

## Kiwifruit 과육에 존재하는 단백질분해효소의 특성과 열안정성

오순자 · 김성철<sup>1</sup> · 고석찬\*

제주대학교 생명과학과 · 기초과학연구소,  
<sup>1</sup>농촌진흥청 제주농업시험장

### Properties and Thermostability of Gelatin-degrading Proteinases in the Fruit of *Actinidia chinensis* (Kiwifruit)

Oh, SoonJa, Seong-Cheol Kim<sup>1</sup> and Seok Chan Koh\*

Department of Life Science and Research Institute for Basic Sciences, Cheju National University,  
Jeju 690-756, Korea

<sup>1</sup>Jeju Agricultural Experiment Station, RDA, Jeju 690-150, Korea

#### Abstract

This study was investigated on properties and thermostability of gelatin-degrading proteinases in the fruit of *Actinidia chinensis* (kiwifruit) for the industrial application. Three gelatin-degrading proteinases (P I, P II and P III) were detected from the pulp of fruits. The molecular weights of these proteinases, P I, P II and P III, were approximately 220 kD, 51 kD, and 26 kD respectively, on the basis of gelatin-containing SDS-PAGE. The optimum pH of these proteinases ranged from 2.0 to 5.0 with a maximal activity at pH 4.0. These proteinases had a high sensitivity to E-64 and iodoacetate which are cysteine protease inhibitors, and required DTT, cysteine, and  $\beta$ -mercaptoethanol for their activities which are stimulators for cysteine proteases. These results indicate that these proteinases are cysteine proteinases and the proteinase P III is actinidin (EC 3.4.22.14), based on the molecular weight and/or susceptibility against proteinase inhibitors. These proteinases were strongly activated by  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$ , whereas strongly inhibited by  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$ . However, these proteinases have slightly different susceptibility against other cations ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ). The temperature stability of proteinase P III was more stable than proteinases P I and P II. Moreover, proteinase P III remained stable below 50°C for 48hr, showing the residual activity above 75% of the enzyme activity.

**Key words** – kiwifruit (*Actinidia chinensis*), gelatin-degrading proteinases, cysteine proteinases, actinidin

#### 서 론

생물공학기술의 발달과 함께 단백질분해효소 (protease)

를 비롯한 cellulase, amylase, lipase 등 다양한 효소들이 생산되고 있으며, 그 산업적 중요성과 이용율의 증가로 인해 연구가 활발하게 진행되고 있다. 그 중에서도 단백질분해효소는 단백질 또는 peptide에 작용하여 peptide bond의 가수분해를 촉매하는 효소로 아미노산에 대한 특이성, 분해 위치와 특성에 따라 serine protease, cysteine protease,

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : 064-754-3528, Fax : 064-756-3541  
E-mail : sckoh@cheju.ac.kr

ispartic protease, metalloprotease로 구분되며, 산업적으로 이용되고 있는 효소 중 가장 큰 비중을 차지하고 있다[5]. 단백질분해효소의 주요 용도는 조미료 제조, 식육의 연화, 맥주·청주의 혼탁방지, 치즈의 숙성 등 식품공업과 소화제, 소염진통제 등 제약산업, 그리고 피혁공업과 세제산업 등 여러 분야에 걸쳐 이용되고 있다[3]. 하지만 이러한 중요성에도 불구하고 대부분의 단백질분해효소들은 대부분 미생물 기원이며 거의 대부분 수입에 의존하고 있는 실정이다.

식물성 단백질분해효소 중에는 papain (EC 3.4.22.2), ficin (EC 3.4.22.3), bromelain (EC 3.4.22.4), actinidin (EC 3.4.22.14) 등이 잘 알려져 있으며[2] 그 효소학적 특성에 관한 연구 또한 많이 보고되고 있다. 이들 중에 papain, ficin, bromelain는 맥주의 혼탁방지제, 연육제, 제빵, 소화제 등 식품공업 혹은 의약용으로 널리 이용되고 있다[3]. Kiwifruit 과육에 다량 들어 있는 actinidin은 cysteine protease로 생화학적 구조와 활성이 papain과 유사하고, 넓은 기질 특이성을 가짐에도 불구하고 그 활용도는 그리 높지 않은 편이다. Kiwifruit는 중국 양자강 부근에서 서식하던 아열대성 식물로 뉴질랜드에서 개량되어 전 세계적으로 재배되고 있는 작물이다. 우리나라에는 1977년 뉴질랜드로부터 도입되어 제주도를 포함한 남해안 지역에서 대량으로 재배되고 있고 생산량도 증가하고 있는 추세이다. 더욱이, kiwifruit 과실은 일정 기간이 지나면 과육이 쉽게 물러지고 기호도가 떨어지는 점을 고려해 볼 때, kiwifruit 과실의 활용 방안을 강구할 필요가 있는데, actinidin을 포함한 단백질분해효소의 산업적 이용이 그 방안이 될 수 있을 것이다.

