

고농도 Heme-iron의 생산을 위한 Hemoglobin의 가수분해 및 분리 조건

강인규 · 인만진¹ · 오남순*

공주대학교 식품공학과, ¹청운대학교 식품영양학과

(2001년 9월 6일 접수, 2001년 9월 26일 수리)

Hemoglobin(Hgb)의 효소 가수분해액으로부터 고농도 heme-iron의 분리에 영향을 주는 기질의 농도, 가수분해도(DH, degree of hydrolysis) 및 분리 pH의 효과 등을 조사하였으며, pilot scale에서 고농도 heme-iron을 생산하였다. 최적 반응조건(pH 10.0, 50°C, 5 hr)에서의 Esperase에 의한 Hgb의 DH는 24~25%였다. Hgb의 농도는 heme-iron의 분리에 영향을 미쳐서 Hgb의 농도가 2.5%, 5.0%, 10.0%로 증가할수록 heme-iron/peptide(heme-iron의 분리도)는 각각 47.4%, 35.6%, 21.8%로 감소하였으며, 이에 따라 농축율도 감소하였다. Hgb의 가수분해액으로부터 고농도 heme-iron의 분리에 효율적인 pH 영역은 DH에 따라 달라졌으며, DH가 6.3%의 경우는 pH 5.0~6.0에서 heme-iron/peptide의 비가 8.92%, DH가 14.5%인 경우는 pH 4.0~6.0에서 12.1~19.5%였으며, DH가 24.3%인 경우는 pH 3.0~5.0에서 34.7~36.4%로 가수분해도가 높을수록 고농도 heme-iron의 분리시 최적 pH 범위가 산성 영역으로 이동되었으며, 이 영역의 pH에서 peptide의 용해도 증가로 분리도가 증가되었다. 가수분해액으로부터 분리된 heme-iron의 분자량은 약 1 kDa 정도로 hematin과 유사한 분리패턴을 보였다. Pilot scale로 제조한 고농도 heme-iron 제품에서의 heme-iron 함량은 27.1%, heme-iron/peptide 비는 38.7%, 생산수율은 9.3%이었다.

Key words: heme-iron, pH, 가수분해도, 분리도, 수율

서 론

생체에서 철분은 미량 무기질의 일종으로 필요량은 적으나 주로 산소운반에 관여하여 생리적으로 중요한 역할을 한다. 철의 결핍은 전세계적으로 가장 흔한 영양문제로 그 원인은 부적절한 섭취, 철 흡수의 불량, 빠른 성장과 혈액손실, 반복되는 임신에 의한 저장 철의 고갈 등이다.^{1,2)} 우리나라에서 철분의 1일 권장량은 소아가 10~12 mg, 청소년이 12~18 mg, 성인남자 12 mg, 성인여자 18 mg, 임신부 26~30 mg, 수유부는 20 mg이다. 식품 중의 철분은 heme-iron과 nonheme-iron의 2가지 형태로 존재하며, 동물성 식품 중의 철 함량의 평균 40%가 heme-iron이고 나머지 60%가 nonheme-iron이며 식물성 식품 중의 철은 모두 nonheme-iron으로 존재한다. 혈액 중 단백질 함량은 17% 정도이며, 특히 적혈구에 함유된 단백질인 hemoglobin(Hgb)은 혈액단백질의 60~70%를 차지하고, heme-iron을 함유하고 있다.³⁾ Heme-iron은 대부분 Hgb과 myoglobin의 형태로 섭취되며 nonheme-iron에 비해 인체 내에서 흡수, 이용도가 3~4배 높아 유아, 여성, 임신부, 빈혈환자에게 우수한 철분 공급원으로 인정되고 있다.^{1,4)}

Heme-iron의 제조원료로 사용되는 Hgb(분자량 대략 65 kDa)은 heme-iron를 포함하고 있는 4개의 폴리펩티드 사슬로 이루어진 단백질로 1몰의 Hgb에는 4몰의 철이 함유되어 있다. Hgb 중 철의 함량은 0.34%(heme-iron의 함량으로는 3.8%)이므로 고

