

막장의 아미노酸 組成에 관한 研究

申 洪 大* · 尹 柱 億**

(1962 10 · 2 受理)

Studies on the Amino Acids Composition of Makjang

By Hong Dae Shin and Joo Ok Yoon

Department of Chemistry, College of Liberal Arts and Sciences, Pusan National University

Amino acid composition of Makjang was determined by combined usage of ion exchange resin and paper chromatography in the following states.

- a. A fraction soluble in water
- b. Hydrolysate of the whole Makjang
- c. Same as a. (p.p.t. formed by tungstic acid or trichloroacetic acid being removed)
- d. Hydrolysate of c. (T and TCA)

By comparing amino acid composition of Makjang with that of its raw material, we found that decomposition of essential amino acids during brewing is slight. From the amino acid composition of a,b,c,d, we discussed the ratio of amino acid liberation during brewing and assumed that Makjang contains peptide-like substances composing of glutamic acid and aspartic acid.

緒 言

우리나라 사람의 主要 蛋白質食品의 하나인 “막장”의 營養的 考察의 基礎材料를 얻기 위하여 그 아미노酸 組成을 研究함에 있어서 比較的 操作도 容易한 이온 交換樹脂와 paper chromatography를 利用하여 定量的 方法에¹⁻⁷⁾ 對하여 檢討을 加하고 몇가지 改良點을 發見하였으므로 그 點과, 아울러 定量的 結果를 報告한다.

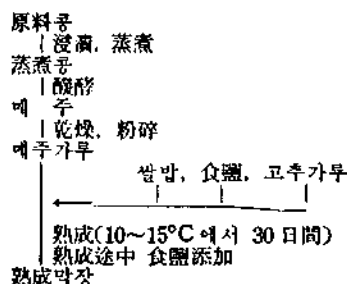
實驗方法 및 檢討

1. 試 料

막장은 種類가 많고 또한 釀造法이 一定하지 않아 分析對象으로서의 試料選擇이 困難하므로 本研究에서는 가장 一般的이라 할 수 있는 다음과 같은 方法으로 特別히 釀造한 것을 試料로 使用하였다.

메주가루 2되에 쌀 3합, 고추가루 1홉을 混合하고 거기에 20% 食鹽水를 若干 加하였다.

이 試料에 對하여 1). 試料抽出液中的 아미노酸含量 2). 加水分解物에서의 全아미노酸含量, 3). Tungstic acid 및 trichloroacetic acid 處理液의 加水分解物中的 아미노酸含量을 分析했다.



이의 一般分析結果는 Table I 과 같다.

Table 1 Analysis of Makjang

| | |
|---------------------|-------|
| Moisture (%) | 50.09 |
| NaCl (%) | 11.16 |
| Total-N (%) | 2.883 |
| Water Soluble-N (%) | 1.005 |
| Formol-N (%) | 0.594 |
| Total Sugar (%) | 4.94 |
| pH | 5.0 |

이들의 處理條件은 막장 約 500g을 乳鉢에서 잘 磨碎하여 均質로 하고 全아미노酸含量은 그 一定量을 酸 或은 알카리로 加水分解한 것에 對하여, 遊離아미노酸 및 其他 水溶性成分의 分析에는 磨碎한 막장 25g에

* **釜山大學校 文理科大學 化學科

0.01 M H₂O₂ 용액을 가하고 다시 잘 磨碎하여 磨碎物의懸濁液을 1時間 振盪한 後에 上澄液을 遠心分離하고, 다시 殘渣의 洗滌을 反覆하여 上澄液의 全量이 250 ml로 될때까지 抽出하고 이 抽出液에 toluol 2방울을 떨어뜨려 冷蔵하여 두었던 것에 對하여⁸⁾, Tungstic acid處理는 그 抽出液 4/5 容에 10% Na-tungstate 및 2 N H₂SO₄ 混液을 1/5 容 加하여 생긴 沈澱을 濾過한 濾液을 酸加水分解한 것에 對해서, Trichloroacetic acid 處理는 亦是 抽出液 4/5 容에 10% Trichloroacetic acid (以下 TCA 로 略함) 1/5 容을 加해서 생긴 沈澱을 濾過한 濾液을 酸加水分解한 것에 對해서 各各 定量했다. 酸分解條件은 最終濃度 3N HCl 10 倍量, 알카리分解는 3N NaOH 10 倍量(Cysteine·HCl을 박장에 對해서 50% 添加)으로 120°C에서 8時間 加壓分解했다. 그中 Methionine, Serine, 및 Threonine 은 2時間, Cysteine 은 1時間 酸分解한 것에 對해서 分析했다⁹⁾.

