

淸國醬 메주 醱酵過程中的 窒素化合物의 消長에 關한 研究(I)

—大豆蛋白質의 消長에 關하여—

朴 啓 仁

國立工業研究所

(1972. 6. 30. 수리)

Studies on the N-compounds during Chung-Kook-Jang Meju Fermentation (1)

—Changes of Soybean Protein during Chung-Kook-Jang Meju Fermentation—

Ke In Park

National Industrial Research Institute

(Received June 30, 1972)

Summary

Three lots of Chung-Kook-Jang were prepared by the use of 2 strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus natto*. For four samples taken from each lot in 12 hrs interval changes of nitrogenous compounds, insoluble protein, water soluble protein, peptides, free amino acids, amino and ammonia nitrogens during Chung-Kook-Jang fermentation, were studied together with the changes of moisture, pH, proteolytic enzyme activity. In addition the average peptide length of the peptides of a *Bacillus subtilis* lot was determined by the method of molecular sieving using ion exchange resin. The results were as follows:

1. The contents of moisture and total-nitrogen changed little in all samples throughout the fermentation as it would be expected.
2. In all three experimental lots the pH became higher gradually from the initial value of 6.65 to the final 7.5~7.85 during the fermentation. Proteolytic enzyme activities, in accordance with this pH change, steadily increased up to 48~60 hrs. of fermentation and then slightly decreased, probably affected by the high pH. The most strong proteolytic activity was observed in the experimental Chung-Kook-Jang fermentation lot using the *Bacillus subtilis* K-27 isolated by the author.
3. The contents of insoluble protein nitrogen in soybeans increased markedly (5%) by the cooking, after steeping 12 hrs in water. During the Chung-Kook Jang fermentation, however, it decreased from 1/2 to 1/10 of that of the cooked soybeans.
4. The contents of water soluble protein nitrogen (5%) whereas, greatly decreased to the value of 1.0% by the cooking; but little changed further during the fermentation.
5. The total contents (0.25%) of peptides, amino, and ammonia-nitrogens, PAA-N., increased almost double by the cooking and steadily became higher as the fermentation proceeded, reaching finally up to 4~7% in 72 hrs fermentation.

6. The amounts of free amino acids of soybean generally decreased during the processing of cooking, even some of them like glutamic acid were destroyed completely. However in the subsequent Chung-Kook-Jang fermentation for 72 hrs., they showed from several to a few hundreds folds increases depending upon the kinds of amino acids.

Valine which was contained in HCl-hydrolyzed steeped or cooked soybeans in amounts 220~267mg % was not detected at all as the free amino acid in all fermented samples.

7. Average peptide length (APL) of all fractions, eluted and fractionated by using the Dowex-50 ion exchange resin column, and fraction collector showed the highest value for the cooked soybean and then decreased as the fermentation proceeded. The APL value of effluent showed the highest in 12 hrs fermented sample. The value decreased thereafter by fermentation.

1. 緒 論

大豆의 醱酵食品은 우리나라를 비롯하여 東南亞의 各地域 사람들의 調味料로서 必要不可缺할 뿐 아니라 營養上 蛋白質의 供給源으로서도 意義가 크다. 그러나 그 大豆의 醱酵加工食品은 나라마다 各各 特色이 있으며, 中國이나 우리나라에서는 간장, 된장, 고추장 및 淸國醬등을 들 수 있으며, 日本에는 Miso, Shyoyu 및 Natto, 인도네시아에서는 Tempeh 등의 形態등으로 食用되고 있다. 수많은 이들 大豆醱酵食品에 對한 研究는 過去 無數히 많은 報告가 나와 있으나 大部分은 그들의 醱酵熟成加工中の 一般成分을 위주로한 蛋白質 및 아미노酸 등의 變化를 分析한 것들이며, 比較的 近來에와서 大豆蛋白質의 變化로서 아미노酸과 peptide의 消長 및 그들의 構造等에 關한 研究가 活潑하게 이루어지고 있다. 1959年 林¹⁻⁶⁾은 自身이 分離同定한 林 11號 株란 納豆菌을 使用하여 大豆原料別로 添加物 및 醱酵溫度를 달리하여 製造한 納豆製品에 대하여 經時的으로 아미노態窒素와 암모니아態窒素 및 官能試驗등으로 調査報告하였다. 1960年 Steinkraus⁷⁻⁸⁾ 등은 *Rhizopus saito*를 使用하여 Indonesia의 Tempeh를 製造하는 過程에서 一般成分의 消長과 아미노酸, 비타민 및 脂肪酸 등의 變化를 調査하여 報告하였다. 1962. 1966. 1967年 竹內⁹⁻¹³⁾ 등은 Miso, Shyoyu의 原料處理法과 製造法을 달리하였을 때 經時的인 peptide의 消長을 cross linkage과 各各 다른 polystyrene系 이온 交換樹脂 Dowex-50을 使用하여 peptide를 分割하여 調査分析하였으며 1965年 金¹⁴⁻¹⁶⁾은 콩코오지 製造中の 經時的인 peptide의 消長關係를 調査報告하였다. 또한 1967年 金¹⁷⁾ 등은 金¹⁴⁻¹⁶⁾의 方法에 準하여 日本의 納豆醱酵中

아미노態窒素와 peptide 態窒素를 測定하여 報告하였다. 1968年 望月¹⁸⁻²¹⁾ 등은 Miso, Shyoyu 熟成中の 窒素化合物의 消長을 polystyrene系 이온 交換樹脂 Dowex 50을 利用하여 調査研究報告하였고 1969~1971年 草野²²⁻²³⁾는 paper chromatography와 이온交換 樹脂 chromatography를 使用하여 日本納豆製品의 trichloroacetic acid(TCA) 可溶性區分의 遊離 아미노酸의 組成과 微生物定量法에 依한 各遊離 아미노酸量을 調査分析한 것 등 많은 報文들이 있다. 그러나 우리나라의 淸國醬에 關한 이와 같은 研究報文은 별로 없다. 元來 淸國醬이란 中國에서부터 傳來된 것으로서 1715年 洪萬選著의 山林經濟²⁴⁾에 依하면 戰亂時代에 速釀할 수 있는 醬이라는 意味에서 戰國醬이라고 記錄되어 있으나 그後 一般民間에서는 이것이 淸國에서부터 由來되었다는 뜻이 걸드려서 戰國醬을 淸國醬이라고 부르게 되었으며 大衆의으로 自然醱酵法에 依한 自家製造로 많이 食用하게 되었다. 筆者는 우리나라의 固有食品의 一種인 淸國醬에 對하여 興味를 느끼고 淸國醬 메주의 醱酵微生物을 調査하여 淸國醬製造에 適合한 醱酵菌 2種(*Bacillus subtilis sp*)을 分離同定하여 報告한바²⁵⁾ 있다. 本 研究에서는 選定된 上記 2種의 醱酵菌을 利用한 淸國醬메주의 醱酵過程에서 蛋白質의 變化를 究明키 爲하여 經時的인 各試料에 對하여 不溶性蛋白質態窒素(insoluble-N), 水溶性蛋白質態窒素(soluble-N), peptide 態窒素, 아미노態窒素 및 암모니아態窒素를 分析하고 同時에 amino acid autoanalyzer에 依한 各試料의 遊離아미노酸의 量的消長과 polystyrene系 이온交換樹脂를 利用한 分子篩別分割區의 average peptide length (APL)를 調査研究한 結果를 이에 報告한다.

2. 實驗材料 및 方法

(1) 試料과 使用菌株

① 大豆 : 1970 年度産 韓國放射線農學研究所에서 栽培된 長端白目種을 使用하였다.

② 菌株 : 筆者가²⁵⁾ 在來式製造法으로 만든 淸國醬메주에서 protease 力價가 크고 優秀한 菌株로서 分離同定한 *Bacillus subtilis* sp의 S-16 과 K-27 의 두가지 菌株를 쓰고 比較菌株로서 서울大學校農科大學에 保存하고 있는 *Bacillus subtilis* var *Natto* (Japan IAM 429-1)를 같이 使用하였다.

本研究에서의 이들 菌株와 醱酵處理區分은 다음과 같다.

O는 : 蒸熟大豆

A는 : 分離菌 S-16을 使用하여 만든 淸國醬메주

B는 : " K-27 " "

C는 : *Bacillus subtilis* var *Natto*(JAM 429-1)을 사용하여 만든 淸國醬메주

③ 試藥 : standard curve를 만드는데 使用한 amino acid는 E. Merck 제를 使用하였으며 一般試藥은 chemical pure grade를 使用하였다.

(2) 實驗方法

① 淸國醬메주의 製造 : 精選한 大豆原料를 室溫에서 約 2 倍量의 물에 一夜(12 時間) 담것다가 꺼내어 물기를 빼낸다음 250ml 드리 三角후라스크에 40gr 內外를 精稱하여 넣고 綿栓하여 autoclave를 使用하여 15 lbs에서 60 分間 蒸熟하여 約 50°C로 冷却시킨다음 blank(O) 시험구를 제외한 기타 區에 대하여 無菌的인 條件下에서 常法으로 各菌株를 接種하고 37°C의 定溫器에서 72 時間 靜置 培養시켜 淸國醬메주를 製造하였다. 또한 試料를 採取하는데 便利하게 하기 爲하여 각 시료구마다 후라스크 10 個씩 製造하였다.

