

# 콩고오지 製造中의 peptide에 관한 研究 第二報 콩고오지 製造中에 生成되는 低級 peptide의 構成 amino acid

서울大學校 農科大學  
農化學科

金 載 勗

(1965年 4月 19日 受理)

Studies on peptides during soybean-koji preparation

Part II. Amino acid pattern composing oligopeptides formed  
during soybean-koji preparation.

Ze Uook Kim

Dept. of Agrochemistry  
College of Agriculture  
Seoul National University

## Summary

In order to detect amino acid pattern of paptides separated from the samples which were taken in seven and half hours intervals during soybean-koji preparation, the peptide spots were eluted from two dimensional paperchromatogram resulting from X-16 fraction of molecular sieving by Dowex-50 ion exchange resin. Also the changes of free amino acids content were observed. The following results were obtained.

(1) When the growth of mycelia and sporulation became active, the amount of free amino acids in general was increased and a few new amino acids were formed in the koji preparation.

(2) The change of peptides during the koji preparation became active when the growth of mycelia and sporulation.

(3) Fifteens of oligopeptides were detected and the amino acid pattern of each peptide was as described below.

Cys, Asp, Ser, Glu, Arg, Ala, Try, Val, Leu or Ileu

Cys, Asp, Ser, Glu, His, Arg, Ala, Phe, Leu or Ileu

Cys, Glu, Ala, Met, Gly

Asp, Glu, Ala, Gly

Asp, Glu, Lys, Ala, Tyr, Met, Leu or Ileu, Gly

Cys, Asp, Ser, Glu, Lys, His, Tyr, Phe, Leu or Ileu, Glu

Asp, Ser, Glu, Thr, Pro, Ala, Try, Val, Leu or Ileu, Gly

Asp, Ser, Glu, Ala, Leu or Ileu, Gly

Asp, Ser, Glu, Ala, Met, Leu or Ileu, Gly

Glu, Gly

Asp, Glu, His, Ala, Pro, Try, Met, Leu or Ileu.

Ser, Glu, Ala

Ser, Glu, Thr, Tyr, Pro, Leu or Ileu, Gly

Asp, Ser, Glu, Ala, Leu or Ileu, Gly

Ser, Ala

## 一. 緒 論

著者は 第一報<sup>(2)</sup>에서 콩고오지 製造中 一定時間 間隔으로 採取한 試料를 處理하여 얻은 peptide 群의 溶液을 cross linkage가 다른 Dowex 50을 利用하여 分子篩別을 한 結果 X-16, X-12, X-8, X-4,

X-2 및 effluent의 fraction으로 分割하여 各fraction에 對한 peptide 分布 및 消長에 關하여 檢討하였는데 이들 fraction中 二次元 paper-chromatography를 適用하여 쉽게 分離할 수 있는 比較的 低級 peptide의 構成 amino acid를 알게 되었으므로 檢出되는 amino acid와 함께 이것을 여기에 報告하는 바이다.

## 二. 實驗方法

### 1. 試料 및 試藥

#### (1) 試料

第一報<sup>(1)</sup>에서 Dowex-50에 依하여 分子篩別을 한 peptide를 含有한 fraction中 X-16에 該當하는 部分을 試料로 하였다.

#### (2) 試藥

##### A) Standard amino acids

美國 Fisher scientific company 製의 試藥을 使用하였다.

##### B) Standard DNP-amino acids

Standard DNP-amino acid는 standard amino acid를 使用하여 다음과 같은 方法으로 製造한 것을 使

用하였다.

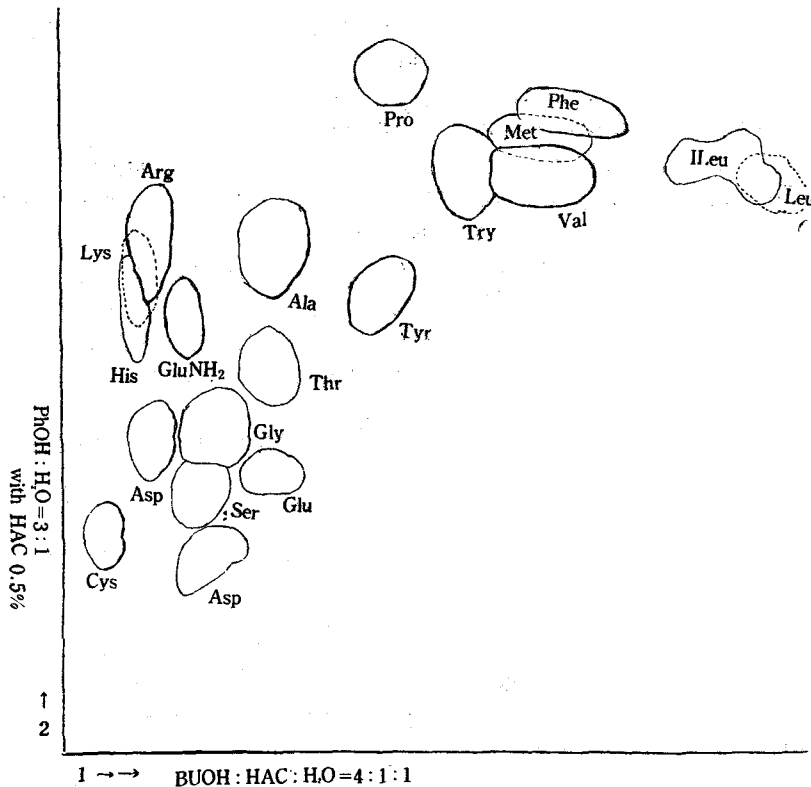
DNP-alanine, DNP-aspartic acid, DNP-leucine, DNP-phenylalanine.

DNP-cystine, DNP-glutamic acid, DNP-glycine.

DNP-valine, DNP-methionine, DNP-lysine, 2HCl DNP-asparagine, DNP-histidine은 Krishnarau, R. Rao 및 Herbert, A. Sober<sup>(2)</sup>의 方法에 따라서 standard amino acid를  $\text{NaHCO}_3$ 의 mild alkali 溶液에 녹이고 여기에 ethanol에 녹인 2,4-Dinitro fluoro benzene (D.N.F.B)을 加하여 3時間 室溫에서 作用시킨 다음 減壓下에 ethanol을 除去하고 過剩의 DNFB는 alkali 條件下에서 ether로 抽出하여 除去한 後 이것을 酸性으로 만들어 生成되는 固體物質을 acetone에 녹이고 無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 乾燥시켜 無水狀態로 만들었다. 여기에 benzene을 넣고 petroleum-ether을 加하여 沈澱을 生成시킨 後 室溫에서 空氣를 通過시켜 蒸發시켰다. 이것을 다시 ether에 녹이고 petroleum ether로 沈澱시키는 操作을 數回 反復하여 DNP-amino acid를 結晶으로 얻었다.

DNP-serine, DNP-threonine, DNP-isoleucine.

Fig. 1. Paperchromatogram of standard amino acid



DNP-proline DNP-tryptophan.

DNP-arginine 은 R. R. Porter<sup>(4)</sup> and F. Sanger<sup>(12)</sup>의 方法에 따라서 mild alkali 條件下에서 ethanol 에 녹인 DNFB 를 amino acid 에 가하여 室溫에서 3 時間 作用시킨 後 減壓하여 ethanol 을 除去하고 過剩의 DNFB 는 alkali 條件下에서 ether 로 抽出하여 除去하였다. 여기에 HCl 溶液을 加하여 酸性으로 만들어 生成되는 固體物質을 氷冷水로 洗滌한 後 다음 溶媒를 使用하여 再結晶하였다.

| 該當 amino acid | 使用溶媒                                         |
|---------------|----------------------------------------------|
| L-serine      | methanol-water                               |
| L-isoleucine  | methanol-water                               |
| L-threonine   | aqueous-methanol                             |
| L-proline     | ether-petroleum-ether<br>및 acetic acid-water |
| L-tryptophan  | aqueous-methanol                             |
| L-arginine    | aqueous-acetone                              |

c) 濾紙

Amino acid 分離를 爲한 chromatography ; Whatman filter paper No. 1 을 使用

D.N.P-amino acid 分離를 爲한 chromatography ; Whatman filter paper No. 4 를 使用

2. 實驗方法

(1) Free amino acid 및 peptide 分離를 爲한 二次元 paper chromatography.

分子篩別을 한 試料를 paper chromatography 로 分離하기 爲하여 試料 1.2.3.4 는 各各 50 μ씩, 그리고 5.6.7.8.9.10 은 free amino acid 含量이 많이 增加되어 分離가 困難하였으므로 25 μ씩 spotting 하였다.

Chromatography<sup>(5)</sup>

試料를 28×23 cm 의 크기로 切斷한 Whatman Filter paper No.1 의 양끝으로부터 3 cm 거리의 穴에 spot 한 다음 下記와 같은 溶媒를 使用하여 室溫에서 第一次은 約 12 時間 第二次는 빛을 遮斷하여 約 10 時間 展開시켰다.

