

ORIGINAL ARTICLE

## Isolation of Iron and Calcium-Binding Peptides from Cottonseed Meal Protein Hydrolysates

Dong-Won Choi · Nam-Ho Kim · Kyung Bin Song\*

### 면실박 단백질로부터 가수분해물 제조 및 철분, 칼슘 결합 펩타이드의 분리

최동원 · 김남호 · 송경빈\*

Received: 13 July 2012 / Accepted: 15 October 2012 / Published Online: 31 December 2012  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2012

**Abstract** Isolation of iron and calcium-binding peptides derived from cottonseed meal protein (CMP) hydrolysates was investigated. The degree of hydrolysis of CMP by Flavourzyme was monitored using trinitrobenzenesulfonic acid method and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Enzymatic hydrolysis of CMP for 12 h was sufficient for the preparation of CMP hydrolysates, and the hydrolysates were membrane-filtered under 3 kDa as a molecular weight. The filtered solution was fractionated using Q-Sepharose fast flow, Sephadex G-15, and reversed phase-high performance liquid chromatography for iron and calcium-binding peptides. As a result, F51 fraction was obtained as the best candidate for calcium and iron chelation, and the isolated iron and calcium-binding peptides can be used as functional food additives, similar to iron and calcium supplements.

**Keywords** calcium · cottonseed meal protein · hydrolysates · iron · peptide

### 서 론

면실박은 높은 함량의 단백질을 함유하고 있고 또한 우수한 아미노산 구성을 가지고 있어 영양학적 가치가 높다(Zhang 등, 2009). 면실은 70개국 이상에서 약 3300만 톤 정도 생산되고

있고, 대두 단백질에 이어 2번째로 중요한 식물성 단백질로 알려져 있다(Marquie와 Guilbert, 2002). 특히, 면실의 부산물인 면실박은 단백질 함량이 45%에 달하기 때문에 활용가치가 높은 반면에, 독성성분인 고시풀 때문에 식품으로써 소비가 꺼려져 수경재배나 가축의 사료로만 이용되고 있는 실정이다(Yue와 Zhou, 2008; Gui 등, 2010). 그러나 고시풀을 제거하는 연구가 수행되었기에(Kuk 등, 2005; Zhang 등, 2009), 면실박 단백질을 이용한 고부가가치 유용물질의 생산에 관한 연구가 가능하게 되었다.

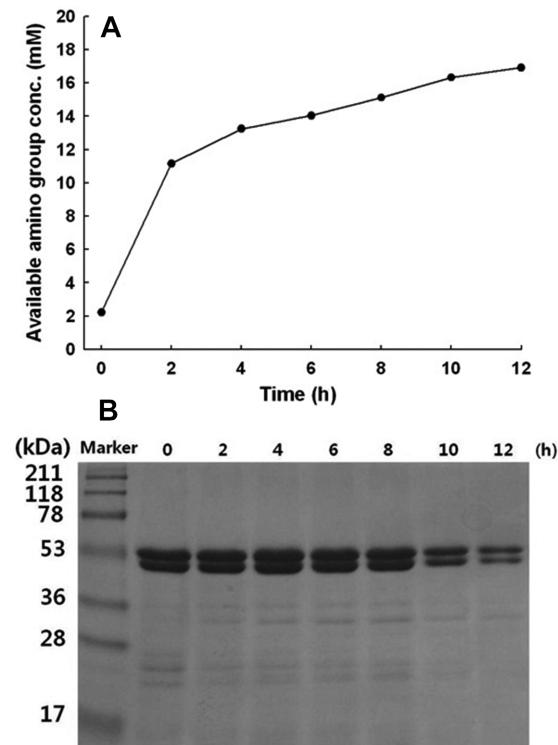
철분은 전 세계 인구의 약 1/5이 결핍증을 가지고 있어 영양학적으로 매우 중요한 미네랄이다(Lee와 Song, 2009a). 철분이 결핍되면 빈혈을 초래할 수 있고, 또한 iron deficiency anemia와 같은 결핍증이 발생하여 피로, 두통, 현기증, 학습능력 저하가 발생할 수 있다(Schumann 등, 2007). 그리고 칼슘은 성장기 어린이의 골격 형성과 중년층의 골다공증과 관련이 있고, 심기능, 근수축, 신경계 등에도 영향을 미친다(Jin 등, 2011). 철분은 주로 십이지장에서 흡수되고 칼슘은 소장에서 흡수되는데, 유통되는 대부분의 철분과 칼슘 제제는 정제형태인 무기염류로 섭취되고 있어 체내에서 흡수가 낮은 단점을 가지고 있다(Lee와 Song, 2009b). 따라서 이러한 문제점을 보완하기 위하여 철분과 칼슘의 체내에서의 흡수율을 높이고 안정성을 갖게 하기 위한 방법으로써 펩타이드에 chelate하여 흡수율을 높이는 방법이 사용된다(Shahidi와 Zhong, 2008). 현재까지 가장 연구가 많이 진행된 우유 단백질이 bioactive 펩타이드의 주요 자원이나(Dziuba 등, 1999), 저가의 식물성 단백질의 가수분해를 통하여 bioactive 펩타이드를 얻을 수 있다(Srinivas와 Prakash, 2010).

