

미강 단백질 가수분해물로부터 Ca, Fe 결합된 peptide 제조

전소정 · 이지혜 · 송경빈*

충남대학교 식품공학과

Preparation for Calcium and Iron-binding Peptides from Rice Bran Protein Hydrolysates

So Jeong Jeon, Ji Hye Lee, and Kyung Bin Song*

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Republic of Korea

Received May 3, 2010; Accepted June 14, 2010

Calcium and iron binding peptides were prepared by enzymatic hydrolysis and ultrafiltration of rice bran protein (RBP), which was isolated from defatted rice bran by phytase and xylanase treatment and ultrasonication. The isolated RBP had a molecular weight in the range of 10-66 kDa. The extracted proteins were hydrolyzed using Flavourzyme for 6 hr. After ultrafiltration under 5 kDa as molecular weight, the peptides were fractionated into 4 peaks by Sephadex G-15 gel permeation chromatography, and each fraction was determined for calcium and iron binding activity. As the result, F1 and F2 fractions were the best candidate for calcium and iron chelation, respectively. These results suggest that the calcium and iron binding peptides can be used as functional food additives in food industry.

Key words: calcium-binding peptides, defatted rice bran protein, hydrolysates, iron-binding peptides

서 론

최근 건강에 대한 소비자의 관심으로 인해 식물성 단백질에 관한 관심이 증가하고 있고, 식품 가공용 식물성 단백질 소재로 대두 단백질이 많이 사용되고 있으나 식품 알레르기 가능성, 유전자 재조합 식품(GMO) 등의 문제가 있다. 반면에, 쌀은 한국 등 아시아에서 가장 많이 생산되는 곡물로서, 도정 후 부산물인 미강의 생산량은 쌀의 약 10%로 추정되는데 현재 일부만이 미강유 생산, 동물용 사료, 버섯 재배용 배지 등의 용도로 활용되고 대부분은 폐기되고 있다[Jiamyangyuen 등, 2005]. Hernandez 등[2000]은 미강 중, 수분 9.0%, 당질 48.3%, 단백질 13.4%, 지방 15.2%, 섬유소 6.5%가 함유되었다고 보고하였는데, 평균적으로 미강 단백질은 전체 미강의 12~15% 정도를 차지하고 알레르기가 적으며 lysine 등 필수 아미노산의 함량이 우수하다[Wang 등, 1999; Parrado 등, 2006]. 미강 단백질에 관한 연구로는 emulsifying activity, stability 등 기능에 관한 연구[Wang 등, 1999; Cao 등, 2009]가 많이 진행되었으나 낮은 solubility와 phytate(1.7%)와 fiber의 함량(12%)이 높아 상업적인

이용이 제한되어 왔다[Juliano, 1985].

한편 미네랄 중 칼슘은 인체에서 뼈, 치아의 구성요소이고 신체 조절 기능을 하는 영양소로서, 골다공증, 고혈압, 비만 등의 질병과 관련이 있다고 보고된 바 있다[Singh와 Muthukumarappan, 2008]. 대부분의 calcium은 소장에서 흡수되는데 그 형태와 함량에 따라 선택적으로 흡수된다[Bass와 Chan, 2006]. 그리고 철분의 경우, 십이지장에서 흡수되는데 cytochrome과 일부 효소의 구조와 연관이 있고 산소의 수송을 담당하는 헤모글로빈과 미오글로빈의 중요 구성요소이다[Benito와 Miller, 1998]. 특히 철분이 결핍될 경우 심각한 빈혈을 초래할 수 있으며, 심할 경우 iron deficiency anemia (IDA)와 같은 결핍증이 발생하여 피로, 두통, 현기증 등이 일어날 수 있으며 특히 성장기 어린이는 주의력 및 학습능력의 저하가 일어날 수 있다[Schumann 등, 2007]. 현재 칼슘과 철분은 정제 형태로 대부분이 무기염류 형태로 섭취되고 있지만 장내 pH나 phosphate, oxalic acid, phytic acid, 섬유소 등에 의해 흡수가 저해되고 또한 음이온 물질과 결합하여 흡수가 불가능한 물질로 변형되기 쉬운 단점이 있다[Lee와 Song, 2009]. 따라서 이러한 문제점을 인식해서 최근에는 무기염류 형태가 아닌 peptide나 protein에 chelate된 형태로써 체내에서 흡수와 안전성을 증대시키는 연구가 보고되었다[Silva와 Malcata, 2005; Miquel과 Farre, 2007]. 특히, chleate source로써 casein[Silva와 Malcata, 2005], porcine blood plasma protein[Lee와 Song, 2009], whey protein[Peng

*Corresponding author
Phone: +82-42-821-6723; Fax: +82-42-825-2664
E-mail: kbsong@cnu.ac.kr

등, 2010] 가수분해물 등이 연구되어왔다.

