한국농화학회지 Vol. 25, No. 3, Sept. 1982
J. Korean Agricultural Chemical Society

트립신 저해단백질의 형광측정법

정 진·이 춘 령
서울대학교 농과대학 농화학과
(1982년 8월 10일 수리)

A Fluorometric Assay for Trypsin Inhibitor

Jin Jung and Chun-Young, Lee
College of Agriculture, Seoul National University, Suwon, Korea

Abstract

A fluorometric method is described which permits the assay of trypsin inhibitor contained in a sample in an extremely small amount, utilizing a novel reagent generally called fluorescamine. The fluorometric assay with an enzyme kinetic approach has been found to be at least 100 times more sensitive than the well-known Kunitz's spectrophotometric method, considerably faster and less complicated, when it was demonstrated with the anti tryptic activities of very dilute extracts from soybean, red-bean and mung bean. Details of experimental procedure as well as theoretical considerations will be discussed.

서 론

Trypsin Inhibitor의 활성도측정(antitryptic activity assay)을 위하여 fluorescamime의 이용을 시도하였다.

부드러운 반응조건, 이를테면 상온하의 중성 pH 매질중에서 일차아민과 빠르게 반응하여 강력한 형광성화합물을 형성하는 fluorescamine (4-phenylspiro[furan-2(3H), 1′-phthalan]-3, 3′-dione)은 Weigele 등[1]에 의해서 그 최초의 합성과 성질이 발표된 이후 과거 10여년간 아미노산, 펩티드 및 단백질의 형광법적 측정에 상당히 넓게 이용되어 왔으며, 그 밖에도 많은 분석화학적 응용이 보고되어왔다.[2,3,4,5] 그 중에서도 특히 본연구와 관련하여 흥미있는 일은 단백질 가수분해효소의 assay에 이를 이용한 예이다.[6] 즉 cathepsin D에 의한 hemoglobin의 가수분해속도를 반응생성물(peptide)의 농도변화로 중계할때 이 형광발색화합물을 이용한 형광법적 방법을 채택한 결과, 반응생성물의 U.V. 흡수를 측정하는 흡광광도법에 비하여 최소한 100배 이상의 측정감도를 보였다는 사실이다.

일반적으로 어떤 시료의 antitryptic activity assay는 trypsin에 의한 기질의 가수분해속도 변화를 측정하는 일이 방법상의 근간을 이루고 있는데, 이때 생성물의 농도증가는 특정파장에서의 흡광도로 중계된다. 널리 쓰이고 있는 Kunitz[7,8] 및 Kakade 등[9]의 방법이 곧 이에 해당한다.

그런데 Inhibitor의 존재시와 부재시에 각각 Trypsin에 의한 기질가수분해생성물의 농도측정을 fluorescamine을 이용하여 형광법으로 시행한다면, 전술한 cathepsin D의 경우와 같이 inhibitor assay의 측정감도도 크게 향상될 수 있으리라 예상된다. 따라서 본연구에서는 이와같은 예상이 옳은지를 시험해 보고자 몇가지 콩과식물 열매의 추출액을 inhibitor의 시료로 사용하여 실험검토하여

보았으며, 그 결과 측정감도를 위시하여 실험방법상 확실한 우수성이 입증되었기에 제반 실험조건 등 방법론적 세부사항과 그 이론적 배경을 정리하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

trypsin(2000μ/g)과 casein(Hammersten quality type)는 wako pure chemical 회사 제품이며, fluorescamine은 Hoffman-La Roche Inc. 의 제품으로 정제하지 않고 사용하였다. 물과 아세톤은 유리용기에서 재증류하였으며, phosphate buffer는 Na염을 이용하여 0.1N, pH 7.6으로 만들었다. 대두, 녹두 및 팥은 농촌진흥청작물시험장 및 시중에서 각각 구입하였다.