국내의 연구 보고로는 kiwifruit 단백질분해효소의 정제 및 특성 규명[8], casein의 식품학적 기능성 향상[13]과 육류의 연화에 미치는 효과[7] 등에 관한 연구가 있으며, 최근에 배, 무화과, 파인애플, 파파야 등의 단백질분해효소와 비교한 연구에서 kiwifruit의 단백질분해효소 활성이 파인애플 다음으로 높은 것으로 밝혀졌다[1]. 본 연구에서는 kiwifruit 과육 속에 들어 있는 단백질분해효소의 산업적 활용을 모색하고자 그 gelatin분해활성을 조사한 바, 몇 가지 특이한 결과를 얻었으므로 이에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에서는 중국에서 수집한 야생종 kiwifruit

(*Actinidia chinensis*)의 과실을 제주농업시험장으로부터 공급받아 사용하였다.

### 조효소액의 추출

Kiwifruit 과실의 껍질을 제거하고 과육 1 g당 10 ml의 추출완충용액 (0.1 M Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 2.5  $\mu$ M polyvinylpyrrolidone, 5 mM ascorbic acid)을 넣어 호모게나이저(Micra D-8, Artlab, 독일)를 사용하여 19,000 rpm으로 마쇄하였다 마쇄액을 4겹의 cheesecloth로 여과한 후, 여과액을 4°C에서 15,000  $\times$ g로 30분간 원심분리하고 그 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

### 단백질분해효소의 전기영동분석

전기영동분석은 Heussen과 Dowdle[6]의 방법을 변형한 Oh 등[10]의 방법으로 gelatin의 분해 여부를 통하여 분석하였다. 즉, 조효소액을 시료용 완충용액 (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8; 0.005% bromophenol blue, 40% glycerol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol)과 동량 혼합하여 0.1% gelatin을 함유하는 12.5% SDS-polyacrylamide gel 위에 넣어 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후, 겔은 1% Triton X-100을 함유하는 25 mM sodium citrate 완충용액 (pH 4.0)으로 10분간 세척하여 SDS를 제거하고, 다시 25 mM sodium citrate 완충용액 (pH 4.0)으로 10분 동안 세척하여 Triton X-100을 제거하였다. Triton X-100이 제거된 겔은 50 mM sodium citrate 완충용액 (pH 4.0; 10 mM CaCl<sub>2</sub>)에서 100분 동안 37°C에서 정치하여 반응시켰다. 반응시킨 겔은 0.025% Coomassie brilliant blue R-250용액으로 염색하여 gelatin의 분해 여부와 그 양상을 관찰하였다. 단백질분해효소 활성을 정량화하기 위해서는 염색이 끝난 겔을 densitometer로 scanning하여 분석하였다. 그리고, 단백질분해효소의 casein분해 활성을 알아보기위해서 gelatin을 같은 농도의 casein으로 대체하여 조사하였다.

### 최적 pH

단백질분해효소의 최적 pH는 전기영동이 끝난 겔을 pH 1.0~10.0의 완충용액 (10 mM CaCl<sub>2</sub> 포함)에서 37°C에서 100분 동안 반응시켜 gelatin의 분해정도를 조사하였다. 완충용액은 50 mM의 용액을 사용하였으며 pH에 따라 potassium chloride-HCl (pH 1.0), glycine-HCl (pH 2.0),

sodium citrate (pH 3.0~4.0), sodium acetate (pH 5.0~6.0), Tris-HCl (pH 7.0~9.0)과 sodium carbonate (pH 10.0)를 사용하였다.

