

***Streptococcus* sp. 기원의 Protease를 이용한 Casein Phosphopeptides의 생산**

임근형* · 이병우 · 박기문 · 손세형 · 유주현¹
오뚜기중앙연구소, ¹연세대학교 식품공학과

Production of Casein Phosphopeptides by Protease from *Streptococcus* sp.

Im, Geun-Hyung*, Byung-Woo Lee, Gi-Moon Park
Se-Hyung Son and Ju-Hyun Yu¹

Ottogi Research Center, Anyang 430-070, Korea

¹Dept. of Food Engineering, Yonsei Univ., Seoul 120-749, Korea

Abstract— For the production of Casein Phosphopeptides(CPP) inhibiting the insolubility of calcium, 10% sodium caseinate was treated with 1.5% of protease from *Streptococcus* sp.. Optimal conditions and productivity for the CPP production, and properties of the CPP were compared with tryptic hydrolysates of sodium caseinate. Optimum conditions of pH, temperature and reaction time were 8.0, 50°C, 4 hrs, respectively. Under these conditions the productivity of CPP was 23% and Molecular weight of CPP was ranged from 3,000 to 17,000. The results also showed that the insolubility of calcium was completely inhibited by using 1.5 times of CPP for the amount of calcium.

생물체내에는 많은 무기이온과 금속염이 존재하는데, 이들은 음식물로부터 섭취되고 배설되며, 생체내 체액중의 무기이온은 흡수와 배설의 조절에 의해 일정농도를 유지하고 있다. 또한, 약 20종류의 무기질 가운데 대부분은 결핍될 염려가 없으나 칼슘과 철분만은 부족현상을 보이고 있다(1, 2). 일반적으로 칼슘의 체내이용율은 그 기원 및 섭취량에 따라 다르며, 유제품의 경우 우유중에 존재하는 casein이 체내의 소화효소에 의해 분해되어 인산을 함유한 peptide를 생성하여 칼슘과 가용성복합체를 형성하기때문에 소장내에서의 흡수율이 높은 것으로 밝혀져 있다(3). 체내에서의 칼슘흡수는 소장상부에서 비타민 D나 각종 홀몬의 조절에 의한 능동적 흡수와 소장하부에서의 수동적 확산에 의한 흡수로 이루어지고 있으며, 특히 casein이 채장효소인 trypsin에 의해 분해된 phosphopeptide가 체내 칼슘흡수를 촉진하고(4), 우유단백질

인 casein의 trypsin 분해에 의한 분해물이 칼슘이나 철 등의 금속이온과 결합하여 가용성 복합체를 형성함으로써 체외로 배설되는 인산칼슘 등 불용성물질의 형성을 방지하는 효과가 있음이 밝혀져 있다(5). 또한, 内藤 博(6)은 인체외에서 trypsin 등의 소화효소에 의해 생성되는 casein phosphopeptides(CPP)가 현저히 칼슘가용화 효과가 있으며, 이것이 체내 소화효소에 의한 분해물과 거의 동일하다고 보고하였다. 본 연구에서는 CPP 생산을 목적으로 유산균의 일종인 *Streptococcus* sp.가 생성하는 효소를 이용하는 방법을 검토하였으며, trypsin에 의한 CPP와의 생산성을 비교하였다.

재료 및 방법

사용원료 및 효소

Sodium caseinate(MD FOODS, Denmark)를 기질로 사용했고, 효소는 기존의 CPP제조에 사용되고 있는 trypsin(Sigma사)을 기준 protease로 선정하여

Key words: *Streptococcus* sp., casein phosphopeptide (CPP)

*Corresponding author

(7) 사용하였으며, 새로운 미생물 효소를 이용한 CPP를 제조하기 위하여 단백분해활성이 높은 유산균 중 casein 분해력이 가장 좋은 *Streptococcus* sp.로부터 추출한 조효소액을 사용하였다.

