

Penicillium oxalicum HCLF-34로부터 Acid Proteinase의 부분유전자 Cloning 및 Sequencing

현성희* · 천재순¹ · 강상순² · 김진규³

을지의과대학교 자연과학교실, ¹충북대학교 바이오연구소, ²충북대학교 사범대학, ³한국원자력연구소

Acid proteinase는 *Aspergillus niger* (acid protease A)와 *Cryphonectria parasitica* (acid proteinase EapC)에서 분비하는 단백질로서 치즈를 제조할 때 이용하는 단백질이다. 본 연구에서는 *Penicillium oxalicum* HCLF-34로부터 acid proteinase의 부분유전자를 기존에 밝혀진 acid proteinase의 homology 정보로부터 degenerate primer를 제작하여 PCR 방법을 이용하여 cloning하였다. Cloning 된 유전자로부터 438 bp 염기서열을 분석하였으며, 이 염기서열을 146 개의 아미노산 정보로 변환하여 acid proteinase family와 homology를 비교한 결과 acid protease A와 71% 아미노산 서열의 homology를 나타내었고, EapC와 67%의 아미노산 서열 homology가 확인되었다.

Key words □ acid protease A, acid proteinase, EapC, *P. oxalicum* HCLF-34

남조류의 생장을 억제하는 세균은 많은 연구자들(20)에 의해 연구가 진행되어져 왔지만, 세균이 세포외로 분비하는 효소에 의해 남조류의 세포벽이 분해되는 연구는 미비하며, 특히 곰팡이(16)에 대한 연구는 부족한 실정이다.

본 연구자들에 의해 분리 및 동정된(9) *Penicillium oxalicum* HCLF-34은 다른 종류의 진균들과 함께 농작물 중 옥수수, 고구마, 토마토 등에 병해를 일으키는 것으로 보고(21) 되었으며, 또한 농작물들의 재배 뿐 아니라 수확 후 저장 시에도 *Penicillium* spp. 감염에 의한 농작물의 생산성 감소와 감염균의 종류에 따라 aflatoxin, secalmonic acid D, penicillic acid, fumonisin 등 인체에 해로운 독소를 분비하는 것으로 알려져 있다(8). 한편, 이들 진균류의 특이적 방제 및 항진균제에 대한 내성균의 출현을 억제하기 위하여 최근 진균만의 특성인 포자발아, 진균 세포벽 생합성 기작 및 식물세포벽 분해 효소의 활성에 대한 억제 물질의 개발 등에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다(23). 농작물에 감염하는 진균류 중 *Penicillium* spp.들이 분비하는 chitinase, glycerol oxidase와 alpha-galactosidase(5), serine proteinase(25), xylanase(2), phospholipase B(15), β -glucanase와 alkaline protease(1), thermostable acid protease(6)에 관한 분리 및 특성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 푸른곰팡이가 세포내·외로 분비하는 단백질 분해효소로는 metalloproteinases, aspartic proteinases, aminopeptidases, acid carboxypeptidases 등(2, 5)이 알려져 있으며 autolysis를 일으키는 galactanase(17), beta-glucanase(4), chitinase (18) 등을 분비하는 것으로 밝혀져 있다. 따라서 본 연구자들은 농작물에 병해를 일으키는 *P. oxalicum* HCLF-34로부터 분비되는 물질 중 남

조류의 생장을 억제 및 분해하는 새로운 acid proteinase를 분리(10)한 바 있으며, 이 효소의 특성을 규명하기 위하여 본 연구에서 부분 유전자의 cloning 및 sequencing을 시도하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 plasmid

실험에 사용한 acid proteinase 공여 균주는 본 연구자들에 의해 분리 및 동정된 *P. oxalicum* (HCLF-34)과 형질전환을 위한 숙주로는 *E. coli* DH5 α [*supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *rhi-1* *relA1*]를 사용하였으며 cloning을 위한 plasmid는 pET22b(+) (Novagene)를 사용하였다.

배지 및 생장조건

P. oxalicum HCLF-34은 potato dextrose broth (PDB)에 접종하여 25°C에서 진탕배양하였다. *E. coli* 는 LB (0.5% yeast extract, 1% tryptone, 1% NaCl)에 접종하여 37°C에서 진탕배양하였으며, 한천 평판배지는 PDB나 LB 배지에 한천을 1.5% (w/v)되게 첨가하여 사용하였다. 형질전환체의 선별을 위해서는 완전배지에 ampicillin (100 μ g/ml)를 첨가하여 사용하였다.

