

젓갈等屬의 呈味成分에 關한 微生物學的 및 酵素學的 研究

李 啓 瑚

서울대학교 農科大學

(1968年 10月 31日 受理)

Microbiological and Enzymological Studies on the Flavor Components of Sea Food Pickles.

Ke Ho Lee

College of Agriculture, Seoul National University

Summary

More than thirty kinds of sea food pickles have been eaten in Korea. Out of these salted yellow tail pickle, salted clam pickle, salted oyster pickle, and salted cuttlefish pickle were employed for the analysis of their components, identification of main fermenting microbes, and determination of enzyme characteristics concerned. Also studied was the effect of enzymic action of microbes, which are concerned with the fermenting of pickles, on the production of flavourous 5'-mononucleotides and amino acids. The results are summarized as follows:

1. Microflora observed in the pickles are:

(a) Total count of viable cells after 1-2 months of pickling was found to be 10^7 and that after 6 months decreased to 10^4 .

(b) Microbial occurrence in the early stage of pickling was observed to be 10-20% *Micrococcus* spp., 10-20% *Brevibacterium* spp., 0-30% *Sarcina* spp., 20-30% *Leuconostoc* spp., ca 30% *Bacillus* spp., 0-10% *Pseudomonas* spp., 0-10% *Flavobacterium* spp., and 0-20% yeast.

(c) Following the early stage of pickling, mainly halophilic bacteria such as *Bacillus subtilis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus halophilus* and *Sarcina litoralis*, were found to exhibit an effect on the

fermentation of pickle and their enzyme activities were in direct concern in fermentation of pickles.

(d) Among the bacteria participating in the fermentation, *Sarcina litoralis* 8-14 and 8-16 strains were in need of high nutritional requirement and the former was grown only in the presence of purine, pyrimidine and cystine and the latter purine, pyrimidine and glutamic acid.

2. Enzyme characteristics studied in relation to the raw materials and the concerned microbes isolated are as follows:

(a) A small amount of protease was found in the raw materials and 30-60% decrease in protease activity was demonstrated at 7% salt concentration.

(b) Protease activity of halophilic bacteria, *Bacillus subtilis* 7-6, 11-1, 3-6 and 9-4 strains, in the complete media decreased by 10-30% at the 7% salt concentration and that of *Sarcina litoralis* 8-14 and 8-16 strains decreased by 10-20%.

(c) Proteins in the raw materials were found to be hydrolyzed to yield free amino acids by protease in the fermenting microbes.

(d) No accumulation of flavourous 5'-mononucleotides was demonstrated because RNA-depolymerase in the raw materials and the pickles tended to decompose RNA into nucleoside and phosphoric acid.

(e) The enzyme produced in *Bacillus subtilis* 3-6 strain isolated from the salted clam pickles, was ascertained to be 5'-phosphodiesterase because of its ability to decompose RNA and thus accumulating 5'-mononucleotide.

(f) It was demonstrated that the activity of phosphodiesterase in *Bacillus subtilis* 3-6 strain was enhanced by some components in the corn steep liquor and salted clam pickle. The enzyme activity was found to decrease by 10-30% and 40-60% at the salt concentration of 10% and 20%, respectively.

3. Quantitative data for free amino acids in the pickles are as follows:

(a) Amounts of acidic amino acids such as glutamic and aspartic acids in salted clam pickle, were observed to be 2-10 times other pickles and it is considered that the abundance in these amino acids may contribute significantly to the specific flavor of this food.

(b) Large amounts of basic amino acids such as arginine and histidine were found to occur in salted yellow tail pickle.

(c) It is much interesting that in the salted cuttlefish pickle the contents of sulfur-containing amino acids were exceedingly high compared with those of others: cystine was found to be 17-130 times and methionine, 7-19 times.

(d) In the salted oyster pickle a high content of some essential amino acids such as lysine, threonine, isoleucine and leucine, was demonstrated and a specific flavor of the pickle was ascribed to the sweet amino acids. Contents of alanine and glycine in the salted oyster pickle were 4 and 3-14 times as much as those of the others respectively.

4. Analytical data for 5'-mononucleotides in the pickles are as follows:

(a) 5'-Adenylic acid and 3'-adenylic acid were found in large amounts in the salted yellow tail pickle and 5'-inosinic acid in lesser amount.

(b) 5'-Adenylic acid, especially 3'-adenylic acid predominated in amount in the salted oyster pickle over that in the other pickles.

(c) The salted cuttlefish pickle was found to contain only 5'-adenylic acid and 3'-adenylic acid. It has become evident from the above fact that

clam and the invertebrate lack of adenylic deaminase and contain high content of adenylic acid. Thus, they were demonstrated to be the AMP-type.

(d) 5'-Inosinic acid was contained in the salted yellow tail pickle in a significant concentration, and it might be considered to be IMP-type.

5. Comparative data for flavor with regard to the flavorful amino acids and the contents of 5'-mononucleotides are:

(a) A specific flavor of salted yellow tail pickle was ascribed to the abundance in glutamic acid and aspartic acid, and to the existence of a small amount of flavorful 5'-inosinic acid. The combined effect of these components was believed to exhibit a synergistic action in producing a specific flavor to the pickle.

(b) A specific flavor of salted clam pickle has been demonstrated to be attributable to the richness in glutamic acid and aspartic acid rather than to that of 5'-mononucleotides.

緒 論

것같은 우리나라를 비롯한 東洋各國에서 古來로부터 傳하여 내려온 貯藏性醱酵食品으로 魚介類에 食鹽을 加하여 一定期間 熟成시키면 自體酵素에 의한 自家消化와 熟成中微生物의 酵素作用에 依하여 原料物質이 分解되어 그 分解產物들이 구수한 맛의 調和를 이루어 特有한 맛을 지니게 하는 것이다.

것같은 副食으로 愛用될뿐 아니라 特히 우리나라의 重要한 固有副食인 김치제조에서 熟成에 關與하는 微生物의 榮養素給源과 맛의 添加劑로 不可缺少하게 利用되고있다.

것같은 구수한 맛은 여러가지 要素가 綜合되어 나타나는 것으로 生覺되거나 原料蛋白質 또는 核酸等の 分解產物인 遊離아미노酸과 呈味性 5'-mononucleotides에 主로 基因되는 것 같다.

Ikeda⁽¹⁾는 glutamic acid가 昆布의 呈味主成分인을 發見하여 처음으로 아미노酸이 食品의 맛과 關係됨을 報告하였으며 그後 것같은 遊離아미노酸에 關해서 鈴木⁽²⁾는 鯉魚젓에서 lysine外 7種, Tudith Blass⁽³⁾는 Nuconan에서 18種의 아미노酸을 檢出確認하였으며 金⁽⁴⁾ 등은 眞石花젓에서 17種. 그리고 金⁽⁵⁾ 등은 魚類內臟젓의 遊離아미노酸에 關하여 報告하였으며 魚類食品의 아미노酸에 關하여 Konosu⁽⁶⁾, Koizumi⁽⁷⁾, Komata⁽⁸⁾, Oishi⁽⁹⁾ 등 一連의 報告가

있었다.

食品呈味成分中 5'-mononucleotides 에 관한 研究로서 Kodama⁽¹⁰⁾에 의하여 鱈節(dried bonito)의 呈味主成分이 이노신酸의 히스티딘鹽이었음이 報告되고 1960年 國中⁽¹¹⁾에 의하여 5'-guanylic acid (5'-GMP)와 5'-xanthylic acid(5'-XMP)도 5'-inosinic acid(5'-IMP)와 같은 呈味性을 가지며 맛의 強度는 5'-GMP>5'-IMP>5'-XMP의 傾向을 보이며 또한 mononucleotides의 化學構造에서 purine base의 6位置에는 OH基가, ribose의 5位置에는 磷酸이 結合되고 purine base의 2位置에는 H(IMP), NH₂(GMP), OH(XMP)의 諸基가 연결된 構造에서만이 呈味性이 發現된다고 報告한 以來 이에 對한 研究가 活潑해졌었다. Ogata⁽¹²⁾는 DNA 誘導體인 d-IMP, d-GMP도 呈味成分임을 報告한 바 있으며 Shimazono⁽¹³⁾는 食品中 mononucleotides를 肉型(ATP에서 由來되는 ① IMP-type로 獸鳥魚肉과 ② AMP-type로 貝類, 水産軟體 魚類), 植物型(버섯類의 GMP-type), 乳型(orotic acid), 그리고 自己消化型(RNA 分解 또는 熱水抽出物)등의 4 pattern으로 分類報告한 바 있다. 한편 Huang⁽¹⁴⁾은 purine 環이 必須적으로 呈味성과 有關하지는 않음을 指摘하면서 purine 環이 開裂된 狀態로 있는 5-amino-4-imidazole carboxamide ribotide(AICAR) 및 5-amino-4-imidazole(N-succinylcarboxamide) ribotide(SAICAR)가 呈味성이 있음을 報告한 바 있다. Shimazono⁽¹³⁾, 國中⁽¹⁵⁾ 등은 5'-IMP 5'-GMP 등과 mono sodium glutamate(MSG)와 맛을 比較하여 5'-mononucleotides가 MSG보다 맛이 強力하고 부드러운 官能을 주며 또한 5'-IMP 5'-GMP의 少量과 MSG를 併用하면 맛의 相乘作用이 發現됨을 報告하였다.

食品加工中에 5'-mononucleotides가 水溶液中에서 100°C까지는 安定하며 100°C以上에서도 中性, alkali性에서는 安定하나 pH 5.0以下の 酸性에서는 不安定하여 分解됨이 岡本⁽¹⁶⁾, 鹿又⁽¹⁷⁾, 栗山⁽¹⁸⁾, 藤田⁽¹⁹⁾, 橋田⁽²⁰⁾ 등에 의하여 밝혀졌다. Tidus⁽²¹⁾에 의하여 5'-IMP, 5'-GMP는 食品의 맛을 特殊로 改良하는 呈味強調劑(Flavor enhancer)라 하였으며 Kurtzman^(22,23) 등은 5'-IMP의 flavor modifying property에 關하여 41種의 食品을 檢討한바 風味向上을 強調하고 加水分解臭等 不快臭를 減退시키는 效果가 있음을 밝힌 바 있다. 그리고 魚肉에서 自體酵素에 의한 自家消化가 이루어짐이 Oya⁽²⁴⁾ 등에 의하여 報告된 以後 Fuji⁽²⁵⁾, Hata⁽²⁶⁾, Makinodan⁽²⁷⁾, Saito⁽²⁸⁾ 등이 魚肉蛋白質分解酵素에 對하여 研究報告하였으며 魚肉中の 呈味成分으로 5'-IMP含量에

對하여 Fujida^(29,30), Kassemarn⁽³¹⁾, Saito⁽³²⁾ 등이 報告하였고 Toda⁽³⁴⁾ 등은 魚肉製品中の phosphatase가 mononucleotides를 分解함을 發表한 바 있다. 溥田等⁽³⁵⁾은 鹽藏食品熱成에서 關與微生物과 그의 酵素들이 風味에 영향을 주는 것임을 發表하였고 halophilic bacteria에 對하여는 Sakaguchi⁽³⁶⁾, 山里⁽³⁷⁾, 上野⁽³⁸⁾, 大西⁽³⁹⁾, 大亦⁽⁴⁰⁾, 中村⁽⁴¹⁾ 등에 의한 一連의 報告가 있다.

것갈等屬이 우리나라食品의 重要멤버가 되며 國民營養에 至大한 영향을 줌에도 不拘하고 우리나라에서 것갈에 對한 研究로서는 아미노酸種類를 定性的으로 確認 또는 數種의 아미노酸탄을 定量^(4,5)하였을 뿐이며 것갈醱酵熟成에 關與하는 菌種에 對한 研究 및 醱酵過程中에 있어서 微生物의 消長과 生態, 菌의 特性研究 그리고 것갈의 呈味主成分인 遊離아미노酸 또는 5'-mononucleotides에서 由來되는가, 혹은 구수한 맛이 이들 兩者의 相乘作用으로 基因하는가에 對한 研究와 그리고 呈味成分의 生成要因인 原料物質과 protease 및 5'-phosphodiesterase에 對한 酵素의 特性和 分解產物로 蓄積되는 諸條件에 對한 研究가 全無함에 비추어 著者は 表題의 研究를 시도하였다.

現在 우리나라에서 알려진 것갈의 種類는 30餘種으로 그數가 相當히 많다. 그러나 著者は 그중에서도 代表的인 것으로 가장 많이 愛用되는 조개젓, 조개젓(20%内外의 高食鹽性 것갈)과 低食鹽性(10%内外)인 굴젓, 오징어젓 등의 4種을 選定하여 市場과 民家에서 蒐集하고 爲先 微生物의 分布相을 檢討하는 同時에 이들 微生物을 純粹分離하여 187菌株의 細菌과 酵母 2菌株를 얻어 그중 代表的인 細菌 19菌株에 對하여 同定하고 아울러 이들 菌株에 對하여 protease, RNA-depolymerase 그리고 5'-phosphodiesterase activity를 測定 screen 함으로써 이들 酵素活性이 강한 菌株를 選定한 다음 이들 酵素의 特性和 酵素生成에 關한 諸條件을 檢討하였으며 아울러 것갈等屬의 呈味主成分인 遊離아미노酸과 5'-mononucleotides의 含量을 測定比較하여 豫想하였던 結果를 얻었으므로 여기에 報告하는 바이다.

實 驗

實驗材料

原 料

조 개 : *Meretrix meretrix* (clam)

조 기 : *Pseudosquilla manchurica* (yellow tail)

오징어 : *Ommatostrephes solani* (cuttle-fish)

굴 : *Ostrea laperousei* (oyster)

試料 試 名	試料 番 號	蒐 集 場 所	採 集 時 期	蒐 集 日 時
조 개 젓 Salted clam pickle	No. 3	서울南大 門市場	1967年 春季	1967年 11月 5日
조 기 젓 Salted yellow tail pickle	No. 5	서울一 民家	1967年 5月	1967年 11月 5日
오 징 어 젓 Salted cuttlefish pickle	No. 8	서울南大 門市場	1967年 10月	1967年 11月 5日
굴 젓 Salted oyster pickle	No. 11	서울南大 門市場	1967年 10月	1967年 11月 5日

實驗方法

[1] 試料調製

젓갈等屬의 一定量을 取하여 waring blender로 3-5分間 homogenize 시키고 冷蔵庫中에 貯藏試料로서 凍結保存 하면서 實驗하였다.

[2] 一般成分 分析方法

水分, 粗蛋白質, 粗脂肪, 粗灰分, 炭水化物, 食鹽, pH를 常法⁽⁴²⁾에 依하여 測定하였다.

