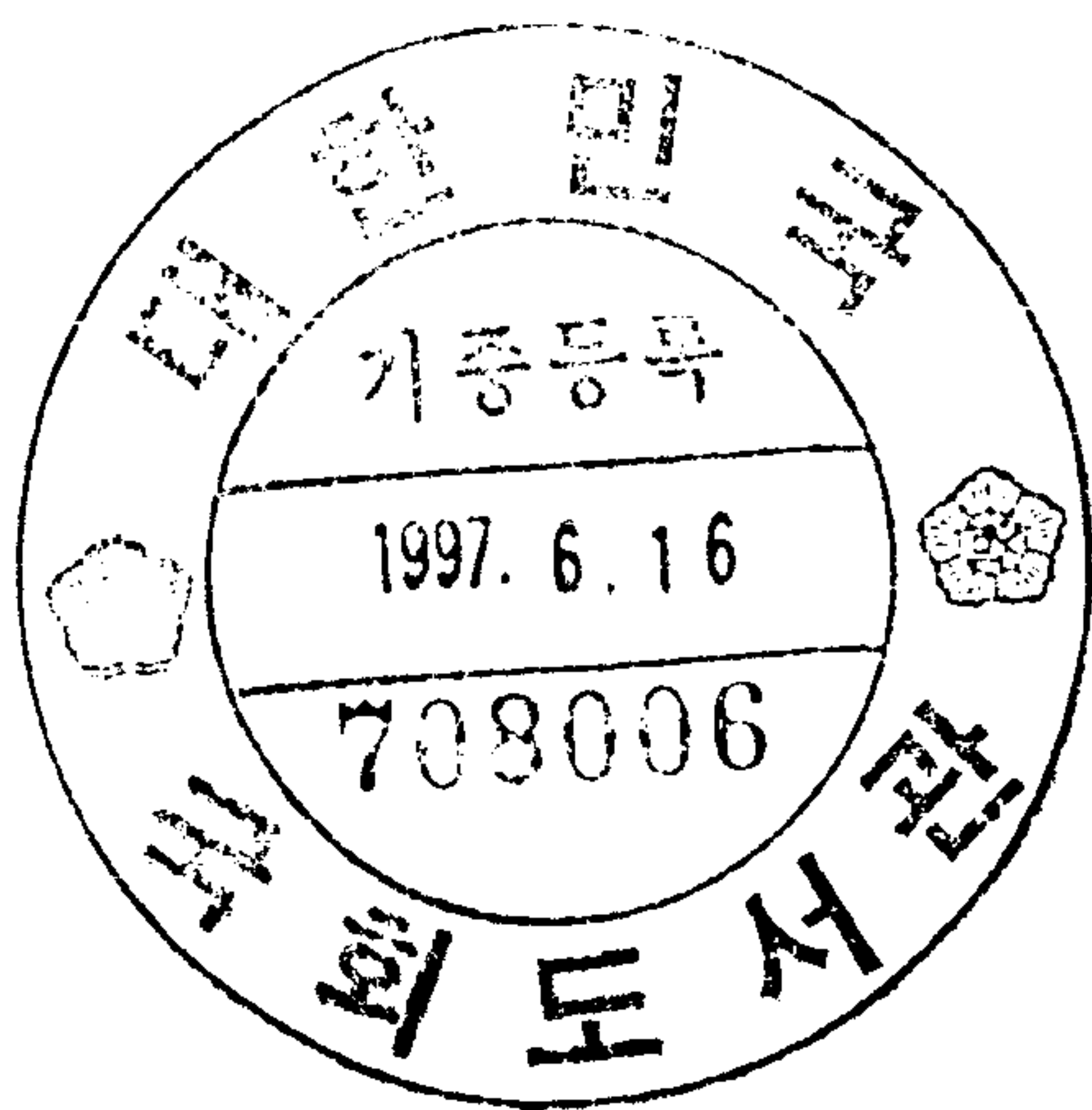


**우렁쉥이 껍질 및 색소를
이용한 양식소재 개발**

**Utilization of Pigments and Tunic
Components of Ascidian as an
Improved Feed Aids for Aquaculture**

**연구기관
부 경 대 학 교**

농 립 수 산 부



최종보고서

1995년도 농림수산특정연구사업에 의하여 완료한 '우렁챙이
겉질 및 색소를 이용한 양식소재 개발'에 관한 연구의 최종
보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨부 : 1. 최종보고서 8부
2. 자체평가의견서 8부
3. 최종보고서 디스켓 1매

1996. 10.

주관 연구 기관 : 부경대학교

총괄연구책임자 : 이 강 호 (인)

주관연구기관장 : 직인

농 립 수 산 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림수산부 장관 귀하

본 보고서를 “우렁쉥이 껍질 및 색소를 이용한 양식소재 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1996. 10.

주관연구기관명 : 부경대학교
총괄연구책임자 : 이 강 호
연 구 원 : 최 병 대
 " : 강 석 중

요 약 문

I. 제 목

우렁쉥이 껍질 및 색소를 이용한 양식소재 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

연어류 등은 생체내에서 카로테노이드 생합성이 불가능하므로 양식할 때 사료에 일정량의 색소성분을 첨가하여 급이하여야 하는 생리적 특성을 갖고 있다. 1992년 FDA에서 식품 및 양어사료에 합성 착색제의 첨가를 금지한 이래 많은 연구자들이 새로운 천연 착색제를 탐색하고 있다.

본 연구자들은 지난 3년동안 우렁쉥이 껍질 추출물을 무지개송어에 첨가하여 채색발현을 조사해 오고 있다. 그 결과 우렁쉥이 껍질에서 추출한 색소를 양어사료에 첨가하였을 때 독성을 나타내지 않았으며, 천연색소로서 인공합성색소의 단점을 개선할 수 있으며, 폐기되는 자원을 재활용할 수 있을 뿐만 아니라 저장 안정성이 높아 경제성이 있는 것으로 나타났다. 그래서 추출물 자체가 액체상태이고 양적으로 아주 적기 때문에, 효과적인 부형제의 사용이 필수적이다. 그래서 본 연구자들은 우렁쉥이 껍질속의 색소 뿐만 아니라 껍질마저도 부형제로서 이용하려는 방안을 시도하였다.

껍질 속에는 tunicin이라는 식물성 셀룰로즈와 유사한 다당류를 함유하고 있는 것으로 알려져 있을 뿐, 이의 물리적 및 화학적 특성에 관한 연구는 없는 실정이다. 따라서 본 연구자들은 껍질로부터 색소

흡착능이 있는 물질을 추출하고 여기에 추출된 색소성분을 흡착시킨 천연색소흡착제의 개발을 목표로 하여 새로운 천연색소첨가제의 개발을 시도하였다.

새로이 개발된 천연색소첨가제 일정량을 무지개송어용 사료에 첨가하여 일정기간 사육한 결과 정상적인 성장 및 착색이 되는 것으로 나타나 천연색소원으로서 상업화가 가능한 것으로 나타나 인공합성색소를 대체할 수 있을 것으로 여겨진다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 우렁쟁이 껍질 분말로부터 색소를 흡착할 수 있는 수용성 물질을 분리하고 이의 물리·화학적 특성을 조사함과 아울러 이 성분을 양어사료에 첨가하였을 때 어류가 정상적인 성장을 하는가를 살펴보고자 하였고, 항균력, ACE 저해능, 항혈액응고력, 등의 생리적 특성 뿐만 아니라, 껍질 분말의 효소처리 및 autoclave처리에 의한 조다당류의 추출효율, 부분정제한 조다당류의 물리·화학적 특성, 부분정제한 조다당류의 구조 및 기능성, 껍질로부터 색소 추출, 추출된 색소의 조다당류에의 흡착능, 색소가 흡착된 조다당류를 첨가한 무지개송어용 사료조제, 무지개송어 사육, 성장과정, 사육된 무지개송어 육 및 표피 중의 색소침착 정도, 무지개송어 육 및 간의 총지질 추출 및 분석, 인지질 함량의 측정, 총지질 구성지방산의 조성 등을 조사하였다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 효소처리 및 autoclave처리에 의한 추출효율

우렁쟁이 껍질의 일반성분 조성은 색소를 함유한 것과 탈색시킨

분말 모두 거의 유사한 경향을 보였다. 총 탄수화물의 양은 일반성분 함량의 약 50%를 차지하였고, 단백질이 약 40%를 차지하였다. 처리조건에 따른 조추출물(crude polysaccharides)의 수율을 검토한 결과, 효소처리 및 autoclave처리 모두 최대 약 10% 정도의 수율을 보였으며, 효소처리의 경우 alkalase, neutrase, 복합-2000 중에서 neutrase의 추출수율이 비교적 높았으며 경제성과 추출수율을 고려할 때 바람직한 첨가비율은 3% 정도였다. 3%를 첨가한 neutrase의 처리시간에 따른 수율을 조사한 결과 약 24시간 처리가 가장 효과적이었으며 에탄올 처리 농도는 70% 처리가 가장 우수하였다. 또한 에탄올처리시 방치시간에 따른 수율을 검토한 결과 약 17시간 방치했을 때, 최대 수율을 나타내었다. 한편, autoclave처리시간에 따른 추출수율을 검토한 결과 6시간 처리가 추출수율이나, 처리시간 면에서 가장 바람직하였고, 추출수율은 약 9.7% 정도였다. 추출된 조추출물의 화학적조성은 sulfate, uronic acid, protein, chondroitin sulfate, amino sugar, hexosamine 등으로 이루어졌으며, sulfate와 chondroitin sulfate의 함량이 다소 많았으며, protein과 uronic acid의 함량은 소량이었다.

2. 부분정제한 조다당류의 조성 및 특성

이온교환수지 및 겔 여과한 결과 2개의 활성획분을 얻었으며, 이들의 화학적조성은 조추출물과 거의 유사하였다. 탈색시킨 우렁쉥이 분말과 효소처리 및 autoclave처리한 조추출물의 아미노산조성은 세시료 모두 유사한 결과였다. Histidine의 함량이 가장 많았으며, 특히 neutrase처리구는 29.2%였으며, autoclave처리구는 20.4%였다. Aspartic acid와 glutamic acid가 9.1-12.2%로 상당량 존재하였다. 필수 아미노산 함량은 탈색한 분말, neutrase처리구, autoclave처리구 각각 31.7%, 26.3%, 29.5%였다.

또한, 이들 세시료의 무기질 함량은 조추출물의 경우 Ca의 함량이

월등히 많았으며, 다음이 Mg과 Na 순이었다. 탈색한 시료는 Na의 함량이 가장 많았고, Ca>Mg>Fe의 순이었다. 색소함유한 시료의 경우 Ca>Mg>Na>Fe의 순이었다.

3. 부분정제 조다당류의 구조 및 기능성

조추출물과 표준품 chondroitin sulfate의 FT-IR spectrometer 분석 결과 거의 유사한 결과를 나타내었다. 황산기나 에스테르등 몇몇 중요한 원자단의 신축 진동수가 IR spectrum의 지문영역(1500-700cm⁻¹)에서 나타났다. 황산기 중의 S=O 신축진동이 1240cm⁻¹에서, C-O-S 신축진동의 경우 수직향배는 850cm⁻¹, 수평향배는 820cm⁻¹에서 나타났고, 세시료 모두 1240cm⁻¹과 820cm⁻¹에서 흡수대를 나타내었다. 또한 3400cm⁻¹부근에서 O-H 신축진동, 2900cm⁻¹부근에서 C-H 신축진동, 1650cm⁻¹부근의 C=O결합의 신축진동을 나타내었다.

한편, 조추출물의 물리적 특성 중에서 유화능과 포말성이 우수하였으며, 특히 색소흡착능이 뛰어났다. 이밖에 항혈액응고능과 ACE저해 효과도 있는 것으로 나타났다.

4. 무지개송어의 사육결과

우렁쉥이 껍질에서 분리한 조추출물에 우렁쉥이 색소추출물을 흡착시킨 후 무지개송어의 사료에 일정량 혼합하여 사육시킨 무지개송어의 일반성분 조성 중 수분함량은 사육 4주 후에는 77%, 8주 후에는 72% 내외였다. 조단백질의 함량은 4주 후보다 8주 후가 증가된 양상을 보였다. 조지방의 경우도 8주 후 약간 증가하는 경향이였다.

이들의 무기질함량 변화는 P와 K의 함량이 월등히 많았으며 Ca, Na, Mg의 함량도 상당량 존재하였다. Mg의 함량은 4주 후보다 8주 후의 함량이 약 배로 증가하였으며, Ca, Mg의 함량도 증가하였다.

무지개송어 근육 중 카로테노이드 함량은 대조구에 비하여 색소침

가구에서의 함량이 높게 나타났고, 우렁쉥이 껍질로부터 추출한 조다당류 물질의 첨가구는 색소추출물 첨가구에 비하여 색소함량이 다소 낮았지만 색소침착을 저해하는 경향은 아니었다. 무지개송어 근육 및 간지질의 지방산조성을 분석한 결과 근육 중의 고도불포화지방산의 함량은 4주 후 색소추출물 및 조다당 첨가구가 pink구에 비하여 다소 낮았으며, 8주 후에도 큰 변화는 없었다. 간지질 중의 고도불포화지방산의 함량은 4 및 8 주 후 조다당류 첨가구에서 가장 높아 조다당류 첨가시 간지질 중 고도불포화지방산의 축적이 높은 것으로 나타났다.

5. 활용에 대한 건의

우렁쉥이 껍질로부터 부형제로 사용할 수 있는 물질을 분리하여, 색소추출물을 흡착시켜 본 결과 색소흡착능이 뛰어난 물질인 것으로 나타났다. 지금까지 보고된 바로는 우렁쉥이 껍질에는 sulfated chitin이 존재하는 것으로 알려져 있으나 본 연구자들의 연구결과로 미루어 볼 때 chondroitin성 물질인 것으로 생각되어진다. 이 물질의 여러 가지 물리·화학적 특성 상 부형제로 개발하기 보다는 생리활성물질로서의 가능성을 검토해야 될 것으로 생각된다. 이 chondroitin성 물질은 세포외액의 용량조절과 수분대사, 세포외액의 이온성 물질의 이동과 조절, 골화·석회화에의 기여, 창상치료, 관절조직의 원활화, 혈액응고 저해작용, 각막투명도 유지작용, 감염방지작용 등이 알려져 있으며, 식품에 첨가하면 노화억제, 미용효과도 있어 이 분야에 대한 연구가 절실한 실정이다.

SUMMARY

I. Title

Utilization of pigments and tunic components of ascidian as an improved feed aids for aquaculture

II. Purpose and significance of research and development

Forage for salmon should be added with certain amount of pigments because salmon has a biological feature of unavailability of carotenoids biosynthesis. Since FDA's prohibition of use of synthetic colorants with food and forage for fish culture in 1992, many researchers have been studying to develop natural colorants.

The authors of this study have studied color development on rainbow trout with forage added with extracts of tunic components of ascidian for three years. The results of the studies of the addition of extracted pigments so far indicated no toxicity, improvement of disadvantages of artificial synthetic pigments, and economical efficiency due to not only possibility of recycling of resources but also highly stable storage. However, it is essential to use an effective vehicle, since extracts itself is liquid with very small amount. Thus, the authors attempted to use pigments combining with tunic components of ascidian as well as the tunic components themselves as vehicle.

Knowledge on the major components of ascidian tunic is limited to the

fact that tunic composes of tunicin, a kind of polysaccharides similar to vegetable cellulose, while very few studies have been performed on physical and chemical characteristics of the tunic components. So, the authors tried to prepare pigment binding material from the tunic components, in order to develop a natural colorant for an improved feed aid for aquaculture. Tunic pigments were extracted and combined with pigment binding tunic component from enzyme or autoclave treated hydrolysates of ascidian tunic.

Results of culture of the rainbow trout for certain period with forage added with certain amount of the newly developed natural colorant showed normal growth and good coloration of the rainbow trout, which means possible replacement of the artificial colorant with the natural colorant in actual marketplaces.

III. Contents and scope of research and development

The scope of this study ranged: investigation of physical and chemical characteristics of extracted pigment binding from powdered tunic of ascidian; normal growth of fish when fish feeded with this material; biological properties such as anti-bacterial ability, ACE inhibition activity, anti-blood coagulation, etc.; polysaccharides extraction efficiency through enzyme treatment and autoclave treatment of the powdered tunic components; physical/chemical characteristics, structure and functionality of partly refined polysaccharides, absorptivity of pigments extracted from tunic components for polysaccharides; preparation of feed added with pigment absorbed polysaccharides for rainbow trout; procedures of culture and growth of rainbow trout; level of pigment deposition in flesh and skin of cultured rainbow trout; extraction and partition total lipid of flesh and livers of rainbow trout; measurement of concentration of phospholipid; and

composition of free fatty acid consisting the total lipid.

IV. Results of study and development and suggestion for application

1. Extraction efficiency by enzyme and autoclave treatments

General composition of the tunic components of ascidian are similar between those containing pigments and those decolorized. Carbohydrate shared around 50% of the general compositions, while protein did around 40%. Results of reviewing yields of crude polysaccharides in accordance with conditions of treatment showed maximum 10% of yield both in the enzyme and autoclave treatment. In case of enzyme treatment, the extraction yield of neutrase was higher than that of alkalase or composite 2000, the desirable addition rate about 3% taking into account of economical efficiency and the extraction yield. The treatment period of 24 hours for neutrase by 3% was most effective, and 70% of ethanol concentration was most superior. Also 17 hours of negligence showed the maximum yield in case of ethanol treatment. On the other hand in autoclave treatment, 6 hour treatment showed most desirable extraction yield and treatment period, and the extraction yield was about 9.7%. The crude extraction consisted of sulfate, uronic acid, protein, chondroitin sulfate, amino sugar, hexosamine, etc., among which sulfate and chondroitin sulfate showed higher concentrations while protein and uronic acid did lower.

2. Composition and characteristics of partially refined polysaccharides

Two types of active materials were obtained through filtration of

ion-exchange resin and gel, and chemical composition of them are very similar to those of crude extraction. Compositions of amino acid of decolorized powdered the ascidian and the crude extraction from the autoclave treatment in the three samples were similar each other. Concentration of histidine was highest particularly in the neutrase treatment group 29.2% and in the autoclave treatment group 20.4%. Aspartic acid and glutamic acid significantly existed in the range of 9.1% to 12.2% respectively. Concentrations of essential amino acid in the decolorized powder group, the neutrase treatment group and the autoclave treatment group were 31.7%, 26.3% and 29.5% respectively.

Also for inorganic materials, concentration of Ca was significantly high followed by Mg and then Na. In the decolored sample, the concentration of Na was highest and then Ca, Mg and Fe in order. Highest concentration in the sample containing pigment was Ca, Mg and Fe in order.

3. Structure of functionality of partially refined polysaccharides

FT-IR spectrometer analysis of the crude extraction and standard chondroitin sulfate showed very similar results. Stretching vibration of major group such as sulfuric acid group and ester was shown in finger print region of IR spectrum(1500-700cm⁻¹). In case of C-O-S stretching vibration, if S=O was 1240cm⁻¹ in sulfuric acid group, vertical attitude appeared at 850cm⁻¹ and horizontal one at 820cm⁻¹, and all the three samples showed their absorption band between 1240cm⁻¹ and 820cm⁻¹. Also, O-H stretching vibration occurred in the vicinity of 3400cm⁻¹, C-H in that of 2900cm⁻¹ and C=O combination in that of 1650cm⁻¹. And among the physical characteristics of the crude extraction, emulsifiability and foaminess were excellent, and particularly pigment absorptivity was

superior. Other characteristics such as anti-blood coagulation and ACE inhibition activity were also noted.

4. Results of culture of rainbow trout

Moisture concentration among general composition of rainbow trout was more or less of 77% after 4 weeks and 72% after 8 weeks of culture with feed added with certain amount of crude extraction separated from the tunic components of pond snails absorbed by pigment extraction of pond snails. Concentration of crude protein after 8 weeks were higher than that after 4 weeks. So did crude fat.

P and K were significantly increased among inorganic composition, and considerable Ca, Na and Mg concentration were also noted. Concentration of carotenoid in pigment added group was higher than the control group, and the level of pigment concentration of the added group of chondroitin extracted from tunic components of ascidian at the was not the one which affects pigment deposit though was a little lower than the pigment added group. Results of analysis of composition of rainbow trout's flesh and liver lipid showed concentration of highly unsaturated fatty acid in flesh of the pigment extraction and the chondroitin added groups was a little lower than that of the pink group after 4 weeks, and showed no significant changes after 8 weeks. The highly unsaturated fatty acid in livers of the chondroitin added group was the highest after 4 and 8 weeks, which suggests addition of chondroitin contributed high accumulation of the highly unsaturated fatty acid in livers.

5. Suggestion for application

Absorption of extracted pigment extraction by the material as vehicle

separated from tunic components of ascidian was excellent material in pigment binding. Many studies on tunic components of ascidian reported sulfated chitin was functional, however in the results of this study it assumed to be chondroitin sulfate. It is suggested that this material should be reviewed not only for vehicle but also for possibility of biological active material not for vehicle when taking into account of various physical and chemical properties. It is urgent to further study of the chondroitin material, since it is known for adjustment of extracellular liquid, hydration, movement and adjustment of extracellular material, improvement of ossification/calcification, wound treatment, smoothing joint organization, anti-blood coagulation, maintenance of cornea transparency and prevention of hepatitis, as well as senility suppression and beauty effects when added on food.

CONTENTS

List of tables	21
List of figures	23
Chapter I . Introduction	26
Section 1. Study background	26
Section 2. Study purpose and experimental contents	29
Chapter II. Materials and Methods	32
Section 1. Materials	32
1. Pigments extraction from ascidian tunics	32
2. Polysaccharide extraction from ascidian tunics	32
(1) Enzyme extraction	32
(2) Autoclave extraction	33
3. Purification of polysaccharide	33
(1) Fractionation of partially purified polysaccharide on ion-exchange chromatography	33
(2) Fractionation of partially purified polysaccharide on Sephadex G-25	33
Section 2. Methods	34
1. Analysis of proximate compositions	34

2. Determination of sulfate and chondroitin sulfate -----	34
3. Determination of uronic acid -----	35
4. Determination of composed amino acid and minerals	35
5. Determination of angiotensin-I converting enzyme inhibition activity -----	35
6. Anti-blood coagulation -----	36
(1) Activated partial thromboplastin time -----	36
(2) Prothrombin time -----	37
7. IR spectrum and SEM of polysaccharide -----	37
8. Physical properties of polysaccharide -----	37
(1) Fat binding capacity -----	37
(2) Foam activity and foam stability -----	37
(3) Emulsifying activity and emulsifying stability -----	38
(4) Dye binding capacity -----	38
(5) Flow properties -----	39
9. Fish culture -----	40
(1) Fish -----	40
(2) Feeding experiment -----	40
(3) Diets -----	41
(4) Extraction of carotenoids -----	41
(5) HPLC analysis of astaxanthin -----	43
(6) Lipids analyses -----	43
① Total lipids extraction and analysis of lipid classes	43
② Determination of phospholipid -----	43
③ Gas chromatographic analyses -----	44

Chapter III. Results and Discussion ----- 45

Section 1. General properties of samples -----	45
1. Proximate compositions of samples -----	45
2. Extraction efficiency of polysacchrde on the extraction treatments -----	48
(1) Extraction efficiency of enzyme treatments -----	48
(2) Extraction efficiency of autoclave treatments -----	48
3. Chemical composition of polusaccaride -----	54
4. FT-IR analysis of polysaccaride -----	56
 Section 2. Purification of crude polysacchrde and specification -----	56
1. Fractionation of crude polysacchrde -----	56
2. Chemical composition of partially purified polysacchrde -----	60
3. FT-IR and SEM analysis of partially purified polysacchrde -----	60
 Section 3. Physical and flow properties of polysaccaride -	69
1. Physical properties -----	69
(1) Fat binding capacity and foam acitivity -----	69
(2) Emulsifying activity and dye binding capacity ---	73
2. Flow properties -----	75
(1) Concentration effect -----	75
(2) Temperature effect -----	81
(3) Sugar and salts effect -----	81

Section 4. Anti-blood coagulate activity and Angiotension-I converting enzyme activity -----	89
Section 5. Fish culture -----	91
1. Feeding experiment -----	91
2. Proximate compositions of rainbow trout -----	91
3. Flesh and skin carotenoids -----	94
4. Lipid contents of flesh and liver -----	97
5. Lipid classes of flesh and liver -----	101
6. Free fatty acids composition of muscle and liver --	102
References -----	108

목 차

표목차 -----	21
그림목차 -----	23
제1장 서론 -----	26
제1절 연구배경 -----	26
제2절 연구개발의 목적과 범위 -----	29
제2장 재료 및 방법 -----	32
제1절 재료 -----	32
1. 우렁쟁이 껍질의 색소 추출 -----	32
2. 우렁쟁이 껍질로부터 조다당의 추출 -----	32
가. 효소처리에 의한 추출 -----	32
나. Autoclavor처리에 의한 추출 -----	33
3. 조다당의 정제 -----	33
가. Ion-exchange chromatography를 이용한 부분정제 조다당의 분획 -----	33
나. Sephadex G-25에 의한 부분정제 조다당 분획 -----	33
제2절 실험방법 -----	34
1. 일반성분, 전당, 환원당 및 단백질함량 분석 -----	34
2. 황산기 및 chondroitin sulfate의 함량 분석 -----	34

3. Uronic acid의 함량 분석 -----	35
4. 구성아미노산 및 무기질 분석 -----	35
5. ACE(Angiotensin-I converting enzyme) 저해능 측정--	35
6. 항혈액응능력측정 -----	36
가. 활성화트롬보플라스틴시간(Activated partial thromboplastin time, APTT) 측정 -----	36
나. 프로트롬빈시간(Prothrombin time, PT) -----	37
7. 조다당의 IR 및 전자현미경 분석 -----	37
8. 조다당의 물리적 특성 -----	37
가. 지방흡수력 -----	37
나. 포말성 및 포말안정성 -----	37
다. 유화성 및 유화안정성 -----	38
라. 색소흡착능 -----	38
마. 유동 특성 -----	39
9. 사육실험 -----	40
가. 실험어 -----	40
나. 사육조건 -----	40
다. 사료조제 -----	41
라. 색소함량 측정 -----	41
마. HPLC 분석조건 -----	43
바. 지질의 분석 -----	43
(1) 총지질의 추출 및 분획 -----	43
(2) 인지질 함량의 측정 -----	43
(3) 총지질 구성지방산의 분석 -----	44
 제3장 결과 및 고찰 -----	 45
제1절 우렁쉥이 껍질로부터 복합다당의 추출효율 -----	45

1. 시료의 일반성분 -----	45
2. 추출조건에 따른 조다당류의 수율 -----	48
가. 효소처리에 따른 수율 -----	48
나. Autoclave 처리에 따른 수율 -----	48
3. 조다당류의 구성성분 -----	54
4. 조다당류의 FT-IR -----	56
제2절 조다당류의 정제 및 특성 -----	56
1. 조다당류의 분획 -----	56
2. 부분정제 조다당류의 화학성분 -----	60
3. 부분정제 조다당류의 FT-IR 및 전자현미경분석 -----	60
제3절 조다당류의 물리적 및 유동특성 -----	69
1. 물리적 특성 -----	69
가. 지방흡수력 및 포말성 -----	69
나. 유화능 및 색소흡착능 -----	73
2. 유동특성 -----	75
가. 농도의 영향 -----	75
나. 온도의 영향 -----	81
다. 설탕 및 소금 첨가의 영향 -----	81
제4절 항혈액응고능 및 ACE 저해능 -----	89
제5절 사육실험 -----	91
1. 성장과정 -----	91
2. 일반성분 -----	91
3. 색소함량 -----	94

4. 지질함량의 변화 -----	97
가. 총지질 -----	97
나. 지질조성 -----	101
다. 지방산조성 -----	102
참고문헌 -----	108

표목차

Table 1. Composition of the experimental diets -----	42
Table 2. Levels of each pigment source in the experimental diets for rainbow trout -----	42
Table 3. Proximate composition of ascidian tunics -----	46
Table 4. Mineral contents of various ascidian -----	46
Table 5. Amino acids composition of various ascidian -----	47
Table 6. Yields of crude polysaccharide treated enzymes ---	49
Table 7. Effect of treating time on the yield crude polysaccharides of ascidian tunic treated autoclave at 125°C -----	55
Table 8. Proximate composition of crude polysaccharide on the extract conditions -----	55
Table 9. Chemical composition of crude polysaccharide on the extract conditions -----	55
Table 10. Chemical composition of partially purified polysaccharide -----	64
Table 11. The foam properties of samples -----	72
Table 12. The emulsifying properties of samples -----	74
Table 13. Dye binding capacity of chitin, chitosan and crude polysaccharide treated by neurase and autoclave -----	74
Table 14. Power law constants for crude polysaccharide solutions extracted by autoclave with varying concentration at 20°C -----	80

Table 15. Activation energies, infinity apparant viscosities, and coefficients of determination for crude polysaccaride solution -----	84
Table 16. Effect of crude polysaccaride solution on activated partial thromboplastin time(APTT) ----	90
Table 17. ACE inhibition of partially purified polysaccaride	90
Table 18. Proximate composition of rainbow trout -----	93
Table 19. Mineral contents of rainbow trout -----	93
Table 20. Carotenoid concentration in flesh and skin of rainbow trout -----	95
Table 21. Astaxanthin composition in flesh and skin of rainbow trout -----	95
Table 22. Lipid contentd of TL, NL and PL of rainbow trout -----	98
Table 23. Lipid classes in flesh and liver neutral lipid of rainbow trout -----	101
Table 24. Lipid classes in flesh and liver polar lipid of rainbow trout -----	101
Table 25. Fatty acid compositions of total lipids from rainbow trout flesh after feeding for 4 weeks --	103
Table 26. Fatty acid compositions of total lipids from rainbow trout liver after feeding for 4 weeks ---	104
Table 27. Fatty acid compositions of total lipids from rainbow trout flesh after feeding for 8 weeks --	105
Table 28. Fatty acid compositions of total lipids from rainbow trout liver after feeding for 8 weeks --	106

그림목차

Fig. 1. Changes in amount of crude polysaccharide extracted by 3% neutrase -----	50
Fig. 2. Effect of ethyl alcohol concentration on the yields crude polysaccharide -----	51
Fig. 3. Effect of standing time on amount of crude polysaccharide extracted by treating with 70% ethyl alcohol -----	52
Fig. 4. Changes in the amount of crude poly saccaride treated by autoclave -----	53
Fig. 5. Foutier transform IR(FT-IR) spectrum of decolored ascidian tunic powder -----	57
Fig. 6. Foutier transform IR(FT-IR) spectrum of crude polysaccharide extracted by neutrase -----	58
Fig. 7. Foutier transform IR(FT-IR) spectrum of crude polysaccharide extracted by autoclave -----	59
Fig. 8. Fractionation of partially purified polysaccharide obtained by DEAE-Cellulose ion chromatography -	61
Fig. 9. Sephadex G-100 rechromatogram of the partially purified polysaccharide obtained by DEAE-Cellulose ion chromatography -----	62
Fig. 10. Sephadex G-25 rechromatogram of the partially purified polysaccharide obtained by sephadexG-100 chromatography -----	63
Fig. 11. Foutier transform IR(FT-IR) spectrum of partially purified polysaccharide by Sephadex G-100 gel	

	filtration after extracted by autoclave -----	65
Fig. 12.	Fourier transform IR(FT-IR) spectrum of partially purified polysaccharide by Sephadex G-25 rechromatography after Sephadex G-100 gel filtration extracted by autoclave -----	66
Fig. 13.	Fourier transform IR(FT-IR) spectrum of standard chondroitin sulfate A -----	67
Fig. 14.	Fourier transform IR(FT-IR) spectrum of standard chondroitin sulfate B -----	68
Fig. 15.	SEM photograph of chitin(A), chitosan(B), chondroitin sulfated A(C), and partially purified ascidian polysaccharide -----	70
Fig. 16.	Fat binding capacity of samples -----	71
Fig. 17.	Flow curves of crude polysaccharide solutions treated trichloroacetic acid after extracted by autoclave -----	76
Fig. 18.	Flow curves of crude polysaccharide solutions untreated trichloroacetic acid after extracted by autoclave -----	77
Fig. 19.	Shear stress-shear rate curves of crude polysaccharide solutions treated trichloroacetic acid after extracted by autoclave -----	78
Fig. 20.	Shear stress-shear rate curves of crude polysaccharide solutions untreated trichloroacetic acid after extracted by autoclave -----	79
Fig. 21.	The effect of temperature on the viscosity of crude polysaccharide solutions treated trichloroacetic	

	acid after extracted by autoclave -----	82
Fig. 22.	The effect of temperature on the viscosity of crude polysaccharide solutions untreated trichloroacetic acid after extracted by autoclave ---	83
Fig. 23.	Changes in viscosity difference of crude polysaccharide solutions treated trichloroacetic acid after extracted by autoclave as affected addition on sugar -----	85
Fig. 24.	Changes in viscosity difference of crude polysaccharide solutions untreated trichloroacetic acid after extracted by autoclave as affected addition on sugar -----	86
Fig. 25.	Changes in viscosity difference of crude polysaccharide solutions treated trichloroacetic acid after extracted by autoclave as affected addition on NaCl -----	87
Fig. 26.	Changes in viscosity difference of crude polysaccharide solutions untreated trichloroacetic acid after extracted by autoclave as affected addition on NaCl -----	88
Fig. 27.	New pigment vehicle made by tunic polysaccharide and pigments -----	92

제 1 장 서 론

제1절 연구배경

최근 우리나라 연근해에서 생산되는 수산물 생산량은 자원감소와 연안환경오염 및 1977년 이후 각 연안국 200해리 경제수역 선포에 따라 점점 감소하는 경향에 있으나, 수산물이 국민식량자원의 단백질 자원으로써 차지하는 비율은 해마다 증가하고 있다. 최근에는 단백질공급 차원이 아니라 성인병 예방, 어린이 두뇌촉진 등 건강상의 이유로 인하여 어류의 소비증가와 더불어 고급 어종의 하나인 연어류의 국내 수요가 급증하는 추세에 있다. 통계에 의하면 1995년도 우리나라 연어 수입량은 4,097톤(92억원 상당)으로 1988년 1,800톤(45억원 상당)에 비해 3.5배(금액상으로는 약 2배)로 소비증가에 따른 수입증가가 이루어지고 있다. 현재 국내에서 소비되고 있는 연어류는 대부분이 수입에 의존하고 있어 국내 양식생산의 필요성이 절실한 실정이다. 그래서 몇 년 전부터 통영해역에서는 이에 대한 실험을 시작하여 실험적 생산 단계를 거쳐서 상업적 생산단계의 출발점에 있다. 특히, 우리나라 남해안에서 양식되고 있는 해산어류는 거의 대부분이 높은 수온에서 성장이 가능한 온수성 어종이다. 그러나 남해안의 물리적 해양환경 특성상 가을부터 봄까지는 수온이 낮아서 어류의 성장이 중지되거나 월동이 불가능한 어종은 저수온기 이전에 판매를 해야하기 때문에 5개월에 가까운 휴한기가 생긴다. 그러나 냉수성 어종인 연어류를 이러한 휴한기를 이용해서 양식을 하게되면, 년중 양식이 가능하기 때문에 이들 어종은 새로운 양식 대상종으로 각광을 받게 될 것이다.

