

# 육류 및 식물성 대체육의 LC/Q-TOF 분석 및 비표적 계량화학 프로파일링

Agilent 1290 Infinity II LC 및 Agilent 6546 Q-TOF를  
이용한 식품 관능 검사

## 저자

Toh Seok Hwa,  
Upendra Khurana,  
Tarun Anumol 및  
Daniel Cuthbertson  
Agilent Technologies, Inc.

## 개요

식물 및 세포 기반의 식품을 포함한 육류 대체용 단백질원은 소비자의 관심 증가, 규제 변화 및 글로벌 푸드 시스템 등이 맞물리며 전 세계적으로 인기를 얻고 있습니다. 예를 들어, 싱가포르는 2030년까지 자체 생산을 통해 해당 식품 생산량의 30%를 달성하는 것을 목표로 하고 있어 기존의 많은 식품 회사와 스타트업이 육류 대체 제품을 개발하고 있습니다. 싱가포르에서 이러한 식품 생산 목표를 세운 주된 동기는 건강과 환경 문제에 관한 것입니다. 역사적으로 식물성 대체육은 동물 고기와 동일한 식감과 맛을 얻는 데 어려움을 겪어왔습니다. 하지만 최근의 식물성 고기 유사체는 생산 기술의 발전에 힘입어 전통적인 고기와 맛, 식감 및 조성이 훨씬 더 비슷해졌습니다. 이 응용 자료에서는 고분해능 accurate mass LC-Q/TOF를 사용하여 미지 식품의 화학 성분에 대한 특성을 규명하는 비표적 프로파일링 방법에 대해 설명합니다. 또한 accurate mass LC/Q-TOF 데이터를 보다 쉽게 이해할 수 있는 정보로 변환하는 다양한 통계 도구를 소개합니다. 데이터의 주성분 분석(PCA)은 다양한 시료 내 화합물과 화합물의 존재비 분포, 그리고 화합물이 맛 표적 프로파일에 어떻게 대응하는지 확인하는 데 사용할 수 있습니다. 히트 맵과 원재료의 계층적 클러스터링은 맛 표적 프로파일과 유사한 단백질 분포를 보여줍니다.

## 서론

식품 관능 평가는 소비자가 감지하는 것을 측정하기 때문에 식품의 향미적 품질을 평가하는 핵심적 방법이지만, 이는 주관적입니다. 기술이 발전함에 따라 질량 분석법을 사용한 액체 크로마토그래피(LC/MS) 등의 보다 객관적이고 측정 가능한 분석법이 이용될 것으로 기대됩니다. 5가지 기본 맛(즉, 단맛, 짠맛, 신맛, 쓴맛, 감칠맛)의 경우 현재 LC/MS로 특성을 규명할 수 있으며, 해당 데이터를 식품의 전반적인 맛을 최적화하는 데 사용할 수 있습니다.

대체육은 동물성 고기를 대체하기 위한 것입니다. 그러나 맛, 식감 및 영양 측면이 소비자들로 하여금 쉽게 선택하지 못하게 하는 주요 장벽인 것으로 확인되었습니다. 대체육 식품을 섭취하는 고객에게 동등한 건강상의 이점과 경험을 보장하기 위해서는 테스트가 중요합니다. 그 결과, 동물 유래의 육류와 대체육 제품 사이의 영양 및 맛 수준의 차이를 비교한 연구가 다수 수행되었습니다.<sup>1</sup>

표적 분석은 알려진 영양소 또는 향미 화합물 그룹에 중점을 둡니다. 표적 분석법과 관능 평가 검사에 의한 결과는 다를 수 있는데, 이는 표적 목록에 없는 화합물이 전체적인 맛에 기여할 수 있기 때문입니다. 이와 대조적으로, 비표적 고분해능 accurate mass 분석은 특정 화합물 그룹으로 제한되지 않습니다. 편향되지 않은 방식으로 단백질의 화합물을 프로파일링하고 식별할 수 있으며 대체육과 진짜 고기를 비교할 수 있습니다. 비표적 LC/MS 방법은 식품 관능 분석 테스트에서와 마찬가지로 특정 향미 프로파일을 분석하지는 않지만, 편향되지 않으며 총 화합물 프로파일에 중점을 두어 미뢰와 매우 유사합니다.

