
능이버섯의 우육단백 분해 특성

이종호 교수
대림대학

능이버섯의 우육단백 분해 특성

이 종 호

대림대학 호텔관광외식경영과

Peptolytic Properties of *Sarcodon aspratus* on Beef Loin

Jong-Ho Lee

Dept. of Tourism Hotel & Restaurant Management Daelim College

Abstract : This study was conducted to investigate the proteolytic properties of *Sarcodon aspratus* on meat proteins. The analytical condition for the measurement of enzyme activity was determined and the effect of *Sarcodon aspratus* on beef protein and its fractions were determined by SDS-PAGE and spectrophotometric method, respectively. Optimum temperature and pH of *Sarcodon aspratus* was 73-78°C, pH 8, respectively. However, the enzyme tended to be denatured at 50°C for 10 min incubation. Proteolytic activity of *Sarcodon aspratus* was higher than those of kiwi and pear by 66 and 990 times by dry weight, respectively. It was appeared that proteolytic activity of *Sarcodon aspratus* toward beef protein by SDS-PAGE was prominent when compared to those of kiwi and bromelain. Furthermore, *Sarcodon aspratus* showed highest proteolytic activity toward all the beef protein fractions, which was followed by collagenase and bovine protease. Transmission electron microscopy showed the muscle fiber started to be degraded when treated with *Sarcodon aspratus*(1,000 unit) for 10min at 25°C. No distinct sarcomere, A-band, and z-line was observed when treated with *Sarcodon aspratus* for 60min at same condition.

Key word : proteolytic enzyme, *Sarcodon aspratus*, tenderizing effect, temperature stability

I. 서 론

버섯은 예로부터 우리 생활과 밀접한 관계가 있으며 식품으로 뿐만 아니라 각종 질병의 치료와 예방용으로 사용되어 왔다. 최근 버섯의 건강증진 효능에 관한 일반인들의 관심이 높아짐에 따라 무공해 자연식품이나, 기능성 식품으로 소비가 꾸준히 증가하고 있다. 또한 식용버섯은 단백질, 비타민, 무기질 등의 영양소가 함유되어 있을 뿐 아니라 독특한 맛¹⁾과 향기²⁾를 가진 식품이다. 특히 항암작용³⁾, 항균성⁴⁾, 그리고 혈중 cholesterol 농도를 저하시키는 작용⁵⁾을 비롯하여 여러 가지 생체기능 조절작용 등의 약리 효과가 보고 되어 있다.

버섯이 생성하는 효소는 거의 가수분해 효소로 알려져 있는데, Hashimoto⁶⁾는 식용버섯 중의 cellulolytic enzyme의 특성에 대하여 보고하였고, Yamasaki와 Suzuki⁷⁾는 표고버섯에서 β -glucosidase와 glucoamylase를 분리정제 하였고, Gavrilova 등⁸⁾은 버섯의 protease를 추출하여 단백질에 대하여 그 분해력을 검토하였다. 한편 한국과 일본에서 자생하는 능이버섯은 오래 전부터 식용과 약용으로 애용되고 있는 바, 이⁹⁾와 은 등¹⁰⁾은 능이버섯 중에는 활성이 강한 protease가 함유되어 있는데 이는 alkaline protease임을 확인하였다. 이 등¹¹⁾은 능이버섯에서 분리한 정제효소가 4℃에서 6개월간 보관하였을 때 효소의 활성은 변화되지 않았으며 이 효소는 endopeptidase일 가능성이 있다고 하였다. 박¹²⁾은 능이버섯의 성분연구에서 casein을 분해하는 protease가 존재함을 확인하였고, 유¹³⁾는 능이버섯 protease의 활성중심은 tryptophan과 serine으로 추정하였다. 한편 이¹⁴⁾와 은 등¹⁵⁾은 버섯의 약리 작용에 관하여 연구하였고 이¹⁶⁾는 능이버섯의 단백질 소화력과 시판 단백질 소화 효소의 역가를 비교하였으며, 은 등¹⁰⁾은 능이버섯중의 protease가 시판되고 있는 몇몇의 단백질 소화제 보다 단백질 분해력이 강하다고 보고하였으며 허¹⁷⁾는 능이버섯중의 단백질분해 효소를 소화제로서의 개발가능성에 대하여 검토하였다. 이상에서 살펴 본 바와 같이 능이버섯의 연구는 주로 단백질 가수분해 효소의 특성과 정제, 약리 작용과 소화효소제로서의 타당성에 관한 연구에 국한되어 있다. 따라서 본 연구는 능이버섯의 육단백 분해효소의 활성을 시중에 판매되고 있는 단백질분해 효소와 비교연구 하였다.

1. 능이버섯이란

능이버섯 [*Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito] 은 분류학상 담자 균류의 민주름살 버섯목(Aphyllphorales) 글뚝 버섯과(Thelephoraceae)에 속 한다¹⁸⁾(Fig. 1).

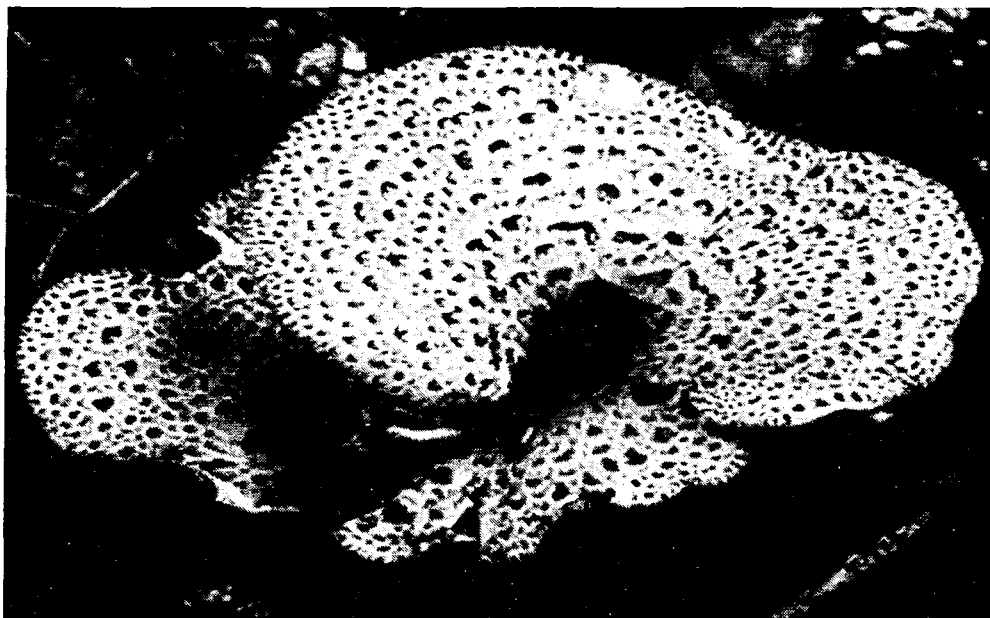


Fig. 1. *Sarcodon aspratus*(Berk.) S. Ito

능이버섯은 한국 및 일본에 자생하고 있으며 활엽수림의 부식이 많은 산지에서 9월 하순부터 10월 초순에 걸쳐서 발생하고, 특히 깊은 산 박달나무 아래 주로 발생한다. 갓의 직경 15~20 cm 크기의 식용버섯으로 깔때기 모양의 대형 버섯이다. 버섯의 표면은 거친 인편 상이고, 또 곰의 귀 모양으로 생겼다 하여 웅이 버섯이라고도 하며, 신선할 때의 색은 담갈색으로 향기가 적으나 건조하면 암황색 내지 흑갈색으로 변하여 강한 향을 낸다. 이로 인하여 일명 향 버섯이라고도 한다¹⁹⁾²⁰⁾.

