

耐酸性 Protease 에 관한 研究

第 2 報 阻害劑에 의한 影響 및 各種基質에 對한 作用性에 對하여

金 相 烈

曉星女子大學 藥學科

Studies on the Acid stable Protease from *Penicillium* sp.

Part II. Effect of inhibitor on the proteolytic activity of acid
Protease and the Milk clotting activity.

Sang Yul Kim

Department of Pharmacy, Hyosung Women's College

(Received November 23, 1973)

Abstract

A study on the active center of the acid protease from *Penicillium* sp. was conducted, and also the milk clotting activity of acid protease was measured.

1. PCMB failed to influence the proteolytic activity of acid protease, indicating that a reactive sulfhydryl group is not required for the enzymatic activity.
2. ϵ -amino caproic acid did not show any inhibitory effect on the proteolytic activity of acid protease.
3. Also 2,4-dinitro phenol did not show any inhibitory effect on the enzyme activity.
4. Acid protease from *Penicillium* sp. showed a strong milk clotting activity in the presence of Ca ion.
5. This enzyme had a strong proteolytic activity on various substrate, such as casein, denatured hemoglobin, ovalbumin, denatured bovine muscle protein, denatured percine muscle protein and denatured chicken muscle protein.

I. 緒 論

耐酸性 protease 를 強力히 分泌하는 *Penicillium* 屬의 菌株을 選定하여 이 菌이 生産하는 酵素의 基本性質에 對해서는 前報⁽¹⁾에서 發表한 바 있으며, 그 結果를 要約하면 最適作用 pH 는 2.6~3.0, 最適作用溫度는 50°C, 安定 PH 의 範圍는 2~6 安定溫度는 40°C 以下, 金屬 ion 및 EDTA 에 對해서는 影響을 받지 않는 酵素였다.

本 實驗에서는 이 酵素에 對하여 一般的 酵素 活性阻害劑가 미치는 影響 및 各種基質에 對한 作用特異性 또한 그 凝乳效果에 對해서 現在까지의 實驗結果를 發表하고자 한다.

II. 實驗方法 및 材料

1. 酵素液의 調製

- 1) 選別菌株 酵素液의 調製
耐酸性 Protease 強力分泌菌 A-43 株을 前報⁽¹⁾

에서와 동일한 방법으로 wheat bran 100g 에 2% Sucrose solution 70ml 를 가한培地를 15 Lbs 에서 30分間 殺菌하여 接種後 30°C 에서 4日間 培養하였다. 이 培養物에 約 2倍의 蒸溜水를 加하여 5°C 에서 約 10時間 抽出後 濾過하여 이 濾過液에 ammonium sulfate 로써 分別 沈澱하였으며, 그 過程을 圖示하면 Fig. 1과 같다.

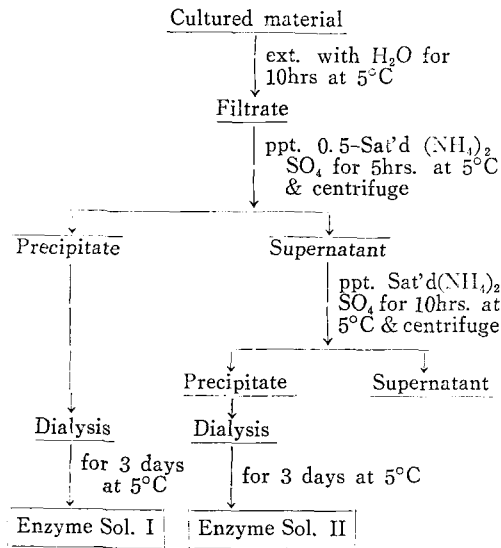


Fig. 1 Preparation of Enzyme.

上記 Fig. 1에서 分割한 0.5-saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction 과 saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction 을 常法에 따라 그 酵素活性度를 測定한 結果 Table 1 에서와 같이 현저한 差異를 나타내지 않았기 때문에 本酵素의 精製는 ammonium sulfate 의 分別 沈澱이 不適當함을 알았으며 本實驗에서는 편의상 saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction 을 適當하게 稀釋하여 酵素液으로 使用하였다.

