

# 능이 [*Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito]중 蛋白質 加水分解 酵素의 精製 및 性質에 관하여

李 泰 圭

全州又石大學 食品營養學科  
(1986년 8월 25일 접수)

## Purification and Some Characteristics of the Proteolytic Enzyme in Fruitbody of Neungee [*Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito]

Tae-Kyoo Lee

Department of Food and Nutrition Jeonju Woosouk University  
(Received August, 25, 1986)

### Abstract

This study was undertaken to investigate the characteristics of the proteolytic enzyme extracted from Neungee mushroom [*Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito].

The enzyme was purified by using Tris-acryl CM-cellulose ion exchange, gel filtration on Ultrogel AcA 54, Hydroxy apatite column chromatography and preparative isoelectric focusing.

The specific activity of the purified enzyme increased 8 times as compared with that of the crude enzyme. The enzyme was homogeneous on polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

The optimum pH was 10.1, indicating the enzyme to be alkaline protease and the optimum temperature was 57°C.

The enzyme was stable at temperatures lower than 50°C and at pH values ranging from 4.0 to 10.8.

However, the enzyme activity decreased by 26 and 65% at 60 and 65°C, respectively, when incubated for 30 minutes.

The enzyme activity was activated by Mn<sup>2+</sup> and inhibited by Cu<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup>.

The enzyme was consisted of monomer and its molecular weight estimated to be about 30,100 when determined by sodium dodecyl sulfate PAGE.

Isoelectric point of the enzyme was determined to be 9.80.

### 緒 論

버섯은 蛋白質, vitamin, 無機質 등의 함량이 일반 菜蔬類에 못지않기 때문에 食品으로 뿐만 아니라 각종 疾病의 치료와 예방에 藥効가 있다 하여 漢藥劑로 사용되어 왔고 최근에는 버섯의

抗菌性, 抗癌效果가 알려져 버섯에 대한 관심도가 점차 높아지고 있으며 이에 따라 버섯의 수요량이 점진적으로 증가하는 경향이다.<sup>1)</sup>

인간이 이용하는 버섯중에는 양송이(*Agaricus bisporus*), 표고(*Lentinus edodes*), 느타리(*Pleurotus ostreatus*), 송이(*Tricholoma matsutake*)

등의 食用버섯과 영지버섯(*Ganoderma lucidum*) 능이(*Sarcodon aspratus*) 등의 藥用버섯이 있다.

능이는 한국과 일본에 自生하고 있으며 한국에서는 9월하순부터 10월초순 사이에 활엽수림의 부석이 많은 山地에서 발생하고 菌帽의 직경은 15~20cm 크기의 깔대기형을 이루고 있는 대형버섯이다.

버섯류의 化學成分에 관한 연구로는 버섯 子實體의 窒素化合物, 炭水化合物, vitamin, sterol, 抗菌, 抗癌成分 등에 관한 연구가 되어 있다.<sup>2~6)</sup>

버섯菌絲의 酵素에 관한 연구로는 洪<sup>7,8)</sup>의 *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes*의 培養條件과 protease의 성질에 관한 연구가 있고, 村尾澤夫<sup>9)</sup>의 *Lentinus edodes*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*의 protease에 대한 연구가 있다.

그리고 버섯子實體내의 酵素에 관해서는 李<sup>10)</sup>의 *Pleurotus sajor-caju*(Fr.) Sing의 aminotransferase에 대한 연구와 Yamasaki<sup>11)</sup>이 *Lentinus edodes*의  $\alpha$ -glucosidase와 glucamylase를 분리 정제하여 그 특성을 규명한 바 있다.

그런데 高等植物體에 함유되어 있는 蛋白質加水分解 酵素로는 papain,<sup>12~15)</sup> bromelain,<sup>16,17)</sup> ficin<sup>18,19)</sup>에 대한 연구가 있고 이용면에서는 醫學,<sup>20~23)</sup> meat tenderizer<sup>24~27)</sup>로서 많은 연구가 되어 있다.

이와 같이 일부 高等植物과 버섯에 대한 蛋白質加水分解 酵素에 대한 연구보고는 있으나 능이 중의 蛋白質加水分解 酵素에 관한 연구보고는 전무한 상태이다. 또한 옛날부터 우리나라에서 肉類를 먹고 채하였을 때 능이가 單方藥으로 사용되어 왔다는 점을 중요시하고 이 버섯에 蛋白質加水分解 酵素가 함유되어 있음을 확인할 수 있었다.

따라서 능이로부터 蛋白質加水分解 酵素를 분리 정제하고 酵素의 作用最適 pH, 最適溫度, pH 安定性, 熱安定性, 分子量, 等 電點 등의 제성질을 검토하여 그 결과를 여기에 보고하는 바이다.

## 材料 및 方法

### 1. 供設材料

가. 試料

본 실험에 사용된 능이는 1982년 9월에 全北

鎭安郡에서 채취된 것을 陰乾하여 4℃로 보관하면서 사용하였다.