상기 시약 및 시료로부터 다음과 같은 stock 용액들을 만들어 사용하였다.

trypisn stock solution; 0.0025N HCl에 trypsin 결정을 녹여 그 농도가 0.3mg/m*l* 이 되도록 하였으며, 비교목적을 위한 kunitz의 방법을 위해서는 3mg/m*l* 의 stock 용액을 만들었다.

casein stock solution; phosphate buffer에 0.4 mg/m*l* 의 농도가 되도록 casein을 녹였으며, Kunitz 방법을 위해서는 20mg/m*l* 의 현탁액으로 만들었다.

fluorescamine stock solution; 정제된 아세톤에 0.2mg/m*l* 이 되도록 fluorescamine 결정을 녹여 만들었으며, 하루 실험에 필요한 양 만큼만 준비하여 암소에 보관하며 사용하였다.

crude trypsin inhibitor extract; 두류종실인 시료를 건조, 마쇄, 탈지 및 인산완충용액용출 등의 과정을 거치는 기존의 방법[10,11]을 통해 제조하였으며, 마지막 과정인 원심분리상등액을 500배 희석하여 stock 용액으로 썼고, Kunitz 방법용으로는 25배 희석액을 사용했다.

형광발색단의 형성반응 및 형광측정과정 : 기질단백질이 trypsin에 의해 가수분해를 받게되면 분해되는 펩티드결합 하나당 한개의 amino group을 노출시키게 되는데, 이 노출된 amino group은 fluorescamine과 반응하게 되면 강력한 형광성의 fluorescamine-Amine adduct를 형성한다. 따라서 F-A adduct의 형광강도의 측정으로 분해된 펩티드결합의 수를 계산할 수 있다. Fig. 1에 F-A adduct의 형성반응과 그 형광 및 형광활성스펙트라를 보였다.

보통크기(약 15~20m*l*)의 시험관 6개에 0.3m*l* 의 trypsin stock 용액을 각각 넣고, 여기에 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 및 1.0m*l* 의 crude trypsin inhibitor extract를 각각 첨가한다. 각 시험관에 phosphate buffer를 가하여 전체용적이 각각 2m*l* 이 되도록 만든 다음 30°C의 항온조에 수분동안 정치시킨다. 동일한 항온조에 보관되어 있던 casein stock 용액 2m*l* 씩을 각각 가하고 잘 저은 후 다시 정치시켜 둔다. 20分후 fluorescamine stock 용액 1.5m*l* 을 vortex mixer를 이용하여 급히 첨가하면서 약 10초동안 세게 교반한다. 이상과 같은 과정을 거쳐 얻은 F-A adduct는 약염기성 매질중에서는 상당히 안정한 것으로 알려져 있으나[12] 가능한 한 지체없이 곧바로 형광강도측정에 들어가는 것이 ad-

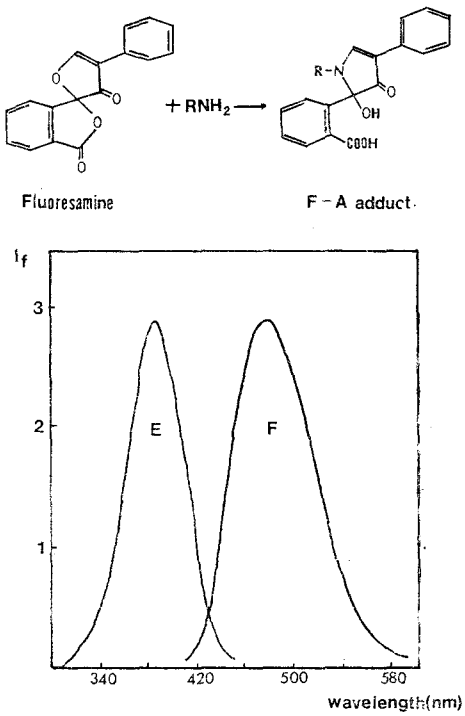

Fig. 1. The structure, flurescence and fluorescence excitation spectra of fluorescamine-amine adduct (F-A adduct) produced by the reaction between fluorescamine and a primary amine compound. The spectra were obtained from a F-A adduct formed by the reaction of fluorescamine with peptides resulted from tryptic digestion of casein.
E; Fluorescence excitation spectrum of F-A adduct with emission at 480nm.
F; Fluorescence spectrum with excitation at 390nm.

duct의 변성에 의한 오차를 없애는데 필요하다.

