

혈합육어 멘헤이든의 장기조직분포 Trypsin-유사효소에 관한 비교효소학적 연구*

변재형 · 김형락** · 제이 · 에스 · 갈버**

부산수산대학교 식품영양학과

**루이지아나주립대학교 식품과학과

Comparative Studies on the Enzymatic Properties of two Trypsin-like Enzymes from Menhaden, *Brevoortia tyranus*

Jae-Hyeung PYEUN, Hyeung-Rak KIM** and J. S. GODBER**

Department of Nutrition and Food Science,

National Fisheries University of Pusan,

Pusan, 608~737 Korea

***Department of Food Science, Louisiana State University,*

Baton Rouge, La. 70803, U. S. A.

Two trypsin-like enzymes, designated trypsin A and B, purified from the intestine of menhaden by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation, Benzamidine-Sepharose 6B affinity chromatography, DEAE-Sephacel ion exchange chromatography and Sephadex G-75 gel filtration chromatography. The two trypsins were subjected to compare the enzymatic properties of the trypsin-like enzymes from the other dark fleshed fishes. Both trypsins catalysed the hydrolysis of $\text{N}\alpha$ -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide and they were remarkably inhibited by several well known trypsin-inhibitors, tosyllysyl chloromethyl ketone, soybean trypsin inhibitor, benzamidine, leupeptin and antipain, etc. Therefore, it was ascertained that the two enzymes are serine-type trypsins. The molecular weights of these enzymes were about 25,000 and 26,200, respectively, as determined by SDS-PAG electrophoresis and by Sephadex G-100 gel filtration, and the molecular weights of these two enzymes are somewhat fewer than those from the other dark fleshed fishes.

Both enzymes had less basic amino acids such as arginine and lysine, whereas they had slightly high contents of neutral amino acids, glycine, alanine and tryptophane.

The enzymes showed a pH optimum of 8~11 at 60°C against the $\text{N}\alpha$ -benzoyl-DL-argi-

* 본 논문의 일부는 1989년 10월 2일 미국 Atlanta, Georgia에서 개최된 14th Annual Conference of the Tropical and Subtropical Fisheries Technological Society of the Americas에서 발표되었음.

nine-p-nitroanilide substrate and they were quite unstable above 40°C and under the acidic pH region.

The Km constant of the two enzymes against the N α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide was 1.4 $\times 10^{-4}$ M for trypsin A and 4.3 $\times 10^{-5}$ M for trypsin B, respectively.

서 론

멘헤이든(menhaden, *Brevoortia tyranus* : 대서양 청어의 일종)은 북미주 대서양안의 친해나 멕시코 만연안에서 회유하는 프랭크톤 식어의 어종이다.

이 어종은 심한 어취와 암적의 육색, 육중에 조밀하게 분포하는 침상세골, 사후변화가 빠른것 등의 원인으로 그 식용에는 많은 결함이 있는 어종인 것으로 알려져 있다.

따라서 미국의 1년 어획고의 약 45%를 차지하는 잠재적 경제성이 높은 어종이지만(Fisheries of the United States, 1980~1987), 그 이용면을 보면 거의 어유어비의 원료로서 소비되고 있어 유용한 단백질 자원이 비효율적으로 이용되고 있는 한예로 되고 있다(MIT sea grant, 1988).

이 자원의 효과적인 이용을 위해서는 빠른 사후변화를 지연시키므로써 원료의 선도를 수송 가공 중에 유지시키는 일이 선결되어야 할것으로 생각 된다.

대체로 어류의 사후변화가 빠른 원인은 효소작용과 미생물의 발육번식이 보다 빠른것을 이유로 들 수 있겠으나(Suyama and Konosu, 1987), 멘헤이든 같은 혈압육어에 있어서는 장기중에 분포하는 단백질분해효소가 자가소화과정에서 활발하게 작용하는 것이 이들 어종의 사후변화를 촉진하는 원인으로 되고 있다고 보고되고 있다(Hjelmeland and Raa, 1980 ; Murakami and Noda, 1981 ; Kim and Pyeun, 1987 ; Martinez and Gildberg, 1988).

장기조직에 분포하는 단백질분해효소중에서는 알카리성단백질분해효소가 많은 영향을 끼치는 것으로 알려져 있으며, 알카리성단백질분해효소중에서는 trypsin류의 효소가 특히 많은 영향을 끼치는 것으로 보고되어 있고(Hjelmeland and Raa, 1982 ; Yoshinaka et al., 1983 ; Simpson and Haard, 1984), trypsin에 관하여는 생물의 종특이성과 효소의 구조와 관련하여 많은 관심이 집중되어 왔다(Travis and Roberts, 1969 ; Gates and Travis, 1969 ; Reek

and Neurath, 1972 ; Vitayathil et al., 1961 ; Zwilling et al., 1969 ; Overnell, 1973 ; Muramatsu and Morita, 1981 ; Osnes and Mohr, 1985).

본 연구는 멘헤이든을 대상으로 그 장기중에 분포하는 알카리성단백질분해효소에 관하여 검색하던 중, trypsin의 특이성이 현저한 두 종류의 효소를 확인하고, 이들 효소가 동 어종의 사후변화과정에 미치는 영향을 비교효소학적 견지에서 분석하였기에 보고한다.

재료 및 방법

재 료

미국 버지니아 근해와 멕시코만에서 어획된 멘헤이든(*Brevoortia tyranus*)을 동결상태로 운반하여 그 장기를 적출 심온동결고(-85°C)에 보관하면서 효소추출용 재료로 하였다.

그리고 본 실험에는 Sigma화학사제의 benzamidine, N α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide(BA-p-NA), Benzamidine-Sepharose 6B, p-tosyl-L-arginine methyl ester(TAME), tosyllysyl chloromethyl ketone(TLCK), tosylphenyl chloromethyl ketone(TPCK), soybean trypsin inhibitor(SBTI), phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF), diisopropyl fluorophosphate(DFP), ethylene diamine tetrachloro acetic acid sodium salt(EDTA), leupeptin, antipain 등을 비롯하여 Bio-Rad Laboratories사제의 분자량 측정용의 표준 Kit와 전기영동용의 시약들, 그리고 Pharmacia Fine Chemicals사제의 크로마토그래피용의 지지체 DEAE-Sephacel과 Sephadex G-75 등이 사용되었다.

그리고 이밖의 모든 분석용 시약들은 각각 시약용의 특급품을 사용하였으며, 실험에서 쓴 모든 물은 증류하여 탈 이온화한 물을 사용하였다.

분석방법

단백질농도; Lowry et al.(1951)의 비색법으로 측정하였다. 이때 적합한 표준곡선은 bovine serum albumin을 농도별로 측정 작성한 검량곡선에 의하였다. 그리고 효소 정제 과정중의 단백질획분의 검색은 분광광도계(Response Spectrophotometer, Gilford사제)로써 파장 280nm에서 검출 측정하였으며, 이때 사용한 측정 시료의 채취는 rapid sampler에 의하였다.

