

## 복상어와 고등어의 Trypsin에 관한 비교 효소학적 연구

### 1. Trypsin의 정제와 반응조건

변재형 · 조득문\* · 허민수

부산수산대학 식품영양학과 · \*동래여자전문대학 식품영양과

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

### 1. Purifications and Reaction Conditions 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*

To elucidate the physiological and biochemical differences between chondrichthyes and osteichthyes, the properties of the specific digestive enzymes in cat-shark, *Cephaloscyllium umbratile*, and mackerel, *Scomber japonicus*, were studied.

Homogenous trypsin proved through the disc-electrophoresis, SDS-PAG electrophoresis and gel filtration was obtained from the pancreas of cat-shark by 50~70% saturated ammonium sulphate fractionation, DEAE-Sephadex A-50 column chromatography, benzamidine-Sepharose 6B affinity chromatography and Sephadex G-75~120 gel filtration.

Two types of trypsins were also obtained from the pyloric caeca of mackerel by 30~70% saturated ammonium sulphate fractionation and the slightly modified procedure from the method adopted in the purification of cat-shark trypsin. The two trypsins, designated trypsin A and B, were proved their homogeneity by disc- and SDS-PAG electrophoresis and gel filtration.

The molecular weights of the trypsins were estimated to be 31,700 for cat-shark trypsin, 30,000 for mackerel trypsin A and 29,000 for mackerel trypsin B by SDS-PAG electrophoresis, but those were estimated to be 21,500 for cat-shark trypsin, 23,700 for mackerel trypsin A and 21,500 for mackerel trypsin B by gel filtration.

The trypsins exhibited their optimum conditions at pH 9.0 and on temperature ranged from 45°C to 50°C for cat-shark, and at pH 8.0 and a temperature of 50°C for mackerel trypsin A and B, respectively.

The cat-shark trypsin was stable at pH 10.0 and the temperature below 10°C, whereas the mackerel trypsin A and B were stable in the range over pH 7.0 to pH 9.0 below 10°C,

---

이 논문은 1990년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

and at pH 8.0 below 35°C, respectively.

The mackerel trypsins were severely inhibited by some heavy metal ions such as Ag<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup> compared to cat-shark trypsin.

All of the enzymes were also inhibited by antipain, leupeptin, TLCK(tosyllysine chloromethyl ketone) and SBTI(soybean trypsin inhibitor) remarkably. The inhibitory effects of PMSF(phenylmethane sulphonyl fluoride), DFP(diisopropyl fluorophosphate) and benzamidine were indicated that these enzymes belong to serine-proteases.

## 서 론

동물의 소화관에서 분비되는 단백질분해효소 중 trypsin은 Northrop와 Kunitz(1932)가 송아지 췌장에서 결정상태로 분리하여 그 성질의 일부를 발표한 이래, 그 zymogen의 활성화(Davie와 Neurath, 1955; Radhakrishnan 등, 1967) 및 효소 촉매기구의 구명과 관련한 연구(Mares-Guia, 1968)를 비롯하여 고등동물 유래 trypsin의 정제 및 그 성질에 관한 연구(Travis와 Roberts, 1969; Voytek과 Gjessing, 1971; Bricteux-Gregoire 등, 1966; Keil, 1971) 등 비교적 많은 연구가 이루어져 있다.

한편, 수산동물의 소화관 중에 분포하는 trypsin에 관하여도 어류 중의 분포와 관련하여 대구의 유문수에 분포하는 trypsin의 활성을 비교 측정 발표한 Overnell(1973)의 보고, 곱상어의 췌장 trypsin에 대하여 분포 분리와 그 아미노산 조성을 소와 돼지에서 분리한 그것과 비교 검토한 Titani 등(1975)의 보고, 메기의 췌장 trypsinogen의 활성화 조건과 효소적인 성질에 관한 Yoshinaka(1981a, b)의 보고, Murakami와 Noda(1981)의 정어리 유문수에서 분리 동정된 trypsin의 성질과 관련된 보고, Pyeun과 Kim(1986)의 고등어 유문수에 분포하는 3종 알칼리성 단백질분해효소의 정제에 관한 보고, Kim과 Pyeun(1986)의 동 알칼리성 단백질분해효소의 성질에 관한 보고, Kolodzeiskaya 등(1987)과 Pivnenko 등(1989)에 의한 연어의 trypsin의 정제와 분자의 특징 및 아미노산 조성에 관한 보고, Martinez 등(1988)의 멸치 trypsin의 성질에 관한 보고, 그리고 Pyeun 등(1990)의 Menhaden(*Brevortia tyrannus*) trypsin A와 B의 아미노산 조성 및 효소적 성질에 관한 보고 등 최근에 이르러 동물의 종류 별에 따른 효소적 성질의 차이와 관련하여 많은 연구들이 보고되고 있다.

그러나 어류 중에서는 진화상 비교적 상관성이 깊으면서도 생리 생태적 차이점이 두드러진 연골어류와 경골어류를 대상으로 하여 동일 기능을 갖는 효소인 trypsin에 대하여 그 효소적 성질의 차

이를 비교효소학적 관점에서 다룬 내용의 연구는 되어있지 않다.

따라서 본 연구는 연골어류 중 복상어와 경골어류 중 고등어를 시료로 선정하여 그 각각이 가진 trypsin의 정제 방법을 검토 확립하였으며, 정제 효소에 대하여는 disc- 및 SDS-polyacrylamide 전기영동과 겔-여과법에 의하여 균질성을 확인한 후에 그 반응 활성에 미치는 pH와 온도조건 및 몇가지 첨가물의 영향에 관하여 비교 분석하였기에 보고한다.

## 재료 및 방법

### 재 료

복상어(*Cephaloscyllium umbratile* Jordan et Fowler: 체장, 95~102cm; 체중, 3.8~4.1kg; 산지, 한국 남해안; 어획일, 1991년 2월 7일)는 부산 남천 해변 시장에서 생존 상태로 구입하여 바로 저온실습실로 옮긴 다음 췌장부를 절취하여 동결상태(-40°C)로 보존하여 두고 효소 정제용 시료로 하였으며, 고등어(*Scomber japonicus*: 체장, 35~41cm; 체중, 383~726g; 산지, 한국 남해안; 어획일, 1990년 9월 15일)는 부산공동어시장에서 어획후 즉시 동결시켜 운반된 것을 구입하여 저온실로 운반한 후에 그 유문수를 각각 절취하여 역시 복상어와 같은 상태로 보존하여 두고 효소 정제용 시료로 하였다.

### 분석방법

단백질 농도; Lowry 등(1951)의 비색법으로 측정하였으며, 효소 정제과정 중의 단백질획분의 검색은 분광광도계(UV/Vis spectrophotometer, Shimadzu UV-140-40)로써 측정하여 구하였다.

효소 trypsin의 활성; Erlanger 등(1961)의 방법을 다음과 같이 부분적으로 축소, 개량하여 측정하였다. 곧, 효소용액 50ul(단백질 농도: 10~20ug/ml 전후)와 10mM BA-p-NA의 DMSO(dimethyl sulfoxide) 용액을 stock solution으로 하여 만든 5.0×10<sup>4</sup>

M BA-*p*-NA의 100mM Tris-HCl, pH 8.0 용액 950  $\mu$ l를 반응혼액으로 하고 30°C에서 5분간 반응시켰을 때 유리되어 나오는 *p*-nitroanilide의 양을 Kinetic spectrophotometer(Philips 사제)로써 파장 410 nm에서 측정하여 효소 활성단위로 계산하였다. 이때의 효소 활성단위는 30°C에서 1분간 반응시켜 유리되어 나오는 *p*-nitroanilide 1  $\mu$ mol을 효소단위 U로 표기하고 amidase activity로서 나타내었다. 한편, 효소의 정제과정 중의 효소활성의 증가 정도에 대하여 천연기질에 의한 효소의 활성을 비교 검토코자 Hammarsten casein 기질에 대하여 Anson (1938)의 방법에 따라 측정하여 천연기질에 대한 합성기질과의 비교 자료로 제시하였다.

### Trypsin의 정제

#### 1) 복상어의 trypsin

탈지 조효소의 조제; 마쇄한 복상어 췌장 약 200 g을 취하여 1% NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub> 및 0.02% NaN<sub>2</sub>를 함유하는 20mM Tris-HCl, pH 7.2 완충액 4배용으로 충분히 추출한 다음, 때때로 잘 저으면서 40°C에서 효소를 활성화시키고 원심분리(12,000×g, 20 min)하였다. 얻어진 상층액은 0.2배(v/v)의 4염화탄소를 가하여 충분히 교반한 후에 원심분리(12,000×g, 20min)하여 탈지 조효소를 얻었다.

