

해바라기씨박 단백질 가수분해물로부터 철분 결합 펩타이드의 분리

- 연구노트 -

최동원 · 김남호 · 송경빈[†]

충남대학교 식품공학과

Isolation of Iron-Binding Peptides from Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Seed Protein Hydrolysates

Dong Won Choi, Nam Ho Kim, and Kyung Bin Song[†]

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

ABSTRACT Proteins from sunflower seeds were hydrolyzed with Alcalase and Flavourzyme to isolate iron-binding peptides. The optimal hydrolysis conditions were determined. Hydrolysates were filtered under a 3 kDa membrane and iron-binding peptides separated from the hydrolysates using ion exchange and gel permeation chromatographic methods. A fraction with the highest iron-binding activity (Fe/peptide, 0.69), F22, was obtained. These results suggest that fractions isolated from sunflower seed protein hydrolysates can be applied toward the production of iron supplements.

Key words: sunflower seed protein, iron-binding peptide, hydrolysate

서 론

해바라기(*Helianthus annuus* L.)는 식용유지 생산과 관련하여 중요한 유지종자 작물 중 하나인데, 해바라기씨박은 해바라기씨로부터 유지를 추출한 후 생성되는 부산물이다(1). 해바라기씨박은 약 30%의 단백질을 함유하고 있어 좋은 단백질 원료이고(2), 또한 대두 단백질과는 구조적으로 유사성을 가지고 있어서(3,4), 해바라기씨박 단백질 가수분해물은 생리활성 펩타이드로써 사용이 가능한데(5), 현재 대부분이 동물사료로만 이용되고 있다.

생리활성 펩타이드는 인체 내에서 생활성을 가져 유익한 영향을 주고(6), 그 크기가 작기 때문에 생체 내에서 쉽게 흡수될 수 있으며(7), 또한 아미노산 서열이나 조성에 따라서 생리활성이 달라진다(8). 이러한 생리활성 펩타이드는 항산화(9), 항고혈압(10), 항균(11), 면역활성(12), 콜레스테롤 저하(13), 금속이온 결합(14,15) 등 다양한 활성들이 보고되고 있다.

철분은 헤모글로빈이나 미오글로빈을 구성하는 필수 미량원소이며(16), 주로 산소 및 전자의 운반 등과 같은 인체 내 다양한 대사 과정에 관여한다(17). 철분 부족으로 인하여 발생하는 철 결핍성 빈혈은 전 세계적인 건강 문제인데, 섭취되는 철분의 낮은 용해도와 phytate, 폴리페놀 등과 같은 철분의 흡수를 저해하는 물질에 의해 체내에서의 흡수율이

낮다(18). 또한 철분 강화제가 염 형태로 시판되고 있지만 낮은 체내 이용률 같은 문제점을 가지고 있어서, 펩타이드와 결합한 형태의 철분이 인체 내 이용률을 향상시킬 수 있다고 보고되었다(19).

따라서 본 연구에서는 기존의 철분 보충제의 문제점을 보완하고자 해바라기씨박 단백질을 단백질 가수분해 효소로 가수분해한 후, 철분과 결합하는 펩타이드를 분리함으로써 철분 보충 식품소재로 활용하기 위한 기초연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 해바라기씨는 Inner Mongolia Xuanda Food Co.(Inner Mongolia, China)에서 구입하였고, 품종은 Black Oil Sunflower Seed O33을 사용하였으며, Alcalase와 Flavourzyme은 Novo Nordisk Co.(Bagsvaerd, Denmark)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 analytical grade를 사용하였고, chromatography를 위한 용매는 HPLC grade를 사용하였다.

해바라기씨박 단백질 추출

해바라기씨는 추출이 용이하도록 blender(Osaka Chemical Co., Osaka, Japan)를 이용하여 30,000 rpm으로 갈아서 사용하였다. 분말 상태로 된 해바라기씨의 유지를 제거하기 위하여 5배수의 헥산을 사용하여 3시간 동안 추출하였고 이를 3회 반복하였다. 탈지된 해바라기씨로부터의 단백질

Received 5 March 2013; Accepted 24 April 2013

[†]Corresponding author.