효소활성; Trypsin-유사효소의 활성은 Erlanger et al.(1961)의 방법에 따라 측정하였다. 곧, 효소용액 50 μ l (단백질농도: 30 μ g/ml 전후)와 9.8 $\times 10^{-4}$ M BA-p-NA의 12.5mM Tris-HCl, pH 8.2 용액 450 μ l 를 반응혼액으로 하여 25 $^{\circ}$ C에서 시간별로 반응시켰을때 유리되어 나오는 p-nitroanilide의 양을 반응속도계측장치부 분광광도계(Response spectrophotometer, Gilford 사제)로써 파장 410nm에서 측정하여 계산하였다. 이렇게 25 $^{\circ}$ C에서 1분간 반응시켜 유리되어 나오는 p-nitroanilide 1 μ mole을 U의 단위로 표기하고 amidase activity로서 나타내었다.

Trypsin-유사효소의 정제

친화성 크로마토그래피; 미리 1% NaCl과 0.005M CaCl₂를 함유한 0.02M Tris-HCl, pH 7.2 용액에 평형화한 Benzamidine-Sepharose 6B를 채운 칼럼(ϕ 1.2cm \times 12cm)을 탈지조효소에서 trypsin의 분리 목적에 사용하였다.

탈지조효소의 조제; -80 $^{\circ}$ C에서 보존한 멕시코 만산 멘헤이든의 내장 약 120g 을 취하여 약 4배 용량의 0.02% NaN₂를 함유하는 방부용매 1% NaCl · 0.005M CaCl₂ in 0.02M Tris-HCl buffer, pH 7.2를 가하여 균질화하고 40 $^{\circ}$ C에서 3시간 가온하르로서 효소를 활성화시킨 후에 다시 2배용량의 tetrachloromethan을 가하여 충분히 교반하여 원심분리(16,500 \times g, 20분)한 상층액을 탈지조효소액으로 하여 다음 단계의 효소의 정제에 제공하였다.

Trypsin-유사효소의 정제; 탈지조효소액을 70% 포화의 황산암모늄을 써서 염석하여 얻은 효소침전물을 1% NaCl · 0.005M CaCl₂ in 0.02M Tris-HCl, pH 7.2용액에 용해하여 투석한 후에 원심분리(16,500 \times g, 20분)한 상층액을 미리 대비해 둔 Benzamidine-Sepharose 6B 칼럼에 장전하고 같은 용매로서 충분히 세정한 다음, 125mM benzamidine을

함유하는 같은 용매 약 250ml로써 흡착된 효소를 용리시켰다. 용리한 benzamidine 함유효소액은 다시 70%포화의 황산암모늄으로 염석시키고, 염석된 침전물은 원심분리(16,500 \times g, 20분)한 후에 0.02M Tris-HCl, pH 7.2 완충액에 현탁하여 용해시킨 다음, 같은 완충액중에서 충분히 투석시켰다. 투석된 시료효소액은 원심분리(16,500 \times g, 20분)한 후에 상층액을 미리 같은 완충액으로 평형화시킨 DEAE-Sephacel anion exchanger 칼럼(ϕ 2.0cm \times 20.0cm)에 장전한 다음, 0~0.4M NaCl의 0.02M Tris-HCl, pH 7.2 용액을 써서 농도구배법으로 용리시켰다. 이때 효소단백질의 용리위치는 Absorbance/Fluorescence detector(ISCO UA-5)가 장착된 automatic fraction collector를 써서 용리확인하고, BA-p-NA를 기질로 하는 amidase activity를 측정하므로써 trypsin-유사효소의 용리위치를 재차 확인하였다.

이렇게 하여 얻어진 효소획분은 Ultrafilter(Sartorius SM 14529)를 써서 질소가스의 압력을 이용하여 가압농축시켰다. 이상의 과정을 거쳐 분획된 효소단백질의 농축획분은 원심분리한 후에 0.02M Tris-HCl, pH 7.2 완충액으로 평형화한 Sephadex G-75-120 칼럼(ϕ 2.5cm \times 90.0cm)으로 재차 장전하여 용리 농축시켜 정제를 완결하였다.

이렇게 하여 정제된 trypsin-유사효소의 순도는 7.5%의 polyacrylamide를 쓰는 disc-겔 전기영동법(Davis, 1964)과 Sephadex G-75-120 축소칼럼(ϕ 2.5cm \times 30cm)을 쓰는 겔여과법(Andrews, 1964)으로 검증하였다.

효소의 아미노산조성; 증류탈이온수중에서 충분히 투석한 시료표품에 대하여 phenylisothiocyanate로서 phenylthiocarbamyl amino acid로 유도체화한 후에 Pico-Tag hydrolyzate 칼럼을 장착하여 분석하였으며(Division of Millipore, 1986), 한편 tryptophan은 LKB 4150의 manual(1983)의 방법으로, 그리고 cystine과 cysteine은 Spencer와 Wald(1969)의 방법으로 정량하였다.

효소활성의 최적온도와 pH조건

정제효소(단백질농도: trypsin-유사효소 각 41 μ g/ml)와 기질, 9.8 $\times 10^{-4}$ M BA-p-NA의 12.5mM Tris-HCl, pH 7.2, 용액의 50 μ l 와 450 μ l 혼액을 온

도조정장치와 반응속도측정장치 장착 분광광도계 (Response Spectrophotometer, Gilford 사제)중에서 5~70°C 간을 5°C의 각격으로 반응온도를 각각 조정하면서 반응시켜 유리되어 나오는 *p*-nitroanilide를 매분당으로 측정하여 각 온도별로 정제효소의 반응생성물을 구하였다.

그리고 반응의 최적 pH조건은 효소표품에 대하여 기질 BA-*p*-NA농도 $9.8 \times 10^{-4}M$ 의 pH 6, 7, 8은 0.1M NaHCO₃와 0.1M Tris-HCl의 각완충액, pH 9, 10일때는 0.1M의 KCl과 H₃BO₃의 0.1M NaOH 혼성 완충액, 그리고 pH 11, 12일때는 0.05M Na₂HPO₄와 0.1M NaOH 및 0.1M KCl과 0.1M NaOH의 각 혼성완충액중에 각각 용해하여 만든 기질용액과 반응시켰을때 유리되어 나오는 생성물을 각 pH별로 측정하여 최적 pH조건을 구하였다. 그리고 온도와 pH조건에 대한 활성도의 표시는 amidase activity의 상대활성 백분비로서 나타내었다.

효소의 분자량

겔여과에 의한 측정: Whitaker(1963)의 방법에 따라 측정하였다. 곧, Sephadex G-100칼럼(Ø3.0cm × 95.0cm)에 시료와 marker protein의 수용액을 주입한 후에 10mM sodium phosphate buffer, pH 6.75로써 용리시켰다(유속, 15ml/hr; 분획용량, 5ml). marker protein으로는 Sigma사제의 bovine albumin (M.W., 66,000), egg albumin (M.W., 45,000), carbonic anhydrase (M.W., 29,000) 및 cytochrome C (M.W., 12,000)을 사용하였다.

Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide vgel (SDS-PAG) 전기영동에 의한 측정: Weber와 Osborn(1969)의 방법에 따라 측정하였다.

저해제의 영향: 합성저해제에 의한 영향은 각 저해제의 농도별 용액과 효소용액을 혼성하여 전단계반응을 시킨 후에 기질용액과 반응시켰다.