Trypsin의 정제; 탈지 조효소를 50~70% 포화 황산암모늄으로 염석하고 얻은 획분을 다시 20mM Tris-HCl, pH 7.2 완충액에 현탁시켰다. 다음에 같은 완충액으로 평형화시켜 DEAE-Sephadex A-50 칼럼( $\phi$  3.0×30cm)에 통과시켜 대칭이 되는 하전을 띤 효소 단백질을 선택적으로 흡착시킨 다음, 같은 완충액에 0.2M와 0.6M의 NaCl을 함유하는 각 500 ml의 용액으로 농도구배법에 의하여 용리시켜 BA-*p*-NA 혼성기질에 대하여 양성인 trypsin 유사 효소획분을 취하였다. 이 획분을 질소가스 압력을 이용하는 한외여과기(Sartorius, SM 14529)로써 농축하고 1% NaCl 함유 20mM Tris-HCl, pH 7.2 완충액으로 충분히 투석시킨 후에 원심분리(12,000×g, 30min)하여 상층액을 취하였다. 이 획분을 미리 같은 완충액으로 평형화시킨 benzamidine-Sepharose 6B 칼럼( $\phi$  1.2×11cm)에 통과시켜 trypsin에 닮은 특이성을 가진 단백질을 선택적으로 흡착케 하였다. 그리고 같은 완충액을 효소단백질이 흡착된 칼럼에 충분히 통과시켜 흡착되지 않은 불순단백질을 제거한 후 1% NaCl과 125mM benzamidine을 함유하는 20mM Tris-HCl, pH 7.2 완충액으로 칼럼을 통과시켜 흡착된 획분을 용리시켰다. 용리된 획분은 질소가스 압력으로 한외여과기(Sa-

rtorius, SM 14529)를 써서 농축한 다음, 0.1M NaCl 함유 10mM sodium phosphate, pH 7.0 완충액을 써서 충분히 투석시켰다. 투석한 효소액은 원심분리(12,000×g, 30min)하고 같은 완충액으로 충분히 평형화시킨 Sephadex G-75~120 칼럼( $\phi$  0.9×90 cm)을 통과시키면서 BA-*p*-NA 혼성 반응액에 대하여 양성(+)을 보이는 획분만을 취하여 같은 한외여과기로써 농축하고 탈이온화 재증류수를 써서 투석하므로써 복상어 trypsin 표품을 얻었다.

#### 2) 고등어의 trypsin

탈지 조효소의 조제; 마쇄한 고등어 유문수 약 200g을 취하여 복상어에서와 같은 방법으로 탈지 조효소액을 조제하였다.

Trypsin의 정제; 탈지 조효소를 30~70% 포화 황산암모늄 용액으로 염석하여 얻은 획분을 1% NaCl 함유 20mM Tris-HCl, pH 7.2 완충액에 다시 현탁시킨 다음 같은 완충액 중에서 충분히 투석시키고 원심분리(12,000×g, 30min)한 상층액을 미리 같은 완충액으로 평형화시킨 benzamidine-Sepharose 6B 칼럼( $\phi$  1.2×11cm)에 통과시켜 trypsin에 닮은 특이성을 갖는 단백질을 선택적으로 흡착케 하였다. 그리고 같은 완충액을 효소단백질이 흡착된 칼럼에 충분히 통과시켜 흡착되지 않은 불순단백질을 녹여 내린 후에 1% NaCl과 125mM benzamidine을 함유하는 20mM Tris-HCl, pH 7.2 완충액으로 칼럼을 통과시켜 흡착된 획분을 용리시켰다. 용리된 획분은 질소가스 압력으로 한외여과기(Sartorius, SM 14529)를 써서 농축한 다음, 20mM Tris-HCl, pH 7.2 완충액을 써서 충분히 투석시켰다. 투석한 효소 용액은 원심분리(12,000×g, 30 min)하고 같은 완충액으로 충분히 평형화시킨 DEAE-Sephadex A-50 칼럼( $\phi$  3.0×30cm)에 통과시켜 흡착된 획분을 0~0.4M NaCl 함유 20mM Tris-HCl, pH 7.2 완충액(600ml : 600ml)을 써서 농도구배법으로 용리시켰다.

용리중에 BA-*p*-NA 기질 함유 반응 혼액에 대하여 양성(+)인 두개의 단백질 획분(잠정적으로 trypsin-A와 trypsin-B라 호칭하여 구분함)을 모아 한외여과기로써 농축하였다. 이렇게 농축한 두 효소 획분은 다시 같은 완충액으로 충분히 투석시켰다. 이 단계에서 전기영동적으로 검정한 결과 균질한 상태가 아니었기 때문에 먼저 용리해 나온 trypsin-A 획분은 DEAE-Sephadex A-50 칼럼( $\phi$  1.6×25cm)에 같은 요령으로 재차 흡착시켜 동일한 완충액에 0~0.2M NaCl 농도로 만든 염용액(150ml : 150ml)으로 농도 구배법에 따라 재차 용리시켜 농축 투석시키므로써 고등어 trypsin-A의 표품을

얻었다.

그리고 trypsin-B로 구분한획분은 역시 같은 DEAE-Sephadex A-50 칼럼( $\phi 1.6 \times 30cm$ )을 써서 같은 완충액으로 만든 염용액(0.05~0.25M NaCl, 150ml : 150ml) 역시 농도구배법에 따라 용리시켜, 농축 투석한 후에 전기영동적으로 검토한 결과 균질상태까지 이르지 않았으므로 benzamidine-Sepharose 6B 칼럼( $\phi 1.2 \times 6.0cm$ )에 다시 통과 흡착시켜 위의 친화성 크로마토그래피에서와 같은 요령으로 1% NaCl와 125mM benzamidine 함유 20mM Tris-HCl, pH 7.2 완충액으로 용리시켜 증류수에 충분히 투석시킨 다음, 전기영동과 겔 여과법으로 검정을 거쳐 trypsin-B의 표품을 얻었다.

위 정제과정 중 단계별 효소 활성의 변화와 크로마토그래피 분석중의 효소 활성 곡선의 측정은 주로 BA-p-NA 기질을 함유하는 반응 혼액으로 측정하였으며, 각 단계별에 따라 Hammarsten casein을 기질로 하는 활성도의 측정도 병행하여 천연기질에 대한 비교 자료로 하였다.

#### Trypsin의 순도와 분자량

1) 전기영동적 분석; 순도 검정을 위한 분석은 Davis(1964)의 disc-PAG(polyacrylamide gel) 전기영동법에 의하였으며, subunit의 분자량 측정은 Weber와 Osborn(1969)의 방법에 따라 sodium dodecyl(SDS)화 분자량 표준 표적단백질(Sigma제: cytochrome C, 14,300; soy bean trypsin inhibitor, 20,000; trypsinogen, 24,000; carbonic anhydrase, 29,000; egg albumin, 45,000; bovine albumin, 66,000)의 전기영동 이동도를 대조로 하고 SDS효소 표준의 전기영동 이동도를 측정하여 구하였다.

2) 겔여과에 의한 분석; Whitaker(1963)의 방법에 따라 측정하였다. 곧, Sephadex G-75~120 칼럼( $\phi 0.9cm \times 95.0cm$ )에 효소 시료와 분자량 표준 표적 단백질의 완충액 중의 혼액을 10mM sodium phosphate, pH 7.0 완충액을 써서 교대로 용리(유속, 15ml/hr; 분획용량, 1ml)시킨 후에 용리 위치와 분자량과의 관계를 대조하여 구하였다. 분자량 표준 표적 단백질은 Sigma사 제의 cytochrome C (12,400Da), carbonic anhydrase(29,000Da), egg albumin(45,000Da) 및 bovine albumin(66,000Da)을 사용하였다.

#### 효소활성의 최적 pH와 온도조건

최적 pH 조건; 정제효소액(단백질 농도: 복상어 trypsin, 25 $\mu g/ml$ ; 고등어 trypsin-A, 20 $\mu g/ml$ ; 고등어 trypsin-B, 10 $\mu g/ml$ ) 50 $\mu l$ 에 대하여 각 pH별(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) 0.5mM BA-p-NA 기질용액 950 $\mu l$ 를 가하고, 반응(반응온도, 30 $^{\circ}C$ ; 반응시간, 5분)시켜 매 분당 유리되어 나오는 p-nitroanilide의 양으로 효소활성을 측정하였다.

최적온도조건; 정제효소액(단백질 농도: 최적 pH 조건 측정시와 같음) 50 $\mu l$ 와 기질(0.5mM BA-p-NA를 함유하는 100mM Tris-HCl, pH 8.0 용액) 950 $\mu l$ 의 혼액을 반응온도 20~65 $^{\circ}C$ 에서 5 $^{\circ}C$  간격으로 반응온도를 조정하면서 5분간 반응시켜 유리되어 나오는 p-nitroanilide의 양을 측정하므로써 최적 온도조건을 구하였다.

위의 pH와 온도조건에 대한 활성도의 표시는 고유활성(U/mg)으로 나타내었다.

한편, 정제효소를 pH 5.0에서 pH 11.0까지의 각 완충액(최적 pH 조건과 같음)중에서 30분간 투석시킨 후에 그 잔류 활성을 측정하므로써 효소활성에 미치는 pH의 영향을 구하였다. 그리고, 정제효소를 0~60 $^{\circ}C$ 의 각 온도에서 30분간 서서히 교반하면서 가온한 후에 각각 잔류하는 효소의 활성을 측정하고 정제 직후에 측정된 고유활성에 대한 백분율을 계산하여 그 안정성을 구하였다.

