

Effect of NaCl on Hydrolytic Activity of Leucine Aminopeptidase from *Bacillus* sp. N2Dong-Min Chung^{1*}, Gang-Deog Lee^{1†}, Sung Sick Chun², Young-Chul Chung² and Hyo-Kon Chun^{1*}¹Bioindustrial Process Center, Jeonbuk Branch Institute, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Jeonbuk 580-185, Korea²Department of Food Nutrition, International University of Korea, Jinju city 660-750, Gyeongsang namdo, Korea

Received March 4, 2011 / Accepted April 14, 2011

Salt stability of enzymes is a crucial practical factor in the food industry. Previously, leucine aminopeptidase (LAP) was purified from *Bacillus* sp. N2. Here, we present the salt effect of LAP using synthetic substrates. LAP had a hydrolytic activity for L-leucine-*p*-nitroanilide in high concentrations of NaCl (up to 4 M), but not for other neutral salts (LiBr, LiCl, NaBr, KBr, and KCl). It hydrolyzed various synthetic di-peptide substrates with hydrophobic and hydrophilic amino acids at the C-terminal Xaa region, in the presence of 0-4 M NaCl. The result indicated that the hydrolytic action of LAP is not dependent on the hydrophobicity of the amino acid side chain at the scissile bond of the substrate. Remarkably, the hydrolytic activity of LAP was 1-3 folds higher than those of other LAPs and aminopeptidases in 4.5 M NaCl, suggesting that NaCl-tolerant LAP might be used in the food industry as cheese and anchovy sauce.

Key words : Amino acid, *Bacillus* sp., exopeptidase, leucine aminopeptidase, salt

서 론

많은 protease들은 미생물에 존재하며, 여러 식품 가공생산과 발효에 널리 이용된다. 특히 염에 대한 내성을 가지는 protease와 peptidase들은 식품산업에 중요한 역할을 한다. Aminopeptidase는 단백질의 N과 C 말단으로부터 아미노산을 가수분해한다. Leucine aminopeptidase (LAPs; EC 3.4.11.1)은 자연계에 널리 분포된 세포 exoprotease의 일종으로, leucine과 같은 소수성 아미노산이 붙어있는 펩타이드 결합을 가수분해하는 효소이다. 다양한 LAP 효소들은 많은 조직과 생물체들로부터 분리되고 그 특징들이 연구되었다 [1,7,9,13,14,16]. Aminopeptidase [12]와 carboxypeptidase [3]를 포함한 exoprotease는 단백질 합성과 분해, 단백질 가수분해에 의한 떫음 감소 [17] 등과 같은 산업적인 응용에 유용하게 이용될 수 있다. 그 exoprotease의 가장 중요한 응용은 치즈와 멸치 젓갈의 생산에서 단백질 가수분해물질(hydrolyzate)의 떫음을 제거하는 것이다.

발효식품의 숙성과정이나 bioactive protein hydrolyzate의 효소 처리과정 동안에 쓴맛(bitterness)이 발생한다고 알려져 있다. 이러한 쓴맛은 발효식품의 가치를 떨어뜨리기 때문에 쓴맛을 최소화하려는 연구가 진행 중이다. 쓴맛의 내포와 쓴맛을 가지는 peptide들의 화학적인 구조 간의 관계 규명에 대한 연구에 의하면, 그 쓴맛은 그 분자의 크기, 소수성(hy-

drophobicity), 1차적인 염기서열, 나선형 구조와 아주 밀접한 관계를 가진다고 한다. 대체적으로, 쓴맛은 peptide 분자의 전체적인 소수성이 증가할수록 더욱 더 쓴맛이 강하다고 보고되었다. 또한, 쓴맛은 Leu, Tyr, Phe를 가지는 peptide들에서 확인되었고, C-말단 부분에 L-configuration을 가지는 소수성 단백질이 많을수록 쓴 맛이 강하다고 보고되었다 [5]. 그러므로, 쓴맛을 내는 peptide의 구조간의 관계를 규명하는 것은 아주 중요하다.

