

양송이버섯의 粗 Trehalase의 분리와 그 성질

이 승 인 · 김 병 목

중앙대학교 식품가공학과

Properties of Crude Trehalase from *Agaricus bisporus*

Seung-In Lee and Byung-Mook Kim

Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Seoul 151, Korea

Abstract: In order to study the trehalase (EC 3.2.1.28) from mushroom, *Agaricus bisporus* Lange Sing., the crude trehalase preparation was separated by fractionation of mushroom extracts with ammonium sulfate between 0.4 and 1.0 saturation, and its properties were examined. Mushroom trehalase showed optimum pH 6.0, and optimum temperature 40°C. The enzyme was stable at pH range between 5.0 and 7.0, and at temperature below 50°C. The activities of crude trehalase had proportional relations with enzyme concentrations below 490.2 mg % of protein and with substrate concentration below $2.6 \times 10^{-3}M$, showing a Km value of 0.760 mM. The enzyme was inhibited by some metal ions such as Sn^{2+} , Ca^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , and Fe^{3+} , while Ag^+ , Ba^{2+} , and Mg^{2+} demonstrated remarkable increasing effects on the enzyme activity.

Keywords: *Agaricus bisporus*, Trehalase, Fractionation, Km value.

버섯은 감미 성분의 하나인 trehalose를 많이 함유하고 있다 (Griffin *et al.*, 1970, Hammond and Nichols, 1979). 이 trehalose는 일명 mycose 또는 mushroom sugar라고도 불리워지는데 생체내에서 trehalase라는 효소의 작용을 받아 분해되며 버섯 생육에 필요한 영양원으로 이용되고 있다.

버섯은 주지하는 바와 같이 광합성을 하지 못하므로 직접 균상내의 유기물질을 생체내의 여러 효소의 작용으로 분해하여 영양 성분으로서 섭취하고 균사의 발육과 자실체의 구성에 이용한다.

따라서 버섯중의 trehalase(α , α -trehalose glucohydrolase, EC 3.2.1.28)는 버섯의 생리 기능상 중요한 역할을 하고 있으며 특히 당대사 기구와 밀접한 관계가 있는 것은 예상하기 어렵지 않다. 그럼에도 불구하고 버섯 trehalase의 연구는 그리 많이 이루어져 있지 않은 상태이다.

필자는 양송이버섯(*Agaricus bisporus* <Lange> Sing), 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus* Quel), 표고버섯(*Lentinus edodes* <Berk> Sing) 등의 몇몇 버섯중의 trehalase 활성을 측정해본 바 양송이버섯이 trehalase 활성이 가장 큰 것을 발견하고 이 효소단백질은 중성염 용

액에서 가장 효과적으로 추출되어 나음을 발견하였다.

따라서 본 연구에서는 양송이버섯중의 trehalase를 0.5 M NaCl로 추출한 후 ammonium sulfate분획에 의해 분리된 효소표본의 효소 화학적 특성을 조사한 후 이미 연구 보고된 곤충 trehalase (Lefebvre and Huber, 1970; Paulsen, 1971), mammalian intestine trehalase (Sasajima *et al.*, 1975; 권 등, 1980), mold trehalase (Hill and Sussman, 1964; Hey and Elbein, 1968), yeast trehalase (Avigad *et al.*, 1965; Penek and Souza, 1964) 등의 성질과는 다소 다른 점이 있어 그 특성을 여기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용된 재료는 시중에서 구입한 증남 부여산 양송이버섯(*Agaricus bisporus*)을 사용하였다. 그리고 trehalose (Michigan Detroit DIF Co., USA), diethylaminoethyl (DEAE)-cellulose (Sigma Chemical Co., ion exchange capacity: 0.91 meg/g), acrylamide (Kokusan Chemical Works, Ltd., Japan), N,N'-

methylene bis acrylamide (Merck Co.) N, N', N', N'-tetramethylene diamine (TEMED, Kanto Chemical Co. Inc., Japan)을 사용하였으며 다른 시약은 모두 일급 혹은 특급을 사용하였다.