형광활성파장은 390nm로 정했고 형광파장은 480nm로 고정하여 강도를 측정하였으며, 기기는 Schimadzu Model RF-500 Spectrofluorophotometer를 사용하였다. F-A adduct의 fluorescence stock shift가 비교적 크기 때문에 형광측정중에 넓은 slit들을 택해도 Reileigh scattering의 간섭을 배재할 수 있어서 측정강도는 더욱 높힐 수 있을 것이다.

상기와 같은 실험과정에서 stock 용액들의 농도, 그들의 혼합용적비율 및 반응시간등 반응최적조건들은 다음의 '결과 및 고찰'의 항에서 논의하게될 실험결과에 근거하여 정하여진 것이며, 따라서 trypsin의 효소역가, 시료추출액의 inhibitor 수준 및 측정기기의 강도에 따라 바뀔 수 있을 것이다.

측정된 모든 형광강도는 blanck test를 거쳐 보정되었다. 왜냐하면 기질단백질, trypsin 및 crude inhibitor extract 중의 각종 단백질은 amino group을 갖는 lysine 잔기를 함유하고 있으므로 혼합반응용액은 기질의 가수분해가 있기 이전에도 F-A adduct를 만들게 되고 따라서 이에 의한 형광이 생기기 때문이다. 효소반응 혼합물을 준비하고 곧바로(t=0에서) fluorescamine을 첨가하여 얻은 형광이 곧 blanck 형광강도를 주게 되며 Fig. 2에서 $\Delta I_f = I_{f_{20}} - I_{f_0}$은 반응시간 20分후의 형광강도($I_{f_{20}}$)과 blanck 형광강도($I_{f_0}$)의 차이 즉 보정된 형광강도를 의미하며, Fig. 3 이후의 모든 데이타에서 I_f라함은 실은 보정된 형광강도를 의미한다.

결과 및 고찰

trypsin 가수분해에 있어서 반응속도론적 고려 : 효소반응속도론적 접근으로 *antitryptic activity* assay를 하는 일에는 다음과 같은 이론적 배경이 갖추어져 있다.

$$\underset{\text{(기질)}}{RNHC(=O)-R'} + H_2O \xrightarrow{E} \underset{}{RNH_2} + \underset{\text{(생성분)}}{HOOC-R'}$$

효소반응에 관한 Michaelis-Menten 식으로부터,

$[RNHC(=O)-R'] \gg K_m$의 조건이 만족되면 RNH_2의 농도로서 반응속도를 측정할 때

$$v = \frac{d[RNH_2]}{dt} = k_{cat}[E]_0,$$ 여기서 $[E]_0$는 첨가된 trypsin의 초기농도이다.

한편 반응시스템에 inhibitor가 첨가될 때 그 초기농도가 $[I]_0$이고, 또한 그것이 비경쟁적 inhibitor라면 이때의 효소반응속도는

$$v' = \frac{d[RNH_2]'}{dt} = k_{cat}([E]_0 - [I]_0)$$

위의 두 가지 속도방정식을 각각 적분하게 되면 일정시간(t)이 경과한 후 $[RNH]_2$는

inhibitor 부재시;

$$[R\text{-}NH_2] = k_{cat}[E]_0 t = \text{const.}[E]_0 \quad \cdots\cdots(1)$$

inhibitor 존재시;

$$[R\text{-}NH_2]' = k_{cat}([E]_0 - [I])t = \text{const.}([E]_0 - [I]_0) \quad \cdots\cdots(2)$$

식(1)과 (2)로부터

$$\frac{[R\text{-}NH_2]'}{[R\text{-}NH_2]} = 1 - \frac{[I]_0}{[E]_0}$$

또는

$$1 - \frac{[R\text{-}NH_2]'}{[R\text{-}NH_2]} = \frac{[I]_0}{[E]_0} \quad \cdots\cdots(3)$$

식 (3)의 오른쪽항은 일정한 농도의 효소에 대한 저해율을 나타내므로 이는 가장 객관성있는(인위적이지 않는) 저해활성도의 척도가 된다.

