

# Biochemical Characterization of Protease Produced by *Cordyceps nutans*

Seon Ah Kim, and Mi-Kyung Kim

Department of Clinical Pathology, Gimhae College, Gimhae 621-706, Korea

The fruiting body of *Cordyceps* is derived from the pupa or larva of insects infected by the entomopathogenic fungi *Cordyceps*. The fruiting body has been used as an anti-cancer and anti-inflammatory ingredient in traditional Chinese medicine. The biochemical characteristics of protease isolated from *Cordyceps nutans* were investigated in this study. The culturing period for production of protease by *C. nutans* was 10 days. The acidity was pH 7.0, and the temperature was 25°C. The carbon and nitrogen sources for the production of the protease were glucose and yeast extract, respectively. The ratio of C/N was 2% glucose and 0.6% yeast extract. 0.06% CuSO<sub>4</sub> was used as the inorganic salt. The investigation into the acidity of the protease produced by *C. nutans* revealed that the optimal pH and temperature were pH 7.0 and 30°C. The stability of the protease was shown as pH 6.0~9.0 and 30~50°C. The investigation into the influence of the metal ions on the enzyme activation of *C. nutans* revealed that it was inhibited in ZnSO<sub>4</sub> and activated in FeSO<sub>4</sub>.

**Key Words :** *Cordyceps nutans*, protease, Biochemical characterization

## 서 론(Introduction)

*Cordyceps*는 곤충기생균(entomopathogenic fungi)의 일종으로 자연생태계 내에서 곤충 집단의 밀도를 조절하기도 하지만 최근 한방약재로 또는 해충방제에 이용할 수도 있다는 점에서 사람들에게 많은 관심을 불러일으키고 있다. 지금까지 곤충에 침입하는 동충하초균은 세계적으로 약 800여종이 알려져 있다(성, 1999). 이들 중에서 버섯을 형성하는 것으로 알려진 것은 대부분 자낭균류의 *Cordyceps*에 속하는 균들로 약 300여종이 보고되었다(이, 2004). 동충하초균은 분류학적으로 자낭균이문의 핵균강, 맥각균목, 동충하초과에 속하며 상당수가 약리작용이 우수하여 의학 연구에 많이 쓰이고 있는데, *Cordyceps* 중 *Cordyceps sinensis*

는 고대로부터 중국에서 결핵, 천식, 마약중독해독, 자양강장제 등의 한약재로 사용되어 왔고, 일본에서도 *Cordyceps militaris*, *Cordyceps ophioglossoides*에서 면역기능증강, 항암효과가 있는 생리활성물질을 확인한 바 있다(남 등, 2004). 국내에서는 *Paecilomyces tenuipes*로부터 항암, 면역증강, 항피로 등의 효과를 구명하였다(Cho 등, 1999; Shin 등, 2001). 동충하초에서 생성되는 주된 생리활성물질은 cordycepin (3'-deoxyadenosine)이며, cordycepin의 활성에 대해서는 항세균성, 항바이러스성, 항암성 및 혈소판응집억제성 등의 효과가 있다고 보고되었다(Cory 등, 1965; Smuckler 와 Hadjiolov, 1972; Lovinger 등, 1973; Blakesley 와 Boezi, 1975; Richardson 등, 1975; Gumpert 와 Edelheit, 1976; Cho 등, 2007). 또한 *P. japonica*, *C. militaris*에서 혈전분해효소의 효능이 보고되었다(김, 2010; 김, 2002). 이와 같이 동충하초는 *Cordyceps*속을 중심으로 많은 연구가 진행되어 왔으며 특히 *C. militaris*와 *C. sinensis*를 중심으로 다른 동충하초 종에 대한 연구도 이루어지고 있다. 본 연구에서는 동충하초균의 포자가 기주로부터 자실체를 형성 시 강력한 단백질 분해제를 분비하는 것에 착안하여(김, 2002) 다른 동충하초속균에 비해 상대적으로 연구가 미흡한 편인 노

Corresponding Author : Kim, Seon-Ah, Department of Clinical Pathology, Gimhae College, Gimhae 621-706, Korea  
Tel: 010-8706-3590  
E-mail : wkdnfla95@naver.com

Received : 9 November 2012

Return for modification : 5 December 2012

Accepted : 14 December 2012

린제에서 유래한 *Cordyceps nutans*를 인공배양하고, *C. nutans*가 생산하는 단백분해효소활성을 조사하였다.