2. 아미노산 定量法

前述한 바와 같이 調製한 各 試料를 처음에 이온交換樹脂로서 酸性, 中性, 鹼性의 三群으로 아미노酸을 群別하고 다음에 各 fraction을 paper chromatogram 으로 上昇法에 依해 展開하여, 各 spot를 充分히 發色시키고 色素를 濾紙에서 溶出하여 比色定量했다.

(1) 이온交換樹脂에 依한 아미노酸의 群別—各 試料에 含有된 아미노酸을 群別하는 方法은 Fig. 1 과 같다.

Resin column 은 Fig. 2 와 같은 유리器具를 쓰고, 樹脂는 分析用的 Amberlite 를 使用한다. 即 Amberlite IR-4B 및 Amberlite IRC-50 으로서 다 같이 1N HCl 및 1N NaOH 로서 洗滌하여 可溶性物質을 除去하고 使用한다. 再生에는 Amberlite IR-4B 는 1N

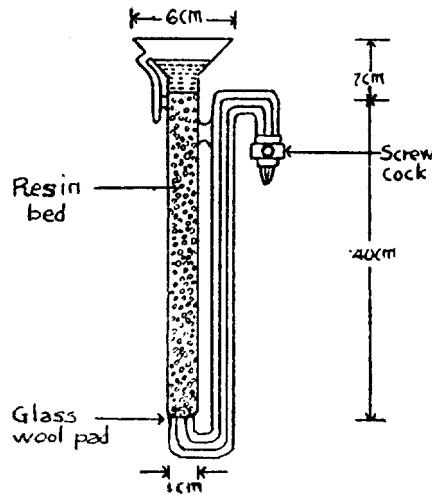


Fig. 2 Size of resin column

NaOH 로서 OH type 로 한다. Buffered Amberlite IRC-50 은 1N NaOH 로서 Na type 로 한다음 各各을 pH 7 및 pH 4.7 의 緩衝液으로 셋고 規定 pH 로 한다. Resin column 의 充填量은 各各 5g (pH 4.7 buffered Amberlite IRC-50 은 10g)이다. 吸着時의 流速은 1 ml/min. 이다. 試料를 다 흘려 보낸 다음 蒸溜水로 셋는데 洗液이 Ninhydrin 反應을 나타내지 않을 때까지 한다. 脫着은 鹽類의 影響을 적게 하기 위하여 0.2 N HCl 로 하고 流速은 2 ml/min. 로, 流出液의 Ninhydrin 反應이 없을 때까지 한다. 脫着液은 減壓濃縮하여 定容으로 하되 濃縮液은 各 아미노酸의 濃度가 約 2 mg/ml 로 되게 한다.

