

## 키위열매 Protease 의 추출 정제 및 그 특성에 대하여

金 福 子

대전실업전문대학 식품영양과

### Purification and Characterization of Kiwifruit Protease

Bok-Ja Kim

Dept. of Food and nutrition, Dae Jeon Junior College

#### Abstract

These studies were conducted to investigate the purification and characterization of Kiwifruit protease, and the results obtained were as follows: The protease was purified by ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-100 filtration and DEAE-Sephadex A-50 column chromatography and purified enzyme gave a single protein band on polyacrylamide gel electrophoresis. The specific activity of purified enzyme was 30,10 units/mg protein and the yield was 7.48. The purified enzyme showed a high affinity for casein and hemoglobin. The optimal pH and temperature for enzyme activity were 7.0 and 45°C, respectively. The enzyme activity was strongly inhibited by HgCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>. However, the enzyme was activated by cysteine and EDTA. The Michaelis constant for casein was calculated to be 50.5 mg/ml according to the Line weaver-Burk method, and its molecular weight was determined as 23,500 by polyacrylamide gel electrophoresis.

Key words: kiwifruit protease, fractionation of mlase, purification of protease, characterization of protease

#### 서 론

식물성 protease 중 papain<sup>(1)</sup>, chymopapain<sup>(2)</sup>, bromelain<sup>(3)</sup>, ficin<sup>(4)</sup> 등에 관한 연구는 많으며 이들 중에는 연육제, 소화제, 소염제 또는 맥주의 혼탁방지제 등 식품공업용 혹은 의약품으로써 널리 이용되고 있는 것도 있다. 최근 Yamaguchi 등<sup>(5)</sup>은 45종의 채소와 18종의 과실을 파쇄 착즙한 액을 사용하여 gelatin 분해활성을 측정하였던 바 이미 강력한 protease 가 함유되어 있다고 알려져 있는 papaya, pineapple, 무화과, 생강 외에 asparagus, kiwi, miut, prince melone 등<sup>(6)</sup>에도 이들 못지않게 강한 protease 가 함유되어 있다고 보고한 바 있다. 한편 우리나라에서는 오래전부터 전통 육류요리에 속하는 불고기, 육회, 갈비찜 등을 하기 위하여 육류를 숙성시킬 때 배를 마쇄한 즙액을 첨가해 와서 배에 대한 연구<sup>(7)</sup>가 최근 보고되기도 하였다. 이에 본인은 근래 수입상품으로 흔히 구할 수 있게된 키위열매를 구입하여 마쇄 착즙한 액

중에 함유되어 있는 효소 중 protease 활성이 강함을 발견하게 되었으므로 이 효소의 추출, 정제 및 성질들을 검토하여 몇가지 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

#### 재료 및 방법

##### 재료

시료용 키위열매

본 실험에서 사용한 키위열매 (*Actinidia chinensis* Planch.)는 1988년도 뉴질랜드산 수입상품을 구입하여 -20°C에 저장해 놓고 사용하였다.

##### 시약

기질로 사용한 casein, hemoglobin 및 elastin은 영국의 BHD chemical 사 제품, L-cysteine 과 trichloroacetic acid (TCA)는 일본의 Junsei 사 제품, Sephadex G-100과 DEAE-Sephadex A-50은 Pharmacia Fine Chemical 사 제품, 기타 일반시약품은 분석용 특급시약을 사용하였다.