다양한 맛 프로파일에 기여하는 다양한 화합물을 찾는 것 외에 각 단백질 내에서의 존재비도 똑같이 중요합니다. 정량 분석을 위한 표준물질이 없는 경우가 많지만 다양한 단백질에 있는 화합물의 상대적인 강도 차이를 이용해 이를 구별할 수 있습니다. 사람은 일부 화합물에서 급격한 존재비 차이가 있을 때만 향미를 구별할 수 있습니다. 이 연구에서는 Q-TOF(quadrupole time of flight) LC/MS 및 통계 소프트웨어를 사용하여 향미 프로파일을 식별하고 구별했습니다. 해당 분석법은 식물성 단백질 식품에서 동등한 향미 프로파일을 개발하는 데 도움이 될 것입니다.

## 실험

### 용매

Agilent ultrapure LC/MS 등급 메탄올 (품번 5191-4497), 아세토니트릴(품번 5191-4496) 및 물(품번 5191-4498)을 사용했습니다. LC/MS용 포름산(Honeywell의 Fluka) 및 LC/MS용 포름산암모늄(LiChropur, MerckMillipore)도 사용되었습니다.

### 재료

Agilent InfinityLab 용매 용기(캡 포함, 품번 9301-6528)를 이동상에 사용했습니다. 개방형 캡에는 Agilent InfinityLab Stay Safe 캡(GL45, 1 포트형, InfinityLab 벤트 밸브 1개, 3.2mm 외경 피팅 PTFE 인서트 포함, 품번 5043-1217)을 장착했습니다. 견고한 진공 용기 캡의 O-링을 사용하여 용기의 PTFE 인서트를 밀봉했습니다. 표준 PTFE 용매 라인을 PTFE 인서트에 통과시켜 연결했습니다. 그런 다음, 스테인리스 스틸 소재의 애질런트 용매 용기 주입기 필터(12 ~ 14µm, 품번 01018-60025)를 용매 라인에 장착했습니다.

### 시료

표 1에 기술된 식물성 고기는 시중에서 판매되는 제품이었습니다. 진짜 고기는 다진 생고기로, 시장에서 구입했습니다.

표 1. 식물성 대체육 시료 및 시료 코드.

시료 코드	식품 설명
PBC 1	식물성 닭고기
PBC 2	식물성 닭고기
PBB 3	식물성 소고기
PBB 4	식물성 소고기
PBP 5	식물성 돼지고기
PBP 6	식물성 돼지고기
PBP 7	식물성 돼지고기

### 시료 전처리

모든 시료 수집 및 전처리 단계는 폴리에틸렌 또는 폴리프로필렌 용기에서 수행되었습니다. 15 및 50mL 용량의 고성능 폴리프로필렌 원심분리기 튜브(플러그 캡 포함, VWR International Ltd., UK)를 전체 실험에 사용했습니다. 애질런트 스크류 캡(품번 5185-5862) 및 2mL 스크류 탑 갈색 유리 자동 시료 주입기 바이알(품번 5182-0716)을 사용했습니다. 시료를 원심분리 튜브에서 칭량한 다음, 70/30 메탄올/물을 1:2 비율로 시료에 첨가했습니다. 시료를 10분간 볼텍싱하고 4,000rpm으로

15분간 원심 분리했습니다. 동일한 조건에서 시료를 다시 추출했습니다. 그런 다음 애질런트 0.45µm 폴리에테르설폰(PES) 필터(품번 5190-5276)를 사용하여 자동 시료 주입기 바이알로 추출물을 여과시켰습니다.

