

최 종
연구보고서

대두 펩타이드를 이용한
고효율 칼슘 제재의 생산기술 개발
(Production of Soybean Phosphopeptide Calcium)

고려대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “대두 펩타이드를 이용한 고효율 칼슘 제제의 생산기술 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002년 11월 23일

주관연구기관명 : 고려대학교
총괄연구책임자 : 최 상 윤
세부연구책임자 : 최 상 윤
연구 원 : 오 상 목
연구 원 : 표 철 응
연구 원 : 유 명 숙
연구 원 : 박 선 호
연구 원 : 이 신 희
연구 원 : 이 범 진
협동연구기관명 : 서도비엔아이
협동연구책임자 : 김 일 환

요 약 문

I. 제 목

대두 펩타이드를 이용한 고효율 칼슘제재의 생산기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 핵심은 첨단 단백질화학 및 인산화 가공 기술을 이용하여, 인체 내로의 흡수도가 탁월한 천연 calcium-peptide 제재를 값싼 칼슘원료와 대두 단백질로부터 생산함으로써, 전량 수입하는 calcium-casein phosphopeptide (CPP)를 대체하는 방법을 확립함을 물론 식, 의약품용 칼슘 제재 개발에 대한 기초연구를 병행함으로써 관련 고부가가치 제품의 응용성 개발에 기여한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 칼슘의 장내 흡수를 증가시킬 수 있는 칼슘 펩타이드를 생산하는데 그 목적이 있다. 칼슘을 무기염 혹은 유기염 형태로 섭취하였을 경우, 인 성분과 더불어 위장 내에서 불용성 침전물을 형성하는 것으로 알려져 있는데 결국 소장 세포막을 통한, 효과적인 칼슘의 흡수를 위해서는 CPP와 같이 단백질의 부분 가수분해물인 oligopeptide와 결합된 수용성 칼슘 형태가 가장 적합한 것으로 알려져 있다. 따라서 칼슘과 결합할 수 있는 phosphopeptide를 경제적으로 분리함으로써 장내 흡수가 용이한 고밀도 칼슘 제재를 생산하고 칼슘 결합에 필수적인 아미노산 성분과 인산화 조건을 확립하였으며 더불어 칼슘 펩타이드의 소장 세포내로의 흡수도를 측정 방법을 개발하여 칼슘 흡수도를 측정하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

칼슘 결합 인산화 펩타이드의 제조에 있어서 인산염을 결정하고 인산화 반응의 조건과 염화칼슘의 농도, 칼슘 결합 반응의 최적 조건을 결정하였고 그 결과 대두 펩타이드의 인산화 반응과 인산화된 펩타이드의 칼슘 결합 반응에 있어서 수소 이온 농도가 중요한 요소로 확인되었으며 무엇보다 펩타이드의 아미노산 구조가 중요하게 작용하는 것으로 확인되었다. 칼슘은 인산화 펩타이드와 결합했을 때 수용액 속의 인산염 존재 조건 하에서도 침전되지 않고 높은 용해도를 유지한다는 결과를 얻었고 실제로 동물 세포를 이용한 칼슘 펩타이드의 흡수도 측정 실험에서 칼슘이 소장 세포 내로 uptake되는 것을 확인하였다. 따라서 칼슘결합 펩타이드는 장내 흡수 과정에서도 침전되지 않고 수용성 칼슘의 형태를 유지할 수 있을 것으로 보인다. 이러한 결과를 토대로 산업화에 응용한다면 기존 시판 제품과는 달리, 효율적으로 장내 흡수가 가능한 형태의 칼슘 제재를 생산 할 수 있다. 당연히 기존 제품과는 충분한 가격 경쟁력이 있으며 수입 대체의 효과도 클 것으로 기대된다.

SUMMARY

Calcium works as a second messenger as well as one of the major components of bone minerals. In order to increase the total absorption level of calcium during the intestinal absorption, a sort of soluble mineral calcium was prepared with peptides derived from isolated soybean protein (ISP). The ISP was modified by tryptic digestion and chemical phosphorylation using a variety of polyphosphate salts including sodium trimetaphosphate, and followed by calcium binding. The optimum conditions for the highest solubility and binding activity of calcium were established. Calcium binding property of the soybean phospho-peptides derived from ISP was compared according to their sizes and amino acid compositions. To investigate the calcium binding properties of the peptide hydrolysates in detail, the proglycinin expressed in *E. coli* was also purified almost homogeneity by ammonium sulfate precipitation, ion-exchange chromatography, and cryoprecipitation. In general, shorter phospho-peptides showed a pronounced level of calcium binding activity than longer peptides without phosphorylation. The hydrophobicity of peptides does not seem to correlate with the calcium binding. It was observed that the phosphorylation on serine residues was crucial for calcium binding activity. The level of absorption of soluble calcium phosphopeptides through peptide transporter was determined using a calcium sensitive reporter in animal cells. Our goals are to establish a new approach in the *in vitro* screening system for the absorption of various forms of calcium. These data may provide a role of the human intestinal oligopeptide transporter in the calcium uptake in addition to the potent application of calmodulin gene in the calcium absorption assay with intestinal cells. These results may lead to an efficient approach in improving oral absorption of calcium or its derivatives.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of the report on development of research

I. Objects and necessities of the development of research

1. Technical aspects
2. Economic industrial aspects
3. Social cultural aspects

II. Scope of the studies

Chapter 2. Status of the development of techniques domestically and at overseas

I. Status of the development of related techniques within the country and at overseas

II. Position of the outcome of the research at the present status of progress

Chapter 3. Contents and products of the development of research

I. Production of calcium bound phosphopeptide

1. Approach of the experiment and contents of the research

- a. Separation and purification of the protein
- b. Establishment of the conditions for the higher solubility of isolated soybean protein (ISP)
- c. Production of phospho-soybean peptide (SPP) using enzymatic

hydrolysis

d. Phosphorylation of ISP

e. Establishment of the conditions for the calcium binding reactions

f. Separation of phosphopeptide from proglycinin using IMAC

g. Gene cloning of calcium binding peptide

2: Results of the studies

a. Separation and purification of the protein

b. Establishment of the conditions for the higher solubility of isolated soybean protein (ISP)

c. Production of soybean phospho-peptide (SPP) using enzymatic hydrolysis

d. Phosphorylation of ISP

e. Establishment of the conditions for the calcium binding reactions

f. Separation of phosphopeptide from proglycinin using IMAC

(i) separation of phosphopeptide

(ii) Measurement of calcium bindings to phosphopeptide from proglycinin

II. Inhibition of calcium phosphate precipitation by phosphopeptide

1: Approach of the experiment and contents of the research

2. Results of the research

a. Inhibition of calcium phosphate precipitation by phosphopeptide: P-Ser and P-SerSerSer vs. Ser and SerSerSer

b. Inhibition of calcium phosphate precipitation by phosphopeptide: P-13 amino acids vs. 13 amino acids

c. Inhibition of calcium phosphate precipitation by phosphopeptide: P-ISP hydrolysates vs. ISP hydrolysates

III. Absorption of the calcium peptide

1. Approach of the experiment and contents of the research

- a. Tissue culture
- b. Plasmids
- c. Transient transfection
- d. Stable transfection
- e. Cell treatment
- f. Luciferase assay

2. Result of the research

- a. Determination for concentration of EDTA
- b. Absorption of Ca-P-SerSerSer
- c. Absorption of Ca-P-Ser

Chapter 4. Achievements and contributions of the studies to the related fields

I. The first year of the study

1. Goal of the study
2. Standpoints of evaluation
3. Accomplishment of the studies
4. Contributions to technical development in related areas

II. The second year of the study

1. Goal of the study
2. Standpoints of evaluation
3. Accomplishment of the studies
4. Contributions to technical development in related areas

III. The third year of the study

1. Goal of the study
2. Standpoints of evaluation
3. Accomplishment of the studies
4. Contributions to technical development in related areas

Chapter 5. Plans for the application of the research

- I. Necessities for further studies
- II. Applications to other studies
- III. Plans for industrialization

Chapter 6. Informations on scientific techniques at overseas

Chapter 7. Reference

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 기술적 측면
2. 경제 산업적 측면
3. 사회 문화적 측면

2 절 연구 개발의 범위

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1 절 국내의 관련분야에 대한 기술 개발 현황

2 절 연구 결과가 국내외 기술 개발 현황에서 차지하는 위치

제 3 장 연구 개발수행 내용 및 결과

1 절 칼슘 결합 인산화 펩타이드의 제조

1. 실험적 접근 방법 및 연구내용

가. 원료 단백질의 분리 정제

나. 분리 대두 단백질 (ISP) 용액의 용해도를 높이기 위한 최적 조건 확립

다. 가수분해 효소를 이용한 인산화 대두 펩타이드 (SPP) 생산

라. 대두 단백질의 인산화

마. 칼슘 결합 반응의 조건 확립

바. Affinity chromatography를 이용한 proglycinin 유래의 phosphopeptide의

분리

사. 우수칼슘결합성 대두 펩타이드의 대량 확보

2. 연구결과

가. 원료 단백질의 분리 정제

나. ISP 용액의 용해도를 높이기 위한 최적 조건 확립

다. 가수분해 효소를 이용한 인산화 대두 펩타이드 (SPP) 생산

라. 대두 단백질의 인산화

마. 칼슘 결합 반응의 조건 확립

바. IMAC를 이용한 proglycinin 유래의 phosphopeptide의 분리

1) phosphopeptide의 분리

2) proglycinin phosphopeptide의 칼슘 결합능 측정

2 절 인산화 펩타이드의 인산칼슘 침전 저해

1. 실험적 접근 방법 및 연구내용

2. 연구 결과

가. 인산화 펩타이드의 인산칼슘 침전 저해: P-Ser and P-SerSerSer vs. Ser and SerSerSer

나. 인산화 펩타이드의 인산칼슘 침전 저해: P-13 amino acids vs. 13 amino acids

다. 인산화 펩타이드의 인산칼슘 침전 저해: P-ISP hydrolysates vs. ISP hydrolysates

3 절 동물 및 조직 배양에 의한 칼슘 펩타이드의 흡수도

1. 실험적 접근 방법 및 연구 내용

가. 조직배양

나. Plasmids

- 다. Transient transfection
- 라. Stable transfection
- 마. Cell treatment
- 바. Luciferase assay

2. 연구 결과

- 가. EDTA의 농도 결정
- 나. Ca-P-SerSerSer의 흡수도 측정
- 다. Ca-P-Ser의 흡수도 측정

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1 절 1차년도

- 1) 연구개발 목표
- 2) 연구 평가의 착안점
- 3) 연구 개발 목표의 달성도
- 4) 관련분야의 기술 발전에의 기여도

2 절 2차년도

- 1) 연구개발 목표
- 2) 연구 평가의 착안점
- 3) 연구 개발 목표의 달성도
- 4) 관련분야의 기술 발전에의 기여도

3 절 3차년도

- 1) 연구개발 목표
- 2) 연구 평가의 착안점
- 3) 연구 개발 목표의 달성도
- 4) 관련분야의 기술 발전에의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 1 절 추가 연구의 필요성
- 2 절 타 연구에의 응용
- 3 절 기업화 추진 방안

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

List of Tables

1. FPLC operating conditions
2. Purification of proglycinin from E.coli JM105 (A1aB1b)
3. ISP농도에 따른 단백질의 용해도
4. 용해도 시간에 따른 단백질의 용해도
5. pH에 따른 단백질의 용해도
6. 가수분해와 인산화 반응 실험 과정
7. 대두 단백질 가수 분해물과 인산화 대두 단백질 가수분해물의 칼슘 결합능 비교 (실험 1의 경우)
8. 대두 단백질 가수 분해물과 인산화 대두 단백질 가수 분해물의 칼슘 결합능 비교 (실험 2의 경우)
9. 대두 단백질 가수 분해물의 수율 (실험 1의 경우)
10. 대두 단백질 가수 분해물의 수율 (실험 2의 경우)
11. Concentration of phosphorus in total sample (ppm).
12. Sample 별 인 함량
13. Sample 별 단백질함량과 인 함량
14. Sample 별 단백질함량과 칼슘 및 인 함량
15. 인산화제에 따른 칼슘 결합능의 비교
16. 합성펩타이드의 칼슘 결합도 측정
17. The inhibition of calcium phosphate precipitation (Ser)
18. The inhibition of calcium phosphate precipitation (P-Ser)
19. The inhibition of calcium phosphate precipitation (SSS)
20. The inhibition of calcium phosphate precipitation (P-SSS)
21. The inhibition of calcium phosphate precipitation (13 amino acids)
22. The inhibition of calcium phosphate precipitation (P-13 aminp acids)
23. The inhibition of calcium phosphate precipitation (ISP hydrolysate)
24. The inhibition of calcium phosphate precipitation (P-ISP hydrolysate)
25. EDTA 농도(0 mM-0.6 mM)에 따른 칼슘의 Chelating
26. EDTA 농도(0 mM-2 mM)에 따른 칼슘의 Chelating

27. Expression of calcium dependent calmodulin-luciferase in response to extracellular concentration of P-Ser-Ser-Ser-Ca
28. Expression of calmodulin-luciferase in response to extracellular concentration of P-Ser-Ca
29. Expression of calmodulin-luciferase by the amount of P-Ser-Ca uptaken through cellular membrane (Caco-2 cells).
30. Expression of calmodulin-luciferase by the amount of P-Ser-Ca uptaken through cellular membrane (HEK 293T cells).
31. Expression of calmodulin-luciferase by the amount of P-Ser-Ca uptaken through cellular peptide transporter.

List of Figures

1. Simplified separation process of glycinin and β -conglycinin
2. Production process of soy protein isolate in pilot-plant scale
3. Modified separation process of glycinin and β -conglycinin in pilot-plant scale
4. STMP에 의한 인산화 과정
5. SDS-PAGE analysis of proglycinin samples at different stages of the purification
6. ISP 농도에 따른 단백질의 용해도
7. 용해도 시간에 따른 단백질의 용해도
8. pH에 따른 단백질의 용해도
9. Determination of isoelectric point of phosphorylated proglycinin
10. Calcium binding activity of phosphorylated tryptic hydrolysates
11. Calcium binding activity of non-phosphorylated and phosphorylated tryptic hydrolysates
12. 인산화후 효소 트립신의 잔여 활성도 측정
13. Calcium binding ability of phosphorylated ISP hydrolysates prepared by the reaction with a variety of phosphorylating agents.
14. Effect of pH on phosphorylation level. (A, B)
15. Effect of pH and STMP concentration on phosphorylation level (A, B)
16. Effect of phosphorylation on calcium binding
17. Calcium binding ability depending on level of phosphorylation (A, B)
18. Effect of pH on Calcium binding (A, B)
19. Calcium binding ability depending on various concentration of CaCl_2 .
20. Fractionation of phosphorylated proglycinin on a HiTrap Chelating by

FPLC system

21. Fractionation of phosphorylated proglycinin hydrolysates on a HiTrap

Chelating by FPLC system

22. Calcium binding activity of IMAC fraction (E:S=1:1000)

23. Ion exchange chromatography of bound fraction on IMAC chromatography

24. Calcium binding activity of Mono Q fraction

25. 합성펩타이드의 칼슘결합도

26. The inhibition of calcium phosphate precipitation (Ser)

27. The inhibition of calcium phosphate precipitation (P-Ser)

28. The inhibition of calcium phosphate precipitation (SSS)

29. The inhibition of calcium phosphate precipitation (P-SSS)

30. Effect of phosphorylation on the inhibition of calcium phosphate precipitation in *in vitro* calcium binding assay

31. The inhibition of calcium phosphate precipitation (13 amino acids)

32. The inhibition of calcium phosphate precipitation (P-13 amino acids)

33. Inhibition of calcium phosphate precipitation by a moderate size of phosphopeptide in *in vitro* calcium binding assay.

