

## 蛋白質 分解酵素 添加時 牛肉의 熟成에 關한 研究

### III. Papain 添加에 따른 牛肉의 Tryptophan 含量 變化에 關하여

尹 政 義 · \*梁 隆 · 李 尚 建 · \*\*朴 順 龍

서울 保健專門學校, \*延世大學校 食品工學科, \*\*建國大學校 畜產大學

(1973년 7월 23일 수리)

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

### III. Changes of Tryptophan Content in Beef According to the Papain Treatment

by

J. E. Youn, \*R. Yang, S. K. Lee, \*\*S. Y. Park

Seoul Health Junior College · \*Yon Sei University · \*\*Kun Kuk University

(Received July 23, 1973)

#### Abstract

Total and free tryptophan contents in the fore shank muscle of Korean cow treated with proteolytic enzymes have been analyzed by the spectrophotometric method and the results are as follows:

1. By adding 0.01%, 0.05%, 0.1% of proteolytic enzymes, the total tryptophan and free tryptophan have increased steadily.
2. The rate of increase of the total tryptophan content was highest when 0.05% of the enzymes for the meat weight were added.
3. The change in free tryptophan incident to the addition of proteolytic enzymes was insignificant.

#### 序 論

Spies, Chambers<sup>(1)</sup>, Goodwin, Morton<sup>(2)</sup> 分光分析 方法에 의하여 순수한 可溶性蛋白에서 tryptophan 을 처음으로 測定하였으며 肉의 tryptophan 에 關한 研究로는 Dvorák, Vognarova<sup>(3)</sup>에 의해서 牛肉, 豚肉, 仔肉, 筋肉의 部位에 따른 必須 아미노산량을 實驗한 것 외에 Dvorák<sup>(4)</sup>은 牛肉의 longissimus dorsimuscle에 papain, leucine amino peptidase, prolidase 를 處理하여 *Streptococcus zymogenes* NCDO 592, *St. faecalis* ATCC 8043, *Lactobacillus arabinosus* ATCC 8014 를 利用해서 微生物學的으로 essential amino acid 를 測定하였으며

Wladyka, Dawson<sup>(5)</sup>은 30日과 90日間 冷凍貯藏된 닭고기의 drip 에서 alkali 加水分解에 의하여 tryptophan 量을 測定하였고 Gardner, Stewart<sup>(6)</sup>는 牛肉 貯藏中 經過 時間에 따른 tryptophan 含量의 變化에 대해서 實驗報告하였다.

著者は 前報<sup>(7,8)</sup>에서 牛肉사태筋肉에 植物性蛋白分解酵素인 papain 을 處理하여 automatic amino acid analyzer 에 의해서 tryptophan 을 除外한 17種의 free amino acid 와 composite amino acid 의 含量 變化에 대해서 實驗報告하였다.

本報에서는 automatic amino acid analyzer 에 의해서 分析되지 않은 total tryptophan 과 free tryptophan 含量의 變化에 關해서 實驗하였으므로 이에 報告하는 바이다.

다.

## 實驗材料 및 方法

### 1. 實驗材料

#### (1) 供試材料

屠殺後 3時間 경과된 韓牛(3歲, ♂)의 사태근육(fores Shank muscle, 저장조건: pH 6.7, 4°C)을 供試材料로 하였다.

(2) Standard tryptophan 은 Merck 製 L-tryptophan (for biochemistry)을 使用하였다.

#### (3) 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)를 使用하였다.

#### (4) 酵素 活性度 測定法

Papain 活性度 測定은 casein 消化法<sup>(9)</sup>에 의하여 測定 하였으며 방법은 前報<sup>(7)</sup>와 동일하게 하였다.

### 2. 實驗方法

#### (1) 試料의 調製<sup>(10)</sup>

試料를 70~80°C의 dry oven에서 乾燥後 72時間 soxhating 하여 脫脂한 후 粉碎機로 粉碎하여 그중 2g을 秤取하여 증류수 20 ml를 加하여 homogenizing 하고 酵素를 添加하여 6時間 作用(作用條件 pH 6.5, 20°C 증류수) 시킨 후 water bath에서 10分間 boiling 하여 酵素를 失活시킨다.

Total tryptophan<sup>(11)</sup>

酵素를 失活시킨 試料 5 ml를 10 ml容 test tube에 取하고 10N NaOH 5 ml를 加하여 封管한 後 120°C의 air bath에서 8時間 alkali 分解하여 이 分解液을 증류수로 5回 反復抽出하여 NaOH를 除去하고 그 抽出液을 60°C에서 減壓 蒸發 乾固, 이 蒸發 乾固物을 N NaOH로 회석하여 全量을 20 ml로 한 후 이것을 total tryptophan의 分析試料로 하였다.

