

# 복상어와 고등어의 Trypsin에 관한 비교효소학적 연구

## 2. 정제 Trypsin의 효소적 성질

변재형 · 조득문\* · 허민수

부산수산대학교 식품영양학과 · \*동래여자전문대학 식품영양과

# Comparative Studies on the Enzymatic Properties of Trypsins from Cat-shark and Mackerel

## 2. Enzymatic Properties of the Trypsins

Jae-Hyeung PYEUN, Deuk-Moon CHO\* and Min-Soo HEU

Department of Nutrition and Food Science, National Fisheries University of Pusan,  
Pusan 608-737, Korea

\*Department of Food and Nutrition, Tongnae Women's Junior College,  
Pusan 607-080, Korea

A comparative study of enzymatic properties between the trypsin from the cat-shark *Cephaloscyllium umbratile*(C-T) and the two trypsins from the mackerel *Scomber japonicus* (M-T<sub>A</sub> and M-T<sub>B</sub>) was carried out following after the previous paper(Pyeun et al., 1991).

Trypsin from cat-shark(C-T) showed the higher heat stability compared to the others (M-T<sub>A</sub> and M-T<sub>B</sub>) and its denaturation constant(K<sub>D</sub>) was  $10.68 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$  at 55°C with BA-p-NA substrate.

The activation energies(E<sub>a</sub>) of the trypsins measured at a temperature range from 30°C to 50°C were estimated to be 4.07 kcal/mole for C-T, 11.61 kcal/mole for M-T<sub>A</sub>, and 8.43 kcal/mole for M-T<sub>B</sub>, respectively. The K<sub>m</sub> values were  $24.9 \times 10^{-5} \text{ M}$  for C-T,  $5.37 \times 10^{-5} \text{ M}$  for M-T<sub>A</sub>, and  $9.65 \times 10^{-5} \text{ M}$  for M-T<sub>B</sub>.

On the other hand, the K<sub>i</sub> values for TLCK and DFP determined by Dixon plot were  $1.50 \times 10^{-6} \text{ M}$  and  $9.28 \times 10^{-6} \text{ M}$  for C-T,  $2.86 \times 10^{-6} \text{ M}$  and  $2.11 \times 10^{-4} \text{ M}$  for M-T<sub>A</sub>, and  $3.90 \times 10^{-6} \text{ M}$  and  $1.60 \times 10^{-4} \text{ M}$  for M-T<sub>B</sub>.

Similar amino acid profiles were showed between three trypsins each other, with few exceptions of M-T<sub>B</sub> containing higher amount of arginine, and the smaller amount of tryptophan in C-T than the others.

### 서 론

수산동물의 소화관 중에 분포하는 trypsin에 관한 연구로 동물의 종류별에 따른 효소의 분포와

분리, zymogen의 활성화 조건 검토, 아미노산 조성 및 효소적 성질 등에 관하여 많은 보고가 있다(Titani 등, 1975; Yoshinaka 등, 1981; Hjemeland와 Raa, 1982; Shin과 Zall, 1986; Genicot 등, 1988; Py-

본 연구는 부산수산대학교 부설 해양산업개발연구소 식량개발연구실의 일부 재정적 후원에 의하여 수행되었음을 부기한다.

eun 등, 1990; Simpson과 Haard, 1990).

그러나 어류 중에서는 진화상 비교적 상관이 깊으면서도 생리 생태적 차이점이 두드러진 연골어류와 경골어류를 대상으로 하여 동일 기능을 갖는 효소인 trypsin에 대하여 그 효소적 차이를 비교 효소학적 관점에서 다른 내용의 연구는 되어있지 않다.

따라서 본 연구는 전보(Pyeun 등, 1991)에 이어 연골어류 중 복상어와 경골어류 중 고등어로부터 분리 정제한 trypsin에 대하여 그 효소적 성질을 비교 분석하고자 시도하였다. 효소적 성질에 관한 실험은 반응속도론적인 분석을 중심으로 수행하였으며, 실험 결과 두 어종이 가진 trypsin의 화학적 및 효소적 성질간에 몇가지 차이점이 인정되었기에 보고한다.

## 재료 및 방법

### 재 료

전보(Pyeun 등, 1991)에서와 같이 복상어(*Cephaloscyllium umbratile*)의 췌장과 고등어(*Scomber japonicus*)의 유문수로부터 trypsin을 추출 정제하여 이들의 효소적 성질의 검토와 아미노산 조성 분석에 사용하였다. 실험에 사용한 Tris(hydroxymethyl) aminomethane, benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide(BA-*p*-NA), tosyl-L-lysine chloromethyl ketone(TLCK)과 diisopropyl fluorophosphate(DFP) 등은 특급시약을 사용하였다.

### 분석방법

단백질 농도 및 trypsin의 활성; 단백질의 농도는 Lowry 등 (1951)의 방법에 따랐으며, trypsin의 활성은 Erlanger 등(1961)의 방법에 따라 각각 측정하였다.

