

능이(*Sarcodon aspratus*(Berk.) S. Ito)에서 분리한 단백질 가수분해 효소의 특성

엄태봉 · 유관성 · 김미경 · 류재수 · 손희숙* · 이태규**

전북대학교 식품공학과, *가정교육학과

**전주우석대학 식품공학과

Characterization of a Serine Protease from Neungee (*Sarcodon aspratus*(Berk.) S. Ito)

Tai-Bong Uhm, Kwan-Sung Ryu, Mi-Kyung Kim, Jai-su Yoo,
Hee-Sook Sohn*, Tae-Kyoo Lee**

Dept. of Food science and Technology, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea

*Dept. of Home Economics, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea

**Dept. of Food Science & Technology Chonju Woosuk University Wanju 565-800, Korea

Abstract

Properties of a protease purified from Neungee(*Sarcodon aspratus*(Berk.) S. Ito) have been investigated. The enzyme displays a glycosylated serine protease.

The enzyme is able to hydrolyze alanine, glycine, methionine, glutamine, and cysteine of N-CBZ- and N-t-BOC-L-amino acid derivatives relatively strongly but splits valine, proline, and isoleucine derivatives with low affinity, which means the enzyme has the broad substrate spectrum toward the amino acids.

Interestingly, the enzyme was inhibited by bromelain inhibitor. That is, the active site environment of the enzyme is believed to be similar to that of bromelain. However, peptide mapping studies show that the two enzymes have distinct different cleavage sites.

서 론

Protease는 단백질 혹은 peptide의 가수분해를 촉매하여 peptone, protease, peptide 또는 유리아미노산을 생성하는데 이것은 많은 세포내 반응에서 소화, 전이, 단백질의 분비작용, 효소와 호르몬 그리고 많은 독소의 활성에 중요한 역할을 한다. 또한 protease는 물리, 화학적인 가수분해에 비해 부반응이 없고 촉매 활성이 크기 때문에 에너지 소모가 적고 가공후에 제거할 필요가 없어 식품이나 의약공업에 널리 응용되고 있다^{1~4)}

식품공업에 이용되는 식물성 protease는 폴파야, 파인애플, 무화과로부터 분리된 papain, bromelain, ficin과 같이 육류의 연화 및 맥주의 chill proofing에 이용되며 이 식물성 protease는 식품 산업에 잠재적 이용 가능성이 높고 대부분 GRAS list에 포함되고 있지 않으나 그 자원의 재한성 때문에 널리 이용되지 못하고 있다.

버섯 균사종의 protease에 관한 연구로는 홍동⁵⁾이 *Pleurotus ostreatus*를, 村澤夫⁶⁾이 *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Flammulina velutipes* 및 *Pleurotus ostreatus*를 연구하였다.

그린고⁷, 이동^{7,8)}과 윤동⁹⁾은 *Sarcodon aspratus* 자설체 중에 protease 활성이 강함을 발견하고 이를 추출 성제하여 그 특성을 연구하였다.

동아리는 한국과 일본에 자생하며 옛부터 우리나라 등산촌에서 육류를 먹고 체하였을 때 사용해 왔던 비섯으로 알려져 있다.

본 연구는 자원의 활용 면에서 이 비섯을 식품 산업에 응용하고자 아직까지 밝혀 지지 않은 특성이 분자구조적 특성, 기질특이성 및 다른 protease와 관계 등을 조사하였다.

재료 및 방법

공시재료

동아리의 protease는 전보⁸⁾의 방법에 따라 (NH₄)₂SO₄ 침전, ion-exchange column chromatography, chromatofocusing까지 정제하여 사용하였다.

효소활성의 측정

진보⁷⁾에 속하여 Folin-Ci색법으로 측정하였다.

구성 탄수화물의 정량

성제효소에 결합된 탄수화물을 dextran을 표준 물질로 하여 phenol-sulfuric acid법¹⁰⁾으로 측정하였다.

합성기질에 대한 Cleavage site의 조사

합성기질 1mM에 0.1mM acetonitrile을 첨가한 후 0.1M sodium acetate(pH 5.5) 와 총액 2.5mL와 효소 30μL를 가하여 40°C water bath에 30분간 반응시킨 후 350nm에서 미색 성량하였다.

Protease inhibitor

Antipain, Cystatin, pepstatin, bromelain inhibitor, carboxypeptidase inhibitor, aprotinin, leupeptin, Lyspin-chymotrypsin inhibitor 30μg은 효소 (10μg/10μg)와 각각 40°C에서 30분간 반응시키 660nm에서 효소활성을 측정하였다.

HPLC에 의한 Peptide mapping

Ribonuclease A를 가질로하여 본 효소(2.5μg/

Table 1. Conditions for Peptide separation.

