

# 納豆製造中の蛋白質, Peptide 및 Amino Acid 의變化에 關한 研究

金 洙 榮 · 金 載 勛

서울대학교 農科大學

(1967年 3月 2日受理)

## Studies on the Changes of Protein, Peptide and Amino Acid During Natto Preparation

Su Yung Kim, Ze Uook Kim

College of Agriculture, Seoul National University

### Summary

In order to study the change of nitrogenous compounds during the "Natto" preparation, the contents of insoluble protein, water soluble protein and amino nitrogen were determined and the pattern of peptides and amino acids was investigated by paper chromatography for the fractions resulting from molecular sieving. The results are summarized as follows:

1. Insoluble protein nitrogen which was increased to 84% by autoclaving the native soybean decreased to 44%, whereas the trichloroacetic acid soluble nitrogen increased from 8% to 45% during Natto preparation, But the soluble protein nitrogen showed a slight increase.

2. Fractionation of the peptides using Dowex-50 resins showed that they consisted mostly of lower molecular weight peptides which increased in accordance with the progress of fermentation, especially after 30-hour period.

3. Sixteen known and two unknown amino acids, and three peptides with different Rf values were identified during the Natto preparation. Their appearance showed some difference in that phenylalanine appeared after 10 hours, methionine, after 20 hours and proline, after 30 hours, respectively. The three peptides appeared at the different stage of fermentation.

### I. 緒 論

大豆蛋白質에 關한 研究로는 Meiss & Böcker<sup>(1)</sup> (1883)氏의 研究를 비롯하여, Osborne & Campell<sup>(2)</sup> 氏는 大豆에서 分離한 粗蛋白質中 80~90%가 globulin 이라 하였고, 大豆 globulin 에는 16種의 amino acid 가 含有되어 있음을 밝힌 Hayward<sup>(3)</sup> 氏外 많은 研究者들의 報告가 있었다.

大豆蛋白質은 各種 必須 amino acid 를 골고루 含有하고 있어 營養價値가 比較的 높아, 植物性 蛋白質中 動物性 蛋白質에 匹敵할 수 있는 唯一한 것이다. 그러므로 主로 植物性 食物을 攝取하는 우리 나라를 비롯한 東洋人으로서 大豆는 重要한 蛋白質의 給源으로 되어있다.

그러나 이 大豆는 組織이 堅固하여 比較的 消化되기 어려운 蛋白質일뿐 아니라 大豆中에 存在하는 蛋白質 分解酵素인 trypsin 의 作用을 抑制하는 trypsin inhibitor 와 hemagglutinin(赤血球 凝集要素) 등이 있어 消化에 不利한 點이 있다. 따라서 이것을 加熱處理 등의 加工을 하므로써 營養價値를 높일 수 있는데, 이 加工處理로 蛋白質의 熱變性이 일어나게 될 뿐만 아니라 trypsin inhibitor 와 hemagglutinin 이 파괴 되는 것이다. 그러나 한편 蛋白質을 構成하는 amino acid 가 大豆中의 炭水化合物과 共存하여 熱處理를 받게 됨으로, 特別히 lysine, arginine histidine 등의 amino acid 가 감소하게 된다.<sup>(4)</sup>

大豆의 營養價値를 높이기 爲한 調理 및 加工形態로서 간장, 된장, 두부, 蒸餾콩, 볶은콩 등이 있는데, 그 處理方法에 따라 營養價値가 달라지게 된다.<sup>(5)</sup>

大豆의 加工方法中에서도 醱酵에 의한 것이 消化率로 보아 가장 効率的이라 할 수 있는데, 大豆醱酵은 蒸煮大豆를 藁, 筵等에 싸서 짚에 附着되어 있던 納豆菌을 接種繁殖 하게하여 醱酵시킨것이 醱酵大豆加工의 嚆矢이며, 이것이 곧 모든 醬油의 起源인 것이다.

山崎<sup>(6)</sup>에 의하면 中國 殷代에 이미 鼓, 鼓胚라 하여, 그 製法에 準하여 細菌鼓(絲引納豆), 徽鼓(絲狀菌納豆), 穀粉입힌 徽鼓等에 각기 다른 첨가물을 넣어 만든 談鼓, 香鼓, 斷鼓, 十香鼓等 여러 가지가 있었다. 이것이 留學僧에 의해 日本에 傳播되어 오늘날 日本의 納豆 元祖가 되었고, 우리나라에서도 여러가지 香辛料를 添加하여 清麴醬이라 하여 널리 食用되고 있다.

간장 된장등의 醱酵熟成에서는 大豆 蛋白質이 分解하는데 적어도 3~5個月 以上の 長時間을 要하는데 比하여, 納豆는 細菌에 의해 分泌되는 強力한 protease에 의해 單只 1~2日의 짧은 期間에 相當量의 蛋白質이 加水分解될 뿐 아니라 다른 어떤 加工에 의한것 보다 消化率이 높으며 低級 peptide 및 amino acid 生成이 많다는 點과 독특한 香味가 있다는 點이 特徵이다.

納豆에 關한 研究로는 1894年 矢部<sup>(7)</sup>氏가 처음으로 細菌및 酵素學的으로 研究하였고, 1905年에 이르러 澤村<sup>(8)</sup>에 의해 納豆菌을 Bacillus Natto 라고 命名하게 되었다. 이외에 納豆의 成分<sup>(9-15)</sup>, 細菌學的<sup>(16-21)</sup> 酵素學的<sup>(22-24)</sup>, 納豆香氣<sup>(25)</sup>에 關한 研究가 있었고, 우리나라에서는 俞<sup>(26)</sup> 및 鄭<sup>(27-29)</sup> 등의 納豆中の 酵素및 成分에 關한 研究가 있었다. 그러나 아직 納豆의 protease에 의하여 大豆 蛋白質이 分解되는 樣相에 關한 研究는 없었다.