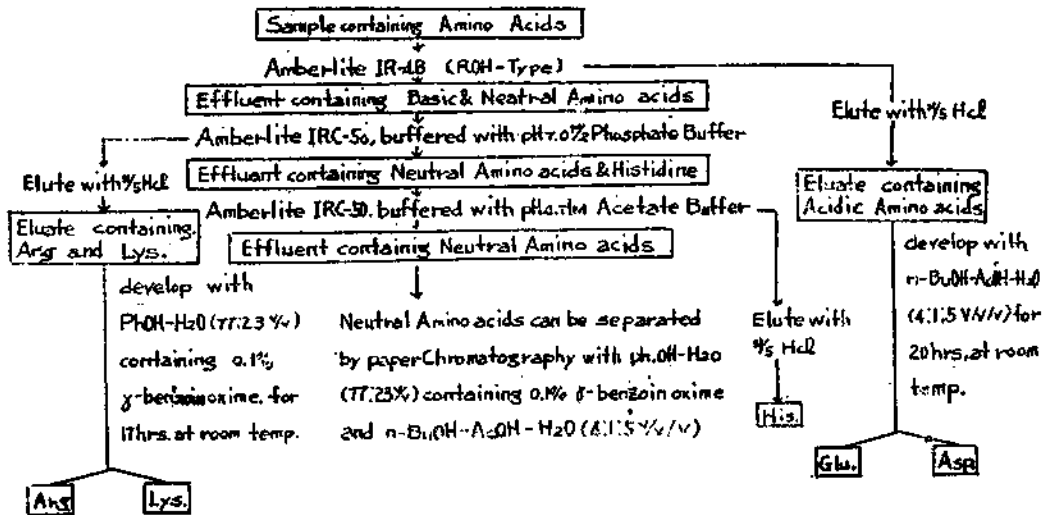


Fig. 1 Separation of amino acids by ion exchange resins and paper chromatography.

(2) Paper chromatography에 의한 아미노酸的 定量

① 試 藥

展開劑: 酸性 아미노酸... *n*-butanol·acetic acid·water (4 : 1 : 5 v/v/v)

鹽基性 아미노酸... phenol·H₂O(77 : 23) (0.1 % α -benzoin oxime 을 含有)

中性 아미노酸... 上記 두 展開劑를 다 使用.

濾 紙: 東洋濾紙 No. 50 (12 cm×50 cm)

Ninhydrin 溶液: 豫備發色用 0.2%, 本發色用 2%의 acetone 溶液

緩衝液: M/25 磷酸緩衝液(pH 7.0), 溶出液으로서는 여기에 同量의 CH₃OH 를 加함.

② 操作法

前記 群別 濃縮한 試料을 10~40 γ 의 範圍안에서 一定量을 均一하게 chromatographic 濾紙에 幅 2 cm 의 線上에 가로로 直게 spotting 하고, 이와 併行해서 定量한 아미노酸의 標準液을 만들어 10 γ , 20 γ , 30 γ , 40 γ 의 4點을 spotting 하여 一次元의 上昇展開를 시킨다. 風乾後 展開劑가 飽和된 標本명中에 넣고 室溫에서 16~22時間 展開한다. 展開한 濾紙는 展開劑의 臭氣가 거의 없어질 때까지 風乾하고 phenol의 경우는 ether로서 脫 phenol을 實施한다.

豫備發色은 0.2% Ninhydrin 溶液을 濾紙全面에 濡고 乾燥器中에서 60°C 3分間 加溫함으로써 이루어진다. 그리하여 定量하고자하는 아미노酸의 位置를 確認하고 그 附近에 나타난 spot 를 中心으로 2% Ninhydrin 溶液을 pipette로 均一하게 스며들게 한다. 이

