

연구노트

## Preparation of chicken feather protein hydrolysates and isolation of iron-binding peptides

Nam Ho Kim, Dong Won Choi, Kyung Bin Song\*

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

### 닭털 단백질로부터 가수분해물 제조 및 철분 결합 펩타이드의 분리

김남호 · 최동원 · 송경빈\*

충남대학교 식품공학과

#### Abstract

As byproducts of chicken slaughtering, chicken feathers are produced and mostly discarded without proper treatment, which results in serious environment pollution. Therefore, the appropriate treatment and utilization of chicken feathers are needed. In particular, chicken feathers can be used as protein sources for the preparation of protein hydrolysates, considering that chicken feathers have a large amount of proteins. In this study, chicken feather protein hydrolysates were prepared and their iron-binding peptides were isolated. Chicken feather protein was extracted from feathers of slaughtered chicken, and its hydrolysates were prepared via hydrolysis with Flavourzyme for 8 h. Then the chicken feather protein hydrolysates were ultra-filtered to obtain small peptide fractions and fractionated using Q-Sepharose and Sephadex G-15 columns to isolate their iron-binding peptides. Two major fractions were produced from each of the Q-Sepharose ion exchange chromatography and the Sephadex G-15 gel filtration chromatography. Among the fractions, the peptide fraction with a high iron-binding activity level, F12, was isolated. These results suggest that chicken feather protein hydrolysates can be used as iron supplements.

Key words : chicken feather, chromatography, isolation, peptide

#### 서 론

닭고기의 소비가 지속적으로 증가하고 있고, 그에 따른 도계장의 부산물로서 생산되는 닭털 또한 증가하고 있는 상황이다(1). 세계적으로 매년 도계 후 부산물인 닭털이 약 9억 톤 이상 발생하는데(2), 국내에선 대부분 특별한 처리 없이 버려지는 등 환경오염 문제가 되고 있다. 닭털은 약 91%가 단백질로 구성되어 있는데(3), 단백질 구성에 있어서 높은 함량의 시스틴과 수산기 함유 아미노산을 갖는 특징이 있다(4). 이러한 특성 때문에 닭털 단백질은 낮은 용해성을 가지고 있고, 단백질을 추출하기 위해서는 이황화(S-S) 결합과 수소결합을 파괴해야 한다(5). 그래서 닭털 단백질의 활용방안으로써 효소적 가수분해를 통한 생리활성을 갖는 펩타이드의 생산이 제시된다.

생리활성 펩타이드는 일반적으로 생리적 활성을 가지는 분자량이 작은 펩타이드로 정의되는데(6). 보통 3-20개의 아미노산으로 구성되어 있고 아미노산의 조성이나 서열에 따라 펩타이드의 활성이 다양하다(7). 특히 단백질에 비해 크기가 작은 생리활성 펩타이드는 생체내로 쉽게 흡수될 수 있으며, 다양한 기능적 특성을 갖는다(8). 생리활성 펩타이드의 효과로는 미네랄 운송(9,10), 항고혈압(11), 항혈전(12), 항균활성(13) 등이 있으며, 일부 생리활성 펩타이드는 다기능적인 특성을 가지고 있다고 보고되었다(14).

필수 미량원소 중 하나인 철분은 헤모글로빈 같은 단백질의 구성요소와 여러 효소의 기능에서 중요한 역할을 한다(15). 그러나 철분의 낮은 생체 내 이용률로 인해 전 세계 여성과 어린이의 약 25%정도가 철분 결핍을 겪고 있는데, 철분 결핍은 빈혈과 관련이 있으며 어린이의 정신적, 신체적 성장을 지연시킨다고 알려졌다(16). 이러한 이유로 인하여 철분 강화 제품이 출시되고 있지만, 대부분 염 형태의 제품이기 때문에 다른 성분들과의 반응으로 인하여 낮은

