

뽕나무에서 추출한 단백질 분해효소의 특성

윤숙자 · 오성훈* · 장명숙**

배화여자전문대학 전통조리과, *안산공업전문대학 식품공업과
**단국대학교 식품영양학과

The Properties of Proteolytic Enzymes from the Mulberry (*Morus alba* L.)

Sook-Ja Yun, Sung-Hoon Oh* and Myung-Sook Jang**

Department of Traditional Cuisine, Bae Hwa Women's Junior College

*Department of Food Engineering, Ansan Technical College

**Department of Food Science and Nutrition, Dankook University

Abstract

The purpose of this study was to investigate the properties of proteolytic enzymes extracted from mulberry (*Morus alba* L.). The protease activity of the enzymes from mulberry was 2,358 unit/g. The enzymes showed strong activities toward hemoglobin and collagen. The optimum temperature and pH of the enzymes were 50°C and 6.0, respectively. The enzymes were stable at the temperature range of 30°C to 60°C and the pH from 5.0 to 7.0 for 1 hr at 37°C of incubation and also retained whole activity after incubation for 1 hr at 60°C.

Key words: proteolytic enzymes, mulberry (*Morus alba* L.), temperature, pH

I. 서 론

「음식디미방」¹⁾, 「규합총서」²⁾ 등의 기록에 의하면 옛날 가정에서 질긴 고기를 삶을 때 저실(楮實, *Broussonetia kazinoki* Siebold)이나 뽕나무(Mulberry, *Morus alba* L.)를 넣으면 연해진다고 하였다. 뽕나무류의 根皮의 코르크층을 제거한 속껍질을 벗겨 건조한 것을 상백피(桑白皮, *Sang-Baik-Pi*, Root bark of mulberry, *Mori Cortex Radicis*)라 하여 많이 이용하였고 뽕나무 줄기나 잎사귀도 사용하였다고 한다.

쇠고기를 조리하였을 때 기호에 가장 큰 영향을 미치는 요인중 하나는 연화인데 식육연화제로는 papain, ficin, bromelin 등이 이용되어 왔고 이들에 대한 연구는 많이 이루어져 왔다. 그러나 우리나라 가정에서 옛부터 육류 연화에 이용해온 재료의 연육효과에 관한 연구는 많이 이루어지지 않았다. 근래에 저실(닥나무 열매)의 단백질 분해효소와 육류 연화효과에 대하여는 연구된 바 있고^{3,4)} 뽕나무에 대한 연구로는 상백피의 분초학적 연구, 성분, 효능에 관한 연구^{5,6)}가 있을 뿐 육류의 연화에 미치는 영향에 대해서는 연구된 바

가 없다. 따라서 뽕나무를 육류조리에 이용할 수 있는지의 가능성을 모색하기 위하여 뽕나무 속껍질의 단백질 분해효소 활성도 및 몇 가지 특성을 측정하여 보았으므로 이에 따른 결과를 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

뽕나무는 경기도 안성에서 재배된 높이 1.8 m 정도의 것으로 이것의 줄기를 채취하여 껍질(코르크)을 제거한 후 속껍질을 벗겨서 자연건조시켜 시료로 사용하였다.

2. 조효소액의 제조

Fig. 1에서 보는 바와 같이 잘게 분쇄한 뽕나무 속껍질(비건조물) 2,800 g(수분함량 60%)에 1차에는 증류수(pH 7.7)를 18.5 L, 2차에는 15.5 L를 가한 다음 저온실(5°C)에서 2차에 걸쳐 침지하여 추출하였다. 1차 19시간 침지 후에는 17.9 L(pH 5.80)를, 2차 17시간 침지 후에는 14.8 L(pH 6.0)를 각각 얻어 총 32.11 L을

