

식품의 아미노산 정량을 위한 단일가수분해 방법의 개발

박 태 선

연세대학교 식품영양학과

Single Hydrolysis Method for the Amino Acid Determination in Foods and Composite Dishes

Taesun Park

Dept. of Food and Nutrition, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

Abstract

For the complete and accurate amino acid determination of protein and food samples, 3 different hydrolysis procedures have been conducted in parallel for each sample, which include the alkaline hydrolysis for tryptophan determination, performic acid oxidation prior to the acid hydrolysis for the determination of cysteine and cystine, and the 6N HCl hydrolysis for the determination of the rest of amino acids. In the present study, amino acid concentrations obtained from the modified single hydrolysis procedure were compared with the values from the conventional hydrolysis procedures in casein and nine food and composite dish samples. In most of the samples tested, the modified single hydrolysis procedure gave significantly higher values of cysteine and cystine compared to the performic acid oxidation method, but resulted in a considerable destruction of tryptophan in food and composite dish samples. There was no consistent difference in the rest of amino acid concentrations between the two hydrolysis systems. Therefore, for complete amino acid determination of various foods and composite dishes, the single hydrolysis method may replace the 6N HCl hydrolysis and performic acid oxidation methods, and thereby reduces 3 hydrolyses to 2 steps with much higher recoveries of the sulfur containing amino acids.

Key words: single hydrolysis method, amino acid analysis, alkaline hydrolysis, 6N HCl hydrolysis

서 론

식품 또는 정제단백질의 아미노산 함량을 분석하는 것은 단백질의 구조를 밝히기 위해서 뿐 아니라 식품의 필수아미노산 함량을 평가하고 제한 아미노산을 밝혀냄으로써 식품 단백질의 질을 평가하는데 없어서는 안될 기본과정이 된다. 1948년 Stein과 Moore(1)가 partition chromatography를 사용하여 아미노산의 분리에 성공한 이후 chromatography를 이용한 아미노산의 분석은 급격한 발전을 거듭하였고, ion-exchange chromatography를 사용한 분석기기가 자동화되면서 그 속도와 정확도가 크게 향상되었다. 한편, 식품의 아미노산 분석을 위해서는 단백질의 가수분해가 필수적으로 선행되어야 하는데 단백질 함성에 관여하는 20여가지 아미노산은 각기 그 화학적 성질 및 안정성 등이 다르기 때문에 최적의 가수분해 조건을 설정하는데 어려움이 있다. 6N HCl을 사용한 가수분해 방법의 경우 현재까지

식품의 아미노산 함량분석을 위해 널리 사용되고 있으나, 중요한 영양적 가치를 지닌 tryptophan, cysteine 및 cystine 등을 파괴시키는 단점을 지니고 있다(2). 따라서 통상적으로 식품의 단백질을 구성하는 모든 아미노산을 정확히 정량하기 위해서는 한가지 시료에 대해 각기 6N HCl 가수분해 방법(1) 외에도 tryptophan의 정량 분석을 위한 알칼리성 가수분해(3)와 cysteine과 cystine을 performic acid에 의해 산화시킨 후 가수분해하는 방법(4) 등을 추가로 병행해야 하므로 단백질의 가수분해 절차가 반복적인 식품의 아미노산 함량분석에 있어서 지연요소로 작용하고 있다.

이와 같은 맥락에서 단백질의 가수분해에 소요되는 시간을 줄이기 위한 연구가 여러차례 문헌에 발표된 바 있으며, 이를 토대로 Simpson과 그 연구팀(5)은 tryptophan, cystine과 cysteine을 포함한 단백질 구성아미노산을 단 한번의 가수분해에 의해 정량분석하는 단일 가수분해 방법(single hydrolysis method)을 제안하여

학계의 관심을 끈 바 있다. 이와 같은 단일가수분해 방법은 어디까지나 순수 단백질과 펩티드를 대상으로 보고된 것으로써 그 이후 Inglis(6) 및 Malmer와 Schroeder(7)에 의해 수정·보완된 바 있으나 정제 단백질에 당질이 첨가된 경우 또는 당단백질의 가수분해시 tryptophan이 파괴되는 경향을 나타내 다양한 식품군과 복합음식의 아미노산 정량분석에 사용될 수 있을지가 의문시되고 있다.

따라서 본 연구에서는 단일가수분해 방법을 개선·보완하고, 이것이 정제된 단백질 뿐만 아니라 다양한 식품군 및 복합음식의 아미노산 함량분석을 위해 전통적인 3단계 가수분해 시스템을 대치하여 사용될 수 있는지의 여부를 평가하고자 하였다. 이러한 목적을 위하여 한가지 식품시료에 대하여 각기 1) 개선된 단일가수분해 방법과 2) 세가지 가수분해를 병행하는 전통적인 방법을 사용하여 단백질을 가수분해시킨 후 가수분해물의 아미노산 함량을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

시료의 선정 및 전처리

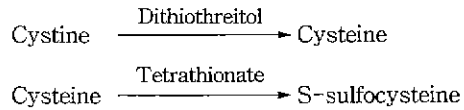
정제 단백질시료로 카제인을 사용하였고, 식품 및 복합음식 시료로는 쇠고기, 소간, 고등어, 농어, 콩나물, 닭조림, 호박튀김, 쿠키와 코코아믹스 등을 사용하였다. 쇠고기, 소간, 고등어, 농어, 닭조림 등의 시료는 일단 균질화하여 진공 오븐에서 건조시킨 후 분말상태로 마쇄하여 사용하였고, 호박전, 콩나물시료는 급속 냉동건조시킨 후 마쇄하여 분말시료로 사용하였다. 쿠키는 마쇄하여 사용하였고, 코코아믹스는 분말상태 그대로 시료로 사용하였다. 분말상태로 된 각 시료의 질소 함량을 micro-kjeldahl방법에 의해 측정하였으며, 각 시료의 단백질 함량은 질소 함량에 계수, 6.25를 곱하여 산출하였다.