34. The inhibition of calcium phosphate precipitation (ISP hydrolysate)

35. The inhibition of calcium phosphate precipitation (P-ISP hydrolysate)

36. Inhibition of calcium phosphate precipitation by phosphopeptides with multiple sizes in *in vitro* Calcium binding assay

37. EDTA 농도(0 mM-0.6 mM)에 따른 칼슘의 Chelating

38. EDTA 농도(0 mM-2 mM)에 따른 칼슘의 Chelating

39. Expression of calcium dependent calmodulin-luciferase in response to extracellular concentration of P-Ser-Ser-Ser-Ca

40. Expression of calmodulin-luciferase in response to extracellular

concentration of P-Ser-Ca

41. Expression of calmodulin-luciferase by the amount of P-Ser-Ca uptaken through cellular membrane (Caco-2 cells).
42. Expression of calmodulin-luciferase by the amount of P-Ser-Ca uptaken through cellular membrane (HEK 293T cells).
43. Expression of calmodulin-luciferase by the amount of P-Ser-Ca uptaken through cellular peptide transporter
44. Mechanism of phosphorylation and calcium binding of soybean peptide

제 1 장 연구개발과제의 개요

1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 기술적 측면

본 과제의 핵심은 첨단 단백질화학 및 인산화 가공 기술을 이용하여, 인체 내로의 흡수도가 탁월한 천연 calcium-peptide 제재를 값싼 칼슘원료와 대두 단백질로부터 생산함으로써, 전량 수입하는 calcium-casein phosphopeptide (CPP)를 대체하는 방법을 확립함을 물론 관련 고부가가치 제품개발에 목표를 두고 있다.

인체를 구성하는 무기질 중 가장 많은 양을 차지하는 칼슘의 섭취는 식생활이 윤택한 선진국에서조차 그 중요성이 새로이 인식되고 있다. 과거에 비해 지방질과 인산염의 섭취가 급격히 증가된 식생활로 인해 소장 내에서의 칼슘 섭취가 저해되어 우유나 생선, 채소류 등과 같이 칼슘 함량이 높은 식품의 섭취량이 늘어남에도 불구하고 소장 내에서 칼슘이 불용성 침전을 형성하여 흡수율이 저하됨으로써 칼슘 부족 현상이 발생하며 이로 인해 골다공증과 같은 물리적인 칼슘 손실 증상과 더불어 여러 가지 생리 활성의 저하를 가져오게 된다(1). 섭취된 음식내의 칼슘이 소장 내에서 효율적으로 흡수되기 위해서는 산성을 띠는 위장 내 (pH 1.5 - 2.5) 혹은 중성에 가까운 소장 내에서조차 용해성 칼슘 형태를 유지해야 한다(2). 탄산염, 인산염 또는 황산염 등과 같은 무기염 형태나 구연산염, 젖산염, 글루콘산염 등과 같은 유기염 형태의 칼슘 제재 형태로 유입될 경우에는 대부분이 체내로 흡수 될 수 없다는 것이 알려져 있으며 특히, 우유나 생선, 채소류 내에 존재하는 수용성 칼슘도 함께 섭취된 식품내의 인 성분과 더불어 위장 내에서 불용성 침전물을 형성하는 것으로 알려져 있다. 결국 소장 세포막을 통한, 효과적인 칼슘의 흡수를 위해서는 단백질의 부분 가수분해물인 oligopeptide와 결합된 수용성 칼슘 형태가 가장 적합한 것으로 알려져 있는데 신경전달물질의 하나인 calmodulin과 같은 calcium-oligopeptide (COP) 형태와 우유 casein의 장내 소화 과정에서 생성되는 Ca-CPP 형태의 두 가지로 크게 구분된다. COP는 다양한 천연 단백질의 가수 분해를 통해 쉽게 얻을 수 있다는

장점이 있지만 평균 분자량이 1000 정도인, 한 분자의 oligopeptide에 하나의 칼슘만이 결합 될 수 있기 때문에 칼슘 함량이 전체 oligopeptide의 4%를 넘을 수 없다는 한계가 있다. 반면에 CPP의 경우에는 oligopeptide내의 인산화된 serine 잔기를 통해 칼슘이 결합 될 수 있다. CPP의 칼슘흡수 촉진 효과는 동물 실험을 통해 입증되었으며(3, 4) 이미 천연 조미료 축, 수산 가공품, 시리얼, 음료, 과자류, 빵, 면류, 각종 디저트를 포함하는 일반 식품 분야와 건강 보조 식품에 광범위하게 사용되고 있다. Manson 등의 연구에 의하면 β -casein의 trypsin 가수분해물에서 분리한 CPP를 분석한 결과, 총 25개의 아미노산으로 구성된 oligopeptide로서 4개의 phosphoserine 잔기를 가지고 있으며 구조상 2 - 4개의 칼슘 원자가 결합될 수 있음을 보였다(5). 또한, CPP는 장내에서 생성될 수 있는 calcium-phosphate 침전물의 형성을 방해하는 긍정적인 효과도 보였다(6). 따라서 칼슘과 결합할 수 있는 phosphopeptide를 경제적으로 분리함으로써 장내 흡수가 용이한 고밀도 칼슘 제재를 생산할 수 있다.

한편, 고단백식품으로 간주되어온 대두 단백질(大豆蛋白質, soybean protein)은 CPP와 비슷한 수준의 serine잔기 (최소 5% 이상)를 함유하기 때문에 화학적 인산화방법을 통한 phosphorylated soybean peptide (SPP)를 개발하여 전량 수입에 의존하는 CPP공급을 대체할 수 있으며 가수분해 과정에서 생성된 다양한 종류의 대두 peptide에 의한 영양학적, 약리학적 효과도 더불어 기대 할 수 있다. 단백질 인산화에 사용되는 인산염은 식용으로 안전성이 확립된 것을 사용한다. 칼슘-SPP 복합체의 생산을 위한 주원료인 무기 칼슘과 대두 peptide는 천연 칼슘원료와 대두로부터 경제적으로 확보 생산할 수 있다. 따라서 대두 단백질에 대한 효과적인 인산화 방법과 SPP의 효율적 결합 및 흡수력증진 방법을 확보하여 보다 경쟁력 있는 천연 칼슘 제재를 생산할 조건을 확립하고자 한다.

더불어 SPP 개발 후 칼슘결합에 관여하는 보다 고부가가치적인 제품개발에 응용할 수 있도록 대두단백질 유전자를 이용하는 생명 공학적 연구도 병행한다. 1987년에 일본의 Udaka 그룹에 의해 대두의 glycinin subunit 유전자의 cDNA 클로닝 및 대장균에서의 발현이 보고된 바 있고(7), Manson 등의 연구를 통해 밝혀진 CPP의 구조와 최근 본 연구실에서 수행한 관련 연구를 바탕으로 칼슘과 결합할 수 있는 대두 peptide를 분리, 분석하여 작용특이성 혹은 다른 특정 peptide를 생산하여 특정 식·의약품용 칼슘 제재 개발에 대한 기초연구를 병행

함으로써 제품의 응용성 개발에 기여한다.

2. 경제·산업적 측면

현재 각종 건강보조식품 및 칼슘보강 의약품에 사용하는 CPP원료 공급은 전량 수입에 의존한다. 따라서 본 과제수행을 통하여 적게는 약 1,300억원 규모의 국내 칼슘함유 건강보조식품 시장 (97년도 기준)에 경쟁력 있는 국산 제품을 공급할 수 있으며 77% (완제품 경우)에 달하는 수입 제품의 대체 효과를 기대할 수 있다. 그럼으로써 각종 식, 의약품 제조용 원료구입에 대한 외화낭비를 감소시키고, 더 나아가 고부가가치의 제품생산 know-how를 자체 개발함으로써 원료와 idea 부재의 국내 경제 및 산업 육성에 기여한다.

80년대에 들어 개인 소득의 증대에 힘입어 기능성 건강식품에 대한 관심이 급격히 증대되고 있으며 94년 이후 97년까지 매년 두 자리 수 이상의 높은 성장률을 보였다. 특히, 우리나라 사람에게 가장 부족한 영양소 중의 하나라고 알려진 칼슘의 경우, 90년 칼슘 제품이 건강보조식품으로 첫 선을 보인 이래, 건강보조식품시장에서 칼슘 제품이 매출 수위를 차지한 97년 기준, 총 79개사에서 136개의 다양한 제품이 시판되고 있다(한국건강보조식품협회자료). 대체로 굴껍질, 우골분, 유청 등에서 추출한 칼슘에 흡수촉진 보조제로서 CPP, 혹은 비타민D를 첨가한 제품이 대부분을 차지하고 있다. 본 과제가 성공적으로 이루어진다면, 값싼 대두를 원료로 인산화 기술을 도입함으로써 칼슘과 효과적으로 결합할 수 있는 인산화 대두peptide (phosphorylated soy protein peptide, SPP)를 경제적으로 대량 생산할 수 있으며 칼슘의 체내 유입에 필수적인 CPP를 완벽히 대체할 수 있다. 인산화된 대두 가수 분해물로부터 분리 정제한 고순도 SPP에 칼슘을 결합시킨 고밀도 칼슘제제를 생산할 경우, 질병예방 및 건강보조의 단순 기능 외에 특정 질환(골다공증, 골연화증, 구루병 등)의 회복을 목적으로 하는 특정 질환 영양제로서의 활용도 기대해 볼 수 있다.

3. 사회·문화적 측면

현재의 건강보조식품 및 일반제약 업계에서의 칼슘수요량을 고려할 때, 원료가 되는 CPP를 수입하는 것에 비하여 저렴한 천연 칼슘원료와 대두단백질을 이용하

여 생체흡수율이 월등한 고효율의 CPP 대체품이 우리기술로 제조 공급될 수 있다는 것은 그 자체로 사회·문화적 측면에서 기여도가 클 것으로 보인다.

대두에는 단백질이 50%정도 함유되어 있어 영양학적으로나 경제적으로 동물성 단백질을 대체할 수 있는 우수한 식품 자원이기 때문에 동양권에서는 예로부터 중요한 단백질 공급원으로서 다양한 식품 재료로 사용되어 왔다. 더욱이 최근 들어 식품의 생체내의 조절기능에 대한 연구가 활성화되면서 대두에 포함된 여러 가지 생리활성 물질들이 확인되고 있다. 그 대부분이 소화과정 중 생성되는 peptide들로서 면역 조절 peptide, angiotension-I converting enzyme(ACE) 저해 peptide, 콜레스테롤 저하 peptide 등이 있다. 따라서 식품 소재로서 이처럼 유용한 대두에 또 하나의 중요성을 부여하기 위하여 칼슘 흡수를 증진시킬 수 있는 peptide를 찾고 인산화를 통해 칼슘결합력을 향상시켜 기존의 CPP를 완벽히 대체할 수 있는, 대두 유래의 peptide형 칼슘제재를 생산하여 값싸게 공급하게 된다면 골다공증, 퇴행성 관절염 등, 대표적 칼슘 부족 노인성 질환의 예방과 치료에 큰 기여를 할 수 있으며 더 나아가 대두 소비를 촉진시킴으로써 국내 농가에서 재배되는 두류를 가공하여 고부가가치의 제품으로 판매할 수 있는 새로운 수요를 제공하게 된다.

2 절 연구 개발의 범위

본 연구는 칼슘의 장내 흡수를 효과적으로 증진시킬 수 있는 칼슘 결합 펩타이드를 생산하는데 그 목적이 있다. 일반적으로 칼슘을 무기염 혹은 유기염 형태로 섭취하였을 경우, 장 내에 존재하는 인 성분과 더불어 불용성 침전물을 형성하는 것으로 알려져 있는데 결국 소장 세포막을 통한 효과적인 칼슘의 흡수를 위해서는 CPP와 같이 단백질의 부분 가수분해물인 oligopeptide와 결합된 수용성 칼슘 형태가 가장 적합한 것으로 알려져 있다. 따라서 칼슘과 결합이 가능한 phosphopeptide를 경제적으로 제조하고 분리함으로써 장내 흡수가 용이한 고밀도 칼슘 제재를 생산하였다. 뿐만 아니라 칼슘 결합에 있어서 아미노산 조성과 인산화의 중요성을 여러 가지 실험을 통하여서 분석하였으며 더불어 칼슘 펩타이드의 소장 세포내로의 흡수도를 측정 방법을 개발하여 칼슘

흡수도를 측정하였다. 본 과제에서의 연구는, 먼저 칼슘 결합 펩타이드를 제조하고 이어서 칼슘 결합에 필요한 중요한 요소들을 밝혀냄과 동시에 실제적으로 칼슘 펩타이드가 얼마만큼 소장 세포 내로 유입이 되는지에 중점을 두고 진행되었다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1 절 국내외 관련분야에 대한 기술개발 현황

국, 내외에서 칼슘 흡수를 증진 시킬 수 있는 방법에 관해 대두 단백질과 칼슘에 관련된 연구가 이미 오래 전부터 진행되어 왔다. 주로 미국과 일본등지에서 이루어지고 있는데 대두 단백을 이용한 연구와 인산화, 칼슘 결합 등에 관한 연구가 꾸준히 이어져 왔다. 그러나 선행기술로는 흡수도를 효율적으로 높일 수 있는 방법의 개발은 미흡한 것으로 보인다.

Oligopeptide를 생산하는데 필요한 glycinin은 대두로부터 전술한 방법에 의해 추출하는 방법을 대장균 내에서 발현시키는 방법과 병행하여 사용하기로 하였는데 대두로부터의 추출법은 널리 보편화되어 있는 상태로 방법상에 큰 어려움은 없으나 실험을 통해 scale-up의 용이성과 경제성에 기준을 두어 분리체계를 확립하여야 한다. 재조합 대장균을 이용한 생산 법은 이미 본 연구팀에서 적절한 glycinin발현 vector를 확보해 놓은 상태이며 대장균으로부터 분리된 glycinin이 대두 추출 천연 glycinin에 비해 trypsin 가수분해 및 STMP에 의한 화학적 인산화에 불리하지 않음을 검증한 바 있다.

