

# 蛋白質 分解 酵素 添加時 牛肉의 熟成에 關한 研究

## IV. Papain 添加에 의한 牛肉의 軟化效果

尹 政 義 · 梁 隆\*

서울保健專門學校 · 延世大學校 食品工學科  
(1974년 7월 6일 수리)

## Studies on the Aging of Beef at Adding the Proteolytic Enzyme

### IV. Studies on the Tenderness Effect of Beef by Papain Treatment

by

J. E. Youn, R. Yang\*

Seoul Health Junior College, Yonsei University\*

(Received July 6, 1974)

#### Abstract

Authors investigated the tenderness effect of beef which was treated with papain and obtained results indicated as follows.

1. By using the sensory test, most desirable tenderness were obtained in 0.05% of enzyme solution for 40minute to 1 hour at 25°C.
2. It was also somewhat recognized as a tenderness effect with treated for 40minute to 1 hour at 10°C.
3. Water soluble and amino acid nitrogen were increased in proportion to enzyme concentration, reaction temperature and reaction time and opposite in connective tissue nitrogen.
4. It will be recongized that there were correlation between result of sensory test and water soluble, amino acid and connective tissue nitrogen.

#### I. 序 言

畜肉 加工品の 柔軟性에 關여하는 因子는 性別, 年齡, 遺傳性, 熟成期間中の 生化學的 變化, 筋肉의 化學的 構成成分, 屠體에서의 脂肪分布와 그 程度, 家畜취급, 蛋白質 分解酵素 處理 等의 여러 要因에 의해서 좌우된다.<sup>(1)</sup>

牛肉筋肉 蛋白質의 柔軟性에 關해서 이제까지 研究된것을 보면 Hoagland, McBryde, Powick<sup>(2)</sup>은 肉의 熟成은 蛋白質 分解作用에 의한 것이라고 하였으며 Tuma, Hendrickson, Stephens, Ruby Moore<sup>(3)</sup>는 肉이 成熟된

에 따라 tenderness 와 juiciness 가 減少한다고 發表, Kastelic<sup>(4)</sup>은 熟成中 肉의 軟化는 筋肉속에 含有되어 있는 cathepsin이라는 自家消化酵素가 蛋白質을 分解해서 肉을 軟化시킨다고 하였다.

또한 Landmann<sup>(5)</sup>은 牛肉筋肉의 死後硬直時 pH 5.4 ~ 6.8에서 cathepsin의 活性度가 가장 높았다는것을 實驗하였으며 Davey, Gilbert<sup>(6)</sup>은 牛肉의 熟成中 蛋白質分解와 柔軟性의 變化는 細菌의 作用이 아니라는 것을 認定 Hegarty, Bratzler, Pearson,<sup>(7)</sup> Hamm<sup>(8)</sup>은 牛肉의 軟化度는 保水性과 밀접한 關係가 있으며 sodium, potassium, calcium, magnesium의 평행에 의해서 높아진다는

것을 報告, Swift, Berman,<sup>(9)</sup> Berman,<sup>(10)</sup> Elbadawi, Anglemier, Cain<sup>(11)</sup>은 牛肉의 軟化度는 筋肉의 pH와 抽出液의 zinc含量과 밀접한 관계가 있다는 것을 認定, Dodze, Stadleman,<sup>(12)</sup> Sayre, Briskey,<sup>(13)</sup> Saffle, Galbreath,<sup>(14)</sup> Goll, Henderson, Kline<sup>(15)</sup>은 牛肉의 軟化度는 筋肉의 pH, 屠殺前處理, 保水性, 筋肉抽出物の 鹽溶性蛋白質에 의하여 많은 영향을 받는다고 하였으며, Gardner, Stewart<sup>(16)</sup>는 新鮮한 牛肉을 各種 溫度에서 저장하는 동안 ammonium-N, urea-N의 變化에 關해서 實驗報告하였다. 蛋白質 分解 酵素를 利用해서 巨大한 分子構造를 갖는 筋肉 蛋白質을 파괴하여 肉을 柔軟하게 하는 效果에 關한 研究를 보면 Chunghee, Eldon<sup>(17)</sup>은 bromelain, collagenase, ficin, papain, rhyzyme P-11, trypsin處理의 의한 牛肉 筋肉蛋白質의 溶解率(water soluble, salt soluble, insoluble)에 대해서 實驗한 結果 papain 處理가 가장 우수하였다는 것을 認定하였고, Huffman<sup>(18)</sup>은 닭을 屠殺前에 100 ppm의 crude papain을 injection하면 筋肉 蛋白質의 軟化에 效果가 있다는 것을 確認 Miel<sup>(19)</sup>은 牛肉덩어리에 fork로 구멍을 내어 酵素를 處理하면 筋肉組織內로 침투하기 쉬운 상태로 된다고 發表, Howard, Judge<sup>(20)</sup>는 牛肉을 溫度에 따라서 調理하였을때 longissimus dorsi muscle의 medial muscle position과 lateral muscle position의 柔軟성과 sarcomere의 길이는 밀접한 상관관계가 있다고 報告하였다.

