

Casein으로부터 Alcalase에 의해 생성된 철분결합 Peptide

최인욱 · 김기성 · 임상동 · 임신원
한국식품개발연구원

Iron Binding Peptides from Casein Hydrolysates Produced by Alcalase

In Wook Choi, Kee Sung Kim, Sang Dong Lim and Sin Won Lim
Korea Food Research Institute

Abstract

Casein was hydrolyzed by alcalase to produce iron binding peptide (IBP). IBP was effectively separated from casein hydrolysates by immobilized Fe³⁺ affinity chromatography and further purified by reverse phase chromatography. 25, 50 and 100 µg/mL of IBP solubilized 4.2, 5.7 and 7.1 µg of ferric at duodenum condition (pH 6, 37°C), respectively. According to the result of MALDI analysis, molecular weight of IBP was determined to 2,175 dalton. IBP was mainly composed of proline (24.5 mol%), lysine (15.7 mol%), and glutamine or glutamic acid (14.9 mol%) and its N-terminal sequence was Met-Ala-Pro-Lys-His. According to the information obtained from molecular weight, amino acids composition and N-terminal sequence of IBP, it was evident that IBP was from f102~119 of β-casein.

Key words: casein, alcalase, iron binding peptide, immobilized Fe³⁺ affinity chromatography

서 론

철분결핍으로 인한 빈혈은 특이하게도 개발도상국 뿐만 아니라 선진국에서도 흔히 볼 수 있는 영양결핍성 질환으로서 후진국에서는 인구의 절반 이상이 빈혈로 고통을 받고 있으며 선진국에서는 비만을 우려하여 에너지가 낮은 식사를 계속하므로써 에너지는 물론 철분도 적게 섭취하는 경향이 있어 식이로부터의 철분이용도가 점차 낮아지고 있다. 우리나라의 경우, ferritin수치를 기준으로 조사한 바에 의하면 성인 남자의 4.7%, 성인 여자의 45%, 10대 남자는 25%, 10대 여자에서는 59%나 철분결핍성 빈혈상태인 것으로 보고되었다⁽¹⁾. 철분결핍성 빈혈의 원인은 주로 부적절한 식이, 흡수장애, 반복적 임신 및 소아기 급성장애 따른 요구량 증가 등으로 열거할 수 있다⁽²⁾. 특히 우유에 의존하고 있는 유아 및 어린이의 철분결핍은 유아 성장상 많은 장애를 일으킬 수 있고 이러한 성장장애가 특이성 중추 신경계에 영향을 미쳐 정신 발달장애

를 일으킨다는 설도 있다^(3,4). 이러한 철분결핍으로 인한 질병을 예방 또는 치료하기 위해서는 충분한 양의 철분섭취 뿐만 아니라 섭취한 철분의 높은 체내흡수율이 무엇보다도 중요하다. 철분의 체내흡수는 식품 내의 다른 구성성분에 의하여 감소 또는 증가될 수 있으며 철분이 흡수되는 소장에서의 철분의 가용성 유무는 체내흡수율을 결정하는 가장 중요한 요인이 된다. 칼슘, tannates, phosphate, oxalate 등은 철분의 가용성을 억제한다고 알려져 있으며 ascorbic acid, 어류나 육류의 단백질 또는 peptide 등은 철분의 가용성을 높인다고 보고되고 있다^(5,6). 저자는 전보⁽⁷⁾에서 우유 casein을 각종의 protease로 가수분해시켰을 때 생성되는 peptide들 중 trypsin과 alcalase에 의해 생성된 peptide들이 철분을 가용화시키는 능력이 우수하였다고 보고한 바 있으며 특히 *Bacillus licheniformis*로부터 생산되는 endoprotease인 alcalase가 경제성이 있고 이를 이용한 철분결합 peptide의 개발가능성을 제시한 바 있다. 본 연구의 목적은 전보에서 보고한 연구결과를 바탕으로 casein으로부터 alcalase에 의해 생성된 peptide 중 철분과 결합력이 있는 peptide를 분리 정제하고 이들에 대한 특성을 조사하는데 있다.

