

최 종  
연구보고서

Myctophid 어종에 함유된 wax esters를  
이용한 사료 첨가제 개발  
Development of feed additives utilizing wax  
esters in Myctophid fishes

경북대학교

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Myctophid 어종에 함유된 wax esters를 이용한 사료 첨가제 개발”  
과제의  
최종보고서로 제출합니다.

2003년 8월 일

주관연구기관명 : 경북대학교  
총괄연구책임자 : 여 영 근

# 요 약 문

## I. 제 목

Myctophid 어종에 함유된 wax esters를 이용한 사료 첨가제 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

Myctophid는 주로 원양이나 해안에서 폐기처분하고 있는 어종으로써 자원이 매우 풍부하기 때문에 매우 저렴(약 50원/kg)하게 구입할 수 있을 것으로 추정하며, 수거량은 이용성에 따라 달라질 수 있으나 현재까지는 무한한 자원으로 알려져 있다. 현재 포화지방산이 주로 함유된 tallow인 경우 400~500원/kg에 비하여 wax esters에서 추출한 고급지방은 200~250원/kg 정도로 추정할 수 있으므로 충분한 가격경쟁력을 가질 수 있다. 그러나 Myctophid는 체내에 주요지질로서 다량의 wax esters를 함유하고 있고 이 wax esters가 docosahexaenoic acid (DHA)와 같은 다량의 n-3 다가 불포화지방산을 함유하고 있으나 이를 이용하지 못하고 있는 실정이다. 본 연구에서는 Myctophid에 함유된 wax esters로부터 지방산을 분리함으로써 DHA와 같은 고급 다가 불포화지방산을 가축(육계)에 이용하기 위한 사료첨가제를 개발하고자 한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

1. Myctophid로부터 wax esters를 대량 추출하고, 화학 및 효소적 방법을 이용하여 분해시킴으로써 wax esters에 연결된 지방산을 알코올로부터 분리시키는 기술을 개발하였다.

2. Wax esters로부터 대량으로 지방산을 분리하기 전에 실험적으로 분리한 지방산을 이용하여 실험동물(육계)사양실험을 실시한다. 동물사양실험은 2%의 분리 지방산을 첨가하여 4주간 사양한 후 분리지방산을 첨가하지 않은 대조구와 비교하여 첨가한 분리지방산의 체내 축적율을 확인함으로써 Wax-esters로부터 분리한 지방산의 체내 흡수효과를 검증하였다.

3. Wax esters의 분해를 통하여 분리된 지방산을 trans esterification이나 gradient solvent system 등을 통하여 용이하게 대량 추출하기 위한 기술을 개발한다.

4. 화학분해를 위한 용매system을 개발한 후 화학적 방법으로 분해된 wax esters

에서 분리된 지방산이나 지방산 esters를 대량 추출한 후, 사양실험을 통하여 가축(육계)에 급여함으로써 가축의 체내에서 대사 되어 효율적으로 체지방으로 축적될 수 있는지를 확인하였다. 가축의 각종 조직에 축적된 지질종(각종 중성지질 및 각종 인지질)과 지방산 조성을 분석하여 wax esters에서 분리된 지방산이 가축의 조직별 지방 및 지방산 축적에 미치는 영향을 파악하고 이를 토대로 사료첨가제로서의 효율성과 이용가능성을 타진하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구결과를 바탕으로 산업화를 위한 활용방안을 검토할 예정이며 , 특별한 건의 사항은 없음

## SUMMARY

### (영문요약문)

This study was carried out to develop feed additives utilizing wax esters in Myctophid fishes.

Myctophid fishes are abundant and very cheap marine resources. There are very high wax esters as major lipid in Myctophid fishes. Most of wax esters are consisted of n-3 polyunsaturated fatty acids such as docosahexaenoic acid. It is very important to separate the fatty acids from wax esters which can't be utilized in the digestive tracks of vertebrates. This study was tried to separate those fatty acids from wax esters in Myctophid fishes.

Various methods were employed to separate fatty acids from wax esters before preparing mass production method for isolation of fatty acid from the wax. It was found that pure chloroform is the most convenient solvent to separate the wax esters from thin layer chromatograph. In chemical method, it was ideal method that 20% methanolic acetic acid was used to separate fatty acid including docosahexaenoic acid(DHA) in 85°C for 2 hours.

New method to separate wax esters from Myctophid fishes in large quantities was examined. In elution method of methylesters, DHA was eluted very efficiently by pet.ether, hexane and pet.ether/diethylether(2 : 1, v/v) as 79.3, 69.9 and 75.2%, respectively.

The animal experiment was carried out to compare absorption rate of fatty acid from wax esters without chemical treatment to that of the acid from wax esters with chemical treatment. There are a remarkable difference in DHA composition of 1,2-diaclyglycerol and 1,3-diaclyglycerol in chest muscle between the animal group fed with wax esters without chemical treatment and those fed wax esters with chemical treatment. Much higher DHA was found in the 1,3-diaclyglycerol, free fatty acid, cholesterol-ester, phosphstidylcholine, phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in leg muscle from the animal fed with wax esters with chemical treatment when compared to those fed wax esters without chemical treatment.

The results of the study could possibly contribute to produce the feed additives utilizing wax esters in Myctophid fishes.

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

Chapter 1.	Introduction	.....	7
Chapter 2.	Domestic and foreign technology concerning this study	...	11
Chapter 3.	Materials, Methods and Results	.....	12
Chapter 4.	Achievements and Contribution	.....	54
Chapter 5.	Planning for Using the Results	.....	55
Chapter 6.	Information employed for this Study	.....	56
Chapter 7.	References	.....	57

## 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	.....	7
제 2 장	국내외 기술개발 현황	.....	11
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	.....	12
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	.....	54
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	.....	55
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	.....	56
제 7 장	참고문헌	.....	57

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구개발의 필요성

#### 1. 기술적 측면

Myctophid는 가장 풍부한 수산자원이지만 체내 다량의 wax esters가 함유되어 있으므로 이를 사료나식품으로 이용하지 못하고 있는 실정이다. 따라서 Myctophid 어종에 많이 함유된 wax esters의 분해방법을 개발함으로써 wax esters에 존재하는 지방을 생물학적으로 이용할 수 있다.

#### 2. 경제·산업적 측면

Myctophid는 주로 원양이나 해안에서 폐기처분하고 있는 어종으로써 자원이 매우 풍부하기 때문에 매우 저렴(약 50원/kg)하게 구입할 수 있을 것으로 추정하며, 수거량은 이용성에 따라 달라질 수 있으나 현재까지는 무한한 자원으로 알려져 있다. 현재 포화지방산이 주로 함유된 tallow인 경우 400~500원/kg에 비하여 wax esters에서 추출한 고급지방은 200~250원/kg 정도로 추정할 수 있으므로 충분한 가격경쟁력을 가질 수 있다. 아울러 지금까지 동물이 이용하지 못하는 wax esters를 이용할 수 있도록 함으로써 wax esters의 실질적 이용성을 크게 증대시킬 수 있다.

#### 3. 사회·문화적 측면

Myctophid를 비롯한 폐기처분되는 어류에서 wax esters를 추출하여 이용함으로써 폐기물의 재활용에 크게 기여할 수 있다.

### 제 2 절 연구개발의 목적과 범위

1. 목표 : Myctophid 어종에 함유된 wax esters의 분해기술을 개발하여 wax esters에 함유된 지방을 생물학적으로 이용하고자 한다.



2. 내용 : Myctophid 물고기는 세계적으로 가장 풍부한 해양어종으로서 앞으로 가장 전망이 좋은 자원이다. 그러나 Myctophid는 체내에 주요지질로서 다량의 wax esters를 함유하고 있으므로 비록 wax esters가 docosahexaenoic acid (DHA)와 같은 다량의 n-3 다가 불포화지방산을 함유하고 있으나 이를 이용하지 못하고 있는 실정이다. 이와 같은 wax esters를 가축에 급여하였을 경우 설사와 위장장애를 초래하게 되어 현재까지 사료로 이용하지 못하고 있는 실정이다. 본 연구에서는 Myctophid에 함유된 wax esters로부터 지방산을 분리함으로써 DHA와 같은 고급 다가 불포화지방산을 가축(육계)에 이용하기 위한 사료첨가제를 개발하고자 한다.

### 3. 년차별 목적과 범위

#### 가. 1차년도(2000년)

1) 목적 : Myctophid 어종에 함유된 wax esters를 추출하여 화학 및 효소적 방법으로 wax esters를 분해하여 지방산과 알코올로 분리하고자 한다.

2) 범위 : 가)해저에서 가장 풍부한 수산자원인 Myctophid를 대량 확보하여 실험재료로 이용한다.

나)Myctophid로부터 wax esters를 대량 추출하고, 화학 및 효소적 방법을 이용하여 분해시킴으로써 wax esters에 연결된 지방산을 알코올로부터 분리시키는 기술을 개발한다.

다)Myctophid로부터 wax esters를 chloroform, methanol, acetic acid 등 유기용매를 이용하여 대량 추출한 후, 순수wax esters는 solvent system으로서 benzene/chloroform(7:3, v/v)를 이용하여 분리한다.

라)Myctophid로부터 추출한 wax esters를 적절한 농도의 HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>등의 acid용액과 NaOH등의 alkali용액을 이용하여 긴 사슬의 지방산을 wax esters로부터 분리하며 아울러 krill이나 fish중의 wax esters분해 효소를 이용하여 효소에 의한 분해 효율성도 검토한다.

#### 나 . 2차년도(2001년)

- 1) 목적 : Wax esters의 분해로부터 분리된 각종 지방산을 대량 추출할 수 있는 기술을 개발한다
- 2) 범위 : 가)Wax esters의 분해를 통하여 분리된 지방산을 trans esterification이나 gradient solvent system 등을 통하여 용이하게 대량 추출하기 위한 기술을 개발한다.  
 나)Acid나 alkali를 이용한 화학적 방법을 통하여 분해한 wax esters로부터 생성되는 지방산을 적절한 온도에서 EtOH, MeOH등을 incubation 시켜 지방산 carboxyl group과 ester bond로 결합시킨 trans esterification 방법이나 여러가지 비율의 유기용매를 이용한 gradient solvent system을 이용하여 wax esters로부터 지방산을 대량 추출하기 위한 최적기술을 개발하고, 특정 지방산을 대량 추출 정제할 수 있도록 한다.  
 다)Wax esters로부터 대량으로 지방산을 분리하기 전에 실험적으로 분리한 지방산을 이용하여 실험동물(육계)사양실험을 실시한다. 동물사양실험은 2%의 분리지방산을 첨가하여 4주간 사양한 후 분리지방산을 첨가하지 않은 대조구와 비교하여 첨가한 분리지방산의 체내 축적율을 확인함으로써 Wax-esters로부터 분리한 지방산의 체내흡수효과를 검증한다.

