

Trypsín úr Atlantshafsporski - tjáning, hreinsun og greining

Ágústa Guðmundsdóttir og Helga Margrét Pálsdóttir

Raunvísindastofnun Háskólans

Vefútgáfa: 16. ágúst 2004

Ágrip Í þessari samantekt er fjallað um frum skilgreiningu á virkni og eiginleikum nýstárlegs forms trypsíns úr Atlantshafsporski (*Gadus morhua*), sem nefnt hefur verið trypsín Y, og erfðatæknilega framleiðslu þess í gersveppnum *Pichia pastoris*. Einnig er gerð grein fyrir framleiðslu áður skilgreinds þorska trypsíns I í bakteríunni *E. coli* og samanburði þess við náttúrulegt form ensímsins. Trypsín Y, ásamt sjö sambærilegum ensímum úr fiskum, tilheyrir nýjum flokki trypsína sem við höfum kosið að nefna flokk III og hefur það nafn hlotið alþjóðlega viðurkenningu. Ekkert ensím af flokki III hefur verið einangrað á náttúrulegu formi úr fiskunum sem þau finnast í heldur hafa þau eingöngu verið skilgreind út frá cDNA röðum. Sérstæðir eiginleikar trypsíns Y felast m.a. í breiðvirkni ensímsins auk virkni við óvenju lágt hitastig á bilinu 2-30 °C. Þessir eiginleikar trypsíns Y gætu reynst mikilvægir í iðnaði og er áhugi á að kanna notkunarmöguleika ensímsins síðar. Ekki er vitað til þess að áður hafi tekist að framleiða kuldaaðlöguð próteinkljúfandi ensím úr fiskum í örverum.

1. Inngangur

Kuldaaðlöguðu serín próteasarnir trypsín [1, 2], chymotrypsín [3, 4], elastasi [5] og kollagenasi [6] hafa verið einangraðir, hreinsaðir og skilgreindir úr Atlantshafsporski (*Gadus morhua*). Þessi ensím eru meðal annars notuð til framleiðslu bragðefnisþykkna úr sjávarafurðum [7] svo og í húðáburð [8] þannig að hagnýting þeirra er þegar orðin að veruleika.

Þrjú náttúruleg afbrigði trypsíns (trypsín I, II og III) hafa fundist í þorski og er trypsín I í mestu magni [1]. Auk þess hefur þetta trypsín afbrigði hæstu hvötunargetuna (kcat/KM) en hún er um 20 sinnum hærri en hjá sambærilegum trypsínum úr spendýrum [1] og ensímið brýtur auðveldlega niður prótein á náttúrulegu formi [7]. Trypsín I er afar viðkvæmt fyrir afmyndun með hita og sjálfmeltu [2]. Allir þessir sérstæðu eiginleikar trypsíns I henta t.d. vel þegar nota á próteinkljúfandi ensím við matvælavinnslu. Þetta er m.a. vegna þess að matvæli eru oft framleidd við lág hitastig til að viðhalda gæðum þar sem hraði efnahvarfa og örveruvöxtur eykst jafnan með hækkandi hitastigi. Því er kostur að ensímin, sem nota á við framleiðsluna séu virk við lág hitastig og að auðvelt sé að óvirkja þau að lokinni notkun.

Trypsín úr þorski [1] og laxi [9] eru dæmigerð fyrir próteinkljúfandi ensím sem hafa aðlagast að

kulda. Um 82% amínósýra þessara tveggja ensíma eru eins og samanburður á sameindalíkönunum þeirra bendir sterklega til að þrívíddarbygging þeirra sé nánast sú sama [10].

Gen (cDNA) fyrir þrjú mismunandi afbrigði trypsína, er nefnast I, X [11] og Y [12], voru einangruð úr cDNA genasafni þorskaskúfa og raðgreind. Samanburður afleiddra amínósýruraða trypsína I og X sýndi að aðeins 8 amínósýrur eru mismunandi á milli þeirra. Raðgreining peptíðbúta hins náttúrulega forms trypsíns I sem áður var einangrað úr þorski [2], bendir til þess að það sé eins og klónaða afbrigði trypsíns I. Trypsín Y er hins vegar frábrugðið trypsínum I og X þar sem samsvörun í amínósýruröðum þeirra er aðeins um 45%. Samt sem áður er trypsín Y líkara trypsínum af flokki I en nokkrum öðrum próteinum úr hryggdýrum sem amínósýruraðir þeirra hafa verið bornar saman við [12]. Trypsín Y myndar nýjan flokk trypsína, flokk III, ásamt sjö sambærilegum trypsínum úr fiskum [12, 13]. Samanburðarrannsóknir hafa sýnt að innbyrðis eru amínósýruraðir trypsína í flokki III um 70-76% eins.