현재 판매되는 칼슘함유식품은 칼슘을 많이 함유한 우유, 어골, 굴 껍질, 우유 등의 동, 식물을 원료로 하여 약간의 비타민 D나 CPP(casein phosphopeptide), 또는 EPA, DHA를 함유한 기능성 정제어유를 소량 첨가한 다음, 섭취가 용이한 분말, 과립, 정제 및 캡슐 형태로 가공한 것이 대부분인데 97년도 판매량 기준, 약 77%(완제품 경우)가 수입품인 실정이다. 따라서 칼슘의 흡수도는 보장할 수 없는 것이다. 본 과제가 성공적으로 수행된다면 값싼 대두(약 213 US\$/ton, 98년도 말 기준)와 본 과제 참여기업인 (주)서도화학으로부터 공급될 칼슘(5,000-7,000원/kg 이하)을 원료로 하여, 기존 시판 제품과는 달리, 효율적으로 장내 흡수가 가능한 형태의 칼슘 제재를 생산 할 수 있다. 당연히 기존 제품과는 충분한 가격 경쟁력이 있으며 수입 대체의 효과도 클 것으로 기대된다.

2 절 연구 결과가 국내외 기술개발현황에 차지하는 위치

본 연구의 결과가 국내외 관련분야 기술개발에 직간접적으로 매우 큰 영향을 미칠 것으로 본다. 직접적인 영향으로는 고농도 고효율의 신칼슘제재 생산기술을 확보하는 것 뿐 아니라 칼슘원자재의 정제기술, 대두펩타이드 제조 및 인산화 기술, 펩타이드와 칼슘의 효율적 결합기술, 조직배양을 이용한 칼슘흡수도 측정기술을 확보하여 관련 분야에 큰 기여를 할 것으로 본다. 간접적으로는 철분 혹은 다른 무기염류 영양소에 대하여 본 기술이 적용될 수 있다. 또한 본 기술에 의하여 생산된 칼슘 제재를 원료로 하여 기능이 보다 진보된 고기능 칼슘완제품을 생산하는데 기술적으로 지대한 영향을 끼칠 수 있다.

1. 직접적인 영향

가. 고농도 고효율의 신칼슘제재 생산기술 확보

첨단 단백질화학 및 인산화 가공 기술을 이용하여 인체 내로의 흡수도가 탁월한 천연 calcium-peptide 제재를 값싼 칼슘원료와 대두 단백질로부터 생산함으로써, 전량 수입하는 calcium-casein phosphopeptide (CPP)를 대체할 뿐 아니라 그 기능과 효율성면에서 훨씬 앞서는 soybean phosphopeptide (SPP)-칼슘 형태의 혁신적인 신제품 개발에 대한 기술을 확보하였다.

나. 칼슘원자재의 정제기술

유청 칼슘, 우골분, 해조 칼슘 등의 칼슘 함유 건강보조식품에 주원료로 사용되는 원료무기 칼슘의 확보의 상당부분이 kg당 15,000 - 30,000원의 단가에 수입되고 있으며 국내산 난각 칼슘의 경우는 kg당 10,000 - 15,000원의 비교적 저가에 생산되고 있다. 그러나 많은 칼슘원료의 경우 과잉 불소함유 등 바람직하지 않은 성분을 제거하지 않은 채 공급되고 있어서, 칼슘제품의 생산에 걸림

돌이 되어왔다. 따라서 본 과제 수행에 있어 협동기관인 (주)서도화학에 의해 자체 기술로 우골분 등의 원료로부터 양질의 천연칼슘을 정제, 생산, 공급할 수 있는 기술을 확보하였다.

다. 대두펩타이드 제조, 인산화 및 칼슘과의 효율적 결합기술

효소에 의한 대두단백질의 가수분해 정도와 연관지어 펩타이드에 대한 보다 정밀한 인산화 조건을 확립하였다. 단백질 인산화에 사용되는 인산염은 식용으로 안전성이 확립된 것을 사용하였다. 다양한 종류의 인산염과 인산화 조건에 따라 대두펩타이드의 인산화 정도에 따른 칼슘 결합반응의 최적조건을 확립하였다. 최적 인산화 반응과 칼슘 결합반응 뿐 아니라 각각의 반응 후 발생하는 펩타이드의 침전방지안도 확립하였다. 본 과제에서는 연구의 타당성을 알아보기 위해 합성하거나 혹은 glycinin subunit 유전자를 대장균에서 대량 발현시킨 후 순수 분리된 대두단백질로부터 얻은 펩타이드의 종류별 결합실험을 통하여 인산화 후 아미노산 Seine 잔기의 칼슘결합 능력에 미치는 영향을 조사하였고, 아미노산 서열과 길이에 따른 칼슘결합도 변화 측정시험을 시행함으로써 칼슘의 결합과 수용성 증진에 대한 기전을 규명하여 고효율의 SPP 제조 기술의 확립에 기여하였다.

라. 조직배양을 이용한 칼슘흡수도 측정기술

본 기술에서 생산한 SPP가 calcium-phosphate 침전물의 형성을 방해하는 효과가 있는 성질을 응용한 기술로서 종래의 동물시험에만 의존하였던 칼슘흡수 및 그 기능시험을 대체할 뿐 아니라 그 효율성도 대폭 증진시켰다. 이는 SPP가 장내에서 생성될 수 있는 calcium-phosphate 침전물의 형성을 저지시킬 수 가능성을 시사한다고 볼 수 있다. 본 연구에서 개발한 조직배양 칼슘흡수도 시험법은 단순 흡수도측정만을 떠나서 생화학적이거나 영양학적인 연구에도 적용될 수 있으리라 본다.

2. 간접적인 영향

가. 다른 무기염류 영양소에 대한 본 기술의 적용

인체를 구성하는 무기질 중 가장 많은 양을 차지하는 무기염류로 칼슘을 들 수 있으나, 철분 등 기타 다른 무기염류 역시 체내에서 중요한 역할을 한다. 특히 칼슘과 같이 2가 양이온을 띠는 무기염류 경우 적용도가 높다. 각 무기염류 별 결합도가 다른 인산화 펩타이드를 분리하여 흡수도 증진 뿐 아니라 고농도의 무기염류와 직접접촉에 의한 세포손상방지 등의 목적으로 응용할 수 있다.

나. 기능과 흡수효율이 강화된 고부가가치 칼슘완제품 생산의 원료로서 사용

칼슘이 소장 내에서 효율적으로 흡수되기 위해서는 산성을 띠는 위장 내 혹은 중성에 가까운 소장 내에도 용해성 칼슘 형태를 유지해야 하며, 탄산염, 인산염 또는 황산염 등과 같은 무기염 형태나 구연산염, 젖산염, 글루콘산염 등과 같은 유기염 형태의 칼슘 제재 형태로 유입될 경우에는 대부분이 체내로 흡수 될 수 없다는 것이 알려져 있다. 따라서 효과적인 칼슘의 흡수를 위해서는 본 기술에 의하여 생산된 칼슘 제재를 원료로 하여 단백질의 부분 가수분해물인 oligopeptide와 칼슘이 결합된 calcium-oligopeptide (COP) 형태의 수용성 칼슘제재가 요구된다. 본 연구에서 밝혀진 칼슘결합 펩타이드 및 아미노산 잔기서열 정보는 고부가가치 칼슘완제품을 생산하는데 기여하리라 본다. 한편, 최근 들어 식품의 생체내의 조절기능에 대한 연구가 활성화되면서 대두에 포함된 여러 가지 생리활성 물질들이 확인되고 있다. 그 대부분이 소화과정 중 생성되는 peptide들로서 면역 조절 peptide, angiotension-I converting enzyme(ACE) 저해 peptide, 콜레스테롤 저하 peptide 등이 있다. 따라서 식품 소재로서 이처럼 유용한 대두에 또 하나의 중요성을 부여하기 위하여 칼슘 흡수를 증진시킬 수 있는 peptide를 분리하고 인산화를 통해 칼슘결합력을 향상시켜 기존의 CPP에서 기대할 수 있는 효과 이상의 기능을 기대할 수 있다. 또한 가수분해 과정에 따라 작용특이성 혹은 다른 특정 peptide를 분리 생산하여 특정 식, 의약품용 칼슘 제재 개발에 대한 기초연구를 병행함으로써, 여러 종류의 대두peptide에 의한 영양학적, 약리학적 효과도 기대 할 수 있다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

1 절 칼슘 결합 인산화 펩타이드의 제조

1. 실험적 접근 방법 및 연구 내용

가. 원료 단백질의 분리 정제

대두 단백질은 대두 단백질이 심혈관 질환 예방, 항암작용, 골다공증 예방 등 다양한 기능이 있다는 연구결과가 속속 발표되고 있는 가운데 콩을 많이 섭취하는 지역일수록 심장 질환의 비율이 낮으며, 이소플라본이 함유된 콩 단백질은 혈장 지질 농도 개선, LDL 콜레스테롤 산화 가능성 감소, 혈압 저하, 혈소판 기능 및 혈관 기능(여성에서만 나타남) 향상의 효과가 있는 것으로 관찰되고 있다(8-10). 이러한 연구 결과와 같이 영양학적 가치가 있고 또한 경제적으로도 우수한 대두 단백을 칼슘 펩타이드의 원료 단백질로 사용하였다.

칼슘 결합 펩타이드의 원료로써 Isolated soybean protein (이하 ISP)이라 불리는 분리대두단백을 사용하였다. 분리대두단백은 콩에서 단백질 부분만 분리하여 제품화 한 것으로서 탄수화물 및 지방이 대부분 제거되어 영양학적으로는 완벽한 식물성 단백질원이며, 식품 제조 시 사용 및 응용범위가 매우 넓어 많은 식료품에 첨가되기도 한다.

식품용 ISP의 제조는 minimum-heat treated soy flour를 원료로 사용하는데 먼저, pH 8의 약 알칼리 상태에서 soy flour를 용해시키고 원심 분리하여 불용성 침전물을 제거한다. 남은 상등액의 pH를 4.5로 낮추어 등전점 침전을 유도하여 생성된 curd를 회수한 다음, 그대로 말리거나 NaOH로 중성화 한 후, spray dry시켜 ISP를 성공적으로 얻을 수 있다. 제조된 ISP는 저장 단백질 globulin(90%)과 trypsin inhibitor, cytochrome 등의 저분자량 성분들로 구성된 2S component(10%)로 구분된다(11). ISP내의 단백질은 주로 glycinin과 β -conglycinin으로 구성되어있는데 globulin의 절반 이상을 차지하는 glycinin을 β -conglycinin으로부터 분리하는 방법으로는 원리상 저온에서 대부분의

glycinin이 침전을 형성하는 원리를 이용한 cryoprecipitation과 낮은 ionic strength 조건에서 pH에 따라 glycinin과 β -conglycinin의 용해도가 다른 점을 이용한 isoelectric precipitation의 방법을 사용하여 침전을 얻어 trypsin으로 분리하기 전단계의 원료 대두단백질을 얻을 수 있었다(12 and 13). ISP 제조와 분리 공정 과정을 fig. 1-3에 표시하였다. 이 연구 수행에 있어서는 제조된 ISP를 사용하였고 공정별 처리조건에 따라 glycinin까지 분리하지 않고 바로 ISP를 원료대두로 사용하기도 하였다. ISP의 용해도를 최대로 증가시키기 위하여 ISP의 농도와 용해 시간 등을 달리하여 실험하였다. 자세한 실험 내용은 나. 항에서 기술하기로 한다. 결정된 최적 조건을 바탕으로 최종 농도가 10% (w/v) 되도록 증류수에 3시간 동안 용해시켜 10,000 rpm에서 40분간 원심분리를 통해 수용성 단백질만을 분리한 후 수용성 대두 단백질만을 칼슘 펩타이드의 원료로 사용하였다.

ISP의 preparation과 동시에 대두 단백질 단일 subunit 유전자의 대량발현에 의한 칼슘결합부위 규명 및 Glycinin 유래 작용 특이적 펩타이드의 대량생산할 목적으로 glycinin A_{1a}B_{1b} subunit의 cDNA가 cloned된 plasmid를 대장균에서 적절한 조건하에 발현시켜 대량의 단백질 수율로 glycinin을 얻고자 하였다 (14-19). 대량의 단백질을 얻기 위해서 proglycinin transformed *E. coli*에 inducer인 IPTG를 첨가해서 과량 발현시킨 후 균체를 파쇄 시키고 원심분리를 통해 단백질을 분리하여서 Ammonium sulfate를 이용하여 원하는 단백질만을 침전시킨 후 침전물을 회수하고 얻은 침전물의 염은 투석(dialysis)을 통해 제거한다. 투석하여 회수된 단백질 농축액을 anion exchange column을 이용하여 FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)로 분리하고 마지막으로, 분리된 분획들을 cryoprecipitation으로 정제한다.

나. ISP 용액의 용해도를 높이기 위한 최적 조건 확립

ISP를 이용한 칼슘 결합 펩타이드를 생산하기 위한 최적 조건을 결정하는 여러 가지 실험을 진행함에 있어서 대부분 ISP는 4% 농도를 사용하였다. 그러나 ISP의 농도를 결정하는 것도 칼슘 펩타이드의 수율을 증가시키는 요인이 될 수 있으므로 ISP의 용해도를 증가시키기 위한 최적 조건을 정하고자 하였다.