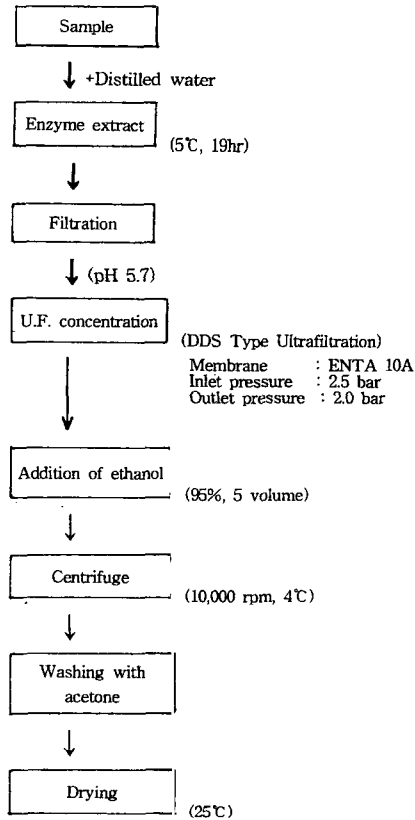


Fig. 1. The procedure for preparation of crude proteolytic enzymes extracted from the stem bark of mulberry.

얻었는데, ultra-filtration을 통해 1.24 L(pH 5.7)로 농축하였다. 여기에 -60°C 의 Deep freezer에서 20시간 이상 보관한 ethanol(95%)을 농축액량의 5배에 해당하는 6.2 L 취해 서서히 가하고, pH를 5.5로 조절하여 5°C 의 저온실에서 20시간 동안 침전시킨 후 연속 원심분리(10,000 rpm, 4°C)하여 침전물을 회수하였다. 이 침전물을 acetone으로 세척하여 4회 감압여과하였다. 이렇게 여과된 침전물을 여과지를 사용하여 여과한 다음 25°C 에서 건조하였다⁹⁾.

3. 효소활성의 측정

Milk casein 0.6 g을 정밀히 취하여 0.1N NaOH 20 mL에 넣고 수욕중에서 가열 용해시킨 다음 냉각하고 0.1N H_3PO_4 용액을 사용하여 pH 6.0으로 조절하였다. 이 용액에 0.1N 인산염 완충액(sodium phosphate buffer, pH 6.0) 20 mL를 가한 후 100 mL volumetric flask에 넣은 다음 증류수로 100 mL가 되게 맞추었다.

기질 1 mL를 시험관에 넣은 다음 37°C 의 수욕조에서 5분간 예열시키고 희석 효소액 1 mL를 가하여

60분 동안 반응시킨 다음 0.4M 트리클로로초산 2 mL를 가하고 30분간 방치시켰다. 그리고 공시험(blank)으로서 0.4M 트리클로로초산 2 mL에 희석한 효소액 1 mL와 기질 1 mL를 넣고 37°C 의 수욕조에서 30분 동안 방치시켰다. 각각을 0.55M Na_2CO_3 를 넣어 둔 시험관에 넣고 Folin 시약 1 mL를 가하여 37°C 의 수욕조에서 발색시킨 다음 660 nm에서 흡광도를 측정하였다¹⁰⁾. 효소 활성 단위는 1분간에 1 μg 의 tyrosine을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 하였다. 단백질 분해효소 역기는(본 반응의 흡광도-blank의 흡광도) \times 희석배수로 계산하였다.

4. 기질 특이성

각 기질 0.6 g을 정밀히 취하여 0.1N NaOH 20 mL에 넣고 수욕중에서 가열 용해시킨 후 냉각하고 1/20M phosphate buffer 용액을 사용하여 pH 7.5로 조절하였다. 이 용액에 0.1N 인산염 완충액(pH 7.5) 20 mL를 가한 다음 100 mL volumetric flask에 넣고 증류수로 100 mL가 되게 맞추어 조제한 다음 효소활성을 측정하여 상대효소활성(%)으로 표시하였다. 실험에 사용한 기질의 종류는 milk casein(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), egg white(Sigma, chicker dried), hemoglobin(Sigma, bovine type I), collagen(Sigma from bovine *Achilles tendon*), gelatin(Sigma type B, from bovine skin)이었다.

5. 효소활성에 대한 온도의 영향

0.6%의 milk casein(pH 7.5)을 기질로 사용하여 30, 40, 60, 70, 80°C 에서 1시간 반응시켜 상대효소활성(%)으로 표시하였다.

6. 효소활성에 대한 pH의 영향

0.6%의 milk casein을 사용하여 0.2M sodium acetate buffer(pH 5-6)와 0.2M 인산염완충액(pH 7-10)로 조절하고 37°C 에서 1시간 반응시켜 상대효소활성(%)으로 표시하였다.

