

## 혈합육어(멸치, 고등어, 황다랭이 및 날개다랭이)의 Trypsin 1. 정제와 반응조건

변재형<sup>†</sup> · 조득문\* · 허민수\*\*

부산수산대학교 식품영양학과

\* 동래여자전문대학 식품영양과

\*\* 통영수산전문대학 식품영양과

## Trypsins from the Dark Fleshed Fish (Anchovy, Mackerel, Yellowfin Tuna and Albacore)

### 1. Purification and Optimal Reaction Conditions

Jae-Hyeung Pyeun<sup>†</sup>, Deuk-Moon Cho\* and Min-Soo Heu\*\*

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

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

\*\*Dept. of Food and Nutrition, National Tongyoung Fisheries Technical College, Chungmu 650-160, Korea

#### Abstract

Deterioration of fish muscle is known to occur more quickly in the dark fleshed fish than in the white fleshed fish, causing by their high intestinal proteolytic activity. Muscle degradation which suffer post-mortem autolysis is affected by trypsin with its unique activation function towards other enzymes. To compare physicochemical and enzymatic properties for the trypsins of the dark fleshed fish, trypsins from the viscera of anchovy (*Engraulis japonica*), and the pyloric caeca of mackerel (*Scomber japonicus*), yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) and albacore (*Thunnus alalunga*) were purified through ammonium sulfate fractionation, benzamidine-Sepharose 6B, DEAE-Sephadex A-50, and Sephadex G-75 chromatography. Two trypsins from mackerel (designated mackerel trypsin A and mackerel trypsin B), and one each from anchovy, yellowfin tuna and albacore were isolated as electrophoretical homogeneity. The purities of anchovy trypsin, mackerel trypsin A and B, yellowfin tuna trypsin, and albacore trypsin increased to 78.1, 4.8, 9.3, 120, and 160-fold, respectively, compared to crude enzyme solutions. Molecular weights of the trypsins from the dark fleshed fish estimated by SDS-polyacrylamide electrophoresis were ranged from 22kDa to 26kDa. The trypsins contained higher amount of glycine, serine and aspartic acid, and less amount of tryptophan, methionine, lysine and tyrosine. Optimal conditions for amidolytic reactions of the enzymes were pH 8.0 and 45°C for anchovy trypsin, pH 8.0 and 50°C for mackerel trypsin A and B, pH 9.0 and 55°C for yellowfin tuna trypsin, and pH 9.0 and 50°C for albacore trypsin. It was supposed that the habitat temperature of the dark fleshed fish is slightly connected with the optimal reaction temperature of the trypsins of the fish.

**Key words** : trypsin, anchovy, mackerel, yellowfin tuna, albacore, benzamidine-Sepharose 6B, viscera, pyloric caeca

#### 서 론

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed  
이 연구는 한국과학재단지정 우수공학연구센터인 부산  
수산대학교 해양산업개발연구소의 연구비 지원에 의해  
수행되었음

동물의 소화관에서 분비되는 단백질분해효소 중  
trypsin은 Northrop과 Kunitz<sup>1)</sup>가 송아지 췌장에서 결정  
상태로 분리하고 그 성질에 관하여 보고한 이래 그  
zymogen의 활성화<sup>2)</sup>를 비롯하여, 고등동물 유래 tryp-

sin의 정제 및 성질에 관한 보고<sup>3,4</sup> 등 비교적 많은 연구가 이루어져 있다.

수산동물의 소화관에 분포하는 trypsin과 관련하여 Reeck 등<sup>5</sup>은 아프리카산 폐어 (*Protopterus aethiopicus*)의 체장 추출액을 이온교환 및 겔 크로마토그래피로 분리하여 pH 8.0에서 강한 활성을 보이는 trypsin을 동정·발표하였으며, Uchida 등<sup>6</sup>은 연어 (*Onchorhynchus keta*) 유문수에 분포하는 trypsin, chymotrypsin 및 carboxypeptidase의 전구체에 관하여 보고하였다.

또, Overnell<sup>7</sup>은 대구의 유문수에, 그리고 Hofer 등<sup>8</sup>은 잉어, 붕어 및 무지개송어 등의 소화관에 분포하는 trypsin의 합성기질 BA-p-NA에 대한 친화성과 온도의존성에 관하여 보고하였으며, 이 밖에 trypsin의 정제 및 활성 최적조건에 관한 보고<sup>9-13</sup>와 효소적 성질에 관한 보고<sup>14,15</sup> 등, 동물의 종류별에 따른 효소적 성질의 차이와 관련하여 많은 연구가 이루어져 있다.

이들 연구들을 종합해 볼 때, 어류는 육상동물에 비하여 조직에 분포하는 효소의 작용이 보다 높은 이유 등으로 자가소화가 빠르다는 사실을 알 수 있으며<sup>16</sup>, 더우기 혈합육 어류는 장기중에 분포하는 단백질 분해효소가 자가소화 과정에서 활발하게 작용하므로서 이들 어종의 사후변화를 촉진하는 원인이 됨을 알 수 있다<sup>17,18</sup>.

이같은 배경에서 본 연구는 어류의 사후변화에 많은 영향을 끼치는 알칼리성 단백질 분해효소인 trypsin의 정제 방법을 검토 확립하고, 어류중에서도 사후변화가 특히 빠른 혈합육어인 우리나라 연근해산 멸치와 고등어, 그리고 원양 열대산 황다랭이 및 날개다랭이의 내장과 유문수에서 각각 trypsin을 정제하여 각 trypsin의 분자량, 아미노산 조성 및 반응 최적조건에 관하여 비교 검토하였기에 보고한다.

## 재료 및 방법

### 재료

멸치 (*Engraulis japonica* : 체장, 8~16cm ; 체중, 10~30g ; 산지, 한국 동해안 ; 어획일, 1991년 5월 7일)는 경남 양산군 기장읍 대변리 선상에서 구입한 것을, 고등어 (*Scomber japonicus* : 체장, 35~41cm ; 체중, 383~726g ; 산지, 한국 남해안 ; 어획일, 1990년 9월 15일)는 부산공동어시장에서 구입한 것을, 그리고 황다랭이 (*Thunnus albacores* : 체장, 104~106cm ; 체중, 13~14kg ; 산지, 북위 10° 부근의 서부 태평양 ; 어획일, 1989년 10월 20일경)와 날개다랭이 (*Thunnus alalunga* : 체장, 85~90cm ; 체중, 8~9kg ; 산지, 북위

30° 부근의 하와이 어장 ; 어획일, 1990년 1월 20일경)는 동원산업(주)에서 냉동상태로 분양받아 각각 내장과 유문수 부분을 절취하고 냉동 보관 (-40°C)하면서 효소정제용 시료로 하였다.