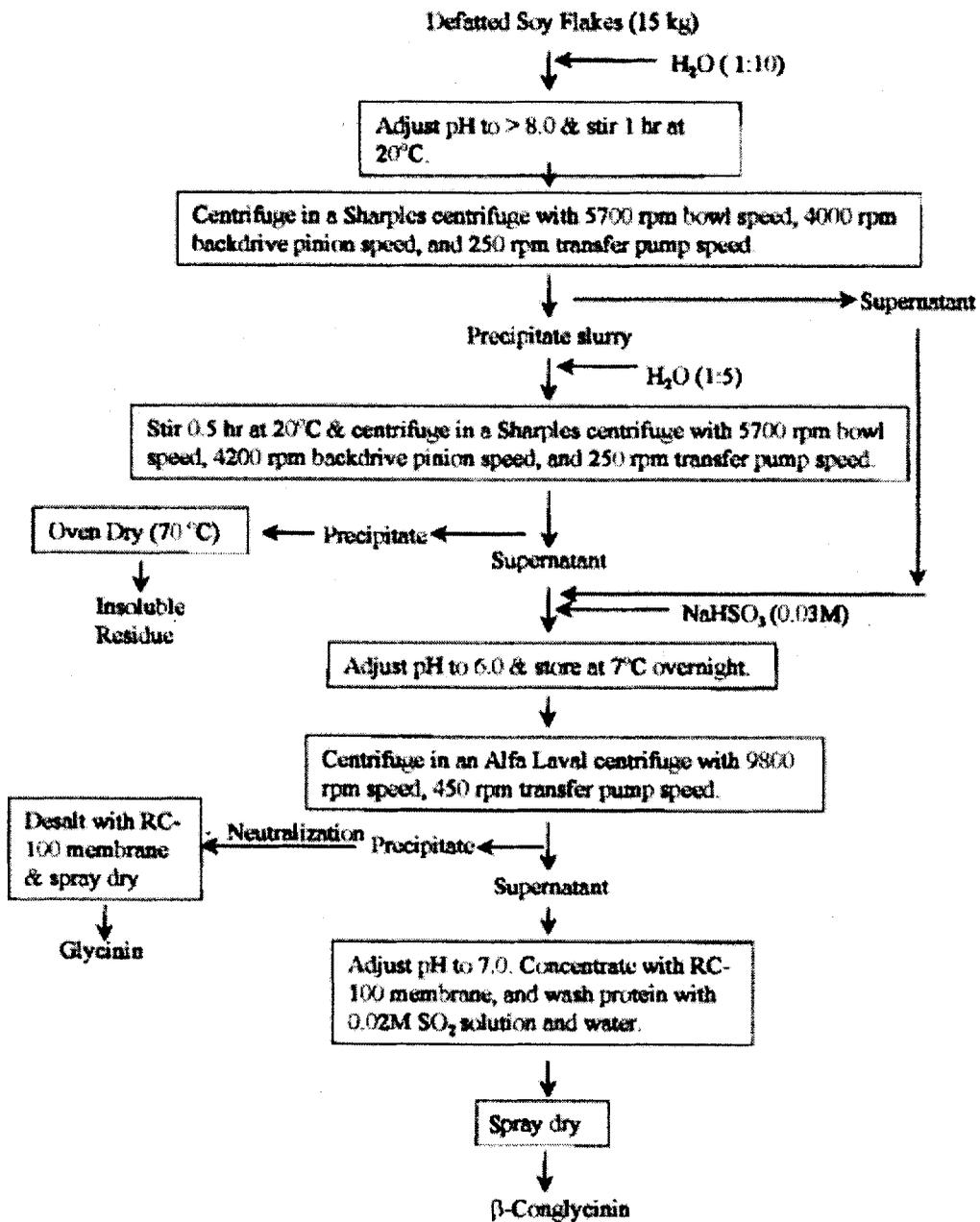


Figure 1. Simplified separation process of glycinin and β-conglycinin. (13)

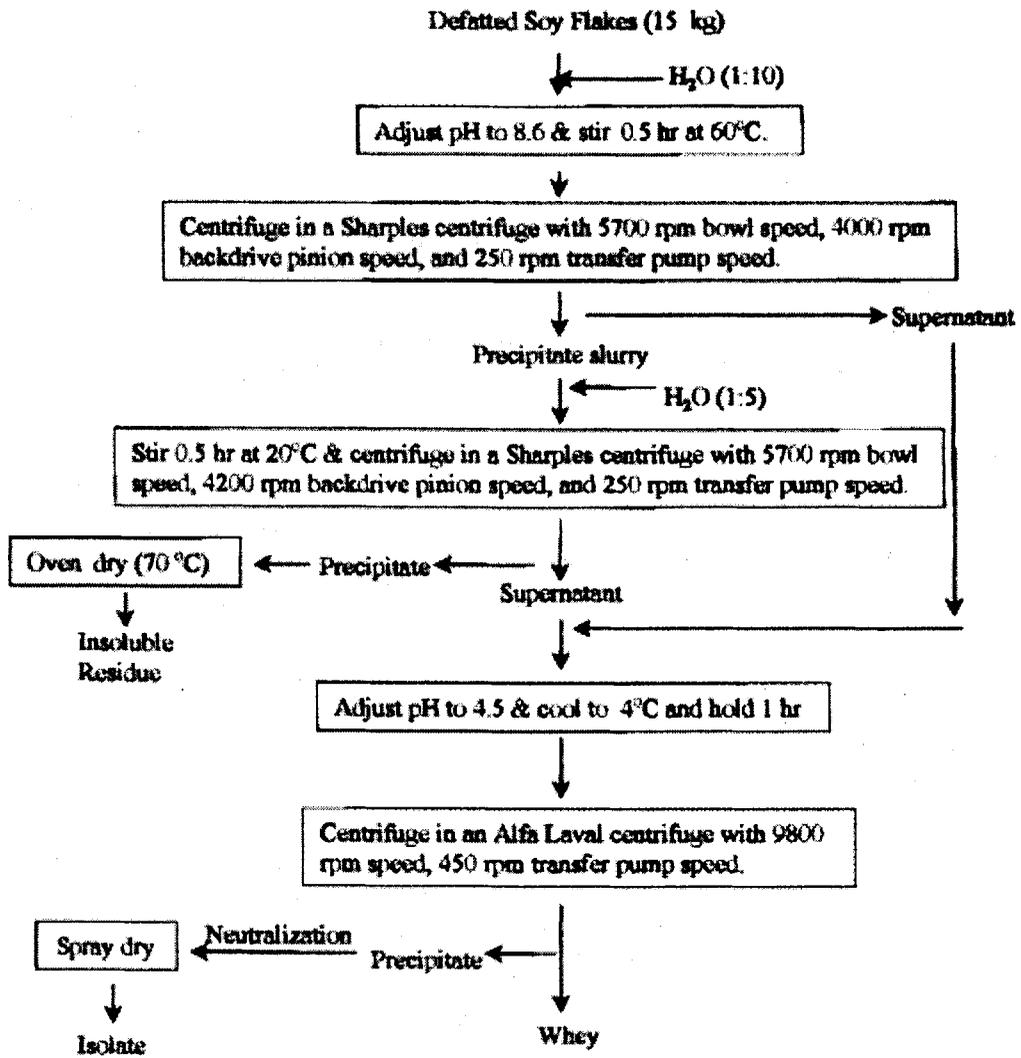


Figure 2. Production process of soy protein isolate in pilot-plant scale (13)

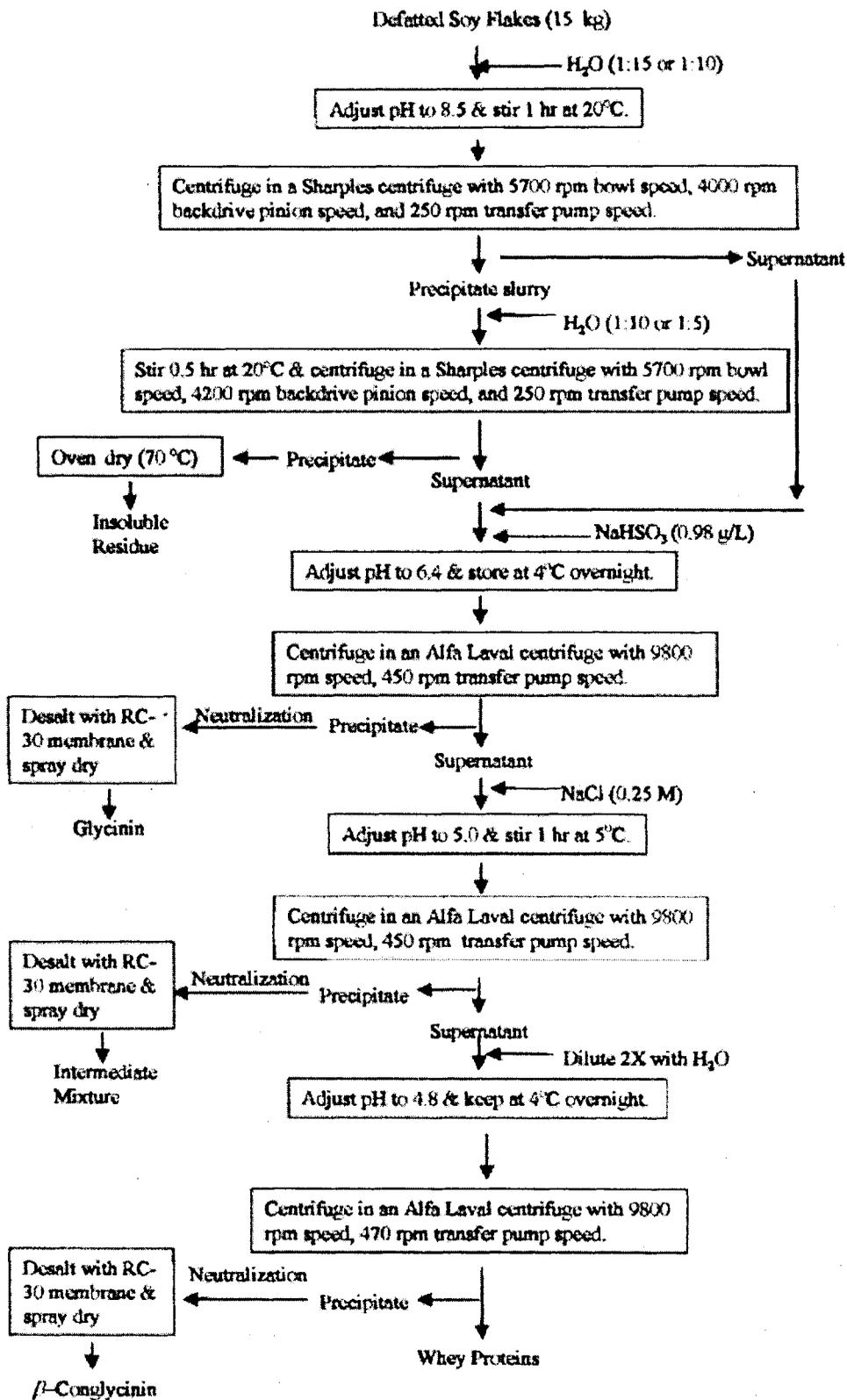


Figure 3. Modified separation process of glycinin and β -conglycinin in pilot-plant scale. (13)

ISP를 각각 5%, 7.5%, 10%, 15%의 농도로 첨가하여 각각을 3시간 동안 stirring하면서 상온에서 녹였다. 용해된 ISP 용액은 원심분리를 통하여 수용성 단백질만을 분리한 후 Bradford assay를 통해 단백질 농도를 측정하였다. 농도를 결정 한 후 정해진 농도에서 pH와 용해 시간을 달리하여 용해된 단백질의 양을 측정하였다.

다. 가수분해 효소를 이용한 인산화 대두 펩타이드 (SPP)의 생산

인산화 공정을 중심으로 SPP를 생산하는 방법은 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 그 하나는 분리된 수용성 대두 단백질을 전 처리를 통해 polypeptide 사슬을 풀고 인산화한 다음 인산화된 대두 단백질을 침전시켜 분리한 후, 효소가수분해(酵素加水分解, enzymatic hydrolysis)시켜 SPP를 얻는 방법이고 다른 하나는 인산화 수준을 높이기 위해 먼저 효소가수분해를 통해 대두 단백질을 oligopeptide로 전환시킨 후, 인산화한 다음 SPP를 분리해내는 방법이다. 후자의 경우, 단백질내의 아미노산 잔기들이 밖으로 노출되게 되어 인산화제와의 반응이 용이하기 때문에 전자의 경우에 비해 보다 효율적으로 인산화시킬 수 있다. 그러나 가수분해물의 인산화 반응 후, 작은 분자량의 수용성 SPP를 인산염들과 그 반응 산물인 pyrophosphate 혹은 polyphosphate가 녹아 있는 반응액으로부터 분리 정제해야 하는 어려움이 있다. 이 과정에 대한 최적조건을 확립하고자 하였다. 따라서 화학적 인산화와 트립신 가수분해 두 가지 방법을 순서를 달리한 후 칼슘 결합 능력을 비교하였다.

1) 실험 1. 인산화 분리 대두 단백질의 트립신 가수분해

분리 대두 단백질을 4%의 농도로 증류수에 녹인 후 2N 수산화나트륨을 이용하여 pH를 11.5로 조정하여 한 시간 동안 혼합한 후 10,000RPM 속도로 원심 분리하여 상등액을 얻어 낸 후 인산화제인 STMP (sodium trimetaphosphate)를 1% 농도로 첨가하여 pH를 11.5로 유지하면서 35℃에서 3시간 동안 반응시켰다. 이후 1N 염산을 이용하여 pH를 8로 조정하여 트립신(trypsin)을 이용하여 효소와 기질의 농도를 달리하여 3시간 동안 반응하였고, 반응 후 잔존하는 인

산화제와 반응 부 생성물인 pyrophosphate를 제거하기 위해서 증류수에서 투석막 (MW cut off size : 1,000Da)을 이용하여 12시간 이상 투석하였다.

2) 실험 2. 분리 대두 단백 트립신 가수분해물의 인산화

분리 대두 단백을 4%의 농도로 증류수에 녹인 후 2N 수산화나트륨을 이용하여 pH를 8로 조정하고 한 시간 동안 혼합 후 원심 분리하여 얻어낸 상등액에 트립신을 이용하여 가수분해한 후 1N 수산화나트륨을 이용하여 11.5로 조정하여 실시 예1과 같이 STMP를 이용하여 인산화를 실시하고 투석을 실시하여 생성물을 얻어냈다.

1), 2)에서 칼슘 결합 능을 비교하기 위해 인산화를 실시하지 않은 분리 대두 단백 가수 분해물도 동일 조건으로 준비하였다.

3) 단백질의 효소가수분해정도에 따른 인산화 정도의 분석

- 효소와 기질 비율의 최적화

ISP 용액의 용해도를 높여서 수용성 단백질의 농도를 높임으로 전체적인 칼슘 결합 펩타이드의 수율을 높이기 위해 ISP 용액의 용해도를 높이기 위한 최적 조건을 확립하였다. 단백질 특성상 3차 구조를 형성하고 있으므로 최적의 인산화 조건을 확립하기 위해서는 효소 처리를 통해 아미노산이 최대한 많이 노출되어야 한다. 효소와 기질의 비율을 달리 하여 가수분해를 실시한 후 인산화의 정도를 측정하였다. 효소에 대한 기질의 비율이 낮은 1 : 250 와 1 : 500, 1 : 1000 (E : S)의 비율로 인산화도와 칼슘 결합 능력을 측정하였다.

또한 1 : 250, 1 : 500, 1 : 1000 (E : S)의 비율로 가수분해만 실시된 시료와 인산화까지 이루어진 시료의 칼슘 결합 능을 측정하였다. 시료에 일정량의 Calcium chloride (CaCl_2)를 첨가한 후 pH 6.0, 37°C에서 1시간 반응시킨 후 TCA를 10%의 농도로 첨가하여 4°C에서 12시간 이상 방치한 후 10,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상등액의 칼슘의 농도를 Atomic Absorption Spectrophotometer (Shimadzu사)를 이용하여 측정하였다.

T : expend quantity of EDTA(ml)

f : factor of EDTA

D : dilution ratio of sample.

