

蛋白質 分解酵素 添加時 牛肉의 熟成에 關한 研究

第1報 Papain 處理에 의한 牛肉의 遊離 Amino Acid 變化에 關하여

尹 政 義 · 吳 錫 欣 · 黃 七 星*

서울保健專門學校 食品加工科 · *建國大學校 畜產大學

(1972년 12월 29일 수리)

Studies on the Ripening of Beef at Adding the Proteolytic Enzyme

I. Changes of Free Amino Acid in Beef According to the Papain Addition

by

J. E. Youn, S. H. Oh and C. S. Hwang*

Seoul Health Junior College - *Kon Kuk University

(Received December 29, 1972)

Abstract

The results, which was analytically surveyed the free amino acids by the automatic amino acid analyzer adding the enzyme on the Korean cow's fore shank muscles, are as follows:

1. The content of free amino acids in the fore shank muscles without addition of the enzyme orderly contains alanine, glutamic acid, lysine, glycine, histidine, leucine, threonine, arginine, cystine, serine, proline, isoleucine, phenylalanine, tyrosine, methionine, aspartic acid and valine.
2. In accordance with the addition of the enzyme by 0.01%, 0.05% and 0.1% the nine free amino acids of glutamic acid, glycine, alanine, cystine, valine, isoleucine, leucine, lysine and arginine were continuously increased.
3. Proline and histidine were decreased at the enzyme addition of 0.01% after showing the high content at the control, but the quantity of free amino acids was increased according to the increase of the quantity of the enzyme.
4. Aspartic acid, threonine, serine, methionine, tyrosine and phenylalanine were increased till the enzyme addition of 0.05% and remarkably decreased from 0.1%.
5. At cooking the meat, the quantity of the enzyme addition was most effective at 0.05% of meat weight.

緒 言

最近 우리나라의 食生活은 動物性 蛋白質源을 많이 消費하는 變化가 왔으며 이에 따른 研究 改善되어야 할 問題도 많다고 본다.

食品의 質的 向上을 위한 研究로는 基礎的 理論的 研究도 重要하겠으나 現實적으로 實用可能한 問題부터 다루는 것도 중요한 것이라 보아 蛋白質源의 質的 向上에 應用시킬 수 있게 本實驗을 試圖하였다.

Papain, bromelain, ficin 등의 植物性 蛋白 分解 酵素는 소, 돼지, 닭 등에서 比較的 단단한 部位의 筋肉에

chewing 에 적당한 柔軟性을 주며 또한 旨味の 基本이 되는 amino acid 生成에 有效하다는 것은 오래전부터 알려진 事實이다.⁽¹⁾ 現在 美國, 日本等에서는 植物性 蛋白 分解 酵素로 Adolph's meat tenderizer(papain 製劑), bromelain 外에 *Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.*가 生産하는 酸性 protease, *Bacillus sp.*가 生産하는 neutral, alkaline protease 들이 市販되고 있어 많이 利用하는 實情이다.⁽²⁾

우리나라에서는 늦은 감이 있어 1970년 보사부령으로 酵素의 食品添加가 許用되고 있으나 이렇다 할만한 研究는 별로 없다.

특히 蛋白質 資源의 맛, 香氣, 消化吸收率을 增進시키기 위한 方法이 問題되며 종래에 생각하던 低質品の 蛋白質源을 高級化시킬 수 있는 일환으로 著者는 papain 을 肉에 處理하여 free amino acid의 變化量을 實驗하였기에 이에 報告하는 바이다.

試料 및 方法

1. 實驗材料

1) 供試材料

屠殺後 3時間 경과된 解牛(3才, ♂)의 사태筋肉(fore shank muscle, 저장온도 4°C, pH 6.7)을 供試材料로 하였다.

2) 使用酵素

Papain (美國 Difco 製品)을 肉重量의 0.01%(S-1), 0.05%(S-2), 0.1%(S-3)을 使用하였다.