이전에 우리는 *Bacillus* sp. N2 유래의 Leucine aminopeptidase의 정제와 그 효소의 특성에 대해 연구하였다. 본 연구의 목적은 염들의 농도에 따른 그 정제된 효소(LAP)의 활성 조사와 L-leucine-*p*-nitroanilide (L-Leu-pNA) di-와 tripeptide 기질을 이용하여 효소의 peptide 가수분해활성의 특이성을 조사하였으며, 또한, 이전에 보고된 aminopeptidase (AP)들과의 가수분해 활성을 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 *Aeromonas proteolytica* aminopeptidase, *Streptomyces griseus* aminopeptidase, porcine kidney cytosol의 aminopeptidase와 porcine kidney cytosol의 microsomes 유래의 leucine aminopeptidases는 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 모든 합성 기질인 L-leucine-*p*-nitroanilide (L-Leu-pNA) di-와 tripeptide은 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

[†]The first two authors contributed equally to this work

*Corresponding author

Tel : +82-63-570-5120, Fax : +82-63-570-5109

E-mail : hkchun@kribb.re.kr

LAP의 단백질 정제

본 실험에 사용된 단백질은 이전에 발표된 Lee 등[6]의 방법에 따랐다. 간단히 요약하면, *Bacillus* sp. N2 유래의 LAP은 4가지의 크로마토그래피 방법(CM-Sepharose, CL-6B, Mono-Q, and Superdex-200)을 이용하여 정제하였다. 정제된 LAP은 실험을 위한 효소로 사용하였다.

아미노펩티데아제(Aminopeptidase) 활성조사

아미노펩티데아제 활성은 합성 기질인 L-Leu-pNA를 이용하여 흡광도 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 간단히 요약하면, 효소액 0.1 ml를 5 M L-Leu-pNA 기질을 포함한 완충용액(50 mM Tris-HCl, pH 7.5)에 혼합하여 총량이 1 ml이 되도록 하였다. 그런 다음, 상기 혼합물을 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후, 흡광도 405 nm 파장에서 측정하였다. 또한, 여러 염(NaCl, LiBr, NaBr, KBr, LiCl, KCl)들의 농도에 의한 LAP 활성을 조사하기 위하여, 상기 기질 액에 각 염의 농도를 0~4.5 M을 포함하여 상기의 방법을 이용하여 측정하였다.

Di-와 tripeptide의 가수분해

LAP에 의한 di-와 tripeptide의 가수분해 활성조사는 Cd-ninhydrin 방법[2]을 이용하여 Leu-Xaa와 같은 여러 dipeptide들로부터 leucine이 방출되는 양을 측정하였다. Cd-ninhydrin 시약은 ninhydrin 0.8 g을 99.5% 에탄올 80 ml 과 아세트산 10 ml의 혼합액에 녹인 다음, CdCl₂ 1 g를 증류수 1 ml에 녹인 용액을 첨가하여 준비하였다. 완충용액(50 mM Tris-HCl, pH 7.5) 800 µl에 2 mM di-와 tripeptide 기질 (leu-Xaa)을 포함한 완충용액(20 mM HEPES, pH 7.0) 100 µl와 효소액 100 µl을 혼합하여 총량이 1 ml이 되도록 하였다. 그런 다음, 상기 혼합물을 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후, Cd-ninhydrin 시약 1 ml를 첨가하여 84°C에서 5분 동안 가열한 후 냉각시키고, 흡광도 507 nm 파장에서 유리된 Leucine을 측정하였다.

V_{max}과 K_m 값

V_{max}과 K_m 값은 이전에 보고된 실험방법[8]에 따랐다. 각 실험은 9가지의 다른 기질 농도에서 수행되었다. 그 기질액(S) 농도(mM)는 1/S가 1/K_m (mM)의 20~200%의 범위까지로 정했다. 기질인 L-Leu-pNA의 양은 K_m 값이 높았기 때문에 0.5~5 mM까지 측정하였다.

결과 및 고찰

염 농도에 의한 LAP의 활성

여러 염(NaCl, LiBr, NaBr, KBr, LiCl, KCl)들에 의한 LAP의 가수분해 활성을 조사하기 위하여 0, 1, 2, 3, 4 M 염의 농도가 포함된 L-Leu-pNA 기질을 사용하여 효소활성을 조사하였다

(Fig. 1). LAP은 다른 염들과 비교하여 상대적으로 NaCl에서 가장 높은 효소활성을 나타내었다. LAP의 효소활성은 NaCl 농도에 비례적으로 증가하였으며, 2 M NaCl 농도에서 최대활성을 보였다.

