중요하다고 할 수 있다.

특히, 지질의 구성 성분과 고도불포화지방산(highly unsaturated

fatty acid, HUFA)인 Docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3), Eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) 및 Arachidonic acid (ARA, 20:4n-6)는 세포막의 구성 물질 및 생리 활성 물질 생산에 관여하여 초기 자어의 성장, 생존 및 번태 등에 있어서 많은 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(Watanabe, 1993; Takeuchi, 1997; McEvoy et al., 1998b; Estevez et al., 1999; Sargent et al., 1999; Izquierdo et al., 2000). 현재 초기 자어의 먹이 생물로 많이 이용되고 있는 rotifer는 주로 담수산 Chlorella나 빵효모를 먹이로 하여 대량생산하지만 이들의 먹이는 고도불포화지방산의 함량이 거의 없기 때문에 이들을 섭취한 rotifer의 n-3계 고도불포화지방산의 함량은 매우 낮다(Park et al., 1999a; Park et

*Corresponding author: hgpark@kangnung.ac.kr

al., 2000). 따라서 n-3계 고도불포화지방산의 함량이 높은 지질을 이용한 rotifer의 영양 강화가 반드시 필요하다(Rainuzzo et al., 1997).

최근에는 해산 어류 자어의 먹이에서 DHA, EPA 및 ARA의 함량 및 이들의 상대적인 비율에 관한 관심이 고조되고 있다(Sargent et al., 1997, 1999; Harel et al., 2001; Bell and Sargent, 2003). 이 중에서 EPA와 경쟁 관계에 있는 DHA는 망막 및 뇌의 신경계 발달과 체색 변이 현상 등과 관련된 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다(Sargent et al., 1999). 따라서 정상적인 어류 자어의 성장을 위해서는 비교적 DHA가 EPA보다 높게 요구되며, 어종에 따라서 DHA의 요구량은 다양한 것으로 보고되고 있다(Takeuchi, 1994; Sargent et al., 1997, 1999). 특히, 냉수성 어류인 노랑가자미, *Limanda ferruginea*, 대서양 가자미, *Hippoglossus hippoglossus*, 대구, *Gadus macrocephalus*에 대한 DHA의 요구량은 온수성 어종보다 매우 높은 것으로 보고되고 있다(Zheng, et al., 1996; McEvoy et al., 1998b; Copeman et al., 2002). 이처럼 DHA의 중요성 때문에 DHA가 풍부한 미세조류, 유화오일, 미생물, 세균 등을 이용하여 rotifer를 영양 강화시킨 후 자어에 공급함으로써 자어의 성장률이나 생존율이 개선되는 경향을 보였다(Kang et al., 1999; Park et al., 1999b; Park et al., 2000).

한편 Rønnestad et al. (1999)은 단백질이 초기 자어의 먹이 섭취 이후에 이들의 성장에 매우 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 예를 들면, 공급된 먹이 생물인 rotifer의 필수 지방산인 turbot (*Scophthalmus maximum*) 자어의 요구량에 만족할 경우, 단백질 함량이 높은 rotifer를 섭취한 자어가 성장과 생존율에 있어서 우수한 것으로 나타났다(Oie et al., 1997). 따라서 해산 자어의 정상적인 성장을 위해서는 여러 가지 고도불포화지방산 뿐만 아니라 초기 먹이 생물의 단백질 함량도 매우 중요하게 고려되어야 할 것으로 판단된다.

따라서 본 연구는 초기 해산 어류 자어에게 공급되는 먹이 생물인 rotifer의 효율적인 영양 강화를 위해서 여러 가지 영양 강화제와 영양 강화시 담수 *Chlorella*의 첨가 및 영양 강화 시

간에 따른 rotifer의 지질 구성, DHA, EPA 및 ARA 함량 및 이들의 상대적인 비율과 단백질 함량을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

영양 강화제

본 실험에 사용된 영양 강화제는 *Cryptocodinium* sp. 로 구성된 분말 건조 세포(Enhance와 Advantage; MarTek Bioscience, USA), 유화오일인 DHA-Selco (Artemia System, Belgium), *Schizochytrium* sp.로 구성된 분말 건조 세포(Algamac-2000; Bio-Marine, Hawthorne, CA, USA)와 Advantage 영양 강화시 담수 *Chlorella*의 첨가는 *Chlorella vulgaris* (*Chlorella*; 대상, 한국)를 이용하였다. 이들 영양 강화제의 지질, 지방산 구성 및 단백질 함량은 Table 1과 2에 나타내었다.

Rotifer 영양 강화

Rotifer는 영양 강화 실험 전에 빵효모와 Culture Selco (INVE, Dendermond, Belgium)를 이용하여 배양하였다. Rotifer는 1 ml 당 400 개체로 10 L의 배양용기에서 영양 강화제 0.8 g을 하루에 세 번씩(0, 6, 12 h) 나누어 공급하였고, 영양 강화 수온은 19°C를 유지하였다. 각 영양 강화제로 영양 강화된 rotifer의 지질과 지방산 및 단백질 분석을 위해서 시간별(6, 12, 24 h)로 배양용기에서 4×10^4 rotifers를 수확하여 분석에 이용하였다.

지질 및 단백질 분석

시간별로 수확한 rotifer는 깨끗이 세척하여 filter paper (GF/C)로 여과 한 후, 지질 추출을 위해서 1 ml chloroform이 있는 15 ml test tube에 filter paper를 수용하여 질소로 충전한 후 -20°C에서 보관하였다. 지질은 Folch et al. (1957) 방법을 변형시킨 Parrish (1998)의 방법으로 추출하였다. 지질 구성은 Parrish (1987)에 의해 제시된 thin layer chromatography (TLC/FID)인 MARKV Iatroscan (Iatron Laboratories, Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였다.

Table 1. Total protein and lipid content, and lipid class composition of commercial enrichments used in this study (mean±SEM, n=3)

Enrichment materials	Enhance	Advantage	Algamac-2000	DHA-Selco	Chlorella
Total protein (mg/g DW)	9.9±0.1	12.2±4.5	18.1±1.9	-	75.5±3.5
Total lipid (mg/g DW)	171.4±15.0	141.5±4.1	289.7±5.3	658.7±24.3	58.4±3.5
Lipid Class (% total lipid)					
Hydrocarbons	5.4±1.5	3.4±1.1	1.8±0.5	0.7±0.2	6.5±0.9
Steryl/Wax Esters	0.0±0.0	0.0±0.0	0.4±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0
Triacylglycerols	59.3±1.5	59.8±1.0	66.9±0.7	52.2±1.4	0.0±0.0
Free fatty acids	4.9±5.2	5.7±0.6	17.1±0.3	2.7±0.1	0.0±0.0
Alcohols	2.5±0.8	1.7±0.9	0.2±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0
Sterols	2.9±1.2	4.6±3.2	2.2±1.4	0.7±0.4	0.0±0.0
Acetone mobile polar lipids	11.6±0.8	12.2±1.8	5.3±1.2	6.2±1.7	17.7±0.8
Phospholipids	13.4±2.2	12.7±1.6	6.0±1.0	4.2±0.4	75.8±1.6

Table 2. Fatty acid composition of the commercial enrichments used in this study (mean±SEM, n=3)

