

아미노산 분석법

김선림[†] · 박남규 · 손종록

작물과학원

I. 서 언

아미노산 (amino acid)은 단백질 분자의 가장 기본적인 조성 물질을 말한다.

아미노산의 구조는 α-탄소원자에 아미노기(-NH₂)와 카르복실기(-COOH)가 붙어 있으며 여기에 수소와 R기가 연결되어 있다(그림 1). 결사슬이 수소원자인 글리신을 제외하고는 α-탄소원자가 모두 비대칭탄소원자이므로 광학이성질체인 D-형과 L-형이 존재하지만 생체단백질을 구성하는 아미노산의 대부분은 L-형이고 화학적으로 합성된 아미노산이 D-형과 L-형의 혼합물로 존재하는 경우가 대부분이며 D-형 아미노산은 생체 내에서 드물지만, 세균의 세포벽이나 어떤 종류의 항생물질 등에는 함유되어 있다. 아미노산의 단위 -NH₂ · CHR · COOH를 아미노산단위, 연결 부분의 -CONH-를 펩티드결합이라고 한다. 천연아미노산에는 20여 종류가 있는데, 이 아미노산들이 펩티드(peptide) 결합으로 서로 연결되어 있으며 서로 각기 다른 모양으로 결합하여 수백만종의 단백질을 만들어 낸다. 단백질과 폴리펩티드는 넓은 의미에서 볼 때 같은 말이지만, 보통 분자량이 비교적 작으면 폴리펩티드(polypeptide)라 하고, 분자량이 매우 크면 단백질이라고 한다. 단백질은 소화효소에 의해 아미노산으로 분해된 후 체내에 흡수되며 흡수된 아미노산은 더욱 분해되어 에너지원이 되거나(4 kcal/g) 유전정보에 따라서 연결되고 합해져서 여러 종류의 단백질이 만들어진다.

필수아미노산(essential amino acid)이란 동물체내에서 합성되지 않으므로 음식물로부터 섭취해야만 하는 아미노산으로 leucine, isoleucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine,

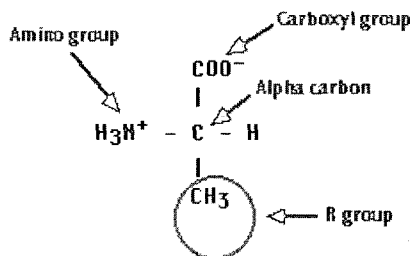


Fig. 1. Basic structure of amino acid.

[†]Corresponding author: (Phone) +82-31-290-6886 (E-mail) kimsl@rda.go.kr

tryptophan, valine 등 8종이다. 식품단백질의 영양가는 필수아미노산의 양에 따라서 결정된다. 필요량에 대하여 부족 되기 쉬운 필수아미노산을 제한아미노산이라 하며 lysine, methionine, threonine, tryptophan 등 4종의 필수아미노산이 제한아미노산이 되는 경우가 많다. 필수아미노산 이외의 아미노산을 비필수 아미노산이라 하며 체내에서 합성된다.

새로 생긴 단백질은 생물체의 구성성분이 되거나 효소로서 생체의 중요한 기능을 담당하게 된다. 아미노산은 카르복시기가 산의 성질을, 아미노기가 염기의 성질을 나타내므로 양쪽 성 전해질로 알려져 있다. 중성인 pH의 수용액 속에서 카르복시기와 아미노기는 수소이온을 각각 해리·결합하여 전하를 가진 $-COO^-$, $-NH_3^+$ 의 형을 취한다. 이러한 전하가 존재하기 때문에 아미노산의 결정은 대부분은 200°C 이상에서 녹으며 녹기 전에 분해되는 특징을 가지고 있다. 아미노산은 여러 가지 방법으로 분류되기도 하지만 중성, 산성, 염기성 아미노산으로 구분하는 것이 일반적이다. 중성 아미노산(monoamino monocarboxylic acid)으로는 glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, cysteine, methionine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, proline, hydroxy proline 등이 있고, 산성아미노산(monoamino dicarboxylic acid)으로 aspartic acid, glutamic acid가 있으며 염기성 아미노산(diamino monocarboxylic acid)으로는 lysine, arginine, histidine 등이 해당된다. 아미노산은 특유의 맛을 지니고 있는데, 이는 식품학적인 면에서 볼 때 중요한 의미를 가지고 있는데, 단맛(sweet)을 내는 아미노산으로는 glycine, alanine, valine, proline, hydroxy proline, histidine, serine, tryptophan 등이 있고, 쓴맛(bitter)을 내는 아미노산류로는 isoleucine, arginine, 무미(no-taste)의 아미노산으로는 leucine, 지미(flavor enhancing)의 아미노산으로는 glutamic acid (Na^+ salt)가 해당된다.

황함유 아미노산(sulfur amino acids)은 그 분자내에 $-SH$ (sulfhydryl group)와 같은 유황원자를 함유한 치환기를 가진 아미노산으로 cyteine, cystine 및 methionine이 있는데 영양학적으로 매우 중요하다.

아미노산의 분리정량방법으로는 여러 가지 방법이 있는데, 고전적인 방법으로 PC(paper chromatography), TLC(thin layer chromatography)법이 있는데, 단백질의 가수분해물을 여과지 또는 TLC판에 spot하여 1차원 혹은 2차원으로 상승 또는 하강법으로 전개하는 방법으로 전개용매로 butanol, acetic acid, 물, 함수 phenol 등이 사용된다. 또한 이온교환수지에 아미노산을 흡착시켜 완충용액으로 용출하여 ninhydrin으로 발색시키는 ion exchange resin chromatography법, GC(gas chromatography)를 이용하여 각종 아미노산을 휘발성 유도체 N-acetyl화나 trifluoroacetyl화 시킨 후 아미노산을 분석하는 방법들이 있으나 최근에는 이들의 방법을 응용하여 모든 분석과정을 자동화하여 분석을 하고 있는데, HPLC의 UV 검출기를 이용하는 Pico-Tag, 형광검출기를 이용하는 AccQ-Tag과 Ion Chromatography방법이 널리 이용되고 있으며 최근에는 유도체화가 손쉽게 이루어 질 수 있도록 kit가 개발되어 GC를 이용하는 방법이 손쉬워졌으며, 아미노산 자동분석기(Amino acid auto analyzer)를 이용하여 아미노산을 전담적으로 분석하는 방법이 이용되고 있다.