저해제의 영향

저해제의 영향은 전기영동이 끝난 겔을 저해제가 포함된 50 mM sodium citrate 완충용액 (pH 4.0; 10 mM CaCl<sub>2</sub>)에서 37°C에서 100분 동안 반응시켜 gelatin의 분해 정도를 조사하였다. 단백질분해효소 저해제로는 metalloproteinase 저해제로 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)와 0.1 mM 1,10-phenanthroline을, serine proteinase 저해제로 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)와 0.1 mM 3,4-dichloroisocumarin (DCI)을, aspartic proteinase 저해제로 10 μM pepstatin A를, cysteine proteinase의 저해제로 20 μM trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido (4-guanidino) butane (E-64)과 10 mM iodoacetate 등을 사용하였다. 그리고, cysteine proteinase의 촉진제로서 1 mM DTT와 cysteine, 5 mM β-mercaptoethanol의 영향도 조사하였다.

금속이온의 영향

금속이온의 영향은 전기영동이 끝난 겔을 10mM의 양이온을 함유하는 50 mM sodium citrate 완충용액 (pH 4.0)에서 37°C에서 100분 동안 반응시켜 gelatin의 분해 정도를 조사하였다. 2가 양이온으로는 Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>등을, 3가 양이온으로는 Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>등을 사용하였고, 대조구는 양이온 대신에 증류수를 넣어 조사하였다.

열안정성

단백질분해효소의 열안정성은 조효소액을 15~60°C까지 다양한 온도에서 1시간 동안 정치한 후 전기영동하여 gelatin분해 정도를 비교하였다. 그리고, 열안정성이 높은 단백질분해효소를 대상으로 다양한 온도에서 48시간 동안 정치하여 같은 방법으로 안정성을 조사하였다. 대조구는 4°C에서 보관중인 조효소액을 사용하였다.

결과 및 고찰

Kiwifruit 과육에서 추출한 조효소액의 gelatin분해활성

과 casein분해활성을 조사한 결과 (Fig. 1), 활성이 높은 2개의 밴드 (P I 과 P III)와 활성이 낮은 1개의 밴드 (P II)가 관찰되었다. 분자량 지표단백질의 Rf (relative mobility)값을 이용하여 표준곡선을 작성하고 이들 3개의 단백질분해효소의 분자량을 산출한 결과, 단백질분해효소 P I 은 220 kD, P II는 51 kD, P III는 26 kD에 해당하는 것으로 추정할 수 있었다.

단백질분해효소 P I, P II, P III의 gelatin분해활성을 pH를 달리하여 조사한 결과 (Fig. 2), P I, P II, P III 모두 pH 2.0~5.0 범위에서 높은 활성을 보였으며 pH 4.0에서 가장 높게 나타났다. 그리고, casein분해활성도 같은 결과를 나타내었다 (자료 미제시). 이러한 결과는 McDowall[9]이 kiwifruit에서 추출한 actinidin이 gelatin을 기질로 사용하였을 때 최적 pH가 4.0이라는 보고와 일치하며, Yoon 등 [13]이 casein을 기질로 사용하였을 때 최적 pH가 3.0에 해당한다는 보고와 유사한 결과이다. 하지만 Kim[8]과 Kang 등[7]이 casein을 기질로 사용하였을 때 효소 활성의 최적 pH가 7.0이라는 보고와는 상이한 결과이다. 이러한 차이는 사용된 기질이나 완충용액 등 효소활성 측정방법, 그리고 실험에 사용한 kiwifruit의 품종이 다른데서 기인한 결과로 해석된다.

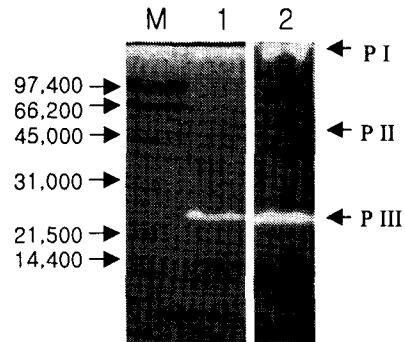


Fig. 1. SDS-PAGE pattern of gelatin-degrading proteinases from the fruit of *Actinidia chinensis* (kiwifruit).