Enrichment materials	Enhance	Advantage	Algamac-2000	DHA-Selco	Chlorella
Fatty acids (% total)					
14:0	3.5±0.0	14.7±0.2	18.0±0.4	16.8±0.0	1.4±0.0
16:0	20.9±0.2	17.4±0.9	17.7±0.4	39.9±0.5	20.2±0.2
18:0	6.2±0.1	1.3±0.1	0.5±0.0	1.1±0.0	0.4±0.0
ΣSFA ¹	35.6±0.0	33.8±1.4	36.4±0.9	58.9±0.5	43.5±0.1
Unsaturated fatty acids					
16:1n-7	5.3±0.0	2.6±0.1	2.0±0.0	3.7±0.0	0.2±0.2
18:1n-9	0.0±0.0	10.0±0.1	9.8±0.4	0.0±0.0	1.7±0.0
18:1n-7	15.2±0.1	0.4±0.0	0.0±0.0	2.4±0.0	0.4±0.0
20:1n-9	0.4±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.1±0.1
ΣMUFA ²	24.7±0.3	13.5±0.0	12.0±0.5	6.2±0.0	3.9±0.2
Polyunsaturated fatty acids					
18:2n-6	5.5±0.1	6.4±0.7	0.1±0.0	0.1±0.0	49.8±0.0
20:3n-6	0.1±0.0	0.1±0.1	0.1±0.0	0.2±0.0	0.2±0.1
20:4n-6	1.4±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.6±0.0	0.0±0.0
20:4n-3	0.3±0.0	0.2±0.1	0.0±0.0	0.4±0.0	0.3±0.1
20:5n-3 (EPA)	4.3±0.0	0.5±0.0	0.0±0.0	0.7±0.0	0.0±0.0
22:5n-3	0.9±0.0	0.5±0.2	0.3±0.0	0.1±0.0	0.0±0.0
22:6n-3 (DHA)	21.4±0.1	43.8±2.2	51.1±1.5	24.2±0.3	0.1±0.0
ΣPUFA ³	39.7±0.3	52.7±1.3	51.6±1.4	34.9±0.5	52.6±0.3
Σn-3	28.9±0.1	46.2±2.2	51.4±1.4	25.8±0.4	2.4±0.1
Σn-6	11.7±0.3	6.5±0.9	0.2±0.0	9.2±0.1	50.1±0.1
n-3HUFA	27.0±0.1	45.0±2.3	51.4±1.5	25.6±0.3	0.5±0.1
n-3/n-6	2.5±0.1	7.2±1.3	283.8±15.3	2.8±0.0	0.0±0.0
DHA/EPA	5.0±0.0	95.7±1.3	0.0±0.0	33.6±0.6	0.0±0.0

¹Sum of saturated fatty acids (SFA) includes ai-15:0, i-15:0, 15:0, ai-16:0, i-16:0, ai-17:0, i-17:0, 18:0, 19:0, 20:0, 22:0, 23:0, 24:0 at <1.9% each.

²Sum of monoene unsaturated fatty acids (MUFA) includes 16:1n-9, 17:1, 18:1n-11, 18:1n-6, 18:1n-5, 20:1n-11, 20:1n-7, 22:1n-11, 22:1n-9, 22:1n-7, 24:1 at <3.5% each.

³Sum of poly unsaturated fatty acids includes 16:2n-4, 16:3n-4, 16:4n-3, 16:4n-1, 18:2n-4, 18:3n-6, 18:3n-4, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:2a, 20:2b, 20:2n-6, 20:3n-3, 21:5n-3, 22:5n-6, 22:2NIMDb at <1.4% each.

단백질 함량은 각 시간별 동결 건조 시킨 rotifer를 Bio-Rad Protien Assay (Bio-Rad Laboratories, USA)를 이용하여 단백질을 추출한 후 spectrophotometer를 이용하여 595 nm에서 단백질 함량을 구하였다.

지방산 분석

지방산 분석은 test tube에 일정량의 시료를 수용한 후 10% BF3-methanol 2 ml로 첨가하고 질소로 충전한 다음 85°C에서 1시간 30분간 가열하여 methyl ester화 하였다(Morrison and Smith, 1964; Budge, 1999). 시료는 약 30~40°C로 냉각한 후 물과 hexane을 첨가하여 지방산을 분리 추출하였다. 추출된 지방산은 Varian 8110 autosampler가 설치된 Varian model 3400GC 분석기(Varian, CA, USA)를 이용하여 지방산을 조사하였다. 지방산 분석에 사용된 GLC는 Omegawax-320 (30 m×0.32 mm, i.d., 0.25 µm film thickness, Supelco Bellefonte, PA, USA)을 이용하였다. 분석 조건은 column온도 185°C~220°C (3°C/min), injector온도 250°C, detector 온도 250°C 그리고 carrier gas는

He (1.0 kg/cm²)을 사용하였다. 지방산의 분석은 동일 조건에서 분석한 standard (PUFA 1, 3 및 37 component FAME Mix, Supelco, Ontario, Canada)를 이용하여 동정하였다.

통계분석

영양 강화제 종류에 따른 rotifer의 단백질 함량 및 지질과 지방산의 구성비율에 대한 실험 결과는 One-way ANOVA를 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로서 평균 간의 유의성(P<0.05)을 SPSS (SPSS Inc., 1997) program (Ver. 10.0)으로 검정하였다.

결 과

영양 강화 시간별 rotifer의 총 지질과 총 단백질의 함량 변화는 Fig. 1과 같다. 모든 실험구에서 rotifer의 총 지질은 시간이 경과할수록 증가하는 경향을 보였지만 영양 강화 6시간 이후 시간별로 뚜렷한 차이는 보이지 않았다(P>0.05). 또한 단백질

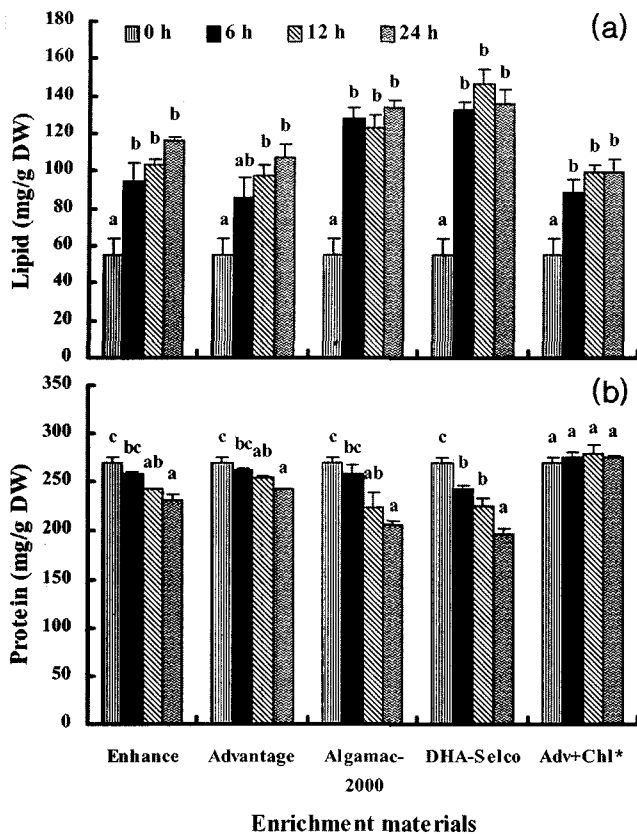


Fig. 1. Changes in total lipid (a) and protein (b) content of rotifer (mg/g DW) enriched with the different enrichments for 0, 6, 12 and 24 hours. *Advantage (70%)+Chlorella (30%). Different letters represent significant difference among duration of enrichment ($P<0.05$).