##### 방법

Corresponding author: Bok Ja Kim, Department of Food and nutrition, Dae Jeon Junior College, Dong-gu, Dae Jeon, 300-100

### 조효소액의 조제

일정량의 키위열매에 5mM cysteine 과 2mM EDTA 의 안정제를 첨가한 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.0) 일정량을 Homogenizer 에 넣고 10,000 rpm 으로 5분간 파쇄하여 cheese cloth 로 여과한 다음 10,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리한 후의 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

### 효소의 정제

조효소액을 유안염석 과정을 거쳐 protease 및 단백질을 정량 비교한 후 이를 PEG 6,000으로 농축하여 Sephadex G-100 column (1.6×150 cm) 상에 loading 한 후 안정제를 첨가한 0.02M Sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 fraction volume 5ml, elution 속도는 8.75 ml/hr 로 유출시켰다. 그런다음 활성부분을 PEG 6,000으로 농축하여 DEAE-Sephadex A-50 column (2.2×58 cm) 상에 주입하여 상기사용한 동일 buffer 로 용출시켜 분획하였으며 요약하면 그림 1과 같다.

### protease 활성의 측정

#### 기질용액의 조제 및 활성측정

Hammasten casein 을 0.1M Sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 1.0% 농도가 되도록 용해하여 기질용액으로 하고 Kunitz 법<sup>(6)</sup>에 따라 활성을 측정하였다. 즉, 기질용액 1.0ml 에 조효소액 1.0ml 를 가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후 3.0ml 의 5.0% TCA 용액을 가하여 반응을 정지시키고 실온에 30분간 정치하였다가 Toyo filter paper No. 5B 로 여과하여 침전을 제거한 용액 중의 TCA 가용성 peptide 의 양을 280 nm 에서 흡광도를 측정, 흡광도의 증가를 직접 표시하거나 1분간에 0.001의 흡광도를 증가시키는데 소요된 효소량을 1 unit 로 표시하였다.

### 단백질의 정량

효소의 정제과정 중에 있어서의 단백질의 정량은 280 nm 에서의 흡광도를 측정하여 표시하였고 비활성측정을 위한 단백질의 정량은 Lowry<sup>(9)</sup>법에 따라 측정하였으며 이때 표준단백질은 bovine serum albumin 을 사용하였다.

### 효소학적 성질의 검토

#### pH 의 영향

작용 최적 pH 는 pH 2~11 이 되도록 조제한 1% casein 용액 1ml 를 1ml 의 효소액에 가하여 효소활

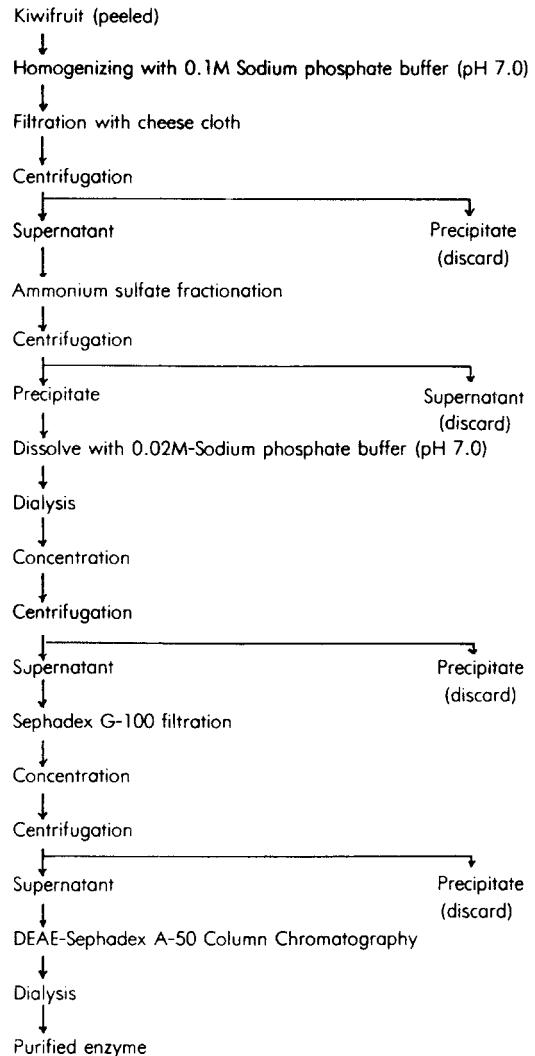


Fig. 1. Purification procedures of kiwifruit protease.

