

淸國醬메주 醱酵過程中的 窒素化合物의 消長에 關한 研究(II)

—低級 paptide 와 構成아미노酸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

Amino acids of oligopeptides formed during Chung-Kook-Jang Fermentation.

Ke In Park

National Industrial Research Institute

(Received, June, 30, 1972)

Summary

An experimental Chung-Kook-Jang was prepared using the strain *Bacillus subtilis* sp. isolated by the author. Samples were taken in 12 hrs interval during the fermentation and the oligopeptides were separated by the method of molecular sieving using the ion exchange resin column of Dowex-50.

Only the X-16 fraction of oligopeptides was taken and the components of oligopeptides were developed in two dimensional thin layer chromatograms. The each peptide spot was eluted and each peptide was isolated. The pattern and kinds of amino acids, and N and C-terminal amino acids were studied.

Fourteen different oligopeptides could be detected by the two dimensional thin layer chromatography, all of which were consisted of 4~9 kinds of amino acids. No dipeptides and no tripeptides could be found. The N and C-terminal amino acids and the residual component amino acids of all these 14 peptides could be summarized as the follows.

[P]-I.	Pro (Cys Ala Asp Trp Ile Val)	Glu
[P]-II.	Val (His Arg Glu Thr Ala Met)	Asp
[P]-III.	Glu (Cys Lys Asp Thr Met)	Ala
[P]-IV.	Glu (His Ser Ala)	Met
[P]-V.	Ile (Cys Asp Arg Gly Pro Trp Phe)	His
[P]-VI.	Gly (Asp Ser)	Lys
[P]-VII.	Thr (Pro Tyr Phe)	Asp
[P]-VIII.	Phe (Tyr Leu Ile)	Val
[P]-IX.	Trp (Phe Ile)	Thr
[P]-X.	Ile (Arg Leu)	Phe

[P]-XI. Asp (Lys His Ser Gly Glu Pro)	Ala
[P]-XII. Glu (Cys Asp Gly)	Ser
[P]-XIII. Ala (Arg Tyr)	Glu
[P]-XIV. Met (Glu Ala)	His

It appears that the protease of the *Bacillus subtilis* K-27 strain has rather wider range of specificity than the proteases of *Aspergillus soya*, pepsin, chymotrypsin, and trypsin.

緒 論

筆者는 本研究의 第1報¹⁾에서 筆者²⁾들이 分離同定한 두가지 淸國醬醱酵菌(S-16, K-27 菌株)과 保存納豆菌株(IAM 429-1)를 利用하여 淸國醬메주를 醱酵시키면서 經時的으로 採取한 試料에 對하여 그들의 total-N, insoluble-N, soluble-N, PAA-N (peptide-N, amino-N 및 ammonia-N), pH, protease activity 및 free amino-acid 等の 消長을 研究한 同時에 *Bacillus subtilis* K-27 醱酵菌을 利用한 淸國醬메주 試料를 處理하여 cross linkage 가 各各 다른 Dowex-50 resin 으로 分子篩別하여 얻은 各 fraction 에 對하여 total-N, amino-N 을 測定하고 이것에서 average peptide length (APL)를 計算한 結果를 報告하였다.

간장, 된장 等の 各種大豆醱酵食品의 맛은 그 食品이 含有하고 있는 遊離아미노酸과 peptide 의 種類 및 그것들의 含量에 따라 크게 달라지는 것이 알려져 있으므로 우리나라 固有의 淸國醬의 맛도 또한 여기에 含有하는 遊離아미노酸과 peptide 가 主要한 구실을 하고 있는 것으로 推測된다. 大豆醱酵 食品의 遊離아미노酸과 peptide 에 關한 調査研究는 過去에도 많이 報告되어 있으나 이것들의 大部分은 아미노酸과 peptide 의 含量을 調査한 程度이며 peptide 의 構造에 關한 研究는 比較的 적다. 大豆醱酵食品의 peptide 의 構造에 關한 새로운 것으로는 *Aspergillus oryzae* 을 使用한 各種 Miso, Shoyu 의 醱酵熟成過程中的의 試料에 對한 竹內³⁻⁷⁾ 等の 研究와 *Aspergillus soya* 를 使用한 콩코오지 製造中的의 試料에 對한 金⁸⁻¹⁰⁾의 研究 및 Miso 熟成中的의 窒素成分의 消長에 關한 望月¹²⁻¹⁴⁾ 等の 研究報告가 있을 뿐이다. 그밖에 우리나라 淸國醬과 類似한 納豆에 對하여 金¹¹⁾等과 草野¹⁵⁻¹⁶⁾의 amino 酸과 peptide 를 定量한 報告가 있을 뿐으로 淸國醬의 peptide 構造를 研究한 것은 없다. 따라서 筆者는 우리나라 固有食品인 淸國醬의 醱酵過程中的의 peptide 構造를 究明하기 爲하여 分離菌株 *Bacillus subtilis* K-27를 利用한 淸國醬메주 醱酵過程中的의 經時的인 試料에 對하여 高橋¹⁷⁻²¹⁾

等, 竹內³⁻⁷⁾等, 金⁸⁻¹⁰⁾ 및 望月¹²⁻¹⁴⁾ 等の 方法를 利用하여 cross linkage 가 各各 다른 Dowex-50 resin 으로 分子篩別을 하여 얻은 X-16 fraction 에서 이것들의 各 peptide 를 分離하고 그 amino acid pattern 과 peptide 의 構造를 調査研究한 結果를 이에 報告한다.

2. 實驗方法

1) 試料 및 試藥

第1報에서 本人이 分離同定한 菌株中 *Bacillus subtilis* K-27 菌株를 使用한 淸國醬메주區의 醱酵過程中的 經時的인 試料 即 原料인 steeped soybean (No.1), cooked soybean (No.2)와 醱酵 12 hrs (No.3), 24hrs(No.4), 36hrs(No.5), 48hrs(No.6) 60hrs(No.7). 및 72hrs 醱酵試料(No.8)等을 採取 磨碎하여 만든 均質液의 一部에 20% trichloroacetic acid (TCA) 溶液을 加하여 하루밤 放置하였다가 遠心分離하여 水溶性蛋白質을 分離除去한 上澄液을 第1報에 準하여 分子篩別로 얻은 X-16 fraction 의 濃縮乾固物을 蒸溜水로 一定量이 되게 溶解시켜 paper chromatography (PC)와 thin layer chromatography (TLC)의 供試液으로 使用하였다.

그리고 展開시켜 만든 60枚의 thin layer chromatogram 中의 一枚를 發色시켜 나타난 peptide 의 位置를 參考로하여 나머지 thin layer chromatogram 에 나타난 peptide 의 部位를 scraper로 긁어 試驗管에 옮기고 6ml의 蒸溜水를 加하여 여러 번 흔들어서 하루밤 放置시켜 peptide 를 抽出시킨 다음 濾過水洗하여 silicagel 을 除去하고 난 濾液을 濃縮하였다가 6ml 가 되게 稀釋한 것을 peptide 의 構成아미노酸, N-terminal amino acid residue 및 C-terminal amino acid residue 의 同定用 試料로 使用하였다. 標準試藥으로서는 standard amino acid 는 E. Merck. Co.製, standard DNP-amino acid 는 Sigma Co. 製를 使用하였으며 TLC 用 silicagel G 는 Yamani Layer Co.製를 使用하였으며 其他試藥은 試藥級純粹品을 使用하였

다. 그리고 PC用 paper는 Toyo filter paper No. 51을 使用하였다.

2) 實驗法

(1) 遊離아미노酸의 分離同定^{8,11,18,23,48,49}:
 27×30cm 크기로 切斷한 Toyo filter paper No.51의 左端과 下端에서 各各 3cm 되는 點에 X-16 fraction에서 얻은 PC用 供試液 25γ씩 spotting 하고 이것의 10枚를 1組로 하여 2次元으로 展開시키되 1次展開¹⁸⁾는 BuOH : HAC : H₂O=4:1:1 (v/v) solvent system 으로 室溫에서 14-15 時間 展開시켰고 2次 展開는 BuOH : HAC : H₂O=4 : 1 : 5 (v/v) solvent system 을 使用하여 室溫에서 12-13 時間 展開시켜서 乾燥시켰다. 이와같이 하여 乾燥시킨 paper 1枚에 0.2%-ninhydrin 溶液 (in acetone)⁴⁸⁻⁴⁹⁾을 spray 하여 80°C의 乾燥器內에서 10分間 發色시켜 一般 아미노酸을 確認하고 다른 1枚의 paper 에는 0.2% Isatine (in acetone) 溶液을 spray 하여 70~76°C의 乾燥器에서 10分間 發色시켜 Cystine²³⁾을 確認하였으며 Tryptophan 은 또 다른 paper 에 Erlich⁴⁸⁾法에 準하여 1%-p-dimethylaminobenzaldehyde (in N-HCl) 溶液을 spray 하여 發色시켜 確認하였다.

이것과 同一한 方法으로 standard amino acid 를 展開하여 發色시킨 standard amino acid의 paper chromatogram Fig.1. 및 Table.1.과 對照하여 遊離 아미노酸의 種類를 同定하였다.

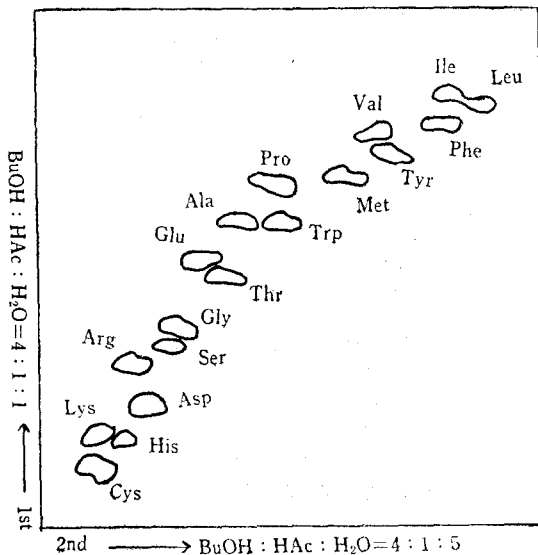


Fig. 1. Paper chromatogram of standard aminoacid

Table 1. Rf value of standard amino-acid

Amino acid	Rf value	
	1st	2nd
Cystine	0.184	0.148
Lysine	0.240	0.175
Hisidine	0.224	0.202
Aspartic acid	0.300	0.233
Arginine	0.336	0.188
Serine	0.380	0.246
Glycine	0.388	0.255
Glutamic acid	0.480	0.289
Threonine	0.460	0.315
Alanine	0.580	0.342
Proline	0.620	0.391
Tyrosine	0.610	0.458
Methionine	0.692	0.510
Tryptophan	0.740	0.564
Valine	0.772	0.515
Phenylalanine	0.800	0.660
Leucine	0.874	0.753
Isoleucine	0.884	0.744

(2) Peptide의 分離²²⁻²⁵: 20×20cm 크기의 TLC 用 glass plate 에 silicagel G : H₂O=1 : 3 (w/v) 로 섞은 것을 applicator 를 使用하여 0.5mm 두께 로 고르게 발아서 約 2 時間 室溫에서 乾燥시킨 다음 다시 約 2 時間 105°C 乾燥器에서 完全 乾燥시켜 使用하였다. 이 plate 의 左端과 下端에서 2cm 되는 곳에 X-16 fraction에서 얻은 TLC用 供試液을 50γ씩 spotting 하여 2次元으로 展開시키되 展開溶媒는 1,2次元 다같이 實驗法 (1)의 PC用 solvent system 과 同一한 것을 使用하였으며 이와같이 展開시킨 TLC는 大體로 Rydon²²⁾의 方法과 Killilea,²⁴⁾ 및 Mazur²⁵⁾法에 準하여 各 peptide 를 分離確認하였다.

即 各 thin layer chromatogram plate 에 新鮮한 1% tert-butylhypochloride⁵⁰⁻⁵¹⁾ (in cyclohexane) 溶液을 골고루 spray 하여 約 30分間 扁風機로서 過剩의 噴霧液을 除去한 다음 1%-starch iodide 溶液을 뿌려 peptide spot 를 鮮명한 blue-black 으로 發色시키고, 이들을 60枚를 1組로하여 同時에 展開시켰다. 그리고 그中 1枚는 參考로 遊離아미노酸의 同定에 準하여 發色시켜 아미노酸과 peptide 가 overlap 되었는지 아닌지를 보았다. 그리하여 여러가지 試料의 thin layer chromatogram에서 同一한 Rf의 peptide는 같은 peptide로 하였다.

(3) Peptide의 構成아미노산²⁶⁻²⁷⁾

① Overlap된 遊離아미노酸을 包含한 各 peptide의 構成아미노酸의 分離同定: 各 peptide의 構成아미노酸 同定用試料 1ml를 6N-HCl 溶液 5ml와 함께 硬質試驗管에 넣고 封管하여 105°C에서 24時間 加水分解한것을 60°C 以下에서 濃縮시켜 HCl을 除去한 다음 小量의 물로 녹여 實驗法 (1)에 準하여 paper chromatogram를 만들어 Fig. 1 및 Table.1의 standard amino acid pattern과 對照하여 overlap된 遊離아미노酸을 包含한 各 peptide의 構成 amino acid를 同定하였다.

② Peptide에 overlap된 遊離아미노酸의 同定: 各 peptide의 構成아미노酸 同定用試料를 Sanger F.²⁶⁻²⁸⁾의 dinitrophenylation 法을 應用하여 TLC로 各 peptide에 overlap된 遊離아미노酸을 同定하였다. 即 試料 3ml에 NaHCO₃ 15mg을 加하여 0.8M-NaHCO₃ buffer로 溶液의 PH를 8.5로 調整하고 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) 0.25ml를 ethanol 5ml에 녹여서 加하여 室溫에서 約 3時間 dinitrophenylation 시켜 減壓下에서 過剩 ethanol을 除去한 다음 蒸溜水 5ml를 加하여 過量의 DNFB는 ether로 抽出除去하였다. 이것에 濃鹽酸을 加하여 pH 1.0이 되게 調節한 다음 acetone을 加하여 完全히 녹여서 다음과 같은 solvent system을 使用하여 2次元 TLC로 展開시켰다.

Ether soluble DNP-amino acid의 展開溶媒^{32,33,36)}
1次, Toluene: 2-Chloroethanol: Pyridine:
25% Ammonia water=50:35:15:7 (v/v)

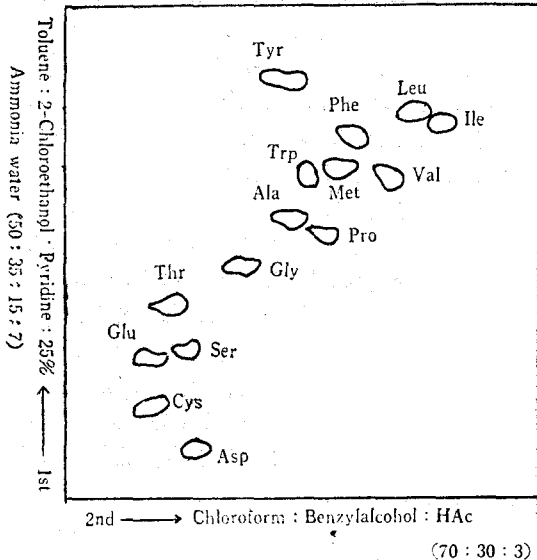


Fig. 2. Thin layer chromatogram of ether soluble standard DNP-amino acids.

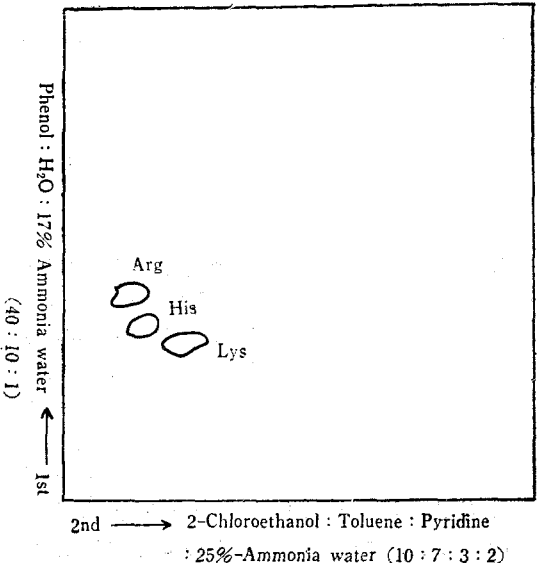


Fig. 3. Thin layer chromatogram of water soluble standard DNP-amino acids.