나. 試藥 및 分析器機

#### 1) 試藥

SDS 및 PAGE시약은 Sigma사 제품을, Tris-acryl CM-cellulose, Ultrogel, Hydroxy apatite는 LKB사 제품을 Agarose IEF, Sephadex G-200 SF, Pharmalyte와 pI maker protein은 Pharmacia사 제품을 사용하였고, 그 밖의 시약은 특급을 사용하였다.

#### 2) 分析器機

Homogenizer는 Dupont/Sorvall (U.S.A.), Electrophoresis 장치는 Pharmacia(Sweden), Column chromatography 장치는 LKB(Sweden), UV-VIS Spectrophotometer는 Shimadzu UV 250W Japan, Freeze dryer는 Labconco사(U.S.A)를 각각 사용했다.

## 2. 實驗方法

가. 酵素의 精製<sup>28)</sup>

#### 1) 粗酵素液의 調製

버섯을 mortar에서 분쇄한 후(80mesh) 10g을 취하여 0.2M-인산완충액(pH 7.0) 300ml을 넣고 분당 300회전으로 조절된 homogenizer에서 4시간 抽出하고 14,000×g로 15분간 원심분리한 후 上澄液을 취하여 粗酵素液으로 하였다.

#### 2) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>에 의한 分割

이 粗酵素液에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>을 가하여 40% 포화용액이 되도록 한후 14,000×g로 20분간 원심분리하여 沈澱物을 제거하고 그 上澄液에 다시 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>을 가해 75% 포화되도록 하였다. 이 용액을 4℃에서 30분간 방치한 후 전과 동일한 방법으로 원심분리하여 沈澱物을 회수하였다. 이 沈澱物을 ImM-인산완충액(pH 7.0)에 용해하고 동일 완충액에서 하룻밤 透析하였다.

#### 3) Tris-acryl CM-cellulose Column Chromatography

10mM citrate-20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 완충액(pH 4.0)으로 평형화된 Tris-acryl CM-cellulose column(2.6×25cm)에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>로 分割된 粗酵素를 동일 완충액에 녹여 注入하여 분획번호 15까지 동일 완충액으로 씻어낸 후 동일 완충액 100ml와 여기에 0.2M-NaCl를 함유하는 완충액으로 grad-

ient elution (45ml/hr.) 시키면서 150방울씩 fraction collector로 분획하여 活性部分을 모았다.

4) Ultrogel AcA54 Column Chromatography  
50mM 인산완충액(pH 7.0)으로 평형화된 Ultrogel AcA 54column (1.6×90cm)에 Tris-acryl CM-cellulose에서 정제한 후 透析 凍結乾燥시킨 酵素를 동일 완충액 1ml에 녹여서 注入 溶出(15ml/hr.) 시키면서 100방울씩 분획하여 活性部分을 모았다.

5) Hydroxy Apatite Column Chromatography  
5mM 인산완충액(pH 6.8)로 평형화시킨 hydroxy apatite column (1.6×20cm)에 Ultrogel AcA54에서 정제한 酵素를 주입한 후 분획번호 15까지 동일 완충액으로 씻어낸 후 200mM 인산완충액(pH 6.8)로 gradient elution (30ml/hr.)시키면서 100방울씩 분획하여 활성부분을 모았다.

#### 6) Preparative Isoelectric Focusing

Focusing은 Pharmacia사의 Isoelectric Principles & Methods<sup>29)</sup>와 Manrique등<sup>30)</sup>의 방법에 준하였다.

Gel은 Sephadex G200SF 2.5%(W/V), Agarose IEF 0.5%(W/V), Sorbitol 8.6%(W/V)가 되게 재증류수에 넣고 물증탕에서 가운한 후 75℃ 부근으로 냉각하여 Pharmalyte 8-10.5를 1:15의 비로 혼합하여 제조하였다. 이때 gel의 크기는 230×230×5mm(두께)였다.

Anode strip액으로는 0.2M-histidine를 cathode strip액으로는 1M-NaOH를 사용하였고, gradient drip를 방지하기 위해서 buffer tank에 1M-NaOH를 채우고 N<sub>2</sub>氣流下에서 focusing 하였다.

Focusing은 3,000V, 25W로 5시간 하였으며, 이때 cooling plate는 10℃가 되도록 하였다.

#### 나. 酵素 活性的 測定<sup>31)</sup>

酵素活性은 Folin比色法으로 측정하였다. 즉 0.6% casein용액 5ml에 효소액을 가하여 57℃로 조절된 shaking water bath(20회/min)에서 10분간 작용시킨 후 0.44M trichloroacetic acid(TCA) 용액 5ml를 가한 후 다시 40℃에서 20분간 방치하여 잔존단백을 沈澱濾過하여 이 濾液 1ml에 0.55M-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10ml와 2배 희석한 Folin시약 1ml를 가하여 40℃에서 20분간 분색시킨 후 660nm에서 그 吸光度를 측정 대조와의 차를 酵素活性度로 나타내었다.

