

황복, *Takifugu obscurus*, 초기 단계의 소화효소 변화

손규희⁺ · 한경남 · 장정순*
 인하대학교 해양학과, *인하대학교 의학과 생화학교실

The Changes of Digestive Enzyme Activity in Early Stages of the River Puffer, *Takifugu obscurus*

Kyu-Hee SON⁺, Kyung-Nam HAN and Chung-Soon CHANG*

Department of Oceanography, Inha University, Incheon 402-751, Korea

*Department of Medicine, Inha University, Incheon 402-751, Korea

The digestive enzyme activities such as α -amylase, trypsin and pepsin from the laboratory-reared river puffer, *Takifugu obscurus*, were measured from the time course of 1 day until the 65 day after hatching. In the case of α -amylase, it was showed minimum activity of 0.0493 U/mg at the total length (TL) 10 mm, and showed maximum activity of 0.1480 U/mg at 19 mmTL. Trypsin and pepsin were showed their maximum activities of 0.0264, 0.0258 U/mg and 0.0178, 0.0201 U/mg when the total length of 16 and 24 mm, and represented remarkable correlations between the changes of enzyme activity and growth rate. The ontogenetic variations of digestive enzymes were represented clearly different patterns; i.e. the pepsin showed higher activity when the periods of larva (4~5 mmTL) and juvenile II (19~24 mmTL), however, the trypsin represented maximum activity at the stages of juvenile I (11~16 mmTL) and young fish (27 mmTL), respectively.

Key words: River puffer, *Takifugu obscurus*, Digestive enzyme

서 론

황복은 분류학적으로 참복과, 참복속 (*Takifugu*)에 속하며, 우리나라의 압록강, 대동강, 한강, 임진강 그리고 금강 등의 서남 연해와 하천 하류 및 양자강 이북, 북부 중국의 연해 및 전당강, 황하, 요하 등의 하천에 분포하는 것으로 알려져 있다 (Chyung, 1977). 고급 어종으로써 산업적 가치가 높은 황복은 하천의 수질오염과 연안역 개발에 의하여 산란장이 축소되고 산란기의 친어들이 남획되어 자원량이 감소하는 추세이다. 최근 새로운 양식어종으로써 부각되고 있으나 양식에 대한 전반적인 기술이 정립되지 않은 실정이다. 따라서 이러한 황복의 발생학적 특성, 섭식습성, 적정 사육환경 등의 초기생활사에 대한 연구는 학문적, 산업적으로 매우 중요하다고 할 수 있다.

지금까지 보고된 국내의 황복에 관한 연구는 난·자치어의 발육 (Jang et al., 1996), 호흡생리 (Kim et al., 1996, 1997), 독성실험 (Park et al., 1999), 초기발육 단계의 형태발달과 비중변화 (Park, 1999)의 연구 등이 있으나, 소화효소 발현 및 변화에 관한 소화생리에 관한 연구는 없다.

보통 어류의 초기단계인 자치어기는 자어기에서 치어기로의 형태학적인 큰 변화와 함께 부유생활에서 저서생활로 이행하는 생리·생태학적인 변화가 일어나는 시기이며, 생활사 중에서 가장 사망률이 높은 시기이기도 하다. 이러한 초기단계의 소화생리에 대한 연구는 담수어인 송어 (Kawai et al., 1973a), 잉어 (Kawai et al., 1973b) 등과 해산어인 넙치 (Maria, 1998; Olsen et al., 2000), 명태 (Oozeki and Bailey, 1995), 청어 (Pedersen et al., 1990), 갑

성돔 (田中, 1969) 등의 연구가 있고, 갑각류에 대한 Kamarudin et al. (1994), Omondi and Stark (1995a, 1995b) 등의 연구가 있으나, 황복과 같은 자치어 시기에 서식지의 변화가 큰 어종에 대한 연구는 전문한 실정이다.

따라서, 본 연구는 담수생활의 자어기에서 해수생활의 치어기로 전환하는 황복의 초기단계에 있어 소화효소의 변화 과정을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

실험어

실험에 사용한 황복은 1999년 5월 16일 김포 전유리 지선에서 자망에 채포된 친어 (평균 체중 700 ± 100 g, 평균 체장 250 ± 35 mm)에 성선자극호르몬 (H.C.G)을 1,000 IU/kg을 주사한 뒤, 24시간 후에 채란하여 수정시켰다. 수정난은 수온 19.0 ± 1.0°C, 염분 3 psu의 사육수에서 관리하였다.

부화된 황복 자치어는 수온 20~25°C에서 사육·관리하였다. 사육수의 염분 농도는 Park (1999)의 사육방법을 참고하여, 자치어의 성장에 따라 부화후 0 psu에서 시작하여 매일 2~3 psu씩 염분 농도를 높여주었고 23일 이후부터는 일반해수에서 사육하였다. 자치어의 관리는 부화 후 23일까지는 1 m³ F.R.P. 수조를 사용하여 지수식 조건하에서 매일 50%씩 환수하였고, 23일부터는 3 m³ 원형 F.R.P. 수조로 옮겨 유수식 조건하에서 사육하였다.

먹이는 부화 후 3일부터 10일까지는 *Nannochloropsis* sp.로 배양한 *Brachionus rotundiformis*를, 11일부터 20일까지는 *B. rotundiformis*와 *Artemia nauplii*를 혼합공급하였고, 21일부터는 200~300 μ m 크기의 배합사료를 성장에 따라 입자의 크기를 조절하여 사육하였다.

