

Osmometry에 의한 Hemoglobin 가수분해도의 신속한 측정

채희정¹ · 인만진² · 김동호³ · 강인규 · 오남순*

¹호서대학교 식품가공학전공, ²청운대학교 식품영양학과, ³헬퍼(주), 광주대학교 식품공학과

(2001년 4월 24일 접수, 2001년 5월 21일 수리)

Hemoglobin(Hb)의 가수분해도(degree of hydrolysis, DH)를 간편하고 신속하게 측정하고자 보편적으로 이용되는 TNBS법(trinitrobenzene sulfonic acid method)에 의한 가수분해도와 osmometer를 이용한 방법의 상관관계를 효소반응 조건에 따라 조사하였다. 다양한 pH 범위(pH 7.5~10.0)에서 DH에 대한 두 방법의 상관계수(R²값)는 0.974~0.991로 매우 높은 값을 보였으며, 각각 측정된 DH 사이의 비율(DH_{osm}/DH_{TNBS})은 1.438~1.656의 범위에 있었다. Hb를 가수분해하여 heme-iron을 얻기 위한 특정 반응조건인 pH 7.5, 50°C에서 Esperase와 Flavourzyme을 각각 사용한 경우와 Esperase와 Flavourzyme을 혼용한 경우에서도 두 방법간의 DH 비율은 효소의 종류 및 처리방법에 무관하게 1.658을 나타내어 Esperase만을 사용한 경우와 매우 유사하였고 두 방법간의 상관계수는 0.982이었다. 따라서, 두 방법간의 상관관계식으로부터 osmometer를 이용한 Hb의 가수분해도를 간편하고 신속하게 측정할 수 있었다.

Key words : hemoglobin, 가수분해도, osmometry, TNBS법

서 론

단백질의 분해는 사용 목적에 따라 산분해 또는 효소분해 방법을 사용하고 있는데, 산분해법은 아미노산으로의 전환율은 높으나 단백질 분해의 목적 산물이 올리고펩타이드이거나 산에 분해되기 쉬운 형태의 화합물일 경우 사용하기 어려운 단점이 있다. 효소분해법은 산분해법에 비해 아미노산으로의 전환율은 낮으나 산분해법의 기술적 특성에 따른 공정과 품질면에서의 단점을 보완하고 있어서 식품소재 산업에서 많이 사용하는 방법이다.^{1,7)}

Hemoglobin(Hb)은 혈액 중에 존재하는 총 단백질의 50%를 차지하는 주요 단백질로서 특정 펩타이드 분획의 생리적 활성에 관한 연구⁸⁻¹⁰⁾들이 많이 이루어지고 있다. 특히, Hb이 포함하고 있는 heme-iron은 기능성 식품소재로 사용되고 있으며 기존 철분 제품에 비해 체내에서의 이용성, 효율성, 안정성 및 안전성이 있는 철분 공급원^{11,12)}으로 알려져 있다. Heme-iron은 heme를 갖고 있는 Hb, 미오글로빈 등의 단백질과 cytochrome, catalase, peroxidase 등의 효소에 존재하는데, 주로 Hb의 효소적 가수분해로 얻어지고 있다.¹³⁾ Heme-iron의 기능성 소재화는 heme-iron 함유 펩타이드와 nonheme-iron 펩타이드가 혼합되어 있는 Hb 가수분해물에서 nonheme-iron 펩타이드 부분을 배제시켜 잔존하는 heme-iron을 농축함으로써 이루어진다. Hb의 가수분해에 의해 생성된 heme-iron 펩타이드와 nonheme-iron 펩타이드들은 소수성 결합으로 인해 응집^{14,15)}되는 경향이 있으며, 이러한 경향은 가수분해도에 의해 영향을 받기 때문에 heme-iron의 선택적 분리를 위하여 적정 가수분해도(degree of

hydrolysis, DH)를 유지하는 것이 중요하다.