② 試料의 調製 : 淸國醬메주製造中 12時間마다의 分析用試料로서 후라스크 1 個씩을 拔取하여 후라스크內容物全量을 waring blender에 100~120ml의 蒸溜水로 씻어 옮겨 5 分間 磨碎하여 500 ml 드리 메스후라스크에 옮겨넣고 20~50ml의 증류수로 waring blender의 器壁을 씻어 메스후라스크에 습친다음 다시 증류수를 添加하여 正確히 500ml로 채웠다. 다음 上記의 500ml 드리 메스후라스크의 內容物을 잘 攪拌하여 여기에서 一定量式을 取하여 水分과 總窒素 및 아미노酸의 分析用試料로 使用하였다. 그리고 후라스크內的 잔액중

一定量을 3,000rpm에서 15 分間 遠心分離하여 沈澱物은 不溶性蛋白態窒素의 分析用試料로 上澄液의 一部는 pH測定用으로 하고 다른 上澄液의 一部에는 토루엔 1~2 방울을 加하여 冷藏保管하였다가 protease activity 測定用試料로 使用하였다. 그리고 나머지 上澄液에는 20% TCA를 添加하여 室溫에서 하루밤 放置하여 생성되는 沈澱物은 濾別하여 水溶性蛋白態窒素의 定量用試料로 하고 이것의 濾液은 一定量식 分取하여 PAA-N, amino-N, ammonia-N, peptide-N 및 autoanalyzer에 依한 各種 아미노酸測定用으로 使用하였으며 다른 一部의 濾液은 peptide의 分子篩別用試料로 使用하였다.

③ Peptide 群의 分子篩別^{9,14,16,17,26,27)} : TCA로 水溶性 蛋白質을 沈澱시켜 濾過하고난 濾液을 다음의 Table 1와 같이 cross linkage가 各各 다른 polystyrene系 이온交換樹脂인 Dowex-50의 H型을 充眞한 column을 Fig.1과 같이 連結組立한 것 에 Dowex-50 X-16 column에서부터 1 分間에 0.4ml의 速度로 試料를 通過시켜서 各 column의

Table 1. Resin size and column dimension of Dowex-50

Resin No	Type	Size	Column dimension
X-16	H	mesh 20~50	60ml (dia 3cm)
X-12	H	50~100	90ml (dia 3cm)
X-8	H	50~100	90ml (dia 3cm)
X-4	H	50~100	90ml (dia 3cm)
X-2	H	50~100	90ml (dia 3cm)

resin에 吸着시키고 마지막 resin을 通過한 것은 effluent로 하여 別途로 收集하였다. 各試料液이 모든 column을 通過한 다음 一但 증류수로 씻고 各 column을 따로따로 分離하여 各 column에 10%의 NH₄OH 溶液을 通過시켜서 各 column에 吸着되어 있는 아미노酸과 peptide를 溶出시켰다. 各試料別溶出液은 rotary evaporator를 使用하여 50°C 以下에서 減壓濃縮乾固시켰다가 다시 물에 녹여서 試料로 하였다.

이와 같이 하여 各 column에서 얻은 溶出液과 試料를 通過시켜서 얻은 effluent에서 一定量식 取하여 總窒素와 아미노酸의 分析試料로 使用하였다.

④ 分析方法

A. 水分 : 使用菌株를 接種키 爲하여 蒸熟한 原料메주용의 水分은 一般法에 準하여 測定하였고

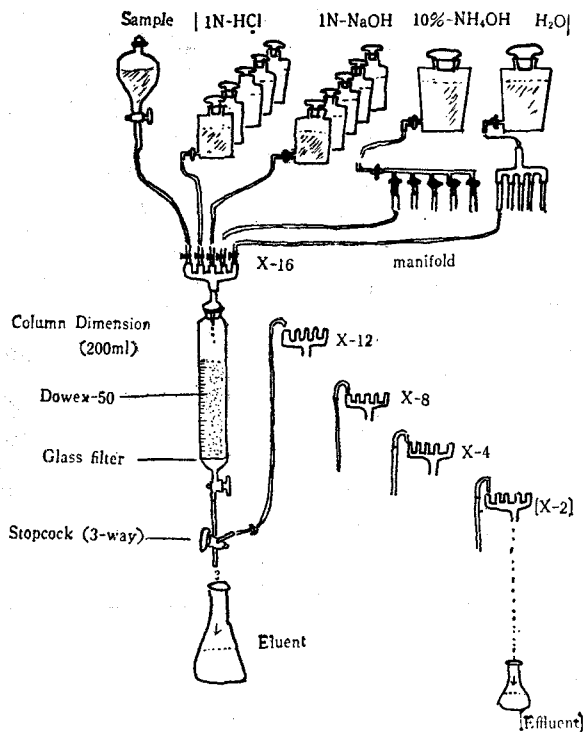


Fig. 1. Apparatus for molecular sieving by Dowex-50

pH 測定用 遠心分離의 上澄液一部에 toluene 1~2 방울을 加하여 冷蔵시켰든 protease 力價測定用 試料를 使用하여 Foline 法에 따라 Beckman spectrophotometer model B로 660 μ 에서의 optical density (OD)를 標準 Tyrosine의 standard curve와 比較하여 Tyrosine 10r를 1單位로 하여 表示하였다.

E. Peptide-N, amino-N^{35,36} ammonia-N³⁷ 및 PAA-N: 磨碎된 試料를 遠心分離하며 TCA로 處理 濾過하여 얻은 濾液의 一定量을 取하여 먼저 PAA-N은 micro-kjeldahl 法으로, amino-N는 Sørensen formol titration 法으로, ammonia-N는 蒸溜法에 依하여 各各 定量한다음 peptide-N은 PAA-N 量에서 amino-N 量과 ammonia-N 量을 合하여 表示함으로써 表示하였다. 그리고 分子篩別을 하여 各 column에서 얻은 amino-N도 같은 方法으로 測定하였다.

F. Free amino acid:³⁸⁻⁴² 遊離아미노酸의 測定用試料는 上記의 PAA-N 分析用試料 50ml를 取하여, 여기에 1% picric acid 50ml를 加하여 하루 밤 放置하였다가 生成된 沈澱物을 遠心分離에 依

菌株을 接種시켜 醱酵시킨 淸國醬에 주는 500ml로 磨碎稀釋한 供試溶液中에서 各各 50ml를 採取하여 蒸發 乾固시켜 얻은 固形物量으로 부터 淸 국장 每주의 水分含量을 計算하였다.

B. 總窒素: 不溶性蛋白態窒素, 水溶性蛋白態窒素 및 總窒素는 磨碎한 試料液중에서 50ml씩을 取하였고, 不溶性蛋白態窒素는 一定量의 試料液을 遠心分離하여 얻은 沈澱物을 그대로 取하였으며 水溶性蛋白態窒素는 TCA로 處理하여 얻어지는 沈澱物을 取하여 各各 micro-kjeldahl 法으로 分析測定하였다. 그리고 分子篩別을 하여 各 column에서 얻어지는 試料에 對하여서도 같은 方法으로 測定하였다.

C. pH: 磨碎한 試料를 遠心分離하여 不溶性蛋白質을 分離除去한 上澄液을 試料로 하여 Expandomatic SS-2 型의 Beckman pH meter로 測定하였다.

D. Protease activity²⁸⁻³⁴: 上記

하여 除去시킨 上澄液을 Dowex 1×8 column에 通過시켜 餘分의 picric acid를 吸着除去시킨 濾液을 60°C 이하에서 rotary evaporator로 10ml 되게 減壓濃縮시키고 NaOH 溶液으로 먼저 pH를 2.2로 มาตรฐาน을 이것에 다시 pH 2.2의 citrate buffer를 添加하여 25ml로 하였다. 이중에서 1ml를 取하여 Technicon 社製의 Amino acid autoanalyzer에 注入하여 Technicon's instruction manual AAA-1에 따라 各種 遊離아미노酸의 recording chart를 만드러 17種의 標準아미노酸으로 만든 standard curve (Fig. 2)와 比較하여 試料中の 各種 아미노酸含量을 算出하였다.

그리고 原料蒸熟前後의 大豆中 總아미노酸을 測定하기 위하여 시료를 6N-HCl로 30時間 加水分解하여 中和, 濾過하여 減壓濃縮한 것을 Amino acid autoanalyzer로 測定하였다.

3. 結果 및 考察

試料原料인 蒸熟大豆에 各使用菌株을 接種하여 37°C, 72時間 醱酵시키면서 12時間 간격으로 各 試料를 拔取하여 調製한 供試液에 對하여 水分,

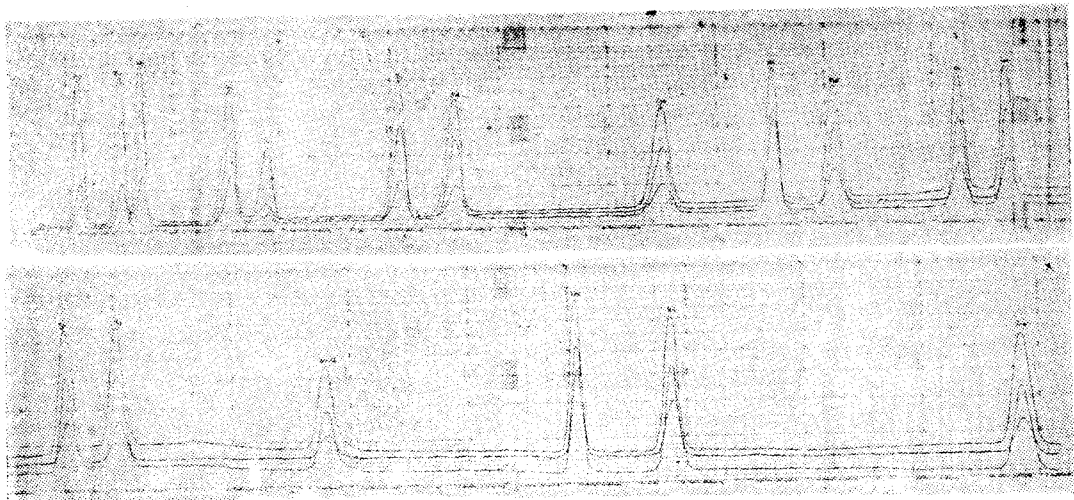


Fig. 2. Autoanalyzer chart recording standard amino acids.