농도 heme-iron을 얻기 위하여는 Hgb의 가수분해도(DH, degree of hydrolysis)를 향상시키고 분해된 펩타이드 부분을 많이 제거해야 한다. 펩타이드 부분을 제거하고 heme-iron을 얻는 방법으로는 pH 침전법과 한외여과막을 이용한 분리방법이 보고되어 있다.⁵⁻⁸⁾

본 연구는 상용화된 세균 기원의 protease인 Esperase를 사용하여 Hgb를 가수분해하여 heme-iron을 얻고자 하였다. Heme-iron의 제조에 기질로 사용되는 Hgb의 농도와 가수분해도가 heme-iron의 분리에 미치는 영향을 조사하였으며, pH에 따른 heme-iron의 분리도를 비교하였다. 또한 pilot scale에서 고농도 heme-iron 제품을 생산하여 제품의 품질에 관련된 인자 및 생산수율 등을 조사하였다.

재료 및 방법

재료. Hgb와 hematin은 Sigma사(St. Louis, MO)의 제품을, 단백질 분해효소는 Novo Nordisk사(Bagsvaerd, Denmark)의 Esperase를 사용하였다. Heme-iron의 분자량 측정에 사용된 SDS-PAGE pre-cast gel은 TEFCO Corp.(Tokyo, Japan)의 Wide-PAGE Mini Gel이었으며 분자량 측정의 marker는 Amersham Pharmacia Biotech사(Uppsala, Sweden)의 peptide marker kit을 사용하였다. Pyridine 및 기타 시약은 분석용 1급 시약을 사용하였다.

Hgb의 가수분해. Hgb를 0.1 N NaOH에 용해하여 실온에서 1시간 동안 변성시킨 후 효소반응의 기질로 사용하였다. Hgb 용액(5%, w/w) 400 g에 Esperase 0.2 g(단백질 기준으로

*연락처

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

E-mail: nsqh@kongju.ac.kr

1%(w/w)을 첨가하여, 50°C로 유지하면서 pH조절이 가능한 600 ml의 효소반응기(glass vessel, double jacket, magnetic stirrer)에서 가수분해하였다. 반응과정에서 pH는 4 N NaOH를 사용하여 pH 10.0으로 유지하도록 조절하며 5시간 동안 분해하였다. 반응이 종료된 효소 분해액은 90°C에서 15분간 열처리하여 반응을 중지시켰다.

가수분해도(DH)의 측정. Hgb의 가수분해도(DH, degree of hydrolysis)는 가수분해되는 동안 소요된 염기의 양을 측정하여 다음의 식을 이용하여 계산하였다.^{9,10)}

$$DH(\%) = (B \times Nb / Mp) \times (1/\alpha) \times (1/h_i) \times 100$$

여기서 B: 4 N NaOH의 소요량(ml)

Nb: 염기의 Normality(4 N)

Mp: 단백질의 양(g, TN×6.25)

α : α -amino group의 평균 해리도(1.0 at pH 10.0)⁹⁾

h_i : Hgb의 peptide 결합수(Hgb의 $h_i=8.3$ meqv/g Hgb)

Heme-iron 분리. 열처리된 효소 분해액 3 g를 묽은 HCl과 NaOH로 pH를 조절하여 8,000×g에서 20분간 원심분리한 후 침전물을 증류수로 세척한 다음 4 N NaOH로 용해시켜 peptide와 heme-iron을 분석하였다. 단백질 및 peptide의 분석은 semimicro-Kjeldahl법¹¹⁾으로 분석된 총질소(TN)로부터 구하였고, heme-iron의 분석은 변형된 Pyridine hemochromogen법¹²⁾에 따라서 희석된 시료 1 g을 pyridine/NaOH 용액 2 ml에 혼합하고, 즉시 sodium sulfite 3 mg을 첨가한 후 557 nm에서 흡광도를 측정한 다음 hematin 표준용액과 대비하여 정량하였다. Hgb 가수분해액으로부터 heme-iron의 분리효율은 HP ratio와 농축율(ER, Enrichment Ratio)로 표현하였으며 각각 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$HP \text{ ratio}(\%) = H/P \times 100$$

여기서 H: 시료 중 heme-iron의 농도(mg/g)

