KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 30, No. 4, pp. 883~887 (1998)

조리용 채소의 단백분해효소 활성 및 연육효과

서형주 · 정수현 · 최양문* · 조원대**
고려대학교 병설 보건대학 식품영양과, *고려대학교 생명공학원,
**농협대학 식품제조과

Protease Activities in Tenderizing Effect of Vegetables used as Cooking Material

Hyung Joo Suh, Soo Hyun Chung, Yang Mun Choi* and Won Dai Cho**
Department of Food and Nutrition, College of Health Sciecces, Korea University
**Graduate School of Biotechnology, Korea University*
***Department of Food Technology, Agricultural Cooperative College*

Abstract

Protease activities were measured in vegetables used as cooking material or a side dish. Proteases of green pepper (Kwari and Chungyang), perilla leaves, soybean sprout and mungbean sprout were showed high activities. Especially, protease in soybean sprout was the highest activity among them. After dialysis, remaining activities in mungbean sprout, green pepper (Kwari and Chungyang) and perilla leaves were 12, 23, 45% and 37%. In the results of thawing after freezing the proteases, remaining activities in sprout of mungbean and soybean were 100% and 65%. Protease in soybean sprout was showed higher activity and stability than others. Proteolytic effects of soybean sprout on myofibrillar and sarcoplasmic protein were showed higher than stroma protein. In SDS-PAGE, myosin heavy chain, actin and tropomyosin were hydrolyzed with increasing time. Protease activity was rapidly increased with increasing meat concentration in a early proteolysis reaction, but was slightly increased in later.

Key words: protease, soybean sprout, green pepper, tenderzing effect

서 론

식물성 기원의 단백분해효소는 fig, papaya, milkweed, euphorebia와 같은 쌍자엽 식물과 pineapple, cereal과 같은 단자엽 식물에서 발견되어 지며 활성부위에 -SH기를 가지며, pH 7.0이하에서 최적활성과 강한 응유활성(milk clotting activity)을 갖는 군과 -SH기를 갖지 않고, pH 7.0 이상에서 최적활성을 가지며 약한 응유활성을 갖는 군으로 나뉘어 진다. 이들 두 군에 속하는 단백분해효소는 열 저항성이 크고 60~70°C에서 활성을 유지하는 것으로 알려져 있다[1,2]. 이러한 특성을 가지는 식물성 단백분해효소는 식육의 결합조직이나 근육 단백질을 분해하는 연육작용을 한다. Fig에서 추출되어진 ficin의 경우 결합단백질인 collagen에 대한 강한 분해능을 갖고 있으며, papaya에서 추출한 papain의 경우 actin에 대한 분해력이 강하다[3]. 넓은 기질 특이성을 가지는 식물성 단백분해효소는 식육가공이나 노폐축육의 연화[4], fish sauce의 속성발효 등에 이용되고 있으며[5], 맥주의 혼탁방지를 위한 양조공업[6]이나 단백가수분해물에 의한 풍미성분 생산[7], 조미료 공업[8,9] 등의 식품공업에 이용된다. 이외에도 잠사의 정제, 염색 등의 피혁공업[3], 치아 단백 침착물의 제거, 소화보조효소, 소염 진통제 등의 제약공업[10,11]에도 널리 이용되고 있다.

이러한 다양한 용도로 사용되는 식물성 단백분해효소는 거의 전량 수입에 의존하고 있으며, 국내산 농산물에서의 단백분해효소의 검색이나 생산에 대한 연구보고는 거의 없는 실정이다. 따라서 국내에서 생산되는 농작물에 대한 단백분해효소의 활성을 검토하여 연육효과를 비교하였으며, 이를 토대로 농산물의 새로운 활용도를 제공하고자 본 실험을 실시하였다.