2. 實驗方法

1) 試料의 調製

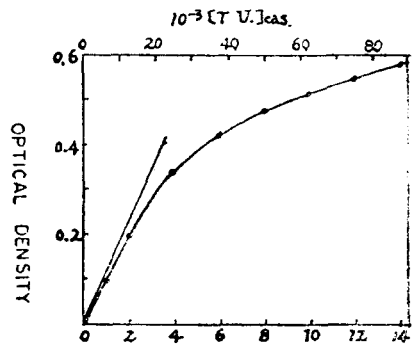
試料를 70~80°C 의 dry oven 에서 乾燥하여 72時間 Soxhlatting 하여 脫脂하고 粉碎機로 粉碎한 후 其中 7g

을 釋取하여 증류수 40 ml 를 加하여 homogenizing 하고 酵素를 加하여 6時間 作用시킨후 (20°C, pH 6.5) water bath 에서 10분간 boiling 하여 酵素를 失活시킨다.

다시 75% ethanol 60 ml 를 加하여 잘 混合한후 70°C 에서 30分間 가온 추출하고 75% ethanol 로 3回 反復하여 油出하고 그 油出液을 모아 45°C 에서 液壓濃縮하여 20 ml 되게 한후 여기에 蛋白質을 除去시키기 위하여 1% picric acid 50 ml 를 加하고 원심분리(4,000 rpm, 20分間)하여 그 上澄液을 取한후 picric acid 를 吸收시키기 위하여 Dowex 1×8 resin column(200~400 mesh) 을 通過시키고,^(3,4) 그 溶出液(fluent)을 45°C 로 液壓濃縮하여 10 ml 되게 한다.

이것을 NaOH 로 pH 7.2되게 조절한후 다시 pH 2.2 의 N/5 citrate buffer solution 을 加하여 25 ml 되게하여 이것을 free amino acid 分析試料로 하였다.⁽⁵⁾

2) 酵素 活性度 測定⁽⁶⁾



Trypsin 의 r/0.5% casein 액 1ml

Fig. 1. Inactivity of trypsin

Table 1. Analysis of amino acids by amino acid autoanalyzer

Sample No.	Neutral & acidic amino acid				Basic amino acid			
	Control	S-1	S-2	S-3	Control	S-1	S-2	S-3
Sample injection	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
Standard amino acid	Each 0.25 μM/ml				Each 0.25 μM/ml			
Column	0.6×133 cm				0.6×133 cm			
Resin	chromobeads				chromobeads			
Flow rate								
Buffer solution	30 ml/hr				30 ml/hr			
Ninhydrin	40 ml/hr				40 ml/hr			
Column temp	60°C constant				60°C constant			
Buffer solution	pH 3.25, pH 4.25				pH 5.9			
Buffer solution	Citrate buffer sol				Citrate buffer sol			
Analysis time	21 hrs				21 hrs			
Chart speed	12 inch/hr				12 inch/hr			

A. 試 藥

Casein 溶液 : Casein(독일 Merck 製) 1g 을 pH 7.6, 0.1 M phosphate buffer solution 100 ml 에 현탁하여 沸騰水中에서 15分間 加熱하여 眞性溶液으로 한다.

B. 操 作

沈澱管에 1% 酵素液 1 ml 를 取하여 여기에 基質 1 ml 를 加하여 35°C 에서 20分間 反應시켜 5% TCA 3 ml 를 加한다. 室溫에 1時間 放置後 원심분리하여 그 上澄液 을 280 m μ 에서 吸先度를 測定한다.

Blank test 는 casein 1 ml 에 5% TCA 3 ml 를 加해서 酵素液 1 ml 를 加한것에 대해서 측정한다.

C. 單 位

이 測定 條件下에서 1分間에 280 m μ 의 吸先度를 1.00 增加시키는 酵素 活性을 1 unit 로 하여 10⁻³[T.U.] cas. 으로 表示하였다. (Fig. 1참조)

供試 papain 의 activity 는 20 units 였다.

3) Amino acid 含量의 測定

Amino acid 定量은 automatic amino acid analyzer 인 Technicon Autoanalyzer 로 Table 1에서와 같은 條件下에서 하였으며 試料를 column 에 1.0 ml 씩 注入 吸着시키고 pH 5.9 buffer solution 으로 basic amino acid, pH 3.25 및 pH 4.25 buffer solution 으로 neutral and acidic amino acid 를 溶出하고 反應시켜 440 m μ , 570 m μ 및 640 m μ 의 wave length 에서 定量하였다.⁽⁷⁾

結果 및 考察

Standard amino acid 로서 Merck 製 18種을 使用하여 basic amino acid 는 各 0.25 μ M/ml, neutral and acidic amino acid 는 各 0.25 μ M/ml 되는 混合液을 standard 로 하고 control, S-1, S-2, S-3의 4가지 sample(사태근육)의 free amino acid 를 automatic amino acid

analyzer 에 의하여 定量한 結果는 Table 2와 같다.