Corresponding author: In Wook Choi, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-gu, Songnam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea

재료 및 방법

Casein 가수분해물 제조

Casein (Sigma Co.)을 20 mM sodium carbonate 완충 용액에 녹여 10%로 만들고 alcalase 0.6 L (Novo Nordisk Co.)을 casein의 10%에 해당하는 농도로 첨가하여 pH를 alcalase의 최적 pH인 8로 조정 한 후, 45°C에서 4시간동안 반응시켜 casein 가수분해물을 만들었다. 반응후 반응액을 90°C에서 5분간 방치하여 alcalase를 불활성화 시켰으며 방냉후 pH를 4.6으로 조정하고 4,000×g에서 20분간 원심분리하여 모은 상등액을 증류수에서 24시간동안 투석하였으며 이를 peptide용액으로 사용하였다.

철분결합 peptide의 분리

Casein으로부터 alcalase에 의해 생성된 peptide 중 철분과 결합력이 있는 분획을 FPLC (Pharmacia Co.)상에서 immobilized Fe³⁺ affinity chromatography를 이용하여 행하였다. 사용된 흡착용매(binding buffer)는 20 mM sodium acetate (pH 5.0)이었으며 용출용매(eluting buffer)는 흡착용매에 100 mM sodium dihydrogen phosphate를 첨가하여 pH를 5.0으로 맞춘 용액을 사용하였으며 유속은 1 mL/min이었고 검출은 206 nm에서 행하였다. 용출용매를 통하여 분리된 peptide 중 iron binding peptide (IBP)만을 순수분리하기 위해 HPLC (Model LC-900, Jasco Co.)상에서 역상 column (crestpak C18S, Jasco Co.)을 사용하였다. 사용된 이동상은 0.1% TFA in H₂O (A)와 0.1% TFA in acetonitrile (B)이고, 95% A에서 50% A까지 50분 동안 선상 구배로 1 mL/min의 유속으로 220 nm에서 검출하였다. IBP fraction을 모아 환외여과(molecular weight cut off 100, Amicon Co.)장치로 농축시켜 다음 실험을 위하여 사용하였다.

IBP의 철분가용화능

IBP의 십이지장 조건에서의 철분 가용화능을 측정하기 위하여 순수분리된 IBP 용액 일정량과 FeCl₃ (50 g/mL) 2.5 mL을 혼합하여 pH 6으로 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 아래의 ferrozine 법¹⁰⁾에 의하여 측정하였다. 먼저 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 발색

시약 0.625 mL을 넣어 20분간 암소에서 발색시켰다. 3차 증류수 0.5 mL을 넣어 반응을 정지시킨 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준용액을 사용하여 얻은 pH 6에서의 철분농도와 흡광도간의 표준식에 의해 가용성 철분의 농도를 측정하였다.

IBP의 분자량 측정

Matrix assisted laser desorption ionization in mass spectrometry (MALDI)는 soft ionization법으로 시료의 질량을 분석하는 방법으로서 현재 단백질 및 peptide의 정확한 질량분석에 널리 사용되어지고 있다. 시료 10 pmol을 0.1% TFA solution에 녹여 1 μL로 조정 한 후, matrix SPA solution in water/acetonitrile (1:1) 2 μL와 혼합하여 Kompact MALDI II mass spectrometer (Kratos Co.)를 사용하여 337 nm에서 nitrogen laser로 IBP의 분자량을 측정하였다.

IBP의 아미노산 조성 및 N-terminal sequence

동결건조된 IBP를 증류수에 현탁하여 섭씨 110°C에서 24시간 염산으로 가수분해시키고 가수분해된 아미노산을 phenylisothiocyanate (PITC)로 유도체화 시킨 후 시료를 완전히 건조시켜 HPLC (PicoTag System, Waters Co.)상에서 PicoTag column을 이용하여 분석하였으며 IBP의 N-terminal sequence는 P. Edman degradation반응을 자동화한 ProSequencer 6600 (Milligen Co.)을 이용하여 행하였다.

