

韓國產 高等 菌類의 酵素에 관한 研究(I)

能楫의 蛋白質 分解酵素의 確認

朴 婉 熙

京畿工業開放大學 環境工學科

Studies on Enzymes of the Higher Fungi of Korea(I)

Identification of Protease in *Sarcodon aspratus*

Wan Hee Park

Department of Environmental Engineering, Kyonggi Technical Open University, Seoul 132-02, Korea

Abstract: The purposes of this study were to investigate enzyme components and its physiological activities of *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito which grows wildly in Korea, belonging to the family *Thelephoraceae*. The carpophores of the fungus was extracted with cooling distilled water and salted out by ammonium sulfate. The precipitate was purified by dialysing through visking tube against distilled water and then dissolved with pH 7.8 ammonia aqua, and the extract was filtered. The fraction of filtrate was obtained as light brown powder after lyophilization and determined proteolytic activity. Protease activity of *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito was about two-third of that of pepsin on casein by cup method. The proteolytic potency of this enzyme was found to be 500 unit/mg. This proved the efficacy of the mushroom when it was used as a folk medicine for treating indigestion of beef.

Keywords: *Sarcodon aspratus*, *Thelephoraceae*, Protease, Proteolytic activity.

擔子菌類는 오래전 부터 인류가 깊은 관심을 가져
식용 및 약용으로 사용되어 왔다.

高等菌類의 酵素에 관한 연구에 대하여 世界的인 動
向을 살펴보면 대단히 활발하여 이것에서 추출한 효소
제품이 널리 쓰이고 있다.

1957년 Kilore-Smith는 *Hydnum henningsii*(Bros.)
에서 cellulase를 추출하여 그 성질을 검토하였다.

1972년 Hashimoto는 6種의 高等菌類에서 carboxy-
cellulase를 분리하여 그 力價를 測定하였으며 Kawa-ai
는 1972년 8종의 고등균류를 배양한 그 배양액에 대
하여 protease의 活性을 연구한 바 있다. 1975년 Gavri-
lova 등은 버섯의 protease를 추출하여 hemoglobin,
serum albumin, ovalbumin, fibrin 등의 단백질에 대
하여 그 분해력을 검토하였다.

高等菌類의 酵素에 관한 우리나라에 있어서의 연구는
1984년 Hong 등이 3종의 食用버섯의 단백질 및 esterase

를 電氣泳動法으로 상호 비교 확인하였다. 1984년에 들
어와 버섯의 효소에 대한 연구가 활발하여 Ro는 *Fomes
fermentarius*의 protease의 分解力을 확인했으며, Hong
등은 *Pleurotus sajor-caju*가 생산하는 cellulase에 대하
여, 1985년 저자는 *Pholiota squarrosa*의 효소성분에
관한 연구를 발표한 바 있다.

能楫는 民間에서 肉類제증, 특히 쇠고기 체증에 湯
劑로 藥用하는 것에 저자는 착안하여 능이에 함유된
protease를 抽出하여 酵素 活性과 蛋白質 分解力價를
실험하였다.

저자는 위의 研究 目的에 따라 실험한 결과 새로운
지견을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

材 料



Fig. 1. *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito.

이 實驗에 사용한 굴뚝버섯과 *Thelephoraceae*에 속하는 能楨 *Sarcodon aspratus*(Berk.) S.Ito는 1982년 10월 초순에 경동시장에서 신선한 것을 구입하여 그 起源을 확인하고 그 子實體를 赤外線燈下에서 건조해서 乳鉢으로 분쇄하여 細末로 하였다(Fig. 1).

抽出

細末로 한 能楨試料 500 g에 3배의 冷却증류수를 가하여 Waring blender로 마쇄하여 24시간 냉장고내에서 추출하였다. 마포로 여과하고 여액을 다시 30분간 원심분리한 다음 이 상등액에 황산암몬으로 포화시켜 침전시켰다. 원심분리하여 침전을 증류수에 현탁시키고 Visking tube에 넣어 透析하였다. 이 투석한 침전을 pH 7.8의 암모니아수에 용해하여 불순단백질을 제거하고 그 여액을 冷凍乾燥하여 갈색침전 1.23 g을 얻었다. 상기조작을 4회 반복하여 총 5.02 g의 효소분획을 얻었다.

