

상백피에서 추출한 단백질 분해효소의 특성

권순경 · 박상욱* · 최우영

충남대학교 농화학과, *우송공업대학 식품영양과

Properties of the Proteolytic Enzymes from Mulberry Tree Barks (*Morus alba* Linne)

Soon-Kyung Kwon, Sang-Wook Park* and Woo-Young Choi

Dept. of Agricultural Chemistry, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Woosong Technical Junior College, Taejon 300-100, Korea

Abstract

Water extract of mulberry tree barks(*Morus alba* Linne) was studied for its proteolytic activity. Protein content of the extract was 1.12 mg/ml and its specific activity was 5.14 U/ml. The enzyme was active on various proteins: the relative activities were 100 for casein, 63 for albumin, 58 for collagen, 45 for hemoglobin and 36 for gelatin, respectively. These suggested that the ability of the enzyme to hydrolyze meat was relatively high since those are major meat proteins. Optimum pH and temperature for proteolytic activity were: pH 6.0 and 60°C. And the enzyme was stable at the pH range of 6.0 to 7.0 and temperature between 50 and 80°C. Apparent proteolytic activities could support some scientific grounds of traditional application of mulberry tree barks to home cooking for meat tenderization.

Key words : mulberry tree barks(*Morus alba* Linne), proteolytic enzyme, substrate specificity.

서 론

뽕나무는 중국, 우리나라 전국 각 지방의 촌락 부근에서 재배되며 잎은 양잠사료, 수피는 약용이나 제지용, 과실은 약용, 식용으로 이용되고 있다¹⁾. 상백피(桑白皮)는 뽕나무의 껍질로서 한방에서는 이뇨제, 소염제, 진해제로 쓰이고 있다.²⁾ 조선시대의 요리서^{3,4)}에 “질긴 고기를 삶을 때 상백피와 함께 삶으면 쉬 연해진다”고 기록되어 있는 것으로 보아 질긴 고기를 삶을 때 상백피를 사용한 것으로 보인다. 그러나 상백피는 조리보다 한약재로서 많이 사용되어 왔다. 단백질 분해효소는 파파야⁵⁾, 파인에플⁶⁾, 무화과⁷⁾, 키위⁸⁾, 멜론⁹⁾, 생강¹⁰⁾, 배¹¹⁾ 등에 존재하는 것으로 보고되었다. 울 등¹²⁾은 단나무 열매에서 단백질 분해효소가 마쇄육¹³⁾과 장조림¹⁴⁾의 연화에 효과가 있음을 보고한 바 있으나 상백피가 육류의 연화에 미치는 영향에 대해서는 연구된 바 없다.

본 연구에서는 우리나라에서 쉽게 구입할 수 있는 상백피에서 단백질 분해효소를 추출하여 육류조리에 사용하였을 때의 연화효과를 알아보기 위하여 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

상백피 (mulberry tree barks, *Morus alba* Linne)는 충청남도 금산에서 채취하여 자연건조시킨 것으로 1998년 7월에 대전 한약재 도매시장에서 0.5 cm 정도 길이로 잘게 썰은 것을 구입하여 사용하였다.