## 기기

Agilent 1290 Infinity II 고속 펌프(품번 G7120A)로 구성된 Agilent 1290 Infinity II LC를 HPLC로 사용했습니다. 또한 해당 시스템에는 Agilent 1290 Infinity II Multisampler(품번 G7167B)이 장착되었으며, 여기에는 Agilent InfinityLab 시료 온도 조절 장치 및 Infinity 다중 세척 옵션이 포함되었습니다. LC에는 Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(품번 G7116B)가 포함되었습니다. Accurate mass 측정을 위해 Agilent 6546 Q-TOF MS 시스템(품번 G6546A)을 사용했습니다. 질량 분석기는 양이온 극성 조건에서 모든 이온이 Q-TOF 충돌 셀을 통과하도록 "데이터 비의존적 All Ion 조각화" 스캔 수집 모드로 실행했습니다.

Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0, Profinder 10.0 및 Mass Profiler Professional 15.1 소프트웨어를 사용하여 데이터 분석을 수행했습니다.

표 2. Agilent 6546 LC/Q-TOF LC/MS 시스템(G6546A) 작동 조건.

HPLC 조건																						
컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 100mm, 2.7µm (품번 695975-302)																					
주입량	5µL																					
이동상	A) 10mM NH <sub>4</sub> F + 0.1% FA의 DIW 용액 B) 아세트오니트릴																					
초기	A) 98% 10mM NH <sub>4</sub> F + 0.1% FA의 DIW 용액 B) 2% 아세트오니트릴																					
그라디언트	<table border="1"> <thead> <tr> <th>시간(분)</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.30</td> <td>98.0</td> <td>2.0</td> </tr> <tr> <td>7.27</td> <td>20.0</td> <td>80.0</td> </tr> <tr> <td>10.27</td> <td>1.0</td> <td>99.0</td> </tr> <tr> <td>12.00</td> <td>1.0</td> <td>99.0</td> </tr> <tr> <td>12.10</td> <td>98.0</td> <td>2.0</td> </tr> <tr> <td>15.00</td> <td>98.0</td> <td>2.0</td> </tr> </tbody> </table>	시간(분)	%A	%B	0.30	98.0	2.0	7.27	20.0	80.0	10.27	1.0	99.0	12.00	1.0	99.0	12.10	98.0	2.0	15.00	98.0	2.0
시간(분)	%A	%B																				
0.30	98.0	2.0																				
7.27	20.0	80.0																				
10.27	1.0	99.0																				
12.00	1.0	99.0																				
12.10	98.0	2.0																				
15.00	98.0	2.0																				
유속	0.4mL/분																					
MS 조건																						
ESI	양이온																					
소스 파라미터																						
가스 온도	300°C																					
가스 유속	11L/분																					
Nebulizer	35psi																					
Sheath 가스 히터	350°C																					
Sheath 가스 유속	11L/분																					
캐필러리	3,500V																					
V Charging	1,000																					

## 결과 및 토의

LC/Q-TOF 데이터는 *m/z* 100 ~ 1,700Da 범위의 All Ion 풀 스캔과 세 가지 충돌 에너지(10, 20 및 40V)에서의 조각화 스펙트럼을 사용하여 획득했습니다. 화합물 식별을 위해, 맛에 영향을 미칠 수 있는 화합물로 구성된 맞춤형 MS 조각화 라이브러리에서 accurate mass 데이터를 검색했습니다. 이들 화합물에는 아미노산, 짧은 펩타이드, 뉴클레오타이드, 지방산 및 다양한 비타민이 포함되었습니다.

그림 1에 나타낸 바와 같이, 원시 데이터의 전체 보기는 실제 육류와 대체육 스펙트럼 간에 약간의 차이가 있음을 보여줍니다. 또한 라이브러리 매칭을 통해 개별 화합물을 식별하기 위한 스펙트럼 라이브러리를 스크리닝하는 것은 시간이 너무 많이 걸립니다. 그런 이유로 통계 분석 도구가 비표적 분석의 원시 데이터를 보다 유용한 정보로 변환하는 데 유용합니다.

