

혈합육어 Trypsin의 효소적 성질에 대한 반응속도론적 해석

조득문 · 허민수* · 김형락** · 김두상*** · 변재형***
동래여자전문대학 식품영양과 · 경상대학교 수산대학 식품과학과
여수수산대학교 식품영양학과 · *부산수산대학교 식품영양학과

Kinetic Analyses for Enzymatic Properties of Trypsins Purified from Dark-Fleshed Fish

Deuk-Moon CHO, Min-Soo HEU*, Hyeung-Rak KIM**,
Doo-Sang KIM*** and Jae-Hyeung PYEUN***

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

*Dept. of Food Science, Fisheries College, Gyeongsang National Univ., Tongyeong 650-160, Korea

**Dept. of Food Science and Nutrition, Yosu National Fisheries Univ., Yosu 550-749, Korea

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

Kinetic properties of trypsins purified from dark-fleshed fish (anchovy, mackerel, yellowfin tuna, and albacore) were examined and analyzed on benzoyl-D,L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA).

The values of K_m and k_{cat} of the purified trypsins from the four dark-fleshed fish were found to be 49.3 μM and 90.9 min^{-1} for anchovy, 53.7 μM and 61.2 min^{-1} for mackerel A, 96.5 μM and 76.6 min^{-1} for mackerel B, 62.8 μM and 46.6 min^{-1} for yellowfin tuna, and 98.3 μM and 47.7 min^{-1} for albacore, respectively. The values of K_i on tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) were determined to be 20.90 μM for anchovy trypsin, 2.86 μM for mackerel trypsin A, 3.90 μM for mackerel trypsin B, 0.96 μM for yellowfin tuna trypsin, and 1.82 μM for albacore trypsin. Thus yellowfin tuna trypsin was the most sensitive to TLCK among all trypsins. The activities and catalytic efficiency of the trypsins purified from the temperate zone fish, anchovy and mackerel, were higher than those of the trypsins purified from yellowfin tuna and albacore which migrate widely from the tropic zone to the temperate zone.

Key words : dark-fleshed fish, trypsins, kinetic parameters, catalytic efficiency, inhibition constant

서 론

혈합육 어류의 소화관 분포 trypsin에 대하여 어종 간의 차이와 특징을 밝히고자 전보 (Pyeun et al., 1993; Cho et al., 1993)에서는 그 정제방법과 반응 최적조건, 합성기질에 대한 반응성, 반응의 화학약제와 금속이온에 의한 영향 및 효소의 안정성 등에 대하여 보고하였다.

그 보고에 의하면, 각 어종간의 고유활성은 온대 연근해산 혈합육어인 멸치와 고등어의 trypsin이 열대

와 온대에 걸쳐 회유하는 원양산 혈합육어인 황다랭이와 날개다랭이의 trypsin에 비하여 높았고, 최적 pH도 전자가 pH 9.0으로 후자의 pH 8.0에 비하여 다소간 차이가 있었다. 또, 온대 연근해산에 비하여 온대와 열대에 걸쳐 회유하는 원양산은 최적온도가 높았고, 열안정성에 대하여도 비슷한 경향을 보임을 알 수 있었다.

본 연구에서는 전보에서 보고되었던 효소적 성질과 관련하여 trypsin의 기질에 대한 친화성, 촉매적 특이성 등을 반응속도론적으로 해석하고자 이들 효소의

기질과 저해제에 대한 반응속도정수를 산출하여 비교 검토 하였기에 보고한다.

재료 및 방법

재 료

전보에서와 같이 멸치 (*Engraulis japonica*)의 내장 과 고등어 (*Scomber japonicus*), 황다랭이 (*Thunnus albacores*) 및 날개다랭이 (*Thunnus alalunga*)의 유문수로부터 정제한 trypsin을 써서 실험하였다.

실험에 사용한 Tris (hydroxymethyl) aminomethane, benzoyl-D,L-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA), tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) 및 *p*-nitrophenyl guanidinobenzoate (*p*-NPGB) 등은 Sigma사 제품을 사용하였다.

Trypsin의 활성측정

전보에서와 같이 Erlanger et al. (1961)의 방법에 따라 측정하였다.