寒天平板 擴散法에 의한 酵素의 活性

효소추출에서 얻은 갈색침전을 pH 4.0의 MacIlvaine 완충액에 녹여 1% 시료효소용액으로 하고 pepsin(G. R. 和光)도 pH 4.0의 MacIlvaine 완충액에 녹여 1% 표준효소용액으로 하였다.

Casein 1 g을 H₂O 및 0.2 N-NaOH를 가해 용해하고 H₂O를 추가하여 완전히 용해하여 0.1 N-HCl로 pH 7.8이 되도록 조절하고 H₂O를 가하여 100 ml로 하여 1% casein 基質용액으로 하였다(사용시 조제하였다.).

食品기질로 albumin은 삶은 계란 흰자위를, 肉類는 쇠고기, 돼지고기, 닭고기를, 魚類는 동태, 꽂치, 광어의 삶은 살을 적외선등하에서 건조하여 粉末로 하여 casein 기질용액조제 때와 같이 조제하여 1% 식품기질용액으로 하였다.

각각의 기질용액 50 ml에 agar 0.5 g을 가하고 10분

간 끓여 그 10 ml를 Petri dish에 부어 10분 후에 培地로 사용하였다.

培地에 cup (outer diam. 8±0.1 mm, inner diam. 6±0.1 mm, height 10±0.1 mm)을 세우고 試料酵素용액 0.2 ml을 주입하고 37°C에서 24시간 작용시킨후 溶解圓직경을 측정하였다. 대조로 pH 4.0의 MacIlvaine 완충액을 사용하였다.

蛋白質 分解酵素 力價 測定

효소추출에서 얻은 갈색 침전 100 mg를 pH 4.0의 MacIlvaine 완충액에 녹여 0.1% 효소시료용액으로 조제하였다.

Pepsin 100 mg을 pH 4.0의 MacIlvaine 완충액에 용해하여 0.1% 표준효소용액으로 조제하였다.

Casein 1 g에 N-NaOH 20 ml를 가하여 가열 용해하여 1분 정도 끓이고 냉각하여 0.1 M-phosphoric acid 완충액으로 pH 4.0으로 조절한후 20 ml를 추가하고 증류수를 가하여 100 ml로 한다. 사용시 조제하여 사용하였다.

시험관에 1% casein 기질용액 1 ml을 공전시험관에 취하고 37°C 항온수조내에서 5분간 예열하고 이에 0.1% 시료 효소용액 1 ml를 정확히 가하여 잘 진탕 혼합한 다음 37°C에서 1시간 반응시키고 이에 0.1 M-trichloroacetic acid 2 ml를 가하고 다시 37°C, 25분간 보존한후 여과한다. 이 여액 1 ml에 0.4 M Na₂CO₃용액 5 ml 및 Folin 시약 1 ml을 가하여 잘 진탕 혼합하고 37°C에서 20분간 발색시킨 다음 여과하여 이 여액을 660 nm에서 그 吸光度를 測定하였다.

단 이때 대조액으로, 별도로 시료효소용액 대신 물을 사용하여 상기와 동일한 조작으로 얻어진 것을 사용하였다.

力價表示 : 상기 측정 실험조건과 동일하게 반응시킨 용액 1 ml 중에 tyrosine 100 µg에 상당하는 아미노산을 생성함을 1 unit로 하였다.

酵素濃도와 活性

pH 4.0의 MacIlvaine 완충액으로 일정하게 농도를 조절한 시료효소용액 1 ml에 1% casein 기질용액 1 ml를 가하여 37°C, 60분간 반응시켜 효소역가측정때와 같이 측정하였다.

基質濃도와 活性

기질의 농도를 0.1 M-borate 완충용액으로 일정하게 조절하여 그 기질용액 1 ml에 0.2% 시료효소용액 1 ml를 가하여 효소역가측정때와 같이 측정하였다.

