

볼락, *Sebastes inermis* 자·치어의 성장에 따른 소화효소 활성 변화

곽우석*, 박대원¹

국립 경상대학교 해양생명과학부/해양산업연구소, ¹경상남도수산자원연구소

Developmental Changes in Digestive Enzymes Activity of Black Rockfish *Sebastes inermis*

Woo-Seok Gwak* and DaeWon Park¹

Division of Marine Bioscience, The Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea
¹Gyeongsangnam-do Fisheries Resources and Research Institute, Tongyeong 650-947, Korea

Black rockfish larvae and juveniles were reared for 95 days after parturition (DAP) in order to determine four enzyme activities (trypsin, pepsin-like enzyme, lipase, amylase) during ontogeny. Larvae were fed rotifers *Brachionus plicatilis* from 1 to 25 DAP, *Artemia nauplii* from 10 to 78 DAP and then gradually changed to pelleted feed from 30 DAP. Temperature was kept between 13.5~14.9°C. Trypsin and lipase activities were found in 2 DAP larvae (7.0±1.5 unit and 4.5±1.4 unit, mean±SD, respectively). The evolution of both enzymes activities showed a profile marked by drastic increases between postflexion and juvenile stage. There is an increment on specific trypsin activity at 10 DAP, corresponding with the beginning of *Artemia* feeding. Pepsin-like enzyme activity was found at 11 DAP and increased drastically from 56 DAP, corresponding with the initiation of juvenile stage. Amylase activity was also found at 11 DAP and maintained at a low level up to 38 DAP followed by a drastic increase from 39 DAP to 50 DAP. Considering our results of both trypsin and pepsin-like enzyme activities, it might be concluded that higher somatic growth of *Sebastes inermis* could be possible with the initiation juvenile of stage and the early juvenile stage is a suitable period for feeding an artificial diet for fish.

Keywords: *Sebastes inermis*, Trypsin, Pepsin-like enzyme, Lipase, Amylase, Protein

서 론

볼락, *Sebastes inermis*는 횡대목 양볼락과 볼락屬에 속하는 난태생(ovoviviparous) 어류로, 우리나라의 서남해 및 일본 연안의 해조가 무성한 천해 암반해역에 많이 분포하며(Chyung, 1977), 연안 어선어업의 중요한 어획대상으로 뿐만 아니라 유어 대상으로도 매우 중요한 어종이다. 볼락은 산출 후 부유 자어가 수심 10 m 층에 머물다가 내만으로 이동하고 전장 20 mm를 전후하여 잘피밭에서 저서생활을 시작한다(Ochiai and Tanaka, 1986). 그 후 전장 60 mm에 달하면 연안 암반지역으로 이동하여 저서에서 생활하는 전형적인 연안정착성 어류로 바다목장 대상 어류로도 주목을 받고 있다. 특히 경상남도에서는 도어로 지정될 정도로 인근해역에 많이 서식하였으나 최근 각종 오염과 무분별한 남획에 의해 자원량이 감소되고 있어 인공종묘생산을 통

한 인위적인 자원조성을 시도하고 있다.

볼락에 대한 연구는 연령과 성장(강, 1982), 자연산 볼락의 생물학적 특성과 교미습성(Shinomiya and Ezaki, 1991), 생식과 체내 자어 발달(Lee and Kim, 1992), 난 발생과정과 부화자어 형태(Kim and Han, 1993), 산출자치어의 외부 형태 및 골격 발달(Kim et al., 1993), 저연령군의 식성(Huh and Kwak, 1998), 섭식생태(Kim and Kang, 1999), 볼락의 초기 생존과 성장에 미치는 환경인자 분석(김 등, 2001) 등이 있다. 그러나 대량 종묘생산을 안정적으로 하는데 있어서 필수적인 자·치어기의 소화생리와 관련된 연구결과는 보고된 것이 없다. 자·치어기의 소화효소 활성에 대한 연구는 인공배합사료의 조성을 결정할 때 뿐만 아니라 대부분의 종묘생산 어종에 있어서 필수인 사료생물의 적절한 선택, 사료 전환기, 급이 횟수, 급이 시간, 급이 량 등에 대해서도 유효한 정보를 제공할 수 있게 된다.

따라서 본 연구에서는 볼락 종묘를 안정적으로 대량생산 하는데 기초자료를 제공하고자 볼락 자·치어 성장과 발달에 따

*Corresponding author: wsgwak@gsnu.ac.kr

른 한 개체 당의 소화효소 즉, trypsin, pepsin-like enzyme, amylase 그리고 lipase의 activity를 조사하였다.

재료 및 방법

실험어 및 사육관리

실험어를 얻기 위하여 경남 통영 인근해역에서 채집된 만 4세 이상 총 240미의 친어집단에서 성숙한 개체를 선별 수용하여 경남수산자원연구소에서 관리하였다.

자연 산출된 볼락 자어는 50톤 용량의 콘크리트 원형 수조 6개 및 25톤 사각 콘크리트 수조 2개에 5000개체/톤 밀도로 수용하였다. 산출 및 종묘생산 기간 동안의 사육수온은 13.5~14.9°C로 유지되었다. 산출후 1일부터 25일까지 해산클로렐라를 실험 수조 내에서 100~120만 cells/ml의 밀도가 유지되도록 첨가하였고 해산클로렐라로 배양된 rotifer, *Branchionus plicatilis*도 6~14개체/ml가 되도록 하루 두 번 급이 하였다. 산출후 10일째부터 rotifer와 함께 *Artemia*를 0.5~2.4개체/ml로 급이하였고 성장에 따라 그 량을 늘렸다. 산출후 26일부터는 rotifer 급이를 중지하고 *Artemia*만을 단독으로 공급하였다, 산출후 30일째부터는 *Artemia*와 함께 배합사료(크기, 200~1000 μ m; 단백질 55.0%, 인 2.3%)를 공급하였고 사료는 하루 네 번 급이 하였으며 산출후 79일째부터는 배합사료만 단독으로 급이 하였다(Fig. 1).

