

An Analytical Method for the Validation of a Salt-enhancing Peptide Using a Liquid Chromatography and a Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy

Sun You Park¹, Yong Jin Jeong^{2,3}, Mi-Yeon Kim³, Ji Hong Hwang³, Taeg Kyu Kwon^{4*} and Young Ho Seo^{1*}

¹College of Pharmacy, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

²Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

³KMF Co., Ltd., Yuram-ro, Dong-gu, Daegu 41065, Korea

⁴Department of Immunology, School of Medicine, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Received October 10, 2017 / Revised October 24, 2017 / Accepted October 24, 2017

Salt, or sodium chloride (NaCl), is a critical ingredient in many foods. It has roles in the flavor profiles of food products, textures of foods and preservation of foods against microbes. However, it increases risks of hypertension and is closely related to the development of cardiovascular disease. In recent years, health concerns related to sodium intake caused an increased demand for salt-reduced products in worldwide; it became necessary to develop natural salt-alternative products that are globally competitive. In a recent study, researchers succeeded in obtaining a natural salt enhancer through the hydrolysis of vegetable- and animal-matter mixtures. This study used various methods to identify and quantify peptide-containing arginine as a salt-alternative peptide (SAP) in an optimum combination. Arginine, or dipeptide-containing arginine, was analyzed as a standard substance using an NMR spectroscopy. The NMR carbon signal of the guanidine group of the standard substance was verified in a similar location (the L-arginine (Arg) was 156.8 ppm, the Arg-Alanine was 156.4 ppm and the Arg-Serine was 156.4 ppm). The results suggested that it is possible to analyze peptide-containing arginine quantitatively through the hydrolysis of vegetable- and animal-matter mixtures.

Key words : Liquid chromatography, nuclear magnetic resonance, salty enhancing peptide

서 론

소금은 식품에 짭맛을 부여할 뿐 아니라, 조직감과 색도 개선 및 미생물 생육 억제 등을 목적으로 식품산업에서 가장 보편적으로 사용되는 소재이다. 그러나 전 세계 인구의 90%가량이 과도한 양의 나트륨을 섭취하고 있으며, 특히 한국인의 평균 1일 나트륨 섭취량은 4,027.5 mg으로 세계보건기구(WHO)의 1일 나트륨 권장량인 2,000 mg의 2배 이상을 섭취하고 있다[5, 9]. 이러한 나트륨의 과다 섭취로 인해 고혈압, 심장마비, 뇌출혈 등 다양한 심혈관 질환뿐만 아니라 위암, 신장결석 등의 유병률이 점점 증가하는 추세이며, 이에 각 나라에서는 국민 건강 보호를 위해 '나트륨 섭취량 감소' 정책을 시행하고 있다[1, 6]. 최근 글로벌 이슈에 따라 식품의약품안전처는 '자율적인 나트륨 저감화 사업'을 시행하여 2020년까지 국민

의 나트륨 1일 섭취량의 20%를 줄이기 위한 사업을 진행하였으며, 국내 식품가공 분야에서도 소금의 함량을 절감하기 위한 연구가 다각도에서 진행되고 있다.

식품에서 나트륨을 저감화하기 위한 방법 중 하나로, 나트륨을 칼륨, 칼슘, 마그네슘 등의 금속염으로 대체하는 방법이 있다. 대표적인 예로 염화칼륨(KCl)이 있으며, 이는 다양한 식품에서 사용되고 있지만 강한 쓴맛과 금속성 이취감 등의 단점이 보고되고 있다[7]. 다른 방법으로는 mono sodium glutamate(MSG), 효모 추출물, 아미노산 등 자신은 짭맛을 거의 가지고 있지 않지만 소금의 짭맛을 끌어내는 염미증강제를 이용한 방법이 있다[3, 8]. 이 중 아미노산을 활용한 짭맛 증강 소재로는 L-arginine (L-Arg), L-lysine (L-Lys) 등의 아미노산이 보고되어 있으며, 특히 L-Arg을 포함한 펩타이드들의 구아니딜 그룹은 Na⁺-channel과 상호작용하여 Na⁺ ion의 유입을 향상시켜 짭맛을 증강시키는 것으로 보고 되어있다[4]. 하지만 합성을 통한 아미노산 계열은 염미 부스팅 효과가 있음에도 소비자로부터 선택되지 않아 시장성이 떨어지며, MSG는 발효로 만들어 지지만 단일 원료로 화학적으로 생성된다는 이미지가 확고해 소비자들에게 외면되고 있는 추세이다[2]. 따라서 염미와 함께 감칠맛을 상승시키면서, 산업적으로 적용 범위가 넓은 천연 펩타이드계 염미대체제가 절실히 필요한 실정이다.

