

제주산 키위에서 분리한 단백질분해효소 Actinidin의 정제 및 특성

조성자 · 정수현 · 서형주* · 이 호** · 강덕호*** · 양한철

고려대학교 식품공학과, 고려대학교 병설보건전문대학 식품영양과*,
경기대학교 식품가공학과**, 순천향대학교 사회체육과***

Purification and Characterization of a Protease Actinidin Isolated from Cheju Kiwifruit

Sung-Ja Cho, Soo-Hyun Chung, Hyung-Joo Suh*, Ho Lee**,
Duk-Ho Kong***, Han-Chul Yang

Dept. of Food Tech., Korea Univ., Seoul 136-701, Korea,

*Dept. of Food and Nutrition, Junior College of Allied Health Science, Korea Univ, Seoul 130-703,

**Dept. of Food Tech., Kyonggi Univ., Suwon 440-270, Korea

***Dept. of Social Physical Education, Soonchunhyang Univ, Chungnam 337-880, Korea

Abstract

A protease, actinidin, was isolated from Cheju kiwi fruit *Actinidia chinensis*. The enzyme was purified about 8.5 fold with the yield of 25% by column chromatographies of DEAE-Toyopearl and Sephadex G-100. Purified enzyme gave a single protein band on polyacrylamide gel electrophoresis and its molecular weight estimated by SDS-PAGE was about 27,000. The optimum pH and temperature were 7.0 and 40°C, respectively. This enzyme was stable at the ranges of pH 5.0~9.0 and below 50°C. It was also found that Fe^{+2} , Fe^{+3} , and Na^{+} ions increased the enzyme activity, whereas Hg^{+2} and Co^{+2} ions decreased. The enzyme was inhibited by phenylmercuric acetate and leupeptin, which indicated that active center of the enzyme had thiol-group. The enzyme reaction followed the Michaelis-Menten kinetics with the K_m value of 0.32 mM for casein.

Key word : kiwi fruit, actinidin, purification

서 론

단백분해효소는 단백질 또는 peptide에 작용하여 peptide bond의 가수분해를 촉매하는 효소로서 동. 식물, 미생물의 조직이나 세포조직 중에 존재한다. 이러한 단백질분해효소는 조미료의 제조, 식육의 연화, 양조산업 등의 식품산업^{1, 2)}이나 소화제, 소염제 등의 제약산업³⁾뿐 아니라 피혁공업⁴⁾, 세제공업 등에 널리 이용되고 있다. 주로 식품공업이나 제약공업에 이용되어지는 식물성 기원의 단백질분해효소는 fig⁵⁾, papaya⁶⁾, milkweed⁷⁾, euphorbia와 같은 쌍자엽 식물과 pine-

apple⁸⁾, creal과 같은 단자엽 식물에서 발견되며 대부분 활성 -SH 기를 가지며 pH 7 이하에서의 최적활성과 강한 응유현상(milk clotting activity)을 갖는 군과 -SH 기를 갖지 않고 pH 7 이상에서 최적활성을 가지며 응유현상이 약한 군으로 나뉘어진다. 이들 두군에 속하는 단백질분해효소는 열 저항성이 크고 60~70°C에서 활성을 유지하는 것으로 알려져 있다⁹⁾.

식물성 단백질분해효소는 식육의 결합조직이나 근육 단백질을 분해하는 연육작용을 한다. Fig에서 추출되어지는 ficin의 경우 결합조직인 collagen을 빠른 속도로 분해하며, papaya에서 추출하는 papain의 경우 actin의 분해 정도가 크다⁴⁾. 이러한 넓은 기질 특성과 안정성 확보라는 측면에서 식물성 단백질분해효소는 가수분해물 제조에 널리 사용되어진다. 이밖에도 식육

가공이나 노폐 가공의 연화에도 이용되어지며 fish sauce에 첨가하여 숙성 발효 등에 좋은 효과를 보고 있다¹⁰⁾. 키위 열매에서 추출되어진 단백분해효소인 actinidin은 -SH 기를 갖는 thiol계의 단백분해효소로서 papain, bromelain, ficin, chymopapain등과 같은 group에 속하며 다른 기원의 효소로서는 Streptococcal protease나 cathepsin B등이 있다. 이러한 효소들은 물리화학적으로 비슷한 특성을 가지고 있으며 구조적으로도 매우 유사하다¹¹⁾. 조효소액 상태의 actinidin의 활성은 fig, pineapple에서 추출되어진 조효소액의 활성보다 약간 낮으며 papaya에서 추출한 조효소액의 활성보다는 높다. 또한 과육이 숙성될수록 활성이 높은 것으로 보고되어 있다¹²⁾. 본 실험은 국내에서 생산되어지는 키위의 이용성 증대에 앞서 키위에서 단백분해효소를 정제하여 그 효소의 특성을 검토하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재 료