#### 효소 활성에 미치는 금속이온의 영향

Ag<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> 등의 1가 금속이온과 Ba<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> 및 Ni<sup>2+</sup> 등 2가의 금속이온의 Cl<sup>-</sup>염의 형태를 한 시약을 BA-p-NA 기질을 함유하는 반응혼액에 첨가시켰을 때의 효소의 활성에 미치는 영향을 검토하였다. 곧, 정제 효소 용액(단백질 농도: 복상어, 25 $\mu g/ml$ ; 고등어 trypsin-A, 20 $\mu g/ml$ ; 고등어 trypsin-B 10 $\mu g/ml$ ) 50 $\mu l$ 와 0.1mM Tris-HCl, pH 8.0 완충액 840 $\mu l$ , 각 200 mM의 금속이온 용액 10 $\mu l$ 를 혼합하여 30 $^{\circ}C$ 에서 30분간 잘 저으면서 예비 가온한 후에 5mM BA-p-NA 기질용액 100 $\mu l$ 를 가하여 30 $^{\circ}C$ 에서 5분간 반응시켜 활성을 측정하고, 금속이온을 첨가하지 않은 반응 혼액이 보인 효소의 활성을 대조로 하여 상대활성으로 나타내었다.

#### 효소활성에 미치는 저해제의 영향

저해제에 의한 영향은 각 저해제의 농도별 용액과 효소액을 혼성하여 저해제와 효소간에 전단계의 반응을 시킨 후에 기질과의 반응에 의한 활성을 측정하였다. 곧, 저해제 TLCK, TPCK 및 PMSF는 전단계의 반응혼액에 대하여 10%에 상당하는 양의 DMSO로써 1mM의 농도로 미리 녹인 후에 증

류수로 정용하여 만든 저해제용액 10 $\mu$ l와 효소용액 (단백질의 농도는 위에 든 금속이온의 영향에 관한 실험의 경우와 같음) 50 $\mu$ l, 그리고 0.1mM Tris-HCl, pH 8.0 완충액 940 $\mu$ l를 혼합하여 진탕항온수조(50 $^{\circ}$ C, 15min)에서 전단계의 반응을 시켰다. 그리고, 천연저해제 SBTI는 0.01mM이 되도록 증류수에 녹여 그 10 $\mu$ l를 취하여 효소용액 50 $\mu$ l와 전술의 완충액 940 $\mu$ l를 혼합하여 얼음물을 담은 수조(0 $^{\circ}$ C, 15min)에서 잘 저으면서 전단계의 반응을 시켰다. 한편, 저해제 benzimidine, EDTA, leupeptin 및 antipain은 증류한 탈이온수로서 각각 1mM이 되도록 만들어 위에서 설명한 바와 같이 저해제 용액 10 $\mu$ l, 효소용액 50 $\mu$ l, 완충액 940 $\mu$ l를 혼합하여 진탕항온수조(30 $^{\circ}$ C, 15min)에서 전단계의 반응을 시켰다. 이와 같이 전단계반응을 거친 효소와 저해제의 혼합액 900 $\mu$ l를 취하여 5mM BA-p-NA 함유 0.1mM Tris-HCl인 기질용액 100 $\mu$ l와 30 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시키므로써 각종 저해제의 영향을 분석하고 상대활성도 100분비로서 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 복상어와 고등어 trypsin의 정제

복상어의 채장과 고등어의 유문수를 절취하여 세절 마쇄한 다음, 변 등(1990)의 방법을 조금 개량하여 그 각각의 trypsin을 정제하였다.

먼저 복상어 trypsin 정제과정의 개요를 menhaden 장기에서 trypsin을 정제한 방법(변 등, 1990)과 비교하여 차이점을 보면, 본 연구의 복상어에서 채장 trypsin을 정제한 과정은 먼저 복상어의 채장을 세절 마쇄하여 0.02% sodium azide를 함유한 1% NaCl과 5mM CaCl<sub>2</sub> 용존 20mM Tris-HCl, pH 7.2 완충액을 써서 조효소를 추출하여 40 $^{\circ}$ C에서 활성화시킨 다음, tetrachloromethane을 써서 탈지하는 단계까지는 같으나, 탈지된 조효소의 염석 단계는 복상어에서 추출한 조효소의 경우 30~50% 염석획분에서는 BA-p-NA 기질에 대한 활성이 거의 나타나지 않았다. 따라서 같은 기질에 대하여 활성이 두드러지게 나타난 50~70% 염석획분을 취하여 정제단계로 옮겼다.

정제를 위한 칼럼-크로마토그래피의 단계로서는 어류중 빙어(*capelin*, *Mallotus villosus*; Hjelmeland와 Raa, 1982)나 멸치(*anchovy*, *Engraulis encrasicolus*; Martinez 등, 1988), 그리고 menhaden (*Brevoortia tyrannus*; Pyeun 등, 1990)의 경우에 있어서는 각각 추출한 조효소 획분에 대하여 20~30

%에서 70%까지의 사이에서 염석되는 획분에 대하여 benzimidine-Sepharose 6B를 거쳐 이온교환수지로서 DEAE-Sephadex나 DEAE-Sepharose, 혹은 DEAE-Sephacel 등의 칼럼-크로마토그래피를 통과시켜 정제를 하고 있는데 대하여, 복상어 trypsin의 경우는 위에서 염석하여 얻은 획분에 대하여 먼저 DEAE-Sephadex A-50 칼럼을 거치도록 하므로써(Fig. 1-1) 복상어의 채장 중에 들어 있는 상대적으로 낮은 활성과 지나치게 적은 양의 trypsin을 미리 불순 단백질과 어느 정도 분리시킨 후에 benzimidine-Sepharose 6B 칼럼을 통과시키므로써 회수토록 하는 과정을 밟았다. 그리고 어느정도 혼재하는 불순단백질은 Sephadex G-75~120을 써서 겔여과를 거치므로써(Fig. 1-2) 미량의 불순단백질까지 제거한 trypsin의 정제 목표에 도달할 수 있었다(Fig. 3).

그리고 고등어 trypsin의 정제에 있어서는 위에서 소개한 빙어나 멸치의 경우와 비슷한 과정으로 30~70%의 황산암모늄 염석획분을 benzimidine-Sepharose 6B 칼럼과 DEAE-Sephadex A-50 칼럼을 통과시켰던바 BA-p-NA에 대하여 활성을 보이는 두개의 뚜렷한 획분이 구분되어 나타났다(Fig. 2-1). 그러나 이들 두 획분은 그 각각이 크로마토그램과 전기영동에 의한 순도의 검정에서 상당한 정도의 불순단백질이 확인되었기에 이들 획분을 각기 분리하여 별도로 재차 DEAE-Sephadex A-50 칼럼을 통과시킨 결과 먼저 용리되어 나온 획분(이 획분을 편의상 trypsin-A라 부르기로 함)은 전기영동적으로나 겔-크로마토그래피상으로 불순물이 나타나지 않았으나(Fig. 2-2), 뒤에 용리되어 나온 획분(이 획분은 편의상 잠정적으로 trypsin-B라 부르기로 함) 중에는 불순단백질이 혼재하는 것으로 확인되어(Fig. 2-3)이 획분을 다시 benzimidine-Sepharose 6B 칼럼을 통과시킨 결과 혼재한 나머지의 불순단백질까지도 제거되어 전기영동적으로나 겔-크로마토그램상으로 순수한 효소단백질이 정제되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

위의 두 어종에서 trypsin을 정제하는 과정 중에 정제단계별로 전기영동 시료를 조제하여 disc-PAG 전기영동을 실시하여 그 확인된 전기영동상과, 그리고 정제단계를 거친 후의 정제효소에 대하여 subunit의 조성분과 분자량을 알아보려고 SDS-겔 전기영동을 실시하고 얻어진 전기영동상을 각각 Fig. 3 및 Fig. 4에 나타내었다.

정제 과정 중의 단계별로 disc-PAG electrophoretogram 상에 확인된 단백질의 수를 보면, 먼저 복상어의 경우(Fig. 3), 탈지 조효소에서는 trypsin을

포함하여 7개의 단백질이 공존하였으며, 각 위치에 분포한 단백질 band를 절취 마쇄하고 효소 추출에 사용한 완충액과 같은 완충액으로 추출하여 trypsin에 특이적인 기질인 BA-p-NA 혼성기질에 대하여 반응시켜 본 결과, 가장 농도가 진한 주 밴드

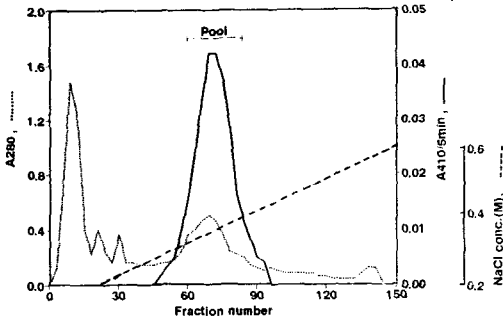


Fig. 1-1. DEAE-Sephadex A-50 chromatogram (column size:  $\phi$  3.0 $\times$ 30cm) of the BA-p-NA positive fractions obtained through salting-out in between the ranges of 30% to 70% of ammonium sulfate saturation of cat-shark pancreas.

The enzymes were eluted with a gradient of 0.2~0.6M NaCl in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2, at a flow rate of 40ml/hr and a fraction volume of 10ml, respectively. Fractions were tested for amidase activity by using BA-p-NA substrate and pooled the BA-p-NA hydrolysing fractions.

Fig. 1. Chromatograms of the BA-p-NA positive fractions in the procedures for purifying the cat-shark trypsin.

