

## 해수산 rotifer, *Brachionus rotundiformis*의 $\alpha$ -amylase, total alkaline protease, trypsin 및 triacylglycerol-lipase 활성 특성

권오남\*, 박흥기  
강릉대학교 해양생명공학부

### Characterization of $\alpha$ -amylase, Total Alkaline Protease, Trypsin and Triacylglycerol-lipase Activity of the Euryhaline Rotifer, *Brachionus rotundiformis*

O-Nam Kwon\* and Heum-Gi Park

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

This study was investigated the condition of their maximum activity to assay the enzymes of rotifer, *Brachionus rotundiformis*.  $\alpha$ -amylase, total alkaline protease, trypsin and TG-lipase activities of rotifer were higher and more sensitive in phosphate-NaOH buffer than Tris-HCl buffer.  $\alpha$ -amylase, trypsin and TG-lipase activities were appeared the maximum at pH 8.0, and total alkaline protease activity showed the maximum activity at pH 7.0.  $\alpha$ -amylase activity showed the highest activity at 40°C, and total alkaline protease and trypsin activities were assayed the highest at 55~60°C. However, TG-lipase activity was appeared the highest at 25~30°C. The optimum substrate concentration of enzyme activity of  $\alpha$ -amylase, total alkaline protease, trypsin and TG-lipase were 3.5% starch, 0.6% azo-casein, 87.5  $\mu$ M BApNA and 81.2 mM olive oil, respectively. The optimum reaction time of enzyme activity of  $\alpha$ -amylase, total alkaline protease, trypsin and TG-lipase were increased up to 40, 60, 30 and 25 min., respectively. The data obtained in this study could be used for the digestive enzyme research of rotifer, *B. rotundiformis*.

**Keywords:** Rotifer,  $\alpha$ -amylase, Total alkaline protease, Trypsin, TG-lipase

#### 서 론

해산 어류 자어는 초기 난황 흡수 직후 대량 폐사하는 현상이 자주 발생하기 때문에 이 시기는 종묘 생산 관리에 있어서 매우 중요하다. 이와 같은 초기 감모의 주요한 요인 중 하나는 외부부터 먹이를 공급받는 시기에 적절한 양질의 먹이 공급이 이루어지지 않았기 때문으로 분석되고 있다(Gawlicka et al., 2000). 일반적으로 담수 어류인 잉어, 연어와 같이 난황 흡수 직후 형태 및 기능적 소화기관이 성어와 유사한 경우는 미립자 사료만을 공급하여도 자어의 성장이 가능하지만 초기 자어의 지느러미와 소화기관의 발달이 부족한 해산 어류인 넙치, 돛류에서는 미립자 사료만의 공급은 절대적으로 제한되고 있다(Støttrup and McEvoy, 2003). 따라서 이러한 유영력과 소화력이 부족한 해산 자어는 첫 먹이 공급 시기에 적정 밀도의 살아있는 먹이 생물 공급만이 높은 자어의 생존률을 유지시켜 줄 수 있다

(Gawlicka et al., 2000; Harboe and Mangor-Jensen, 1998).

이와 같이 해산 어류의 첫 먹이 공급 시 먹이 생물의 공급은 해산 자어가 필요로 하는 각종 영양분을 전달하는 biocapsule로써의 역할을 할 뿐만 아니라 자어의 endogenous digestive enzymes을 보충해 줄 수 있는 exogenous digestive enzymes의 측면에서도 매우 중요한 역할을 한다(Dabrowski and Glogowski, 1977; Munilla-Moran et al., 1990; Cahu and Zambonino Infante, 1995).

지난 20여 년간 해산 어류의 자어 성장 과정에서 소화 효소에 대한 연구가 되어 왔지만 자어의 소화력을 효과적으로 증진시켜 줄 수 있는 이들의 먹이 생물 (rotifer, *Artemia* 및 물벼룩)에 대한 소화효소 연구는 미미한 실정이다(Warner and Matherson, 1998; Munilla-Moran et al., 1990; Garcia-Ortega et al., 2000; Han et al., 2002; Elert et al., 2004). 하지만 지금까지 이들의 연구는 소화효소 활성 조건을 변형한 방법을 이용하여 분석하고 있다. 그러나 Benitez and Tiro (1982)와 Alarcón et al. (1998)에서 밝힌 바와 같이 단일 종 내에서도 환경에 따라 조직 내 효소의 형태와 최적 활

\*Corresponding author: quiz@kangnung.ac.kr

성 조건이 변하므로 각 종에 대한 소화효소 활성을 측정하려면 각각의 종에 대한 최적 활성 조건을 확인할 필요가 있다.