Table. 2. Rf Value of standard DNP-amino acids

Solvent	DNP-amino-acid	Rf	
		1st	2nd
Water Soluble	DNP-Lysine	0.307	0.243
	" -Histidine	0.336	0.164
	" -Arginine	0.393	0.136
Ether Soluble	DNP-Aspartic acid	0.043	0.243
	" -Cystine	0.143	0.171
	" -Glutamic acid	0.250	0.179
	" -Serine	0.264	0.235
	" -Threonine	0.357	0.207
	" -Glycine	0.428	0.357
	" -Proline	0.500	0.528
	" -Alanine	0.521	0.471
	" -Valine	0.621	0.679
	" -Tryptophan	0.628	0.500
	" -Methionine	0.623	0.571
	" -Phenylalanine	0.728	0.607
	" -Isoleucine	0.743	0.800
	" -Leucine	0.757	0.743
" -Tyrosine	0.828	0.457	

2次, Chloroform: Benzylalcohol: Acetic acid
=70:30:3 (v/v)

Water soluble DNP-amino acid의 展開溶媒^{29,34,37)}

1次, Phenol: Water: 17% Ammonia water
=40:10:1 (v/v)

2次, 2-Chloroethanol: Toluene: Pyridine:

25% Ammonia water=10:7:3:2 (v/v)

이와 같이 하여 展開된 thin layer chromatogram plate 上에 黃色 spot 가 하나인 것은 DNP-peptide 로 認定하고 2個 以上인 것은 overlap 된 遊離아미노酸이 있는 것으로 보고 같은 方法으로 만든 Fig.2 및 Fig.3의 standard-DNP-amino acid pattern 과 그것의 Rf 值(Table. 2)를 參考로 하여 peptide 에 overlap 된 아미노酸을 同定하였다.

③ N-terminal amino acid residue 와 peptide 構成아미노酸의 同定^{25,27-37,52,54}: 實驗②에서 peptide 構成아미노酸 同定用 試料로 dinitrophenylation 시킨것의 1ml 를 6N-HCl 5ml 와 함께 試驗管에 密封하여 105°C 에서 24 時間 加水分解시켜^{21,31,52} 60°C 以下에서 減壓濃縮하여 鹽酸을 除去한 다음 小量의 물에 녹여서 實驗①, ②와 같은 操作으로 PC 와 TLC 를 展開發色시켰다. 이때에 thin layer chromatogram plate 에 하나의 yellow spot 가 生成된 것은 그 peptide 의 N-terminal amino acid residue 의 DNP-amino acid 로 하고, 2個 以上の yellow spot 가 나온 것은 peptide 에 overlap 된 遊離아미노酸의 DNP-amino acid 를 除外한 yellow spot 를 그 peptide 의 N-terminal amino acid residue 로 하였으며, 이때에 overlap 된 遊離아미노酸과 同數의 yellow spot 가 나왔을 때는 overlap 된 遊離아미노酸 中の 1個와 N-terminal amino acid residue 의 DNP-amino acid 의 yellow spot 가 重複되어 나온 것으로 看做하여, 그중 色調의 強度와 넓이의 差로 實驗①의 overlap 된 遊離아미노酸의 thin layer chromatogram 와 standard DNP-amino acid 의 thin layer chromatogram 를 對照하여 各 peptide 의 N-terminal amino acid residue 를 同定하였다. 또한 yellow spot 가 同數이거나 減少되었을 때는 DNP-Glycine 이 長時間의 加水分解操作으로 파괴되는 것이 豫想되므로 試料를 다시 6N-HCl 로 105°C 에서 4 時間만 加水分解하여 같은 方法으로 thin layer chromatogram 에 의하여 N-terminal amino acid residue 를 確認하였다. 그리고 paper chromatogram 에서는 ninhydrin 과 其他 發色劑로 確認된 모든 amino acid pattern 에 各 peptide 別 N-terminal amino acid residue 의 아미노酸을 合한 것을 各己 peptide 의 純構成아미노酸으로 同定하였다.

④ C-terminal amino acid residue 의 同定^{38,39-47,53,54}: 各 peptide 構成아미노酸 同定用試料 6ml

를 硬質試驗管에 옮겨 hydrazine sulfate 26mg 를 加하고 脫水劑를 넣은 vacuum desiccator 속에서 完全히 脫水시킨 다음 無水 hydrazine 0.2ml 를 注射加封하여 60°C 以下에서 32 時間 加水分解하여 開管한 것을 脫水劑를 넣은 vacuum desiccator 를 使用하여서 乾固시켜 過剩의 hydrazine 을 完全히 除去하였다. 이것을 0.1N-HCl 1ml 에 녹이고 適量의 benzaldehyde 를 加하여 室溫에서 約 3 時間 흔들면서 各 peptide 의 C-terminal amino acid residue 以外の amino radical 은 全部 amino hydrazide 로 만들고, 이것을 얼음으로 冷却시켜 不溶性物質로 沈澱시킨後 遠心分離하여 그 上澄液을 取하고 60°C 에서 減壓濃縮시켜 鹽酸을 除去한 다음, 그중 一部를 試料로 하여 Levy³⁸의 方法으로 0.5M-carbonate buffer⁵³로 녹여 實驗②의 Sanger F. 法에 따라, dinitrophenylation 시키고 實驗②의 solvent system 으로 thin layer chromatogram 를 만드렸다. 이 thin layer chromatogram plate 에는 C-terminal amino acid residue 의 DNP-amino acid 와 overlap 된 遊離아미노酸의 DNP-amino acid 의 yellow spot 가 同時에 나타나나 實驗②에서 同定된 overlap 된 遊離아미노酸의 DNP-amino acid 를 除外한 나머지 yellow spot 를 standard DNP-amino acid 와 比較하여 各 peptide 의 C-terminal amino acid residue 를 同定하였다. 그리고 이때에 yellow spot 가 overlap 된 遊離아미노酸의 yellow spot 와 同數일 때는 實驗③의 N-terminal amino acid residue 를 同定할 때와 같은 方法으로 重複된 yellow spot 를 찾아서 그 peptide 의 C-terminal amino acid residue 를 同定하였다. 또한 上記의 amino hydrazide 와 HCl 을 除去한 dinitrophenylation 化 直前의 試料一部를 蒸溜水에 녹여서 實驗①에 準하여 paper chromatogram 를 作成하여 standard amino acid 의 paper chromatogram 와 對照하여 各 peptide 의 C-terminal amino acid residue 를 再確認하였다.

3. 結果와 考察

1) 遊離아미노酸의 分離同定

Bacillus subtilis K-27 菌株를 使用한 淸國醬에 主 醱酵過程에서 採取한 經時的인 試料를 TCA 로 處理하고 分子篩別을 하여 얻은 X-16 fraction 의 遊離 amino acid 의 PC 用 試料를 Toyo filter paper No.51 에 spotting 하여 2次元으로 展開시켜 發色 시킨 paper chromatogram 는 Fig.4 같으며 이 結

果를 standard amino acid의 paper chromatogram과 對照한 結果를 綜合하면 Table.3과 같다. 即

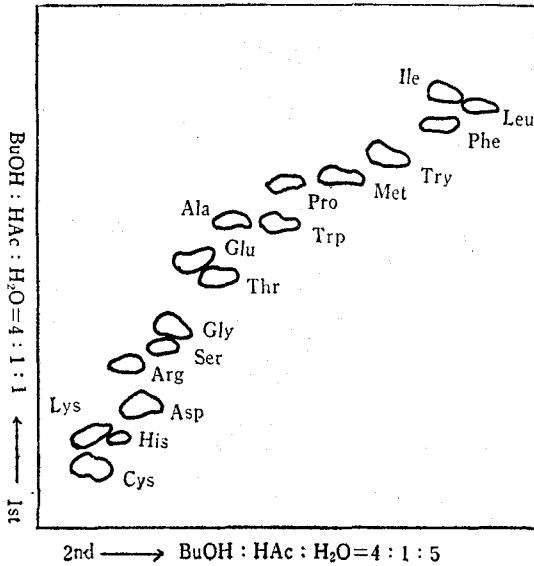


Fig. 4 Paper chromatogram of free amino acids in X-16 fraction

Table 3. Free amino acids in X-16 fraction during 72 hrs fermentation

Aminoacid	Sample
	1~8
Cystine	+
Lysine	+
Histidine	+
Aspartic acid	+
Arginine	+
Serine	+
Glycine	+
Glutamic acid	+
Threonine	+
Alanine	+
Proline	+
Tyrosine	+
Methionine	+
Tryptophan	+
Valine	+
Phenylalanine	+
Leucine	+
Isoleucine	+

standard amino acid를 사용한 18種의 아미노酸中 Cystine, Lysine, Histidine, Aspartic acid, Argin-

ine, Serine, Glycine Glutamic acid. Threonine, Alanine, Proline, Tyrosine. Methionine, Tryptophan, Phenylalanine. Leucine, Isoleucine 등 17種의 아미노酸은 全醱酵過程中的 試料에서 檢出되었으나 Valine 만은 全試料에서 遊離아미노酸으로는 檢出되지 않았다. 이들 結果는 本研究의 第1報¹⁾에서 Autoanalyzer에 의한 分析結果와 잘 一致되는 것이며 淸國醬메주 醱酵에서 始終 Valine 이 檢出되지 않았다. 이것은 金¹¹⁾ 등이 納豆製造時 全醱酵過程중에 Valine 이 檢出된 것과는 다르나 草野^{15,16)}가 日本納豆에 對한 研究에서 遊離아미노酸中 Valine 이 試料에 따라서 檢出된 것도 있고 檢出되지 않은 것도 있는 것으로 보아서 納豆菌株에 따라서 그것이 分泌하는 protease의 特性에 依하여 差異가 있는 것으로 생각된다. 따라서 本研究中에서 使用한 *Bacillus subtilis* K-27 菌株은 大豆醱酵中에 Valine 을 分解遊離시키지 못하는 protease 를 生成하는 것이 아닌가 생각된다.

2) Peptide의 分離

淸國醬메주 醱酵試料를 TCA 로 處理하고 分子 篩別을한 X-16 fraction의 TLC에 依한 peptide 分離用 試料를 TLC用 silicagel-G plate에 spotting 하여 2次元으로 展開시킨 peptide의 thin layer chromatogram에 ninhydrin과 其他試藥으로 發色시킨 各種 遊離아미노酸의 位置를 함께 表記하는 同時에 各試料別로 peptide의 No.를 붙인것은 Fig.5-1~5-8과 같다. 이 thin layer chromatogram에서 各試料의 Rf 值를 計算하면 Table.4와 같다. 即 No.1 試料에서 3個의 peptide, No.2 試料에서는 4個, No.3 試料에서는 5個, No.4 試料에서는 7個, No.5 試料에서는 6個, No.6 試料에서는 6個, No.7 試料에서는 8個, No.8 試料에서는 7個, 都合 46個의 peptide가 分離되었으며 이들 各 peptide 中에는 各試料中에 같은 Rf 值를 나타내는 peptide가 많으므로 이것들을 같은 peptide로 看做하여 綜合하면 Table.5와 같이 peptide No. [P]-1~[P]-14 등으로 14個의 各己 다른 peptide가 分離되었다.

3) Overlap된 遊離아미노酸을 包含한 各 peptide 構成아미노酸의 同定: TLC로서 分離한 overlap된 遊離아미노酸을 包含하고 있는 各 peptide를 抽出하여 HCl로 加水分解한 것을 蒸發濃縮하여 PC用 filter paper에 展開시켜 發色하여 얻은 paper chromatogram를 standard amino acid의

