

영양성분 분석에 관하여

김민아·양미옥·황진봉

식품 분석실

전보에 이어 식이섬유, 콜레스테롤, 지방산 분석법에 대하여 소개하고자 한다.

1. 식이섬유(Dietary Fiber)

섬유질의 분석과 그 정의의 역사는 그리 길지가 않지만 1970년 초 Burkitt와 Trowell의 십장병, 암등의 병과 식이섬유가 관련되어 있다는 보고 이래 식이섬유에 관한 관심이 집중되었다

식이섬유란 용어자체는 1953년 Hipsley에 의해 '식물성 식품의 소화불능성 탄수화물로서 쓸모없는 물질'로 정의하였으며 그 후 1972년 Trowell은 '소화되지 않는 식물세포벽 물질'이라고 정의하였다. 1976년 '인체의 소화기관내에서 분비되는 소화효소로 분해되지 않은 리그닌과 식물성 다당류'라고 정의 하였다. 이러한 정의는 현재까지 일반적으로 세계적으로 받아들여지고 있다. 최근에는 식물성 뿐만 아니라 동물성식품의 기원도 포함하여 난소화성 성분의 총체라고 정의하여 널리 받아들여지고 있다.

식이섬유의 방법론은 섬유의 비영양성때문에 별로 주목을 받지 못하다가 현대에 들어서 식이섬유가 건강에 영향을 미친다고 알려짐에 따라 식이섬유 분석방법이 요구되었다. 하지만 Total Dietary Fiber(이하TDF)는 식이섬유의 실제적 물리적 특성을 항상 예견할 수 없으며, 가장 이상적인 방법으로 확실한 식이섬유양, 각각의 섬유성분의 결정이 빠르고 간단해야 하지만 아직 이 모든 것을 충

족시키는 방법은 없다.

TDF의 평가방법으로 효소적 분해방법이 Association of Official Analytical Chemistry(이하 AOAC)에 의해 인정받게 되었고, Food And Drug Administration(이하 FDA)에 labeling 목적으로 인정받게되었다.(Proskey et al 1984, AOAC collaborative Study, 1984;FDA, 1984).

이에 본보에서는 AOAC와 FDA에서 권장되고 있는 효소중량법을 소개하고자 한다.

1.1 시료 준비

식품의 sampling은 식이섬유의 분석뿐만 아니라 다른 영양소의 분석과정에서도 가장 중요한 단계이다.

시료의 지방 함량이 10%이상인 경우에는 석유 에테르를 시료 1g당 20ml를 취해 3회 정도 추출하여 탈지를 시키며, 당이 많은 시료의 경우에는 85% EtOH(10ml/g)로 2~3회 추출한 후 그 상등액을 decanting하여 40℃에서 하룻밤 건조시킨 다음 시료로 사용한다.

TDF의 정량을 위해서는 건조시료를 사용해야하는데 하룻동안 건조된 시료의 입자크기는 0.3~0.5mm가 적당하므로 체로 쳐서 균질화하며 만약 가열 건조가 불가능한 시료인 경우에는 냉동건조를 한 다음 분쇄하고 체를 쳐서 사용한다.

1.2 효소분해

일반적으로 효소 중량법에 사용되는 주요 효소 그룹은 전분이나 단백질 분해효소이다. α-amylase, amyloglucosidase는 대부분의 경우 전분을 완전히 분해시키나, 식이 섬유와 결합하고 있는 전분, 셀룰로즈, 베타글루칸, 글로코만난 등 여러 종류의 글루칸 때문에 논쟁의 여지가 있으며 α-amylase의 경우 최적 pH는 6.0~7.0이다. 단백질은 주로 세포벽 matrix를 결합하고 있어 분해하기 힘들다. 현재 microbial protease가 펩신 대신에 일반적으로 사용되고 있고 최적 활성 pH는 6.0~9.0이다.

1.3 TDF의 측정

효소분해물을 여과하여 잔사를 alcohol, acetone 이나 물로 세척, 건조한 후 단백질과 회분을 측정하여 TDF, SDF(Soluble Dietary Fiber)와 IDF (Insoluble Dietary Fiber)의 함량을 구하는 방법으로 그림 1과 같다.

