

미강 단백질 가수분해물에서 담즙산 결합 획분의 분리 및 특성구명

조완일 · 문태화
서울대학교 식품공학과

Isolation and Partial Physicochemical Characterization of Bile Acid-Binding Fraction from Rice Bran Protein Hydrolysates

Wan Il Cho and Tae Wha Moon

Department of Food Science and Technology, Seoul National University

Abstract

Rice bran protein hydrolysates were prepared and some of their physicochemical properties were investigated to utilize rice bran as starting material for functional food ingredient. Rice bran proteins (RBP) were prepared from defatted rice bran by alkaline extraction and isoelectric precipitation. The enzyme for hydrolysis of RBP was selected through measuring relative activity by pH-drop method and comparing the degree of hydrolysis (DH) of hydrolysates. The enzymatic hydrolysates prepared by Esperase[®] treatment were partitioned into two fractions by ultrafiltration(UF) with a 10 kDa molecular weight cut-off membrane. Each fraction was applied to a cholic acid-conjugated ω -aminohexyl Sepharose 4B column and the bile acid-binding components were obtained by eluting with deoxycholate. Gel permeation chromatography on a Sephadex G-50 column revealed that molecular weight of the bile acid-binding fraction of UF permeate was distributed in ranges of 2 kDa~10 kDa and 0.2 kDa~0.6 kDa. Three peaks (R-1, R-2 and R-3) were obtained by prep-HPLC of bile acid-binding fraction of UF retentate and analyzed for total and free amino acid composition. The results showed that proline content of the bile-acid binding polypeptides and peptides was four times as much as that of rice bran protein and that the peak corresponding to higher average hydrophobicity had a higher free amino acid content. Average hydrophobicity slightly increased with enzymatic hydrolysis.

Key words: rice bran protein hydrolysate, bile acid-binding polypeptides and peptides, average hydrophobicity

서 론

쌀의 도정과정 중에 얻어지는 미강은 주로 미강유 추출 후 탈지미강 형태로 사료에 이용되어 왔다. 미강의 경우 지질, 무기질, 섬유질, 비타민 B 복합체 외에도 양질의 단백질을 함유하고 있어 사료로서의 수요는 증가하였으나⁽¹⁾, 도정 후 효소에 의한 빠른 산패와 높은 섬유질 함량으로 식품에의 적용은 제한되었는데 압출 공정을 이용한 미강 안정화 기술이 개발됨에 따라 보존기간이 증대되어 식품으로서의 이용 가능성이 증가되었다⁽²⁻⁴⁾.

오늘날의 조제식품은 비용효율이 높으면서 특정 기능성을 함유한 단백질을 필요로 한다. 단백질의 기능성은 일반적으로 식품의 가공, 저장, 이용 중 식품계에

서 식품의 품질 및 관능적 특성과 연관된 단백질의 거동에 영향을 미치는 물리 화학적인 요소들로 용해도, 수분 및 지방의 흡수성, 겔 형성, 에멀전 안정성, 거품 형성, 탄성, 점성 등을 포함한다⁽⁵⁾. 물리적, 화학적 및 효소적 방법과 유전자 조작에 의한 물리 화학적 특성의 변화는 단백질의 기능성 변화로 이어진다. 효소에 의한 변형 방법은 화학적인 방법에 비해 온화한 조건에서 이루어지며, 효소 가수분해물의 경우 맛, 기능성, 영양적 측면 등에서 식품에의 첨가가 가능하기 때문에 널리 사용되어 왔다⁽⁶⁾. Watanabe 등⁽⁷⁾은 쌀을 Actinase AS로 처리하여 쌀의 조직단백질을 분해함으로써 저알레르기성 쌀의 제조 방법을 제시한 바 있다.

효소처리에 의한 가수분해물의 식품에의 적용에서 나아가 여러 가지 생리활성을 갖는 펩티드 탐색을 위한 연구가 진행되어 왔는데 미강 단백질 가수분해물에 대한 연구는 미진한 실정이다. 대두 단백질의 경우 혈중 콜레스테롤 저하 효과에 대한 연구가 많이 수행

Corresponding author: Tae Wha Moon, Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

되어^(8,9) 단백질 가수분해 효소에 의해 생산된 펩티드 중 담즙산과 결합하는 소수성 펩티드와 혈중 콜레스테롤 저하효과와의 관련성이 제안된 바 있다^(10,11). Sugano 등⁽¹²⁾은 효소처리하지 않은 대두단백을 투여하였을 때와 비교하여 가수분해물 중 고분자량의 분획물을 쥐에게 투여하였을 때 분변으로의 담즙산과 중성스테로이드 배출량이 증가함과 동시에 콜레스테롤 수치가 낮아짐을 보고하여, 담즙산과 중성스테로이드와 결합한 단백질이 스테로이드의 재흡수를 저해함으로써 혈중 콜레스테롤 농도의 증가를 억제한다고 제안하였다. 미강 단백질의 경우 Sugano 등⁽¹³⁾은 쥐에게 섭취시켰을 때 카제인이나 어류 단백질에 비하여 혈중 콜레스테롤 저하에 상당한 효과가 있었다고 보고하였다.

이 연구에서는 미강 단백질 가수분해물의 혈중 콜레스테롤 저하 효과의 가능성을 탐색하기 위하여 pH-drop method⁽¹⁴⁾로 미강 단백질의 가수분해에 적합한 효소를 선택하여 반응시킨 후, 친화 크로마토그래피를 이용하여 가수분해물 중 담즙산과 결합하는 폴리펩티드 및 펩티드를 분리하고, 한외여과와 역상 크로마토그래피로 부분 정제하여 아미노산 조성과 평균 소수도를 조사하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

탈지 미강은 미강에서 30~40°C의 hexane으로 1시간 30분 미강유를 추출한 후 잔사를 120°C에서 30분 건조시켜 제조한 것으로 신양 현미유(주)의 전복 정음공장으로부터 제공받아 사용하였으며, 분쇄기로 분쇄한 후 35 mesh (0.417 mm) 표준체로 쳐서 -20°C에 보관하며 사용하였다. 알칼리 추출 미강 단백질은 Gnanasambandam과 Hettiarachchy⁽¹⁵⁾의 방법을 변형하여 pH 11에서 1시간 추출하는 방법으로 제조하였다 (Fig. 1). 단백질 가수분해용 효소로는 *Bacillus subtilis*에서 생산된 *Neutrase*[®], *Bacillus licheniformis*에서 생산된 *Alcalase*[®] Food Grade, *Bacillus lentus*에서 생산된 *Esperase*[®] Food Grade, *Bacillus protease* 혼합물인 *Protamex*[™] (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark)를 사용하였다.