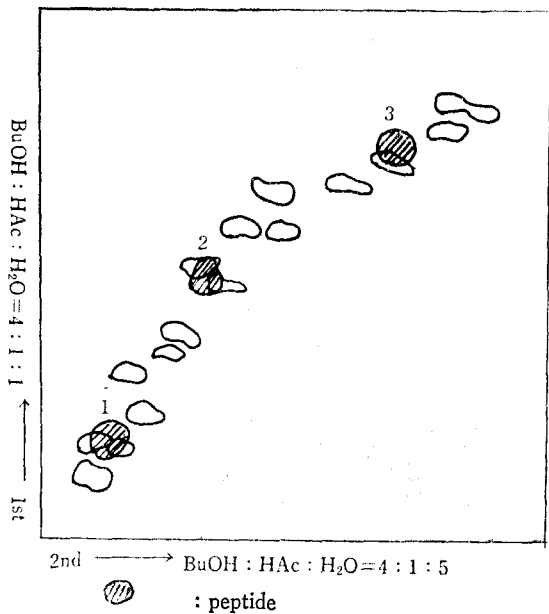


Fig. 5-1 Thin layer chromatogram of X-16 Fraction, Sample No. 1

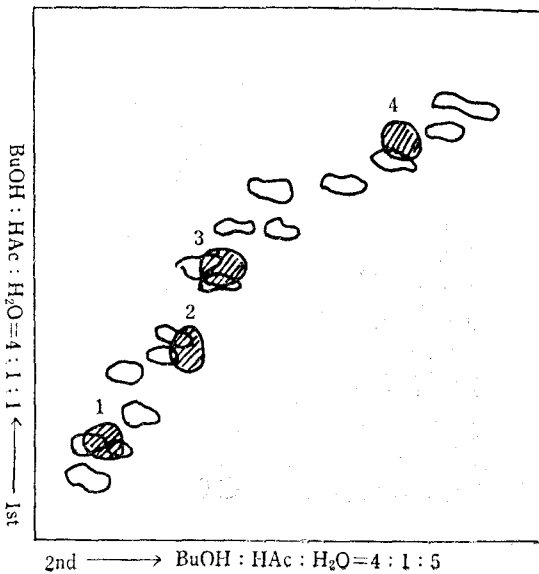


Fig. 5-2 Thin layer chromatogram of X-16 Fraction, Sample No. 2

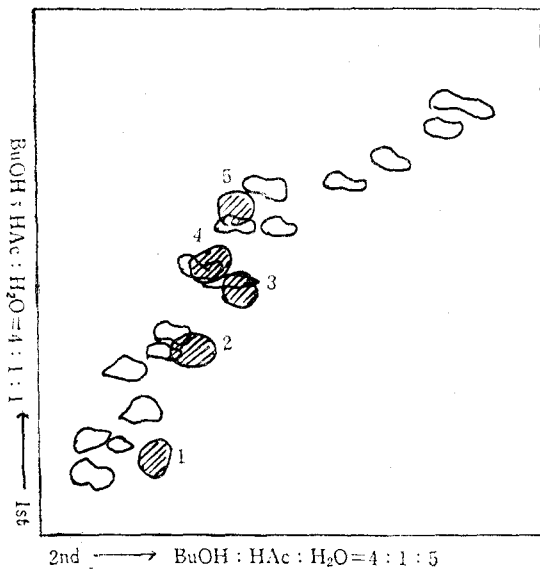


Fig. 5-3 Thin layer chromatogram of X-16 Fraction, Sample No. 3

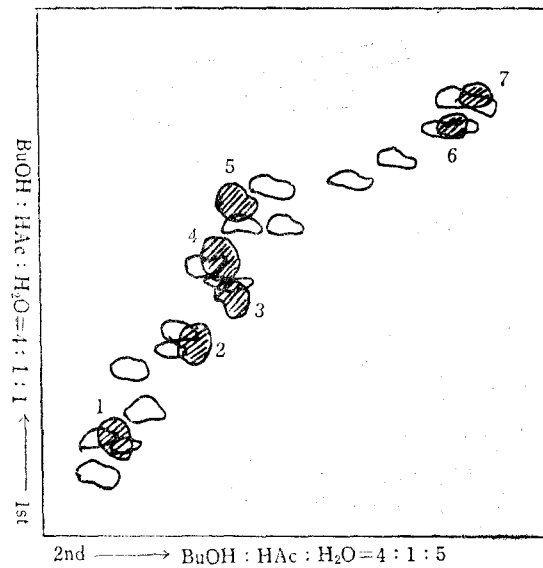


Fig. 5-4 Thin layer chromatogram of X-16 Fraction, Sample No. 4

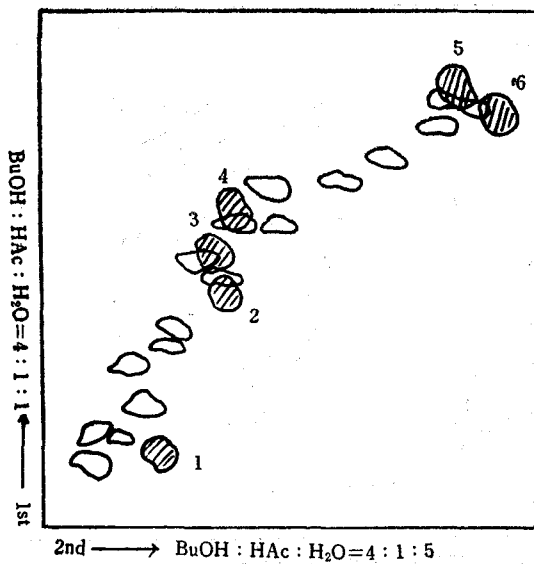


Fig. 5-5 Thin Layer chromatogram of X-16 Fraction, Sample No. 5

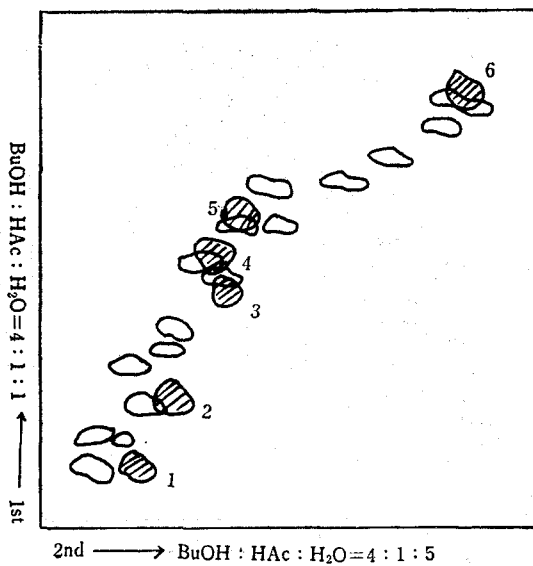


Fig. 5-6 Thin Layer chromatogram of X-16 Fraction, Sample No. 6

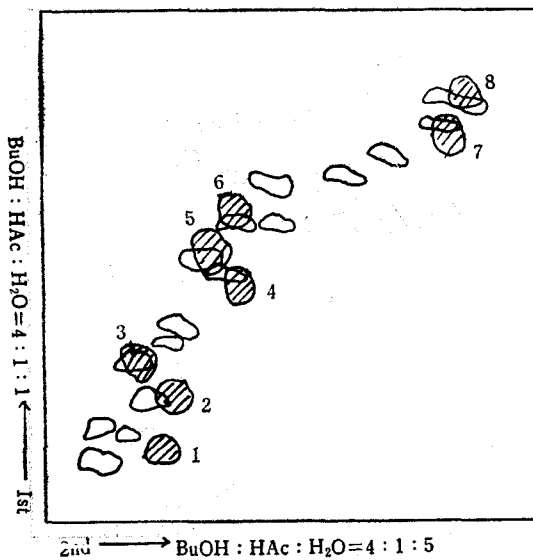


Fig. 5-7 Thin Layer chromatogram of X-16 Fraction, Sample No. 7

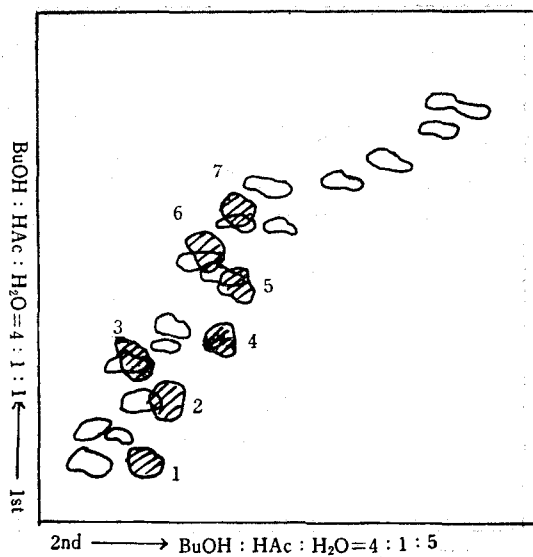


Fig. 5-8 Thin Layer chromatogram of X-16 Fraction, Sample No. 8

Table 4. Rf value of peptides

Sample No.	Peptide No.	Rf value					
		1st	2nd				
1 (steeped)	1	0.220	0.190	5 (36 hrs)	3	0.470	0.298
	2	0.471	0.295		4	0.599	0.342
	3	0.760	0.530		5	0.895	0.477
2 (0hrs)	1	0.220	0.191	6 (48 hrs)	6	0.874	0.761
	2	0.383	0.250		1	0.200	0.307
	3	0.470	0.292		2	0.311	0.312
	4	0.750	0.540		3	0.440	0.301
3 (12 hrs)	1	0.200	0.315	7 (60 hrs)	4	0.470	0.295
	2	0.383	0.255		5	0.599	0.343
	3	0.440	0.305		6	0.897	0.745
	4	0.471	0.295		1	0.200	0.311
	5	0.610	0.342		2	0.312	0.313
4 (24 hrs)	1	0.221	0.191	8 (72 hrs)	3	0.326	0.195
	2	0.381	0.252		4	0.430	0.300
	3	0.440	0.302		5	0.472	0.297
	4	0.470	0.297		6	0.598	0.348
	5	0.609	0.342		7	0.820	0.662
	6	0.810	0.660		8	0.893	0.747
	7	0.895	0.749		1	0.185	0.202
	1	0.184	0.203		2	0.311	0.315
	2	0.440	0.301		3	0.330	0.195
					4	0.378	0.581
					5	0.431	0.302
					6	0.471	0.295
					7	0.601	0.348

Table 5. Table for peptide No.

Peptides identified as same		Peptide No.
1*-1**, 2-1, 4-1,	(3)	[P]-I
1-2, 2-3, 3-4, 4-4, 5-3, 6-4, 7-5, 8-6,	(8)	[P]-II
1-3, 2-4,	(2)	[P]-III
2-2, 3-2, 4-2,	(3)	[P]-IV
3-1, 5-1, 7-1,	(3)	[P]-V
3-3, 4-3, 5-2, 6-3, 7-4, 8-5,	(6)	[P]-VI
3-5, 4-5, 5-4, 6-5, 7-6, 8-7,	(6)	[P]-VII
4-6, 7-7,	(2)	[P]-VIII
4-7, 5-5, 6-6, 7-8,	(4)	[P]-IX
5-6,	(1)	[P]-X
6-1, 8-1,	(2)	[P]-XI
6-2, 7-2, 8-2,	(3)	[P]-XII
7-3, 8-3,	(2)	[P]-XIII
8-4,	(1)	[P]-XIV

* sample No.

** peptide No.

Paper chromatogram 와 對照하여 各 아미노酸 種類를 確認한 것은 Fig.6-1~Fig.6-14 과 같으며, 이것을 綜合한 overlap 된 遊離아미노酸을 包含

하는 各 peptide 의 amino acid pattern 은 Table.6 와 같이 된다.