본장에서는 아미노산의 분석방법으로 최근에 널리 쓰여 지고 있는 방법 중 HPLC를 이용한 Pico-Tag법, kit를 이용한 GC법과 아미노산 자동분석기(Amino acid auto-analyzer)를 이용한 아미노산 분석방법에 대하여 살펴보겠다.

II. 분석방법

1. 시료의 준비 및 가수분해

아미노산 분석을 하고자하는 식물체 또는 종자는 분석을 하기 전에 수분함량을 정확히 측정하여야 한다. 수분함량의 측정은 일반적으로 105°C건조법으로 측정을 하는데, 수분함량 측정에 사용된 시료는 단백질이 열변성되었을 가능성이 매우 높기 때문에 사용하지 않는 것이 좋다. 작물의 식물체에 함유된 아미노산을 측정하고자 할 경우에는 시료를 동결건조하는 것이 바람직하며 수분함량이 측정된 시료는 100 mesh 이상으로 분쇄를 하는 것이 좋다. 분쇄된 시료는 일정량을 취하여 가수분해를 하게 된다. 아미노산을 분석하기위하여 시료에 함유된 단백질이 아미노산으로 분해시키기 위한 절차로서 0.1%의 phenol이 함유된 6 N 염산(HCl)으로 가수분해는 하는 것이 일반적인 방법이다. 농염산은 12 N에 해당하기 때문에 6 N 염산용액을 만들기 위해서는 증류수와 염산을 각각 50 : 50(v/v)으로 혼합하면 된다. 농염산은 유독가스가 발생되기 때문에 반드시 흡후드를 사용해야 한다. 6 N HCl에 의한 시료의 가수분해방법은 HPLC, GC 및 아미노산 자동분석기에 사용될 시료에 공통적으로 적용되는 전처리 과정이지만 가수분해를 하는 방법은 사용되는 기기와 실험실 여건에 따라 조금씩 변형이 가능하다. 여기서는 110°C 24시간 가수분해법, 150°C, 1시간 가수분해법 및 Microwave 장치를 이용한 가수분해법에 대하여 설명하겠다.

1) 110°C 24시간 가수분해법

이 방법은 조작이 간단하여 보편적으로 사용되고 있으나 시간이 많이 소요되는 단점이 있다.

(1) 장치 및 기구

- ① 가수분해병 또는 cap tube(Pyrex 관을 사용하는 것이 좋다)
- ② 항온기(110°C)
- ③ N₂ gas

(2) 조작

- ① 분석시료 0.3-0.5 g을 가수분해병(또는 cap tube)에 넣고 6 N HCl 10 mL을 가한다
- ② N₂ gas을 수 초간 불어 넣어 분해관 내부를 N₂로 치환 후 밀봉한다.
- ③ 110°C로 온도가 설정된 항온기에 분해관을 넣고 24시간 가열한다.

2) 150°C 1시간 가수분해법

이 방법은 workstation을 이용하는 방법으로 가수분해 시간이 매우 빠르고 정확하지만 특별한 장치가 요구되는 단점이 있다.

(1) 장치 및 기구

- ① Reaction vial
- ② Workstation
- ③ Vacuum pump
- ④ N₂ gas

(2) 조작

- ① 분석시료 0.3-0.5 g을 reaction vial에 넣고 6 N HCl 10 mL을 가한다.
- ② Work station에서 vacuum과 N₂ gas 스위치를 번갈아 조절하여 reaction vial내부의 공기를 완전히 제거하고 N₂ gas로 치환시킨다. N₂의 치환상태가 과도할 경우 가수분해과정 중 reaction vial이 폭발하는 경우가 발생하기 때문에 주의를 요하며 40 millitorr의 압력으로 질소를 치환하는 것이 좋다.
- ③ 150°C로 온도가 설정된 work station의 digest block에 reaction vial을 넣고 1시간 동안 가수분해를 한다.

(3) Microwave 장치를 이용한 가수분해

Micro wave 장치를 이용하여 아미노산 시료를 가수분해 하는 방법은 최근에 적용되기 시작하였는데, 분석시간이 매우 짧고 가수분해시 발생하는 유독 gas를 차단하는 기능이 뛰어나지만 아미노산이 과잉분해(파괴)되는 단점이 있기 때문에 분석시료의 성격이나 목적에 맞게 가수분해 시간을 조절해야 하는 단점이 있다.

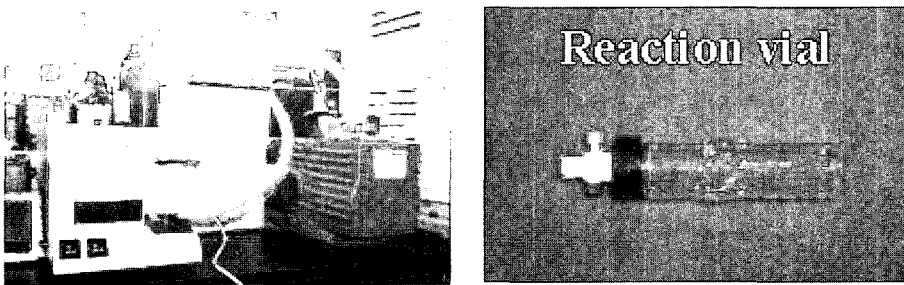


Fig. 2. Workstation and reaction vial.

