

아연(Zn) 첨가사료의 투여에 따른 돌돔, *Oplegnathus fasciatus*의 항산화효소활성의 변화

김용석 · 강주찬[†]

부경대학교 수산생명의학과

Changes in the antioxidant enzyme activities of rock bream *Oplegnathus fasciatus* administrated with Zn-supplemented diets

Young Sug Kim and Ju-Chan Kang[†]

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University
Busan 608-737, Korea

The objective of this study was to investigate the antioxidant enzyme (superoxide dismutase, SOD; glutathione, GSH; glutathione peroxidase, GPx) activities in liver and gill of rock bream, *Oplegnathus fasciatus* fed the experimental diets for 40 days. The experimental diets were prepared by adding with 30, 60 120 and 240 mg/kg to a commercial diet. In the liver, there were significant increases in SOD at 30~240 mg/kg. GPx activities of liver also were significantly increased at 30~120 mg/kg. The increased activities of SOD and GSH in the gills were observed in the 120 and 240 mg/kg, hence, GPx activity of gill exposed to lower concentrations of zinc (60~240 mg/kg) showed significant augmentation.

Key words : Rock bream, Zinc, Antioxidant enzyme

어류는 육상 동물과 마찬가지로 영양원으로 각종 미네랄이 요구되며, 여기에는 칼슘(Ca), 인(P), 마그네슘(Mg), 철(Fe), 구리(Cu), 망간(Mn), 아연(Zn), 셀레늄(Se) 및 요오드(I) 등이 포함된다 (NRC, 1993). 아연은 metalloenzyme으로 여러 가지 효소와 단백질을 구성하는 필수인자이며, 탄수화물과 지방대사에도 관여하는 미량원소로서 (송과 정, 1990), carboxypeptidase, lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD), phosphatase 및 glutamate dehydrogenase 등과 같은 몇몇 효소의 활성화에 필요한 물질이다

(Sorensen, 1991). 아연은 비만상태에서 유의한 효과가 있는 것으로 보고되어 있으며 (김과 조, 2009), 단백질 합성, 핵산, 지질, 탄수화물대사 및 면역기능에도 관여하며 (Singh *at al*, 1992), 항산화효과를 증진시키는 것으로 알려져 있다 (Bray and Bettger, 1990). 또한 식이성 아연의 항산화기능은 간, 신장 및 장내의 Zn-metallothionein pool의 세포 크기의 증가에 의한 것이다 (Samman, 1993). 일반적으로 어류의 사료에 아연의 첨가는 어류의 항산화 효과를 증진시키는 것으로 알려져 있으나 아연흡수와 관련하여 항산화능력을 증가시키기 위한 세포내 적정 아연요구량에 대한 연구는 미비한 실정이다 (Hill and Matrone, 1970). 지금까지 어류에 미치는 아연에 대한 연구는 주로

[†]Corresponding author: Ju Chan Kang

Tel : +82-51-629-5944 Fax : +82-51-629-5938

Email : jckang@pknu.ac.kr

독성적인 측면에서 많은 연구들이 이루어져 왔지만, 부분적으로는 영양적인 측면에서도 연구들이 이루어져 왔다. 하지만 이들 대상 어류는 담수성인 무지개송어, 잉어 및 틸라피아 등이 대부분이다 (Ogino and Yang, 1978; Ogino and Yang, 1979). 따라서 본 연구는 우리나라의 주요 해산양식어종인 돌돔, *Oplegnathus fasciatus*를 대상으로 아연의 경구 투여에 따른 항산화 효소활성의 변화를 검토하였다.

재료 및 방법

실험어

돌돔, *Oplegnathus fasciatus*은 경남소재 양식장에서로부터 분양받아 실험실 조건에서 4주 이상 순치 시킨 후, 외관상 질병증세가 없는 건강한 개체 (체장, 12.14 ± 0.08 cm; 체중 33.78 ± 0.74 g)를 실험에 사용하였다. 이때 수온, pH 및 용존산소는 각각 $19.2 \sim 20.4^\circ\text{C}$, $6.8 \sim 7.2$ 및 $6.4 \sim 6.9$ mg/L이었으며, 기타 사육수의 수질은 Table 1과 같다. 모든 실험은 항온실에서 유리수조(500×280×310 mm)를 사용하여 매일 사육수를 교환하는 환수식 방법에 의해 실시하였다.