Sephadex G-100과 표준 분자량 물질은 Pharmacia LKB Biotechnology (Sweden)으로 부터 구입하였으며 DEAE-Toyopearl 650C는 Toso Co. (Japan)에서 구입하여 사용하였다. 그외 분석용 시약은 1급 이상 시약을 사용하였다. 키위열매 (*Actinidia chinensis*)는 제주도에서 구입 사용하였다.

2. 조효소액의 제조

1 kg의 키위 열매에 5 mM cystein 과 2 mM EDTA를 안정제로 첨가한 20 mM 인산염 완충액 (pH 7.0) 2,500 ml을 첨가하여 균질화 시킨 후 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

3. 효소의 정제

1) Acetone 분획

조효소액 250 ml에 750 ml의 아세톤을 가하여 1시간 방치 후 상등액을 제거한 다음 침전물을 감압건조하여 acetone powder를 제조하였다.

2) DEAE-Toyopearl 650C column chromatography

800 mg의 acetone powder를 20 mM 인산염 완충용액 (pH 7.0)에 녹여 DEAE-Toyopearl 650C column (2.5×28cm)에 주입한 후 동일 완충용액으로 세척하여 미흡착 분획을 분리하고 0~500 mM NaCl 직선농도차를 이용하여 1 ml/min 속도로 용출하여 활성 부위를 한외여과 (Amicon Co. PM-10)을 이용하여 농축하였다.

3) Sephadex G-100 chromatography

20 mM 인산염 완충용액 (pH 7.0)으로 평형화된 Sephadex G-100 column (1.8×60cm)에 농축된 효소액을 주입 후 동일 완충용액으로 9 ml/h의 속도로 용출 분획하였다.

4. 단백분해효소의 활성측정

효소의 활성은 Minami¹³⁾방법에 의해 측정하였다. Casein을 인산염 완충용액 (pH 7.0)에 1.2% 농도가 되도록 용해하여 기질 3 ml, 0.15 M cystein 0.2 ml로 반응계를 구성하였다. 이를 10분간 방치 후 0.1 ml의 효소액을 가하여 35℃에서 10분간 반응시킨 후 0.44 M TCA용액으로 반응을 정지하여 20분간 방치 후 2,800 rpm (2,000×g)에서 10분간 원심분리하여 275 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 1 unit는 tyrosine을 표준물질로 1ml의 효소액이 1분간 생산하는 product의 μg 수로 정의한다.

5. 단백질의 정량

효소 정제 과정 중의 단백질 정량은 280 nm에서 흡광도를 측정 표시하였으며 비활성 측정을 위한 단백질의 정량은 Lowry¹⁴⁾법에 의해 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 측정하였다.

6. 전기영동

키위 단백분해효소의 정제 여부를 확인하기 위한 전기영동은 Ames¹⁵⁾등의 방법에 의해 7.5% polyacrylamide gel을 이용하여 Tris-glycine 완충용액 (pH 6.8) 하에서 전기영동을 하였다. 분자량은 Weber¹⁶⁾의

방법에 의해 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 표준 단백질인 albumin(68000 Da), egg albumin(42000 Da), pepsin(35000 Da), trypsinogen(24000 Da), β -lactoglobulin(18500 Da), lysozyme(14500 Da)과 비교하여 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 효소의 정제

조효소액을 아세톤 분획하여 얻은 결과는 순도가 2배 높아지고 수율은 71%의 결과를 나타내었으며 아세톤 분획을 DEAE-Toyopearl 650C column에 의해 분획한 결과 Fig. 1과 같이 미흡착 분획과 200 mM NaCl에 의해 용출된 효소 활성이 있는 분획을 얻었다. 활성이 있는 peak부분을 Sephadex G-100 column chromatography를 실시한 결과 Fig. 2에서와 같이 protein과 효소활성이 일치하는 하나의 peak를 얻었으며 정제도가 8.5배 증가하였고 회수율은 25%이다. 뉴질랜드산 키위열매를 유산 분획, Sephadex G-100 및 DEAE-Sephadex A-50에 의해 본 정제결과보다 다소 높은 10.9배의 정제도와 다소 낮은 7%의 회수율을 보고하였다¹⁷⁾.