자연산 연어류는 그 어육이 분홍 또는 붉은 색깔을 띠고 있는 것이 특징이나, 양식산 연어류에서는 이러한 색소가 결여되고 있으므로

인공적으로 착색을 하고 있다. 주로 카로테노이드계 색소를 사료에 혼합, 투여하고 있다. 세계적으로 연어의 양식생산량이 급격하게 증가하고 있으므로 앞으로 카로테노이드 색소의 수요량도 크게 늘어날 것으로 예상된다. 여러가지 색소원 중에서도 인공합성 astaxanthin이 가장 널리 사용되고 있으나, 인공합성품의 인체유해에 대한 많은 논란을 거듭한 끝에 FDA에서는 식품에는 인공합성착색제의 사용을 금지하였기 때문에(Lovel, 1992), 전 세계적으로 새로운 천연착색제의 탐색을 위한 연구가 진행 되고 있다.

카로테노이드 색소는 주로 적색계열의 밝은 색깔을 띄고 있는데 자연계에서는 다른 관련물질과 혼합된 상태로 불안정하게 분포하고 있으며 산화, 이성질화 및 재결합 반응 등이 쉽게 일어나게 된다. 특히 이들을 정제하여 표준화하거나 화학적으로 분석하기가 어려워서 어류 체내에서의 이동과 흡수 및 착색과정 등을 정확하게 규명하기 어려운 실정이다.

천연 연어류는 동물 플랑크톤으로부터 카로테노이드 색소를 얻고 있는데 산화 카로테노이드를 외부로부터 취하여 그대로 저장하게 된다. 대부분(90%)을 어육의 조직속에 축적하며 소량은 피부와 생식소 등에 저장하고 있다. 어류에서 카로테노이드는 비타민 A의 전구체(Bauernfeind et al., 1971) 및 육과 표피의 착색효과(Choubert, 1983; Foss et al., 1984)라는 생리적 기능 외에 지질산화방지(Rånby and Rabek, 1978), 호르몬 기능의 향진(Hartmann et al., 1947), 난의 성숙(Deufel, 1965), 환경적응능력 향상(Mikulín and Soín, 1975) 등 생리활성에 관한 기능도 가진 것으로 알려져 있다. 더우기 연어류처럼 색소가 상품가치에 절대적 영향을 미치는 어류는 색소가 결여되어 육색이 제대로 나지 않으면 상품가치가 떨어지므로 색소를 이용하여 육색을 개선할 필요가 있다. 양식연어는 대개 3-4 mg/Kg의 카로테노이드를 함유하고 있으면 상품으로서 손색이 없으나, 냉동저장 또는 가공시 색

소가 휘발하되므로 양어장에서는 이보다 약간 높은 함량이 요구된다.

카로테노이드 색소를 함유하고 있는 대표적인 갑각류는 크릴을 비롯하여 새우, 붉은게, 코페포다 등이다. 특히 붉은게(*Pleuoncodes planipes*)는 100-160mg/Kg의 카로테노이드를 함유하고 있으며, 그 추출유는 1,550mg/Kg의 높은 astaxanthin 색소를 함유하고 있다 (Peterson et al., 1966). 또 크릴 어분에서는 200mg/Kg, 증기 건조된 새우의 어분에서는 192mg/Kg, 그리고 이의 냉동 건조된 새우 카로테노프로테인에는 1,160mg/Kg이 함유되어 있다. 그 외 고등어 및 열빙어의 어유에도 상당량의 카로테노이드 색소가 들어 있다. 또 식물인 스콰시꽃, 금잔화 및 파프리카(Peterson et al., 1966) 등에서도 카로테노이드가 검출되며 남조류인 *Spirulina* sp.에서도 상당량의 카로테노이드가 함유되어 있다.

우렁쉥이는 그 독특한 형태 때문에 분류학적으로 무척추동물과 척추동물의 중간에 위치하고 있다. 전 세계에 약 2,000여종이 존재하는 것으로 알려져 있고, 일본에는 270여종 이상이 자생하고 있다(中内, 1986). 양식면적의 확대와 새로운 소득원으로서 우렁쉥이 양식이 시작되어 1994년 생산량이 43,000톤으로 10여년 동안 약 1,000배 정도의 생산 증가가 이루어 졌다(한국수산회, 1995). 우렁쉥이는 현재 생식이외의 특별한 가공법이 개발되어 있지 않으므로 수산 가공공장에서는 육을 포장하여 냉장 판매하고 있다. 이 때 전량 폐기되는 껍질은 분해가 어려울 뿐만 아니라, 현재까지도 이용되지 않았기 때문에 바닷가에 그냥 버려져 폐기물로 인한 새로운 연안환경 오염문제로까지 대두되고 있다.

Lönnerberg(1931)가 피막이 있는 해양생물에서 동정되지 않은 몇 종의 xanthophyll과 carotene이 존재한다고 보고한 이후, Lederer(1938)는 피막생물에 α - 및 β -carotene, astaxanthin, astaxanthin-ester, cynthiaxanthin 및 lycopene 등이 있다고 하였다. Nishibori

(1958)는 우렁쉥이 껍질로부터 상당한 량의 astacene과 cynthiaxanthin을 분리하였다. Tsuchiya and Suzuki(1960)는 우렁쉥이 껍질속에는 cynthiaxanthin 및 astaxanthin이 주된 카로테노이드이며 β -carotene과 antheraxanthin 유사한 색소는 적은 양이 들어 있다고 하였고, Campbell et al.(1967)은 *Bortryllus schlosseri* 및 *Halocynthia papillosa*(Lederer, 1938)로부터 alloxanthin(cynthiaxanthin, pectenoxanthin)을 동정하였다. 해양동물의 카로테노이드에 관한 일련의 비교 생리학적 연구 결과 Matsuno and Ookubo(1981, 1982)는 halocynthiaxanthin 및 mytiloxanthinone을 *H. roretzi* 로부터 분리·동정하였다. 또한 일본산 *Amaroucium pliciferum* 으로부터 2종류의 독특한 카로테노이드인 amarouciaxanthin A 및 B가 동정되었다(Matsuno et al., 1985).

이와같이 우렁쉥이 껍질 속에는 천연색소가 약 1.0-1.5% 정도 함유되어 있지만, 계절 및 크기에 따라 색소함량에 차이가 난다. 이들을 무지개송어용 사료에 첨가하여 사육하였을 때 체색개선에도 도움을 주는 것으로 밝혔으나, 어민들이 손쉽게 사용할 수 있도록 하기 위해서는 액체상태인 색소를 고체화하기 위한 부형제의 개발이 필요하게 되었다.

제2절 연구개발의 목적과 범위

당쇄는 세포의 특이적인 접착 및 인식에 「세포의 눈」의 기능을 갖는 것으로 알려져 있지만, 해양생물에도 이러한 물질이 들어있다. 예를들면, 해산무척추동물의 수정에 당쇄가 관여하고 있다는 것, 병원미생물이 숙주에 감염할 때 당쇄가 receptor가 될 가능성이 있다는 것이 지적되었다. 이와같은 연구에서 해양 유용생물의 인공수정술의 향상

및 새로운 품종의 창출, 혹은 새로운 방법에 근거한 어병용 약제 및 치료약의 개발이 기대된다. 또, 해조의 lectin과 특수한 다당 및 올리고당이 세포의 새로운 분화유도제 혹은 항암제, 항알레르기제 등의 의약품으로서 장래 각광을 받을 가능성이 있다. 그래서 해양생물의 생명현상에 특유한 당쇄의 기능이 보여지면 생명과학의 영역에 중요한 공헌을 할 새로운 응용연구의 장이 열릴 것으로 기대하고 있다. 한편, 해양에는 미지의 무수한 유용 유전자 자원이 잠자고 있는 것으로 생각된다. 이런 측면에서 지금까지는 알려지지 않았던 특이성을 가진 새로운 당쇄분해 혹은 합성효소가 발견될 가능성을 보여주고 있다.

우렁쉥이는 표피가 tunicin이라는 식물성 셀룰로즈와 유사한 다당류를 함유하고 있다. 이 tunicin은 chitin과 유사한 분자구조를 가진 (1,4)-2-acetamido-2-deoxy-6-O-sulfo- β -D-glucopyran으로 알려져 있으므로(Anno et al., 1974), chitin, chitosan 및 CM-chitin과 유사한 물리적, 화학적 성질을 가질 것으로 여겨진다.

전에는 이와같은 아미노당을 함유한 다당류를 뮤코(muco)다당이라 했지만 현재는 glycosaminoglycan이라 하는데, chitin은 중성 glycosaminoglycan에 속한다. 산성 glycosaminoglycan은 이당의 반복단위가 β -glycoside 결합한 직쇄상 고분자이며, D-galactosamine(혹은 glucosamine)의 N-acetyl화된 화합물과 D-glucuronic acid(또는 L-iduronic acid이거나 D-galactose)로 이루어진다. 여러 분자 종이 있으며, 황산기의 유무에 따라 황산화 다당과 비황산화 다당으로 크게 나뉜다. 이들 산성 glycosaminoglycan은 동물세포의 matrix성분으로 체내에 널리 분포하지만, 주로 연골, 껍질, 혈관이나 관절액, 눈의 초자체(vitreous body)에도 많다. 음이온기가 많은 chondroitin sulfate와 keratan sulfate(또는 dermatan sulfate)는 중심 단백질(core protein)과 결합하여 proteoglycan으로 존재한다. 세포 속을 이동하는 물이나 전해질을 조절하고, 조직에 점성과 탄력을 부여하며, 관절조직의 윤활제

로 작용하기도 하고, 외력이나 세균감염으로부터 세포를 보호하기도 하며, 지혈청정작용 및 혈액응고를 방지하는 작용, 각막의 투명도를 유지하는 등의 생리기능을 갖는다.

또한 단백질과 결합된 chondroitin-protein 복합체는 식품에 첨가되기도 한다. 결합조직 중의 chondroitin sulfate 합성은 나이가 들면 감소하는 것으로 알려져 있어 식품속에 이 아미노당을 첨가하면 결합조직세포의 신진대사를 원활히 하여 노화를 억제할 수 있으며, 결합조직 중의 기초물질로서 수분대사에도 관여함으로써 미용효과도 나타내는 것으로 알려져 있어 식품 첨가물로서의 이용 가능성이 매우 높다.

따라서 전량 폐기되는 우렁쉥이 껍질을 양식용 소재로 재활용하기 위한 방편의 하나로 이와같은 생리적 특성 뿐만 아니라, 껍질 분말의 효소처리 및 autoclave처리에 의한 복합다당의 추출효율, 부분정제한 복합다당의 물리·화학적 특성, 부분정제한 복합다당의 구조 및 기능성, 껍질로부터 색소 추출, 추출된 색소의 복합다당에의 흡착능, 색소가 흡착된 복합다당을 첨가한 무지개송어용 사료조제, 무지개송어 사육, 성장과정, 사육된 무지개송어 육 및 표피 중의 색소침착 정도, 무지개송어 육 및 간 지질조성 등을 조사하고자 하였다.

제 2 장 재료 및 방법

제1절 재 료

1. 우렁쟁이 껍질의 색소 추출

3년된 우렁쟁이를 채취하여 육과 껍질을 분리한 후, 껍질을 수회 수세한 다음 동결고에 보관하면서 시료로 사용하였다. 색소 추출은 동결 저장된 우렁쟁이 껍질을 해동시킨 후, 일정량의 시료에 3배량의 acetone을 가하고 하룻밤 실온에 방치한 다음 색소 성분을 추출·여과하였다. 이 조작을 3회 반복하여 시료로부터 색소를 충분히 용출시켰다. 여과된 acetone추출물을 회전진공증발농축기로 40℃ 이하에서 농축한 후 분액여두로 옮기고, 여기에 ether를 가하여 색소성분을 전용시킨 후, 다시 회전진공증발농축기를 이용하여 용매를 완전히 제거하여 색소추출물로 하였다. 총 카로테노이드 함량은 benzene 중에서 가시부 흡수 spectrum의 흡수극대치를 McBeth (1972)의 방법에 따라 흡광계수 $E_{1\text{cm}}^{1\%}=2,400$ 으로하여 계산하였다.

2. 우렁쟁이 껍질로부터 조다당류의 추출

가. 효소처리에 의한 추출

우렁쟁이의 껍질을 protease인 alkalase, neutrase, mixer-2000으로 처리하여 단백질 부분을 부분적으로 제거하여 조다당을 추출하였다. 즉, 일정량의 우렁쟁이 분말에 적당량의 증류수를 가하고 여기에 각각의 효소를 첨가하여 shaking incubater에서 48시간 반응시켰다. 반응 후 원심분리하여 상등액을 취하고 TCA(trichloroacetic acid)를 첨가하여 10% TCA 용액이 되도록 한 것과 처리하지 않은 것으로 구분하였다. 원심분리하여 침전물을 제거하고 상등액에 각각의 알콜 농도가 되게 ethyl alcohol을 첨가한 후 24시간 정도 방치하여 조다당을 침전시

켰다. 침전시킨 조다당을 동결건조하여 동결고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

나. Autoclave처리에 의한 추출

고온, 고압처리에 의해 조다당을 추출 하고자 autoclavor로 125℃ (압력:1.5kg/cm²)에서 시간별로 처리하여 조다당을 추출하였다. 즉, 삼각 플라스크에 일정량의 시료를 취하고 여기에 물을 가해 알루미늄호일을 덮은 상태로 autoclave처리를 하였다. Autoclave처리후의 과정은 효소처리방법과 동일하게 하였다.

3. 조다당의 정제

가. Ion-exchange chromatography를 이용한 조다당의 분획

20mM 인산완충용액(pH 7.0)으로 평형화시킨 DEAE-Cellulose(φ 3.5 x 25cm)에 조다당을 loading하여 NaCl이 함유된 완충용액을 1.5M 까지 직선적으로 증가시키면서 당이 검출 되지 않을 때까지 용출시켰다. 용출액을 fraction collector로 6ml씩 모은 후 페놀-황산법(Rodolpho and Paulo, 1986)으로 분광광도계(UV/Vis spectrophotometer, Milton Roy 1201, USA)로써 470nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 획분을 합쳐 증류수에 24시간 투석한 후 농축하여 동결 건조하였다. Chromatography에 의한 각 획분의 단백질함량은 분광광도계로 280nm로 측정하였다.

나. Sephadex G-25에 의한 부분정제 조다당의 분획

유리 칼럼(φ 1.5×100cm)에 팽윤시킨 Sephadex G-25 수지를 75cm 까지 충전 시키고, 전용량에 대해 2-5% 의 시료액을 용출, 분획하였다. 용출액은 0.05M NaCl 용액으로 하였고, 각 획분별 6ml 씩 분취하였다. 분취한 획분은 전당을 측정 분석하였다.

제2절 실험방법

1. 일반성분 전당, 환원당 및 단백질 함량 분석

수분은 105°C 상압건조법, 조지방은 soxhlet 분석법, 조단백질은 micro kjeldahl 정량법, 회분은 550°C 건식회화법에 따라 측정하였다 (AOAC, 1990). 전당은 phenol-sulfuric acid법(Dubois et al., 1956)에 따라 시료 용액 1ml(10~100 μ g/ml)를 test tube에 취하고, 5% phenol 용액 1ml를 가한 후 혼합하고, 진한 황산 5ml를 반응액에 직하하여 가능한 발열시키면서 잘 혼합한다. 이 반응액을 실온에서 20 ~30 분 방치한 후 470nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검량선으로부터 구하였다. 단백질함량은 Lowry법(Lowry et al., 1951)따라 bovine serum albumin을 표준 단백질로하여 구한 검량곡선으로 540nm에서 구하였다.

2. 황산기 및 chondroitin sulfate의 함량 분석

황산기의 함량은 Dodgson(1962)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 가수분해한 시료 0.2ml에 4% TCA용액 3.8ml 및 BaCl₂-젤라틴시약(증류수 400ml에 젤라틴 2g을 넣고 65°C에서 녹여 4°C에서 하룻밤 방치한 후 이 액에 BaCl₂ 2g 넣어 녹인후 2-3시간 방치 후 사용) 1ml를 첨가하여 교반 후 20분간 방치하여 360nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선은 K₂SO₄를 이용하여 작성하였다. Chondroitin sulfate의 함량은 비색정량법(Yabe et al., 1987)으로 측정하였다. 즉, 시료용액 1ml에 alcian blue용액 0.2ml를 가해 20분정도 방치한 후 원심분리(1,250g × 5min)하여 침전물을 취하고 이를 증류수로 수세한 후 다시 원심분리하였다. 침전물을 monoethanolamine 10ml로 용해시켜 615nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량곡선은 표준 chondroitin sulfate A로부터 구하였다.

3. Uronic acid의 함량 분석

Uronic acid의 함량은 Knutson and Jeanes(1968)의 방법에 따라 분석하였다. 즉, H₂SO₄-borate시약(H₃BO₃ 24.74g을 4M KOH용액 45ml에 녹인 후 증류수로 100ml로 정용한 뒤 25ml 취하여 진한 황산 용액으로 1L로 정용) 6ml에 3.3.1법에 따라 가수분해한 시료 용액 0.7ml를 넣고 교반 후 냉각하였다. 냉각된 용액에 carbazole 용액(carbazole을 에탄올에 녹여 0.1% 용액을 조제) 0.2ml를 넣어 교반한 후 55℃ 수욕조상에서 30분간 가열, 발색시켜 530nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량 곡선은 galacturonic acid를 이용하여 작성하였다.

4. 구성아미노산 및 무기질 분석

단백질을 구성하는 아미노산을 분석하기 위해서 시료 20mg을 5ml의 6N HCl dimethylsulfoxide(DMSO) 50 μ l를 glass ampoule에 넣고 질소로 충전한 다음 밀봉하여 100 \pm 5℃에서 24시간 가수분해시켰다. 가수분해된 시료는 염산을 제거하기 위해 농축 후 인산 완충액(pH 2.2)으로써 일정액으로 하여 아미노산 자동분석계(Hitachi 835, Tokyo, Japan)로서 분석정량하였다. 무기질은 건식화화법에 의해 회화시킨 시료를 0.5N HNO₃으로 녹여 25ml로 정용한 후 Inductive Coupled Plasma Emission Spectrophotometer(ICP, Seiko SPS 1200A, Tokyo, Japan)에 의하여 분석하였다.

5. ACE(Angiotensin-I converting enzyme) 저해능 측정

ACE 저해능은 Cushman and Cheung(1970)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 일정 농도의 시료용액 50 μ l에 ACE 조효소액 200 μ l 및 0.1M sodium borate buffer(pH 8.3) 200 μ l를 가한 후 37℃에서 5분간 전(前)반응 시켰다. 여기에 기질로써 Hippuryl-His-Leu 용액(25mg/2.5ml sodium borate buffer) 100 μ l를 가하여 다시 37℃에서

30분간 반응 시킨 후 1N HCl을 500 μ l 가하여 반응을 정지시켰다(공 시험은 올리고당 용액 대신에 증류수를 사용하였으며, 대조구는 1N HCl 500 μ l를 가한 다음 ACE 조효소액 200 μ l를 가하였다). 여기에 ethyl acetate 1.5ml를 가하여 15초간 voltex한 후 3,000rpm에서 5분간 원심 분리시켜 상층액 1ml를 취하였다. 이것을 완전히 건조시킨 후 증 류수 3ml를 가하여 용해 시키고 228nm에서 흡광도를 측정하여 아래 의 식에 의해 ACE 저해율로 나타내었다.

$$\text{ACE저해율(\%)} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

여기서, A : 시료 첨가구의 흡광도

B : 시료 무첨가구의 흡광도

단, A,B 모두 대조구의 흡광도를 제외한 수치임.

6. 항혈액응고력 측정

정상인의 정맥혈 4, 5ml를 채취하여 0.5ml의 sodium citrate (3.8%) 용액과 혼합한 다음 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 분리한 혈장은 -20 $^{\circ}$ C에 저장하여 두고 실험에 사용하였 다.

가. 활성트롬보플라스틴시간(Activated partial thromboplastin time, APTT) 측정

혈장 100 μ l에 시료 용액 10 μ l를 넣고 교반한 후 37 $^{\circ}$ C 항온수조에 서 1분간 가온하였다. 여기에 100 μ l Actin을 첨가한 후 다시 37 $^{\circ}$ C 항 온수조에서 2분간 가온하였다. 2분이 되는 순간 미리 37 $^{\circ}$ C로 가열하여 둔 20mM CaCl₂ 100 μ l를 넣음과 동시에 스톱워치를 눌러 응고 시간을 특정하였다. 대조시료로는 heparin을 희석하여 항혈액응고 시간을 동 일하게 측정하였다.

나. 프로트롬빈시간(Prothrombin time, PT) 측정

37°C 항온수조에서 1분이상 미리 가온하여둔 Thromboplastin.C 200 μ l에 37°C에서 미리 1분 이상 가온하여 둔 혈장과 시료용액 혼합액(혈장:시료용액=10:1) 100 μ l를 가함과 동시에 스톱워치를 눌러 응고 시간을 측정하였다.

7. 조다당의 IR 및 전자현미경 분석

조다당의 FT-IR(Fourier Transform Infrared Spectrophotometer, IFS-66, Bruker, W. Germany)로 황산기 결합 위치 및 주요 반응기의 특성을 조사하기 위하여 KBr pellet형태로 시료를 조제하여 FT-IR을 이용하여 측정하였다. 또한 조다당을 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope; SEM, JEM-6400, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)으로 gold coating(두께, 100~150Å)을 행한 후, 주사전자현미경으로 가속 전압 10kv에서 관찰하였다.

8. 조다당의 물리적 특성

가. 지방흡수력

지방흡수력은 Lin et al.(1974)의 방법에 따라 각각의 시료 0.2g을 원심관(15×110mm)에 넣고 정평한 후 대두유(동방유량, 진해) 10ml을 넣고 vortex mixer에서 1분간 교반한 다음 실온에서 1시간 동안 15분마다 5초 교반한 후 원심분리(1,600g×25min)하여 상층액을 제거시킨 다음 원심관을 45°로 기울여 30분 동안 여지상에서 방치하여 무게를 정평하였다.

$$\text{지방흡수력} = \text{흡수 후의 무게(g)}/\text{건조 시료 무게(g)} \times 100$$

나. 포말성 및 포말안정성

포말성과 포말안정성은 Johnson(1983)과 Watanabe의 방법(1981)에 따라 측정하였다. 각 시료 1% 분산액 20ml을 수조에서 20분 동안 25℃로 가열하여 온도를 유지시킨 다음 균질기(Ace Homogenizer, AM-7, Tokyo, Japan)로 10,000rpm에서 교반시킨 후 250ml의 메스실린더에 즉시 옮긴 다음 30초 후에 거품량과 분리된 물층의 부피를 측정하여 포말성을 계산하였다. 포말안정성은 포립된 각 시료를 250ml의 메스실린더에 옮긴 다음 25℃에서 30분간 정치시킨 후 남아 있는 물층을 측정하여 포말안정성을 계산하였다.

$$\text{포말성} = \frac{\text{전체부피(ml)} - \text{물층의 부피(ml)}}{\text{포립전의 부피(ml)}}$$

다. 유화성 및 유화안정성

유화성과 유화안정성은 Wang et al.(1976)의 방법에 따라 측정하였다. 각각의 1% 분산액 10ml을 10,000rpm에서 3분간 균질기로 처리한 다음 대두유(동방유량, 진해) 10ml을 가하여 10,000rpm에서 3분간 균질화하였다. 유화된 생성액을 즉시 원심관(15×110mm)에 나누어 넣고 원심분리(1,600g×5min)하여 다음식에 의해 계산하였다. 유화안정성은 80℃의 물중탕에서 30분간 가열한 후 15℃로 냉각하여 원심분리(1,600g×5min)한 다음 유화성과 같은 방법으로 측정하였다.

$$\text{유화성(\%)} = \frac{\text{유화된 층의 부피(cm)}}{\text{시험관내 총 내용물의 부피(cm)}} \times 100$$

라. 색소흡착능

수용성인 Coomassie brilliant blue R-250과 지용성인 우렁쉥이 색소추출물을 대상으로 Knorr(1983)의 방법에 따라 측정하였다. 각 시료 1.0g을 정평하여 시험관에 넣고 일정농도(0.01mg dye/ml water)의 색

소용액 10ml을 가하여 vortex mixer로 10분간 교반하였다. 이를 20분마다 5초간 교반하면서 1시간 동안 방치하여 원심분리(1,600g×5min)한 상층액을 취하여 UV spectrophotometer(Milton Roy 1201, USA)로 505nm에서 흡광도를 측정하여 검량선을 이용해 잔존색소의 농도를 계산하였다. 색소흡착능은 아래 식과 같이 처음색소의 농도와 반응후의 잔존색소의 농도차로 나타내었다.

$$\begin{aligned} & \text{Dye binding capacity(mg dye/g sample)} \\ & = \frac{\text{최초 색소농도}-\text{흡착후 잔존 색소농도}}{\text{용액중 시료량(g)}} \end{aligned}$$

마. 유동특성

부분정제 조다당의 유동특성을 조사 하기 위하여 추출 및 정제한 조다당 용액을 원추평판형 회전점도계(Brookfield DV-Ⅱ+C/P, sample volume 2ml) 및 원주형 회전점도계(Brookfield LVTDV-Ⅱ)를 사용하였다. 농도에 따른 부분정제 조다당 용액의 유동특성은 전단 속도를 0에서 800/s까지 증가시키면서 겔보기 점도 및 전단응력을 22℃에서 농도(2.5%, 5%, 10%, 15%)별로 각각 측정하였다. 조다당의 유동특성 값은 아래의 power law model을 이용하여 계산하였다(Rao, 1982).

$$\tau = k \gamma^n$$

τ : 전단응력 (Shear stress, Pa)

γ : 전단속도 (Shear rate, 1/s)

k : 점조도 지수 (Consistency index, Pa S⁻ⁿ)

n : 유동지수 (Flow behavior index)

온도에 따른 점도 변화는 부분정제 조다당 용액(10%)을 온도별(10℃, 20℃, 30℃, 40℃, 50℃, 60℃)로 전단속도 증가에 따른 점도를 측

정하였다. 온도 변화에 따른 활성화 에너지 값의 변화는 Rao등(1982)에 따라 Arrhenius model을 이용하여 계산하였다.

$$\eta_{app} = \eta_{\infty} \exp (E_a /RT)$$

η_{app} = 겉보기 점도 (Apparent viscosity, Pa.S)

η_{∞} = 무한 겉보기 점도 (Infinity apparent viscosity, Pa,S)

E_a = 유동활성화 에너지 (Activation energy of flow, J/kg,mol)

R = 기체상수 (Gas constant, J/kg mol k)

T = 절대온도 (Absolute temperature, k)

설탕과 소금을 첨가에 따른 겉보기 점도의 변화는 5% 부분 정제 조다당 용액에 일정량의 설탕과 소금을 각각 첨가하여 설탕농도(5.0 - 40.0%) 및 소금농도(2.5 - 15.0%)에 따른 겉보기 점도를 측정하였다.

9. 사육실험

가. 실험어

시판사료로써 4주간 예비사육한 평균체중 500g의 무지개송어를 사용하였으며, 각 실험구마다 20마리씩 수용하였고, 각 실험구는 duplicate로 하였다.

나. 사육조건

사육실험은 1996년 6월 3일부터 7월 29일까지 8주간 경상남도 밀양시 소재 경상남도 내수면개발시험장의 옥외 사육장에서 행하였으며, 사육장치는 지하수를 계속 공급하는 유수식 사육장치로서 지속적인 보충수의 첨가에 의하여 어류의 배설물이 즉시 사육조 밖으로 유출될 수 있도록 하였다. 사육조의 크기는 직경 1.7m, 수심 0.9m(수량 2톤)의 원형의 FRP탱크였으며, 이때 주수량은 20 l/min였으며, 용존산소량은

8ppm전후였고, 전 사육기간을 통하여 수온은 16.0~18.5℃(평균 17.3℃)였다. 급이는 체중의 1.5%에 해당하는 양을 하루 3회, 주 7일 급이하였다.

다. 사료제조

기본사료의 조성과 첨가물의 함량을 Table 1, 2에 각각 나타내었다. 어분은 미국산 백색어분을 사용하였고, 우렁쉥이 껍질로부터의 색소추출은 Lee et al.(1994)에 준하였으며, 색소원의 첨가량과 astaxanthin의 함량계산과 결정도 이들 자료를 근거로 하였다. 분말은 건조한 우렁쉥이 껍질을 초파에 먼저 분쇄한 다음 분쇄기를 이용하여 분말을 만들었다. 우렁쉥이 색소추출물은 일정량의 에탄올에 녹여서 복합다당 6g에 약 1.6g의 색소성분을 첨가하여 혼합기를 이용하여 30분간 균일하게 혼합한 후 펠렛사료를 제조하였다. Diet 3구(Tunisan I)는 껍질분말을 가열한 후 ethanol 가용성 성분을 추출한 것이고, Diet 4구(Tunisan II)는 껍질분말을 가열한 후 다시 중화하고 ethanol 가용성성분을 추출하여 동결건조한 것이다. Carophyll pink(Hoffman La-Roche, Switzzland)는 수입시판용인 인공합성색소로서 사료 중의 astaxanthin 함량이 64ppm이 되도록 하였다. 제조한 실험사료는 소량 단위로 비닐포장하여 질소충진하여 -20℃의 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

라. 색소함량 측정

실험어는 얼음에 채워 실험실로 운반한 후 꼬리 및 아가미를 떼어내고 육과 표피로 분리하였다. 육은 일정량을 homogenizer (Speed cutter, MK-K51, National, Tokyo, Japan)에 acetone을 용매로 마쇄하였고, 표피는 그대로 아세톤에 침지하여 하룻밤 방치하였다. 각각 3회 반복 추출하고 이를 ether 층으로 전용시킨 후 농축하였다. 총카로테

Table 1. Composition of the experimental diets

Ingredient	Percentage
Fish meal	51
Soybean meal	6
Flour	26
Wheat middlings	13
Yeast	1
Vitamin mix*	2
Mineral mix*	1
Total	100

* Vitamin and mineral mixture were commercially available for fish.

