

투석법에 의한 Heme-iron의 분리

강인규 · 인만진¹ · 오남순*

공주대학교 식품공학과 및 공주대학교 식품과학연구소

¹청운대학교 식품영양학과

(2003년 3월 26일 접수, 2003년 5월 12일 수리)

Hemoglobin(Hgb)의 가수분해물로부터 heme-iron을 분리하는데 영향을 미치는 Hgb의 농도, 가수분해도(DH, degree of hydrolysis), 투석용액의 pH, 투석막의 pore size에 대하여 조사하였다. 가수분해에 사용된 Hgb의 농도가 높아짐에 따라 heme-iron의 회수율은 증가하였으나, peptide의 제거율과 HP ratio(총 peptide 중 heme-iron이 차지하는 비율)는 Hgb의 농도에 따른 큰 차이를 볼 수 없었다. Hgb의 가수분해도가 8%, 16%, 24%로 증가함에 따라 투석에 의한 peptide의 제거가 용이하게 이루어져 HP ratio가 13.7%, 20.7%, 31%로 증가하였다. 투석용액에 KH₂PO₄를 25 mM이 되도록 첨가할 때는 HP ratio가 25.7%이었으나, 50 mM이상의 농도에서는 30.0-32.5%로 증가하였다. 투석용액의 pH가 높을수록 heme-iron의 용해도가 증가하여 투석막을 통한 heme-iron의 세출이 많아졌다. Peptide의 제거율은 투석막이 2 kDa에서 5 kDa로 커질 때 74.5%에서 87.5%의 큰 폭으로 증가하였으며, heme-iron의 회수율은 투석막의 크기에 따라 감소하여 2 kDa에서는 86.5%, 15 kDa에서는 79.6%, 25 kDa에서 63.1%로 급감하였다. 투석법에 의해 분리, 건조된 heme-iron 제품의 heme-iron과 peptide의 함량은 각각 21.7%와 77.0%이었으며, HP ratio는 28.2%, 수율은 6.5%이었다.

Key words: 투석법, heme-iron, 분리효율

서 론

철분은 미량 무기질로 체내에서의 필요량은 적으나 생리적으로 중요한 역할을 한다.¹⁾ 식품 중의 철은 여러 형태로 존재하나 동물성 식품인 경우는 주로 heme-iron으로, 식물성 식품인 경우는 nonheme-iron의 형태로 체내에 공급된다. 유기질 형태의 heme-iron의 체내 흡수율은 nonheme-iron에 비하여 약 2배 정도 높고, 효율성이나 안정성이 무기질 형태보다 우수한 철분 공급원으로 인정받고 있다.^{2,3)} Heme-iron의 주요 공급원인 hemoglobin(Hgb)은 전체 혈액 단백질의 약 60-70% 정도를 차지하며, 구조적으로는 4개 polypeptide 단위사슬의 각각에 heme-iron이 1분자씩 결합되어 있다. 지금까지 heme-iron의 제조에 관한 연구는 Hgb이 함유하는 heme-iron의 분체점인 붉은 색택, 금속성 이취 및 산패 촉진⁴⁾ 등을 제거하는 노력의 일환으로 수행되어 왔다. Heme-iron의 제조는 먼저 혈액의 적혈구에서 헤모글로빈을 분리하고, acetone⁵⁾이나 carboxymethyl cellulose를 첨가하여 CMC 복합체로서의 heme-iron을 침전시키는 방법,⁶⁾ 저급 알코올과 같은 탈수제를 사용하거나 imidazol 유도체를 사용하는 방법⁷⁾ 등이 있으며, 고농도의 유기산을 이용하여 고온에서 Hgb를 분해하거나⁸⁾ 단백질 분해효소를 처리하여 Hgb 가수분해물로부터 peptide와 함께 heme-iron을 제조하는 방법⁹⁾이 있다. Hgb으로부터 heme-iron을 획득하기 위한 Eriksson¹⁰⁾의 생산공정에 관한 연구 외에도, Lebrun 등¹¹⁾은 heme-iron을 효율적 획득을 위한 heme-iron 분자의 성질에 관