주성분 분석(PCA)을 위해 각 추출물을 3회 주입하여 시료의 클러스터링(군집)을 관찰함으로써 데이터의 반복성을 점검했습니다. 전체적으로, 각 식품 시료별 반복 시료가 밀집되어 있어 해당 분석법에서 높은 수준의 반복성을 나타내는 것으로 관찰되었습니다(그림 2). 그림 2의 스코어 플롯 보기에서 각 점은 하나의 시료 주입을 나타냅니다. 단백질 시료에는 맛 표적 프로파일에 따라 고유한 색상 데이터 포인트가 할당되었고 개별 제품에는 구별을 위해 다른 모양이 할당되었습니다. 그림 2의 이 스코어 플롯 보기는 시료 세트의 어떤 경향이 향미 프로파일과 특정 제품 간의 차이에 기여하는지를 보여줍니다. 또한 해당 플롯은 PCA 스코어 플롯에서 동일한 일반 영역을 공유하여 서로 다른 시료가 유사한지 여부를 나타낼 수 있습니다. 대체 단백질 식품은 표적화된 맛 프로파일에서 잘 클러스터링되는 것으로 밝혀졌으며, 예상대로 각 식품 유형의 맛 프로파일 간에 상당한 차이가 있었습니다. 대조적으로, PCA 로딩 플롯 보기(그림 3B)에서 각 점은 화합물을 나타냅니다. 이 플롯은 PCA의 스코어 플롯에 영향을 미치는 화합물에 대한 정보를 제공합니다. 주성분에서 가장 높은 부하를 갖는 화합물(기호로 표시)은 시료에서 해당 화합물의 더 높은 존재비와 상관 관계를 갖습니다.

그림 2는 서로 다른 고기 종류와 해당 식물성 대체육에 대한 개요를 보여줍니다. 비휘발성 화합물의 2차원(2D) PCA 플롯에서 각 육류(예: 닭고기)와 이에 대응하는 식물성 식품(예: PBC 1 및 PBC 2)은 다른 육류(예: 소고기 또는 돼지고기)에 비해 서로 더 유사합니다.

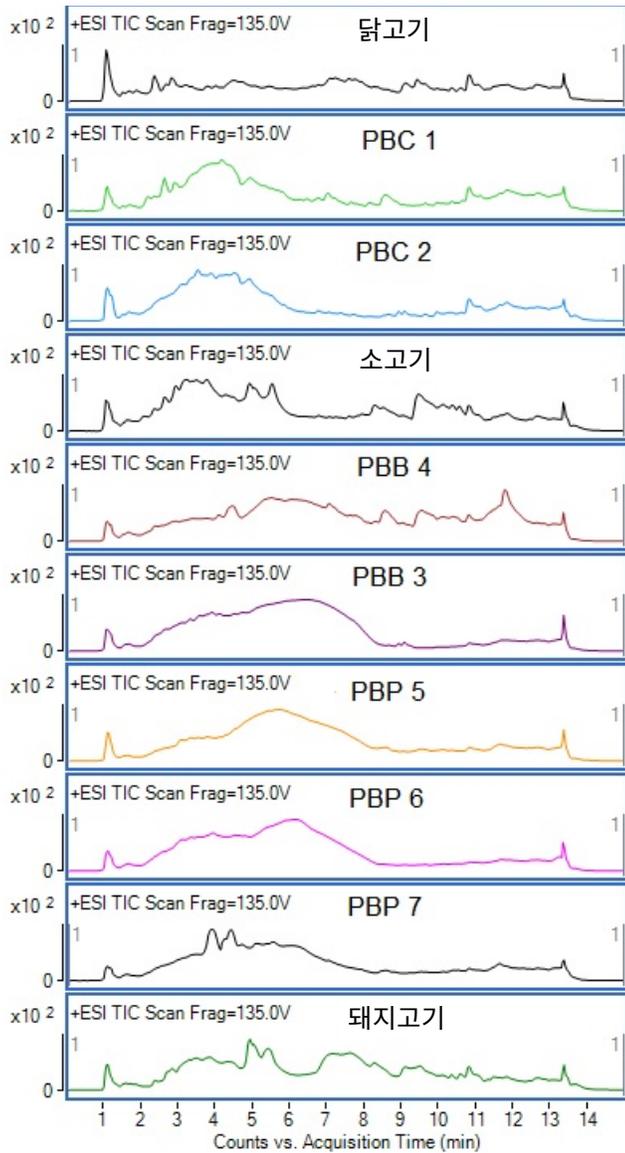


그림 1. 실제 육류 및 이에 대응되는 식물성 육류에 대한 TIC 개요.