總窒素, 不溶性蛋白態窒素, 水溶性蛋白態窒素, PAA-N, amino-N, ammonia-N 및 peptide-N을 測定하여 計算한 結果를 綜合하면 6面, 7面의 Table 2와 같다.

1) 水分: Table 2에서 水分의 變化를 그림으로 表示하면 Fig. 3와 같다. 即 水分의 含量은 醱酵時間이 經過함에 따라 blank 區인 O區는 조금씩 減少하는데 比하여 反對로 A.B.C區는 時間이 經過함에 따라 若干式 增加되는 傾向을 나타내고 있다. 本結果는 Natto 製品에 關한 金¹⁷⁾과 草野^{22,23)}의 實驗結果와 같다. 그러나 이것은 實際로 水分含量이 增加된 것이 아니라 醱酵過程에서 原料大豆가 微生物의 酵素에 依하여 分解되어 암모니아 등으로 逸散消失되어 實質的인 固形物量이 減少되므로서 分析計算上 相對的으로 水分含量이 增加된 것이라고 解釋된다.

2) 總窒素, 不溶性蛋白態窒素, 水溶性蛋白態窒素 및 PAA-N: 이들의 變化를 그림으로 表示하면 Fig. 4와 Fig. 5와 같다. 이 結果에 依하면 總窒素는 A,B,C區 各같이 그리 큰 變化가 없고 其他의 各種 蛋白態窒素의 消長은 醱酵時間이 經過함에 따라 各같이 大體로 같은 傾向의 變化를 나타내고 있다. 그러나 B區에 있어서는 PAA-N의 경시적인 증가와 不溶性蛋

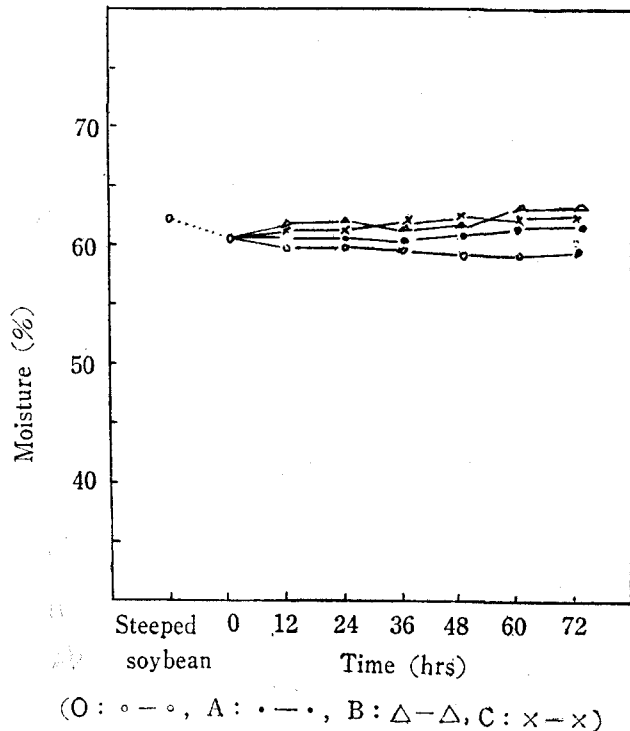


Fig. 3. Changes of Moisture content during the Chung-Kook-Jang Meju Fermentation

白態窒素의 감소가 A,C區에 比하여 현저하였다.

이들 各種蛋白態窒素中 不溶性蛋白態窒素는 水浸生大豆에서 2.14%로 比較的 적었으나 蒸熟操作에 依하여 水溶性蛋白態窒素가 熱變化를 이르켜 約 2.5 倍인 5.29%로 增加되어 一旦 最高值를 이

Table 2. Changes of each N-compound and Moisture content

N-compound	Fermented time		R.M. (steeped)			0hrs (cooked)			12 hrs			24
	Sample		gr%	per- cent to T-N	per- cent to PA A-N	gr%	per- cent to T-N	per- cent to PA A-N	gr%	per- cent to T-N	per- cent to PA A-N	gr%
Total-N	D		7.63			7.54			7.52			7.52
	A								7.56			7.68
	B								7.51			7.68
	C								7.66			7.63
Insoluble-N	D		2.14	28.04		5.29	70.15		5.29	69.01		5.30
	A								3.82	50.53		3.63
	B								2.43	32.36		1.81
	C								4.77	62.27		4.16
Soluble-N	D		5.12	67.10		1.12	14.85		1.12	14.89		1.09
	A								1.18	15.61		0.92
	B								0.95	12.65		0.98
	C								0.93	12.14		0.91
PAA-N { peptide amino ammonia }	D		0.37	4.86		1.13	15.00		1.12	14.89		1.13
	A								2.56	33.86		3.13
	B								4.13	54.99		4.79
	C								1.96	25.59		2.56
Amino-N	D		0.108	1.41	29.19	0.072	0.95	6.47	0.071	0.94	6.34	0.072
	A								0.314	4.15	12.27	0.624
	B								0.368	4.90	8.91	0.644
	C								0.251	3.28	12.81	0.304
Peptide-N	D		0.165	2.16	44.59	0.875	11.60	77.43	0.869	11.55	77.59	0.875
	A								1.988	26.29	77.66	2.072
	B								3.499	46.59	84.72	3.582
	C								1.520	19.84	77.55	2.025
Ammonia-N	D		0.097	1.29	26.22	0.183	2.43	16.10	0.189	2.51	16.00	0.185
	A								0.258	3.41	10.07	0.435
	B								0.263	3.50	6.36	0.564
	C								0.189	2.47	9.64	0.231
Moisture	D		62.14			60.31			59.71			59.70
	A								60.52			60.79
	B								61.26			61.53
	C								60.81			61.23

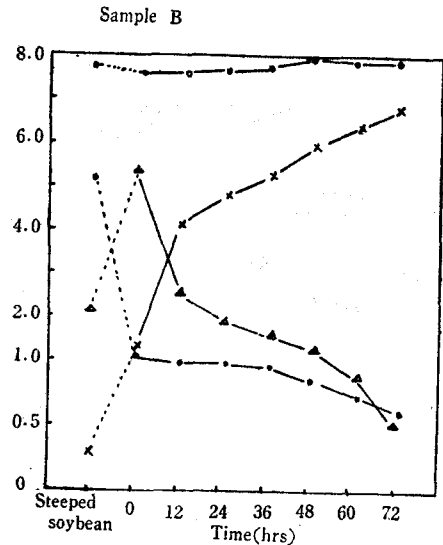
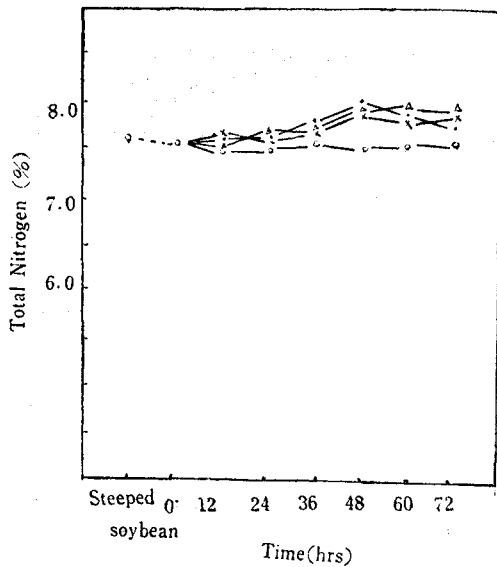
during the Chung-Kook-Jang Meju Fermentation

hrs		36 hrs			48 hrs			60 hrs			72 hrs		
per- cent to T-N	per- cent to PA A-N	gr%	per- cent to T-N	per- cent to PA A-N	gr%	per- cent to T-N	per- cent to PA A-N	gr%	per- cent to T-N	per- cent to PA A-N	gr%	per- cent to T-N	per- cent to PA A-N
		7.56			7.51			7.53			7.54		
		7.81			8.03			7.88			7.79		
		7.74			8.01			7.95			7.91		
		7.71			7.91			7.83			7.89		
70.48		5.28	69.85		5.28	70.31		5.28	70.12		5.31	70.42	
47.27		3.26	41.74		3.16	39.95		2.75	34.90		2.31	29.65	
23.53		1.51	19.51		1.33	16.60		0.85	10.69		0.52	6.57	
54.52		3.32	43.06		2.66	33.63		2.23	28.48		1.92	24.33	
14.52		1.13	14.94		1.11	14.78		1.13	15.01		1.11	14.72	
11.93		0.93	11.91		0.94	11.71		0.84	10.66		0.96	12.32	
12.76		0.96	12.40		0.87	10.86		0.75	9.45		0.63	7.96	
11.93		1.02	13.23		1.02	12.90		0.95	12.13		0.93	11.79	
15.02		1.13	14.94		1.12	14.91		1.12	14.87		1.12	14.85	
40.76		3.62	47.63		3.93	48.94		4.29	54.44		4.51	57.89	
62.37		5.27	68.09		5.81	72.53		6.35	79.87		6.76	85.46	
33.55		3.37	43.71		4.23	53.48		4.65	52.39		5.04	63.88	
0.95	6.37	0.073	0.96	6.46	0.070	0.92	6.25	0.072	0.95	6.42	0.071	0.94	6.33
8.13	19.94	0.657	8.41	18.15	0.701	8.73	17.84	0.863	10.95	20.12	1.210	15.53	26.83
8.39	13.44	1.176	15.20	22.32	1.978	24.09	34.05	2.149	27.03	33.84	2.399	30.33	35.49
3.98	11.88	0.419	5.43	12.43	0.789	9.97	18.57	1.212	15.48	26.06	1.713	21.71	33.99
11.68	77.43	0.874	11.56	77.34	0.872	11.61	77.85	0.874	11.60	78.03	0.875	11.60	78.12
26.98	66.20	2.390	30.61	66.02	2.601	32.39	66.18	2.651	33.64	61.79	2.438	31.30	54.06
46.64	74.38	3.169	40.94	60.13	2.658	33.18	45.75	2.925	36.79	46.06	2.968	37.51	43.91
26.54	79.10	2.570	33.33	76.26	2.784	35.20	65.82	2.495	31.86	53.66	2.218	28.11	44.00
2.46	16.20	0.179	2.37	16.00	0.171	2.28	15.90	0.173	2.30	15.55	0.174	2.31	15.55
5.65	13.86	0.573	7.37	15.86	0.628	7.82	15.98	0.776	9.87	18.89	0.881	11.10	19.09
7.34	11.77	0.925	11.95	17.55	1.174	14.66	20.21	1.276	16.05	20.09	1.393	17.61	20.61
3.63	9.01	0.371	4.81	11.01	0.657	8.31	15.53	0.743	12.04	20.26	1.109	14.06	22.01
		59.49			59.19			59.22			59.48		
		61.23			61.78			62.17			62.37		
		61.68			62.05			62.44			62.87		
		61.75			62.06			62.36			62.58		