Degenerate primer의 합성

본 연구에 사용된 primer는 Table 1에서와 같이 forward primer는 *P. oxalicum* HCLF-34이 분비하는 acid proteinase의 아미노말단 염기서열(11)로부터 27mer를 제작하였고, reverse primer는 약 500 bp downstream에서 acid proteinase family로부터 동일한 아미노산 서열을 갖는 29mer의 degenerate primer (Bioneer Co., Taejon, Korea)를 제작하여 사용하였다. Cloning을

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-259-1074, Fax: 042-259-1047
E-mail: hyunsh@eulji.ac.kr

Table 1. Derived degenerate oligonucleotides from amino acid sequences of tryptic peptides from aspergillopepsin and EapC

Peptide	Amino acid sequence	Oligonucleotide
Aspergillopepsin	EEYSSNWAGAVLI	5'-GGAATTCCATATGGG[ACTG]GC[ACTG] GT[ACTG]CT[ACTG]AT-3'
EapC	VEYSSNWAGAVLI	
Pen	ESYSSNAAGAVLI	
Aspergillopepsin	SEFDEVIWEANTE	5'-CCCAAGCTTGGATCC[CT]TC[ACTG]AC [ATG]ATCCA[CT]T-3'
EapC	EEFDEVIWEANLE	

Underlined amino acids indicate the sequences used for the construction of degenerate oligonucleotides. *Underlined* nucleotides indicate the restriction sites used for cloning of the PCR products, coding nucleotides are indicated in *large capitals*.

위하여 upper primer의 5'말단에는 *EcoRI*과 *NdeI* 제한효소의 절단부위를 down primer의 5'말단에는 *HindIII*와 *BamHI* 제한효소 자리를 각각 2개씩 첨가하였다.

DNA의 분리과 PCR

염색체 DNA의 분리는 *P. oxalicum* HCLF-34를 PDB에 접종하여 25°C 진탕배양기에서 4일간 배양한 후 거름종이에 여과하여 얻은 균체에 액체질소를 첨가하면서 분쇄하여 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)을 이용한 Murray와 Thompson(14)의 방법을 변형하여 추출하였다. PCR 조건은 Pfu Tag polymerase 0.5 µl, PCR buffer 2 µl, dNTP mix 8 µl, template 2 µl (150ng), primer는 각각 2 µl (10 pmol)씩 첨가하여 94°C 3분 cycle을 1회 수행하고, 94°C 1분, 52°C 1분, 72°C 1분 30초 cycle을 30회 수행한 후 72°C에서 5분간 최종반응을 수행하였다. PCR 증폭에서 얻은 조각 DNA는 1% agarose gel에서 100 V로 28분간 전개시켜 예상되는 500 bp 크기의 band를 회수하였다.

재조합 plasmid 제작 및 형질전환

PCR 산물 중 약 500 bp 조각 DNA와 plasmid를 *NdeI*과 *BamHI* 제한효소로 처리하고, plasmid는 alkaline phosphatase (AP)를 처리하여 plasmid와 500 bp의 조각 DNA를 1:6으로 혼합하고 16°C에서 18시간동안 ligation하였다. 형질전환은 Sambrook 등(22)의 방법에 의한 전기 충격 방법을 이용하여 1.8 KV로 숙주세포인 *E. coli* DH5α에 형질전환시켜, ampicillin이 포함된 선택배지에 도말하였다.

조각 DNA의 염기서열 결정

성공적으로 형질전환된 세포로부터 Bioneer사(Taejon, Korea)의 PrepMate를 이용하여 plasmid를 분리하고, 분리된 plasmid DNA는 T7 forward primer와 T3 reverse primer를 이용하여 DNASIS/PROSIS (Hitachi V7.06)로 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 NIH GeneBank에서 homology search와 CLUSTAL X algorithm을 이용하여 분석하였다.

