

산·학·연 논문

헴철의 생산공정

강인규 · 채희정\* · 인만진\*\* · 오남순†

공주대학교 식품공학과 및 식품과학연구소

\*호서대학교 식품생물공학과

\*\*청운대학교 식품영양학과

A Manufacturing Processes of Enriched Heme Iron

In-Kyu Kang, Hee Jeong Chae\*, Man-Jin In\*\* and Nam-Soon Oh†

Dept. of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan 340-800, Korea

\*Dept. of Food and Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

\*\*Dept. of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University, Hongsung 350-701, Korea

서론

헴철(heme iron)은 헤모글로빈(hemoglobin, Hgb)을 효소처리한 후 분리하여 얻어지는 철(Fe) 원자를 함유한 포피린(porphyrin) 복합체로 정의된다. 헴철은 또한 프로토헴( $C_{34}H_{32}FeN_4O_4$ , MW 616.48)이 9.0~27.0% 함유하고, 철(Fe, MW 55.85)로서는 1.0~2.6%를 함유하는 것으로 규격을 정해두고 있다(1). 식품 중 철분은 헴철(heme iron)과 비헴철(non-heme iron)의 2가지 형태로 존재하며 동물성 식품 중의 철 함량의 평균 40%가 헴형이고 나머지 60%가 비헴형이며 식물성 식품 중의 철은 모두 비헴형으로 존재한다(2).

생체에서 철분은 미량 무기질의 일종으로 필요량은 적으나 주로 산소운반에 관여하는 중요한 역할을 한다. 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.

섭취한 식품으로부터 철의 흡수는 식품의 종류에 따라 큰 차이가 있어 육류식품에 함유된 철의 흡수율은 10% 이상이고 쌀과 시금치에 함유된 철의 흡수율은 5% 이하로 불량하다. 또한 개인의 철 영양상태에 따라서도 흡수율은 영향을 받는다. 여성과 어린이들과 같이 체내 보유량이 적으면 흡수율은 높아지고 남성처럼 철 저장량이 높으면 낮아진다. 이와 같이 철분의 흡수율은 섭취한 철분의 형태 및 다른 식이인자의 존재, 체내 철분 저장상태에 영향을 받으며 통상 건강인은 섭취한 철분의 5~10% 정도만을 흡수하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 철의 결핍은 전세계적으로 가장 흔한 영양문제로 그 원인은 부적절한 섭

취, 철 흡수의 불량, 빠른 성장과 혈액손실, 반복되는 임신에 의한 저장 철의 고갈 등이다(3,4). 철 결핍의 위험이 높은 시기는 급격한 신체성장이 이루어지는 6개월~4세의 영유아기, 사춘기, 월경혈의 손실이 있는 가임기 여성, 철의 요구가 증가하는 임신기이며 특히 영유아와 임신부는 철 결핍이 되기 쉬운 것으로 알려져 있다. 철 결핍을 예방, 치료하기 위하여 염화 제2철(ferric chloride), 구연산 철(ferric citrate), 구연산 철 암모늄(ferric ammonium citrate), 호박산 구연산 철 나트륨(iron and sodium succinate citrate), 젖산 철(ferrous lactate), 피로인산 제 2철(ferric pyrophosphate), 헴철(heme iron) 등의 철 화합물이 식품의 철 강화제 및 제약 원료로 사용되고 있다.

철 화합물 중 헴철을 제외한 나머지는 무기철 성분으로 철 함량이 높고 경제적으로 저렴한 장점이 있으나 생체에서 흡수율이 낮고 과잉 섭취시 철 중독을 유발할 수 있는 단점이 있어 점차 흡수율이 높고(3,5) 부작용이 없는 유기철 성분인 헴철의 사용량이 증가하고 있다.

헴철은 대부분 헤모글로빈과 미오글로빈의 형태로 섭취되며 흡수율이 매우 높고 다른 식사 요인에 의하여 영향을 받지 않으나, 비헴철의 흡수는 몇 가지 요인에 의하여 영향을 받는다. 헴철은 헤모글로빈, 미오글로빈 등에 함유되어 있는 성분으로 도축 혈액으로부터 분리, 정제하여 제조한다. 헤모글로빈(Fig. 1, 분자량; 약 65,000 dalton)은 헴기(heme group)를 포함하고 있는 4개의 폴리펩티드 사슬로 이루어진 단백질로 1몰의 헤모글로빈에는 4몰의 철이 함유되어 있다. 헤모글로빈 중 철의 함량을 분자량에 따라 계산하면 0.34%(=223.4/65,000×100), 헴철의 함량은 3.8%(=2,466/65,000×100)이다. 따라서, 고농도 헴철(최소

†Corresponding author. E-mail: nsoh@kongju.ac.kr  
Phone: 041-330-1485. Fax: 041-333-9610