질 함량은 시간이 경과할수록 감소하는 경향을 보였지만 Advantage+Chlorella 실험구에서 270~279 mg/g DW로 초기 단백질 함량보다 조금 증가하였지만 시간별로 유의적인 차이는 보이지 않았다($P>0.05$).

영양 강화 종류에 따른 24시간 영양 강화된 rotifer의 단백질 및 지질의 함량과 지질의 구성은 Table 3에 나타내었다. 24시간 영양 강화된 rotifer의 총 단백질 함량은 Advantage+Chlorella

실험구의 276 mg/g DW를 제외하고 모든 실험구가 초기 rotifer의 단백질 함량(270 mg/g DW)보다 낮게 나타나는 경향을 보였고 Algamac-2000 (207.4 mg/g DW)과 DHA-Selco (196.6 mg/g DW)로 영양 강화한 rotifer의 총 단백질 함량은 영양 강화전의 rotifer함량보다 유의적으로 낮게 나타났다($P<0.05$). 그러나 rotifer의 총 지질 함량은 모든 실험구에서 영양 강화전 보다 2배 정도 높게 나타났고, DHA-Selco 실험구에서 가장 높은 135.8 mg/g DW로 나타났다($P<0.05$). 그러나 Enhance와 Algamac-2000과는 유의적인 차이는 보이지 않았다($P>0.05$). 또한 모든 실험구에서 영양 강화된 rotifer의 단백질/지질의 비율은 초기 영양 강화전의 rotifer의 비율(5.0)보다 유의적으로 낮게 나타났다($P<0.05$). 이들 실험구중 가장 높은 단백질/지질의 비율은 Advantage+Chlorella구에서 2.7로 나타났다.

한편 24시간 영양 강화된 rotifer의 지질 구성은 모든 실험구에서 triacylglycerol과 phospholipid가 20%이상의 높은 비율을 차지하고 있지만 예외적으로 Algamac-2000에서 free fatty acid의 비율이 23.2%로 다른 실험구보다 높게 나타났다(Table 3). 영양 강화 시간별 phospholipid의 비율은 Enhance 및 Advantage 실험구에서 12시간 이후 다시 증가하였지만 다른 실험구는 시간이 경과할수록 감소하는 경향을 보였다(Fig. 2b). 그러나 Algamac-2000 및 Advantage+Chlorella 실험구의 phospholipid는 실험 초기와 영양 강화 시간별 유의적인 차이는 보이지 않았으며($P>0.05$), DHA-Selco 실험구는 12시간 이후 뚜렷한 차이는 보이지 않았다. 한편 24시간 이후 DHA-Selco의 phospholipid 비율이 다른 실험구보다 가장 낮은 27.1%로 나타났지만 Algamac-2000과 유의적인 차이는 보이지 않았다(Table 3; $P>0.05$). 또한 시간별 triacylglycerol 비율은 12시간까지 증가하는 경향을 보이다가 24시간이후 다시 감소하는 경향을 보였다. 그러나 DHA-Selco는 12시간 이후 계속 증가하는 경향을 보였지만 12시간과 뚜렷한 차이는 보이지 않았다(Fig. 2a; $P>0.05$). 영양 강화 24시간 DHA-Selco 실험구의 triacylglycerol의 비율이 54.2%로 다른 실험구 보다 높은 비율로 나타났다 (Table 3; $P<0.05$).

Table 3. Protein and lipid content, and lipid class composition of rotifers enriched with different enrichments for 24 h

Enrichment materials	Initial	Enhance	Advantage	Algamac-2000	DHA-Selco	Adv+Chl
Total protein (mg/g DW)	270.3±5.8 ^{bc}	231.3±6.0 ^{ab}	242.6±0.5 ^{ab}	207.4±2.9 ^a	196.6±36.4 ^a	276.0±0.3 ^c
Total lipid (mg/g DW)	55.1±8.4 ^a	116.1±2.0 ^{bc}	107.6±6.8 ^b	133.6±4.4 ^c	135.8±7.9 ^c	102.5±6.7 ^b
Protein/Lipid	5.0±0.7 ^c	2.0±0.1 ^{ab}	2.3±0.2 ^{ab}	1.6±0.1 ^a	1.5±0.4 ^a	2.7±0.2 ^b
Lipid Class (% total lipid)						
Hydrocarbons	0.9±0.5	3.5±1.2	4.2±1.9	2.9±1.6	2.4±1.1	3.9±2.2
Triacylglycerols	20.2±4.6 ^a	35.5±2.0 ^b	33.3±0.3 ^{ab}	39.1±4.1 ^b	54.2±6.2 ^c	30.8±4.9 ^{ab}
Free fatty acids	0.3±0.3 ^a	2.4±0.2 ^a	4.0±2.1 ^a	23.2±0.1 ^b	10.0±5.6 ^{ab}	8.8±8.6 ^{ab}
Sterols	7.5±0.0 ^c	5.4±1.6 ^{abc}	6.7±1.8 ^{bc}	3.4±0.4 ^{ab}	2.4±0.2 ^a	3.5±0.1 ^{ab}
Acetone mobile polar lipids	2.2±2.2	3.3±0.3	3.9±0.3	1.2±0.1	4.0±0.8	3.5±2.1
Phospholipids	69.2±6.1 ^c	50.0±1.7 ^{bc}	48.2±5.6 ^b	30.4±5.2 ^{ab}	27.1±0.5 ^a	49.7±9.1 ^{bc}

Values (mean±SEM of three replicates) in the same row not sharing a common superscript are significantly different ($P<0.05$).

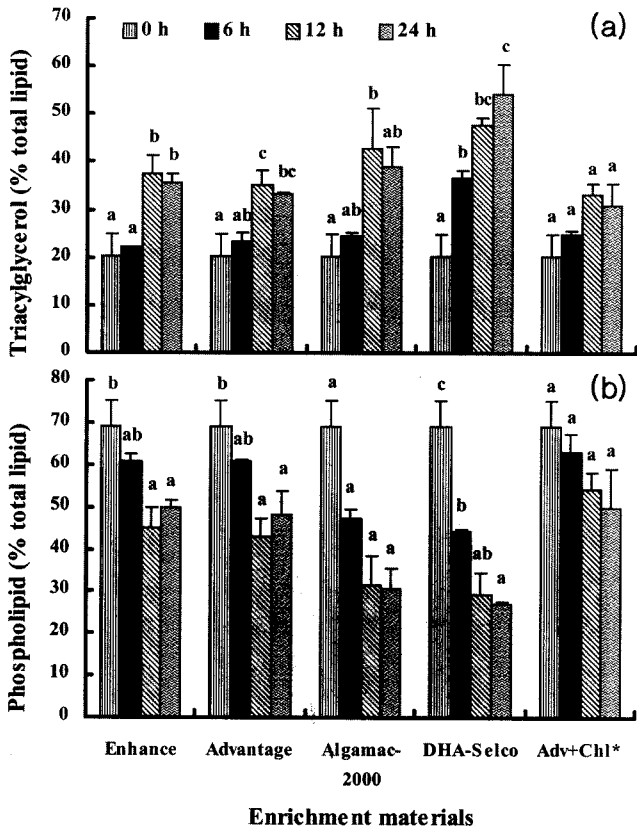


Fig. 2. Changes in triacylglycerol (a) and phospholipid (b) ratios in total lipid of rotifer (%) enriched with the different enrichments for 0, 6, 12 and 24 hours. *Advantage (70%)+Chlorella (30%), Different letters represent significant difference among duration of enrichment (P<0.05).