E-mail: kbsong@cnu.ac.kr, Phone: 82-42-821-6723

추출은 Hagenmaier(20)의 방법을 변형하여 수행하였다. 해바라기씨박 200 g을 8배수의 증류수에 분산시킨 후, ultrasonicator(Model-GE 750, Sonics & Materials, Newtown, CT, USA)를 사용하여 단백질을 추출하였고, 3 N NaOH를 이용하여 pH 10으로 조정하여 1시간 동안 교반한 다음 4,000×g에서 20분간 원심분리 하였다. 얻어진 상등액을 2 N HCl을 사용하여 pH 4.3으로 조정하여 30분간 교반한 후, 4,000×g에서 20분간 원심분리 하여 해바라기씨박 단백질을 침전시켰다. 침전물을 deionized water로 수세한 후 얻어진 해바라기씨박 단백질을 동결 건조하였다.

해바라기씨박 단백질의 가수분해물 제조

해바라기씨박 단백질 가수분해는 Lee 등(21)의 방법을 변형하여 실시하였다. 동결 건조된 해바라기씨박 단백질은 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 용해하여 2%(w/v)의 용액으로 제조하여 가수분해를 위한 기질로 사용하였다. 단백질 가수분해 효소는 alcalase(from *Bacillus licheniformis*, activity 2.4 AU/g protein)를 기질대비 효소 500:1(w/v)로 첨가하여 최적조건인 55°C, pH 8.0에서 4시간 동안 반응시켰다. 그리고 flavourzyme(from *Aspergillus oryzae*, activity 500 LAPU/g protein)의 최적 반응 조건인 50°C, pH 7.0으로 조정한 후 flavourzyme을 기질대비 효소 50:1(w/v)로 첨가하여 8시간 동안 반응시켜 가수분해를 실시하였으며, 가수분해 중 매 2시간마다 시료를 취해 펩타이드 함량 측정 및 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 실험에 사용하였다. 가수분해 종료 후, 효소의 반응을 정지시키기 위해서 95°C에서 5분간 가열하여 효소를 불활성화시켰고, 4,000×g에서 20분 동안 원심분리 하여 상등액을 얻었다.

펩타이드 함량 측정

Trinitrobenzenesulfonic acid(TNBS) 방법(22)을 사용하여 가수분해 시간에 따른 펩타이드 함량을 측정하였다. 시료에 0.1 M sodium borate buffer(pH 9.2)를 첨가한 후, 5 mM TNBS 용액과 혼합하여 30분 동안 반응시키고 반응을 정지시키기 위해 18 mM sodium sulfate(Na_2SO_4)와 2 M monobasic sodium phosphate(NaH_2PO_4)를 첨가시켰다. 그리고 spectrophotometer(UV-2450, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정함으로써 펩타이드 함량을 측정하였다.

SDS-PAGE

SDS-PAGE는 Laemmli(23)의 방법으로 실시하였다. 사용된 분리 겔은 15%를 사용하였고, 표준 분자량 마커로는 myosin(211 kDa), β -galactosidase(118 kDa), bovine serum albumin(78.9 kDa), ovalbumin(53 kDa), carbonic anhydrase(36.8 kDa), soybean trypsin inhibitor(28.6 kDa), lysozyme(17.8 kDa), aprotinin(6.4 kDa)을 사용하

였다. 전기영동 후, commasie brilliant blue를 사용하여 염색하고 탈색시켰다.