⁺Corresponding author: sonkyuhee@hanmail.net

실험 표본

소화 효소 분석을 위한 표본은 총 7회에 걸쳐 채집하였다. 분석에 앞서 모든 표본에 대하여 전장 및 체중을 측정하였다. 전장(TL)은 자어기에는 해부현미경 하에서 측정하였고, 자어기 이후에는 버어니어 캘리퍼스 0.01 mm 범위까지 측정하였다. 체중은 전자저울을 이용하여 10⁻⁴ mg까지 측정하였고, 드라이아이스로 냉동한 후 Deep freezer (Forma, #0859, USA)에 보관하였다.

각 발육 단계별로 채집된 표본은 Park (1999)의 연구 결과에 근거하여 Prelarva, Postlarva, Juvenile I, Juvenile II, Young fish 등의 변태기를 전·후로 하여 채집하였고, 각각의 단계를 Table 1에 언급하였다. 실험에 사용한 자치어는 각각 부화 후 5일, 11일, 35일, 41일, 49일, 56일, 65일인 자치어이며, 실험에 앞서 각 단계의 표본은 24시간 절식 후, 6시간 간격으로 채집하여 하루 동안의 각 효소 활성의 변화를 측정하였다.

Table 1. Ontogenetic development stage of the river puffer using enzyme activity (p<0.01)

	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 4	Stage 5	Stage 6	Stage 7
Day after hatching	5	11	35	41	49	56	65
Total length (mm)	4.00	5.00	10.78	16.09	19.13	23.59	26.80
Transitional stage	Pre larva	Post larva	Juvenile I	Juvenile II		Young Fish	

측정 및 분석

소화효소의 측정을 위해 실험에 사용된 황복 어체에 0°C의 증류수를 넣고 glass homogenizers (B. Braun, Potter, Germany)로 균질하게 분쇄하였다. 각각의 단계별로 사용된 개체수는 Table 2에 나타내었다. 균질화된 시료는 20분간 12,000×g으로 원심분리한 후, 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 조효소액은 0°C의 냉장고에 보관하였고, 24시간 이내에 α-amylase, trypsin 그리고 pepsin의 활성을 측정하였고, 동시에 protein 정량도 측정하였다.

1) α-amylase

α-amylase의 활성도 측정은 Bernfeld (1951)의 방법을 사용하였다. Buffer로는 sodium phosphate pH 6.9를 사용하였고, 기질은 1%의 soluble starch를 사용하였다. Color reagent는 3,5-dinitrosalicylic acid 1g을 2N NaOH 20 mL 용액에 용해시킨 후 sodium potassium tartrate 30g을 넣고 전체 용량이 100 mL가 되도록 증류수로 희석하였다. 조효소액에 soluble starch 100 μL를 잘 섞고 25°C에서 10분간 반응시킨 후 color reagent를 0.2 mL 첨가하여 100°C의 물에 5분간 방치하였다. 실온에서 30분이 지난 후 spectrophotometer (Model 8452A, Hewlett Packard Diode Array, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, standard로 maltose를 사용하였고, 동일 조건의 분석을 4회 반복 측정하였다.

2) Trypsin

Trypsin 활성도 측정은 Meyers and Ahearn (1977)의 방법을 사용하였다. Tris-HCl pH 8.1을 buffer로 사용하였고 pH는 HCl을

Table 2. Total individual and weights of the river puffer using analyses in each stage

	Hr	Total individual	Total weight
Stage 1	1	253	0.489
	7	310	0.63
	13	191	0.338
	19	189	0.335
Stage 2	1	200	0.4996
	7	236	0.5907
	13	184	0.4595
	19	232	0.5811
Stage 3	1	20	0.5758
	7	21	0.5407
	13	20	0.4376
	19	23	0.6153
Stage 4	1	12	0.8225
	7	15	0.9853
	13	14	0.7203
	19	13	0.7975
Stage 5	1	5	1.0558
	7	5	1.0513
	13	4	1.0285
	19	5	1.0474
Stage 6	1	5	1.6626
	7	5	1.0927
	13	5	1.6921
	19	5	1.3504
Stage 7	1	5	2.1673
	7	5	2.3823
	13	5	2.4238
	19	5	2.0903

사용하여 조절하였으며 기질로 Na-casein을 사용하였다. Buffer와 기질 그리고 조효소액을 eppendorf tubes에 넣어 37°C에서 10분간 반응시킨 후 Trichloroacetic acid (TCA)를 넣고 잘 섞은 후, 10분간 14,000×g로 원심분리하였다. 새로운 eppendorf tubes에 상등액을 옮긴 뒤, NaOH, Na₂CO₃, CuSO₄와 K-Na-tartrate를 넣고 실온에서 15분간 방치하였다. 다시 Folin-Ciocalteu's를 넣고 3분이 지난 후, 3분간 5000×g로 원심분리하여 1시간 후 추출하여 spectrophotometer로 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosine의 농도를 standard로 하여 각각의 조효소액의 활성도를 구했으며, 동일 조건의 분석을 4회 반복 측정하였다.

