



찰가자미, *Micromus achne* 자어의 성장과 발달에 따른 소화효소 활성의 변화

박상언 · 임한규*¹ · 한현섭² · 이종하¹ · 임영수¹ · 이종관¹ · 이상민³

국립수산과학원 동해연구소 증식과, ¹국립수산과학원 울진수산종묘시험장

²국립수산과학원 서해연구소 증식과, ³강릉대학교 해양생명공학부

Changes of Digestive Enzyme Activity in Slime Flounder, *Micromus achne* Larvae with Growth and Development

Sang Un Park, Han Kyu Lim*¹, Hyon-Sob Han², Jong Ha Lee¹, Young Su Lim¹,
Jong Kwan Lee¹ and Sang Min Lee³

East-Sea Fisheries Research Institute, Yeon-kok, Kangnung, 210-860, Korea

¹Uljin Marine Hatchery, National Fisheries Research and Development Institute, Uljin 767-860, Korea

²West-Sea Fisheries Research Institute, San 66-1, Eul Wang-Dong, Jung-gu, Incheon 400-420, Korea

³Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

Growth and activities of digestive enzymes in slime flounder (*Microstomus achne*) larvae were measured from hatching to near the end of larval development (day 58). Larvae reared under starved and fed conditions and the changes of acid phosphatase (ACPase) specific activity, alkaline phosphatase (ALPase) specific activity, trypsin-like enzyme activity and pepsin-like enzyme activity were described with growth and developmental stage of larvae. Total length of the starved larvae was gradually increased for 7 days post hatching and then almost unchanged. Total length of the fed larvae ranged from 5.13±0.178 mm at the day of hatching to 13.43±1.395 mm at 58 days after hatching. In starved group, dry body weight decreased from 0.10±0.020 mg at the day of hatching to 0.05±0.012 mg at 12 days after hatching. Dry body weight of fed larvae decreased during the prelarva stage like starved group and then gradually increased. ACPase and ALPase specific activity in the starved larvae increased until all larvae died, however those activities in the fed larvae increased until 20 days and then decreased until 58 days after hatching, with no significant difference between groups. Trypsin-like enzyme activity in the starved larvae was unchanged until 3 days and then was the highest on 5 days after hatching, but not detected after completion of yolk sac absorption. Those of fed larvae decreased until 3 days and sharply increased until completion of yolk sac absorption. The highest trypsin-like enzyme activity in the fed group was observed at 20 days after hatching. Trypsin-like enzyme activity in the fed larvae was significantly higher than that in the starved larvae from 8 days after hatching. Pepsin-like enzyme activity was increased in 5 days after hatching in both groups. There was significant difference at 8 and 10 days after hatching between both groups. Based on above results, digestive enzyme activities were correspondingly changed to a growth and morphological transformation. Trypsin-like enzyme and pepsin-like enzyme activities are able to be a useful indices for health and growth status in larval slime flounder, because there was significant difference in digestive enzyme activities with developmental stages, growth or feed supply.

Keywords: Slime flounder, Growth, Metamorphosis, ACPase, ALPase, Trypsin-like enzyme, Pepsin-like enzyme

서 론

해산 어류에서 발달중인 자어의 영양상태와 건강도 및 성장에 관한 연구는 자어의 사망이 대부분 이 시기에 집중되고, 생물학적인 기관의 급격한 변화와 빠른 지수성장을 보이는 시기

이기 때문에 중요하다(Buckley, 1981). 자연에서 자어 단계의 사망은 포식이나 기아 때문이며, 인위적인 사육 환경에서는 먹이 부족과 질병발생, 수질악화 및 공식 등이 자어 사망의 원인이 되고 있다(Rosenthal and Alderdice, 1976). 특히 좌우대칭의 체형에서 눈의 이동과 동시에 두개골, 코의 위치, 턱의 모양 등 몸의 대부분이 좌우비대칭으로 바뀌는 가자미형 변태(pleuronectiform-type metamorphosis)를 거치는 어류들은 급격한 형태 변화를 거

*Corresponding author: limhk@nfrdi.re.kr

쳐야한다(隆島·羽生, 1989). 이들 자어는 발달과정 중 어떤 시기에 먹이와 조우하여 최초의 먹이 섭취에 성공할 경우 각 기관들이 순조롭게 발달하여 그 다음 먹이 탐색이나 섭취에 필요한 여러 가지 기능이 상승하여 생존할 확률이 높아지지만 처음 먹이를 먹어야 할 시기에 먹이를 만나지 못하거나 먹지 못한 개체들은 이후 먹이 탐색과 포식 행위에 이용될 에너지가 낭비되어 그만큼 발육이 지연되고 결국 생존할 확률도 낮아진다(Sanderson and Kupferberg, 1999).

어류의 종묘를 생산하는 양식장에서도 처음 먹이를 먹기 시작하는 시기, 즉 난황에 의한 내부영양에서 먹이 공급에 의한 외부영양으로 전환하는 시기에 사망률이 높아지기 때문에 이 시기에 자어의 영양상태를 파악하는 것은 자어의 생존을 향상을 위하여 매우 중요하다. 그러나 지금까지 보고된 자·치어들에 관한 연구는 주로 형태적인 발달(Minami, 1982; Han and Kim, 1999)이나 조직학적인 기관의 관찰(Walford and Lam, 1993; Lee et al., 2000)과 함께 길이나 무게로 성장을 표현할 뿐 자어의 영양 상태에 관한 자료는 부족한 실정이다.

