

## 소화효소 활성으로 본 rotifer *Brachionus rotundiformis*의 적정 영양강화 조건

권오남\*, 박흠기<sup>1</sup>

북해도대학 대학원수산과학연구원, <sup>1</sup>강릉대학교 해양생명공학부

### The Optimal Enrichment Condition of Rotifer *Brachionus rotundiformis*

O-Nam Kwon\* and Heum-Gi Park<sup>1</sup>

Division of Marine Biosciences, Graduate School of Fisheries Science, Hokkaido University, Hakodate 041-8611, Japan

<sup>1</sup>Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University, Gangneung 210-702, Korea

The purpose of the study was to suggest the optimal lipid enrichment conditions used digestive enzyme activity of rotifer changing due to water temperature and salinity. The high population growth appeared at the experiment temperature more than 28 degrees highly on the culture temperature (maximum 32 degrees, 1,453 individual /mL). The fecundity was low at high temperature, and the egg ratio was high at low temperature. Population growth of 10 and 15 ppt appeared in most highly, but the fecundity and the egg ratio were high most significantly appeared in natural seawater (32 psu). The digestive enzyme activity by the culture environment mainly showed high activity in natural seawater (amylase exclusion, 15 psu). However, the TAP activity by the water temperature showed highly at the more high temperature, but the amylase and the lipase appeared at low temperature. We carried out the lipid enrichment at 20 degrees and 26 degrees in a condition of the natural seawater. Total protein, the total essential amino acids differed not significantly. The methionine content that was essential amino acids, a total lipid content, unsaturated index of fatty acids, DHA and the DHA/EPA ratio were high significantly each in 20°C enrichment trial. Therefore, we could suggest the 20°C and natural seawater for the optimal lipid enrichment condition in aquaculture, because methionine contents, several indexes by the lipid, TG-lipase activity, fecundity and egg ratio are high.

**Keywords:** *Brachionus rotundiformis*, Rotifer, 수온, 염분, 소화효소 활성, 지질영양강화

### 서 론

Rotifer *Brachionus rotundiformis*는 어류중요생산에 있어서 필수적인 초기 동물성 먹이생물이다. 이들 rotifer에 대한 연구는 뱀장어 양식장 물 변화의 해적생물에서 우수한 먹이생물로의 인식전환 이후, 수온 및 염분농도 등의 배양환경 규명을 시작으로 해산 중요생산에 이용하게 되었다(Hagiwara et al., 1988; Park 1997, 1998). 그러나 rotifer는 적정 배양환경에서 담수산 농축 *Chlorella*로 배양하였을 때, C<sub>18</sub>계열 이상의 탄소수를 갖는 지방산의 축적이 어렵다(Maruyama et al., 1997; Sargent et al., 1999b; Park and Brown, 2004). 이런 이유로 HUFA 함량이 비교적 많은 미세조류인 *Nannochloropsis oculata*와 *Tetraselmis* sp.의 공급을 통해 HUFA 함량을 증가시키기도 하였다(Lubzens, 1987). 이와 같은 rotifer의 영양강화는 유화오일인 Super selco

와 Marina-α, 그리고 팽효모에 유화오일을 입힌 유지효모를 통해 총 HUFA 함량을 높이는데 치중되어져 왔다. 최근 어류 자어에 있어 HUFA 중 DHA와 EPA의 중요성이 대두됨에 따라, 이들의 함량이 높은 유화오일과 미세조류인 *Schizochytrium* sp., *Crypthoecodinium* sp. 등의 이용을 통해 자어 단계에 필요로 하는 필수 지방산을 공급하는 연구가 이루어지고 있다(Fernandez-Reiriz et al., 1993; Watanabe, 1993; Park and Brown, 2004; Park et al., 2006). 한편 어류자어에 있어서 rotifer와 같은 살아있는 동물성 먹이생물은 초기 우수한 영양분을 공급하는 매체로서의 역할과 초기 자어에게 외부에서 공급할 수 있는 소화효소체의 역할을 동시에 수행하고 있다(Kolkovski, 2001). 그렇지만 rotifer에 대한 연구는 전술한 바와 같이 자어의 필수 영양분의 보충에만 집중되어 이루어지고 있는 것이 현실이다. 그러나 rotifer와 같이 살아있는 먹이생물의 공급을 통해 자어의 소화능력 향상에 대한 여러 보고들이 수년에 걸쳐 보고되고 있다(Ueberschr, 1993; Dabrowski, 1977; Kolkovski, 2001). 그렇지

\*Corresponding author: onamkwon@yahoo.com

만 정작 rotifer가 가진 소화효소에 대한 연구는 일부에서 이루어져 있을 뿐 체계적으로 진행되어 있지 않다(Munilla-Moran and Stark, 1989; Munilla-Moran et al., 1990, Kurokawa and Suzuki, 1998; Kwon and Park, 2005). 이런 이유로 인해 rotifer의 배양 환경에 따른 소화효소 활성의 변화를 알고 어떤 조건에서 배양된 rotifer가 자어가 필요로 하는 지질 영양강화가 잘 되는지를 파악할 필요가 있다. 그리고 이것을 rotifer의 소화효소 보유의 측면에서 해석하여 최적의 지질 영양강화 조건을 제시해 줄 필요가 있다.