결과 및 고찰

Casein으로부터 alcalase에 의해 생성된 peptide 중 철분과 결합하는 peptide만의 분리를 위해 chelating sepharose fast flow matrix의 immuno diacetic acid에 철분을 결합시키고 결합된 철분과 친화력 정도에 따라서 peptide를 흡착용매 또는 용출용매를 통하여 분리하는 immobilized Fe³⁺ affinity chromatography법을 사용하였다. Fig. 1의 왼쪽은 FPLC상에서 흡착용매와 용출용매에 의하여 분리된 peptide들의 206 nm에서의 FPLC chromatogram을 보여주고 있으며 오른쪽은 이들 각 분획에 의하여 분리된 peptide들을 역상 column을 통하여 220 nm에서 분리 검출하였을때의 HPLC chromatogram을 보여주고 있다. Alcalase에 의하여 생성된 peptide들의 대부분은 흡착용매에 의하여 용출되었으며 이와같은 결과는 casein으로부터 alcalase에 의해 생성된 peptide 대부분이 철분과의 친화력이 약하다는 것을 알려주고 있다. 그러나 용출용매에 의해

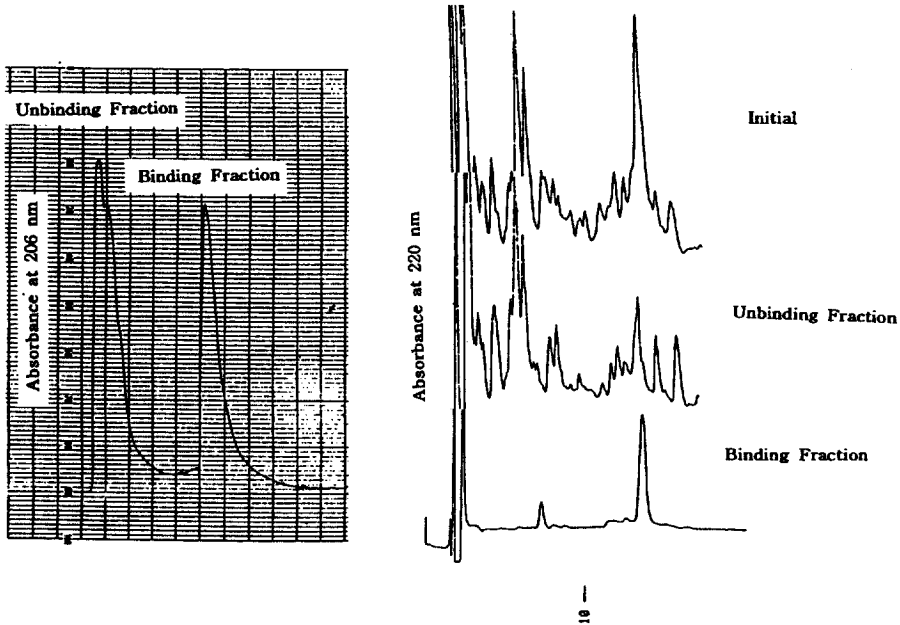


Fig. 1. Immobilized Fe³⁺ affinity (left) and reverse phase column chromatogram (right) of initial, unbinding and binding fractions of casein hydrolysates produced by alcalase.

서 분리된 철분과 결합하는 peptide들은 hydrophilic쪽의 미량의 peptide를 제외하곤 거의 hydrophobic쪽의 단일 peptide로 구성되어 있었다. 전보에서 이미 보고된 alcalase에 의해 생성된 casein hydrolysates의 각 fraction별 철분가용화능의 결과와 비교해 볼 때, 이 peptide는 철분가용화능이 가장 높았던 fraction 7에 속한 peptide임을 알 수 있었다(Fig. 2). 앞으로 편의상 이 peptide를 IBP (iron binding peptide)로 명하기로 하겠다. IBP의 철분가용화능, 분자량, 아미노산 조성, N-terminal sequence 등에 관한 연구를 위해 FPLC에서 분리된 IBP분획을 HPLC상에서 역상 column을 이용하여 순수분리하고 이들을 한외여과, 동결건조 등의 방법을 통하여 농축하였다.

