

蛋白質 分解酵素 添加時 牛肉의 熟成에 關한 研究

VII. Papain 處理 牛肉의 組織學的 考察

尹 政 羲

서울 保健 專門學校 食品工業科

(1977년 8월 22일 수리)

Studies on the Aging of Bovine Muscle at Adding the Proteolytic Enzyme

VII. Studies on the Histological Observation of Bovine Muscle Treated with Papain

by

Jung-Eui Yoon

Seoul Health Junior College. Dept. of Food Technology. Seoul, Korea.

(Received, August 22, 1977)

Abstract

Treating with step concentration of papain, round muscle of Korean cattle were cut in longitudinal and cross section and stained.

Collagenous fibre and elastic fibre of its connective tissue were observed microscopically.

The results were as follows:

1) In proportion to the increase of enzyme concentration amorphous bundle of collagenous fibre were loosed gradually and destroyed in the long run and besides the property of this fibre stained became remarkably weak.

2) Elastic fibre was paralleled to muscle fibre and in proportion to the increase of enzyme concentration, it was lost elasticity, loosed, straightened and broken remarkably to pieces.

3) Histological variation of collagenous fibre and elastic fibre treated with enzyme was more remarkable than control.

序 論

蛋白質食品의 質的 向上을 爲한 物理的 研究도 重要하나 著者는 本試驗에서 生物學的으로 基礎가 되는 組織學的인 面에서 研究하고 그 變化를 추적하기로 하였다.

많은 研究者⁽¹⁻⁶⁾들이 牛肉의 fibre protein에 關한 組織學的인 染色液의 調製 및 染色方法을 案出하였으며 이러한 組織學的인 研究를 통하여 근섬유에 대한 많은 識見이 얻어지고 있다.

Brady 등⁽⁶⁾ 일반적으로 가축의 연령이 增加함에 따라 muscle fibre의 직경은 커지며 1년생 송아지가 平均 58.8 μ 성숙한 암소는 平均 70.9 μ 이라고 報告하였으며 Hiner 등⁽⁷⁾은 muscle fibre의 직경차이는 tenderloin;

chuck, eith rib, short loin, loinend; round, neck, forshank muscle의 섬유사이에서 tenderness와 相關關係가 있다고 하였다.

Wang⁽⁸⁾은 牛筋肉 組織에서 microbial enzyme인 protease 15, Rhozyme P-11은 Collagenous fibre와 elastic fibre에 대하여 거의 變化를 일으키지 않았으며 plant enzyme에서는 ficin이 bromelin보다 collagenous fibre와 elastic fibre에 대하여 현저하게 染色 및 形態의 變化를 일으켰다고 하였다.

Wang 등⁽⁹⁾은 筋肉의 組織 切片을 slide glass에 부착시킨 다음 染色하고 enzyme solution으로 mounting하여 觀察한 結果 perimysium internum에 있어서의 elastic fibre의 size는 thick fibre가 3.5~6.5 μ , thin fibre가

0.5~0.8 μ 이라고 보고하고 있다.

Goll등⁽¹⁰⁾은 筋肉에 있어서 collagenous fibre의 含量은 가축의 연령에 따라 增加하지 않는다고 하였으나 Ramsbottom등⁽¹¹⁾과 Hiner 등⁽¹²⁾은 筋肉에서 connective tissue의 含量은 肉의 軟化에 밀접한 相關關係가 있다고 하였으며 Dechhardt등⁽¹³⁾은 豚肉의 longissimus dorsi muscle을 熱處理하였으나 reticulous fibre와 collagenous fibre에서는 形態의 變化가 觀察되지 않았다고 하였다.

이에 著者は 日常生活에서 많이 食用하는 牛筋肉의 round muscle을 植物性 蛋白質 分解 酵素인 papain으로 處理한 다음 longitudinal section과 cross section을 製作하고 collagenous fibre 및 elastic fibre의 組織의 變化를 觀察하였으므로 그 結果를 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

實驗材料

(1) 供試原料肉

屠殺後 6時間 經과된 韓牛(Bos taurus Coreanae 송, 5才)의 round muscle (pH6.5)을 供試原料肉으로 하였다.

(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에 대하여 각각 0.01%, 0.05%, 0.1% 이었다.

