

닥나무 열매(楮實子)에서 추출한 단백질 분해효소의 특성에 관한 연구

윤숙자[†] · 오평수* · 장명숙**

배화여자전문대학 전통조리과

*(주)태평양 중앙연구소 생물공학연구소

**단국대학교 식품영양학과

The Properties of Proteolytic Enzymes from the Fruit of *Broussonetia Kazinoki* Siebold

Sook-Ja Yun[†], Pyong-Su Oh* and Myung-Sook Jang**

Dept. of Traditional Cuisine, Bae Hwa Women's Junior College, Seoul 110-735, Korea

*Laboratory of Biotechnology, Pacific R & D Center, Ansan 425-120, Korea

**Dept. of Food Science and Nutrition, Dankook University, Seoul 140-714, Korea

Abstract

The properties of proteolytic enzymes from the fruit of *Broussonetia kazinoki* Siebold were investigated. The protease activity of the enzymes from the fruit of *Broussonetia kazinoki* Siebold was 1.6 unit. The optimum temperature and pH of the enzymes were 60°C and 7.0, respectively. The enzymes were stable at pH values from 6 to 8 for 1 hr. at 37°C of incubation and also retained all activity after incubation for 1 hr. at 60°C. The enzyme preparations showed strong activities toward hemoglobin and collagen.

Key words : fruit of *roussonetia kazinoki* Siebold, proteolytic enzyme, collagen

서 론

닥나무는 우리나라 전역의 산간지방에서 야생 또는 재배되는 것으로 그 열매를 저실자(楮實子)라고 하는데 9월에 익으며 맛이 달고 붉은 색으로 모양은 딸기와 같은 핵과로서 지름이 2mm정도이다. 눈을 밝게 하며 이뇨작용의 효과가 있다고 하여 한방재료로 널리 사용되어 왔다¹⁾.

고서의 기록^{2,3)}을 보면 “닥나무 열매 서너알 넣어 증이로 뚜껑을 만들어 틈을 막아 김이 안새게 하면 고기가 속히 익고 연하며 맛도 좋았다”고 기록되어 있는 것으로 보아 옛날 가정에서 쇠고기를 조리할 때 저실자를 넣으면 연하여 지고 맛도 좋아진다고 하여 질긴 쇠고기를 삶을 때 사용하였던 것을 알 수 있다. 그러나, 닥나무 열매가 육류의 연화에 미치는 영향에 대해서는 전혀 연구된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 우리나라에서 쉽게 구입할 수 있는 닥나무 열매를 육류 조리에서 적용하였을 때의 연화효과와 맛에 미치는 영향을 보고자 하여 우선 1차적으로 닥나무열매의 연화작용에 미칠 수 있는 성분으로 단백질 분해효소의 활성도 및 몇몇 특성을 측정하여 보았으므로 이에 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

재료

닥나무 열매는 강원도 고성에서 채취하여 자연 건조시킨 것으로 1992년 11월에 경동시장에서 구입하여 사용하였다.

효소액의 제조⁴⁾

분쇄하여 35mesh 체를 통과시킨 닥나무 열매 10g에

[†]To whom all correspondence should be addressed

증류수 50ml를 가한 다음, 저온에서 12시간동안 침지시켰다. 가제를 사용하여 추출 여과한 다음 여과액량의 5배에 해당하는 냉각된 ethanol(5°C)을 가하고 pH를 5.5로 조절하여 저온실에서(5°C) 12시간동안 단백질을 침전시켰다. 침전된 단백질은 원심분리에 의해 회수한 다음 acetone으로 건조하였다(Fig. 1).

효소활성의 측정

기질용액의 조제(1.5% milk casein용액)

Milk casein 1.5g을 정밀히 취하여 0.1N NaOH 20ml에 넣고 수욕중에서 가열 용해시킨 다음 냉각하고 0.1N H₃PO₄용액을 사용하여 pH 6.0으로 조정하였다. 이 용액에 0.1N 인산염 완충액(sodium phosphate buffer, pH 6.0) 20ml를 가한 후 100ml volumetric flask에 넣은 다음 증류수로 100ml가 되게 맞추었다.

효소활성 측정법

기질 1ml를 시험관에 넣은 다음 37°C의 수욕조에서 5분간 예열시키고 회색효소액 1ml를 가하여 60분동안 반응시킨 다음, 0.4M 트리클로로초산 2ml를 가하고 30분간 방치시켰다. 따로 공시험(blank)으로서 0.4M 트리클로로초산 2ml에 회색한 효소액 1ml와 기질 1ml를 넣고 37°C의 수욕조에서 30분동안 방치시켰다. 각각을 여과지로 여과한 다음 여액중 1ml를 취해 미리 Na₂CO₃ 5ml를 넣어둔 시험관에 넣고 Folin시약 1ml를 가하여 37°C의 수욕중에서 발색시킨 다음 660nm에서 흡광도를 측정하였다³⁾. 효소활성 단위는 1분간에 1μg의 tyrosine을 생성하는 효소의 양을 1unit로 하였다.