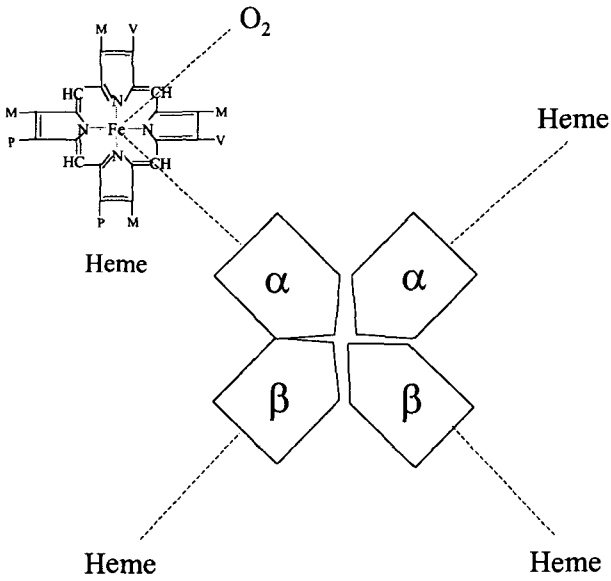


Fig. 1. Outline of hemoglobin structure.

함량, 9.0% 이상)을 얻기 위하여는 단백질 부분의 함량을 낮추어야 한다.

**Heme-iron의 생산공정과 Hemoglobin의 화학적 변화**

식품첨가물공전(1)의 규격에 명시된 고농도 헴철(원료에 함유한 헴철의 함량에 비하여 고농도로 농축됨)의 생산을 위한 공정은 원료인 헤모글로빈을 불활성화시키는 전처리 단계와 효소적 가수분해 단계, 분리단계, 건조 및 제품화 단계 등의 각 단위공정(Fig. 2)으로 나눌 수 있다(6). 여기서는 이들 단위 공정 중에서 중요한 단계인 효소적 가수분해 공정과 분리공정을 중심으로 기술하고자 한다. 각 단위 공정을 거치는 동안 헤모글로빈 분자의 화학적 변화는 Fig. 3에서와 같은 화학적 변화 과정(7)을 겪게 된다.

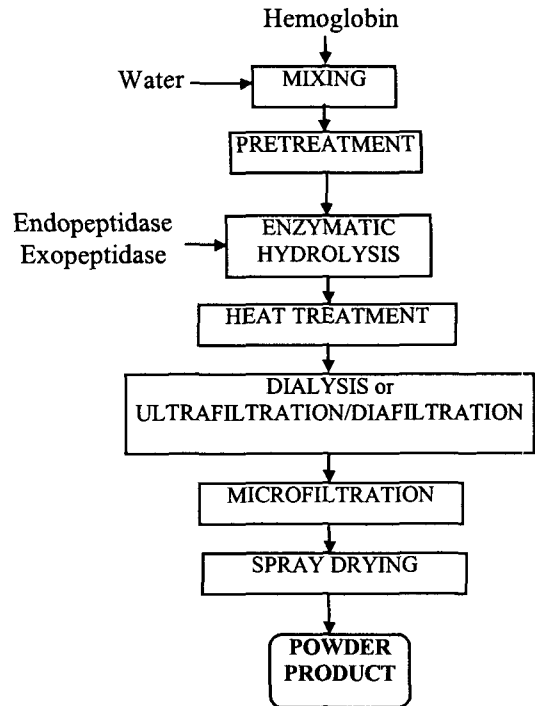


Fig. 2. Process diagram of the proposed enzymatic hydrolysis of hemoglobin (M.J. In et al., 2002).

**용어 및 공정인자**

본 논문에서 사용된 heme, heme iron, enriched heme iron, HEP(heme iron enriched peptide) 등의 용어는 “헴철”과 동일한 뜻으로 사용되었으며, 펩타이드(peptide, non-heme iron peptide, NHP)는 헤모글로빈 중 heme iron 이외의 단백질 부분을 말한다. 가수분해도(degree of hydrolysis, DH, %)가 헴철의 분리에 큰 영향을 미치므로 중요하게 다루어져야 한다. 또한 분리공정에서 펩타이드 또는 헴철의 잔존율(retention coefficient, 잔존헴철(또는

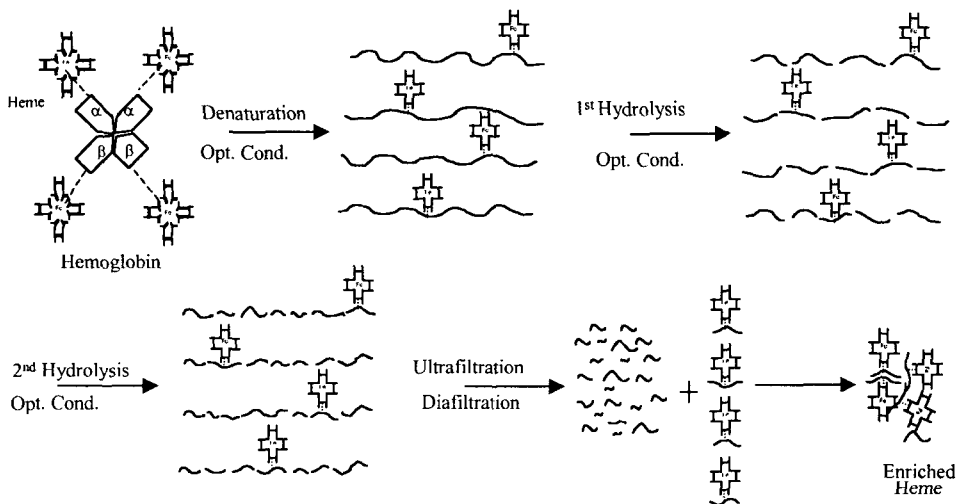


Fig. 3. The supposed chemical changes of hemoglobin during hydrolysis and heme separation (7).

