

염분 스트레스가 동근전복 *Haliotis discus discus*의 유리아미노산 조성에 미치는 영향

양현성, 박경일¹, 홍충희², 최광식*

제주대학교 해양과학대학 해양과학부, ¹군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과, ²제주특별자치도 수산정책과

Effects of Salinity Stress on the Composition of Free Amino Acids of the Pacific abalone *Haliotis discus discus*

Hyun-Sung Yang, Kyung-Il Park¹, Choong-Hee Hong² and Kwnag-Sik Choi*

School of Applied Marine Science, College of Ocean Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

¹Department of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science, Kunsan National University, Kunsan 573-701, Korea

²Marine Affairs and Fisheries Policy Division, Munyeonno2, Jeju-si, Jeju Special Self-Governing Province, Jeju 690-700, Korea

Changes in 13 free amino acids (FAA) of *Haliotis discus discus* exposed to various salinities were investigated using a high performance liquid chromatography (HPLC). Taurine, glycine and alanine are three major contributors to the total FAA in the gill tissues of *H. discus discus*. Concentration of taurine was 114 $\mu\text{mol/g}$ dry tissue weights accounting for 76.64% of total FAA in *H. discus discus*. Levels of most FAAs in *H. discus discus* exposed to low and high salinities for 24 h decreased dramatically. Taurine concentration was slightly increased in the samples exposed to 20 psu and 25 psu for 48 h, and greatly increased after 120 h exposure. After 48 hrs exposure to 20 psu, 25 psu, 30 psu and 40 psu, methionine in *H. discus discus* was not detected; no methionine was detected in the sample exposed to 20 psu, 25 psu, 30 psu and 40 psu after 120 h of exposure. Taurine:glycine ratio increased depending upon hyper-hypoosmotic condition as well as period of osmotic stress. These data indicate that taurine, glycine and methionine play important role in regulating osmotic stress in *H. discus discus*. This study suggesting that FAA analysis is a useful tool to diagnose osmotic stress to *H. discus discus*.

Key words: Free amino acid, *Haliotis discus discus*, Salinity stress, Osmotic stress

서 론

전복류 중 동근전복(*Haliotis discus discus*)은 제주 연안에 널리 분포하며, 양식되기도 하는데, 이는 제주 연안의 일정한 외양성 염분(30-35 psu)이 전복과 같은 협염성 생물의 분포에 적합하기 때문이다. 그러나 제주 주변 해역은 때때로 여름철에 중국 대륙으로 저염수가 유입되어 연안에 서식하는 생물에 피해를 주기도 한다. 특히 이러한 저염 피해는 운동성이 거의 없고 외양성인 전복, 성게 등에 피해를 미친다. 1996년의 경우 제주 해역에 유입된 저염수는 염분이 20 psu로, 이에 따라 전복류의 대량 폐사 현상이 발생하였다(Pang and Hyun, 1998; Hyun and Pang, 1988; Moon and Pang, 2003).

이와 관련하여 Won et al. (2001)은 동근전복을 저염수에 노출시켜 저염분수가 이들에 미치는 영향을 알아 보는 실험을 수행하였다. 동근전복을 대상으로 반수치사를 조사한 결과, 같은

수온(32°C) 조건에서 염분 30 psu의 실험구와 25 psu의 실험구는 각각 13시간과 4시간을 나타내었고, 같은 저염분 (20 psu) 조건에서 수온을 26°C와 23°C로 비교한 실험에서는 각각 11시간과 38.2시간을 나타내었다.

수온과 염분은 수서생물의 생리, 생태를 지배하는 주 환경 인자로, 해수의 염분 변화는 해양 생물의 체액 농도 및 삼투 조절(osmoregulation)에 지대한 영향을 미친다. 전복과 같은 외부의 염분변화에 따라 체 내의 염분이 변화하는 동물은 변화된 삼투압에 적응하기 위한 생리적 반응을 보이는데(Lynch and Wood, 1966), 이런 생리적 반응의 일환으로 세포는 organic osmolyte의 일종인 유리아미노산을 분비함으로써 생리적 안정을 도모하며, 유리아미노산은 생화학적, 생리적 대사에 민감하게 반응하기 때문에 해양무척추동물의 스트레스 지표로 이용되기도 한다(Lynch and Wood, 1966; Hummel et al., 1996; Souza and Scemes, 2000). Livingstone (1985)은 이매페류에 있어 유리아미노산인 Taurine과 Glycine이 환경변화 등의 스트레스를 받게

*Corresponding author: skchoi@cheju.ac.kr

되면 각각 증가하고 감소하는 경향을 나타내 일반적으로 이들의 비율(T:G ratio)을 다양한 환경변화에 대해 반응하는 스트레스 지표로 이용하였다.

이 연구는 다양한 염분조건에 노출된 둥근전복(*H. discus discus*)의 유리아미노산 변화를 분석함으로써 염분 변화에 반응하는 전복의 생리적 변화를 규명하였다.

재료 및 방법

실험생물 및 실험장치

실험에 사용된 둥근전복은 제주도 해양수산자원연구소에서 생산되었으며, 평균 각각 54.43±0.17 mm, 중량 11.95±0.61 g이었다. 실험에 쓰인 전복은 실험환경에 적응할 수 있도록 실험 시작 전까지 수온 16.8~17.5°C, 염분 32~33 psu에서 충분한 먹이(생다시마, 생미역)를 공급하며 60 L 사각형 FRP (600×400×300 mm) 수조에 순치하였다. 실험조건은 (1) 대조구 35 psu, (2) 저염 stress 15 psu, 20 psu, 25 psu, 30 psu, (3) 고염 stress 40 psu로 각각 설정하고, 각 수조당 20마리의 전복을 수용하였다. 사육수는 여파해수를 사용하였고, 염분 조절은 증류수와 천일염을 이용하여 조절하였으며, 염분, 수온 및 용존산소(DO)를 측정하였다.

