

한국산 고등균류에 관한 연구(제 3보) 능이 중의 단백질 가수분해효소의 정제 및 안정성

이태규[†]·은재순·양재현·조덕이·양희천

전주우석대학

(1989년 5월 13일 접수)

Studies on Higher Fungi in Korea (III) Purification and Stability of Proteolytic Enzyme in *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito

Tae Kyoo Lee[†], Jae Soon Eun, Jae Heon Yang, Duck Yi Jo and Hee Cheon Yang

Jeonju Woosuk University, Jeonju 565-800, Korea

(Received May 13, 1989)

The proteolytic enzyme extracted from Neungee [*Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito] was purified by using Tris-acryl CM-cellulose column chromatography and chromatofocusing. The specific activity of the purified enzyme increased 15.8 times as compared with that of the crude enzyme. The enzyme was homogeneous on polyacrylamide gel electrophoresis and stable at pH values ranging from 4.0 to 10.8. The enzyme activity remained unchanged when the mushroom and the purified enzyme were stored for 3 years and 6 months at 4°C, respectively. The enzyme was found to be an endogeneous protease.

Keywords— *Sarcodon aspratus*, Neungee, proteolytic enzyme, endogeneous protease, stability

버섯은 여러 영양소가 함유되어 있고 특유한 풍미가 있기 때문에 식품으로서 널리 이용되어 왔으며¹⁻³⁾ 최근에는 버섯의 항균성,⁴⁾ 항암효과⁵⁾ 및 효소⁶⁻⁸⁾ 등에 대한 연구가 활발해지면서 버섯에 대한 관심이 높아지고 있어, 이에 따라 버섯의 수요량도 점진적으로 증가하는 경향이다.

식용버섯 중 한국과 일본에 자생하고 있는 능이가 농산촌에서 육류를 먹고 체하였을 때 가정의 단방약으로 사용되어 왔고 또한 육류요리시 사용되어 왔던 점을 중시하여 실험한 결과 다량의 단백질 가수분해효소가 함유되어 있음을 밝혀내었으며,⁹⁾ 소화효소제로 시판되고 있는 제품의 단백질분해력보다 강력함을 보고하였다.¹⁰⁾

단백질 가수분해효소는 세포내 반응에서 소화,

전이, 효소와 호르몬 및 많은 독소활성에 중요한 역할을 하며, 물리화학적 가수분해에 비하여 부반응이 없고 촉매활성이 크기 때문에 미생물이나 동식물체로부터 추출하여 식품·의약품 공업에 널리 이용되고 있다.¹¹⁻¹⁵⁾

그러나 아직도 그 자원의 제한성과 효소의 독성 및 안정성 등이 충분히 검토되어야 하는 문제점이 있다. 본 실험은 능이 중의 효소를 추출 정제하여 저장기간에 따른 안정성 등을 검토하여 그 결과를 보고하는 바이다.

실험방법

재료 및 기기

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

본 실험에 사용된 능이는 1985년 9월 전북 진안 군에서 채취된 것을 양건, 음건 및 동결건조하여 -50°C , 4°C 및 상온으로 보관하면서 시료로 사용하였다. papain, bromelain, pepsin, trypsin 및 전기영동시약은 Sigma 사 제품을 사용하였고 그밖의 시약은 특급을 사용하였다.

기기로는 homogenizer (DuPont/Sorval OMNI Mixer, U. S. A.), 전기영동장치 (Pharmacia, Sweden), 칼람크로마토그래프장치 (LKB, Sweden), Spectronic 21 (B/L, U. S. A.), 원심분리기 (Hitachi, Japan) 및 동결건조장치 (Labconco, U. S. A.)를 사용하였다.

효소의 활성 측정

전보⁸⁾의 방법에 준하였다.

단백질 농도 측정

우 혈청알부민을 표준 단백질로 하여 Lowry 등⁹⁾의 방법으로 측정하였다.

시료의 조제

전보⁸⁾의 방법에 준하였다.