Table 2. Free amino acid contents in fore shank muscle

Sample	(unit : mg%)			
	Control	S-1	S-2	S-3
Amino Acid	酵素量	0.01%	0.05%	0.1%
Aspartic acid	0.993	1.594	2.293	1.729
Threonine	0.048	8.816	19.516	9.226
Serine	6.770	7.113	17.115	16.274
Glutamic acid	35.284	35.656	36.587	43.882
Proline	4.908	2.28	4.692	6.234
Glycine	12.393	12.932	17.758	19.529
Alanine	73.400	76.040	82.882	87.710
Cystine	7.229	9.836	9.926	10.130
Valine	0.192	0.315	0.524	0.974
Methionine	1.388	2.912	11.705	8.631
Isoleucine	4.143	6.258	7.781	9.318
Leucine	8.671	13.461	27.007	38.333
Tyrosine	3.156	10.101	24.620	10.606
Phenylalanine	3.569	6.308	12.521	10.708
Lysine	16.960	19.078	24.755	30.236
Histidine	11.358	7.335	8.683	10.128
Arginine	7.943	14.750	29.401	37.879

이것은 사태근육 100 g當 mg 으로 表示하였고 auto-analyzer 의 recorder 에 의한 各 free amino acid 의 分析結果는 standard amino acid 를 Fig. 2에 表示하였고 control(酵素를 添加하지 않는것)의 free amino acid 를 Fig. 3, S-1(酵素 0.01% 添加)의 free amino acid 를 Fig. 4, S-2(酵素 0.05% 添加)의 free amino acid 를 Fig. 5, S-3(酵素 0.1% 添加)의 free amino acid 를 Fig. 6에 表示하였다.