pH-drop method

시료의 단백질 함량은 micro-Kjeldahl법으로 정량하였으며, 시료에 대한 각 효소의 상대적 활성도의 비교 평가에는 Hsu 등⁽¹⁶⁾의 *in vitro* 단백질 소화율 측정 방

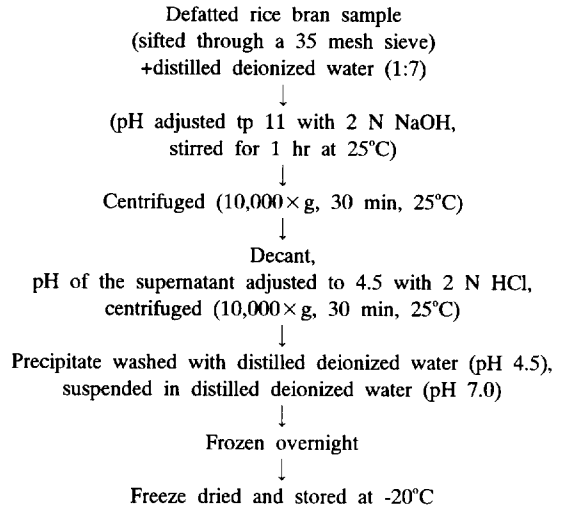


Fig. 1. Preparation procedure for alkali-extracted rice bran protein.

법에서 변형된 pH-drop method⁽¹⁴⁾를 사용하였다. 알칼리 추출 미강 단백질을 증류수 50 mL에 1% (w/v)로 녹여 수조에서 50°C로 유지하면서 0.06 N NaOH로 pH 8에 맞추었다. 각 효소를 4.7 mg/mL의 농도가 되도록 증류수에 녹여 0.06 N NaOH로 pH 8에 맞추어 5 mL를 첨가하였고 기질 대 효소 비는 23.4 (w/w)로 일치시켰으며 첨가 순간부터 매 30초 간격으로 10분간 pH의 변화를 기록하였다. 단백질의 가수분해 외의 pH 저하효과를 제외시키기 위하여 1 mM 인산 완충용액 50 mL를 사용하여 동일하게 pH 변화를 측정하여 pH 8-ΔpH로 pH 저하를 표현하였다. ΔpH는 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\Delta\text{pH} = [\text{pH}(t) \text{ 완충용액}] - [\text{pH}(t) \text{ 단백질 용액}]$$

$$t = \text{시간}(30\text{초})$$

가수분해물의 제조

가수분해는 Fig. 2에 나타낸 것과 같이 항온수조를 사용하여 일정온도에서 수행하였으며 4 N NaOH를 이용하여 가수분해 중 일정 pH를 유지시켰다. 단백질의 가수분해에 의한 pH 저하 외의 요인을 제거하기 위하여 질소 가스를 반응 중 지속적으로 불어넣었다. 기질 농도 5% (단백질%, w/v)가 되도록 알칼리 추출 미강 단백질을 첨가하고 Ultra-turrax homogenizer (Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Straufen, Germany)와 S25N-25F dispersing tool을 사용하여 30초간 균질화(13,000 rpm)시킨 다음 50°C로 유지시켰다. 기질 대 효소 비는

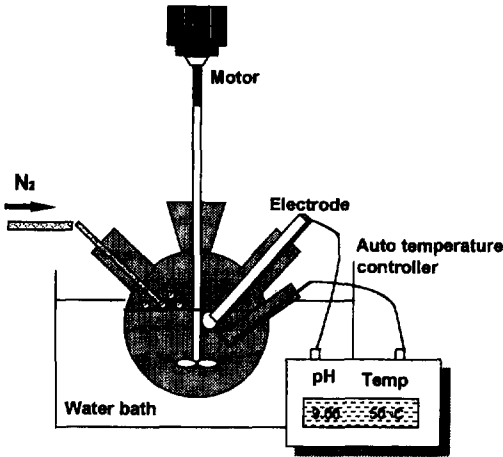


Fig. 2. Schematic diagram of enzymatic hydrolysis system.

기질 1 kg에 대해 첨가한 효소의 활성이 12 AU (Anson unit)로 동일하게 하였다. 반응 pH는 Esperase의 경우 pH 9, Protamex의 경우 pH 7.5로 4 N NaOH를 사용하여 맞추었다. 60분 동안 가수분해한 후 pH 4.0에서 15분 동안 유지하여 효소를 불활성화시킴으로써 반응을 종료시켰다. 기질의 가수분해 정도를 지속적으로 파악하기 위하여 pH-stat method⁽¹⁷⁾를 사용하였다. pH를 일정하게 유지하는 데 소요된 4 N NaOH의 양으로 단백질 분자내 펩티드 결합의 총수에 대한 분해된 결합수의 비를 계산하였다. 4 N NaOH를 50 µL 단위로 첨가하면서 일정시간 동안 첨가한 양의 합으로 그 시간에서의 DH (degree of hydrolysis) %를 계산하였으며 계산 식은 다음과 같다.

$$DH, \% = B \times N_b \times \alpha' \times M^{-1} \times (h_{tot})^{-1} \times 100$$

여기서, B=소요된 염기의 양 (mL)

N_b =염기 농도 (4N)

α' = α -amino기의 평균 해리도

M=단백질의 질량 (g)

h_{tot} =기질 단백질에서 전체 펩티드 결합의 수(meq/g 단백질)

α' 값은 가수분해의 pH와 온도에 따라 변화하는데 pH 7.5, 온도 50°C의 경우는 1.40 그리고 pH 8.0, 온도 50°C의 경우는 1.04이다. h_{tot} 값은 미강 단백질의 아미노산 조성으로부터 계산하여 8.12 (meq/g 단백질)를 사용하였다.

한외여과에 의한 가수분해물의 분획

가수분해 종료 후 10,000×g에서 10분 동안 원심분

리한 후, 상정액 중의 단백질 함량을 Lowry법으로 측정하여 단백질 함량이 약 3% 수준이 되도록 희석하였다. 이어서 압력 55 psi에서 Diaflo® ultrafiltration membrane (YM10, molecular weight cut-off 10 kDa, Amicon, Beverly, MA, USA)을 사용하여 한외여과를 수행하였으며, 여과액이 가수분해용액의 1/2이 되는 시점에서 여과를 종료하고 분자량 10 kDa을 기준으로 >10 kDa 획분과 <10 kDa 획분으로 나누어 냉동건조한 후 냉동 보관하였다.