Megin markmið rannsóknanna sem hér eru kynntar var að skilgreina tjáða form trypsíns Y og finna hentug tjáningarkerfi til framleiðslu á því og trypsíni I. Erfðatæknileg framleiðsla þorskaensím-

anna opnar nýjar víddir í rannsóknum og eykur notkunarmöguleika þeirra.

2. Serín próteasar

Trypsín, chymotrypsín, elastasi, brachyurin og fleiri ensím eru hluti af vel skilgreindum flokki ensíma sem nefnist serín próteasar [14]. Trypsín tilheyrir S1 fjölskyldu innan SA ættflokks serín próteasa [14] en þessi ensím gegna mikilvægu hlutverki við meltingu fæðu í líkamanum og við stjórnun annarra lífefnafræðilegra ferla [15, 16]. Ennfremur gegna trypsin mikilvægu hlutverki í fósturþroska lífvera eins og t.d. fiska [17]. Ensímið gerir lírfum fiska m.a. kleift að brjóta niður forðaprótein í gulpokanum (yolk sack) til orkumyndunar og/eða uppbyggingar fruma. Þá gegna trypsin einnig mikilvægu hlutverki við virkjun forveraforms ýmissa annarra ensíma sem nauðsynleg eru lífverum til vaxtar og viðgangs [17]. Trypsín og önnur meltingarensím eru framleidd á óvirku forveraformi. Þau eru síðan virkjuð þegar þeirra er þörf með því að forraðir á N-endum ensímanna eru klipptar frá fjölpeptíðkeðjunni með próteinrofi [18].

Serín próteasar hafa innbyrðis líka grunnbyggingu, þ.e. tvo β -fleti sem tengdir eru saman með tveimur lykkjum og α -helix [19]. Amínósýrur sem ákvarða þrívíddarbyggingu ensímanna er aðallega að finna á vatnsfælnum svæðum sameindanna. Serín próteasar eiga það sameiginlegt að notast við eins virkunarferli sem ákvarðast af hvötunarþrennuni His57, Asp102 og Ser195. Hvötunarþrennan er staðsett á milli β -flatanna tveggja ásamt amínósýrurum í bindiseti fyrir hvarfefni. Hvarfennissérhæfni serín próteasa ákvarðast síðan að miklu leyti af amínósýrunum sem sitja á botni og í hliðum bindisetsins. Lögum bindisetsins er mismunandi á milli serín próteasa. Í trypsinum er hún t.d. djúp og íhvolf með amínósýruna Asp189 staðsetta á botninum. Amínósýrur sem staðsettar eru í yfirborðslykkjum ensímanna hafa einnig áhrif á hvarfennissérvirkinna auk annarra varðveittra amínósýra í sameindunum [19].

3. Flokkar trypsína

Trypsínur úr hryggdýrum hefur til skamms tíma verið skipt upp í tvo flokka, katjónískan og anjónískan. Nýlega var önnur flokkun lögð til, sem byggir á amínósýru samsetningu ensímanna. Þessi nýja flokkun skiptir trypsinum í tvo flokka, I og II, út frá samsvörun í amínósýruröðum [20]. Árið 1999 bættist við nýr flokkur trypsína, flokkur III, sem byggir á rannsóknum á trypsinu Y úr Atlantshafsporski [12] og er nafnið þaðan komið. Þessi flokkur hefur þegar hlotið alþjóðlega viðurkenningu og sýnt hefur verið

að hér sé lýst áður óskilgreindum flokki trypsína úr fiskum [13, 21].

Hvarfennissérvirkin trypsinu úr hryggdýrum sem teljast til flokks I eða II, er talin ráðast af nokkrum varðveittum amínósýrum. Þar ber fyrst að telja amínósýruna Asp189 sem gegnir lykilhlutverki í trypsin sérvirkinni ásamt Tyr172 [22]. Auk þess gegna amínósýrunar Gly216 og Gly226 mikilvægu hlutverki í sérvirkinni en þær er að finna á jöðrum bindisetsins [23, 24]. Varðveittar amínósýrur í yfirborðslykkjum hafa enn fremur áhrif á trypsin sérvirkinni svo og amínósýran Ser190 sem staðsett er við hlið Asp189 á botni bindisetsins [25, 26]. Ser190 myndar vetnistengi við hvarfefni sem hafa amínósýrunar argínín og lýsín í röð sinni og stuðlar þannig að auknum tengslum við hvarfefnið [26]. Sameindir nær allra trypsína sem teljast til flokka I og II innihalda amínósýruna Ser190 og 6 tvísúlfiðtengi [13, 27].