Lane 1, proteinase activity on gelatin-containing SDS-PAGE gel; lane 2, proteinase activity on casein-containing SDS-PAGE gel; lane M, marker proteins: phosphorylase b (97.4 kD), serum albumin (66.2 kD), ovalbumin (45 kD), carbonic anhydrase (31 kD), trypsin inhibitor (21.5 kD), lysozyme (14.4 kD). The gels were incubated in 50 mM sodium citrate buffer (pH 4.0; 10 mM CaCl<sub>2</sub>) for 100min at 37°C, and then stained with Coomassie Blue.

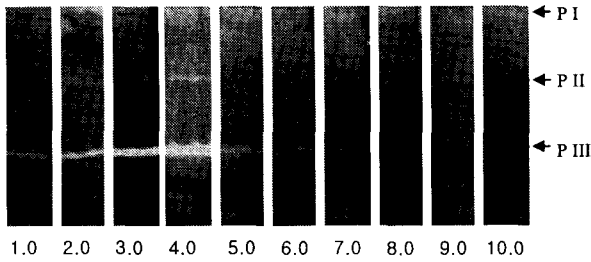


Fig. 2. Effects of pH on gelatin-degrading proteinase activity in crude extract from the fruit of *Actinidia chinensis* (kiwifruit).

The gels were incubated in various buffer (pH 1.0~10.0; 10 mM CaCl<sub>2</sub>) for 100min at 37°C, and then stained with Coomassie Blue. Buffer solutions used were 50 mM potassium chloride-HCl (pH 1.0), glycine-HCl (pH 2.0), sodium citrate (pH 3.0~4.0), sodium acetate (pH 5.0~6.0), Tris-HCl (pH 7.0~9.0), and sodium carbonate (pH 10.0).

Kiwifruit 과육의 단백질분해효소의 유형을 알아보기 위하여 단백질분해효소 저해제를 사용하여 그 효과를 조사하였다 (Fig. 3). 그 결과, 단백질분해효소 P I, P II, P III 모두 cysteine proteinase 저해제인 E-64와 iodoacetate에 의해서 저해되었으며, aspartic proteinase 저해제인 pepstatin A에서도 크게 저해되었다. 그리고, serine proteinase 저해제인 PMSF와 DCI에서도 다소 저해되었으나 E-64, iodoacetate, pepstatin A에 비해 저해 정도는 매우 낮았다. 하지만 cysteine proteinase를 촉진하는 DTT, cysteine 및 β-

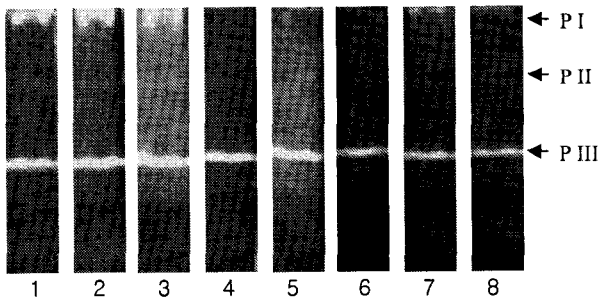


Fig. 3. Effects of various inhibitors on gelatin-degrading proteinase activity in crude extract from the fruit of *Actinidia chinensis* (kiwifruit).

1, control; 2, 5 mM EDTA; 3, 0.1 mM 1,10-phenanthroline; 4, 0.1 mM 3,4-DCI; 5, 1 mM PMSF; 6, 20 μM E-64; 7, 10 mM iodoacetate; 8, 10 μM pepstatin A. The gels were incubated in 50 mM sodium citrate buffer (pH 4.0; 10 mM CaCl<sub>2</sub>) with various inhibitors for 100min at 37°C, and then stained with Coomassie Blue.

mercaptoethanol에 의해서 활성이 증가하여 이들 단백질분해효소들은 모두 cysteine proteinase인 것으로 판단되었다 (Fig. 4).

여러 가지 금속이온이 첨가된 조건에서 금속이온이 단백질분해효소 P I, P II, P III의 gelatin분해활성에 미치는 영향을 조사하였다 (Fig. 5). 대조구는 Ca<sup>2+</sup>을 제거한 조건으로 하였으며 이를 금속이온이 첨가된 조건과 비교하였다. 그 결과, Ca<sup>2+</sup>을 처리하였을 때는 단백질분해효소 P I, P II, P III 모두 대조구보다 활성이 높았다. 그리고 Mg<sup>2+</sup>과

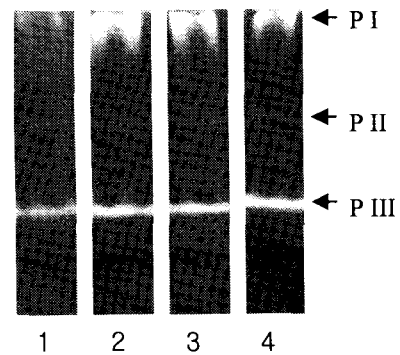


Fig. 4. Effects of cysteine proteinase stimulators on gelatin-degrading proteinase activity in crude extract from the fruit of *Actinidia chinensis* (kiwifruit).