(3) 酵素 活性度 測定法

papain의 活性度 測定은 casein消化法⁽¹⁴⁾에 의하여 測定하였으며 方法은 前報⁽¹⁵⁾와 同一하게 하였고 그 活性度는 20 Units였다.

實驗方法

(1) 試料調製

原料肉을 예리한 칼로 1cm³되게 5개씩 절단한 다음 다시 2~3회 forking하였으며 酵素處理는 pot에 절단한 肉과 同量의 酵素液(處理區 pH 7.0) 또는 증류수(對照區 pH 7.0)를 加하여 室溫에서 6時間 作用시킨 다음 10% buffered neutral formalin(特級 KANTO CHEMICAL) 용액으로 固定시켰다⁽¹⁶⁾.

(2) Prepared 製作⁽¹⁶⁾

固定液에서 꺼낸 試料를 gauze로 싸서 beaker에 넣고 running water에서 水洗한 다음 試料 組織을 5×5×5m/로 정리하고 Fig. 1과 같이 處理하여 permanent prepared를 製作하였다.

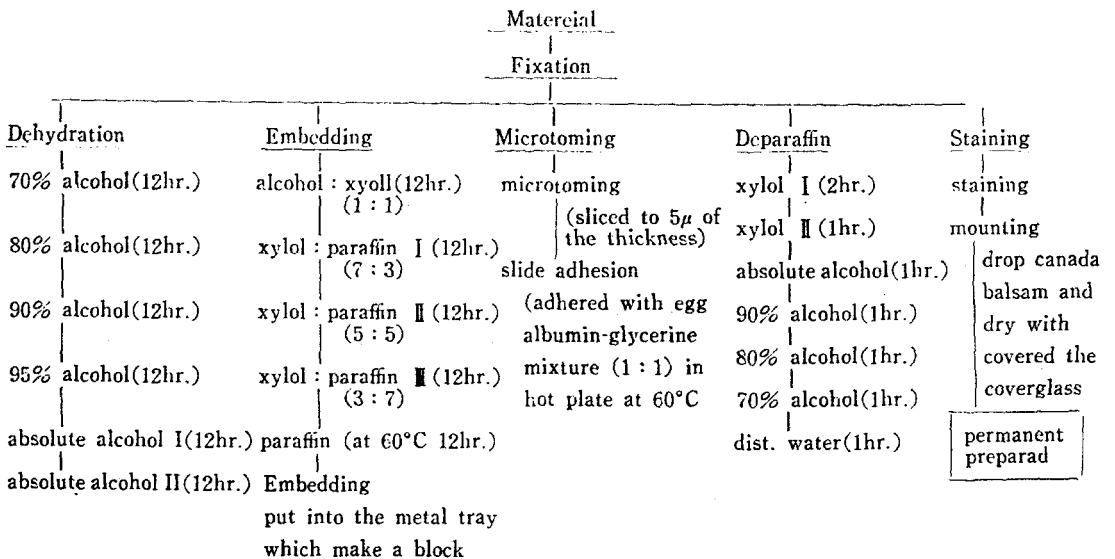


Fig. 1. Preparation of permanent prepared

(3) 染色方法

結締組織의 collagenous fibre는 Masson's trichrome method로 elastic fibre는 特殊染色方法인 Hart's Staining method로 染色하였으며 染色試藥은 E. MERCK 製品을 使用하였고 그 方法은 다음과 같다.

1) Masson's trichrome method for collagenous fibre⁽¹⁷⁾

Staining solution

Weigert's iron hematoxylin solution

Hematoxylin (Crystals) 1gm을 95% ethyl alcohol 100ml에 溶解한 것을 A液으로 하고 29% ferric chloride 수용액 4ml와 진한 염산 1ml를 dist. water 95ml에 混合한 것을 B液으로 하여 A液과 B液을 同量 混合하여 Weigert's iron hematoxylin 용액으로 하였다.

Biebl's Scarlet acid fuchsin solution

1% biëblich scarlet 수용액 90ml와 1% acid fushin 수용액 10ml 및 glacial acetic acid 1ml를 각각 혼합해서 調製하였다.

Phosphomolybdic—phosphotungstic acid

Phosphomolybdic acid 5gm과 phosphotungstic acid 5gm을 dist. water 200ml에 溶解하며 調製하였다.