루웠다가 經時的으로 漸減되어 72 時間經過時에서 A는 2.31, B는 0.52, C는 1.92%로 減少되어 B區가 가장 적은 數字를 나타내고 있다. 水溶性蛋白質態窒素는 不溶性蛋白質態窒素의 境遇와는 反對로 水浸生大豆로서 5.12%이던것이 蒸熱操作으로 相當量의 水溶性蛋白質態窒素가 熱變化를 이르켜서 不溶性蛋白質態로 變化되어 蒸熱大豆에서는 1.12%로 大幅 減少되었다가 72 時間經過時에서는 A는 0.96, B는 0.63, C는 0.93%로 減少되어 B區가

最小値로 나타났다. PAA-N는 最初 水浸生大豆에서 0.37% 이던 것이 蒸熱工程에서 增加되어 1.12%가 되었고 다음 時間經過에 따르는 醱酵作用으로 繼續增加되어 72 時間後에는 A,B,C區 다 같이 漸增되나 特히 B區는 12 時間까지 急增된 것이 特徵的이다.

이 結果는 金¹⁷ 등의 Natto 製造時의 實驗結果와 大同少異하나 B만은 그 變化의 幅이 크다. 그리



(O: ○-○, A: - - △, B: △-△, C: ×-×) (Total-N: ○-○, Insol-N: △-△, Sol-N: PAA-N: ×-×)

Fig. 4. Change of Total-N during the Chung-Kook-Jang Meju Fermentation

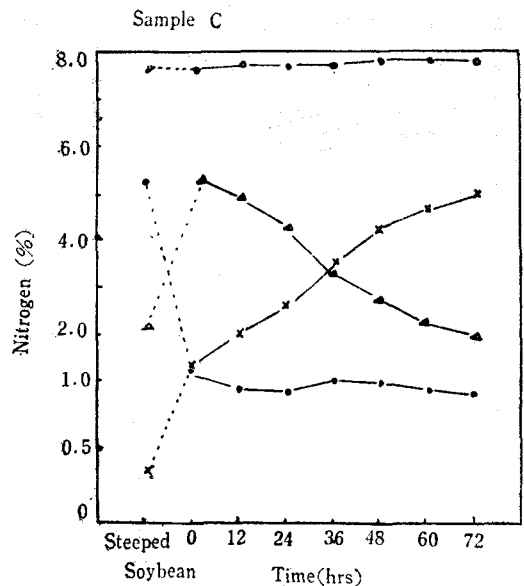
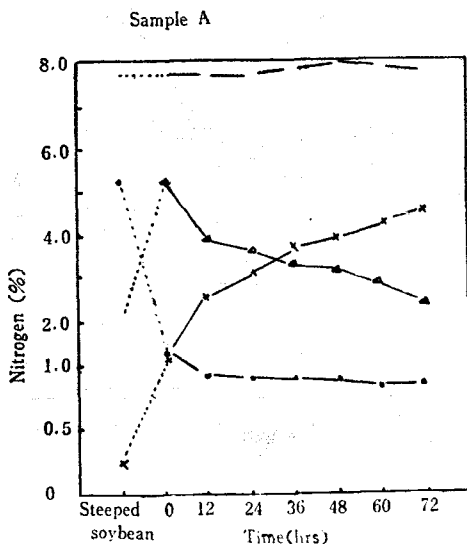
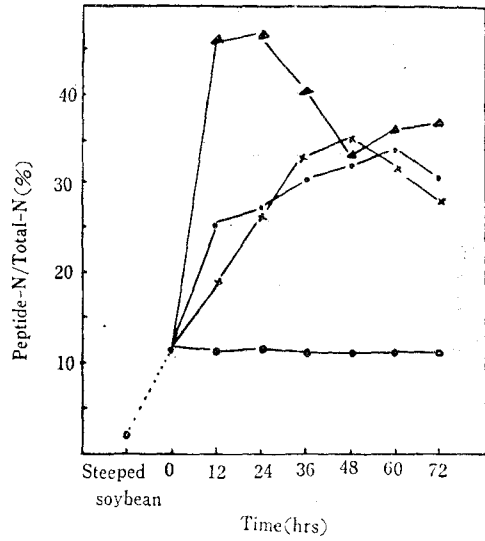
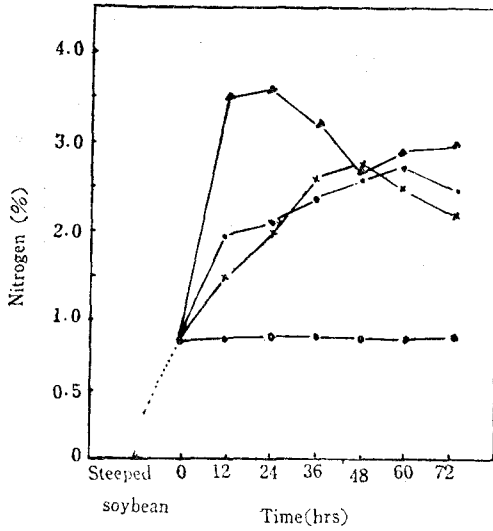


Fig. 5. Change of each N-compound in samples of A,B,C during the Chung-Kook-Jang Fermentation

고 金¹⁴⁾의 *Aspergillus Soya*를 사용한 콩코오지
 製造中 水溶性蛋白態窒素의 變化를 調査한 結果에
 依하면 水浸生大豆 胚와 蒸熟工程 및 22.5 時間醱

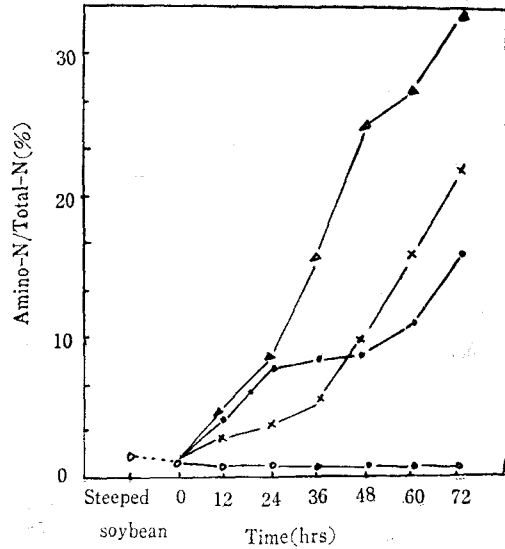
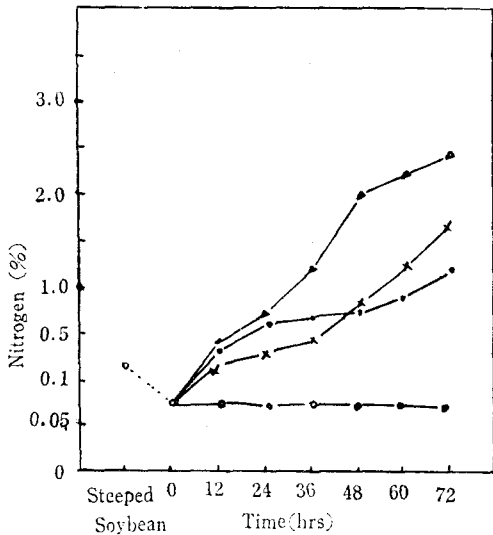
酵까지의 變化는 大概同一한 傾向이나 콩코오지
 製造에서는 22.5 時間後 부터는 漸增되어 33.7 時
 間醱酵에서는 一但 最高值를 이루었다가 다시 漸



(O: ○-○, A: △-△, B: ◇-◇, C: ×-×)

Fig. 6. Change of the Peptide-N during the Chung-Kook-Jang Fermentation

Fig. 6.* Change of percent of the Peptide-N to the Total nitrogen



(O: ○-○, A: △-△, B: ◇-◇, C: ×-×)

Fig. 7. Change of the Amino-N during the Chung-Kook-Jang Fermentation.