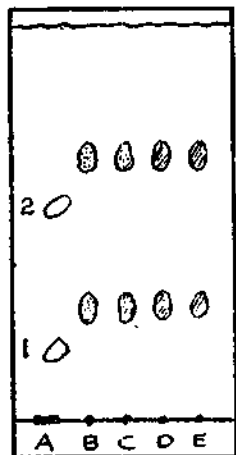


Fig. 3 Single-dimensional paper chromatogram of basic amino acids

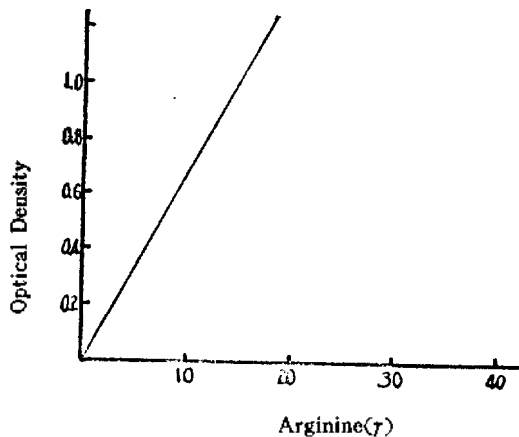


Fig. 4 Standard curve of Arginine

것을 直時 60°C에서 3分間 加熱하고 acetone이 完全히 蒸發한 後 M/25 磷酸緩衝液 pH 7.0을 濾紙의 兩面에서 充分히 濡고, 60°C에서 40分間 加熱한다. 發色한 아미노酸의 spot 를 直徑 約 5 mm 程度로 餘裕를 두고 濾紙를 끊어, 크립트로서 均一하게 하고 蒸氣浴 器안에 넣고 100秒 동안 蒸氣浴中에서 完全히 發色시킨다.

發色이 끝난 濾紙의 spot 를 各기 同面積으로 끊어서 試驗管에 넣고 M/25 磷酸緩衝液을 含有하는 methanol 5 ml를 加해서 色素가 完全히 溶出될때까지 室溫에 放置하여, 590 m μ 의 filter 를 써서 光電比色計로 吸光度를 測定한다. 同時에 併行展開한 標準 아미노酸의 吸光度에 依해 標準曲線을 作成하여 이에 따라서 試料中의 아미노酸量을 求한다. 但 Leucine 과 Isoleucine 을 定量할 積에는 40×40 cm의 濾紙를 使用하여 2次元 paper chromatogram으로 展開하고 標準曲線 作成은 標準 아미노酸을 同時 併行展開한 하지 않고 따로 8×40 cm의 濾紙로서 一次元으로 展開한 것을 使用했다.

前述한 바와같은 方法으로 群別한, 鹽基性 아미노酸을 含有한 試料과, 이와 同時에 併行展開한 標準 Arginine의 paper chromatogram과, 이 paper chromatogram에서 溶出한 標準 Arginine의 吸光度에 依해 作成한 標準曲線은 各기 Fig. 3과 Fig. 4에 表示한 것과 같다.

(3) 定量方法의 檢討

前述한 定量方法의 여러가지 條件을 決定하기 위해서 試料의 調製, 展開劑의 影響, 發色の 溫度, 時間,

pH 等과의 關係에 對해서 Valine 을 使用하여 檢討를 加했다.

㉔ 試料와 展開劑

Kunin 等¹⁰⁾은 Amberlite IR-4 B 에서 酸性아미노酸 을 脫着하는데 pH 4.0 의 0.1 M 醋酸緩衝液을 使用하

고 있으나 N/5 HCl 을 使用한 편이 醋酸 Na 에 依한 spot 形狀의 不良이나 發色阻害를 받지않 없이 낫다는 것을 다음과 같은 實驗結果로 알았다.

一定量의 酸性標準 아미노酸을 含有한 溶液을 Amberlite IR-4 B 에 吸着시킨 後 pH 4.0 의 0.1 M 醋酸

Table 2 Recoveries of amino acids eluted with N/5 HCl and M/5 acetate buffer(pH 4.0)

| Elute with | Amino Acids | Total Amino Acids added | Total Amino Acids of recovered | Recovery (%) | Mean of recovery (%) |
|----------------------------|-------------|-------------------------|--------------------------------|--------------|----------------------|
| N/5 HCl | Glu. | 40 γ | 34 γ | 85.0 | 86.7 |
| | | // | 36 // | 90.0 | |
| | | // | 34 // | 85.0 | |
| | Asp. | 40 γ | 37 γ | 92.5 | |
| | | // | 34 // | 85.0 | |
| | | // | 33 // | 82.5 | |
| M/5 Acetate Buffer(PH 4.0) | Glu. | 40 γ | 33 γ | 82.5 | 84.2 |
| | | // | // | 82.5 | |
| | | // | 35 // | 87.5 | |
| | Asp. | 40 γ | 34 γ | 85.0 | |
| | | // | 36 // | 90.0 | |
| | | // | 33 // | 82.5 | |