[3] 總生菌數測定⁽³⁵⁾ 및 純粹分離

試料 5g을 無菌의으로 秤量하여 殺菌된 200 ml 容 共徑三角 flask 中에 넣고 滅菌食鹽水(NaCl conc. 10%)를 加하여 全容을 100 ml로 한다음 約 5分間 振盪하여 試料의 微生物을 食鹽水中에 均一하게 현 탁시키고 殺菌된 pipette와 滅菌食鹽水로 10進法稀釋을 하는 dilution pour plate法으로 petri dish에 試料의 各稀釋液 0.5 ml式을 注入하되 1稀釋段階에 對하여 petri dish 6個를 使用하여 colony數가 30-300個 範圍에 있는 petri dish를 選定하여 colony數의 算術平均値를 얻어 稀釋倍數를 곱해주어 原試料 1g 中의 生菌數를 算出하였다. 이와 아울러 純粹分離를 하기 위하여 代表的으로 많은 分布를 보이는 菌種부터 採菌하고 生菌數의 分布相을 百分率로 決定해두고 同定後에 菌의 屬 및 種別로 表示하였다. 이때 使用한 培地組成은 溥田⁽³⁵⁾法을 改良한것(Table 1)에 準하였으며 viable cell counting은 오징어젓, 굴젓은 [담금한지 1~2個月지나고 조개젓 조기젓은 담금후 6個月이 지난 것이다.

[4] 細菌의 同定

Table 1. Composition of the selective medium

Aerobic bacteria		Anaerobic bacteria		Yeast	
[1] TGY medium	[2] Complete medium	[3] medium	[4] medium		
Distld. water 1000 ml.	Distld. water 1000 ml.	Distld. water 1000 ml.	Distld. water 1000 ml.		
Tryptone 5 g	Beef ext. 10 g	Poly-peptone 10 g	Sea food pickle 10 g		
Glucose 1 g	Poly-peptone 10 g	Yeast ext. 5 g	Glucose 50 g		
Yeast ext. 3 g	Glucose 10 g	Glucose 10 g	NaCl 50 g		
Sea food pickle 10 g	NaCl 25 g	NaCl 25 g	Agar 16 g		
Agar 16 g	Yeast ext. 3 g	Na-thioglycollate 1 g	pH 5.0		
NaCl 25 g	Agar 16 g	Sea food pickle 10 g			
pH 7.0	Sea food pickle 10 g	Agar 14 g			
	pH 7.0	pH 7.0			
Selective agents (final concentration)					
Eurocidine 100 μ /medium ml.			Na-propionate 0.2%		
Culture					
30 $^{\circ}$ C, 2-7 days in aerobic condition		30 $^{\circ}$ C, 7-10 days in anaerobic condition 15-30 mm Hg		30 $^{\circ}$ C, 4-7 days in aerobic condition	
M-medium(minimal medium) ⁽⁵⁷⁾		NH ₄ Cl 5 g	Glucose 0.5 g	Distld. water 1,000 ml	
		Na ₂ SO ₄ 2 g	NH ₄ NO ₃ 1.0"	pH 7.0	
		CaCl ₂ 10 mg	MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1"		
		KH ₂ PO ₄ 1 g	K ₂ HPO ₄ 3.0"		

Pelczar⁽⁴³⁾의 "Manual of Microbiological Methods" 및 飯塚⁽⁴⁴⁾等의 同定法에 따라서 다음과같이 培養的, 形態學的, 生理學的, 諸特性을 檢討하여 "Ber-

gey's Manual of Determinative Bacteriology"(7th ed.,)⁽⁴⁵⁾에 依하여 同定을 하였다.

(a) form과 size는 Ziehl⁽⁴³⁾의 石炭酸 fuchsin

液으로 染色檢鏡하여 測定하였다.

(b) Gram 染色은 Hucker⁽⁴³⁾變法에 따라 染色檢鏡하였으며.

(c) 運動性은 motility agar stab(Tryptose 1.0% NaCl 0.5% Agar 0.5% pH 7.2)으로 25°C에서 48 hrs 培養하여 檢討하였다.

(d) 鞭毛는 새로운 bouillon agar slant 에 24 hrs 培養하고 西澤, 菅原⁽⁴⁴⁾法 및 Leifson⁽⁴³⁾法으로 染色하여 鏡檢하였다.

[5] Protease activity 測定^(43,47,48)

(1) 酵素液의 調製

(a) 젓갈 및 그 原料自體의 酵素液: 젓갈 및 그 原料인 魚介生體 10g 을 취하고 여기에 0.1 M phosphate buffer solution(pH 7.0) 100 ml 를 加하여 waring blender 로 3 分間 處理한 것을 冷藏庫中에서 一夜放置하여 抽出하고 遠沈한 上澄液을 粗酵素液으로 하고 여기에 toluol 0.5 ml 를 加하여 冷藏庫에 保管하여 試料로 하였다.

(b) 分離菌株의 protease 生成: TGY liquid media 를 基本培地로 하여 分離菌株中 代表的인 菌種을 接種하여 30°C에서 5 日間培養하고 遠沈한 上澄液을 粗酵素液으로 하고 위와 같이 保管하면서 試料로 하였다. 한편 protease 生成增加劑를 確認하고자 TGY media(T-media)와 complete media(C-media) 등에 여러 補強化合物(NaCl, Corn steep liquor, Casamino acid 및 조개젓)을 加減하여 protease producibility 를 檢討하였다.

(2) 基質調製

萩原⁽⁴⁶⁾의 方法에 따라 N.B.C 製의 milk casein 5g 을 0.1-M phosphate buffer solution(pH 7.0) 250 ml 에 녹여 2% casein 液으로 하고 toluol 數滴을 加하고 冷藏庫中에서 保管하고 使用時 흔들어서 試驗에 使用하였다.

(3) Activity 測定^(46,47,49)

基質液 2 ml 에 酵素液 1 ml 를 加하여 35°C water bath 에서 30 分間 反應시킨 다음 0.4-M TCA 5 ml 를 加하여 35°C에서 20 分間 放置하여 protease 를 失活케 하여 蛋白質을 沈澱시키며 除蛋白한 上澄液 1 ml 와 0.4-M Na₂CO₃ 5 ml 와 1 ml 의 Folin phenol reagent⁽⁴⁹⁾를 加하여 35°C water bath 에서 25 分間 作用시킨後 室溫으로한 다음 Coleman Junior Spectrophotometer 로 620 mμ 에서 optical density(O.D)를 測定하고 blank 値를 뺀 酵素作用液의 O.D 를 Fig. 1 의 standard curve 에서 tyrosin(μg/ml)으로 換算하여 酵素活性으로 表示하였다. 한편 NaCl 濃도가 protease 活性에 미치는 영향을 檢討하고자 酵素液

및 基質溶液에 NaCl 를 7, 15, 20%로 加하여 酵素反應後의 tyrosin 量으로서 protease 活性阻害度를 아울러 檢討하였다.

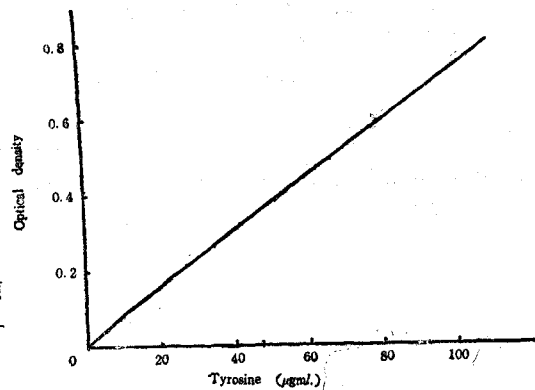


Fig 1. Standard curve of tyrosine.

[6] RNA-depolymerase activity 測定^(50,51)

(1) 酵素液의 調製

(a) 젓갈 및 젓갈原料의 酵素液: 젓갈 및 젓갈原料인 魚介生體 10g 式을 취하고 0.1 M Tris buffer solution(pH 6.5) 90 ml 를 加하여 waring blender 로 3 分間 處理하고 冷藏庫中에서 一夜放置하면서 抽出하고 遠沈한 上澄液을 粗酵素液으로 하되 toluol 0.5 ml 를 加하여 冷藏庫에 保管하여 試料로 하였다.

(b) 分離菌株의 RNA-depolymerase production: TGY liquid media 를 基本培地로 하여 全分離菌株를 接種하고 30°C에서 5 日間培養한 것을 濾過하여 얻은 濾液을 粗酵素液으로 하여 위와같이 保管하여 試料로 하였다. 그리고 RNA-depolymerase 生成增加劑를 確認하고자 T-media 와 C-media 등에 補強化合物(NaCl, Corn steep liquor, Casamino acid 및 조개젓)을 加減하여 RNA-depolymerase producibility 를 檢討하였다.

(2) 基質調製

國中⁽⁵⁰⁾ 方法에 따라 E. Merck 製인 Yeast RNA 1g 과 Bacto agar 2g 을 Tris buffer solution(pH 6.5) 20 ml 와 증류수 80 ml 에 녹여서 1% RNA 의 固體基質로 하여 使用하였다.

(3) Activity 測定⁽⁵¹⁾

RNA 1%의 buffered substrates 18 ml 를 直徑 9 cm 의 petri dish 에 流入放冷하여 平板을 만들고 stainless steel 製 cup(height 1 cm, width 0.8 cm) 을 平板에 並置하고 酵素液 0.5 ml 式을 接種하여 30°C, 37°C, 44°C 의 定溫器內에서 4 時間 酵素

反應을 시킨後 cup 과 나머지 酵素液을 除去하고 uranyl reagent^(52,53)(uranyl acetate 0.25 g, trichloro acetic acid 2.5 g 을 증류수 100 ml 에 溶解)를 平板 全面에 流入한後 約 10 分間室溫에서 放置함으로써 酵素活性을 失活시키면 酵素未反應部位는 白濁이 되고 RNA-depolymerase 가 作用하여 RNA 가 分解된 部分은 uranyl reagent 에 可溶性임으로 透明한 ring 을 나타냄으로 透明한 ring 의 直徑을 vernier 로 測定하여 RNA-depolymerase activity 를 比較測定하였다. 그리고 uranyl reagent 를 除去하고 Fiske-Subbarow^(54,55)의 molybden 酸 II solution(2.5 g 의 ammonium molybdate 를 증류수 200 ml 에 녹이고 0.1 N H₂SO₄ 300 ml 를 加하여 全容을 1 l 로 混) 10 ml 와 amino naphthol sulfonic acid solution(0.5 g 의 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid 를 15% Na HSO₄ solution 195 ml 에 녹인 다음 20% Na₂SO₃·7H₂O solution 5 ml 를 加하여 混合한 液) 4 ml 를 混和한 溶液을 透明해진 ring 部位에 一滴씩 滴加하여 室溫에서 5-20 分間에 發現하는 靑色으로 RNA-depolymerase 中에 遊離磷酸으로 까지 分解시키는 phosphomonoesterase 가 共存하고 있음을 確認하고 靑色이 發現치 않으면 phosphomonoesterase 活性이 缺如되고 phosphodiesterase 만이 作用하여 RNA 가 分解되어 最終產物로 mononucleotide 가 蓄積됨을 確認하였다. 그리고 蓄積되는 mononucleotide 가 5'-mononucleotide 인지 또는 isomer 인 3'-mononucleotide 인지는 RNA 0.5%(Tris buffered solution pH 6.5)의 液體基質 4.9 ml 에 酵素 0.1 ml 를 加하여 30°C 에서 4 時間 反應시킨 液을 熱處理로 不活性化시키고 paper electrophoresis 에서 anode side 로 migrate 한 UV-吸收物質을 確認하여 periodate oxidation 에 따른 Schiff's reaction 으로서 同定한 spot 가 5'-mononucleotide 인 경우는 5'-phosphodiesterase, 3'-mononucleotide 인 경우는 3'-phosphodiesterase 의 活性으로 確認하였다.

(4) Adenylic acid deaminase activity

(a) 酵素液의 調製: complete liquid media 에 菌株을 接種하여 30°C 에서 5 日間 培養하고 遠沈한 上澄液을 粗酵素液으로 하여 前記와 같이 保管하고 試料로 하였다.

(b) 基質液: 3 μ mole 의 5'-AMP(Tris buffer pH 6.5) solution.

(c) Activity 測定: buffered substrate 4.9 ml 에 酵素溶液 0.1 ml 를 加하여 30°C 에서 4 時間 反應시킨 다음 加熱處理에 依하여 反應을 停止시키고 paper electrophoresis 에 나타난 UV-吸收 spot 와 泳動距離

로서 AMP 와 IMP 를 同定하고 adenylic acid deaminase 活性을 確認하였다.

(5) UV-吸收物質의 確認⁽⁵⁶⁾

Paper chromatography, paper electrophoresis 에 依하여 分離된 spot 에 Ultra-violet light(filter 2537 Å) (Ultra violet products 社製)를 照射하여 paper 上의 UV 吸收 spot 가 검게 보이면 이것을 연필로 mark 하여 確認하였다.

(6) Paper electrophoresis^(56,59)

Paper electrophoresis 는 Beckman electrophoresis spinco model R type 를 利用하였고 electrolyte 는 10% acetic acid, constant voltage 는 400 V, constant current 는 0.5 mA/cm 로 室溫에서 展開하고 paper strip 는 Whatman No. 1(3×31 cm)을 使用하여 15.5 cm 地點인 中間點을 starting line 으로 하여 이 starting line 에 sample 0.05 ml 를 applicator 로서 올린 것을 4 時間 泳動시키면 anode side 로 migrate 하는 것은 nucleotide, cathode side 로 migrate 하는 것은 nucleoside 또는 base 임으로 UV 吸收 band 로 確認하고 periodate oxidation 에 따른 Schiff's reaction 에 依하여 確認同定하였다.

(7) Paper chromatography^(58,66,67)

Paper chromatography 는 ① Markham Smith 의 saturated ammonium sulfate-tertiary butanol-0.025 N ammonia water(160:3:40). ② Hans 의 N-propyl alcohol-conc. ammonia water-water(60:30:10). ③ Krebs 의 isobutylic acid-1 M ammonia water-0.1 M EDTA(100:60:1.6)을 solvent system 으로 하고 paper 는 Whatman No.1 을 使用하여 上昇法으로 室溫에서 約 10 時間展開시킨 다음 60°C 에서 乾燥하고 UV-absorbing spot 를 確認하였다.

(8) Periodate oxidation^(59,60)

Paper chromatography 나 paper electrophoresis 를 거친 paper 에 1% sodium meta periodate solution 을 UV 吸收物質이 있는 spot 에 充分히 spray 하고 60°C 에서 7 分間 건조시키든가 또는 室溫에서 風乾後 SO₂ gas 로 處理하고 미리 SO₂ gas 로 漂白한 0.1% rosaniline solution 을 spray 하고 室溫에서 1~2 時間 放置한後 靑紫色 spot 또는 band 가 發現하면 5'-mononucleotide 임을 確認同定하였다. 卽 pentose 의 2', 3' 位置에 cis form 으로 OH 가 存在하면 NaIO₄ 로 酸化되면서 aldehyde 로 되고 rosaniline 의 Schiff's reaction 으로 靑紫色이 發現하게 됨으로 5' 位置에 磷酸이 붙은 5'-mononucleotide 임을 確認하였다.

