

## 微生物定量法에 의한 참돔中の Tryptophan의 定量

金 章 亮 · 李 鉉 琪

(釜山水產大學) (釜山大學校文理科大學)

## THE MICROBIOLOGICAL ASSAY OF TRYPTOPHAN IN

RED PORGY, *PAGROSOMUS MAJOR*

by

Chang Yang KIM and Hyun Ki LEE

(Pusan Fisheries College) (College of Liberal Arts & Sciences  
Pusan National University)

A porgy was divided into eight parts. After drying at low temperature and pulberizing it, the sample was hydrolyzed by  $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$  at  $120^\circ C$ , under the pressure of  $1 \text{ kg/cm}^2$  for 8 hours. Tryptophan was determined by means of microbiological assay, using *Lactobacillus arabinosus* 17-5. The result of experiments was as follows:

The content of nitrogen of eight parts of the body amounted 12.55% in muscle being the highest of all, 11.49% in heart, 11.31% in eyeball, 11.22% in liver, 11.06% in intestine, 8.75% in head, 7.81% in gill, and 6.02% in fin which was the lowest of the parts tested.

The content of tryptophan per 1 gram nitrogen was 11.79mg in liver, which was the highest of all, 10.11mg in heart, 9.76mg in eyeball, 8.77mg in intestine, 6.28mg in muscle, 5.72mg in head, 4.03mg in gill 2.64mg in fin, and in that order.

## 1. 序 論

必須 Amino acid인 Tryptophan은 比較的 우리나라 食性에서 欠乏되기 쉬운 Amino acid이며 또한 人體의 貧血症에도 有關하므로 그 攝取效率의 資料를 얻고자 特히 Sparidae(감성돔科)에 屬하는 참돔(*Red porgy, Pagrosomus major*)의 各部位에 含有되어 있는 Tryptophan의 含量을 定量하기로 하였다. 近來 食品中の Tryptophan을 定量하는 方法에 많은 發展을 가져와 試料를 加水分解하여 Ion Exchange Column Chromatography<sup>2)</sup> 定量法이나 或은 Spies<sup>3)</sup> 등의 方法에 準하여 試料를 加水分解하지 않고 直接 P- dimethyl amino benzaldehyde(D. A. B.)法에 依한 化學的 比色定量法과 乳酸菌을 使用한 Microbiological assay法등이 있는데 化學的 比色法에서는 一般的으로 特有의 Radical을 가지는 物質 모두가 呈色하지만 Bio-assay法은 L-amino acid인 天然型것만 定量되므로 本實驗에서는 Greene<sup>4)</sup> 등의 方法에 依한 Microbiological assay法으로 참돔 各部位別에 含有되어 있는 Tryptophan의 含量을 定量하여 이를 報告한다.

## 2. 實驗 方法

## 1) 試 料

1967年 6月 16日 釜山 魚市場에서 購入한 新鮮한 참돔(*Red porgy, Pagrosomus major*)을 8部位別(心臟, 肝臟,

腸, 眼球, 筋肉, 頭部, 아카미, 지느러미)로 나누어 使用하였다.

### 2) 試料의 處理

試料는 40°C에서 48時間 低溫乾燥 粉末(40~60 Mesh)로 然後 Alkali 加水分解<sup>9)</sup>하여 Microbiological assay<sup>6-10)</sup>에 供試하였다. 窒素는 Mikrokjeldahl法으로 定量하였다.

### 3) 試料의 加水分解

粉末로 한 참돔 各部位別로 各各 250mg씩을 Ampoule에 넣고 4.0g의 Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O와 물 4.0ml을 加하여 Ampoule을 封한後 120°C kg/cm<sup>2</sup>에서 8時間 加熱하였다.

### 4) 檢液調製

加水分解한 試料를 Autoclave에서 꺼낸 Ampoule을 Water bath中에서 10分間 加熱하여 Ampoule壁에 附着되어 있는 內容物이 溶解되게 한 後 冷却되기 前에 內容物을 50ml Beaker에 注入시켰다. 새로 熱水 5ml로써 Ampoule內를 씻었다. 이같은 操作을 3回 反復하였다. 이와 같이 하여 回收한 液에 10N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 加하여 pH4.0로 調節한 後 生成된 Fumin質은 定量值를 높일 念慮가 있으므로 Ba-salt와 같이 遠心分離(3,000 r.p.m. 15min)하여서 除去하여 熱水로써 다시 3回 씻어 여기서 얻은 液을 100ml로 Mass up하였다. *Lactobacillus arabinosus* 17-5로써 定量할때 Indol나 Anthranilic acid등이 Tryptophan活性를 가지므로 이를 除去하기 爲하여 100ml로 Mass up한 이 液을 200ml의 分液 깔때기에 옮겨 Ether로 抽出<sup>11)</sup>시킨 다음(2回 反復하였음) 다시 Toluene으로써 振盪抽出시켰다. 이 液을 5ml 또는 30ml(各部位에 따라 달리하였음) 分取하여 50ml로 Mass up하여 定量用 檢液으로 使用하였다.

