

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁷
A23J 3/16

(45) 공고일자 2005년03월31일
(11) 등록번호 10-0479755
(24) 등록일자 2005년03월21일

(21) 출원번호 10-2002-0079333
(22) 출원일자 2002년12월12일

(65) 공개번호 10-2003-0048367
(43) 공개일자 2003년06월19일

(30) 우선권주장 1020010078478 2001년12월12일 대한민국(KR)

(73) 특허권자 학교법인고려중앙학원
서울 성북구 안암동5가 1 의2

(72) 발명자 최상운
서울특별시강남구도곡동960도곡대림아파트102-302

이신희
서울특별시광진구노유2동극동아파트1-501

양정익
서울특별시성북구성북동안암동5가1번지고대생명공학원

(74) 대리인 이덕록

심사관 : 김정희

(54) 인산화 대두펩타이드 칼슘의 제조방법

요약

본 발명은 인산화 대두펩타이드 칼슘의 제조방법에 관한 것으로, 분리대두단백질을 인산염을 이용하여 화학적으로 인산화한후 가수분해효소로 가수분해하거나, 먼저 가수분해효소로 가수분해하여 얻은 대두펩타이드를 화학적으로 인산화하여 얻은 인산화 대두펩타이드를 칼슘결합시킴으로써 제조한 인산화 대두펩타이드 칼슘은 높은 수용성을 가지며 생체내 칼슘의 흡수율을 높이는 뛰어난 효과가 있다.

대표도

도 1

색인어

대두단백질, 대두펩타이드, 포스포펩타이드, 칼슘, 인산화, 가수분해

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 선 인산화 - 후 가수분해 제조방법을 이용한 인산화 대두펩타이드 칼슘의 제조공정을 도시한 블록도이다.

도 2은 선 가수분해 - 후 인산화 제조방법을 이용한 인산화 대두펩타이드 칼슘의 제조공정을 도시한 블록도이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 인산화 대두펩타이드 칼슘의 제조방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명은 대두로부터 분리한 분리 대두단백질을 가수분해, 인산화 및 칼슘결합반응시켜 고효율의 인산화 대두펩타이드 칼슘을 제조하는 방법에 관한 것이다.

칼슘이온은 골격, 세포 및 체액 중에 존재하며 신경전달 및 근육수축에 관여하고 성장인자나 호르몬 등 다양한 자극을 세포내에 전달하는 등 폭 넓은 생리작용에 관계하고 있는 인체 내에서 함량이 높은 원소 중의 하나이다. 칼슘의 대부분은 뼈와 치아 내에 인산칼슘의 형태로 존재하지만 나이가 들면서 칼슘의 흡수율이 점차 줄어들고 이로 인해 뼈에 있는 칼슘이 이탈되어 골다공증이나 골연화증과 같은 질병을 일으키게 된다.

인체의 소화기내에서의 칼슘의 흡수는 수용성 상태로 존재하는 칼슘에 의해 좌우된다고 알려져 있다. 즉, 산성을 띠는 위장 내부에서는 칼슘이 흡수가 가능한 이온상태로 유지되어 거의 대부분 흡수될 수 있지만 pH가 중성에 가까운 소장 하부에서는 인(phosphorous)과 불용성 염을 형성하여 흡수되지 못한 채 체외로 배설된다. 이러한 불용성 칼슘을 과량 섭취하는 경우 결석이 형성되는 것으로 알려져 있다.

식품 중에서는 우유 속에 존재하는 유청 칼슘의 흡수율이 가장 높은 것으로 보고되어 있다. 그 이유로서 우유 중에 존재하는 유당이 유청 칼슘의 흡수를 촉진시키기 때문인 것으로 생각되지만 최근, 우유 단백질의 효소 가수분해물인 포스포펩타이드(phosphopeptide)가 인체의 소화기내에서 인산 칼슘의 형성을 억제하기 때문이라는 이론이 제안되고 있다. 상기와 같은 포스포펩타이드는 소화 효소에 의해 더 이상 분해되지 않으며 칼슘 이온과 수용성 복합체를 이루는 것으로 알려져 있다.