## 대상 및 방법(Materials and Methods)

### 1. 사용균주 및 배양

본 실험에 사용한 균주는 노린제에서 분리한 *C. nutans*로 PDA (potato dextrose agar)배지에 25℃에서 7일간 배양하여 접종원으로 사용하였다. 생산을 위한 액체배지로는 glucose 2%, yeast extract 0.6%, CuSO<sub>4</sub> 0.06% 를 첨가하고, pH 7.0으로 조정하여 25℃에서 10일간 배양하여 사용하였다.

### 2. 연구방법

#### 1) 조효소액의 제조

배양액 내의 균체를 제거한 여액을 4℃에서 20분간 5,000 rpm으로 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% 포화용액으로 4℃에서 염석하였다. 염석한 용액을 원심분리하여 상등액을 회수하고 다시 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 70% 포화용액으로 하여 염석시킨 후 4℃에서 10,000 rpm으로 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 각 침전물은 소량의 Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 용해하여 투석한 후 동결 건조하여 -70℃에서 보존하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

#### 2) Protease 의 생화학적 특성

##### (1) 최적 pH

Protease 활성의 최적 pH를 조사하기 위해 0.1 M 농도의 완충용액으로 pH 4.0에서부터 pH12.0까지 조절하여 효소활성을 측정하였다. pH4.0~6.0 완충용액은 0.1M citrate-phosphate, pH 6.0~8.0 완충용액은 0.1 M sodium-phosphate, pH 8.0~10.0 완충용액은 0.1 M Tris-HCl을, 그리고 pH 10.0~12.0 완충용액은 0.1 M glycine-NaOH를 사용하였다. 각 pH별로 0.1% casein(w/v)기질용액을 제조하여, 조효소액과 혼합하여 30 분간 30℃에 반응시킨 후 280 nm에서 protease활성을 측정하여 상대적 활성을 비교하였다.

##### (2) 최적 온도

Protease의 최적 활성온도를 조사하기 위하여 0.1% casein 용액(pH 7.4)을 제조하여 이를 조효소액과 혼합하고 반응온도를 20℃에서부터 100℃까지 10℃ 간격으로 측정하였다. 각각의 온도에서 30분간 반응시킨 후 280 nm에서 protease 활성을 측정하여 상대적 활성을 비교하였다.

##### (3) pH 안정성

pH에 따른 protease활성의 안정성을 조사하기 위하여 pH 4.0에서부터 pH 12.0까지 조사하였다. pH4.0~6.0 완충용액은 0.1M citrate-phosphate, pH6.0~8.0 완충용액은 0.1 M sodium-phosphate, pH 8.0~10.0 완충용액은 0.1 M Tris-HCl을, 그리고 pH 10.0~12.0 완충용액은 0.1 M glycine-NaOH 를 사용하였다. 각 pH의 완충용액과 조효소액을 혼합하여 30℃에서 1시간동안 전처리 시켰다. 전처리 반응액과 0.1% casein기질용액을 섞어 30분 동안 반응시킨 후, 잔류 protease 활성을 측정하여 상대적 활성을 비교하였다.

##### (4) 온도 안정성

온도에 따른 protease활성의 안정성을 조사하기 위하여 20℃에서부터 100℃까지 10℃ 간격으로 하여 완충용액과 조효소액을 혼합하여 1시간동안 전처리 시켰다. 전처리 반응액과 0.1% casein기질용액을 섞어 30℃에서 30분 동안 반응시킨 후, 잔류 protease 활성을 측정하여 상대적 활성을 비교하였다.

##### (5) Protease의 활성에 관한 금속이온 및 EDTA의 영향

Protease의 활성에 관한 여러 가지 금속이온 및 EDTA의 영향은 각종 금속이온과 EDTA를 각각 첨가한 후 30℃에서 30분간 반응 후 잔류 protease의 활성을 조사하였다. 각종 금속이온은 10 mM로서 FeSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, CoSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> 및 10 mM EDTA를 사용하였다.

