(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0012688
(43) 공개일자 2013년02월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 21/06 (2006.01) *C07K 1/34* (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0073987
(22) 출원일자 2011년07월26일
심사청구일자 2011년07월26일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
송경빈
대전광역시 서구 청사로 70, 115동 508호 (월평동, 누리아파트)
이지혜
대전광역시 대덕구 중리서로 31, 103동 1508호 (중리동, 영진로얄아파트)
최동원
대전광역시 유성구 은구비남로 56, 열매마을 9단지 903동 701호 (노은동)
(74) 대리인
이원희

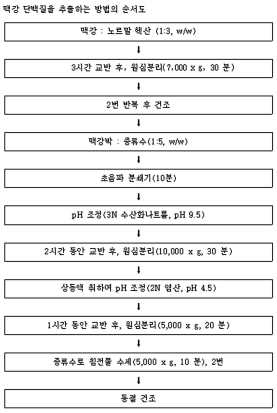
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **맥강 단백질 이용한 미네랄 결합 펩타이드의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 맥강유래 미네랄 결합 펩타이드 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로, 저활용되고 있는 양질의 단백질 소재인 맥강단백질을 알칼리 또는 산 처리로부터 추출하고, 추출된 단백질을 단백분해효소인 플라보자임(Flavourzyme)으로 가수분해한 후, 맥강단백질 가수분해물로부터 칼슘 또는 철분 등의 미네랄과 결합 활성이 우수한 펩타이드를 분리하는 방법에 의해 맥강으로부터 미네랄 결합 펩타이드를 간단하고 용이하게 제조할 수 있으며, 제조된 미네랄 결합 펩타이드는 기존 미네랄 강화식품 및 영양보충제품들의 체내 흡수율이 낮은 단점을 보안하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20110701302501001050O
부처명	농촌진흥청
연구사업명	식량안정생산 · 경쟁력 제고기술개발 사업
연구과제명	보릿가루의 단백질 소재자원 활용기술 개발
주관기관	충남대학교
연구기간	2011.06.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

1) 맥강(barley bran)으로부터 알칼리 또는 산을 처리하여 단백질을 추출하는 단계;

2) 단계 1)의 단백질에 가수분해효소를 처리하여 가수분해물을 제조하는 단계;

3) 단계 2)의 가수분해물을 한외여과하는 단계; 및

4) 단계 3)의 여과된 가수분해물을 미네랄과 반응시킨 후 미네랄 결합활성을 갖는 펩타이드를 분리하는 단계를 포함하는, 맥강유래 미네랄 결합 펩타이드의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 단계 1)의 산은 노르말 헥산인 것을 특징으로 하는 맥강유래 미네랄 결합 펩타이드의 제조방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 단계 1)의 추출은

1) 맥강을 노르말 헥산에 1:3(w/w)의 비율로 용해시키는 단계;

2) 단계 1)의 용해물을 교반 후 원심분리한 다음 건조시켜 탈지맥강을 제조하는 단계;

3) 단계 2)의 탈지맥강을 증류수에 1:5(w/w)의 비율로 가수시키는 단계;

4) 단계 3)의 가수분해물을 초음파 균질기로 맥강단백질을 추출하는 단계;

5) 단계 4)의 맥강단백질의 pH를 9.5로 조정하는 단계;

6) 단계 5)의 맥강단백질을 교반 후 원심분리한 다음 상등액을 취하는 단계;

7) 단계 6)의 상등액의 pH를 4.5로 조정하는 단계;

8) 단계 7)의 상등액을 교반 후 원심분리한 침전물을 취하는 단계; 및

9) 단계 8)의 침전물을 증류수로 수세하는 단계를 포함하는 방법에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 맥강유래 미네랄 결합 펩타이드의 제조방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 단계 2)의 가수분해효소는 플라보자임(Flavourzyme)인 것을 특징으로 하는 맥강유래 미네랄 결합 펩타이드의 제조방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 단계 3)의 한외여과는 분자량 5,000달톤 이하로 한외여과하는 것을 특징으로 하는 맥강유래 미네랄 결합 펩타이드의 제조방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 단계 4)의 미네랄은 칼슘 또는 철분인 것을 특징으로 하는 맥강유래 미네랄 결합 펩타이드의

제조방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 단계 4)의 펩타이드는

1) 단계 2)의 단백질을 인산완충용액에 용해시켜 5%(w/w) 수용액을 제조하는 단계;

2) 단계 1)의 수용액에 플라보자임을 기질 대비 50:1의 비율로 첨가하여 반응시켜 가수분해물을 제조하는 단계;

3) 단계 2)의 가수분해물을 가열시켜 가수분해효소를 불활성화시키는 단계;

4) 단계 3)의 가수분해물을 원심분리한 다음 상등액을 취하는 단계;

5) 단계 4)의 상등액을 한외여과시키는 단계; 및

6) 단계 5)의 여과액을 동결건조시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는 맥강유래 미네랄 결합 펩타이드의 제조방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 단계 4)의 펩타이드는 칼슘 결합 펩타이드인 것을 특징으로 하는 맥강유래 미네랄 결합 펩타이드의 제조방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 단계 4)의 미네랄 결합활성을 갖는 펩타이드는 이온교환 크로마토그래피(ion exchange chromatography), 아미노컬럼이 장착된 고속액체크로마토그래피(high performance chromatography) 및 겔여과 크로마토그래피(gel permeation chromatography)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 이용하여 분리하는 것을 특징으로 하는 맥강유래 미네랄 결합 펩타이드의 제조방법.

청구항 10

1) 맥강을 노르말 헥산에 1:3(w/w)의 비율로 용해시키는 단계;

2) 단계 1)의 용해물을 교반 후 원심분리한 다음 건조시켜 탈지맥강을 제조하는 단계;

3) 단계 2)의 탈지맥강을 3차 증류수에 1:5(w/w)의 비율로 가수시키는 단계;

4) 단계 3)의 가수분해물을 초음파 균질기로 맥강단백질을 추출하는 단계;

5) 단계 4)의 맥강단백질을 수산화나트륨으로 pH9.5로 조정하는 단계;

6) 단계 5)의 맥강단백질을 교반 후 원심분리한 다음 상등액을 취하는 단계;

7) 단계 6)의 상등액을 염산으로 pH4.5로 조정하는 단계;

8) 단계 7)의 상등액을 교반 후 원심분리한 침전물을 취하는 단계;

9) 단계 8)의 침전물에 증류수를 더하여 pH7.0이 되도록 수세한 맥강단백질을 제조하는 단계;

10) 단계 9)의 맥강단백질을 pH7.0의 인산완충액에 용해시켜 5%(w/w) 수용액을 제조하는 단계;

11) 단계 10)의 수용액에 플라보자임을 기질 대비 50:1의 비율로 첨가하여 반응시켜 가수분해물을 제조하는 단계;

12) 단계 11)의 가수분해물을 90℃에서 5분 가열하여 가수분해효소를 불활성화시키는 단계;

13) 단계 12)의 가수분해물을 원심분리한 후 상등액을 취하는 단계;

14) 단계 13)의 상등액을 분자량 5,000달톤 이하로 한외여과시키는 단계;

15) 단계 14)의 여과된 가수분해물을 동결건조시키는 단계; 및

16) 단계 15)의 여과된 가수분해물을 칼슘과 반응시킨 후 칼슘 결합활성을 갖는 펩타이드를 분리하는 단계를 포함하는, 맥강유래 칼슘결합 펩타이드의 제조방법.