온도 안정성; 각 효소액(효소 농도: 복상어, 25 $\mu$ g/ml; 고등어 trypsin A, 20 $\mu$ g/ml; 고등어 trypsin B, 10 $\mu$ g/ml) 50 $\mu$ 씩을 온도 단계별(30 $^{\circ}$ C, 45 $^{\circ}$ C, 55 $^{\circ}$ C 및 60 $^{\circ}$ C), 시간별(0~120분)로 가온한 후에, 0.5mM BA-*p*-NA · 100mM Tris-HCl, pH 8.0용액 950 $\mu$ 를 가하여 30 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켜 잔류하는 효소의 활성을 측정하였다. 그리고, 별도로 가온하지 않고 반응시켜 측정한 효소의 활성에 대하여 온도단계별, 시간별로 가온한 후에 측정된 효소의 활성을

대비하여 온도 안정성을 각각 계산하고 상대활성으로 나타내었다.

변성속도정수( $K_D$ )와 활성화에너지( $E_a$ ); 변성속도정수는 효소를 각각 30 $^{\circ}$ C, 45 $^{\circ}$ C, 55 $^{\circ}$ C 및 60 $^{\circ}$ C에서 5분간씩 가온한 다음, Hashimoto와 Arai(1985)의 방법에 따랐으며, 활성화 에너지는 Segel(1976)의 방법에 따라 구하였다.

반응속도정수; Michaelis-Menten의 상수( $K_m$ )와 최대반응속도( $V_{max}$ )는 0.025mM~1.0mM의 BA-*p*-NA 기질용액에 대하여 반응 온도 30 $^{\circ}$ C에서, 시간(분)당 유리되어 나오는 *p*-nitroanilide의 양을 측정하여 Lineweaver-Burk의 식으로 구하였다(Dixon과 Webb, 1979). 촉매정수( $K_{cat}$ )는 효소 1 $\mu$ mole이 1분간 유리시키는 반응 생성물의 양으로 계산하였으며, 효소의 반응 효율( $K_{cat}/K_m$ )은 촉매정수에 대하여  $K_m$ 정수를 나누어 구하였다.

TLCK와 DFP에 의한  $K_i$ 정수; TLCK의 농도(0.25~40 $\mu$ M)와 DFP의 농도 (50~400 $\mu$ M)를 변화시키면서 BA-*p*-NA 기질의 농도를 0.5mM로 고정시켜 반응시켰을 때의 저해제 정수( $K_i$ )를 Dixon의 식에 따라 구하였다(Dixon과 Webb, 1979).

아미노산 조성; 정제 효소와 6N HCl을 시험관에 취하여 감압상태로 밀봉한 다음, 24, 48 및 72시간 110 $^{\circ}$ C의 사조(sand bath)속에서 분해시켜 감압하에 농축 정용한 것을 아미노산 자동분석기(LKB 4150 type)로써 분석하였다. 그리고 tryptophan은 Hugli와 Moore(1972)의 방법에 따라 7.5N NaOH를 써서 110 $^{\circ}$ C의 사조에서 24시간 가수분해 시킨 후에 감압 농축하여 정용한 것을, 그리고 cysteine은 Spencer와 Wold(1969)의 방법에 따라 0.2M dimethyl sulfoxide를 써서 cysteic acid로 만든 것을 6N HCl로 가수분해하고(110 $^{\circ}$ C, 24시간) 감압 농축하여 정용한 것을 각각 위의 아미노산 자동분석기로서 분석하였다.

또, 아미노산 조성의 측정 결과에서 염기성 아미노산에 대한 산성 아미노산의 비를 구하였으며, 평균소수성(Average hydrophobicity, kcal/residue)은 Bigelow(1967)의 방법에 따라 각 아미노산 측쇄의 평균 소수성값에 각 아미노산의 잔기수를 곱하여 나온 값을 합한 다음, 총 잔기수로서 나누어 구하였다.

결과 및 고찰

온도 변화에 따른 안정성

30℃, 45℃, 55℃ 및 60℃의 각 온도에서 시간의 경과에 따라 온도 차이가 효소활성에 미치는 영향을 측정된 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 복상어 trypsin은 30℃에서 120분까지 활성의 변화가 없었으나, 고등어 trypsin B는 20분 경과후 잔류활성이 약 80%, 고등어 trypsin A는 약 50%로 나타났으며, 이후 완만한 활성의 감소를 보였다.

45℃에서의 가온에서는 복상어 trypsin의 활성은 10분 경과후 잔류활성이 약 80%였으나, 이후 완만하게 감소하여 120분 경과후에는 약 70%의 잔류활성을 나타내었고, 고등어 trypsin B는 10분 경과후에 약 70%, 고등어 trypsin A는 약 60%의 잔류활성을 각각 보였다. 그리고 60℃에서 가온하였을 때, 복상어 trypsin은 120분 후에 활성이 거의 나타나지 않는데 비하여, 고등어 trypsin B는 40분 경과후에, 그리고 고등어 trypsin A는 20분 후에 각각 활성이 소멸하였다. 결과적으로 세 trypsin의 열 안정성을 비교했을 때, 복상어 trypsin이 가장 안정하였고, 이어서 고등어 trypsin B와 고등어 trypsin A의 순으로 나타났다.