그리고, 본 실험에서 쓴 시약은 모두 특급품을 사용하였으며, 실험에 쓴 수용액은 모두 증류된 탈이온수로써 조제하였다.

### 단백질 농도 및 trypsin의 활성

정제 단계별로 단백질농도는 Lowry 등<sup>19</sup>의 비색법에 따라 측정하였으며, 효소의 활성은 BA-p-NA를 기질로 하는 Erlanger 등<sup>20</sup>의 방법에 따라 측정하였다. 또한, 각 정제 단계별로 천연기질인 Hammarsten casein에 대한 활성도 병행하여 측정하므로써 합성기질로서 측정된 효소활성에 대한 비교 자료로 하였다.

### Trypsin의 정제

#### 탈지 조효소의 조제

Pyeun 등<sup>13</sup>의 조효소 추출방법에 따라 멸치의 내장과 고등어, 황다랭이 및 날개다랭이의 유문수로부터 탈지 조효소를 얻었다.

#### Trypsin의 정제

각각의 탈지 조효소를 30~70% 포화 황산암모늄으로 염석하여 얻은 획분을 1% NaCl을 함유하는 20mM Tris-HCl, pH 7.0 완충액으로 용해시킨 다음, 같은 완충액으로 투석시켰다. 이를 원심분리 (12,000×g, 15분)하여 상층액을 미리 동일한 완충액으로 평형화시킨 benzamidine-Sepharose 6B 친화성 수지를 충전한 칼럼(Φ1.1×12cm)에 주입하고, trypsin의 성질을 지닌 단백질을 선택적으로 흡착시켰다. 그리고, 같은 완충액을 칼럼에 통과시켜 흡착되지 않은 단백질을 흘려내린 후에, 1% NaCl과 125mM benzamidine을 함유하는 20mM Tris-HCl, pH 7.0 완충액으로 칼럼에 통과시켜 흡착된 획분을 용리시킨 다음, 용리된 획분은 이를 다시 한외여과기 (Sartorius SM 14529)로 농축하였다. 이 단계까지는 네 어종의 효소 추출액에 대하여 모두 동일한 과정을 거쳤다.

이후 멸치 trypsin의 정제는 benzamidine-Sepharose 6B 친화성 수지에 흡착 용출된 효소액을 0.1M NaCl을 함유하는 10mM sodium phosphate, pH 7.0 완충액으로 투석하여, 같은 완충액으로 평형화시킨 Sephadex G-75 칼럼(Φ2.6×75cm) 겔 크로마토그래피를 거치고, DEAE-Sephadex A-50 칼럼(Φ1.6×30cm) 이온교

환 크로마토그래피, Sephacryl S-100 칼럼( $\Phi 0.9 \times 55\text{cm}$ ) 겔 크로마토그래피의 단계를 거침으로써 가능하였다.

고등어 trypsin의 경우는 별도로 Pyeun 등<sup>13)</sup>에 의하여 정제된 trypsin으로서 실험하였다.

그리고, 황다랭이와 날개다랭이 trypsin의 정제는 benzamidine-Sephrose 6B 친화성 수지에 흡착 용출된 각 효소액에 대하여, 다음 단계로 황다랭이의 경우는 2회에 걸친 DEAE-Sephadex A-50 이온교환 칼럼 크로마토그래피를 거쳐 BA-p-NA 기질에 대하여 활성을 보이는 획분을 분획한 후에 Sephadex G-75를 채운 칼럼을 써서 겔 여과과정을 거쳐 정제하였다. 날개다랭이의 경우는 benzamidine-Sephrose 6B 친화성 크로마토그래피를 거친 효소액을 DEAE-Sephadex A-50 칼럼 크로마토그래피와 Sephadex G-75 칼럼을 써서 BA-p-NA기질에 대하여 활성을 보이는 획분을 분획한 후에 재차 benzamidine-Sephrose 6B 친화성 칼럼 크로마토그래피를 통과시켜 흡착분을 선별 용리함으로써 정제하였다.

#### 효소의 순도 검정

##### 전기영동에 의한 분석

순도 검정을 위한 분석은 Davis<sup>21)</sup>의 disc-polyacrylamide gel (PAG, 7.5% polyacrylamide gel) 전기영동법에 의하여였으며, 효소 구성 subunit와 그 분자량의 측정에는 Laemmli<sup>22)</sup>의 SDS-PAG(10% polyacrylamide gel) 전기영동법에 따랐다.

##### 겔 여과에 의한 분석

Whitaker<sup>23)</sup>의 방법에 따라 Sephadex G-75 칼럼( $\Phi 0.9 \times 95\text{cm}$ )을 써서 측정하였다.

##### 아미노산 조성

정제 효소를 시험관에 취한 후에 염산을 6N이 되도록 가하여 조정하고 감압상태로 밀봉한 다음, 24, 48 및 72시간 110°C의 사조(sand bath) 속에서 분해시켜 감압하에 농축 정용한 것을 아미노산 자동분석기(LKB 4150type)로써 분석하였다. 그리고, tryptophan은 Huggli와 Moore<sup>24)</sup>의 방법에 따랐고, cysteine은 Spencer와 Wold<sup>25)</sup>의 방법에 따라 시료를 조제하여 아미노산 자동분석기로써 분석하였다. 또, trypsin 분자의 평균소수성(average hydrophobicity)은 Bigelow<sup>26)</sup>의 방법에 따라 계산하였다.