정제 여부를 확인하기 위하여 polyacrylamide disc gel electrophoresis를 행한 결과(Fig. 3), 전기영동

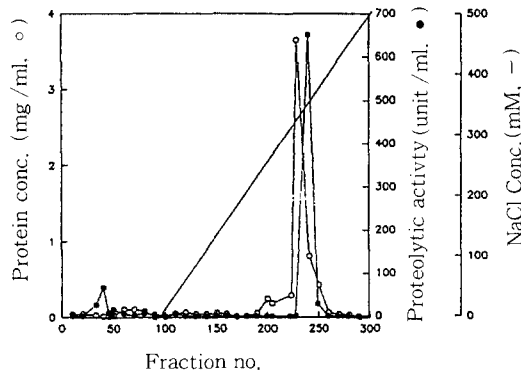


Fig. 1. Chromatography of actinidin on DEAE-Toyopearl 650C.

The column(2.5×28 cm) was eluted with a linear gradient from 0 mM to 500 mM NaCl in 20 mM phosphate buffer(pH 7.0) at a flow rate of 1 ml/min : 5 ml fractions were collected.

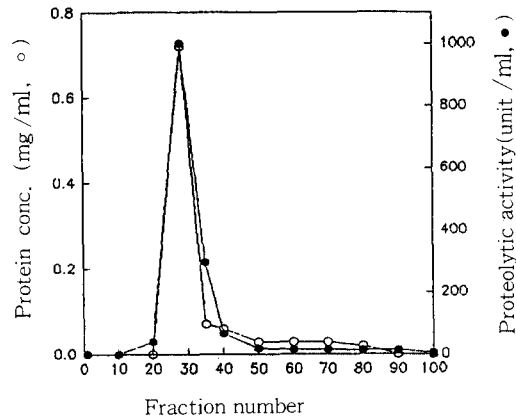


Fig. 2. Chromatography of actinidin on Sephadex G-100.

The column (1.8×60 cm) was eluted with 20 mM phosphate buffer(pH 7.0) at a flow rate of 9 ml/h ; 3 ml fractions were collected.

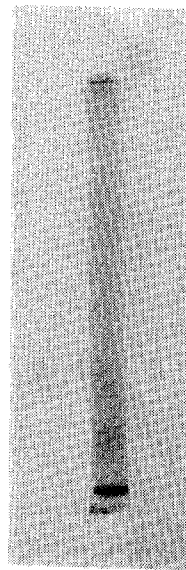


Fig. 3. Polyacrylamide disc gel electrophoresis on the purified actinidin.

Purified enzyme were subjected to electrophoresis with 1% polyacrylamide gel in Tris-glycine buffer (pH 6.8) system. After running at current 5 mA, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue.

상에서 1개의 밴드를 나타냄으로써 순도가 높은 단일 단백임을 알 수 있었다

2. 분자량 측정

키위 단백분해효소의 분자량은 SDS-polyacrylamide gel에 의해 표준 단백질과 비교 측정된 결과, Fig. 4에서와 같이 분자량이 27,000으로 측정되었다. Mcdowall¹⁸⁾ 등은 본 실험 결과보다 작은 23,500의 분자량을 보고하였으며 다른 식물성기원 단백분해효소인 chymopapain¹⁹⁾은 27,000, ficin²⁰⁾은 25,000, melon protease²¹⁾는 50,000으로 보고되었다.

3. 효소학적 특성

1) 온도의 영향

효소의 활성 및 안정성에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과(Fig. 5), 40℃에서 최적반응온도를 보이며 50℃에서 75%의 잔존활성을 보였으나 60℃에서 열안정성이 급격히 저하되어 16% 잔존활성을 보였다.

