

연구노트

Isolation of Calcium-Binding Peptides from Barley Protein Hydrolysates

Ji Hye Lee, Dong Won Choi and Kyung Bin Song[†]

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

보리 단백질 가수분해물로부터 칼슘 결합 물질의 분리

이지혜 · 최동원 · 송경빈[†]

충남대학교 농업생명과학대학 식품공학과

Abstract

To prepare calcium-binding peptides as calcium supplement, barley proteins were hydrolyzed using Flavourzyme for 18 h and the hydrolysates were ultra-filtered under 3 kDa as a molecular weight. The resultant filtered peptides were fractionated using ion exchange and normal-phase high performance liquid chromatography. Then each fraction that was obtained was determined for its calcium-binding activity to isolate the calcium-binding peptides. As a result, the highest calcium-binding peptide fraction was obtained, and the results suggest that barley protein hydrolysates can be used as a calcium supplement.

Key words : calcium-binding peptides, barley protein hydrolysates, purification

서 론

보리(*Hordeum vulgare*)는 섬유질, 비타민, 무기질, 단백질 함량이 높고, 필수아미노산이 많이 함유되어 있는 작물이다(1). 보리는 백미에서 부족한 영양성분을 보충할 수 있어서 1970년대 까지만 해도 국민의 기본식량으로써 쌀과 더불어 큰 몫을 차지하였으나(2), 80년대 이후 식용으로의 보리 소비가 크게 줄어들었다. 그러나 최근 건강에 대한 소비자의 관심이 높아짐에 따라, 보리 식이섬유가 LDL-콜레스테롤을 낮추어 관상동맥 질환의 예방효과가 있고 또한 보리에 함유되어 있는 catechine과 proanthocyanidine의 항산화 및 항암효과가 알려짐에 따라(3,4), 보리빵, 보리음료 등 보리를 이용한 가공식품의 개발이 활발히 이루어지고 있다(5). 특히 새찰보리의 단백질 함량은 10.8%로(2), 양질의 단백질을 많이 가지고 있어 식품산업에서의 활용이 요구되고 있다(6).

삶의 질 향상으로 인간의 수명이 증가하면서 골다공증 예방에 중요한 칼슘 섭취에 관한 관심이 증가하였다(7).

칼슘은 인체 내 가장 많이 존재하는 무기질로, 세포의 상호작용, 혈액응고, 신경전달 등 중요한 기능에 관여하고(8), 또한 칼슘 같은 무기질의 농도 변화는 정상적인 신경작용을 방해하여 우울증과도 연관이 있으며 학습과 기억력에도 영향을 준다고 보고되었다(9). 현재 칼슘 보충제는 대부분이 무기염류 형태로 섭취되고 있는데, 장내 pH나 phosphate, oxalic acid, phytic acid, 섬유소 등에 의해 흡수가 저해되거나 흡수 불가능한 물질로 변형되기 쉬운 단점을 가지고 있다(10). 따라서 이러한 문제점을 보완하기 위해 무기염류 대신 펩타이드 같은 물질에 칼슘을 결합시켜 체내에서의 흡수를 촉진시킬 수 있는 방법에 대한 연구가 진행되어 왔다(10-12).

따라서 본 연구에서는 기존의 칼슘보충제를 대체하고자 보리 단백질을 단백질분해효소로 가수분해하여 칼슘과 chelate하는 펩타이드를 분리하여 biomineral 소재 활용을 위한 기초연구로써 그 연구 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

[†]Corresponding author. E-mail : kbsong@cnu.ac.kr
Phone : 82-42-821-6723, Fax : 82-42-825-2664

본 실험에 사용된 보리는 2011년 전남 보성에서 생산된 새찰쌀보리를 대전 소재 롯데마트에서 구입하여 사용하였다. Flavourzyme (activity 500 LAPU/g protein)은 Novo Nordisk Co (Bagsvaerd, Denmark)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 analytical grade를 사용하였고, 크로마토그래피를 위한 용매는 high performance liquid chromatography (HPLC) grade를 사용하였다.

보리 단백질의 추출

보리 단백질 추출은 deionized water를 이용하여 10%(w/w) 보릿가루 용액을 제조한 후, ultrasonicator를 이용하여 보리 단백질을 추출하였다. 보릿가루 용액은 4°C, 24 hr 교반 시킨 후, 불용성 물질을 제거하기 위하여 3,500 x g에서 20 min 원심분리하여 얻어진 여액을 동결 건조하였다.