#### 효소반응의 최적조건

##### 최적 pH

각 효소용액(반응혼액 중의 최종농도: 멸치 trypsin A, 2 $\mu\text{g/ml}$ ; 고등어 trypsin A, 2 $\mu\text{g/ml}$ ; 고등어 trypsin B, 1 $\mu\text{g/ml}$ ; 황다랭이 trypsin, 3 $\mu\text{g/ml}$ ; 날개다랭이 trypsin, 3 $\mu\text{g/ml}$ ) 50 $\mu\text{l}$ 에 대하여 0.5mM BA-p-NA를 함유하는 0.1M sodium acetate, pH 5.0; 0.1M sodium phosphate, pH 6.0과 pH 7.0; 0.1M Tris-HCl, pH 8.0과 pH 9.0; 0.1M sodium carbonate, pH 10.0과 pH 11.0 각 완충액의 혼액 950 $\mu\text{l}$ 를 각기 반응(반응온도, 30°C; 반응시간, 5분)시켜 유리되어 나오는 p-nitroanilide의 양을 측정하므로써 효소활성의 pH의존성을 구하였다.

##### 최적 온도

각 효소용액(효소의 농도: 최적 pH 측정시와 같은 농도조건) 50 $\mu\text{l}$ 와 기질(0.5mM BA-p-NA 함유 100mM Tris-HCl, pH 8.0 용액) 950 $\mu\text{l}$ 의 혼액을 20°C에서 5°C 간격으로 65°C까지 반응온도를 조정하면서 각각 5분 간씩 반응시켜 유리되어 나오는 p-nitroanilide의 양을 측정하므로써 반응 최적 온도조건을 구하였다.

위의 반응 최적 pH와 온도조건에 대한 활성도의 표시는 상대활성(%)으로 나타내었다.

#### 결과 및 고찰

##### Trypsin의 정제

멸치의 내장과 고등어, 황다랭이 및 날개다랭이의 유문수에서 전술한 trypsin의 정제방법을 준용하여 각 trypsin의 정제를 시도하였으며, Sephadex G-75 겔 칼럼 크로마토그래피단계까지는 멸치에 있어서 BA-p-NA 기질에 대하여 활성을 보인 하나의 획분을 분리할 수 있었으나, 고등어, 황다랭이 및 날개다랭이의 효소액의 용리획분은 이어서 DEAE-Sephadex A-50 이온교환 칼럼 크로마토그래피로서 용리시킨 결과 BA-p-NA기질에 대하여, 고등어에서는 두개의 획분(각각 mackerel trypsin A와 mackerel trypsin B로 표시)을, 황다랭이와 날개다랭이에서는 각각 하나의 획분을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

다음, 멸치의 겔 여과 획분은 DEAE-Sephadex A-50 이온교환 칼럼 크로마토그래피로써 용리시켜 BA-p-NA 기질에 대하여 분해 활성을 보이는 획분을 분리할 수 있었고(Fig. 1), 고등어 trypsin A와 B, 그리고 황다랭이 trypsin의 획분은 각각 DEAE-Sephadex A-50 이

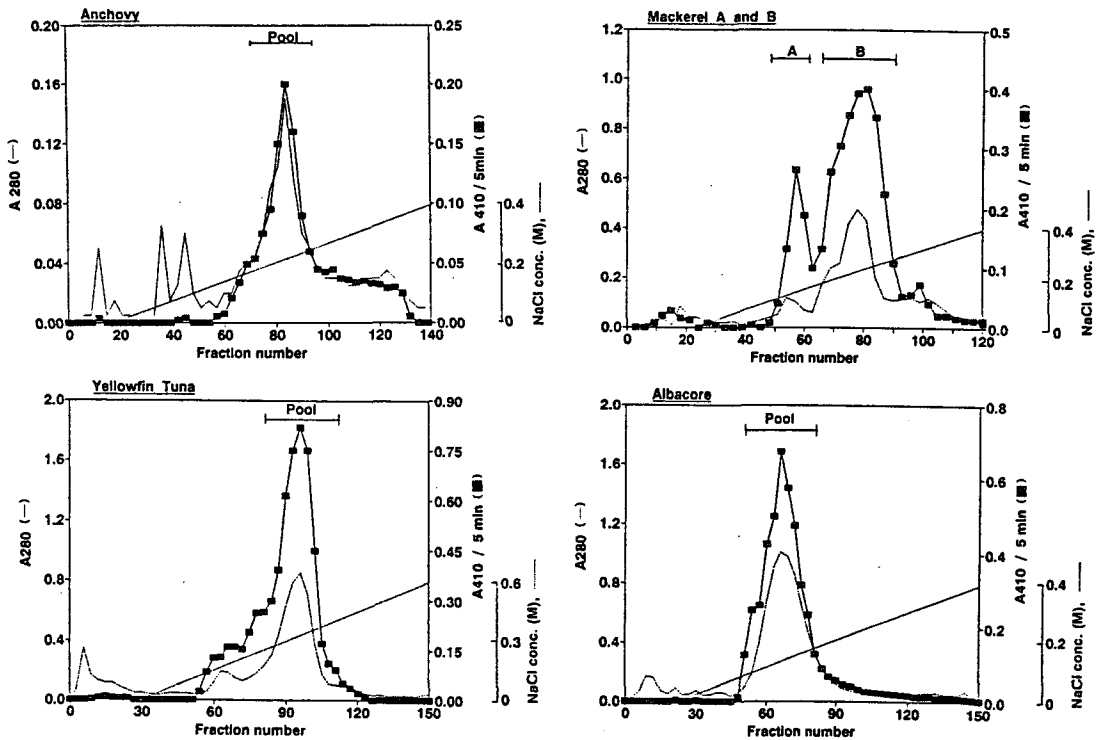


Fig. 1. DEAE-Sephadex A-50 chromatograms of the BA-p-NA positive fraction obtained from the benzamidine-Sepharose 6B affinity chromatography after salting-out by saturated ammonium sulfate solution in the range of 30-70% for purifying the dark fleshed fish trypsins. Flow rate and fraction volume : 30ml/hr and 5ml.

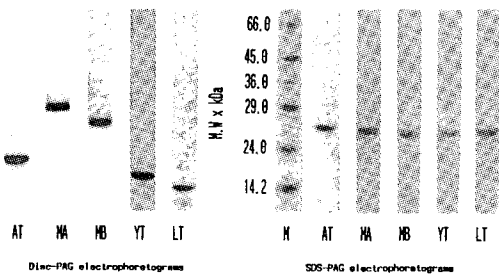


Fig. 2. Disc- and SDS-polyacrylamide gel(PAG) electrophoretograms of the purified trypsins from the anchovy, mackerel, yellowfin tuna and albacore. AT ; anchovy trypsin, MA ; mackerel trypsin A. MB ; mackerel trypsin B, YT ; yellowfin tuna trypsin. LT ; albacore trypsin, M ; SDS-marker protein.