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

생체 이용률을 갖는다(9). 반면에, 연구 결과에 의하면 낮은 분자량을 갖는 펩타이드에 킬레이트 된 철분의 경우 생체 내 흡수 및 이용률이 향상될 수 있다고 보고되었다(17). 그러므로 본 연구에서는 저렴한 단백질 원료로써 이용 가능한 도계 부산물인 닭털의 효소적 가수분해를 통해 얻어진 닭털 단백질 가수분해물로부터 철분 결합 펩타이드를 분리하고자 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에서 사용된 닭털은 (주)하림(Iksan, Jeonbuk, Korea)에서 제공받아 사용하였고, Flavourzyme(from *Aspergillus oryzae*, activity 500 LAPU/g protein)은 Novo Nordisk Co(Bagsvaerd, Denmark)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 일급 이상의 등급을 사용하였다.

### 닭털의 전처리

닭털의 오염물질을 제거하기 위해 물로 세척한 후, 실온에서 72시간 동안 건조하였다. 세척된 닭털을 분쇄기(Osaka Chemical Co, Osaka, Japan)를 이용하여 30,000 rpm으로 75-700  $\mu\text{m}$  크기로 절단하고, 절단된 닭털의 지방을 제거하기 위하여 헥산과 1:50 (w/v)의 비율로 혼합하여 30분 동안 추출하고 정치시켜 상층액을 제거하였으며, 이를 3회 반복하여 수행하였다. 탈지된 닭털은 실온에서 24시간 동안 건조하였다.

### 닭털 단백질의 추출

탈지된 닭털로부터의 단백질 추출은 Nomura 등(18)의 방법을 변형하여 수행하였다. 닭 털과 증류수를 1:1(w/v)의 비율로 섞어 준 뒤 1 N NaOH 300 mL를 첨가하여 24시간 동안 실온에서 교반하여 추출한 다음, 불용성물질을 제거하기 위해 10,000 g에서 1시간 동안 원심 분리하였다. 이렇게 얻어진 상층액을 1 N HCl을 사용하여 중화하였고, 중화된 용액을 탈염하기 위하여 투석막(Regenerated cellulose, MWCO, 3.5 kDa, Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA)에 넣고 72시간 동안 투석하였다. 투석된 용액은 다음 실험에 사용하기 위해 동결 건조한 다음  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 저장하였다.

### 닭털 단백질 가수분해물의 제조

닭털 단백질 가수분해물을 제조하기 위하여 Lee와 Song(9)의 방법을 참고하여 가수분해를 실시하였다. 가수분해를 위한 기질로 사용될 2%(w/v) 닭털 단백질 용액을 제조하기 위하여 동결건조된 닭털 단백질을 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 용해하였다. 단백질 가수분해 효소로써 Flavourzyme을 기질 대비 효소 30:1(w/w)로 첨가

하여  $50^{\circ}\text{C}$ , pH 7.0에서 8시간 동안 가수분해를 진행하였다. 가수분해 종료 시, 효소의 반응을 정지시키기 위하여  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 가열하여 효소를 불활성화 하였고, 5,000g에서 20분 동안 원심 분리하여 상등액을 얻어 가수분해물을 얻었다.