단백질의 가수분해도는 AN/TN ratio, TCA index,¹⁶⁾ osmometry,¹⁷⁾ kinetic model¹⁸⁾ 등의 방법으로 측정할 수 있으며, 보편적으로는 TNBS법¹⁹⁾이 많이 이용된다. 그러나 AN/TN ratio, TCA index, TNBS법 등은 일반적으로 osmometry에 비하여 번거롭고, 분석시간이 많이 소요되는 단점이 있다.

따라서 본 연구는 단백질의 가수분해도 측정에 널리 사용되는 TNBS법을 대조로 하여 osmometry에 의해 측정된 Hb의 가수분해도를 비교하고, 두 가지 방법간의 상관관계를 고찰함으로써 osmometer를 이용한 신속하고 간편한 Hb의 가수분해도 측정방법의 이용 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

재료. 기질로 사용된 Hb은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)의 제품을, 단백질 분해효소는 Novo Nordisk사(Bagsvaerd, Denmark)의 Esperase와 Flavourzyme을 사용하였다. 가수분해도는 osmometer(Osmette A, Precision Systems, Inc., USA)를 사용하여 측정하였다. Hb의 가수분해는 온도조절이 가능한 자켓이 달린 자력교반형 반응기(0.6 L, glass vessel)를 사용하였다.

Hb 가수분해. Hb을 0.1 N NaOH로 용해시키고 pH를 11.0~11.2 범위로 조절하여, 상온에서 1~2시간 동안 방치하여 변성시킨 후 효소반응의 기질로 사용하였다. Hb 용액(50 g/L) 400 ml에 Esperase 또는 Flavourzyme을 원료 단백질 함량 기준으로 1%(w/w)되도록 첨가하였으며, 효소반응은 pH-stat법으로 실험목적에 따라 반응 pH와 온도를 달리하여 수행하였다. 가수분해도는 효소반응액을 20분간 원심분리(10,000 g, 5°C)한 후 상등액을 이용하여 osmometer와 TNBS법¹⁹⁾으로 분석하였다.

가수분해도(DH)의 계산. TNBS법: 가수분해도는 다음의 식(1)과 (2)에 따라 계산하였다.¹⁶⁾

*연락처

Phone: 82-41-330-1121; Fax: 82-41-333-9610

E-mail: nsqh@kongju.ac.kr

$$DH = h/h_{tot} \times 100 (\%) \tag{1}$$

여기서, h_{tot} 는 Hb의 총 peptide 결합수로 8.3 meqv/g이며, h (hydrolysis equivalents)는 가수분해된 펩타이드 결합의 수 (meqv/g protein)로 효소분해과정에서 단백질 1g당 소요된 염기의 밀리당량으로 다음과 같이 계산하였다.

$$h = ([leucine-NH_2]-\beta)/\alpha(\text{meqv/g protein}) \tag{2}$$

여기서, [leucine-NH₂]는 효소분해에 의해 생성된 leucine 당량이며, α , β 값은 실험적 상수이다. 즉, pH-stat법을 이용한 효소분해 과정에서 미리 결정된 실험치인 α , β 값과 TNBS법으로 측정된 시료 중의 leucine-NH₂ 농도를 이용하여 h 와 DH를 계산하였다.

Leucine의 분석은 TNBS법¹⁹⁾에 준하여 시행하였다. 즉, 시료 1 ml를 1% sodiumdodecylsulfate(SDS) 용액 10 ml에 첨가하여 75°C의 항온수조에서 15분간 정치시킨 다음 1% SDS용액으로 50배로 희석하였다. 이 용액 0.2 ml에 0.2 M 인산완충용액(pH 8.2) 2 ml와 0.1% 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid(TNBS) 2 ml를 첨가하고 알루미늄 호일로 싸 후 50°C의 항온수조에서 60분간 반응시켰다. 이 반응액에 0.1 N HCl 4 ml를 첨가하고 실온에서 30분간 발색시킨 다음 340 nm에서 흡광도를 측정하여 leucine 표준 검량선을 이용하여 leucine-NH₂ 농도를 측정하였다.

