

잎담배 단백질 질소 분석법(Mohr법) 개선

김석재* · 나승주 · 김지혜 · 이정래

KT&G R&D 본부

(2011년 11월 1일 접수 ; 2011년 11월 15일 수정 ; 2011년 11월 21일 승인)

Optimum Determination Method of Protein-Nitrogen Improve Mohr Method in Leaf Tobacco

Suk-Jae Kim*, Seung-Ju Na, Ji-Hae Kim, Jung-Lae Lee

KT&G R&D Headquarters

(Received Nov 1, 2011; Revised Nov 15, 2011; Accepted Nov 21, 2011)

ABSTRACT : This study was carried out in order to improve the Mohr method for protein-nitrogen concentration determining. Existing Mohr's method takes seven hours to analyze for one sample.

In order to make up for these things tried to utilize filter bag(F75, ANKOM) for sample treatment. As a result of this implementation, have saved sample loss amount and analyzing time for a quarter comparing with Mohr's method. In addition, it have gotten high efficiency through five samples hydrolyze per one trial by using ANKOM hydrolysis system with 0.5 % acetic acid. Besides, had a good reproducibility for analysis results in relation to nitrogen concentration determining with Dumas methodology. Thus, new Mohr's method takes one day to analyze for 40 sample. It is more efficiency about 6 times compare with existing Mohr's method. And, this modified Mohr's method was verified that is substitutable for the existing Mohr's method in statistical analysis.

Key words : protein nitrogen, Mohr method, leaf tobacco, F57

잎담배 중에 존재하는 질소 화합물은 담배 맛을 결정하는데 중요한 성분인 니코틴을 포함하는 알칼로이드류, 단백질, 아미노산, 암모니아와 질산화 질소 등이 있다(담배과학 총론, 1987, p.411). 이들 대부분의 질소화합물은 연기의 맛과 냄새를 일반적으로 저해하는 것으로 알려져 있으며 특히, 단백질은 그 물질의 특이한 냄새 때문에 저해하는 정도가 크다.

생엽 중에 함유된 단백질 함량은 건조 과정을 거치며 버어리종 50 %, 황색종 20 %가 가수분해되어 감소하지만, 일부 과도한 비료 살포, 일조량 부족, 높은 상대습도 조건에서 재배되거나 미숙엽 수확 건조 시 단백질 함량은 높아진다. 특히 품미를 나쁘게 하는 아스파라진, 구루타민산, 프로린, 알기닌 등이 증가하여 흡연 시 불쾌한 객연감을 주는 단백질 성취의 원인이 된다(담배과학, 2009, p.123).

*연락처 : 305-805 대전광역시 유성구 가정로 30 KT&G R&D 본부

*Corresponding author : KT&G R&D Headquarters, 30 Gajeong-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-805, Korea
(phone: 82-42-866-5551; fax: 82-42-866-5544; e-mail: 20100348@ktng.com)

잎담배 중의 단백질은 연기의 맛과 품질에 중요한 요인으로 알려져 있다. (T.C.Tso, 1990).

일반적으로 잎담배 중의 단백질 함량측정은 시안 화합물이 생성 가능한 단백질을 이루고 있는 질소 즉, 단백태 질소가 주로 측정되어 진다. 단백태 질소의 측정법은 침전제를 활용한 방법과 pH와 열을 이용하여 단백질을 변성시켜 측정하는 방법이 있다. 잎담배에서 단백태 질소를 측정하기위해 침전제를 활용한 방법으로는 삼염화 초산법이 있으나 단백질 침전제의 취급상의 위험성과 시간이 오래 걸리는 문제점으로 널리 사용되지 않는다. 그래서 일반적으로 잎담배 분석에서는 pH와 열을 이용하여 단백질을 변성시켜 분석하는 Mohr법이 주로 사용되고 있다(Tobacco Science 31).

현재 0.5 % 초산을 이용하는 Mohr법에서는 안정적인 데이터를 얻을 수는 있지만(Protein Nitrogen : Analyses) 0.5 % 초산에 시료를 끓이고 여과하여 남은 잎담배 찌꺼기를 켈달(Kjeldahl) 법으로 분해하여 질소를 측정하는 복잡한 과정을 거치고 질소 분석과정에서 강산을 취급하여 실험자 및 실험실 안전에 문제를 유발할 수 있으며 분석 소요시간도 매우 오래 걸린다.