Table 2. Levels of each pigment source in the experimental diets for rainbow trout

Diet no.	Pigment source	Content, g/kg in diet (Astaxanthin basis, mg/kg)
1	Control ¹	0.0(0)
2	Carophyll pink ²	0.8(64)
3	Tunisan I ³ + Tunic acetone extracts	1.6(80)
4	Tunisan II ⁴ + Tunic acetone extracts	1.6(80)
5	Tunic acetone extracts	1.6(80)

¹ The levels of astaxanthin were not measured.

² Astaxanthin 8%(Hoffman La-Roche, Switzland).

³ Tunisan I (6g/kg) was ethanol soluble material of ascidian tunic powder.

⁴ Tunisan II (6g/kg) was ethanol soluble material of deproteinized ascidian tunic powder.

노이드 함량은 McBeth(1972)의 방법에 따라 최대흡광도 480nm에서 benzene을 용매로 흡광계수 $E^{1\%}_{1cm}=2,400$ 으로 계산하였다. 육 및 표피 중 astaxanthin 획분의 분리 및 동정은 HPLC로 하였다.

마. HPLC 분석조건

육 및 표피 중의 카로테노이드 분석은 HPLC double pump시스템을 사용하였다. 칼럼은 3.9×300 mm의 μ Porasil silica(Waters Millipore, MA, USA) 칼럼을 사용하였고, 흡광도는 LKB UVM 2141 uv-visible spectrophotometer로 476nm에서 측정하였다. 용매 hexane/acetone(86:16)을 0.8ml/min 속도로 흘리면서 분석하였다. 표준 astaxanthin의 retention time과 비교하여 동정하였다.

바. 지질의 분석

(1) 총지질의 추출 및 분획

Bligh and Dyer법(1959)에 따라 실험어의 육과 간지질을 추출하였고, 총지질의 함량은 중량법으로 정량했다. 총지질을 구성하는 지질 성분은 중성지질과 극성지질로 나누어 thin layer chromatography (Silica gel, TLC)에 의하여 분별하였다. 전개용매는 중성지질의 경우 hexane:diethyl ether:acetic acid(80:20:1, v/v/v), 극성지질은 chloroform:methanol:acetic acid:water(65:45:1:2, v/v/v/v) 혼합용매를 사용하였고, $K_2Cr_2O_7$ -70% H_2SO_4 시약을 발색제로 분무하여 130°C에서 5분간 탄화시켜 분리된 각 획분을 TLC-scanner(Shimadzu CS-910, dual wavelength TLC-scanner, Tokyo, Japan)에 의하여 정량하였다.

(2) 인지질 함량의 측정

인지질의 함량은 총지질 중의 총무기인을 Bartlett법(1959)에 의하여 측정하였다. 즉, 일정량의 총지질(무기인으로 약 $5\mu g$)을 10N H_2SO_4

로 가수분해시키고 5% ammonium molybdate, Fiske- SubbaRaw 시약 및 물을 가해서 100℃에서 15분 가열하고 난 뒤 생긴 청색을 830nm에서 비색정량하였다. 각 시료의 흡광도는 KH_2PO_4 을 이용하여 작성한 표준곡선에 의해 인의 함량을 구하였다. 그리고 총지질 함량과 인지질 함량의 차이를 중성지질 함량으로 정했다.

(3) 총지질 구성지방산의 분석

지방산 조성은 약 100mg의 총지질을 정량하여 1N KOH 95% ethanol용액으로 검화한 다음, 검화물에 10% BF_3 -methanol을 3ml 가하여 95℃에서 30분간 환류가열하여 지방산 methylester시료를 조제하였다. 이것을 capillary column(Sigmawax 320, fused silica column, 30m×0.25mm i.d., Supelco, USA)이 장착된 GC(Shimadzu GC-14A, Japan)로써 분석하였다. 지방산 조성의 분석조건은 injector 및 detector(FID)온도 각각 250℃, column온도는 185℃에서 8분간 유지한 후 3℃/min씩 승온하여 230℃에서 12분간 유지하였고, carrier gas는 헬륨($1.5\text{kg}/\text{cm}^3$)을 사용하였으며, split ratio는 50:1로 하였다. 각 지방산의 동정은 표준품의 retention time(RT)과 비교하였으며, 표준품이 없는 지방산은 GC-Mass로서 동정된 Manhaeden fish oil를 2차 표준품으로 사용하여 동정하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제1절 우렁쉥이 껍질의 일반적 성질

1. 시료의 일반성분

본 실험에 사용한 우렁쉥이는 양식장에서 채취하여 육과 껍질을 분리한 후, 껍질에서 카로테노이드 색소를 추출하여 탈색시켜 건조한 분말과 생시료를 그대로 건조하여 분말화한 것으로, 시료의 일반성분 분석결과는 Table 1과 같다. 두 시료의 성분조성은 거의 유사하였는데 조단백질은 약 40%였고, 총탄수화물은 약 46%였다.

한편 본 실험의 주시료인 탈색시킨 분말의 아미노산 조성과 무기질 분석 결과를 Table 2와 3에 각각 나타내었다. 주요 아미노산은 histidine, glutamic acid, aspartic acid이며, 이들 함량은 전체의 34.4%를 차지하였고, 필수 아미노산 함량은 31.7%를 나타내었다. Lee et al.(1993)은 우렁쉥이 육 구성아미노산 중 asparagine, glutamic acid, taurine, aspartic acid 등이 주요 아미노산이었고, histidine, methionine 등의 함량은 적었다고 보고하였다. 이것은 우렁쉥이의 육과 껍질의 구성아미노산의 함량에 다소간의 차이를 나타내는 것으로 특히 껍질에 가장 많았던 histidine이 육에는 미량 존재하여 큰 차이를 나타내었다. 필수 아미노산이 차지하는 비율에 있어서도 육은 25% 정도로 껍질보다 적었다.

무기질은 탈색시킨 분말과 색소함유분말 모두 유사한 경향을 보였으나, Na의 함량에서 많은 차이를 보였다. 두 시료 모두에서 Ca의 함량이 5000mg/kg 이상으로 비교적 풍부하였으며 Mg, Na, K 등도 많은 함량을 나타내었다. 그러나 Cu의 함량은 10mg/kg 정도로 가장 적었으며,

Table 3. Proximate composition of ascidian tunics^a

Component	Ascidian tunics (%)	
	Dry powder	Decolored powder
Moisture	8.5 ± 0.3	7.4 ± 0.2
Crude protein	40.3 ± 2.4	39.1 ± 1.8
Crude lipid	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Crude ash	4.1 ± 1.1	7.2 ± 0.5
Total carbohydrate ^b	46.7 ± 1.6	46 ± 1.3

^a Mean ± S.D.^b 100-(moisture + crude protein + crude lipid + crude ash)

Table 4. Mineral contents of various ascidian

Mineral	(mg/kg)		
	Colored powder	Decolored powder	Crude polysaccharide ^a
Ca	5127.6	5636.4	23267.7
Na	1935.3	5803.7	7366.1
Cu	10.3	12.4	3.0
Mg	4820.9	3757.6	9416.3
Mn	98.2	67.5	214.4
Fe	215.9	269.4	62.8
Zn	40.5	38.9	16.1
P	336.4	287.6	436.2
K	4876.1	3421.6	6520.2

^aObtained by autoclave

Table 5. Amino acid composition of various ascidian
(g/100sample)

Amno acid	Decolored power ^a	Neutrased ^b	Autoclaved ^c
Tau	0.5	0.2	0.0
Asp	10.4	10.1	11.8
Thr	4.7	5.1	5.3
Ser	4.3	3.0	3.8
Glu	11.0	9.1	12.2
Gly	5.4	4.6	4.5
Ala	4.5	2.6	3.8
Cys	2.8	4.8	2.7
Val	4.5	3.8	5.9
Met	2.2	1.5	1.6
Ile	4.2	2.6	3.8
Leu	5.2	2.4	4.4
Tyr	4.0	2.9	3.4
Phe	4.6	2.8	3.7
Lys	6.2	8.1	4.7
NH ₃	1.9	0.2	0.2
His	13.0	29.2	20.4
Arg	6.1	4.0	3.9
Pro	4.5	3.1	3.8
E.A.A	31.7	26.3	29.5

^a Decolored powder : pigments were extracted from raw ascidian.

^b Crude polysaccharide extracts from the digestives by neutrased.

^c Crude polysaccharide extracts from the hydrolysates by autoclaving

^d E.A.A : Essential amino acid.

Zn도 40mg/kg으로 적었다. 일반적인 어패류 근육중의 주요한 무기질은 Na, K, Ca, Mg, Cl, P, S 등으로 이들은 전체의 60~80%를 차지하며 (順山·鴻巢), 갑각류의 경우 껍질의 무기질 비율은 건물당 20~30%로서 주로 Ca의 인산염이나 탄산염을 주체로 하고, 소량의 Mg, P 등이 함유된다(山口). 이상에서 우렁쟁이의 껍질내에 다량 존재하는 Ca는 갑각류의 패각과 유사한 역할을 할 것으로 추정된다.

2. 추출조건에 따른 조다당류의 수율

가. 효소처리에 따른 수율

조다당류를 효과적으로 추출하기 위해 alkalase, neutrase, mixture-2000으로 각 농도별로 처리하여 이에 따른 수율을 Table 4에 나타내었다. 전반적으로 첨가농도를 증가시킬수록 수율이 향상되었으며, 특히 Neutrase 처리가 효과적이었다. Neutrase 처리 경우 0.1% 처리때 약 3.5%였으나, 3%첨가시 9%였다. 따라서 이후의 실험에는 neutrase를 선택하였고, 첨가농도는 경제성과 수율면을 고려하여 3%로 하였다. Fig. 1은 3% neutrase로 처리할 때 가수분해 처리시간에 따른 수율의 변화를 나타낸 것이다. 처리 10~15시간 때 8%정도였고, 24시간 처리시 약 9.5% 이상이었으나, 이후 48시간과 72시간을 처리하여도 약 10%로 거의 일정하였다. 이상의 결과에서 가수분해처리 시간을 24시간으로 정하여 이후 실험에 적용하였다. 한편 조다당류를 침전시킬 때 처리하는 에탄올의 농도 변화에 따른 수율은 Fig. 2와 같다. 에탄올 농도가 70%와 75% 처리에서 수율이 6%이상으로 효과적으로 나타나 이후 에탄올 처리농도는 70%로 하였다. 또한 70% 에탄올로 처리하여 상온에서 방치할 때 방치 시간에 따른 수율은 Fig. 3에서와 같이 15시간 이후가 효과적이었으므로 에탄올 방치시간은 15시간으로 하였다.

나. Autoclave 처리에 따른 수율

Autoclave를 이용하여 125℃에서 처리함에 따른 수율변화는 Fig. 4

Table 6. Yields of crude polysaccharide when treated with enzymes^a

Concentration	Alkalase	Neutralse	Mixter-2000
0.1%	3.1±0.3 ^b	3.5±0.4	3.2±0.2
0.5%	3.7±0.2	4.6±0.2	3.3±0.3
1%	3.8±0.1	5.4±0.3	3.5±0.4
3%	4.2±0.4	9.1±0.4	4.3±0.1
6%	5.3±0.3	10.5±0.2	6.7±0.1
10%	6.7±0.2	11.8±0.4	6.8±0.4

^aEnzyme treated at the optimum temperature and pH

^bDry basis (w/w, %), Mean±S.D.

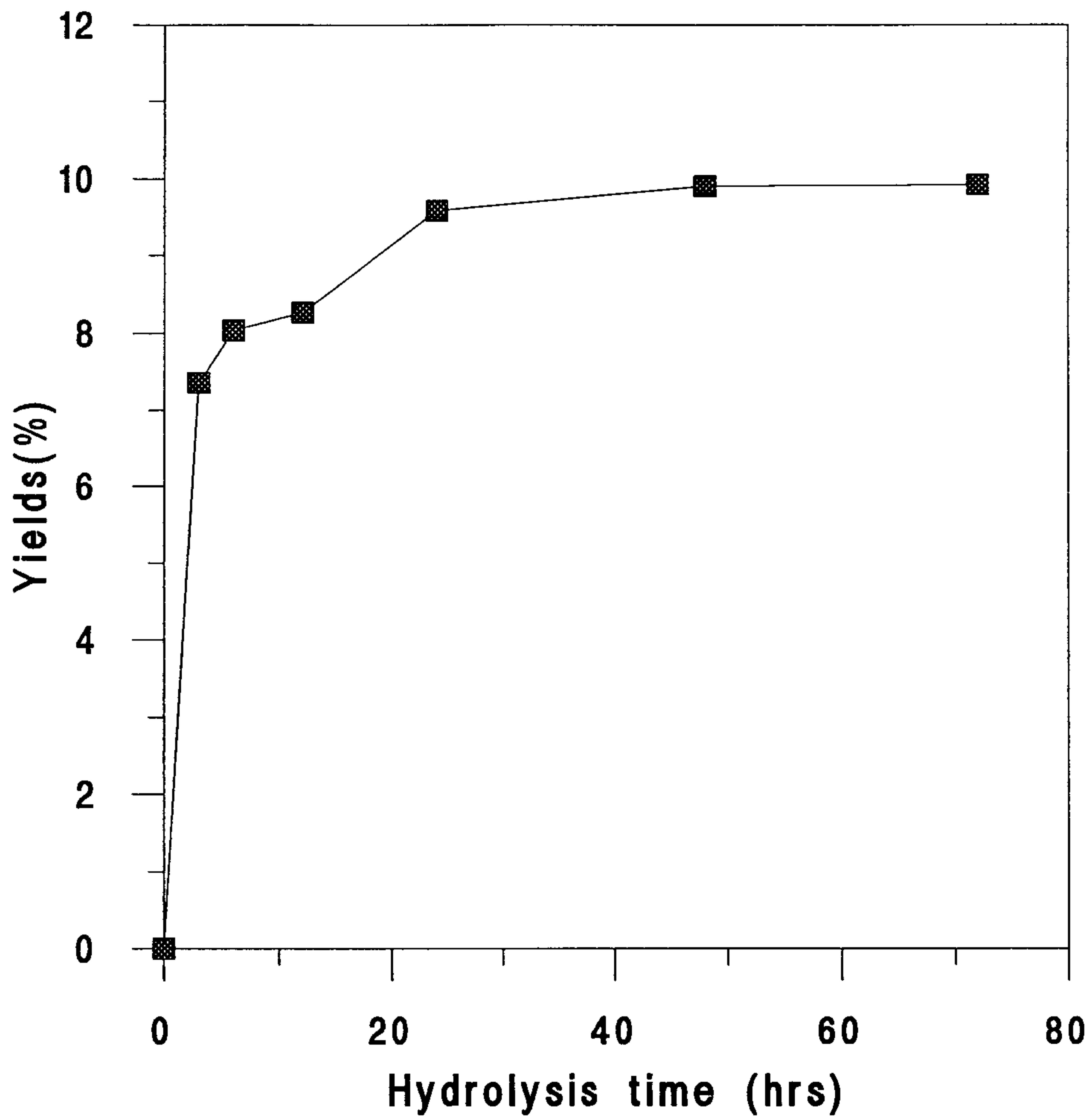


Fig.1. Changes in amount of crude polysaccharide extracted with 3% neurase.

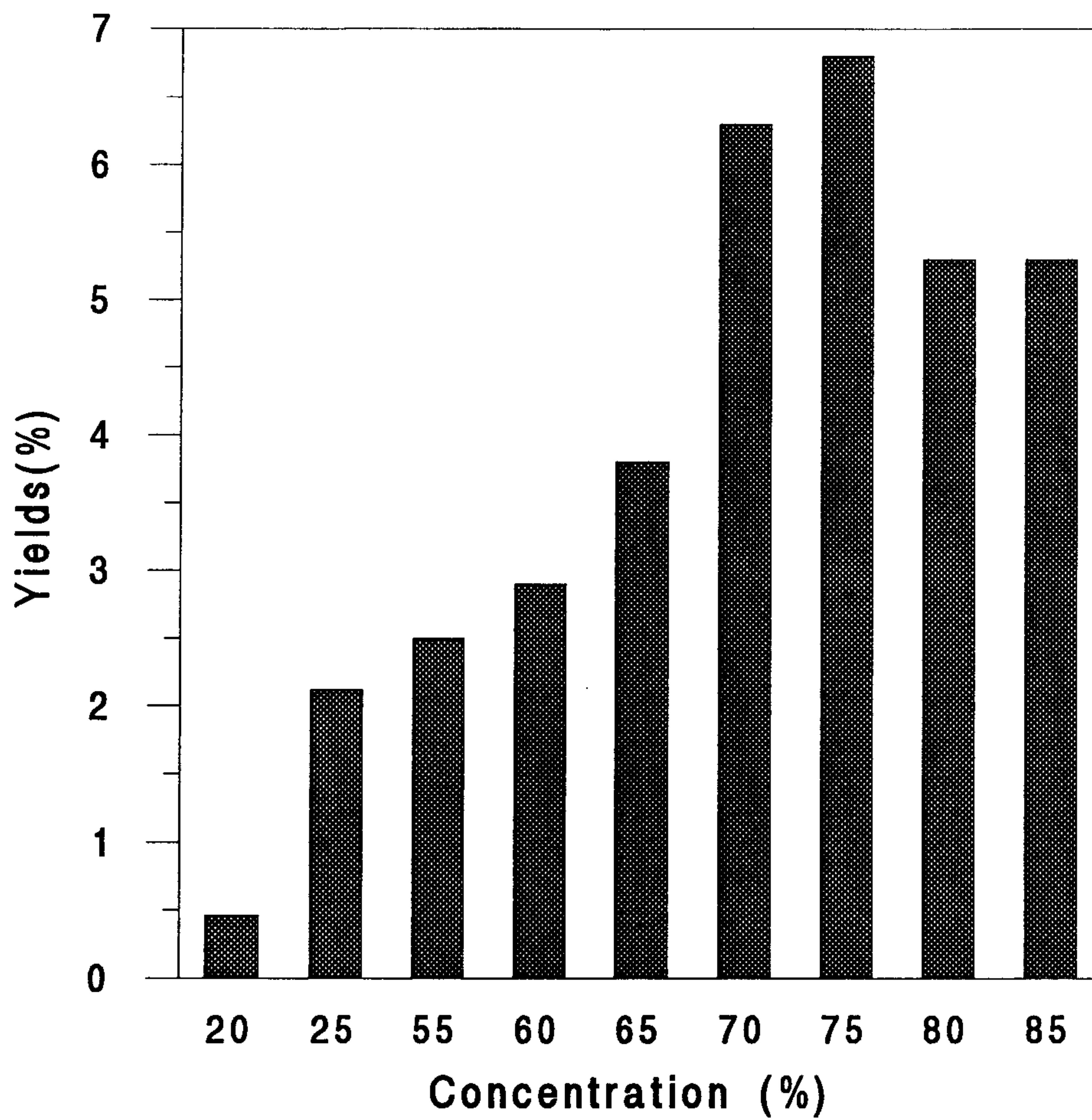


Fig.2. Effect of ethyl alcohol concentration on the yields of crude polysaccharide.

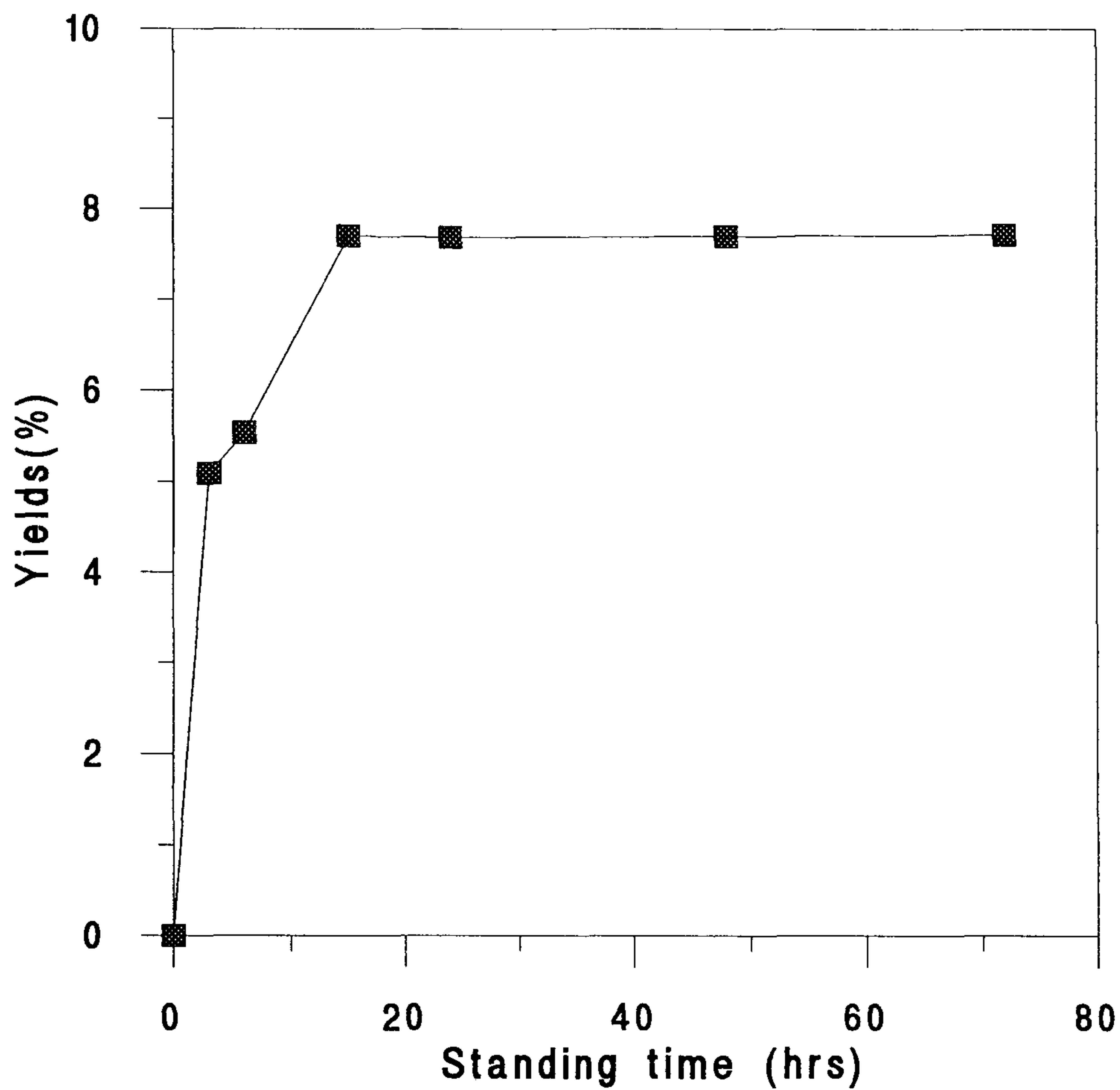


Fig.3. Effect of standing time on amount of crude polysaccharide extracted by treating with 70% ethyl alcohol.

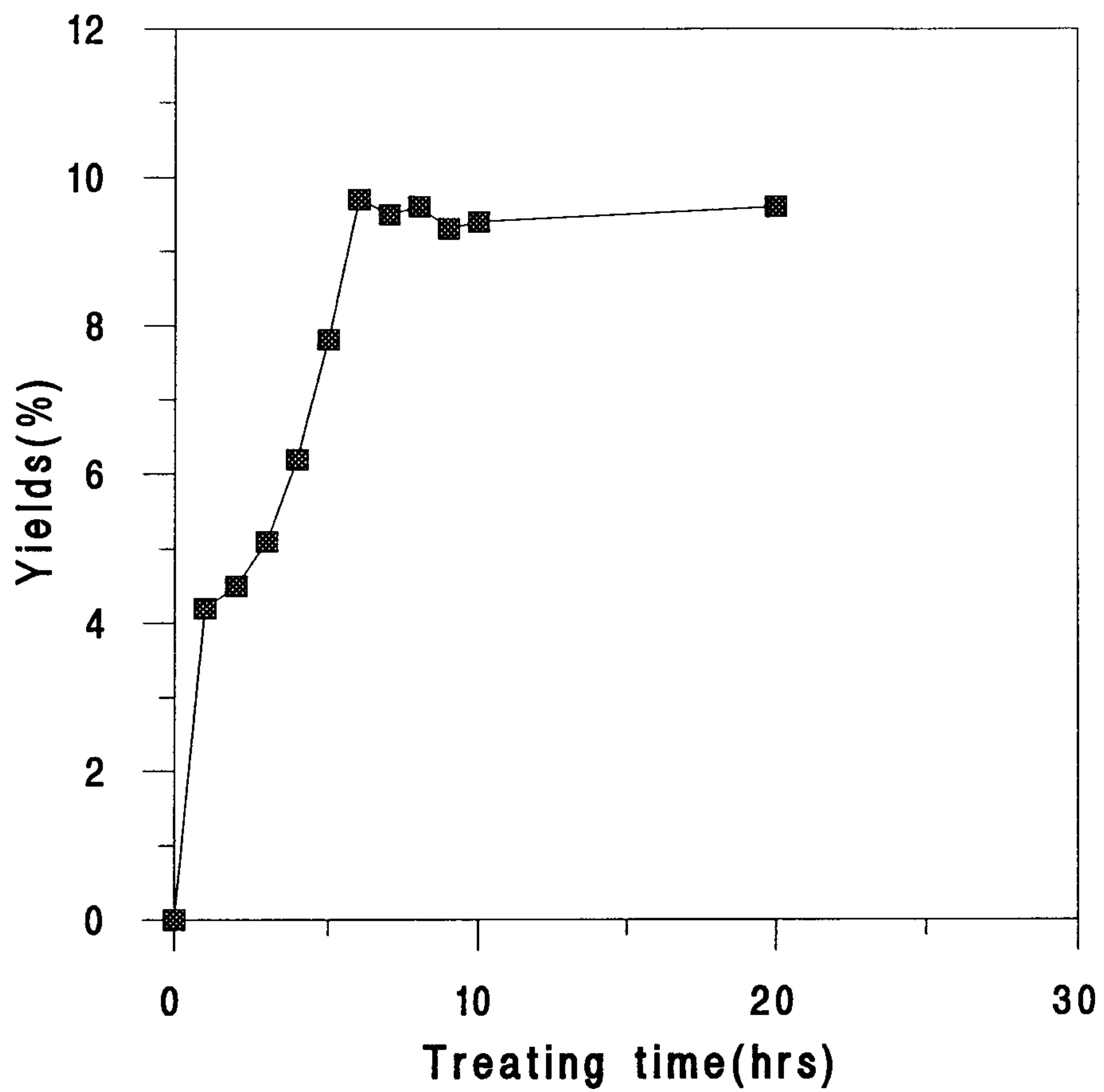


Fig.4. Changes in the amount of crude polysaccharide treated by autoclaving.

와 같다. 처리시간이 증가함에 따라 추출효율이 증가하는 경향이였으며, 약 6시간 처리하였을 때 9% 이상을 나타내었다. 따라서 autoclave 처리는 6시간으로 정하는 것이 바람직하였다. 한편, autoclave 처리횟수에 따른 수율의 변화는 Table 5과 같다. 세가지의 시료, 즉 탈색한 분말, 색소를 함유한 생시료 건조분말, 그리고 뿌리 부분을 따로 모아 건조한 분말 모두 1차 추출에서 가장 많이 추출되었다. 전반적으로 처리횟수를 반복함에 따라 수율이 감소되는 경향이였으나 뿌리 분말의 경우는 1차 추출에서 약 7%, 3차 추출에서 약 3.6%로 절반정도 감소하여 autoclave 처리에도 비교적 안정한 상태를 나타내었다.

3. 조다당류의 구성성분

Neutralse와 autoclave에 의해 추출된 조다당류의 일반성분은 Table 6과 같다. 조단백질의 함량이 neutralse처리구, autoclave처리구 각각 31%와 36% 정도였으며, 회분함량은 10%정도로 건조분말에 비해서 높게 나타났으며 총탄수화물은 약 51%와 46%였다. 한편, 이들 조다당류는 수용성이므로 적당량 취하여 물에 녹인 다음 구성성분을 조사하였는데 그 결과는 Table 7과 같다. Sulfate함량은 autoclave 처리구가 2.3%, neutralse 처리구가 3.5%였으며 표품인 chondroitin sulfate A의 경우는 1.1%를 나타내었다. 해조류의 sulfate 다당인 fucoidan의 경우 열수추출한 다시마가 53.0%, 톳은 30%이라 하였고(Nishide et al., 1987), 산성조건으로 추출한 톳은 22.7%, 모자반이 17%라 하였고(Nishino and Nagumo, 1987), 3종류 해삼의 경우는 0.9~1.2%였다고 보고하고 있다(문, 1996). 이상의 결과에서 우렁쟁이의 sulfate 함량은 해조류 유래 황산 다당류에 비해서는 적은 반면, 극피동물인 해삼보다는 다소 많은 것으로 나타났다. 한편, uronic acid의 경우는 미량 검출되었고, protein이 30% 이상을 차지하였으며, chondroitin sulfate 함량이 autoclave 처리구와 neutralse 처리구에서 각각 18.5%와 16.7%를 차지했다. 특히 표품인 chondroitin sulfate A는 비색정량법에서 95%이상이 검출되어 본 실

Table 7. Effect of treating time on the yield of crude polysaccharide of ascidian tunic treated in the autoclave at 125°C

(%, dry basis)

Treating time	Colored powder	Decolored powder	Root
1 Treated	6.3±0.4 ^a	10.5±0.6	6.9±0.3
2 Treated	4.8±0.2	3.6±0.2	4.5±0.1
3 Treated	1.3±0.1	2.2±0.2	3.6±0.4

^aMean ± S.D.

Table 8. Proximate composition of crude polysacchride according to extract condition

(%)

Component	Neutrased	Autoclave
Moisture	5.4±0.3 ^a	4.3±0.1
Crude protein	31.4±0.3	36.8±0.3
Crude lipid	1.3±0.1	1.2±0.4
Crude ash	10.5±0.4	11.9±0.2
Total carbohydrate ^a	51.4±0.4	45.8±0.5

^aMean ± S.D.

^b100-(moisture+crude protein+crude lipid+crude ash)

Table 9. Chemical composition of crude polysaccharide according to extract condition

(%)

Condition	Sulfate	Uronic acid	Protein	Chondroitin sulfate
Autoclave	2.3	0.02	31.5	18.5
Neutrased	3.5	0.01	35.9	16.7
Chondroitin sulfate A ^a	1.1	0.003	-	95.1

^aStandard chondroitin sulfate A

험에서 채택한 방법의 신뢰도가 높다는 것을 입증시켜 주었다.

한편, chondroitin sulfate류는 척추동물의 연골류에 널리 분포하고 있으며(Rodolpho et al., 1986), 미색류의 경우도 껍질에서 이와 유사한 sulfated glycan에 관한 많은 연구가 진행되었다(Rodolpho and Pauro, 1983; Paulo and Arthur, 1987; Mauro et al., 1989a; Mauro et al., 1989b; Mauro et al., 1990; Rodolpho et al., 1990).

4. 조다당류의 FT-IR분석

추출된 조다당류의 주요 관능기를 조사하기 위해 FT-IR을 측정된 결과를 Fig. 5, 6, 7에 각각 나타내었다. 탈색한 분말과 autoclave 및 neutrase 처리구는 전체적으로 유사한 양상 이었으나, $1750\sim 750\text{cm}^{-1}$ 영역에서 다소 차이를 나타내었다. autoclave 및 neutrase 처리구는 1240cm^{-1} 와 850cm^{-1} 부근에서 강한 흡수 peak를 나타내었는데 이는 각각 S=O과 C-O-S 결합이 존재함을 의미하여, 특히 850cm^{-1} 는 C-O-S가 axial 위치에 결합되어 있음을 나타내었다. 이 결과는 조다당류가 황산기를 함유하였으며, 그 밖에 340cm^{-1} 부근의 O-H 신축진동, 2900cm^{-1} 부근의 C-H 신축진동, 1650cm^{-1} 부근의 C=O 결합의 신축진동 등을 관찰할 수 있어 타 다당류의 일반적인 특징을 나타내었다.