펩타이드)/초기헴철(또는 펩타이드)이나 제거율이 중요 공정개선 자료가 된다. 또한 분리 후 잔존하는 공정시료의 헴철과 펩타이드의 비율(헴철/펩타이드, heme iron/peptide (H/P) ratio, %)은 가수분해된 저분자의 펩타이드의 제거에 의해 얼마나 고농도의 헴철로 농축되었나를 나타낸다.

### Hemoglobin의 가수분해 효소

헴철을 생산하기 위한 첫 단계는 헤모글로빈에 대한 효소작용이 용이하도록 헤모글로빈을 불활성화시킨 후 효소를 첨가하여 가수분해를 유도시키는 과정이다. 주요 공정 변수로는 효소의 종류와 농도, 원료의 농도, 효소반응 방법, 반응시간, pH, 온도 등이 되며, 획득하고자 하는 헴철의 함량(9~27%)에 따라서 반응조건 또는 가수분해도가 조절되어야 한다.

통상의 단백질 가수분해 실험에서 수행되는 사항이지만, 여러 종류의 상용화된 효소들의 분해활성을 비교하고 선정되어야 한다. 본 연구실에서는 다음 Table 1에 나타낸 바와 같은 효소들을 조사(8)한 후 덴마크의 NOVO사 제품인 Esperase를 헤모글로빈 분해효소로 선정하였다.

헤모글로빈의 가수분해에 사용할 단백질 분해효소를 선정하기 위하여 상용화된 10종(9종류는 endo형, Flavourzyme은 exo형)의 단백질 분해효소에 대한 활성을 조사하였다. 효소의 활성은 불활성화된 hemoglobin을 기질로 하여 각 효소의 최적반응 pH와 온도 구간에서 활성도와 비활성도를 측정하였다. 그 결과 Table 1에 나타낸 것처럼 Esperase의 비활성도가 2,761(U/mg protein)으로 endopeptidase들 중에서는 가장 높았으며, 반응 pH 조건이 7.5~10.0인 alkaline protease로 헤모글로빈을 가수분해한 경우 기질 단백질의 불활성화와 함께 효소반응이 용이하게 이루어졌다.

### Hemoglobin의 가수분해

#### 1단계 효소분해(9)

헤모글로빈의 가수분해에 의해 생성된 헴철 펩타이드와 비헴철 펩타이드 들은 소수성 결합으로 인해 응집되는 경향이 있으며, 이러한 경향은 가수분해도에 의해 영향을 받기 때문에 헴철의 선택적 분리를 위하여 적정 가수분해도(degree of hydrolysis, DH)를 유지하는 것이 중요하다. 단백질의 가수분해도는 AN/TN ratio, TCA index(10), osmometry(11), kinetic model(12) 등의 방법으로 측정할 수 있으며, 보편적으로는 TNBS법(13)이 많이 이용된다. Fig. 4에 효소의 종류와 사용방법을 달리하여 1단계 효소분해법으로 반응을 수행하면서 TNBS법과 osmometry법으로 가수분해도를 분석하여 나타냈다.

헤모글로빈을 가수분해하여 heme-iron을 얻기 위하여 endopeptidase인 Esperase를 이용하여 Esperase의 반응 pH 범위인 7.0~10.0에서 헤모글로빈을 가수분해하고

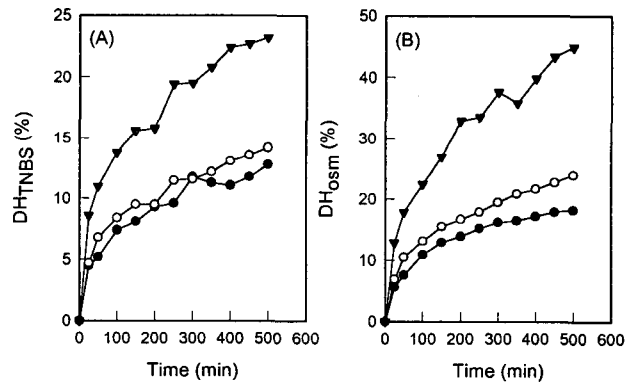


Fig. 4. Time courses of  $DH_{TNBS}$  (A) and  $DH_{osm}$  (B) of hemoglobin hydrolysis using different enzyme systems (Flavourzyme (●), Esperase (○), cotreatment of Esperase and Flavourzyme (▼)).

The hydrolysis conditions: 50°C and pH 7.5.