第一次 展開溶媒; BuOH : HAC : H<sub>2</sub>O = 4 : 1 : 1 (v/v)

第二次 展開溶媒; phenol : water = 3 : 1 (v/v)  
HAC 0.5% 含有

(2) Free amino acid 및 peptide 의 確認

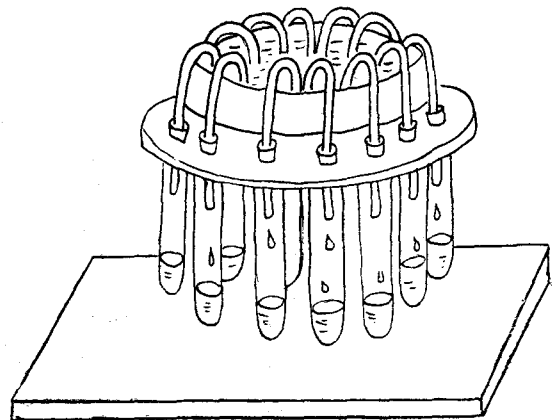
paper 6 枚를 一組로 하여 展開시켜 其中 一枚의 paper 에 0.2% ninhydrin acetone 溶液을 spray 하여 80°C 에서 10 分間 發色시켰다. 同一한 條件으로 展開시킨 第 1 圖와 같은 standard amino acid 의

paper chromatogram 의 pattern 과 對照하고 또 이들의 Rf 值를 參照하여 free amino acid 의 pattern 을 確認하고 spot 를 鉛筆로 黑線으로 表示하였다. peptide 의 位置는 紫外線에 依한 fluorescence<sup>(6)</sup>法을 參考로 하되 主로 Rydon<sup>(6)(7)</sup>의 starch-iodine reagent 를 使用하여 確認하였다. 即 前記한 0.2% ninhydrin 으로 發色시킨 paper 를 60°C 에서 2 時間 乾燥하고 空氣中에다 하루밤 放置한 다음날 다시 60°C 에서 30 分間 乾燥하고 paper 를 느슨하게 말아서 硝子 cylinder 속에 넣어 10 分間 鹽素 gas 를 通過시켰다가 꺼내서 室溫에서 fan 으로 30 分間 부처 鹽素 gas 를 除去시킨 다음 1% starch-iodine reagent 를 spray 하면 background 는 faint blue 인 것에 比하여 peptide 는 blue-black spot 인 것을 確認하고 나머지 5 枚은 可能한 限 peptide 와 ninhydrin 이 作用하여 破壞되는 것을 避하기 爲하여 0.04% 의 比較的 低濃度の ninhydrin acetone 溶液을 小量 spray 하여 80°C 에서 10 分間 發色시킨 것을 沃度反應을 일으킨 paper 와 對照하여 peptide spot 의 位置를 定하게 하였다.

(3) 各 peptide 의 抽出

0.04%의 ninhydrin 溶液을 뿌려서 얇게 發色시킨 5 枚의 paper 를 0.2% ninhydrin 으로 發色시키고 沃度反應을 일으킨 paper 와 對照하여 peptide 로 確認된 部分을 切斷하여 第 2 圖와 같은 中村<sup>(9)</sup>의 抽出裝置를 使用하여 水 約 1 ml 로 抽出하였다.

Fig. 2. Apparatus for extraction of peptide



이들 抽出液을 모아 眞空 desiccator 內에 넣고 下部에는 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 를 채운 다음 眞空 펌프로 約 30 分間 減壓시키고 하루밤 放置하여 乾燥시킨 후 試料로 使用하였다.

(4) 各 peptide 의 構成 amino acid

peptide 를 分離하기 爲하여 二次로 展開시킨 paper 20 枚에서 抽出하여 乾燥한 各 peptide 에 濃 HCl 을 加하여 20%의 HCl 濃度가 되게 調整하고 이것을 試驗管에 넣어 sealing 한 後 150°C에서 6 時間 加水分解시켰다<sup>(10)</sup>. 이 加水分解物中에 들어있는 HCl 은 KOH 와 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 를 넣은 減壓 desiccator 속에 넣어 減壓放置시켜서 濃縮除去하고 Whatman filter paper No.1 을 使用하여 peptide 를 分離할때와 같이 二次元으로 展開하여 ninhydrin 으로 發色시켰다.

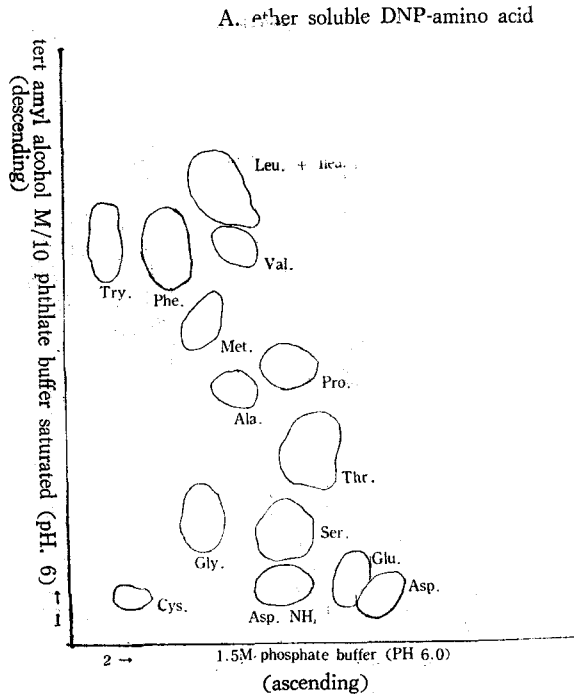
이 peptide hydrolyzate 中에는 overlap된 free amino acid 도 同時에 含有하고 있을 수도 있고 또한 overlap된 free amino acid 와 같은 種類의 amino acid 가 이 peptide 의 構成 amino acid 일 수도 있는데 overlap된 free amino acid 의 同定과 overlap된 free amino acid 가 peptide 의 構成 amino acid 인가의 여부는 Sanger 의 DNP method 를 使用하여 알아냈다.

(5) Overlap된 free amino acid 의 同定

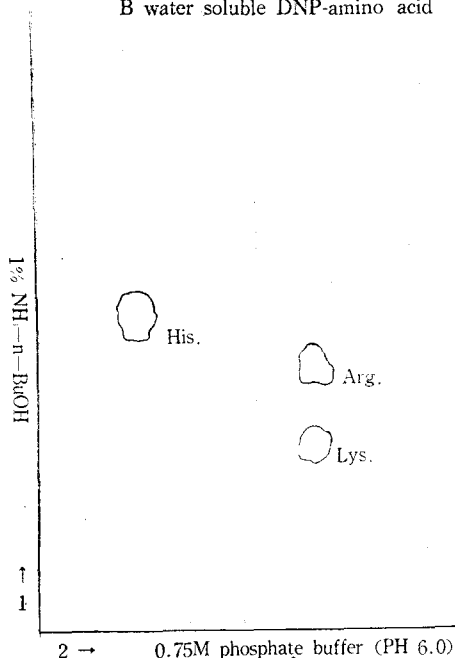
peptide 位置에 overlap된 free amino acid 를 同定하기 爲하여 高橋<sup>(11)</sup>는 Electrophoresis 을 使用하였으나 筆者는 50 枚의 paper 에서 分離한 peptide 의 spot 를 抽出하여 濃縮시킨 다음 Sanger F.의 方法에 따라서 DNFB 를 作用시키고 그中 一部를 paper chromatography 로 展開하여 同定하였다. 이때 yellow spot 가 하나뿐인 境遇에는 free amino acid 가 overlap 되지 않는 것으로 判定하고 peptide 가 ninhydrin 에 依하여 發色된 것으로 간주하였다.

2,4-Dinitro fluoro benzene<sup>(3) (4) (12) (13) (14)</sup> 과의 反應 約 10 mg 程度에 該當되는 peptide 를 3 ml 의 물에 녹이고 NaHCO<sub>3</sub> 10 mg 을 加한 다음 0.8 M NaHCO<sub>3</sub> buffer 로 溶液의 pH 를 8.5 로 調整하였다. 이 buffer 溶液에 DNFB 0.2 ml 을 녹인 ethanol 6 ml 을 加하고 室溫에서 3 時間 흔들면서 作用시켰다. 減壓으로 Ethanol 을 除去하고 물 5 ml 을 加한 다음 過剩의 DNFB 는 ether 로 抽出하고 減壓시켜

Fig. 3. Paper chromatogram of standard DNP-amino acid



## B water soluble DNP-amino acid



ether를除去하였다. 여기에 conc HCl을加하여 pH 1이되게調整하고 ether 및 ethyl acetate로抽出하였다. 따로 water layer부분은濃縮하여 methyl ethyl ketone으로抽出하여 chromatography에供하였다. ether 및 ethyl acetate抽出液은 Mills<sup>(15)</sup>의方法을應用하여眞空 desiccator에 넣어減壓시키면서赤外線燈으로加熱하여過剩의 DNP를除去한후 acetone으로 녹여 chromatography에 걸었다.

### Chromatography

Paper는 Whatman filter paper No. 4를 15 cm × 35 cm 및 25 cm × 28 cm의 크기로切斷하고 0.1 M phthalate buffer (pH 6.0)에 적신後室溫에서乾燥하여使用하였는데 DNP-amino acid의展開는 다음과 같은溶媒로展開시켰다.