효소의 정제

조효소의 추출, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 에 의한 분획, Tris-acryl CM-cellulose 칼람크로마토그래피는 전보⁸⁾의 방법에 준하였고, chromatofocusing은 Pharmacia사의 Chromatofocusing with Polybuffer and PBE manual에 준하여 Pharmacia column SR 10/50에 0.025 M 염산 트리에틸아민 (pH 11.0)으로 평형화시킨 후 탈기시킨 polybuffer exchanger 118 gel을 reservoir를 이용해 bed 높이가 30 cm가 되도록 충전하였다. 이와 같이 충전된 칼람에 Tris-acryl CM-cellulose에서 정제된 효소를 위와 동일한 완충액에 녹여 (10 mg/ml) 3 ml를 주입한 후 0.0075 mmol/pH unit/ml pharmalyte pH 8-10.5-HCl (pH 8.0)를 15 cm/hr로 gradient elution시켰다. 분획 수집기로 활성부위를 모아 pH를 측정 후 효소액에 존재하는 polybuffer를 제거하기 위하여 80% 황산암모늄 용액을 넣어 4°C 에서 1시간 방치하여 침전시키고 이를 14,000×g로 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 이와 같이 회수된 침전물을 증류수에 하루밤 투석 동결건조시켜 정제효소(이하 본효소)로 하였다.

전기영동

전보⁸⁾에 준하여 cathodic slab polyacrylamide 겔 전기영동을 행하였다. 겔의 농도는 T 10%, C 2.63%이며, 시료용 완충액은 0.06 M KOH-0.375 M CH_3COOH (pH 4.3)이고, 전기영동 완충액은 시료용 완충액을 pH 4.0으로 조절하여 사용하였다. tracking dye로는 염기성 fuchsin을 사용하여 120 volts, 15°C 에서 전기영동하여 tracking dye가 12 cm 이동한 후 겔을 10% sulphosalicylic acid 수용액에서 30분간 단백질을 고정하였다. 단백질을 고정한 후 0.1% coomassie blue R-250을 함유하는 25% 메탄올·10% 초산·물 혼합액에서 24 volts로 45분간 염색하고, 이어 24 volts로 50분간 탈색하였다.

pH 안정성

pH 3.0에서 pH 11.8까지의 여러 완충액에 효소액을 가하여 혼합한 후 40°C 에서 2시간 및 4시간 보존하였다. 잔존활성은 0.1 M 탄산수소나트륨 완충액 (pH 10.1)에 0.6%되게 카제인을 용해시킨 기질액에 상기와 같이 보존한 효소액을 가하고 전체의 pH를 10.1로 조절한 다음 측정하였다.

저장기간에 따른 안정성

음건, 양건 및 동결건조시킨 버섯을 -50°C , 4°C 및 상온으로 밀봉저장하면서 효소를 추출하여 그 활성도를 비교하였다.

또한 완전히 정제된 효소를 50 mM 인산염 완충용액 (pH 7.0)에 녹여 4°C 에서 보관하면서 6개월 간에 걸쳐 그 활성도 변화를 비교하였다.

HPLC에 의한 Peptide Map의 비교

Wilson 등¹⁷⁾의 방법에 준하여 카제인을 기질로 하여 능이의 효소는 pH 10.1 및 27°C , papain은 pH 7.0 및 50°C , bromelain은 pH 4.5 및 45°C ,

Table I—Conditions Peptide Separation.

Instrument: Waters HPLC
Detector wavelength: 214 nm
Column: μ Bondapak C ₁₈ 3.7mm × 30cm
Solvent: A 0.05% TFA
B 0.05% TFA in 60% acetonitrile
Flow rate: 1 ml/min

Table II—Purification of the Proteolytic Enzyme from *Sarcodon aspraus*.