Hin nýlega skilgreindu trypsin af flokki III finnast öll í fiskum sem lifa við mjög kaldar aðstæður (0 °C) [13]. Í dag eru átta trypsin af þessum flokki þekkt og er trypsin Y úr þorski [12, 21] eitt þeirra. Þessi trypsin hafa flestar varðveittar amínósýrur sem einkenna hryggdýratrypsín af flokki I og II, s.s. Asp189, Tyr172, Gly216 og Gly226. Hins vegar hafa trypsin í flokki III margar breytingar í bindipokanum fyrir hvarfefni eins og t.d. Glu185Asp, Gly187Ser, Lys188Arg, Ser190Ala, Gln192Asn og Gly197Ser. Mikilvægasta breytingin í þessum trypsinum gæti verið Ser190Ala þar sem amínósýran alanín myndar ekki vetnistengi við hvarfefni sem innihalda argínín og lýsín á sama hátt og amínósýran serín. Því er líklegt að tengingin á milli ensíms og hvarfennis í trypsinum af flokki III verði lausari við breytinguna Ser190Ala. Þetta gæti skýrt hið sérstæða tvíeðli í hverfennissérhæfni trypsíns Y en ensímið hefur bæði trypsin og chymotrypsín virkni [21]. Slík tvíeðlisvirkni er þekkt hjá skyldum flokki serín próteasa sem nefnist brachyurin [28] en trypsin af flokki III virðast ekki hafa önnur einkenni brachyurina. Varðveittar amínósýrur í átta þekktum yfirborðslykkjum trypsína af flokki I [23] eru einnig mjög frábrugðnar í flokki III [13, 21] þar sem yfirborðslykkjur trypsína í flokki III innihalda t.d. fleiri vatnsfælnar amínósýrur. Trypsín Y er eina trypsiníð af flokki III sem hefur eingöngu 5 tvísúlfiðtengi í byggingu sinni [12, 13].

4. Kuldaaðlöguð ensím

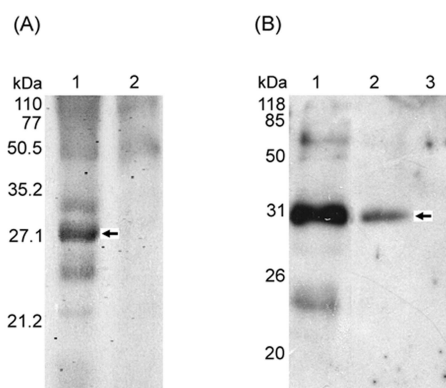
Flestir kuldaaðlagðir serín próteasar hafa verið einangraðir úr fiskum [1, 29–31] og örverum [32–34] sem lifa við lágt umhverfishitastig. Megin einkenni

kuldaaðlagaðra ensíma er að þau hafa hærri hvötunargetu (catalytic efficiency) og minna hitaþol en sambærileg ensím úr spendýrum eins og t.d. nautum og svínum [35–37]. Kuldaaðlögðuð próteinkljúfandi ensím eru viðkvæmari fyrir sjálfmeltu [2] en sambærileg ensím úr spendýrum og eru almennt talin hafa meiri sveigjanleika í byggingu sinni [36]. Á undanförunum árum hefur verið sýnt fram á að aðlögun ensíma að kulda er mun flóknari en áður var talið þar sem að ensímin virðast hafa aðlagast á mismunandi hátt [28, 36, 38]. Ímynd ensíma úr spendýrum hefur skaðast á undanförunum árum m.a. vegna sjúkdómsvaldandi örvera sem borist hafa úr spendýrafurðum í menn eins og t.d. *Salmonella typhimurium* og *Escherichia coli* O157. Því hefur orðið vart aukins áhuga á notkun kuldaaðlagaðra ensíma í iðnaði. Auk þess henta kuldaaðlögðuð ensím einkar vel í margs konar iðnað vegna hárrar virkni þeirra og getu til að starfa við lág hitastig.

5. Rannsóknir á þorskatrypsín

Árið 2002 birtist grein í alþjóðlega vísindaritinu Proteins [13] um trypsín af flokki III. Í henni er því haldið fram að þessi trypsín séu hugsanlega ofur kuldaaðlögðuð ensím sem starfi við kaldari aðstæður en áður hefur þekkt í lífverum. Þetta er í grundvallaratriðum sama kenning og við höfðum áður haldið fram um trypsín Y úr þorski [12]. Þorskatrypsín Y er eina trypsínið af flokki III sem tjáð hefur verið í örverum og einangrað [21] og eru niðurstöður okkar því einu lífefnafræðilegu upplýsingarnar sem til eru um þennan sérstæða flokk trypsína en áður höfðu þau eingöngu verið skilgreind út frá cDNA röðum [13].

