

## Meat Tenderizer 제조에 관한 연구

### 제 2 보 *Asp. oryzae* 생산 protease 의 연속효과

\*이 정 희, 김 건 화, 유 주 현, 양    용  
연세대학교 이공대학 식품공학과  
(1975년 10월 2일 수리)

## Study on Meat Tenderizer

### Part II. Tenderizing ability of Enzyme from *Asp. oryzae*

\*Jung-Hee Lee, Kun-wha Kim, Ju-hyun Yu and Ryung Yang  
Department of Food engineering Yon Sei University,

(Received October 2, 1975)

#### Abstract

An attempt was made to utilize the enzyme produced by *Asp. oryzae* as meat tenderizer. The production, purification, and various properties of proteinase produced by *Asp. oryzae* were investigated. Results obtained are as follow;

1. A strain which had the highest proteolytic activity was selected among 9 *Aspergillus* species.
2. Culture medium consisted of wheat bran 10g, 2% glucose, 0.03% urea and 0.1%  $MgSO_4$  (pH 6.5). Mold was incubated at 30°C for 3 days.
3. Enzyme extract from culture medium were fractionated with ammonium sulfate and purified by Sephadex G-75 column chromatography.
4. When pH of reaction mixture was controlled, maximal activity of proteinase by *Asp. oryzae* was obtained at pH 3, pH 6.6, 8.4~8.5 and pH 10.0 to 10.5. Those results were interpreted to show that enzyme consists of acid proteinase, neutral proteinase and alkaline proteinase. Enzyme was stable at pH 6 to 10.
5. Opt. temperature for proteinase activity was 50°C, but enzyme was stable up to 40°C.
6. The proteinase was inhibited by  $Ag^+$ . It was also inhibited by EDTA.
7. When myofibrillar proteins were treated by proteinase from *Asp. oryzae*, ATPase activities of myofibrillar proteins changed remarkably. Accordingly, it was concluded that proteinase produced by *Asp. oryzae* were able to be used as meat tenderizer.

\* 수도여자사범대학 식품영양학과

\* Department of Food and Nutrition Soodo Women's University

## 結 論

제 1 보에서 著者들은 市販 meat tenderizer의 연육 효과에 대하여 검토하였다<sup>(1)</sup>. 그 결과, 보다 효과적이며 생산 가격이 저렴한 meat tenderizer의 제조가 요청된다고 생각되었다. 물론 일찍부터 meat tenderizer로 식물성 단백질 분해 효소인 papain 등이 실용화되고 있으나 그 연육효과에 대하여서는 panel test에 의한 것이 대부분으로 고기의 tenderness에 관한 근거 있는 분석으로 실험실에서 규명된 일이 거의 없으므로 연육효과에 대한 본질적인 검토가 필요하다고 생각되는데, 이것은 근수축현상에 대한 본질적인 해명이 최근에 와서야 납득이 갈만큼 풀이 되어가고 있으며 따라서 고기의 tenderness에 관한 분석도 최근에 이르러서 그 연구 방법이 정리되어가고 있기 때문이다. 뿐만 아니라 식물성 단백질 분해 효소는 식물체로 부지의 추출, 정제의 면에서나 그 생산량의 면에서 미생물 생산효소의 추출 및 생산량에 필적하기 어렵다고 생각되므로 미생물생산효소를 meat tenderizer로 이용하는 것이 바람직하다고 생각되었다.

현재까지 많은 종류의 미생물들이 단백질 가수분해 효소를 형성한다는 사실이 알려져 있으며 공업적으로 이용되고 있는 것도 많다.

일찍이 Crewther 등은 *Asp. oryzae*가 Protease를 생산한다는 사실을 밝혔는데<sup>(2)</sup>, 그들은 Protease생산을 위한 배양방법으로써 액체배양법을 사용하였다<sup>(2,3)</sup>. 한편, Dworschack과 Specht는 통기배양법으로 배양하였을 때 *Asp. oryzae*가 protease를 생산하였음을 밝혔고<sup>(4,5)</sup> Matsushima와 Maxwell은 고체배지에서 배양시켰을 때 *Asp. oryzae*가 강한 단백질분해력의 효소를 생산하였음을 보고하였다<sup>(6,7)</sup>. Hagihara는 많은 연구자의 데이터를 정리하여 *Asp. oryzae*가 3종류의 단백질 분해효소를 생산하고 있다고 총괄하였다<sup>(8)</sup>. 최근에 와서 Kundu 등은 밀기울로 고체 배양하였을 때 *Asp. oryzae*가 강한 단백질 분해효소를 생산하였고, 그 효소는 collagen 가수분해에도 이용할수 있음을 밝혔다<sup>(9)</sup>. Nordwig 등도 *Asp. oryzae*가 생산하는 단백질 가수분해효소가 collagen chemistry에 이용할수 있는지를 검토하고, 천연 collagen 분자를 절단할수 있다고 보고 하였다<sup>(10,11)</sup>. Misaki 등이 *Asp. oryzae*가 생산하는 Protease를 체계적으로 분리, 정제하여 각각 결정화시키므로써 acid protease, neutral protease, alkaline protease의 존재를 확인하였는데, neutral protease는 결정화되지 않았으나 단일 성분이었다는 것과 그밖에 semi-alkaline protease가 존재하고 있음을 보고 하고 있다<sup>(12)</sup>. Sekine 등은

neutral protease가 두개의 효소의 혼합물임을 밝혔고<sup>(13)</sup> Nakadai 등은 neutral protease I과 II가 각각 41,000과 19,300의 분자량을 갖는다고 보고하고 있다<sup>(14,15)</sup>.