한 연구 결과를 보고하였다. 단백질 분해효소로 Hgb를 가수분해하여 heme-iron을 제조하는 경우 globin의 분해로 생성되는 peptide와 peptide, peptide와 heme기 사이의 소수성 결합으로 고분자 연합체가 생성되기¹¹⁾ 때문에 peptide를 제거하여 heme-iron의 함량을 높이기가 어려웠다. 따라서 본 연구는 Hgb의 효소분해물로부터 투석막을 이용하여 heme-iron을 분리하는데 영향을 미치는 몇가지 인자들에 대하여 조사하였으며, 고농도의 heme-iron을 얻을 수 있는 제조방법을 확립하고자 수행되었다.

재료 및 방법

재료. 기질로 사용된 hemoglobin(Hgb)은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였으며, 단백질분해효소는 Novo Nordisk사(Bagsvaerd, Denmark)의 Esperase를 사용하였다. Hematin, pyridine과 같은 heme-iron과 peptide의 분석에 사용된 시약은 1급 시약을 사용하였다.

Hgb의 가수분해. pH와 온도가 자동으로 조절되는 자력교반형 반응기(0.6 L glass vessel, double jacket) 및 bench top bioreactor(7 L Bioreactor, Hanil R&D, 한국)를 이용하여 가수분해를 수행하였다. Hgb 20 g을 0.1 N NaOH로 용해시켜 400 ml(pH 10.0)의 용액을 제조하였다. 분해효소인 Esperase를 단백질 기준으로 1%(w/w)를 첨가하여 가수분해를 시작하였다. 반응온도는 50°C이며 반응 pH가 10.0으로 유지되도록 4 N NaOH로 조절하여 300 분간 반응을 시켰다. 반응 종료 후 가수분해액은 90°C에서 15분간 열처리한 후 12,000 g에서 20분간 원심분리(Mega 17R, Hanil R&D, 한국)한 후 시료로 사용하였다. 가수분해도의 측정은 TNBS법¹²⁾을 이용하여 측정하였다.

Heme-iron의 분리. 투석을 이용한 heme-iron의 분리는

*연락처자

Tel: 82-41-330-1485, Fax: 82-41-333-9610

E-mail: nsoh@kongju.ac.kr

Table 1. Effect of hemoglobin concentration on the separation efficiency of heme-iron from hemoglobin hydrolysate

Hgb (%)	DH ¹⁾ (%)	Heme-iron recovery (%)	Peptide rejection (%)	HP ²⁾ ratio (%)	ER ³⁾ (times)
2.5	24.6	75.7	92.2	30.0	9.7
5.0	24.0	83.4	91.8	30.7	10.2
10.0	24.9	91.0	91.6	31.7	10.8

¹⁾Degree of hydrolysis

²⁾HP ratio was calculated as the amount of heme-iron divided by amount of peptide in the dialysate.

³⁾Enrichment ratio was shown as the ratio between HP ratio of the dialysate and HP ratio of the hydrolysate.

pore size(molecular weight cut-off, MWCO, dalton)가 12-14 kDa의 dialysis membrane(Regenerated cellulose membrane, Spectrum Lab., Inc., USA)에 시료를 충전하고 50 mM KH₂PO₄ 투석용액(pH 8.0)에서 수행하였다. 투석 후 분리된 heme-iron 용액은 동결건조기로 건조하였다.

Heme-iron의 분리효율 표현. Hgb 가수분해액으로부터 heme-iron의 분리효율은 투석 후 막 내부에 잔류하는 heme-iron 회수율, peptide의 제거율, HP ratio(투석막 내부에 잔존하는 총 peptide 중 heme-iron이 차지하는 비율)와 농축율(ER, enrichment ratio) 등으로 표현하였다.

즉, $HP\ ratio(\%) = H/P * 100$, 여기서 H는 시료 중 heme-iron의 농도이며, P는 peptide의 농도이다. $ER(times) = HP_d/HP_h$, HP_d는 투석 후 heme-iron 분리액 중의 HP ratio이며, HP_h는 투석 전 heme-iron의 HP ratio이다.