결 과

Degenerate primer의 합성

본 연구자에 의해 *P. oxalicum* HCLF-34로부터 분리된 단백질

의 아미노산 서열을 NIH의 blastp로 homology를 조사한 결과 *Aspergillus niger*의 aspergillopepsin II precursor (acid protease A)와 13개의 아미노산 중 11개(84 %)의 유사도를 나타내었고, *Cryphonectria parasitica*의 acid proteinase EapC precursor과 13개 중 10개(81%)의 유사도를 나타내었다(Fig. 1). 분석된 아미노 말단 13 개의 서열과 *A. niger* 및 *C. parasitica*의 공통부분인 yssn 4개의 아미노산 서열을 upper primer (Pen 1)로 제작하고, down primer (Pen 2)는 약 500 bp 아래쪽에 *A. niger*과 *C. parasitica*의 공통부분인 wive 4개의 아미노산 서열로부터 Table 1과 같이 degenerate primer를 제작하여 사용하였다.

Acidic proteinase 유전자의 cloning

P. oxalicum HCLF-34로부터 추출한 genomic DNA를 template로 하여 제작된 degenerate primer로 PCR을 수행한 결과 여러 개의 부분유전자가 증폭되었다. 특히 500 bp, 1.2 kb 및 4 kb의 band가 뚜렷하게 증폭되었으나 예상되는 약 500 bp의 band를 acid proteinase의 부분유전자로 판단하여 형질전환에 사용하였다(Fig. 2A). PCR 결과 500 bp의 band를 회수하여 *NdeI*과 *BamHI* 제한효소로 절단하고 동일한 제한효소로 절단한 pET22b(+) plasmid의 *NdeI/BamHI* 자리에 삽입하였다. 형질전환된 clone은



Fig. 1. Blastp search results of acid proteinase from *P. oxalicum* HCLF-34. ASP, aspergillopepsin II precursor from *A. niger*. CRY, acid proteinase EapC precursor from *C. parasitica*. PEN, alginate lytic enzyme from *P. oxalicum* HCLF-34. Asterisks and dots indicate identical and similar matches, respectively.

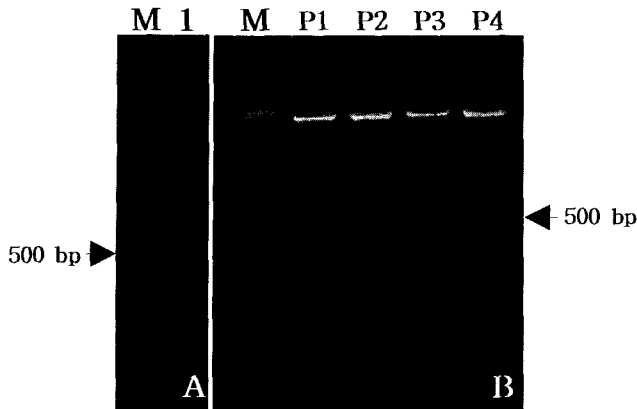


Fig. 2. A. Agarose gel (1%) electrophoresis of the amplified DNA after PCR. M, 1 kb DNA molecular weight ladder. 1, PCR amplified DNA from *P. oxalicum* HCLF-34. B, Vector and insert of clones. M, 1 kb DNA molecular weight ladder. P1~P4, clones.

83개였으며, 이 중 4개의 clone으로부터 plasmid를 회수하여 *Nde*I과 *Bam*HI 제한효소로 절단 및 동일 primer로 PCR로 확인한 결과 삽입된 부분유전자의 크기가 서로 상이함이 확인되었다 (Fig. 2B).

Acid proteinase 유전자의 염기 배열 결정

형질전환 clone의 염기서열을 확인하고 NIH GeneBank에서 유사도를 분석한 결과 P1 clone은 예상한 *P. oxalicum* HCLF-34의 acid proteinase의 부분 유전자임이 확인되었고, P2, P3 및 P4는 *P. oxalicum* HCLF-34의 다른 유전자의 조각임이 판명되었다. P1 clone에는 *P. oxalicum* HCLF-34의 acid proteinase 부분유전자가 438 bp가 삽입된 것을 염기서열 판독으로 확인하였다.

Acid proteinase 유전자들과 비교분석

분석된 438 bp의 염기서열을 아미노산 서열로 전환하여 146개의 아미노산 서열로 번역하였고, GeneBank을 이용하여 *A. niger*의 aspergillopepsin II precursor (acid protease A) 282개의 아미노산 서열과 *C. parasitica*의 acid proteinase EapC precursor 269개의 아미노산 서열과 본 연구에서 clone된 아미노산 서열의 유사도를 분석하였다(Fig. 3). *P. oxalicum* HCLF-34 acid proteinase의 부분 유전자는 aspergillopepsin II precursor (acid protease A)와 71%의 유사도를 나타내었고, acid proteinase EapC precursor와 67%의 아미노산 서열의 유사도를 나타내었다(Fig. 3).