그러나 이상과 같은 연구자들은 어디까지나 효소화학적 연구로 protease의 분리, 정제 및 그 성질의 규명을 위한 연구였다.

본 연구에서는 이들의 연구를 기초로하여 *Asp. oryzae* 생산 protease가 myofibrillar protein의 성질에 현저한 변화를 일으키며 따라서 meat tenderizer로서 이용할수 있는지를 밝히려는데 그 목적을 두고 있다.

## 材 料 및 方 法

### 1. 菌 株 의 選 定

延世大學校 食品工學科에 보존되어 있는 9종류의 *Asp. oryzae*중에서 효소생산량이 가장 많은 균을 선정하였다. 즉, 10g의 밀기울에 tap water 7ml를 첨가, 가압살균한 다음 30°C에서 3일간 배양하여 추출액의 단백질분해능력이 가장 우수한 균을 선택하였다.

### 2. Protease activity의 측정법

단백질 가수분해 효소의 활성은 Anson의 방법을 약간 수정하여 측정하였다<sup>(16)</sup>. 즉, 0.6% Casein용액 (40 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.6) 5ml에 효소액 1ml를 첨가하여 30°C에서 10분간 반응시킨 다음 5% TCA 5ml를 가하여 반응을 정지 시켰다. 600×g에서 원심분리시킨 후 상등액 2ml에 0.55M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 5ml를 가하고 phenol시약 1ml를 가하여 혼합, 발색시켜 30분 방치후에 Hitachi model 101 spectrophotometer로 660mμ에서 O.D를 측정하였다.

효소단위는 위와같은 조건에서 1분간에 1μg의 tyrosine을 생성시킬때를 1 unit로 하였다.

근원섬유 단백질에 대한 *Asp. oryzae* 생산 protease의 활성은 반응전후의 280mμ에서의 ΔO.D의 값으로 나타내었다.

### 3. Gel filtration

Sephadex G-75 column (2.5cm×36cm)에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 포화분별 및 투석의 결과 얻어진 효소활성분분을 유속 8~12ml/min으로 용출 시키고 5ml 시험관에 분획하여 효소활성을 측정하였으며 단백질 농도는 280mμ에서의 O.D 및 Lowry법에 의한 tyrosine equivalent법으로 측정하였다<sup>(17,18)</sup>.

### 4. Myofibril 및 Actomyosin의 調製

myofibril과 actomyosin을 조제하기 위하여 소의 lon-

gissimus dorsi muscle과 닭의 pectoralis muscle을 切取하였다. muscle에서 fat와 connective tissue를 가능한 한 제거하고 chopping하였으며 myofibril 및 actomyosin 조제의 sample로 하였다. 저장의 필요가 있을 경우에는 부패방지를 위하여 10mM sodium azide용액을 고기 표면과 은기에 spray하여주고 4°C에서 저장하였다.

myofibril은 梁동희의 방법<sup>(19,20)</sup>으로 조제하였다. Actomyosin은 Weber-Edsall 용액<sup>(21)</sup>을 사용하여 Szent-György 原法<sup>(22)</sup>으로 추출정제하였다.

5. AT Pase 活性測定<sup>(20)</sup>

반응액조성은 효소단백질 농도들 0.125mg/ml 내지 0.25mg/ml로 하고 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATP 및 25mM Tris-HCl 용액(pH 8.0)의 반응액에 KCl용액으로 이온 강도를 조절하여 30°C에서 5분간 반응시켰다. 최종농도 4%의 TCA로 반응을 정지시켜 유리된 무기인(Pi)을 molybdate-sulfate 법으로 발색시켰다.

ATPase 활성은 1mg의 단백질에 의하여 1분동안에 유리되는 무기인(Pi)의  $\mu$ mole로 표시하였다.

6. 단백질농도 측정

280m $\mu$ 에서의 흡광도로 측정하거나 Folin-lowry법<sup>(17,18)</sup>을 이용하여 500m $\mu$  또는 750m $\mu$ 에서의 흡광도로 측정하였으며 검량선은 egg albumin으로 작성하였다.

근육단백질의 농도는 biuret 법<sup>(23)</sup>으로 측정하였다. Biurat법의 검량선은 serum albumin으로 작성하여 micro-kjeldahl법으로 검정하였다.

結 果 및 考 察

1. Protease 생산을 위한 *Asp. oryzae* 배양조건

보존균주를 사용하여 protease를 생산하기 위하여 먼저 최대의 효소형성을 위한 균주배양조건을 검토하였다.

Table 1. Optimum composition of medium

wheat bran	10g
glucose	2%
urea	0.03%
MgSO <sub>4</sub>	0.1 %
Tap water	130%
Temp	26°C
pH	6.5
incubation time	3 days

table 1에서 보는 바와 같이 밀기울 10g, tap water 130%, pH 6.5가 선정되었으며 N원으로는 Urea가

가장 좋은 결과를 나타내었다. 무기질로서는 0.1% FeSO<sub>4</sub>도 양호한 결과를 나타내기도 하였으나 최대의 효소형성은 0.1% MgSO<sub>4</sub>가 첨가될때 이루어졌다.