Crude protease의 제조

Streptococcus sp. 배양액을 멸균 M17 broth 5L에 2% 접종하여 37°C에서 24시간동안 배양하고 8,000 rpm에서 15분간 원심분리한 상등액을 (NH₄)₂SO₄로 침전시켜 부분정제한 것을 조효소액으로 사용하였으며, 효소활성은 Casein-Folin법(8)을 변형하여 측정하였다. 즉 0.1 M phosphate buffer(pH 7.3) 3 ml에 효소액 1 ml와 5% casein액 1 ml를 가하여 65°C에서 40분간 반응시킨 후 5% TCA 용액 5 ml를 가하여 실험시켰다. 이 액을 여과(Toyo No. 5)하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 효소 1 g이 1시간 동안 반응하여 tyrosine 100 g을 생성하는 것을 1 unit로 하였다.

CPP 제조

효소처리된 배양액을 105°C에서 5분간 실험시킨 후, pH 4.6에서 등전침전시켜 얻은 상등액에 CaCl₂ 2%, 95% Ethanol 50%를 가하여 침전시킨 다음 8,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 회수한 침전물을 동결건조하여 CPP를 제조하였다(9).

CPP 생성조건 결정

Protease의 최적반응 조건을 결정하기 위해 sodium caseinate 사용량, pH, 반응온도 및 반응시간 등에 따른 CPP 생성량을 기준으로 하였고, 반응조건 설정시 삼각flask 및 5l fermenter를 사용하여 1차조건을 결정하였으며, 생산조건 설정을 위해 pilot scale (50l fermentor)에서 sodium caseinate에 조효소액을 가하여 반응시켜 얻은 효소분해물을 사용하여 CPP를 제조하였다.

분자량 측정

분자량분포 확인을 위하여 Swank 등(10)의 방법에 따라 SDS-PAGE를 행하였다. Separating gel buffer로는 1% SDS, 1.0 M H₃PO₄를 사용하여 12.5% gel 농도에서 12시간 전개시킨 다음, 0.25% Coomassie brilliant blue R-250으로 12시간 염색한 후 gel은 12.5% isopropanol, 10% acetic acid 혼합용액에서 탈색시켰으며, marker는 protein standard mixture I(Me-

rck, Germany)을 사용하였다.

순도측정

순도는 Ba-Ethanol 침전법(11)을 이용하였다. 즉 2% CPP 용액 100 ml에 10% BaCl₂ 용액 2.5 ml, ethanol 100 ml를 가하여 4°C에서 4시간동안 정치하여 얻어진 침전물(Ba-CPP)을 6,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 동결건조한 다음 중량을 확인하여 사용한 CPP와의 비를 구하였다.

칼슘가용화 실험

칼슘흡수촉진 효과를 확인하기 위하여 *in vitro*에서 인산칼슘 침전저지효과 확인실험을 행하였다. 즉 소장하부의 환경과 같은 pH 7.0, 37°C에서 증류수 0.5 ml에 CPP 0.5 ml, 10 mM CaCl₂ 0.5 ml, 20 mM phosphate buffer 1 ml를 혼합하여 CPP를 농도별로 첨가하여 25°C에서 6시간 정치한 후 원심분리하였고, 그 상등액내의 calcium 농도를 ICP로 측정하여 침전정도를 확인(12)함으로써 calcium과 phosphorous의 결합에 의한 침전물은 체내에 흡수되지 않는 칼슘으로 간주하여 CPP의 칼슘흡수율을 간접적으로 측정하였다.

결과 및 고찰

Crude protease activity

Streptococcus sp.를 M17 broth 배양액으로부터 생성된 조효소액을 사용하여 각각 온도 및 pH에 따른 activity를 측정한 결과는 Fig. 1에서와 같이 50°C, pH 8.0에서 최대활성을 나타냈다.

CPP 최적생성조건

Streptococcus sp.를 M17 broth에서 배양하여 투석한 액을 조효소액으로 사용하여 CPP의 최적생성조건을 설정한 결과는 Fig. 2와 같다. 즉 10% sodium caseinate를 사용하여 pH 8.0, 반응온도 50°C에서 4시간 반응시 CPP 생성율이 23%로 최적이었으며, 조효소 사용량은 기질용액에 대하여 1.5%가 적당하였다. 또한, trypsin의 최적반응조건인 pH 8.0, 반응온도 37°C에서의 반응시간에 따른 CPP 생성량 변화와 *Streptococcus* sp.로부터 추출한 조효소액의 CPP 생성량을 비교한 결과는 Fig. 3과 같다. 즉, trypsin을 사용했을 때 반응 1시간에서 CPP의 최대 생성량이 17%인데 비해 *Streptococcus* sp.를 배양하여 투석한 조효소액을