청구항 11

제 1항의 방법으로 제조된, 맥강유래 미네랄 결합 펩타이드.

청구항 12

제 1항의 방법으로 제조된, 맥강유래 칼슘결합 펩타이드.

청구항 13

1) 맥강을 노르말 헥산에 1:3(w/w)의 비율로 용해시키는 단계;

2) 단계 1)의 용해물을 교반 후 원심분리한 다음 건조시켜 탈지맥강을 제조하는 단계;

3) 단계 2)의 탈지맥강을 3차 증류수에 1:5(w/w)의 비율로 가수시키는 단계;

4) 단계 3)의 가수분해물을 초음파 균질기로 맥강단백질을 추출하는 단계;

5) 단계 4)의 맥강단백질을 수산화나트륨으로 pH9.5로 조정하는 단계;

6) 단계 5)의 맥강단백질을 교반 후 원심분리한 다음 상등액을 취하는 단계;

7) 단계 6)의 상등액을 염산으로 pH4.5로 조정하는 단계;

8) 단계 7)의 상등액을 교반 후 원심분리한 침전물을 취하는 단계;

9) 단계 8)의 침전물에 증류수를 더하여 수세한 맥강단백질을 제조하는 단계;

10) 단계 9)의 맥강단백질을 pH7.0의 인산완충액에 용해시켜 5%(w/w) 수용액을 제조하는 단계;

11) 단계 10)의 수용액에 플라보자임을 기질 대비 50:1의 비율로 첨가하여 반응시켜 가수분해물을 제조하는 단계;

12) 단계 11)의 가수분해물을 90℃에서 5분 가열하여 가수분해효소를 불활성화시키는 단계;

13) 단계 12)의 가수분해물을 원심분리한 후 상등액을 취하는 단계;

14) 단계 13)의 상등액을 분자량 5,000달톤 이하로 한외여과시키는 단계;

15) 단계 14)의 여과된 가수분해물을 동결건조시키는 단계;

16) 단계 15)의 여과된 가수분해물을 칼슘과 반응시킨 후 칼슘 결합활성을 갖는 펩타이드를 분리하는 단계; 및

17) 단계 16)의 여과된 가수분해물을 이온교환 크로마토그래피에 로딩하여 10mM 트리스완충용액(Tris-buffer, pH8.0)을 사용하여, 3.3 ml/min의 유속으로 0.5M 소듐클로라이드(NaCl) 함유 완충용액으로 선형구배를 걸어 2시간 45분 내지 2시간 50분 사이에 분획된 분획물을 수득하는 단계를 포함하는 방법으로 제조된, 맥강유래 칼슘결합 펩타이드.

청구항 14

제 13항의 펩타이드를 고속액체 크로마토그래피를 이용하여 물과 아세토나이트릴(acetonitrile)을 3:97의 비율로, 0.1% 트리플로아세트산(trifluoroacetic acid, TFA)인 용매와 물과 아세토나이트릴(acetonitrile)을 70:30

의 비율로, 0.1% 트리플로아세트산인 용매를 0.5 ml/min의 유속으로 0~80% 까지 20분, 80~100% 까지 20분에 걸쳐 분획된 칼슘결합 펩타이드 분획에 5mM 염화칼슘을 반응시켜 원심분리 후 상등액 중 칼슘 함량을 측정한 후 가장 높은 결합력을 보인 5분 내지 10분 사이에 분획된 분획물을 수득하는 단계를 포함하는 방법으로 제조된, 맥강유래 칼슘결합 펩타이드.

청구항 15

제 14항의 펩타이드를 겔여과 크로마토그래피에 로딩하여 10mM 인산완충용액(pH7.0)으로 0.4 ml/min의 유속으로 5시간 15분 내지 5시간 40분 사이에 분획된 분획물인 단일 펩타이드를 수득하는 단계를 포함하는 방법으로 제조된, 맥강유래 칼슘결합 펩타이드.

청구항 16

제 15항의 펩타이드를 겔여과 크로마토그래피에 로딩하여 용매로 물을 사용하여 염을 제거한 후 0.5 ml/min의 유속으로 30분 내지 40분 사이에 분획된 분획물인 최종 단일 펩타이드를 수득하는 단계를 포함하는 방법으로 제조된, 맥강유래 칼슘결합 펩타이드.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 맥강으로부터 유래된 체내에서 미네랄 흡수를 증진시키는 미네랄 결합 펩타이드 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 보리는 밀, 쌀, 옥수수와 함께 세계 4대 곡물 중 하나로 우리나라에서 오랫동안 쌀 다음으로 중요한 곡식으로 우리 식생활에 널리 이용되어왔다. 특히 보리는 환경 적응력이 좋아 겨울철 농지 활용에 최적인 작물이며, 사용 용도에 있어서 폭넓은 가능성을 가지고 있다. 그러나 보리쌀 도정 후 남는 맥강의 경우 영양학적 구성이 뛰어나고, 특히 양질의 단백질을 다량 함유하고 있어서 유망한 단백질 자원임에도 불구하고 현재 대부분 사료로 쓰이고 있다. 따라서 저활용되고 있는 맥강으로부터 고부가가치 기능성 식품 소재를 생산해 낼 수 있는 기술 개발이 필요하다.