실험 방법

1) Trehalase의 추출

Trehalase를 추출하기 위하여 양송이버섯에 3 배량의 0.5 M NaCl을 가하여 Waring blender로 균질화하여 30°C에서 30 분 동안 항온시킨 다음 Cheese cloth로 짜서 다시 3,000 rpm으로 10 분 동안 원심분리 하여 그 상등액을 추출액으로 사용하였다.

2) 조(粗) Trehalase의 분리

버섯 trehalase의 추출액을 ammonium sulfate로 분획시켜 활성을 측정해 본 결과 Table I에서 보는 바와 같이 0.2~1.0 포화분획에서 모두 효소 활성이 측정되고 있으나 specific activity로 보아 대체로 trehalase 활성은 0.6~1.0 포화분획에 편중되어 있다.

따라서 본 실험에서는 추출액에 ammonium sulfate를 소량씩 가하여 0.4 포화시켜 1 주야 저온에서 방치시킨 후 7,500 rpm으로 30 분간 4°C에서 원심분리를 하였고 다시 그 상등액에 ammonium sulfate를 위와 같은 방법으로 가하여 1.0 포화시켜 1 주야 저온에서 방치한 후 동일한 조건 하에서 원심분리를 하였다. 여기서 얻은 침전을 소량의 증류수에 현탁시켜 visking tube (#30/32)에 옮긴 후 증류수로 충분히 투석시켰다. 투석한 후 이때 생성된 불용성 침전물을 제거하기 위하여 이것을 다시 원심분리를 한 후에 그 상등액을 본 실험의 조(粗) trehalase로 사용하였다.

3) Trehalase 활성측정

Trehalase 활성은 일반법(Eichhlz, 1967; 上代 等, 1983)에 의하여 측정하였다. 즉 시험관에 기질로서 1 % trehalose를 함유하는 0.1 M phosphate buffer(pH 5.5)를 0.7 ml가하여 30°C에서 10 분간 예비항온시킨 후 여기에 효소액 0.3 ml를 가하여 30°C에서 30 분간

항온시켜 가수분해시키고 이 혼합액을 2 분간 끓여서 효소작용을 중지시켰다. 이 중 0.5 ml를 취하여 Somogyi와 Nelson의 방법(Somogyi, 195; Phillip *et al.*, 1954; 福井, 1974)으로 생성된 환원당을 정량하였다.

효소 활성은 30°C에서 30 분 동안에 1 μmole의 환원당을 생성할 수 있는 효소의 양을 1 unit로 하였으며 비활성(specific activity)은 units/mg of protein으로 표시하였다.

4) Protein정량

Spectrophotometric method(Layne, 1957)과 Lowry 등의 방법(1951)에 의하여 정량하였다.

결과 및 고찰

조(粗) trehalase의 효소 화학적 성질을 검토하기 위하여 pH 및 열 의존도, pH 및 열 안정성, 효소 농도와 기질 농도에 따른 활성, 그리고 금속 이온의 영향 등을 측정한 결과는 다음과 같다.

1) pH 의존도

조(粗) trehalase에 0.1 M acetate buffer (pH 3.0, 4.0, 4.5, 5.0), 0.1 M phosphate buffer (pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0) 및 0.1 M carbonate buffer(pH 9.0)로 각각 pH를 조절한 후 trehalase 활성을 측정할 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 조(粗) trehalase는 pH 6.0에서 최대 활성을 나타냈으며 alkali 조건에서 보다는 acid 조건에서 활성이 현저히 감소하였다.