따라서 筆者는 蒸煮大豆에 Bacillus Subtilis Natto를 接種하여 納豆製造 過程中에 일어나는 蛋白質의 變化와 生成되는 peptide 및 amino acid의 樣相에 關한 研究를 하기爲하여 高橋<sup>(30)</sup>의 清酒中の peptide 研究, 竹內<sup>(31)</sup>의 간장 된장中の peptide 研究 및 金<sup>(32)</sup>이 콩 Koji 製造中에 生成되는 peptide에 關한 研究에 利用한, cross linkage가 다른 polystyrene系 Ion 交換樹脂 Dowex-50을 使用하여 分子篩別한 各 fraction의 average peptide length를 求하였고, paper chromatography에 의하여 amino acid 및 peptide을 同定하는 등 一聯의 實驗을 하였기에 此에 報告하고자 한다.

## II. 實 驗

### 1. 試料의 調製

(1) 大豆; 市販大豆.

(2) Natto 菌; Bacillus Subtilis Natto 492-2.

(3) Natto 菌接種液; 밀기울 20g와 물 40ml을 넣은 三角 flask를 autoclave에 넣어 15Lbs 加壓下에서 121°C로 15分동안 殺菌하여 36°C程度로 冷却한 다음, 여기에 Natto 菌을 接種하여 37°C의 incubator에서 30時間 培養하였다. 이 培養菌에 150ml의 殺菌水를 加하여 잘 攪拌한 다음, 그 上澄液을 納豆菌 接種液으로 使用하였다.

### 2. 試料納豆 製造

市販大豆를 精選하여 常溫의 물에 하루밤 浸漬하였다가 水切하고 3倍의 물을 加하여 常壓에서 約 4時間 蒸煮한後 36°C程度로 冷却 放置하였다. 여기에 培養調製直後에 Natto 菌 接種液을 撒布하여 잘 混合하였다. 이를 30g씩 6個의 petri schale에 正確히 秤量하고, 別途로 水分測定用 試料를 마련하여 38°C의 incubator에서 醱酵시켰다. 定溫醱酵中の 試料에서 每 10時間 間隔으로 1 schale分의 試料를 取하여 供試試料로 處理하였다.

### 3. 試料의 處理

醱酵中の 試料에서 每 10時間의 間隔으로 取한 1 schale分의 試料를 waring blender에 넣고 증유수 80ml을 加하여 100volt로 30秒 동안 磨碎하고, 다시 20ml의 증유수로 Waring blender器壁에 붙어 있는 部分을 씻어 내린後 다시 30秒 동안 磨碎하였다. 이들 液을 遠心分離管에 넣고 40ml의 증유수로 두번 waring blender를 洗滌하여 遠心分離管에 舍하여 約 3,000 r.p.m.으로 8分동안 遠心分離하였다. 管內 上澄液을 1l의 三角 flask에 옮기고 남은 殘滓部에 증유수 70ml을 넣어 攪拌하여 5分동안 遠心分離하여 上澄液을 먼저의 flask에 舍하는 操作을 3回 反復하였고, 分離管에 남은 殘滓部를 증유수 40ml로 funnel上의 filter paper에 옮겨, 濾過한 殘滓部를 不溶性 蛋白態 窒素 測定用 試料로 하였다.

flask에 모은 上澄液에 10%-trichloro acetic acid (T.C.A.) 190~210ml를 加하여 하루밤 放置하여 沈澱된 蛋白質을 濾過하고, 그 沈澱物을 水溶性 蛋白態 窒素測定用 試料로 하였다.

水溶性 蛋白質을 濾過하고난 濾液을 700ml 되게 증유수로 채우고, 그中 100ml를 取하여 一部를 peptide, amino acid 및 ammonia態 全窒素 測定用 試料로 하고 다른 一部를 ammonia態 窒素 測定用 試料로 하였다.

나머지 濾液 600ml을 cross linkage가 다른 Dowex-50의 Ion 交換樹脂(表1)를 충전하여 高橋

(30) 氏와 같은 방법으로 連結한 column에 流速 4 ml/10min. 되게 조절하여 通過시키면서 溶液中의 peptide 및 amino acid를 吸着시키며, 마지막 X-2 column을 通過한 것도 別途 effluent로 모았다. 繼續하여 증류수로 試料溶液이 X-2 column을 完全히 通過할 수 있도록 充分量을 通過시켜 effluent로 모았다.

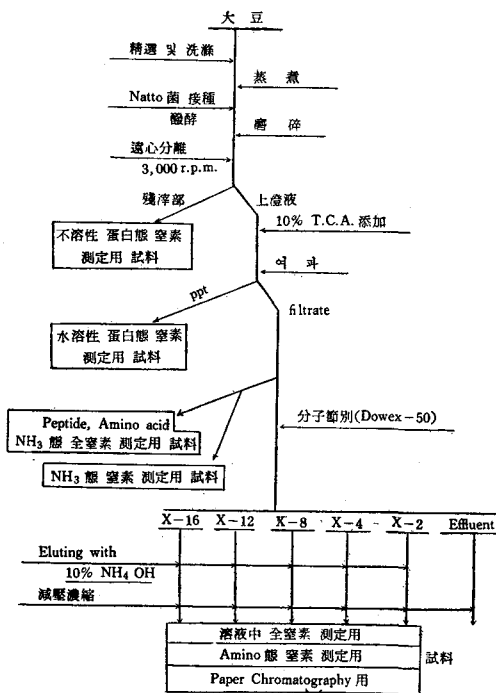
그리하여 각 column을 各各으로 分離하여 10% -NH<sub>4</sub>OH 水溶液을 各 column에 같은 速度(4ml/10min)으로 通過시켜 resin에 吸着된 peptide 및 amino acid를 elute시켰다.

