J. Korean Soc. Food Nutr.
22(6), 811 ~ 814(1993)

능이[*Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito]중 알카리성 단백질가수분해효소의 1차구조에 관한 연구 I. 아미노산 조성, 활성부위 아미노산 및 N-말단 부위의 아미노산 배열

이 태 규
전주우석대학교 식품공학과

Studies on the Primary Structure of the Alkaline Protease in Neungee [*Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito] I. Amino Acid Composition, Chemical Modification and Sequence of the N-terminal Amino Acid

Tae-Kyoo Lee
Dept. of Food Science and Technology, Chonju Woosuk University, Samrye 565-800, Korea

Abstract

Properties of a protease purified from *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito have been investigated. The enzyme displays as a glycosylated serine protease. The sequence for the 21 amino acids of the N-terminal side in the enzyme was determined by automated sequence analysis. The sequence was V-T-T-K-Q-T-N-A-P-W-G-L-G-N-I-S-T-T-N-K-L-.

Key words : glycosylated protease, sequence

서 론

Protease는 미생물 · 식물 · 동물로 부터 추출되어 이용되고 있으며, 단백질과 peptide의 가수분해를 촉매하여 물리 · 화학적인 가수분해에 비하여 부반응이 없고, 촉매활성이 크기 때문에 에너지 소모가 적고 처리 후 제거할 필요가 없기 때문에 식품산업에 널리 이용되고 있다[1,2].

능이[*Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito]는 능얼이라고도 부르며 한국과 일본에 자생하고 있다. 한국에서는 9월 하순부터 10월 초순 사이에 활엽수림의 부식이 많은 산지에서 발생하고 갓의 크기가 10~20cm의 대형 버섯이다.

능이는 옛부터 우리나라 농산촌에서 식용뿐만 아니라 육류를 먹고 체하였을때의 단방약이나 육류를 요리할 때도 일부 이용하고 있다.

이런점에 착안하여 능이중의 단백질가수분해효소를 분리 정제하여 일반적인 제 특성이 일부 규명되어 보고된 바 있다[3,4].

그러나 아직도 능이의 단백가수분해효소에 대한 생화학적인 성질 등이 충분히 규명되어 있지 않았기 때문에 본 효소의 일차구조를 알아낼 목적으로 아미노산 조성 · 활성부위에 관여하는 아미노산 및 N-말단 부위의 아미노산 배열 등을 분석 검토하여 몇가지 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료

전북 진안군에서 채취한 버섯을 -70°C에 동결보관하면서 공시재료로 사용하였다.

효소의 정제

조효소액의 조제, $(NH_4)_2SO_4$ 염석, ion exchange (CM)와 gel (protein PAK-125) column chromatography는 전보[3]의 방법에 따랐다.

Chromatofocusing은 Pharmacia사의 Chromatofocusing with Polybuffer™ and PBE™ manual[5]에 준하였다. 즉, 직경 1cm의 column에 0.025M triethylamine-HCl (pH 11.0)로 평형화 시킨 후 탈기시킨 PBE 118을 bed height가 30cm 되도록 충진한 다음 0.025M triethylamine-HCl(pH 11.0)완충액으로 평형화시켰다. 효소액 5ml (10mg/ml)을 column에 주입한 후 0.0075 mmol/pH unit/ml (Pharmalyte pH 8~10.5)인 limit buffer로 유속 15cm/hr.로 용출 시켰다. Fraction collector로 부터 활성부위를 모아 polybuffer을 제거하기 위하여 80% 되도록 $(NH_4)_2SO_4$을 가하여 단백질을 염석 시킨 후 14,000×g로 원심분리하여 침전물을 회수한 후 증류수에 하룻밤 투석시켜 정제효소로 사용하였다.

실험방법

효소의 활성 측정

전보[3]의 방법에 따라 Folin 비색법으로 측정하였다.

아미노산 분석

Sanger와 Thompson의 방법[6]에 준하여 250μg의 정제효소를 가수분해 시켰으며, tryptophan은 Penke 등[7]의 방법에 따라 250μg의 정제효소에 소량의 tryptamine을 함유하는 4M methansulfonic acid 0.3ml를 가하여 105 °C에서 24시간 가수분해 시킨후 4M NaOH로 pH를 조절하여 시료 40μl를 아미노산 자동분석기 (LKB4150 Alpha)로 각각 정량 하였다.