3) Pepsin

Pepsin 활성도 측정은 Meyers and Ahearn (1977)의 방법을 사용하였다. Sodium acetate pH 3.0을 buffer로 사용하였고 pH는 HCl을 사용하여 조절하였으며 기질로 Na-casein을 사용하였다. Buffer와 기질 그리고 조효소액을 eppendorf tubes에 넣어 37°C에서 10분간 반응시킨 후 TCA를 넣고 잘 섞은 후, 10분간 14,000×g로 원심분리하였다. 새로운 eppendorf tubes에 상등액을 옮긴 뒤, NaOH, Na₂CO₃, CuSO₄와 K-Na-tartrate를 넣고 실온에서 15분간 방치하였다. 다시 Folin-Ciocalteu's를 넣고 3분이 지난 후, 3분

간 5000×g로 원심분리하여 1시간 후 추출하여 spectrophotometer로 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosine의 농도를 standard로 하여 각각의 조효소액의 활성도를 구했으며, 동일 조건의 분석을 4회 반복 측정하였다.

4) Protein

단백질의 측정은 Bradford method (1976)를 사용하였다. Dye reagent concentrate를 사용하여 spectrophotometer로 595 nm에서 흡광도를 측정하였고, Standard로는 BSA (Albumin, Bovine)를 사용하였다. 분석은 4회 반복 측정하였다.

5) 통계분석

발육 단계에 따른 각 효소의 비활성의 상관관계를 알아보기 위하여 분산분석 (ANOVA)을 통하여 유의수준 ($p < 0.01$)하에서 유의성을 검증하였고, Duncan test를 이용하여 grouping을 하였다 (SAS, 1987).

결과 및 고찰

성장에 따른 α -amylase 활성의 변화

황복 자치어의 성장에 따른 α -amylase 활성의 변화와 각 발육 단계에서의 24시간 동안의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 발육단계

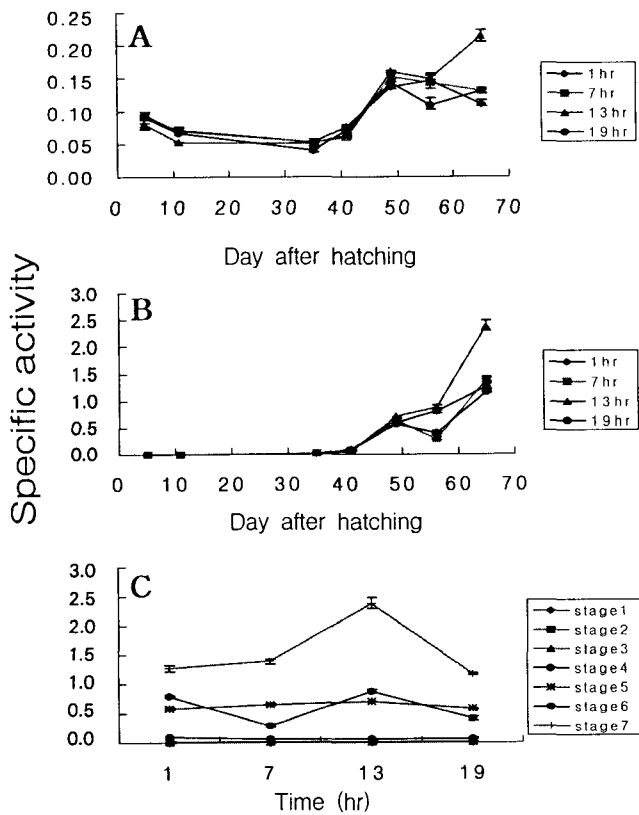


Fig. 1. Relationship between A α -amylase specific activity and day after hatching, B α -amylase individual activity and day after hatching, C α -amylase individual activity and a whole day and night.

별 α -amylase의 비활성은 부화 후 5일 (전장 4.0 mm)에서부터 35일 (전장 10.78 mm) 사이에는 0.0898 U/mg에서 0.0493 U/mg로 완만하게 감소하는 경향을 보였으나, 부화 후 35일 (전장 10.78 mm)에서 49일 (전장 19.13 mm)사이에서는 급격한 증가 추세를 나타냈다 (Fig. 1-A). 이러한 결과는 Baragi and Lovell (1986)의 줄무늬농어 (*Morone saxatilis*)에 관한 실험에서 유구 소멸의 시기에 amylase 비활성이 감소하는 결과와 일치하는 것으로, 황복도 유구가 완전히 소멸되는 시기까지 α -amylase 비활성이 감소하는 양상을 보였다. 또한, 장의 형성이 성어와 유사한 단계에 이르는 부화 후 41일 (전장 16.09 mm)부터는 0.0714 U/mg로 급격히 증가하고 0.1480 U/mg를 보이는 49일 (전장 19.13 mm) 이후로는 변화가 적어졌다.

武居 (1953)는 은어 (*Plecoglossus altivelis*)가 체장이 60~90 mm가 되어 그 식성이 동물플랑크톤에서 조류로 전환하는 시기에 이르러 amylase의 활성이 출현한다고 하였다. 황복의 경우, α -amylase의 활성이 처음으로 인지되는 것은 전장 4~5 mm의 자어기부터이고, 이것은 α -amylase의 발현은 어느 정도 성장하면 인지되는 것으로 사료된다.