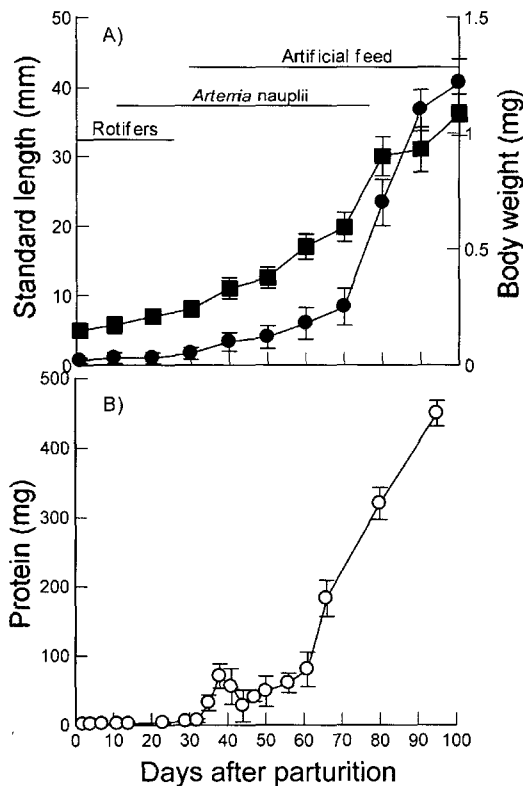


Fig. 1. Standard length (A), body weight (A), and protein content (B) of *S. inermis* during larval and juvenile development. Lines show the live prey sequence.

시료채집 및 분석방법

성장 측정을 위한 시료 채집을 산출 직후부터 35일까지는 매일 하였고 그 후는 3일 간격으로 30개체를 하였다. 형태학적 측정용 시료는 채집 후 습중량 측정을 위해 키트와이프롤 물기를 제거한 후 전자저울(Mettler Toledo, AB 204-5)로 0.001 mg까지 측정하였다. 그 후 채집된 시료를 10% 포르말린에 보존하였고 체장을 측정하기 위해 만능투영기(Nikon V-12B)와 버니어캘리퍼스(Mitutoyo CD-6"CS)를 이용하여 0.01 mm까지 측정하였다. 자치어의 형태발달 단계는 Kendall (1991)에 근거하여 flexion, postflexion, juvenile stage로 구분하였다.

소화효소활성 분석용 시료 채집일과 간격은 위에서 언급된 형태학적 측정용 시료 채집과 동일하고 채집한 개체수는 각 채집일 당 15개체이며 분석에는 10개체가 이용되었다. 분석용 시료의 채집은 먹이를 공급하기 전 위와 장이 완전히 비어있는 상태에서 실시하였다. 시료 채집 후 증류수로 세척 후 1.5 ml Eppendorf 튜브에 한 개체씩 넣어 초저온냉동고(-90°C)에서 분석 할 때 까지 보관하였다.

소화효소 분석

동결 보존 되어있는 볼락 자·치어 한 개체를 100 μ l의 homogenization buffer (20 mM tris-HCl, 1 mM EDTA, 10 mM CaCl₂, pH 7.5)가 들어 있는 Duall disposable homogenizer (1.5 ml microcentrifuge tube와 1회용 tissue grinder; Knotes Glass Co., San Francisco, California)로 얼음 물 속에서 2분간 130 rpm으로 분쇄하였다. Tissue grinder의 끝 부분을 300 μ l의 homogenization buffer로 씻은 후, 400 μ l의 homogenate를 0에서 30분간 1,700 \times g로 원심분리 하였다. 원심 분리 후 상등액을 취하여 trypsin, pepsin-like enzyme, lipase 그리고 amylase activity 측정과 protein 정량에 이용하였다.

Trypsin 활성은 N- α -carbobenzoxy-L-arginine 7-amino-4-methylcoumarin hydrochloride (CBZ-L-Arg-MCA) 기질을 이용하여 측정하였다. CBZ-L-Arg-MCA는 dimethyl-sulfoxide (DMSO)로 녹인 후 -80°C에 보존하였다. 상등액 50 μ l를 250 μ l의 기질과 섞은 후 37°C에서 10분간 반응시켰다. Blank도 위와 같은 방법으로 만든 후, 형광분광광도계(Shimadzu, RF-5300)로 excitation 380 nm과 emission 440 nm에서 흡광도를 측정하였다. Trypsin 활성(unit)은 1분당 형광강도의 증가량을 나타내는 unit/min/individual로 나타내었다. 또한 비활성은 단위 단백질당 trypsin 활성으로 표시하였다.

Pepsin-like enzyme 활성은 원심분리한 상등액 100 μ l에 1M CH₃COONa-1N HCl (pH 2.0)과 2% 산변성 헤모글로빈 혼합액을 400 μ l 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시키고 TCA 500 μ l를 혼합하여 반응을 정지 시켰다. 이것을 4000 \times g에서 6분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 분광광도계(Shimadzu, BioSpec-mini)로 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosine 표준용액을 이용하여 표준곡선을 작성하였다. Pepsin-like enzyme 활성

(unit)은 $\mu\text{g tyrosine liberated}/30\text{min}/\text{individual}$ 을 나타낸다. 또한 비활성은 단위 단백질당 pepsin-like enzyme 활성으로 표시하였다.