Purification	Total protein (mg)	Total activity	Specific activity (O.D./mg·protein)	Purification fold	Yield (%)
Crude extract	620.0	4,906	7.9	1.00	100.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation (40-70%)	261.5	4,521	17.3	2.19	92.2
Tris-acryl CM-cellulose	110.5	4,080	36.9	5.05	83.2
Chromatofocusing	30.5	3,810	124.9	15.81	77.7

pepsin은 pH 2.0 및 37°C, trypsin은 pH 7.5 및 35°C에서 각각 20, 40, 60분간 작용시켜 0.45 μm 필터로 여과한 후 Table I과 같은 분석조건에서 펩타이드를 분리하였다.

실험결과 및 고찰

효소의 정제

효소의 정제 결과는 Table II와 같다. 이에서 보는 바와 같이 Tris-acryl CM-cellulose 칼럼크로마토그래피까지의 정제과정을 거침으로써 버섯특유의 갈변색소 및 냄새를 완전히 제거할 수 있었고, 수율이 83.2%로 양호한 회수율을 보였다. 전보⁹⁾의 정제과정인 겔 및 hydroxyl apatite 칼럼크로마토그래피와 flat bed electrofocusing를 chromatofocusing의 한 단계로 줄임으로써 회수율 증가와 specific activity의 저하를 방지할 수 있었다. 또한 chromatofocusing 한 결과 능이 중의 단백질 가수분해효소는 pH 9.8 부근에서 용출됨으로써 전보⁹⁾에서 측정된 pI point와 같은 값을 보였다. 정제된 효소를 전기영동한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 단일 band를 나타내어 거의 완전히 정제되었음을 알 수 있었다.

pH 안정성

Fig. 2에서 보는 바와 같이 pH 별 효소의 안정성은 40°C에서 2시간 및 4시간씩 보존하여 잔존활성을 측정한 결과 모두 pH 7.0 부근에서 가장 안정하였다. 2시간 보존한 경우 pH 4.0-10.8까지는 활성이 거의 감소하지 않았으며, pH 3.0에서는 70%의 활성을 나타내었으나 pH 11.8에서는 40%의 활성을 나타내었다. 4시간 보존하였을 때는 pH 4.0-10.8까지는 2시간 보존했을 때보다 pH

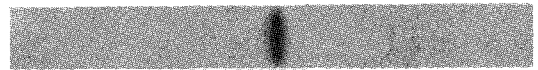


Figure 1—Separation of purified proteolytic enzyme by cathodic PAGE.

Gel concentration: T 10%, C 2.63%
 Sample buffer: 0.06M KOH-0.375M CH₃COOH (pH 4.3)
 Gel buffer: same as sample buffer
 Electrophoresis buffer: 0.06M KOH-0.375M CH₃COOH (pH 4.0)
 Electrophoresis conditions: 120 volts, constant voltage
 Fixation: 30 min in 10% sulphosalicylic acid
 Staining: 50 min at 24 volts in 0.1% coomassie blue R-250 in the mixture of 25% CH₃OH, 10% CH₃COOH, and distilled water (v/v/v)
 Destaining: electrophoresis at 24 volts for 50 min in the above staining solution without coomassie blue R-250.

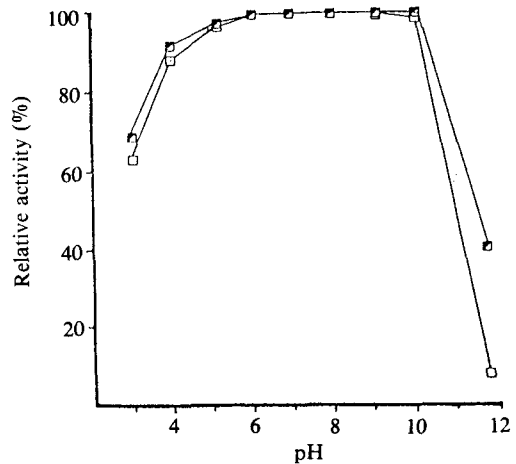


Figure 2—Stability of the enzyme in Neungee at various pH conditions.