곧, 합성저해제 TLCK, TPCK 및 PMSF는 전량의 10%에 상당하는 dimethyl sulfoxide로써 농도별 (2.5mM, 5mM 및 10mM)로 미리 녹힌 후에 증류수로 정용하여 만든 저해제용액을 써서 효소용액 (단백질농도; 39μg/ml) 200μl 와 같은 용량으로 혼합하여 진탕항온수조(30°C, 15분)에서 전 단계의 반응을 시켰고, 천연저해제 SBTI는 농도별 (25μg/ml, 50μg/ml, 100μg/ml, 150μg/ml, 및 300μg/ml)로 용해한 수용액을 빙수조중에서 같은 용량의 효

소용액과 혼합교반(15분)하여 전 단계의 반응을 시켰으며, 합성저해제 benzamidine, EDTA, leupeptin 및 antipain은 증류탈이온수로서 농도별 (benzamidine; 1.25mM, 2.50mM, 5.00mM; EDTA; 0.125mM, 0.250mM, 0.500mM; leupeptin; 2.15μg/ml, 4.3μg/ml, 8.6μg/ml; antipain; 2.15μg/ml, 4.3μg/ml, 8.5μg/ml)로 용해하여 진탕항온수조(30°C, 15분)에서 각각 전단계반응을 시켰다.

이렇게 각각 전단계반응을 거친 효소와 증류별저해제의 혼액 50μl 를 취하여 450μl 의 기질용액 (9.8 × 10⁻⁴M BA-*p*-NA의 12.5mM Tris-HCl, pH 8.2)과 반응시키므로써 저해제의 영향을 분석하였다. 그리고 효소활성의 표시는 상대활성도 백분비로서 나타내었다.

결 과

효소의 정제

멘헤이든의 장기에서 trypsin-유사효소를 정제하는 과정중에 amidase activity를 측정한 결과를 정제단계별로 Table 1에 나타내었다.

정제방법의 개요는 지방의 제거를 위하여 활성화시킨 마쇄 균질화시료를 4염화탄소로서 세척 처리하는 과정을 포함시킨 것이 특징이며, Benzamidine-Sepharose 6B 에 의한 친화성크로마토그래피, DEAE-Sephacel수지에 의한 농도구배 이온교환크로마토그래피, 그리고 최종적으로 미량의 혼입된 분순물의 제거를 위한 Sephadex G-75 겔여과크로마토그래피를 순차 적용하여 정제목적을 달성하였다.

Trypsin-유사효소는 Benzamidine-Sepharose 6B 에 의한 친화성크로마토그래피 단계를 거침으로서 거의 대부분의 불순물이 제거되었다(Table 1).

그리고 DEAE-Sephacel 이온교환크로마토그래피를 거치므로써 trypsin-유사효소들은 0.08~0.12M NaCl · 0.02M Tris-HCl, pH 7.2의 NaCl농도범위에서 용리되어 나오는 흰분과 0.30~0.34M NaCl · 0.02M Tris-HCl, pH 7.2의 NaCl농도범위에서 용리되어 나오는 흰분의 두획분을 얻을 수 있었다(Fig. 1).

이 두획분의 단백질 용리곡선 및 amidase activity

관계의 그래프는 Fig. 1과 같으며, 따라서 먼저 용리된 획분을 trypsin A, 그리고 늦게 용리된 획분을 trypsin B로 명명하였다.

Trypsin A와 B는 다시 Sephadex G-75 칼럼크로마토그래피로 겔여과 한 결과, Fig. 2에 나타낸 바와 같이 각각 단일 피크에 disc-전기영동상으로도 단일 밴드를 보여 정제는 훌륭하게 수행된 것으로 판단할 수 있었다.

각 단계별로 정제도를 보면(Table 1), Benzamidine-Sepharose 6B 칼럼을 거친 단계에서는 trypsin A와 B의 분별이 되지 않은 상태로 탈지한 효소 추출분을 시발로 대조했을때 약 9.5배의 정제도를 보였으며, 다음 단계인 DEAE-Sephacel이온교환크로마토그래피로 분획한 결과는 trypsin A와 B로 분획되었고, 정제도는 각각 12.4와 6.3배로 되었다. 이를 다시 Sephadex G-75칼럼으로 겔여과한 결과,

Table 1. Purification of Trypsins A and B of Menhaden

Fraction	Volume (ml)	Protein (mg)	Total activity(U)	Specific activity(U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Defatted extract	474	758	212	0.28	100	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	86	256	169	0.66	80	2.4
Benzamidine-Sepharose 6B	28	57	152	2.67	72	9.5
DEAE-Sephacel						
A	16	15	52	3.47	24	12.4
B	12	21	37	1.77	17	6.3
Sephadex G-75						
A	7	11	48	4.40	23	15.7
B	8	18	34	1.91	16	6.8

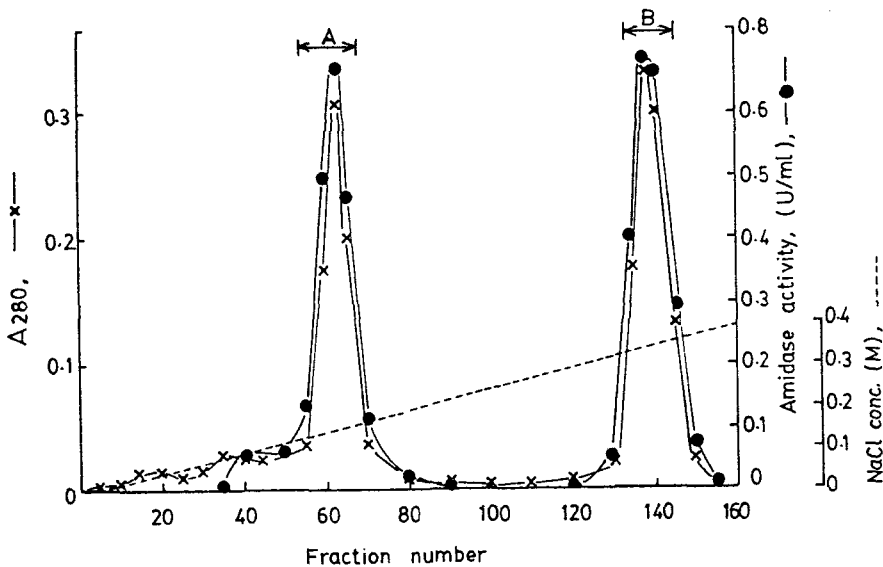


Fig. 1. Chromatography on DEAE-Sephacel of the proteolytic fraction obtained from the Benzamidine-Sepharose 6B affinity chromatography of the defatted extract of menhaden intestine. The two trypsin-like enzymes were eluted with a gradient of 0~0.4M NaCl in 20mM Tris-HCl, pH 7.2, at a flow rate of 0.4ml/min. Fractions were tested for amidase activity by using BA-p-NA substrate and pooled the BA-p-NA hydrolysing fractions. Fraction volume, 13.6ml.

trypsin A는 15.7배, trypsin B는 6.8배로 정제되었으며 disc-전기영동 및 겔여과 크로마토그램에 비추어(Fig. 2), 최종정제단계에 도달하였음을 알 수 있었다.