따라서 기존의 철분이나 칼슘제재를 대체하고자 본 연구에서는 저렴하고 쉽게 활용 가능한 새로운 식물성 단백질원으로써 미강 단백질을 추출하고 가수분해하여 칼슘과 철분을 chelate하여 얻어진 bioactive peptides를 분리함으로써, 향후 기능성 식품 소재 활용을 위한 기초연구로써의 연구결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료. 본 실험에 사용된 탈지미강은 (주)세립현미에서 제공 받아 사용하였다.

탈지미강 단백질의 추출. 탈지미강 단백질의 추출은 Wang 등 [1999]의 방법을 변형하여 수행하였다(Fig. 1). 탈지미강 100 g을 10배의 deionized water에 용해시킨 후, phytase와 xylanase를 첨가하여 pH 5.0, 55°C에서 2시간 동안 교반하여 단백질과 결합되어 있는 섬유질을 분리하고, 반응시킨 용액은 ultrasonicator(Model-GE 750, Sonics&Materials, Newtown, CT, USA)를 사용하여 남아있는 단백질을 분리시키고 pH를 조정하여 효소를 불활성화 시켰다. 단백질과 불용성 섬유질을 분리하기 위하여 원심 분리한 후 얻어진 상등액의 pH를 조정하여 단백질을 침전시키고, 침전된 단백질은 원심 분리하여 회수한 후 deionized water를 첨가하고 pH 7.0으로 조정한 후 동결 건조하였다.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. SDS-PAGE는 Laemmli[1970]의 방법을 따라 실시하였으며 15% separating gel과 5% stacking gel을 사용하였다. 표준 분자량 marker는 lysozyme(14.4 kDa), trypsin inhibitor(21.5 kDa), carbonic anhydrase(31 kDa), ovalbumin(45 kDa), bovine serum albumin

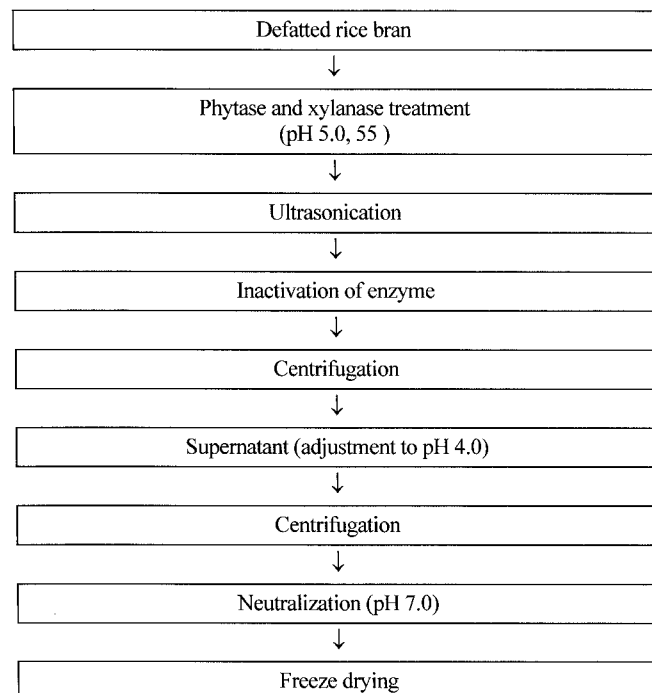


Fig. 1. Procedure for extraction of rice bran protein.

(66.2 kDa), phosphorylase b(97 kDa)을 사용하였다.