따라서 본 연구에서는 Kwon and Park (2005)에서 밝힌 rotifer *B. rotundiformis*의 소화효소 활성 특성을 바탕으로 수온과 염분농도의 변화에 따른 이들의 소화효소 활성을 파악하고 설정 온도에서 영양강화하여 특히 TG-lipase 활성이 높은 온도에서 영양강화 효과가 좋은지를 증명하는데 목적이 있다.

## 재료 및 방법

배양조건별 소화효소 활성 측정을 위한 실험에 사용된 rotifer는 *B. rotundiformis* (Uijin strain)이었다. Rotifer 배양에서 수온에 따른 실험은 20, 24, 28, 32 및 36°C에서 이루어졌으며, 염분별 실험은 28°C에서 5, 10, 15, 20, 25 psu 및 32 psu(자연해수)의 조건으로 실시하였다.

Rotifer는 mL 당 1,000개체의 밀도로 접종하였으며 접종 후 24시간 경과 후 개체수/mL로 계수하여 성장측정을 하였다. 또한 포란 개체와 알을 계수하여 포란률과 난 비율로 나타내었다.

각각의 배양 조건의 rotifer는 균질화하고 4°C에서 원심분리(6,000 rpm, 30 min) 후 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 그리고 소화효소 활성 분석 시까지 -80°C에 보관하였다. 모든 조효소액은 준비 후 48시간 내에 모든 측정을 실시하였다.

소화효소 활성 측정은 Somogyi (1952), Kunitz (1947) 및 Schmidt et al. (1974)의 방법을 rotifer 활성 특성을 고려하여 변형한 Kwon and Park (2005)의 방법으로  $\alpha$ -amylase, Total

alkaline protease (이하 TAP) 및 triacylglycerol lipase (이하 TG-lipase) 활성을 측정하였다. 그리고 수용성 단백질량의 측정은 Lowry et al. (1951)의 방법에 따라 정량하였다.

지질 영양강화는 염분별로 배양했던 rotifer의 각 소화효소 활성이 높았던 32 psu에서 20°C와 26°C로 나누어 실시하였다. 영양강화 시 rotifer는 1,000 개체/mL로 수용하여 1,000,000 rotifer 당 0.3 g의 Algamac 2000 (Martek, U.S.A.)으로 지질 영양강화 해 주었다. 영양강화는 Park and Brwon (2004)에서 이상적인 영양강화 시간으로 제시한 6시간 동안 해 주었고, 깨끗한 해수로 옮긴 후 바닥의 영양강화제 찌꺼기와 rotifer 사체를 제거한 후 분석용으로 사용하였다. 영양강화한 rotifer는 동결건조 후 자동아미노산 분석기(HSAAA, Hitachi L-8800, Japan)와 가스 크로마토그램(GC, 6890 plus, Agilent, U.S.A.)을 이용하여 구성 아미노산과 지방산을 분석하였으며, 총 단백질과 총 지질은 구성 아미노산의 총량과 중량법으로 각각 계산하여 백분율로 표기하였다.

개체성장과 소화효소 활성의 통계처리는 one-way ANOVA test를 실시하고 Duncan (1955)의 다중검정으로 처리, 평균 간의 유의성을 검정하였다. 모든 통계처리는 유의확률 95% 범위에서 SPSS 프로그램(Ver. 14.0)을 이용하여 분석하였다.

## 결 과

각각 다른 온도에서 24시간 배양된 rotifer 배양 밀도는 32°C에서 1,453 개체/mL로 가장 높았다( $P < 0.05$ ). 그러나 28과 36°C과의 유의적인 차이는 없었다. 그리고 포란률은 20°C에서 가장 높은 29%로 나타났지만( $P < 0.05$ ), 24, 28 및 32°C와 유의적인 차이는 보이지 않았으며, 36°C에서 가장 낮은 10.4%의 포란률을 보였다( $P > 0.05$ ). 난 비율은 20°C에서 가장 높은 37.1%로 조사되었지만( $P < 0.05$ ) 24°C와 유의적인 차이는 없었다. 배양온도 28°C에서 염분농도에 따른 rotifer 배양 밀도는 15 psu에서 2,147 개체/mL로 가장 높게 나타났지만( $P < 0.05$ ), 1,993 개체/mL로

**Table 1.** Rotifer density, specific growth rate (SGR), fecundity and egg ratios of rotifer *Brachionus rotundiformis* cultured for 24 hour after inoculation to 1,000 inds./mL on the different temperatures and salinities