가수분해물의 친화 크로마토그래피

친화 크로마토그래피의 matrix는 Pattinson 등⁽¹⁸⁾의 방법을 변형하여 제조하였다. 99.9% ethanol 31.5 mL에 cholic acid 500 mg을 녹여 20% ethanol에 미리 팽윤시킨 ω -aminoethyl-Sepharose 4B gel 70 mL에 섞었다. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCl 900 mg을 녹인 50% (v/v) ethanol 100 mL를 gel 현탁액에 천천히 첨가한 후 24°C에서 16시간 동안 교반하면서 공유결합시켰다. 제조한 친화 크로마토그래피 matrix를 16×150 mm의 컬럼에 충전한 뒤 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM dithiothreitol과 0.02% sodium azide를 녹인 용액 1 L를 흘려주어 결합하고 남은 cholic acid를 제거하였다. Makino 등⁽¹⁹⁾의 방법에 따라 한외여과로 분획한 후 냉동건조한 시료 400 mg을 5 mM dithiothreitol과 0.02% sodium azide를 함유한 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액 20 mL에 용해시킨 후 친화 크로마토그래피의 matrix를 충전한 컬럼에 걸어주었다. 0.1 mM dithiothreitol과 0.02% sodium azide를 함유한 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액에 이어서 이 완충용액에 NaCl을 가하여 1 M과 0.15 M로 제조한 완충용액을 280 nm에서 흡광도를 관찰하면서 35 mL/hr의 유속으로 흘려 보냈다. 0.5% sodium deoxycholate, 0.15 M NaCl, 0.1 mM dithiothreitol, 0.02% sodium azide를 함유한 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)을 흘려 보내어 matrix에 결합되어 있던 펩티드를 용리시켰다. 마지막으로 8 M urea, 0.1 mM dithiothreitol, 0.02% sodium azide를 함유한 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)을 흘려 보내어 비특이적 결합체를 용리시켰다. 용리액은 5 mL씩 분취하여 280 nm에서 흡광도를 측정하여 분획하였다. 그 중 cholic acid 결합 펩티드 분획물은 앞서 한외여과시 분자량 10 kDa 이상인 획분의 경우는 55 psi 압력으로 Diaflo® ultrafiltration membrane (YM10)을 이용하여 처음 부피의 1/4까지 여과한 후 증류수를 다시 첨가하여 다시 1/4부피가 될 때까지 여과하는 방법으로 염을 제거한 뒤 냉동건조시켰다. 분자량 10 kDa 이하 획분

의 경우는 바로 냉동건조하였으며 각 건조시료는 3차 증류수에 녹여 eppendorf tube에 담아 냉동 보관하였다. 보관시료는 HPLC 분석 및 분취, 겔저거기에 의한 분석의 시료로 사용하였다.

담즙산 결합 획분(>10 kDa 획분)의 역상 HPLC 분석

1차 분석시 Delta-Pak C₁₈ (7.8×300 mm I.D., 5 μm, 300 Å) 컬럼을 이용하여 0.1% trifluoroacetic acid를 함유한 10%와 90%의 acetonitrile로 5분 동안에 10%부터 85%까지 직선상으로 acetonitrile 농도 기울기를 만들어 3 mL/min의 유속으로 214 nm에서 흡광도를 측정하여 염 peak와 비교하였다. 2차 분석시에는 주요 peak만을 분취할 목적으로 65% acetonitrile 농도로 흘러주면서 주요 peak를 받아 evaporator로 농축한 후 냉동시켜 보관하였다.

담즙산 결합 획분(<10 kDa 획분)의 겔저거기에 의한 분석

Sephadex G-50 superfine column (16×450 mm)을 이용하여 분자량에 따라 분리하였다. 냉동건조시료를 적당히 희석하여 이 중 2 mL를 컬럼에 걸은 후 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 4 M urea (pH 8.0) 완충용액을 18 mL/hr로 흘러주면서 3 mL씩 분취하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분자량 추정에는 cytochrome c (12,400 Da), aprotinin (6,500 Da), vitamin B₁₂ (1,357 Da)를 표준물질로 사용하였으며 각 표준물질 1 mg씩을 완충용액 2 mL에 녹여 사용하였다.

아미노산 조성 분석

Prep-HPLC로 얻은 시료는 Integrated Speedvac® System (Savant Instruments, Inc., Farmingdale, NY, USA)을 이용하여 43°C에서 농축한 후, 총 아미노산 분석과 유리 아미노산 분석의 간접 가수분해 시료로 사용하였다. 시험관에 각 시료 농축액을 50 μL씩 넣고 25×150 mm 가수분해 용기에 담아 Waters workstation에서 건조시킨 후, 가수분해 용기 바닥에 1% phenol (v/v)을 함유한 6 N HCl 200 μL를 첨가하였다. 가수분해 용기를 workstation에 설치한 후 vacuum/N₂ purging을 3회 반복하고 150°C에서 1시간 가수분해하였다. 150°C 1시간 가수분해시 손실량이 큰 serine, threonine, tyrosine에 대해서는 각각 83%, 87% 그리고 82%의 수율을 적용하여 분석결과를 보정하였다. 가수분해가 끝난 시료는 용기를 바꾸어 Waters workstation에서 amino acid standard (PIERCE, Rockford, IL, USA) 5 μL와 함께 건조시킨 후 각 시료 시험관에 재 건조시약

(methanol : water : triethylamine=2 : 2 : 1 (v/v)) 10 μL씩을 첨가하여 workstation에서 재 건조하였다. 재 건조된 시료 시험관에 유도제 시약(methanol : water : triethylamine : phenylisothiocyanate=7 : 1 : 1 : 1 (v/v))을 20 μL씩 첨가하고 상온에서 20분 정치하여 phenylthiocarbamate amino acid 유도체를 제조하였다. Workstation에서 다시 건조시킨 다음 시료 희석액(Waters Corporation, Milford, MA, USA) 250 μL씩을 첨가하여 완전 용해시키고 0.45 μm filter를 통과시켜 HPLC 분석시료를 제조하였다. 1회 분석에 standard의 경우는 5 μL, 분석시료의 경우는 15 μL를 주입하였다.

평균 소수도의 계산

Prep-HPLC의 각 peak에 대한 총 아미노산과 유리 아미노산 분석결과로부터 펩티드 부분의 아미노산 조성을 계산하여 펩티드 부분의 평균 소수도를 구하였다. 평균 소수도의 계산은 김과 이의 방법⁽²⁶⁾에 따라 계산하였다. 계산식은 다음과 같다.

$$Q(\text{cal} \cdot \text{mole}^{-1}) = \frac{\sum \Delta Ft \cdot n}{100}$$

여기서, Q: 평균 소수도

ΔFt: 특정 농도의 수용액에서 동일 농도의 에탄올 용액으로의 아미노산 자유 이동 에너지

n: 각 아미노산의 몰백분율

통계분석

효소의 선택을 위한 pH-drop method와 DH (%) 측정 실험에서의 결과는 각 실험군의 평균간에 차이가 있는가를 검정하기 위해 SAS를 이용하여 α=0.01 수준에서 Duncan의 다중비교를 행하였다.