Ether soluble DNP-amino acid<sup>(17) (16) (19)</sup>

1次; tert-amyl alcohol -0.1 M phthalate buffer (pH 6.0) saturated (descending)

2次; 1.5 M phosphate buffer (pH 6.0)<sup>(17) (19)</sup> (ascending)

Water-soluble DNP-amino acid

1次; 1% NH<sub>3</sub>-n-BuOH<sup>(14) (20)</sup>

2次; 0.75 M phosphate buffer (pH 6.0)<sup>(14) (21)</sup>

(6) Overlap된 free amino acid 종류가 peptide의構成 amino acid에包含되었는가의與否  
實驗 5에서試料를 dinitrophenyl 化시켜 chromatography로處理하고 남은殘液全部에는 5.7N

HCl 3 ml을加하고試驗管에 넣어封管하여 105°C에서 20時間加水分解<sup>(10) (11)</sup>시킨 다음 이것을 KOH와 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>를 넣은減壓 desiccator에서 HCl을除去하고濃縮한後 그一部分을前述한바와 같이 BuOH:HAc:H<sub>2</sub>O=4:1:1(v/v), PhOH:H<sub>2</sub>O=3:1(v/v) HAC 5% 含有의 solvent system으로 Chromatography를實施하여 ninhydrin으로發色을시켰다. 이렇게하여 얻은 amino acid pattern은 peptide를加水分解하여 얻은實驗 4의 amino acid pattern에서 overlap된 free amino acid와 N-terminal amino acid가除去된 pattern이다. 여기서 overlap된 것과同一한種類의 amino acid pattern이 또 나타나는 경우에는 이 amino acid種類가 peptide와 overlap된同時에 peptide構成 amino acid로도 들어 있는境遇이며反對로 overlap된 것과同一한種類の free amino acid pattern이 나타나지 않으면 overlap된 free amino acid가 이 peptide의構成 amino acid가 아닌境遇임으로 이것을對照하여 overlap된 free amino acid가 peptide構成 amino acid로서 들어있나의與否를決定하였다.

### 三. 結 果

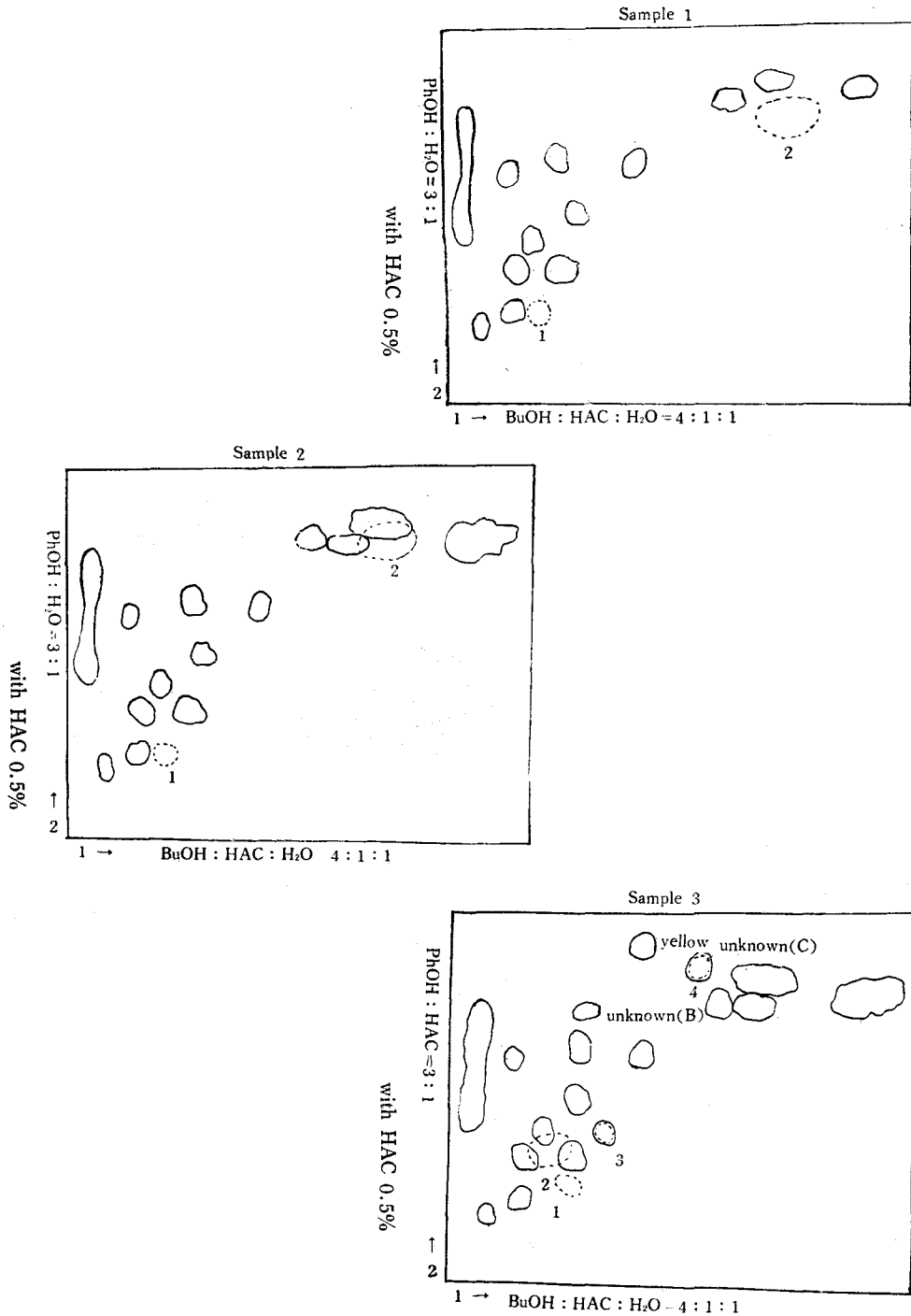
(1) 各 fraction의 paperchromatography

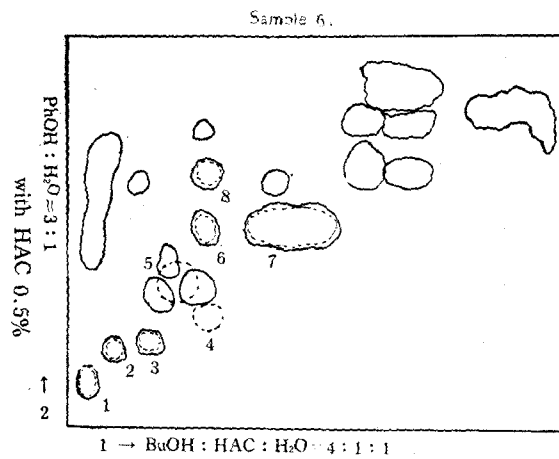
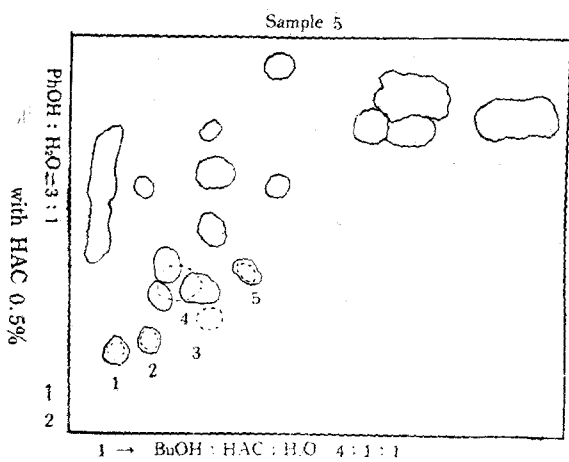
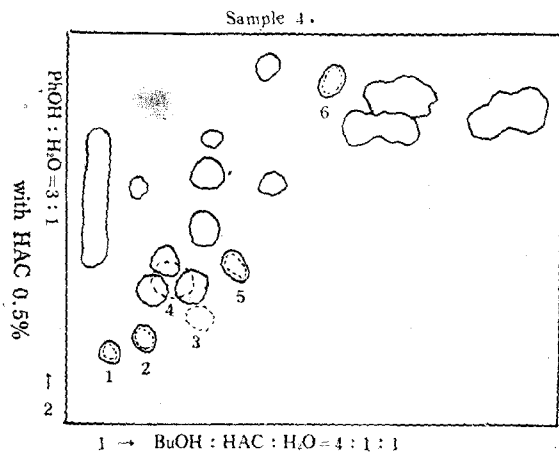
Cross linkage가 各其 다른 여러가지 Dowex 50을使用하여分子篩別을 한 各 fraction中 X-16 fraction에對하여 paper-chromatography를 하여二次元으로展開시켜 amino acid 및 peptide를 各各分離한