1, control; 2, 1 mM cysteine; 3, 1 mM DTT; 4, 5 mM β-mercaptoethanol. The gels were incubated in 50 mM sodium citrate buffer (pH 4.0; 10 mM CaCl<sub>2</sub>) with various stimulators for 100min at 37°C, and then stained with Coomassie Blue.

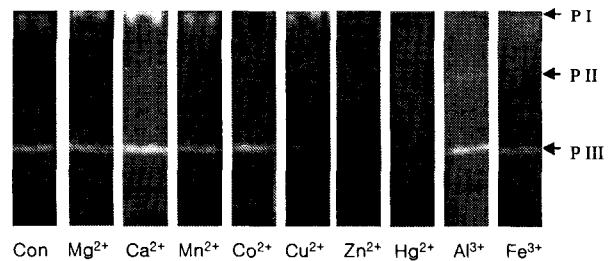


Fig. 5. Effects of various inorganic cations on gelatin-degrading proteinase activity in crude extract from the fruit of *Actinidia chinensis* (kiwifruit).

The gels were incubated in 50 mM sodium citrate buffer (pH 4.0) with or without inorganic cations for 100min at 37°C, and then stained with Coomassie Blue.

Mn<sup>2+</sup>을 처리했을 때에도 대조구보다는 활성이 높았으나, Ca<sup>2+</sup>을 처리하였을 때 보다는 다소 낮았다. 반면에 Zn<sup>2+</sup>과 Hg<sup>2+</sup>을 처리하였을 때에는 모든 단백질분해효소들의 활성이 완전히 저해되는 것으로 나타났다. 한편, Co<sup>2+</sup>을 처리했을 때에는 PIII은 대조구와 유사하였으나 PI이 거의 저해되었고, Cu<sup>2+</sup>을 처리하였을 때에는 PI에 비해 PIII의 저해 정도가 더 큰 것으로 나타났다. 반면에 3가 양이온인 Al<sup>3+</sup>과 Fe<sup>3+</sup>을 처리하였을 때에는 단백질분해효소 PII, PIII는 금속이온을 처리하지 않은 대조구와 거의 유사하게 나타났으나 PI는 대조구보다 활성이 매우 낮게 나타났다.

이상의 Fig. 1~5의 결과로 보아 kiwifruit 과육에서 관찰되는 3개의 밴드들은 모두 cysteine proteinase임을 알 수 있었다. 그 중 단백질분해효소 PIII는 분자량과 효소의 일반적인 특성이 actinidin (EC 3.4.22.14)과 동일한 것으로 판단할 수 있었다[11,12]. 그리고, 단백질분해효소 PI과 PII는 효소의 일반적인 특성이 대체로 PIII와 유사하여 PIII의 cross-linking 산물일 가능성을 생각해 볼 수 있다. 하지만, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup> 등 금속이온의 영향이 다소 다르게 나타나서 단백질분해효소 PI, PII, PIII는 서로 별개의 효소일 가능성 또한 배제할 수 없을 것으로 보인다. 앞으로 이들 단백질분해효소 PI, PII, PIII의 1차구조 또는 번역학적 친화성 등을 면밀히 검토할 필요가 있다고 사료된다.