Table 1. Enzyme activities of commercial proteases

Enzyme	Optimum temperature	Optimum pH	Protein (mg/g enzyme)	Denatured hemoglobin	
				Activity (U/g enzyme)	Specific activity (U/mg protein)
Alcalase	55~70	6.5~8.5	135.5	93,930	693
Pacific NP	50	7.0	52.2	40,027	767
Collpulvin	50~70	5.0~7.5	85.2	104,654	1,228
Neutrase	45~55	5.5~7.5	117.9	18,548	157
Esperase	55~75	7.5~10.0	75.5	208,475	2,761
Pescalase	50~60	9.5~10.5	142.6	352,170	2,470
Protamex	35~60	6.0	103.3	119,247	1,154
Trypsin	45~55	7.0~8.5	576.7	684,839	1,188
Bromelain	50~60	4.5~5.5	840.5	325,220	387
Flavourzyme	45~50	7.0	125.7	33,773	269

TNBS법으로 가수분해도를 측정된 결과 pH가 증가함에 따라 가수분해도가 증가하여 pH 10.0에서 최대의 가수분해도를 보인다(14)(Fig. 5). 가수분해도가 낮으면 헤모글로빈의 가수분해물에서 펩타이드와 헴철부분 또는 펩타이드 간의 소수성 결합으로 인하여 헤모글로빈보다 분자량이 큰 응집물(aggregate)이 형성되므로 헴철을 분리하기가 곤란해진다.

단백질 분해효소 중에서 exopeptidase를 endopeptidase와 병용하면 DH를 증가시킬 수 있으므로, exopeptidase인 Flavourzyme을 Esperase와 병용하여 헤모글로빈을 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, 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 효소 반응에 어려움이 있다. Esperase와 Flavourzyme을 병용한 경우 헤모글로빈의 가수분해도는 한가지 효소만을 사용한 경우보다 약 2배 증가하였다.

1단계 효소분해에 의한 가수분해물을 투석한 결과(15)는 다음 Table 2와 같이 가수분해도에서는 처리간 큰 차이를 볼 수 있으나, 헴철/펩타이드 비율의 증가는 크지

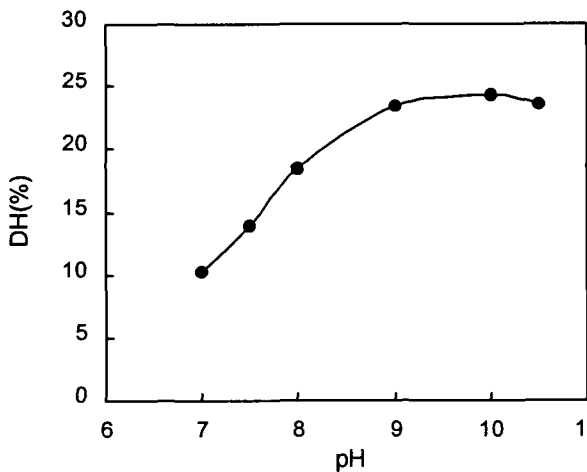


Fig. 5. Effect of pH on the hydrolysis of hemoglobin with Esperase.

Hydrolysis conditions: Hgb, 5%; Esperase, 1% (w/w, on protein base); temperature, 50°C; reaction time, 5 h.

않았다.

2단계 효소분해(6)

1단계 효소분해에서는 헤모글로빈의 가수분해도 향상을 위하여 exopeptidase인 Flavourzyme을 endo형인 Esperase와 병용하여 단일 효소 처리보다 높은 가수분해도를 얻었으나, 각각의 효소반응에는 최적조건이 될 수 없다. 최적조건 of 효소반응을 수행하기 위하여 각 효소를 단계적으로 첨가하여 반응시키는 2단계 효소분해를 실시하였다.

1단계 반응에서는 endo형 효소(Esperase)의 반응조건에서 수행하고, 2단계에서 exo형 효소(Flavourzyme)의 반응조건에서 수행하여 높은 가수분해도(Fig. 6)를 얻었으며, 헴철의 분리에도 좋은 효과(Table 3)를 보였다.

2단계 효소분해법에서 osmometry법으로 측정된 가수분해도는 Flavourzyme의 첨가량에 따라 증가하였다. 가수분해도를 측정하는 또 다른 방법 중의 하나인 AN/TN 비율에서도 유사한 가수분해도 증가를 Table 2에서 볼 수 있다.

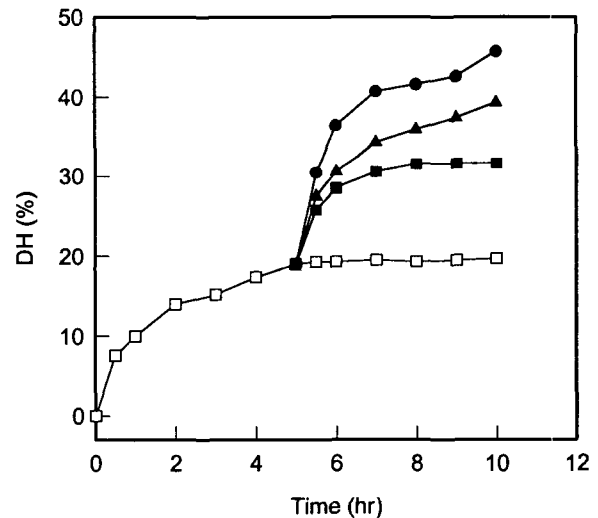


Fig. 6. Time courses of degree of hydrolysis during two-stage hydrolysis using Esperase and Flavourzyme.