Corresponding author: Hyung Joo Suh, Department of Food and Nutrition, College of Allied Health Sciences, Korea University, Seoul 136-703, Korea

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 고추, 깻잎, 콩 등의 농산물은 성북구에 소재한 정릉시장에서 국내산을 구입하여 사용하였으며, bromelain (4,000 units/g)과 papain (4,400 units/g)은 Sigma Co.에서 구입 사용하였다.

조효소액의 제조

각 농산물을 깨끗이 세척 후 물기를 제거한 다음 100 g씩 취하여 착즙기(GJ-551SB, LG전자)를 이용하여 착즙을 한 다음 원심분리하여 상징액을 회수하여 조효소액으로 사용하였다.

단백분해효소 활성 측정

단백분해효소의 활성은 Kunitz의 방법[12]에 따라 다음과 같이 측정하였다. Casein 0.6% 용액 2.5 mL에 조효소액 0.5 mL을 가하고 30℃에서 10분간 반응 후 TCA mixture (0.11 M trichlroacetic acid, 0.22 M sodium acetate, 0.33 M acetic acid) 2.5 mL를 가하여 반응을 정지시켜 20분간 방치 후 275 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 1 unit는 효소 1 mL이 1분당 흡광도를 0.001 증가시키는 양으로 정의하였다.

육 단백질의 분획

Kang과 Rice[13]의 방법에 따라 소고기와 돼지고기의 단백질을 수용성, 염용성, 불용성 단백질로 분획하여 단백분해 효과를 측정하였다. 즉 100 g에 해당되는 고기에 3배량의 물을 가하여 마쇄 후 얻은 수용성 단백분획(sarcoplasmic protein), 잔사에 0.67 M NaCl용액을 가하여 얻은 염용성 단백분획(myofibrillar protein)과 물과 염에 불용성인 단백분획(stroma protein)을 얻어 동결건조하여 단백분해 효과를 측정하는데 기질로 사용하였다.

육 단백질의 분해 효과

상기 방법[13]에 따라 얻은 수용성, 염용성, 불용성 단백질을 전체 질소량이 19.6 mg에 해당되는 양을 취하여 50 mM 인산완충용액(pH 7.0) 8 mL을 가하고 5℃에서 하룻밤 방치하여 수화하였다. 수화된 각 단백분획별로 casein에 대해 100 units의 활성을 보이는 효소양을 첨가하여 총 부피를 10 mL로 조정 후 30분~2시간 분해하여 단백분해효소 활성을 측정하였다.

SDS-PAGE에 의한 육 단백질의 분해력 측정

단백분해효소 처리한 소고기, 돼지고기에 대한 근육 단백질 분해 양상을 전기영동법으로 분석, 비교하였다. 즉, 전체 근육 10 g에 효소 100 units를 첨가하여 30℃에서 일정시간 동안 조효소액과 반응시킨 소고기와 돼지고기의 근육 단백질을 0.4 g씩 취하여 7.5 mL의 8 M urea-2% mercaptoethanol-2% SDS-20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)의 용액을 가하여 100℃에서 2분간 가열한 후 실온에서 20시간 교반하면서 가용화시켜 전기 영동 시료로 사용하였다[14]. 이때 전기영동 시료는 20 μg에 상당하는 단백질 양을 전기영동에 사용하였다.

전기영동은 Laemmli법[15]에 의한 10% polyacrylamide gel을 조제하여 사용하였다.

결과 및 고찰

조리용 채소의 단백분해효소 활성

농산물의 단백분해효소 활성을 측정하기 위해 육류 조리에 사용되거나 또는 육류 섭취 시 부식으로 제공되는 농산물을 위주로 단백분해효소의 활성을 측정한 결과(Table 1), 육류 조리에 사용되는 생강이 가장 높은 활성을 보였으며, 육류 섭취 시 부식으로 제공되는 고추가 비교적 높은 단백분해효소 활성을 보였다. 특히 고추류중에 꽈리고추의 효소활성이 84.4 units로 가장 높았으며, 매운 맛이 없는 피망의 경우 효소활성이 없었고, 붉은 색을 띠는 붉은 고추 역시 풋고추에 비해 비교적 낮은 효소 활성을 보였다. 깻잎 역시 70.4 units로 비교적 높은 효소활성을 보였다. 또한 발아시켜 식품 소재로 사용하는 콩나물, 숙주나물에서도 비