P: 시료 중 peptide의 농도(mg/g)

$$\text{Enrichment ratio} = HP_p / HP_h$$

여기서 HP_p : 침전물에서의 HP ratio

HP_h : pH 조절 전 효소분해물에서의 HP ratio

Heme-iron의 분자량 측정. Hgb 가수분해물과 pH 조절법으로 분리한 heme-iron의 분자량은 Hames의 방법¹³⁾에 준하여 urea-SDS-PAGE를 이용하여 측정하였으며 16% acrylamide gel을 이용하여 전기영동한 후 marker protein과 mobility를 비교

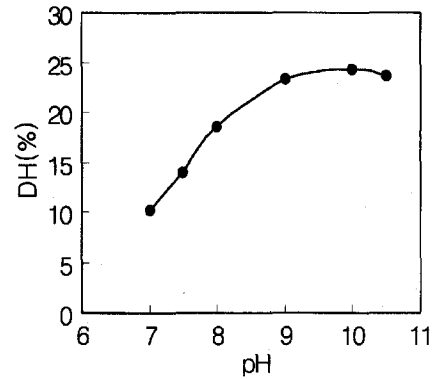


Fig. 1. Effect of pH on the hydrolysis of hemoglobin with Esperase. Hydrolysis conditions: Hgb, 5%; Esperase, 1%(w/w, on protein base); temperature, 50°C; reaction time, 5 h.

하였다.

Heme-iron의 생산. Heme-iron의 제품화를 위한 예비단계로 pilot scale의 효소반응기(7L-Bioreactor, Hanil R&D, 한국)에서 효소반응을 시행하였다. Hgb 200 g을 0.1 N NaOH 용액에 용해시킨 후 실온에서 1시간 동안 변성시켰다. 기질용액 4 L에 Esperase를 단백질 기준으로 1%(w/w) 첨가하여 50°C, pH 10.0에서 pH-stat법으로 5시간 동안 분해하고 90°C에서 15분간 열처리하였다. 이 분해액은 HCl로 pH를 4.0으로 조절하여 용량을 8 L가 되게 하고 8,000×g에서 20분간 원심분리한 다음 침전물은 다시 8 L의 증류수로 세척하고 원심분리하였다. 침전물은 동결건조하여 분말상의 heme-iron을 얻었으며, 수율은 초기 기질로 사용된 Hgb으로부터 건조분말로 얻어진 분말상의 heme-iron 중량의 비로 계산하였다.

결과 및 고찰

Hgb 농도가 heme-iron의 분리에 미치는 영향. 단백질 분해효소인 Esperase의 최적 pH는 7.5~10.0, 온도는 55~75°C로 알려져 있다.¹⁴⁾ Hgb의 가수분해에 적합한 pH조건을 찾기 위하여 50°C에서 pH-stat법으로 5시간 동안 진행한 결과(Fig. 1), pH 10.0에서 DH가 최고값(약 24%)을 보여, pH 10.0을 Hgb 가수분해에 적합한 pH 조건으로 하였다. 기질(Hgb) 농도를 변화시킨 경우 DH는 기질농도(2.5~10.0%)와 무관하게 24.6~25.5%로 거의 유사한 값을 나타내어(Table 1) 단백질 기준으로 1%(w/w)로 사용하는 효소량이 충분한 것으로 판단되며, 추후 경제적인 관점에서 효소 사용량을 최적화하는 연구가 필요할 것으로 사료되었다.

Table 1. Effects of hemoglobin concentration on the recovery of heme-iron and peptide from the hemoglobin hydrolysate

Hgb (%)	DH (%)	Heme-iron recovery (%)	Peptide recovery (%)	HP ratio ¹⁾	ER ²⁾ (times)
2.5	25.5	89.4	5.5	47.4	16.40
5.0	24.6	90.0	7.7	35.6	11.67
10.0	24.9	87.3	12.7	21.8	6.90

After pH of hemoglobin hydrolysates was adjusted to 4.0, heme-iron and peptide were recovered by centrifugation. The amounts of heme-iron and peptide in the precipitate were determined.

¹⁾HP ratios were calculated as amount of heme-iron divided by amount of peptide in the precipitate.

²⁾Enrichment ratios were shown as the ratio between HP ratio of precipitate and HP ratio of hydrolysate.