영양 강화 시간별 건조 중량당 n-3 HUFA 및 DHA의 함량 변화는 Fig. 3과 같다. 모든 실험구에서 영양 강화 시간이 경과 할수록 n-3 HUFA 및 DHA의 함량은 같은 경향으로 증가하는 하는 것으로 나타났다. 그러나 DHA-Selco 실험구의 경우 영양 강화 12시간 이후 뚜렷한 차이는 보이지 않았고(P>0.05) 특히, Algamac-2000 실험구에서 6시간 이상 영양 강화 시간에 따른 이들의 함량은 유의적인 차이가 나타나지 않았다(P>0.05).

한편 영양 강화 24시간 이후 rotifer의 지방산 구성은 Table 4와 같다. 영양 강화제의 종류에 따른 건조 중량당 n-3 HUFA의 함량은 DHA-Selco 실험구에서 3.1%로 가장 높게 나타났지만, Enhance와 Advantage 실험구와 유의적인 차이는 보이지 않았다(P>0.05). 한편 건조 중량당 DHA의 함량은 Advantage 실험구에서 2.5%로 가장 높게 나타났지만 Algamc-2000을 제외한 다른 실험구와 유의적인 차이는 보이지 않았다(P>0.05).

24시간 영양 강화된 rotifer의 DHA/EPA의 비율은 Advantage+Chlorella 실험구에서 11.1:1로 가장 높게 나타났지만 Algamac-2000 실험구의 9.5:1과는 유의적인 차이는 보이지 않았고(P>0.05) DHA-Selco 실험구에서 가장 낮은 4.1%로 나타났(P<0.05). 또한 EPA/ARA의 비율은 Advantage+Chlorella와 Enhance 실험

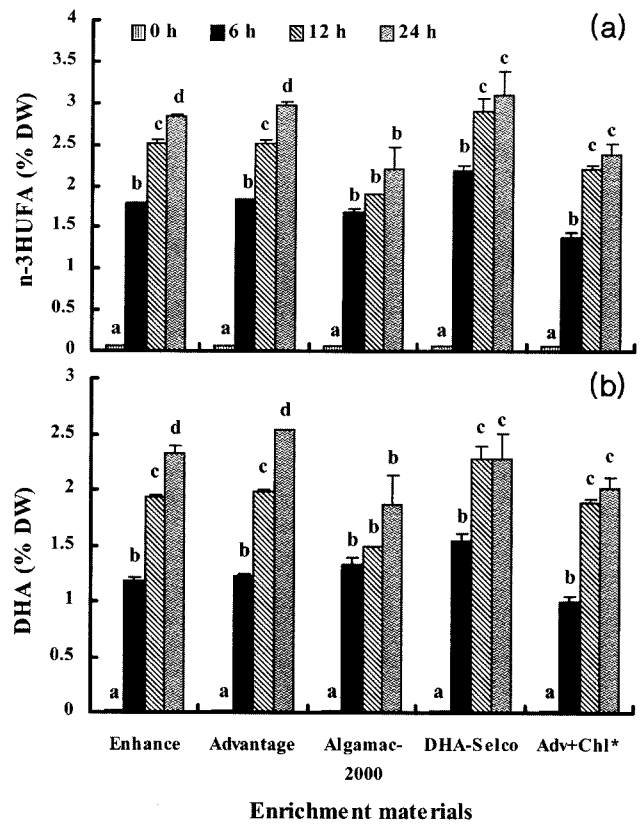


Fig. 3. Change in n-3 HUFA (a) and DHA (b) contents in total lipid of rotifer (% dry weight) enriched with the different enrichments at 0, 6, 12 and 24 hours. *Advantage (70%)+Chlorella (30%), Different letters represent significant difference among duration of enrichment (P<0.05).

험구에서 모두 5.2:1로 가장 높게 나타났으며(P<0.05) Algamac-2000에서 가장 낮은 1.3:1로 나타났.

고 찰

초기 해산 어류 자어의 먹이 생물인 rotifer의 생화학적 조성에 대한 연구는 많이 이루어졌다. 특히, 이중에서 지질과 n-3 HUFA인 DHA, EPA 및 ARA에 대한 관심이 집중되었다 (Planas and Cunha, 1999).

Mercier et al. (2004)은 지질의 구성 성분 중 triacylglycerol은 자어의 주요한 에너지원으로 이용되지만 phospholipid는 세포막의 구성 및 신경조직(neural tissues)의 유동성 역할을 한다고 보고하였다. 그러나 어류는 phospholipid를 자체적으로 합성할 수 없기 때문에 먹이를 통해 외부로부터 공급되어야 한다 (Fontagne et al., 1998). 몇몇 어류 자어의 성장과 생존율에 대한 phospholipid 공급 효과는 triacylglycerol보다 우수한 것으로 보고되고 있다(Kanazawa, 1997; Izquierdo et al., 2000; Bell et al., 2003). 이러한 이유는 phospholipid 공급은 소화효소 분비와 관련하여 완전한 소화 기관 기능이 부족한 어류의 소화계에

Table 4. Fatty acid composition of rotifer enriched with different enrichments for 24 h

