

*Aspergillus tubingensis*의 acid protease에 관한 研究

— I. Crude Acid Protease의 精製와 kinetic properties 및 觸媒 Mechanism—

鄭允秀\* · 高東成 · 趙 暎 · 李錦洙\*\*

(建國大學校 畜産加工學科\* ·  
忠南大學校 化學科, 生物學科\*\*)

Studies on acid protease produced from *Aspergillus tubingensis*

— I. Enzyme purification, kinetic study and reaction mechanism.—

CHUNG, Yun-Su,\* Dong-Sung KO, Young CHO, and Keum-Soo LEE\*\*

(Dept. of Animal science, Kon Kuk University\* and  
Dept. of Chemistry, Biology\*\*, Chung Nam National University)

ABSTRACT

Acid protease produced from *Aspergillus tubingensis* was purified by ethanol fractionation, dialysis, and DEAE cellulose column chromatography. As a result of purification its specific activity increased to 5.4 times, and percent recovery was 39.

The kinetic constants of the enzyme were studied. Km and Vmax was  $1.5 \times 10^{-7}M$  and 0.1140.D/min, respectively, when casein was used as substrate. The order of Km value of several proteins is: casein < hemoglobin < myoglobin < BSA < cytochrome C, and that of Vmax is: myoglobin < casein < hemoglobin < BSA < cytochrome C. In case of BSA, substrate inhibition pattern was found.

The enzyme was remarkably inhibited by EPNP, TPCK and NBS which inhibit carboxyl and tryptophan groups in the active site, and this property is similar with that of pepsin.

The results of inhibition study show that carboxyl group of aspartic acid or glutamic acid takes roll in nucleophilic attack to peptide bond, and tryptophan group is involved in the binding site.

緒 論

Protease는 蛋白質 結合인 peptide bond를 加水分解하는 酵素로서, 그 抽出根源에 따라 動物性, 植物性 및 微生物性 protease(Hata, 1967)로 나뉘어지며, 加水分解하는 위치에 따라 endopeptidase(Remold, 1968), exopeptidase(Campbell, 1966), 作用最適 pH에 따라 acid prote-

ase(Yoshida, 1956), neutral protease(Hukumoto, 1958), alkaline protease(Gruther, 1953)로 나뉘어진다.

이들 각종 protease의 應用性 및 抽出源은 前報(I)에서 상세히 敘述한 바 있으며, 이들 菌株로부터 ion exchange chromatography, gel filtration, electrophoresis 및 isoelectric focusing (Yoshio, 1976; Kohei, 1976), 그리고 ultracentrifugation 등에 의한 酵素精製는 상당수 보고

되었으며, 또한 substrate analogue(Shuzo, 1975; Wen-Jong Chang, 1976) 등을 이용한 inhibition study(Kenji, 1976)에 의해 protease의 active site를 淸明하려는 研究 또한 활발하다. neutral protease나 alkaline protease의 critical catalytic residue는 보통 histidine, cysteine, serine 등으로 알려졌으며, acid protease는 aspartic acid가 주로 관여된다고 報告되어 있다.

본 實驗에 使用된 菌株은 *Aspergillus tubingensis*로서 acid protease의 生成이 비교적 強한 편이다. 여기서 生成되는 extracellular protease는 ethanol fractionation 및 DEAE cellulose chromatography에 의해 비교적 純粹한 형태로 얻어졌으며, 이 酵素에 대한 kinetic parameter의 측정 및 기질 특이성에 대한 實驗을 행하였다. 특히 각종 inhibition test 및 기질 특이성 시험에 의해 이 酵素의 catalytic site 및 binding site를 밝히고자 하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 實驗材料

酵素生産을 위한 天然培地인 wheat bran은 變敗가 없는 것으로서 農協에서 購入하였고, inhibitor 중의 하나인 physostigmine salicylate는 직접 合成하여 使用하였다.

