



우유 Casein 중의 Calcium Phosphopeptide에 관한 연구

이수원 · 황보 식 · 양희진 · 남명수* · 유제현** · 정충일**

성균관대학교 생명공학부

*충남대학교 낙농학과, **건국대학교 낙농학과

Studies on the Calcium Phosphopeptide in Milk Casein

Soo-Won Lee, Sik Hwangbo, Hee-Jin Yang, Myoung-Soo Nam*,
Jae-Hyun Yu** and Chung-Il Chung**

Faculty of Life Science and Technology, Sungkyungwan University

*Dept. of Dairy Science, Chungnam National University

**Dept. of Dairy Science, Konkuk University

Abstract

The economical producing method of casein phosphopeptide (CPP) and the physicochemical properties related to the solubilization of calcium were studied. Firstly, The compositions of the purified CPP-III were 13.1% of nitrogen, 2.3~2.4% of phosphate and the ratio of N/P was 5.4~5.6. In consideration of economic aspects, the preparation method of the CPP-I and II which were lower purity than the CPP-III was established. The physico-chemical property of the CPP was compared with the enzymically dephosphorylated CPP. CPP and polyglutamate effectively inhibited the formation of insoluble calcium phosphates at physiological pH.

Key words : calcium, phosphopeptide, CPP, dephosphorylated CPP

서 론

한국인의 영양소 섭취가 부족에서 과잉으로 가고 있는 현재, 특히 부족하다고 생각되는 것이 무기물, 특히 칼슘이라고 생각된다. 칼슘의 부족은 여러 가지 질환을 유발하며 특히 골다공증에 기인하는 골절은 심각하다. 이것은 칼슘 섭취량이 적은 것도 이유이지만 섭취한 칼슘의 소화관에 있어서의 흡수율의 저하에도 원인이 있다고 말해지고 있다.

섭취된 칼슘의 소장 내에서의 흡수 경로는 소장 상부에서는 능동적 수송(active transport)으로 Vit D₃의 도움을 받아 세포 내로 흡수되며, 소장 하부에서는 수동적 확산(passive transport)에 의해 소장 점막을 통과한다(Bronner, 1987). 이때 칼슘이 흡수되기 위해서는 가용성 상태로 소장 내에 존재해야 하는데 소장 하부의 pH는 중성에서 알칼리측에 기울어져

있어 칼슘이 침전하거나 불용화 되기 쉬운 상태가 된다. 그러나 이때 우유 중의 casein 유래의 phosphopeptide (CPP)가 존재하면 칼슘을 가용화시키므로써 칼슘 흡수를 촉진한다는 것이 밝혀졌다.

한편 casein의 가수분해에 의해 생성되는 casein phosphopeptide (CPP)는 소화 효소에 의해 공격받기 어렵고, 또 Ca 이온과 가용성의 염을 형성하기 때문에 Ca의 흡수를 촉진하는 물질이라 추측하였다(Naito et al, 1972). 또한, casein을 섭취한 rat의 소장 중에 CPP가 생성되며, 이것이 casein을 trypsin으로 분해하여 얻어지는 CPP와 유사하며, 칼슘과 강한 결합 작용이 있는 것을 *in vitro*를 이용하여 처음으로 밝혔다.

본 연구는 장내에서 칼슘 흡수를 촉진하는 phosphopeptide를 우유 casein으로부터 제조하는 방법을 확립하고, 소장 하부 조건에서의 가용화 능력을 검정하기 위하여 실시하였다.

Corresponding author : S. W. Lee, Faculty of Life Science and Technology, Sungkyungwan University, 300, Chunchun-dong, Jangan-gu, Suwon, Kyunggi-do, Korea

재료 및 방법

Casein의 효소처리

Lactic casein (NewZealand Dairy Board)을 10% 용액으로 제조한 후, 효소(trypsin) : 기질 = 1 : 8000으로 희석하였다 (Dickson and Perkins, 1971). 이 혼합물을 40℃에서 6시간 가수분해하였으며, 이때 pH 8.5로 일정하게 유지시키기 위해 pH stat system으로 2N NaOH와 2N NaCl를 자동으로 투여해 주면서 실시하였다. 이 가수분해물을 80℃에서 10분간 열처리한 후, 전기영동을 이용하여 가수분해 정도를 확인하였다.

탈인산 CPP를 제조하기 위하여 acid phosphatase와 phosphatase를 이용하여 CPP의 탈인산화를 시도하였으나 일부 밖에 탈인산화되지 않으므로 casein을 Li-Chan (Li-Chan and Nakai, 1989)의 방법을 이용하여 potato acid phosphatase를 이용하여 탈인산시켰다.