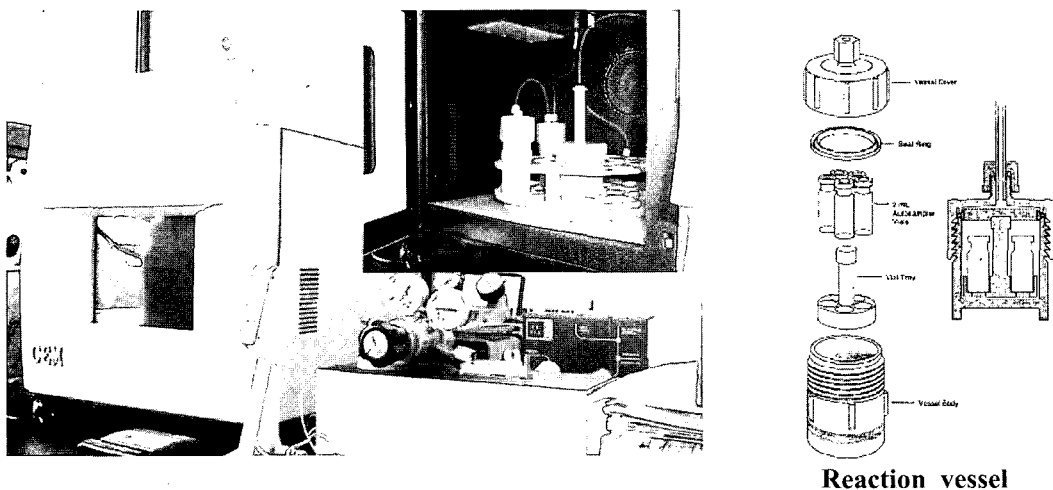


Fig. 3. Microwave vapor phase hydrolysis system and reaction vessel.

2. Sep-pak C₁₈ cartridge에 의한 가수분해액의 여과

- 1) 가수분해가 완료된 시료는 냉각을 위하여 실온에 방치한다. 충분히 냉각되기 전에 분해관을 개봉하면 위험하므로 주의를 요한다.
- 2) 가수분해 후 냉각된 가수분해 시료는 증류수로 50 또는 100 mL로 부피를 맞춘다.
- 3) 증류수로 부피를 맞춘 후 No 2 여과지로 여과를 한다.
- 4) 여과액의 일정량을 취하여 사전에 활성화된 Sep-pak C₁₈ cartridge에 통과시켜 그 액을 수거한다. Sep-pak C₁₈의 활성화는 가수분해 후 남아있는 각종 불순물 제거하기 위한 과정이다(그림 4).
- 5) 4)의 여과액을 다른 용기에 옮겨 담고 아미노산분석시료로 사용한다.

[Sep-pak C₁₈ cartridge의 활성화]

- 1) Solution I : 0.1% TFA
- 2) Solution II : methanol (80 : 20)
- 3) Solution III : methanol (70 : 30)
- 1)-2)-3) 용액 순으로 10 mL을 통과시켜 Sep-pak C₁₈ cartridge를 활성화 한다

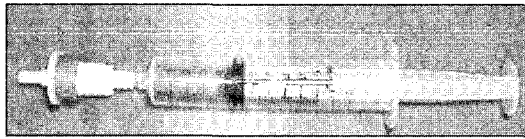


Fig. 4. Activation of Sep-pak C₁₈ Cartridge and filtering of hydrolysate.

3. 아미노산 분석

앞서 기술한 바와 같이 기기를 이용하는 아미노산의 분석법 중 HPLC, GC 및 아미노산 자동분석기를 이용하는 방법에 대하여 각각 설명을 하면 다음과 같다.

3.1. HPLC에 의한 아미노산 분석 (Pico-Tag system)

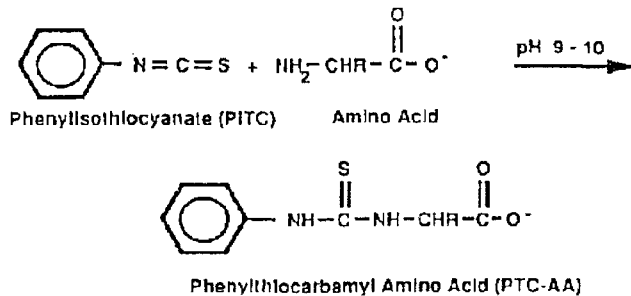


Fig. 5. Reaction complex of PITC and Amino acid.

White 등(1988)에 의해 개발된 Pico-Tag 방법은 protein과 peptide가 HCl에 가수분해된 후 PITC(Phenylisothiocyanate)로 유도체화 되어 PTC(Phenylthiocarbonyl) amino acid를 생성하며(그림 5) 이 유도체화물을 HPLC로 분석하여 reverse phase liquid chromatogram을 얻어 standard chromatogram과 retention time 및 area 비교에 의해 pmol range로 아미노산을 정성·정량분석 하는 방법이다. Pico-Tag법으로 아미노산 분석을 위한 시료의 유도체화 과정은 다음과 같다.

- (1) Sep-Pak C₁₈은 0.1% TFA(trifluoroacetic acid: 제1용액), 제1용액과 methanol의 80 : 20 비율의 용액(제2용액), 제1용액과 methanol의 70 : 30 비율의 용액(제3용액)으로 순차적으로 활성화하고, 최종적으로 제3용액과 시료 용액을 2 : 1로 혼합하여 Sep-Pak C₁₈에 통과시켜 workstation에 장착하여 건조시킨다.
- (2) 건조가 완료되면 MeOH: Water: TEA(2 : 2 : 1, V/V)의 redrying 시약을 sample tube에 가한 후 workstation에서 다시 건조시킨다.
- (3) 시료의 PITC 유도체화는 methanol : water : TEA(Triethylamine) : PITC(7 : 1 : 1 : 1, V/V)로 제조된 유도체 제조 시약을 각 sample tube에 넣고 몇 초 간 섞어준 후 20 분 동안 실온에서 방치시킨 다음 workstation에 장착하여 완전 건조시킨다.
- (4) 시료전처리가 끝난 시료는 sample diluent 500 μl를 각 sample tube에 넣어 시료를 완전 용해시킨 다음 20 μl를 HPLC에 주입하며 HPLC의 조건과 gradient curve는 표 1과 같다.