antitryptic activity를 측정하고자 하는 시료용액중의 inhibitor의 농도를 $[I]_s$라하고 이 시료용액 $V_a$ml을 취하여 반응시스템에 넣어 전체용적이 Vml가 되었을 때, 효소반응씨스템중의 inhibitor의 농도 $[I]_0 = \frac{V_a}{V}[I]_s$가 되므로 이를 식 (3)에 대입하면 결국

$$1 - \frac{[R\text{-}NH_2]'}{[R\text{-}NH_2]} = \frac{[I]_s}{[E]_0 \cdot V} \cdot V_a \quad \cdots\cdots(4)$$

식 (4)는 이론상으로는 저해율을 측정하면 시료중에 함유된 inhibitor의 농도를 계산할 수 있음을 나타낸다. 오직 문제는 $[R\text{-}NH_2]'/[R\text{-}NH_2]$를 어떻게 구하는가 하는 것이다. 이를 위해서 여러가지 화학적 물리적 방법이 고려될 수 있으나, 아마 가장 쉽게 응용할 수 있는 방법은 $R\text{-}NH_2$가 기질과 전혀 상이한 파장영역에서 광흡수를 보이거나 또는 어떤 적절한 방법으로 기질과 분리될 수 있다면 광흡수도의 측정일 것이다.

그런데 만일 $R\text{-}NH_2$가 어떤 다른 화합물의 형태로 정량적으로 변형되어질 수 있고 그 변형된 화합물의 특정한 물리적 성질이 농도에 비례한다면 그러한 물리적 성질의 측정으로 $[R\text{-}NH_2]'/[R\text{-}NH_2]$는 구해질 수 있다. 바로 이와 같은 경우가 $R\text{-}NH_2$를 F-A adduct로 변형시키고 그것의 형광을 측정하여 $[R\text{-}NH_2]'/[R\text{-}NH_2]$를 구하고 나아가서 inhibition activity assay를 실시하려는 본 연

구의 방법론적 기반이 된다.

$[R\text{-}NH_2]\propto[F\text{-}A\ adduct]\propto I_f$의 비례관계가 성립된다면, 식 (1), (2) 및 (5)는 각각 (1)′ (2)′ 및 (5)′으로 바뀌게 될 것이다.

$$I_f=\text{const.}[E]_0 \qquad \cdots\cdots(1)'$$

$$I_f=\text{const.}([E]_0-[I]_0)$$

$$=\text{const.}\left([E]_0-\frac{[I]_s}{V}V_a\right) \qquad \cdots\cdots(2)'$$

$$1-\frac{I_f'}{I_f}=\frac{[I]_s}{[E]_0\cdot V}\cdot V_a \qquad \cdots\cdots(5)'$$

따라서 상기식들을 이용하여 antitrytic activity를 assay하기 위해서는 필수적인 두 가지 기본조건 즉 첫째 $[RNHCOR']\gg K_m$과 둘째 $[RNH_2]\propto[F\text{-}A\ adduct]\propto I_f$가 만족되어야 할 것이다. 이러한 조건들은 기질, 효소 및 fluorescamine의 농도로 조정되며 '재료 및 방법'의 항에서 기술한 stock 용액들의 농도와 그들의 혼합비율은 상기조건을 만족시키는 농도범위내에서 결정된 것들이다.

기질, 효소 및 fluorescamine의 최적농도범위 및 반응시간 결정 :

상기 세 가지 반응물의 농도변수중에서 우선은 하나의 변수를 임의로 고정시키고 그에 따라 나머지 두개의 변수를 실험적으로 결정하는 방법을 택한다. 여기서는 기질로 사용하는 casein의 농도를 임의로 고정시켰는데, inhibition activity의 측정감도를 높히기 위해 비교실험으로 실시한 Kunitz 방법의 실험에 필요한 기질농도보다 1/20로 희석된 것을 택하였다. 즉 전체반응용액 4ml중에 0.4 mg/ml의 casein 용액 2ml이 포함되어 있을 때, (따라서 casein의 농도가 0.2mg/ml로 고정될 때) $[RNHCOR']\gg K_m$의 조건을 만족시켜 식(1)′이 성립되는 $[E]_0$의 범위는 30μg/ml이하이다. 즉 4ml의 전체반응용액중에 0.3mg/ml의 trypsin stock 용액이 0.4ml 이하로 첨가되어 있을 때 20분동안의 반응으로 생긴 생성물의 농도는 $[E]_0$와 일차함수관계를 보였다. 물론 이때 RNH_2는 F-A adduct로 변형되어 그 형광강도로 측정된 것이며, Fig. 2에 그 결과를 보여주었다.

