

우릉셴이(Cynthia roretzi. V Drasche)의
消化酵素에 對하여 (第 2 報)

Proteinase 의 酵素的 性質

徐 錫 洙 · 梁 漢 錫

Suk Soo Suh, Han Suk Yang : Studies oh the Digestive
Enzyme of *Cynthia roretzi* V. Drasche.

Ⅱ. Some propeinic properties of Amylase.

(College of pharmacy, Pusan National University)

Some enzymatic prooprties of Cynthia roretzi V. Drasche (Korean : U-Rung-Shei) was studied by author. and obtained the following results:

1. The optimum pH of the digestive gland proteinase was 7.4~7.6
2. Activity of metallic ion on the proteinase showed the following order; 10^{-3} M. $Mn^{++} > 10^{-3}$ M. $Co^{++} > 10^{-4}$ M. $Mg^{++} > 10^{-2}$ M. Sr^{++}
Inhibrtion of metallic ion on the Proteinase showed following order; 10^{-3} M. $Ag^{+} > 10^{-3}$ M. $cd^{++} > 10^{-3}$ M. $Pb^{++} > 10^{-3}$ M. Zn^{++}
3. The digestive gland enzyme inactivated at 70°C, but no influence at 50°C.
4. When the enzyme Concentration increase 2times, and 3times, the enzymatic activity also increase, but not proportionally
5. The digestive gland Proteinase showed remarkably higher enzymatic activity than the intestinal Proteinase.
6. The digestive gland amylase brom the ascidion showed remarkobly higher enzymatic activity than the heptaponcreatic amylase from shell fish (Turbo (Batillus) Cornutus Solander.)

(Received November 11, 1959)

緒 論

Amylase 의 酵素的性質에서 論한것과 같은 趣旨에서 우릉셴이의 Proteinase 의 酵素的性質을 調査한 일은 몇 結果를 報告한다.

Ⅰ. 實 驗

1. 酵素液 : 酵素製品은 前記와 같은 酵素液은 粗素粉末을 實驗할때마다. M/15 Phosphate Buffer pH 7.5 (M/15 NaH_2PO_4 16 : M/15 Na_2HPO_4 84) 20倍量을 加하여 35°C 의 incubator 에 2時間 放置하였다가 吸引 濾過하여 같은 Buffer 로서 2倍로 稀釋하여 實驗에 使用하였다.

但 最適 pH 를 求할時는 0.15M NaCl 29倍量으로 35°C 의 incubator 에 2時間 放置後 吸引濾過하여 2倍로 稀釋하였다.

2. 基質溶液 : (2% Casein 溶液) Casein (Hammarsten method 에 依하여 만든 日本和光會社製品) 2g 를 100ml 의 三角 flask 에 넣고 M/15 Na_2HPO_4 75ml 을 加하여 振盪하면서 沸騰水中에 約 15分間 加熱하여 完全히 溶解하면 Casein 은 酸性임으로 pH 約 7.4 이다. 萬一 PH 7.4 以上일때는 0.1N H_3PO_4 로 pH 7.4 以下일때는 0.1N NaOH 로서 補正하여 pH 7.4~7.6 으로 하여 蒸溜水를 加하여 100ml 로 한다.

3. 試 藥

○Folin 試藥 [F.R.]의 調製法: 100g 의 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 와 25g 의 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 을 約 700ml 의 물에 녹여 1.5l 의 flask 에 넣고 85% H_3PO_4 50ml 와 Conc HCl 100ml 을 加하여 逆流 Condenser 을 달고 10時間 徐徐히 沸騰시킨다. 終了後 곧 150g 의 Li_2SO_4 와 물 50ml 을 加하고 脫色시키기 爲하여 1.2滴의 液體臭素를 加한後 Condenser 를 閉고 沸騰시킨다. 液이 黃色이 되지 않으면 追加한다. 脫色이 끝난後 過剩의 臭素를 除去시키기 爲하여 15分間 沸騰시키고 冷却後 glass filter 로서 濾過한다. [FR 原液] 測定할때마다 蒸溜水로 5倍로 稀釋하여 使用한다.