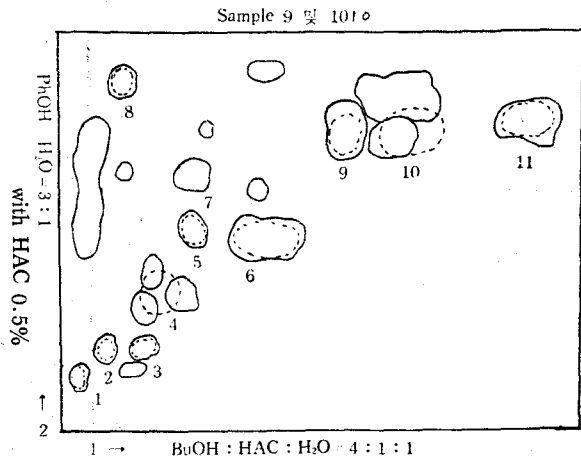
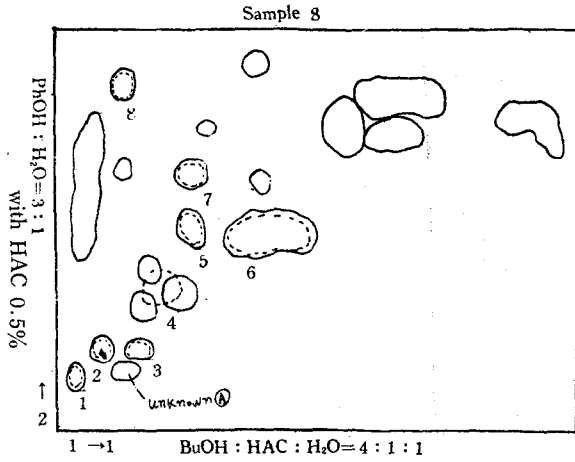
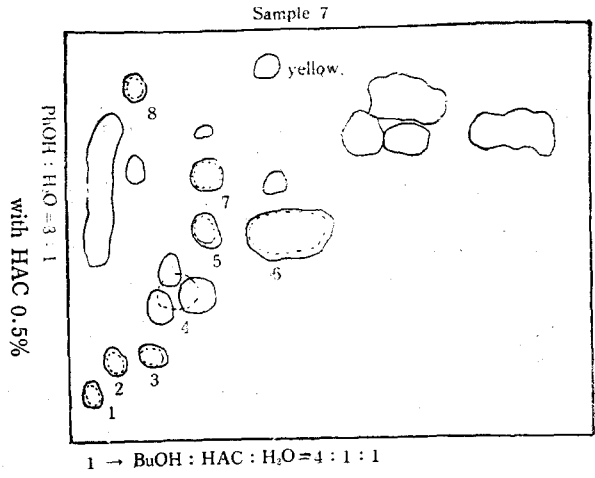
paper 上에 ninhydrin 試藥을 噴霧하여 發色시킨 amino acid의 spot를 黑線으로 表示하고 starch-iodine 試藥을 使用하여 確認한 peptide의 spot를 點

線으로 表示하던 그 結果는 第4圖와 같으며 各 peptide에 對하여 表示한 것과 같이 No.를 부쳤고 unknown amino acid에 對하여서도 記號를 부쳤다.

Fig. 4. paperchromatogram of X-16 fraction









第4圖의 paper chromatogram 에 의하여 分離된 各 peptide 의 Rf 值를 測定한 結果를 綜合하면 第1表 와 같다.

第1表의 各 peptide 의 Rf 值를 比較 檢討하는 同 時에 各 peptide 의 構成 amino acid pattern 을 比較

Table 1. Rf values of peptides

| Sample No. | Peptide No. | Rf    |       |
|------------|-------------|-------|-------|
|            |             | 1 次   | 2 次   |
| 1          | 1           | 0.23  | 0.28  |
| 1          | 2           | 0.55  | 0.78  |
| 2          | 1           | 0.227 | 0.28  |
| 2          | 2           | 0.55  | 0.78  |
| 3          | 1           | 0.25  | 0.35  |
| 3          | 2           | 0.23  | 0.37  |
| 3          | 3           | 0.28  | 0.40  |
| 3          | 4           | 0.39  | 0.89  |
| 4          | 1           | 0.07  | 0.23  |
| 4          | 2           | 0.12  | 0.25  |
| 4          | 3           | 0.25  | 0.35  |
| 4          | 4           | 0.23  | 0.37  |
| 4          | 5           | 0.28  | 0.41  |
| 4          | 6           | 0.39  | 0.90  |
| 5          | 1           | 0.06  | 0.23  |
| 5          | 2           | 0.12  | 0.26  |
| 5          | 3           | 0.25  | 0.34  |
| 5          | 4           | 0.23  | 0.37  |
| 5          | 5           | 0.28  | 0.41  |
| 6          | 1           | 0.02  | 0.12  |
| 6          | 2           | 0.06  | 0.235 |
| 6          | 3           | 0.12  | 0.26  |
| 6          | 4           | 0.25  | 0.34  |
| 6          | 5           | 0.23  | 0.37  |
| 6          | 6           | 0.25  | 0.50  |
| 6          | 7           | 0.30  | 0.49  |
| 6          | 8           | 0.29  | 0.59  |
| 6          | 9           | 0.11  | 0.88  |
| 7          | 1           | 0.02  | 0.12  |
| 7          | 2           | 0.07  | 0.23  |
| 7          | 3           | 0.12  | 0.25  |
| 7          | 4           | 0.23  | 0.37  |
| 7          | 5           | 0.25  | 0.50  |
| 7          | 6           | 0.30  | 0.49  |
| 7          | 7           | 0.29  | 0.59  |
| 7          | 8           | 0.11  | 0.88  |

|    |    |       |       |
|----|----|-------|-------|
| 8  | 1  | 0.02  | 0.12  |
| 8  | 2  | 0.07  | 0.23  |
| 8  | 3  | 0.12  | 0.26  |
| 8  | 4  | 0.23  | 0.37  |
| 8  | 5  | 0.25  | 0.50  |
| 8  | 6  | 0.30  | 0.495 |
| 8  | 7  | 0.29  | 0.59  |
| 8  | 8  | 0.11  | 0.88  |
| 9  | 1  | 0.02  | 0.12  |
| 9  | 2  | 0.07  | 0.24  |
| 9  | 3  | 0.12  | 0.25  |
| 9  | 4  | 0.23  | 0.37  |
| 9  | 5  | 0.25  | 0.50  |
| 9  | 6  | 0.31  | 0.49  |
| 9  | 7  | 0.29  | 0.59  |
| 9  | 8  | 0.11  | 0.88  |
| 9  | 9  | 0.50  | 0.80  |
| 9  | 10 | 0.55  | 0.78  |
| 9  | 11 | 0.85  | 0.88  |
| 10 | 1  | 0.019 | 0.12  |
| 10 | 2  | 0.07  | 0.235 |
| 10 | 3  | 0.12  | 0.25  |
| 10 | 4  | 0.23  | 0.37  |
| 10 | 5  | 0.25  | 0.50  |
| 10 | 6  | 0.31  | 0.49  |
| 10 | 7  | 0.29  | 0.59  |
| 10 | 8  | 0.11  | 0.88  |
| 10 | 9  | 0.50  | 0.80  |
| 10 | 10 | 0.55  | 0.78  |
| 10 | 11 | 0.85  | 0.88  |

함으로서 第2表와 같이 여러가지 試料에서 나오는 많은 peptide 가 一致하는 것으로 判定되어 各 peptide 에 對하여 Rf 值가 적은것에서 부터 다시 番號를 부쳐 命名 (([P]-I ~ [P]-XV) 하였다.

第4圖의 peperchromatogram 와 第2圖의 standard amino acid 의 paper chromatogram 와 對照하여 살필 수 있는 free amino acid 의 量的 變化를 代表 表示하면 第3表와 같다.

(2) overlap 된 free amino acid 를 包含하는 peptide 의 構成 amino acid.

X-16 fraction 의 二次元 paperchromatography 에서 切取한 overlap 된 free amino acid 를 包含하는 peptide spot 를 抽出하여 鹽酸으로 加水分解한 後 二次元으로 展開시켜서 判定된 overlap 된 free amino acid 를 包含하는 peptide 의 構成 amino acid 는 第4表와 같다.

**Table 2.** Table for peptide No.

| peptides identified as same (* sample N; * * peptide No.) | peptide No. |
|-----------------------------------------------------------|-------------|
| * **                                                      | [P]-I       |
| 6-1, 7-1, 8-1, 9-1, 10-1,                                 | [P]-II      |
| 4-1, 5-1, 6-2, 7-2, 8-2, 9-2, 10-2.                       | [P]-III     |
| 4-2, 5-2, 6-3, 7-3, 8-3, 9-3, 10-3.                       | [P]-IV      |
| 1-1, 2-1,                                                 | [P]-V       |
| 3-1, 4-3, 5-3, 6-4                                        | [P]-VI      |
| 3-2, 4-4, 5-4, 6-5, 7-4, 8-4, 9-4, 10-4                   | [P]-VII     |
| 3-3, 4-5, 5-5                                             | [P]-VIII    |
| 6-6, 7-5, 8-5, 9-5, 10-5                                  | [P]-IX      |
| 6-7, 7-6, 8-6, 9-6, 10-6                                  | [P]-X       |
| 6-8, 7-7, 8-7, 9-7, 10-7                                  | [P]-XI      |
| 6-9, 7-8, 8-8, 9-8, 10-8                                  | [P]-XII     |
| 9-9, 10-9                                                 | [P]-XIII    |
| 3-4, 4-6                                                  | [P]-XIV     |
| 1-2, 2-2, 9-10, 10-10                                     | [P]-XV      |
| 9-11, 10-11                                               |             |

**Table 3.** Free amino acids accompanied in each peplide fraction

(equivalents 50  $\lambda$  of each fraction)

