

한국산 고등균류에 관한 연구 (제 2보) 양송이 중의 단백분해효소 활성

은재순[†]·양재현·조덕이·이태규·박인화

전주우석대학
(1989년 2월 8일 접수)

Studies on Higher Fungi in Korea (II) Proteolytic Enzyme of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing.

Jae Soon Eun[†], Jae Heon Yang, Duck Yee Cho, Tae Kyu Lee and In Hwa Park
Jeonju Woosuk University, Jeonju 565-800, Korea
(Received February 8, 1989)

In order to study the protease from *Agaricus bisporus* (Lange), the crude protease preparation was separated by fractionation of mushroom extracts with ammonium sulfate. It was found that extracts from *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. contained protease. The optimum pH of the enzyme was 6.0, and the pH range at which the enzyme was stable was 4.0 to 7.0. The optimum temperature at which the enzyme showed the highest proteolytic activity was 50 °C, while the enzyme was instantly inactivated at about 60 °C. The enzyme activity was inhibited by Ag⁺, Hg²⁺, Cu²⁺, Ba²⁺, Fe³⁺, Co²⁺, Ca²⁺, Pb²⁺, Mg²⁺ and Mn²⁺. The K_m value was 0.32 mM with Hammarsten casein.

Keywords—*Agaricus bisporus* (Lange) Sing., protease, proteolytic enzyme activity, optimum pH, stability, optimum temperature, K_m value.

버섯은 식품으로 뿐만 아니라 각종 질병의 치료와 예방에 사용되어 왔기 때문에 버섯 중에 함유된 여러 성분의 약리작용¹⁻²⁾ 및 효소화학적 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 식용버섯 중에 함유된 각종 효소에 대한 연구로는 Park³⁾ 및 Hong 등^{4,5)}의 cellulase에 관한 보고와 Ezmat 등⁶⁾의 amylase에 관한 보고 등 다수가 있다.

한편 Lee⁷⁾ 및 Park⁸⁾ 등의 식용버섯 중 protease에 관한 보고에 의하면, 능이 (*Sarcodon aspratus*) 중에 함유된 protease의 활성이 기존 protease에 비하여 활성이 크며, Eun 등⁹⁾은 능이 중에 함유된 protease의 활성이 소화효소제로 시판되고 있는 제품의 단백분해력보다 강력하다고 보고하였다.

저자 등은 식용버섯 중에 함유된 소화효소들을 검색하여 새로운 소화효소제를 검색하여 새로운 소화효소제를 개발하고자 전보⁹⁾에 이어 식용으로 사용하고 있으며 재배가 가능한 양송이 [*Agaricus bisporus* (Lange) Sing.]를 실험재료로 선택하였다.

양송이에 대한 연구로는 Lee 등¹⁰⁾의 trehalase, Kim 등¹¹⁾의 지방산 성분에 관한 것이 있고, 주로 Kim 등¹²⁾ 및 Cha 등¹³⁾의 재배에 관한 보고가 있을 뿐 소화효소에 관한 효소화학적 연구는 거의 보고된 바 없다. 이에 저자 등은 양송이로부터 소화효소를 분리한 후 효소에 대한 최적 pH, 최적 온도, pH 안정성, 열 안정성, 금속 이온의 영향과 기질 특이성에 대해 검토함으로써 소화효소제로서

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

의 개발 가능성을 검토하였다.

실험방법

재료 및 기기

본 실험에 사용된 양송이는 전북 완주군에서 채취된 것을 구입하여 -50°C 로 동결건조한 후 4°C 로 보관하면서 시료로 사용하였으며, 시약으로 Hammarsten 카제인(분자량 87,000, Merck Co.) folin-ciocalteau(Hayashi Co., Ltd.), 헤모글로빈, 우혈청알부민 및 사이토크롬 C(Sigma Co., Ltd.)를 사용하였고 그 밖의 시약은 시판 특급품을 사용하였다.