- 蛋白質沈澱試藥 A; 0.4M Trichloro acetic acid [TCA]..... CCl_3COOH 65.375g 을 1l 의 蒸溜水에 녹임.
- 蛋白質沈澱試藥 B; 0.3M CH_3COOH , 0.2M CH_3COONa , 0.1M CCl_3COOH , 의 混液임. 即 CH_3COOH 18.066g, CH_3COONa 16.403g, CCl_3COOH , 16.339g 을 1l 의 蒸溜水에 녹임.
- M/15 NaH_2PO_4 ; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 9.197g 을 蒸溜水 1l 에 녹임.
- M/15 Na_2HPO_4 ; Na_2HPO_4 9.466g 을 蒸溜水 1l 에 녹임.
- 0.4M Na_2CO_3 42.39g 을 蒸溜水 1l 에 녹임.

4. 酵素活性的 測定: 大體로 Anson and Kunitz method 를 HAGIHARA 가 改良한 方法으로 測定하였다. 內經 約3分의 試驗管에 酵素液 1ml 을 加하고 37°C 의 incubatop 內에 約3分間 保存後 미리 同溫度로 保存한 2% Casein 溶液 1ml 을 加하고 곧 振盪 混合하여 incubator 에 넣어 둔다. Casein 添加後 正確히 10, 30, 60分을 經過後 2ml 의 0.4 M TCA 을 加하고 振盪하던 酵素反應이 停止될과 同時에 末反應의 Casein 이 沈澱한다. 沈澱을 完全히 시키기 爲하여 小試驗管에 自然濾過한다. 이 濾液 1ml 을 시험관에 取하여 0.4M Na_2CO_3 5ml. 다음 5倍 稀釋 FR 1ml 을 加하여 곧 振盪 混和하여 37°C 의 incubatop 內에 正確히 29分間 經過後 Klett-Summerson photoelectric colormeter 로 Filter No. 66 을 使用하여 蒸溜水를 標準으로 그 absorbance 을 읽는다.

Casein 이나 酵素試料中에는 反應前부터 多少의 [TCA] 可溶性 [FR] 呈色物을 含有함으로 blank Test 가 必要하다. 이것은 上記 操作을 酵素液-[TCA]-基質溶液의 順으로 넣고 같은 操作後 比色한다. 이 blank 值를 위의 測定值에서 除한 것이 實際의 測定值이다.

5. 最適 pH: 上記의 測定方法으로 pH 6.0 부터 8.2 사이의 여러가지 基質溶液을 만들고 30分間 酵素를 作用시켜서 最適 pH 를 求한 結果는 第1圖과 같다.

6. 金屬 Ion 의 影響: 最終濃度가 各各 10^{-2}M , 10^{-3}M , 10^{-4}M 가 되도록 下記 鹽類를 調製하였다. $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CdCl_2 , PbAc_2 , ZnSO_4 , AgNO_3 . 이를 鹽溶液을 各各 加하여 測定한 結果는 第2圖과 같다.

7. 溫度에 對한 影響: 酵素液을 50°C, 60°C, 70°C 의 恒溫槽에 各各 5分間 담구었다가 上記方法으로 測定한 結果는 第3圖과 같다. 8. 酵素濃도에 依한 影響: 基質溶液에 酵素液을 2倍와 3倍를 加하여 酵素活性을 測定한 結果는 第4圖과 같다. 9. 蛋白質沈澱試藥에 依한 影響: 蛋白質沈澱試藥 A 와 B 를 使用하였을 때의 差異를 比較한 結果는 第5圖과 같다. 10. 우렁쟁이의 digestive gland 와 gastrointestinal 을 比較한 結果는 第6圖과 같다. 11. 우렁쟁이의 digestive gland 와 소라(貝類)의 Heptapancreas 의 酵素活性度를 比較한 結果는 第7圖과 같다.

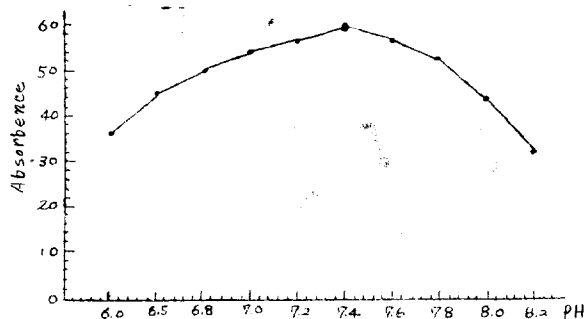


Fig 1. pH. Optimum on the proteinase, extracted from the digestive gland of the ascidian (*Cynthia, roretzi* v. *Drasche*) with 0.15M NaCl Solution.