다. 3차년도(2002년)

- 1) 목적 : Wax esters에서 분리된 지방을 가축의 사료로 이용하기 위한 사양실험을 수행한다.
- 2) 범위 : 가) 1, 2차년도에서 개발한 wax esters의 분해 및 지방분리기술을 이용하여 지방을 대량 추출한 다음, 사양실험을 통하여 가축에 급여한 후 가축(육계)의 체내 지방축적에 미치는 영향을 탐색하여 사료첨가제로 이용할 수 있는 가능성을 모색한다.  
 나) 화학분해를 위한 용매system을 개발한 후 화학적 방법으로 분해된 wax esters에서 분리된 지방산이나 지방산 esters를 대량 추출한 후, 사양실험을 통하여 가축(육계)에 급여함으로써 가축의 체내에서 대사 되어 효율적으로 체지방으로 축적될

수 있는지를 확인한다. 가축의 각종 조직에 축적된 지질종(각종 중성지질 및 각종 인지질)과 지방산 조성을 분석하여 wax esters에서 분리된 지방산이 가축의 조직별 지방 및 지방산 축적에 미치는 영향을 파악하고 이를 토대로 사료첨가제로서의 효율성과 이용가능성을 타진한다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

일본 동북대학교 Fujimoto 교수에 의해서 본 연구와 관련된 실험이 수행되어 왔으나 wax esters의 다량 분해를 통한 지방의 분리기술이 아직 개발되지 못하고 있으며, 국내에서는 이와 관련된 기술개발이 전무한 실정이다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 1차년도 연구수행 방법 및 결과

#### 1. 연구수행 방법

가. Myctophid 어종에 함유된 wax esters의 분리법개발:

##### 1) 실험재료

해저에서 wax esters을 함유한 가장 풍부한 수산자원인 Myctophid를 포함한 식용 어종 삼치(Spanish Mackerel), 생태(Pollack), 전갱이(Horse Mackerel), 고등어(Mackerel), 임연수어(Atka Mackerel), 등을 실험재료로 이용하였다.

##### 2) Myctophid로 부터 wax estes분리를 위한 분리용매선정:

가) Chloroform/methanol를 이용한 wax estes분리:

(1) 용매로서 chloroform/methanol(2:1, v/v)을 이용하여 wax estes를 다음과 같이 분리하였다.

① 시험관에 sample 2g을 넣는다.

② 시험관에 chloroform/methanol(2:1, v/v)6ml을 첨가한후 3분간 vortex 한다.

③ 증류수 2ml을 첨가한후 다시 3분간 vortex한다.

④ 하층(lower phase)의 chloroform을 분리한다.

(2) 이렇게 총지질을 추출한 다음 TLC를 이용하여 wax esters의 분리 효율성을 측정하였다.

(3) TLC solvent system으로 hexane/diethyl ether(7:3, v/v)과 benzene/chloroform(7:3,v/v)을 이용하였으며 다음과 같은 방법으로 TLC를 전개하였다.

① Solvent를 TLC tank에 넣고 1시간 정도 포화시킨다

② TLC plate에 선을 표시 하였다 (아랫부분-1.5cm, 윗부분-0.5cm).

③ TLC plate 2장에 standard(palmitoleic acid lauryl ester)와 위의 5가지 어종(삼치, 생태, 전갱이, 고등어, 임연수어)의 Wax를 spotting 하였다.

- ④ Spotting한 plate를 각각 TLC tank에 넣고 전개용매가 윗부분을 넘지 않을 때까지 둔다(1시간 20분).
- ⑤ 전개후 TLC plate를 cool air로 건조한다.
- ⑥ 2,7-difluoresceine solution을 질소를 이용해서 TLC plate에 spray한다.
- ⑦ TLC plate를 Ammonium hydroxide tank에 10초 둔다.
- ⑧ UV lamp로 wax esters의 band를 확인한다.

나) Chloroform을 이용한 wax esters분리:

- (1) 용매로서 순수 Chloroform을 이용하여 시료로서 생태(Pollack)를 이용하여 wax esters를 다음과 같이 분리하였다.
  - ① 시험관 4개에 각각 sample 2g을 넣는다.
  - ② 3개의 시험관에 Chloroform 6ml을 넣고 1분, 3분, 5분 동안 정치한다. 나머지 1개의 시험관에는 Chloroform 6ml을 넣고 10초 동안 균질화 한 후 5분간 정지한다.
  - ③ 정해진 시간이 지난 후 각각의 Chloroform층을 분리한다.
- (2) 이렇게 분리된 wax esters를 다시 TLC를 이용하여 분리 효율을 측정하였다. TLC solvent system으로 hexane/diethyl ether(7:3, v/v)을 이용하였다.

나. Wax esters의 화학적 분해를 통한 지방산 분리기술 개발

1) 0.5% Methanolic sulfate(M/S)을 이용한 wax esters의 분해 및 지방산 분리:

가) 0.5% M/S - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5ml + MeOH 48.5ml

나) Wax esters에 0.5% M/S 6ml과 internal standard (15:0) 10 $\mu$ l을 넣는다.

다) Heating block(85 $^{\circ}$ C)에서 2시간 동안 둔다.

라) 실온에서 cooling한 후 Pet.ether 5ml 넣고 vortex한다.

마) H<sub>2</sub>O 2ml 넣고 vortex한 후 2200 r.p.m.에서 20분간 centrifuge 한다.

바) Upper phase를 분리 후 N<sub>2</sub>로 dry한다

사) Hexane 100 $\mu$ l를 넣는다.

아) 지방산 측정을 위하여 GLC에 injection한다.

- 2) 실온에서 24시간 0.5% M/S를 이용한 wax esters분해 및 지방산 분리:  
0.5% M/S을 이용하여 실온에서 24시간 wax esters을 분해하였으며  
나머지 과정은 1)과 같다.
- 3) 1% Methanolic sulfate(M/S) 방법을 이용한 wax esters의 분해 및  
지방산 분리:  
1% M/S( $H_2SO_4$  0.5ml + MeOH 49.5ml)을 이용하며 나머지과정은 1)과  
같다.
- 4) 3% M/S방법을 이용한 wax esters의 분해 및 지방산 분리:  
3% M/S을 이용하며 나머지과정은 1)과 같다.
- 5) 85°C에서 5시간 동안 0.1% M/S를 이용한 wax esters분해 및 지방산  
분리:  
가) wax esters에 internal standard(15:0) 10 $\mu$ l 넣고 vortex한다.  
나)  $N_2$ 에서 dry한후 0.1% M/S를 6ml 넣는다.  
다) Heating block(85°C)에서 5시간 동안 둔다.  
라) 실온에서 cooling  
마) Wax eaters의 2/1은 Heating block(85°C)에서 5시간 더 둔다  
바) 나머지 2/1의 wax esrwes에 pet.ether 5ml 넣고 vortex한다.  $H_2O$   
2ml 넣고 vortex한다. 2200 r.p.m.에서 20분간 centrifuge한다.  
upper phase를 분리후  $N_2$  dry한다.  
Hexane 150 $\mu$ l를 넣는다. GLC 에 injection(2 $\mu$ l)한다  
사) 총 10시간 methylation한 wax에 pet.ether 5ml 넣고 vortex한다.  
 $H_2O$  2ml 넣고 vortex한다. 2200 r.p.m.에서 20분간 centrifuge한다.  
upper phase를 분리후  $N_2$  dry한다. Hexane 150 $\mu$ l를 넣는다. GLC  
에 injection(2 $\mu$ l)한다
- 6) 85°C에서 5시간 동안 0.05% M/S를 이용한 wax esters분해 및 지방산  
분리:  
0.05% M/S을 이용하여 85 C에서 5시간 wax esters을 분해하였으며  
나머지 과정은 1)과같다.
- 7) 0.05N NaOH을 이용한 wax esters의 분해 및 지방산 분리:

- 가) Wax esters을 (1.5ml sample from Tube)을 N<sub>2</sub> 에서 dry한다
- 나) 건조한 Wax esters에 0.05N NaOH/MeOH를 1ml 넣고 vortex한다.
- 다) 85 C에서 2시간 둔다.
- 라) 0.5N HCl 100 $\mu$ l을 넣는다.
- 마) Internal standard 10 $\mu$ l를 넣는다.
- 바) 1ml MeOH, 1ml CHCl<sub>3</sub> , 0.5ml H<sub>2</sub>O를 넣고 vortex (single phase)한다.
- 사) 1ml CHCl<sub>3</sub> , 1.5ml H<sub>2</sub>O를 넣고 vortex ( 2 phase)한다.
- 아) Lower phase를 분리한후 N<sub>2</sub>로 건조시킨후 Hexane 100 $\mu$ l를 넣는다.
- 자) 지방산 측정을 위하여 GLC에 injection한다.

8) 0.1N NaOH을 이용한 wax esters의 분해 및 지방산 분리:  
0.1N NaOH을 이용하여 실온(25 C)에서 1시간 wax esters을 분해하였으며 나머지 방법은 4)와 같다.

9) 0.5N NaOH을 이용한 wax esters의 분해 및 지방산 분리:  
0.5N NaOH을 이용하여 실온(25 C)에서 1시간 wax esters을 분해하였으며 나머지 방법은 4)와 같다.

10) 10% Methanolic formic acid을 이용한 wax esters의 분해 및 지방산 분리:

- 가) Myctophid로 부터 10mg의 wax esters을 15ml test tube에 넣는다..
- 나) N<sub>2</sub> 로dry한다.
- 다) 시료에10% Methanolic formic acid 6ml을 넣고 Heating block(85 $^{\circ}$ C)에서 2시간 둔다.
- 라) 실온에서 cooling-후 pet.ether 5ml을 넣고 vortex한다.
- 마) H<sub>2</sub>O 2ml을 넣고 vortex한후 2200 r.p.m.에서 20분간 centrifuge한다.
- 바) Upper phase 분리 후 N<sub>2</sub> 로 dry한후 Hexane 40 $\mu$ l를 넣는다.
- 사) GLC에 injection(1.5 $\mu$ l)한다.

11) 20% Methanolic acetic acid을 이용한 wax esters의 분해 및 지방산



분리: Wax esters의 분해 및 지방산 분리를 위하여 20% Methanolic acetic acid을 이용하였으며 나머지 방법은 10)과 같다.

12) 20% Methanolic propionic acid을 이용한 wax esters의 분해 및 지방산 분리: Wax esters의 분해 및 지방산 분리를 위하여 20% Methanolic propionic acid을 이용하였으며 나머지 방법은 10)과 같다.

## 2. 연구수행 결과

가. Myctophid 어종에 함유된 wax esters의 분리법개발:

실험재료로서 해저에서 wax esters을 함유한 가장 풍부한 수산자원인 Myctophid를 포함한 식용 어종 삼치(Spanish Mackerel), 생태(Pollack), 전갱이(Horse Mackerel), 고등어(Mackerel), 임연수어(Atka Mackerel), 등을 이용하여 wax esters를 분리하였다.

1) Chloroform/methanol를 이용한 wax estes분리:

Chloroform/methanol를 이용하여 wax estes를 분리한 후 TLC를 이용하여 wax esters의 분리 효율성을 측정된 결과 TLC solvent system으로 hexane/diethyl ether(7:3, v/v)과 benzene/chloroform(7:3, v/v)을 이용하였을 경우의 TLC chromatogram은 Fig. 1과 Fig. 2에서와 같다.



Fig. 1. TLC chromatogram of total lipids extracted with chloroform/methanol(2:1) from various fish species containing wax esters using solvent system of hexane/diethyl ether (7:3, v/v). The chromatogram shows bands of Wax esters standard, Spanish Mackerel, Pollack, Horse Mackerel, Mackerel, Atka Mackerel, and Myctophid from the left.