자어의 영양과 건강상태를 파악하는 방법으로는 핵산량의 변화를 통한 어체의 건강도와 성장을 유추하는 방법(Bulow, 1970; Bulow, 1987; Steinhart and Eckmann, 1992; Fukuda et al., 2001)과 함께 소화효소 활성을 측정함으로써 영양 상태를 추정하는 방법이 이용되고 있다(Pedersen and Hjelmeland, 1988). 소화효소의 활성은 자어의 발달과도 관련되어 있을 뿐만 아니라 첫 먹이의 공급시기 결정이나 먹이의 이용 가능성 등을 파악할 수 있는 좋은 지표로 활용될 수 있다. 소화 효소 중 핵산량 변화와 함께 자어단계의 영양상태를 추정하기 위한 방법으로 trypsin과 trypsinogen 변화를 측정하는 방법이 많이 사용되어 왔으며(Ueberschar et al., 1992), 자어 단계의 핵산량과 소화효소 활성은 환경이나 먹이 결핍 등에 영향을 받아 감소하기 때문에(Pedersen and Hjelmeland, 1988; Steinhart and Eckmann, 1992), 자어의 건강이나 영양상태를 확인할 수 있는 지표로 이용할 수 있다.

본 연구는 우리 나라와 일본, 중국 연해 등에 널리 분포하는 가자미과(Pleuronectidae) 찰가자미속에 속하는 찰가자미(*Microstomus achne*)의 종묘생산 기술을 개발하기 위한 연구의 일환으로 찰가자미 자어의 성장과 발달에 따른 영양상태를 파악하기 위하여 소화효소 중 acid phosphatase(ACPase) specific activity, alkaline phosphatase(ALPase) specific activity, trypsin-like enzyme activity 및 pepsin-like enzyme activity를 조사하였다.

재료 및 방법

산란용 어미와 자어 사육

실험어는 강원도와 경북지역에서 어획된 찰가자미를 사육하여 어미로 사용하였다. 산란을 유도하기 위하여 1톤 FRP 수조에 암컷 3마리(1.26~1.43 kg)와 수컷 5마리(0.52~0.87 kg)를 수

Table 1. Feed composition and developmental stages of slime flounder (*Microstomus achne*) during experimental period

Feed	← Af					
	← A					
Developmental stages	← R					
	P	Pm	Em	Mm	Lm	
Days	0	10	20	30	40	50
						60

A; *Artemia* nauplius, Af; artificial feed, Em; early-metamorphosis stage, Lm; late-metamorphosis stage, Mm; middle-metamorphosis stage, P; prelarva stage, Pm; pre-metamorphosis stage.

용하였으며, 산란을 유도하기 위하여 각 실험어는 LHRHa (Sigma, St Louis, USA) pellet을 어체 1 kg당 100 µg씩 근육에 삽입하였다.

자연 산란된 수정란은 채란망을 설치하여 매일 오전 9시에 수집한 후 자연 수온(10~11°C)으로 관리하였으며, 부화 1일전에 자어 사육수조에 수용한 후 수온을 1일 1°C씩 상승시켜 13 ± 1°C에서 사육하였다. 자어 수조의 수량은 500 L로 유지하였으며, 주수량은 부화 초기 1 L · min⁻¹에서 먹이를 공급하기 시작한 후부터 5 L · min⁻¹으로 증가시켰다.

절식구의 건조 체중은 부화 후부터 12일째까지 매일 측정하였고, 먹이 공급구는 부화 후부터 8일째까지는 매일 측정하였으나 부화 후 10일부터 실험을 종료한 58일째까지는 2~5일 간격으로 측정하였다. 전장은 30마리씩 무작위로 채집하여 만능 투영기(V-12A, Nikon, Japan)로 측정하여 평균값을 이용하였고, 건조 체중은 10마리씩 3회에 걸쳐 60°C에서 24시간 건조하여 측정하였다(Lee, 1994).

자어 수조의 사육 밀도는 사육수 1 L당 약 115개체였으며, 절식구는 처음 사망이 일어나는 시점(부화 후 12일)까지 먹이를 공급하지 않고 사육하였다. 먹이 공급구는 부화 후 2일째부터 해산 클로렐라로 배양된 rotifer, *Branchionus plicatilis*를 공급하였으며, 20일째부터 rotifer와 함께 *Artemia* nauplius를 먹였고, 23일째부터 넙치 치어용 배합사료를 rotifer 및 *Artemia* nauplius와 함께 공급하였다. 부화 후 35일부터 rotifer 공급을 중단하였고 배합사료의 공급량을 증가시켰다(Table 1).

부화 후 성장에 따른 자어의 형태 발달은 입체현미경(Olympus, Japan)을 이용하여 관찰하였으며, 자어의 형태발달 단계는 Minami (1982)와 Okiyama(1967)의 기준을 변형하여 prelarva stage, pre-metamorphosis stage, early-metamorphosis stage, middle-metamorphosis stage, late-metamorphosis stage로 나누었다(Table 1).

소화효소 분석

분석용 자어의 채집은 먹이를 공급하기 전 위와 장이 완전히 비어있는 상태에서 실시하였다. 자어를 계수한 다음 증류수로 자어에 붙어있는 이물질과 해수를 1회 씻은 후 고정액[0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl(pH 7.5)]으로 다시 씻

었다. 그 후 자어는 고정액 3 ml에 고정한 후 초저온냉동고(-87°C)에서 분석 할 때까지 보관하였다. 자어는 1개체 당 건조 체중이 적기 때문에 여러 마리를 이용하였으며, 성장에 따라 개체 수를 조절하였다. 자어 샘플들은 해동 후 homogenizer로 분쇄한 후 2,500 rpm에서 20분간 원심분리하였다.