[0003] 국내 기능성식품 소재 개발 및 활용 기술은 선진국에 비해 부족하여 건강기능식품의 대부분을 수입에 의존하고 있는데, 생체조절 작용을 갖는 펩타이드는 일반적으로 효소를 이용한 단백질의 가수분해를 통해 얻어지고, 이렇게 제조된 펩타이드는 미네랄과 결합시켜 바이오미네랄을 제조할 수 있다. 특히 2~10개의 아미노산으로 된 저분자형 펩타이드는 분자크기가 세포막을 투과하기에 적당하며, 크기는 미네랄 이온과 킬레이트(chelate)할 수 있는 최단의 분자이기 때문에 미네랄 이온을 분자 외각으로의 노출을 막아 줄 수 있어 세포막 투과에 지장이 없으며 영양분의 흡수처인 소장막 세포를 통과하는 흡수작용이 용이한 장점이 있다. 또한, 기존의 철분, 칼슘 제재의 경우 대부분이 염 형태로 제조되기에 장에서의 흡수가 매우 낮은 문제점이 있는데, 이러한 문제점을 개선하고자 미네랄의 체내 흡수율을 증진시키기 위해서 단백질을 특정 효소로 분해하여 얻은 펩타이드를 이용하려는 시도가 행해지고 있다.

[0004] 구체적으로, 식품에서 유래된 단백질(Shimizu., BioFactors., 21:43, 2004), 유제품(Natio et al., Agr. Biol. chem., 36:409, 1972; Silva et al., Int. Dairy. J., 15:1, 2005), 가재(Inoue et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 318:649, 2004), 생선 뼈(김세권. 대한민국특허, 등록번호 10-0699047; Jung, W. K., Process Biochem., 41:2097, 2006), 리마콩(Maliarik et al., Plant Physiol., 95:286, 1991), 혈장단백질(Lee and Song, Process Biochem., 44:378-381, 2009), 미강(Jeon, S. J., J. Appl. Biol. Chem., 53:174, 2010) 등을 이용하여 연구되었는데, 맥강단백질 가수분해물로부터 칼슘 등 미네랄 결합을 갖는 펩타이드 제조에 대한 연구는 보고된 바 없다. 따라서 저활용되고 있는 맥강 단백질을 이용한 바이오미네랄 제품 기술 개발은 새로운 기

능성 식품 소재화 연구로써 의미가 크다고 판단된다.

[0005] 이에 본 발명자들은 저활용되고 있는 양질의 단백질 소재인 맥강 단백질을 알칼리·산 처리로부터 추출하고, 추출된 단백질을 단백분해효소인 플라보자임(flavourzyme) 등으로 가수분해한 후, 이것을 크로마토그래피법을 이용하여 미네랄과 높은 결합성을 갖는 펩타이드를 제조함으로서 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 맥강 단백질 이용한 미네랄 결합 펩타이드의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 제조방법에 의해 제조된, 맥강유래 미네랄 결합 펩타이드를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0009] 1) 맥강(barley bran)으로부터 알칼리 또는 산을 처리하여 단백질을 추출하는 단계;

[0010] 2) 단계 1)의 단백질에 가수분해효소를 처리하여 가수분해물을 제조하는 단계;

[0011] 3) 단계 2)의 가수분해물을 한외여과하는 단계; 및

[0012] 4) 단계 3)의 여과된 가수분해물을 미네랄과 반응시킨 후 미네랄 결합활성을 갖는 펩타이드를 분리하는 단계를 포함하는, 맥강유래 미네랄 결합 펩타이드의 제조방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은

[0014] 1) 맥강을 노르말 헥산에 1:3(w/w)의 비율로 용해시키는 단계;

[0015] 2) 단계 1)의 용해물을 교반 후 원심분리한 다음 건조시켜 탈지맥강(맥강박)을 제조하는 단계;

[0016] 3) 단계 2)의 탈지맥강을 3차 증류수에 1:5(w/w)의 비율로 가수시키는 단계;

[0017] 4) 단계 3)의 가수분해물을 초음파 균질기로 맥강단백질을 추출하는 단계;

[0018] 5) 단계 4)의 맥강단백질을 수산화나트륨으로 pH9.5로 조정하는 단계;

[0019] 6) 단계 5)의 맥강단백질을 교반 후 원심분리한 다음 상등액을 취하는 단계;

[0020] 7) 단계 6)의 상등액을 염산으로 pH4.5로 조정하는 단계;

[0021] 8) 단계 7)의 상등액을 교반 후 원심분리한 침전물을 취하는 단계;

[0022] 9) 단계 8)의 침전물에 증류수를 더하여 pH7.0이 되도록 수세한 맥강단백질을 제조하는 단계;

[0023] 10) 단계 9)의 맥강단백질을 pH7.0의 인산완충액에 용해시켜 5%(w/w) 수용액을 제조하는 단계;

[0024] 11) 단계 10)의 수용액에 플라보자임을 기질 대비 50:1의 비율로 첨가하여 반응시켜 가수분해물을 제조하는 단계;

[0025] 12) 단계 11)의 가수분해물을 90℃에서 5분 가열하여 가수분해효소를 불활성화시키는 단계;

[0026] 13) 단계 12)의 가수분해물을 원심분리한 후 상등액을 취하는 단계;

[0027] 14) 단계 13)의 상등액을 분자량 5,000달톤 이하로 한외여과시키는 단계;

[0028] 15) 단계 14)의 여과된 가수분해물을 동결건조시키는 단계; 및

[0029] 16) 단계 15)의 여과된 가수분해물을 칼슘과 반응시킨 후 칼슘 결합활성을 갖는 펩타이드를 분리하는 단계를 포함하는, 맥강유래 칼슘결합 펩타이드의 제조방법을 제공한다.

[0030] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 제조방법으로 제조된, 맥강유래 미네랄 결합 펩타이드를 제공한다.

[0031] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 제조방법으로 제조된, 맥강유래 칼슘결합 펩타이드를 제공한다.

[0032] 또한, 본 발명은

[0033] 1) 맥강을 노르말 헥산에 1:3(w/w)의 비율로 용해시키는 단계;

[0034] 2) 단계 1)의 용해물을 교반 후 원심분리한 다음 건조시켜 탈지맥강을 제조하는 단계;

[0035] 3) 단계 2)의 탈지맥강을 3차 증류수에 1:5(w/w)의 비율로 가수시키는 단계;

[0036] 4) 단계 3)의 가수분해물을 초음파 균질기로 맥강단백질을 추출하는 단계;

[0037] 5) 단계 4)의 맥강단백질을 수산화나트륨으로 pH9.5로 조정하는 단계;

[0038] 6) 단계 5)의 맥강단백질을 교반 후 원심분리한 다음 상등액을 취하는 단계;

[0039] 7) 단계 6)의 상등액을 염산으로 pH4.5로 조정하는 단계;

[0040] 8) 단계 7)의 상등액을 교반 후 원심분리한 침전물을 취하는 단계;

[0041] 9) 단계 8)의 침전물에 증류수를 더하여 수세한 맥강단백질을 제조하는 단계;

[0042] 10) 단계 9)의 맥강단백질을 pH7.0의 인산완충액에 용해시켜 5%(w/w) 수용액을 제조하는 단계;