Table 1. Protease activity of vegetable used as cooking materials

Common name	Korean name	Activity (unit/min)
Green pepper (Kwari)	꽈리고추	84.4
Green pepper (Chungyang)	청양고추	48.0
Red pepper	붉은고추	12.5
Sweet pepper	피망	0
Green pepper leaves	고추잎	0
Lettuce	상치	0
Perilla leaves	깻잎	70.4
Crown daisy	쑥갓	0
Shepherd's purse, raw	냉이	0
Leek	부추	0
Soybean sprout	콩나물	121.0
Radish sprout	무우순	6.0
Mungbean sprout	숙주나물	68.0
Ginger root	생강	494.0
Pears	배	5.5

교적 높은 효소활성을 보였으며, 이는 두류의 주성분인 단백질을 이용하기 위해 발아시 비교적 높은 단백분해효소를 생산하는 것으로 생각된다. 대두에서의 단백분해효소 활성은 대두의 주 단백질인 glycinin을 분해하는 serin protease로 보고[17]됨에 따라 콩나물에 존재하는 단백분해효소 역시 대두를 발아시킨 것으로 serin protease로 추정된다. Ohtski 등[16]이 보고한 생강의 단백분해효소 활성이 494 unit/mL로 가장 높은 활성을 보였으나, 이미 보고가 되어있으므로 본 연구에서는 제외하기로 하였다.

단백분해효소의 안정성

단백분해효소를 식품에 사용하기 위해서는 효소의 활성도 중요하지만 이에 못지 않게 안정성 역시 중요하므로 비교적 단백분해효소의 활성이 높았던 깻잎, 고추, 무순, 콩나물의 단백분해효소의 안정성을 비교하기 위해 각 조효소액을 5 mL씩 취하여 투석막에 주입 후 50 mM 인산완충용액(pH 7.0)에 대해 12시간 투석을 실시한 후 잔존활성을 비교한 결과(Fig. 1), 투석 전에 비해 투석 후 효소의 활성이 감소되는 경향을 보였다. 특히 숙주나물, 청양고추, 깻잎과 꽈리고추는 12, 23, 37%와 45%의 잔존 활성을 보였으며, 콩나물은 64%의 잔존 활성을 보임에 따라 비교적 다른 효소에 비해 안정한 것을 확인하였다.

또한 동결한 단백분해효소를 해동한 후 잔존 활성을 비교한 결과(Fig. 2), 투석에 비해 비교적 잔존활성이 높았으나 효소 활성이 대체로 감소하는 경향을 보였다. 특히 깻잎과 무순은 18%와 0%의 가장 낮은 잔존 활성을 보였으나, 투석에 의해 18%의 잔존 활성을 보였던 숙주나물의 경우 100% 보존되는 결과를 보였다. 비록 숙주나물의 안정성이 콩나물에 비해 우수하나 해동 후 효소 활성이 숙주나물은 70 unit/min인 반면 다소 안정성이 떨어지는 콩나물의 효소활성은 76

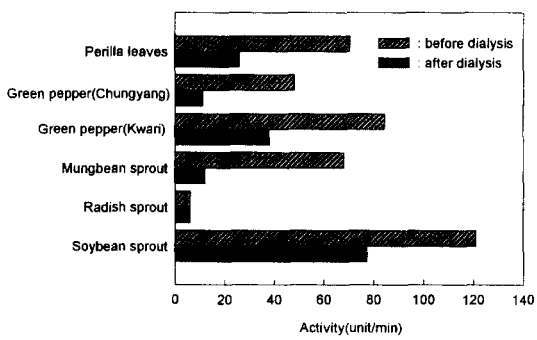

Fig. 1. Protease activity before and after dialysis.