따라서 본 연구에서는 해산 어류 자어에게 exogenous digestive enzymes을 공급해 줄 수 있는 먹이생물인 해수산 rotifer, *Brachionus rotundiformis*를 대상으로  $\alpha$ -amylase, total alkaline protease, trypsin 및 triacylglycerol-lipase 활성 특성을 파악하여 rotifer 소화효소 연구의 기초를 마련하는데 그 목적이 있다.

## 재료 및 방법

### Rotifer 배양

실험에 사용한 rotifer는 강릉대학교 먹이생물연구실에서 보관 중인 *Brachionus rotundiformis* 올진 strain이었다. Rotifer는 20 L 용기(배양수 15 L)를 이용하여 수온 28°C, 염분 15 ppt에서 먹이로 담수산 농축 *Chlorella* (주식회사, 대상)를 하루에 1,000 rotifers 당 건조중량 4 mg을 공급하면서 배양하였다.

### 조효소액 준비

조효소액은 배양 중인 rotifer를 3차 증류수로 세척 후 ml 당  $20 \times 10^3$  개체로 수용하여 1분간 균질화하였다(homogenizer, SHM-7211 YHaNa®). 이후 4°C, 6,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 추출한 조효소액은 각 소화효소 및 수용성 단백질 분석을 위해 15 ml corning tube와 1.8 ml eppendorf tube에 각각 나누고 분석 시까지 -80°C에 보관하였다.

### 소화 효소의 최적 활성 조건

실험에 사용된 buffer의 종류는 0.1 M phosphate-NaOH buffer와 0.1 M Tris-HCl buffer이었고, pH 범위는 pH meter (Orion, 920A)를 이용하여 pH 5, 6, 7, 8, 9 및 10으로 조절하였다(단, trypsin은 pH 7.0, 7.5, 8.0 및 8.5로 하였다). 반응 온도에 따른 모든 효소의 활성 측정은 20°C에서 60°C까지 5°C 간격으로 하였다. 최적 반응 온도가 결정된 후 배양시간에 따른  $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1) 활성과 total alkaline protease 활성은 10분에서 80분까지 10분 간격으로 측정하였으며, trypsin (EC 3.4.4.4)과 triacylglycerol-lipase (TG-lipase, EC 3.1.1.3) 활성은 5분에서 40분까지 5분 간격으로 측정하였다. 이와 같이 결정된 buffer, pH, 배양 온도 및 시간을 기초로 하여 기질 량에 따른 효소의 활성을 측정하였다.  $\alpha$ -amylase 활성은 0.5에서 4.0%까지 0.5% 간격으로 한 soluble starch를 사용하였으며, total alkaline protease 활성은 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 및 4.0%의 azo-casein을 사용하였다. Trypsin 활성은 12.5, 25.0, 37.5, 50, 62.5, 75.0, 87.5, 100, 125, 150, 174, 200, 250 및 200  $\mu$ M의 BApNA를 사용하였다. 또한 triacylglycerol-lipase 활성은 11.6, 34.8, 58.0, 81.2, 104.4, 127.6, 150.8 및 174.0 mM의 olive oil을 사용하였다.

### 효소의 측정방법

$\alpha$ -amylase 활성 측정은 Somogyi-Nelson 방법(Somogyi, 1952)을 이용하였다. Rotifer 조효소액 50  $\mu$ l에 125  $\mu$ l의 buffer와 soluble starch solution 125  $\mu$ l를 첨가한 후 반응시켰다. 배양 종료 후  $\alpha$ -amylase 분석용 알칼리성 동용액을 1 ml 씩 첨가하고 즉시 100°C 끓는 물에 10분간 방치하여 반응을 정지시켰다. 이후 10분간 상온에 방치한 후 1 ml의 arsenomolybdate 시약을 넣고 mini shaker를 이용하여 1,800 rpm으로 강하게 교반해 주었다. 그리고 15분간 상온에서 방치시킨 후 10 ml가 되도록 반응액을 희석하여 500 nm에서  $\alpha$ -amylase 활성을 측정하였다.

Total alkaline proteinase 활성 측정은 Kunitz (1947)의 방법을 변형된 Dabrowski and Glogowski (1977)의 casein hydrolysis 방법을 이용하였다. Rotifer 조효소액 100  $\mu$ l에 250  $\mu$ l의 buffer와 250  $\mu$ l의 Azo-casein을 혼합하여 배양하였다. 반응 후 0.6 ml의 차가운 20% (w/v) trichloroacetic acid를 첨가하여 반응을 정지시켰으며 1시간 동안 냉장보관(-4°C) 하였다. 이후 3,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상등액을 280 nm에서 total alkaline proteinase 활성을 측정하였다.