##### 3) Protease 활성 측정

배양액을 원심분리(10,000 rpm, 5분, 4℃)한 후, 상등액을 분리하였다. Protease 활성 측정은 50 mM Tris-HCl(pH 7.4)

에 용해한 0.1% casein 기질용액 900  $\mu$ l와 효소액 100  $\mu$ l를 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. 반응액에 10% trichloroacetic acid 용액 100  $\mu$ l를 가하여 반응을 중지시키고 13,000 rpm에서 20분 동안 원심 분리하여 상등액을 회수하였으며, 상등액의 흡광도를 280 nm에서 측정하였다. 효소의 1 unit는 1분당 흡광도 0.01을 증가시키는데 필요한 효소량으로 하였다 (Braun V, 1980).

## 결 과(Result)

### 1. Protease 활성의 최적 pH

*C. nutans*가 생산한 protease의 활성에 관한 pH 영향을 조사하기 위해 0.1 M 농도의 완충용액으로 pH 4.0에서부터 pH12.0까지 조절하여 효소활성을 측정하였다. 각각의 pH용액에 조효소를 용해하여 0.1% casein(w/v)기질용액과 30분간 30 $^{\circ}$ C에 반응시킨 후 protease 활성을 측정한 결과는 Fig. 1에서와 같이 pH 7.0에서 최적 protease 활성이 나타났다.

### 2. Protease 활성의 최적 온도

Protease활성에 관한 최적온도를 조사하기 위하여 20 $^{\circ}$ C에서 10 $^{\circ}$ C 간격으로 하여 100 $^{\circ}$ C까지 설정하여 조사한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과 30~60 $^{\circ}$ C에서 높은 활성이 나타났으며 그 중에서도 30 $^{\circ}$ C에서 최대 활성을 보였고, 70 $^{\circ}$ C부터는 활성이 급격히 감소하였다.

### 3. Protease의 pH 안정성

Protease의 pH 안정성을 조사하기 위하여 pH4.0에서부터 pH12.0까지의 각각의 완충용액을 조제하여 사용하였다. 각각의 pH에서 조효소액과 반응시킨 후 잔류활성을 조사하였다. protease 활성의 안정성 조사 결과 Fig. 3에서 나타난 것과 같이 pH6.0에서 pH9.0까지 안정한 것으로 나타났으며, 이 중 pH7.0에서 가장 높은 안정성을 보였다. 또한 pH10.0에서부터는 서서히 감소하나 pH10.0에서 pH12.0까지는 비슷한 활성을 보였다.

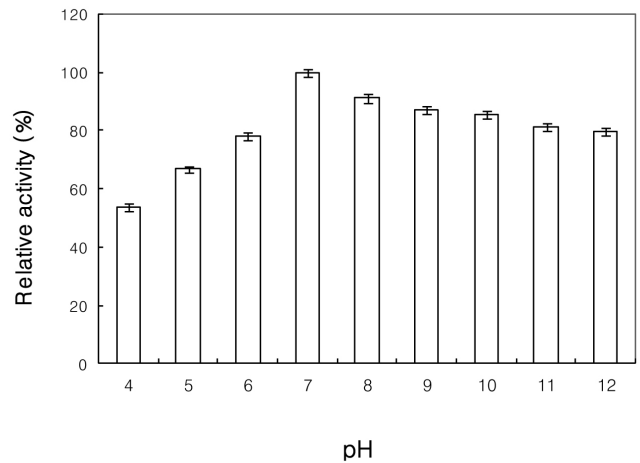


Fig 1. Effect of pH on the activity of protease from *C. nutans*.

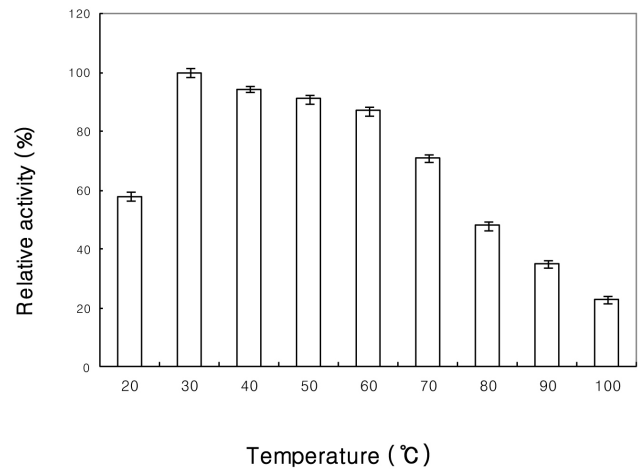


Fig 2. Effect of temperature on the activity of protease from *C. nutans*.