Kundu등은<sup>(9)</sup> 밀기울로 30°C에서 3일간 배양하였을 때 강한 gelatin 및 casein가수 분해효소를 생산하였으나 통기배양법이나 정지배양법으로는 효소형성에 거의 없었다고 보고하고 있으며, 徐<sup>(24)</sup>역시 neutral protease의 생산을 위한 배저로서는 밀기울과 CaCO<sub>3</sub>을 이용하고 있으며 30°C에서의 3일간의 배양조건을 선정하고 있다. Misaki등도 *Asp. oryzae*의 Protease 생산배저로서 wheat bran solid medium을 사용하고 있다<sup>(12)</sup>. 이러한 사실들은 wheat bran solid medium을 이용하고 더욱 효소형성은 높이기 위하여 glucose, urea, MgSO<sub>4</sub>등을 보강한 저자들의 최적배저조성의 타당성을 높여주는 것으로 풀이되었다.

2. 酵素液의 調製

선정된 최적배저 조성으로 *Asp. oryzae*를 배양하고 5배량의 증류수를 가한다음 마쇄하고 3시간동안 추출한 뒤 Ammonium sulfate으로 鹽析시켰다.

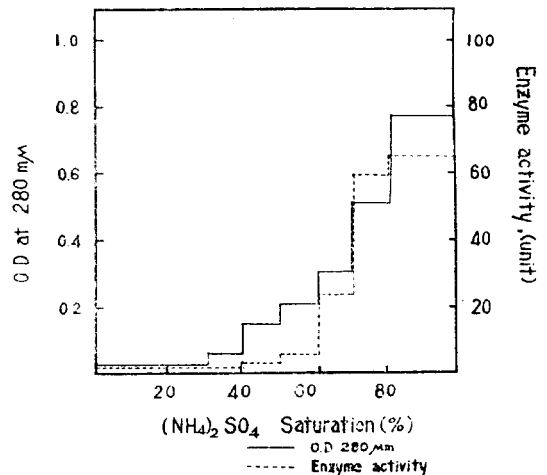


Fig. 1. Salting out curve of crude enzyme solution

Fig. 1에서 보는 바와 같이 protease 활성성분은 40% 포화구분까지는 거의 나타나지 않고 40%~60% 포화구분에 약간 존재하나 60%~80% 포화구분에 대부분 존재하고 있다. Masaki등도 밀기울배저중에서 형성되는 *Asp. oryzae*의 생산효소중에서  $\alpha$ -amylase는 40%~60% 포화구분에, protease는 50%~80% 포화구분에 존재한다고 보고하고 있으며<sup>(12)</sup> 徐도 35%~75%포화구분으로부터 protease를 조제하고 있으므로 *Asp. oryzae* 생산 protease는 40%~80%포화구분에 존재하는 것으로 생각되었다.

40%~80%포화구분에 형성된 침전을 2,000×g에서 원심분리하여 얻고 Visking tube로 증류수에 대하여 20시간 투석한 다음 투석내액을 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 再鹽析시켜 원심분리하여 얻은 침전을 20시간투석, 투석내액을 gel filtration 시켰다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 활성구분은 fraction No. 14로부터 22까지로, 활성이 높은 fraction No. 15~19를 모아 중간정제의 효소액으로 하였다.

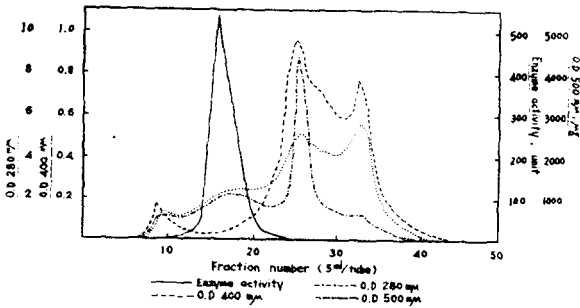


Fig. 2. Sephadex G-75 chromatograph of Enzyme solution

본 연구는 *Asp. oryzae* 생산 protease가 meat tenderizer로서 이용할수 있는지를 검토하는것이 연구의 주된 목적이므로 중간정제의 효소액으로 그 성질을 조사하고 다음단계의 실험을 시행하는 것이 합리적이라고 생각 되었다.

Fig. 2에서 400mμ에서의 흡광도는 공존색소의 溶離現象을 관찰하기 위한 것이다. Fig. 2는 본 효소액중에 자외선흡수물질(280mμ에서의 흡광도의 분포) 및 phenol시약 환원성물질(500mμ에서의 흡광도의 분포)이 다량 함유되어 있음을 나타내어 주고 있으며 또한 이러한 물질들은 gel filtration에 의하여 효과적으로 분리시킬수 있음을 보여주고 있다.

Crude enzyme 용액에서 부터 salting out 및 gel filtration에 이르는 과정에서의 비활성의 증가는 table 2에 나타내었다.

Table 2. Purification of protease

Procedure	Activity (O.D. 660mμ)	E1ml at 1cm at 280mμ	Specific activity
Crude enzyme solution	0.032	0.970	100
Dialysed product	0.260	0.730	1090
Gel filtration on Sephadex G-75	0.176	0.078	7140

total volume, total activity 및 yield는 나타내지 않았으나 비활성은 gel filtration에 의하여 약 71배 증가

되고 있다.

### 3. *Asp. oryzae* 생산 protease의 성질

*Asp. oryzae* 생산 protease의 작용최적 pH를 구하기 위하여 pH 2~13까지 0.5 pH단위로 phosphate buffer, Tris-HCl buffer 및 glycine-NaOH buffer를 사용하여 시험하였다. 산성영역에서 casein의 산응고에 의한 오차를 막기 위하여 pH 2에서 6까지는 hemoglobin을 기질로 사용하였고 pH 6에서 13까지는 casein을 기질로 사용하였다.