이들 elute된 NH<sub>4</sub>OH 性 溶出液을 45°~50°C에서 減壓濃縮시켜 25ml로 하여 冷藏保管하면서, 液中的 全窒素 amino 態窒素 測定用 및 paper chromatography 用試料로 하였다.

이들을 簡單하게 圖示하면 그림 1과 같다.

表 1. Column dimension

Resin	mesh	resin height diameter
X-16	20~50	22cm × 3.3cm
X-12	//	23.2 × 3.4
X-8	//	23 × 3.3
X-4	//	0.5 × 3.1
X-2	//	25.3 × 2.9



#### 4. 分析方法

供試試料 處理에서 얻은 各各의 試料를 다음과 같은 方法으로 分析 測定하였다.

1. 水分含量; 納豆 醱酵中 每 10 時間 間隔으로 試料를 處理할때, 미리 秤量한 Weighing bottle에 約 2g씩 秤量하여 105~110°C 乾燥器에서 乾燥하여 測定하였다.

2. pH; 試料를 waring blender로 磨碎한 後 濾液을 Beckman pH meter로 測定하였다.

3. 不溶性 蛋白態 窒素; 試料處理中 遠心分離하고 남은 殘滓部를 乾燥하여, 그 一部를 取해 macro-Kjeldahl method로 測定하였다.

4. 水溶性 蛋白態 窒素; 10%-T.C.A.를 加하여 沈澱시킨 蛋白質을 乾燥하여 Macro-Kjeldahl method로 測定하였다.

5. Peptide, amino acid 및 ammonia 態 窒素: 水溶性 蛋白質을 除去한 濾液中 一部를 取해 macro-Kjeldahl method로 測定하였다.

6. Ammonia 態 窒素; 水溶性 蛋白質을 除去한 濾液의 一部에서 ammonia 態 窒素를 MgO法<sup>(33)</sup>으로 測定하였다.

7. Peptide 및 amino acid 態 全窒素; 分子篩別하여 10% NH<sub>4</sub>OH로 elute한 것을 25ml로 濃縮한 各 試料의 一部를 取해 micro-Kjeldahl method로 測定하였다.

8. Amino 態 窒素: "7"과 同一한 試料의 一部를 Van Slyke 法으로 測定하였다.

9. Paper chromatography에 依한 amino acid 및 peptide 同定<sup>(34)</sup>;

Filter paper; whatman No.1 23 × 28cm.

Solvent 一次; BuOH : HAc : H<sub>2</sub>O = 4:1:1(V/V/V)

二次; Phenol : H<sub>2</sub>O = 3:1(V/V) 0.5% HAc 含有

發色 및 固着劑; 0.2% Ninhydrin in Butanol

1% Starch-Iodine Soln<sup>(35) (36)</sup>

1% Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> in Methanol

"7"과 同一한 試料中 X-16 fraction을 試料로 하여 Whatman No.1 濾紙의 右側邊과 下邊에서 3cm 되는 點에 10~20 μ씩 spot 하여 室温에서 13 時間 一次 展開한後 fan으로 1 時間 乾燥하고 8 時間 放置하였다가, 빛을 遮斷한 paper chromatography 用 chamber 속에서 13 時間 二次 展開시켰다. 이것을 80°C의 oven에서 30 分間 乾燥시킨 後 0.2% ninhydrin butanol 溶液을 spray 하여 80°C에서 10 分間 發色시켰다. 이것을 同一한 條件으로 展開시

킨 standard amino acid의 paper chromatogram 의 pattern 과 對照하는 同時에, 이들 各各의 Rf值를 참작하여 free amino acid의 pattern을 同定 確認하고 黑線으로 表示한 後 1%Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 溶液으로 固着시켰다.

또 1% Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 溶液을 處理하지 않은 發色된 paper chromatogram을 乾燥시켜, 느슨하게 말아서 圓形硝子管속에 넣고, 約 10分동안 paper가 黃色으로 될때까지 鹽素 Gas를 通過시켰다가 꺼내서, 室溫에서 30分間 fan으로 부쳐 excess Cl<sub>2</sub> gas를 除去시킨다음 1% starch-iodine 溶液을 spray 한다. 그러면 paper는 faint blue 인것에 비해 peptide spot는 black로 나타나게 되는데, 이 點을 點線으로 表示하여 먼저의 1%Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 溶液으로 處理한 各 paper와 對照하여 位置를 定하였다.

### Ⅲ. 結果 및 考察

1. 蒸煮大豆에 納豆菌을 接種하여 醱酵시키면서 10時間 間隔으로 採取한 試料에 對하여 水分含量 및 pH를 測定한 結果는 表2와 같다.

表2에서의 水分含量은 大體로 큰 變化가 없었는데, 이것은 醱酵中 雜菌의 汚染을 防止하기 爲해 schale의 뚜껑을 덮어 둔 것에 原因이 있는 것으로

表 2. 納豆製造中の 水分含量 및 pH 變化

試料番號	醱酵時間	水分含量	pH
1	0(hr)	62.3(%)	6.7
2	10	62.3"	6.4
3	20	62.5"	6.9
4	30	62.8"	7.4
5	40	62.2"	7.8
6	50	63.3"	8.2

生覺된다.

그러나 pH의 變化에 있어서는 처음 pH 6.7이었던 것이 一旦 6.4로 내려 갔다가 醱酵時間이 經過함에 따라 漸次的으로 上昇하였다. 이것은 蒸煮大豆中에 存在하는 free ammonia 態 窒素가 納豆菌의 繁殖에 必要한 榮養分으로 消耗되므로 일단 減少하였다가 時間이 經過함에 따라 deamination이 일어나 ammonia가 生成하기 때문에 pH가 높아 지는 것으로 生覺된다.

2. 採取한 各 試料를 處理하여 試料의 不溶性 蛋白態 窒素, 水溶性 蛋白態窒素, 그리고 peptide, amino acid 및 ammonia 態(以下 P.A.A.態라 稱함)의 全窒素와, 別途로 ammonia 態窒素를 測定한 結果는 表3과 같다.