ACPase 비활성과 ALPase 비활성은 원심분리한 상등액 50 µl에 50 mM P-nitrophenolphosphate PNP-P 50 µl, 완충액 0.1 ml와 증류수 0.3 ml를 첨가한 후 25°C에서 30분간 반응시킨 다음 0.1N NaOH 2.0 ml를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 완충액으로는 ACPase 측정을 위하여 초산완충액(pH 3.5)을, ALPase 측정에는 Glycine-NaOH 완충액(pH 10.0)을 사용하였다. 활성 억제구는 0.1 N NaOH로 반응을 정지시킨 후 위의 시약들을 첨가하였고, 400 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Trypsin-like enzyme 활성은 0.04 mg enterokinase를 0.1 M CaCl₂과 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)을 혼합한 용액 0.4 ml에 같은 양의 시료를 첨가한 후 30°C에서 30분간 반응시켰다. 이것을 0.2 ml씩 2개의 시험관에 분주하여 효소 활성구와 억제구로 삼았다. 활성구는 0.1 M CaCl₂, 5% azocasein과 증류수를 혼합한 액 0.6 ml를 첨가하여 30°C에서 60분간 반응시킨 후 10% TCA로 반응을 정지시켰다. 억제구는 10% TCA를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 활성구와 같은 시약을 첨가하였다. 활성구와 억제구는 여과 후 366 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Pepsin-like enzyme 활성의 측정은 원심분리한 상등액 0.2 ml에 0.2 N 초산나트륨-염산 완충액(pH 2.5)과 1% 산변성 헤모글로빈 혼합액을 0.8 ml 첨가한 후 30°C에서 60분간 반응시킨 다음 10% TCA 2 ml를 혼합하여 반응을 정지시켰다. 그리고 이 용액의 단백질 정량은 Lowry법(Lowry, 1955)으로 측정하였다. 효소 활성 억제구는 2 ml TCA로 반응을 정지시킨 후 활성구와 같이 시약을 첨가한 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

효소 활성은 일정한 조건에서 1분간 기질 1 µmole을 변화시키는 속도를 1 unit라하고 1마리 당 단백질 1 µg으로 환산하여 비활성을 나타내었다.

통계처리

자어의 성장과 생화학 분석을 위하여 부화 일수에 따라 3반복으로 샘플을 채취하여 평균값을 구하였으며, 모든 측정값은 평균값±표준오차로 표현하였다. 먹이 공급구와 절식구 사이의 차이를 비교하기 위해서 t-test를 이용하였고, 각 실험구에서 측정값의 일별 변화량을 비교하기 위해 신뢰구간 95%에서 ANOVA-test를 실시한 후 Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)를 이용하여 유의성을 검증하였다.

결 과

부화 일수에 따른 전장과 건조체중의 변화는 Fig. 1에 나타내었다. 절식구의 전장은 부화 직후(0일) 4.871±0.208 mm이었

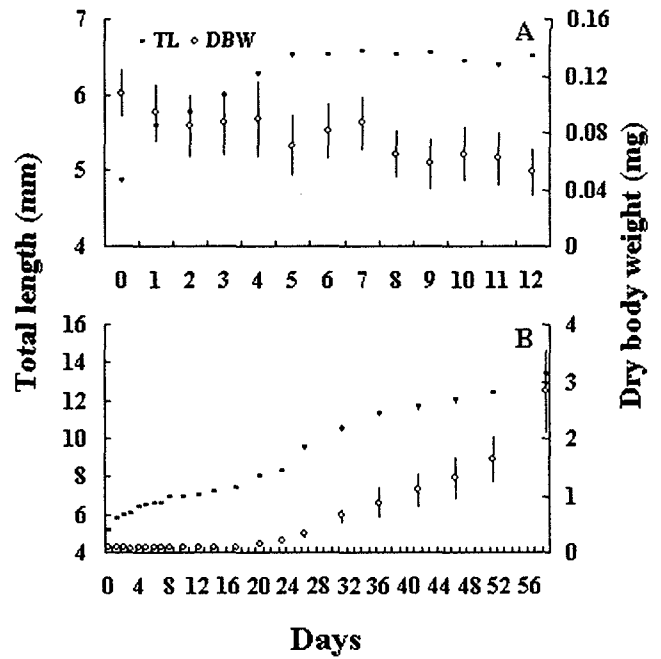


Fig. 1. Changes of total length and dry body weight in starved and fed larvae of slime flounder, *Microstomus achne*. A: starved larvae, B: fed larvae, DBW: dry body weight, TL: total length.

던 것이 부화 5일 후 6.522±0.146 mm까지 빠르게 성장하였으나, 난황이 완전히 흡수된 이후에는 더 이상 길이 성장이 되지 않아 모두 사망한 12일째에도 6.511±0.183 mm였다. 먹이 공급구의 경우 부화시 5.132±0.179 mm였던 것이 시간 경과와 함께 빠르게 성장하여 부화 후 23일에 8.331±0.851 mm, 실험을 종료한 58일째에는 13.431±1.396 mm로 성장하였다. 절식구의 경우 자어 한 마리당 건조 체중은 부화 직후 0.108±0.020 mg이었던 것이 난황을 완전히 흡수한 7일 후에는 0.087±0.015 mg으로 감소하였고, 12일째에는 0.052±0.012 mg으로 더욱 감소하였다. 먹이 공급구에서는 부화 직후 0.100±0.010 mg이었으며 17일째까지 감소하는 경향을 보였으나, 20일째부터 증가하기 시작하여 23일째에는 0.203±0.032 mg이었고, 이후 빠른 지수성장을 보여 58일째에는 2.830±0.658 mg까지 증가하였다. 두 실험구의 성장 차이는 난황을 완전히 흡수한 pre-metamorphosis stage의 시작 시기부터 나타났고, 먹이 공급구는 부화 후 12일째부터 체고의 성장이 활발하였다. Middle-metamorphosis stage인 35일째부터 눈이 돌아가기 시작하였으며, 41일을 전후하여 꼬리지느러미 발달이 확연히 구분되었다. Late-metamorphosis stage인 부화 후 58일째부터 체색은 발달하지 않았지만 1/3의 개체가 변태를 완료하였으며 어미의 형태를 갖춘 개체가 출현하였다(Table 1).