고 찰

일반적으로 세균은 생장을 위하여 1가지 이상의 세포벽 분해 효소를 합성하는 것으로 알려져 있으며(19), 대개의 경우 세포벽 분해효소는 염기성 단백질(basic protein)이기 때문에 SDS 처리를 하지 않으면 전기영동이 잘 안되는 것으로 알려져 있다. 따라서 이들 효소의 특성을 규명하는데 있어서 renaturing SDS-

Pencillium	-----	-----
ASPERGILLOPEPSIN	MKFSTILTGSLFATAALAPLTKRKRARKEARAAGKRHSNPPYIPGSDKEILKLNQ---	56
EapC	MKYATVVAALLGANAALGARFTEKRRERNEARLA---RRSGSVRLPATNSEGVAIDAAESR	58
Pencillium	---ESYSSNAAGAVLIGSGVTSVTAEFVTPKAPSKASS-----	NTQY 41
ASPERGILLOPEPSIN	--TTNEEYSSNWAGAVLIGDGYTKVTOEFTVPSVSAGSSGSGYGGYGVWKNRQSEY	114
EapC	NDTTNVEYSSNWAGAVLIGSGYKVTGIFVVPVTPKSPGSGNT-----	EY 102
*	..*
Pencillium	CASAWVIGDGTGCGSAIILQTVDFCVGGGSVSYDAWYWPDYAVNFNSISISAGDVIK	101
ASPERGILLOPEPSIN	CASAWVIGDGTGCGSAIILQTVDFCVGGGSVSYDAWYWPDYAVNFNSISISAGDVIK	174
EapC	AASAWVIGDGTGCGSAIILQTVDFCVGGGSVSYDAWYWPDYAVNFNSISISAGDVIK	162
	*****	*****
Pencillium	TVDASSTTGTATIQNLNNGQSVTHFNQGVGDGLCEYNAEWI-----	146
ASPERGILLOPEPSIN	TVEATSKSSGSATVENLITGQSVTHFSSNVEGDLCEYNAEWI-----	234
EapC	TVTATTTTSQAVVENVTGTTTITFTG-QSAALQELNAEWI-----	221
	**	*****
Pencillium	-----	-----
ASPERGILLOPEPSIN	SVTFPTNAEATSGGTVGPSDATVMDIEQDGSVLTETSVDGSDVTVTV	282
EapC	TVTFPTGAEATTSSGTVTAAADAILDIEQGEVLTSTVSGSTVTVKVV	269

Fig. 3. Alignment of amino acids sequence. Pencillium, acid proteinase of *P. oxalicum* HCLF-34. Aspergillopepsin, acid protease A of *A. niger*. EapC, acid proteinase EapC of *C. parasitica*. Asterisks and dots indicate identical and similar matches, respectively.

PAGE는 매우 유용한 방법으로 알려져 있고(7), 실제로 많은 연구자들이 이 방법을 이용하여 세균 분해효소의 특성을 연구한 바 있다(3). 본 연구자들은 이전의 연구로부터 *P. oxalicum* HCLF-34의 약 22 kDa의 acid proteinase를 분리 및 동정하고 남조류의 세포벽 분해효과를 보고하였다(9).

*P. oxalicum*은 주로 β -glucanase(4, 17), chitinase(18), polygalacturonase등을 분비하며, 본 연구에서 분리한 acid proteinase의 N-말단으로부터 Glu-Ser-Tyr-Ser-Ser-Asn-?-Ala-Gly-Ala-Val-Leu-Ile-13개의 아미노산 서열을 분석하여 degenerated primer를 제작하고 PCR방법을 이용하여 438개의 염기서열을 확인하였다. 번역된 146개의 acid proteinase 부분 아미노산 서열을 이용하여, BLAST program에서 아미노산 서열의 유사도를 검증한 결과 aspergillopepsin II precursor(12)의 282개의 아미노산과 71%의 유사도를 나타내었으며, acid proteinase EapC precursor(13)의 269개의 아미노산과 67%의 유사도를 나타내었다.