분석. Heme-iron은 변형된 pyridine hemochromogen법¹³⁾에 따라서 분석하였다. 즉, 시료 1g을 피리딘·수산화나트륨시액 2ml에 혼합하고, 즉시 sodium hydrosulfite를 3mg 첨가한 후 557 nm에서 흡광도를 측정하고 hematin 표준액과 비교하여 heme-iron을 정량하였다. 단백질 및 peptide의 분석은 semimicro-Kjeldahl법¹⁴⁾에 따라서 총질소를 분석하였으며, peptide의 농도는 분석된 총질소의 농도로부터 계산(TN*6.25)되었다.

결과 및 고찰

Heme-iron의 분리에 대한 Hgb 농도 효과. 기질인 Hgb의 농도를 달리하여 가수분해한 후 투석법으로 heme-iron을 분리하였다. Heme-iron의 회수율은 Hgb의 농도가 높아짐에 따라 75.7%에서 91.0%로 증가하는데(Table 1), 이는 투석막 내부에 잔존하는 고농도의 heme-iron 분자들이 연합에 의한 거대분자 화^{8,11)}로 막 공극을 통한 세출이 억제되기 때문으로 생각된다. Table 1에서 보는 바와 같이 peptide의 제거율은 91.6-92.2%로 Hgb 농도에 따른 큰 차이는 없었으며, heme-iron의 분리효율을 나타내는 지표인 HP ratio(투석막 내부에 잔존하는 총 peptide 중 heme-iron이 차지하는 비율)와 농축율(ER)에서도 유사한 경향을 보였다. 등전점 침전법에 의한 Heme-iron의 분리에서는 Hgb의 농도를 달리할 경우 heme-iron의 회수율에는 큰 차이가 없었던 반면, peptide의 제거율은 Hgb의 농도가 낮을수록 높게 나타났으며, HP ratio와 농축율(ER)에서도 높게 나타났다.¹⁵⁾ 이는 heme-iron을 분리하는 기작이 투석법과 등전점 침전법이 다른데서 오는 차이로서, 투석법에서는 peptide 또는 heme-iron 분

Table 2. Recovery of heme-iron after dialysis of hydrolysate with different degree of hydrolysis

DH (%)	Heme-iron recovery (%)	Peptide rejection (%)	HP ratio (%)
8	94.0	77.9	13.8
16	96.1	85.4	20.8
24	83.4	91.8	30.7

자의 크기, 등전점 침전법은 이들 분자의 용해도가 분리효율에 영향을 준다는 것을 보여준다.

Hgb의 가수분해도에 따른 heme-iron의 분리. Hgb의 가수분해도가 heme-iron의 분리에 미치는 영향을 조사하기 위하여 가수분해도가 각각 8%, 16%, 24%인 효소분해액을 pore size(MWCO, dalton)가 12-14 kDa인 투석막을 사용하여 투석한 후 heme-iron의 회수율, peptide의 제거율과 HP ratio를 조사하였다(Table 2). 가수분해도가 8%, 16%일 때 heme-iron의 회수율은 각각 94.0%, 96.1%로 유사하였으나, 24%인 경우에는 83.4%로 감소하였다. Peptide의 제거율은 Hgb의 가수분해도가 8%에서 24%로 증가할 때, 77.9%에서 91.8%로 크게 증가하였으며, 이에 따라서 HP ratio도 13.8%에서 30.7%로 현저히 증가하였다. 이것은 Hgb의 가수분해도가 증가할수록 저분자 peptide로 분해되어 투석에 의한 제거가 용이하게 이루어지고, heme-iron도 분자량이 작아지면서 소수성 상호작용에 영향을 주어 투석에 의한 세출이 증가하는 것으로 사료된다. 상술한 결과들로부터 heme-iron의 분리효율은 Hgb 가수분해액으로부터 peptide의 제거율에 따른다고 할 수 있다.

Heme-iron 분리에 사용된 투석용액의 조성과 pH의 영향. Heme-iron을 분리하기 위한 In 등¹⁶⁾의 연구결과에 의하면, 다 양성자성 산을 투석용액에 첨가하여 투석하는 경우가 더 높은 heme-iron 분리효율을 얻을 있다고 한 바 있으며, 특히 KH₂PO₄를 사용한 경우는 높은 HP ratio를 나타내어 본 연구의 투석용액으로 선정하여 사용하였다.