또한 능이버섯은 독특한 풍미와 향취가 있어 표고나 송이 등과 같이 식용으로 사용되고 있으며 조리 시에는 보통 감미제를 첨가하여 기름에 볶아 조리하면 색이 더욱 검어진다. Park²¹⁾²²⁾의 연구에 의하면 능이버섯의 성분으로는 ethanol 추출물의 유리아미

노산이 21종, 산 가수분해물 에서는 전 아미노산 22종이 확인되었으며, 가장 많이 함유된 아미노산은 glutamic acid이고, 금속 원소로는 Ca이 가장 많이 함유되어 있으며 Fe, Zn, Mg 및 Mn등의 순으로 함유되어 있고 단백질이 31.5%, 다당류가 52.8%라고 보고 되어 있다. 능이버섯은 예로부터 우리 나라 농촌에서 채취 건조하여 보관해 두었다가 쇠고기를 먹고 체하였을 때에 그 달인 물을 소화제로(양방, 한방 민간요법) 이용되어 왔고, 그 맛이 독특하여 육류를 요리할 때도 사용하고 있다.

II. 재료 및 실험방법

1. 재료

본 실험에 사용한 능이버섯은 2003년 강원도 원주 산을 서울 경동시장에서 구입하였고, 키위, 배, 쇠고기 이마트 에서 구입하였으며, 조리 과학적 변화를 관찰하기 위한 쇠고기(등심부위)는 김해 축산물 공판장에서 도살직후의 생고기를 구입하여 실험재료로 사용하였다. 단백질 분해 활성을 비교하기 위한 시판 protease인 bromelain, papain, collagenase, chymotrypsin, bovine protease 등의 단백분해 효소와 단백질 분해 활성의 측정에 사용된 시약 및 SDS-PAGE 시약은 Sigma사 제품 사용하였다.

2. 실험 방법

일반성분 분석

수분은 105℃ 상압가열건조법, 조지방은 Soxhlet 추출법, 조단백은 semimicro Kjeldahl법, 조회 분은 550℃ 건식회화법, 식이 섬유는 Prosky 등²³⁾에 의해 개발 수정된 AOAC법²⁴⁾으로 각각 측정하였다. 효소 활성 측정을 위한 단백질 정량은 조효소는 Lowry 등²⁵⁾의 방법을, 정제효소는 Bradford 등²⁶⁾의 방법을 이용하여 측정하였으며 표준물질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

조효소 추출 및 작용특성 분석

조효소 추출 : 건조된 능이버섯 10 g을 25℃에서 증류수(100 ml)에 넣어 2시간동안 교반하여 원심분리(10,000×g, 20분)한 후 잔사를 다시 100 ml의 증류수로 2 시간 동안 교반하여 원심 분리한 상등액을 모아 조효소액으로 사용하였으며, 비교용 시료인 키위와 배는 Waring blender로 추출하여 원심분리(10,000×g, 20 분) 한 후 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

단백분해 효소의 활성측정: 효소반응의 초기속도 구간을 설정하기 위해 1% hammersten casein(0.1 M 인산완충용액, pH 8.0)용액 1 ml에 적절한 농도로 희석된 조효소액 1 ml을 가하고 50℃에서 time course reaction을 실시하고 효소와 기질의 적정 반응 시간을 결정하였다.

분해되는 기질의 양은 5% TCA 용액 3 ml을 가하여 반응을 정지시키고 2,000×g에서 20 분간 원심 분리한 후 상등액의 가수분해된 펩타이드의 양을 280 nm에서 흡광도와 Lowry 등²⁵⁾의 방법으로 결정하고 그 결과의 상관성을 검토하였다. 이때 효소의 활성은 초기속도 구간에서 1 분당 0.001의 흡광도 증가를 1 unit로 정의하였다.

육 단백질의 분획 및 획분에 대한 분해활성측정: 우육을 Kang과 Rice의 방법²⁷⁾에 따라 수용성, 염용성, 불용성 단백질로 분획하고 각 획분에 대한 능이버섯의 단백질분해능력을 papain, bromelain, collagenase, chymotrypsin, bovine protease 등의 효소와 비교하였다. 각 획분은 쇠고기의 3배에 해당하는 물을 가하고 마쇄하여 얻은 여액을 가지고 수용성 획분(water soluble fraction), 그리고 남은 잔사에 0.67 M NaCl 용액을 가하여 얻은 여액을 염용성 획분(salt soluble fraction), 그리고 남은 잔사를 불용성 획분(insoluble fraction)으로 하였다. 각 획분 들을 동결 건조한 후 단백질 함량 100 mg에 해당하는 양을 취하고 50 mM 인산완충용액(pH 8.0)으로 수화하였다. 수화된 각 단백질 획분에 100 unit의 활성을 보이는 단백질분해효소를 첨가하여 육 단백질분해활성을 측정하였다.

SDS-PAGE에 의한 육류 단백질 분해력 측정 : 능이버섯, 키위 조효소액, 및

bromelain을 처리한 쇠고기 단백질의 분해 양상을 전기 영동법으로 비교하였다. 즉 쇠고기 근육 2 g에 각각의 효소 200 unit를 첨가하고 25℃에서 1 시간 반응시킨 후 100℃에서 5 분간 가열한 후 염용성 단백질을 취하여 8 M urea, 2% mercaptoethanol, 2% SDS, 20 mM Tris HCl buffer(pH 8.0)의 용액에서 가온하고 교반하여 전기영동에 이용하였다. 전기영동은 Laemmli 법²⁸⁾에 의한 10% polyacrylamide gel을 조제하여 사용하였으며, 전기영동 시료는 320 μ g의 단백질을 loading하였다. 분자량 크기의 비교를 위하여 prestained SDS-PAGE 표준물질(Bio-Rad Co.)과 근육단백을 구성하는 myosin heavy chain과 myosin light chain 표준품(Sigma Co.)을 사용하였다.

능이버섯 protease의 쇠고기 근육분해 양상에 대한 조직학적 관찰

능이버섯이 육류의 질긴 정도를 결정하는 주된 요인인 근원섬유의 분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 도살 직후의 쇠고기(등심부위)를 1 mm³으로 잘게 썰고 이에 1,000 unit의 능이버섯 추출물 및 키위 추출물을 5 ml을 가하고 25℃에서 10분 및 60분간 반응 시켰다.

