

# 미생물이 생산하는 응유효소 (제 11 보) *Mucor pusillus* 가 생산하는 결정응유효소, *Mucor-rennin* 의 합성 Peptide 에 대한 기질 특이성

연세대학교 이공대학 식품공학과

유주현 · 오사와 히사오\*\* · 타무라 카쿠소\*\* · 홍윤명\* · 아리마 케이\*\*

(1970년 9월 5일 受理)

## Milk-clotting Enzyme from Microorganisms (Part XI) Specificity *Mucor-rennin* (Crystalline Milk-clotting Enzyme of *Mucor pusillus*) on Synthetic Peptides

by

Juhyun Yu, Hisao Osawa\*\*, Gakuzo Tamura\*\*, Yun Myung Hong\*, Kei Arima\*\*

Dept. of Food Engineering, Yonsei University, Seoul, Korea

(Received Sept. 5, 1970)

### Abstract

When of the synthetic peptides were subjected hydrolysis with *Mucor-rennin* which crystalline milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus*, the peptides of Z-L-Glu—L-Phe-OH, Z-L-Phe—L-Tyr—OH, Z-L-Phe—L-Leu-OH, Z-L-Tyr—L-Leu and Z-L-Glu—L-Phe-OH, were found to be hydrolysis.

### 서 언

송아지 rennin(이하 AR로 약함)은 송아지의 제 4 위로부터 분리, 정제하여 단리하여 결정화하고 있다<sup>(1,2)</sup>. 이 효소에 대응할 수 있는 효소를 개발하기 위하여 미생물을 가지고 많은 연구들을 하여왔다<sup>(3,18)</sup>. *Mucor pusillus*의 고체배양으로 AR과 흡사한 응유효소<sup>(7)</sup>가 발견되어 실제 치즈를 제조함에 있어서 실용성이 세계적으로 인정을 받게 되었다<sup>(19,20)</sup>. 이 효소를 정제하여 결정효소 *mucor-rennin*(이하 MR로 약함)을 얻어<sup>(30,31)</sup> 그의 물리화학적 성질과 아미노산의 조성 등이 AR과 다르다는 것을 확인하였다<sup>(31,32,33)</sup>.

양 rennin은 응유작용의 성질을 가진 산성 protease로 분류되어 있다. MR은 단백질 분해력에 비하여 응유력이 현재까지 발견된 효소중에서 가장 강력하나 그의 활성은 AR보다 낮다<sup>(31)</sup>. 즉, 같은 응유활성에서는

MR이 AR보다 단백질 분해력이 크다. 따라서 MR과 AR은 peptide 또는 단백질에 대하여 기질 특이성에 다른 점이 있으리라 생각된다. 따라서 이들에 대하여 연구하는 것은 중요하다. 그래서 단백질분해작용의 기질로서 합성 peptide를 사용하여 기질의 특이성과 작용기에 대하여 검토하였다.

### 재료와 실험방법

#### 응유효소

결정송아지 rennin은 Sigma 회사에서 판매하고 있는 것을 투석 동결건조하여 사용하고, MR은 유주현 등에 의한 정제결정화법<sup>(31)</sup>에 의하여 결정화시킨 다음 투석 동결건조한 것을 사용했다.

#### 합성 peptide 용액

합성 peptide는 시판품 또는 나눠받은 것이며, 일본 단백질장려회와 Nutritional Biochemicals Corporation에서 만든 것이 대부분이었다. 각 합성 peptide는 pH 3.9 pyridine-acetic acid의 완충액(pyridine : acetic acid : 물 = 1 : 4 : 195)에 녹여 2ml 용액으로 한다. 이 용매에

\* 연세대학교 이공대학 화공과(Dept. of Chem. Eng., Yonsei Univ., Seoul, Korea)

\*\* 도쿄오 대학교 농학부 농예화학과(Dept. of Agri. Chem., Tokyo Univ., Tokyo, Japan)

녹지 않는 것은 ethanol 30ml 에 위의 완충액을 가하여 100ml 로한 것(30% ethanol 완충액)에 녹인다. 이 방법에 의하여 Z-L-Phe-L-Leu-NH<sub>2</sub> 을 제외하고는 다 녹일 수 있었다.

