

## 저속압착방식으로 착즙한 파인애플 및 키위 주스의 저온저장 조건에 따른 단백질분해효소 및 항산화 활성

박신영<sup>1</sup> · 김민주<sup>2</sup> · 박지인<sup>1</sup> · 김정인<sup>1</sup> · 김묘정<sup>1</sup>

<sup>1</sup>인제대학교 식품생명과학부

<sup>2</sup>(주)휴롬 바이오식품연구소

### Effect of Low Temperature Storage on Proteolytic and Antioxidant Activities of Fresh Pineapple and Kiwi Juices Extracted by Slow-Speed Masticating Household Juicer

Shin-Young Park<sup>1</sup>, Min-Ju Kim<sup>2</sup>, Ji-In Park<sup>1</sup>, Jung-In Kim<sup>1</sup>, and Myo-Jeong Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Life Science, Inje University

<sup>2</sup>Bio-Food Research Center, Hurom Co., Ltd.

**ABSTRACT** The aim of this study was to evaluate proteolytic and antioxidant activities of fresh pineapple and kiwi juices extracted using a slow-speed masticating household juicer during low temperature storage. While over 90% of vitamin C and total polyphenols in both juices were retained after storage for 30 days at -20°C, reduction of 56.8% for vitamin C and 31.9% for total polyphenols in pineapple juice were detected after storage at 4°C. In the case of kiwi juice, 32.9% of vitamin C and 22.4% of total polyphenols were lost. A high initial content of vitamin C in kiwi juice resulted in a slower reduction rate than that for pineapple juice. A similar result was obtained for 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity. Proteolytic activities of both juices were maintained efficiently with less than 10% loss during storage for 30 days at -20°C. Protease stability of pineapple juice was better than that of kiwi juice during storage at 4°C, and the same result was obtained when boiled chicken breast was used as a substrate. From these results, when storing pineapple and kiwi juices, which are widely used as a natural meat tenderizer and digestive aid, cold storage at -20°C seemed to be more suitable for maintaining antioxidant and proteolytic activities than cold storage at 4°C.

**Key words:** pineapple juice, kiwi juice, low-speed masticating household juicer, proteolytic activity, antioxidant activity

## 서 론

최근 건강에 대한 소비자들의 관심이 지속해서 증가하고 있으며, 마시는 음료에 대해서도 탄산음료보다 건강에 좋은 기능성 성분이 다량 함유된 과일주스류가 각광을 받고 있다 (1). 과일에는 비타민과 무기질이 풍부하여 식생활에서 주식의 영양적 결핍을 보충할 수 있으며 당, 유기산 및 안토시아닌 등 다양한 색소성분이 기호성을 향상시키는 역할을 한다 (2). 특히 과일에는 폴리페놀(polyphenol) 성분이 풍부하게 함유되어 있으며, 대표적인 폴리페놀의 일종인 플라보노이드(flavonoids)는 항산화, 세포노화 억제, 심혈관계 질환 개선 등 다양한 생리활성들을 나타내는 것으로 알려져 있다 (3,4). 이와 같은 생리활성 성분들은 조리과정 중 열에 의한 파괴가 쉬운 것으로 알려져 있으며, 가정에서 사용하는 믹서

기와 같이 칼날이 고속으로 회전함에 따라 발생하는 열에 의해서도 영양소가 파괴될 수 있다(5-7).

이러한 이유로 최근 소비자들 사이에서는 고속파쇄방식의 주서기보다 저속압착방식을 사용한 착즙기(low-speed masticating juicer)의 사용이 증가하고 있으며, 저속압착방식의 착즙기는 금속칼날을 이용한 분쇄방식이 아닌 80 rpm으로 저속 회전하는 스크류로 과일을 압착하여 즙을 짜내기 때문에 발열을 최소화하고 수율도 높은 편이다(8).

가정에서는 육류를 연화시키기 위한 연육제(meat tenderizer)로서 파인애플 및 키위와 같은 단백질분해효소(protease)가 풍부한 천연소재를 이용하고 있으며, 전체 연육제의 약 20~50%를 이와 같은 천연소재가 차지하고 있다(9, 10). 또한, 파인애플 및 키위는 식후 단백질의 소화를 돕는 디저트로 널리 사용되는 과일이기도 하다. 단백질분해효소는 단백질 또는 peptide에 작용하여 peptide 결합의 가수분해를 촉매하는 효소로서 동·식물과 미생물에 널리 분포되어 있다(11). 파인애플과 키위는 각각 bromelain과 actinidin이라는 단백질분해효소를 가지고 있으며, 파인애플의 bro-

Received 4 May 2016; Accepted 20 July 2016

Corresponding author: Myo-Jeong Kim, Department of Food and Life Science, Inje University, Gimhae, Gyeongnam 50834, Korea  
E-mail: fdsnkmj@inje.ac.kr, Phone: +82-55-320-3844

melain(EC 3.4.22.33)은 -SH기를 갖는 thiol계의 단백질분해효소로 중세시대부터 보조 소화제, 소염제로 이용되어 왔으며, 안전성이 매우 높아 부작용이나 독성이 없고 계속 사용하여도 신체 내에 내성이 생기지 않는 것으로 알려져 있다(12-15). 키위에 포함된 actinidin(EC 3.4.22.14)은 bromelain과 같은 thiol계의 단백질분해효소로 papain, ficin 등과 같은 군에 속하며 위장 및 소장에서 단백질을 함유한 음식의 소화를 도와주는 보조소화제로 알려져 있다(16,17).