(□) First hydrolysis condition: 50°C, pH 9.0, 1% Esperase, second hydrolysis condition: 50°C, pH 7.0, different concentration of Flavourzyme (■), 0.5% Flavourzyme; (▲), 1% Flavourzyme; (●), 2% Flavourzyme.

Table 2. Effects of enzyme treatment on heme/peptide ratio

Enzyme treatment (based on protein content)	DH (%) (TNBS method)	Heme content* (mg/mL)	Peptide content* (mg/mL)	Heme/Peptide (%)
Flavourzyme 1%	12.8	0.99	21.7	4.6
Esperase 1%	14.2	1.45	12.7	11.4
Esperase 1%+Flavourzyme 1%	23.2	1.56	11.1	14.1

\*After removal of the small NHP (non-heme peptide) in hydrolysate by dialysis against 25 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), heme and peptide concentrations of the retentate were measured.

Table 3. Degree of hydrolysis, retention coefficient and heme/peptide ratio after dialysis of hemoglobin hydrolysates by two stage enzyme reaction<sup>1)</sup>

Enzyme treatment (based on protein content)	DH (%) (as AN/TN (%))	Retention coefficient after dialysis <sup>2)</sup> (%)		Heme/Peptide (%)
		Peptide	Heme	
Esperase 1% (control)	10.9	13.8	85.9	16.3
Esperase 1% → Flavourzyme 0.5%	15.0	12.1	85.3	18.4
Esperase 1% → Flavourzyme 1%	17.3	11.6	87.8	19.7
Esperase 1% → Flavourzyme 2%	20.4	10.0	87.5	22.9

<sup>1)</sup>Hydrolysis was carried out for 10 h by a two-stage enzyme reaction; First hydrolysis condition: 50C, pH 9.0, 1% Esperase. Second hydrolysis condition: 50C, pH 7.0, different concentration of Flavourzyme.

<sup>2)</sup>Dialysis membrane: Spectra/Por membrane (MWCO 12-14,000 dalton).

가수분해가 완료된 분해액을 투석(dialysis)한 후 잔류물 중 헴철/펩타이드의 비율(헴철의 농축 정도를 나타냄)을 보면 가수분해도가 증가할수록 값이 커졌으며, Flavourzyme을 2% 처리한 경우가 대조군에 비하여 약 1.4배 높았다. 즉, 2단계 효소분해를 통하여 헴철/펩타이드 비율이 3.8%인 원료 헤모글로빈의 그 비율이 22.9%로 향상된 결과를 보여준다(Table 3).

### 헴철의 분리

헤모글로빈을 가수분해한 후 저분자화된 헴철분자와 불필요한 펩타이드가 생성된다. 헴철-펩타이드 복합체를 분리하는 방법으로는 한외여과법과 pH 조절에 의한 등전점 침전법이 있다. 한외여과법에 의해 분리된 헴철은 등전점 침전법에 비해 용해도가 높으며, 장내에서의 흡수율이

높은 것으로 알려져 있어, 미세막을 이용한 한외여과법이 선호되고 있다. 등전점 침전법(pH precipitation)과 투석막(dialysis membrane)을 이용한 막여과법을 비교하고자 한다.

### 등전점 침전법에 의한 헴철의 분리(14, 15)

Fig. 7에서 보는 바와 같이 특정 가수분해도의 헤모글로빈 가수분해물에서 비헴철 펩타이드는 거의 전 범위의 pH 구간에서 용해 상태로 존재하고, 헴철 펩타이드의 대부분은 pH 3~5 사이에서 침전되고 있음을 보여준다. 이 pH 구간이 헴철 펩타이드의 평균적인 등전점 pH이다. 이와 같은 헴철 펩타이드의 용해도는 가수분해도에 따라 달라지고 있음을 Fig. 8에서 볼 수 있다. 즉, 일정 pH 영역에서는 가수분해도에 따라 헴철의 용해도가 영향을 받고 있다.

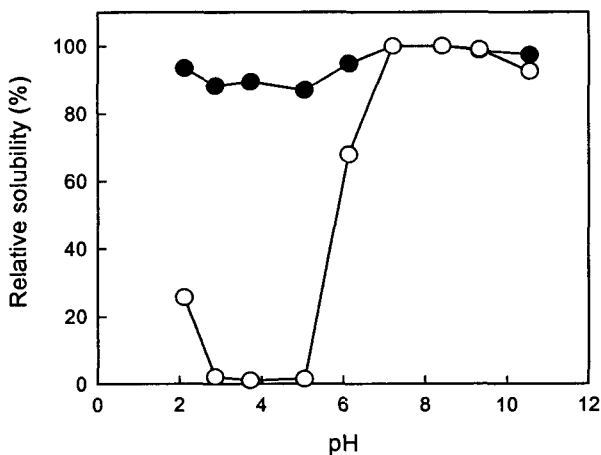


Fig. 7. Effects of pH on the relative solubility of NHP (●) and HEP (○) in hemoglobin hydrolysate.