Free amino acid (FAA)의 분석

염분 변화에 따른 시료의 FAA 분석을 위하여 실험시작 전 (Day 0), 실험시작 후 24시간(Day 1), 48시간(Day 2), 120시간(Day 5) 마다 실험구별로 각각 5마리씩 무작위 선별하였다. FAA 분석을 위해 시료의 아가미를 적출하였으며, 5개체의 적출된 아가미들을 모아 한 실험구로 만들어 실험에 사용하였다. FAA 추출을 위하여 절단한 아가미 조직을 4°C 에서 초음파 분쇄기를 사용하여 균질화 시킨 후 원심분리 하였다. 단백질과 DNA를

침전시키기 위해 상등액에 10% trichloroacetic acid (TCA)를 첨가하였다. 원심분리 후, FAA를 함유한 상등액을 분리하였다. 분리된 FAA는 Ether로 수 회 세척하여 TCA를 제거한 후, HPLC (Vintage 2000, Oromtech)를 이용하여 아미노산 분석을 실시하였다. FAA 분석을 위하여 적정농도로 희석된 시료 1 mL와 100 µL의 O-phthaldialdehyde-acetyl-L-cystein (OPA)/N-acetyl L-cystein (NAC)를 2분간 교반하여 유도체화 한 후, 20 µL를 HPLC에 주입하였으며 이때 이동상(mobile phase)은 sodium acetate buffer와 methanol을 이용하였다. 아미노산의 정성 분석을 위하여 표준 아미노산 시약 13종(Aspartic acid, Glutamic acid, Serine, Threonine, Glycine, Taurine, Alanine, Tyrosine, Valine, Methionine, Phenolic acid, Isoluecine, Leucine)을 HPLC 를 이용하여 분석하고, 여기서 얻어진 retention time에 따라 동일한 분석 조건에서 나타난 시료의 peak를 비교함으로써 아미노산을 동정하였다. 아미노산 정량은 아미노산 표준 시약을 0.25, 1.25, 2.5, 10 nmol로 희석 한 후 각각의 농도에서 얻은 peak의 면적과의 상관식을 구하고 여기에 시료의 면적을 대입함으로써 최종 시료의 아미노산 농도(µmol/g dry tissue)를 정량하였다.

결 과

사육환경 및 생존율

실험에 사용된 사육수조의 수질분석을 위하여 입식 후 24시간 내에 전량 폐사한 수조 (15 psu)를 제외한 나머지 수조에 대하여 수온, 염분, 용존산소량을 Table 1에 나타내었다. 수온은 15.9~18.1°C 범위로 측정되었으며, 용존산소는 6.4~8.5의 범위를 나타내어 수조간 실험 기간 동안 유사한 수질 조건을 나타내었다. 둥근전복의 생존율은 염분 15 psu에 노출되었던 개체들이 입식 후 24시간 이내 전 개체가 사망하였으며, 염분 20 psu

Table 1. Water quality in each rearing tank.

Salinity	Water quality	Day 0	Day 1	Day 2	Day 5	Remark
15 psu	Temp.	17.6				All samples died after 1 day
	Sal.	15.1				
	D.O.	7.4				
20 psu	Temp.	17.6	17.6	17.2	15.9	8 samples died after 2 days
	Sal.	19.7	20.0	20.1	20.3	
	D.O.	7.4	7.2	7.9	7.9	
25 psu	Temp.	17.7	17.6	17.0	15.9	
	Sal.	24.9	25.0	25.0	25.0	
	D.O.	7.1	7.2	8.4	7.7	
30 psu	Temp.	17.9	17.7	17.0	15.9	
	Sal.	29.9	30.0	30.0	30.2	
	D.O.	7.1	6.7	8.1	7.1	
35 psu	Temp.	18.0	17.8	17.3	15.9	
	Sal.	35.0	35.2	35.0	35.2	
	D.O.	7.0	6.7	7.9	7.0	
40 psu	Temp.	18.1	17.8	17.0	16.0	
	Sal.	39.7	39.8	39.7	40.3	
	D.O.	6.5	6.4	7.2	6.7	

의 실험구에서는 48시간 이내 8개체가 사망하였다. 그러나 다른 염분의 실험구에서는 실험 종료 시기인 5일 후까지 100% 생존율을 보였다.

등근전복의 일반적인 FAA 조성

실험에 앞서 분석된 등근전복 아가미 FAA는 비 필수 아미노산인 Aspartic acid (Asp), Glutamic acid (Glu), Serine (Ser), Glycine (Gly), Taurine (Tau), Alanine (Ala), Tyrosine (Tyr) 과, 필수 아미노산인 Threonine (Thr), Valine (Val), Methionine (Met), Phenylalanine (Phe), Isoleucine (Lie), Leucine (Leu) 등으로, 이중 비 필수 아미노산인 Taurine이 114.1 $\mu\text{mol/g dry tissue}$ 으로 가장 높은 함량을 나타냈으며 Glutamic acid, Alanine, Aspartic acid 등이 각각 8.4, 7.4, 7.1 $\mu\text{mol/g dry tissue}$ 의 함량을 보였다. 이들 4종류의 비 필수 아미노산은 등근전복의 총 FAA 구성성분 중 약 90% 이상을 차지하고 있었다. 반면, 필수 아미노산의 함량은 0.2 $\mu\text{mol/g dry tissue}$ (Methionine)~1.6 $\mu\text{mol/g dry tissue}$ (Valine) 의 범위를 나타냈으며, 총 FAA의 약 3%를 구성하고 있었다(Table 2).