일반적으로 생과일로부터 착즙한 파인애플 및 키위 주스는 바로 또는 짧은 기간의 저장 후 연육제로 사용하지만, 이들을 장기간 냉장 또는 냉동 저장할 경우 단백질분해효소 및 항산화 활성이 어떻게 변화하는지에 대한 보고는 거의 없는 실정이다(18). 따라서 본 실험은 비타민 C를 비롯한 항산화 성분이 다량 함유되어 있으면서 천연 연육제로 사용되는 대표적인 과일인 파인애플 및 키위로부터 저속압착방식의 착즙기를 사용하여 얻은 주스의 저장온도와 저장기간에 따른 단백질분해효소 활성 및 항산화 성분의 함량 변화를 측정된 결과를 바탕으로 적절한 저장 조건을 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 재료

파인애플(*Ananas comosus*), 키위(*Actinidia deliciosa*), 닭 가슴살은 김해시에 소재하는 마트에서 2015년 5월에 구매하였으며, 파인애플은 필리핀산, 키위는 뉴질랜드산을 사용하였고, 닭 가슴살은 국내산을 사용하였다. Hammarsten casein은 Merck(Kenilworth, NJ, USA), Folin & Ciocalteu's phenol reagent, DL-dithiothreitol(DTT), tannic acid, trichloroacetic acid(TCA), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), L-cysteine, L-tyrosine, L-ascorbic acid는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 기타 시약들은 모두 특급품을 사용하였다.

### 주스 착즙 및 저장

각 과일의 과피를 제거하고 과육 부위를 직육면체(4×2×2 cm) 모양으로 잘라 저속압착방식의 착즙기(HH-SBF11; Hurom Co., Ltd., Gimhae, Korea)를 이용하여 제조사의 사용설명서에 따라 착즙한 후 cheese cloth로 여과하였다. 주스 여과액은 각각 1.5 mL씩 microtube에 담아 냉장고(LS-1660RF, Lassele, Ansan, Korea)의 냉장실(4°C) 및 냉동실(-20°C)에 저장하였으며, 논문에 제시된 저장기간(0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30일)에 따라 microtube를 취하여 deep freezer(-70°C, SW-UF-120, Samwon Freezing Engineering Co., Busan, Korea)로 옮겨 보관한 후 함께 분석시료로 사용하였다. 분석시료는 실험하기 직전에 ice bath에서 천천히 해동시킨 후 사용하였다.

### pH, 산도 및 당도 분석

pH 및 산도는 pH meter(model 420, Thermo Scientific Orion, Waltham, MA, USA)를 이용하여 측정하였고, 당도는 당도계(PAL-a, Atago Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 20°C에서 °Brix를 측정하였다. 산도는 주스시료 20 mL를 증류수 80 mL와 혼합하여 최종부피가 100 mL가 되도록 희석한 후 0.1 N NaOH를 이용하여 pH 8.3이 되도록 적정하여 구하였다. 시료의 산도는 다음의 식을 사용하여 계산하였다.

$$\text{산도}(\%) = \frac{0.1 \text{ N NaOH 양}(\text{mL}) \times 0.1 \text{ N NaOH 계수} \times 0.0064}{\text{시료의 양}(\text{g})} \times 100$$

### 비타민 C 분석

주스에 포함된 비타민 C(ascorbic acid)의 농도는 Furu-sawa(19)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 우선 시료 300 µL와 2 mg/mL 농도의 DTT 용액 300 µL를 혼합한 후 냉암소에서 12시간 방치하여 dehydroascorbic acid를 L-ascorbic acid로 환원시켰다. 이후 4°C, 9,900×g에서 10분간 원심분리 하여 취한 상등액을 적정 농도로 희석한 후 0.45 µm syringe filter(Advantec MFS, Inc., Tokyo, Japan)로 여과하여 HPLC 분석의 시료로 사용하였다. 비타민 C의 정량분석을 위하여 C<sub>18</sub> 칼럼(250×4.6 mm, Kinetex 5u C<sub>18</sub> 100A, Phenomenex, Torrance, CA, USA)이 장착된 HPLC(UltiMate 3000, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하였으며, 이동상으로 2%(v/v) acetic acid를 1 mL/min의 유속으로 흘려주었다. 시료 20 µL를 주입한 후 등용매 용리 조건으로 분석하였으며 피크는 photodiode array detector(PDA detector, Dionex)를 이용하여 파장 254 nm에서 검출하였다. 비타민 C의 농도(mg/mL)는 L-ascorbic acid 표준품을 사용하여 얻은 검량선으로부터 계산하였다.

### 총폴리페놀 함량

주스에 포함된 총폴리페놀의 함량은 Wolfe 등(20)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 주스시료 1 mL에 80%(v/v) 메탄올 용액 1 mL를 첨가하여 격렬히 혼합한 후 1시간 동안 냉암소에서 방치한 다음 4°C, 2,500×g에서 10분 동안 원심분리 하여 얻은 상등액을 적정 농도로 희석한 후 분석시료로 사용하였다. 96 well plate에서 시료 120 µL와 50%(v/v) Folin & Ciocalteu's phenol reagent 60 µL를 혼합한 후 3분 동안 방치한 다음 2%(w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 120 µL를 첨가하고 다시 실온에서 1시간 동안 방치하였다. Blank는 주스 시료 대신 증류수를 사용하여 같은 방법으로 진행하였다. 흡광도는 microplate reader(PowerWave XS, BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 750 nm에서 측정하였으며, 총폴리페놀 함량은 tannic acid 표준품을 사용하여 얻은

검량선으로부터 시료와 blank의 흡광도 차이 값( $\Delta$ Abs)을 tannic acid 농도(mg TAE/mL)로 환산하여 결정하였다.