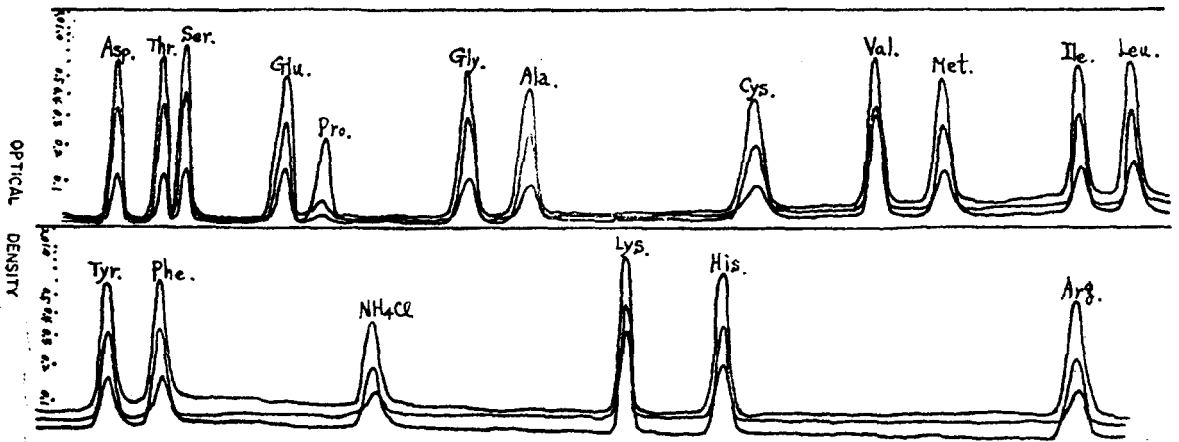


Fig. 2. Pattern of standard amino acid

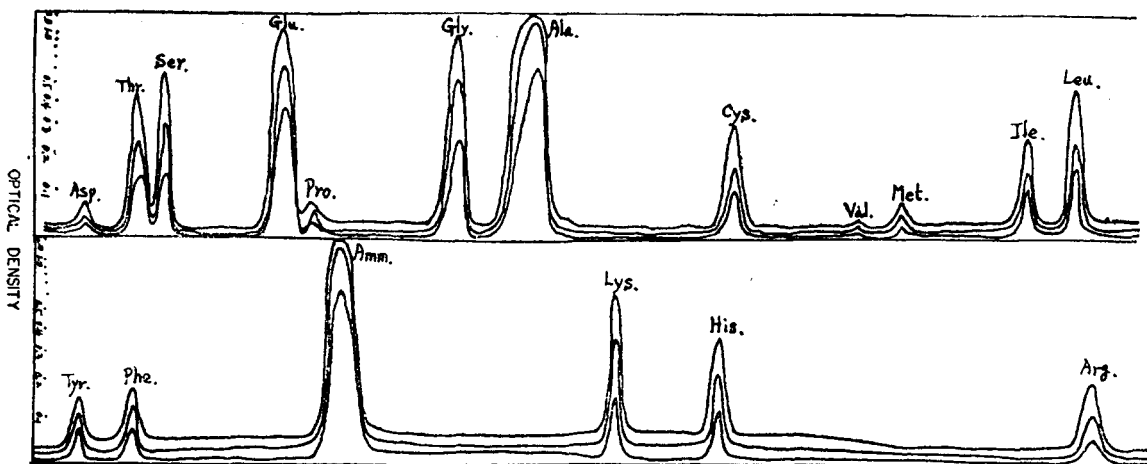


Fig. 3. Free amino acid pattern of control

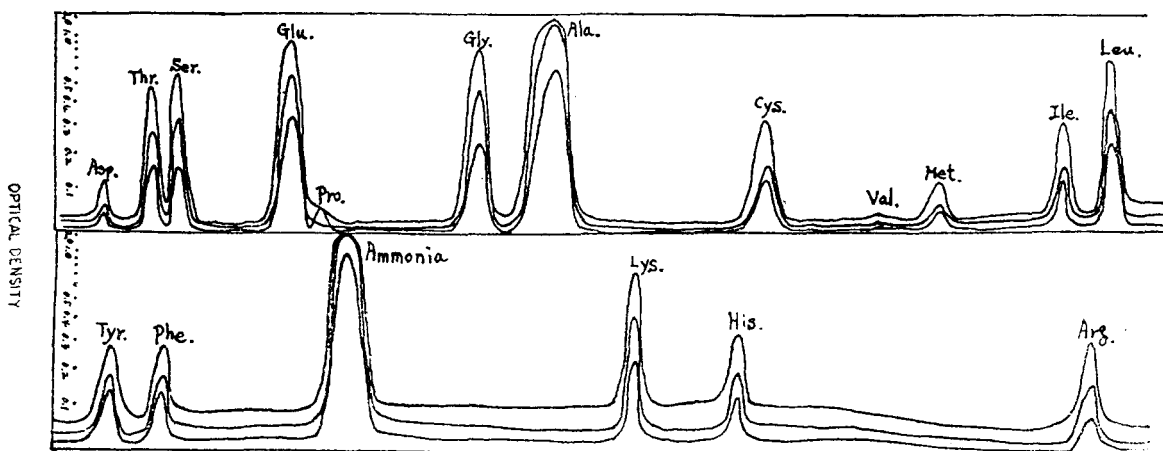


Fig. 4. Free amino acid pattern of when the 0.01% papain addition

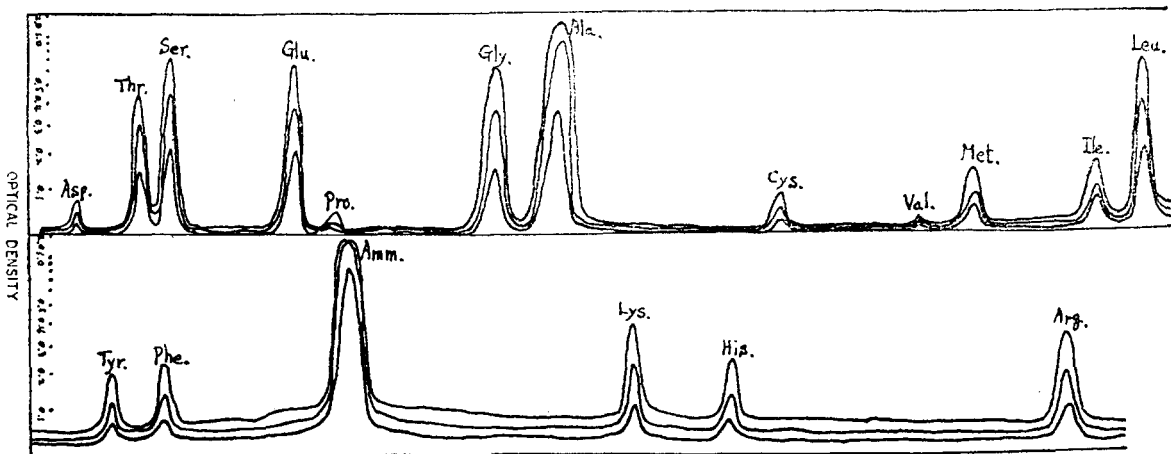


Fig. 5. Free amino acid pattern of when the 0.05% papain addition

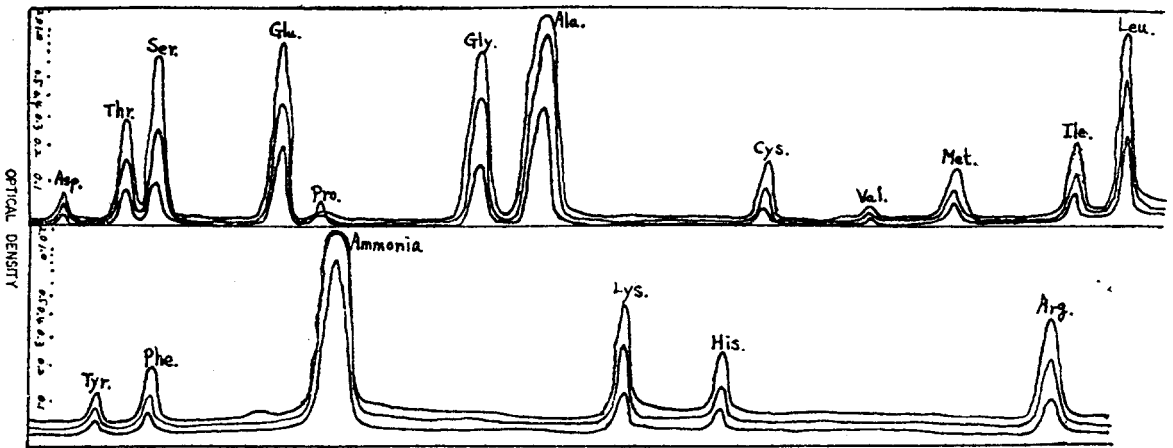


Fig. 6. Free amino acid pattern of when the 0.1% papain addition

이 結果로 보면 牛肉의 사태근육에서 tryptophan 을 除外한 17種의 free amino acid가 定量되었다. (本 automatic amino acid analyzer 는 tryptophan 이 定量되지 않으며 이것은 個別定량을 要한다.)

그中 tryptophan 을 除外한 7種의 essential amino acid 가 定量되었으며 lysine 이 가장 많은 含量을 보였고 valine 이 가장 적었다.

全體를 통하여 보면 glutamic acid, alanine, leucine, lysine, glycine, histidine 의 6가지가 가장 많았으며 이러한 것들이 牛肉의 旨味性에 關여하는 것으로 생각되며 valine 과 aspartic acid 가 가장 적었다.