분자량의 추정

Trypsin A와 trypsin B의 분자량을 Sephadex G-

100칼럼크로마토그래피에 의한 겔여과법으로 분석한 결과, trypsin A는 25,000, trypsin B는 26,200이었으며(Fig. 3), SDS-polyacrylamide겔전기영동법으로도 별도로 검증된 결과에 비추어 이 trypsin A와 B는 monomeric enzyme임이 확인되었다.

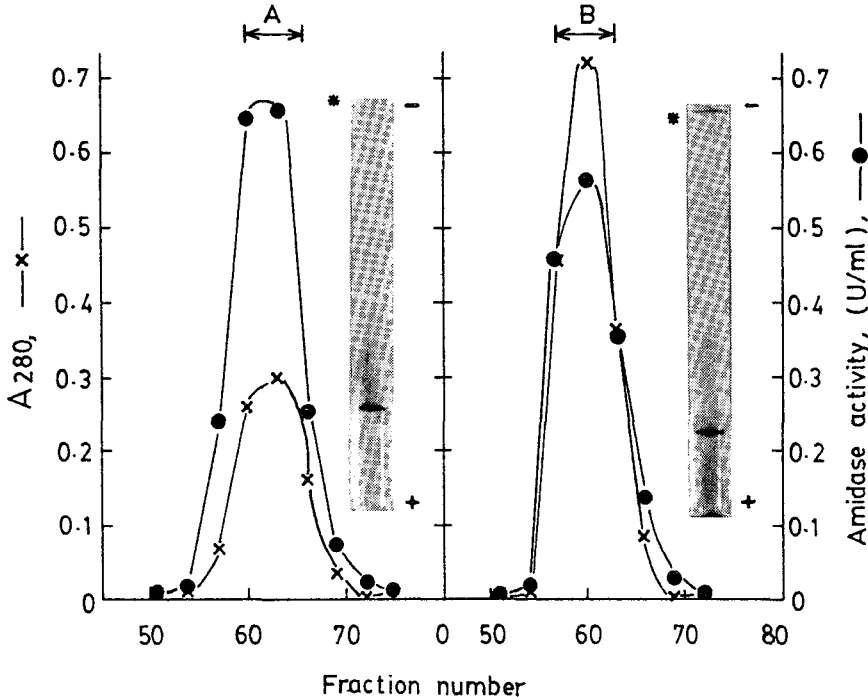


Fig. 2. Chromatography on Sephadex G-75 gel filtration(column size, $\phi 2.0\text{cm} \times 90\text{cm}$) of the proteolytic fraction obtained from the DEAE-Sephacel chromatography of menhaden trypsin-like enzyme. The protein was applied in 20mM Tris-HCl buffer, pH 7.2. The flow rate was $0.29\text{ml}/\text{min}$ and 4.8ml fractions were collected. In the chromatography 14mg Enzyme A and 19mg Enzyme B, respectively, were applied to the column. (A), Enzyme A; (B), Enzyme B.

Electrophoretograms of trypsin A and B were shown on the right side of the chromatograms A and B, respectively.

아미노산 조성

정제된 멘헤이든 trypsin A와 B의 아미노산 조성을 다른 혈합육어에 속하는 멸치와 정어리 trypsin과 비교하여 Table 2에 나타내었다. 아미노산의 잔기수에 대하여 분자당의 수치로서 나타낸 결과를 보면, glycine과 serine, 그밖에 alanine 등이 많이 함유되어 있었던 반면, aspartic acid와 glutamic acid등 산성아미노산이 lysine과 arginine 등 염기성

아미노산에 비하여 월등히 많은 특징을 보였다.

멸치와 정어리의 trypsin에 비하면 glycine과 aspartic acid가 대체로 많은 공통점을 보인 반면, alanine과 tryptophane은 멘헤이든 trypsin이 멸치나 정어리의 trypsin에 비하여 많았는가 하면, arginine은 멘헤이든 trypsin이 멸치나 정어리의 trypsin에 비하여 적은 것을 알 수 있다.

그리고, 멘헤이든 trypsin의 A형과 B형간에 아미

노산 조성이 극히 유사하였으나, tyrosine, serine 및 arginine은 A형이 B형에 비하여 조금 많고, glycine, valine, glutamic acid, aspartic acid 등은 B형이 A형에 비하여 조금 많은 차이점을 보였다.

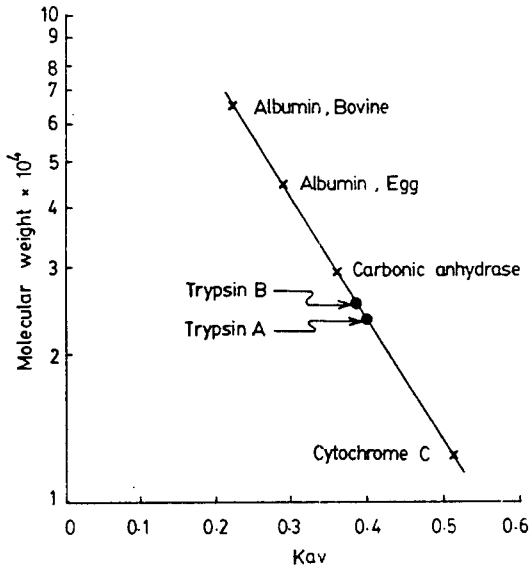


Fig. 3. Estimation of molecular weight of the menhaden trypsin by Sephadex G-100 gel filtration.

효소활성의 온도 및 pH 의존성

효소의 활성화에 미치는 기질에 대한 반응온도와 pH에 의한 영향에 관하여 실험한 결과를 Fig. 4와 Fig. 5에 나타내었다.

Trypsin의 일반적 최적 pH인 8.2에서, 20mM Tris-HCl완충액 중에서 trypsin에 대하여 선택적인 합성기질인 BA-p-NA로서 반응성을 측정 검토한 결과, trypsin A는 60°C에서, 그리고 trypsin B는 55°C에서 상대활성으로 가장 높은 활성을 보였다.

또, 한편, 이들 효소의 반응최적 pH조건을 밝히기 위하여 pH 6, 7, 8에 대하여는 0.1 M NaHCO₃와 0.1 M Tris-HCl의 각 완충액, pH 9, 10에 대하여는 0.1 M KCl과 H₃BO₃의 0.1 M NaOH 혼성완충액, 그리고 pH 11, 12에 대하여는 0.05 M Na₂HPO₄와 0.1 M NaOH 및 0.1 M KCl과 0.1 M NaOH의 각 혼성완충액중에 BA-p-NA기질을 용해시킨 반응액에 대하여 25°C에서 반응시키면서 생성물인 nitroanilide의 생성량을 측정하여 상대활성을 구한 결

Table 2. Comparison of amino acid compositions of menhaden trypsin A and B with the other trypsin from the dark fleshed fishes cited from literature

(Residues/Molecule)

Amino acid	Menhaden		Anchovy* ¹		Sardine* ²
	A	B	A	B	
Asp	25	29	28	29	31
Glu	17	21	27	28	31
Ser	31	28	30	29	16
Gly	47	53	33	34	27
His	4	3	6	6	3
Arg	5	3	10	10	6
Thr	13	15	10	10	19
Ala	22	23	16	17	15
Pro	11	12	11	12	10
Tyr	15	9	6	8	13
Val	19	23	18	18	18
Met	6	5	5	6	1
½Cys	10	8	10	10	8
Ileu	10	10	10	11	11
Leu	14	14	16	18	10
Phe	4	4	5	4	4
Lys	3	4	5	6	17
Trp	8	8	-	-	4

*¹ Martinez et al.(1988)

*² Yoshinaka et al.(1983)

과, trypsin A는 pH 8.0에서 가장 높은 활성을 보였고, trypsin B는 pH 10.0에서 가장 높은 활성을 보였다. 그러나, trypsin A는 pH 8.0~11.0간에서 약 90% 이상의 상대활성을, 그리고 trypsin B도 또한 pH 8.0~10.5간에서 약90% 이상의 높은 상대활성을 보여, 두 효소가 모두 강한 알칼리성쪽에서 반응이 활발함을 알 수 있었다(Fig. 5).