Aspergillopepsin II precursor와 acid proteinase EapC는 acid proteinase계통의 물질로서 치즈제조과정에서 우유를 응결시키는 aspartic proteinase의 일종이며, 상품명은 proctase로 불리운다(13). Aspergillopepsin II precursor은 *A. niger*에서 분리되며, aspartic acid proteinase family에 속하면서 여러 가지 다른 특징을 갖는다. 전통적인 pepsin type acid 혹은 aspartic proteinase와 달리 분자량은 약 20 kDa 이고, pepstatin과 PENP에 의해 활성도가 감소되지 않으며, diazoacetyl-DL-norleucine methyl ester에도 덜 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있다(24). 또한 aspergillopepsin II precursor는 282개의 아미노산으로 구성된 전효소이고, N-말단에 59개의 preprosequence를 갖으며, 39개의 아미노산으로 구성된 light chain과 173개의 아미노산으로 구성된 heavy chain의 두 가지 mature form을 형성하고, light chain과 heavy chain사이에 11개의 intervening sequence를 갖는다(Inoue 등, 1991). 본 연구에서 밝혀진 acid proteinase의 아미노산 서열은 mature form인

light chain 및 heavy chain과 71%의 유사도를 나타내었고, 11개의 intervening sequence는 생략되어 있었다.

밤나무 부패 곰팡이인 *C. parasitica*가 분비하는 acid proteinase EapC precursor는 269개의 아미노산으로 구성된 전효소이고, N-말단에 63개의 preprosequence를 갖으며, 206개의 아미노산으로 구성된 mature form을 형성한다(13). 본 연구에서 밝힌 acid proteinase의 아미노산 서열은 mature form의 N-말단부터 67%의 아미노산 homology를 나타내었다.

이상과 같은 결과로 본 연구에서 *P. oxalicum* HCLF-34로부터 분리한 남조류 분해 효소는 acid proteinase계통의 단백질로서 확인되었으며, 앞으로 cDNA library를 제작하여 전체 유전자의 염기서열을 밝히고 유전자의 부분결실 또는 특정부분의 돌연변이 방법을 이용하여 효소활성을 나타내는 활성부위를 얻게 되면 단순한 단백질 분자로서 남조류의 대발생을 제어하는데 중요한 역할을 하게 될 것으로 사료된다.

감사의 말

이 논문은 을지의과대학교 교내 학술연구비(EJRG-02-001-11C07)의 지원에 의하여 연구 되었습니다.

참고문헌

1. Abbas, C. A., S. Groves, and J.E. Gander. 1989. Isolation, purification, and properties of *Penicillium charlesii* alkaline protease. *J. Bacteriol.* 171, 5630-5637.
2. Belancic, A., J. Scarpa, A. Peirano, R. Diaz, J. Steiner, and J. Eyzaguirre. 1995. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes. *J. Biotechnol.* 15, 71-79.
3. Buist, G., J. Kok, K.J. Leenhouts, M. Dabrowska, G. Venema, and A.J. Haandrikman. 1995. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation. *J. Bacteriol.* 177, 1554-1563.
4. Copa-Patino, J.L., F. Reyes, and M.I. Perez-Leblic. 1989. Purification and properties of a 1,3-beta-glucanase from *Penicillium oxalicum* autolysates. *FEMS Microbiol. Lett.* 53, 285-291.
5. Dey, P.M., S. Patel, and M.D. Brownleader. 1993. Induction of alpha-galactosidase in *Penicillium ochrochloron* by guar gum. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17, 361-371.
6. Emi, S., D.V. Myers, and G.A. Iacobucci. 1976. Purification and properties of the thermostable acid protease of *Penicillium duponti*. *Biochemistry* 24, 842-848.
7. Foster, S.J. 1992. Analysis of the autolysins of *Bacillus subtilis* 168 during vegetative growth and differentiation by using renaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 174, 464-470.
8. Gelderblom, W.C.A., K. Jaskiewicz, W.F.O. Marasas, P.G. Thiel, and R.M. Horak. 1988. Fumonisin-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl.*