효소활성 측정은 1% hammersten casein(0.1 M 인산완충용액, pH 7.5) 용액을 기질로 한 Yamaguchi 등²⁹⁾의 방법을 다소 수정하여 사용하였다. 대조군에는 같은 양의 증류수를 가하고 동일한 조건에서 반응 시켰다. 단백질 분해 효소를 처리하지 않은 대조군과 처리한 시료를 5% glutaraldehyde(0.1 M phosphate buffer, pH 7.2)로 4℃에서 12시간 고정하고 1% osmium tetroxide로 후 고정한 후 30%-100% 아세톤으로 탈수시키고 spurr resin으로 포뮤텍하여 자른 60 nm의 절편을 uranyl acetate 및 lead citrate로 염색하여 75 KV에서 투과전자현미경(Hitachi, Japan)으로 관찰하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 능이버섯의 일반성분

능이버섯의 일반성분은 Table 3에 나타난 바와 같이, 수분 7.26%, 조단백질 24.03%, 조지방 2.26%로 나타났다. 이것은 표고버섯의 단백질 18.7%과 지방함량 1.7%인 것에

비해서 보다 다소 높은 것으로 나타났으며³⁰⁾, 식이 섬유 함량은 36.4%로 양송이버섯 19.0%이나 목이버섯 19.7%보다 높았으나 표고버섯 48.8%보다는 낮았다³¹⁾.

한편 김 등³²⁾은 상수리, 오리, 밤나무에서 재배한 표고버섯의 일반성분의 경우 조단백질 및 조지방은 밤나무에서 재배한 표고버섯이 각각 24.50%, 1.83%, 오리나무에서 재배한 것은 각각 19.26%, 1.17%, 상수리나무에서 재배한 것의 19.25%, 0.76%의 보다 많았다. 따라서, 능이버섯도 자생 토양과 기후에 따라서 일반성분이 다르고 건조정도에 따라 차이가 있을 것으로 사료된다.

Table 1. Proximate composition of *Sarcondon aspratus*

(%)

Constituents	Contents
Moisture	7.26
Crude protein	24.03
Crude fat	2.26
Carbohydrate	18.80
Ash	11.23
Total dietary fiber	36.42

2. 능이버섯 단백질분해 효소의 작용특성

1) 최적 온도와 pH

능이버섯의 단백질분해 효소를 40℃에서 100℃ 사이의 온도에서 시간별로 반응 시켜 반응시간에 따른 효소의 반응 생성물의 생성 정도를 비교한 결과 Fig. 2와 같다. 즉 70℃까지의 온도에서는 반응시간에 따라 반응 생성물의 양이 비례적으로 증가하였으나, 그 이상의 온도에서는 반응시간 1분 이후부터 반응생성물의 농도 증가가 완만하였다.

한편 온도에 따른 반응생성물의 농도를 반응시간에 따라 살펴 본 결과는 Fig. 3과 같다. 즉 1분간 반응 시 반응생성물의 농도는 온도가 높아질수록 증가하나 2분간 반응시켰을 때의 단위시간당 반응생성물의 농도는 78℃ 까지 증가하다가 감소하였으며 3분간 반응시켰을 때의 단위시간당 반응생성물 농도는 73℃ 이상에서 감소하기 시작하였다. 이와 같이 일정온도 이상에서 효소 반응물의 생성이 저하하는 것은 반응시간과 온도함수에 따른 효소의 변성 때문으로 생각된다. 따라서 이 효소의 최적온도는 초기 속도구간 혹은 특정반응시간 후의 단위시간 당 반응생성물의 농도로 결정할 수 있는데, Fig. 2 와 Fig 3의 결과를 종합해보면 능이버섯 단백질분해 효소의 최적온도는 초기속도에 따르면 1분 반응 시에는 100℃, 2분 반응 시에 78℃, 3분 반응 시에 73℃인 것을 알 수 있다. 그러나 70℃이상의 온도에서 효소의 활성이 저하된 것이 관찰되었으므로 이 효소를 특정 온도에서 10분간 incubation 한 후 남아있는 효소의 활성을 측정한 열 안정성 실험의 결과 50℃이상의 온도에서부터 효소의 변성이 일어남을 알 수 있었다. 즉 60℃에서 그 활성이 40% 감소하였으며, 온도가 증가할 갈수록 잔여활성은 급격히 감소하였다 (Fig. 4). 따라서 능이버섯 단백질분해 효소의 활성 측정을 위한 적정 온도로 50℃ 이하의 온도가 적당하다 하겠다. 또한 pH가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 pH 8.0에서 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 5).

한편, 은 등³³⁾은 양송이버섯의 단백질분해 효소 활성에서 효소의 최적 pH 8.0 까지 각 pH 별로 효소활성을 검토한 결과 pH 6.0부근에서 최대의 활성을 나타내었고 이 때의 온도는 50℃에서 20분간 반응시킨 결과라고 하였다. 능이버섯 단백질분해 효소 활성 측정은 pH 8.0의 완충용액과 50℃의 온도를 적용하였다. 그리고 단백질분해 효소에 의해

분해된 펩티드의 함량을 결정하는 방법으로 280 nm에서의 흡광도에 의한 방법과 Lowry법²⁵⁾에 의한 결과를 비교하였을 때 상관관계가 매우 높아($r^2=0.99$) 분석방법이 간편하고 신속한 280 nm 에서의 흡광도 측정으로 단백 분해효소의 활성을 비교하였다.