따라서 본 연구는 기존 Mohr법과 같이 안정적인 데이터를 얻고 F57 filter bag(ANKOM, USA)을 적용하여 시료의 손실을 방지하며, 0.5 % 초산의 균일한 처리를 위해 가수분해장치(ANKOM, HCl Hydrolysis)를 적용하였다. 또한, 질소 분석과정에서 강산을 사용하지 않는 Dumas 법의 질소 분석기(Rapid N Cube, Germany)로 대체하여 재현성을 높이고 실험자 및 실험실 안전을 확보하고 분석시간을 단축하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

본 실험에서 사용한 시약은 초산 (Junsei Chemical Co, Japan), 황산 (J.T Baker, USA), 황산분해 시 촉매로서 Potassium Sulfate(Junsei Chemical Co, Japan)을 사용하였다.

Filter bag은 ANKOM사의 F57 filter bag(조섬유 분석용)을 사용하였다.

재료는 표준담배(Ky3R4F)는 Kentucky Tobacco Research & Development Center (University of Kentucky, Lexington, KY, USA)로부터 구입하여 사용하였고, 잎담배 시료는 미국산 황색종 후엽과 박엽 2구(UB3OR, UC20), 말라위 버어리 후엽과 박엽 2구(MBIT, MC1W), 2010년산 황색종 (상, 중, 분, 하엽)과 버어리종(상, 분, 중, 하엽) 각각 네 개의 제맥엽 시료를 사용하였다.

모든 담배시료는 40 °C 이하로 유지된 오븐에서 하룻밤 동안 건조시킨 후 믹서기로 1 mm 이하의 크기로 분쇄한 후 사용하였다.

기존 단백질 질소 분석 조건

기존 분석법은 fig. 1에 나타낸바와 같이 시료 1.5 g을 0.5 % 끓는 초산에서 5 분간 끓인 후 여액의 색이 보이지 않을 때까지 여과한 뒤 fig. 1에 나타낸 장비를 활용하여 여과지와 잎담배 찌꺼기를 황산으로 켈달(Kjeldahl)분해시킨 후 분해액을 CFA(Continuous Flow Analyzer)를 이용하여 질소를 비색정량(660 nm)하여 단백질 질소함량을 아래의 식과 같이 계산하였다.

Protein - Nitrogen =

$$\frac{\text{Nitrogen measurement}(\%) \times \text{After washing filter bag dry weight}(g)}{\text{Sample weight}(g)}$$

개선 단백질 질소 분석 조건

시료를 filter bag에 약 1 g을 넣은 후 밀봉하고 ANCOM HCl Hydrolysis 장치를 활용하여 0.5 % 초산으로 가수분해하고 끓는 초산으로 filter bag을 감압여과 후 일정시간 건조하여 무게를 측정하였다. 그리고 filter bag 내의 시료를 일부 취하여 질소분석기로 질소 함량을 측정하여 단백질 질소 함량을 아래와 같이 계산하였다. 자세한 방법은 fig. 2에 나타낸바와 같다.

$$\text{Total Nitrogen}(\%) = \frac{Ea}{S} \times \frac{100}{1000}$$

EA: Nitrogen content of samples obtained by calibration
S : Sample Weight(g)

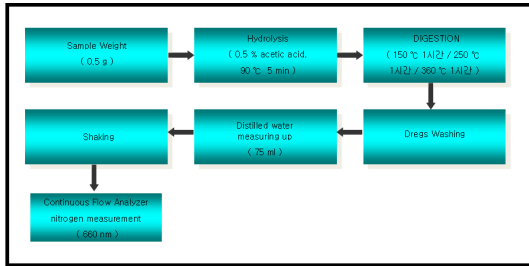


Fig. 1. The process of existing method for Protein-Nitrogen.

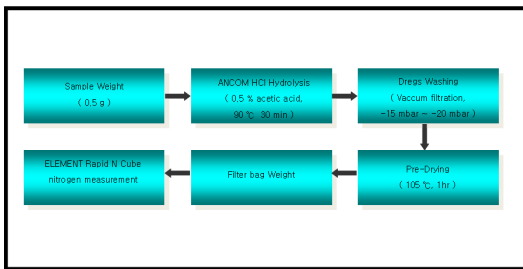


Fig. 2. The process of be improved method for Protein-Nitrogen.