Osmometry: osmometer에 의해 측정되는 osmolality는 다음의 식(3)에 의해 가수분해도로 환산하였다.¹⁶⁾ Osmolality는 원심분리한 시료 200 μ l를 바로 osmometer의 시료 용기에 주입하여 측정하였다.

$$DH = \Delta C/(S \cdot f_{osm}) \times 1/\omega \times 1/h_{tot} \times 100(\%) \tag{3}$$

여기서,

ΔC : osmolality의 증가분(miliosmoles)

S: 기질의 농도(%)

f_{osm} : 변환계수, $f_{osm}=1000/(100-D)$

D: 반응용액 중의 고형분 함량(%)

ω : 펩타이드의 osmotic coefficient=0.963

h_{tot} : 단백질의 총 펩타이드 결합수(Hb의 $h_{tot}=8.3$ meqv/g Hb)

결과 및 고찰

pH-stat법에 의한 Hb의 α , β 값 결정. Hb의 가수분해 조건은 단백질 분해효소의 성질에 따라 다르며, 본 연구에서 사용한 Esperase의 최적 반응온도는 50°C이며 최적 반응 pH는

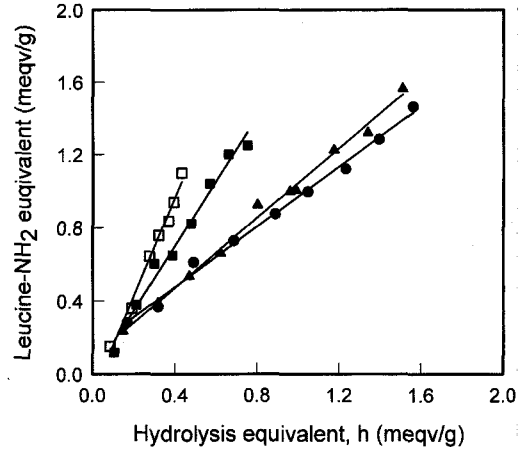


Fig. 1. Correlation between hydrolysis equivalents (h) and leucine amino equivalents (leucine-NH₂) for the Hemoglobin-Esperase system. The hydrolysis conditions: 50°C, pH 7.5 (□), 8.0 (■), 9.0 (▲), 10.0 (●).

7.5~10.0으로 알려져 있다.²⁰⁾ 따라서, 일정온도 조건과 반응 pH 범위에서 Hb의 DH를 TNBS법으로 측정하기 위하여는 식(2)의 실험상수 α 와 β 값을 결정해야 한다. α 와 β 값은 pH-stat법에서 단백질의 가수분해 중 변화되는 pH를 일정하게 유지하는데 소요되는 염기의 당량과 효소분해에 의해 생성되는 leucine 당량간의 상관관계식에서 얻어지는 직선의 기울기와 y축 절편 값을 의미한다. Endopeptidase의 일종인 Esperase의 최적 반응 온도 50°C에서 pH를 달리한 Hb 가수분해실험으로부터 α 와 β 값을 구하였다(Fig. 1). 그 결과 α 는 0.822~1.763, β 는 0.004~0.148의 범위에 있었으며 pH가 증가할수록 α 값은 감소하였으며 β 값은 증가하였다. 본 연구에서 효소반응 조건 중 pH에 따른 α 와 β 값의 변화는 기질과 효소의 종류에 따라 차이가 있으며, 동일 효소를 사용한 가수분해 반응에서 반응 온도보다 pH의 영향을 크게 받는 것으로 알려진 기존의 보고¹⁶⁾와 일치하였다. 콩단백질과 카제인을 효소분해하는 과정에서 TNBS법으로 DH를 측정하기 위하여 알려진 기존의 α 와 β 값을 본 연구결과와 비교하였다(Table 1). Adler-Nissen¹⁹⁾은 일정한 pH조건에서 대두의 가수분해실험으로부터 구한 고정된 α 와 β 값을 이용하여 DH를 계산하였는데 본 실험결과에 의하면 pH가 달라지면 두 상수도 다른 값을 가질 것으로 사료된다. 따라서 단백질을 효소분해하는 경우 효소반응 조건에 따라 α 와 β 값을 실험으로 측정된 후 DH 계산에 이용하는 것이 바람직하다.

