

Casein 가수분해물 소재 철분결합 Peptide에 관한 연구

최인욱 · 김기성 · 임상동 · 김희수
한국식품개발연구원

A Study on Iron Binding Peptides from Casein Hydrolysates

In Wook Choi, Ki Sung Kim, Sang Dong Lim and Hee Soo Kim
Korea Food Research Institute

Abstract

When casein was hydrolyzed by trypsin, alcalase, neutrase, protamax, and *S. aureus* type V8, peptides (100 µg/mL) which were produced by trypsin and alcalase solubilized 6.42 and 2.37 µg/mL of added irons at pH 6, respectively, while peptides which were produced by other proteases solubilized less than 1 µg/mL. Peptides produced by trypsin and alcalase were fractionated to 10 fractions on a reverse phase column and each fraction was tested for its iron solubilizing ability at pH 6. Among peptides produced by trypsin, fraction 5 showed the highest iron solubilizing ability (2.33 µg/mL). In the case of alcalase, fraction 7 showed the highest iron solubilizing ability (1.56 µg/mL). To isolate iron binding peptides from peptides produced by trypsin and alcalase, immobilized iron affinity chromatography which irons were chelated to imino diacetic acids in chelating sepharose fast flow were utilized. Our results showed that immobilized iron affinity chromatography was an effective method to isolate iron binding peptides produced by either trypsin or alcalase from milk casein.

Key words: casein, trypsin, alcalase, iron binding peptide, soluble iron, immobilized iron affinity chromatography

서 론

철분은 모든 형태의 생물에 있어서 필수적인 영양소로서 대부분 단백질과 결합되어 여러 가지 중요한 생리적 작용에 관여한다. 철분의 체내흡수는 소장상부의 십이지장에서 일어난다고 알려져 있으며 체내 철분 저장상태에 따라 다르지만 정상적인 성인의 경우, 섭취한 철분의 약 5~10%만이 흡수된다고 알려져 있다^(1,2). 철분의 체내흡수는 철분의 화학적 상태, 철분이 포함된 식이의 구성요소들, 개인의 영양상태 등의 요인들에 의해 좌우된다⁽³⁾.

철분 결핍은 세계에서 가장 흔한 영양 결핍 중 하나로 50억의 사람들이 음식에서 체내로의 낮은 흡수율로 인한 철분 결핍성 빈혈을 가지고 있다고 한다⁽⁴⁾. 철분 결핍은 체내철분요구량보다 철분흡수율이 낮은 경우, 음식으로부터 낮은 철분흡수율, 성장률이 높은 시기, 계속되는 만성출혈시, serum ferritin 농도감소 등

의 원인으로 인하여 일어난다⁽⁵⁾. 철분결핍은 성장기의 어린이들과 여성들에게 주로 일어나며 철분결핍으로 인하여 일에 대한 수용능력의 감소를 유발하고 피로가 빨리 오며 지능적인 일의 수행력 감소, 어린이의 경우 행동 장애, 면역기능의 저하 등의 현상을 일으키기도 한다. 특히 우유만 먹는 유아의 경우 우유중에 많이 함유된 칼슘에 의하여 철분이 결핍되기 쉬우므로 인하여 정상적인 성장에 장애가 될 수도 있다^(6,7).

철분이 체내에 흡수되기 위해서는 철분이 가용성의 상태가 되어야 하며 특정한 음식이나 식이성분이 십이지장의 조건에서 철분의 용해성을 높인다면 이들이 철분의 체내로의 흡수를 증가시킬 가능성이 매우 높다. 많은 연구자들에 의해 단백질이나 peptide 등이 철분의 가용화를 돕는다는 연구결과가 발표되고 있다. Slavkavitz와 Clydesdale⁽⁸⁾은 닭근육질의 산에 용해되지 않는 추출물이 철분을 가용화시키는 능력이 뛰어나다고 보고한 바 있으며 수용성의 추출물이나 산추출물에서는 철분 가용화능이 나타나지 않았다. Van Campen과 Gross⁽⁹⁾는 쥐를 이용한 ligated duodenal segments 실험에서 아미노산 중에서도 histidine과 lysine이 철분의