가수분해물의 제조

동결건조 된 보리 단백질을 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 용해하여 5% 수용액으로 제조한 후, 3,500 x g에서 20분 원심분리 후 상등액을 가수분해를 위한 기질로 사용하였다. 단백질 가수분해 효소 Flavourzyme을 기질 대비 50:1의 비율로 첨가하여 shaking incubator에서 24시간 동안 가수분해를 실시하였다. 가수분해 종료 후 효소반응을 정지시키기 위해 90°C에서 5분간 가열하여 효소를 불성화 시킨 뒤 4,500 x g에서 20분 원심분리하여 얻어진 상등액을 ultrafiltration disc (Ultracel PL-3, Millipore Co Billerica, MA, USA)를 이용하여 분자량 3 kDa 이하만을 취한 후 동결건조 하였다.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

단백질 분자량 측정은 Laemmli (13)의 방법에 따라 sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)를 이용하여 실시하였다. 시료는 각 시간에 따른 가수분해물의 일부를 취해 10% 용액으로 제조하여 5X sample buffer와 4:1의 비율로 혼합하여 15% separating gel과 5% stacking gel에 사용하였다. 표준분자량 marker로 myosin (210 kDa), β -galactosidase (117 kDa), bovine serum albumin (97 kDa), ovalbumin (55 kDa), carbonic anhydrase (37 kDa), soybean trypsin inhibitor (29 kDa), lysozyme (19 kDa), aprotinin (6 kDa)을 사용하였다.

펩타이드 함량 측정

가수분해된 시료의 available amino group 농도측정을 위해 trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) method (14)를 사용하였다. Sodium borate buffer (0.1 M, pH 9.2)로 희석한 시료에 0.1 M NaH_2PO_4 를 첨가하여 반응을 정지시킨 후,

spectrophotometer를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정함으로써 가수분해 시료의 펩타이드 함량을 구하였다.

칼슘 결합력 측정

동결건조 된 보리 단백질 가수분해물을 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 용해하여 1% 용액으로 제조하고, 5 mM calcium chloride를 첨가한 후 실온에서 1시간 동안 교반하여 칼슘과 chelating 반응을 시켰다. 반응이 끝나면 3,500 x g에서 20분 원심분리하여 얻어진 상등액의 칼슘 정량은 orthocresolphthalein complexone reagent를 이용한 colorimetric method로 실시하였다(15).

보리 단백질 가수분해물로부터 칼슘결합 펩타이드의 분리

보리 단백질 가수분해물을 20 mM Tris-buffer (pH 8.0)에 용해하여 3 mg/mL의 용액을 제조한 후, anion exchange column (2.5 cm x 20 cm, Q-Sepharose, Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)를 이용하여 3 mL/min의 유속으로 분획하였다. 이동상 용매 A는 20 mM Tris-buffer (pH 8.0)로 하였고, 용매 B는 20 mM Tris-buffer (pH 8.0)에 0.5 M NaCl을 첨가하여 사용하였다. 분리된 분획 중 칼슘 결합 능력이 가장 높은 분획을 선택하여 동결건조 하고, HPLC (Waters, Milford, MA, USA)를 사용하여 분리하였다. Anion exchange column으로부터 얻어진 분획을 동결건조한 펩타이드 시료를 deionized water에 용해하여 10 mg/mL의 용액으로 제조한 후, normal-phase column (4.6 mm x 250 mm, Luna NH₂, Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA)을 사용하여 200 μ L를 주입하였다. 이동상 용매 A는 acetonitrile:water를 97:3으로 섞은 후 0.1% trifluoroacetic acid를 첨가하였고, 용매 B는 acetonitrile:water를 30:70으로 섞은 후 0.1% trifluoroacetic acid를 첨가하여 사용하였다. 용매 B를 0~80%까지 30분, 80~100%까지 15분 동안 상승시켜 0.5 mL/min의 유속으로 분획하였고, 214 nm에서 흡광도를 측정하여 검출하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 측정하였고, 그 결과는 평균값 \pm 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