S : Sample quantity (g)

○ Reagents :

0.4% EDTA · 2Na · 2H₂O

metallic indicator -

Dotite NN

10%NaOH, KCN powder, calcium standard solution

○ Method :

1. Determination of EDTA factor

Calcium standard solution(1ml=1mg Ca ; Showa) 5 ml + D.W. 10 ml + 10% NaOH 5 ml + KCN powder 0.3 g + Dotite NN powder 0.3 g

→ propriety by EDTA

; end point : color red → blue measurement of sample.

2. calculation

$$\text{Ca(mg\%)} = T \times f \times D \times (100/s)$$

T : expend quantity of EDTA(ml)

f : factor of EDTA

D : dilution ratio of sample.

S : Sample quantity (g)

5) 인산화후 효소 트립신의 잔여 활성도 측정

대두 단백질은 트립신에 의해 펩타이드로 가수 분해 된다. 가수 분해 된 펩타

이드는 인산화 반응을 거쳐 칼슘 결합에 참여하게 되는데 펩타이드 가수분해에서 사용되었던 트립신이 비활성화 되지 않아 칼슘 결합 과정에서 작용할 우려가 있다. 이것을 확인하기 위하여 가장 흔히 사용하는 표준 단백질인 BSA(bovine serum albumin)를 이용해 칼슘 반응 시 트립신의 작용 여부를 알아보았다. BSA 에 트립신 처리한 것과 BSA에 STMP 처리, 즉 인산화 반응시킨 후 트립신 처리 한 것을 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용해 비교해보았다.

라. 대두 단백질의 인산화

1) 인산화제

인산화 방법에는 크게 효소적인 방법과 화학적인 방법이 있다. 대표적 인산화 peptide인 우유의 CPP의 경우, 합성된 casein이 소포체 (endoplasmic reticulum) 막을 통과한 후에 골지체에 존재하는 casein kinase에 의해 인산화가 이루어진다(20-22). 따라서 대두로부터 단백질을 뽑아내는 대두 단백질의 가공 과정 중에 효소적 인산화에 적합한 3차 구조 및 반응 환경을 유지해야 하는 문제가 있기 때문에 효소적 방법에는 어려움이 있다. 따라서 경제적인 면에서도 보다 유리한 화학적인 방법을 사용하고자 하였다.

화학적 인산화제로는 phosphorous oxychloride (POCl_3) 와 phosphoric acid, phosphorus pentoxide (P_2O_5), sodium trimetaphosphate (STMP), miscellaneous reagent 등이 있다(23). 이중에서 특히, STMP는 미국 FDA(Food & Drug Administration)에서 승인된 식품 첨가제로서 독성이 없고 단백질의 침전을 유발시키지 않으며 경제적으로도 우수하지만 단백질의 영양 손실은 전혀 일으키지 않는다고 알려져 있기 때문에 본 과제의 인산화제로서 사용하고자 한다. STMP는 세린(Serine), 트레오닌(Threonine)과 리신(Lysine) 잔기에 인산화를 시키는 것으로 알려져 있다(24,25). 특히 세린과 트레오닌은 hydroxyl group에 인산화를 시키는데 primary hydroxyl group을 포함한 세린 잔기에 우선적으로 인산화를 시킨다. Fig. 4 에서 볼 수 있듯이 반응이 진행된 후 phosphoserine과 동량의 pyrophosphate가 생성된다. 이 반응은 염기성의

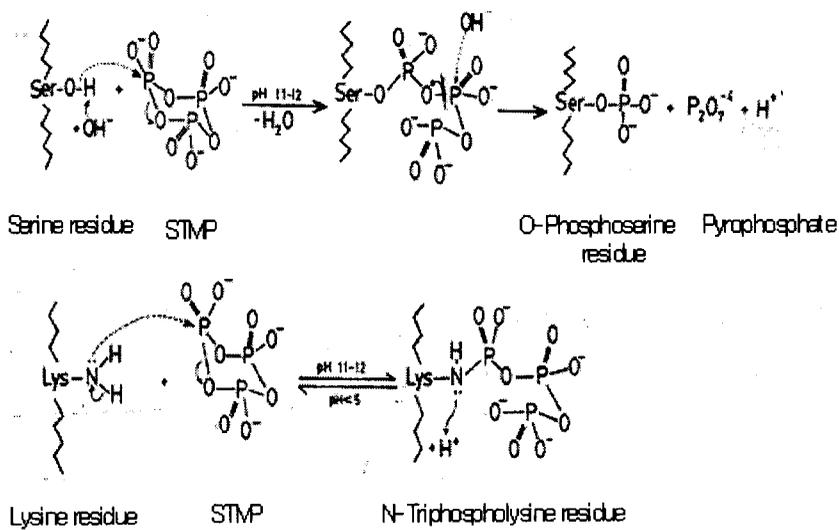


Figure 4. STMP에 의한 인산화 과정 (24)

조건에서 비가역적으로 진행된다. STMP는 리신에도 반응을 하지만 본 과제에서는 세린기의 인산화를 중심으로 실험을 진행하였다.

아미노산의 특성에 따라 인산화 반응의 최적조건을 확립하려 하였다. 이미 기술한 대로 STMP를 사용하고 있지만 중합도별 칼슘 결합 능력을 확인해 보기 위해 중합도가 높은 인산화제를 사용하여 비교하였고 이로부터 ISP의 인산화를 위한 최적 조건을 확립할 수 있었다.

STMP의 반응 최적 조건은 이미 알려져 있다. STMP는 Sodium dihydrogen orthophosphate를 530°C에서 5시간 동안 가열해서 얻는다. 얻어진 STMP를 인산화가 가장 잘 되는 조건을 찾기 위해 각각의 pH, 온도, 농도별로 실험한다. 또한 인산화제 사용에 있어서 중합도별 칼슘 결합능을 알아보기 위해서 여러 인산화제를 사용해 각각의 칼슘 결합 능력을 확인하여 보았다. 각각의 반응조건은 STMP의 반응 최적 조건과 동일하게 실시하였다.

따라서 대두 단백질의 칼슘 결합도와 수용성을 증가시키기 위해 STMP 이외에 다중($n > 4$) 인산염 중합체별 여러 인산염을 이용하여 칼슘 결합능을 비교 실험하였다. 이 실험에서 사용된 인산화제로는 sodium trimetaphosphate (STMP), Sodium metaphosphate(SMP), Sodium polyphosphate(SPP)와 Sporix가 있다. 이 인산화제는 다중 중합체로 이루어진 것으로서 각기 다른 중합도를 가지고 있어서 칼슘 결합의 기회를 증가시킬 것으로 생각되므로 사용되었다.

2) 인산염의 공정 과정

다중 인산염의 공정 과정은 다음과 같다. 인산화 대두펩타이드 제조시 사용될 sodium polymetaphosphates ($n = 3 \sim 18$)를 합성한 후 정제처리 과정을 거친 다음 중합도를 측정하였다

Sodium polymetaphosphate를 제조하기 위한 방법으로 1안과 2안으로 나누어 제조 실험을 하였다. 제1안과 2안은 원료의 선택에 차이를 두고 있으며 보다 좋은 Sodium polymetaphosphate를 제조하기 위한 것이다.

가) 제1안

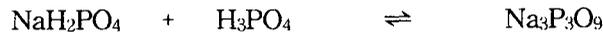
- 원료는 탄산나트륨(NaCO_3)과 인산(H_3PO_4)을 주원료로 하여 축합로에서 반응을 진행하였으며 반응식은 다음과 같다



- 원료는 탄산나트륨 64 kg과 인산 32 kg을 혼합하여 축합온도 $550\sim 620^\circ\text{C}$ 에서 3-4시간 동안 반응을 통하여 얻어진 film 형태의 결정성 물질을 분쇄를 통하여 분말화 하였다.

나) 제 2안

- 원료를 탄산나트륨이 아닌 MSP (Sodium phosphate monobasic)를 이용한 방법으로 1안 보다는 반응 시간을 단축하여 제조 할 수 있음.



- 원료의 투입량은 1안과 동일한 양으로 혼합하여 축합온도를 $500 \sim 550^\circ\text{C}$ 에서 1~2 시간 동안 반응을 통하여 얻어진 film 형태의 결정성 물질을 분쇄를 통해 분말화 시켰다.

한편 앞의 나. 문항에서 기술한 것처럼 대두 단백질의 인산화를 극대화하기 위해 단백질 내부에 묻혀 존재하는 세린 잔기의 노출을 위해 적절한 unfolding을 유도할 수 있도록 인산화 반응 전에 효소에 의한 전(前) 처리 조건의 최적화된 반응 조건을 확립하고자 하였다.

3) 대두 펩타이드의 인산화

수용성 분리 대두 단백만을 분리한 후 가수분해 효소인 트립신을 이용하여 가수분해하였다. 트립신을 이용한 가수분해는 트립신의 최적 수소 이온 농도 (pH)인 8에서 실시하였다. 이미 대두 단백질의 인산화에 STMP가 최적 인산화제인 것이 알려져 있으나 본 과제에서는 단백질이 아닌 단백질의 가수분해물인 펩타이드를 사용하므로 다시 한번 검증해야 할 필요가 있었다. 가수분해된 대두 펩타이드를 다시 2N 수산화나트륨을 이용하여 STMP가 작용할 수

있는 최적 pH 조건을 찾기 위해 pH 6.8에서 11.5로 각각 조정하여 여러 농도의 STMP를 첨가 인산화를 실시한 후 투석을 실시하여 잔류 인산이 제거된 생성물을 얻어낼 수 있었다. 이와 동시에 STMP를 사용하지 않고 대두 단백질 자체적으로 가지고 있는 phytate를 이용한 인산화 반응 실험도 여러 pH에서 병행하였다. 인산화된 펩타이드 생성물을 분리하여 얻어 낸 후 각각의 생성물의 인산화 정도를 비교하기 위하여 인 정량을 실시하였다.

<인 phosphorous concentration 측정>

인의 함량은 칼슘의 함량과 함께 영양학적으로 매우 중요하다. 따라서 칼슘제품에서 칼슘과 인과의 ratio는 제품의 질과 관계된다. 인의 적정은 Molybden blue 비색법을 이용하여 측정하였다.

Sample 과 Ammoniummolybdate, hydroquinone, Na_2SO_3 을 혼합하여 Na_2SO_3 를 가한 시간을 기준으로 정확히 30 min 간 반응시켜 650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

- Protocol: Molybden blue 비색법
- Method :

50ml mess flask에 Sample 2ml와 Ammoniummolybdate 4ml을 가하여 수분간 방치

- hydroquinone 4ml, 10% Na_2SO_3 4ml을 혼합하여 수분간 방치.
- 3rd. D.W로 표선까지 채운 후 Na_2SO_3 를 가한 시간을 기준으로 정확히 30 min 간 반응.
- 650nm에서 흡광도측정.
- blank는 D.W.를 이용한다.

마. 칼슘 결합 반응의 조건 확립

1) 천연칼슘(Animal Bone Calcium phosphate)으로부터의 무기 칼슘의 제조

실험

Ca-phosphate의 경우에 비하여 CaCl_2 , CaSO_4 형태의 경우는 물에 대한 용해성이 좋아 추후의 공정이 용이하므로 특히 CaCl_2 칼슘 펩타이드의 칼슘원으로 확보하고자 하였다. 우골분 및 어분을 퇴화시키거나 질산, 인산, 염산, 황산 등으로 처리하여 칼슘을 추출하였다.

우골분 및 어분으로부터 calcium을 얻기 위해서 질산, 인산, 염산, 황산 등으로 처리하여 칼슘을 추출하게 되는데 Ca-phosphate인 경우에는 공정은 비교적 쉬우나 불용성침전을 형성하기 때문에 free 칼슘을 확보하기 어려우므로 CaCl_2 , CaSO_4 형태로 추출한 경우 물에 대한 용해성이 좋아 추후의 공정에 적용하기에 용이하였다.

가) 수거된 우골을 가지고 세척을 한 후 분쇄하여 회화로 온도 800°C 에서 1시간, 2시간, 3시간 동안 회화를 시킨 우골분과 회화로 온도 1000°C 에서 1시간, 2시간, 3시간 동안 회화한 우골의 유기물과 단백질, 불소(Fluoride)를 제거한 후 질산, 인산, 염산, 황산 등의 무기산으로 처리하여 무기칼슘을 제조 하는 방법을 택하였다.

나) 우골을 800°C 에서 회화를 한 우골분은 불소의 함유량이 높고 칼슘 및 인의 함량이 낮기 때문에 무기칼슘을 제조 하는데 있어 불소를 제거하여야 하는 공정을 다시 거쳐야 하는 번거로움이 있는 반면, 1000°C 에서 회화한 우골분은 그에 비해 양호한 제품을 얻을 수 있었다.

2) CaCl_2 를 이용한 칼슘 결합 반응

대두 펩타이드의 칼슘 결합에 있어 인산화의 중요성을 확인하기 위하여 두 가지의 조건에서 대조 실험을 실시하였다. 칼슘 결합능은 인산화 펩타이드와 인산화하지 않은 펩타이드의 두 가지 조건하에서 측정되었다.

제조된 대두 펩타이드와 인산화 대두 펩타이드는 각각 칼슘과 결합하여 칼슘 결합 인산 펩타이드를 형성하게 된다. 인산화 펩타이드 수용액을 중성 pH로 조정한 후 각각의 펩타이드 수용액에 염화칼슘을 각 농도별로 첨가하여 칼슘

결합 반응을 진행시킨 후 칼슘 결합능을 칼슘 정량을 통하여서 실시하였다.

펩타이드 각각의 수용액에 염화칼슘을 최종 농도가 1-3% (w/v)가 되도록 첨가하였다.

3) 인산화 반응 상등액 속의 잔여 인산염 및 그 분해 유도체들의 침전방지 방법 확립

가수 분해 후 인산화 반응을 시킬 경우 인산화 반응 상등액 속의 잔여 인산염 과 그 분해 유도체인 pyrophosphate 혹은 polyphosphate가 잔재해 있다가 칼슘이 첨가되면 calcium-phosphate로서 침전을 형성시키게 되서 칼슘이 인산화 펩타이드에 결합할 기회를 감소시키게 되므로 칼슘 결합에 문제를 일으킨다. 칼슘결합을 정상적으로 유도하기 위해서는 calcium-phosphate의 생성에 따를 문제를 해결해야 했다. 따라서 CaCl_2 를 첨가해서 결합을 유도하기 이전에 pre-precipitation시켜서 일단 ISP와 결합되지 않은 인산염을 제거하고 그 후에 다시 칼슘을 첨가하면 이러한 문제들을 해결할 수 있다. 일단 잔여 인산염을 제거하기 위해 calcium-phosphate 결합을 유도해서 centrifugation을 통해서 침전을 제거함으로써 해결하였다.