Trypsin 활성 측정은 Erlanger (1961)의 BApNA를 기질로 하는 방법을 이용하였다. Rotifer 조효소액 50  $\mu$ l에 배양 혼합액(buffer 100 ml에 BApNA를 녹인 DMSO 1 ml 첨가)을 800  $\mu$ l을 넣고 반응시킨다. 반응이 종료된 후 30% acetic acid 500  $\mu$ l를 넣어 반응을 정지시켰다. 상온에서 10분간 방치 후 410 nm에서 trypsin의 활성량을 측정하였다.

TG-lipase 활성 측정은 Schmidt et al. (1974)의 방법을 이용하였다. Rotifer 조효소액 100  $\mu$ l를 1 ml의 반응 혼합액(olive oil, 520  $\mu$ l; 10 mM deoxycholate, 50  $\mu$ l; buffer, 430  $\mu$ l)에 넣고 반응시킨다. 이 후 70~90°C에서 1분간 두어 반응을 정지시킨다. 그 후 chloroform 5 ml와 동시약(Triethanoamine-HCl 18.6 g을 증류수 70 ml에 녹인 것을 NaOH로 pH를 7.5로 맞추고 증류수로 200 ml을 맞춘 것)을 2.5 ml 첨가하고 20분간 혼합한 후 2,000 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 바닥의 chloroform 층 3 ml를 모으고 11 mM diethyldithiocarbamate 0.25 ml를 첨가한 후 상온에서 440 nm에서 TG-lipase의 활성을 측정한다.

또한 각각의 모든 조건에서 소화효소 활성의 분석은 4회 반복 실험 실시하였다.

Rotifer, *Brachionus rotundiformis*의 buffer, pH, 배양온도, 배양시간 및 기질 농도에 따른 효소 활성에 대한 측정 결과는 One-way ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 처리한 후 평균간의 유의성( $P < 0.05$ )을 SPSS (SPSS Inc., 2000) program (Ver. 10.0.7)으로 검정하였다.

## 결 과

해수산 rotifer, *B. rotundiformis*에 있어서 pH, 반응온도 및 시간 그리고 기질 농도에 따른  $\alpha$ -amylase 활성의 변화는 Fig.

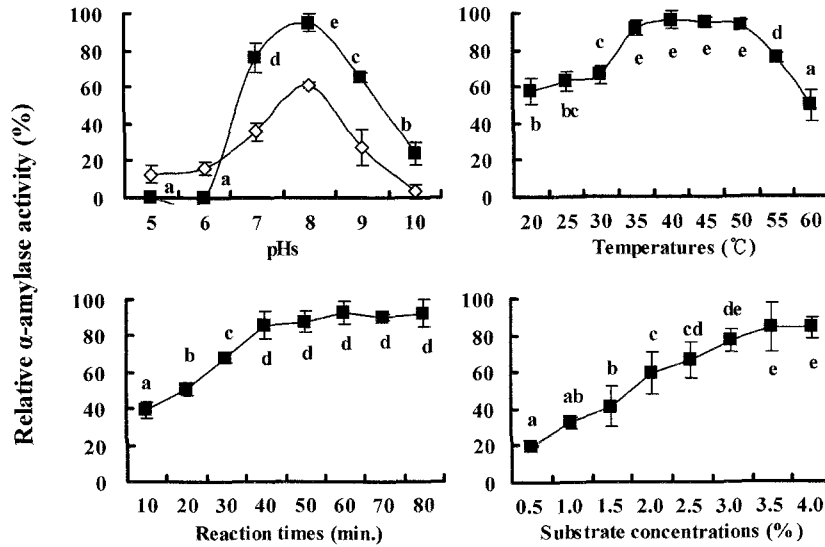


Fig. 1. Variations of  $\alpha$ -amylase activity in rotifer, *Brachionus rotundiformis* on the different buffers and pHs, reaction temperatures and times, and substrate concentrations. The different superscript are significantly difference ( $P<0.05$ ) by ANOVA and Duncan's multiple comparison. "■" and "◇" was indicated phosphate- NaOH buffer and Tris-HCl buffer, respectively.

1에 나타내었다. 두 종류의 phosphate-NaOH buffer와 Tris-HCl buffer에 따른  $\alpha$ -amylase 활성은 모두 pH 8.0을 중심으로 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다( $P<0.05$ ). 특히, pH 8에서 Tris-HCl buffer에서의 활성이 phosphate-NaOH buffer에 비해 61.4%로 낮게 나타났었다( $P<0.05$ ). 반응온도에 따른 활성은 20°C에서 35°C까지 온도가 상승함에 따라 증가하였고, 35°C에서 50°C까지 유의적인 차이는 보이지 않았으나( $P>0.05$ ) 그 이상의 온도에서 유의적으로 활성이 감소하는 것으로 나타났었다( $P<0.05$ ). 또한 soluble starch 농도에 따른 활성은 3.5% starch까지 증가하였으며 그 이상에서 유의적인 증가는 보이지 않았었다( $P>0.05$ ).