[0043] 11) 단계 10)의 수용액에 플라보자임을 기질 대비 50:1의 비율로 첨가하여 반응시켜 가수분해물을 제조하는 단계;

[0044] 12) 단계 11)의 가수분해물을 90℃에서 5분 가열하여 가수분해효소를 불활성화시키는 단계;

[0045] 13) 단계 12)의 가수분해물을 원심분리한 후 상등액을 취하는 단계;

[0046] 14) 단계 13)의 상등액을 분자량 5,000달톤 이하로 한외여과시키는 단계;

[0047] 15) 단계 14)의 여과된 가수분해물을 동결건조시키는 단계;

[0048] 16) 단계 15)의 여과된 가수분해물을 칼슘과 반응시킨 후 칼슘 결합활성을 갖는 펩타이드를 분리하는 단계; 및

[0049] 17) 단계 16)의 여과된 가수분해물을 이온교환 크로마토그래피에 로딩하여 10mM 트리스완충용액(Tris-buffer, pH8.0)을 사용하여, 3.3 ml/min의 유속으로 0.5M 소듐클로라이드(NaCl) 함유 완충용액으로 선형구배를 걸어 2시간 45분 내지 2시간 50분 사이에 분획된 분획물을 수득하는 단계를 포함하는 방법으로 제조된, 맥강유래 칼슘결합 펩타이드(F3)를 제공한다.

[0050] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 맥강유래 칼슘결합 펩타이드(F3)를 고속액체 크로마토그래피를 이용하여 물과 아세토나이트릴(acetonitrile)을 3:97의 비율로, 0.1% 트리플로아세트산(trifluoroacetic acid, TFA)인 용매와 물과 아세토나이트릴(acetonitrile)을 70:30의 비율로, 0.1% 트리플로아세트산인 용매를 0.5 ml/min의 유속으로 0~80% 까지 20분, 80~100% 까지 20분에 걸쳐 분획하여 5분 내지 10분 사이에 분획된 분획물을 수득하는 단계를 포함하는 방법으로 제조된, 맥강유래 칼슘결합 펩타이드(F31)를 제공한다.

[0051] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 맥강유래 칼슘결합 펩타이드(F31)를 겔여과 크로마토그래피에 로딩하여 10mM 인산완충용액(pH7.0)으로 0.4 ml/min의 유속으로 5시간 15분 내지 5시간 40분 사이에 분획된 분획물인 단일 펩타이드를 수득하는 단계를 포함하는 방법으로 제조된, 맥강유래 칼슘결합 펩타이드(F311)를 제공한다.

[0052] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 맥강유래 칼슘결합 펩타이드(F311)를 겔여과 크로마토그래피에 로딩하여 용매로 물을 사용하여 염을 제거한 후 0.5 ml/min의 유속으로 30분 내지 40분 사이에 분획된 분획물인 최종 단일 펩타이드를 수득하는 단계를 포함하는 방법으로 제조된, 맥강유래 칼슘결합 펩타이드(F3111)를 제공한다.

발명의 효과

[0053] 본 발명은 저활용되고 있는 양질의 단백질 소재인 맥강 단백질을 알칼리 또는 산 처리로부터 추출하여, 추출된 단백질을 단백분해효소인 플라보자임 등으로 가수분해한 후, 맥강단백질 가수분해물을 크로마토그래피법을 이용하여 미네랄과 결합력이 높은 펩타이드를 분리 제조하는 방법을 제공하여, 이를 통해 미네랄 결합 펩타이드를 신속하고 용이하게 제조할 수 있으므로, 기존 미네랄 강화식품 및 영양보충제품들의 체내 흡수율이 낮은 단점을 보완하는 데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1은 맥강단백질을 추출하는 방법의 순서도이다.

도 2는 맥강단백질을 가수분해하여 펩타이드 제조하는 방법의 순서도이다.

도 3은 도 2에 있어서 맥강단백질 가수분해물의 가수분해 시간에 따른 전기영동 사진(SDS-PAGE)을 나타낸 도이다.

도 4는 도 2에 있어서 맥강단백질 가수분해물의 이온교환 크로마토그램(QAE Sephadex)을 나타낸 도이다.

도 5는 도 4에 있어서 칼슘과 결합성이 높은 분획 F3을 고속액체 크로마토그라피(-NH2 컬럼)에 다시 로딩한 크로마토그램을 나타낸 도이다.

도 6는 도 5에 있어서 칼슘과 결합성이 높은 분획 F31을 겔여과 크로마토그라피(Sephadex G15)에 다시 로딩한 크로마토그램을 나타낸 도이다.

도 7은 도 6의 분획 F311을 겔여과 크로마토그라피(Superdex)에 다시 로딩한 크로마토그램을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0056] 본 발명은 맥강(barley bran)으로부터 미네랄 결합 펩타이드를 제조하는 방법을 제공한다. 구체적으로 상기 방법은 하기와 같이 제조되는 것이 바람직하다:

[0057] 1) 맥강으로부터 알칼리 또는 산을 처리하여 단백질을 추출하는 단계;

[0058] 2) 단계 1)의 단백질에 가수분해효소를 처리하여 가수분해물을 제조하는 단계;

[0059] 3) 단계 2)의 가수분해물을 한외여과하는 단계; 및

[0060] 4) 단계 3)의 여과된 가수분해물을 미네랄과 반응시킨 후 미네랄 결합활성을 갖는 펩타이드를 분리하는 단계.

[0061] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 산은 노르말 헥산을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0062] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 추출은

[0063] a) 맥강을 노르말 헥산에 1:3(w/w)의 비율로 용해시키는 단계;

[0064] b) 단계 a)의 용해물을 교반 후 원심분리한 다음 건조시켜 탈지맥강(맥강박)을 제조하는 단계;

[0065] c) 단계 b)의 탈지맥강을 증류수에 1:5(w/w)의 비율로 가수시키는 단계;

[0066] d) 단계 c)의 가수분해물을 초음파 균질기로 맥강단백질을 추출하는 단계;

[0067] e) 단계 d)의 맥강단백질의 pH를 9.5로 조정하는 단계;

[0068] f) 단계 e)의 맥강단백질을 교반 후 원심분리한 다음 상등액을 취하는 단계;

[0069] g) 단계 f)의 상등액의 pH를 4.5로 조정하는 단계;

[0070] h) 단계 g)의 상등액을 교반 후 원심분리한 침전물을 취하는 단계; 및

[0071] i) 단계 h)의 침전물을 증류수로 수세하는 단계를 포함하는 방법에 의해 수행되는 것이 바람직하고, 도 1에 기재된 바와 같이 수행되는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정하지 않는다(도 1 참조).