°C	Rotifer (ind./mL) (SGR)	Fecundity (%)	Egg ratios (%)	psu	Rotifer (ind./mL) (SGR)	Fecundity (%)	Egg ratios (%)
Initial	1,000 ± 102.0	22.9 ± 2.85	23.3 ± 2.39		1000 ± 151.8	51.2 ± 9.00 <sup>a</sup>	52.3 ± 2.39 <sup>a</sup>
20	1,073 ± 94.5 <sup>a</sup> (0.07 ± 0.087 <sup>a</sup> )	29.0 ± 8.18 <sup>b</sup>	37.1 ± 9.84 <sup>c</sup>	5	1653 ± 23.1 <sup>b</sup> (0.07 ± 0.087 <sup>a</sup> )	22.1 ± 3.95 <sup>a</sup>	33.5 ± 0.92 <sup>a</sup>
24	1,193 ± 80.8 <sup>ab</sup> (0.18 ± 0.067 <sup>ab</sup> )	23.9 ± 4.83 <sup>b</sup>	26.6 ± 7.15 <sup>bc</sup>	10	1993 ± 180.4 <sup>c</sup> (0.69 ± 0.090 <sup>c</sup> )	20.0 ± 2.53 <sup>a</sup>	32.1 ± 3.30 <sup>a</sup>
28	1,240 ± 111.4 <sup>abc</sup> (0.22 ± 0.091 <sup>abc</sup> )	18.4 ± 2.81 <sup>ab</sup>	21.2 ± 24.92 <sup>ab</sup>	15	2147 ± 172.4 <sup>c</sup> (0.76 ± 0.081 <sup>c</sup> )	19.7 ± 2.07 <sup>a</sup>	28.7 ± 3.25 <sup>a</sup>
32	1,453 ± 98.7 <sup>c</sup> (0.37 ± 0.070 <sup>c</sup> )	18.5 ± 6.76 <sup>ab</sup>	18.5 ± 6.76 <sup>ab</sup>	20	1640 ± 60.0 <sup>b</sup> (0.49 ± 0.037 <sup>b</sup> )	24.0 ± 0.43 <sup>a</sup>	36.7 ± 3.30 <sup>a</sup>
36	1,380 ± 163.7 <sup>bc</sup> (0.32 ± 0.117 <sup>bc</sup> )	10.4 ± 3.50 <sup>a</sup>	10.4 ± 3.50 <sup>a</sup>	25	1427 ± 115.5 <sup>b</sup> (0.35 ± 0.079 <sup>b</sup> )	24.5 ± 5.88 <sup>a</sup>	57.8 ± 26.94 <sup>a</sup>
				32	1053 ± 144.7 <sup>a</sup> (0.05 ± 0.133 <sup>a</sup> )	39.2 ± 17.32 <sup>b</sup>	93.3 ± 38.87 <sup>b</sup>

나타난 10 psu와 유의적인 차이는 없었다. 포란률은 개체밀도가 가장 낮은 32 psu(자연해수)에서 가장 높은 39.2%이었다 ( $P<0.05$ ). 난 비율은 32 psu 실험구에서 93.3%의 비율로 가장 높게 나타났다( $P<0.05$ ). 그리고 15 psu 실험구에서 가장 낮은 난 비율을 나타내었지만, 32 psu 실험구 이외의 실험구와 유의적인 차이를 보이지는 않았다( $P>0.05$ )(Table 1).

배양환경에 따른 rotifer의 소화효소 활성에서 수온에 따른 변화는  $\alpha$ -amylase 활성에서 개체별 활성과 단백질 비활성에서 20~28°C 사이에서는 유의적인 차이 없이 높게 나타났다( $P<0.05$ ). TAP 활성에 있어서 개체별 활성은 24~32°C에서 유의적으로 높게 나타났으며( $P<0.05$ ), 단백질 비활성에 있어서는 높은 온도 실험구인 32~36°C에서 높게 나타났다( $P<0.05$ ). 그리고 TG-lipase 활성에서는 개체당 활성과 단백질 비활성 모두 가장 낮은 온도인 20°C에서 유의적으로 가장 높은 활성을 보였다( $P<0.05$ ). 또한 염분별 실험에서  $\alpha$ -amylase의 개체당 활성은 15 psu 이상의 염분에서 유의적으로 높게 나타났지만( $P<0.05$ ), 단백질 비활성에서는 20 psu에서 유의적으로 높은 활성을 보였다( $P<0.05$ ). 그러나 TAP 활성은 개체당 활성에 있어서는 32 psu 염분에서 가장 높은 활성을 보였지만, 단백질 비활성에서는 가장 낮은 염분인 5 psu에서 가장 높은 활성을 보였다( $P<0.05$ ). TG-lipase 활성은 자연해수인 32 psu에서 개체당 활성과 단백질 비활성에서 유의적으로 가장 높은 활성을 나타내었다( $P<0.05$ )(Table 2).