철분 결합 펩타이드의 분리

총 12시간 가수분해를 수행하여 얻은 해바라기씨박 단백질 가수분해물은 Amicon 8200(Millipore Co., Billerica, MA, USA)을 이용하여 한외여과를 하였다. Ultrafiltration disc로는 Ultracel PL-3(Millipore Co.)를 사용하였고, 한외여과를 통해 얻어진 가수분해물은 동결 건조하였다. 한외여과된 해바라기씨박 단백질 가수분해물은 anion exchange column(2.5 cm×20 cm, QAE Sephadex™ A-25, GE Healthcare Co., Uppsala, Sweden)을 이용하여 1.6 mL/min의 유속으로 분획하였다. 이동상 용매 A는 10 mM tris buffer(pH 8.0), 이동상 용매 B와 C는 10 mM tris buffer(pH 8.0)에 0.5 M NaCl, 1 M NaCl을 각각 첨가하여 사용하였다. 분획된 시료는 214 nm에서 흡광도를 측정하여 검출하였고, 분리된 각각의 fraction의 철분에 대한 결합력과 펩타이드 농도를 측정하였다. 분획 과정 중의 염을 제거하기 위하여 100~500 Da 이하 size의 크기를 투과하는 membrane(regenerated cellulose, Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA)을 이용하여 dialysis를 하였다. 얻어진 분획들을 더 분리하기 위하여 gel permeation chromatography를 이용하였는데, column은 Superdex™ peptide 10/300 GL column(GE Healthcare Co.)을 사용하였다. 이동상 용매로 deionized water를 사용하여 0.4 mL/min의 유속으로 분획하였고, 분획은 214 nm에서 흡광도를 측정하였다.

철분 결합력 측정

시료를 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 용해시킨 뒤 5 mM ferrous chloride(FeCl_2)를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후, 침전물을 제거하기 위해 4,000×g에서 20분간 원심분리 하여 상등액을 얻은 다음 ortho-phenanthroline을 이용한 발색법(24)으로 standard curve를 이용하여 철분 함량을 측정하였다.

결과 및 고찰

해바라기씨박 단백질 가수분해물 제조

생리활성을 가지는 펩타이드는 일반적으로 효소에 의한 단백질의 가수분해를 통하여 생산되는데(25), 본 연구에 사용된 alcalase와 flavourzyme은 가장 일반적으로 사용되는 상업적 protease로써 선행연구(26,27)를 기초하여 선정하였다. Alcalase와 flavourzyme을 병용하여 해바라기씨박 단백질을 가수분해한 후, 가수분해 시간에 따른 가수분해도를 측정하기 위해 그 지표로써 사용되는 available amino group 농도를 TNBS assay를 통해 측정하였다. 단백질이 가수분해 되면 가수분해 정도에 비례하여 available amino

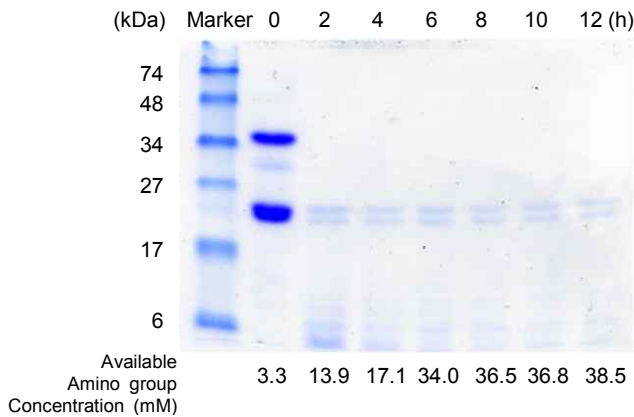


Fig. 1. Effect of hydrolysis time on SDS-PAGE profile of sunflower seed protein hydrolysates.

group 농도가 증가하기에 가수분해도를 나타내는 지표가 될 수 있다(14,27). 본 연구에서는 먼저 가수분해 시 alcalase를 첨가하였고, 4시간 경과 후 flavourzyme을 추가적으로 첨가하여 가수분해를 진행하였는데, 가수분해 시간이 경과함에 따라 available amino group 농도가 증가하는 것을 확인할 수 있었으나 효소 첨가 6시간 이후부터는 그 증가폭이 점점 감소하였다(Fig. 1). 처음 해바라기씨박 단백질 시료의 available amino group 농도는 3.3 mM이었고, alcalase 첨가 2시간 경과 후 13.9 mM로써 4시간이 지났을 때의 17.1 mM과 비교해 보았을 때 처음 2시간 동안 alcalase에 의한 가수분해가 가장 많이 일어난 것을 확인할 수 있었다. 그리고 4시간 후 flavourzyme을 추가적으로 첨가함으로써 가수분해 6시간 후 available amino group 농도가 34.0 mM로 증가했으나 8시간 후에는 36.5 mM로, flavourzyme을 첨가한 4시간부터 6시간 사이 가수분해 증가폭이 큰 반면에 6시간 후에는 더 이상 가수분해가 많이 일어나지 않았기에(Fig. 1), 해바라기씨박 단백질의 가수분해는 12시간(38.5 mM)이면 충분한 것으로 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Villanueva 등(5)의 해바라기씨박 단백질 가수분해 결과와 유사하였다.