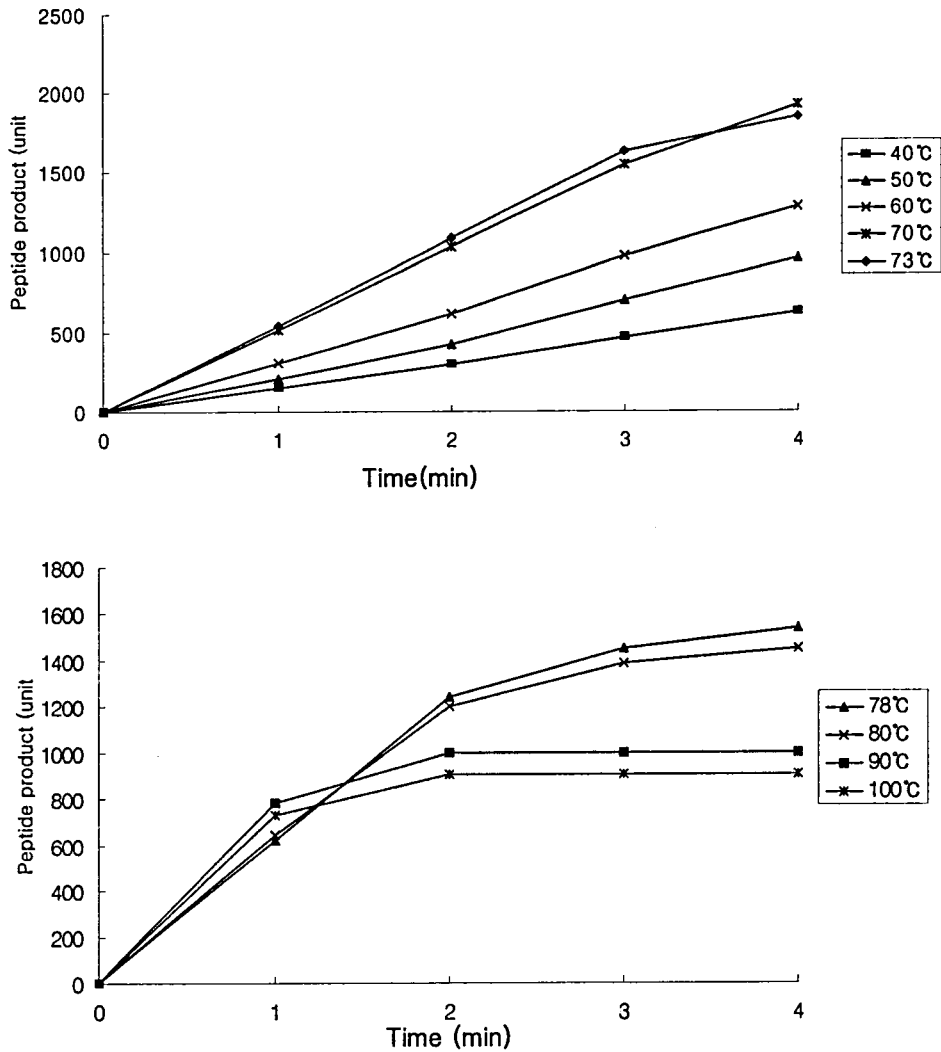


Fig. 2. Time dependent peptide formation of crude proteolytic enzyme from *Sarcodon aspratus* at different temperatures of 40~100°C

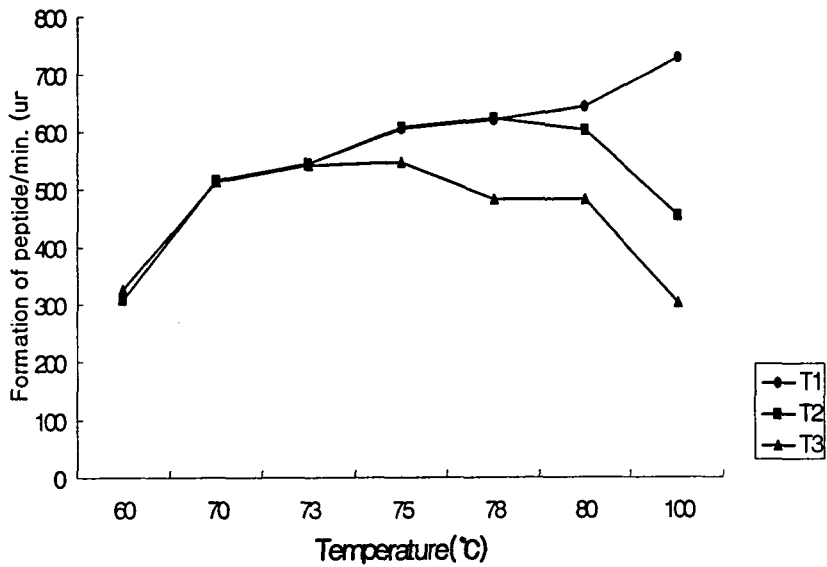


Fig. 3. Peptide formation rate of crude proteolytic enzyme as function of temperature (data are taken from Fig. 2 at 1min(T1), 2min(T2), 3min(T3))

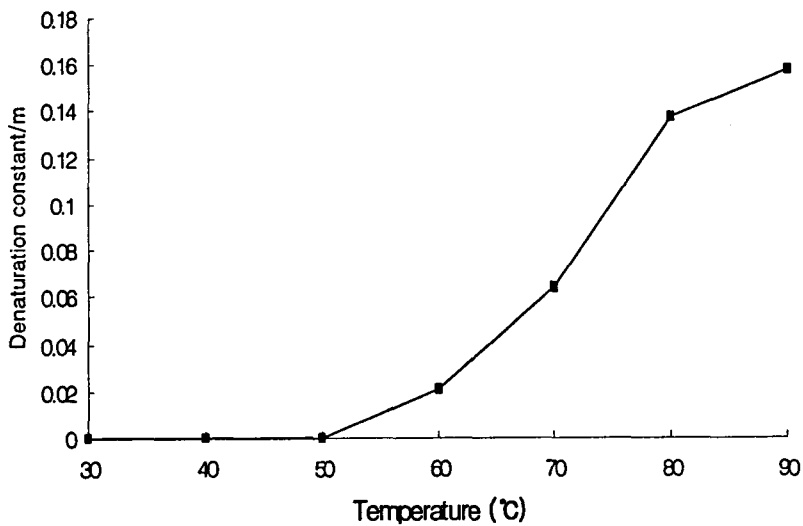


Fig. 4. Effect of temperature on stability of crude proteolytic enzyme from *Sarcodon asparatus* for 10 minutes incubation.

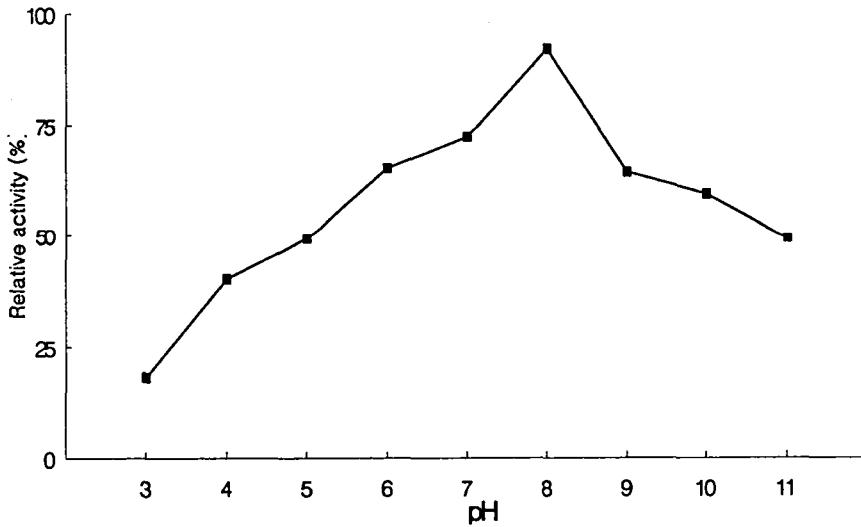


Fig. 5. Effect of pH on crude proteolytic enzyme activity from *Sarcodon aspratus*