효소농도

각 농도별 효소용액 (반응혼액 중의 효소의 최종농도; 0.25~4.0 $\mu\text{g/ml}$) 50 μl 와 기질 0.5 mM BAPNA 함유 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 용액 950 μl 를 혼합하여 30°C에서 5분간 반응시킨 후, 파장 410nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 흡광도 ($\Delta A_{410}/5 \text{ min}$)와 효소농도간의 관계식에 대입하여 효소농도를 구하였다.

반응시간

각 효소용액 (반응혼액 중의 최종농도; trypsin, 1 $\mu\text{g/ml}$) 50 μl 와 0.5 mM BAPNA를 함유하는 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 기질용액 950 μl 의 혼액을 30°C에서 반응시간 (분)별로 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 (A_{410})와 시간에 대한 관계식으로 반응시간의 영향을 구하였다.

BAPNA 기질의 농도

Michaelis-Menten 정수 (K_m')와 최대반응속도 (V_{max})

는 농도 0.025 mM~1.0 mM의 BAPNA 기질용액에 대하여 반응온도 30°C에서, 반응시간 (분)당 유리되어 나오는 *p*-nitroanilide의 양을 측정하여 Lineweaver-Burk식으로 구하였다 (Dixon and Webb, 1979). 촉매 정수 (k_{cat})는 효소 1 μmole 이 1분간 유리시키는 반응 생성물의 양으로 계산하였으며, 효소의 촉매효율 (k_{cat}/K_m')을 구하였다.

활성 Trypsin의 농도

활성 trypsin의 농도는 Chase and Shaw (1967)의 방법을 변형한 다음의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 효소용액 (반응혼액 중의 효소농도 약 40 μM) 200 μl 와 62.5 μM *p*-NPGB를 함유하는 0.1 M veronal buffer (pH 8.3) 800 μl 를 혼합하여 30°C에서 10분간 반응시키면서 1분 간격으로 반응속도 측정장치부 분광광도계 (Philips사제)로써 파장 410 nm 에서 흡광도를 측정하고, 각 흡광도와 반응시간 간의 관계에서 반응속도식을 구하였다. 그리고 이 반응속도식의 y 축 절편 (π)을 다음 식에 대입하여 활성 trypsin의 농도 (concentration of active trypsin, C)를 구하였으며, 그 당량관계로서 효소의 활성부위 (active site)의 수를 추정하였다.

$$C (\text{mol/l}) = \pi \times D / 16,518$$

단, D는 반응혼액 중의 효소의 회석배수, 16,518은 파장 410 nm에서의 *p*-nitrophenol이 나타내는 분자흡광계수임.

저해제 TLCK의 농도

각 효소에 대하여 BAPNA 기질의 농도를 0.5 mM로 고정하고 반응혼액 중의 TLCK 농도를 0.1~40 μM 로 변화시키면서 활성을 측정한 다음, Dixon식으로부터 저해제 정수를 계산하여 나타내었다 (Dixon and Webb, 1979; Segel, 1976).

통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 각각 3회 실시한 측정치의 평균값을 구하고, Enzfitter program (Elsevier Biosoft, 1987)으로 회귀분석하였다.

결과 및 고찰

반응속도에 미치는 효소농도의 영향

효소의 농도(반응혼액 중 0.25~4.0 µg/ml)에 따른 0.5 mM BAPNA 기질에 대한 활성의 변화 정도를 Fig. 1에 나타내었다.

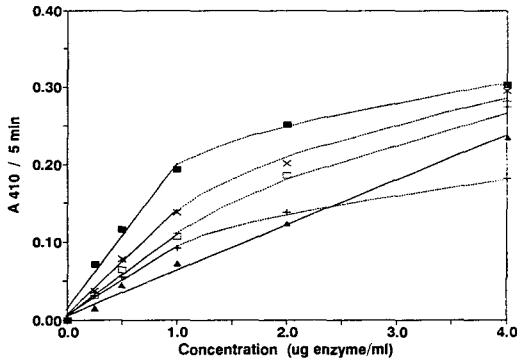


Fig. 1. Effect of enzyme concentration on the hydrolysis of the BAPNA substrate by the anchovy trypsin (▲), mackerel trypsin A (□), mackerel trypsin B (■), yellowfin tuna trypsin (+), and albacore trypsin (×).