보리 단백질을 Flavourzyme으로 가수분해하여 각 시간에 따른 펩타이드 함량을 TNBS assay로 측정된 결과를

Fig. 1A에 나타내었다. 가수분해 시간이 경과함에 따라 available amino group 농도가 증가하였으나, 그 증가폭은 시간이 지날수록 점점 감소하였다. 가수분해 전 available amino group 농도는 9.34 mM이었던 반면, 가수분해 1 시간 후에는 14.29 mM로써, 24 시간 후의 available amino group 농도가 16.47 mM로 측정된 것을 고려하면 가수분해 시작 후 1 시간 동안 Flavourzyme에 의한 가수분해가 가장 많이 이루어진 것을 알 수 있었다. 이와 같은 연구결과는 Jeon 등(10)의 Flavourzyme을 이용한 미강박 단백질 가수분해 결과와 유사하였다. 또한, 가수분해를 시작한지 18 시간 후에는 available amino group 농도가 16.32 mM로 24시간 후인 16.47 mM와 큰 차이를 보이지 않아 보리 단백질의 가수분해는 18시간이면 완료되는 것을 확인할 수 있었다.

SDS-PAGE를 이용하여 보리 단백질의 가수분해도를 측정한 결과(Fig. 1B), 가수분해를 시작한지 1시간까지 가수분해가 가장 활발히 일어났고, 점차 시간이 경과할수록 보리 단백질의 분자량이 감소하여 18시간이면 가수분해가

완료되어 TNBS assay의 결과와 일치함을 확인할 수 있었다. 따라서 Flavourzyme을 이용한 보리 단백질의 가수분해는, 50°C, pH 7.0, 18시간 조건이 최적 가수분해 조건이었다. 그리고, 가수분해물 중에서 1-5 kDa의 저분자량 펩타이드가 체내에서의 활용과 흡수율이 높기 때문에(16,17), 가수분해물을 3 kDa 분자량 이하로 한외여과 하였다.

한외여과 된 보리 단백질 가수분해물은 Q-Sepharose column를 사용하여 분획하였다. 분획한 결과, 5개의 주요 peak로 분리되었는데(Fig. 2A), 각 분획의 칼슘 결합능력과 펩타이드 함량을 측정한 결과, 5개의 분획 중 F5의 Ca/peptide 값이 가장 높게 나타났다(Table 1). 따라서 F5 fractions를 모아 동결건조한 후, HPLC를 이용하여 칼슘 결합 펩타이드를 분리하였다. 분획한 결과, 2개의 주요 peak로 분리되었는데(Fig. 2B), 두 peak에서 큰 차이는 없었지만 그 중 F52가 칼슘과 chelating 되는 함량이 가장 많은 것으로 확인 되었다. 따라서 F52 fraction이 칼슘 결합 펩타이드로써 biomineral 소재로의 활용이 가능하다고 생각된다.

Korhonen 등(18)은 Casein을 가수분해하여 얻은 Casein-phosphopeptides가 우리 몸에서 칼슘의 흡수와 안정

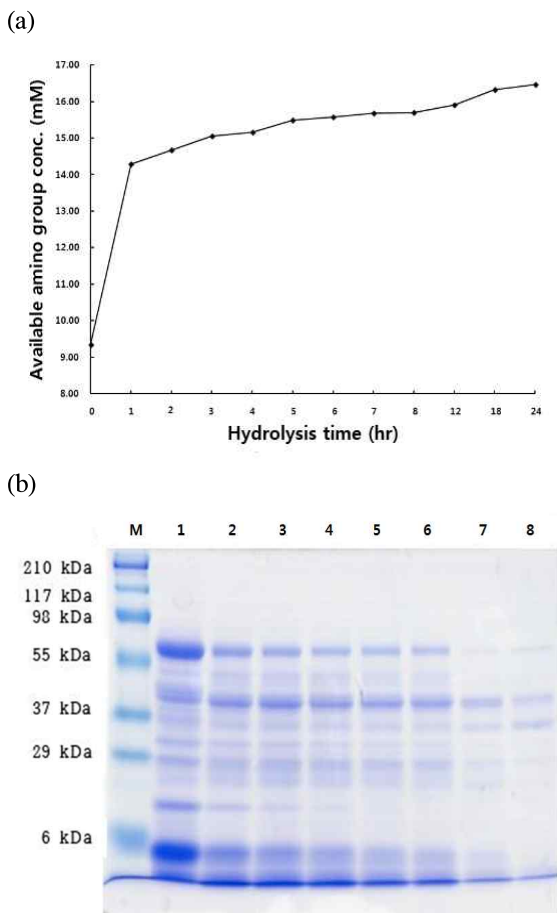


Fig. 1. (a) Effect of hydrolysis time on the available amino group concentrations of barley protein hydrolysates.