**Paper chromatography**

Amino acid 의 시료를 도오요 여지 No. 50 혹은 No. 51 에 spot 한다음 전개제(n-butanol : acetic acid : 물 = 4 : 1 : 1)로 전개한 다음 건조시켜 0.4% ninhydrin 용액(ninhydrin 400g, S-코리딘 1.5ml, 95% ethanol 100ml) 을 spray 하여 amino acid 를 발색시켰다.

**Amino acid 의 점제**

시료용액 0.5~1.0ml 에 구연산완충액 0.5ml KCN-ninhydrin 혼합액 1.0~1.2ml 를 가하여 끓는 물통에서 15 분간 끓인 다음 냉각하고, 60% ethanol 로 적당히 희석한 다음 O.D 570 mμ 로 유리 amino acid 양을 정량하였다.

**시 험 결 과**

**합성 peptide 에 대한 MR 및 AR 의 작용**

**Table 1. Hydrolysis of synthetic peptides by mucor-rennin**

| Peptides                      | Mucor-rennin | Calf-rennin | Calf-rennin <sup>(85)</sup> | Pepsin <sup>(85)</sup> | <i>Rizopus chinensis</i> 의 protease |
|-------------------------------|--------------|-------------|-----------------------------|------------------------|-------------------------------------|
| Z-L-Glu↓-L-Tyr OH             | ++           | -           | +                           | +                      | +                                   |
| Z-L-Glu↓-L-Phe OH*            | +            | -           | +                           | ++                     | +                                   |
| Z-L-Val↓-L-Glu OH             | -            | -           | -                           | -                      | -                                   |
| Z-L-Phe↓-L-Tyr OH*            | +            | -           | +                           | +                      | +                                   |
| Z-L-Phe↓-L-Leu OH*            | ++           | -           | -                           | -                      | -                                   |
| Z-L-Tyr↓-L-Leu OH*            | ++           | -           | -                           | -                      | -                                   |
| Z-L-Tyr-L-Leu NH*             | -            | -           | -                           | -                      | -                                   |
| L-Tyr-L-Leu-OH                | -            | -           | -                           | -                      | -                                   |
| Z-Gly-L-Phe-OH                | -            | -           | ±                           | ±                      | ±                                   |
| Z-Gly-L-Phe-NH <sub>2</sub> * | -            | -           | -                           | -                      | -                                   |
| Z-Gly-L-Leu-OH                | -            | -           | -                           | -                      | -                                   |
| Z-Gly-L-Leu-NH <sub>2</sub> * | -            | -           | -                           | -                      | ±                                   |
| L-Leu-L-Phe-OH                | -            | -           | +                           | +                      | -                                   |
| D-Leu-Gly-OH                  | -            | -           | -                           | -                      | -                                   |
| L-Leu↓-Gly-OH                 | ±            | -           | -                           | -                      | -                                   |
| D-Leu-Gly-Gly-OH              | -            | -           | -                           | -                      | -                                   |
| L-Leu↓-Gly-Gly-OH             | ±            | -           | -                           | -                      | -                                   |
| L-Leu-Gly-Phe-OH              | -            | -           | ++                          | -                      | +                                   |
| L-Gly-Pro-L-AlaOH             | -            | -           | +++                         | +                      | -                                   |
| Z-Gly-Pro-L'-Leu-OH*          | -            | -           | -                           | -                      | -                                   |
| Z-Gly-Pro-L-Leu↓-Gly-OH*      | +            | -           | -                           | -                      | -                                   |