The enzyme solutions were incubated in 0.1M citrate-Na₂HPO₄ buffer (pH 3.0 to 6.0), 0.2M sodium phosphate buffer (pH 7.0 to 8.0), 0.1M sodium bicarbonate buffer (pH 9.0 to 10.1) and 0.1M NaOH-borate buffer (above pH 10.8) at various pH conditions for 2 (■) and 4 (□) hr.

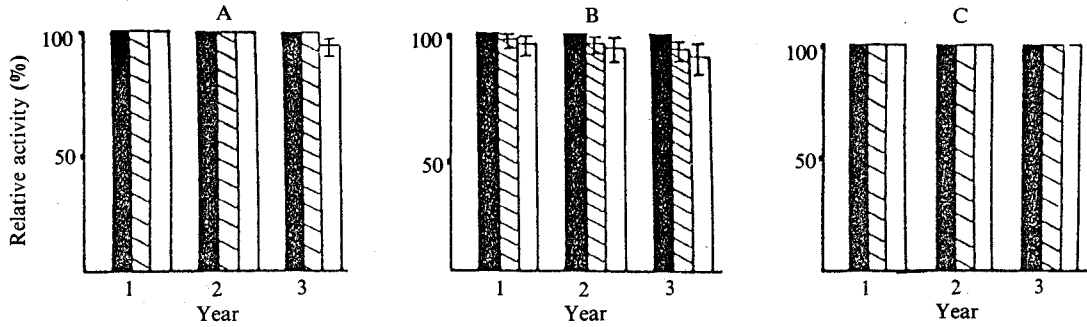


Figure 3—Changes of the activity of the crude enzymes extracted from the shadow-dried (A), sun-dried (B) and freeze-dried mushrooms during the storage at various conditions.

Key: ■, storage at -50°C; ▨, storage at 4°C; □, storage at room temperature

7.0 부근을 제외하고 전체적으로 활성이 약간 감소하였으며, pH 3.0에서는 63%의 활성을 보인 반면 pH 10.8 이상에서는 효소의 활성이 급격히 감소하였다. 이상의 결과로 미루어 보아 본 효소는 강알칼리성이나 강산성 조건을 제외하고는 pH에 따라 안정한 영역이 넓은 것으로 생각된다.

저장기간에 따른 안정성

능이를 음건, 양건 및 동결건조하여 저장기간별로 조효소의 활성변화를 검토한 결과는 Fig. 3과 같고, 정제효소의 저장기간별 활성변화를 검토한 결과는 Fig. 4와 같다.

Fig. 3의 A에서 보는 바와 같이 음건시킨 버섯을 -50°C, 4°C 및 상온에서 3년간 저장하는 동안 조효소의 활성은 -50°C와 4°C에서는 거의 변화가 없었으나 상온 저장시 약 7% 정도 감소하였다.

Fig. 3의 B에서 보는 바와 같이 양건시킨 버섯은 -50°C에서는 거의 변화가 없었으나 4°C와 상온에서는 저장기간이 증가할수록 활성이 감소하여 3년 보관시에는 각각 8%와 12% 활성이 감소되었다. 또한 동결건조시켜 저장하였을 때에는 Fig. 3의 C에서 보는 바와 같이 활성의 변화가 거의 없었다. 정제효소의 경우 Fig. 4에서 보는 바와 같이 6개월간 저장하여도 효소의 활성이 거의 감소하지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 보면 음건한 것에서는 상온에서, 양건한 것에서는 4°C와 상온에서 효소의 활성이 감소한 것은 동결건조시에서보다 수분함량이 많았기 때문으로 추정되며, 전체적으로는 오랜기간 버섯상태로나 정제효소로 저장하여도 능

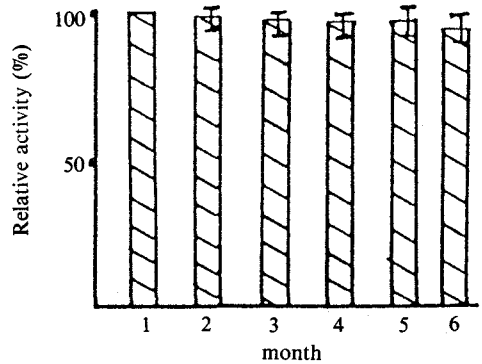


Figure 4—Changes of the activity of the purified enzyme during the storage at 4°C.