해수산 rotifer, *B. rotundiformis*에 있어서 pH, 반응온도 및 시간 그리고 기질 농도에 따른 total alkaline protease 활성의 변화는 Fig. 2에 나타내었다. Phosphate-NaOH buffer를 사용했을 때 pH 7에서 가장 높은 활성을 나타냈으며( $P<0.05$ ) pH 10에서 다시 상승하는 경향을 보였다. 그러나 Tris-HCl buffer에서는 pH 8까지 뚜렷한 경향은 없었으며 pH 10에서 상승하여 phosphate-NaOH buffer와 같은 경향을 보였다. 반응온도에 따른 활성은 온도가 증가할수록 높아지는 경향을 보였으며 55°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다( $P<0.05$ ). 반응시간에 따른 활성은 시간이 경과할수록 증가하는 경향을 보였고( $P<0.05$ ), 60

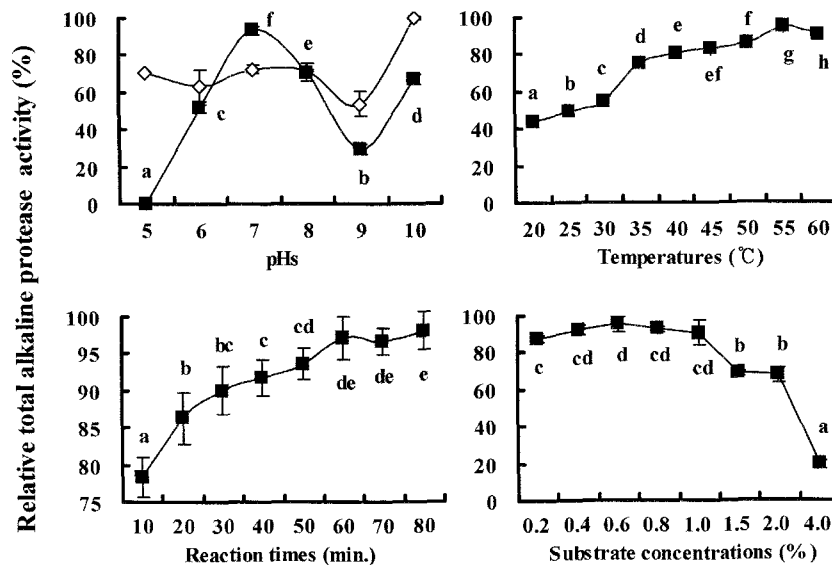
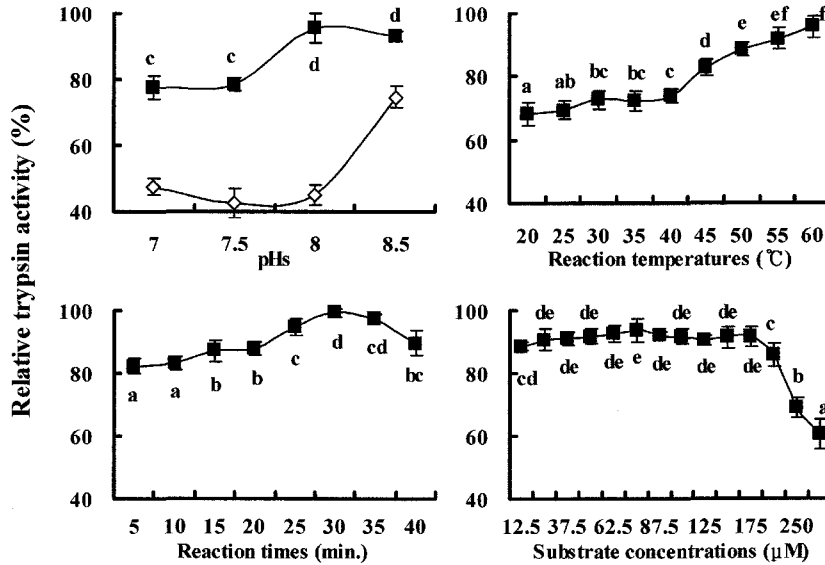
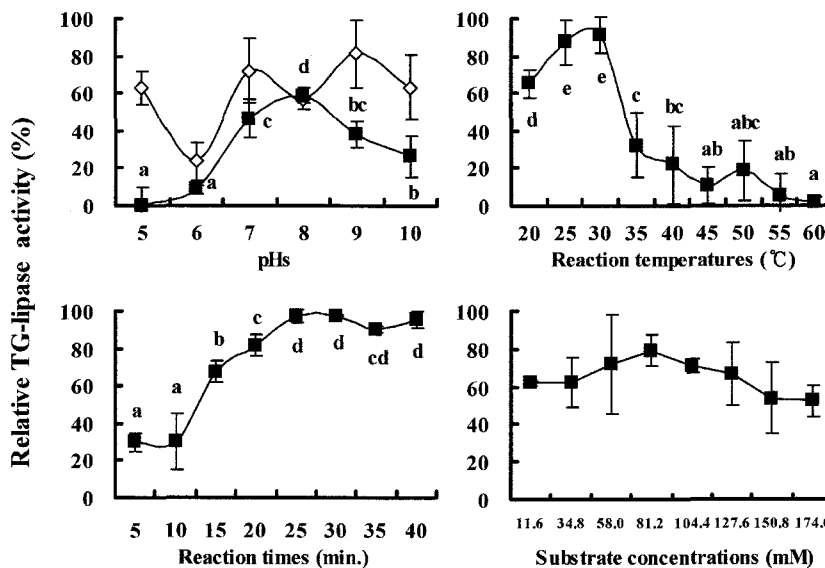