7. 단백질 정량

Bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry 법¹¹⁾에 따라 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 효소액의 수율 및 효소활성

시료의 효소를 조제한 다음 시료 추출물 100 mL 중의 조효소 분말량은 2.25 g으로 회수율 0.08%(wet

Table 1. Summary of preparation of protease from the stem bark of mulberry

Sample	Steps	Amount	Ac-tivity (unit/g)	Total activity (unit)	Yield (%)
Stem bark of Mulberry	Raw material	2,800 g	8.24	23,072	100
	Sample extract	32.7 L	0.34	10,954	48
Mulberry	Ultra-filtration	1.24 L	8.39	10,403	45
	Dried by acetone	2.25 g	2,358	53,044	23

basis)이었다. 상백피에서 추출한 단백질 분해효소 활성은 Table 1에서와 같이 2,358 unit/g을 나타내었다.

2. 효소의 특성

(1) 기질 특이성

뽕나무에서 추출한 조효소의 다른 단백질 기질에 대한 효소활성을 조사해 본 결과 본 효소의 기질에 대한 특이성은 Table 2에서와 같이 기질로서 casein 100에 대하여 hemoglobin 44, collagen 34, egg white 20, gelatin 13의 비율로 가수분해하는 것으로 나타났다. 이 결과로 부터 뽕나무 조효소의 기질 특이성은 육류에 주로 함유된 단백질인 hemoglobin과 collagen을 비교적 잘 가수분해하는 것으로 나타나 육류의 연육제로서의 사용가능성을 나타낸다고 하겠다. 이는 다나무 열매에서 추출한 단백질 분해효소의 기질 특이성과 같은 경향이였다.

(2) 효소활성에 대한 온도의 영향

뽕나무 조효소의 활성은 Fig. 2에서와 같이 30~60°C에서 비교적 안정하였고, 50°C에서 그 활성이 가장 크게 나타났으며 70°C 이상의 온도에서는 그 활성이 급격히 감소하였다. 이것은 papain의 최적 활성온도와 같고, trypsin(40°C)에 비해 높으며 bromelin과 다나무 열매효소(60°C)^{3,12)}에 비해서는 낮은 값이었다. 또한 김 등¹³⁾은 무화과에 있는 ficin의 최적 작용온도는 60°C이며, 열에 대한 안정성은 0~55°C 범위라고 하였다.

(3) 효소활성에 대한 pH의 영향

pH를 달리한 역가 실험은 pH 5.0~7.0에서 안정하였고, 최적 pH는 6.0으로 관찰되어졌으며 8.0이상의 pH에서는 그 활성이 급격히 떨어졌다(Fig. 3). 윤 등³⁾도 다나무 열매에서 추출한 단백질 분해효소의 pH가 6.0~

Table 2. Substrate specificity of proteolytic enzymes from the stem bark of mulberry

Substrate	Relative activity (%)
Milk Casein	100
Egg White	20
Hemoglobin	44
Collagen	34
Gelatin	13

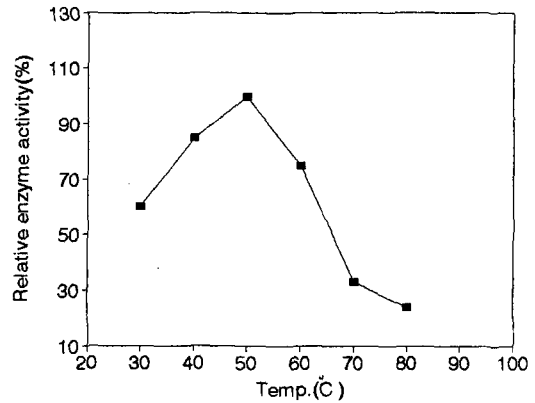


Fig. 2. Optimum temperature of protease extracted from the stem bark of mulberry.

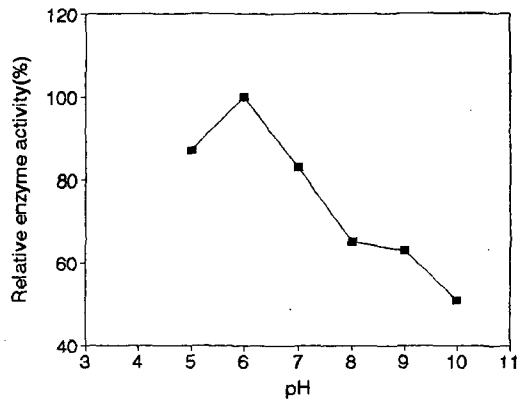


Fig. 3. Optimum pH of protease extracted from the stem bark of mulberry.