#### 다. 蛋白質 濃度 測定

蛋白質 濃度는 Lowry등<sup>32)</sup>의 방법에 따라 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 측정하였다.

#### 라. 酵素의 特性

##### 1) 作用最適 pH

pH 3.0에서 pH 6.0까지는 0.1M citrate-0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 완충액을, pH 7.0~pH 8.0까지는 0.2M 인산완충액을, pH 9.0~pH 10.1사이는 0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>완충액을 pH 10.8이상은 0.1M NaOH-borate 완충액을 사용하여 0.6% casein용액을 조제한 후 정제효소액을 가하여 57℃에서 10분간 작용시킨 후 그 활성을 측정하여 相對活性度로 나타내었다.

##### 2) 最適溫度

0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>완충액(pH 10.1)에 0.6% casein용액을 조제한 후 효소액을 가하고 40℃에서 65℃까지 각 온도별로 10분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하여 相對活性度를 나타냈다.

##### 3) pH 安定性

최적 pH에서와 동일한 완충액에 효소액을 가하여 혼합한 후 40℃에서 1시간과 3시간 보존하였다.

한편 0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>완충액(pH 10.1)에 0.6% 되게 casein을 용해시킨 기질액에 상기와 같이 보존한 효소액을 가하고 전체의 pH를 10.1로 조절한 후 57℃에서 그 殘存活性을 측정하였다.

##### 4) 熱安定性

50mM-인산완충액(pH 7.0)에 효소를 용해시켜 50℃, 55℃, 60℃, 65℃에서 보존하면서 30분간 경시적으로 효소액을 취해 곧 얼음물에 냉각하고 효소의 殘存活性을 57℃에서 측정하였다.

##### 5) 金屬 ion의 影響

MnCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub> 및 HgCl<sub>2</sub>를 0.6% casein이 용해된 0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 완충액(pH 10.1)에 1mM과 5mM이 되게 가하고 이에 효소액을 가한 다음 酵素活性度를 측정하였다.

마. Polyacrylamide Slab Gel Electrophoresis  
Reisfeld등<sup>33)</sup>과 Pharmacia사의 Laboratory techniques<sup>34)</sup>에 준하여 cathodic slab gel electrophoresis로 하였다.

Gel의 농도는 T10%, C2.63%며 크기는 8cm (폭)×14cm(길이)×2.7mm(두께), gel과 sample buffer는 0.06M KOH-0.375M CH<sub>3</sub>COOH(pH4.3) 이고, 전기영동완충액은 pH 4.0으로 조절하여 사용했다.

120V, 15℃에서 전기영동한 후 10% sulphosalicic acid에 蛋白質을 고정하여 0.1% coomassie blue R-250으로 染色하였다.

바. SDS-Gel Electrophoresis에 의한 分子量測定

Weber와 Osborn<sup>35)</sup>의 방법에 준하였다. Gel은 0.2% SDS를 포함한 T 10%, C2.63%로 조제하였고 pH는 7.0(0.1M 인산완충액)이었다. 전기영동완충액은 0.1% SDS를 포함한 0.05M 인산완충액(pH 7.0)을 사용했다.

試料와 標準蛋白質은 2.5% SDS, 5% β-mercaptopethanol과 15% sucrose을 녹인 0.1M 인산완충액(pH 7.0)에 녹여 100℃ 물중탕에서 10분간 가열 처리하여 사용하였다.

120V, 10℃에서 전기영동한 후 25% propane-2-ol 10% CH<sub>3</sub>COOH용액에서 24V로 30분간 단백질 고정 및 SDS를 제거하여 染色하였다.

이때 試料의 分子量은 標準蛋白質의 Rf값과 비교 계산하였다.

사. 等電點 測定

等電點의 측정은 Olssen<sup>36)</sup>과 Burdett<sup>37)</sup>의 방법에 준하였다.

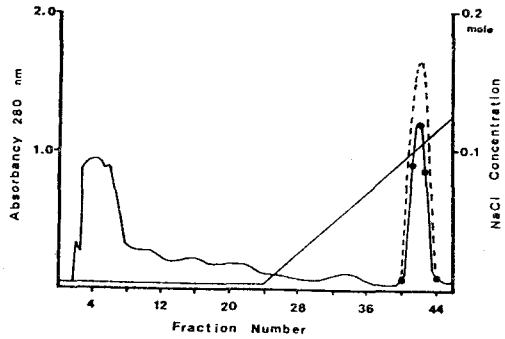
Gel은 0.3g agarose IEF과 3.6g sorbitol을 27ml의 再蒸溜水에 넣고 가온하여 녹인 후 70℃ 부근으로 냉각하여 1.6ml pharalyte 8-10.5을 혼합하여 조제하였다.

