

혈합육어(멸치, 고등어, 황다랭이 및 날개다랭이)의 Trypsin 2. 성질과 열 안정성

조득문 · 허민수* · 변재형**†

동래여자전문대학 식품영양과

* 통영수산전문대학 식품영양과

** 부산수산대학교 식품영양학과

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

2. Enzymatic Properties and Thermal Stabilities

Deuk-Moon Cho, Min-Soo Heu* and Jae-Hyeong Pyeon**†

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

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

Abstract

In the present paper, enzymatic properties of the trypsin from the four dark fleshed fish were compared with each other and thermal stabilities of the enzymes were also investigated. The trypsin from the dark fleshed fish showed their activity only in BA-p-NA substrate of the amide substrates such as BA-p-NA and SP-p-NA, and BAEE and TAME of the ester substrates such as ATEE, BAEE, BTEE, and TAME. The enzymes were strongly inhibited by the serine protease inhibitors such as antipain, leupeptin, TLCK, DFP and SBTI, and were also inhibited by such metal ions as Cu^{2+} and Hg^{2+} , but fairly activated by Mg^{2+} . Denaturation constants of the enzymes were $13.4 \times 10^4 \text{sec}^{-1}$ for anchovy trypsin, $47.18 \times 10^4 \text{sec}^{-1}$ for mackerel trypsin A, $34.06 \times 10^4 \text{sec}^{-1}$ for mackerel trypsin B, $42.28 \times 10^4 \text{sec}^{-1}$ for yellowfin tuna trypsin and $16.6 \times 10^4 \text{sec}^{-1}$ for albacore trypsin at 55°C . The activation energies of the trypsin at a temperature range of 30°C to 50°C were estimated to be 13.91 kcal/mole for anchovy trypsin, 11.61 kcal/mole and 8.43 kcal/mole for mackerel trypsin A and for mackerel trypsin B, 4.35 kcal/mole for yellowfin tuna trypsin, and 3.76 kcal/mole for albacore trypsin.

Key words : trypsin, antipain, leupeptin, TLCK, denaturation constant, activation energy

서 론

전보"에서 저자들은 멸치, 고등어, 황다랭이 및 날개다랭이 등의 혈합육어가 가진 trypsin의 정제 방법을 검토 확립하였으며, 각 trypsin들의 아미노산 조성을 분석 비교하고, 그 반응 최적 pH와 온도조건에 관하여 검토 보고하였다.

그 요지에 의하면, 혈합육어 중 멸치, 고등어, 그리고 황다랭이와 날개다랭이 간에 서식온도대의 차이가 클에도 불구하고, 이들 어류의 trypsin의 분자량과 아미노산 조성 및 반응 최적조건에 있어서는 그 차이를 발견할 수 없었다.

본 연구에서는 이들 혈합육어 trypsin의 상관성을 효소학적 성질의 관점에서 더욱 밝혀보고자 시도하였다.

실험에 있어서는 이들 trypsin의 선택적 합성기질에 대한 반응성, 효소의 활성화에 미치는 몇가지 화학약제와 무기 금속이온의 영향, 효소의 안정성에 미치는 온도의 영향 및 각 효소의 활성화 에너지를 중심으로 비교 분석하였다.

† To whom all correspondence should be addressed
이 연구는 한국과학재단지정 우수공학연구센터인 부산수산대학교 해양산업개발연구소의 연구비지원에 의해 수행되었음.

재료 및 방법

재료

멸치의 내장과 고등어, 황다랭이 및 날개다랭이 의 유문수로부터의 trypsin의 분리정제는 전보¹⁾에 따랐다.

Tris (hydroxymethyl)aminomethane, benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BA-*p*-NA), succinyl-DL-phenylalanine-*p*-nitroanilide (SP-*p*-NA), acetyl-L-tyrosine-ethylester (ATEE), benzoyl-DL-arginine-ethylester (BAEE), benzoyl-DL-tyrosine ethylester (BTEE), benzamidine, tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), soybean trypsin inhibitor (SBTI), L-cysteine, dithiothreitol (DTT), monoiodoacetate (IAA), *o*-phenanthroline (*o*-PNT) 등은 Sigma사 제품을 사용하였으며, 이밖의 모든 시약과 수용액의 조제 등도 전보¹⁾에서와 같이 하였다.