단일가수분해

본 연구에서는 Simpson 등(5)과 Inglis(6)가 각기 정제 단백질을 대상으로 사용하였던 단일가수분해 방법을 다양한 식품군 및 복합음식의 아미노산 정량을 위해 수정·보완하여 사용하였다. 즉 10~20mg의 단백질을 포함하는 시료의 무게를 달아 40ml의 screw cap 유리병(Pierce Co., IL, USA)에 담고, cysteine과 cystine의 회수율을 향상시키기 위해 1mg의 sodium tetrathionate를 첨가한 후, 0.2%(w/v) tryptamine과 5μmole의 norleucine을 함유한 10ml의 4N methanesulfonic acid를 첨가하였다. 유리병을 질소가스로 채운 후 mininert

valve(Pierce Co., IL, USA)가 부착된 screw cap을 사용하여 봉하고, valve를 통해 유리병 안의 공기를 제거시킨 후 115°C에서 22시간 가열하여 가수분해를 실시하였다.

가수분해가 끝나면 유리병을 실온에서 식힌 다음 5.7~5.8ml의 7N NaOH용액을 첨가하여 가수분해물의 pH를 일차 중화시키고, 다시 4N methanesulfonic acid 또는 1N NaOH용액을 약간씩 첨가하여 pH를 6.8~7.2에 오도록 조절하였다. 중화된 가수분해물에 dithiothreitol 10mg을 첨가시키고, N₂ gas를 5분간 주입한 후 마개를 하여 37°C에서 2시간 동안 방치하였다. 여기에 다시 800mg의 sodium tetrathionate를 첨가하고, O₂ gas를 15분간 주입한 후 20~25°C에서 하룻밤 방치하였다. 이 과정에서 cystine이 cysteine으로 환원되고, 다시 cysteine은 S-sulfocysteine으로 전환되어진다.



최종 가수분해물의 pH를 4N methanesulfonic acid를 사용하여 1~2 정도로 낮추고, Na citrate buffer(0.2N, pH 2.2)를 사용하여 최종부피를 25ml로 보정하였다. 부피와 pH가 조절된 가수분해물을 여과지(Whatman No. 42)를 사용하여 여과시킨 후 아미노산 분석시까지 -20°C에 보관하였다.

6N HCl 가수분해

단백질과 식품시료에서 tryptophan, cysteine, cystine 및 methionine을 제외한 아미노산의 정량분석을 위해 Moore와 Stein(2)의 6N HCl 가수분해 방법을 수정하여 사용하였다. 즉, 16mg의 질소를 함유하는 시료의 무게를 측정하여 1000ml flask에 담은 후 400ml의 6N HCl을 첨가시키고, reflux condenser를 flask에 부착시켜서 110°C에서 24시간 가수분해시켰다. 가수분해 기간동안 시료의 산화를 방지하기 위해 N₂ gas를 flask 내로 주입시켰다. 가수분해가 끝나면 가수분해물을 실온으로 식힌 후 0.22μm filter를 사용하여 여과시키고, rotary evaporator를 사용하여 60°C에서 증발시켰다. 농축된 가수분해물에 남아있는 HCl을 제거하기 위해 20ml의 증류수를 더하여 가수분해 잔여물을 녹인 후 다시 증발시키는 것을 두번 반복하였다. 최종 농축액을 25ml의 sodium citrate buffer에 녹여서 아미노산 분석 시까지 -20°C에 보관하였다.

Performic acid에 의한 산화

합황아미노산의 정량분석을 위해 가수분해를 실시하기 전 Moore(4)의 방법을 보완하여 cysteine 및 cystine을 cysteic acid로, methionine을 methioninesulfone으로 각기 산화시켰다. 이를 위해 16mg의 질소에 해당하는 식품시료의 무게를 측정하여 flask에 담고, 50ml의 performic acid용액을 첨가한 후 마개를 하여 냉장고에서 15시간 방치하였다. 반응에 사용되고 남은 과량의 performic acid는 6ml의 47% hydrobromic acid를 한방울씩 서서히 첨가시킴으로써 불활성화시켰다. Rotary evaporator를 사용하여 용액을 증발시키고 남은 농축잔여물을 20ml의 증류수를 사용하여 2번 세정한 후, 앞에서 언급된 것과 같은 방법에 의해 6N HCl 가수분해를 실시하였다.

알칼리성 가수분해

Tryptophan의 정량 분석을 위해 Alegria 등(8)이 사용하였던 방법을 수정하여 사용하였다. 즉 10mg 단백질에 해당하는 식품시료의 무게를 달아 가수분해 tube에 담고, 2ml의 증류수에 4N 농도가 되도록 고체 barium hydroxide를 첨가시켜 tube에 더하였다. 질소가스를 주입시켜 tube 내의 산소를 제거하고, 마개를 하여 110°C에서 48시간 가수분해하였다.