表 3. 納豆製造中の 蛋白質, peptide, amino acid, 및 ammonia 態窒素의 變化

試料番號	全 窒 素	不溶性蛋白態 N		水溶性蛋白態 N		P.A.A 態 N		
	(mg)	(mg)	* (%)	(mg)	* (%)	(mg)	* (%)	NH <sub>3</sub> 態 N ** (%)
1	788.774	662.273	83.96	67.08	8.5	59.421	7.53	4.06
2	730.549	573.295	78.47	68.72	9.41	88.534	12.11	3.65
3	722.396	461.960	63.95	69.81	9.66	190.626	26.39	11.10
4	720.628	400.686	55.60	76.43	10.61	243.512	33.79	15.6
5	720.248	325.663	44.54	80.54	11.18	314.045	43.60	26.02
6	709.120	310.475	43.78	81.20	11.46	317.445	44.78	26.6

註 \* 全窒素에 對한 %

\*\* P.A.A.態 全窒素에 對한 %

表3의 結果를 圖示하면 그림 2와 같다. 表3과 그림 2에 依하면, 蒸煮大豆中에는 全窒素의 約 84%에 該當되는 窒素量이 不溶性 蛋白態 窒素로 存在하는 것이 醱酵時間이 經過함에 따라 徐徐히 減少하였다가 10時間 後에는 急激히 적어져서 40時間 後에는 44.5%로 되고, 그 以後에는 減少率이 比較的 緩化되었다.

한편 水溶性 蛋白態 窒素는 蒸煮大豆中 全窒素의 8.5%에 該當하던 量이 納豆製造中 徐徐히 增加하여 醱酵 50時間 後에 11.5%로 增加하였다.

P.A.A.態 窒素는 처음 全窒素의 7.5%에 該當되던 量으로 存在하던 것이 醱酵 初期에는 比較的 徐徐히 增加하였고, 10時間以後에는 急激히 增加되었다가 40時間以後에는 增加率이 比較的 낮아졌다.

水溶性, 蛋白態 窒素의 增加가 不溶性 蛋白態 窒素의 減少에 비해 매우 적은 값을 나타내는 것은 分解過程中 比較的 分解하기 쉬운 水溶性 蛋白質이 peptide 및 amino acid 등의 低分子 形態로 移行되었기 때문이라 볼 수 있다.

또한 同一한 試料中의 全窒素가 大體로 減少한

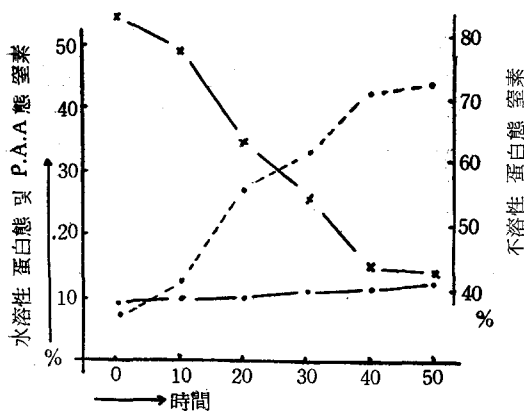


그림 2. 蛋白態 및 Peptide 態窒素變化曲線  
 註. ···· 水溶性蛋白態질소  
 ----- P.A.A 態질소  
 ×-× 不溶性蛋白態질소

것은 納豆製造中 ammonia 로 一部 飛散하며, 水溶性 蛋白質을 除去한 後 濾液中 溶解된 ammonia 態 含量을 測定한 結果를 보면, 20 時間 前後에서 ammonia 生成이 가장 甚했고 그림 3 에서와 같이

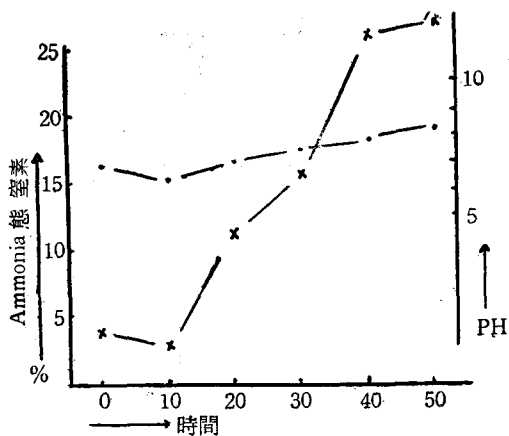


그림 3. Ammonia 態窒素 및 pH 變化曲線  
 註. ×-× Ammonia 態窒素  
 ···· pH.

pH 曲線은 ammonia 生成量에 比例하여 上昇하였다.

酵素活性과 pH 關係는 大島<sup>(22)</sup>氏에 依하면 納豆에서 分離한 蛋白質 分解 酵素에 對해서 casein 等

表 4. 分子篩別한 peptide 및 amino 態窒素變化

		X-16	X-12	X-8	X-4	X-2	Effluent	Total	Recovery.
1	Total N	8.89	3.16	2.15	1.77	0.57	38.12	54.67	92.0%
	Amino N	6.48	1.19	0.72	0.57	0.14	5.36	—	—
	A.P.L	1.37	2.65	2.98	3.1	4.01	7.1	—	—
2	Total N	8.91	4.59	4.59	2.27	14.99	48.42	84.42	95.2%
	Amino N	6.36	2.15	1.75	0.71	3.89	7.15	—	—
	A.P.L	1.4	2.3	2.62	3.2	3.85	6.77	—	—
3	Total N	20.43	3.55	10.76	7.08	8.38	74.88	135.08	70.86%
	Amino N	15.02	6.57	4.14	2.28	2.26	10.93	—	—
	A.P.L	1.36	2.06	2.9	3.1	3.71	6.85	—	—
4	Total N	29.05	18.36	14.66	8.96	14.02	68.42	153.46	63.01%
	Amino N	22.7	9.42	7.2	3.56	3.99	10.26	—	—
	A.P.L	1.28	1.94	2.03	2.51	3.76	6.67	—	—
5	Total N	40.30	22.08	13.92	8.66	12.22	62.23	159.41	50.76%
	Amino N	37.66	12.91	6.57	3.6	3.85	9.5	—	—
	A.P.L	1.07	1.71	2.1	2.4	3.17	6.55	—	—
6	Total N	44.89	17.21	12.12	10.63	17.23	57.36	159.42	50.2%
	Amino N	43.16	10.43	6.06	4.25	5.55	8.92	—	—
	A.P.L	1.04	1.65	2.0	2.5	3.1	6.43	—	—