Osmometry와 TNBS법에 의한 가수분해도의 상관관계. Esperase의 최적 반응온도인 50°C에서 pH 7.5, 8.0, 9.0, 10.0

Table 1. Experimental values of α and β for various food proteins

Protein	Enzyme	pH	Temp. (°C)	α	β	Ref.
Soy protein isolate	Alcalase	9.5	50	0.970	0.342	19
Casein	Trypsin	9.5	50	1.039	0.383	19
	Esperase	7.5	50	1.763	0.004	
Hemoglobin	"	8.0	50	1.131	0.112	
	"	9.0	50	0.956	0.089	
	"	10.0	50	0.822	0.148	

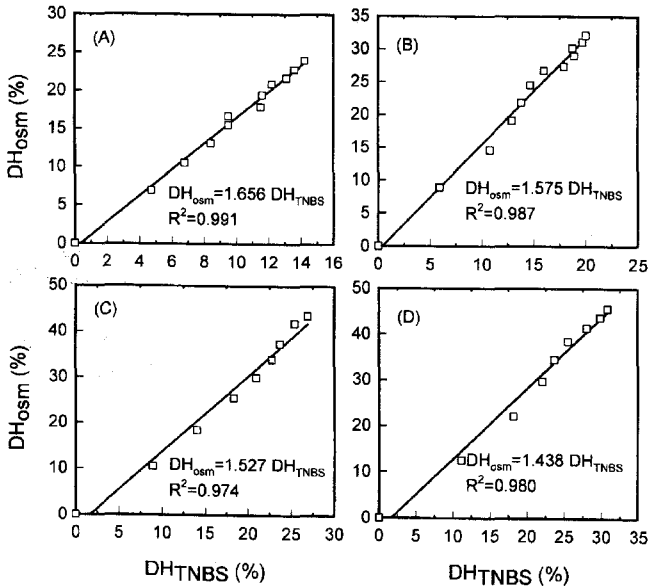


Fig. 2. Correlation between DH_{TNBS} and DH_{osm} for the Hemoglobin-Espase system. Hydrolysis was carried out at constant temperature of 50°C and different pH values of 7.5 (A), 8.0 (B), 9.0 (C), 10.0 (D), respectively.