Table 3에서 보는 바와 같이 KH₂PO₄의 첨가농도를 25 mM에서 200 mM로 증가할수록 heme-iron의 회수율은 79.2%에서 87.5%로 증가하였고, peptide의 제거율은 90.4%에서 91.6%로 미미한 증가를 보였다. HP ratio는 KH₂PO₄의 농도가 25 mM일 때 25.7%이었으며, 50 mM 이상에서는 30.0-32.5%로 증가하였다. 분리된 heme-iron의 제폭화를 위하여 투석용액에 잔류하는 KH₂PO₄를 제거해야 하기 때문에 분리효율을 나타내는 HP ratio를 크게 저하시키지 않는 최소량인 50 mM의 KH₂PO₄를 투석용액에 첨가하여 실험하였다.

Table 3. Effect of KH_2PO_4 concentration on the recovery of heme-iron from Hgb hydrolysate

KH_2PO_4 Concentration (mM)	Heme-iron recovery (%)	Peptide rejection (%)	HP ratio (%)
Hydrolysate	100	0	3.1
25	79.2	90.4	25.7
50	83.4	91.4	30.0
100	84.4	91.5	31.0
200	87.5	91.6	32.5

Table 4. Effect of pH of dialysis solution on the recovery of heme-iron from Hgb hydrolysate

pH	Heme-iron recovery (%)	Peptide rejection (%)	HP ratio (%)
Hydrolysate	100	0	3.1
2.0	98.8	87.2	24.3
4.0	95.1	89.7	28.6
6.0	90.1	90.5	29.3
8.0	83.4	91.4	30.0
10.0	69.2	91.6	25.4

Heme-iron의 분리효율에 미치는 투석용액의 pH에 따른 영향을 조사하기 위하여, 50 mM KH_2PO_4 용액의 pH를 달리하여 투석한 결과 pH가 2.0에서 10.0으로 증가함에 따라서 heme-iron의 회수율은 98.8%에서 69.2%로 감소하는 경향을 보였으며, peptide의 제거율은 87.2%에서 91.6%로 대략 90%에 가까운 peptide 제거율을 보였다(Table 4). 투석용액의 pH가 산성에서 알칼리성으로 이동됨에 따라 heme-iron의 회수율이 감소한 것은 heme-iron의 pH에 따른 용해도 차이에 기인하며, pH가 증가할수록 heme-iron의 용해도가 증가¹⁵⁾하여 투석막 외부로 세출이 증가하였기 때문으로 분석된다. Hgb의 가수분해도가 큰 경우는 peptide의 용해도는 pH에 따라 차이가 크게 나타나지 않으며,¹⁵⁾ 결국 pH 변화에 따른 peptide 제거율의 변화가 크게 나타나지 않았다. pH 4.0-8.0 구간에서의 HP ratio는 28.6%-30.0%이었으나, 강산성과 강알칼리인 pH 2.0과 10.0에서는 각각 24.3%와 25.4%로 낮은 HP ratio를 보였다.

투석막의 pore size에 따른 heme-iron의 분리. Hgb 가수분해액을 pore size가 다른 투석막을 사용하여 heme-iron을 분리한 경우 heme-iron의 회수율과 peptide의 제거율을 조사하였다. Dialysis membrane의 pore size가 2-25 kDa의 막을 사용하여 원심분리한 가수분해액을 투석막에 넣어 50 mM의 KH_2PO_4 (pH 8.0) 용액에서 투석하였다.