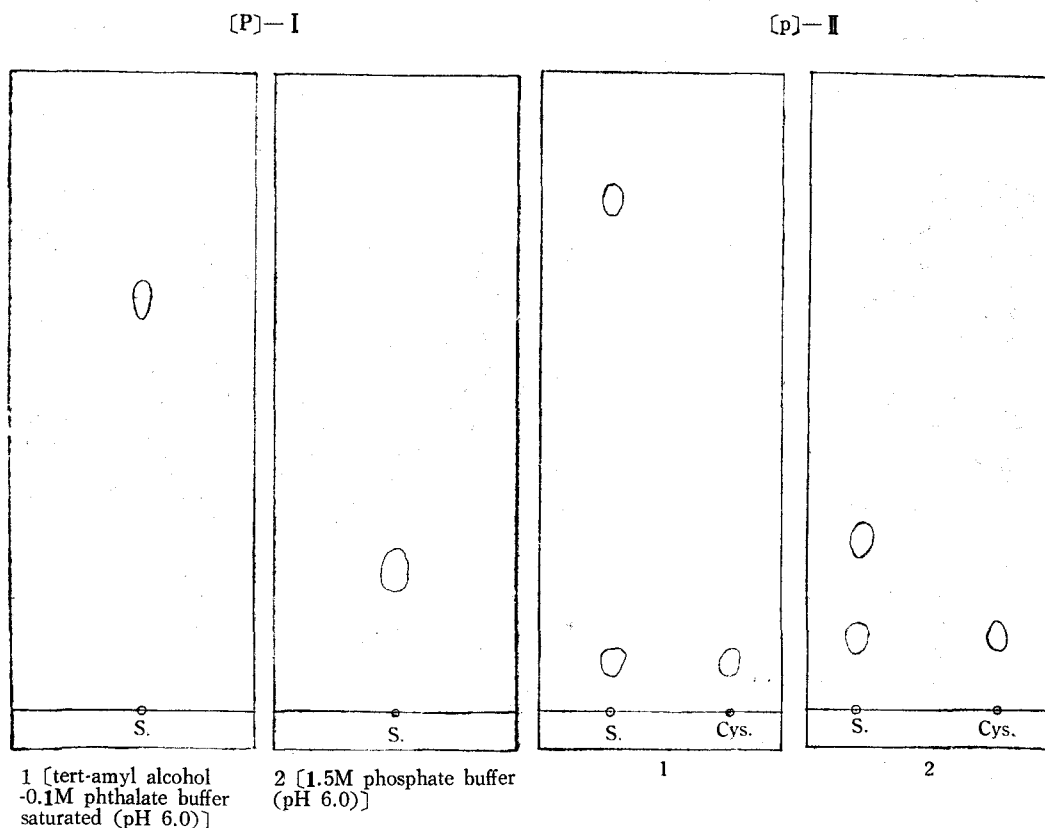
| amino acid         | sample No |       |       |       |    |    |    |    |     |     |
|--------------------|-----------|-------|-------|-------|----|----|----|----|-----|-----|
|                    | 1         | 2     | 3     | 4     | 5  | 6  | 7  | 8  | 9   | 10  |
| cystine            | +         | +     | +     | +2    | +2 | +2 | +2 | +2 | +2  | +2  |
| aspartic acid      | +2        | +2    | +3    | +4    | +4 | +6 | +6 | +8 | +8  | +8  |
| serine             | +         | +     | +     | +2    | +2 | +2 | +2 | +4 | +4  | +4  |
| glutamic Acid      | +3        | +3    | +3    | +5    | +6 | +6 | +8 | +8 | +10 | +10 |
| glycine            | +         | +2    | +2    | +3    | +4 | +4 | +4 | +4 | +5  | +5  |
| glutamine          | $\pm$     | $\pm$ | $\pm$ | $\pm$ | +  | +  | +  | +2 | +2  | +2  |
| lysine             | +2        | +2    | +2    | +3    | +4 | +4 | +4 | +4 | +4  | +4  |
| histidine          | +         | +2    | +2    | +3    | +4 | +4 | +4 | +4 | +4  | +4  |
| arginine           | +         | +     | +     | +     | +  | +  | +2 | +2 | +2  | +2  |
| threonine          | +         | +     | +     | +     | +  | +  | +  | +2 | +2  | +2  |
| alanine            | +2        | +2    | +2    | +3    | +4 | +4 | +4 | +4 | +6  | +6  |
| tyrosine           | +         | +     | +     | +     | +  | +  | +  | +  | +   | +   |
| proline            | -         | -     | +     | +     | +  | +  | +  | +  | +   | +   |
| tryptophan         | +         | +     | +     | +2    | +2 | +2 | +2 | +2 | +2  | +2  |
| valine             | -         | +     | +     | +2    | +2 | +2 | +2 | +2 | +2  | +2  |
| phenylalanine      | +         | +     | +2    | +2    | +2 | +2 | +3 | +4 | +4  | +4  |
| methionine         | -         | +     | +2    | +2    | +2 | +2 | +2 | +2 | +3  | +3  |
| leucin+ Isoleucine | +         | +     | +     | +2    | +2 | +2 | +2 | +2 | +2  | +2  |
| unknown A          |           |       |       |       |    |    |    | +  | +   | +   |
| unknown B          |           |       | +     | +     | +  | +  | +  | +2 | +2  | +2  |
| unknown C          |           |       | +     | +     |    |    |    |    |     |     |

Rf of unknown A(1; 0.11 2; 0.17)      Rf of unknown B(1; 0.31 2; 0.04)  
Rf of unknown C(1; 0.39 2; 0.895)

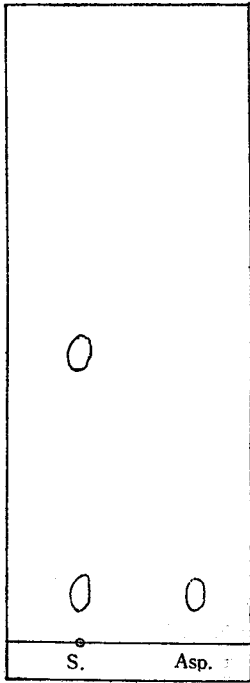
**Table 4.** Amino acid pattern containing overlapped free amino acid

| Peptide No.          | I  | II | III | IV | V  | VI | VII | VIII | IX | X | XI | XII | XIII | XIV | XV |
|----------------------|----|----|-----|----|----|----|-----|------|----|---|----|-----|------|-----|----|
| amino acid           |    |    |     |    |    |    |     |      |    |   |    |     |      |     |    |
| Cystine              | +  | ## | +   |    |    | +  |     |      |    |   |    |     |      |     |    |
| Aspartic acid        | +  | +  | ##  | +  | +  | +  | +   | +    | +  |   | +  |     |      | +   |    |
| Serine               | ## | +  |     |    |    | ## |     | +    | +  |   |    | +   | +    | +   | +  |
| Glutamic acid        | +  | +  | +   | +  | ## | ## | ##  | +    | +  | + | +  | +   | +    | +   |    |
| Glycine              |    |    | +   | +  | +  | ## | +   | +    | +  | + |    |     | +    | +   |    |
| Lysine               |    |    |     |    | +  | +  |     |      |    |   |    |     |      |     |    |
| Histidine            |    | +  |     |    |    | +  |     |      |    |   | +  |     |      |     |    |
| Arginine             | +  | +  |     |    |    |    |     |      | +  |   |    |     |      |     |    |
| Threonine            |    |    |     |    |    | +  |     | ##   |    |   |    |     | +    |     |    |
| Alanine              | +  | +  | +   | +  | +  |    |     | +    | +  | + | +  | +   |      | +   | +  |
| Tyrosine             |    |    |     |    | +  |    | +   |      |    |   |    |     | +    |     |    |
| Proline              |    |    |     |    |    |    |     | +    |    |   | +  |     | +    |     |    |
| Tryptophan           | +  |    |     |    |    |    |     | +    |    |   | +  | ##  |      |     |    |
| Valine               | +  |    |     |    |    |    |     | +    |    |   |    |     |      |     |    |
| Phenylalanine        |    | +  |     |    |    | +  |     |      |    |   |    |     |      |     |    |
| Methionine           |    |    | +   |    | +  |    |     |      | +  |   | +  |     |      |     |    |
| Leucine & isoleucine | +  | +  |     |    | +  | +  |     | +    | +  |   | +  |     | +    | +   | ## |
| Unknown A            |    |    |     |    |    |    |     |      |    |   |    |     | ##   |     |    |

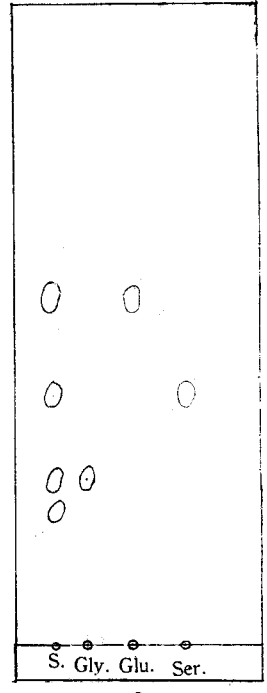
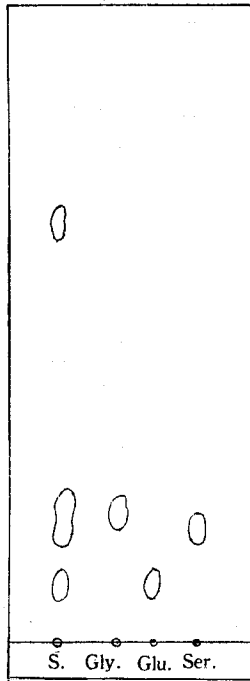
**Fig 5.** paper chromatogram for identification of overlapped free amino acid