[0072] 상기 방법에 있어서, 단계 e)의 pH는 수산화나트륨으로 조정하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0073] 상기 방법에 있어서, 단계 g)의 pH는 염산으로 조정하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0074] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 가수분해효소이 플라보자임(Flavourzyme) 인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0075] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 한외여과는 분자량 5,000달톤 이하로 한외여과하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0076] 상기 방법에 있어서, 단계 4)의 미네랄은 칼슘 또는 철분인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0077] 상기 방법에 있어서, 단계 4)의 펩타이드는

[0078] ⅰ) 맥강으로부터 추출된 단백질을 인산완충용액에 용해시켜 5%(w/w) 수용액을 제조하는 단계;

[0079] ii) 단계 ⅰ)의 수용액에 플라보자임을 기질 대비 50:1의 비율로 첨가하여 반응시켜 가수분해물을 제조하는 단계;

[0080] iii) 단계 ii)의 가수분해물을 가열시켜 가수분해효소를 불활성화시키는 단계;

[0081] iv) 단계 iii)의 가수분해물을 원심분리한 다음 상등액을 취하는 단계;

[0082] ⅴ) 단계 iv)의 상등액을 한외여과시키는 단계; 및

[0083] vi) 단계 ⅴ)의 여과액을 동결건조시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는 것이 바람직하고, 도 2에 기재된 바와 같이 수행되는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다(도 2 참조).

[0084] 상기 방법에 있어서, 단계 ⅰ)의 인산완충용액은 pH7.0인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0085] 상기 방법에 있어서, 단계 4)의 펩타이드는 칼슘 결합 펩타이드인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0086] 상기 방법에 있어서, 단계 4)의 미네랄 결합활성을 갖는 펩타이드는 이온교환 크로마토그래피(ion exchange chromatography), 아미노컬럼이 장착된 고속액체크로마토그래피(high performance chromatography) 및 겔여과 크로마토그래피(gel permeation chromatography)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 이용하여 분리하는 것이 바람직하고, 상기 세 가지 크로마토그래피를 순차적으로 수행하여 최종적으로 분리된 미네랄 결합활성이 우수한 펩타이드를 선별하는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

[0087] 또한, 본 발명은

[0088] 1) 맥강을 노르말 헥산에 1:3(w/w)의 비율로 용해시키는 단계;

[0089] 2) 단계 1)의 용해물을 교반 후 원심분리한 다음 건조시켜 탈지맥강을 제조하는 단계;

[0090] 3) 단계 2)의 탈지맥강을 3차 증류수에 1:5(w/w)의 비율로 가수시키는 단계;

[0091] 4) 단계 3)의 가수분해물을 초음파 균질기로 맥강단백질을 추출하는 단계;

[0092] 5) 단계 4)의 맥강단백질을 수산화나트륨으로 pH9.5로 조정하는 단계;

[0093] 6) 단계 5)의 맥강단백질을 교반 후 원심분리한 다음 상등액을 취하는 단계;

[0094] 7) 단계 6)의 상등액을 염산으로 pH4.5로 조정하는 단계;

[0095] 8) 단계 7)의 상등액을 교반 후 원심분리한 침전물을 취하는 단계;

[0096] 9) 단계 8)의 침전물에 증류수를 더하여 pH7.0이 되도록 수세한 맥강단백질을 제조하는 단계;

[0097] 10) 단계 9)의 맥강단백질을 pH7.0의 인산완충액에 용해시켜 5%(w/w) 수용액을 제조하는 단계;

[0098] 11) 단계 10)의 수용액에 플라보자임을 기질 대비 50:1의 비율로 첨가하여 반응시켜 가수분해물을 제조하는 단계;

[0099] 12) 단계 11)의 가수분해물을 90℃에서 5분 가열하여 가수분해효소를 불활성화시키는 단계;

[0100] 13) 단계 12)의 가수분해물을 원심분리한 후 상등액을 취하는 단계;

[0101] 14) 단계 13)의 상등액을 분자량 5,000달톤 이하로 한외여과시키는 단계;

[0102] 15) 단계 14)의 여과된 가수분해물을 동결건조시키는 단계; 및

[0103] 16) 단계 15)의 여과된 가수분해물을 칼슘과 반응시킨 후 칼슘 결합활성을 갖는 펩타이드를 분리하는 단계를 포함하는, 맥강유래 칼슘결합 펩타이드의 제조방법을 제공한다.

[0104] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 제조방법으로 제조된, 맥강유래 미네랄 결합 펩타이드를 제공한다.

[0105] 상기 미네랄은 칼슘 또는 철분인 것이 바람직하고, 칼슘인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

[0106] 또한, 본 발명은

[0107] 1) 맥강을 노르말 헥산에 1:3(w/w)의 비율로 용해시키는 단계;

[0108] 2) 단계 1)의 용해물을 교반 후 원심분리한 다음 건조시켜 탈지맥강을 제조하는 단계;

[0109] 3) 단계 2)의 탈지맥강을 3차 증류수에 1:5(w/w)의 비율로 가수시키는 단계;

[0110] 4) 단계 3)의 가수분해물을 초음파 균질기로 맥강단백질을 추출하는 단계;

[0111] 5) 단계 4)의 맥강단백질을 수산화나트륨으로 pH9.5로 조정하는 단계;

[0112] 6) 단계 5)의 맥강단백질을 교반 후 원심분리한 다음 상등액을 취하는 단계;

[0113] 7) 단계 6)의 상등액을 염산으로 pH4.5로 조정하는 단계;

[0114] 8) 단계 7)의 상등액을 교반 후 원심분리한 침전물을 취하는 단계;

[0115] 9) 단계 8)의 침전물에 증류수를 더하여 수세한 맥강단백질을 제조하는 단계;

[0116] 10) 단계 9)의 맥강단백질을 pH7.0의 인산완충액에 용해시켜 5%(w/w) 수용액을 제조하는 단계;

[0117] 11) 단계 10)의 수용액에 플라보자임을 기질 대비 50:1의 비율로 첨가하여 반응시켜 가수분해물을 제조하는 단계;

[0118] 12) 단계 11)의 가수분해물을 90℃에서 5분 가열하여 가수분해효소를 불활성화시키는 단계;

[0119] 13) 단계 12)의 가수분해물을 원심분리한 후 상등액을 취하는 단계;

[0120] 14) 단계 13)의 상등액을 분자량 5,000달톤 이하로 한외여과시키는 단계;

[0121] 15) 단계 14)의 여과된 가수분해물을 동결건조시키는 단계;

[0122] 16) 단계 15)의 여과된 가수분해물을 칼슘과 반응시킨 후 칼슘 결합활성을 갖는 펩타이드를 분리하는 단계; 및

[0123] 17) 단계 16)의 여과된 가수분해물을 이온교환 크로마토그래피에 로딩하여 10mM 트리스완충용액(Tris-buffer, pH8.0)을 사용하여, 3.3 ml/min의 유속으로 0.5M 소듐클로라이드(NaCl) 함유 완충용액으로 선형구배를 걸어 2시간 45분 내지 2시간 50분 사이에 분획된 분획물을 수득하는 단계를 포함하는 방법으로 제조된, 맥강유래 칼슘결

합 펩타이드(F3)를 제공한다(도 4 참조).