### 닭털 단백질 가수분해물로부터 철분 결합 펩타이드의 분리

분자량이 작은 철분 결합 펩타이드를 분리하기 위하여, 닭털 단백질 가수분해물을 먼저 Amicon 8200(Millipore Co, Billerica, MA, USA)을 이용하여 분자량 3 kDa 이하로 한외 여과를 하였는데, 한외여과막으로는 Ultracel PL-3 (Millipore Co., Billerica, MA, USA)을 사용하였다. 한외여과 된 닭털 단백질 가수분해물을 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 용해하여 용액(3 mg/mL)을 제조하였고, Q-Sepharose fast flow 컬럼(5 cm x 10 cm, GE Healthcare Co., Uppsala, Sweden)을 이용하여 2 mL/min의 유속으로 분획하였고, 이때 용출은 10 mM Tris buffer(pH 8.0)에 0.5 M NaCl을 첨가하여 선형구배를 사용하였다. 분획된 시료는 214 nm에서 흡광도를 측정하여 검출하였고, 분획에 존재하는 염들을 제거하기 위하여 regenerated cellulose로 제조된 투석막(MWCO, 0.1-0.5 kDa, Spectrum Laboratories, Inc, Rancho Dominguez, CA, USA)을 이용하여 24시간 동안 투석을 한 후, 분리된 각 분획에 대해 철분 결합력과 펩타이드 농도를 측정하였다. 얻어진 분획들 중 가장 철분 결합력이 높은 분획을 더 분리하기 위해 Sephadex G-15 컬럼(1.5 cm x 100 cm, GE Healthcare Co, Uppsala, Sweden)을 사용하였다. 이동상 용매로 탈이온수를 사용하여 0.75 mL/min의 유속으로 분획하였고, 용출된 시료는 214 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분리된 각 분획에 대해 철분 결합력과 펩타이드 농도를 측정하여 비교, 분석하였다.

### 펩타이드 함량 측정

펩타이드 함량의 측정은 지표로 사용되는 available 아미노기 농도를 trinitrobenzene sulfonic acid(TNBS) assay를 이용하여 측정하였다(9,19). 시료에 0.1 M sodium borate buffer(pH 9.2)를 첨가한 후 5 mM TNBS 용액과 혼합하여 30분 동안 실온에서 반응시키고, 반응을 정지시키기 위해 18 mM sodium sulfite( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )와 2 M monobasic sodium phosphate( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )를 첨가한 후, spectrophotometer (UV-2450, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 철분 결합력 측정

시료를 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 용해시킨 뒤, 5 mM ferrous chloride( $\text{FeCl}_2$ )를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 침전물을 제거하기 위해 3,500 g에서 20분간 원심 분리하여 상등액을 얻은 후, free Fe을

제거하기 위하여 투석막(regenerated cellulose, MWCO, 0.1-0.5 kDa, Spectrum Laboratories, Inc.)에 넣고 6시간 동안 투석을 수행하였다. 이렇게 얻어진 용액의 철분 함량을 ortho-phenanthroline을 이용한 발색법(20)을 이용하여 측정하였다(9).

## 결과 및 고찰

### 닭털 단백질로부터 가수분해물의 제조

닭털 단백질로부터 철분 결합력이 높은 저분자량 펩타이드를 분리하기 위하여, 상업적으로 널리 사용되는 단백질 가수분해 효소인 Flavourzyme을 이용하여 닭털 단백질 가수분해물을 제조하였다. Flavourzyme의 최적 가수분해 조건인 50°C, pH 7.0에서 8시간 동안 가수분해를 실시하여 가수분해물을 얻었는데, 가수분해 시간 8시간은 기존 연구 결과(9,21)를 토대로 충분히 가수분해되는 시간으로 판단하여 결정하였다. 가수분해 시간이 증가함에 따라, 펩타이드 농도에 비례하는 available 아미노기 농도(0 h, 5.90; 1 h, 16.68; 4 h, 21.94; 6 h, 25.73; 8 h, 29.43 mM)가 증가하는 등 기존 문헌 보고(9,21)와 유사한 경향을 나타내었다. 이렇게 얻어진 가수분해물로부터 저분자량 펩타이드를 얻기 위해 한외여과막을 이용하여 한외여과를 하였다. 가수분해물 중 체내 흡수율과 이용률이 높은 펩타이드가 저분자량이어서(22), 3 kDa 이하로 한외여과 하였다. Huang 등(23)의 새우 가공 부산물로부터 철분 결합 펩타이드를 동정한 결과 699 Da의 분자량을 가진 펩타이드가 보고되었고, 최 등(29)의 면실박 단백질로부터 철분 결합 펩타이드의 분리 실험에서도 철분 결합력을 갖는 분획이 3 kDa 이하였으며, Vattem과 Mahoney(25)의 연구에서도 닭 근육단백질로부터 철분 결합력을 가지는 주요 분획이 2-3.5 kDa에 존재하였다고 보고한 바 있다.