Instrument :	Waters HPLC
Detector Wavelength :	214nm
Column :	μ Bondapak C ₁₈ φ3.7mm×30cm
Flow Rate :	1mL/min.
Solvent :	A, 0.05% TFA B, 0.05% TFA in acetonitrile
Gradient :	0% B for 10min. 0% B to 80% B in 60min. 80% B to 0% B in 10min.

mL)와 bromelain(Sigma)을 각각 40°C에서 2시간 반응시킨 후 12μL씩 걸레에 주입하였다. 이때 HPLC분석조건은 Table 1과 같다.

결과 및 고찰

탄수화물 함량

*Sarcodon aspratus*로부터 성제된 본 효소는 당이 2.1%(w. t. carbohydrate/w. t protein)나 함유되어 있었다.

이와 유사하게 탄수화물 함유 protease로 처음 보고되어진 stem bromelain에는 1.46%가 탄수화물로 이루어져 있고 그 구성분은 mannose, fucose, xylose, N-acetylglucosamine으로 보고된 바 있다.

합성기질에 대한 Cleavage site조사

여러 합성기질에 광범위한 기질 특이성을 나타내었다.(Table 2) 특히 alanine, glycine, methionine, glutamine, cysteine의 아미노기에서 높은 가수분해율을 보였고 tyrosine, tryptophan, phenylalanine, leucine, aspartic acid도 상당한 분해율을 나타냈다. 그러나 valine, proline, isoleucine은 거의 잘 분해하지 못하였다. 잘 분해되는 아미노산의 R group은 L chain이 비교적 짧거나(glycine, alanine, cysteine), 또는 방향족 group(tyrosine, tryptophan, phenylalanine)을 가진것이 특색이다. 그러나 imino기로 이루어진 proline과 두개의 methyl기가 가지고 분자된 valine과 isoleucine은 잘 분해하지 못했다. 앞으로 cleavage site의 더 정

Table 2. Substrate specificity of the *Sarcodon aspratus* protease

Synthetic substrate	Relative activity(%)	Remark
N-CBZ-L-tyrosine p-nitrophenylester	41	
N-CBZ-L-valine p-nitrophenylester	9	
N-CBZ-L-tryptophan p-nitrophenylester	50	
N-CBZ-L-proline p-nitrophenylester	3	
N-CBZ-L-phenylalanine p-nitrophenylester	38	
N-CBZ-L-leucine p-nitrophenylester	51	
N-CBZ-L-isoleucine p-nitrophenylester	2	
N-CBZ-S-benzyl-L-cysteine p-nitrophenylester	59	
N-CBZ-L-lysine p-nitrophenylester		insoluble
N-CBZ-B-benzyl-L-aspartic acid p-nitrophenylester	33	
Na-CBZ-L-asparagine p-nitrophenylester	40	
Na-CBZ-L-arginine p-nitrophenylester		insoluble
N-CBZ-L-alanine p-nitrophenylester	100	
N-T-BOC-L-benzyl-L-glutamic acid p-nitrophenylester	25	
Na-T-BOC-L-glutamine p-nitrophenylester	63	
N-T-BOC-L-methionine p-nitrophenylester	66	
N-CBZ-L-glycine p-nitrophenylester	83	

확한 기작을 알기 위해서는 이미 sequence가 알려져 단백질을 이 효소로 가수분해시켜 cleavage site를 밝히는게 필요하리라 생각된다.

Protease inhibitor

Table 3에서 보는 바와 같이 흥미롭게도 이 효소는 bromelain inhibitor에 강한 저해를 받았다

Table 3. Effects of chemicals and metals on the enzyme activity

Reagents	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Relative activity(%)	Inhibitor type
Control	-		
Aprotinin	30	102	trypsin
Bromelain inhibitor	30	10	bromelain
Carboxypeptidase inhibitor	30	102	carboxypeptidase
Antipain	30	88	thiol protease
Cystatin	30	113	cysteine
Pepstatin A	30	84	pepsin, rennin, chymosin
Leupeptin	30	104	papain, cathepsin
Trypsin-chymotrypsin inhibitor	30	110	trypsin, chymotrypsin
1. 10-phenanthroline	1mM	106	metal protease
8-hydroxyquinoline	10mM	110	metal protease
EDTA	10mM	102	metal protease