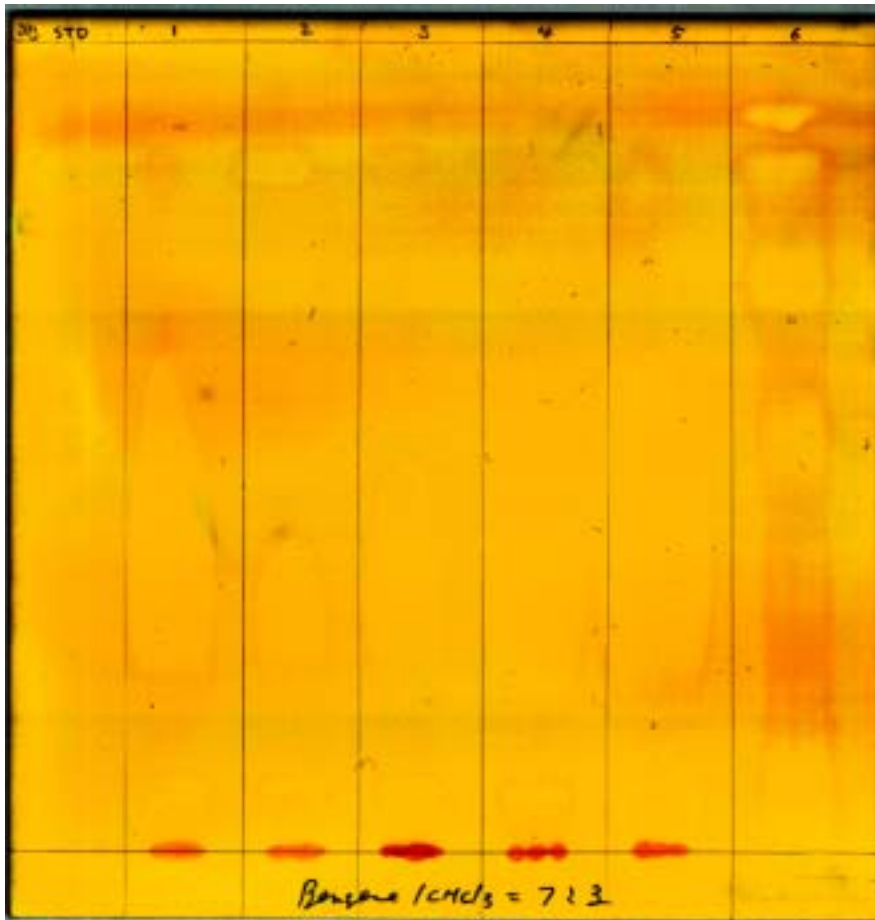


fig. 2. TLC chromatogram of total lipids extracted with chloroform/methanol(2:1) from various fish species containing wax esters using solvent system of benzene/chloroform (7:3, v/v). The chromatogram shows bands of Wax esters standard, Spanish Mackerel, Pollack, Horse Mackerel, Mackerel, Atka Mackerel, and Myctophid from the left.

2) Chloroform을 이용한 wax estes분리:

용매로서 순수 Chloroform을 이용하여 wax estes를 분리한 후 TLC를 이용하여 분리효율을 측정하였다. TLC solvent system으로 hexane/diethyl-ether(7:3, v/v)을 이용하였으며 TLC chromatogram은 Fig. 3과 같다. TLC를 이용하여 chloroform/methanol를 이용한 wax estes분리법과

Chloroform을 이용한 분리법을 비교해 볼 때 순수 Chloroform을 이용하였을 경우 편리하고 분리효율이 더 우수한 것으로 사료된다.

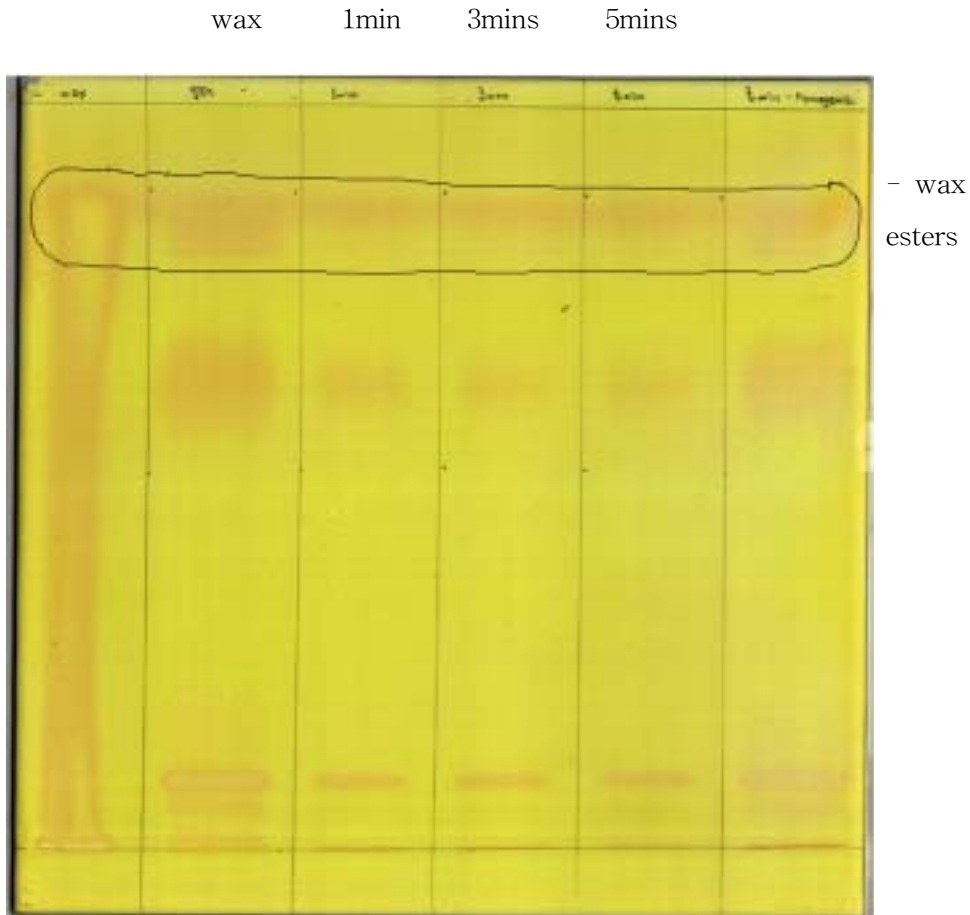


Fig. 3. TLC chromatogram of total lipids extracted with chloroform for 1, 3, 5 mins from Pollack containing wax esters using solvent system of hexane/diethyl ether(7:3, v/v). The chromatogram shows bands of Wax esters standard, 1, 3, and 5 mins of extracting time from the left.

나. Wax esters의 화학적 분해를 통한 지방산 분리:

1) 0.5% Methanolic sulfate(M/S)을 이용한 wax esters로부터 지방산

분리: Heating block(85℃)에서 2시간 동안 0.5% M/S을 이용하여 wax esters을 분해한후 지방산을 분리하여 GLC로 지방산조성을 측정한 결과는 Table 1의 A와 같다.

- 2) 실온에서 24시간 0.5% M/S를 이용한 wax esters분해 및 지방산 분리:  
0.5% M/S을 이용하여 실온에서 24시간 wax esters을 분해한 후 지방산을 분리하여 GLC로 지방산조성을 측정한 결과는 Table 1의 B와 같다.
- 3) 1% Methanolic sulfate(M/S) 방법을 이용한 wax esters의 분해 및 지방산 분리: 1% M/S을 이용하여 85℃에서 2시간 동안 wax esters을 분해한 후 지방산을 분리하여 GLC로 지방산조성을 측정한 결과는 Table 1의 C와 같다.
- 4) 3% M/S방법을 이용한 wax esters의 분해 및 지방산 분리:  
3% M/S을 이용하여 85℃에서 2시간 동안 wax esters을 분해한 후 지방산을 분리하여 GLC로 지방산조성을 측정한 결과는 Table 1의 D와 같다.
- 5) 0.05N NaOH을 이용한 wax esters의 분해 및 지방산 분리:  
0.05N NaOH을 이용하여 85℃에서 2시간 동안 wax esters을 분해한 후 지방산을 분리하여 GLC로 지방산조성을 측정한 결과는 Table 1의 E와 같다.
- 6) 0.1N NaOH을 이용한 wax esters의 분해 및 지방산 분리:  
0.1N NaOH을 이용하여 실온(25 C)에서 1시간 wax esters을 분해한 후 지방산을 분리하여 GLC로 지방산조성을 측정한 결과는 Table 1의 F와 같다.
- 7) 0.5N NaOH을 이용한 wax esters의 분해 및 지방산 분리:  
0.5N NaOH을 이용하여 실온(25 C)에서 1시간 wax esters을 분해한 후 지방산을 분리하여 GLC로 지방산조성을 측정한 결과는 Table 1의 G와 같다.

Table 1에서 볼 때 B항의 0.5% methanolic sulfuric acid를 이용하여 25 C 에서

24 시간 동안 분해했을 경우 가장 이상적으로 각종 지방산이 잘 분리되었으며 아울러 중요한 지방산인 20:4n-3와 DHA(22:6n-3) 등 의 지방산의 분리 수율도 상대적으로 다른 wax esters 분해법과 비교해볼 때 가장 바람직한 것으로 나타났다.

Table 1. Fatty acid composition of wax esters from Myctophid

Fatty acid	Composition (mol %)						
	A	B	C	D	E	F	G
14 : 0	1.1	0.1	0.5	0.6	tr	1.7	0.1
16 : 0	42.5	3.2	22.6	29.3	tr	14.9	2.1
16 : 1	0.7	tr	tr	0.1	tr	2.6	0.1
18 : 0	1.7	0.3	0.6	0.8	tr	5.0	0.2
18 : 1	4.9	0.7	1.4	1.8	tr	19.0	0.9
18 : 2n-6	1.3	0.2	0.1	0.2	tr	7.4	0.1
18 : 3n-6	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
18 : 3n-3	0.3	0.5	0.4	0.6	tr	0.4	0.1
18 : 4n-3	5.6	10.8	9.9	9.2	tr	4.1	12.2
20 : 1	0.6	1.2	1.4	0.7	tr	2.2	tr
20 : 3n-6	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
20 : 4n-6	0.4	tr	tr	0.9	tr	tr	0.2
20 : 4n-3	31.1	52.3	53.5	44.3	tr	21.7	67.3
20 : 5n-3	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
22 : 4n-6	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
22 : 5n-6	tr	tr	tr	tr	tr		
22 : 5n-3	tr	tr	tr	tr	tr		
22 : 6n-3	9.8	30.7	9.6	11.5	tr	21.0	16.7

A, hydrolyzed in 0.5% methanolic sulfuric acid for 5 hours at 85°C;

B, hydrolyzed in 0.5% methanolic sulfuric acid for 24 hours at 25°C;

C, hydrolyzed in 1% methanolic sulfuric acid for 2 hours at 85°C;

D, hydrolyzed in 3% methanolic sulfuric acid for 2 hours at 85°C;

E, hydrolyzed in 0.05N methanolic NaOH for 2 hours at 85°C;

F, hydrolyzed in 0.1N methanolic NaOH for 1 hours at 25°C;

G, hydrolyzed in 0.5N methanolic NaOH for 1 hours at 25°C.