그러므로 본 연구에서는 저활용되고 있는 면실의 부산물인 면실박 단백질을 이용하여 철분과 칼슘을 chelate하는 bioactive 펩타이드를 분리하여 철분, 칼슘 제제 같은 새로운 기능성 식품 소재로 활용하고자 한다.

D.-W. Choi · N.-H. Kim · K.B. Song  
Department of Food Science & Technology, Chungnam National University,  
Daejeon 305-764, Republic of Korea

\*Corresponding author (K.B. Song: kbsong@cnu.ac.kr)

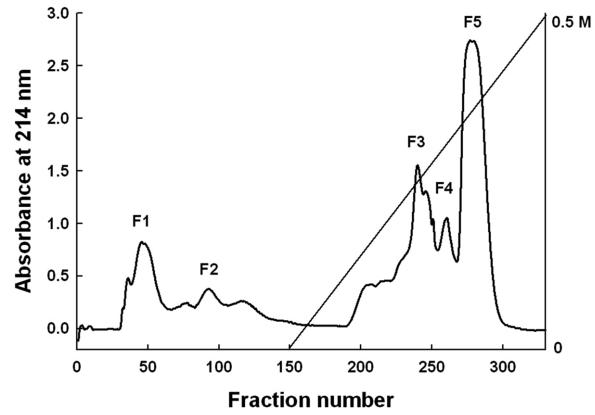




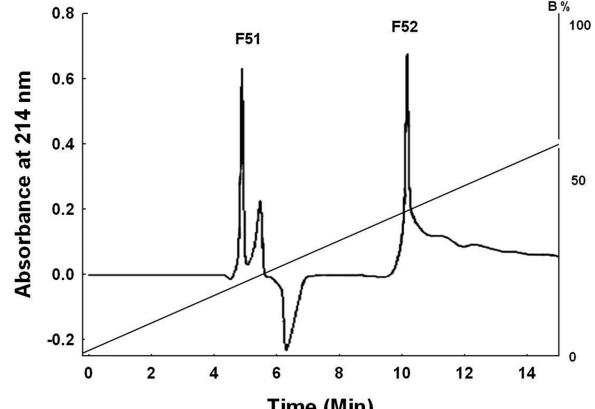
**Fig. 1** (A) Effect of hydrolysis time on the available amino group concentration of cottonseed meal protein hydrolysates. (B) Effect of hydrolysis time on the SDS-PAGE profile of cottonseed meal protein hydrolysates.