바. Affinity chromatography(IMAC, immobilized metal affinity chromatography)를 이용한 proglycinin 유래의 phosphopeptide의 분리

금속을 이용하여 금속과 결합할 수 있는 peptide를 효과적으로 분리해 내는 방법을 immobilized metal affinity chromatography (IMAC) 이라 하는데 본 과제에서도 펩타이드를 순수 분리해 내는 방법으로 칼슘이온을 이용하는 IMAC을 SPP 분리에 사용하고자 하였다(26-29).

칼슘과 펩타이드의 결합 정도에 따라서 칼슘에 결합하는 펩타이드를 분리해 낼 수 있는 방법을 사용함으로써 원하는 펩타이드만을 분리 정제하는데 용이한 방법이다(30).

대장균으로부터 발현 정제를 거쳐 인산화된 트립신 가수 분해물은 인산화 정도에 따라 HiTrap chelating column으로 분리하였다.

Table 1. FPLC operating conditions.

	A. Proglycinin purification	B. Phosphopeptide isolation by IMAC	C. Peptide fragment isolation
Injection volume	7ml	100µl	1ml
Sample	65% (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitate (5.03mg/ml)	phosphorylated proglycinin hydrolysates (0.83mg/ml)	proglycinin phosphopeptides
Mobile phase	35mM Tris-HCl (containing 50mM NaCl, pH 7.6)	20mM Sodium acetate (pH 5.0)-binding buffer	10mM Tris-HCl (containing 50mM NaCl, pH 7.0)
Gradient buffer	35mM Tris-HCl (containing 0.5M NaCl, pH 7.6)	200mM Sodiumdihydrogen- phosphate in binding buffer	10mM Tris-HCl (containing 1M NaCl, pH 7.0)
Flow rate	1ml/min	0.5ml/min	1ml/min
Detector detector	UV (280nm) detector	UV (214nm) detector	UV (214nm)
Column	Mono Q HR 5/5 1ml	HiTrap Chelating 1ml	Mono Q HR 5/5 1ml

우선 0.1M CaCl₂를 column에 고정화 시킨 후 흡착용매와 용출용매를 이용하여 분리하였다. 분리한 조건은 Table. 1.과 같다.

사. 우수칼슘결합성 대두 펩타이드의 대량 확보

칼슘과 결합하는 대두 펩타이드를 대량 생산하기 위하여 상기와 같이 proglycinin중 한 subunit 유전자를 박테리아에서 대량 발현시킴과 분리한 후, 인산화와 가수분해과정을 거쳐 유용펩타이드균을 분리 정제하였다. 유용펩타이드에 칼슘을 결합시킨 후 칼슘결합력이 우수한 펩타이드를 분리하여 해당 대두단백질 유전자를 클로닝한 벡터를 발현하도록 계획하였다. 그러나 대두단백질의 heterogeneity와 low yield 등의 문제로 화학적 합성하는 방안으로 대체하였다. 대두의 glycinin은 acidic subunit (A)과 basic subunit (B)이 disulfide결합으로 연결된 A-B 형태의 subunit 6개로 구성되어 있는 hexamer로 식물체 내의 protein body에 저장되어 있는데 A, B subunit의 종류에 따라 A_{1a}B_{1b}, A₂B_{1a}, A_{1b}B₂, A₃B₄, A₅A₄B₃의 5종류로 분류되며 다시, 아미노산 서열의 상동성에 따라 A₂(A₂B_{1a}, A_{1a}B_{1b}, A_{1b}B₂)와 A₃(A₃B₄, A₅A₄B₃)의 두 그룹으로 대별된다(16). 1987년, 일본의 Udaka 연구그룹에 의해 methionine함량이 비교적 풍부한 A_{1a}B_{1b}와 A₂B_{1a}의 cDNA가 클로닝되어 대장균에서 약 1%의 수율로 발현되었음이 보고 되었다(5, 7). 그 후, Nielsen과 Goldberg 연구그룹에 의해 다양한 glycinin단백질들이 5개의 유전자에 의해 결정됨과 함께 이들의 전사(transcription)조절 기작을 부분적으로 밝혔다(45, 46, 17). 본 실험실은 glycinin A_{1a}B_{1b} subunit의 cDNA에서 signal sequence부분인 N-말단 9개의 염기가 제거되고 3'-말단에 30개의 염기가 삽입되어 대장균에서의 발현이 가장 안정된 plasmid를 이미 보유하고 있으며(19) 적절한 발현 조건하에서 균 전체 단백질 량의 약 12%의 수율로 glycinin을 얻을 수 있었다. 따라서 본 과제에서 유전자 재조합 기술에 의해 단일 종류의 칼슘 결합 oligopeptide를 생산할 수 있다. 그리고 박테리아에서는 post-translational phosphorylation이 일어나지 않는다. 유핵세포에서는 세린, 트레오닌 또는 타이로신 잔기 중 리부는 히드록시 기의 효소작용으로 ATP에 의해 인산화 되는 경우가 있다. 인산기

에 의해서 이들 폴리펩타이드는 마이너스 전하가 된다. 이로 인하여 어떤 단백질이 다른 단백질로 변하는데 유증 단백질인 카제인에는 phosphoserine group이 많이 있으며 이것이 칼슘과 결합하게 되는데 박테리아 시스템에서는 이러한 modification이 일어나지 않으므로 자연적인 인산화를 기대하기는 어렵다. 그 뿐 아니라 펩타이드를 합성하는 비용이 본 과제 시작 시점에 비해 하락하였으므로 박테리아를 통한 펩타이드의 대량 생산보다 합성을 통한 생산이 더 효율적이라 할 수 있겠다. 따라서 본 과제에서는 유전자 클로닝을 화학적 합성으로 대체하여 칼슘 결합 펩타이드를 합성하고 칼슘결합능을 assay를 통하여 측정하였다.

2. 연구 결과

가. 원료 단백질의 분리 정제

ISP는 Minimum-heat treated soy flour를 원료로 하여 먼저, pH 8의 약 알칼리 상태에서 soy flour를 용해시키고 원심 분리하여 불용성 침전물을 제거하였다. 남은 상등액의 pH를 4.5로 낮추어 등전점 침전을 유도하여 생성된 curd를 회수한 다음, 그대로 말리거나 NaOH로 중성화 한 후, spray dry시켜 ISP를 얻을 수 있었다. 대두의 protein함량은 96% 이었다. 제조된 ISP는 globulin이라 불리는 저장 단백질(90%)과 trypsin inhibitor, cytochrome 등의 저분자량 성분들로 구성된 2S component(10%)로 구분되는데 globulin의 절반 이상을 차지하는 glycinin을 β -conglycinin으로부터 isoelectric precipitation의 방법을 사용하여 침전을 얻어 대두단백질을 얻을 수 있었다.

ISP의 제조와 함께 대장균으로부터 proglycinin의 대량 생산이 진행되었다. Proglycinin을 coding하는 cDNA를 이용하여 단백질을 대량 생산하였다. 최종적으로 정제된 proglycinin은 최소 93%이상의 순도(fig. 5)를 보였고, 수율은 다음의 Table 2와 같다.

나. ISP 용액의 용해도를 높이기 위한 최적 조건 확립

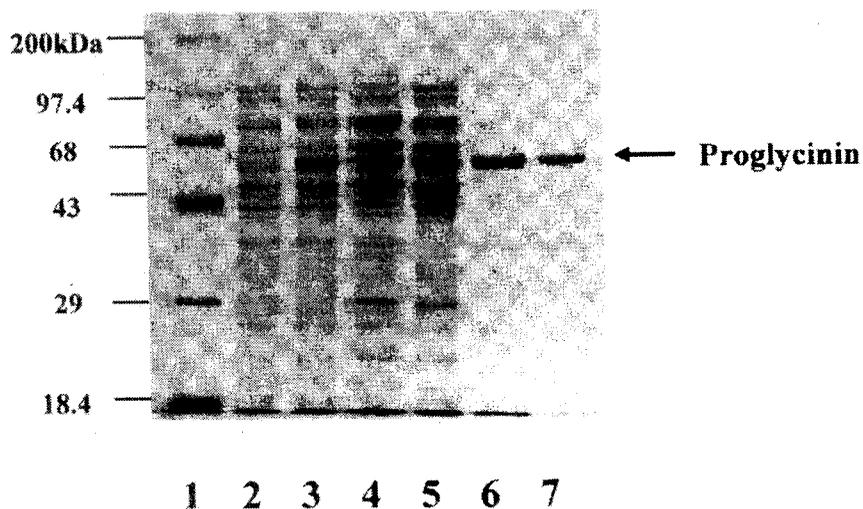


Figure 5. SDS-PAGE analysis of proglycinin samples at different stages of the purification. Lane 1, molecular weight maker ; Lane 2, non-induced JM105 [pKGA1aB1b]; Lane 3, induced JM105 [pKGA1aB1b] ; Lan4, crude extract ; Lane 5, fraction with 40-65% saturation of ammonium sulfate; Lane 6, Mono Q pool ; Lane 7, Cryoprecipitation

**Table 2. Purification of Proglycinin from
E. coli JM105 (A_{1a}B_{1b})**

	Total protein [mg]	Total proglycinin [mg]	purification [mg]	yield [%]
Crude extract	714.6	87.5	12.2	100
Ammonium sulfate fractionation	409.3	76.6	18.7	76.6
Mono-Q pool	25.7	19.7	76.6	22.5
Cryoprecipitation	5.5	5.3	96.4	6.1

농도와 시간, pH를 달리하여 단백질 농도가 높은 적절한 조건을 확립하였다.

1) ISP 농도

ISP를 각각 5%, 7.5%, 10%, 15%의 농도로 첨가하여 각각을 3시간 동안 stirring하면서 상온에서 녹였다. 용해된 ISP 용액은 원심분리를 통하여 수용성 단백질만을 분리한 후 Bradford assay를 통해 단백질 농도를 측정하였다. 농도가 높아짐에 따라 단백질 농도도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 10% 이상에서는 단백질 농도의 증가 정도가 크지 않고 ISP의 손실도 커지게 되므로 최적 조건은 10% 농도로 결정하였다(Table 3, Fig. 6)

2) 용해 시간

각각 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 6시간으로 stirring한 후에 단백질의 농도를 측정하였다(Table 4, Fig. 7). 역시 stirring time에 비례해서 농도는 높게 측정되었는데 3시간 이후로는 단백질 농도가 크게 높아지지 않고 또 변성의 위험이 있기 때문에 최적 stirring time을 3시간으로 결정하였다.

3) pH

각각의 pH를 PBS (phosphate buffered saline) 용액으로 pH 5, 6, 7, 8, 9로 적정한 다음 단백질의 농도를 측정하였다(Table 5, Fig. 8). pH에 따른 단백질의 농도 차이는 크지 않았으므로 중성 pH가 적당하다고 보았다. 따라서 pH를 따로 조절하지 않고 3차 증류수에 녹여 ISP 용액을 만들었다.

다. 가수분해 효소를 이용한 인산화 대두펩타이드 (SPP)의 생산

1) 분리 대두 단백질의 트립신 가수분해물의 인산화

Table 3. ISP 농도에 따른 단백질의 용해도

concentration of ISP (w/v %)	A ₅₉₅ (Bradford assay)	Conc. of Protein [mg/ml]
5	0.248	40
7.5	0.336	55
10	0.474	78
15	0.610	100

ISP의 농도에 따른 용해도

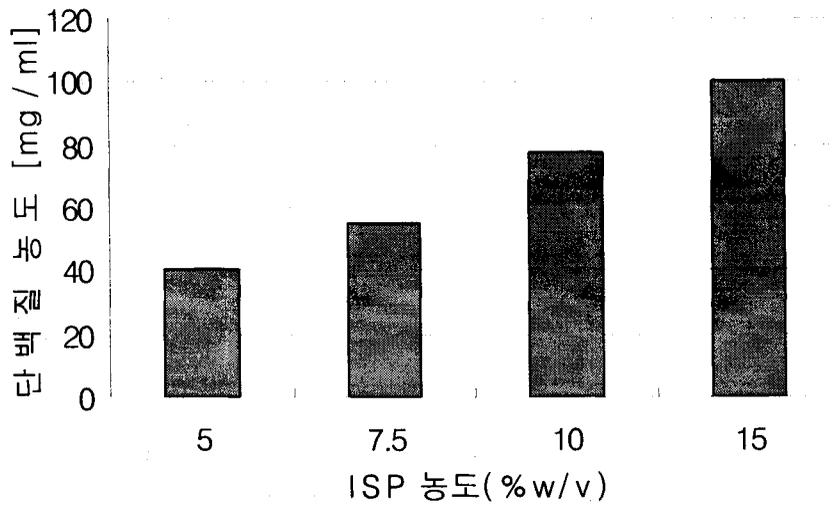


Figure 6. ISP 농도에 따른 단백질의 용해도

Table 4. 용해 시간에 따른 단백질의 용해도

time	A595 (Bradford assay)	Conc. of Protein [mg/ml]
30 min	0.394	64
1 hr	0.463	76
2 hr	0.594	98
3 hr	0.630	105
6 hr	0.737	123

- pH7, ddH₂O, RT, 10% ISP solution

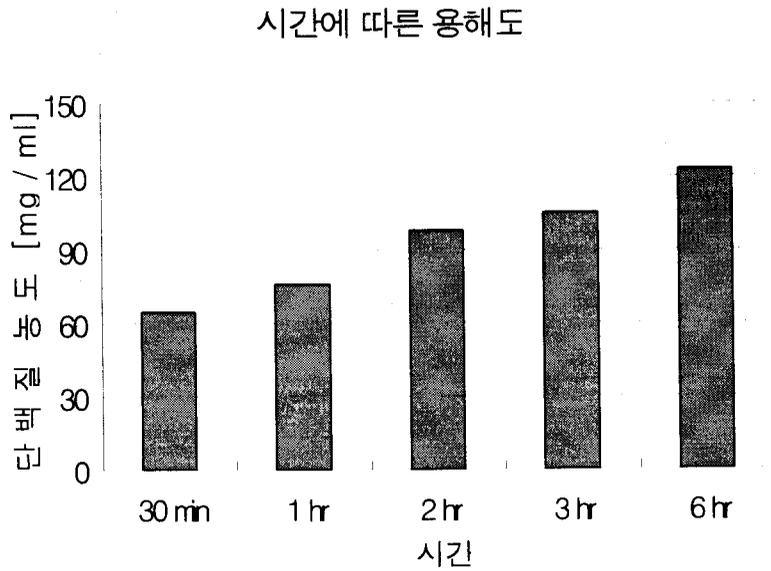


Figure 7. 용해도 시간에 따른 단백질의 용해도

- pH7, ddH₂O, RT, 10% ISP solution

Table 5. pH에 따른 단백질의 용해도

pH	A595 (Bradford assay)	Conc. of Protein [mg/ml]
5	0.176	27
6	0.183	28
7	0.220	35
8	0.226	36
9	0.265	42