결과 및 고찰

pH drop method를 이용한 효소의 상대적 활성 조사 미강의 알칼리 추출물 중 총질소 함량은 9.99%이었으며, 단백질 환산계수로는 사료산업에서 6.25를 널리 사용하는 점과 가수분해율 계산식에서 사용된 h_{max} 값에 환산계수로 6.25를 사용한 점을 감안하여서 6.25를 선택하여 계산한 결과 단백질 함량은 63.38% (wet basis)였다.

기질의 가수분해에 앞서 여러 효소의 기질에 대한 상대적 활성을 조사하여 이 가운데 활성이 강한 효소를 1차 선택함으로써 다음 단계의 실험횟수를 줄일 수

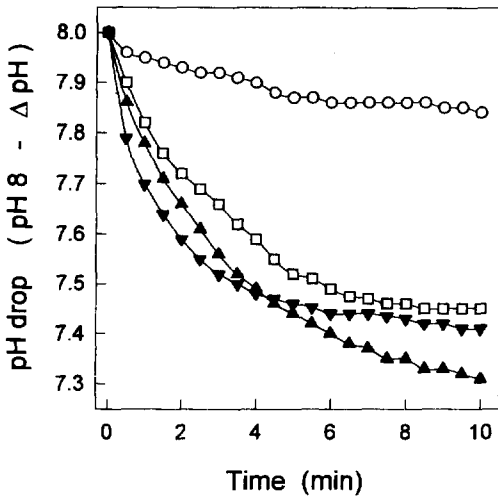


Fig. 3. Comparison of proteolytic activity of various enzymes for rice bran protein using the pH-drop method. ○—○: Neutrase 0.5 L, □—□: Alcalase 0.6 L, ▼—▼: Protamex, ▲—▲: Esperase 7.5 L. Substrate was 1% (w/v) rice bran protein in aqueous solution. pH 8.0, Temp.=50°C, S/E=23.4 (w/w).

있었다. 효소에 의한 단백질의 가수분해가 일어나면서 아미노산의 카르복실기가 노출되어 용액의 pH가 떨어지게 되는데 효소첨가 10분 후의 pH는 어떤 다른 요소보다 단백질 소화율의 *in vivo* 실험 결과와 높은 상관관계가 있다고 보고된 바 있다⁽⁶⁾. 미강 단백질의 경우는 albumin, globulin, glutelin의 함량이 각각 20~30% 정도로 비슷하며 prolamin은 상대적으로 미량 존재하므로 수용액 상에서 효소의 활성을 비교하였다⁽²¹⁾. 실험 결과 Esperase, Protamex, Alcalase 그리고 Neutrase 순으로 기질에 대한 활성이 높게 나타났다(Fig. 3). (pH8-ΔpH)의 최종 값은 Esperase가 7.31, Protamex는 7.41, Alcalase는 7.45 그리고 Neutrase는 7.84였으며, 효소 첨가 후 10분에서의 pH에 대한 Duncan의 다중비교 결과, 1% 유의수준에서 각 효소간에 차이가 있었다. 위 결과로부터 알칼리 추출 미강 단백질의 가수분해 효소로 Esperase와 Protamex를 선택하였다.

효소적 가수분해에 의한 효소 선택 및 가수분해물의 제조

가수분해 반응의 종료시점을 가수분해 반응 중에 결정하기 위하여 pH를 일정하게 유지하는 데 소요된 알칼리 양에 상응하는 DH값을 미리 계산하여 가수분해 진행에 따른 DH값의 변화를 바로 읽음으로써 반응의 진행정도를 파악하였다. 반응 종료 후 DH값에 4 N NaOH의 factor를 곱하여 그 값을 보정하였다. 50°C

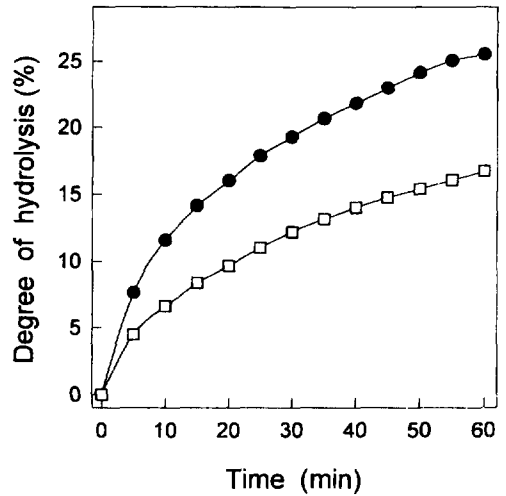


Fig. 4. Rice bran protein hydrolysis in aqueous solution. ●—●: Esperase 7.5 L, □—□: Protamex. Initial substrate concentration=5% (w/v), S/E=183/1 (Esperase), 125/1 (Protamex). Reaction was carried out at 50°C and pH 9.0 (Esperase) or pH 7.5 (Protamex).

수용액 상에서 60분 동안 반응시켰을 때 Esperase의 경우는 25.50%, Protamex의 경우는 16.67%의 DH에 도달하였다(Fig. 4). 단위 질량에 대한 효소의 활성이 Esperase가 1.5배 정도 높은 점을 감안하여, 효소 선택시 pH저하 효과와 가수분해 결과를 고려하였을 때 Esperase가 Protamex에 비하여 알칼리 추출 미강 단백질에 대한 활성이 높은 것으로 나타났다.

친화 크로마토그래피를 이용한 담즙산 결합 획득의 분리

친화 크로마토그래피 matrix 제조시 carbodiimide와 cholic acid의 농도는 ω-aminoethyl-Sepharose 4B gel의 spacer 농도(10 μmol spacer/mL gel)와 cholic acid의 결합효율(3.5 μmol /mL gel)⁽¹⁸⁾을 고려하여 결정하였다. 시료 성분 중 matrix 와 상호작용이 없는 부분은 10 mM Tris-HCl 완충용액을 흘려 제거하였으며, matrix 및 side arm에 정전기적 상호작용으로 결합되어 있는 부분은 1 M NaCl을 함유한 완충용액으로 용리시켰다. 이어서 0.15 M NaCl을 함유한 완충용액을 흘려줌으로써 0.15 M NaCl과 sodium deoxycholate를 함유한 완충용액으로 cholic acid와 수소성 상호작용력에 의해 결합되어 있던 단백질이나 펩티드를 분리할 때 염농도에 의한 해리 현상의 발생을 배제시켰다. 그리고 matrix와 비 특이적으로 강하게 결합하고 있는 부분은 8 M urea를 함유한 완충용액으로 용리시켜 제거하였다. 한외여과로 분획하여 얻은 두 획분에 대하

여 각각 친화 크로마토그래피를 수행한 결과는 Fig. 5와 같다. Cholic acid에 결합하는 단백질 또는 폴리펩티드 및 펩티드의 농도는 분자량 10 kDa 이상인 단백질 분획물에서 10 kDa 이하의 폴리펩티드 및 펩티드 분획물에서보다 높게 나타났다. Fig. 5에서 1, 2, 4번 완충용액에 비해 3번 완충용액에 의한 결합물의 해리 시간이 상대적으로 길게 나타났는데 이는 matrix에 결합된 ligand의 농도 증가가 결합력의 세기, 입체장애, 비 특이적 결합에 영향을 끼치는 것과 관계가 있는 것으로 추정된다.