또한 Herring, Cassens, Briskey<sup>(21)</sup>는 牛肉의 냉장중 sarcomere의 길이가 길어짐에 따라 柔軟하게 된다고 하였으며 Gothard, Mullins, Boulware, Hansard<sup>(22)</sup>는 牛肉 筋肉의 熟成도중 軟化에 따른 pH 變化和 sarcomere length와의 關係에 대해서 研究, Balls<sup>(23)</sup>는 熟成中 肉이 柔軟하게 되는것은 筋肉속에 축적되어 있는 非蛋白質 窒素때문이라고 하였다.

Smalling, Kemp, Fox, Moody<sup>(24)</sup>는 papain의 屠殺前處理가 dry cured ham의 柔軟성과 맛에 미치는 영향이 일반적으로 우수하다는 것을 實驗報告하였다.

이에 著者는 牛肉의 熟成에 關한 研究의 一環으로 여러 조건으로 植物性 蛋白質分解酵素인 papain을 處理하여 官能檢査와 水溶性 窒素, amino 態窒素, 結合組織窒素를 分析하여 肉의 柔軟效果와의 相關係를 比較 試驗하였으므로 이에 報告하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 實驗材料

#### (I) 供試 原料肉

屠殺後 6時間 경과된 韓牛(숫컷, 6歲)의 shank muscle(저장조건: pH 6.6, -20°C로 동결저장하여 실험에供할 때 10°C에서 半解凍)을 slicer로 筋纖維에 直角으로 잘라 길이 10 cm, 폭 5 cm, 두께 1 cm의 크기로 定形하여

사용하였다.

#### (2) 供試蛋白質分解酵素

Papain(美國 Difco製劑)을 供試酵素로 하였으며 그 使用量은 肉重量의 0.01%(S-2), 0.05%(S-3), 0.1%(S-4)使用하였다.

#### (3) 酵素 活性度 測定法

Papain activity測定은 casein淸化法<sup>(25)</sup>에 의하여하였으며 그 活性度는 20 units였다.

### 實驗方法

#### (1) 酵素 處理肉의 調製法

- a) 酵素液: 濃度는 肉重量의 0.01~0.10%까지로 하였다. 酵素의 溶媒로서는 pH 7.0의 중류수를 使用하였다. (10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>로 pH 조절)
- b) 酵素處理法: Pot에 定形한 肉 500 g을 넣고 이것에 500 g의 酵素液(處理區) 또는 中류수(對照區)를 注加한 後 室溫에서 60分間 保存하였다. 이 사이에 肉의 앞 뒤 部分을 fork로 2回씩 刺戟한다. 所定時間後 處理區와 對照區의 肉을 흐르는 물에서 充分히 세척하고 건조된 가제를 이용하여 물을 제거 한것을 試料肉으로 하여 官能檢査와 窒素分析을 하였다.

#### (2) 酵素 處理 效果의 判定

- a) 官能檢査
  - 100°C의 물에 익힌 對照區와 處理區의 試料肉을 20名(20~35歲, 男, 女, 男 12명, 女 8명) 評價하였다.
  - 品質判定에 있어서는 軟한 것에 중점을 두어 對照區와 比較해서 變함이 없는 것에서 柔軟한 정도가 매우 強한것까지의 4단계로 나누어 評價하였다.
  - A: Tenderness가 매우 強함.
  - B: Tenderness가 적당함.
  - C: 弱한 tenderness
  - D: 變함이 없음.
- b) 酵素 處理肉의 化學分析
  - 試料는 2 mm plate chopper에서 2回 通해서 다시 칼로 잘 다진것을 使用하였다.