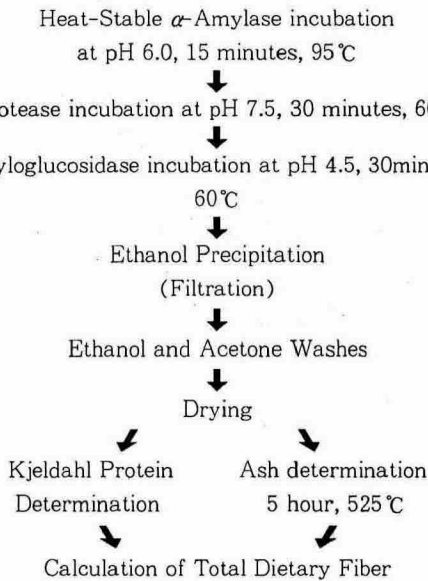


Fig. 1 Total Dietary Fiber Assay

1) 장치

- (1) Fritted crucible : porosity #2(coarse

40~60 microns)

- (2) 진공장치 : 진공펌프나 aspirator
- (3) 105°C 건조기나 70°C 진공건조기
- (4) 데시케이터
- (5) 전기회화로(525°C)
- (6) 열탕기(95°C)
- (7) 항온진탕기(60°C)
- (8) 비이커(tall beaker 400ml 또는 600ml)
- (9) 전자저울(0.1mg까지 측정가능한 저울)
- (10) pH meter

2) 시약 (시약제조시 사용되는 물은 증류수 또는 탈이온수를 사용할것)

- (1) 석유에테르
- (2) 95% 알콜
- (3) 78% 알콜(95% 알콜용액을 희석해서 사용하여도 됨)
- (4) 아세톤
- (5) 인산완충용액(0.08M, pH 6.0) :
Na₂HPO₄(무수)1.400g과 NaH₂PO₄ (무수)8.400g을 달아 증류수 700ml에 녹이고 1l 정용플라스크에 증류수로 정용한다.
- (6) α-Amylase, Heat-Stable
- (7) Protease : Sigma Product No. 3910
- (8) Amyloglucosidase : Sigma Product No. 9913
- (9) NaOH용액(0.275N) : 마개를 꼭 닫고 실온에서 보관
- (10) HCl용액(0.325M) : 마개를 꼭 닫고 실온에서 보관
- (11) Celite : Sigma Product No. C8656

3) 시료전처리

Crucible : Crucible는 525°C에서 1시간 동안 가열한 후 냉각시켜 증류수에 담가 깨끗이 씻은 후 건조시킨다. 각각의 crucible에 celite를 0.5g 달아 넣고 130°C에서 1시간 이상 항량이 될 때까지 건조시키며 “celite+crucible”의 무게를 0.1mg까지 잰다. 사용 전까지 데시케이터에서 보관한다.

Sample : 시료의 지방함량이 10% 이상인 경우에는 석유에테르를 시료 1g당 20ml를 취해 3회 정도 추출하여 탈지를 시키며, 당이 많은 시료의 경우에는 78% EtOH(10ml/g)로 2~3회 추출한 후 그 상등액을 decanting하여 40°C에서 하룻밤 건조시킨 다음 시료로 사용한다.

TDF의 정량을 위해서는 건조시료를 사용해야 하는데 하룻동안 건조된 시료의 입자크기는 0.3~0.5mm가 적당하므로 체로 쳐서 균질화하며 만약 가열 건조가 불가능한 시료인 경우에는 냉동건조를 한 다음 분쇄하고 체를 쳐서 사용한다. 또한 건조시료의 보관은 분석 시작전까지 데시케이터에 넣어둔다.

4) 측정

여기서 공시험은 4개를 준비해야 하는데 시약에서 잔사에 이르기 까지 전과정을 시료와 동일한 방법으로 수행한다. 이 중 2개는 단백질 분석에 사용하며 나머지는 회분에 사용한다.