은교환 칼럼에 재차 통과시켰고, 날개다랭이 trypsin의 획분은 Sephadex G-75 겔 칼럼 크로마토그래피로서 용리시켜 효소 이외의 불순단백질을 제거하였다. 이 단계에서 BA-p-NA 기질에 대하여 활성을 보인 각 획분을 disc-PAG 전기영동법으로 정제정도를 검정한 결과, 고등어 trypsin A만을 단일 band로 얻을 수 있었다.

이어서, 멸치 trypsin의 획분은 Sephacryl S-100 겔 크로마토그래피로써, 고등어 trypsin B 획분과 날개다랭이 trypsin 획분은 benzamidine-Sepharose 6B의 친화성 크로마토그래피로써, 그리고 황다랭이의 trypsin 획분은 Sephadex G-75 겔 크로마토그래피로써 각각 용리시켜 BA-p-NA 기질에 대하여 활성을 보인 획분을 한외여과막으로 농축한 후에 증류한 탈이온수로 투석하고, 이 획분들을 각각 disc-와 SDS-PAGE 전기영동법으로 순도를 검정한 결과(Fig. 2), 각각 균질상태의 정제 trypsin이 얻어진 것을 확인할 수 있었으며, 이들 정제 trypsin을 저온(-40°C)에 보관하면서 관련된 효소의 실험에 사용하였다.

각각의 정제 단계에서는 trypsin에 대한 선택적 합성 기질인 BA-p-NA를 써서 단백질 획분에 대하여 효소능을 확인하면서 정제과정을 거친 결과, 불순물을 능률적으로 제거 할 수 있었으며, 최종적으로 고등어로부터는 2종의 trypsin을, 멸치, 황다랭이 및 날개다랭이로부터는 각각 1종의 trypsin이 정제 가능하였다(Fig. 2).

멸치, 고등어, 황다랭이 및 날개다랭이의 trypsin에

Table 1. Purification of trypsins from anchovy, mackerel, yellowfin tuna and albacore

Fraction	Anchovy		Mackerel A		Mackerel B		Yellowfin tuna		Albacore	
	S.A. (U/mg)	Yield (%)	S.A. (U/mg)	Yield (%)	S.A. (U/mg)	Yield (%)	S.A. (U/mg)	Yield (%)	S.A. (U/mg)	Yield (%)
Crude extract (defatted)	0.05 (0.05)	100.0	0.47 (0.29)	100.0	0.47 (0.29)	100.0	0.02 (0.07)	100.0	0.01 (0.05)	100.0
Ammonium sulfate fractionation (30~70%)	0.34 (0.34)	20.4	0.71 (0.36)	98.0	0.71 (0.36)	98.0	0.14 (0.62)	86.0	0.14 (0.41)	96.0
Benzamidine-Sepharose 6B	1.36 (0.89)	7.1	0.99 (0.54)	33.0	0.99 (0.54)	33.0	0.97 (1.06)	64.0	0.91 (1.20)	50.0
Sephadex G-75	1.51 (1.14)	4.3								
DEAE-Sephadex A-50	2.38 (1.46)	3.2	1.77 (0.95)	6.0	1.77 (0.74)	12.0	1.11 (1.35)	27.0	1.12 (1.31)	37.0
DEAE-Sephadex A-50			2.27 (1.16)	2.5	2.39 (1.24)	10.0	1.15 (1.85)	15.0		
Sephadex G-75	3.56 (1.87)	3.2					1.92 (2.01)	14.0	1.52 (1.68)	34.0
Benzamidine-Sepharose 6B					4.38 (2.08)	9.7			2.32 (2.03)	21.0

Numericals in parentheses represent the caseinolytic activity

대하여 각각 정제 단계별로 trypsin의 정제 정도를 측정하여 나타내면 Table 1과 같다.

정제가 완료된 멸치 trypsin의 고유활성은 탈지 조효소에 대하여 3.56U/mg으로 약 78.1배까지 증가하였으며, 고등어 trypsin A와 B의 고유활성은 각각 2.27U/mg와 2.39U/mg으로 정제도는 4.8배와 9.3배까지 증가하였다.

황다랭이 trypsin의 고유활성은 탈지 조효소에 대하여 1.92U/mg으로 약 119.8배까지 증가하였고, 날개다랭이 trypsin의 정제 단계별 고유활성의 증가는 탈지 조효소에 대하여 2.32U/mg로서 165.6배의 증가를 보였다.

정제에 따른 실험결과를 다른 연구 결과들과 비교하여 보면, BA-p-NA를 선택기질로하여 측정된 결과로서 Simpson과 Haard<sup>27)</sup>은 그린랜드 대구 (*Gadus ogac*)의 유문수에서 정제한 trypsin의 고유활성이 0.780U/mg이라고 하였으며, Martinez 등<sup>28)</sup>의 보고에 의하면, 멸치 (*Engraulis encrasicolus*)의 소화관에 분포하는 trypsin의 고유활성은 trypsin A와 B가 각각 2.5U/mg, 4.7U/mg이라고 하였다. Pyeon 등<sup>12)</sup>은 역시 혈합육어인 menhaden (*Brevoortia tyrannus*) trypsin의 고유활성이 trypsin A가 4.40U/mg, trypsin B는 1.91U/mg, 그 정제배율도 15.7배와 6.8배라고 하였고, 복상어 (*Cephaloscyllium umbratile*) trypsin의 고유활성은 0.739U/mg, 정제배율은 186배라고 하였다<sup>13)</sup>.

이들 연구결과에 비추어 활동성 어류인 혈합육어의

trypsin은 백색육 어류의 trypsin에 비하여 대체로 고유활성이 보다 높다는 것을 알 수 있었다.

#### Trypsin의 순도와 분자량

정제 trypsin들은 disc-PAG 전기영동법과 SDS-PAG 전기영동법에 의하여 측정된 결과, 균질 상태임이 확인되었으며 (Fig. 2), Sephadex G-75 겔 여과를 통해서도 각각 단일의 용리 곡선과 활성곡선을 보임으로써 효소의 정제가 완료된 것으로 판정할 수 있었다. 또, 이 효소들은 SDS-전기영동상에서 각기 단일 band로 나타나 단량체인 것으로 판단되었다.