最適 pH

MacIlvaine 완충액으로 pH 3~8까지 조절한 효소시

료용액 1 ml에 1% casein 기질용액 1 ml를 가해 37°C, 60분간 반응시켜 효소 역가측정때와 같이 측정하였다.

pH에 대한 酵素의 影響

효소시료를 MacIlvaine 완충액으로 pH 2.0~pH 6.0의 각 시료효소용액을 조제후 37°C에서 24시간 방치한 후 다시 pH 4.0으로 조절시킨후 열에 대한 효소의 안정성때와 같이 잔존하는 효소의 활성을 측정하였다.

最適 溫度

0.2% 시료효소용액 1 ml에 casein 기질용액 1 ml를 가해 작용온도를 20°C~60°C로 변화시켜 효소역가측정때와 같이 측정하였다.

熱에 대한 酵素의 安定性

pH 4.0의 0.2% 시료효소용액을 30, 40, 50, 60 및 70°C의 각 온도에서 60분간 열처리하면서 각각에 1% casein 기질용액을 가해 37°C에서 1시간 효소반응시켜 경시적으로 잔존하는 효소의 활성을 측정하였다.

酵素活性에 대한 鹽類의 影響

10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ M 농도의 sodium chloride, magnesium sulfate, calcium chloride의 각 농도의 鹽類를 0.2% 시료효소용액 1 ml와 1% casein 기질용액 1 ml에 첨가시켜 효소분해력 측정때와 같은 실험조건으로 반응시켜 효소활성을 측정하였다.

結果 및 考察

Casein을 기질로 하여 寒天平板擴散法으로 능이 酵素 분획의 protease活性 유무를 실험한 결과는 Fig. 2와 같다.

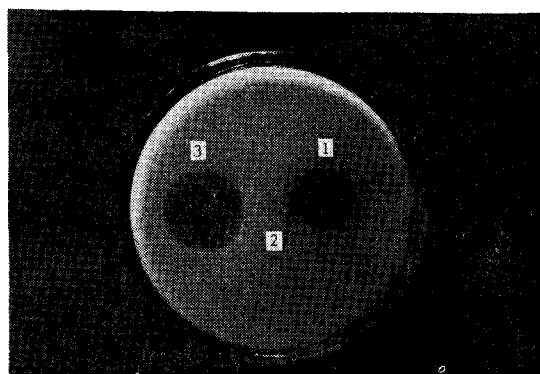


Fig. 2. Protease activities of *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito. and pepsin on casein by cup method.

- 1: Enzyme fraction of *Sarcodon aspratus*
- 2: MacIlvaine buffer solution
- 3: Pepsin

Table I. Protease activity of *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito on 8 kinds of substrate by cup method.

Substrate	<i>Sarcodon aspratus</i> (mm)	Pepsin(mm)
Casein	14.4	17.8
Albumin	15.3	17.4
Beef	21.0	21.0
Pork	20.0	18.9
Chicken	20.5	19.4
Frozen pollack	16.3	16.3
Plackerel pike	15.6	15.5
Flatfish	15.1	15.2

효소분획이 casein 기질에 대하여 나타난 용해원직경은 Table I과 같이 14.4 mm였으며 표준 pepsin의 경우는 17.8 mm였다. casein 기질에 대한 효소분획의 活性은 pepsin의 活性에 비하면 약간 낮은 수치이지만 능이가 protease를 함유하고 있다는 사실이 증명되었다. 그런데 능이 조효소분말과 표준 pepsin을 동일한 농도를 실험하여 얻은 결과를 볼때 능이 protease가 pepsin의 용해원의 약 3분의 2 정도의 직경을 나타내었으므로 protease는 pepsin의 2분의 1 정도의 역가를 함유하리라 추측된다. 더구나 시약으로서의 pepsin은 고도로 정제된 효소임에 반하여 능이 protease는 粗효소라는 점에서 볼때 그 이상의 역가를 가지고 있을 수도 있다. Albumin 기질에 대한 능이 protease 활성은 15.3이고 pepsin은 17.4였다. 또 쇠고기 기질에 대한 능이 protease의 활성은 21.0이고, 돼지고기, 닭고기는 20.0, 20.5이었으며, 동태, 콩치, 광어의 근육에 대한 활성은 각각 16.3, 15.6 및 15.1이었다. 이에 비하여 pepsin의 활성은 쇠고기, 돼지고기, 닭고기, 동태, 콩치 및 광어에 대하여 21.0, 18.9, 19.4, 16.3, 15.5 및 15.2였으며 그 활성치가 거의 일치하였다.