- (1) 각각 4개의 비이커에 시료 1g씩 달아 넣고 (이때 각각의 무게차이는 20mg이내가 되어야 함) 인산용액 pH 6.0(시약 5) 50ml을 가한다.
- (2) α -amylase 0.1ml(시약 6)을 각각 비이커에 가하고 잘 혼합한다.
- (3) 각 비이커는 알루미늄 호일로 덮고 끓는 열탕기로 옮겨 5분간 천천히 진탕하며 비이커 용액의 온도가 95°C로 도달되면 15분간 배양한 후 꺼내어 실온으로 냉각시킨다.
- (4) 0.275N NaOH 10ml을 가하여 비이커용액의 pH를 7.5 ± 0.2 가 되도록 조절시킨다(이때 시약 9,10).
- (5) 인산용액(시약 5)에 protease(시약 7)용액을 50mg/ml가 되게끔 사용 전 즉시 제조하여 각 비이커에 0.1ml(5mg)을 첨가하여 잘 섞는다.
- (6) 알루미늄 호일로 마개를 한 후, 60°C 온탕기에 넣고 비이커용액이 60°C가 될 때까지 교반시키고 도달되면 30분간 배양한 다음 실온

으로 냉각시킨다

- (7) 0.325M HCl 10ml(시약 10)를 용액에 가해 pH를 4.0~4.6로 조절하고, 여기에 Amyloglucosidase(시약 8) 0.3ml를 가한다.
- (8) 알루미늄 호일로 다시 마개를 한 후, 60°C 온탕기에 넣고 비이커용액이 60°C가 될 때까지 교반시키고 도달되면 30분간 배양한 다음 실온으로 냉각시킨다
- (9) 각 비이커에 95% 에탄올을 280ml를 가한다.
- (10) 시료의 내용물이 완전하게 침전이 되도록 실온에서 하룻밤 방치한다.
- (11) 각 crucible속에 들어 있는 celite는 78% 에탄올을 사용하여 celite가 평평하도록 미리 적셔 놓으며, 하룻밤 방치시킨 시료를 비이커에서 crucible로 진공을 걸어 천천히 여과한다. 여과가 종료되면 여기에 78% 에탄올 20ml를 3번 가해 잔사를 씻고, 95% 에탄올 10ml 씩 2번 가해 재차 씻고, 마지막으로 아세톤 10ml를 넣어 최종적으로 여과한다. gum을 형성하는 시료는 여과가 잘 안되므로 이때에는 여과의 속도를 높이기 위해 잔사의 표면을 spatula를 이용하며 여과시간은 crucible당 평균 30분간 소요된다.
- (12) 여과가 끝난 crucible는 105°C 건조기나 70°C 진공건조기에 넣어 하룻밤 건조하고 방냉한 다음 무게를 정확히 잰다.
Residue + Celite + Crucible
Residue Weight = (Residue + Celite + Crucible) - (Celite + Crucible)
- (13) 시료 2개와 공시험 2개는 단백질분석(질소계수 6.25)에 사용한다.
- (14) 또한 나머지 시료 2개와 공시험 2개는 회분 분석용으로 525°C에서 5시간 회화시킨다음 방냉하여 정확히 무게를 잰다.
Ash + Celite + Crucible
Ash Weight = (Ash + Celite + Crucible) - (Celite + Crucible)

5) 계산

$$\text{Blank} = \frac{\text{Average Blank Residue Weight (mg)}}{\text{Average Sample Weight (mg)}} - \frac{\text{Average Protein Weight (mg)}}{\text{Average Sample Weight (mg)}} - \frac{\text{Average Ash Weight (mg)}}{\text{Average Sample Weight (mg)}} - \frac{\text{Blank}}{\text{Average Sample Weight (mg)}}$$

$$\% \text{ TDF} = \frac{\text{Average Sample Residue Weight (mg)} - \text{Average Sample Protein Weight (mg)} - \text{Average Sample Ash Weight (mg)} - \text{Blank}}{\text{Average Sample Weight (mg)}} \times 100$$

2. Cholesterol

2.1 Gas Chromatograph법

AOAC에서 콜레스테롤 분석시 보편적으로 권장하고 있는 방법으로 혼합용매를 이용하여 시료에서 지질을 추출한 다음 검화시킨다. 콜레스테롤과 다른 스테롤을 함유하는 불검화물 분획을 벤젠으로 추출한다. 스테롤을 트리메틸실릴 에틸 형태로 유도체를 만들어 5 α -콜레스테인을 내부표준물질로 하여 GC로 정량분석한다.