蛋白質을 非凝固性 peptone 類로 消化하는 opt. pH 는 6.0 前後이고 amino acid 까지 消化 하는 opt.Hp 는 8.2 前後라고 報告하였다, 鄭<sup>(27)</sup>의 納豆酵素의 opt. pH 가 7.0~8.0 이라는 報告에 比하여, 筆者의 實驗에서 納豆製造中 蛋白質 加水分解가 活發하게 일어날 무렵부터 終了에 이르기까지 pH의 範圍가 6.9~8.2로 維持되었음에 上記 報告와 大體로 一致함을 볼 수 있다.

3. 10% T.C.A.로 處理하여 水溶性 蛋白質을 除去한 後의 濾液을 cross linkage 가 다른 X-16, X-12, X-8, X-4, X-2의 Dowex-50 을 使用하여 分子篩別하고 10% NH<sub>4</sub>OH 로 elute 한 것을 各各 25ml로 濃縮한 試料에서 全窒素와 amino 態 窒素를 測定하여 全窒素값을 amino 態 窒素로 나눈값인 average peptide length(A.P.L.)를 求한 結果는 表 4와 같다.

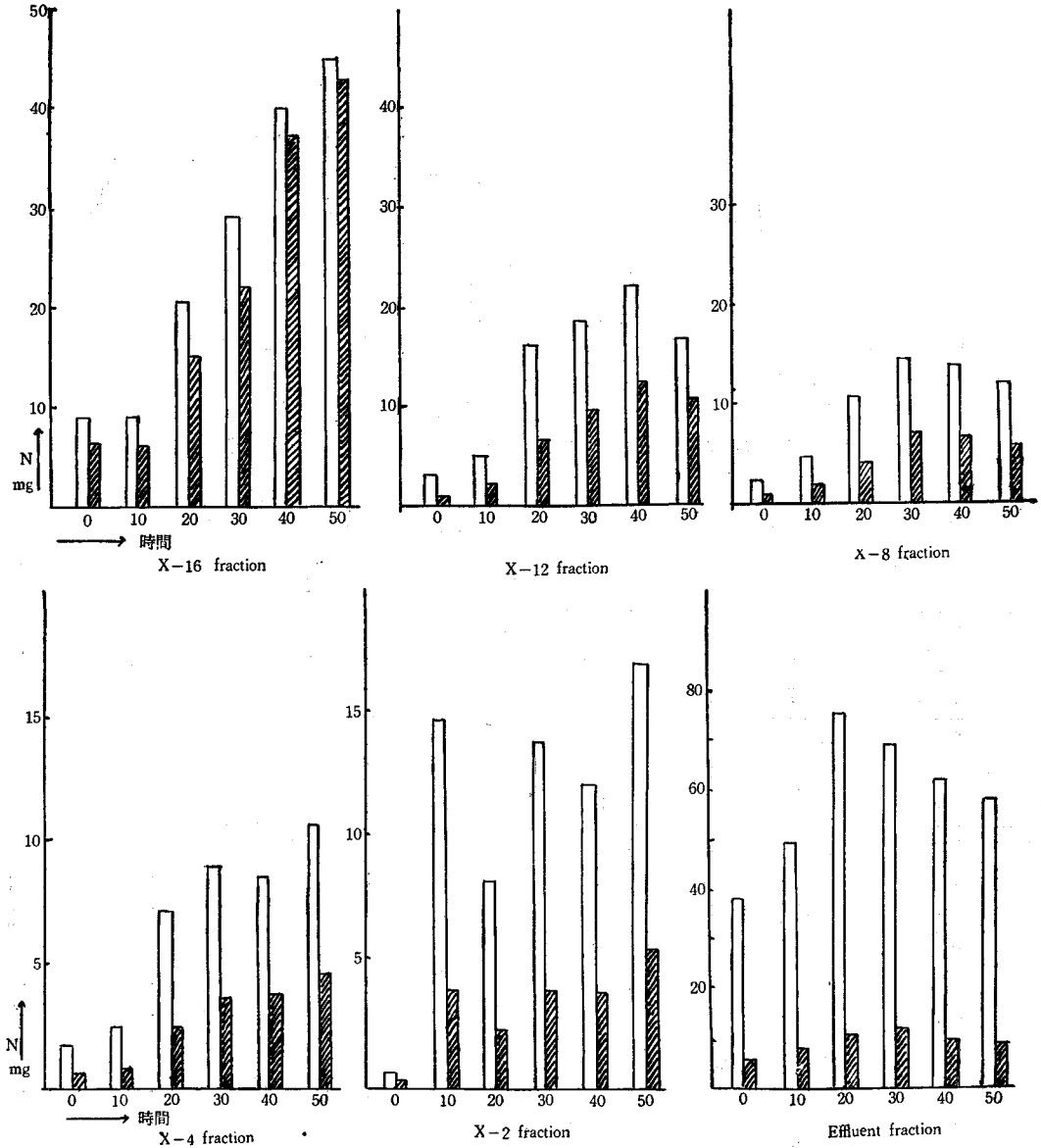


그림 4. 濾液中の fraction 別 全窒素 및 Amino 態 窒素量의 變化

□ Peptide 및 Amino acid 態 全窒素  
 ■ Amino 態 窒素

表 4의 結果를 圖示하면 그림 4과 같다.