가수분해가 끝나면 얼음 위에서 tube를 신속히 냉각시킨 후 가수분해물을 원심분리용 tube에 옮기고 tube를 잘 흔든 상태에서 CO₂ gas를 약 10분간 불어넣어 barium 침전물을 형성시켰다. 생성된 barium ion 침전물을 20,000×g에서 30분간 원심분리하여 제거시켰으며, barium 침전물에 섞여있는 아미노산을 모두 회수하기 위해 5ml의 증류수를 사용하여 침전물을 세차례 세정하였다. 얻어진 상층액을 rotary evaporator를 사용하여 28°C에서 1ml 정도로 농축시키고, 0.22µm filter를 사용하여 여과한 후 다시 완전 건조시켰다. 최종 가수분해물을 5ml의 sodium citrate buffer에 녹여서 아미노산 분석시까지 -20°C에 보관하였다.

아미노산의 분석

가수분해된 단백질의 아미노산 함량은 ion-exchange chromatography에 입각한 아미노산 전용 자동분석기(Beckman 6300, USA)를 사용하여 분리·측정하였다. 가수분해된 시료(0.5ml)를 분석기에 주입시키고, 농도와 pH가 다른 세가지의 sodium citrate buffer를 단계적으로 사용하여 아미노산을 분리하였다(buffer A, 0.2N, pH

3.49, 70분간 사용; buffer B, 0.4N, pH 4.12, 40분간 사용; buffer C, 1.0N, pH 6.40, 120분간 사용). 각 아미노산의 농도는 chromatography에 표시된 peak 면적을 농도를 아는 표준아미노산용액의 peak 면적과 비교하여 산출하였고, mg 아미노산/g N으로 표시하였다. 실험에서 오는 오차를 줄이기 위해 internal standard로 nor-leucine을 표준아미노산용액과 시료용액에 첨가시킨 후 회수율을 검토하여 실험 결과를 수정하였다.

통계처리

단일가수분해 시스템과 3단계의 전통적인 가수분해 시스템에 의해 단백질을 가수분해한 후 얻어진 정제 단백질 및 모든 식품시료의 아미노산 함량은 4차례의 가수분해물로부터 얻어진 값의 평균과 표준편차로 나타내었다. 모든 시료에 있어서 단일 가수분해 시스템과 전통적인 가수분해 시스템에 의한 아미노산 함량의 차이는 Student's t-test에 의해 p<0.05, p<0.01 및 p<0.001에서 유의성 여부를 검증하였다.

결과 및 고찰

시료의 단백질 함량

본 연구에서 사용하기 위해 분말상태로 만든 각 시료의 질소 함량을 micro-kjeldahl법에 의해 분석한 결과가 Table 1에 제시되어 있다. 질소 함량(%)에 전환 계수, 6.25를 곱하여 산출된 각 시료의 단백질 함량은 쿠키시료의 5.8%에서부터 카제인의 87.5%에 이르기까지 매우 다양하였다.

단일가수분해에 의한 cysteine과 cystine의 회수율 측정

정제 cysteine, cystine 및 glutathione(glutamic acid, cysteine과 glycine의 tripeptide)을 대상으로 단일가수

Table 1. Percentages of nitrogen and protein of casein and various food samples

Samples	% Nitrogen	% Protein
Casein	14	87.5
Beef	11.2	70.0
Beef liver	10.1	62.8
Mackerel	8.4	52.8
Seabass	7.9	49.4
Soybean sprouts	6.7	41.6
Chicken stew	6.5	40.6
Zucchini tempura	2.98	18.6
Cookies	0.93	5.8
Cocoa mix	3.3	20.9

분해를 실시한 후 S-sulfocysteine의 회수율을 측정한 결과 cysteine 및 cystine이 거의 정량적으로 S-sulfocysteine으로 전환되어 약 97~101%의 높은 회수율을 보였다(Table 2). 산화형과 환원형 glutathione의 경우 glutamic acid와 glycine의 회수율 역시 97.3~99.2% 사이로 매우 양호하였다. 이와 같은 결과는 본 연구에서 사용된 개선된 단일가수분해 조건에서 cysteine과 cystine의 파괴가 최소화되었음을 시사해주는 것이라 하겠다(Table 2).

6N HCl을 사용하여 가수분해하는 경우 cysteine과 cystine은 ion-exchange chromatography에서 측정이 어려운 cystine oxide로 전환될 뿐 아니라, cysteine의 일부가 proline과 함께 ion-exchange column을 빠져나오게 되므로 종종 proline이 실제값 보다 높게 평가되는 단점이 있다(2,9). 이와 같은 문제를 해결하기 위하여 performic acid를 사용하여 cysteine 및 cystine을 ion-exchange column에서 다른 아미노산에 영향을 미치지 않고 분리가 가능한 cysteic acid로 산화시킨 후 가수분해하는 방법이 사용되고 있으나(4,10), performic acid에 의해 상당량의 tyrosine, histidine 및 tryptophan 등과 같은 아미노산이 파괴되므로 이 방법 역시 식품의 모든 아미노산 정량에는 적합한 방법이 되지 못하고 있다. 한편, Inglis와 Liu(11)는 6N HCl 가수분해 조건에서 dithiothreitol과 tetrathionate를 단계적으로 사용함으로써 단백질과 펩티드시료의 cysteine과 cystine을 S-sulfocysteine으로 전환시켜 정량분석할 수 있음을 제안하여 산성 가수분해 조건에서 함량아미노산의 정량 분석이 가능함을 처음으로 제시하였다. S-sulfocysteine은 ion-exchange chromatography에서 aspartic acid보다 산성이 더 강하기 때문에 이보다 약 15~16분 정도 먼저 column을 빠져나오게 되고, 따라서 다른 아미노산의 분리에 전혀 영향을 미치지 않는 장점을 지닌다.