[0124] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 칼슘결합 펩타이드(F3)를 고속액체 크로마토그래피를 이용하여 물과 아세토나이트릴(acetonitrile)을 3:97의 비율로, 0.1% 트리플로아세트산(trifluoroacetic acid, TFA)인 용매와 물과 아세토나이트릴(acetonitrile)을 70:30의 비율로, 0.1% 트리플로아세트산인 용매를 0.5 ml/min의 유속으로 0~80% 까지 20분, 80~100% 까지 20분에 걸쳐 분획하여 5분 내지 10분 사이에 분획된 분획물을 수득하는 단계를 포함하는 방법으로 제조된, 맥강유래 칼슘결합 펩타이드(F31)를 제공한다(도 5 참조).

[0125] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 칼슘결합 펩타이드(F31)를 겔여과 크로마토그래피에 로딩하여 10mM 인산완충용액(pH7.0)으로 0.4 ml/min의 유속으로 5시간 15분 내지 5시간 40분 사이에 분획된 분획물인 단일 펩타이드를 수득하는 단계를 포함하는 방법으로 제조된, 맥강유래 칼슘결합 펩타이드(F311)를 제공한다(도 6 참조).

[0126] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 칼슘결합 펩타이드(F311)를 겔여과 크로마토그래피에 로딩하여 용매로 물을 사용하여 염을 제거한 후 0.5 ml/min의 유속으로 30분 내지 40분 사이에 분획된 분획물인 최종 단일 펩타이드를 수득하는 단계를 포함하는 방법으로 제조된, 맥강유래 칼슘결합 펩타이드(F3111)를 제공한다(도 7 참조).

[0127] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 상세히 설명한다.

[0128] 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0129] **<실시예 1> 맥강으로부터 맥강단백질의 추출**

[0130] 우선 맥강을 탈지시키고자 노르말 헥산에 1:3 비율로 용해시킨 후, 3시간동안 교반하여 7,000 x g, 30분 원심분리하고 이 과정을 두 번 반복하였다. 원심분리하고 남은 탈지맥강을 건조시켜 5배의 3차 증류수에 가수시켜 입자가 고르게 분산되면 초음파균질기를 이용하여 맥강단백질을 추출하고, 3N 수산화나트륨으로 pH를 9.5로 조정하여 2시간 동안 교반 한 후, 10,000 x g, 20분 원심분리하였다. 얻어진 상등액은 2N의 염산으로 pH를 4.5로 조정하여 맥강단백질을 침전시켰다. 침전된 맥강단백질 용액은 5,000 x g, 30분 다시 원심분리 하여 침전물에 증류수를 더하여 pH 7.0이 되도록 수세하고, 추출된 맥강단백질은 동결 건조하여 가수분해를 위한 시료로 사용하였다(도 1).

[0131] **<실시예 2> 맥강단백질로부터 가수분해를 이용한 펩타이드의 제조**

[0132] 상기 <실시예 1>의 맥강단백질을 10mM 인산완충액(Sodium phosphate buffer, pH 7.0)에 용해하여 5% 수용액을 제조하였다. 단백질 가수분해 효소 플라보자임은 기질 대비 50:1 비율로 첨가하여 쉐이킹 인큐베이터(shaking incubator), 50℃에서 24시간 동안 가수분해를 실시하였고, 가수분해가 종료되면 효소 반응을 정지시키기 위해 90℃ 항온수조에서 5분 가열하여 효소를 불활성화시켰다. 효소 불활성 후 가수분해물을 3,500 x g에서 20분간 원심분리하여 얻어진 상등액만을 취해서 실온에서 한외여과 과정을 거쳐 분자량 5,000달톤 이하 펩타이드만을 수거하여 동결건조 하였다(도 2).

[0133] **<실시예 3> 맥강단백질의 가수분해 시간에 따른 가수분해정도 확인**

[0134] 맥강단백질의 가수분해 시간에 따른 가수분해 정도를 확인하기 위해 단백질전기영동(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)을 이용하였다(도 3). 15% 세퍼레이팅겔(separating gel)과 5% 스태킹겔(stacking gel)로 구성된 겔을 사용하고, 표준분자량 표지는 분자량별 라이소자임(14.4 kDa), 트립신저해제(21.5 kDa), 탄산무수화효소(31 kDa), 오브알부민(45 kDa), 소혈청알부민(66.2 kDa), 포스포릴라아제(97 kDa)을 사용하였다.

[0135] 그 결과, 도 3에서 보는 바와 같이 시간에 따른 가수분해도를 볼 때 24시간이 최적 가수분해 시간인 것으로 확인되었다(도 3).

[0136] **<실시예 4> 맥강단백질의 가수분해물로부터 칼슘결합 가수분해물의 제조**

[0137] 맥강단백질 가수분해물을 10mM 인산완충용액에 0.1g/L 농도로 첨가하여 제조된 가수분해물 용액에 5mM 염화칼슘($CaCl_2$)을 첨가하여 실온에서 30분간 교반하고, 원심분리한 후 상등액을 취하여 칼슘결합 가수분해물을 제조하였다. 맥강단백질 가수분해물과 결합한 칼슘의 농도는 칼슘-오쏘-크레졸프탈레인컴플렉슨법(calcium-o-cresolphthalein complexone method)을 이용하여 정량하였다. 10mM 인산완충액(pH 7.0)에 용해한 맥강단백질 가수분해물을 오쏘-크레졸프탈레인컴플렉슨용액과 염산(hydrochloric acid) 그리고 8-하이드록시퀴놀린(8-hydroxy quinoline)이 첨가된 발색시약(color reagent)과 반응시키고, 실온에서 15분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0138] **<실시예 5> 칼슘결합 가수분해물의 칼슘결합력이 우수한 펩타이드의 제조**

[0139] **<5-1> 이온교환 크로마토그래피를 이용한 칼슘결합분획의 제조**

[0140] 맥강단백질 가수분해물을 이온교환 크로마토그래피(QAE sephadex)에 로딩하여 크로마토그램으로 나타내었다. 10mM 트리스완충액(Tris-buffer, pH 8.0)을 사용하였으며, 3.3 ml/min의 유속으로 0.5M 소듐클로라이드(NaCl) 함유 완충용액으로 선형구배(linear gradient)를 걸어 분획한 결과 7개의 주요 피크로 분획하였다. 각 분획에 5mM 염화칼슘을 반응시켜 원심분리 후 상등액 중 칼슘 함량을 측정하였다.