SDS-PAGE를 통하여 해바라기씨박 단백질의 가수분해도를 측정하였다(Fig. 1). 단백 가수분해 효소를 첨가하고 가수분해를 진행한지 2시간이 되었을 때 36 kDa과, 17 kDa과 27 kDa 사이의 major band가 사라져 가수분해가 가장 활발하게 일어났음을 확인할 수 있었다. 단백 가수분해 효소 첨가 후 36 kDa의 band가 사라지고 6 kDa 이하의 band가 생긴 것을 확인할 수 있었는데, 이는 단백질이 가수분해되어 저분자량의 펩타이드 양이 증가함을 보여주는 것이고, 또한 가수분해 시간이 점차 경과함에 따라 6 kDa 이하의 band도 점차 사라지는 것을 볼 수 있었다. 따라서 TNBS assay와 SDS-PAGE 결과를 종합해 보았을 때 12시간 후에는 가수분해가 거의 완료됨을 확인할 수 있어서, 12시간 가수분해한 시료를 철분 결합 펩타이드 분리에 사용하였다.

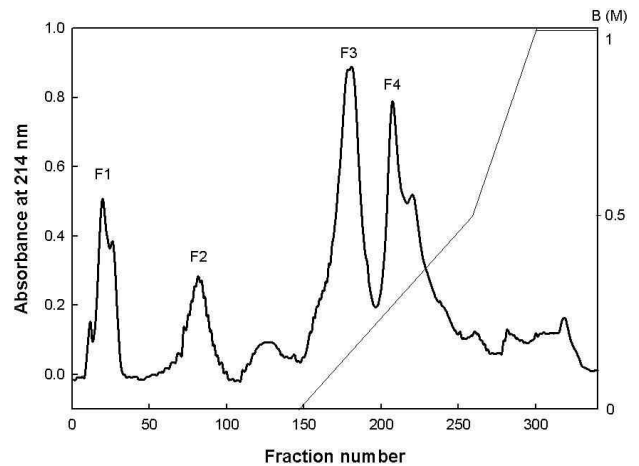


Fig. 2. Elution profile of sunflower seed protein hydrolysates from QAE Sephadex anion exchange chromatography. The absorbance was measured at 214 nm.

철분 결합 펩타이드의 분리

단백질 가수분해물의 경우, 저분자량 펩타이드가 쉽게 체내로 흡수되고 체내 이용률도 높기 때문에(28) 가수분해물을 분자량 3 kDa 이하로 한외여과 하였다. 한외여과한 해바라기씨박 단백질 가수분해물은 anion exchange chromatography를 사용하여 분리하였으며, 분획한 결과 4개의 주요 peak를 얻었고(Fig. 2), 각 분획의 펩타이드 함량과 철분 결합력을 측정하였다. 철분 결합력 계산을 위해 ortho-phenanthroline을 이용한 발색법(24)으로 측정된 흡광도는 standard curve를 이용하여 기존 방법(26,27)에 따라 철분 함량을 계산하였다. 그 결과, 주어진 시료의 peptide 함량 대비 철분 함량에 있어서 4개의 분획 중 F2의 철분 결합력이 가장 높게 나타났다(Fe/peptide: F1, 0.16; F2, 0.35; F3, 0.02; F4, 0.03). F2 분획을 다시 gel permeation chromatography column인 Superdex™ peptide 10/300 GL column을 사용하여 더 분리한 결과, 3개의 주요 peak를 얻었고(Fig. 3), 각 분획에 대한 펩타이드 함량과 철분 결합력을 측정한 결과, 3개의 분획 중 F22가 철분과의 결합력이 가장 높은 것으로 확인되었다(Fe/peptide: F21, 0.37; F22, 0.69; F23, 0.60). 이러한 결과는 기존 보고된 미강단백질 가수분해물을 이용한 철분 결합력을 측정 연구(26)에서 gel permeation chromatography를 이용하여 분리한 결과, 가장 높은 peptide 함량 대비 철분 함량을 측정된 결과 값인 0.63과 비교하여 비슷한 결과를 보여 철분 보충제의 소재로 적합하다고 판단된다.