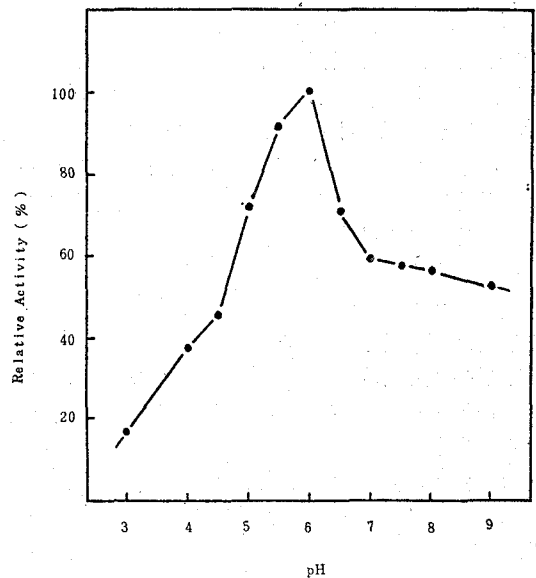


Fig. 1. Effects of pH on the activities of crude trehalase.

Table I. Trehalase activities in fractions of crude extract.

Fractions	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)	Total activity (units)
0.2	224.9	0.260	58.4
0.4	105.5	0.337	35.5
0.6	85.5	0.615	52.6
0.8	91.3	0.751	68.6
1.0	9.9	1.266	12.5

이와 같은 결과는 김 등(1981) 및 박 등 (1983)의 rabbit kidney(pH 6.0), Alexander (1973)의 *Saccharum spp.* (pH 6.0), Cadido 등 (1980)의 *Triatoma vitticeps* (pH 6.0), Paulsen (1971)의 개미의 labial gland (pH 6.1), Hisajima 등 (1981)의 persimmon (pH 6.0)에서 얻은 trehalase의 경우와 일치했다.

대체로 trehalase의 pH 의존성은 각기 분리해 낸 급원 (source)에 따라 Horikoshi와 Ikeda (1966), 住田等(1980) 등의 경우에서와 같이 pH 4.0의 낮은 pH를 나타내는 것도 있고 Patterson 등(1972)의 경우에서와 같이 pH 7.5의 높은 pH를 나타내는 것도 있으나 위의 예에서 보는 바와 같이 자연계에 존재하는 trehalase는 대부분 pH 5.2~6.9로서 본 실험의 경우와 비슷한 pH 의존성을 나타내고 있다.

2) 열 의존성

조(粗) trehalase의 작용온도를 0, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100°C로 조절하여 활성을 측정할 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 조(粗) trehalase는 40°C에서 최적 작용온도를 나타냈으며 40°C이하 저온에서 보다는 40°C이상 고온으로 온도가 상승할수록 활성이 현저히 감소하였다.

이와 같은 결과는 Friedman (1960, 1966)의 *Phormia regina* (45°C), Ceccarini (1965)의 *Dictyostelium discoideum* (45°C)과 비슷하였다. 그러나 Avigad 등 (1965)의 hybrid yeast (30°C), Panek와 Souza (1964)의 빵효모(40~50°C), Lefebvre와 Huber (1970)의

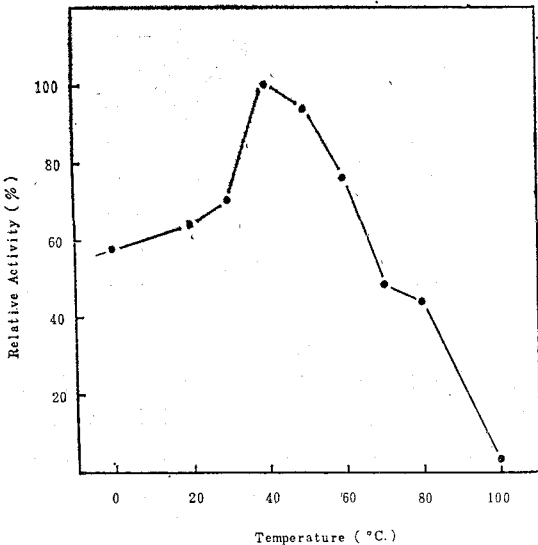


Fig. 2. Effects of temperature on the activities of crude trehalase.

honeybee (55°C), Paulsen (1971)의 개미의 labial gland (50°C), 권 등 (1980)의 Sarcoma 180 복수암에 걸린 mouse (60°C), Prasad와 Maheshwari (1978)의 *Humicola lanuginosa* (50°C) 등에서 얻은 trehalase와는 상당히 다른 열 의존도를 나타내었다.