[0141] 그 결과, 도 4에서 보는 바와 같이 가장 높은 칼슘 결합력을 보인 F3을 분획하였다(도 4).

[0142] **<5-2> 고속액체 크로마토그래피를 이용한 칼슘결합분획의 제조**

[0143] 상기 실시예 <5-1>의 F3을 모아 동결건조시킨 다음 고속액체 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 컬럼은 아미노(-NH2)컬럼을, 용매 A(물:아세토나이트릴(acetonitrile), 3:97, 0.1% 트리플로로아세트산(trifluoroacetic acid, TFA))과 용매 B(물:아세토나이트릴, 70:30, 0.1% 트리플로로아세트산)를 0.5 ml/min의 유속으로 0~80% 까지 20분, 80~100% 까지 20분에 걸쳐 칼슘결합 펩타이드 분획을 분리하였다. 2개의 주요 피크로 분획하였는데 각 분획에 5mM 염화칼슘을 반응시켜 원심분리 후 상등액 중 칼슘 함량을 측정하였다.

[0144] 그 결과, 도 5에서 보는 바와 같이 가장 높은 결합력을 보인 분획물은 F31인 것을 확인하였다(도 5).

[0145] **<5-3> 겔여과 크로마토그래피를 이용한 칼슘결합분획의 제조**

[0146] 상기 실시예 <5-2>의 F31을 모아 동결건조시킨 다음 겔여과 크로마토그래피(Sephadex G15)에 로딩하여 정제하였다. 10mM 인산완충액(pH 7.0)을 0.4ml/min의 유속으로 흘려 분획하였다.

[0147] 그 결과, 도 6에서 보는 바와 같이 단일 펩타이드(F311)를 분리하였다(도 6).

[0148] **<5-4> 단일 펩타이드의 정제**

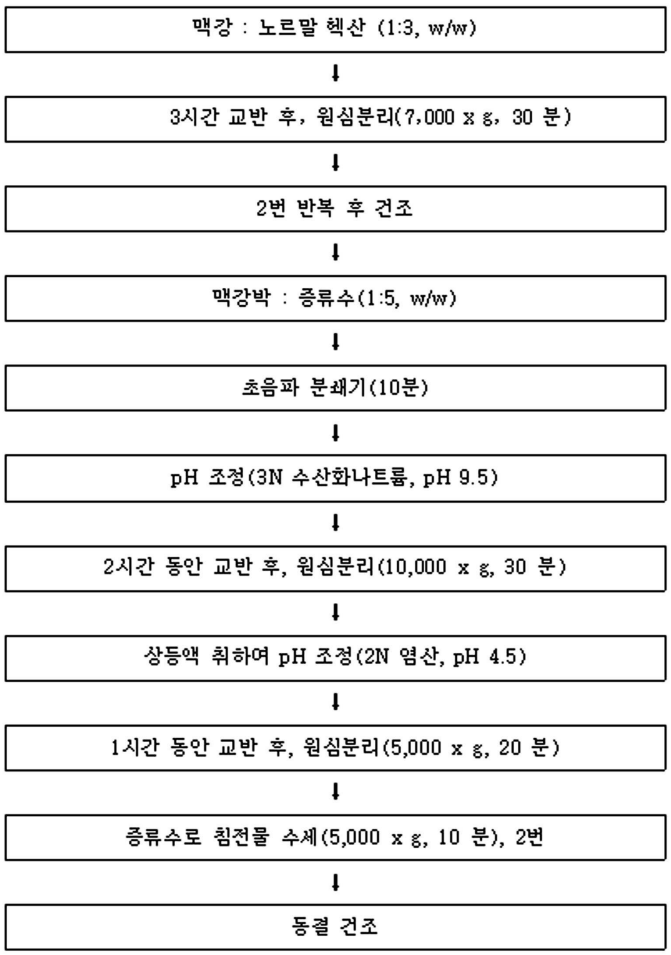
[0149] 상기 실시예 <5-3>의 F311을 모아 동결건조시킨 다음 겔여과 크로마토그래피(Superdex)에 로딩하여 최종적으로 정제하였다. 용매로 물을 사용하여 염을 제거하였고, 유속은 0.5ml/min으로 흘려 분획하였다.

[0150] 그 결과, 도 7에서 보는 바와 같이 칼슘과 결합하는 최종 단일 펩타이드(F3111)를 분리하였다(도 7).