##### 1) 水溶性 窒素

試料 5g을 물에 현탁해서 100 ml로 하여 1時間 放置後 東洋여지 No.2로 여과하여 여액 70 ml中 25 ml의 窒素分析을 micro Kjeldahl法<sup>(26)</sup>으로 定量하였다.

##### 2) Amino態 窒素

Formol 滴定法<sup>(27)</sup>

##### ① 試料調製

破碎肉 5g에 10倍量의 물을 加하여 1時間 冷浸한 후 吸引濾過하고 다시 1回 反復 浸出 후 잔유물에 10倍量의 물을 加해서 boiling, 여과한 후 여액을 전부 합하여 다시 boiling 해서 蛋白質을 응고시킨다. (albumin의 응고), 이것을 여과 세척하여 10% 황산 용액을 加하여

5% 황산 산성으로 한 후 인팅스텐산 용액을 가하여 점전이 생기면 다시 여과, 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액으로 세척하여 여액에 세척액을 합하여 일정량으로 하고 그중 50 ml를 100 ml 용 mess flask에 취하여 0.5% phenolphthalein 용액 1 ml, BaCl<sub>2</sub> 2 g을 가하여 진탕 용해후 indicator가 분색할때까지 포화 Ba(OH)<sub>2</sub> 용액을 가하고 다시 5 ml를 가한 후 標線까지 증류수를 채워서 진탕한다. 15분간 放置해서 여과하여 여액의 80 ml를 100 ml 용 mess flask에 취하여 0.2N HCl 용액으로 中和하여 (litmus paper) 탄산을 함유하지 않는 증류수를 標線까지 가하여 供試液으로 한다.

② 試料檢査

200 ml 용 삼각 flask에 試料溶液 25 ml를 pipette로 취하고 中性 formalin溶液 (formalin 50 ml에 phenolphthalein 용액 1 ml를 가하여 0.2N-NaOH 용액으로 微赤색을 띠때까지 中和) 20 ml와 증류수 20 ml를 mess cylinder에 넣은 후 phenolphthalein 2~3 drop 을 가한 후 0.5N NaOH로 titration 한다.

③ 空試驗

별도로 200 ml 용 삼각 flask에 試料溶液 25 ml와 증류수 40 ml를 취하여 phenolphthalein 2~3 drop 을 가한 후 0.05N NaOH로 滴定한다.

④ 計算

$$\text{Amino態 窒素(\%)} = (V_1 - V_0) \times f \times 0.0007 \times \frac{D}{25} \times 100$$

V<sub>1</sub>: 試料檢査에서의 0.05N NaOH 표준액의 滴定值 (ml)

V<sub>0</sub>: 空試驗에서의 0.05N NaOH 표준액의 滴定值 (ml)

f: 0.05N NaOH factor

D: 회석배수

0.0007: 0.05N NaOH 표준액 1 ml에 대한 질소량 (g)

3) 結合 組織 窒素

Lörincz-Szeredy<sup>(28)</sup> 方法에 따라 먼저 2g의 試料에 대해서 總窒素를 定量한다. 다음에 試料 1g을 50 ml의 0.05N NaOH 용액으로 100 ml 용 mess flask에 씻어넣어 증류수를 가하여 標線까지 채운다. 24時間 室溫에 放置後 여과하여 여액 50 ml에 대해서 microkjeldahl 法으로 질소를 定量하여 總窒素와의 差를 結合 組織 窒素로 하여 總窒素에 대한 百分率로서 表示하였다.

III. 結果 및 考察

1. Papain의 處理 濃度가 牛肉의 軟化에 미치는 영향

牛肉에 papain處理時 官能檢査의 結果는 Table 1~4와 같다. 評價의 集計 結果에서 試料의 個體差가 起因하는 것을 알 수 있었지만 酵素의 濃度에 비례해서 軟化效果가 認定되었다.

評價點數로 보아 肉의 軟化度가 가장 적당한 것이 B~C이며 A는 肉 特有的 씹는 맛을 일울 정도로 軟化된 것이다. Table 1에서 보는 바와 같이 0.1%의 濃度에서

는 A가 70%, B~C가 30%에 해당하며 0.01%, 0.05%는 B~C가 각각 85%, 95%로 0.05%에서 가장 적당한 軟化效果를 認定할 수 있었다.