[P]-I



[P]-VI

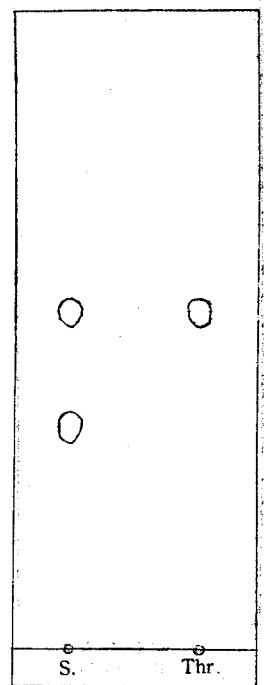
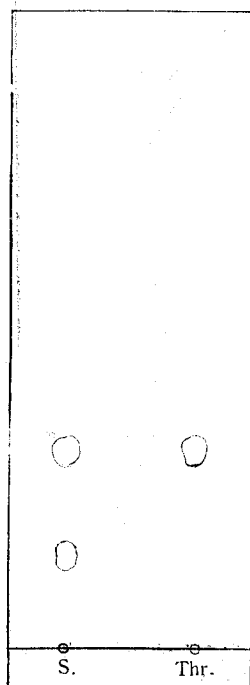
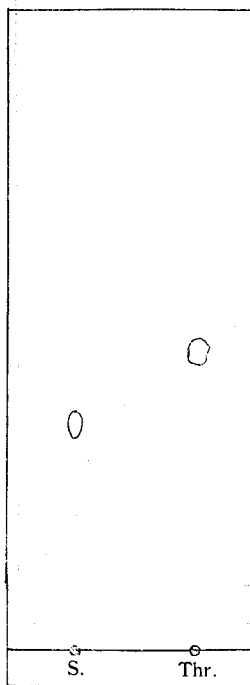
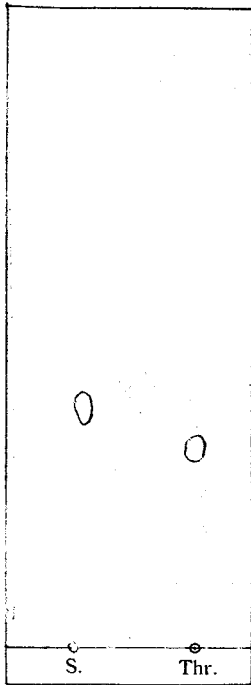


1

2

[p]-VII

[p]-VII



1

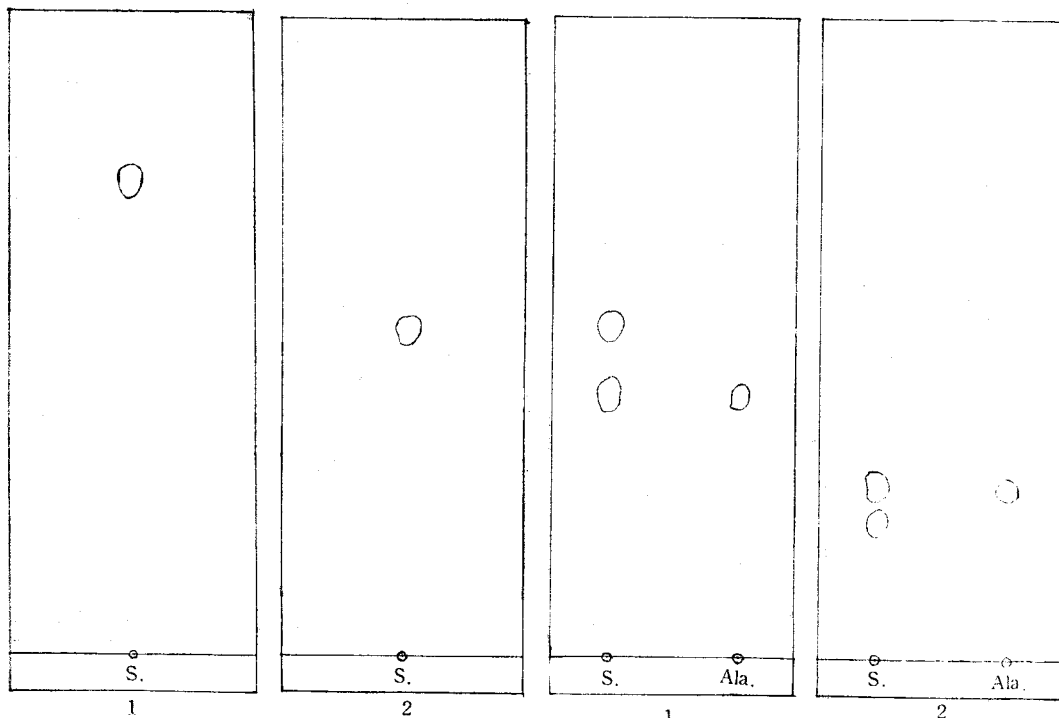
2

1

2

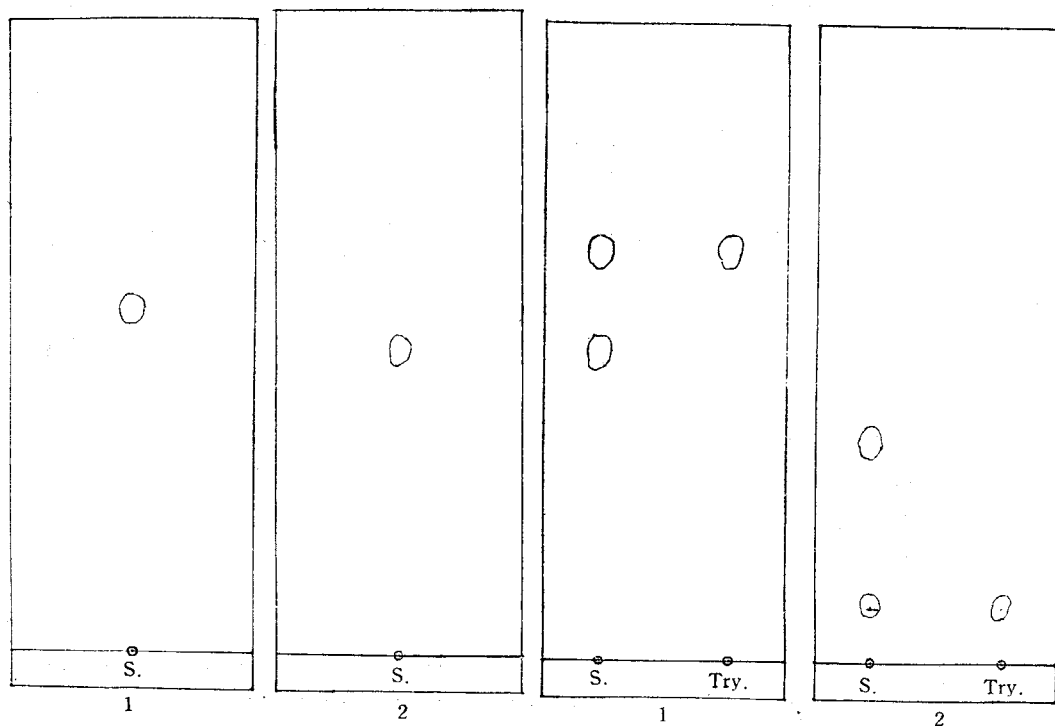
[p]-IX

[p]-X



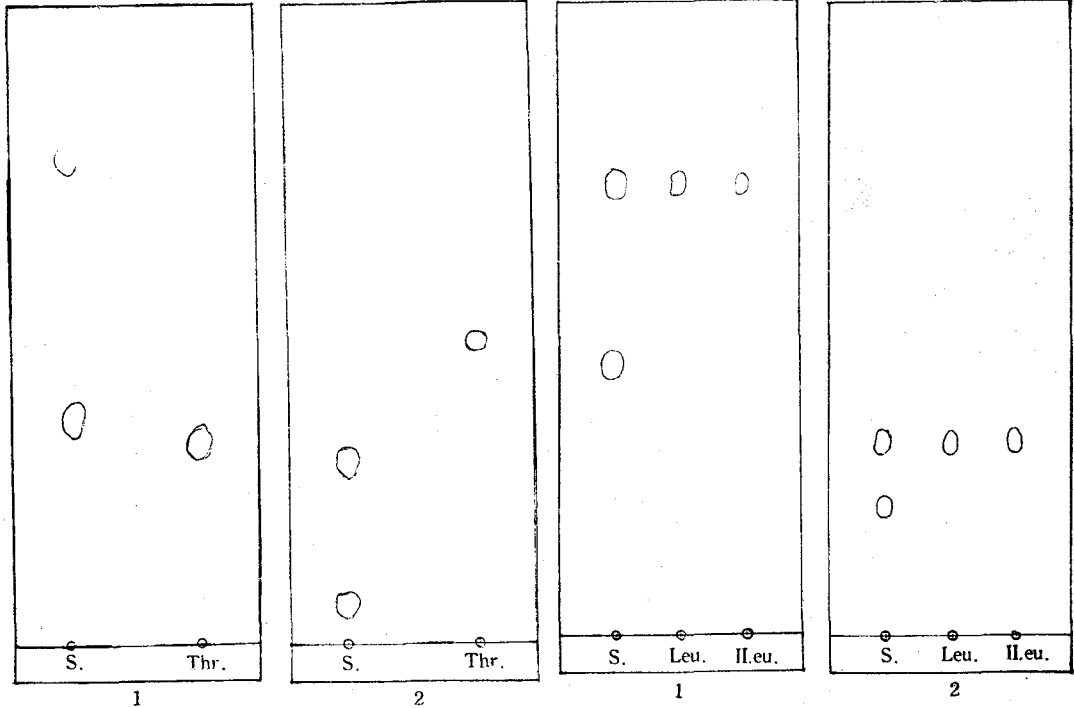
[P]-XI

[P]-XII



[P]-XIII

[P]-XV



(3) peptide 에 overlap 된 free amino acid 의 同定 展開시킨 paperchromatogram 에 ninhydrin 溶液과 starch-iodine reagent 를 使用하여 free amino acid 가 peptide 에 overlap 되었는가 아닌가는 大體的으로 알 수 있었으나 이것을 再確認하기 爲하여 free amino acid 가 overlap 되지 않은 것이 確實한 [P]-XIV, [P]-IV 및 [P]-V 는 除外하고 ninhydrin 과 starch-iodine reagent 에 동시에 發色된 spot 을 Sanger 의 DNP 方法으로 DNP-amino acid 및 DNP-peptide 를 生成케 하여 實驗 5 에 따라 實驗한 結果는 第 5 圖 와 같다.

