

Formic Acid에 의한 단백질 가수분해 및 Butylthiocarbamyl-trimethylsilyl (BTC-TMS) 아미노산 유도체의 Gas Chromatography를 이용한 분석

우강웅[†] · 이동선 · 김민철
경남대학교 생명과학부

Protein Hydrolysis with Formic Acid and Analysis of Amino Acid Using Butylthiocarbamyl-trimethylsilyl (BTC-TMS) Derivatives by Gas Chromatography

Kang-Lyung Woo[†], Dong-Sun Lee and Min-Chul Kim

Division of Life Science, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

Abstract

The protein hydrolysis with 6 M formic acid containing 0.3% tryptamine was a superior method for amino acid analysis of standard amino acid and protein than 6 M HCl containing 0.3% tryptamine. The recoveries of standard amino acid after acid hydrolysis were more accurate in the 6 M formic acid hydrolysis than 6 M HCl hydrolysis, especially recovery of tryptophan showed higher values of 1.5 times than that of 6 M HCl hydrolysis. The results of analysis on the standard protein, bovine serum albumin, showed very similar values compared to the sequence analysis reported in the literature for the 6 M formic acid hydrolysis than 6 M HCl hydrolysis, especially in the tryptophan recovery as standard amino acid recovery. Butylthiocarbamyl-trimethylsilyl (BTC-TMS) derivatives of 22 standard amino acids were successfully resolved DB-17 capillary column. Excellent reproducibility of standard amino acid recovery and composition of bovine serum albumin were obtained with BTC-TMS derivatives.

Key words: 6 M formic acid, amino acid analysis, gas chromatography, BTC-TMS derivatives

서 론

식품이나 단백질 표준품의 아미노산 조성을 분석하기 위하여 우리는 제일 먼저 단백질을 가수분해하여야 한다. 지난 수십 년 동안 단백질 가수분해방법이 다양하게 개발되었으나 아직 6 M HCl에 의한 가수분해방법보다 더 우수한 방법은 개발되지 않고 있는 실정이다(1-4). 그러나 6 M HCl 가수분해 방법은 tryptophan을 완전히 파괴시키며 glutamine과 asparagine도 완전히 glutamic acid와 aspartic acid로 전환시키고 cysteine이나 cystine도 상당량 파괴시키는 것으로 알려져 있다(5). 최근 6 M HCl 용액에 0.3% tryptamine을 가함으로서 상당량의 tryptophan 파괴를 막을 수 있었다는 보고가 있다(6,7). 그러나 아직도 어떠한 가수분해방법도 모든 단백질 구성아미노산을 파괴 없이 가수분해시키는 방법은 없다. 최근 Woo 등(8)은 0.3% tryptamine을 함유한 6 M formic acid 용액에 의한 단백질 가수분해 방법을 연구한 결과 tryptophan을 비롯한 몇 가지 아미노산의 회수율이 6 M HCl 보다 높게 나타났고 식품 단백질의 가수분해 방법으로 상당히 우수한 것으로 보고하고 있다.

Gas chromatography(GC)에 의한 아미노산 분석은 높은 감도와 분리능, 저렴한 비용, 기기의 보편성 및 질량분석 검출기와 연결사용에 의한 정확한 동정 등 많은 장점을 갖고 있다. 그러나 GC에 의한 분석 시 끓는점이 낮고 극성이 낮은 유도체로 유도체화할 필요가 있다. 지금까지 많은 유도체가 개발되었으나 trimethylsilyl(TMS) 유도체(9) 및 N(O)-tert-butyl dimethylsilyl 유도체(tBDMSi)(8,10-12) 등이 비교적 성공적으로 이용되고 있다. TMS 유도체의 경우 열과 수분에 대한 안정성이 부족하고 유도체화하는데 높은 온도와 긴 시간이 필요하다(9). 이에 비하여 tBDMSi 유도체는 비교적 열과 수분에 안정하며 반응시간도 짧으나 반응과정에서 glutamine이 pyroglutamic acid로 일부 전환되고 일부 유도체가 두 개의 peak로 분리되는 경향이 있다(8).