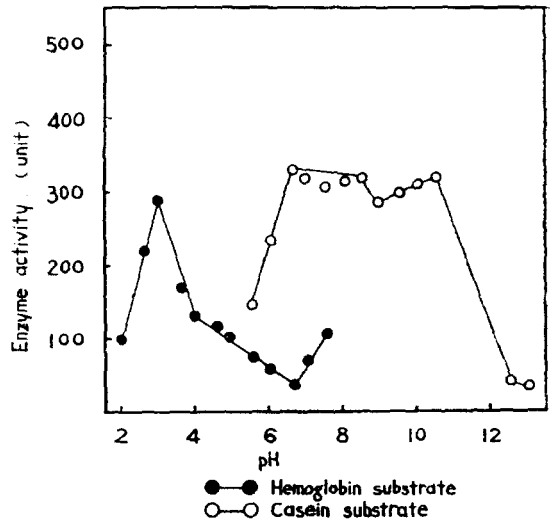


Fig. 3. Effect of pH on protease activity

Fig. 3에서 보는 바와 같이 protease 활성은 pH 3, 6.6, 8.4~8.5, 10.0~10.5에서 각각 높은 값을 나타내었다. 이 결과는 조제된 효소가 3~4종류의 복합효소제이거나 혹은 각각의 pH에서 서로 다르게 작용하는 3종류 이상의 官能基(functional group)의 해리와 효소활성이 밀접하게 관계되는 것이거나 둘중의 하나라고 생각되었다. 그러나 일찌기 Hagihara가 *Asp. oryzae*는 3종류의 protease를 생산한다는 사실을 밝혔고(8) Misaki등은 최근에 *Asp. oryzae* 생산 protease를 acid protease, neutral protease, semi-alkaline protease 및 alkaline protease를 분리정제하여 그 성질을 규명하고 있다(12).

이러한 사실로 위의 활성-pH관계가 酵素活性中心의 官能基의 해리와 관련되는 것이라기 보다는 본 연구에서 조제된 효소가 3종류 내지는 4종류의 복합효소제임을 나타내는 것으로 해석되었다. 그러나 본 연구의 목적상 acid-protease, semi-alkaline protease 및 alkaline protease는 불필요하므로 neutral protease만을 선택하여 이후의 실험조건에 있어서의 최적 pH는 7.0으로 선

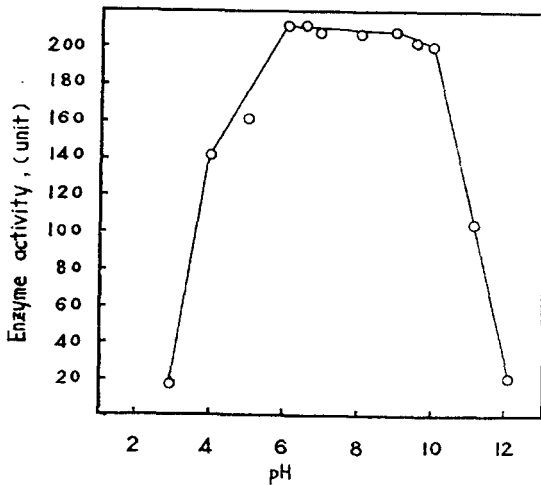


Fig. 4. pH stability of Enzyme

정하였다.

Fig. 4는 본 효소의 pH안정성을 나타낸 것이다. Fig. 4는 각각의 pH에서 30°C 3시간 incubation하고나서 최적반응 조건에서 殘存活性을 측정된 것으로 본 효소는 6에서 10까지의 pH범위에서 안정하다는 것을 나타내고 있다. 徐는 결정 neutral protease의 pH안정성을 5.5에서 9까지라고 발표하고 있으나<sup>(24)</sup> Nakadai등은 neutral protease I의 pH안정성은 5.5에서 12.0까지라고 하였으며, 더욱이 그들은 효소를 37°C에서 3시간 방치하고 있다<sup>(14)</sup>. 그러므로 Nakadai 등의 neutral protease I과 비교하면 본 효소의 pH안정성을 뒤떨어지나 본 연구에서의 효소액은 복합효소제이므로 보다 정밀한 검토를 가한뒤에 비교되어야 한다고 생각되었다.