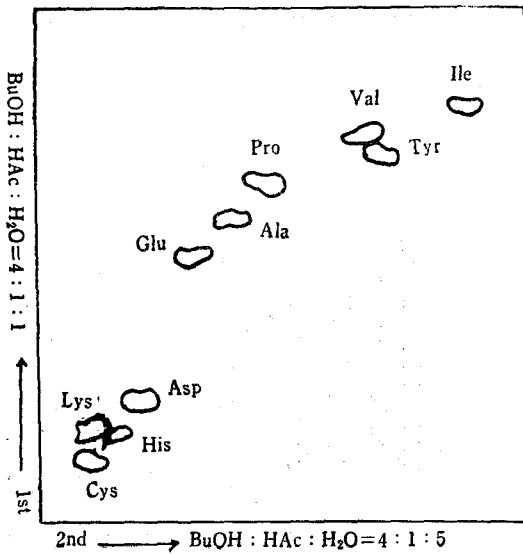


Fig. 6-1 Paper chromatogram of amino acid in each peptide hydrolyzed [P]-I

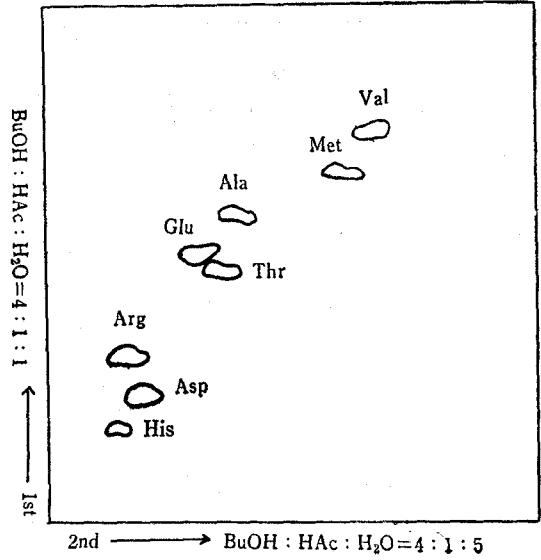


Fig. 6-2 [P]-II

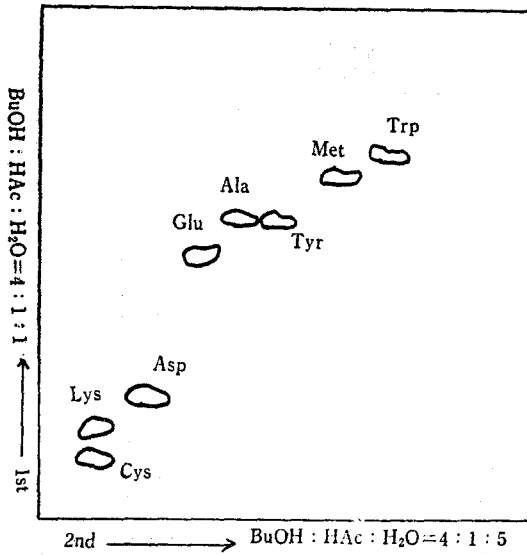


Fig. 6-3 [P]-III

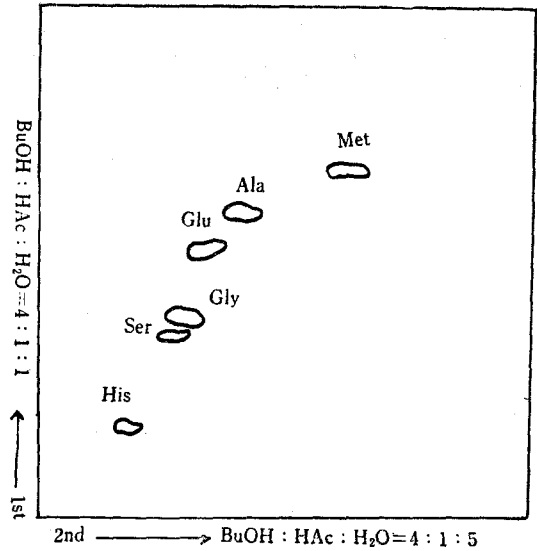


Fig. 6-4 [P]-IV

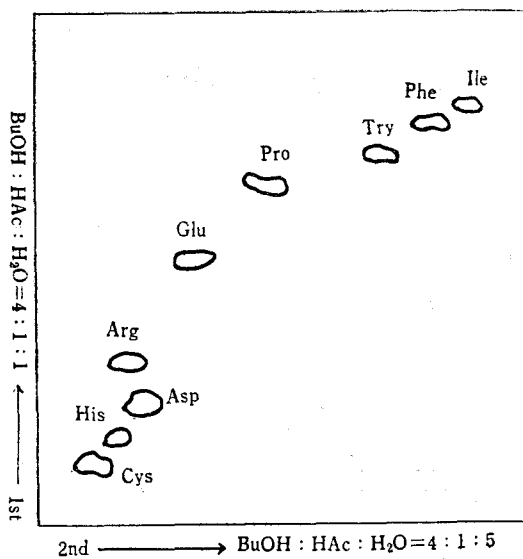


Fig. 6-5 [P]-V

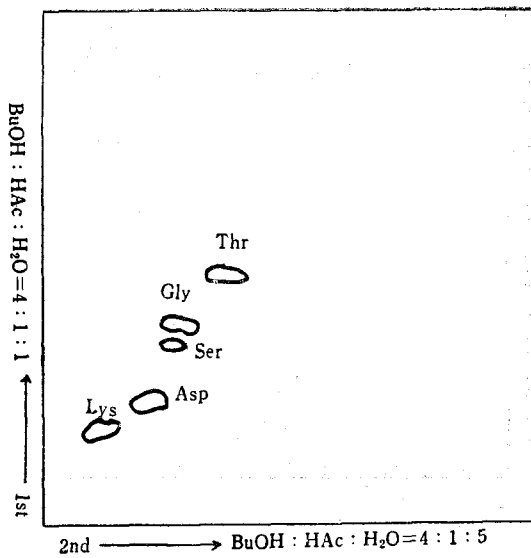


Fig. 6-6 [P]-VI

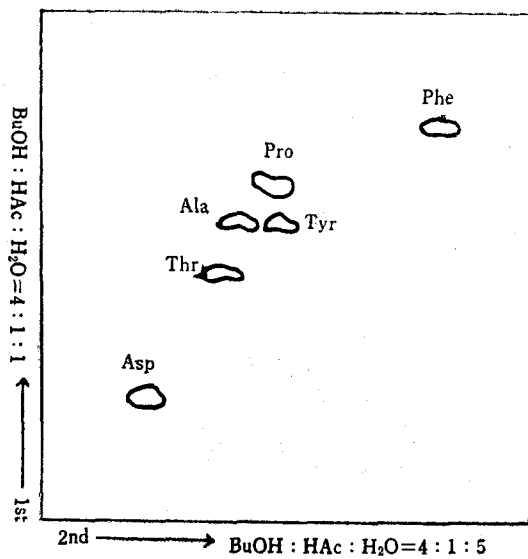


Fig. 6-7 [P]-VII

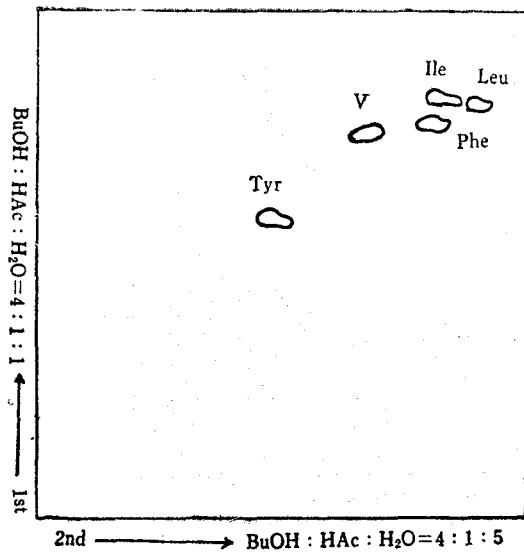


Fig. 6-8 [P]-VIII

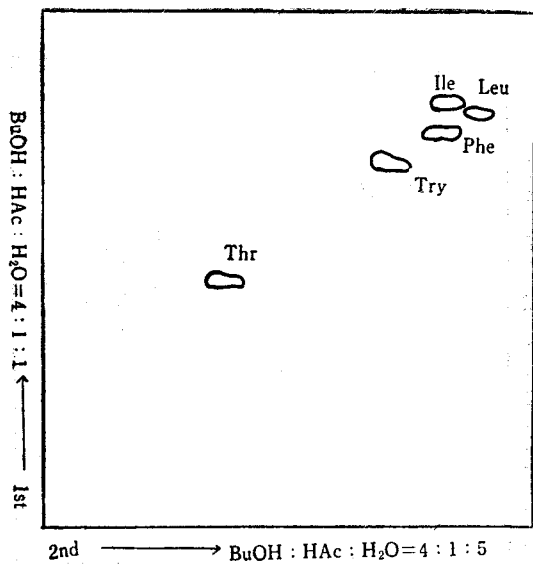


Fig. 6-9 [P]-IX

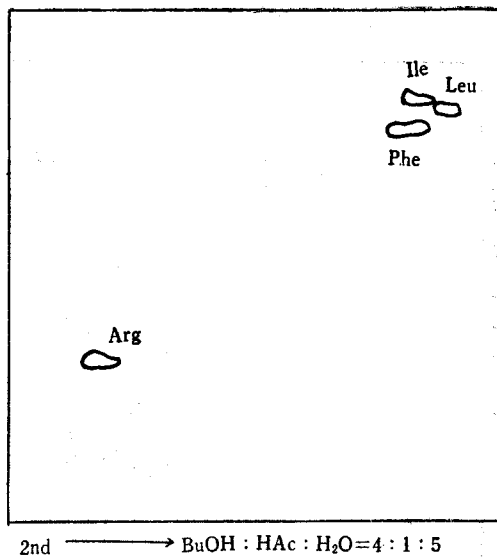


Fig. 6-10 [P]-X

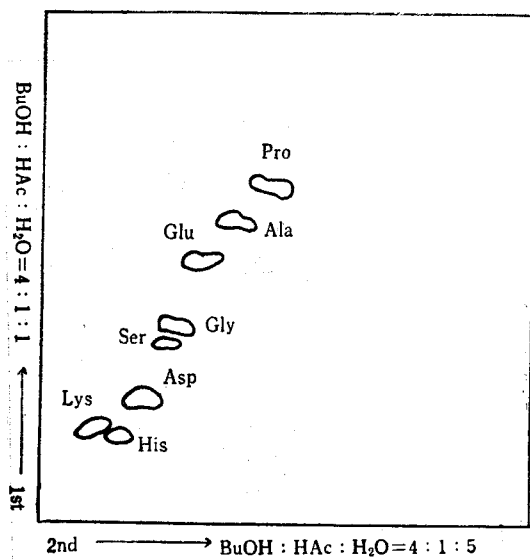


Fig. 6-11 [P]-XI

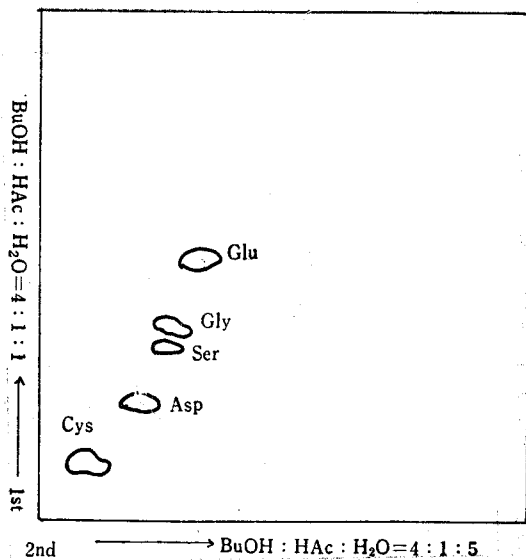


Fig. 6-12 [P]-XII

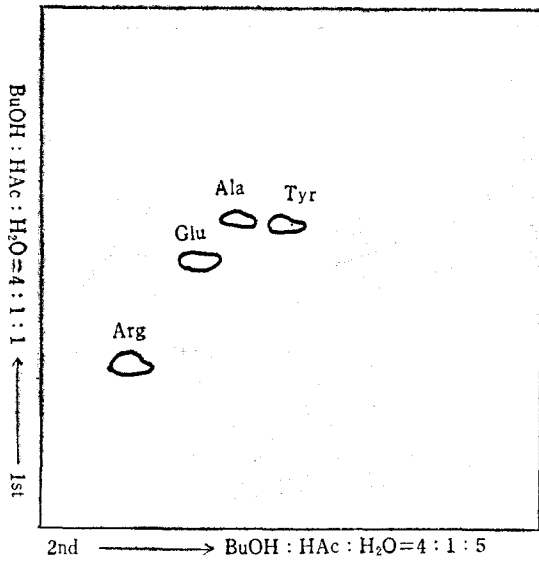


Fig. 6-13 [P]-XIII

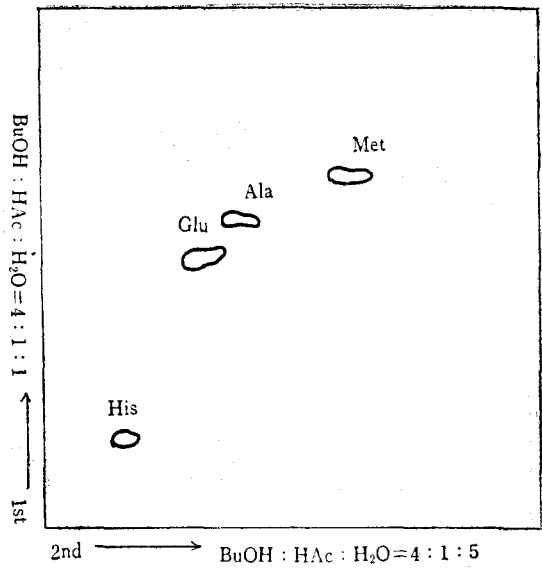


Fig. 6-14 [P]-XIV

Table 6. Amino acid including overlapped free amino acids

Peptide No. / Amino-acid	Peptide No.													
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Cystine	+		+		+							+		
Lysine	+		+			+					+			
Histidine	+	+		+	+						+			+
Aspartic acid	+	+	+		+	+	+				+	+		
Arginine		+			+					+			+	
Serine				+		+					+	+		
Glycine				+		+					+	+		
Glutamic acid	+	+	+	+	+						+	+	+	+
Threonine		+				+	+		+					
Alanine	+	+	+	+			+				+		+	+
Proline	+				+		+				+			
Tyrosine			+				+	+					+	
Methionine		+	+	+										+
Tryptophan	+		+		+				+					
Valine	+	+						+						
Phenylalanine					+		+	+	+	+				
Leucine								+	+	+				
Isoleucine	+				+			+	+	+				

4) 各 peptide 에 overlap 된 遊離아미노酸의 同定: overlap 된 遊離아미노酸을 包含한 各 peptide 의 抽出液을 DNFB 로 dinitrophenylation 시킨 다음 TLC 로 展開發色시켜 나타나는 DNP-amino acid 의 thin layer chromatogram 를 standard DNP-amino acid 와 對照하여 各 peptide 에 overlap 된 遊離아미노酸을 同定한 것은 Fig.7-1~Fig.7-14

와 같다. Fig.7-1~Fig.7-14 에서 各 peptide 別로 yellow spot 가 1 個인 것은 overlap 된 遊離아미노酸이 없고, 2 個以上일 때는 1 個 以上의 overlap 된 遊離아미노酸이 있게 되므로 이것들을 綜合한 結果는 Table.7 과 같이 된다. 이 結果에 依하면 Table.3 및 Fig.5-1~Fig.5-14 의 結果와도 一致된다.

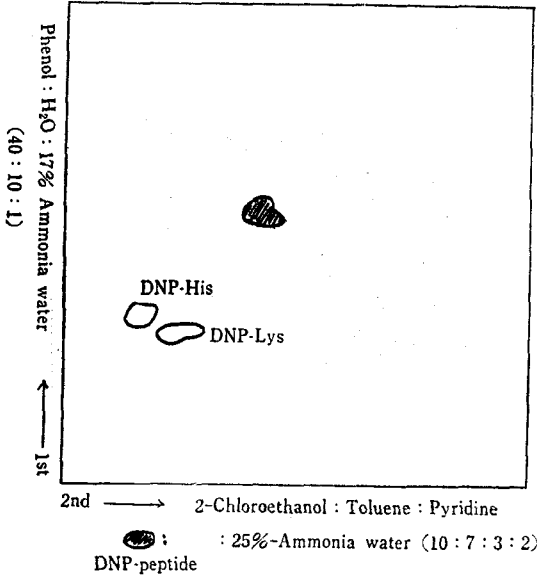


Fig. 7-1 Thin layer chromatogram of free amino acids overlapping DNP-peptide, [P]-I

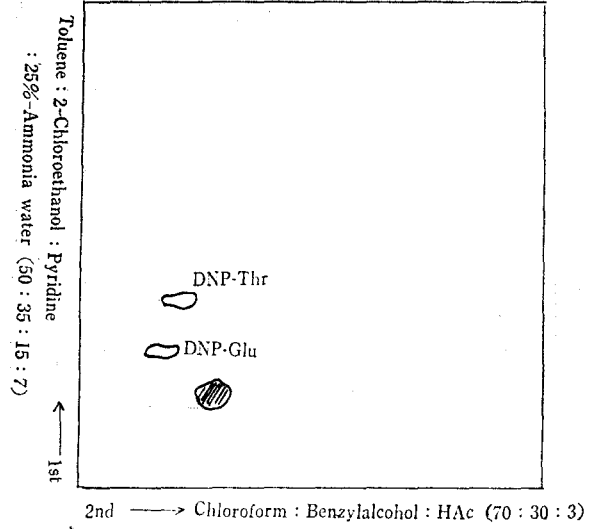


Fig. 7-2 Thin layer chromatogram of free amino acids overlapping DNP-peptide, [P]-II

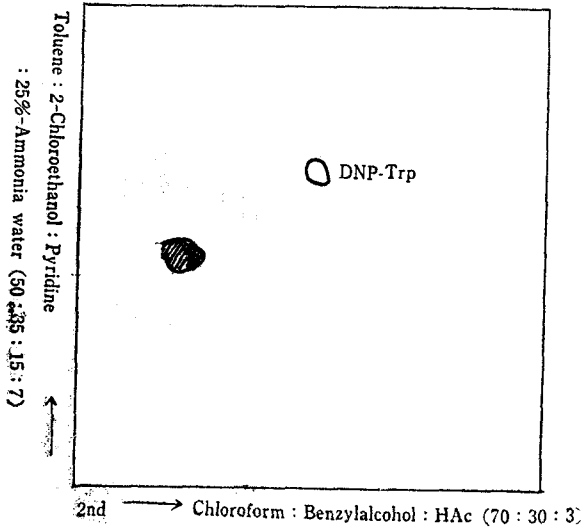


Fig. 7-3 Thin layer chromatogram of free amino acids overlapping DNP-peptide, [P]-III

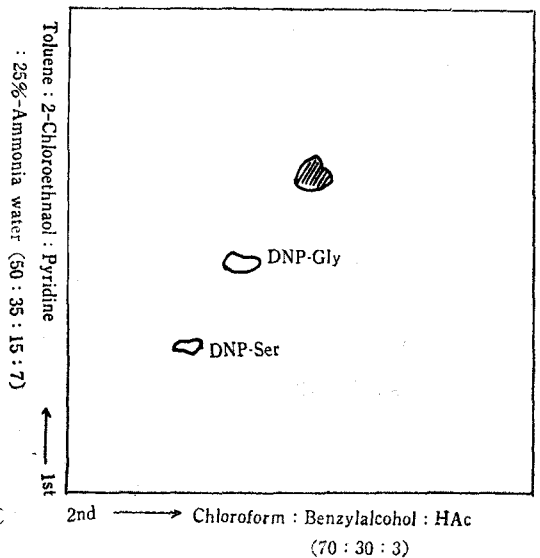


Fig. 7-4 Thin layer chromatogram of free amino acids overlapping DNP-peptide, [P]-IV

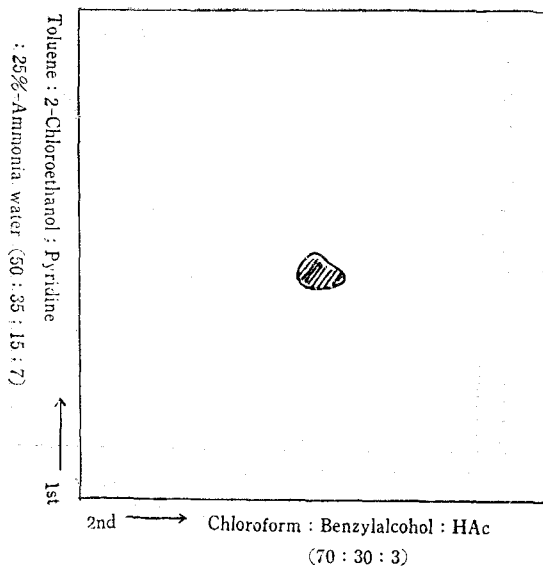


Fig. 7-5 Thin layer chromatogram for free amino acids overlapping DNP-peptide, [P]-V

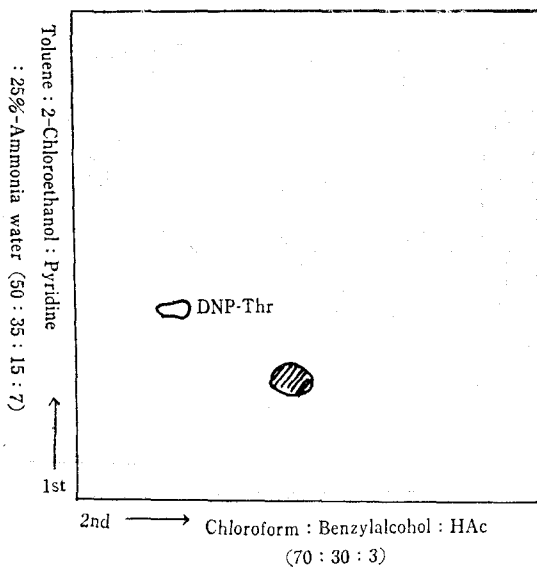


Fig. 7-6 Thin layer chromatogram of free amino acids overlapping DNP-peptide, [P]-VI

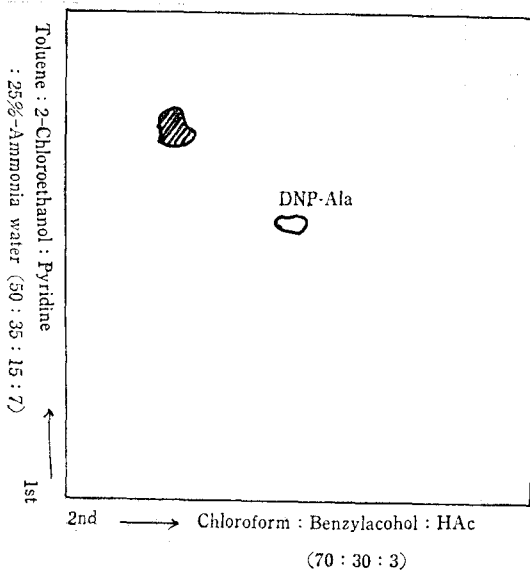


Fig. 7-7 Thin layer chromatogram of free amino acids overlapping DNP-peptide, [P]-VII

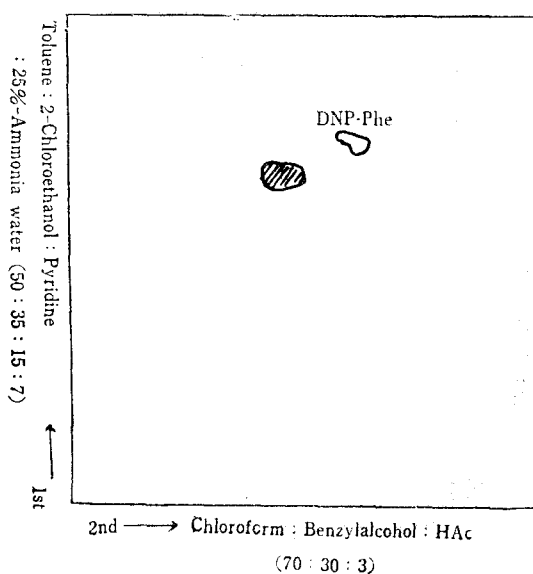


Fig. 7-8 Thin layer chromatogram of free amino acids overlapping DNP-peptide, [P]-VIII

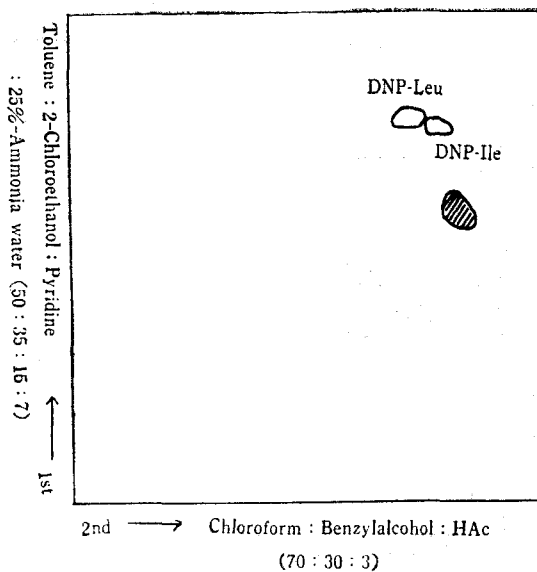


Fig. 7-9 Thin layer chromatogram of free amino acids overlapping DNP-peptide, [P]-IX

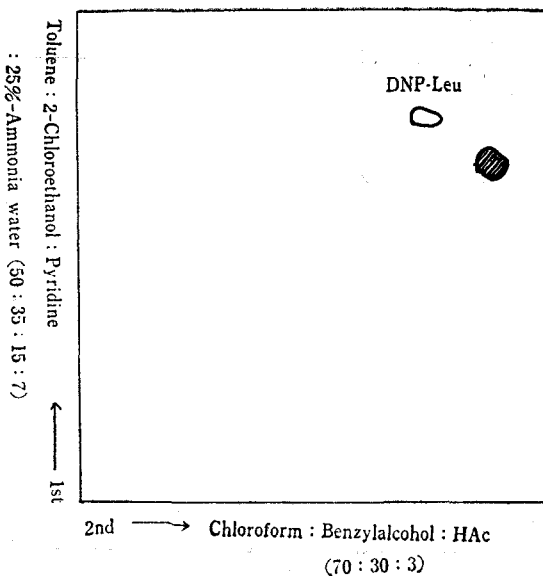


Fig. 7-10 Thin layer chromatogram of free amino acids overlapping DNP-peptide, [P]-X