염분변화에 따른 FAA 구성 변화

1) 대조구 (35 psu)

실험기간 동안 관찰된 대조구 전복의 FAA 농도변화는 실험 시작 Day 1 이후 비 필수 아미노산인 Taurine (131.8 $\mu\text{mol/g dry tissue}$), Alanine (43.3 $\mu\text{mol/g dry tissue}$), Glycine (31.1 $\mu\text{mol/g dry tissue}$) 등이 총 FAA 함량 중 70% 이상을 차지하며 가장 높게 나타났으며, Glutamic acid와 Serine 등이 각각 18.4 $\mu\text{mol/g dry tissue}$ 와 16.9 $\mu\text{mol/g dry tissue}$ 순으로 높게 나타났다 (Table 3). 한편 필수 아미노산은 Threonine이 11.4 $\mu\text{mol/g dry tissue}$ 로 다른 필수 아미노산의 함량보다 상대적으로 높았으나, 전반적으로 비 필수 아미노산에 비하여 낮은 함량을 보였다. 실험

Table 2. The composition of free amino acid of the abalone *Haliotis discus discus* before the experiment. Unit= $\mu\text{mol/g dry tissue weight (mg/100g)}$

Amino acids	Day 0
Aspartic acid	7.1 (94.5)
Glutamic acid	8.4 (123.6)
Serine	1.9 (20.0)
Threonine	1.2 (14.3)
Glycine	4.7 (35.3)
Taurine	114.1 (1427.4)
Alanine	7.4 (65.9)
Tyrosine	0.8 (14.5)
Valine	1.6 (18.7)
Methionine	0.2 (3.0)
Phenylalanine	0.3 (5.0)
Isoleucine	0.3 (3.9)
Leucine	0.7 (9.2)

시작 Day 5 이후 Aspartic acid 및 Tyrosine을 제외한 나머지 아미노산 함량이 급격히 감소하는 것을 관찰할 수 있었고, 총 FAA 함량 또한 286.0 $\mu\text{mol/g dry tissue}$ 에서 111.1 $\mu\text{mol/g dry tissue}$ 로 현저히 감소하는 것이 관찰되었다.

2) 20 psu 염분 처리구

노출 Day 1 이후 Taurine의 농도는 86.0 $\mu\text{mol/g dry tissue}$, Glutamic acid 45.6 $\mu\text{mol/g dry tissue}$ 그리고 Alanine이 25.5 $\mu\text{mol/g dry tissue}$ 로 다른 실험구들과 마찬가지로 총 FAA의 70%를 차지하고 있었다. 노출 시간이 경과함에 따라 각각의 아미노산 함량과 총 FAA 함량은 감소하는 경향을 보였으나 Taurine의 경우 노출 Day 2 과 Day 5 에 100.8 $\mu\text{mol/g dry tissue}$, 122.3 $\mu\text{mol/g dry tissue}$ 으로 농도가 노출 Day 1 에 비해 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 Methionine의 경우 노출 Day 2 이후 검출되지 않았다(Table 3).

3) 25 psu 염분 처리구

노출 Day 1 후 Taurine의 총량은 93.4 $\mu\text{mol/g dry tissue}$ 로 총 FAA 함량의 약 70%를 차지하였으며, Glutamic acid과 Alanine이 각각 10.7 $\mu\text{mol/g dry tissue}$ 과 8.2 $\mu\text{mol/g dry tissue}$ 이었다. 다른 염분 처리구와는 상대적으로, 이 실험구에서는 노출 Day 5 이후 총 FAA 농도가 증가하였다. 그러나 각 아미노산의 경우 Taurine (93.4 $\mu\text{mol/g dry tissue}$ ~124.8 $\mu\text{mol/g dry tissue}$)과 Aspartic acid (4.5 $\mu\text{mol/g dry tissue}$ ~5.0 $\mu\text{mol/g dry tissue}$)만 증가하였고, 다른 아미노산은 전부 감소하였다. 한편 필수 아미노산 중 Methionine, Phenylalanine, Isoleucine 그리고 Leucine 등은 노출 Day 2 이후 검출되지 않았고, Isoleucine의 경우 노출 Day 5 후 미량이 측정되었다(Table 3).

4) 30 psu 염분 처리구

30 psu에서 배양된 전복은 실험 기간 동안 모든 FAA 함량이 감소하는 것이 관찰되었다. 노출 Day 5 후 Taurine이 48.5 $\mu\text{mol/g dry tissue}$ 로 총 FAA 중 80%를 차지하였으며, Alanine 과 Glycine이 각각 3.6 $\mu\text{mol/g dry tissue}$ 과 2.9 $\mu\text{mol/g dry tissue}$ 로 나타났다. 한편 Methionine은 노출 Day 5 후 검출되지 않았다. 이 처리구에서는 다른 저염 처리구와는 달리 Taurine이 대조구와 같이 노출 시간이 지남에 따라 감소하는 경향을 나타냈다(Table 3).

5) 40 psu 염분 처리구

노출 시간이 지남에 따라 총 FAA는 30 psu 염분 처리구와 마찬가지로 급격히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이들 아미노산 중 Taurine 이 103.5 $\mu\text{mol/g dry tissue}$ 에서 36.8 $\mu\text{mol/g dry tissue}$ 로 급격히 감소하였고, 이러한 현상은 다른 아미노산의 경우에서도 관찰되었다. 노출 Day 5 후 Taurine, Glycine 그리고 Alanine이 총 FAA의 95%를 차지하였다. Methionine,

Table 3. Concentration of amino acids in the FAA pool in controlled and treated Pacific abalone at Day 1, Day 2 and Day 5. Unit= imol /g dry tissue weight (mg/100g)