분석방법

단백질 농도와 활성측정은 전보¹⁾에서와 같이 Lowry 등²⁾의 방법에 따라 측정하였으며, trypsin의 활성은 Erlanger 등³⁾의 방법에 따라 측정하였다.

선택 합성기질에 대한 반응성

Amide 기질에 대한 반응성은 합성기질 BA-*p*-NA와 SP-*p*-NA에 대한 반응활성으로 나타내었으며, Erlanger 등³⁾의 방법에 따라 측정하였다.

Ester 기질에 대한 반응성은 합성기질 ATEE, BAEE, BTEE 및 TAME에 대한 반응활성으로 구하였으며, Hummel⁴⁾의 방법에 따라 측정하였다.

효소활성에 미치는 첨가물의 영향

화학약제

화학약제에 의한 영향은 각 저해제의 농도별 용액과 정제 효소액을 섞어 효소와의 사이에 미리 반응을 시킨 후에 기질과 반응시켜 활성을 측정하였다. 곧, 저해제 TLCK, TPCK 및 PMSF는 전단계의 반응혼액에 대하여 10%에 상당하는 양의 DMSO로써 1mM의 농도가 되도록 미리 녹인 후에 탈이온수로 정용하여 만든 저해제용액 10 μ l와 효소용액(단백질 농도 : 최적 pH 및 온도 조건의 측정시와 같음) 50 μ l, 그리고 0.1M Tris-HCl, pH 8.0 완충액 940 μ l를 혼합하여 진탕항온수조 (30°C, 15min)에서 전단계의 반응을 시켰다. Ben-

zamidine, EDTA, leupeptin 및 antipain은 증류한 탈이온수로서 각 1mM 이 되도록 만들어 위에서와 같은 과정을 거쳤다. 그리고, 천연저해제 SBTI는 0.01mM이 되도록 탈이온수에 녹여 10 μ l를 취하고, 효소용액 50 μ l와 전술한 완충액 940 μ l를 혼합하여 얼음과 물을 담은 수조 (0°C, 15min)에서 잘 저으면서 전단계의 반응을 시켰다.

이렇게 전단계 반응을 거친 효소와 저해제의 혼액 900 μ l를 취하여 5mM BA-*p*-NA 함유 0.1M Tris-HCl, pH 8.0 기질용액 100 μ l와 30°C에서 5분간 반응시키므로써 각종 저해제의 영향을 분석하고 상대활성으로 나타내었다.

금속이온

염화물(-Cl)형의 K⁺과 Na⁺의 1가 이온과 Ba²⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Mg²⁺ 및 Mn²⁺ 등 2가 이온을 BA-*p*-NA 기질을 함유하는 반응혼액에 첨가시켰을 때의 효소의 활성에 미치는 영향을 검토하였다.

곧, 정제 효소용액(단백질 농도 ; 최적 pH 조건의 측정시와 같음) 50 μ l와 0.1M Tris-HCl, pH 8.0 완충액 940 μ l, 각 200mM의 금속이온 용액 10 μ l를 혼합하여 30°C에서 30분간 예비 가온한 후에 효소와 금속이온의 혼합액 900 μ l를 취하여 5mM BA-*p*-NA 기질용액 100 μ l를 가하여 30°C에서 5분간 반응시켜 활성을 측정하고, 금속이온을 첨가하지 않고 대신에 10 μ l의 탈이온수를 넣은 반응혼액중에서 보인 효소활성을 대조로 하여 상대활성으로 나타내었다.