### DPPH 라디칼 소거능

시료의 항산화 활성을 평가하기 위하여 DPPH 라디칼 소거능을 Blois(21)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 주스 시료 1 mL에 메탄올 4 mL를 첨가하여 격렬하게 혼합한 후 냉암소에서 1시간 동안 방치한 다음 4°C, 9,900×g에서 10분 동안 원심분리 한 상등액을 적정 농도로 희석하여 분석시료로 사용하였다. DPPH 시약은 에탄올에 DPPH를 0.3 mM의 농도로 용해한 후 사용하기 전에 흡광도가 1.00±0.02가 나오도록 희석하여 제조하였다. 96 well plate에서 시료 50 µL와 DPPH 시약 200 µL를 혼합한 다음 30분 동안 암소에서 방치한 후 microplate reader를 이용하여 525 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. Blank는 시료 대신 메탄올을 사용하여 같은 방법으로 진행하였다. 시료의 DPPH 라디칼 소거능(%)은 다음의 식을 사용하여 계산하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{Blank의 흡광도}}\right) \times 100$$

### 단백질분해효소 활성 측정

주스시료에 포함된 단백질분해효소의 활성은 Kunitz법(22)을 일부 변형하여 측정하였다. 즉 Hammerstein casein을 5 mM cysteine과 2 mM EDTA-2Na가 함유된 0.1 M 인산완충용액(pH 7.0)에 1%(w/v) 농도가 되도록 첨가한 후 90°C에서 15분간 가열하여 용해시킨 다음 냉각시켜 기질용액으로 하였으며, 사용 시 37°C로 가온하여 사용하였다. 해동시킨 주스시료들은 4°C, 3,000×g에서 20분간 원심분리 한 후 상등액을 취하여 조효소액으로 사용하였다. 1%(w/v) casein 기질 300 µL가 담겨 있는 2 mL microtube에 적절히 희석한 조효소액 600 µL를 가하여 37°C 항온수조에서 5분간 반응시킨 후 효소반응 정지를 위하여 5%(w/v) TCA 용액 900 µL를 첨가한 다음 실온에서 5분간 방치하였다. 이후 효소반응액을 9,900×g에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 취한 후 분광광도계(UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank에는 기질에 TCA 용액을 먼저 혼합한 후 조효소액을 첨가하여 효소반응을 억제하였다. 단백질분해효소의 활성은 tyrosine 검량선으로부터 효소반응액과 blank의  $\Delta$ Abs를 tyrosine 농도(mg TyrE/mL)로 환산하여 구하였다.

### 닭 가슴살 단백질분해실험

닭 가슴살은 끓는 물에서 15분간 삶은 후 상온에서 식힌 다음 정육각형 모양(0.7×0.7×0.7 cm)으로 무게가 0.50±0.02 g이 되도록 썰어 사용하였다. 반응에 사용한 조효소액은 단백질분해효소 활성 측정 실험과 동일하게 준비하였다. 투명한 스크류캡 바이알(10 mL)에 미리 준비한 닭 가슴살

한 조각을 넣고 조효소액을 10 mL 첨가한 후 heating block(TS-18821, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 stirring 하면서 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 대조구는 조효소액 대신 증류수를 사용하여 같은 방법으로 진행하였다.

### 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였으며 결과는 평균±표준편차로 제시하였다. 실험군 간의 결과 비교는 SPSS program (version 19, IBM Inc., Armonk, NY, USA)의 독립표본 *t*-test를 이용하여 실시하였으며 유의수준  $P<0.05$ 로 각 시료의 유의적인 차이를 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 주스의 pH, 산도 및 당도

저속압착방식의 주서기를 이용하여 파인애플과 키위의 과육으로부터 착즙한 주스의 수율은 각각 77.0±1.3%, 61.9±2.2%로 파인애플이 키위보다 수율이 높았다(Table 1). 착즙한 주스의 pH는 파인애플 주스(3.88±0.08)보다 키위 주스(3.63±0.06)가 낮아 좀 더 산성을 띠었으며, 산도 역시 키위 주스(1.15±0.02%)가 파인애플 주스(0.37±0.01%)보다 약 3배 이상 높아 키위 주스에 더 많은 유기산이 포함된 것으로 나타났다. 당도는 파인애플 주스가 16.4±0.1°Brix로 키위 주스의 12.9±0.1°Brix보다 높게 나와 수용성 당이 약 1.3배 더 많이 함유된 것으로 나타났다.

### 저장조건에 따른 비타민 C 함량 변화

비타민 C는 자유라디칼, 활성산소 및 질소화합물로부터 신체의 거대분자들의 손상을 방지하는 천연산화방지제 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다(23). 착즙 직후 파인애플 주스와 키위 주스의 비타민 C 함량은 각각 0.44±0.01 및 0.73±0.06 mg/mL로 키위 주스가 파인애플 주스보다 약 1.7배 더 높게 나타났으며, 이는 키위가 비타민 C의 함량이 높은 대표적인 과일로 알려진 사실과 일치하였다(24). 저장 온도 및 기간에 따른 영향을 알아보기 위하여 착즙한 주스를 냉장(4°C) 또는 냉동(-20°C) 저장하면서 비타민 C의 함량을 측정된 결과 두 가지 주스 모두 냉장보다는 냉동저장 조건에서 비타민 C의 파괴가 최대한 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 1). 파인애플과 키위 주스를 냉동실에서 30일 저장

**Table 1.** Physicochemical properties of pineapple juice and kiwi juice extracted using a slow-speed masticating household juicer

	Pineapple	Kiwi
Yield (%)	77.0±1.3	61.9±2.2*
pH	3.88±0.08	3.63±0.06*
Acidity (%)	0.37±0.01*	1.15±0.02
Sugar content (°Brix)	16.4±0.1	12.9±0.1*

The data with asterisk (\*) are significantly different ( $P<0.05$ ).