농·축부산물 원료 배합을 통한 염미 상승 발효 조성물의

*Corresponding authors

Tel : +82-53-580-3882, Fax : +82-53-580-3795

E-mail : seoyho@kmu.ac.kr (Young Ho Seo)

kwontk@dsmc.or.kr (Taeg Kyu Kwon)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

조제에 성공하였으나, 최적 조성물에 포함된 염미성 펩타이드를 규명하고 정량 하는 연구는 부족한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 동·식물성 발효 조성물에 포함된 펩타이드 및 아미노산 함량의 정량법을 개발하고 유효성을 검증하기 위해 고성능 액체 크로마토그래피(High-performance liquid chromatography; HPLC), 핵자기 공명 분광법(Nuclear magnetic resonance; NMR)등 다양한 방법을 이용하여 검증하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

실험에 사용된 high-performance liquid chromatography (HPLC)는 Shimadzu (Japan)사의 LC-6AD 시스템은 사용하였으며, 고정상은 Shimadzu (Japan)사의 VP-ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)을 사용하였다. HPLC용 용매인 acetonitrile은 J. T. Baker사 제품을 사용하였고, H₂O는 3차 증류수를 여과하여 사용하였다. 그 외 시약은 특급 시약을 사용하였다. ¹H- 및 ¹³C-NMR spectra는 Joel resonance (Japan)사의 JNM-ECZ 500R를 이용하여 500과 125 MHz에서 각각 측정하였으며, Chemical shift는 δ (ppm)로 나타내었다. 지표성분 정량에 사용된 두 종류의 dipeptide (Arg-Ala, Arg-Ser)는 에니젠(Korea)사에서 구입하였으며, L-Arg는 대정화금(Korea)사에서 구입하였다.

염미성 펩타이드(Salty Enhancing Peptide: SAP) 분말

분리대두단백에 물을 첨가하여 원료를 5%(w/v)의 수용액으로 제조하였다. 분리대두단백 중량대비 protease를 0.3%(w/w) 혼합하여 50℃에서 2시간 효소적 가수분해하고 80℃에서 30분 효소를 실행 하였다. 3,000 rpm 15분간 원심분리하여 얻은 상등액을 동결건조하여 염미성 펩타이드 분말로 제조하였다.

핵자기 공명 분광법(Nuclear magnetic resonance; NMR) 분석

L-Arginine

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ: 3.19~3.16 (1H, m, H-1), 3.13~3.10 (2H, m, H-6 and H-7), 1.57~1.51 (4H, m, H-2, H-3, H-4 and H-5). ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ: 183.19 (C-1), 156.80 (C-6), 55.59 (C-2), 41.01 (C-5), 31.62 (C-3), 24.50 (C-4).

Dipeptide1 (Arg-Ala)

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ: 4.39 (1H, m, H-8), 3.88 (1H, t, J=6.0 MHz, H-1), 3.18 (2H, t, J=6.5 MHz, H-6 and H-7), 1.89 (2H, q, J=8.0 MHz, H-2 and H-3), 1.71~1.60 (2H, m, H-4 and H-5), 1.39 (3H, dd, J=7.5 MHz, 1.0 MHz, CH₃). ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ: 176.08 (C-8), 169.25 (C-1), 156.8 (C-6), 52.65 (C-2), 48.88 (C-7), 40.42 (C-5), 28.01 (C-3), 23.34 (C-4),

15.97 (C-9).

Dipeptide2 (Arg-Ser)

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ: 4.53~4.51 (1H, m, H-8), 4.07~4.04 (1H, m, H-1), 3.95~3.91 (1H, m, H-9), 3.88~3.84 (1H, m, H-10), 3.19~3.17 (2H, m, H-6 and H-7), 1.91 (2H, q, J=7.5 MHz, H-2 and H-3), 1.70~1.61 (2H, m, H-4 and H-5). ¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ: 173.11 (C-8), 169.62 (C-1), 156.84 (C-6), 60.97 (C-9), 55.17 (C-7), 52.75 (C-2), 48.92 (C-5), 40.41 (C-8), 28.13 (C-3), 23.36 (C-4).