Enrichment materials	Initial	Enhance	Advantage	Algamac-2000	DHA-Selco	Adv+Chl ⁵
Fatty acids (% total)						
14:0	2.1±0.0 ^a	5.3±0.1 ^b	5.8±0.2 ^b	10.2±0.3 ^c	2.3±0.1 ^a	5.8±0.5 ^b
16:0	7.7±0.2 ^a	15.5±0.1 ^b	14.6±0.3 ^b	39.6±2.8 ^c	14.2±1.1 ^b	13.5±0.5 ^b
18:0	4.2±0.2 ^c	3.8±0.1 ^c	3.1±0.0 ^b	2.4±0.1 ^a	4.2±0.3 ^c	2.5±0.1 ^{ab}
ΣSFA ¹	16.6±0.4 ^a	26.1±0.6 ^b	25.3±0.3 ^b	54.2±2.9 ^c	24.3±1.5 ^b	25.3±1.0 ^b
16:1n-7	26.8±1.0 ^c	9.8±0.2 ^b	11.1±0.2 ^b	6.3±0.3 ^a	9.8±0.2 ^b	10.1±0.4 ^b
18:1n-9	27.2±0.2 ^c	14.0±0.2 ^b	15.8±0.1 ^c	4.8±0.1 ^a	17.3±0.9 ^d	14.6±0.4 ^{bc}
18:1n-7	7.1±0.7 ^b	3.4±0.1 ^a	3.6±0.2 ^a	3.6±0.0 ^a	3.9±0.3 ^a	3.3±0.4 ^a
20:1n-9	4.3±0.3 ^b	0.5±0.0 ^a	0.6±0.0 ^a	0.3±0.0 ^a	0.5±0.0 ^a	0.5±0.0 ^a
ΣMUFA ²	73.6±2.1 ^c	34.1±1.2 ^b	37.7±0.7 ^b	18.0±0.0 ^a	35.4±1.5 ^b	35.7±2.5 ^b
18:2n-6	3.8±0.4 ^b	8.9±0.4 ^d	3.0±0.0 ^b	1.2±0.1 ^a	6.8±0.0 ^c	9.7±0.2 ^d
20:3n-6	0.8±0.0	0.9±0.1	1.0±0.1	0.6±0.0	0.8±0.1	0.8±0.1
20:4n-6(ARA)	0.7±0.1 ^a	0.6±0.0 ^a	0.6±0.0 ^a	1.2±0.0 ^b	1.8±0.1 ^c	0.5±0.0 ^a
20:4n-3	0.0±0.0 ^a	0.8±0.0 ^c	0.8±0.1 ^c	0.7±0.0 ^c	0.7±0.0 ^c	0.5±0.1 ^b
20:5n-3 (EPA)	0.9±0.0 ^a	2.9±0.0 ^c	2.9±0.2 ^c	1.6±0.1 ^b	4.5±0.4 ^d	2.6±0.1 ^b
22:5n-3	0.0±0.0 ^a	1.3±0.4 ^b	0.0±0.0 ^a	0.6±0.0 ^a	1.4±0.0 ^b	0.6±0.0 ^a
22:6n-3 (DHA)	0.4±0.0 ^a	22.5±0.6 ^{cd}	26.5±0.0 ^d	15.6±2.2 ^b	18.7±2.0 ^{bc}	22.9±1.1 ^{cd}
ΣPUFA ³	9.8±1.6 ^a	39.8±0.5 ^c	37.0±0.4 ^c	27.8±2.9 ^b	40.3±3.0 ^c	39.0±1.5 ^c
Σn-3	2.0±0.0 ^a	28.5±0.1 ^c	31.6±0.4 ^c	18.7±2.2 ^b	27.1±2.5 ^c	26.5±1.3 ^c
Σn-6	5.9±0.5 ^a	10.8±0.6 ^c	4.7±0.1 ^a	8.8±0.7 ^b	11.3±0.4 ^c	11.8±0.1 ^c
n-3HUFA	1.5±0.0 ^a	27.5±0.1 ^{cd}	31.1±0.3 ^d	18.6±2.2 ^b	25.6±2.4 ^c	26.0±1.3 ^{cd}
n-3/n-6	0.3±0.0 ^a	2.7±0.2 ^c	6.8±0.2 ^d	2.1±0.1 ^b	2.4±0.1 ^{bc}	2.2±0.1 ^{bc}
DHA/EPA	0.4±0.0 ^a	7.9±0.2 ^c	9.2±0.7 ^c	9.5±1.1 ^{cd}	4.1±0.1 ^b	11.1±0.2 ^d
EPA/ARA	0.3±0.1 ^a	5.2±0.3 ^d	4.8±0.2 ^c	1.3±0.0 ^a	2.5±0.1 ^b	5.2±0.2 ^d
n-3HUFA (%DW) ⁴	0.1±0.0 ^a	2.9±0.0 ^{cd}	3.0±0.0 ^{cd}	2.2±0.3 ^b	3.1±0.3 ^d	2.4±0.1 ^{bc}
DHA (%DW)	0.0±0.0 ^a	2.3±0.0 ^{bc}	2.5±0.0 ^c	1.9±0.3 ^b	2.3±0.2 ^{bc}	2.0±0.0 ^{bc}

Values (mean SEM of three replicates) in the same row not sharing a common superscript are significantly different (P<0.05).

¹Includes ai-15:0, i-15:0, 15:0, ai-16:0, i-16:0, ai-17:0, i-17:0, 18:0, 19:0, 20:0, 22:0, 23:0, 24:0 at<1.9% each.

²Includes 16:1n-9, 17:1, 18:1n-11, 18:1n-6, 18:1n-5, 20:1n-11, 20:1n-7, 22:1n-11, 22:1n-9, 22:1n-7, 24:1 at<3.5% each.

³Includes 16:2n-4, 16:3n-4, 16:4n-3, 16:4n-1, 18:2n-4, 18:3n-6, 18:3n-4, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:2a, 20:2b, 20:2n-6, 20:3n-3, 21:5n-3, 22:5n-6, 22:2NIMDb at<1.4% each.

⁴n-3 HUFA and DHA content of dry weight % = total lipid of dry weight (%)×area (%)×0.892 (Yoshimatsu et al., 1997).

⁵Advantage (70%)+Chlorella (30%).

긍정적인 영향을 미치기 때문이며(Bisbal and Bengtson, 1995), 특히, phospholipid는 사료섭취 개선(Koven et al., 1998), 장에서의 유화제로써의 역할(Koven et al., 1993), 장이나 영양 강화시 지질의 산화 방지(McEvoy et al., 1995; Murai et al., 1988) 및 장의 장낭종에서의 lipoprotein합성을 자극(Fontagne et al., 1998)하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 본 연구에서 Enhance, Advantage 및 Advantage+Chlorella로 영양 강화한 rotifer의 phospholipid의 비율이 Algamac-2000과 DHA-Selco를 공급한 rotifer보다 높게 나타나 어류 자어의 성장과 생존을 보다 개선시킬 수 있는 영양 강화제로 판단된다.

초기 해산 자어의 정상적인 성장을 위한 n-3 HUFA의 중요성에 대한 연구가 많이 이루어졌는데, Planas and Cunha (1999)는 넙치 자어에 있어서 rotifer의 건조 중량당 2% 이상, turbot

자어는 1.3% 이상을 요구한다고 보고하였다. 또한 Yoshimatsu et al. (1997)은 대부분의 해산 어류의 자어는 이들의 건강한 성장을 위해서 약 3-4%의 n-3 HUFA를 요구한다고 보고하였다. 본 실험에 있어서 각 영양 강화제로 24시간 영양 강화한 rotifer의 n-3 HUFA는 DHA-Selco, Advantage 및 Enhance가 2.9% 이상으로 Yoshimatsu et al. (1997)이 제시한 요구량에 가까운 값을 보였다. 그러나 Advantage+Chlorella와 Algamac-2000은 각각 2.4%, 2.2% 정도로 낮은 경향을 보였지만 Planas and Cunha (1999)가 제시한 해산 어류 자어의 요구량에 충족시켜 줄 수 준인 것으로 판단된다.

Rodriguez et al. (1996)은 rotifer의 영양 강화는 영양 강화제의 공급량보다 시간이 중요하다고 보고하였는데 다양한 유화 오일을 영양 강화제로 이용한 실험에서 rotifer의 총 지질의 함

량은 3시간 이후 큰 변화가 없는 것으로 나타났다. 본 실험에서도 다양한 영양 강화제로 공급할 경우 6시간 후 모든 실험구에서 뚜렷한 차이는 보이지 않았다. 또한 Watanabe (1993)의 연구 보고에 의하면 유화오일을 이용한 rotifer 영양 강화시 12시간 이후 n-3 HUFA의 함량은 변화가 없는 것으로 나타났다. 본 실험에서도 유화오일인 DHA-Selco와 Algamac-2000 및 Advantage+Chlorella는 12시간 이후 n-3 HUFA의 함량은 차이가 없지만 Enhance와 Advantage는 12시간 이후 증가하는 경향을 보였다. Yoshimatsu et al. (1997)이 제시한 n-3 HUFA의 요구량을 고려할 경우, Enhance와 Advantage는 24시간 영양 강화하는 것이 효과적인 것으로 판단된다. 한편 Advantage에 Chlorella를 첨가할 경우 n-3 HUFA의 함량이 Advantage만 공급한 것보다 증가하지 못하는 경향을 보였는데 이것은 Chlorella 내의 n-3 HUFA 함량이 낮기 때문인 것으로 판단된다. 그러나 Algamac-2000의 경우 n-3 HUFA의 함량이 자체 내 비교적 높음에도 불구하고 rotifer의 n-3 HUFA 함량이 낮게 나타나는 것은 rotifer의 이용성에 대한 문제점이 있는 것으로 판단된다.