Table 1. The chemical components of seawater used in the experiments

Item	Value
Temperature(°C)	20.0±1
pH	8.10±0.5
Salinity(psu)	33.5±0.6
Dissolved oxygen(mg/L)	7.1±0.3
Chemical Oxygen Demand(mg/L)	1.13±0.1
Ammonia(μg/L)	12.50±0.7
Nitrite(μg/L)	1.30±0.3
Nitrate(μg/L)	11.48±1.0

Table 2. Composition of the experimental diet

Component	Composition (%)
Protein	48.0
Lipid	10.0
Fiber	5.0
Ash	15.0
Calcium	2.5
Phosphorus	2.7
Other	16.8

실험 사료

실험어는 순치기간 동안 시판되는 아연이 20 mg/kg 함유되어 있는 시판사료 (CJ사료 한국)를 1일 2회 충분히 공급하였다 (Table 2). 아연첨가사료는 이 시판용 사료에 아연을 각각 30, 60, 120 및 240 mg/kg 첨가하여 조제하였다. 아연이 각각 첨가된 사료는 밀봉상태로 -20°C 냉동으로 보관하면서 1일 2회 (오전 9시, 오후 5시) 어체중 kg당 1% (건중량 하루 기준)를 공급하였고, 대조구의 사료는 아연을 첨가하지 않은 같은 사료를 공급하였다.

Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD 활성의 측정은 간과 아가미 조직에 대해서 SOD Assay Kit-WST (Dojindo Co., Japan)를 이용하였다. 즉 어체로부터 조직을 분리한 후 0.1 M PBS로 2회 세척 한 후 각각 간과 아가미의 3배에 해당하는 sucrose buffer (0.25 ml/L sucrose, 10 mmol/L HEPES, 1 mmol/L EDTA, pH 7.4)를 첨가하고, homogenizer를 이용하여 얼음 위에서 균질화하고 4°C 에서 10,000 g 로 60분간 원심분리한 후 상층액을 분리하여 분석에 사용하였다. 또한 상층액은 5배로 희석하여 각 희석 배수에 따른 inhibition rate을 구한 후 inhibition rate를 이용하여 inhibition curve를 작성하고, 작성한 inhibition

curve에서 활성이 50% 방해받는 희석배수를 찾고 이 희석배수를 1 unit/20μl로 하여 계산하였다. 이렇게 나온 값을 단백질량으로 나누어주어 1 unit/mg protein으로 SOD activity를 나타내었다. 단백질의 정량은 Bradford 법을 이용한 키트(Biorad Co., Ltd.)를 이용하여 정량하였다.

Glutathione (GSH) level

총 글루타치온 (GSH) 함량은 Baker et al. (1990)의 방법에 의하여 측정되었다. 측정을 위한 시료는 GSH의 측정시 방해되는 protein을 제거하기 위하여 5% 5-sulfosalicyclic acid (SSA)로 희석하여 사용하였다. 일정 시료에 혼합시액 (100 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, 0.15 mM DTNB, 0.2 mM NADPH 및 1 U/mL glutathione reductase, pH 7.5)을 첨가하여 파장 405 nm에서 2분 이상 측정하였다 (Zenyn 200, Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria). GSH 함량 계산은 GSSG를 사용한 검량선을 바탕으로 계산하여 단위는 μM/g tissue로 나타내었다.

Glutathione peroxidase (GPx)

GPx 효소는 Bell et al. (1985)의 방법을 수정한 것으로 H₂O₂를 기질로, sodium azide를 catalase 억제제로 사용하였다. 시료에 1 mM GSH, 0.1 mM NADPH, 0.5U GSH-reductase, 1 mM EDTA, 2 mM sodium azide 및 50mM 인산완충용액 (pH 7.4)이 포함된 혼합용액을 가한 후 5분 동안 20°C에서 배양하였다. 반응은 2.5 mM H₂O₂를 넣는 동시에 시작되었다. NADPH가 산화되는 비율을 340 nm에서 4분 동안 20초 단위로 분광광도계 (Zenyn 200, Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria)로 측정하였고, 단위는 nmol/min/mg protein으로 표시하였다.

통계학적 분석

대조구와 각 실험구 사이의 통계학적 유의성은 SPSS 통계프로그램 (SPSS Inc.)을 이용하여 ANOVA test를 실시한 후 P 값이 0.05 미만일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

Superoxide dismutase (SOD) 활성

간의 SOD활성은 20일과 40일에서 Zn 30~240 mg/kg 농도구간에서 유의적으로 증가하였으나 (P<0.05), 50일 이후에는 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 1). 아가미의 SOD활성은 20일째 120 및 240 mg/kg 농도구간에서 유의한 증가를 보였으나 (P<0.05), 40일 이후로는 유의한 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 2).