- 8) 85°C에서 5시간 동안 0.1% M/S를 이용한 wax esters분해 및 지방산 분리: 0.1% M/S를 이용하여 85°C에서 5시간 동안 wax esters을 분해한 후 지방산을 분리하여 GLC로 지방산조성을 측정한 결과는 Table 2의 A와 같다.
- 9) 85°C에서 10시간 동안 0.1% M/S를 이용한 wax esters분해 및 지방산 분리: 0.1% M/S를 이용하여 85°C에서 5시간 동안 wax esters을 분해한 후 지방산을 분리하여 GLC로 지방산조성을 측정한 결과는 Table 2의 B와 같다.
- 10) 85°C에서 5시간 동안 0.05% M/S를 이용한 wax esters분해 및 지방산 분리: 0.05% M/S를 이용하여 85°C에서 5시간 동안 wax esters을 분해한 후 지방산을 분리하여 GLC로 지방산조성을 측정한 결과는 Table 2의 C와 같다.
- 11) 10% Methanolic formic acid을 이용한 wax esters의 분해 및 지방산 분리: 10% Methanolic formic acid을 이용하여 85°C에서 2시간 동안 wax esters을 분해한 후 지방산을 분리하여 GLC로 지방산조성을 측정한 결과는 Table 2의 D와 같다.
- 12) 20% Methanolic acetic acid을 이용한 wax esters의 분해 및 지방산 분리: 20% Methanolic acetic acid을 이용하여 85°C에서 2시간 동안 wax esters을 분해한 후 지방산을 분리하여 GLC로 지방산조성을 측정한 결과는 Table 2의 E와 같다.
- 13) 20% Methanolic propionic acid을 이용한 wax esters의 분해 및 지방산 분리: 20% Methanolic propionic acid을 이용하여 85°C에서 2시간 동안 wax esters을 분해한 후 지방산을 분리하여 GLC로 지방산조성을 측정한 결과는 Table 2의 F와 같다.

Table 2에서 볼 때 E항의 20% methanolic acetic acid 를 이용하여 85 C 에서 2 시간 동안 분해했을 경우 가장 이상적으로 각종 지방산이 잘 분리되었으며 아울러 가장 중요한 지방산인 DHA(22:6n-3)의 분리수율도 상대적으로 가장 높게 나타났다. 그러나 20:4n-3 지방산 이 A, B, C 항과 비교하여 볼때 낮았으며 이러한 결과는 20:4n-3 지방산을 함유한 wax esters 는 acetic acid에 의해서 alcohol과 지방산 간의 결합이 분리되지 않는 것으로 사료된다.

본 실험에서는 인체에 가장 필요한 지방산인 DHA(22:6n-3)의 상대적 분리 수율에 따라 E항의 20% methanolic acetic acid를 이용하여 85 °C 에서 2 시간 동안 분해했을 경우 가장 이상적인 것으로 판단할 수 있다.

Table 2. Fatty acid composition of wax esters from Myctophid

Fatty acid	Composition (mol %)					
	A	B	C	D	E	F
14 : 0	0.6	0.8	0.7	0.6	1.0	0.6
16 : 0	30.8	36.4	0.2	13.5	12.1	12.1
16 : 1	0.1	0.4	0.9	3.4	3.1	2.9
18 : 0	0.8	0.8		3.5	2.6	3.1
18 : 1	1.9	2.1	0.4	5.9	5.9	6.7
18 : 2n-6	0.2	0.2	0.2	1.0	1.0	1.0
18 : 3n-6		0.1		0.4		
18 : 3n-3	0.5	0.2		3.3	4.0	2.7
18 : 4n-3	9.1	5.5	13.2	2.3	4.6	3.3
20 : 1	0.2	0.3	1.5	3.8	4.6	5.1
20 : 3n-6				0.2		
20 : 4n-6				1.5	0.8	0.9
20 : 4n-3	31.9	35.7	57.3	2.6	3.1	4.5
20 : 5n-3				10.2	13.4	8.6
22 : 4n-6						
22 : 5n-6						
22 : 5n-3				1.1		1.0
22 : 6n-3				14.1	14.2	11.8

A, hydrolyzed in 0.1% methanolic sulfuric acid for 5 hours at 85°C;

B, hydrolyzed in 0.1% methanolic sulfuric acid for 10 hours at 85°C;

C, hydrolyzed in 0.05% methanolic sulfuric acid for 2 hours at 85°C;

D, hydrolyzed in 10% methanolic formic acid for 2 hours at 85°C;

E, hydrolyzed in 20% methanolic acetic acid for 2 hours at 85°C;

F, hydrolyzed in 20% methanolic propionic acid for 2 hours at 85°C;



## 제 2 절 2차년도 연구수행 방법 및 결과

### 1. 연구수행 방법

#### 가. Wax esters의 density 측정

- 1) TLC plate에 sample을 spotting 후 hexane/diethylether(7 : 3,v/v) 으로 포화되어 있는 TLC tank에 넣고 전개시킨다.
- 2) developing 후 TLC plate를 hood에서 완전히 건조시킨다.
- 3) Iodine fume으로 포화되어 있는 tank에 TLC plate를 넣는다.
- 4) 착색된 TLC plate를 Bio-rad GS-700 imaging Densitometer로 density를 측정한다.

#### 나. Wax esters로부터 Trans esterification에 의해 생산된 Methylsters의 elution 방법

- 1) 7개의 test tube에 sample을 넣고 6% Methanolic sulfate 6ml을 넣고 약 85°C에서 1.5hr 둔다.
- 2) 각의 tube에 ㉠pet.ether, ㉢diethylether, ㉣chloroform, ㉤hexane ㉥chloroform/methanol(2 : 1) ㉦hexane/isopropanol(1 : 1) ㉧pet. ether/diethylether(2 : 1)을 4ml 씩 넣고, vortex한다.
- 3) ㉠㉢㉧에는 H<sub>2</sub>O를 2ml씩 ㉣㉤㉦에는 1.3ml씩, ㉥에는 0.8ml을 첨가한후 vortex한다
- 4) 2200r.p.m.에서 20분간 centrifuge한다
- 5) N<sub>2</sub> dry 후 100 $\mu$ l씩 hexane을 넣는다.
- 6) GLC를 이용하여 지방산 조성을 관찰한다.

#### 다. Methylsters의 효율적 elution을 위한 혼합 용매의 Phase 형성확인

- 1) 6% Methanolic sulfate 5ml, chloroform 3ml, H<sub>2</sub>O 1ml을 첨가하고 vortex 후 phase 형성유무를 확인한다.
- 2) 6% Methanolic sulfate 5ml을 넣고, chloroform 5ml을 넣은 후, vortex한 후 H<sub>2</sub>O 1ml을 넣고 vortex 후 phase 형성 유무를 확인한다.
- 3) 6% Methanolic sulfate 5ml, chloroform 7ml, H<sub>2</sub>O 1ml을 첨가하고

vortex후 phase 형성 유무를 확인한다.

- 4) 6% Methanolic sulfate로 70°C에서 24hr 동안 Methylation 시킨다. 냉각 후, Methylation 된 것의 3ml씩을 6개의 test tube에 넣고 각 test tube에 hexane 3ml씩을 넣고 vortex한다.  
H<sub>2</sub>O를 각각의 test tube에 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3ml 넣고 vortex한다. 1500 r.p.m.에서 10분간 centrifuge한 후 phase 형성 유무를 확인한다.
- 5) 20% Methanolic propionic acid 5ml, hexane 2ml을 첨가하고 vortex후 phase 형성 유무를 확인한다.
- 6) 20% Methanolic propionic acid 5ml, hexane 1ml, H<sub>2</sub>O 2ml을 첨가하고 vortex후 phase 형성 유무를 확인한다.
- 7) 20% Methanolic propionic acid 5ml, hexane 2ml, H<sub>2</sub>O 2ml을 첨가하고 vortex후 phase 형성 유무를 확인한다.
- 8) 20% Methanolic propionic acid 5ml, chloroform 10ml, H<sub>2</sub>O 2ml을 첨가하고 vortex후 phase 형성 유무를 확인한다.

#### 라. Wax esters의 지방산 조성

- 1) 위의 실험(Methylesters의 효율적 elution을 위한 혼합 용매의 Phase 형성 확인)에서 phase가 형성된 methyl esters phase부분의 지방산 조성을 확인하기 위하여 pet. ether 3ml을 넣고 vortex한 후 H<sub>2</sub>O 1ml을 넣고 다시 vortex한다.
- 2) 상층액을 mini vial에 옮긴 후, N<sub>2</sub>로 건조한다.
- 3) 적정량을 GLC에 주입시켜 지방산을 측정한다.

#### 마. 추출 지방산을 이용한 실험동물 사양실험

실험동물(육계)사양실험을 통하여 분리지방산을 첨가하지 않은 대조구와 비교하여 elution 방법으로 DHA가 가장 많이 추출된 pet.ether을 이용하여 분리한 지방산을 첨가한 실험구의 분리지방산의 체내 축적율을 확인하기 위하여 Wax-esters로부터 분리한 지방산의 체내흡수율을 분석하였다.

## 2. 연구 결과

### 가. Wax esters의 density 측정



Fig.1. TLC plate에 sample을 spotting후 hexane/diethylether(7 : 3,v/v) 으로 포화되어 있는 TLC tank에 넣고 전개 시킨 TLC plate.

Table 1. Densitometer에 의한 Wax esters의 density 측정

Name	Type	Mean (OD)	Area (mm*mm)	Min (OD)	Max (OD)	Volume (OD*mm*mm)	Adj. Volume (OD*mm*mm)	% Volume
V1	Wax esters	0.136	628.81	0.091	0.226	8.5423e+1	1.1725e+1	97.60
V2	unknown	0.111	321.08	0.055	0.234	3.5763e+1	2.8811e-1	2.40
V3	background	0.097	142.91	0.063	0.357	1.3855e+1	-	-

Densitometer에 의한 Wax esters의 density 측정결과 상위 부분(V1)의 Wax esters가 97.6%로서 매우 효율적으로 분리되었다.

나. Wax esters로부터 Trans esterification에 의해 생산된 Methylsters의 elution 방법

실험방법에서와 같이 각각의 tube에 ①pet.ether, ②diethylether, ③chloroform, ④hexane ⑤chloroform/methanol(2 : 1) ⑥hexane/isopropanol(1 : 1) ⑦pet. ether/diethylether(2 : 1)을 4ml씩 넣고 ①②③에는 H<sub>2</sub>O를 2ml씩 ④⑤⑥에는 1.3ml씩, ⑦에는 0.8ml을 첨가한후 vortex하여 2200r.p.m.에서 20분간 centrifuge한후 N<sub>2</sub> 건조후 100 $\mu$ l씩 hexane을 넣은다음 일부를 GLC에 주사하여 지방산 조성을 측정 한 결과 ①④⑦에는 지방산조성이 측정 되었으나 나머지 elution 방법에서는 지방산이 충분히 측정되지 않았다. 따라서 elution 방법으로 ①④⑦가 바람직한 것으로 간주된다.