(b) SDS-PAGE pattern of barley proteins hydrolyzed by Flavourzyme.

M, marker; 1, barley protein; 2-8, hydrolysis time for 1, 2, 4, 8, 12, 18, and 24 hr.

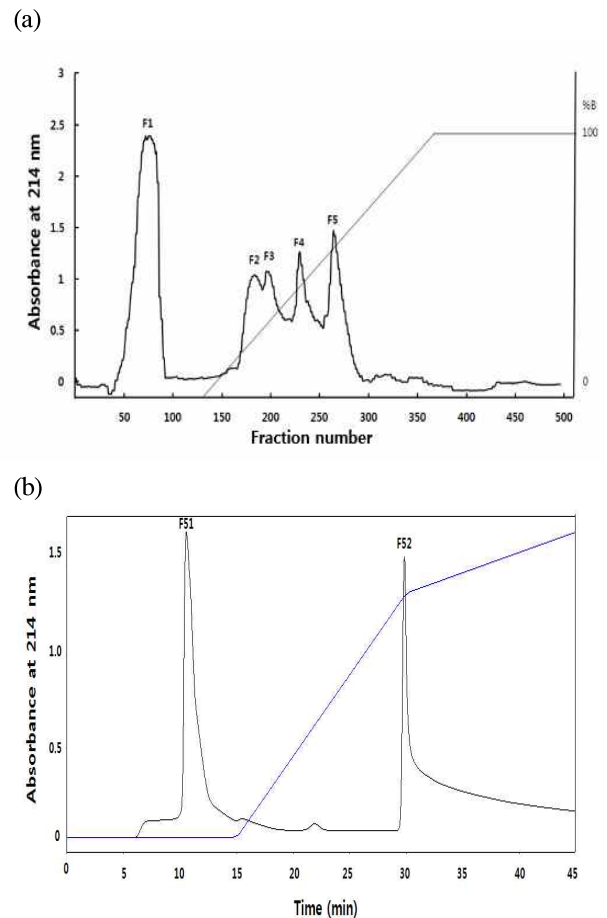


Fig. 2. Elution profile of barley protein hydrolysates from different chromatographic methods.

(a) ion exchange chromatography (b) normal-phase HPLC.

성을 향상시켜주고, 이는 골다공증, 고혈압, 충치를 예방하는데 도움을 준다고 보고하였다. Miquel 등(19)의 연구보고에 따르면 as1-casein as2-casein, 그리고 β -casein이 Ser, Glu와 phosphoserine을 포함하고 있는데 이것이 칼슘과 복합체를 형성하여 체내에서의 칼슘의 bioavailability를 증진시킨다고 하였다. 또한, 물고기 뼈에 존재하는 칼슘과 친화력이 높은 fish-bone peptides II의 경우에도 Glu가 포함되어 있다고 보고하였다(17). Jeon 등(20)은 콜로렐라 단백질 가수분해물로부터 칼슘과 결합력이 높은 펩타이드를 정제하여 분석한 결과 Asn을 포함하였다고 보고한 바 있다. 따라서 보리 단백질 가수분해물을 ion exchange chromatography와 HPLC로 분석한 결과 얻어진 F52에는 칼슘 결합에 관여하는 Glu와 Asn 등이 있을 것이라 생각되나, 향후 이와 관련하여 더 많은 연구가 진행되어야 한다고 판단된다. 본 연구 결과를 토대로, 보리 단백질 가수분해물로부터 일정 분자량 크기의 펩타이드를 칼슘에 chelate 하여 제조한 biomaterial은 향후 기능성식품 소재로서 활용될 수 있다고 판단된다.

Table 1. Ca/peptide concentration ratio for each fraction from ion exchange chromatography

Fraction	Ca concentration (mM)	Peptide concentration (mM)	Ca/peptide
F1	0.345±0.003 ^a	1.878±0.012 ^a	0.184
F2	0.285±0.011 ^b	0.268±0.002 ^b	1.062
F3	0.157±0.017 ^c	0.142±0.003 ^c	1.099
F4	0.167±0.003 ^d	0.056±0.022 ^d	2.952
F5	0.173±0.004 ^c	0.044±0.001 ^e	3.961

^{a-c}Any means in the same column followed by different letters are significantly ($p < 0.05$) different by Duncan's multiple range test.