최근 n-3 HUFA인 DHA, EPA 및 ARA는 많은 해산 어류 자어의 필수 지방산으로 이용되고 있으며 특히, 이들의 상대적인 비율이 매우 중요하다고 보고하였다(McEvoy et al., 1998a; Estevez et al., 1999; Sargent et al., 1999). 이것은 DHA와 EPA 뿐만 아니라 EPA와 ARA간의 경쟁적인 상호 작용 때문이다. DHA와 EPA는 phospholipid구조에서 fatty acid을 에스테르화시키는데 같은 효소를 사용하는 경쟁 물질(분자)로 알려져 있다(Sargent et al., 1999). 일반적으로 DHA는 신경조직에 많이 분포하고 있으며 신경막 조직과 기능에 중요한 역할을 한다(Bell and Dick, 1991). 그러므로 DHA보다 상대적으로 높은 EPA 사료는 자어의 신경 기능에 부정적인 효과를 줄 가능성이 높기 때문에 자어의 성장과 생존에 나쁜 영향을 미칠 수 있다(Bell et al., 1995; Rodriguez et al., 1997).

Sargent et al. (1999)는 일반적으로 해산 자어에 대한 먹이생물의 최적 DHA/EPA비율은 2:1로 보고하고 있지만 어종에 따라서 이들의 비율은 조금 차이가 있다고 보고하였다. 예를 들면 Estevez et al. (1999)의 실험에서 turbot 자어의 경우, rotifer의 DHA/EPA (0.1~3.1) 비율에 따라서 성장과 생존율은 차이가 없는 것으로 나타났고, Furuita et al. (1999)은 넙치 자어의 경우, DHA/EPA 비율은 성장과 생존율에 있어서의 차이는 나타나지 않았지만 염분 노출 stress실험에서 DHA가 EPA보다 중요하다고 보고하였다. 그러나 Rodriguez et al. (1997)은 초기 gilthead seabream에서 DHA/EPA (0.3~1.4)율이 높을수록 이들의 성장이 높게 나타났고, 특히, Copeman et al. (2002)은 냉수성 어종인 노랑 가자미의 경우 DHA/EPA의 비율은 7:1로 높은 DHA 함량을 요구하는 것으로 보고하였다. 또한 대구, *Gadus macrocephalus* 자어와 대서양 halibut의 경우, DHA가 이들 어종의 높은 성장과 생존율을 위해서 EPA보다 매우 높게 요구된다고 보고된 바 있다(Zheng et al., 1996; Evjemo et al., 2003).

본 실험의 경우, 각 영양 강화제로 영양 강화된 rotifer의 DHA/EPA의 비율이 모두 4:1이상으로 DHA의 비율이 높게 나타났지만 DHA의 요구량이 매우 높은 냉수성 어류를 대상으로 먹이로 공급될 경우, DHA/EPA의 비율이 11:1로 가장 높은 Advantage+Chlorella가 rotifer의 영양 강화제로 적합할 것으로 판단된다.

또한 EPA와 ARA의 상호 경쟁적인 작용은 eicosanoid형성에 있어서 매우 중요하다(Sargent et al., 1999). Eicosanoid는 자어의 성장, 생존, 난질, 면역, stress 저항, 변태, 체색 변이 등 다양한 생리적 역할을 수행하는 것으로 보고되고 있다(Bell and Sargent, 2003). EPA와 ARA는 eicosanoid형성을 위한 기질이며, ARA가 EPA보다 높은 생리적 활성을 가지는 eicosanoid를 생성한다(Bell et al., 1994). 이러한 측면에서 ARA의 비율이 높을수록 gilthead sea bream의 성장, 생존, stress의 저항이 높은 것으로 보고되고 있다(Bessonart et al., 1999). 그러나 상대적으로 ARA가 EPA보다 높은 먹이를 섭취할 경우 flatfish인 turbot, 대서양 halibut, 노랑 가자미 및 넙치 자어의 체색 변이 현상이 높게 나타나는 것으로 보고되고 있는데(Estevez et al., 1999; McEvoy et al., 1998b; Copeman et al., 2002), 이것은 지나친 eicosanoid 활성화에 의한 stress 상승의 결과로 보고되고 있다. 따라서 Bell et al. (2003)는 EPA/ARA 비율이 5:1이상으로 하는 것이 이체류 어류 자어의 체색 변이 현상을 감소시킬 수 있다고 보고하였다. 또한 최근 연구 보고에 의하면 자어 성장을 위한 어종마다 EPA/ARA 비율이 다르게 요구되는데 sea bass 및 striped bass가 각각 1:1, 3:1인 것으로 보고하였다(Sargent et al., 1999; Harel et al., 2001). 따라서 본 실험에서 EPA와 ARA의 함량이 DHA보다 상당히 낮게 나타났지만 rotifer 영양 강화를 위한 Algamac-2000과 DHA-Selco는 이체류의 먹이로 공급될 경우 자어의 체색 변이율을 높일 가능성이 있을 것으로 판단된다.

일반적으로 먹이 생물에 있어서 단백질보다는 지질에 많은 관심을 두고 연구되어 왔다. 그러나 단백질의 구성물질인 아미노산은 해산 어류 자어의 첫 먹이 섭취 이후 신진대사 에너지 및 생체 근육의 증가에 매우 중요한 역할을 하기 때문에 외부로부터의 아미노산의 요구는 증가된다(Rønnestad et al., 1999).

해산 자어의 초기 먹이 생물인 rotifer의 단백질 함량은 건조중량당 28~67%로 다양하게 나타나지만 구성 아미노산의 조성은 먹이종류 및 먹이의 질에 관계없이 거의 일정하게 나타난다(Lubzens et al., 1989). Øie and Olsen (1997)은 rotifer의 단백질 함량은 매우 다양한 변화를 가지며 이들의 먹이 섭취 및 성장 상태에 따라서 많은 영향을 받는 것으로 보고하였다. 그러나 rotifer의 단백질 함량은 영양 강화(지질) 시 혹은 굶김 상태에서는 감소하는 경향을 보였다(Øie et al., 1997; Øie and Olsen, 1997). 본 실험에 있어서 Enhance, Advantage, Algamac-2000 및 DHA-Selco를 이용하여 영양 강화한 rotifer의 단백질 함량은 시간이 경과함에 따라 영양 강화 이전의 rotifer 단백질

함량보다 감소하는 경향을 보였다. 그러나 영양 강화제에 rotifer의 배양 먹이인 담수 *Chlorella*를 첨가하였을 경우, 단백질 함량은 영양 강화 이전 rotifer 단백질 함량과 거의 일정하게 유지되는 경향을 보였다. 이것은 영양 강화 시 rotifer가 단백질 함량이 높은 담수 *Chlorella* (Maruyama et al., 1997)를 섭취함으로써 그들의 단백질 함량이 감소되는 경향을 줄인 것으로 판단된다. 또한 단백질 함량이 276 mg/g DW으로 일반적으로 해양 미세조류인 *Tetraselmis* sp., *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*를 먹이로 배양한 rotifer (Reitan et al., 1997)의 단백질 함량 317-334 mg/g DW보다 조금 낮게 나타났는데 이것은 영양 강화 이전에 rotifer 배양시 성장 상태(먹이 종류, 성장률 등)에 의한 것으로 판단된다(Øie and Olsen, 1997). 따라서 단백질 함량이 높은 rotifer를 생산하기 위해서는 영양 강화 이전의 rotifer 배양 상태도 신중하게 고려되어야 할 것으로 판단된다.