기기로는 homogenizer(Dupont/Sorvall Omni mixer), 원심분리기(Hansin Med. Co., HC-16), 초원심분리기(Hitachi 70P-72), 동결건조기(Labconco Ltd.), 흡광도측정기(Bausch & Lomb spectronic 21)를 썼다.

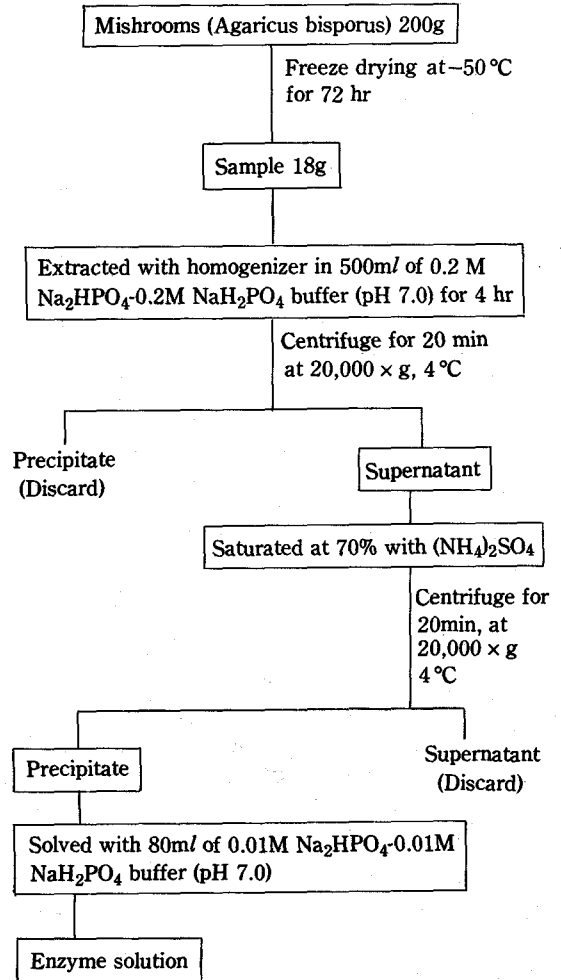
시료의 조제

Scopes¹⁴⁾의 방법에 준하여 양송이 200g을 동결건조기로 3일 동안 -50°C 에서 동결건조한 후 건조된 버섯 18g을 분쇄하여 80호 체를 통과시킨 다음 0.2M 인산염완충액(pH 7.0) 500 ml를 넣고 homogenizer로 300 rpm에서 4시간 동안 마쇄하고 $20,000\times\text{g}$ 로 20분간 원심분리한 후 상정액을 취하여 조효소액으로 하였다.

조효소액에 황산암모늄을 넣어 70% 포화용액이 되도록 하고 4°C 에서 12시간 방치한 후 이 용액을 $20,000\times\text{g}$ 로 20분간 원심분리하여 상정액을 제거한 다음 침전물을 0.01M 인산염완충액(pH 7.0) 80 ml로 용해시켜 효소액으로 사용하였다(Scheme 1).

단백분해효소의 활성 측정

기질용액의 조제는 pH 3.0~5.5까지는 0.1M citrate-0.1M Na_2HPO_4 완충액을, pH 6.0~8.0까지는 0.1M Na_2HPO_4 -0.1M NaH_2PO_4 완충액을, pH 9.0~10.0까지는 0.1M Na_2CO_3 -0.1M NaHCO_3 완충액을 사용하여 기질로 카제인 1.5g을 각각의 완충액 80 ml에 넣고 가운하면서 녹인 다음 pH를 조절하고 완충액을 넣어 100 ml로 한 액을 기질용액으로 하였다.