효소의 열 안정성

정제 효소를 0-60°C의 각 온도에서 30분간 서서히 교반하면서 가온한 후에 각각 잔류하는 효소의 활성을 측정하고, 가온 전에 측정한 효소활성을 대조하여 상대활성으로 나타내었다.

변성속도정수와 활성화 에너지

변성속도정수(K₀)는 온도 30°C, 45°C, 55°C 및 60°C로 조정할 수조에서 각각 5분간 가온하고 가온 전후의 효소활성을 측정하므로써 잔류활성을 계산하여 구하였다⁵⁾.

활성화 에너지(E_a)는 절대온도로서 나타낸 반응온도의 역수(1/T)의 차에 대한 각 반응온도에 있어서의 고유활성의 차를 대수값으로 구하고, 이를 Arrhenius식으로부터 도출한 회귀직선식(기울기 = -E_a/2.303R)으로부터 구하여 나타내었다⁶⁾.

결과 및 고찰

기질에 대한 반응성

2종의 amide 기질과 4종의 ester 기질에 대한 반응성을 살펴 본 결과를 Table 1에 나타내었다. BA-*p*-NA, BAEE, TAME기질에 대해 3종의 trypsin 모두 활성을 보였으며, 날개다랭이 trypsin을 제외하면 TAME에 대한 활성이 가장 높았다. 그러나, ATEE, BTEE, SP-*p*-NA 즉, chymotrypsin에 의해 활성을 보이는 기질에 대해서는 4종의 효소 모두 활성을 보이지 않았다.

Martinez 등⁷⁾은 멸치 trypsin A와 B의 BA-*p*-NA에 대한 고유활성이 2.5U/mg과 4.7U/mg이라고 하였고, Pyeun 등⁸⁾은 menhaden trypsin A와 B는 각각 4.4 U/mg과 1.9U/mg이라고 하였으며, Yoshinaka 등⁹⁾은 메기 trypsin의 TAME에 대한 활성을 측정된 결과, 7200U/mg로 나타나 합성기질의 종류에 따라 그 활성에는 많은 차이가 있음을 알 수 있었다. 또, Asgeirsson

등¹⁰⁾은 대서양 대구의 유문수에서 정제한 3종류의 trypsin의 TAME기질에 대한 활성은 각각 8,160 U/ μ mole, 3,456U/ μ mole, 3,768U/ μ mole이라고 하였고, Voytek과 Gjessing¹¹⁾은 돼지 췌장 trypsin의 TAME 기질에 대한 활성이 60U/mg, BA-*p*-NA기질에 대한 활성이 3.3U/mg으로 TAME기질에 대한 활성이 크다고 보고하였다.

그리고, Simpson 등¹²⁾과 Guizani 등¹³⁾은 대구와 송어 유문수에서 정제한 trypsin의 활성을 TAME와 BA-*p*-NA에 대해 측정할 결과, 대구 trypsin은 각각 18,200 U/ μ mole과 250U/ μ mole이었고, 송어 trypsin은 각각 2,640U/ μ mole과 400U/ μ mole로써 TAME에 대한 활성이 BA-*p*-NA에 대한 것보다 높게 나타남으로서 ester결합을 보다 잘 분해함을 보여 주었으며, 이같은 결과들은 본 실험의 결과와도 일치하였다.

활성에 미치는 화학약제의 영향

화학약제 및 저해제에 의한 영향을 검토한 결과 (Table 2), 이들 정제 trypsin들은 SH-화합물(L-cysteine, dithiothreitol)과 SH-차단제 (*o*-phenanthroline, *p*-CMB)에 의하여 저해를 받지 않았으므로 thiol-효소가 아닐 뿐만 아니라, 금속 chelate제 (EDTA, iodoacetate)에 의하여서도 효소의 활성에 미치는 영향이 인정되지 않아 metallo-enzyme도 아님이 판명되었다¹⁴⁾.