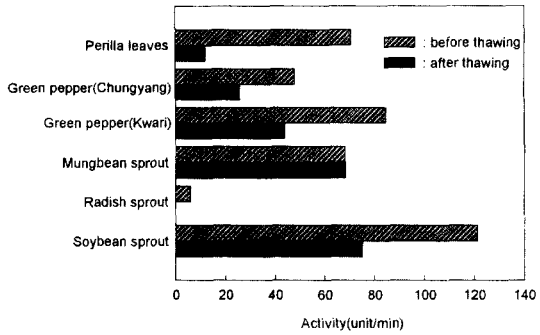

Fig. 2. Protease activity before and after thawing.

unit/min로 숙주나물에 비해 높은 활성을 보였다. 이상의 결과에 의하면 콩나물의 단백분해효소가 다른 효소에 비해 비교적 안정성이 높게 나타났으므로 이를 연육제로 활용하는 것이 바람직할 것이다.

육 단백질의 분해효과

비교적 안정성이 우수한 콩나물 단백분해효소의 단백질 분해능을 측정하고자 연육효소로 널리 사용되는 bromelain, papain과 비교한 결과(Table 2), 소고기의 단백분획에 대해서 콩나물 단백분해효소가 bromelain이나 papain에 비해 다소 낮은 연육효과를 보였으나, 돼지고기의 단백분획에 대해서는 bromelain이나 papain 보다 우수한 연육효과를 보였다. 또한 소고기의 경우 stroma protein에 대한 효소 활성이 61 unit/min로 21 unit/min과 33 unit/min의 효소 활성을 보인 sarcoplasmic protein과 myofibrillar protein에 비해 분해력이 우수하였으며, 돼지고기의 경우 stroma protein에 대해 91 unit/min의 효소활성을 보인 반면, myofibrillar과 sarcoplasmic protein에 대해서는 116 unit/min과 107 unit/min의 효소 활성을 보여 높은 분해력을 보였다. 특히 콩나물의 단백분해효소는 돼지고기에 대한 분해

Table 2. Protease activity of meat fraction separated from beef and pork

Protease	Meat fraction	Activity on beef (unit/min)	Activity on pork (unit/min)
Soybean sprout	Sarcoplasmic protein	21	107
	Myofibrillar protein	33	116
	Stroma protein	61	91
Bromelain	Sarcoplasmic protein	39	91
	Myofibrillar protein	46	51
	Stroma protein	50	58
Papain	Sarcoplasmic protein	23	34
	Myofibrillar protein	35	42
	Stroma protein	32	23

효과가 bromelain과 papain보다 우수하였다. 또한 불용성 단백질인 collagen과 elastin으로 구성되어있는 stroma protein에 대한 분해력 역시 콩나물의 단백분해효소가 뛰어났다.

육 단백질 분해 특성

육 단백질의 분해 특성을 측정하고자 SDS-PAGE를 이용한 결과(Fig. 3), myosin heavy chain, actin, tropomyosin과 myosin light chain이 관찰되었으며, 반응시간이 경과할수록 myosin heavy chain, actin, tropomysin이 분해되는 경향을 보였다. 특히 2시간 효소처리시 근원섬유 단백질의 분해 효과가 뛰어났다. 오 등[16]이 보고한 새우젓으로부터 분리한 단백분해효소를 처리한 소고기, 돼지고기, 닭고기의 분해 양상과 유사한 결과를 보였으며, 반응시간에 따른 분해 효과는 4분이내에 대부분의 근원 섬유단백질이 분해되는 것으로 보고하였다. 그러나 이는 가열 처리에 의해 변성된 육 단백을 이용한 결과이어서 실제 조리시 연육 효과는 가열 처리하지 않은 육 단백질에서 진행되므로 본 실험에서 얻은 결과가 좀 더 타당성이 있을 것이다.