제2절 조다당류의 정제 및 특성

1. 조다당류의 분획

조다당류의 성상이 autoclave와 neutrase처리구가 유사하였고 특히 autoclave처리는 대량처리가 가능하고, 처리시간이 짧은 장점 등으로 이후의 시료는 autoclave처리한 시료로 정제하였다. autoclave처리에 의해 얻어진 조다당류를 DEAE-cellulose ion exchange chromatography

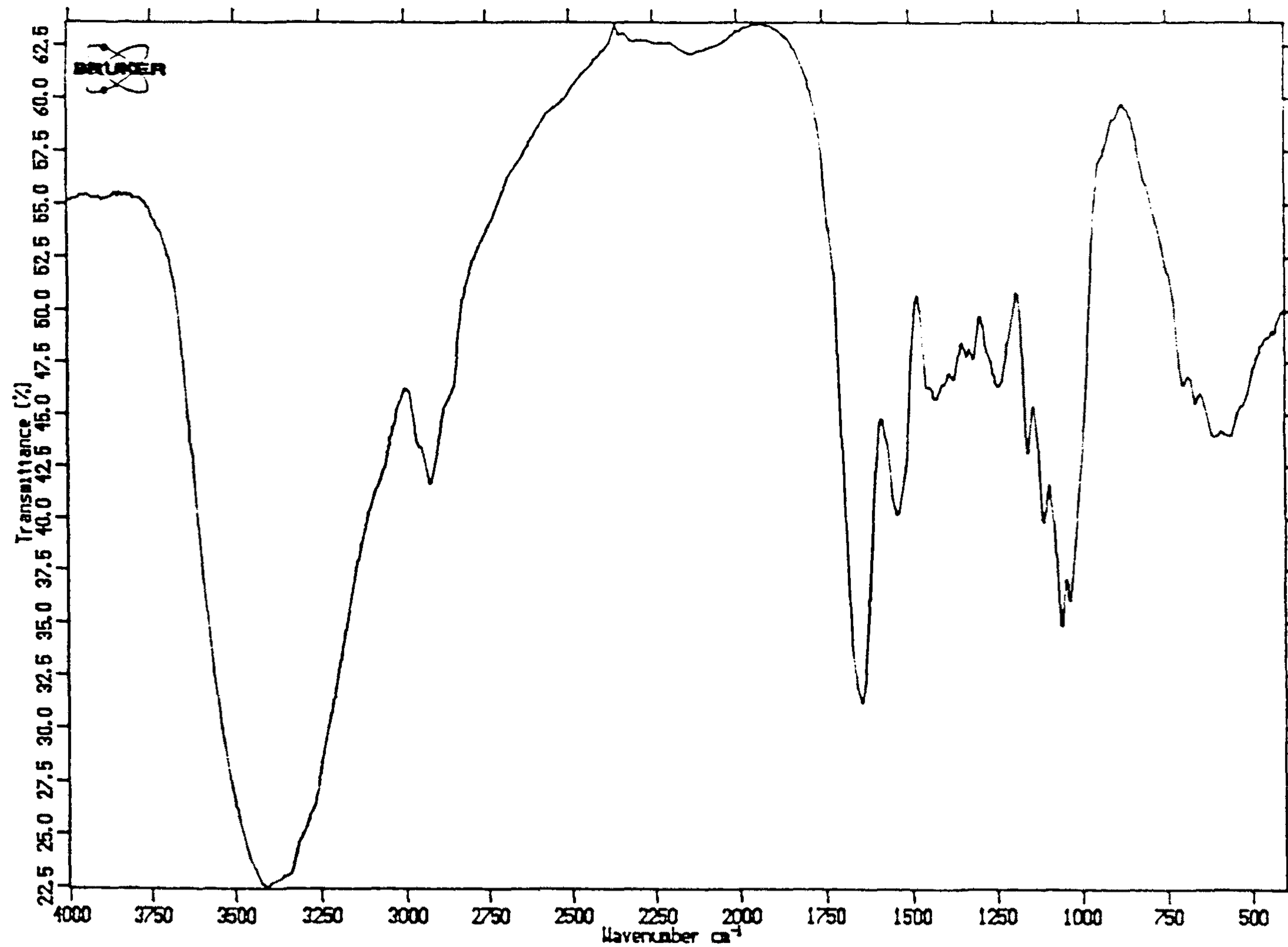


Fig. 5. Fourier transform IR(FT-IR) spectrum of decolorized ascidian tunic powder.

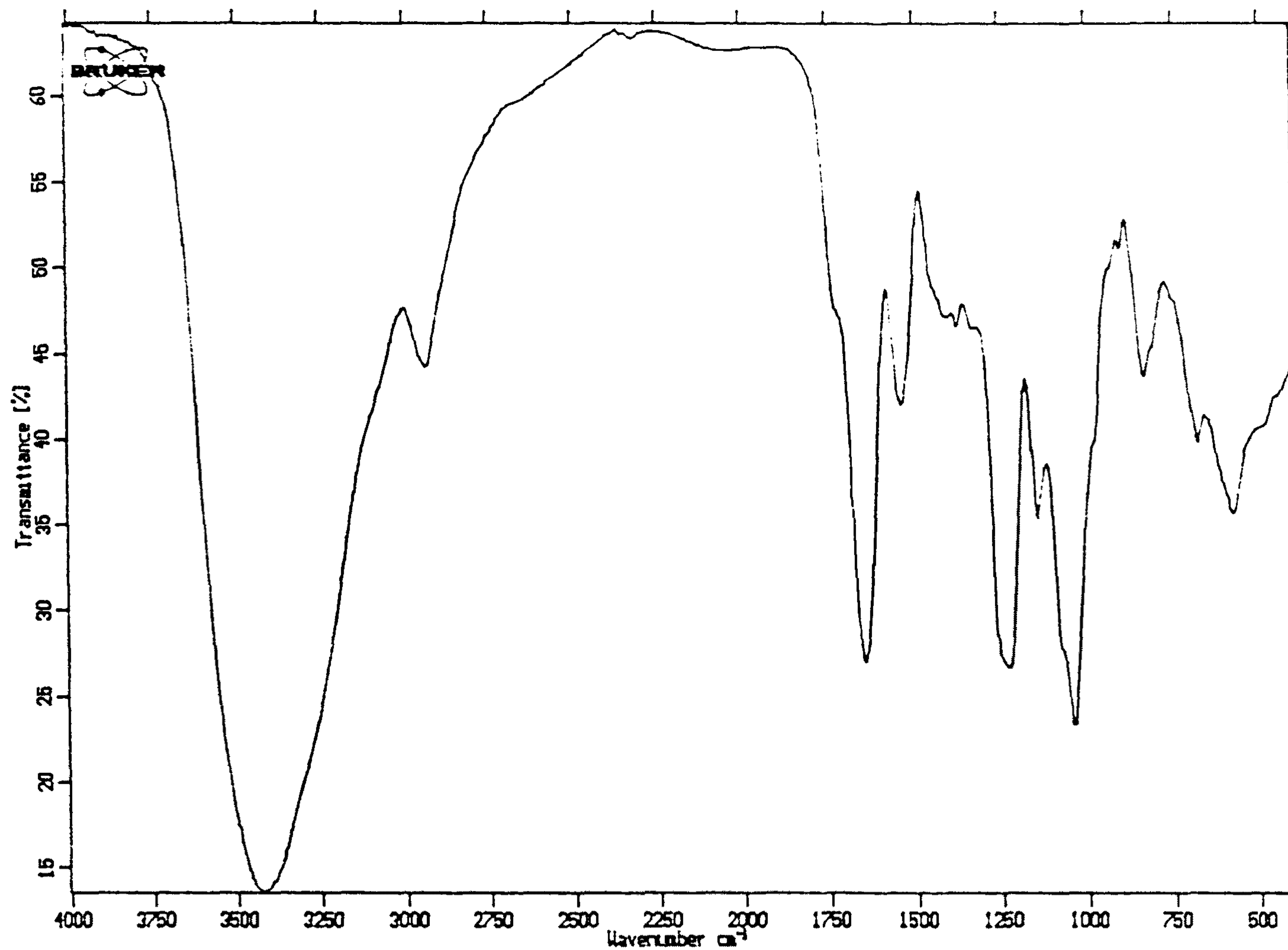


Fig. 6. Fourier transform IR(FT-IR) spectrum of crude polysaccharide extracted by neutrase

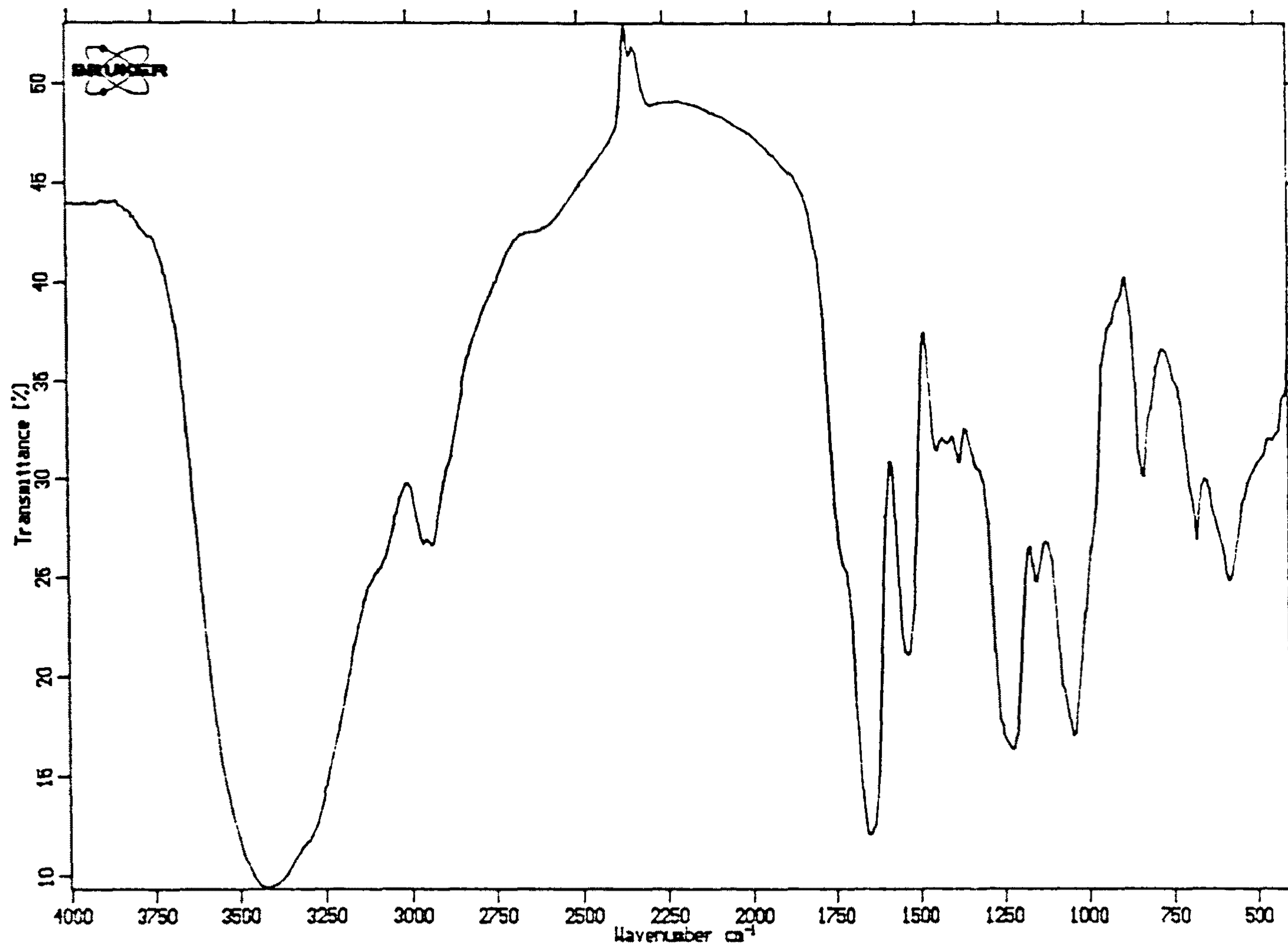


Fig. 7. Fourier transform IR(FT-IR) spectrum of crude polysaccharide extracted by autoclave

로 분획한 결과는 Fig. 8과 같다. 0~1.5M로 NaCl의 농도를 구배시켜 470nm에서 전당을 측정하였고, 280nm에서 단백질활성획분을 측정하였고, 전당 측정에서 활성이 있는 획분만을 모았다. 활성획분을 모아 투석 및 알콜침전을 통해 조다당류를 침전시킨 다음, 동결건조를 행하였다. 한편, DEAE-cellulose 이온 교환 처리로 얻어진 활성획분을 Sephadex G-100으로 gel filtration으로 행하여 여기서 얻어진 활성획분을 다시 Sephadex G-25로 gel 여과하여 활성획분을 얻었다(Fig. 9와 10). Sephadex G-100 겔여과에서 2개의 활성획분을 얻었는데 이를 F1, F2로 하였는데 이들의 수율은 각각 11.4%와 20%였다. Sephadex G-100의 F2획분을 다시 Sephadex G-25로 gel 여과한 결과 두 개의 활성획분을 얻었으나, 1개의 획분은 활성정도가 미미하여 활성이 큰 획분만을 모아서 알콜침전, 동결건조하였다.

2. 부분정제 다당류의 화학성분

DEAE-cellulose ion exchange chromatography한 시료와 Sephadex G-100과 G-25로 겔여과한 시료의 화학성분조성은 Table 8과 같다. sulfate 함량은 1.8~2.5% 정도였으며, uronic acid 함량은 미미하였고, protein 함량은 9.4~15.7%였다. 또한 chondroitin sulfate 함량은 18.6~23.5%로 정제하기 전보다 증가하는 경향이였으며 특히 Sephadex G-25의 경우 23.5%로 증가하였다.

3. 부분정제 조다당류의 FT-IR 및 전자현미경분석

Sephadex G-100과 G-25의 FT-IR spectrum과 표품 chondroitin sulfate A와 B의 FT-IR spectrum은 Fig. 11~14에 각각 나타내었다. 황산기 중 1240cm^{-1} 에서 S=O의 stretching vibration이 C-O-S 신축진동의 경우 axial 향배는 850cm^{-1} 에서 나타난다(Fujihava et al., 1984). 황산기가 850cm^{-1} 에서 강한 흡수대를 나타낼 경우 C_4 위치에 결합되어 있다고 할수 있고 C_2 와 C_3 의 위치에 결합한다면 820cm^{-1} 에서 흡수대가

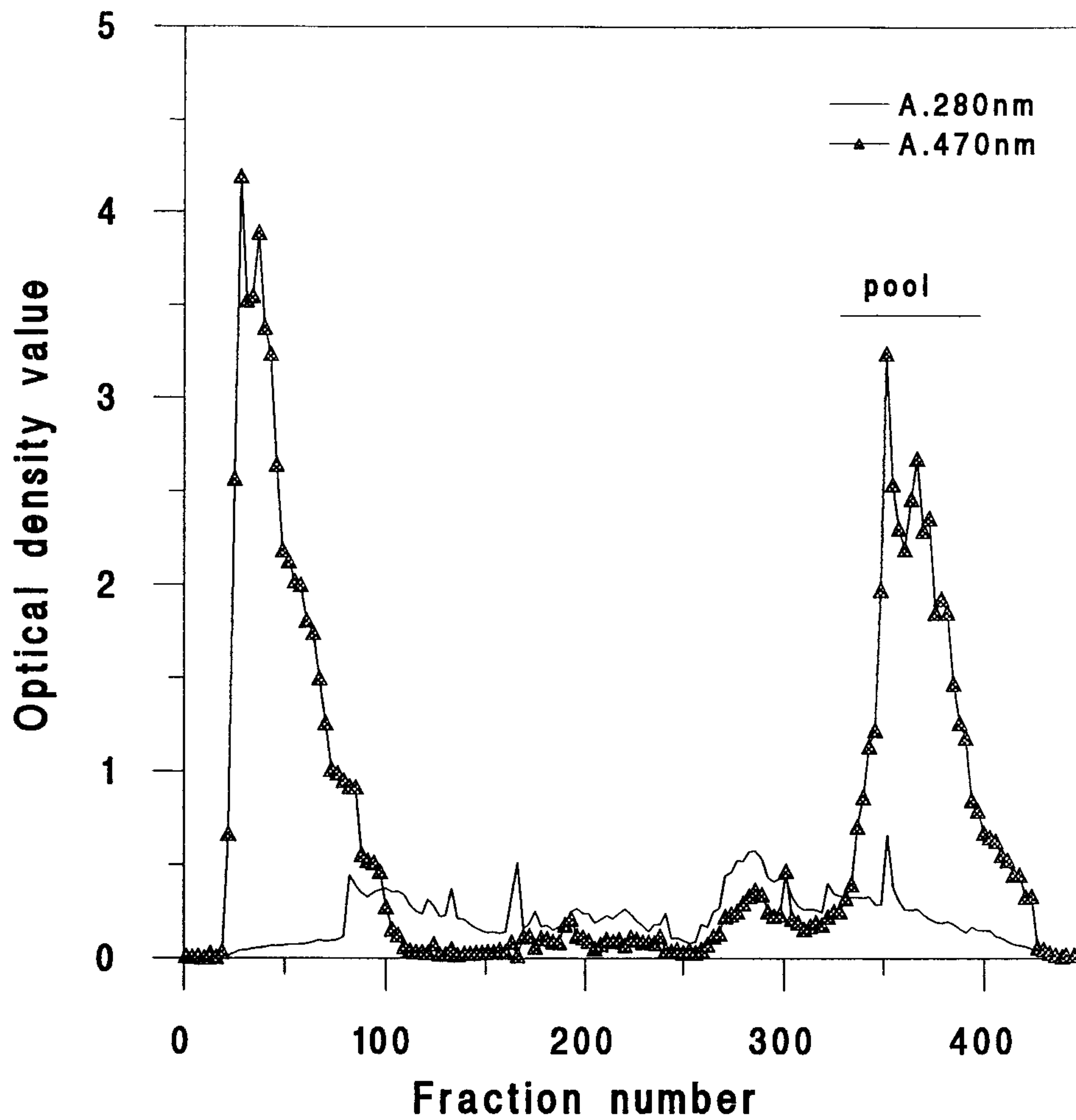


Fig.8. Fractionation of partially purified polysaccharide obtained by DEAE-Cellulose ion chromatography.

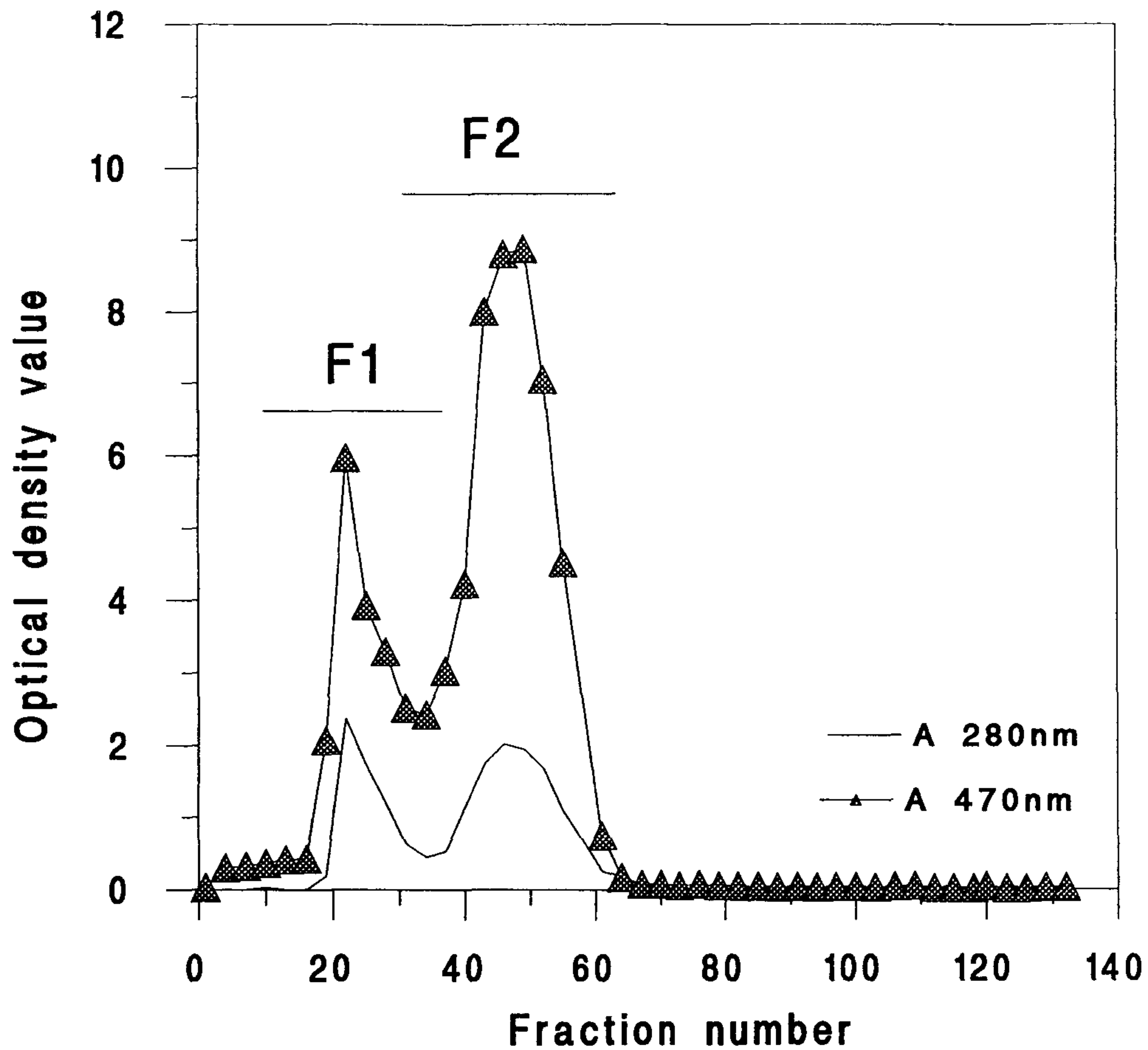


Fig.9. Sephadex G-100 rechromatogram (i.d. 2.5cm x 100cm) of the partially purified polysaccharide obtained by DEAE-Cellulose ion chromatography.

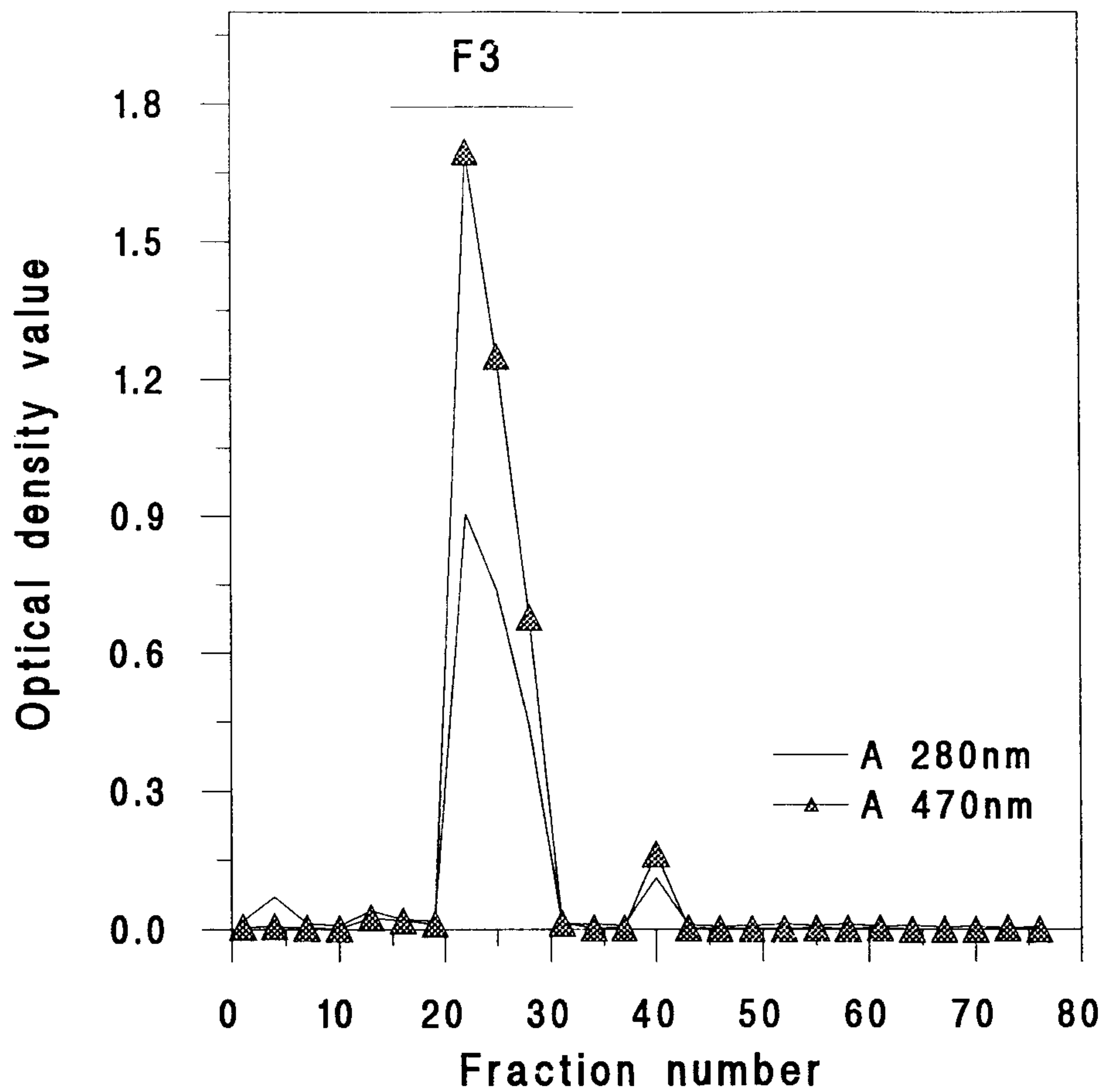


Fig.10. Sephadex G-25 rechromatogram(i.d.1.5cm x 100cm) of the partially purified polysaccharide obtained by the Sephadex G-100 chromatography.

Table 10. Chemical composition of partially purified polysaccharide (%)

	Sulfate	Uronic acid	Protein	Chondroitin sulfate
DEAE-Cellulose	1.9	0.02	15.7	18.6
Sephadex-100 ^a	2.5	0.04	12.4	21.2
Sephadex-25 ^b	1.8	0.01	9.6	23.5

^aObtained by the DEAE-Cellulose Chromatography

^bObtained by the Sephadex-100 Chromatography

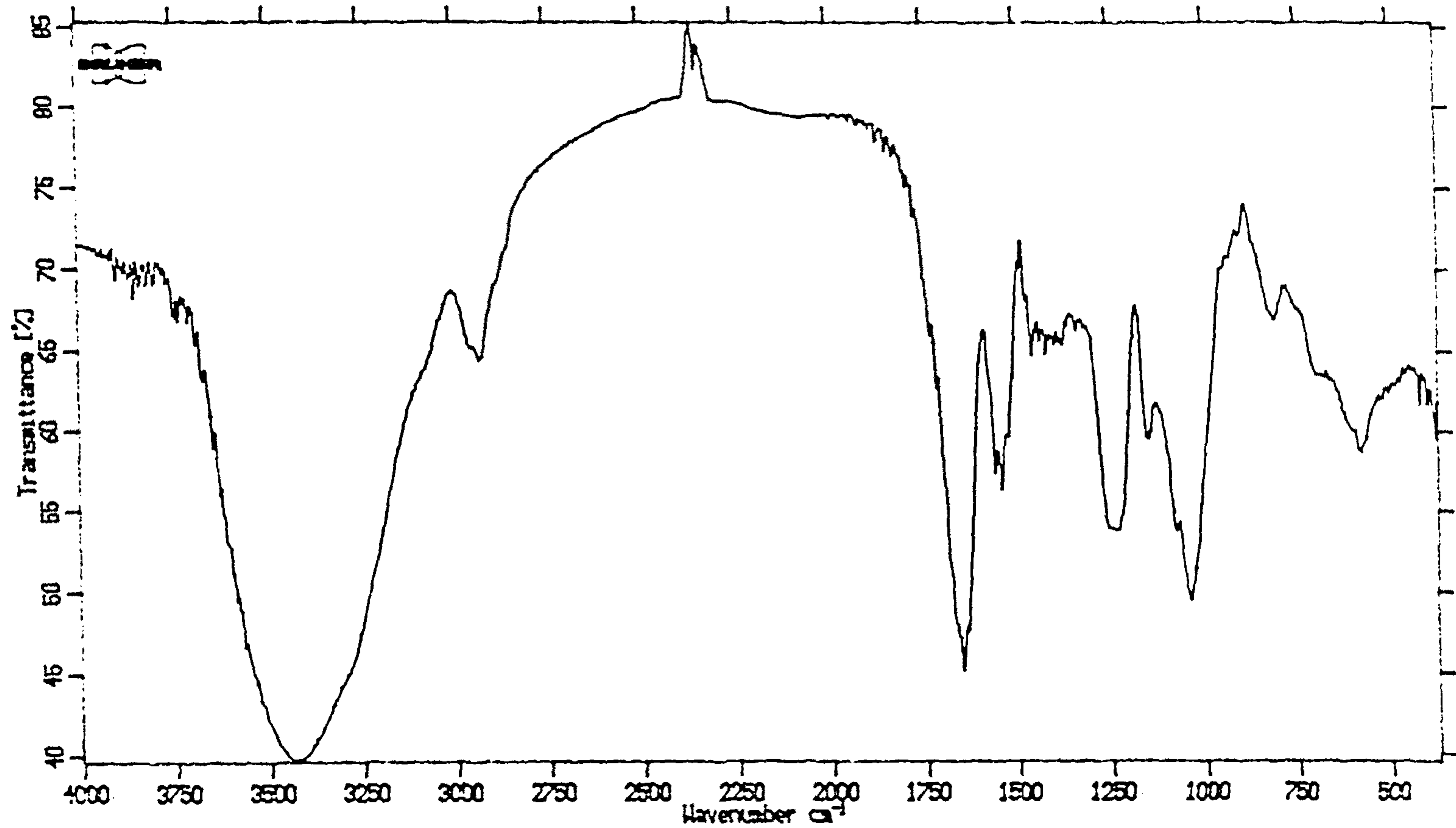


Fig. 11. Fourier transform IR(FT-IR) spectrum of partially purified polysaccharide by Sephadex G-100 gel filtration after extracted by autoclave.

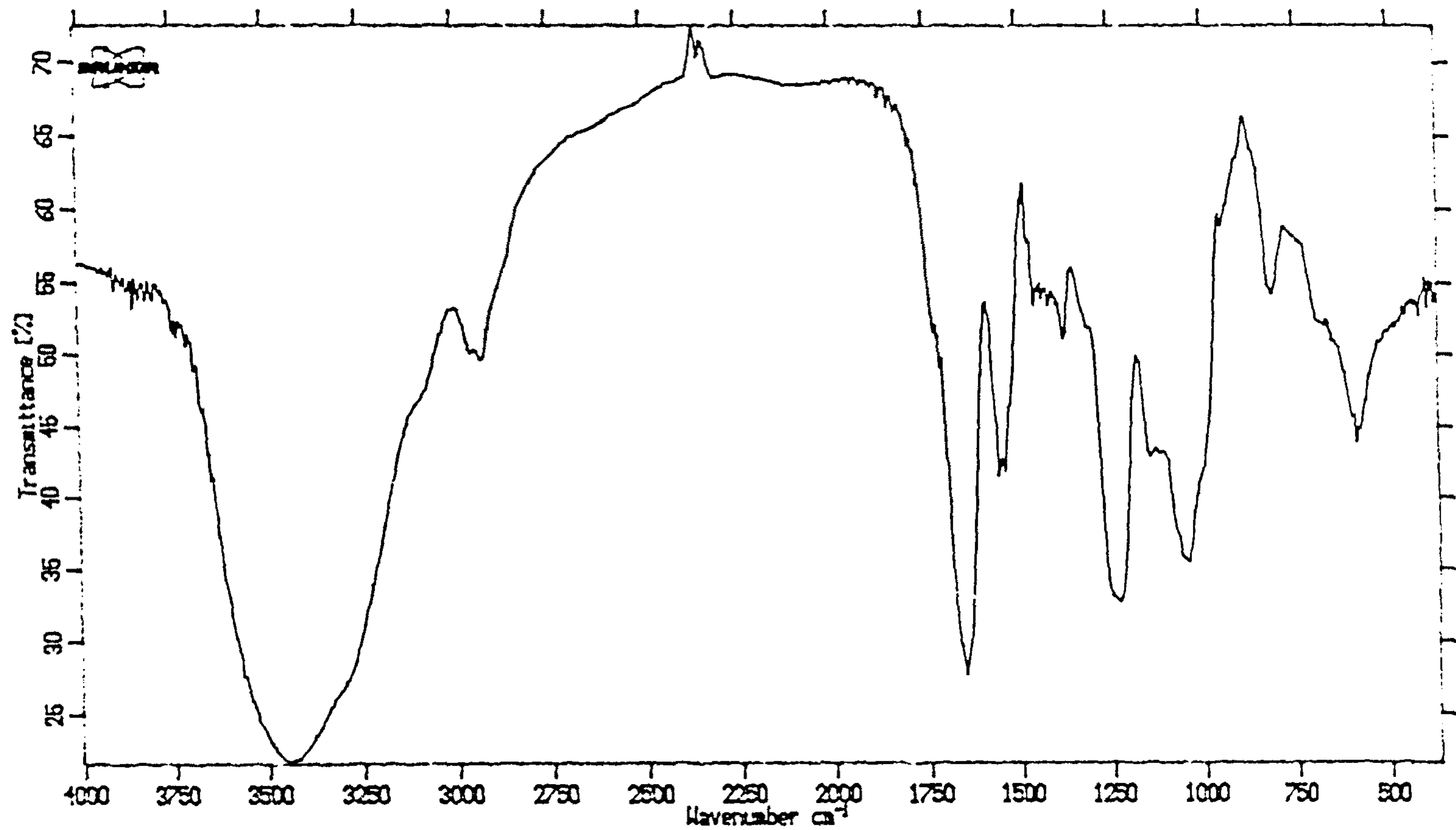


Fig. 12. Fourier transform IR(FT-IR) spectrum of partially purified polysaccharide obtained by Sephadex G-25 rechromatography after Sephadex G-100 gel filtration extracted by autoclave.