### 닭털 단백질 가수분해물로부터 철분 결합 펩타이드 분리

Vegarud 등(26)의 보고에 따르면 단백질과 펩타이드가 음전하를 갖는 결사슬을 가지고 있어야 철분이나 칼슘과 같은 2가 양이온과 효과적으로 결합한다고 하였고, Chaud 등(27) 또한 펩타이드의 전하가 철분과 결합하는데 큰 영향을 준다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는, 한외여과된 닭털 단백질 가수분해물로부터 철분 결합 펩타이드를 분리하기 위하여 음이온수지 크로마토그래피를 이용하여 분획을 실시하였다. Q-Sepharose fast flow column을 사용한 결과, 2개의 주요 분획을 얻을 수 있었다(Fig. 1). 각 분획에서 염을 제거하기 위하여 투석막을 사용하여 투석을 진행한 후 동결건조하여 각 분획에 대한 펩타이드 함량 및 철분 결합력을 측정하였다. 2개의 분획 중 F1의 철분 결합력이 가장 높았다(Fe/Peptide; F1, 0.13; F2, 0.02). 따라서 F1을

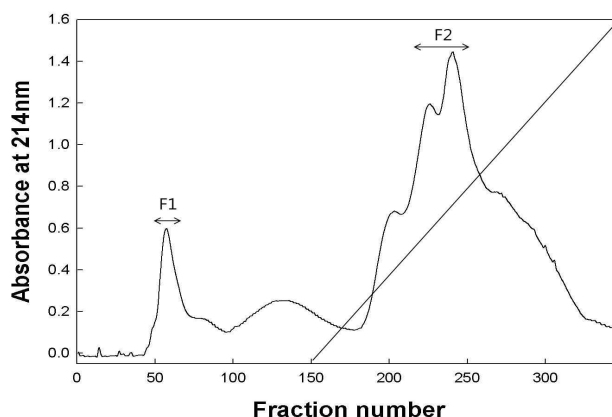


Fig. 1. Elution profile of chicken feather protein hydrolysates from Q-Sepharose fast flow column.

다시 켈여크로마토그래피로써 Sephadex G-15 컬럼을 사용하여 더 분리한 결과, 2개의 주요 분획을 얻었다(Fig. 2). 그리고 각 분획에 대한 펩타이드 함량과 철분 결합력을 측정하였다. 2개의 분획 중 F12가 F11에 비해 철분과의 결합력이 더 높은 것으로 확인되었다(Fe/Peptide; F11, 0.06; F12, 0.22).

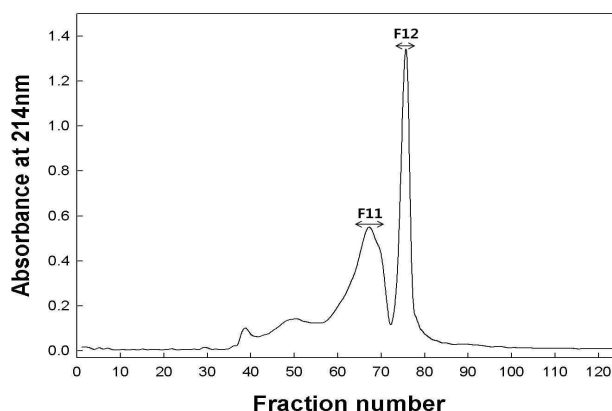


Fig. 2. Elution profile of the F1 fraction (Fig. 1) from Sephadex G-15 column.