Antipain과 leupeptin은 10 μ M의 농도에서 5종의 효소가 모두 완전히 실패하였으며, DFP에 의하여서는 경우 100 μ M의 농도에서 활성이 약 75%까지 실패하였다. TLCK에 의하여서는 10 μ M의 농도에서 약 90%

Table 1. Hydrolysis of synthetic substrate by the anchovy, mackerel, yellowfin tuna and albacore trypsins
(specific activity ; U/mg)

Synthetic substrate	Anchovy	Mackerel A	Mackerel B	Yellowfin tuna	Albacore
BA- <i>p</i> -NA	3.00	2.27	4.38	1.92	2.32
SP- <i>p</i> -NA	0	0	0	0	0
ATEE	0	0	0	0	0
BAEE	22.14	39.22	58.11	42.08	43.51
BTEE	0	0	0	0	0
TAME	30.56	70.0	141.67	83.33	24.44

Table 2. Effect of chemical reagents and inhibitors on the enzyme activity by the anchovy, mackerel, yellowfin tuna and albacore trypsins
(relative activity, %)

Reagent	Conc. (μ M)	Anchovy	Mackerel A	Mackerel B	Yellowfin tuna	Albacore
Control		100	100	100	100	100
Cysteine	1,000	89	100	80	99	104
DTT	1,000	94	108	71	81	98
EDTA	1,000	98	105	76	90	104
<i>o</i> -PNT	1,000	102	90	82	84	87
<i>p</i> -CMB	1,000	102	100	95	103	95
IAA	1,000	102	91	86	91	107
DFP	100	18	68	76	29	26
PMSF	100	93	64	75	97	100
Benzamidine	100	76	60	58	40	56
TLCK	10	9	20	36	10	14
TPCK	10	108	98	98	98	105
Antipain	10	0	0	0	0	0
Leupeptin	10	0	0	0	0	0
SBTI	0.1	7	0	4	18	10

까지 실패하였다. SBTI의 경우는 0.1 μ M의 농도에서도 활성이 현저히 감소하였으며(85~95%), 그 밖의 저해제에 의하여서는 영향을 받지 않았다.

결과적으로 본실험에서 다루어진 효소들은 peptide aldehyde인 antipain과 leupeptin, trypsin에 대한 저해제로서 알려져 있는 합성저해제인 TLCK¹⁵⁻¹⁷⁾, trypsin에 대한 선택적 저해제인 SBTI, serine계 단백질 분해효소의 저해제로서 알려져 있는 organophosphorus저해제인 DFP 등의 저해제에 의해 분명히 불활성화함으로써 5종의 정제 효소가 모두 serine계의 trypsin임을 명확히 뒷받침하였다.

DFP와 TLCK는 효소의 특이적 활성부위에 직접 작용하는 비가역 저해제로서, DFP의 경우 100 μ M의 첨가에서도 25% 전후의 잔류활성을 보인 반면, TLCK는 10 μ M의 첨가에서 세 효소 모두 약 10%의 잔류활성을 나타내었다. 이 결과에 비추어 TLCK가 DFP보다 예민하게 작용함을 알 수 있었으며, 이는 DFP가 isopropanol 중에서는 안정하지만, 수용액 중에서는 그 저해능이 pH 7.0에서 110분, pH 7.5에서 55분, pH 8.0에서 35분으로 반감한다고 알려져 있으며¹⁹⁾, 본 실험에서도 DFP와 효소가 공존하는 전처리 조건이 pH 8.0, 30분이므로 DFP가 원래 가진 저해제로서의 작용능이 감소하였기 때문에 DFP의 농도가 다른 저해제의 농도보다 고농도에서 그 저해능을 발현하게 되는데 기인한 것이다.

이와 관련하여 어류 trypsin의 저해제에 대한 보고들에서도 저해제의 첨가정도에 따른 저해정도의 차이는 있으나 그 경향은 비슷함을 알 수 있었다.¹⁸⁻²¹⁾

활성에 미치는 금속이온의 영향

각 효소의 활성에 미치는 금속이온의 영향을 Table 3에 나타내었다. 5종의 효소 모두 금속이온 Cu²⁺과 Hg²⁺에 의하여 0~35%의 잔류활성을 보임으로써 현저한 저해작용을 나타내었다.