#### 다. Methylsters의 효율적 elution을 위한 혼합 용매의 Phase 형성확인

실험방법에서와 같이 각종 실험을 수행한 결과 6% Methanolic sulfate로 70℃에서 24hr 동안 Methylation 시킨다. 냉각후, Methylation 된 것의 3ml씩을 6개의 test tube에 넣고 각 test tube에 hexane 3ml씩을 넣고 vortex한후 다시 H<sub>2</sub>O를 각각의 test tube에 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3ml 넣고 vortex한 후 1500 r.p.m.에서 10분간 centrifuge한 후 phase 형성유무를 확인한 결과 Fig.2에서와 같이 Phase 형성이 잘 이루어 졌음을 알 수 있다.



Fig.2. 6% Methanolic sulfate로 70℃에서 24hr 동안 Methylation 시킨후 hexane 3ml씩을 넣고 vortex한 후 H<sub>2</sub>O를 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3ml 넣은 후 나타난 phase 형성결과.

그외에 20% Methanolic propionic acid 5ml, hexane 1ml, H<sub>2</sub>O 2ml을 첨가했을 경우, 20% Methanolic propionic acid 5ml, hexane 2ml, H<sub>2</sub>O 2ml을 첨가했을 경우, 20% Methanolic propionic acid 5ml, chloroform 10ml, H<sub>2</sub>O 2ml을 첨가했을 경우 phase 형성이 잘 이루어진 것으로 나타났다.

라. Wax esters의 지방산 조성

Wax esters로부터 Trans esterification에 의해 생산된 Methylesters의 효율적인 elution 방법으로 간주된 ①pet.ether ②hexane ③pet. ether/diethylether(2 : 1,v/v)의 지방산조성을 측정 한 결과는 Table 2에서 보여주고 있다. 지방산 조성이 3가지 방법 모두 유사하게 나타났으며 Methylesters의 elution 방법으로 바람직한 것으로 나타났으며 DHA(22:6n-3)는 각각 79.3, 69.9, 75.2 로 나타났다.

Table 2. Wax esters로부터 유도된 Methylesters의 효율적인 elution 방법으로 pet.ether, hexane, pet. ether/diethylether(2 : 1,v/v)을 이용했을 경우의 지방산조성

Fatty acid	Composition(mol%)		
	A	B	C
14:0	0.2	0.4	0.2
16:0	2.7	4.2	2.3
16:1	0.4	0.9	0.4
18:0	0.7	1.5	0.4
18:1	2.5	4.8	2.5
18:2n-6	0.1	0.2	0.2
18:3n-3	0.1	tr	0.1
20:1	0.6	0.1	1.0
20:4n-6	0.2	0.3	0.4
22:0	0.4	1.2	tr
22:6n-3	79.3	69.9	75.2

A, Eluted by Pet. ether B, Eluted by Hexane C, Eluted by Pet. ether/Diethylether (2 : 1, v/v).

마. 추출 지방산을 이용한 실험동물 사육실험

Table 3에서 다리근육과 가슴근육 모두에서 분리지방산이 첨가되지 않은 사료를 먹인 집단보다 분리 지방산이 포함되어 있는 사료를 먹인 집단에서 DHA의 함량이 높게 나타난 것을 알 수 있다.

Table 3. Fatty acid composition of chicken affected by diet enriched with fatty acids extracted by pet.ether from wax-esters

Fatty acid	Composition(mol%)			
	leg		chest	
	Control <sup>a</sup>	Experimental <sup>b</sup>	Control <sup>a</sup>	Experimental <sup>b</sup>
14 : 0	0.7	1.3	0.7	1.3
14 : 1	0.3	0.3	0.4	0.1
15 : 0	0.1	0.1	0.2	0.1
16 : 0	19.1	20.1	19.5	23.7
16 : 1	9.8	6.6	10.1	3.9
18 : 0	8.2	5.6	8.4	6.7
18 : 1	32.8	27.6	32.1	24.1
18 : 2n-6	24.7	20.4	24.7	19.3
18 : 3n-3	1.6	3.0	1.2	2.2
18 : 4n-3	tr	tr	0.1	tr
20 : 1	0.5	0.9	0.3	0.7
20 : 2n-6	0.1	tr	0.1	tr
20 : 3n-6	tr	tr	tr	tr
20 : 4n-6	0.9	2.0	1.1	2.4
20 : 5n-3	0.1	1.7	0.1	2.0
22 : 1	0.1	0.4	0.1	0.3
22 : 4 plus	0.2	0.2	0.2	0.3
22 : 5n-6				
22 : 5n-3	tr	tr	tr	tr
22 : 6n-3	0.2	8.9	0.4	11.7
Uniden	0.6	0.9	0.3	1.2
n-6/n-3	13.6	2.1	15.2	1.7

<sup>a</sup> No fatty acids were added into feedstuffs for chicken.

<sup>b</sup> Fatty acids, extracted by pet.ether from wax-esters, were added into feedstuffs for chicken.

### 제 3 절 3차년도 연구수행 방법 및 결과

#### 1. 연구수행 방법

가. 실험재료: 육계, Bee wax,

나. n-3 지방산 축적 계육 생산

Myctophid로부터 추출한 지방산으로부터 EPA와 DHA가 축적된 계육을 생산하기 위하여 DHA를 포함하는 사료와 Bee wax의 esters를 포함한 사료를 조제하였다.(Table 1). 우선 육계 20마리를 4주간 사양하여 도체의 가슴과 다리살의 지방산 조성을 GLC을 이용하여 분석하였다.

Table 1. Composition of diet for chicken(broiler)

INGREDIENT	AMOUNT %	MIN %	MAX %	COST /Tne	REST COST	LOW RANGE	HIGH RANGE
CORN (USA)	62.1518	60.0000		147.29		24.00	171.34
SOYBEAN ML 44%	23.0000	23.0000	25.0000	249.00	1.027	146.30	
Added POWDER (80/20)	6.5000	5.8000	6.5000	.00	1.468		146.79
C.G.M 60% (PUGIN)	3.0000	3.0000	4.0000	300.00	2.026	147.37	
MEAT&BONE ML 50%	3.0000	3.0000		200.00	1.919	98.05	
LIMESTONE 20	.8482	.8000		34.00			147.29
D.C.P (18%)	.8000	.8000		270.00	1.950	75.01	
SALT (HANJOO)	.4000	.4000		172.00	.246	147.42	
VIT-MIN (BRO)	.2000	.2000		800.00	6.526	147.42	
DL-METHIONINE 50%	.1000	.1000	1.0000	950.00	18.03	147.42	
NUTRIENT SOLUTION:							
NUTRIENT	UNIT	ANALYSIS	MIN	MAX	INCR	R-COST	
WEIGHT	%	1.000	1.000	1.000	.01	1.474	
C. PROTEIN	%	18.533	18.400				
C. FAT	%	6.825	6.000				
C. FIBER	%	3.263		6.000			
C. ASH	%	5.079					
CA	%	1.060	1.000	1.960	010	.329	
TP	%	.608	.600				
AVP	%	.391					
CA/P RATIO	%	1.742					
ME	Kcal/kg	3108.95	3100.00				
(POULTRY)	%	1.093	0	2.000			
ARGININE	%	.878		2.000			
LYSINE	%						

- to be continued -

METH+CYS	%	.690		
METHIONINE	%	.392		2.000
THYRONINE	%	.692		2.000
TRYPTOPHAN	%	.218	.140	2.000
Na	%	.242		2.000
Cl	%	.303		.500
K	%	.683		.500
Mg	%	.136		.800
S	%	.216		
VITAMIN E	IU/kg			
VITAMIN A	IU/kg	4400.00		
XANTHOPHYL	IU/kg	13.823		
L	mg/kg	.132		30.000
BIOTIN	mg/kg	949.234		1.000
CHOLINE	%	19.462		3000.000
PIF	%	0.622		
N - 6	%	2.231		
N - 3	mg/kg	6342.80		
DHA				

#### 다. 부위별 지방종 분석

계육의 부위(다리 및 가슴 부위)를 총지질추출용으로 사용하였다. 총지질추출을 위하여 시료를 chloroform/methanol (2:1, v/v) 용액에 넣고 Polytron homogenizer 로 균질화 한 후 이중층을 만들어 하층에 존재하는 총지질을 수집하였다. 중성지질을 분리하기 위하여 중성지질용 thin layer chromatography (TLC) 를 이용하였으며 TLC plate 는 Merck 회사의 Art. 5721의 silica gel 60으로 20X20cm plate (without fluorescein indicator) 에 0.25mm 도포두께를 사용하였다. 전개용매로서 heptane/isopropyl ether/acetic acid (60:40:3, v/v/v) 혼합용액을 TLC 용매조에 넣고 1~2시간 방치하여 포화시켰다. TLC 판의 하단부로부터 1.5cm 지점에 hemilton syringe로 2ml chloroform/methanol (2:1, v/v) 혼합용액에 용해되어 있는 총지질을 일정량 점적한 다음 hood내에서 완전히 건조시켜 TLC 판을 용매조에 넣고 상단부로부터 1cm 지점까지 전개하였다. 전개가 완료된 plate를 2, 7-dichlorofluoresceine indicator 와 28% ammonium hydroxide 증기로 노출시켜 중성지질 band가 선명하게 보이도록 한 뒤 자외선 아래에서 각종 중성지질 band를 standard Rf치와 비교하여 확인하였다.

극성지질 분리를 위하여 총지질로부터 thin layer chromatography (TLC) 를 이용하였으며 TLC plate는 중성지질용과 같은 것을 사용하였다. 각조직 총지질이 함



유된 C/M 혼합용액 일정량씩 고르게 TLC plate에 점적한 다음 chloroform/methanol/acetic acid/H<sub>2</sub>O (50:37.5:3.5:2, v/v/v/v) 이 혼합된 용매를 이용하여 각종 극성지질을 분리하였다. 전개된 TLC plate는 건조 후 2,7-dichlorofluorescein 용액으로 분무한 후 28% ammonium hydroxide 의 증기에 노출 시킴으로서 극성지질 밴드가 더욱 선명하게 보이도록 유도한 다음 자외선광 (UV lamp) 아래에서 standard Rf치와 비교하여 각종 극성지질 종을 동정하였다. TLC plate에서 분리된 각종 중성지질과 sphingomyelins (SM), choline glycerophospholipids (CGP), serine glycerophospholipids (SGP), inositol glycerophospholipids (IGP), ethanolamine glycerophospholipids (EGP), total neutral lipids (TNL) 등은 acyl chain 분석용으로 이용하였다.

#### 라. Acyl-chain 분석

총지질을 분리한 후 TLC로 각종 중성지질과 인지질을 분리한 후 분리 동정된 TLC plate의 각종 인지질 band를 수집하여 시험관에 담고 10 $\mu$ l internal standard 15:0와 6% methanolic- sulfuric acid를 첨가하여 90 $^{\circ}$ C 항온 수조에서 90분간 메틸화(methylation) 시켰다. 메틸화된 지방산을 분리하기 위해 pet·ether를 넣고 교반한 후 H<sub>2</sub>O를 첨가하여 2000rpm으로 원심분리한 다음 상층액 (pet·ether 층) 만을 분리하였다. Gas-liquid chromatography (GLC) 로 분석하기 위해서 질소가스로 ether를 휘발시키고 hexane으로 다시 용해하여 지방산을 분석하였다. GLC의 분석은 Shimadzu GC14A gas chromatograph (Shimadzu Co. Japan) 을 사용하였으며 분석조건은 detector temperature 250 $^{\circ}$ C, injector temperature 240 $^{\circ}$ C, column initial temperature 220 $^{\circ}$ C, column final temperature 220 $^{\circ}$ C, 공기압력 0.5kg/cm, 수소압력 0.5kg/cm, 질소압력 0.25kg/cm, chart speed 2mm/min이 되도록 조정하여 지방산을 분석하였다. GLC용 column은 DB-225 megabor column (J&W Scientific, USA) 를 이용하였고 분리된 지방산은 Nuchek standard (Nuchek prep., Elysian, USA) GLC-87과 GLC-68로 동정하였다.