Table 1. Enzyme activity on Casein.

Case		O. D. (-logT)
Enzyme I	Sample	1.3370
	Control	0.2798
Enzyme II	Sample	1.5230
	Control	0.5200

2) Pepsin液의 調製

市販 一級 pepsin 製劑를 蒸溜水에 溶解하여 最終濃度 0.05mg/ml 가 되게하였다.

3) 酵素 活性度 測定方法

亦是 前報⁽¹⁾에서와 同-하게 Folin's casein 比色法을 使用하였다. substrate 로써 0.6% casein (dissolved in phosphate buffer pH 2.2) 液 2.5ml 에 酵素液을 0.5ml 加하여 38°C 에서 20분간 反應시킨후 常法에 따라 蛋白沈澱試藥 0.44M-TCA 2.5ml 를 加하여 蛋白을 除去시키고 이 濾液 1ml 에 蒸溜水 1ml, 0.55M- Na_2CO_3 5ml 및 Folin 試藥 1ml 를 加하여 38°C 에서 30分間 呈色시킨 후 colorimeter 를 使用하여 波長 660m μ 에서 그 吸光度를 測定하여 對照區와의 O. D.의 差로써 酵素活性度を 나타내었다.

4) 凝乳活性 測定法

本實驗에서 凝乳活性度 測定은 有馬⁽²⁾ 등이 使用한 方法으로서 凝乳로써 生成된 白色 微粒子의 肉眼的 觀察方法을 使用하였다. 즉, 新鮮한 市販牛乳 5ml 를 試驗管에 取하여 38°C 의 水槽에 넣어 10分間 放置한 후 여기에 同一溫度의 酵素液 一定量을 加한 후 牛乳와 混合하여 38°C 에 保存하면서 凝乳現象이 일어나는 때까지의 時間을 測定했으며 必要에 따라서는 牛乳에 M/100이 되도록 CaCl_2 를 添加하여 使用하였으며 對照區로서는 Hog Pepsin 을 使用하였다.

5) 基質 調製法

Beef, pork, chick, chicken, 의 新鮮肉(市販品)을 細切한 후 100°C 에서 10分間씩 2回 끓여서 脫脂한 후 homogenizer 로 磨碎하여 遠心分離하였다. 여기서 얻은 沈澱 約 2g 에 對하여 2倍로 稀釋한 Phosphate buffer (PH2.2) 30ml 를 加하여 懸濁한 液을 基質로 使用하였다.

또 Casein, Hemoglobin, Egg albumin 은 각각 0.6%, 2.0%, 4.0%가 되게 2倍 稀釋된 Phosphate buffer (PH2.2)에 溶解시켜 그대로 使用하였다.

6) 試藥

Casein; Merk, GR, milk Casein

Hog pepsin; Wako, EP

Hemoglobin; Merck, GR.

2.4-Dinitro Phenol (DNP); Wako, GR

P-Chloromercuribenzoic Acid (PCMB);

Wako GR ϵ -Amino caproic acid; Wako GR.

III. 實驗 結果

1. 阻害劑에 의한 影響

1) PCMB

一般的으로 酵素分子中 SH 基의 阻害劑로써 加해지는 PCMB 가 本 Acid protease 에 어떠한 影響을 미치는가를 檢討해 보고저 Ethyl alcohol 98ml 에 10% NaOH 2ml 加한 EtOH-NaOH 溶液에 PCMB 를 $2 \times 10^{-3}M$ 에서 2×10^{-8} , 濃度가 되게 加하여 溶解한 후 이 PCMB 液 1ml 에 酵素液 1ml 를 加하여 38°C 에서 10分間 前處置시킨 후 이 PCMB-Enzyme 液 0.5ml 를 0.6% Casein 2.0ml 에 加하여 38°C 에서 1時間 酵素作用을 시켜 常法에 따라 酵素의 活性度를 測定하였으며, 이때 對照區로

Table 2. Effects of PCMB on Enzyme activity.