Lipase activity는 6 mM Sodium Taurocholate와 0.1 M NaCl 그리고 0.5 M Tris-HCl (pH 7.4)를 혼합 후 30°C에 보존하였다. 이 혼합액 1 ml에 기질(4-Nitrophenyl Caproate)과 상등액 50 μl 을 혼합하여 Microplate reader (Bio-Rad Model 2550)를 이용하여 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank도 위와 같은 방법으로 만든 후 측정하였다. 4-NPC의 분자흡광계수 $16300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (조건: pH 7.4, 400 nm)를 이용하여 Total activity를 구했다. Lipase activity (unit)는 $\mu\text{mol 4-NPC hydrolyzed min}^{-1}$ 로 정의하였다. 또한 비활성은 단위 단백질당 lipase 활성으로 표시하였다.

Amylase activity는 분석용 kit (關聯試藥 시리즈 리키택AMY EPS)를 이용하여 측정하였다. kit의 기질 혼합물 속에는 105 mM HEPES buffer (pH 7.1), 52 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 3 mM 4, 6-ethylidene-G₇ para-nitrophenol 기질, 24 U ml^{-1} α -glucosidase (enzyme code 3.2.1.20, 25°C, yeast)가 auxiliary enzyme으로 포함되어있다. 상등액 12 μl 와 효소액 300 μl 그리고 기질 60 μl 를 혼합하여 반응 시킨 후 Microplate reader (Bio-Rad, 2550)를 이용하여 405 nm에서 측정하였다. Amylase activity (unit)는 1분 동안에 기질 1 μmol 을 전환하는 amylase의 활성으로 정의 하였다. 또한 비활성은 단위 단백질당 amylase 활성으로 표시하였다.

단백질 정량에는 Bio-Rad protein kit (Bio-Rad, Tokyo, Japan)을 이용하였다. 효소와 단백질 분석은 한 개체 당 3반복으로 실시하여 평균값으로 나타냈다.

결 과

불락 자치어의 체장과 습중량 변화는 Fig. 1A에 나타내었다. 산출 직후 자어의 체장은 $5.01\pm 0.22\text{ mm}$ 이었던 것이 산출 후 100일에는 $36.01\pm 1.22\text{ mm}$ 까지 성장하여 실험기간 중 0.31 mm day^{-1} 의 성장률을 나타내었고 성장식은 $Y=0.324X+0.386$ ($r^2=0.924$)를 나타냈다. 자치어 습중량은 산출 후 70일 전후로 급격히 증가하면서 두 가지의 성장양식을 나타내었다. 산출 후 1일 짜 습중량이 $0.02\pm 0.01\text{ g}$ 이었던 것이 산출 후 70일에는 $0.25\pm 0.08\text{ g}$ 로 완만하게 증가하였고 성장식은 $Y=0.003X-0.002$ ($r^2=0.896$)을 나타냈다. 그 후 100일째 습중량은 $1.22\pm 0.10\text{ g}$ 으로 급격히 증가하여 산출 후 70일에서 100일 사이의 성장식은

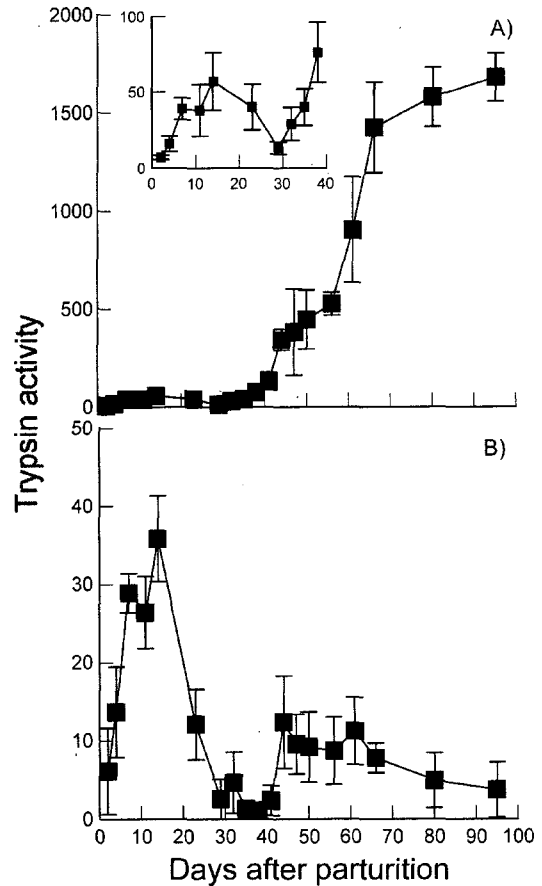


Fig. 2. Total enzyme (A) and specific enzyme (B) activity of trypsin in whole body homogenate, during larval and juvenile development of black rockfish.

$Y=0.033X-1.996$ ($r^2=0.948$)으로 나타났다. 단백질은 산출후 2일째 $1.14\pm 0.12\text{ g}$ 을 기록하고 6일째는 $6.24\pm 2.90\text{ g}$ 으로 증가 되었다. 그 후 61일째까지 $80.30\pm 24.75\text{ g}$ 으로 서서히 증가하다가 산출후 95일 $450\pm 18\text{ g}$ 까지 급격히 증가하였다(Fig. 1B). 본 실험에서 불락은 산출후 60일을 경계로 자어에서 치어로 이행하는 것으로 확인되었다(Table 1).