- Environ. Microbiol.* 54, 1806-1811.
9. Hyun, S.H., J.Y. Soung, and Y.K. Choi. 1997. Isolation and identification of fungi that inhibiting the growth of cyanobacteria *Kor. J. Environ. Biol.* 15, 185-193.
10. Hyun, S.H. and Y.K. Choi. 1998. Lysis of *Anabaena cylindrica* by extracellular enzymes of *Penicillium oxalicum* (HCLF-34) *Kor. J. Environ. Biol.* 16, 157-167.
11. Hyun, S.H. and Y.K. Choi. 1999. Characteristics of the cell wall lytic enzyme of *Anabaena cylindrica* from *Penicillium oxalicum*(HCLF-34) *Kor. J. Microbiol.* 35, 231-236.
12. Inoue, H., T. Kimura, O. Makabe, and K. Takahashi. 1991. The gene and deduced protein sequences of the zymogen of *Aspergillus niger* acid proteinase A. *J. Biol. Chem.* 266, 19484-91489.
13. Jara, P., S. Gilbert, P. Delmas, J.C. Guillemot, M. Kaghad, P. Ferrara, and G. Loison. 1996. Cloning and characterization of the eapB and eapC genes of *Cryphonectria parasitica* encoding two new acid proteinases, and disruption of eapC. *Mol. Gen. Genet.* 250, 97-105.
14. Murray M.G. and Thompson W.E. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8, 4321-4325.
15. Okumura, T., S. Kimura, and K. Saito. 1980. A novel purification procedure for *Penicillium notatum* phospholipase B and evidence for a modification of phospholipase B activity by the action of an endogenous protease. *Biochim. Biophys. Acta.* 22, 264-273.
16. Redhead, K. and S.J.L. Wright. 1978. Isolation and properties of fungi that lyse blue-green algae. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 962-969.
17. Reyes, F., C. Alfonso, M.J. Martinez, A. Prieto, F. Santamar, and J. A. Leal. 1992. Purification of a new galactanase from *Penicillium oxalicum* catalysing the hydrolysis of beta-(1-5)-galactofuran linkages. *Biochem. J.* 281, 657-660.
18. Rodriguez, J., J.L. Copa-Patino, and M.I. Perez-Leblic. 1995. Purification and properties of a chitinase from *Penicillium oxalicum* autolysates. *Let. Appl. Microbiol.* 20, 46-49.
19. Rogers, H.J., H.R. Perkins, and J.B. Ward. 1980. Microbial cell walls and membranes, p. 437-456. Chapman & Hall, London.
20. Sallal, A.K.J. 1994. Lysis of cyanobacteria with *Flexibacter* spp. isolated from domestic sewage. *Microbios* 77, 57-67.
21. Shah, D.M., C.M.T. Rommens, and R.N. Beachy. 1995. Resistance to diseases and in transgenic plants: progress and applications to agriculture. *Trends Biotech.* 13, 362-368.
22. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
23. Taft, C.S., C.S. Enderlin, and C.P. Selitrennikoff. 1994. A high throughput *in vitro* assay for fungal (1,3)beta-glucan synthase inhibitors. *J. Antibiot.* 47, 1001-1009.
24. Takahashi, K., J. Inoue, K. Sakai, T. Kohama, S. Kitahara, K. Takishima, M. Tanji, S.B.P. Athauda, T. Takahashi, H. Akanuma, G. Mamiya, and M. Yamasaki. 1991. The primary structure of *Aspergillus niger* acid proteinase A. *J. Biol. Chem.* 266, 19489-19483.
25. Yamamoto, N., K. Matsumoto, Y. Yamagata, K. Hirano, and E. Ichishima. 1993. A heat-labile serine proteinase from *Penicillium citrinum*. *Phytochemistry* 32, 1393-1397.

(Received January 26, 2004/Accepted February 26, 2004)

ABSTRACT : Cloning and Sequencing of Gene Fragment of Acid Proteinase from *Penicillium oxalicum* HCLF-34

Sounghee Hyun*, Jaesun Chun¹, Sang Sun Kang², and Jin Kyu Kim³ (*Department of Natural Science, Eulji University School of Medicine, Taejon 301-112, ¹Biotechnology Research Institute, ²School of Science Education, Chungbuk National University, Chongju 361-763, ³Atomic Energy Research Institute, Daejeon 305-353, Korea)

Acid proteinase has been discovered in *Aspergillus niger* (acid protease A) and *Cryphonectria parasitica* (acid proteinase EapC) and it plays major roles in cheese formation from milk. In this study, a partial gene encoding acid proteinase in *Penicillium oxalicum* HCLF-34 was cloned by using PCR with degenerate primers corresponding to highly conserved regions of the acid proteinase. The partial acid proteinase gene in *P. oxalicum* HCLF-34 contains an open reading frame of 438 base pairs and encodes an acid proteinase protein of 146 amino acids. The predicted amino acid sequences showed 71% homology with acid protease A and 67% homology with EapC.