Table 1. A relation between enzyme concentration and tenderness of beef treated with papain for 1hr at 20°C.

Enzyme Valuation Enzyme Concentration (%)	Papain			
	D	C	B	A
0.01	2	10	7	1
0.05	0	8	11	1
0.1	0	2	4	14

\*Numeral=Panel member

Table 2.

A relation between activation time and tenderness of beef treated with 0.05% papain of meat weight at 10°C.

Enzyme Valuation Reaction time (min.)	Papain			
	D	C	B	A
20	11	7	1	1
40	6	12	2	0
60	1	10	7	2
80	0	2	6	12
100	0	1	1	18

\*Numeral=panel member

Table 3. A relation between activation time and tenderness of beef treated with 0.05% papain of meat Weight at 25°C.

Enzyme Valuation Reaction time (min.)	Papain			
	D	C	B	A
20	4	6	10	0
40	2	8	8	2
60	0	4	14	2
80	0	0	2	18
100	0	0	0	20

\*Numeral=Panel member

papain 處理肉의 理化學的 分析結果는 Fig. 1~4와 같다.

Fig. 1에 표시 한바와 같이 水溶性窒素, amino態 窒素는 papain 濃度에 따라서 增加하는 傾向을 보였다.

Table 4. A relation between activation time and tenderness of beef treated with 0.05% papain of meat weight at 40°C.

Enzyme Valuation	Papain			
	D	C	B	A
Reaction time (min.)				
20	2	2	6	10
40	0	4	4	12
60	0	2	2	16
80	0	1	0	19
100	0	0	0	20

\*Numerals=Panel member

이것은 papain處理에 의해서 筋肉의 構成 蛋白質이 分解되어 溶解性이 높아지는 것으로 생각되며, 또한 amino 態 窒素가 증가하는 것은 많은 peptide結合이 加水分解되는 것으로 思料된다.

藤卷(29)은 papain이 actomyosin의 分해작용이 특히 강하고 elastin, collagen의 分解를 促進한다고 지적하였으며 本 實驗에서도 結合組織窒素는 papain濃도에 따라

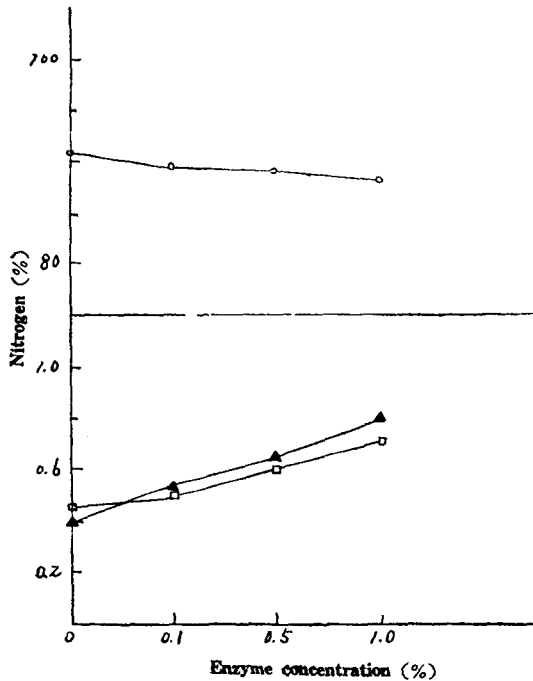


Fig. 1. Changes of nitrogen amounts for each nitrogen fraction according to enzyme concentration

\* —□—□—: Soluble N  
 —▲—▲—: Amino acid N  
 —○—○—: Connective tissue N

서 輕微한 減少현상을 보였는데 이것은 papain이 結合組織을 構成하는 collagen纖維와 elastin纖維에 作用하는 硬蛋白質(scleroprotein)의 分解에 關連되는 것으로 思料된다.

이러한 結果는 官能檢査의 結果와 많은 關連性이 있는 것으로 보여진다.

2. Papain 處理時間 및 作用溫度가 肉의 軟化에 미치는 영향

0.05%의 酵素 濃度에서 處理溫度 및 作用時間을 輕時的으로 하여 papain處理한 試料를 官能檢査한 結果는 Table 2, 3, 4와 같다.