Fig. 1에서 나타난 바와 같이 투석막의 크기가 2-25 kDa으로 pore size가 증가함에 따라서 heme-iron의 회수율은 86.5%에서 63.1%로 감소하였으며, 특히 15 kDa 이상의 투석막에서 감소폭이 컸다. Peptide의 제거율은 투석막 pore size가 클수록 증가하였으며, 특히 2 kDa의 투석막인 경우는 74.5%이었으며 5 kDa인 경우는 84.9%로 그 증가폭이 컸다. 투석막을 통한 heme-iron의 회수율과 peptide의 제거율 사이의 일관성 있는 관계가 없기 때문에 HP ratio와 투석막의 pore size와의 상관관계를 나타내기는 어렵지만, 2-13 kDa 범위의 투석막을 사용하는

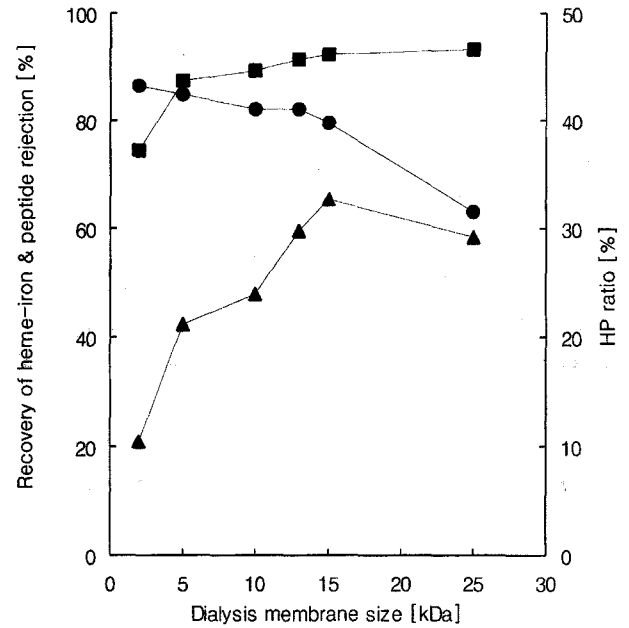


Fig. 1. Effects of membrane pore sizes on the recovery of heme-iron (●), peptide rejection (■), and HP ratio (▲) after membrane dialysis.

경우는 pore size의 크기가 클수록 HP ratio도 증가하였고, 13 kDa 이상의 투석막을 사용할 때는 HP ratio가 약 29-33%를 나타냈다. 그러나, pore size가 13 kDa 이상의 투석막을 사용하는 경우는 heme-iron의 제거율이 대략 20%로 손실율이 크기 때문에 pore size가 13 kDa 이하의 막을 사용하는 것이 바람직할 것으로 판단되었다. 상기와 같은 투석막의 pore size의 크기에 따라서 heme-iron의 회수율 감소와 peptide의 제거율 증가는 분자량이 약 1 kDa 이하¹⁵⁾로 Hgb가 가수분해되어 heme-iron과 저분자의 peptide 및 아미노산 상태로 투석막을 통해 빠져나간 결과이며, heme-iron이 peptide에 비하여 투석막 내부 잔존하는 비율이 높은 것은 heme-iron의 경우는 heme-heme 또는 heme-peptide간 소수성 상호작용⁸⁾으로 인한 복합체로 잔존하기 때문인 것으로 사료된다.

투석법에 의해 분리된 heme-iron 제품의 평가. 투석법으로 heme-iron을 분리한 후 건조하여 소량의 시험제품을 얻은 후 등전점 침전법으로 얻었던 heme-iron의 품질평가 지표¹⁵⁾들과 비교하였다. 등전점 침전법인 경우 heme-iron 제품의 heme-iron과 peptide의 함량은 각각 27.1%, 70.0%이었으며, HP ratio는 38.7%고 수율은 9.3%였다. 한편, 투석법의 가수분해액을 투석막의 pore size가 12-14 kDa인 투석막으로 50 mM KH_2PO_4 용액 (pH 8.0)에서 투석하여 분리한 heme-iron을 건조하여 분말상의 heme-iron을 제조하였으며, 시험제품의 heme-iron과 peptide의 함량은 각각 21.7%, 77.0%이었으며, HP ratio는 28.2%, 수율은 6.5%로 등전점 침전법에 비하여 낮은 결과를 보였다. 투석법에서는 등전점 침전법보다 heme-iron과 peptide의 연합에 의한 거대분자화로 분리가 곤란하며, 또한 이러한 문제점을 극복하기 위하여 pore size가 큰 투석막을 사용할 경우는 투석막을 통한 heme-iron의 세출(wash-out)로 수율이 낮아진다는 문제가 있다. 그러나 투석법과 같은 막분리법을 사용하여 제조한 heme-