멸치 trypsin은 Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺에 의하여 11~14% 정도 활성이 증가하였으며, 고등어 trypsin은 K⁺, Ca²⁺, Mn²⁺에 의하여 약 12~30%까지 활성이 증가하였다.

황다랭이 trypsin은 K⁺, Mg²⁺, Mn²⁺에 의하여 약 20%까지 활성이 증가하였고, 날개다랭이 trypsin은 Na⁺에 의하여 약 30%까지 활성이 증가하였다.

멸치, 황다랭이 및 날개다랭이 trypsin은 Co²⁺에 의하여는 약 20%까지 활성이 감소하였으나, 그밖의 금속이온에 의하여서는 활성에 영향을 미치지 않았다.

이상의 결과는 Chen 등²²⁾이 milk fish (*Chanos chanos*)의 내장에서 정제된 trypsin 유사효소에 대한 보고

Table 3. Effect of metal ions on the enzyme activity by the anchovy, mackerel, yellowfin tuna and albacore trypsins

Metal ion*	(relative activity, %)				
	Anchovy	Mackerel A	Mackerel B	Yellowfin tuna	Albacore
Control	100	100	100	100	100
K ⁺	108	109	115	110	96
Na ⁺	114	86	76	106	129
Ba ²⁺	110	64	85	82	101
Ca ²⁺	111	109	107	102	84
Co ²⁺	84	94	112	76	80
Cu ²⁺	4	6	4	35	13
Hg ²⁺	6	8	15	0	4
Mg ²⁺	114	98	115	118	109
Mn ²⁺	98	103	134	119	90

*2 mmoles of chloride form were used

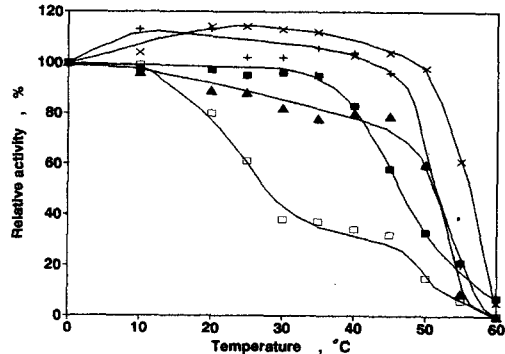


Fig. 1. Stability of the anchovy trypsin (▲), mackerel trypsin A (□), mackerel trypsin B (■), yellowfin tuna trypsin (+) and albacore trypsin (×) on the hydrolysis of the BA-p-NA substrate at various preincubation temperature.

The enzymes were preincubated at 0~60°C for 30 min.

에서 1mM의 Ca²⁺과 Mg²⁺에 의해 각각 약 10%와 5%의 활성이 증가한 반면, 0.5mM의 Hg²⁺에 의해 약 40%의 활성이 감소하였다는 결과와는 불활성화 정도에 다소 차이를 보였다.

효소의 열 안정성

정제효소를 0~60°C의 각 온도에서 30분간 서서히 교반하면서 가온한 후에 잔류하는 효소의 활성을 측정하여 온도에 대한 안정성을 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

멸치 trypsin과 고등어 trypsin A는 10°C 부터 활성이 서서히 감소하였으며, 반면에 고등어 trypsin B는 35°C, 황다랭이 trypsin은 45°C, 그리고 날개다랭이 trypsin은 50°C까지는 비교적 안정하였다. 이들 효소 모두 60°C

에서는 거의 활성이 나타나지 않았다.

따라서 온도에 의한 안정성을 비교하여 볼 때, 원양 열대산 다랑어류의 trypsin에 비하여 연근해 온대산 멸치의 trypsin과 고등어 trypsin A가 온도에 대하여 훨씬 불안정함을 알 수 있었다.