Concentration of inhibitor	Sample (O. D-logT)	Control
$10^{-3}M$	0.6536	0.6421
10^{-4}	0.5834	0.6459
10^{-5}	0.6108	0.6478
10^{-6}	0.6478	0.6478
10^{-7}	0.6819	0.6383
10^{-8}	0.6383	0.6198

는 PCMB 를 加하지 않는 EtOH-NaOH 溶液에 enzyme 을 加하여 sample 區와 同一하게 處理하였다. 上記와 같은 方法으로 比較檢討한 結果 Table 2. 에서 보는 바와 같이 本 Acid protease 는 PCMB 에 依하여 全혀 그 活性에 阻害를 받지 않음을 알게 되었으며, 또한 本 enzyme 의 活性圈에 SH 基가 無關함을 알게 되었다.

2) 2,4-Dinitro phenol

酵素分子의 末端 amino 基와 親和性이 強하여 이 末端 amino acid 가 酵素活性圈인 경우 酵素活性를 阻害하게 되는 2,4-Dinitro phenol 을 本 protease 의 作用時 反應液에 加하여 本 酵素의 活

性에 미치는 影響을 檢討하였다. 즉 2,4-Dinitro Phenol 를 適當히 稀釋된 Phosphate buffer (PH2.2)에 各各 反應液에서의 最終濃度 $10^{-2}M$ 에서 $10^{-6}M$ 濃度까지 되게 溶解하여 이 2,4-DNP 溶液 0.5 ml 에 酵素液 0.5ml 를 38°C 에서 1時間 preincubation 시킨 後 casein 2.0ml 을 加하여 38°C 에서 40分間 酵素作用을 시킨 後 常法에 따라 그 活性度를 測定하였으며 對照區로써는 앞에서의 實驗때와 同一한 方法으로 酵素液만을 基質에 加하여 作用시킨 結果는 다음 Table 3. 과 같다.

Table 3. Effects of DNP on Enzyme activity.

Concentration of inhibitor	Sample (O. D-logT)	Control
$10^{-2}M$	1.569	1.585
10^{-3}	1.569	1.569
10^{-4}	1.569	1.569
10^{-5}	1.585	1.585
10^{-6}	1.602	1.569

上記 Table 3. 에서 보는 바와 같이 2,4-DNP 에 依해서도 本 酵素는 活性에 全然 系響을 받지 않음을 알게 되었다.

3) ϵ -Aminocaproic acid

一般的으로 protease 의 競爭的阻害劑(Competitive inhibitor)로써 特히 plasmin 및 Carboxypeptidase B에 強하게 作用하는 ϵ -Aminocaproic acid 가 本 酵素의 作用에 어떠한 影響을 미치는가를 檢討해 보고저 ϵ -Aminocaproic acid 를 反應液에서 最終濃度 $10^{-2}M$ 에서 $10^{-7}M$ 가 되게 蒸溜水에 溶解하여 調製한 後 常法에 따라 다음과 같은 反應區를 設定하였다.

즉 酵母液과 ϵ -Aminocaproic acid 液 各各 0.5 ml 적을 38°C 에서 30分間 處理한 後 여기에 Casin 2.0ml 를 加하여 酵素作用을 시켰으며, 그 結果는 Table 4. 와 같다. Table 4. 에서 보는 바와 같이 ϵ -Amino caproic acid 도 全然 本 酵素活性에 影響을 나타내지 않음이 認定되었다.

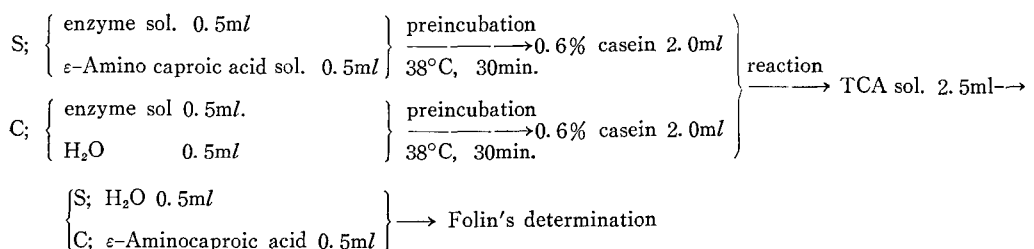


Table 4. Effects of ϵ -Aminocaproic Acid on Enzyme Activity.