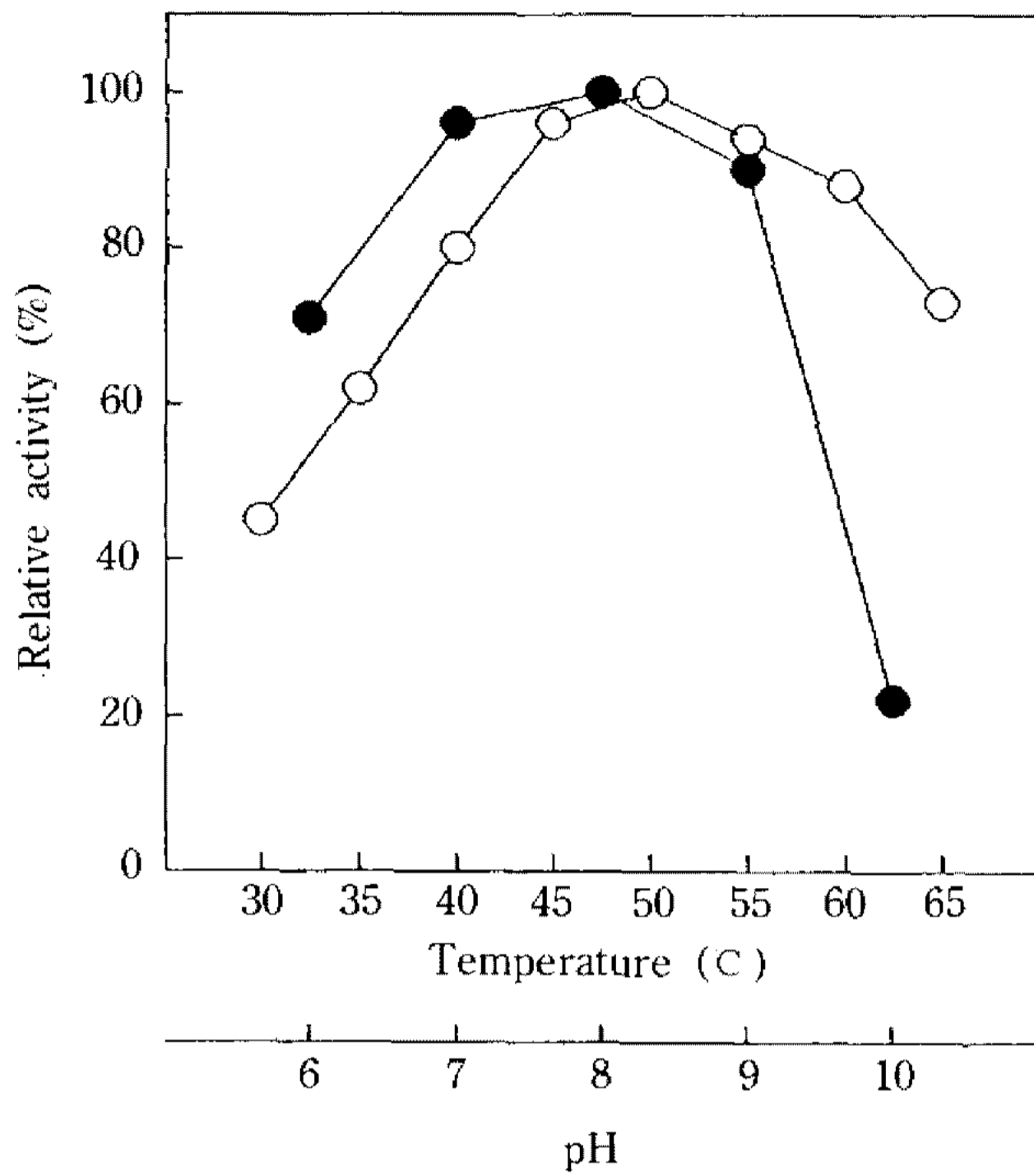


Fig. 1. Effect of temperature and pH on the activity of protease from *Streptococcus* sp.
 ○ Temperature, ● pH
 Maximum activity; temperature and pH was 50°C and 8.0, respectively.