### 2. 酵素의 分離

Malt agar slant(pH4.0)에서 두차례 移植培養하여 活性化된 菌株은 wheat bran(0.2% yeast extract 첨가)培地に 접종하여 30°C에서 72시간 培養하였다. 培養후 0.1M acetate buffer(pH 3.0)을 培地무게의 약 5배 가량 붓고 고르게 섞

은 후, 상온에서 6시간 放置하였다. 그 후 탈지면 및 꺼즈를 使用하여 1차 濾過한 후, 이 濾液를 遠心分離(7,000rpm, 30分)하여 不溶性 物質을 완전히 除去하였다(enzyme solution I)

### 3. 酵素의 精製

Enzyme solution I에 ethanol을 천천히 加하여 40%가 되도록 하여 1시간 放置 후 遠心分離(5,000rpm, 20分)하여 上等液을 取한 후, 다시 ethanol을 加하여 75%가 되도록 한다. 1시간 放置후 재차 遠心分離하여(5,000rpm, 20分) 沈澱物을 取하고 최소량의 0.1M acetate buffer(pH 3.0)에 녹여(enzyme solution II) 24시간 dialysis시킨다(enzyme solution III). enzyme solution III을 DEAE cellulose column(25×60mm, LKB)에 가하고 먼저 0.01M acetate buffer(pH6.0)로 流出시켜 酵素活性도가 거의 없는 分획들을 除去시켰으며 다시 0.1M acetate buffer(pH3.0)로 流出시켜 活性이 높은 分획들을 모았다. 이 fraction은 24시간 dialysis시켜 본 實驗이 使用하였다.(모든 實驗은 4°C에서 행하였으며 酵素活性도 및 蛋白質定量은 前報(I)의 方法과 같다)

## 結果 및 考察

### 1. 酵素의 精製

酵素精製 결과, percent recovery는 39%였으며 specific activity는 5.4배 증가되었고, 반면 total protein은 14배 가량 減少되었다(Table 1) 蛋白質의 fractionation에 ethanol이 使用된 이유는 ammonium sulfate나 acetone보다 酵素가 denaturation되는 現狀이 덜했기 때문이다.

Table 1. Summary of the purification process of acid protease.

Section Purification	Total volume (ml)	Total protein* (mg)	Total @ activity	Specific ϕ activity	Percent recovery	Purification fold
Enzyme solution I	950	226	570	2.5	100	1
Enzyme solution II	210	43.2	252	5.8	44	2.3
Enzyme solution III	230	40	250	6.3	44	2.5
Enzyme solution IV	75	16.4	222	13.5	39	5.4

\*; mg of protein/ml×total volume(ml)

@; O.D. at 660nm×total volume (ml)

ϕ; @/\*

한편 DEAE cellulose chromatography에서, 0.01M acetate buffer(pH6.0)로 流出된 첫번째 peak는 酵素 活性도가 거의 없었으며, 0.1M acetate buffer(pH3.0)로 流出된 두번째 peak에서는 酵素 活性도와 蛋白質 濃도가 一致하였다 (Fig. 1). pH gradient를 걸어 주었을 때는 본 결과보다 分離가 좋지 않았고, buffer의 濃도를 증가시켜 주었기 때문에(0.01M에서 0.1M로) salt gradient 효과도 있었다.

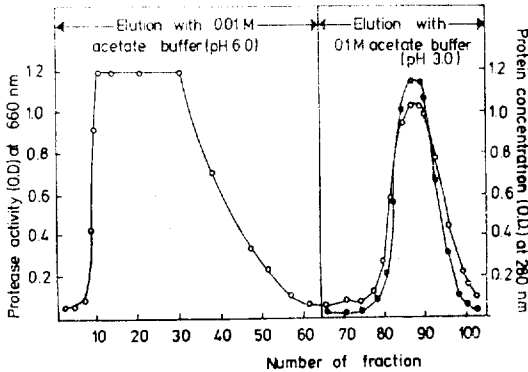


Fig. 1. Chromatogram of acid protease on DEAE-cellulose column chromatography  
●—●; acid protease activity  
○—○; protein concentration

많이 사용되는 sodium chloride gradient는 이 酵素를 거의 失活시켰는데, 이는 chlorine ion의 영향인 것으로 考慮된다.