8.0에서 안정하였고, 최적 pH는 7.0이라고 하였는데 뽕나무 조효소는 이들보다 조금 낮은 것으로 나타났다. 김 등¹³⁾에 의하면 무화과에서 분리한 ficin의 최적 pH는 7.0이라고 하였다.

(4) 단백질정량

조효소 분말의 단백질함량은 7.2%로 나타났으며, specific activity는 32.75(unit/mg)이었다.

IV. 요약

뽕나무는 옛날 가정에서 질긴 쇠고기를 조리할 때 사용하였다고 하였는데, 실제로 육류 조리에는 이용가능성을 모색하기 위하여 우선 뽕나무 줄기의 속껍질에서 추출한 단백질 분해효소의 활성 및 특성을 알아 본 결과는 다음과 같다. 시료 2,800 g으로부터 조효소 분말 2.25 g을 회수하였는데, 회수율은 0.08% (wet basis)이었다. 뽕나무에서 추출한 단백질 분해효

소 활성은 2,358 unit/g을 나타내었다. 효소의 특성 중 기질 특이성은 다른 단백질 기질에 대한 뽕나무에서 추출한 조효소의 효소활성을 조사해 본 결과 casein 100에 대하여 hemoglobin 44, collagen 34, egg white 20, gelatin 13의 비율로 가수분해하는 것으로 나타났다. 이 결과 뽕나무에서 추출한 조효소의 기질 특이성은 육류에 주로 함유된 단백질인 hemoglobin과 collagen을 비교적 잘 가수분해하는 것으로 나타났다. 뽕나무에서 추출한 조효소의 활성 온도는 30~60°C였고, 최적온도는 50°C로 나타났으며, 70°C 이상의 온도에서는 그 활성이 급격히 감소하였다. 또한 pH를 달리한 역가 실험은 pH 5.0~7.0에서 안정하였고, 최적 pH는 6.0으로 관찰되어졌으며 8.0 이상의 pH에서는 그 활성이 급격히 떨어졌다. 또한 뽕나무에서 추출한 조효소의 단백질 함량은 7.2%였고, specific activity는 32.75 unit/mg이었다.

참고문헌

1. 이성우: 규곤시의방-음식디미방(안동 장씨 원저, 1670년경). "한국고식문헌집성 고요리서(I)", 수학사, p. 252 (1992).
2. 이성우: 규합총서(빙허각 이씨 원저, 1815년경). "한국고식문헌집성 고요리서(II)", 수학사, p. 613 (1992).
3. 윤숙자, 오평수, 장명숙: 닥나무 열매에서 추출한 단백질 분해효소의 특성에 관한 연구. 한국영양식량학회지, 22(6), p. 803 (1993).
4. 윤숙자, 김천제, 장명숙: 닥나무 열매분말이 마쇄육의 연화와 맛에 미치는 영향. 한국조리과학회지, 10(4), 346 (1994).
5. 안덕균: 상백피에 관한 연구 I. 생약학회지, 11(2), p. 85 (1980).
6. 도정애: 상백피에 관한 연구 II. 생약학회지, 11(2), p. 95 (1980).
7. 송보완: 상백피에 관한 연구 III. 생약학회지, 12(1), p. 1 (1981).
8. 최대선: 상백피의 효능에 관한 연구, 경희대학교 박사학위논문 (1988).
9. 김현옥, 김영주, 이상열, 김광수, 정숙근: 식육의 연화에 관한 연구, 식물즙액에서 단백질분해효소분리 이용 시험, 시험연구보고서-축산시험장-, 축산-축시-축이-7, p. 572 (1978).
10. Anson, M. L.: The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin, *J. Gen. Physiol.*, 22, 79 (1939).
11. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
12. 이상령, 이길왕, 김영주, 정숙근: 식육연화에 관한 연구, 단백질분해효소에 의한 식육의 연화에 관한 연구. 시험연구보고서-축산시험장-, 축산-축시-축이-8, p. 578 (1978).
13. 김준평, 서재신, 김정숙: 무화과에서 ficin의 분리 및 정제, 한국식품과학회지, 18, 270 (1986).

(1997년 11월 20일 접수)