이전에, 우리는 *Bacillus* sp. N2 유래의 LAP 정제 및 효소활성에 대해 보고하였다[6]. 본 연구에는 다른 염들에 의한 LAP의 효소활성에 관한 내용을 조사하였다. 특히, LAP는 NaCl에 의해서 효소활성이 증가되었다. 또한, 정제된 효소의 온도에 대한 안정성을 조사한 결과, 고농도의 NaCl 조건에서 24시간 동안 37°C와 28°C에서 효소의 활성이 안정한 것으로 확인되었다(data not shown). 고농도의 NaCl이 존재할 경우에 LAP가 높은 효소활성이 보인다는 점과 온도에 대한 효소의 안정성은 산업적인 응용 측면에서 용이할 것으로 판단된다.

NaCl 농도에 따른 LAP 활성에 관한 속도론

5가지의 서로 다른 NaCl 농도(0, 1, 2, 3, 4 M)에서 LAP의 L-Leu-pNA에 대한 반응속도(v)는 lineweaver-Burk ([1/v vs 1/S])식에 의해 그래프화하였다(Fig. 2). Km과 Vmax 값은 linear-squares regression 방법에 의해 계산되었다. Km 값은 NaCl의 존재에 의해 영향을 받으며 Vmax 값은 NaCl 농도가 증가함에 따라 값이 높아진다는 것을 알 수 있었다.

Di-와 tripeptide 기질에 대한 LAP의 가수분해활성

12종류의 C-말단 끝부분의 scissile bond에 di-와 tripeptide가 붙은 기질을 이용하여 NaCl이 LAP의 활성에 끼치는 영향에 대해 조사하였다(Fig. 3, 4). 그 반응은 각 Km 값 보다 낮은 기질 농도에서 수행하였다. NaCl이 존재할 경우, C-말단 끝부분에 수소성 아미노산을 기질로써 사용하였을 때, LAP은 Leu-Met, Leu-Leu-Leu, Leu-Val, Leu-Leu, Leu-Phe, Leu-Trp에는 활성이 있었지만, Leu-Pro에는 활성이 없었다. 그리고, 동일한 NaCl의 조건에서 친수성 아미노산을 기질로써 사용하

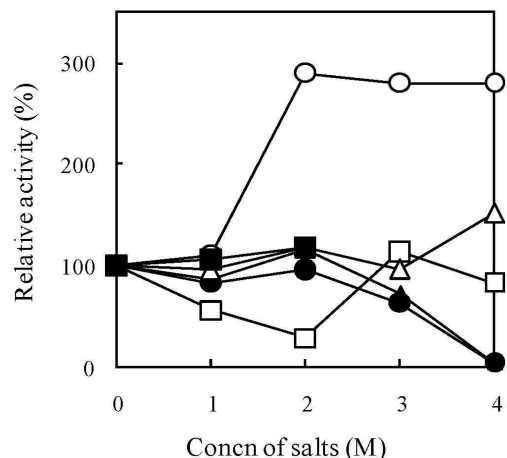


Fig. 1. Effects of various salts on LAP activity. ○, NaCl; △, KBr; □, NaBr; ●, LiBr; ▲, LiCl; ■, KCl

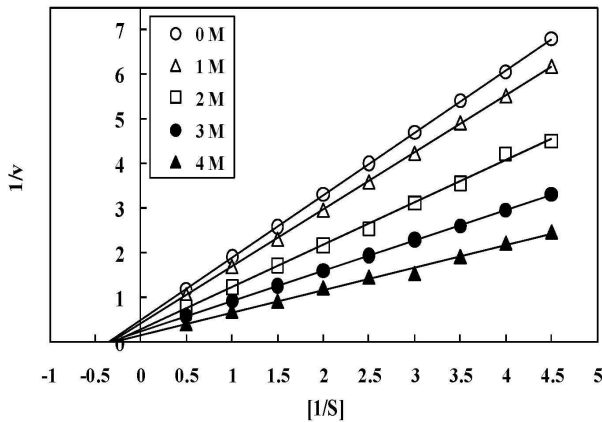


Fig. 2. Enzyme kinetics of LAP in the presence of NaCl.