## 2. 연구결과

가. DHA를 첨가한 사료와 WAX esters를 첨가하여 조제한 사료의 지방산 조성은 table 1과 같으며, DHA를 첨가한 사료에서 DHA가 4.3%으로 WAX 첨가 사료에 비해 높은 비율을 차지하였다.

Table 1. Fatty acid composition of DHA and WAX diets

Fatty acid <sup>a</sup>	Composition(wt%)	
	DHA	WAX
14:0	1.86	0.94
16:0	23.64	21.67
16:1	1.89	1.19
17:0	0.51	0.24
18:0	6.15	6.76
18:1	28.85	30.19
18:2n-6	<b>29.02</b>	<b>36.26</b>
18:3n-3	1.53	2.53
20:0	0.31	0.24
20:5n-3	<b>1.22</b>	tr
22:5n-3	<b>0.11</b>	tr
22:6n-3	<b>4.33</b>	tr
uniden. <sup>b</sup>	0.59	tr

<sup>a</sup> Other minor fatty acids have been excluded.

<sup>b</sup> Unidentified fatty acids

나. Table 2에 나타나 있는 것처럼 육계의 가슴근육에서 DHA를 포함한 사료를 먹은 집단에서 WAX를 포함하는 사료를 먹은 집단보다 DPA와 DHA가 1.0%, 5.4%로 더 높게 나타났으며, 유의차가 인정되었다.

Table 2. Fatty acid composition of total lipid in chest muscle from chicken<sup>a</sup>

Fatty acid <sup>b</sup>	Composition(mol%)	
	DHA	WAX
14:0	0.8 ± 0.06	0.5 ± 0.03 *
16:0	30.4 ± 0.8	28.6 ± 0.4 *
16:1	3.8 ± 0.6	3.4 ± 0.2
17:0	0.1 ± 0.1	0.05 ± 0.03
18:0	11.3 ± 0.8	10.4 ± 0.2
18:1	30.2 ± 1.1	30.1 ± 0.7
18:2n-6	12.2 ± 0.5	16.7 ± 0.5 *
18:3n-3	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.03 *
20:0	0.03 ± 0.03	0.02 ± 0.02
20:1	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1
20:2n-6	tr	0.1 ± 0.1
20:3n-6	0.4 ± 0.1	0.9 ± 0.1 *
20:4n-6	2.5 ± 0.4	5.8 ± 0.4 *
20:5n-3	1.2 ± 0.2	0.3 ± 0.1 *
22:0	2.8 ± 2.8	tr
22:5n-3	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.1 **
22:6n-3	5.4 ± 0.3	1.2 ± 0.2 *
uniden <sup>c</sup>	0.5 ± 0.1	2.3 ± 0.2 *

<sup>a</sup> Values represent means±S.E. for six animals/DHA group and nine animals/WAX group.

<sup>b</sup> Other minor fatty acids have been excluded.

<sup>c</sup> Unidentified fatty acids

\* Indicates a significant difference from the DHA group, p<0.01

\*\* Indicates a significant difference from the DHA group, p<0.05

다. 육계의 다리근육에서는 table 3에서와 같이 DHA가 DHA 와 WAX 집단에서 각각 4.2%와 0.6%로 유의차가 인정되었다.

Table 3. Fatty acid composition of total lipid in leg muscle from chicken<sup>a</sup>

Fatty acid <sup>b</sup>	Composition(mol%)	
	DHA	WAX
14:0	0.9 ± 0.02	0.5 ± 0.02 *
16:0	29.3 ± 0.6	25.5 ± 0.4 *
16:1	4.5 ± 0.5	4.0 ± 0.2
17:0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.04
18:0	11.3 ± 0.5	11.4 ± 0.4
18:1	31.0 ± 1.0	30.4 ± 0.6
18:2n-6	13.6 ± 0.5	18.2 ± 0.4 *
18:3n-3	0.4 ± 0.02	0.5 ± 0.02 **
20:1	0.1 ± 0.1	0.04 ± 0.04
20:2n-6	0.04 ± 0.04	tr
20:3n-6	0.2 ± 0.1	0.7 ± 0.1 *
20:4n-6	1.9 ± 0.2	5.0 ± 0.3 *
20:5n-3	0.7 ± 0.03	0.1 ± 0.04 *
22:5n-3	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1
22:6n-3	4.2 ± 0.8	0.6 ± 0.2 *

<sup>a,b,\*\*\*</sup> See Table 2 for description.

라. 육계의 가슴근육으로부터 중성지방중에 따른 지방산 조성은 table 4, 5, 6, 7 그리고 8 과 같다. 1,2-diaclyglycerol(1,2 DG)와 1,3-diacylglycerol(1,3 DG)에서 DHA를 포함한 사료를 먹은 집단에서 DHA가 높게 나타났으며, 유의차가 인정되었다.

Table 4. Fatty acid composition of three subclasses of 1,2 DG in chest muscle of chicken fed the DHA and WAX diets.<sup>a</sup>

Fatty acid <sup>b</sup>	Composition(mol%)	
	DHA	Wax
14:0	0.4 ± 0.4	0.7 ± 0.3
16:0	27.3 ± 1.6	27.8 ± 2.4
16:1	6.8 ± 0.9	4.8 ± 0.7
18:0	14.2 ± 1.2	13.2 ± 1.0
18:1	33.7 ± 0.5	38.7 ± 1.8
18:2n-6	10.4 ± 0.2	9.9 ± 0.6
20:1	tr	0.4 ± 0.2
20:2n-6	0.1 ± 0.1	0.7 ± 0.03 *
20:3n-6	0.5 ± 0.2	1.0 ± 0.1
20:4n-6	2.3 ± 0.3	2.4 ± 0.3
22:1	0.3 ± 0.2	tr
22:5n-3	0.5 ± 0.3	tr
22:6n-3	2.1 ± 0.4	tr *

<sup>a</sup> Values represent means±S.E. for three animals/group.

<sup>b</sup> Other minor fatty acids have been excluded.

<sup>c</sup> Unidentified fatty acids

\* Indicates a significant difference from the DHA group, p<0.01

Table 5. Fatty acid composition of three subclasses of 1,3 DG in chest muscle of chicken fed the DHA and WAX diets.<sup>a</sup>

Fatty acid <sup>b</sup>	Composition(mol%)	
	DHA	Wax
14:0	1.5 ± 0.2	0.9 ± 0.4
16:0	27.3 ± 0.7	28.9 ± 1.5
16:1	10.6 ± 0.9	7.8 ± 0.5
18:0	10.2 ± 0.2	9.7 ± 0.4
18:1	36.9 ± 0.7	44.3 ± 2.9
18:2n-6	5.9 ± 0.2	5.2 ± 0.3
20:4n-6	0.9 ± 0.5	1.5 ± 0.4
22:1	0.6 ± 0.3	tr
22:5n-3	1.3 ± 0.4	0.4 ± 0.2
22:6n-3	3.7 ± 0.4	0.3 ± 0.2 *
uniden. <sup>c</sup>	0.8 ± 0.4	0.8 ± 0.4

<sup>a,b,c,\*</sup> See Table 4 for description.

Table 6. Fatty acid composition of three subclasses of FFA in chest muscle of chicken fed the DHA and WAX diets.<sup>a</sup>

Fatty acid <sup>b</sup>	Composition(mol%)	
	DHA	Wax
14:0	0.6 ± 0.3	0.9 ± 0.1
16:0	26.5 ± 2.0	32.4 ± 2.7
16:1	5.5 ± 0.2	4.2 ± 0.6
17:0	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.2
18:0	14.3 ± 1.0	15.0 ± 0.8
18:1	31.6 ± 0.9	29.6 ± 0.6
18:2n-6	9.0 ± 0.5	8.6 ± 1.1
20:0	tr	0.1 ± 0.1
20:1	tr	0.3 ± 0.2
20:2n-6	tr	0.1 ± 0.1
20:3n-6	0.7 ± 0.04	0.9 ± 0.1
20:4n-6	3.7 ± 0.6	4.4 ± 1.1
20:5n-3	1.7 ± 0.6	0.1 ± 0.1
22:5n-3	0.9 ± 0.3	0.5 ± 0.3
22:6n-3	4.7 ± 1.5	1.0 ± 0.6
uniden <sup>c</sup>	63.0 ± 28.1	29.3 ± 12.4

<sup>a,b,c</sup> See Table 4 for description.

Table 7. Fatty acid composition of three subclasses of TG in chest muscle of chicken fed the DHA and WAX diets.<sup>a</sup>

Fatty acid <sup>b</sup>	Composition(mol%)		
	DHA	Wax	
14:0	1.1 ± 0.1	0.8 ± 0.1	**
16:0	25.9 ± 0.7	24.7 ± 0.8	
16:1	6.7 ± 0.5	6.4 ± 0.2	
17:0	0.3 ± 0.01	0.1 ± 0.1	
18:0	7.8 ± 0.7	7.3 ± 0.2	
18:1	42.4 ± 0.5	43.9 ± 0.7	
18:2n-6	13.9 ± 0.7	15.7 ± 0.8	
18:3n-3	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.03	
20:3n-6	0.1 ± 0.04	0.04 ± 0.04	
20:4n-6	0.3 ± 0.04	0.2 ± 0.03	
20:5n-3	0.4 ± 0.1	tr	**
22:5n-3	0.1 ± 0.04	tr	
22:6n-3	0.4 ± 0.2	tr	

<sup>a</sup> Values represent means±S.E. for three animals/group.

<sup>b</sup> Other minor fatty acids have been excluded.

\*\* Indicates a significant difference from the DHA group,  $p < 0.05$



Table 8. Fatty acid composition of three subclasses of CE in chest muscle of chicken fed the DHA and WAX diets.<sup>a</sup>

Fatty acid <sup>b</sup>	Composition(mol%)	
	DHA	Wax
12:0	1.2 ± 0.6	tr
14:0	1.0 ± 0.5	0.3 ± 0.3
14:1	3.2 ± 1.7	1.6 ± 0.8
16:0	14.8 ± 1.2	14.4 ± 0.8
16:1	38.7 ± 5.0	36.2 ± 2.2
18:0	5.5 ± 0.5	4.6 ± 0.4
18:1	17.4 ± 1.6	24.0 ± 1.9
18:2n-6	16.4 ± 1.6	17.8 ± 0.3
20:3n-6	tr	0.4 ± 0.2
20:4n-6	tr	0.8 ± 0.4
20:5n-3	0.4 ± 0.4	tr

<sup>a,b</sup> See Table 4 for description.

마. Table 9, 10, 11, 12 그리고 13에서는 육계의 다리근육으로부터 분리한 중성지방종에 따른 지방산 조성을 나타낸다. 1,3 DG, free fatty acid(FFA)에서 DHA는 두 집단간에 유의차를 보였다. Cholesterol ester에서 DPA와 DHA가 WAX group보다 DHA group에서 유의차가 인정되었다.