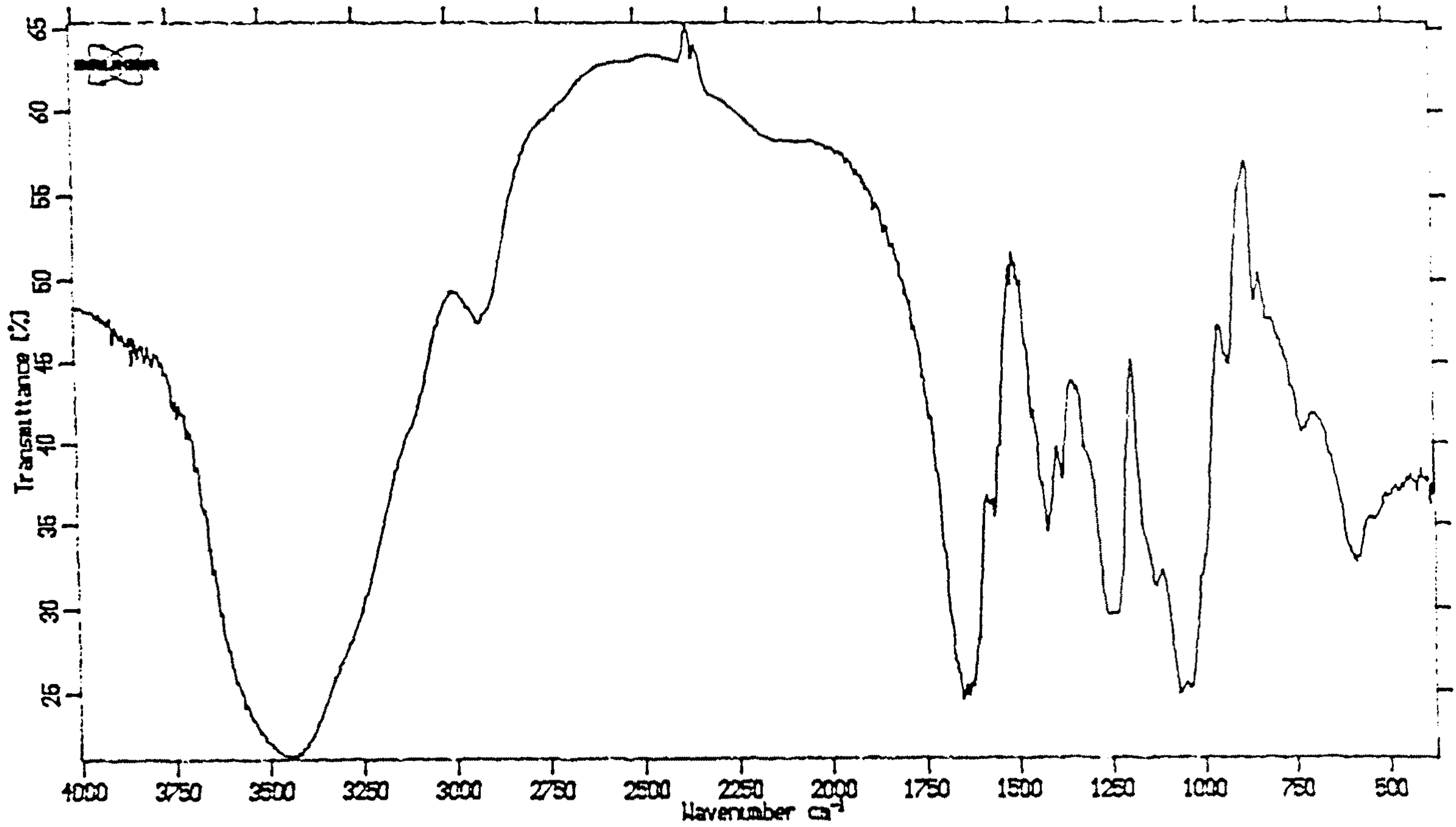


Fig. 13. Fourier transform IR(FT-IR) spectrum of standard chondroitin sulfate A.

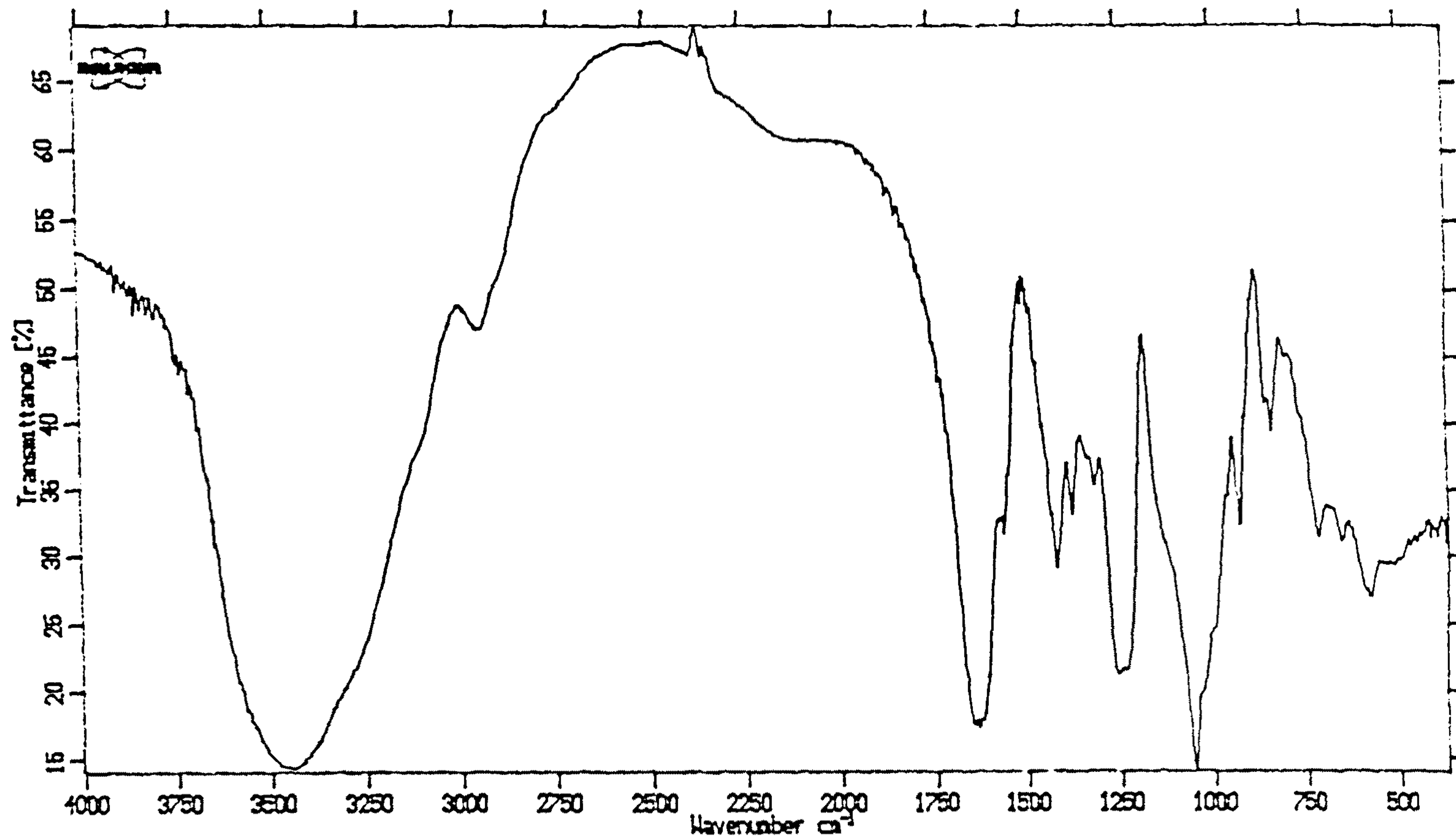


Fig. 14. Fourier transform IR(FT-IR) spectrum of standard chondroitin sulfate B.

나타나게 되는데 850cm^{-1} 에 강한 흡수대가 존재하므로 C_4 위치에 결합되어 있다고 생각할 수 있다.

조다당류와 마찬가지로 3400cm^{-1} 부근의 O-H 신축진동, $2,900\text{cm}^{-1}$ 부근의 C-H 신축진동, 1650cm^{-1} 부근의 C=O결합의 신축진동, $1000\sim 1100\text{cm}^{-1}$ 부근에서의 C-H, C-O등의 진동운동등이 관찰되었다. 한편 표품인 Chondroitin sulfate A 및 B와 유사한 IR 패턴을 나타내고 있으며 chondroitin sulfate A와 더욱 유사한 패턴을 보여주고 있다.

제3절 조다당류의 물리적 및 유동특성

1. 물리적 특성

가. 지방흡수력과 포말성

우렁쉥이 분말의 지방흡수력과 포말성은 Fig.11과 Table 9에 각각 나타내었다. 지방흡수력은 대조구인 chitin과 chitosan에 비하여 다소 떨어졌으며, 추출한 조다당류보다 건조분말이나 조다당류를 추출하고 남은 잔사가 보다 효과적이었다. Autoclave 추출구와 neutrase 추출구의 지방흡수력은 대략 250~300% 정도였다. Knorr(1983)는 chitin, chitosan, microcrystalline chitin 및 microcrystalline cellulose의 지방흡수력을 조사한 결과, 170~215% 범위이며 chitosan이 가장 적었고, chitin이 가장 높았다고 보고한 바 있다.

한편 포말성 및 포말안정성은 대조구인 chitin과 chitosan에서는 나타나지 않았지만 우렁쉥이 분말에서는 거의 모든 처리조건에서 나타났다. 특히 Autoclave와 neutrase 처리한 조다당류에서는 포말성이 각각 0.70과 0.67이었으며 포말안정성은 0.50과 0.38로 비교적 우수하였다. Poolo (1988)은 부분적으로 분해한 점도 chitosan은 egg albumin이나 serum albumin과 같은 구상단백질의 포말성을 향상시키는 작용을 하였는데

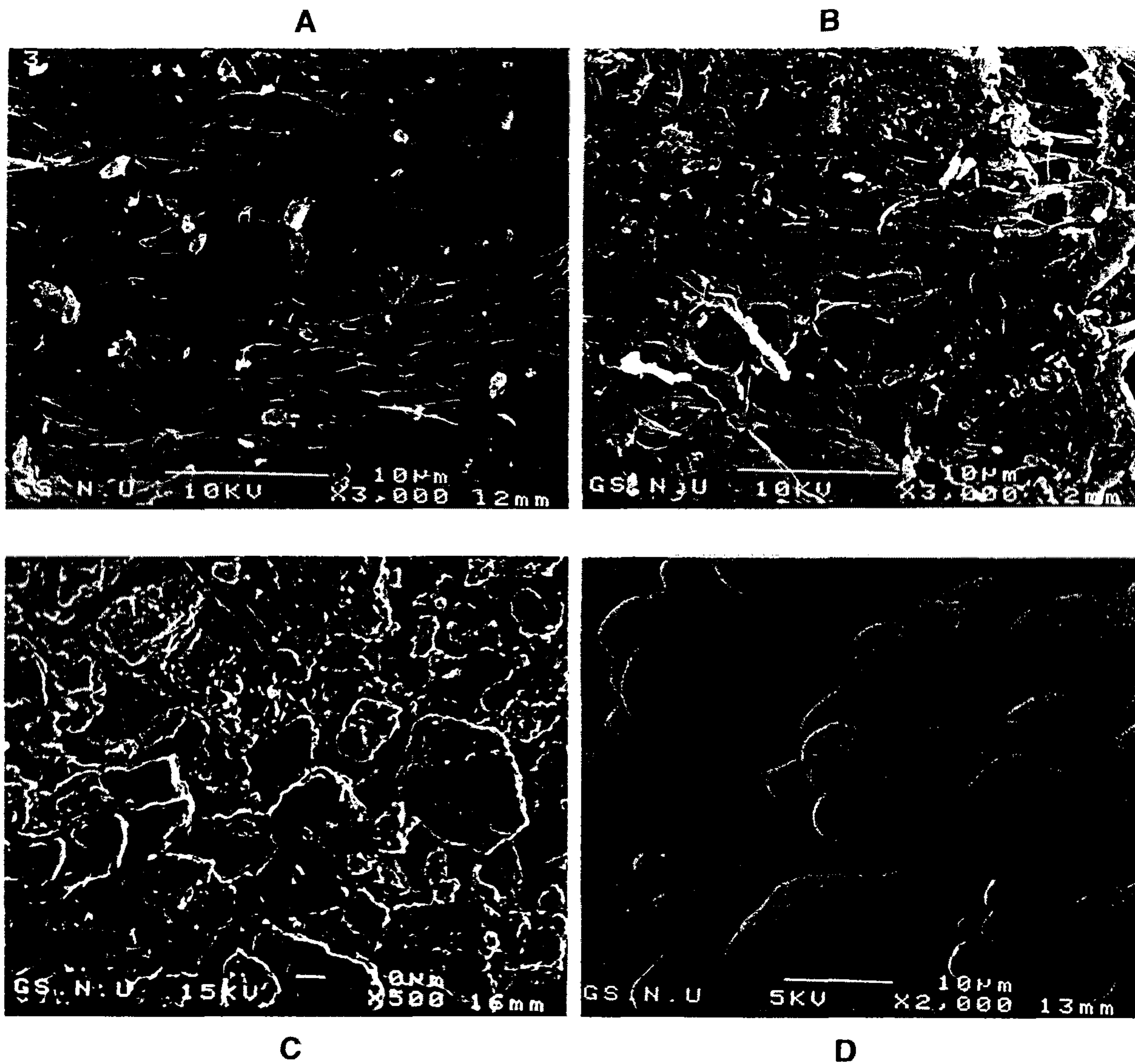


Fig.15. SEM phtography of chitin(A), chitosan(B), chondroitin sulfate A(C), and ascidian polysaccharide(D).

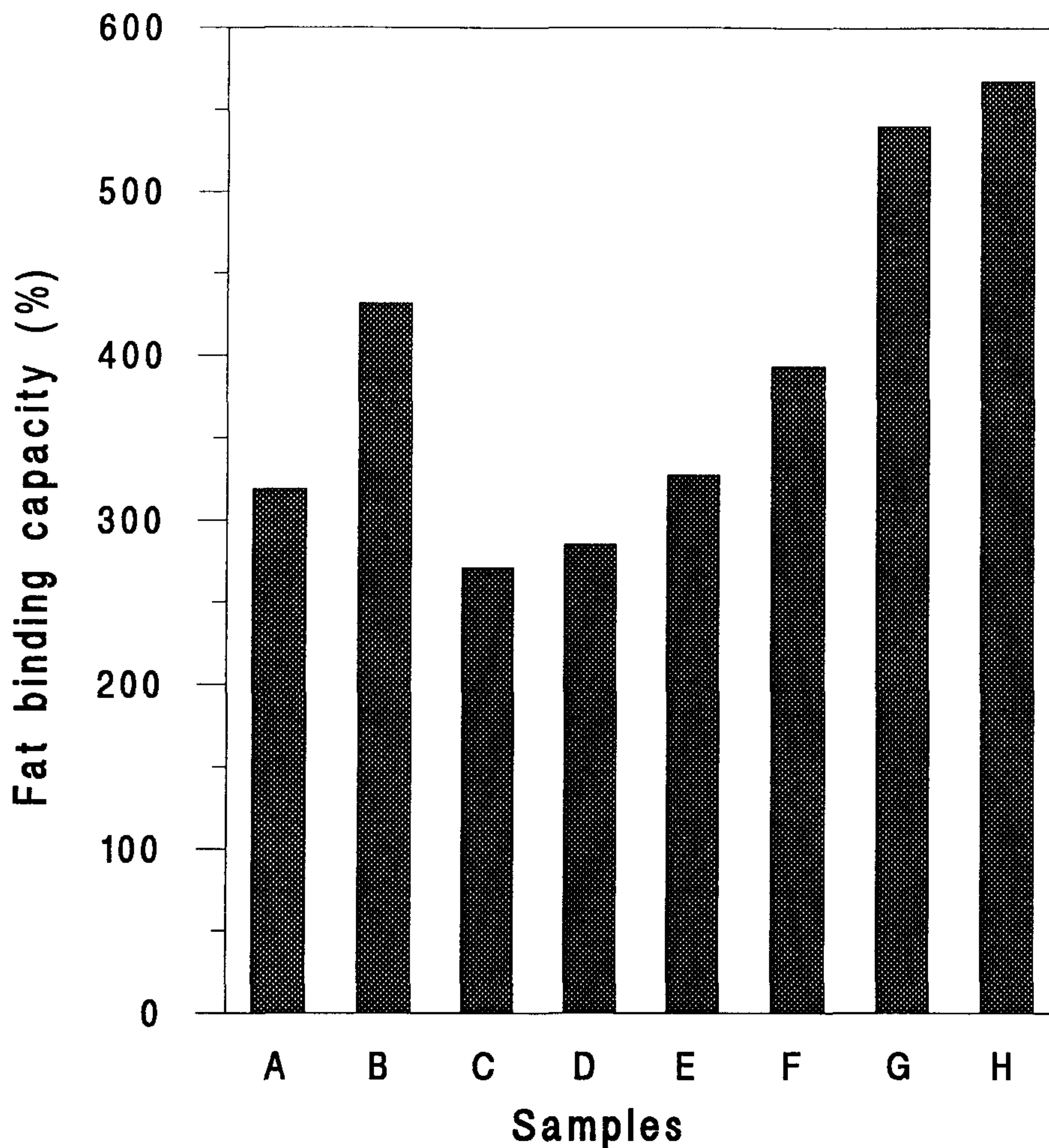


Fig.16. Fat binding capacity of samples.
A:Colored powder B:Decolored powder
C:Neutrase extract D:Autoclave extract
E:Residue of neutrase F:Residue of autoclave
G:Chitin H:Chitosan

Table 11. The foaming properties of samples

Sample	Whippability ^a	Foam stability ^b
Color powder	0.05	0.03
Decolored powder	0.20	0.08
Neutrase extracts	0.67	0.38
Autoclave extracts	0.70	0.50
Residue of neutrase	0.05	0.05
Residue of autoclave	-	-
Chitin	-	-
Chitosan	-	-

^aWhippability = (Total volume-Drainage volume) / Initial volume

^bFoam stability = (Initial volume-Drainage volume) / Initial volume

이는 등전점 이상의 pH값에서 단백질과 chitosan의 정전기적 상호작용에 기인된다고 하였다.

나. 유화능 및 색소흡착능

조다당류의 유화능 및 색소흡착능을 Table 10과 11에 각각 나타내었다. 유화능 및 유화안정성은 autoclave 및 neutrase 처리한 조다당류에서만 나타났는데 유화능은 각각 49.2%와 47.1%, 유화안정성은 48.3%와 44.8% 정도였다. 유화능과 유화안정성이 건조분말에는 그 기능이 없다가 조다당류에 나타난 것은 단백질의 소수성 부분에 기름방울이 결합하고, 그 표면에 다당류가 짝을 지어 수화수를 강력히 흡착하여 안전한 유화를 형성하기 때문으로 생각된다(加藤, 1994). Knorr(1983)는 microcrystalline chitin의 유화성은 있었으나, chitin, chitosan의 경우 농도를 변화시켜도 유화성이 없었다고 보고하고 있어 본 실험의 chitin, chitosan의 결과와 유사하였다. 이와 관련하여 Paredeo-ropez and Ordorica-Falomir(1986)는 safflower 단백질의 pH 변화에 따른 유화성을 측정한 결과 pH 2, 4 및 8에서 52.5, 53.7 및 56.8 %로 유화성이 증가하였다고 하였다.

한편, 색소흡착능을 조사하기 위해 Blue-R-250, Red-2 그리고 우렁쉥이 껍질추출물을 조다당류에 첨가하여 흡착시키기 위해 용매를 증발시킨 후 Blue-R-250과 Red-2는 70%-EOH로 우렁쉥이 색소추출물은 acetone으로 3회에 걸쳐 추출하여 정량하였다.

색소흡착능이 알려진 chitin 및 chitosan과 비교하여 손색이 없을 정도였으며 특히, 우렁쉥이 색소추출물의 색소흡착능은 acetone과 neutrase가 각각 84.2%와 85.6%로 대조시료에 비해 다소 우수하였다. 이와 관련하여 Knorr(1983)는 chitin과 chitosan의 색소흡착능 실험에서 전반적으로 색소농도가 증가함에 따라 흡착능이 증가하였고, pH의 영향은 pH 7.0에서 감소하였고 pH 2.0~7.0 사이에서 안정하였다고 보고한 바 있다. 따라서 조다당류의 경우 색소흡착능이 뛰어나므로 색소부

Table 12. The emulsifying properties of samples

(%)

Sample	Emulsifying activity	Emulsifying stability
Color powder	-	-
Decolored powder	-	-
Neutrased extracts	47.1	44.8
Autoclaved extracts	49.2	48.3
Residue of neutrased	-	-
Residue of autoclave	-	-
Chitin	-	-
Chitosan	-	-

Table 13. Dye binding capacity of chitin^a, chitosan^b and crude polysaccharide treated by neutrased and autoclave

(%)

Sample	Blue R-250	Red-2	Pigment of ascidian tunic
Neutrased	81.2	83.5	85.6
Autoclave	76.3	87.1	84.2
Chitin	52.5	57.6	82.1
Chitosan	82.7	88.4	83.9

^aSigma Co. no. C-7170 (from crab shells)^bSigma Co. no. C-3646 (from crab shells)

형제로서 손색이 없을 것으로 생각되어 진다.

2. 유동특성

Autoclave로 추출한 조다당류를 추출과정에서 수용성 단백질을 제거하기 위해 유동특성을 조사하였다. trichloroacetic acid(TCA)로 제단백처리한 것과 TCA처리 하지 않은 것으로 구분하여 이 두 시료의 TCA를 처리하지 않은 이유는 TCA로 인해 pH가 저하되어 색소를 흡착시킬 때 색소파괴의 가능성이 있기 때문이다.

가. 농도의 영향

조다당류를 농도별로 조제하여(5%, 10%, 15%, 20%) 전단속도 증가에 따른 겔보기 점도 변화는 Fig. 16과 17에 각각 나타내었다. 두 시료 모두 농도가 증가함에 따라 겔보기 점도가 증가하였고 또한 전단속도가 증가함에 따라 겔보기점도는 감소하는 경향이 있다. 전단속도가 100 1/s일 때 시료농도가 5%에서 20%로 증가함에 따라 TCA처리구의 겔보기점도는 0.007에서 0.049 Pa·s로 증가하였고, TCA무처리구는 0.014에서 0.081로 증가하였다. 즉, 시료 모두 농도의 증가에 따라 겔보기점도가 급격히 증가하였고, 동일한 농도에서 TCA무처리구가 TCA처리구에 비해 상당히 높았다. 점도에 영향을 미치는 것은 구성물질의 분자구조나 분자량인데(Word et al., 1990), TCA무처리구가 점도가 높은 것은 단백질이 상당량 존재하기 때문으로 생각된다.

한편 전단속도의 변화에 따른 전단응력의 변화는 Fig. 18과 19에 각각 나타내었다. 전반적으로 전단속도가 증가함에 따라 전단응력은 비직선적으로 증가하여 대부분 시료가 비뉴턴 유체임을 나타내었다. TCA처리구와 무처리구에 있어서 저농도인 5% 경우 TCA무처리구가 보다 비뉴턴성 유체에 가까웠다. 전단속도에 따른 전단응력값을 이용해 power law식에 따라 구한 조다당류의 유동특성값은 Table 12와 같다. TCA처리 및 무처리구 모두 유동지수값(n)이 1이하로 의가소성을 나타

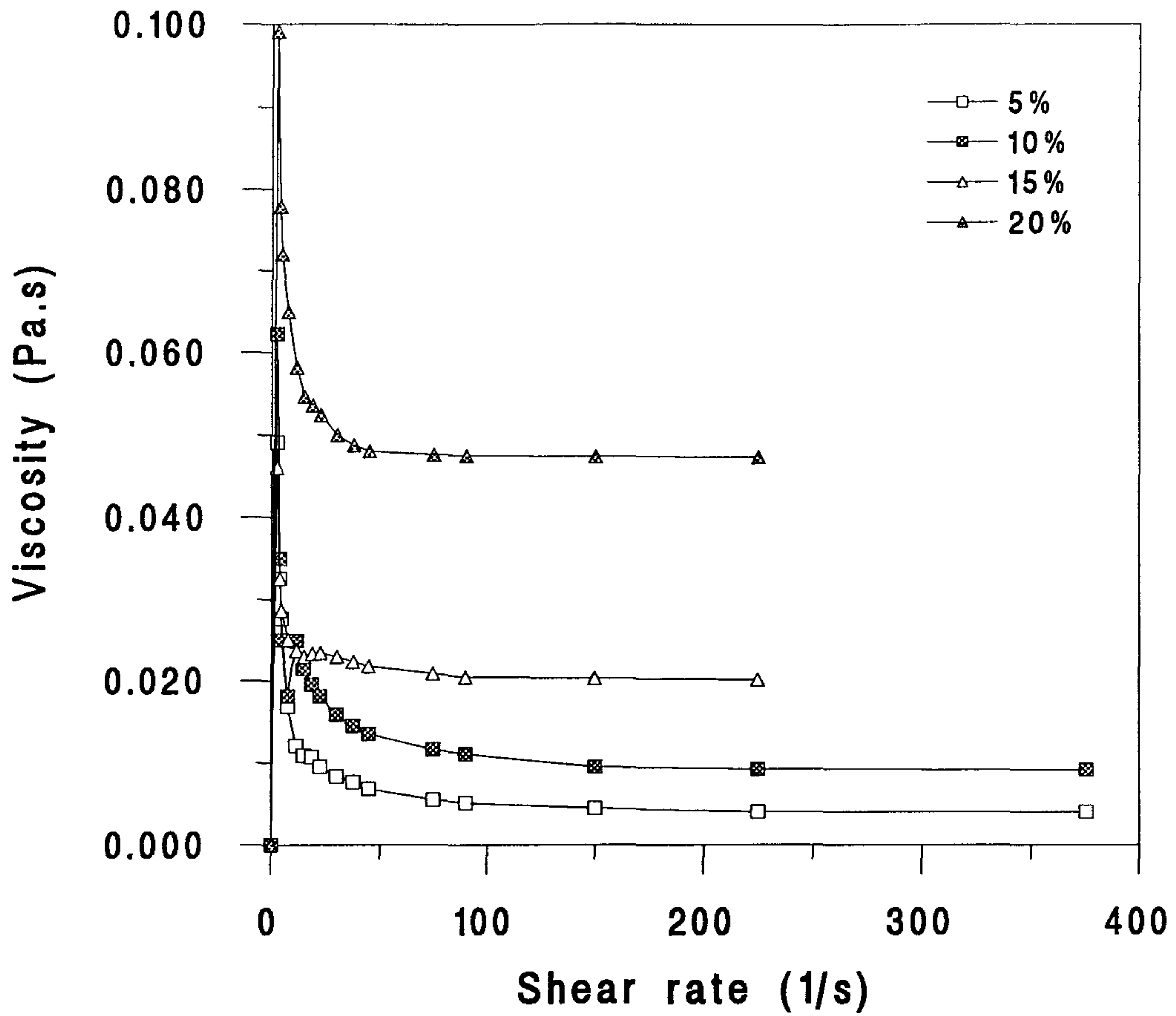


Fig.17. Flow curves of crude polysaccharide solutions treated with trichloroacetic acid after extracted by autoclave.

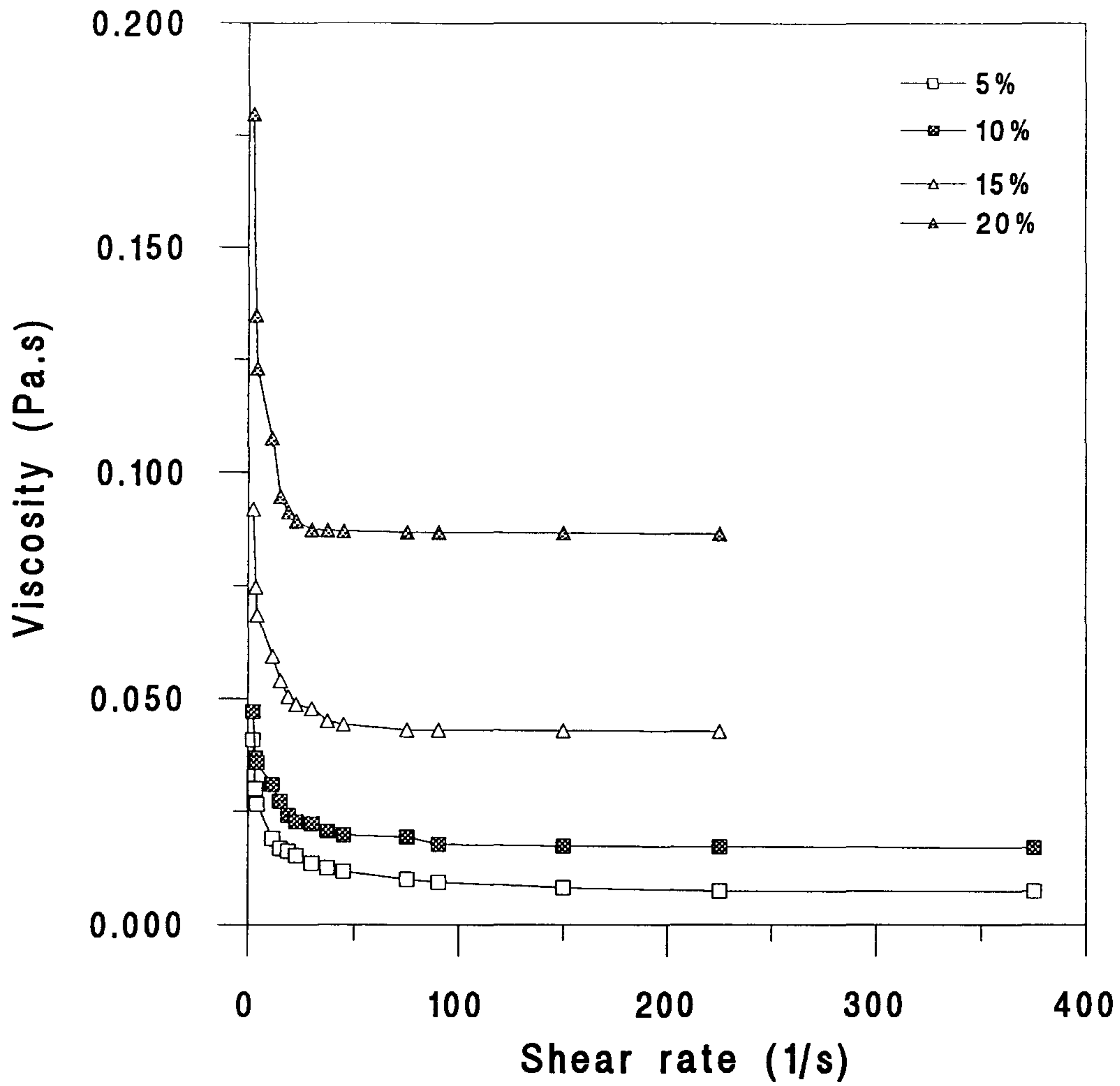


Fig.18. Flow curves of crude polysaccharide solutions with untreated trichloroacetic acid after extracted by autoclave.