3) pH 안정성

조(粗) trehalase에 0.1 M acetate buffer (pH 3.0, 4.0, 4.5, 5.0), 0.1 M phosphate buffer (pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0) 및 0-1 M carbonate buffer (pH 9.0)를 각각 2 배량씩 가하여 pH를 조절한 후 저온실(약 5°C)에 24 시간 방치하였다가 visking tube(#32/30)를 사용하여 3 일간 증류수에 투석시켜 buffer액은 제거한 다음 trehalase 활성을 측정할 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 조(粗) trehalase는 pH 5.0에서 7.0사이의 범위에서 안정성을 나타내었다.

이와 같은 결과는 Paulsen (1971)의 개미의 labial gland (pH 5.5~8.0), Avigad 등 (1965)의 hybrid yeast (pH 5.5~8.5), Lefebvre와 Huber (1970)의 honey bee 등에서 얻은 trehalase의 경우와 비슷하였다

4) 열 안정성

조(粗) trehalase에 기질을 제외한 반응액의 조성을 모두 가하고 0, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100°C의 각 온도에서 30 분간 항온시킨 뒤 기질을 가하고 반응시켜 효소 활성을 측정할 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 조(粗) trehalase는 50°C 이하의 온도에서 안정적이었다고 하며 그 이상의 온도에서는 trehalase 활성이 급저하되었다.

이와 같이 양송이버섯 trehalase의 열 안정성이 크지

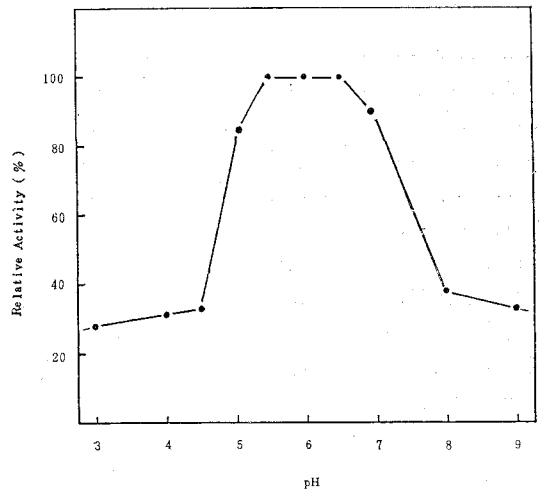


Fig. 3. pH stabilities of crude trehalase.

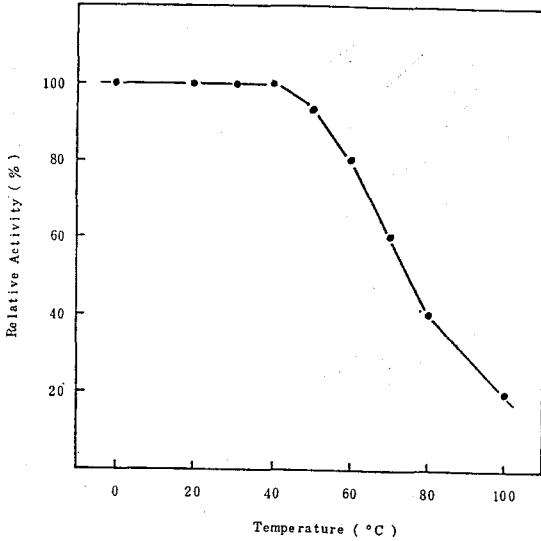


Fig. 4. Thermal stabilities of crude trehalase.