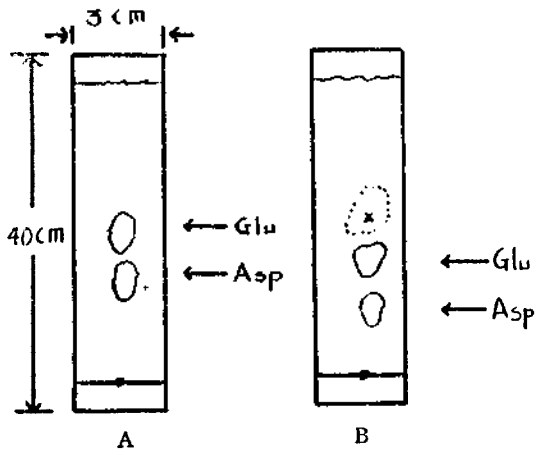


Fig. 5 Single dimensional paper chromatograms of acidic amino acids eluted with N/5 HCl and M/5 acetate buffer(pH 4.0)

A: Eluate with N/5 HCl

B: Eluate with M/5 Acetate Buffer(pH 4.0)

Solvent: n-BuOH-AcOH-H₂O(4 : 1 : 5 v/v/v)

Descending for 20 hrs at room temp.

緩衝液과 N/5 HCl 로 各各 脫着하여 paper chromatography 로서 展開하여 (Fig. 5), 定量한 回收率은 Table 2 와 같다.

展開劑에 依해서 展開中의 아미노酸이 酸化를 받으므로 phenol 에는 0.1%의 α-Benzoin oxime 을 加해서 酸化를 防止한다. Butanol 과 phenol 의 두 溶媒에

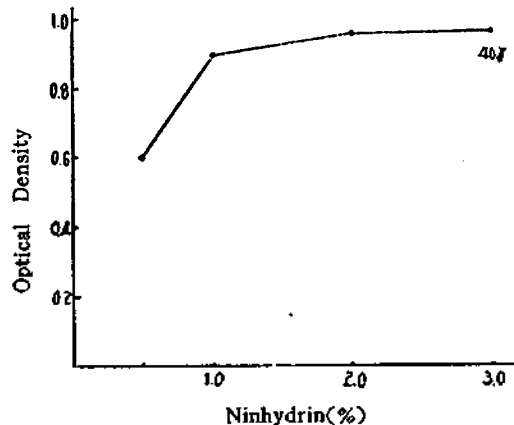


Fig. 6 Relation between concentration of Ninhydrin soln. and O.D. of Val. (40)

關해서 吸光度를 比較해 온 結果 phenol 이 約 8~10% 程度 떨어져지만 各各의 標準曲線의 誤差는 거의 비슷했다.

㉔ Ninhydrin 溶液의 濃度

豫備 및 本發色에 使用하는 Ninhydrin 溶液의 溶媒는 acetone 이 좋다. 0.5%, 1%, 2%, 3%의 Ninhydrin 溶液과 發色과의 關係는 Fig. 6과 같다. 0.5%, 1.0% 程度로는 發色이 不完全하고 2.0%, 3.0%로 되면 發色이 거의 完全하고 誤差는 ±6% 程度이다.

㉕ 緩衝溶液의 pH

發色시절적에 濾紙에 흡는 緩衝溶液의 pH와 發色度와의 關係를 Fig. 7을 通해서 考察해 보면, 一般적으로 아미노酸과 Ninhydrin의 棕色反應의 最適 pH는 5.0으로 말하고 있어서, 本實驗結果와는 一致하지 않는것 같으나 이는 濾紙에 남아있던 醋酸으로 因해 酸性을 띄고 있으므로 pH 7.0의 緩衝液을 填霧함으로써 pH 5.0에 가까워지게 되는 것으로 생각된다.

緩衝液을 흡는 뒤의 加溫溫度와 時間이 Ninhydrin 發色에 미치는 影響을 살펴보면 60°C에서 40분이면 充分하다.