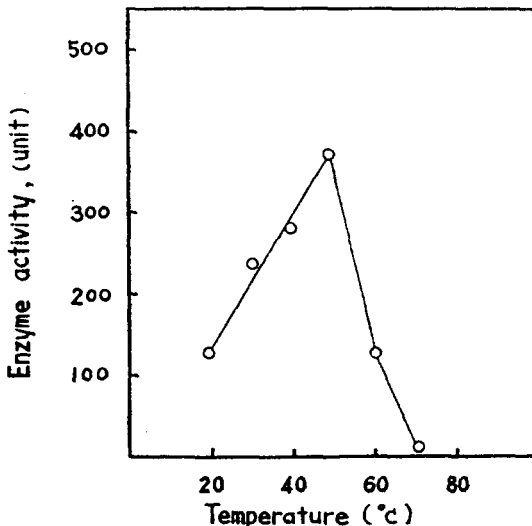


Fig. 5. Effect of temperature on protease activity

Fig. 5는 효소활성에 대한 반응온도의 영향을 나타낸 것으로 45°C~50°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다. Kundu 등은 pH 6.5에서 측정하는 경우 최적온도는 37°C~40°C라 하였고<sup>(9)</sup>, Misaki 등은 neutral protease의 최적온도를 53°C~55°C라 하였다<sup>(12)</sup>. 따라서 본 연구에서 얻어진 효소는 최적온도에 관한 한 *Asp. oryzae* 생산 neutral protease에 관한 다른 연구보고와 큰 차이를 나타내지 않고 있다고 결론 되었다. 그러나 본 효소를 meat tenderizer로 사용하는 경우 常溫축에서 강한 단백질 분해력을 갖고 있는 동시에 열안정성이 높아 고온축에서도 단백질분해력을 지속시키는 것이 바람직하다고 본다. 왜냐하면 제 1보<sup>(1)</sup>에서도 논의하였듯이 조리시에 가열에 의하여 근육단백질은 열수축을 일으키므로 열수축이 일어나기 전에 단백질 분자를 절단하므로서 열수축에 의한 고기의 硬化가 방지된다면 meat tenderizer로 적합하다고 볼수있으며, 따라서 열수축을 일으키는 70°C정도에 까지 효소활성이 충분히 잔존되어야 한다고 보기 때문이다.

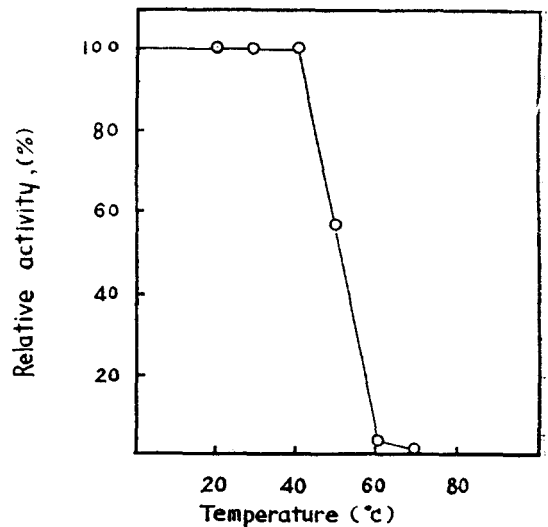


Fig. 6. Heat stability curve of protease

Fig. 6은 효소의 열안정성을 나타내고 있다. 40°C까지는 안정하였으나 50°C에서는 활성은 약 50% 감소되었으며 70°C에서 완전히 熱變性을 일으켜 失活되었다. 본 효소가 50°C에서 불안정함에도 불구하고 최적온도가 50°C인 사실은 본 효소의 활성발현에는 단백질 고차구조에 어떤 변형(transformation)이 일어나야 한다는 것을 나타내는 것으로 추정되었다.

Misaki의 neutral protease는 55°C까지 안정하였으나<sup>(12)</sup> Nakadai의 neutral protease I은 40°C까지는 안정하였으나 50°C에서 서서히 변성이 일어나 70°C에서 완전히 失活하고 있으며<sup>(14)</sup>, 徐의 neutral protease<sup>(24)</sup> 역,

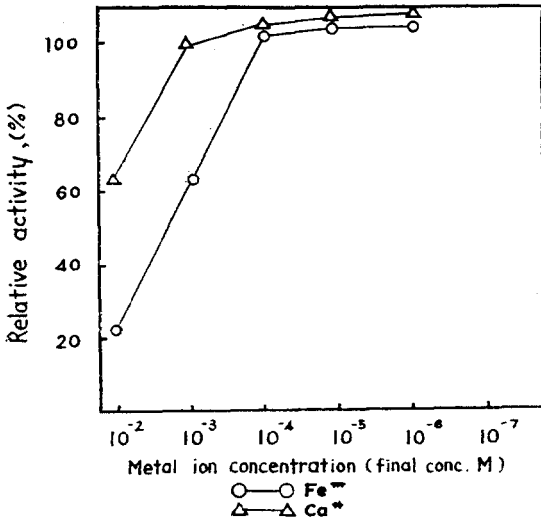


Fig. 7. Effect of metalions on protease activity

시 40°C까지는 안정하였으나 50°C에서는 50% 이하로 감소하고 있다. 이러한 결과들로부터 *Asp. oryzae* 생산 neutral protease의 열안정성은 40°C~50°C인 것으로 결론되었다.

Fig. 7은 효소활성에 미치는 금속 ion의 영향을 나타낸 것이다.

많은 연구자들이 bacterial protease가 metalloenzyme임을 밝혔고(25-30) *Asp. oryzae* 생산 protease가 EDTA에 의하여 不活性化한다는 사실(9,31)과 *Asp. sojae* 생산 neutral protease가 Z<sup>++</sup>을 포함하는 Metalloenzyme 이

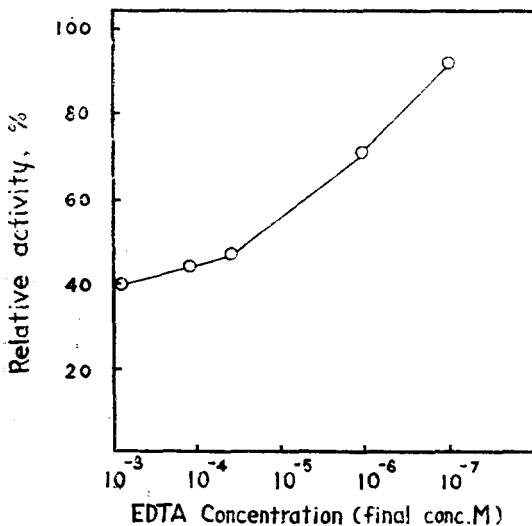


Fig. 8. Effect of EDTA concentration on protease activity

라는 사실(32)로 부터 본 효소가 금속 ion에 의하여 어떠한 영향을 받는가를 검토한 것이다.