한 후 비타민 C의 함량은 각각  $0.47 \pm 0.02$  및  $0.72 \pm 0.07$  mg/mL로 착즙 직후와 차이가 거의 없었으나 냉장저장의 경우 5일 후부터 비타민 C의 감소가 두드러져 30일 후에는 그 함량이 각각  $0.19 \pm 0.01$  및  $0.49 \pm 0.02$  mg/mL로 착즙 직후 비타민 C의 56.8% 및 32.9%가 파괴되는 것으로 나타났다. 두 가지 주스 모두 비타민 C의 감소량은 거의 유사하였으나 초기 비타민 C 함량이 상대적으로 높은 키위 주스의 비타민 C의 감소율이 더 낮게 나타났다. 비타민 C의 안정성은 온도가 올라감에 따라 급격히 감소하는 것으로 알려져 있으며 이에 따라 냉동보다는 냉장조건에서 비타민 C의 파괴가 심한 것으로 보인다(25,26). 따라서 과일주스에 포함된 비타민 C의 파괴를 최대한 억제하기 위해서는 냉장보다는 냉동온도에서 저장하는 것이 타당한 것으로 사료된다.

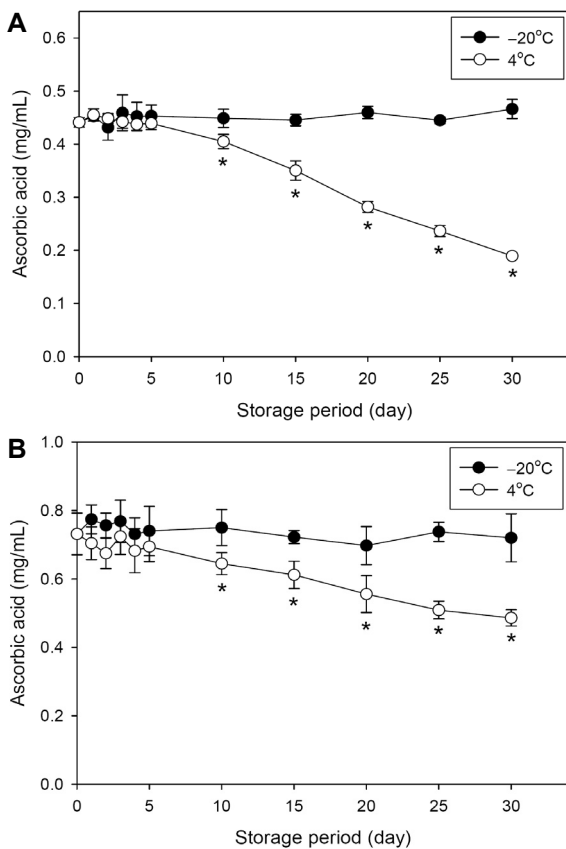
### 저장조건에 따른 총폴리페놀 함량 변화

폴리페놀은 방향족고리 및 하나 이상의 수산기(hydroxyl group)가 포함되어 있는 구조로 플라보노이드와 페놀산으로 분류되며, 비타민 C와 함께 파인애플과 키위에 존재하는 중요한 항산화 성분 중의 하나이다(27). 착즙 직후 파인애플 주스와 키위 주스의 총폴리페놀 함량은 각각  $0.72 \pm 0.06$  및

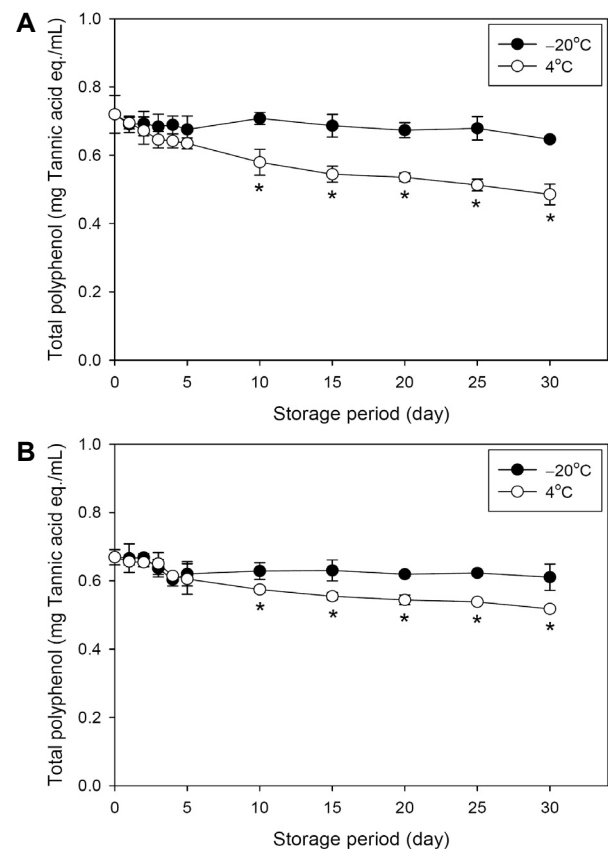
$0.67 \pm 0.02$  mg TAE/mL로 측정되어 비타민 C와는 달리 거의 비슷하게 나타났다(Fig. 2). 냉장 및 냉동 저장 시 주스의 총폴리페놀 함량 변화는 비타민 C와 유사한 경향을 나타내었으며 냉장( $4^{\circ}\text{C}$ )보다 냉동조건( $-20^{\circ}\text{C}$ )에서 변화가 적었다. 즉 냉동저장 30일 경과 후 파인애플 주스와 키위 주스의 총폴리페놀 함량은 각각  $0.65 \pm 0.01$  및  $0.61 \pm 0.04$  mg TAE/mL로 모두 저장 전 함량의 90% 이상이 유지되었으나 냉장저장 시에는 5일 경과 후부터 감소폭이 커지기 시작하여 30일 후에는 각각  $0.49 \pm 0.03$  및  $0.52 \pm 0.01$  mg TAE/mL로 저장 전 함량의 31.9% 및 22.4%가 감소하였다. 이는 냉동조건보다 냉장조건의 온도가 높아 산화에 의한 폴리페놀 성분의 파괴가 빠르기 때문이며 키위 주스의 감소율이 파인애플 주스보다 낮은 이유는 키위 주스에 강한 항산화 활성을 가지는 비타민 C가 더 많이 함유되어 있기 때문으로 판단된다(28).