3.2. Gas chromatography (GC)에 의한 아미노산 분석

Gas chromatography에 의한 아미노산의 분석은 아미노산의 휘발성 유도체화 과정이 번거롭고 까다롭기 때문에 GC에 의한 방법보다는 HPLC에 의한 방법이 널리 적용되어 왔다. 그러나 최근 아미노산의 유도체화가 용이하게 이루어 질 수 있도록 kit가 개발되어 GC를 이용한 아미노산의 분석이 손쉬워졌다. 본 장에서는 현재 상업화되어 있는 Easy-fast amino acid sample testing kit (EZ:Faast, Phenomenex, USA)에 의한 아미노산 분석을 소개 하고자 한다.

1) 장치 및 기기

Gas chromatography

Easy-fast amino acid sample testing kit (EZ:Faast, Phenomenex, USA)

Carrier Gas: Helium

2) 분석조건(Condition for Gas Chromatographic Analysis)

Constant Flow Mode-GC-FID/NPD Parameters

Injection: Split 1 : 15@250°C, 2.5 ul

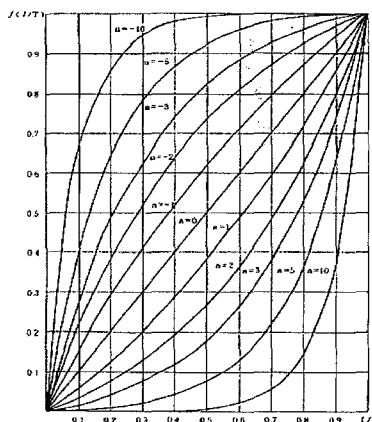
Carrier Gas: Helium, 8 psi(60kPa), Hydrogen 30 kPa

Oven Program: 32°C/min from 110 to 320°C, hold at 320°C for 1 minute

Detector: FID@320°C

Table 1. Instrument and analysis conditions for amino acids.

Instrument			Shimadzu SPD-7AV UV detector Shimadzu LC-7A pump 2 system Shimadzu SCL-6B system controller Shimadzu C-R6A integrator
Wave length			254 nm
AUFS			0.02
Column			Waters Pico-Tag column (3.9×150 mm, 4 μm)
Column temperature			47°C
Mobil phase			A: HPLC grade water containing sodium acetate trihydrate, TEA and mixed with CH ₃ CN B: 60% CH ₃ CN
Initial parameter			
Total flow		1.0 ml/min.	
B Conc		0%	
Time	Function	Value	
0.01	B Conc	0	
21.0	B Curve	-1	
21.0	B Conc	46	
21.5	T Flow	1.0	
21.5	B Conc	100	
21.5	B Curve	0	
22.0	T Flow	1.5	
26.0	B Conc	100	
26.5	B Conc	0	
39.0	B Conc	0	
39.5	T Flow	1.5	
39.9	T Flow	1.0	
39.91	Stop		



Various gradient curve profiles

3) 조작

- (1) 가수분해된 sample 100 μl와 Reagent 200 μl를 glass vial에 가하고 가볍게 흔들어 준다 (시료의 pH가 1-2에 해당할 경우 상기의 혼합액 중 25 μl를 취하여 glass vial에 가하고 100 μl Reagent 1을 가한다).
- (2) Sorbent tip을 1.5 ml syringe에 부착 후 혼합액을 pulling back한다.

- (3) 200 μ l HPLC grade water를 sample preparation vial에 가한다.
- (4) Sorbent tip이 장착된 syringe로 HPLC grade water를 천천히 끌어 올린다
- (5) Sorbent tip을 분리 후(Sorbent tip을 sample preparation vial에 남겨둠) syringe 속의 용액을 버린다.
- (6) Eluting medium 200 μ l을 sample preparation vial에 가한다.
(Eluting medium : Reagent 3A : Reagent 3B = 3 : 2, v/v, 분석 시료의 양에 따라 다르며 매일 새롭게 제조)
- (7) 0.6 ml syringe를 반쯤 뒤로 pull back 시킨 후 Sorbent tip을 부착시킨다.
- (8) Eluting medium이 sorbent tip의 plug에 도달할 때까지 흡수되면 sample preparation vial에 Eject 시키는 작업을 sorbent tip의 sorbent가 모두 빠져 나올 때까지 반복한다.
- (9) Drummond dialamatic microdispenser를 이용하여 50 μ l의 Reagent 4를 가한다.
- (10) 약5초간 vortexing 후 2분간 방치(Emulsify)
- (11) 2분후 시료를 수 초간 흔들어준 후 약 1분간 방치
- (12) Reagent 5를 100 μ l 가한 후 약 5초간 vortexing 후 1분간 방치 (Re-emulsify)
- (13) Reagent 6을 100 μ l가한 후 3초간 vortexing 후 상등액(아미노산 유도체)을 취하여 ZB-HAA column에 주입