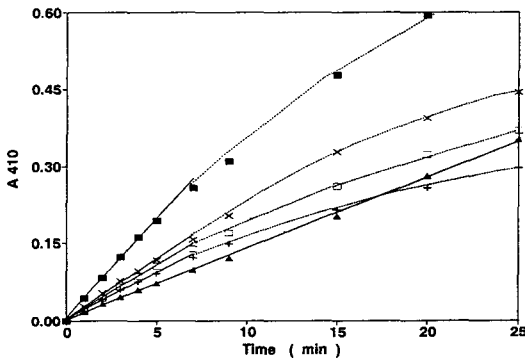


Fig. 2. Effect of reaction time on the hydrolysis of the BAPNA substrate by the anchovy trypsin (▲), mackerel trypsin A (□), mackerel trypsin B (■), yellowfin tuna trypsin (+), and albacore trypsin (×).

멸치 trypsin은 반응혼액에 대하여 효소의 농도 0.25~4.0 µg/ml 범위까지는 효소농도의 증가와 더불어 활성도 비례적으로 증가하였으며, 이때의 흡광도와 효소농도간의 상관관계식은 $y=0.005x+0.0052$ ($r=0.9984$)였다.

고등어, 황다랭이 및 날개다랭이 trypsin은 네 효소 모두 반응혼액에 대하여 0.25~1.0 µg/ml에 해당하는 농도까지는 직선적인 관계를 보였으며, 이 때의 흡광도(y)와 효소농도(x)간의 상관관계식은 고등어 trypsin A가 $y=0.107x+0.004$ ($r=0.9940$), 고등어 trypsin B는 $y=0.187x+0.013$ ($r=0.9889$), 황다랭이 trypsin이 $y=0.091x+0.005$ ($r=0.9925$), 그리고 날개다랭이 trypsin은 $y=0.138x+0.003$ ($r=0.9974$)였다.

멸치 trypsin은 효소농도 차에 따른 활성의 차이를 측정된 결과, 효소농도의 증가와 더불어 직선적인 활성증가를 보였으나, 고등어, 황다랭이, 그리고 날개다랭이 trypsin은 1.0 µg/ml보다 높은 효소농도에서는 활성의 증가 정도가 완만하였으며, 이는 0.5 mM BAPNA 기질의 분해로 인하여 기질의 농도가 저농도 상태에 이르렀음을 알 수 있었다. 따라서 0.5 mM의 기질에 대한 효소의 적정농도는 반응혼액 1 ml에 대해 1 µg 정도임을 알 수 있었다.

반응속도에 미치는 반응시간의 영향

각 효소용액 50 µl와 0.5 mM BAPNA 기질(반응혼액 중의 효소농도, 1 µg/ml)에 대하여 반응시간(분)의 경과에 따른 활성의 변화 정도를 측정하여 Fig. 2에 나타내었다.

멸치 trypsin은 반응 30분까지는 활성이 직선적으로 증가하였으며, 이때의 흡광도(y)와 반응시간(x)간의 상관관계식은 $y=0.0039+0.0004x$ ($r=0.9995$)였다. 고등어, 황다랭이 및 날개다랭이 trypsin은 네 효소가 모두 반응 7분까지는 직선적 상관관계를 보였으며, 이 식은 고등어 trypsin A가 $y=0.021x+0.001$ ($r=0.9995$), 고등어 trypsin B가 $y=0.039x+0.003$ ($r=0.9990$), 황다랭이 trypsin이 $y=0.018x+0.003$ ($r=0.9980$), 그리고 날개다랭이 trypsin은 $y=0.023x+0.003$ ($r=0.9985$)였다. 그 이후는 반응 시간의 경과와 더불어 효소의 활성은 완만하게 증가하였다. 효소와 기질의 농도를 일정하게 유지시킨 반응조건에서 반응시간만을 연장시켰을 때, 반응 7분까지는 생성물의 생성은 규칙적으로 증가하였다. 그러나 그 이후 부터는 반응에 의하여 생성된 생성물의 농도의 증가와 더불어 기질의 농도 감소에 의하여 반응계의 조성이 변화함으로써 반응속도에 영향을 미치게 되어 반응속도의 증가는 완만한 경향으로 나타났다. 이 결과는 효소와 기질의 농도비와 반

응시간과 반응속도 간의 관계로서 Arrhenius와 van't Hoff의 이론(Dixon and Webb, 1979)에 일치하는 관계임을 알 수 있었다.