Kiwifruit 과육에서 추출한 조효소액을 다양한 온도에서 1시간 동안 정치하고 gelatin분해활성을 조사하여 열안정성을 조사한 결과 (Fig. 6), PI과 PII는 온도가 증가함에 따라 점차 감소하여 60℃에서는 활성이 극히 낮았다. 그러나, PIII는 PI이나 PII에 비해 고온에 비교적 안정한 것으로 조사되었다. 즉, 50℃까지는 높은 활성을 나타내어 4℃에서와 큰 차이가 없었고 60℃에서 다소 감소하는 경향을 보였다. 단백질분해효소 PI과 PII는 온도가 증가함에 따라 점차적으로 감소하는 경향을 보여 이들 단백질분해효소들은 고온에서 3차원적 구조를 유지하는 결합력의 약화 또는 변성으로 효소 활성도가 낮아진 것으로 해석된다. 그리고 단백질분해효소 PIII는 고온에서도 비교적 안정한 것으로 조사되었는데, 이는 PIII가 비교적 열에 안정한 특성을 나타내거나 또는 Fig. 1에서 살펴본 바와 같이 고분자 단백질분해효소인 PI이나 PII가 PIII의 cross-linking 산물일 가능성을 생각해볼 때 이들 단백질분해효소 PI의 분리된

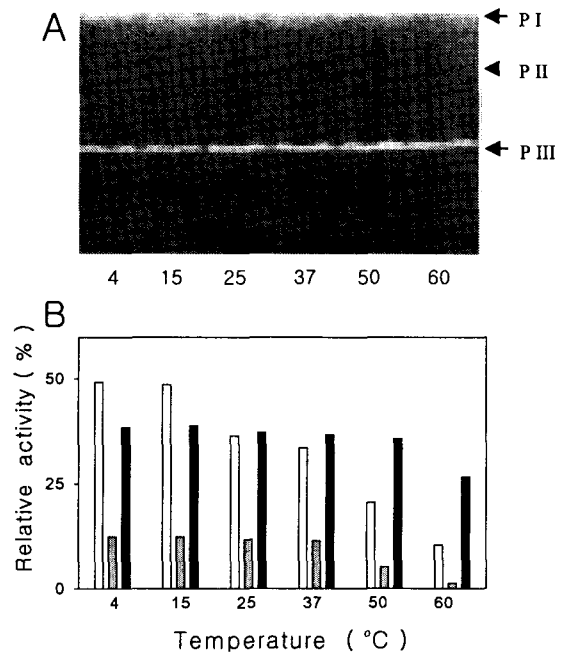


Fig. 6. Effects of temperature on gelatin-degrading proteinase activity in crude extract from the fruit of *Actinidia chinensis* (kiwifruit).

A, proteinase activity on gelatin-containing SDS-PAGE gel; B, data obtained from densitometric analysis of gelatin-degrading activity on SDS-PAGE gel (□, PI; ▒, PII; ■, PIII). Crude extracts, before electrophoresis, were preincubated at various temperature (4, 15, 25, 37, 50 and 60°C) for 60min. After electrophoresis, the gels were incubated in 50 mM sodium citrate buffer (pH 4.0; 10 mM CaCl<sub>2</sub>) for 100min at 37°C, and then stained with Coomassie Blue.

결과가 아닌가 사료된다.

단백질분해효소 PI, PII, PIII 중 열에 비교적 안정한 것으로 나타난 PIII을 장시간 동안 고온에 노출시킨 후 활성변화를 조사하였다. 그 결과, Fig. 7에서 보는 바와 같이 48시간 경과시에도 15~37℃의 범위에서는 90% 이상의 활성을, 그리고 50℃에서는 75% 이상의 활성을 나타내어, 50℃ 이하의 온도에서는 상당 시간 동안 안정한 것으로 조사되었다. 그리고 60℃에서는 1시간 동안 처리했을 때 그 활성이 50% 정도 감소하고, 그 이상 시간에서는 급격하게 감소하여 12시간 반응 시 완전히 저해되었다. 이러한 결과는 Kim[8]이 kiwifruit에서 추출한 단백질분해효소가 50℃ 이하에서는 안정하였으나 그 이상의 온도에서는 안정성이 급격히 저하하였다는 보고와 일치하며, Kang 등[7]이 kiwifruit에서 추출한 단백질분해효소의 열안정성 분석에