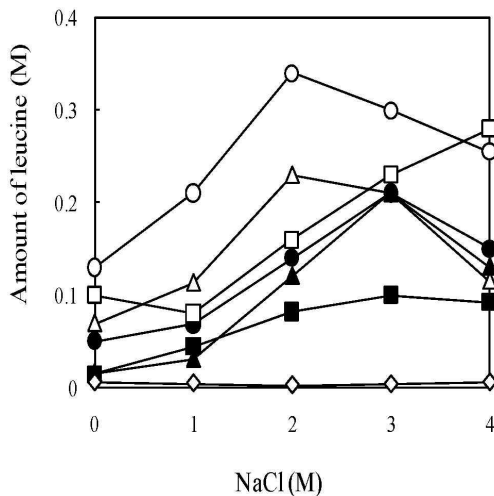


Fig. 3. Enzymatic hydrolysis of various hydrophobic amino acid in Xaa region by *Bacillus* sp. N2. ○, Leu-Met; △, Leu-Leu-Leu; □, Leu-Val; ●, Leu-Leu; ▲, Leu-Phe; ■, Leu-Trp; ◇, Leu-Pro

였을 때, LAP은 Leu-Tyr와 Leu-Asp에서는 활성이 있었으나, Leu-Arg, Leu-Gly, Leu-Asn에서는 가수분해가 일어나지 않았다. 이와 같은 결과는 *Bacillus* sp. N2 유래 LAP의 가수분해활성은 C-말단에 위치하는 소수성과 친수성 아미노산과는 아무런 관련이 없다라는 것을 의미한다. 하지만, LAP은 Leu-Pro를 제외한 C-말단에 위치하는 소수성 아미노산 기질에 대해서는 효소활성을 나타내었다라는 점은 주목할 만하다.

단백질의 효소 처리공정은 다양한 식품산업 분야에서 많이 이용된다. 이러한 과정 동안 쓴맛을 내는 peptide가 생성되는데, 그 peptide로 인해 쓴맛이 발생된다. 이러한 쓴맛은 peptide의 소수성 아미노산과 밀접한 관계가 있다고 알려져 있으며, 소수성 아미노산을 제거함으로써 그 쓴맛을 제거하려는 연구가 진행되고 있다. Izawa 등[4]에 의하면, *Aeromonas caviae* T-64 유래의 AP는 N-말단에 붙어있는 소수성 아미노산 잔기들을 가진 peptide을 가수분해한다는 것을 알았으며, 쓴

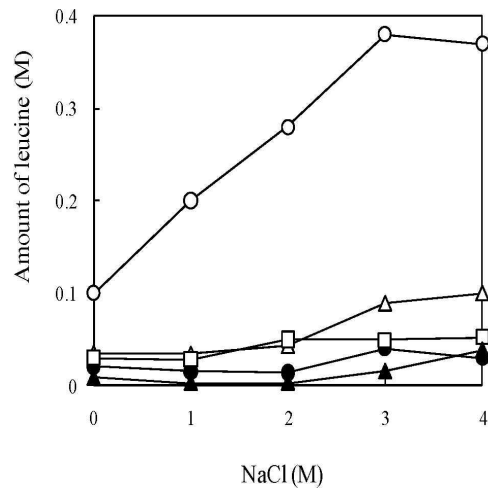


Fig. 4. Enzymatic hydrolysis of various hydrophilic amino acid in Xaa region by *Bacillus* sp. N2. ○, Leu-Tyr; △, Leu-Asp; □, Leu-Arg; ●, Leu-Gly; ▲, Leu-Asn

맛을 내는 소수성 peptide를 포함한 milk casein과 soy protein의 hydrolyzate을 기질로 사용했을 때 쓴맛이 제거된다는 사실을 보고했다.