[7] 玆갈等屬의 遊離 Amino acid 定量

(1) Automatic Amino acid Analyzer 用 試料調製 Waring blender 로 處理한 짓갈等屬 試料 各 0.5 g 式을 秤取하고 여기에 1% picric acid 5 ml 式을 加하여 1 時間 放置後 除蛋白하고 遠沈하여 上澄液을 冷藏庫에 保管하는 한편 沈澱殘渣에 1% picric acid 2 ml 를 더 加하여 再次 除蛋白함과 아울러 遊離

amino acid 를 抽出하고 再遠沈한 上澄液을 먼저 上澄液과 合쳤다. 이것을 冷藏庫中에서 一夜放置한後 沈澱物을 遠沈하고 殘渣를 증류수 2 ml 로 洗滌하여 그 洗液을 上澄液에 合치고 이것을 0.5N HCl 로서 pH 2.2 로 調整하였다. 이 上澄液中 除蛋白劑인 picric acid 를 2×20 cm 인 Dowex 1×8 column

Table 2. Analysis of amino acids by Amino acid autoanalyzer

Sample No.	Neutral and acidic amino acid					Basic amino acid				
	Standard amino acid	Pickle No. 3	Pickle No. 5	Pickle No. 8	Pickle No. 11	Standard amino acid	Pickle No. 3	Pickle No. 5	Pickle No. 8	Pickle No. 11
Sample size	each 0.1 μ mole	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	each 0.05 μ mole	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Column	0.9×70 cm					0.9×15 cm				
Resin	Amberite CG-120(25-28 U)					Amberite CG-120(19-22 U)				
Flow rate buffer soln. Ninhydrin reagent	100 ml./hr. 50 ml./hr.					100 ml./hr. 50 ml./hr.				
Column temp.	49°C	49°C	51°C	50°C	52°C	49°C	49°C	50°C	52°C	52°C
Buffer soln.	pH 3.25 and 4.25 0.2 N-citrate buffer soln.					pH 5.28 0.35 N-citrate buffer soln.				
Buffer change time. Analysis time	57 min. 140 min.					60 min.				
Chart speed	9 inch/hr.					9 inch/hr.				

(200~400 mesh Cl-type)에서 吸着除去하고 amino acid 만 含有된 effluent 를 얻어 pH 2.2 로 再調整하여 Autoanalyzer 用 試料로 하였다.

(2) Amino acids 測定

Amino acid 定量은 Automatic amino acid analyzer Yanagimoto Model LC-5 로 Table 2 에서와 같은 條件下에서 遂行하였으며 試料를 column 에 0.5 ml 式注入 吸着시키고 pH 5.28 인 buffer solution 으로 basic amino acid 를 pH 3.25 및 pH 4.25 인 buffer solution 으로 neutral and acidic amino acid 를 溶出하고 反應시켜 定量케 하였다.

既知濃度의 amino acid standard curve 와 sample 의 各 peak 를 對照하고 peak 의 height 와 width 를 幅한值를 standard constant 로 나누어 amino acid 濃度를 μ mole 로 算出하여 定量值로 하였다.

[8] 짓갈等屬의 5'-mononucleotide 의 定量

(1) Ion exchange column chromatography 用 試料調製^(61,62,63)

Waring blender 로 處理한 짓갈等屬의 試料를 各 各 2 g 式秤取하여 여기에 10% perchloric acid 10 ml 를 加하고 氷冷下에서 一液放置하면서 抽出하여 遠沈하고 殘渣에 10 ml 의 5% perchloric acid 를 加

하여 2 時間 放置하여 再次抽出, 遠沈하고 또 한번 反復하여 나온 上澄液들을 原上澄液과 合치고 이것을 5 N-KOH 로 中和 氷冷下에서 K-chlorate 로 沈澱시킨것을 遠沈하여 上澄液을 냉장고에 保管하는 한편 殘渣를 氷冷水로 洗滌한 洗液을 上記 上澄液과 合쳐서 1 N-H₂SO₄ 를 加하여 pH 2.0 으로 調整하고 liquid liquid extractor 上에서 ether 로서 48 時間 抽出한 다음 coconut active charcoal column 에 吸着시킨 後 0.01 M-EDTA solution (pH 7.0) 을 注加하고 증류수로 洗滌한後 5% NH₄OH 含有 50% ethanol 로 溶出하여 얻은 溶出液을 Amberite IR 120 column 에 通過시킨 다음 通過된 液을 1 N-NH₄OH 로서 pH 9.5 로 調整하여 Dowex 1×8 column (formic type) 用 試料로 하였다.

(2) Ion exchange resin column 의 準備^(64,65)

Ion exchange resin 으로 Dowex 1×8(200~400 mesh) 를 使用하였으며 強鹽基性 ion 交換樹脂를 蒸溜水에 넣어 攪拌한 다음 水面에 浮遊되는 粒子를 傾瀉除去한 後 適當한 column 에 充填하고 樹脂의 5-10 倍量(V/V) 이 되는 6 N-formic acid 와 1 M-sodium formate 溶液의 等量混合液을 column 에 通過시킨 다음에 다시 5~6 倍量(V/V) 의 88% formic acid

를 通過시키고 끝으로 再蒸溜水를 通過하되 流出液이 中性이 될때까지 계속세척하였다. 以上과같이 formic acid type로 活性化시킨 ion 交換樹脂를 pyrex 製 column(0.9×7cm)에 弱한 壓力를 加하면서 氣泡가 생기지 않게 注意하여 均一하게 充填하였다. 常壓에서 이 column에 試料液을 徐徐히 加하여 nucleotide 成分을 樹脂에 吸着시킨後 再蒸溜水로 2-3回 洗滌하여 column 準備를 完了하였다.

(3) Stepwise elution system⁽⁶¹⁾

이온 交換樹脂에 依한 試料中 nucleotide의 段階의 溶出은 弱한 壓力(水壓)으로 Fig. 11의 展開液이 1 ml/1分間의 流速이 되게 調節하고 Automatic fraction collector(Rinco 社製)를 利用하여 10 ml 式 分取하였다. 1回實驗에서 200~220個의 fraction을 分取하였으며 約 34~37時間이 所要되었다.

(4) Optical density 測定^(64,65)

以上과 같이 fraction collector로 分取한 各溶出液의 fraction을 silica cell에 넣어 Beckman spectrophotometer DU-2를 使用하여 波長 260 mμ 및 280 mμ에서 O.D를 測定하였고 各 fraction의 O.D를 plot하여 nucleotide의 各 peak를 決定하고 nucleotide가 ion exchange resin column에서 溶離되는 位置를 標準 nucleotide의 各 peak와 比較하였다.

(5) 各 Nucleotide의 同定

260 mμ의 吸收로 peak가 되는 各個의 fraction을 모아 1 N-HCl로 pH 2.0가 되게 調整하고 Active charcoal column에 吸着시켜 水洗한後 1.4% NH₄ OH 含有 50% ethanol로 溶出하여 rotary vacuum evaporator에서 濃縮하여 UV-absorption spectra의 測定用 그리고 paper chromatography用 및 paper electrophoresis 用的 試料로 하였다. UV-absorption curve는 波長 230 mμ에서 300 mμ까지 O.D를 5mμ 間隔으로 連續測定하여 authentic compound의 標準曲線과 比較하여 同定하였으며 paper chromatography의 R_f值 paper electrophoresis의 migrated distance 등에 依하여 同定을 뒷받침하였다.

(6) 各 Nucleotide의 mole 濃度算出法^(68,69)

各 peak의 O.D合計에서 back ground를 減한 다음 各 nucleotide의 extinction coefficient로 除하여 各 nucleotide의 mole濃도를 算出하였으며 이때 260 mμ의 extinction coefficient는 pH 2.0으로 調整된 경우의 E₂₆₀=14.2(AMP), E₂₆₀=11.8(GMP), E₂₈₀=6.2(CMP), E₂₆₀=9.9(UMP), E₂₆₀=7.4(IMP)를 使用하였다.

結 果 및 考 察

[1] 一般成分

試料것갈의 一般成分을 分析한 結果는 Table 3에

Table 3. Chemical composition of sea food pickles

Samples	Moisture %	ash %	Crude Protein %	Crude fat %	Carbo-hydrates %	NaCl %	Others %	pH
Salted Clam pickle(No. 3)	62.12	1.29	11.0	1.3	2.25	21.8	0.14	5.2
" Yellow tail pickle(No. 5)	67.61	1.13	7.4	0.8	0.1	22.7	0.26	6.0
" Cuttlefish pickle(No. 8)	63.98	1.98	14.8	1.8	1.9	15.4	0.6	5.8
" Oyster pickle(No. 11)	62.84	1.97	14.9	4.4	2.9	12.65	0.15	5.4

서 보는 바와같다.

이 結果를 보면 粗蛋白質이 7.4~15%의 範圍에 있고 水分은 62.12~67.61%, 食鹽이 12.65~22.70%의 범위에 있다. 粗蛋白質이 7.4%로 가장 적은 조끼것은 水分이 가장 많이 들어있어 어느정도 相關性을 볼수 있다. 食鹽은 오징어것과 굴것에 12~15%로서 조끼것, 조끼것 등의 20% 이상에 比較하여 比較的 적은데 前者는 短期間에 熟成되어 봄, 가을, 겨울과 같이 氣溫이 낮은 季節에 食用하고 있는 反面 後者는 食鹽이 많아 一年에 걸쳐 長期的으로 食用하는것으로 생각된다.

[2] Microflora

試料것갈中 microflora의 動態를 各 group 別로 보면 Table. 4와 같다. viable cell의 total count를 보면 7,200~28,000,000까지 현저한 差異를 보였다. 即 total count에서 오징어것 굴것 등은 담금時 原料에 附着한 細菌에 基因하는 것인지 10⁷을 보이거나 조끼것 및 조끼것은 10⁸~10⁹을 보이는데 前者는 試料가 담금 1~2個月이고 後者는 熟成期間이 相當히 지난것이다. 이것은 溥田氏⁽⁶⁵⁾가 miso 熟成中 細菌의 消長에서 耐鹽性細菌만이 存在함을 指摘한 것을 볼때 前者에 많은 細菌이 있든것이 熟成過程에서 一般細菌은 淘汰되고 耐鹽性細菌만이 남게 되는 까닭에 全細菌數가 적어진것으로 생각된다.

Table 4. Microflora in sea food pickles during fermentation

Samples (g)	Clam pickle No. 3	Yellowtail pickle No. 5	Cuttlefish pickle No. 8	Oyster pickle No.11
Viable cells				
Total counts	3.2×10^4	7.2×10^8	1.6×10^7	2.8×10^7
Aerobic bacteria	3.0×10^4	5.4×10^8	1.1×10^6	2.1×10^8
Anaerobic bacteria	1.0×10^4	3.0×10^8	1.0×10^6	1.5×10^8
Yeasts	5.2×10^8	3.1×10^8	2.0×10^5	2.5×10^5
<i>Micrococcus</i>	+		+	++
<i>Brevibacterium</i>			++	+
<i>Sarcina</i>	+	++	+++	
<i>Leuconostoc</i>	+++	+	++	+++
<i>Pediococcus</i>	++	++		
<i>Bacillus</i>	+++	+++		+++
<i>Pseudomonas</i>			+	+
<i>Flavobacterium</i>			+	+

※ Total count : 100% + 0~10% ++ 11~20% +++ 21~30% ++++ 31~40%

食鹽濃도가 낮고 담금한後 1 個月程度인 굴치, 오징어것에는 生菌數가 많은值로 보이며 細菌의 好氣性, 嫌氣性比도 비슷하며 分布된屬도 多彩로워 *Micrococcus* 屬이 10~20%, *Brevibacterium* 屬이 10~20%, *Sarcina* 屬이 0~30%, *Leuconostoc* 屬이 20~30%, *Bacillus* 屬이 30%, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* 屬이 0~10%를 보여준다. 그러나 反對로 食鹽濃도가 높고 담금한後 6 個月程度지난 조개젓, 조기젓등에는 耐鹽性이 弱한 菌은 少되하여 好鹽性細菌인 *Bacillus* 屬이 30~40%, *Sarcina* 屬이 10~20% 嫌氣性 好鹽性細菌인 *Leuconostoc* 屬이 10~40%, *Pediococcus* 屬이 20% 그리고 耐鹽性酵母가 共存하면서 젓갈醱酵後期까지 存在하여 熟成에 影響을 미치는 것으로 생각된다.

[3] 細菌의 同定

菌分離는 Table 1의 各 media 中에 食鹽濃度를 0, 4, 7, 15, 21%로 하여 菌種分布가 外觀으로 보아 많은 것에서부터 順序로하여 採菌하였다. Table 5에서와 같이 好氣性細菌 101 株中 37 菌株가 그리

Table 5. Isolates from sea food pickles

Sample	Sea food pickles				Total
	No. 3	No. 5	No. 8	No.11	
Aerobic bacteria	22	18	28	33	101
(Halophilic)	(11)	(13)	(4)	(9)	(37)
Anaerobic bacteria	5	2	9	11	27
(Halophilic)	(3)	(2)	(8)	(4)	(17)

고 嫌氣性細菌 27 菌株中 17 菌株가 halophilic 이었

다. 總分離菌 128 株中 protease 및 RNA-depolymerase activity가 優秀한 菌株와 그밖에 外觀上 비슷하다고 認定되는것 中에서 選擇하여 19 菌株를 選定하고 이들에 對하여서만 同定하기 爲하여 培養的인 特性의 結果를 Table 6. 形態學的 特性의 結果를 Table 7, 그리고 生理學的 特性과 糖類에서의 酸및 gas生成等의 結果를 Table 8 및 Table 9에 各各 表示하였다.

group 1은 catalase 陽性, 好氣性, rod shaped cell, endospore의 存在, gram 陽性, liquid culture broth에서 pellicle形成, glucose agar, soybean agar에서 잘자라는點, 澱粉加水分解性, 7% 食鹽含有培地에서 잘자라는 點等으로 보아 *Bacillus subtilis* 近緣菌임을 알수있었다.

group 2는 catalase 陽性, 好氣性, 球菌, gram 陽性, gelatine 液化性, nitrate의 還元力이 없는 點으로 보아 *Micrococcus* spp.에 屬하는듯하다.

group 3은 食鹽濃度 4%에서 잘자라고 培養液에 色素溶出이 없으며 gelatine 液化와 polar flagellate, motile, gram 陰性, 短桿狀, milk에서 生育치않고, indol negative, nitrate의 還元力이 없고 H₂S生成, xylose에서는 生酸하나 glucose에서 生酸치못하는 點等으로 보아 *Pseudomonas marinoglutinosa* 近緣菌임을 알수있었다.

group 4는 gram 陰性, 桿狀, non motile, yellow-white, gelatine 液化, milk를 peptonize하는 點으로 보아 *Flavobacterium* spp. 인것같다.

group 5는 rod shaped cell, non motile, gram 陽性, white, nitrate의 還元力이없고 食鹽濃度 4%에서 잘자라고 gelatine 液化, maltose에서 生酸못하며

Table 6. Culture characteristics of isolates from sea food pickles.