Scheme 1—Schematic diagram for the preparation of enzyme solution.

protease의 활성측정은 folin 비색법¹⁵⁾으로 행하였다. 즉 1.5% 카제인 용액 1 ml를 50°C 수욕 중에서 5분간 가운한 후 효소액 0.3 ml를 넣고 50°C 에서 20분간 반응시킨 후 0.4 M 트리클로로초산 2 ml를 넣어 반응을 중지시킨 다음 50°C 에서 15분 방치한 후 $3,000\times\text{g}$ 에서 10분간 원심분리하여 상정액 1 ml를 취해서 0.4 M 탄산나트륨용액 5 ml 및 묽은 folin 용액(1→3) 1 ml를 넣어 50°C 에서 15분간 정색시킨 후 물을 대조로 하여 파장 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편 대조시험은 1.5% 카제인용액 1 ml를 취하여 50°C 에서 5분간 가운한 후 0.4 M 트리클로로초산 2 ml, 효

소액 0.3ml를 순차적으로 가하여 50°C에서 15분 방치한 후 3,000×g에서 10분간 원심분리한 뒤 상장액 1ml를 취해서 상기와 동일한 방법으로 측정하여 그 차로써 효소활성을 산출하였다.

본 실험에서는 최대활성을 100으로 하여 상대활성으로 표시하였다.

pH에 따른 단백질화효소의 활성 측정

효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 관찰하기 위하여 pH 3.0~10.0의 상기 여러 완충액을 사용하여 앞의 방법에 따라 효소의 활성을 측정하였다.

온도에 따른 단백질화효소의 활성 측정

효소활성에 미치는 온도의 영향을 관찰하기 위하여 0.1M 인산염완충액 (pH 6.0)으로 1.5% 카제인 용액을 조제한 후 30~70°C의 온도범위에서 앞의 방법에 따라 효소의 활성을 측정하였다.

단백효소의 pH별 안정성 실험

본 효소용액의 pH에 따른 안정성을 관찰하기 위하여 pH 3.0~5.0은 0.1M citric acid-0.1M Na₂HPO₄ 완충액을, pH 6.0~8.0은 0.1M Na₂HPO₄-0.1M NaH₂PO₄ 완충액을, pH 9.0~10.0은 0.1M Na₂CO₃-0.1M NaHCO₃ 완충액을 써서 1.0의 pH 간격으로 pH 3.0~10.0의 범위에서 각각의 완충액 0.3ml와 효소액 0.3ml를 혼합하여 40°C에서 1시간 및 3시간을 보존한 뒤, 기질액에 상기와 같이 보존한 효소액을 넣고 앞의 방법에 따라 50°C에서 효소의 활성을 측정하였다.

단백소화효소의 열 안정성 시험

본 효소의 열에 대한 안정성을 관찰하기 위하여 효소액을 40~70°C의 범위에서 10°C 간격으로 10분, 20분, 30분, 40분, 50분 및 60분 동안 열처리하였다가 급냉시켜 앞의 방법에 따라 효소의 활성을 측정하였다.

금속 이온의 공존시 단백질화효소의 활성 측정

금속 이온이 본 효소의 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 CaCl₂, Co(NO₃)₂·6H₂O, MgSO₄·7H₂O, CuSO₄·5H₂O, ZnSO₄·7H₂O, HgCl₂, FeCl₃·6H₂O, BaCl₂·2H₂O, AlCl₃·6H₂O, AgNO₃, Pb(NO₃)₂ 및 MnCl₂·4H₂O의 12종의 금속염을 0.01M 용액으로 조제한 후 0.3ml를 취해 효소액 0.3ml와 혼합하여 반응액 중의 금속 이온의 농도가 0.005M이 되게 하고