Rotifer의 영양강화는 32 psu(자연해수)에서 20°C와 26°C로

나누어 실시하였다. 그 결과 methionine 함량(% in protein)이 20°C에서 유의적으로 높은 6.2 ng/mg dry matter로 조사되었다 ( $P<0.05$ ). 하지만 총단백질과 총 필수아미노산 함량에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다( $P>0.05$ ). 지질 함량과 지방산 불포화도 또한 20°C 영양강화구에서 유의적으로 높게 나타났으며 ( $P<0.05$ ), 특히, DHA와 DHA/EPA 비에서 20°C 영양강화구에서 12.6%와 12.5%의 비로 각각 유의적으로 높았다( $P<0.05$ )(Table 3).

## 고 찰

Rotifer는 해산 어류 및 갑각류 종묘생산에 초기 동물성 먹이 생물로 유용하게 이용되고 있다(Ito, 1960; Porriot and Snell, 1983). 이들 rotifer는 내부 소화기관이 잘 발달된 동물성 부유생물로 어류에서 가지고 있는 여러 가지 소화효소의 활성을 가지고 있다(Chun et al., 1996; Kwon and Park, 2005). 이 같은 체내 소화효소는 서식환경에 의해 많은 활성의 변화가 있으며 (Benitez and Tiro, 1982; Alarcn et al., 1998), 특히 이중 수온에 의한 변화가 크다. 그렇지만 이들 rotifer의 번식과 성장속도에 가장 많은 영향을 주는 환경요인도 염분을 포함한 수온 조건을 들 수 있다. Hagiwara et al. (1988)과 Park and Hur (1996)는 *Brachionus rotundiformis* (예전의 S-type)는 15 psu, 28°C가 성장률이 가장 좋았다고 보고하였다. 성장이 양호한 환경에서 생물은 DNA의 꾸준한 증가로 체성장(번식 포함)을 계속하

**Table 2.** Activities of digestive enzymes of rotifer *Brachionus rotundiformis* cultured for after inoculation to 1,000 inds./mL on the different temperatures and salinities\*

°C	IA**	SA**	psu	IA**	SA**
<b><math>\alpha</math>-amylase</b>					
20	3.63 ± 0.736 <sup>bc</sup>	14.1 ± 2.86 <sup>c</sup>	5	1.43 ± 0.096 <sup>a</sup>	3.1 ± 0.21 <sup>a</sup>
24	4.02 ± 0.853 <sup>c</sup>	12.4 ± 2.63 <sup>bc</sup>	10	2.11 ± 0.167 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.30 <sup>bc</sup>
28	3.60 ± 0.908 <sup>bc</sup>	10.9 ± 2.75 <sup>abc</sup>	15	2.63 ± 0.452 <sup>c</sup>	4.4 ± 0.75 <sup>c</sup>
32	2.37 ± 0.692 <sup>ab</sup>	9.2 ± 2.67 <sup>ab</sup>	20	2.58 ± 0.272 <sup>c</sup>	5.2 ± 0.55 <sup>d</sup>
36	1.84 ± 0.373 <sup>a</sup>	7.4 ± 1.49 <sup>a</sup>	25	2.55 ± 0.179 <sup>c</sup>	4.4 ± 0.31 <sup>c</sup>
			32	2.68 ± 0.188 <sup>c</sup>	3.2 ± 0.23 <sup>ab</sup>
<b>Total alkaline protease</b>					
20	0.38 ± 0.053 <sup>a</sup>	3.0 ± 0.36 <sup>a</sup>	5	0.68 ± 0.058 <sup>b</sup>	2.9 ± 0.25 <sup>c</sup>
24	0.46 ± 0.073 <sup>bc</sup>	2.8 ± 0.40 <sup>a</sup>	10	0.76 ± 0.030 <sup>cd</sup>	2.8 ± 0.11 <sup>bc</sup>
28	0.51 ± 0.014 <sup>c</sup>	3.1 ± 0.09 <sup>a</sup>	15	0.80 ± 0.028 <sup>d</sup>	2.7 ± 0.09 <sup>b</sup>
32	0.50 ± 0.030 <sup>c</sup>	3.9 ± 0.23 <sup>b</sup>	20	0.60 ± 0.030 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.12 <sup>a</sup>
36	0.45 ± 0.015 <sup>ab</sup>	3.6 ± 0.14 <sup>b</sup>	25	0.73 ± 0.021 <sup>cd</sup>	2.5 ± 0.07 <sup>a</sup>
			32	1.03 ± 0.026 <sup>e</sup>	2.5 ± 0.06 <sup>a</sup>
<b>Triacylglycerol lipase***</b>					
20	0.114 ± 0.0293 <sup>d</sup>	0.89 ± 0.228 <sup>c</sup>	5	0.026 ± 0.0075 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.032 <sup>a</sup>
24	0.067 ± 0.0178 <sup>c</sup>	0.41 ± 0.109 <sup>b</sup>	10	0.033 ± 0.0101 <sup>ab</sup>	0.12 ± 0.037 <sup>a</sup>
28	0.055 ± 0.0063 <sup>bc</sup>	0.33 ± 0.038 <sup>b</sup>	15	0.042 ± 0.0122 <sup>bc</sup>	0.14 ± 0.041 <sup>a</sup>
32	0.030 ± 0.0111 <sup>ab</sup>	0.23 ± 0.086 <sup>b</sup>	20	0.050 ± 0.0124 <sup>cd</sup>	0.20 ± 0.050 <sup>b</sup>
36	0.001 ± 0.0001 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.001 <sup>a</sup>	25	0.063 ± 0.0013 <sup>de</sup>	0.21 ± 0.005 <sup>b</sup>

\*Same superscript on each column of  $\alpha$ -amylase, total alkaline protease and triacylglycerol lipase was not the significant difference, respectively.