육 단백의 농도에 따른 단백분해효소의 활성을 측정한 결과(Fig. 4), 육 단백의 농도가 증가할수록 단백분해 활성은 완만히 증가하다가 평형을 이루는 경향을 보였다. 기질의 농도에 따른 효소의 활성 변화는 정제된 효소에 의해 측정을 하여야 정확한 결과를 얻을 수 있겠지만 지금까지의 결과와 Fig. 4의 결과에 의하면 소고기보다는 돼지고기에 대한 분해능력이 우수함을 확인할 수 있었다. 이는 돼지고기가 소고기에 비해 결합조직이 적기 때문에 조직이 연하여 단백분해효소에 의해 쉽게 분해된 듯하다.

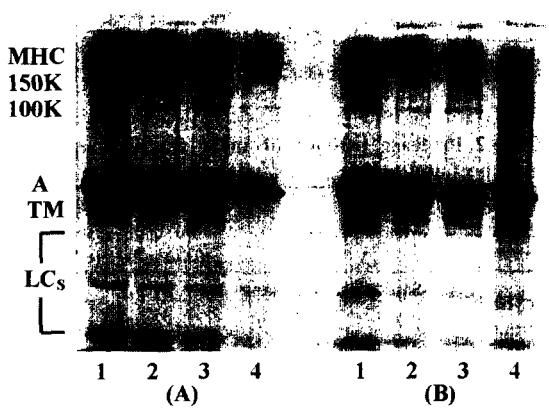

Fig. 3. SDS-PAGE patterns of solubilized protein from beef and pork. (A) beef, (B) pork, Lane 1: control (raw meat), 2, 3, 4: raw meat hydrolyzed with protease of soybean sprout for 30 min, 1 hr and 2 hrs. MHC: myosine heavy chain. A: actin. TM: tropomysin. LCs: myosine light chains.

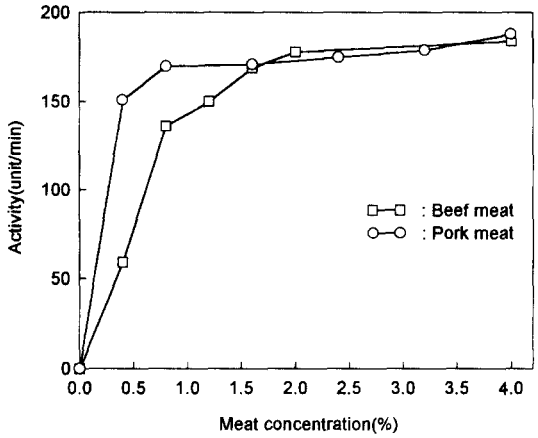

Fig. 4. Protease activity of soybean sprout according to meat concentration.

요 약

육류 조리에 사용되거나 또는 육류 섭취시 부식으로 제공되는 농산물을 위주로 단백분해효소의 활성을 측정한 결과, 청양고추, 꽈리고추, 깻잎, 콩나물, 숙주나물에서 높은 효소 활성을 보였으며, 이중 콩나물의 단백질분해 활성이 가장 높았다. 또한 효소의 사용시 중요한 지표인 효소의 안정성을 투석과 동결 해동 후 잔존 효소활성을 측정하였다. 투석 후 숙주나물, 청양고추, 꽈리고추와 깻잎은 12, 23, 45%와 37%의 잔존 활성을 보였으며, 콩나물은 64%의 잔존 활성을 보임에 따라 비교적 다른 효소에 비해 안정한 것을 확인하였다. 동결 해동 후 숙주나물과 콩나물의 단백분해효소는 100%와 65%의 높은 잔존 활성을 보였다. 비교적 효소의 활성이 높고 또한 안정성이 우수한 콩나물의 단백분해효소의 활성은 소고기보다는 돼지고기에 대한 분해 효과가 우수하였으며, stroma protein보다는 myofibrillar과 sarcoplasmic protein에 대한 분해력이 우수하였다. SDS-PAGE에 의한 육 단백의 분해 특성은 myosin heavy chain, actin, tropomyosin과 myosin light chain이 관찰되었으며, 반응시간이 경과할수록 myosin heavy chain, actin, tropomyosin이 분해되는 경향을 보였다. 특히 2시간 효소처리 시 근원섬유 단백질의 분해 효과가 뛰어났다. 육 단백의 농도가 증가할수록 단백분해 활성은 완만히 증가하다가 평형을 이루는 경향을 보였다.