본 연구에서는 formic acid에 의한 단백질 가수분해방법을 연구하고 GC에 의한 아미노산의 분석을 위하여 TMS 유도체보다 더욱 열 안정성이 높고 낮은 온도에서 짧은 시간동안 반응하여 22개의 모든 단백질 구성 아미노산을 분석할 수 있는 방법으로 butylthiocarbamyl-TMS 유도체를 개발하여 이를 GC로 분석할 수 있는 방법을 연구하였다.

[†]Corresponding author. E-mail: klwoo@kyungnam.ac.kr
Phone: 82-55-249-2688. Fax: 82-55-249-2995

재료 및 방법

재료

표준아미노산, bovine serum albumin(BSA), butyl isothiocyanate(BITC), bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide(BSTFA), tryptamine 및 formic acid 등은 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고 기타 시약은 분석용 등급을 사용하였다.

표준아미노산 용액의 조제

Asparagine, glutamine, cystine을 제외한 모든 아미노산은 0.01 M HCl 용액으로 mL당 2.5 μ mole 농도로 만들었고 asparagine, glutamine은 사용직전에 별도로 위와 같은 농도로 만들어 사용하였다. Cytine은 용해도가 매우 낮으므로 mL당 0.5 μ mole 농도로 만들었다.

가수분해 및 정제

BSA 2.0 mg씩을 두개의 conical vial에 각각 넣고 한쪽에는 0.3% tryptamine을 함유한 6 M formic acid 2 mL, 다른 하나에는 0.3% tryptamine을 함유한 6 M HCl 용액 2 mL를 가하여 septum이 들어있는 위에 구멍이 나 있는 screw cap으로 단단히 닫고 뚜껑의 구멍으로 septum을 통하여 두 개의 주사바늘을 꽂아 넣고 한쪽 바늘은 질소 gas에 연결하고 한쪽은 진공 펌프로 연결하여 질소 gas 주입과 동시에 진공 펌프로 내부 공기를 약 2분간 빨아내어 내부를 완전히 질소 gas로 충전되게 하였다. 이것을 145°C에서 4시간 동안 가수분해하였다. 가수분해 후 BSA는 60°C에서 질소 gas로 완전히 건조하여 5 mL의 0.01 M HCl용액으로 녹여 이 용액을 유도체화하는데 바로 사용하였다.

표준아미노산의 회수율 측정

표준아미노산 용액 200 μ L씩을 2개의 2 mL conical vial에 각각 넣고 질소 gas로 말린 후 여기에 6 M formic acid 2 mL, 6 M HCl 2 mL씩을 각 vial에 넣어 BSA 가수분해와 같은 과정을 거쳐 유도체화하여 분석한 분석치를 표준아미노산 용액 200 μ L를 질소로 말려 가수분해하지 않고 그대로 유도체화하여 분석한 결과치에 비교하여 백분율로 회수율을 나타내어 가수분해과정에서 각 표준아미노산의 파괴 정도를 비교 분석하였다.

유도체화

아미노산 표준용액 및 BSA 가수분해 용액을 각각 따로따로 2 mL conical vial에 200 μ L씩 넣고 질소 gas로 60°C에서 말린 후 acetonitrile 200 μ L 및 butylisothiocyanate 5 μ L를 가하여 마개를 잘 막고 50°C에서 약 10분간 유도체화하였다. 이때 아미노산의 아미노기와 반응하여 butylthiocarbonyl 아미노산 유도체가 생성되었다(13). 이것을 질소 gas로 60°C에서 말린 후 acetonitrile을 200 μ L 가하여 다시 한번 더 말리고 내부표준물질 octadecane을 mL당 1 mg 함유하고 있는 cou-