Table 9. Fatty acid composition of three subclasses of 1,2 DG in leg muscle of chicken fed the DHA and WAX diets.<sup>a</sup>

Fatty acid <sup>b</sup>	Composition(mol%)	
	DHA	Wax
14:0	1.0 ± 0.1	0.3 ± 0.3
16:0	28.4 ± 1.4	28.9 ± 0.8
16:1	5.7 ± 0.5	5.0 ± 0.3
18:0	14.5 ± 1.4	13.0 ± 1.1
18:1	34.1 ± 1.3	32.9 ± 0.5
18:2n-6	12.3 ± 1.7	15.6 ± 0.2
20:3n-6	0.2 ± 0.2	0.9 ± 0.1 **
20:4n-6	1.6 ± 0.2	3.0 ± 0.1 *
22:6n-3	1.2 ± 0.7	tr
uniden. <sup>c</sup>	1.0 ± 1.0	0.2 ± 0.2

<sup>a</sup> Values represent means±S.E. for three animals/group.

<sup>b</sup> Other minor fatty acids have been excluded.

<sup>c</sup> Unidentified fatty acids

\* Indicates a significant difference from the DHA group, p<0.01

\*\* Indicates a significant difference from the DHA group, p<0.05

Table 10. Fatty acid composition of three subclasses of 1,3 DG in leg muscle of chicken fed the DHA and WAX diets.<sup>a</sup>

Fatty acid <sup>b</sup>	Composition(mol%)	
	DHA	Wax
14:0	0.7 ± 0.4	0.5 ± 0.5
16:0	29.2 ± 1.1	27.9 ± 1.1
16:1	9.9 ± 0.3	10.2 ± 0.5
18:0	11.1 ± 0.2	9.8 ± 0.9
18:1	35.0 ± 1.5	38.2 ± 0.8
18:2n-6	8.4 ± 0.3	7.8 ± 0.3
20:4n-6	1.2 ± 0.6	2.6 ± 0.3
22:5n-3	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
22:6n-3	3.5 ± 0.6	0.7 ± 0.02 *
uniden. <sup>c</sup>	tr	1.1 ± 0.6

<sup>a,b,c,\*</sup> See Table 9 for description.

Table 11. Fatty acid composition of three subclasses of FFA in leg muscle of chicken fed the DHA and WAX diets.<sup>a</sup>

Fatty acid <sup>b</sup>	Composition(mol%)	
	DHA	Wax
14:0	0.6 ± 0.03	0.2 ± 0.2
16:0	24.3 ± 0.2	23.1 ± 0.9
16:1	4.4 ± 0.2	4.0 ± 0.6
17:0	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1
18:0	13.5 ± 1.2	12.7 ± 1.2
18:1	35.3 ± 1.6	32.5 ± 0.5
18:2n-6	13.7 ± 1.1	17.3 ± 0.3 **
20:1	tr	0.1 ± 0.1
20:3n-6	0.3 ± 0.2	1.0 ± 0.2 **
20:4n-6	3.5 ± 0.9	6.2 ± 0.6
20:5n-3	0.6 ± 0.3	0.1 ± 0.1
22:5n-3	0.4 ± 0.04	0.5 ± 0.02
22:6n-3	2.9 ± 0.6	0.7 ± 0.1 **
uniden <sup>c</sup>	0.4 ± 0.4	1.2 ± 0.1

<sup>a,b,c,\*\*</sup> See Table 9 for description.

Table 12. Fatty acid composition of three subclasses of TG in leg muscle of chicken fed the DHA and WAX diets.<sup>a</sup>

Fatty acid <sup>b</sup>	Composition(mol%)	
	DHA	Wax
12:0	0.3 ± 0.3	1.2 ± 0.6
14:0	0.3 ± 0.3	0.7 ± 0.6
14:1	3.5 ± 0.1	3.5 ± 0.4
16:0	14.9 ± 1.2	14.2 ± 0.7
16:1	39.2 ± 8.0	34.5 ± 4.1
18:0	5.0 ± 0.6	4.8 ± 0.7
18:1	20.3 ± 0.5	19.9 ± 2.1
18:2n-6	14.5 ± 0.7	18.2 ± 2.8
18:3n-3	0.2 ± 0.2	1.0 ± 0.1 **
20:3n-6	tr	0.4 ± 0.2
20:4n-6	0.3 ± 0.3	1.1 ± 0.5
20:5n-3	0.2 ± 0.2	tr
22:1	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.1
22:6n-3	0.9 ± 0.5	tr

<sup>a,b,\*\*</sup> See Table 9 for description.

Table 13. Fatty acid composition of three subclasses of CE in leg muscle of chicken fed the DHA and WAX diets.<sup>a</sup>

Fatty acid <sup>b</sup>	Composition(mol%)	
	DHA	Wax
14:0	1.0 ± 0.04	0.8 ± 0.04 **
14:1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1
16:0	25.9 ± 0.5	25.9 ± 1.0
16:1	6.1 ± 0.5	6.8 ± 0.5
18:0	8.1 ± 0.7	8.3 ± 0.9
18:1	41.8 ± 0.5	40.0 ± 1.2
18:2n-6	14.4 ± 0.3	16.7 ± 1.0
18:3n-3	0.6 ± 0.03	0.8 ± 0.1
20:2n-6	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.04
20:3n-6	0.1 ± 0.04	0.1 ± 0.04
20:4n-6	0.3 ± 0.03	0.1 ± 0.1
20:5n-3	0.4 ± 0.04	tr *
22:5n-3	0.2 ± 0.03	tr *
22:6n-3	0.9 ± 0.1	tr *

<sup>a,b,c,\*,\*\*</sup> See Table 9 for description.

바. 육계의 가슴근육 중 극성지질종을 분리하여 그에 결합되어 있는 지방산 조성을 table 14, 15, 16 그리고 17에 나타내었다. Phosphatidylcholine(PC), phosphatidylserine(PS) 그리고 phosphatidylethanolamine(PE)에서 DHA group에서 DHA가 WAX group에 비해 높으나, 유의차가 인정되지 않았다.

Table 14. Fatty acid composition of three subclasses of PC in chest muscle of chicken fed the DHA and WAX diets.<sup>a</sup>

Fatty acid <sup>b</sup>	Composition(mol%)	
	DHA	Wax
14:0	0.3 ± 0.2	tr
16:0	33.2 ± 3.5	29.6 ± 1.0
16:1	1.4 ± 0.6	2.0 ± 0.3
18:0	9.1 ± 1.1	7.3 ± 0.2
18:1	25.5 ± 1.3	27.2 ± 0.3
18:2n-6	17.5 ± 0.8	20.2 ± 0.6
20:1	0.1 ± 0.9	0.4 ± 0.1
20:2n-6	0.1 ± 0.1	0.8 ± 0.2
20:3n-6	1.0 ± 0.1	2.1 ± 0.5
20:4n-6	3.1 ± 0.8	6.3 ± 0.8 **
20:5n-3	1.8 ± 0.7	0.4 ± 0.03
22:5n-3	1.7 ± 0.6	0.8 ± 0.1
22:6n-3	4.4 ± 1.4	0.7 ± 0.1
uniden <sup>c</sup>	0.4 ± 0.2	2.1 ± 0.4 **

<sup>a,b,c,\*\*</sup> See Table 9 for description.

Table 15. Fatty acid composition of three subclasses of PS in chest muscle of chicken fed the DHA and WAX diets.<sup>a</sup>

Fatty acid <sup>b</sup>	Composition(mol%)	
	DHA	Wax
16:0	16.3 ± 5.1	11.9 ± 0.3
16:1	8.9 ± 1.1	8.0 ± 0.4
17:0	0.8 ± 0.1	0.3 ± 0.3
18:0	42.0 ± 4.2	38.8 ± 0.5
18:1	12.0 ± 0.6	15.1 ± 0.3 *
18:2n-6	7.9 ± 0.8	11.3 ± 1.1
20:0	1.3 ± 0.5	0.3 ± 0.3
20:3n-6	0.7 ± 0.4	2.9 ± 0.7
20:4n-6	1.2 ± 0.6	3.5 ± 0.3 **
22:0	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.3
22:1	0.7 ± 0.4	0.2 ± 0.2
22:5n-3	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.3
22:6n-3	4.3 ± 2.1	1.9 ± 0.4
uniden <sup>c</sup>	0.4 ± 0.4	4.4 ± 1.0 **

<sup>a,b,c,\*,\*\*</sup> See Table 9 for description.



Table 16. Fatty acid composition of three subclasses of PI in chest muscle of chicken fed the DHA and WAX diets.<sup>a</sup>

Fatty acid <sup>b</sup>	Composition(mol%)	
	DHA	Wax
16:0	9.7 ± 3.7	5.5 ± 0.6
16:1	8.1 ± 2.3	5.2 ± 0.2
17:0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1
18:0	56.9 ± 6.4	48.7 ± 3.0
18:1	7.5 ± 1.4	8.6 ± 0.5
18:2n-6	3.4 ± 0.8	3.8 ± 0.2
20:3n-6	2.0 ± 0.5	5.6 ± 1.5
20:4n-6	10.3 ± 5.4	21.6 ± 3.1
20:5n-3	0.5 ± 0.5	tr
22:5n-3	0.8 ± 0.8	tr
22:6n-3	0.4 ± 0.4	tr

<sup>a,b</sup> See Table 9 for description.

Table 17. Fatty acid composition of three subclasses of PE in chest muscle of chicken fed the DHA and WAX diets.<sup>a</sup>

Fatty acid <sup>b</sup>	Composition(mol%)		
	DHA	Wax	
16:0	13.2 ± 2.2	6.7 ± 0.3	
16:1	2.9 ± 0.7	0.6 ± 0.6	
17:0	0.9 ± 0.02	tr	*
18:0	36.7 ± 3.1	23.0 ± 2.4	**
18:1	20.5 ± 0.2	15.8 ± 1.5	
18:2n-6	9.8 ± 0.8	11.6 ± 0.9	
20:1	tr	0.6 ± 0.1	
20:3n-6	tr	1.6 ± 0.5	
20:4n-6	6.6 ± 0.7	21.3 ± 1.7	*
20:5n-3	1.8 ± 0.6	1.1 ± 0.2	
22:2n-6	tr	0.4 ± 0.2	
22:5n-3	0.8 ± 0.1	2.6 ± 0.1	*
22:6n-3	6.9 ± 0.9	5.3 ± 0.4	
uniden <sup>c</sup>	tr	9.2 ± 0.7	*

<sup>a,b,c,\*,\*\*</sup> See Table 9 for description.

Table 18. Fatty acid composition of three subclasses of PC in leg muscle of chicken fed the DHA and WAX diets.<sup>a</sup>

Fatty acid <sup>b</sup>	Composition(mol%)	
	DHA	Wax
14:0	0.2 ± 0.1	tr
16:0	29.9 ± 1.5	27.0 ± 2.1
16:1	1.3 ± 0.7	1.7 ± 0.2
17:0	0.2 ± 0.1	tr
18:0	15.3 ± 2.0	13.3 ± 0.4
18:1	21.9 ± 2.2	24.9 ± 1.8
18:2n-6	21.2 ± 1.6	24.3 ± 0.3
20:3n-6	0.6 ± 0.1	1.3 ± 0.1 **
20:4n-6	2.6 ± 0.3	5.4 ± 0.9 **
20:5n-3	0.8 ± 0.2	0.5 ± 0.5
22:5n-3	1.2 ± 0.4	0.6 ± 0.1
22:6n-3	3.7 ± 1.0	0.6 ± 0.1 **
uniden <sup>c</sup>	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.3

<sup>a,b,c,\*\*</sup> See Table 9 for description.