Free tryptophan

酵素를 失活시킨 試料를 70% ethanol 30 ml를 加하여 20°C에서 24時間 진탕추출하여 ethanol을 제거한 후 여과하여 그 抽出液을 60°C에서 減壓濃縮하여 20 ml 되게 한 후 1% picric acid solution을 50 ml 加하여 원심분리(rpm 2,000, 20分)후 침전된 단백질을 제거하고 그 上澄液을 取하여 Dowex 1×8 resin column(200~400 mesh)을 通過시키고<sup>(12,13)</sup> 그 溶出液을 60°C로 減壓濃縮하여 10 ml 되게 한 후 증류수를 加하여 全量을 20 ml 되게 하여 이것을 free tryptophan의 分析試料로 하였다.

#### (2) Tryptophan 測定

Tryptophan의 全量은 Spectrophotometer(Spectronic

20, Bausch & Lomb, Arther H. Thomas Co.)로 *p*-dimethylaminobenzaldehyde 法<sup>(1,14)</sup>으로 測定하였다.

標準曲線: 23.8N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液 8 ml 및 *p*-dimethylaminobenzaldehyde(이하 *p*-DAB로 略함) 30 mg을 含有한 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 ml를 10 ml容 mess flask에 取하여 25°C로 냉각후 5~100 μg에 tryptophan을 含有한 N NaOH 용액을 차례로 1 ml씩 注加한다. 잘 진탕하여 차광해서 25°C에서 24時間 放置後 0.04% NaNO<sub>2</sub> 溶液 0.1 ml를 加하여 30分間 차광해서 室溫에 放置 後 590 mμ의 wave length에서 比色測定하였다. (Fig. 1 참조)

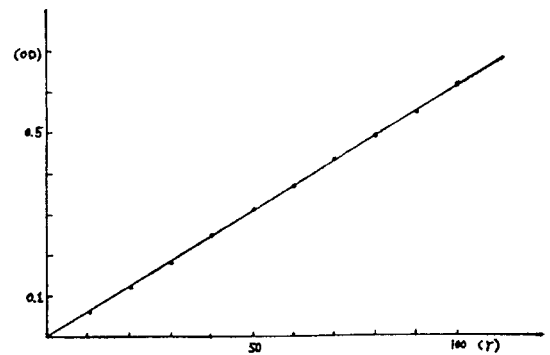


Fig. 1. Standard curve of tryptophan

試料測定: Total tryptophan: *p*-DAB 30 mg을 21.4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액 9 ml에 溶解하여 여기에 alkali 회석액 1 ml를 加하여 12時間 放置한 후 0.04% NaNO<sub>2</sub> 溶液 0.1 ml를 加하여 30分間 차광해서 실온에 放置 後 590 mμ의 wave length에서 比色測定한다.

blank test는 *p*-DAB를 加하지 않는다.

Free tryptophan: *p*-DAB 30 mg을 21.4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액 9 ml에 溶解하여 이것에 試料溶液 1 ml를 加하여 12時間 放置한 후 0.04% NaNO<sub>2</sub> 溶液 0.1 ml를 加하여 30分間 차광해서 室溫에 放置 後 590 mμ의 wave length에서 比色測定한다.

blank test는 *p*-DAB를 加하지 않는다.

計算方法: 測定 試料液의 吸光度에서 空試驗의 吸光度差를 標準曲線에서 찾는다.

### 實驗結果 및 考察

韓牛의 사태筋肉에 植物性 蛋白分解酵素인 papain을 處理하여 total tryptophan과 free tryptophan의 含量變化를 分光分析方法에 의해서 實驗하였다.

Standard tryptophan으로 E. Merck 製 L-tryptophan (for biochemistry)을 使用하여 分析한 結果 total tryp-

tophan의 optical density를 Fig. 2, free tryptophan의 optical density를 Fig. 3에 表示하였다.

Fig. 4에 total tryptophan과 free tryptophan을 mg%로 환산하여 表示하였다.

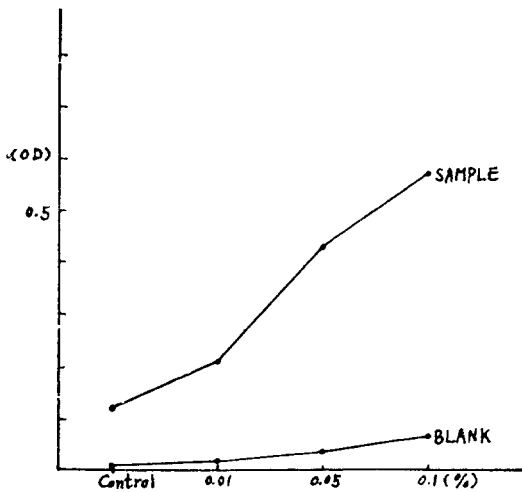


Fig. 2. Optical density of total tryptophan according to papain treatment of fore shank muscle