따라서 반응온도와 pH조건에 대한 이들 실험결과에 비추어, 이들 두 효소의 BA-p-NA기질에 대한 반응 최적조건은 trypsin A가 60°C, pH 8.0, 그리고, trypsin B는 55°C, pH 10.0였다.

효소의 Km 정수

정제된 두 효소에 대하여 trypsin의 선택성 합성 기질인 BA-p-NA를 써서 측정한 기질농도에 대한 반응속도관계를 Lineweaver-Burk의 방법으로 plot 하여 Fig. 6과 Fig. 7에 나타내었다.

Trypsin A는 Km=1.4×10⁻⁴M, V_{max}=4.4×10⁻⁷M

$\times \ell^{-1} \times \text{min}^{-1}$ 였으며, trypsin B는 $K_m = 4.3 \times 10^{-5}$ M, $V_{\max} = 2.1 \times 10^{-7} \text{M} \times \ell^{-1} \times \text{min}^{-1}$ 였다.

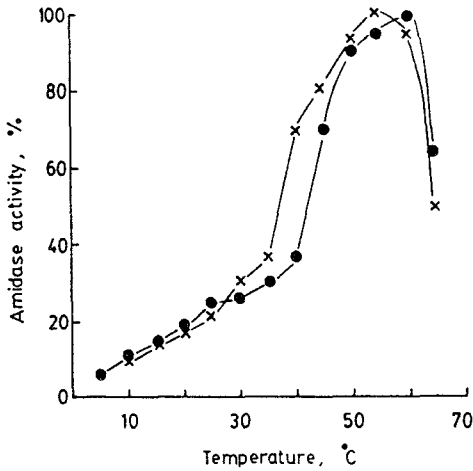


Fig. 4. Effect of temperature on the amidase activity of trypsin A (—●—) and B (—X—). Enzymes were incubated in 20mM Tris-HCl buffer, pH 8.2, at the indicated temperatures for reaction times.

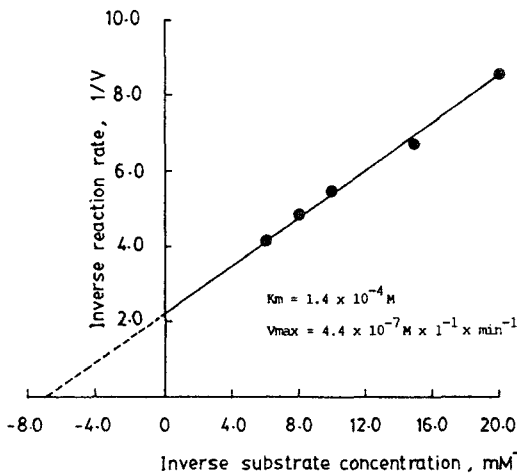


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot of BA-p-NA hydrolysis by the menhaden trypsin A. The reaction mixture contains various concentrations of the substrate and $3.0 \mu\text{g} / \text{ml}$ of trypsin in 20mM Tris-HCl buffer, pH 8.2.

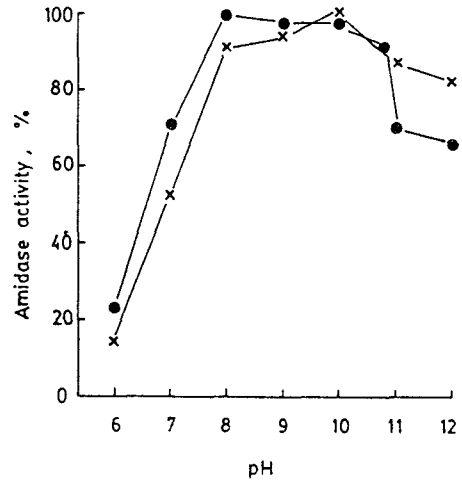


Fig. 5. Effect of pH on the amidase activity of trypsin A (—●—) and B (—X—). The activity was determined at 25°C .

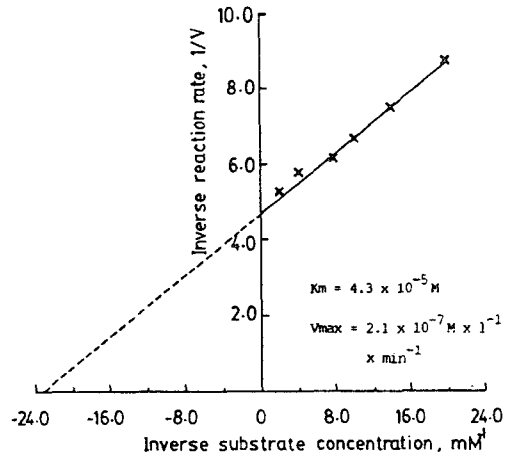


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of BA-p-NA hydrolysis by menhaden trypsin B. The reaction condition is as indicated in the legend to previous Fig. 6.

효소의 안정성에 미치는 pH와 온도의 영향

정제된 두 trypsin의 안정성에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위하여 두 효소를 pH 3.0, pH 7.2 및 pH 9.0의 각 완충액중에서 온도 20°C 로 유지시킨 진탕항온수조에서 각각 일정시간씩 투석시킨 후에 시간 간격별로 상대활성도를 측정하여 Fig. 8과 Fig. 9에 나타내었다.

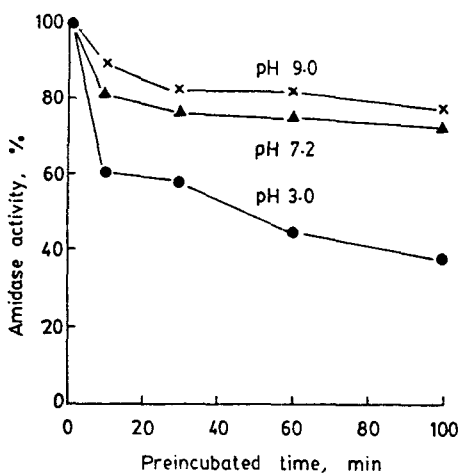


Fig. 8. pH stability of the menhaden trypsin A. The enzymes were preincubated at 20°C and in 0.2 M Glycine-HCl, pH 3.0, 0.2M Tris-HCl, pH 7.2, and 0.2M Glycine-NaOH, pH 9.0, buffers by dialysing time intervals.