比較적 酵素活性이 낮은 10°C에서 80~60分, 25°C에서 60~40分, 40°C에서 40~20分으로 B~A의 評價가 많았다. Fig. 2, 3, 4는 10, 25, 40°C에서 papain 處理했을때의 水溶性窒素, amino態 窒素, 結合組織窒素의 經時的 變化를 表示한 것이다.

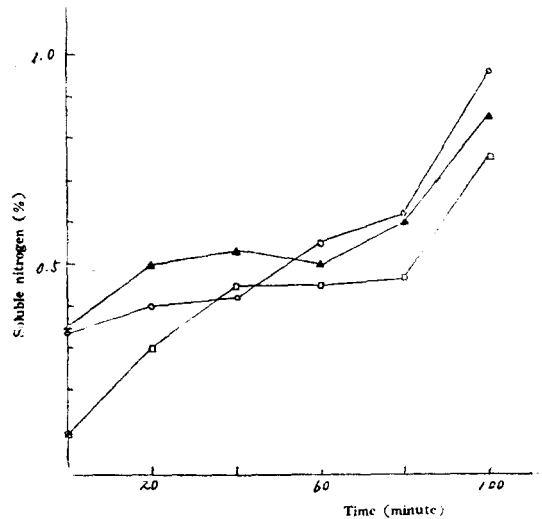


Fig. 2. Changes of soluble nitrogen according to reaction time and temperature when the beef treated with 0.05% papain.

\* —□—□—: Treated at 10°C  
 —▲—▲—: Treated at 25°C  
 —○—○—: Treated at 30°C

Lörincz, Szeredy(28)와 伊藤, 三浦, 石田, 加藤, 安部宮崎(30)가 去勢牛에 蛋白分解 酵素를 정맥 주사하여 水溶性窒素, amino態窒素, 結合組織 窒素量에 각각 다르게 變한다는 것을 지적한바와 같이 本實驗에서도 水溶性窒素와 amino態 窒素는 處理時間이 길어짐에 따라 增加하는 현상을 보였으며 또한 amino態窒素는 酵素 處理溫度가 높아짐에 따라 增加하는 현상을 보였다.

이것은 蛋白質의 peptide結合이 酵素의 活用溫度가 높아짐에 따라 加水分解가 促進되는 것으로 思料된다. 結

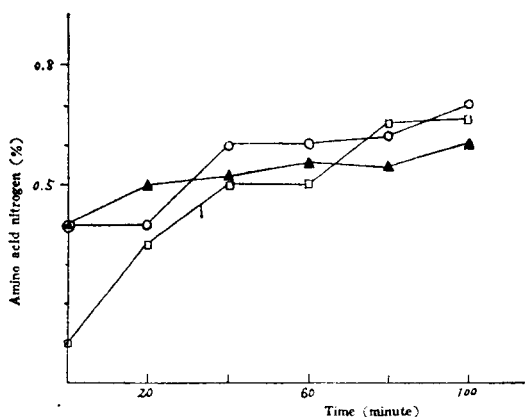


Fig. 3. Changes of amino acid nitrogen according to reaction time and temperature when the beef treated with 0.05% papain

\* —□—□— : Treated at 10°C  
 —▲—▲— : Treated at 25°C  
 —○—○— : Treated at 30°C

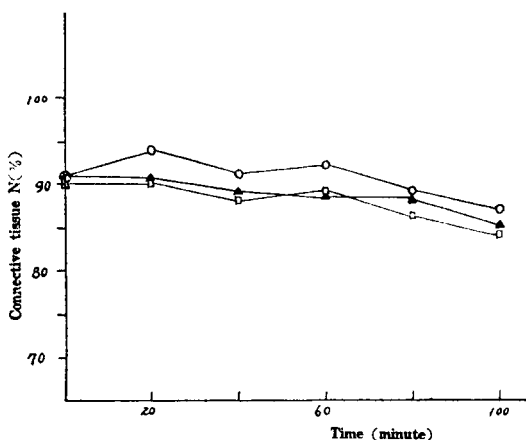


Fig. 4. Changes of connective tissue nitrogen according to reaction time and temperature when the beef treated with 0.05% papain.

\* —□—□— : Treated at 10°C  
 —▲—▲— : Treated at 25°C  
 —○—○— : Treated at 30°C

合 組織 窒素는 뚜렷한 경향은 認定할 수 없었지만 作用 時間에 따라서 輕微하게 減少하는 傾向을 보였다.

### 要 約

Papain을 處理하여 牛肉의 軟化效果를 實驗한 結果 다음과 같다.