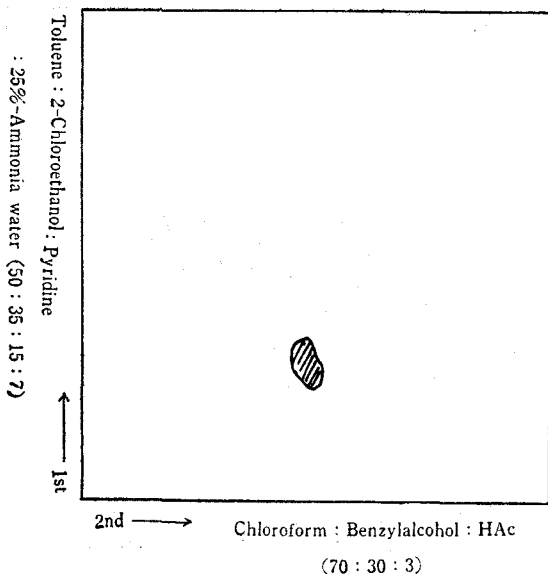


Fig. 7-11 Thin layer chromatogram of free amino acids overlapping DNP-peptide, [P]-XI

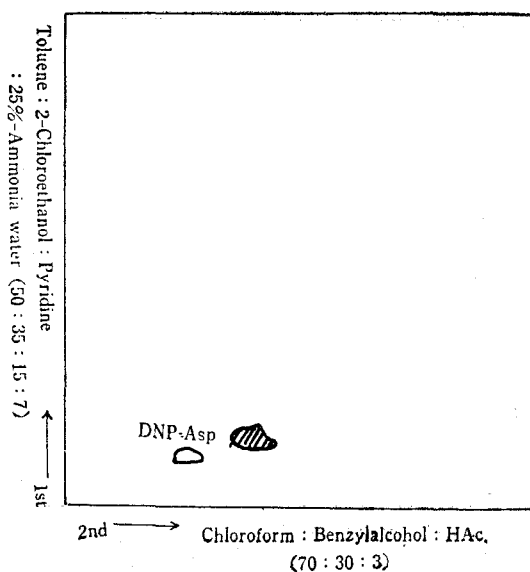


Fig. 7-12 Thin layer chromatogram of free amino acids overlapping DNP-peptide, [P]-X

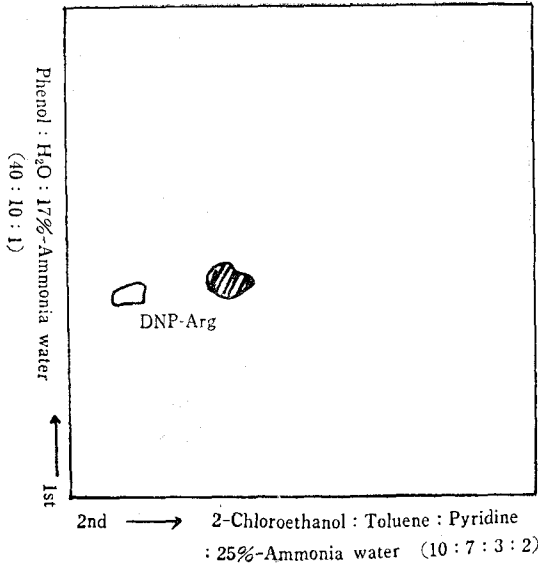


Fig. 7-13 Thin layer chromatogram of free amino acids overlapping DNP-peptide, [P]-III

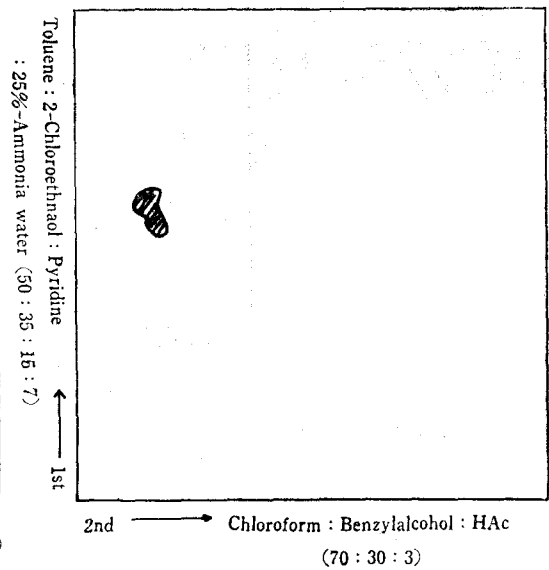


Fig. 7-14 Thin layer chromatogram of free amino acids overlapping DNP-peptide, [P]-XIV

Table. 7. Free amino acids overlapping peptide

Peptide No.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Overlapping amino acid	Lys His	Glu Thr	Trp	Gly Ser	—	Thr	Ala	Phe	Ile Leu	Leu	—	Asp	Arg	—

5) 各 peptide 의 N-terminal amino acid residue 의 同定 : overlap 된 遊離아미노酸을 包含한 各 peptide 의 抽出液을 dinitrophenylation 시킨 다음 HCl 로 加水分解시킨 것을 TLC plate 에 展開乾燥 시켰다. 各 peptide 에 overlap 된 遊離아미노酸의 DNP-amino acid 와 N-terminal amino acid residue 의 DNP-amino acid 의 yellow spot 를 standard chromatogram 와 對照하여 overlap 된 遊離아미노酸과 N-terminal amino acid residue 를 確認한 것

은 Fig. 8-1~Fig. 8-14 와 같다. 그리고 이것들 中에서 Table 7의 各 peptide 別로 overlap 된 遊離아미노酸을 除外한 나머지 DNP-amino acid 를 各 peptide 의 N-terminal amino acid residue 로 同定하였다. 이때에 Fig. 8-8 에서 生成된 DNP-amino acid 의 yellow spot 는 하나이며 Fig. 7-8 에서 overlap 된 遊離아미노酸으로 同定된 yellow spot 의 數도 하나이므로 Fig. 7-8 에 比하여 그 色調가 強하고 넓이가 큰 것으로 보아서 overlap 된 遊離

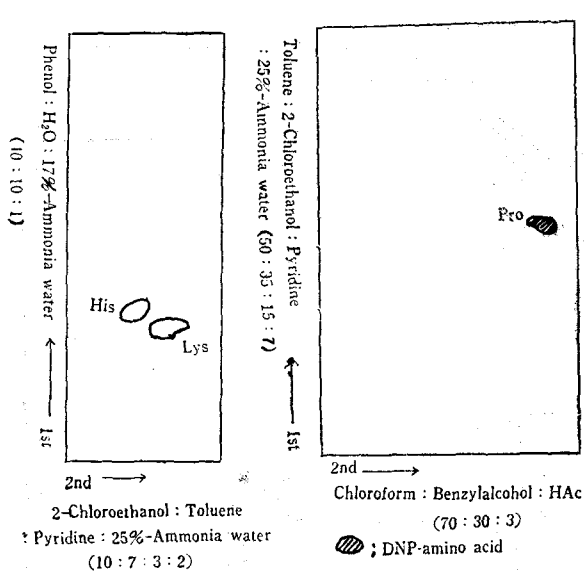


Fig. 8-1 Thin layer chromatogram of N-terminal DNP-amino acid of peptide, [P]-I

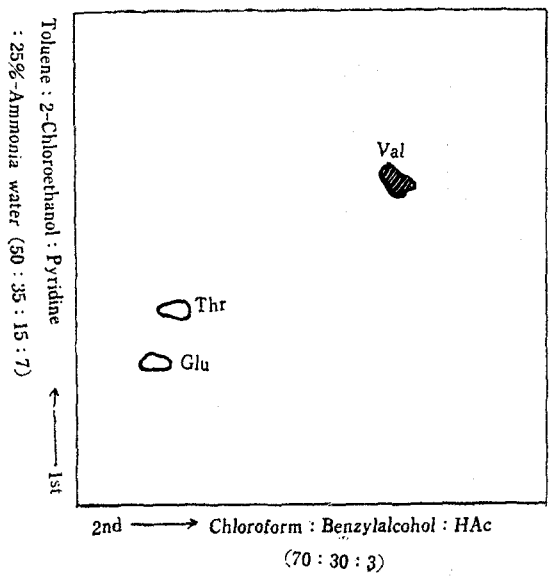


Fig. 8-2 Thin layer chromatogram of N-terminal amino acid of peptide, [P]-II

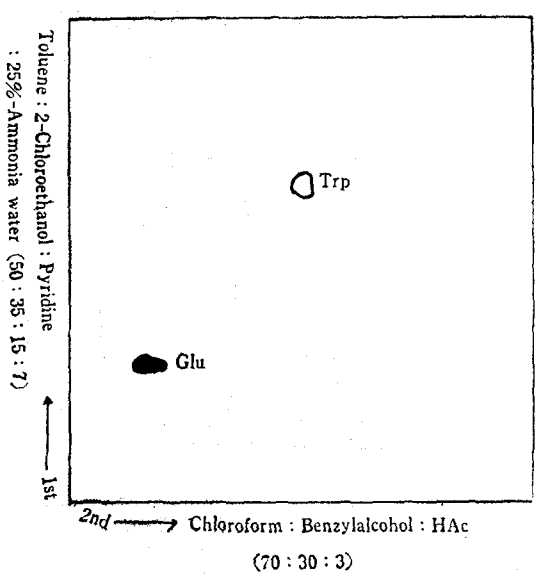


Fig. 8-3 Thin layer chromatogram of N-terminal amino acid of peptide, [P]-III

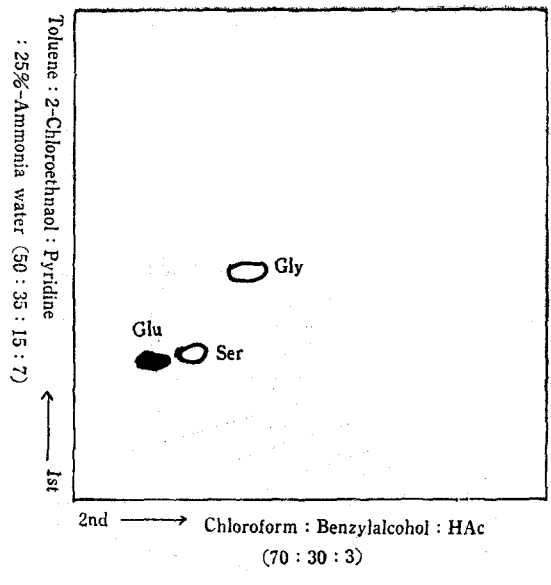


Fig. 8-4 Thin layer chromatogram of N-terminal DNP-amino acid of peptide, [P]-IV

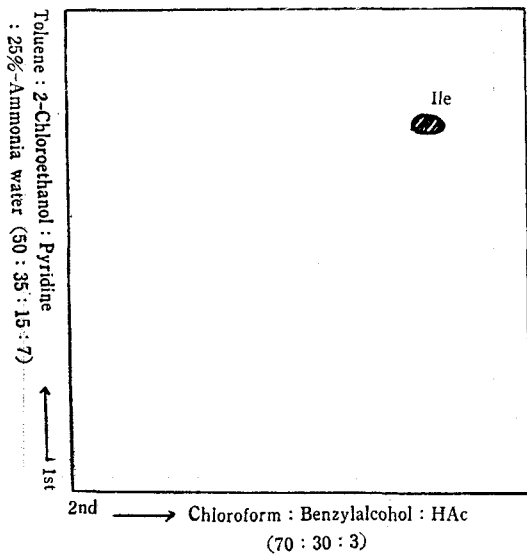


Fig. 8-5 Thin layer chromatogram of N-terminal DNP-amino acid of peptide, [P]-V

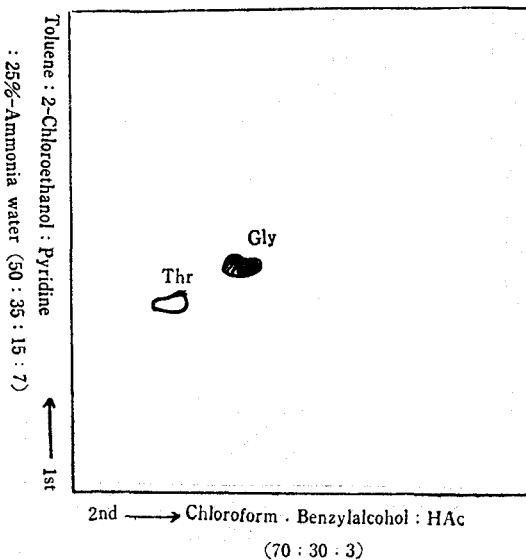


Fig. 8-6 Thin layer chromatogram of N-terminal amino acid of peptide, [P]-VI

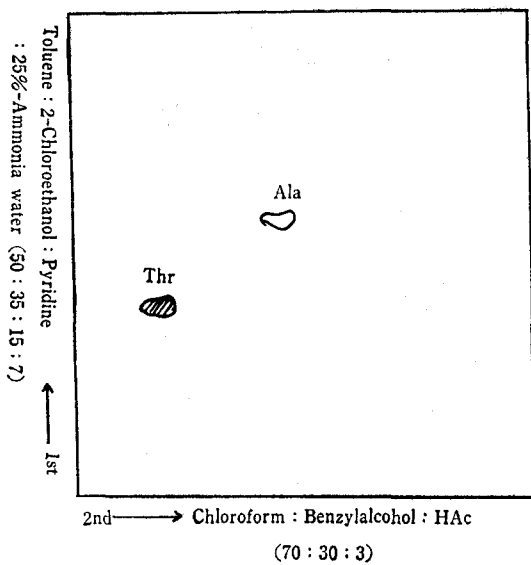


Fig. 8-7 Thin layer Chromatogram of N-terminal DNP-amino acid of peptide, [P]-VII

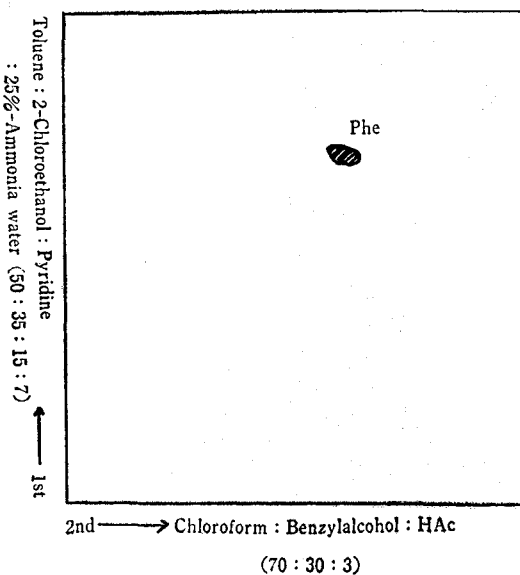


Fig. 8-8 Thin layer chromatogram of N-terminal amino acid of peptide, [P]-VIII

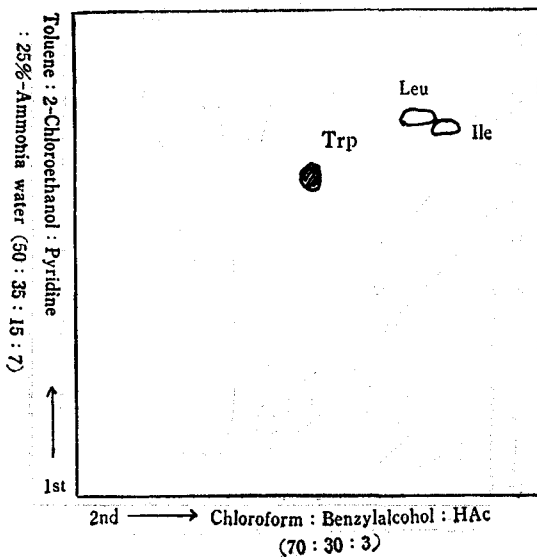


Fig. 8-9 Thin layer chromatogram of N-terminal amino acid of peptide, [P]-IX

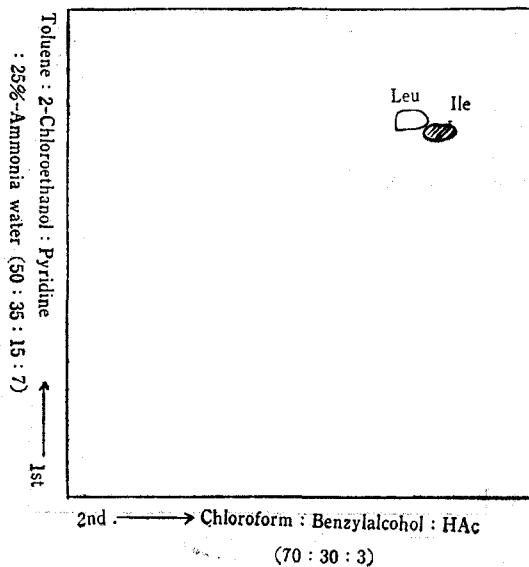


Fig. 8-10 Thin layer chromatogram of N-terminal amino acid of peptide, [P]-X

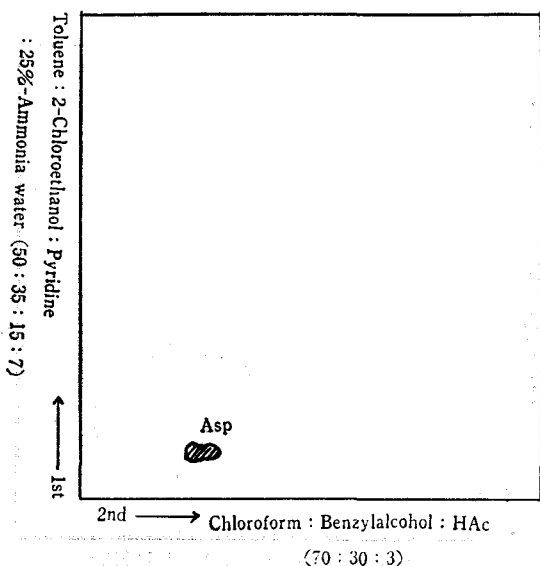


Fig. 8-11 Thin layer chromatogram of N-terminal DNP-amino acid of peptide, [P]-XI