이 중의 단백질 가수분해효소는 안정함을 알 수 있다.

HPLC에 의한 Peptide Map의 비교

카제인을 기질로 하여 papain, bromelain, trypsin, pepsin 및 본 효소를 적용시켰을 때 생성된 펩타이드를 HPLC로 분석한 결과 Fig. 5의 A~E에서 보는 바와 같이 유지시간 10분 이후 22분 사이에 분리된 피크 수는 약 20여개로서 본 효소는 기존의 효소들과 거의 같은 정도의 가수분해력을 갖고 있고, 각각의 효소에 의해 생성된 피크의 양상이 다르기 때문에 작용점이 다른 것으로 추정된다.

또한 본 실험에 사용된 효소들이 endo-type이기 때문에 이들 효소가 생성한 펩타이드의 크로마토그램의 양상으로 미루어 보아 본 효소는 endo-type인 것으로 추정할 수 있다.

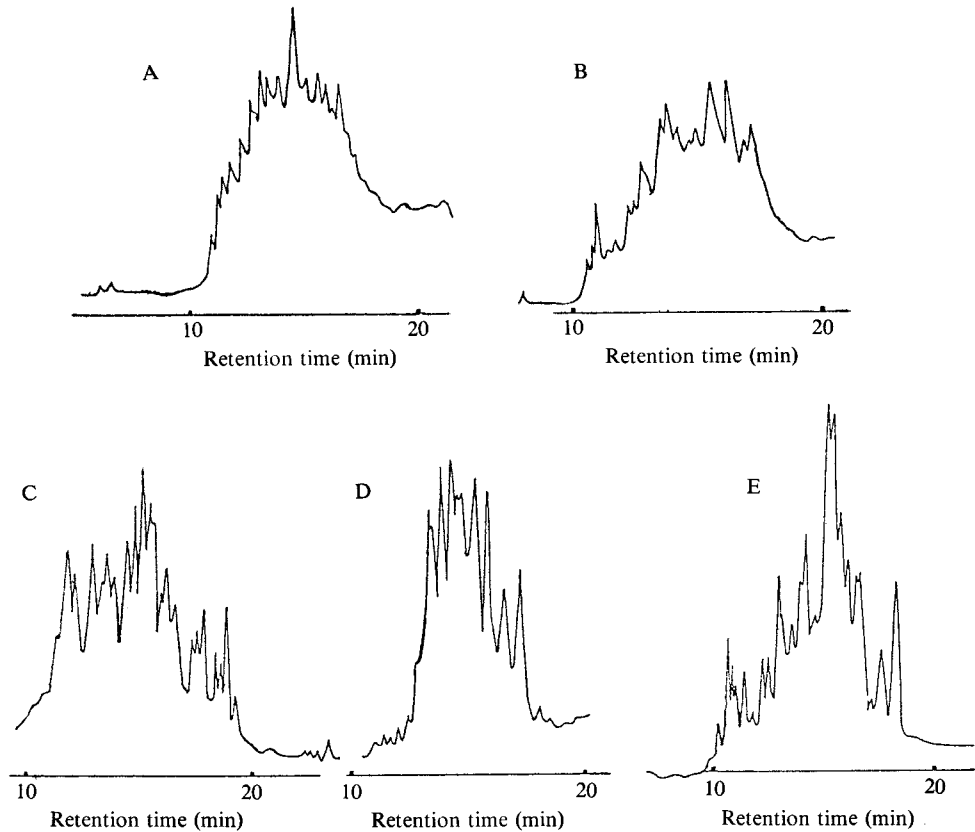


Figure 5—Peptide chromatograms of casein digested by various proteolytic enzymes.