도면

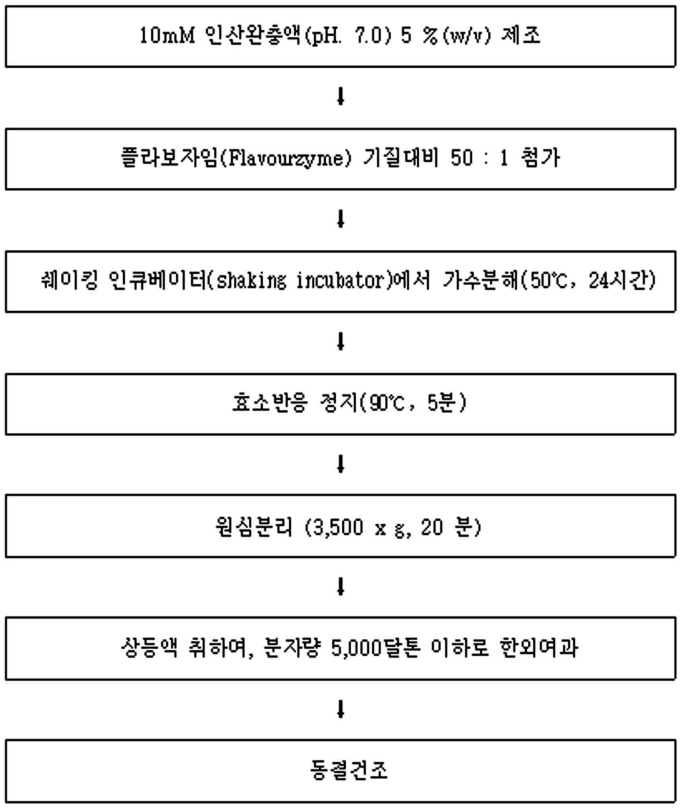
도면1

맥강 단백질을 추출하는 방법의 순서도



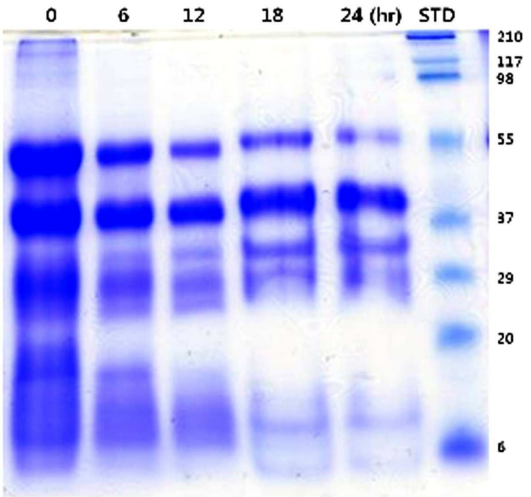
도면2

맥강단백질을 가수분해하여 펩타이드 제조하는 방법의 순서도



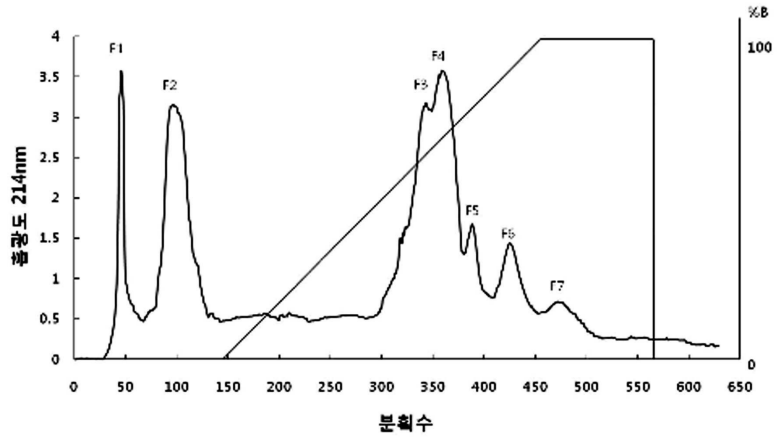
도면3

맥강단백질 가수분해물의 가수분해 시간에 따른 SDS-PAGE



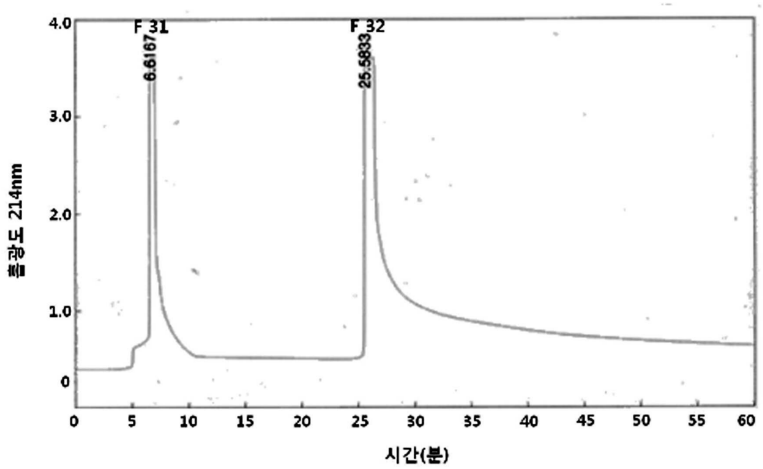
도면4

맥강단백질 가수분해물의 이온교환크로마토그램

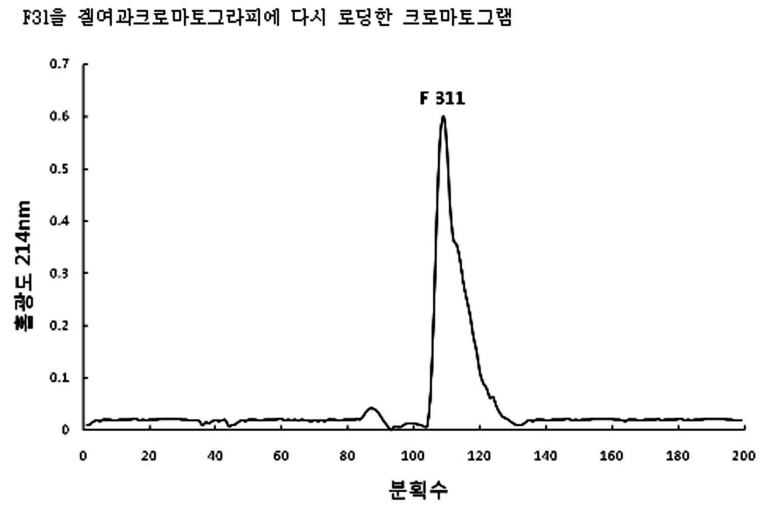


도면5

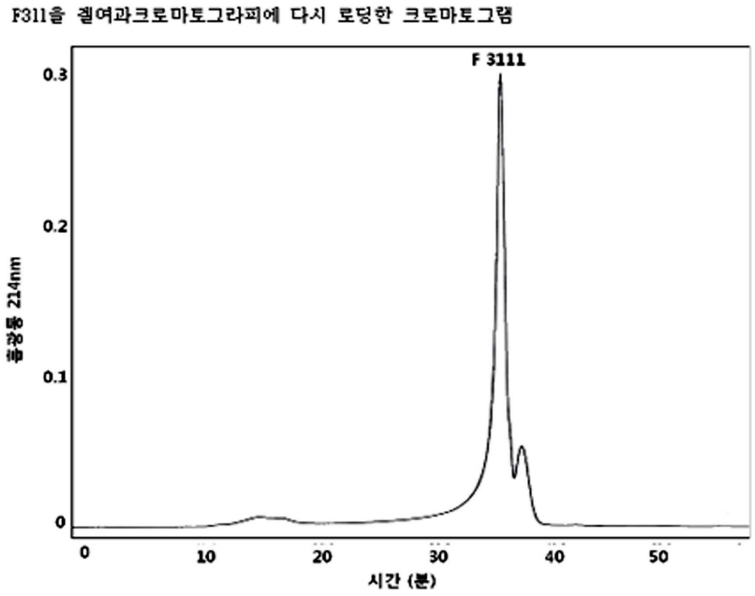
F3을 고속액체크로마토그라피에 다시 로딩한 크로마토그램



도면6


F31을 겔여과크로마토그라피에 다시 로딩한 크로마토그램
F 311
흡광도 214nm
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
분획수

도면7


F311을 겔여과크로마토그라피에 다시 로딩한 크로마토그램
F 3111
흡광도 214nm
0.3
0.2
0.1
0
0
10
20
30
40
50
시간 (분)