일반적으로 효소의 열 안정성은 완충액의 pH, 이온강도 등에 의하여 영향을 받는 것으로 알려져 있으며 (Segel, 1976; Dixon과 Webb, 1979), 본 실험에서 3종 trypsin의 온도의 영향에 따른 안정성을 검토한 결과 각 효소의 최적 반응조건 (Pyeun 등, 1991)보다 낮은 온도 조건에서도 불안정한 것은 효소의 반응조건에 관하여 실험한 경우와 같이 기질 또는 용질이 효소와 공존할 때에는 효소가 기질 또는 용질에 의하여 열에 대해 보호를 받는 효과가 있으나, 효소만을 가열할 때는 효소 그 자체가 직접적으로 외부온도에 노출되어 쉽게 변성을 일으키는 데 기인하는 것으로 판단되었다.

변성속도정수와 활성화 에너지

3종의 trypsin에 대하여 30℃, 45℃, 55℃ 및 60℃의 각 온도에서 측정 계산한 변성속도정수를 Table 1에 나타내었다. 각 온도 조건에서 5분간 가온한 후에 효소 활성의 변화를 측정된 결과, 55℃에서 측정된 변성속도상수값은 복상어 trypsin이  $10.68 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ , 고등어 trypsin A가  $47.18 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$  그리고 고등어 trypsin B가  $34.06 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 로서 복상어 trypsin은 고등어 trypsin A에 비하여 약 4배 이상, 고등어 trypsin B에 비하면 3배이상 안정함을 알 수 있었다.

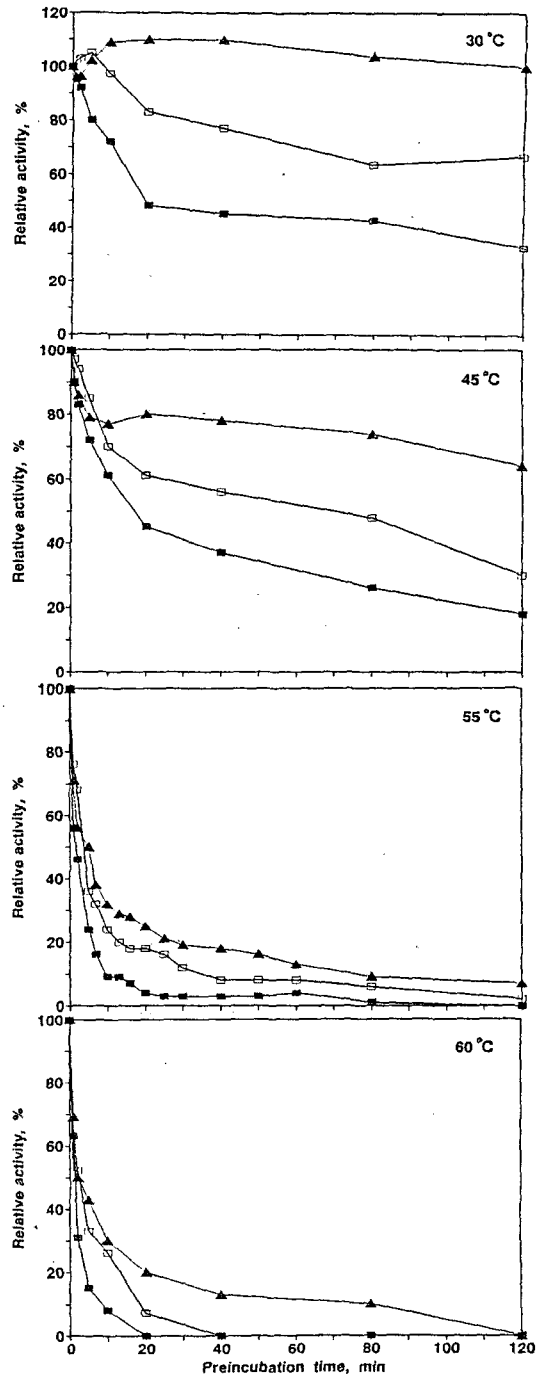


Fig. 1. Effect of the Elongated Preincubation Time at 30℃, 45℃, 55℃ and 60℃ of Preincubation Temperature on the Amidase Activity of Cat-shark Trypsin, Mackerel Trypsin A and Mackerel Trypsin B.

The buffer used was 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0  
 Symbols: ▲, cat-shark trypsin; ■, mackerel trypsin A; □, mackerel trypsin B

Table 1. Denaturation constants calculated by determining amidase activity of cat-shark trypsin, mackerel trypsin A and mackerel trypsin B in regard with activity variation of the enzymes vs reaction time (Unit; sec<sup>-1</sup>)

Condition of temperature	Trypsins		
	Cat-shark	Mackerel A	Mackerel B
30°C	-	7.49×10 <sup>-4</sup>	-
45°C	7.85×10 <sup>-4</sup>	10.09×10 <sup>-4</sup>	5.50×10 <sup>-4</sup>
55°C	10.68×10 <sup>-4</sup>	47.18×10 <sup>-4</sup>	34.06×10 <sup>-4</sup>
60°C	23.18×10 <sup>-4</sup>	64.18×10 <sup>-4</sup>	36.62×10 <sup>-4</sup>

각각의 가온온도를 절대온도로 환산한 후에 그 역수에 대한 효소의 고유활성의 대수값을 계산하여 얻은 식으로부터 구한 활성화 에너지를 Fig. 2에 나타내었다.