Fig. 7에서 보는바와 같이 본 효소는 10<sup>-2</sup>M이상의 Fe ion과 Ca ion에 의하여 저해되나 10<sup>-4</sup>M이하의 농도에서는 영향을 받지 아니하며 10<sup>-7</sup>M이상의 EDTA에 의하여서는 활성이 저하되나 EDTA의 농도가 희박함에 따라 활성이 저해받지 아니하는 결과(Fig 8)로부터 본 효소의 활성발현에는 미량의 2가 이온이 필요하다고 결론되었다. 그러나 본 효소는 Ag이온에 의하여 강하게 저해를 받았다. (Table 3)

#### 4. Myofibrillar protein의 ATPase활성에 미치는 *Asp. oryzae* 생산 protease의 영향

제 1 보(1)에서 언급한바와 같이 저장중에 있어서의

Table 3. The effect of metal ions on the enzyme reaction

Kinds of metal	Relative activity (%)
None	100
CaCl <sub>2</sub>	57
BaCl <sub>2</sub>	83
AgNO <sub>3</sub>	0
MgCl <sub>2</sub>	83
(Fe) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	19
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	74
Pb(Ac) <sub>2</sub>	88
K <sub>2</sub> K <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	100

고기의 軟化 mechanism에 대하여서는 아직도 잘 알려져 있지 않다. 많은 사람들의 研究에 의하면 고기의 軟化에 있어서의 근육조직내 단백질 분해효소의 역할에 대하여서는 不定的인 결과를 나타내고 있으며 肉基質蛋白質(結締組織) 역시 아무런 變化를 일으키지 않는다고 했다(33-37). 그런데 Fujimaki 등은(40,41) 저장중의 고기의 軟化는 筋原纖維의 變化에 의한 것으로 발표하였고 실제로 死後硬直(rigor mortis)은 筋原纖維인 myosin과 actin의 association에 의한 것임이 확실하여졌다. 따라서 meat tenderizer로서의 酵素의 응용에 대한 연구는 그 酵素가 筋原纖維蛋白質에 대하여 酵素活性을 갖고 있으나 없느냐는 문제가 중요한 작업 메-마가 된다. Fukazawa 등(38,39)도 sausage 製造時에 物性에 중요한 영향을 미치는 key compound는 myosin이라 하였다.

본 연구의 목적은 meat tenderizer로서의 이용에 있으므로 meat tenderizer의 필수조건 몇가지를 알아보기로 하였다. 즉, protease라고 해서 전부가 meat tenderizer가 되는것은 아니고 meat tenderizer가 되려면 근

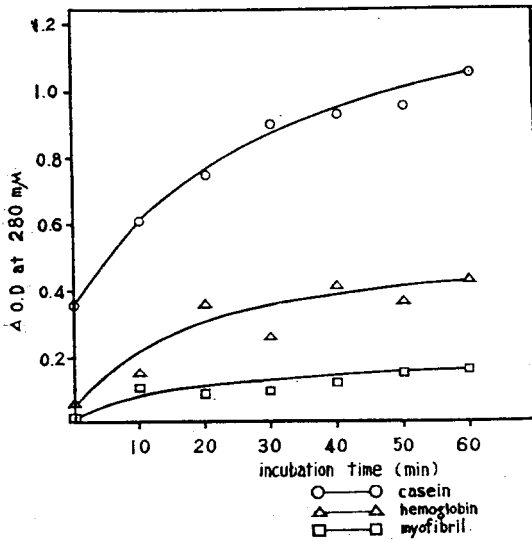


Fig. 9. Degradation of protein by protease from *Asp. oryzae*

원섬유 구성단백질 및 결합조직 형성단백질에 대한 기질선택성이 커야하므로 따라서 몇가지 단백질에 대한 기질 선택성을 알아 보았다.

Fig. 9에서 보는 바와같이 casein에 대해서는 강한 proteolytic activity를 나타내지만 牛乳단백질이므로 고기의 tenderness에는 별의미가 없고<sup>(1)</sup>, 근육단백질중에서 水溶性단백질에 속하는 hemoglobin에 대해서는 강한 proteolytic activity를 나타내고 있으며 기질로서 충분하다.

Casein이나 hemoglobin에 비하면 근원섬유단백질인

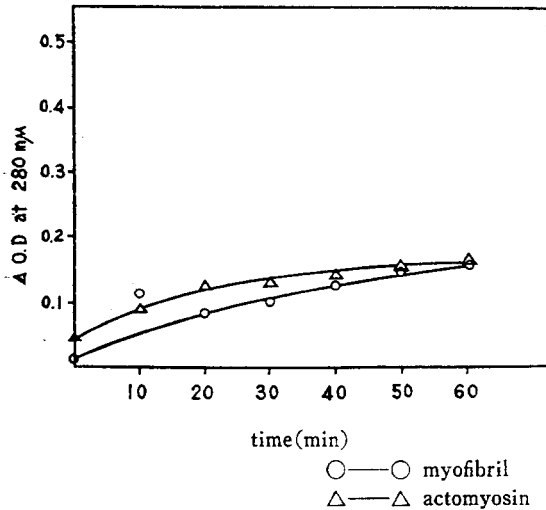


Fig. 10. Degradation of myofibrillar protein by protease from *Asp. oryzae*

myofibril에 대하여서는 낮은 기질 선택성을 나타내고 있으나 280mμ에서의 ΔO.D의 값으로 나타내고 있으므로 보다 정밀한 검토를 가하기로 하였다.