만슨(Manson) 등은 베타-카제인(β -casein)의 효소 가수분해물에서 25개의 아미노산으로 되어있는 포스포펩타이드를 분리하여 분석한 결과, 이 펩타이드가 4개의 인산화세린 (phosphoserine)을 포함하고 있음을 밝혔다(*Arch. Biochem. Biophys.* 145:16-26). 이처럼 소화기내에서 칼슘과의 수용성 복합체를 이루는 것이 바로 이 포스포펩타이드의 세린 잔기에 연결된 인산기(PO_4^{3-})인 것이 밝혀짐으로써 카제인 포스포펩타이드(casein phosphopeptide)에 의해 칼슘의 용해성이 증가하는 것은 이 펩타이드의 인산기에 기인하는 것으로 추정되고 있다. 또한 여러 동물실험들을 통해서도 포스포펩타이드에 의해서 가용성 칼슘의 양이 증가하여 그 흡수가 촉진된다는 사실이 증명되었다(*J. Nutr.* 110:2141-2148, *Br. J. Nutr.* 49:67-76). 일본의 사토(Sato) 등은 시험관 내 실험을 통해 쥐의 소장부분에서 카제인 포스포펩타이드의 칼슘 흡수 증진효과를 나타낸다는 것을 밝혀냈다(*J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 32:67-76).

우유에 존재하는 카제인 포스포펩타이드의 인산화는 카제인이 소포체 (endoplasmic reticulum)의 막을 통과한 후, 골지체(golgi complex)에 존재하는 카제인 키나아제(casein kinase)에 의해서 특이적으로 일어나는 반응이며(*J. Dairy. Sci.* 71:324-336), 현재까지 칼슘함유 천연식품 중에서는 우유 속의 카제인 포스포펩타이드가 가장 효율적으로 인체 내로의 칼슘 흡수를 촉진시키는 것으로 밝혀졌다. 그러나 카제인 포스포펩타이드는 우유에서 추출해야 하기 때문에 한정적인 추출량을 향상 시켜야 하는 문제가 있다.

따라서 칼슘의 결합력과 수용성이 증가하여 체내 흡수율이 용이하면서도 안전한 새로운 식품 또는 의약소재의 개발이 요구되어지고 있다.

대두 단백질은 우유 단백질 못지 않게 보편화되어 있고 영양학적으로 우수하며 뛰어난 경제성을 갖고 있다. 그러나 대두 단백질은 식물체내에서 인산화가 이루어지지 않으므로 칼슘을 함유하지 않아 칼슘의 주요 공급원이 될 수 없었다. 따라서 천연 대두단백으로부터 얻은 펩타이드를 효과적으로 인산화하여 칼슘 결합력과 수용성 및 체내 흡수율이 높은 칼슘 제재를 개발하는 일은 매우 의미 있는 일이 된다.

본 발명자들은 상기와 같은 점을 감안하여 분리대두단백질을 화학적으로 인산화한 후 가수분해효소로 가수분해하거나, 또는 가수분해로 얻어진 대두펩타이드를 인산화한 뒤 칼슘결합시킴으로써 인산화 대두펩타이드 칼슘을 제조 분리하고 상기 인산화 대두펩타이드 칼슘의 칼슘결합능력을 측정함으로써 본 발명을 완성하였다.

따라서, 본 발명의 목적은 분리대두단백질을 가수분해, 인산화 및 칼슘결합반응을 시킴으로써 고가의 카제인 포스포펩타이드를 대체할 수 있고 효율성이 우수한 인산화 대두펩타이드 칼슘을 제조하는 방법을 제공함에 있다.

상기 본 발명의 목적은 분리대두단백질로부터 최종 고효율의 인산화 대두펩타이드 칼슘을 얻기까지 전 공정에 대한 제조방법과 최적조건에 해당되며, 가수분해 및 인산화 등의 부분공정에 대한 발명과는 구분된다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 상기 목적은 분리대두단백질을 인산염을 이용하여 화학적으로 인산화한 후 가수분해효소로 가수분해하거나, 또는 가수분해로 얻은 대두펩타이드를 인산화한 뒤 칼슘결합반응을 시킴으로써 인산화 대두펩타이드 칼슘을 제조 분리하고 상기 인산화 대두펩타이드 칼슘의 칼슘결합능력을 측정함으로써 달성하였다.

이하, 본 발명의 구성 및 작용을 설명한다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 분리대두단백질을 인산염을 이용하여 화학적으로 인산화한 후 가수분해효소로 가수분해하고 칼슘결합반응을 시킴으로써 인산화 대두펩타이드 칼슘을 분리하는 단계; 분리대두단백질을 가수분해효소로 가수분해한 후 인산염을 이용하여 인산화하고 칼슘결합반응을 시킴으로써 인산화 대두펩타이드 칼슘을 분리하는 단계; 상기 두 단계에서 얻은 인산화 대두펩타이드 칼슘의 칼슘결합능력을 측정하는 단계로 구성된다.