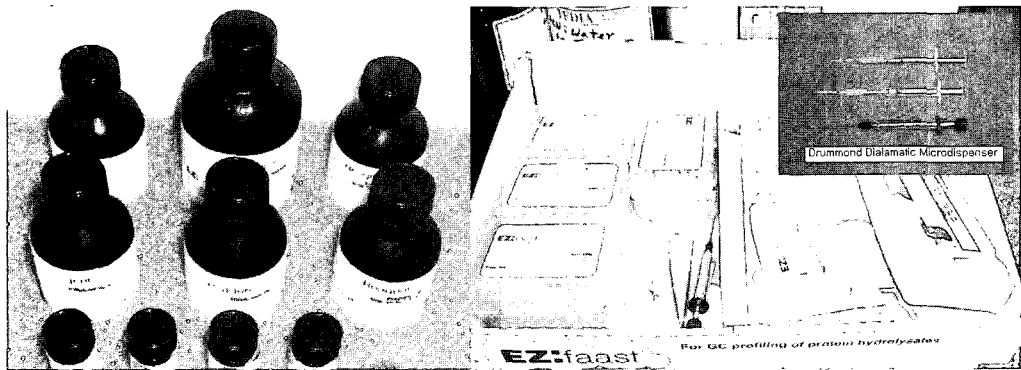


Fig. 6. Easy-fast amino acid sample testing kit (Phenomenex, USA).

3.3. 아미노산 자동분석기에 의한 분석

아미노산을 HPLC로 분석할 경우 UV에 흡광도를 갖게 하기위하여 PITC로 유도체화하고, GC로 분석할 경우 휘발성을 갖도록 유도체화 과정이 필요하다. 아미노산 자동분석기의 경우에는 아미노산에 ninhydrin을 첨가하고 가열하여 생성된 청색(prolin의 경우 황색) 화합물을 비색법으로 정량하는 과정을 자동화하여 개발된 분석기 이다. 아미노산 자동분석기로 분석을 할 경우 재현성이 뛰어나고 일반아미노산과 유리아미노산의 정성, 정량이 가능하지만 비용이 많이 드는 단점이 있다.

아미노산자동분석기에 의한 시료의 가수분해, Sep-pak C₁₈에 의한 filtering의 절차는 전술한바와 동일하며 분석기에 요구되는 이동상과 ninhydrin용액이 별도로 요구된다.

1) 장치 및 시약

- (1) System: L-8800 Amino acid auto analyzer (Hitachi, Japan)
- (2) 이동상: PH1, PH2, PH3, PH4, PH-RG, R-3, C-1, Ninhydrin solution (Wako, Japan), Buffer solution (Wako, Japan)
- (3) Column: Ion exchange column #2622SC PH
- (4) 표준용액: Amino acid calibration mixture (Ajinomoto-takara, Japan)

2) 조작

- (1) 가수분해 용액
- (2) L-8800 Amino acid auto analyzer (Hitachi, Japan)에 적재
- (3) Ion exchange column #2622SC PH 사용
- (4) Column 온도 : 50°C
- (5) Reaction chamber 온도 : 135°C
- (6) 자동분석기로 분석

3.4. 유리아미노산

1) 장치 및 시약

- (1) System: L-8800 Amino acid auto analyzer (Hitachi, Japan)
- (2) 이동상: PF1, PF2, PF3, PF4, PF-RG, R-3, C-1, Ninhydrin solution (Wako, Japan), Buffer solution (Wako, Japan)
- (3) Column: Ion exchange column #2622SC PF
- (4) 표준용액: Type AN II와 Type B(Wako, Wako-shi, Japan)를 각각 50 : 50(v/v)으로 혼합하여 사용한다.

2) 조작

- (1) 0.5g 시료 (유리아미노산의 경우 가수분해를 하지 않는다)
- (2) 3% TCA (trichloroacetic acid) 용액 10ml 가함
- (3) Vortexing
- (4) 상온에서 1시간 교반?추출 한다
- (5) 15,000rpm으로 15분간 원심분리
- (6) 상등액을 취함
- (7) Millipore 0.45 lm syringe filters (Milford, USA)로 여과
- (8) 아미노산 자동분석기로 분석

III. 분석결과

1. Pico-Tag 방법에 의한 HPLC chromatogram

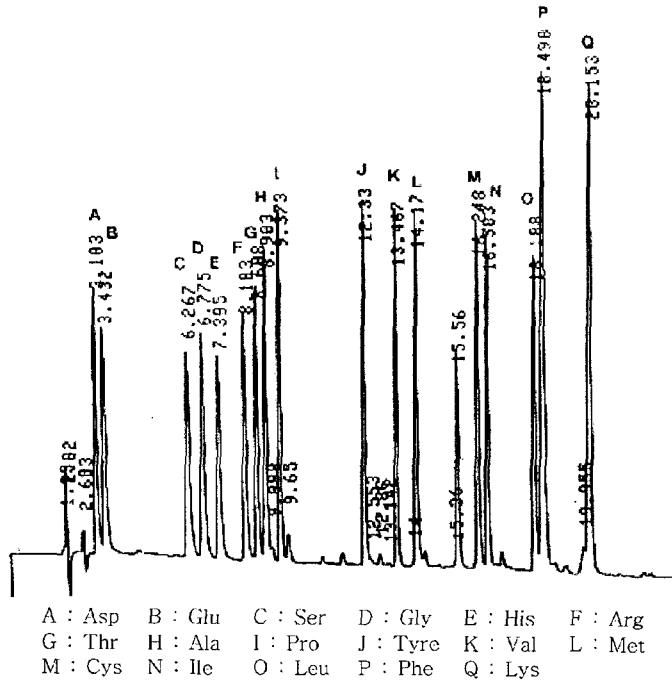


Fig. 7. HPLC chromatogram of standard amino acids.