그런데 상용하는 이들 단백질源이 능이 protease에 의하여 분해된다는 사실은 능이가 육류체중에 민간약으로 사용되는 사실을 뒷받침하는 것이라 볼 수 있다.

특히 능이 protease가 쇠고기에 활성도가 가장 높았다는 사실은 한방에서 쇠고기체중에 선택적으로 능이를 넣어 조제하고 있는 사실을 더욱 입증해 주고 있다. 뿐만아니라 능이의 protease가 pepsin의 활성과 유사한 점으로 보아 pepsin에 유사한 효소일 것이라고 추측된다.

기질의 종류에 따라 그 활성도가 다른것은 기질로 사용된 단백질의 종류와 그 단백질내의 아미노산의 결

Table II. Proteolytic activity of protease in *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito.

Proteolytic activity (after Folin test, measured 660 nm)	500 u/mg
---	----------

합순서의 차에 기인하는 것으로 사료된다.

능이의 protease의 역가를 측정할 결과는 Table II와 같다. 능이의 protease의 역가는 500 unit/mg로 매우 높은 수치라고 생각된다.

pH 4.0의 MacIlvaine 완충액으로 일정하게 희석한 시료효소용액 1 ml에 1% casein 기질용액 1 ml를 가하여 37°C, 60분간 작용시킨 후 그 흡광도를 측정할 결과는 Fig.3와 같다. 단백질 분해효소의 활성때의 흡광도가 0.500 이하이면 효소농도와 비례관계를 나타내므로 이 범위내의 농도, 즉 0.2%가 되게 시료효소용액으로 조절하였다.

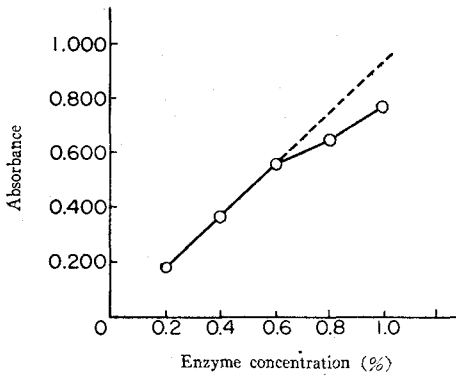


Fig. 3. Effects of enzyme concentration on the proteolytic activity.

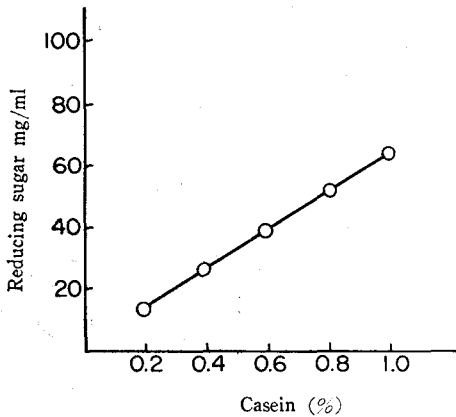


Fig. 4. Effects of casein concentration on the enzymatic reaction.

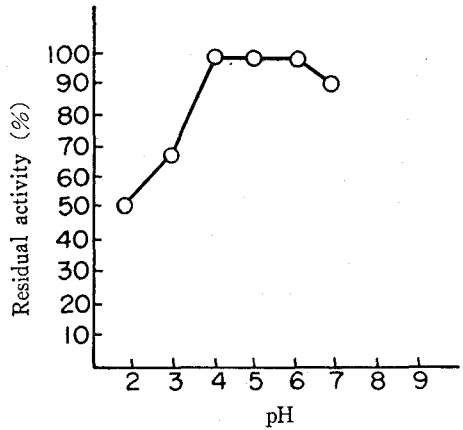


Fig. 5. pH stability of proteolytic activity.

반응액중의 기질의 농도와 효소활성의 관계는 Fig.4와 같이 기질농도가 1%이하에서 직선성을 나타내었으므로 기질의 농도를 1%가 되게 조절하여 사용하였다.