Amiline blue solution

aniline blue 2.5gm과 glacial acetic acid 2ml를 dist. water 100ml에 溶解하여 調製하였다.

2% Light green solution

light green, SF Yellowish 2gm을 dist. water 98ml에 溶解하고 다시 glacial acetic acid 1ml를 添加하여 調製하였다.

1% Glacial acetic acid Solution

glacial acetic acid 1ml를 dist. water 100ml에 溶解하였다.

Staining procedure:

1. deparaffine 과정의 dist. water 처리후 weigert's iron hematoxylin solution에서 10分間 染色하여 running water에서 10분간 세척, 다시 dist. water로 세척

2. biëblich scarlet-acid fuchsin solution에서 2분간 染色後 running water에서 2분간 세척후 dist. water로 세척

3. phosphomolybdic-phosphotungstic acid solution으로 10~15분간 染色後 染色液은 버리고 dist. water로 세척

4. aniline blue solution에서 5분간, light green solution에서 1분간 染色後 染色液은 버리고 dist. water로 세척

5. glacial acetic acid solution에서 35분간 染色後 染色液은 버리고 dist. water로 세척

6. 95% ethyl alc, absolute alc, xylol I, II를 통과시켜 脫水

7. canada balsam으로 mounting

staining results;

nuclei—black

cytoplasm, keratin, muscle fibre and intracellular fibre—red

collagen—blue

2) Hart's method for elastic fibre⁽¹³⁾

Staining solution

0.25% potassium permanganate solution

potassium permanganate 0.25gm을 dist. water 100ml에 溶解하였다.

5% Oxalic acid solution

oxalic acid 5gm을 dist. water 100ml에 溶解하였다.

Resorcin-fuchsin solution (stock)

중발집시에서 basic fuchsin 2gm과 resorcinol 4gm을 dist. water 200ml와 함께 잘 섞어 加溫하고 溶液이 끓기 시작할 때부터 약 1분간 지난뒤 29% ferric chloride 용액 25ml를 添加하고 이 용액을 완전히 冷却시킨다음 여과지로 여과하여 여과지가 건조 될때까지 방치하였다. 중발집시에 건조된 여과물질을 완전히 옮긴후 95% ethyl alcohol 200ml를 加하고 주의해서 加熱溶解시켰으며 완전히 溶解된 물체에 HEI (Concentrated) 4ml를 加하여 Stock용액으로 하였다.

Resorcin-fuchsin solution (working)

resorcin-fuchsin (stock solution) 10ml와 70% alcohol 100ml hydrochloric acid (concentrated) 2ml를 混合하며 resorcin-fuchsin solution (working)으로 調製하였다.

Van Gieson's solution

1% acid fuchsin 수용액 2.5ml와 picric acid 9.75ml를 混合溶解하여 調製하였다.

Staining procedure:

1. deparaffine 과정의 dist. water 처리후 potassium permanganate solution에서 5분간 染色後 dist. water로 세척

2. 조직 절편이 깨끗하여질때까지 oxalic acid solution에 담근다.