Trypsin 활성(unit)은 산출후 2일째 처음으로 확인되어 $7.00\pm 1.48\text{ unit}$ 을 나타내고 35일째 $40\pm 12\text{ unit}$ 까지 변화가 없다가 급격히 증가하여 산출후 66일에는 $1425\pm 230\text{ unit}$ 를 나타내었고 산출후 95일째 $1680\pm 123\text{ unit}$ 을 나타내며 비교적 완만히 증가 하였다(Fig. 2A). Trypsin의 specific activity는 산출후 14일 35.8 ± 5.5 로 peak를 나타낸 후 38일째 1.1 ± 1.0 까지 감소 후

Table 1. Developmental phase composition (number of fish) of black rockfish, showing in terms of age

Developmental phase	Days after parturition						
	45	50	55	60	65	70	75
Flexion	3						
Postflexion	27	30	5	2			
Juvenile			25	28	30	30	30

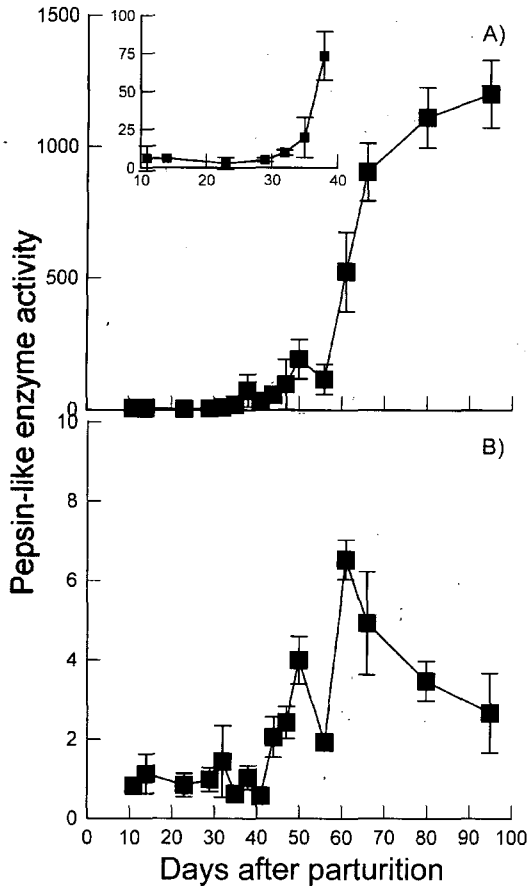


Fig. 3. Total enzyme (A) and specific enzyme (B) activity of pepsin-like enzyme in whole body homogenate, during larval and juvenile development of black rockfish.

44일째 다시 증가 후 실험 종료까지 거의 비슷한 값을 나타냈다(Fig. 2B).

Pepsin-like enzyme 활성은 산출 후 11일째 처음으로 6.0 ± 3.2 unit가 확인되었고 47일째까지 큰 변화가 없다가 50일째 194 ± 75 unit로 첫 peak를 나타냈다. 그 후 66일째 902 ± 160 unit까지 급격히 증가한 후 95일째는 1200 ± 130 unit을 나타내며 비교적 완만한 증가 경향을 나타내었다(Fig. 3A). Pepsin-like enzyme의 specific activity는 산출 후 11일째부터 41일까지 $0.83 \pm 0.12 \sim 0.58 \pm 0.21$ 범위에서 유의한 변화가 없었으나 산출 후 50일과 61일 사이 3.91 ± 0.61 과 6.53 ± 0.52 로 각각 peak를 나타낸 후 감소하였다(Fig. 3B).

Lipase 활성(unit)은 산출 후 2일째 4.5 ± 1.4 unit으로 확인된 후 23일째 1.8 ± 0.4 unit로 최저값을 나타내었다. 그 이후 값이 급격히 증가하여 산출 후 47일째에는 38.3 ± 0.4 unit을 나타낸 후 95일째 38.1 ± 9.5 unit를 유지하며 큰 변화가 없었다(Fig. 4A). Lipase의 specific activity는 산출 후 2일째 3.95 ± 0.41 로 peak를 나타낸 후 41일째 0.39 ± 0.11 까지 급격히 감소한 후 44일째 1.28 ± 0.45 로 두 번째 peak를 나타낸 후 감소하였다(Fig. 4B).

Amylase 활성(unit)은 산출 후 11일째 0.18 ± 0.11 unit으로 처

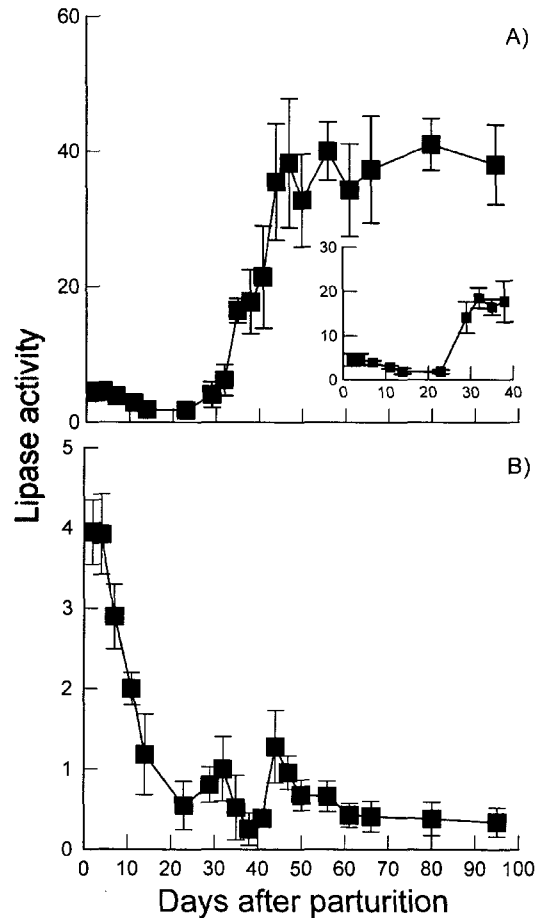


Fig. 4. Total enzyme (A) and specific enzyme (B) activity of lipase in whole body homogenate, during larval and juvenile development of black rockfish.

음 확인되었고 35일째까지 0.11 ± 0.07 unit으로 변화가 거의 없었다. 그러나 산출 후 50일째 23.48 ± 5.11 unit까지 급격히 증가하였고 95일째 25.91 ± 4.30 unit을 나타내며 변화 없이 일정한 값이 유지되었다(Fig. 5A). Amylase의 specific activity는 산출 후 11일째 0.13 ± 0.05 로 첫 번째 peak를 나타낸 후 감소하다가 47일째 0.55 ± 0.11 로 두 번째 peak를 나타내고 급격히 감소하였다(Fig. 5B).