고성능 액체 크로마토그래피(High-performance liquid chromatography; HPLC) 분석

SAP 10 mg을 200 μl acetonitrile/ H₂O (5:5, v/v)로 녹인 후, 필터를 사용하여 정제한 용액을 liquid chromatography (LC) 표준시료로 사용하였다. 또한, 아미노산 정량을 위해 아민(-NH₂)기를 중성 조건과 염기성 조건에서 benzyl chloride로 capping 한 시료를 함께 분석하였다. Capping된 시료는 다음과 같은 방법으로 준비되었다. SAP 10 mg을 200 μl acetonitrile/ H₂O (5:5, v/v)로 녹여 benzyl bromide 10 mg을 추가하여 12시간 교반 하였고, 반응 종료 후 남은 benzyl bromide 제거를 위해 16시간 동결건조 하였다. 준비된 시료는 HPLC는 Shimadzu (Japan)사의 LC-6AD 시스템하에서 고정상으로는 Shimadzu (Japan)사의 VP-ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)을 사용하였으며, 40℃ 오븐에서 유속은 1.0 ml/min, injection volume은 10 μl로 설정하였다. 이동상으로는 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)가 포함된 H₂O (A)와 acetonitrile (B)을 사용하였으며, 최초 100%(A)로 시작하여 40분 후 100%(B)가 되도록 gradient를 준 후 10분간 유지하는 조건을 설정하였다.

결과 및 고찰

HPLC 분석을 통한 peptide 정량

HPLC는 다양한 물질의 분석 및 정제를 위해 사용하는 분석 기기로서 식품, 제약, 화장품, 환경 등 여러 분야에서 필수적인 분석 기술로 알려져 있다. 따라서, 본 실험에서는 SAP 내 펩타이드 및 아미노산 함량을 정량 하기 위한 한 방법으로 HPLC를 이용하였다. 분석하고자 하는 아미노산은 -COOH, -NH₂ 그룹이 포함되어 있는 친수성이 큰 물질이므로, C18-칼럼을 사용한 HPLC 분석 시 머무름 시간이 짧아 분리 및 분석이 힘들다는 단점이 있다. 이러한 점을 극복하기 위해 아미노산의 -NH₂ 그룹에 benzyl기로 보호하여 C18-칼럼 내 머무름 시간을 최적화 하였다.

시료 내 benzyl기를 capping하기 위하여 SAP 샘플 10 mg을 200 μl acetonitrile/ H₂O (5:5, v/v)로 녹인 후, 필터를 사용하여 정제한 용액을 LC 표준 시료로 사용하였다. 또한, 동일한 시료 10 mg을 200 μl acetonitrile/ H₂O (5:5, v/v)로 녹인 혼합

물에 benzyl chloride 10 mg을 추가하여 12시간 교반 하였고, 반응 종료 후 16시간 동결건조 하여 남은 benzyl chloride를 제거하였다. 준비된 시료의 분석을 위해 최적 HPLC 조건을 검토한 결과, Shimadzu (Japan)사의 VP-ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)을 고정상으로 하여 40°C 오븐에서 유속은 1.0 ml/min으로 분석하였다. 또한 이동상으로는 0.1% TFA가 포함된 H₂O (A)와 acetonitrile (B)을 사용하였으며, 최초 100%(A)로 시작하여 40분 후 100%(B)가 되도록 gradient를 준 후 10분간 유지하는 조건을 설정하였다. 적정 파장은 190 nm와 254 nm로 설정하였으며, 이 방법으로 SAP 시료를 분석할 경우 30분 이내에 모든 성분을 확인 할 수 있었다(Fig. 1).

하지만 위에서 얻어진 결과를 통해 표준시료와 benzyl기로 capping 된 시료 사이의 큰 변화를 관측하는데 어려움이 있었다. 이는 중성조건에서 benzyl기 capping 반응이 제대로 이루어지지 않았기 때문이라고 예측하고, pH를 염기성 조건으로 조정한 후 시료 내 benzyl기를 capping하기로 결정하였다. 시료 20 mg을 400 μl acetonitrile/ H₂O (5:5, v/v)로 녹인 후 절반은 표준 시료로 사용하였고, 나머지 절반은 benzyl bromide 10 mg 와 K₂CO₃ 10 mg을 추가하여 12시간 교반 하였다. 반응 종료 후 남은 benzyl bromide 제거를 위해 16시간 동결건조 하였으며, 위와 동일한 방법을 통해 분석하였다. 그 결과,

23~25분 사이의 머무름 시간에서 유의미한 피크 변화가 일어남을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

NMR 분석을 통한 peptide 정량

NMR은 주로 단일 화합물의 구조를 분석하는 도구로 사용되지만, 점차 정량을 위한 도구로도 많이 이용되는 추세이다. NMR의 시그널 적분 강도는 해당 시그널에 나타나는 핵의 수에 정 비례할 뿐 아니라, 스펙트럼의 모든 양성자의 감도가 동일하므로 다른 분석법에서는 필수적인 검교정이 필요 없다는 큰 장점이 있다. 또한 별다른 시료의 전처리가 필요하지 않아 혼합물에서 분석 물질을 분리해내거나 시료를 분해하는 등의 과정에서 발생하는 오차를 줄일 수 있다. 따라서, 농·축부산물 유래 발효 조성물에서 L-Arg을 포함한 peptide 정량을 위한 또 다른 방법으로서 NMR 분석법을 이용하였다.