Gradient drip를 방지하기 위해 N<sub>2</sub>氣流下에서 600V, 5W, 10℃에서 focusing하였다.

## 結果 및 考察

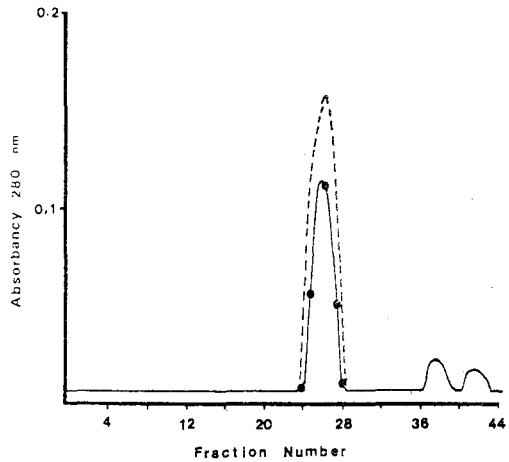
### 1. 酵素의 精製

Tris-acryl CM-cellulose column chromatography에 의한 효소정제 결과는 Fig.1과 같다. 능이의 蛋白質加水分解 酵素의 활성은 단일 peak로 나타났으며 효소단백은 NaCl의 농도가 0.1mole 부근에서 용출되기 시작했고 酵素活性이 있는 분획번호 40~44번까지를 모았다.



○—○: Protein ○---○: Enzyme activity

Fig. 1. Ion-exchange Chromatogram of Ammonium Sulfate Fractionation on Tris-acryl CM-cellulose.

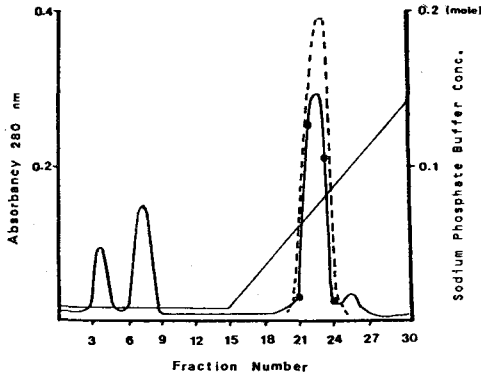


○—○: Protein ○---○: Enzyme activity

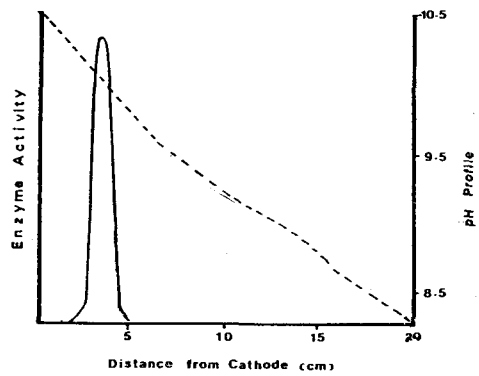
Fig. 2. Gel Filtration Chromatogram of the Proteolytic Enzyme Prepared from Tris-acryl CM-cellulose on Ultrogel Aca 54.

이를 5mM 인산완충액(pH 7.0)에서 透析 凍結 乾燥하여 gel column chromatography를 실시한 결과는 Fig.2와 같다. 酵素活性은 분획번호 24~28번 사이에서 단일 peak로 나타났다.

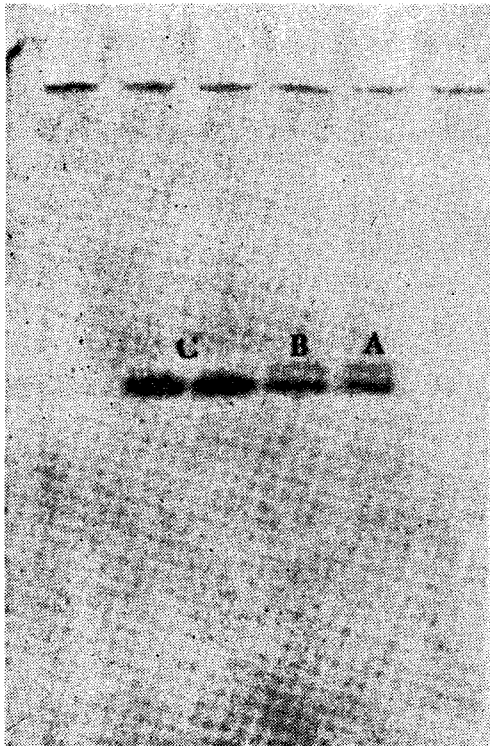
이를 透析시킨 후 hydroxy apatite column chromatography를 실시한 결과는 Fig.3과 같다. 이때 효소의 활성분획번호는 21~24번까지였으며 0.05mole 인산완충액(pH 6.8) 부근에서 酵素蛋白質이 용출되었다.