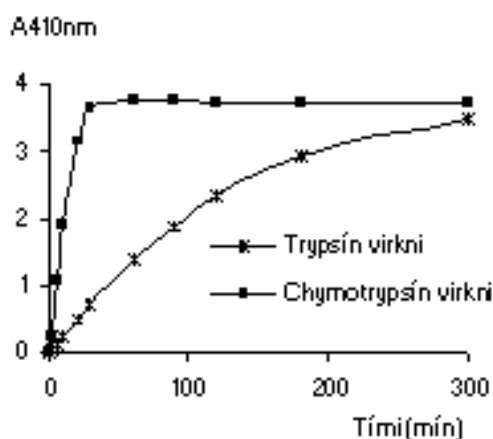
Trypsín Y var framleitt með allri forröð ensímans í *Pichia pastoris* tjáningarkerfinu. Trypsín Y ásamt forröð var framleitt með og án HisMyc raðar sem hengd var á C-enda próteinsins. HisMyc röðin veitir möguleika á að greina próteinið með antimyc mótefni. Mynd 1A sýnir Sypro Red litað SDS-PAGE gel af floti fruma sem notaðar voru til að tjá trypsín Y ensímið og kemur próteinið fram sem 27 kDa band (rás 1) eins og örin á myndinni vísar til. Í rás 2 (mynd 1A) er viðmiðunarsýni en það er flot af frumum sem innihalda tjáningarvektorinn án trypsín Y innskots. Greinilega sést á myndinni að 27 kDa próteinið er ekki framleitt í viðmiðunarsýninu. Mynd 1B sýnir Western blott af trypsín Y ensíminu með áföstum HisMyc enda sem bætir u.þ.b. 3 kDa við próteinið þannig að það kemur fram sem 30 kDa band á geli. Í rás 1 (mynd 1B) er óhreinsað trypsín Y frumufлот og í rás 2 er samskonar frumufлот sem heinsað var á Q-Sepharósa jónaskiptasúlu og 4-Phenýlbútýlamín chymotrypsín sérvirkri súlu.



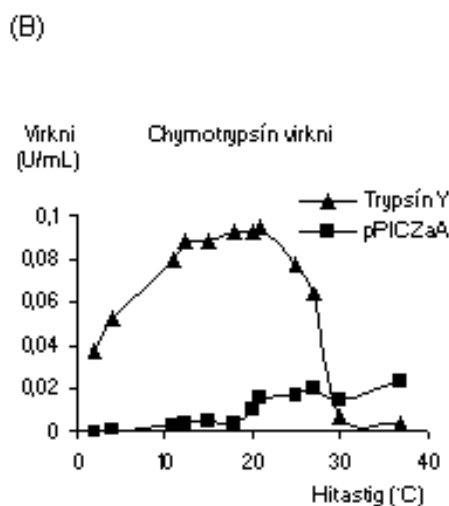
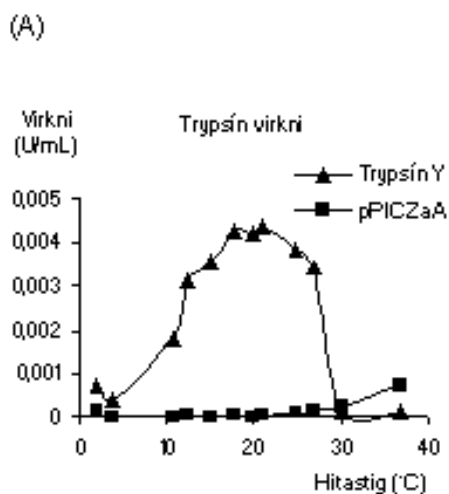
Mynd 1. SDS-PAGE gel litað með Sypro Red (hluti A) og greint með Western blotti og anti-Myc mótefni (hluti B). Mynd 1A sýnir óhreinsað trypsín Y frumufлот (rás 1) og viðmiðunarsýni (rás 2). Mynd 1B sýnir óhreinsað trypsín Y frumufлот (rás 1), hreinsað trypsín Y frumufлот (rás 2) og viðmiðunarsýni (rás 3). Örvar benda á trypsín Y prótein böndin.

Trypsín Y próteinið var ekki greinanlegt í viðmiðunarsýninu (mynd 1B, rás 3).