한편, SDS-PAG 전기영동법에 의하여 표준단백질과 대조하여 이들 효소들의 분자량을 측정된 결과 (Fig. 2), 5종의 효소는 분자량이 모두 25kDa 정도였다.

혈합육 어류중 다른 어종의 trypsin에 대한 보고에 의하면, Martinez 등<sup>28)</sup>은 멸치의 소화관에서 정제한 trypsin의 분자량을 역시 SDS-PAG 전기영동법으로 측정된 결과, trypsin A가 27kDa, 그리고 trypsin B는 28kDa이라고 하였으며, Murakami와 Noda<sup>29)</sup>는 정어리 (*Sardinops melanosticta*) trypsin의 분자량을 SDS-PAG 전기영동법으로 측정된 결과 27.6kDa이라고 하여 어종에 따라 trypsin의 분자량에는 다소 차이가 있음을 알 수 있었다.

이들 정제된 trypsin들에 대하여 그 분자량을 분자량 표준단백질을 대조로 하여 Sephadex G-75 겔 크로마토그래피법으로 측정해 본 결과 (Fig. 3), 멸치 trypsin은 26kDa, 고등어 trypsin A와 B는 각각 24kDa과 22kDa

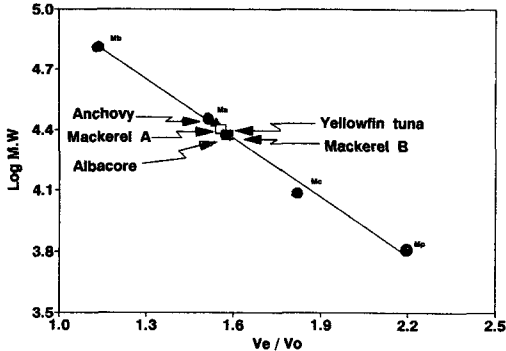


Fig. 3. Estimation of molecular weights of the trypsins from the anchovy, mackerel, yellowfin tuna and albacore by gel filtration.

Molecular weight markers described below were used as the molecular weight standards for gel filtration.

Mp : aprotinin (6,500 Da).

Mc : cytochrome c (12,400 Da).

Ma : carbonic anhydrase (29,000 Da).

Mb : bovine albumin (66,000 Da).

Regression equation :

$$y(MW)=10^{1.52134-0.9710x}, \quad r=0.9960$$

였으며, 그리고 황다랭이와 날개다랭이 trypsin의 분자량은 각각 25kDa와 24kDa으로 SDS-PAG 전기영동법에 의하여 얻어진 값과는 상당한 차이를 보였다.

겔 여과에 의한 단백질의 분자량 측정 결과와 관련하여 Maire 등<sup>30)</sup>은 수용성 단백질의 Sepharose 겔에 의한 분리능을 검정한 결과, 겔 입자의 반경과 분배계수의 관계가 분자량이 40~220kDa인 단백질은 해당 겔 입자의 크기에 의한 영향은 없는 것으로 보고하였으며, Figueiredo 등<sup>31)</sup>에 의한 보고에서도 쥐의 신장 rennin과 cathepsin D를 정제하여 그 분자량을 겔 여과법과 SDS-PAG 전기영동법으로 측정한 결과, 각각 42kDa과 36kDa에 대하여 38kDa과 36kDa이라고 하여 차이가 있음을 보고하였다. 또, Hjelmeland와 Raa<sup>32)</sup>는 빙어 (*Mallotus villosus*)의 장기에서 정제한 2종의 trypsin의 분자량이 SDS-PAG 전기영동법으로는 각각 28kDa, Sephadex G-100의 겔 여과법으로 측정한 결과, 21kDa과 22kDa이라고 하여 각각 차이가 있음을

Table 2. Comparison of amino acid compositions of anchovy, mackerel, yellowfin tuna and albacore trypsins\*1 (residue/mol-protein)<sup>1)</sup>

Amino acid	Anchovy	Mackerel A	Mackerel B	Yellowfin tuna	Albacore
<b>Non-polar</b>					
Ala	11	14	11	15	12
Ile	10	13	12	11	11
Leu	15	13	12	18	17
Met	3	4	1	6	6
Phe	5	5	4	7	5
Pro	11	15	14	12	12
Trp <sup>2)</sup>	2	5	6	2	1
Val	16	19	17	19	17
<b>Polar</b>					
<b>Negative charge</b>					
Asp	32	21	23	18	20
Glu	24	20	20	24	24
<b>Positive charge</b>					
Arg	6	7	15	7	7
Lys	6	6	6	6	5
<b>Uncharged at pH 7</b>					
Cys <sup>3)</sup>	5	15	16	13	18
Gly	28	25	23	25	26
His	9	10	12	9	9
Ser <sup>4)</sup>	30	23	25	19	16
Thr	14	12	12	10	10
Tyr	8	3	2	8	8
Total residues	235	230	231	229	223
Total amount	29629	28208	28951	28690	27988
Corrected M.W.	25399	24068	24793	24568	23974
Acidic A./Basic A.	4.67	3.15	2.05	3.23	3.67
Avg. hydrophobicity <sup>5)</sup> (kcal/residue)	0.86	0.99	0.93	1.04	0.99

\*1 Amino acid compositions were exhibited by determining the highest values in the results of 24hr, 48hr and 72hr hydrolysed samples

<sup>1)</sup> Molecular weights of the trypsins adopted in the analysis of amino acid composition were based on the values determined by SDS-PAGE method

<sup>2)</sup> Tryptophane was determined by analysing the alkaline-hydrolysed sample<sup>24)</sup>

<sup>3)</sup> Cysteine was analysed in accordance with the method of Spencer and Wold<sup>25)</sup>

<sup>4)</sup> Serine was determined by extrapolation of the values analysed the 24hr, 48hr and 72hr hydrolysed samples

<sup>5)</sup> Average hydrophobicity was calculated by the method of Bigelow<sup>26)</sup>

보고하였으며, 이들 보고에 비추어 효소 단백질의 분자량의 측정값은 효소의 분자구조에 따라 많은 영향을 받는다는 사실을 확인할 수 있었다.

따라서 본 연구에서도 분자량의 측정 결과는 측정 방법에 따라 나타내었으며, 이상 분자량 측정 결과를 감안하여 본 실험에서의 효소 분자의 아미노산 조성 분석에 적용한 잔기 수의 계산은 SDS-PAG 전기영동법에 의해 측정된 분자량을 기준으로 하였다.