Fig. 2. Variations of total alkaline protease activity in rotifer, *Brachionus rotundiformis* on the different buffers and pHs, reaction temperatures and times, and substrate concentrations. The different superscript are significantly difference ( $P<0.05$ ) by ANOVA and Duncan's multiple comparison. "■" and "◇" was indicated phosphate- NaOH buffer and Tris-HCl buffer, respectively.



**Fig. 3.** Variations of trypsin activity in rotifer, *Brachionus rotundiformis* on the different buffers and pHs, reaction temperatures and times, and substrate concentrations. The different superscript are significantly difference ( $P<0.05$ ) by ANOVA and Duncan's multiple comparison. "■" and "◇" was indicated phosphate- NaOH buffer and Tris-HCl buffer, respectively.



**Fig. 4.** Variations of TG-lipase activity in rotifer, *Brachionus rotundiformis* on the different buffers and pHs, reaction temperatures and times, and substrate concentrations. The different superscript are significantly difference ( $P<0.05$ ) by ANOVA and Duncan's multiple comparison. "■" and "◇" was indicated phosphate- NaOH buffer and Tris-HCl buffer, respectively.

분 이상에서는 증가하지 않았다( $P>0.05$ ). Azo-casein 농도에 따라서는 0.4~1.0%까지 유의적인 차이 없이 높은 활성을 보였으며( $P<0.05$ ), 1.5% 이상에서 급격히 낮아지는 경향을 보였다( $P<0.05$ ).

해수산 rotifer, *B. rotundiformis*에 있어서 pH, 반응 온도 및 시간 그리고 기질 농도에 따른 trypsin 활성의 변화는 Fig. 3과 같다. Phosphate-NaOH buffer의 pH 8.0과 8.5에서 유의적으로 높은 trypsin 활성을 보였으며( $P<0.05$ ), Tris-HCl buffer에서는 phosphate-NaOH buffer보다 낮은 활성을 보였다. 반응온도에

따른 활성은 60°C까지 유의적으로 증가하는 경향을 보였다( $P<0.05$ ). 또한 반응시간에 따른 변화는 30분까지 활발한 반응을 보이다가 30분에서 가장 높은 활성을 나타내었으며( $P<0.05$ ), 이후 유의적인 감소하였다( $P<0.05$ ). 또한 BApNA 농도에 따른 활성은 87.5 μM 농도에서 가장 높은 활성을 보였지만( $P<0.05$ ), 25.0~175.0 μM까지의 BApNA 농도에 따른 활성 차이는 보이지 않았다( $P>0.05$ ). 그러나 보다 높은 농도의 기질에서는 급격히 감소하는 것으로 나타났다( $P<0.05$ ).

해수산 rotifer, *B. rotundiformis*에 있어서 pH, 반응온도 및

시간 그리고 기질농도에 따른 TG-lipase 활성의 변화는 Fig. 4와 같다. TG-lipase 활성이 phosphate-NaOH buffer를 사용했을 때 pH 7~8 범위에서 유의적으로 높게 나타났으며(P<0.05) 이중 pH 8에서 가장 높게 나타났다. 그러나 Tris-HCl buffer를 사용하였을 때 pH 5, pH 7 및 pH 9에서 각각 높은 활성을 나타내었지만 뚜렷한 경향을 볼 수 없었다. 반응온도에 따른 활성은 20°C에서 서서히 증가하여 30°C에서 최고 활성으로 나타났으며 그 이후 감소하는 경향으로 나타났다(P<0.05). 또한, 반응시간에 따른 활성은 반응 25분까지 지속적으로 증가하는 경향을 보였으며, 25분 이상의 온도에서는 유의적인 차이를 확인할 수 없었다(P<0.05). 기질로 사용한 olive oil 농도에 따른 활성은 11.6~174.0 mM인 모든 실험구에서 유의적인 차이는 보이지 않았다(P>0.05).