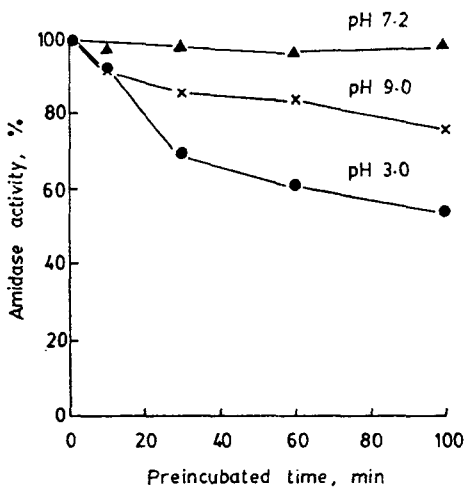


Fig. 9. pH stability of the menhaden trypsin B. The preincubation condition is as indicated in the legend to previous Fig. 8.

먼저 trypsin A에 대하여 보면, pH 3.0에서는 투석 10분에 약 40% 전후까지 실활하였으며 이후 완만하게 실활이 계속되다가 투석 100분에 약 63%가 실활하여 버려 산성 pH에서는 불안정함을 반영하였다. 그러나 pH 7.2인 중성 pH에서는 투석 100분에도 29% 정도만이 실활하여 산성 pH에 비

하면 안정함을 알 수 있었다. 그리고 pH 9.0에서는 투석 100분일때 23% 정도가 실활하여 그 차이는 크지 않지만 중성에서 알칼리성쪽으로 pH가 기울수록 안정한 효소임을 뒷받침하였다.

이같은 pH에 대한 안정성을 trypsin B에 대하여도 같은 방법으로 검증하여 본 결과, 역시 산성인 pH 3.0에 투석시켰을 때는 시간에 따라 급속히 실활하여 투석 100분에 약 46%의 실활율을 보였으나, 중성에 해당하는 pH 7.2에 투석시켰을 때는 불과 1% 전후의 실활에 그쳐 trypsin A에 비하면 중성완충액중에서는 아주 안정한 성질을 보이는 차이가 있었다. 그러나 알칼리성의 pH 9.0에서는 약 24% 정도가 실활하여 trypsin A의 경우와 유사한 실활율을 보였다. 이와같이 trypsin A와 B간에는 pH에 대한 안정성의 관점에 있어서도 다소 차이가 나타나는 결과는 흥미를 끈다.

다음에 trypsin A와 B를 중류탈이온수 중에서 투석한 후에 각각 상이한 온도조건에 약 60분간 노출시킨 후에 각각 상대활성도를 측정하므로써 보관온도에 따른 안정성을 분석 검토한 결과를 Fig. 10에 나타내었다.

대체로 trypsin A와 B가 30°C까지는 안정성에 별다른 영향을 보이지 않다가 40°C 전후에서는 조금씩 실활하여 갔으며, 45°C에서는 trypsin A는 불과 15% 정도가 실활하였는데 반하여, trypsin B는 44% 정도가 실활하여 trypsin A에 비하면 trypsin B

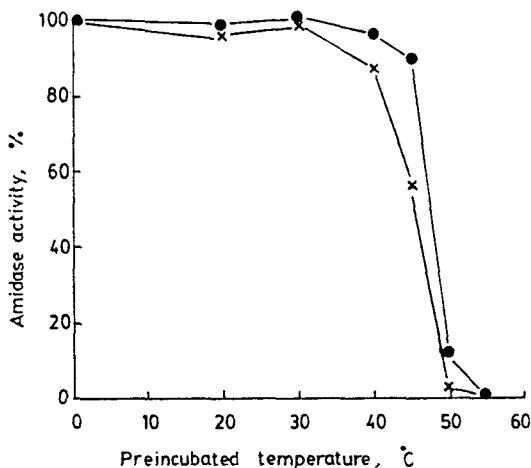


Fig. 10. Thermostability of the menhaden trypsin A(—●—) and B(—X—). Enzymes(protein concentration, 40μg/ml) were maintained at the various temperature for 60min before assaying.

는 보관온도에 의하여 훨씬 민감함을 알 수 있었다.

그러나 50°C에서는 trypsin A가 87%, trypsin B는 98%까지 실패하였으며, 55°C에서는 두 효소 모두 활성을 측정할 수 없었다. 결과적으로 이들 두 효소는 열에 의하여 극히 불안정한 효소임을 알 수 있었다.

효소활성에 미치는 저해제의 영향

Trypsin A와 B의 BA-p-NA 기질에 미치는 몇가지 선택저해제의 영향에 관하여 실험한 결과를 Table 3과 그리고, serine계 효소에 대하여 활성중심에 비가역적저해제로서 알려져 있는 DFP의 농도별 저해정도에 대하여는 Fig. 11에, 또, trypsin에 대한 선택적 합성저해제인 TLCK의 농도별 저해정도에 대하여는 Fig. 12에 각각 나타내었다.

먼저 trypsin에 대한 특이적 저해제인 TLCK, SBTI, antipain 등에 의하여서는 각기 Table 3에 제시된 농도 이상에서는 거의 완전저해를 보였으며, trypsin에 대한 경쟁적저해제인 benzamidine의 1.25 mM일때는 trypsin A는 86%, trypsin B는 57% 정도가, 그리고 PMSF 5.0mM일때는 trypsin A는 16%, trypsin B는 44%가 각기 저해를 받아, 따라서 trypsin A와 B에 대한 이들 저해제의 반응성에 비추어 두 효소는 활성중심의 구조가 차이가 있음을 암시하였다.

또 이들 두 효소는 금속에 대한 chelate제인 EDTA 0.50 mM에 대하여 trypsin A는 86%, trypsin

B는 100%가 저해를 받았고, 또 효소축매의 활성 측이 serine이나 cysteine 잔기에 대하여 특이적 저해제인 leupeptin 2.15 μg/ml에 대하여도 완전한 저해를 보였다.

활성중심이 serine계인 효소에 대하여 특이성을 보이는 DEP에 대하여(Fig. 11) 0.2mM 이하까지는

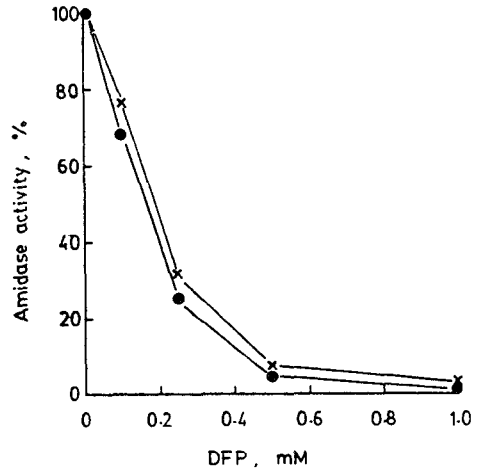


Fig. 11. Effect of DFP on the activity toward BA-p-NA of the menhaden trypsin A(—●—) and B(—X—). Enzyme(30μg/ml) was mixed with equal volume of inhibitor solutions with the concentrations shown, and assayed after preincubation at 30°C for 15min.