Fig. 1-B는 α -amylase 활성의 변화를 단위 개체당으로 보인 것이다. 그림에 나타난 바와 같이 전기자어기인 stage 1의 0.0055 U/larva에서부터 유어기인 stage 7의 1.5524 U/mg까지 지속적으로 증가하는 것을 볼 수가 있다. 그러나, 부화 후 35일 (전장 10.78 mm)까지는 미약하게 나타나지만 41일 (전장 16.09 mm)부터는 급격히 증가하고 있다. Park (1999)의 연구에 의하면 장의 분화는 전장 15 mm가 지나면서 소화관은 2회의 꼬임 현상을 가짐으로써 더욱 밀착되어 성어와 유사한 구조를 갖는다고 하였다. 따라서, 자어기 이후의 α -amylase 활성의 증가는 소화기관의 발달과 관련이 있으며, 장의 외형적 분화가 이루어지기 시작할 때부터 활성은 더욱 활발해지는 것으로 사료된다.

Fig. 1-C는 α -amylase 활성에 대하여 각 발육 단계에서 24시간 동안의 변화를 보여주고 있다. 이를 Duncan test를 사용하여 Grouping 한 결과를 Table 3에 나타내었다. 황복 자치어는 발육 단계별로 3 group으로 구별되고, stage 1부터 4, stage 5와 6 그리고 stage 7을 각각 유사한 Group으로 볼 수 있다. 각 발육 단계에서의 주기성을 살펴보면, 전기 자어기인 stage 1부터 치어 II기 초기인 stage 5까지는 24시간 동안의 주기성은 보이지 않으나, 치어 II기 이후로 13시에 α -amylase 활성이 높은 경향을 보이고 있다. 이러한 현상은 황복 치어기에서의 주야 수직 운동과 밀접한 관련이 있는 것으로 사료되나, 인위적인 사육에 따른 효과인지 아니면 황복 자치어가 자연적으로 지닌 것인지에 관한 것은 추후 연구가 필요하겠다.

성장에 따른 Trypsin 활성의 변화

Trypsin 비활성을 자치어의 발육단계에 따라 살펴보면, 자어기인 부화 후 5일 (전장 4.0 mm)부터 증가하기 시작하여 치어기 이후에 2 번에 걸쳐 높게 일어나는 것을 보였다 (Fig. 2-A). 첫번째 peak는 부화 후 41일 (전장 16.09 mm)로 치어 I기에서 II기로의 전환기에 해당하며, 두 번째 peak는 부화 후 56일 (전장 23.59 mm)

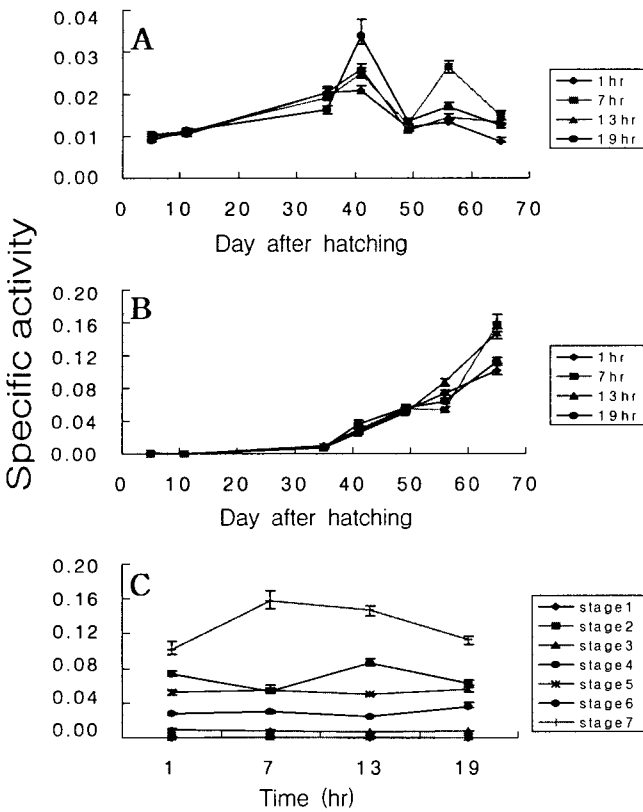


Fig. 2. Relationship between A trypsin specific activity and day after hatching, B trypsin individual activity and day after hatching, C trypsin individual activity and a whole day and night.

로 치어 II기에서 유어로의 전환기에 해당된다. 전자는 먹이가 A. nauplii에서 artificial food로 완전히 전환되는 시기이며, 후자는 생리적으로 성 성숙의 측면을 제외하고는 성어와 유사한 유어단계로 전환하는 시기이다.

무지개송어 (*Salmo gairdneri*)에 대한 Kawai and Ikeda (1973 a)의 연구에 의하면, 난황을 어느 정도 흡수하여 섭이를 개시할 시기가 되면 trypsin 활성은 급격히 증가한다고 하였다. 잉어 (*Cyprinus carpio*)에 관한 연구 (Kawai and Ikeda, 1973b)에서도, trypsin 활성은 부화직전의 난에서는 높았으나 3일 후에는 현저하게 저하되었고, 이후 점차로 증가하여 특히 부화 40일 전후의 증가는 매우 크다고 보고하였다. 또한, 田中 (1969)는 감성돔 (*Acanthopagrus schlegelii*)의 trypsin 활성은 부화 후 3일의 자어에서 인지되어, 이후 성장에 따라 증가한다고 하였고, Kamarudin (1994)은 참새우 (*Macrobrachium rosenbergii*) 연구에서 trypsin 활성의 증가는 간체장의 발달과 일치한다고 하였다.