본 발명의 인산화 대두펩타이드는 대두단백질이 부분적으로 절단된 대두펩타이드의 세린 잔기를 포함하여 인산화가 가능한 수산기(-OH)나 (-) 전위를 가진 아미노산 잔기에 다량의 인산기가 연결되어 있는 것이다.

본 발명에서는 칼슘과 결합하는 아미노산 잔기의 노출을 극대화하기 위하여 대두단백질을 가수분해하는 것이 바람직하다. 대두단백질의 가수분해는 강산 또는 강알칼리 처리에 의해 부분적으로 절단될 수 있으나, 산물의 품질 균일성을 보장하고 공정 소요시간을 절약하기 위하여 펩신(pepsin), 트립신(trypsin), 알카라제(Alcalase), 브로멜라인(Bromelain), 파파인(Papain), 또는 뉴트라제(Neutrase) 등과 같은 단백질 가수분해효소를 통상의 가수분해방법에 따라 이용하는 것이 바람직하다. 예를 들면, 상기의 단백질 분해효소를 반응물 내 기질의 1/250 ~ 1/1000의 비율로 첨가하여 30°C에서 3시간 동안 처리한다.

본 발명의 대두펩타이드에 인산기를 공유결합시키는 과정에서는 카제인 키나제(casein kinase) 등과 같은 각종의 단백질 분해 효소(protein kinases)를 사용할 수도 있으나 경제적인 면에서는 물론 인산화 효율을 증대시키기 위해서도 화학적인 방법을 적용하는 것이 더 유리하다.

분리대두의 경우 자체에 소량 존재하는 인산 이외에 인산의 공급원으로는 인산화 반응을 통해 영양가의 큰 손실 없이도 대두펩타이드의 여러 가지 물리화학적 성질을 변화시킬 수 있는 인산염을 선택하는 것이 바람직하다.

본 발명에서는 보다 효율적인 칼슘결합 및 환경친화적인 제품생산을 위하여 분리대두단백질을 인산염으로 처리한 후 가수분해하거나 분리대두단백질을 가수분해한 후 인산염으로 처리하는 제조방법을 이용한다.

본 발명에서 분리대두단백질의 인산화를 위한 인산염의 농도는 0.001~1%(v/v)가 바람직하다.

상기의 선 인산화 후 가수분해하는 전자의 방법은 화학적 인산화제인 화학적 인산화제인 인산염을 이용하여 대두단백질을 인산화시킨 후 효소를 이용하여 단백질을 가수분해시켜 인산화 대두 펩타이드(Phosphorylated Soybean Peptide)를 분리정제하는 것이고, 선 가수분해 후 인산화하는 후자의 방법은 공정의 순서를 달리하여 대두단백질을 먼저 효소가수분해하고 그 가수분해물(hydrolysate)을 인산화시켜 분리정제하는 것이다. 이 때, 인산화 대두 펩타이드의 분리정제는 잔존하는 인산염(sodium phosphate)을 제거하기 위한 것으로, 통상적인 분리정제방법에 따라 원심분리(8,000 rpm, 1시간) 혹은 투석(dialysis) 등을 이용하여 할 수 있다.

이하 본 발명의 구체적인 방법을 실시예를 들어 단계별로 설명하고자 하지만 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

실시예 1 : 선 인산화 - 후 가수분해 제조방법을 이용한 인산화 대두펩타이드 칼슘의 분리

분리대두단백을 10% 농도로 증류수에 녹이고 충분히 혼합한 후 10,000 × g로 30분간 원심분리하여 상등액을 얻어 내었다. 분리대두의 자체 인산기 농도에 따라 그대로 혹은 추가적으로 인산염(sodium metaphosphate, sodium trimetaphosphate, sodium polyphosphate 등)을 1%(v/v) 농도로 첨가하여 35°C에서 3시간동안 반응시킨 후 염산(HCl)용액을 이용하여 반응물의 pH를 8.0으로 조정하고 가수분해효소인 트립신을 반응물내 기질의 1/250 ~ 1/1000의 비율로 첨가하여 30°C에서 3시간 동안 가수분해하였다. 잔존하는 인산염을 제거하기 위하여 상기 반응물을 원심분리(8,000 rpm, 1시간)한 다음, 수산화나트륨(NaOH) 용액을 이용하여 반응물의 pH를 10.5로 조정하면서 염화칼슘을 1% 농도로 첨가하여 상온에서 1시간 동안 칼슘 결합반응을 시켰다.