Øie et al. (1997)은 초기 turbot 자어를 대상으로 높은 단백질/지질 비율로 높은 단백질 함량을 가진 rotifer를 섭취하였을 경우, 이들의 성장과 생존율이 높게 나타났다고 보고하였다. 이처럼 해산 자어의 초기 먹이 섭취 시 단백질 함량이 높은 사료를 공급하는 것은 매우 중요하므로 본 실험과 같이 같은 지질 함량을 가졌더라도 rotifer 영양 강화 시 단백질의 함량이 감소되는 것을 억제하거나 영양 강화 이전으로 유지하는 것이 필요할 것으로 판단된다. 이러한 관점에서 영양 강화제에 단백질 함량이 높은 담수 *Chlorella vulgaris* (Maruyama et al., 1997)의 첨가는 이중에 DHA 및 EPA가 전혀 없어, 영양 강화제만을 섭취한 rotifer의 DHA/EPA 비율에 영향을 끼치지 않으면서 rotifer의 단백질/지질 비율을 높일 수 있을 것으로 판단된다.

본 실험을 종합하여 볼 때, 정상적인 해산 어류 자어의 성장을 위해서 이들이 요구하는 지질의 구성, 필수 지방산의 함량 및 비율과 단백질의 함량 등을 고려할 경우, 영양 강화제에 담수 *Chlorella*를 첨가하여 영양 강화시키는 것이 적합할 것으로 판단되며 앞으로 다양한 영양 강화제에 효율적인 담수 *Chlorella*의 첨가 방법과 어류 자어를 대상으로 한 검증 실험 등이 이루어져야 할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 해산 어류의 성장 및 높은 생존율 개선을 위하여 rotifer의 효율적인 영양 강화제를 선택할 목적으로 여러 가지 영양 강화제의 종류(Enhance, Advantage, Algamac-2000, DHA-Selco 및 Advantage+Chlorella)와 영양 강화 시간(6, 12 및 24 시간)에 따른 rotifer의 생화학적 조성을 조사하였다.

영양 강화제의 종류에 따른 총 지질은 영양 강화 시간에 따라 증가하였지만, 영양 강화제의 종류 및 영양 강화 시간에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았다. 그러나 Advantage+Chlorella 실험구를 제외한 rotifer의 총 단백질 함량은 영양 강화 시간에 따라서 감소하는 경향을 보였다. 모든 실험구에서 영양 강화된

rotifer의 단백질/지질의 비율은 초기 영양 강화 이전의 rotifer (5.0)보다 감소하는 경향을 보였고 Advantage+Chlorella 실험구에서 2.7로 가장 높게 나타났다. Enhance, Advantage 및 Advantage+Chlorella로 영양 강화된 rotifer의 phospholipid 비율이 Algamac-2000과 DHA-Selco보다 유의적으로 높게 나타났다. 모든 실험구의 rotifer 건조 중량 기준으로 DHA 함량은 영양 강화 시간에 따라 증가되는 경향을 보였고, 24시간 이후 가장 높은 DHA 함량은 Advantage 실험구에서 2.5%로 나타났지만 Algamac-2000 실험구를 제외한 모든 실험구와는 유의적인 차이는 보이지 않았다. 그리고 n-3 HUFA 및 DHA의 함량은 Algamac-2000, DHA-Selco 및 Advantage+Chlorella 실험구의 12시간과 24시간 간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 영양 강화된 rotifer의 DHA/EPA의 비율은 가장 높은 Advantage+Chlorella 실험구의 11:1과 가장 낮은 DHA-Selco 실험구의 4:1과는 유의적인 차이를 보였다.

본 연구의 결과를 통해서 Enhance, Advantage, Advantage+Chlorella로 영양 강화된 rotifer의 phospholipid, DHA/EPA, protein/lipid의 비율이 Algamac-2000 및 DHA-Selco의 것보다 높아 모든 해산 어류 자어를 위해서 rotifer의 영양을 개선할 수 있는 효과적인 영양 강화제로 판단된다. 특히, rotifer의 영양 강화시 *Chlorella*의 첨가는 자어의 성장을 위해서 중요한 protein 함량이 감소되지 않기 때문에 효과적인 방법인 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 한국과학재단의 해외 Post-doc. 연수지원에 의하여 연구된 결과로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Bell, M. V. and J. R. Dick, 1991. Molecular species composition of the major diacylglycerophospholipids from muscle, liver, retina, and brain of cod (*Gadus morhua*). *Lipids*, **26**: 565-573.
- Bell, J. G., D. R. Tocher and J. R. Sargent, 1994. Effect of supplementation of 20:3(n-6), 20:4(n-6) and 20:5(n-3) on the production of prostaglandins E and F of the 1-, 2- and 3-series in turbot (*Scophthalmus maximus*) brain astroglial cells in primary culture. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1211**: 335-342.
- Bell, M. V., R. S. Batty, J. R. Dick, K. Fretwell, J. C. Navarro and J. R. Sargent, 1995. Dietary deficiency of docosahexaenoic acid impairs vision at low light intensities in juvenile herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids*, **30**: 443-449.
- Bell, J. G. and J. R. Sargent, 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture*, **218**: 491-499.
- Bell, J. G., L. A. McEvoy, A. Estevez, R. J. Shields and J. R. Sargent, 2003. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture*, **227**: 211-220.
- Bessonart, M., M. S. Izquierdo, M. Salhi, C. M. Hernández-Cruz,