第 5 圖의 結果를 보면 [P]-I, [P]-VII, [P]-IX 및 [P]-XI 는 1 個의 spot 을 나타내는 것으로 보아 이것들은 free amino acid 가 overlap 되지 않은 spot 임이 分明하다. 한便 [P]-II, [P]-III, [P]-VIII, [P]-X, [P]-XII, [P]-XIII, [P]-XV 는 各各 2 個의 spot 을 나타내고 [P]-VI 는 4 個의 spot 을 表示하고 있어 이들 peptide 는 1 個 또는 3 個의 amino acid 와 overlap 된 것 을 알 수 있으며 같은 paper 에 올린 standard DNP-amino acid 와 對照하여 各各의 overlap 된 amino acid 의 種類를 알 수 있었는데 이들 結果를 綜合하면 第 5 表와 같다.

Tabel 5. Overlapped amino acid to peptides

| peptide No.            | I | II   | III  | IV | V | VI             | VII | VIII | IX | X    | XI | XII  | XIII      | XIV | XV          |
|------------------------|---|------|------|----|---|----------------|-----|------|----|------|----|------|-----------|-----|-------------|
| overlapped amino acids | - | Cys. | Asp. | -  | - | Glu. Ser. Gly. | -   | Thr. | -  | Ala. | -  | Try. | unknown A | -   | Leu or Ileu |

第 5 圖의 結果에서 얻은 第 5 表의 overlap 된 free amino acid 의 種類를 第 4 表의 overlap 된 free amino acid 를 包含하는 peptide 의 構成 amino acid 에서 除外하면 第 6 表와 같이 된다.

**Table 6.** Amino acids pattern of peptide except overlapped free amino acid

| Peptide No           | I  | II | III | IV | V  | VI | VII | VIII | IX | X | XI | XII | XIII | XIV | XV |
|----------------------|----|----|-----|----|----|----|-----|------|----|---|----|-----|------|-----|----|
| cystine              | +  |    | +   |    |    | +  |     |      |    |   |    |     |      |     |    |
| aspartic acid        | +  | +  |     | +  | +  | +  | +   | +    | +  |   | +  |     |      | +   |    |
| serine               | ++ | +  |     |    |    |    |     | +    | +  |   |    | +   | +    | +   | +  |
| glutamic Acid        | +  | +  | +   | +  | ++ |    | ++  | +    | +  | + | +  | +   | +    | +   | +  |
| glycine              |    |    | +   | +  | +  |    | +   | +    | +  | + |    |     | +    | +   |    |
| lysine               |    |    |     |    | +  | +  |     |      |    |   |    |     |      |     |    |
| histidine            |    | +  |     |    |    | +  |     |      |    |   | +  |     |      |     |    |
| arginine             | +  | +  |     |    |    |    |     |      | +  |   |    |     |      |     |    |
| threonine            |    |    |     |    |    | +  |     |      |    |   |    |     | +    |     |    |
| alanine              | +  | +  | +   | +  | +  |    |     | +    | +  |   | +  | +   |      | +   | +  |
| tyrosine             |    |    |     |    | +  |    | +   |      |    |   |    |     | +    |     |    |
| proline              |    |    |     |    |    |    |     | +    |    |   | +  |     | +    |     |    |
| tryptophan           | +  |    |     |    |    |    |     | +    |    |   | +  |     |      |     |    |
| valine               | +  |    |     |    |    |    |     | +    |    |   |    |     |      |     |    |
| phenylalanine        |    | +  |     |    |    | +  |     |      |    |   |    |     |      |     |    |
| methionine           |    |    | +   |    | +  |    |     |      | +  |   | +  |     |      |     |    |
| leucine & Isoleucine | +  | +  |     |    | +  | +  |     | +    | +  |   | +  |     | +    | +   |    |

(4) Peptide 에 overlap 된 free amino acid 가 peptide 構成 amino acid 에 包含與否 Peptide 에 overlap 된 free amino acid 種類가 그 peptide 를 構成하고 있는 amino acid 의 一員인가 아닌가를 알기 爲하여 抽出한 peptide 抽出液에 DNFB 를 作用시켜서 DNP-amino acid 및 DNP-peptide 를

生成시킨 다음 5.7 N-HCl 로 105°C 에서 24 時間 加水分解시켜서 一次 溶媒로는 BuOH:HAC:H<sub>2</sub>O= 4:1:1(v/v) 를 쓰고 二次 溶媒로는 PhOH:H<sub>2</sub>O= 3:1 (v/v) HAC 0.5% 含有를 使用하여 展開시킨 다음 ninhydrin 으로 發生시킨 amino acid pattern 은 第 7 表와 같다. 이 amino acid pattern 은 peptide 의

**Table 7.** Amino acids pattern of peptides except N-terminal amino acid residue

| peptide No           | I  | II | III | IV | V  | VI | VII | VIII | IX | X | XI | XII | XIII | XIV | XV |
|----------------------|----|----|-----|----|----|----|-----|------|----|---|----|-----|------|-----|----|
| cystine              | +  | +  | +   |    |    | +  |     |      |    |   |    |     |      |     |    |
| aspartic acid        | +  | +  |     | +  | +  | +  | +   | +    | +  |   | +  |     |      | +   |    |
| serine               | ++ | +  |     |    |    | +  |     | +    | +  |   |    | +   | +    | +   | +  |
| glutamic acid        | +  | +  | +   | +  | ++ | +  | ++  | +    | +  | + | +  |     | +    | +   |    |
| glycine              |    |    | +   | +  | +  | +  |     | +    | +  |   |    |     | +    |     |    |
| lysine               |    |    |     |    | +  |    |     |      |    |   |    |     |      |     |    |
| histidine            |    | +  |     |    |    | +  |     |      |    |   | +  |     |      |     |    |
| arginine             | +  | +  |     |    |    |    |     |      | +  |   |    |     |      |     |    |
| threonine            |    |    |     |    |    | +  |     | +    |    |   |    |     |      |     |    |
| alanine              | +  | +  |     |    | +  |    |     | +    | +  |   | +  | +   |      | +   |    |
| tyrosine             |    |    |     |    | +  |    | +   |      |    |   |    |     | +    |     |    |
| proline              |    |    |     |    |    |    |     |      |    |   | +  |     | +    |     |    |
| tryptophan           | +  |    |     |    |    |    |     | +    |    |   | +  |     |      |     |    |
| valine               |    |    |     |    |    |    |     | +    |    |   |    |     |      |     |    |
| phenylalanine        |    |    |     |    |    | +  |     |      |    |   |    |     |      |     |    |
| methionine           |    |    | +   |    |    |    |     |      | +  |   |    |     |      |     |    |
| leucine & Isoleucine | +  | +  |     |    | +  |    |     | +    | +  |   | +  |     | +    | +   |    |

構成 amino acid 에서 N-terminal amino acid residue 가 除外된 結果일 것이다.

(5) Peptide 의 構成 amino acid

第 7 表의 結果를 overlap 된 amino acid 種類와 比較 檢討하면 [P]-II 에는 cystine, [P]-VI 에서는

Serine, Glycine, Glutamic acid 가, [P]-VII 는 threonine 이 overlap 된 amino acid 인 同時에 peptide 의 構成 amino acid 로도 들어 있는 것을 알게 되어 各 peptide 의 完全 amino acid 의 pattern 은 第 8 表와 같다.