#### 아미노산 조성

멸치 trypsin, 고등어 trypsin A와 B, 황다랭이 trypsin 및 날개다랭이 trypsin에 염산을 첨가하여 염산의 농도가 6N이 되도록 조정된 후에 24시간, 48시간 및 72시간 동안 110°C의 사조(sand bath)에서 분해시켜 감압하에 농축 정용한 다음, 아미노산 자동분석기로써 분석한 결과를 Table 2에 나타내었다. 이때, tryptophan, cysteine, serine을 제외한 수치는 각 가수분해 시간에 따른 근사치를 평균하여 나타내었으며, 평균 소수성은 각각 소수성 잔기를 갖는 아미노산의 소수성값을 기준으로 하여 계산하였다<sup>26)</sup>.

각종 어류 trypsin의 아미노산 조성을 분석하여 보고한 자료에 의하면, 어종별로 trypsin의 공통점은 glycine, aspartic acid, glutamic acid 및 serine을 다량으로 함유하는 반면, tryptophan, methionine, phenylalanine 및 tyrosine은 대체로 그 함량이 적었다.

이들 효소들은 염기성 아미노산에 대한 산성 아미노산의 잔기수 비율에 있어서도 멸치 trypsin이 4.67, 고등어 trypsin A와 B가 각각 3.15와 2.05였으며, 황다랭이 trypsin이 3.23, 그리고 날개다랭이 trypsin이 3.67로서 각각 차이가 많음을 알 수 있었다.

Simpson과 Haard<sup>27)</sup>가 보고한 그린랜드 대구(*Gadus ogac*)의 trypsin은 염기성 아미노산에 대한 산성 아미노산의 잔기수 비가 5.24, 그리고 Kiel<sup>14)</sup>에 의한 새우 trypsin과 송아지 trypsin은 7.63과 4.65로서 이들 비율만으로 단정짓기는 어렵지만, 혈합육어인 고등어와 다량어류의 trypsin이 염기성 아미노산에 대한 산성 아미노산의 잔기수 비가 상대적으로 낮은 것은 이 효소들이 산성 pH쪽에서 불안정하게 된 일부의 원인을 뒷받침하였다.

평균소수성은 멸치 trypsin이 0.86kcal/residue, 고등어 trypsin A와 B는 각각 0.99kcal/residue와 0.93kcal/residue, 황다랭이 trypsin이 1.04kcal/residue, 그리고 날개다랭이 trypsin이 0.99kcal/residue로서 황다랭이 trypsin이 가장 높았다.

Bigelow<sup>26)</sup> 및 Hazel과 Prosser<sup>33)</sup>에 의하면, 동일 기능의 단백질 분자일 때 열대성 생물의 단백질은 온대나 한대성 생물의 그것에 비하여 평균소수성이 높다고 보고한 내용에 비추어, 멸치의 trypsin은 황다랭이나 날개다랭이의 trypsin에서보다 평균소수성이 다소 낮은 trypsin을 보유하고 있었으며, 앞의 보고들과 깊은 관련성을 보였다.

또한, Bigelow<sup>26)</sup>는 50°C나 그 이상의 온도에서도 서식하는 생물체가 많이 존재하며, 이들 생물의 특정 단백질은 중온생물의 같은 단백질보다 열 안정성이 높다고 하였으며, 그 원인은 분자구조에 수소결합과 소수성결합이 보다 강하게 작용하는 분자적 요인일 것으로 추측하였는데, 이 보고와 관련하여 Simpson과 Haard<sup>27)</sup>는 그린랜드 대구의 trypsin은 평균 소수성이 0.86kcal/residue였다고 하였고, 또 Simpson 등<sup>34)</sup>는 대서양 대구(*Gadus morhua*)의 소수성은 0.846kcal/residue라고 하였는데, 이들 한대성 어류들이 본 연구의 온대성과 열대성 네 혈합육어의 trypsin에 비하여 낮은 평균소수성을 보인 점은 위의 Bigelow<sup>26)</sup>의 제의와 일치하는 결과임을 알 수 있었다.

#### 반응조건

정제된 각 효소에 대하여 BA-p-NA의 분해에 미치는 pH의 영향을 Fig. 4에 나타내었다. pH 5.0에서는 5종의 효소 모두 활성을 나타내지 않았으며, 이후 pH의 증가에 따라 활성도 증가하여 멸치 trypsin, 고등어 trypsin A와 B는 pH 8.0에서, 그리고 황다랭이와 날개

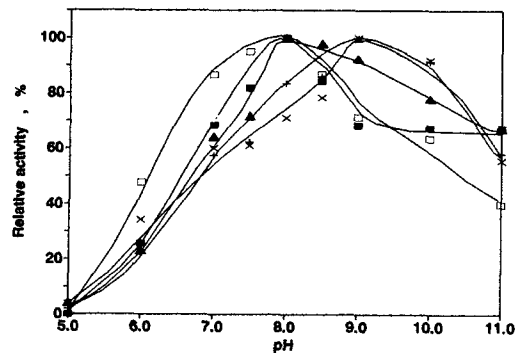


Fig. 4. pH dependence on the hydrolysis of the BA-p-NA substrates by the anchovy trypsin(▲), mackerel trypsin A (□), mackerel trypsin B(■), yellowfin tuna trypsin (+) and albacore trypsin (×).

Buffers used in the reaction mixtures: pH 3.0~4.0, 0.1M glycine-HCl; pH 4.0~6.0, 0.1M sodium acetate-acetate; pH 6.0~8.0, 0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 8.0~9.0, 0.1M Tris-HCl; pH 9.0~10.0, 0.1M glycine-NaOH; pH 10.0~12.0, 0.1M NaOH-NaHCO<sub>3</sub>.

다랭이는 pH 9.0에서 최대의 활성값을 나타내었다.