別所⁽⁸⁾는 소의 우둔살을 材料로 하여 *Rhizopus niveus*가 生成하는 acidic protease 와 植物性 蛋白分解酵素인 bromelain (pine apple 果皮에서 抽出)을 使用하여 paper chromatography 에 의하여 free amino acid 를 定性試驗한 結果 bromelain 處理에서 cystine, aspartic acid, glycine, glutamic acid, alanine 의 5個를 檢出하였고 acidic protease 에서는 上記 5個의 free amino acid 外에 threonine 한개가 더 증가한다고 하였으나 本 實驗에서는 이보다 많은 17種이 모두 檢出되었다.

Table 2에서 보는 바와 같이 酵素를 添加하지 않은 것에서 free amino acid 의 含量은 alanine, glutamic acid, lysine, glycine, histidine, leucine, threonine, arginine, cystine, serine, proline, isoleucine, phenylalanine, tyrosine, methionine, aspartic acid, valine 의 순서로 含有되었으며 酵素를 0.01%, 0.05%, 0.1%로 添加함에 따라 glutamic acid, glycine, alanine, cystine, valine, isoleucine, leucine, lysine, arginine 의 9개 free amino acid 는 계속 增加하는 傾向을 보이며, (Fig. 7 참조) 그中 leucine, lysine, arginine 은 특히 현저하게 增加하였다.