단일가수분해와 전통적인 가수분해 방법의 비교

정제 단백질시료

단일가수분해와 세가지의 가수분해를 병행한 전통적인 방법에 의해 카제인을 가수분해시킨 후 아미노산 함량을 측정된 결과가 Table 3에 제시되어 있다. 단일가수분해 방법을 사용한 경우 performic acid에 의한 산화과정을 실시한 후 가수분해하여 얻은 값에 비해 총 cysteine 함량(cystine을 포함) 및 methionine 함량이 높게 나타난 경향을 보였으나 통계적으로 유의적인 차이는 아니었다. 특히 cysteine 함량의 경우 전통적인 방법에 비해 단일가수분해 방법에서 약 40% 정도 높은

Table 2. Percentage recoveries of cystine and cysteine as S-sulfocysteine from pure cystine, cysteine and glutathione

	% Recovery		
	S-Sulfocysteine	Glutamic acid	Glycine
Cystine	96.5±3.6	-	-
Cysteine	97.7±2.3	-	-
Glutathione (reduced)	99.1±4.7	98.8±2.1	99.2±1.3
Glutathione (oxidized)	101.1±4.7	97.3±1.5	98.9±2.0

Values are mean±SD of three analyses

Table 3. Amino acid concentrations of casein treated by two different hydrolysis systems: A-single hydrolysis method and B-conventional methods

Amino acid	Hydrolysis method		t-value
	A	B	
	mg amino acid/g nitrogen		
EAA			
Thr	304±23	295±32	0.46
Val	428±37	447±32	-0.78
Met	209±13	189±14 ¹⁾	2.09
Iso	350± 6	356±27	-0.43
Leu	623±30	614±29	0.43
Phe	332±21	351±23	-1.22
His	207±14	199±10	0.93
Lys	540±38	531±29	0.38
Trp	80±14	118±31 ²⁾	-2.24
NEAA			
Cyst ³⁾	42±16	30±9 ⁴⁾	1.31
Asp	474±22	466±23	0.50
Ser	368±14	384±30	-1.00
Glu	1361±71	1334±17	0.74
Pro	719±51	753±87	-0.67
Gly	130±11	128±12	0.25
Ala	210±11	206±11	0.51
Tyr	392±34	396±25	-0.19
Arg	262±26	253±23	0.52
N-rec ⁵⁾	1025±69	988±59	0.82

Value are mean±SD of 4 hydrolyzates

¹⁾Data from methionine sulfone(performic acid oxidation)

²⁾Data from the alkaline hydrolysis

³⁾Cysteine+cystine

⁴⁾Data from cysteic acid(performic acid oxidation)

⁵⁾Nitrogen recovery: mg total amino acid nitrogen/g nitrogen

값을 보였음에도 불구하고 통계적인 유의성을 보이지 않는 이유는 표준편차가 유난히 크기 때문인 것으로 사려된다. 반면 카제인을 단일가수분해시킨 결과 얻어진 tryptophan의 함량은 알칼리성 가수분해에 의한 값 보다 낮아서 단일가수분해시 약 32% 정도의 tryptophan이 파괴되었던 것으로 나타났으나 역시 통계적으로 유의적인

수준은 아니었다. 그 이외의 아미노산에 대하여는 단일 가수분해와 6N HCl을 사용한 가수분해 방법 간에 매우 근소한 차이를 보였다. 카제인을 가수분해한 후 얻어진 모든 아미노산의 질소 함량을 더하여 질소 회수율(mg total amino acid nitrogen/g nitrogen)을 측정된 결과, 단일가수분해와 전통적인 가수분해 시스템에서 각기 102.5%와 98.8%의 매우 우수한 회수율을 보였다.

Tryptophan의 indole side chain은 산성조건에서 매우 불안정하기 때문에 6N HCl을 사용하여 단백질을 가수분해하는 경우 상당량이 파괴되어지며, 특히 시료에 과량의 당질이 함유되어있는 경우 tryptophan의 파괴가 더욱 가속화됨이 보고된 바 있다(3). 따라서 단백질의 tryptophan 함량을 정량분석하기 위해서는 통상적으로 알칼리를 사용하여 가수분해하는데, 알칼리 환경에서 전분은 용액내의 산소와 반응함으로써 오히려 반응액에 남아 있는 잔여 산소를 제거시켜 아미노산의 산화를 막아주는 보호효과를 지니는 것으로 알려져 있다(3). 한편, 산성 가수분해 조건에서 tryptophan의 안정성을 높이기 위해 thioglycolic acid 또는 tryptophan과 구조가 비슷하여 가수분해 과정 중 산소 또는 당질과 작용함으로써 tryptophan의 파괴를 막아주는 3-(2-amino-ethyl) indole(tryptamine)과 같은 보호제들을 첨가시킴으로써 정제 단백질의 tryptophan 회수율이 향상되었음이 보고된 바 있다(12-15). 본 연구에서는 tryptophan의 파괴율을 최소화하기 위해 산화력이 염산보다 약한 methanesulfonic acid를 사용하였으며, tryptophan 보호제로 tryptamine을 0.2% 첨가시킨 결과 카제인 단백질로부터 알카리성 가수분해에 의한 값의 약 70%에 달하는 tryptophan 회수율을 얻었다. 이와 같은 결과는 선행 연구자들이 비슷한 조건에서 lysozyme, cytochrome C 및 bovine deoxyribonuclease A를 비롯한 다수의 정제 단백질을 가수분해하여 90% 정도의 tryptophan 회수율을 얻었다는 보고(13-15) 보다는 낮은 수치였다.