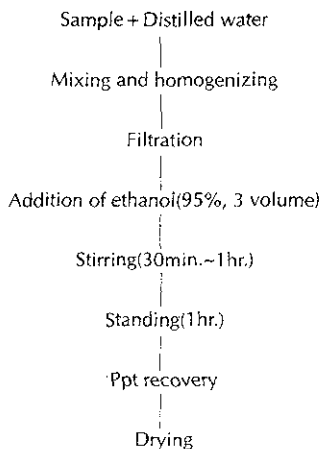


Fig. 1. The procedure for preparation of crude proteolytic enzymes from the fruit of *Broussonetia kazinoki* Siebold.

단백질 분해 효소 역가(unit)는

(본반응의 흡광도 - blank의 흡광도) × 회색배수로 계산 하였다.

효소의 특성

기질 특이성

기질용액의 조제

각 기질 0.6g을 정밀히 취하여 0.1N NaOH 20ml에 넣고 수욕중에서 가열 용해시킨 후 냉각하고 1/20M phosphate buffer용액을 사용하여 pH 7.5로 조정하였다. 이 용액에 0.1N 인산염 완충액(sodium phosphate buffer, pH 7.5) 20ml를 가한 다음 100ml volumetric flask에 넣고 증류수로 100ml가 되게 맞추었다.

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.

효소활성 측정법

효소활성은 Murachi와 Neurath⁶⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 기질 3ml를 시험관에 넣은 다음 37°C의 수욕조에서 5분간 예열시키고 0.15M cysteine 0.2ml를 첨가하고, 여기에 회색효소액 0.5ml를 가한 후 37°C의 수욕중에서 60분동안 반응시킨다음, TCA 용액 3.2ml를 첨가하고 30분간 방치시켰다. 각각을 여과지(Whatmann No. 1)로 여과한 다음 여액중 1ml를 취해, 미리 Na₂CO₃ 5ml를 넣어둔 시험관에 넣고 Folin시약 1ml를 가하여 37°C의 수욕중에서 30분간 발색시킨 다음 660nm에서 흡광도를 측정하였다.

효소활성에 대한 온도의 영향

0.6%의 milk casein(pH 6.0)을 기질로 사용하여 30, 40, 50, 60, 70, 80°C에서 1시간 반응시켜 상대효소활성(%)으로 표시하였다.

효소활성에 대한 pH의 영향

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

단백질 정량

Bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry 법⁷⁾에 따라 측정하였다.

결과 및 고찰

효소액의 조제 및 효소활성

시료의 효소를 조제하였을 때 시료추출물 100ml중의 조효소 분말량은 1.01g으로 회수율 6.2%를 나타내었다. 다나무 열매 추출액의 단백질함량은 건물량으로 9.6%였고 단백질 분해효소활성은 1.6unit을 나타내었다(Table 1).

효소의 특성

기질특이성

다나무 열매 효소(protease)의 다른 단백질 기질에 대한 효소활성을 조사해 본 결과 본 효소의 기질에 대한 특이성은 Table 2에서와 같이 기질로써 casein 100에 대해 egg white 50, hemoglobin 79, collagen 53, gelatin 42의 비율로 가수분해 하는 것으로 나타났다.

이와 같은 결과로부터 다나무 열매효소의 기질 특이성은 육류에 주로 함유된 단백질인 hemoglobin과 collagen을 비교적 잘 가수분해 하는 것으로 나타나 육류 연질에 사용되었던 근거를 잘 설명한다고 하겠다.

효소활성에 미치는 온도의 영향

Fig. 2에서와 같이 다나무 열매 효소의 활성은 60°C 까지 증가하여 60°C에서 활성이 가장 컸으며 그 이후 온도에서는 급격히 감소하였다. 다른 효소들(trypsin 40°C, papain 50°C, bromelin 60°C)⁸⁾의 열안정성과 비교해 볼 때 다나무 열매의 효소가 비교적 높은 것으로 나타났다.