The pH of the hydrolysate (DH, 19.8%) was adjusted to 2-11. After centrifugation at 3,000×g for 15 min, NHP (non-heme iron peptide) and HEP (heme iron enriched peptide) concentrations were assayed and are expressed as the heme and peptide contents, respectively, of the supernatant. Relative solubility is expressed as the amount of HEP or NHP solubilized at a given pH as a percentage of the initial amount in the hemoglobin hydrolysate.

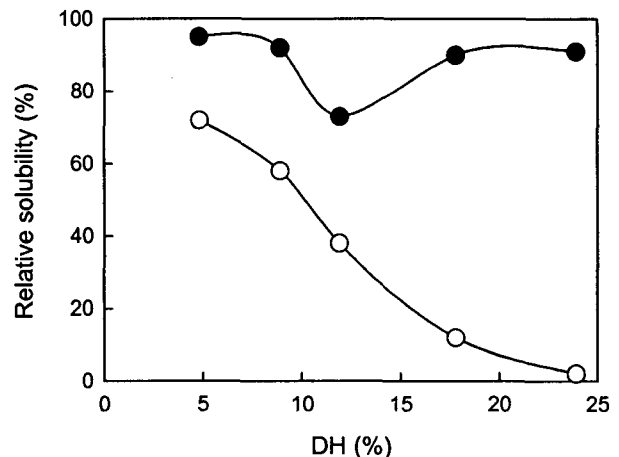


Fig. 8. Effects of degree of hydrolysis on the the relative solubility of NHP (●) and HEP (○) in hemoglobin hydrolysate.

The pH of hydrolysate was adjusted to 5. After centrifugation at 3,000×g for 15 min, NHP (non-heme iron peptide) and HEP (heme iron enriched peptide) concentrations were assayed and are expressed as the heme and peptide contents, respectively, of the supernatant. Relative solubility is expressed as the amount of HEP or NHP solubilized at pH 5 as a percentage of the initial amount in the hemoglobin hydrolysate.

가수분해도가 높은 헤모글로빈 가수분해물의 pH를 4~5로 조절할 경우 대부분의 헴철 펩타이드가 침전되었다.

헤모글로빈의 가수분해도를 달리한 가수분해액으로부터 헴철을 70% 이상 침전물로 회수되는 pH 영역에서 헴철/펩타이드 비율(HP ratio)을 Table 4에 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, 가수분해도가 높아질수록 헴철의 침전물 중으로의 잔존율은 증가하고 펩타이드의 잔존율은 감소하여 헴철/펩타이드 비율이 증가하였다. 가수분해도의 증가는 헴철에 결합된 펩타이드의 길이와 헴철과 상호작용하는 펩타이드 크기의 감소를 의미하므로 산성 pH 영역에서 헴철의 용해도 향상에 기여하는 펩타이드가 줄어들게 되고, 결국 용해도의 감소로 이어진다(15-17). 따라서 가수분해도가 증가하면 산성 pH에서 헴철의 잔존율이 증가하며 동시에 용해도가 낮아지는 구간이 산성쪽으로 이동하는 것으로 생각된다.

#### 막여과법에 의한 헴철의 분리(6, 16)

막여과법에서는 사용하는 막의 재질과 pore size가 중요하다. 재생된 셀룰로스 막이 단백질의 흡착을 최소화할 수 있기 때문에 단백질 계통의 성분을 분리하는 경우에 적합하다. 헴철의 분리에는 1~15 kDa의 pore size를 갖는 막을 사용하는 것이 적당하며, 15 kDa보다 큰 pore size를 갖는 막을 사용하면 헴철의 손실이 커서 수율이 낮아지는 단점이 있다. 투석막을 이용하여 수행된 실험에서 투석막의 pore size별 실험결과를 보면 Table 5와 같이 pore size가 대략 1~15 kDa에서는 크기가 클수록 헴철의 잔류비율

**Table 4. 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 5. Retention coefficient and ratio of heme and peptide after dialysis on various membrane pore sizes**

Membrane pore size (MWCO, dalton)	Retention coefficient (%)		Heme/Peptide (%)
	Peptide	Heme	
12-14,000	8.9	87.5	25.4
6-8,000	10.9	87.4	20.3
3,500	15.7	88.7	14.4
1,000	25.4	88.1	8.8

과 헴철/펩타이드 비율이 높게 나타났다. 본 실험에서 헴철의 분자량은 대략 1 kDa이었음(14)에도 불구하고 상기와 같은 결과를 보인 이유는 헴철분자 사이 또는 펩타이드 분자와의 다분자 응집체(17)를 형성하기 때문으로 생각된다.