효소분해물에서 heme-iron을 침전법으로 분리하기 위하여 heme-iron의 용해도가 최소가 되는 것으로 보고된^{6,15)} 약산성 pH로 가수분해액의 pH를 조절한 후 원심분리하여 침전물 중 heme-iron과 peptide의 회수율, HP ratio, 농축율(ER) 등을 Table 1에 나타내었다. 가수분해액에 존재하는 heme-iron은 90% 내외로 침전되었으며, peptide의 침전율은 Hgb의 농도에 비례하여 5.5~12.7%로 증가하였다. 이는 Hgb의 농도가 높을수록 Hgb의 대부분을 차지하는 peptide의 농도가 높아 heme-iron의 침전과 함께 공침하는 것으로 판단되었다. 따라서 침전물 중 heme-iron의 순도 혹은 heme-iron의 분리도를 나타내는 HP ratio는 Hgb의 농도가 낮을수록 높아 Hgb의 농도가 2.5%인 경우의 47.4%로 Hgb 10%인 경우의 21.8% 보다 2배 이상 향상되었으며, 침전법으로 분리하기 전의 HP ratio에 대한 비율을 의미하는 농축율 역시 Hgb 농도를 2.5%의 경우가 16.4배로 매우 높은 값을 나타내었다. 이상의 결과는 고농도로 농축된 (heme-iron의 함량이 높은) heme-iron을 얻기 위하여는 낮은 농도의 Hgb 용액을 사용하여 효소분해하는 것이 필요함을 시사한다.

Hgb의 DH가 heme-iron의 분리에 미치는 영향. Hgb의 DH가 heme-iron의 분리에 미치는 영향을 조사하기 위하여 DH가 상이한(DH 6.3%, DH 14.5%, DH 24.3%) 가수분해액의 pH를 1.0~11.0 범위에서 조절한 후 원심분리하여 얻은 침전물의 heme-iron과 peptide 잔존율을 조사하였다(Fig. 2). DH가 6.3%인 경우 [Fig. 2(A)], heme-iron의 잔존율은 pH 5~6에서는 각각 80% 이상으로 높은 잔존율을 보여 이 구간의 pH에서 heme-iron의 용해도가 제일 낮게 나타났다. pH 4에서와, pH 7 이상의 영역에서는 잔존율이 미미하여 대부분의 heme-iron은 침전되지 않고 상등액에 존재하여 분리하기 곤란하였다. 특히 하계 pH 1 부근에서는 35% 정도의 잔존율을 보였다. 한편 pH에 따른 peptide의 잔존율도 heme-iron의 잔존율과 유사한 경향을 보여 pH 4 이하와 pH 7 이상의 조건에서는 대부분의 peptide가 상등액에 용해되어 존재하는 것으로 나타났다. pH 5~6에서는 약 32~36%의 peptide가 침전물로 잔존하여 이 구간에 Hgb분해로 생성된 많은 peptides의 등전점이 존재하는 것으로 생각된다. DH 14.5%의 Hgb 가수분해물에서 [Fig. 2(B)] 특히 하계 pH 1~3의 강산성 영역에서 heme-iron의 잔존율이 약 50%로 향상되었다. 동시에 heme-iron과 peptide의 잔존율은 pH 4~6 구간에서 각각 74~94%와 12~23%로 최고를 나타냈으며 DH 6.3%보다 heme-iron과 peptide가 높은 잔존율을 보인 pH 영역이 좀 더 산성 쪽으로 이동되었다. 이러한 경향은 DH가 증가함에 따라 계속되어 Hgb의 DH가 24.3%로 매우 높은 경우 [Fig. 2(C)], 산성영역에서 heme-iron의 용해도는 급격히 감소하여 잔존율이 향상되었고, pH 3~5에서 heme-iron은 95% 이상, peptide는 10% 이하의 잔존율을 보였다. 또한 각 DH의 Hgb 가수분해액으로부터 heme-iron의 70% 이상이 침전물로 회수되는 pH 영역에서 HP ratio를 Table 2에 정리하였다. 고농도 heme-iron의 획득에 유효한 pH 영역은 DH가 6.3%에서 24.3%로 증가함에 따라 pH 5.0~6.0에서 pH 3.0~5.0으로 이동하였고, HP ratio는 8.9%에서 36.4%로 4배 이상 향상되었다. 즉, DH가 높아질수록 heme-iron의 잔존율은 증가하고 peptide의 잔