Table 1. Summary of preparation of protease enzymes from the fruit of *Broussonetia kazinoki* Siebold

Sample	Step	Total protein	Total activity(unit)	Yield(%)
Fruit of <i>Broussonetia kazinoki</i> Siebold	Sample extract	100.00ml	0.26	100.00
	Dried by acetone	1.01g	1.60	6.20

Table 2. Substrate specificity of proteolytic enzymes from the fruit of *Broussonetia kazinoki* Siebold

Substrate	Relative ratio(%)
Milk casein	100
Egg white	50
Hemoglobin	79
Collagen	53
Gelatin	42

효소의 활성에 미치는 pH의 영향

Fig. 3에서 보는 바와 같이 다나무 열매 효소는 pH 6.0~8.0에서 안정하였고 최적 pH는 7.0으로 관찰되었으며 9.0이상의 pH에서는 그 활성이 급격히 떨어졌다. 이 등⁸⁾의 연구에 의하면 pH 7.0~9.0에서의 역가 감소 속도면에서는 브로멜린의 경우가 가장 빨랐는데 본 실험의 다나무 열매는 감소속도가 더 느린 것으로 나타났다.

요 약

우리나라 전역의 산간지방에서 야생 또는 재배되는 다나무의 열매는 옛날 가정에서 질긴 쇠고기를 조리할 때 사용하였다고 하므로 본 연구에서는 다나무 열매를

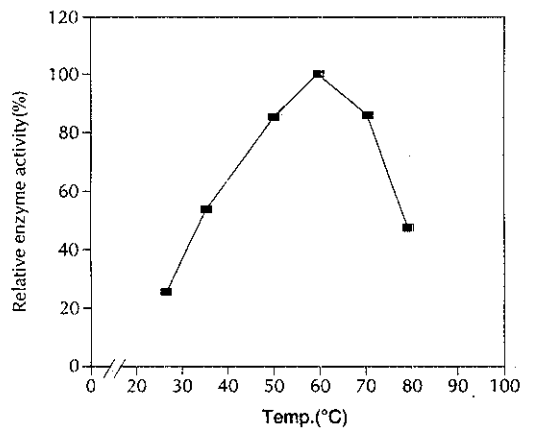


Fig. 2. Optimum temperature of protease from the fruit of *Broussonetia kazinoki* Siebold.

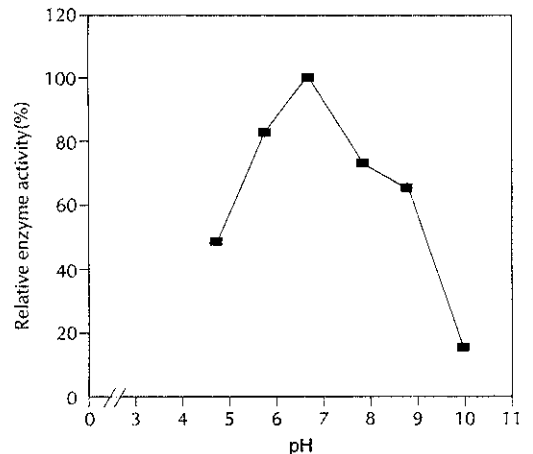


Fig. 3. Optimum pH of protease from the fruit of *Broussonetia kazinoki* Siebold.

육류조리에 이용하였을 때의 연화효과를 보고자하여 1차적으로 닭나무열매에서 추출한 단백질 분해효소의 활성도를 측정하였다. 시료의 효소를 조제하였을 때 시료추출물 100ml중의 회수된 조효소 분말량은 1.01g으로 회수율 6.2%를 나타내었고 단백질 분해효소 활성은 1.6 unit의 활성을 나타냈으며 닭나무 열매추출물의 단백질함량은 건물량으로 9.6%였다. 또한 효소의 기질에 대한 특이성은 casein 100에 egg white 50, hemoglobin 79, collagen 53, gelatin 42의 비율로 가수분해하는 것으로 나타나 육류에 함유된 단백질인 hemoglobin과 collagen에 대한 효소의 가수분해율이 높은 것으로 나타났다. 효소의 최적온도는 60°C로 관찰되었으며 열에 비교적 안정하였다. 효소의 최적 pH는 7.0이었으며, 전반적으로 넓은 pH영역에서 활성이 있는 것으로 나타났다.

문 헌

1. 육창수 : 한국 약품식물자원도감. 진명출판사, 서울, p.78(1981)
2. 저자미상 : 부인필지(1951)
3. 빙허각이씨 : 규합총서. 보음재(1815)
4. 김현욱, 김영주, 이상열, 김광수, 정숙근 : 식육의 연화에 관한 연구, 식물즙액에서 단백분해효소분리 이용시험. 시험연구보고서-축산시험장-, 축산-축시-축이-7, p.572(1978)
5. Anson, M. L. : The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, **22**, 79(1939)
6. Murachi, T. and Neurath, H. : Fractionation and specificity studies on stem bromelain. *J. Biol. Chem.*, **235**(1), 99(1960)
7. 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)
8. 이상열, 이길왕, 김영주, 정숙근 : 식육 연화에 관한 연구, 단백분해 효소에 의한 식육의 연화에 관한 연구. 시험연구보고서-축산시험장-, 축산-축시-축이-8, p.578(1978)

(1993년 8월 16일 접수)