	20 psu	25 psu	30 psu	35 psu	40 psu
Day 1					
Aspartic acid	5.1 (67.9)	4.5 (59.9)	2.1 (28)	2.7 (35.9)	2.3 (30.6)
Glutamic acid	45.6 (670.8)	10.7 (157.4)	15.6 (229.5)	18.4 (270.7)	13.7 (201.5)
Serine	13 (136.6)	4.3 (45.2)	14.4 (151.3)	16.9 (177.6)	10.4 (109.3)
Threonine	8.5 (101.2)	2.7 (32.2)	8.3 (98.9)	11.4 (135.8)	5.4 (64.3)
Glycine	14.7 (110.4)	6.3 (47.3)	9.1 (68.3)	31.1 (233.5)	14.6 (109.6)
Taurine	86 (1075.9)	93.4 (1168.4)	82.6 (1033.3)	131.8 (1648.8)	103.5 (1294.8)
Alanine	25.5 (227.2)	8.2 (73.1)	28.8 (256.6)	43.3 (385.8)	16.1 (143.4)
Tyrosine	4.4 (79.7)	1.4 (25.4)	3.7 (67)	4.2 (76.1)	2.6 (47.1)
Valine	10.9 (127.6)	3.3 (38.6)	7.9 (92.5)	8.8 (103)	6.1 (71.4)
Methionine	1 (14.9)	0.03 (0.4)	2 (29.8)	1.8 (26.9)	0.7 (10.4)
Phenylalanine	2.7 (44.6)	0.6 (9.9)	2.4 (39.6)	3.4 (56.2)	1.7 (28.1)
Isoleucine	4.2 (55.1)	1.1 (14.4)	3.5 (45.9)	4.1 (53.8)	2.5 (32.8)
Leucine	6.1 (80)	1.2 (15.7)	6.6 (86.6)	8.1 (106.3)	4.8 (63)
Day 2					
Aspartic acid	7.2 (95.8)	2.2 (29.3)	0.7 (9.3)	1.5 (20)	1.5 (20)
Glutamic acid	11.2 (164.8)	4.9 (72.1)	3.7 (54.4)	7.3 (107.4)	2.5 (36.8)
Serine	1.6 (16.8)	1.3 (13.7)	3.5 (36.8)	6.1 (64.1)	0.8 (8.4)
Threonine	1.5 (17.9)	0.7 (8.3)	3.6 (42.9)	4.3 (51.2)	0.5 (6)
Glycine	6.1 (45.8)	3.9 (29.3)	9.5 (71.3)	13.4 (100.6)	7 (52.5)
Taurine	100.8 (1261)	81.5 (1019.6)	58.8 (735.6)	68.2 (853.2)	76.1 (952)
Alanine	11.4 (101.6)	7.6 (67.7)	19.3 (171.9)	15.6 (139)	5.1 (45.4)
Tyrosine	1.1 (19.9)	0.2 (3.6)	0.7 (12.7)	1.5 (27.2)	0.2 (3.6)
Valine	1.7 (19.9)	0.7 (8.2)	1.6 (18.7)	3.1 (36.3)	0.3 (3.5)
Methionine	0	0	0.3 (4.5)	1.1 (16.4)	0
Phenylalanine	0.2 (3.3)	0	0.4 (6.6)	0.5 (8.3)	0
Isoleucine	0.4 (5.2)	0	0.6 (7.9)	1.3 (17.1)	0
Leucine	0.5 (6.6)	0	1.6 (21)	3.3 (43.3)	0
Day 5					
Aspartic acid	3.3 (43.9)	5 (66.6)	1.5 (20)	3 (39.9)	0.3 (4)
Glutamic acid	7 (103)	7.7 (113.3)	2 (29.4)	6.5 (95.6)	0.9 (13.2)
Serine	1.6 (16.8)	2.2 (23.1)	0.8 (8.4)	3 (31.5)	0.3 (3.2)
Threonine	0.8 (9.5)	1.4 (16.7)	0.4 (4.8)	3.2 (38.1)	0.3 (3.6)
Glycine	4 (30)	4.1 (30.8)	2.9 (21.8)	13.1 (98.3)	2.8 (21)
Taurine	122.3 (1530)	124.8 (1561.2)	48.5 (606.7)	47.2 (590.5)	36.8 (460.4)
Alanine	7.6 (67.7)	7.6 (67.7)	3.6 (32.1)	16.5 (147)	2.4 (21.4)
Tyrosine	0.7 (12.7)	0.6 (10.9)	0.2 (3.6)	7.3 (132.3)	0.1 (1.8)
Valine	1.2 (14.1)	1.6 (18.7)	0.4 (4.7)	3.7 (43.3)	0.2 (2.3)
Methionine	0	0	0	0.9 (13.4)	0
Phenylalanine	0.1 (1.7)	0	0.1 (1.7)	1.4 (23.1)	0
Isoleucine	0.3 (3.9)	0.2 (2.6)	0.1 (1.3)	1.6 (21)	0.1 (1.3)
Leucine	0.2 (2.6)	0	0.1 (1.3)	3.7 (48.5)	0

Phenylalanine 그리고 Leucine의 경우 노출 Day 2 이어 Day 5 이후에도 이 실험구에서는 검출되지 않았다(Table 3).

T:G ratio

T:G ratio 는 실험 시작 전 22.4로 나타났으며, 모든 실험구에서 Day 1 이후 급격히 감소하였다. T:G ratio는 대조구인 35 psu의 노출된 실험구에서 실험시작 Day 1 후 4.2를 나타내었고,

Day 2 이후 5.1로 증가하였다. 하지만 노출 Day 5 후 3.6으로 Day 1 의 노출된 실험구보다 낮은 값을 나타냈다. 한편, 20 psu, 25 psu의 실험구에서는 노출 Day 5 후 T:G ratio가 각각 30.5 와 30.3으로 이번 실험에서 가장 높게 나타나는 것을 관찰할 수 있었고, 대조구와 비슷한 염분인 30 psu, 40 psu에서도 17.0과 13.4로 대조구보다 높게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 이번 실험 결과 시간이 경과함에 따라 T:G ratio가 저염분에

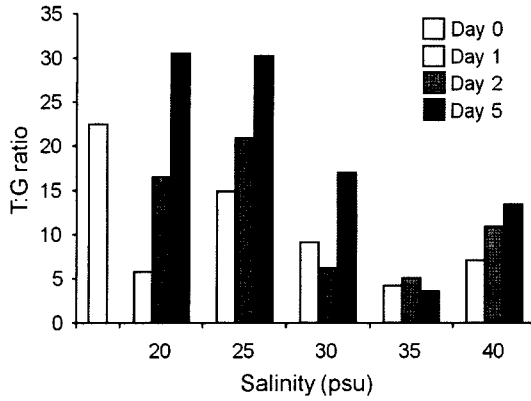


Fig. 1. T:G ratio in the abalone *Haliotis discus discus* exposed to various salinities at different times.

노출된 실험구에서 뚜렷이 증가하는 것을 관찰할 수 있었고, 고 염분의 환경에서도 노출 시간이 지속 될수록 비율이 상승하는 것을 볼 수 있었다.