역상 크로마토그래피에 의한 담즙산 결합 획분(>10 kDa 획분)의 분리 및 정제

친화 크로마토그래피로써 분리한 담즙산 결합 획분

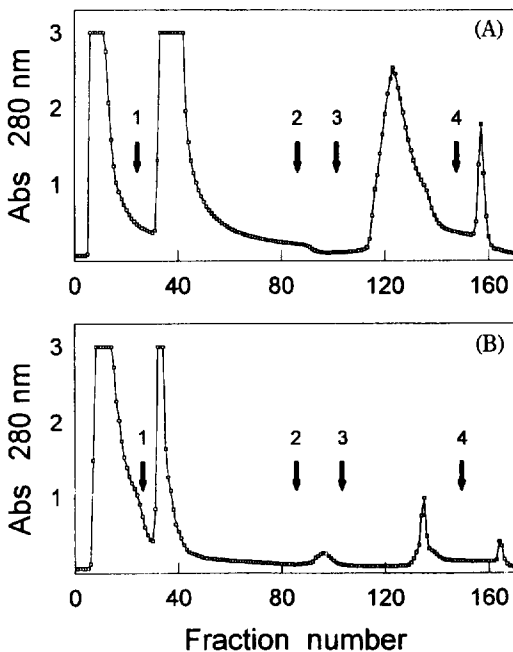


Fig. 5. Affinity chromatography of >10 kDa fraction (A) and <10 kDa fraction (B) of rice bran protein hydrolysate prepared by Esperase treatment. Twenty mL of each fraction of RBPH (c. 400 mg protein) in 10 mM Tris-HCl, 5 mM dithiothreitol and 0.02% NaN_3 at pH 8.0 were applied to a cholic acid-conjugated Sepharose 4B column (1.6×15 cm), and washed with 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM dithiothreitol and 0.02% NaN_3 at pH 8.0. After the column was further washed with the same buffer containing 1 M NaCl(1) and 0.15 M NaCl(2), the adsorbed proteins were eluted with the same buffer containing 0.5% sodium deoxycholate and 0.15 M NaCl(3). The remaining materials bound with higher affinity were subsequently removed by 8 M urea(4).

은 C_{18} column을 이용하여 acetonitrile 10%에서 90%까지 농도 기울기를 주어 역상 크로마토그래피를 실시한 결과, 소수성 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드 및 각종 염을 포함하고 있는 것으로 나타났다. 주요 염 peak는 deoxycholate인 것으로 확인되었는데 한외여과에 의한 염 제거 단계에서 단백질 및 펩티드와 강하게 결합하고 있는 다량의 deoxycholate가 제거되지 않았음을 보였다. 60~70% acetonitrile 농도 기울기에서 대부분의 염 peak가 나타나는 것과 염 peak 앞에는 특이한 peak가 없는 점을 감안하여 초기에 acetonitrile 함량을 높여줌으로써 대부분의 염이 함께 제거되도록 하여 분석하였다. Fig. 6(A)는 담즙산 결합 획분에 존재하는 각종 염의 용액만을 분석한 것이다. 16~18분에서 나오는 deoxycholate의 peak와 26분 정도에 나오는 Tris염의 peak사이에는 염 peak가 없음을 보여주고 있다. 알칼리 추출 미강 단백질 가수분해물의 담즙산 결합 획분(>10 kDa 획분)에 대한 분석 결과, 4개의 peak가 관찰되었다(Fig. 6(B)). 주요 peak를 분취할 목적으로 65% acetonitrile을(Fig. 7(B)) 일정하게 흘리면서 같은 조건에서의 염용액에 대한 분석 결과(Fig. 7(A))와 비교하여 3개 peak를 분취하였다.

담즙산 결합 획분(<10 kDa 획분)의 분자량 분포

친화 크로마토그래피에 의하여 분리한 담즙산 결합 부분(<10 kDa 부분)을 C_{18} column을 이용하여 acetonitrile

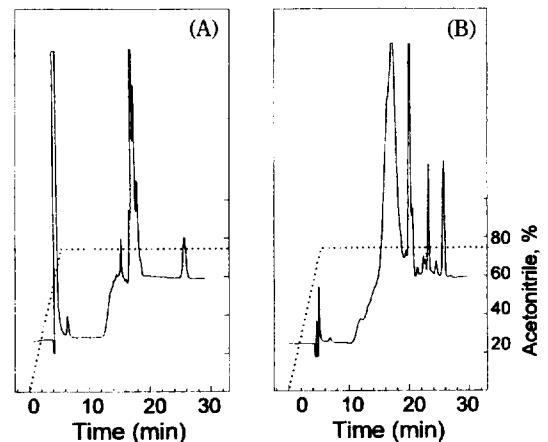


Fig. 6. Analytical reverse phase HPLC chromatogram of the salt in the affinity fraction (A) and the bile acid-binding fraction of RBPH (>10 kDa fraction) prepared by Esperase treatment. Running conditions: Column, Delta-Pak C_{18} (7.8×300 mm); Flow rate, 3 mL/min; Absorbance at 214 nm; Eluent gradient, 10~85% B in 5 min, A=0.1% TFA in 10% acetonitrile, B=0.1% TFA in 90% acetonitrile.

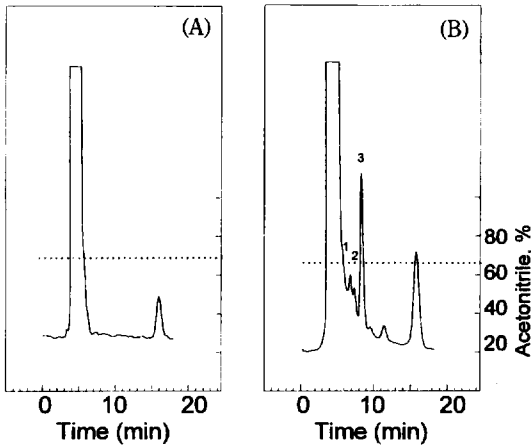


Fig. 7. Preparative reverse phase HPLC chromatogram of the salt in affinity fraction (A) and bile acid-binding fraction of RBPH (>10 kDa fraction) prepared by Esperase treatment. Running conditions: Column, Delta-Pak C₁₈ (7.8×300 mm); Flow rate, 3 mL/min; Absorbance at 214 nm; Eluent, 0.1% TFA in 70% acetonitrile.