가수분해물의 제조. 미강단백질의 가수분해는 Lee와 Song[2009]의 방법에 따라 실시하였다. 동결건조된 미강단백질을 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 5%(w/v)가 되도록 용해시켜 제조한 후 4,500×g에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 취해 가수분해를 위한 기질로 사용하였다. 단백질 가수분해 효소로는 Flavourzyme(*Aspergillus oryzae*, activity 500 LAPU/g protein)을 기질대비 50:1의 비율로 첨가하여 shaking incubator에서 50°C에서 8시간 동안 가수분해를 실시하였다. 가수분해 종료 후 효소 반응을 정지시키기 위해 90°C에서 5분간 가열하여 효소를 불활성화 시킨 후 4,500×g에서 20분 동안 원심분리하여 얻어진 상등액을 Pellicon XL(Millipore Co., Billeica, MA, USA)을 이용하여 한외여과하여 molecular weight 5,000 Da 이하만을 취한 후 동결건조 하였다.

Peptide의 분획. 미강단백질 가수분해물은 gel permeation chromatography(1.5 cm×100 cm)를 이용하여 분자량의 크기에 따라 분리하였다. Column 충전물은 Sephadex G-15를 사용하였으며 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 0.4 mL/min의 유속으로 분획하였다. 분획된 시료는 214 nm에서 흡광도를 측정하여 검출하였다. 분리된 각각의 fraction에 대해 칼슘, 철분에 대한 결합능과 펩타이드 농도를 측정하였다.

Peptide 함량 측정. Trinitrobenzensulfonic acid(TNBS) method [Eklund, 1976]를 이용하여 available amino group 함량을 측정하였다. 시료에 1 M sodium borate buffer(pH 9.2)를 첨가한 후 5 mM trinitrobenzensulfonic acid와 혼합하여 실온에서 30분 동안 반응시킨 후 18 mM sodium sulfite(Na_2SO_3)와 2 M monobasic sodium phosphate(NaH_2PO_4)를 첨가하여 반응을 정지시키고 spectrophotometer를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정함으로써 peptide 함량을 계산하였다.

Ca, Fe binding capacity 측정. 시료를 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 용해시킨 뒤, 2.5 mM calcium chloride(CaCl_2)와 ferrous chloride(FeCl_2)를 첨가하여 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 침전물을 제거하기 위해 4,500×g에서 20분간 원심분리 하여 얻어진 상등액으로 칼슘함량은 ortho-cresolphthalein complexone을 이용한 colorimetric method [Gitelman, 1967]로 측정하고, 철분함량은 ortho-phenanthroline을 이용한 colorimetric method[Harris, 1996]로 측정하였다.

통계처리. 모든 실험은 3회 반복하여 측정하였고, 그 결과는 평균값±표준편차로 나타냈으며 통계적 분석은 SAS(Statistical Analysis System program, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 이용하여 각 처리구 간의 유의성($p < 0.05$)검증을 위해 분산분석(analysis of variance, ANOVA) 후 Duncan's multiple range test로 다중비교를 실시하였다.

결과 및 고찰

미강 단백질 분자량 특성. 탈지미강으로부터 추출한 단백질의 SDS-PAGE 경우, 단백질의 분자량은 10~66 kDa으로 분포하였는데(Fig. 2), 기존 문헌에서도 미강의 주요 단백질은 albumin, globulin, glutelin, prolamin으로 이루어져 10~66 kDa

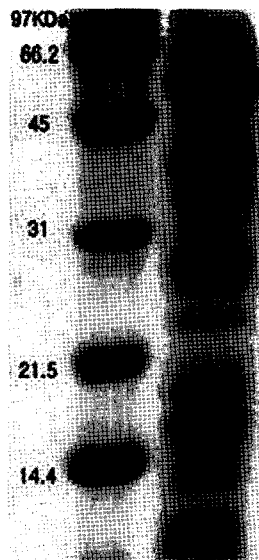


Fig. 2. SDS-PAGE pattern of defatted rice bran protein. Lane 1, standard marker; lane 2, defatted rice bran protein

까지 다양한 분자량으로 분포되어 있다고 보고되어서[Adebiyi 등, 2009; Chanput 등, 2009], 본 연구에서 추출된 미강단백질 역시 일치함을 알 수 있었다.

미강단백질 가수분해물 제조. 추출된 미강단백질을 Flavourzyme에 의해 8시간까지 가수분해하여 각 시간마다 TNBS assay로 peptide 함량을 측정된 결과, 가수분해 시간이 증가함에 따라 available amino group concentration이 증가하였다(Fig. 3A). 가수분해 전에 available amino group 농도는 2.857 ± 0.352 mM 이었지만 가수분해가 시작되고 1시간 후에는 9.724 ± 0.469 mM을 나타내었고 8시간 후에는 17.345 ± 0.244 mM을 보였다. 가수분해를 시작한 2시간 후에 50% 정도가 분해되었고 6시간 후에는 분해율이 급격히 줄어들었기에 최적 가수분해 시간을 6시간으로 설정하였다.