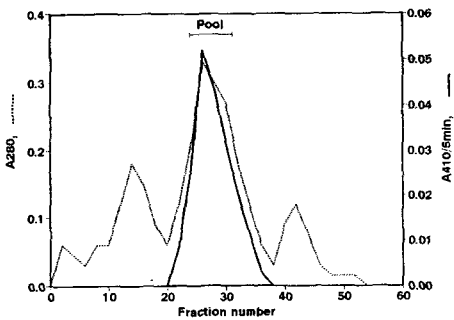


Fig. 1-2. Sephadex G-75~120 chromatogram (column size:  $\phi$  0.9 $\times$ 90cm) of the fraction from the benzamidine-Sepharose 6B affinity chromatography.

The enzymes were eluted with the 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1M NaCl.

The flow rate and fraction volume was 10 ml/hr and 2ml, respectively.

하나 이외에는 모두 불순 단백질을 알 수 있었다.

따라서 trypsin을 제외한 7개의 단백질을 제거하기 위하여 첫 단계로서 황산암모늄으로 염색시킨 결과, 포화 황산암모늄으로 계산하여 50~70%의 범위에서 대부분의 trypsin을 얻을 수 있었으며, 이 침전을 용해하여 전기영동 시료로 만든 다음, disc-PAG 전기영동에 의하여 확인한 결과(Fig. 3), 조효소에서 분포하던 3개의 불순단백질이 제거된 trypsin을 포함한 4개의 불순단백질을 제거시키기 위하여 DEAE-Sephadex A-50 chromatography, benzamidine-Sepharose 6B chromatography, 그리고 Sephadex G-75~120 gel chromatography 등의 각 정제 단계를 거치므로서 단일의 균질상태인 trypsin을 얻을 수 있었다. 얻어진 정제 복합어 trypsin의 subunit수의 확인 및 subunit의 분자량 측정을 위하여 실시한 SDS-PAG 전기영동의 실험 결과(Fig. 3)를 보면 본 정제 과정을 통하여 얻은 복합어의 trypsin은 단지 1개의 subunit로서 이루어진 분자량 31,000 dalton 전후의 단백질을 알 수 있었다.

다음에 고등어의 trypsin을 정제하는 과정 중에 단계별로 disc-PAG electrophoretogram을 통하여 정제단계를 확인하여 간 경과를 보면, 먼저 고등어의 유문수를 세질 마쇄하여 복합어에서와 같은 과정을 거침으로서 탈지 조효소를 추출하고 다시 30~70%의 포화 황산암모늄의 농도 범위에서 염색시켜 얻은 희분을 전기영동 시료로 만든 다음, disc-PAG 전기영동을 실시한 결과와 이어서 각 정제 단계별로 각각 처리하여 전개한 disc-PAG 전기영동상을 대비하여 Fig. 4에 나타내었다.

Fig. 4의 전기영동상의 순서에 따라 보면, 탈지 조효소를 30~70% 포화 황산암모늄으로 염색시켜 얻은 희분에서는 약 10종 전후의 단백질이 혼재한 상태였으나, benzamidine-Sepharose 6B chromatography를 거친 결과 trypsin에 대하여 특이적인 기질인 BA-p-NA 혼액에 대하여 현저한 양성을 보인 2개의 단백질과 그 밖의 2, 3종의 단백질이 혼재함을 알 수 있었다. 따라서 이 희분을 DEAE-Sephadex A-50 chromatography를 써서 0~0.4M NaCl 함유 20mM Tris-HCl, pH 7.2 완충액으로 농도구배법에 의하여 용리시켰던바, 기질 특이성이 분명한 2개의 희분을 분리할 수 있었기에 용리되어 나온 순서에 따라, 먼저 용리되어 나온 희분을 fraction-A, 다음에 용리되어 나온 희분을 fraction-B라 하고 구분하여 전기영동에 의한 단백질의 확인 실험에 옮겼다.

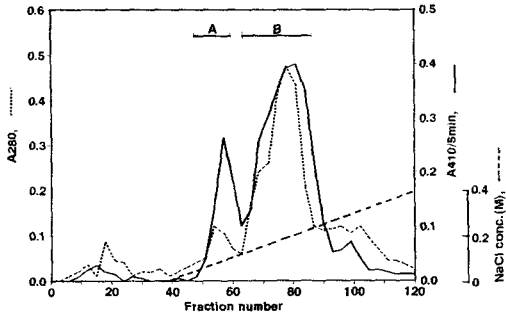


Fig. 2-1. DEAE-Sephadex A-50 chromatogram (column size:  $\phi$  3.0 $\times$ 30cm) of fractions eluted from the benzamidine-Sepharose 6B affinity chromatography after salting-out in the 30~70% range of saturated ammonium sulfate solution and defatting the crude enzyme by tetrachloromethane.

The enzymes were eluted with a gradient of 0~0.4M NaCl in 20mM Tris-HCl buffer, pH 7.2, at a flow rate of 40ml/hr and a fraction volume of 10ml, respectively. Amidase activity was measured by using BA-p-NA substrate.

Fig. 2. Chromatograms of the BA-p-NA positive fractions in the procedures for purifying the mackerel trypsin.

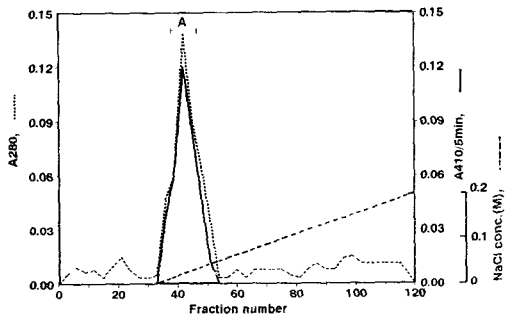


Fig. 2-2. DEAE-Sephadex A-50 rechromatogram (column size:  $\phi$  1.6 $\times$ 25cm) of fraction A obtained through the 1'st DEAE-Sephadex A-50 chromatography (Fig. 2-1).

The enzyme was eluted with a gradient of 0~0.20M NaCl in 20mM Tris-HCl buffer, pH 7.2 and the other conditions were the same with Fig. 1-1 and Fig. 2-1.

전기영동에서 얻은 결과는 Fig. 4의 disc-PAG electrophoretogram DCa에서 나타난 바와 같이 전기영동 band를 별도로 절취하고 효소 추출 과정에서의 완충액으로 추출하여 BA-p-NA 혼성 기질로써 활성을 확인한 결과, 활성이 강한 main band와 활성이 거의 무시할 정도인 2개의 minor band가 검지되었다.

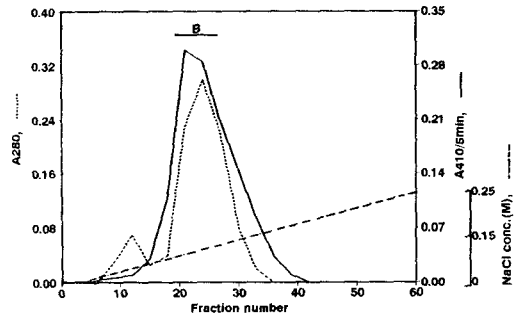


Fig. 2-3. DEAE-Sephadex A-50 rechromatogram (column size:  $\phi$  1.6 $\times$ 30cm) of the fraction B obtained through the 1'st DEAE-Sephadex A-50 chromatography (Fig. 2-1).

The enzyme was eluted with a gradient of 0.05~0.25M NaCl in 20mM Tris-HCl buffer, pH 7.2 and the other conditions were the same with Fig. 1-1, Fig. 2-1 and Fig. 2-2.

따라서 fraction-A는 main band 이외의 혼재하는 2개의 minor band를 제거하기 위하여 DEAE-Sephadex A-50 chromatography로서 재차 분획한 결과(Fig. 2-2), BA-p-NA 혼성 기질에 대하여 명료한 획분을 얻을 수가 있었으며, 이 획분을 disc-PAG 전기영동을 실시하여 정제정도를 검정하고 사진으로 나타낸 것이 Fig. 4 disc-PAG electrophoretogram의 TA이다. 전기영동 사진에서 알 수 있는 바와 같이 fraction-A로서 구분하여 정제한 획분은 전기영동적으로 균질상태인 것을 알 수 있으며, 이후 fraction-A는 성질에 관한 실험을 통하여 확인된 결과에 의하여 trypsin-A라 명명하였고 구분하여 보관하면서 그 밖의 실험에 사용하였다.