다음은 $R\text{-}NH_2$를 F-A adduct로 정량적으로 변형시키는데 필요한 fluorescamine의 농도를 결정하는 일이다. Casein 농도 0.2mg/ml, trypsin 농도 30μg/ml인 반응용액 4ml에 20分경과후 1.5ml의 fluorescamine 용액을 섞었을 때 형광강도를 fluorescamine 용액의 농도의 함수로서 도시할 때 Fig. 3과 같은 결과를 주었다. 즉 F-A adduct로 변환시

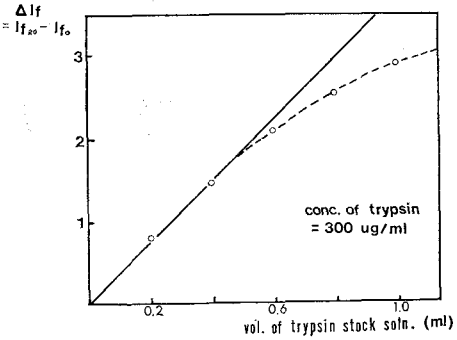

Fig. 2. Relative fluorescence intensity (I_f) of F-A adduct as a function of volume of trypsin stock solution: Trypsin stock solution with concentration of 0.3mg/ml was added to the phosphate-buffered casein solution to make total volume of the reaction mixture 4 ml with casein concentration of 0.2mg/ml. (Referto text for details)

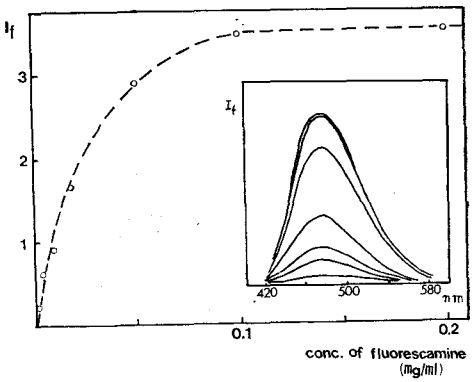

Fig. 3. Relative fluorescence intensity of F-A adduct formed by the reaction of tryptic hydrolysis product and fluorescamine of various concentrations: 125ml of fluorescamine solution was added to the reaction mixture of total volume 4 ml for each experiment.

키는데 필요한 fluorescamin의 농도는 0.1mg/ml 이상이어야함을 알 수 있고, 따라서 약간의 여유를 두기로 할 때 0.2mg/ml의 stock 용액이 적절할 것으로 판단되었다. 한편 상기와 같은 농도비율 및반응시간 20分의 실험조건에서 생성된 F-A adduct의 농도는 최대흡수파장에서의 광흡수도가 0.1이하로 유지되어 소위 형광의 "concentration quenching" 현상은 배제될 수 있었다.

casein, trypsin 및 fluorescamine의 stock 용액들의 농도 및 첨가용적이 식 (1)′에 맞도록 결정되었으므로 이제 최적반응시간을 결정하여야 한다.