2) 능이버섯의 단백분해 조효소활성 및 분해양상

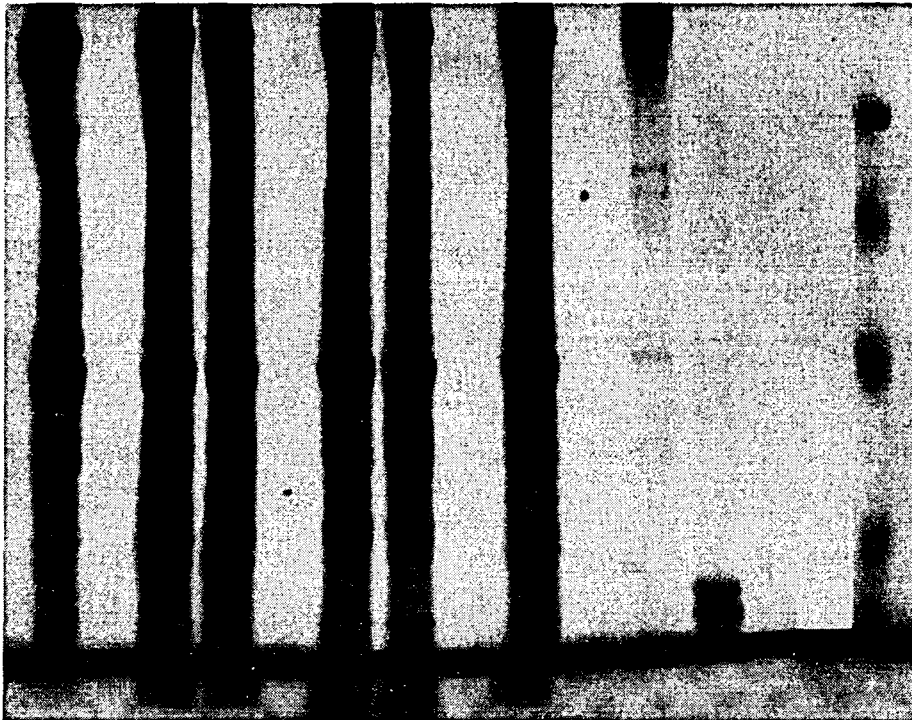
육류를 조리할 때 연육 효과를 높일 목적으로 첨가하는 키위, 배 및 표고버섯의 단백분해 효소활성을 능이버섯과 비교한 결과는 Table 2와 같다. 즉 건조 중량 당 능이버섯은 배, 키위 및 표고버섯보다는 현저히 높은 효과를 보였다. 또한 시판 연육 효소제, 키위, 능이버섯의 육단백 분해특성을 조사하고자 각각의 효소를 육 단백질에 첨가하고 1시간 반응시킨 후 육단백의 분해 양상을 SDS-PAGE로 비교한 결과, 조효소액 대신 증류수를 첨가하여 1시간 반응시킨 대조군에 비해 모든 단백분해 효소 첨가 군에서 myosin heavy chain의 분해현상이 나타났다.

특히 키위와 bromelain 처리 군에 비해 능이버섯 처리 군에서 myosin heavy chain의 분해효과가 현저한 것을 관찰할 수 있었는데(Fig. 6), 이 결과로 능이버섯 단백분해 효소가 육단백 분해에 특이적으로 작용함을 알 수 있었다. 오 등³⁴⁾은 새우젓으로부터 분리한 단백분해 효소가 우육이나 돈육보다 계육에서 단백질분해 효과가 현저하였다고 보고하였다.

서 등³⁵⁾은 우육과 돈육에 대해서 콩나물 효소 추출물을 가지고 단백질 분해 양상을 SDS-PAGE에 비교한 결과 myosin heavy chain, actin, tropomyosin 및 myosin light chain등이 분해된 것이 관찰되었다고 하였으며 시간이 경과할수록 myosin heavy chain, actin 및 tropomyosin이 분해되는 경향을 보인 것은 능이버섯 효소의 작용양상과 비슷하였다.

Table 2. Proteolytic activities of pear, kiwi, *Lentinus edodes* and *Sarcodon aspratus*

Sources	Dry basis (unit/g)	Fold (Relative activity)
Pear	162	1
Kiwi	2,402	15
<i>Lentinus edodes</i>	2,417	15
<i>Sarcodon aspratus</i>	160,440	990



1 2 3 4 5 6 7 8 9

Fig. 6. SDS-PAGE pattern of salt soluble protein from beef treated with various proteases

Lane 1 : Control

2, 3 : treated with *Sarcodon aspratus* extract for 30 min and 1 hr

4, 5 : treated with kiwi extracts for 30 min and 1 hr

6 : bromelain treatment for 1 hr

7 : myosin heavy chain

8 : myosine light chain

9 : prestained molecular markers (phosphorylase B 100,000, BSA 73,000, ovalbumin 47,500, carbonic anhydrase 33,900, soybean trypsin inhibitor 28,800)

3) 육 단백질 획득의 분해효과

또한 능이버섯 단백질분해 효소의 육단백 분해력을 연육 효소로 널리 이용되고있는 bromelain, papain 과 정제된 단백질분해 효소인 collagenase, chymotrypsin, bovin protease를 쇠고기의 수용성, 염용성 및 불용성 획득에 대한 분해능을 획득별로 작용시켜 비교한 결과 Table. 3과 같다. Table. 3에서 보는 바와 같이 모든 우육 단백질 획득에 대해 능이버섯의 활성이 가장 높았으며, 다음으로 collagenase, bovine protease 순이었다. 식육의 단백질은 용해도에 따라서 수용성, 염용성 및 불용성으로 나뉘어지고 연도에 크게 관여하는 것은 염용성과 불용성 획득에 있는 단백질이다³⁶⁾. 식육의 연도를 개선하기 위해서 연육소 또는 단백질 분해효소를 첨가하면 염용성의 근원섬유단백질을 분해하여 소편화 시키고 불용성의 육기질 단백질을 분해해서 질긴 것을 연하게 한다. 식육의 질긴 현상은 사후경직으로 인하여 미오신과 액틴의 결합형태를 반영하는 actomyosin type toughness와 불용성인 육기질 단백질 특히 콜라겐의 량과 형태를 반영하는 background toughness로 나타난다. 어느 형태이든 식육을 가열하여 이용할 때에 질김에 대한 거부감을 느끼는 것은 돼지고기나 닭고기에 비해 쇠고기에서 크게 느끼게 된다. 그러므로 연육소와 단백질 분해효소는 쇠고기에 많이 이용된다. 능이버섯에서 추출한 조효소의 단백질 분해력은 쇠고기의 염용성과 불용성 획득에 대해 각각 79.5와 98.5 unit/min.의 활성을 보여 시판되는 연육소나 단백질 분해효소보다 높은 활성치를 보였다. 염용성 획득에는 근원섬유에서 용해된 근수축 단백질인 미오신과 액틴, 그리고 조절단백질도 포함되고, 불용성 획득에는 콜라겐이 많이 있게되므로 능이버섯 단백질 분해효소는 actomyosin type toughness는 물론 background toughness 형태인 질긴 고기에도 연화효과가 커서 연육제로서의 개발 가치가 충분하다고 할 수 있겠다.