본 실험에서는 표준물질로서 L-Arg과 arginine을 포함한 두 종의 염기성 펩타이드(Arg-Ala, Arg-Ser)를 이용하여 NMR 분석을 수행하였다. 총 3종의 표준물질을 일정량(Arg: 20.2 mg, Arg-Ala: 5.0 mg, Arg-Ser: 20.0 mg) 취한 후, 0.7 ml의 D₂O에 녹여 시료를 준비하였으며 준비된 시료는 Joel resonance (Japan)사의 JNM-ECZ500R를 이용하여 측정하였다. 각 시료의 ¹H-NMR spectrum을 얻기 위해 500 MHz 주파수에서

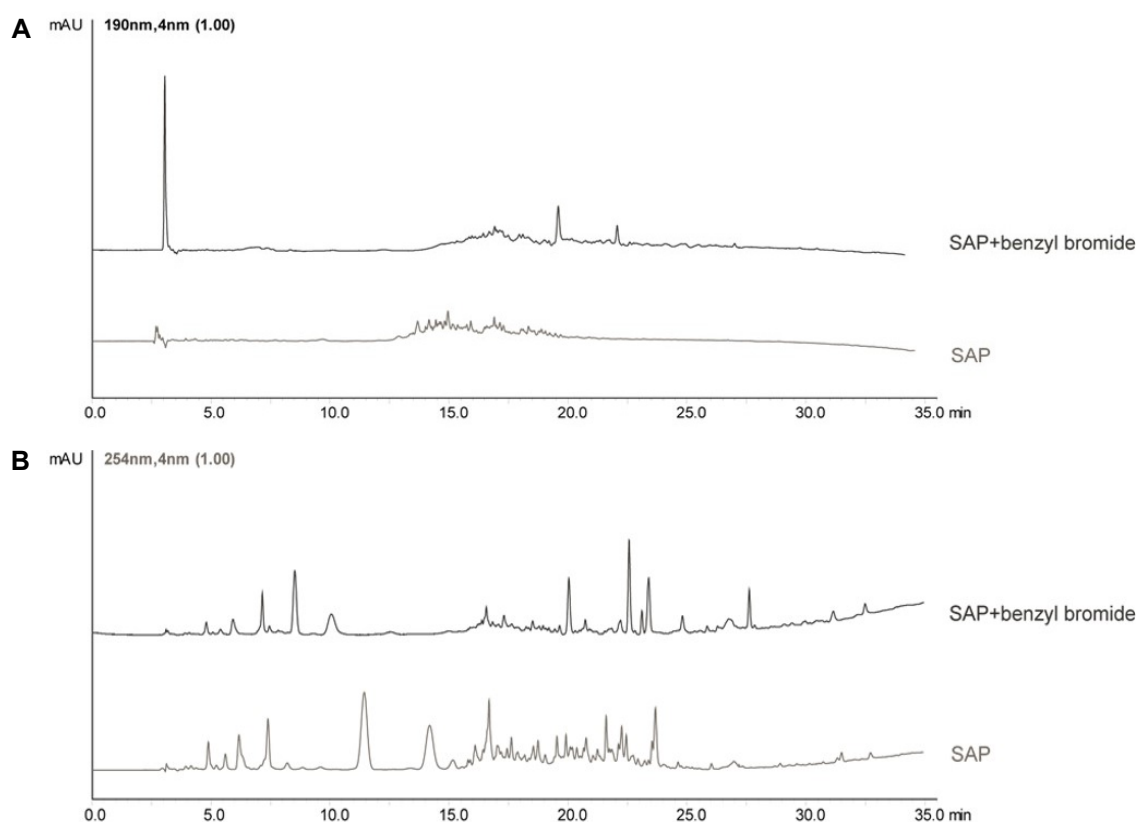


Fig. 1. (A) HPLC profile of SAP and SAP capped benzyl group under neutral conditions at 190 nm; (B) at 254 nm. Column: VP-ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Temperature: 40°C, Flow rate: 1.0 ml/min, Injection volume: 10 μl, Mobile Phase: A) H₂O + 0.1% TFA, B) acetonitrile + 0.1% TFA.