상기와 같은 반응이 종결된 후 잔존하는 인산염(sodium phosphate)과 반응 부생성물을 제거하기 위해서 원심분리 혹은 투석(dialysis) 등으로 인산화 대두펩타이드 칼슘을 분리하였다.

실시예 2 : 인산염의 처리농도를 달리한 선 인산화 - 후 가수분해 제조방법을 이용한 인산화 대두펩타이드 칼슘의 분리

분리대두단백을 10% 농도로 증류수에 녹이고 충분히 혼합한 후 10,000 × g로 30분간 원심분리하여 상등액을 얻어 내었다. 분리대두의 자체 인산기 농도에 따라 그대로 혹은 추가적으로 인산염(sodium metaphosphate, sodium trimetaphosphate, sodium polyphosphate 등)을 0.001%(v/v) 농도로 첨가하여 35°C에서 3시간동안 반응시킨 후 염산(HCl)용액을 이용하여 반응물의 pH를 8.0으로 조정하고 가수분해효소인 트립신을 반응물내 기질의 1/250 ~ 1/1000의 비율로 첨가하여 30°C에서 3시간 동안 가수분해하였다. 잔존하는 인산염을 제거하기 위하여 상기 반응물을 원심분리(8,000 rpm, 1시간)한 다음, 수산화나트륨(NaOH) 용액을 이용하여 반응물의 pH를 10.5로 조정하면서 염화칼슘을 1% 농도로 첨가하여 상온에서 1시간 동안 칼슘 결합반응을 시켰다.

상기와 같은 반응이 종결된 후 잔존하는 인산염(sodium phosphate)과 반응 부생성물을 제거하기 위해서 원심분리 혹은 투석(dialysis) 등으로 인산화 대두펩타이드 칼슘을 분리하였다.

실시예 3 : 선 가수분해 - 후 인산화 제조방법을 이용한 인산화 대두펩타이드 칼슘의 분리

분리대두단백을 10% 농도로 증류수에 용해하여 혼합한 후 10,000 × g로 30분간 원심분리하여 상등액을 얻어내었다. 상기 상등액을 가수분해효소인 트립신을 이용하여 실시예 1에서와 같은 조건으로 가수분해하고 pH를 9.0으로 조정한다. 다음 분리대두의 자체 인산기 농도에 따라 그대로 혹은 추가적으로 인산염(sodium metaphosphate, sodium trimetaphosphate, sodium polyphosphate 등)을 1%(v/v)(또는 0.001%(v/v)) 농도로 첨가하여 35℃에서 3시간 동안 인산화 반응을 시켰다. 칼슘 결합반응을 시키기 전에 잔존하는 인산염을 제거하기 위하여 상기 반응물을 원심분리(8,000 rpm, 1시간)한 다음 수산화나트륨(NaOH) 용액을 이용하여 반응물의 pH를 10.5로 조정하고, 염화칼슘을 1% 농도로 첨가하여 상온에서 1시간 동안 칼슘 결합반응을 시켰다. 상기와 같은 반응이 종결된 후 다시 잔존하는 인산염(sodium phosphate)과 반응 부생성물을 제거하기 위하여 원심분리 혹은 투석(dialysis) 등으로 인산화 대두펩타이드 수용액을 분리하였다.

삭제

실시예 4 : 인산염의 처리농도를 달리한 선 가수분해 - 후 인산화 제조방법을 이용한 인산화 대두펩타이드 칼슘의 분리

분리대두단백을 10% 농도로 증류수에 용해하여 혼합한 후 10,000 × g로 30분간 원심분리하여 상등액을 얻어내었다. 상기 상등액을 가수분해효소인 트립신을 이용하여 실시예 1에서와 같은 조건으로 가수분해하고 pH를 9.0으로 조정한다. 다음 분리대두의 자체 인산기 농도에 따라 그대로 혹은 추가적으로 인산염(sodium metaphosphate, sodium trimetaphosphate, sodium polyphosphate 등)을 0.001%(v/v) 농도로 첨가하여 35℃에서 3시간 동안 인산화 반응을 시켰다. 칼슘 결합반응을 시키기 전에 잔존하는 인산염을 제거하기 위하여 상기 반응물을 원심분리(8,000 rpm, 1시간)한 다음 수산화나트륨(NaOH) 용액을 이용하여 반응물의 pH를 10.5로 조정하고, 염화칼슘을 1% 농도로 첨가하여 상온에서 1시간 동안 칼슘 결합반응을 시켰다. 상기와 같은 반응이 종결된 후 다시 잔존하는 인산염(sodium phosphate)과 반응 부생성물을 제거하기 위하여 원심분리 혹은 투석(dialysis) 등으로 인산화 대두펩타이드 수용액을 분리하였다.