### 저장조건에 따른 DPPH 라디칼 소거능 변화

DPPH는 항산화 성분의 자유라디칼 소거 활성을 평가하기 위해 널리 사용되는 자유라디칼 공여체로 항산화 활성에 의한 자주색의 감소를 통하여 라디칼 소거능을 측정할 수



**Fig. 1.** Vitamin C (ascorbic acid) content of (A) pineapple and (B) kiwi juices during long term storage at low temperatures of  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $4^{\circ}\text{C}$ . Data are expressed as mean $\pm$ SD (n=3). The data with asterisk (\*) are significantly different between the storage temperatures ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 2.** Total polyphenol of (A) pineapple and (B) kiwi juices during long term storage at low temperatures of  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $4^{\circ}\text{C}$ . Data are expressed as mean $\pm$ SD (n=3). The data with asterisk (\*) are significantly different between the storage temperatures ( $P < 0.05$ ).

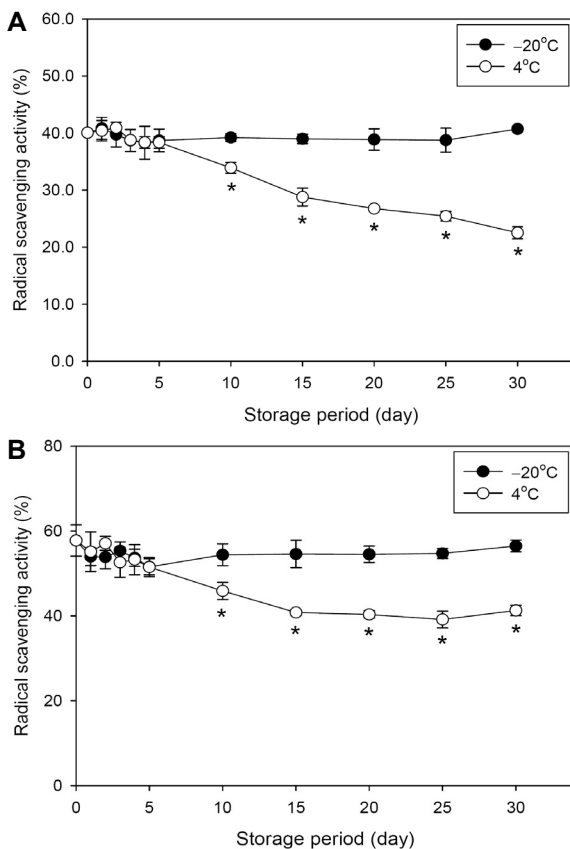
있다(29). 착즙 직후 파인애플 주스와 키위 주스의 DPPH 라디칼 소거능은 각각  $40.1 \pm 0.1$  및  $57.8 \pm 3.7\%$ 였으며 키위 주스가 더 높은 라디칼 소거능을 보이는 것은 비타민 C 함량 차이로부터 기인하는 것으로 판단된다(Fig. 3). 앞의 결과에서 비타민 C 및 총폴리페놀 함량이 냉동보다는 냉장저장 시 더 빠른 감소 속도를 보여주었던 것처럼 DPPH 라디칼 소거능도 이와 유사한 경향을 나타내었다. 즉 냉동저장 시 30일 경과 후에도 파인애플 주스는  $40.7 \pm 0.5\%$ , 키위 주스는  $56.5 \pm 1.4\%$ 의 라디칼 소거능을 나타내 착즙 직후와 거의 차이가 없었으나 냉장저장 시 5일 이후부터 라디칼 소거능이 지속해서 감소하는 경향을 보였으며 30일 후에는 파인애플 주스의 경우  $22.5 \pm 1.0\%$ , 키위 주스의 경우  $41.3 \pm 1.2\%$ 로 각각 43.9% 및 28.5%의 감소율을 나타내었다. 키위 주스의 라디칼 소거능 감소율이 파인애플 주스보다 적은 결과는 비타민 C와 총폴리페놀 함량의 감소 속도 역시 키위 주스가 느린 결과와 일치한다.

위의 결과로부터 주스에 포함된 항산화 성분 및 항산화 활성은 키위 주스가 파인애플 주스보다 많거나 높았으며 냉동저장( $-20^\circ\text{C}$ ) 시 30일까지 대부분의 항산화 성분이 보존되며 항산화 활성도 유지되는 것으로 나타났다. 냉장저장