고찰

체내 삼투 변화 조절 능력이 없는 혐염성 해양 무척추 동물 들은 세포 외부 환경(external environment) 변화에 대하여 안정적인 세포 내 환경(intracellular environment)을 유지하기 위

한 다양한 세포 내 생리적 반응을 발전시켜 왔다(Davenport, 1985). 그 중 삼투압 변화는 세포 내 FAA (Free Amino Acid) 변화를 일으키는 주 원인으로 알려져 왔으며, 환경 변화에 따른 삼투 현상으로 인한 세포의 수축과 팽창을 방지하기 위하여 세포 내 FAA를 중요한 삼투 조절 물질로 사용해 왔다(Davenport, 1985; Cornet, 2006; Yancey, 2005). 또한, FAA는 단백질 구성 성분이며, 에너지 획득 대사경로(energy-yielding metabolic pathway)의 기질, 효소와 호르몬, 체액의 완충제로서의 기능을 담당하는 것으로 알려져 있다(Sokolowski et al., 2003). Livingstone (1985)은 FAA와 같은 생화학적 지수가 측정이 간편하고, 환경스트레스 등에 특이적으로 반응하기 때문에 스트레스에 대한 일반적인 지수 측정방법으로 유용하게 쓰인다고 보고한 바 있다. 이로 인해, 이메페류에 있어 세포 내 FAA 변화는 서식지의 염분 변화에 따른 적응 상태를 이해하는 연구에 이용되었으며(Lee et al., 2004; Powell et al., 1982), 그 밖에 먹이공급(Mai et al., 1998; Viana et al., 2007), 기생충 감염(Soniat and Koenig, 1982), 번식(Kube et al., 2007), 환경 오염(Babarro et al., 2006; Hummel et al., 1996; Neff et al., 1987; Soini and Rantamaki, 1985) 등 다양한 환경 변화로 인한 스트레스를 이해하는 연구에 쓰여왔다. 이러한 생물학적 특성으로 인해 고착성 해산 연체동물이 환경 변화를 측정하기 위한 주요 지표종으로 이용되고 있다(Rittschof and McClellan-Green,

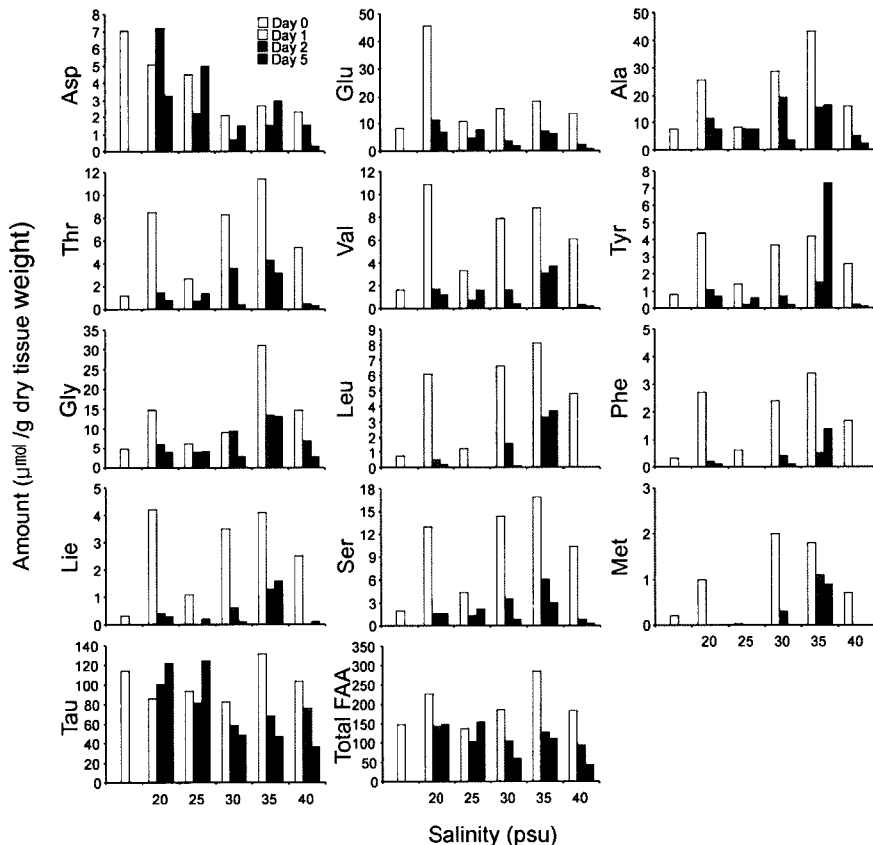


Fig. 2. Fluctuation of the change each free amino acid in the abalone *Haliotis discus discus* exposed to various salinities at different times.

2005; Zaccaron da Silva et al., 2005).

실험에 앞서 측정된 등근전복 아가미의 FAA 구성은 비 필수 아미노산인 Aspartic acid, Glutamic acid, Serine, Glycine, Taurine, Alanine, Tyrosine 7종과 필수 아미노산인 Threonine, Valine, Methionine, Phenylalanine, Isoleucine, Leucine 6종 등 함유량이 높은 성분들을 중심으로 총 13종만 분석한 결과, 이들 아미노산 중 Taurine이 전체의 약 77%를 차지하고 있으며, 이어서 Glutamic acid, Aspartic acid, Alanine, Glycine 등의 순서였다. 이들 비 필수 아미노산 5종의 아미노산 함량은 전복 아가미 전체 FAA의 96%를 이루고 있었으나, 필수 아미노산은 극히 소량으로 존재함이 확인 되었다. Hatae et al. (1995)은 *Hariltis discus*의 폐각근에서 FAA를 계절별로 측정한 결과, Taurine이 가장 높게 나타났으며 뒤를 이어 Arginine, Glycine, Glutamic acid의 순으로 풍부하다고 보고한 바 있다. 또한, Hwang et al. (1997)과 Chiou et al. (2001)은 오분자기(*H. diversicolor*)의 폐각근FAA를 분석한 결과 Taurine, Arginine, Glycine, Glutamic acid와 Alanine 등이 총 FAA의 81~94%를 구성하고 있다고 보고하였으며, 이는 이 연구에서 얻어진 FAA의 범위와 유사한 결과이다.