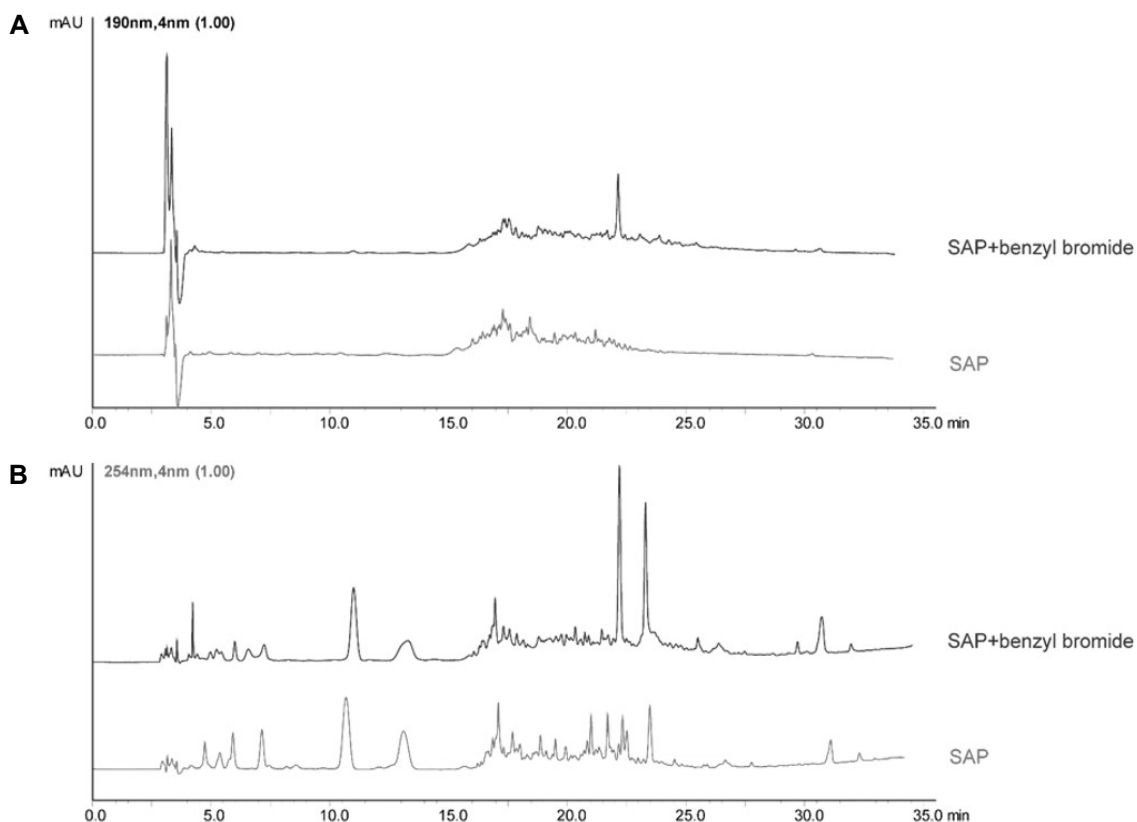


Fig. 2. (A) HPLC profile of SAP and SAP capped benzyl group under basic conditions at 190 nm; (B) at 254 nm. Column: VP-ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Temperature: 40°C, Flow rate: 1.0 ml/min, Injection volume: 10 μl, Mobile Phase: A) H₂O + 0.1% TFA, B) acetonitrile + 0.1% TFA.

relaxation time은 5초, 온도는 25°C로 설정 한 후, 32회 scan 하여 최종 결과를 얻었다. 또한, ¹³C-NMR spectrum 결과를 위해 125 MHz 주파수에서 relaxation time은 2초, 온도는 25 °C, scan number는 12288.0회 조건에서 분석을 수행하였다 (Table 1).