(1) 지질추출법

① 클로르포름-메탄올법

AOAC에서는 유지추출에 관한 언급이 없는 모든 식품에 적용하는 가장 효율적인 방법으로 일반적으로 알려져 있다. 콜레스테롤과 다른 스테롤은 이 용매를 사용하는 지질을 추출하는 과정에서는 파괴되지 않으며 지질의 구조가 바뀔 가능성이 매우 적다. 하지만 클로르포름-메탄올-물의 비율이 지질을 정량적으로 추출하는데 매우 중요하다. 따라서 지질 추출 전에 수분의 함량을 측정하여야 한다.

일정량의 시료를 취하여 클로르포름 : 메탄올 : 물 = 1 : 1 : 0.9의 비율이 되도록 용매를 가하여 균질기에 넣어 균질화 시킨 시료를 분액여두에 넣어 흔들어서 층을 분리시킨다. 이때 클로르포름 층을 취한 후 50ml의 클로르포름을 각각 2회 더 가하여 흔들어서 다음 정제한 후 250ml 삼각플라스크에 클로르포름층을 취한다. 무수황산나트륨으로

탈수 후 여과하여 농축한다.

② 산가수분해법

산(염산)을 이용하여 단백질, 다당류를 가수분해하여 세포벽을 부수기 때문에 지질추출에 용이한 방법이다.

이 방법은 주로 밀가루, 구운제품, 과일이 들어간 구운제품, 마카로니, 야채드레싱같은 계란가공품들에 적당하다.

AOAC에서 권장하는 시료는 다음과 같다.

- 925.32-Fat in eggs
- 922.06-Fat in flour
- 935.39D-Fat in baked products
- 935.38-Fat in macaroni products
- 948.15-Fat in seafoods

③ 에틸추출법

에테르나 석유에테르를 이용하여 마쇄한 시료로부터 환류 냉각시키면서 12-72시간 동안 연속적으로 지질을 추출하는 것이다. 이 방법은 동물사료(920.39 B,C) 중의 지질이나 보리, 밀, 맥아, 콩과 같은 곡류제품이나 육류, 버터(936.06), 향신료 등으로 부터 지질을 추출하는데 적합하다.

이외에도 암모늄을 이용한 알카리 처리 방법, 진한 황산을 이용하여 유화상태에 있는 지방질을 깨어 지질을 추출하는 백곡법 등이 있다.

(2) 검화 및 불검화물 추출

(1)의 적절한 방법을 이용하여 추출한 지방에 석유에테르 70ml를 잔사에 가하여 녹인 후 여과한다. 60% KOH 8ml를 넣어 계속 섞어준 후 반응용 알콜(에틸알콜 : 메틸알콜 : 이소프로필알콜 = 90:5:5) 40ml을 가하고 환류냉각관을 부착한 상태로 100°C에서 1시간 반응시킨 후 반응용 알콜 60ml을 더 가하면서 서서히 냉각시킨다. 벤젠 100ml을 서서히 넣은 후 30초간 강하게 흔들어 준 다음 분액여두로 옮긴다. 1N KOH 200ml을 가하고 10초간 가볍게 교반하고, 층분리가 되면 물층은 버리고 벤젠층을 받아 페놀프탈레인과 증류수로 pH 7.0정도가 될 때까지 벤젠층을 수세한다.

수세한 벤젠층을 받아 무수황산나트륨으로 15분간 탈수한 후 여과하여 감압건조시킨다. 아세톤 3ml를 가하여 녹인 다음 질소기체를 이용하여 다시 건조한다.