Concentration of inhibitor	Sample (O. D-logT)	Control
$10^{-2}M$	0.9318	0.9431
10^{-3}	0.9547	0.9547
10^{-4}	0.9355	0.9547
10^{-5}	0.9547	0.9508
10^{-6}	0.9547	0.9586
10^{-7}	0.9355	0.9547
10^{-8}	0.9393	0.9547

2. 基質에 對한 作用 特異性

앞에 記述한 方法에 依하여 調製된 各種 基質에 대하여 本 酵素가 作用時 그 活性能을 比較 檢討 함과 同時에 市販 肉類의 消化性을 알아 보고져 pepsin 을 對照로 하여 比較하였다. 즉 各各의 基 質溶液 2.5ml 에 enzyme 0.5ml 를 加하여 38°C 에 서 2 時間까지 酵素作用을 시키면서 經時的으로 그 基質에 對한 分解能을 調查하였으며, 이때 酵 素作用은 常法에 따라 Folin 比色法으로 測定하여 logT 로써 酵素의 活性度를 比較하였다.

本 酵素에 對하여 對照區로서 pepsin 을 同一條

Table 5. Enzyme Activity on Different Substrate

Substrate	Enzyme	Time (min.)	15	30	60	120
		0 (O. D-logT)				
Casein	Pepsin	0.0862	0.1931	0.2328	0.4685	0.7423
	Enzyme	0.1215	0.9431	1.2010	1.3090	1.4550
Hemoglobin	Pepsin	0.1643	0.3010	0.3279	0.4559	0.5918
	Eyme	0.2147	1.1610	1.3090	1.4550	1.7210
Egg Albumin	Pepsin	0.2676	0.3279	0.3363	0.4202	0.4685
	Enzyme	0.3080	0.6383	0.7212	0.7872	1.1670
Beef Ext.	Pepsin	0.0570	0.0926	0.1135	0.1518	0.2007
	Enzyme	0.1290	0.4089	0.4750	0.6289	0.7669
Pork Ext.	Pepsin	0.0381	0.0706	0.0969	0.1163	0.1169
	Enzyme	0.1051	0.3279	0.3979	0.4750	0.6180
Chicken Ext.	Pepsin	0.0599	0.0910	0.1024	0.1385	0.1772
	Enzyme	0.1209	0.3958	0.5017	0.6478	0.7696

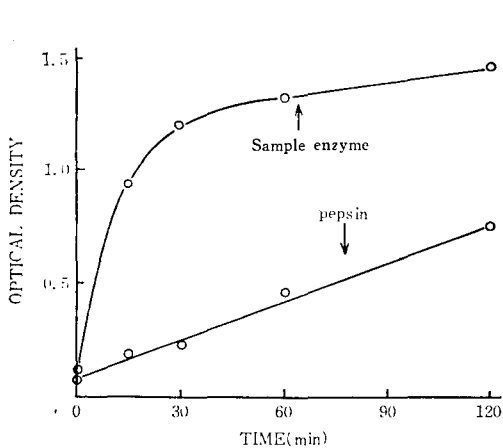


Fig. 2 Enzyme Activity on Casein.

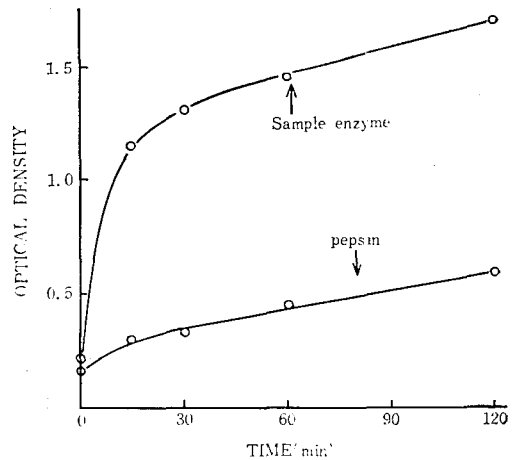


Fig. 3 Enzyme Activity on Hemoglobin.