다양한 식품군 및 복합음식시료

쇠고기, 소간, 고등어, 농어, 및 콩나물시료를 대상으로 단일가수분해와 전통적인 3단계 가수분해 방법을 실시한 후 두 군간의 아미노산 함량의 차이를 평가한 결과가 Table 4에 제시되어 있다. 각 시료에 대하여 단일 가수분해와 3단계 가수분해 방법을 각기 4번씩 시행하여 평균과 표준오차를 구하였다. 모든 식품시료에 있어서 S-sulfocysteine으로 전환되어 측정된 cysteine과 cystine의 함량은 performic acid에 의한 산화과정을 거쳐 cysteic acid로 측정된 값 보다 43(쇠고기)~83%(소간) 정도 더 높게 나타났으며, 특히 소간(83% 증가), 농어

Table 4. Differences in the amino acid concentrations of various food samples obtained with the single hydrolysis method and conventional hydrolysis procedures

Amino acid	t-value ¹⁾				
	Beef	Beef liver	Mackeral	Seabass	Soybean sprouts
EAA					
Thr	-0.67	-1.52	-5.17**	-5.76**	-3.80**
Val	1.15	-0.36	0.71	-1.56	-2.91*
Met ²⁾	2.33	5.22**	2.30	3.83*	0.56
Iso	0.04	0.47	-1.84	-0.72	-3.06*
Leu	5.06**	1.15	-1.66	0.93	-3.17*
Phe	4.62**	4.42**	-0.42	1.39	-0.34
His	2.15	2.29	-3.42*	0.35	-6.60***
Lys	4.84**	4.10**	0.73	0.49	-1.26
Trp ³⁾	-	-	-	-	-
NEAA					
Cyst ⁴⁾	2.20	8.24***	2.29	2.85*	3.20*
Asp	2.62*	0.55	-4.13*	1.62	-2.11
Ser	-3.60*	-3.25*	-0.52	-2.46*	-2.38
Glu	3.49*	0.76	0.77	3.68*	-3.75**
Pro	0.10	-0.82	1.70	-1.37	-3.32*
Gly	-1.15	-0.45	0.09	-3.39*	1.75
Ala	3.05*	-1.93	1.79	4.64**	-2.09
Tyr	0.69	2.78*	-3.53*	-1.12	-1.16
Arg	2.10	0.82	0.69	1.91	-2.03
N-rec ⁵⁾	2.14	1.44	0.23	0.98	0.07

¹⁾ Positive t-value means that the values of single hydrolysis method is greater than those of conventional procedures and vice versa. t-values were obtained from mean \pm SD of 4 hydrolyzates of two hydrolysis procedures

²⁾ Data from the single hydrolysis method was compared to the data from methionine sulfone(performic acid oxidation)

³⁾ Tryptophan peak was not detected on the ion-exchange chromatography after single hydrolyses of the samples

⁴⁾ Data from the single hydrolysis method was compared to the value from cysteine acid(performic acid oxidation)

⁵⁾ Nitrogen recovery: mg total amino acid nitrogen/g nitrogen

*Significantly different by Student's t-test at $p < 0.05$

**Significantly different by Student's t-test at $p < 0.01$

***Significantly different by Student's t-test at $p < 0.001$

(60% 증가)와 콩나물시료(68% 증가)에서 유의적인 증가를 보였다. Methionine 함량 역시 단일가수분해를 실시한 경우 performic acid에 의해 methioninesulfone으로 전환시켜 측정된 값 보다 쇠고기, 고등어, 농어 및 콩나물시료에서 5~58% 정도 더 높았으며 특히 소간(58% 증가)과 농어 시료(22% 증가)에서 유의적인 차이를 보였다. 필수아미노산 중 phenylalanine과 lysine 함량 역시 단일가수분해를 실시한 경우 6N HCl 가수분해 방법에 의한 값 보다 쇠고기와 소간에서 10~22% 정도 더 높게 나타났으나($p < 0.01$), 다른 시료에 있어서는 일률적

수준은 아니었다. 그 이외의 아미노산에 대하여는 단일 가수분해와 6N HCl을 사용한 가수분해 방법 간에 매우 근소한 차이를 보였다. 카제인을 가수분해한 후 얻어진 모든 아미노산의 질소 함량을 더하여 질소 회수율(mg total amino acid nitrogen/g nitrogen)을 측정된 결과, 단일가수분해와 전통적인 가수분해 시스템에서 각기 102.5%와 98.8%의 매우 우수한 회수율을 보였다.

Tryptophan의 indole side chain은 산성조건에서 매우 불안정하기 때문에 6N HCl을 사용하여 단백질을 가수분해하는 경우 상당량이 파괴되어지며, 특히 시료에 과량의 당질이 함유되어있는 경우 tryptophan의 파괴가 더욱 가속화됨이 보고된 바 있다(3). 따라서 단백질의 tryptophan 함량을 정량분석하기 위해서는 통상적으로 알칼리를 사용하여 가수분해하는데, 알칼리 환경에서 전분은 용액내의 산소와 반응함으로써 오히려 반응액에 남아 있는 잔여 산소를 제거시켜 아미노산의 산화를 막아주는 보호효과를 지니는 것으로 알려져 있다(3). 한편, 산성 가수분해 조건에서 tryptophan의 안정성을 높이기 위해 thioglycolic acid 또는 tryptophan과 구조가 비슷하여 가수분해 과정 중 산소 또는 당질과 작용함으로써 tryptophan의 파괴를 막아주는 3-(2-amino-ethyl) indole(tryptamine)과 같은 보호제들을 첨가시킴으로써 정제 단백질의 tryptophan 회수율이 향상되었음이 보고된 바 있다(12-15). 본 연구에서는 tryptophan의 파괴율을 최소화하기 위해 산화력이 염산보다 약한 methanesulfonic acid를 사용하였으며, tryptophan 보호제로 tryptamine을 0.2% 첨가시킨 결과 카제인 단백질로부터 알칼리성 가수분해에 의한 값의 약 70%에 달하는 tryptophan 회수율을 얻었다. 이와 같은 결과는 선행 연구자들이 비슷한 조건에서 lysozyme, cytochrome C 및 bovine deoxyribonuclease A를 비롯한 다수의 정제 단백질을 가수분해하여 90% 정도의 tryptophan 회수율을 얻었다는 보고(13-15) 보다는 낮은 수치였다.