활성화 에너지는 복상어 trypsin 4.07 kcal/mole, 고등어 trypsin A 11.61 kcal/mole 및 고등어 trypsin B 8.43 kcal/mole로서, 복상어의 trypsin이 고등어의 trypsin에 비하여 낮은 활성화 에너지 값을 보였다.

Simpson과 Haard(1984)는 그린랜드산 대구 trypsin의 활성화 에너지를 측정된 결과, 6.6 kcal/mole로서 Ooshiro(1971)가 보고한 고등어 proteinase의 활성화 에너지(6.5 kcal/mole)와 비슷한 값을 보였으며, 송아지 trypsin의 활성화 에너지(12.7 kcal/mole)와 비교할 때 어류 trypsin의 활성화 에너지가 낮은 것을 알 수 있었는데, 이들 어류에 대하여 보고된 활성화 에너지는 본 실험의 복상어와 고등어 trypsin의 활성화 에너지와 큰 차이가 없었음을 알 수 있었으나, 복상어 trypsin의 활성화 에너지는 비교적 낮았다.

효소반응에 있어서도 다른 화학반응에서와 같이 온도의 상승과 더불어 반응속도가 증가되지만, 효소의 경우는 일정온도보다 높게되면 많은 에너지를 외부로부터 흡수하게 되어 효소의 3차 구조가 변화함으로써 불활성화를 초래하게 되며, 따라서 일정한 수준까지의 온도 상승에서는 효소와 기질의 충돌횟수의 증가에 의하여 반응은 촉진되지만 그 한계를 넘어서면 효소의 구조가 영향을 받게 되어 활성이 급격히 떨어지는 관계를 보인다(Dixon과 Webb, 1979).

반응속도정수

BA-p-NA 합성기질의 농도를 변화시키면서 효소의 활성을 측정하여 Lineweaver-Burk의 식으로

Km정수를 구하여 나타내었다(Table 2). 이때 각 trypsin의 Km은 복상어 trypsin 24.86×10<sup>-5</sup>M, 고등어 trypsin A 5.37×10<sup>-5</sup>M, 고등어 trypsin B 9.65×10<sup>-5</sup>M 이었으며, 복상어 trypsin의 Km이 고등어 trypsin에 비하여 큰것은 BA-p-NA 기질에 대한 친화도가 상대적으로 낮은 것을 암시하고 있다. 최대 반응속도는 고등어 trypsin B가 3.57 μ/mg로서 가장 빨랐으며, 촉매정수는 복상어 trypsin이 113.52 min<sup>-1</sup>로서 가장 높았고, 각 효소의 기질에 대한 이용 효율은 고등어 trypsin A가 1.14 min<sup>-1</sup>/μM로서 BA-p-NA 기질에 대한 친화도가 가장 큰 것을 알 수 있었다. 효소와 기질간의 반응효율은 고등어 trypsin A가 가장 크고, 다음으로 고등어 trypsin B와 복상어 trypsin의 순이었다. Martinez 등(1988)의 보고에 의하면, 멀치(*Engraulis encrasicolus*) 내장에서 정제한 trypsin A와 B의 BA-p-NA 기질에 대한

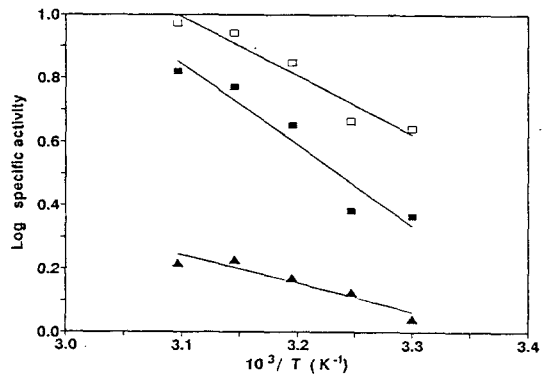


Fig. 2. Arrhenius plots for BA-p-NA Hydrolysis by Temperature Dependence in Cat-Shark Trypsin, Mackerel Trypsin A and Mackerel Trypsin B.

The symbols are as described in legend to Fig. 1.

Activation energy:

- Cat-shark trypsin; 4.07(kcal/mole).
- Mackerel trypsin A; 11.61(kcal/mole).
- Mackerel trypsin B; 8.43(kcal/mole).