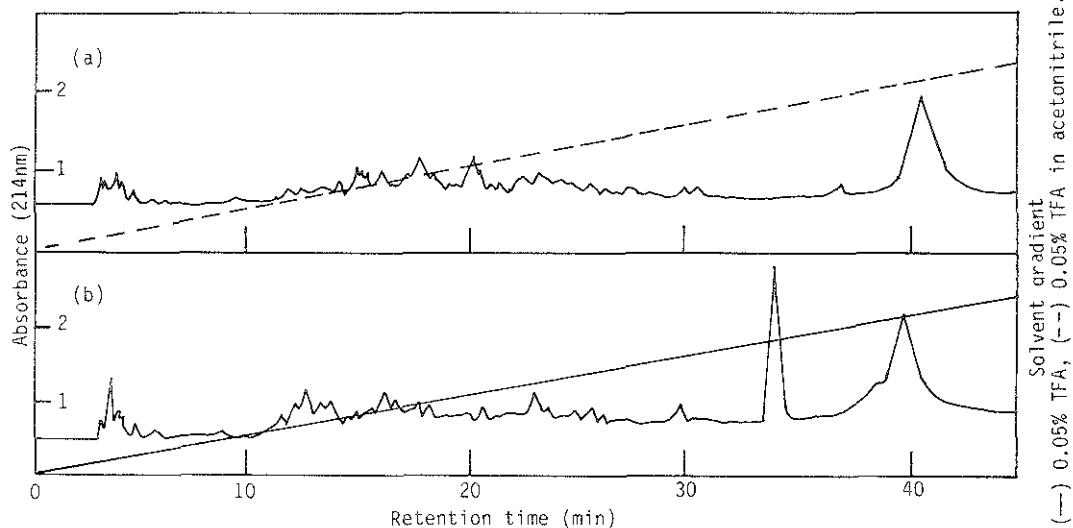


Fig. 1. Peptide mapping chromatogram.

(a) Digestion of ribonuclease A by bromelain.

(b) Digestion of ribonuclease A by the *Sarcodon aspratus* protease

The experimental conditions were described in the text.

(Table 3). 따라서 그 active site의 구조가 bromelain과 비슷할 것이라는 추측을 갖게 되었다. 또한 이 효소와 bromelain의 cleavage site가 같은가를 규명하기 위해 ribonuclease A를 기질로 peptide mapping한 결과 그 cleavage site는 완전히 달랐다 (Fig. 1). 따라서 두 효소가 bromelain inhibitor에 의해 같이 저해되어 그들의 active site의 삼차구조는 유사하지만 ribonuclease A 기질에 대한 cleavage site나 그들의 아미노산 조성은 다른 것으로 보아 별개의 protease인 것으로 생각된다. 그리고 다른 protease inhibitor에는 별 영향을 받지 않았다.

Metal protease의 저해제인 1, 10-Phenanthroline, 8-hydroxyquinoline, EDTA에는 영향을 받지 않으므로 metal은 활성에 관계하지 않는 것을 확인하였다.

요 약

*Sarcodon aspratus*에서 분리한 단백질 가수분해 효소의 특성을 조사하였다. 이 효소는 당을 함유한 protease이며, N-CBZ-과 N-T-BOCL-L-amino

acid의 alanine, glycine, methionine, glutamine, cysteine 유도체는 비교적 강하게 가수분해시키나 valine, proline, isoleucine 유도체는 거의 분해하지 못하였다. 따라서 이 효소는 아미노산에 대해 비교적 넓은 기질 특이성을 가진 것으로 생각된다. 또한 이 효소는 bromelin inhibitor에 의해 저해되었기 때문에 이 효소의 active site 주위는 bromelin의 active site와 유사한 것으로 추측되었다. 그러나 두 효소를 ribonuclease A를 기질로 peptide mapping한 결과 이 효소와 bromelin은 cleavage site가 완전히 달랐다.

문 헌

- Nakadai, T., Nasuno, S. and Iguchi, N.: The action of peptidases from *Aspergillus oryzae* in digestion of soybean proteins., *Agric. Biol. Chem.*, 32, 261(1977)
- Impoolsup, A., Bhumiratana, A. and Flegel, T. : Isolation of alkaline and neutral proteases from *Aspergillus flavus* var *columnaris*, a soy-sauce koji mold, *Appl. Environ Microbiol.*, 42, 619(1982)
- Law, B. A. : Microorganisms and their enzy-

- mes in the maturation of cheeses, Progr. in Ind. Microbiol., 19, 245(1971)
4. Tasuziro, I : Morphology and classification, in the biology and cultivation of edible mushroom, Academic Press, New York., 3(1978)
 5. 홍재식, 남궁희 : *Pleurotus ostreatus*가 생산하는 효소에 관한 연구. II. 중성 protease의 성질, 전북농대논문집, 제6집, 107(1975)
 6. 村澤夫 : 新規な酸性プロテアーゼ並びに擔子菌子實體形成と酸性プロテアーゼの役割に關する研究, 科學研究補助金(一般研究A)研究成果, 報告書, 1982.
 7. 이태규 : 능이 [*Sarcodon aspratus*(Berk.) S. Ito]중 단백질 가수분해 효소의 정제 및 성질에 관하여, 한국영양식량학회지, 15(3), 276 (1986)
 8. 이태규 · 은재순 · 양재현 · 노덕이 · 양희천 : 한국산고등균류에 관한 연구(제3보), 능이종에 함유된 단백분해효소의 정제 및 안정성, 약제학회지, 19(2), 81(1989)
 9. 은재순 · 양재현 · 이태규 · 최동성 : 한국산고등균류에 관한 연구(제5보), 능이종 단백분해효소의 특성과 N-말단 아미노산 배열, 약학회지, 33(6), 339(1989)
 10. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Robers, P. A. and Smith, F. : Calorimetric method for determination of sugars and related substances, Anal. Chem., 28, 350(1956)

(1990년 10월 10일 접수)