Corresponding author: In Wook Choi, Korea Food Research Institute, San 46-1 Baekhyun-dong, Boondang-gu, Seongnam-si, Kyunggi-do 463-420, Korea

체내흡수를 현저히 증가시킨다는 것을 발견하였다. 본 연구에서는 인간에게 중요한 단백질급원인 우유 casein을 각종의 protease를 이용하여 분해시키고 생성된 peptide 중 철분의 가용화능을 증가시키는 분획을 확인하고 이들을 효과적으로 분리하는 방법에 대하여 연구한 바를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

Casein 가수분해를 제조

본 실험에서 사용된 protease 중 trypsin과 *S. aureus* type V8는 Sigma사 제품을, 그 외 alcalase, neutrase, protamax는 Novo사 제품을 사용하였다. Casein (Sigma)을 20 mM sodium carbonate 완충용액에 녹여 10%로 만들고 각 protease의 최적반응 pH로 조정한 후, 일정량의 protease를 첨가하여 45°C에서 4시간동안 반응시켜 각각의 casein 가수분해물을 만들었다(Table 1). 반응 후 반응액을 90°C에서 5분간 방치하여 protease를 불활성화 시켰으며 방냉후 pH를 4.6으로 조정하고 4,000×g에서 20분간 원심분리하여 모은 상등액을 증류수에서 24시간동안 투석하였으며 이를 peptide용액으로 사용하였다.

Peptide 농도측정

Peptide량을 측정하기 위하여 micro-lowry 방법 (Sigma)을 사용하였다. 즉 0.85% sodium chloride을 사용하여 단백질용액을 농도별로 녹여 표준용액을 만들고 casein가수분해물의 단백질 농도를 15~100 mg/dL이 되도록 조정한 후, 0.2 mL을 취하여 cuvette에 넣고 2.2 mL의 biuret 시약과 혼합하여 10분 동안 실온에서 방치하였다. 0.1 mL Folin & Ciocalteu's phenol 지시약을 첨가하여 혼합한 후, 실온에서 30분간 발색시켰다. Spectrophotometer (Hitachi 200-0062, Japan) 725 nm에서 0.85% NaCl 용액에 대해 흡광도를 읽고, 표준곡선으로부터 얻은 식에 의하여 가수분해된 단백질의 농도

를 구하였다.

Peptide의 철분가용화능

생성된 peptide의 위와 십이지장 조건에서의 철분 가용화능을 측정하기 위하여 peptide용액(100 µg/mL) 10 mL과 FeCl₃ (50 µg/mL) 2.5 mL을 혼합하여 pH를 2 또는 6으로 1 N HCl과 1 N NaOH를 이용하여 조정 한 후, 37°C에서 1시간 반응시켜 4,000×g, 5°C에서 30분간 원심분리하여 상등액에 포함된 침전되지 않고 남아 있는 가용성철분의 양을 ferrozine 법과 원자흡광 광도계를 이용하여 측정하였다.

Ferrozine 법¹⁾: 가용성철분이 포함된 상등액 10 mL을 취하여 0.02% L-ascorbic acid 0.625 mL와 혼합한 후 10분간 방치하여 10% ammonium acetate 0.5 mL와 반응시키고 1 mM ferrozine 발색시약 0.625 mL을 넣어 20분간 암소에서 발색시켰다. 3차 증류수 0.5 mL을 넣어 반응을 정지시킨 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준용액을 사용하여 얻은 각각의 pH에서의 표준식에 의해 가용성 철분의 농도를 측정하였다.