2. Kinetic parameter의 測定

이같이 精製된 酵素는 水溶液 상태로 4°C에서

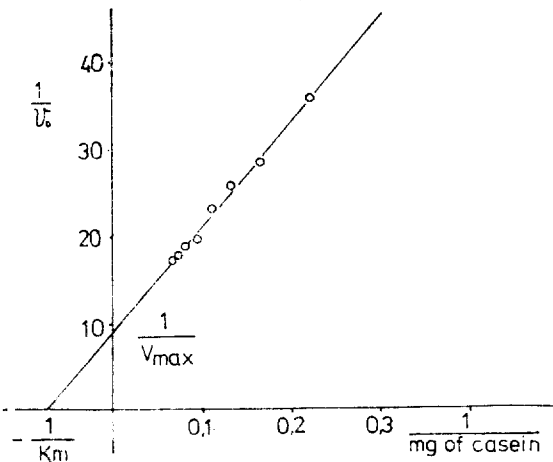


Fig. 2. Lineweaver-Burk plot for hydrolysis of casein by acid protease.

저장할 경우 약 6개월은 安定하였다. 1 unit는 1分間에 O.D.값 0.01만큼을 增加시키는 酵素量으로 하였으며, 初期 反應速度는 약 10分까지가 反應速度의 一定한 增加를 보였고, 酵素濃度에 따른 反應速度의 增加는 酵素量 11 unit까지 直線이 연결되었다. 따라서 본 實驗에서 行한 모든 酵素 活性도의 測定은 反應時間 10分, 酵素量 11 unit로 하였다.

Casein을 기질로 하여 測定한 Km 및 Vmax값은 각각  $1.5 \times 10^{-7}M$ , 0.11 ΔO.D./min로 나타났다. (casein의 分子量은 87,000으로 計算) (Fig. 2)

3. 기질 特異性

기질로서 casein과 함께 hemoglobin, myoglobin, cytochrome C, bovine serum albumin (BSA) 등을 使用하여 Km 및 Vmax 값을 비교하였다 (Table 2, Fig. 3). Km값은 casein < hemoglobin < myoglobin < BSA < cytochrome C 順이었으며, Vmax값은 myoglobin < casein < hemoglobin < BSA < cytochrome C 順이었다. 따라서 cytochrome C는 이 酵素와 結合되는 率은 상당히 낮

Table 2. Substrate specificity of acid protease

Substrate	km(M)	V <sub>max</sub> (ΔO.D./min)
Casein	$1.5 \times 10^{-7}$	0.11
Hemoglobin	$3.1 \times 10^{-7}$	0.16
Myoglobin	$5.06 \times 10^{-7}$	0.09
Cytochrome C	$4.04 \times 10^{-6}$	1.0
BSA	$6.36 \times 10^{-7}$	0.22

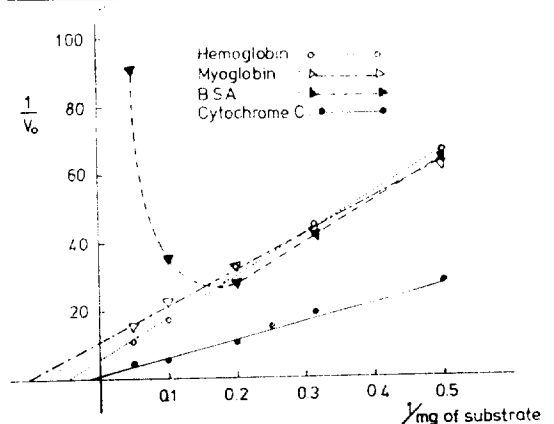


Fig. 3. Lineweaver-Burk plot for hydrolysis of hemoglobin, myoglobin, cytochrome C, and BSA by acid protease.

으나, 일단 結合되면, 쉽게 觸媒가 일어날 수 있으며, casein은 結合은 잘 되나, 觸媒가 cytochrome C보다 느리게 進行된다.

이러한 現狀은 이 酵素의 catalytic site 및 binding site의 conformational structure와 관계되는 것으로 생각된다.

한편 BSA의 경우는 濃도가 增加함에 따라 反應速度가 減少하는 substrate inhibition 現狀을 보였다.

4. Inhibition study

酵素의 catalytic site의 特定한 residue만 modification시키는 각종 inhibitor를 사용하여 實驗한 結果, histydl group, sulfhydryl group, hydroxyl group을 blocking하는 inhibitor에는 阻害現狀이 거의 일어나지 않았으며, carboxyl group 및 tryptophan group을 blocking시키는 1,2-Epoxy-3-(p-nitrophenoxy)-propane(EPNP).