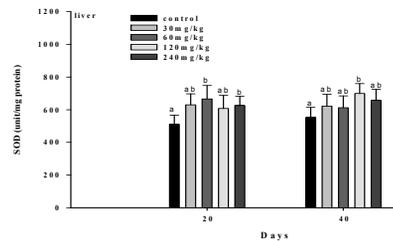


Fig. 1. Changes of SOD (unit/mg protein) in liver of rock bream, *Oplegnathus fasciatus* administrated dietary Zn for 40 days.

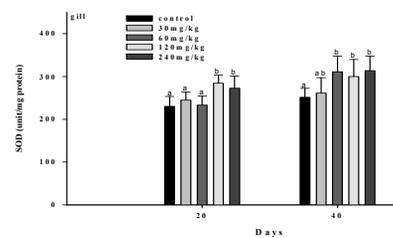


Fig 2. Changes of SOD (unit/mg protein) in gill of rock bream, *Oplegnathus fasciatus* administrated dietary Zn for 40 days.

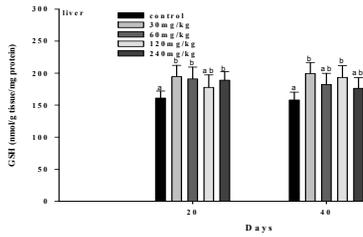


Fig. 3. Changes of GSH (nmol/g tissue/mg protein) in liver of rock bream, *Oplegnathus fasciatus* administrated dietary Zn for 40 days.

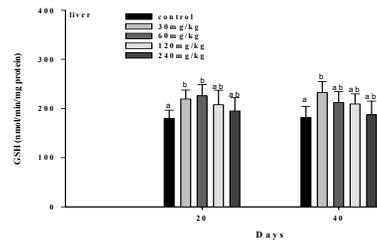


Fig 5. Changes of GPx (nmol/g tissue/mg protein) in liver of rock bream, *Oplegnathus fasciatus* administrated dietary Zn for 40 days.

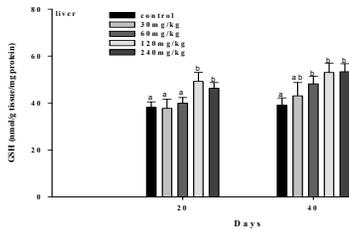


Fig. 4. Changes of GSH (nmol/g tissue/mg protein) in gill of rock bream, *Oplegnathus fasciatus* administrated dietary Zn for 40 days.

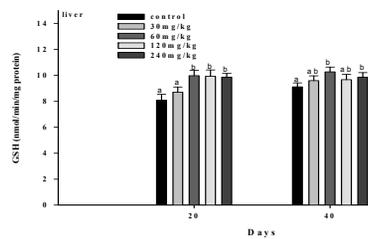


Fig 6. Changes of GPx (nmol/g tissue/mg protein) in gill of rock bream, *Oplegnathus fasciatus* administrated dietary Zn for 40 days.

Glutathione (GSH) 활성

간에서 GSH level은 20, 40일에 모든 농도구간에서 증가였지만 50일과 60일에서는 유의한 차이가 관찰 되지 않았다 (Fig. 3). 아가미에서는 20일에 120, 240 mg/kg에서 유의한 증가가 있었으며 40일에는 60 ~ 240 mg/kg에서 유의한 증가를 관찰하였다 (Fig. 4).

Glutathione peroxidase (GPX)

간에서 20일에 30 ~ 120 mg/kg 농도구간에서 유의적인 증가가 확인되었고 240 mg/kg은 대조구와 유의한 변화가 보이지 않았다. 40일에는 30 ~ 120 mg/kg에서만 유의한 증가를 보였으며 50일과 60일 구간에서는 대조구와 비교하였을 때 유의한 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 5). 아가미는 20, 40일에서 60 ~ 240 mg/kg 농도구간에서 유의적인 증가가 확인되었다 (Fig. 6).