\*\*The IA and SA were to indicate the individual activity and specific activity, respectively.

\*\*\*The Triacylglycerol lipase activities (IA and SA) were  $\mu$ U and mU, respectively.

**Table 3.** Biochemical contents of the rotifers *Brachionus rotundiformis* enriched with Algamac 2000 of which the main gradient is microalgae, *Schizochytrium* species for 6 hours at 16°C, 20 and 26°C

	20°C	26°C	
Protein contents (% DW)	52.5 ± 0.04	40.5 ± 2.23	
Essential amino acid contents (% of protein)	19.3 ± 0.01	11.7 ± 2.11	
Amino acids <sup>1</sup>	Methionine	16.2 ± 0.17	4.1 ± 0.35
	Leusine	39.7 ± 0.27	31.1 ± 1.80
	Histidine	10.3 ± 0.23	8.6 ± 0.83
Total lipid (% DW)	8.0 ± 0.30	5.2 ± 0.50	
Unsaturated index <sup>2</sup>	200.8 ± 9.77	128.8 ± 6.31	
P/S ratio	2.2 ± 0.31	2.0 ± 0.13	
Fatty acids <sup>3</sup>	C18:2n6	40.3 ± 2.01	30.2 ± 0.60
	C18:3n3	3.5 ± 0.53	0.8 ± 0.08
	C20:4n6	1.1 ± 0.21	1.5 ± 0.03
	C20:5n3	1.0 ± 0.18	0.9 ± 0.00
C22:6n3	12.6 ± 0.79	6.0 ± 0.97	
DHA/EPA	12.5 ± 1.75	6.9 ± 1.11	
EPA/ARA	1.0 ± 0.21	0.6 ± 0.01	
Saturated fatty acid	29.8 ± 2.41	31.2 ± 1.47	
Mono-unsaturated fatty acid	3.9 ± 1.08	6.1 ± 0.26	
Poly-unsaturated fatty acid	66.3 ± 3.42	62.7 ± 1.21	
n-3 PUFA	17.2 ± 0.72	10.0 ± 1.01	

"\*" was to indicate the significant difference by t-test ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup>The unit of each amino acid was ng/mg dry matter.

<sup>2</sup>Unsaturated index were indicated the  $\Sigma$  (the number of double bond  $\times$  the fatty acid contents).

<sup>3</sup>The unit of each fatty acid was % in total fatty acids.

고 RNA 함량의 증가로 단백질 생산량이 증가하여 체중 증가(변식 포함)에 영향을 주게 된다(Buckley, 1979, 1980, 1984; Richard et al., 1991). 또한 이 시기 먹이로 공급된 에너지의 소비를 늘리기 위하여 장내 소화효소 활성이 높아져 영양분의 흡수 또한 증가양상을 보이게 된다. 따라서 성장률이 좋고 변식 속도가 빠르다고 하는 것은 체내 에너지 축적 보다는 체내 흡수된 에너지를 최대한 이용하여 체성장과 번식에 사용하기 때문에 단위 유용물질의 축적량은 단일 개체 내에서 줄어들게 된다. 또한 Kwon and Park (2008)과 성장률이 높을 때, 포란률이 낮아지는 것과 같이 성체의 비율이 적어지고 유체(neonate)의 비율이 높아지는 현상을 보이는데, 일반적인 생물의 개체 발달 과정에서 소화 흡수 능력은 외부 섭식 환경의 적응으로 인해 유체에서 보다 성체에서 훨씬 높으며, 지질 축적과 같은 에너지 축적 면에서도 체 성장에 많은 에너지를 사용할 필요가 없기 때문에 에너지 축적이 많은 부분이 활용된다.

본 연구의 결과에서 볼 때, 낮은 수온일수록 성장률이 낮으면서 포란률이 높고 온도가 올라갈수록 성장률은 높아지고 포란률은 낮아지는 것을 알 수 있다. 또한 염분 농도별 배양 결과 적정 염분인 15 psu에서 성장률이 가장 높았으며, 32 psu 해수에서 가장 낮은 성장률과 높은 포란률을 보였다. 이로 인해 성장률과 에너지 축적의 일부분인 산란이 반대 경향을 보이는 것

을 알 수 있으며 포란률이 높아진다는 것은 일생동안 산란과 포란을 반복하는 rotifer의 생활사를 고려해 보았을 때, 성체의 비율과 일치한다.