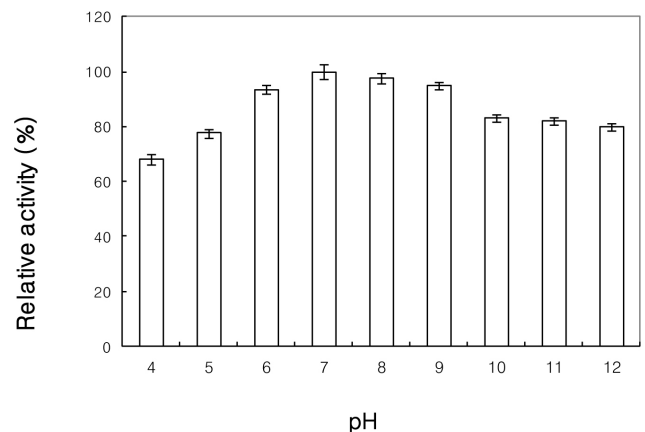


Fig 3. Effect of pH on the stability of protease from *C. nutans*.

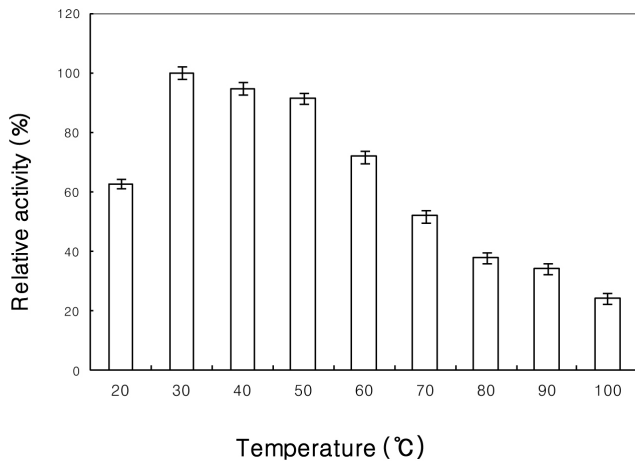


Fig 4. Effect of temperature on the stability of protease from *C. nutans*.

#### 4. Protease의 온도안정성

Protease의 열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 조효소액을 20°C에서 10°C 간격으로 하여 100°C까지의 온도에서 1시간 반응 후 그 잔류활성을 조사하였다. Fig. 4에서 나타난 것과 같이 온도가 낮거나 높은 경우 활성이 저하되었으나, 30°C에서부터 50°C까지의 범위에는 80% 이상의 안정성을 보였고, 그 중 30°C에서 가장 높은 안정성을 보였다.

#### 5. 금속이온(metal ion) 및 EDTA의 영향

효소활성에 대한 금속이온 및 EDTA의 영향을 조사하기 위해 금속이온 및 EDTA처리를 하지 않은 조효소액을 대조군으로 하여 10 mM FeSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, CoSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, EDTA 용액에 조효소액을 처리하여 활성을 측정하였다. Table 1에서 나타난 것과 같이 ZnSO<sub>4</sub>에서 저해가 나타나고, FeSO<sub>4</sub>에서는 오히려 반응이 촉진되는 것이 관찰되며, 나머지 금속이온들은 효소활성에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Table 1. Effect of several metal ions and EDTA on the activity of protease

Metal ion (10 mM)	Relative activity (%)
Control	100
FeSO <sub>4</sub>	528
CuSO <sub>4</sub>	106
CoSO <sub>4</sub>	96
CaCl <sub>2</sub>	93
MgSO <sub>4</sub>	94
ZnSO <sub>4</sub>	87
MnCl <sub>2</sub>	91
EDTA	108