다양한 염분에 노출된 전복의 FAA 함량은 저염분에 노출된 실험구의 경우 시간이 경과함에 따라 전반적으로 대조구(35 psu) 및 대조구와 비슷한 염분(30 psu, 40 psu)에 노출된 실험구보다 높아지는 경향이 관찰되었다. 이는 저염분 실험구의 경우 Taurine 함량이 시간이 증가할수록 증가하고, 대조구 및 염분 함량이 비슷한 실험구(30 psu, 40 psu)의 경우에는 낮아진 것에 기인한다. Taurine을 제외한 다른 FAA 성분들은 시간이 지날수록 점점 낮아지는 경향을 보였지만, Taurine의 경우 저염구에서 함량이 증가하는 반대의 결과를 보였다. 또한, 대조구에서도 FAA가 시간에 따른 변화를 보이며 감소하는 이유는 먹이 공급 중단에 따른 단백질 분해에 기인한 것으로 사료된다. 이와 같은 결과는 Viana et al. (2007)와 Mai et al. (1998)의 실험에서 확인할 수 있는데, Viana et al. (2007)은 먹이를 공급하지 않은 *Haliotis fulgens*의 FAA 변화를 관찰한 결과 실험 종료 후 모든 FAA가 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 반면 *Haliotis discus hannar*를 상대로 먹이를 공급한 Mai et al. (1998)의 실험에서는 Taurine을 제외한 모든 FAA가 증가하는 결과를

알 수 있었다.

Taurine은 대부분의 해산 이매패류의 중요 FAA이며, 세포내 독성 제거, 세포벽 안정화, 칼슘 flux 조절, 스트레스 감소, 신경 안정의 기능이 있는 것으로 알려져 있다(Walther, 2002). 저염 스트레스에 대한 FAA의 변화에 있어 패류의 반응은 종마다 차이가 나타나는 것을 이미 여러 연구자들에 의해 확인되었다. Lee et al. (2004)의 연구에서는 참굴(*Crassostrea gigas*)을 저염 실험구에 노출시켰을 때 Glutamic acid, Glycine, β -Alanine의 농도는 증가하고, Taurine의 농도가 감소함을 보고하고 있다. 반면, Kube et al. (2007)의 연구에서 대양조개 *Macoma balthica* FAA의 연중 변화를 관찰한 결과 염분이 낮은 계절에 Alanine, Glycine, Taurine 등이 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Hosoi et al. (2003)의 연구에서도 마찬가지로 참굴을 저염 실험구로 옮겨 사육 하였을 때 Taurine 농도가 50% 이상 감소하였으며, 반대로 고염 실험구로 옮겨 사육 하였을 때는 Taurine 농도가 30% 이상 증가하는 것이 관찰되었다. 그러나 본 연구에서 등근전복은 노출 1일 후 Taurine 농도는 저염에서 낮게 검출된 반면, 노출 기간이 길고 염분도가 낮을수록 Taurine의 농도가 증가하였다. 따라서 저염에 대한 Taurine 농도의 변화는 노출기간과 염분도에 따라 변화하는 것으로 사료되며 노출 기간을 늘리는 등 삼투압 조절에 대한 Taurine의 역할을 규명하기 위한 보다 심도 있는 연구가 요구된다.

등근전복에서 Taurine, Glycine, Alanine 등 비필수 아미노산과는 대조적으로 필수 아미노산인 Threonine, Valine, Methionine, Phenylalanine, Leucine, Isoleucine 등은 염분에 상관없이 저염과 고염의 환경에서 대조구와 비교하여 현저히 감소하였다. 특히 Methionine의 경우 저염과 고염에 노출된 후 2일 후부터 실험 종료시까지 실험구에서는 전혀 검출되지 않았다. Litaayet al. (2001)에 의하면 하나 이상의 필수아미노산이 과하거나 또는 결핍될 경우 단백질 합성이나 성장 또는 이 두 가지 모두에 영향을 줄 수 있음을 보고한 바 있어 삼투압 스트레스에 장기간 노출될 경우 전복의 생리에 매우 심각한 영향이 초래될 것으로 판단된다.

T:G ratio 는 이매패류에 있어 자연적 환경변화 또는 실험적인 스트레스 유발에 의해 그 값이 증가하는 것으로 나타났고 (Roesijadi, 1979), 이로 인해 T:G ratio를 스트레스에 노출된 정

Table 4. Responses of the T:G ratio to stress in bivalve mollusks

Species	Tissues	Stressors	Control animals	Stressed animals	Reference
<i>Macoma balthica</i>	whole tissue	copper	0.3 ~ 0.7	0.5~1.6	Hummel et al. (1996)
<i>Crassostrea virginica</i>	mantle	parasitism	1.2	8.4	Soniat and Koenig (1982)
<i>Crassostrea gigas</i>	whole tissue	salinity	9.5	21.5~22.0	Hosoi et al. (2003)
<i>Mya truncata</i>	adductor muscle	spilled oil	0.108~0.141	0.134~0.263	Neff et al. (1987)
<i>Mytilus edulis</i>	mantle	crude oil	2.2	12.7	Soini and Rantamaki (1985)
<i>Haliotis fulgens</i>	muscle	starvation	1.4	2.16	Viana et al. (2007)
<i>Crassostrea gigas</i>	gill	turbidity	9.7~13.3	13.8~18.9	Lee et al. (2004)
<i>Haliotis discus discus</i>	gill	salinity	3.6~5.1	5.8~30.5	The present study