MacIlvaine 완충액으로 pH 3~7로 조절한 시료효소용액을 사용하여 그 활성을 측정할 결과 Fig.5에 보이는 바와 같이 최적 pH는 4.0으로 나타났다.

pH에 대한 효소의 안정성을 검토하기 위하여 여러 단계의 pH로 시료효소용액을 조절한 후, 37°C에서 24시간 방치하고 다시 MacIlvaine 완충액으로 pH 4.0으로 조절하여 잔존하는 효소활성을 측정할 결과 능이의 protease는 pH 3.5~6.5에서 안정하였다.

온도가 protease의 활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 pH 4.0의 0.1% 시료효소용액과 1% casein 기질용액을 30°C~60°C의 각 온도에서 1시간 작용시킨 후 protease 활성을 측정할 결과 Fig. 6과 같다.

열에 대한 능이 protease의 안정성은 30°C와 40°C에서 열처리한 시료효소용액은 1시간 열처리로 안정했으며

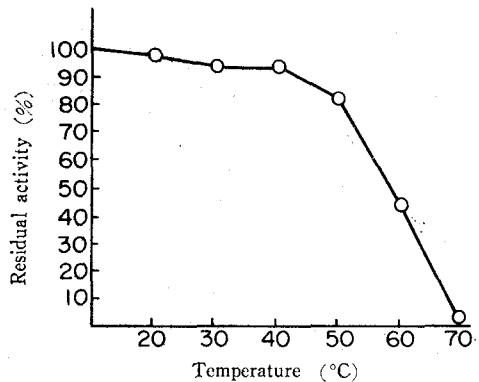


Fig. 6. Thermal stability of proteolytic activity.

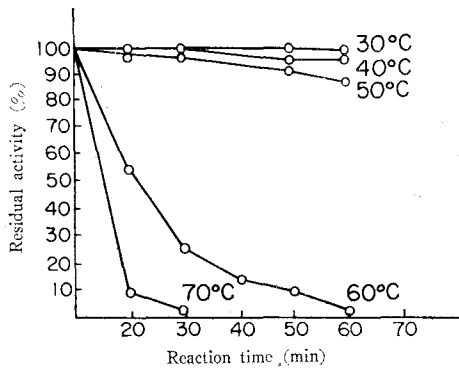


Fig. 7. Effects of temperature on proteolytic activity.

60°C에서는 20분 열처리로 약 50%의 효소활성을 상실했으며 70°C에서는 30분 열처리로 거의 완전히 효소활성을 잃었다.

능이의 protease 활성에 미치는 염류의 첨가의 영향은 Table III과 같이 Na⁺의 첨가는 저해작용을 나타내었으나 Mg²⁺ 및 Ca²⁺의 첨가는 약간의 촉진작용을 나타내었다.

끝으로 근래의 보고에 따르면 protease는 소화효소제, 소염제, 주류혼탁방지제, 장류의 발효촉진제, 식육의 연화제, 조미료등에 널리 이용되고 있으므로 이러한 목적에 능이 protease가 개발될 가능성이 있다고 사료된다.

Table III. Effects of metallic ions on proteolytic activity of *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito.

Compounds	Proteolytic activity unit/mg		
	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
NaCl	488.6	491.2	492.6
MgSO ₄	502.2	501.3	501.0
CaCl ₂	505.4	504.5	503.9

摘 要

Sarcodon aspratus (Berk.) S. Ito에서 효소분획을 추출하여 casein 및 여러 식품 단백질기질을 조제하여 그것에 대한 분해작용을 실험하였다. Casein을 크게 분해하고 각 식품단백질기질도 분해하였으므로 protease의 존재를 알게 되었고 여러 기질에 대해 표준 pepsin과 비교할때 거의 동일한 역가를 나타내었으므로 우수한 protease가 함유되어 있음을 규명하였다. 아울러 능

이가 육류체증 치료에 민간약으로 사용되는 근거를 제시하였다고 사료된다.

감사의 말씀

이 연구를 처음부터 끝까지 지도해 주신 숙명여자대학교 약학대학 魯一協교수님께 깊이 감사드리며 또 여러 격려와 아낌없는 조언을 주신 서울대학교 약학대학 金炳珪교수님께 감사를 드리는 바입니다.