다양한 식품군 및 복합음식시료

쇠고기, 소간, 고등어, 농어, 및 콩나물시료를 대상으로 단일가수분해와 전통적인 3단계 가수분해 방법을 실시한 후 두 군간의 아미노산 함량의 차이를 평가한 결과가 Table 4에 제시되어 있다. 각 시료에 대하여 단일 가수분해와 3단계 가수분해 방법을 각기 4번씩 시행하여 평균과 표준오차를 구하였다. 모든 식품시료에 있어서 S-sulfocysteine으로 전환되어 측정된 cysteine과 cystine의 함량은 performic acid에 의한 산화과정을 거쳐 cysteic acid로 측정된 값 보다 43(쇠고기)~83%(소간) 정도 더 높게 나타났으며, 특히 소간(83% 증가), 농어

Table 4. Differences in the amino acid concentrations of various food samples obtained with the single hydrolysis method and conventional hydrolysis procedures

Amino acid	t-value ¹⁾				
	Beef	Beef liver	Mackeral	Seabass	Soybean sprouts
EAA					
Thr	-0.67	-1.52	-5.17**	-5.76**	-3.80**
Val	1.15	-0.36	0.71	-1.56	-2.91*
Met ²⁾	2.33	5.22**	2.30	3.83*	0.56
Iso	0.04	0.47	-1.84	-0.72	-3.06*
Leu	5.06**	1.15	-1.66	0.93	-3.17*
Phe	4.62**	4.42**	-0.42	1.39	-0.34
His	2.15	2.29	-3.42*	0.35	-6.60***
Lys	4.84**	4.10**	0.73	0.49	-1.26
Trp ³⁾	-	-	-	-	-
NEAA					
Cyst ⁴⁾	2.20	8.24***	2.29	2.85*	3.20*
Asp	2.62*	0.55	-4.13*	1.62	-2.11
Ser	-3.60*	-3.25*	-0.52	-2.46*	-2.38
Glu	3.49*	0.76	0.77	3.68*	-3.75**
Pro	0.10	-0.82	1.70	-1.37	-3.32*
Gly	-1.15	-0.45	0.09	-3.39*	1.75
Ala	3.05*	-1.93	1.79	4.64**	-2.09
Tyr	0.69	2.78*	-3.53*	-1.12	-1.16
Arg	2.10	0.82	0.69	1.91	-2.03
N-rec ⁵⁾	2.14	1.44	0.23	0.98	0.07

¹⁾ Positive t-value means that the values of single hydrolysis method is greater than those of conventional procedures and vice versa. t-values were obtained from mean \pm SD of 4 hydrolyzates of two hydrolysis procedures

²⁾ Data from the single hydrolysis method was compared to the data from methionine sulfone(performic acid oxidation)

³⁾ Tryptophan peak was not detected on the ion-exchange chromatography after single hydrolyses of the samples

⁴⁾ Data from the single hydrolysis method was compared to the value from cysteic acid(performic acid oxidation)

⁵⁾ Nitrogen recovery: mg total amino acid nitrogen/g nitrogen

*Significantly different by Student's t-test at $p < 0.05$

**Significantly different by Student's t-test at $p < 0.01$

***Significantly different by Student's t-test at $p < 0.001$

(60% 증가)와 콩나물시료(68% 증가)에서 유의적인 증가를 보였다. Methionine 함량 역시 단일가수분해를 실시한 경우 performic acid에 의해 methioninesulfone으로 전환시켜 측정된 값 보다 쇠고기, 고등어, 농어 및 콩나물시료에서 5~58% 정도 더 높았으며 특히 소간(58% 증가)과 농어 시료(22% 증가)에서 유의적인 차이를 보였다. 필수아미노산 중 phenylalanine과 lysine 함량 역시 단일가수분해를 실시한 경우 6N HCl 가수분해 방법에 의한 값 보다 쇠고기와 소간에서 10~22% 정도 더 높게 나타났으나($p < 0.01$), 다른 시료에 있어서는 일률적

높게 나타난 것은 선행 연구(6,11)에서와는 달리 본 연구에서 sodium tetrathionate를 가수분해를 실시하기 전에 시료에 첨가시킴으로써 가수분해가 시작되는 초기 과정에서 cysteine을 S-sulfocysteine으로 전환시킴으로써 장기간의 가열 도중 나타날 수 있는 합황아미노산의 파괴를 최소화하였기 때문인 것으로 생각된다. 이와 같이 사용된 모든 시료에 있어서 단일가수분해를 실시한 경우 전통적인 가수분해 방법 보다 합황아미노산 함량이 더 높게 나타난 본 연구의 결과는 현재까지 전통적인 가수분해 방법을 이용하여 측정된 식품의 합황아미노산 함량에 대한 수치가 실제치 보다 낮게 평가되었을 가능성을 시사해 주는 것이라 생각된다.