이와 같이, 위가 없는 잉어를 제외하고는 trypsin 활성은 난황이 소비되고 섭이가 시작되는 자어기에서부터 인지가 되었지만 증가하는 형태는 어종에 따라 차이가 있다. 황복의 경우는 자어기부터 인지되었고 부화 후 35일 (전장 10.78 mm)에서 41일 (전장 16.09 mm), 49일 (전장 19.13 mm)에서 56일 (전장 23.59 mm) 구간에서 급격히 증가하는 특징을 보였다.

Trypsin 비활성이 급격히 증가하는 시기를 자치어의 성장률과 비교하면, 이 시기에 자치어의 성장률도 높게 나타났다. 이러한 결과는 명태 (*Theragra chalcogramma*)에 대한 Oozeki and Baily (1995)의 결과와 일치하는 것으로, 황복도 trypsin 비활성이 급격히 증가하는 시기에 자치어의 성장률도 높게 나타났다. Trypsin 비활성의 각 구간에서의 증감과 자치어의 성장률과의 관계를 Table 4에 나타내었다.

Fig. 2-B는 trypsin 활성의 변화를 단위 개체당으로 나타낸 것이다. 자어기인 부화 후 5일의 0.0006 U/larva에서 35일의 0.0083 U/larva로 완만하게 증가하고 35일 이후부터 급격히 증가함을 알 수 있다. 이러한 결과를 α -amylase의 변화와 비교하여 보면, α -amylase의 단위 개체당 활성의 변화는 장의 분화가 성어와 유사한 부화 후 41일 (전장 16.09 mm)에서 급격히 증가하지만, trypsin의 경우는 장에서 분비되는 효소임에도 불구하고 α -amylase와는 달리 부화 후 35일 (전장 10.78 mm)부터 증가했다. 이는 α -amylase의 활성은 장의 분화와 일치하지만, trypsin의 경우는 장의 발달과 더 붙어 먹이에 의한 영향도 받는다고 사료된다.

Fig. 2-C은 trypsin 활성에 대하여 각 발달 단계에서 24시간 동안의 변화를 보여주고 있다. Duncan test의 결과를 보면 stage 1~3, stage 4, stage 5~6 그리고 stage 7로 각각 나누어 진다 (Table 3). 이는 치어 II기를 기준으로 그 이전의 자어기와 그 후의 치어기 그리고 유어기가 각각 다른 양상을 보이는 것을 나타내고 있다. 또한, 황복 자치어의 비중 변화 (Park, 1999)의 측면에서 보면, 주야 수직 운동을 시작하는 치어기 이후에 황복의 효소 활성이 변함을 알 수 있다. 즉, 표층생활을 하는 자어기, 밤에는 위로 낮에는 아래로 이동하는 치어기 그리고 밤에는 아래로 낮에는 위로 이동하는 유어기 등 생태적인 면이 황복 자치어의 trypsin 활성에 영향을 준다고 사료된다. 각 발달단계에서 trypsin의 주기성을 보면, α -amylase와 마찬가지로 부화 후 49일 (전장 19.13 mm)의 stage 5까지는 24시간 동안의 주기성은 보이지 않지만, 부화 후 56일 (전장 23.59 mm)의 stage 6부터는 변화를 보였다.

Table 3. Result of Duncan test for specific activity of each stage

Stage	α -amylase		Trypsin		Pepsin	
	Mean specific activity	Duncan	Mean specific activity	Duncan	Mean specific activity	Duncan
1	0.0055	A	0.000600	A	0.000772	A
2	0.0034	A	0.000569	A	0.000637	A
3	0.0216	A	0.008332	A	0.008011	A
4	0.0776	A	0.029716	B	0.028915	B
5	0.6344	B	0.053506	C	0.059753	C
6	0.5970	B	0.069577	C	0.077926	D
7	1.5524	C	0.130018	D	0.114984	E

성장에 따른 Pepsin 활성의 변화

Pepsin 비활성은 부화 후 5일 (전장 4.0 mm)의 0.0125 U/mg에서 11일 (전장 5.0 mm)의 0.0119 U/mg로 감소한 후, 41일 (전장 16.09 mm)에 0.0258 U/mg로 첫 번째 peak를 보였고, 56일 (전장

23.59 mm)에 0.0201 U/mg로 두 번째의 peak를 보였다 (Fig. 3-A).

Kawai and Ikeda (1973a)에 의하면 무지개송어는 부화 직후에 있어서 현저한 pepsin 활성이 인지되었으나 3일째에는 저하되고, 20일 정도가 지나 섭이를 시작하면 pepsin 활성이 급격히 증가하였다고 하였다. 또한, 이 시기가 되면 치어 내의 체단백질의 합성과 효소단백의 합성이 활발해진다고 하였다. 田中 (1969)는 감성돔의 pepsin 비활성은 부화 후에는 저하되나 20일 전후부터는 급격히 증가하고 이것은 자어 체내의 위선의 형성기와 일치한다고 하였으며, 이 시기가 해산 rotifer로부터 대형의 동물플랑크톤 또는 사료 전환기라고 추정하였다. 황복 자치어의 pepsin 비활성의 급격한 증가는 trypsin 비활성과 같이 부화 후 35일 (전장 10.78 mm)에서 41일 (전장 16.09 mm), 부화 후 49일 (전장 19.13 mm)에서 56일 (전장 23.59 mm)구간에서 급격한 증가하는 특징을 보였는데, 이러한 2번의 증가는 위의 연구결과와 마찬가지로 위선의 발달과 먹이 전환에 따른 것으로 사료된다. 田中 (1975)는 위선의 분화시기와 성어에서 볼 수 있는 소화계가 완성되는 시기가 거의 일치한다고 하였는데, 황복 자치어의 경우, 두 번의 증가에서 어느 시기에 위선이 형성되는 가는 차후에 조직학적인 연구를 통하여 밝혀내야 하겠지만, Park (1999)의 전장 15 mm 전후에 위와 장의 분화가 이루어진다는 연구 결과에 비추어 첫 번째 증가가 위선의 형성과 관련이 있다고 사료된다. 이러한 pepsin 비활성의 각 구간

에서의 증감과 자치어의 성장률과의 관계를 Table 4에서 비교하였다.