감사의 글

이 논문은 1997년도 한국학술진흥재단의 공모과제 (과제번호: 1997-004-G00025) 연구비에 의해 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Beynon, R.J. and Bond, J.S.: Proteolytic enzymes. IRL Press, Oxford, p.1 (1994)
2. Caygill, J.C.: Sulphydryl plant protease. *Methods Enzymol.*, **2**, 54-61 (1955)
3. Caygill, J.C.: Sulphydryl plant proteases. *Enzyme Microb. Technol.*, **1**, 233-242 (1979)
4. Blanchard, P.J. and Mantle, D.: Comparison of proteolytic enzyme levels in chicken, pig, lamb and rabbit muscle at point of slaughter : role in meat tenderisation post mortem. *J. Sci. Food Agric.*, **71**, 83-91 (1996)
5. Suh, H.J., Chung, S.H., Son, J.Y., Lee, H.K. and Bae, S. W.: Studies on the properties of enzymatic hydrolysates from file-fish (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**, 678-683 (1996)
6. MacGregor, A.W.: Malting and brewing science : challenges and opportunities. *J. Institute Brewing.*, **102**, 97-102 (1996)
7. Baek, H.H. and Cadwallader, K.R.: Volatile compounds in flavour concentrates produced from crayfish-processing byproducts with and without protease treatment. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3262-3267 (1996)
8. Diniz, F.M. and Martin, A.M.: Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *J. Food Engin.*, **31**, 419-426 (1996)
9. Tavaria, F.K., Sousa, M.J., Domingos, A., Malcata, F.X., Brodelius, P., Clemente, A. and Pais, M.S.: Degradation of caseins from milk of different species by extracts of *Centaurea calcitrapa*. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3760-3765 (1997)
10. Hermine, L.W.: On the pharmacology of bromelain. An update with special regard to animal studies on does-dependent effect. *Planta Med.*, **56**, 249-253 (1990)
11. Pirotta, F. and Giuli-Morghen, C.: Bromelain-A deeper phamacological study. Note 1. Antiinflammatory and serum fibrindytic activity after oral administration. *Drugs Exptl. Clin. Res.*, **4**, 1-5 (1978)
12. Murachi, T. and Neurath, H.: Fractionation and specificity studies on stem bromelain. J. Biological Chem., 235, 99-107 (1960)
13. Kang, C.H. and Rice, E.E.: Degradation of various meat fractions by tenderizing enzymes. *J. Food Sci.*, **35**, 563-565 (1970)
14. Oh, S.W., Kim, Y.M., Nam, E.J. and Jo, J.H.: Proteolytic properties of Saewoojeot (salted and fermented shrimp) on meat proteins (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**, 1191-1195 (1997)
15. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970)
16. Ohtski, K., Taguchi, K., Sato, K. and Kawabata, M.: Purification of ginger proteases by DEAE-Sepharose and isoelectric focusing. *Biochem. Biophy. Acta*, **1243**, 181-184 (1995)
17. Morita, S., Fukase, M., Yamaguchi, M. and Morita, Y.: Substrate specificity of a novel serine protease from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *J. Biochem.*, **119**, 1094-1099 (1996)

(1998년 4월 30일 접수)