2. Gas chromatography에 의한 분석

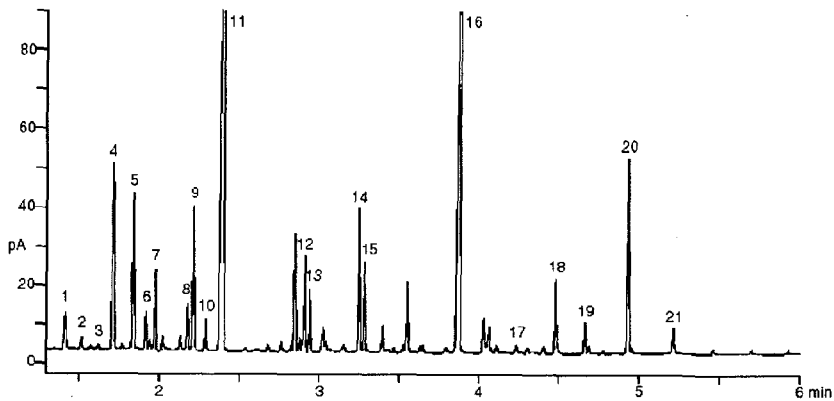


Fig. 8. Chromatogram of amino acids analyzed by gas chromatography.

1: alanine, 2: glycine, 3: α -aminobutyric acid, 4: valine, 5: norvaline(IS), 6: Leucine, 7: isoleucine, 8: theronine, 9: serine, 10: proline, 11: asparagine, 12: aspartic acid, 13: methionine, 14: glutamic acid, 15: phenylalanine, 16: glutamin, 17: ornithine, 18: lysine, 19: tyrosine, 20: tyrosine, 21: tryptophan

3. Amino acid auto-analyzer에 의한 분석

α -amino acid, peptide 및 protein은 pH 4~8범위 및 110°C범위에서 ninhydrin과 반응하여 자색의 착색물질을 형성한다. 그러나 착색물질의 색은 아미노산의 종류에 따라 다른데, prolin과 hydroxyprolin의 경우 황색의 착색물질을 형성하기 때문에 아미노산 자동분석기에서는 2 channel방식에 의해 아미노산을 동시에 분석한다.

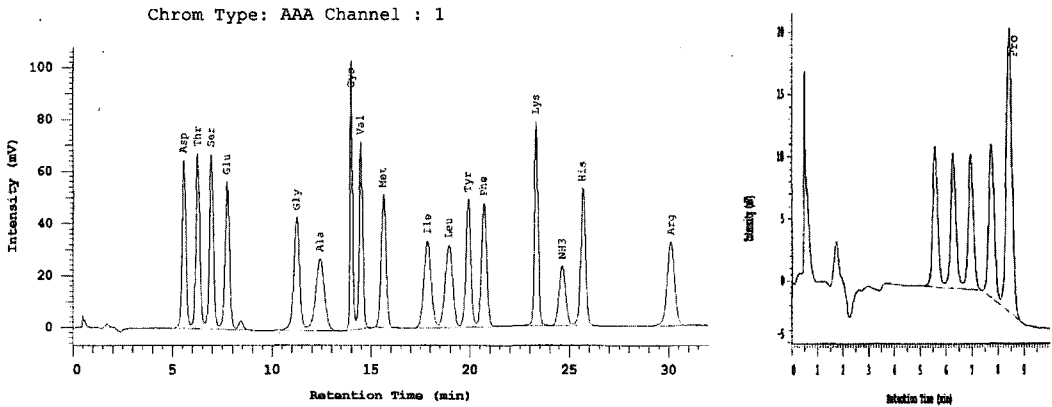


Fig. 9. Chromatogram of amino acids analyzed by amino acid auto-analyzer.

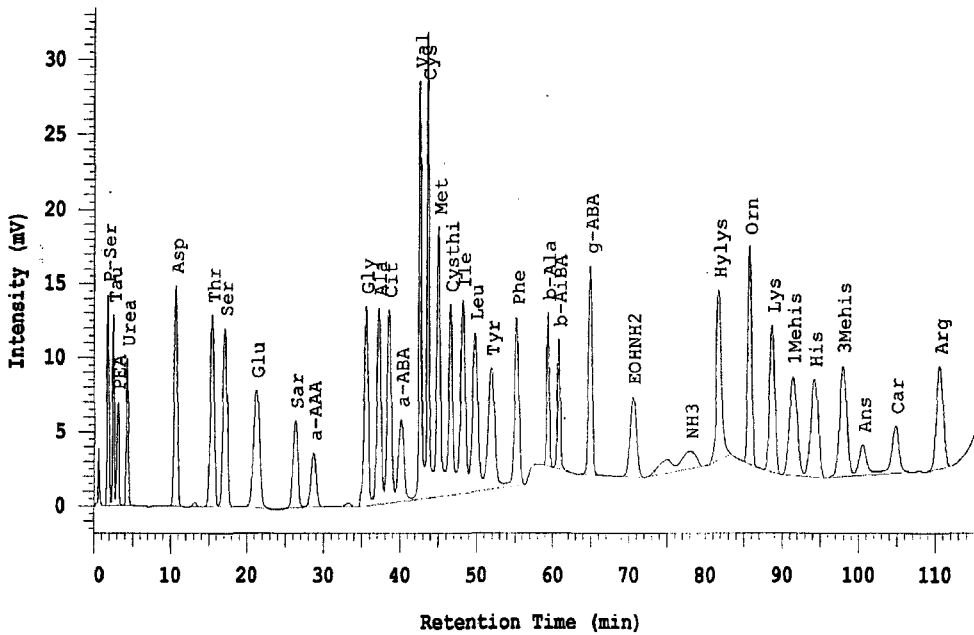
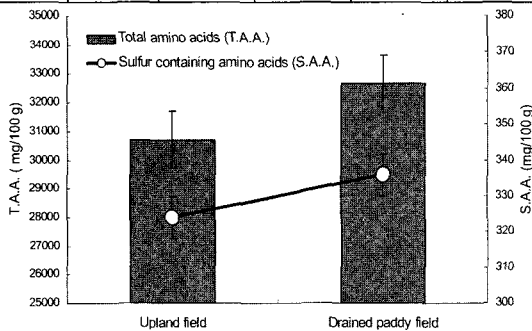


Fig. 10. Chromatogram of physiological fluid amino acids(PFAA)analyzed by amino acid analyze.