○—○: Protein ○---○: Enzyme activity  
**Fig. 3. Adsorption Chromatogram of the Proteolytic Enzyme Prepared from Ultragel Aca 54 on Hydroxy Apatite.**



**Fig. 5. Preparative Electrofocusing of the Proteolytic Enzyme Prepared from Hydroxy Apatite.**



A: Dnzyme Purified by Hydroxy Apatite Column Chromatography  
 B: Enzyme Purified by Rechromatography  
 C: Enzyme Purified by Isoelectric Focusing  
**Fig. 4. Separation of the Purified Proteolytic Enzyme by Cathodic PAGE.**

溶出液을 모아 透析 凍結乾燥하여 完全精製 여부를 電氣泳動(PAGE)로 검토해 본 결과 Fig.4-A 에서와 같이 두개의 band가 나타났다. 이 band 를 회수하여 酵素活性을 검토해본 결과 아래쪽 band만이 酵素活性이 있어 다시 rechromatography하여도 Fig.4-B에서와 같이 동일한 결과를 얻었다.

이를 더 정제하기 위해 preparative isoelectric focusing을 하였다. 이때 gel의 酵素活性을 나타내는 부분과 pH profile은 Fig.5와 같다. cathode로부터 2.5cm에서 3.0cm사이의 gel에서 酵素活性을 나타냈기 때문에 이부분을 취하여 酵素蛋白을 추출한 후 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>로 鹽析하여 透析 凍結乾燥시켰다. 이의 정제여부를 PAGE상에서 검토해 본 결과 Fig.4-C에서와 같이 단일 band를 나타내어 거의 완전히 정제되었음을 알 수 있었다.

한편 능이의 蛋白質加水分解 酵素의 전체적인 정제결과는 Table 1에서 보는 바와 같이 粗酵素의 specific activity는 7.8/mg. protein이었으나 hydroxy apatite column chromatography에서는 60.8/mg. protein으로 粗酵素에 비하여 7.79배 정제되었고 回收率도 73.5%로 우수하였다. 또한 focusing한 결과 粗酵素에 비해 specific activity가 8.01배 증가하였다.

이러한 결과는 본효소가 精製倍數는 낮으나 精製가 거의 완전히된 점등으로 미루어보아 乾燥버섯중 酵素가 다량 포함되어 있음을 알 수 있었다.

Table 1. Purification of the Proteolytic Enzyme from *Sarcodon aspratus*.

	Total protein (mg)	Total activity	Specific activity (O.D./mg. protein)	Purification fold	Yield (%)
Crude extract	617.5	4819	7.8	1.00	100.0
AmSO <sub>4</sub> fractionation(40~75%)	259.5	4505	17.4	2.23	83.5
Tris-acryl CM-cellulose	120.7	4082	33.8	4.33	84.5
Ultrogel AcA54	89.1	4070	41.5	5.32	84.7
Hydroxy apatite	58.2	3540	60.8	7.79	73.5
Preparative electrofocusing	—	—	62.5	8.01	—

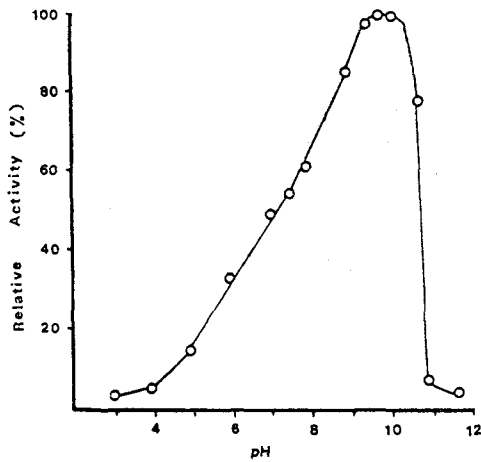


Fig. 6. Effect of pH on the Activity of the Alkaline Protease.

2. 酵素의 特性

1) 作用最適 pH

Fig.6은 본 효소의 각 pH별 相對活性度를 나타낸 결과이다. 본 효소는 pH 10.1 부근에서 최대활성을 나타냈으며 pH 10.8 이상에서는 급속히 활성이 감소하여 pH 11.0에서는 酵素의 活性이 10%이하가 되었으나 pH 7.0까지는 50%로 비교적 완전히 活性이 감소되었다. 또한 pH 3.0에서는 활성이 5%미만으로 감소됨으로써 능이 중의 蛋白質加水分解 酵素는 전형적인 alkaline protease임을 알 수 있었다.

일반적으로 버섯류의 菌絲培養液 菌絲體 및 子實體중의 蛋白質加水分解 酵素들이 acid 또는 neutral protease이 있는데<sup>7-9)</sup> 본 효소가 alkaline

protease인 것은 특기할 만한 사실이다.