2. 효소액의 조제

상백피를 분쇄하여 35mesh 체를 통과시킨 분말 20g에 증류수 100ml를 넣고 12~16시간 침지 추출

Corresponding author : Sang-Wook Park

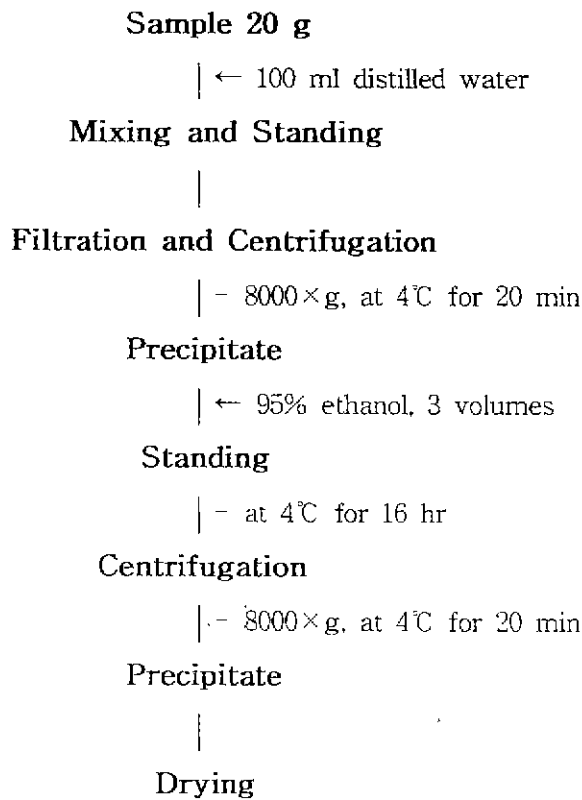


Fig. 1. Procedure for preparation of the crude proteolytic enzymes from mulberry tree bark.

한 다음 가제로 여과하였다. 여액을 8,000×g에서 20분간 원심분리한 후 3배량의 냉각된 에탄올(4°C)을 가하고 pH를 5.5로 조절하여 저온실(4°C)에서 12~16시간 방치한 후 8000×g에서 20분간 원심분리하여 침전물을 회수한 다음 아세톤으로 건조하고 증류수로 용해한 것을 조효소액으로 사용하였다 (Fig. 1).

3. 효소의 활성 측정

기질용액의 조제는 Milk casein 0.6g을 0.1N NaOH 10ml에 넣고 수욕 중에서 가열 용해시킨 후 인산을 첨가하여 pH 6.0으로 조정하였다. 이 용액에 0.1M 인산 완충액 (pH 6.0) 20ml를 가한 후 100ml 플라스크에 넣고 증류수로 정용하였다.

Protease의 활성은 Kunitz법¹⁵⁾을 변형하여 측정하였다. 즉 0.6% milk casein용액 0.5ml에 인산 완충액 (pH 6.0) 4.5ml를 넣고 37°C 수욕상에서 예열한 후 조효소액 1ml를 넣어 10분간 반응시키고 0.44M trichloroacetic acid (TCA)용액을 5ml 첨가하여 그대로 수욕상에서 30분간 방치하였다. 공시험으로서 효소를 반응시키기 전에 미리 0.44M TCA용

액 5ml를 넣고 같은 방법으로 실험하였다. 이를 원심 분리 (8000×g, 10분)한 후 상정액 1ml를 취하여 0.55M Na₂CO₃ 5ml와 3배 희석한 Folin시약 1ml를 첨가하고 37°C 수욕상에서 30분간 발색시킨 다음 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성의 단위는 1분 간에 1 μmol의 tyrosine을 생성하는 효소의 양으로 정의하였으며, 단위의 계산은 (본 반응의 흡광도 - 공시험의 흡광도) × 희석배수로 하였다.

4. 기질특이성

기질특이성을 위한 기질용액의 조제는 milk casein (Wako Pure Chemical Industries Ltd.), hemoglobin (Sigma, bovine type I), albumin (Sigma, chicken dried), collagen (Sigma, bovine Achilles tender), gelatin (Sigma, bovine skin type B) 각 0.6g에 0.1N NaOH 20ml를 가하고 수욕상에서 가열 용해시킨 후 냉각하고 0.1M 인산 완충액을 사용하여 pH 7.5로 조정하였다. 이 용액에 0.1M 인산 완충액 (pH 7.5) 20ml를 가한 다음 증류수로 100ml가 되도록 정용하였다.