Table 8. Amino acids pattern of peptide

| Peptide No.          | I  | II | III | IV | V  | VI | VII | VIII | IX | X | XI | XII | XIII | XIV | XV |
|----------------------|----|----|-----|----|----|----|-----|------|----|---|----|-----|------|-----|----|
| cystine              | +  | +  | +   |    |    | +  |     |      |    |   |    |     |      |     |    |
| aspartic acid        | +  | +  |     | +  | +  | +  | +   | +    | +  |   | +  |     |      |     |    |
| serine               | ++ | +  |     |    |    | +  |     | +    | +  |   |    |     |      |     | +  |
| glutamic acid        | +  | +  | +   | +  | ++ | +  | ++  | +    | +  |   | +  | +   | +    | +   |    |
| glycine              |    |    | +   | +  | +  | +  | +   | +    | +  | + |    |     |      | +   | +  |
| lysine               |    |    |     |    | +  | +  |     |      |    |   |    |     |      |     |    |
| histidine            |    |    | +   |    |    | +  |     |      |    |   |    | +   |      |     |    |
| arginine             | +  | +  |     |    |    |    |     |      | +  |   |    |     |      |     |    |
| threonine            |    |    |     |    |    | +  |     | +    |    |   |    |     |      | +   |    |
| alanine              | +  | +  | +   | +  | +  |    |     | +    | +  |   | +  | +   |      | +   | +  |
| tyrosine             |    |    |     |    | +  |    | +   |      |    |   |    |     |      |     |    |
| proline              |    |    |     |    |    |    |     | +    |    |   |    | +   |      | +   |    |
| tryptophan           | +  |    |     |    |    |    |     | +    |    |   |    | +   |      |     |    |
| valine               | +  |    |     |    |    |    |     | +    |    |   |    |     |      | +   |    |
| phenylalanine        |    | +  |     |    |    | +  |     |      |    |   |    |     |      |     |    |
| methionine           |    |    | +   |    | +  |    |     |      | +  |   | +  |     |      |     |    |
| leucine & isoleucine | +  | +  |     |    | +  | +  |     | +    | +  |   | +  |     |      | +   | +  |

四. 考 察

以上の 結果에서 코오지 生成中에 Dowex-50 의 X-16 fraction 을 二次元 paper chromatography 로 展開한 結果 peptide 는 普通 amino acid 位置에 overlap 된 것과 overlap 되지 않고 單獨으로 存在하는 境遇가 있는 것을 알 수 있었는데 코오지 生成初期에는 단지 두 가지의 peptide spot 만을 表示하나 菌系發生과 더불어 peptide 數가 若干 增加되며 胞子形成期에 이르러서는 그數가 相當히 增加 되었다.

Free amino acid 는 大體으로 菌系가 充分히 發育한 時期에 가서 나타나지 않던 것이 出現하던가 元來 出現하였던 amino acid 種類의 量이 若干 增加되는 傾向을 보이고 그中 몇個의 amino acid 는 胞子 完全 形成期에 가서 그 量이 增加되는 境遇도 있다.

Peptide 의 生成消滅動向은 다음과 같이 分類할 수 있다.

① Peptide 中에는 코오지 生成初期에 存在하다가 菌系の 發生과 더불어 없어지는 것—[P]-IV

② 콩고오지 生成初期에 存在하다가 菌系發生과 더불어 없어졌다가 終期에 가서 다시 나타나는 peptide—[P]-XIV

③ 콩고오지 生成中 菌系發生 時期에서 생겼다가 胞子生成 前後에서 없어지는 것—[P]-V, [P]-VII [P]-XIII.

④ 콩고오지 生成中 菌系發生 時期에서 생긴 것이 끝까지 存在하는 것—[P]-VI, [P]-II, [P]-III.

⑤ 胞子生成前後에서 생긴 것이 끝까지 存在하는 것—[P]-VIII, [P]-IX, [P]-X, [P]-XI, [P]-I.

⑥ 콩고오지 製造中 終期에 가서 생기는 것—[P]-XII, [P]-XV.

콩고오지 製造中 生成되는 低級 peptide 는 다음과 같은 構成 amino acid pattern 을 가진 15 個의 peptide 를 檢出할 수 있었다.

[P]-I (Cys, Asp, Ser, Glu, Arg, Ala, Try, Val, Leu or Ileu.)

[P]-II (Cys, Asp, Ser, Glu, His, Arg, Ala, Phe, Leu or Ileu)

[P]-III (Cys, Glu, Ala, Met, Gly)



- [P]-IV (Asp, Glu, Ala, Gly)  
 [P]-V (Asp, Glu, Lys, Ala, Tyr, Met, Leu or Ileu Gly)  
 [P]-VI (Cys, Asp, Ser, Glu, Lys, His, Thr, Phe, Leu or Ileu Gly)  
 [P]-VII (Asp, Glu, Tyr, Gly)  
 [P]-VIII (Asp, Ser, Glu, Thr, Pro, Ala, Try, Val, Leu or Ileu, Gly)  
 [P]-IX (Asp, Ser, Glu, Arg, Ala, Met, Leu or Ileu, Gly)  
 [P]-X (Glu, Gly)  
 [P]-XI (Asp, Glu, His, Ala, Pro, Try, Met, Leu or Ileu)  
 [P]-XII (Ser, Glu, Ala)  
 [P]-XIII (Ser, Glu, Thr, Tyr, Pro, Leu or Ileu, Gly)  
 [P]-XIV (Asp, Ser, Glu, Ala, Leu or Ileu, Gly)  
 [P]-XV (Ser, Ala)

上記 peptide 가 大部分 aspartic acid, glutamic acid 및 alanine 을 含有하고 있고 이것을 free amino acid 의 量이 많은 amino acid 種類과 大體로 一致한다.

## 五. 摘 要

第2報에서 콩코오지 製造中 一定時間 間隔으로 採取한 試料를 處理하여 얻은 peptide 群 濾液을 Dowex-50 을 利用한 分子 篩別로서 分割된 X-16 fraction 에 들어 있는 peptide 群을 同定하기 爲하여 二次元 paperchromatography 法을 使用하여 分離되는 peptide spot 群을 各各 切斷抽出하여 그 構成 amino acid 를 檢討하는 同時에 兼하여 遊離 amino acid 의 變化도 觀察하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

(1) free amino acid 는 大體의으로 菌絲가 發生하는 時期와 孢子完全 形成時의 二段階로서 새로운 amino acid 가 出現하던가 또는 amino acid 의 量이 增加되었다.

(2) peptide 는 大體의으로 菌絲發生時期와 孢子生成의 二段階로 peptide 가 消滅되던가 生成되는 傾向이 있다.

(3) 콩코오지 製造中 生成되는 低級 peptide 로서 大部分 aspartic acid, glutamic acid 및 alanine 을 含有하는 다음과 같은 構成 amino acid 을 갖은 15 種의 peptide 를 檢出하였다.

- [P]-I (Cys, Asp, Ser, Glu, Arg, Ala, Try, Val,

Leu or Ileu)

- [P]-II (Cys Asp, Ser, Glu, His, Arg, Ala, Phe, Leu or Ileu)

- [P]-III (Cys, Glu, Ala, Met, Gly)

- [P]-IV (Asp, Glu, Ala, Gly)

- [P]-V (Asp, Glu, Lys, Ala, Tyr, Met, Leu or Ileu, Gly)

- [P]-VI (Cys, Asp, Ser, Glu, Lys, His, Thr, Phe, Leu or Ileu, Gly)

- [P]-VII (Asp, Glu, Tyr, Gly)

- [P]-VIII (Asp, Ser, Glu, Thr, Pro, Ala, Try, Val, Leu or Ileu, Gly)

- [P]-IX (Asp, Ser, Glu, Arg, Ala, Met, Leu or Ileu, Gly)

- [P]-X (Glu, Gly)

- [P]-XI (Asp, Glu, His, Ala, Pro, Try, Met, Leu or Ileu)

- [P]-XII (Ser, Glu, Ala)

- [P]-XIII (Ser, Glu, Thr, Tyr, Pro, Leu or Ileu, Gly)

- [P]-XIV (Asp, Ser, Glu, Ala, Leu or Ileu, Gly)

- [P]-XV (Ser, Ala)

끝으로 本 研究를 遂行함에 있어 校閱과 始終 指導 鞭達을 하여 주신 本大學學長 金浩植博士를 비롯하여 本科主任教授 李春寧博士 本科教授 李成煥博士 서울大學校 醫科大學教授 李基寧博士任께 衷心으로 感謝를 드리며 아울러 本實驗遂行에 있어 獻身助力하여준 本大學校 大學院 學生 邊時明君에게 謝意를 表하는 바이다.

## 引用 文 獻

- 1) E. Brand and J.T. Edsall; Ann. Biochem. 16 224 (1947)
- 2) 金載島 本誌 6 79 (1965)
- 3) K. R. Rao and H. A. Sober; J. Am. Chem. Soc. 76 1328 (1954)
- 4) R.R. Porter and F. Sanger; J.Biol. Chem. 42 287 (1948)
- 5) 高橋 暉; 醱酵工誌 35 404 (1957)
- 6) F. Sanger and H. Tuppy; Biochem. J. 49 463 (1951)
- 7) H.N. Rydon; Nature 169 922 (1952)
- 8) R.J. Block E.L. Durrum and G.A. Zweig; Manual of paper chromatography and paper electrophoresis (1955) Academic press, New York
- 9) 中村 敏郎; 日本農化會誌 27 272 (1953)

- 10) A.L. Levy and David Dhung; *Anal. Chem.* **25** 396 (1953)
- 11) 高橋; *日本農化會誌* **38** 319 (1960)
- 12) F. Sanger; *Biochem. J.* **39** 507 (1945)
- 13) F. Sanger and H. Tuppy; *ibid.* **49** 481 (1951)
- 14) Fumihiko Yoshida, Michitaro Nagasawa and Eiji Ichi Shima; *B. of Agr. Soc. of Japan.* **23** 363 (1959)
- 15) G.L. Mills; *Biochem. J.* **50** 707 (1952)
- 16) S. Blackburn and A.G. Lowther; *J.B.C.* **48** 126 (1951)
- 17) S. Blackburn; *Biochem J.* **45** 597 (1949)
- 18) H.T.S. Britton; *Hydrogen Ions* **1** 306 (1942)  
C-Table 70, London; Chapman and Hall
- 19) A.L. Levy; *Nature* **174** 126 (1954)
- 20) G. Braunitzer; *Chem. Ber.* **88** 2025 (1955)
- 21) J.W. Davis and G. Harris; *Arch. Biochem. Biophys.* **74** 229 (1958)