Table 2. Kinetic parameters of cat-shark trypsin, mackerel trypsin A and mackerel trypsin B

Parameter	Trypsins		
	Cat-shark	Mackerel A	Mackerel B
Km(μM)	248.59	53.70	96.50
Vmax(U/mg)	1.98	2.58	3.57
k <sub>cat</sub> (min <sup>-1</sup> )	113.52	61.20	76.61
k <sub>cat</sub> /Km (min <sup>-1</sup> /μM)	0.46	1.14	0.79

반응속도정수는  $K_m$ 이 각각  $830\mu M$ 과  $660\mu M$ 로서 복상어와 고등어의  $K_m$ 정수보다 컸으나, 촉매정수는 각각  $93.0\text{ min}^{-1}$ 와  $192.0\text{ min}^{-1}$ 로서 고등어 trypsin A와 B보다는 높았다. 또한 Genicot 등(1988)은 송어(*Salmo gairdneri*)와 남극어(*Paranotothenia magellanica* FORSTER)의 유문수로부터 trypsin을 정제하여  $35^\circ\text{C}$ 에서 BA-p-NA기질에 대하여 그 반응속도정수를 비교 하였는데, 송어 trypsin과 남극어 trypsin의  $K_m$ 값은 각각  $228\mu M$ 과  $202\mu M$ 로서 복상어 trypsin의  $K_m$ 과 비슷하였고, 효소와 기질간의 상호반응효율은 각각  $0.41\text{ min}^{-1}/\mu M$ 과  $0.87\text{ min}^{-1}/\mu M$ 로서 송어 trypsin은 복상어 trypsin과 그리고 남극어 trypsin은 고등어 trypsin B와 각각 비슷한 값을 보였으나, 특히 고등어 trypsin A는 다른 어류의 trypsin보다도 기질과의 상호반응효율이 높았다.

TLCK와 DFP에 의한 저해제 정수( $K_i$ )

TLCK와 DFP를 농도별로 용해시켜 만든 반응혼액으로 반응속도를 측정하고 Dixon식을 적용하여 구한  $K_i$ 정수는 TLCK에 대하여 복상어 trypsin이  $1.50 \times 10^{-6} M$ , 고등어 trypsin A는  $2.86 \times 10^{-6} M$ , 그리고 고등어 trypsin B는  $3.90 \times 10^{-6} M$  이었으며 (Fig. 3), DFP에 대하여는 복상어 trypsin이  $9.28 \times 10^{-6} M$ , 고등어 trypsin A가  $2.11 \times 10^{-4} M$ , 고등어 trypsin B는  $1.60 \times 10^{-4} M$ 이었다(Fig. 4). 이들 저해제 정수 중 TLCK에 있어서는 고등어 trypsin B가 가장 높은데 반하여 복상어 trypsin이 가장 낮았고, DFP에 있어서는 고등어 trypsin A가 가장 높은 값을 보였으며, 역시 복상어 trypsin이 가장 낮은 값을 보였다. 그리고 복상어의 trypsin은 낮은 저해제의 농도에서도 예민한 반응을 보였다. 세 효소 모두 DFP보다는 TLCK가 더욱 예민한 반응을 보였다.

Shin과 Zall(1986)은 대구의 유문수에서 분리한 trypsin 유사효소를 casein기질에 대하여 그 친화성을 실험한 결과, TLCK보다 DFP가 오히려 더 예민하게 반응한다는 보고와는 차이가 있었으나, Pyeun 등(1990)이 대서양 청어의 일종인 menhaden의 장기로부터 두 종류의 trypsin 유사효소를 정제하여 BA-p-NA 합성기질에 대한 DFP와 TLCK의 영향을 조사한 결과는 TLCK가 DFP보다 훨씬 더 예민하다는 보고와 일치하였다.

이는 저해제 DFP의 영향을 검토하는 반응과정에서 DFP를 isopropanol로서 용해시켜 반응시키면 안정하지만, 수용액으로 하여 반응시키면 그 저해작용이 pH조건에 따라(pH 7.0에서 110분, pH 7.5

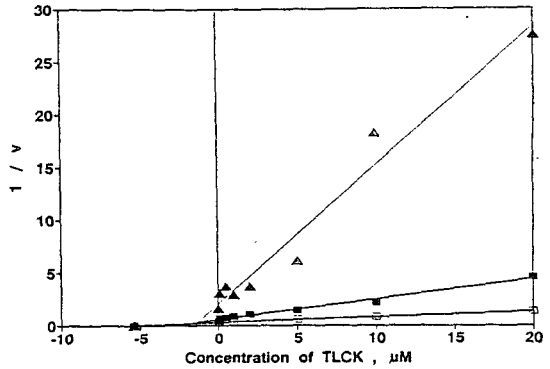


Fig. 3. Dixon plots for the Inhibitory Effects of TLCK on the BA-p-NA Hydrolysis by Cat-shark Trypsin, Mackerel Trypsin A and Mackerel Trypsin B.

The symbols are as described in legend to Fig. 1.

The reaction was performed at pH 8.0 and  $30^\circ\text{C}$

The reaction mixture contained 0.5 mM BA-p-NA as a substrate and various concentrations of TLCK in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0.