L-1-Tosylamide-2-phenylethylchloromethylketone(TPCK) 및 N-Brcmosuccinimide(NBS)에 의해 阻害되었다(Table 3, Fig. 4).

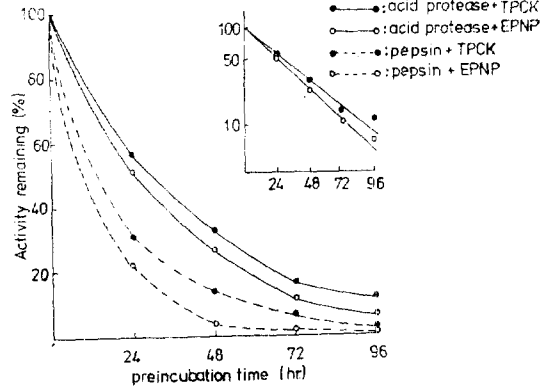


Fig. 4. Inactivation of acid protease and pepsin by EPNP, TPCK.

Table 3. Inhibition of acid protease and pepsin on casein hydrolysis

Inhibitor	Concentration (mM)	Amino acid(s) modified	Activity remaining(%)	
			Acid protease	Pepsin
EPNP	---	Asp.	6.5	1.0
TPCK	---	Asp. His. Ser.	11.8	2.0
TLCK	10	Asp. His. Ser.	97.1	100
Diethylpyrocarbonate	10	His.	83.2	90.9
NBS	10	Trp.	26.8	0
Iodoacetic acid	10	Cys.	78.8	97.2
PHMB	10	Cys.	76.5	71.3
Physostigmine salicylate	10	Ser.	87.5	100
1,10-Phenanthroline	10	Cys.	86.3	99.0
Dithiothreitol	10	Disulfide bond	94.2	91.3

같은 carboxyl group inhibitor이더라도 N- $\alpha$ -p-Tosyl-L-lysinechloromethylketone (TLCK)의 경우는 전혀 阻害現狀이 없었으며, 이것은 phenylethyl group과 lysine과의 stereospecific한 차이에 기인된다고 볼 수 있다. carboxyl group 및 tryptophan group을 blocking시키는 EPNP, TPCK 및 NBS는 pepsin과의 比較試驗에서도 같은 結果를 나타내었기 때문에 이 acid protease의 反應 mechanism은 pepsin과 거의 類似하다고 생각된다.

즉 carboxyl group이 peptide bond에 nucleop-

hilic attack를 하여 peptide bond의 amino group과 새로운 peptide bond를 形成하면서 첫 단계로 carboxyl group이 떨어져 나오고 둘째로 aminogroup이 떨어져 나오는 mechanism이다.

Tryptophan은 hydrophobic한 amino acid로서 이 酵素의 binding site에서 存在하여 기질의 binding에 關與된다고 생각된다.

EPNP 및 TPCK는 水溶液에서 불용성 이기 때문에 JORDAN(1971) 등이 實驗한 方法에 依據하여 實施하였다.

EPNP 및 TPCK에 의한 阻害효과는 pseudofi-

rst order kinetics 現狀을 보였으며 樣相은 pepsin과 비슷하였다. EPNP에 의한 阻害度의 half life는 24시간으로서 K. TAKAHASHI(1976) 등이 實驗한 *Mucor pusillus*의 acid protease의 half life와 비슷하였으며, 반면 *Aspergillus nigar*(Kenji, 1976)의 acid protease의 half life는 30시간 가까이 된다는 報告가 있다.

이같은 實驗結果들로 미루어 볼 때, 이 acid protease는 觸媒 mechanism이 pepsin과 비슷하며, catalytic site에는 aspartic acid의 carboxyl

group이 主役割을 하고 있음이 분명하다.

또한 tryptohan residue는 binding site에서 주로 作用하여 기질을 active site에 結合시키는 役割을 하는 것으로 추측된다. 酵素의 기질 特異性 實驗에서 使用된 기질 중에서 가장 hydrophobic한 蛋白質인 casein의 Km값이 가장 낮았던 사실은 다소 hydrophobic한 tryptophan residue가 binding site에서 作用할 것이라는 사실을 뒷받침하여 준다.

### 摘 要

*Aspergillus tubingensis*가 生産하는 acid protease는 ethanol fractionation, dialysis, DEAE cellulose chromatography를 거쳐 specific activity는 약 5.4배 增加되었으며 percent recovery는 39%였다.