또 연구를 크게 도와주셨던 서울대학교 약학대학 명예교수 故 金泳根 博士님께 이것을 바치는 바입니다.

文 獻

Dishe, Z. (1956): *Method of Biochemical Analysis*. Vol. II, Academic Press, New York, N.Y. p. 319.

Ernst, H.R. and Henning, K. (1972): *Methods in Enzymology*. XLV. Edited by Laszlo lorand p. 26, Academic Press.

Gavrilova, V.P. and Falina, N.N. (1975): (Russ) Proteolytic enzyme isolated from a fungus, *Flammulina velutipes* (Fr.) Sing. *Mikol. Fitopatol.* 9: 431~433.

Hashimoto, K. (1972): Biochemical studies on the mushroom. *Toyo Shokuhin Kenkyusho Kenkyu Hokukusho* 10: 163.

Hong, J.S., Uhm, T.B., Jung, G.T. and Lee, K.B. (1984): Studies on the enzymes produced by *Pleurotus sajor-caju*. *Kor. J. Mycol.* 12: 59~64.

Hong, S.W. and Min, C.P. (1974): Electrophoretic comparison of mycelial protein and enzyme patterns in their interspecies of some edible fleshy fungi. *Kor. Jour. Microbiol.* 12: 138~146.

Kawa-ai, M., (1972): *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 47: 34953.

Kilore-Smith, T.A. (1957): The metabolism of fungi. *J.S. African Chem. Inst.* 10: 29~35.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Determination of protein with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.

Lin, J.Y., Lin, Y.J. and Chen, C.C. (1974): Cardio-toxic protein from edible mushrooms. *Nature* 252: 15.

- Menan, I.A. and Haberman, H.F. (1975): Use of affinity chromatography for purification of tyrosine. *Acta. Dermatovener (Stochholm)* 55: 344.
- Miodecki, H., Lasota, W. and Tomczak-Nowacka (1973): Hygienic evaluation of *Sarcodon imbricatum*(I). *Bromat. Chem. Toksykol.* 6: 41.
- Miodecki, W., Lasota, B. and Tomczak-Nowacka, Hygienic evaluation of *Sarcodon imbricatum* (II). *Bromat. Chem. Toksykol.* 6: 3.
- Nobuhiko, K. (1963): Flammulin, a basic protein of *Flammulina velutipes* with antitumor activities. *J. Antibiotics* 16: 139~143.
- Omura, H., Tomita, Y., Murakami, H. and Nakamura, Y. (1974): Antitumoric potentiality of enzyme preparations of pumpkin ascorbate oxidase and shiitake mushroom polyphenol oxidase. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.* 18: 191~200.
- Park, W.H., Kim, T. H. and Ro, I.H. (1984): Studies on the enzyme from Korean higher fungi and crude drug. *Theses Collection Sookmyoung Pharm. Sci.* 1: 39~46.
- Park, W.H. (1982): Studies on antitumor components of wild *Pholiota squarrosa* (Fr.) Quel. *Yakhak Hoeji* 26: 185~188.
- Park, W.H. (1975): Studies on placental chorionic gonadotropin. *Kor. Jour. Nutrition* 8: 65~69.
- Park, W.H., Kim, B.K. and Ro, I.H., (1983): Studies on the components of *Pholiota squarrosa*. *Kor. J. Mycol.* 2: 35~37.
- Park, W.H. (1985): Studies on enzyme components of *Pholiota squarrosa* (Fr.) Quel. *Theses Collection Sookmyoung Pharm. Sci.* 2: 93~103.
- Ro, I.H. (1984): Studies on protease activity of *Fomes fermentarius* (Fr.) Kicky. *Theses Collection of Sookmyoung Univ. Sci.* 25: 475~485.
- Wirnt, R. and Walf-Peter, F. (1972): *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd edition, Bergmeyer 1, p.1046.
- Worthigton (1980): *Enzymes, Enzyme Reagent Related Biochemicals*. Worthington Biochemical Corporation Breehold, New Jersey, U.S.A.

<Received October 7, 1985;

Accepted November 17, 1985>