철분은 대부분 십이지장에서 흡수되며 철분의 체내 이용성(bio-availability)을 높이기 위해서는 철분이 십이지장의 조건에서 가용성의 상태를 유지하는 것이 중요하다. IBP의 철분가용화능을 측정하기 위하여 일정량 IBP와 10 g Fe/mL에 해당하는 양의 FeCl₃를 십이지장의 조건(pH 6, 37°C)에서 1시간 incubation한 후 원심분리하여 침전되지 않고 상층부에 존재하는 가용성철분의 양을 측정할 결과, 25, 50, 100 g/mL의 IBP는 각각 4.2, 5.7, 7.1 g의 철분을 가용화시킨 반면 IBP를 첨가하지 않은 control의 경우에는 첨가된 철분의 4%에 해당하는 0.4 g의 철분만이 상등액에 가용성

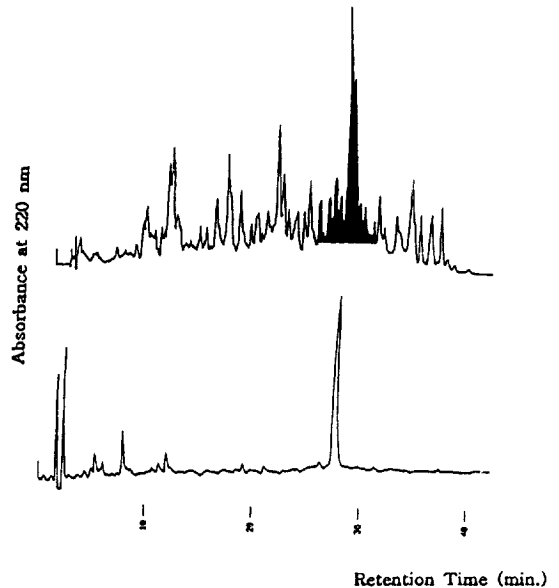


Fig. 2. Reverse phase column chromatograms of whole peptides produced by alcalase (upper) and peptides eluted by elution buffer through immobilized Fe³⁺ affinity column (bottom). Peptides in black were from fraction 7 in whole peptides.

의 상태로 남아있었다(Fig. 3). 실제로 Conrad^(®)는 섭취된 철분이 위의 조건인 pH 2에서는 대부분 가용화상

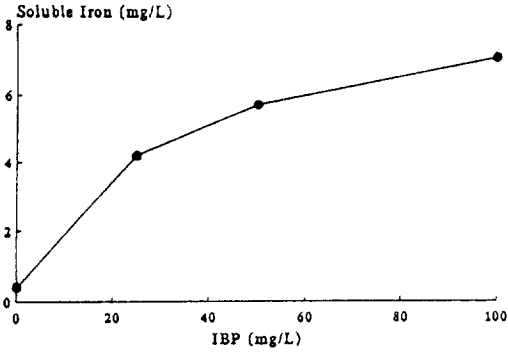


Fig. 3. Iron solubilizing abilities of IBP after incubation with FeCl₃ at pH 6, 37°C for 1 hr.

태로 존재하다가 철분의 체내흡수가 이루어지는 십이지장 조건에서는 철분이 ferrous oxide와 같은 불용성의 염을 형성하여 2~3%만이 가용성의 상태로 존재한다고 보고한 바 있다. 따라서 철분과의 친화력에 의해 immobilized metal chelate affinity chromatography를 통해 분리된 IBP가 철분을 가용화시키는 능력도 또한 우수함을 알 수 있었다.

IBP의 분자량을 MALDI를 이용하여 측정한 결과, IBP의 분자량은 2,175 dalton이었다(Fig. 4). IBP의 분자량과 앞에서 언급한 철분가용화능을 고려해 볼 때, IBP 한분자가 2내지 3분자의 철분을 가용화시킬 수 있다는 결론을 얻을 수 있다.