Fig. 7.* Change of percent of the Amino-N to the Total-nitrogen

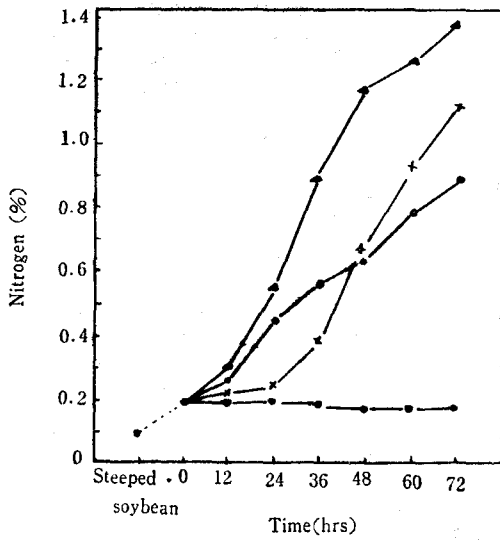


Fig. 8. Change of the Ammonia-N during the Chung-Kook-Jang Fermentation

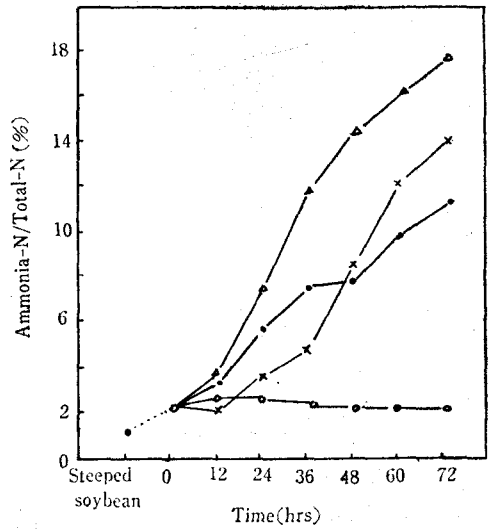


Fig. 8.* Change of percent of the Ammonia-N to the Total-nitrogen

減되었으나 本實驗의 淸國醬메주나 Natto 實驗結果에서는 繼續하여 完만한 減少傾向을 보이고 있다.

3) Peptide-N, Amino-N 및 ammonia-N: Table 2 에서 淸國醬메주의 醱酵過程中에서 經時的인 各試料의 peptide-N 과 amino-N 및 ammonia-N 의 消長關係를 그림으로 表示하면 Fig. 6, 6*, 7, 7*, 8, 8* 와 같다.

Fig. 6 에 依하면 peptide-N 은 水浸生大豆에서 0.17%였으나 蒸熟工程에서 0.88%로 增加되었으며 其後의 經時的인 變化에서 對照區인 O 區는 別變化가 없었으나 A, B, C 區는 多같이 Fig. 5 의 PAA-N 와 類似한 曲線으로 急増現象을 나타냈으며 各各 A 는 60 時間, B 는 12 時間, C 는 48 時間에 가서 最高値를 이루었다가 漸減現象으로 나타났다. 또한 Fig. 7 과 8 에 依하면 amino-N 와 ammonia-N 은 多같이 비슷한 曲線으로 增加되었는데 그中 B 區는 A, C 區에 比하여 현저한 증가를 보였다. 이 결과에서 A, C 區는 金¹⁷⁾ 등의 결과와 같은 傾向이었고 B 區는 상당한 차이를 보이고 있다. 또한 金¹⁴⁾의 peptide-N 의 急増現象이 15~22.5 時間에 나타난 것과 本實驗에서 12~24 時間에 急増된 것과는 同一한 傾向이나, 콩코오지에서는 繼續증가 되었으나 淸國醬메주에서는 各各의

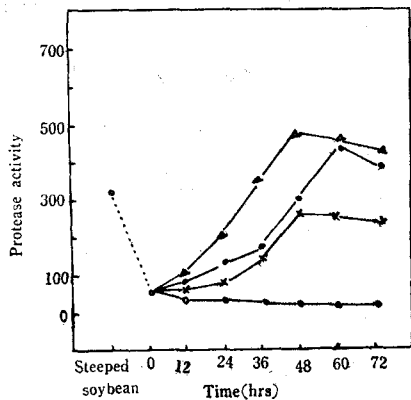
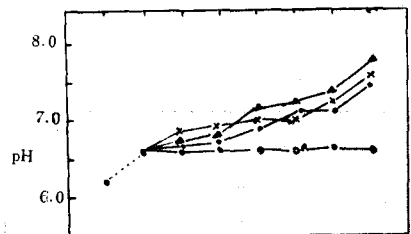


Fig. 9. Change of pH and Protease activities during the Chung-Kook-Jang Meju Fermentation

試料에 따라 一定한 醱酵時間에 最高值를 이루었다가 다시 減少되는 現象이 다르다. 이와같은 結果는 淸國醬메주의 醱酵菌이 *Bacillus subtilis* sp. 이며 이것이 콩코오지製造에 使用된 *Aspergillus soya*에 比하여 分解力이 強力한데 基因되는 것으로 解釋된다.

4). pH와 protease activity: 淸國醬메주의 磨碎均質試料에서 不溶性蛋白質을 遠心分離한 上澄液을 試料로하여 測定한 pH와, protease activity 測定用試料로 Forlin法으로 測定한 protease activity의 變化는 Fig 9과 같다. Fig. 9에 依하면 水浸生大

豆는 pH 6.25로서 弱酸性이었으나 蒸熟後에는 6.65가 되고 醱酵時間이 經過함에 따라 A,B,C區가 다같이 높아져서 72時間에서 A區는 7.52, B區는 7.85, C區는 7.65로 共히 알카리性化하였다. 또한 protease activity는 水浸生大豆에서 323.3單位이던것이 蒸熟으로 완전히 破괴되었다가 醱酵經過에 따라 各各 特徵있는 變化를 보이고 있다. 即 A區는 60時間에서 446.6單位로 最高值가 되었다가 점차 減少되었고 B,C區는 單位의 差는 있으나 다같이 48時間 醱酵에서 最高值를 보였다가 漸次로 減少되었다. 이 結果는 金¹⁷⁾ 鄭³⁸⁾ 등의 Natto

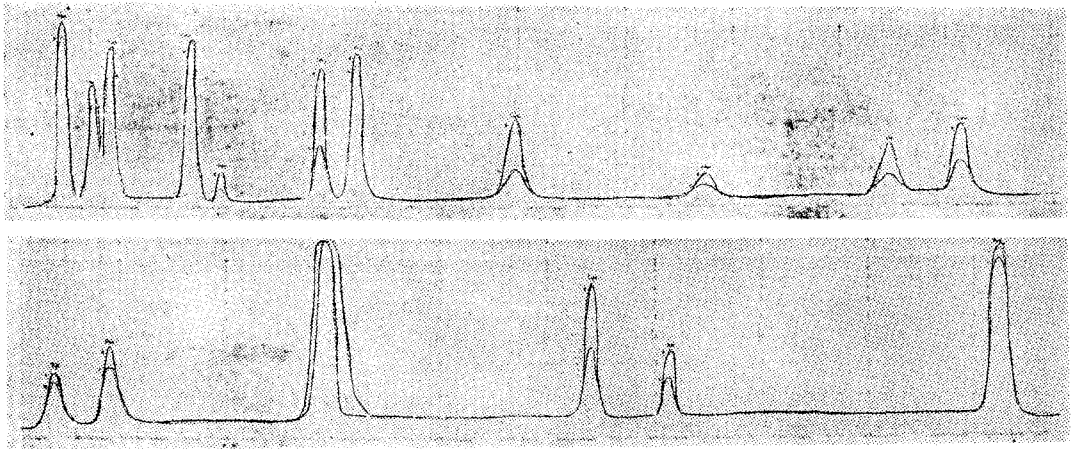


Fig. 10. Autoanalyzer chart recording of free amino acid steeped and cooked soybean

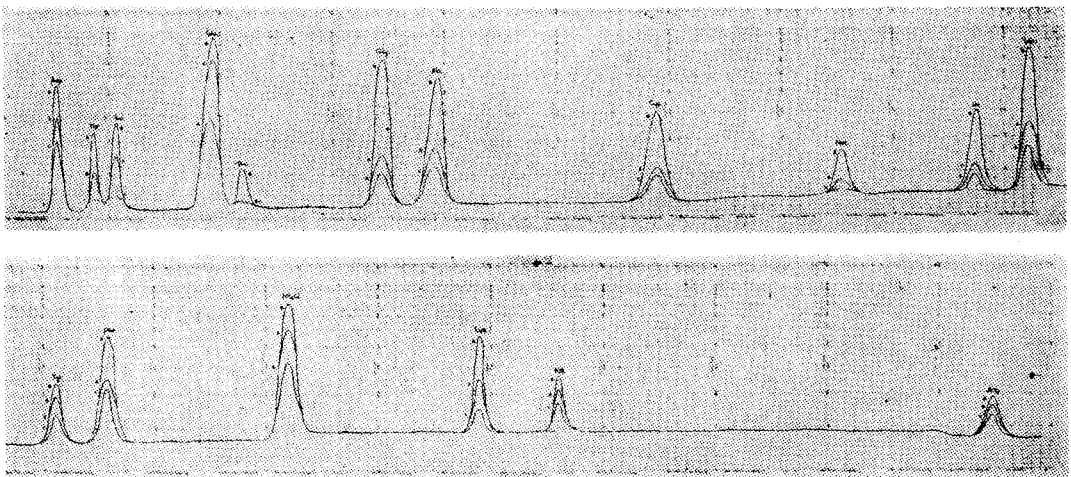


Fig. 11. Autoanalyzer chart recording of free amino acid in 24hrs fermented samples