group strain	Bouillon agar colony	Bouillon agar slant	Bouillon broth	Soy bean agar	Tyrosin agar	NaCl(%)broth	Gelatin stab	Litmus milk	Starch liquef-action
1	7-6	Cir. S. En. D. Sp. Op.	Ab. Sp. Op. M.	P. Fl. Sl.	Ab. echinulate. Y-G	+ + # ± -	Rp. Sr.	Al. (pep)	+
	11-1	Ir. Sp. S. Lo. F. Op.	Mo. Op. W. M.	P. Fl. Sl.	" "	+ + # ± -	Rp. Sr.	Al. (pep)	+
	3-6	" " " " " "	Ab. Sp. Op. M.	P. Mo. Sl.	" "	+ + # ± -	Mo. Sr.	" "	+
	9-4	" R. Un. Um. Op. G.	" Pl. Op. W. M.	P. St. Sl.	" "	+ + # ± -	Sw. C.	" "	+
2	11-7	Cir. R. Un. F. Op. W.	Mo. Sp. Op. W. M.	M. Sl.	" "	+ + # - -	Mo. C.	Nc.	-
	11-8W	" S. En. " " " "	Ab. " " Y-W.	" "	" "	+ + - - -	N.	" "	-
	11-8Y	" " " " " "	" " " " Y	" "	" "	+ + + - -	N.	" "	-
	11-11	" " " " " "	Mo. " " T. W.	" "	" "	+ + - - -	Mo. Np.	" "	-
3	8-9	" " " Am. T. G.	" Fi. G. T. Cr. Gr	" Rg.	" "	+ + ± - -	" "	Al. (pep)	+
	11-23	" " " Cn. Op.	" " " " " "	" "	" "	+ # ± - -	" Sr.	" "	+
4	8-27	" " " Pt.	" " " Op. Y.	" V.	" "	+ + ± - -	Np.	(pep)	-
	11-25	" " " " " "	" " " " Y-W.	" "	" "	+ + ± - -	Sr.	" "	+
	8-1	" " " Cn. G. Op. Y. G.	" " " " Y.	Ht.	" "	+ + + - -	" "	Dc. (pep)	+
5	8-21	" " " " " "	" " " " Y-W.	" "	" "	+ + + - -	C	(pep)	+
NaCl 20% included									
Complete agar colony Starch agar colony Starch agar slant									
6	8-14	Puncti form S. Cn. T.	Ro. En. Cn. Wx. Re.	Fi. Ri. En. Re.	" "	(Complete broth) NaCl (%)	NaCl 20% included		
	8-16	" " " " " "	" " " " " "	" " " " " "	" "	0 4 7 15 21	N.	Nc.	±
NaCl 15% included									
Glucose gelatin colony Glucose gelatin stab Sucrose broth									
7	8-17	Small. W. Ri. nodular	Growth along En. stab	slime	" "	(Glucose broth) NaCl (%)	NaCl 15% included		
	8-18	" " " " " "	" " " " " "	" "	" "	0 4 7 15 21	N.	Nc.	-
8	12-14	Peptone meat gelatin colony yellowish brown	Malt gelatin W. carbonate dissolved	Meat ext. gelatin stab Growth along stab W. Ri.	" "	- + + # # + +	" "	" "	-
						- + + # # + +	" "	" "	-

Notes: Cir: circular, S: smooth, En: entire, D: dull, Op: opaque, Ir: irregular, Sp: spreading, Lo: lobate, F: flat, R: rough, Un: undulate, Um: umbonate, Y: yellow, Y-W: yellowish white, T: translucent, Am: amphorus, G: gristening, Dc: decolorized, Cn: convex, Pt: pulvinate, Y-G: yellowish gray, Ro: round, Wx: waxy, Re: red, Ab: abundant, M: membranous, Mo: moderate, W: white, Pl: plumose, Fi: filiform, Cr-Gr: cream gray, Ri: raised, P: pellicle, Fi: flocculent, Sl: slight, St: strong, Rg: ring, V: viscid, Ht: heavy turbid, Rp: rapid, Sr: stratiform, Sw: slow, C: crateriform, N: none, Np: napiform, Al: alkaline, Pep: peptonized, (pep): slow, No: no change, Oa: opalescent.

Table 7. Morphological characteristics of isolates from sea food pickles.

Group	Strain	Size(μ)	Shape	Gram	Motility	Flagella	Spore
1	7-6	0.7~0.8×2.0~4.5	rods	+	+	peritrichous	+
	11-1	0.8~0.9×3.0~5.4	"	+	+	"	+
	3-6	0.7~0.8×2.2~3.8	"	+	+	"	+
	9-4	0.7~0.9×2.4~3.6	"	+	+	"	+
2	11-7	1.0~1.5 spheres singly, in pairs, masses		+	-	-	-
	11-8W	1.0~1.4	"	+	-	-	-
	11-8Y	0.9~1.2	"	+	-	-	-
	11-11	1.2~2.1	"	+	-	-	-
3	8-9	0.7~1.0×1.8~2.3	rods	-	+	polar	-
	11-23	0.8~1.0×2.0~2.8	"	-	+	polar	-
4	8-27	0.7~0.8×0.9~1.2	short rods	-	-		-
	11-25	0.7×1.0	"	-	-		-
5	8-1	0.3~0.4×0.9~1.0	rods, nonpleomorphic	+	-		-
	8-21	0.3~0.5×0.9~1.2	rods, slightly curved	+	-		-
6	8-14	0.9~1.5 spheres in singly in pairs, in packets		+	-		-
	8-16	1.0~1.6	"	+	-		-
7	8-17	0.9~1.1	spheres in pairs	+	-		-
	8-18	1.0	"	+	-		-
8	12-14	0.8~1.0	spheres in pairs in tetrad in short chain	+	-		-

Table 8. Physiological characteristics of isolates from sea food pickles.

Group	Strain	Catalase	H ₂ S	Indol	Nitrite	V.P. test	M.R. test
1	7-6	+	-	±	+	+	-
	11-1	+	-	±	+	+	-
	3-6	+	-	±	-	+	-
	9-4	+	-	±	-	+	-
2	11-7	+	-	+	-	-	-
	11-8W	+	-	-	-	-	+
	11-8Y	+	-	-	-	-	+
	11-11	+	-	+	-	-	+
3	8-9	+	-	-	-	+	-
	11-23	+	-	-	-	+	-
4	8-27	+	-	-	-	+	+
	11-25	+	-	-	-	+	+
5	8-1	+	-	-	-	-	+
	8-21	+	-	-	-	-	+
6	8-14	+	-	-	-	-	-
	8-16	+	-	-	-	-	-
7	8-17	-	-	-	-	-	+
	8-18	-	-	-	-	-	+
8	12-14	-	-	-	-	-	-

notes :

V.P.: Voges-Proskauer

M.R.: methyl red.

Table 9. Acids producibility from carbohydrates by the isolates from sea food pickles.

Group	Strain	Ara	Rha	Xyl	Glu	Fru	Gal	Man	Lac	Suc	Mal	Raf	Dex	Sta	Gol	Erl	Arl	Mtl	Inu	Sal	
1	7-6	+	-	+	+		-		-	+				±					+	-	-
	11-1	+	±	+	+		-		-	+				±					+	-	-
	3-6	+	-	+	+		-		-	+				-					+	-	-
	9-4	+	-	+	+		-		-	+				-					+	-	-
2	11-7	+	-	+	+	+	+	±	-	±	±	-	-	-	-	-			±		
	11-8W	+	±	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-			±		
	11-8Y	±	-	-	+	+	+	+	-	±	-	-	-	-	-	-			±		
	11-11	+	±	+	+	+	+	+	-	±	+	-	+	-	-	+			+		
3	8-9			+	-				-	-			+	-	-						
	11-23			+	-				-	-			+	-	-	+					
4	8-27			-	+					+	+			-	-						+
	11-25			-	+					+	+			-	-						
5	8-1			-	+				-	-	-			-	-				+		-
	8-21			-	+				-	-	-			-	-				+		-
6	8-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	8-17	+	-	+	+	+	+	+	±	+	-	-	-	-	-				+	-	
	8-18	+	±	+	+	+	+	+	±	+	-	-	-	-	-				+	-	
8	12-14	+	±	+	+	+	+	+	+	±	+	-	±	±	-				+	-	+

Notes. Ara: arabinose, Rha: rhamnose, Xyl: xylose, Glu: glucose, Fru: fructose, Gal: galactose, Man: mannose, Lac: lactose, Suc: sucrose, Mal: maltose, Raf: raffinose, Dex: dextrin, Sta: starch, Gol: glycerol, Erl: Erithritol, Mtl: mannitol, Inu: inulin, Sal: salicine, +: acid produced, ±: acid produced questionably, -: acid not produced.

澱粉液化力이 있는 點等으로 보아 *Brevibacterium marinopiscosum* 近緣菌임을 알수있었다.

group 6 은 aerobic, halophilic, spheres, in singly, in packets, gram 陽性, non motile, 一般培地에서 자라지 못하고 食鹽濃度 15% 以上の 澱粉含有培地에서 자라며 indol 陰性, nitrate의 還元力이 없고 食鹽濃度 4% 以下에서 안자라는 obligatory halophilic 인點이 *Sarcina litoralis* 近緣菌임을 알수있었다.

또한 *Sarcina litoralis* 8-14 와 8-16 兩菌株는 오징어젓에서 分離된 것으로 Table 10에서와 같이 營養要求性 halophilic 인 것으로 要求營養素는 8-14 菌株는 含硫黃 amino 酸인 cystine 과 purine, pyrimidine base 를 다같이 要求하며 8-16 菌株는 肉味性 amino 酸인 glutamic acid 및 purine, pyrimidine base 를 같이 要求하고 짓갈等屬의 肉味性과 相關性을 가질수있는 興味있는 菌株임을 알게되었다.

group 7 은 sucrose broth에서 slime 生成, chaine 狀, sphere in pairs, gram 陽性, gelatine 非液化, 穿刺孔에 따라生育, anaerobic, indol negative, nitrate 還元力이 없고 microaerophilic, 糖類에서 生酸性으로

보아 *Leuconostoc mesenteroides* 近緣菌임을 알수있었다. 이菌은 또한 obligatory halophilic 임을 알았다.

group 8 은 sphere in pairs in tetrads, non motile, gram 陽性, obligatory halophilic, meat extract gelatine stab culture에서 穿刺孔에 沿하여 生育하고 gelatine 非液化, anaerobic, catalase positive, H₂S negative, indol negative, nitrate 還元力이 없고 糖類에서의 生酸으로 보아 *Pediococcus halophilus* 近緣菌으로 생각된다.

[4] Protease activity

짓갈이 熟成됨은 주로 짓갈原料蛋白質이 amino 酸으로 分解되는것인데 蛋白分解酵素가 原料인 魚介類自體의 것인지 醱酵熟成微生物에 依하여 生成되는 것인지를 알기 爲하여 原料 및 熟成짓갈에 對하여 prtease 活性을 測定한 結果는 Table 11 과같다.

原料에서 由來되는 protease 活性도 無視할 수 없을 만큼 存在하는데 이들은 짓갈의 高濃度食鹽으로 인한 活性阻害로 30~60%까지 活性減少를 볼 수 있다. 한편 醱酵에 關與하는 細菌이 生成한 protease 는 주로 *Bacillus* 屬에서 두드러지게 많이 生成됨을

Table 10. Nutritional requirements of isolates from sea food pickles.

Media	Isolates		8-14		8-16	
	18 hr.	24 hr.	18 hr.	24 hr.	18 hr.	24 hr.
M-media ⁽⁵⁷⁾	-	-	-	-	-	-
NaCl 8% M-media	-	-	-	-	-	-
" + Vitamin free Casamino acid 0.5%	±	+	±	+	±	+
" + Vitamin mixture 0.1%	-	-	-	-	-	-
" + Casamino acid 0.5% + Vitamin mixture 0.1%	±	+	±	+	±	+
" + RNA hydrolyzate soln. 0.5%	+	++	+	++	+	++

NaCl 8% M-media + Amino acid 0.01mg/ml	8-14 24hr	8-16 24hr	NaCl 8% M-media + Cys. & Glu. 0.01mg/ml + Base 0.01mg/ml	8-14 18hr.	8-16 18hr.
Leucine	-	-	Adenine	+	+
Isoleucine	-	-	Hypoxanthine	+	+
Valine	-	-	Xanthine	+	+
Glycine	-	-	Guanine	+	+
Methionine	-	-	Uracyl	+	+
Proline	-	-	Cytidine	+	+
Lysine	-	-	Thymine	+	+
Arginine	-	-			
Alanine	-	-			
Cysteine & Cystine	+	+			
Phenyl alanine	-	-	NaCl 8% M-media + Base 0.01mg/ml	8-14 24hr.	8-16 24hr.
Tyrosine	-	-	Adenine	-	-
Glutamic acid	-	+	Hypoxanthine	-	-
Aspartic acid	-	-	Xanthine	±	+
Tryptophan	-	-	Guanine	-	-
Threonine	-	-	Uracyl	-	-
Serine	-	-	Cytidine	-	-
Histidine	-	-	Thymine	-	-
Total	+	+			

Table 11. Protease activities of sea food pickles, their raw materials and isolates

Sample		Protease activity (tyrosine µg/ml)		Sample	Protease activity (tyrosine µg/ml)	
		NaCl 1%	NaCl 7%		NaCl 1%	NaCl 7%
Clam (No. 3)	raw material	36.4	20.6	Isolates 11-8 Y	(0) [0]	[0]
	pickle	40.7	36.4	" 11-11	(0) [51.4]	[33.8]
Yellow tail (No. 5)	raw material	17.1	7.8	" 8-9	(41.6) [52.4]	[41.6]
	pickle	30.6	26.3	" 11-23	(60.4) [71.7]	[43.5]
Cuttlefish (No. 8)	raw material	27.3	12.1	" 8-27	(25.1) [28.0]	[17.1]
	pickle	60.9	52.7	" 11-25	(37.7) [41.2]	[21.5]
Oyster (No. 11)	raw material	44.8	21.3	" 8-1	(16.3) [26.7]	[10.4]
	pickle	71.6	59.2	" 8-21	(14.4) [29.8]	[7.9]
Isolates	7-6	(118) [156]	[124]	" 8-14	(0) [104]	[89.2]
"	11-1	(107) [138]	[113]	" 8-16	(0) [84]	[67]
"	3-6	(94) [121.4]	[92]	" 8-17	(0) [0]	[0]
"	9-4	(40.4) [115]	[89]	" 8-18	(0) [0]	[0]
"	11-7	(39.8) [106]	[64]	" 12-14	(0) [0]	[0]
"	11-8W	(0) [0]	[0]			

Note: () : Protease production in Nutrient broth (Difco)
 [] : " " " Complete broth (Table 1)

을 엿볼 수 있었으며, 이들의 食鹽濃度에 依한 阻害程度도 前者보다는 差가 있어 20~40%程度로 活性이 減少함을 보여 주었다. 그리고 耐鹽性이 아닌 細菌으로 *Pseudomonas* 屬, *Flavobacterium* 屬, *Micrococcus* 屬, *Brevibacterium* 屬 等도 protease 가 生成되나 이들은 食鹽濃度에 依한 活性阻害程度가 좀 甚하여 40~60%로 減少함을 알았다. 이것은 好鹽性細菌이 生成하는 protease 가 其他細菌의 것보다 食鹽에 依한 活性阻害程度가 적은 傾向을 보여 주었다. 好鹽性細菌의 protease 生成은 大體의 으로 nutrient broth 에서보다 榮養素가 豊富한 complete media 에

서 增加를 보여주었고 特別 complete media 에서만 生育하는 榮養要求菌株인 *Sarcina litoralis* 8-14 및 8-16 兩菌株가 complete media 에서만 protease 生成이 현저하게 나타난 것은 注目할만 한 것이다. 위와 같이 生成된 protease 가 젓갈 熟成中 原料蛋白質을 分解하여 遊離 amino 酸을 蓄積시키므로 구수한 맛이 發現된다고 生覺된다.