Rannsóknirnar á trypsíni Y sýndu að ensímið hefur bæði trypsín (Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-pNA) og chymotrypsín (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA) virkni gagnvart tilbúnum hvarfefnum eins og sést á mynd 2. Ensímið reyndist hafa hærri chymotrypsín



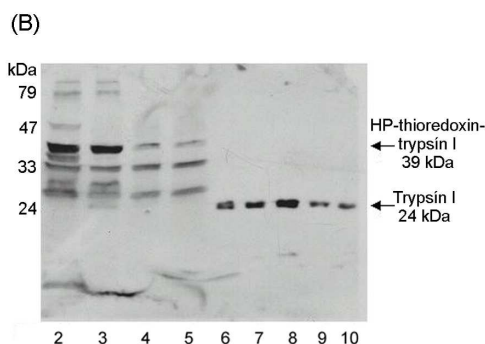
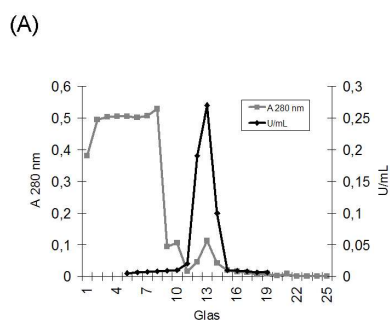
Mynd 2. Trypsínvirkni (Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-pNA) og chymotrypsínvirkni (Suc-Ala-Ala-Pr-Phe-pNA) trypsíns Y mæld gagnvart tilbúnum hvarfefnum fyrir trypsín- (stjörnur) og chymotrypsín virkni (ferningar). Viðmiðunarsýni var mælt á sama hátt og hefur bakgrunnsvirkni þess verið dregin frá gildunum á myndinni.



Mynd 3. Trypsínvirkni (Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-*p*NA) (hluti A, þríhyrningar) og chymotrypsínvirkni (Suc-Ala-Ala-Pr-Phe-*p*NA) (hluti B, þríhyrningar) trypsíns Y mæld gagnvart tilbúnum hvarfefnum á hitastigsbilinu 2-37 °C. Til viðmiðunar er flot af frumum sem innihalda pPICZ α A tjáningarvektorinn án trypsínogens Y innskots (hlutar A og B, ferningar).

en trypsín virkni sem kemur verulega á óvart. Ástæðan gæti þó verið sú að ákveðin aminósýrusvæði sem talin eru gegna mikilvægu hlutverki í hvarfessírhæfni trypsína af flokki I eru frábrugðin í trypsíni Y [12, 13, 21, 24]. Í þessu sambandi er Ser190Ala breytingin sérlega áhugaverð þar sem sýnt hefur verið að Ser190 í trypsínum af flokki I, tengist lysín og argínín aminósýrum í trypsín hvarfefnum. Því má e.t.v. búast við því að trypsín Y sameindin, sem inniheldur Ala í stöðu 190, tengist trypsín hvarfefnum ekki jafn sterkum böndum.

Við mælingar á hitastigsstöðugleika trypsíns Y þar sem virkni ensímsins gagnvart tilbúnum trypsín og chymotrypsín hvarfefnum var mæld við mismunandi hitastig á bilinu 2-37 °C kom í ljós að ensímið er virkt við 2 °C (mynd 3A og B).



Mynd 4. A. Losunarferill tjáðs og virkjaðs trypsíns I af *p*-Aminóbenzamidín súlu þar sem gleypni var mæld við 280 nm (ferningar) og virkni var mæld við 410 nm gagnvart tilbúna hvarfeginu N-CBZ-Gly-Pro-Arg-*p*NA (tiglar).

B. Western blott greining sem sýnir tjáða og virkjaða form trypsíns I en það var hreinsað á *p*-Aminóbenzamidín súlu (rásir 6, 7, 8 og 9) og náttúrulega afbrigði ensímsins (rás 10) til viðmiðunar. Rásir 2-3 sýna ProBond hreinsuð ómeðhöndluð trypsín I sýni en rásir 3-4 sýna sambærileg flot sem meðhöndluð voru með örlitlu magni af náttúrulegu trypsíni I.

Ensímvirknin jókst með vaxandi hitastigi upp í 21 °C þar sem hámarksvirkni var náð en ensímið var algerlega óvirkt við 37 °C. Niðurstöðurnar benda til þess að trypsín Y sé lagað að mjög lágu hitastigi þar sem það er virkt við 2 °C. Að auki sýnir ensímið virkni á þrengra hitastigsbili en t.d. þorskatrypsín I [1].