Table 2. Comparison of amino acid contents in soybeans produced in the upland and drained-paddy fields. (Unit: mg/100 g)

	Amino acids [†]	Amino acid contents of eight soybean varieties								
		DW [‡]	GJ	HK	PS	SP	SM	SW	TK	Mean
Uplandfield	Asp	2446.3	2231.1	2021.8	2203.4	2387.0	2309.8	2162.2	2197.5	2244.9
	Thr	2699.2	2455.9	2224.1	2495.7	2621.0	2559.2	2478.5	2488.0	2502.7
	Ser	1739.8	1593.9	1445.3	1568.4	1708.3	1614.2	1571.1	1590.7	1604.0
	Glu	4986.8	4641.0	4183.3	4506.9	4976.4	4792.5	4443.9	4538.0	4633.6
	Gly	2911.6	2692.2	2373.5	2727.2	2796.5	2784.9	2683.0	2626.0	2699.4
	Ala	1942.1	1798.6	1587.8	1834.0	1855.7	1857.5	1786.5	1757.0	1802.4
	Cys	162.3	143.2	123.3	147.0	134.6	125.5	134.6	143.4	139.2
	Val	1430.8	1317.0	1242.6	1388.1	1472.0	1586.1	1312.6	1336.1	1385.7
	Met	207.9	238.0	121.7	176.8	166.9	202.7	213.3	150.6	184.7
	Ile	943.0	901.2	933.4	940.7	1135.0	1286.5	872.2	931.8	993.0
	Leu	1872.8	1797.7	1900.8	1803.2	2331.5	2517.9	1739.8	1857.9	1977.7
	Tyr	244.3	245.4	276.3	252.1	327.9	351.0	248.4	252.5	274.7
	Phe	296.9	307.0	388.1	317.9	406.3	389.3	289.1	321.4	339.5
	Lys	260.3	231.5	214.0	242.7	252.5	249.8	237.9	236.5	240.7
	NH ₃	4430.0	8251.5	4389.8	4389.1	4676.0	4643.0	4195.9	3904.0	4859.9
	His	847.5	782.5	717.5	809.5	848.9	850.4	785.2	768.2	801.2
	Arg	2522.0	2352.4	2081.0	2304.3	2442.7	2509.4	2151.3	2241.3	2325.6
Pro	1800.6	1662.5	1585.2	1647.5	1842.2	1733.3	1682.3	1653.7	1700.9	
Drained-paddy field	Asp	2558.8	2460.0	2463.7	2212.7	2563.2	2367.0	2186.1	2567.4	2422.4
	Thr	2778.4	2673.8	2668.3	2445.4	2752.9	2627.7	2479.1	2802.3	2653.5
	Ser	1814.1	1738.4	1713.0	1581.4	1765.0	1693.2	1572.1	1787.9	1708.1
	Glu	5252.6	5088.0	5069.4	4603.7	5359.8	4945.3	4580.3	5332.2	5028.9
	Gly	3002.6	2940.6	2870.0	2664.8	2992.7	2829.4	2669.0	3003.7	2871.6
	Ala	1995.5	1959.1	1908.6	1762.3	1965.8	1886.1	1780.0	1974.7	1904.0
	Cys	162.3	152.8	150.6	141.4	131.5	132.2	135.9	156.1	145.4
	Val	1538.1	1415.7	1506.1	1423.5	1599.4	1465.8	1427.6	1573.6	1493.7
	Met	324.1	164.6	108.4	213.0	191.6	155.8	160.6	205.9	190.5
	Ile	1119.3	949.6	1007.1	1448.9	1073.6	1023.7	1040.5	1034.0	1087.1
	Leu	2228.3	1904.4	1980.2	3014.1	2076.6	2079.0	2052.8	1969.5	2163.1
	Tyr	305.6	254.7	247.4	513.2	272.3	290.4	264.8	251.2	300.0
	Phe	374.1	321.4	312.9	664.9	328.9	365.3	291.4	306.4	370.7
	Lys	258.3	261.0	259.6	237.1	263.5	257.7	239.9	261.0	254.8
	NH ₃	4608.1	4577.8	4736.1	4612.9	5459.5	4320.3	4496.0	5079.6	4736.3
	His	885.1	850.1	860.8	805.8	911.0	871.4	802.0	898.4	860.6
	Arg	2736.4	2608.6	2580.7	2563.6	2703.7	2732.3	2211.0	2772.2	2613.6
Pro	1971.6	1812.7	1905.8	1724.9	1982.8	1776.4	1720.0	1987.4	1860.2	



†Asp: aspartic acid; Thr: threonine; Ser: serine; Glu: glutamic acid; Gly: glycine; Ala: alanine; Cys: cysteine; Val: valine; Met: methionine; Ile: isoleucine; Leu: leucine; Tyr: tyrosine; Phe: phenylalanine; Lys: lysine; His: histidine; Arg: arginine; Pro: proline
 *DW: Daewonkong; GJ: Geomjeongkong 1; HK : Hwangkeumkong; PS: Pungsannamulkong; SP: Sinpaldalkong 2; SM: Somyeongkong; SW: Sowonkong; TK: Taekwangkong

This figure represents the mean values of total amino acid (T.A.A.) and sulfur containing amino acid (S.A.A.; methionine +cysteine) contents of eight varieties.

[Source : Kim et al., 2004. Korean J. Crop Sci. 49(4):309-315]

아미노산 분석법

Table 3. Free amino acid contents of buckwheat sprouts according to days after seeding.