따라서 본 연구에서 반응조건중 반응시간을 5분으로 적용한 것은 이미 확립된 반응조건에 따른 것이긴 하지만(Erlanger et al., 1961), 본 실험 결과에 비추어 그 타당성이 충분히 입증되었다.

반응속도에 미치는 기질농도의 영향

BAPNA 합성기질의 농도(0.2~1mM)에 따른 반응속도를 측정하여 Lineweaver-Burk식으로 구한 반응속도식은 멸치 trypsin이 $1/v=0.0139(1/s)+0.2813$ ($r=0.9922$), 고등어 trypsin A가 $1/v=0.0208(1/s)+0.3972$ ($r=0.9804$), 고등어 trypsin B가 $1/v=0.0270(1/s)+0.2798$ ($r=0.9881$), 황다랭이 trypsin은 $1/v=0.0339(1/s)+0.5410$ ($r=0.9971$), 그리고 날개다랭이 trypsin은 $1/v=0.0484(1/s)+0.4920$ ($r=0.9897$)였으며 (Fig. 3), 이 식에서 구한 trypsin의 Km'값은 각각 49.3, 53.7, 96.5, 62.8, 그리고 98.3 μM 이었다. 측정한 Km'값에 의하면 멸치 trypsin이 5종의 효소 중에서 가장 낮아 BAPNA기질에 대한 친화도가 가장 큰 것을 알 수 있었다.

실험에 사용된 4종의 혈합육어 trypsin의 반응속도정수를 나타내면 Table 1과 같다. 최대 반응속도는 멸치 trypsin과 고등어 trypsin B가 3.6 U/mg 정도로서 가장 빨랐으며, 효소 1 μmole 이 1분간 유리시키는 반응생성물의 양, 즉, 촉매정수는 멸치 trypsin이 90.9 min^{-1} 로 가장 많은 양의 생성물을 생산하였고, 각 효소의 기질에 대한 촉매효율은 멸치 trypsin이 1.84 $\text{min}^{-1}/\mu\text{M}$ 로서 가장 높았다.

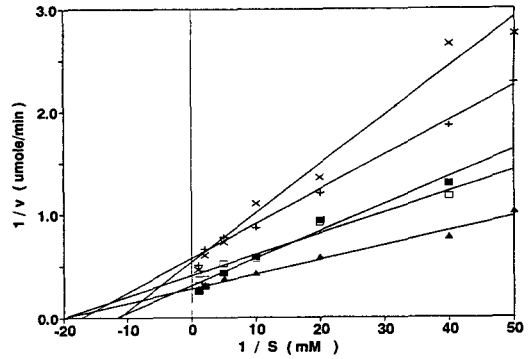


Fig. 3. Lineweaver-Burk plots for the hydrolysis of the BAPNA substrate by the anchovy trypsin(▲), mackerel trypsin A(□), mackerel trypsin B(■), yellowfin tuna trypsin (+), and albacore trypsin(×).

따라서, 이들 효소의 기질간의 촉매효율은 멸치 trypsin, 고등어 trypsin A, 고등어 trypsin B, 황다랭이 trypsin, 그리고 날개다랭이 trypsin의 순이었다.