[5] RNA-depolymerase activity

젓갈 熟成과 더불어 젓갈 原料中 核酸이 分解되어 5'-mononucleotide 로 되는데 이것이 呈味性을 갖는 것은 分子構造上 Fig. 2 와 같이 5'-IMP, 5'-

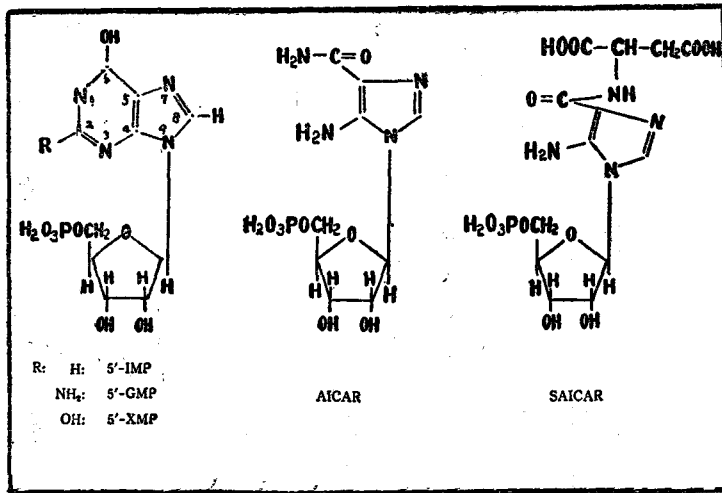


Fig. 2. Nucleic acid-related flavor components

GMP, 5'-XMP 그리고 이들의 purine 環이 開裂된 5'-AICAR, 및 5'-SAICAR 이다. 그러나 이들 核酸 分解酵素의 根源이 原料인 魚介體인지 或은 醱酵熟成微生物의 繁殖에 由來된 것인지를 究明하기 爲하여 實驗한 結果는 Table 12. 와 같다. Table 12. 中

조개젓의 경우 1個月熟成것에서 cup method 로 透明帶의 直徑이 0.8 cm 이든 것이 2個月熟成인것에서는 約 2倍가 되는 1.5 cm 로 커지고 조기젓도 이와 비슷한 傾向을 보여 2個月의 것이 1.1cm 이었다. 오징어젓에는 原料中의 酵素活性이 0.9 cm 로

Table 12. RNA-depolymerase of sea food pickles and their raw materials.

Samples	RNA-depolymerase activities (pH6.0) (cm)	Molybden blue reaction	
Clam (raw material pickle(No.3))	+ * 0.8	** 1.5	+ +
Yellow tail (raw material pickle(No.5))	+ +	1.1	+ +
Cuttlefish (raw material Pickle(No.8))	0.9 1.0	2.1	+ +
Oyster (raw material pickle(No.11))	0.9 1.7	2.3	+ +

notes. *: fermented 1 month

** : fermented 2 months

比較的 높은편이었으며 이것이 1個月熟成에서는 活性的 增加는 그리 없었으나 2個月熟成에서는 2.1 cm 로 1個月때의 約 2倍로 增加했음을 나타내 고 있다. 이것은 熟成1個月까지 耐鹽性이 아닌 細菌이 쇠퇴하고 그후 熟成期間中 耐鹽性細菌들만이 增殖함과 더불어 酵素가 生成되는것 같다. 굴것에 서도 酵素活性이 原料中에 상당히 높아서 0.9cm 인 데 1個月 熟成으로 約 2倍로 增加되고 2個月熟成 에서 2.3 cm 로 增加하여 最高值를 보였다. 이와같 이 原料때 보다는 이것이 醱酵熟成함에 따라 酵素活 性이 增加하는 傾向은 不活性態로 存在하든것이 다 른 要因으로 活性化되는것도 있을지모르나 微生物의 繁殖으로 生成되는 酵素에 依한 것이 主가 아닌가 생각된다. 여기서 4種 것갈의 RNA-depolymerase 作用의 共通의인 特性은 molybden blue reaction 이

全部 positive 인 것으로 이런 現象은 核酸이 上記 RNA-depolymerase, phosphomonoesterase, 및 nucleosidase 等 여러 共存酵素들에 依하여 nucleotide 로 되 고 더 分解가 進行되어 nucleoside 와 磷酸으로가 되 됨을 알았으며 base 까지도 分解될 可能性이 었보 이므로 臭味性 5'-mononucleotides 로는 蓄積되기 어려움을 알 수 있다. 따라서 것갈의 核酸分解酵素 活性이 主로 關與微生物에서 由來되는 것임을 알 수 있다. 分離菌株中 核酸分解酵素生成을 screen 하여 選拔한 菌株의 酵素特性을 究明하기 爲하여 實驗한 結果는 Table 13. 및 Fig. 3 에서와 같다. 選拔菌株 中 가장 生産性이 強한 것은 *Micrococcus* spp. 11-8w 및 11-7의 兩菌株이며 다음으로 *Bacillus subtilis* 11-1, 9-4 및 3-6 菌株도 強力한 것임을 나타냈다. 그러나 上記 5 菌株中 *Bacillus subtilis* 3-6 菌株만을

Table 13. RNA-depolymerase producibilities of isolates from sea food pickles

Isolates	Enzyme	RNA-depolymerase activity (cm) from producing media								Molybden blue reaction
		1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>Bac. subtilis</i>	3-6	1.25	2.0	1.3	1.6	±	±	±	±	-
	9-4	±	±	1.6	±	±	±	±	±	+
	11-1	±	2.4	±	±	±	±	±	±	+
<i>Micrococcus</i> spp	11-8w	±	±	2.68	±	-	-	-	-	+
	11-7	±	-	±	±	-	-	2.43	2.25	+

notes. RNA-depolymerase producing media { 1: C-media
2: " corn steep liquor 0.5% contained
3: " casamino acid " "
4: " clam pickle " "

{ 5: T-media
6: " corn steep liquor 0.5% contained
7: " casamino acid " "
8: " clam pickle " "

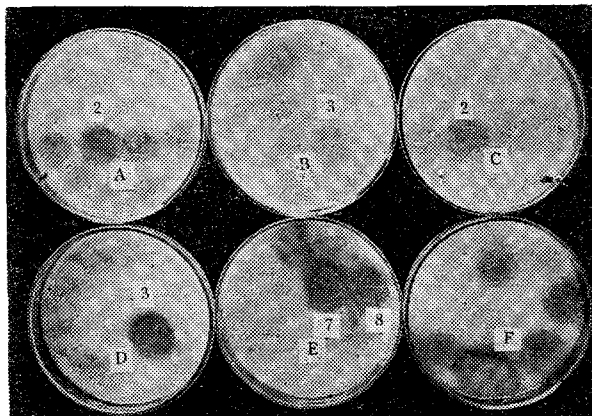


Fig. 3 Effect of sensitiser on RNA-depolymerase producibilities of isolates from pickles

notes: A: *Bacillus subtilis* 3-6 strain substrates: 1% RNA 2% Agar pH 6.5
B: " " 9-4 "
C: " " 11-1 "
D: *Micrococcus* spp. 11-8w "
E: " " 11-7 "
F: pickle

除外한 다른 4 菌株의 酵素는 molybden blue reaction 이 positive 였으므로 核酸이 mononucleotide 를 거쳐서 nucleoside 및 磷酸으로까지 分解함을 알았다.

한편 *Bacillus subtilis* 3-6 菌株는 食鹽 10% 含有 complete media 를 酵素生成基礎培地로 하고 여기에 corn steep liquor 및 조개젓갈이 各各 0.5%가 含有되게 添加한 區에서 RNA-depolymerase 의 生産效果가 현저하였으며 molybden blue reaction 이 nega-

tive 였으므로 mononucleotide 로 蓄積可能性을 보여 주었다. 上記事實로 corn steep liquor 및 조개젓갈 0.5%를 強化함으로서 *Bacillus subtilis* 3-6 菌株의 RNA-depolymerase 生成增加劑가 됨을 알았다.

위와 같은 條件에서 生成된 *Bacillus subtilis* 의 RNA-depolymerase 에 對하여 食鹽濃度가 酵素活性에 미치는 영향을 檢討하고자 食鹽濃度 0%, 10%, 20%式이 各各 含有된 1% RNA 基質과 酵素 活性

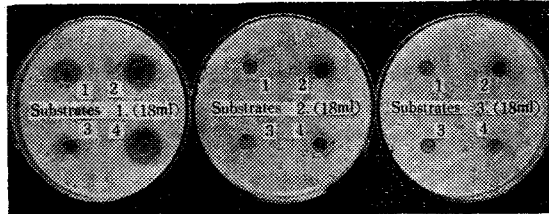


Fig. 4. Effect of NaCl conc. on 5'-phosphodiesterase of *Bacillus subtilis* 3-6 strain

note: Substrates 1		1% RNA,	2% Agar	pH 6.5	NaCl 0%	} Enzyme reaction	
2		"	"	"	" 10%		
3		"	"	"	" 20%		
Enzyme	1	NaCl 10%	C-media			} 44°C 4hrs	
production	2	"	"	corn steep liquor 0.5% contained			
	3	"	"	casamino acid	" "		
	4	"	"	clam pickle	" "		
Activities substrate 1	1	1.35cm		substrate 2	1	0.8cm	substrate 3
	2	1.90 "			2	1.3 "	
	3	1.30 "			3	0.8 "	
	4	2.25 "			4	0.9 "	
	1				1	±	
	2				2	1.1cm	
	3				3	±	
	4				4	0.9cm	

과의 關係를 究명한 結果는 Fig. 4 와 같다.

NaCl 0%의 基質에서 酵素活性이 크게 作用하여 corn steep liquor 0.5% 強化로 生成된 酵素는 1.9 cm 이나 조개젓갈의 強化로 生成된 酵素活性은 2.25 cm 이었고 NaCl 10% 含有基質에서는 活性阻害가 현저히 나타나 前者는 1.3cm 로 32%의 活性이 減少되었고 後者는 0.9cm 로 60%의 活性이 減少되었음을 나타냈고 NaCl 20% 含有基質에서는 前者는 42%, 後者는 60%의 活性減少를 보였다.

Bacillus subtilis 3-6 菌株의 RNA-depolymerase 生成增加劑로서 corn steep liquor 는 조개젓갈보다 高食

鹽 濃度에서 酵素活性阻害程度가 적은 傾向을 보여 주었다. 그리고 *Bacillus subtilis* 3-6 菌株의 RNA-depolymerase 가 RNA 를 分解하여 mono nucleotide 로 蓄積함은 molybden blue reaction 이 negative 인 點에서 確認한바 있으나 mono nucleotide 가 5', 3'-中 어떤 異性體인가를 確認하고자 0.5% RNA solution(Tris buffer soln. pH 6.5) 4.9ml 에 0.1ml 의 enzyme solution 을 加하여 40°C 에서 4hrs 反應시키고 熱處理를 하여 酵素를 不活性으로 하여 paper electrophoresis 로서 anode side 로 migrate 한 UV 吸收 band 를 確認, periodate 酸化, Schiff's 反應에 依한 靑紫色 band 를 確認함으로서 5'-mononucleotide 인 것을 authentic 5'-AMP 와 對照하여 Fig. 5. 와 같이 確認하였다.

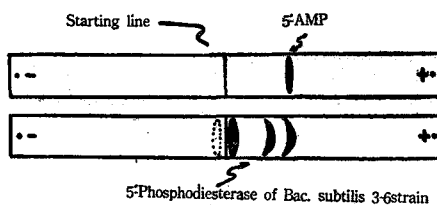


Fig. 5 Paper electrophoresis of RNA hydrolysates by *Bac. subtilis* 3-6 strain

그러므로 *Bacillus subtilis* 3-6 菌株가 生産한 核酸分解酵素는 5'-phosphodiesterase 임을 究明하였고 이것은 Kakinuma 等⁽⁷⁸⁾이 報告한 *Bacillus subtilis* 培養液의 RNA 分解酵素가 RNA 를 5'-mononucleotide 와 3'-mononucleotide 로 分解함과 비슷한 結果임을

알았다.

(6) 젓갈等屬의 遊離 Amino 酸

Standard amino acid 로서 N.B.C. 社製 18 種을 使用하여 basic amino acid 는 各各 0.05 μ mole 中, 酸性 amino 酸은 0.1 μ mole 을 含有하는 混合液을 standard

로 하고 4 가지젓갈의 遊離 amino 酸을 Amino acid Autoanalyzer 에 依하여 定量한 結果는 Table 14 와 같으며 Autoanalyzer 의 recorder 에 依한 各 amino acid 의 分析 結果로서 standard amino acid 를 Fig. 6 조개젓(No.3)의 amino acid 를 Fig. 7 에, 조기젓

Table 14. Free amino acid contents of the sea food pickles

(unit: mg/ml)

Pickles Sample No.	Salted clam pickle No. 3	Salted yellow tail pickle No. 5	Salted cuttle fish pickle No. 8	Salted oyster pickle No. 11
Amino acids				
Lysine	9.66	0.92	30.75	35.22
Histidine	—	0.71	—	—
Arginine	0.17	4.62	—	—
Aspartic acid	14.16	0.36	1.46	1.79
Threonine	7.10	0.17	0.58	17.63
Serine	6.10	0.02	0.96	1.54
Glutamic acid	31.76	4.67	28.07	3.77
Proline	5.31	—	0.59	3.80
Glycine	10.72	1.74	7.43	25.62
Alanine	34.33	—	39.12	142.44
Cystine	0.16	0.15	21.45	1.20
Valine	8.31	5.78	12.25	0.30
Methionine	0.41	0.47	7.93	1.33
Isoleucine	7.82	4.98	13.47	27.75
Leucine	7.62	7.29	18.21	31.12
Tyrosine	0.36	0.10	6.53	1.41
Phenyl alanine	0.19	0.08	5.73	1.23
	Fermented 15 months	Fermented 16 months	Fermented 10 months	