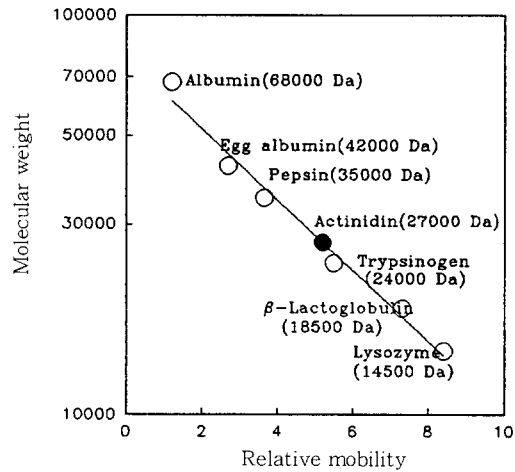
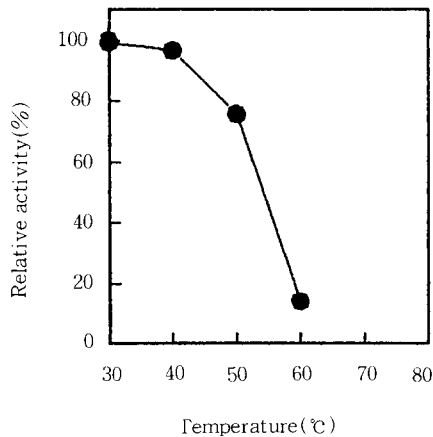
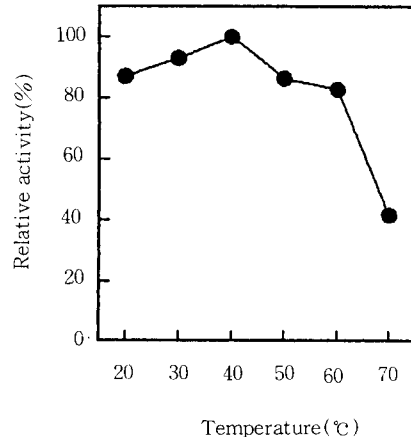


Fig. 4. Determination of the molecular weight of actinidin by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.



a) Temperature stability



b) Optimum temperature

Fig. 5. Effect of temperature on the activity of actinidin.

- a) The enzyme solutions were treated at various temperature for 15 min. After heat treatment, the enzyme solution was immediately cooled in ice-water. The remaining activity was measured with casein as substrate after incubation at 35℃ for 10 min.
- b) The assay was done under the standard conditions at various temperature.

Yamaguchi²²⁾ 등은 키위의 경우 58~62°C 에서 최적 반응온도를 보이며 60°C 까지는 열에 안정하다고 보고하여 본 실험결과보다 다소 높은 최적반응온도와 열안정성을 나타내었다. Green asparagus의 경우 38~43°C에서 최적반응온도를 나타내었으나 열안정성은 낮았으며 munit는 40~45°C에서 최적활성을 나타낸다고 보고하였다. Ficin²⁰⁾의 최적반응온도는 62.5°C이고 papain¹⁹⁾은 고온에서도 안정하다고 보고되었다. 키위 단백분해효소는 다른 식물성 단백분해효소에 비해 열안정성이 다소 낮은 것으로 나타났다.

2) pH의 영향

효소 활성에 대한 pH의 영향을 검토하기 위해 pH 7 이상에서는 casein을, pH 7 이하에서는 hemoglobin을 기질로 하여 활성을 비교한 결과 Fig. 6에서와 같이 최적 pH는 7.0이며 pH 5~9 사이에서 pH 안정성을 보였다. Yamaguchi²²⁾ 등은 pH 7.3~7.6 사이에서 최적활성을 나타내며 본 실험 결과와 유사한 pH 7

~10 사이에서 pH 안정성을 보고하였다. 이상의 결과에 의해 키위의 단백분해효소는 중성 pH에서 안정성이 높음을 확인하였다.

3) 기질 특이성

동물성과 식물성에 대한 기질 특이성을 검토하기 위해 collagen, elastin 등의 동물성 단백질과 ISP(isolated soybean protein), wheat gluten 등의 식물성 단백질로 측정된 결과(Table 2), casein을 제외한 다른 기질에서는 비교적 낮은 활성을 나타내었다. Casein을 제외한 동물성 단백질보다 식물성 단백질에 대한 기질 특이성이 비교적 높았다.

4) 금속 이온과 화합물의 영향

효소 반응액에 각종 금속이온과 화합물을 첨가해 효소활성을 측정된 결과(Table 2, 3), 1 mM Hg⁺, Co²⁺이온에 의해 저해를 받으며 Na⁺, Fe³⁺이온에 의해 활성이 증가되는 것을 알 수 있었다.