전기영동

O'Farrell의 Slab-gel electrophoresis방법 (O'Farrell, 1975)에 따라 7.5% acrylamide gel을 사용하여 실시하였다.

Phosphate 정량

습식분해한 후, 시험용액은 측정조건에 따라 ICP Emission Spectro Analyzer(JY 38 Plus Isa, Jobin, France)로 3회 반복 측정하여 평균값을 구하였다.

Semi-micro Kjeldahl에 의한 N 함량 측정

식품공전 (Kenneth, 1990)에 따라 시료 0.5g에 H₂SO₄ 20 ml, 분해촉진제 0.5g 정도를 넣고, 황산용액이 무색용액이 될 때까지 완전히 분해시켰다. 이 분해물을 32% NaOH, 2% H₃BO₄ · H₂O의 용액으로 적정하였다(적정시간은 약 4분).

회분 정량

A.O.A.C 방법[Korea Food Industry Association (1990)]에 준하여 분석하였다.

Dephosphorylated CPP의 제조

0.5% casein 용액(pH 7.0)에 50mg potato phosphatase/g casein농도로 효소를 첨가한 후, 37℃에서 0.5, 1, 2, 4, 6, 8시간 동안 가수분해하였다. 이 분해산물을 80℃에서 10분간 열처리하여 효소를 불활성화시킨 후, 증류수로 4℃에서 65시간 동안 투석하였다. 그 후, dephosphorylated casein을 trypsin으로 효소 처리하여 탈인산화된 CPP를 얻었다.

CPP의 가용화 능력 검정

內藤(內藤 博, 1986)의 방법에 준하여 20mM CaCl₂ 0.25ml 에 CPP, poly-glutamic acid, dephosphorylated CPP 1mg을 첨가한 후, 20mM NaH₂PO₄ (pH 7.0) 1ml을 첨가하였다. 소장

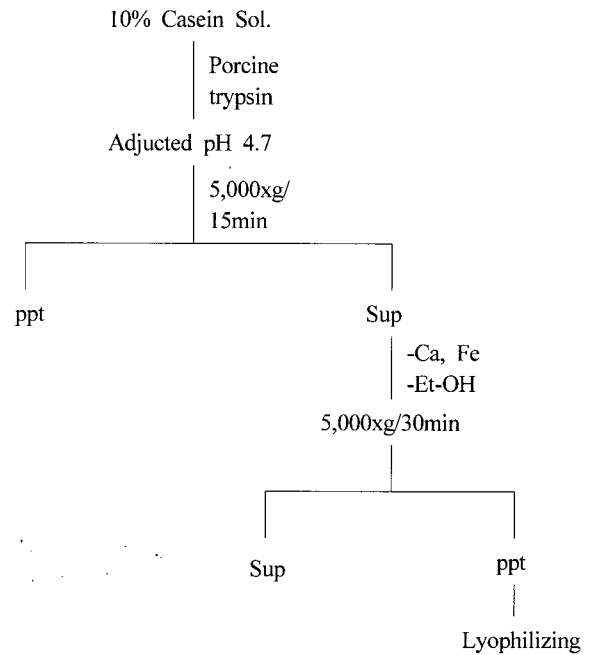


Fig. 1. Preparation of the phosphopeptide.

하부의 조건(pH 7.0, 37℃)을 유지시켜 주면서 2시간 간격으로 0시간, 2시간, 4시간, 6시간, 8시간, 24시간에 시료를 채취하여 10,000g에서 10분간 원심분리한 후, 상등액만을 취하여 ICP Emission Spectro Analyzer로 3회 반복 측정하여 평균값을 구하였다.

결과 및 고찰

효소처리에 의한 CPP의 제조 및 성분분석

CPP의 제조는 Fig. 1과 같은 방법으로 실시하였다. 가수분해물을 원심분리후 상등액에 20ml FeCl₃나 CaCl₂를 첨가하고 에탄올을 1 : 1 비율로 첨가하여 생긴 침전물을 증류수로 세척한 후 동결건조하였다. 그 후, Ca²⁺이온과의 결합력을 조사한 결과, pH 7.0과 pH 4.7을 비교한 결과 거의 차이가 없었다. Dickson (Dickson and Perkins, 1971)에 의하면 금속이온과 단백질의 결합에 있어서 pH가 크게 영향을 미치는데 pH 6에서 Ca²⁺과 단백질의 결합정도는 낮으나 pH 7로 조정하면, 단백질과 Ca²⁺의 결합이 현저하게 증가한다고 하였다.