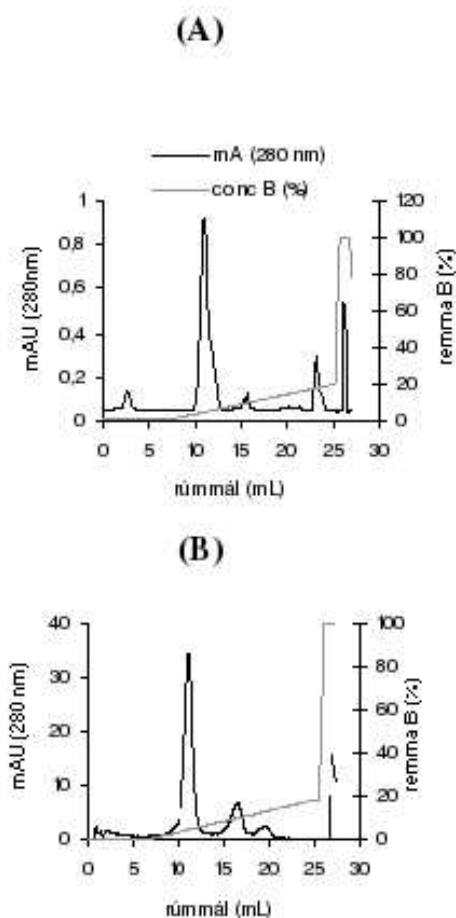
6. Rannsóknir á þorskatrypsíni I

Rannsóknir Bjarna Ásgeirssonar og Jóns Braga Bjarnasonar [1] á Raunvísindastofnun Háskólans sýndu að trypsín I er kuldaaðlagað ensím, sem hef-

ur um 20 sinnum hærrí hvötunargetu (kcat/KM) en sambærileg ensím úr spendýrum. Genið (cDNA) fyrir forveraform trypsíns I úr þorski hefur verið einangrað [11] og nýlega tókst að framleiða ensímið í *E.coli* His-Patch ThioFusion tjáningarkerfinu [39]. Trypsín I geninu var komið fyrir í pThioHis genaferju á þann hátt að bútur er svarar til HP-thioredoxín próteins, og var hluti ferjunnar, var tengdur við 5' enda trypsíns I gensins. Við tjáninguna myndast samrunaprótein á milli HP-thioredoxíns og trypsíns I. Tilgangurinn með þessari tengingu er bæði sá að auka leysni tjáðu afurðarinnar með HP-thioredoxíni en þessi hluti samrunapróteinsins er einnig mótefnavaki þannig að unnt er að greina það með anti-thio mótefni. Þessir þættir skiptu sköpum við framleiðslu og greiningu á tjáða formi trypsíns I. HP-thioredoxin hluti samrunapróteinsins binst einnig ProBond málbindi súluefni, sem auðveldaði hreinsun trypsíns úr frumufloði. Virki hluti trypsíns I var síðan klipptur frá HP-thioredoxin samrunapróteininu með örlitlu magni af náttúrulegu þorskatrypsíni. Virkjaða ensímið var hreinsað á *p*-amínóbendamidín súlu sem er sértæk fyrir trypsín.

Mynd 4A sýnir losunarferil ensímsins af súlunni þar sem gleypnin var mæld við 280 nm (ferningar) og virkinn gagnvart tilbúna trypsín hvarfefninu *N*-CBZ-Gly-Pro-Arg-*p*NA var mæld við 410 nm (tiglar). Virkjunarskrefið reyndist vera mjög vandasamt og krafðist mikillar nákvæmni vegna viðkvæmni ensímsins fyrir óvirkjun með sjálfmeltu og hita. Samanburður á tjáða og virkjaða trypsín I ensíminu og náttúrulega formi þess á Western blotti, þar sem notuð voru fjölstofna mótefni gegn náttúrulega afbrigði trypsíns I til greininga, sýndi að próteinböndin koma fram á sama stað (mynd 4B). Rásir 6-9 á mynd 4B sýna tjáða og virkjaða afbrigði trypsíns I en rás 10 sýnir náttúrulega form þess. Sambærilegt magn af náttúrulegu formi trypsíns I og notað var til að virkja tjáða afbrigði ensímsins kom ekki fram í Western blott greiningum. Slík viðmiðunarsýni voru útbúin í öllum tilraunum sem framkvæmdar voru á tjáðu og virkjuðu trypsíni I og mæliniðurstöður leiðréttar með tilliti til bakgrunnsvirgni. Í rásum 2 og 3 á mynd 4B eru trypsíns I sýni sem hreinsuð voru á ProBond súlu og í rásum 4 og 5 eru sambærileg ProBond hreinsuð sýni sem meðhöndluð voru með örlitlu magni af náttúrulegu trypsín I.

Við hreinsun tjáða og virkjaða afbrigðis trypsíns I og náttúrulega forms þess á MonoQ súlum (myndir 5A og B) kom í ljós að losunarferlar þeirra voru eins. Niðurstöður ofangreindra rannsókna benda sterklega til þess að um sama trypsínform sé að ræða [39]. Um 50% amínósýruraðar náttúrulega forms trypsíns I hefur verið greind með próteinrað-



Mynd 5. Losunarferill tjáðs og virkjaðs trypsíns I á MonoQ súlu (hluti A) samanborið við losunarferil náttúrulega forms ensímsins á sömu súlu (hluti B).

greiningu. Samanburður hennar við afleidda amínósýruröð klónaða afbrigðis trypsíns I, sem ákvörðuð var með raðgreiningu á klónuðu cDNAi, sýndi að raðirnar eru eins. Því eru yfirgnæfandi líkur á að klónaða afbrigði trypsíns I og náttúrulega formið einangrað úr þorski séu eitt og sama ensímið.