Analysis by Automatic amino acid Analyzer Yanagimoto Model LC-5

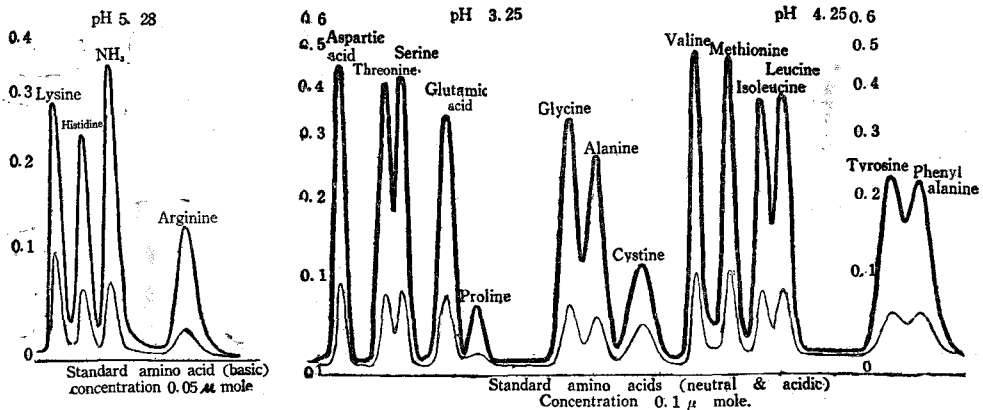


Fig. 6. Pattern of standard amino acid

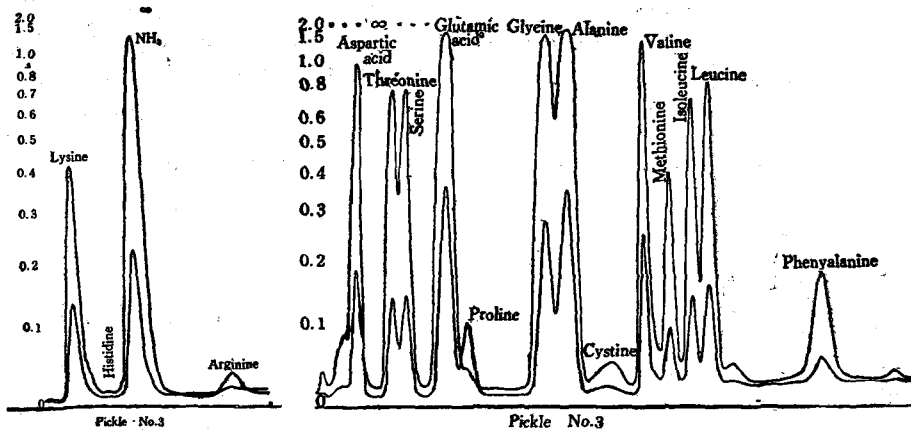


Fig. 7. Free amino acid pattern of salted clam pickle

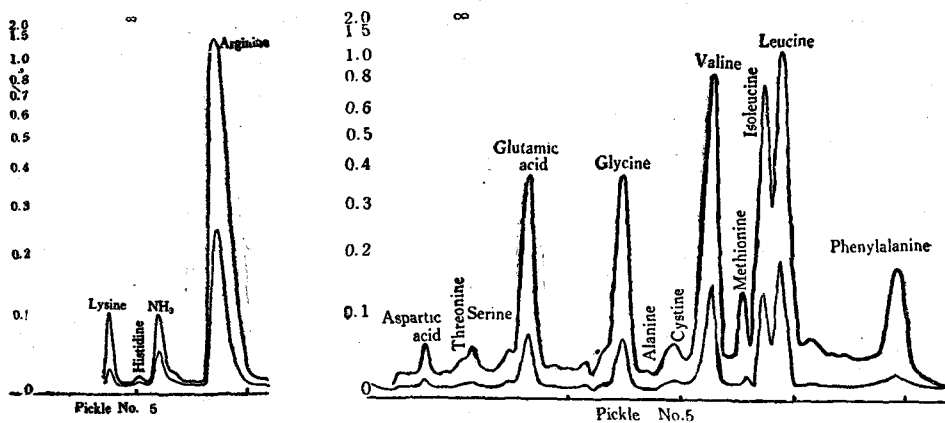


Fig. 8. Free amino acid pattern of salted yellow tail pickle

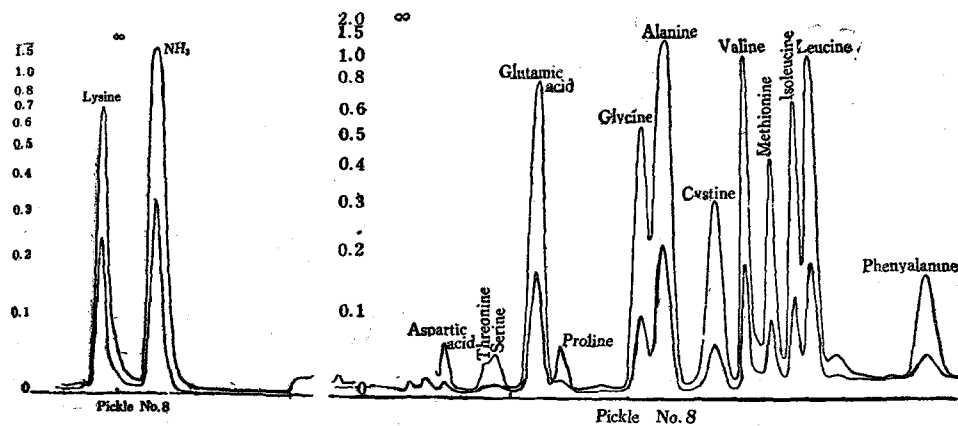


Fig. 9. Free amino acid pattern of salted cuttlefish pickle

(No. 5)의 amino 酸을 Fig. 8에, 오징어젓(No. 8)의 amino 酸을 Fig. 9에, 굴젓(No. 11)의 amino 酸을 Fig. 10에 表示하였다. 이것을 보면 大端히 興味있는 分布를 보이고 있다. 即 조개젓은 다른 것같이

比하여 酸性 amino 酸인 glutamic acid와 aspartic acid가 두드러지게 많으며 또한 serine, proline이 많다. lysine을 除外한 basic amino acid가 다른 것 같에는 없는데 조기젓에는 存在하며 오징어젓은 食

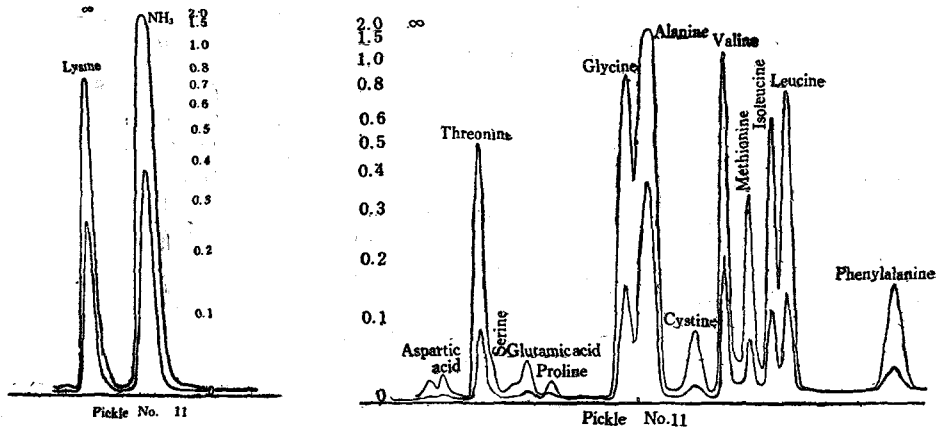


Fig. 10. Free amino acid pattern of salted oyster pickle

硫黃 amino 酸인 cystine 含量이 다른 것같이 17~130 배, methionine이 7~17 배나 많이 含有되고 그밖에 valine, tyrosine이 다른 것보다 많이 있다. 굴젓에는 essential amino acid인 lysine, threonine, isoleucine, leucine 含量이 다른 것같이 보다 현저하게 많고 phenyl alanine, methionine, valine이 고부 들어있는 점이 興味가 있다. 이 4가지 것중 共通의 점은 tryptophan이 熱에 對하여 不安定함과 Ehrlich 分解 樣式에 따라 tryptophal로 變하였거나 또는 decarboxylation⁽⁷⁷⁾에 依하여 tryptamine으로 變했을지도 모르지만 全然 나타나지 않은 점을 指摘할 수 있다.

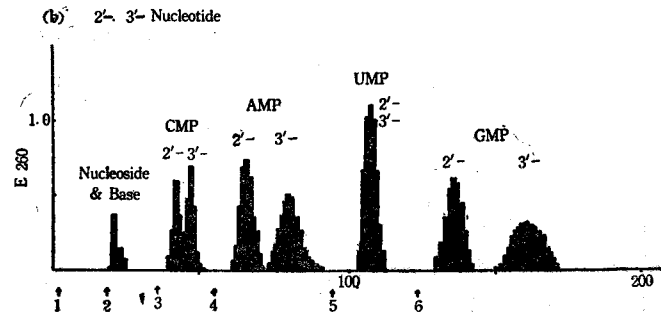
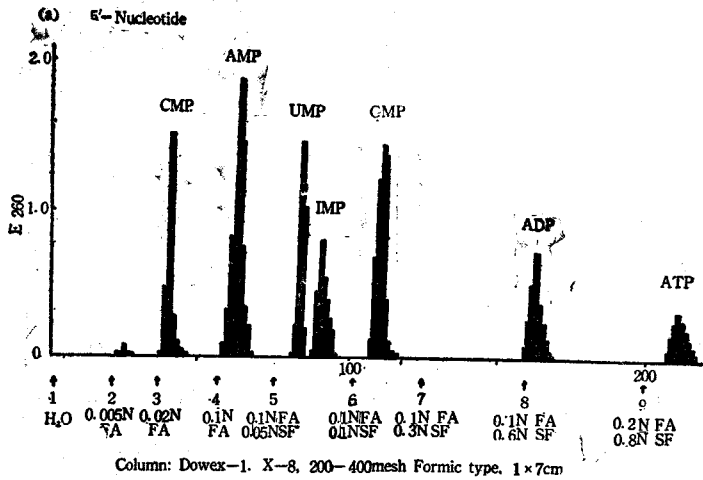
amino 酸中에서 呈味性 amino 酸의 代表的⁽⁷⁵⁻⁷⁶⁾인 glutamic acid 및 aspartic acid 含量을 考察하여 보면 조개젓이 으뜸이어서 조개젓 特有의 風味를 支配하는 것 같다. 이와 같이 것갈種類에 따라 多樣하게 遊離 amino 酸이 存在하는 것은 原料蛋白質을 構成하는 amino 酸들이 polypeptide로 結合된 것이 것갈醱酵熟成過程中 protease에 依하여 加水分解된 產物인 을 알았으며 protease의 根源이 原料自體의 것을 無視 못하지만 것갈熟成中 醱酵微生物에서 由來되는 protease 活性은 매우 重要한 位置를 占하고 있음을 알았다. 即 *Bacillus subtilis* 7-6, 11-1, 3-6, 9-4 菌株等은 耐鹽性細菌 때문인지는 몰라도 다른 細菌의 protease 보다 食鹽濃度에 依한 活性阻害程度가 적고 또한 *Sarcina litoralis* 8-14, 8-16 兩菌株는 一般培地에서는 榮養 要求가 甚한 菌인므로 生育치

못하지만 complete media에서 protease 生成이 두드러지게 많고 食鹽濃度에 對한 活性阻害程度가 근소한 點等을 볼때 *Bacillus*를 비롯한 이들 細菌이 T.G.Y-media나 nutrient broth에서 보다 complete media에서 protease 生成能의 增加가 현저한 點은 것갈自體가 complete media에 近似할 程度로 豊富한 榮養素를 갖춘 點으로 說明할 수 있다. 即 complete media에서와 같이 것갈中에서도 多量이 protease 生成이 이루어져서 이로서 原料中 蛋白質이 加水分解되어 呈味性인 glutamic acid, aspartic acid, lysine, glycine, alanine 등을 비롯하여 其他 amino 酸이 遊離됨을 究明하였다.

(7) 것갈中 5'-mononucleotides

Standard nucleotides로서 Sigma 社製 5'-AMP 3.16 μ mole, 5'-IMP 4.71 μ mole, 5'-GMP 6.12 μ mole, 5'-CMP 2.82 μ mole. 및 5'-UMP 2.92 μ mole을 含有하는 混合液을 試料로 하여 ion exchange column chromatography를 行하여 그 分離相으로서 Fig. 11(a)와 같은 溶離曲線을 얻었다. 即 5種의 5'-mononucleotide는 完全히 分離되고 Table 15에 表示한 바 같은 定量結果를 얻었으며 回收率도 良好하였다.

2'-, 3'-, mononucleotide가 共存할때 5'-mononucleotide의 定量이 妨害되는가의 與否를 檢討하기 爲하여 yeast RNA의 alkali 分解物을 試料로 하여 ion exchange column chromatography에 依하여 얻은 溶離曲線을 Fig. 11(b)에 表示하였다. 이것은 소 肝藏 RNA의 alkali 分解物을 試料로 하여 위와같이



Tube number (10 ml fraction size) and elution system
Fig. 11. Ion exchange column chromatography of various nucleotides
 extinction coefficients used: CMP 6.2 AMP 14.2 UMP 9.9
 IMP 7.4 GMP 11.8
 FA: Formic acid SF: Sodium formate

行한 Cohn⁽⁶⁸⁾ 등의 實驗結果와 비슷한 傾向을 보여 UMP에서 2'-, 및 3'-의 isomer가 分離되지 않았고, 또한 5'-AMP와 2'-AMP, 5'-GMP와 2'-GMP 그리고 5'-IMP와 2', 3'-UMP가 약간 중첩되어 있음을 알 수 있었다.

Table 15. Recovery test of 5'-mononucleotides by column chromatographic assay method

Mononucleotide	Assay values (μmole)	Recovery(%)
5'-AMP	3.20	101
5'-GMP	6.17	101
5'-IMP	4.77	102
5'-UMP	2.91	99.6
5'-CMP	2.84	101

조개젓갈의 試料로서 ion exchange column chromatography를 行하고 fraction number에 對하여 O. D를 plot하여 얻은 溶離曲線은 Fig. 12와 같다. 여기에서 A.B.C.D.E.F.G.H.I.J.K.L等 12 fraction이 分離되었는데 이것을 Fig 11의 standard와 對照하여 보면 C fraction은 5'-CMP, D fraction은 2'-CMP, E fraction은 3'-CMP F fraction은 5'-AMP, G fraction은 2'-AMP, H fraction은 3'-AMP이며 가장 많은 量이 存在하고 I fraction은 5'-UMP, J fraction은 5'-IMP, K fraction은 5'-GMP, L fraction은 ADP인것을 standard series의 溶離位置와 對照하여 우선 認定할 수가 있다. 그리고 A.B. 두 fraction은 Cohn等⁽⁶⁸⁾의 結果와 比較하여 nucleoside 및 base의 混合物를 混입을 確認하였다. 그러나 呈味性 5'-mononucleotides는 5'-IMP와 5'-GMP

인데 5'-GMP의 K fraction은 너무 적은 양임으로 無視하고 5'-IMP인 J fraction과 5'-AMP인 F fraction을 각각 모았다. 5'-AMP는 呈味性은 없으나 이것의 purine ring 4位置에 있는 amino基가 deamination되면 5'-IMP가 되므로 F fraction을 모았다. 이들 두 fraction을 active charcoal로 處理하여 pH 2.0로 하고 각 peak의 nuclide를 同定하는데 사용한 波長 230m μ 에서 300m μ 까지의 連續인 UV-absorption spectra를 測定한 OD曲線은 Fig. 16의 No. 3와 같다. 即 F fraction은 5'-AMP, J fraction은 5'-IMP임을 각각 同定하고 Fig. 17, Fig. 18에서와 같이 paper electrophoresis에 의하여 starting line으로부터 anode side에 migrated distance를 authentic componnd와 對照하고 paper chromatography에 의하여 Rf值로서 authentic com-

ponnd인 5'-AMP, 5'-IMP와 對照하고 periodate 酸化와 Schiff's reaction에 의한 靑紫色 band를 確認함으로써 5'-AMP와 5'-IMP임을 同定하는데 뒷받침 하였다.