Cohen et al. (1981)은 잉어 체장 trypsin은 BAPNA에 대하여 Km'값이 39 μM 이었으며, 촉매효율은 4.77 $\text{min}^{-1}/\mu\text{M}$ 이라고 하였고, Martinez et al. (1988)의 보고에 의하면 멸치 (*Engraulis encrasicolus*) 내장에서 정제한 trypsin A와 B의 BAPNA기질에 대한 Km'값이 각각 830 μM 과 660 μM 로 본 실험의 멸치, 고등어, 황다랭이, 날개다랭이 trypsin의 값보다 훨씬 높았고, 촉매정수는 각각 93.0 min^{-1} 과 192 min^{-1} 로 본 실험의 결과보다 높았으며, 효소와 기질간의 반응속도가 빠른 것으로 해석되었다. 그러나, Km'값과 촉매정수와의 관계인 효소와 기질상호간의 촉매효율을 비교해보면 각각 0.11 $\text{min}^{-1}/\mu\text{M}$ 과 0.29 $\text{min}^{-1}/\mu\text{M}$ 로 본 실험결과에 비추어 2~10배 가량 낮은 것을 알 수 있었다.

Table 1. Kinetic parameters of the anchovy, mackerel, yellowfin tuna, and albacore trypsin

Parameter	Anchovy ¹	Mackerel A	Mackerel B	Yellowfin tuna	Albacore
Km (μM)	49.28	53.70	96.50	62.80	98.30
Vmax (U/mg)	3.55	2.58	3.57	1.85	2.03
k _{cat} (min^{-1})	90.88	61.20	76.61	46.64	47.68
k _{cat} /Km ($\text{min}^{-1}/\mu\text{M}$)	1.84	1.14	0.79	0.74	0.49
Conc. of active trypsin (μM) ²	39.70(99.1%)	37.80(94.5%)	36.30(90.8%)	36.60(91.5%)	38.70(96.8%)

¹ Heu et al. (1995)

² determined with 40 μM of trypsin.

이상의 결과로 미루어, 전보 (Pyeun et al., 1993)에 서는 이들 네가지 어종의 아미노산 조성에서 평균소수성과 열역학적 성질에 있어서 평균소수성이 클수록 열안정성이 크다고 하였는데, 이는 서식환경의 온도 대가 높을 수록 평균소수성이 큰 경향을 나타내고 그 원인은 효소분자 구조내의 수소결합과 소수성 결합이 보다 강하게 작용하는 분자적 요인이라고 하였다 (Bigelow, 1967). 따라서 본 실험의 결과에서도 이러한 서식환경에 따른 분자구조 차이로 인하여 최적반응조건에서의 반응속도가 온대산 멸치의 trypsin이 아열대산 황다랭이와 날개다랭이보다 높게 나타난 것이라 하겠다 (Hofer et al, 1975; Asgeirsson et al, 1989).

활성 trypsin의 농도

정제 trypsin과 62.5 μM p-NPGB를 기질로 하여 active site titration법으로 시간 경과에 따른 효소활성과의 관계를 측정하여 활성효소의 농도를 Table 1에 나타내었다. 효소가 반응초기에 기질 p-NPGB를 신속히 분해하여 반응생성물인 p-nitrophenol의 양이 급속히 증가하는 상태 (burst phase)를 지나 반응시간의 경과와 더불어 비례적으로 증가하는 정상상태 (steady state)에 이르렀을 때의 흡광도(y)와 반응시간(x)과의 상관관계식은 멸치 trypsin이 $y=0.0398x+0.131$ ($r=0.9889$), 고등어 trypsin A가 $y=0.0414x+0.125$ ($r=0.9869$), 고등어 trypsin B는 $y=0.0508x+0.120$ ($r=0.9950$), 황다랭이 trypsin은 $y=0.0340x+0.121$ ($r=0.9930$), 그리고 날개다랭이 trypsin은 $y=0.0474x+0.128$ ($r=0.9839$)이었다.

이상의 정상상태 상관관계식에서 0시간의 외삽에 의한 흡광도 (π , y축절편)로 효소활성 촉매기의 농도를 구한 값은 멸치 trypsin 39.7 μM, 고등어 trypsin A 37.8 μM, 고등어 trypsin B 36.3 μM, 황다랭이 trypsin 36.6 μM, 그리고 날개다랭이 trypsin 38.7 μM로 본래의 효소용액 40 μM에 대하여 각각 99.1%, 94.5%, 90.8%, 91.5% 및 96.8%인 것으로 판명되어 결과적으로 효소와 p-NPGB와의 반응에 있어서 당량관계를 추정하면 거의 1:1로 이들 5종의 효소는 각기 한 개의 활성부위를 가지는 것으로 추정되었다.