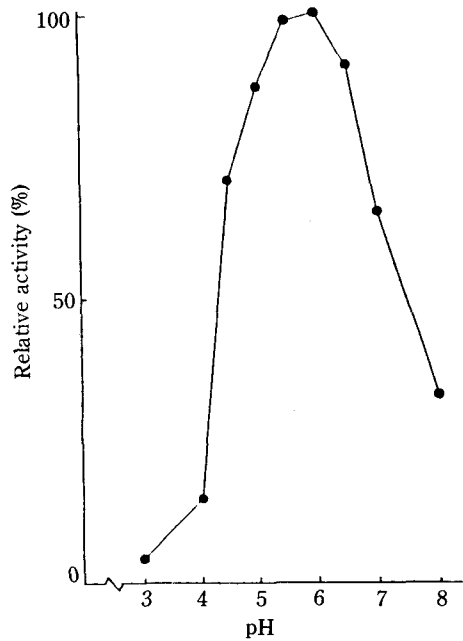


Figure 1 — Effect of pH on protease activity of *Agaricus bisporus*. The reaction was carried out at 50°C for 20 min. Buffers used were 0.1M citric acid-0.1M Na₂HPO₄ buffer (pH 3.0 to 5.5) and 0.1M Na₂HPO₄-0.1M NaH₂PO₄ buffer (pH 6.0 to 8.0).

40°C의 수욕에서 1시간 방치한 후 급냉시켜 앞의 방법에 따라 효소의 활성을 측정하였다.

단백소화효소의 기질 특이성 시험

본 효소의 기질에 대한 특이성을 관찰하기 위해 기질로서 Hammarsten 카제인, 사이토크롬 C, 헤모글로빈, 우혈청알부민을 사용해서 반응액 중의 각 기질의 농도가 0.5%되게 하고 앞의 방법에 따라 효소의 활성을 측정하였다. 또 기질 중에서 활성이 높은 Hammarsten 카제인에 대한 본 효소의 Michaelis 정수(K_m)는 0.5, 0.25, 0.10, 0.05 및 0.025mM의 카제인 용액에서 초기반응 속도를 구하여 Lineweaver-Burk 플롯트를 하여 구하였다.

실험결과 및 고찰

단백소화효소의 최적 pH

본 효소의 최적 pH를 구하기 위해 pH 3.0에서 pH 8.0까지 각 pH별로 효소활성을 검토한 결과 본 효소는 pH 6.0 부근에서 최대 활성을 나타내었

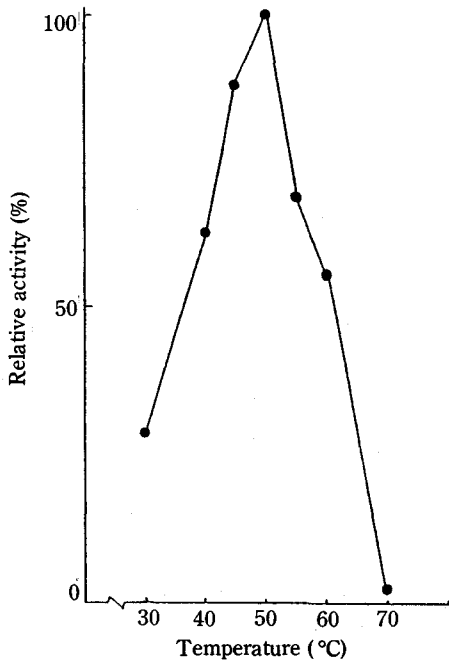


Figure 2—Effects of temperature on protease activity of *Agaricus bisporus*. The reaction was carried out at various temperatures for 20 min.

으며 pH 8.0에서는 33%로 활성이 감소하였고, pH 4.5까지는 71%로 비교적 완만하게 활성이 감소된 것으로 보아 본 효소는 acidic protease인 것으로 추정되었다(Fig. 1).

단백소화효소의 최적온도

본 효소활성의 최적온도를 알기 위해 카제인을 기질로 하여 온도별 효소의 활성을 검토한 결과 50°C 부근에서 최대활성을 나타내었으며 40°C에서는 60%로 활성이 감소하였고, 60°C에서는 56%로 활성이 감소되었다(Fig. 2).