7. Lokaorð

Tekist hefur að framleiða þorskatrypsín I og Y í bakteríunni *E. coli* og gersveppnum *Pichia pastoris*. Greint er frá sérstæðum eiginleikum klónaðs og tjáðs forms trypsíns Y sem meðal annars felast í breiðvirkni ensímsins auk virkni við óvenju lágt hitastig (2 °C) og á hitastigsbilinu 2-30 °C. Þessir eiginleikar trypsíns Y gætu reynst mikilvægir í iðnaði og er áhugi á að kanna notkunarmöguleika ensímsins síðar. Trypsín Y ásamt sjö sambærilegum ensímum úr fiskum tilheyrir nýstárlegum flokki trypsína (flokkur III). Trypsín Y er eina

ensímið af þessum flokki sem hefur verið framleitt í örverum og skilgreint að hluta. Ekkert ensímanna af flokki III hefur verið einangrað á náttúrulegu formi úr fiskunum sem þau finnast í heldur hafa þau eingöngu verið skilgreind út frá cDNA röðum. Framhaldsrannsóknir miða að einangrun og skilgreiningu á náttúrulega afbrigði trypsíns Y úr þorski og könnun á áhrifum mismunandi umhverfishitastigs á tjáningu ensímsins í eldistilraunum á þorski. Með þessum rannsóknum yrðum við fyrsti rannsóknahópurinn í heiminum til að skilgreina trypsin af flokki III úr sínu náttúrulega umhverfi. Jafnframt mundu niðurstöðurnar leiða í ljós hvort um ofur kuldavirkt ensím sé að ræða.

Pakkir

Rannsóknirnar hafa verið styrktar af eftirtöldum aðilum: Rannsóknasjóði Háskólans, Rannsóknánámsjóði, Vísindasjóði Rannís og Tæknisjóði Rannís, Háskóla Íslands og Raunvísindastofnun Háskólans.

Summary: This paper describes the production of the novel recombinant trypsin Y polypeptide from Atlantic cod (*Gadus morhua*) in a *Pichia pastoris* expression system and the expression of cod trypsin I in *E.coli*. It presents the first biochemical data on trypsin Y supplementing the molecular description of the putative group III trypsins. Unexpectedly, the results demonstrate that the recombinant trypsin Y has a dual substrate specificity demonstrating both trypsin and chymotrypsin activities. It shows increasing proteolytic activity at temperatures between 2-21 °C and it is completely inactivated at 37 °C. These properties may be important for the commercial use of recombinant trypsin Y as other cold-adapted proteolytic enzymes from the Atlantic cod have proven their usefulness in various industrial and medical applications.