구성 탄수화물의 정량

정제된 효소에 결합된 탄수화물은 dextran을 표준물질로하여 phenol-sulfuric acid법[8]으로 측정하였다.

화학적 수식

효소의 활성중심을 추정하기 위한 화학적 수식은 Mean과 Feeney의 방법[9]으로 행하였으며, lysyl 잔기는 pyridoxal 5′-phosphate, arginyl 잔기는 1,2-cyclo hexanedione과 phenylglyoxal, histidyl 잔기는 diethyl pyrocarbonate, cysteinyl 잔기는 5,5′-dithio bis-(2-nitrobenzoic acid), tryptophanyl 잔기는 rose bengal과 N-bromosuccinimide, cystinyl 잔기는 dithiothreitol, serinyl 잔기는 phenyl methane sulfonyl fluoride를 사용하여 상온에서 농도별로 처리한 후 일정시간 후 상대활성도로 비교하였다.

N-말단 아미노산 배열

시료(60μg protein)를 Laemli법을 개량한 Anderson 등[10] 방법에 따라 전기영동한 후, PVDF막과 gel을 겹으로 포개 블로팅 장치(Hoeffer사)에서 200mA로 1.5시간 용출시켰다. PVDF막은 탈이온수로 세척하여 coomassie brillant blue R-250으로 염색하고 탈색한 후, band를 짤라내어 teflon seal의 중앙에 놓은 다음, sequencer의 upper catrige block에 setting 하였다. 단백질의 아미노산 배열은 프로그램 FIL-1을 사용하는 on-line phenylthiohydantoin(PTH) 분석장치를 내장한 Applied biosystem model 477A/120A protein sequencer로 분석하였다.

결과 및 고찰

아미노산 조성

아미노산 조성은 Table 1과 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 전체 아미노산중에서 가장 많이 함유되어 있는 아미노산은 glycine (16.11 mol%)이며, 염기성 아미노산인 lysine과 arginine은 4.2mol%, 산성 아미노산인 aspartic과 glutamic acid는 10.8mol%를 보였다. 이밖에 threonine, alanine, serine도 각각 13.66, 11.01, 7.17mol% 순으로 비교적 많이 함유되어 있었다.

본 효소의 아미노산 함량의 결과를 살펴보면 염기성

Table 1. Amino acid composition of the *Sarcodon aspratus* protease

Amino acids	mol%
Aspartic aicd + asparagine	8.25
Threonine	13.66
Serine	7.17
Glutamic acid + glutamine	2.58
Proline	4.20
Glycine	16.11
Alanine	11.01
Cystine (half)	nc*
Valine	6.49
Methionine	2.60
Isoleucine	5.90
Leucine	5.12
Tyrosine	3.39
Phenylalanine	3.26
Histidine	2.96
Lysine	3.11
Arginine	1.05
Tryptophan	3.11

*Not countable

아미노산 보다는 산성 아미노산의 함량이 많은 것으로 나타났으나, 전보[3]에서 본 효소의 등전점이 9.80인 사실과는 결과가 차이가 있다. 이러한 사실을 종합하여 볼때 pKa값이 높은 tyrosine (R group의 pKa값 10.07), lysine (R group의 pKa값 10.53), arginine (R group의 pKa값 12.48)와 같은 아미노산들이 *glutamic acid* (R group의 pKa값 4.25), aspartic acid (R group의 pKa값 3.86)과 같은 산성 아미노산들보다 더 밖으로 노출이 많이 되었을 것으로 생각해볼 수도 있을 것이다.

탄수화물의 함량

당 함유량이 2.1%이었다. 처음으로 당을 함유하는 protease로 알려진 stem bromelain에는 1.46%의 탄수화물이 함유되어 있는 것으로 알려져 있고, 그 구성 성분이 3M mannose, 1M fucose, 1M xylose, 2M N-acetyl-*glucosamine*으로 보고되었다[11].