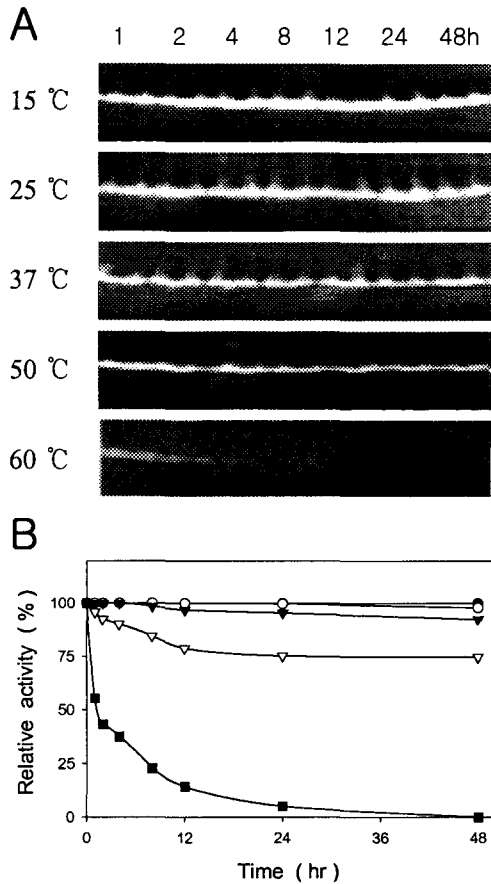


Fig. 7. Effects of temperature on stability of proteinase P III in crude extract from the fruit of *Actinidia chinensis* (kiwifruit).

A, proteinase activity on gelatin-containing SDS-PAGE gel; B, data obtained from densitometric analysis of gelatin-degrading activity on SDS-PAGE gel. Crude extracts, before electrophoresis, were preincubated at various temperature (15°C, ●; 25°C, ○; 37°C, ▼; 50°C, ▽ and 60°C, ■) for various time intervals. After electrophoresis, the gels were incubated in 50 mM sodium citrate buffer (pH 4.0; 10 mM CaCl<sub>2</sub>) for 100min at 37°C, and then stained with Coomassie Blue.

서 60°C 이상에서 급격히 효소활성이 저하된다는 보고와도 유사한 결과이다. 산업적 가치를 고려해 볼 때 단백질분해효소는 우선적으로 넓은 기질특이성과 열안정성이 높아야 한다. 위의 Fig. 6~7의 연구 결과로 보아 kiwifruit에서 추출한 단백질분해효소는 40°C 전후에서 최대의 활성을 보이고, 고온에서도 상당 시간 비교적 안정한 특성을 보여 식품제조, 식육연화 등 식품산업 분야에서의 활용가능성이 높을 것으로 보이며, 나아가 단백질이 갖는 식품학적 기능

성을 높이는 데에도 사용할 수 있을 것으로 판단된다. 더욱이 이들 단백질분해효소는 추출원이 과실이기 때문에 식품첨가제로서 안전성이 있어 그 이용가치가 충분한 것으로 사료된다.

이상의 연구 결과를 종합해 보면 kiwifruit의 단백질분해효소 중 PIII는 최적 pH와 열안정성이 동물성 단백질분해효소인 pepsin (EC 3.4.23.1.)이나 곰팡이 (*Aspergillus niger* var. *macrosporus*)의 acid protease (EC 3.4.23.6)의 것과 유사하여[4], 효소활성도 및 경제성 측면에서 pepsin이나 acid protease의 대용으로서 가치가 있을 것으로 추정된다. 하지만, 단백질분해효소 PI과 PII가 PIII와 어떠한 관련성이 있는지 또는 PIII와는 전혀 다른 단백질분해효소인지를 밝힐 필요가 있다. 그리고, 본 단백질분해효소의 산업적 이용을 위해서는 kiwifruit 과실의 발달과 저장기간 중에 이들 효소들의 출현시기와 활성변화 등 생화학적인 특성과 다래나무속 식물 전체를 대상으로 한 포괄적인 연구가 필요하다. 더불어 gelatin과 casein 등 천연기질 뿐만 아니라 여러 가지 합성기질을 이용한 기질특이성을 조사하여 kiwifruit 단백질분해효소의 새로운 활용도를 탐색할 필요가 있다.