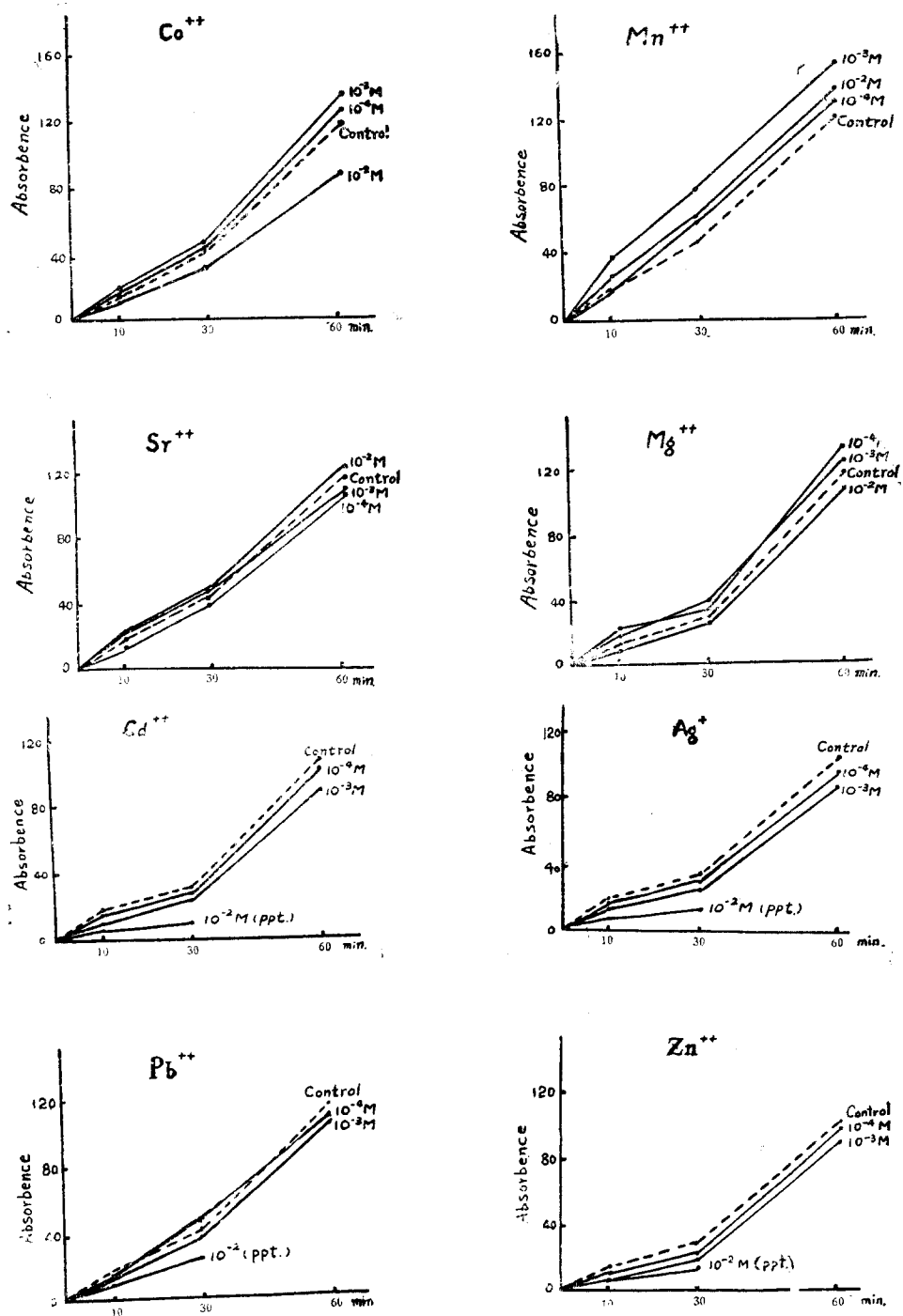


Fig 2. Effects of metal ions on the amylase, extracted from the digestive gland of the ascidian (*Cynthia raretzi* v. Drasche) with 0.02M phosphate Buffer, pH 7.5

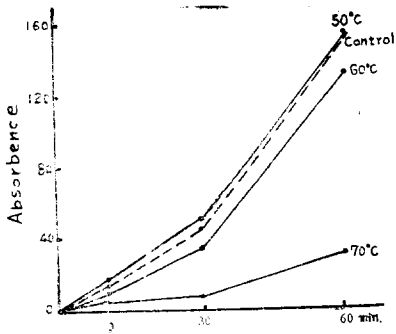


Fig 3. Effects of temperature on the proteinase, extracted from the digestive gland of the ascidian