미강 단백질의 가수분해 정도를 분석하기 위해 SDS-PAGE를 실시한 결과(Fig. 3B), 가수분해 시간이 증가하면서 미강단백질의 분자량이 10 kDa 이하로 감소함을 확인할 수 있었는데, 이것은 가수분해시간이 증가하면서 단백질이 가수분해 되어 저분자량 펩타이드 양이 증가함을 보여주는 것이다. 그러나 55 kDa와 40 kDa의 일부 단백질의 경우 가수분해 시간이 증가해도 단백질의 분해가 진행되지 않았는데, 이것은 미강에서 유지를 추출할 때 높은 압력과 온도에 의해 미강단백질이 변성됨에 따라서 가수분해가 잘 이루어지지 않은 것으로 판단된다.

미강단백질 가수분해물의 Ca, Fe binding activity. 미강단백질 가수분해물은 deamination이 일어나 negative charge를 띄기 쉽기 때문에 칼슘이나 철분과 같은 divalent metal ion과 반응하기 쉽다[Hamada, 2000]. 따라서 가수분해물 중에서 분자량이 작은 peptide가 binding시키는 activity가 높고 또한 체내 활용과 흡수가 더 높기에, 본 연구에서는 5 kDa 분자량 이하로 가수분해물을 한외여과 하였다. Flavourzyme에 의해 얻어진 가수분해물은 한외여과 후 gel filtration chromatography를 사용하여 분석을 실시하였는데 elution 결과 4개의 major peak를 얻었다

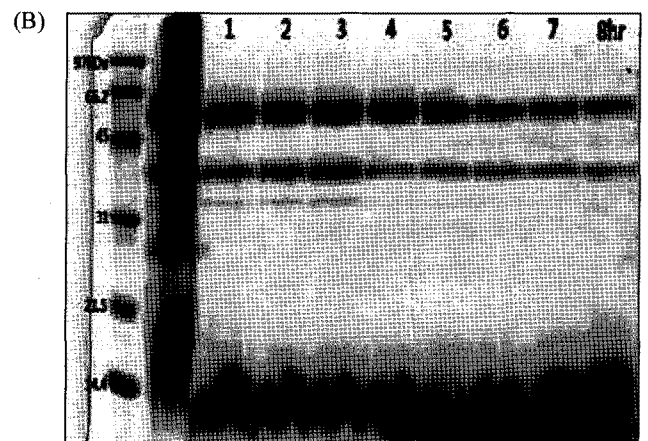
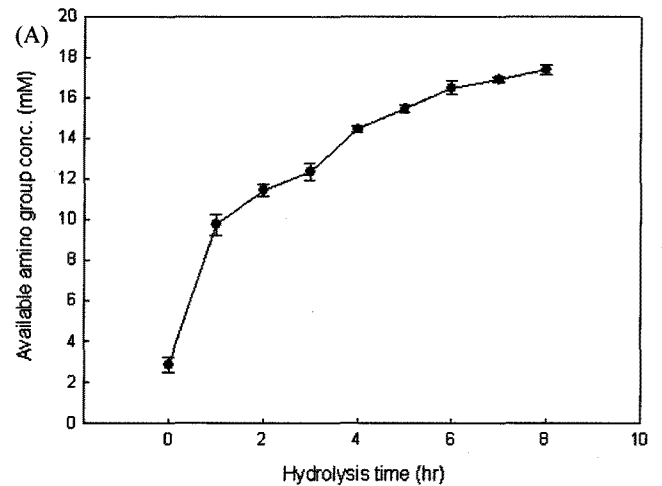


Fig. 3. Effect of hydrolysis time on the available amino group concentration of rice bran protein hydrolysates (A) and SDS-PAGE profile (B).