그림 4에 依하면 分子篩別한 各 fraction의 全窒素量은 어느 段階에서나 A.P.L.이 큰 effluent fraction에서 가장 많으며, 不溶性 및 水溶性 蛋白質의 加水分解가 進行함에 따라 全般的으로 peptide, 特히 低級 peptide 및 amino acid態의 窒素量이 顯著하게 增加되었다. 醱酵 30時間 以後에는 effluent fraction의 窒素量은 그 前에 比해 漸次 減少하였고, 代身 各 fraction 特히 X-2 fraction에서 增加하였다. 醱酵 40時間에서는 effluent fraction과 30時間에서 增加를 보인 X-2 fraction은 減少를 보인 反面에 X-16, X-12 fraction에서 急激한 增加를 보인 同時에, 表 3에 依하면 ammonia態 窒素도 相當量으로 增加하였다. 醱酵 50時間에는 繼續인 effluent fraction이 減少됨에 따라 X-fraction에서 增加하였다.

一般的으로 醱酵 30時間 以後부터 蛋白質 加水分解는 微弱하게 일어나면서, 比較的 큰 分子의 peptide가 主로 分解되어 低級 peptide 및 amino acid가 生成함을 볼 수 있다. 또한 分子篩別하기 前의 溶液中 全窒素에 比較하여 fraction한 後의 回收率을 보면, 初期에는 92%에서 95%로 增加하였다가 다시 漸次 減少하는 것은 前述한 바와 같이 蒸煮大豆中 存在하는 ammonia가 菌增殖의 榮養分으로 消耗되었기 때문에 回收率이 增加되었다가,

다시 deamination으로 因해 生成된 ammonia가 分子篩別 後 減壓濃縮으로 除去되었기 때문에 漸次 減

表 5. X-16 fraction 中 free amino acid

Amino acid	Sample No.					
	1	2	3	4	5	6
Leucine, Isoleu-Cine	+	+	+	+	+	+
Valine	+	+	+	+	+	+
Alanine	+	+	+	+	+	+
Tyrosine	+	+	+	+	+	+
Threonine	+	+	+	+	+	+
Glutamic acid	+	+	+	+	+	+
Histidine	+	+	+	+	+	+
Glycine	+	+	+	+	+	+
Serine	+	+	+	+	+	+
Aspartic acid	+	+	+	+	+	+
Arginine	+	+	+	+	+	+
Lysine	+	+	+	+	+	+
Cystine	+	+	+	+	+	+
Phenylalanine		+	+	+	+	+
Methionine			+	+	+	+
Proline				+	+	+
Unknown 1		+	+	+	+	+
" 2		+	+	+	+	+
Unknown 1 Rf值	1次 0.055		2次 0.173			
Unknown 2 Rf	1次 0.021		2次 0.173			

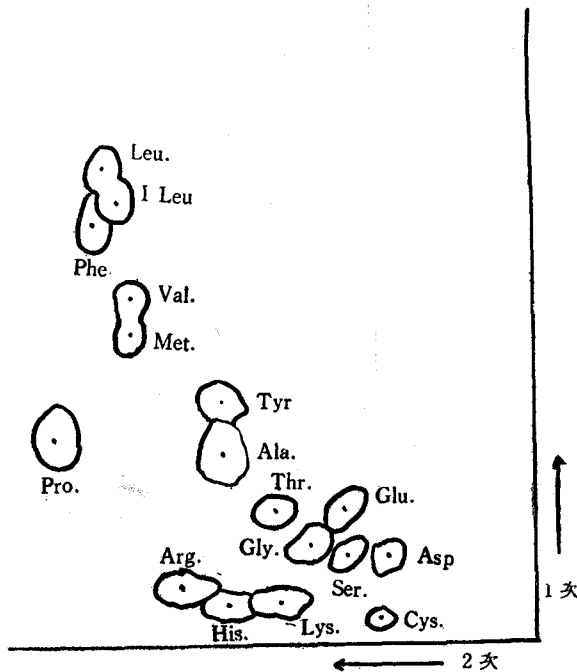
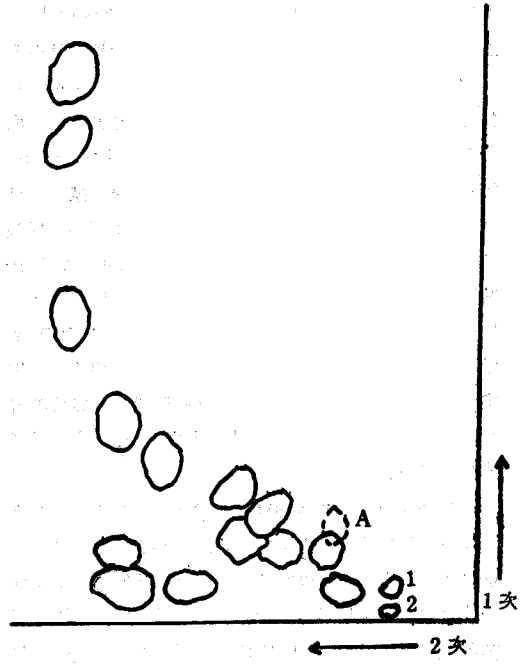