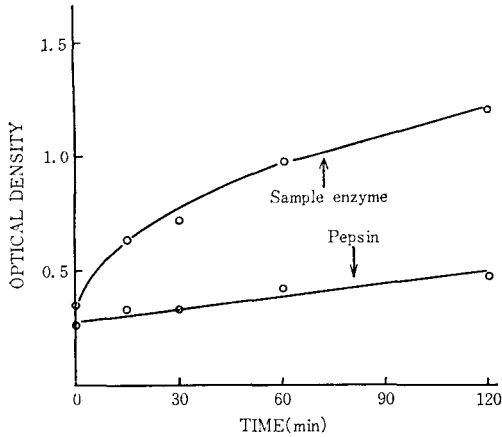


Fig. 4. Enzyme Activity on Egg Albumin.

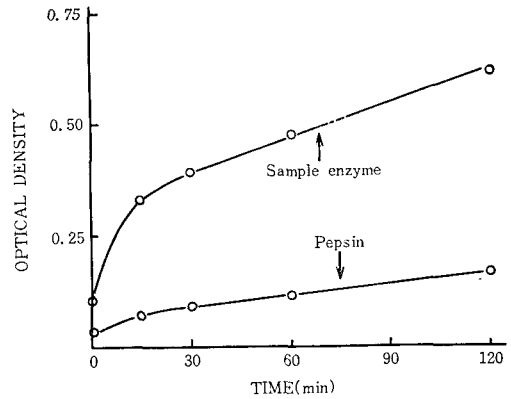


Fig. 6 Enzyme Activity on Pork

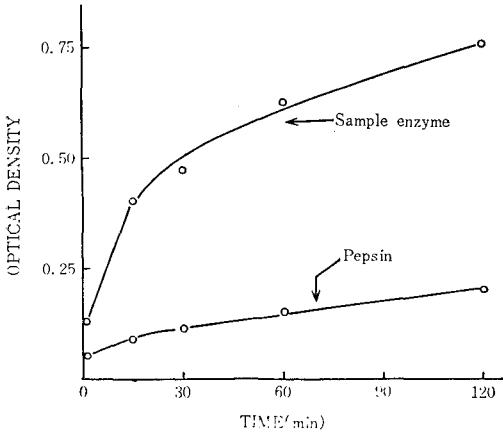


Fig. 5 Enzyme Activity on Beef.

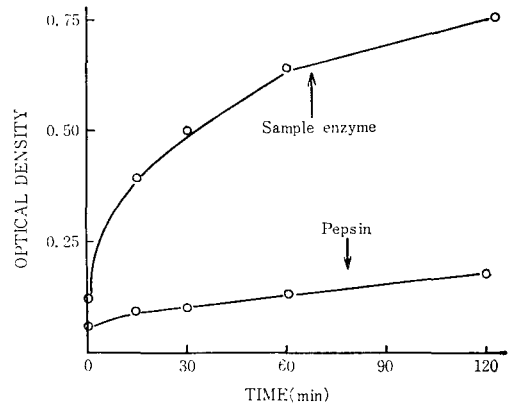


Fig. 7. Enzyme Activity on Chicken

件에서 作用시켰으며, 그 결과는 Table 5와 Fig. 2~7과 같다.

以上 Table 5와 Fig 2~7에서 보는 바와 같이 一般 肉類에 대하여 比較할때 pepsin은 그 作用能에 別다른 差異가 없었으나 本 酵素는 他 基質에 比하여 hemoglobin과 casein에 對해서는 pepsin에 比해서 그 分解度가 顯著히 減少하였다.

3. 凝乳에 對한 活性

凝乳 活性 測定은 milk clotting enzyme인 Rennin의 方法에 準하였으며, 또 酸性 protease인 pepsin이 강한 clotting activity를 가지고 있으므로 本 耐酸性 protease도 milk clotting activity가 있는 지를 pepsin을 對照로 하여 前述한 方法으로 그 活性를 調査 比較하였으며 實驗에서는 特히

Ca⁺⁺이 milk clotting에 크게 影響을 줌으로^(3,4) 酵素液을 調製할 때 혹시 培養基로 부터 Ca⁺⁺ 등이 混入될가 細心히 注意하였으며, 얻어진 結果는 다음 Table 6과 같다.