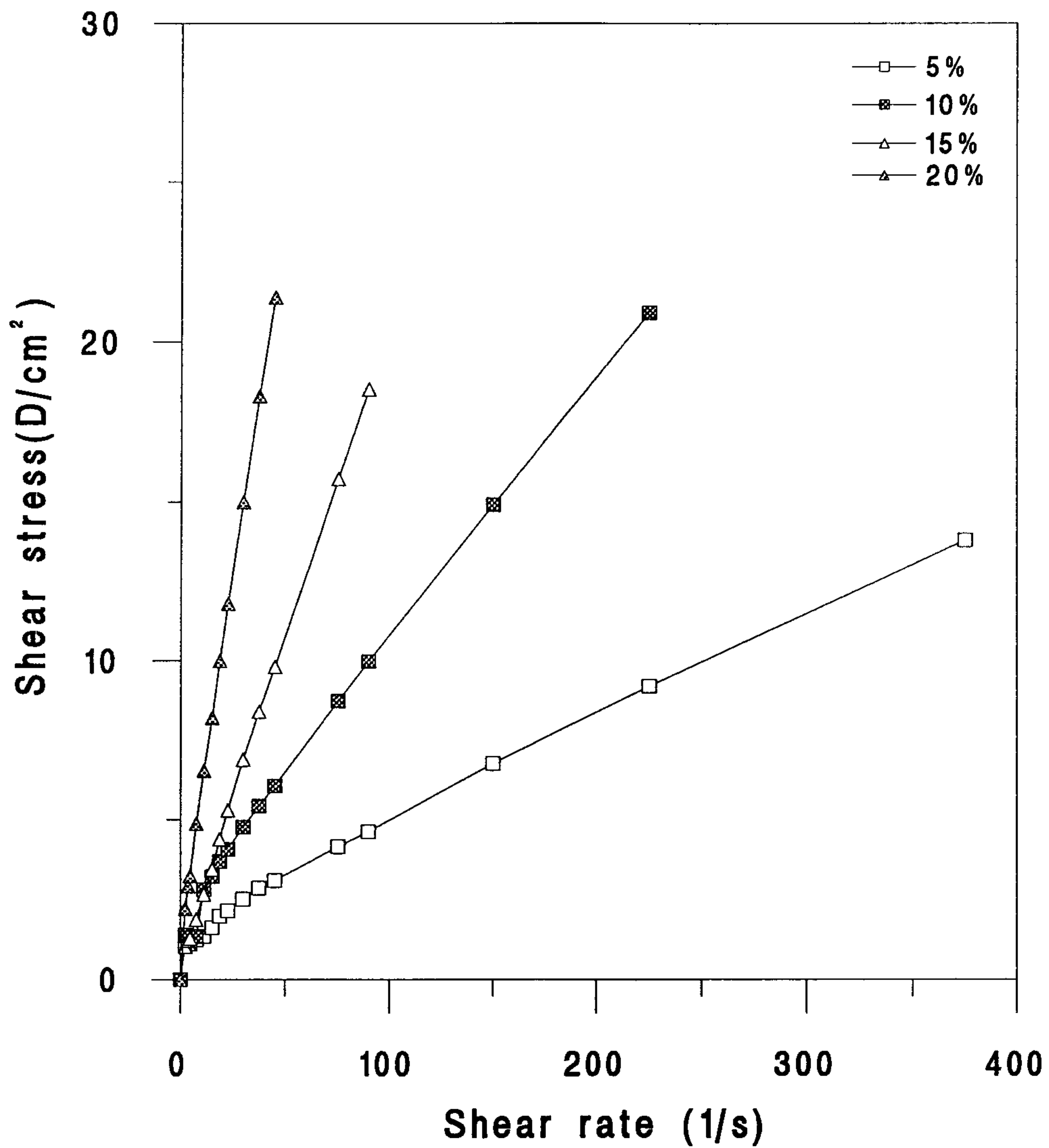


Fig.19. Shear stress-shear rate curves of crude polysaccharide solutions treated with trichloroacetic acid after extracted by autoclave.

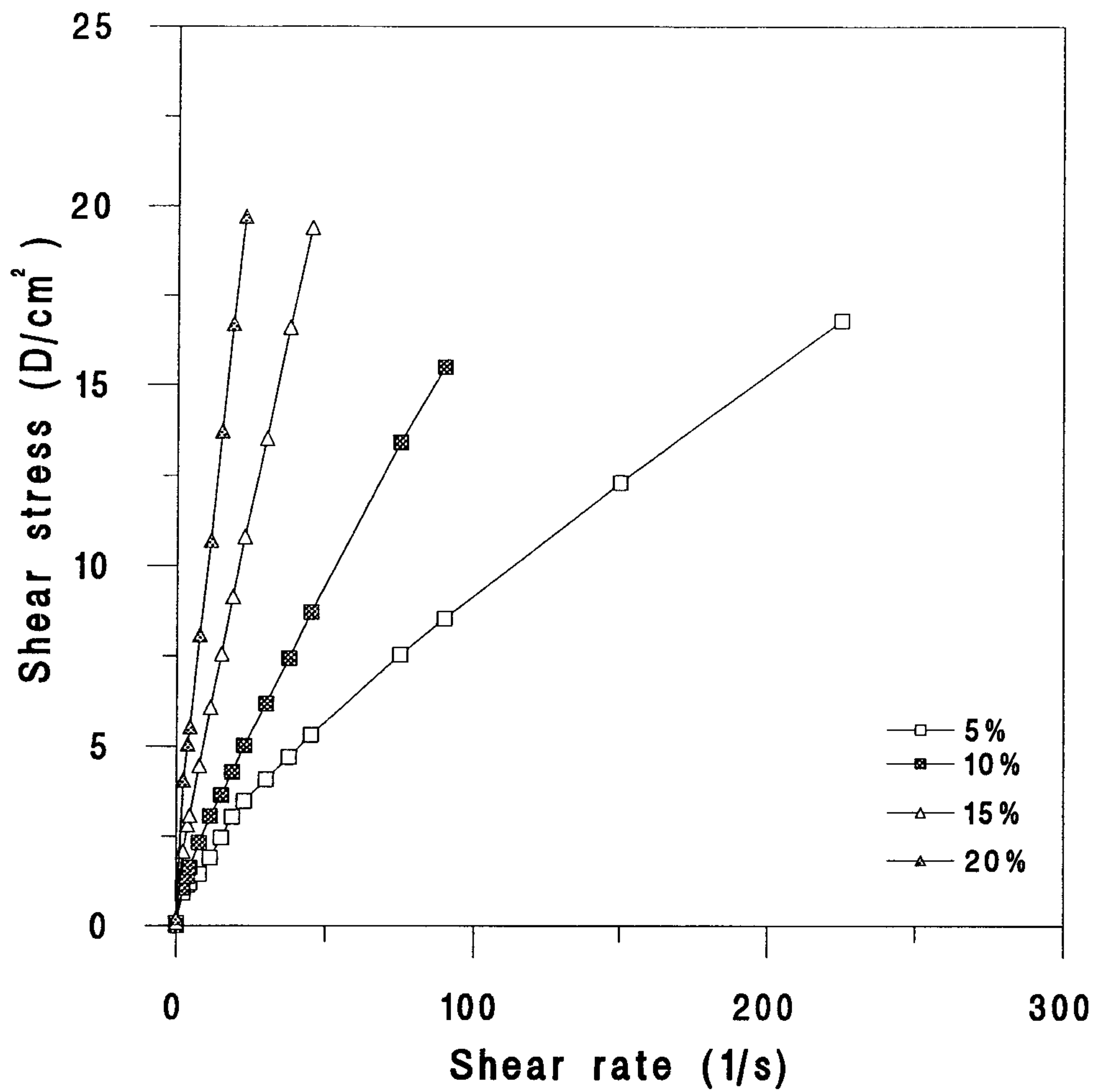


Fig.20. Shear stress-shear rate curves of crude polysaccharide solutions untreated with trichloroacetic acid after extracted by autoclave.

Table 14. Power law constants for crude polysaccharide solutions
extracted by autoclave with various concentration at 20°C

	Conc. (% w/v)	K ^a (Pa. s)	n ^b	r ^c
Treated trichloroacetic acid	5	0.2968	0.6360	0.9961
	10	0.3979	0.7240	0.9978
	15	0.3174	0.9006	0.9994
	20	0.7901	0.8676	0.9989
Untreated trichloroacetic acid	5	0.3960	0.6835	0.9976
	10	0.3688	0.8293	0.9993
	15	0.7937	0.8349	0.9987
	20	1.1886	0.9007	0.9997

^aConsistency index

^bFlow behavior index

^cCorrelation coefficient

내었고, 점조도지수(k)는 두 시료 모두 농도가 증가할수록 증가하는 경향을 보여 시료농도에 의해 영향을 받는 것으로 나타났다. 그리고 상관계수는 전시료에서 모두 0.99이상을 나타내었다.

나. 온도의 영향

조다당류의 온도의존성을 살펴보기 위해 전단속도는 150 1/s에서 온도를 10°C에서 50°C로 증가함에 따른 겔보기 점도를 측정된 결과를 Fig. 20과 21에 각각 나타내었다. 전 시료에서 온도가 증가할수록 겔보기점도는 거의 직선적으로 감소하였다. Arrhenius식을 이용하여 구한 활성화 에너지(Ea) 및 무한 겔보기점도(η_{∞})는 Table 13과 같다. 전단속도 150 1/s에서 두 시료의 활성화에너지는 TCA처리구가 2.2248×10^4 , TCA무처리구가 1.4422×10^4 으로 TCA처리구의 온도의존성이 컸다. 이 같은 낮은 활성화 에너지는 내부결합력, 즉 유동에 따른 저항력이 적은 것을 의미하며, 따라서 유동에 대한 온도의존성이 그다지 크지 않음을 나타내는 것으로 생각된다. 또한 전단속도에 따른 활성화 에너지값은 큰 차이가 없었으나 전반적으로 TCA처리구가 높게 나타났다.

다. 설탕, 소금첨가의 영향

5% 조다당류 용액에 설탕과 소금을 첨가하였을 때의 점도변화는 Fig. 22~25에 나타내었다. 설탕의 경우는 5%, 10%, 20%, 40% 농도로 하였으며 소금은 5%, 10%, 15%, 20%로하여 측정하였는데 이 때 겔보기점도차이는 조다당류에 설탕과 소금자체의 점도를 뺀 값을 나타내었다. 설탕 첨가에 따라 TCA처리구 및 무처리구 모두 점도가 증가하였으며, 전단속도 100 1/s에서의 TCA처리구는 설탕첨가농도에 따른 영향이 비교적 확연하였으나 TCA무처리구의 경우는 크게 구분되지 않았다. 고분자 용액은 농도가 높을 경우 설탕첨가에 따라 수화가 저하되어 점도가 감소하는 반면에, 농도가 낮은 경우는 설탕첨가로 인해 분자간의 상호작용증대로 점도가 증가하였다는 보고(Elfak et al., 1977; 김 등,

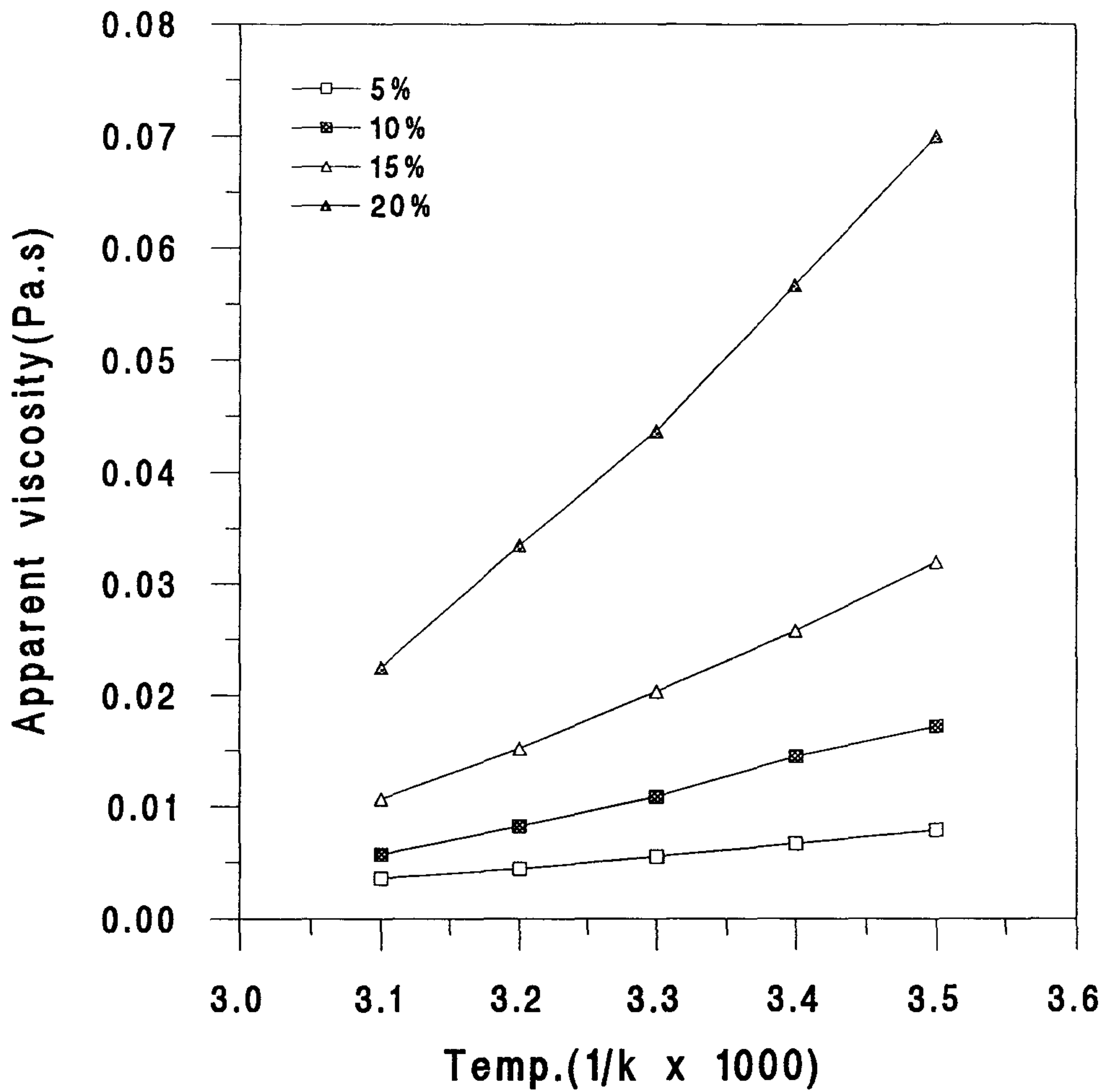


Fig.21. The effect of temperature on the viscosity of crude polysaccharide solutions treated with trichloroacetic acid after extraction by autoclave.

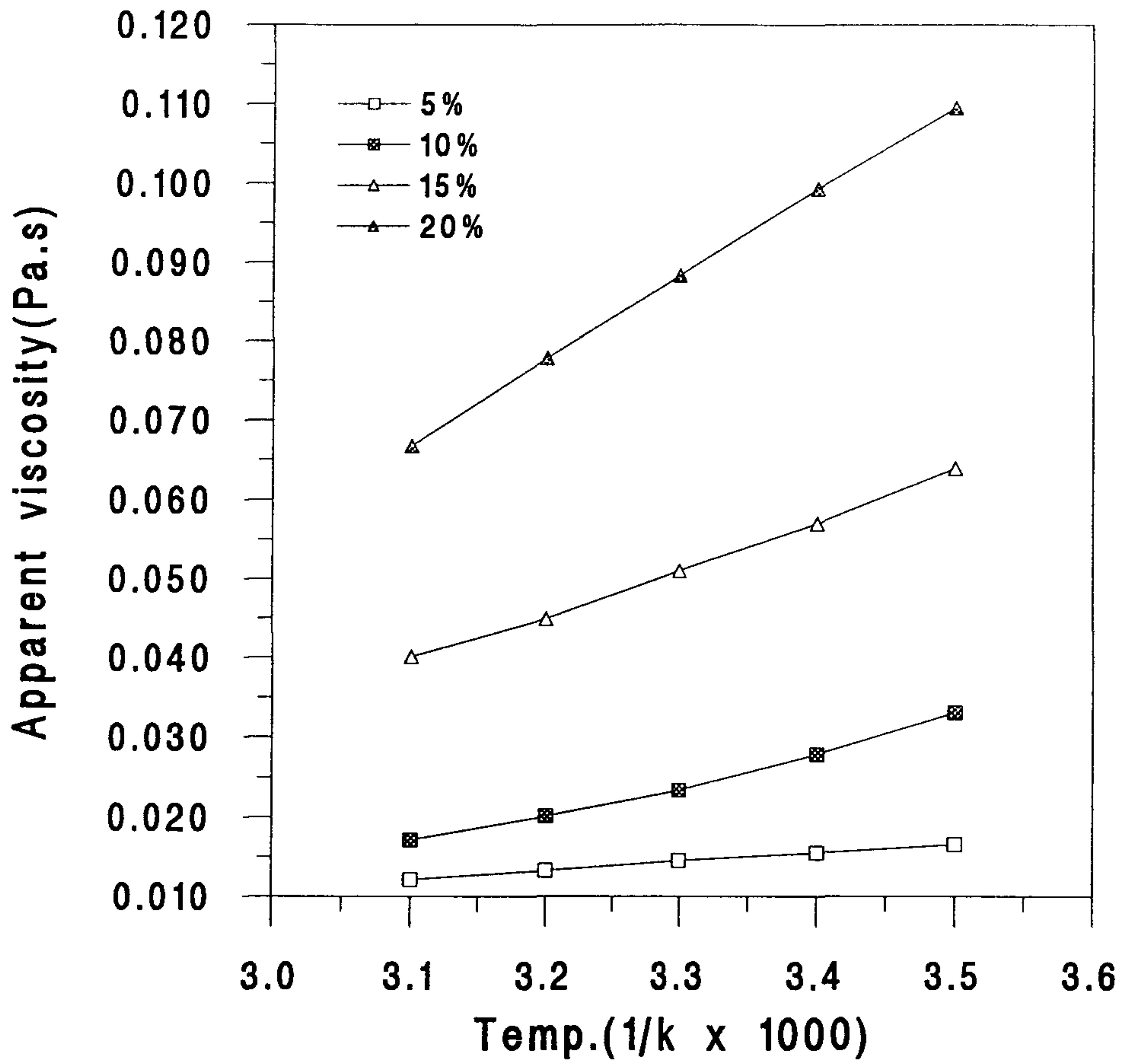


Fig.22. The effect of temperature on the viscosity of crude polysaccharide solutions untreated with trichloroacetic acid after extraction by autoclave.

Table 15. Activation energie, infinity apparant viscosity, and coefficients of determination for crude polysaccharide solutions

	Shear rate (1/s)	Ea ^a (J/Kg.mol × 10 ⁴)	η _∞ ^b	r ^c
Treated with trichloroacetic acid	30	2.0058	0.00364	0.9957
	90	2.1664	0.00416	0.9963
	150	2.2248	0.00106	0.9950
	225	1.6128	0.00939	0.9959
Untreated with trichloroacetic acid	15	0.7475	1.41574	0.9955
	30	1.1195	0.24310	0.9958
	90	1.4422	0.04805	0.9986
	150	1.6002	0.02451	0.9960

^aActivation energy

^bInfinity apparent viscosity

^cCoefficient of determination

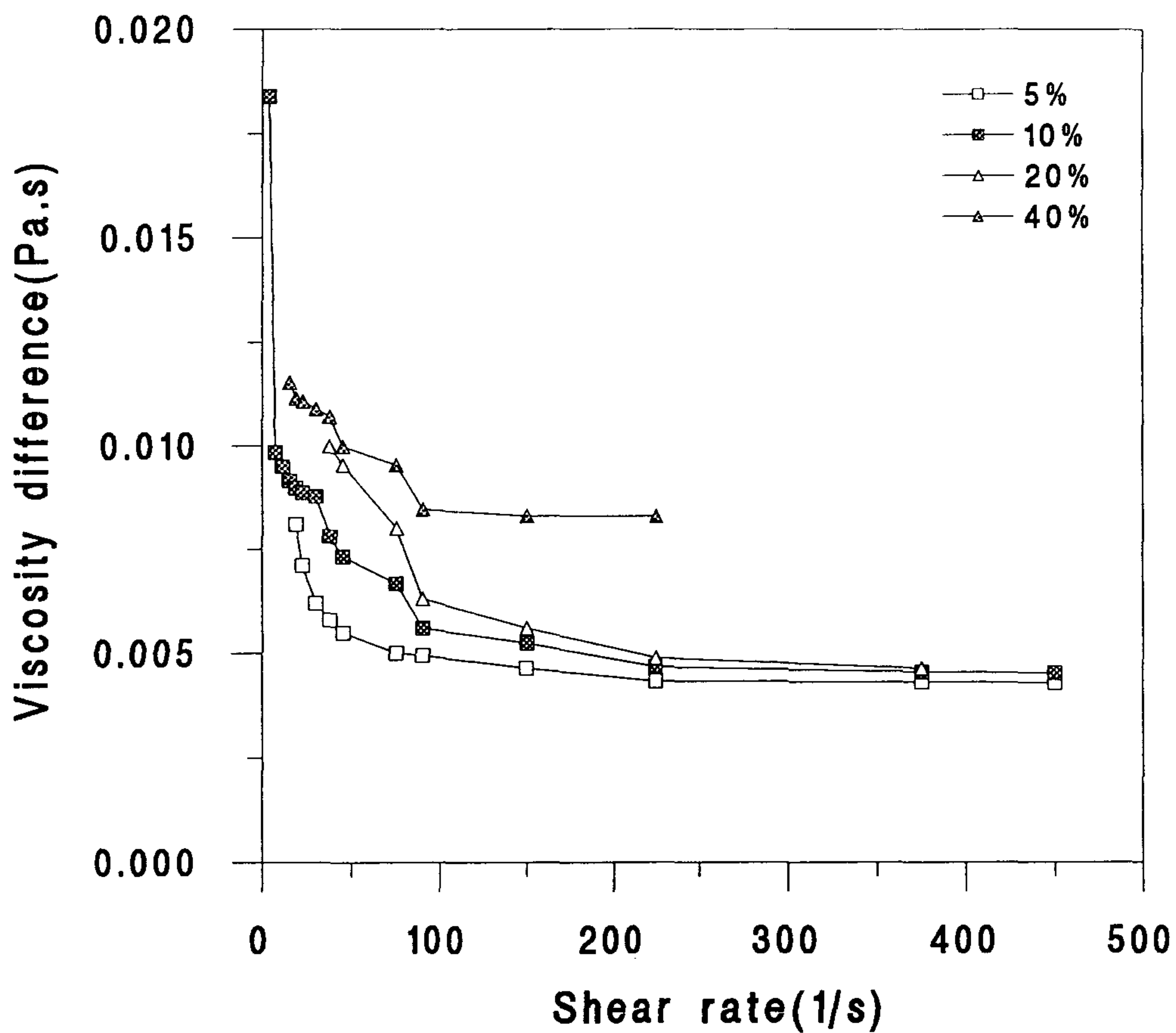


Fig.23. Changes in viscosity of crude polysaccharide solutions with sugar added treated with trichloroacetic acid after extractoin by autoclave.

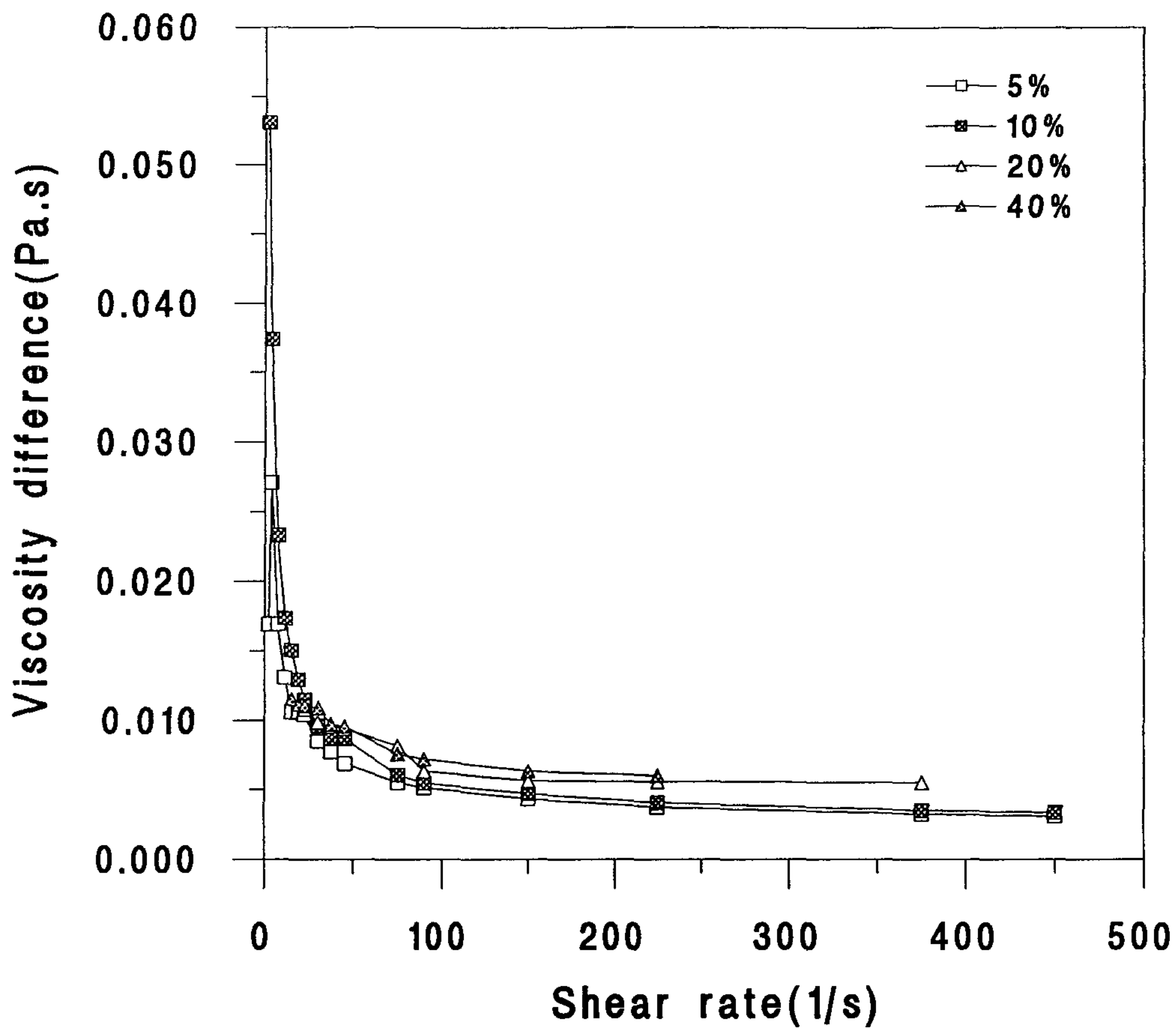


Fig.24. Changes in viscosity of crude polysaccharide solutions with sugar added untreated with trichloroacetic acid after extraction by autoclave.

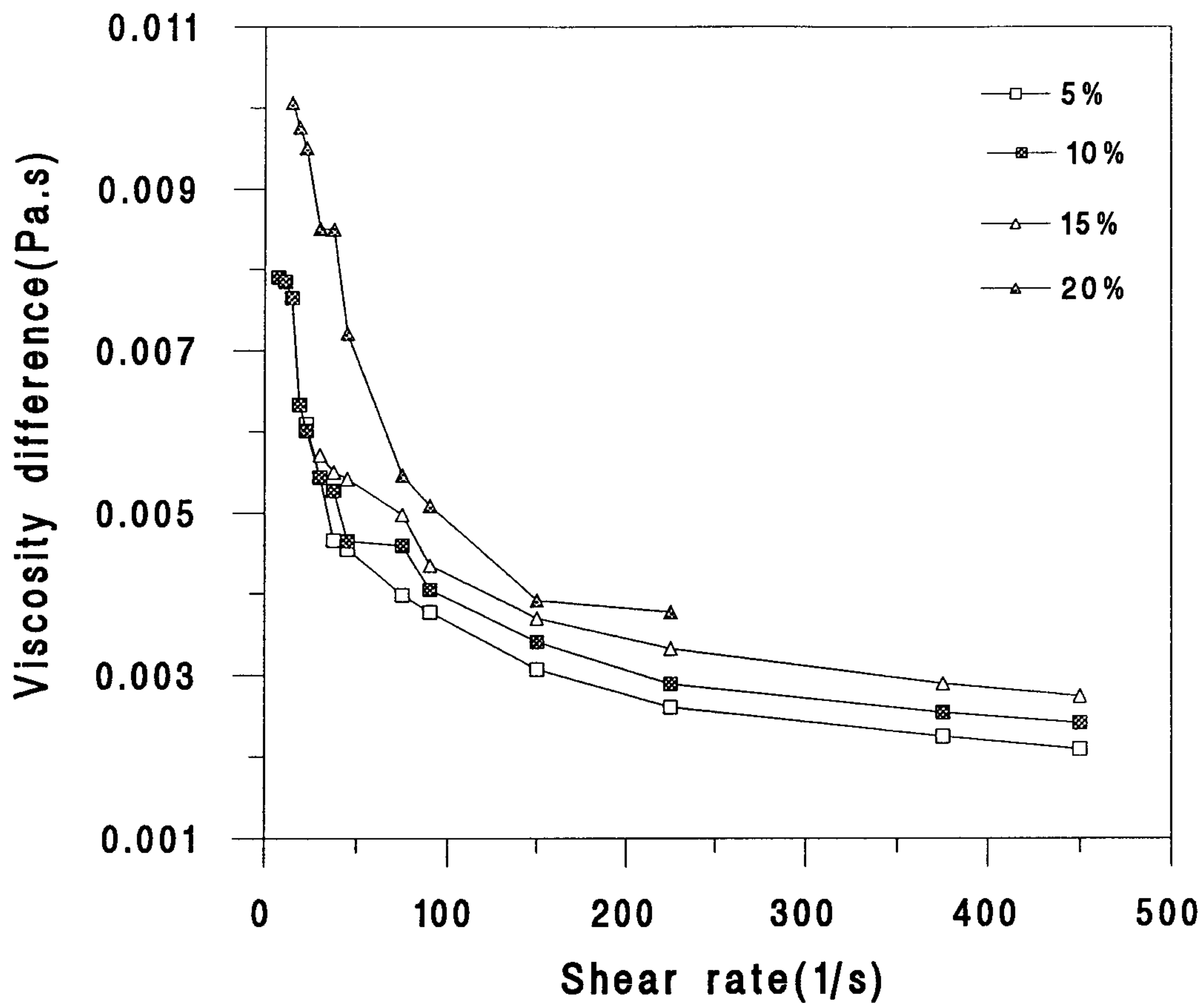


Fig.25. Changes in viscosity difference of crude polysaccharide solutions with NaCl added treated with trichloroacetic acid after extracted by autoclave.