그림 5. Standard Amino acid의 paper chromatogram

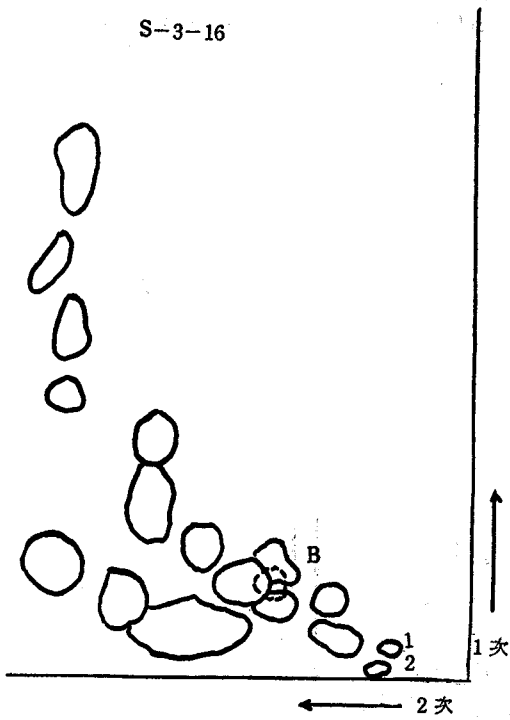
S-1-16



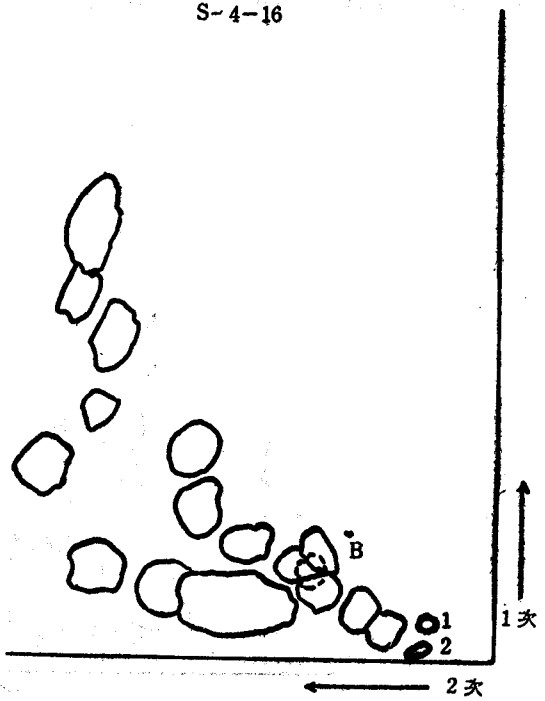
S-2-16



S-3-16

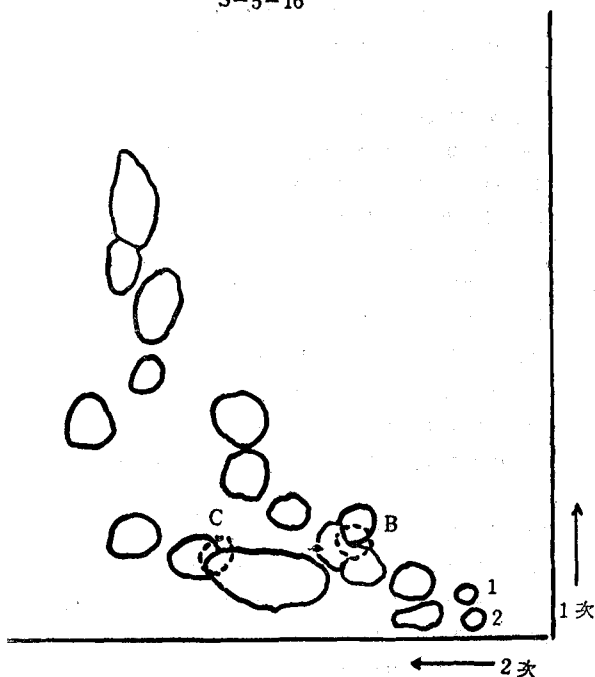


S-4-16





S-5-16



S-6-16

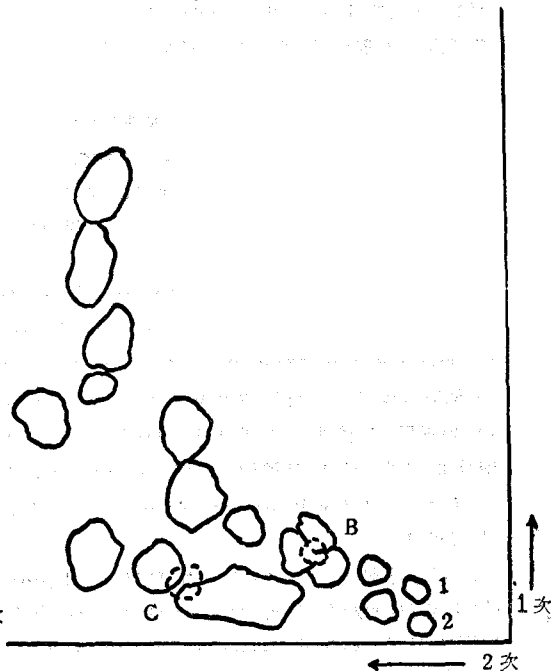


그림 6. X-16 fraction 試料의 paper chromatogram

少하는 것이 아닌가 生覺된다.

4. 上記 分子篩別한 各 fraction 中 50~60%의 amino 態 및 peptide 態 窒素가 X-16 fraction 에 있으며 또 比較的 分離하기 쉬우므로 X-16 fraction 을 試料로 하여 paper chromatography 로 二次 展開시켜 分離된 amino acid 를 standard amino acid 의 paper chromatogram 과 比較 同定하고, 또 Cl<sub>2</sub> gas 를 通過시킨 後 1% starch-iodine solution 으로 peptide 位置를 決定한 結果를 standard amino acid 와 함께 表示하면 그림 5 및 그림 6 과 같다. 그림 6 의 amino acid 및 peptide 의 結果를 綜合하면 表 5 와 表 6 과 같다.

表 5 에 依하면 16 種의 amino acid 와 2 種의 unknown amino acid 가 나타났으며 醱酵時間이 經過함에 따라 나타나는 amino acid 의 種類가 달랐다.