본 연구의 결과 단백질이외에 당질 및 지질 등을 함유하는 식품 및 복합음식시료를 대상으로 단일가수분해를 한 경우 tryptophan peak가 전혀 검출되지 않았고, 따라서 단일가수분해 시스템에서 tryptophan의 파괴가 여전히 문제로 남아 있다고 하겠다. 산을 이용하여 당질의 함량이 높은 식품을 가수분해할 경우 정량적인 tryptophan의 분석을 위해서는 가수분해 전 식품 시료로부터 당질 및 지질을 제거시키거나 가수분해시 더 많은 양의 산을 사용함으로써 당질의 농도를 희석시키는 방안, 또는 tryptamine과 같은 'oxygen scavenger'의 양을 본 연구에서 사용된 0.2% 보다 증가시켜 사용하는 방안 등을 포함하여 앞으로 계속적인 연구가 진행되어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구의 결과를 요약하면 여러가지 식품군과 복합음식의 아미노산 함량을 정량하는데 있어서 단일가수분해 방법은 전통적인 6N HCl을 사용하는 가수분해와 합황아미노산의 정량을 위한 performic acid 산화과정을 대신하여 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 단일가수분해를 실시하여 얻은 cysteine, cystine과 methionine의 농도는 performic acid로 산화시킨 후 가수분해하여 얻은 수치에 비해 대부분의 식품 및 복합음식시료에서 유의적으로 더 높게 나타났다. 반면 0.2%의 tryptamine이 첨가된 상태에서 단일가수분해를 실시하는 경우 여전히 상당량의 tryptophan이 파괴되었으므로 식품과 복합음식시료에서의 tryptophan 정량분석을 위해서는 전통적인 알칼리성 가수분해가 필히 병행되어야 한다고 생각된다. 결과적으로 단일가수분해 방법을 도입함으로써 식품의 모든 아미노산 정량을 위해 사용되어 오던 3단계 가수분해 과정을 2단계로 간소화할 수 있을 뿐 아니라 6N HCl 가수분해 방법에 비해 훨씬 소

량의 산을 사용하고, 가수분해 후 산을 증발시켜야 하는 번거로운 과정이 삭제됨으로써 비용 및 노동력 절감이 기대되며, 아울러 합황아미노산의 회수율이 향상될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 1995년 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

문 헌

- Stein, W. H. and Moore, S. : Chromatography of amino acids on starch column separation of phenylalanine, leucine, isoleucine, methionine, tyrosine and valine. *J. Biol. Chem.*, **176**, 337(1948)
- Moore, S. and Stein, W. H. : Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. In "*Methods in enzymology*" Colowick, S. P. and Kaplan, N. O.(eds.), Academic Press, New York, Vol. 6, p.819(1963)
- Hugli, T. E. and Moore, S. : Determination of the tryptophan content of proteins by ion exchange chromatography of alkaline hydrolysates. *J. Biol. Chem.*, **247**, 2828(1972)
- Moore, S. : On the determination of cysteine and cysteic acid. *J. Biol. Chem.*, **238**, 235(1963)
- Simpson, R. J., Neuberger, M. R. and Liu, T. Y. : Complete amino acid analysis of protein from a single hydrolyzate. *J. Biol. Chem.*, **251**, 1936(1976)
- Inglis, A. S. : Single hydrolysis method for all amino acids, including cysteine and tryptophan. In "*Methods in enzymology*" Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. (eds.), Academic Press, New York, Vol. 96, p.26(1983)
- Malmer, M. F. and Schroeder, L. A. : Amino acid analysis by high performance liquid chromatography with methanesulfonic acid hydrolysis and 9-fluorenylmethyl-chloroformate derivatization. *J. Chromatography*, **514**, 227(1990)
- Alegria, A., Barbera, R., Farre, R., Ferreres, M., Lagarda, M. J. and Lopez, J. C. : Isocratic high-performance liquid chromatographic determination of tryptophan in infant formulas. *J. Chromatography*, **721**, 83(1996)
- Gardner, M. L. G. : Cysteine : A potential source of error in amino acid analysis of mercaptoethane sulfonic or hydrochloric acid hydrolyzates of proteins and peptides. *Anal. Biochem.*, **141**, 429(1984)
- Schram, E., Moore, S. and Bigwood, E. J. : Chromatographic determination of cystine as cysteic acid. *Biochem. J.*, **57**, 33(1954)
- Inglis, A. S. and Liu, T. Y. : The stability of cysteine and cystine during acid hydrolysis of protein and peptides. *J. Biol. Chem.*, **245**, 112(1970)
- Liu, T. Y. and Chang, Y. H. : Hydrolysis of proteins with p-toluenesulfonic acid. *J. Biol. Chem.*, **246**, 2842(1971)

높게 나타난 것은 선행 연구(6,11)에서와는 달리 본 연구에서 sodium tetrathionate를 가수분해를 실시하기 전에 시료에 첨가시킴으로써 가수분해가 시작되는 초기 과정에서 cysteine을 S-sulfocysteine으로 전환시킴으로써 장기간의 가열 도중 나타날 수 있는 함황아미노산의 파괴를 최소화하였기 때문인 것으로 생각된다. 이와 같이 사용된 모든 시료에 있어서 단일가수분해를 실시한 경우 전통적인 가수분해 방법 보다 함황아미노산 함량이 더 높게 나타난 본 연구의 결과는 현재까지 전통적인 가수분해 방법을 이용하여 측정된 식품의 함황아미노산 함량에 대한 수치가 실제치 보다 낮게 평가되었을 가능성을 시사해 주는 것이라 생각된다.