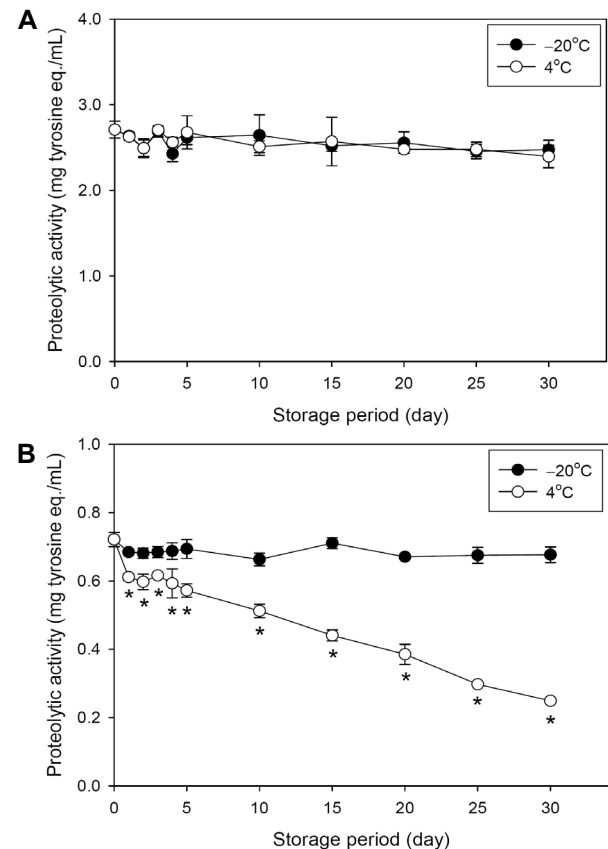
( $4^\circ\text{C}$ )에서는 5일까지 항산화 성분의 함량과 항산화 활성이 유지되었으나 이후 감소하였으며 파인애플 주스보다는 초기 비타민 C의 함량이 높은 키위 주스의 감소폭이 상대적으로 적은 것을 확인할 수 있었다.

#### 저장조건에 따른 단백질분해효소 활성 변화

파인애플과 키위는 고기의 조직을 연하게 하는 연육제로 널리 사용되고 있으며 식후 육류의 소화를 돕는 디저트로 사용되는 대표적인 과일이다(9). 생과일로부터 착즙한 파인애플과 키위 주스를 냉장 및 냉동조건에서 보관 시 저장 기간에 따라 단백질분해효소의 활성이 얼마나 유지되는지 확인하기 위한 실험을 진행하였다. Casein을 기질로 사용하여 파인애플 주스와 키위 주스의 착즙 직후부터 저장 30일까지의 단백질분해효소 활성 변화를 Fig. 4에 나타내었다. 착즙 직후 파인애플 주스와 키위 주스의 단백질분해효소 활성은 각각  $2.71 \pm 0.10$  및  $0.72 \pm 0.02$  mg TyrE/mL로 파인애플 주스가 키위 주스보다 약 3.8배 더 강한 활성을 나타내어 파인애플 조효소액의 활성이 키위 조효소액의 활성보다 높다는 기존의 보고와 유사한 결과를 얻었다(18). 각각의 주스를 냉동 또는 냉장저장 한 후 효소 활성을 비교한 결과 냉동



**Fig. 3.** DPPH radical scavenging activity of (A) pineapple and (B) kiwi juices during long term storage at low temperatures of  $-20^\circ\text{C}$  and  $4^\circ\text{C}$ . Data are expressed as mean $\pm$ SD (n=3). The data with asterisk (\*) are significantly different between the storage temperatures ( $P < 0.05$ ).

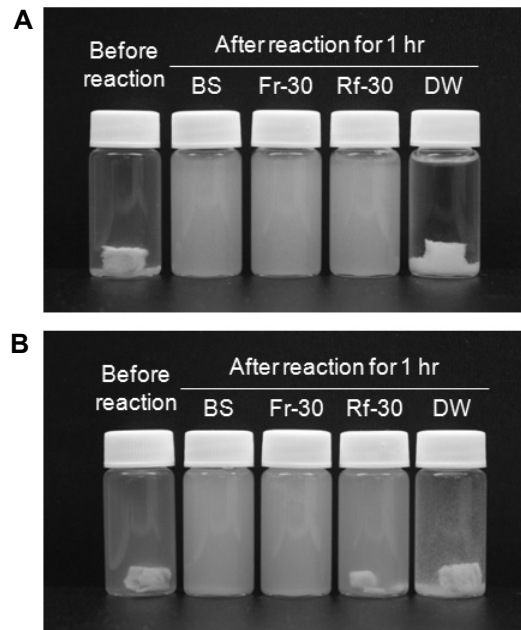


**Fig. 4.** Proteolytic activities of (A) pineapple and (B) kiwi juices during long term storage at low temperatures of  $-20^\circ\text{C}$  and  $4^\circ\text{C}$ . Data are expressed as mean $\pm$ SD (n=3). The data with asterisk (\*) are significantly different between the storage temperatures ( $P < 0.05$ ).

저장의 경우 30일 이후 파인애플 주스는  $2.47 \pm 0.11$  mg TyrE/mL, 키위 주스는  $0.68 \pm 0.02$  mg TyrE/mL로 두 가지 주스 모두 초기 효소 활성의 90% 이상으로 높게 유지되었으며, 이 결과는 키위 조효소액을  $-20^\circ\text{C}$ 에서 한 달간 저장하였을 때 효소 활성이 90% 이상 유지되었다는 보고와 일치하였다(18). 그러나 냉장저장의 경우는 서로 다른 양상을 나타내었는데 파인애플 주스의 경우 냉장저장 30일 후  $2.40 \pm 0.13$  mg TyrE/mL의 활성을 나타내 초기 활성의 88.4%가 유지되어 냉동저장과 유의적인 차이가 없었으나 키위 주스의 경우는 냉장저장 시 효소 활성이 지속해서 감소하여 30일 후는 초기의 34.5% 활성( $0.25 \pm 0.01$  mg TyrE/mL)만이 남아 있었다. 그러나 저장 5일까지는 초기 활성의 78.22% ( $0.57 \pm 0.02$  mg TyrE/mL)가 유지되고 있어 단백질분해 활성을 응용하기에 큰 무리가 없는 것으로 보인다. 이 결과로부터 파인애플 및 키위 주스에 포함된 단백질분해효소는 냉동저장 시 모두 안정하나 냉장저장 시 특히 키위의 단백질분해효소가 불안정하여 활성 감소가 두드러짐을 알 수 있었다. 이는 파인애플의 단백질분해효소인 bromelain을 정제한 후 냉장저장할 때 안정성이 낮아 저장시간이 지날수록 그 활성이 감소한다는 기존의 보고와 다소 다른 결과로, 특히 파인애플 단백질분해효소의 경우 순수 정제된 단백질이 아닌 착즙된 주스의 형태로 보관할 경우 주스에 존재하는 여러 성분이 안정제 역할을 수행하기 때문으로 판단된다(30). 이와 관련하여 파인애플 주스의 어떤 성분이 단백질분해효소의 안정제 역할을 하는지에 대한 추가 연구가 필요한 것으로 사료된다.