요 약

칼슘보충제로 칼슘 결합 펩타이드를 만들기 위해, 보리 단백질에 Flavourzyme을 사용하여 18시간 동안 가수분해하였고, 가수분해 된 보리 단백질은 3 kDa 이하로 한외여과하였다. 한외여과 된 펩타이드는 ion exchange chromatography와 normal-phase HPLC를 사용하여 칼슘 결합 펩타이드를 분리하였고, 분리된 각 분획의 칼슘결합력을 측정하였다. 그 결과 가장 높은 칼슘 결합력을 보인 분획을 칼슘 chelation을 위한 소재로 얻었고, 따라서 본 연구 결과 얻어진 보리 단백질 가수분해물은 칼슘보충제로의 사용이 가능하다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업의 지원에 의한 연구

의 일부로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Choe JS, Youn JY (2005) The chemical composition of barley and wheat varieties. J Korean Soc Food Sci Nutr, 34, 223-229
- Jun HI, Cha MN, Song GS, Yoo CS, Kim YT, Kim YS (2011) Physicochemical properties and cooking quality of naked waxy barley (Saechalssal bori). Korean J Food Preserv, 18, 165-170
- Park TS, Lee SY, Kim HJ, Kim KT, Kim YJ, Jeong IH, Do WN, Lee HJ (2009) Extracts of adlay, barley and rice bran have antioxidant activity and modulate fatty acid metabolism in adipocytes. Korean J Food Nutr, 22, 456-462
- McIntosh GH, Whyte J, McArthur R, Nestel PJ (1991) Barley and wheat foods: Influence on plasma cholesterol concentration in hypercholesterolemic men1-3. Am J Clin Nutr, 53, 1205-1209
- Yang EJ, Cho YS, Choi MS, Woo MN, Kim MJ, Shon MY, Lee MK (2009) Effect of young barley leaf on lipid contents and hepatic lipid-regulating enzyme activities in mice fed high-fat diet. Korean J Nutr, 42, 14-22
- Chang HG, Jung IH (1994) The physicochemical properties and cooking qualities of barley. J Korean Soc Food Nutr, 23, 816-821
- Titchenal CA, Dobbs J (2007) A system to assess the quality of food sources of calcium. J Food Compos Anal, 20, 717-724
- Bowers GN, Brassard C (1986) Measurement of ionized calcium serum with ion-selective electrode: A mature technology that can meet the daily service needs. Clin Chem, 32, 1437-1447
- Barclay JW, Morgan A, Burgoyne RD (2005) Calcium-dependent regulation of exocytosis. Cell Calcium 38, 343-353
- Jeon SJ, Lee JH, Song KB (2010) Preparation for calcium and iron-binding peptides from rice bran protein hydrolysates. J Appl Biol Chem, 53, 174-178
- Lee JH, Jeon SJ, Song KB (2010) Isolation of a calcium-binding fraction from hot-water extract of *Smilax rhizoma*. Korean J Food Preserv, 17, 903-907
- Lee SH, Song KB (2009) Isolation of a calcium-binding peptide from enzymatic hydrolysates of porcine blood plasma protein. J Korean Soc Appl Biol Chem, 52,

- 290-294
13. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685
 14. Ekund A (1976) On the determination of available lysine in casein and rapeseed protein concentration using 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) as a reagent of free α -amino group of lysine. *Anal Chem*, 70, 434-439
 15. Gitelman HJ (1967) An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens. *Anal Biochem*, 18, 521-531
 16. Hara H, Funabiki R, Iwata M, Yamazaki KI (1984) Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained conditions. *J Nutr*, 114, 1122-1129
 17. Jung WK, Lee BJ, Kim SK (2006) Fish-bone peptide increases calcium solubility and bioavailability in ovariectomised rats. *Brit J Nutr*, 95, 124-128
 18. Korhonen H, Pihlanto A (2006) Bioactive peptides: Production and functionality. *Int Dairy J*, 16, 945-960
 19. Miquel E, Alegria A, Barbera R, Farre R (2005) Speciation analysis of calcium, iron, and zinc in casein phosphopeptide fraction from toddler milk-based formula by anion exchange and reversed-phase high-performance liquid chromatography-mass spectrometry/flame atomic-absorption spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*, 381, 1082-1088
 20. Jeon SJ, Lee JH, Song KB (2010) Isolation of a calcium-binding peptide from chlorella protein hydrolysates. *J Food Sci Nutr*, 15, 282-286

(접수 2012년 1월 2일 수정 2012년 4월 18일 채택 2012년 5월 4일)