Fig. 10은 myofibril과 actomyosin에 대한 기질선택성을 비교한 것으로 양자 사이에 큰차이는 없는 것으로 나타내고 있다.

myofibril에는 actomyosin을 비롯한 7종류의 단백질이 들어 있으므로<sup>(20)</sup> actomyosin의 다른 5종류의 단백질에 대한 기질선택성을 검토하기 위한 것이었으나 Fig. 10의 결과에 따르면 본 효소가 myofibril중의 actomyosin에 대하여 강한 선택성을 갖고 있는 것으로 나타내고 있다.

근원섬유 단백질인 경우에는 그 生物活性(ATPase activity)을 추구하므로서 단백질의 형태변화를 추적하는 방법이 확립되어 있으므로 본 효소로 처리되어 있을때 근원섬유단백질의 生物活性이 어떻게 변하는가를 알아보았다.

Fig. 11에서 보는 바와 같이, chicken pectoralis mu-

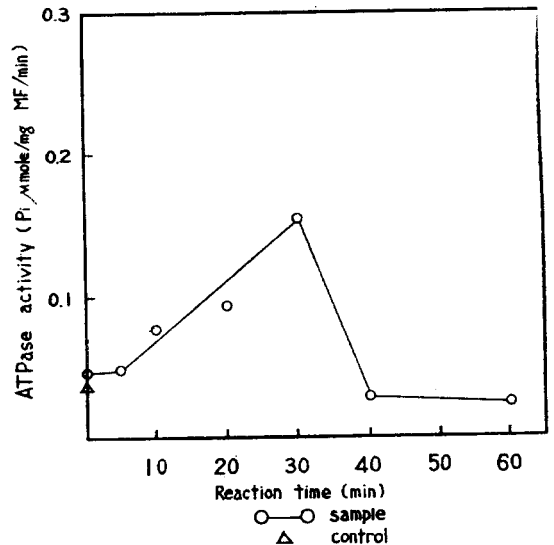


Fig. 11. Mg-ATPase activity of myofibril from chicken treated by protease

scle로부터 얻어진 myofibril의 ATPase 활성에 대하여서 본 효소는 현저한 영향을 미치고 있다.

처리 30분만에 myofibril의 Ca-ATPase 활성은 무처리 control 보다 4배이상 증가되고 있다. 이 결과는 myofibril의 형태가 처리에 의하여 ATP가 확산 침투되기 쉬운 상태로 변화하고 있음을 나타내는 것으로 meat tenderness의 관점에서 바람직한 변화가 일어나고 있음을 나타내는 것이다. 처리 40분 뒤 부터는 감소하고 있는데 이것은 myofibril의 ATPase의 활성중심이 효소

에 의하여 파괴되고 있음을 나타내고 있다.

동물의 종류에 따른 차이를 알아보기 위하여 소의 longissimus dorsi muscle로 부터 추출된 actomyosin에 대한 영향을 조사하였다.

Table 4. Ca-ATPase activity of actomyosin from bovine treated by purified enzyme

처리시간 (min)	ATPase activity	
	treatment	control
5	0.275	0.180
20	0.475	0.190
40	0.400	0.160
60	0.410	0.125
80	0.390	0.125

Table 4에서 보는 바와 같이 소의 actomyosin인 경우도 처리 60분까지 활성은 현저하게 증가되고 있으며 80분 처리에서 감소하기 시작하고 있다. 따라서 소의 근육인 경우에도 다름없는 기질 선택성을 갖고 있는 것으로 풀이 되었다. 이러한 결과는 근원섬유단백질에 대한 trypsin처리와 같은 효과<sup>(20)</sup>를 나타내는 것으로 본 효소가 myofibril을 절단 내지는 그 미세구조를 변화시켜 보다 loose한 형태로 변화 시키는 것을 말하여 주는 것이다.

이러한 결과들을 종합하여 저자들은 *Asp. oryzae* 생산 protease가 meat tenderizer로 충분히 이용될 수 있다고 결론 지었다.

要 約

Protease生産을 위한 *Asp. oryzae*의 培養條件, 生産酵素의 精製 및 精製酵素의 肉軟化에 관한 效果에 對하여 研究 하였다.

*Asp. oryzae*가 生産하는 proteolytic enzyme이 肉軟化에 미치는 影響을 조사한 結果는 다음과 같다.

1. *Asp. oryzae*를 밀기울에 固體培養한 結果 最適條件은 培養日數 3일, 散水量 130%, pH 6.5와 炭素原으로는 glucose 2%, 질소원으로는 urea 0.03%, mineral salts로 MgSO<sub>4</sub> 0.1%가 가장 좋았다.

2. *Asp. oryzae* 固定배양액으로 부터 酵素를 抽出하고 그 추출액으로 부터 硫酸鹽析 및 Sephadex G-75 column chromatography에 의하여 精製하였다.

3. 精製된 enzyme은 酸性에서는 hemoglobin, 中性, alkali性에서는 casein를 基質로 사용한 結果 作用最適 pH가 3.0, 6.6, 8.4~8.5, 10~10.5이었으며 pH의 安定性범위는 pH 6~10이었다.

4. 最適溫度는 50°C 이었으나 安定性은 40°C 까지였다.