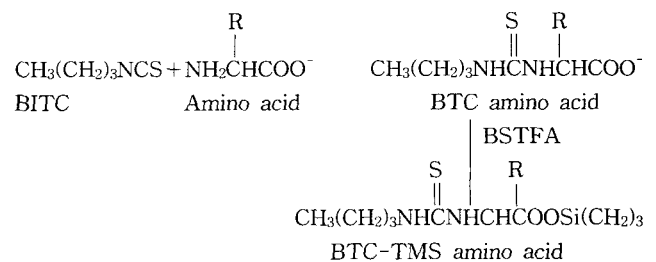
pling buffer(acetonitrile 10 : methanol 10 : triethylamine 1)를 200 μ L, BSTFA 200 μ L를 가한 후 50°C에서 30분간 가열하여 carboxyl기를 TMS유도체로 유도체화하였다. 이를 실온으로 식힌 후 GC에 주입하였다.

Gas chromatography

GC는 전자 압력조절 장치가 장착된 HP-5890 gas chromatograph(Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA)를 사용하였고 column은 DB-17(30 m \times 0.32 mm I.D., film 두께 0.25 μ m, J&W Scientific, USA)를 사용하였고 splitless mode로 inlet valve를 주입 후 0.1분간 OFF상태로 두고 나머지 시간을 ON으로 하여 분석하였다. 주입구와 검출기(FID)온도는 280°C로 하였고 column 온도는 초기 50°C에서 1분간 머문 후 분당 4°C로 170°C까지 올리고 1분간 머문 후 분당 8°C로 280°C까지 올리면서 분석하였다. 운반기체는 초고순도(99,999%)수소 기체를 분당 1.2 mL로 흘렸고 보조 기체로 질소를 분당 30 mL로 흘렸다.

결과 및 고찰

BTC-TMS유도체 반응 기작



아미노산의 아미노기와 BITC시약간에 일차적인 반응으로 butylthiocarbonyl(BTC) 아미노산 유도체가 형성되고 이 유도체를 염기성 조건하에서 BSTFA와 반응시키면 아미노산의 carboxyl기에 BSTFA의 trimethylsilyl기가 결합하여 trimethylsilyl(TMS)유도체가 생성되어 아미노기에는 butylthiocarbonyl(BTC)유도체, carboxyl기에는 trimethylsilyl(TMS)유도체인 BTC-TMS아미노산 유도체가 형성되어 극성이 줄어들고 끓는점이 낮아져 GC로 분석하기 좋은 유도체가 된다.

표준아미노산의 BTC-TMS유도체의 분석 chromatogram

표준아미노산 BTC-TMS유도체의 chromatogram을 Fig. 1에 나타내었다. 22개의 단백질 구성아미노산이 모두 용리되었고 분리능도 매우 우수하였다. 그러나 gas chromatography 분석을 위한 대부분의 유도체들에서 나타나는 두 개 이상의 peak로 갈라지는 현상이 이 BTC-TMS 유도체에서도 나타났다. 두 개 이상의 peak로 갈라지는 아미노산으로 proline, hydroxyproline, arginine 및 tryptophan이었다. Peak response가 비교적 낮은 것으로는 lysine, glutamine, hydroxy