**면실박 단백질 가수분해물로부터 철분, 칼슘 결합 펩타이드 분리.** Flavourzyme에 의해 가수분해된 면실박 단백질 가수분해물을 Fe, Ca과 결합된 펩타이드 소재로 활용하기 위해서, 먼저 가수분해물의 한외여과를 통하여 분자량이 일정 크기 이하가 되도록 하였다. 한외여과로부터 단백질 가수분해물에 존재하는 고분자 물질이나 남아있는 효소들로부터 분리시켜 작은 분자량의 펩타이드를 얻을 수 있는데, 기존 연구에 따르면 금속 결합 펩타이드의 경우 3~20개의 아미노산으로 이루어진 작은 크기의 펩타이드가 체내에서 흡수율과 이용률이 높다고 보고되었기 때문에, 3 kDa 이하로 한외여과를 하였다(Korhonen과 Pihlanto, 2003; Megias 등, 2007). 한외여과 된 면실박 단백질 가수분해물은 이온교환크로마토그래피를 사용하여 분획하였다. Fe와 Ca을 결합시키기 위해서는 음전하를 띠는 펩타이드가 더 결합하기 쉽기 때문에 anion exchanger로 분리하였다(Vegarud 등, 2000). 용출 결과 5개의 major peak를 얻었고(Fig. 2), 각 분획의 peptide 양에 대한 Fe와 Ca이 결합된 정도를 비교한 결과, Fe와 Ca 모두 분획 5에서 가장 높았다(Fe, 0.002 mM; Ca, 0.012 mM). 따라서 분획 5를 동결건조 한 후 Sephadex G-15를 이용하여 염을 제거한 후, reversed-phase HPLC를 이용하여 펩타이드를 더 분획하였다(Fig. 3). 그 결과, 2개의 major peak로 분리되었고 Fe, Ca의 chelate 결합력을 측정하였더니 F51이 더 높은 값을 나타내었다(Table 1).

Mineral-carrying 펩타이드는 미네랄과 결합하여 소장에서의 흡수를 증진시키며 또한 체내에서 안정성을 갖는다(Korhnen과 Pihlanto, 2006). Silva와 Malcata (2005)에 의하면 phosphopeptide



**Fig. 2** Elution profile of cottonseed meal protein hydrolysates from ion exchange chromatography. The absorbance was measured at 214 nm.



**Fig. 3** Elution profile of reversed-phase HPLC. The absorbance was measured at 214 nm.

**Table 1** Fe and Ca-binding activity for the fractions from reversed-phase HPLC

Mineral	Fraction	Mineral concentration (mM)	Peptide concentration (mM)	Mineral/Peptide
Fe	F51	0.027±0.002	0.039±0.001	0.70
	F52	0.028±0.001	0.042±0.001	0.66
Ca	F51	0.030±0.001	0.035±0.001	0.85
	F52	0.018±0.001	0.035±0.001	0.51

에 결합한 철분은 흡수를 방해하는 고분자량의 ferric hydroxides의 형성을 막아준다고 보고하였다. 한편 무기염류 형태의 철분과 칼슘은 장내 pH, phosphate, oxalic acid, phytic acid 등에 의해 흡수가 저해되거나 다른 음이온 물질과 결합하여 흡수가 감소한다(Jeon 등, 2010). 이러한 방해요소로부터 철분과 칼슘이 체내에서 보다 안정한 형태로 흡수되기 위해서는 펩타이드와 결합해야 되는데, Meisel (1998)에 따르면 아미노산의 side chain에 음전하와 인산기가 미네랄을 결합할 수 있고, 특히 아미노산 중 음전하를 띠는 Glu와 Asp가 미네랄의 결합에 가장 큰 영향을 미친다고 보고하였다. Lee와 Song (2009a; 2009b)은 단백질 구성 아미노산 중 Asp, Glu, Gly, Lys<sup>o</sup> Fe과 Ca의 결