절식구에서 부화 일수에 따른 ACPase 비활성은 부화 후 9.79±2.53 unit/µg protein에서 부화 일수가 경과함에 따라 유의적으로 증가하여 실험을 종료한 12일째에는 23.76±3.23 unit/µg protein으로 증가하였다. 먹이 공급구에서는 부화 직후 8.55±

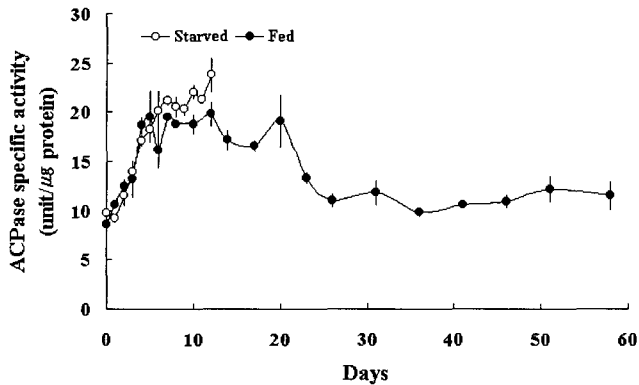


Fig. 2. Changes of acid phosphatase (ACPase) specific activity in starved or fed larvae of slime flounder, *Microstomus achne*.

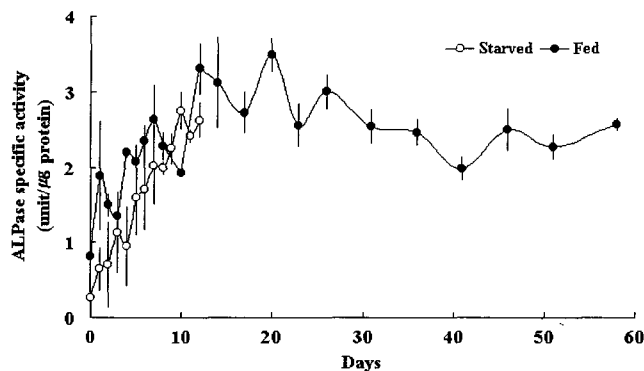


Fig. 3. Changes of alkaline phosphatase (ALPase) specific activity in starved or fed larvae of slime flounder, *Microstomus achne*.

1.16 unit/ μg protein에서 난황이 대부분 흡수된 7일 후에 19.54 ± 0.78 unit/ μg protein으로 부화 직후와 비교하여 유의적으로 높아졌다. 그러나 26일째에는 11.00 ± 1.24 unit/ μg protein으로 감소하였으며, 이후부터 실험을 종료한 부화 후 58일까지 일정한 수준을 유지하였다. 절식구와 먹이 공급구 사이에서 유의적인 활성의 차이는 없었다(Fig. 2).

절식구의 ALPase 비활성은 부화 후 0.26 ± 0.42 unit/ μg protein에서 난황을 대부분 흡수한 7일째에는 2.02 ± 0.93 unit/ μg protein으로 유의적으로 증가하였고 자어의 사망이 발생한 12일째까지 계속 증가하였다. 먹이 공급구의 경우 부화 후 0.80 ± 0.63 unit/ μg protein이었던 것이 4일째에 2.19 ± 0.13 unit/ μg protein으로 부화직후와 비교하여 유의적으로 증가하였으며, 이후 계속 증가하여 20일째에는 3.48 ± 0.40 unit/ μg protein으로 가장 높은 활성을 나타내었다. 절식구와 먹이공급구 사이에서는 비활성의 유의적인 차이가 없었다(Fig. 3).

절식구의 경우 trypsin-like enzyme 활성은 부화 후 3일까지 변화가 없었으나, 부화 후 4일째에 0.019 ± 0.003 unit/ μg protein으로 증가하였으며 6일째에는 0.152 ± 0.024 unit/ μg protein으로 가장 높은 활성을 나타내었다. 그러나 난황을 완전히 흡수한 이후에는 거의 검출되지 않았다. 먹이 공급구의 활성은 초기에 약간 감소하였지만, 난황을 대부분 흡수한 부화 후 7일에

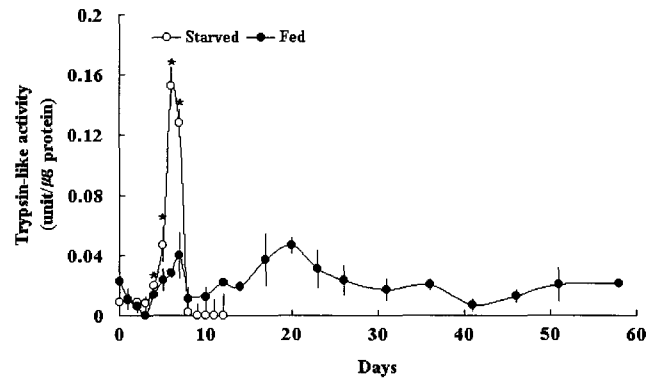


Fig. 4. Changes of trypsin-like enzyme activity in starved or fed larvae of slime flounder, *Microstomus achne*. Asterisks indicate significant differences between starved and fed larvae at that sampling day ($P < 0.05$).