결과 및 고찰

단백태 질소 분석 조건 최적화 요인

개선 분석법은 기존 비이커와 여과지를 filter bag으로 대체하여 시료 손실을 예방하고 가수분해장치를 활용하여 15개/Set로 동시 처리하여 처리과정 중 발생하는 오차요인을 줄였다. 0.5 % 초산으로 시료를 추출하는 과정은 끓는 초산에서 5분간 진행되어야 하므로 추출조건을 설정하였고, 또한 추출 이후에 단백질 질소를 제외한 질소화합물을 제거하기 위하여 세척 조건을 최적화 하였다.

1) 가수분해장치 추출 조건 설정

끓는 0.5 % 초산에서 5분간 가수 분해하는 조건에 맞춰 주기 위해 가수분해장치에서 상온의 0.5 % 초산이 100 °C까지 올라가는데 25분이 소요되어 기존 분석법과 유사한 결과를 얻기 위해서는 100 °C에서 30분의 설정 값을 확인하였다.

2) 감압여과 세척 최적 조건 설정

Filter bag을 세척하는 방법으로 끓는 초산에서 손으로 직접 세정하는 방법과 감압여과를 이용한 방법을 실험하였다.

Table 1에 나타낸 바와 같이 손으로 직접 세척하는 방법은 많은 시간이 소요되며 분석결과에서도 기존의 Mohr법 보다 높은 값을 나타내었다. 이는 단백질 구조 질소를 제외한 질소화합물이 세척되지 않은 것으로 판단되었으며 filter bag을 세척하는 방법으로 적절하지 않은 것으로 나타났다.

Table 1. Protein-Nitrogen concentration of Ky3R4F by two methods

| Sample | (%) | | | |
|--------|-----------------|------|-----------------|------|
| | Existing method | | Washing by hand | |
| | Average | RSD | Average | RSD |
| Ky3R4F | 1.04 | 2.61 | 1.69 | 5.08 |

반면, Table 2에 나타낸 바와 같이 - 0.15 ~ - 0.2 kPa의 감압 조건에서 끓는 초산을 활용하여 여과 하였을 때 250 mL에서 기존 방법과 가장 유사한 값을 얻을 수 있었다. (포 크기가 벗어남)

Table 2. Protein-Nitrogen concentration of Ky3R4F by be improved method (Vacuum filtration methods)

| Sample | (%) | | | | | |
|--------|--------------------------|------|--------------------------|------|--------------------------|------|
| | Vacuum filtration 100 mL | | Vacuum filtration 250 mL | | Vacuum filtration 500 mL | |
| | Average | RS D | Average | RS D | Average | RS D |
| Ky3R4F | 1.16 | 3.24 | 1.18 | 1.44 | 0.98 | 4.01 |

기존 Mohr법과 개선 Mohr법 분석 결과 비교

기존 Mohr법과 개선된 Mohr법을 사용하여 포준 제품 담배 Ky3R4F와 잎담배 12종을 분석한

Table 3. Protein-Nitrogen concentration of Ky3R4F and tobacco leaf by two methods raw data

| Sample | (%) | |
|--------------------|-----------------|--|
| | Existing method | be improved method (Vacuum filtration) |
| | Average | Average |
| Ky 3R4F | 1.04 | 1.08 |
| Flue-cured (Thin) | 0.83 | 1.02 |
| Flue-cured (Thick) | 0.95 | 1.16 |
| Burly (Thin) | 1.35 | 1.58 |
| Burly (Thick) | 1.40 | 1.67 |
| Flue-cured Tips | 0.89 | 0.73 |
| Flue-cured Cutters | 0.77 | 0.71 |
| Flue-cured Leaf | 0.79 | 0.66 |
| Flue-cured Lugs | 0.74 | 0.61 |
| Burly Tips | 1.48 | 1.30 |
| Burly Cutters | 1.59 | 1.36 |
| Burly Leaf | 1.44 | 1.23 |
| Burly Lugs | 1.38 | 1.17 |

결과를 Table 3에 나타내었다.

황색종에서 단백질 질소 함량은 0.6 % ~ 0.9 %의 수준을 나타냈으며 버어리종은 이보다 높은 1.1 % ~ 1.7 % 수준으로 나타났다. 이는 버어리종의 질소 흡수량이 많기 때문으로 판단된다.