의 조건으로 Hb의 효소분해를 실시하면서 경시적으로 Hb의 DH를 두 가지 방법으로 측정하여 비교하였다. 이 때 TNBS법에 의한 DH(DH_{TNBS})는 pH별로 구한 α 와 β 값을 이용하여 계산하였다. Fig. 2는 pH에 따른 DH_{TNBS} 와 osmometry에 의해 측정된 DH(DH_{osm}) 사이의 상관관계를 보여주는 것으로 상관계수 R^2 은 0.974~0.991로 두 방법 간의 높은 상관관계를 보여주었다. 직선의 기울기는 DH_{TNBS} 에 상응하는 DH_{osm} 과의 비(DH_{osm}/DH_{TNBS})를 나타내는 것으로 1.656~1.438의 값을 나타냈다(Fig. 2). 즉, DH_{osm} 은 DH_{TNBS} 보다 조사된 pH 구간에서 약 1.656~1.438배가 높게 측정되었다. 한편 pH가 증가함에 따라 기울기가 다소 감소하는 경향(TNBS법에 의한 DH값이 osmometer에 의한 DH값에 유사해지는 경향)을 보였다. 이러한 차이는 주로 DH_{TNBS} 를 계산하는 과정에 관여하는 α 값의 차이에 기인하는 것으로 판단된다. 다시 말해 pH 7.5에서의 α 값은 1.763, pH 10.0에서는 0.822로(Table 1) pH 7.5에서의 α 값이 약 2배 크기 때문에 시료 중 동일한 leucine-NH₂의 농도일 경우 pH 7.5에서의 DH가 약 2배 높게 계산된다. 따라서 pH의 증가에 따라 α 값이 작아지므로 DH_{osm}/DH_{TNBS} 는 작아지게 된다. Fig. 2에서 pH의 증가에 따른 α 값의 변화보다 회귀직선의 기울기의 변화가 작게 나타나는 것은 Hb의 가수분해 과정에서 효소반응 pH가 증가할수록 Hb의 분해에 의해 생성되는 아미노산 또는 펩타이드 분자에 기인하는 실질적인 삼투압의 증가보다는 pH를 일정하게 유지하기 위하여 반응 중에 첨가되는 NaOH의 사용량이 많아지기 때문에 osmometry에 의해 측정된 DH가 크게 측정되기 때문인 것으로 사료된다. DH_{osm}/DH_{TNBS} 은 단백질과 단백질 분해효소의 반응조건에 따라 변하는 것으로 산성 단백질분해효소로 콩 단백질을 가수분해하는 경우 이 값은 거의 1에 가까운 0.963의 기울기를 갖는 것으로 보고된 바 있다.¹⁶⁾

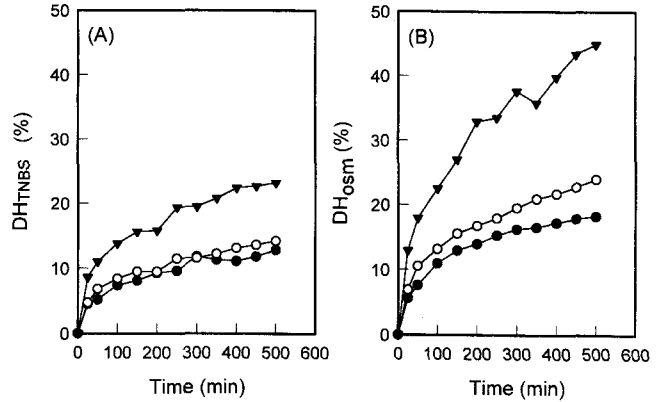


Fig. 3. Time courses of DH_{TNBS} and DH_{osm} of hemoglobin hydrolysis using different enzyme systems (Flavourzyme (●), Esperase (○), co-treatment of Esperase and Flavourzyme (▼)). The hydrolysis conditions: 50°C and pH 7.5.

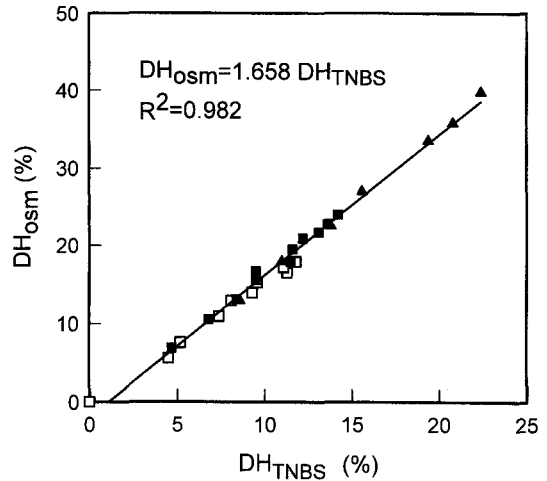


Fig. 4. Correlation between DH_{TNBS} and DH_{osm} of hemoglobin hydrolysis using different enzyme systems (Flavourzyme (□), Esperase (■), co-treatment of Esperase and Flavourzyme (▲)). The hydrolysis conditions: 50°C and pH 7.5.