㉖ 蒸氣浴 및 色素의 溶出

60°C에서 40分間 加熱해도 Ninhydrin과 아미노酸과의 反應이 不充分하므로 蒸氣浴器中에서 完全發色을 시킨다. 蒸氣浴時間과 發色度와의 關係는 Fig. 8과 같이 100秒면 充分하다. 溶出液은 methanol-磷酸緩衝液이 가장 良好하다.

3. 本定量法의 精密度檢討

이온交換樹脂 Amberlite IR-4B 로서는 酸性아미노酸이 그 一部分 吸着된다는 點, 또 試料에 灰分이 많은 경우에도 前述과 같은 簡單한 操作으로는 아미노酸의

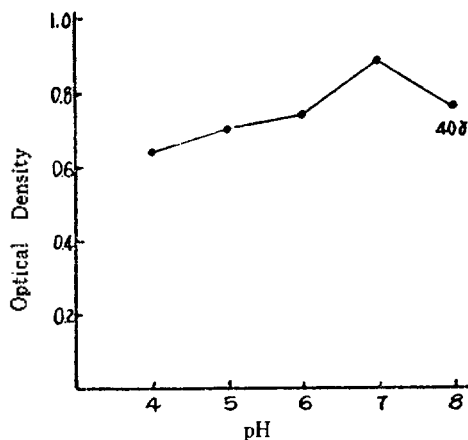


Fig. 7 Relation between pH of buffer soln. and O.D.

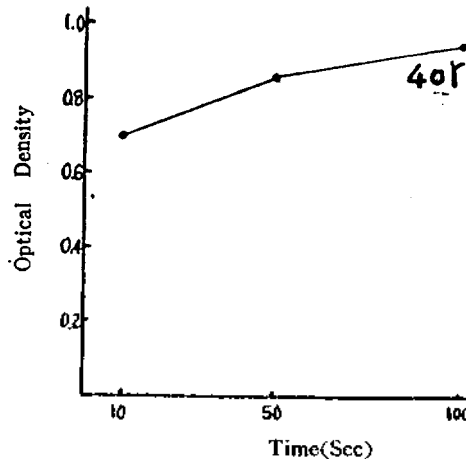


Fig. 8 Relation between steam-bathing time and O.D.

群別이 잘 안되며, (11) 또 paper chromatography로 展開한 試料中의 蛋白質以外的 成分(脂質, 糖質, 其他)에 依해서, 그리고 試料中和로 因한 鹽類의 增加에 依해서 發色이 阻害받을 것을 생각할수 있다. 그러므로 이러한것들의 本定量法에 미치는 影響을 考慮하여 그 精密度를 檢討하기 爲해 各 標準아미노酸 一定量을 取해 混合液을 만들고 거기에 食鹽 13%를 加하여 本法에 依해서 定量한 結果는 Table. 3과 같다. 그 回收率은 85~100% 程度이고 誤差는 ±10% 以內였다.

Table 3 Recovery of amino acids after ion exchange and paper chromatography

| Amino Acids | Solvent | Recovery of (%) | | | |
|-------------|-------------------------------|-----------------|-------|-------|-----------|
| | | Exp. No.1 | 2 | 3 | Mean |
| Arg | PhOH-H ₂ O (77:23) | 92.4 | 86.5 | 81.0 | 86.0 ±4.7 |
| Lys | " | 83.8 | 91.6 | 87.5 | 87.6 ±3.2 |
| His | " | 85.0 | 105.0 | 92.0 | 94.0 ±8.3 |
| Asp | n-BuOH-AcOH-H ₂ O | 92.5 | 85.0 | 82.5 | 86.7 ±4.2 |
| Glu | " | 85.0 | 90.0 | 85.0 | 86.7 ±2.4 |
| Gly | " | 96.6 | 92.5 | 89.0 | 92.7 ±3.1 |
| Leu | " | 90.0 | 100.6 | 102.0 | 97.5 ±5.3 |
| Ileu | " | 87.5 | 107.5 | 96.7 | 97.2 ±8.1 |
| Met | " | 103.3 | 86.3 | 82.5 | 90.7 ±9.1 |
| Phe | " | 102.0 | 80.5 | 105.4 | 96.0 ±7.2 |
| Pro | " | 101.9 | 89.0 | 82.5 | 91.1 ±8.0 |
| Ser | " | 87.5 | 100.2 | 100.0 | 95.9 ±5.9 |
| Thr | " | 90.7 | 92.5 | 89.3 | 90.8 ±1.4 |
| Tyr | " | 100.3 | 91.5 | 89.7 | 93.8 ±4.5 |
| Val | " | 90.0 | 84.6 | 97.6 | 90.7 ±5.2 |
| Try | " | 91.4 | 80.5 | 101.0 | 91.0 ±8.4 |
| Ala | " | 82.0 | 100.5 | 100.0 | 94.2 ±8.6 |
| Cys | " | 92.0 | 89.8 | 86.0 | 89.3 ±2.4 |