원자흡광광도계를 이용한 방법: 먼저 분석에 사용될 모든 초자기구들은 진한 황산으로 세척한 후 3차 증류수로 적어도 3번 행구어 남아있는 철분들을 제거 하였다. 일정량의 상등액을 초자도가니에 취하고 열 관상에서 예비건조한 후, 600°C의 회화로에서 3시간 방치하였다. 유기물질이 다 분해된 시료를 50% HCl 6 mL에 녹여 원전 건조시키고 0.1 N HCl로 25 mL 메 스플라스크로 옮겨 정량한 후, 여과지(whatmann paper #1)로 여과하여 원자흡광광도계(Perkin Elmer model 2380)를 이용하여 남아있는 철분의 양을 측정하였다. 각 peptide의 철분가용화능은 ferrozine법과 원자 흡광 광도계를 이용하여 측정된 각각의 상등액 중 가용성 철분량을 평균하여 나타낸 값으로 하였다.

철분결합 peptide의 분리

역상 chromatography: Casein으로부터 trypsin이나 alcalase에 의해 생성된 peptide들을 역상 column (crestpak C18S, Jasco)이 장착된 HPLC (Jasco Model LC-900)로 220 nm에서 유속 1 mL/min으로 분리하였다. 사용된 이동상은 0.1% TFA/H₂O (A)와 0.1% TFA/acetonitrile (B)이고, 95% A에서 50% A까지 50분 동안 선상 구배로 각각 10개의 분획 (5 mL/fr.)으로 분취하였다. 각 분획을 모아 환외여과(molecular weight cut off 100, Amicon)장치로 농축시켜 각 분획에 대한 철분 가용화능을 pH 6에서 ferrozine 법으로 측정하였다.

Immobilized metal affinity chromatography (IMAC):

Table 1. Conditions for producing casein hydrolysates

Proteases	E/S ratio ²⁾	pH	Tem.	Time
Trypsin	1/100	8.0	45°C	4 hr
Alcalase 0.6 L ¹⁾	1/10	7.5		
Neutrase 0.5 L ¹⁾	1/10	6.0		
Protamax 1.5 L ¹⁾	1/10	6.0		
<i>Staphylococcus aureus</i> strain V8	1/5,000	8.0		

¹⁾Novo Nordisk. Bagsvaerd. Denmark, L=AU/g.

²⁾E/S ratio=enzyme/substrate ratio.

Casein으로부터 trypsin이나 alcalase에 의해 생성된 peptide 중 철분과 결합력이 있는 분획을 FPLC (Pharmacia)상에서 0.1 M FeCl₃를 chelating sepharose fast flow에 chelating시키고 이와 친화력이 있는 peptide를 용출용매를 통하여 분리하는 방식의 immobilized iron affinity chromatography를 이용하여 행하였다. 사용된 흡착용매 (binding buffer)는 20 mM Na₂HPO₄, 0.5 M NaCl, pH 7.2이었고 용출용매(eluting buffer)는 흡착용매와 조성은 동일하나 pH를 3.5로 맞춘 용액을 사용하였으며 유속은 1 mL/min이었다. 용출용매를 통하여 분리된 peptide는 역상 column을 통하여 동정하였다.

결과 및 고찰

Casein을 실험에 사용된 protease의 최적 pH에서 45 °C, 4시간동안 가수분해시켰을 때, 첨가된 protease의 양은 동일하지 않았지만 alcalase가 가장 높은 casein가수분해력을 보인 반면에 *S. aureus* type V8이 casein에 대하여 가장 낮은 가수분해력을 보였다(Table 2). 철분은 대부분 십이지장에서 흡수되며 철분의 체내이용성(bio-availability)를 높이기 위해서는 철분이 십이지장의 조건에서 가용성의 상태를 유지하는 것이 중요하다. 각종 protease에 의해 생성된 peptide들의 철분 가용화능을 측정하기 위하여 일정량의 FeCl₃ (10 µg/mL)와 peptide용액(100 µg peptide/mL)을 위와 십이지장의 조건(pH 2와 6, 37°C)에서 1시간 incubation한 후 원심분리하여 침전되지 않고 상층부에 존재하는 가용성철분의 양을 ferrozine법과 원자흡광광도계를 이용하여 측정한다. 결과, pH 2에서는 첨가된 철분의 90%이상이 침전되지 않고 가용화되었으나 pH 6에서는 trypsin과 alcalase에 의해서 생성된 peptide만이 첨가된 철분의 64.2%와 23.7%를 각각 가용화 시켰다(Fig. 1). 그 외의 protease에 의해 생성된 peptide들의 철분 가용화능은 neutrase의 경우 7.5%, *S. aureus* type V8는 8.3%, protamax는 5.3% 정도로 peptide를 첨가하지 않은 control (4%)에 비해 상등액에 남아 있는 가용성 철분의 양이 약간 높았다. Conrad⁽¹³⁾는 섭취된 철분이 위의 조건인 pH 2에서