조기것갈의 ion exchange column chromatography에서 얻은 각 fraction의 O.D를 plot한 溶離曲線은 Fig. 13.과 같다. 即 A.F.H.J.의 4 fraction이 分離되었는데 Fig. 11의 standard series의 溶離位置와 對照하면 F fraction은 5'-AMP, H fraction은 3'-AMP임을 알수있으며 3'-AMP가 가장 많고 5'-IMP, 5'-AMP의 순서로 적게 들어있다. 이中 F.J 두 fraction을 active charcoal로 處理하고 濃縮하여 pH 2.0으로 調整한 다음 UV-absorption spectra를 測定한 結果를 Fig. 16의 No. 5 그리고 paper electrophoresis를 한것은 Fig. 17.과 같고 paper

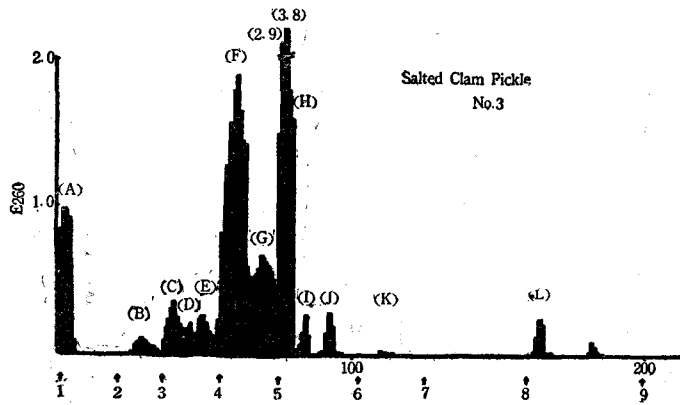


Fig. 12. Ion exchange column chromatography of salted clam pickle

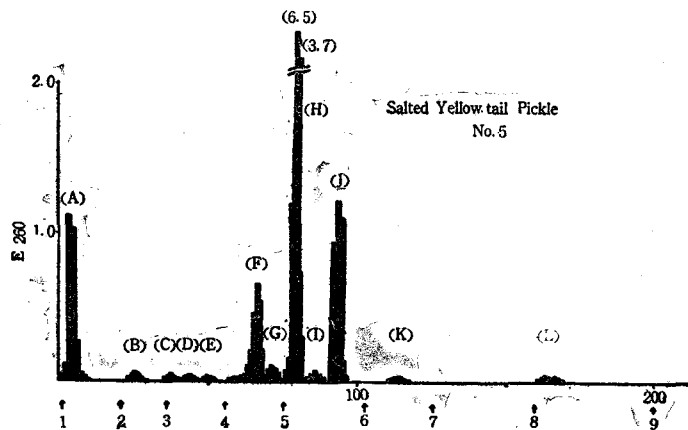


Fig. 13. Ion exchange column chromatography of salted yellow tail pickle

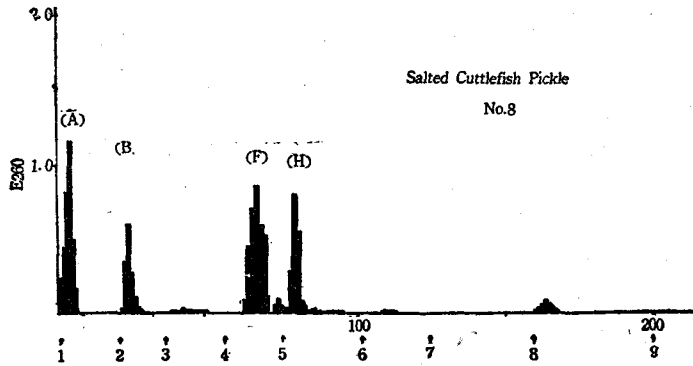


Fig. 14. Ion exchange column chromatography of salted cuttlefish pickle

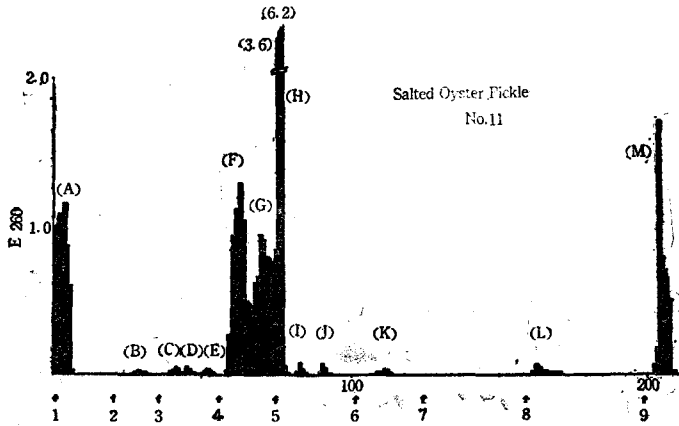


Fig. 15. Ion exchange column chromatography of salted oyster pickle

chromatography의 결과는 Fig. 18.과 같은데 前記와 같은 방법으로 5'-AMP, 5'-IMP임을 알수 있었다. 以上の結果를 볼때 5'-IMP가 조기것에만 들어있고 다른것같은 거의 들어있지 않은것은 興味있는 事實이다. 이것은 Shimazono⁽¹³⁾가指摘한바 같이 척추 동물들의 筋肉은 肉型으로서 5'-IMP-type이라고한 것과 一致하는 傾向을 보여주었다.

오징어것의 ion exchange column chromatography에서 fraction의 O.D를 plot한 溶離曲線은 Fig. 14와 같으며 A.B.F.H. 4 fraction으로 分離되었는데 이것을 Fig. 11의 standard series의 溶離曲線과 對照한 結果 F fraction은 5'-AMP, H fraction은 3'-AMP임을 認定하였고 A.B의 2 fraction은 nucleoside 및 base이었다. F fraction만을 모아서 前記와 같이 處理하고 UV-absorption spectra를 測定

하여 Fig. 16과 같은 結果를 얻었고 또한 paper electrophoresis 및 paper chromatography에 依하여 Fig. 17 및 Fig. 18과 같은 結果에서 5'-AMP임을 同定하였다. 오징어것에는 5'-mononucleotide中 5'-AMP뿐이고 다른것은 없으며 3'-AMP가 共存하고 있음은 興味있는 事實이다. 即 Shimazono⁽¹³⁾가指摘한바와 같이 무척추동물은 肉型이지만 AMP-type에 屬하는 것임을 알수있다.

굴것의 ion exchange column chromatography에서 얻은 溶離曲線은 Fig. 15와 같으며 A.F.G.H.I. J.K.L.M.의 9個 fraction이 分離되었다. 이 試料에서 얻은 溶離位置를 Fig. 11의 standard series의 溶離曲線과 對照한 結果 F fraction은 5'-AMP, G fraction은 2'-AMP, H fraction은 3'-AMP, I fraction은 5'-UMP, J fraction은 5'-IMP, K fraction은

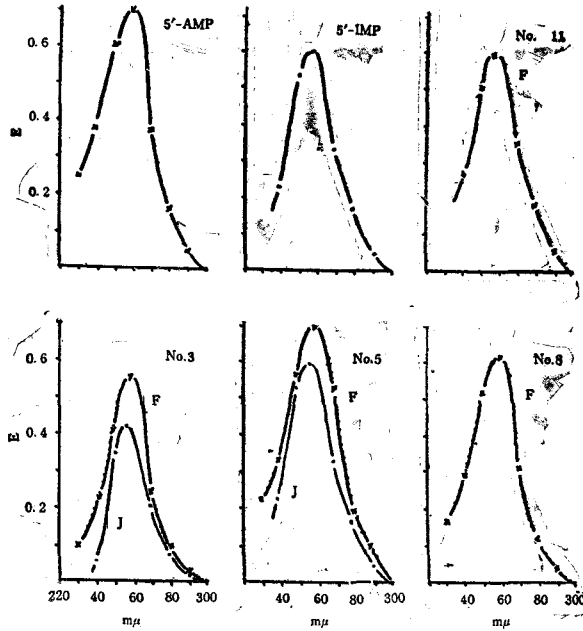


Fig. 16. U.V. absorption spectra of the 5'-mononucleotides (pH2.0)

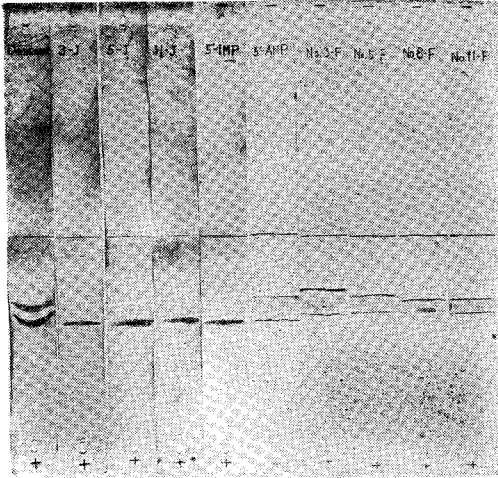
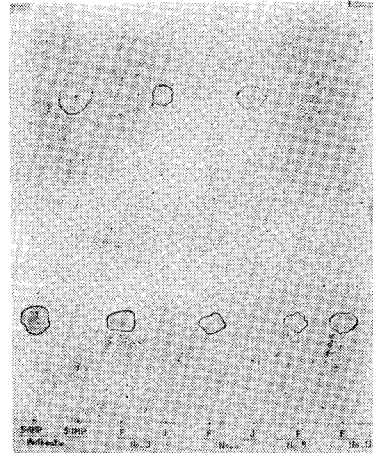


Fig. 17. Paper electrophoresis of 5'-mononucleotides



Solvent: Satu. $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ -tert. Butanol-0.025N $\text{NH}_4 \text{OH}$ (160: 3: 40)

Fig. 18. Paper chromatograms of 5'-mononucleotides

은 5'-GMP, L fraction 은 ADP 임을 各各 確認하였다. 그리고 F fraction 만을 모아서 前記와 같이 處理하여 U.V-absorption 을 測定한 結果는 Fig. 16 과 같고 또한 paper electrophoresis 및 paper chromatography 에 依한 結果는 Fig. 17 과 Fig. 18 과 같으며 이들은 어느 것이나 5'-AMP 임을 同定하였다.

以上 4 種의 것갈에 對한 5'-mononucleotide 의

定量結果는 Table 16. 에서와 같다.

以上과 같은 結果로 보아 4 가지 것갈中 5'-AMP 는 貝類인 조개젓에 가장 많고 다음이 굴젓 다음이 水産無脊椎軟體動物인 오징어젓의 順序이다. 이들은 mononucleotides 中 AMP 含量이 많은 것으로 보아 AMP-type 에 屬함을 알았다. 即 齊藤⁽⁷⁰⁾ 등이 水産軟體動物 및 貝類에는 adenylic deaminase 가 缺

Table 16. 5'-Mononucleotide contents of sea food pickles

Sample	5'-Mono nucleotide					5'-IMP 5'-GMP mg/100g	
	5'-CMP	5'-AMP	5'-UMP μ mole/g	5'-IMP	5'-GMP	5'-IMP	5'-GMP
Salted Clam pickle	1.24	5.87	0.68	0.13	0.03	4.46	0.41
" Yellow tail pickle	0.09	0.94	0.14	1.47	0.08	51.3	0.92
" Cuttle fish pickle	—	1.35	—	—	—	—	—
" Oyster pickle	0.04	3.27	0.06	0.03	0.02	1.01	0.21

如함을指摘하여 5'-IMP 는 없고 5'-AMP 가 많은 特有한 nucleotide pattern 임을 報告한 바와 같은 結果를 얻었다. 그런데 呈味性 5'-mononucleotide 인 5'-IMP 는 조기젓이 다른 젓갈보다 현저하게 많았다. 이것은 齊藤,⁽⁷⁰⁾ 藤田⁽⁷¹⁻⁷²⁻⁷³⁾ 등이 脊椎動物 魚類 肉中에는 死後 數時間에 AMP-deaminase 가 活性化되어 5'-AMP 가 deamination 되어 5'-IMP 로 轉化하므로 5'-IMP 가 많은 特有한 nucleotide pattern 임을 報告하였는데 이것과 大體로 一致된 結果임을 알 수 있다.

5'-GMP 는 4種 젓갈 어느 것에서나 痕跡밖에 들어 있지않다.

그러나 貝類인 조개젓에서는 5'-IMP 가 少量 含有하고 있는데 이것은 조개젓 熟成中 關與微生物이 分泌하는 adenylic acid deaminase 에 의하여 5'-AMP 가 5'-IMP 로 轉化된 것임에 기인한 것으로 生覺된다. 即 조개젓에서 分離한 *Bacillus subtilis* 3-6 菌株의 complete media 에서 培養한 液을 酵素로 하여 酵素反應物을 paper electrophoresis 로 展開하여 Fig. 17 과 같은 結果를 얻었는데 이것은 基質中 5'-AMP 一部는 adenylic acid deminase 에 의하여 5'-IMP 로 轉化된 것을 나타내고 있어 이것에 의하여 조개젓 中에는 5'-IMP 가 少量 存在하는 것임을 알 수 있다.

Shimazono⁽¹⁹⁾에 依하면 飲食物調理에서 MSG:5'-IMP 의 含量비가 ① 83:12 ② 92:8 ③ 95:4 인데 味の 相乘作用이 높았고 MSG:5'-IMP:5'-GMP 의 含量비가 ④ 95:2.5:2.5 인데 味の 相乘作用이 最高로 發現함을 報告한 바 있다. 또한 佐藤⁽⁷⁰⁾는 5'-IMP Na₂ 또는 5'-GMP Na₂ 를 MSG 와 配合할 때 이들이 MSG 의 1/100 量 程度로 存在하여도 味の 果가 나타났으며 1/5~1/10 인데 味の 相乘作用이 最大임을 報告하였다. 4種 젓갈中에서 위와 같은 구수한 味の 呈味相乘效果가 가장 顯著한 것이 조기젓인데 이것은 呈味性 amino acid 인 glutamic acid 497mg%, aspartic acid 36mg% 含有되고 5'-mononucleotide 인 5'-IMP:51.3mg%, 5'-GMP:0.

92mg% 含有하였으므로 佐藤⁽⁷⁰⁾가 報告한 味の 相乘 效果에서 最大值인 glutamic acid:5'-IMP=10:1 의 範圍에 있고 조개젓은 glutamic acid:3176mg%, aspartic acid:1416mg%와 5'-IMP:4.46mg%, 5'-GMP:0.41mg% 含有하여 glutamic acid:5'-IMP=712:1 의 範圍에 있어 呈味相乘效果는 極히 微弱하게 作用하는 것으로 보이며 이 젓갈의 味の 根源은 主로 amino acid 에서 由來되는 것으로 생각된다. 같은 5'-IMP 1.01mg% 含有하여 glutamic acid:5'-IMP=350:1 의 範圍에 있으므로 구수한 味은 조개젓보다도 적을 것이나 같은 味에는 단맛을 내는 amino acid 인 glycine 이 2.56%, alanine 이 14.24%나 되며 比較的 많이 들어 있어 이것같이 단맛을 지니는 한가지 원인이 되는 것으로 생각된다. 오징어젓의 구수한 味은 5'-IMP 는 없고 glutamic acid 2807mg% aspartic acid 146mg%로 各各 相當量이 들어 있어 이것들이 구수한 味の 根源이 됨을 알 수 있다.