3. running water로 5분간 세척후 dist. water로 세척

4. resorcin-fuchsin solution (working)에서 1주야 방치

5. running water로 10分間 세척후 dist. water로 세척

6. Van Gieson's solution에서 1分間 염색후 dist. water로 세척

7. 95% ethyl alc, absolute alc, xylol I, II를 各各 통과시켜 脫水

8. canada balsam으로 mounting

staining results

elastic fibre—blue black to black

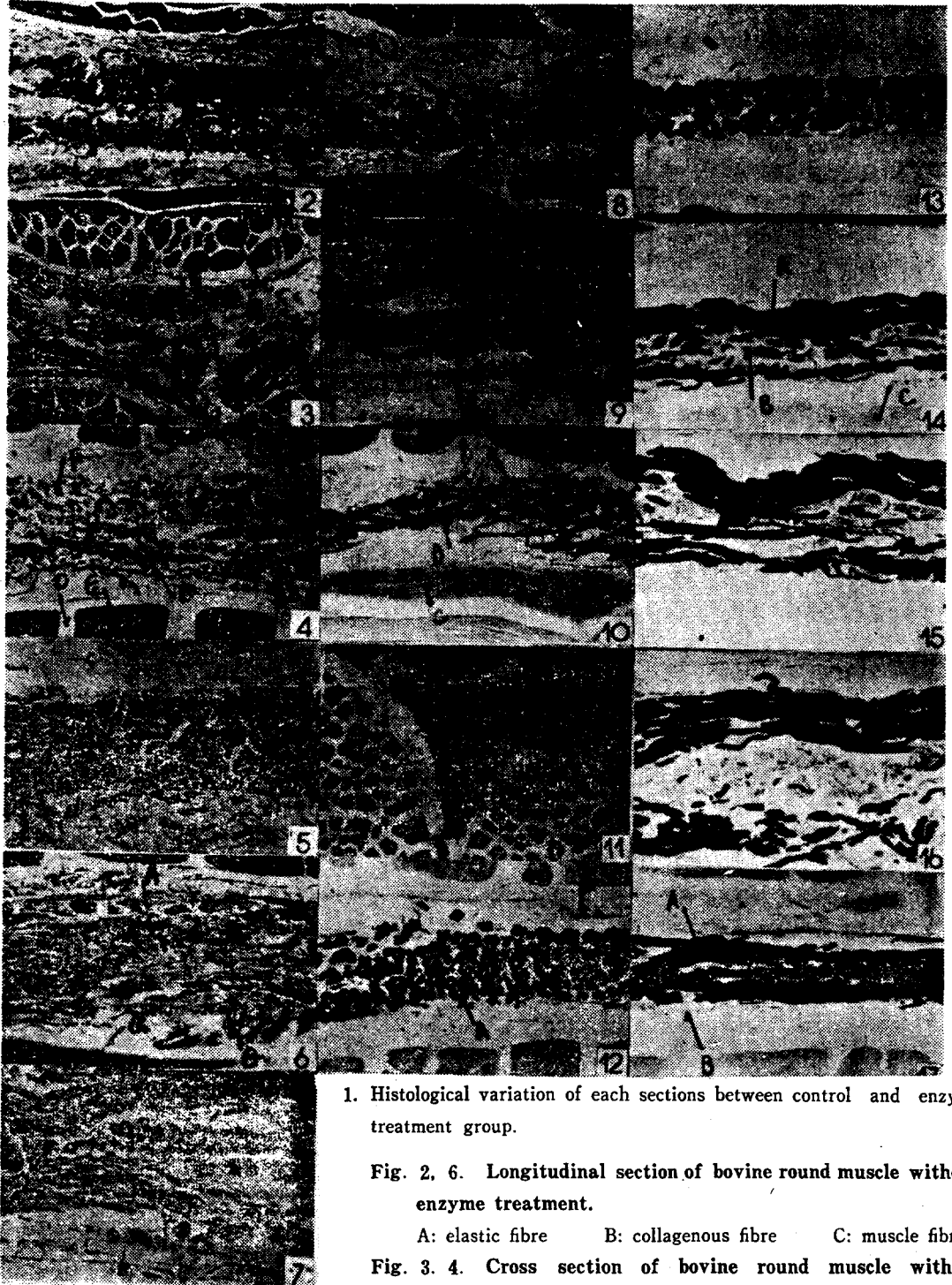
nuclei—blue to black

collagen—pink to red

muscle fibre—yellow

(4) 檢鏡

酵素에 의한 組織變化를 上記와 같이 操作하여 collagenous fibre와 elastic fibre를 各各 longitudinal section 및 cross section 별로 현미경(獨, Leitz) 觀察하였다.



1. Histological variation of each sections between control and enzyme treatment group.

Fig. 2, 6. Longitudinal section of bovine round muscle without enzyme treatment.

A: elastic fibre B: collagenous fibre C: muscle fibre

Fig. 3, 4. Cross section of bovine round muscle without enzyme treatment.

A: blood vessel B: collagenous fibre C: nucleus
 D: endomysium E: bundle of muscle fibre F: elastic fibre

Fig. 5. Cross section of bovine round muscle with treatment of 0.1% papain.

Fig. 6. Longitudinal section of bovine round muscle without enzyme treatment.

A: elastic fibre B: collagenous fibre
C: muscle fibre

Fig. 7. Longitudinal section of bovine round muscle with treatment of 0.1% papain.

Fig. 8. Longitudinal section of bovine round muscle with treatment of 0.05% papain.

Fig. 9. Longitudinal section of bovine round muscle with treatment of 0.1% papain.