기질특이성을 위한 Protease의 활성 측정은 Murachi와 Neurath⁶⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉 기질 0.5ml에 0.2M 인산 완충액 (pH 6.0) 4.5ml를 가하여 37°C 수조에서 10분간 예열시키고 0.15 M cysteine 0.2ml와 효소액 1ml를 첨가한 후 10분 동안 반응시켰다. 0.44M TCA용액 5ml를 첨가하여 반응을 정지하고 30분간 방치한 다음 원심분리 (8000×g, 10분)하였다. 상정액 1ml를 취해 0.55M Na₂CO₃ 5ml를 넣고 3배 희석한 Folin시약 1ml를 가하여 37°C에서 30분간 발색시킨 다음 660nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 온도의 영향

기질로서 0.6%의 milk casein (pH 6.0)을 사용하여 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C의 각 온도에서 활성을 측정하고 상대활성 (%로 표시)으로 나타내었다. 온도 안정성은 효소액을 위의 각 온도에서 30분간 열처리한 후 냉각하여 잔존 활성을 측정 비교하였다.

6. pH의 영향

0.6%의 milk casein 0.5ml에 0.2M 아세트산 완충액 (pH 3~5) 또는 0.2M 인산 완충액 (pH 6~10) 4.5ml를 가하여 pH를 조정하고 다음, 활성을 측정하고 상대활성으로 표시하였다. pH 안정성은 효소액

에 pH 3~10의 같은 완충액 4배량을 첨가하여 5°C에서 16시간 방치한 후 잔존활성을 측정 비교하였다.

7. 단백질의 정량

상백피의 단백질 함량은 AOAC의 마이크로 켈달법¹⁶⁾에 따라 분석하였으며, 시료 1g을 분해 증류한 후 0.01N NaOH로 적정하였다.

결과 및 고찰

1. 조효소액의 효소 활성

상백피 추출액 (분말 20 g을 증류수 100ml로 추출한 것)을 조효소액으로 사용하여 protease의 활성을 정하고 단백질을 정량한 결과, 단백질 함량은 1ml당 1.12mg, protease는 비활성도로서 1mg당 5.14 unit 수준이었다. 상백피 분말의 단백질 함량은 1g당 26.30mg이었으므로 조효소액중에 추출된 단백질은 그 21.3%에 상당하는 양이다.

2. 기질 특이성

상백피에서 추출한 단백질 분해효소의 기질 특이성은 Table 1과 같다. Casein을 기준 (100)으로 하였을 경우 albumin 63, collagen 58, hemoglobin 45, gelatin 36의 수준으로서 육류 단백질에 주로 함유된 collagen 및 hemoglobin의 분해력은 비교적 컸다. 윤 등¹²⁾이 보고한 다나무 열매로부터 추출한 효소의 상대활성도 hemoglobin 79, collagen 53에 비교하여 보면 상백피의 것이 hemoglobin에 대한 활성이 낮은 반면 collagen에 대한 분해력은 비슷하거나 다소 높은 것으로 나타났다.

3. 온도의 영향

상백피 효소의 활성 및 안정성에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과 Fig. 2 및 Fig. 3과 같다. 상백피 효소의 활성은 60°C에서 가장 높았으며, 70~80°C에

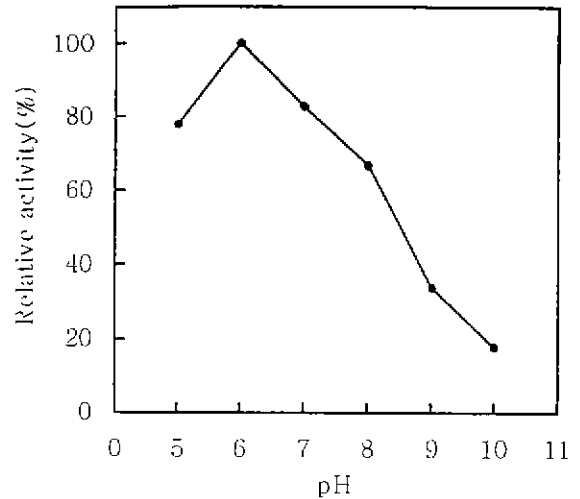


Fig. 2. Effect of temperature on the activity of protease from mulberry tree barks.