성을 측정 비교하였고, pH 안정성은 각 pH 의 buffer 와 효소액을 동량 혼합하여 4°C에서 24시간 방치하였다가 잔존 활성을 측정 비교하였으며 이때 사용한 buffer 로서는 pH 2~8에서는 0.1M McIlvaine buffer, pH 9~11에서는 0.1M Tris-HCl buffer 를 사용하였다.

### 온도의 영향

작용 최적온도는 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.0) 에 용해되어 있는 효소액 1ml 와 동일 buffer 에 용해한 1% casein 용액 1ml 를 20~100°C에서 20분간 반응시켜 측정하였고, 온도안정성은 효소액을 각 온도에서 20분간씩 처리한 후에 잔존활성을 측정 비교하였다.

기질특이성

Casein, hemoglobin 및 elastin을 기질로 하였을 때의 분해 활성을 측정 비교하였으며 casein과 hemoglobin의 분해력은 Kunitz법<sup>(8)</sup>에 의하여, elastin 분해력은 Lewis 등<sup>(10)</sup>의 방법에 의하여 측정하였다.

각종 화합물의 영향

금속염류 중의 CaCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub> 및 HgCl<sub>2</sub>, 환원제인 2-mercaptoethanol, cysteine, glutathion 금속chelator인 EDTA를 0.5~2.0mM이 되도록 첨가한 효소액 1ml를 37°C에서 60분간 처리한 후에 1ml의 기질용액을 가하여 casein 분해력을 측정 비교하였다.

Km 값

기질의 농도에 따르는 효소의 반응속도를 측정하기 위하여 10~100 µg/ml의 casein 용액에 정제효소를 작용시켰을 때의 반응속도를 측정 후 1/S에 대한 1/V의 Lineweaver-Burk 법<sup>(11)</sup>으로 plot하여 얻은 직선으로부터 Km 값을 구하였다.

효소의 순도 및 분자량 측정

효소의 순도는 Davis<sup>(12)</sup>의 방법에 따라 정제효소를 PAGE에 의하여 확인하였으며 분자량측정은 Weber<sup>(13)</sup>의 방법에 따라 SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis를 실시한 후 표준단백질과 정제 효소단백질의 상대이동거리를 반대수그래프에 도화하여 분자량을 측정하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

상기조건하에서 추출조제한 조효소액을 유안분획한 결과는 표 1에 나타난 바와 같으며 0.25~0.65 포획에서 분획한 결과가 가장 양호하였으며 22.36%의 활성 수율과 20, 30 unit/mg의 비활성을 나타내어 순도가

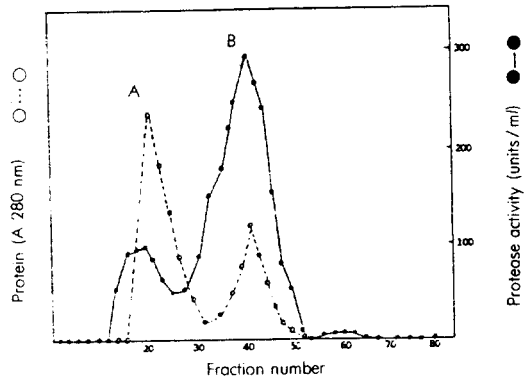


Fig. 2. Gel filtration of Kiwifruit protease on sephadex G-100.

The Column (1.6×150 cm) was equilibrated with 0.02M sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 5mM cysteine, 2 mM EDTA, and eluted with the same buffer. The flow rate was 8.57 ml/hr and 5 ml fractions were collected.