Proline 과 histidine 의 2個 free amino acid 는 control 에서 가장 많은 含量을 보이다가 0.01% 酵素添加에서 減少되었다가 다시 0.05%, 0.1% 添加에 의해서 增加되는 現象을 보였다 (Fig. 8 참조)

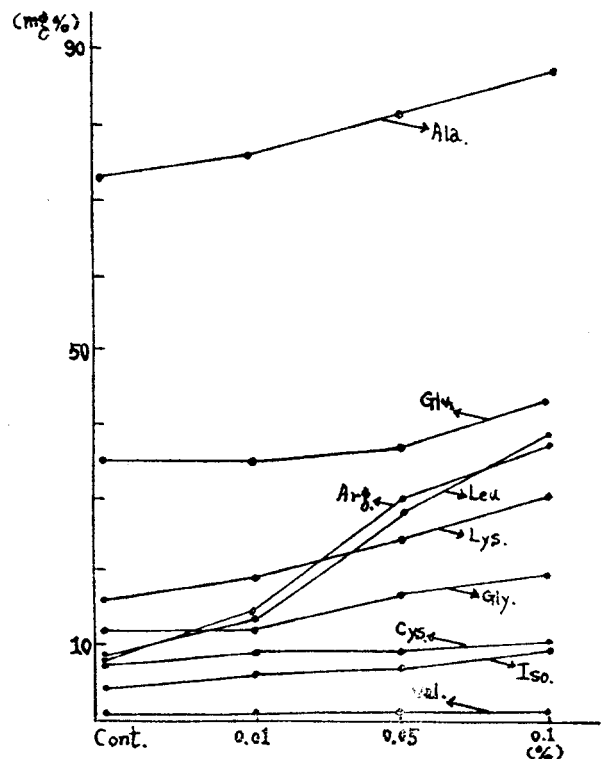


Fig. 7. Changes of free amino acids according to the enzyme addition

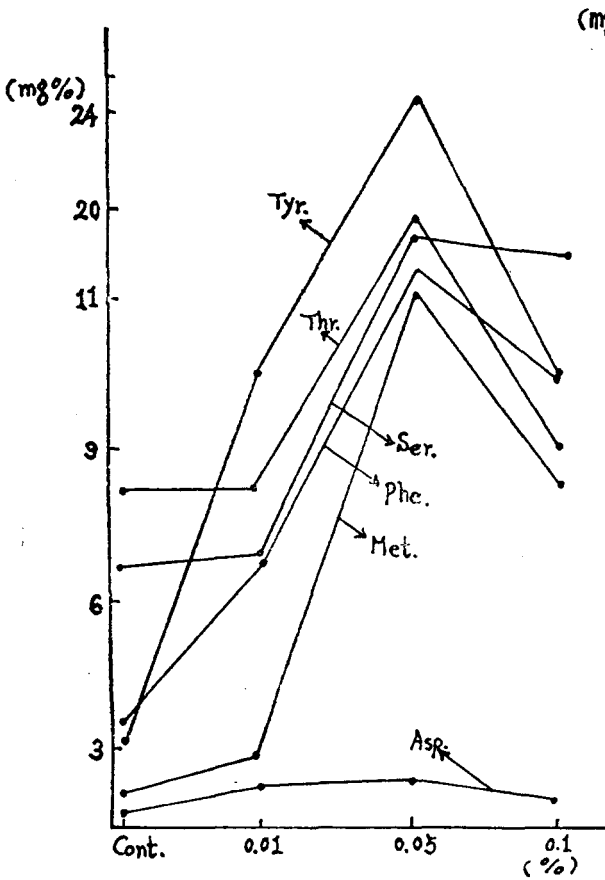


Fig. 8. Changes of free amino acids according to the enzyme addition

또한 aspartic acid, threonine, serine, methionine, tyrosine, phenylalanine 의 6개 free amino acid 는 control 에서 0.05%의 酵素添加까지 계속 增加하다가 0.1%의 酵素添加에서 free amino acid 의 含量이 현저히 減少되었다. (Fig. 9 참조)

이것은 過량의 酵素에 의해서 amino acid 가 파괴되어 ammonia 로 遊離된 것으로 보며 이러한 結果로 보아 酵素使用量은 肉 重量의 0.05%가 가장 効果的이라고 思料된다.