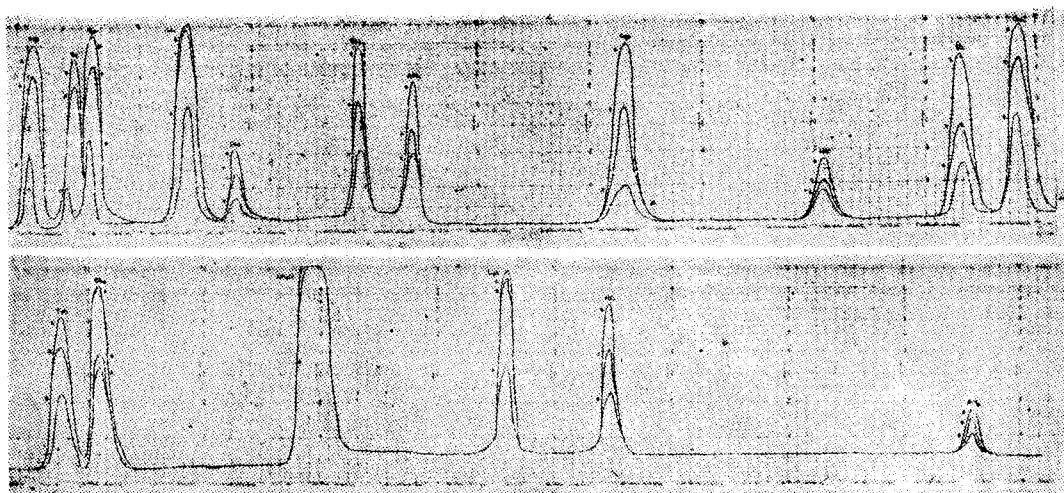


Fig. 12. Autoanalyzer chart recording of free amino acid in 72hrs fermented samples

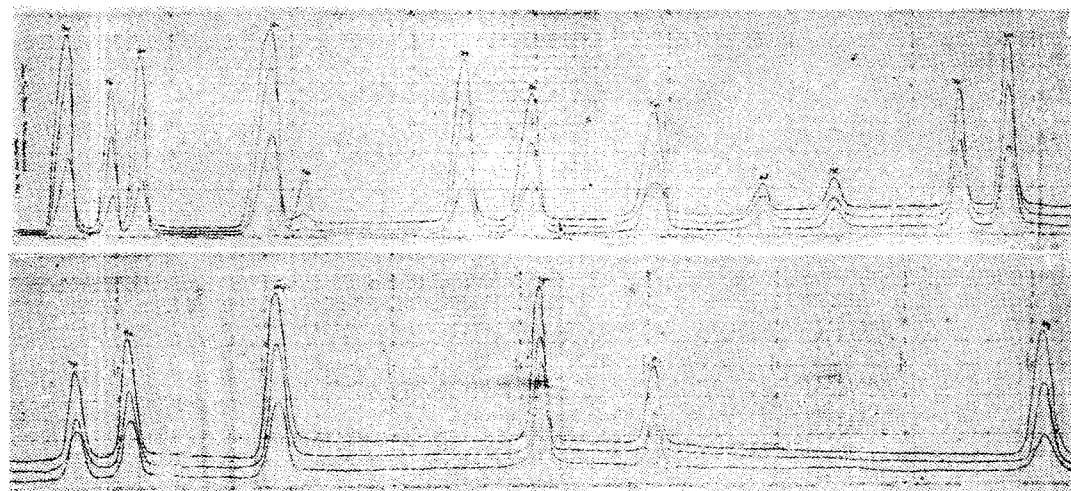


Fig. 13. Autoanalyzer chart recording in total amino acid of steeped soybean

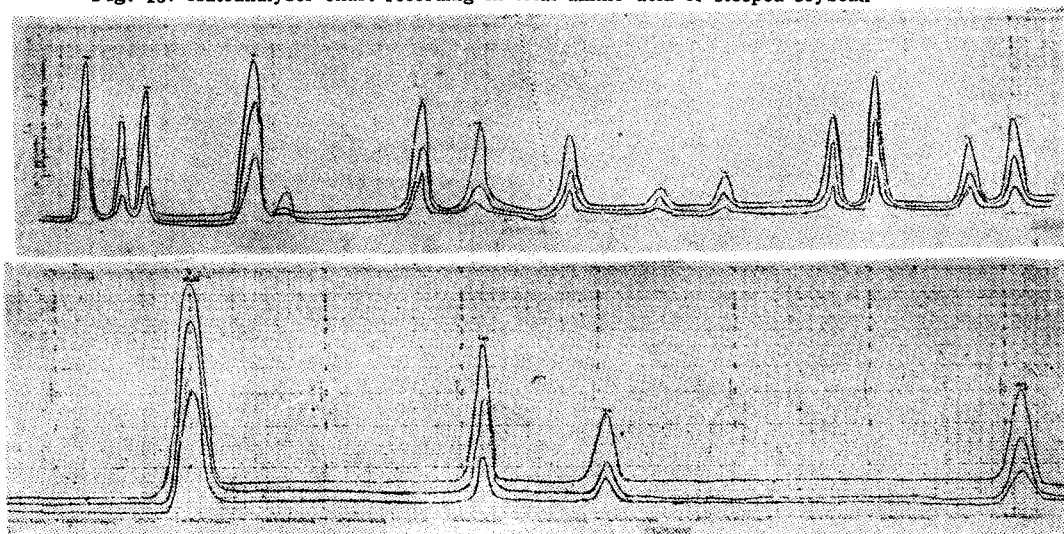


Fig. 13.* Autoanalyzer chart recording in total amino acid of cooked soybean

Table 3. Change of free amino-acids during the Chung-Kook-Jang Fermentation (mg % dry base)

Amino acids		Aspartic acid	Threonine	Serine	Glutamic acid	Proline	Glycine	Alanine	Valine	Cystine
Mol. wt	Sample	133.10	119.10	105.10	165.10	115.10	75.10	89.10	117.10	120.20
Time										
Steeped soybean	O	42.37	13.95	26.98	63.56	9.40	14.64	35.34	—	23.64
O. hrs (cooked soybean)	區	49.47	19.83	35.93	Trace	2.91	4.58	29.11	—	5.89
24 hrs	A	63.62	18.48	15.22	200.42	Trace	6.27	29.40	—	30.02
	B	72.00	11.49	44.78	127.07	19.02	34.33	30.25	—	117.53
	C	25.20	Trace	Trace	190.12	Trace	2.28	8.12	—	14.58
72 hrs	A	302.09	228.28	104.22	1606.91	7.83	26.79	46.53	—	291.72
	B	723.34	421.94	266.42	3520.88	447.37	477.79	527.25	—	1858.96
	C	246.78	92.13	180.84	3143.04	60.45	253.53	250.38	—	1093.51
Steeped soybean	O	5114.29	1778.42	2452.95	9146.41	1109.09	2016.13	2079.52	267.31	2889.02
O hrs (cooked)	O	5067.32	1753.31	2441.21	9156.81	938.77	1841.25	1839.16	220.41	2124.89

Amino acids		Methionine	Isoleucine	Leucine	Tyrosine	Phenylalanine	Ammonia (NH ₄ Cl)	Lysine	Histidine	Arginine
Mol. wt	Sample	149.20	131.20	131.20	181.20	165.20	53.20	182.70	209.60	210.70
Time										
Steeped soybean		5.72	11.59	17.54	15.40	26.43	—	49.33	26.55	221.21
O. hrs (cooked soybean)		4.21	4.59	7.06	18.64	20.38	—	15.97	12.82	161.00
24 hrs	A	9.13	49.35	137.42	42.00	82.36	—	194.66	77.09	34.38
	B	13.13	71.28	177.04	83.27	180.99	—	187.50	96.24	10.38
	C	Trace	2.70	18.72	36.74	36.68	—	35.94	19.44	20.38
72. hrs	A	187.04	314.14	804.67	467.61	1801.25	—	986.71	277.31	520.52
	B	351.07	1402.04	2450.45	1426.71	2078.58	—	2343.85	1104.91	226.40
	C	313.00	922.77	2067.03	1439.80	2092.84	—	3225.15	918.66	434.70
Steeped soybean		505.48	1959.09	3614.28	1719.04	2344.48	—	3622.18	1576.03	4335.93
O. hrs (cooked)		408.16	1812.38	3309.05	1705.27	2404.59	—	3521.14	1400.20	3997.39

(※ Total amino-acid)

의 實驗結果와 대체로 같은 경향이다. 本實驗의 結果와 같이 protease activity가 1但 最高值를 이루었다가 減少되는 理由는 醱酵의 進行에 따라 試料가 알카리性으로 됨에 따라 protease 최적 pH 영역에서 벗어나는 결과라고 생각된다.

5) Free amino acid: 淸國醬에 主의 醱酵過程에서 遊離아미노酸의 消長關係를 Amimo acid autoanalyzer로 測定한 結果는 Fig 10, 11, 12, 13와 같으며 이것을 standard curve와 比較하여 換算한 유리아미노산의 變化는 Table 3와 같다. Table 3

에 依하면 水浸生大豆 (R.M., steeped) 中에 含有 되어 있는 遊離아미노酸量에 比하여 加壓蒸熟大豆는 Aspartic acid, Threonine, Serine 및 Tyrosine 等 4 種의 아미노酸은 微量식의 增加를 보이고 남 어지 13 種의 아미노酸은 量的差異는 있으나 全部 減小되었으며 Valine 은 水浸試料나 蒸熟試料에서 檢出되지 않았다. 또한 24 時間醱酵試料는 蒸熟試料에 比하여 A 區는 Threonine, Serine, Proline 및 Arginine 等 4 種, B 區는 Threonine 과 Arginine 等 2 種 C 區는 Aspartic acid, Threonine, Serine, Proline, Glycine, Alanine, Methionine, Isoleucine 및 Arginine 等 9 種의 아미노酸類가 減少되었으며 其他種類는 若干 增加되었다. 72 時間 醱酵試料는 모두 水浸試料에 比하여 아미노酸種類에 따라 다르나 어떤 것은 數拾倍 내지 數百倍로 增加되었으며 A,B,C 中 B 區가 他에 比하여 현저하게 增加되었다. 그러나 Valine 은 어느 區에서도 檢出되지 않았으나 水浸生大豆와 蒸熟大豆의 葉산가수분해시료에서는 Valine 이 檢출되었다.