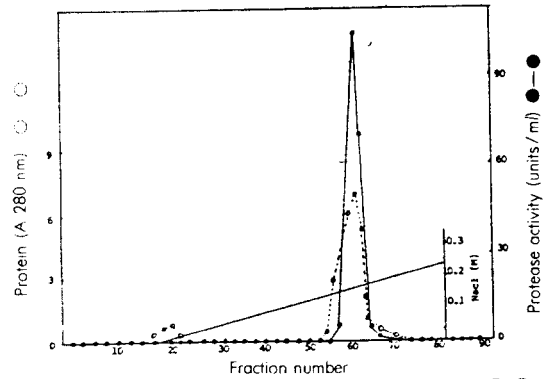


Fig. 3. Chromatography of Kiwifruit protease on DEAE-Sephadex A-50.

The column (2.2×58 cm) was eluted with a linear gradient from 0.02M-sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 5 mM-cysteine, 2 mM EDTA to the same buffer with 0.3M sodium chloride at flow rate of 12.5ml/hr and fraction of 50 ml was collected.

약 7배 높아진 결과를 나타내었다. 유안염석에 의해서 얻은 활성획분을 투석, 농축한 다음 Sephadex G-100 column chromatography한 결과 그림 2와 같이

Table 1. Purification of Kiwifruit protease

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Recovery (%)	Purity
Crude enzyme	14,183	39,045	2.75	100	1
Ammonium sulfate	430	8,729	20.30	22.36	7.38
Sephadex G-100	187	4,288	22.61	10.98	8.22
DEAE-Sephadex A-50	97	2,920	30.10	7.48	10.95

peak가 두개 얻어졌으므로 두개의 peak 중 효소활성이 현저히 강한 peak B를 main active peak로 인정하여 이를 다시 DEAE-Sephadex A-50 column chromatography를 실시한 결과는 그림 3과 같이 protein peak와 protease active peak가 일치함을 볼 수 있었으며 이 fraction은 조효소에 비하여 비활성이 10.95배 증가하였고 활성수율은 7.48%에 달하였다. Kaneda 등<sup>(6)</sup>은 melon protease를 유안분획, CM-cellulose column chromatography 및 Sephadex G-75 filtration을 통하여 정제하였을 때 비활성이 약 7배 증가하였고 회수율은 54%이었다고 보고하였으며 Ebata 등<sup>(2)</sup>은 유안분획, 식염용액, 침전방법 등을 거쳐 papain 결정을 얻었을 때의 수율은 4%, 비활성은 2.90으로 약간 상승하였다고 보고한 바 있다. 또 Alexander 등<sup>(14)</sup>은 무화과 유액을 추출하여 유안분획, 식염분획 CM-cellulose column chromatography 및 Sephadex G-75 filtration을 거쳐 ficin II와 ficin III를 결정화하였고 이때의 수율은 0.28%와 0.12%였으며 비활성은 양자 공히 약 4배 상승하는 결과를 얻었다고 보고한 바 있다.

효소학적 성질

pH의 영향

Kiwifruit protease의 활성 및 안정성에 미치는 pH의 영향을 검토한 결과는 그림 4, 5와 같았으며 pH 7.0에서 활성이 가장 강하였고 pH 7.0~8.0에서 안정하였다.

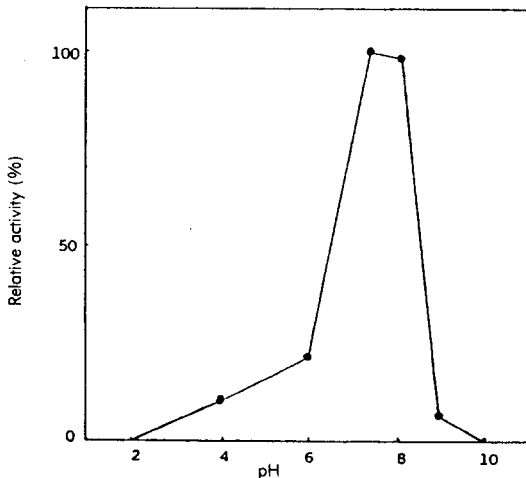


Fig. 4. Effect of pH on the activity of Kiwifruit protease. The buffers used were Mclvaine, pH 2-8, and Tris-HCl, pH 9-11.