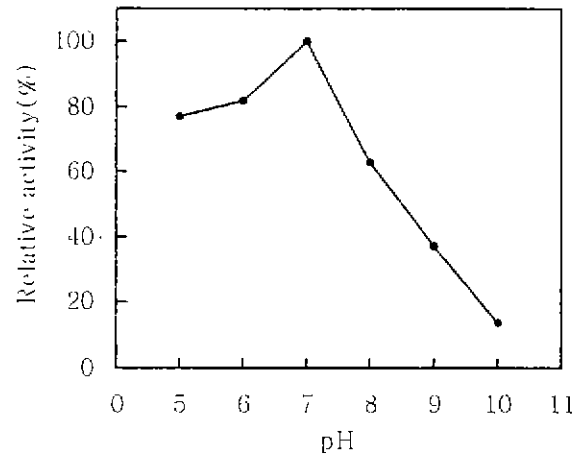


Fig. 3. Effect of temperature on the stability of protease from mulberry tree barks.

서는 완만하게 90°C에서는 현저히 감소하였다. 열 안정성은 50~80°C에서는 안정하였고 90°C 이상에서는 급격히 감소하는 것으로 나타났다. 다른 효소와 비교해 보면 키위 열매의 효소는 50°C 이하⁸⁾, ficin은 62.5°C⁷⁾, melon은 60°C 이하⁹⁾, papain은 50°C⁵⁾, bromelain은 60°C⁶⁾, 다나무 열매의 효소는 60°C¹²⁾ 등으로 보고되어 있으므로 상백피 효소가 비교적 열 안정성이 높은 것으로 생각된다.

4. pH의 영향

상백피 효소의 활성 및 안정성에 미치는 pH의 영향은 Fig. 4 및 Fig. 5와 같다. 상백피 효소는 pH 6.0에서 가장 활성이 높았으며 pH 9.0 이상에서는 활성이 급격히 저하되었고, pH 6.0~7.0에서 가장 안

Table 1. Substrate specificity of the proteolytic enzyme from mulberry tree barks

Substrate	Relative activity (%)*
Milk casein	100
Hemoglobin	45
Albumin	63
Collagen	58
Gelatin	36

* A modification of the method described by Murachi and Neurath⁶⁾ was employed for protease assay.

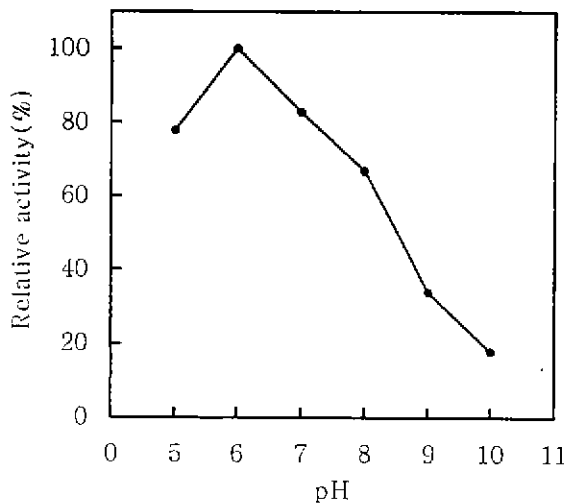


Fig. 4. Effect of pH on the activity of protease from mulberry tree barks.

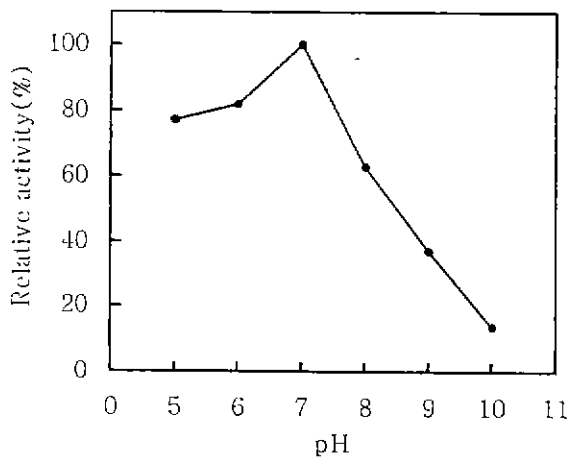


Fig. 5. Effect of pH on the stability of protease from mulberry tree barks.