Table 4. Comparison of growth rate and slope of trypsin for each stages

	Stage 1~2	Stage 2~3	Stage 3~4	Stage 4~5	Stage 5~6	Stage 6~7
Growth rate (mmd ⁻¹)	0.167	0.240	0.883	0.381	0.636	0.357
Slope of trypsin	2.1×10 ⁻⁴	3.4×10 ⁻⁴	12.3×10 ⁻⁴	-17.4×10 ⁻⁴	7.6×10 ⁻⁴	-6.1×10 ⁻⁴
Slope of pepsin	-0.3×10 ⁻⁴	2.6×10 ⁻⁴	12.3×10 ⁻⁴	-14.8×10 ⁻⁴	8.8×10 ⁻⁴	-10.2×10 ⁻⁴

Fig. 3-B는 pepsin 활성의 변화를 단위 개체당으로 본 것이다. Trypsin과 마찬가지로 자어기인 부화 후 5일의 0.0008 U/larva에서 0.0080 U/larva의 35일까지 완만하게 증가하고 35일 이후부터 급격히 증가하기 시작했다. 이것은 황복 자치어가 비슷한 시기에 장과 위의 분화가 이루어 지고, 먹이에 대한 활성의 변화가 이루어지는 것으로 사료된다. 즉, 기관의 분화에 의해서도 영향을 받지만, 단백질 분해효소인 trypsin과 pepsin이 비슷한 경향을 보이는 것은 먹이에 의한 영향이 크다는 田中 (1969)의 감성돔에 대한 연구 결과와도 일치한다.

Fig. 3-C은 pepsin 활성에 대하여 각 발달 단계에서 24시간 동안의 변화를 보여주고 있다. 이를 Duncan test를 사용하여 Grouping 한 결과는 Table 3-C와 같다. Test의 결과를 보면, pepsin 활성은 stage 1~3, stage 4, stage 5, stage 6 그리고 stage 7에서 각각 차이를 보여주고 있다. 즉, 치어기 이후에는 성장에 따라 활성의 변화가 다음을 나타내고 있다. 각 발육단계에서 pepsin 활성의 주기성을 보면, α-amylase, trypsin과 마찬가지로 부화 후 49일 (전장 19.13 mm)의 stage 5까지는 24시간 동안의 주기성은 보이지 않지만, 부화 후 56일 (전장 23.59 mm)의 stage 6부터는 변화를 보였다.

Trypsin과 pepsin 활성의 비교

Fig. 4는 단백질 분해 효소인 trypsin과 pepsin의 비활성을 성장에 따라 비교하여 보았다. stage 1과 2, stage 5와 6에서는 pepsin의 비활성이 높았고, stage 3과 4, stage 7에서는 trypsin의 비활성이 더 높았다. 이를 발육 단계로 보면, 자어기와 치어 II기에서는 pepsin이 치어 I기와 유어에서는 trypsin이 더 높은 것으로 나타났다. 또한 유구가 소멸되기 전까지의 발달 양상을 보면 trypsin의 경우는 증가하는 반면 pepsin의 경우는 감소하는 경향을 보인다. 이와 같은 경향은 Maria (1998)의 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 자어에 관한 연구 결과와 비슷한 경향을 보이고 있다. Kawai and Ikeda (1973a)의 무지개송어에 대한 연구와 田中 (1969)의 감성돔에 대한 연구에서 보면, 난황이 소비되기 전까지 pepsin의 비활성은 감소하고 trypsin 비활성은 증가하는 양상을 보인다고 하였다. 이는 trypsin과 pepsin 활성을 단위 개체당으로 비교하였을 때 도 같은 결과가 보여지고 있다 (Fig. 5).