그리고 수온별 배양에서 온도가 높아질수록 TG-lipase 활성은 급격히 낮아지고,  $\alpha$ -amylase 활성도 낮고, TAP 활성이 높게 나타났다. Rotifer 무성생식 난 내에서 단백질 분해 효소의 작용이 적으면서 탄수화물과 지질을 분해하여 에너지나 체성분의 합성에 이용하는 것으로 판단된다. 하지만 36°C의 경우 난 비율이 10.4%임에도 불구하고 TG-lipase 활성이 극히 적은 것으로 보아서 부화 과정에 TG-lipase의 관여는 거의 없는 것으로 판단된다. 따라서 TG-lipase 활성은 전적으로 암컷 체내에서 분비되는 TG-lipase의 영향인 것으로 보인다.

그리고  $\alpha$ -amylase 활성은 Kwon and Park (2005)에서 30°C에서 가장 높은 활성 특성을 보이는데 낮은 수온과 높은 난 비율에서 높은 활성을 보인 것으로 수온에 따른 활성의 차이보다는 난 비율에 따른 난 내 활성과 무관하지는 않은 것으로 판단된다. 그리고 TAP 활성은 포란률이나 난 비율에 관계없이 개체 증가와 함께 높아지는 활성을 보였기 때문에 난 내에서는 단백질의 분해가 많지 않다는 것으로 판단되지만 *Artemia*는 부화 직전 TAP 활성이 다소 높아진다는 Garca-Ortega et al. (1998)의 보고를 보았을 때, 활성이 적을 뿐 있으며 부화 직후부터 섭식활동을 하는 rotifer neonate의 높은 TAP 활성을 예측할 수 있다. 그러나 본 연구에서는 neonate와 성체를 구분하여 측정하지 않았기 때문에 비교는 할 수 없었다.

Rotifer *Brachionus* spp.의 염분별 개체 성장은 Hagiwara et al.(1988)과 Park and Hur (1996)의 개체군 성장 패턴과 같이 나타나 15 psu에서 성장률이 가장 높은 0.7617로 나타났으며 32 psu, 즉 자연해수에서 0.0459의 성장률로 가장 낮았다. 그러나 개체 증식이 늦지만 포란률과 난 비율은 성장률과 반대의 경향을 보였다. 그리고 최고 성장률과 최저 성장률을 보이는 15 psu과 자연 해수에서  $\alpha$ -amylase 활성은 유의적 차이가 없고, TAP는 20%, TG-lipase 활성에서는 약 2배 정도의 차이밖에 보이지 않는 것으로 보아 수온에 의한 변화(약 114배) 차이와 비교했을 때, 조금밖에 나지 않는 것을 알 수 있다.

이 같은 성장과 소화효소 활성과의 관계를 보이는 rotifer는 해산어 종묘생산에서 반드시 지질 영양강화를 거친 후 자어에게 공급이 되기 때문에 이상의 결과를 바탕으로 Mercier et al. (2004)와 Barclay and Zeller (1996)에서 실시한 영양강화 온도의 범위 안에 있는 26°C와 본 연구에서 모든 효소 활성이 높은 해수와 TG-lipase 활성이 높았던 20°C에서 각각 Algamac으로 지질 영양강화를 했다. 또한 시간은 Park and Brown (2004)와 Park et al., (2006)에서 추천한 6시간 영양강화를 하였다. 그리고 아미노산 자동분석기를 이용한 구성아미노산과 중량법에 의한 총지질량(Folch et al., 1957) 및 가스크로마토그램을 이용한 지방산함량(Park et al., 2006)을 측정하여 비교 할 수 있었다.

그 결과 총 단백질과 총 필수 아미노산 함량에서는 methionine

함량만 20°C에서 영양강화하였을 때 더 높게 나타났고, 이외에는 유의적인 차이가 없었다. 또한 지질에서는 총 지질과 지방산 불포화도뿐만 아니라 자어의 생존/성장에 많은 영향을 주는 것으로 알려져 있는 DHA와 DHA/EPA 비(Sargent et al., 1999a; Park et al., 2006)에 있어서 20°C에서 영양강화하는 것이 보다 효율적인 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 rotifer가 낮은 온도에 노출이 될 경우 생식기능이 떨어져 개체수가 줄어들지만(Mercier et al., 2004), HUFA 함량의 변화가 적으며 DHA 함량이 증가한다는 결과들(Rainuzzo et al., 1989; Ølsen et al., 1993; Mercier et al., 2004)과 일치하는 것으로 판단된다.