### 고 찰

생물의 소화효소 활성은 이들의 주위환경(Alarcón et al., 1998), 개체 발달(Lovett and Felder, 1990; Biesiot and McDowell Capuzzo, 1990; Dang and Lee, 1992; Lemos et al., 1999), 생식소 속도, 일주기(Hernandez-Cortes et al., 1999), 탈피(Fernández Gimenez et al., 2001, 2002) 및 먹이의 종류와 양(Benitez and Tiro, 1982; Alarcón et al., 1998)에 의해 많은 영향을 받는다.

지금까지 수산생물의 탄수화물 소화효소인  $\alpha$ -amylase 활성을 측정하기 위해서 Tris-HCl buffer를 사용하는 Somogyi-Nelson 법(Somogyi, 1952)을 이용하고 있다. Somogyi (1952)가 사용한 Tris-HCl buffer 하에서 기질로 soluble starch를 사용하였을 때 해산어류인 seabream, turbot 및 redbfish에서 장 내 활성은 모두 pH 7~8 범위에서 높게 나타났으며 최고 활성 온도는 35~45°C로 보고하였다(Munilla-Morán and Saborido-Rey, 1996b).

본 실험에서 rotifer, *B. rotundiformis*의  $\alpha$ -amylase 활성은 다른 어류에서 주로 사용하는 Tris-HCl buffer 보다 phosphate-NaOH buffer (pH 8)에서 높은 활성을 보였다. 따라서 rotifer에 대한  $\alpha$ -amylase 활성 측정을 위해서는 phosphate-NaOH buffer를 이용하는 것이 효과적인 것으로 판단된다. 반응온도별 활성은 35~50°C에서 높은 활성을 보였다. 본 실험에서 조효소액으로 50  $\mu$ l를 사용하였는데 이 조효소액 내  $\alpha$ -amylase의 부족으로 판단되는 plateau가 형성되어 최고활성 온도를 확인할 수는 없었지만 40~45°C에서 나타날 것으로 판단된다. 최적반응 온도인 40°C에서의 반응시간은 40분에서 더 이상의 활성 증가는 보이지 않았으며 기질로 사용한 soluble starch 3.0% 이상의 농도에서 활성 증가는 보이지 않았다.

주로 주위환경과 먹이의 양 및 질에 따라 변화하는 단백질 소화효소 활성은 경골어류에서 유문수와 췌장에 존재하는 trypsinogen과 chymotrypsinogen이 trypsin과 chymotrypsin으로 전이되는 과정에 따른 차이에 의해 변하게 된다(Fish, 1960; Kitamikado and Tachino, 1960; Overnell, 1973). 열대성 어류

인 milkfish에서 pH 7과 9에서 높은 활성이 나타나지만(Benitez and Tiro, 1982), gilthead seabream, *S. aurata*, common dentex, *Dentex dentex*, discus, *Symphysodon aequifasciata* 등에서는 pH 8 이상에서 trypsin과 chymotrypsin으로 판단되는 두 개의 높은 활성치를 가진다(Alarcón et al., 1998; Chong et al., 2002a; Chong et al., 2002b; Munilla-Morán and Saborido-Rey, 1996a). 반면에 소화기관의 분화가 어류에 비해 미비한 해산 절지동물인 *Artemia franciscana*는 pH 4~10에서 여러 개의 높은 활성치를 보이며(García-Ortega et al., 1998), *Daphnia magma*에서는 pH 7에서 10까지 plateau를 형성하였다(Elert et al., 2004). 그러나 Munilla-Moran and Stark (1989)은 rotifer, *B. plicatilis*에서 약산성과 약알칼리에서 각각 하나의 활성을 보였으며, 본 실험에서 사용된 rotifer, *B. rotundiformis*의 경우에는 총 알칼리성 단백질 소화효소가 phosphate-NaOH buffer pH 7과 10에서 상승하는 것으로 나타났다. 이것은 rotifer의 경우 Chong et al. (2002b)의 보고처럼 높은 pH에서의 활성이 chymotrypsin일 것으로 판단된다. 그리고 trypsin은 phosphate-NaOH buffer (pH 8~8.5)에서 높게 나타났는데 총 알칼리성 단백질 소화효소와 pH 범위가 다른 것은 pH 7에서 cathepsin과 여러 종류의 peptidase의 활성이 있기 때문인 것으로 판단된다. 또한 총 단백질 소화효소와 trypsin에서 최고 활성 온도가 55°C로 조사되었으며 반응시간은 총 단백질 소화효소와 trypsin에서 각각 60분과 30분경과 후 활성 증가는 보이지 않았다. 그리고 기질 량에 따른 활성 증가는 각각 azo-casein 0.6%와 BApNA 37.5  $\mu$ M 이후 증가하지 않았다. 오히려 농도가 증가할수록 blank 내 기질의 자가분해로 인해 활성이 빠르게 감소하였던 것으로 판단된다.