사. Table 18, 19, 20 그리고 21에서는 육계의 다리근육 중 극성지질을 분리하여 그에 결합되어 있는 지방산 조성을 나타낸다. Phosphatidylcholine(PC), phosphatidylserine(PS) 그리고 phosphatidylethanolamine(PE)에서 DHA group에서 DHA가 WAX group에 비해 현저히 높게 나타났으며, 유의차가 인정되었다.

Table 19. Fatty acid composition of three subclasses of PS in leg muscle of chicken fed the DHA and WAX diets.<sup>a</sup>

Fatty acid <sup>b</sup>	Composition(mol%)		
	DHA	Wax	
16:0	11.3 ± 1.4	11.2 ± 1.0	
16:1	8.8 ± 1.2	7.8 ± 0.3	
17:0	0.9 ± 0.2	tr	**
18:0	45.8 ± 1.8	43.2 ± 1.4	
18:1	12.2 ± 1.0	14.3 ± 1.1	
18:2n-6	7.9 ± 0.5	12.6 ± 0.3	*
20:0	1.3 ± 0.5	0.4 ± 0.2	
20:3n-6	0.8 ± 0.4	2.0 ± 0.2	**
20:4n-6	1.7 ± 0.2	4.0 ± 0.4	**
22:0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	
22:1	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.2	
22:5n-3	0.6 ± 0.3	0.2 ± 0.2	
22:6n-3	6.6 ± 1.5	1.3 ± 0.7	*
uniden <sup>c</sup>	1.2 ± 0.6	2.4 ± 1.2	

<sup>a,b,c,\*,\*\*</sup> See Table 9 for description.

Table 20. Fatty acid composition of three subclasses of PI in leg muscle of chicken fed the DHA and WAX diets.<sup>a</sup>

Fatty acid <sup>b</sup>	Composition(mol%)	
	DHA	Wax
16:0	7.7 ± 1.3	5.8 ± 1.1
16:1	8.8 ± 2.4	5.9 ± 0.6
18:0	56.5 ± 5.2	46.9 ± 3.0
18:1	7.0 ± 1.4	10.0 ± 1.0
18:2n-6	3.9 ± 0.6	4.4 ± 0.6
20:3n-6	1.4 ± 1.0	3.8 ± 1.0
20:4n-6	13.8 ± 4.1	22.5 ± 0.7
22:5n-3	0.3 ± 0.3	tr
22:6n-3	0.2 ± 0.2	tr
uniden <sup>c</sup>	0.3 ± 0.3	0.7 ± 0.3

<sup>a,b,c</sup> See Table 9 for description.

Table 21. Fatty acid composition of three subclasses of PE in leg muscle of chicken fed the DHA and WAX diets.<sup>a</sup>

Fatty acid <sup>b</sup>	Composition(mol%)		
	DHA	Wax	
16:0	11.3 ± 1.1	7.4 ± 0.8	
16:1	2.2 ± 0.8	0.9 ± 0.5	
17:0	0.8 ± 0.2	0.1 ± 0.1	**
18:0	39.5 ± 3.1	24.2 ± 1.4	**
18:1	15.5 ± 1.5	14.8 ± 1.9	
18:2n-6	9.4 ± 0.6	12.6 ± 1.3	
18:3n-3	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1	
20:1	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.1	
20:2n-6	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	
20:3n-6	tr	0.7 ± 0.2	**
20:4n-6	7.6 ± 1.4	20.0 ± 0.6	*
20:5n-3	1.6 ± 0.5	0.8 ± 0.2	
22:5n-3	1.0 ± 0.3	3.2 ± 0.3	*
22:6n-3	10.2 ± 1.5	5.1 ± 0.5	**
uniden <sup>c</sup>	0.4 ± 0.4	9.3 ± 1.3	*

<sup>a,b,c,\*,\*\*</sup> See Table 9 for description.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

개발내용	구분	연구개발기간		
		1차년도	2차년도	3차년도
Myctophid 어종에 함유된 wax esters를 추출하여 화학 및 효소적 방법으로 wax esters를 분해하여 지방산과 알콜로 분리 하고자 한다.				
Wax esters의 분해로부터 분리된 각종 지방산을 대량 추출할 수 있는 기술을 개발한다.				
Wax esters에서 분리된 지방을 가축의 사료로 이용하기 위한 사양실험을 수행한다.				

\* 당초계획은 - - - - , 진도는 ——— 표시

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구결과를 바탕으로하여 Wax-esters로부터 유효한 지방산을 대량 추출하여 식품이라 사료 등 산업화에 이바지하고자 한다.



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구와 관련된 실험을 수행하고 있는 일본 동북대학교 Fujimoto 교수와 본 연구에 관련하여 지속적인 정보교류가 있었다.

## 제 7 장 참고문헌

1. Das UN, Horrobin DF, Begin ME, Huang YS, Cunnance SC, Manku MS, Nassar BA. 1988. Clinical significance of essential fatty acids. *Nutr.* 4: 337-341.
2. Fujimoto K. 1993. Oxidative deterioration in fish and fish products. *Life Sci.* 17: 70-76.
3. Fujimoto K. Antioxidant activity of algal extracts. *Introduction to Applied Phycol.* 199-208.
4. Gandemer G. 1997. Muscle lipids and meal quality - phospholipids and flavor. *Ocl-Oleagineux Corps Gras Lipides* 4: 19-25.
5. Golovnya RV, Terenina MB, Ruchkina EL. 1994. Flaked capillary columns with crown ether complexes for gas-liquid chromatography. *Russian Chemical Bulletin.* 43: 2049-2053.
6. Griebenow RL, Martz FA, Morrow RE. 1997. Forage-based beef finishing systems - a review. *J. Prod. Agr.* 10: 84-91.
7. Holub BJ, Weaver BJ, Corner EJ, Bruce VM, Meedonal BE. 1990. Dietary canola oil: effect on the accumulation of eicosapentaenoic acid in the alkenylacyl fraction of human platelet ethanolamine phosphoglyceride. *Am. J. Clin. Nutr.* 51: 594-598.
8. Itoh T, Tamura T, Matsumoto T. 1973. Sterol composition of la vegetable oil. *J. Amer. Oil Chemists* 50: 122-125.
9. Kim DN, Schmee J, Lee CS, Solis O, Ross JS, Thomas WA. 1991. Reductions in serum thromboxane, prostacyclin, and leukotriene B<sub>4</sub> levels in swine fed a fish oil supplement to an atherogenic diet. *Exp. Mol. Pathol.* 55: 1-12.

10. Kinsella JE, Broughton SK, Whelan JW. 1990. Dietary unsaturated fatty acids: interaction and possible needs interrelation to eicosanoid synthesis. *J. Nutr. Biochem. Bol.* 1: 123-141.
11. Kuo JM, Hwang A, Hsu HH, Pan BS. 1996. Preliminary identification of lipoxygenase in algae (*Enteromorpha Intestinalis*) for aroma formation. *J. Agr. Food Chem.* 44: 2073-2077.
12. Lawson LD, Hughes BG. 1988. Human absorption of fish oil fatty acids as triacylglycerols, free acids, or ethyl esters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152: 328-332.
13. Lopezbote C, Rey A, Ruiz J, Isabel B, Arias RS. 1997. Effect of feeding diets high in monounsaturated fatty acids and alpha-tocopheryl acetate to rabbits on resulting carcass fatty acid profile and lipid oxidation. *Anim. Sci.* 64: 177-186.
14. Martin BR, Harvey DJ, Paton WD. 1977. Biotransformation of cannabidiol in mice. Identification of new acid metabolites. *Drug. Metab. Dispos.* 5: 259-67.
15. Mead JF, Alfin-Slater RB, Howton DR, Popjak G. 1986. Desaturation of fatty acids-The essential fatty acids. *Lipids Chemistry, Biochemistry and Nutrition*, Chapter 9: 133-147.
16. Noelsuberville C, Cruz C, Guinberteau J, Montury M. 1996. Correlation between fatty acid content and aromatic compound release in fresh blewit (*Lepista Nuda*). *J. Agr. Food Chem.* 44: 1180-1183.
17. Scheppach WM, Fabian CE, Kasper HW. 1987. Fecal short-chain fatty acid (SCFA) analysis by capillary gas-liquid chromatography. *Am. J. Clin. Nutr.* 46: 641-646.
18. Seo HS, Endo Y, Fujimoto K, Watanabe H, Kawaguchi K. 1996. Characterization of lipids in Myctophid fish in the subarctic and tropical pacific ocean. *Fisheries Sci.* 62: 447-453.

19. Seo HS, Endo Y, Fumimoto K, Moku M, Kawaguchi K. 1998. Characterization of molecular species of wax esters in Myctophid fishes. *Fisheries Sci.* 64: 423-427.
20. Simopoulos AP. 1989. Summary of the NATO advanced research workshop on dietary  $\omega$ 3 and  $\omega$ 6 fatty acids : Biological effects and nutritional essentiality. *J. Nutr.* 119: 521-528.
21. Simopoulos AP. 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.* 54: 438-463.
22. Srivastava VK, Srivastava PK, Misra UK. 1985. Polycyclic aromatic hydrocarbons of coal fly ash: analysis by gas-liquid chromatography using nematic liquid crystals. *J. Toxicol. Environ. Health.* 15: 333-337.
23. Venugopal V, Shahidi F. 1996. Structure and composition of fish muscle [Review]. *Food Rev. Int.* 12: 175-197.
24. Yeo YK, Holub BJ. 1990. Influence of dietary fish oil on the relative synthesis of triacylglycerol and phospholipids in rat liver in vivo. *Lipids* 25: 811-814.
25. Yeo YK, Horrocks LA. 1986. Determination of the phospholipid composition of bovine muscle by high performance liquid chromatography with emphasis on the choline and ethanolamine plasmalogens. *Food Chem.* 28: 197-205.
26. Yeo YK, Philbrick D-J, Holub BJ. 1989. Altered acyl chain composition of alkylacyl, alkenylacyl and diacyl subclasses of choline and ethanolamine glycerophospholipids in rat heart by dietary fish oil. *Biochim. Biophys. Acta* 1001: 25-30.
27. Yeo YK, Philbrick D-J, Holub BJ. 1989. Effects of dietary n-3 fatty acids on mass changes and [ $^3$ H] glycerol incorporation in various glycerolipid classes of rat kidney in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1006: 9-14

28. Yeo YK, Philbrick D-J, Holub BJ. 1989. The effect of long-term consumption of fish oil on platelet-activating factor synthesis in rat renal microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160: 1238-1242.
29. Yeo YK, Philbrick D-J, Holub BJ. 1989. The effects of dietary n-3 fatty acid on the incorporation of radioactivity into ether-linked renal phospholipids in rats following [1-<sup>14</sup>C] hexadecanol injection. *Arts Biomed. Publishers Distributors* 525-536.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.