이상의 결과들로 보았을 때, rotifer의 개체 성장과 포란률의 경향은 상반된다. 또한 포란률은 Kwon and Park (2008)의 보고와 같이 소화효소 활성의 경향과 거의 일치하는 것을 알 수 있다. Rotifer의 성장률과 소화효소 활성과의 관계를 바탕으로 세웠던 가설인 “낮은 수온에서 지질 영양강화 효과가 높다”의 증명이 가능하다는 것을 말 할 수 있다. 그렇지만 본 연구에서의 최저 온도인 20°C 미만의 온도는 rotifer의 개체증식, 즉 생존 혹은 대사 가능 범위를 벗어나는 온도이기 때문에 또 다른 많은 해석이 필요할 듯하며, 이 후 본 연구의 결과를 바탕으로 어류 적용실험을 통해 최종 영양강화 적정 온도에 대한 증명을 해야 할 것으로 판단된다.

## 요 약

본 연구의 목적은 rotifer *Brachionus rotundiformis*의 수온과 염분농도의 변화에 따른 이들의 소화효소 활성을 파악하고, 소화효소 활성을 기초로 적정 영양강화 조건을 찾는 것이다.

다른 온도에서 24시간 배양된 rotifer 밀도는 32°C에서 1,453 개체/mL로 가장 높았다( $P<0.05$ ). 그리고 배양온도 28°C에서 염분농도에 따른 rotifer 밀도는 15‰에서 2,147 개체/mL로 가장 높게 나타났다( $P<0.05$ ). 배양환경에 따른 rotifer의 소화효소 활성에서 TAP 개체당 활성은 24-32°C에서 유의적으로 높게 나타났으며( $P<0.05$ ), 단백질 비활성은 32-36°C에서 높게 조사되었다( $P<0.05$ ). 그리고 TG-lipase 활성에서는 개체당 활성과 단백질 비활성 모두 20°C에서 가장 높은 활성을 보였다( $P<0.05$ ). 또한 염분별 실험에서 TAP와 TG-lipase 활성은 32 psu에서 가장 높은 활성을 보였다( $P<0.05$ ). 32 psu에서 온도별 영양강화한 rotifer의 methionine 함량(% in protein), 지질 함량과 지방산 불포화도가 20°C에서 유의적으로 높게 나타났다. 특히, DHA와 DHA/EPA 비가 20°C 실험구에서 12.6%와 12.5의 비로 각각 높았다( $P<0.05$ ).

따라서 rotifer *B. rotundiformis*의 지질 영양강화는 특히 TG-lipase 활성을 높여 줄 수 있는 32 psu, 20°C에서 실시하는 것이 지방산 불포화도, DHA 및 DHA/EPA 비를 높여 줄 수 있는 효과적인 방법이라고 판단된다.

## 참고문헌

- Alarcn, M. D., F. J. Moyano and E. Abelln, 1998. Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). Fish Physiol. Biochem., 19, 257-267.
- Barclay, W. and S. Zeller, 1996. Nutritional enrichment of n-3 and n-6 fatty acids in rotifers and *Artemia* nauplii by feeding spray-dried *Schizochytrium* sp. J. World Aquacult., 27, 314-322.
- Benitez, L. V. and L. B. Tiro, 1982. Studies on the digestive proteases of the milkfish *Chanos chanos*. Mar. Biol., 71, 309-315.
- Buckley, L. J., 1979. Relationship between RNA-DNA ratio, prey density and growth rate in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. J. Fish. Res. Bd. Can., 36, 1479-1502.
- Buckley, L. J., 1980. Changes in ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid, and protein content during ontogenesis in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, and effect of starvation. Fish. Bull., 77, 703-708.
- Buckley, L. J., 1984. RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. Mar. Biol., 80, 291-298.
- Chun, C. Z., H. G. Park, S. B. Hur and Y. T. Kim, 1996. Biochemical studies of an endoglucanase from marine rotifer, *Brachionus plicatilis*. J. Aquacult., 9, 453-459.
- Dabrowski, K. and J. Glogowski, 1977. A study of the application of proteolytic enzymes to fish food. Aquaculture, 12, 349-360.
- Duncan, D.B., 1955. Multiple-range and multiple F tests. Biometrics, 11, 1-42.
- Fernandez-Reiriz, M. J., U. Labarta and M. J. Ferreira, 1993. Effects of commercial enrichment diets on the nutritional value of the rotifer (*Brachionus plicatilis*). Aquaculture, 112, 195-206.
- Garca-Ortega, A., J. A. J. Verreth, P. Coutteau, H. Segner, E. A. Huisman and P. Sorgeloos, 1998. Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages. Aquaculture, 161, 501-514.
- Folch, J., M. Lees, G. H. Sloane Stanley, 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. J. Biol. Chem., 226, 497-509.
- Hagiwara, A., A. Hino and R. Hirano, 1988. Effects of temperature and chlorinity on resting egg formation in the rotifer *Brachionus plicatilis*. Nippon Suisan Gakkaishi, 54, 569-575.
- Ito, T., 1960. On the culture of the mixohaline rotifer *Brachionus plicatilis* O.F. Muller, in sea water. Rep. Fac. Fish., Prefect. Univ. Mie, 3, 708-740.
- Kolkovski, S., 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. Aquaculture, 200, 181-201.
- Kunitz, M., 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. J. Gen. Physiol., 30, 291-310.
- Kurokawa, T., M. Shiraishi and T. Suzuki, 1998. Qualification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine *Sardinops melanoticus* larvae. Aquaculture, 161, 491-499.