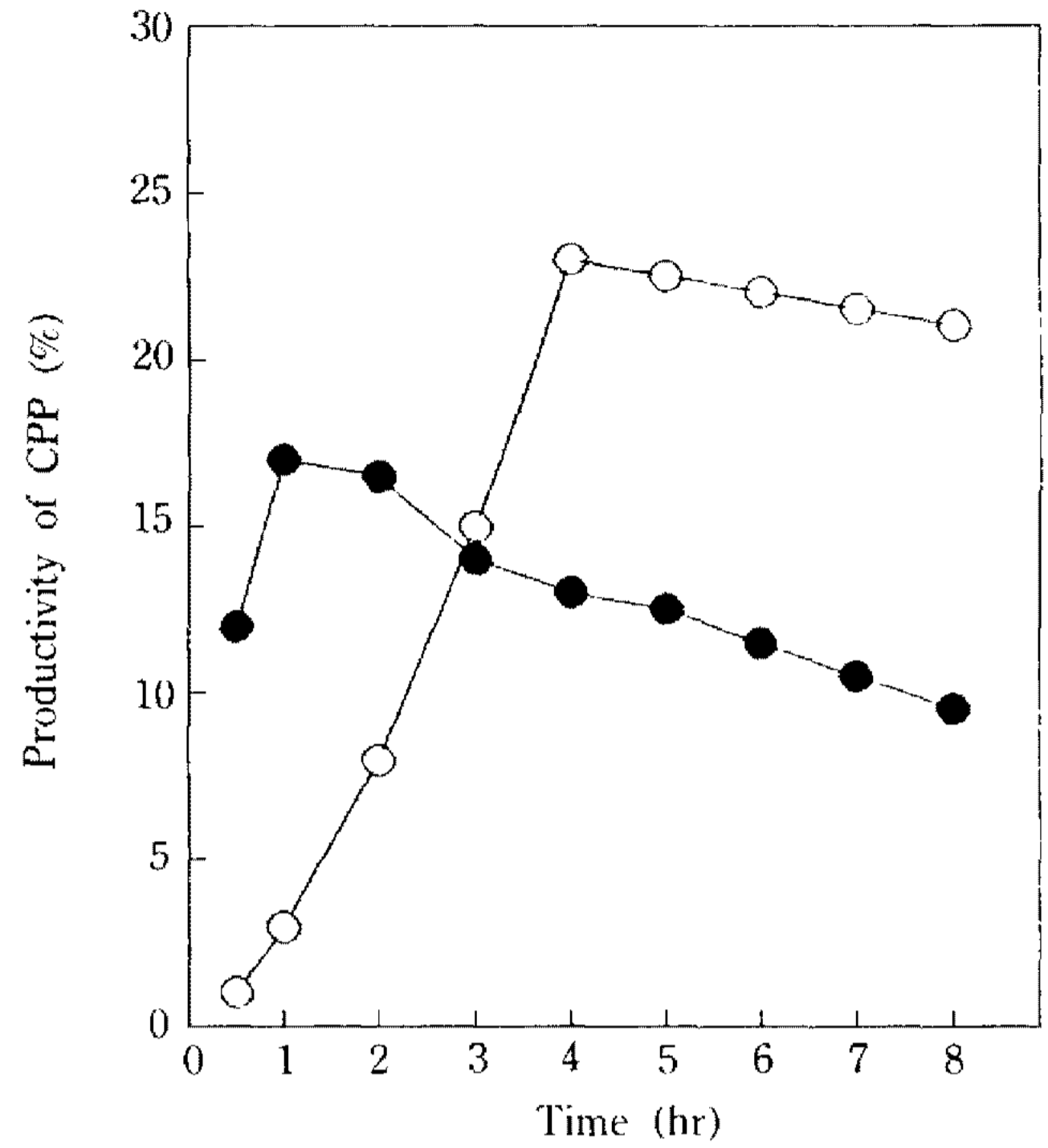


Fig. 3. Comparison of CPP production by trypsin and protease from *Streptococcus* sp. in 10% Na-caseinate solution.
 ○ Protease from *Streptococcus* sp. (15 ml/l, 50°C)
 ● Trypsin (2.38 g/l, 37°C)