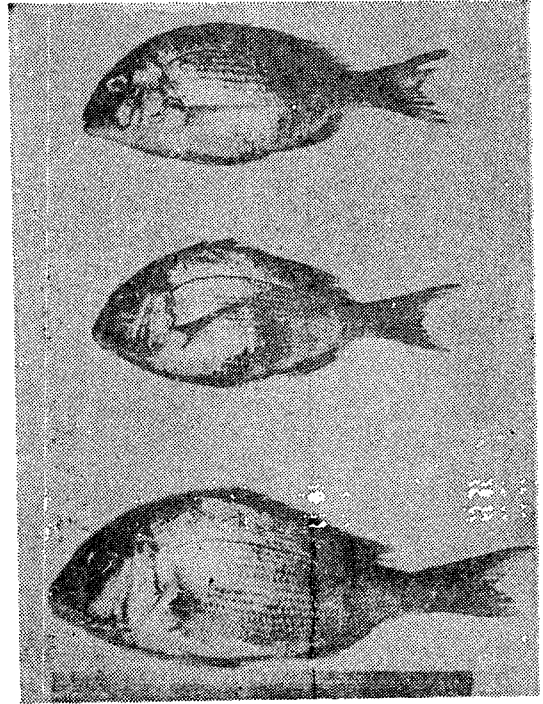


Fig. 1. Red porgy used for the assay.

### 5) 定量方法

#### a) 基礎培地

Tryptophan을 除去한 基礎 培地(Tryptophan-less Basal medium)를 Casein酸 分解 Medium로 調製하였다. 그 組成 및 調製方法을 Table I에 나타낸다.

Table I. Composition of tryptophan-less medium

(100ml)

Component	Amount	Component	Amount
Casein-hydrolysate	2.0g	*Vitamin mix	2.0ml
Glucose	4.0g	*Base 1	4.0 "
Sodium acetate	4.0g	*Base 2	4.0 "
NH <sub>4</sub> Cl	0.6g	*Salt A	4.0 "
L-Cys. (20mg/ml in N-HCl)	1.0ml	*Salt B	4.0 "

※ pH6.8 (with NaOH), after add. distilled water to 100ml

※Vitamin mix.의 調製는 Table 2와 같이 하여 使用하였다.

참돔中的 Tryptophan

Table 2. Composition of the Vitamin mixture for 550ml

Component	(mg)	Component	(mg)
Thiamine·HCl	50	Nicotinic acid	50
Riboflavin	50	P-aminobenzoic acid	20
Pyridoxin	50	Biotin	5
Pyridoxal	25	Foric acid	5
Ca-phantotenate	50		

※ Base 1의 調製

Adenine, Guanine, Uracil 各 500mg을 녹여 N-HCl로써 1,000ml로 Mass up하였다.

※ Base 2의 調製

Xanthine 500mg을 N-NaOH로써 1,000ml로 Mass up 하였다.

※ Salt A의 調製

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 各 25g을 H<sub>2</sub>O로써 1,000ml로 Mass up하였다.

※ Salt B의 調製

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.6g, MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.6g을 H<sub>2</sub>O에 녹여 1,000ml로 Mass up하였다.

Table 1과 같은 組成을 秤量하여 1,000ml Beaker에 넣고 녹인後 N-NaOH로써 pH6.8(B.T.B)로 한後 1,000ml로 Mass up하였다. 이 Medium을 各 試驗管에 2ml씩 分注한 後 各 試驗管에 調製 檢液한 試料와 Standard의 L-tryptophan을 Table 3과 같은 分量으로 分注하였다.

Table 3. Added form of standard L-tryptophan and sample in each test tube

Test tube No.	1	2	3	4	5	6
Standard L-Try. (10 <sup>r</sup> /ml)	0 <sup>r</sup>	1 <sup>r</sup>	2 <sup>r</sup>	3 <sup>r</sup>	4 <sup>r</sup>	5 <sup>r</sup>
Sample	0.1ml	0.2ml	0.4ml	(0.1ml+1 <sup>r</sup> )	(0.2ml+1 <sup>r</sup> )	(0.4ml+1 <sup>r</sup> )

이와 같이 分注한 各 試驗管에 물을 加하여 各 試驗管마다 總液量이 4ml가 되게 하였다. 이 分注 操作이 끝난 後 鐵網箱子에 넣어 가아제를 깐 鐵網 뚜껑을 하고 油紙로 싸서 120°C, 1kg/cm<sup>2</sup>, 10分間 加壓加熱하였다.

b) *Lactobacillus arabinosus* 17-5의 植菌

液体培地の 組成은 Table 4와 같이 하였다.