온도의 영향

효소의 활성 및 안정성에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과는 그림 6, 7과 같으며 pH 7.0에 있어서의 작용 최적온도는 40~45°C이고 50°C 이하에서는 안정하였으나 그 이상의 온도에서는 안정성이 급격히 저하하였다. 한편 papain<sup>(11)</sup>은 고온하에서 매우 안정하며 ficin<sup>(14)</sup>의 작용 최적온도는 pH 7.5에서 62.5°C이고 melon protease<sup>(6)</sup>는 70°C가 작용 최적온도이고 60°C 이하에서는 안정하다고 보고된 바 있다.

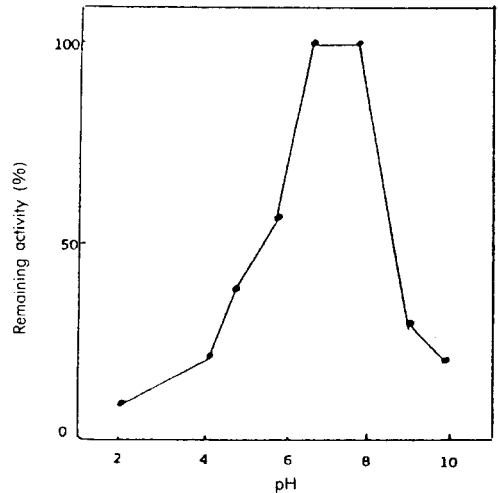


Fig. 5. Effect of pH on the stability of Kiwifruit protease. The enzyme solution were kept at various pH's at 4°C for 24 hrs and the remaining activity was measured by the same method as Fig. 4.

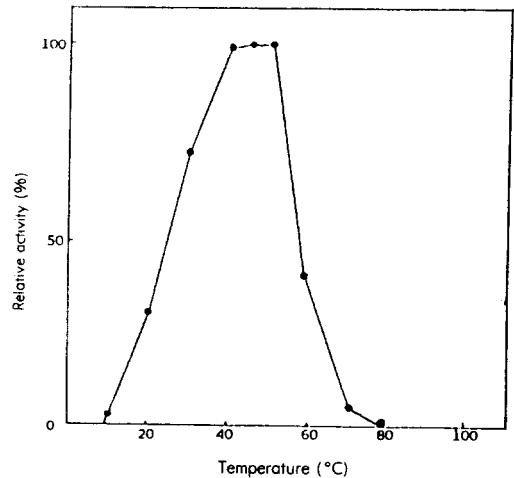


Fig. 6. Effect of temperature on the activity of Kiwifruit protease.

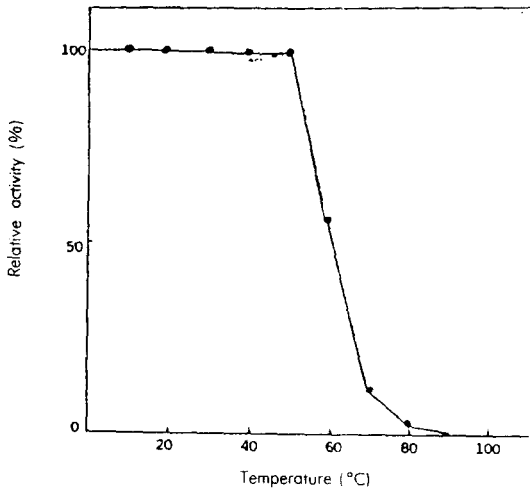


Fig. 7. Effect of temperature on the stability of Kiwifruit protease.

The enzyme solution of 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.0) containing 5mM cysteine and 2 mM EDTA were preincubated at various temperature for 20 min.