이와 같은 각 발육 단계에서의 trypsin과 pepsin의 활성의 비교와 더불어 이들 단백질 분해효소의 역할과 발현 기작에 대하여도 추후의

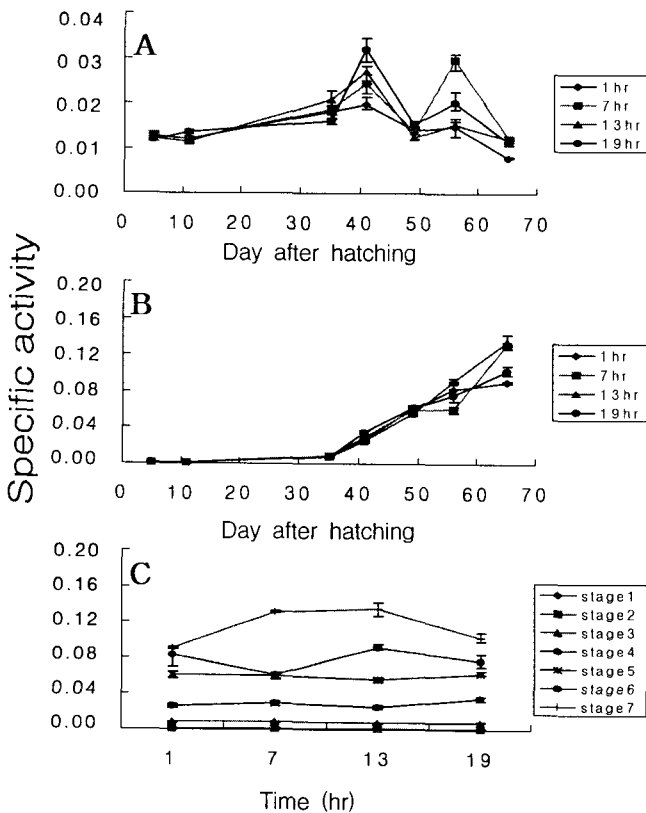


Fig. 3. Relationship between A pepsin specific activity and day after hatching, B pepsin individual activity and day after hatching, C pepsin individual activity and a whole day and night.

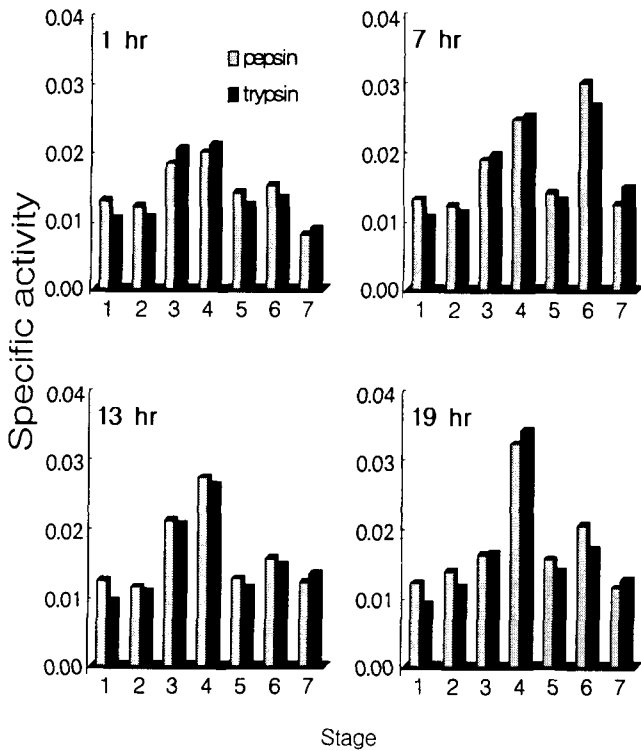


Fig. 4. Development of trypsin and pepsin specific activity of river puffer developmental stage.

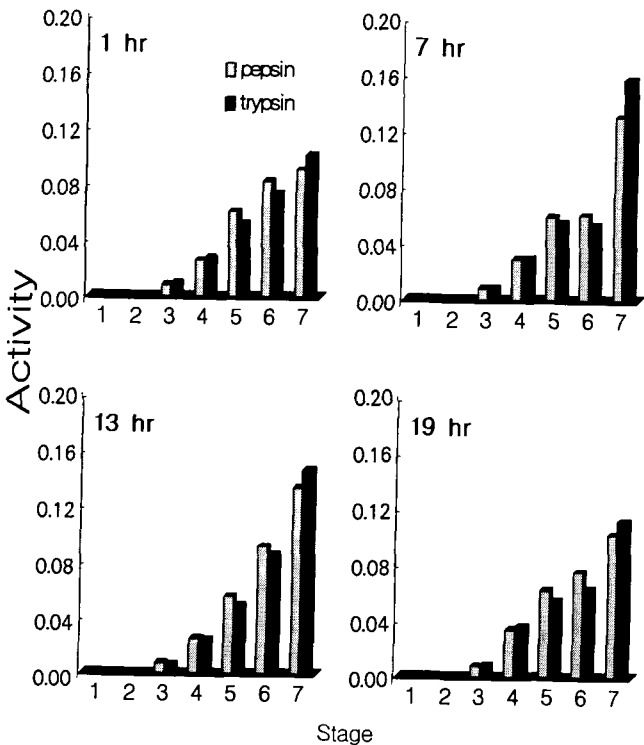


Fig. 5. Development of trypsin and pepsin individual activity of river puffer developmental stage.

연구가 요구된다. 소화기관이 완전히 분화되기 전인 전기자어기에 발현하는 단백질 분해효소의 역할에 대하여, 川合 (1975)은 부화할 때의 어느 정도의 역할, 즉 부화효소학적 역할을 한다고 추정하였고, 渡辺 (1985)는 틸라피어나 연어류를 제외하고는 많은 어류에서 부화 후 수십일 동안에 위선의 작용없이 먹이를 소화흡수하기 때문에 자어는 복잡한 고차구조를 가진 단백질을 직장상피세포에서 흡수하고, 성어의 소화흡수 기관과는 다르다고 하였다. 그러므로, 황복에 있어서도 전기 자어기의 단백질 분해효소의 난각에 대한 작용을 연구해야하고, 소화기관의 분화 이전에 발현되는 단백질 분해효소의 발현에 대하여도 장의 상피세포 등을 통하여 추후 연구할 필요가 있다고 생각된다.

요 약

황복의 소화효소의 변화과정을 부화직후부터 부화 후 65일까지 측정하였다.