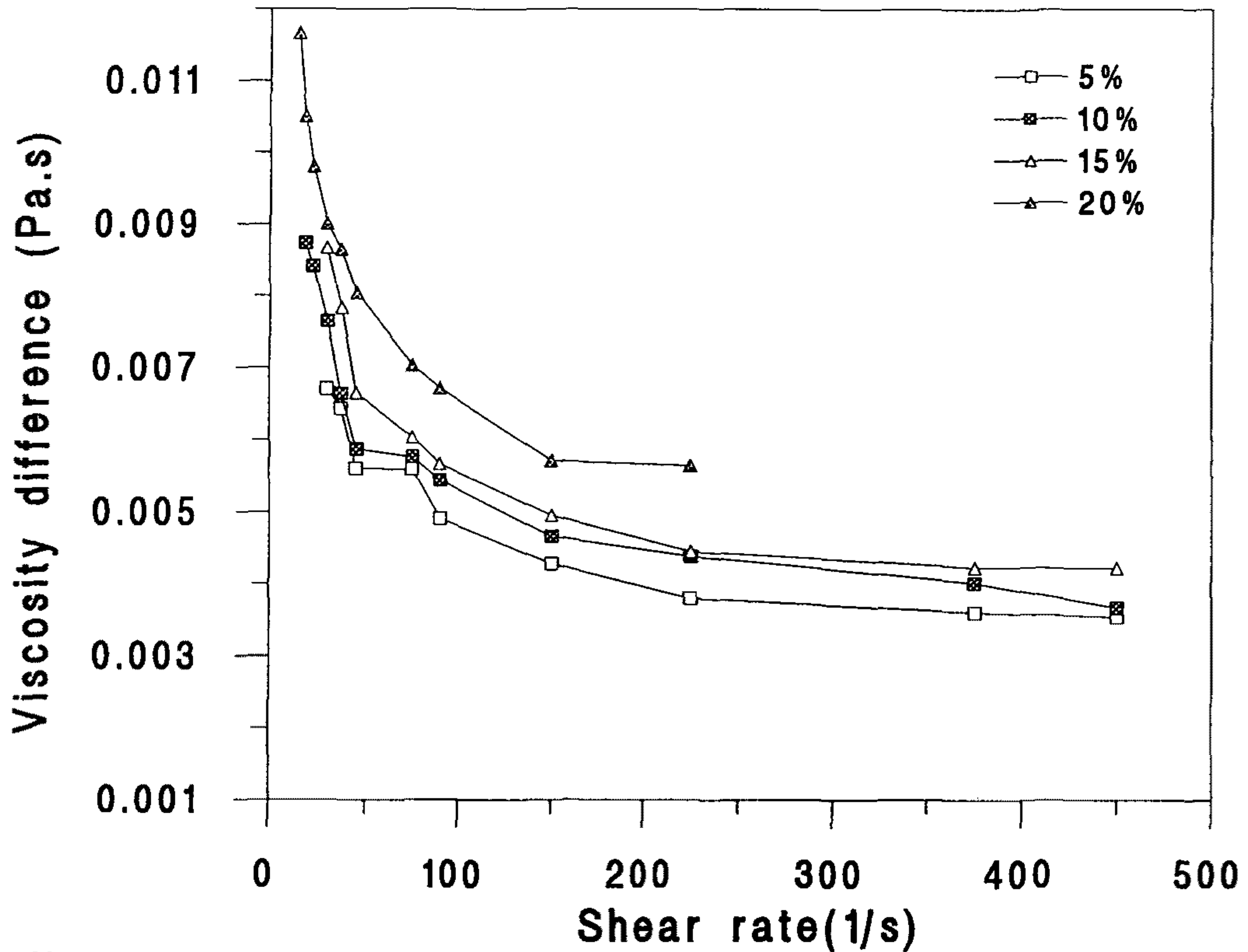


Fig.26. Changes in viscosity difference of crude polysaccharide solutions with NaCl added untreated with trichloroacetic acid after extracted by autoclave.

1992) 등에 미루어 5%의 설탕첨가에도 점도가 증가하는 것은 설탕이 분자간의 상호작용을 증가시킨 결과로 생각된다. 소금첨가에 따른 영향은 전체적으로 TCA처리구나 무처리구 모두 첨가효과가 거의 없었다. 다만 농도에 따른 약간의 변화만을 나타내었다.

제4절 항혈액응고능 및 ACE 저해능

가. 항혈액응고능 및 ACE 저해능

조다당류의 항혈액응고능을 살펴보기 위해 시료들을 일정한 농도 ($100\mu\text{g/ml}$)로 하여 activated partial thromboplastin time(APTT)를 측정 한 결과는 Table 14와 같다. 모든 시료에서 APTT 저지효과가 나타났 으며 특히 Sephadex G-100 획분은 75초로 APTT연장효과가 가장 높 았으며 다음이 neutralse 추출 조다당류였다. APTT는 내인성경로 (intrinsic pathway)의 단독 혹은 복합적 결점이나 이들 인자의 억제물 질이 존재할 때 일어난다고 한다(문, 1996). 해조다당류인 fucoidan의 항혈액응고능은 잘 알려져 있는데 Nishino and Nagumo(1987)는 fucoidan의 항혈액 응고능은 황산기의 mole비가 높을수록 증가한다고 하였는데 본 실험결과와 유사하였다.

항혈액응고능은 황산기함량, 분자량 및 그 구조 등에 따라 많은 차이 를 나타낸다는 보고(Nishino et al., 1989)는 정제도가 높을수록 반드시 항응고능이 증가한다는 것이 아님을 나타낸다. 조다당류의 ACE저해능 을 살펴본 결과는 Table 15와 같다. 모든 시료에서 ACE저해효과가 있 었으나 25%를 넘지는 못하였다.

Table 16. Effect of crude polysaccharide solutions on activated partial thromboplastin time(APTT)

Sample	Clotting time (seconds)
Neutrased ^a	67
Autoclaved ^b	63
Sephadex-100 ^c	75
Sephadex-25 ^d	57

^aCrude polysaccharide extracted by neutrased

^bCrude polysaccharide extracted by autoclave

^cObtained by the DEAE-Cellulose Chromatography

^dObtained by the Sephadex-100 Chromatography

Table 17. ACE inhibition of partially purified polysacchride

Sample	ACE inhibition ratio(%)
Neutrased ^a	12.4
Autoclaved ^b	16.2
Sephadex G-100 ^c	24.6
Sephadex G-25 ^d	17.3

^{a-d}Refer the foot in Table 14.

제5절 사육실험

1. 성장과정

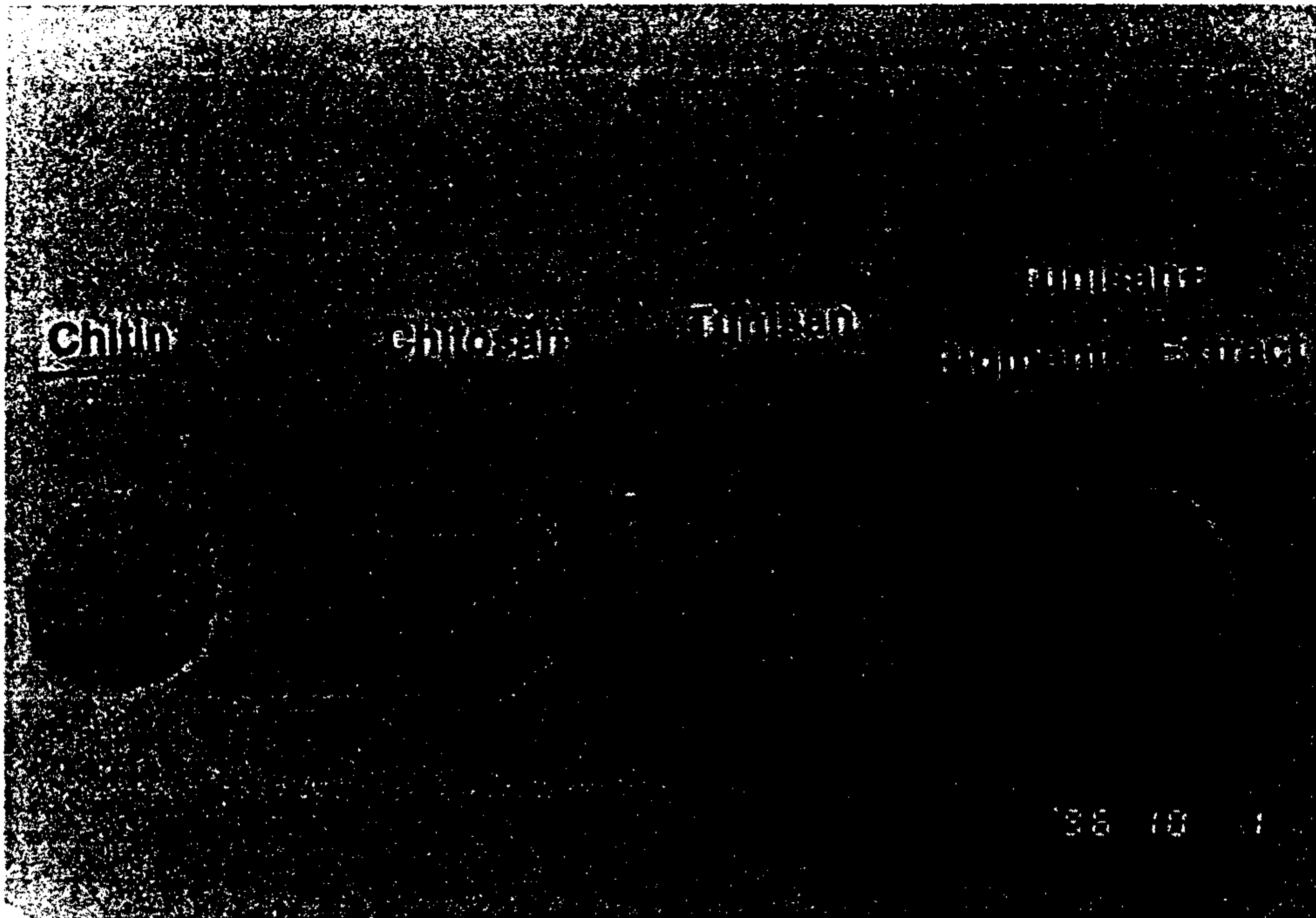
우렁쉥이 껍질로부터 추출한 조다당류는 앞서 언급한 바와같이 색소 흡착능 및 안정성이 양호하였으므로, 추출된 조다당 6g에 1.6g의 우렁쉥이 껍질 추출물을 흡착시킨 색소개선제(Fig. 26)를 섞어 사료를 조제한 후 하루 3회씩 어체중의 1.5%를 급이하였다. 사육기간 중 수온은 17℃ 전후, 용존산소량 8ppm으로 수질상태는 양호하였다. 무지개송어를 15℃에서 6주간 사육하였을 때 육색소 함량과 5℃에서 18주간 사육하였을 때의 색소함량이 비슷하다고 하여 15℃ 전후의 온도에서 사육할 때 성장 및 색소침착이 좋은 것으로 알려져 있다(No and Storebakken, 1991). 그리고 모든 구에서 사료에 대한 급이반응도 양호하였다.

2. 일반성분

평균체중 500g의 무지개송어를 8주간 사육한 후 육 일정량을 채취하여 일반성분을 분석한 결과를 Table 16에, 무기질 함량변화를 Table 17에 각각 나타내었다.

사육 4주 후 수분함량은 대조구(Diet 1)가 약 76%, pink구, 조다당류 I, II구 및 색소추출물구(Diet 2-5)는 77-78%로 거의 차이가 없었다. 조단백질의 함량도 17-19%로 급이구에 따른 변화는 없었으나, 지질의 함량은 색소추출물구(Diet 4), 조다당II구(Diet 4)가 약간 낮아 3.2, 2.9% 였으나, 대조구(Diet 1), pink구(Diet 2), 조다당 I 구(Diet 3)는 3.7-3.9% 였다. 총무기질의 함량은 0.8-1.1%로 차이가 없었다.

사육 8주 후 수분함량은 71-74%로 4주 후보다 감소한 경향인 반면, 조단백질의 함량은 조다당 I 구와 추출물첨가구가 24%로 가장 높았고, 대조구, pink구 및 조다당II구가 각각 22%로 약간 낮았다. 조지질 함량은 대조구가 약간 증가하는 경향이었지만, 색소추출물구가 가장 큰 변



**Fig.27. New pigment vehicle(Tunisan+Pigments extract)
made by ascidian tunic polysaccaride and pigment.**

Table 18. Proximate composition of rainbow trout

Component	(%)									
	4 weeks					8weeks				
	Diet 1*	Diet 2	Diet 3	Diet 4	Diet 5	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4	Diet 5
Moisture	75.9	78.3	77.0	78.2	77.1	72.7	73.8	70.8	73.7	71.4
Crude protein	19.1	17.0	18.3	17.7	19.2	21.6	22.1	24.3	22.1	23.7
Crude lipid	3.9	3.7	3.7	3.2	2.9	4.4	3.0	3.8	3.2	4.0
Crude ash	1.1	1.0	1.0	0.9	0.8	1.3	1.1	1.1	1.0	0.9

* See the footnote of the Table 5.

Table 19. Mineral contents of rainbow trout

Mineral	(mg/kg)									
	4 weeks					8weeks				
	Diet 1*	Diet 2	Diet 3	Diet 4	Diet 5	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4	Diet 5
Ca	195.4	207.1	138.3	163.7	238.1	876.3	321.5	734.4	526.3	452.8
Na	547.2	631.5	822.1	633.9	1064.0	1883.7	944.7	1335.4	1069.5	1693.7
Cu	1.4	1.1	1.9	1.9	1.7	11.6	3.9	6.0	4.9	11.0
Mg	204.7	225.7	194.7	183.2	213.9	401.8	338.5	345.8	298.8	328.3
Mn	0.2	0.5	0.5	0.4	0.5	4.3	1.1	0.8	0.5	0.9
Fe	13.1	17.7	24.5	23.6	22.5	108.1	56.4	45.3	37.8	34.6
Zn	6.3	12.1	7.5	10.3	9.7	55.2	62.6	21.2	16.5	26.4
P	783.6	1695.9	994.7	1444.1	1220.4	3791.6	2493.2	2611.5	2473.7	1957.4
K	3355.6	3344.5	2789.1	2776.3	2198.4	2030.0	2514.2	1828.1	3158.9	2544.2

* See the footnote of the Table 5.

화를 나타내어 3.5%였다. 총무기질의 함량은 변화가 없었다.

무지질은 호르몬 대사, 호흡색소, 뼈 형성 및 금속효소의 구성성분으로 어류 생리에 매우 중요한 역할을 한다. 그러서 이들 무기질을 각 조성별로 살펴 본 결과 P, K 함량이 다른 원소보다 월등히 많았으며, Na, Mg, Ca도 상당량 존재하였다. 일반적으로 Na, K는 세포내·외액의 조절물질로 그 함량이 많고, P는 어종에 따른 변화가 적은 물질로 알려져 있으나 P의 함량이 높았다. Ca와 P는 뼈를 구성하는 성분으로 매우 밀접한 관계가 있다. 연어류 사육시 P의 요구량은 0.7-0.8%로 다른 원소보다 크며, 식이에 따라 영향을 받지 않는다. 따라서 P의 요구량은 충분하였고 사육일수의 증가에 따라 증가하는 경향이였다. Zn은 금속효소(metalloenzyme)의 구성성분으로 대사에 관여한다. 무지개송어는 식이에 15-30mg/kg을 요구하나 사육초기에는 그 함량이 부족하였으나 8주 후 Zn의 함량은 충분한 것으로 나타났다. Cu는 미량(1mg/kg 이하)이라도 무지개송어 성장에는 영향을 미치지 않는 반면, Mg는 12-13mg/kg 이상을 요구하므로 충분한 양이 공급되었다고 생각된다 (Cho et al., 1985)

3. 색소함량의 변화

우렁쉥이 껍질 분말로부터 추출한 조다당, 색소추출물 및 carophyll pink 등을 첨가한 실험구의 색소함량의 변화를 Table 18, 19에 각각 나타내었다.

실험전 예비사육된 무지개송어의 육 및 껍질 중의 색소함량은 각각 0.0157, 0.2073mg/100g였다. 무지개송어 육 색소함량의 변화를 살펴보면 4주 후 대조구가 0.0652mg/100g, pink구와 색소추출물구는 각각 0.1156, 0.1263mg/100g으로 조다당류 첨가구보다 약간 높은 함량을 나타내었다. 사육 8주 후 대조구는 0.0896mg/100g였으나, 색소추출물구는 0.2841mg/100g으로 색소축적이 가장 양호하였다. Pink구와 조다당 첨가구는 각각 0.2840, 0.2224 및 0.2137mg/100g으로 거의 유사한 값을 나타내어 복

Table 20. Carotenoid concentration in flesh and skin of rainbow trout¹
(mg/100g tissue)

	4 weeks		8 weeks	
	Flesh	Skin	Flesh	Skin
Diet 1 ²	0.0652	0.2363	0.0896	0.2542
Diet 2	0.1156	0.4957	0.2480	0.8816
Diet 3	0.0916	0.4529	0.2224	0.8625
Diet 4	0.0884	0.4825	0.2137	0.8437
Diet 5	0.1263	0.5734	0.2841	0.9023

¹ Total amount of carotenoids in the initial sample(0 week) of flesh and skin was 0.0517, 0.2073mg/100g tissue respectively.

² See the footnote of the Table 5.

Table 21. Astaxanthin composition(%) in flesh and skin of rainbow trout
(%)

	4 weeks				8 weeks			
	Free ¹	Mon.	Di.	U.K.	Free	Mono.	Di.	U.K.
Flesh								
Diet 1 ²	16.05	9.69	60.22	14.04	16.39	6.78	64.64	12.18
Diet 2	18.02	6.97	72.48	2.54	6.90	7.34	84.70	1.06
Diet 3	12.75	9.15	73.28	4.82	7.81	8.49	81.08	2.62
Diet 4	12.58	9.58	75.11	2.73	6.53	7.29	82.71	3.47
Diet 5	13.39	8.91	70.32	2.37	6.23	6.22	84.01	3.54
Skin								
Diet 1	4.96	6.25	76.84	11.95	3.10	6.65	70.78	19.47
Diet 2	7.46	8.73	81.31	2.48	2.42	12.54	83.81	1.23
Diet 3	9.41	7.08	79.80	3.71	3.52	10.94	79.22	6.32
Diet 4	6.25	6.12	82.74	4.89	5.76	9.97	79.09	5.18
Diet 5	9.92	5.50	81.58	3.00	7.94	7.12	79.98	4.96

¹ Free, astaxanthin free; mono., astaxanthin monoester; di., astaxanthin diester; U.K., unknown.

² See the footnote of the Table 5.

합다당에 의한 색소침착은 정상적으로 이루어졌던 것으로 생각되어 진다.

무지개송어 껍질 중 색소함량 변화는 4주 후 대조구가 0.2363mg/100g, 추출물 첨가구는 0.5734mg/100g으로 pink구나 조다당 첨가구보다는 약간 높았다. 8주 후 대조구는 거의 변화가 없었지만 추출물 첨가구가 가장 높아 0.9023mg/100g 이었으며, pink구가 0.8816mg/100g, 조다당 첨가구가 각각 0.8625, 0.8437mg/100g으로 껍질에서도 색소침착이 원할했던 것으로 나타났다.

양식산 무지개송어 육중의 색소함량은 크기에 따라 크게 영향을 받아 0.1-0.5kg의 송어는 6-7mg/kg을 축적할 수 있으며, 더 큰 송어는 25mg/kg까지 축적할 수 있다고 하였다(Storebakken and No, 1992). 그리고 상품가치를 갖기 위해서는 3-4mg/kg을 나타내어야 한다.

무지개송어 육 및 껍질 중 astaxanthin의 축적형태는 astaxanthin diester가 가장 많고, monoester, free 순이었다. 그러나 4주 후 육중의 형태는 diester>free>monoester 순이었다. 육중 비의 변화는 대조구를 제외하고는 diester가 70-75%로 가장 높고, free가 13-18%, monoester가 7-9%였다. 그러나 껍질은 diester가 77-83%, monoester가 6-9%, free가 5-10%로 나타났다. 대조구에서 미동정 물질이 14.04%로 나타나 급이원에 따라 체내대사가 달라지는 것으로 생각된다. Kang et al.(1995)은 우렁쉥이 껍질로부터 정제한 적색 carotenoprotein으로부터 astaxanthin diester와 monoester를 분리하였으며, 이들이 각각 55%, 45% 비로 구성되어 있다고 하여 이와 관련이 있는 것으로 여겨진다.

성적으로 미성숙한 무지개송어는 astaxanthin과 canthaxanthin을 변형시키지 않은 free형으로 육속에 저장하며(Foss et al., 1984), 노랑색의 xanthophyll이 송어 육속에 존재하는 것은 먹이에 존재하는 astaxanthin diester가 대사되어 생성된 것이라 하였다(Schiedt et al., 1986). 그러나 Katayama et al.(1987)은 astaxanthin diester를 급이하더라도 무지개송어 육중에서는 환원적 대사가 일어나지 않는다고 하였다.

이와같이 사육초기에는 육색침착이 이루어지고 있는 단계이기 때문에 free astaxanthin의 비가 높은 것으로 생각된다. 8주 후에는 이 비가 바뀌어서 pink구가 84.70%, 색소추출물구가 84.01%, 복합다당 첨가구는 81.08, 82.71%로 나타났다. 껍질중 함량비도 대조구의 70.78%를 제외하고는 색소추출물 및 복합다당 첨가구는 79-80%로 비슷하였으며, pink구가 83.81%로 나타났다. 그리고 8주 후 껍질의 색소축척 형태는 diester>monoester>free이었다. Choubert and Heinrich(1993) 등이 alga(*Haematococcus pluvialis*)를 이용하여 무지개송어 육색개선을 시도한 결과 free형이 ester형보다 육색침착에 효과적일 것이라 하였으나, Simpson and Kamata(1979), Ando and Hatano(1987) 등은 astaxanthin ester형이 더 효과적이라 하여 실험어 크기, 실험조건 등에 따라 차이가 나는 것으로 여겨진다.

한편, 합성색소혼합물(asataxanthin+canthaxanthin)을 송어 육색 개선을 위해 투여하였을 때 astaxanthin 단독 투여구보다 육색침착이 우수하다고 하여 색소상호간의 상승효과를 주장하였다(Torrissen, 1989). 따라서 우렁쟁이 껍질 추출물 첨가구의 색소함량이 높은 것은 우렁쟁이 껍질속에 함유된 여러종류의 색소에 의해 상승효과가 나타난 것으로 생각된다.

4. 지질함량의 변화

가. 총지질(Total lipid, TL)

사육된 무지개송어 육 및 간에서 추출한 TL을 구성하는 중성(Neutral lipid, NL) 및 인지질(Phospholipid, PL) 함량은 Table 20과 같다.

사육 4주 후 육 중 TL 함량은 대조구가 3.88g으로 가장 많았으며, 색소추출물구가 2.86g으로 가장 적었다. 간 중 TL 함량은 색소추출물구가 4.49g으로 가장 많았고, 조다당Ⅱ구가 2.70g으로 가장 적었다. 색소추출물구를 제외하고는 육지질 함량이 간지질 함량보다 높게 나타났다.

Table 22. Lipid contents of TL, NL and PL of rainbow trout
(mg/100g tissue)

	4 weeks		8 weeks	
	Flesh	Liver	Flesh	Liver
	TL ¹			
Diet 1 ²	3.88	3.22	4.36	4.52
Diet 2	3.70	2.97	3.04	3.47
Diet 3	3.72	3.13	3.81	3.17
Diet 4	3.22	2.70	3.19	3.32
Diet 5	2.86	4.49	3.96	4.01
	NL			
Diet 1	3.16	1.51	3.84	2.82
Diet 2	2.95	1.86	2.43	1.78
Diet 3	2.99	2.09	3.14	1.16
Diet 4	2.58	1.19	2.49	0.94
Diet 5	2.26	3.05	3.21	2.03
	PL			
Diet 1	0.72	1.71	0.52	1.70
Diet 2	0.75	1.11	0.61	1.69
Diet 3	0.73	1.04	0.67	2.01
Diet 4	0.64	1.51	0.70	2.38
Diet 5	0.60	1.44	0.75	1.98

¹ TL, total lipid; NL, neutral lipid; PL, phospholipid.

² See the footnote of the Table 5.

사육 8주 후 육 중 TL 함량은 색소추출물구가 가장 많이 증가하여 3.96g이었고, 대조구가 4.36g, 조다당 I, II구가 각각 3.81g, 3.19g, pink구가 3.04g으로 가장 적었다. 간 중 TL 함량은 대조구가 4.52g, 색소추출물구가 4.01g, pink구가 3.47g, 조다당 I, II구 각각 3.17g, 3.32g이었다. 따라서 색소침착과 지질함량 사이의 관계에 대한 논의가 이루어지고 있지만, 사육초기 지질의 육 중 축적량은 색소축적량과는 달리 대조구가 높았으나 간에서는 색소추출물구가 색소 및 지질의 함량도 높게 나타나 색소함량과 지질함량과는 상관성이 있는 것으로 여겨진다.

시험구의 NL 함량비는 사육 4주 후 육 중 TL의 80%였으며, 간에서의 비는 대조구가 47%, 조다당 I 구 및 색소추출물은 각각 63%, 67%, 68%로 나타났다. 사육 8주 후는 육 중 TL의 78-88%였으며, 간 TL에서는 대조구가 62%로 가장 높고, 조다당 첨가구는 각각 37%, 28%로 가장 낮았다. 그리고 pink구와 색소추출물 첨가구는 각각 51%로 나타났다.

PL의 함량을 측정한 결과 사육 4주 후 육 중에서는 각 구별로 0.60-0.75g으로 TL의 19-21%이었으며, 간에서는 대조구가 1.71g으로 가장 많았고, 조다당 I 구는 1.04g으로 가장 적었다. 8주 후 육 중 PL 함량은 대조구가 0.52g으로 TL의 12%에 불과하였다. 그리고 간의 PL 함량도 가장 낮아 38% 였다. 따라서 사육기간에 관계없이 육 중 TL에 대한 NL 및 PL의 비는 각각 80%, 20%에 이르러 색소함량의 증가와 상관성이 있는 것으로 나타났다.

간은 카로테노이드 색소의 대사 및 배설기관이므로 대부분의 색소는 간에서 흡수된다(Hardy et al., 1990). 또한, 간은 vitamin A를 저장하는 기관이기도 하다. 그러나 무지개송어의 간에서 카로테노이드가 환원되는지 혹은 vitamin A로 전환되는지는 아직 밝혀지 있지 않으나(Guillou et al., 1989), 지질성분의 대사와 밀접한 관계가 있으므로 이 부분에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것이다.

나. 지질조성

무지개송어의 부위별 지질class의 조성을 TLC-Scanner에 의하여 분석한 결과는 Table 21과 22에 나타난 바와 같다.

(1) 육의 지질class

극성지질의 경우 4주후의 조성을 보면 대조구가 15.07%로서 가장 높았고 조다당 I 과 II구에서는 10.93과 10.83으로 조다당의 첨가시 극성지질의 함량이 약간 감소하였으나, 8주후에는 대조구와 같은 수준으로 되어 차이가 거의 없었다. 근육내의 극성지질 조성변화를 좀더 세분해 보면 Table 22에 나타난 바와 같이 PC와 PE가 인지질로서 극성지질의 주요 구성성분이었고, 각조성간에 변화는 전실험구간에 걸쳐서 특이 사항은 없었다.

육에 있어서 비극성지질의 경우 비극성지질의 종류는 TG와 S(스테롤)였으나 대부분이 TG였고 스테롤은 10% 이하의 적은 양이었다. 각 비극성지질의 구성성분 중 TG는 4주후에 대조구에 비해서 조다당 I 과 II구에서는 약간 높게 나타났으나, 8주후에는 대조구와 비슷하게 되어 전 실험구간에 차이는 없었다. 스테롤의 경우에는 4주후에는 TG와 반대의 경향이 있었으나 8주후에는 거의 비슷한 수준으로 되어 전실험구간에 뚜렷한 차이를 발견할 수가 없었다.

(2) 간의 지질class

극성지질의 경우 4주후의 조성을 보면 대조구가 28.67%로서 가장 높았고 pink구와 색소추출물구에서는 16.13과 17.19%으로 색소만을 첨가했을 때는 극성지질의 함량이 약간 감소하였으나, 8주후에는 대조구가 낮은 수준으로 되어 색소나 조다당의 첨가가 간의 극성지질의 증가를 나타내었다. 이 점에 대해서는 좀더 상세한 연구가 필요하다고 생각되며, 간 중의 극성지질 조성변화를 좀더 세분해 보면 Table 22에 나타난 바와 같이 LPC, SPM, PC, LPE, PE 및 PE로서 근육지질에 비해서는 아주 복잡한 극성지질의 구성을 나타냈다. 이들 중에서는 PC와 PE

Table 23. Lipid classes in flesh and liver neutral lipid of rainbow trout*

(%)

Lipid class	4 weeks					8weeks				
	Diet 1*	Diet 2	Diet 3	Diet 4	Diet 5	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4	Diet 5
Flesh										
PL	15.07	12.42	10.93	10.83	12.19	12.01	12.83	12.12	11.70	13.70
S	10.04	8.27	7.29	7.21	8.12	5.17	5.54	5.21	7.79	5.88
TG	73.76	78.27	80.68	80.87	78.55	81.70	80.48	81.51	79.43	79.32
Liver										
PL	28.67	16.13	21.82	26.91	17.19	13.19	23.49	22.69	10.33	21.49
S	11.52	9.93	9.55	12.59	8.30	9.54	10.81	10.10	8.49	9.53
FA	3.93	2.55	2.59	3.74	2.95	3.80	3.54	4.31	2.00	3.48
TG	40.81	48.92	44.83	35.87	49.10	55.29	43.63	44.19	60.17	43.28
SE	15.07	22.47	21.21	20.89	22.46	18.17	18.53	18.72	19.00	22.21

* PL, polar lipid; S, sterol; FA, fatty acid; TG, triglyceride; SE, sterolester.

Table 24. Lipid classes in flesh and liver polar lipid of rainbow trout*

(%)

Lipid class	4 weeks					8weeks				
	Diet 1*	Diet 2	Diet 3	Diet 4	Diet 5	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4	Diet 5
Flesh										
PC	67.38	73.52	72.02	67.91	69.13	60.66	69.12	65.15	70.14	64.49
PE	32.62	26.48	27.98	32.09	30.87	39.34	30.88	34.85	29.86	35.51
Liver										
LPC	2.42	3.24	2.13	4.12	3.76	1.80	2.36	1.58	2.42	1.88
SPM	5.00	4.96	4.82	5.18	4.28	4.26	4.33	4.17	4.76	5.05
PC	49.49	51.72	48.74	52.23	48.73	44.82	47.41	47.97	46.82	49.51
LPE	7.75	8.73	7.31	10.00	8.61	10.62	8.11	9.33	8.14	8.81
PE	24.62	20.30	26.07	18.45	24.91	27.01	26.94	25.31	26.21	25.06
PA	10.72	11.05	10.94	10.02	9.71	11.50	10.86	11.63	11.64	9.69

* PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; LPC, lysophosphatidylcholine; SPM, sphingomyeline, LPE, lysophosphatidylethanolamine; PA, phosphatic acid.

가 대부분을 차지하였고 PA가 그 다음 순였다. 각 조성간에 변화는 전 실험구 간에 걸쳐서 비극성지질의 경우와 같이 특이 사항은 없었다.

간에 있어서 비극성지질의 경우 종류는 TG, S(스테롤), FA, SE등으로 근육의 조성과는 달리 복잡한 조성을 나타내었다. 구성성분으로서는 대부분이 TG였고 다음이 SE, 스테롤, FA 순이었다. 각 비극성지질의 구성성분 중 TG가 4주후에 전실험구에 비해서 조다당Ⅱ구만이 약간 낮게 나타났으나, 8주후에는 다른 실험 구보다는 약간 높게 나타나는 경향을 나타내었다. SE의 경우에는 4주후에는 대조구만이 전실험구에 비하여 현저히 낮았으나, 8주후에는 거의 동일한 수준으로 되었으며, 그 외의 다른 구성성분에 있어서도 전실험구간에 뚜렷한 차이를 발견할 수가 없었다.

다. 지방산조성

무지개송어 부위별 총지질의 지방산조성을 capillary column으로 분석한 결과를 Table 12-15에 나타내었다.

4주 후 근육지질의 지방산조성 변화를 살펴보면 각구의 주된 지방산의 종류는 16:0, 18:1n-9, 22:6n-3, 18:2n-6, 16:1n-7 등이었다. 대조구의 포화산:monoene 산:고도불포화산의 비가 27:38:34이었고, pink구는 28:37:35로 비슷하였다. 색소가 첨가된 구(Diet 3, 4, 5)의 비도 28-29:39-41:30-33으로 서로 유사하여 성장초기에 근육지방산의 조성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

간지질의 지방산조성 변화를 살펴보면, pink구와 색소추출물구의 포화산:monoene 산:고도불포화산의 비가 29:52:19로 매우 비슷하였고, 대조구와 복합다당 첨가구의 비는 28-29:41-46:26-30으로 비슷하게 나타나 복합다당의 첨가에 의한 간지질 조성의 변화에 다소의 영향이 있는 것으로 나타났다.