그리고 위에서 fraction-A와 구분하여 분취한 fraction-B는 전기영동 시료로 조제하여 disc-PAG 전기영동을 실시한 결과, Fig. 4의 disc-PAG electrophoretogram DCb에서 볼 수 있는 바와 같이 BA-p-NA 혼성 기질에 대하여 활성을 보인 것은 trypsin-A와 같은 이동 거리를 보인 작은 band, 그리고 별개로 많은 양으로서 trypsin-A 보다는 이동이 조금 빠른 band, 그 밖에 BA-p-NA 기질에 대하여 활성을 보이지 않은 2개의 불순 단백질의 band 등 4개의 band가 혼존함을 알 수 있었다. 따라서 위의 획분을 다시 DEAE-Sephadex A-50 chromatography (column size:  $\phi$  1.6 $\times$ 30cm)에 의하여 20mM Tris-HCl, pH 7.2 완충액에 용해한 0.05~0.25M NaCl의 농도 구배법을 써서 용리시킨 결과, trypsin-A가 완전히 제거되고 그 밖의 2개 불순 단백질이 잔류하는 Fig. 4의 disc-PAG electrophoretogram 중 DCb'

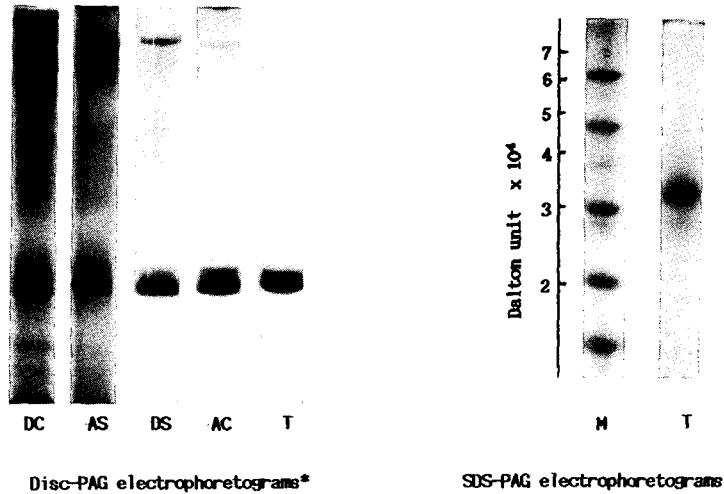


Fig. 3. Disc- and SDS-polyacrylamide gel(PAG) electrophoretograms of cat-shark trypsin.  
 \*Disc-electrophoretograms were taken with regard to the purification procedure.  
 DC; Defatted crude enzyme.  
 AS; Salted-out fractions of defatted crude enzyme by saturated ammonium sulfate in the range of 50~70%.  
 DS; Fraction obtained through DEAE-Sephadex A-50 chromatography after salting-out.  
 AC; Fraction obtained through benzamidine-Sepharose 6B chromatography after DEAE-Sephadex A-50 chromatography.  
 T ; Purified trypsin obtained through salting-out of saturated ammonium sulfate, DEAE-Sephadex A-50 chromatography, benzamidine-Sepharose 6B chromatography and Sephadex G-75~120 gel chromatography.  
 M ; SDS-marker proteins.

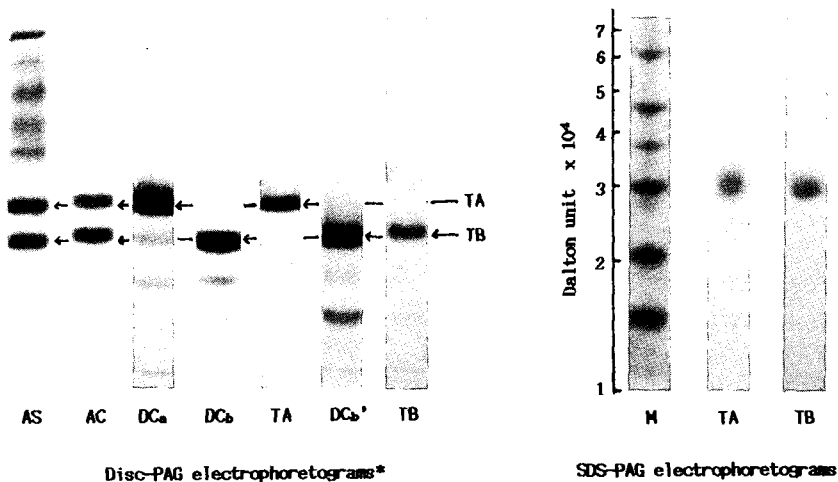


Fig. 4. Disc- and SDS-polyacrylamide gel(PAG) electrophoretograms of mackerel trypsin.  
 \*Disc-electrophoretograms were taken with regard to the purification procedure.  
 AS ; Salted-out fractions of defatted crude enzyme by saturated ammonium sulfate in the range of 30~70%.  
 AC ; Fractions obtained through benzamidine-Sepharose 6B chromatography of salted-out fraction of the defatted crude enzyme.  
 DCa ; Fraction-A obtained through DEAE-Sephadex A-50 chromatography of AC.  
 DCb ; Fraction-B obtained through DEAE-Sephadex A-50 chromatography of AC.  
 TA ; Purified trypsin A obtained through DEAE-Sephadex A-50 rechromatography of DCa.  
 DCb' ; Rechromatographed Fraction of DCb using DEAE-Sephadex A-50.  
 TB ; Purified trypsin B obtained through benzamidine-Sepharose 6B rechromatography of DCb' fraction.  
 M ; SDS-marker proteins.



와 같은 상태의 획분이 얻어졌다. 이어서 이 획분 중에 잔존하는 2개의 불순 단백질을 제거하기 위하여 benzamidine-Sepharose 6B 칼럼을 이용하는 친화성 크로마토그래피를 거친 결과, 혼재하는 불순 단백질까지도 제거되어 완전 정제가 가능하였으며, 그 disc-PAG electrophoretogram을 Fig. 4의 TB에 나타내었다.

이렇게 하여 정제된 고등어의 trypsin-A와 trypsin-B에 대하여 구성 subunit의 조성과 subunit의 분자량을 알아보기 위하여 SDS-PAG 전기영동을 실시하였으며 그 결과를 Fig. 4의 SDS-PAG electrophoretogram에 나타내었다. 분자량을 알고 있는 기준 단백질의 전기영동 이동상과 비교하여 보면, 고등어의 trypsin-A와 trypsin-B는 각각 분자량 30,000과 29,000 정도의 단량체임을 알 수 있었다.

Pyeun과 Kim(1986)은 고등어 유문수에서 알칼리성 단백질분해효소 3종을 황산암모늄염석, DEAE-Sephadex A-50 크로마토그래피, Sephadex G-100 겔 여과법으로 정제하였다고 보고하고, 그 분자량(Kim과 Pyeun, 1986)은  $27,500 \pm 2,500$ ,  $20,500 \pm 1,500$  그리고  $15,250 \pm 250$ 이라고 하여 본 연구에서 정제된 고등어 trypsin의 분자량과 일부 중복되는 것으로 미루어 당시에 정제한 효소 일부는 trypsin임을 알 수 있었다.

다음에는 이상에서 설명한 경과를 거쳐 각각 정제된 복상어와 고등어의 trypsin에 대하여 Sephadex G-75~120을 쓰는 겔-여과법으로 그 분자량을 측정하여 본 결과(Fig. 5), 복상어의 trypsin과 고등어의 trypsin-B는 21,500, 고등어의 trypsin-A는 23,700 정도로서 두 어종이 가진 trypsin이 조금 차이가 있음을 알 수 있었다. 또, 분자량을 측정할 때 이미 위에서 제시한 바와 같이 복상어의 trypsin이 32,000이었고, 고등어는 trypsin-A가 30,000이고 trypsin-B가 29,000이었음에 비추어, 겔-여과법으로 측정할 때는 복상어의 trypsin과 고등어의 trypsin-B가 21,500이었으며, 고등어의 trypsin-A는 23,700으로서 상당한 차이를 보였다.

Maire 등(1980)에 의하면 거대분자의 분자량을 겔-여과법으로 측정하면 흔히 그 용리 위치와 분자량간에 상관성을 보이지 않을 수도 있다고 하였는데 이 실험 결과에서도 겔-여과법으로 측정된 복상어와 고등어의 trypsin의 분자량은 SDS-PAG 전기영동법으로 측정된 분자량 값에는 훨씬 미달함을 알 수 있었다.

이미 다른 어류의 trypsin에 대하여 분자량을 측정 보고한 바에 의하면, 대부분의 경우 SDS-PAG

전기영동법으로 측정 보고하고 있으며, Murakami와 Noda(1981)는 정어리의 trypsin 유사 효소의 경우 27,000 정도라고 하였고, Cohen 등(1981)은 잉어 trypsin의 분자량은 25,000 정도라고 하였다. 또, Yoshinaka 등(1983)은 메기(*Parasilurus asotus*)의 trypsin의 분자량은 26,000 정도라고 하였고, Hjelmeland와 Raa(1982)는 빙어(*Mallotus villosus*)의 trypsin이 분자량 28,000 전후, 또, Simpson과 Haard(1984)는 그린랜드 대구(*Gadus ogac*)의 분자량은 23,500이라고 하였다. Martinez 등(1988)은 멸치(*Engraulis encrasicolus*)에서 2종의 trypsin을 정제하여 그 분자량이 각각 27,000과 28,000 정도라고 하였으며, Asgeirsson 등(1989)은 대서양산 대구에서 3종의 trypsin을 분리하고 각 trypsin은 24,200 정도의 비슷한 분자량을 가졌다고 보고하였다. 어류 trypsin에 대한 이들 보고들을 종합하여 볼때 그 분자량은 어종에 따라 일관성이 없이 차이를 보인다는 것을 알 수 있었으며, 본 실험의 SDS-PAG 전기영동법으로 측정된 분자량 값이 보다 근사치일 것으로 간주하면 고등어 trypsin-A와 B의 분자량은 같은 방법으로 측정된 다른 어류의 trypsin의 분자량에 비하면 보다 크다는 것을 알 수 있었고, 더우기 복상어의 trypsin의 분자량은 이미 보고된 어류의 trypsin 중에서 가장 큰 것으로 나타났다.

복상어의 trypsin과 고등어 trypsin-A와 B에 대하여 그 각각의 정제의 주요단계별로 각 trypsin의 정제 정도를 측정하여 Table 1에 나타내었다.