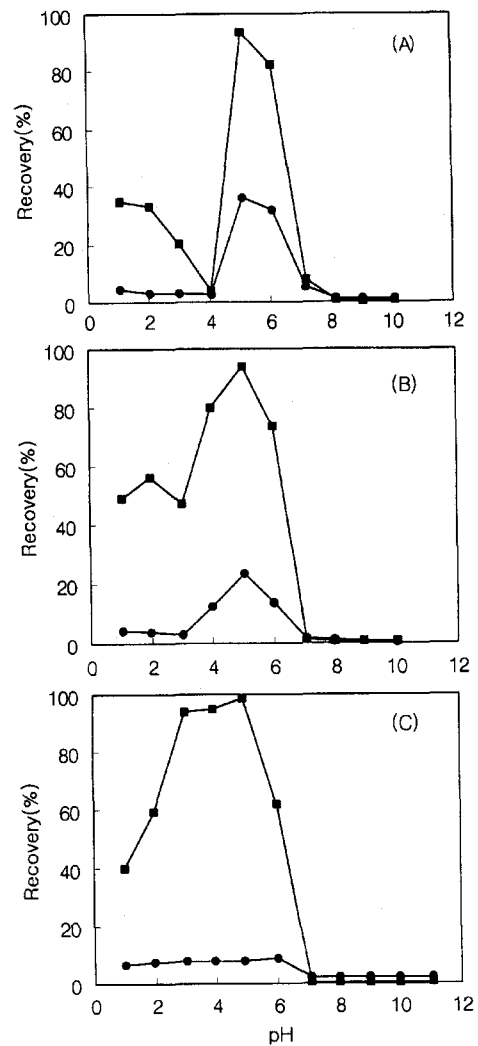


Fig. 2. Influence of pH on the separation of heme-iron(■) and peptide(●). Separation was carried out by centrifugation of hydrolysate with DH 6.3%(A), 14.5%(B) and 24.3%(C) at various pH values.

존율은 감소하여 HP ratio가 향상되므로 pH 조절에 의하여 간편하게 고농도 heme-iron을 얻을 수 있는 장점이 있다. 또한 heme-iron의 용해도가 낮아지는 pH 구간이 산성쪽으로 이동하였다.

본 연구의 염기성 조건에서 heme-iron의 회수율이 매우 낮은 것은 순수한 hemin의 경우 염기성 조건(pH 8 이상)에서 물에 잘 녹는 용해 특성에 기인하는 것으로 사료된다.¹⁵⁾ Hemin은 산성 조건(pH 6 이하)에서는 불용성인 특성이 있으나 HP ratio가 7%인 Hgb의 가수분해물에서는 heme-iron이 peptide와의 상호작용에 의하여 산성 pH(pH 4.5 이하)에서 잘 녹는 것으로 보고¹⁵⁾되어 있다. 그러나 DH의 증가는 heme에 결합된 peptide의 길이와 heme과 상호작용하는 peptide 크기의 감소를 의미⁹⁾ 하므로 산성 pH에서 heme의 용해도 향상에 기여하는 peptide가 줄어들게 되어 용해도가 낮아지므로 Fig. 2와 같이 DH가 증가하면 산성 pH에서 heme-iron의 잔존율이 증가하며 동시에 용해도가 낮아지는 구간이 산성쪽으로 이동하는 것으로 판단되었다.

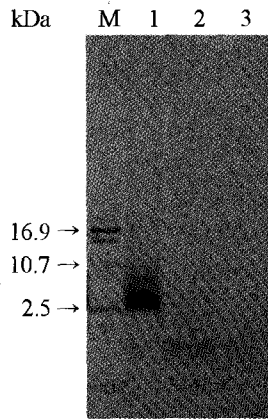


Fig. 3. Urea-SDS-PAGE patterns of hemoglobin hydrolysates, heme-iron enriched fraction and hematin. lane M, molecular mass markers; lane 1, hemoglobin hydrolysates(DH 24.3%); lane 2, heme-iron enriched fraction; lane 3, hematin.