우선 L-Arg 시료의 ¹H-NMR spectrum을 살펴보면(Fig. 3), 3.13 ppm과 3.10 ppm 사이에 triplet 피크를 확인할 수 있었으며, 문헌치를 통해 이 피크가 구아니딘기에 가장 근접한 탄소의 수소일 것으로 추정하였다. 이러한 시그널은 Arg-Ser 과 Arg-Ala 시료에서도 각각 3.19~3.17 ppm과 3.18~3.17 ppm에

Table 1. Sample, ¹H-NMR and ¹³C-NMR parameters of peptides containing arginine

	Compound	L Arginine	Arg Ala	Arg Ser
Sample parameters	Molecular weight (g/mol)	89.09	245.28	261.18
	Sample weights (mg)	20.2	5.0	20.0
	Volume of solvent (ml)	0.7	0.7	0.7
	Molarity (mol/l)	0.323	0.029	0.109
	Solvent	D ₂ O	D ₂ O	D ₂ O
¹ H NMR parameters	Scans	36	36	36
	Relaxation Delay	5	5	5
	X_angle (deg)	45	45	45
	Chemical Shift (ppm)	3.17 (t)	3.18 (t)	3.18 (t)
¹³ C NMR parameters	Scans	12288.0	12288.0	12288.0
	Relaxation Delay	2	2	2
	X_angle (deg)	30	30	30
	Chemical Shift (ppm)	156.80	156.84	156.84

(t) = triplet

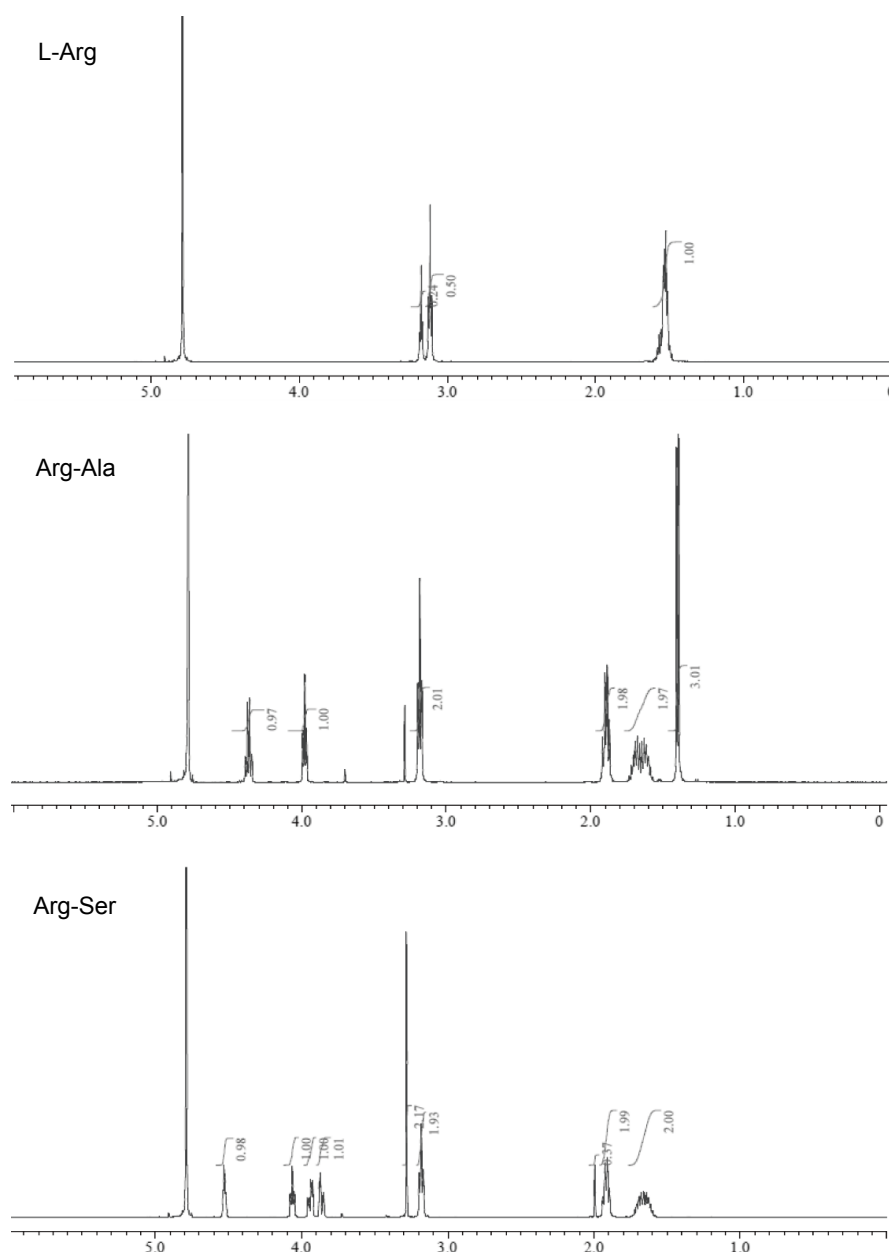


Fig. 3. ^1H -NMR spectrum of various samples containing guanidine group (L-Arg, Arg-Ala, Arg-Ser) from JNM-ECZ500R spectroscopy.