Table. 3. Proteolytic activities of various proteases on water soluble, salt soluble, insoluble fraction extracted from beef

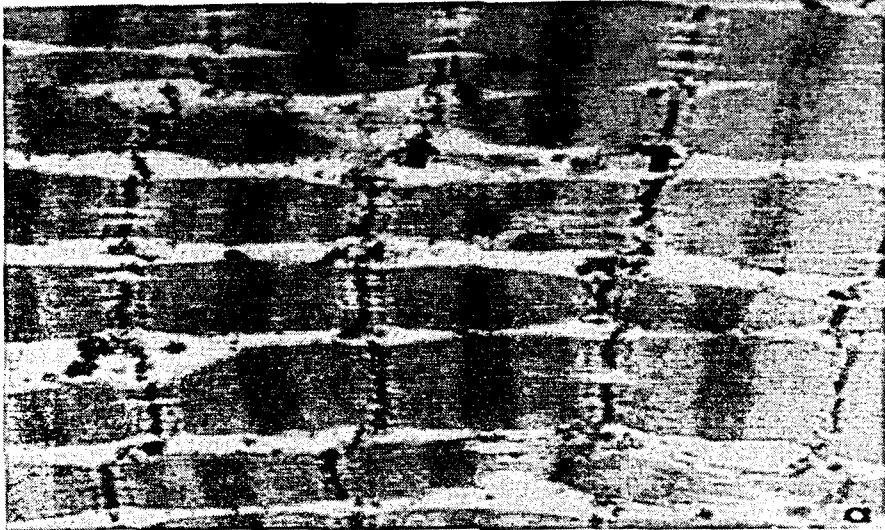
Proteases	Fractions		
	Water soluble	Salt soluble	Insoluble
	<i>Sarcodon aspratus</i>	49.5	79.5
Papain	4.5	12.5	19.5
Bromelain	5.0	12.0	17.0
Collagenase	36.0	71.5	82.0
Chymotrypsin	7.5	11.0	13.5
Bovine protease	8.0	75	20.0

3. 능이버섯 protease에 의한 쇠고기 근육의 조직학적 변화

근육의 조직단백질은 결합조직 단백질과 근원섬유 단백질로 구성되며, 근원섬유 단백질은 actin, myosin, connectin 등 여러 단백질로 구성되어 있다. 이러한 단백질 등을 효소 처리하였을 때 분해양상을 알아보기 위하여, 시판되는 냉동 우육을 조리하여 미세 구조를 관찰한 결과 근원섬유의 분해가 빈번히 관찰되어 능이버섯 첨가에 의한 효과를 비교하기가 힘들었다. 따라서 능이버섯의 단백분해 효소에 의한 근원섬유의 분해 양상을 조사하기 위하여 도살 직후의 생고기에 능이버섯 효소추출물을 사용하였으며 투과 전자현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 7과 같다. 도살 직후의 우육을 단백분해 효소를 첨가하지 않고 증류수에서 60 분간 반응시킨 대조군의 종단면에서는 전형적인 줄무늬 모양의 횡문근인 근육세포를 볼 수 있었으며, 어둡게 보이는 A-band, 밝게 보이는 I-band, 그리고 Z-line, M-line(화살표)과 근절을 명확히 구분할 수 있었다(Fig 7. a, b). 증류수에서 10분간 반응시킨 대조군 역시 60분간 반응시킨 대조군과 구조적 차이

를 보이지 않았다. 반면 능이버섯 추출물을 첨가한 근육조직에서는 10 분 처리 시 대조 군에 비해 Z-line과 A-band가 얇아지는 단백질분해 현상을 관찰할 수 있었다 (Fig 7. c, d). 또한 60 분간 처리 한 것은 Z-line, A-band와 I-band가 모두 분해되어 근절을 확인하기가 어려웠을 뿐만 아니라 섬유다발의 단백질이 분해되면서 전형적인 근육 세포의 형태를 완전히 잃어버리고 섬유다발이 넓게 퍼지는 양상을 보였다 (Fig 7. e, f). 그러나 thick filament가 모여있는 A-band의 M-line은 약하게나마 그 형태를 유지하고 있었다(Fig 7. e, 화살표). 키위를 처리한 조직에서도 능이버섯을 처리한 것과 같은 현상이 관찰되었다. 근원섬유를 구성하는 단백질의 퇴화현상은 사후장직 상태의 육류가 숙성되는 과정 중에서도 일어난다. Gann과 Merkel³⁷⁾은 숙성 중 쇠고기 배장근육 내의 구조 변화를 관찰하면서 사후 48 시간에 Z-line과 I-band의 접합 점에서 근원섬유가 파괴되기 시작하였고 사후 216 시간에 Z-line이 완전히 분해되었다고 보고하였다. 이러한 사실은 Z-line과 I-band 사이에 존재하는 filament 혹은 connectin이라 불리는 탄성단백질이 분해되어 육조직이 흐물흐물하게 된다는 Takahashi와 Saito³⁸⁾의 보고에 의해 확인되었다. Park³⁹⁾은 ficin 처리시 근원섬유의 myosin이 먼저 분해되기 시작하였으며 actin은 비교적 안정하였다고 보고하였고, Choe와 Park⁴⁰⁾은 배 단백질분해 효소가 myosin heavy chain의 분해를 촉진하였다고 보고하였다.

한편 Youn과 Yang⁴¹⁾은 파파인이 근원섬유 분해를 촉진하였으나 결합조직을 구성하는 콜라겐과 엘라스틴 섬유에는 작용하지 않았다고 보고하였다. 그러나 능이버섯 단백질분해 효소는 근원섬유를 구성하는 actin, myosin과 connectin을 비롯한 근원섬유 단백을 분해하여 섬유의 탄성과 장력을 낮추고, 따라서 육조직을 부드럽게 하는 것으로 사료된다. 또한 김⁴²⁾은 ficin 처리시 우육의 조직학적인 변화를 광학현미경, 주사현미경 및 투과 현미경으로 관찰한 결과 결체조직 단백질은 시간의 경과에 따라 정형에서 무형정형의 상태로 나타나고 opening-up 현상이 일어나 세분화되었으며 근원섬유 단백질의 경우 sarcomere의 길이가 길어지며 M-line이 희미해지고 Z-line의 I-band가 끊어져 소편화(fragmentation)되었다고 하였다.