要 約

韓牛의 사태근육에 酵素를 添加해서 遊離 amino acid 를 automatic amino acid analyzer 로 分析 調査한 結果는 다음과 같다.

1) 酵素를 添加하지 않은 사태근육에서 遊離 amino acid 의 含量은 alanine, glutamic acid, lysine, glycine, histidine, leucine, threonine, arginine, cystine, serine,

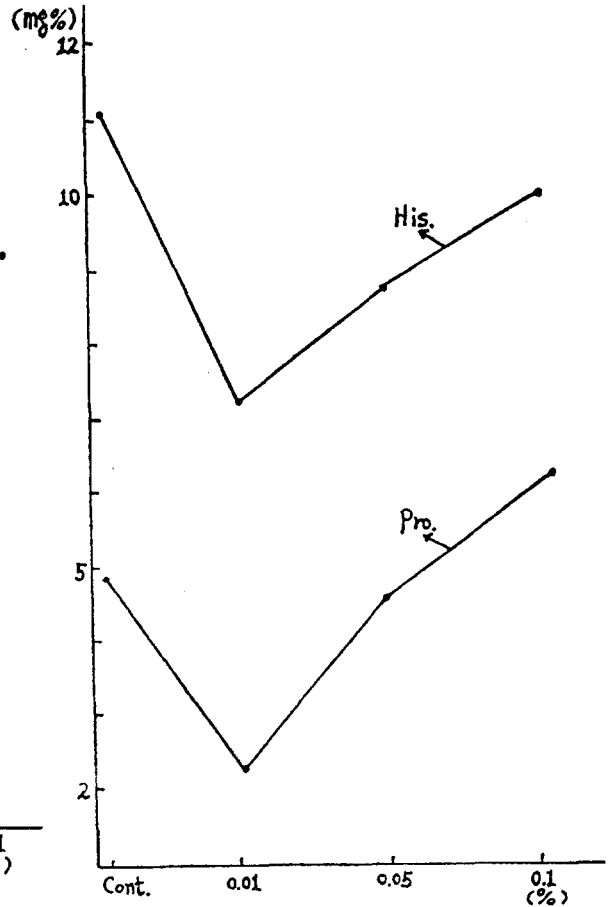


Fig. 9. Changes of free amino acids according to the enzyme addition

proline, isoleucine, phenylalanine, tyrosine, methionine, aspartic acid, valine 의 順序로 含有되었다.

2) 酵素를 0.01%, 0.05%, 0.1%로 添加함에 따라 glutamic acid, glycine, alanine, cystine, valine, isoleucine, leucine, lysine, arginine 의 9個 遊離 amino acid 는 계속 增加하였다.

3) Proline, histidine 은 control 에서 높은 含量을 보 이다가 0.01%의 酵素添加에서 減少된후 酵素量이 增加됨에 따라 遊離 amino acid 의 量이 增加되었다.

4) Aspartic acid, threonine, serine, methionine, tyrosine, phenylalanine 은 0.05%의 酵素添加까지 增加하다가 0.1%에서 현저히 減少되었다.

5) 肉 調理時 酵素의 添加量은 肉重量의 0.05%가 가장 効果的이다.

끝으로 本 實驗 수행에 많은 수고를 해주신 허윤행, 서정숙 선생에게 깊은 감사사를 드립니다.

문 헌

- 1) Gottsehall, G. Y.: *Food Research*, 7, 373 (1942).
- Wang, H.: *Food Research* 19, 534 (1954).
- 2) 別所秀子, 黒澤祝子: 栄養と食糧(日本), 6, 27 (1962).
- 3) 波多野 博行: アミノ酸 自動分析法, 化學同人, 東京, p. 79 (1964).
- 4) 小原哲二郎: 食品分析 ハンドブック, 建帛社, 東京, p. 84 (1969).
- 5) 波多野 博行: アミノ酸 自動分析法, 化學同人, 東京, p. 62 (1964).
- 6) Kunitz, M.: *J. Gen. Physiol.*, 30, 291 (1947).
- 7) Technicon Instrument Co.: *Amino Acid Autoanalyzer Instruction Manual AAA-1*, (1970).
- 8) 別所秀子, 黒澤祝子: *New Food Industry*, 9, 10, 35 (1962).
- 9) 李熙鳳, 梁且範, 劉太鍾: 한국식품과학회지, 4, 36 (1972).