서 동일한 위치의 수소 시그널이 나타남을 확인하였다. 비록 각 시료의 구아니딘에 근접한 수소의 화학적 이동값은 매우 유사한 값을 나타내지만, 아미노산의 α -탄소의 수소피크와 sulfides에서의 수소피크 등과 겹쳐질 우려가 있어 내부표준시그널로 선정하는데 어려움이 있었다.

다음으로 각 표준물질의 ^{13}C NMR spectrum을 살펴 본 결과, 모든 시료에서 156.0~156.9 ppm 사이에 하나의 탄소 피크가 나타남을 확인하였다(Fig. 5). 위 실험에서 얻어낸 결과와 각 시료들의 문헌치를 비교하여 보았을 때, 156.0~156.9 ppm 위치의 탄소 피크는 구아니딘 위치에 있는 탄소의 시그널 일 것으로 추정하였다. 각 시료의 구아니딘 위치에 있는 탄소의

화학적 이동값은 매우 유사한 값(L-arginine: 156.8 ppm, Arg-Ala: 156.4 ppm, Arg-Ser: 156.4 ppm)을 나타내며, 무시할 수 있을 만큼의 오차를 가진다. 또한, 구아니딘 위치의 탄소 시그널은 다른 위치의 탄소 시그널들과 겹치지 않아 정확한 적분비와 화학적 이동값을 얻는 것이 가능하였다. 따라서, 구아니딘 위치의 탄소 시그널을 L-arginine을 포함한 peptide 정량을 위한 내부표준시그널로 선정하였다. 비록 충분한 양의 SAP를 확보하지 못하여 유의미한 ^{13}C -NMR 스펙트럼 결과를 얻는 것은 실패하였지만, 위 결과를 통해 arginine 함유 펩타이드 정량분석을 위해 NMR의 사용이 매우 간편하고 효율적인 수단임을 증명하였다.