2) 作用最適 溫度

본 효소의 작용 최적 온도를 알기위해 casin를 基質로하여 온도별 효소의 활성을 검토한 결과 Fig.7에서 보는 바와 같이 57℃ 부근에서 最大活性을 나타내었다.

3) pH 安定性

본 효소의 pH安定性を 검토한 결과 Fig.8에서와 같이 40℃에서 1시간과 3시간 보존했을 때 pH 7.0부근에서 가장 안정하였고, 1시간의 경우 pH 4.0~10.8까지는 활성이 감소되지 않았으며, pH 3.0에서는 75%의 활성을 나타내었으나 pH 12.0에서는 52.3%의 활성을 나타냈다.

3시간 보존했을 때는 1시간 보존했을 때보다 전체적으로 활성이 약간 감소했으나 1시간의 경

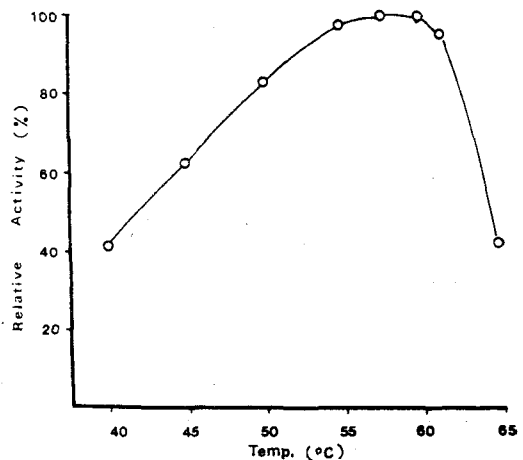


Fig. 7. Effect of Temperature on the Activity of the Alkaline Protease.

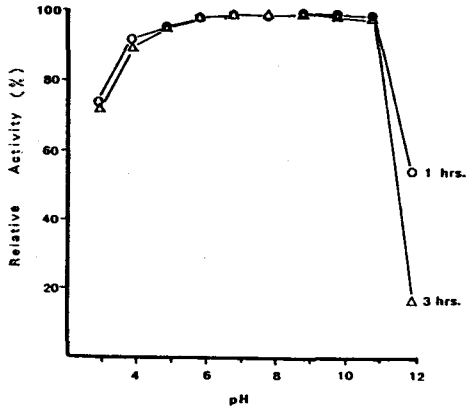


Fig. 8. pH Stability of the Alkaline Protease.

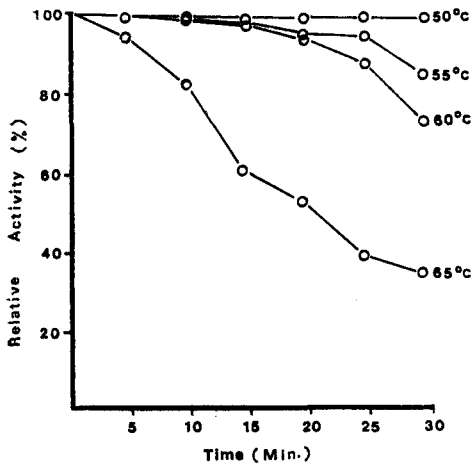


Fig. 9. Thermal Stability of the Alkaline Protease.

우와 마찬가지로 pH 4.0~10.8까지는 비교적 안정했다.

이상의 결과로 미루어 보아 본 효소는 强alkali 나 强酸性조건을 제외하고는 pH 안정폭이 넓었다.

4) 熱安定性

본 효소의 熱安定性을 검토해 본 결과 Fig.9에서 보는 바와 같이 50℃ 이하에서는 처음 활성을 그대로 유지하였으나, 55℃에서는 30분후 不活性化率이 13%, 60℃에서는 26%, 65℃에서는 65%이었으며, 55℃에서 25분 보존했을 때 不活性化率이 4%, 60℃에서 11%에 불과해 비교적 안정했

으나, 65℃에서 시간이 경과함에 따라 不活性化率이 급격히 증가함을 알 수 있었다.

5) 金屬 ion의 影響

각종 金屬 ion의 농도를 1mM과 5mM되게 첨가해 酵素活性을 검토한 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 Mn<sup>2+</sup>1mM과 5mM에서 효소활성이 증가된 반면 Zn<sup>2+</sup>에서는 약간 감소되었고 Hg<sup>2+</sup>과 Cu<sup>2+</sup>에서는 현저히 阻害되었다.

본 실험에서 Mn<sup>2+</sup>이 酵素活性을 월등히 증가시켰기 때문에 Mn<sup>2+</sup>를 1, 5, 10, 20mM되게 하여 酵素活性을 검토한 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 Mn<sup>2+</sup>의 농도가 증가함에 따라 酵素活性도 증가하였다.

Table 2. Effect of Metal Ions on the Activity of the Alkaline Protease.