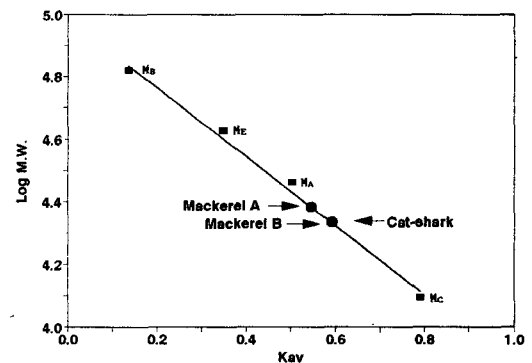


Fig. 5. Estimation of molecular weight of cat-shark trypsin, and mackerel trypsin A and B by Sephadex G-75~120 gel filtration.

Molecular weight marker proteins used for determining molecular weight by the gel filtration: 12,400 daltons; cytochrome c ( $M_C$ ), 29,000 daltons; carbonic anhydrase ( $M_A$ ), 45,000 daltons; egg-albumin ( $M_E$ ), 66,000 daltons; bovine-albumin ( $M_B$ ).

복상어는 유문수를 장기중에 갖지 않아 채장을 절취하여 효소를 추출 정제하였는데 각 단계별로 측정된 합성기질 BA-p-NA 혼성액과 천연기질 Hammarsten casein에 대한 고유활성도는 탈지 조효소일 때 불과 0.004와 0.003 정도로서 다른 어류의 trypsin의 정제 과정에서 조효소에 대하여 BA-p-NA 혼성액을 기질로 하여 측정된 값[빙어 조효소, 0.55U/mg(Hjelmeland and Raa, 1982); 그린랜드 대구 조효소, 0.015U/mg(Simpson and Haard, 1984); 멸치 조효소, 0.2U/mg(Martinez 등, 1988);

menhaden 조효소 0.28U/mg(Pyeun 등, 1990); 송어 조효소, 0.015U/mg(Guizani 등, 1991)]에 비하면 가장 약한 그린랜드 대구 조효소와 송어 조효소의 불과 27% 정도, 그리고 활성이 강한 빙어 조효소의 0.7% 전후에 지나지 않아 따라서 이같은 결과는 분포 효소의 양이 적거나, 혹은 trypsin 그 자체의 활성이 아주 약하다는 사실을 뒷받침하였다. 정제 단계별로 측정해 본 고유활성도의 증가 정도에 비추어 DEAE-Sephadex 6B에 의한 크로마토그래피의 순서에 의한 정제가 효과적인 방법으로 됨을 알

Table 1. Purification of cat-shark trypsin, and mackerel trypsin A and B

Fraction	Vol (ml)	Protein (mg)	Total activity(U)	Specific activity(U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
<i>Cat-shark(Cephaloscyllium umbratile)</i>						
Crude extract (defatted)	1,760	4,941	19.8	0.004 (0.003)	100	1.0
Ammonium sulfate fractionation(50~70%)	150	1,058	14.1	0.013 (0.009)	71	3.3
DEAE-Sephadex A-50	10	23.6	8.7	0.367 (0.012)	44	91.8
Benzamidine-Sepharose 6B	10	12.8	6.9	0.534 (0.073)	35	133.5
Sephadex G-75~120	9	6.8	5.0	0.739 (0.087)	25	185.8
<i>Mackerel(Scomber japonicus)</i>						
Crude extract (defatted)	915	1,143	540.6	0.47 (0.29)	100	1.0
Ammonium sulfate fractionation(30~70%)	75	750	528.9	0.71 (0.36)	98	1.0
Benzamidine-Sepharose 6B	51	178.5	58.6	0.99 (0.54)	33	2.1
DEAE-Sephadex A-50						
Fraction A	12	10.8	19.2	1.77 (0.95)	6	3.7
Fraction B	15	37.5	66.3	1.77 (0.74)	12	3.7
DEAE-Sephadex A-50 rechromatography						
Fraction A	9	6.0	13.5	2.27 (1.16)	2.5	4.8
Fraction B	12	22.5	53.7	2.39 (1.24)	10.0	5.1
Benzamidine-Sepharose 6B						
Fraction B	6	12.0	52.5	4.38 (2.08)	9.7	9.3

Numericals in parentheses represent caseinolytic activity.

수 있었다. Sephadex G-75~120에 의한 겔 여과까지 거친 최종 정제된 표품의 고유활성은 0.739U/mg, 그리고, 정제 배율은 약 186배로서 복상어의 trypsin은 그 고유활성이 낮고, 따라서 상대적으로 그 정제도 비교적 난해함을 알 수 있었다.

다음에 고등어 trypsin의 정제 단계별 고유활성도의 변화 정도를 측정된 결과를 보면(Table 1), 탈지 조효소를 염석하고 benzamidine-Sepharose 6B에 의한 친화성 크로마토그래피를 거친 결과 고유활성이 약 2배까지 증가하였으며, 이를 DEAE-Sephadex A-50 크로마토그래피에 의하여 NaCl-농도 구배법으로 분획한 결과 fraction-A와 fraction-B로 분리할 수 있었다. 이 두 획분을 SDS-PAG 전기영동법으로 검정해 본 결과(Fig. 4, DCa와 DCb), 각각 상당한 불순물이 혼재하고 있어 다시 DEAE-Sephadex A-50 크로마토그래피에 의하여 NaCl-농도 구배법으로 재차 분획하고 얻어진 획분을 SDS-PAG 전기영동법으로 검정한 결과, fraction-A는 단일 band로서 정제가 되었음을 알 수 있었고, fraction-B는 아직도 불순 단백질이 혼재함을 알 수 있었다. 이렇게 정제된 fraction-A는 그 성질에 관한 검색에서 trypsin임이 확인되었으며, 따라서 trypsin-A라 명명하고, 그 고유활성을 측정된 결과 2.27 U/mg였고, 정제 배율은 4.8배까지 정제되었음을 알았다.

한편, 불순물이 잔류했던 fraction-B는 다시 benzamidine-Sepharose 6B 크로마토그래피에 의하여 용리 분취하고 SDS-PAG 전기영동법으로 검정한 결과 균질상태에 이르렀음을 확인할 수 있었다. 따라서 여기서 얻은 fraction-B 또한 투석 농축하여 그 성질을 검색한 결과 trypsin으로서의 성질이 증명되었기에 이를 trypsin-B라 명명하고, 그 고유활성을 측정된 결과 4.38U/mg였고, 그 정제 배율은 9.3이었다.

이와 같이 정제 단계에 관한 실험의 결과, 복상어의 trypsin은 고유활성이 0.739U/mg로서 고등어 trypsin-A에 비하면 약 33%, 고등어 trypsin-B에 비하면 약 17%에 지나지 않아 연골어에 속하는 복상어의 trypsin이 경골어에 속하는 고등어의 trypsin에 비하여 약한 활성을 보인다는 점과 그리고 고등어에는 복상어에서 보다 많고 활성이 높은 trypsin을 가졌다는 것을 차이점으로 들 수 있었다.

어류의 trypsin에 대하여 보고되어 있는 고유활성을 보면, BA-p-NA 혼액 기질에 대한 활성이 빙어는 trypsin I과 trypsin II의 고유활성이 0.050U/mg 전후(Hjelmeland와 Raa, 1982), 그린랜드 대구는 0.78U/mg(Simpson과 Haard, 1984), 멸치가 try-

sin-A 2.5U/mg와 trypsin-B 4.7U/mg(Martinez 등, 1988), menhaden의 trypsin-A가 4.40U/mg, trypsin-B가 1.91U/mg(Pyeun 등, 1990), 그리고 승어의 trypsin이 1.356U/mg(Guizani, 1991)로서 복상어의 trypsin은 빙어의 trypsin보다는 강했으나 대구의 trypsin과는 비슷하였으며, 멸치, menhaden, 승어의 trypsin보다는 약하였다. 그리고 고등어의 trypsin-A와 trypsin-B는 빙어나 대구보다는 훨씬 강하였으나 멸치와는 trypsin-A와 B가 거의 비슷한 값을 보였으며, menhaden의 trypsin-A와 B에 대하여 비교했을 때는 반대 경향의 활성을 보였다.

효소의 활성과 안정성에 미치는 pH 및 온도의 영향

정제된 각 효소에 대하여 그 활성에 미치는 pH의 영향을 Fig. 6에 나타내었다. 복상어의 trypsin은 pH 9.0에서 가장 활성이 높았을 뿐만 아니라 알칼리성측에서도 활성은 크게 영향을 받지 않았던 반면에, 고등어의 trypsin-A와 B는 pH 8.0에서 활성이 높았으나 pH 9.0 부터는 활성에 상당한 영향이 큰 것을 알 수 있었다. 활성에 미치는 pH의 영향과 관련하여 Hjelmeland와 Raa(1982)는 극지에서 어

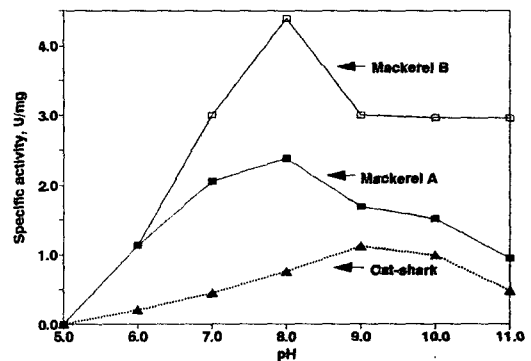


Fig. 6 pH dependence of the amidase activity of cat-shark trypsin, and mackerel trypsin A and B.