Casein을 기질로 使用하여 測定한 Km 및 Vmax값은 각각  $1.5 \times 10^{-7}M$ , 0.11 $\Delta$ O.D./min로 나타났으며, hemoglobin, myoglobin, cytochrome C, BSA 등을 기질로 하여 기질 特異性を 觀察한 結果, Km값은 casein<hemoglobin<myoglobin<BSA<cytochrome C, Vmax값은 myoglobin<casein<hemoglobin<BSA<cytochrome C 順이었다. 또한 BSA의 경우는 substrate inhibition의 樣相을 보였다.

한편 각종 inhibitor를 使用하여 이 酵素의 inhibition test를 한 結果, carboxyl group 및 tryptophan group을 blocking하는 inhibitor(EPNP, TPCK, NBS)에 의해 顯著하게 阻害되었는데 이 現狀은 pepsin과 類似하였다. 따라서 catalytic site의 critical residue는 pK값이 酸性인 glutamic acid나 aspartic acid임이 확실하며, binding site에는 tryptophan residue가 관여되는 것으로 推測된다.

### 引用文獻

- Hata, T., et al. 1972. *Agri. Biol. Chem.* **31**, 357.
- Remold, H., et al. 1968. *Biochim. Biophys. Acta.* **167**, 399.
- Campbell, B.J., et al. 1966. *Biochim. Biophys. Acta.* **118**, 371.
- Yoshida, F. 1956. *Bull. Agri. Chem. Soc. Japan.* **20**, 252.
- Hukumoto, J., et al. 1958. Studies on Bacterial proteinase. *J. Agri. Chem. Soc.* **32**, 230.
- Gruther, W.G., et al. 1953. *Australian J. of Biol. Sci.* **6**(410), 428.
- Yoshio, Tsujita. 1976. purification and characterization of the two molecular forms of *Aspergillus oryzae* acid protease. *Biochim. Biophys. Acta.* **445**, 194.
- Kohei Oda, et al. 1976. Some physicochemical properties and substrate specificities of acid proteases A-1 and A-2 of *Scytalidium lignicolumn* ATCC 24568. *Agri. Biol. Chem.* **40**(5), 859.
- Shuzo Sato, et al. 1975. Effect of a microbial acid protease inhibitor (S-PI). *Agri. Biol. Chem.* **39**(4), 773.
- Wen-Jong Chang. 1976. The structure and function of acid proteases. *J. Biochem.* **80**, 975.
- Kenji Takahashi. 1976. *J. Biochem.* **80**, 61.
- Jordan Tang. 1971. *J. Biol. Chem.* **246**(14), 4510.
- Method in enzymology, General analytical method. III. DEAE cellulose chromatography. **47**, 292.
- Lowry, O.H., et al. 1951. protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265.
- M. Yamasaki, et al. 1976. Specificity of acid protease from *Aspergillus nigar var. macrosporus* toward B-chain of performic acid oxidized bovine insulin. *Biochim. Biophys. Acta.* **429**, 912.

16. Tomoda, K., *et al.* 1964. Acid protease produced by *Trametes sanguinea*, a wood destroying fungus. *Agr. Biol. Chem. Soc.* **28**, 770.
17. Emi, S., *et al.* 1976. Coupling of the *Penicillium duponti* acid protease to ethylene-maleic acid (1 : 1) linear copolymer. *Biochim. Biophys. Acta.* **445**, 67.
18. Gripon, J.C. 1976. Inactivation of *Penicillium roqueforti* acid protease. *Biochemie.* **58**, 747.
19. Somkuti, G.A., *et al.* 1968. Purification and properties of *Mucor pusillus* acid protease. *J. Bacteriol.* **95**, 1407.
20. Sardinas, J.L. 1968. Rennin enzyme of *Endothia parasitica*. *Appl. Microbiol.* **16**, 248.
21. Yoshida, F., *et al.* 1956. Studies on the proteolytic enzymes of *Black Aspergillus* (part II). *Bull. Agri. Chem. Soc. Japan.* **20**, 257.
22. Fukumoto, J., *et al.* 1967. Studies on bacterial protease. *Agr. Biol. Chem.* **31**, 710.