고 찰

본 연구에서는 체장과 습중량 측정을 통해 볼락 자어의 성장을 알아보고 종묘를 안정적으로 대량생산하는데 있어서 필수적인 소화효소의 출현시기와 성장에 따른 변화에 대해 조사하였다.

볼락 자어의 산출 직후 체장은 5.25 ± 0.51 mm로 Kim et al. (1993)이 산출 후 자어의 전장을 $5.95 \sim 6.25$ mm로 보고한 것과 유사하지만, 같은 양볼락과에 속하는 조피볼락(*Sebastes schlegeli*)의 $6.5 \sim 7.2$ mm (星畝, 1977) 및 황점볼락(*Sebastes oblongus*)의 $7.25 \sim 7.50$ mm (Fujita, 1958)보다 작은 것으로 나타났다. 그

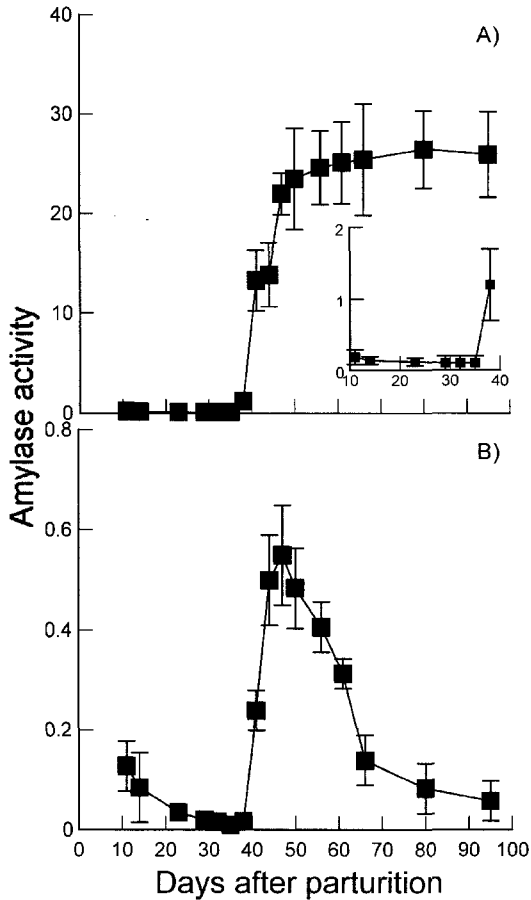


Fig. 5. Total enzyme (A) and specific enzyme (B) activity of amylase in whole body homogenate, during larval and juvenile development of black rockfish.

후 체장은 실험기간 중 서서히 증가하는 경향을 나타내었다. 어체 습중량은 산출후 50일까지는 큰 변화가 없다가 산출후 50일과 70일 사이를 경계로 급격히 증가하였는데 이 시기는 블락 자어가 치어로 이행하는 시기와 일치하였다. 본 실험에서는 평균 체장 17 mm 에서 블락이 치어의 모습을 갖추었다. 이것은 조피블락(Kim and Han, 1991)의 전장 15.20 mm, 황점블락(Fujita, 1958)의 전장 14.0 mm 등의 보고와 비교할 때 늦은 것을 알 수 있다. 단백질량은 산출후 60일부터 급격히 증가하였고 기본적으로 습중량 변화와 유사한 경향을 나타내었다. Tanaka (1973)는 은어(*Plecoglossus altivelis*)의 경우 자어기에 색이행동을 뒷받침할 수 있는 운동 에너지원 획득을 위하여 지방에 상당한 중점을 두고 영양섭취를 하고, 치어가 되면 지방이 축적됨과 동시에 운동기관이나 감각기관도 일정 수준의 발달 단계에 달하게 되어 성장에 중점을 둔 단백질 중심의 영양섭취로 전환하는 것으로 보고하였다. 또한 이 같은 전환은 위선 분화에 의한 단백질 소화기구의 발달에 의해 가능하게 되고 먹이생물로 보면 유생 플랑크톤에서 성체 플랑크톤 중심으로 먹이의 전환이 일어나므로 가능하다고 하였다. 자연산 블락도 Harada

(1962)와 Huh and Kwak (1998)의 보고에 의하면 체장 10~30 mm에 변태를 마치고 치어가 된 후 생활공간이 잘피밭으로 변함과 동시에 먹이생물도 copepod에서 갑각류인 amphipods, isopods 그리고 mysids로 변하게 된다고 하였으므로 블락도 치어기를 전후로 한 영양섭취의 전환이 일어나는 것으로 생각된다.