The buffers used in the reaction mixture were 0.1M sodium acetate-acetate(pH 5.0), 0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 6.0~7.0), 0.1M Tris-HCl(pH 8.0), 0.1M glycine-NaOH(pH 9.0~10.0) and 0.1M NaOH-NaHCO<sub>3</sub>(pH 11.0).

Reaction condition:

- Enzyme concentration;
- cat-shark trypsin, 25ug/ml.
- mackerel trypsin A, 20ug/ml.
- mackerel trypsin B, 10ug/ml.

Concentration of substrate;

0.5mM BA-p-NA.

pH of reaction mixture; pH 8.0.

Reaction temperature; 30°C.

획한 병어의 trypsin- 유사 효소는 효소-I 과 효소-II 형이 있고, 그 활성발현에 미치는 알맞은 조건은 모두 pH 8.0과 pH 9.0에 넓게 걸쳐 있다고 하였고, 또 Simpson과 Haard(1984)는 그린랜드산 대구의 trypsin의 알맞은 pH 조건은 pH 8.0이라고 하였다. Martinez 등(1988)은 멸치의 trypsin-A와 B형의 활성을 위한 알맞은 pH는 8~9라고 하였고, Pyeon 등(1990)은 menhaden의 trypsin-A와 B는 활성 최적 pH가 pH 8.0~11.0의 넓은 범위에 걸쳐 있다고 보고하여 활성에 미치는 pH의 영향도 어종에 따라 많은 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 어류가 가진 trypsin의 활성에 미치는 pH의 영향이 어종에 따라 많은 영향을 미친다는 사실은 어종에 따라 trypsin의 아미노산 잔기의 구성과 그 측쇄의 배열상의 차이 및 그로 인한 하전성의 차이 등이 크다는 것을 암시하였다.

다음에는 온도 의존성을 측정하여 본 결과(Fig. 7), 복상어의 trypsin-A와 고등어의 trypsin-A, B가 모두 50℃까지는 온도의 상승과 더불어 효소의 활성도 완만하게 증가하였으나, 그 이후부터는 급격한 감소 경향을 나타내었으며, 그보다 높은 온도에서는 효소가 불안정한 것으로 판단할 수 있었다. 병어의 trypsin-유사 효소인 효소-I 과 효소-II의 경우는 42℃였고(Hjelmeland와 Raa, 1982), menhaden의 trypsin-A와 B는 60℃였음(Pyeon 등, 1990)에 비추어, 어류 trypsin의 활성에 미치는 온도조건은 생존시의 서식환경조건과도 관련성이 깊은 것으로 보여(Simpson과 Haard, 1984) 흥미로운 결과였으며, 더욱 검토가 있어야 할 것으로 생각되

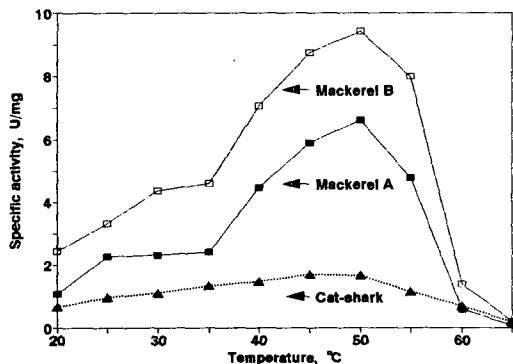


Fig. 7. Temperature dependence of the amidase activity of cat-shark trypsin, and mackerel trypsin A and B.

The used buffer in the reaction mixture was 0.1M Tris-HCl, pH 8.0.

The details of reaction condition are shown in Fig. 6.

었다.

효소의 안정성에 미치는 pH와 온도의 영향을 Fig. 8과 9에 나타내었다.

효소를 pH 5에서 pH 11까지의 각 pH에서 30분간 투석시킨 후에 각각 활성을 측정하여 본 결과, 복상어 trypsin의 경우는 pH 10 부근에서는 비교적 안정하였으나 그 이전에는 산성으로 기울수록 점점 불안정하여 가고 알칼리측은 더욱 급격히 안정성이 떨어지는 경향이였다. 그리고 고등어 trypsin-A와 B는 pH 8.0을 중심으로 하여 pH 7~9 간에는 비교적 안정하였으나 그 이후는 불안정한 관계를

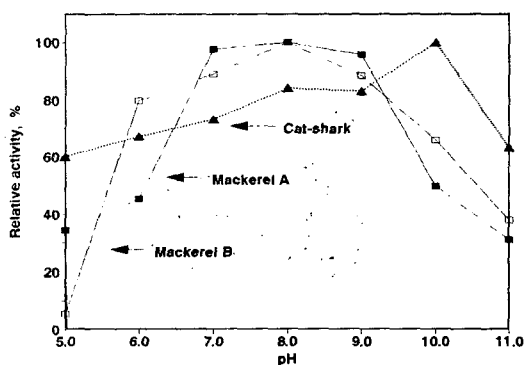


Fig. 8. Comparison of pH-stability of the cat-shark trypsin, and mackerel trypsin A and B under the different preincubation condition of pH.

The enzymes were preincubated for 30 min by dialysing against the different pH solution of buffer.

The buffers used were the same in Fig. 6 and the details of reaction condition, also, are shown in Fig. 6.

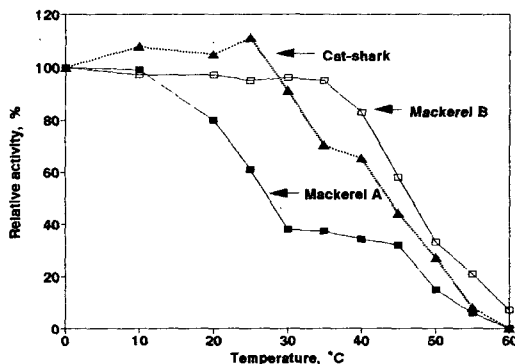


Fig. 9. Comparison of temperature-stability of the cat-shark trypsin, and mackerel trypsin A and B under different preincubation temperature at pH 8.0.

The details of reaction condition are the same as described in Fig. 6.

보였으며, 이같은 경향은 고등어 trypsin-A에서는 훨씬 현저하였다.

다음에는 효소의 안정성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 정제된 각 효소를 0~60℃의 각 온도에 30분간씩 정치시킨 후에 각각 잔유의 활성을 측정해 본 결과, 복상어 trypsin은 25℃까지는 안정하였으나 30℃부터는 급격히 활성이 떨어졌으며, 고등어 trypsin-A는 10℃ 이후부터, 그리고 고등어 trypsin-B는 35℃ 이후부터 각각 급격히 활성이 떨어졌다.

결과적으로 복상어의 trypsin의 열안정성은 고등어 trypsin-A보다는 높고, 고등어 trypsin-B보다는 낮은 것을 알 수 있었다.

금속이온과 화학약제가 활성에 미치는 영향

정제된 복상어와 고등어 trypsin의 활성에 미치는 금속이온의 영향을 검토한 결과를 Table 2에 나타내었다.

대체로 trypsin류의 효소의 활성에 영향을 미치는 금속이온의 농도조건인 2mM로 처리한 결과, 복상어의 trypsin은 Ca<sup>2+</sup>, Li<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>에 의하여, 고등어 trypsin-A는 Ca<sup>2+</sup>와 K<sup>+</sup>, trypsin-B는 Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 및 Mn<sup>2+</sup>에 의하여 각각 1~33%까지 활성이 높아졌다. 모든 효소가 Ba<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> 및 Ni<sup>2+</sup>에 의하여 5~40%까지 활성이 저해되었으며, Ag<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 및 Hg<sup>2+</sup>에 의하여서는 공통적으로 50~95%까지 활성이 떨어졌다.

Table 2. Effect of metal ions on the amidase activity of cat-shark trypsin, and mackerel trypsin A and B

(Unit: Relative activity %)

Metal ion (2mM)	Cat-shark	Mackerel A	Mackerel B
Control	100	100	100
Ag <sup>+</sup>	56	23	37
Ba <sup>2+</sup>	95	64	85
Ca <sup>2+</sup>	121	109	107
Co <sup>2+</sup>	71	94	112
Cu <sup>2+</sup>	69	6	4
Hg <sup>2+</sup>	26	8	15
K <sup>+</sup>	91	109	115
Li <sup>2+</sup>	121	88	92
Mg <sup>2+</sup>	133	98	115
Mn <sup>2+</sup>	101	103	134
Na <sup>+</sup>	78	86	76
Ni <sup>2+</sup>	78	60	59

금속이온에 의한 영향이 어종간, 효소간에 따라 다소 차이가 있음은 이들 금속이온이 효소의 구조를 이루는 아미노산 측쇄의 인력에 미치는 영향과도 관계가 있을 것으로 보이며 활성중심의 구조형성에 관여하는 아미노산과 관련하여 더욱 검토해야 할 과제이다.

효소활성에 미치는 몇가지 약제의 영향을 Table 3에 나타내었다.