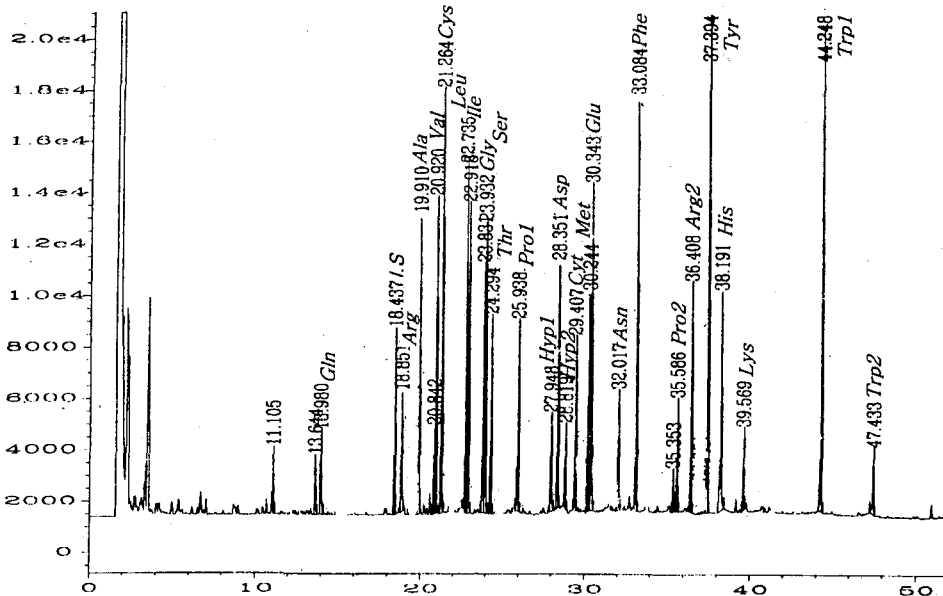


Fig. 1. Gas chromatogram of BTC-TMS amino acid derivatives resolved on DB-17 capillary column (30 m×0.32 mm I.D. film thickness 0.25 μm). Cyt: cystine.

proline 및 asparagine이었다.

표준아미노산의 회수율

가수분해과정을 거친 표준아미노산의 BTC-TMS-유도체와 가수분해과정을 거치지 않은 표준아미노산의 BTC-TMS-유도체의 분석결과로 비교한 표준아미노산의 회수율을 Table 1에 나타내었다.

표준아미노산의 회수율을 보면 대체로 6 M formic acid에 의한 가수분해가 6 M HCl에 의한 가수분해보다 높게 나타나고 있다. 특히 tryptophan의 경우는 1.5배 정도 높은 회수율을 보이고 있다. 이는 Woo 등(8)의 연구와 비슷한 결과이다. 어느 경우든지 2개로 쪼개져 분리되는 아미노산의 경우 회수율이 상당히 낮아지므로 이는 반응과정에서 두 개로 쪼개지는 반응이 정량적으로 일어나지 않음을 말하는 것으로 앞으로 GC에 의한 아미노산 분석 시 이 점을 반드시 해결하여야 할 문제로 지적할 수 있다. 그러나 상대 표준편차값이 모든 아미노산에서 5% 이내로 나타나 재현성은 매우 좋았다.

Bovine serum albumin(BSA)의 아미노산 조성 분석

Fig. 2에 6 M formic acid로 가수분해한 BSA의 BTC-TMS 아미노산 유도체의 크로마토그램을 나타내었다. 모두 19개의 아미노산 peak가 검출되었고 6 M HCl가수분해의 경우에 나타나지 않은 cystine peak가 나타난 것이 특징이다.

Table 2에 BSA에 대하여 6 M formic acid와 6 M HCl로 가수분해하였을 경우 BSA 1 mole을 583 아미노산 잔기로 환산한 수치를 나타내었다

6 M formic acid에 의한 가수분해가 6 M HCl 가수분해의 경우 보다 훨씬 아미노산 서열 분석치와 가깝게 나타났다. Glutamic acid와 aspartic acid 결과치가 서열 분석치보다 훨씬

Table 1. Recovery of standard amino acids as BTC-TMS derivatives by acid hydrolysis process with 6 M formic acid and 6 M HCl containing 0.3% tryptamine