Table 2. Degree of casein hydrolysis by different proteases

proteases	% hydrolysis
Trypsin	31.5
Alcalase 0.6 L	57.8
Neutrase 0.5 L	44.1
Protamax 1.5 L	45.5
<i>Staphylococcus aureus</i> strain V8	17.5

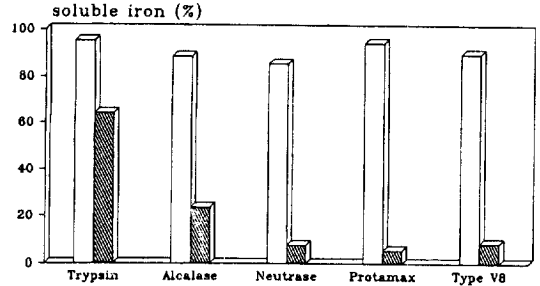


Fig. 1. Iron solubilizing abilities of casein hydrolysates produced by trypsin, alcalase, neutrase, protamax, *S. aureus* type V8 at pH 2 and 6. ■: pH 2, ▨: pH 6.

는 대부분 가용화상태로 존재하다가 철분의 체내흡수가 이루어지는 십이지장 조건에서는 철분이 ferrous oxide와 같은 불용성의 염을 형성하여 2~3%만이 가용성의 상태로 존재한다고 보고한 바 있다. Casein으로부터 trypsin과 alcalase에 의해 생성된 peptide만이 철분의 체내흡수가 일어나는 십이지장의 조건에서 control에 비해 높은 철분 가용화능이 인정되었다.

Trypsin과 alcalase에 의해 생성된 peptide용액의 농도별 철분가용화능을 측정하기 위하여 peptide농도를 25, 50, 100, 200 µg/mL로 조절하고 이들의 pH 6에서의 철분가용화능을 ferrozine 법으로 측정하였을 때, casein으로부터 trypsin에 의해 생성된 peptide의 경우에는 200 µg/mL의 농도에서는 첨가된 철분(10 µg/mL)이 거의 가용화상태였으며, alcalase에 의해 생성된 peptide의 경우에는 200 µg/mL 농도에서 4.0 µg/mL의 철분을 가용화시키는 능력을 보였다(Fig. 2).

Trypsin과 alcalase에 의해 생성된 peptide를 HPLC 상에서 역상 column을 통해 10개의 분획(5 mL/fraction)으로 분리 농축하고 각각의 분획에 대한 pH 6에

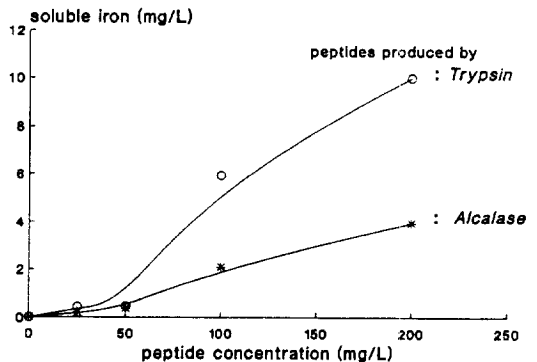


Fig. 2. Effects of concentrations of peptides produced by trypsin and alcalase on iron solubilities at pH 6.