Free amino acids	Seed	Day after seeding		
		3	5	7
		(mg/100g, DW)		
Phosphoserine	4.3 ± 0.2*	6.1 ± 0.2	10.3 ± 0.2	36.2 ± 2.3
Taurine	2.1 ± 0.1	2.3 ± 0.0	4.3 ± 0.8	1.6 ± 0.0
Phospho ethanol amine	1.5 ± 0.0	2.4 ± 0.3	5.2 ± 1.0	11.3 ± 2.4
Urea	37.8 ± 3.3	27.3 ± 2.5	65.9 ± 5.2	10.4 ± 2.1
Aspartic acid	24.7 ± 2.2	26.5 ± 2.4	50.7 ± 2.3	38.0 ± 3.2
Threonine	12.4 ± 1.7	26.7 ± 1.9	46.7 ± 3.6	94.9 ± 7.6
Serine	10.3 ± 0.9	30.7 ± 2.7	51.5 ± 3.1	114.6 ± 10.3
Glutamic acid	58.8 ± 5.2	99.3 ± 5.2	158.3 ± 8.8	72.8 ± 5.2
Sarcosine	2.7 ± 0.7	3.1 ± 0.2	4.1 ± 0.7	-
α-amino adipic acid	9.1 ± 1.1	11.6 ± 1.1	19.0 ± 2.1	21.0 ± 1.3
Glycine	8.6 ± 1.0	18.7 ± 2.0	30.1 ± 3.2	47.5 ± 4.5
Alanine	8.1 ± 1.2	47.0 ± 3.2	64.6 ± 6.0	55.6 ± 6.1
Citrulline	0.6 ± 0.0	3.3 ± 0.2	9.4 ± 2.5	27.0 ± 2.1
α-amono-n-butyric acid	0.5 ± 0.0	1.2 ± 0.1	1.6 ± 0.1	2.5 ± 0.6
Valine	26.3 ± 2.3	40.6 ± 3.5	64.0 ± 4.5	119.7 ± 7.9
Cystine	-	1.1 ± 0.0	8.2 ± 1.6	31.9 ± 2.1
Methionine	3.7 ± 0.1	7.5 ± 1.0	8.8 ± 2.2	14.7 ± 3.0
Cystathionine	47.5 ± 3.2	56.1 ± 3.3	63.5 ± 2.6	46.9 ± 1.8
Isoleucine	9.6 ± 1.5	14.6 ± 2.1	31.1 ± 2.0	68.3 ± 4.1
Leucine	6.8 ± 1.4	22.7 ± 1.9	38.4 ± 3.0	74.9 ± 3.9
Tyrosine	4.9 ± 0.8	18.4 ± 2.0	31.3 ± 2.5	37.7 ± 2.3
Phenylalanine	3.7 ± 0.3	17.6 ± 2.1	26.6 ± 3.3	68.6 ± 3.2
β-Alanine	1.1 ± 0.1	2.3 ± 0.1	6.5 ± 1.0	13.3 ± 0.8
β-Amino isobutyric acid	-	-	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0
γ-Amino-n-butyric acid	2.5 ± 0.1	16.5 ± 2.4	81.9 ± 5.5	78.8 ± 6.2
Ethanol amine	0.9 ± 0.0	4.6 ± 0.3	19.6 ± 1.5	55.1 ± 4.5
NH ₃	3.6 ± 0.3	7.6 ± 1.0	55.8 ± 3.4	80.7 ± 6.4
Hydroxylysine	3.9 ± 0.6	4.4 ± 0.2	3.7 ± 0.8	0.9 ± 0.0
Ornithine	3.1 ± 0.2	3.6 ± 0.0	5.4 ± 1.1	4.9 ± 0.7
Lysine	7.0 ± 1.1	22.0 ± 0.5	41.4 ± 3.2	56.2 ± 2.6
1-Methylhistidine	-	-	2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.2
Histidine	3.7 ± 0.3	19.1 ± 1.1	56.2 ± 3.6	144.3 ± 10.2
3-Methylhistidine	-	-	0.6 ± 0.0	0.9 ± 0.0
Anserine	-	-	2.1 ± 0.0	-
Carnosine	4.6 ± 0.6	2.2 ± 0.3	1.0 ± 0.0	-
Arginine	73.0 ± 5.2	115.6 ± 11.0	224.5 ± 12.1	146.0 ± 7.8
Proline	2.9 ± 0.4	11.3 ± 1.3	22.8 ± 2.4	16.2 ± 1.6
Total	389.9 ± 35.2 (100)	694.1 ± 56.7 (178.0)	1317.9 ± 91.0 (338.0)	1596.3 ± 115.5 (409.4)

(Source : Kim et al., 2004. Food Research International. 37: 319-327)

참고문헌

1. Kim, S. L., H. T. Yun, J. K. Moon, K. Y. Park, Y. H. Lee, and Y. H. Ryu. 2004. Variations in seed storage protein among different colored soybean varieties. *Korean J. Crop Sci.* 49(2) : 141-147.
2. Kim, S. L., K. Y. Park, Y. H. Lee, and Y. H. Ryu. 2004. Seed quality of soybean produced from upland and drained-paddy Field. *Korean J. Crop Sci.* 49(4) : 309-315.
3. Kim, S. L., S. K. Kim, and C. H. Park. 2004. Introduction and nutritional evaluation of buckwheat sprouts as a new vegetable. *Food Research International.* 37 : 319-327.
4. Tarr, G. E. 1986. *Methods of Protein Microcharacterization* (J. E. Shively, ed), Humana Press, Clifton, NJ. pp. 155-194.
5. White, J. A., R.J. Hart, and J. C. Fry. 1988. An evaluation of Waters pico-tag system for the amino acid analysis of food materials. *J. Automatic Chem.* 8(4) : 170-177.

Analysis of Amino Acids

Sun-Lim Kim[†], Nam-Kyu Park, and Jong-Rok Son
National Institute of Crop Science, R.D.A., Suwon 441-857, Korea
+82-31-290-6886, kimsl@rda.go.kr