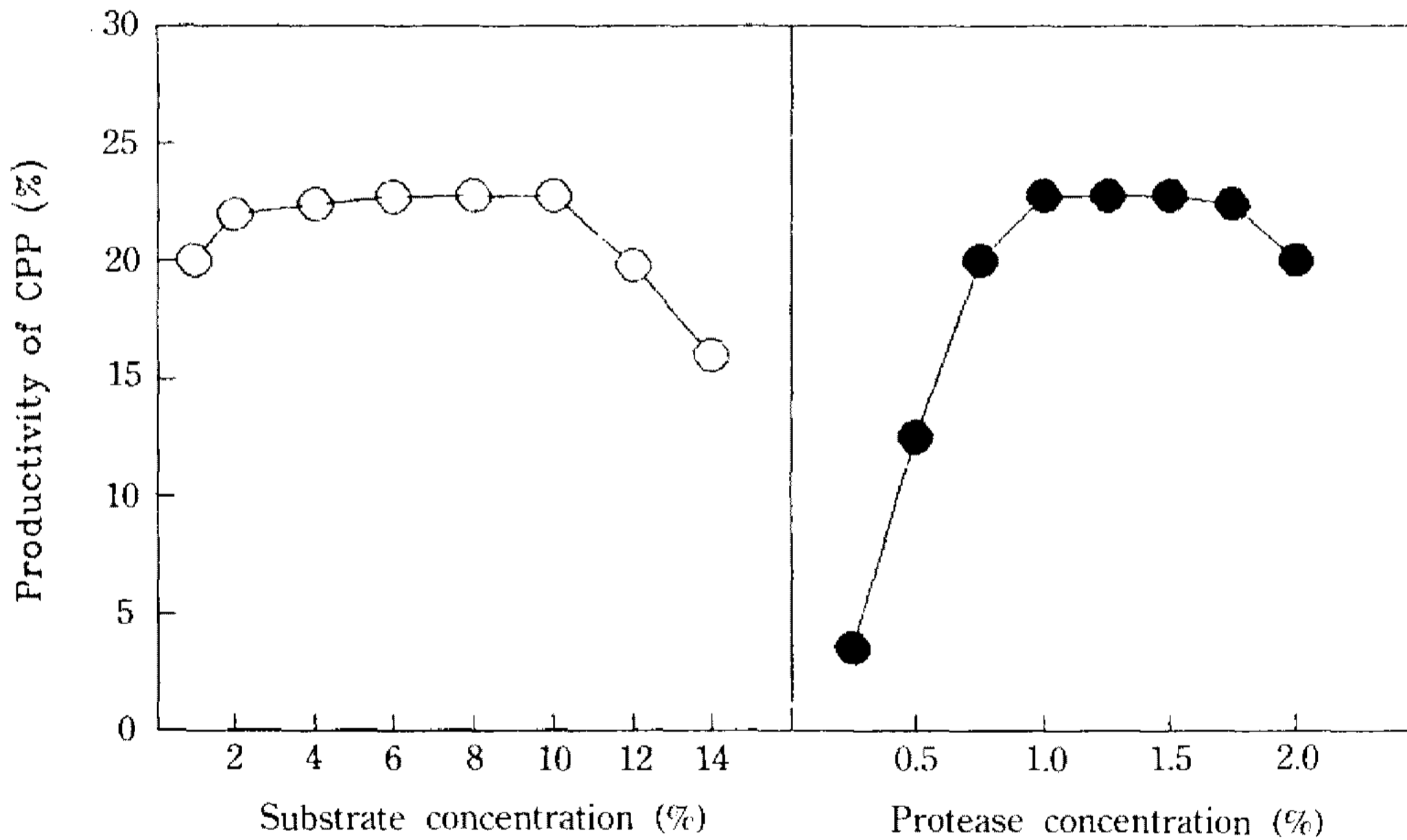


Fig. 2. Changes of CPP production in the concentration of substrate and protease from *Streptococcus* sp.

사용했을 때는 반응 4시간에서 23%로 더 높게 나타났다.