實驗結果 및 考察

蛋白質加水分解液과 같은 各種의 아미노酸이 混合되어 있는 試料中の 各 아미노酸을 定量함에 있어서 本定最法은 前述한 바와 같이 誤差가 $\pm 10\%$ 以內로서 比較的 좋은 精度로 定量할 수 있음을 確認했다.

이 方法으로 막장組成 아미노酸의 分析結果는 Table 4와 같다. 여기에서 W는 遊離아미노酸含量, F는 遊離아미노酸含量, T는 Na-tungstate 處理濾液中の 아미노酸含量, TCA는 TCA 處理濾液中の 아미노酸含量이다. 試料中の 아미노酸含量을 原料 蛋白質에 關해서는 R.J. Block의 分析值¹³⁾, 蛋白質에 關해서

는 K. Sasaoka의 分析值¹³⁾ 參考로 推定한 값과 Table 4와 比較하면 Arginine, Lysine, Histidine 등의 鹽基性아미노酸, Valine, Leucine, Isoleucine, Threonine, Phenylalanine 등은 거의 減少를 볼수 없으나 Aspartic acid는 原料에 比해 30%, Glutamic acid는 20%의 減少를 Methionine은 相當한 減少를 보이고 Tryptophane, Cystine, Alanine은 Paper chromatogram에 나타나지 않고 있다.

以上에서 보면 釀造工程中에 特定아미노酸의 損失은 比較的 적고, Aspartic acid, Glutamic acid, Methionine은 若干減少하고 있다. Tryptophane을 除外한 必須아미노酸은 大概 原料中 含量과 비슷하며 釀造中

Table 4 Amino acid content of Makjang

| Amino Acids | mg/g | | | | ratio of A.A content (%) | | | |
|-------------|------|-----|------|------|--------------------------|-----|-----|-------|
| | W | F | T | TCA | F/W | T/W | F/T | F/TCA |
| Arg | 6.5 | 0.6 | 0.8 | 0.9 | 9 | 12 | 75 | 67 |
| Lys | 8.7 | 3.8 | 4.5 | 3.9 | 44 | 52 | 84 | 97 |
| His | 2.3 | 0.8 | | 0.9 | 35 | | | 89 |
| Asp | 14.3 | 4.5 | 6.8 | 7.0 | 32 | 48 | 66 | 64 |
| Glu | 33.8 | 8.9 | 24.1 | 25.5 | 26 | 71 | 37 | 35 |
| Gly | 10.4 | 3.2 | 2.4 | 3.5 | 31 | 23 | 133 | 91 |
| Leu | 21.6 | 4.8 | 5.8 | 5.0 | 22 | 27 | 83 | 96 |
| Isoleu | 13.0 | 6.7 | 7.0 | 6.9 | 52 | 54 | 96 | 97 |
| Met | 3.1 | 1.6 | | | 52 | | | |
| Phe | 6.2 | 2.6 | | | 42 | | | |
| Pro | 10.6 | 5.9 | | | 56 | | | |
| Ser | 10.5 | 4.8 | | | 46 | | | |
| Thr | 5.9 | 1.6 | | | 27 | | | |
| Tyr | 7.2 | 1.7 | | | 24 | | | |
| Val | 10.7 | 4.0 | 3.8 | 4.0 | 37 | 36 | 105 | 100 |