Lv 등(29)의 대두 단백 가수분해물로부터 분리된 철분과 결합력이 강한 펩타이드를 동정한 결과, Glu와 Asp의 함량이 높은 펩타이드임을 보고하였고, 다른 육단백질 가수분해물로부터 분리된 펩타이드에서도 Glu와 Asp가 포함되어 있다고 보고되었다(30). 또한 Gaucheron(16)의 연구에 의하면 단백질이나 phosphopeptide의 주요 철분 결합 부위에는 phosphoserine, Asp, Glu와 같은 아미노산으로 구성되어

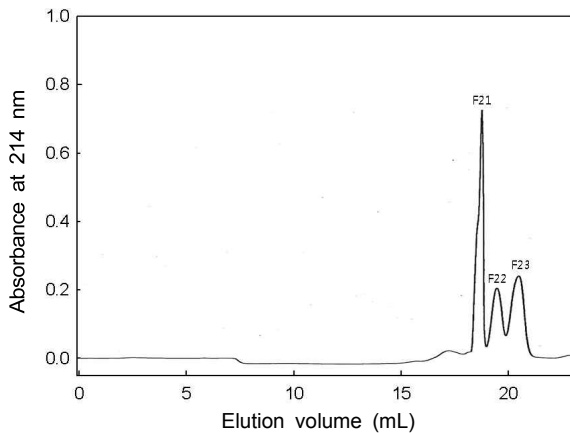


Fig. 3. Elution profile of the fraction 2 (Fig. 2) from Superdex™ peptide 10/300 GL column. The absorbance was measured at 214 nm.

있다고 보고하였는데, 이러한 결과는 Glu와 Asp가 철분과의 결합에 중요한 영향을 미친다는 것을 보여 준다. 또한 해바라기씨박 단백질을 가수분해하여 얻은 가수분해물의 구성 아미노산은 그 연구 방법에 따라 함량의 차이를 보이지만, Glu와 Asp, Arg의 함량이 많은 경향을 나타낸다고 보고된 바 있는데(5,31), 향후 F22의 아미노산 서열 분석 등의 연구가 더 필요하다고 생각된다.

결론적으로, 본 연구에서 해바라기씨박 단백질 가수분해물로부터 분리된 F22은 철분 결합력이 가장 큰 분획으로 확인되었는데, 향후 gel permeation chromatography를 통해 얻어진 F22와 F23들은 철분 결합력이 타 fraction에 비해 높아 기능성식품 소재로써 사용될 수 있다고 판단된다. 특히, 철분과 같은 무기질은 기존에 시판되고 있는 염의 형태보다 펩타이드에 결합된 형태가 더 안정적이며 체내 흡수 및 이용률이 높다는 장점이 있기 때문에 바람직한 식품소재라고 판단된다.

요 약

해바라기씨박 단백질 가수분해물로부터 철분 결합 펩타이드를 분리하기 위해 해바라기씨박 단백질을 단백질 가수분해 효소인 alcalase와 flavourzyme을 이용하여 가수분해하였고, 가수분해물을 3 kDa 이하로 한외여과를 하였다. 한외여과된 가수분해물은 QAE Sephadex™ A-25 column과 Superdex™ peptide 10/300 GL column을 사용하여 철분 결합 펩타이드를 분리하였고, 분리된 분획 중 철분 결합력이 가장 높은 F22를 얻었다. 본 연구에서 얻어진 해바라기씨박 단백질 가수분해물로부터 분리된 분획들은 향후 기능성식품 소재 원료로 사용될 수 있다고 판단된다.