- Kwon, O. N. and H. G. Park, 2005. Characterization of  $\alpha$ -amylase, total alkaline protease, trypsin and triacylglycerol-lipase activity of the euryhaline rotifer, *Brachionus rotundiformis*. J. Aquacult., 18, 245–251. (in Korean)
- Kwon, O. N. and H. G. Park, 2008. The relationship with the population growth and the digestive enzymes activity of rotifer, *Brachionus rotundiformis*. J. Aquacult., in press (in Korean)
- Lowry, O. H, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the folic phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265–275.
- Lubzens, L., 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. Hydrobiologia 147, 245–255.
- Maruyama, I., T. Nagano, I. Shigeno, Y. Ando, K. Hirayama. 1997. Application of unicellular algae *Chlorella vulgaris* for the mass-culture of marine rotifer *Brachionus*. Hydrobiologia, 385, 133–138.
- Mercier, L., C. Audet, Jol de la Noe, B. Parent, C. C. Parrish, and N. W. Ross, 2004. First feeding of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) larvae: use of *Brachionus plicatilis* acclimated at low temperature as live prey. Aquaculture. 229. 361–376.
- Munilla-Moran, R. and J. R. Stark, 1989. Protein digestion in early turbot larvae, *Scophthalmus maximus* (L.). Aquaculture, 81, 315–326.
- Munilla-Moran, R., J. R. Stark. and A. Barbour, 1990. The role of exogenous enzyme in digestion in cultured turbot larvae *Scophthalmus maximus*. Aquaculture, 88, 337–350.
- Ølsen, Y., K. I. Reitan, and O. Vadstein, 1993. Dependence of temperature on loss rates of rotifers lipids and  $\omega$ 3 fatty acids in starved *Brachionus plicatilis* cultures. Hydrobiologia, 255/256, 13–20.
- Park, H. G. and J. A. Brown, 2004. Biochemical composition of rotifer, *Brachionus plicatilis* enriched with different commercial enrichments. J. Aquacult., 17, 187–196. (in Korean)
- Park, H. G. 1997. Mass production of resting eggs of Korean rotifer *Brachionus plicatilis*. Ph.D. thesis. Pukyong National University, Korea, 115 pp. (in Korean)
- Park, H. G. 1998. Growth and production of resting eggs of freshwater rotifer, *Brachionus calyciflorus* Pallas at the different temperature. J. Korean Fish. Soc., 31(5), 779–784. (in Korean).
- Park, H. G., S. B. Hur, 1996. Effect of temperature and salinity on production of resting egg in Korean rotifer, *Brachionus plicatilis* (L and S type). J. Aquacult., 9, 321–327.
- Park, H. G., V. Puvanendran, A. Kellett, C. C. Parrish, and J. A. Brown, 2006. Effect of enriched rotifers on growth, survival, and composition of larval Atlantic cod (*Gadus morhua*). J. Mar. Sci., 63, 285–295.
- Pourriot. R. and T. W. Snell, 1983. Resting eggs in rotifers. Hydrobiologia 104, 213–224.
- Rainuzzo, J. R., Y. Olsen and G. Rosenlund, 1989. The effect of enrichment diets on the fatty acids composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Aquaculture, 79, 157–161.
- Richard, P., J. P. Bergeron, M. Boulhic, R. Galois and J. Person-Le Ruyet, 1991. Effect of starvation on RNA, DNA and protein content of laboratory-reared larvae and juveniles of *Solea solea*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 72, 69–77.
- Sargent, J., L. McEvoy, A. Estevez, G. Bell, M. Bell, J. Henderson, and D. Tocher, 1999a. Lipid nutrition of marine fish during early development: culture status and future directions. Aquaculture, 179, 217–229.
- Sargent, J., G. Bell, L. McEvoy, D. Tocher and A. Estevez, 1999b. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. Aquaculture, 177, 191–199.
- Schmidt, F. H., H. Stork and K. von Dahl., 1974. Lipase, photometric assay. (in) H.U. Bergmeyer (ed.), Methods of enzymatic analysis vol. 2, Academic Press, New York, pp. 819–823.
- Somogyi, M., 1952. Notes on sugar determination. J. Bio. Chem., 195, 19–23.
- Ueberschr, B., 1993. Measurement of proteolytic enzyme activity: significance and application in larval fish research. (in) Walther, B.T., Fyhn, H.T. (eds.), Physiology and biochemistry of fish larvae development. University of Bergen Press, Bergen, Norway, 235–238.
- Watanabe, T., 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. J. World. Aquacult. Soc., 24, 152–161.

---

원고접수 : 2007년 12월 31일

수정본 수리 : 2008년 2월 22일