#### 저장조건에 따른 닭 가슴살 단백질분해 활성 변화

냉동 및 냉장 저장 후 파인애플과 키위 주스의 단백질분해 효소 활성을 육안으로 직접 확인하기 위하여 닭 가슴살을 기질로 하여 실제 단백질이 분해되는 정도를 관찰하였다. 즉 각각의 주스를 착즙 직후(BS), 냉동저장 30일(Fr-30) 그리고 냉장저장 30일(Rf-30)로 구분하여 삶은 닭 가슴살과  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간 반응시킨 후 남아있는 닭 가슴살 덩어리의 크기를 확인하였다(Fig. 5). 대조군으로 증류수(DW)를 사용한 경우 1시간이 경과하여도 닭 가슴살 덩어리가 그대로 남아있었으나, 파인애플 및 키위 주스를 첨가한 시험군에서는 키위 주스 Rf-30을 제외한 모든 주스에서 닭 가슴살이 대부분 분해되어 그 형태를 알아보기 어려웠다. 냉동저장 시 30일 후에도 두 가지 주스 모두(파인애플 주스 Fr-30과 키위 주스 Fr-30) 단백질분해 활성이 유지되는 것을 확인할 수 있었으나, 냉장저장 30일 후 키위 주스의 경우(키위 주스 Rf-30)는 닭 가슴살이 완전히 분해되지 않고 일부분이 남아 있어 단백질분해 활성이 상당 부분 감소한 것을 알 수 있었다. 그러나 파인애플 주스의 경우(파인애플 주스 Rf-30)는 냉장저장 시에도 단백질분해 활성이 유지되었다. 이와 같은 결과는 casein을 기질로 실험한 결과(Fig. 4)와 일치하였으며 이때 냉장저장 30일 후 키위 주스의 단백질분해 활성은



**Fig. 5.** Hydrolysis of chicken breast protein by (A) pineapple and (B) kiwi juices after storage for 30 days at low temperatures of  $-20^\circ\text{C}$  and  $4^\circ\text{C}$ . A half gram of boiled chicken breast was incubated with 10 mL of juice for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ . The reaction mixture was stirred vigorously with a stirring bar. BS, fresh juice before storage; Fr-30, after 30 day storage at  $-20^\circ\text{C}$ ; Rf-30, after 30 day storage at  $4^\circ\text{C}$ ; DW, distilled water.

초기의 34.5%만이 남아있었다.

이상의 결과로부터 저속압착방식의 주서기로 착즙한 파인애플 주스와 키위 주스의 저온저장 후 항산화 활성과 단백질분해 활성은 냉동저장 시 안정성이 매우 높아 초기 활성이 30일까지 대부분 유지되었으나 냉장저장의 경우에는 안정성이 다소 저하되어 저장 5일 이후부터 유의적인 활성 감소를 확인할 수 있었다. 따라서 가정에서 주서기로 착즙한 주스의 보관 시 냉장저장보다는 냉동저장이 여러 생리활성의 유지 측면에서 바람직한 것으로 사료된다.

#### 요 약

저속압착방식의 주서기를 이용하여 착즙한 파인애플 주스와 키위 주스를 냉장( $4^\circ\text{C}$ ) 및 냉동온도( $-20^\circ\text{C}$ )에서 30일 동안 저장하면서 저장조건이 주스의 항산화 활성 및 단백질분해효소 활성에 미치는 영향을 확인하였다. 비타민 C 함량 및 총폴리페놀 함량은 파인애플 주스, 키위 주스 모두 냉동저장에서는 30일까지 90% 이상이 유지되었으나 냉장저장에서 비타민 C 함량은 각각 56.8% 및 32.9%, 총폴리페놀 함량은 각각 31.9% 및 22.4%가 감소하였으며, DPPH 라디칼 소거능도 냉동조건보다는 냉장조건에서 활성 감소율이 크게 나타나 유사한 결과를 보였다. 활성 감소율은 초기 비타민 C의 함량이 파인애플 주스보다 1.7배 더 높은 키위 주스에서 낮게 나타났다. 파인애플 주스와 키위 주스의 단백