효소용액을 p-NPGB와 반응시키므로써 올 수 있는 효소 그 자체의 반응 기구를 살펴 보면, 반응초기에 p-nitrophenol의 농도가 신속히 증가한 다음, 반응이

직선적 관계로 서서히 진행되어 반응종점에 이르게 되는데, 이는 p-nitrophenol이 생성됨과 동시에 acyl효소는 탈acy화하기 때문이다 (Chase and Shaw, 1967).

반응속도에 미치는 저해제 농도의 영향

각 효소에 대하여 TLCK의 농도 (0.1~40 μM)와 반응속도와의 관계를 측정 Dixon 식으로 구하여 Fig. 4에 나타내었다. 반응속도와 저해제 농도간의 상관관계식은 멸치 trypsin이 $1/v=0.0123 \cdot [I]+0.2574$ ($r=0.9929$), 고등어 trypsin A가 $1/v=0.1933 \cdot [I]=0.5527$ ($r=0.9926$), 고등어 trypsin B가 $1/v=0.0623 \cdot [I]+0.2432$ ($r=0.9955$), 황다랭이 trypsin이 $1/v=0.4204 \cdot [I]+0.4017$ ($r=0.9758$) 그리고 날개다랭이 trypsin은 $1/v=0.4077 \cdot [I]+0.7337$ ($r=0.9872$)이었다. 그리고, 위 식으로부터 구한 저해제의 K_i값은 각각 20.90, 2.86, 3.90, 0.96, 그리고 1.82 μM이었다.

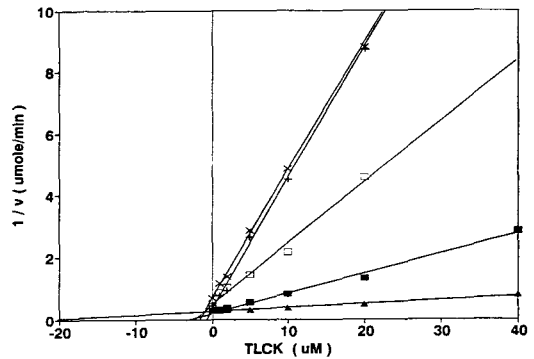


Fig. 4. Dixon plots for the inhibitory effects of TLCK on the hydrolysis of the BAPNA substrate by the anchovy trypsin (▲), mackerel trypsin A(□), mackerel trypsin B (●), yellowfin tuna trypsin(+), and albacore trypsin(×).

- K_i values:**
 Anchovy Trypsin; 20.90 μM*
 Mackerel Trypsin A; 2.86 μM
 Mackerel Trypsin B; 3.90 μM
 Yellowfin Tuna Trypsin; 0.96 μM
 Albacore Trypsin; 1.82 μM

* Heu et al. (1995)

이상의 결과에서 멸치 trypsin이 20.90 μM로 가장 높은 반면, 황다랭이 trypsin이 0.96 μM로 가장 낮았으며, 저해제의 농도가 낮을수록 TLCK에 대하여 예민하게 반응함을 알 수 있었고, 이들 효소 중에서 가

장 예민하게 반응하는 효소는 황다랭이 trypsin이었다.

Cohen et al. (1981)은 잉어 (*Cyprinus carpio*) trypsin의 TLCK에 대한 K_m 정수는 $310 \mu\text{M}$ 이라고 하였으며, Yoshinaka et al. (1984)은 곱상어 (*Parasilusus asotus*) trypsin의 benzamidine에 대한 K_m 값은 $27 \mu\text{M}$ 이라고 하였다. 이는 본 실험의 혈합육어 trypsin들이 잉어의 trypsin 보다 TLCK에 대하여 15~300배 정도 예민하게 반응함을 보였으며, Yoshinaka et al. (1984)의 보고서에서 나타난 값과의 차이 등에 비추어 이들 trypsin은 그 동물체의 다른 유래 뿐만 아니라, 저해제의 종류에 따라서도 그 친화력에 있어서 차이가 큰 것을 알 수 있었다.