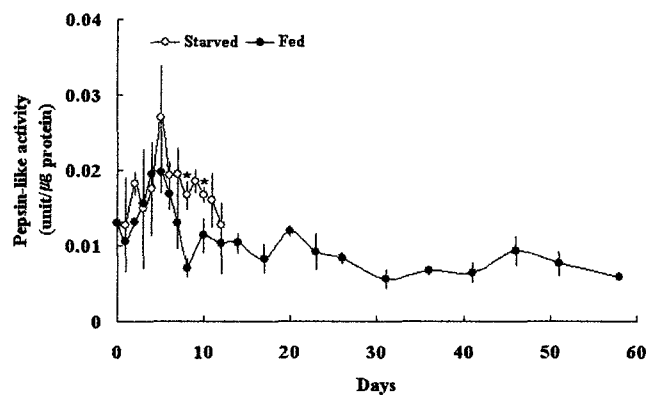


Fig. 5. Changes of pepsin-like enzyme activity in starved or fed larvae of slime flounder, *Microstomus achne*. Asterisks indicate significant differences between starved and fed larvae at that sampling day ($P < 0.05$).

는 0.039 ± 0.027 unit/ μg protein으로 증가하였다. 부화 후 20일째에는 0.046 ± 0.010 unit/ μg protein으로 가장 높은 활성을 나타내었으며, 이후 서서히 감소하기 시작하여 실험을 종료한 부화 후 58일째에 0.021 ± 0.003 unit/ μg protein이었다. 먹이 공급구에서 사육일수에 따른 trypsin-like enzyme 활성은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 절식구와 먹이 공급구 사이에서는 부화 후 4일부터 7일째까지 절식구가 유의적으로 높았지만, 8일째 이후부터는 먹이 공급구가 높은 활성을 나타내었다(Fig. 4).

Pepsin-like enzyme의 활성은 Fig. 5와 같다. 절식구의 경우 부화 직후 0.013 ± 0.009 unit/ μg protein에서 부화 후 5일에 0.027 ± 0.012 unit/ μg protein으로 가장 높은 활성을 나타내었지만 이후 감소하기 시작하여 12일째에는 0.012 ± 0.0054 unit/ μg protein이었다. 사육일수에 따른 활성의 유의적인 차이는 없었다. 먹이 공급구의 경우 부화를 완료한 0일째에 0.013 ± 0.0003 unit/ μg protein에서 5일째에는 0.019 ± 0.0050 unit/ μg protein으로 부화 직후에 비해 유의적으로 높아졌다. 이후 상승과 하강을 반복하면서 일정한 수준을 유지하였다. Pepsin-like enzyme의 활성은 부화 후 8일째와 10일째 절식구가 먹이 공급구에 비해 유의적으로 높았다(Fig. 5).

고 찰

본 연구는 전장과 건조 체중의 측정에 의한 찰가자미 자어의 성장뿐만 아니라 자어의 발달과 성장에 관한 생화학적인 지표로서 소화효소의 활성 변화를 절식구와 먹이 공급구로 구분하여 조사하였다.

먹이 공급구의 전장은 Buckley (1981)의 연구에서와 같이 지수적으로 증가하였으며($TL=5.8636e^{0.0159D}$, $r^2=0.964$), 부화 후 4일만에 장에서 rotifer가 확인되었으나 난황을 보유하고 내부영양을 하는 prelarva 시기에는 먹이를 공급한 실험구와 절식구 사이에서 성장의 차이는 없었다. 이러한 결과는 먹이 공급구에서도 이 시기동안은 성장에 필요한 총단백질량의 증가가 거의 없었으며(data not shown), 세포내 가수분해의 지표로 측정된 ACPase의 활성 증가와 함께 골격 형성에 관여하는 것으로 알려진 ALPase의 활성이 증가한 것으로 보아 이 시기에는 체내 단백질 합성에 의한 성장보다 기관발달 및 골격 형성에 따른 체내 가수분해 활동이 활발하게 진행되는 시기인 것으로 추정된다.

건조 체중의 변화는 절식구의 경우 난황을 가지고 있는 부화 후 7일까지는 완만하게 감소하였지만 난황을 대부분 소모하고 난 후에는 빠르게 감소하였다. 이러한 결과는 난황을 가지고 있는 기간에는 난황 흡수에 의한 체중 감소로 보이며, 난황 흡수 후에는 기아로 인한 단백질 합성 능력 저하와 체내의 영양분 소모 때문으로 추측된다. 먹이 공급구에서도 난황 흡수 기간 동안 난황 흡수로 인하여 건조 체중이 서서히 감소하였고, 부화 후 8일부터 10일까지 일시적으로 상승하지만 10일째부터 17일째까지 다시 감소하였다. 이 기간의 체중 감소는 영양적인 측면보다는 갑작스런 자어 사육 수온의 변화에 따른 스트레스 때문으로, 세포내 가수분해 효소 활성 증가와 total RNA량 감소(data not shown)에 따른 단백질 합성능력이 떨어졌기 때문으로 생각된다(Canino, 1994; Buckley et al., 1999). 부화 20일 이후부터 빠른 지수성장($DBW=0.0542e^{0.0676D}$, $r^2=0.9314$)을 보이는 것은 Artemia와 배합사료 공급으로 인해 자어에게 적합한 크기의 먹이와 영양원으로 먹이의 전환이 이루어짐과 함께 단백질 합성능력의 증가 및 세포내 가수분해 효소의 활성이 감소했기 때문으로 생각된다.