Table 1. Composition of Ca- and Fe-CPP (%)

	Protein	P	Ash	N/P
Fe-CPP*	83.58	2.33	8.4	5.62
Ca-CPP	83.58	2.40	8.5	5.46

* CPP : calcium phosphopeptide

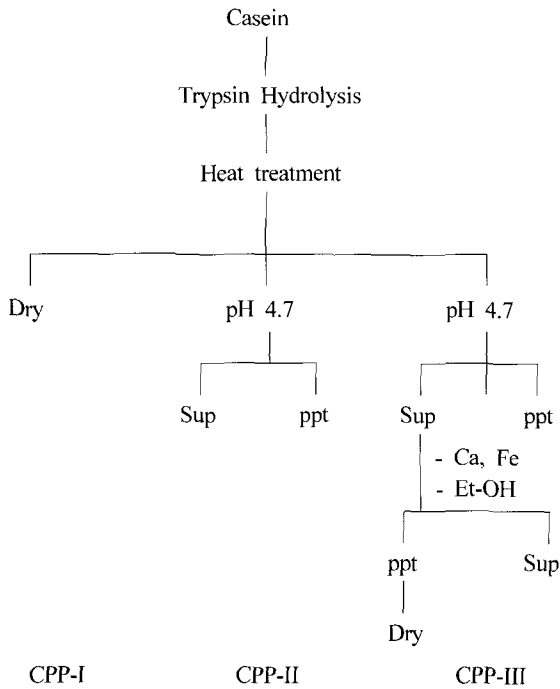


Fig. 2. Preparation of the CPP-I, II and III.

본 실험과의 결과를 비교했을 때, pH 6.0 이하에서는 금속이온의 결합력이 다소 회복될 수 있다는 것을 의미한다고 할 수 있을 것이다.

Fig. 1과 같이 제조한 Fe-CPP와 Ca-CPP의 성분을 분석한 결과, 단백질 83.5%, P 2.3-2.4%, N/P 비는 5.4~5.6 정도로 순도가 매우 높은 것으로 나타났다(Table 1).

CPP를 Fig. 1과 같이 Ca이나 Fe, ethanol 등을 사용하여 분리 정제하는 방법은 경비가 많이 들고 폐기되는 부분이 많으므로 순도가 좀 낮더라도 경제성이 있는 방법을 모색하기 위하여 Fig. 2와 같은 제조공정으로 3종류의 CPP를 제조하였다.

실제로 높은 순도의 CPP를 요구하는 경우도 있지만, CPP의 원재료가 casein이기 때문에, CPP 함량이 적더라도 좀 더 많은 양을 첨가하여 1회 섭취량을 동일하게 하면 별문제가 없는 식품도 많고, 한편 가축 사료용의 경우 무엇보다 비용이 싸야 한다고 생각된다. 따라서 본 연구에서는 CPP-I은 casein을 trypsin으로 가수분해한 후 열처리하여 효소를 불활성화 시킨 후, 그대로 건조한 것이고, CPP-II는 CPP-I에서 pH 4.7의 불용성 단백질을 제거한 후 건조하였으며, CPP-III는 Fig. 1에서와 같이 순도 높게 분리 정제한 제품이다. 따라서, 보다 간단하게, 그리고 순도가 좋은 제품이 생산되었으므로 이는 충분히 경제적인 가치가 있다고 생각된다.

CPP의 탈인산화

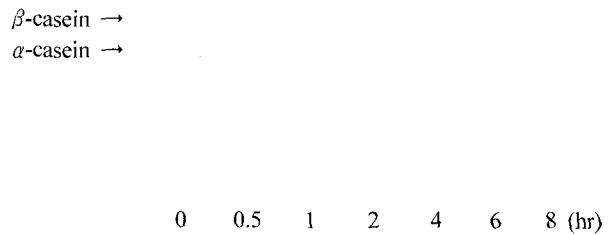


Fig. 3. Electrophoretic patterns of bovine casein after potato acid phosphatase treatment. Bovine casein was hydrolyzized with potato acid phosphatase for 0.5 to 8hrs at 37°C.

탈인산화된 CPP를 전기영동시킨 결과, Fig. 3과 같았다. α_{S1} -, β -casein 모두 탈인산화 후 전기이동도가 낮음을 볼 수 있는데 이것은 탈인산화로 인해 serine 잔기에 결합된 phosphate group이 제거됨에 따라 음전하가 감소되었기 때문이라고 생각되어진다. 이것은 Li-Chan(内藤 博, 1986)의 결과와도 일치하였다.