REFERENCES

1. Villanueva A, Vioque J, Sanchez-Vioque R, Clemente A,

- Bautista J, Millan F. 1999. Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo- and exo-proteases. *Grasas Y Aceites* 50: 472-476.
2. Megías C, del Mar Yust M, Pedroche J, Lquari H, Girón-Calle J, Alaiz M, Millán F, Vioque J. 2004. Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. *J Agric Food Chem* 52: 1928-1932.
3. González-Pérez S, Vereijken JM. 2007. Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. *J Sci Food Agric* 87: 2173-2191.
4. Molina MI, Petrucci S, Anon MC. 2004. Effect of pH and ionic strength modifications on thermal denaturation of the 11S globulin of sunflower (*Helianthus annuus*). *J Agric Food Chem* 52: 6023-6029.
5. Villanueva A, Vioque J, Sanchez-Vioque R, Clemente A, Pedroche J, Bautista J, Millan F. 1999. Peptide characteristics of sunflower protein hydrolysates. *J Am Oil Chem Soc* 76: 1455-1460.
6. Kitts DD, Weiler K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr Pharm Des* 9: 1309-1323.
7. Roberts PR, Burney JD, Black KW, Zaloga GP. 1999. Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion* 60: 332-337.
8. Korhonen H, Pihlanto A. 2006. Bioactive peptides: production and functionality. *Int Dairy J* 16: 945-960.
9. Sheih IC, Wu TK, Fang TJ. 2009. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresour Technol* 100: 3419-3425.
10. Kim SY, Kim SH, Song KB. 2003. Purification of an ACE inhibitory peptide from hydrolysates of duck meat protein. *Nutraceuticals & Food* 8: 66-69.
11. 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.
12. Gauthier SF, Pouliot Y, Saint-Sauveur D. 2006. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Int Dairy J* 16: 1315-1323.
13. Zhong F, Liu J, Ma J, Shoemaker CF. 2007. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. *Food Res Int* 40: 661-667.
14. Lee SH, Song KB. 2009. Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein. *Process Biochem* 44: 378-381.
15. Megías C, Pedroche J, Yust MM, Girón-Calle J, Alaiz M, Millan F, Vioque J. 2007. Affinity purification of copper-chelating peptides from sunflower protein hydrolysates. *J Agric Food Chem* 55: 6509-6514.
16. Gaucheron F. 2000. Iron fortification in dairy industry. *Trends Food Sci Technol* 11: 403-409.
17. Ponka P, Beaumont C, Richardson DR. 1998. Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol* 35: 35-54.
18. Hurrell R, Egli I. 2010. Iron bioavailability and dietary reference values. *Am J Clin Nutr* 91: 1461S-1467S.
19. Torres-Fuentes C, Alaiz M, Vioque J. 2011. Affinity purification and characterization of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chem* 129: 485-490.
20. Hagenmaier FD. 1974. Aqueous processing of full-fat sunflower seeds: Yields of oil and protein. *J Am Oil Chem Soc* 51: 470-471.
21. Lee JH, Choi DW, Song KB. 2012. Isolation of calcium-

- binding peptides from barley protein hydrolysates. *Korean J Food Preserv* 19: 438-442.
22. 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.
 23. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
 24. Harris DC. 1995. *Quantitative chemical analysis*. 4th ed. W. H. Freeman and Company, New York, NY, USA. p 804-805.
 25. Korhonen H, Pihlanto A. 2003. Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Curr Pharm Des* 9: 1297-1308.
 26. 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.
 27. 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.
 28. Jung WK, Lee BJ, Kim SK. 2006. Fish-bone peptide increases calcium solubility and bioavailability in ovariectomised rats. *Br J Nutr* 95: 124-128.
 29. Lv Y, Liu Q, Bao X, Tang W, Yang B, Guo S. 2009. Identification and characteristics of iron-chelating peptides from soybean protein hydrolysates using IMAC-Fe³⁺. *J Agric Food Chem* 57: 4593-4597.
 30. Storcksdieck genannt Bonsmann S, Hurrell RF. 2007. Iron-binding properties, amino acid composition, and structure of muscle tissue peptides from in vitro digestion of different meat sources. *J Food Sci* 72: S019-S029.
 31. Conde JM, Escobar Mdel M, Pedroche Jiménez JJ, Rodríguez FM, Rodríguez Patino JM. 2005. Effect of enzymatic treatment of extracted sunflower proteins on solubility, amino acid composition, and surface activity. *J Agric Food Chem* 53: 8038-8045.