ACPase와 ALPase는 동물계에서 다른 분자 형태로 광범위하게 분포하고 있으며, 비록 적은 양이지만 여러 가지 기관이나 조직에서 가수분해를 수행하고 있다(Cousin et al., 1987). 인산분해 효소는 영양과정, 미네랄화 과정을 포함한 해독 기능에 관여하며, 인산염 수송과 인산과 연결된 단백질의 가수분해 과정에 중요하다(Letelier et al., 1985). ACPase는 라이소자임의 표지효소로서 산성역에서 인산 모노에스테르를 가수분해한다. 본래 단백질 대사 회전을 생각하는 경우 카텝신계의 효소 활성을 측정하는 것이 적합하지만, 자·치어의 경우 기관을 분리하기 어렵기 때문에 전어체를 이용하여 ACPase 비활성을 측정한다. 대사 회전의 지표로서 이용은 하고 있지만 카텝신계의

효소와 펩신을 구별하기 어렵기 때문에 완전한 지표로 활용할 수는 없다. ACPase 비활성은 세포내 인 화합물에 대한 분해속도의 지표로서 이용되며, 활성이 높은 시기는 세포내 물질의 분해가 진행되는 것으로 보고되었다(中野 等, 1985). ACPase 비활성은 먹이 공급구에서 부화 후부터 계속 증가하여 난황이 대부분 흡수된 부화 후 7일에 최고값을 보였고, 20일까지 높은 수준으로 유지되었지만, 부화 23일째 급격히 감소한 후 안정된 값을 나타내었다. 이것은 부화 직후의 turbot, *Scophthalmus maximus* 자어에서 난황과 유구를 덮고 있는 세포막에서 강한 활성이 관찰되었고, 신경계, 직장, 비장, 신장, 심장 등에서 부화 일수가 경과할수록 강하게 나타나지만, 치어기로 진행될수록 활성은 떨어진다(Cousin et al. (1987)의 연구 결과와 유사하였다. 본 논문에서 나타내지는 않았지만 ACPase 비활성은 RNA/DNA의 경향과는 역 상관관계를 나타내었다. 즉, RNA/DNA가 증가할 때 ACPase 비활성은 감소하였다. 이것은 Lee (1994)가 보고한 것처럼 정상적인 성장에 따른 결과 때문이라고 생각되며, 절식구의 ACPase 비활성이 부화 후부터 지속적으로 증가한 것은 외부 영양 결핍으로 인한 체내 가수분해가 활발하게 진행되었기 때문으로 추측된다.

어류 자어의 발달과정중 ALPase의 생리작용은 명확하게 밝혀져 있지 않지만, 알카리역에서 인 가수분해 효소로 작용하며 골격형성에 관여하는 것으로 알려져 있으며(Takii et al., 1992), 발생중인 배와 자·치어의 조직에 전반적으로 분포하는 특징을 가지고 있다. 본 연구에서 ALPase 비활성은 부화 후 급격히 상승하여 turbot에서 부화 직후 췌장, 신장, 심장, 아가미, 비장에서 강한 활성이 관찰되었다던 Cousin et al.(1987)의 연구 결과를 뒷받침하였다. 먹이 공급구에서 부화 후 4일째에 활성이 증가한 것은 이 시기에 자어들의 장에서 먹이가 확인되는 것으로 보아 장 발달에 따른 것으로 추측된다. 부화 후 20일까지의 증가는 red seabream, *Pagrus major*을 이용한 Takii et al. (1992)의 보고와 같이 신경두개, 구개, 설골 및 새궁의 발달에 따른 활성 증가로 생각된다. 또한 ALPase는 연골에서 경골로 이행될 때에도 활성이 증가하기 때문에 실험 종료 시까지 높은 활성을 나타내는 것은 형태적으로 불안정한 변태과정과 치어기로 발달하는 과정 때문으로 사료된다.

먹이 공급구의 trypsin-like enzyme은 부화 직후 높은 활성을 보이지만 개구가 완료되는 3일째까지 급격히 감소하였다. 이와 같은 부화 직후의 높은 활성은 carp, *Cyprinus carpio*와 black seabream, *Acanthopagrus schlegeli* (Kawai and Ikeda, 1973)에서 보고된 것처럼 부화 효소 때문으로 추측된다. 먹이공급과는 상관없이 절식구와 먹이 공급구 모두에서 부화 후 7일까지 비교적 높은 활성을 나타내었고, 난황을 완전히 흡수한 이후 절식구의 활성은 급격히 감소하여 거의 활성이 검출되지 않았다. 이러한 활성의 감소는 trypsin의 경우 먹이를 먹는데 따른 반응으로 트립신이 방출되고 축적되지만 절식구는 먹이를 먹을 수 없기 때문에 trypsin-like enzyme의 활성이 거의 검출되지 않았

다고 추측된다. 먹이 공급구에서 부화 7일째의 peak 후 14일까지 활성이 낮은 것은 두 가지 가능성을 예측할 수 있다. 하나는 Hjelmeland et al. (1988)의 보고처럼 난황 흡수 이후 효소량의 감소 때문이거나, 또는 핵산량과 효소 활성의 감소는 환경이나 먹이 결핍 등에 영향을 받는다는 연구 결과(Pedersen and Hjelmeland, 1988; Steinhart and Eckmann, 1992; Ueberschar, 1993)처럼 이 기간 동안 수온저하에 따른 스트레스 때문일 수 있다. 부화 후 40일을 전후하여 활성이 감소한 것은 Baragi and Lovell (1986)과 Hjelmeland et al. (1988)의 언급처럼 먹이생물에는 효소가 첨가되어 있어 자어의 소화를 돕고 먹이생물에 의해 활성이 높게 나타나지만 본 연구에서는 35일째부터 생물사료인 rotifer 공급을 중단하였기 때문에 활성이 감소한 것으로 생각된다.