Heimildir

- [1] B. Ásgeirsson, J.W. Fox, and J.B. Bjarnason, *Eur. J. Biochem* **180** (1989) 85.
- [2] L. Helgadóttir, M.Sc. Thesis, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Iceland, Reykjavík, Iceland (2002).
- [3] B. Ásgeirsson and J. B. Bjarnason, *Comp. Biochem. Physiol.* **99** (1991) 327.
- [4] R. Leth-Larsen, B. Asgeirsson, M. Thorolfsson, M. Norregaard-Madsen and P. Hojrup, *Biochim. Biophys. Acta.* **1297** (1996) 49.
- [5] B. Ásgeirsson and J. B. Bjarnason, *Biochim. Biophys. Acta.* **1164** (1993) 91.
- [6] M. M. Kristjánsson, S. Guðmundsdóttir, J. W. Fox and J. B. Bjarnason, *Comp. Biochem. Physiol.* **110B** (1995) 707.
- [7] J.B. Bjarnason and B. Benediksson, Protein hydrolysates produced with the use of marine proteases. Patent: PCT, WO 01/28353 A2 (26. April 2001).
- [8] J.B. Bjarnason, Fish serine proteases and their pharmaceutical and cosmetic use. Patent: PCT, WO 00/78332 A2 (28. December 2000).
- [9] A. O. Smalås, E. S. Heimstad, A. Hordvik, N. P. Willassen and R. Male, *Proteins.* **20** (1994) 149.
- [10] H. K. Schröder-Leiros, N. P. Willassen and A. O. Smalås, *Eur. J. Biochem.* **267** (2000) 1039.
- [11] A. Guðmundsdóttir, E. Guðmundsdóttir, S. Oskarsson, J.B. Bjarnason, A.E. Eakin and C.S. Craik, *Eur. J. Biochem.* **217** (1993) 1091.
- [12] R. Spilliaert and Á. Guðmundsdóttir, *Mar. Biotechnol.* **1** (1999) 598.
- [13] J.C. Roach, *Proteins* **47** (2002) 31.
- [14] S. Halfon and C.S. Craik, Serine peptidases and their clans, in: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, eds. A.J. Barrett, N.D. Rawlings and J.F. Woessner, San Diego, Calif., 1998.
- [15] E. W. Davie, K. Fujikawa and W. Kisiel, *Biochemistry* **30** (1991) 10363.
- [16] S. Morita, M. Fukase, K. Hoshino, Y. Fukuda, M. Yamagushi and Y. Morita, *Plant Cell Physiol.* **35** (1994) 1049.
- [17] B. Ueberschär, in: *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development*, eds. B. T. Walther and H. J. Fyhn, Bergen, 1993.
- [18] A. Light and H. Janska, *Trends. Biochem. Sci.* **14** (1989) 110.
- [19] S. Halfon and C.S. Craik, Trypsin. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, eds. A.J. Barrett, N.D. Rawlings, and J.F. Woessner, San Diego, Calif., 1998
- [20] J. C. Roach, K. Wang, L. Gan, and L. Hood, *J. Mol. Evol.* **45** (1997) 640.
- [21] H. M. Pálsdóttir and Á. Guðmundsdóttir, *J. Aquat. Food Prod. Technol.* (2003) (in press).
- [22] L. Hedstrom, J. J. Perona, and W. J. Rutter, *Biochemistry* **33** (1994) 8757.
- [23] L. Hedstrom, L. Szilagy, and W. Rutter, *Science* **255** (1992) 1249.
- [24] J. J. Perona and C. S. Craik, *Protein Sci.* **4** (1995) 337.
- [25] A. Ruhlmann, D. Kukla, P. Schwager, K. Bartels, and R. Huber, *J. Mol. Biol.* **77** (1973) 417.
- [26] W. Bode, J. Walter, R. Huber, H. R. Wenzel and H. Tschesche, *Eur. J. Biochem.* **144** (1984) 185.
- [27] C. de Haën, H. Neurath and D.C. Teller, *J. Mol. Biol.* **92** (1975) 225.
- [28] Á. Guðmundsdóttir, *Biol. Chem.* **383** (2002) 1125.
- [29] G.I. Berglund, A.O. Smalås, H. Outzen, and N.P. Willassen, *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **7** (1998) 105.
- [30] N. Hiramatsu, N. Ichikawa, H. Fukada, T. Fujita, C.V. Sullivan, and A. Hara, *J. Exp. Zool.* **292** (2002) 11.
- [31] M.M. Kristjánsson and H.H. Nielsen, *Comp. Biochem. Physiol.* **B101** (1992) 247.
- [32] J.A. Irwin, G.A. Alfredsson, A.J. Lanzetti, H.M. Guðmundsson, and P.C. Engel, *FEMS Microbiol. Lett.* **201** (2001) 285.

- [33] Y. Morita, Q. Hasan, T. Sakaguchi, Y. Murakami, K. Yokoyama, and E. Tamiya, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50** (1998) 669.
- [34] M.M. Kristjánsson, Ó.Th. Magnússon, H.M. Guðmundsson, G.Á. Alfredsson, and H. Matsuzawa, *Eur. J. Biochem.* **260** (1999) 752.
- [35] G. Feller, E. Narinx, J.L. Arpigny, M. Aittaleb, E. Baise, S. Genicot, and C. Gerday, *FEMS Microbiol. Rev.* **18** (1996) 189.
- [36] A.O. Smalås, H.K. Schrøder-Leiros, V. Os, and N.P. Willassen, *Biotechnol. Annu. Rev.* **6** (2000) 1.
- [37] B. Ásgeirsson, in: *Raust, tímarit um raunvísindi og stærðfræði.* **1** (2003) 35.
- [38] G. Feller and C. Gerday, *CMLS Cell. Mol. Life Sci.* **53** (1997) 830.
- [39] G. Jónsdóttir, J.B. Bjarnason and Á. Guðmundsdóttir, *Prot. Expr. Purif.* (2003) (in press, available online at www.sciencedirect.com).

Um höfundana: Ágústa Guðmundsdóttir er prófessor í matvælaefnafræði við Háskóla Íslands.

Helga Margrét Pálsdóttir er doktorsnemi í matvælaefnafræði við Háskóla Íslands.

Raunvísindastofnun Háskólans
Læknigarði, Vatnsmýrarvegi 16
IS-101 Reykjavík
ag@hi.is

Móttékin: 1. desember 2003