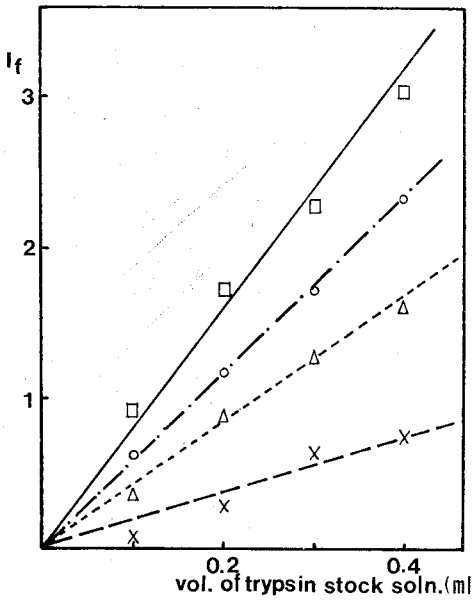

Fig. 4. Variation of the concentration of tryptic hydrolysis product monitored by fluorescence intensity of F-A adduct with volumes of trypsin stock soln.:
×– – –×; reaction time 5 min.
·· △……△ ··; reaction time 10 min.
– ·○– · ··○– ·; reaction time 15 min.
—□————□—; reaction time 25 min.

왜냐하면 반응시간의 경과에 따라 [RNHCOR']≫K_m의 기본조건이 무너지게 될지도 모르기 때문이다. Fig. 4에 그 결과를 보였는바, 최소한 25分동안은 F-A adduct의 형광강도를 측정된 생성물의 농도가 효소농도(즉 trypsin stock 용액의 첨가용적)와 일차함수관계를 유지한다는 사실은 [RHCOR']≫K_m의 상태가 유지되고 있음을 뜻한다. 따라서 Fig. 4의 결과에 따라 반응시간 20분을 최적시간으로 정하였고, 본연구의 모든 데이타는 이에 준해 얻었다.

두류의 trypsin inhibitor 활성도 측정 :

trypsin inhibitor 시료가 효소반응씨스템에 첨가될 때 효소반응저해를 보이는 결과를 Fig. 5와 Fig. 6에 보였다. 이들은 각각 식 (2)'와 식(5)'의 정당성을 검토하는 자료가 된다.

팥과 녹두로부터 얻은 crude trypsin inhibitor extract인 경우 I_f'와 $1-I_f'/I_f$는 동 extract의 첨가용적 V_a에 대해 일차함수관계를 보이며, 이는 식 (2)'와 식(5)'를 잘 만족시킨다. 이에 반해서 대두의 경우는 그 함수관계가 직선으로부터 상당히 큰 편차를 보여준다. 이 사실은 대두에는 효소와 화학당론적결합(1 : 1 stoichiometric binding)을 하는 비경쟁성 inhibitor 이외에도 최소한 한 가지 이상의 비화학당론적결합을 하는 inhibitor가 함유되어 있음을 의미하며, 실제로 Frattali[13]는 금속에 trypsin과 비화학당론적결합을 하는 Birk type의 AA inhibitor가 상당량 함유되어 있음을 보고한 바 있다.

Fig. 6에서 V_a에 대한 $1-I_f'/I_f$의 기울기는 곧 $[I]'/[E]_0V$이므로 이론상으로는 crude inhibitor extract중의 inhibitor의 양 $[I]_s$를 계산할 수 있다. 이를 위해서는 활성형태의 trypsin의 농도 $[E]_0$를 정확하게 알아야하는데, 대부분의 상품용 trypsin 결정은 순수하지 못하며, 또한 정제를 하였다해도 보관중에 생기는 효소역가의 상실을 막기 어렵다. $[E]_0$를 알기 위해서는 먼저 trypsin의 순도결정실험을 하여야하며, 아마 *p*-nitrophenyl-N-benzyloxycarbonyl-L-lysinate을 이용한 활성부위적정방법[14]을 택할수 있을 것이다. 그러나 많은 경우에 우리는 inhibitor의 절대양을 측정하기