이전에 우리는 정제된 LAP은 mono peptide 잔기 하나가 붙여 있는 합성기질인 L-Leu-pNA에서 가수분해 활성이 가장 높았다는 사실을 밝혔다[6]. 본 연구에서는 정제된 LAP가 고농도의 NaCl에서 여러 소수성 아미노산이 붙여 있는 di-와 tripeptide 기질에 대해서 활성화된다는 것을 보여주었다. 이러한 사실은 단백질 hydrolyzate으로부터 쓴맛을 제거하는 것과 반응시간을 줄이는데 중요한 인자가 될 수 있을 것이다.

보고된 AP와 LAP와의 효소활성 비교

NaCl이 효소활성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 L-Leu-pNA을 기질로 하여 예전에 보고된 다른 AP들과 정제된 LAP의 효소활성을 비교하였다(Fig. 5). 여러 가지 농도의 염(1~4.5 M NaCl)이 존재할 경우, *Bacillus* sp. N2 유래의 LAP은 매우 안정한 효소활성을 보였지만, *Streptomyces griseus* 유래의 AP [10]와 Porcine kidney cytosol 유래의 AP에서는 NaCl의 농도가 증가함에 따라 효소활성이 감소하였다. Porcine kidney microsomal 유래의 AP는 0.5~1 M NaCl 농도에서는 효소활성이 증가하였으나, 2~4.5 M의 농도에서는 활성이 감소하였다. *Aeromonas proteolytica* 유래의 AP [9] 효소활성은 NaCl의 농도와는 무관하게 아무런 영향을 받지 않았다.

기존의 알려진 AP들과의 비교 실험 결과, *Bacillus* sp. N2 유래의 LAP가 고농도의 NaCl에서 가장 높은 효소활성을 나타내었다는 것은 가장 주목할 만한 점이다. 비록 그 기질이 LAP 활성 조사에서 서로 다르게 사용되었다 할지라도 정제된 LAP은 다른 AP들보다도 1~3배의 높은 활성을 보여주었다.

미생물 유래의 AP는 중요한 식품 처리공정에 사용되는 효

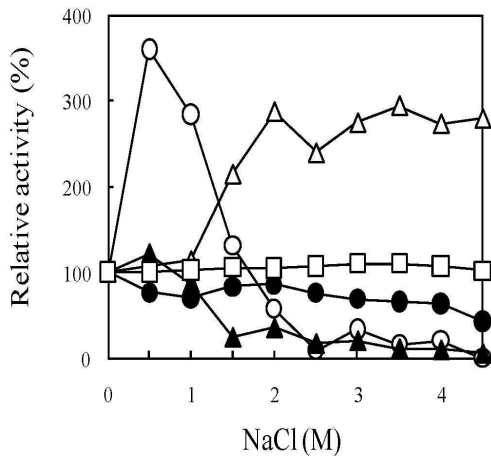


Fig. 5. Comparison of Aminopeptidases and LAPs activity in the presence of NaCl. ○, Aminopeptidase from porcine kidney microsomes; △, LAP from *Bacillus* sp. N2; □, LAP from *Aeromonas proteolytica*; ●, LAP from *Streptomyces griseus*; ▲, Aminopeptidase from porcine kidney cytosol

소이며, 식품의 단백질을 변형하기 위해 사용되고 있다. 염과 관련된 식품산업에서 이러한 효소를 사용하려면 염에 대한 안정성이 아주 중요할 것으로 사료된다. NaCl에 내성을 지닌 LAP는 치즈와 멸치 젓갈과 같은 식품 산업 공정에서 단백질 hydrolyzate의 쓴맛을 가진 펩타이드를 제거하는데 용이한 효소로 제공될 수 있을 것이다.

References

1. Cahan, R., E. Hetzroni, M. Nisnevitch, and Y. Nitzan. 2007. Purification and identification of a novel leucine aminopeptidase from *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Curr. Microbiol.* **55**, 413-419.
2. Doi, E., D. Shibata, and T. Matoba. 1981. Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Anal. Biochem.* **118**, 173-184.
3. Geoghegan, K. F., A. Galdes, and G. Hanson. 1986. Hydrolysis of peptides by carboxypeptidase A: equilibrium trapping of the ES2 intermediate. *Biochem.* **25**, 4669-4674.
4. Izawa, N., K. Tokuyasu, and K. Hayashi. 1997. Debittering

of protein hydrolysates using *Aeromonas caviae* aminopeptidase. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 543-545.