(Fig. 4). 또한 각 fraction에 calcium chloride와 iron chloride를 첨가하여 칼슘과 철분의 binding activity와 trinitrobenzensulfonic acid(TNBS) assay를 이용하여 peptide 함량을 측정 한 결과 (Table 1), 각 fraction 별 peptide 함량의 차이는 없었지만 fraction F1과 F2에서 0.032 mM로 가장 많은 함량을 나타내었다. 또한 칼슘 함량의 측정 결과 F1에서 0.0203 ± 0.0005 mM, F2는 0.0155 ± 0.0003 mM, F3은 0.0178 ± 0.0005 mM, F4에서는 0.0155 ± 0.0005 mM이 측정되어 F1이 가장 높은 값을 나타내었다. 철분 함량의 측정 결과 F2에서 철분 함량이 0.0096 ± 0.0002 mM로 가장 많은 것으로 확인되었다. Ca/peptide와 Fe/peptide는 각각 F1에서 0.634, F2에서 0.3 mM로 가장 큰 함량을 보였다.

따라서 F1과 F2에서 칼슘, 철분의 binding activity가 가장 높은 것으로 확인되었는데, 이것은 저분자량 peptide의 amino acid 중에서 특히, Asp, Glu, His에 의해 영향을 받아 binding activity가 다른 fraction에 비해 높았을 것이라고 추측되는데[Lee와 Song, 2009], 향후 peptide sequence 등의 연구가 진행된다면 보다 명확해 질 수 있다고 판단된다.

Ca, Fe binding peptide의 식품에의 적용. 칼슘과 철분과 같은 무기질은 peptide에 binding 되면 염의 형태로 섭취할 때 보다 안정하며 체내 흡수 및 이용률이 높다는 장점이 있어[Lee와

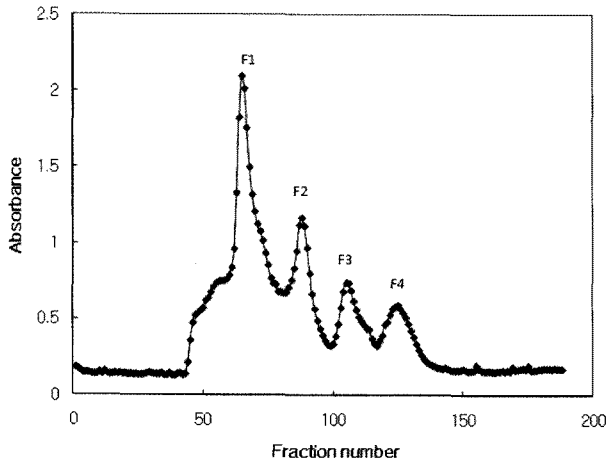


Fig. 4. Elution profile of rice bran protein hydrolysates from Sephadex G-15. Void volume of the column was 80 mL and exclusion limit was 1,500 Da. The absorbance was measured at 214 nm.

Song, 2009], 본 연구에서 얻어진 F1과 F2 fractions는 각각 칼슘과 철분 binding된 biomineral 소재로의 활용이 가능하다고 판단된다. 또한 추출된 미강단백질을 Flavourzyme으로 가수분해하여 얻은 미강단백질 가수분해물은 본연의 미강단백질 보다 solubility, emulsifying property가 증가하여 dressing, coffee whitener, beverage 등 식품가공 분야에 다양하게 사용할 수 있고, 또한 debittering agent나 flavor enhancer 등 식품 첨가물로써 사용될 수 있다고 판단된다[Hamada, 2000].

초 록

탈지 미강으로부터 미강단백질을 추출하고 상업용 단백질분해 효소로 가수분해하고 환외여과하여 얻어진 미강단백질 가수분해물을 Sephadex G-15로 분리하여 얻어진 peptide fraction에 칼슘, 철분을 binding하여 칼슘, 철분 함유 peptide를 제조하였다. 추출된 탈지 미강 단백질의 분자량은 10~66 kDa에 분포하고 있었다. 추출된 단백질을 Flavourzyme으로 가수분해 시, 최적 가수분해 시간은 6시간이었으며, 5 kDa 이하로 환외여과하여 얻어진 peptide를 Sephadex G-15로 분획한 결과 4개의 major peak를 얻었는데, 각 fraction의 칼슘, 철분을 binding한 결과 Ca/peptide는 F1에서, Fe/peptide는 F2에서 가장 많은 함량을 나타내었다. 본 연구 결과 얻어진 칼슘, 철분 binding peptide는 biomineral 기능성 식품의 소재로써 식품산업에 활용될 수 있다고 판단된다.