Castell et al.(1972a, b)에 의하면 무지개송어 필수지방산은 18:2n-3로 18:3n-6보다 성장효과가 뛰어나다고 하였고, Watanabe(1982)도 사료

Table 25. Fatty acid compositions of total lipids from rainbow trout flesh after feeding for 4 weeks¹ (%)

Fatty acid	Control	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4
14:0	2.37±0.23	2.29±0.16	2.39±0.12	2.42±0.14	2.47±0.10
15:0	0.15±0.02	0.14±0.00	0.12±0.00	0.13±0.00	0.12±0.01
16:0 iso	0.20±0.06	0.29±0.07	0.17±0.03	0.18±0.03	0.17±0.02
16:0	19.45±0.26	20.51±0.90	21.09±0.30	21.15±0.38	22.11±0.20
16:1n-7	7.08±0.70	7.40±0.20	8.48±0.35	8.71±0.24	9.54±0.21
7Me16:0	0.14±0.01	0.15±0.01	tr	0.13±0.04	tr
16:1n-5	0.11±0.02	tr ²	tr	tr	tr
16:2n-4	0.23±0.02	0.21±0.02	0.21±0.08	0.41±0.03	0.19±0.10
17:0	0.12±0.01	0.10±0.01	tr	0.10±0.01	tr
16:3n-4	0.13±0.01	0.12±0.02	tr	0.11±0.01	tr
16:4n-1	0.10±0.01	0.10±0.03	tr	0.13±0.02	tr
18:0	4.04±0.08	3.99±0.16	3.94±0.22	3.70±0.16	3.76±0.02
18:1n-9	20.89±1.74	20.45±0.87	22.58±1.14	20.79±0.49	21.74±0.34
18:1n-7	3.73±0.02	3.59±0.31	3.71±0.07	4.02±0.70	3.81±0.12
18:1n-5	0.24±0.06	0.26±0.08	0.24±0.04	0.16±0.12	0.27±0.02
18:2n-6	9.83±1.08	9.61±0.41	9.32±0.31	10.50±0.44	10.10±0.22
18:2n-4	0.23±0.01	0.19±0.05	0.19±0.05	0.14±0.01	0.25±0.12
18:3n-6	0.17±0.04	0.12±0.02	0.15±0.08	0.12±0.01	0.21±0.04
18:3n-4	0.22±0.01	0.22±0.01	0.21±0.05	0.19±0.02	0.20±0.04
18:3n-3	0.75±0.06	0.78±0.03	0.68±0.02	0.75±0.02	0.73±0.04
18:4n-3	0.60±0.46	0.30±0.01	0.26±0.01	0.29±0.04	0.33±0.07
18:4n-1	0.23±0.04	0.23±0.01	0.19±0.03	0.19±0.02	0.17±0.02
20:0	0.11±0.02	0.21±0.11	tr	tr	tr
20:1n-11	2.17±0.13	2.01±0.38	1.88±0.30	1.93±0.18	1.84±0.10
20:1n-9	1.78±0.03	1.62±0.16	1.79±0.14	1.67±0.29	1.57±0.08
20:1n-7	0.35±0.21	0.21±0.04	0.22±0.03	0.14±0.06	0.24±0.08
20:2 NMID ³	0.21±0.05	0.16±0.01	0.17±0.01	0.16±0.04	0.18±0.05
20:2n-6	0.55±0.03	0.54±0.03	0.59±0.04	0.55±0.07	0.53±0.04
20:3n-6	0.30±0.01	0.26±0.01	0.21±0.01	0.26±0.05	0.24±0.05
20:4n-6	0.63±0.09	0.66±0.06	0.54±0.03	0.55±0.04	0.54±0.03
20:4n-3	0.32±0.03	0.31±0.01	0.26±0.01	0.26±0.03	0.23±0.01
20:5n-3	3.67±0.34	3.83±0.25	3.22±0.07	3.15±0.10	3.07±0.08
22:1n-9	1.58±0.06	1.29±0.18	1.42±0.10	1.56±0.18	1.48±0.17
22:1n-7	0.36±0.02	0.31±0.02	0.33±0.04	0.33±0.04	0.35±0.04
21:5n-3	0.39±0.11	0.63±0.25	0.56±0.23	0.66±0.23	0.46±0.06
22:3n-6	0.25±0.01	0.26±0.02	0.27±0.05	0.25±0.01	0.21±0.01
22:4n-6	0.10±0.01	0.17±0.07	0.20±0.05	0.22±0.06	0.19±0.04
22:5n-6	0.16±0.02	0.18±0.02	0.13±0.00	0.15±0.03	0.13±0.01
22:5n-3	1.21±0.11	1.22±0.03	1.19±0.03	1.11±0.10	0.97±0.04
22:6n-3	14.23±2.02	14.89±1.73	12.59±1.02	12.51±1.59	10.85±0.15
Total sat. ⁴	26.79	27.84	28.14	28.05	29.07
Total mono.	38.29	37.22	40.65	39.31	40.84
Total poly.	34.30	34.83	31.12	32.50	29.74
Total n-3	21.17	21.96	18.76	18.73	16.64
Total n-6	11.99	11.80	11.41	12.60	12.15

¹ The data are presented as the mean±standard deviation of 4(2 groups×2) determinations. ² Tr<0.1. ³ NMID, nonmethylene-interrupted diene.

⁴ Sat., saturated fatty acids; mono., monoenoic fatty acids; poly., polyenoic fatty acids.

Table 26. Fatty acid compositions of total lipids from rainbow trout liver after feeding for 4 weeks¹

Fatty acid	Control	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4
14:0	1.14 ± 0.05	1.24 ± 0.05	1.40 ± 0.12	1.24 ± 0.01	1.32 ± 0.06
16:0	20.64 ± 0.18	21.45 ± 0.53	20.78 ± 0.46	21.99 ± 0.15	21.97 ± 0.35
16:1n-7	6.69 ± 0.23	10.37 ± 0.22	9.63 ± 0.37	6.47 ± 0.33	11.33 ± 0.48
17:0	tr ²	0.10 ± 0.02	0.15 ± 0.06	0.11 ± 0.02	tr
18:0	6.02 ± 0.09	5.69 ± 0.05	5.12 ± 0.02	5.50 ± 0.06	4.93 ± 0.07
18:1n-9	27.17 ± 0.15	33.29 ± 0.10	27.68 ± 0.18	28.82 ± 0.19	31.50 ± 0.22
18:1n-7	3.49 ± 0.02	4.54 ± 0.01	4.14 ± 0.03	4.95 ± 0.11	6.45 ± 0.04
18:1n-5	0.24 ± 0.00	0.13 ± 0.09	0.26 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.18 ± 0.05
18:2Δ5,11	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.05	0.17 ± 0.01	0.18 ± 0.04	0.22 ± 0.11
18:2n-7	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.03	0.16 ± 0.01	0.22 ± 0.05	0.22 ± 0.08
18:2n-6	3.04 ± 0.04	2.83 ± 0.04	3.19 ± 0.06	3.27 ± 0.17	2.33 ± 0.14
18:2n-4	0.22 ± 0.01	0.11 ± 0.04	0.12 ± 0.06	0.10 ± 0.01	tr
18:3n-6	0.13 ± 0.06	tr	tr	tr	tr
18:3n-4	0.12 ± 0.01	tr	0.10 ± 0.02	tr	tr
18:3n-3	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.01	tr
20:0	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.00	0.12 ± 0.05	tr	0.10 ± 0.01
20:1n-9	3.34 ± 0.10	2.73 ± 0.08	3.16 ± 0.20	2.38 ± 0.04	2.31 ± 0.00
20:1n-7	0.28 ± 0.03	0.19 ± 0.00	0.29 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.17 ± 0.02
20:2 NMID ³	0.46 ± 0.02	0.50 ± 0.16	0.37 ± 0.01	0.45 ± 0.04	0.35 ± 0.02
20:2n-6	0.90 ± 0.02	0.59 ± 0.02	0.88 ± 0.05	0.73 ± 0.04	0.47 ± 0.03
20:3 NMT ³	0.16 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.18 ± 0.01	0.15 ± 0.00	tr
20:3n-6	1.17 ± 0.01	0.55 ± 0.02	0.75 ± 0.03	1.02 ± 0.00	0.51 ± 0.01
20:4n-6	1.48 ± 0.05	0.79 ± 0.03	1.23 ± 0.06	1.46 ± 0.02	0.74 ± 0.01
20:5n-3	1.05 ± 0.05	0.63 ± 0.03	1.00 ± 0.03	1.16 ± 0.01	0.55 ± 0.01
22:1n-9	0.10 ± 0.00	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.01	tr	0.12 ± 0.01
22:1n-7	0.16 ± 0.00	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.22 ± 0.01
21:5n-3	0.43 ± 0.02	0.45 ± 0.02	0.65 ± 0.01	0.49 ± 0.02	0.60 ± 0.06
22:3n-6	tr	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.04	0.10 ± 0.02	tr
22:4n-6	0.10 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.27 ± 0.02	0.10 ± 0.00	0.27 ± 0.03
22:3n-3	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.05	0.14 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.13 ± 0.03
22:5n-6	0.50 ± 0.01	0.30 ± 0.04	0.37 ± 0.02	0.62 ± 0.02	0.28 ± 0.01
22:5n-3	0.57 ± 0.01	0.41 ± 0.02	0.51 ± 0.02	0.68 ± 0.01	0.39 ± 0.02
22:6n-3	19.74 ± 0.17	11.43 ± 0.50	16.45 ± 0.66	16.65 ± 0.48	12.25 ± 0.38
Total sat. ⁴	28.52	29.20	28.12	29.52	28.76
Total mono.	41.47	51.60	45.50	43.21	52.28
Total poly	30.00	19.09	26.30	27.12	18.96
Total n-3	22.04	13.18	18.86	19.25	13.92
Total n-6	7.32	5.44	6.89	7.30	4.60

1, 2, 3, 4 See the foot note of the Table 13.

Table 27. Fatty acid compositions of total lipids from rainbow trout flesh after feeding for 8 weeks¹ (%)

Fatty acid	Control	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4
14:0	2.36±0.12	2.35±0.21	2.30±0.02	2.35±0.19	2.10±0.05
15:0	0.12±0.00	0.12±0.01	0.12±0.01	0.12±0.01	0.11±0.00
16:0 iso	0.16±0.03	0.18±0.02	0.17±0.01	0.19±0.03	0.15±0.03
16:0	21.70±0.86	21.61±0.69	21.91±0.13	21.17±1.00	20.60±0.18
16:1n-7	8.29±0.18	8.08±0.61	8.37±0.19	8.36±0.35	8.04±0.31
7Me16:0	0.14±0.00	0.14±0.02	0.16±0.02	0.12±0.02	0.11±0.00
16:2n-4	0.18±0.02	0.20±0.10	tr	0.19±0.12	tr
17:0	tr	0.10±0.01	0.25±0.11	0.11±0.01	0.21±0.09
18:0	3.88±0.05	3.95±0.01	4.28±0.04	4.02±0.10	3.99±0.08
18:1n-9	24.42±0.58	21.55±0.43	23.53±0.46	23.63±0.75	23.89±0.61
18:1n-7	3.61±0.09	3.56±0.15	3.68±0.07	3.41±0.11	3.54±0.08
18:1n-5	0.19±0.06	0.22±0.02	0.29±0.12	0.24±0.02	0.25±0.08
18:2Δ5,11	0.12±0.04	0.12±0.02	0.20±0.08	0.17±0.02	0.15±0.05
18:2n-7	tr	tr	0.15±0.02	0.13±0.03	tr
18:2n-6	9.20±0.25	11.03±0.12	9.98±0.13	9.65±0.17	9.83±0.18
18:2n-4	0.17±0.02	0.17±0.02	0.15±0.05	0.23±0.06	0.17±0.04
18:3n-6	0.13±0.03	0.11±0.02	0.12±0.04	0.20±0.08	0.13±0.05
18:3n-4	0.22±0.03	0.21±0.03	0.17±0.03	0.23±0.05	0.20±0.03
18:3n-3	0.74±0.00	0.76±0.03	0.74±0.03	0.74±0.07	0.72±0.01
18:4n-3	0.25±0.00	0.26±0.03	0.31±0.07	0.30±0.06	0.30±0.01
18:4n-1	0.19±0.00	0.17±0.01	0.16±0.01	0.19±0.03	0.20±0.03
20:0	tr	tr	0.10±0.00	0.11±0.06	tr
20:1n-11	1.62±0.06	1.70±0.03	1.73±0.04	1.63±0.10	1.74±0.07
20:1n-9	1.76±0.09	1.83±0.03	1.86±0.05	1.75±0.11	1.77±0.12
20:1n-7	0.16±0.01	0.19±0.03	0.18±0.02	0.18±0.04	0.19±0.05
20:2 NMID ³	0.17±0.00	0.21±0.0 3	0.26±0.02	0.22±0.06	0.22±0.06
20:2n-6	0.55±0.01	0.77±0.02	0.71±0.03	0.63±0.05	0.62±0.09
20:3n-6	0.24±0.02	0.33±0.01	0.34±0.02	0.34±0.09	0.31±0.02
20:4n-6	0.53±0.04	0.64±0.06	0.56±0.01	0.58±0.02	0.57±0.05
20:4n-3	0.21±0.01	0.23±0.03	0.26±0.02	0.23±0.02	0.28±0.01
20:5n-3	2.97±0.13	2.88±0.34	2.73±0.05	2.92±0.18	3.38±0.21
22:1n-9	1.23±0.06	1.33±0.08	1.25±0.10	1.23±0.02	1.42±0.20
22:1n-7	0.31±0.02	0.35±0.01	0.34±0.03	0.32±0.03	0.33±0.04
21:5n-3	0.64±0.12	0.45±0.02	0.39±0.02	0.52±0.12	0.56±0.30
22:3n-6	0.22±0.03	0.22±0.01	0.20±0.02	0.26±0.03	0.22±0.02
22:4n-6	0.21±0.06	0.16±0.02	0.14±0.03	0.17±0.03	0.17±0.07
22:5n-6	0.13±0.01	0.19±0.01	0.17±0.01	0.17±0.01	0.16±0.01
22:5n-3	1.01±0.03	1.00±0.06	0.95±0.05	1.01±0.12	1.13±0.08
22:6n-3	11.38±0.73	12.35±1.17	10.77±0.33	11.81±0.55	12.14±1.01
Total sat. ⁴	28.71	28.75	29.55	28.19	27.58
Total mono.	41.59	38.81	41.23	40.75	41.17
Total poly.	29.37	32.34	29.20	30.67	31.24
Total n-3	17.20	17.93	16.15	17.53	18.51
Total n-6	11.21	13.45	12.22	12.00	12.01

1, 2, 3, 4 See the foot note of the Table 13.

Table 28. Fatty acid compositions of total lipids from rainbow trout liver after feeding for 8 weeks¹ (%)

Fatty acid	Control	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4
14:0	1.29±0.07	1.41±0.06	1.10±0.03	1.41±0.05	1.29±0.04
16:0	19.66±0.17	21.70±0.92	19.08±0.25	21.66±0.77	18.73±0.28
16:1n-7	6.73±0.22	6.96±0.60	4.71±0.06	5.36±0.24	6.70±0.12
16:2n-4	tr ²	tr	tr	0.17±0.01	tr
18:0	6.24±0.05	8.12±0.33	8.18±0.03	8.16±0.17	6.35±0.07
18:1n-9	32.88±0.09	25.60±0.76	22.00±0.09	19.45±0.45	35.55±0.04
18:1n-7	4.05±0.17	4.24±0.24	4.03±0.04	3.83±0.05	3.57±0.03
18:1n-5	0.20±0.04	0.11±0.04	0.18±0.04	0.17±0.01	0.20±0.06
18:2△5,11	0.15±0.02	tr	tr	tr	0.14±0.04
18:2n-7	0.10±0.01	tr	tr	tr	0.10±0.02
18:2n-6	5.13±0.05	4.48±0.31	5.14±0.03	5.79±0.25	4.17±0.04
18:2n-4	0.13±0.01	0.22±0.07	0.12±0.01	0.12±0.00	0.10±0.02
18:3n-3	0.19±0.02	0.22±0.07	0.22±0.02	0.33±0.00	0.12±0.01
20:0	0.10±0.00	0.17±0.02	0.10±0.01	tr	tr
20:1n-9	3.26±0.04	2.72±0.09	2.86±0.04	2.85±0.07	3.28±0.06
20:1n-7	0.21±0.01	0.21±0.06	0.20±0.01	0.21±0.03	0.19±0.01
20:2 NMID ³	0.28±0.02	0.35±0.07	0.25±0.01	0.25±0.01	0.29±0.01
20:2n-6	1.37±0.05	1.09±0.06	1.81±0.02	1.55±0.08	1.09±0.12
20:3 NMT ³	0.18±0.02	0.22±0.02	0.21±0.00	0.30±0.03	0.15±0.01
20:3n-6	0.97±0.02	1.03±0.07	1.22±0.01	1.12±0.02	0.83±0.02
20:4n-6	1.31±0.02	1.77±0.15	2.46±0.02	2.88±0.18	1.47±0.02
20:5n-3	0.77±0.01	0.82±0.05	1.49±0.04	1.38±0.04	0.69±0.02
22:1n-9	0.23±0.01	0.14±0.04	0.12±0.01	0.24±0.01	0.11±0.01
22:1n-7	0.21±0.01	0.18±0.02	0.13±0.00	0.15±0.01	0.21±0.01
21:5n-3	0.34±0.03	0.31±0.04	0.31±0.01	0.28±0.04	0.29±0.03
22:4n-6	0.14±0.02	tr	tr	tr	tr
22:3n-3	tr	0.14±0.01	0.10±0.01	0.13±0.02	tr
22:5n-6	0.38±0.01	0.69±0.03	0.56±0.02	0.75±0.07	0.47±0.01
22:5n-3	0.38±0.01	0.48±0.08	0.69±0.02	0.67±0.03	0.34±0.02
22:6n-3	12.81±0.15	16.54±0.54	22.26±0.39	20.45±0.64	13.32±0.39
Total sta. ⁴	28.05	33.86	28.92	31.75	26.90
Total mono.	47.77	38.16	34.23	32.26	49.81
Total poly.	23.96	27.83	36.47	35.65	23.29
Total n-3	14.58	18.51	25.07	23.24	14.83
Total n-6	9.30	9.06	11.19	12.09	8.12

1, 2, 3, 4 See the foot note of the Table 13.

에 0.8-1.6%의 18:2n-3를 공급하면 성장에 영향을 받지 않으며, 이 때 18:3n-3의 함량이 0.5% 이상이 되는 것이 바람직하다고 하였다. 따라서 근육지질의 18:2n-6, 18:3n-3의 함량은 충분하였으나, 간지질의 함량은 부족하였다.

8주 후의 경향은 근육지질의 경우 대조구와 pink구는 monoene산의 함량이 약간 증가한 반면, 고도불포화산의 함량이 감소하였고, 색소가 첨가된구는 4주 후와 비슷하였다. 그러나 간지질의 경우 18:2n-6 및 18:3n-3의 함량이 증가하여 4주 후와는 다른 양상을 나타내었다. 색소 추출물구의 경우 monoene이 50%, 고도불포화산이 23%에 이르러 다른 첨가구와는 다르게 나타났다. Kang et al.(1995) 에 의하면 카로테노이드 색소의 ester는 18:1n-9, 16:1n-7, 16:0 등이 주성분이었으며, monoene이 41.5%, 고도불포화산이 37.4%, 포화산이 20.6%였다고 하였다. 이로 미루어 볼 때 색소추출물구의 지방산조성이 사육어의 근육 지방산조성에 영향을 미친 것으로 여겨진다.

참고문헌

- Ando, S. and M. Hatano. 1987. Merabolic pathways of carotenoids in chum salmon *Oncorhynchus keta* during spawning migration. *Comp. Biochem. Physiol.*, 87B, 411~416,
- Anno, K., K. Otsuka and N. Seno. 1974. A chitin sulfate-like polysaccharide from the test of the tunicate *Halocynthia roretzi*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 362. 215~219.
- AOAC. 1990. Official methods of Analysis. 15th ed., Assoc. of Official Analytical Chemists, Washington, DC., p. 237
- Bartlett, G.R. 1959. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, 234, 466~468.
- Bauernfeind, J.C., G.B. Brubacher, H.M. Kläui and W.L. Marusich. 1971. Use of carotenoids. In "Carotenoids"(ed. by O. Isler). Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 742~770.
- Bligh, E.C. and W.J. Dyer. 1959. Rapid and convenient separation of phospholipids and nonphosphorus lipids from rat heart using silica cartridge. *Lipids*, 20, 40~41.
- Campbell, S.A., A.K. Mallams, E.S. Waight and B.C.L. Weedon. 1967. Pectenoxanthin, cynthiixanthin, and a new acetylenic carotenoid, pectenolone. *Chem. Commun.* 941~942.

- Castell, J.D., D.J. Lee and R.O. Sinnhuber. 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., D.J. Lee and R.O. Sinnhuber. 1972b. Essential fatty acids in the diet of rainbow trout(*Salmo gairdneri*): lipid metabolism and fatty acids composition. J. Nutr., 102, 93~99.
- Cho, C.Y., C.B. Cowey and T. Watanabe. 1985. Methodological approaches to research and development. In *Finfish nutrition in asia*. C.Y. Cho, ed. IDRC, Ottawa, pp. 16~28.
- Choubert, G. 1983. La canthaxanthin:ses effects sur la pigmentation de la truite arc-en-ciel, *Salmo gairdneri* Richardson. Bull. Fr. Soc. Zool., 108, 267~276.
- Choubert, G. and O. Heinrich. 1993. carotenoid pigments of the green alga *Haematococcus pluvialis*:assay on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, pigmentation in composition with synthetic astaxanthin and canthaxanthin. Aquaculture, 112, 217~ 226.
- Cushman, D.W. and H.S. Cheung. 1970. Spectromatric assay and properties of the Angiotensia-converting enzyme of rabbit lung. Biochemical pharmacology, 20, 1637~1648
- Deufel, J. 1965. Pigmentierungversuche mit canthaxanthin bei regenbogenforellen. Arch. Fischereiwiss, 16, 125~132.

- Dodgson, K.S. 1962. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. *Biochem. J.*, 78, 312
- Dubois, M., K. Gilles, J. Hamilton, P. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350~353.
- Elfak, A.M., G. Pass, G.O. Phillips and R.G. Morley. 1977. The viscosity of dilute solution of guar gum and locust bean gum with and without added sugars. *J. Sci. Food Agric.*, 28, 896.
- Foss, P., T. Storebakken, K. Schiedt, S. Liaaen-Jensen, E. Austreng and K. Streiff. 1984. Carotenoids in diets for salmonids. I. Pigmentation of rainbow trout with the individual optical isomers of astaxanthin in comparison with canthaxanthin. *Aquaculture*, 41, 213~226.
- Fujihava, M., N. Iizime, I. Yamamoto and T. Ngamo. 1984. Purification and chemical and physical characterization of an antitumor polysacchride from the brown seaweed, *Sargassium fulvellum*. *Carbohydr. Res.*, 125, 97.
- Guillou, A., G. Choubert, T. Storebakken, J. De La Noüe and S. Kaushik. 1989. Bioconversion pathway of astaxanthin into retinol in mature rainbow trout (*Salmo gairdneri* R)
- Hardy, R.W., O.J. Torrison and T.M. Scott. 1990. Absorption and distribution of ¹⁴C-labeled canthaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 87, 331~340.

- Hartmann, M., F.G. Medem, R. Kuhn and J.H. Bielig. 1947. Untersuchungen über die Berfruchtungsstoffe der regenbogenforelle. Z. Naturforsch., 2, 330~349.
- Johnson, E.A. and C.J. Breke. 1983. Functional properties of acylated pea protein isolates. J. Food Sci., 48, 722~725
- Kang 1995. Purification and characterization of the red caroteno protein from the skin of ascidian, *Halocynthia roretzi* 1. Purification and characterization of the carotenoprotein. Korean J. Life Sci., 5, 170~180.
- Katsuyama, M., T. Komori and T. Matsuno. 1987. Metabolism of three stereoisomers of astaxanthin in the fish, rainbow trout and tilapia. Comp. Biochem. Physiol., 86B, 1~5.
- Knorr, D. 1983. Dye Binding Properties of Chitin and Chitosan. J. Food. Sci., 48, 36~41.
- Knutson, C.A. and A. Jeanes. 1968. A new modification of the carbazole analysis. Anal. Biochem., 24, 470~473.
- Lederer, E. 1938. Recherches sur les carotenoids des invertébrés. Bull. Soc. Chim. Biol., 20, 567~610.
- Lee, K.H., M.G. Kim, B.C. Jung and W.J. Jung. 1993. Utilization of ascidian, *Halocynthia roretzi*. 3. Taste compounds of ascidian, *Halocynthia roretzi*. Bull. Korean Fish. Soc., 26, 2, 150-158.

- Lee, K.H., S.J. Kang, B.D. Choi, Y.J. Choi, and M.G. Youm. 1994. Utilization of ascidian(*Halocynthia roretzi*) tunic. 1. Effect of ascidian tunic extracts on pigmentation and growth of rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*). Bull. Korean Fish. Soc. 27(3), 232~239.
- Lin, M.J.Y., E.S. Humbert and F.W. Sosulki. 1974. Certain functional properties of sunflower meals. J. Food Sci., 39, 368~371
- Lönnerberg, E. 1931. Untersuchungen über das Vorkommen Carotenoider Stoffe bei Marinen Evertebraten. Ark. Zool., 22(A), 1~49.
- Lovell, T. 1992. Dietary enhancement of color in ornamental fish. Aquaculture magazine, 18, 77~79.
- 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
- Matstuno, T. and T. Maoka. 1981. Isolation of a new carotenoid 3,4,3'-trihydroxy-7',8'-didehydro- β -carotene from sea mussels. Nippon Suisan Gakkaishi, 47, 377~384.
- Matsuno, T. and M. Ookubo. 1982. A new marine carotenoid, mytiloxanthinone from the sea squirt, *Halocynthia roretzi*. Chem. Lett., 10, 1605~1606.
- Matsuno, T., M. Ookubo and T. Komori. 1985. Carotenoids of tunicate. III. The structural elucidation of two new marine

- carotenoids, amarouciaxanthin A and B. J. Natur. Prod., 48, 606~610.
- Mauro S.G.P., M.A. Rodolpho, M.L. Alexander and A.S.M. Paulo. 1989a. Structural heterogeneity among unique sulfated L-galactans from different species of ascidians(Tunicates). J. Biol. Chem., 264, 9972-9979.
- Mauro S.G.P., M.A. Rodolpho and A.S.M. Paulo. 1989b. L-Galactose in sulfated polysaccharides from tunicates. Carbohydr. Res., 189, 374~379.
- Mauro S.G.P., A.S.M. Paulo and M. Barbara. 1990. Structure of a unique sulfated α -L-galactofucan from the tunicate *Clavellina*. Carbohydr. Res., 208. 153~161.
- MecBeth, T.W. 1972. Carotenoids from nudibranches. Comp. Biochem. Physiol., 41B, 55~68.
- Mikulin, A.W. and S.G. Soin. 1975. The functional significance of carotenoids in the embryonic development of teleosts. J. Ichthyol., 15, 749~759.
- Nishibori, K. 1958. Studies on the pigments of marine animals VI. Carotenoids of some tunicates. Publ. Seto. Mar. Biol. Lab., 7, 181~192.
- Nishide, E., H. Anzai and N. Uchide. 1987. A comparative investigation on the contents of fucose containing polysaccharide from various japanses brown algae. Nippon Suisan Gakkaishi, 53,

1083.

Nishino, T. and T. Nagumo. 1987. Sugar constituents and blood-anti coagulant activities of fucose-containing sulfated polysaccharides in nine brown seaweed species. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 61, 361~364.

Nishino, T. and G. Yokoyama, K. Dobashi, M. Fujihara and T. Nagumo. 1989. Isolation, purification, and characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Ecklonia kurome* and their blood-acticoagulant activities. *Carbohydr. Res.*, 186, 119.

No. H.K. and T. Storebakken. 1991. Pigmentation of rainbow trout with astaxanthin at different water temperatures. *Aquaculture*, 97, 203~216.

Paulo A.S.M. and S.P. Arthur. 1987. Structural features of sulfated glycans from the tunic of *Styela plicata* (Chordata tunicata). *Eur. J. Biochem.*, 100, 431~436.

Peterson, D.H., H.K. Jäger, G.M. Savage, G.N. Washburn and H. Westers. 1966. Natural coloration of trout using xanthophylls. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 95, 408~414.

Paredes-Lopez, O. and C. Ordorica-Falomir. 1986. Functional properties of safflower protein isolates: Water absorption, whipping and emulsifying characteristics. *J. Sci. Food Agric.*, 37, 1104~1106.

Poolo, S. 1988. The foam properties of low viscosity chitosan. In chitin and chitosan. G. Skjak-Braek, T. Anthonsen, P. Stanford, ed, Wiley, New York, pp. 331.

- Rånby, B. and J.F. Rabek. 1978. Singlet oxygen. J.F. Rabek, ed. Wiley, Chichester, pp. 331.
- Rao, M.A and R.C. Anantheswaran. 1982. Rheology of fluids in food processing. Food Technology, 36, 116~126
- Rodolpho M.A. and A.S.M. Paulo. 1983. Presence of sulfated glycans in ascidian tunic and the body wall of a sea cucumber. Biochim. Biophys. Acta., 760, 192~196.
- Rodolpho M.A. and A.S.M. Paulo. 1986. Isolation, fractionation, and preliminary characterization of a novel class of sulfated glycans from the tunic of *Styela plicata* (Chordata tunicata). J. Biol. Chem., 261, 758~765.
- Rodolpho M.A., S.G.P. Mauro, A.S.M. Paulo and M. Barbara. 1990. Structural studies of a sulfated L-galactan from *Styela plicata* (Tunicate): Analysis of the smith-degraded polysaccharide. Carbohydr. Res., 208. 167~174.
- Schiedt, K., M. Vecchi and E. Glinz. 1986. Astaxanthin and its metabolites in wild rainbow trout(*Salmo gairdneri* R.). Comp. Biochem. Physiol., 83B, 9~12.
- Simpson, K.L. and T. Kamata. 1979. Use of carotenoids in fish feed. In:J.E. Halver and K. Tiews(Editors), Proc. World Symp. on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology. Vol. II. Heenemann, Berlin, pp. 415~424.
- Storebakken, T. and H.K. No. 1992. Pigmentation of rainbow trout.

- Aquaculture, 100, 209~229.
- Torrissen, O.J. 1989. Pigmentation of salmonoids: interactions of astaxanthin and canthaxanthin on pigment deposition in rainbow trout. *Aquaculture*, 79, 363~374.
- Tsuchiya, Y. and Y. Suzuki. 1960. Biochemical studies of the ascidian, *Cynthia roretzi* v. Drasche IV. Carotenoids in test. *Tohoku J. Agric. Res.*, 10, 397~407.
- Wang, J.C. and J.E. Kinsella. 1976. Functional properties of novel protein: Alfalfa leaf protein. *J. Food Sci.*, 41, 286~292
- Watanabe, M., H. Toyokana, A. Shimada and S. Arai. 1981. Proteinaceous surfactant produced from gelatin by enzymatic modification evaluation for their functionality. *J. Food Sci.*, 46, 1407~1469
- Watanabe, T. 1982. Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73B, 3~16.
- Word, P.T., J.T. Brasten, F.W. Scott, D. Riedel and L.H. Poste. 1990. Comparisons of viscous properties of oat and guar gum and the effect of these and oat bran on glycemic Index. *J. Agric. Food Chem*, 38, 753.
- Yabe, Y., T.H. Ninomiya, T. Kashiwaba, M. Tatsuno and T. Okada. 1987. Determination of sodium chondroitin sulfate added in foods. *J. Food Hygiene*, 28, 13~18.
- 加藤唱夫. 1994. 多糖類修飾による蛋白質の機能変換と新規食品素材の

開發. 日本食品工業學會志, 41, 304.

山口勝己 (1991) : 水産物物理學, 東京大學出版會, 東京, pp. 72~79.

順山三千・鴻巢章二. 1991. 水産食品學, 東京大學出版會, 東京, pp. 8~33.

中内光明. 1986.“動物系統分類學”, 8(下), 中山書店, 東京, p. 118

김상인, 조한익, 박성십. 1992. “혈액핵”, 서울대학교, 의과대학편, p.313.

문정혜. 1996. 해삼 당단백질의 물리화학적 특성, 항돌연변이원성 및 항암효과. 부경대학교 대학원 박사학위논문.

한국수산회. 1995. 수산연감. 한국수산회, 서울, pp. 520~521.