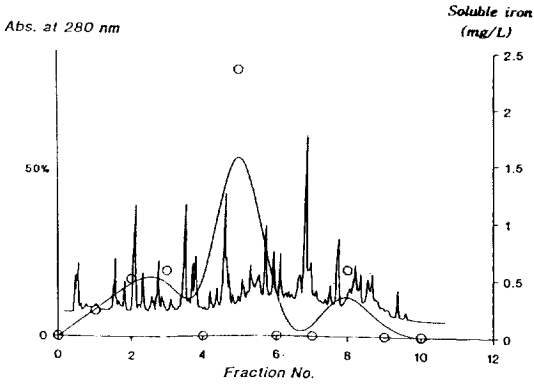


Fig. 3. Iron solubilizing abilities of fractions of peptides produced by trypsin. Peptides were fractionated by a C-18 reverse phase column on HPLC.

서의 철분가용화능을 측정하였다. Trypsin에 의하여 생성된 peptide의 경우, 분획 5에서 가장 높은 철분가용화능(2.33 µg/mL)이 발견되었으며(Fig. 3) alcalase에 의해 생성된 peptide의 경우에는 분획 7에 포함된 peptide들이 가장 높은 철분가용화능(1.13 µg/mL)을 보였다(Fig. 4).

Trypsin과 alcalase에 의해 생성된 peptide 중 철분과 결합하는 peptide의 분리를 위해 IMAC법을 이용하였으며 IMAC는 Porath 등⁽¹⁴⁾에 의해 혈액의 단백질을 분획하는데 유용한 수단으로 소개된 이래 인단백질(phosphoprotein), 각종 효소 등의 분리에 널리 이용되고 있다^(15,17). 본 실험에서는 chelating sepharose fast flow matrix (Pharmacia, Sweden)의 immino diacetic acid에 철분을 결합시키고 결합된 철분과 친화력이 있는 peptide를 흡착용매(binding buffer)와 용출용매(eluting buff-

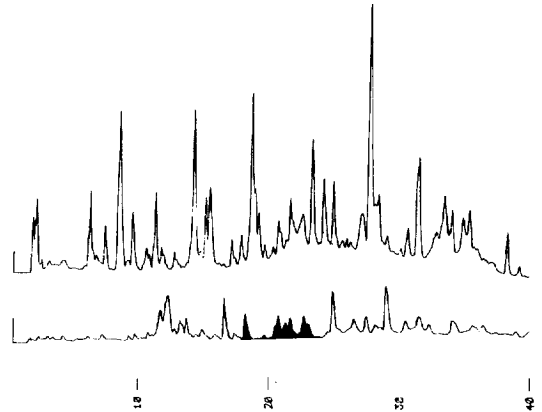


Fig. 5. Reverse phase column chromatograms of whole peptides produced by trypsin (upper) and peptides eluted by immobilized iron affinity chromatography (bottom). Peptides in black were from fraction 5 in whole peptides.

er)를 통하여 분리하는 방법을 사용하였다. Fig. 5는 casein으로부터 trypsin에 의하여 생성된 peptide를 IMAC상 흡착용매와 용출용매로 분리하였을 때, 용출용매에 의하여 분리된 peptide들을 역상 column상에서 분리되기 전의 전체 peptide의 chromatogram과 비교한 것이다. IMAC상에서 용출용매에 의해 분리된 peptide 중 분획 5에 포함된 peptide의 조성이 다른 peptide들에 비하여 상대적으로 높은 것을 알 수 있다. Alcalase의 경우에도 분획 7에 포함된 대부분의 철분결합 peptide가 IMAC의 용출용매에 의해 분리되었음을 보여주고 있으며(Fig. 6) 이들 결과는 IMAC가 특정