지금까지 어류에서 pepsin-like enzyme 활성에 관한 광범위한 연구가 이루어져 왔다. 펩신은 위 중에 함유되어 있는 세포의 소화효소이고, 위는 많은 수의 위선을 가지며, 낮은 pH 값과 높은 농도의 펩신을 보유하고 있다(Gisbert et al. 1999). 찰가자미 자어에서 이 효소의 활성은 무지개송어, *Salmo gairdnerii*와 감성돔(川畝, 1975)에서처럼 부화 직후 활성이 높게 나타났다. 이 시기에 활성이 증가한 것은 위선 발달에 따른 증가라기 보다는 Lee (1994)의 보고와 같이 lysosome에 함유되어 있는 카텝신 D에 의한 세포내 물질이 분해되고 있는 것으로 추정된다. 먹이 공급구에서 부화 10일 후 활성이 증가하였는데 이것은 위선이 분화되기 시작했기 때문으로 생각되며, 20일째 높은 활성을 나타낸 이후 완만하게 감소하며 안정된 값을 나타내었다.

이상의 실험 결과들을 종합해보면 초기 자어기 동안 성장과 발달은 ACPase와 ALPase의 비활성 및 trypsin-like enzyme과 pepsin-like enzyme의 활성과 깊은 연관이 있었다. 특히 난황을 가지고 내부 영양을 하는 prelarva 시기는 먹이의 공급 유무가 ACPase와 ALPase의 비활성 및 trypsin-like enzyme과 pepsin-like enzyme의 활성에 영향을 미치지 않았으나, 난황 흡수 이후부터 먹이의 공급은 trypsin-like enzyme과 pepsin-like enzyme의 활성에 영향을 주었다. 또한 먹이를 공급한 실험구에서 부화 후 20일까지 세포내 가수분해 효소인 ACPase와 ALPase의 비활성이 높은 반면 단백질 합성 능력은 떨어지는 것으로 보아 단백질 합성에 따른 성장보다 기관 발달에 따른 세포내 가수분해가 활발한 시기로, 어체가 매우 불안정하기 때문에 어체에 적합한 먹이 공급과 안정적인 환경을 유지하여 자어에게 미치는 스트레스를 최소화할 수 있는 사육 조건을 유지해야 할 것으로 생각된다.

요 약

부화 직후부터 변태를 완료하는 58일째까지 찰가자미 자어에서 소화효소들의 활성과 성장이 조사되었다. 자어들은 먹이를 공급하지 않는 조건과 충분히 공급하는 두가지 조건에서 사

육되었고 일정한 간격으로 성장과 함께 acid phosphatase (ACPase), alkaline phosphatase (ALPase)의 비활성 및 trypsin-like enzyme과 pepsin-like enzyme의 활성 변화를 파악하였다.

절식구에서 전장의 성장은 부화 후 7일까지 빠르게 증가하였으나, 이후부터는 거의 변화가 없었고 먹이 공급구의 경우 부화시 5.13±0.18 mm였던 것이 58일 후 13.43±1.40 mm로 성장하였다. 절식구의 개체 당 건조 체중은 부화 직후부터 기아로 사망이 발생한 12일째까지 시간이 경과할 수록 감소하였다. 먹이 공급구의 경우 난황이 흡수될 때까지는 감소하였지만, 부화 후 20일째부터 빠르게 증가하기 시작하였다. ACPase와 ALPase 비활성은 절식구의 경우 실험을 종료할 때까지 증가하였으나, 먹이공급구는 부화 후 20일까지 증가한 후 실험을 마칠 때까지 서서히 감소하였으며 두 실험구 사이에서는 유의적인 차이가 없었다. 절식구의 trypsin-like enzyme 활성은 부화 후 3일부터 증가하여 6일째에 가장 높은 활성을 나타내었으나 난황을 완전히 흡수한 이후부터는 활성이 거의 검출되지 않았다. 먹이 공급구의 경우 부화 후 3일부터 난황을 완전히 흡수할 때까지 빠르게 증가하였고, 20일째 가장 높은 활성을 나타내었다. Trypsin-like enzyme 활성은 부화 후 8일부터 먹이공급구가 절식구보다 유의적으로 높게 나타났다. Pepsin-like enzyme 활성은 두 실험구 모두에서 부화 초기에는 증가하였으나, 절식구에서는 실험 종료 시까지 감소하였고, 먹이 공급구는 부화 후 10일째 높은 활성을 나타낸 후 일시적으로 감소하지만 부화 후 20일째 다시 높은 활성을 나타낸 후 실험 종료 시까지 서서히 감소하였다. Pepsin-like enzyme 활성은 8일째와 10일째 절식구가 먹이공급구보다 유의적으로 높게 나타났다.

이상의 결과들을 종합해보면 ACPase, ALPase의 비활성 및 trypsin-like enzyme과 pepsin-like enzyme의 활성은 자어의 성장이나 형태 발달과 깊은 연관이 있었다. 그리고 trypsin-like enzyme과 pepsin-like enzyme의 활성은 자어의 발달 단계, 성장 및 먹이 공급 등에 영향을 받기 때문에 자어의 건강이나 성장 상태를 나타낼 수 있는 간접적인 지표로써 이용 할 수 있겠다.