Table 4. Composition of the liquid medium for *lactobacillus arabinosus* 17-5

Component	Amount	Remark
Yeast extract	5.0 g	
Pepton	5.0 "	
Sodium acetate	5.0 "	
Glucose	5.0 "	
Salt A	5.0 ml	} Same as table 1
Salt B	5.0 ml	

이 液体培地에 移植한 *Lactobacillus arabinosus* 17-5를 遠心分離 (3,000. r. p. m. 15min)하여 滌물을 버리고 沈澱된 菌體를 0.9%-NaCl로 씻은後 다시 遠心分離하여 한번 더 0.9%-NaCl로 씻어 다시 遠心分離하여 滌물을 버리고 0.9%-NaCl 2~3ml로 잘 混合한 Heavy inoculum을 만들어 미리 滅菌한 2ml用 注射器에 옮겨서 Autoclave한 各 試驗管의 Medium에 2滴씩 떨어뜨려 넣었다.

c) 培養

위의 操作이 끝난後 뚜껑을 닫고 解卵器內에서 32°C, 72 時間 培養하였다.

d) Titration

培養이 끝난後 鐵網 箱子 그대로 約5分間 끓는 물속內에 담가 두었다가 冷却시킨 後 0.2%—BTB와 0.2%—NR를 各各一滴씩 떨어뜨려 5ml用 自動 微量 Burette로써 1/10N—NaOH로 滴定하였다

3. 實驗 結果

1) 窒素의 含量

Microkjeldahl 法으로 定量的 窒素와 Crude protein의 含量을 Table 5에 나타낸다.

Table 5. Percentage of total quantity of nitrogen and crude protein

Sample	Nitrogen	Cude protein
Fin	6.02	37.63
Gill	7.81	48.81
Head	8.75	54.69
Intestine	11.06	69.13
Liver	11.22	70.13
Eyeball	11.31	70.69
Heart	11.49	71.81
Muscle	12.55	78.44

2) Tryptophan의 含量

1) 標準曲線

Tryptophan의 定量에 *Lactobacillus arabinosus* 17—5를 使用하여 Dose-response를 본 結果를 Table 6에 나타낸다.

Table 6. Dose-response of *Lactobacillus arabinosus* 17—5 for Tryptophan determination

L-Try. (10 <sup>r</sup> /ml)	0 <sup>r</sup>	1 <sup>r</sup>	2 <sup>r</sup>	3 <sup>r</sup>	4 <sup>r</sup>	5 <sup>r</sup>
1. Standasd (1/10N—NaOHml)	0.65	1.38	2.02	2.50	2.83	2.85
2. Standard (1/10N—NaOHml)	0.59	1.38	2.00	2.46	2.78	2.84
Standard ave.	0.62	1.38	2.01	2.48	2.80	2.84

從軸에 Response, 橫軸에 Tryptophan의 含量을 取하여 Dose-response를 만들었다. 이 標準 Tryptophan의 Dose response를 Fig. 2 에 나타낸다.

2) 軀體중의 各部位別 Tryptophan의 含量을 Micro-bio. assay에 依하여 定量的 값을 Table 7에 나타낸다.

Table 7. Contents of tryptophan in porgy

Sample	Try(ave. γ/ml)	Found try(mg/N—g)
Liver	4.96±0.84	11.79
Heart	4.36±0.26	10.11
Eye ball	4.1±0.1	9.76
Intestine	3.6±1.2	8.77
Muscle	2.96±0.56	6.28
Head	3.76±0.14	5.72
Gill	2.36±0.16	4.03
Fin	1.2±0	2.64

위의 값을 Graph로 나타내면 Fig. 3과 같다.