要 約

우리나라에서 알려진 젓갈 30餘種에서 中 代表的인 것으로 알려진 조기젓, 조개젓(高食鹽性인 20%内外)과 굴젓, 오징어젓(低食鹽性인 10%内外)의 4種을 試料로하여 一般成分 分析, microflora, 主要醱酵微生物의 同定 및 酵素의 特性을 調査하는 同時에 熟成에 關與하는 微生物의 酵素作用이 呈味性 5'-mononucleotide 및 amino acid 의 生成에 미치는 影響을 調査하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

(1) 4種 젓갈에 對한 microflora 를 調査한 結果는 다음과 같다.

a) 젓갈담금 1~2個月의 것은 生菌數의 total counts 가 10⁷이였으며 담금後 6個月의 것은 10⁴이였다.

b) 젓갈 담금 1~2個月의 것은 *Micrococcus* 屬이 10~20%, *Brevibacterium* 屬이 10~20%, *Sarcina* 屬이 0~30%, *Leuconostoc* 屬 20~30%, *Bacillus* 屬이 30%内外 *Pseudomonas* 屬이 0~10% *Flavobacter-*

ium屬이 0~10% Yeast가 0~20%인 分布相을 나타냈다.

c) 젓갈熟成에 關與하는 微生物로서 初期以後에는 主로 耐鹽性인 *Bacillus subtilis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus halophilus*, *Sarcina litoralis* 等 菌을 同定하였고 이들의 酵素活性이 젓갈熟成을 支配하는 要素임을 알 수 있었다.

d) 熟成에 關與하는 細菌中에 *Sarcina litoralis* 8-14 및 8-16. 兩菌株는 榮養要求性이 顯著하여 前者는 purine, pyrimidine base 및 cystine 後者는 purine, pyrimidine base 및 glutamic acid가 共存하여야 生育이 可能하였다.

(2) 젓갈原料 및 젓갈에서 分離한 關與微生物에 對하여 酵素特性을 檢討한 結果는 다음과 같다.

a) 젓갈原料中에 protease는 少量 存在하나 食鹽濃度 7%에서 protease 活性이 顯著하게 阻害를 받아 그 酵素活性의 30~60%나 減少하였다.

b) 耐鹽性細菌인 *Bacillus subtilis* 7-6, 11-1, 3-6 9-4 等 4 菌株는 complete media에서 生成한 protease 活性은 食鹽濃度 7%에서 약간 阻害를 받아 活性이 10~30%가 減少하였고 *Sarcina litoralis* 8-14 및 8-16 兩菌株는 同培地에서 生成한 protease 活性은 食鹽濃度 7%에서 그 酵素活性의 10~20%가 減少하였다.

c) 젓갈 原料中의 蛋白質은 自家酵素에 의한것보다 主로 젓갈熟成中 關與微生物의 protease에 依한 加水分解로 遊離 amino acid가 生成됨을 알 수 있었다.

d) 젓갈原料 및 젓갈의 RNA-depolymerase는 젓갈中 RNA를 nucleoside 및 遊離磷酸까지 分解하므로 呈味性 5'-mononucleotide로서 蓄積되기 어렵다

e) 조개젓에서 分離한 *Bacillus subtilis* 3-6 菌株가 生成한 酵素는 RNA를 分解하여 5'-mononucleotide로 蓄積하므로 이 菌株가 生成한 RNA 分解酵素는 5'-phosphodiesterase임을 밝혔다.

f) *Bacillus subtilis* 3-6 strain의 酵素生成培地中에 corn steep liquor 0.5% 濃度로 添加한 區와 조개젓 0.5% 濃度로 添加한 區에서 5'-phosphodiesterase 生成增加를 보았으므로 corn steep liquor 및 조개젓 成分이 各各 5'-phosphodiesterase 生成增加劑가 됨을 밝혔다 또한 이 酵素는 10%의 食鹽濃度에서 活性阻害를 받아 10~30%에 該當되는 活性이 減少되었고 食鹽濃度 20%에서 이 酵素活性의 40~60%가 減少함을 나타냈다. 그리고 이 菌株의 5'-phosphodiesterase에 依하여 젓갈中 5'-mononucl-

eotides가 生成되는 것이라고 생각된다.

(3) 젓갈의 遊離 amino acid를 Autoanalyzer로 定量한 結果는 다음과 같다.

a) 조개젓은 酸性 amino acid인 glutamic acid, aspartic acid 含量이 다른 젓갈보다 2~10倍 程度로 현저하게 많아서 조개젓의 구수한 맛이 發現되는 것이라고 生覺된다.

b) 조기젓에는 basic amino acid인 arginine, histidine 含量이 다른 젓갈보다 特異하게 많았다.

c) 오징어젓은 含硫黃 amino acid인 cystine 含量이 다른 젓갈의 17~130倍, methionine 含量이 7~17倍 程度로 현저하게 많았다.

d) 굴젓에는 必須 amino acid인 lysine, threonine, iso leucine, leucine 含量이 다른 젓갈보다 현저하게 많을 뿐 아니라 또한 甘味性 amino acid인 alanine 含量이 다른 젓갈들보다 4倍, glycine 含量이 3~14倍 程度로 含有하고 있어 이것이 굴젓 特有의 단맛을 發現하는 것이라 生覺된다.

(4) 4種젓갈에 對한 5'-mononucleotide를 ion exchange column chromatography로 測定한 結果는 다음과 같다.

a) 조개젓에는 5'-adenylic acid, 3'-adenylic acid가 많이 들어있고 5'-inosinic acid가 微量 들어 있다.

b) 굴젓에는 5'-adenylic acid와 3'-adenylic acid가 다른 mononucleotides보다 현저하게 많았다.

c) 오징어젓에는 5'-adenylic 및 3'-adenylic acid만이 含有되어 있는데 이것은 貝類의 젓갈들과 같이 無脊椎軟體動物이며 이것들은 adenylic deaminase가 缺如되어 있어 mononucleotide中 adenylic acid의 含量이 높아 adenylic acid-type임을 알았다.

d) 조기젓 中에는 5'-inosinic acid 含量이 다른 젓갈보다 현저하게 많았으므로 이것은 다른 脊椎動物의 魚肉이나 獸肉과 같이 adenylic deaminase가 있어 5'-inosinic acid가 많은 inosinic acid-type임을 알았다.

(5) 呈味性 amino acid 및 5'-mononucleotide의 組成과 含量으로 맛의 調和性을 比較하여 보면 다음과 같다.

a) 조기젓은 glutamic acid와 aspartic acid가 豊富하고 少量의 5'-inosinic acid가 共存된 狀態이므로 呈味成分組成과 含量이 잘 調和되어 구수한 맛의 相乘作用이 適當하게 發現됨을 究明하였다.

b) 조개젓의 맛은 呈味性 5'-mononucleotides에서 由來되는것 보다는 현저하게 많이 들어있는

glutamic acid 및 aspartic acid 에 기인됨을 알았다.

本 연구를 遂行함에 있어 始終懇曲한 指導鞭撻과 校閱을 하여 주신 恩師이시며 本大學長이신 金浩植 博士님과 李春寧 博士님 그리고 金載勗 博士님께 衷心으로 感謝를 드리는 同時에 聲援과 協力を 아낌 없이 해주신 農化學科 教授여러분께 感謝하오며 實驗에 協助해주신 放射線農學研究所 食品工學室 金榮洙 博士님과 諸研究員께 謝意를表하는 바이다.

參 考 文 獻

1. Ikeda, K; J. Tokyo Chem. Soc., **30**, 820 (1909)
2. 鈴木梅太郎; 日化總, **3**, 114 (1910)
3. Tudith Blass; Annales de l'Institut Pasteur, **83**, 791 (1952)
4. 金榮洙, 金晚助, 李春寧; 農化學會誌, **5**, 39 (1964)
5. 金榮洙, 申東禾; 農化學會誌, **9**, 83 (1968)
6. Konosu, S., Akiyama, T. & Mori, T.; Bull. Japan Soc. Sci. Fish., **23**, 561, 565 (1958)
7. Koizumi, C.; Bull. Japan Soc. Sci. Fish., **28**, 431 (1962)
8. Komata, Y., Kosugi, N. & Ito, T.; Bull. Japan Soc. Sci. Fish., **28**, 623 (1962)
9. Oishi, K., Takagi, M. & Okumura, A.; Bull. Japan Soc. Sci. Fish., **33**, 41 (1967)
10. Kodama, S; J. Tokyo Chem. Soc., **34**, 751 (1913)
11. 國中 明; 日農化學會誌, **34**, 489 (1960)
12. Ogata, K. and Nakao, Y.; Agr. Biol. Chem., **26**, 1118 (1962)
13. Shimazono, H.; Food Tech., **18**, 294 (1964)
14. Huang, H.T.; Biochemistry, **4**, 58 (1965)
15. Kuninaka, A.; Food Tech., **18**, 287 (1964)
16. 岡本武; 日釀協, **56**, 628 (1961)
17. 鹿又和郎; 愛知食品工試報, **3**, 32 (1962)
18. 栗山千枝子; 榮養と食糧, **17**, 337 (1965)
19. 藤田榮一; 榮養と食糧, **18**, 98 (1966)
20. 橋田 慶; 缶詰時報, **43**, 65 (1964)
21. Titus, D.S.; Food, **24**, 150 (1963)
22. Kurtzman, C.H.; Food Tech., **18**, 221 (1964)
23. Caul, J.F.; Food Tech., **18**, 353 (1964)
24. Oya, T. and Shimada, S.; Suisan Koshujo HOKOKU, **21**, 149 (1926)
25. Fuji, M and Hirose, H.; Bull. Japan Soc. Sci. Fish., **16**, 553 (1951)
26. Hata, H and Aso, T.; Syokoryo Kagaku Kenkyujio HOKOKU **24**, 43 (1960)
27. Makinodan, Y. and Yamamoto, M., Bull. Japan Soc. Sci. Fish., **29**, 1776 (1963)
28. Saito, K. and Sameshima, M.; Bull. Japan Soc. Sci. Fish., **24**, 201 (1958)
29. Fujida, A., Hashimoto, Y. and Mori, T.; Bull. Japan Soc. Sci. Fish., **25**, 147.312 (1959)
30. Fujida, A., Hashimoto, Y. and Mori, T.; Bull. Japan Soc. Sci. Fish., **26**, 907 (1960)
31. Kassemarn, B., Perez, B.S., Murray, J. and Jones, N.R.; J. Food Sci., **28**, 28 (1963)
32. Saito, T.; Ribotide Japan, **1**, 60 (1964)
33. Sakaguchi, M. and Simidu, W.; Bull. Japan Soc. Sci. Fish., **30**, 1003 (1964)
34. Toda, J., Nakadani, H. and Fujida, E.; J. Japan Soc. Food and Nut., **18**, 63 (1965)
35. 樽田 亘, 益子房之助, 松尾貞之極; 日釀工會誌, **39**, 1 (1961)
36. Sakaguchi, K.; Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, **22**, 345 (1958)
37. 山里一英, 飯塚廣; 日農化會誌, **33**, 379. 383 (1959)
38. 山野照雄; 日釀工會誌, **39**, 360, 383 (1961)
39. 大西博; 日釀協會誌, **63**, 127 (1968)
40. 大亦正次郎; 日釀工會誌, **46**, 113 (1968)
41. 中村清; 日農化會誌, **42**, 152 (1968)
42. Association of Official Agricultural Chemists; Official methods of Analysis, 10th ed., (1965)
43. Society of American Bacteriologists; Manual of Microbiological Methods, (Mc GrawHill) (1957)
44. 飯塚廣, 瀬戸尚典; 日釀協會誌, **18**, 22 (1962)
45. Breed, R.S., Murray, E.G.D. and Smith, N.P.; Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed., (Willian & Wilkins) (1957)
46. 萩原文二; 標準生化實驗 (東京 文光堂) p. 207 (1953)
47. 好井久雄, 石原昭好; 日釀工會誌, **37**, 110 (1959)
48. Anson, M.L.; J. Gen. Physiol., **22**, 79 (1938)
49. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.; Methods in Enzymology, Vol, III (Academic press) p.469 (1957)
50. 國中 明; 日農化會誌, **29**, 52. 797 (1955)
51. 金浩植, 李啓瑚; 農化學會誌, **4**, 11 (1963)
52. Kuninaka, A.; J. Gen. Appl. Microbiol., **3**, 55 (1957)

53. Kaplan, H.S. and Heppel, L.B.; *J. Biol. Chem.*, **222**, 907 (1956)
54. Fiske Subbarow, Y.; *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925)
55. 赤堀四郎; 酵素研究法Ⅱ (東京朝倉書店) p.943 (1956)
56. Kuninaka, A.; *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23**, 239 (1959)
57. Gray, C.H. and Tatum, E.L.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **38**, 404 (1944)
58. Markahm, R. and Smith, J.D.; *Biochem. J.*, **49**, 401 (1951)
59. Buchanan, J.G. and Dekker, C.A.; *J. Chem. Soc.*, 3162 (1950)
60. Markahm, R.; *Modern Method of Plant Analysis* **4**, 269 (1955)
61. 中島宣郎, 藤田榮一郎; *日農化會誌*, **35**, 9, 803 (1961)
62. Pontis, H.G., Cabib, E. and Leloir, L.F.; *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 146 (1957)
63. 杉本 洋, 岩淺孝, 石山二郎; *日農化會誌*, **36**, 690 (1962)
64. Bergkvist, R. and Deutch, A.; *Acta Chem. Scand.*, **8**, 1877 (1954)
65. Nakajima, N., Ichikawa, K. and Fujida, E.; *J. Agr. Chem. Soc. (Japan)*, **35**, 797 (1961)
66. Hans, C.S. and Isherwood, F.A.; *Nature*, **164**, 1107 (1949)
67. Krebs, H.A. and Hems, R.; *Biochim. Biophys. Acta*, **12**, 172 (1953)
68. Volkin, E. and Cohn, W.E.; *Methods of Biochemical Analysis*, **1**, 287 (1954)
69. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.; *Methods in Enzymology* Vol, III (Academic press) p. 724 (1957)
70. 齊藤恒行; *化學 (日本)*, **13**, 101 (1960)
71. 藤田孝夫, 橋本芳郎, 森高次郎; *日水誌*, **25**, 147 (1959)
72. 藤田孝夫, 橋本芳郎; *日水誌* **25**, 312 (1959)
73. 藤田孝夫, 橋本芳郎; *日水誌* **26**, 907 (1960)
74. Jones, N.R. and Murray, J.; *Biochem. J.*, **66**, 5 (1957)
75. 市川邦介; *日農工會誌*, **33**, 198 (1955)
76. 有働織三; *日農化會誌*, **8**, 673 (1932)
77. 金浩植; *醱酵微生物學*, (郷文社). p.265 (1966)
78. Kakinuma, A., Igarasi, S. and Ogata, K.; *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 213, 218 (1962)
79. 佐藤昌康; *Amino acid and Nucleic acid 醱酵と代謝* **11**, 53 (1965)