Key words: calcium-binding peptides, defatted rice bran protein, hydrolysates, iron-binding peptides

감사의 글

본 연구는 율촌재단의 지원에 의해 이루어진 것으로 감사를 드립니다.

참고문헌

- Adebiyi AP, Adebiyi AO, Hasegawa Y, Ogawa T, and Muramoto K (2009) Isolation and characterization of protein fractions from deoiled rice bran. *Eur Food Res Technol* **228**, 391-401.
- Bass J and Chan G (2006) Calcium nutrition and metabolism during infancy. *Nutrition* **22**, 1057-1066.
- Benito P and Miller D (1998) Iron absorption and bioavailability: an updated review. *Nutr Res* **18**, 581-603.
- Cao X, Wen H, Li C, and Gu Z (2009) Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenic rice protein. *J Cereal Sci* **50**, 184-189.
- Chanput W, Theerakulkait C, and Nakai S (2009) Antioxidative properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. *J Cereal Sci* **49**, 422-428.
- Eklund A (1976) On the determination of available lysine in casein and rapeseed protein concentration using 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) as a reagent of free α -amino group of lysine. *Anal Chem* **70**, 434-439.
- Gitelman HJ (1967) An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens. *Anal Biochem* **18**, 521-531.
- Hamada JS (2000) Characterization and functional properties of rice bran proteins modified by commercial exoproteases and endoproteases. *J Food Sci* **65**, 305-310.
- Harris DC (1996) Quantitative chemical analysis, pp 804. Freeman and Company, New York, NY, USA.
- Hernandez N, Rodriguez-Alegria ME, Gonzalez F, and Lopez-Munguia A (2000) Enzymatic treatment of rice bran to improve processing. *J Am Oil Chem Sci* **77**, 177-180.
- Jiamyangyuen S, Srihesdaruk V, and Harper WJ (2005) Extraction of rice bran protein concentrate and its application in bread. *Songklanakar J Sci Technol* **27**, 55-64.
- Juliano BO (1985) Rice Bran. In: Rice Chemistry and Technology. pp 647-687. American Association of Cereal Chemists Inc., St Paul, MN, USA.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-

Table 1. Ca/peptide and Fe/peptide concentration for GPC fraction

Fraction	Ca (mM)	Fe (mM)	Peptide (mM)	Ca/peptide	Fe/peptide
F1	0.0203±0.0005 ^a	0.0076±0.0002 ^c	0.032±0.003 ^a	0.634	0.237
F2	0.0155±0.0003 ^c	0.0096±0.0004 ^b	0.032±0.002 ^a	0.484	0.300
F3	0.0178±0.0005 ^b	0.0060±0.0002 ^d	0.029±0.001 ^a	0.613	0.206
F4	0.0155±0.0005 ^c	0.0029±0.0001 ^a	0.028±0.002 ^a	0.553	0.103

¹⁾GPC(Gel permeation chromatography).

²⁾Means in the same column followed by different letters are significantly ($p<0.05$) different by Duncan's multiple range test.

- 685.
- Lee SH and Song KB (2009) Purification of an iron-binding nonapeptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein. *Process Biochem* **44**, 378-381.
- Miquel E and Farre R (2007) Effects and future trends of casein phosphopeptides on zinc bioavailability. *Trends Food Sci Technol* **18**, 139-143.
- Parrado J, Miramontes E, Jover M, Gutierrez JF, Collantes de Teran L, and Baurista J (2006) Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. *Food Chem* **98**, 742-748.
- Peng X, Kong B, Xia X, and Liu Q (2010) Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with alcalase. *Int Dairy J* **20**, 360-365.
- Schumann K, Ettle T, Szegner B, Elsenhans B, and Solomons NW (2007) On risks and benefits of iron supplementation recommendations for iron intake revisited. *J Trace Elem Med Bio* **21**, 147-168.
- Silva SV and Malcata FX (2005) Caseins as source of bioactive peptides. *Int Dairy J* **15**, 1-15.
- Singh G and Muthukumarappan K (2008) Influence of calcium fortification on sensory, physical and rheological characteristics of fruit yogurt. *LWT-Food Sci Technol* **41**, 1145-1152.
- Wang M, Hettiarachchy NS, Qi M, Burks W, and Siebenmorgen T (1999) Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *J Agric Food Chem* **47**, 411-416.