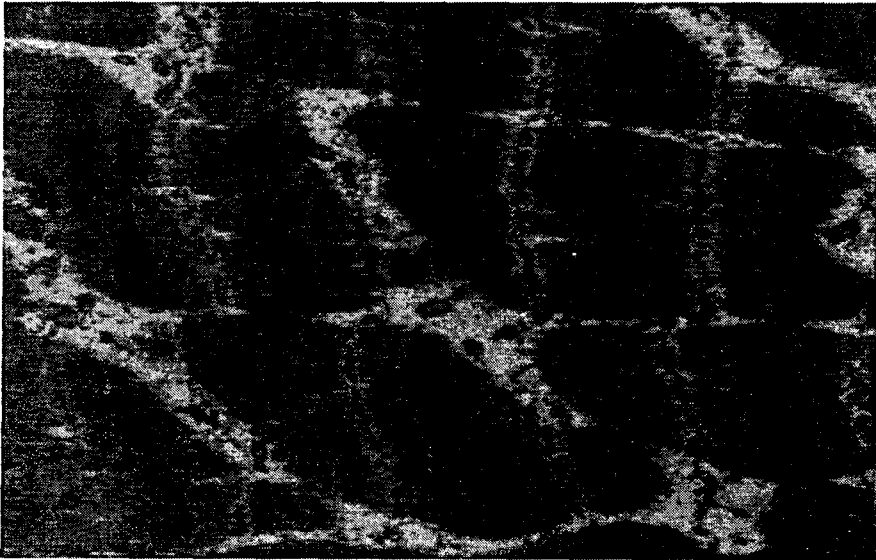
a



b

Fig. 7. Transmission electron micrographs of bovine muscle cell treated with 1,000 unit of *Sarcodon aspratus* at 25°C for 10 and 60 mins

a and b: Longitudinal section of control treated with water at 25°C for 60 min, which shows muscle fiber composed of sarcomere, A-band(A), I-band(I), Z-line(Z) and M-line(arrow)



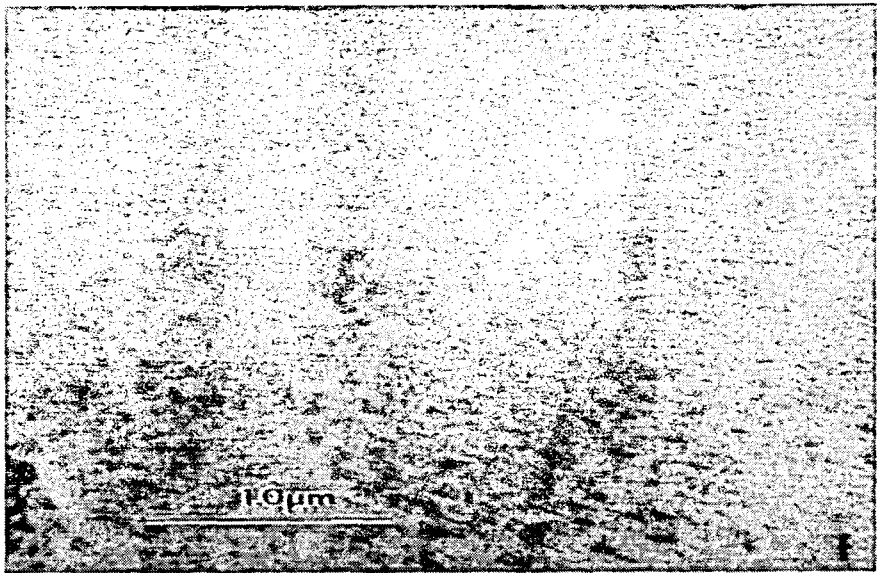
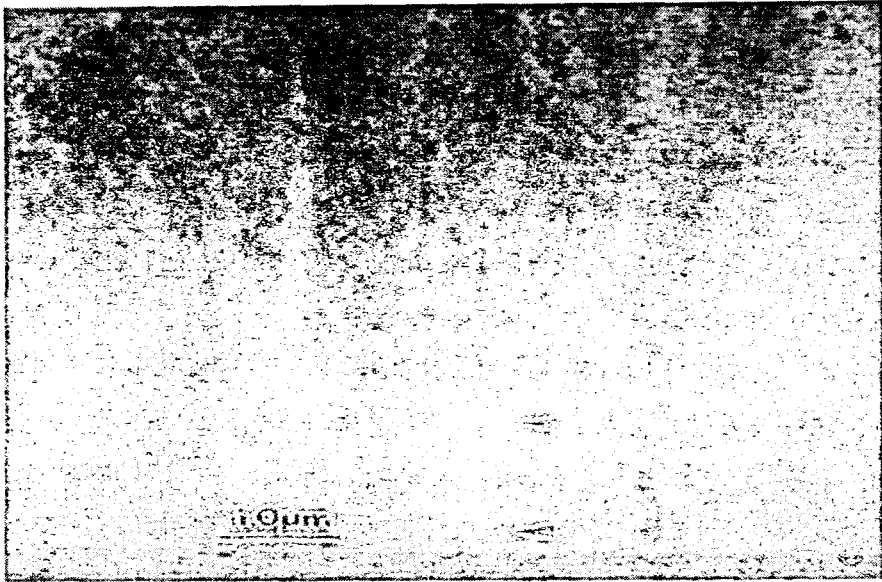
c



d

d

c and d: Longitudinal section of muscle fiber treated with *Sarcodon aspratus* for 10 min at 25°C. Z-line(Z) and A-band(A) appears thinner than control



e and f: Longitudinal section of muscle fiber treated with *Sarcodon aspratus* for 60 min at 25°C. No distinct sarcomere, Z-line, and A-band is shown, but M-line(arrows) was observed. Magnification: a-c (x 11,000), d-f (x 25,000)

IV. 요약 및 결론

능이버섯에서 추출한 효소의 특성과 이 효소를 이용한 연육 효과를 구명하기 위하여 조효소 대한 특성과 쇠고기에 첨가하여 그 작용특성을 실험하였다. 능이버섯 추출물의 단백분해 조효소는 pH 8.0에서 최대활성을 나타내었으며, 50℃ 이상의 온도에서 변성하는 경향을 나타내었다. 능이버섯 단백분해 효소는 키위, 배의 경우에 비해 단백 분해 능이 우수하였으며, SDS-PAGE에 의한 전기영동 시험결과 우육 단백질에 대한 분해특성 역시 능이버섯이 우수하였다. 특히 능이버섯의 가수 분해력은 쇠고기의 수용성 획분을 49.5 unit/min 보다 염용성과 불용성 획분에 대해 각각 79.5와 98.5 unit/min 높은 활성을 보였으며, 시판되는 연육 효소인 papain, bromelain, collagenase, bovine protease 보다 높게 나타났다. 투과전자현미경에 의한 미세구조 관찰 결과, 능이버섯(1,000 unit)을 25℃에서 10분간 처리했을 때 근원섬유 단백질이 분해 되기 시작하였으며, 60분간 처리 시 근절, A-band, Z-line 등을 전혀 구분할 수 없을 정도로 근원섬유의 분해현상이 현저하였다.