실체를형성하거나포자과를형성하는곤충기생균(entomopathogenic fungi)의 일종이며, 자실체는 불로장수의 비약으로 결핵, 황달, 아편중독의 해독제, 강장제로 이용되고 있는 균이다(성 등, 1993). 많은 종류의 동충하초들은 인공적으로 자실체 형성이 가능한 것으로 *Cordyceps*속을 중심으로 많은 연구가 진행되고 있다. 인공생산을 위한 액체배양에 관한 연구는 Sung 등(2002)은 *C. militaris*, Lee 등(2000)은 *Cordyceps scarabaeicola*의 균사체 배양을 위한 배양이나 영양원에 대한 최적조건을 보고하였는데 *Cordyceps*속의 균주는 대부분 PDA배지에서 적합하였으며, 영양상 특별한 제한인자는 없었고, 배지의 pH는 중성부근, 배양온도는 25°C가 가장 적합하였다. Choi 등(1999)은 *P. tenuipes*, Sung 등(2002)은 *C. militaris*, Lee 등(2002)은 *C. scarabaeicola*의 자실체 생성조건을 규명하였다. 이에 본 연구는 노린재에서 유래한 *C. nutans*에 의해 분비되는 protease의 특성을 밝히기 위해 본 실험을 수행하였다. *C. nutans*의 protease 생산을 위한 배양은 PDA(potato dextrose agar)배지에 25°C에서 7일간 배양하여 접종원으로 사용하였고, 기본배지로는 glucose 2%, yeast extract 0.6%, CuSO<sub>4</sub> 0.06%를 첨가하여 25°C에서 10일간 배양하여 사용하였다. 배양상등액을 원심분리하고 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 염석 및 투석하여 제조한 조효소에 대하여 protease의 최적온도 및 pH, 온도 안정성과 pH 안정성을 각각 조사하였다. 최적 protease활성 pH를 조사한 결과 pH 7.0에서 최적을 보였으며 안정성 실험에서는

### 고찰(Discussion)

*Cordyceps*속 균은 모든 곤충균의 유충, 번데기, 성충 등의 전시기에 걸쳐 침입하여 곤충을 죽게한후이를기주로자

pH 6.0에서부터 pH 9.0까지에서 안정성을 80% 이상 유지하였고, 특히 pH 7.0에서 안정성이 가장 높았다. *C. nutans*의 protease 온도 안정성을 조사한 결과 30℃에서 50℃까지 80%이상의 활성을 보였고, 최적 활성온도는 30℃였다. 이는 *C. militaris*에 관한 효소활성도가 pH 7.0에서부터 pH 8.0까지 안정성을 보이고, 20℃에서부터 40℃까지 안정성을 보인 점(김, 2006)과 *Paecilomyces farinosus*가 pH 8.5에서 최적 효소활성을 나타낸 점(Luis V, 2002) 등이 비슷하였다. 또한 *C. nutans*의 금속이온에 미치는 영향을 조사한 결과 ZnSO<sub>4</sub>에서 저해가 나타나고, FeSO<sub>4</sub>에서는 오히려 반응이 촉진되는 것으로 조사됐으며, 나머지 금속이온들은 저해되거나 효소활성에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이는 *C. militaris*의 효소활성도가 Fe<sup>2+</sup>와 Zn<sup>2+</sup>에서 저해되었다(김, 2006)는 결과와는 다소 상이한 경향을 나타냈다. 본 실험에서는 *C. nutans*가 생산한 protease의 활성에 관한 생화학적 특성을 조사하였으며, 향후 *C. nutans*가 생산하는 protease의 활용가능성을 평가하기 위해서는 위와 같은 실험 외에도 정제를 통한 더 면밀한 조사를 실시하여야 할 것이다.