Hb의 가수분해. Hb을 가수분해하여 heme-iron을 얻기 위하여 endopeptidase인 Esperase를 이용하여 Esperase의 반응 pH 범위인 7.5~10.0에서 Hb을 가수분해하고 TNBS법으로 DH를 측정된 결과 pH가 증가함에 따라 DH도 증가하여 pH 10.0에서 30.8%의 높은 값을 보였다. 그러나 DH가 낮으면 Hb가 수분해물에서 펩타이드와 heme, 펩타이드 간의 소수성 결합으로 인하여 Hb보다 분자량이 큰 응집물(aggregate)이 형성되므로¹⁵⁾ heme-iron을 분리하기 곤란하다. 단백질 분해효소 중에서 exopeptidase를 endopeptidase와 병용하면 DH를 증가시킬 수 있으므로,^{2,5,6)} exopeptidase인 Flavourzyme을 Esperase와 병용하여 Hb을 가수분해하였다. 두 종류의 효소를 사용하는 경우 각각의 효소의 반응조건을 일치시키는 것이 중요하다. Esperase의 반응 pH는 7.5~10.0이며 Flavourzyme은 pH 5.0~7.0이므로,²¹⁾ 두 효소를 동시에 사용하는 경우 반응 pH는 7.5로 온도는 50°C로 하였다. 특히 pH 7.5이하의 경우, 기질로 사용된 Hb이 50 g/L의 농도에서 유동성이 급격히 감소하여 효소반응에 어려움이 있다. Esperase와 Flavourzyme을 병용한 경우 Hb

의 DH는 한가지 효소만을 사용한 경우보다 약 2배 증가하였으며(Fig. 3), 사용한 효소의 종류와 관계없이 TNBS법과 osmometry으로 측정된 DH는 매우 높은 상관관계(상관계수 $R^2 = 0.982$)를 보였다(Fig. 4). 또한 두 가지 방법으로 측정된 DH 사이의 비율(Fig. 4에서 직선의 기울기)인 1.658은 Esperase만을 사용하여 얻은 Fig. 2(A)의 1.656과 거의 일치하는 결과이다. 이는 단백질 분해과정에서 동일 기질에 있어 효소의 종류와 첨가방법을 달리한 경우에서도 osmometry에 의한 DH로부터 TNBS법에 의한 DH를 정확하고 신속하게 평가할 수 있음을 시사하는 것이다. TNBS법의 총 분석시간은 대략 120분인 반면 osmometry에 의한 DH 측정방법은 총 분석시간이 1분 이내로서 신속하고, 간편한 Hb의 가수분해도 측정이 요구되는 생산현장에서 실용성이 큰 분석방법이라고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 공주대학교 자원재활용 신소재 연구센터(RRC/NMR, OOS03)와 호서대학교 교내연구비(2000년도)의 지원으로 수행된 연구결과와 일부이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Chae, H. J., In, M.-J. and Kim, M. H. (1997) Characteristic properties of enzymatically hydrolyzed soy proteins for the use in protein supplements. *Agric. Chem. Biotechnol.* **40**, 404-408.
- Chae, H. J., In, M.-J. and Kim, M. H. (1997) Optimization of enzyme treatment for the enzymatic production of hydrolyzed vegetable protein. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **29**, 1125-1130.
- Chae, H. J., In, M.-J. and Kim, M. H. (1997) Characteristics of enzymatically hydrolyzed soy sauce prepared from enzymatically hydrolyzed vegetable protein. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* **26**, 784-787.
- Chae, H. J., In, M.-J. and Kim, E. Y. (1998) Effect of solubilization conditions on molecular weight distribution of enzymatically-hydrolyzed silk peptide. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **13**, 114-118.
- Chae, H. J., In, M.-J. and Lee, J. D. (1998) Production of a protein supplement from soymilk residues by combined use of enzymes and microorganisms. *Agric. Chem. Biotechnol.* **41**, 73-77.
- Chae, H. J., In, M.-J. and Kim, M. H. (1998) Process development for the enzymatic hydrolysis of food protein: effects of pre- and post-treatments on degree of hydrolysis and other product characteristics. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **3**, 35-39.
- Chung, Y., Chae, H. J., Kim, D. C., Oh, N.-S., Park, M. J., Lee, Y. S. and In, M.-J. (1999) Selection of commercial proteolytic enzymes for the production of brewer's yeast extract. *Food Eng. Progress* **3**, 159-163.
- Fruitier, I., Garreau, I., Lacroix, A., Cupo, A. and Piot, J. M. (1999) Proteolytic degradation of hemoglobin by endogenous lysosomal proteases gives rise to bioactive peptides: hemorphins. *FEBS Lett.* **447**, 81-86.
- Aubes-Dufau, I. and Combes, D. (1997) Effect of different proteases on bitterness of hemoglobin hydrolysates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **67**, 127-138.
- Zhao, Q., Garreau, I., Sannier, F. and Piot, J. M. (1997) Opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins. *Biopolymer* **43**, 75-98.
- Carpenter, C. E. and Mahoney, A. W. (1992) Contribution of heme and nonheme iron to human nutrition. *Crit. Rev. Sci. Nut.* **31**, 333-367.
- Reizenstein, P. (1980) Hemoglobin fortification of food and prevention of iron deficiency with heme iron. *Acta Medica Scandinavica* **629**, 1-46.
- Eriksson, C. (1981) Hemeiron-enriched amino acid preparation and a process for the preparation of hemeiron-enriched amino acid preparations from hemeproteins. E.P. 0061556.
- Lebrun, F., Bazus, A., Dhulster, P. and Guillochon, D. (1998) Solubility of heme in heme-iron enriched bovine hemoglobin hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 5017-5025.
- Liu, X. Q., Yonekura, M., Tsutsumi, M. and Sano, Y. (1996) Physicochemical properties of aggregates of globin hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2957-2961.
- Adler-Nissen, J. (1986) In *Enzymic hydrolysis of food protein*. Elsevier, London.
- Adler-Nissen, J. (1984) Control of the proteolytic reaction and level of bitterness in protein hydrolysis processes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **32**, 215-222.
- Marquez, M. C. and Vazquez, M. A. (1999) Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochem.* **35**, 111-117.
- Adler-Nissen, J. (1979) Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* **27**, 1256-1262.
- Novo Nordisk A/S (1998) Esperase: Product sheet, B 654c-GB.
- Novo Nordisk A/S (1999) Flavourzyme: Product sheet, B 717h-GB.