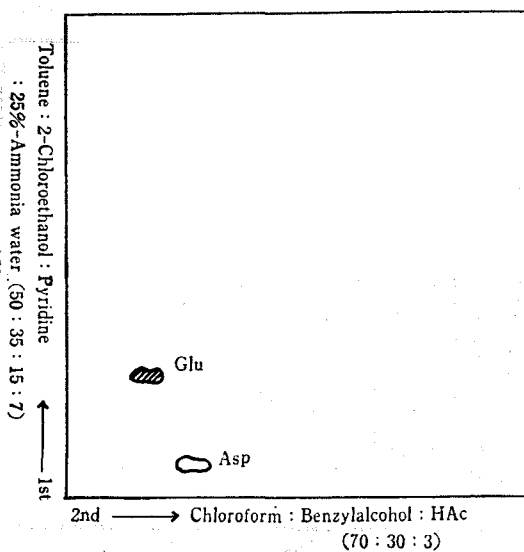


Fig. 8-12 Thin layer chromatogram of N-terminal DNP-amino acid of peptide, [P]-XII

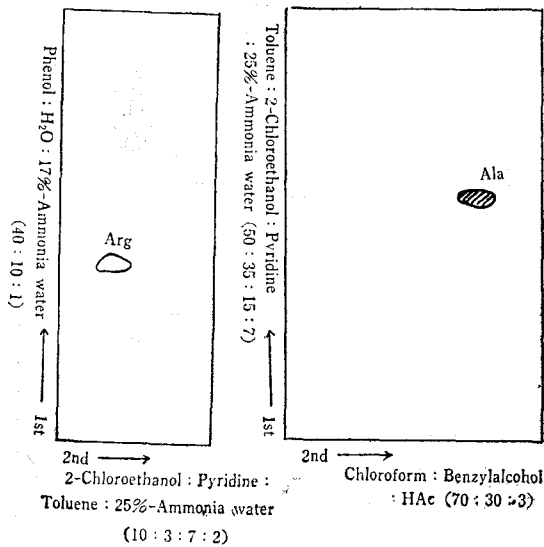


Fig. 8-13 Thin layer chromatogram of N-terminal DNP-amino acid of peptide, [P]-XIII

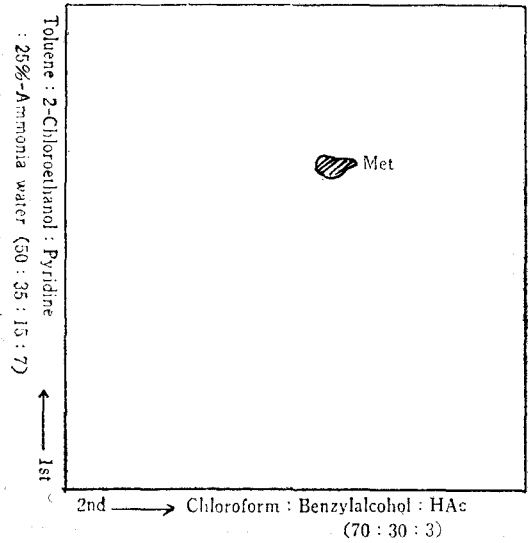


Fig. 8-14 Thin layer chromatogram of N-terminal DNP-amino acid of peptide, [P]-XIV

아미노산의 DNP-amino acid의 yellow spot와 N-terminal amino acid residue의 DNP-amino acid의 그것과重複된 것으로認定하여 overlap된遊離아미노산과同一種의 아미노산을 N-terminal

amino acid residue로 同定하였다. 이것들의各 peptide의 N-terminal amino acid residue를綜合한 것은 Table. 8과 같다.

Table. 8 N-terminal amino acid residues of each peptide

Peptide No.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Identified	Pro	val	Glu	Glu	Ile	Gly	Thr	Phe	Trp	Ile	Asp	Glu	Ala	Met
Amino-acids	Lys	Glu	Trp	Gly	—	Thr	Ala	Phe	Ile	Leu	—	Asp	Arg	—
Overlapped amino acids	Lys	Glu	Trp	Gly	—	Thr	Ala	Phe	Ile	Leu	—	Asp	Arg	—
N-terminal amino-acid	Pro	Val	Glu	Glu	Ile	Gly	Thr	Phe	Trp	Ile	Asp	Glu	Ala	Met

6) 各 peptide의 構成 아미노산同定: 各 peptide 構成아미노산 同定用試料를 dinitrophenylation 시킨 다음에 이것을 HCl로 加水分解하여 PC用 filter paper에 展開發色시켜 standard amino acid와 對照하여 確認된 paper chromatogram은 Fig. 9-1~Fig. 9-14와 같다. Fig. 9-1~Fig. 9-14의

peptide 構成아미노산 paper chromatogram 中에는 各 N-terminal amino acid residue가 DNP-amino acid로 되어 除外된 것이므로 各 peptide의 全構成아미노산으로서는 이것을 合쳐야 되므로 이것들을 綜合하여 各 peptide의 全構成아미노산으로 同定한 結果는 Table. 9과 같다.