Hjelmeland와 Raa<sup>32)</sup>는 빙어의 소화관에서 2종의 trypsin A와 trypsin B를 분리 정제하여 BA-p-NA 기질에 대한 반응 최적 pH를 검토한 결과, pH 8.0~9.0에서 가장 높은 활성을 보인다고 하였으며, Uchida 등<sup>35)</sup>의 보고에 의하면, 연어 유문수에서 정제한 2종의 trypsin은 casein 기질에 대한 최적 pH가 pH 10.0~11.0이라고 하였다. 또, Simpson과 Haard<sup>27)</sup>는 그린랜드산 대구의 trypsin은 BA-p-NA기질에 대하여 pH 7.5에서 그리고 casein 기질에 대하여는 pH 9.0~9.5 부근에서 최대 활성을 나타낸다고 하였고, Genicot 등<sup>36)</sup>은 남극어 (*Paranotothenia magellanica* Forster), 송어와 송아지의 trypsin에 대하여 서식환경에 따른 효소적 성질의 비교에 관한 보고에서 BA-p-NA 기질에 대한 최적 pH는 세 효소 모두 pH 8.0이라고 하였으며, 서식환경에 의한 차이는 인정되지 않는다고 보고하였다.

이상의 발표들과 본 실험의 결과를 종합할 때, trypsin의 BA-p-NA기질에 대한 최적 pH조건은 pH 7.6~9.0 범위임을 알 수 있었다.

Fig. 5는 효소활성에 미치는 온도의 영향을 살펴 본 것으로 멸치 trypsin은 45°C, 고등어 trypsin A, B 및 날개다랭이 trypsin은 50°C, 그리고 황다랭이 trypsin은 55°C에서 각각 최대의 활성을 나타내었다. 반응온도 20°C에서의 상대활성은 멸치 trypsin과 고등어 trypsin A는 18%, 고등어 trypsin B는 25%, 황다랭이 trypsin은 29%, 날개다랭이 trypsin은 43%의 활성을 보였으며, 65°C에서는 5종의 효소 모두 거의 활성이 나타나지 않았다.

활성 최적조건을 다른 다른 어류 trypsin의 보고에

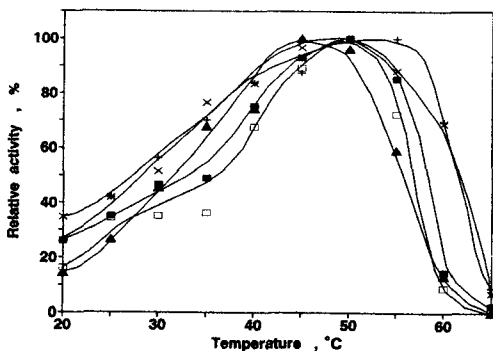


Fig. 5. Temperature dependence on the hydrolysis of the BA-p-NA substrates by the anchovy trypsin(▲), mackerel trypsin A(□), mackerel trypsin B(■), yellowfin tuna trypsin(+) and albacore trypsin(×). The used buffer in the reaction mixtures was 0.1M Tris-HCl, pH 8.0.

의하면, 빙어(*Mallotus villosus*)의 trypsin은 trypsin I과 II가 모두 pH 8.0~9.0, 42°C였다고 하였으며<sup>32)</sup>, 그린랜드 대구 trypsin의 경우는 BA-p-NA합성기질에 대한 활성 최적조건이 Ca<sup>2+</sup>에 의하여 많은 영향을 받는데, 반응 혼합액중에 Ca<sup>2+</sup>이 없을 때는 pH 7.5에서 30°C, Ca<sup>2+</sup>이 20mM 정도 존재할 때는 pH 7.5에서 35°C, Ca<sup>2+</sup>이 200mM 존재할 때는 pH 7.5에서 40°C라고 하여, Ca<sup>2+</sup>이 반응액중에 용존하는 농도에 따라 최적 온도 조건에는 영향이 크다고 하였다<sup>27)</sup>.

그린랜드 대구의 최적 pH조건은 본 실험의 trypsin들에 비하여 중성쪽으로 다소 편향하고 있음을 알 수 있었고<sup>27)</sup>, 남극어의 경우는 pH 8.0에서 60°C였다고 보고하여<sup>36)</sup> 어종에 따라 활성 최적조건에는 차이가 있음을 알 수 있었다.

Trypsin의 활성을 위한 최적 온도조건은 어류의 생태와도 깊은관계가 있는 것으로 보고되어 있으나<sup>27,37)</sup>, 혈합육어에 관한 본 연구의 trypsin에 있어서는 서식 생태에 따른 차이가 인정되지 않았다.

## 요 약

혈합육어 중 연근해 온대산 멸치의 내장과 고등어의 유문수, 그리고 원양 열대산 황다랭이 및 날개다랭이의 유문수를 각각 시료로 하여 trypsin을 분리 정제하였으며, 그 분자량과 아미노산 조성 및 효소의 반응 최적조건에 관하여 비교분석하였다. 실험결과를 요약하면 다음과 같다. 1. 멸치의 내장과 고등어, 황다랭이 및 날개다랭이의 유문수에서 각각 황산암모늄염석, benzamidine-Sepharose 6B 친화성 크로마토그래피, DEAE-Sephadex A-50 크로마토그래피, Sephadex G-75 겔 여과 크로마토그래피 등의 방법을 혼용하여 고등어로부터는 2종의 trypsin(고등어 trypsin A와 고등어 trypsin B로 명명함)을, 그리고 다른 어류로부터는 각각 1종의 trypsin을 분리 정제하였다. 2. 멸치 trypsin과 고등어 trypsin B는 고등어 trypsin A와 황다랭이 trypsin 및 날개다랭이 trypsin에 비하여 그 고유활성이 월등히 높았다. 3. 이들 혈합육어 trypsin의 분자량은 22kDa~26kDa 범위였다. 4. 이들 trypsin은 공통적으로 glycine, serine, aspartic acid를 많이 함유하고 있었으며, tryptophan, methionine, lysine, tyrosine의 함유량은 적었다. 5. BA-p-NA기질에 대한 반응 최적조건은 멸치 trypsin은 pH 8.0에서 45°C, 고등어 trypsin A와 B는 pH 8.0에서 50°C, 그리고 황다랭이 trypsin은 pH 9.0에서 55°C, 날개다랭이 trypsin은 pH 9.0에서



50°C였다. 6. 위에 든 실험 결과들은 혈합육 어류의 서식온도가 이들 어류의 trypsin의 반응 최적 온도와는 어느정도 관계가 있을 것으로 추측되었다.