$K_i$  value:

- Cat-shark trypsin;  $K_i=91.50 \times 10^{-6} M$
- Mackerel trypsin A;  $K_i=2.86 \times 10^{-6} M$
- Mackerel trypsin B;  $K_i=3.90 \times 10^{-6} M$

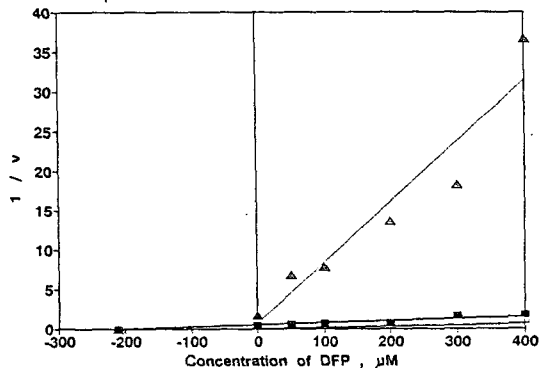


Fig. 4. Dixon plots for the Inhibitory Effects of DFP on the BA-p-NA Hydrolysis by Cat-shark Trypsin, Mackerel Trypsin A and Mackerel Trypsin B.

The symbols are as described in legend to Fig. 1.

The reaction condition was the same as in Fig. 3.

$K_i$  value:

- Cat-shark trypsin;  $K_i=9.28 \times 10^{-6} M$
- Mackerel trypsin A;  $K_i=2.11 \times 10^{-4} M$
- Mackerel trypsin B;  $K_i=1.60 \times 10^{-4} M$

에서 55분, pH 8.0에서 35분) 반감한다는 보고(Power와 Harper, 1986)와 같이 본 실험에서 나타난 DFP의 영향도 반응혼액의 조제에 쓴 isopropanol의 영향인 것으로 판단된다.

이 결과는 다른 어류의 trypsin의 저해제에 대한 보고 중(Hjelmeland와 Raa, 1982; Yoshinaka 등, 1984; Simpson과 Haard, 1984; 1990; Shin과 Zall, 1986; Martinez 등, 1988; Pyeun 등, 1990) 저해제의 농도에 따라 저해정도의 차이는 있으나, 전체적으로는 비슷한 경향을 나타내었다.

#### 효소의 아미노산 조성

정제된 복상어 trypsin과 고등어 trypsin A 및 B를 각각 6N 염산으로 24시간, 48시간 및 72시간 동안 110°C의 사조(sand bath)에서 분해시켜 감압하에 농축 정용한 다음, 아미노산 자동분석기로서 분석하여 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 이때 tryptophan, cysteine, serine을 제외한 수치는 각 가수분해시간에 따른 값 중 가장 높은 값을 취하여 아미노산 조성으로 해석하였다. 분석 결과에 의하면, 세 효소는 모두 산성아미노산(aspartic acid, glutamic acid)과 serine 및 glycine을 많은 양 함유하였으나, methionine, tyrosine 및 tryptophan은 그 함량이 적었다. 이들 아미노산 조성은 현재까지 보고된 다른 어류의 trypsin(정어리의 trypsin 유사효소; Murakami와 Noda, 1981: 남극어(antarctic fish, *Paranotothenia magellanica* Forster)와 송어의 trypsin; Genicot 등, 1988: 잉어의 trypsin; Cohen 등, 1981: 그린랜드산 대구의 trypsin; Simpson과 Haard, 1984)에 비하면 미미한 차이를 보였다. 그러나 고등어 trypsin B의 arginine 함량은 16개의 잔기를 보유하여 다른 trypsin보다 2배 이상 많이 함유하는 특징을 보였다.

또 이들 효소들은 염기성 아미노산에 대한 산성 아미노산의 비율에 있어서도 복상어 trypsin이 3.57, 고등어 trypsin A와 B가 각각 3.36과 2.23으로 서로 간에 차이가 있음을 알 수 있었으며, 고등어 trypsin B의 arginine 잔기수가 다른 효소에 비하여 많았기 때문에 그 비율에서 특히 큰 차이를 보였다. Simpson과 Haard(1984)가 보고한 그린랜드산 대구(*Gadus ogac*)의 trypsin은 염기성 아미노산에 대한 산성 아미노산 잔기수의 비가 5.24로서 본 실험의 복상어와 고등어 trypsin에서 측정된 비보다는 훨씬 높은 값을 보였다.

평균 소수성은 복상어 trypsin 0.92 kcal/residue, 고등어 trypsin A 0.97 kcal/residue 및 고등어 tryp-

sin B 0.91 kcal/residue로서 고등어 trypsin A가 비교적 높은 값을 보였다. Kiel(1971)의 보고에 의하면, 돼지, 송아지 및 새우의 각 trypsin의 평균소수성값은 각각 1.08, 1.04 및 0.91로서 복상어 trypsin과 고등어 trypsin B는 새우 trypsin과는 비슷한 값을 보였으나, 육상 포유동물의 소수성값보다는 낮았다.

일반적으로 단백질 분자의 물리적 성질과 분자를 구성하는 비극성 아미노산의 측쇄의 수 사이에는 깊은 관련성이 있으며, 특히 소수성결합이 단백질의 구조를 안정화하는데 있어서 소수결합보다 더 크게 작용한다는 보고(Bigelow, 1964)에 비추어, 본 연구의 복상어와 고등어의 trypsin은 육상동물의 trypsin에 비하면 상대적으로 온도에 대하여 보다 불안정하다는 사실을 뒷받침하였다.

## 요 약

전보(Pyeun 등, 1991)에 이어 복상어의 횡장에서 정제한 trypsin과 고등어 유문수에서 정제한 trypsin A 및 trypsin B에 대하여 그 효소적 특성을 비교 검토한 내용을 요약하면 다음과 같다.