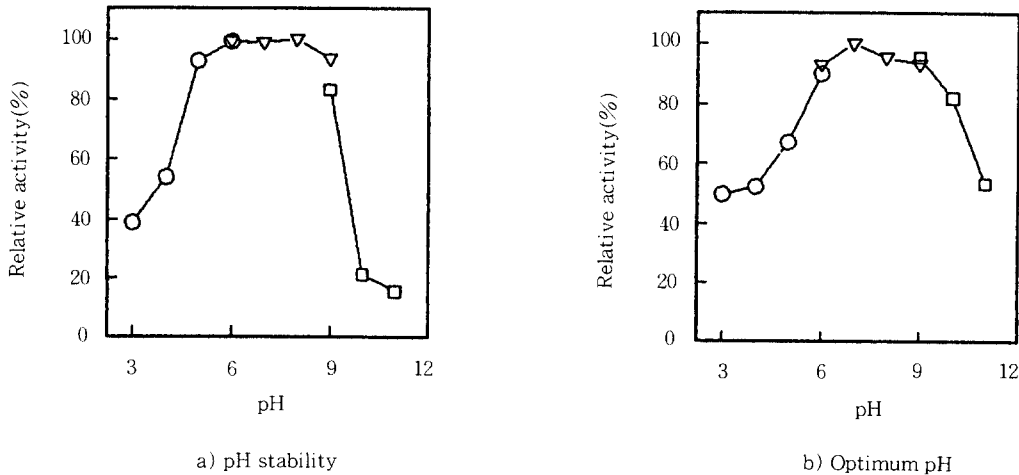


Fig. 6. Effect of pH on the activity of actinidin.

- a) The enzyme solution was incubated at various pH for 24 hr. The remaining activity was measured on casein.
 b) The assay was done under the standard condition at various pH with hemoglobin pH 3~7, casein pH 7.0~11.0
 ○-○ : Citrate buffer (pH 3~6), ▽-▽ : Phosphate buffer (pH 6~9), □-□ : Carbonate-bicarbonate buffer (pH 9~11)

Table 1. Summary of purification step on actinidin

Step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit /mg)	Purify fold	Yield (%)
Crude	3402	16274	4.7	1	100
Aceton fractionation	917	11592	12.6	2.6	71
DEAE- Toyopearl	188	6506	34.5	7.2	39
Sephadex G-100	98	3994	40.6	8.5	25

Table 2. Effect of substrates on the activity of actinidin

Substrate	Relative activity (%)
Casein	100.0
Hemoglobin	21.0
Elastin	35.6
Collagen	22.6
ISP ¹	31.3
Wheat gluten	63.4

¹ ISP : Isolated soybean protein.

화합물에 대한 영향을 검토한 결과(Table 4), phenylmercuric acetate와 leupeptin에 의해 효소활성이 완전히 저해되는 것으로 보아 키위 단백질효소는 활성부위에 thiol기를 가지는 효소임을 알 수 있었다.

5) K_m 값

기질인 casein의 농도를 달리하여 효소반응속도를 측정하여 기질 농도에 대한 반응 속도의 변화를 그림으로 표시한 결과(Fig. 7), K_m 값은 0.32 mM으로 비교적 높은 기질 특이성을 보였다. 식물성 단백질분해효

Table 3. Effect of meatal ions on the activity of actinidin

Metal ion	Compound	Relative activity (%)			
		10^{-2} mM	10^{-1} mM	1mM	5mM
NONE		100	100	100	100
Cu ²⁺	CuSO ₄ · 5H ₂ O	100	15	13	N.D
Co ²⁺	CoCl ₂ · 6H ₂ O	120	75	N.D	N.D
Fe ²⁺	FeSO ₄ · 7H ₂ O			172	73
Fe ³⁺	FeCl ₃ · 6H ₂ O			166	126
Na ⁺	NaCl			117	97
Ca ²⁺	CaCl ₂			93	85
K ⁺	KCl			132	112
Hg ²⁺	HgCl ₂	55	N.D	N.D	N.D