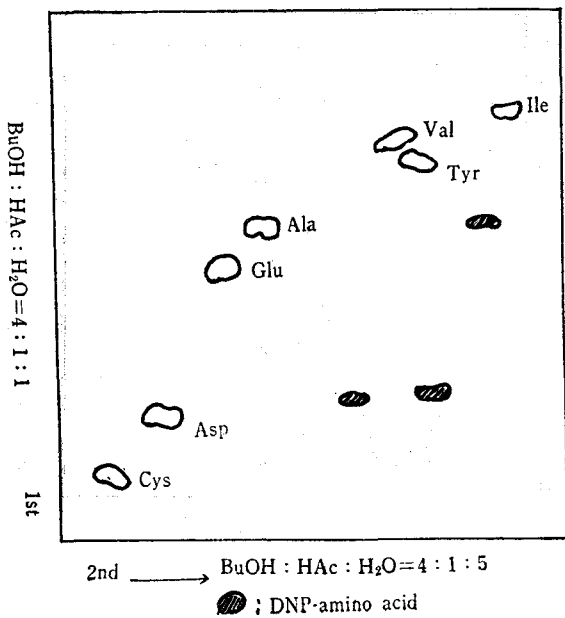


Fig. 9-1 Amino acid pattern of peptide No. I

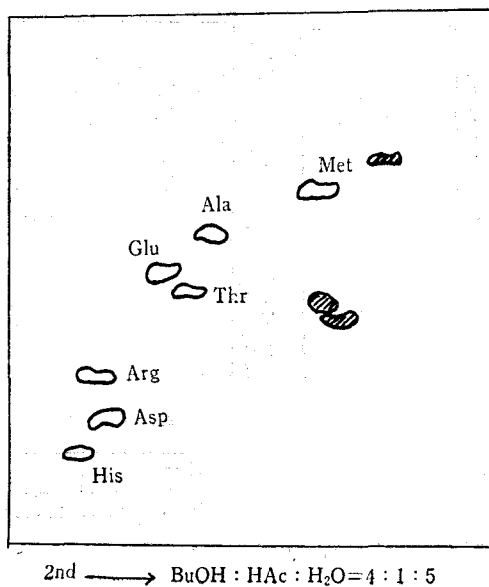


Fig. 9-2 Amino acid pattern of peptide No. II

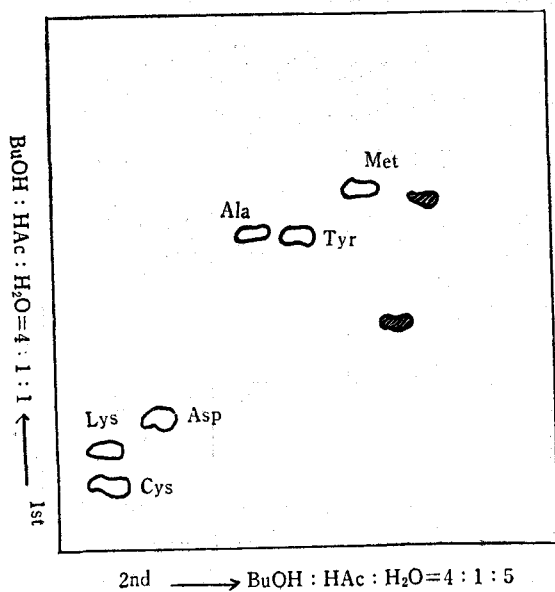


Fig. 9-3 Amino acid pattern of peptide No. III

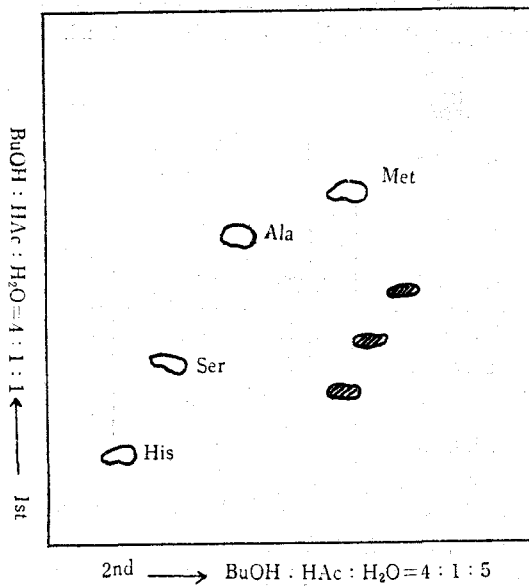


Fig. 9-4 Amino acid pattern of peptide No. VI

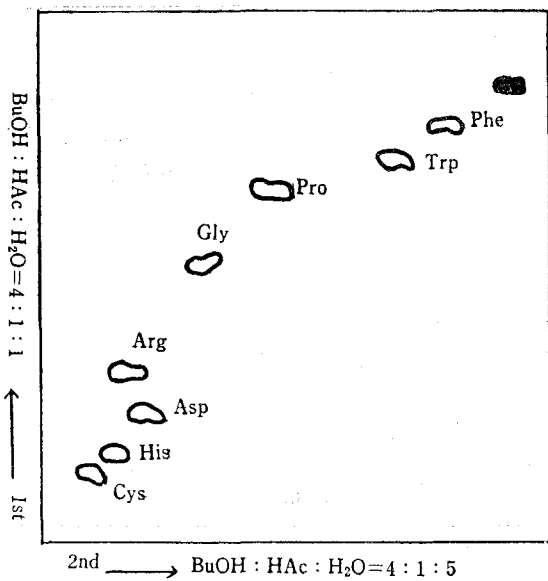


Fig. 9-5 Amino acid pattern of peptide No.V

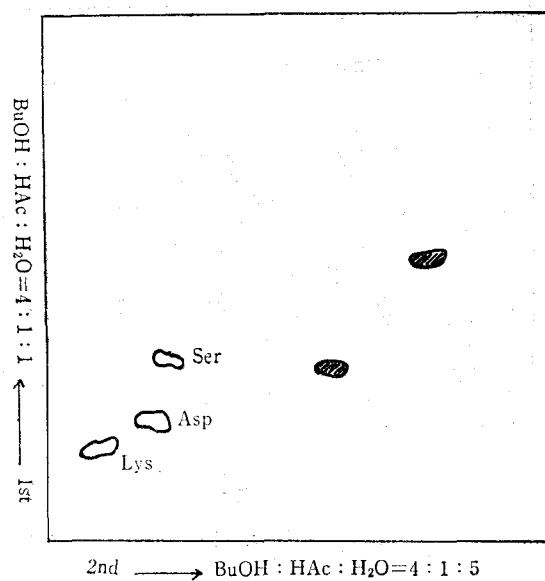


Fig. 9-6 Amino acid pattern of peptide No.VI

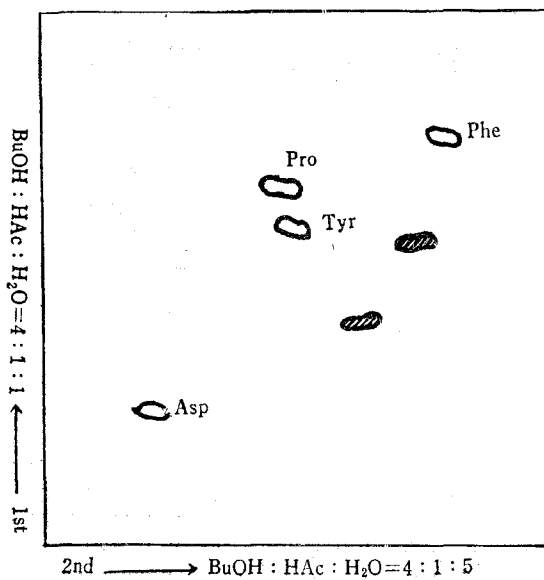


Fig. 9-7 Amino acid pattern of peptide No.VII

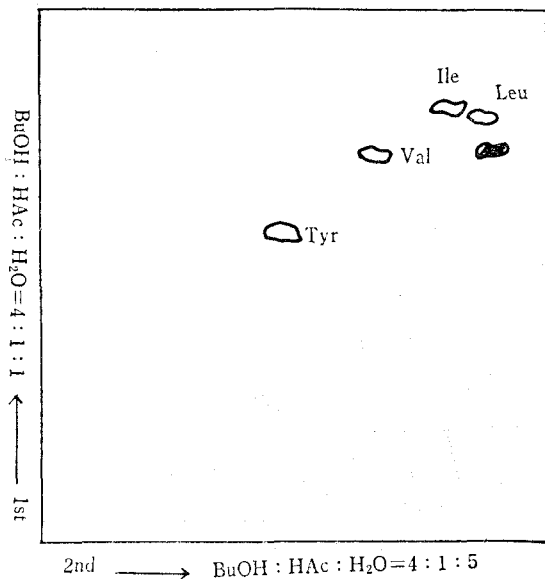


Fig. 9-8 Amino acid pattern of peptide No.VIII

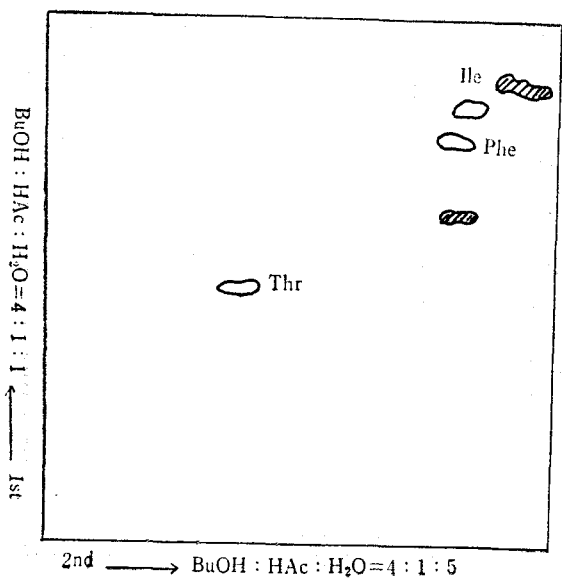


Fig. 9-9 Amino acid pattern of peptide No. IX

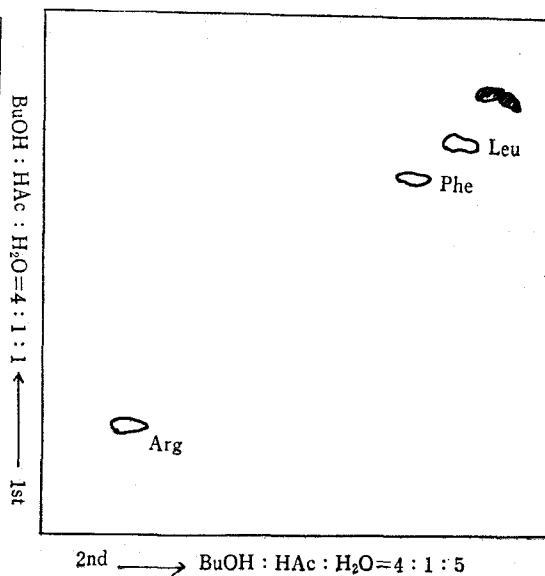


Fig. 9-10 Amino acid pattern of peptide No. X

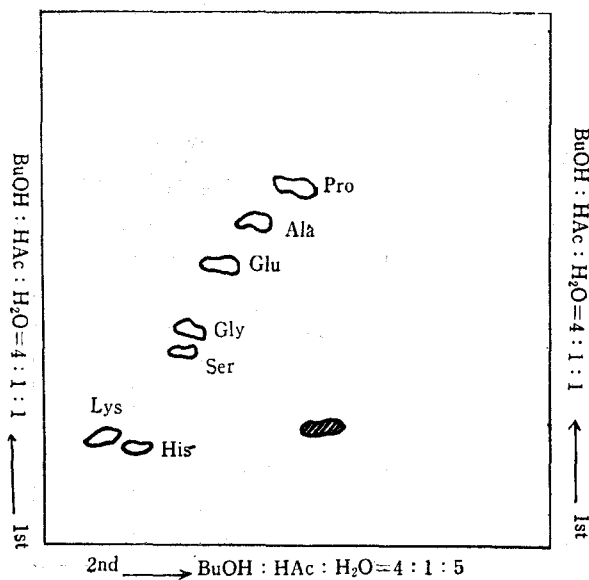


Fig. 9-11 Amino acid pattern of peptide No. XI

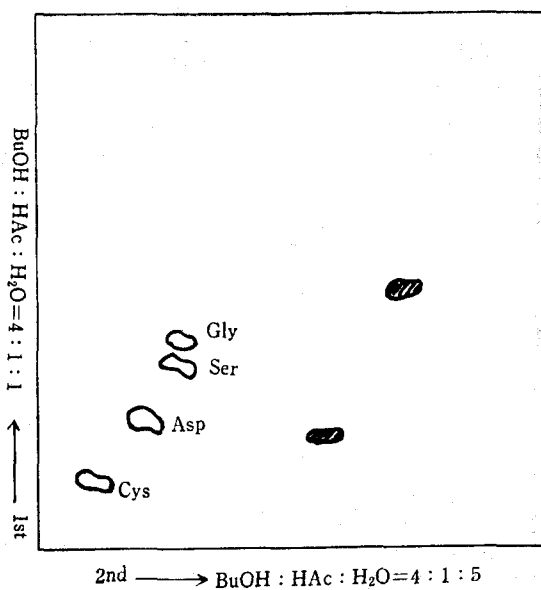
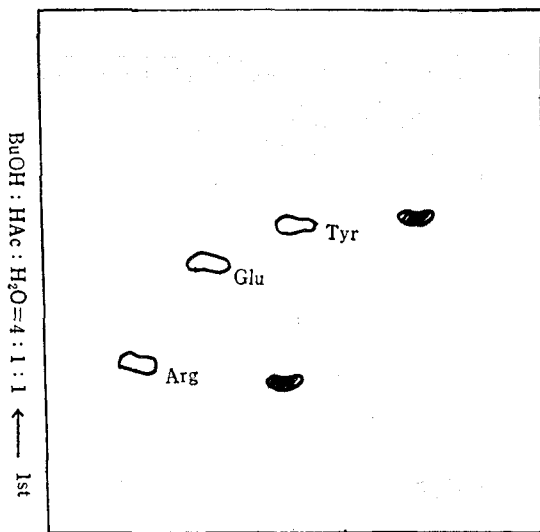
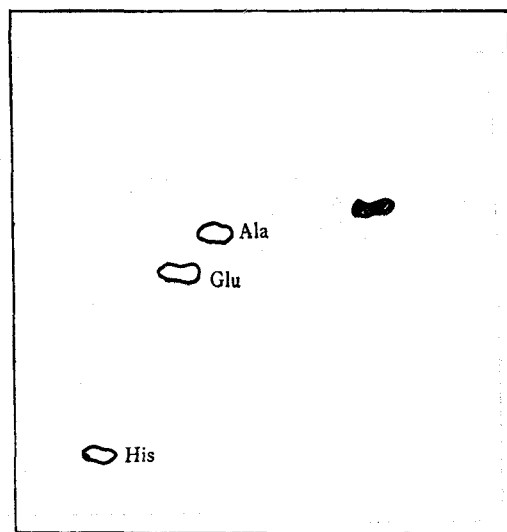


Fig. 9-12 Amino acid pattern of peptide No. XII



2nd → BuOH : HAc : H₂O = 4 : 1 : 5



2nd → BuOH : HAc : H₂O = 4 : 1 : 5

Fig. 9-13 Amino acid pattern of peptide No. XIII

Fig. 9-14 Amino acid pattern of peptide No. XIV

Table 9. Amino acid patterns of peptides

Peptide No.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Cystine	+		+		+							+		
Lysine			+			+					+			
Histidine		+		+	+						+			+
Aspartic acid	+	+	+		+	+	+				+	+		
Arginine		+			+					+			+	
Serine				+		+					+	+		
Glycine					+	+					+	+		
Glutamic acid	+	+	+	+							+	+	+	+
Threonine		+					+		+					
Alanine	+	+	+	+							+		+	+
Proline	+				+		+				+			
Tyrosine			+				+	+					+	
Methionine		+	+	+										+
Tryptophan	+				+				+					
Valine	+	+						+						
Phenylalanine					+		+	+	+	+				
Leucine								+		+				
Isoleucine	+				+			+	+	+				

7) C-terminal amino acid residue의 同定 :
 各 peptide 別로 抽出한 供試液을 hydrazine 을 使用하여 hydrazinolysis 를 이 르 키 고, 이 것 에 benza-
 ldehyde 를 加하여 冷 却 시 키 면 서 C-terminal amino

acid residue 以外의 amino radical 을 全 部 不 溶 性
 物 質 로 沈 澱 시 킨 다음 水 溶 層 만 을 取 하 여 Sanger
 F. 法 으 로 dinitrophenylation 시 켜 TLC 로 展 開 分
 離 하 여 standard DNP-amino acid 와 Table 7 의