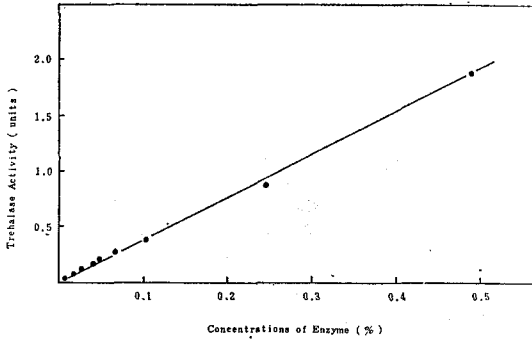


Fig. 5. Relations between the concentrations and the activities of crude trehalase.

못한 것은 Gussin과 McCormack (1970)의 *Lilium longiflorum* pollen (50°C, 30 분), Lefebvre와 Huber (1970)의 honey bee (40°C, 10 분), Avigad 등 (1965)의 hybrid yeast (40°C, 20 분), Hill과 Sussman (1964)의 *Neurospora* (60°C, 20 분) 등에서 얻은 trehalase와 비슷하였다.

5) 효소 농도 및 기질 농도와 효소 활성

효소량을 11.4에서 490.2 mg %의 범위까지 각각 달리하여 효소 활성을 측정해본 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 효소 농도에 비례하여 효소 활성이 straight curve를 그리며 증가하였다.

또 기질 농도 2.6×10^{-3} M 이하에서는 기질 농도가 증가할수록 효소활동도 비례해서 증가하였으며 Fig. 6에서 보는 바와 같이 trehalase의 기질(trehalose)에 대

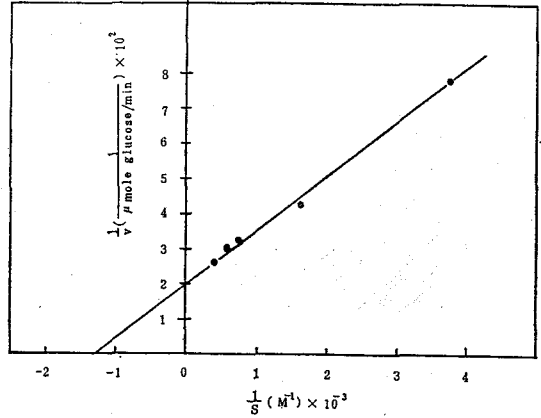


Fig. 6. Effect of substrate (trehalose) concentration on crude trehalase activity.

Table II. Effects of metal ions on the activities of crude trehalase.

Metals ($1 \times 10^{-2}M$)	Relative activities(%)
None	100.0
KCl	100.0
NaCl	104.4
AgNO ₃	194.4
SnCl ₂	26.7
CaCl ₂	71.1
HgCl ₂	24.4
BaCl ₂	153.3
MgCl ₂	111.1
CbCl ₂	35.6
CoCl ₂	106.7
CuCl ₂	26.7
MnCl ₂	40.0
Zn(NO ₃) ₂	48.9
AlCl ₃	24.4
FeCl ₃	62.2

한 Km 값은 0.760 mM 이었다.

이와 같은 결과는 Bargiello와 Grossfield (1980)의 *Drosophila melanogaster* (0.666 mM), Friedman(1960)의 *Phormia regina* (0.67 mM), Alexander (1973)의 *Saccharum spp.* (0.63 mM) 등에서 얻은 trehalase의 경우와 아주 비슷하였다. 그러나 Gussin과 McCormack (1970)의 *Lilium logiflorum* pollen (1.00 mM), Roberts와 Tovey(1969)의 *Selaginella marlensis*(1.70 mM),

Avigad 등 (1965)의 hybrid yeast(10.2 mM), Hey와 Elbein (1968)의 *Streptomyces hygroscopicus*. (18 mM), Sasajima 등 (1975)의 rat의 작은창자의 mucosa (5.4 mM) 등에서 얻은 trehalase의 경우와는 상당한 차이를 나타내었다.