Guizani 등¹³⁾은 송어의 유문수에서 trypsin을 정제하여 송아지에서 분리한 trypsin의 온도안정성과 대비해 본 결과, 송아지의 trypsin은 약 75°C까지 안정하였으나 송어의 trypsin은 25°C 전후부터 그 안정성을 잃기 시작했다고 하여 어류 trypsin이 포유동물 trypsin에 비하여 훨씬 불안정하다고 보고하였으며, 동일 기능을 갖는 단백질의 열안정성에 있어서 어류 중에서는 높은 온도에서 서식하는 어류가 낮은 온도에서 서식하는 어류에 비하여 상대적으로 높은 온도에 대해 안정함을 보였다^{18,19,23)}.

이 연구와 관련하여, 본 실험의 혈합육어 trypsin의 열 안정성은 대서양산 대구 유문수에서 추출한 trypsin의 열안정성을 분석 보고한 Simpson 등¹²⁾의 연구와 비슷한 결과임을 알 수 있었으며, 난대성 어류인 menhaden trypsin⁸⁾의 열안정성을 보고한 경우에서도 trypsin A가 30°C까지, 그리고 trypsin B는 40°C까지 안정하다고 하였다.

한편, 효소를 각 온도별로 그 안정성을 측정한 결과, 대체로 효소의 안정 온도상한이 각 효소의 반응 최적 온도 조건보다 낮는데, 그 이유는 반응액 중에 기질이나 그 밖의 용질이 효소와 공존할 때는 효소만을 가열할 때와는 달리 그 공존하는 기질이나 용질이 효소를 열에 대하여 보호하는 효과가 있기 때문이며, 효소만을 가열할 때는 효소 그 자체가 외부온도에 직접 노출케 되어 쉽게 변성을 일으키므로서 불활성화하기 때문에 각 효소의 안정 온도상한이 각 효소의 반응 최적 온도 조건보다 낮게 나타나는 것으로 해석되었다^{6,23)}.

변성속도정수와 활성화 에너지

이들 trypsin의 각 온도대에서의 변성속도정수(KD)와 활성화 에너지(Ea)를 측정 계산한 결과를 Table 4와 Fig. 2에 나타내었다.

먼저, 변성속도정수는 해당 온도대에서 5분간의 가온에 따른 효소활성의 변화를 측정한 것으로 이들 효소의 최적 온도에 가까운 45°C에서 측정한 변성속도정수를 비교하여 보면, 날개다랭이 trypsin은 $0.32 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$, 멸치 trypsin은 $1.31 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$, 그리고 황다랭이 trypsin은 $3.31 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$, 고등어 trypsin B는 $5.50 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$, 그리고 고등어 trypsin A는 $10.09 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 로서 날개다랭이 trypsin이 다른 trypsin에 비하여 약 4~30배까지 안정함을 알 수 있었다.

그리고, 활성화에너지는 멸치 trypsin이 13.91kcal/mol, 고등어 trypsin A는 11.61kcal/mole, 고등어 trypsin B는 8.43kcal/mole, 황다랭이 trypsin은 4.35kcal/mole, 그리고 날개다랭이 trypsin이 3.76kcal/mole로서 멸치 trypsin이 가장 높은 활성화 에너지값을 보였다.

일반적으로 화학반응속도는 온도의 상승과 더불어 더 많은 운동에너지를 반응물질의 분자에 이행시키기 때문에 단위시간당 충돌 횟수가 늘어나므로써 증가하는 것으로 알려져 있다²⁴⁾. 효소반응에 있어서도 일반적인 화학반응과 비슷한 양상을 보이지만, 일정 온도를

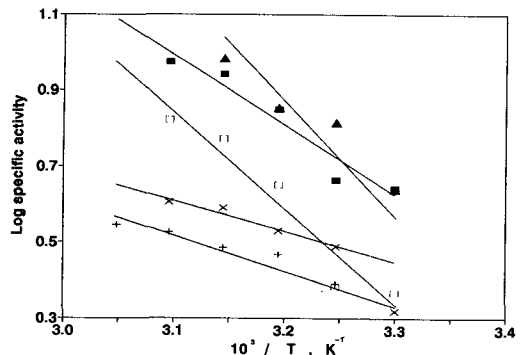


Fig. 2. Arrhenius plots for the hydrolysis of the BA-p-NA substrate by the anchovy trypsin (▲), mackerel trypsin A (□), mackerel trypsin B (■), yellowfin tuna trypsin (+) and albacore trypsin (×).