치어기 이전에는 위선이 발달되지 않았다고 볼 때 체장이 매우 중요하고 유일한 소화효소 분비작용을 하는 곳이므로 성장에 따른 체장의 발달과 활성을 조사하는 것은 매우 중요하다 (O'Connell, 1981; Miwa et al., 1992; Douglas et al., 1999; Murray et al., 2003). 체장에서 분비되는 소화효소 중의 하나인 trypsin은 자어 단계의 소화에서 가장 중요한 단백질 분해 효소이고 분비되는 양은 섭식한 먹이의 양과 크기에 좌우되므로 체장 또는 장점막에서 분비되는 trypsin 활성을 측정해서 기아 또는 섭식 상황 등 자어의 건강 상태를 파악하는데 이용하기도 한다(Pedersen et al., 1987; Ueberschär and Clemmesen, 1992). 자어의 체액 중에는 섭식개시 시에 이미 티모진 과립이 준비되어 있어서 잉어 (*Cyprinus carpio*)나 감성돔(*Acanthopagrus schlegelii*) 자어는 이 시기에 trypsin이 급상승한다는 보고가 있다(Kawai, 1972). 블락도 산출 직후부터 trypsin이 확인되었으나 급격한 증가는 보이지 않았다. 블락의 trypsin 전환성이 산출 직후부터 자어기 전반에 걸쳐 낮은 값을 유지하고, 특히 산출 후 10일째 자어의 경우 같은 속의 속하는 조피블락의 1/280 그리고 누루시블락(*Sebastes vulpes*)의 1/80 정도로 전환성이 낮게 나타난 것으로 볼 때 자어 초기 protease로서의 trypsin 역할이 상대적으로 약할 것으로 추측된다(川畠, 1995). 은어(*P. altivelis*)는 25~30 mm 자어에서 trypsin 전환성의 peak가 확인되고 이후에는 증가 없이 오히려 감소 하였다(川畠, 1975). Tanaka (1973)는 원인을 자어가 치어로 성장하면서 완성된 소화관과 새롭게 분화된 위선에서 왕성하게 분비되는 pepsin-like enzyme에 의해 trypsin의 역할이 상대적으로 저하된 것으로 생각하였다. 하지만 블락의 경우 산출후 40일 이후 trypsin 전환성이 급격히 증가하는 것으로 볼 때 치어기에 pepsin-like enzyme 활성이 높아진 때에도 trypsin이 protease로서 역할을 지속적으로 하고 있는 것으로 생각된다. 블락 trypsin의 specific activity가 산출 후 11일째 높게 나타났는데 이 시기는 *Artemia*를 급이하기 시작한 시기와 일치하였다. 이와 유사한 결과가 금붕어(*Carassius auratus*) (Abi-Ayad and Kestemont, 1994)와 넙치(*Paralichthys olivaceus*) (Bolasina et al., 2006)에서 보고되었다. *Artemia* 급이 후 trypsin의 specific activity가 높게 나타난 이유는 자어가 큰 개체의 *Artemia* nauplii를 섭식하여 trypsin 분비량이 증가했을 가능성 또는 *Artemia*를 한 번 섭취했던 자어의 섭취를 증가에 기인했을 가능성을 생각할 수 있겠다. 블락 자어기에 trypsin의 specific activity가 peak를 나타낸 후 감소하는 것과 유사한 경향이 *Dicentrarchus labrax* (Cahu and Zamboni Infate, 1994), *Solea senegalensis* (Ribeiro et al., 1999) 그리고 *Pseudosciaena crocea* (Ma et al., 2005)에서도 확인 되었고 이것은 성장에 따

른 단백질량 증가에 기인한 것으로 소화효소의 용량이 감소하는 것은 아닌 것으로 생각된다.

Pepsin-like enzyme은 위액 중에 존재하는 소화효소 중 가장 강력한 것으로 최적 pH 2~4이고 먹이 중의 단백질 소화를 최초로 담당하는 소화효소라고 할 수 있다(田村, 1991). 불락 자어의 pepsin-like enzyme 전활성과 specific activity는 값이 매우 적지만 치어기 이후에 급상승하게 된다. 이것은 은어와 감성돔(Kawai, 1972) 등의 어류에서도 확인된 것으로 pepsin-like enzyme을 분비하는 위선이 치어기 이전에 분화하여 현저하게 발달하였기 때문인 것으로 생각된다. 그러므로 불락의 치어기 이후 단백질 소화에는 pepsin-like enzyme이 많은 기여를 할 것으로 생각된다.

Lipase는 대부분의 자어의 경우 섭식개시 시 리파제의 주요한 분비 부위인 췌장에서 티모겐 과립이 다량 확인되므로(Tanaka, 1969), 섭식 초기부터 지질분해 능력은 높다고 추측된다. Bolasina et al. (2006)는 넙치의 경우 부화 후 2일째 자어에서 neutral lipase activity를 확인하고 섭식개시 시점에서 자어는 지질을 소화할 수 있는 효소를 갖고 있음을 보고하였다. 불락 자어도 산출후 2일째부터 lipase의 전활성이 확인되고 특히, specific activity가 높게 나타난 것으로 보아 자어 초기부터 지질을 소화할 수 있는 능력이 있을 것으로 생각된다.

Amylase 전활성과 specific activity는 유사한 변화 경향을 나타냈고 전활성은 산출후 11일째 처음 확인 되었고 trypsin 전활성 변화와 유사한 경향을 나타내어 산출후 40일을 경계로 급격히 증가하였고 산출후 50일부터는 일정한 값을 유지하는데 이것은 아밀라제를 합성하는 분비세포의 기능이 일정 수준으로 안정되었기 때문인 것으로 생각된다. 조피불락이 산출후 10일째 불락보다 약 40배 높은 전활성을 나타내는 것과 비교하면 대조적인 결과라고 할 수 있겠다(川畠, 1995). 川畠 (1995)는 섭식개시 전후인 부화후 5일째 조피불락, 누루시불락, 참돔(*Pagrus major*) 그리고 감성돔 자어에서 amylase가 확인 된 것을 보고 하였다. 그러나 자치어 사육시 주로 급이하는 것은 동물플랑크톤인 rotifer이고 이를 배양하기 위해 식물플랑크톤을 이용하지만 해조류 내에는 전분 이외의 다당류가 포함되어 있고 자어가 이것을 섭취해도 amylase로 소화하는 것은 불가능한 것을 지적 하며 많은 어종에서 자어 전기부터 확인되는 amylase 역할에 대한 의문점을 제시하였다. 이에 대해 田中 (1975)는 식물플랑크톤의 탄수화물 함량이 건조중량으로 체중의 1~3%에 지나지 않는 매우 적은 량으로 자치어 영양원으로서의 중요도는 낮지만 자어의 섭식개시기에 amylase가 출현하는 것은 먹이생물의 양적 질적 변화에 대응하여 보다 다양한 먹이를 이용할 수 있는 가능성을 보장해 준 것으로 설명하였다.