Table 2. Substrate specificity of Kiwifruit protease

Substrate	% of resolution
Casein	27
Hemoglobin	25
Elastin	7

Table 3. Effect of various compounds on the activity of Kiwifruit protease against casein as a substrate. The enzyme solution was preincubated containing various compounds at 37°C for 60 min. After incubation, 1% casein solution was added to the mixture and the activity assayed by the standard method.

Addition	Concentration (mM)	Relative activity <sup>a)</sup> (%)
CaCl <sub>2</sub>	0.5	97
HgCl <sub>2</sub>	0.5	19
MnSO <sub>4</sub>	0.5	43
2-mercaptoethanol	1.0	98
Cysteine	2.0	107
Ascorbic acid	0.5	100
Glutathione	0.5	96
EDTA	0.5	104

<sup>a)</sup> Activity of control with no addition was taken 100%

기질 특이성

본 효소의 각 기질에 대한 분해활성을 측정한 결과는 표 2에 나타난 바와 같으며 casein 및 hemoglobin 이

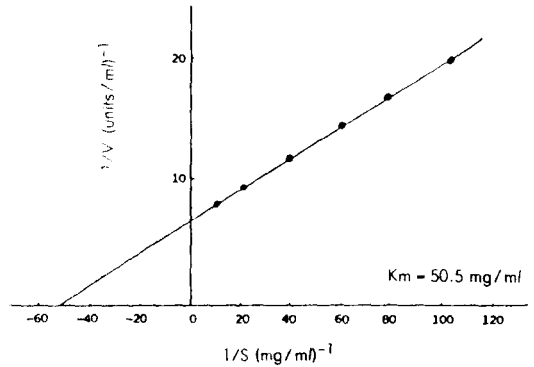


Fig. 8. Line weaver-Bruk plot for the determination of the Michaelis constant for Kiwifruit protease.

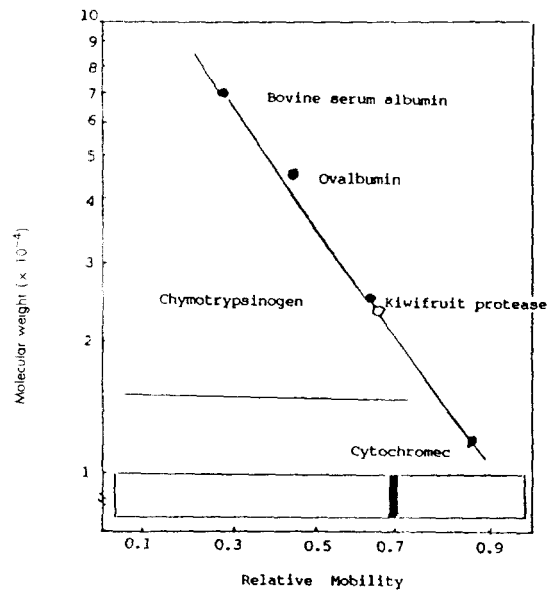


Fig. 9. Estimation of the molecular weight of Kiwifruit protease by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The reference proteins are: cytochrome C, 12,500; chymotrypsinogen A, 25,000; ovalbumin, 45,000; bovine serum albumin, 68,000.

잘 분해되는 편이었고 elastin 분해력은 미약하게 나타났다.

각종 화합물의 영향

몇가지 금속염, 환원제 및 금속 chelator 의 첨가가 효소활성에 미치는 영향을 검토한 결과는 표 3에 나타난 바와 같으며 HgCl<sub>2</sub>와 MnSO<sub>4</sub>를 제외하고는 효소활성에 큰 영향을 주지않았으며 cysteine 및 EDTA 에 의해 효소활성이 특히 증가되는 경향을 보여주었다.

Km 값

기질의 농도에 따르는 효소의 반응속도를 측정하여 Lineweaver-Burk 법<sup>(11)</sup>으로 plot 한 결과 그림 8에 나타난 바와 같으며 Km 값은 50.5 mg/ml 이었다.