Salts	Concentration (mM)	Relative Activity (%)
None		100.0
MnCl <sub>2</sub>	1	134.5
	5	391.7
MgCl <sub>2</sub>	1	101.0
	5	100.0
CuSO <sub>2</sub>	1	71.6
	5	52.5
CuSO <sub>4</sub>	1	70.8
	5	50.2
FeSO <sub>4</sub>	1	102.6
	5	100.0
CaCl <sub>2</sub>	1	100.0
	5	97.0
ZnCl <sub>2</sub>	1	96.0
	5	96.0
ZnSO <sub>4</sub>	1	97.0
	5	89.0
HgCl <sub>2</sub>	1	40.1
	5	32.3

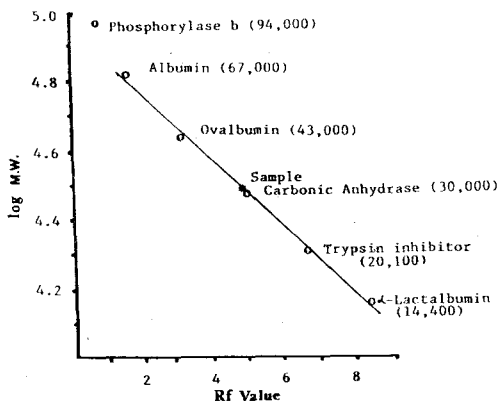
Table 3. Effect of Manganese Chloride Concentration on the Activity of the Alkaline Protease.

Salts	Concentration (mM)	Relative Activity (%)
None		100.0
MnCl <sub>2</sub>	1	134.4
	5	191.4
	10	260.6
	20	294.1



A: Standard protein  
B: Purified Alkaline Protease

Fig. 10. SDS-PAGE of the Purified Alkaline Protease and Low Molecular Weight Kit.



Molecular weight of the enzyme was determined to be 30, 100.

Fig. 11. Molecular Weight Determination of the Enzyme by SDS-PAGE Using SDS-Phosphate Continuous Buffer System.

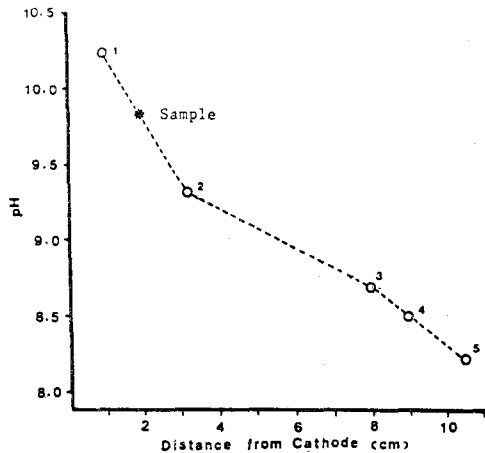
그러나  $Mn^{2+}$ 이온이 Folin's phenol시약의 물색에 큰 영향을 준다는 보고<sup>28)</sup>로 미루어 보아 실제로 효소活性 증가에 영향을 미쳤는지는 더 연구해 봐야 할 것으로 생각된다.

6) 分子量 測定

Focusing하여 정제된 효소의 SDS-PAGE를 행한 결과는 Fig.10과 같고 이를 標準蛋白質의 Rf 값과 分子量에 따라 plotting한 결과 Fig.11에서 보는 바와 같이 본 효소의 分子量은 30,100으로 추정되었고, Fig.10에서 보는 바와 같이 단일 band를 나타냈기 때문에 본 효소는 monomer로 추정되었다.

7) 等電點의 測定

Cathode로부터 標準蛋白質 및 본 효소의 위치를 거리로 나타낸 결과 Fig.12에서 보는 바와 같이 pI값은 9.80으로 추정할 수 있었다.



1. cytochrome C (pI-10.25)
  2. trypsinogen (pI-9.30)
  3. lentil lectin-basic (pI-8.65)
  4. lentil lectin-middle (pI-8.45)
  5. lentil lectin-acidic (pI-8.15)
- Isoelectric point of the alkaline protease was calculated to be 9.80.

Fig. 12. High pI Calibration Kit Run on 1% Agarose IEF Containing Pharmalyte 8-10.5.



## 要 約

능이 [*Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito]로부터蛋白質加水分解 酵素를 분리 정제하여 그 특성을 조사하였다.

본 효소는 Tri-acryl CM-cellulose, Ultrogel AcA 54, Hydroxy apatite column chromatography와 preparative isoelectric focusing 방법으로 순차 정제되었고, 정제된 효소는 PAGE상에서 단일 band를 나타내었으며 活性은 62.50. D/mg. protein으로 粗酵素보다 8.01배 증가하였다.

作用最適 pH는 10.1로 alkaline protease였으며 作用最適 溫度는 57℃부근이었다.

50℃ 이하의 溫度와 pH 4.0~10.8 범위에서 安定하였으나, 60℃에서 30분후 26%, 65℃에서는 65%가 失活되었다.