| Amino acid | Recovery(%) | | | |
|------------|-----------------|------|---------|------|
| | 6 M formic acid | RSD | 6 M HCl | RSD |
| Gln | 0 | | 0 | |
| Arg1 | 89.5 | 1.4 | 85.5 | 1.7 |
| Ala | 98.9 | 2.0 | 97.6 | 2.9 |
| Val | 101.1 | 0.7 | 99.8 | 2.1 |
| Cys | 98.8 | 2.9 | 99.0 | 0.9 |
| Leu | 99.5 | 1.4 | 105.2 | 4.5 |
| Ile | 97.7 | 3.4 | 95.3 | 4.9 |
| Gly | 97.2 | 2.9 | 98.5 | 3.2 |
| Ser | 93.4 | 4.1 | 87.9 | 2.2 |
| Thr | 99.8 | 1.1 | 104.6 | 1.0 |
| Pro1 | 94.3 | 4.8 | 87.1 | 6.1 |
| Hyp1 | 87.5 | 3.9 | 88.7 | 4.5 |
| Asp | 101.5 | 2.5 | 92.8 | 1.4 |
| Hyp2 | 82.1 | 1.6 | 78.9 | 4.1 |
| Cyt | 96.1 | 3.0 | 95.8 | 4.7 |
| Met | 98.9 | 2.4 | 94.5 | 1.9 |
| Glu | 99.3 | 1.0 | 90.2 | 2.0 |
| Asn | 0 | | 0 | |
| Phe | 100.5 | 94.6 | 0.3 | 1.1 |
| Pro2 | 83.6 | 5.0 | 80.1 | 4.0 |
| Arg2 | 91.7 | 3.6 | 90.3 | 4.8 |
| Tyr | 97.8 | 2.9 | 98.7 | 2.1 |
| His | 98.5 | 1.7 | 89.4 | 4.3 |
| Lys | 97.9 | 0.1 | 96.1 | 0.6 |
| Trp1 | 85.1 | 4.8 | 57.1 | 7.8 |
| Trp2 | 64.2 | 8.7 | 16.5 | 11.9 |

n=4.
RSD: Relative standard deviation.
Hyp: hydroxyproline. Cyt: cystine.

훨씬 높게 나오는 것은 산 가수분해 과정에서 glutamine과 asparagine이 모두 glutamic acid와 aspartic acid로 전환되기

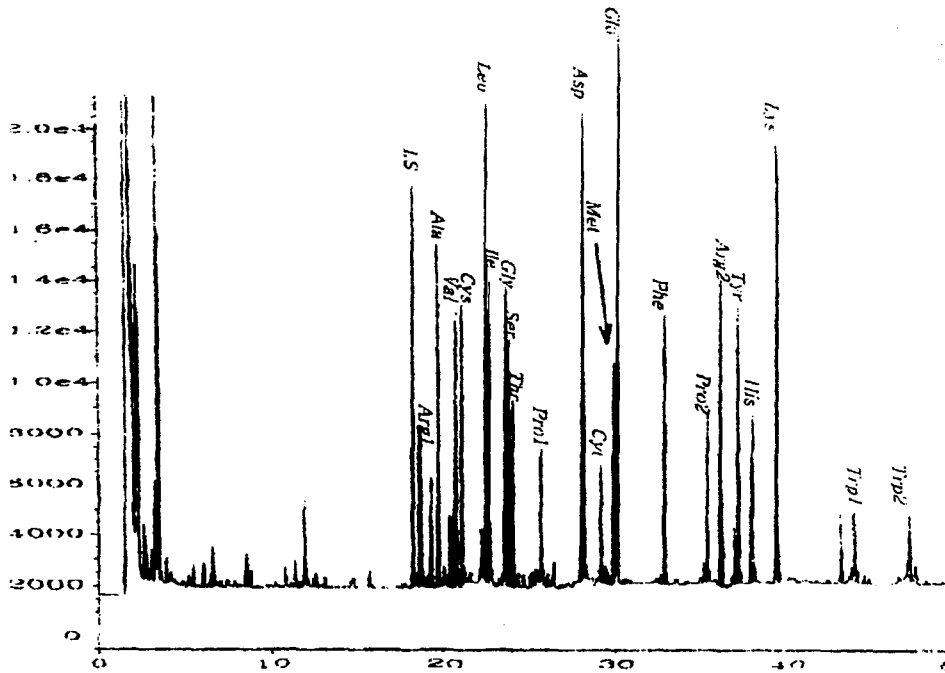


Fig. 2. Gas chromatogram of BTC-TMS amino acid derivatives of bovine serum albumin (BSA) hydrolyzed with 6 M formic acid resolved on DB-17 capillary column.

Cyt: Cystine.