질분해효소 활성은 냉동저장 30일까지 모두 초기 활성의 90% 이상으로 높게 유지되었으며 냉장저장 30일 후 파인애플 주스는 초기 활성의 88.4%를 유지하였지만 키위 주스는 초기 효소 활성의 34.5%만이 남아있어 서로 다른 양상을 나타내었다. 이러한 결과는 단백질을 분해효소 활성을 육안으로 직접 확인하기 위해 진행한 닭 가슴살 단백질 분해 활성 측정 결과에서도 확인할 수 있었다. 이상의 결과로부터 천연 연육제 또는 소화보조제로 널리 이용되는 파인애플 및 키위 주스의 보관 시 냉장저장보다는 냉동저장이 항산화 활성 및 단백질 분해효소 활성의 유지 측면에서 바람직한 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 (주)휴롬의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Lee HR, Jung BR, Park JY, Hwang IW, Kim SK, Choi JU, Lee SH, Chung SK. 2008. Antioxidant activity and total phenolic contents of grape juice products in the Korean market. *Korean J Food Preserv* 15: 445-449.
- Jeong SM, Son MH, Lee SC. 2003. A survey on contents of phenolic compounds of market fruit and vegetables juices. *J Basic Sci* 18: 117-123.
- Lee MH, Kim MS, Shin HG, Sohn HY. 2011. Evaluation of antimicrobial, antioxidant, and antithrombin activity of domestic fruit and vegetable juice. *Korean J Microbiol Biotechnol* 39: 146-152.
- Klimczak I, Małeczka M, Szlachta M, Gliszczyńska-Świągło A. 2007. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *J Food Compos Anal* 20: 313-322.
- Hinman WF, Brush MK, Halliday EG. 1944. The nutritive value of canned foods: VI. effect of large-scale preparation for serving on the ascorbic acid, thiamin, and riboflavin content of commercially-canned vegetables. *J Am Diet Assoc* 20: 752-756.
- Park S, Kim S, Yoo Y. 1995. Effect of blanching time, blanching water and power settings on minerals retention in microwave blanched vegetables. *Korean J Soc Food Sci* 11: 98-103.
- Yeom HW, Streaker CB, Zhang QH, Min DB. 2000. Effects of pulsed electric fields on the quality of orange juice and comparison with heat pasteurization. *J Agric Food Chem* 48: 4597-4605.
- Kim MJ, Kim JI, Kang MJ, Kwon B, Jun JG, Choi JH, Kim MJ. 2015. Quality evaluation of fresh tomato juices prepared using high-speed centrifugal and low-speed masticating household juicers. *Food Sci Biotechnol* 24: 61-66.
- Bae YH, Lee JS, Lee KA, Yoon JD, Kang DH, Lee JS. 2002. The effect of *Sarcodon aspratus* fruitbody on the cooking quality of beef steak. *J East Asian Soc Diet Life* 12: 326-333.
- Ketnawa S, Chaiwut P, Rawdkuen S. 2012. Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food Bioprod Process* 90: 385-391.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 597-635.
- Gaspani L, Limiroli E, Ferrario P, Bianchi M. 2002. In vivo and in vitro effects of bromelain on PGE<sub>2</sub> and SP concentrations in the inflammatory exudate in rats. *Pharmacology* 65: 83-86.
- Engwerda CR, Andrew D, Ladhams A, Mynott TL. 2001. Bromelain modulates T cell and B cell immune responses in vitro and in vivo. *Cell Immunol* 210: 66-75.
- Manhart N, Akomeah R, Bergmeister H, Spittler A, Ploner M, Roth E. 2002. Administration of proteolytic enzymes bromelain and trypsin diminish the number of CD4<sup>+</sup> cells and the interferon- $\gamma$  response in Peyer's patches and spleen in endotoxemic balb/c mice. *Cell Immunol* 215: 113-119.
- Kelly GS. 1996. Bromelain: a literature review and discussion of its therapeutic applications. *Alt Med Rev* 1: 243-257.
- Kaur L, Rutherford SM, Moughan PJ, Drummond L, Boland MJ. 2010. Actinidin enhances protein digestion in the small intestine as assessed using an in vitro digestion model. *J Agric Food Chem* 58: 5074-5080.
- Kaur L, Rutherford SM, Moughan PJ, Drummond L, Boland MJ. 2010. Actinidin enhances gastric protein digestion as assessed using an in vitro gastric digestion model. *J Agric Food Chem* 58: 5068-5073.
- Soda I, Kaneko M, Sato T, Nakagawa H, Ogura N. 1987. Studies on utilization of kiwifruit protease—Studies on utilization of kiwifruit Part II. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 34: 36-41.
- Furusawa N. 2001. Rapid high-performance liquid chromatographic identification/quantification of total vitamin C in fruit drinks. *Food Control* 12: 27-29.
- Wolfe K, Wu X, Liu RH. 2003. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem* 51: 609-614.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Kunitz M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. general properties. *J Gen Physiol* 30: 291-310.
- Gabriel AA, Usero JMCL, Rodriguez KJ, Diaz AR, Tiangson-Bayaga CLP. 2015. Estimation of ascorbic acid reduction in heated simulated fruit juice systems using predictive model equations. *LWT—Food Sci Technol* 64: 1163-1170.
- Valente A, Albuquerque TG, Sanches-Silva A, Costa HS. 2011. Ascorbic acid content in exotic fruits: A contribution to produce quality data for food composition databases. *Food Res Int* 44: 2237-2242.
- Lee HE, Lim CI, Do KR. 2007. Changes of characteristics in red pepper by various freezing and thawing methods. *Korean J Food Preserv* 14: 227-232.
- Park WB, Kim DS. 1995. Changes of contents of  $\beta$ -carotene and vitamin C and antioxidative activities of juice of *Angelica keiskei* Koidz stored at different conditions. *Korean J Food Sci Technol* 27: 375-379.
- Minoggio M, Bramati L, Simonetti P, Gardana C, Iemoli L, Santangelo E, Mauri PL, Spigno P, Soressi GP, Pietta PG. 2003. Polyphenol pattern and antioxidant activity of different tomato lines and cultivars. *Ann Nutr Metab* 47: 64-69.
- Patthamakanokporn O, Puwastien P, Nitithamyong A, Sirichakwal PP. 2008. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *J Food Compos Anal* 21: 241-248.
- Matsukawa R, Dubinsky Z, Kishimoto E, Masaki K, Masuda Y, Takeuchi T, Chihara M, Yamamoto Y, Niki E, Karube I. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant

activity in seaweeds. *J Appl Phycol* 9: 29-35.  
30. Chaurasiya RS, Hebbar HU. 2013. Extraction of bromelain

from pineapple core and purification by RME and precipitation methods. *Sep Purif Technol* 111: 90-97.