IBP는 proline (24.5 Mol%), lysine (15.7 Mol%), glu-

Table 1. Mol percentages of amino acids in iron binding peptide (IBP)

Amino acid	Mol%
Asx	1.71
Glx	14.96
Ser	1.71
Gly	0.88
His	3.18
Arg	0
Thr	3.56
Ala	6.50
Pro	24.54
Tyr	1.93
Val	7.01
Met	6.24
Cys	0
Ile	1.10
Leu	1.97
Phe	9.00
Lys	15.71
Total	100.00

tamic 또는 glutamine (14.9 Mol%) 등의 아미노산으로 구성되어 있었으며(Table 1), 이들의 N-terminal sequence를 조사한 결과, Met-Ala-Pro-Lys-His의 순으로 이루어져 있었다. 분자량, 아미노산 조성, N-terminal sequence 등의 결과를 종합해 보면 IBP는 casein 중 β-casein의 아미노산서열 102~119에 해당하는 18개의 아미노산으로 구성된 peptide임을 알 수 있었으며 Table 2는 이들간의 아미노산조성, 분자량, N-terminal

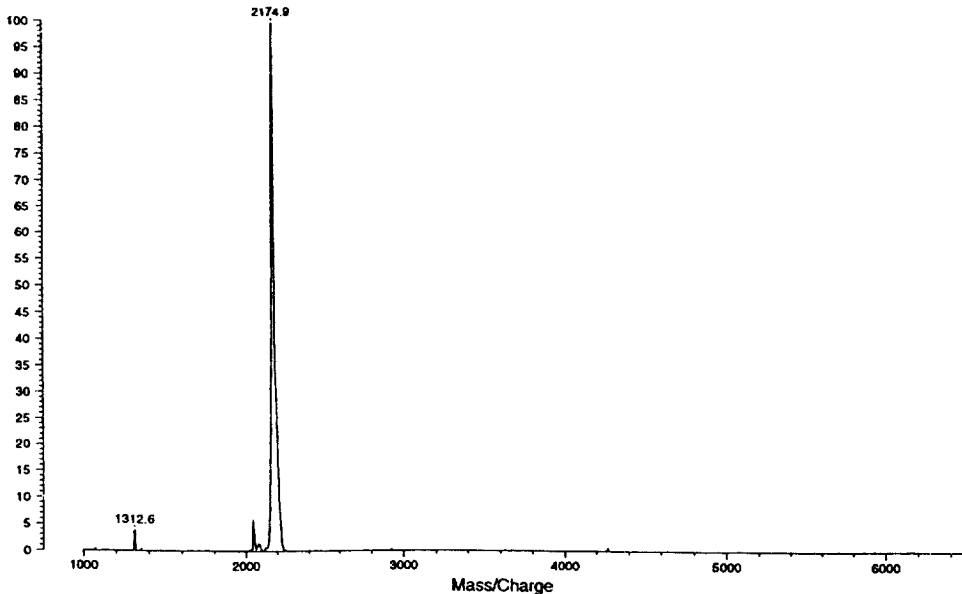


Fig. 4. MALDI spectrum of iron binding peptide (IBP).

Table 2. Comparisons of amino acid compositions, molecular weight and N-terminal sequence between IBP and f102-119 of β -casein

Amino Acid	IBP	β -CN (f102-119)
Asx	0.3	0
Glx	2.7	2
Ser	0.3	0
Gly	0.2	0
His	0.6	1
Arg	0	0
Thr	0.6	1
Ala	1.2	1
Pro	4.4	5
Tyr	0.4	1
Val	1.3	1
Met	1.1	2
Cys	0	0
Ile	0.2	0
Leu	0.3	0
Phe	1.6	2
Lys	2.8	3
M.W. (dalton)	2,175	2,173
No. A.A.	18	18
N-terminal Sequence : Met-Ala-Pro-Lys-His		

sequence를 비교해주고 있다. IBP를 구성하고 있는 아미노산 중 어떠한 것이 철분과의 결합에 관여하는지는 알 수 없으나 histidine, cysteine, glutamic acid 등이 가능하리라 사료되며 정확한 결론을 얻기 위해서는 더 많은 연구가 수행되어야 할 것이다. 이상의 결과들로부터 casein으로부터 alcalase에 의해 생성된 IBP가 십이지장의 조건하에서 철분의 가용성을 크게 향상시킨다는 사실을 알 수 있었다.