A: elastic fibre B: collagenous fibre

Fig. 10, 14. Longitudinal section of bovine round muscle without enzyme treatment.

A: elastic fibre B: collagenous fibre
C: bundle of muscle fibre

Fig. 11, 12. Cross section of bovine round muscle without enzyme treatment.

A: elastic fibre B: collagenous fibre

Fig. 13. Cross section of bovine round muscle with treatment of 0.1% papain.

Fig. 15. Longitudinal section of bovine round muscle with treatment of 0.01% papain.

Fig. 16. Longitudinal section of bovine round muscle with treatment of 0.05% papain.

Fig. 17. Longitudinal section of bovine round muscle with treatment of 0.1% papain.

A: elastic fibre B: collagenous fibre

2. Staining method

Masson's trichrome method:

Fig. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

Hart's method:

Fig. 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17

3. Magnification

100x : Fig. 2, 3, 10, 11.

250x : Fig. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17.

結果 및 考察

韓牛의 round muscle을 5mm³되게 절단하여 papain을 濃度別로 處理하여 longitudinal section과 cross section을 製作하고 collagenous fibre는 Masson's trichrome staining method로 elastic fibre는 Hart's staining method로 染色하여 현미경 관찰한 結果는 Fig. 2~17과 같다.

Fig. 2~9는 collagenous fibre를 Masson's trichrome

staining한 것으로 Fig. 3에서 보는 바와같이 muscle fibre는 赤色으로 染色되고 약 50~150개의 muscle fibre가 모여 muscle bundle을 形成하며 이것은 다시 perimysium internum(內筋周膜)에 둘러 싸여 있다.

collagenous fibre는 pale blue로 染色되며 다소 波狀을 이루고 endomysium(筋內膜)에는 거의 없는 것으로 보였다.

Fig. 6에서 보는 바와 같이 얇은 黃褐色의 elastic fibre는 muscle fibre에 平行으로 나가며 비교적 얇은 줄과 같은 형태를 나타내고 있으며 collagenous fibre는 perimysium internum에 콜로루 elastin과 함께 다소 산만하고 뭉쳐진 것도 많고 가늘게 흩어진 것도 많으며 특히 blood vessel을 中心으로 짙게 분포되어 있는 것이 많이 보였고(Fig. 3) 그 직경은 20~40 μ 정도이다.

Fig. 5, 7, 8, 9와 같이 papain 處理 濃度에 따라서 差異가 없으며 collagenous fibre는 그 굵기가 현저하게 가늘어지며 또한 불규칙하게 뭉쳐진 것들이 잘려져 있는 상태를 보이고 papain 處理에 의하여 fibre가 붕괴되어 量의 減少를 가지오며 그의 染色性은 對照區의 Fig. 2, 3, 4, 6에 비하여 0.1% 處理한 Fig. 5, 9에서 거의 認定할 수 없을 정도로 현저하게 減少되었다.

Fig. 4, 5에서 보는 바와같이 elastic fibre도 處理區(Fig. 5)는 對照區(Fig. 4)에 비하여 黃褐色의 染色性을 認定할 수 없는 정도이며 collagenous fibre나 elastic fibre 모두 그의 染色性에 의하여 매우 얇게 染色된다.

Fig. 10~17은 elastic fibre를 特殊 染色方法인 Hart's staining한 것이다.

Fig. 10, 14에서 보는 바와같이 muscle fibre는 黃色으로 染色되며 perimysium internum에서 connective tissue의 量이 많은 部位에서 波狀의 비교적 굵고 暗紫色으로 染色된 elastic fibre가 組織의 주로 中央部 쪽에 線狀으로 不規則한 多列狀으로 分布되어 있고 collagenous fibre는 全長에 걸쳐 비교적 均等한 연분홍색의 染色性을 가지며 섬유의 境界 부위는 더욱 진하게 染色되어 보인다.

Fig. 12에서 보는 바와 같이 elastic fibre가 collagenous fibre를 둘러 싸고 있는 상태이다. Fig. 12(對照區)와 Fig. 13(處理區)에서 볼때 處理區는 對照區에 비하여 collagenous fibre는 현저하게 loose해진 것을 볼 수 있다.