도를 나타내는 지수로서 이용되어 왔다(Zurburg et al., 1989). 그 이유로서, 스트레스에 노출될 경우 Glycine의 농도는 감소하고 대신 Taurine의 농도는 증가하는 경향을 보이기 때문이다(Hummel et al., 1996). 이에 다양한 스트레스에 대한 T:G ratio 연구가 수행되었다(Table 4). 담치, *Mytilus edulis*의 경우 원유(Crude oil)에 노출시켜 외투막의 FAA 변화 반응을 지켜본 결과, 2일 경과 후 대조구의 T:G ratio는 약 2.2 이었으나 원유에 노출된 개체는 12.7로 대조구에 비해 급격히 증가하였다(Soini and Rantamaki, 1985). 대양조개류인 *Macoma balthica*의 경우도 중금속인 구리(Cu)의 오염이 심한 지역이 그렇지 않은 지역보다 T:G ratio가 높게 나타나는 것이 보고되었다(Hummel et al., 1996). 또한, 대서양굴, *Crassostrea virginica*의 경우 기생충 *Perkinsus marinus*의 감염도가 높은 개체일 수록 T:G ratio가 8.4로 감염도가 낮은 개체보다(1.2) 높게 나타났고(Soniat and Koenig, 1982), 참굴을 염분 30 psu에서 15 psu의 저염에 노출시킨 실험결과 T:G ratio는 9.5에서 21.5-22.0으로 급격히 증가하는 것이 관찰되었다(Hosoi et al., 2003). 본 둥근전복에서도 다른 연구 결과와 유사한 경향의 결과가 나타났다. 염분 변화를 스트레스 조건으로 삼은 이번 실험에서 대조구인 35 psu에 노출된 전복의 실험 시간에 따른 T:G ratio는 3.6-5.1의 범위였으나, 저염에 노출시킨 실험구(5.8-30.5)와 고염에 노출시킨 실험구(7.1-13.4) 모두 T:G ratio가 대조구보다 높았다. 특히 이 같은 현상은 저염에 노출된 기간이 길어질수록 더욱 뚜렷한 경향이 관찰되었다. T:G ratio의 증가는 고염 실험구에서 저염에 노출시 만큼 증가하지는 않았으나 염분이 높은 환경에서도 시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 나타냈고 노출 시간이 지속 될수록 그 비율 또한 상승하였다.

결론적으로 이번 실험에서 수행된 다양한 염분에 노출시킨 전복의 FAA 조성의 경우, 저염에 노출시킨 실험구에서 실험 시간이 경과할수록 FAA의 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 이 중 Taurine이 급격히 상승하여 총 FAA의 80% 이상을 차지하였는데, 이는 둥근전복이 저염분의 환경 변화에 유지하기 위하여 Taurine을 분비하는 것으로 사료된다. 또한, 다양한 염분 변화에 따른 변화를 보이는 T:G ratio는 둥근전복의 염분 스트레스에 대한 지수로 사용할 수 있는 것으로 판단된다.

요 약

이 연구는 염분 변화가 둥근전복(*Haliotis discus discus*)의 유리아미노산(FAA) 조성에 미치는 영향을 조사하고자 염분 15, 20, 25, 30, 35, 40 psu에 각각 24 h, 48 h, 120 h 노출 시킨 후 총 13가지 FAA의 함량 변화를 HPLC를 이용하여 분석하였다. 시료 중 15 psu에 노출된 전복 전량이 24 h 이내 폐사하였고, 20 psu에 노출된 시료의 경우 전체 20 개체 중 8개체가 48 h 이내 사망하였다. FAA 중 Taurine, Glycine, Alanine의 함량이 가장 높았으며, 이중 Taurine의 함량은 114 μ mol/g dry tissue weight

로써 전체 FAA의 77%를 점유하였다. 저염 및 고염 환경에 노출된 시료의 FAA 함량은 분석 기간 동안 감소하는 경향을 나타냈다. 그러나 Taurine의 농도는 노출 후 24 h이 경과하였을 때까지 대조구 보다 낮았으나 노출 48 h 후부터는 저염 환경인 20 psu 및 25 psu에서 증가하여 분석 종료 시점인 노출 120 h 이 되었을 때까지 급격히 증가하였다. 반면 필수아미노산인 Methionine은 노출 48 h부터 20, 25, 40 psu에서 검출되지 않았고 노출 120 h 후에는 대조구를 제외한 전 실험구에서 측정되지 않았다. Taurine 과 Glycine 비율(T:G ratio)은 저염환경에 노출된 시료에서 높게 나타났으며, 저염에 노출된 기간이 길어질수록 더욱 뚜렷한 경향이 관찰되었다. 이 같은 현상은 염분이 높은 환경에서도 나타났고 노출 시간이 지속 될수록 그 비율은 상승하였다. 이상의 결과는 FAA 특히 Taurine, Glycine, Methionine 등이 둥근전복의 삼투조절에 중요한 기능을 담당하는 것을 의미하며, FAA 분석은 염분 변화에 따른 둥근전복의 삼투조절 및 생리 특성을 이해하는데 유용한 방법임을 제시하였다.

감사의 글

실험에 쓰인 전복과 수조를 제공해 주신제주도 해양수산자원연구소에 깊은 감사를 표합니다. 이 연구는 한국과학재단 특정기초연구 (과제번호 KRF-2003-042-F00006)에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

- Babarro, J.M.F., M.J.F. Reiriz, J.L. Garrido and U. Labarta, 2006. Free amino acid composition in juveniles of *Mytilus galloprovincialis*: Spatial variability after *Prestige* oil spill. *Comp. Biochem. Phys. A*, 145, 204-213.
- Chiou, T.-K., M.-M. Lai and C.-Y. Shiau, 2001. Seasonal variations of chemical constituents in the muscle and viscera of small abalone fed different diets. *Fish. Sci.*, 67, 146-156.
- Cornet, M., 2006. Effects of seawater salinity fluctuations on primary tissue culture from the mussel *Mytilus galloprovincialis* potential application to the detection of seawater genotoxicity. *Toxicol. Vitro*, 20, 1500-1505.
- Davenport, J., 1985. Osmotic control in marine animals. (in) M.S. Laverack (ed), *Physiological Adaptations of Marine Animals*. The Company of Biologists Limited. University of Cambridge, England, pp. 207-244.
- Hatae, K., H. Nakai, A. Shimada, T. Murakami, K. Shirojo and S. Watabe, 1995. Abalone (*Haliotis discus*): seasonal variations in chemical composition and textual properties. *J. Food Sci.*, 60, 32-35, 39.
- Hosoi, M., S. Kubota, M. Toyohara, H. Toyohara and I. Hayashi, 2003. Effect of salinity change on free amino acid content in Pacific oyster. *Fish. Sci.*, 69, 395-400.
- Hummel, H., C. Amiard-Triquet, G. Bachelet, M. Desprez, J. Marchand, B. Sylvand, J. C. Amiard, H. Rybarczyk, R. H.