발육단계에 따른 소화효소의 발현과 활성의 변화에서 α -amylase 비활성은 전장 10 mm에서 0.0493 U/mg의 최소값을 나타낸 후, 전장 19 mm를 전후하여 0.1480 U/mg의 최대값을 나타냈다. Trypsin과 pepsin 비활성은 전장 16 mm에서 각각 0.0264 U/mg, 0.0258 U/mg와 전장 24 mm에서 0.0178 U/mg, 0.0201 U/mg의 값을 가지는 두 번의 peak를 보였고, 이 시기에 황복 자치어의 성장률도 증가하는 경향을 보였다. 또한, trypsin과 pepsin의 비활성을 비교하여 보면, 자어기인 전장 4~5 mm와 치어 II기인 전장 19~24 mm에서는 pepsin이 높았고, 치어 I기인 전장 11~16 mm와 유어기인 전장 27 mm 이후에서는 trypsin이 높았다.

사 사

본 연구는 과학기술부·한국과학재단 지정 인하대학교 서해연안환경연구센터의 지원에 의한 것입니다.

참 고 문 헌

Baragi, V. and R.T. Lovell. 1986. Digestive enzyme activities in striped bass from first feeding through larva development. *Trans. Am. Fish Soc.*, 115, 478~484.

Bernfeld, P. 1951. Enzymes of Starch Degradation and Synthesis. *Advances in Enzymol.*, 12, 379.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248~254.

Chyung, M.K. 1977. *The Fishes of Korea*. Iljisa, Seoul. 727 pp (In Korean).

Jang, S.I., H.W. Kang and H.K. Han. 1996. Embryonic, larval, and juvenile stage in Yellow puffer, *Takifugu obscurus*. *J. Aquaculture*, 9, 11~18 (In Korean).

Kamarudin, M.S., D.A. Jones, L.I. Vay and A.Z. Abidin. 1994. Ontogenetic change in digestive enzyme activity during larval development of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 123, 323~333.

- Kawai, S. and S. Ikeda. 1973a. Studies on digestive enzymes of fishes-III Development of the digestive enzymes of rainbow trout after hatching and the effect of dietary change on the activities of digestive enzymes in the juvenile stage. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 39, 819~823.
- Kawai, S. and S. Ikeda. 1973b. Studies on digestive enzymes of fishes-IV Development of the digestive enzymes of carp and black sea bream after hatching. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 39, 877~881.
- Kim, W.S., J.K. Jeon, S.H. Lee and H.T. Huh. 1996. Effects of pentachlorophenol (PCP) on the oxygen consumption rate of the river puffer, *Takifugu obscurus*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 143, 9~14.
- Kim, W.S., J.K. Jeon, S.H. Lee and H.T. Huh. 1997. Endogenous circadian rhythm in the rate of oxygen consumption of the river puffer, *Takifugu obscurus*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 153, 293~298.
- Maria del Carmen Alvarez, 1998. Factors affecting digestive function of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, larvae and early juveniles. Kyoto University, 47 pp.
- Meyers, S.P. and D.G. Ahearn. 1977. Extracellular proteolysis by *Candida lipolytica*. Mycologia, 69, 646~651.
- Olsen, A.I., Y. Attramadal, K.I. Reitan and Y. Olsen. 2000. Food selection and digestion characteristics of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae fed cultivated prey organisms. Aquaculture, 181, 293~310.
- Omondi, J.G. and J.R. Stark. 1995a. In vitro carbohydrate digestibility tests in the Indian white shrimp, *Penaeus indicus*. Aquaculture, 139, 315~328.
- Omondi, J.G. and J.R. Stark. 1995b. Some digestive carbohydrases from the midgut gland of *Penaeus indicus* and *Penaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae). Aquaculture, 134, 121~135.
- Oozeki, Y. and K.M. Bailey. 1995. Ontogenetic development of digestive enzyme activities in larval walleye pollock, *Theragra chalcogramma*. Marine Biology, 122, 177~186.
- Park, H., K.N. Han and H.S. Kim. 1999. Study on short-term toxicological evaluation of treated landfill leachate using early stage of river puffer fish, *Takifugu obscurus*. J. Korean Soc. Oceanogr., 4, 298~304 (In Korean).
- Park, M.A. 1999. Studies on morphological development and specific gravity changes in early life history of river puffer, *Takifugu obscurus*. Inha University, 64 pp (In Korean).
- Pedersen, B.H., I. Ugelstad and K. Hjelmeland. 1990. Effect of a transitory low food supply in the early life of larval herring (*Clupea harengus*) on mortality, growth and digestive capacity. Marine Biology, 107, 61~66.
- S.A.S. 1987. SAS/STAT Guide for personal computers, Version 6.03 Edition. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.
- 川合 眞一郎. 1975. 消化酵素. In 稚魚の攝餌と發育, 日本水産學會編. 恒星社厚生閣, pp. 30~44.
- 武居 薫. 1953. 鮎 (*Plecoglossus altivelis* T & S) の成長に伴う消化酵素系の變化について. 農水講研報, 3, 289~294.
- 渡辺 良朗. 1985. 仔魚の消化吸收機構. In 養魚飼料-基礎と應用, 米 康夫編. 恒星社厚生閣, pp. 89~98.
- 田中 克. 1969. 仔魚の消化系の構造と機能に関する研究. 魚類學雜誌, 16, 41~49.
- 田中 克. 1975. 消化器官. In 稚魚の攝餌と發育, 日本水産學會編. 恒星社厚生閣, pp. 7~29.

2001년 5월 31일 접수

2001년 10월 31일 수리