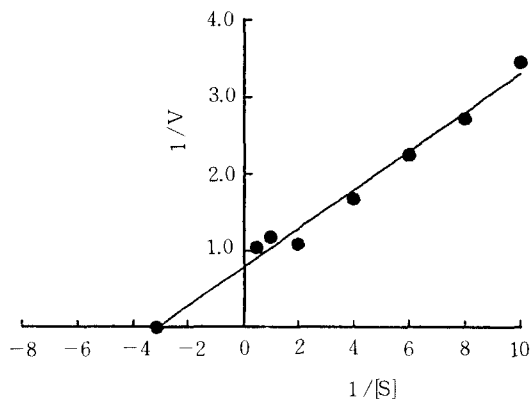
N.D : Not detected

Table 4. Effect of inhibitors on the activity of actinidin

Concentration (mM)	Relative activity (%)				
	EDTA ¹	PMA ²	PMSF ³	Leupeptin	Pepstatin
Control	100	100	100	100	100
10 ⁻⁵	102	50	125	68	105
10 ⁻⁴	95	50	119	26	104
10 ⁻³	95	N.D	114	N.D	96
10 ⁻²	94	N.D	90	N.D	92
10 ⁻¹	93	N.D	85	N.D	87

¹ EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid² PMA : Phenylmercuric acetate³ PMSF : Phenylmethylsulfonyl fluoride

N.D : Not detected

**Fig. 7. Lineweaver-Burk plot for hydrolysis of cassin catalyzed by actinidin.** K_m value : 0.32mM.

소로 가장 많이 사용되고 있는 bromelain²³⁾의 casein에 대한 친화력($K_m=0.57$ mM)보다 높은 기질 친화력을 보였다.

요 약

제주산 키위에서 추출 정제한 단백분해효소의 특성을 조사하였다. 본 효소는 DEAE-Toyopearl 650C, Sephadex G-100 chromatography에 의해 정제하였고 비활성은 8.5배 증가하고 회수율은 25%이었다. 이 효소는 40℃, pH 7에서 최대활성을 나타내었으며

30~50℃, pH 5.0~9.0사이에서 안정하고 K_m 값은 32 mM, 분자량은 27,000으로 추정된다. 또한 Hg^{+} , Co^{2+} 이온에 의해 활성이 저해되며 phenylmercuric acetate, leupeptin에 의해 저해되므로 활성부위에 thiol기를 갖는 것으로 추정되어진다.

참고문헌

1. Monsan, P., Dutertre, B., Moll, M. and Durand, G. : *J. Food Science*, **43**, 424(1978)
2. Krishnaswamy, M. A., Johar, D. S., Subrahmanyam, V. and Thamas, S. P. : *Food. Tech.*, **15**, 482(1961)
3. Moss, J. N., Frazier, C. V. and Martin, G. J. : *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **145**, 166(1963)
4. Caygill, J. C. : *Enzyme. Microb. Technol.*, **1**, 233(1979)
5. Kortt, A. A., Hamilton, S., Webb, E. C. and Zerner, B. : *Biochemistry*, **13**, 2023(1974)
6. Kimmel, J. R. and Smith, E. L. : *J. Biol. Chem.*, **207**, 515(1954)
7. Winnick, T., Davis, A. R. and Greenberg, D. M. : *J. Gen. Physiol.*, **23**, 275(1940)
8. Rowan, A. D., Buttle, D.J. and Barret, A. J. : *Biochem. J.*, **266**, 869(1990)
9. Greenberg, D. M. : *Method Enzymol.*, **2**, 54 (1955)

10. Beddows, C. G. and Ardeshir, A. G : *J. Food Technol.*, **14**, 603(1979)
11. Baker, E.N. : *J. Mol. Biol.*, **115**, 267(1977)
12. Soda, I., Kaneko, M., Sato, T., Nakagawa, H. and Ogura, N. : *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **34**, 36(1987)
13. Minami, Y., Doi, E., and Hata, T : *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1419(1971)
14. Lowry, O.H., Resbraough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
15. Ames, G. F. L : *J. Biol. Chem.*, **244**, 634 (1974)
16. Weber, K. and Osborn, M. : *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406(1969)
17. 김복자 : 한국식품과학회지, **21**, 569(1989)
18. Kaneda, M. and Tomiraga, N. : *J. Biochem.*, **78**, 1287(1975)
19. Mcdowall, M. A. : *Eur. J. Biochem.*, **14**, 214 (1970)
20. Ebata, M. and Yasunoba, K. T. : *J. Biol. Chem.*, **237**, 1086(1962)
21. Kramer, D. E. and Whitaker, J. R : *J. Biol. Chem.*, **239**, 2178(1964)
22. Yamaguchi, T., Yamashita, Y., Takeda, I. and Kiso, H. : *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1983 (1982)
23. 최정, 손목규, 조영제, 천성숙, 임성길, 석영란 : 농화학회지, **35**, 23(1992)

(1994년 4월 2일 수리)