화학적 수식

화학적 수식을 일으키는 시약들이 본 효소의 활성에 미치는 결과를 조사해본 결과 arginine, lysine, cysteine, *methionine*에 작용하는 시약들은 본 효소의 활성을 저해하지 않는다.

Histidine에 반응할 수 있는 rose bengal은 효소활성을 저해 시켰으나 이는 tryptophan도 산화시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. Histidine의 imidazole group과 반응하는 *ethoxyformic anhydride*의 농도가 증가되어도 효소의 활성이 저해되지 않는 것으로 미루어보아 histidine은 active site에 관여하지 않을 것으로 생각된다.

또한 aspartyl과 glutamyl에 작용하는 carbodiimide의 농도가 저농도에서는 활성감소가 미약했으나 100mM 이상에서는 급격히 효소이 활성이 감소하였다. Carbodiimide의 농도가 높을수록 다음과 같은 반응으로 인하여 pH가 급격히 감소하는 것으로 알려져 있다.

전보[3]에서 본 효소는 pH 3.0이하에서는 급격한 효소의 활성 감소가 이루어졌던 점으로 미루어 보아 pH 영향임을 생각해 볼 수 있다. 따라서 aspartyl과 glutamyl 잔기는 active site에 관여하지 않을 것으로 생각되어 진다.

Fig. 1, 2 및 3에서 보는 바와 같이 0.4, 1 및 4mM의 농도로 처리했을 때 시간이 경과함에 따라 first-order kinetics에 따라 수식되는 것으로 미루어 보아 serine과

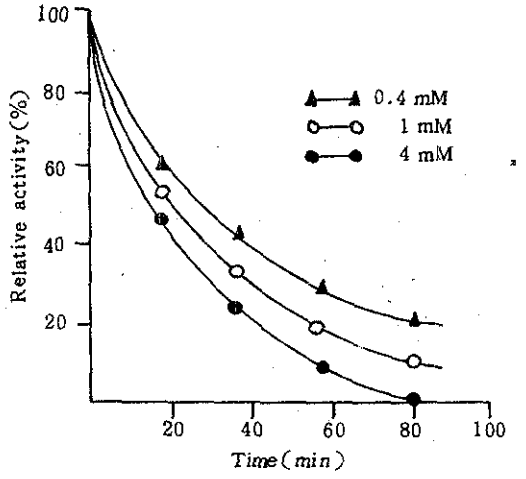

Fig. 2. Effect of time on the chemical reactant (Rose bengal).

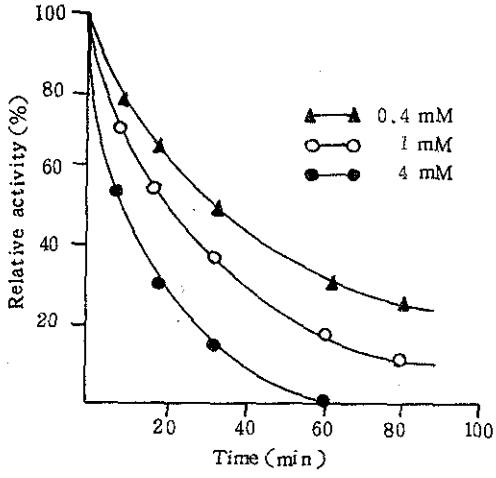

Fig. 1. Effect of time on the chemical reactant (N-bromosuccinimide).

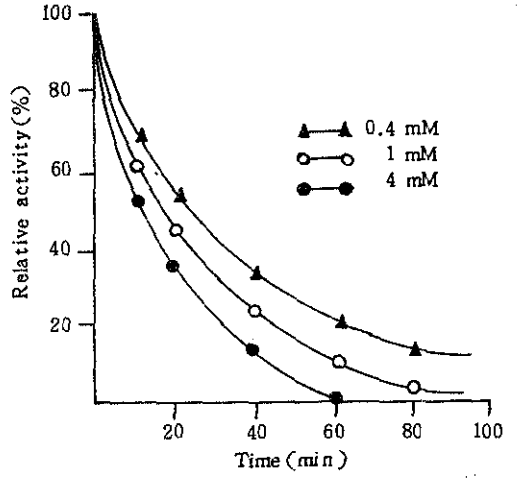

Fig. 3. Effect of time of the chemical reactant (PMSF).