Table 6. Milk Clotting Activity of Enzyme

Sub- strat	Enzyme		Pepsin	
	0.5ml	1.0ml	0.5ml	1.0ml
Milk	595sec.	570sec.	no clotting	no clotting
Milk Ca ⁺⁺	160	126	126	100

Table 6에서 보는 바와 같이 本 Penicillium屬 菌株의 耐酸性 酵解도 강한 凝乳 活性를 가지고 있으며 凝乳하는데 있어서 Ca⁺⁺의 影響이

pepsin 에 비해 그다지 크지 못한 點等を 보아 耐酸性 protease 이기는 하나 그 作用 規範이 pepsin 과는 확실히 다른다는 것을 알게 되었다.

IV. 考 察

本 Penicillium 屬으로 부터 얻은 耐酸性 protease 는 그 作用條件에 있어서는 動物性 耐酸性 protease 인 pepsin 과 類似한 性質을 나타내는 것이다. 이 酸酵의 active site 에 對해 多少의 知見을 얻고져 -SH 基에 阻害하는 PCMB 와 metal 에 chelate 하는 EDTA⁽¹⁾의 影響에 對해서 調査하였으나 影響이 全然 없었으며, 또 Amino 末端에 位置하는 terminal amino acid 亦是 本 酵素 活性에 別影響이 없음이 나타났으며 또한 ϵ -Aminocaproic acid 에 對해서도 別 影響이 없었다. 이것은 pepsin 과 類似한 性質으로써 이 點에 對해서는 pepsin 과 別다른 差異를 찾아 볼수 없었다.⁽⁵⁾ 한편 milk clotting test 에 있어서 Ca^{++} 의 存在下에서는 pepsin 과 같이 강한 activity 를 나타내고 있기는 하나 Ca^{++} 이 없는 反反應條件에서는 Table 6에서 보는 바와 같이 pepsin 에 비해 顯著한 clotting activity 를 나타내는 것으로 보와 pepsin 과는 이 點에서 顯著한 差異를 볼 수가 있었다. 특히 이 點은 近來에 問題가 되어 있는 microbial rennet^(5,6,7,8)와 關係시켜 생각할 때 상당히 흥미가 있다고 보여진다.

또 pepsin 을 對照로 하여 各基質別 作用性을 볼 때 他基質에서는 pepsin 과 別 差異가 없으나, Fig. 2 및 3에서 보는 바와 같이 milk casein 및 hemogrobin 에 있어서는 本 sample 酵素的 活性이

pepsin 에 비해 顯著히 저하한다는 興味있는 事實을 發見하였다.

IV. 結 論

本 實驗에서 얻은 成果를 要約하면 다음과 같다.

① 本 酵素는 活性部에 SH 基를 가지고 있지 않다.

② N-末端의 amino acid 亦是 活性에는 關係되지 않는다.

③ 競爭의 阻害劑의 一種인 ϵ -Aminocaproic acid 는 本 酵素 作用에 影響을 미치지 아니한다.

④ 本 酵素는 강한 milk clotting activity 를 가지며 Ca^{++} 의 存在時 그 活性이 增進된다.

⑤ 基質에 對한 分解活性을 調査 結果 milk casein 과 hemogrobin 에 對해서는 pepsin 에 비해 本 酵素는 그 生性이 많이 低下된다.

參 考 文 獻

- 1) 金相烈; 韓國産業微生物學會誌 1. 93 (1973)
- 2) 日本應用酵素協會編; Protease 利用(1956).
- 3) Hofstetter, H; J, Stein, R. Imhot, Milchwiss, 10. 196(1955)
- 4) Storrs, F. C.; J. Dairy Res, 23. 269(1956)
- 5) Nishikawa, K; Bioch. 2. 188. 386(1927)
- 6) Tsugo, T; Dairy Congr. 5. 636. (1959)
- 7) Washlin, J. G.; J. Bact. 16, 355(1928)
- 8) Emanuilott, I; Dairy Congr. 2. 200(1956)