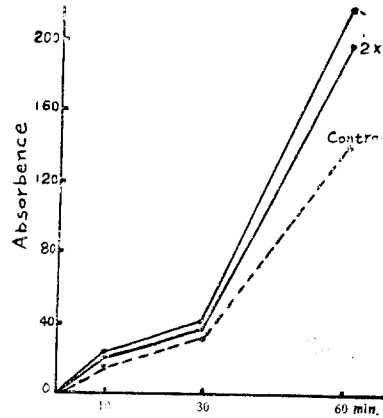


Fig 4. Comparison with the enzymatic activity of various cocentration

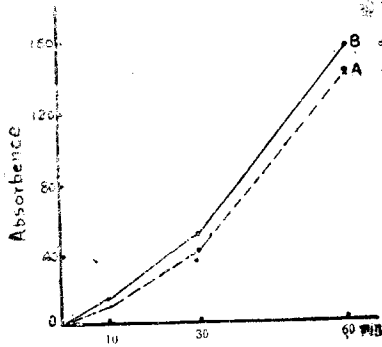


Fig 5. Comparison with the enzymatic activity of precipitation reagent A and B.

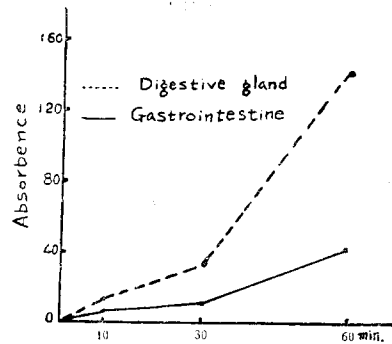


Fig 6. Comparison with the enzymatic activity of digestive gland and gastrointestinal.

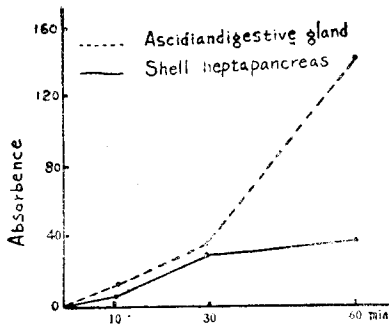


Fig 7. Comparison with the enzymatic activity of ascidian digestive gland and shell heptapancreas.

II. 考 察

- 우롱행이 Proteinase 의 最適 pH는 7.4~7.6이다.
- Co^{++} 는 $10^{-2}M$ 에서는 阻止作用을 나타내나 $10^{-3}M > 10^{-5}M$ 의 順位로 相當한 賦活作用이 있다.
 Mn^{++} 의 $10^{-3}M$ 는 顯著한 活性作用이 있으며 $10^{-2}M, 10^{-4}M$ 도 相當한 賦活作用이 있다. $Sr^{++}10^{-2}M$ 는 若干의 賦活性을 보이나 $10^{-3}M, 10^{-4}M$ 는 크게 영향을 주지 않는다. $Mg^{++}10^{-2}M$ 는 多少의 阻止作用이 있으나 $10^{-4}M$ 는 相當한 賦活作用이 强하나 $10^{-3}M$ 는 $10^{-4}M$ 보다 弱하다. Cd^{++} 는 全體의으로 阻止作用이 强하나 그 順位는 $10^{-3}M, 10^{-4}M$ 이다. $Cd^{-2}M$ 는 白沈이 생겼는데 아주 顯著한 阻止作用을 보았다. Ag^{+} 는 阻止作用이 $10^{-3}M, 10^{-4}M$ 의 順序로 줄어든다. $10^{-1}M$ 는 測定不能이었다. Pb^{++} 는 그 阻

止作用이 $10^{-3}M$ 에 비하여 $10^{-4}M$ 는 微弱하였다. $10^{-2}M$ 는 白沈이 생겼는데 阻害的이었다. Zn^{++} 는 거의 Pb^{++} 와 비슷한 阻害作用을 보였다. 그러므로 賦活作用은 $10^{-3}Mn^{++}$, $10^{-3}M Co^{++}$, $10^{-4}M Mg^{++}$, $10^{-2} Sr^{++}$ 의 順序로 줄어드는 것을 알 수 있으며 阻止作用은 $10^{-3}M Ag^{+}$, $10^{-3} M Cd^{++}$, $10^{-3}M Pb^{++}$, $10^{-3}M Zn^{++}$ 의 順序로 弱해진다.