Table 3. Effect of inhibitors on the amidase activity of Trypsins A and B of Menhaden*

Inhibitor	Concentration	Relative activity, %	
		Trypsin A	Trypsin B
Control		100	100
TLCK	2.50 μM	0	0
TPCK	1.25 μM	100	100
SBTI	0.15 μg/ml	0	0
Benzamidine	1.25 μM	14	43
PMSF	5.00 μM	84	56
EDTA	0.50 μM	14	0
Leupeptin	2.15 μg/ml	0	0
Antipain	8.50 μg/ml	0	0

* Enzymes(39μg/ml) were mixed with equal volume of inhibitor solutions with the concentrations shown in this table and preincubated at 30°C for 15min before assaying.

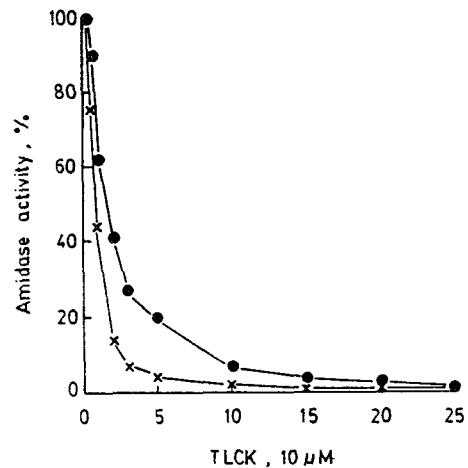


Fig. 12. Effect of TLCK on the activity toward BA-p-NA of the menhaden trypsin A(—●—) and B(—X—). The preincubation condition is as indicated in the legend to previous Fig.

농도의 증가와 더불어 규칙적으로 저해를 보이다가 그 이상의 농도에서는 점차 저해가 심해진 후에 1.0mM의 농도에서는 거의 100%의 저해율을 보였다.

Trypsin의 활성중심부근의 histidine잔기의 알킬화에 의하여 저해를 보이는 TLCK의 농도별 저해 정도를 검토한 결과(Fig. 12), 3 μ M까지는 거의 직선적으로 급격한 저해를 보인후에 이후 완만하게 저해가 농도와 더불어 계속된 후에 농도 25 μ M 이상에서는 거의 100%의 완전한 저해를 보였다.

고 찰

멘헤이든 장기에서 4염화탄소를 쓴 지방의 제거에 이어, Benzamidine-Sepharose 6B 친화성크로마토그래피를 응용한 결과, 2종의 trypsin(편의상 trypsin A와 B로 칭함)을 순수 정제할 수 있었다. 이들 두 효소는 최종 정제단계인 Sephadex G-75 칼럼크로마토그래피를 거쳤을때는 수율이 장기의 탈치추출물에 대하여 trypsin A가 23%, trypsin B는 16%였다. 그리고, 고유활성과 정제도가 trypsin A 4.40 u/mg, 15.7배, 그리고 trypsin B 1.91 u/mg, 6.8배였는데, 이같은 고유활성과 정제도는 Martinez 등(1988)에 의하여 발표된 멸치(*Engraulis encrasicolus*)의 유문수와 장기에서 정제한 trypsin A와 B의 고유활성과 정제도가 각각 2.5 u/mg과 4.7 u/mg 및 12.5배와 23.5배였다는 내용에 비하면 고유활성에 있어서는 trypsin A는 멘헤이든이 멸치보다, trypsin B는 멸치가 멘헤이든보다 약 2배 정도 높음을 알 수 있었고, 정제도에 있어서는 trypsin A는 멘헤이든이 멸치에 비하여, trypsin B는 멸치가 멘헤이든에 비하여 훨씬 높음을 알 수 있었다.

그리고 정제된 두 효소의 분자량은 trypsin A가 약 25,000, trypsin B는 약 26,200으로서 이미 어류의 trypsin에 관하여 보고된 병어(*Mallotus villosus*)의 두 trypsin 약 28,000(Hjelmeland and Raa, 1982), 그린랜드 대구(*Gadus ogac*)의 trypsin 23,500(Simson and Haard, 1984), 멸치의 trypsin A 27,000, trypsin B 28,000(Martinez et al., 1988)과는 다소 차이가 있음을 알 수 있었다.

이들 두 효소의 아미노산 조성에 비추어 이미 발표된 다른 혈압육어의 trypsin과는 큰 차이는 없으나(Martinez et al., 1988), arginine과 lysine등 염기성아미노산이 다소 적은 반면, glycine과 alanine 등 중성아미노산이 조금 많이 함유되어 있는 것이 특징이었다. 대체로 구성아미노산의 조성 및 배열

상태와 활성중심의 구조 등에 의하여 효소의 성질은 많은 영향을 받는다는 사실(Dixon and Webb, 1970)에 비추어 비록 미미하지만 이같은 차이는 다음에 기술하는 효소적성결과 관련하여 흥미있는 결과이다.

이들 두 trypsin의 반응최적온도와 pH는 다른 혈압육어 trypsin의 그것(Murakami and Noda, 1981; Pyeon et al., 1988; Martinez et al., 1988)과 비슷한 경향을 보였으나 반응을 위한 pH조건은 멘헤이든의 두 trypsin이 알칼리성측에서 넓은 범위에 걸쳐 있는 것이 차이점이었다.

그리고 이들 두 효소는 trypsin의 합성기질 중 ester기질 TAME에 비하면, amide기질 BA-p-NA에 의하여 보다 예민한 반응을 보였기에 효소의 활성에 관한 실험은 이후 BA-p-NA 기질로서 수행하였다. 그리고 이들 효소가 BA-p-NA기질에 대하여 높은 활성을 보이는 성결과 다음에 기술하는 저해제에 관한 성질 등에 비추어 본 효소들은 trypsin임이 밝혀졌다.

이들 두 효소의 Km값은 같은 혈압육어 중 멸치의 trypsin A 0.83 mM와 trypsin B 0.66 mM(기질 BA-p-NA에 대하여)에 비하면(Martinez et al., 1988), 훨씬 낮은 값을 보여, 멘헤이든 trypsin 쪽이 멸치 trypsin에 비하여 BA-p-NA 기질에 대한 친화성이 보다 큰 결과임을 뒷받침하였다. 이들 효소의 pH에 따른 안정성을 검토한 결과, trypsin A와 B간에는 다소 차이는 있지만, 산성 pH일수록 불안정함을 확인하였다. trypsin의 특정 pH에 있어서의 안정성은 해당 pH에 있어서의 효소의 하전상태와 밀접한 관계가 있으며(Fersht, 1977), 대체로 해상 동물체에서 분리한 trypsin은 산성 pH 조건에서 극히 불안정한 것으로 보고되어 있고(Murakami and Noda, 1981; Yoshinaka et al., 1983), 포유동물 trypsin은 산성 pH조건에서 비교적 안정한 것으로 알려져 있으며(Vithayathil et al., 1961; Walsh, 1970), 동물의 진화와 관련하여 분자량은 보다 적고, 이같은 현상은 분자표면의 부하전(negative charge)의 감소를 가져와 결과적으로 산성 pH조건에서 활성이 감소한다는 보고가 있어(Martinez, et al., 1988), 본 연구의 결과와 관련하여 흥미있는 점이다.

온도안정성에 관한 실험에서 이들 두 효소는 불과 40°C 이상에서 급격히 실활하여 고온에서는 비교적 불안정한 성질이었는데, 대체로 어류의 trypsin은 축우(畜牛)의 trypsin에 비하여 불안정한 것으로 보고되어 있으나(Hjelmeland and Raa, 1982), trypsin의 온도안정성과 효소의 구조와의 간에는 밀접한 관계가 있는 것으로 생각되지만 충분한 뒷

받침자료는 아직 없다.