참돔中的 Tryptophan

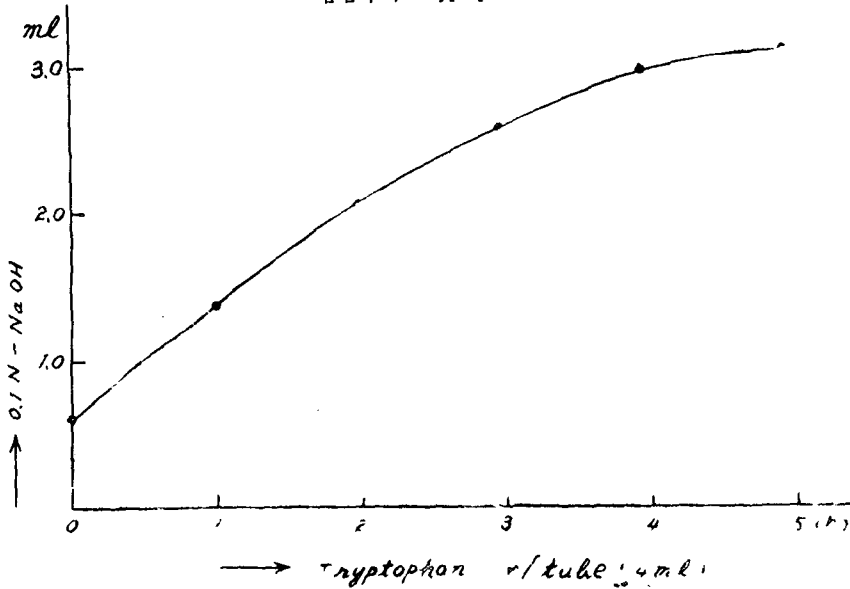


Fig. 2. Dose-response for standard tryptophan with *Lactobacillus arabinosus* 17-5.

4. 結 論

試料 참돔을 八部位로 나누어 低溫乾燥 粉末로 한後 水酸化 바름으로써 120℃, 1kg/cm<sup>2</sup>에서 8hr 加水分解하여 *Lactobacillus arabinosus* 17-5를 使用하여 Microbiological assay로 Tryptophan의 含量을 定量한 結果는 다음과 같다.

1. 참돔 八部位中的 N의 含量은 筋肉이 12.55%로 가장 높았고, 心臟이 11.49% 眼球 11.31%, 肝臟 11.22%, 腸 11.06%, 頭部 8.75%, 아가미 7.81%의 順으로 지느러미가 6.02%로 가장 낮았다.

2. N-1g當 Tryptophan의 含量은 肝臟中에 11.79로 가장 높았으며 다음이 心臟 10.11, 眼球 9.76 腸 8.77, 筋肉 6.28, 頭部 5.72. 아가미 4.03의 順이고 지느러미는 2.64mg/N-g로써 가장 낮았다.

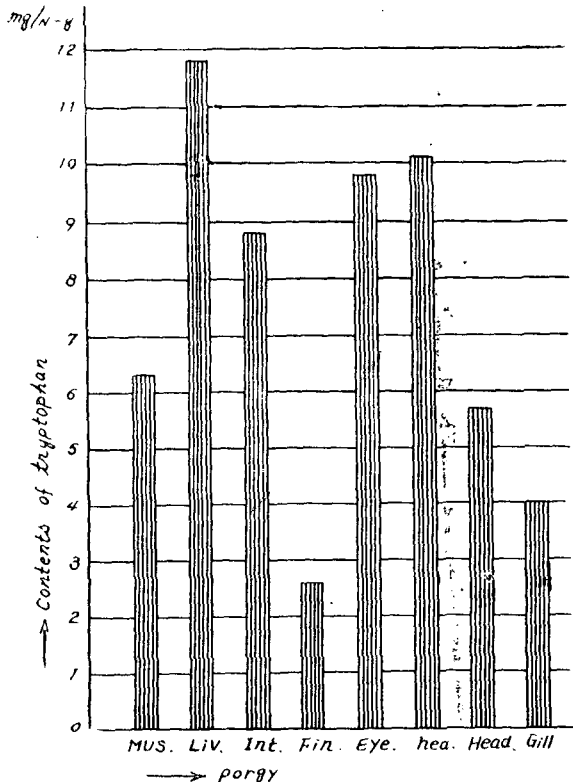


Fig. 3. Contents of tryptophan in porgy (mg/N-g).

5. 文 献

- 1) Hawk, Philip B. and Bernard Loser: Practical Physiological Chemistry : Blakiston Co. 954. (1951).
- 2) Moore, Stanford; H.D. Speckman and Willim H. Stein : Anal. Chem. 30. 1185. (1958)
- 3) Spiess, J.R. and D.C. Chambers: Anal. Chem. 20. 30. (1948)
- 4) Greene A. and A. Blach: J. Biol. Chem. 155. 1. (1944)
- 5) Tamura, Tunoda et al: J. Agr. Chem. Soc. Japan 26. 464 (1952)
- 6) Hac, L.R, E.E. Snell and R.J.J. Williams: J. Biol. Chem. 159. 273 (1945)
- 7) Henderson. L. M. and E.E. Snell : J. Biol. Chem. 172. 15(1948)
- 8) 李 鉉 琪 : 大韓化學會會誌 Vol.19. No.4. 201 (1965)
- 9) 李 鉉 琪 : 大韓化學會會誌 Vol.10. No.3. 109 (1966)
- 10) Snell, E.E. : Adv. Protein. Chem. 11. 107 (1945)
- 11) 松野信郎, 田村盈之輔, 中津晶子, 李鉉琪: 榮養と食糧, Vol. 18, No.1, 34 (1965)