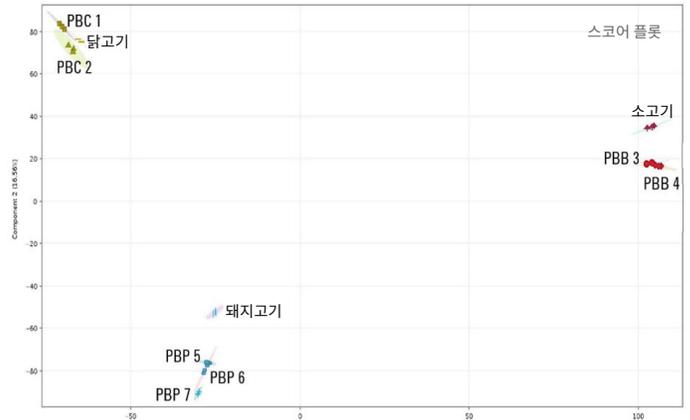


그림 2. 돼지고기, 소고기 및 닭고기와 이에 대응되는 식물성 대체육의 2D PCA 스코어 플롯.

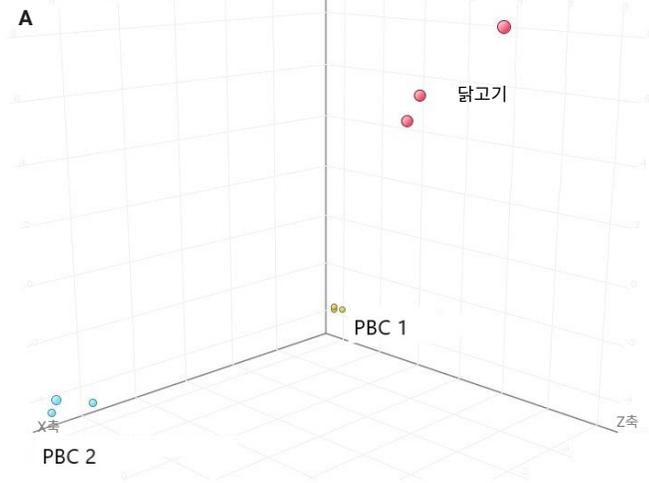
하나의 육류 유형에 대한 PCA 스코어 플롯과 로딩 플롯을 나란히 두고 보면, 영양소 또는 향미 화합물 그룹과 관련된 화합물의 상관 관계를 쉽게 파악할 수 있습니다. 그림 3A는 닭고기에 대한 3D 스코어 플롯을 보여주며, 서로 다른 그룹이 각 축을 따라 분리되어 있습니다. 로딩 플롯(그림 3B)은 스코어 플롯에서 차이를 유발하는 화합물에 대한 정보를 제공합니다.

히트 맵은 색상을 척도로 화합물의 존재비를 보여주는 데이터 시각화 기술로, 빨간색은 높은 존재비를 나타내고 파란색은 낮은 존재비를 나타냅니다. 히트 맵을 통해 사용자는 그림 4와 같이 특정 맛 프로파일 세트의 화합물 존재비 차이를 빠르게 확인할 수 있습니다.

일반적인 조리 온도에서 고기 표면에 형성되는 유리 아미노산은 소비자가 좋아하는 "구운 고기"의 향미를 제공합니다.<sup>1</sup> 따라서 식물성 소고기 식품 제조업체가 제품에 함유된 다양한 아미노산의 존재비를 조절하는 것이 중요합니다. 그림 4는 식물성 소고기 제품인 PBB 3과 4가 실제 소고기보다 쓴맛이 나는 아미노산을 더 많이 함유하고 있음을 보여줍니다. 이 아미노산들은 이들 제품의 최종적인 맛에 영향을 미칠 수 있습니다. 식품의 아미노산 프로파일 데이터는 원하는 향미에 대한 화합물 종류와 유사한 존재비를 제공하는 기본 재료를 선택하는 데 사용할 수 있습니다.