단백소화효소의 pH별 안정성

pH 안정성을 검토한 결과 효소를 각 pH별로 40°C에서 1시간 및 3시간씩 보존하였을 때 pH 5.0 부근에서 가장 안정하였고 1시간의 경우 pH 4.0~7.0까지는 비교적 안정되었으나 pH 3.0에서는 31%의 활성을 나타내었고, pH 10.0에서는 11%의 활성을 나타내었다. 3시간 보존하였을 때는 1시간 보존하였을 때보다 전체적으로 활성이 약간 감소하였으나, 1시간의 경우와 마찬가지로 pH 4.0~7.0까지는 비교적 안정하였고 pH 3.0에서는 14%의 활성을 보인 반면 pH 8.0 이상에서는 효소

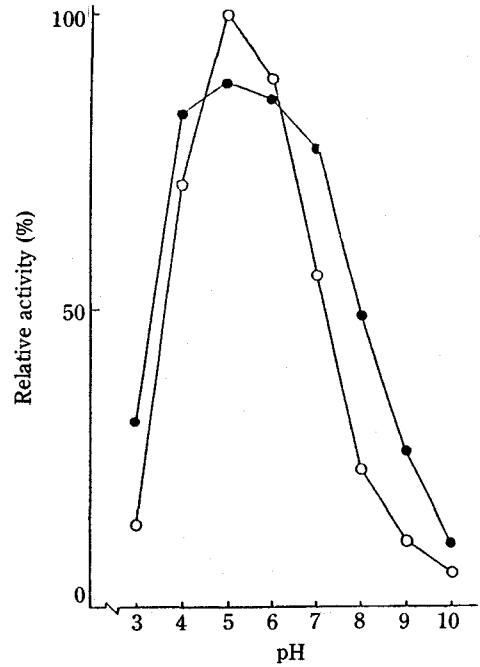


Figure 3—Effect of pH on protease stability of *Agaricus bisporus*. The enzyme solutions having various pH values were incubated for 1 (●) and 3 hr (○) in 0.1M citric acid- Na_2HPO_4 buffer (pH 3.0 to 5.0), 0.1M Na_2HPO_4 -0.1M NaH_2PO_4 buffer (pH 6.0 to 8.0) and 0.1M Na_2CO_3 -0.1M NaHCO_3 buffer (pH 9.0 to 10.0).

의 활성이 급격히 감소하며 pH 10.0에서는 6%의 활성을 나타내었다. 이상의 결과로 미루어 보아 본 효소는 약산성 부근에서 안정한 것으로 보인다(Fig. 3).

단백소화효소의 열 안정성

본 효소의 열 안정성을 검토하기 위해 효소액을 여러 온도에서 60분간 보존하면서 경시적으로 잔존활성을 측정된 결과 40°C 이하에서는 처음 활성을 그대로 유지하였으며, 50°C에서도 활성의 저하가 심하지 않았으나, 60°C에서는 10분 보존시에 불활성화율이 73%이었고, 70°C에서는 거의 완전히 실활되었으며, 60분 보존하였을 때는 효소활성이 60°C 이하에서도 상당히 감소되는 것으로 보아 열에 대하여 매우 불안정함을 알 수 있었다(Fig. 4).