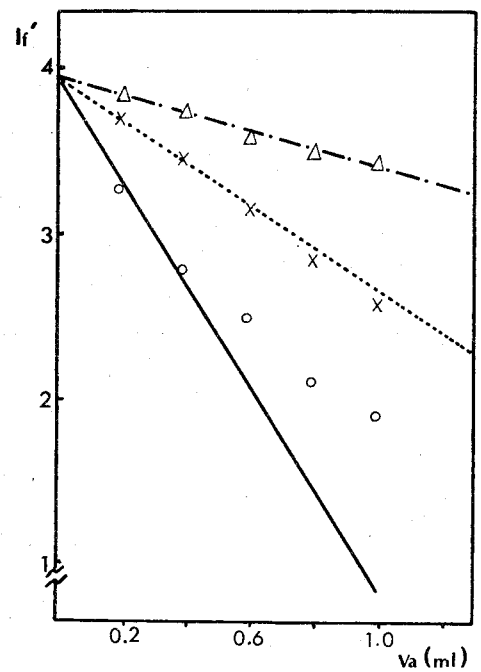

Fig. 5. Relative fluorescence intensity of F-A adduct as a function of volume of the crude inhibitor extracts from various legume seeds. (Refer to eqn. (2)')
—○————○—; soy bean
—△ — · — △—; red-bean
···×·····×···; mung bean

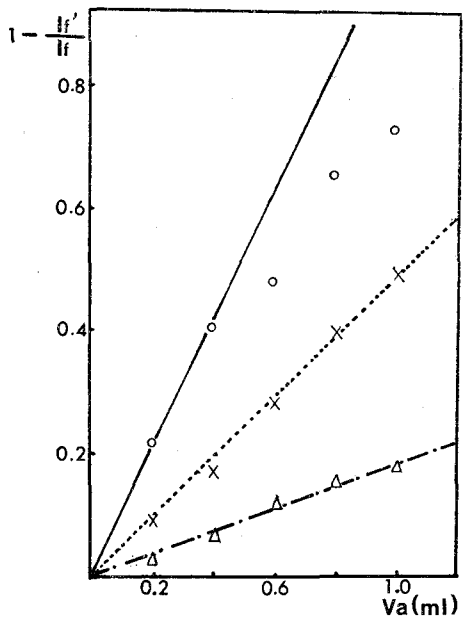

Fig. 6. Antitryptic activity of inhibitor as a function of volume of crude extracts from various legume seeds. (Refer to eqn. (5)')
○○; soy bean
△△; red-bean
××; mung bean

보다는 상당량의 측정으로 족할때가 있으며, 이럴 때는 Fig. 6의 기울기의 비교로서 충분하다.

전술한 대두에서와 같이 비화학당론적 결합을 하는 제 2 의 inhitor 의 존재 때문에 저해활성도와 V_a 간에 직선관계가 성립되지 않을 때는 inhitor 의 수준이 0 에 접근할 때의 기울기(Fig. 6 에서 대두의 경우 실선)를 취하는 것이 타당한 일이다. 왜냐하면 〔Inhibitor〕/〔trypsin〕가 0에 접근하게 되면 실제로 비화학당론적결합의 성질을 갖는 inhibitor 도 trypsin 과 거의 1 : 1 의 화학당론적결합을 하게 되며[9], 이때의 $1-I_f'/I_f$ 는 진정한 저해활성도에 가까워지기 때문이다.

시료로 이용된 세 가지의 건조된 두류종실 단위 그람당 trypsin inhibitor 의 상대적 함량(또는 상대적 저해활성도)은 Fig. 6 의 기울기들로부터 대두, 녹두, 팥에서 그 비율이 1.00 : 0.48 : 0.32로 측정되었다.

비교목적으로 실시된 Kunitz 의 방법에서는 가수분해반응의 진행도가 trypsin 농도에 대하여 일차함수관계를 보이지 않았으며 이는 이미 보고되어 있는 바와 같았다. 여러 연구자들은 이 문제점을 해결하기 위해 casein 의 농도를 조정하거나 또는 흡광도 A대신 $A^{3/2}$로 수학적변환을 시켜 효소농도에 대한 직선관계를 얻으려고 시도하였다.[8,9] 그러나 이러한 일은 순전히 실험결과의 통계학적 처리에 불과하며 이를 뒷받침하는 이론적 근거가 빈약하다. 따라서 실험조건의 변화가 생기면 또한 그것에 맞는 새로운 처리가 필요하게 될지 모른다. 본연구에서도 $A^{3/2}$이 trypsin 의 농도에 대해 일차함수관계를 보여주지 않았다.

fluorescamine 을 이용한 형광법적방법에서는 casein 을 기질로 쓰는 경우에도 전혀 인위적인 숫자변환이 필요없었다. (Fig. 4 참조)