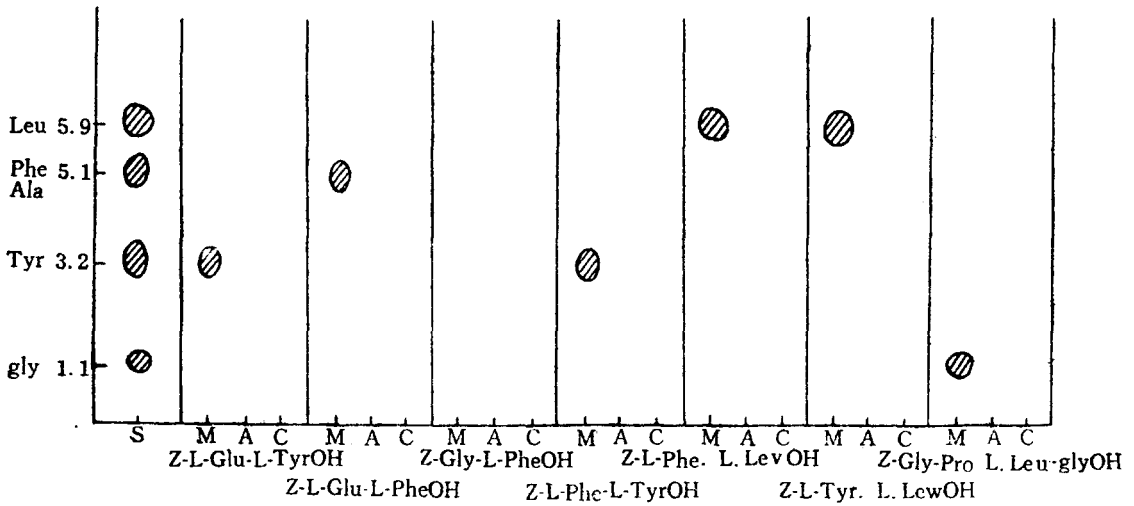
\* 기질 용액중에 30% ethanol 포함

2mM 합성 peptide 용액 0.5ml 에 0.1% MR 효소용액 0.2ml 를 가하여 35°C, 24 시간 반응시킨 다음, 정색접시에 옮겨 동결건공 건조하였다. 여기에 각각 약 50μl 의 물을 넣어 건조물을 녹인 다음, 도오요 여지 위에 spot 하여 열풍건조한 다음, 다시 직경 5mm 이하 되게 spot 한다. 이와 같은 조작을 5 회 반복한다.(때에 따라서는 더 많은 회수를 반복한다). 이와 동시에 2mM 합성 peptide 용액 0.5ml 에 증류수 0.2ml 를 가하여 그대로 건조한 것을 control 로써 위와 같이 spot 하였다. 위의 실험에서는 0.04 % AR 효소용액을 가지고 위와 같은 조건으로 행하였다. 이 실험에 사용한 AR 과 MR 효소의 용유효성은 단위농적당 서로 비슷한 것을 사용했다. 즉, 0.1% MR의 0.033 ml 의 응고시간은 52초, 0.04% AR 의 0.033 ml 은 63 초이었다. 위의 여지를 paper chromatography 한 결과를 Table 1-2 에 표시하였다. Z-L-Glu-L-Tyr OH peptide 의 71 종류의 합성 peptide 중에서 AR 이 합성 peptide 를 분해하는 것을 볼수 없었으나 MR 의 가수분해로 Z-L-Glu-Tyr OH, Z-Phe-L-Tyr OH 의 peptide 는 tyrosine 의 zone, Z-L-Glu-L-Phe OH의 peptide 에는 phenylalanine, Z-Phe-L-Leu OH, Z-L-