의 必須아미노酸의 分解는 적다고 할수있다. 아미노酸 組成으로 본 막장의 蛋白質食品으로서의 營養價는 原料에 依한 것이며, 따라서 原料中の 含量도 적고 釀造中の 消失도 豫想되는, Methionine과 Tryptophane을 強化함으로써 營養價를 높일 수 있을 것이다. Tryptophane, Cystine, Alanine은 거듭 實驗을 해 왔으나 나타나지 않았으며 釀造 或은 加水分解中에, 破壞되었거나, 그렇지 않으면 本定最法이 適當하지 않는 탓인지 생각된다.

15種의 아미노酸의 平均遊離度 F/W는 約 36%이고, 各 아미노酸의 F/W에 關해서 平均値와 比較해보면 Arginine은 27%나 낮고 Aspartic acid, glutamic acid, glycine, Leucine, Threonine, Tyrosine 등은 平均値以下로서 結合形이 많은 것으로 생각된다.

Methionine, isoleucine, Proline은 잘 遊離되고 있다. 그중 Methionine은 酸分解時 破壞가 있으리라 생

각된다. 其他아미노酸은 거의 비슷한 遊離度를 나타내고 있다.

Na-tungstate로 沈澱되지 않는 部分中에 含有되는 遊離아미노酸의 比率은 F/T로 表示했는데 Glutamic acid는 37%, Aspartic acid는 66%로 다른 아미노酸에 比하면 特히 적다. 따라서 結合狀으로 存在하는 것이 많으리라 생각되며 其他아미노酸은 (加水分解로 破壞되는 것은 除外함) 75~100%나 된다.

TCA 處理濾液에서 얻은 結果는 T 處理液에 比해서 Glycine, Glutamic acid, Aspartic acid가 增加하고 있다.

要 約

(1) 아미노酸定量은 加水分解物을 이온交換樹脂로서 群別하고 그것을 paper chromatography로서 展開하여 比色定量하는 方法을 擇하고 그 方法에 對해서 檢

討論 加하고 改良을 했다.

(2) 代表的인 乳糖을 釀造하여 그 全아미노酸, 遊離 아미노酸, T & TCA 處理 濾液中的 아미노酸을 前述한 方法으로 定量하여 그 組成을 決定했다.

(3) 全아미노酸含量은 原料中的 아미노酸含量과 比較해서 釀造中 必須아미노酸의 分解는 적음을 確認했다.

(4) 遊離아미노酸 및 沈澱劑處理濾液中的 아미노酸量에서 아미노酸의 遊離狀態에 對해서 考察을 해 보고 Glutamic acid, Aspartic acid의 結合狀으로 含有되는 量이 많음을 알았다.

引用 文 獻

- 1) 田中, 洪多野, 香川: *Protein*, 2, (No. 1), 13 (1951)
- 2) 田中, 香川: *日化*, 73, 303(1952)
- 3) 田中, 香川, 江頭: *日化*, 74, 53(1953)
- 4) 丸田, 鮫島, 田中: *日農化*, 28, 775(1954)
- 5) K.V. Giri: *Nature*, 170, 1025(1952)
- 7) 渡邊, 渡邊, 小出, 齋藤, 志村: *日農化*, 34, 620 (1960)
- 7) 赤堀, 水島: *蛋白質化學*, 1, 214(1954)
- 8) 益子, 大橋: *日農化*, 34, 431(1960)
- 9) 田村, 桐村, 原, 杉村: *日農化*, 26, 483(1952)
- 10) J.C. Winters and R. Kunin: *Ind. Eng. Chem.*, 41, 460(1949)
- 11) 赤堀, 水島: *蛋白質化學*, 1, 38(1954)
- 12) R.J. Block, D. Bolling: *Amino acid Composition of Proteins and Foods*, Thomas, C.C., (1951)
- 13) K. Sasaoka: *Memoirs of Research Inst. for Food Sci., Kyoto Univ.*, 13, 17, 26(1957)