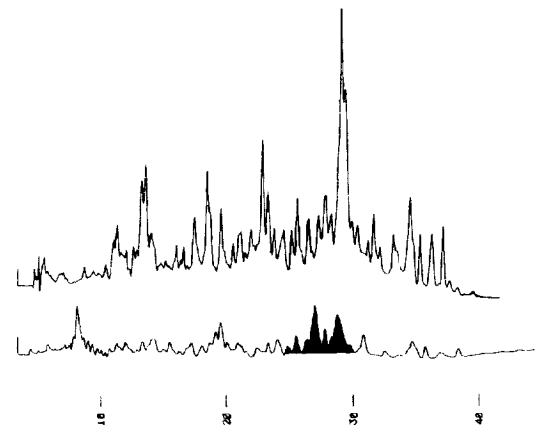


Fig. 6. Reverse phase column chromatograms of whole peptides produced by alcalase (upper) and peptides eluted by immobilized iron affinity chromatography (bottom). Peptides in black were from fraction 7 in whole peptides.

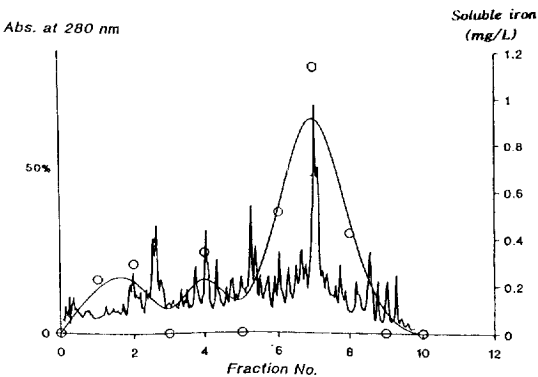


Fig. 4. Iron solubilizing abilities of fractions of peptides produced by alcalase. Peptides were fractionated by a C-18 reverse phase column on HPLC.

무기질과 결합력이 있는 단백질이나 peptide 등을 분리할 수 있는 효과적인 수단임을 알려주고 있다.

우유의 casein을 trypsin으로 분해시킬 때 생성되는 peptide 중 phosphoserin이 다량 함유된 casein phosphopeptide (CPP)는 칼슘의 체내흡수를 촉진시킨다고 알려져 있다^(18,21). CPP는 칼슘외에 철분과 같이 다른 2가 이온에 대해서도 어느 정도 결합력이 있으리라 추정되었으며 본 실험결과에서 처럼 trypsin에 의해 생성된 peptide들이 철분과도 결합력이 상당히 우수하여 이를 이용한 철분강화식품의 개발도 가능하리라 생각되어진다. 한편 trypsin보다는 다소 떨어지지만 *Bacillus licheniformis*로부터 생산되는 endoprotease인 alcalase에 의해 생성된 peptide들도 철분과의 결합력이 어느 정도 인정되었으며 trypsin보다 alcalase가 경제적인 면에서 훨씬 저렴한 것을 고려해 볼 때, alcalase를 이용한 철분결합 peptide의 개발도 상당히 가능성이 클 것으로 기대되어진다. 향후 이들 철분결합 peptide들을 분리 정제하여 이들에 대한 특성 등에 관해서 더 자세히 연구할 계획이다.

요 약

우유 casein단백질을 trypsin, alcalase, neutrase, pro-tamax, *S. aureus* type V8 등의 단백질분해효소를 이용하여 가수분해시키고 생성된 peptide의 철분가용화능을 측정하였을 때, trypsin과 alcalase에 의해 생성된 peptide들이 pH 6의 조건에서 각각 6.42와 2.37 µg/mL를 가용화시키는 능력을 보였으며 그외의 protease들은 1 µg/mL내외의 철분가용화능을 보였다. Trypsin과 alcalase에 의해 생성된 peptide를 역상 column으로 10개의 분획으로 나누어서 각각의 분획의 pH6에서의 철분가용화능을 측정한 결과, trypsin의 경우 분획 5에서 가장 높은 철분가용화능(2.33 µg/mL)이 발견되었으며 alcalase의 경우에는 분획 7이 가장 높은 철분가용화능(1.56 µg/mL)을 보였다. 이들 철분과 결합력이 있는 peptide를 분리하기 위하여 IMAC의 방법을 이용하여 철분을 chelating sepharose fast flow column에 고정화 시키고 이들 철분에 흡착하는 peptide의 분리를 시도한 결과, trypsin이나 alcalase에 의해 생성된 peptide 중 철분을 가용화시키는 능력이 높은 peptide들이 IMAC에 의해 효과적으로 분리되었다.