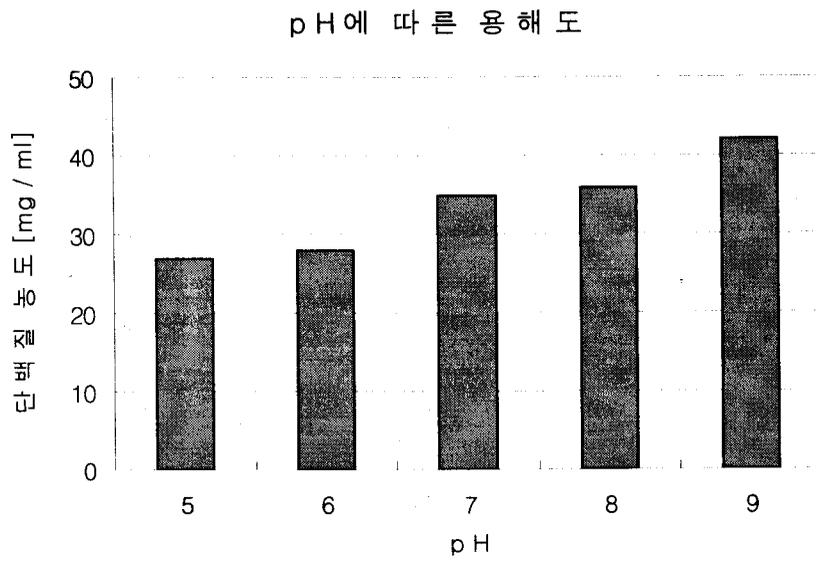


Figure 8. pH에 따른 단백질의 용해도

분리 대두 단백을 10%의 농도로 증류수에 녹인 후 3시간 동안 충분히 대두단백이 용해되도록 한 후 원심 분리하여 얻어낸 상등액에 트립신을 이용하여 가수분해하였다. 상등액을 1N 수산화나트륨을 이용하여 STMP가 작용할 수 있는 11.5로 조정하여 STMP를 첨가한 후 35℃에서 3시간 동안 인산화를 실시하였다. 인산화 된 펩타이드 수용액은 잔류하는 인산염을 제거하기 위해 투석을 실시하여 인산화 펩타이드 생성물을 얻어냈다. Fig. 9 에서 보여주는 바와 같이 인산화됨에 따라 펩타이드들이 좀더 산성화되는 방향으로 이동됨을 확인할 수 있었다.

2) 단백질의 효소가수분해정도에 따른 인산화 정도의 분석

- 효소와 기질 비율의 최적화

단백질 특성상 3차 구조를 형성하고 있으므로 최적의 인산화 조건을 확립하기 위해서는 효소 처리를 통해 아미노산이 최대한 많이 노출되어야 한다. 효소와 기질의 비율을 달리 하여 가수분해를 실시한 후 인산화의 정도를 측정하였다. 효소에 대한 기질의 비율이 낮은 1 : 250 와 1 : 500, 1 : 1000 (E : S)의 비율로 인산화도와 칼슘 결합 능력을 측정하였다(Fig. 10). 이 세 가지 조건의 반응에서 특히 1 : 1000 일 때의 칼슘 결합능이 가장 뛰어난 것으로 조사되었다. 이것은 가수 분해가 높은 경우 비 특이적인 가수 분해에 의해 칼슘과 결합할 수 있는 아미노산 서열을 가지지 못하는 peptide가 생성되어 가수 분해가 낮을 때 보다 칼슘 결합능이 떨어지는 이유로 생각할 수 있다.

효소와 기질의 비율을 달리 하여 가수분해 후 인산화시킨 시료와 그렇지 않은 시료에 대해서 칼슘 결합능을 측정하였다. 그 결과 첨가한 칼슘에 대해서 가수분해물과 결합한 비율을 인산화 유무에 따라 비교하여 Fig. 11 에 나타내었다. 모든 인산화된 가수 분해물에서 그렇지 않은 시료에 비해 칼슘 결합능이 높은 것으로 나타났다. 따라서 인산화에 의해 칼슘 결합능이 증가함을 확인할 수 있었기 때문에 기존의 serine 잔기 중 일부가 인산화로 인해 phosphoserine으로 전환되었다고 할 수 있다. 그리고 효소에 대한 기질의 비율이 낮은 1 : 250 (E : S)에서는 인산화되지 않은 가수 분해물에 비해 인산화된 가수분해물의 칼슘 결합능이 26% 정도 높게 나타났으나, 1 : 500과 1 : 1000에서는 약 47% 와

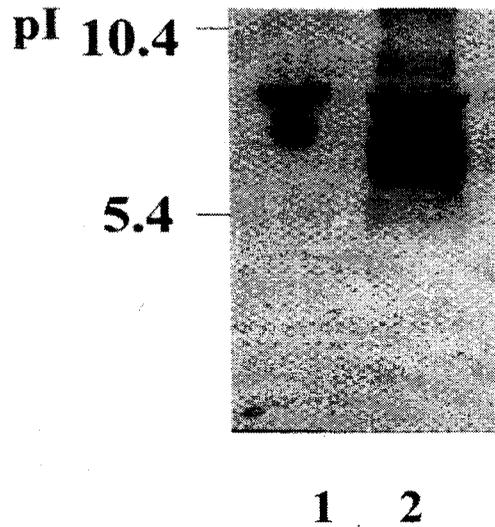


Figure. 9 Determination of isoelectric point of phosphorylated proglycinin Lane 1, purified proglycinin ; Lane 2, phosphorylated proglycinin

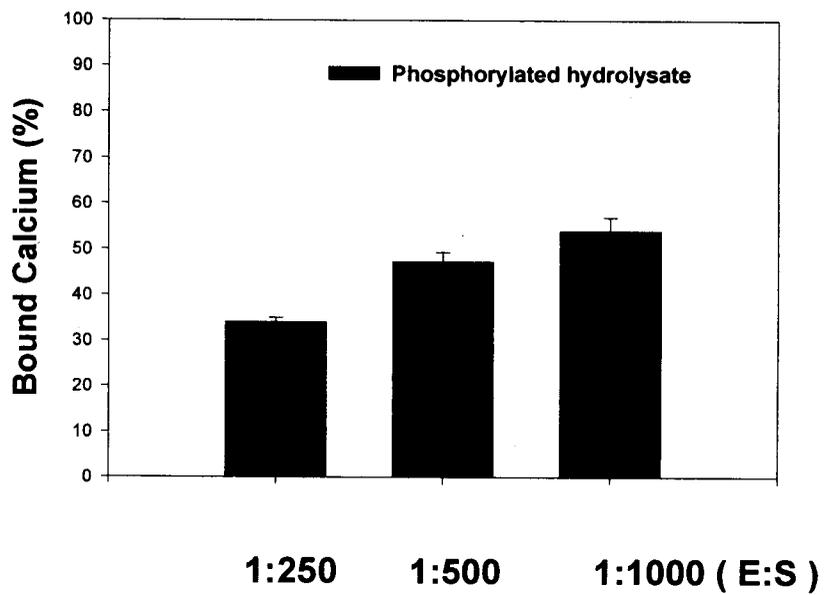


Figure 10. Calcium binding activity of phosphorylated tryptic hydrolysates

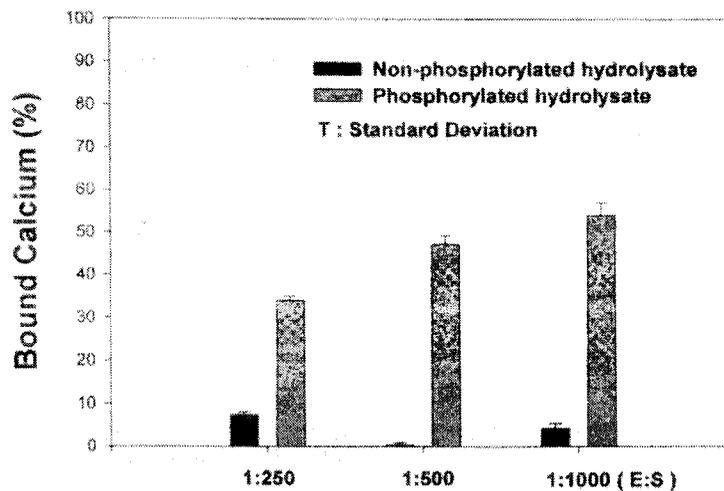


Figure 11. Calcium binding activity of non-phosphorylated and phosphorylated tryptic hydrolysates. After TCA precipitation, the Ca conc. of the supernatant was measured. The amount of added CaCl_2 is 2.5 ug. (Bound calcium (%) = Added Ac conc. - Ca conc. of supernatant / Added Ac conc.)

50% 정도로 높게 나타났다. 특히 1 : 1000에서는 인산화시킨 가수분해물이 칼슘 결합능이 가장 높은 것으로 나타났다. CPP의 경우 연속된 phosphoserine이나 aspartic acid와 glutamic acid에 칼슘이 킬레이팅되어 복합체를 이룬다고 알려져 있다. 그런데 가수분해가 높은 경우 비 특이적인 가수분해에 의해 칼슘과 결합할 수 있는 아미노산 서열을 가지지 못하는 peptide가 생성되어 가수분해가 낮을 때보다 칼슘 결합능이 떨어진다고 할 수 있다.

3) 인산화 후 효소 트립신의 잔여 활성도 측정

효소 가수분해의 조건과 이후의 칼슘 결합 반응의 조건이 유사하므로 가수분해에 이용된 트립신이 이후의 칼슘 결합 반응에서 다시 작용할 수 있는 가능성이 있기 때문에 이를 확인해 보았는데 정확한 기작은 알 수 없지만 STM P를 첨가하여 phosphorylation된 후에 트립신의 activity가 감소하는 것을 확인하였다. Figure 12 에서 볼 수 있듯이 BSA에 트립신을 처리했을 경우 BSA 단백질이 digestion되는 것을 볼 수 있지만 BSA를 인산화시킨 후 트립신 처리를 했을 때는 인산화하지 않은 것에 비해 상대적으로 digestion의 정도가 감소된 것을 볼 수 있다. 이 결과를 바탕으로 ISP 펩타이드를 이용한 실험에서도 트립신의 활성도가 인산화 후 감소한다는 결과를 적용시킬 수 있다.

4) 칼슘 이온과 인산화 대두펩타이드의 결합

화학적 인산화와 트립신 가수분해 두 가지 방법을 순서를 달리한 후 칼슘 결합능을 비교하였다. 실험 과정은 Table 6에 요약하였다.

칼슘 결합능을 비교하기 위해서 최종적으로 얻어낸 가수 분해물에 그 양의 250분의 1에 해당하는 염화칼슘(CaCl_2)을 첨가하고 체내 소장조건인 37°C 에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 펩타이드와 결합한 칼슘의 양을 측정하기 위해서 TCA (Trichloroacetic acid)를 최종 10%의 농도로 첨가하고 4°C 에서 12시간 이상 방치하여 침전시킨 후, 원심 분리하여 상등액에 존재하는 칼슘을 원자 흡광도계를 이용하여 정량하였다.

측정 결과 가수 분해 후 인산화를 실시한 실험 2의 시료가 더 높은 칼슘 결

marker
BSA
BSA+trypsin
BSA-[Ⓟ]+trypsin

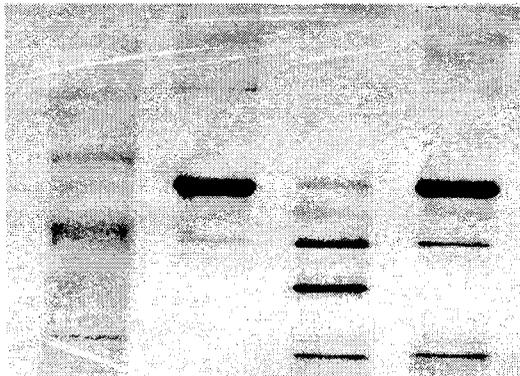


Figure 12. 인산화후 효소 트립신의 잔여 활성도 측정

Table 6. 가수분해와 인산화 반응 실험 과정

실험 1	실험 2
분리 대두 단백질	분리 대두 단백질
↓ 화학적 인산화 (pH 11.5)	↓ 트립신 가수분해 (pH 8)
인산화 분리 대두 단백질	대두 단백질 트립신 가수 분해물
↓ 트립신 가수분해 (pH 8)	↓ 화학적 인산화
↓ 투석	↓ 투석
인산화된 대두 단백질 가수 분해물	인산화된 대두 단백질 가수 분해물

Table 7. 대두 단백질 가수 분해물과 인산화 대두 단백질 가수분해물의 칼슘 결합능 비교 (실험 1)

효소와 기질의 비율(w/w)	첨가한 칼슘에 대한 펩타이드에 결합한 칼슘의 비율(%)	
	대두 단백질 가수 분해물	인산화 대두 단백질 가수 분해물
1 : 250	5.46±2.86	16.12±1.82

Table 8. 대두 단백질 가수 분해물과 인산화 대두 단백질 가수 분해물의 칼슘 결합능 비교 (실험 2)

첨가한 칼슘에 대한 펩타이드에 결합한 칼슘의 비율(%) 효소와 기질의 비율 (w/w)	대두단백 가수 분해물	인산화 대두단백 가수 분해물
	1 : 250	9.63±0.13

Table 9. 대두 단백질 가수 분해물의 수율 (실험 1)

	단백질, 펩타이드 농도(mg/ml)	총 부피(ml)	총단백질, 펩타이드의 양(mg)	수 율(%)
분리대두단백	11.72	100	1172	
인산화 대두단백 가수 분해물 ¹	1.97	520	1024.4	87.41

* 인산화 대두 단백질 가수 분해물 비율, 1 : 250

Table 10. 대두 단백질 가수 분해물의 수율 (실험 2)

	단백질, 펩타이드농도(mg /ml)	총 부피(ml)	총 단백질, 펩타이드의 양(mg)	수 율(%)
분리대두단백	5.68	100	568	
인산화 대두단백 가수 분해물 ¹	0.71	520	369.2	65

* 인산화 대두단백 가수 분해물 비율, 1 : 250

합능을 나타냈고, 가수 분해 정도에 따라서는 큰 차이를 보이지 않았다. Table 7, 8은 칼슘 결합능을 나타내었고 Table 9, 10은 최종적으로 얻어진 가수 분해 물에 대한 수율을 나타내었다.

실험의 결과 인산화된 가수 분해물이 그렇지 않은 대조군에 비해 전체적으로 높은 칼슘 결합능을 보였고, 특히 가수분해 후에 인산화를 실시하였을 때 칼슘 결합능이 높게 나타났다.

가) 칼슘 결합능 : 실험 2의 방법 즉 트립신 가수분해 후 인산화를 실시하였을 때 더 높은 칼슘 결합능을 보임

* 실험 1의 방법 : 대조군에 비해 3배 정도 높은 칼슘 결합능

실험 2의 방법 : " 5배 "

나) 수율

* 실험 1의 방법 : 87 ~ 90%

실험 2의 방법 : 65 ~ 73%

다) 가수분해 정도에 따른 비교 : 가수분해 정도에 따라서는 큰 차이를 보이지 않음.