삭제

실시예 5 : 칼슘 결합능력의 비교

상기 실시예로부터 얻은 인산화 대두펩타이드 칼슘의 칼슘결합능력을 비교하기 위해서, 상기 실시예 1 내지 4에서 얻은 인산화 대두펩타이드 칼슘 수용액에 TCA (trichloroacetic acid)를 최종 10%의 농도를 첨가하고 -20℃에서 12시간 이상 방치하여 침전시킨 후, 2,500 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 상등액에 존재하는 침전물을 분리하였다. 550℃에서 4시간 가량 회화한 후 10 mL 3N HCl로 시료를 녹인 후 5% La₂O₃와 3차 증류수로 희석한 후 원자흡광도계(Atomic Absorption Spectrophotometer)를 이용하여 정량하였다. 수율은 [측정된 칼슘(결합한 칼슘)의 양/ 첨가한 칼슘의 양]을 백분율로 계산하였다. 측정결과, 가수분해 후 인산화를 실시한 실시예 3 및 실시예 4의 시료가 더 높은 칼슘 결합능력을 나타내었다. 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1.

| | 결합한 칼슘의 비율 (%) |
|-------|----------------|
| 실시예 1 | 1.2 |
| 실시예 2 | 1.5 |
| 실시예 3 | 2.8 |
| 실시예 4 | 4.0 |

인산화 하지 않은 대두 펩타이드와 인산화한 것의 칼슘결합도를 대두펩타이드 농도별로 비교하였다. 칼슘결합능력 시험은 상기의 방법과 동일하였다. 측정결과를 표 2에 표시되었으며, 인산화한 대두펩타이드의 칼슘결합도가 인산화 하지 않은 것보다 월등히 높은 것을 보여주고 있다.

표 2.

| 대두펩타이드 | ISP 가수분해물 농도 (ppm) | 결합한 칼슘함량 (ppm) |
|--------|--------------------|----------------|
| 비인산화 | 50 | 1.8 |
| | 150 | 8.8 |
| 인산화 | 50 | 8.2 |
| | 150 | 26 |

발명의 효과

이상, 상기 실시예를 통하여 설명한 바와 같이 본 발명 인산화 대두펩타이드 칼슘의 제조방법은 칼슘결합능력과 수용성이 높아 생체 내 흡수율이 높은 인산화 대두펩타이드 칼슘을 제공함으로써 식품 및 제약산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

삭제

청구항 2.

분리대두단백질을 단백질분해효소로 가수분해하여 얻은 대두펩타이드를 인산염을 이용하여 화학적으로 인산화시키고 상기에서 얻은 인산화 대두펩타이드를 칼슘결합시킴을 특징으로 하는 인산화 대두펩타이드 칼슘의 제조방법.

청구항 3.

제 2항에 있어서, 상기 단백질분해효소는 트립신(trypsin), 펩신(pepsin), 알카라제(alcalase), 브로멜라인(bromelain), 파파인(papain) 및 뉴트라제(neutrase)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나임을 특징으로 하는 인산화 대두펩타이드 칼슘의 제조방법.

청구항 4.

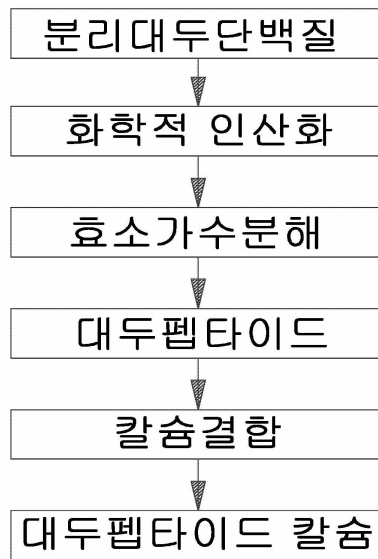
제 2항에 있어서, 상기 인산염은 소듐 메타포스페이트, 소듐 트리메타포스페이트 및 폴리인산나트륨으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나임을 특징으로 하는 인산화 대두펩타이드 칼슘의 제조방법.

청구항 5.

제 4항에 있어서, 상기 인산염의 농도는 0.001~1%(v/v)임을 특징으로 하는 인산화 대두펩타이드 칼슘의 제조방법.

도면

도면1



도면2