고 찰

어류에 대한 아연은 미량원소인 관점에서 연구가 되어 왔기 때문에 영양적인 측면에서 결핍에 의한 관점에서의 결과가 대부분으로 (이와 방, 1998) 과잉 공급에 대한 독성적인 관점에서의 연구는 미비한 실정이다. 하지만 아연은 중금속의 하나로 비록 미량일 지라도 생물에 농축되며, 어류에 있어서 과량으로 농축될 경우에 일어나는 생물학적 반응은 매우 중요하다 (Dallinger and Kautzky, 1985). 특히 식이성 아연의 공급수준은 oxygen free radical 방어효소계의 활성화에 영향을 미치며 (Taylor and Bray, 1991), cystein을 함유한 metallothionein과 친화력이 커서 metallothionein과 합성하고, metallothionein은 생체내 아연의 항상성

을 유지하며 독성효과를 방지한다(Zhou *et al.*, 1992). SOD, GSH 및 GPx는 항산화 효소로서 SOD는 O_2^- 를 H_2O_2 로 바꾸는 역할을 하며, GPx는 H_2O_2 를 $2H_2O+O_2$ 로 바꾼다. GPx와 CAT는 H_2O_2 를 $2H_2O+O_2$ 로 바꾸면서 그 반대급부로 glutathione의 환원형인 GSH를 산화형인 GSSG로 바꾸고 GR은 GSSG를 NADPH를 소모하여 다시 GSH로 바꾸는 역할을 한다.

본 실험에서 돌돔의 간의 SOD활성은 30~240 mg/kg 농도에서 유의하게 증가하였고, 아가미의 SOD활성은 120 및 240 mg/kg 농도에서 유의하게 증가하였으나, 이들 농도사이의 차이는 인정되지 않았다. 무지개송어와 잉어는 일반적으로 15~30 mg/kg의 아연농도를 적정농도로 보고 있다 (Ogino and Yang, 1978, Ogino and Yang, 1979). 이들 중에 있어 아연의 결핍은 SOD 활성을 감소시키는데 (Amira *et al.*, 1995), 이는 과산화지질 생성이 증가에 따라 막 보호를 위한 방어적 단백질 합성을 위한 전사나 번역에서의 아연의 역할 및 유리에 의해 아연의 요구가 증가되기 때문이다 (Taylor and Bray, 1991). 또한 SOD의 활성은 아연의 과잉 존재할 경우에도 감소되지만 (조와 김, 1994; Amira *et al.*, 1995), 적정농도를 유지할 경우에는 SOD의 활성은 변동하지 않는다. 따라서 대조구의 아연농도가 30 mg/kg인 것을 감안한다면, 돌돔에 있어서 아연농도 30~240 mg/kg 범위는 SOD의 활성을 변화시킬만한 농도의 범위가 아니라고 생각된다.

간에서 GSH level은 30~240 mg/kg 농도에서 유의하게 증가하였고, 아가미에서는 60~240 mg/kg 농도에서 유의하게 증가하였다. GPx는 간에서 30~120 mg/kg 농도구간에서 유의적인 증가가 확인되었으나 240 mg/kg은 대조구와 유의한 변화가 보이지 않았으며 아가미는 60~240 mg/kg 농도구간에서 유의적인 증가가 확인되었으며 각각의 농도 사이의 차이는 유

의하게 인정되지 않았다. GSH와 GPx활성의 증가는 SOD의 유의한 증가에 따라 유의하게 증가가 이루어진 것으로 보인다. GSH의 경우 아연의 과잉시 지질과산화물을 증가 시키고 이의 분해에 GPx가 소모되면서 활성의 감소가 이루어지고 GPx는 Se containing 항산화 효소로서 지질과산화와 hydrogen peroxide에 대하여 detoxification을 촉매하는 작용 (Geeta *et al.*, 1991)이 있기 때문에 증금속에 의하여 GSH활성이 저해된다고 보고 (Spilttgerber and Tappel, 1979) 되어 있다. 가장 높은 240 mg/kg 농도구간에서 GSH의 활성감소는 일어나지 않았지만 GPx의 활성은 감소되었다. 이것은 240 mg/kg에서 Zn의 과잉으로 인한 지질과산화물의 증가로 인해 GPx의 활성이 감소된 것으로 보인다. 이상의 결과와 논의에서 돌돔은 30~120 mg/kg의 아연농도에서 항산화효소의 활성 차이가 나타내지 않아 돌돔 양식에 있어 30~120 mg/kg의 아연첨가를 긍정적으로 검토해 볼 필요가 있다고 생각된다.