(3) GC분석

- ① 주입기 및 불꽃이온화검출기(FID)가 부착되어 있는 GC
- ② 칼럼 : 극성이 낮은 모세관 칼럼(예, HP-1, HP-1 또는 이와 유사한 극성을 가진 칼럼) 0.53mm i.d×5m×2.65 μ m film thickness
- ③ GC의 조건 : 주입기-260 $^{\circ}$ C, 검출기-280 $^{\circ}$ C
오븐 220 $^{\circ}$ C(3분)-3 $^{\circ}$ C/분-250 $^{\circ}$ C(10분)
- ④ 운반기체 - 수소 10psi
- ⑤ 보충기체 - 질소 25ml/분
- ⑥ 분할기체 - 1:40

(4) Fluorometric Method

지질 추출 후 fluorescence spectrophotometer를 이용하여 extraction wave length 546nm, emission wave length 577nm에서 측정하는 방법이다.

AOAC에서 권장하는 시료는 다음과 같다.
969.14 - Sterol in macaroni products

(5) 이외에도 계란의 콜레스테롤을 분석하는 Trimetric Method(941.09 - Cholesterol I eggs), Digitonin Method(955.29, 935.39) 등이 있다.

3. 지방산

지방질로부터 지방산을 얻는 고전적인 방법은 비누화를 시키는 것이다. 비누화에 의하여 지방산의 알칼리염과 글리세롤이 얻어지며 이 혼합물을 산성화시켜 지방산을 얻는다. 이 과정은 상온에서 천천히 진행되며 온도를 높이면 이중결합을 가진 것은 이성화가 일어난다. 트랜스메틸레이션화가 보통 많이 사용되는 방법이다.

AOAC에서 글리세라이드와 인지질을 검화시켜 지방산을 떼어내고 BF₃촉매하에 GC로 분석하기

위하여 메틸에스터를 제조한다. 이 방법은 에폭시, 하이드로퍼록시, 알데하이드, 케톤, 사이클로프로필을 포함하는 지방산의 메틸에스터를 만드는데 부적합하다. 왜냐하면 이들 화합물은 메틸에스터를 만드는 과정에서 완전히 또는 부분적으로 파괴되기 때문이다.

3.1 지질의 추출

(1)의 ①-③의 방법에서 시료의 특징에 따라 적절한 방법을 이용하여 지질을 추출한다.

3.2 메틸레이션

추출한 지방에 0.5N NaOH 5ml를 가한후 90 $^{\circ}$ C water bath에서 2분 동안 냉각기를 부착하거나, 150 $^{\circ}$ C sand bath에서 5분동안 가열하여 지방구가 없어질 때까지 환류시킨다. BF₃시약 5ml를 가하고 2분간 반응을 시킨다. heptane 2~5ml를 가하고 1분간 더 끓인다. 플라스크를 분리하고 포화식염수 약 15ml를 가한 후 15초간 심하게 흔들여준다. 포화식염수를 추가로 가하여 heptane층이 플라스크목에까지 올라오도록 한다. Heptane층에서 12ml를 뽑아 무수황산나트륨이 충전되어 있는 파스퇴르 피펫을 통과시켜 탈수시킨다. 필요하면 heptane 중의 지방산 농도를 5~10%까지 농축한다.

3.3 GC를 이용한 지방산 분석

주입기 및 불꽃이온화검출기(FID)가 부착되어 있는 GC

칼럼 : 극성이 높은 모세관 칼럼(예, BP-20, Carbowax 20M, Supelcowax 10 또는 이와 유사한 극성을 가진 칼럼)
0.32mm i.d×30m×0.25 μ l film thickness

GC조건 : 주입기-230 $^{\circ}$ C, 검출기-250 $^{\circ}$ C
오븐 160 $^{\circ}$ C(1분)-3 $^{\circ}$ C/분-220 $^{\circ}$ C(9분)

운반기체 - 헬륨 또는 수소 12psi
보충기체 - 질소 또는 헬륨 25ml/분
분할기체 - 1:30-1:100