문 헌

1. Cotran, R.S, Kumar, V. and Robbins, S.L.: Iron deficiency anemia. In *Pathologic Basis of Disease*, 5th ed.,

- Philadelphia, p.610 (1994)
2. Charlton, R.W. and Bothwell, T.H.: Iron absorption. *Annu. Rev. Med.*, **34**, 55 (1983)
3. Baynes, R.D. and Bothwell, T.H.: Iron deficiency. *Ann Rev. Nutr.*, **10**, 133 (1990)
4. Lee, K. and Clydesdale, F.M.: Chemical changes of iron in food and drying processes. *J. Food Sci.*, **45**, 711 (1980)
5. Zemel, M.B.: *In vitro* evaluation of the effects of ortho-, tripoly- and hexametaphosphate on zinc, iron and calcium bioavailability. *J. Food Sci.*, **49**, 1562 (1984)
6. Meyer, E.M. and Adiels-Tegman, M.: The prevalence of anemia in the world. *World Health Stat Q.*, **38**, 302 (1985)
7. FAO/WHO: *Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B-12*. Report of a Joint FAO/WHO Expert Group. Geneva, Switzerland (1989)
8. Cook, J.D. and Lynch, S.R.: The liabilities of iron deficiency. *Blood*, **68**, 803 (1986)
9. Dallman, P.R.: Iron deficiency: Does it matter? *J. Int. Med.* **226**, 367 (1989)
10. Slakavitz, C.A. and Clydesdale, F.M.: Solubility of inorganic iron as affected by proteolytic digestion. *Am. J. Clin. Nutr.*, **47**, 487 (1988)
11. Van Campen, D. and Gross, E.: Effect of histidine and certain other amino acids on the absorption of iron⁵⁹ by rat. *J. Nutr.*, **99**, 68 (1969)
12. Stookey, L.L.: Ferrozine - a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.*, **42**, 779 (1970)
13. Conrad, M.E.: Iron absorption. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 2nd ed., Raven Press, New York, p. 1437 (1987)
14. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. and Belfrage, G.: Metal chelate affinity chromatography. a new approach to protein fractionation. *Nature*, **258**, 598 (1975)
15. Al-Mashiki, S. and Nakai, S.: Separation of immunoglobulin and transferrin from blood serum and plasma by metal chelate interaction chromatography. *J. Dairy Sci.*, **71**, 1756 (1988)
16. Scanff, P., Yvon, M. and Pelissier, J.P.: Immobilized Fe³⁺ affinity chromatographic isolation of phosphopeptides. *J. Chromatography*, **539**, 425 (1991)
17. Hortin, G.L. and Gibson, B.L.: Purification of carboxypeptidase B by zinc chelate chromatography. *Preparative Biochemistry*, **19**(1), 49 (1989)
18. Mellander, O.: The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II. Peroral calcium dosage of infants. *Acta. Soc. Med. Upsal.*, **55**, 217 (1950)
19. Manson, W. and Cannon, J.: The reaction of α_s- and β-casein with ferrous ions in the presence of oxygen. *J. Dairy Res.*, **45**, 59 (1978)
20. Manson, W. and Annan, W.D.: The structure of a phosphopeptide derived from β-casein. *Arch. Bioch. Biophys.*, **145**, 16 (1971)
21. Lee, Y.S., Noguchi, T. and Naito, H.: Phosphopeptides and soluble calcium in the small intestine of rats given a casein diet. *Br. J. Nutr.*, **43**, 457 (1980)