금속 이온이 단백질소화효소의 활성에 미치는 영향

여러가지 금속 이온이 본 효소에 미치는 영향을

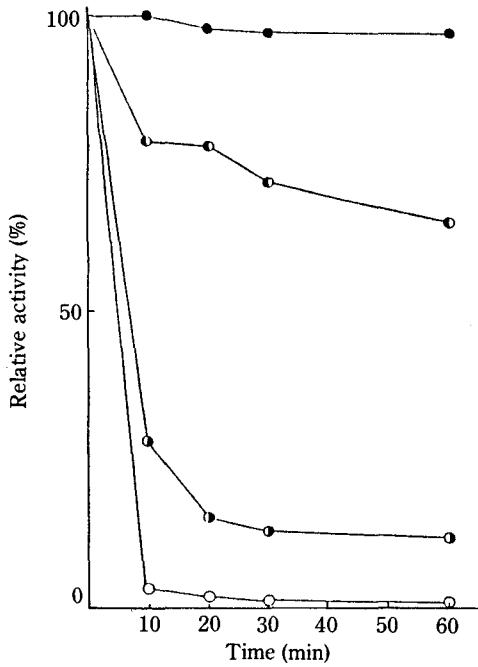


Figure 4—Thermal stability of protease of *Agaricus bisporus*. The enzyme solutions were heated at 40(●), 50(○), 60(●) and 70°C (○) in 0.1M Na₂HPO₄-0.1M NaH₂PO₄ buffer (pH 7.0).

Table I—Effects of Metal Ions on Protease Activity of *Agaricus bisporus*.

Metal ion	Relative activity (%)
None	100.0
Ca ²⁺	76.8
Co ²⁺	75.5
Mg ²⁺	77.9
Zn ²⁺	94.3
Cu ²⁺	40.7
Hg ²⁺	37.2
Fe ³⁺	69.6
Ba ²⁺	63.3
Al ³⁺	91.3
Ag ⁺	20.5
Pb ²⁺	77.4
Mn ²⁺	78.7

The final concentration of metal ions in the reaction mixture was about 0.005M.

조사하였다. FeCl₃·6H₂O 등 12종의 금속염용액 0.3ml를 반응액에 가하여 금속염의 최종농도가

Table II—Substrate Specificity of Protease.

Substrate	Relative activity (%)
Casein	100.0
Hemoglobin	53.1
Cytochrome C	34.7
Bovine serum albumin	10.7

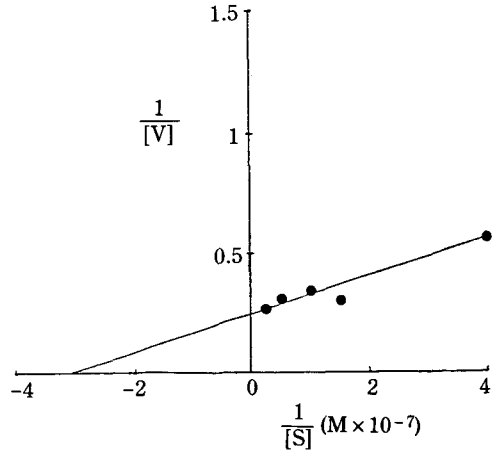


Figure 5—Lineweaver-Burk plot for the hydrolysis of Hammarsten casein.

0.005 M이 되도록 한 후 효소활성을 검토한 결과 Ag⁺ > Hg²⁺ > Cu²⁺ > Ba²⁺ > Fe³⁺ 순서로 효소활성을 저해하였으며 Zn²⁺과 Al³⁺에 의해서는 별로 영향을 받지 않았다. 따라서 본 실험에 사용한 12종의 금속 이온 중에서는 효소활성을 증강시키는 이온은 없었다 (Table I).

단백소화효소의 기질 특이성

본 단백질소화효소의 기질 특이성을 알기 위해 기질로서 Hammarsten 카제인, 사이토크롬 C, 헤모글로빈 및 우혈청 알부민을 사용해서 가장 높은 효소활성을 나타낸 Hammarsten 카제인에 대한 활성도를 100으로 하여 백분율로 계산하였다 (Table II).

또 기질 중에서 활성이 높은 Hammarsten 카제인에 대한 본 효소의 Michaelis 정수 (K_m)를 구하였다. 즉 카제인의 각기 다른 농도에서의 초기 반응속도를 구하여 Lineweaver-Burk 플롯트를 하여 K_m값을 구한 결과 0.32 mM이었다 (Fig. 5).

결 론

1. 양송이 중의 protease의 최적 pH는 6.0이 있으며 최적온도는 50°C 이었다.

2. 양송이 중의 protease는 pH 4.0~7.0의 범위에서 안정하였으며, 50°C 이하의 온도에서는 비교적 안정하나 60°C 이상의 온도에서는 열에 의하여 급격히 실활되었다.