Fig. 14(對照區)와 Fig. 15, 16, 17(處理區)에서 보면 對照區에서는 elastic fibre가 波狀을 나타내나 papain 處理濃度가 높아짐에 따라 彈性을 잃은 상태로 loose하여져 거의 直線의으로 보이며 fragment된 것이 많이 보인다. fragment된 elastic fibre에서 양단은 中央部位보

다 淡染으로 보이며 全長에 걸쳐서 그것의 굵기도 가
늘어진 경향을 볼수 있었다.

Fig. 6, 14의 對照區에 미하여 Fig. 7, 8, 9, 15,
16, 17에서 보는 바와같이 callagenous fibre는 染色性
의 減少, fibre의 붕괴가 현저 하였다. 즉 collagenous
fibre의 染色性的 減少, 조직의 붕괴는 Wang등⁽⁸⁾이 實
驗한 longissimus doris muscle에 microbial enzyme
(protease 15, Rhozyme P-11, Rhozyme A-4) plant
enzyme (bromclin, ficin) pancreatic enzyme (trypsin,
vlokase)과의 비교 實驗에서 plant enzyme이 가장 우
수하며 特히 ficin이 우수하다고 한 우육조직의 현미경
적 구조의 實驗結果와도 어느정도 일치한다고 볼 수
있다.

要 約

軛牛의 round musck에 papain을 濃度別로 增加시켜
서 longitudinal section과 cross section하여 結締組織의
collagenous fibre와 elastic fibre를 各各 染色하여 현미
경으로 관찰한 結果는 다음과 같다.

1. 酵素 濃度의 增加에 따라 비정형 형태로 뭉쳐져
있는 collagenous fibre는 점점 풀어지는 狀態를 지나 후
에는 붕괴되며 또한 染色性이 현저하게 약해진다.

2. elastic fibre의 方向은 muscle fibre에 平行하게 存
在하며 酵素 濃度의 增加에 따라 점차 彈性을 잃고
loose해지며 直線의으로 보이고 fragment되는 것도 현
저하다.

3. collagenous fibre와 elastic fibre 모두 酵素 處理區
가 對照區에 미하여 組織變化가 현저하다.

References

- 1) Cruise, A.J.: *J. Soc. Leather Trade's Chemists*,
40, 321(1956)
- 2) Deasy, C.: *J. Am. Leather Chemist's Assoc.*, 50,

- 463(1955)
- 3) Fulmer, H.M. and Lillie, R.D.: *J. Histochem. and
Cytochem.*, 5, 11(1957).
- 4) Grant, N.H. and Robbins, K.C.: *Arch. Biochem.
Biophys.*, 66, 396(1957)
- 5) Lewis, U.J., Williams, D.E., and Brink, N.G.:
J. Biol. Chem., 222, 705(1956)
- 6) Brady: American Society of Animal Production,
30th Annual Meeting (1937)
- 7) Hiner, R.L., Hankins, O.G., Sloane, H.S., Fellers,
C.R. and Anderson, E.E: *Food Research*, 18, 364
(1953)
- 8) Wang, H: *Exptl. Cell Research*, 11, 452(1956)
- 9) Wang, H., Weir, C.E., Birkner, M. L and Ginger,
B.: *Food Research*, 23, 423(1958).
- 10) Goll, D.E., Bray, R.W., and Hoekstra, W.G.: *J.
Food Sci.* 28, 503(1963)
- 11) Ramsbottom, J.M., Strandine, E.S. and C.H.
koonz: *Food Research*, 10, 497. (1945)
- 12) Hiner, R.L., Anderson, E.E. and C.R. Fellers:
Food Techn., 9, 80(1955)
- 13) Derothy Deethardt and H. J. Tuma: *J. Food Sci.*,
36, 563(1971)
- 14) Kunitz, M.: *J. Gen. Physiol.*, 30, 291(1947)
- 15) 尹政義, 黃七星, 吳錫欣: 한국식품과학회지, 5, 71
(1973)
- 16) Leen G. Luna, HT: Manual of Histoologic Staining
Method of the Armed Forces Institue of Pathology,
3rd ED., Mc Graw Hill, New York, p.10(1968)
- 17) Masson, P.J.: *J. Techn. Method*, 12, 75-90, AFIP
modification,(1929)
- 18) Mallory, F.B.: Pathological Technique, New York,
Hafner Publishing Co., p.169, AFIP modification
(1961)