Rapid Determination of Degree of Hydrolysis for Hemoglobin by Osmometry

Hee Jeong Chae¹, Man-Jin In², Dong-Ho Kim³, In-Kyu Kang and Nam-Soon Oh* (¹*Department of Food Science and Technology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea;* ²*Department of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University, Hongsung 350-701, Korea;* ³*Helper Co., Ltd., Seoul 100-120, Korea;* *Department of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan 340-800, Korea*)

Abstract: An osmometrical method for determination of the degree of hydrolysis (DH) of hemoglobin was comparatively examined through TNBS (trinitrobenzene sulfonic acid) method using two experimental variables (α and β), which were chosen based on correlation curves between hydrolysis equivalents (h) and leucine-NH₂ equivalents. DH values measured through osmometry and TNBS method highly correlated with R² values of 0.974~0.991, irrespective of the reaction pHs and types of enzyme used. DH_{osm}/DH_{TNBS} was 1.438~1.656 depending on the hydrolysis pH (7.5~10.0). Correlation equations were well fit for measuring DH of Hb hydrolysate at different pH conditions. DH_{osm}/DH_{TNBS} for co-treatment system using Esperase and Flavourzyme was 1.658, in good agreement with that of 1.656 for the single enzyme (Esperase) system. Thus, the osmometrical method was suggested to be a convenient, reliable, and rapid method for the determination of DH of hemoglobin hydrolysates.

Key words: hemoglobin, hydrolysis, osmometry, TNBS method

*Corresponding author