Table 2. Composition of amino acid determined as BTC-TMS derivative of bovine serum albumin (BSA) hydrolyzed with 6 M formic acid and 6 M HCl

| Amino acid | 6 M formic acid | | 6 M HCl | | Sequence ¹⁾ |
|----------------|-----------------|---------|-------------|---------|------------------------|
| | 582 residue | RSD (%) | 582 residue | RSD (%) | |
| Gln | 0 | | 0 | | 20 |
| Ala | 46.2 | 3.1 | 51.0 | 6.3 | 46 |
| Val | 36.5 | 2.8 | 40.1 | 2.1 | 36 |
| Cys | 33.9 | 1.5 | 34.8 | 4.8 | 35 |
| Leu | 60.9 | 2.3 | 65.4 | 6.9 | 60 |
| Ile | 13.7 | 1.4 | 15.2 | 1.4 | 14 |
| Gly | 15.7 | 3.7 | 16.9 | 3.3 | 16 |
| Ser | 28.0 | 4.6 | 28.1 | 1.6 | 28 |
| Thr | 33.8 | 0.6 | 34.3 | 2.5 | 34 |
| Pro1 | 28.3 | 3.1 | 27.8 | 1.4 | 29 |
| Asp | 54.8 | 4.0 | 51.9 | 3.9 | 41 |
| Cyt | 1.4 | 3.9 | | | |
| Met | 4.1 | 1.2 | 3.5 | 2.8 | 4 |
| Glu | 79.9 | 0.2 | 70.2 | 0.9 | 59 |
| Asn | | | | | 12 |
| Phe | 25.5 | 2.0 | 29.0 | 4.1 | |
| Arg2 | 24.9 | 2.1 | 23.2 | 5.9 | 25 |
| Tyr | 19.7 | 1.1 | 20.1 | 2.7 | 20 |
| His | 17.0 | 4.6 | 15.4 | 8.9 | 20 |
| Lys | 57.5 | 2.9 | 55.7 | 3.1 | 58 |
| Trp1 | 1.2 | 4.6 | 0.4 | 6.9 | 2 |
| Total recovery | 583 | | 583 | | 583 |

n=4.

¹⁾ Ref. 14.

때문으로 추정할 수 있다. Tryptophan의 경우 formic acid에 의한 가수분해가 HCl 가수분해 경우보다 훨씬 적게 파괴되

는 것으로 나타났다.

Formic acid 가수분해의 경우 6 M HCl 가수분해나 서열 분석에서 나타나지 않은 cystine이 검출되고 있는데 Woo와 Lee(5), Woo 등(8)은 BSA에서 cystine을 검출하고 있어 서열 분석에서 나타나지 않는 cystine이 BSA에 존재하는지는 앞으로 연구대상이다. 만약 cystine이 존재한다면 이는 가수분해과정에서 formic acid의 강력한 환원력이 cystine의 파괴를 막은 때문으로 추론할 수 있겠다. 6 M formic acid 가수분해 방법이 식품 시료 중 단백질 조성 분석에도 잘 적용될지는 앞으로의 연구과제이다. 결과치 평균값에 대한 상대 표준편차 값이 formic acid 가수분해의 경우 모든 아미노산에서 5% 이내로 HCl 가수분해 경우보다 매우 정밀한 분석값을 나타내었다.

요 약

단백질 구성 아미노산 분석을 위한 효과적인 가수분해 방법을 찾기 위하여 0.3% tryptamine을 함유한 6 M formic acid와 6 M HCl을 표준 아미노산과 단백질 표준품인 bovine serum albumin 가수분해에 적용하여 표준아미노산의 회수율과 bovine serum albumin의 아미노산 조성을 분석하였고 GC에 의한 효과적인 아미노산 분석을 위하여 새로운 유도체인 butylthiocarbonyl-trimethylsilyl(BTC-TMS)유도체를 개발하여 분석한 결과는 다음과 같았다. 표준아미노산의 회수율은 6 M formic acid에 의한 가수분해방법이 6 M HCl에 의한 가수분해 방법보다 상당히 정확하였고 특히 산 가수분