단백질 분해효소로 헤모글로빈을 가수분해하여 헴철을 생산하는 경우 글로빈의 분해로 생성되는 peptide와 peptide, peptide와 heme기 사이의 소수성 결합으로 고분자 연합체가 생성(17)되기 때문에 peptide를 제거하여 heme iron의 함량을 높이기 어렵다. 헤모글로빈의 가수분해도가 각각 8%, 16%, 24%인 효소분해액을 pore size (MWCO, dalton)가 12~14 kDa인 투석막을 사용하여 투석한 후 heme iron의 회수율, peptide의 제거율과 헴철/펩타이드(HP ratio)를 조사하였다(Table 6). 가수분해도가 8%, 16%일 때 헴철의 회수율은 각각 94.0%, 96.1%로 유사하였으나, 24%인 경우에는 83.4%로 감소하였다. Peptide의 제거율은 헤모글로빈의 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 헤모글로빈의 가수분해도가 증가할수록 저분자 peptide로 분해되어 투석에 의한 제거가 용이하게 이루어지고, 헴철도 분자량이 작아지면서 소수성 상호작용(17)에 영향을 주어 투석에 의한 세출이 증가하는 것으로 사료된다. 상술한 결과들로부터 heme-iron의 분리효율은 헤모글로빈 가수분해액으로부터 peptide의 제거율에 좌우된다고 할 수 있다.

이외의 헴철의 분리에 영향을 미치는 인자들로써 가수분해액의 농도, 투석용액의 pH, 온도 등 여러 인자들이 있겠으나 여기서는 기술하지 않았다.

이렇게 가수분해된 헤모글로빈은 등전점 침전법이나 막여과법을 거쳐 특정 농도의 헴철을 함유하는 분리액을 얻으며, ultrafiltration과 정제수로 diafiltration을 실시하고 한외여과공정을 거친 고농도 헴철함유 공정물은 건조 공정으로 이송되어 제품화된다.

#### 분리방법에 따른 헴철의 품질(16)

투석막을 이용한 막분리법(membrane dialysis)으로 헴

**Table 6. Recovery of heme iron after dialysis of hydrolysate with different degree of hydrolysis**

Degree of hydrolysis (DH, %)	Heme recovery (%)	Peptide rejection (%)	Heme/Peptide ratio (%)
8	94.0	77.9	13.8
16	96.1	85.4	20.8
24	83.4	91.8	30.7

Table 7. Quality of heme iron product

Quality parameter	Methods	
	pH precipitation	Membrane dialysis
Peptide (%)	70.0	77.0
Heme iron (%)	27.1	21.7
Heme/Peptide ratio (%)	38.7	28.2
Yield <sup>1)</sup> (%) (heme iron/hemoglobin)	9.3	6.5

<sup>1)</sup>Ratio between raw hemoglobin and heme iron product.

철을 분리한 후 건조하여 소량의 시험제품을 얻은 후 등전점 침전법(pH precipitation)으로 얻었던 heme iron의 품질평가 지표(Table 7)들과 비교하였다.

등전점 침전법인 경우 생산된 제품의 헴철과 peptide의 함량은 각각 27.1%, 70.0%이었으며, 헴철/펩타이드 비율(HP ratio)은 38.7%며, 수율은 9.3%였다. 한편, 투석법의 가수분해액을 투석막의 pore size가 2~14 kDa인 투석막으로 분리하고 제품화한 시험제품의 헴철과 peptide의 함량은 각각 21.7%, 77.0%이었으며, 헴철/펩타이드 비율(HP ratio)은 28.2%, 수율은 6.5%로 등전점 침전법에 비하여 낮은 결과를 보였다. 투석법에서는 헴철과 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 iron이 등전점 침전법에 의해 분리한 heme iron보다 체내 이용율이 높다는 점에서 막분리법은 여전히 큰 장점을 갖고 있다.

### 결 론

헴철(heme iron)은 헤모글로빈(hemoglobin)에 함유되어 있는 성분으로 도축 혈액으로부터 분리, 정제하여 제조한다. 도축 혈액으로부터 글로빈(globin)의 분리 및 이용에 관한 연구는 국내에서도 많이 진행되어 왔지만, 헴철(heme iron)에 대한 연구는 미미하다. 우리나라는 도축 혈액의 활용도가 매우 낮은 실정으로 극소량만 이용되고, 대부분은 폐기처분되고 있으며, 헴철의 국내 공급량은 전부 수입에 의존하고 있다. 국내에서 생산되는 소·돼지의 도축 혈액량은 연간 약 50,000여 톤에 이르며, 혈액 중 단백질 함량이 18%에 이르는 고단백질 특성으로 인하여 폐수처리 비용이 다른 부산물에 비해 월등히 높아 문제가 되어 왔으며(18), 더욱이 재활용 가능한 부산물 자원이란 점에서 많은 연구가 진행되어 왔다. 국내에서 진행된 관련 연구를 간략히 소개하면, 도축 혈액의 재활용에 관한 연구(19), 도축 부산물로부터 단백질의 회수(20), 도축 단백질의 석시닐화(21), 도축 단백질의 섬유화와 이용(22), 돈혈로부

터 단백질의 분리에 관한 연구(23) 등이 보고되어 있으며, 도축 혈액 혈장 단백질의 특성 및 접착제로의 응용(24), 도축 혈액 단백질을 이용한 유산균체의 생산(25), 도축 혈액 으로부터 면역글로빈의 분리 및 정제(26), 면역단백질의 효과적인 분리(27), 도축 혈액 단백질로부터 ACE 저해 peptide의 생산(28) 등 도축 혈액 단백질의 산업적 이용과 생리활성 물질의 분리 등에 관한 연구들이 진행되어 왔다.