-참 고 문 헌-

1. Khanna, P. and Garcha, H. S. : Nucleic acid content and relative nutritive value of sporophore proteins of *Pleurotus* Species. *Mushroom Newsl. Trop.*, 6(3), 17 (1986)
2. Sulkowska, J. and Kaminski, E. : Effects of different drying methods on quality and content of aromatic volatiles in dried mushrooms *Agaricus bisporus*. *Acta Aliment, Pol.*, 3, 409 (1977)
3. Ikekawa, T., Uehara, N., Maeda, Y., Nakamishi, M. and Fukouka, F. : Antitumor activity of aqueous extracts of some edible mushrooms. *Cancer Res.*, 29, 734 (1968)
4. Bose, S. R. : Campestrin, the antibiotic of *Psalliota campestris*. *Nature*, 175, 468 (1955)
5. 김선희, 유영상 : 식이내 표고함량과 지방의 종류가 고콜레스테롤 식이를 섭취한 흰쥐의 지방대사에 미치는 영향. *대한 가정학회지*, 30(2), 61 (1992)
6. Hasimoto, K. : Carboxy methyl cellulase from edible mushroom, *Toyo Shokuhin Kogyo Tanki Daigaku Toyo Shokuhin Kenkyusho Kenkyu Hokokush.*, Japan, 163,

8 (1972)

7. Yamasaki, Y. and Suzuki, Y. : Purification and properties of α -glucosidase and glucamylase from *Lentinus edodes*(Berk). *Agri. Biol Chem.*, 42(5), 971 (1978)
8. Gavrilova, V. P. and Falina, N. N(Russ). : Proteolytic enzyme isolated from a fungus. *Flammulina Velutipes* (Fr) Sing. *Mikol. Fitopatol.*, 9, 431-433 (1975)
9. 이태규 : 능이(*Sarcodon aspratus* (Berk.) S.Ito) 중 단백질 가수분해 효소의 정제 및 성질에 관하여, 한국 영양 식량 학회지, 15(3), 276-285 (1986)
10. 은재순, 양재현, 조덕이, 이태규 : 한국산 고등균류에 관한 연구(제1보) : 능이버섯의 단백질분해효소 활성. 한국 약학회지, 18(3), 125-131 (1988)
11. 이태규, 은재순, 양재현, 조덕이, 양희권 : 한국산 고등균류에 관한 연구 (제 3보) : 능이 중의 단백질 가수분해효소의 정제 및 안정성, 한국 약학회지, 19(2), 81-86 (1989)
12. 박완희 : 능이의 성분에 관한 연구. 숙명여자대학교 박사 학위논문(1982)
13. 유관성 : 능이버섯의 serine protease의 특성. 전북대학교석사학위논문(1989)
14. 이증원 : 능이버섯의 약리 작용에 관한 연구. 전주 우석대학 석사학위 논문 (1990)
15. 은재순, 이증원, 황갑수 : 능이버섯의 약리 작용에 관한 연구. : 전주우석대학교 논문집 제 12집. 51-66 (1989)
16. 이재혁 : 능이버섯의 소화 효소에 관한 연구. 전주 우석대학 석사학위논문 (1988)
17. 허정득 : 능이버섯 중 단백 가수분해 효소의 정제화에 관한 연구. 전주 우석대학교 석사학위논문 (1990)
18. 이지열, 정준 : 학습원색도감, 균류편, 금성 출판사, p.282 (19770)
19. 村三千男: 원색 식물 대도감. 성문당. p. 28 (1962)
20. 김훈수. 한국 생물사에 관한 연구. 과학기술처 p.136 (1973)
21. 박완희 : 능이 성분에 관한 연구(제 1보). 한국 균 학회지, 11(2), 85-89 (1983)
22. 박완희 : 능이 성분에 관한 연구(제 2보). 한국 균 학회지, 11(4), 159-162 (1983)
23. Prosky, L., Asp, N., Scheizer, T. F., et al : Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in food and food products, Interlaboratory study. *J. Assoc, off Anal, Chem.*, 79, 1017- 1021 (1998)
24. A.O.A.C : Official Methods of Anlysis, Association of official Analytical Chemists. *Washington., D.C 15th ed.* (1990)
25. Lowry, O .H., Rosebrouh, N. J., Farr, A. L and Randall, R. J. :Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951)
26. Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantitatives of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal, Biochem.*, 72, 248-254 (1976)

27. Kang, C. K. and Rice, E. E. : Degradation of various meat fractions by tenderizing enzymes. *J. Food Sci.*, 35, 563 (1970)
28. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄, *Nature*, 227, 680-685 (1970)
29. Yamaguchi, T., Yamashita, Y., Takeda, I. and Hirashi, K. : Proteolytic enzymes in green asparagus. kiwi fruit and miut, *Agric. Biol Chem.*, 46(8), 1983-1986 (1982)
30. Rural Nutrition Institute. R. H. D. : Food composition Table, Fourth revision., p.78 (1991)
31. Hwang. S. H. : Analysis of dietary fiber contents of Korean common foods and assesment of dietary fiber intake in Korean male college students, ph. D. Disseration. Sookmyung Women's university. *Seoul Korea* (1995)
32. 김하원, 민흥기, 강창울, 김병국 : 한국산 고등균류의 성분연구: (XXII), 골목에 따른 표고버섯의 성분비교. 한국 미생물 학회지. 8(1), 21-23 (1980)
33. 은재순, 양재현, 조덕이, 이태규, 박인화 : 한국산 고등균류에 관한연구 (제 2보) : 양송이 중의 단백분해효소 활성, 한국 약학 회지, 19(1), 9-14 (1989)
34. 오세욱, 김영명, 남은정, 조진호 : 새우젓의 육류단백질 분해특성. 한국식품 과학회지, 29, 1191 (1997)
35. 서형주, 정수현, 최양문, 조원애 : 조리용 채소의 단백 분해 효소활성 및 연육 효과. 한국식품과학회지, 30(4), 883-887 (1998)
36. Yang, R., Akitani, A. and Fujimaki, M : *Agr. Biol. chem.*, 34, p. 1765 (1970)
37. Gann, G. L. and Merkel, R. A. : Ultrastructural changes in bovine longissimus muscle during postmortem aging. *Meat Sci.*, 2, 129-144 (1978)
38. Takahashi, K. and Saito, H. : Post-mortem changes in skeletal muscle connectin. *J. Biochem.*, 85, 1539-1542 (1979)
39. 박영실 : Ficin 처리시 우육 및 myofibrillar 단백질의 변화에 관한연구. 중앙대학교 석사학위논문 (1986)
40. Choe, I. S. and Park, Y. J. : A study on the utilization as meat tenderizer from Korean pear protease. *Kor. J. Food Ani. Resour.*, 16, 89-93 (1996)
41. Youn, J. E. and Yang, R. : Sudies on the aging of beef at adding the proteolytic enzyme. IV. Studies on the tenderness effect of beef by papain treatment. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 6, 163-167 (1974)
42. 김정숙 : Ficin 처리시 우육의 단백질 분해에 관한 연구. 중앙대학교 박사학위 논문 (1985)