현재 시판되고 있는 철분 보충제의 경우, phosphate, oxalic acid, phytic acid 등과 같은 화합물에 의해 생체 내 철분의 흡수가 저해되고, 또한 다른 음이온 물질과 결합하여 흡수가 불가능한 물질로 변형되기 쉽기 때문에 철분의 안정적인 흡수를 위해서는 펩타이드와 결합된 형태가 바람직하며(28), 또한 펩타이드에 결합된 철분이 철분의 흡수를 저해하는 ferric hydroxides의 형성을 막아준다고 보고되었다(29). 한편, Lee와 Song(9)의 돼지 혈청 단백질로부터 철분 결합 펩타이드의 분리 실험에서도 철분 결합력이 높은 펩타이드를 분리한 결과, Asp와 Glu이 철분 결합에 영향을 준다고 보고하였고, Gaucheron(15)의 보고에서도

철분 결합 부위에는 Asp, Glu 같은 아미노산으로 구성되어 있다고 보고하였다. 이러한 연구 결과들은 Asp와 Glu가 철분의 결합에 중요한 영향을 미친다는 것을 보여주는데, 닭털을 구성하는 아미노산의 조성에서도 Asp와 Glu의 함량이 많다고 보고된 바 있다(30).

본 연구에서 닭털 단백질 가수분해물로부터 분리된 F12는 철분과 결합력이 강한 분획으로써 향후 아미노산 서열 분석 등 더 많은 연구가 필요하지만, 기존 염 형태의 철분 보충제보다 안정적이고 생체 내 흡수 및 이용률이 높다는 장점을 가지고 있기 때문에, 앞으로 철분 보충제로써 사용될 수 있다고 판단된다.

## 요 약

닭털 단백질을 단백질 가수분해 효소인 Flavozyme을 이용하여 8시간 동안 가수분해하여 가수분해물을 제조하였다. 닭털 단백질 가수분해물로부터 저분자량 펩타이드를 얻고자 한외여과를 하였고, 철분 결합 펩타이드를 분리하기 위해 Q-Sepharose와 Sephadex G-15 컬럼을 사용하여 분리하였다. 그 결과, 철분 결합력이 높은 펩타이드 분획, F12를 분리하였고, 향후 철분 보충제로써 활용이 가능하다고 판단된다.

## References

1. Sahoo DK, Das A, Thatoi H, Mondal KC, Mohapatra PKD (2012) Keratinase production and biodegradation of whole chicken feather keratin by a newly isolated bacterium under submerged fermentation. *Appl Biochem Biotech*, 167, 1040-1051
2. Agrahari S, Wadhwa N (2010) Degradation of chicken feather a poultry waste product by keratinolytic bacteria isolated from dumping site at Ghazipur poultry processing plant. *Int J Poult Sci*, 9, 482-489
3. Kock JW (2006) Physical and mechanical properties of chicken feather materials. MS Thesis, School of Civil and Environmental Engineering, Georgia Institute of Technology
4. Arai KM, Takahashi R, Yokote Y, Akahane K (1983) Amino-acid sequence of feather keratin from fowl. *Eur J Biochem*, 132, 501-507
5. Woodin AM (1954) Molecular size, shape and aggregation of soluble feather keratin. *Biochem J*, 57, 99-109
6. Kitts DD, Weiler K (2003) Bioactive proteins and