- M. M. González and H. Fernández-Palacios, 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquaculture*, **179**: 265–275.
- Bisbal, G. A. and D. A. Bengtson, 1995. Development of the digestive tract in larval summer flounder. *J. Fish Biol.*, **47**: 277–291.
- Budge, S. M., 1999. Fatty acid biomarkers in a cold water marine environment. Ph. D. thesis, Memorial University of Newfoundland, St. John's, Newfoundland, Canada. 197 pp.
- Copeman, L. A., C. C. Parrish, J. A. Brown and M. Harel, 2002. Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture*, **210**: 285–304.
- Duncan, D. B. 1955. Multiple-range and multiple F tests. *Biometrics*, **11**: 1–42.
- Evans, R. P., P. Zhu, C. C. Parrish and J. A. Brown, 2000. Lipid and amino acid metabolism during early development of marine fish. In Shahidi F. (Ed.), *Seafood in Health and Nutrition-Transformation in Fisheries and Aquaculture: Global Perspectives*, ScienceTech Publishing Company, St. John's, Newfoundland, pp. 477–493.
- Estevez, A., L. A. McEvoy, J. G. Bell and J. R. Sargent, 1999. Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live-prey enriched in arachidonic and eicosapentaenoic acids. *Aquaculture*, **180**: 321–343.
- Evjemo, J. O., K. I. Reitan and Y. Olsen, 2003. Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture*, **227**: 191–210.
- Folch, J., M. Lees and G. H. Sloane-Stanley, 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **22**: 497–509.
- Fontagne, S., I. Geurden, A. M. Escaffre and P. Bergot, 1998. Histological change induced by dietary phospholipids in intestine and liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture*, **161**: 213–223.
- Furuita, H., K. Konishi and T. Takeuchi, 1999. Effect of different levels of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in *Artemia* nauplii on growth, survival and salinity tolerance of larvae of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **199**: 59–69.
- Harel, M., S. Gavasso, J. Leshin, A. Gubernatis and A. R. Place, 2001. The effect of tissue docosahexaenoic and arachidonic acids levels on hypersaline tolerance and leucocyte composition in striped bass (*Morone saxatilis*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.*, **24**: 113–107.
- Izquierdo, M. S., J. Socorro, L. Arantzamendi and C. M. Hernandez-Cruz, 2000. Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiol. Biochem.*, **22**: 97–107.
- Kanazawa, A., 1997. Effects of docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish. *Aquaculture*, **155**: 129–134.
- Kang, S. J., Y. S. Lim, S. U. Park, W. J. Lee, B. D. Cho, H. G. Park, Y. S. Park and H. Y. OH, 1999. Availability of marine bacteria (*Erythrobacter* sp. Sd-1) for enrichment of livefood in the slime flounder larvae, *Microstomus achne*. *J. Korean Fish. Soc.*, **32**(6): 798–802 (in Korean).
- Koven, W. M., S. Kolkovski, A. Tandler, G. Wm. Kissil and D. Sklan, 1993. The effect of dietary lecithin and lipase, as a function of age, on n-9 fatty acid incorporation in the tissue lipids of *Sparus aurata* larvae. *Fish Physiol. Biochem.*, **10**: 357–364.
- Koven, W. M., G. Parra, S. Kolkovski and A. Tandler, 1998. The effect of dietary phosphatidylcholine and its constituent fatty acids on microdiet ingestion and fatty acid absorption rate in gilthead sea bream, *Sparus aurata*, larvae. *Aquac. Nutr.*, **4**: 39–45.
- Lubzens, E., O. Gibson, O. Zmaora and A. Sukenik, 1989. Rotifers as food in aquaculture. *Hydrobiologia*, **186/187**: 387–400.
- Maruyama, I., T. Nakao, I. Shigeno, Y. Ando and K. Hirayama, 1997. Application of unicellular algae *Chlorella vulgaris* for the mass-culture of marine rotifer *Brachionus*. *Hydrobiologia*, **358**: 133–138.
- McEvoy, L. A., J. C. Navarro, J. G. Bell and J. R. Sargent, 1995. Autoxidation of oil emulsions during the *Artemia* enrichment process. *Aquaculture*, **134**: 101–112.
- McEvoy, L. A., A. Estevez, J. G. Bell, R. J. Shields, B. Gara and J. R. Sargent, 1998a. Influence of dietary levels of eicosapentaenoic and arachidonic acids on the pigmentation success of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Bull. Aquacult. Assoc. Can.*, **98**: 17–20.
- McEvoy, L. A., T. Naess, J. G. Bell and Ø. Lie, 1998b. Lipid and fatty acid composition of normal and malpigmented Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed enriched *Artemia*: a comparison with fry fed wild copepods. *Aquaculture*, **163**: 237–250.
- Mercier, L., C. Audet, J. No?e., B. Parent, C. C. Parrish and N. W. Ross, 2004. First feeding of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) larvae: use of *Brachionus plicatilis* acclimated at low temperature as live prey. *Aquaculture*, **229**: 361–376.
- Morrison, W.R. and L.M. Smith, 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride methanol. *J. Lipid Res.*, **5**: 600–608.
- Murai, T., T. Akiyama, H. Ogata and T. Suzuki, 1988. Interaction of dietary oxidised fish oil and glutathione of fingerling yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **54**: 145–149.
- Øie, G. and Y. Olsen, 1997. Protein and lipid content of the rotifer *Brachionus plicatilis* during variable growth and feeding condition. *Hydrobiologia*, **358**: 251–258.
- Øie, G., P. Makridis, K. I. Reitan and Y. Olsen, 1997. Protein and carbon utilization of rotifers (*Brachionus plicatilis*) in first feeding of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, **153**: 103–122.
- Parrish, C. C., 1987. Separation of aquatic lipid classes by Chromarod thin-layer chromatography with measurement by Iatroncan flame ionization detection. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **44**: 722–731.
- Parrish, C. C., 1998. Determination of total lipid, lipid classes and

- fatty acids in aquatic samples. In: Arts, M. T., Wainman, B. C. (Eds.), *Lipids in Freshwater Ecosystems*. Springer-Verlag, New York, pp. 4–12.
- Park, H. G., S. K. Kim, K. Y. Park and Y. J. Park, 1999a. High density cultivation of rotifer, *Brachionus rotundiformis* in the different diets. *J. Korean Fish. Soc.*, **32**(3): 280–283 (in Korean).
- Park, H. G., K. W. Lee, S. M. Lee, S. K. Kim and H. S. Kim, 1999b. Change of fatty acid compositions of rotifer according to enrichment diets methods in the high density culture. *J. Korean Fish. Soc.*, **32**(6): 748–752 (in Korean).
- Park, H. G., K. W. Lee, S. K. Kim, S. M. Lee, J. H. Lee and Y. S. Lim, 2000. Dietary value of rotifer fed on the different diets in high density culture for flounder larvae, *Paralichthys olivaceus*. *J. Korean Fish. Soc.*, **33**(2): 93–97 (in Korean).
- Planas, M. and I. Cunha, 1999. Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, **177**: 171–190.
- Rainuzzo, J.R., K.I. Reitan and Y. Olsen, 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*, **155**: 103–115.
- Reitan, K. I., J. S. Rainuzzo, G. Øie and Y. Olsen, 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture*, **155**: 207–221.
- Rodríguez, C., J. A. Pérez, M. S. Izquierdo, J. R. Cejas, A. Bolaños and A. Lorenzo, 1996. Improvement of the nutritional value of rotifers by varying the type and concentration of oil and the enrichment period. *Aquaculture*, **147**: 93–105.
- Rodríguez, C., J. A. Perez, M. Diaz, M. S. Izquierdo, H. Fernandez-Palacios and A. Lorenzo, 1997. Influence of EPA/DHA ratio in rotifers on gilthead seabream (*Sparus aurata*) larval development. *Aquaculture*, **150**: 77–89.
- Rønnestad I., A. Thorsen and R. N. Finn, 1999. Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture*, **177**: 201–216.
- Sargent, J., L. A. McEvoy and J. G. Bell, 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, **155**: 117–127.
- Sargent, J., J. G. Bell, L. A. McEvoy, D. Tocher, and A. Estevez, 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, **177**: 191–199.
- Takeuchi, T., F. Zheng, T. Takeuchi, M. Yosheda, J. Hirokawa and T. Watanabe, 1994. Nutritive value of DHA-enriched rotifer for larval cod. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **60**: 641–652 (in Japanese).
- Takeuchi, T., 1997. Essential fatty acid requirements of aquatic animals with emphasis on fish larvae and fingerlings. *Fisheries Science*, **5**: 1–25.
- Watanabe, T., 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *J. World. Aquacult. Soc.*, **24**: 152–161.
- Yoshimatsu, T., H. Imoto, M. Hayashi, K. Toda, and K. Yoshimura, 1997. Preliminary results in improving essential fatty acids enrichment of rotifer cultured in high density. *Hydrobiologia*, **358**: 153–157.
- Zheng, F., T. Takeuchi, K. Yosheda, M. Kobayashi, J. Hirokawa and T. Watanabe, 1996. Requirement of larval cod for arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid using by their enriched *Artemia* nauplii. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **62**: 669–676 (in Japanese).

원고접수 : 2004년 3월 9일

수정본 수리 : 2004년 7월 28일

책임편집위원 : 황형규