## 요 약

본 연구에서는 단백질분해효소의 산업적 이용을 위하여 kiwifruit 과육 속에 들어 있는 gelatin분해활성을 조사하였다. Kiwifruit 과육에는 3개의 단백질분해효소의 활성 밴드 (PI, PII, PIII)가 관찰되었다. 단백질분해효소 PI은 220 kD, PII는 51 kD, PIII는 26 kD에 해당하는 것으로 추정할 수 있었다. 이들 단백질분해효소 PI, PII, PIII는 모두 pH 2.0~5.0 범위에서 높은 활성을 보였으며 pH 4.0에서 가장 높게 나타났다. 이들 단백질분해효소 PI, PII, PIII는 모두 cysteine proteinase 저해제인 E-64와 iodoacetate에 의해서 저해되었으며, cysteine proteinase를 촉진하는 DTT, cysteine 및 β-mercaptoethanol에 의해서 활성이 증가하였다. 그 중 단백질분해효소 PIII는 분자량과 효소의 특성으로 보아 actinidin (EC 3.4.22.14)과 동일한 것으로 판단되었다. 단백질분해효소 PI, PII, PIII는 모두 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>과 Mn<sup>2+</sup>에 의해 촉진되었으며 Zn<sup>2+</sup>과 Hg<sup>2+</sup>에 의해 완전히 저해되는 것으로 나타났다. 하지만, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup> 등

금속이온의 영향이 다소 다르게 나타났다. Kiwifruit 과육의 단백질분해효소 P I, P II, P III 중에서 P I 과 P II는 온도가 증가함에 따라 활성이 점차 낮아졌으나 P III는 비교적 안정한 것으로 조사되었다. 특히, P III는 50°C 이내의 범위에서 48시간 경과시에도 75% 이상의 활성을 보여 이 범위의 온도에서는 상당 시간 동안 안정한 것으로 나타났다.

### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 제주대학교 이열대원에 산업연구센터의 지원에 의한 것입니다.

### 참 고 문 헌

- Bai, Y.H. and J.H. Roh. 2000. The properties of proteolytic enzymes in fruits (pear, kiwifruit, fig, pineapple and papaya). *Korean J. Soc. Food Sci.* **16** (4), 363-366.
- Boller, T. 1986. Roles of proteolytic enzymes in interactions of plants with other organisms, pp. 97-117, In Dalling, M.J. (ed.), *Plant proteolytic enzymes Vol. I*, CRC Press, Boca Raton.
- Cowan, D. 1983. Industrial applications: Proteins, pp.352-374, In Godfrey, T. and S. West (eds.), *Industrial enzymology - The application of enzymes in industry*, The Nature Press, New York.
- Godfrey, T. 1983. Comparison of key characteristics of industrial enzymes by type and source, pp. 466-502, In Godfrey, T. and S. West (eds.), *Industrial enzymology - The application of enzymes in industry*, The Nature Press, New York.
- Godfrey, T. and S. West. 1983. Introduction to industrial enzymology, pp.1-7, In Godfrey, T. and S. West (eds.), *Industrial enzymology - The application of enzymes in industry*, The Nature Press, New York.
- Heussen, C. and E.B. Dowdle. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* **102**, 196-202.
- Kang, B.S., E.S. Lee, B.Y. Kim and Y.T. Hahm. 1996. Studies on the characterization of protease in the Korean Kiwi fruit and its possibility of industrial application.. *Daesan Journal* **4**, 125-132.
- Kim, B.J. 1989. Purification and characterization of kiwifruit protease. *Korean J. Food Sci. Technol.* **21** (4), 569-574.
- McDowall, M.A. 1970. Anionic proteinase from *Actinidia chinensis* preparation and properties of the crystalline enzyme. *Eur. J. Biochem.* **14**, 214-221.
- Oh, S.J., Y.C. Park, O.Y. Lee-Stadelmann and S.C. Koh. 1998. Induction by salicylic acid and characterization of PR-proteinases from bulbs of *Lilium formosanum* Wallace. *Korean J. Plant Res.* **11** (2), 195-201.
- Sugiyama, S., K. Ohtsuki, K. Sato and M. Kawabata. 1996. Purification and characterization of six kiwifruit proteases isolated with two ion-exchange resins, Toyopearl-SuperQ and Bakerbond WP-PEI, *Biosci. Biotech. Biochem.* **60** (12), 1994-2000.
- Tello-Solis, S.R., M.E. Valle-Guadarrama and A. Hernández-Arana. 1995. Purification and circular dichroism studies of multiple forms of actinidin from *Actinidia chinensis* (kiwifruit), *Plant Science* **106**, 227-232.
- Yoon, S., H. Choi and J. Lee. 1991. Modification of functional properties of casein by kiwifruit protease. *Korean J. Soc. Food Sci.* **7** (4), 93-101.

(Received September 3, 2002; Accepted December 21, 2002)