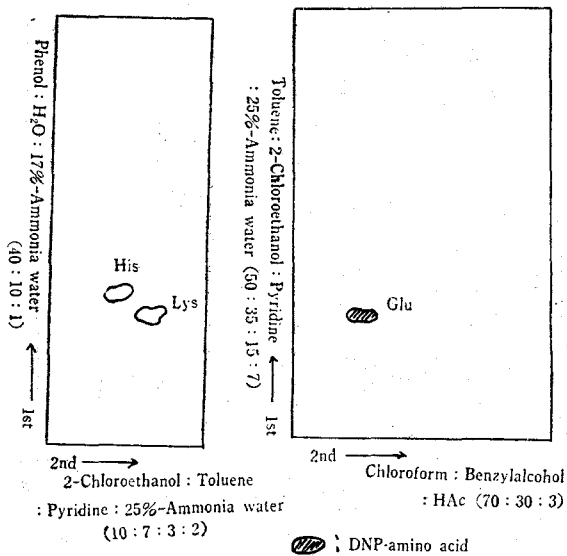


Fig. 10-1 Thin layer chromatogram of C-terminal amino acid of peptide No. I

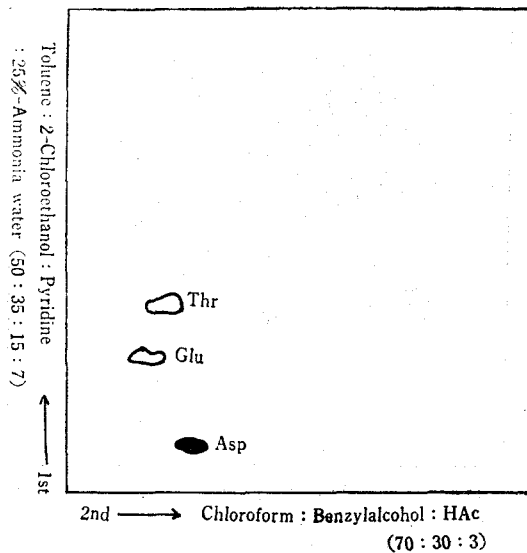


Fig. 10-2 Thin layer chromatogram of C-terminal amino acid of peptide No. II

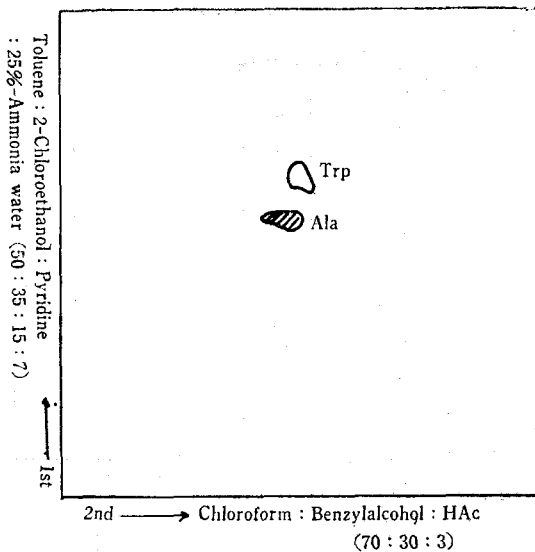


Fig. 10-3 Thin layer chromatogram of C-terminal amino acid of peptide No. III

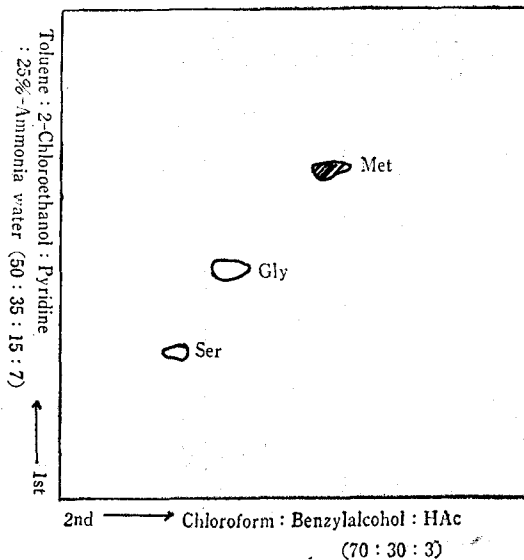


Fig. 10-4 Thin layer chromatogram of C-terminal amino acid of peptide No. IV

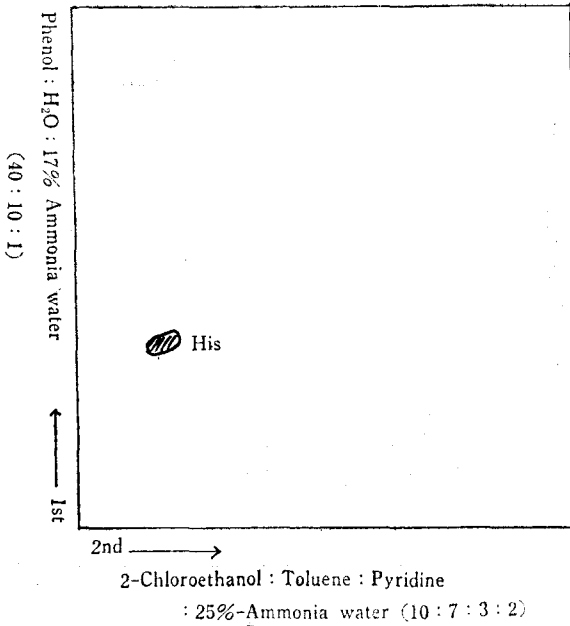


Fig. 10-5 Thin layer chromatogram of C-terminal amino acid of peptide No.V

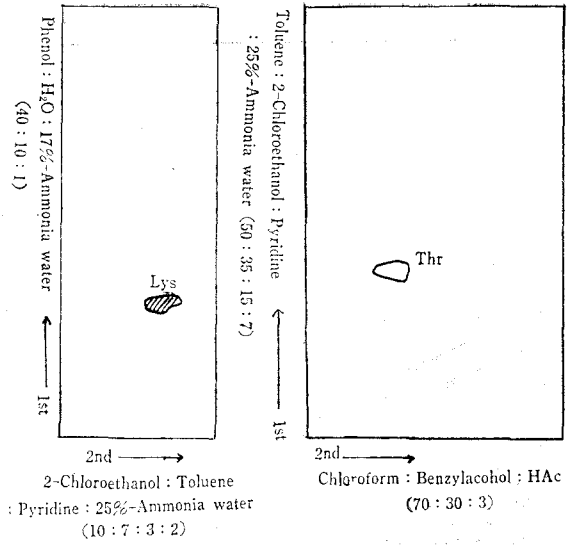


Fig. 10-6 Thin layer chromatogram of C-terminal amino acid of peptide No.VI

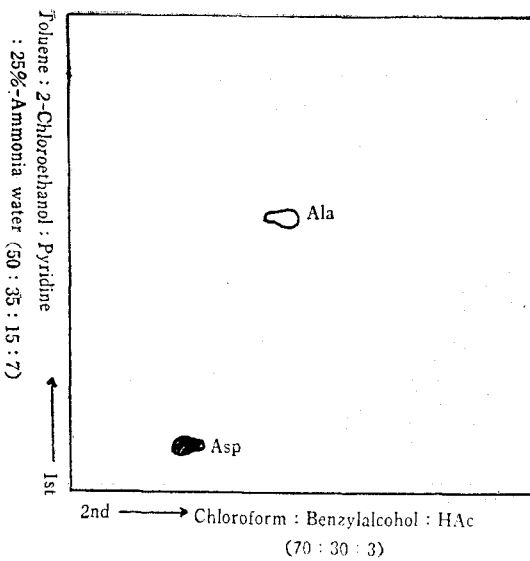


Fig. 10-7 Thin layer chromatogram of C-terminal amino acid of peptide No.VII

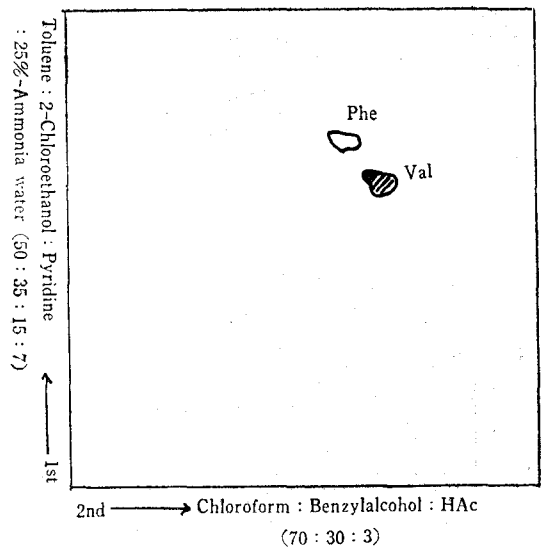


Fig. 10-8 Thin layer chromatogram of C-terminal amino acid of peptide No.VIII

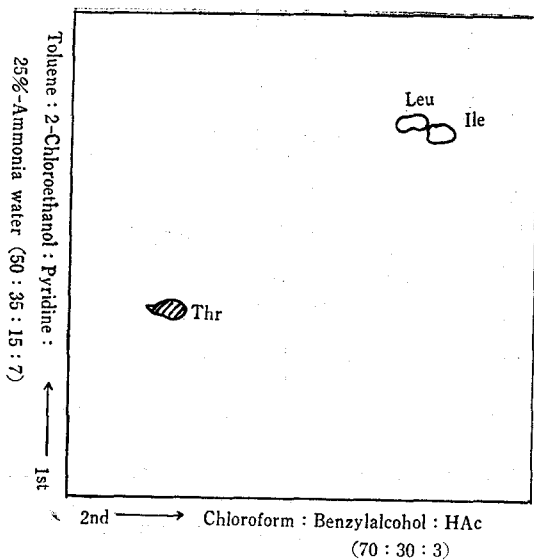


Fig. 10-9 Thin layer chromatogram of C-terminal amino acid of peptide No.IX

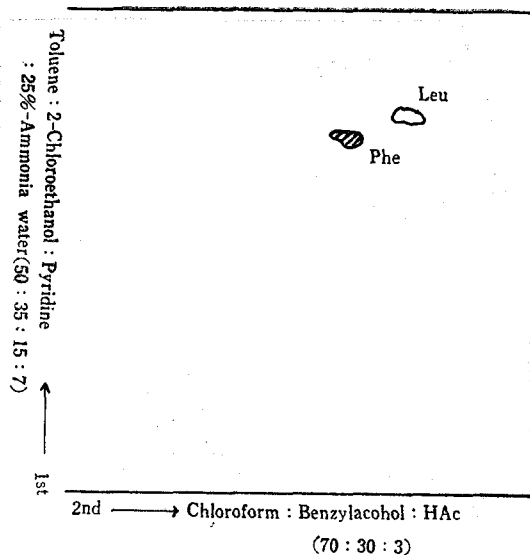


Fig. 10-10 Thin layer chromatogram of C-terminal amino acid of peptide No.X

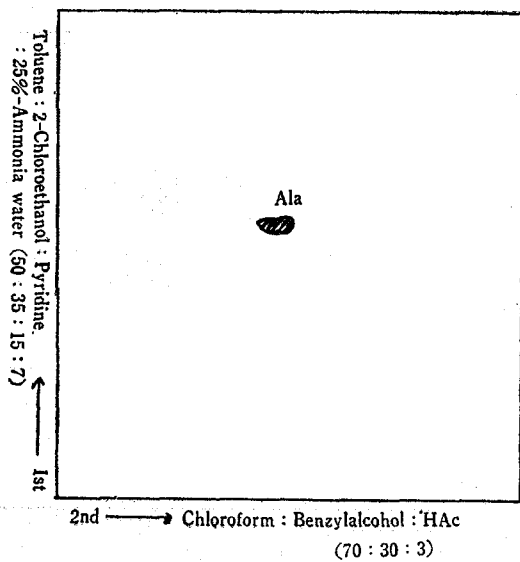


Fig. 10-11 Thin layer chromatogram of C-terminal amino acid of peptide No.XI

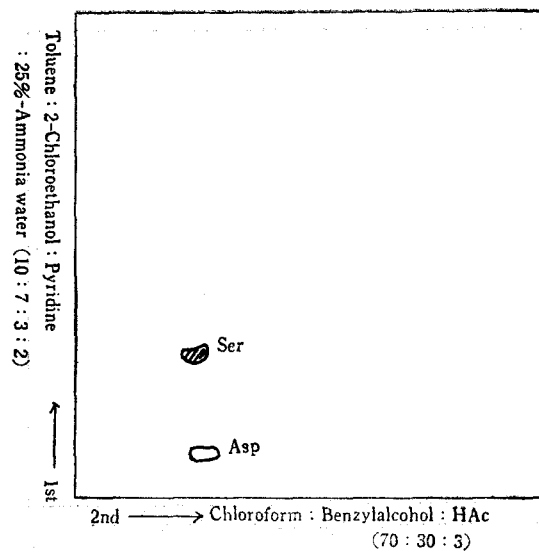


Fig. 10-12 Thin layer chromatogram of C-terminal amino acid of peptide No.XII

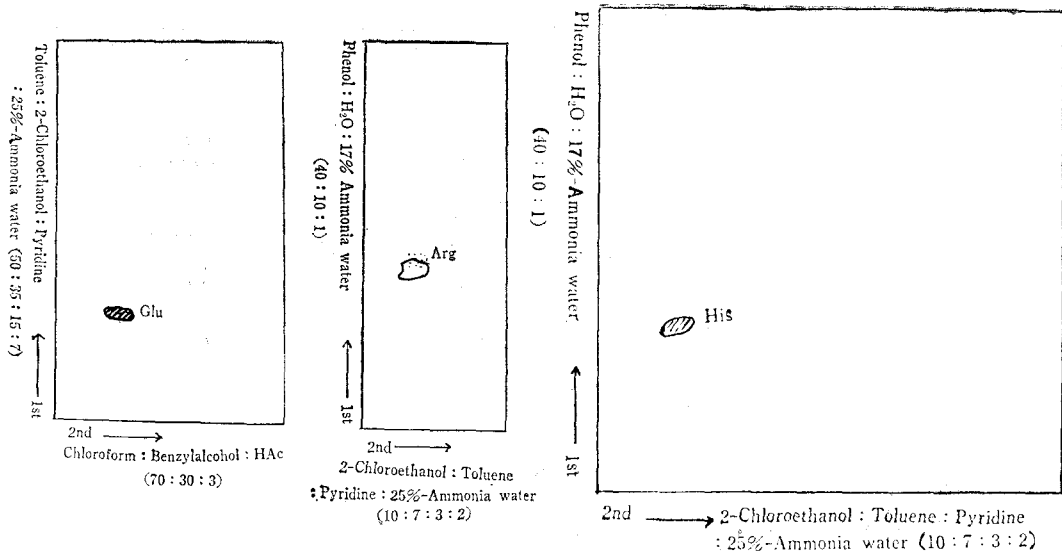


Fig. 10-13 Thin layer chromatogram of C-terminal amino acid of peptide No.XIII

Fig. 10-14 Thin layer chromatogram of C-terminal amino acid of peptide No.XIV

overlap 된 아미노산등을 比較檢討하여 C-terminal amino acid residue 를 同定한 結果는 Fig.10-1~ Fig.10-14 와 같다. 이 結果에서 元來 overlap 된 유리아미노산이 없는 [P]-V, [P]-XI 및 [P]-XIV 는 各各 1 個의 spot 를, 1 個의 遊離아미노산이 overlap 되었던 [P]-III [P]-VII, [P]-VIII [P]-X, [P]-XII, 및 [P]-XIII 은 各各 2 個의 spot 를 나타냈고, 그리고 2 個의 遊離아미노산이 overlap 되었던 [P]-I, [P]-II, [P]-IV, 및 [P]IX 은 各各 3 個의 yellow spot 를 나타내고 있어, 앞의 여러 實驗結果와 잘 一致된다. 따라서 各 peptide 에서

나타나는 yellow spot 가 1 個인 것은 그것이 바로 C-terminal amino acid residue 이고 2 個以上の yellow spot 가 나타난 것은, 여기에서 overlap 된 遊離아미노산을 除去하여 C-terminal amino acid residue 를 同定하였고, 이것을 綜合하면 Table 10 과 같이 된다.

以上の 여러가지 實驗結果에서 同定된 N-terminal amino acid residue C-terminal amino acid residue 및 構成아미노산에서 얻어지는 各 peptide 의 amino acid composition 과 C and N-terminal amino acid residue 를 Brand E. & Edsall J.T.⁵⁵⁾ 法으로 表示

Table 10. C-terminal amino acid residue of each peptide

Peptide No.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Identified amino acid	His Lys Glu	Glu Thr Asp	Trp Ala	Gly Ser Met	— His	Thr Lys	Ala Asp	Phe Val	Ile Leu Thr	Leu Phe	— Ala	Asp Ser	Arg Glu	— His
Overlapped amino acids	His Lys	Glu Thr	Trp Ala	Gly Ser	—	Thr	Ala	Phe	Ile Leu	Leu	—	Asp	Arg	—
C-terminal amino acid	Glu	Asp	Ala	Met	His	Lys	Asp	Val	Thr	Phe	Ala	Ser	Glu	His

하면 Table 11 과 같다. 本實驗方法에서 C-terminal amino acid residue 와 各 peptide 의 構成아미노酸의 種類가 같을 때는 確實한 郡別이 되지 않아 問題點으로 남아있기는 하나, 이 結果에 依하면 淸國醬메주 醱酵過程中에는 dipeptide 나 tripeptide 는 생기지 않고 4 個以上の 아미노酸으로 構成된 比

較的 큰 peptide 만이 分離되었다. 또 分離된 各 peptide 의 C-terminal amino acid 의 種類가 많은 것으로 보아 本實驗에 使用된 *Bacillus Subtilis* K-27 菌株의 crude protease 의 作用 specificity 는 *Aspergillus soya*⁸⁻¹⁰ 나 crystalized pig pepsin, chymotrysin 및 trypsin⁵⁶ 보다도 넓은 specificity

Table 11 Amino acids composition and C and N-terminal residues of peptides.

Peptide No.	Amino acid pattern	
I	Pro. (Cys Ala Asp Trp Ile Val)	Glu
II	Val. (Arg His Ala Glu Thr Met)	Asp
III	Glu. (Cys Lys Asp Met Tyr)	Ala
IV	Glu. (His Ala Ser)	Met
V	Ile. (Cys Asp Trp Arg Pro Phe Gly)	His
VI	Gly. (Asp Ser)	Lys
VII	Thr. Thr (Tyr Pro Phe)	Asp
VIII	Phe. (Tyr Ile Leu)	Val.
IX	Trp. (Phe Ile)	Thr
X	Ile. (Arg Leu)	Phe
XI	Asp. (Gly Ser Lys His Pro Glu)	Ala
XII	Glu. (Gly Asp Cys)	Ser
XIII	Ala. (Arg Tyr)	Glu
XIV	Met. (Glu Ala)	His

range를 갖인것으로 생각된다.

이 結果로 經時的인 各試料에서 나타난 各 peptide 의 構成아미노酸의 種數를 計算하여 보면 다음 Table 12 와 같으며 水浸과 蒸熟大豆試料인 sample No.1, No.2 試料에서는 아미노酸種數가 8~9 個나 되는 比較的 큰 peptide 가 많이 나왔고 그 다음부터의 醱酵試料에서는 時間이 經過함에 따라 보다 적은 4~5種의 아미노酸으로 構成되어 있는 peptide 가 많이 나타나 順次的인 分解過程을

엿볼 수가 있다.

그러나 本結果에서 2種의 아미노酸으로 된 peptide 나 3種의 아미노酸으로 된 peptide 및 6種의 아미노酸으로된 peptide가 나타나지 않은 것은 매우 興味있는 結果이다.

4. 要約

淸國醬메주 醱酵過程中的 經時的인 試料를 採取하여 cross linkage가 各各 다른 5個의 Dowex-50 resin 을 充填한 column 을 通過시켜 일은 Dowex-50 의 X-16 fraction 의 低級 peptide 의 種類를 究明하는 同時에 淸國醬메주 醱酵過程中에 生成되는 低級 peptide 의 N-terminal amino acid 와 C-terminal amino acid 를 同定하고 各 peptide 群의 構成 amino acid 의 種類를 決定하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 各 peptide 群의 N 및 C-terminal amino acid 와 構成아미노酸은 다음과 같다.

[P]-I	Pro (Cys Ala Asp Trp Ile Val)	Glu
[P]-II	Val (Arg His Ala Glu Thr Met)	Asp
[P]-III	Glu (Cys Lys Asp Met Tyr)	Ala
[P]-IV	Glu (His Ala Ser)	Met
[P]-V	Ile (Cys Asp Trp Arg Pro Phe Gly)	His

Table 12. Number of different amino acids in peptide

Sample	Number of different amino acids	No. of peptide
1	8 8 7	3
2	8 8 7 5	4
3	9 8 5 5 4	5
4	8 8 5 5 5 4 4	7
5	9 8 5 4 4 4	6
6	8 8 5 5 4 4	6
7	9 8 5 5 5 4 4 4	8
8	8 8 5 5 4 4 4	7

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

2. 淸國醬에 주 醱酵過程中的 經時的인 試料의 各低級 peptide 群에는 2種, 3種 및 6種의 아미노酸으로 되어 있는 peptide 는 찾아볼 수 없으며 構成아미노酸도 4~9 種의 아미노酸으로 結合되어 있는 peptide 群들의 混合物로 되어 있다.

3. *Bacillus Subtilis* K-27 菌株의 protease 는 그 作用 specificity 가 *Aspergillus soya* 나 pepsin, chymotrypsin 및 trypsin 보다 넓다.

끝으로 本研究를 遂行하는데 始終一貫하여 指導 鞭達과 校閱을 하여 주신 서울大學校 農科大學 金載勳 博士와 李春寧 博士任을 비롯하여 資料를 貸與하여 주신 李基寧 博士任께 衷心으로 感謝를 드리며 아울러 本實驗遂行에 獻身助力하여 준 國立工業研究所 食品工業科 成洵淳, 尹宗鎬, 朴京台 研究士들에게 謝意를 表하는 바이다.

引用 文 獻

1. 朴啓仁, 未發表
2. 朴啓仁, 成洵淳, 韓微學誌 9, 74 (1971)
3. 竹內德外, 日酸工誌 40, 375 (1962)
4. " , Ibid 40, 379 (1962)
5. " , Ibid 44, 934 (1966)
6. " , Ibid 45, 29 (1967)
7. " , Ibid 45, 34 (1967)
8. 金載勳, 韓農化誌 6, 79 (1965)
9. " , Ibid 6, 89 (1965)
10. " , Ibid 6, 107 (1965)
11. 金洙榮, 金載勳, Ibid 8, 11 (1967)
12. 望月務外, 日食工誌 15, 414 (1968)
13. " , Ibid 15, 418 (1968)
14. " , Ibid 16, 155 (1969)
15. 草野愛子, 日榮養と食糧 22, (9) 29 (1969)
16. " , Ibid 24, (1), 8 (1971)
17. 高橋障外, 日酸工誌 35, 318 (1957)
18. " , Ibid 35, 404 (1957)
19. " , Ibid 36, 21 (1958)

20. 高橋障外, Ibid 36, 248 (1958)
21. " , Ibid 38, 319 (1960)
22. A.N. Rydon; Nature 169, 222 (1952)
23. R.J. Block. E.L. Durrum and G.A. Zweig: Manual of paper chromatography and paper electrophoresis, (1955), Academic press, new york
24. S.D. Killiea: J. Chromatography. 54, 284 (1971)
25. R.H. Mazur et al: J. Biochem. 237, 1619 (1962)
26. F. Sanger and R.R. Porter; Ibid 42, 287 (1948)
27. F. Sanger; Biochem. J. 39, 507 (1945)
28. F. Sanger and H. Tuppy; Ibid 49, 481 (1951)
29. Fumihiko yoshida, Michitaro Nagasawa and Eiji Ichishima, B. of Agr. Soc. of Japan 23, 363 (1959)
30. 中村敏郎外, 日農化誌 27. 272 (1953)
31. A.L. Levy and David Dhung; Anal. Chem. 25, 396 (1953)
32. S. Blackburn and A.G. Lowther, J.B.C. 48, 126 (1951)
33. S. Blackburn; Biochem, J. 45, 597 (1949)
34. J.W. Dalis and G. Harris; Arch. Biochem, Biophys. 74, 229 (1958)
35. K.R. Ras and H.A. Sober; J. Am. Chem. Soc 70, 1328 (1954)
36. A.L. Levy; Nature 174, 126 (1954)
37. G. Braunitzer; Chem. Ber. 88, 2025 (1955)
38. S. Akabory, K. Ohno and K. Nanta; Bull. Soc. Chem. (Japan) 25, 214 (1952)
39. J.H. Bradbury; Nature 178, 912 (1956)
40. K.J. Ohno; Biochem. (Japan) 40, 621 (1953)
41. K.J. Ohno; Ibid 41, 345 (1954)
42. C. Niu and H. Fraenkel Conrat; J. Am. Chem. Soc. 77, 5882 (1955)
43. F. Raschig; Ber. Dent. Chem. Ges. 43, 1927 (1910)
44. C.H.W. Hirs, S. Moore and W.H. Stein; J.B.C. 235, 633 (1960)
45. H.I. Silman, J.J. Cobra and D. Givol; Ibid 237 2196 (1962)
46. R.H. Locker; Biochem. Biophys. Acta 14,

- 532 (1954)
47. J.L. Bailey; Techniques in protein Chemistry
p.206 (1962)
48. Erick Heftmann; Chromatography 2nd, ed
(1967)
Reihold Publishing Corperation in U.S.A
49. 糸田村治, Paper Chromatography 의 實際
(1954)
50. Paul. G. Slecheretal; The Merck Index p.
181 8th, ed (1968) merck & Co. Inc. in U.S.A
51. Teeter and Bell; Org. Syn. 32, 20 (1952)
52. F. Sanger and H. Tuppy; Biochem. J. 49,
463 (1951)
53. A.L. Levy Geschwind I.I. and H.Lic; J
Biochem. 213, 187 (1955)
54. G.L. Mills; Biochem, J. 50, 707 (1952)