以上의 遊離아미노酸의 消長관계를 綜合하면, 24 時間醱酵試料가 蒸熟試料에 比하여 大部分의 아미노酸類가 減少된 現象은 醱酵初期에서 醱酵微生物의 增殖에 따라 그것들이 營養分으로 吸收同

Table 4. The Ratio of Free amino acid to the cooked soybean amino acids in during Chung-Kook-Jang Meju Fermentation by "B"

Ratio		Ratio	
Amino acid	%	Amino acid	%
Asp	12.30	Met	86.00
Thr	24.13	Ile	77.36
Ser	10.91	Leu	74.05
Glu	38.43	Tyr	83.66
Pro	39.02	Phe	86.09
Gly	25.95	Lys	66.36
Ala	28.66	His	78.89
Val	0	Arg	5.60
Cys	87.48		

化된 것으로 생각된다. 그리고 72 時間試料에서 大量增加된것은 Fig. 6 에서와 같이 醱酵初期에 多量生成되었던 peptide-N가 酵素作用으로 분해된 아미노산 양이 增加되는 것이라고 생각된다. 그러나 草野^{22,23}의 Natto 實驗에 依하면 試料에 따라 Valine이 檢出된것도 있고 檢出되지 않는것으로 보아 菌株에 따라 틀리는 것으로 생각된다.

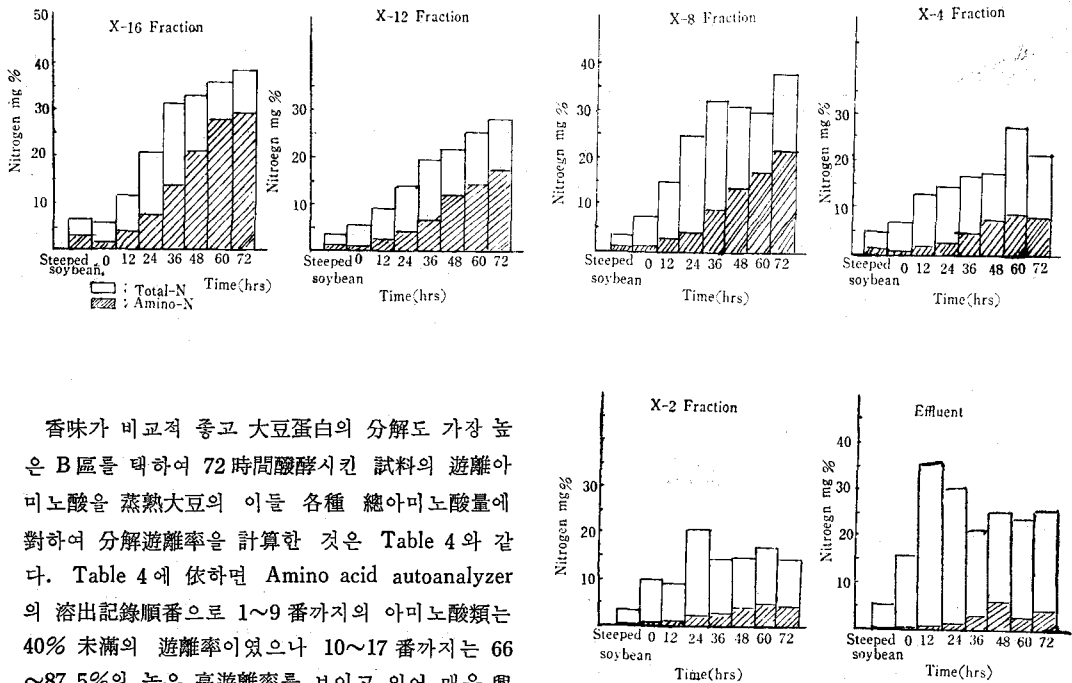


Fig 14. Changes of Total-N and Amino-N during the Chung-Kook-Jang Fermentation

香味가 비교적 좋고 大豆蛋白의 分解도 가장 높은 B 區를 택하여 72 時間醱酵시킨 試料의 遊離아미노酸을 蒸熟大豆의 이들 各種 總아미노酸量에 對하여 分解遊離率을 計算한 것은 Table 4 와 같다. Table 4 에 依하면 Amino acid autoanalyzer의 溶出記錄順序로 1~9 番까지의 아미노酸類는 40% 未滿의 遊離率이었으나 10~17 番까지는 66~87.5%의 높은 高遊離率을 보이고 있어 매우 興味있는 特徵이라고 생각된다.

6) Average peptide length (APL): 3 種의 菌株

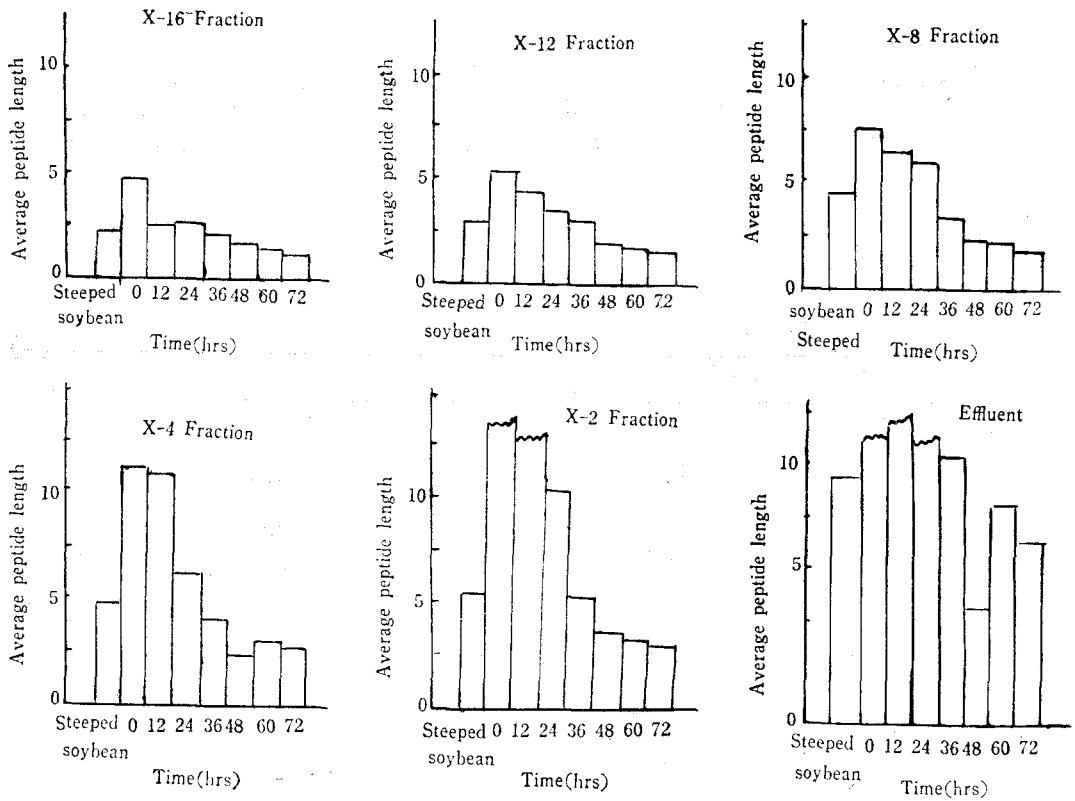


Fig 15. Change of APL of each fraction during the Chung-Kook-Jang Fermentation

분해도가 가장 높은 B區(K-27菌株)의 醱酵過程中에 經時的으로 採取한 試料를 處理하여 얻은 分子篩別用試料를 cross linkage가 다른 여러가지 Dowex-50 resin을 利用하여 分子篩別한 各 fraction에 대하여 total-N와 amino-N을 分析하여 total-N/amino-N을 計算한 結果는 Table 5과 같으며 이것을 막대 그림으로 表示하면 Fig. 14, 15과 같다.

이들 結果에서 전 발효과정중을 통하여 total-N, amino-N의 變化를 보면 effluent가 가장 많고 이것을 제외한 各 fraction은 X-16이 가장 많으며 X-2 fraction이 가장 적은 順으로 나타났다. 그中 total-N을 발효시간별로 보면 12時間 시료에서 effluent fraction이 70.58mg로 가장 많고 그後 醱酵時間이 經過함에 따라 漸次減少되었다. 그러나 이것과는 對照的으로 醱酵時間의 經過에 따르는 effluent를 除外한 其他 各 fraction의 total-N量은 24~36時間까지는 大體的으로 顯著한 增加를 보였으나 그 以後에는 比較的 완만한 增加를 보이고 있다.