## 문 헌

- Northrop, J. H. and Kunitz, M. : Crystalline trypsin. I. Isolation and tests of purity. *J. Gen. Physiol.*, **16**, 267 (1932)
- Davie, E. W. and Neurath, H. : Identification of a peptide released during autocatalytic activation of trypsinogen. *J. Biol. Chem.*, **212**, 515 (1955)
- Travis, J. and Robert, R. C. : Human trypsin. Isolation and physical-chemical characterization. *Biochemistry*, **8**, 2884 (1969)
- Kiel, B. : *The enzymes*. Boyer, P. D.(ed.), Academic Press, New York, Vol. III, p. 249 (1971)
- Reeck, G. R., Winter, W. P. and Neurath, H. : Pancreatic enzymes of the African lungfish, *Protopterus aethiopicus*. *Biochemistry*, **9**, 1398 (1970)
- Uchida, N., Obata, T. and Saito, T. : Occurrence of inactive precursors of proteases in chum salmon pyloric caeca. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **39**(7), 825 (1973)
- Overnell, J. : Digestive enzymes of the pyloric caeca and of their associated mesentery in the cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **46B**, 519 (1973)
- Hofer, R., Ladumer, H., Gattringer, A. and Wieser, W. : Relationship between the temperature preferenda of fishes, amphibians and reptiles, and the substrate affinities of their trypsins. *J. Comp. Physiol.*, **99**, 345 (1975)
- Shin, D. H. and Zall, R. R. : Purification and identification of a trypsin-like enzyme from the pyloric caeca of cod. *Process Biochem.*, Feb., 11 (1986)
- Kolodzeiskaya, M. V., Pivnenko, T. N., Malen'kikh, L. B. and Kladsnikaya, G. V. : Serine proteases of the pyloric caeca of far-eastern salmonides. *Trans. Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, **24**, 291 (1988)
- Pivnenko, T. N., Kolodzeiskaya, L. M. and Kudinov, S. A. : Purification and properties of trypsin from pyloric caeca of Pacific salmon. *Trans. Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, **25**, 412 (1989)
- Pyeun, J. H., Kim, H. R. and Godber, J. S. : Comparative studies on the enzymatic properties of two trypsin-like enzymes from menhaden, *Brevoortia tyrannus*. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **23**, 12 (1990)
- Pyeun, J. H., Cho, D. M. and Heu, M. S. : Comparative studies on the enzymatic properties of trypsins from cat-shark and mackerel. 1. Purifications and reaction conditions of the trypsins. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **24**, 273 (1991)
- Simpson, B. K. and Haard, N. F. : Trypsin and a trypsin-like enzyme from the stomachless cunner. Catalytic and other physical characteristics. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 652 (1987)
- Pyeun, J. H., Cho, D. M. and Heu, M. S. : Comparative studies on the enzymatic properties of trypsins from cat-shark and mackerel. 2. Enzymatic properties of the trypsins. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **25**, 383 (1992)
- Nonaka, J. : *Suisanshokuhinkaku*. Sea-food Gosei-sago-goseigaku, Tokyo, p.56 (1976)
- Hjelmeland, K. and Raa, J. : Fish tissue degradation by trypsin type enzymes. In "Advances in fish science and technology" Connel, J. J.(ed.), Fishing News Books Ltd. Farnham, Surrey, England, p. 456 (1980)
- Martinez, A. and Gildberg, A. : Autolytic degradation of belly tissue in anchovy, *Engraulis encrasicolus*. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **23**, 185 (1988)
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- Erlanger, B. F., Kokowsky, N. and Cohen, W. : The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 271 (1961)
- Davis, B. J. : Disc-electrophoresis II. Method and application to human serum protein. *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964)
- Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680 (1970)
- Whitaker, J. R. : Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex. *Anal. Chem.*, **35**, 1950 (1963)
- Hugli, T. E. and Moore, S. J. : Determination of tryptophan content of protein by ion exchange chromatograph of alkaline hydrolysates. *J. Biol. Chem.*, **247**, 2828 (1972)
- Spencer, R. L. and Wold, F. : A new convenient method for estimation of total cysteine-cysteine in proteins. *Anal. Biochem.*, **32**, 185 (1969)
- Bigelow, C. C. : On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure. *J. Theoret. Biol.*, **16**, 187 (1967)
- Simpson, B. K. and Haard, N. F. : Trypsin from Greenland cod, *Gadus ogac*. Isolation and comparative properties. *Comp. Biochem. Physiol.*, **79B**, 613 (1984)
- Martinez, A., Olsen, R. L. and Serra, J. L. : Purification and characterization of two trypsin-like enzymes from the digestive tract of anchovy *Engraulis encrasicolus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **91B**, 677 (1988)
- Murakami, K. and Noda, M. : Studies on proteinases from the digestive organs of sardine. I. Purification and characterization of three alkaline proteinases from the pyloric caeca. *Biochim. Biophys. Acta*, **658**, 17 (1981)
- Maire, M. L., Rivas, E. and Moller, J. V. : Use of gel chromatography for determination of size and molecular weight of proteins. Further caution. *Anal. Biochem.*, **106**, 12 (1980)
- Figueiredo, A. F. S., Takii, Y., Tsuji, H., Kato, K. and Inagami, T. : Rat kidney renin and cathepsin D. Purification and comparison of properties. *Biochemistry*, **22**, 5476 (1983)

32. Hjelmeland, K. and Raa, J. : Characteristics of two trypsin type isozymes isolated from the Arctic fish capeline (*Mallotus villosus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **71B**, 557 (1982)
  33. Hazel, J. R. and Prosser, C. L. : Molecular mechanisms of temperature compensation in Poikilotherms. *Physiol. Rev.*, **54**, 620 (1974)
  34. Simpson, B. K., Simpson, M. V. and Haard, N. F. : Properties of trypsin from the pyloric caeca of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J. Food Sci.*, **55**, 959 (1990)
  35. Uchida, N., Tsukayama, K. and Nishide, E. : Purification and some properties of trypsins from the pyloric caeca of chum salmon. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **50**, 129 (1984)
  36. Genicot, S., Feller, G. and Gerday, Ch. : Trypsin from Antarctic fish (*Paranotothenia magellanica* Forster) as compared with trout (*Salmo gairdneri*) trypsin. *Comp. Biochem. Physiol.*, **90B**, 601 (1988)
  37. Guizani, N., Rolle, R. S., Marshall, M. R. and Wei, C. I. : Isolation, purification and characterization of a trypsin from the pyloric caeca of mullet (*Mugil cephalus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **98B**, 517 (1991)
- (1993년 1월 12일 접수)