Table 5. Quality of heme-iron product

Quality parameter	Methods	
	Precipitation ^{Ref.15)}	Dialysis
Peptide (%)	70.0	77.0
Heme-iron (%)	27.1	21.7
HP ratio (%)	38.7	28.2
Yield ¹⁾ (%) (heme-iron/Hgb)	9.3	6.5

¹⁾Ratio between raw hemoglobin and heme-iron product

iron이 등전점 침전법에 의해 분리한 heme-iron보다 체내 이용률이 높다는 점에서 막분리법은 여전히 큰 장점을 갖고 있다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 공주대학교 자원재활용 신소재 연구센터의 지원에 의한 것입니다. 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Knipe, C. L. (1988) In *Production and use of animal blood and blood proteins for human food. Edible meat by-product*, Advances in meat research 5, Elsevier Science Publisher, New York, USA.
- 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.
- Reizenstein, P. (1980) Hemoglobin fortification of food and prevention of iron deficiency with heme iron. *Acta Med. Scand.* **629**, 1-46.
- Howell, N. K. and Lawrie, R. A. (1983) Functional aspects of blood plasma proteins: Separation and characterization. *J. Food Technol.* **18**, 747-762.
- Tybor, P. T., Dill, C. W. and Landmann, W. A. (1975) Functional properties of protein isolated from bovine blood by a continuous pilot process. *J. Food Sci.* **40**, 155-159.
- Autio, K., Kiesvaara, M. and Malkki, Y. (1985) Method for dividing blood hemoglobin into heme and globin, U.S. Patent 4,518,525.
- Lindroos, P. G. S. (1984) Heme concentrate and method for the preparation thereof, U.S. Patent 4,431,581.
- 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.
- 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.
- 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. EP. 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.
- Adler-Nissen, J. (1979) Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* **27**, 1256-1262.
- Paul, K. G., Theorell, H. and Akeson, A. (1953) The molar light absorption of pyridine ferroprotoporphyrin (pyridine haemochromogen). *Acta Chem. Scand.* **7**, 1284-1287.
- Hjalmarsson S. and Akesson R. (1983) Modern Kjeldahl procedure. *Int. Laboratory* **3**, 70-76.
- Kang, I. K., In, M. J. and Oh, N. S. (2001) Conditions of hemoglobin hydrolysis and separation for the production of enriched heme-iron. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **44**, 219-223.
- In, M. -J., Chae, H. J. and Oh, N. -S. (2002) Process development of heme-enriched peptide by enzymatic hydrolysis of hemoglobin. *Bioresource Technol.* **84**, 63-68.
- Lebrun, F., Bazus, A., Dhulster, D. and Guillochon, D. (1998) Influence of molecular interactions on ultrafiltration of a bovine hemoglobin hydrolysate with an organic membrane. *J. Membrane Sci.* **146**, 113-124.

Separation of Heme-iron by Dialysis

In-Kyu Kang, Man-Jin In¹ and Nam-Soon Oh* (*Department of Food Science and Technology, and Food Science Research Institute, Kongju National University, Yesan 340-802, Korea; ¹Department of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University, Hongsung 350-701, Korea*)

Abstract: A method for separating heme-iron from hemoglobin (Hgb) hydrolysate by dialysis was developed. Recovery of heme-iron increased with increasing Hgb concentration, whereas rejection of peptide and separation efficiency expressed by HP ratio (heme-iron/peptide) did not show significant differences. HP ratio increased with increases in the degree of hydrolysis of Hgb and KH_2PO_4 concentrations of dialysis solution. Recovery of heme-iron decreased with increase in the pH of dialysis solution due to wash-out of heme-iron across the dialysis membrane caused by increase in solubility of heme-iron. Rejections of peptide were 74.5 and 87.5% (2 and 5 kDa of cut off size, respectively), whereas recovery of heme-iron decreased from 86.5 (2 kDa) to 63.1% (25 kDa). Amounts of heme-iron and peptide of dried heme-iron product were 21.7 and 77.0%, and HP ratio and production yield were 28.2 and 6.5%, respectively.

Key words: dialysis, heme-iron, separation efficiency

*Corresponding author