요 약

우리나라의 주요 해산양식어종인 돌돔, *Oplegnathus fasciatus*을 대상으로 30, 60, 120 및 240 mg/kg의 아연을 40일 동안 경구 투여에 따른 아가미와 간의 항산화효소 활성의 변화를 검토하였다.

돌돔 간의 superoxide dismutase(SOD) 활성은 30~240 mg/kg 아연농도, glutathione peroxidase (GPx) 활성은 30~120 mg/kg의 아연농도에서 유의적으로 증가하였다. 돌돔 아가미의 SOD 및 Glutathione(GSH) 활성은 120 및 240 mg/kg 아연농도, GPx활성은 60~240 mg/kg의 아연농도에서 유의한 증가가 관찰되었다.

참고문헌

- Amira, A.S. and Amal, A.E.: Effect of dietary zinc on lipid peroxidation, glutathione, protein thiols levels and superoxide dismutase activity in rat tissues. *Int. J. Cell. Biol.*, 27:89-95. 1995.
- Bray, T.M. and Bettger, W.J.: Physiological role zinc as an antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.*, 8:281. 1990.
- Dallinger, R. and Kautzky, H.: The importance of contaminated food for the uptake of heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*): a field study. *Oecologia*, 67:82-89. 1985.
- Friverg, I. and Vostal, J., Mercury in the environment. CRS Press(develand), ISI. 1972.
- Geeta, S., Ravindra, N. and Kiran, D.G.: Effect of ethanol on Cd-induced lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, 42:S9-S16. 1991.
- Gropper, S.S., Smith, J.L. and Groff, J.L.: *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. 4th ed. Belmont:Thomson Wadsworth; pp. 417-445. 2005.
- Hill, C.H. and Matrone, G.: Chemical parameters in the study of in vivo and in vitro interactions of transition element. *Ged. Proc.*, 29:14-74. 1970.
- NRC(National Research Council): *Nutrient Requirements of fish*. National Acad. Press, Washington, D.C. pp. 114. 1993.
- Ogino, C. and Yang, G.Y.: Requirement of rainbow trout for dietary zinc. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 42:793-799. 1978.
- Ogino, C. and Yang, G.Y.: Requirement of carp for dietary zinc. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 46:455-458. 1979.
- Samman, S.: Dietary versus cellular zinc : The antioxidant paradox. *Free Radic. Biol. Med.*, 14:95-96. 1993.
- Shils, M.E., Shike, M., Ross, A.C., Caballero, B. and Cousins, R.J.: *Modern Nutrition in Health and Disease*. 10th ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, pp. 271-285. 2005.
- Singh, K.P., Zaidi, S.I A., Raisuddin, S., Saxena, A.K., Murthy, R.C. and Ray, P.K.: Effect of zinc on immune functions and host resistance against infection and tumor challenge. *Immuno-pharmacol. Immunotoxicol.*, 14:813-840. 1992.
- Sorensen, E.M.B.: *Metal Poisoning in Fish*. CRC, Boca Raton, FL, USA. 1991.
- Spilttgerber, A.G. and Tappel, A.L.: Inhibition of glutathione peroxidase by cadmium and other metal ions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 197(2):534-542. 1979.
- Taylor, C.G. and Bray, T.M.: Effects of hyperoxia on oxygen free radical defense enzymes in the lung of Zn-deficient rats. *J. Nutr.*, 121(4):460-466. 1991.
- Zhou, Y., Hu, X., Dou, C., Liu, H., Wang, S. and Shen, P.: Structural studies on metal-serum albumin IV. The interaction of Zn(II), Cd(II) and Hg(II) with HSA and BSA. *Biophys. Chem.*, 42(2):201-211. 1992.
- 김현숙, 조경옥. 아연 수준이 비만 쥐의 당대사와 혈청 아연, 마그네슘, 크롬 함량에 미치는 영향. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.*, 38(9): 1174-1178. 2009.
- 송미영, 정영진. 아연 보충이 젊은 여성의 혈청 콜레스테롤 농도에 미치는 영향. *한국영양학회지* 23: 237-247. 1990.
- 이상민. 박승렬 사료의 P, Ca, Zn, Mg, Fe, K, Mn과 Se이 조피볼락의 성장 및 체성분에 미치는 영향. *J.*

Kor. Fish. Soc., 31(2):245~251. 1998.

조수열, 김명주. 식이성 아연 수준이 카드뮴 중독에 미치는 영향. J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr., 23(4):574~580. 1994.

Manuscript Received : August 2, 2011

Revised : January 30, 2012

Accepted : March 22, 2012