최근에 casein을 trypsin으로 가수분해시킬 때 생성되는 casein phosphopeptide (CPP)가 칼슘의 체내흡수율을 증가시킨다고 알려져 있으며 칼슘외에 철분과 같은 2가, 3가 양이온들과도 가용성의 복합체를 형성하여 장관 내에서의 이들의 가용성을 증진시킬 가능성을 제시하고 있다⁽¹⁰⁻¹³⁾. 한편 trypsin보다 가격면에서 훨씬 저렴한 alcalase를 이용하여 생성된 IBP는 본 연구를 통하여 뛰어난 철분가용화능이 입증되어 기존의 CPP와 기능적인 면이나 경제적인 면에서 좋은 경쟁력을 지니고 있다고 사료되어 장차 IBP를 이용한 철분 강화음료나 식품 등의 개발이 가능하리라 기대된다.

요 약

우유 casein단백질을 alcalase로 가수분해시켰을 때,

생성되는 peptide 중 철분과 결합력이 있는 peptide인 IBP가 immobilized Fe³⁺ affinity chromatography에 의하여 용이하게 분리되었다. IBP의 분자량은 2,175 dalton이었으며 pH 6, 37°C에서 1시간동안 일정량의 철분과 항온처리하였을 경우, 25, 50, 100 g/mL의 IBP는 각각 4.2, 5.7, 7.1 g의 철분을 가용화시키는 능력을 보였다. IBP는 proline (24.5 Mol%), lysine (15.7 Mol%), glutamic 또는 glutamine (14.9 Mol%) 등의 아미노산으로 구성되어 있었으며 이들의 N-terminal sequence는 Met-Ala-Pro-Lys-His의 순으로 이루어져 있었다. 분자량, 아미노산 조성, N-terminal sequence 등의 결과를 종합해 보면 IBP는 casein 중 β -casein의 아미노산 서열 102~119에 해당하는 18개의 아미노산으로 구성된 peptide임을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구의 MALDI 분석과 N-terminal sequence 분석에 적극 협조하여 주신 기초과학지원연구소 유종신 박사님과 남명희 연구원님께 깊은 감사를 표하는 바입니다.

문 헌

- Kim, B.K.: Iron deficiency anemia. In *Hematology*, 2nd ed., Seoul National University Press, Seoul, p.68 (1997)
- FAO/WHO: *Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B-12*, Report of a Joint FAO/WHO Expert Group. Geneva, Switzerland, (1989)
- Cook, J.D. and Lynch, S.R.: The liabilities of iron deficiency. *Blood*, **68**, 803-809 (1986)
- Dallman, P.R.: Iron deficiency: Does it matter? *J. Int. Med.* **226**, 367-372 (1989)
- Slakavitz, C.A. and Clydesdale, F.M.: Solubility of inorganic iron as affected by proteolytic digestion. *Am. J. Clin. Nutr.*, **47**, 487-495 (1988)
- Van Campen, D. and Gross, E.: Effect of histidine and certain other amino acids on the absorption of iron-59 by rat. *J. Nutr.*, **99**, 68-74 (1969)
- Choi, I.W., Kim, K.S., Lim, S.D. and Kim, H.S.: A study on iron binding peptides from casein hydrolysates (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**, 1052-1056 (1997)
- Stookey, L.L.: Ferrozine-a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.*, **42**, 779-783 (1970)
- Conrad, M.E.: Iron absorption. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 2nd ed., Raven Press, New York, p. 1437 (1987)
- Mellander, O.: The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II. Peroral calcium dosage of infants. *Acta. Soc. Med. Upsal.*, **55**, 247-255 (1950)

11. 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**, 59-67 (1978)
 12. Manson, W. and Annan, W.D.: The structure of a phosphopeptide derived from β -casein. *Arch. Bioch. Biophys.*, **145**, 16-26 (1971)
 13. 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**, 457-467 (1980)
-

(1997년 11월 13일 접수)