### 참고문헌(Reference)

- Blakesley RW, Boezi JA. A kinetic and structural characterization of adenosine-5'-triphosphate:ribonucleic acid adenylyl-transferase from *Pseudomonas putida*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1975, 414(2):133-45.
- Braun V, Schmitz G. Excretion of a protease by *Serratia marcescens*. *Tech Microbiol*. 1980, 124:55-61.
- Cho SY, Shin KH, Song SK, Sung JM. Mass production and useful material development of the entomopathogenic fungi (*Cordyceps*) growing on the silkworm, *Bombyx mori* L. *Rural Development Agaricultural*. 1999, 1-234.
- Cory JG, Suhadolink RJ, Resnick B, Rich MA. Incorporation of cordycepin(3'-deoxyadenosine) into ribonucleic acid of human tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta*. 1965, 103(4):646-653.
- CHO HJ.. Inhibitory effects of cordycepin(3'-deoxyadenosine), a component of *Cordyceps militaris*, on human platelet aggregation induced by Thapsigargin. *J. Microbiol. Biotechnol*. 2007, 17(7):1134-1138.
- Choi IY, Choi JS, Lee WH. The production of artificial fruiting body of *Paecilomyces japonica*. *Kor. J. Mycol*. 1999, 27(2):87-93.
- Kim JS, Kumar Sapkota, Park SE, Choi BS, Kim S, Nguyen Thi Hiep, et al. A fibrinolytic enzyme from the medical mushroom *Cordyceps militaris*. *Kor. J. Microbiol*. 2006, 42(4):622-631.
- Lee JK, Choi YS, Sung JM. Investigation on culture characteristics of mycelial growth by *Cordyceps scarabaeicola*. *Kor. J. Mycol*. 2000, 28(2):81-87.
- Lee JK, Sung JM, Park YJ. Investigation of the condition of fruiting body formation by *Cordyceps militaris*. *Kor. J. Mycol*. 2002, 30(1):11-17.
- Lovinger GG, Klein RA, Gilden RV, Hatanaka M. The effect of cordycepin on cell transformation by RNA tumor viruses. *Virology*. 1973, 55(2):524-526.
- Luis V. Lopez-Llorca, Toni Carbonell, Sonia Gomez-Vidal. Degradation of insect cuticle by *Paecilomyces farinosus* proteases. 2002, *Mycological Progress*. 1(3):249-256
- Richardson LS, Ting RC, Gallo RC, Wu AM. Effect of cordycepin on the replication of type-cRNA tumor viruses. *Int. J. Cancer*. 1975, 15:451-456.
- Shin KH, Lim SS, Lee SH, Lee YS, Cho SY. Antioxidant and immunostimulating activities of the fruiting bodies of *Paecilomyces japonica*, a new type of *Cordyceps* sp. *Health Aging for Functional Longevity*. 2001, 928:261-273.
- Smuckler EA, Hadjiolov AA. Inhibition of hepatic deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerases by the exotoxin of *Bacillus thuringiensis* in comparison with the effects of amanitin and cordycepin. *Biochem. J*. 1972, 129(1):153-66.
- Sung JM, Choi YS, Shrestha B, Park YJ. Culture characteristics of mycelial growth by *Cordyceps militaris*. *Kor. J. Mycol*. 2002, 30(1):1-5.
- Sung JM, Choi YS, Shrestha B, Park YJ. Investigation on artificial fruiting of *Cordyceps militaris*. *Kor. J. Mycol*. 2002, 30(1):6-10.
- Shim JO, Son SG, Kim YH, Lee YS, Lee TS, Lee SS, et al. The cultural conditions affecting the mycelial growth of *Griofola umbellata*. 1997, *Kor. J. Mycol*. 25(3): 209-218.
- 김희창. 눈꽃동충하초로부터 혈전분해효소 정제 및 특성 분석. 2010, 조선대학교 학위논문
- 김재성. 밀리타리스동충하초와 약용버섯으로부터 혈전용해효소 정제 및 특성 분석. 2002, 조선대학교 학위논문
- 남성희, 정이연, 홍인표, 지상덕, 박해철, 이진근, 등. 동충하초 자원의 효율적 이용에 관한 고찰. 한국잡사학회지. 2004, 46(1):18-22.
- 성재모, 이현경, 양근주. 동충하초속균의 형태적인 특징과 단백질 pattern에 의한 계통분류. 한국균학회지. 1995, 23:92-104.



21. 성재모. 동충하초의 생태와 분류. 한국균학회. 1999.
22. 성재모, 김천환, 양근주, 이현경, 김양숙. 동충하초속균의 분포 및 *Cordyceps militaris*와 *C. nutans*의 이용에 관한 연구. 한국균학회지. 1993, 21(2):94-105.
23. 이해미. 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*) 열수추출물의 항암활성 및 면역 조절작용에 미치는 영향. 2004, 연세대학교 박사학위논문
24. 유관희. 화경버섯의 배양조건에 따른 균사생장 및 섬유질분해 효소 활성에 관한 연구. 한국미생물학회지. 2003, 31(1):14-21.