Key: A, papain; B, bromelain; C, trypsin; D, pepsin; E, enzyme purified from Neungee

결 론

능이 [*Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito]로부터 단백질 가수분해효소를 추출하여, Tris-acryl CM-cellulose 칼럼 크로마토그래프법과 chromatofocusing의 과정을 거쳐 정제하였다. 정제된 효소는 전기영동을 행한 결과 단일 밴드를 나타내었으며, 비활성이 15.8배 증가하였다. 능이 중의 효소는 pH 4.0-10.8의 범위에서는 안정하였다. 능이를 음건, 양건, 동결건조하여 4°C 이하에서 3년간 보관하거나, 정제효소를 4°C에서 6개월간 보관하였을 때도 효소의 활성이 거의 변하지 않았다. 또 능이 중의 단백질 가수분해효소는 endo-type으로 추정되었다.

감사의 말씀

이 논문은 1986년도 문교부 대학부설 연구소 지원 학술조성 연구비의 일부로 연구되었으며 이에 감사드리는 바이다.

문 헌

- 1) I. Tasuziro, Morphology and Classification, in Biology and Cultivation of Edible Mushroom, Academic Press, New York, 1978, p. 3
- 2) R.B. Holts, Qualitative and quantitative analysis of free neutral carbohydrates in mushroom tissue by gas-liquid chromatography and mass spectrometry, *J. Agr. Food Chem.*, **19**, 1272 (1972)
- 3) G.C. Birth, Mushroom sugar, *Plant Foods Man.*, **1**, 49 (1973)
- 4) F.S. Vogel, S.J. McGarry, L.A.K. 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)
- 5) T. Ikekawa, N. Uehara, Y. Maeda, M. Nakamishi and F. Fukouka, Antitumor activity of aqueous extracts of some edible mushrooms, *Cancer Res.*, **29**, 734 (1969)
 - 6) Y. Yamasaki and Y. Suzuki, Purification and properties of β -glucosidase and glucamylase from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing, *Agri. Biol. Chem.*, **42**(5), 971 (1978)
 - 7) N.C. Kaarcholm and P. Schack, Characterization of papaya peptidase A as an enzyme of extreme basicity, *Acta Chem. Scand. (B)*, **37**, 607 (1983)
 - 8) J.S. Eun, J.H. Yang, D.Y. Cho, T.K. Lee and I. H. Park, Studies on Higher Fungi in Korea (II), Proteolytic Enzyme of *Agaricus bisporus* Sing, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **19**(1), 9 (1989)
 - 9) T.K. Lee, Purification and some characteristics of the proteolytic enzyme in fruitbody of Neungee [*Sarcodon aspratus* (Berk). S. Ito], *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **17**(1), 276 (1986)
 - 11) J. Swada, Studies on the acid-protease of *Paezilomyces varioti* Bainer TPR-220. Part II, Some enzymatic properties of the crystalline acid-protease, *Agr. Biol. Chem.*, **28**(6), 348 (1964)
 - 12) S. Weiner, M. Mangel, L. Mahar and G.C. Kelley, The effectiveness of commercial papain in meat tenderization, *Food Technol.*, **12**, 248 (1958)
 - 13) G.Y. Gottschall and M.W. Kies, Digestion of beef by papain, *Food Res.*, **7**, 373 (1942)
 - 14) J.R. Whitaker, Assay and properties of commercial ficin, *ibid.*, **22**, 468 (1957a)
 - 15) J.A. Waters and A.K. Sinsh, Effects of papain treatment of lymphocytes on the express of their membrane surface markers, *J. Clin. Lab. Immunol.*, **12**, 151 (1984)
 - 16) O.H. Lawry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.L. Randal, Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
 - 17) K.J. Wilson, A. Honegger and G.J. Hughes, Comparison of buffers and detection systems for high pressure liquid chromatography of peptide mixture, *Biochem. J.*, **199**, 43 (1981)