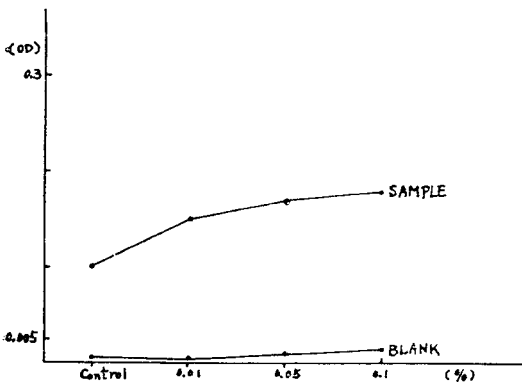


Fig. 3. Optical density of free tryptophan according to papain treatment of fore shank muscle

이것은 사태筋肉 100 g 당 mg으로 表示한 것이며 이 結果에서 보면 total tryptophan의 含量은 酵素添加量에 따라 계속 增加하였으며 특히 肉重量의 0.05%添加에서 가장 많은 增加率을 나타내었고 free tryptophan은 酵素添加에 따라 계속 增加는 하였으나 變化가 그다지 심하지 않은 것으로 나타났다.

이것은 酵素에 의해서 tryptophan이 그다지 많이 遊離되지 않는다는 것으로 생각되며 이러한 tryptophan의 變化量은 著者가 前報(8)에서 報告한 다른 amino acid에

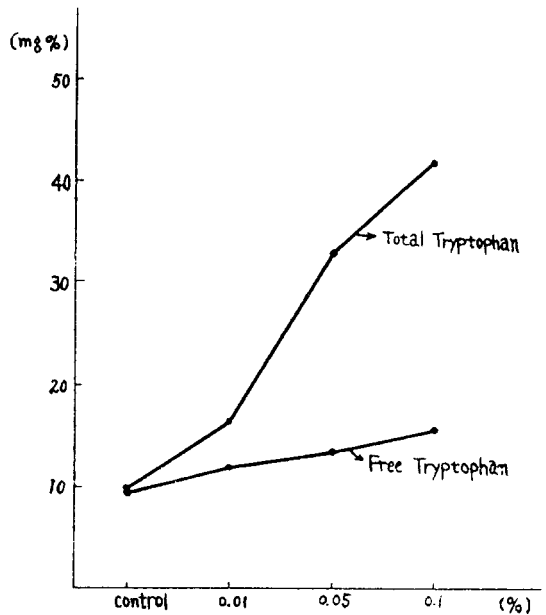


Fig. 4. Changes of total tryptophan and free tryptophan content according to the papain treatment

비하면 가장 적은 量이었으며 이것은 Dvorák, Vognarova(3)가 牛肉의 筋肉部位에 따라 essential amino acid를 分析한 結果와 同一하였고 또한 Dvorák(4)이 실험한 바와 같이 牛肉의 longissimus dorsi muscle에 papain 處理時 必須 아미노산 含量變化를 微生物學的으로 測定한 tryptophan 量의 結果와도 同一하였다.

### 要 約

韓牛의 사태筋肉에 蛋白分解酵素를 添加해서 total tryptophan과 free tryptophan을 spectrophotometric method로 分析한 結果는 다음과 같다.

1. 蛋白質分解酵素를 0.01%, 0.05%, 0.1%로 添加함에 따라 total tryptophan과 free tryptophan은 계속 增加하였다.
2. Total tryptophan은 蛋白分解酵素를 肉重量의 0.05% 添加時 그 增加率이 가장 높았다.
3. 蛋白分解酵素 添加에 따른 free tryptophan의 含量變化는 그다지 심하지 않았다.

### References

- 1) Spies, J. R., and Chambers, D. C.: *Anal. Chem.*, **20**, 30 (1948).
- 2) Goodwin, T. W., and Morton, R. A.: *Biochem. J.*, **40**, 628 (1946).
- 3) Dvorak, Z., and Vognarova, I.: *J. Sci. Fd Agr.*,

- 20, 146 (1969).
- 4) Dvorak, Z.: *J. Sci. Fd Agr.*, **19**, 77 (1968).
- 5) Wladyka, E. J., and Dawson, L. E.: *J. of Food Sci.*, **33**, 453 (1968).
- 6) Gardner, G. A., and St Ewart, D. J.: *J. Sci. Fd Agr.*, **17**, 491 (1966).
- 7) 黃七星, 尹政義, 吳錫欣: *한국식품과학회지*, **5**, 71 (1973).
- 8) 尹政義: 미발표
- 9) Kunitz, M.: *J. Gen. Physiol.*, **30**, 291 (1947).
- 10) 波多野 博行: *アミノ酸 自動分析法*, 化學同人, p-63 (1964).
- 11) Shaffer, N. K., Balaker, R.A., Rilley, V., and Meffit, T.E.: *Anal. Biochem.*, **15**, 93 (1966).
- 12) 波多野 博行: *アミノ酸 自動分析法*, 化學同人, 東京, p. 79, (1964).
- 13) 小原哲二郎, 鈴木隆雄, 岩尾裕之: *食品分析 ハンドブック*, 建帛社, 東京, p. 84 (1969).
- 14) Spies, J. R., and Chambers, D. C.: *Anal. Chem.*, **21**, 1249 (1949).