분자량분포 확인

Streptococcus sp. 배양액 및 trypsin을 사용하여 제조된 CPP의 분자량을 비교하기 위하여 SDS-

PAGE를 행한 결과 Fig.4와 같이 두 시료 모두 3,000~17,000으로 나타났다. 순수한 α-CPP 및 β-CPP의 분자량이 각각 4,600과 3,100인데 반해, 실험 결과와 같이 분자량분포가 큰 이유는 α-CPP 및 β-CPP 외에 다른 peptide 물질이 존재하고 있는 것으로 추측되며, 또한 α-CPP와 β-CPP는 일정하지 않기에

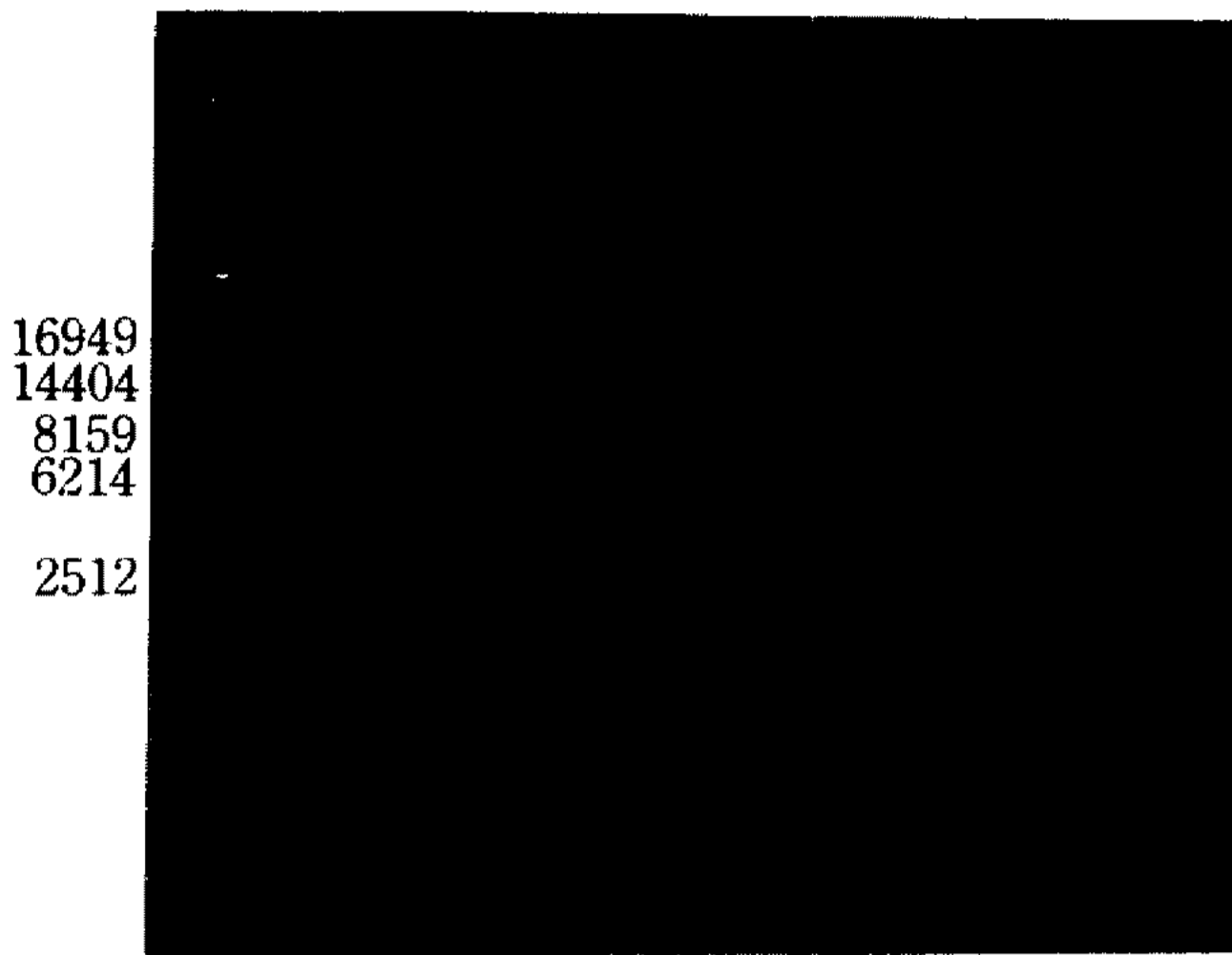


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of casein based materials.