5. Metal ion 및 EDTA에 미치는 영향은 protease는 Ag ion에 저해 되었다. 또 ion 농도가 낮아질에 따라 금속 ion에 의한 阻害는 감소되었다. EDTA에 의하여 시도 阻害되었다.

6. Chicken과 bovine으로부터 myofibril과 actomyosin을 抽出 精製하여 attack시킨 結果 筋原纖維蛋白質의 MgATPase活性 및 Ca-ATPase活性은 현저하게 變化하였다. 따라서 本 酵素는 軟肉素로서 利用할 수 있음을 알았다.

REFERENCES

- 1) Yang, R., Kim., K.W. Lee, J.H. and Yu, J.H., *Korean J. Food Sei Technol.* this Journal (part I).
- 2) Crewther, M.G and Lennox, F.G., *Nature*, 165, 680 (1950).
- 3) Maxwell, M.E., *Australian J. Sci. Res.*, 5, 42 (1952).
- 4) Dworschack, R.G., *Arch. Biochem. Biophys.* 41, 48 (1952).
- 5) Specht, H., *Naturwissenschaften* 44, 37 (1957).
- 6) Matsushima, K.J. *Ferment. Technol.*, 31, 367 (1953).
- 7) Maxwell, M.E., *Australian J. Appl. Sci.*, 1, 348 (1950).
- 8) Hagihara, B. *The Enzymes* (Boyer, Lardy and Myrbäck, eds). vol. 4. p. 193, Academic Press, New York (1960).
- 9) Kundu, A.K., Das, S, Manna, S. and Pal, N., *Appl. Microbiol.*, 16, 1799 (1968).
- 10) Nordwig, A. and Jahn, W.F., *European J. Biochem.*, 3, 519 (1968).
- 11) Nordwing, A. and Bretschneider, G., *Biochem. Biophys. Acta*, 250, 408 (1971).
- 12) Masaki, T., Yamada, M., Okazaki, To and Sawada, J. *Agr. Biol. Chem.*, 34, 1383 (1970).
- 13) Sekine, H., Nasuno, S. and Iguchi, N., *Ag. Biol. Chem.*, 34, 1690 (1970).
- 14) Nakadai, T., Nasuno, S. and Iguchi, No., *Agr. Biol. chem.*, 37, 2695 (1973).
- 15) Nakadai, T., Nasuno, S. and Iguchi, N., *Ibi.*, 37, 2703 (1973).
- 16) Anson, M.L., *J. Gen. physiol.*, 22, 79 (1938).



- 17) Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L. and Randall, R.J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 18) Miller, G.L., *Anal. chem.*, **31**, 964 (1959).
- 19) Yang, R., Okitani, A. and Fujimaki, M., *Agr. Biol. chem.*, **34**, 1765 (1970).
- 20) Yang, R., Kim, C.J., Moon, Y.H. and Yu, J.H., *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **26**, 79 (1974).
- 21) Briskey, E.J. and Fukazawa, T., *Adv. in Food Res.* **19**, 279, Academic Press, New York (1971).
- 22) Szent-György, A., *Chemistry of Muscle Contraction*, 2nd rev. eds., Academic Press, New York (1951).
- 23) 연세대학교 식품공학과편, 식품공학실험서 제 1 권, p. 345, 탐구당발행 (1975).
- 24) Suh, H.W., *Kor. J. Microbiol.*, **9**, 163 (1971).
- 25) Mc Conn, J. D., Tsuru, D. and Yasunobu, K.T., *J. Biol. chem.*, **239**, 3706 (1964).
- 26) Keay, L., Feder, J., Garrett, L.R., Moseley, M.H. and Cirulis, N., *Biochem. Biophys. Acta*, **229**, 829 (1971).
- 27) Feder, J., Keay, L., Garrett, L.R., Moseley, M. H. and Wildi, B.S., *ibid.*, **251**, 74 (1971).
- 28) Latt, S.A., Halmquist, B. and Vallee, B.L., *Biochem. Biophys. Res. commun.*, **37**, 333 (1969).
- 29) Miyada, K., Tomoda, K. and Isono, M., *Agr. Biol. chem.*, **35**, 460 (1971).
- 30) Griffin, T.B. and Prescott, J.B., *J. Biol. chem.*, **245**, 1348 (1970).
- 31) Sekine, H., *Agr. Biol. chem.*, **36**, 207 (1972).
- 32) Sekine, Ho, *ibid.*, **36**, 2143 (1972).
- 33) E. Wierbicki, L.E. Kunkle, V.R. Cahill and F.E. Deatherage, *Food Tech.*, **8**, 506 (1954).
- 34) M. Fujimaki, *Nippon Negeikagaku Kaishi*, **32**, 629 (1958).
- 35) F.C. Parrish Jr., D.E. Goll, W.J. Newcomb II, B.O. de Lumen, H.M. Chaudhry and E.A. Kline, *J. Food Sci.*, **34**, 196 (1969).
- 36) J.R. Whitaker, *Advances in Food Research*, **9**, 1 (1959).
- 37) D.R. Buege and J.R. Stouffer, *J. Food Sci.*, **39**, 402 (1974).
- 38) Fukazawa, T., Hashimoto, Y., and Yasui, T. Effect of storage conditions of some physicochemical properties in experimental sausage prepared from fibrils. *J. Food Sci.* **26**, 331 (1961).
- 39) Fukazawa, T., Hashimoto, Y., and Yasui, T. Effect of some proteins on the binding quality of an experimental sausage. *J. Food. Sci.* **26**, 541 (1961).
- 40) M. Fujimaki, N.A. Okikani and N. Arakawa, *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 581 (1965).
- 41) M. Fujimaki, N. Arakawa, A. Okitani and O. Takagi, *J. Food Sci.*, **30**, 937 (1965).