1. 官能檢査는 0.05% 酵素液으로 25°C에서 40~60분간 處理한것이 가장 좋은 軟化效果를 갖는다.
2. 10°C에서 40~60분간 處理한것도 어느정도 軟化效果를 認定할 수 있었다.
3. papain 濃度, 活性溫度 및 時間에 비례해서 水溶性 窒素, amino 態 窒素는 增加하였으며 結合組織窒素는 減少하였다.
4. 官能檢査 結果와 水溶性窒素, amino 態窒素, 結合組織窒素의 變化關係는 相關성이 있는 것으로 認定된다

### References

- 1) Webb, N. B., Kahlenberg, D. J., and Naumann, H. D. : *J. of Animal Science*, **23**, 1027 (1964).
- 2) Hoagland, R., Mc Bryde, C. M., and Powick, W. C. : *U.S. Dept. Agr. Bull.*, No. **433**, p.100 (1917).
- 3) Tuma, H. J., Hendrickson, R. L., Stephens, D. F. and Ruby Moore: *J. of Animal Science*, **21**, 848 (1962).
- 4) Kastelic, J. : Seminar at Iowa State College, Ames, Iowa. (1953).
- 5) Landmann, W. A. : Campbell Meat Tenderness Symposium, (1963).
- 6) Davey, C. L. and Gilbert, K. V. : *J. of Food Sci.*, **31**, 135 (1966).
- 7) Hegarty, G. R., Bratzler, L. J., and Pearson, A. M. : *J. of Food Sci.*, **28**, 525 (1963).
- 8) Hamm, R. : *Food Research*, **10**, 356 (1960).
- 9) Swift, C. E. and Berman, M. D. : *Food Technol.*, **13**, 365 (1959).
- 10) Eerman, M. D. : *J. of Food Sci.*, **26**, 422 (1961).
- 11) El-badawi, A.A. Anglemier, A. F., and Cain, R. F. : *Food Technol.*, **18**, 1807 (1964).
- 12) Dodge, J. W. and Stadlman, W. J. : *Food Technol.*, **14**, 43 (1960).
- 13) Sayre, R. N. and Briskey, E. J. : *J. of Food Sci.*, **28**, 675 (1963).
- 14) Saffie, R. L. and Galbreath, J. W. : *Food Technol.*, **18**, 1943 (1964).
- 15) Goll, D. E., Henderson, D. W., and Kline, E. A. : *J. of Food Sci.*, **29**, 590 (1964).
- 16) Gardner, G. A. and Stewart, D. J. : *J. Sci. Fd. Agr.*, **17**, 491 (1966).
- 17) Chunghee, K. K. and Eldon, E. R. : *J. of Food Sci.*, **35**, p.563 (1970).
- 18) Huffman, D. L. : *Poultry Sci.*, **40**, 1627 (1961).
- 19) Miel, G. : *Food Technol.*, **16**, 111 (1962).
- 20) Howard, R. D. and Judge, M. D. : *J. Food Sci.*, **33**, 456 (1968).

- 21) Herring, H.K., Cassens, R.G., and Briskey, E.J. : *J. of Sci Fd Agr.*, **16**, 379 (1965).
- 22) Gothard, R. H, Mullins, A. M., Boulware, R. F., and Hansard, S. L. : *J. of Food Sci.*, **31**, 825 (1966).
- 23) Balls, A. K. : *Ice and Cold Storage*, **41**, 85 (1938).
- 24) Smalling, J. B., Kemp, J. D., Fox, J. D., and Moody, W. G. : *J. of Animal Science*, **32**, 1107 (1971).
- 25) Kunitz, M. : *J. Gen. Physiol.*, **30**, 291 (1947).
- 26) 東京大學農學部農藝化學教室編：實驗農藝化學，朝倉書店，東京，上卷，54 (1967).
- 27) 小原，鈴木，岩尾：食品分析ハンドブック，建帛社 52 (1969).
- 28) Lörincz, F. and Szeredy, I. : *J. of Sci. Fd. Agr.*, **10**, 468 (1959).
- 29) 伊藤安，三浦弘之，石田義夫，加藤光雄，安部龍郎，宮崎昌久，日本食品工業學會誌 **11**, 191 (1964).
- 30) 藤卷正生：日本農技研誌，**6**, 287 (1959).