Activation energy :
 Anchovy trypsin ; 13.91kcal/mole.
 Mackerel trypsin A ; 11.61kcal/mole.
 Mackerel trypsin B ; 8.43kcal/mole.
 Yellowfin tuna trypsin ; 4.35kcal/mole.
 Anchovy trypsin ; 3.67kcal/mole.

Table 4. Denaturation constants of the anchovy, mackerel, yellowfin tuna and albacore trypsins

(unit : sec⁻¹)

Temperature	Anchovy	Mackerel A	Mackerel B	Yellowfin tuna	Albacore
30°C	1.10×10^{-4}	7.49×10^{-4}	-	3.37×10^{-4}	0.19×10^{-4}
45°C	1.31×10^{-4}	10.09×10^{-4}	5.50×10^{-4}	3.31×10^{-4}	0.32×10^{-4}
55°C	13.40×10^{-4}	47.18×10^{-4}	34.06×10^{-4}	42.28×10^{-4}	16.06×10^{-4}
60°C	-	64.18×10^{-4}	36.62×10^{-4}	92.07×10^{-4}	27.94×10^{-4}

넘어서면 지나치게 많은 에너지를 흡수하게 되어 효소의 3차구조가 파괴됨으로써 불활성화가 일어나게 되며, 따라서 온도가 상승되면 효소와 기질의 충돌횟수 증가에 따른 반응속도의 증가가 효소의 변성을 촉진시키는 결과로 반전된다고 알려져 있으며²⁵⁾, 본 실험에서 혈합육어 trypsin의 경우는 그 같은 이론에 일치하는 결과로 나타났다.

Simpson과 Haard¹⁹⁾는 그린랜드 대구의 활성화 에너지(6.6 kcal/mole)를 측정해 본 결과, Ooshiro²⁶⁾가 발표한 고등어 proteinase의 활성화 에너지와 비슷한 값(6.5kcal/mole)을 보인다고 하였고, 송아지 trypsin의 활성화 에너지(12.7kcal/mole)와 비교하여 어류의 trypsin이 활성화 에너지가 낮다고 하였는데, 본 연구의 결과에 있어서는 온도대에 따라 차이는 있지만, 네 어종의 trypsin만으로 비교하여 보면 멸치 trypsin쪽이 다랑어 trypsin의 활성화 에너지에 비하여 3배이상 높은 값을 보였다.

요 약

전보¹⁾에 이어, 정제된 혈합육어 trypsin에 대하여 효소적 성질 및 열 역학적 성질에 관하여 비교 검토한 내용을 요약하면 다음과 같다. 이들 혈합육어 trypsin은 BA-p-NA와 SP-p-NA 같은 amide기질 중 BA-p-NA기질만에 대하여, 그리고 ATEE, BAEE, BTEE 및 TAME 등의 ester기질 중에서는 BAEE와 TAME에 대하여만 현저한 활성을 보였다. 이들 효소는 antipain, leupeptin, DFP, TLCK, SBTI 등 화학약제와 금속이온 Cu²⁺ 및 Hg²⁺에 의하여서는 그 활성이 현저히 저해를 받았으나, Mg²⁺에 의하여서는 부활하였다. 이 효소들은 모두 50°C 이상의 온도에서는 불안정하였으며, 날개다랭이의 trypsin이 온도 변화에 대하여 가장 안정하였다. 그리고, 활성화에너지는 멸치 trypsin이 13.91kcal/mole, 고등어 trypsin A는 11.61kcal/mole, 고등어 trypsin B는 8.43kcal/mole, 황다랭이 trypsin은 4.35kcal/mole, 그리고 날개다랭이 trypsin은 3.76kcal/mole 이었다.