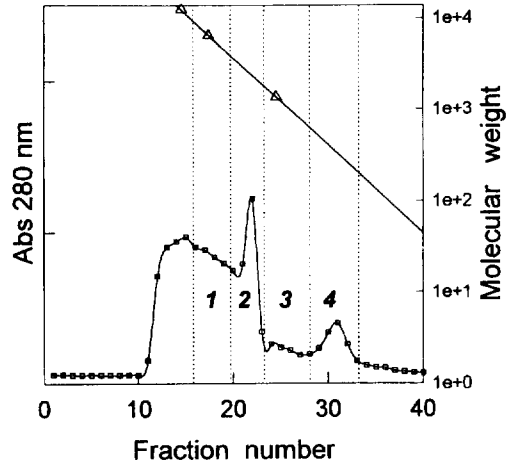


Fig. 8. Elution profile of the bile acid-binding fraction of RBPH (<10 kDa fraction) prepared by Esperase treatment on Sephadex G-50 superfine column. Eluent: 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, and 4 M urea at pH 8.0, Flow rate: 18 mL/hr, Fraction volume: 3 mL.

trile 10%에서 90%까지 농도 기울기를 주어 역상 크로마토그래피를 실시한 결과, 소수성 폴리펩티드 및 펩티드의 peak가 각종 염 peak와 겹쳐져 분리가 불가능하였다. 담즙산 결합 획득 (<10 kDa 획득)에 대하여 200 nm~400 nm 파장에 대해 scanning을 해본 결과 273 nm부근에서 peak가 검출되어 폴리펩티드 및 펩티드의 존재를 확인할 수 있었다(자료 생략). 각종 염과 폴리펩티드 및 펩티드의 분리, 담즙산 결합 획득의 분자량 측정을 위해 Sephadex G-50 column을 이용하여 겔저거기를 수행하였다. 표준물질의 겔저거기 결과에 따라서 알칼리 추출 미강 단백질 가수분해물의 담즙산 결합 획득(<10 kDa)을 Sephadex G-50 column에 걸어 용리액을 분자량 10,000 Da~4,000 Da, 4,000 Da~1,500 Da, 1,500 Da~600 Da 그리고 600 Da~200 Da에 해당하는 부분으로 나누었다(Fig. 8). 각 획득(1~4)에 대해 RP-HPLC를 이용하여 폴리펩티드 또는 펩티드의 분리를 시도했으나 염 이외의 peak는 확인할 수 없었다. 여전히 염과의 강한 결합에 의해 역상 크로마토그래피에서 염 peak와 겹치는 것으로 추정되었다. C₁₈보다 덜 비극성인 방향으로 pore size가 큰 C₈, C₄, diphenyl column 등을 이용하거나 이와 병행하여 반대이온으로 TFA이외의 H₃PO₄, heptafluorobutyric acid, HCl을 사용하면서 역상 크로마토그래피를 진행시켜보는 방법도 고려해야 할 것 같다. 또한 이온교환 크로마토그래피도 유용한 방법이 될 것으로 판단된다.

Preparative reverse phase HPLC peak의 아미노산 조성 분석

알칼리 추출 미강 단백질 가수분해물의 RP-HPLC 크로마토그램(Fig. 7B)에 나타난 peak 1, 2 및 3에 상응하는 획득 R-1, R-2, R-3의 총 아미노산과 유리 아미노산 조성을 분석하여 각 획득에 함유된 단백질과 일부 펩티드 및 폴리펩티드의 아미노산 조성을 비교한 결과 세 획득의 proline 함량이 원시료의 4배 정도로 나타났다. 그 밖에 glutamic acid, glycine의 함량이 많은 것은 비슷하였으며, 획득별 조성을 살펴보면 R-2는 leucine을 제외하고는 phenylalanine, isoleucine, valine의 함량이 R-1, R-3에 비하여 높은 것으로 나타났고, R-3의 경우 leucine과 tyrosine의 함량이 R-2의 3배 정도로 조사되었다. Table 1에서 보면 유리 아미노산의 경우 serine, glycine의 함량이 높게 나타났으며 R-3 획득의 경우 30%의 유리 아미노산 함량을 보였다. Fig. 9에는 세 획득의 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드를 구성하는 각 아미노산을 mole %로 나타내어 비교하였다.

단백질, 폴리펩티드 및 펩티드 부분의 평균 소수도

총 아미노산 및 유리 아미노산 분석 결과로부터 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드 부분의 아미노산 조성을 계산하여 각 획득의 평균 소수도를 계산하였다(Table 2). 미강 단백질의 경우 평균 소수도는 1,072 cal·mole⁻¹로 계산되었으며 RP-HPLC에서 얻은 3개 peak에 상응

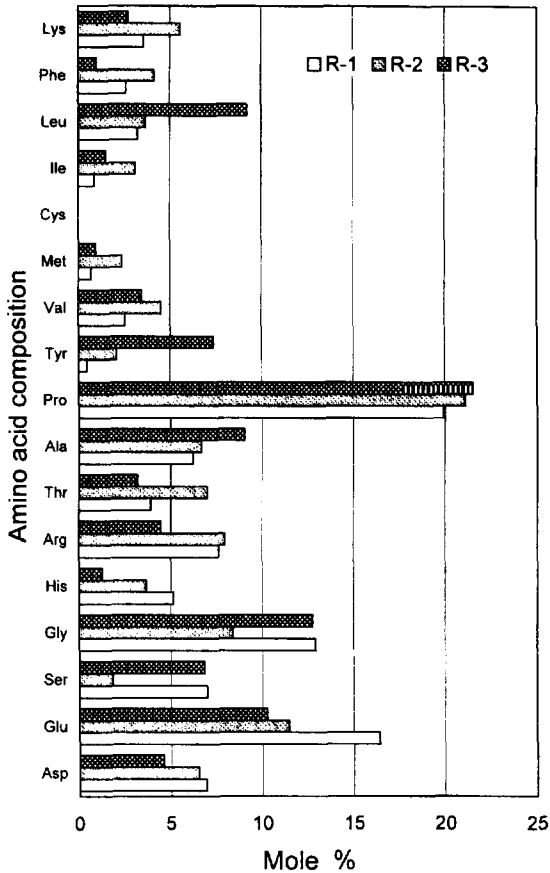


Fig. 9. Mole % vs amino acid composition of peptide and polypeptide part in peaks 1, 2 and 3 on prep-HPLC chromatogram of the bile acid-binding fraction of RBPH (>10 kDa fraction) prepared by Esperase treatment.