- peptides from food sources. Application of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr Pharm Des*, 9, 1309-1323
7. Pihlanto-Leppala A (2001) Bioactive peptides derived from bovine whey protein: opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends Food Sci Technol*, 11, 347-356
8. Arihara K, Nakashima Y, Mukai T, Ishikawa S, Itoh M (2001) Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from enzymatic hydrolysates of porcine skeletal muscle proteins. *Meat Sci*, 57, 319-324
9. Lee SH, Song KB (2009) Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein. *Process Biochem*, 44, 378-381
10. Huang G, Ren Z, Jiang J (2011) Separation of iron-binding peptides from shrimp processing by-products hydrolysates. *Food Bioprocess Technol*, 4, 1527-1532
11. Lee SH, Song KB (2003) Isolation of an angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from irradiated bovine blood plasma protein hydrolysates. *J Food Sci*, 68, 2469-2472
12. Chabance B, Jolles P, Izquierdo C, Mazoyer E, Francoual C, Drouet L, Fiat AM (1995) Characterization of an antithrombotic peptide from kappa-casein in newborn plasma after milk ingestion. *Br J Nutr*, 73, 583-590
13. Mine Y, Ma F, Lauriau S (2004) Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *J Agric Food Chem*, 52, 1088-1094
14. FitzGerald RJ, Meisel H (2000) Milk protein-derived peptide inhibitor of angiotensin-I-converting enzyme. *Br J Nutr*, 84, 33-37
15. Gaucheron F. (2000) Iron fortification in dairy industry. *Trends Food Sci Technol*, 11, 403-409
16. Stolfus RJ, Mullany L, Black RE (2005) Iron deficiency anaemia. In: Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors, Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Murray CJL(eds), World Health Organization, Geneva, Swiss, p 163-209
17. Peres JM, Bouhalab S, Bureau F, Neuville D, Maubois JL, Devroede G, Arhan P, Bougle D (1999) Mechanisms of absorption of casein phosphopeptide bound iron. *J Nutr Biochem*, 10, 215-222
18. Nomura Y, Aihara M, Nakajima D, Kenjou S, Tsukuda M, Tsuda Y (2006) Process for producing solubilized keratin. European Patent No 1731528
19. Eklund A (1976) On the determination of available lysine

- in casein and rapeseed protein concentrates using 2, 4, 6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) as a reagent for free epsilon amino group of lysine. *Anal Biochem*, 70, 434-439
20. Harris DC (1995) *Quantitative Chemical Analysis*. WH Freeman and Company, New York, NY, USA. p 804-805
  21. Jeon SJ, Lee JH, Song KB (2010) Isolation of a calcium-binding peptide from chlorella protein hydrolysates. *J Food Sci Nutr*, 15, 282-286
  22. Hara H, Funabiki R, Iwata M, Yamazaki K (1984) Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained conditions. *J Nutr*, 114, 1122-1129
  23. Huang G, Ren Z, Jiang J, Chen W (2012) Purification of a hepta-peptide with iron binding activity from shrimp processing by-products hydrolysates. *Adv J Food Sci Technol*, 4, 207-212
  24. Choi DW, Kim NH, Song KB (2012) Isolation of iron and calcium-binding peptides from cottonseed meal protein hydrolysates. *J Appl Biol Chem*, 55, 263-266
  25. Vattem DA, Mahoney RR (2005) Production of dialyzable iron by in vitro digestion of chicken muscle protein fractions: the size of the dialyzable iron. *J Sci Food Agric*, 85, 1537-1542
  26. Vegarud GE, Langsrud T, Svenning C (2000) Mineral-binding milk proteins and peptides; occurrence, biochemical and technological characteristics. *Br J Nutr*, 84, 91-98
  27. Chaud MV, Izumi C, Hahaal Z, Shuhama T (2002) Iron derivatives from casein hydrolysates as a potential source in the treatment of iron deficiency. *J Agric Food Chem*, 50, 871-877
  28. Jeon SJ, Lee JH, Song KB (2010) Preparation of calcium and iron-binding peptides from rice bran protein hydrolysates. *J Appl Biol Chem*, 53, 174-178
  29. Silva SV, Malcata FX (2005) Caseins as source of bioactive peptides. *Int Dairy J*, 15, 1-15
  30. Gupta A, Kamarudin NB, Kee CYG, Yunus RBM (2012) Extraction of keratin protein from chicken feather. *J Chem Chem Eng*, 6, 732-737

---

(접수 2013년 3월 13일 수정 2013년 5월 14일 채택 2013년 5월 21일)