Lane: A; Marker, B; Sodium-caseinate, C, D; CPP treated with trypsin, E, F; CPP treated with protease from *Streptococcus* sp.

Table 1. Purity of CPP

Protease	Purity
Trypsin	88%
<i>Streptococcus</i> sp.	90%

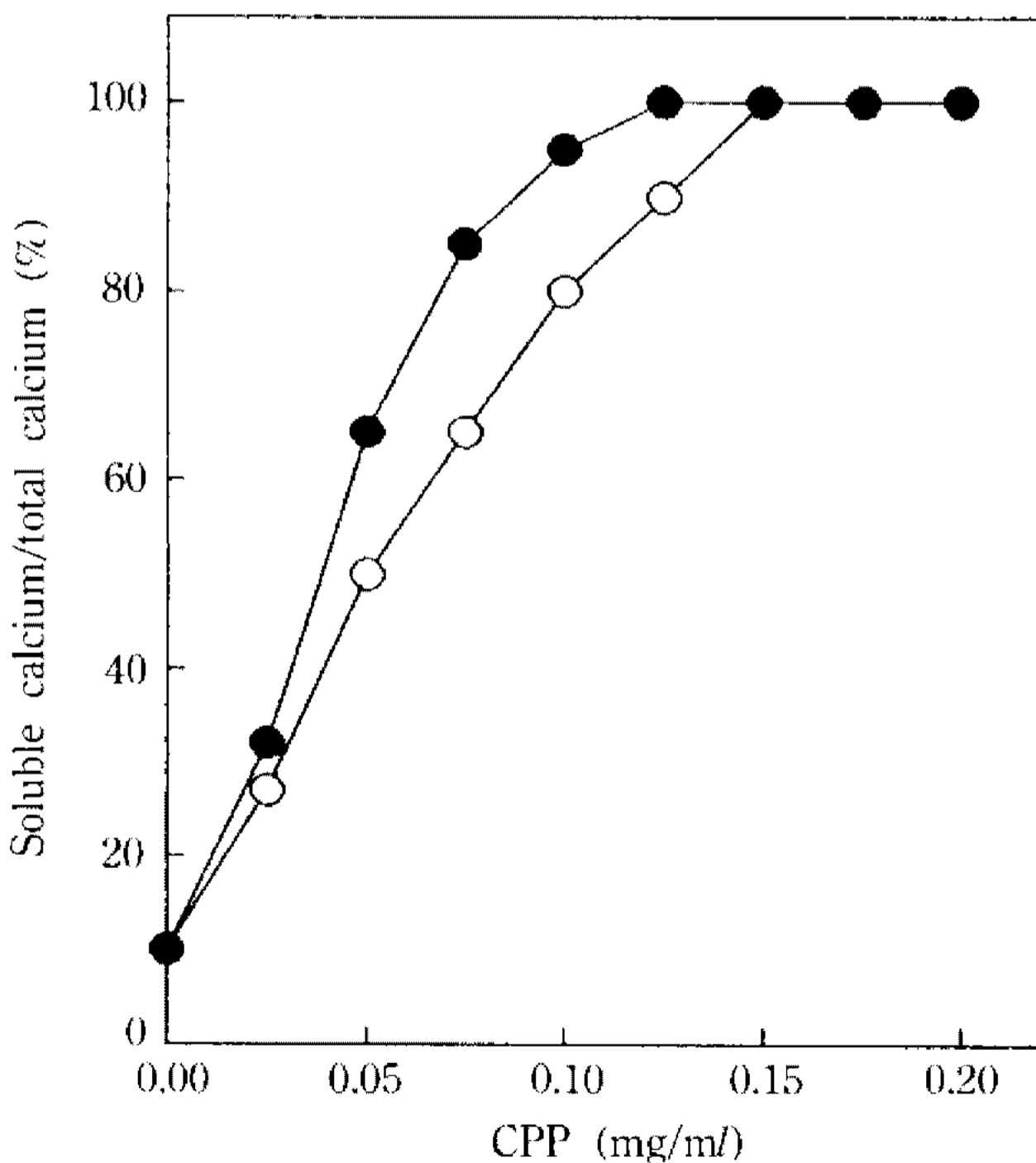


Fig. 5. Effect of CPP concentration on the solubility of calcium phosphate.