Heme-iron의 molecular mass. Hgb의 가수분해 생성물은 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)으로 aggregate가 생성되는 것이 보고¹⁶⁾되어 있으므로 Hgb의 가수분해물 중 heme-iron을 함유하고 있는 fraction의 분자량을 측정하기 위하여 urea-SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동 결과(Fig. 3), DH 24.3%인 가수분해물에서 heme-iron을 함유한 band는 가장 작은 peptide marker band(분자량 2.5 kDa)보다는 큰 mobility를 보였고 hematin(분자량 0.6 kDa) band와는 유사한 mobility를 나타내어 molecular mass는 약 1 kDa 정도로 판단되었다. 이상의 결과를 DH가 11%인 Hgb 가수분해물을 한외여과법으로 heme-iron을 분리하여 HP ratio가 7%인 fraction을 urea-SDS-PAGE 결과 molecular mass가 4~5 kDa이었다는 보고¹⁵⁾와 비교하면 DH의 증가로 heme과 결합된 peptide의 길이가 감소하여 molecular mass가 상당히 작아졌음을 알 수 있다.

Pilot scale로 Heme-iron의 생산. Pilot scale로 5시간 동안 Hgb를 가수분해한 결과 DH는 25.7%이었다. 분해액의 pH를 4.0으로 조정하고 원심분리로 얻은 침전물의 heme-iron의 잔존율은 95.3%(분해액과 침전물에서 heme-iron 농도는 각각 1.39 mg/g, 1.33 mg/g)였으며, peptide의 잔존율은 7.4%(분해액과 침전물에서 peptide 농도는 각각 47 mg/g, 3.5 mg/g)로 침전물의

Table 2. Heme-iron/peptide ratio of precipitate from hydrolysate with different DH

Separation pH	DH 6.3%	DH 14.5%	DH 24.3%
3.0	-	-	34.7
4.0	-	19.5	35.1
5.0	8.92	12.1	36.4
6.0	8.92	16.4	-

Table 3. Quality parameters of enriched heme-iron product

Quality parameter	Contents (%)
Peptide	70.0
Heme-iron	27.1
HP ratio	38.7
Yield (Heme-iron/Hgb)	9.3

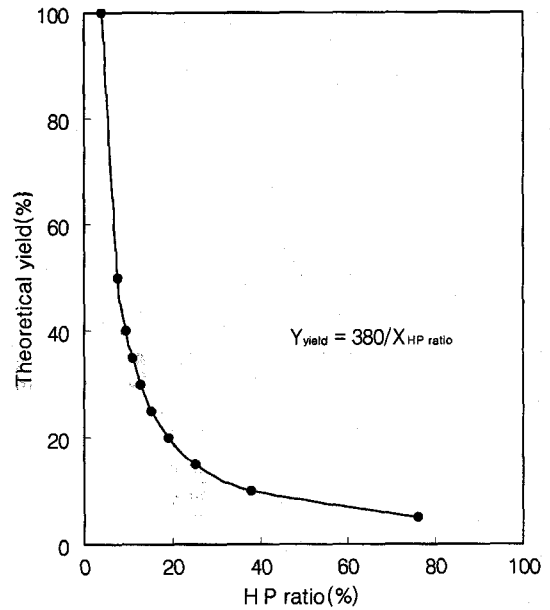


Fig. 4. Relationship between HP ratio and theoretical yield. The theoretical yield(produced heme-iron/consumed Hgb) is reciprocal to HP ratio(heme-iron/peptide, see material and method).

HP ratio는 37.9%였다. 이는 bench scale에서 DH 값이 유사했던(DH 24.3%) 결과(Table 2)와 유사한 수준을 보여 scale-up에 따른 성적의 저하는 없었다.