지질 분해효소인 TG-lipase의 활성은 지시약을 이용한 적정 방법과 효소적 방법의 두 가지 방법으로 분석을 하는데 milkfish는 적정 방법으로 olive oil을 기질로 이용하였을 경우 pH 6.4~8.4의 넓은 범위에서 45~50°C의 온도에서 최고 활성을 보였다(Borlongan, 1990). 그러나 효소적 방법으로 naphthyl compound를 기질로 이용한 shuttlefish, *Cephaloleia presignis*는 40°C 이하의 온도, pH 7.0 조건에서 높은 활성을 나타내었다.

그러나 본 실험에서는 olive oil을 기질로 이용한 TG-lipase는 phosphate-NaOH buffer pH 8.0에서 높은 안정성을 가졌으며 다른 생물의 활성온도 보다 낮은 25~30°C에서 높은 활성을 보이고 이후 급격히 감소하는 것으로 나타났다. 또한 반응시간 25분 이후 더 이상의 반응은 일어나지 않았으며 가장 낮은 농도의 olive oil에서 가장 높은 농도까지 활성의 유의적인 차이는 없었다. 이것은 조효소액 내 TG-lipase의 부족이나 rotifer 자체 효소 활성이 낮기 때문이었던 것으로 판단된다.

본 연구를 종합하여 볼 때, rotifer, *B. rotundiformis*의  $\alpha$ -amylase, total alkaline protease, trypsin 및 TG-lipase는 phosphate-NaOH buffer에서 안정적인 효소 활성을 보였다.  $\alpha$ -amylase, trypsin 및 TG-lipase는 pH 8.0에서, total alkaline protease는 pH 7.0에서 높은 효소활성을 나타내었다. 그리고  $\alpha$ -amylase 활성은 40°C에

서 가장 높은 활성을 보였으며 total alkaline protease와 trypsin은 55~60°C의 온도에서 높은 활성을 나타내었다. 반면 TG-lipase 활성은 25~30°C의 낮은 온도에서 활성이 높았다.

따라서 각기 다른 서식환경과 서식처에 따른 먹이조건으로 인해 생물체마다의 다른 효소활성 조건을 갖기 때문에 각 종에 대한 소화효소 활성에 대한 연구는 본 연구에서와 같이 최적 효소활성 조건이 밝혀진 이 후 수행되어야 한다. 본 연구는 차후 rotifer 배양환경과 먹이 등의 조건에 따른 rotifer, *B. rotundiformis*의 소화효소 활성 연구에 기초가 될 것으로 판단된다.

## 요 약

본 연구는 rotifer, *B. rotundiformis*를 대상으로 소화효소 실험을 하기 위해 이들이 가지고 있는 소화효소의 최고 활성 조건을 확인하기 위해 수행하였다.

Rotifer, *B. rotundiformis*의  $\alpha$ -amylase, total alkaline protease, trypsin 및 TG-lipase는 Tris-HCl buffer 보다 phosphate-NaOH buffer에서 안정적인 효소활성을 보였다.  $\alpha$ -amylase, trypsin 및 TG-lipase는 pH 8.0에서, total alkaline protease는 pH 7.0에서 높은 효소 활성을 나타내었다.  $\alpha$ -amylase 활성은 40°C에서 가장 높은 활성을 보였으며, total alkaline protease와 trypsin은 55~60°C의 온도에서 높은 활성을 나타내었다. 반면 TG-lipase 활성은 25~30°C의 낮은 온도에서 활성이 높았다.  $\alpha$ -amylase, total alkaline protease, trypsin 및 TG-lipase의 활성의 적정 기질 농도는 3.5% starch, 0.6% azo-casein, 87.5  $\mu$ M BApNA and 81.2 mM olive oil이었다.  $\alpha$ -amylase, total alkaline protease, trypsin 및 TG-lipase의 활성의 적정 반응시간은 40, 60, 30 and 25 min.으로 나타났다.