요 약

멸치, 고등어, 황다랭이 및 날개다랭이의 혈합육어에서 정제된 trypsin을 시료로 하여 각각의 BAPNA기질에 대한 반응속도와 그 관련 성질들을 분석 검토하였다.

4종의 혈합육어에서 정제된 trypsin의 K_m '와 k_{cat} 는 멸치 trypsin이 각각 $49.3 \mu\text{M}$ 과 90.9 min^{-1} , 고등어 trypsin A는 $53.7 \mu\text{M}$ 과 61.2 min^{-1} , 고등어 trypsin B는 $96.5 \mu\text{M}$ 과 76.6 min^{-1} , 황다랭이 trypsin은 $62.8 \mu\text{M}$ 과 46.4 min^{-1} , 그리고 날개다랭이 trypsin은 $98.3 \mu\text{M}$ 과 47.68 min^{-1} 이었다.

TLCK에 대한 K_m 값은 멸치 trypsin이 $20.90 \mu\text{M}$, 고등어 trypsin A가 $2.86 \mu\text{M}$, 고등어 trypsin B가 $3.90 \mu\text{M}$, 황다랭이 trypsin이 $0.96 \mu\text{M}$, 그리고 날개다랭이 trypsin이 $1.82 \mu\text{M}$ 이었으며, 황다랭이의 trypsin이 TLCK에 대하여 가장 예민하게 반응하였다.

이들 trypsin의 효소 활성과 촉매효율은 연근해 온대산 혈합육어인 멸치와 고등어 trypsin이 열대해역에서 온대해역에 걸쳐 널리 회유하는 혈합육어인 황다랭이와 날개다랭이의 trypsin에 비하여 높은 특징을 보였다.

참 고 문 헌

- 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.
- Bigelow, C.C. 1967. On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure. J. Theoret. Biol., 16, 187~190.
- Chase, T. and E. Shaw. 1967. *p*-Nitrophenyl-*p*'-guanidinobenzoate HCl. A new active site titrant for trypsin. Biochem. Biophys. Research Comm., 29, 508~514.
- Cho, D.M., M.S. Heu and J.H. Pyeun. 1993. Comparative studies on the enzymatic properties of trypsin from the dark fleshed fish (anchovy, mackerel, yellowfin tuna and albacore). 2. Enzymatic properties and thermal stabilities of the trypsin. J. Korean Soc. Food Nutr., 22, 458~464 (in Korean).
- Cohen, T., A. Gertler and Y. Birk. 1981. Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*)—II. Kinetic properties and inhibition studies of trypsin, chymotrypsin and elastase. Comp. Biochem. Physiol., 69B, 647~653.
- Dixon, M. and E.C. Webb. 1979. Enzymes, 3rd Ed., Longman, London, p. 47, p. 138.
- 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.
- Heu, M.S., H.R. Kim and J.H. Pyeun. 1995. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. Comp. Biochem. Physiol. In press.
- Hofer, R., H. Ladurner, A. Gattringer and W. Wieser. 1975. Relationship between the temperature preference of fishes, amphibians and reptiles, and the substrate affinities of their trypsin. J. Comp. Physiol., 99, 345~355.
- Martinez, A., R.L. Olsen and J.L. Serra. 1988. Purification and characterization of two trypsin-like

- enzymes from the digestive tract of anchovy, *Engraulis encrasicolus*. Comp. Biochem. Physiol., 91B, 677~684.
- Pyeun, J.H., D.M. Cho and M.S. Heu. 1993. Comparative studies on the enzymatic properties of trypsins from the dark fleshed fish(anchovy, mackerel, yellowfin tuna, and albacore). 1. Purifications and optimal reaction conditions of the trypsins. J. Korean Soc. Food Nutr., 22, 448~457 (in Korean).
- Segel, I. H. 1976. Biochemical calculations. John Wiley & Sons, Inc. New York, pp. 208~210.
- Yoshinaka, R., M. Sato, T. Suzuki, and S. Ikeda. 1984. Enzymatic characterization of anionic trypsin of the catfish (*Parasilusus asotus*). Comp. Biochem. Physiol., 77B, 1~6.

1995년 8월 11일 접수

1995년 12월 16일 수리