7) 금속이온의 영향

금속이온이 조(粗) trehalase 활성화에 미치는 영향을 보기 위하여 여러 종류의 무기염($1 \times 10^{-2}M$) 들을 조(粗) trehalase 작용액에 각각 첨가한 후 30°C에서 30분간 항온시킨 후 trehalase 활성을 측정 한 결과는 Table II에서 보는 바와 같이 Sn^{2+} , Ca^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} 등은 $1 \times 10^{-2}M$ 농도에서 trehalase 활성화에 대하여 현저한 저해효과를 나타내었으나 같은 농도에서 Ag^{+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} 등은 trehalase 활성화에 대하여 현저한 증가 효과를 나타내었다.

이 결과는 대체로 다른 자연계 trehalase의 경우와 비슷한 성적이거나 Mg^{2+} , Ag^{+} 등에 의한 trehalase 활성화의 증가 효과는 일반적인 경우와는 특이한 것이었다 (Pank and Souza, 1964; Patterson *et al.*, 1972; Sasajima *et al.*, 1975).

적 요

버섯중의 trehalase를 연구하기 위하여 각 버섯의 활성을 측정 한 후 가장 활성이 좋은 양송이의 trehalase를 $(NH_4)_2SO_4$ 로 분획하여 조(粗) trehalase의 성질을 조사해 본 결과는 다음과 같다.

1. 조(粗) trehalase는 pH 5.0~7.0, 50°C에서 최적 작용조건을 나타내었다.
2. 조(粗) trehalase는 pH 5.0~7.0, 50°C 이하에서 안정하였다.
3. 조(粗) trehalase의 활성은 490.2 mg %이하의 효소농도 및 $2.6 \times 10^{-3} M$ 이하의 기질 농도 범위 내에서 비례적으로 증가하였다.
4. 기질(trehalose) 농도에 대한 Km 값은 0.76 mM 이었다.
5. 금속이온에 대한 조(粗) trehalase 활성은 Sn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} 에 의하여 현저한 저해효과를 나타낸 반면에 Ag^{+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} 에 의해서는 활성이 증가하였다.

문 헌

Alexander, A.G. (1973): Studies on trehalase in

Saccharum spp. leaf and storage tissues. *Plant & Cell Physiol.* 14:157-168.

Avigad, G., Ziv, O. and Neufeld, F. (1965): Intercellular trehalase of a hybrid yeast. *Biochem. J.* 97:715-722.

Bargiello, T.A. and Grossfield, J. (1980): Electrophoretic purification of soluble trehalase from *Drosophila melanogaster* by selective unstacking. *Anal. Biochem.* 101:131-137.

박세웅, 이동욱, 이희성(1983): 가토신장의 soluble form trehalase의 정제 및 특성, 중앙의대지, 8(1): 97-106.

Candido, L.M., Marechal, L.R. and Veiga, L.A. (1980): Comparative studies of trehalase from different tissues of *Triatoma vitticeps*, *Agr. Biol. Technol.* 23(3):349-362.

Ceccarini, C. (1965): Trehalase from *Dictyostelium discoideum*: purification and properties. *Science* 151: 454-456.

Eichholz, A. (1967): Structural and functional organization of the brush border of intestinal epithelial cells. III. Enzymic activities and chemical composition of various fractions of tris-disrupted brush borders. *Biochim. Biophys. Acta* 135:475-482.

福井作藏 (1974): Somgie-Nelson法, 生物化學 實驗法 還元糖의 定量法, p.10-12, 東京大學出版會.

Friedman, S. (1960): The purification and properties of trehalase isolated from *Phormia regina*, Meig. *Arch. Biochem. Biophys.* 87:252-258.