하는 획분의 평균 소수도는 R-1 $1,083 \text{ cal} \cdot \text{mole}^{-1}$, R-2 $1,345 \text{ cal} \cdot \text{mole}^{-1}$ 그리고 R-3 $1,377 \text{ cal} \cdot \text{mole}^{-1}$ 로 소수도가 증가하였다. 평균 소수도가 높은 획분일수록 소수성 유리 아미노산과의 소수성 결합을 통하여 peak내 유리 아미노산 함량이 높은 것으로 보여진다.

평균 소수도는 측정방법에 따라 각각 상이한 값이 얻어지는데 한 등⁽²²⁾은 대두 단백질의 섭취에 의한 혈청 콜레스테롤의 저하요인을 구명하기 위한 시도 중의 하나로 카제인 및 대두 단백질로부터 제조한 펩티드의 아미노산 조성을 분석하여 각 펩티드들의 lysine/arginine 비율 및 계산법을 달리한 평균 소수도를 구하고 이들을 섭취시킨 흰쥐의 혈청 콜레스테롤 농도와 상관관계를 분석하였다. 이 보고에 의하면 lysine/arginine 비율 및 소수성 아미노산의 몰분율은 혈청 콜레스테롤의 농도와 상관관계가 없었으며, Tanford,

Table 1. Amino acid composition of the peaks R1-R3 on prep-HPLC chromatogram of the bile acid-binding fraction of RBPH (>10 kDa fraction) prepared by Esperase treatment

Amino acid	ΔF_t	R-1	R-2	R-3
		$\Delta F_t \times n'$	$\Delta F_t \times n'$	$\Delta F_t \times n'$
Asp	540	3,741	3,513	2,474
Glu	550	9,031	6,302	5,636
Ser	40	279	73	273
Gly	0	0	0	0
His	500	2,572	1,811	630
Arg	730	5,555	5,800	3,251
Thr	440	1,722	3,080	1,403
Ala	730	4,537	4,874	6,601
Pro	2,600	51,759	54,873	55,947
Tyr	2,870	1,274	5,938	21,071
Val	1,690	4,304	7,644	5,843
Met	1,300	917	3,085	1,241
Ile	2,970	2,557	9,293	4,342
Leu	2,420	7,807	8,844	22,254
Phe	2,650	6,918	11,010	2,644
Lys	1,500	5,352	8,325	4,082
Sum		108,325	134,465	137,692
Average hydrophobicity ($\text{cal} \cdot \text{mole}^{-1}$)		1083	1345	1377

Manavalan 및 Meirovitch 법으로 구한 평균 소수도와도 상관관계가 없었다. 그러나 Krigbaum법으로 구한 평균 소수도와는 상관관계수가 -0.736 으로 음의 상관관계이어서 펩티드의 Krigbaum 평균 소수도가 높을수록 흰쥐의 혈청 콜레스테롤 농도가 낮았다. Preparative reverse phase HPLC에서 분리한 peak의 혈청 콜레스테롤 농도에 미치는 영향을 유추하기 위하여 각 peak의 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드 부분에 대한 평균 소수도를 Krigbaum법으로 계산해 본 결과, R-1 획분이 547.13, R-2 획분이 722.03 그리고 R-3 획분이 695.08이었다. 그러나 한 등⁽²²⁾의 연구는 효소에 의한 단백질 가수분해물의 평균 소수도에 대해 *in vivo*에서의 혈청 콜레스테롤 농도저하 효과와의 상관관계를 조사한 것으로 담즙산 결합능력이 확인된 가수분해물의 획분을 Krigbaum법에 의한 평균 소수도와 연관시켜 그 효과를 추정하기는 어렵다. 담즙산 결합 획분의 평균 소수도로 혈청 콜레스테롤 저하 효과를 추정하기 위해서는 가수분해물의 담즙산 결합능력과 소수도와의 상관관계 및 보다 넓은 영역의 소수도에 걸친 상관성 조사가 이루어져야 할 것이다.

이 연구에서는 탈지 미강으로부터 미강 단백질의 추출 방법을 정립하고 단백질 가수분해물을 제조하는

Table 2. Average hydrophobicity of the peptide and polypeptide part in the peaks R1-R3 obtained by prep-HPLC

Amino acid	Concentration, mole %								
	R-1			R-2			R-3		
	Total amino acid	Free amino acid	Peptide and polypeptide	Total amino acid	Free amino acid	Peptide and polypeptide	Total amino acid	Free amino acid	Peptide and polypeptide
Asp	6.00	¹ ND	6.00	5.33	ND	5.33	3.20	ND	3.20
Glu	14.23	ND	14.23	9.39	ND	9.39	7.16	ND	7.16
Ser	9.99	3.94	6.05	8.12	6.62	1.50	10.51	5.74	4.77
Gly	13.88	2.68	11.20	11.42	4.54	6.88	14.39	5.48	8.91
His	5.73	1.27	4.46	6.32	3.35	2.97	3.00	2.12	0.88
Arg	6.59	ND	6.59	6.51	ND	6.51	3.11	ND	3.11
Thr	3.93	0.54	3.39	5.73	ND	5.73	4.48	2.25	2.23
Ala	6.99	1.61	5.38	7.04	1.57	5.47	10.41	4.09	6.32
*Pro	17.25	ND	17.25	17.29	ND	17.29	15.04	ND	15.04
*Tyr	0.38	ND	0.38	1.71	ND	1.71	5.59	0.46	5.13
*Val	2.91	0.70	2.21	3.71	ND	3.71	3.59	1.17	2.42
Met	0.61	ND	0.61	1.94	ND	1.94	0.67	ND	0.67
Cys	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
*Ile	1.79	1.04	0.75	2.56	ND	2.56	2.48	1.46	1.02
*Leu	3.29	0.50	2.79	3.52	0.53	2.99	7.88	1.46	6.42
*Phe	2.91	0.64	2.27	4.65	1.25	3.40	3.82	3.13	0.69
Lys	3.52	0.43	3.09	4.76	0.21	4.55	4.67	2.77	1.90
Total	100.0	13.35	86.65	100.0	18.07	81.93	100.0	30.13	69.87

¹ND : Not detected.

데 적합한 효소를 선정하였다. 이어서 친화 크로마토그래피로써 가수분해물 중 담즙산 결합 획분을 분리하고 한외여과하여 분획한 다음, 분자량 분포, 아미노산 조성, 평균 소수도 등을 조사하였다. C₁₈ column을 이용한 역상 크로마토그래피를 수행하여 담즙산 결합 획분을 부분적으로 정제하였으나, column의 종류를 달리하거나 다른 크로마토그래피 방법을 사용하여 계속 정제하고 최종적으로 순수 분리된 성분에 대하여 물리화학적 특성을 규명하기 위한 연구가 수행되어야 할 것이다.