10 mM CaCl₂ 0.5 ml, 20 mM phosphate buffer 1 ml
 ○ CPP treated with protease from *Streptococcus* sp.
 ● CPP treated with trypsin

문에 공업적으로 일정한 조성의 CPP를 제조하기는 어렵다고 보고한 바 있다(13).

순도측정

Streptococcus sp. 배양액 및 trypsin을 사용하여 제조된 CPP의 순도를 비교한 결과는 table 1과 같이 차이가 없었으며, 본 실험에 사용한 CPP 생성량도 Naito 등(4)의 보고와 거의 유사하였다.

칼슘가용화 효과

Streptococcus sp. 배양액 및 trypsin을 사용하여 제조된 CPP의 칼슘침전방지 효과를 비교한 결과는 Fig. 5와 같다. 즉, 칼슘양에 대하여 trypsin에 의한 CPP는 1.25배, *Streptococcus* sp.에 의한 CPP는 1.5배 사용으로 칼슘의 불용성화를 100% 방지할 수 있었으며, 이는 齊藤安弘(1) 및 榮田利章(14)의 실험결과와도 거의 일치하였다.

요 약

칼슘의 불용성화를 저해하는 casein phosphopeptides(CPP)를 제조하기 위하여 sodium caseinate를 기질로 하여 기존의 trypsin과는 다른 *Streptococcus* sp.로부터 생성된 조효소를 사용하여 최적생성조건, 생산수율 및 그 특징을 검토하였다. 최적조건은 기질농도 10%에서 조효소 사용량 1.5%, 반응온도 50°C, pH 8.0 및 반응시간 4시간으로서, 이때의 CPP 생성율은 23%였다. 또한, CPP의 분자량은 3,000~17,000으로 확인되었으며, *in vitro*에서 칼슘양에 대하여 1.5배의 사용으로 칼슘의 불용성화를 방지할 수 있었다.

참고문헌

1. 齊藤安弘. 1990. CPP의 生理活性과 機能性食品에의 應用. *Japan Food Sci.* 1: 21-32.
2. 허갑범. 1990 영양과 관련된 질환의 현황과 대책. *한국영양학회지* 23: 204-207.
3. Armand, C.R. and H.M. Linkswiler. 1974. Effect of protein intake on calcium balance of young man given 500 mg calcium daily. *J. Nutr.* 104: 695-699.
4. Naito, H., A. Kawasaki and T. Imamura. 1972. *In vivo* formation of phosphopeptide with Ca-binding property in the small intestinal tract of the rat fed on casein. *Agr. Biol. Chem.* 36: 409-415.
5. Reeves, R.F. and N.G. Latour. 1958. Calcium

- phosphate sequestering phosphopeptide from casein. *Science* **128**: 472-478.
6. 内藤 博. 1986. casein의 消化時生成되는 phosphopeptide의 calcim 吸收促進機構. 日本營養食料學會誌 **39**: 433-441.
 7. 河村幸雄. 1990. Peptide素材의 開發과 應用. 食品과 開發 **26**: 33-37.
 8. Nakanish, T., Y. Matsmura, N. Minamiura and T. Yamamoto. 1974. Purification and some properties of an alkalophilic proteinase of a *Streptomyces* species. *Agr. Biol. Chem.* **38**: 37-44.
 9. 河野敏明. 1984. Casein phosphopeptide production with reduced bitterness, Japan patent 59-159792.
 10. Swank, R.W. and K.D. Munkres. 1971. Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal. Biochem.* **39**: 462-471.
 11. Peterson, R.F., L.W. Nauman and T.L. McMeekeen. 1958. The separation and amino acid composition of a pure phosphopeptone prepared from β -casein by the action of trypsin. *J. Am. Soc.* **80**: 95-99.
 12. 内藤 博. 1990. 健康飲品. *Japan Patent* 2-7616.
 13. 山田昌彦. 1990. CPP의 機能과 利用. 月刊食品化學 **6**: 46-52.
 14. 榮田利章. 1990. CPP의 生理機能과 그應用. 食品工業 **33**: 33-40.

(Received August 17, 1993)