1. 30°C, 45°C, 55°C 및 60°C의 각 온도 조건에서 효소의 안정성을 검토한 결과, 복상어의 trypsin이 고등어의 두 trypsin 보다 안정하였으며, 고등어 trypsin A는 가장 불안정하였다. 55°C에서의 변성속도정수는 복상어 trypsin이  $10.68 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ , 고등어 trypsin A는  $47.18 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ , 그리고 고등어 trypsin B는  $34.06 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 로서 고등어 trypsin A의 변성속도가 가장 빨랐다. 활성화에너지는 복상어 trypsin이 4.07 kcal/mole, 고등어 trypsin A는 11.61 kcal/mole, 그리고 고등어 trypsin B는 8.43 kcal/mole이었다.

2. Km정수는 복상어 trypsin이 248.59 μM, 고등어 trypsin A는 53.7 μM, 그리고 고등어 trypsin B는 96.50 μM이었다.

3. Dixon식에서 구한 저해제 TLCK에 대한 저해제 정수는 복상어 trypsin이  $1.50 \times 10^{-6} M$ , 고등어 trypsin A는  $2.86 \times 10^{-6} M$ , 그리고 고등어 trypsin B는  $3.90 \times 10^{-6} M$ 였으며, 저해제 DFP에 대한 저해제 정수는 복상어 trypsin이  $9.28 \times 10^{-6} M$ , 고등어 trypsin A는  $2.11 \times 10^{-4} M$ , 그리고 고등어 trypsin B는  $1.60 \times 10^{-4} M$ 이었다.

4. 복상어와 고등어 trypsin의 효소적 특성의 두드러진 차이는 pH와 온도에 대해서 복상어의 tryp-

Table 3. Amino acid compositions of cat-shark trypsin, mackerel trypsin A and B (residue/mol-protein)<sup>1)</sup>

Amino acid	Cat-shark			Mackerel A			Mackerel B		
	24hr	48hr	72hr	24hr	48hr	72hr	24hr	48hr	72hr
Non-polar									
Ala	8.0	7.9	7.8	14.2	13.4	13.0	9.4	11.2	10.8
Ile	8.0	8.4	7.9	14.2	13.0	12.2	11.5	11.8	11.8
Leu	17.1	13.9	14.2	13.7	12.3	11.9	13.2	11.9	11.0
Met	1.3	1.3	0.8	4.2	4.2	4.2	0.8	0.8	0.8
Phe	8.4	8.0	7.1	4.2	4.7	4.7	3.8	3.7	3.0
Pro	10.4	8.3	8.1	15.1	14.5	14.5	14.8	13.6	13.6
Trp <sup>3)</sup>	0.7			4.9			6.0		
Val	15.8	13.9	15.8	19.4	18.3	18.2	16.8	15.8	18.0
Polar									
Negative charge									
Asp	26.3	24.4	22.8	21.3	24.0	18.7	25.3	21.2	22.5
Glu	24.1	19.3	17.8	23.2	17.9	18.8	24.3	19.6	15.0
Positive charge									
Arg	4.7	5.0	5.0	6.7	7.7	6.9	15.0	15.4	15.4
Lys	9.3	8.1	7.9	5.9	5.5	5.1	6.1	5.0	5.0
Uncharged at pH 7									
Cys <sup>4)</sup>	13.0			15.4	26.7		16.1		
Gly	17.4	16.9	15.7	23.2	11.8	23.9	23.0	24.9	24.9
His	10.1	11.2	11.9	6.0	16.7	11.4	9.8	13.0	13.0
Ser <sup>5)</sup>	18.0	16.3	14.5	19.5	13.5	13.5	20.0	12.2	12.2
Thr	18.3	18.8	17.0	12.3	2.6	10.5	11.7	8.3	8.3
Tyr	2.1	4.7	7.0	3.9			1.9		
Total residues				220.4	219		245.2	246	243.8
Total amount				28,000			30,555		30,836
Corrected M. W.				24,058			26,127		26,444
Acidic A./Basic A.				3.57			3.36		2.23
Avg. hydrophobicity <sup>6)</sup> (kcal/residue)				0.92			0.97		0.91

The values in parentheses are the nearest integer.

- 1) Molecular weights of the trypsins adapted in the calculation of residue/mol-protein were based on the values determined by Sephadex G-75 gel filtration (Molecular weights of the trypsins: Cat-shark, 21,500 Da; mackerel a, 23,700 Da; mackerel B, 21,500 Da).
- 2) This was taken the highest value among the results of 24hr, 48hr, and 72hr hydrolysed samples.
- 3) Tryptophan was determined by analysing the alkaline-hydrolysed sample (LKB., 1982).
- 4) Cysteine was analysed in accordance with the method of Spencer and Wold(1969).
- 5) Serine was determined by extrapolation of the values analysed the 24hr, 48hr and 72hr hydrolysed samples.
- 6) Average hydrophobicity was calculated by the method of Bigelow(1967).

sin은 고등어의 두 trypsin보다 알칼리성측과 고온에 대해 안정하였으며, 저해제에 의하여서는 복상어 trypsin이 보다 예민하게 나타났다. 또한 BA-p-NA 합성기질에 대한 친화성에 있어서는 고등어의 두 trypsin이 복상어의 trypsin보다 높은 것을 알 수 있었다.