분석된 결과를 통계적 유의성 검정결과를 Table 4에 나타내었다. 두 방법 간의 표준담배와 황색종과 버어리종의 박엽과 후엽, 착엽 위치별 단백질 구조의 질소 분석결과에 대한 통계적 유의차는 나타나지 않아 두 방법의 결과가 유사함을 확인할 수 있다($P > 0.05$). 따라서 잎담배에서 단백질 질소를 측정하는데 기존의 Mohr법을 대체할 것으로 확인되었다.

Table 4. Statistical analysis(t-test) of two methods(Location leaf)

t-test: Two-method assuming equal variances

| | Existing Mohr method | Be improved Mohr method |
|------------------------|----------------------|-------------------------|
| Mean | 1.1327202 | 0.9689365 |
| Variance | 0.1351527 | 0.1055995 |
| Observation | 8 | 8 |
| Pooled Variance | 0.1203761 | |
| Hypothesized Mean Diff | 0 | |
| df | 14 | |
| t Stat | 0.9441273 | |
| P(T<=t) one-tail | 0.1805571 | |
| t Critical one-tail | 1.7613101 | |
| P(T<=t) two-tail | 0.3611142 | |
| t Critical two-tail | 2.1447867 | |

결 론

본 연구는 잎담배 중 단백질 질소 분석에 일반적으로 사용되는 Mohr법에 Filter bag과 산 가수분해 장치(ANKOM HCl Hydrolysis)를 활용하여 전처리를 하고 Dumas법으로 질소를 정량함으로써 보다 신속하고 안전하게 분석하기 위하여 수행하였다.

기존의 Mohr법은 비이커에 시료를 넣고 분해를 할 때 기벽에 시료가 묻어 시료에 손실이 있을 수 있으며 여과세척 시, 특히 황색종에서 여과가 늦어져 실험 시간이 지연되거나 실험의 진행이 중단되는 문제점이 있다. 또한 켈달 분해 시 강산을 활용하여 분해하기 때문에 실험실 및 실험자의 안전을 위협할 가능성이 있다.

기존 Mohr법은 시료 20개에 2일이 소요되는 오랜 실험 과정이 요구 된다. 그러나 본 연구에서 제안한 방법은 1일 시료 40개를 분석할 수 있어 약 4배의 효율을 나타낸다. 또한 잎담배 및 각초

의 단백질 질소의 함량 분석에 최적의 실험조건을 설정을 함으로써 기존의 Mohr법과 유사한 결과를 도출할 수 있음을 통계적 유의성 검정을 통해 확인되어 새로운 개선 Mohr법을 잎담배 및 각초의 단백질 질소 함량 분석법으로 활용 가능하다고 판단되어지며 실험자 및 실험실의 안전을 확보할 수 있는 좋은 방법이라고 생각된다.

참 고 문 헌

- Drochioiu, G., Mangalagiu, I. and Tataru, V.(2000) Specific spectrophotometric determination of hydrocyanic acid in the environment. *Analyst*, 200, 125. 939-941.
- HCN : Removal - Properties - Analyses.
<http://legacy.lib>
- Leffingwell, J.C. and Leffingwell, D.(1988) Chemical and sensory aspects of tobacco flavor. *Rec. Adv. Tob. Sci.*, 14, 162-218.
- R. POWELL GAINES (1986) Determining Protein Nitrogen in Tobacco.
<http://legacy.library.ucsf.edu/tid/hnf81b00/pdf>
- Protein Nitrogen : Analyses.
Determination of "Protein" Nitrogen using dry-block heaters and auto analyses. (Sgaf93a99(legacy)-Bat.pdf)
- Determination of "Protein" Nitrogen.(Sgaf46a99(legacy)-Bat.pdf)
- Tso, T.C. (1990) Production, *physiology and biochemistry of tobacco plant. institute of international development & education in agricultural and life sciences*, USA.610.
- Tso, T. C. (1977) Tobacco as potential Food Source and Smoke Material. *Beitr. Tabakforsch.* 9, 63
- 한국연초학회 (2009) 담배과학, 123-124.
- 한국연초학회 (1987) 담배과학총론, 411.
- 한국인삼연초연구소 (1991) 담배성분분석법, 38-45.