분리된 침전물은 동결건조하여 분말상의 heme-iron 제품을 얻었다. Heme-iron 제품의 품질을 나타내는 지표 인자를 분석하여 Table 3에 나타낸 바와 같이 heme-iron을 27.1% 함유하며, 기질로 사용된 Hgb에 대한 생산된 heme-iron 제품의 비인 생산수율은 9.3%이었다. HP ratio와 이론적 수율은 반비례($Y = 380/X$)적 관계(Fig. 4)를 보이는데, 고농도의 heme-iron일수록 Hgb으로부터 peptide가 많이 제거되므로 수율은 상대적으로 낮아진다. 본 실험에서 제조된 heme-iron 제품의 HP ratio와 수율의 관계에 있어서는 이와 정확히 일치하지는 않으나, 제조과정 중의 손실분을 감안한다면 유사한 경향을 보인다 할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 공주대학교 자원재활용 신소재 연구센터(RRC/NMR, 01S09)의 지원으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Carpenter, C. E. and Mahoney, A. W. (1992) Contribution of heme and nonheme iron to human nutrition. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **31**, 333-367.
2. Walter, T., Hertrampf, E., Pizarro, F., Olivares, M., Llaugno, S., Letelier, A., Vega, V. and Stekel, A. (1993) Effect of bovine-hemoglobin-fortified cookies on iron status of schoolchildren: a nationwide program in Chile. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**, 190-194.

3. Ledward, D. A. and Lawrie, R. A. (1984) Recovery and utilization of by-product proteins of the meat industry. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **34B**, 223-228.
4. Reizenstein, P. (1980) Hemoglobin fortification of food and prevention of iron deficiency with heme iron. *Acta Med. Scand.* **629**, 1-46.
5. In, M. -J., Chae, H. J. and Oh, N. -S. (2001) Process development for heme-enriched protein stuff by enzymatic hydrolysis of protein. *Bioresource Technol.* (submitted).
6. In, M. -J. and Oh, N. -S. (2001) The simple manufacturing process for the heme-iron from hemoglobin, KR Patent Application No. 2001-0024522.
7. Eriksson, C. (1981) Heme iron-enriched amino acid preparation and a process for the preparation of heme iron-enriched amino acid preparations from heme proteins. E.P. 0061556.
8. Piot, J. M., Guillochon, D., Leconte, D. and Thomas, D. (1988) Application of ultrafiltration to the preparation of defined hydrolysates of bovine haemoglobin. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **42**, 147-156.
9. Adler-Nissen, J. (1986) In *Enzymic hydrolysis of food protein*, Elsevier, London.
10. Marquez, M. C. and Vazquez, M. A. (1999) Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochem.* **35**, 111-117.
11. Hjalmarsson S. and Akesson R. (1983) Modern Kjeldahl procedure. *Int. Laboratory* **3**, 70-76.
12. Paul, K. G., Theorell, H. and Akeson, A. (1953) The molar light absorption of pyridine ferroprotoporphyrin(pyridine haemochromogen). *Acta Chem. Scand.* **7**, 1284-1287.
13. Hames, B. D. (1981) An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In *Gel electrophoresis of protein*, Hames, B. D. and Rickwood, D. [eds.], pp. 64-71. IRL Press, Oxford, UK.
14. Novo Nordisk A/S (1998) In *Esperase: Product sheet*. B 654c-GB.
15. 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.
16. 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.

Conditions of Hemoglobin Hydrolysis and Separation for the Production of Enriched Heme-iron

In-Kyu Kang, Man-Jin In¹ and Nam-Soon Oh* (*Department of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan 340-800, Korea; ¹Department of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University, Hongsung 350-701, Korea*)

Abstract: Effects of hemoglobin (Hgb) concentration and degree of hydrolysis (DH) of Hgb on the separation of heme-iron were examined to produce highly enriched heme-iron from Hgb hydrolysate. Separation efficiency of Hgb hydrolysate with different DH was studied at wide pH range (pH 1.0~11.0). Separation efficiency expressed as heme-iron/peptide ratio increased with decreasing Hgb concentration. When 5% Hgb (pH 10.0) was hydrolyzed using commercially available Esperase for 5 h at 50°C, DH was 25%. The precipitation of heme-iron-enriched peptides were remarkably high at pH range 3~6. Optimal pH range for heme-iron with high heme-iron/peptide ratio shifted to acidic pH with increasing DHs of Hgb. The enriched heme-iron fraction in the precipitates showed a single band through urea-SDS-PAGE, with a molecular mass of 1 kDa. In the dry heme-iron product produced in a pilot bioreactor, content of heme-iron and heme-iron/peptide ratio were 27.1 and 38.7%, respectively, and production yield was 9.3%.

Key words: heme-iron, pH, degree of hydrolysis, separation, yield

*Corresponding author