이들 두 효소는 trypsin에 대한 선택적 저해제인 TLCK, SBTI, benzamidine 등에 의하여서 뿐만 아니라, 미생물균주에 의하여 생산된 trypsin 선택저해제 leupeptin이나 antipain 등에 의하여서도 저해가 분명히 들어났으므로 trypsin임이 확인되었으며, 동시에 활성중심이 serine일때 선택적 저해를 보이는 PMSF에 의하여도 또한 저해가 분명히 나타났으므로 멘헤이든 장기에서 분리된 이 두 trypsin 유사효소는 serine계의 trypsin임이 판명되었다.

요 약

멘헤이든의 장기에서 황산암모늄염석, 친화성크로마토그래피(Benzamidine-Sepharose 6B), 이온교환크로마토그래피(DEAE-Sepacel), 겔여과크로마토그래피(Sephadex G-75)등의 정제과정을 거쳐 2종의 trypsin-유사효소를 정제하고 다른 혈압육어 trypsin의 성질과 비교·검토할 수 있는 효소학적 성질에 관하여 분석하였다.

이들 두 효소는 trypsin에 대한 선택성 합성기질인 $N\alpha$ -benzoyl-DL-arginine *p*-nitroanilide(BA-*p*-NA)를 분해하고, 이미 알려져 있는 trypsin 저해제 tosyl lysyl chloromethyl ketone(TLCK), soybean trypsin inhibitor(SBTI), benzamidine, leupeptin, antipain 등에 의하여 현저히 저해를 받으므로 serine계의 trypsin임이 확증되었다.

이들 두 효소의 분자량은 겔여과법과 SDS-polyacrylamide 전기영동법에 의하여 trypsin A가 약 25,000, trypsin B가 약 26,200이었으므로 이미 밝혀진 혈압육어의 trypsin 중에서는 비교적 작았다.

이들 효소는 다른 혈압육어들에 비하여 염기성 아미노산에 속하는 arginine과 lysine이 다소 적었던 반면, 중성아미노산인 glycine과 alanine, 그밖에 tryptophan이 조금 많았다.

한편, 이들 효소는 BA-*p*-NA 기질에 대하여 60°C 전후, pH 8~11에서 최대활성을 보였으며, 산성 pH의 조건과 40°C 이상의 온도에서는 극히 불안정하였다.

이들 두 효소의 BA-*p*-NA에 대한 Km 정수는 trypsin A가 $1.4 \times 10^{-4}M$, trypsin B가 $4.3 \times 10^{-5}M$ 였다.

문 헌

- Andrews, P.(1964) : Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex gel filtration. *Biochem. J.*, 91, 222~233.
- Davis, B.(1964) : Disc-electrophoresis-II. Method and application to human serum protein. *Ann. New York Acad. Sci.*, 121, 404~427.
- Division of Millipore(1986) : The Pico-Tac method, A manual of advanced techniques for amino acid analysis. WMP 2, Rev. 1. Waters.
- Dixon, M. and E. Webb(1979) : *Enzymes*. 3rd ed., Longman Group Ltd., London, England, 231~241, 261~262.
- Erlanger, B., N. Kolowsky and W. Cohen(1961) : The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 95, 271~278.
- Fersht, A.(1977) : Enzyme structure and mechanism. Freeman, U. S. A. Chap. 10~11.
- Gates, B. and J. Travis(1969) : Isolation and comparative properties of shrimp trypsin. *Biochemistry*, N. Y. 8, 4483~4489.
- Hjelmeland, K. and J. Raa(1980) : Fish tissue degradation by trypsin type enzymes. In *Advances in Fish Science and Technology*(Edited by Connell J. J.), Fishing News Books Ltd., Farnham, Surrey England, 456~459.
- Hjelmeland, K. and J. Raa(1982) : Characteristics of two trypsin type isozymes isolated from the arctic fish Capelin(*Mallotus villosus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 71B(4), 557~562.
- Kim, H. and J. Pyeon(1986) : 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(6), 547~557.
- L. K. B.(1983) : An introduction to the LKB 4150 Alpha amino acid analyser. LKB biochrom Ltd. England, AB 38.
- Lowry, O., N. Rosebrough, A. Farr and R. Radall (1951) : Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265~275.
- Martinez, A. and Gildberg(1988) : Autolytic degradation of belly tissue in anchovy, *Engraulis encrasicolus*. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 23, 185~194.

- MIT Sea Grant(1988) : Quarterly report. 10(4), 1~4.
- Murakami, K. and M. Noda(1981) : 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, 17~26.
- Muramatsu T. and T. Morita(1981) : Anionic trypsin-like enzymes from the crab, *Eriocheir japonicus* de Haan, active in more acidic media. *Comp. Biochem. Physiol.*, 527~533.
- Osnes, K. and V. Mohr(1985) : On the purification and characterization of three anionic serine-type peptide hydrolases from antarctic krill, *Euphausia superba*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 82B, 607~619.
- Overnell J.(1973) : Digestive enzymes of the pyloric caeca and of their associated mesentery in the cod(*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 46B, 519~531.
- Pyeun J., H. Kim and M. Heu(1988) : 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), 85~96.
- Reek, G. and H. Neurath(1972) : Pancreatic trypsinogen from the African lungfish. *Biochemistry*, 11, 503~510.
- Simpson, B. and N. Haard(1984) : Trypsin from Greenland cod, *Gadus ogac*. Isolation and Comparative properties. *Comp. Biochem. Physiol.*, 79B(4), 613-622.
- Spencer, R. and F. Wold(1969) : A new convenient method for estimation of total cystine-cysteine in proteins. *Anal. Biochem.*, 32, 185~190.
- Suyama, S. and S. Konosu(1987) : *Seafood Science*. Kosheishagoseigaky, Tokyo, Japan, 95~107.
- Travis, J. and R. Roberts(1969) : Human Trypsin. Isolation and Physical-chemical characterization. *Biochemistry*, 8, 2884~2889.
- Vithayathil, A., F. Buck, M. Bier and F. Nord(1961) : On the mechanism of enzyme action. LXXII. Comparative studies of trypsins of various organs. *Archs. Biochem. Biophys.*, 92, 532~540.
- Walsh, K.(1970) : Trypsinogens and trypsins of various species. *Meth. Enzym.*, 19, 41~63.
- Weber, K. and M. Osborn(1969) : The reliability of molecular weight determinations by sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244, 4406~4412.
- Whitaker, J.(1963) : Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex. *Anal. Chem.*, 1950~1953.
- Yoshinaka, R., T. Suzuki, M. Sato and S. Ikeda (1983) : Purification and some properties of anionic trypsin from the catfish pancreas. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 49, 207~212.
- Zwilling, R., G. Pfleiderer, H. Sonnenborn, V. Kraft and I. Stucky(1969) : The evolution of endopeptidases-V. Common and different traits of bovine and crayfish trypsin. *Comp. Biochem. Physiol.*, 28, 1275~1287.

1990년 2월 1일 접수

1990년 2월 15일 수리