Table 3. Effect of chemical reagents and inhibitors on the amidase activity of cat-shark trypsin, and mackerel trypsin A and B  
(Unit: Relative activity %)

Reagents(10μM)	Cat-shark	Mackerel A	Mackerel B
Control	100	100	100
L-Cysteine	79	102	79
Dithiothreitol	69	130	139
EDTA	88	93	76
Iodoacetate	92	83	65
o-Phenanthroline	92	90	95
p-CMB	75	108	83
Antipain	0	0	0
Leupeptin	0	0	0
Benzamidine	83	60	58
DFP	67	64	75
PMSF	81	64	75
TLCK	3	20	37
TPCK	108	98	98
SBTI(0.1μM)	0	0	4

실험에서 검토된 약제에 대하여 공통적으로 trypsin의 저해제에 속하는 antipain, leupeptin, TLCK 및 SBTI에 의하여서는 명확하게 저해를 받았으며, benzamidine과 DFP 및 PMSF에 의하여서는 다소간 저해를 받았다. 이 결과에서 복상어 trypsin과 고등어 trypsin-A, B와의 간에 나타난 활성에 미치는 화학약제의 영향이 다소간에 차이를 보인 것은 각 효소의 화학약제에 대한 친화성과 관련하는 성질상의 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

요 약

연골어류와 경골어류의 진화에 관한 생리생화학 적 차이를 특정한 소화효소의 성질과 구조면에서 밝혀 보고자 본 연구를 시도하였다.

양 어종을 대표하는 종류로서 복상어와 고등어를 시료로 선정하고, 소화효소 중 trypsin을 대상으로 하여, 우선 그 정제방법의 확립, 분자량의 측정, 반응 및 안정성에 미치는 pH 및 온도의 영향, 그리고 금속이온과 화학약제가 반응에 미치는 영향 등을 분석 검토하였으며, 그 내용을 요약하면 다음과 같다.

1. 정제방법에 관하여, 먼저 복상어 trypsin은 4염화탄소로서 탈지 추출한 조효소에 대하여 50~70% 포화 황산암모늄 염석, DEAE-Sephadex A-50 칼럼 크로마토그래피, benzamidine-Sepharose 6B, 친화성 크로마토그래피, Sephadex G-75~120 겔 여과법을 거쳐 disc-전기영동법, SDS-PAG 전기영동법 및 겔 여과법상 균질상태로 얻었다.

또, 고등어의 trypsin은 역시 4염화탄소로서 탈지 추출한 조효소에 대하여 30~70% 포화 황산암모늄 염석, benzamidine-Sepharose 6B 친화성 크로마토그래피, DEAE-Sephadex A-50 크로마토그래피 등의 재크로마토그래피, benzamidine-Sepharose 6B에 의한 재크로마토그래피 등의 정제과정을 거쳐 disc-전기영동법, SDS-PAG 전기영동법 및 겔 여과법으로 균질의 가칭 trypsin-A와 B를 달리하였다.

2. 이들 유래를 달리하는 각 trypsin의 분자량은 SDS-PAG 전기영동법으로 측정했을 때, 복상어 trypsin 31,700, 고등어 trypsin-A 30,000, 고등어 trypsin-B 29,000, 그리고 겔 여과법으로 측정했을 때, 복상어 21,500, 고등어 trypsin-A 23,700, 고등어 trypsin-B 21,500이었다.

3. 이들 효소들의 알맞은 반응조건은 복상어 trypsin pH 9.0, 45~50°C, 고등어 trypsin-A와 B pH 8.0, 50°C였다.

pH와 온도조건에 따른 안정성을 각각 pH와 온도조건별로 30분간 전처리한 후에 그 활성에 미치는 영향으로 비교해 본 결과, pH의 변화에 대하여는 복상어 trypsin은 pH 10.0에서, 그리고 고등어 trypsin-A는 pH 7.0~9.0에서, 고등어 trypsin-B는 pH 8.0에서 안정하였고, 온도조건에 대하여는 복상어 trypsin은 25°C까지, 그리고 고등어는 trypsin-A가 10°C까지, 고등어 trypsin-B는 35°C까지는 안정하였으나, 그 이후부터는 불안정하였다.

4. 이들 효소들은 공통적으로 금속이온  $Ag^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  및  $Hg^{2+}$ 에 의하여 저해를 받았으며, 그 저해의 정도는 고등어 trypsin-A와 B가 보다 심하게 받았다.

또 이들 효소들은 antipain, leupeptin, TLCK(tosyllysine chloromethyl ketone) 및 SBTI(soybean trypsin inhibitor)에 의하여 현저한 저해를 받았고,

PMSF(phenylmethane sulfonylfluoride), DFP(dii-sopropyl fluorophosphate) 및 benzamidine에 의하여 어느정도 저해를 보여 모두 serine-계의 trypsin임을 뒷받침하였다.

## 참고 문헌

- Anson, M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Physiol.*, 22, 79~89.
- Asgeirsson, B., J. W. Fox and J. B. Bjarnason. 1989. Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. *Eur. J. Biochem.*, 180, 85~94.
- Bricteux-Gregoire, S., R. Schyns and M. Florin. 1966. Structure des peptides libérés au cours de l'activation du trypsinogène de mouton. *Biochim. Biophys. Acta*, 127, 277~279.
- 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.
- Davie, E. W. and H. Neurath. 1954. Identification of a peptide released during autocatalytic activation of trypsinogen. *J. Biol. Chem.*, 212, 515~529.
- Davis, B. J. 1964. Disc-electrophoresis-II. Method and application to human serum protein. *Ann. New York Acad. Sci.*, 121, 404~427.
- 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.
- Guizani, N., R. S. Rolle, M. R. Marshall and C. I. Wei. 1991. Isolation, purification and characterization of a trypsin from the pyloric ceca of mullet (*Mugil cephalus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 98B(4), 517~521.
- Hjelmeland, K. and J. Raa. 1982. Characteristics of two trypsin type isozymes isolated from the Arctic fish capeline (*Mallotus villosus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 71B(4), 557~562.
- Keil, B. 1971. Trypsin in "The Enzymes" Ed. Boyer, P. D., Vol. III, 250~259, 3rd Ed., Academic Press. U. S. A.

- Kim, H. R. and J. H. Pyeun. 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.
- Kolodzeiskaya, M. V., T. N. Pivnenko, L. B. Malen'kikh and G. V. Kladnitskaya. 1988. Serine proteases of the pyloric caeca of far-eastern salmonoids. Trans. Prikl. Biokhim. Mikrobiol., 24(3), 353~360.
- 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.
- Mares-Guia, M. 1968. Hydrophobic interactions in the trypsin active center. The sensitivity of the hydrophobic binding site to side chain modifications in competitive inhibitors of the amidinium type. Arch. Biochem. Biophys., 127, 317~322.
- Maire, M. L., E. Rivas and J. V. Moller. 1980. Use of gel chromatography for determination of size and molecular weight of proteins: Further caution. Anal. Biochem., 106, 12~21.
- 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(4), 677~684.
- 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.
- Northrop, J. H. and M. Kunitz. 1932. Crystalline trypsin I. Isolation and tests of purity. J. Gen. Physiol., 16, 267~294.
- 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.
- Pivnenko, T. N., L. M. Epshtein, M. V. Kolodzeiskaya and S. A. Kudinov. 1989. Purification and properties of trypsin from the pyloric caeca of Pacific salmon. Trans. Prikl. Biokhim. Mikrobiol., 25(4), 490~497.
- 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(1), 12~24.
- Pyeun, J. H. and H. R. Kim. 1986. The proteinase distributed in the intestinal organs of fish. 1. Purification of the three alkaline proteinases from the pyloric caeca of mackerel, *Scomber japonicus*. Bull. Korean Fish. Soc., 19(6), 537~546.
- Radhakrishnan, T. M., K. A. Walsh and H. Neurath. 1967. Relief by modification of carboxylate groups of the calcium requirement for the activation of trypsinogen. J. Am. Chem. Soc., 89(12), 3059~3061.
- Simpson, B. K. and N. F. Haard. 1984. Trypsin from Greenland cod *Gadus ogac*. Isolation and comparative properties. Comp. Biochem. Physiol., 79B(4), 613~622.
- Titani, K., L. H. Ericsson, H. Neurath and K. A. Walsh. 1975. Amino acid sequence of dogfish trypsin. Biochemistry, 14(7), 1358~1366.
- Travis, J. and R. C. Roberts. 1969. Human trypsin. Isolation and physical-chemical characterization. Biochemistry, 8(7), 2884~2889.
- Voytek, P. and E. C. Gjessing. 1971. Studies of an anionic trypsinogen and its active enzyme from porcine pancreas. J. Biol. Chem., 246(2), 508~516.
- Weber, K. and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determination by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 244(16), 4406~4412.
- Whitaker, J. R. 1963. Determination of molecular weight of proteins by gel filtration on Sephadex. Anal. Chem., 35(12), 1950~1953.
- 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(11), 1473~1478.
- Yoshinaka, R., M. Sato and S. Ikeda. 1981. Distribution of trypsin and chymotrypsin and their zymogens in digestive system of catfish. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 47(12), 1615~1618.
- Yoshinaka, R., T. Suzuki, M. Sato and S. Ikeda. 1983. Purification and some properties of an-

ionic trypsin from the catfish pancreas. Bull.  
Japan. Soc. Sci. Fish., 49(2), 207~212.

---

1991년 9월 13일 접수

1991년 9월 20일 수리