본 연구 결과에서 얻어진 자료는 rotifer, *B. rotundiformis*의 소화효소 연구를 위한 기초 자료로 이용될 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 2005년도 산업자원부 지방기술혁신사업(RTI05-01-02) 지원으로 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Alarcón, M. D., F. J. Moyano and E. Abellán, 1998. Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiol. and Biochem.*, 19, 257-267.
- Araujo, A. B. D., T. W. Snell and A. Hagiwara, 2000. Effect of unionized ammonia, viscosity and protozoa contamination on the enzyme activity of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture Research*, 31, 359-365.
- Benitez, L. V. and L. B. Tiro, 1982. Studies on the digestive proteases of the milkfish *Chanos chanos*. *Mar. Biol.*, 71, 309-315.
- Borlongan, I. G., 1990. Studies on the digestive lipases of milkfish *Chanos chanos*. *Aquaculture*, 89, 315-325.
- Cahu, C. L. and J. Zambonino Infante, 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass *Dicentrarchus labrax*: effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiol. Biochem.*, 14, 431-437.
- Chiu, Y. N., and L. V., Benitez, 1981. Studies on the carbohydrases in the digestive tract of the milkfish *Chanos chanos*. *Mar. Biol.*, 61, 247-254.
- Chong, A., R. Hashim, L. -C. Lee and A. Ali, 2002a. Characterization of protease activity in developing discus *Symphysodon aequidasciata* larva. *Aquaculture Research*, 33, 663-672.
- Chong, A., R. Hashim, L. -C. Lee and A. Ali, 2002b. Partial characterization and activities of protease from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquaculture*, 203, 321-333.
- Dabrowski, K. and J. Glogowski, 1977. Studies on the proteolytic enzymes of invertebrates containing fish food. *Hydrobiologia*, 52, 171-174.
- Elert, E. V., M. K. Agrawal, C. Gebauer, H. Jaensch, U. Bauer and A. Zitt, 2004. Protease activity in gut of *Daphnia magna*: evidence for trypsin and chymotrypsin enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 137B, 287-296.
- Fernández Gimenez, A. V., F. L. Garcia-Carreno, M. A. Navarrete del Toro, and J. L. Fenucci, 2001. Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda, Penaeoidea): partial characterization and relationship with molting. *Comp. Biochem. Physiol.*, 130B, 331-338.
- Fernández Gimenez, A. V., F. L. Garcia-Carreno, M. A. Navarrete del Toro, and J. L. Fenucci, 2002. Digestive proteinases of *Artemesia longinaris* (Decapoda, Penaeidae) and relationship with molting. *Comp. Biochem. Physiol.*, 132B, 593-598.
- García-Ortega, A., J. Verreth, A. Van Hoornyck and H. Segner, 2000. Heat treatment affects protein quality and protease activity in decapsulated cysts of *Artemia* when used as starter food for larvae of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell). *Aquaculture Nutrition*, 6, 25-31.
- Gawlicka, A., B. Parent, M. H. Horn, N. Ross, I. Opstad and O. J. Tottissen, 2000. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture*, 184, 303-314.
- Han, X., R. Wang and J. Wang, 2002. Digestive gut structure and activity of protease, amylase, and alkaline phosphatase in *Calanus sinicus* during summer in the Yellow Sea and the East China Sea. *J. Exp. Mar. Biol.*, 270, 131-146.
- Harboe, T. and A. Mangor-Jensen, 1998. Time of first feeding of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., larvae. *Aquaculture Research*, 29, 913-918.
- Kunitz, M., 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *Journal of General Physiology*, 30, 291-310.
- Kurokawa, T., M. Shiraishi and T. Suzuki, 1998. Quantification of exogenous protease derived from zooplankton in the intestine of Japanese sardine *Sardinops melanoticus* larvae. *Aquacul-*

- ture, 161, 491–499.
- Ma, H., C. Cahu, J. Zambonino, H. Yu, Q. Duan, M. L. Gall, K. Mai, 2005. Activities of selected digestive enzymes during larval development of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Aquaculture*, 245, 239–248.
- Munilla-Morán, R. and F. Saborido-Rey, 1996a. Digestive enzymes in Marine species. I. Proteinase activities in gut from redfish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 113B, 395–402.
- Munilla-Morán, R. and F. Saborido-Rey, 1996b. Digestive enzymes in Marine species. II. Amylase activities in gut from seabream (*Sparus aurata*), turbot (*Scophthalmus maximus*) and redfish (*Sebastes mentella*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 113B, 827–834.
- 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.
- Schmidt, F. H., H. Stork and K. von Dahl. 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.
- Støttrup, J. G. and L. A. McEvoy, 2003. Live feeds in marine aquaculture. Blackwell Science, Oxford, pp. 318.
- Tover, D., J. Zambonino Infante, C. Cahu, F. J. Gatesoupe, R. Vazquez-Juarez and R. Lesel, 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 204, 113–123.
- Warner, A. H. and C. Matheson, 1998. Release of protease from larvae of the brine shrimp *Artemia franciscana* and their potential role during the molting process. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119B, 255–263.

---

원고접수 : 2005년 6월 10일

수정본 수리 : 2005년 11월 2일