측정감도의 관점에서 비교할 때도, Kunitz 방법에서 사용된 crude inhibitor extract 보다 20배 희석한 시료용액으로도 정량적취급이 가능한 결과들을 얻을 수 있었다. (Fig. 4, 5, 6 참조) 이들 결과는 형광광도기의 기기감도를 noice 가 최소로 유지되는 최상의 조건에 두고 실시한 실험결과인데, 실제로 noice 가 실험에 영향을 미치지 않을만큼 기기감도를 증가시켰을 경우 100배 이상의 희석시료용액으로도 정량성이 높은 결과들을 얻을 수 있었다. 이는 즉 본 형광광도법은 기존의 흡광광도법보다 antitryptic activity 의 측정감도에 있어서 단연 우월함을 입증한다.

본방법은 기질단백질의 선택에 있어서도 융통성이 크다. 즉 어떤 종류의 단백질이건 간에 그것이 arginine 과 lysine 을 포함하고 있고 또한 수용성이기만하면 기질로 사용될 수 있다. 물론 aromatic amino 산잔기를 다량 포함하고 있어야한다거나, 합성기질인 경우 광흡수 chromophore 를 갖고 있어야 한다는 조건도 전혀 요구되지 않는다.

한편 천연단백질을 기질로 사용하여야 하는 경우에는 기존의 방법에서와 같이 반응종결후 단백질을 침전 또는 여과시켜야 하는 번거로움이 필요없으므로 실험과정이 훨씬 단순하고 빠르다는 장점도 아울러 갖고 있다.

초 록

일차아민과 반응하여 형광활성화합물을 형성하는 fluorescamine 을 이용하여 어떤 시료중에 포함된 극미량의 trypsin inhibitor 의 함량 또는 그 활성도를 측정하는 형광방법을 기술하였다. 세 가지 두류종실 즉 대두, 녹두 및 팥의 상대적 antitryptic

activity 측정을 예로들어 본방법의 분석화학 우적수성을 여러 각도에서 검토하였던바, 효소반응속도론적 접근으로 이루어진 본방법은 동일한 접근으로 이루어진 기존의 흡광광도방법과 비교하여 측정감도는 대략 100배이상이였으며 casein과 같은 천연기질을 사용하는 경우에서는 실험과정이 보다 단순하여 빠른 방법으로 판정되었다.

사　　의

본연구를 수행함에 있어서 실험을 도와주신 본학과 대학원생 김계원군과, 또한 본연구에 쓰인 fluorescamine을 보내주신 텍사스공과대학교 송필순박사께 감사의 말 올립니다.

참고문헌

1. Weigele, M., DeBernardo, B.L., Tengi, J.P. and Leimgruber, W.: J. Amer. Chem. Soc., 94 : 5927(1972)
2. Stein, S., Böhlen, P. and Udenfield, S.: Arch. Biochem. Biophys., 163 : 400(1974)
3. Nakamura, H. and Pisano, J.J.: Arch. Biochem. Biophys., 172 : 102(1976)
4. Felix, A.M., Westley, J.W. and Meienhofer, J.: Anal. Biochemistry, 73 : 70(1976)
5. Weissler, A.: Analytical Chem., 46 : 500R (1974)
6. Schwabe, C.: Anal. Biochemistry, 53 : 483 (1973)
7. Kunitz, M.: J. Gen. Physiol., 30 : 291(1947)
8. Miller, B.S., and Johnson, J.A.: Arch. Biochem. Biophys. 32 : 200(1951)
9. Kakade, Simon, N. and Liener, I.E.: Cereal Chem. 46 : 518(1969)
10. 손혜숙 · 박정릉 · 이성우 : 한국농화학회지, 20 : 182(1977)
11. 변시명, 김성곤, 이춘녕 : 한국농화학회지, 7: 85(1966)
12. Udenfield, S., Stein, S., Böhlen, P. and Dairman, W.: Science, 178 : 871(1972)
13. Frattalic, V.: J. Biol. Chem., 244 : 274(1969)
14. Bender, M.L., Kihleffer, J.W. Jr. and Roeske, R.W.: Biochim, Biophys. Acta. 19 : 161(1965)