Mn<sup>2+</sup>은 효소의 活性을 증가시켰으나 Hg<sup>2+</sup>와 Cu<sup>2+</sup>는 현저히 저해시켰다.

SDS-PAGE에 의해 分子量은 30,100으로 측정되었고, monomer임이 확인되었다.

等電點은 9.80이었다.

본 연구는 1985년 문교부 학술연구조성비에 의해 연구되었습니다.

## 參 考 文 獻

1. Tasuziro, I.: Morphology and Classification, in the Biology and Cultivation of Edible Mushroom, Academic Press, New York, 3 (1978).
2. Ikekawa, T., Uehara, N., Maeda, Y., Nakamishi, M. and Fukouka, F.: *Cancer Res.*, **29**, 734 (1969).
3. Hatanak, S. and Terakawa, H.: *Bot. Mag.*, **81**, 259 (1968).
4. Holts, R.B.: *J. Agri. Food Chem.*, **19**, 1272 (1972).
5. Birch, G.C.: *Plant Foods Man.*, **1**, 49 (1973).
6. Ee, C.O. Chung, J.W. and Kim, B.K.: *Kor. J. Mycol.*, **9**(3), 153 (1981).
7. 洪載植, 南宮熙: 全北大農大論文集, 第VI輯, 107 (1975).
8. 洪載植: 全北大論文集 自然科學篇 第21集,

- 215 (1979).
9. 村尾澤夫: 1982, 科學研究費補助金(一般研究 A) 研究成果 報告書.
10. Lee, M.C. and Nam, C.W.: *Kor. J. Biochem.* **17**(3), 219 (1984).
11. Yamasaki, Y. and Suzuki, Y.: *Agri. Biol. Chem.* **42**(5), 971 (1978).
12. Zucker, S., Buttle, D.J., Nicklin, H.J. and Barrett A.J.: *Biochem. Biophys. Acta*, **5** (825), 196 (1985).
13. 노봉수, 박관화: 한국식품과학회지, **12**(3), 209 (1980).
14. Syu, W.J., Wu, S.H. and Wans, K.T.: *J. Chromatogr.*, **262**, 364 (1983).
15. Kaarcholm, N.C. and Skack, P.: *Acta Chem. Scand*(B), **37**, 607 (1983).
16. Warton, C.W.: *Biochem. J.*, **143**, 575 (1974).
17. Silverman, R.M. and Kezdy, F.J.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **167**, 678 (1975).
18. Kortt, A.A., Hamilton, S., Webb, C.E. and Zernes, B.: *Biochemistry*, **13**(10), 2023 (1974).
19. Whitaker, J.R.: *Food Res.*, **22**, 468 (1957 a).
20. Waters, J.A. and Sinsh, A.K.: *J. Clin. Lab. Immunol.* **12**, 151 (1984).
21. Heain, P.R., Formor, J. and Russel, R.G.: *Cell Mol. Biol.*, **30**, 97 (1984).
22. Butta-choduhry, T.A. and Rosenberry, T.L.: *J. Biol. Chem.*, **10**, (259), 5653 (1984).
23. Helting, T.B. and Nau, H.H.: *Acta Pathol. Microbio. Immunol. Scand.* (S), **92**, 59 (1984).
24. Gottschall, G.Y. and Kies, M.W.: *Food Res.*, **7**, 373 (1942).
25. Tappel, A.L., Miyada, D.S., Sterling and Maizer, V.P.: *Food Res.*, **21**, 375 (1956)
26. Weiner, S., Mangel, M., Mahar, L. and Kelley, G.C.: *Food Technol.*, **12**, 248 (1958).
27. 윤정의, 양용: 한국식품과학회지, **6**(3), 163

- (1973).
28. Scopes, P.K. : The extract in the techniques for protein purification, in the Techniques in the Life Sciences, Elsevier North-Holland, New York, B101/2 (1978).
29. Isoelectric Focusing Principles & Methods, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, 15 (1982).
30. Manrique, and Lasky, A. : Electrophoresis, 2, 315 (1981).
31. 金相烈 : 韓國産業微生物學會誌, 1(2), 93 (1973).
32. Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L. and Randal, R.L. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
33. Reisfel, R.A, Lewis, U.J. and Williams, D.E. : *Nature*, **195**, 281 (1962).
34. Cathodic Disc-PAGE system for basic protein, Polyacrylamide gel electrophoresis laboratory techniques (Revised edition), Pharmacia Fine chemicals, Uppsala, 23 (1985).
35. Weber, K. and Osborn, M. : *J. Biol. Chem.*, 244, 4406 (1969).
36. Olssen, I, and Laas, T. : *J. Chromat.*, **215**, 373 (1981).
37. Burdett, P.E. : *J. Forens. Sci.*, **26**, 405 (1981).
- 38) Swada, J. : *Agr. Biol. Chem.*, **28**(6), 348 (1964).