Friedman, S. (Colowick, S.P. and yaplan, N.O., ed.), (1966): Trehalase from insects. *Methods in Enzymology*, 8:600-603, Academic Press Inc., New York.

Griffin, P.F.S., Brenna, P. and Lösel, D.M. (1970): Free lipids and carbohydrates of *Agaricus bisporus* mycelium. *Biochem. J.* 119(3):11-12.

Gussin, A.E.S. and McCormack, J.H. (1970): Trehalase and the enzymes of trehalose biosynthesis in *Lilium Longiflorum* pollen. *Phytochem.* 9:1915-1920.

Hammond, J.B.W. and Nichols, R. (1979): *New Phytol.* 83:723-730.

Hey, A.E. and Elbein, A.D. (1968): Partial purification and properties of a trehalase from *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Bacteriol.* 96:105-110.

- Hill, E.P. and Sussman, A.S. (1964): Development of trehalase and invertase activity in *Neurospora*. *J. Bacteriol.* 88(6):1556-1566.
- Hisajima, S., Hasegawa, T., Ito, T. and Suzuki, T. (1981): Cell wall-bound trehalase in cultured cells of Japanese morning-glory. *Biologia Plantarum* (Praha) 23:351-355.
- Horikoshi, K. and Ikeda, V. (1966): Trehalase in conidia of *Aspergillus oryzae*. *J. Bacteriol.* 91: 1883-1887.
- Layne, E. (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., ed.), (1957): Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring Proteins. *Methods in Enzymology*, 3:447-454, Academic press Inc., New York.
- Lefehvre, Y.A. and Huber, R.E. (1970): Solubilization, purification and some properties of trehalase from honeybee. *Arch. Biochem. Biophys.* 140:514-518.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Fair, A.L. & Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- 권중만, 이희성, 이근배 (1980): Trehalase에 관한 연구(1). Sarcoma 180복수암에 걸린 mouse trehalase에 관하여. 한국식품과학회지, 13: pp.112.
- 김성환, 이동욱, 이희성 (1981): 가트신장의 Bound-form trehalase에 대하여, 중앙의대지 6:387-396.
- Panek, A. and Souza, N.O. (1964): Purification and properties of baker's yeast trehalase. *J. Biol. Chem.* 239:1671-1673.
- Patterson B.W., Ferguson, A.H., Matula, M. and Elbein, A.D. (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. ed.), (1972): Trehalase from *Streptomyces hygroscopicus* and *Mycobacterium smegmatis*. *Methods in Enzymology*, 28:996, Academic Press Inc., New York.
- Paulsen, R. (1971): Characterization of trehalase from labial glands of ants. *Arch. Biochem. Biophys.* 142:170-176.
- Phillip, B.H., Bernand, L.O. and William, H.S. (1954): *Practical Physiol. Chem.*: 573, The Blanton Co. Inc., New York
- Prasad, A.S. and Maheshwari, R. (1978): Purification and properties of trehalase from the *thermophilic fungus Humicola lanuginosus*. *Biochem. Biophys. Acta* 525:162-170.
- Roberts, R.M. and Tovey, K.C. (1969): Trehalase activity in *Selaginella mortensii*. *Arch. Biochem. Biophys.* 133:408-412.
- Sasajima, K., Kawachi, T., Sato, S. and Sugimura, T. (1975): Purification and properties of α, α -trehalase from the mucosa of rat small intestine. *Biochem. Biophys. Acta* 403:130-146.
- Somogyi, M. (1952): Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195:19-23.
- 住田光夫, 横江正明, 村尾澤夫 (1980): Trehalase의 製造方法, 日本公開特許公報, 昭 55-9705.
- 上代淑人, 徳重正信, ハホ速彦, 一島英治 (1983): α, α -trehalase. 酵素 Handbook 503, 朝倉書店.

<Received June 9, 1986; Accepted July 1, 1986>