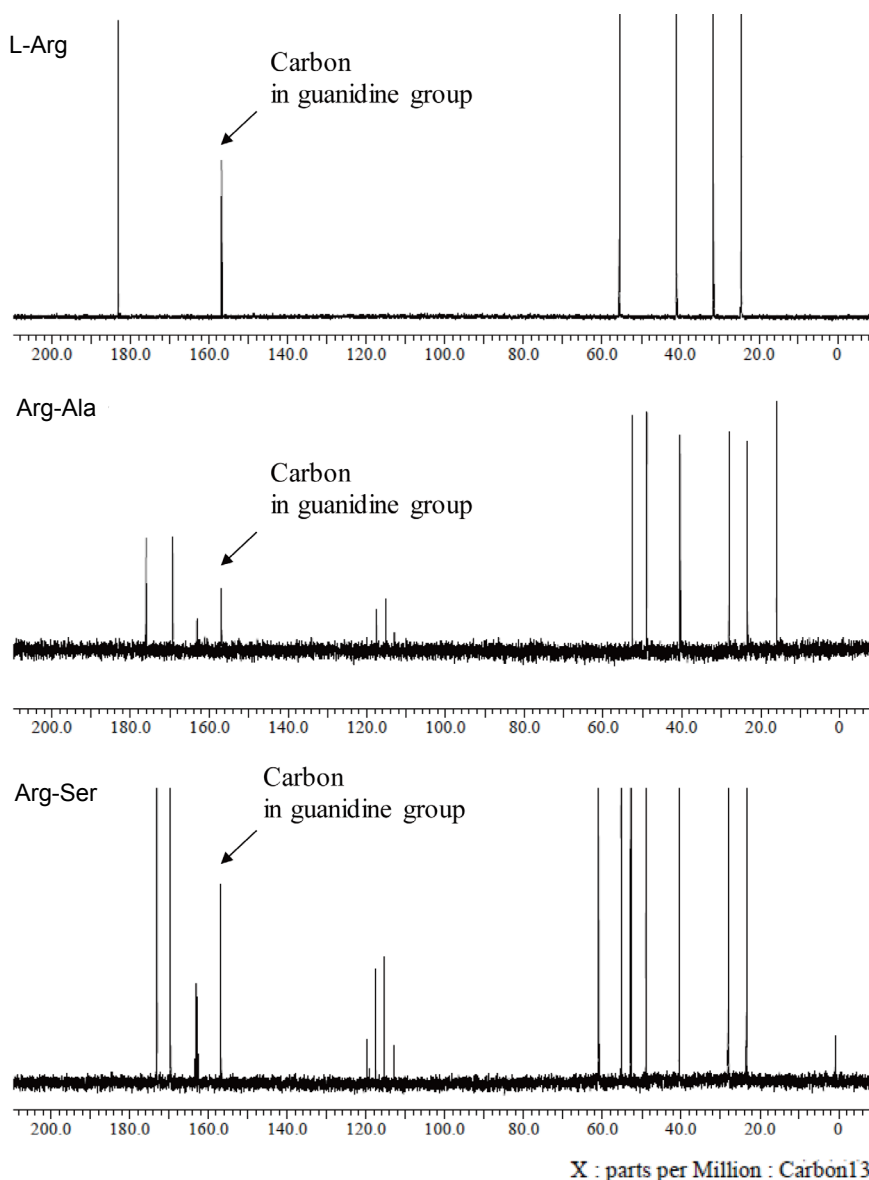


Fig. 4. ^{13}C -NMR spectrum of various samples containing guanidine group (L-Arg, Arg-Ala, Arg-Ser) from JNM-ECZ500R spectroscopy.

감사의 글

본 연구 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산 식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음(316053-02).

References

1. Kesteloot, H. and Joossens, J. V. 1988. Relationship of dietary sodium, potassium, calcium, and magnesium with blood pressure. *Belgian Interuniversity Research on Nutrition and Health. Hypertension* **12**, 594-599.
2. Kil, G. Y. and Jin, S. Y. 2015. A survey of awareness and preference for MSG according to the pursuit of well-being in diet. *J. Kor. Soc. Food Cult.* **30**, 481-490.
3. Kremer, S., Mojet, J. and Shimojo, R. 2009. Salt reduction in foods using naturally brewed soy sauce. *J. Food Sci.* **74**, 255-262.
4. Ogawa, T., Nakamura, T., Tsuji, E., Miyana, Y., Nakagawa, H., Hirabayashi, H. and Uchida, T. 2004. The combination effect of L-arginine and NaCl on bitterness suppression of amino acid solutions. *Chem. Pharm. Bull.* **52**, 172-177.
5. Powles, J., Fahimi, S., Micha, R., Khatibzadeh, S., Shi, P., Ezzati, M., Engell, R. E., Lim, S. S., Danaei, G. and Mozaffarian, D. 2013. Global, regional and national sodium intakes in 1990 and 2010: a systematic analysis of 24 h urinary sodium excretion and dietary surveys worldwide. *BMJ open* **3**, e003733.
6. Ritz, E., Koleganova, N. and Piecha, G. 2009. Role of sodium intake in the progression of chronic kidney disease. *J. Ren.*

- Nutr.* **19**, 61-62.
7. Van Der Klaauw, N. J. and Smith, D. V. 1995. Taste quality profiles for fifteen organic and inorganic salts. *Physiol. Behav.* **58**, 295-306.
8. Yamaguchi, S. and Ninomiya, K. 2000. Umami and food palatability. *J. Nutr.* **130**, 921S-926S.
9. Yoon, E. K. 2015. Policy Trends of sodium reduction. *Food Ind. Nutr.* **20**, 6-7.

초록 : HPLC와 NMR를 이용한 염미성 펩타이드 분석방법 검증

박선유¹ · 정용진^{2,3} · 김미연³ · 황지홍³ · 권택규^{4*} · 서영호^{1*}

(¹계명대학교 약학대학 제약학과, ²계명대학교 자연과학대학 식품가공학전공, ³KMF(주), ⁴계명대학교 의과대학 면역학교실)

최근 염분의 섭취와 관련하여 건강에 대한 우려가 늘어남에 따라, 염미대체제에 대한 소비자들의 관심이 급증하고 있으며, 세계적으로 경쟁력 있는 천연 저염제품의 개발이 필요한 실정이다. 최근 연구를 통해 식물성 및 동물성 원료 배합을 통해 가수분해물을 조제하여 최적 화합물을 얻는 것에 성공하였다. 본 연구에서는 염미성 펩타이드 분말내 arginine을 함유한 염미성 펩타이드를 규명하고 정량하고자 하였다. L-arginine 또는 arginine을 포함한 펩타이드를 표준물질로 하여 ¹³C-NMR로 분석한 결과 유사한 위치에 구아니딘기 탄소가 시그널(L-arginine: 156.8 ppm, Arg-Ala: 156.4 ppm, Arg-Ser: 156.4 ppm)이 나타남을 확인하였고, 이를 통해 간편하고 신속하게 arginine 함유 펩타이드 정량분석이 가능할 것으로 기대된다.