요 약

미강을 혈중 콜레스테롤 저하 효과가 있는 기능성 식품소재의 원료로 활용하는 데 필요한 기초 자료를 얻기 위하여 미강 단백질의 가수 분해물을 제조하여 담즙산 결합 획분을 분리하고 일부 물리화학적 특성을 조사하였다. 미강 단백질을 탈지 미강으로부터 알칼리 추출과 등전점 침전 방법을 이용하여 제조하였다. 미강 단백질을 기질로 하여 pH-drop method로 측정된 효소의 상대적 활성과 가수분해시 가수분해율의 변화를 비교 평가하여 기질의 가수분해에 적합한 효소를 선택하였다. Esperase에 의한 가수분해물을 한외

여과(MWCO: 10 kDa)하여 두 부분으로 나누었다. 각 분획물을 cholic acid를 공유결합 시킨 ω-aminoethyl Sepharose 4B column에 걸어, 소수성 상호작용에 의해 cholic acid와 결합하는 폴리펩티드 및 펩티드를 deoxycholate 완충용액으로 용출시켜 분리하였다. 겔 투과 크로마토그래피(Sephadex G-50)를 이용하여 한외여과 여과액의 담즙산 결합물에 대해 분자량 분포를 측정된 결과, 대부분 2 kDa~10 kDa에 걸쳐 넓게 분포하였고 일부는 0.2 kDa~0.6 kDa 사이에 존재하였다. 한외여과 잔류액의 담즙산 결합물에 대해서는 preparative reverse phase HPLC를 실시하여 미강 단백질 가수분해물에서 3개(R-1, 2, 3)의 peak를 분리하였다. 각 peak의 총 아미노산과 유리 아미노산 조성을 분석하여 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드 부분의 아미노산 조성을 조사하였다. 그 결과 미강 단백질 가수분해물에서 얻은 peak의 경우 proline 함량이 미강 단백질의 4배에 달했고, 평균 소수도가 높은 peak일수록 유리 아미노산의 함량이 높았으며 평균 소수도는 미강 단백질보다 다소 높은 것으로 나타났다.

감사의 글

이 연구에 사용된 탈지미강과 가수분해 효소를 제

공하여 주신 신양현미유(주)와 노보 노르디스크 코리아의 담당자께 감사드립니다.

문헌

- Piliang, N.G., Bird, H.R., Sunde, M.L. and Pringle, D.J.: Rice bran as the major energy source for laying hens. *Poultry Sci.*, **61**, 357 (1982)
- CFTRI: Rice bran and rice bran oil. An annotated bibliography 1970-1980. CFTR I Bibliographical Ser. No. 28. Central Food Technological Research Institute, Mysore, India (1983)
- Randall, J.M., Sayre, R.N., Schultz, W.G., Fong, R.Y., Mossman, A.P., Tribelhorn, R.E. and Saunders, R.M.: Rice bran stabilization by extrusion cooking for extraction of edible oil. *J. Food Sci.*, **50**, 361 (1985)
- Saunders, R.M.: The properties of rice bran as a food-stuff. *Cereal Foods World*, **35**, 632 (1990)
- Kinsella, J.L.: Functional properties of proteins in foods: A survey. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **7**, 219 (1976)
- Constantinides, A. and Adu-Amankwa, B.: Enzymatic modification of vegetable protein: mechanism, kinetics, and production of soluble and partially soluble protein in a batch reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1543 (1980)
- Watanabe, M., Miyakawa, J., Ikezawa, Z., Suzuki, Y., Hirao, T., Yoshizawa, T. and Arai, S.: Production of hypoallergenic rice by enzymatic decomposition of constituent proteins. *J. Food Sci.*, **55**, 781 (1990)
- Huff, M.W. and Carroll, K.K.: Effects of dietary protein on turnover, oxidation and absorption of cholesterol, and steroid excretion in rabbits. *J. Lipid Res.*, **21**, 546 (1980)
- Yashiro, A., Oda, S. and Sugano, M.: Hypocholesterolemic effect of soybean protein in rats and mice after peptic digestion. *J. Nutr.*, **115**, 1325 (1985)
- Iwami, K., Sakakibara, K. and Ibuki, F.: Involvement of post-digestion 'hydrophobic' peptides in plasma cholesterol-lowering effect of dietary plant proteins. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1217 (1986)
- Sugano, M., Yamada, Y., Yoshida, K., Hashimoto, Y., Matsuo, T. and Kimoto, M.: The hypocholesterolemic action of the undigested fraction of soybean protein in rats. *Atherosclerosis*, **72**, 115 (1988)
- Sugano, M., Goto, S., Yamada, Y., Yoshida, K., Hashimoto, Y., Matsuo, T. and Kimoto, M.: Cholesterol-lowering activity of various undigested fractions of soybean proteins in rats. *J. Nutr.*, **120**, 977 (1990)
- Sugano, M., Ishiwaki, N. and Nakashima, K.H.: Dietary protein-dependent modification of serum cholesterol level in rats. *Ann. Nutr. Metab.*, **28**, 192 (1984)
- Mannheim, A. and Cheryan, M.: Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor. *J. Food Sci.*, **55**, 381 (1990)
- Gnanasambandam, R. and Hettiarachchy, N.S.: Protein concentrates from unstabilized and stabilized rice bran: preparation and properties. *J. Food Sci.*, **60**, 1066 (1995)
- Hsu, H.W., Vavak, D.L., Satterlee, L.D. and Miller, G. A.: A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J. Food Sci.*, **42**, 1269 (1977)
- Adler-Nissen, J.: Enzymatic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Sci. Publishers, New York (1985)
- Pattinson, N., Collins, D. and Campbell, B.: Covalent coupling of cholic acid to aminohexylamino-Sepharose 4B and its use in affinity chromatography of serum albumin. *J. Chromatogr.*, **187**, 409 (1980)
- Makino, S., Nakashima, H., Minami, K., Moriyama, R. and Takao, S.: Bile acid-binding protein from soybean seed: isolation, partial characterization and insulin-stimulating activity. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 803 (1988)
- Kim, S.H. and Lee, H.J.: Characteristics of bitter peptides from a cheese and a soybean paste. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **17**, 276 (1985)
- Landers, P.S. and Hamaker, B.R.: Antigenic properties of albumin, globulin, and protein concentrate fractions from rice bran. *Cereal Chem.*, **71**, 409 (1994)
- 한응수, 이형주, 손동화: 대두 펩타이드의 아미노산 조성 및 평균소수도가 흰쥐의 혈청 콜레스테롤 농도에 미치는 영향. *한국식품과학회지*, **25**, 552 (1993)

(1996년 12월 27일 접수)