정하였다. 키위⁸⁾ 및 닥나무 열매의 효소¹²⁾의 작용 최적 pH는 7.0으로서 본 실험에서 사용한 상백피가 약간 낮았다.

요 약

상백피에서 추출한 단백질 분해효소의 효소적 성질을 분석하였다. 상백피 추출액으로부터 분리한 단백질 함량은 1.12mg/ml, protease는 비활성도로서 5.14U/mg 수준이었다. 효소의 기질에 대한 특이성은 casein을 100으로 하였을 때 albumin 63, collagen 58, hemoglobin 45, gelatin 36의 비율로 가수분

해하여 육류 단백질에 주로 함유된 collagen, hemoglobin을 분해하는 능력이 비교적 큰 것으로 나타났다. 효소의 최적온도는 60℃, 열안정성은 50~80℃로서 비교적 열에 안정하였다. 효소의 최적 pH는 6.0이었으며 pH 6.0~7.0에서 안정하였고 pH 9.0 이상에서는 활성이 급격히 저하되었다. 따라서 옛날부터 가정에서 고기를 삶을 때 연화를 위하여 사용하였던 상백피 중에 단백질 분해효소력이 존재함을 확인하였다.

참고문헌

1. 김태정 : 한국의 자원식물 I, 서울대학교 출판부, p. 122~123 (1996).
2. 장준근 : 산야초 동의보감, 아카데미북 p. 279 (1997).
3. 황혜성 : *구근시의방*, 음식디디방 해설편, p. 31~32 (1985).
4. 이성우 : 한국요리문화사, 교문사, p. 131~132 (1985).
5. Kimmel, J.R. and Smith, E.L. : Crystalline papain, *J. Biol. Chem.*, 207, 515~520 (1954).
6. Murachi, T. and Neurath, N. : Fractionation and specificity studies on stem bromelain, *J. Biol. Chem.*, 235, 99~104 (1960).
7. Kramer, D.E. and Whitaker, J.R. : Ficus enzymes, *J. Biol. Chem.*, 239, 2178~2186 (1964).
8. 김복자 : 키위열매 protease의 추출정제 및 그 특성에 대하여, *한국식품과학회지*, 21, 569~574 (1989).
9. Kaneda, M. and Tomimaga, N. : Isolation and characterization of a proteinase from the sarcocarp of melon fruit, *J. Biochem.*, 78, 1287~1292 (1975).
10. 김경자, 이유방 : 생강즙이 precooked인 살코기 보존기간과 연화에 미치는 영향, *한국조리과학회지*, 11, 119~123 (1995).
11. 정혜정 : 동양매 protease의 정제 및 성질에 관하여, 충남대학교 대학원 석사학위논문 (1989).
12. 윤숙자, 오평수, 장명숙 : 닥나무 열매에서 추출한 단백질 분해효소의 특성에 관한 연구, *한국영양식품과학회지*, 22, 803~806 (1993).
13. 윤숙자, 김천제, 장명숙 : 닥나무 열매분말이 마쇄육의 연화와 맛에 미치는 효과, *한국조리과학회지*, 10, 346~350 (1994).
14. 윤숙자, 김나영, 장명숙 : 닥나무 열매의 알갱이와 분말 첨가가 장조림의 맛과 연화에 미치는 영향, *한국조리과학회지*, 11, 330~335 (1995).
15. Kunitz, M. : Crystalline soybean trypsin inhibitor, *J. Gen. Physiol.*, 30, 291~295 (1947).
16. A.O.A.C.: Official Methods of Analysis (16th ed.), Chapter 12, p. 7 Washington D.C. (1995).

(1998년 10월 24일 접수)