V-T-T-K-Q-T-N-A-P-W-G-L-G-N-I-S-T-T-N-K-L-

Fig. 4. N-terminal amino acid sequence of the protease from *Sarcodon aspratus*.

tryptophane 잔기가 active site에 관여할 것으로 생각된다.

N-말단 아미노산 배열

Fig. 4에서 보는 바와 같이 N-말단 아미노산은 valine으로 동정되었다.

21번째까지의 아미노산 배열중 14번째의 아미노산 잔기는 sequenator에 의해 aspartic acid로 동정되었으나 p mol ration이 너무나 낮은 수치를 나타내었고, 실제 주 peak로 간주할만한 peak가 없으므로 aspartic acid로 간주할 수 없었고, 또한 glycoprotein의 아미노산 배열을 PTH-유도체로 만들어 분석하는 경우 당에 의해 수식된 아미노산 잔기는 동정하기 어려운 실정이며, N형 glycoprotein은 asparagine에 당수식이 일어난다[11,12]. 또한 본 효소는 당 함량이 2.1%인 점(분자량 약 650)을 감안한다면 효소 단백중 1개 부분에서 glycosyl화가 일어났을 것으로 추정되며 따라서 14번째의 아미노산 잔기는 asparagine으로 동정할 수 있다.

아미노산 분석에서도 threonine이 13.66mol%이었는데 동정된 21개의 아미노산 잔기중에도 5개의 threonine이 들어있었다.

요 약

Sarcodon aspratus(Berk.) S. Ito에서 분리정제한 단백질가수분해효소의 특성을 조사하였다. 이 효소는 당을 2.1% 함유하고 있었다. Rose bengal, N-bromo succinimide, phenyl methyl sulfonyl fluoride(PMSF)와 같은 화학적 수식 시약에 효소 활성이 저해되었으며, 1차 반응속도론적 불활성 mode를 가지므로 활성 부위는 tryptophan과 serine으로 추정된다. N-말단에서 21번째 잔기까지의 아미노산 배열은 V-T-T-K-Q-T-N-A-P-W-G-L-G-N-I-S-T-T-N-K-L-으로 동정되었다.

감사의 글

이 논문은 1991년도 국비해외파견 연구교수 학술연구조성비에 의한 결과이며 이를 감사드립니다.

문 헌

1. Knorr, D. : *Food biotechnology*. Marcel Dekker, Inc., New York, p.413 (1987)
2. Schwimmer, S. : *Source book of food enzymology*. AVI Publishing Co., Inc., p.89 (1981)
3. Lee, T. K. : Purification and some charcteristics of the proteolytic enzyme in fruitbody of Neungee. *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, **17** (1), 276 (1986)
4. Lee, T. K., Eun, J. S., Yang, J. H., Jo, D. Y. and Yang, H. C. : Purification and stability of proteolytic enzyme in *Sarcodon aspratus*(Berk.) S. Ito. *J. Kor. Pharm. Sci.*, **19** (2), 81 (1989)
5. Chromatofocusing with Polybuffer™ and PBE™ manual : *Pharmacia fine chemicals*, Revised edition, Uppsala (1982)
6. Sanger, F. and Thompson, E. O. D. : Halogenation of tyrosine and hydrolysis. *Biochem.*, **60**, 45 (1963)
7. Penke, B., Ferenczi, R. and Kovacs, K. : A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins. *Anal. Biochem.*, **60**, 45 (1974)
8. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Robers, P. A. and Smith, F. : Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956)
9. Means, G. E. and Feeney, R. E. : *Chemical modification of proteins*. Holden-Day Inc., p.66 (1971)
10. Anderson, C. W., Baum, P. R. and Gesteland, R. F. : Processing of adenovirus 2-induced proteins. *J. Virology*, **12**, 241 (1973)
11. Boyer, P. D. : *The enzymes*. Vol Ⅲ, Academic Press, p.544 (1971)
12. Ferguson, M. A. J., Duszeks, M., Lamont, G. S., Overath, P. and Gross, G. A. M. : Biosynthesis of *Trypanosama brucei* varient surface glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, **26**, 356 (1986)

(1993년 9월 3일 접수)