Table 2. Hydrolysis of synthetic peptides by mucor-rennin

| Peptides                          | Mucor-rennin | Calf-rennin | <i>Asp. saitoi</i> <sup>(87)</sup><br>의 protease | <i>St. griseus</i> <sup>(23)</sup><br>의 protease | <i>Rhizopus chinensis</i> <sup>(86)</sup><br>의 protease |
|-----------------------------------|--------------|-------------|--|--|---|
| Z-L-'Glu-L-Tyr-OH                 | ++           | -           | +++  | +  | +   |
| D-Leu-Gly                         | +            |             |  |  |   |
| ↓                                 |              |             |  |  |   |
| L-Leu-Gly                         | ±            |             | ++   | +  |   |
| D-Leu-Gly-Gly                     | -            |             |  |  |   |
| ↓                                 |              |             |  |  |   |
| L-Leu-Gly-Gly                     | ±            |             | ++   | +  | -   |
| D-Leu-L-Tyr                       | -            |             |  |  |   |
| L-Leu-L-Tyr                       | -            |             |  | +++  | +   |
| L-Leu-'L-Phe                      | -            | -           |  |  |   |
| L-Tyr-L-Leu                       | -            | -           |  |  |   |
| Bz-Gly-L-Lys-OH                   | -            | -           |  |  |   |
| Z-L-Ala-L-Leu-NH <sub>2</sub> *   | -            | -           |  |  |   |
| Z-L-Ala-L-Phe-NH <sub>2</sub> *   | -            | -           |  |  |   |
| Z-Gly-L-Pro-NH <sub>2</sub> *     | -            | -           |  |  |   |
| Z-Gly-L-Val-NH <sub>2</sub> *     | -            | -           |  |  |   |
| Z-Gly-L-Ala-OH                    | -            | -           |  |  |   |
| Z-Gly-L-Arg-OH                    | -            | -           |  |  |   |
| Z-Gly-L-His-OH                    | -            | -           |  |  |   |
| Z-Gly-L-Pro-OH                    | -            | -           |  |  |   |
| Z-Gly-L-Trp-OH                    | -            | -           |  |  |   |
| Z-L-Pro-L-Leu-L-NH <sub>2</sub> * | -            | -           |  |  |   |
| DL-Ala-DL-Asp                     | -            |             |  |  |   |
| DL-Ala-DL-Ala                     | -            |             |  |  |   |
| DL-Ala-Gly-Gly                    | -            |             | +  | ++   |   |
| DL-Ala-DL-Leu                     | -            |             |  | +++  |   |
| DL-Ala-DL-Met                     | -            |             |  |  |   |
| DL-Ala-DL-NorVal                  | -            |             |  |  |   |
| DL-Ala-DL-NorLeu                  | -            |             |  |  |   |
| DL-Ala-DL-Phe                     | -            |             |  | +++  |   |
| DL-Ala-DL-Val                     | -            |             |  |  | -   |
| Gly-DL-'Ala                       | -            |             |  | +  | -   |
| Gly-D-Asp                         | -            |             |  |  |   |
| Gly-L-Asp                         | -            |             | +  | +  |   |
| Gly-Gly                           | -            |             | -  | -  | -   |
| Gly-Gly-OEt                       | -            |             |  |  |   |
| Gly-Gly-Gly                       | -            |             |  | +  |   |
| Gly-L-Leu                         | -            |             | ±  | +++  | -   |
| Gly-DL-Met                        | -            |             |  |  |   |
| Gly-DL-NorVal                     | -            |             |  |  |   |
| Gly-DL-NorLeu                     | -            |             |  | +++  |   |
| Gly-DL-Phe                        | -            |             |  |  | -   |
| Gly-DL-Ser                        | -            |             |  |  |   |
| Gly-L-Tyr                         | -            |             |  | ++   | -   |
| Gly-L-Trp                         | -            |             |  |  | -   |
| Gly-DL-Val                        | -            |             |  | +  | -   |

\* 기질 용액중에 30% ethanol 포함



M; Mucor-rennin, A; Calf rennin, Control and S: Standard Amino Acids.

Fig. 1. Paper chromatogram on hydrolysis of synthetic peptide by mucor-rennin

Tyr-L-LeuOH의 peptide는 L-leucine, Z-Gly-Pro-L-Leu-Gly OH의 peptide의 glycine의 zone을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

분해되는 peptide 중 Z-Gly-L-Phe OH, Z-L-Glu-L-Tyr OH, Z-L-Glu-L-Phe OH, Z-L-Phe-L-Tyr OH의 합성 peptide를 택하여 시간에 따라서 어느정도 가수분

해되는가를 재검토하였다. Table 3 과 Fig. 2에 표시된 바와 같이 이들의 peptide중에서도 Z-L-Phe-L-Tyr OH peptide가 용이하게 분해되는 것을 알 수 있었다.

### 고 찰

이와사끼 등은 정제한 mucor-rennin을 Z-Glu-TyrOH을 포함한 수십종류의 합성 peptide에 작용시켰을 때, 가수분해가 전연 되지 않았다고 보고했다(34). Fish, 福本(35) 등은 송아지 rennin에 의하여 Z-Glu-Tyr을 포함한 수종류의 peptide가 가수분해되는 것을보고 하였다. 본 실험에 의하여 결정 mucor-rennin을 71종류의 합성 peptide (pH 3.9)에 작용시켰을 때, Z-Glu-Tyr OH, Z-L-Glu-L-Phe OH, Z-L-Phe-L-Tyr OH, Z-L-Phe-L-Leu OH, Z-L-Phe-L-Leu OH, Z-L-Tyr-L-Leu OH, Z-Gly-Pro-L-Leu-Gly OH, Z-L-Glu-L-Tyr OH의 peptide가 가수분해되는 것은 확인되었으나, mucor-rennin과 동일한 응유활성을 나타내는 효소량의 송아지 rennin을 동일 반응조건하에서 평행실험을 했을 때, 이들의 peptide를 전연 가수분해하지 않았다. 이 사실은 본 실험과 같이 한정된 조건에서 송아지 rennin은 합성 peptide를 분해하지 않는다는 것이고, 다른 실험 조건에서 송아지 rennin은 합성 peptide를 분해할 수 있을 것이다. 따라서 어떤 한정된 실험 조건하에서 mucor-rennin은 peptide분해성에 있어서 송아지 rennin과 다르다고 할 수 있다. 이것은 같은 응유활성에 대하여 mucor-rennin이 송아지 rennin보다 단백질분해력이 강하다는 사실과 관련이 있다는 것을 암시한다. Table