식물성 닭고기인 PBC 2는 짧은 펩타이드를 보다 많이 함유하고 있는 반면, PBC 1 시료에는 콩 또는 콩 기반 성분에서 유래할 수 있는 뉴클레오타이드 향미 증진제가 더 많이 포함되어 있습니다. 실제 닭고기는 그림 3에서와 같이 지방산, 아미노산, 아세틸 카르니틴을 함유하고 있는 것으로 알려져 있습니다. 닭고기는 Y축과 Z축 사이의 플롯 오른쪽 상단에 있습니다. PBC 1은 세 축의 원점 근처에 있고 PBC 2는 X축의 맨 아래 끝에 있습니다. 글루타민-글루타민(glu-glu), 아데노신이인산(ADP), 이노신-5-이인산(IDP) 및 발란-글루타민(val-glu)과 같은 화합물은 식물성 고기에 실제 닭고기의 감칠맛을 더 많이 제공합니다.<sup>2</sup>

스코어 플롯



로딩 플롯

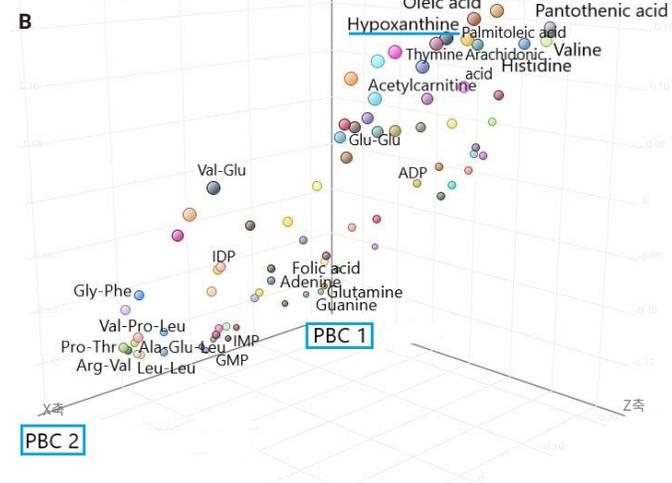


그림 3. 3D PCA 스코어 플롯(A)과 닭고기 및 그 식물성 대체육(PBC 1 및 PBC 2)의 로딩 플롯(B).

PBC 1 및 PBC 2에서 이러한 향미 수준이 더 높아질수록 화합물 데이터 포인트가 Y축 위로 이동하여 닭고기 영역에 더 가깝게 나타날 것입니다.

자연적으로 발생하는 퓨린 유도체인 뉴클레오타이드 히포잔틴은 닭고기의 감칠맛에 중요한 역할을 합니다. 하지만 PBC2는 퓨린(구아닌) 함량이 낮기 때문에 통풍을 유발할 수 있는 요산의 형성을 줄이기 위한 더 건강한 선택이 될 수 있습니다.<sup>3</sup>