본 연구의 결과 단백질이외에 당질 및 지질 등을 함유하는 식품 및 복합음식시료를 대상으로 단일가수분해를 한 경우 tryptophan peak가 전혀 검출되지 않았고, 따라서 단일가수분해 시스템에서 tryptophan의 파괴가 여전히 문제로 남아 있다고 하겠다. 산을 이용하여 당질의 함량이 높은 식품을 가수분해할 경우 정량적인 tryptophan의 분석을 위해서는 가수분해 전 식품 시료로부터 당질 및 지질을 제거시키거나 가수분해시 더 많은 양의 산을 사용함으로써 당질의 농도를 희석시키는 방안, 또는 tryptamine과 같은 'oxygen scavenger'의 양을 본 연구에서 사용된 0.2% 보다 증가시켜 사용하는 방안 등을 포함하여 앞으로 계속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구의 결과를 요약하면 여러가지 식품군과 복합음식의 아미노산 함량을 정량하는데 있어서 단일가수분해 방법은 전통적인 6N HCl을 사용하는 가수분해와 함황아미노산의 정량을 위한 performic acid 산화과정을 대신하여 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 단일가수분해를 실시하여 얻은 cysteine, cystine과 methionine의 농도는 performic acid로 산화시킨 후 가수분해하여 얻은 수치에 비해 대부분의 식품 및 복합음식시료에서 유의적으로 더 높게 나타났다. 반면 0.2%의 tryptamine이 첨가된 상태에서 단일가수분해를 실시하는 경우 여전히 상당량의 tryptophan이 파괴되었으므로 식품과 복합음식시료에서의 tryptophan 정량분석을 위해서는 전통적인 알칼리성 가수분해가 필히 병행되어야 한다고 생각된다. 결과적으로 단일가수분해 방법을 도입함으로써 식품의 모든 아미노산 정량을 위해 사용되어 오던 3단계 가수분해 과정을 2단계로 간소화할 수 있을 뿐 아니라 6N HCl 가수분해 방법에 비해 훨씬 소

량의 산을 사용하고, 가수분해 후 산을 증발시켜야 하는 번거로운 과정이 삭제됨으로써 비용 및 노동력 절감이 기대되며, 아울러 함황아미노산의 회수율이 향상될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 1995년 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

문 헌

- Stein, W. H. and Moore, S. : Chromatography of amino acids on starch column separation of phenylalanine, leucine, isoleucine, methionine, tyrosine and valine. *J. Biol. Chem.*, **176**, 337(1948)
- Moore, S. and Stein, W. H. : Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. In *"Methods in enzymology"* Colowick, S. P. and Kaplan, N. O.(eds.), Academic Press, New York, Vol. 6, p.819(1963)
- Hugh, T. E. and Moore, S. : Determination of the tryptophan content of proteins by ion exchange chromatography of alkaline hydrolysates. *J. Biol. Chem.*, **247**, 2828(1972)
- Moore, S. : On the determination of cysteine and cysteic acid. *J. Biol. Chem.*, **238**, 235(1963)
- Simpson, R. J., Neuberger, M. R. and Liu, T. Y. : Complete amino acid analysis of protein from a single hydrolyzate. *J. Biol. Chem.*, **251**, 1936(1976)
- Inglis, A. S. : Single hydrolysis method for all amino acids, including cysteine and tryptophan. In *"Methods in enzymology"* Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. (eds.), Academic Press, New York, Vol. 96, p.26(1983)
- Malmer, M. F. and Schroeder, L. A. : Amino acid analysis by high performance liquid chromatography with methanesulfonic acid hydrolysis and 9-fluorenylmethyl-chloroformate derivatization. *J. Chromatography*, **514**, 227(1990)
- Alegria, A., Barbera, R., Farre, R., Ferreres, M., Lagarda, M. J. and Lopez, J. C. : Isocratic high-performance liquid chromatographic determination of tryptophan in infant formulas. *J. Chromatography*, **721**, 83(1996)
- Gardner, M. L. G. : Cysteine : A potential source of error in amino acid analysis of mercaptoethane sulfonic or hydrochloric acid hydrolyzates of proteins and peptides. *Anal. Biochem.*, **141**, 429(1984)
- Schram, E., Moore, S. and Bigwood, E. J. : Chromatographic determination of cystine as cysteic acid. *Biochem. J.*, **57**, 33(1954)
- Inglis, A. S. and Liu, T. Y. : The stability of cysteine and cystine during acid hydrolysis of protein and peptides. *J. Biol. Chem.*, **245**, 112(1970)
- Liu, T. Y. and Chang, Y. H. : Hydrolysis of proteins with p-toluenesulfonic acid. *J. Biol. Chem.*, **246**, 2842(1971)

13. Penke, B., Ferenczi, R. and Kovacs, K. : A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins. *Anal. Biochem.*, **60**, 45(1974)
14. Matsubara, H. and Sasaki, R. M. : High recovery of tryptophan from acid hydrolyzates of proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **35**, 175(1969)
15. Fabian, V., Pinter-Szakacs, M. and Molnar-Perl, I. : Gas chromatography of tryptophan together with other amino acids in hydrochloric acid hydrolysates. *J. Chromatography*, **520**, 193(1990)

(1997년 4월 7일 접수)