Table 3. Hydrolysis of peptide by mucor-rennin

| Peptides         | Reaction time, O.D. 570m $\mu$ |         |          |
|------------------|--------------------------------|---------|----------|
|                  | 1 hour                         | 5 hours | 23 hours |
| Z-Gly-L-Phe-OH   | 2.209                          | 0.220   | 0.290    |
| Z-L-Glu-L-Tyr-OH | 0.245                          | 0.350   | 0.90     |
| Z-L-Glu-L-Phe-OH | 0.219                          | 0.300   | 0.444    |
| Z-L-Glu-L-Phe-OH | 0.235                          | 0.430   | 0.666    |

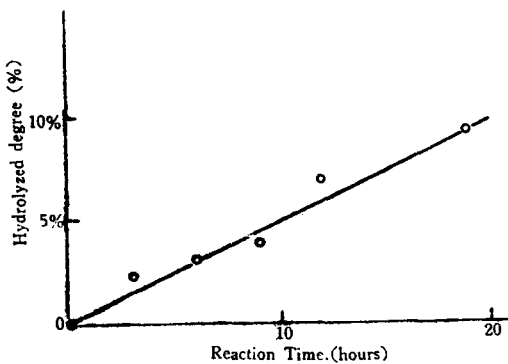


Fig. 2. Hydrolysis of Z-L-Glu-L-Tyr OH by mucor-rennin

1에 표시한 바와 같이 mucor-rennin, 송아지 rennin, pepsin과 *Rhizopus chinesis*의 protease<sup>(35,36)</sup>의 합성 peptide에 대한 작용 spectrogram을 본다면 2~3개의 예외를 제외하고는 거의 일치하고 있다. Table 2에서 이들 4 종류의 효소는 단백질 분해력이 강한 *Aspergillus saitoi*<sup>(37)</sup>, *Streptomyces griseus*의 protease보다 그의 기질특이성이 한정되어 있다는 것을 알 수 있고, 어느 것이고 응유활성을 가지고 있으나 응유활성에 대한 단백질분해력의 비는 서로 다르다. 대략 pepsin>*Rhizopus chinesis*의 protease>mucor-rennin> 송아지 rennin의 순이다<sup>(31,38)</sup> 한편 mucor-rennin, pepsin, 송아지 rennin은 어느것이고 활성중심에 histidine 잔기가 관여하고 있다고 보고되어 있다.<sup>(38,40)</sup> Pepsin, 송아지 rennin, *Rhizopus chinesis*의 insulin  $\beta$  chain에 대한 작용부위의 해석에 의하여<sup>(35,41)</sup> 전달하는 곳은 서로 비슷한 부위가 많다는 것이 인정되어 있다. 이들 4종의 효소는 산성 protease에서도 매우 특이한 위치를 가지고 있는 듯하고, 서로 다소 variation이 있다고 할지라도, 활성중심은 공통된 구조일 것이며, 기질특이성에 있어서도 공통부분이 많으리라 생각된다.