5. Kim, H. O. and E. C. Y. Li-Chan. 2006. Quantitative structure-activity relationship study of bitter peptides. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 10102-10111.
6. Lee, G. D., S. S. Chun, Y. H. Kho, and H. K. Chun. 1998. Purification and properties of an extracellular leucine aminopeptidase from the *Bacillus* sp. N2. *J. Appl. Microbiol.* **85**, 561-566.
7. Matsui, M., J. L. Flower, and L. L. Walling. 2010. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biol. Chem.* **387**, 1535-1544.
8. Morihara, K. and H. Tsuzuki. 1970. Thermolysin: kinetic study with oligopeptides. *Eur. J. Biochem.* **15**, 374-380.
9. Nowak, J. and H. Tsai. 1988. The yeast aminopeptidase Y. *Can. J. Microbiol.* **34**, 118-124.
10. Prescott, J. M. and S. H. Wilkes. 1976. *Aeromonas* aminopeptidase. *Methods Enzymol.* **45**, 530-543.
11. Spungin, A. and S. Blumberg. 1989. *Streptomyces griseus* aminopeptidase is a calcium activated zinc metalloprotein; Purification and properties of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* **183**, 471-47
12. Tan, P. S. T., T. A. J. M. Van Kessel, and F. L. M. Van De Veerdonk. 1993. Degradation and debittering of a tryptic digest from beta-casein by aminopeptidase N from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1430-1436.
13. Taylor, A. 1993. Aminopeptidase: towards a mechanism of action. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 167-172.
14. Taylor, A. 1993. Aminopeptidases: structure and function. *FASEB J.* **7**, 290-298.
15. Umetsu, H., H. Matsuoka, and E. Ichisima. 1983. Debittering mechanism of bitter peptides from milk casein by wheat carboxypeptidase. *J. Agric. Food Chem.* **31**, 50-53.
16. Van Wart, H. E. and S. H. Lin. 1981. Metal binding stoichiometry and mechanisms of metal ion modulation of the activity of porcine kidney leucine aminopeptidase. *Biochem.* **20**, 5682-5689.
17. Zevaco, C., V. Monnet, and J. C. Gripho. 1990. Intracellular X-propyl-dipeptyl peptidase from *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis*: purification and properties. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 357-366.

초록 : *Bacillus* sp. N2 유래 leucine aminopeptidase의 가수분해활성에 대한 NaCl의 영향

정동민^{1*} · 이강덕^{1*} · 전성식² · 정영철² · 전효곤^{1*}

(¹한국생명공학연구원 전북분원 생물산업공정센터, ²한국국제대학교 식품영양학과)

효소의 염에 대한 안정성은 식품산업 응용에 있어서 중요한 인자이다. 이전에, leucine aminopeptidase (LAP)은 *Bacillus* sp. N2에서 정제되었다. 본 연구에서는, LAP효소의 염 효과에 관한 연구를 수행했다. LAP은 고농도의 NaCl (4 M)에서 L-leucine- ρ -nitroanilide의 가수분해활성을 가지고 있지만, 다른 중성 염들(LiBr, LiCl, NaBr, KBr, KCl)에서는 활성이 없었다. 그 효소는 0-4 M NaCl 농도에서 C-말단 Xaa쪽에 소수성 아미노산과 친수성 아미노산을 가진 여러 di-peptide 합성 기질들을 가수분해하였는데, 이러한 결과는 LAP의 가수분해성은 기질의 Scissile bond에 있는 아미노산 사이드 체인의 소수성과는 관련이 없다라는 것을 의미한다. 또한, LAP의 가수분해활성은 4.5 M NaCl 농도에서 다른 LAP와 Aminopeptidase의 활성 보다 1-3배가 높다는 것을 보여주었다. 이러한 결과들은 NaCl에 내성을 지닌 LAP을 치즈와 멸치 젓갈과 같은 식품 산업에 응용될 수 있다는 것을 보여준다.