문 헌

1. Pyeun, J. H., Cho, D. M. and Heu, M. S. : Trypsins from the dark fleshed fish(anchovy, mackerel, yellowfin tuna and albacore). 1. Purification and optimal reaction conditions. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **22**(4), 448(1993)
2. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Ran-

- dall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
3. 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)
4. Hummel, B. C. W. : A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 1393 (1959)
5. Hashimoto, A. and Arai, K. : The effect of pH on the thermostability of fish myofibrils. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **51**, 99 (1985)
6. Segel, I. H. : *Biochemical calculations*. Wiley, New York, p.208 (1976)
7. 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)
8. 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)
9. Yoshinaka, R., Sato, M., Suzuki, T. and Ikeda, S. : Enzymatic characterization of anionic trypsin of the catfish (*Parasilus asotus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **77B**, 1 (1984)
10. Asgeirsson, B., Fox, J. W. and Bjarnason, J. B. : Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. *Eur. J. Biochem.*, **180**, 85 (1989)
11. Voytek, P. and Gjessing, E. C. : Studies of an anionic trypsinogen and its active enzyme from porcine pancreas. *J. Biol. Chem.*, **246**, 508 (1971)
12. Simpson, B. K., Simpson, M. V. and Haard, N. F. : Properties of trypsin from the pyloric ceca of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J. Food Sci.*, **55**, 959 (1990)
13. Guizani, N., Rolle, R. S., Marshall, M. R. and Wei, C. I. : Isolation, purification and characterization of a trypsin from the pyloric ceca of mullet (*Mugil cephalus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **98B**, 517 (1991)
14. Whitaker, J. R. : *Principles of enzymology for the food science*. Marcel Dekker Inc., New York. p.514 (1972)
15. Powers, J. C. and Harper, J. W. : Inhibitors of serine proteinases. In "Proteinase inhibitors" Barrett, A. J. and Salvesen, G. (eds.), Elsevier, Amsterdam, p.66 (1986)
16. Kim, H. R. and Pyeun, J. H. : The proteinase distributed in the intestinal organs of fish. 2. Characterization of the three alkaline proteinases from the pyloric caeca of mackerel, *Scomber japonicus*. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **19**, 547 (1986)
17. Pyeun, J. H., Kim, H. R. and Heu, M. S. : The proteinase distributed in the intestinal organs of fish. 3. Purification and some enzymatic properties of the alkaline proteinases from the pyloric caeca of skipjack, *Katsuwonus vagans*. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **21**(2), 85 (1988)
18. Hjelmeland, K. and Raa, J. : Characteristics of two

- capeline (*Mallotus villosus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **71B**, 557 (1982)
19. Simpson, B. K. and Haard, N. F. : Trypsin from Greenland cod, *Gadus ogac*. Isolation and comparative properties. *Comp. Biochem. Physiol.*, **79B**, 613 (1984)
 20. 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)
 21. Dendinger, J. E. and O' Connor, K. L. : Purification and characterization of a trypsin-like enzyme from the midgut gland of the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **95B**, 525 (1990)
 22. Chen, C. S., Tsao, C. Y. and Jiang, S. T. : Purification and characterization of proteases from the viscera of milkfish (*Chanos chanos*). *J. Food Biochem.*, **12**, 269 (1989)
 23. 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)
 24. Palmer, T. : *Understanding enzymes*. 2nd ed., Ellis Horwood Ltd. Chichester, England, p.102 (1985)
 25. Dixon, M. and Webb, E. C. : *Enzymes*. 3rd ed., Longman, London, p.47, 138, 169 (1979)
 26. Ooshiro, Z. : Studies on proteinase in the pyloric caeca of fishes-III. Substrate specificity of mackerel proteinase. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **37** (7), 638 (1971)

(1993년 1월 12일 접수)