- Bogaards, J. Sinke and L. de Wolf, 1996. Free amino acids as a biochemical indicator of stress in the estuarine bivalve *Macoma balthica*. *Sci. Total Environ.*, 188, 233–241.
- Hwang, D.F., W.P. Liang, C.Y. Shiau, T.K. Chiou and S.S. Jeng, 1997. Seasonal variations of free amino acids in the muscle and viscera of small abalone *Haliotis diversicolor*. *Fish. Sci.*, 63(4), 625–629.
- Hyun, K.-H. and I.C. Pang, 1998. Abnormal low salinity waters around Cheju Island in summer. *Bull. Mar. Res. Inst. Cheju Nat. Univ.*, 22, 69–78.
- Kube, S., A. Sokolowski, J.M. Jansen and D. Schiedek, 2007. Seasonal variability of free amino acids in two marine bivalves, *Macoma balthica* and *Mytilus* spp., in relation to environmental and physiological factors. *Comp. Biochem. Phys. A*, 147, 1015–1027.
- Lee, N.H., K.N. Han and K.S. Choi, 2004. Effects of salinity and turbidity on the free amino acid composition in gill tissue of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.*, 23, 129–133.
- Litaay, M., S.S. De Silva and R.M. Gunasekera, 2001. Changes in the amino acid profiles during embryonic development of the blacklip abalone (*Haliotis rubra*). *Aquat. Living Resour.*, 14, 335–342.
- Livingstone, D.R., 1985. Biochemical measurements. (in) B.L. Bayne, D.A. Brown, K. Burnes, D.R. Dixon, A. Ivanovici, D.R. Livingstone, D.M. Lowe, M.N. Moore, A.R.D. Stebbing and J. Widdows (eds), *The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals*. Praeger, New York, pp. 81–115.
- Lynch, M.P. and L. Wood. 1996. Effects of environmental salinity on free amino acids of *Crassostrea virginica* Gmelin. *Comp. Biochem. Phys.*, 19, 783–796.
- Mai, K., G. He and W. Xu, 1998. Studies on postprandial changes of digestive status and free amino acids in the viscera of *Haliotis discus hannai* Ino. *J. Shellfish Res.*, 17(3), 717–722.
- Moon, J.H. and I.C. Pang, 2003. Inflowing of Yangtze coastal water in summer and its cause. *Bull. Mar. Res. Inst. Cheju Nat'l. Univ.*, 27, 29–47.
- Neff, J.M., R.E. Hillman, R.S. Carr, R.L. Buhl and J.I. Lahey, 1987. Histopathologic and biochemical responses in arctic marine bivalve mollusks exposed to experimentally spilled oil. *Arctic* 40 (Supp. 1), 220–229.
- Pang, I.C. and K.H. Hyun, 1998. Seasonal variation of water mass distributions in the Eastern Yellow Sea and the Yellow Sea Warm Current. *J. Kor. Soc. Oceanogr.*, 33, 41–52.
- Powell, E.N., M. Kasschau, E. Chen, M. Koenig and J. Pecon, 1982. Changes in the free amino acid pool during environmental stress in the gill tissue of the oyster, *Crassostrea virginica*. *Comp. Biochem. Phys.*, 71(4), 591–598.
- Rittschof, D. and P. McClellan-Green, 2005. Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. *Mar. Poll. Bull.*, 50, 369–373.
- Roesijadi, G., 1979. Taurine and glycine in the gills of the clam *Protothaca staminea* exposed to chlorinated seawater. *Bull. Environm. Cont. Toxicol.*, 22, 543–547.
- Soini J. and P. Rantamaki, 1985. Free amino acid pattern in blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to curde oil. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 35, 810–815.
- Sokolowski, A., M. Wolowicz and H. Hummel, 2003. Free amino acids in the clam *Macoma balthica* L. (Bivalvia, Mollusca) from brackish waters of the southern Baltic Sea. *Comp. Biochem. Phys. A*, 134, 579–592.
- Soniat, T.M. and M.L. Koenig, 1982. The effects of parasitism by *Perkinsus marinus* on the free amino acid composition of *Crassostrea virginica* mantle tissue. *J. Shellfish Res.*, 2(1), 25–28.
- Souza, M.M. and E. Scemes, 2000. Volume changes in cardiac ventricles from *Aplysia brasiliana* upon exposure to hypotonic shock. *Comp. Biochem. Phys. A*, 127, 99–111.
- Viana, M.T., L.R. D'Abramo, M.A. Gonzalez, J.V. Garcia-Suarez, A. Shimada and C. Vasquez-Pelaez, 2007. Energy and nutrient utilization of juvenile green abalone (*Haliotis fulgens*) during starvation. *Aquaculture*, 264, 323–329.
- Walther, M., 2002. Taurine in the marine hydrozoan *Hydractinia echinata*: stabilizer of the larval state? *Comp. Biochem. Phys. A*, 133, 179–190.
- Won, S. W., S. J. Han, J. W. Kim and B. R. Kim, 2001. Report on the effects of high water temperature and low salinity on survival in juvenile *Haliotis discus discus*, *Haliotis diversicolor* and *Batillus cornutus*. *Mar. Sci. Res. Rept.* 59, Nat'l. Fish. Res. Devel. Insti., 59: 1–39.
- Yancey, P.H., 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.*, 208, 2819–2830.
- Zaccaron da Silva, A., J. Zanette, J.F. Ferreira, J. Guzinski, M.R. Marques and A.C. Baily, 2005. Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. *Ecotox. Environ. Safe.*, 62, 376–382.
- Zurburg, W., H. Hummel, R. Bogaards, L. De Wolf and H. Ravestein, 1989. Free amino acid concentrations in *Mytilus edulis* L. from different locations in the southwestern part of the netherlands: Their possible significance as a biochemical stress indicator. *Comp. Biochem. Phys. A*, 93, 413–417.

원고접수 : 2008년 7월 10일

심사완료 : 2008년 11월 5일

수정본 수리 : 2008년 11월 6일