단백질에 결합된 phosphate를 acid phosphatase로 처리하였을때는 whole, α_{S1} -, β -casein이 각각 97%, 70%, 99%의 탈인산화를 보여주었다(Li-Chan and Nakai, 1988). 94% dephosphorylated casein에 결합하는 Ca의 양은 10mM 농도에서 native whole casein 보다 약 3배 낮은 것으로 나타났다(Kitts and Yuan, 1992). Dephosphorylated casein에 trypsin을 작용시킨 것을 pH 4.7로 조정 한 후 얻어진 상등액을 건조하여 dephosphorylated CPP (DPP)로 사용하였다.

CPP의 칼슘 가용화 능력 검정

CPP가 소장하부에서 Ca을 가용화시키므로 Ca-P의 침전을 저지하는 효과가 있으리라 생각된다. 이를 검증하기 위하여

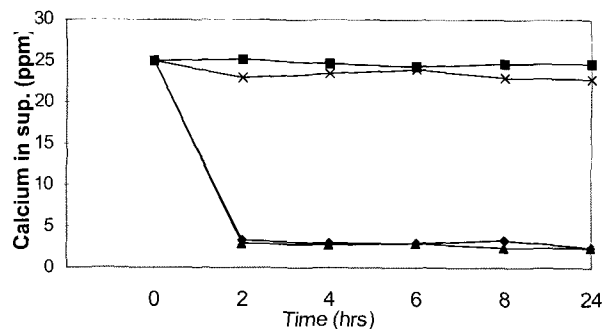


Fig. 4. Inhibition with casein phosphopeptide on precipitation of calcium phosphate *in vitro* at physiological pH. ◆ blank; ■ CPP; ▲ DPP; × Poly-Glutamate.

여 *in vitro* 실험을 통해 pH 7.0에서 Ca 효과를 조사한 결과, CPP와 함께 poly-anion성 peptide인 polyglutamic acid는 Ca-침전 형성 저지효과가 현저하였다(Fig. 4). 그러나, DPP에서는 Ca-침전 형성 저지 효과가 거의 없는 것으로 나타났다.

지금까지 CPP의 제조 방법을 경제적인 측면에서 고려하여 3종류의 CPP 생산방법을 확립하고, CPP의 Ca 가용화 능력을 검정하였다. 앞으로 이러한 CPP의 더 경제적인 생산방법을 고려하고 CPP의 생리적 역할을 종합적으로 검토하기 위하여 연구를 진행할 예정이다.

요 약

본 연구는 생리활성 casein phosphopeptide의 경제적인 생산방법과 CPP의 칼슘 가용화 능력을 검정하기 위하여 수행되었다. 먼저 정제된 CPP-Ⅲ는 N 13.1%, P 2.3~2.4%, N/P 비 5.4~5.6 정도로 CPP 순도가 매우 높은 것으로 나타났다. 경제적인 면을 고려하여 CPP-Ⅲ보다는 순도가 떨어지는 CPP-I, CPP-II의 제조방법을 확립하였다. 한편 CPP의 칼슘 가용화 능력을 생리적 pH 조건하에서 검정한 결과 CPP와 polyglutamic acid는 Ca 침전 형성 저지효과가 현저하였으나, DPP는 효과가 없었다.

참고문헌

1. Bronner, F. (1987) Intestinal calcium absorption : Mechanisms and application. *Am. Ins. Nutr.*, **47**, 1347.
2. Dickson, J. R. and Perkins, D. J. (1971) Studies on the interaction between purified bovine casein and alkine-earth-metal ions. *Biochem. J.*, **124**, 235.
3. Kenneth, H. (1990) "Official methods of analysis". *A.O.A.C.*, p. 835.
4. Kitts, D. D. and Yuan, Y. V. (1992) Casein phosphopeptides and calcium bioavailability. *Trends in Food Sci. Technol.*, **31**, 45.
5. Korea Food Industry Association (1990) *Food Code* p. 409
6. Li-Chan, E. and Nakai, S. (1988) Rennin modification of bovine casein to simulate human casein composition : effect on acid clotting and hydrolysis by pepsin. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **21**, 200.
7. Li-Chan, E. and Nakai, S. (1989) Enzymic dephosphorylation of bovine casein to improve acid clotting properties and digestibility for infant formula. *J. Dairy Res.*, **56**, 381.
8. Naito, H., Kawakami, A. and Imamura, T. (1972) *In vivo* formation of phosphopeptide with calcium-binding property in the small intestinal tract of the rat fed on casein. *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 409.
9. Naito, H. (1986) Calcium absorption mechanism of phosphopeptide in the hydrolyzes casein, *J. Japanese Nutrition & Food*. **39**, 433
10. O'Farrell, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007.

(2001년 8월 30일)