#### 효소의 순도 및 분자량 측정

정제효소를 polyacrylamide disc gel 에서 전기영동시킨 결과 단일 band 를 나타내었고 SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis 법에 의하여 분자량을 측정한 결과 그림 9에 나타난 바와 같으며 분자량이 약 23,500으로 측정되었다. Papain 의 분자량<sup>(1)</sup>은 20,700, chymopapain<sup>(2)</sup>은 27,000으로 알려져 있으며 ficin<sup>(4)</sup>의 분자량은 25,000, melon<sup>(6)</sup>의 분자량은 50,000으로 알려져 있다.

### 요 약

Kiwifruit 에서 protease 를 추출 정제하여 그의 특성을 검토하였다. 조효소는 유안분획, sephadex G-100 filtration 및 DEAE-sephadex A-50 column chromatography 를 거쳐 정제되었으며 정제효소의 비활성은 30.10으로 10.95배 증가하였고 활성수율은 7.48%에 달하였다. 정제효소는 casein 및 hemoglobin 을 잘 분해하였고 작용 최적 pH 는 7.0이었으며 pH 7.0~8.0에서 안정하였고 작용 최적온도는 45°C 이고 50°C 이하에서 안정하였다. 0.5 mM HgCl<sub>2</sub>와 MnSO<sub>4</sub>에 의해 강한 저해를 받았으며 2 mM cysteine 과 0.5 mM EDTA 에 의해 활성이 촉진되었으며 Km 값은 50.5 mg/ml 이었고 분자량은 SDS 전기영동법에 의하여 측정하였을 때 23,500이었다.

### 문 헌

1. Kimmel, J.R. and Smith, E.L.: Crystalline papain *J. Biol. Chem.*, **207**, 515 (1954)
2. Ebata, M., and K.T. Yasunoba: Chymopapain: I. Isolation crystallization and preliminary characterization, *J. Biol. Chem.*, **237**(4), 1086 (1946)
3. Murachi, T. and N. Neurath: Fractionation and specificity studies on stem bromelain, *J. Biol. Chem.*, **235**(1), 99 (1960)
4. Kramer, D.E. and J.R. Whitaker: Ficus enzymes, *J. Biol. Chem.*, **239**(7), 2178 (1964)
5. Yamaguchi, T., Y. Yamashita, I. Takeda and K. Hirashi: Proteolytic enzymes in green asparagus, Kiwifruit and miut: *Agric. Biol. Chem.*, **46**(8), 1983 (1982)
6. Kaneda, M. and N. Tominaga: Isolation and characterization of a proteinase from the sarcocarp of melon fruit, *J. Biochem.*, **78**, 1287 (1975)
7. 정해정: 동양배 protease 의 정제 및 성질에 관하여, 충남대 석사학위논문(1989)
8. Kunitz, M.: Crystalline soybean trypsin inhibitor, *J. Gen. Physiol.*, **30**, 291 (1947).
9. Lowry, D.H. and N.J. Rose brough: protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
10. Lewis, U.J., D.E. Williams and N.g. Brink: Pancreatic elastase: purification, properties and function, *J. Biol. Chem.*, **222**, 705 (1956)
11. Lineweaver, H., D. Burk: Determination of enzyme dissociation constants, *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658 (1934)
12. Davis, J.: *Disc electrophoresis II*, Method and applications to human serum proteins, Annual N.Y. Academy Sci., **121**, 404 (1964)
13. Weber, K. and M. Osborn: The reliability of molecular weight determination by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969)
14. Alexander, A.K., H. Susan, C.W. Edwin and Z. Burk: Ficin: purification and characterization of the enzymatic components of latex of *Ficus glaburata*, *Biochemistry*, **13**(10), 2023 (1974)

(1989년 7월 3일 접수)