참고문헌

- Baragi, V. and R. T. Lovell, 1986. Digestive enzyme activity in stripped bass from first feeding through larva development. *Transactions of the American Fisheries Society*, **115**: 478-484.
- Buckley, L. J., 1981. Biochemical changes during ontogenesis of cod (*Gadus morhua* L.) and winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) larvae. *Rapp. P.v. Reun. Cons. int. Explor. Mer.*, **178**: 547-552.
- Buckley, L. J., E. Caldarone and T. L. Ong, 1999. RNA-DNA ratio and other nucleic acid-based indicators for growth and condition of marine fishes. *Hydrobiologia*, **401**: 265-277.
- Bulow F. J., 1970. RNA-DNA ratios as indicators of recent growth rates of a fish. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **27**: 2343-2349.

- Bulow F. J., 1987. RNA-DNA ratios as indicators of growth in fish: a review. (in) The age and growth of fish, Summerfelt RC, Hall GE (eds.), Iowa State University Press, Iowa, pp. 45-64.
- Canino, M. F., 1994. Effects of temperature and food availability on growth and RNA/DNA ratios of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) (Pallas) eggs and larvae. Journal of Experimental Marine Biology, **175**: 1-16.
- Cousin J. C. B., Baudin Laurencin, F., and J. Gabaudan, 1987. Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus* L. J. Fish Biol., **30**: 15-33.
- Duncan, D. B., 1955. Multiple-range and multiple F tests. Biometrics, **11**: 1-42.
- Fukuda, M., H. Sako, T. Shigeta and R. Shibata, 2001. Relationship between growth and biochemical indices in laboratory-reared juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), and its application to wild fish. Marine biology, **138**: 47-55.
- Gisbert, E., M. C. Sarasquete, P. Williot and F. CastelloOrvay, 1999. Histochemistry of the development of the digestive system of Siberian sturgeon during early ontogeny. Journal of Fish Biology, **55**: 596-616.
- Hjelmeland, K., B. H. Pedersen and E. M. Nilssen, 1988. Trypsin content in intestines of herring larvae, *Clupea harengus*, ingesting inert polystyrene spheres or live crustacea prey. Marine Biology, **98**: 331-335.
- Han, K. H. and Y. U. Kim, 1999. Eggs development and morphology of larvae of the flounder, *Limanda herzensteini*. Korean J. Ichthyol., **11**: 86-93 (in Korean).
- Kawai, S. and S. Ikeda, 1973. Studies on digestive enzyme of fishes-IV Development of the digestive enzyme of Carp and Black sea bream after hatching. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, **39**: 877-881.
- Lee, B. I., 1994. Morphological and Biochemical Studies on the Early Development of the Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Ph.D. thesis, Tokyo University of Fisheries, Tokyo, Japan, 200 pp (in Japanese).
- Lee, J. S., H. Y. Kim, S. G. Byun, J. D. Kim, C. S. Go and P. Chin, 2000. Ontogeny of the digestive organ during early life stages of the black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii* (Teleostei: Sparidae). J. Korean Fish Soc., **33**: 129-136 (in Korean).
- Letelier, M. E., Y. Repetto, J. Aldunate and A. Morello, 1985. Acid and alkaline phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Comp. Biochem. Physiol., **81B**: 47-51.
- Lowry, O. H., N. J. Rosenberough, A. R. Farr and R. J. Randall, 1955. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **192**: 265-275.
- Minami, T., 1982. The early life history of a flounder, *Paralichthys olivaceus*. Nippon Suisan Gakkaishi, **48**: 1581-1588.
- Okiyama, M., 1967. Studies on the early life history of a flounder, *Paralichthys olivaceus* 1. Morphology of postlarvae. Bull. Jap. Sea Reg. Fish. Res. Lab., **17**: 1-12 (in Japanese).
- Pedersen, B. H. and K. Hjelmeland, 1988. Fate of trypsin and assimilation efficiency in larval herring (*Clupea harengus*) following digestion of copepods. Marine Biology, **97**: 467-476.
- Rosenthal, H. and D. F. Alderdice, 1976. Sublethal effects of environment stressors, natural and pollutional, on marine fish eggs and larvae. J. Fish. Res. Bd Can., **33**: 2047-2065.
- Sanderson, S. L. and S. J. Kupferberg, 1999. Developmental and evolution of aquatic larval feeding mechanism. (in) The origin and evolution of larval forms. Academic Press, San Diego, pp. 301-377.
- Steinhart, M. and R. Eckmann, 1992. Evaluating the nutritional condition of individual whitefish (*Coregonus* spp.) larvae by the RNA/DNA ratio. Journal of Fish Biology, **40**: 791-799.
- Takii, K. J., M. Nakamura, O. Takaoka, S. Fukuta and H. Kumai, 1992. Some enzyme activities of red bream from larvae just after hatching to juveniles. Suisanzoshohu, **40**: 291-296 (in Japanese).
- Ueberschar B., B. H. Pedersen and K. Hjelmeland, 1992. Quantification of trypsin with a radioimmunoassay in herring larvae (*Clupea harengus*) compared with a highly sensitive fluorescence technique to determine tryptic enzyme activity. Marine Biology, **113**: 469-473.
- Walford, J. and T. J. Lam, 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juvenile. Aquaculture, **109**: 187-205.
- 隆島史夫・羽生功. 1989. 9. 仔稚魚の成長. (in) 水族繁殖學. 水産養殖學講座, 緑書房, pp. 239-289.
- 中野廣・安・義秀・白旗總一郎. 1985. 成長に伴うさけ稚魚の酸性フォスファターゼ活性, 總タンパク質, RNAおよびDNA量の變化. 北水研報告, **50**: 71-77.
- 川合眞一郎. 1975. 消化酵素. (in)水産學 시리즈 8 稚魚の攝餌と發育. 日本水産學會編, 恒星社厚生閣, pp. 30-44.

원고접수 : 2003년 6월 26일

수정본 수리 : 2003년 8월 18일

책임편집위원 : 권혁추