即 醱酵 10 時間 以後부터 蒸煮大豆에서 나타나지 않던 phenylalanine 과 2 種의 unknown amino acid 가 나타났고, 醱酵 20 時間부터는 methionine 이, 30 時間以後에는 proline 이 各各 出現하였다.

Peptide 에 있어서는 그림 6 과 같이 peptide-A spot 는 처음부터 나타났다가 20 時間以後 消失하였고, peptide-B spot 는 20 時間以後, peptide-C spot 는 40

表 6. Peptide 의 Rf 值

		Rf values	
		1 次	2 次
1	A	0.18	0.279
2	A	0.17	0.276
3	A	—	—
	B	0.21	0.398
4	A	—	—
	B	0.22	0.40
5	A	—	—
	B	0.17	0.398
	C	0.397	0.665
6	A	—	—
	B	0.170	0.399
	C	0.130	0.66

時間以後부터 各各 出現했다.

#### IV. 摘 要

蒸煮大豆에 納豆菌(Bacillus subtilis Natto 492-2) 을 接種하고 38°C 에서 醱酵시키면서 每 10 時間

다 試料를 採取 處理하여 納豆 製造過程中에 일어나는 蛋白質의 變化와 peptide 및 amino acid의 生成樣相에 關하여 研究하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 蒸煮大豆의 不溶性 蛋白態 窒素가 84%에서 醱酵 50 時間에 44%로 減少하였고, 水溶性 蛋白態 窒素는 若干의 增加를 했지만, peptide, amino acid 및 ammonia 態 窒素가 8%에서 45%로 增加하여 蛋白質의 加水分解가 顯著하였다.

2. 納豆菌에서 分泌된 酵素에 依해 分解된 peptide 및 amino acid를 cross linkage가 다른 dowex-50 resin으로 分子篩別한 結果, 大體로 A.P.L.이 작은 低級 peptide가 많이 生成됨을 알 수 있으며 醱酵 30 時間 以後에는 以前보다 蛋白質 分解가 微弱하게 일어나면서 比較的 큰 分子의 peptide 分解가 主로 일어나 低級 peptide 및 amino acid 生成이 많았다.

3. 分子篩別한 X-16 fraction을 試料로하며 paper chromatography에 依한 amino acid 및 peptide를 同定한 結果, 16 種의 amino acid와 그種의 unknown amino acid가 同定되었는데, 이들中 phenylalanine은 醱酵 10 時間 以後, methionine은 20 時間, proline은 30 時間 以後부터 各各 出現하였고, 또 Rf 値가 다른 3 點의 peptide中 1 個는 처음부터 나타나서 醱酵 20 時間 以後 消失하였고, 다른 2 點은 20 時間, 40 時間 以後부터 各各 繼續하여 出現하였다.

本 論文을 作成함에 있어 指導를 베풀어 주신 李春寧博士任께 感謝드리으며 많은 편의를 제공하여 준 趙大永 및 金永九에게 謝意를 表하는 바입니다.

## V. 引用文獻

1. E.Meissl & F.Böcker; Monatsch 4, 349(1883)
2. T.B. Osborne & G.F. Campell; J.Am. Chem. Soc., 20, 419(1898)
3. J.W. Hayward; The Composition and Nutritive Properties of Soybeans & Soybean Oil Meal. p. 12(1939).
4. 櫻井芳人; 日本食品工業 5, 13(1962).
5. 鄭泰錫外 2名; 科研彙報 4, 41(1959).
6. 山崎百治; 日本釀工誌 37, 249, 348(1959).
7. 矢部規矩治; 日本農學會報 24, 4(1894).
8. 澤村眞; Ibid 67, 1(1905).
9. 井口重次; 札幌農林學報 195(1917).
10. 伊藤武男; 日本農化誌 2, 32(1926).
11. 誌山田正一; Ibid 2, 246(1926).
12. 阿部久三; Ibid 10, 545(1934).
13. 中島顯三; Ibid 19, 155(1943).
14. 有働繁三; Ibid 12, 386(1936).
15. 木原芳次郎外 2名; Ibid 35, 57(1961).
16. 澤村眞; 日本農學會報 120, 1(1912).
17. 吳祐吉中村清三; 日本農化誌 13, 295(1937)
18. 山木義彦. 田村芳祐; 日本釀造學雜誌 5, 589(1928).
19. 林右市; 日本釀工誌 37, 22, 233, (1959).
20. 村松舜祐; 日本學術協會誌 5, 341(1930).
21. 半澤句, 田村芳祐; 日本農化誌 10, 520(1934)
22. 林右市; 日本釀工誌 37, 272(1959).
23. 逸見文雄; 札幌農林學報 328(1928).
24. 井上吉之; 日本農化誌 24, 291(1951).
25. 小幡彌太郎外名; Ibid 38, 567(1959).
26. 俞日濬; 朝鮮醫學會報 75, 284(1927).
27. 鄭泰錫; 科研彙報 1, 19(1956).
28. 鄭泰錫, 金燦祚, 尹斗石; Ibid 3, 75(1958)
29. 鄭泰錫, 金燦祚, 黃圭晟; Ibid 3, 83(1958).
30. 高橋暲, 能勢惟一; 日本釀工誌 35, 318(1957).
31. 竹內德男外 2名; Ibid 40, 375(1962).
32. 金載勳; 韓國農化會誌 6, 79(1965).
33. A.O.A.C.; Method of Analysis of the A.O.A.C. 13 9th.ed. (1960).
24. 高橋暲, 能勢惟一; 日本釀工誌 35, 404(1957).
35. H.N. Radon; Nature, 169, 922(1952).
36. R.J. Block, E.L. Durrum & G.Zwig; A manual of paper chromatography and Paper Electrophoresis p. 91. Academic Press (1955)