지금까지 많은 연구들이 도축 혈액에 풍부한 동물성 단백질의 개발을 위주로 진행되어 혈액세포로부터 글로빈을 분리할 때 생성되는 비단백질의 헴철(heme iron)은 부산물로 처리되었다. 그러나 생물학적 활성인자에 대한 관심 및 이용에 관한 연구가 활발해지면서 도축 혈액에 풍부한 헴철에 관한 폭 넓은 연구가 함께 진행되리라 기대한다.

### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 공주대학교 자원재활용 신소재 연구센터(RRC/NMR)의 지원에 의한 것입니다.

### 참 고 문 헌

1. 식품첨가물공전. 2002. 한국식품공업협회, 서울. p 895-896.
2. Ledward DA, Lawrie RA. 1984. Recovery and utilization of by-product proteins of the meat industry. *J Chem Technol Biotechnol* 4B: 223-228.
3. Carpenter CE, Mahoney AW. 1992. Contribution of heme and nonheme iron to human nutrition. *Crit Rev Food Sci Nutr* 31: 333-367.
4. Walter T, Hertrampf E, Pizarro F, Olivares M, Llaugno S, Letelier A, Vega V, Stekel A. 1993. Effect of bovine-hemoglobin-fortified cookies on iron status of school-children: a nationwide program in Chile. *Am J Clin Nutr* 57: 190-194.
5. Reizenstein P. 1980. Hemoglobin fortification of food and prevention of iron deficiency with heme iron. *Acta Med Scand* 629: 1-46.
6. In MJ, Chae HJ, Oh NS. 2002. Process development of heme-enriched peptide by enzymatic hydrolysis of hemoglobin. *Bioresource Technol* 84: 63-68.
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. Kang IK. 2003. A study on the production and separation of enriched heme-iron from hemoglobin. *MS thesis*, Kongju National University.
9. Chae HJ, In MJ, Kim DH, Kang IK, Oh NS. 2001. Rapid determination of degree of hydrolysis for hemoglobin by osmometry. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 44: 143-147.

10. Adler-Nissen J. 1986. *Enzymic hydrolysis of food protein*. Elsevier, London.
11. Adler-Nissen J. 1984. Control of the proteolytic reaction and level of bitterness in protein hydrolysis processes. *J Chem Technol Biotechnol* 32: 215-222.
12. Marquez MC, Vazquez MA. 1999. Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochem* 35: 111-117.
13. Adler-Nissen J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J Agric Food Chem* 27: 1256-1262.
14. Kang IK, In MJ, Oh NS. 2001. Conditions of hemoglobin hydrolysis and separation for the production of enriched heme-iron. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 44: 219-223.
15. In MJ, Kim DC, Chae HJ, Oh NS. 2003. Effects of degree of hydrolysis and pH on the solubility of heme-iron enriched peptide in hemoglobin hydrolysate. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 365-367.
16. Kang IK, In MJ, Oh NS. 2003. Separation of heme-iron by dialysis. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 46: 130-133.
17. Liu XQ, Yonekura M, Tsutsumi M, Sano Y. 1996. Physicochemical properties of aggregates of globin hydrolysates. *J Agric Food Chem* 44: 2957-2961.
18. Park HK, 15 authors. 1994. *The past and present of meat utilization: The science and Utilization of Meat*. Seon-Jin Publishers, Seoul. p 24-25.
19. Kim CH, Park GH, Ryu KS, Lee JH. 1997. Utilization of slaughter porcine blood as an animal feed. *Kor J Livestock Housing and Environment* 3: 133-143.
20. Song IS, Yoo IJ, Min BY, Song KW. 1984. Protein recovery from meat industry by-products. *Kor J Animal Sci* 26: 296-302.
21. Song IS, Yoo IJ, Kang TS, Song KW. 1984. Physicochemical properties and succinylation of protein isolates from meat industry by-products. *Kor J Animal Sci* 26: 288-295.
22. Song IS, Lee SH, Kang TS, Song KW. 1984. Spinning and utilization of blood plasma and protein isolates from meat industry by-products. *Kor J Animal Sci* 26: 303-309.
23. Kim YB, Kim KS, Yoo IJ, Lee SK, Kim SM. 1990. Studies on the quality of meat product made with blood protein. *Kor J Animal Sci* 32: 428-433.
24. Park EH, Lee HH, Song KB. 1996. Characterization of plasma proteins from bloods of slaughtered cow and pig and utilization of the proteins as adhesives. *Kor J Agric Chem Biotechnol* 39: 123-126.
25. Hyun CK, Shin HK. 1997. Utilization of animal blood proteins as nitrogen sources for the cultivation of lactic acid bacteria. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 25: 218-223.
26. Jeon KH, Lee HA, Yoo IJ. 1995. Production of immunoglobulin from animal blood. *Kor J Food Sci Ani Resour* 15: 237-243.
27. Choi IW, Lee HJ. 1997. An effective method of isolating immunoglobulins from bovine plasma proteins. *Kor J Food Sci Technol* 29: 1067-1070.
28. Hyun CK, Shin HK. 1999. Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from bovine blood plasma proteins. *Kor J Biotechnol Bioeng* 14: 600-605.