그리고 amino-N의 變化를 醱酵時間別로 보면 X-16, X-12, X-8의 세 fraction은 時間이 經過함에 따라 大體的으로 增加되었으나 X-4, X-2 및 effluent의 세 fraction은 40~60時間까지 增加되었다가 減少되었다. 그리고 全試料를 通하여 APL은 X-16이 가장 적고 X-12, X-8, X-4, X-2 및 effluent의 順으로 漸次 큰 값을 나타내고 있다. 또한 醱酵時間別 APL의 變化는 12時間에서 最高値를 보이는 effluent를 除外한 全 fraction이 다같이 蒸熱大豆에서 가장 크고 醱酵時間이 經過함에 따라 順次的으로 적이졌다. 이 傾向은 X-16 fraction에서는 比較的 적었으나 X-12, X-8, X-4, X-2 및 effluent에서는 시간이 경과할수록 그 變化가 甚하였다. 이 結果는 Fig. 6에서 PAA-N中的 peptide-N生成이 醱酵 12時間에서 最高値를 이루었다가 時間經過에 따라 줄어든 것과 Fig. 7에서 12時間 以後 醱酵에서 amino-N가 顯著하게 增加된 結果와 잘 一致되는 것으로서 12時間近處에서 強力한 蛋白分解酵素가 作用하기 始作하여 醱酵가 進行함에 따라 APL이 적이

Table 5. Average peptide length of each fraction of peptide during the Chung-Kook-Jang Meju Fermentation by "B" (K-27) (mg)

Time	Class	Fraction	Sample Prior to fermentation	X-16	X-12	X-8	X-4	X-2	Effluent	Total-N (Sum)	Recovery
Steeped soybean	Total-N	Amino-N	27.30	6.35	3.63	1.85	2.75	1.65	10.93	27.16	99.5
			6.42	2.82	1.21	0.47	0.56	0.30	0.93	6.29	98.0
	APL		2.33	3.00	3.93	4.71	5.50	11.75			
Ohr (cooked soybean)	Total-N	Amino-N	56.82	6.29	5.43	3.64	3.54	4.86	31.75	55.51	97.7
			4.41	1.35	1.03	0.49	0.35	0.26	0.85	4.32	98.2
	APL		4.65	5.27	7.43	11.14	19.44	37.35			
12 hrs (fermented)	Total-N	Amino-N	116.01	11.78	9.12	7.87	6.68	4.52	70.58	110.55	95.3
			11.04	4.68	2.28	1.25	0.62	0.32	1.77	10.92	98.3
	APL		2.51	4.07	6.29	10.79	14.12	39.87			
24 hrs	Total-N	Amino-N	126.78	21.12	13.72	12.45	7.48	10.21	60.13	125.11	97.9
			19.32	8.34	4.22	2.16	1.22	0.98	2.05	18.97	98.2
	APL		2.53	3.25	5.76	6.13	10.41	29.33			
36 hrs	Total-N	Amino-N	130.35	31.83	19.85	16.26	8.45	7.19	45.36	128.94	98.8
			35.28	14.29	7.01	4.86	2.04	1.32	3.55	33.17	93.7
	APL		2.23	2.83	3.34	4.14	5.45	12.77			
48 hrs	Total-N	Amino-N	139.08	33.78	21.45	15.67	8.76	7.35	49.84	136.85	98.4
			59.34	21.49	11.86	7.01	3.65	2.01	9.47	55.49	93.5
	APL		1.57	1.81	2.23	2.40	3.65	5.26			
60 hrs	Total-N	Amino-N	152.22	36.42	25.45	17.58	13.75	8.54	47.59	149.33	98.1
			64.47	27.91	14.61	8.75	4.46	2.55	4.64	62.93	97.6
	APL		1.30	1.74	2.01	3.08	3.35	10.25			
72 hrs	Total-N	Amino-N	161.01	38.78	28.26	19.47	10.95	7.21	52.79	157.46	97.8
			71.97	29.90	17.65	10.81	4.18	2.35	6.29	71.18	98.9
	APL		1.29	1.60	1.80	2.62	3.07	8.38			

는 것으로 解釋된다.

4. 要 約

우리나라 固有食品의 一種인 淸國醬의 질소화합물의 變化를 연구하기 위하여 筆者가 분리동정한 2 가지 淸國醬메주 醱酵菌(K-27, S-16)과 보존 納豆菌으로 淸國醬메주를 醱酵시키면서 經時的으로 採取한 試料에 對하여 總窒素, pH, 蛋白質 分解酵素力價, 不溶性蛋白態窒素, 水溶性蛋白態窒素, 펩타이드態窒素, 아미노態窒素, 암모니아態窒素 및 各種遊離아미노酸등을 調査分析하는 동시에 cross linkage가 각각 다른 Dowex-50을

사용하여 分子篩別을 한 各 fraction에 對하여 total-N, amino-N을 측정하고 average peptide length를 계산하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 總窒素: 발효가 진행함에 따라 세가지의 시험구의 총질소가 다같이 若干 增加되었다.

2. 不溶性蛋白態窒素: 不溶性蛋白態窒素는 蒸熟工程에서 一旦顯著하게 增加되었다가 三種試料가 다 같이 經時的으로 減少되는 傾向이었으나 보존균주구에 比하여 分離菌株區의 減少가 더욱 甚하며, 그중에서도 K-27 菌株接種區가 特히 顯著한 減少傾向을 보였다.

3. 可溶性蛋白態窒素: 可溶性蛋白態窒素는 蒸

熟工程에서 一但 大幅 減少되었다가 其後부터는 세가지 淸國醬매주區가 다 같이 若干씩 減少되는 傾向이었으나 그중에서 K-27 菌株區의 減少率이 컸다.

4. Peptide 態, 아미노態 및 암모니아態窒素 : 蒸熟操作으로 펩타이드態, 암모니아態窒素는 增加되고 아미노態窒素는 若干씩 減少되었다가 醱酵過程에서 세가지區가 모두 繼續하여 현저하게 증가하였다. 其中 펩타이드態窒素같은 各區에 따라 각각 다른 一定時間에 最高值를 이루었다가 그후 점차 감소되었다. 그리고 세가지 시험구중 특히 K-27 균주집중구의 질소화합물변화가 다른 것에 비하여 현저하게 컸다.

5. pH와 protease activity: 세가지 試驗區의 pH 變化는 蒸熟大豆의 6.65에서 繼續上昇하여 72時間 醱酵時에는 7.5~7.85까지 이르렀으며 protease activity는 醱酵가 進行됨에 따라 顯著하게 높아졌다가 pH가 7.3內外가 되는 48~60時間 醱酵를 限界點으로 하여 漸次減少되었다.

6. 遊離아미노酸 : 遊離아미노酸은 醱酵가 進行함에 따라 세가지 試驗區가 다같이 數拾倍 내지 數百倍로 顯著하게 增加되었으며 그중 K-27 菌株區의 遊離아미노酸의 增加가 훨씬 높았다.

7. 分子篩別 fraction의 總窒素, 아미노態窒素 및 APL: K-27 菌株區의 試料를 分子篩別하여 얻은 各 fraction의 總窒素와 아미노態窒素는 醱酵가 進行함에 따라 X-16, X-12 및 X-8 fraction은 大體的으로 增加되었으나 X-4, X-2 및 effluent fraction은 一定한 醱酵時間까지 增加되었다가 그後 減少되었다. effluent를 除外한 全 fraction의 APL은 蒸熟大豆에서 가장 크고 醱酵時間이 經過함에 따라 漸次減少되었다.

끝으로 本研究를 遂行하는데 始終一貫 指導鞭撻과 校閱을 하여주신 서울大學校 農科大學 金載勳 博士와 李春寧 博士任께 衷心으로 感謝를 드리며 아울러 本實驗遂行에 獻身助力하여준 國立工業研究所 食品工業科 成綯淳, 尹宗鎬, 朴京台 研究士들 에게 謝意를 表하는 바이다.

引用 文 獻

1. 林右市; 日釀工誌 37, 233 (1959)
2. " ; Ibid 37, 272 "
3. " ; Ibid 37, 276 "
4. " ; Ibid 37, 327 "
5. " ; Ibid 37, 329 "
6. " ; Ibid 37, 360 "
7. K.H. Steinkraus; Food Research. 25, 777-788 (1960)
8. " ; J of Food Science 26, 4, 373-376 (1961)
9. 竹內德勇外; 日釀工誌 40, 375 (1962)
10. " ; Ibid 40, 379 "
11. " ; Ibid 44, 934 (1966)
12. " ; Ibid 45, 29 (1967)
13. " ; Ibid 45, 34 "
14. 金載勳 ; 韓農化誌 6, 79 (1965)
15. " ; Ibid 6, 89 "
16. " ; Ibid 6, 107 "
17. 金洙榮外1; Ibid 8, 11 (1967)
18. 望月務外2; 日食工誌 15, 408 (1968)
19. " ; Ibid 15, 414 "
20. " ; Ibid 15, 418 "
21. " ; Ibid 16, 21 (1969)
22. 草野愛子; 日榮養과 食糧 22, (9), 29 (1969)
23. " ; Ibid 24, (1), 8 (1971)
24. 洪萬選; 山林經濟, 煎鼓醬法 (1715)
25. 朴啓仁, 成綯淳; 韓微誌 9, 74 (1971)
26. 高橋暉外2; 日釀工誌 35, 318 (1957)
27. K. Narita & S. Fugiwara; Bull, Chem, Soc (Japan 31, 282 (1958)
28. 赤堀四郎編; 酵素研究法 1卷 164 (1957)
29. " " 2卷 238 "
30. K. Kageyama; 日釀工誌 38, 28 (1955)
31. " ; Ibid 38, 111 "
32. 朴啓仁; 國工研報告 16, 97 (1966)
33. 鄭泰錫; 科연회보 1, 19 (1956)
34. " ; Ibid 3, 75 (1958)
35. 京都大學; 農藝化學實驗書 2卷 p.533 (1967)
36. 權肅杓; 環境衛生學 p.133 (1965)
37. 京都大學; 農藝化學實驗書 1卷 p.131 (1967)
38. Technicon Lab; Technicon's instruction manual AAA-1
39. 波變野搏行; Amino 酸自動分析法 (1964)
40. Block R.J.O Belling D: Arch, Biochem. 25, 350 (1950)
41. Shinbayashi K. & yonemura J., Nat. Inst. Anim. Helth Quart., 3, 36 (1963)
42. More S. Spackman D.H. & Stein W.H.: Analyt. Chem., 30, 1185 (1958)