3. 양송이 중의 protease의 활성에 미치는 금속 이온의 영향은 $Ag^+ > Hg^{2+} > Cu^{2+} > Ba^{2+} > Fe^{3+}$ 순으로 활성을 저해하였으며 Zn^{2+} 과 Al^{3+} 은 별로 영향을 미치지 않았다.

4. 양송이 중의 protease의 Hammarsten 카제인에 대한 K_m 값은 0.32 mM 이었다.

감사의 말씀

이 논문은 1986년도 문교부 대학 부설연구소 지원 학술연구조성비의 일부로 연구되었으며 이에 감사드리는 바이다.

문 헌

- 1) F.S. Vogel, S.J. McGarry, L.A. Kemyer and D.G. Graham, Bacteriological properties of a class of quinoid compound related to sporulation in the mushroom, *Agaricus bisporus*, *Am. J. Pathol.*, **76**, 165 (1974)
- 2) T. Ikekawa, N. Uehara, Y. Meada, M. Nakamishi and F. Fokouka, Antitumor activity of aqueous extracts of some edible mushrooms, *Cancer Res.*, **29**, 734 (1969)
- 3) W.H. Park, Studies on enzymes of the higher fungi of Korea(IV). Isolation and enzymatic properties of cellulase from wild *Cryptoderma citrinum*, *Kor. J. Pharmacogn.*, **19**(1), 28 (1988)
- 4) J.S. Hong, T.B. Uhm, G.T. Jung and K.B. Lee, Studies on the enzymes produced by *Pleurotus sajor-caju*(I). The production of cellulolytic enzymes. *Kor. J. Mycol.*, **12**(2), 59 (1984)
- 5) J.S. Hong, J.Y. Lee, D.H. Kim and G.S. Lyu, Studies on characteristics of the cellulolytic enzymes produced by *Pleurotus sajor-caju*, *Kor. J. Mycol.*, **12**(4), 133 (1984)
- 6) M. Ezmat, E. Ialaki and M.A. Hamza, *Food Chem.*, **4**(3), 203 (1979)
- 7) T.K. Lee, Purification and some characteristics of the proteolytic enzyme in fruit-body of *Neungee* [*Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito.] *J. Korea Soc. Food Nutr.*, **15**(3), 276 (1986)
- 8) W.H. Park, Studies on enzymes of the higher fungi of Korea (I). Identification of protease *Sarcodon aspratus*, *Kor. J. Mycol.*, **14**(1), 25 (1986)
- 9) J.S. Eun, J.H. Yang, D.Y. Cho and T.K. Lee, Studies on higher fungi in Korea (I). Activity of proteolytic enzyme from *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **18**(3), 125 (1988)
- 10) S.I. Lee and B.M. Kim, Properties of crude trehalse from *Agaricus bisporus*. *Kor. J. Mycol.*, **14**(3), 209 (1986)
- 11) B.K. Kim, M.H. Lee and M.J. Shim, Studies on the constituents of the higher fungi of Korea (IX). Fatty Acids from *Agaricus bisporus*, *Kor. J. Mycol.*, **6**(1), 5 (1978)
- 12) G.P. Kim, D.Y. Cha and H.S. Chung, Some factors affecting growth of *Diehlomyces microsporus* and chemical control of truffle disease in cultivation of *Agaricus bisporus*, *Kor. J. Mycol.*, **9**(1), 31 (1981)
- 13) D.Y. Cha, J.S. Park, and G.C. Shin, Effects of some environmental factors on the mycelial growth and mushroom yield of *Agaricus bisporus*, *Kor. J. Mycol.* **9**(1), 7 (1981)
- 14) P.K. Scopes, The extract in the techniques for protein purification, in *The Techniques in the Life Sciences*, Elsevier North-Holland, New York, 1978, B101/2
- 15) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)