#### 참 고 문 헌

- 1) Berridge, N.J.: *Biochem. J.*, 39, 179(1945)
- 2) 大條方義, 河西京浦, 日畜會報, 25, 209(1945)
- 3) Velselov, I.Y., P.Y. Tipograf, T.A. Pentia: *Prik. Bichim, Microbiol.* 1, 52(1965)
- 4) Tsugo, T., Yamauch K.: *XVth Intern. Dairy Congr. Proc.*, 2, 636, 634(1959)
- 5) Paleva, N.S., Povova, N.Y.: *Ferment. Sprit. Prom.*, 31, 6(1965)
- 6) Dyachenck, P.F., V.V. Slavayanova: *XVI th Int. Dairy Congr., Sect., IV-1*, 349(1962)
- 7) Arima, K., S. Iwasaki, G. Tamura: *Agr. Biol. Chem.*, 31, 540(1967)
- 8) Srinivasan, R.A. et al.: *XVIth Intern. Dairy Proc. B401*, 506(1962)
- 9) Shimwell, J.L., J.E. Evans: *Brit. Pat.*, 565, 788 (1944)
- 10) Emanuilof I.: *XIVth Intern. Dairy Congr. Proc.*, 2, 200(1956)
- 11) Tipograf, D.Ya., et al.: *Prik. Biokhim. Miokrobiol.* 2, 45(1966)
- 12) Yulius, A.A., O.Kh. Tinyakova: *Prik. Biokhim. Microbiol.*, 2, 670(1966)
- 13) Puhan, Z.: *Int. Dairy Congr.*, XVII, D199(1966)
- 14) Wahlin J.G.: *J. Bact.*, 16, 355(1928)
- 15) Morihara, K.: *Agr. Chem. Soc. Japan*, 30, 514 (1965)
- 16) Somukuti, G.A., Babel F.J.: *J. Dairy Sci.*, 49, 700(1966)
- 17) Sardinas, J.L., G. Fery: *U.S. Pat.* 3275453(1966)
- 18) Jnight, S.G.: *Can. J. Mic.*, 12, 420(1966)
- 19) Tsugo, T., U. Yoshino, K. Taniguchi, A. Ozawa, Y. Miki, S. Iwasaki, and K. Arima: *Japan J. of Zootech. Sci.*, 35, 221(1964)
- 20) Grimberg, M.: *Fette Seifen Anstrichmittel*, 67, 271(195)
- 21) Jaarverslag, Rijkszuivelstation-Melle(Belgium)Jaarverslag, p.29 (1966)
- 22) 38th Annual Report of the Dairy Research Institute (New Zealand) p.16 (1966)
- 23) 吉田文彦, "Protease의 利用에 關한 講習會 텍스트" 日本應用酵素協會, p.97~110 (1965)
- 24) Roberston P.S. et al.: *N.Z.J. Dairy Tech.*, 1, 91 (1966)
- 25) Annual Report of Division of Dairy Research, C.S.I.R.O. Australia 7 (1966)
- 26) Richardson, G.H. et al.: *J. Dairy Sci.*, 50, 1066 (1967)
- 27) Schultz, M.E. et al.: *Milchwissenschaft*, 22, 139 (1967)
- 28) Blaauw, J.: *Stremsel en stremselvervangers Officieel Orgaan*, 59, 300(1967)
- 29) 39th Annual Report of the Dairy Research Institute (New Zealand) p.24(1967)
- 30) Kikuchi T. et al.: Orally Presented at the 15th Annual Meeting of the Japanese Food. Eng. Assoc. on April 18, 1968 at Tokyo
- 31) Yu, J., S. Iwasaki, G. Tamura, K. Arima: *Agr. Biol. Chem.*, 32, 1051(1968)
- 32) Arima, K., J. Yu, S. Iwasaki, G. Tamura: *Appl. Microbiology*, 16, 1727(1968)
- 33) Yu, J., G. Tamura, K. Arima: *Biochem. Biophys. Acta.* 171, 138(1969)
- 34) Yu, J., G. Tamura, K. Arima: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 43, 60(1969)
- 35) 岩崎慎二郎, 田村學造, 有馬啓, 日本農畜化學大會

講演要旨 p.6 (1965)

- 37) Fukumoto, J. *et al.*: *Symposium of Japan Enzyme Chem.*, **19**, 147-149 (1968)
- 38) Fukumoto, J.D. Tsuru, T. Yamamoto: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 710(1967)
- 39) Yoshida, F.M. Nagasawa: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **20**, 262 (1956)
- 40) Arima, K., S. Iwasaki, G. Jamura: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 540(1967)
- 41) Hill, R.D., R.R. Laing: *Biochim. Biophys. Acta.* **99**, 352(1965)
- 42) Yu, J., G. Tamura, K. Arima: *Biochim, Biophys, Acta.* in Press (1970)
- 43) Foltman, B.: *Compt. Rem. Lab. Carlsberg*, **35**, 143(1966)