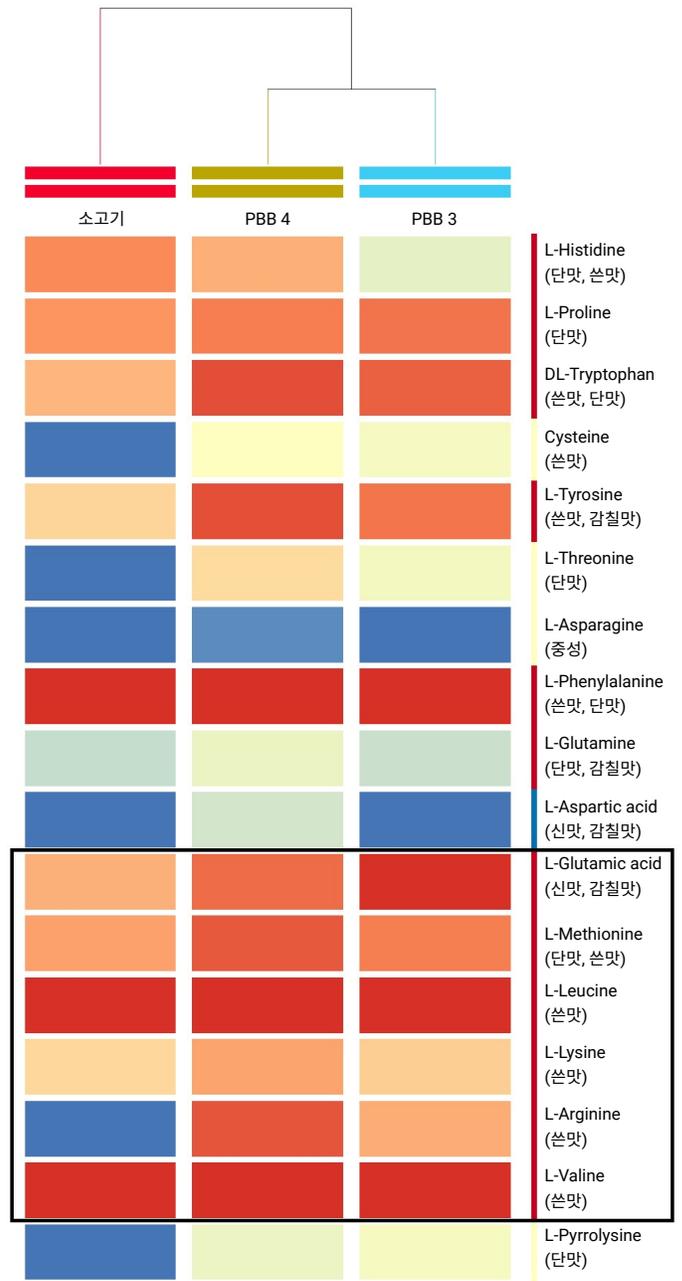


그림 4. 소고기 및 이에 대응되는 식물성 대체육(PBB 3 및 PBB 4) 내 아미노산의 히트 맵.

## 결론

육류 대체용 단백질원의 향미, 식감 및 영양가는 소비자의 인식, 수용력 및 가치 평가에 매우 중요합니다.

고분해능 Agilent 6546A Q-TOF LC/MS 시스템을 사용하는 비교적, 데이터 비의존적, All Ion 워크플로를 통해 닭고기, 소고기, 돼지고기 및 각각의 식물성 대체육에서 많은 향미 화합물을 성공적으로 프로파일링하고 식별했습니다. Agilent Mass Profiler Professional(MPP) 소프트웨어는 고급 통계 분석과 시각화 도구를 사용하여 진짜 고기와 식물성 대체육 사이의 관계를 결정하는 데 사용되었습니다. PCA 스코어 및 로딩 플롯은 식품 내 화합물을 비교하는 데 유용합니다. 히트 맵 또한 육류 및 시판되는 식물성 대체육 식품에서 아미노산과 같은 화합물의 프로파일링을 시각화하는 데 유용한 도구입니다.

대체 단백질 식품 제조업체는 포괄적인 LC/MS 데이터 수집 및 통계 워크플로를 통해 제품에 대한 분자 차원의 중요한 정보를 얻을 수 있습니다. 프로파일 데이터는 제조업체가 제품 성분을 미세 조정하여 동물 유래 고기의 맛을 더욱 잘 재현하는 데 도움을 줍니다.

## 참고자료

1. Kaczmarek, K. *et al.* Flavor and Metabolite Profiles of Meat, Meat Substitutes, and Traditional Plant-Based High-Protein Food Products Available in Australia. *Foods* **2021**, *10(4)*, 801.
2. Ueda, Y. *et al.* Flavor Characteristics of Glutathione in Raw and Cooked Foodstuffs. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, *61(12)*, 1977–80.
3. Jakse, B. *et al.* Uric Acid and Plant-Based Nutrition. *Nutrients* **2019**, *11(8)*, 1736.

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE68216217

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2022  
2022년 7월 26일 한국에서 인쇄  
5994-5130KO

한국에질런트테크놀로지스(주)  
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,  
A+ 에셋타워 9층, 06621  
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)  
팩스: 82-2-3452-2451  
이메일: [korea-inquiry\\_lsca@agilent.com](mailto:korea-inquiry_lsca@agilent.com)