해에서 tryptamine 의 존재하에서도 잘 파괴되는 tryptophan 의 경우 formic acid 가수분해가 HCl 가수분해보다 1.5배정도 높은 회수율을 보였다. Bovine serum albumin의 아미노산 조성을 583 아미노산 잔기로 환산하여 나타내었을 경우도 formic acid에 의한 가수분해가 HCl가수분해 경우보다 훨씬 정확하였고 이 때 tryptophan의 회수율도 훨씬 높게 나타났다. 다만 서열분석에서 분석되지 않는 cystine이 formic acid 가수분해시 분석되고 있어 이에 대한 정확한 검정이 필요하였다. BTC-TMS 유도체는 GC분석시 극성이 다소 낮은 DB-17 column으로 분리가 잘되었고 재현성도 좋았으나 GC분석을 위한 대부분의 유도체에서와 마찬가지로 몇 가지 아미노산에서 두 개의 peak로 나타나는 결점이 있었다.

문 헌

- Hirs CHW, Stein H, Moore S. 1954. The amino acid composition of ribonuclease. *J Biol Chem* 211: 941-949.
- Moore S, Stein WH. 1963. *Methods of Enzymology* 6. Colowick SP, Kaplan NO, eds. Academic Press, New York. p 819.
- Hare PE. 1977. Subnanomole-range amino acid analysis. In *Method of Enzymology* 47. Hirs CHW, Timasheff SN, eds. Academic Press, New York. p 3-18.
- Zumwalt RW, Absheer JS, Kaiser FE, Gehrke CW. 1987. Symposium on chromatography of amino acids. 99th annual international meeting of AOAC. Acid hydrolysis of protein for chromatographic analysis of amino acids. *J Assoc Off Anal Chem* 70: 147-151.
- Woo KL, Lee DS. 1995. Capillary gas chromatographic determination of proteins and biological amino acids as N(O)-tert.-butyldimethylsilyl derivatives. *J Chromatogr B* 665: 15-25.
- Favian V, Szakacs MP, Perl IM. 1990. Gas chromatography of tryptophan together with other amino acids in hydrochloric acid hydrolysates. *J Chromatogr* 520: 193-199.
- Perl IM, Szakacs MP, Khalifa M. 1993. High-performance liquid chromatography of tryptophan and other amino acids in hydrochloric acid hydrolysates. *J Chromatogr* 632: 57-61.
- Woo KL, Jang DK, Kim JI, Woo DK, Lee YW. 2002. Effective hydrolysis and clean-up methods for the analysis of amino acid composition in food proteins using N(O)-tert.-butyldimethylsilyl derivative by GC. *Food Sci Biotechnol* 11: 205-214.
- Gajewski E, Dizdaroglu M, Simic MG. 1982. Kovats indices of trimethylsilylated amino acids on fused-silica capillary columns. *J Chromatogr* 249: 41-55.
- Mawhinney TP, Robinett RSR, Atalay A, Madson MA. 1986. Analysis of amino acids as their tert.-butyldimethylsilyl derivatives by gas chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr* 358: 231-242.
- Portier G, Tenaschuk D, Meckenzie SL. 1986. Capillary gas chromatography micro-assay for pyroglutamic, glutamic and aspartic acids, and glutamine and asparagine. *J Chromatogr* 361: 253-261.
- Woo KL, Chang DK. 1993. Determination of 22 protein amino acids as N(O)-tert.-butyldimethylsilyl derivatives by gas chromatography. *J Chromatogr* 638: 97-107.
- Woo KL, Lee SH. 1994. Determination of protein amino acids as butylthiocarbamyl derivatives by reversed-phase high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization and UV detector. *J Chromatogr A* 667: 105-111.
- Hirayama K, Akashi S, Furuya M, Fukuhara KI. 1990. Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS. *Biochem Biophys Res* 173: 639-646.

(2002년 7월 30일 접수; 2003년 3월 28일 채택)