일반적으로 해산어는 난생으로 알에서 갓 부화했을 때는 먹이를 찾을 수 있는 눈, 먹이를 쫓아서 포획할 수 있는 유영력 그리고 먹이를 소화할 수 있는 기능화 된 소화기관을 갖지 못하다가 부화 후 발생이 진행되면서 이 들 능력을 갖추어나간다

(水戸, 1966). 그러나 불락과 같은 난태생 어류 들은 수정란 발생이 난소 내에서 진행되어 부화한 자어가 태내에서 약 27~30일 머문 후 난황이 거의 흡수 되었을 때 난소강을 나와서 산출되므로 산출 직후부터 외부에서 먹이를 섭취할 수 있는 능력을 갖추고 있을 것으로 생각된다(Kim and Han, 1993). 불락과 같은 속에 속하는 조피불락은 산출 시에 소화계의 분화발달 정도가 상당히 높은 어류로 소화효소의 활성화도 자어기 때 매우 높은 것으로 보고 되어 있다(川畠, 1995). 사육현장에서 조피불락은 산출후 7일째부터 배합사료를 급이 하여도 생존에 지장이 없고 성장도 양호하지만(personal communication), 불락은 배합사료만 단독으로 급이 할 경우 반드시 산출후 60일 이후에 해야지만 소화불량에 의한 대량폐사를 피할 수 있다고 하였다(박, 2004). 이것은 본 연구에서 얻어진 결과와 잘 일치하는 것으로 불락은 같은 속에 속하는 조피불락, 황점불락 보다 자어기가 상대적으로 길고, 치어가 되면서 소화관이 완성되어 기능화 되고(Harada, 1962), 이로 인해 소화관내에 먹이가 머무는 시간과 먹이와 소화효소가 소화관내에서 혼합될 수 있는 시간이 늘어나 효율적인 소화가 일어나게 되어 결과적으로 치어기 이후의 성장을 상승에 기여하는 것으로 생각된다.

지금까지 결과를 종합해 보면 불락의 소화효소 활성화와 체중은 밀접한 상관관계를 갖고 있음을 알 수 있다. 특히 체중 증가가 현저하게 나타나기 시작하는 시기에 맞춰서 각 효소의 전활성이 급격히 상승하는 것은 재미 있는 현상 이라고 할 수 있다. 일반적으로 이 시기는 위선이 기능적으로 역할을 하는 시기와 일치하므로 단백질 소화능력의 비약적인 증가가 체중 증가에 크게 관여하였음을 나타낸다. 이와 관련하여 조직학적 실험을 통한 불락의 위선 출현시기에 대한 확인이 필요하다고 생각된다. 또한 체중이 급격하게 증가하는 시기인 산출후 66일째를 경계로 체중 증가율이 2.6배로 향상되는데 이 시기는 lipase를 제외한 trypsin, pepsin-like enzyme 그리고 amylase 모두가 체중당 각 효소의 활성이 가장 높게 나타난 시기이기도 하다(data not shown). 그러므로 본 실험에서 확인 된 체중이 급격히 증가하기 시작하는 시기는 불락 양식에 있어서 사료 전환기 즉, 생물사료에서 배합사료로 전환하기에 적당하다고 할 수 있겠다.

요 약

본 실험은 불락 종묘를 안정적으로 대량 생산하는 데 필 수적인 자치어기의 성장과 소화효소인 trypsin, pepsin-like enzyme, amylase 그리고 lipase의 activity를 측정하여 소화생리에 대한 기초 자료를 제공하고자 수행하였다.

산출 직후 자어의 체장은 5.01 ± 0.22 mm이었던 것이 산출 후 100일에는 36.01 ± 1.22 mm 까지 성장하였고, 습중량은 산출 후 70일 전후로 급격히 증가하였다. trypsin 활성은 산출후 2일째 처음으로 확인되어 7.00 ± 1.48 unit을 나타내고 산출후 66일 1425 ± 230 unit으로 peak를 나타내었다. pepsin-like enzyme 활

성은 산출 후 11일째 처음으로 확인되었고 산출후 66일째 902±160 unit까지 급격히 증가하였다. Lipase 활성은 산출후 2 일째 4.5±1.4 unit으로 확인되었고 산출후 47일째에는 38.3±0.4 unit로 peak를 나타내었다. Amylase 활성은 산출후 11일째 0.18±0.11 unit으로 처음 확인되었고 산출후 50일째 23.48±5.11 unit까지 급격히 증가하였다. specific activity는 trypsin이 산출 후 14일째, pepsin-like enzyme이 61일째 peak를 나타냈다.

블락의 체중이 현저하게 증가하는 시기에 맞춰서 각 효소의 전환성이 급격히 상승하는 것을 확인 할 수 있었다. 이것은 이 시기가 위선이 기능적으로 역할을 하는 시기와 일치하므로 단백질 소화능력의 비약적인 증가가 체중 증가에 크게 관여하였음을 나타낸다. 그러므로 본 실험에서 확인 된 체중이 급격히 증가하는 시기는 블락 양식에 있어서 사료 전환기 즉, 생물사료에서 배합사료로 전환하기에 적당하다고 할 수 있겠다.

감사의 글

본 연구 수행에 있어서 많은 도움을 주신 日本 京都大學의 田中 克 교수님과 동 대학의 藤井 あや씨에게 감사 드립니다.