全般的으로 阻害的인 Cd^{++} , Ag^{+} , Pb^{++} , Zn^{++} 의 $10^{-2}M$ 는 모두 顯著한 阻止作用을 보았으나 白沈이 생기므로 圖表로서는 比較치 않았다.

3. 酵素液의 溫度에 對한 影響은 50° 에서는 無關係였고 $60^{\circ}C$ 에서는 多少, $70^{\circ}C$ 에서는 顯著히 그 活性이 줄어들는 것을 볼 수가 있었다. 이것은 80° 에서 不可逆的으로 破壞를 이르는 酵素의 一般의 性質과 같다.

4. 酵素溫度를 2倍 또는 3倍로 增加하여 測定한 結果 Control과 2倍와의 사이에는 그 差異가 많으나 2倍와 3倍와의 사이는 이보다 아주 적은 것으로 보아 酵素活性이 比例하지 않는 酵素의 一般의 性質과 같다.

5. 蛋白質沈澱試藥 A와 B를 比較한 結果 B쪽이 더 많은 測定值를 나타내었다. 이것은 沈澱試藥 A는 蛋白質 뿐만 아니라 低級 Peptide 까지 作用함으로 非沈澱量이 增加하지 않으나 沈澱試藥 B는 蛋白質만 沈澱 除去시키는데 起因한다.

6. 우렁헝이의 digestive gland와 gastrointestine을 比較한 結果 digestive gland는 酵素作用이 顯著하나 gastrointestine은 微弱하다.

7. 우렁헝이의 digestive gland와 소라의 Heptapancreas의 酵素活性을 比較한 結果 우렁헝이가 顯著히 強하다.

Ⅲ. 要 約

1. 우렁헝이 Proteinase의 最適 pH는 7.4~7.6이다.
2. 金屬 Ion의 賦活作用은 $10^{-3}M. Mn^{++} > 10^{-3}M. Co^{++} > 10^{-4}M Mg^{++} > 10^{-2}M Sr^{++}$ 의 順序로 줄어들며 阻止作用은 $10^{-3}M Ag^{+} > 10^{-3}M Cd^{++} > 10^{-3}M Pb^{++} > 10^{-3}M Zn^{++}$ 의 順序로 弱해진다.
3. 酵素液의 溫度에 對한 影響은 $50^{\circ}C$ 에서는 別關係 없으며 $60^{\circ}C$ 에서는 多少, $70^{\circ}C$ 에서는 그 活性이 顯著히 줄어진다.
4. 酵素量을 增加시키면 活性이 增加하나 酵素量에 比例치 않는다.
5. 蛋白質 沈澱試藥 A와 B를 使用하였을 때 B쪽이 效果的인 測定值였다.
6. digestive gland와 gastrointestine의 酵素活性은 digestive gland가 顯著히 크다.
7. 우렁헝이 digestive gland proteinase가 소라(貝類)의 Heptapancreas proteinase보다 顯著히 活性도가 크다.
(釜山大學校 藥學大學)

文 獻

1. Bunji Hagihara; Annual report of Scientific works Osaka University Vol. 2 (1954)
2. Sidney P. Colowick and Natfian O Kaplan; methods in Enzymology I (1957)
3. Sidney P. Colowick and Nathan OK aplan; matnods in Enzymology II (1957)
4. Sidney P. Colowick and Nathan O Kaplan; method in Enzymology III (1957)
5. B. Sumnep and G. F. Somers; Chemistry and method of Enzymes (1953)
6. Tracy I Stovep; Genrcal Zoology (1951)
7. Ralph Buchsbamm; Animals Without Backborns (1954)
8. 赤堀四郎 編; 酵素研究法 Vol. I (1956)
9. 赤堀四郎 編; 酵素研究法 Vol. II (1956)
10. 赤堀四郎 編; 蛋白質化學 Vol. I (1955)
11. 赤堀四郎 編; 蛋白質化學 Vol. II (1955)
12. 赤堀四郎 編; 蛋白質化學 Vol. III (1955)
13. 江上不二夫 編; 標準生化學試驗法 (1954)
14. 斗ヶ澤宜久, 膝又第三; 日本水産化學會誌 Vol. 21, 22, 23, (1956~1958)
15. 徐錫洙; 生物化學 (1957)
16. 徐錫洙, 洪承詰, 梁漢錫; 本誌 Vol. 4, 35 (1959)
17. 徐錫洙, 洪承詰, 梁漢錫; 本誌 Vol. 439 (1951)