5. 아미노산 조성은 새 효소 모두 비슷하였으나, 고등어 trypsin B의 경우 arginine의 함량이 높은 특징을 보였다. 산성아미노산과 염기성아미노산의 비는 복상어 trypsin이 3.57, 고등어 trypsin A는 3.36, 그리고 고등어 trypsin B는 2.23이었다.

### 참 고 문 헌

- Bigelow, C. C. 1967. On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure. *J. Theoret. Biol.*, 16, 187~211.
- Cohen, T., A. Gertler and Y. Birk. 1981. Pancreatic proteolytic enzymes from carp(*Cyprinus carpio*)-II. Kinetic properties and inhibition studies of trypsin, chymotrypsin and elastase. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69B, 647~653.
- Dixon M. and E. C. Webb. 1979. *Enzymes*, 3rd Ed., Longman, pp. 47~62, 138~140, 164~169.
- Erlanger B. F., N. Kokowsky and W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 95, 271~278.
- Genicot, S., G. Feller and C. Gerday. 1988. Trypsin from Antarctic fish(*Paranotothenia magellanica* Forster) as compared with trout(*Salmo gairdneri*)trypsin. *Comp. Biochem. Physiol.*, 90B, 601~609.
- Hashimoto, A. and K. Arai. 1985. The effect of pH on the thermostability of fish myofibrils. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 51, 99~105(in Japanese).
- Hjelmeland, K. and J. Raa. 1982. Characteristics of two trypsin type isozymes isolated from the Arctic fish capelin(*Mallotus villosus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 71B, 557~562.
- Hugli, T. E. and S. J. Moore. 1972. Determination of tryptophan content of protenin by ion exchange chromatograph of alkaline hydrolysates. *J. Biol. Chem.*, 247, 2828~2834
- Kiel, B. 1971. *The Enzymes*. Vol.III. Ed. by P. D. Boyer. Academic Press, New York, pp. 249~275.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265~275.
- Martinez, A., R. L. Olsen and J. L. Serra. 1988. Purification and characterization of two trypsin-like enzymes from the digestive tract of anchovy *Engraulis encrasicolus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91B, 677~684.
- Murakami, K. and M. Noda. 1981. Studies on proteinases from the digestive organs of sardine. I. Purification and characteriazion of three alkaline proteinases from the pyloric caeca. *Biochim. Biophys. Acta*, 658, 17~26.
- Ooshiro, Z. 1971. Studies on proteinase in the pyloric caeca of fishes-III. Substrate specificity of mackerel proteinase. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 37, 638~641(in Japanese).
- Power, J. C. and J. W. Harper. 1986. Inhibitors of serine proteinases. In *Proteinase inhibitors*. (Ed. by Barrett, A. J. and G. Salvesen), Elsevier, Amsterdam, pp. 66~73.
- Pyeun, J. H., H. R. Kim and J. S. Godber. 1990. Comparative studies on the enzymatic properties of two trypsin-like enzymes from menhaden, *Brevoortia tyrannus*. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 23, 12~20(in Korean).
- Pyeun, J. H., D. M. Cho and M. S. Heu. 1991. Comparative studies on the enzymatic properties of trypsins from cat-shark and mackerel. 1. Purification and reaction conditions of trypsins. *Bull. Korean Fish. Soc.* 24, 275~290(in Korean).
- Segel, I. H. 1976. *Biochemical calculations*, Wiley, New York, pp. 208~224.
- Shin, D. H. and R. R. Zall. 1986. Purification and Identification of a trypsin-like enzyme from the pyloric caeca of cod. *Process Biochem.*, Feb., 11~15.
- Simpson, B. K. and N. F. Haard. 1984. Trypsin from Greenland cod, *Gadus ogac*. Isolation and comparative properties. *Comp. Biochem. Phy-*



- siol., 79B, 613~622.
- Simpson, B. K., M. V. Simpson and N. F. Haard. 1990. Properties of trypsin from the pyloric ceca of Atlantic cod(*Gadus morhua*). J. Food Sci., 55, 959~961.
- Spencer, R. L. and F. Wold. 1969. A new convenient method for estimation of total cysteine-cysteine in proteins. Anal. Biochem., 32, 185~190.
- Titani, K., L. H. Ericsson, H. Neurath and K. A. Walsh. 1975. Amino acid sequence of dogfish trypsin. Biochemistry, 14, 1358~1366.
- Yoshinaka, R., M. Sato and S. Ikeda. 1981. In vitro activation of trypsinogen and chymotrypsinogen in the pancreas of catfish. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish, 47, 1473~1478.
- Yoshinaka, R., M. Sato, T. Suzuki and S. Ikeda. 1984. Enzymatic characterization of anionic trypsin of the catfish(*Parasilusus asotus*). Comp. Biochem. Physiol., 77B, 1~6.

---

1992년 8월 18일 접수

1992년 9월 7일 수리