참고문헌

- Abi-Ayad, A. and P. Kestemont, 1994. Comparison of the nutritional status of goldfish (*Carassius auratus*) larvae fed with live, mixed or dry diet. *Aquaculture*, 128, 163–176.
- Bolasina, S., A. Pérez and Y. Yamashita, 2006. Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 252, 503–515.
- Cahu, C. and J. L. Zambonino Infante, 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109A, 213–222.
- Chung, M. K., 1977. *The Fishes of Korea*, Iljisa, Seoul, 727 pp.
- Douglas, S. E., A. Gawlicka, S. Mandala and J. W. Gallant, 1999. Ontogeny of the stomach in winter flounder: characterization and expression of the pepsinogen and proton pump genes and determination of pepsin activity. *J. Fish Biol.*, 55, 897–915.
- Fujita, S., 1958. On the egg development and larval stages of a viviparous scorpaenidae fish, *Sebastes oblongus* Günther. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 24, 475–479.
- Harada, E., 1962. A contribution to the biology of the black rockfish, *Sebastes inermis* Cuvier et Valenciennes. *Publ. Seto. Mar. Biol. Lab.*, 10, 307–361.
- Huh, S. H. and S. N. Kwak, 1998. Feeding habits of *Sebastes inermis* in the eelgrass (*Zostera marina*) bed in Kwangyang bay. *J. Korean Fish. Soc.*, 31, 168–175.
- Kawai, S., 1972. Studies on the digestive enzymes of fishes with special references to carbohydrates. Ph. D. thesis, Kyoto University, Kyoto, Japan, 44 pp.
- Kendall, A. W. Jr., 1991. Systematics and identification of larvae and juveniles of the genus *Sebastes*. *Environ. Biol. Fishes*, 30, 173–190.
- Kim, C. K. and Y. J. Kang, 1999. Feeding ecology of black rockfish, *Sebastes inermis*. *J. Korean Fish. Soc.*, 32, 637–641.
- Kim Y. U. and K. H. Han, 1991. The early life history of rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Korean J. Ichthyol.*, 3, 67–83.
- Kim Y. U. and K. H. Han, 1993. The early life history of the rockfish, *Sebastes inermis*. 1. Egg development and morphology of larvae by artificial treatment on aquarium. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 26, 458–464.
- Kim Y. U., K. H. Han and S. K. Byun, 1993. The early life history of the rockfish, *Sebastes inermis*. 2. Morphological and skeletal development of larvae and juveniles. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 26, 465–476.
- Lee, T. Y. and S. Y. Kim, 1992. Reproduction and embryonic development within the maternal body of ovoviviparous teleost, *Sebastes inermis*. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 25, 413–431.
- Ma, H., C. Cahu, J. Zambonino, H. Yu, Q. Duan, M. Le Gall and K. Mai, 2005. Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Aquaculture*, 245, 239–248.
- Miwa, S., K. Yamano and Y. Inui, 1992. Thyroid hormone stimulates gastric development in flounder larvae during metamorphosis. *J. Exp. Zool.*, 261, 424–430.
- Murray, H. M., J. W. Gallant, J. C. Pérez-Casanova, S. C. Johnson and S. E. Douglas, 2003. Ontogeny of lipase expression in winter flounder. *J. Fish Biol.*, 62, 816–833.
- Ochiai, A. and M. Tanaka, 1986. Black rock fish. (in) A. Ochiai and M. Tanaka (ed.), *Ichthyology*. Koseisyakoseikaku, Tokyo, pp. 1031–1034.
- O’Connell, C. P., 1981. Development of organ systems in the northern anchovy *Engraulis mordax*, and other teleosts. *Am. Zool.*, 21, 429–446.
- Pedersen, B. H., E. M. Nilssen and K. Hjelmeland, 1987. Variations in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring (*Clupea harengus*) digesting copepod nauplii. *Mar. Biol.*, 94, 171–181.
- Ribeiro, L., J. L. Zambonino Infante, C. Cahu and M. T. Dinis, 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture*, 179, 465–473.
- Shinomiya, A. and O. Ezaki, 1991. Mating habits of the rockfish, *Sebastes inermis*. *Environ. Biol. Fishes*, 30, 9–13.
- Tanaka, M., 1969. Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae-I. Development of the digestive system during prelarval stage. *Jap. J. Ichthy.*, 16, 1–9.
- Tanaka, M., 1973. Studies on the structure and function of the digestive system of teleost larvae. Ph. D. thesis, Kyoto University, Kyoto, Japan, 134 pp.
- Ueberschär, B. and C. Clemmesen, 1992. A comparison of the nutritional condition of herring larvae as determined by two biochemical methods-trypsin activity and RNA/DNA ratio measurements. *ICES J. Mar. Sci.*, 49, 245–249.
- 川合 眞一郎, 1975. 消化酵素. 日本水産學會編, 稚魚の攝食と發

- 育. 恒星社厚生閣, 東京, pp. 30-40.
- 川合 眞一郎, 1995. 栽培漁業技術体系化事業 基礎理論コース
テキスト集, 東京, 日本, 36 pp.
- 田中 克, 1975. 稚魚の消化系. 日本水産學會編, 稚魚の攝食と發育.
恒星社厚生閣, 東京, pp. 7-23.
- 田村 保, 1991. 消化と吸収. 田村 保編, 魚類生理學概論, 恒星
社厚生閣, 東京, pp. 84-103.
- 水戸 敏, 1966. 日本海洋プランクトン圖鑑, 第7卷 魚卵・稚魚.
蒼洋社, 63 pp.
- 星合 愿一, 1977. クロソイ仔稚魚について. 魚雜, 24, 35-42.
- 강용주, 1982. 한국연안천해생물군집의 구조와 생산. 1. 남해산
불락 (*Sebastes inermis*)의 연령과 성장. 부산수대해연보.
14, 51-58.
- 김중현, 이윤호, 문영봉, 고창순, 2001. 수온, 먹이계열 및 사
육밀도에 따른 불락 (*Sebastes inermis*)의 초기 생존율과
성장. 수진연구보고. 59, 90-98.
- 박대원, 2004. 불락, *Sebastes inermis*의 초기 미립자사료 공
급시기 규명. 한국양식. 16, 4-10.

원고접수 : 2006년 4월 5일

수정본 수리 : 2006년 5월 5일