예비시제품들에 대한 실험 결과를 Table 11-14에 비교 정리하였다. 인산화된 가수 분해물이 그렇지 않은 대조군에 비해 전체적으로 높은 칼슘 결합능을 보였고, 특히 가수 분해 후에 인산화를 실시하였을 때 칼슘 결합능이 높게 나타났다. 대두 단백질로부터 칼슘 결합 펩타이드를 분리하기 위하여 첫 번째는 화학적 인산화제인 sodium trimetaphosphate를 이용하여 단백질을 인산화시킨 후 트립신을 이용하여 단백질을 가수 분해시켜 펩타이드를 얻어낸 후 인산화시키지 않은 트립신 가수분해 대두 펩타이드와 소장조건에서의 칼슘과의 결합능을 시험관내에서 조사하였고, 한편, 두 번째 방법으로 위 공정순서와 반대로 트립신 가수분해를 실시한 후 인산화후에 칼슘 결합능을 비교하였다.

그 결과 두 번째 방법인 가수 분해 후에 인산화를 실시하였을 때 인산화 후의 가수분해의 경우보다 인산화된 가수분해물이 그렇지 않은 대조군에 비해

Table 11. Concentration of phosphorus in total sample

Elements	P (ppm)	
	AVE ¹	SD ²
Y1	21.26	0.45
Y2	31.72	0.82
Y3	235.4	2.18
Y4	255.4	8.86
Y5	355.2	0.42
blank	0.042	0.10
peptide	235.6	1.82

¹Remark : Samples were analyzed three times and averaged. ("AVE")

²SD : Standard deviation

- Samples :
- ① Y1 (trypsin 0.1% 2hr)
 - ② Y2 (trypsin 0.1% 3hr),
 - ③ Y3 (Ca-pep.-Ⓟ at pH 3.5)
 - ④ Y4 (trypsin 0.01% 2hr)
 - ⑤ Y5 (trypsin 0.01% 3hr)
 - ⑥ Blank
 - ⑦ Sample-BLK: pure peptide (treated 0.1% trypsin).

· ICP-AES 측정

- Model : Jobin Yvon138 Ultrace
- Source : Argon plasma (600K)
- Spectral range : 160-800 nm
- Resolution : 0.005nm(UV) and 0.05(Visible)
- detection limit : numeral ppb- more ppb

· 한국기초과학연구소에서 측정

Table 12. Sample 별 인 함량

Samples	Concentration
Non-Ⓟ, Dialysis, Et-OH	47.44 mg%
Ⓟ, Dialysis, Et-OH	21.5 mg%
Non-Ⓟ, Et-OH	48.39 mg%
peptide	21.5 mg%

Samples : Group

- ① Non-Ⓟ, Dialysis, Et-OH
- ② Ⓟ, Dialysis, Et-OH
- ③ Non-Ⓟ, Et-OH
- ④ peptide

Table 13. Sample 별 단백질함량과 인 함량

sample	protein (mg/ml)	P(mg%)
Blank	1.28	-
A	2.25	83.72
B	2.22	466.67
C	2.22	450
D	2.13	127.06
E	1.06	2160
F	2.32	-
G	2.68	490.91

Samples : Group 2

Blank : 4% ISP solution,

A - before dialysis at phosphorylation,

B - after dialysis at phosphorylation,

C - supernatant of final product at phosphorylation

D - ppt. of final product at phosphorylation

E - final ppt. of crud supernatant at non-phosphorylation

F - supernatant of final product at non-phosphorylation

G - ppt. of final product at non-phosphorylation

Table 14. Sample 별 단백질함량과 칼슘 및 인 함량

sample	calcium conc. (mgCa)	P conc. (mg%)	protein conc. (mg/ml)	Yield (%)
A	0.6	291.89	19.05	93.28
B	1.2	101.89	18.72	93.16

A - 인산화 처리 후 3% CaCl₂를 가한 sample, Non-dialysis

B - 인산화 처리 후 3% CaCl₂를 가한 sample, dialysis

더 높은 칼슘 결합능을 나타냈다. 소장 내에서 칼슘과의 수용성 복합체를 이루는 것이 바로 이 phosphopeptide의 세린 잔기의 인산인 것이 밝혀짐으로써 카제인 포스포펩타이드(CPP)에 의한 용해성 칼슘의 증가는 인산기에 의한 것이 확실해졌다.

본 연구의 시험관 내에서의 화학적 인산화 단백질의 칼슘결합도가 높은 것이 입증됨으로써 무기칼슘의 체내 흡수도의 증진 가능성이 커졌다.

라. 대두 단백질의 인산화

1) 인산화제

대두 펩타이드를 화학적으로 인산화할 수 있는 인산화제로는 phosphorous oxychloride와 STMP가 널리 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 우선적으로 STMP를 중심으로 사용하였지만 앞서 기술했듯이 여러 인산염 중합체를 서로 비교하여 칼슘 결합능이 가장 우수한 인산화제를 검토하기 위해서 비교 실험하였다.

이 실험에서 sodium trimetaphosphate (STMP), Sodium metaphosphate (SMP), Sodium polyphosphate (SPP)와 sporix를 비교 실험하였다. 이 4가지의 인산화제는 여러 개의 인산기를 포함하는 것으로서 각각의 인산기의 구조 또는 그 수가 서로 다르게 합성되어 있다. 각각의 인산화제를 이용하여 칼슘 결합 반응을 한 후 결합한 칼슘의 양을 Table 15와 Fig. 13에 나타내었다.

이 결과에서 볼 수 있듯이 다른 인산화제에 비해 STMP가 칼슘결합능이 뛰어난 것으로 확인되었다. STMP를 사용해서 인산화 시켰을 경우 다른 인산화제에 비해 칼슘의 농도가 최고 13배가량 높게 나타났다. 인산화 반응 이후에 칼슘 결합을 위해 염화칼슘을 첨가했을 때 고분자 중합체의 경우 STMP에 비해 침전되는 양이 많고 이것은 인산칼슘염의 생성을 증가시키는 것으로 생각된다. 그러나 각 인산화제의 최적 조건을 찾는다면 좀 더 칼슘 결합능을 증가시킬 수 있을 것으로 보인다.

Table 15. 인산화제에 따른 칼슘 결합능의 비교

인산화제	결합한 칼슘의 농도 ($\mu\text{g/ml}$)
sodium trimetaphosphate (STMP)	67.3
sodium metaphosphate (SMP)	13.5
Sodium polyphosphate (SPP)	5.0
sporix	13.1

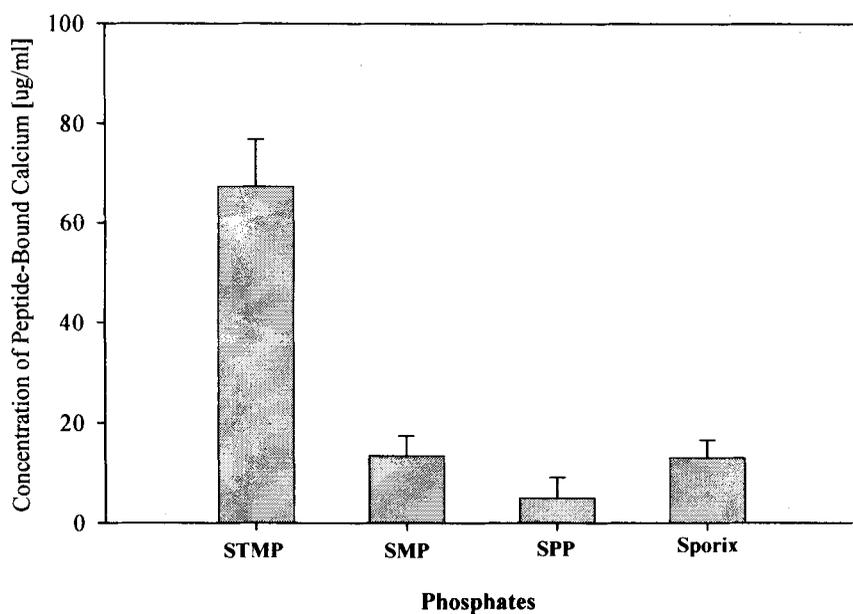


Figure 13. Calcium binding ability of phosphorylated ISP hydrolysates prepared by the reaction with a variety of phosphorylating agents. Phosphorylation of soybean peptide was performed with various phosphates under alkaline condition (pH11.5, 1%, 3 hr, 35 °C). 1% CaCl₂ was added. STMP: sodium metaphosphate, SMP: Sodium metaphosphate, SPP: Sodium polyphosphate.

2) 인산염의 공정 과정

무기 칼슘을 제조하기 위한 무기산은 염산으로 설정을 하여 회화한 우골분과 반응을 한 후 세부 조건 변화별 무기칼슘 제조 실험을 하고 분석을 하였다.

Sodium polymetaphosphate를 제조하기 위한 방법으로 1안과 2안으로 나누어 제조 실험을 하였다. 제1안과 2안은 원료의 선택에서 차이를 두고 있으며 보다 좋은 Sodium polymetaphosphate를 제조하기 위한 것이다.

가) 제1안

- 원료는 탄산나트륨(NaCO_3)과 인산(H_3PO_4)을 주원료로 하여 축합로에서 반응을 진행하였으며 반응식은 다음과 같다



- 원료는 탄산나트륨 64 kg과 인산 32 kg을 혼합하여 축합온도 $550\sim 620^\circ\text{C}$ 에서 3-4시간 동안 반응을 통하여 얻어진 film 형태의 결정성 물질을 분쇄를 통하여 분말화 하였다.
- 분말화 한 제품의 분석결과는 다음과 같다.

P_2O_5 : 53.4%

pH : 5.7

용해 시간 : 15 min

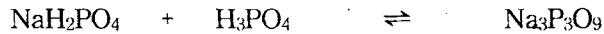
축합도 (중합도) : 5.24

- 결론 : 축합도를 본다면 만들고자 하는 STMP(Sodium Trimetaphosphate)의 순도는 상당히 떨어지는 것으로 보인다. 순수한 STMP의 축합도는 3정도가 가장 이상적인 값으로 제조한 제품의 축합도나 P_2O_5 의 값을 본다면 Tri, Pyro, Hexa 등이 함께 공

존하고 있는 것으로 판단된다

나) 제2안

- 원료를 탄산나트륨이 아닌 MSP (Sodium phosphate monobasic)를 이용한 방법으로 1안 보다는 반응 시간을 단축하여 제조 할 수 있다.



- 원료의 투입량은 1안과 동일한 양으로 혼합하여 축합온도를 500 ~ 550 °C에서 1~ 2 시간 동안 반응을 통하여 얻어진 film 형태의 결정성 물질을 분쇄를 통해 분말화 시켰다.

- 제품의 분석 결과

P_2O_5 : 50.86 %

pH : 6.4

용해 시간 : 11 min

축합도(중합도) : 5.1

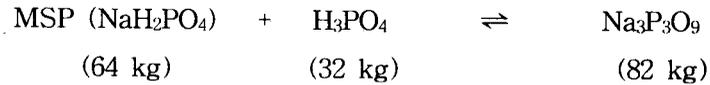
- 결론 : 분석 결과를 보면 탄산나트륨을 사용한 제품보다는 물리적인 측면에서는 STMP의 순도가 좋다고 볼 수가 있다.

- 적용: 1안과 2안을 실험한 결과 1안의 사용원료인 탄산나트륨은 인산과의 혼합시 많은 GAS 발생이 일어나 제조하는데 어려움이 있으며 STMP의 순도 및 수율이 낮아 탄산나트륨을 사용하는 것이 바람직하지 않은 것으로 판단되며 2안의 MSP를 사용하는 것은 1안 보다 축합 온도를 낮추어 조절하기가 쉬우며 반응 시간을 줄이

는 효과가 있고 수율 및 순도 면에서 좋은 제품의 STMP를 제조할 수 있다고 판단되어 앞으로의 실험은 2안으로 계속 진행을 하였다.

다) 실시 예 1

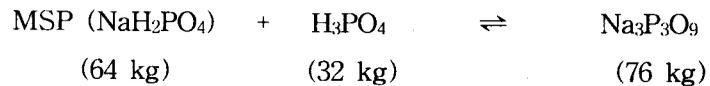
- 1 batch :



- 반응조건 : 온도, 500~550℃
반응시간 1~2시간
- 제조량: 총 3 batch 실험하여 230 kg 제조
- 분석결과 : 축합도, 3.5
P₂O₅함량, 48.55 %

라) 실시 예 2

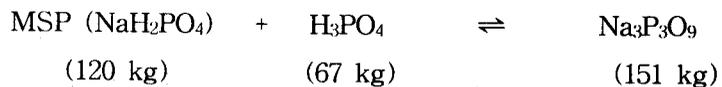
- 1 batch :



- 반응조건 : 온도, 500~550℃
반응시간, 1~2 시간
- 제조량 : 총 2 batch 반응하여 150 kg 제조
- 분석결과 : 축합도, 4.2
P₂O₅함량, 50.09 %

마) 실시 예 3

- 1 batch :



- 반응 조건 : 온도 :500~550℃
반응 시간, 1~2시간
- 제조량 : 총 2 batch의 실험을 통해 298 kg을 제조
(원료의 양을 늘려 제조 실험)
- 분석 결과 : 축합도, 4.86
P₂O₅함량, 50.36%

앞서 제조한 Sodium Trimetaphosphate는 Tri , Pyro , Hexa등과 같은 polyphosphates가 함께 섞여 있어 순도가 낮고 수율이 낮아 여러 번의 시험 공정을 거쳐 순수한 Sodium Tri phosphate의 제조가 필요하며 지금 까지 실험에서 사용한 탄산나트륨(NaCO₃)및 MSP(Sodium phosphate)이외의 원료를 검토하여 제품의 수율을 늘리고 순도를 증대 할 수 있는 원료를 찾아 실험을 진행하여 차후에 보완하였다.

3) 대두 펩타이드의 인산화

칼슘 결합에 있어 가장 중요한 요소 중의 하나인 인산화 반응을 위해서 대두 펩타이드 수용액을 pH 6.8, 8.5, 10.5, 11.5로 조정한 후 각각의 수용액에 0 ,0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1%의 STMP 첨가, 35℃에서 3시간 동안 반응시켰다. 특별히 STMP를 첨가하지 않고 pH 변화에 따라 인산화 반응을 진행시킨 실험을 병행하였다. ISP내에는 자체적으로 phytate라는 hexaphosphate를 포함하고 있는데 이 phytate는 대두 단백질의 인산화에 작용하는 것으로 알려져 있다 (31,32). 실제로 본 연구에서 대두 펩타이드의 인산화에 phytate가 각 pH별로 얼마만큼의 영향을 미치는지에 대해 실험하였다. 다음의 실험 결과는 phytate와 pH가 인산화 반응에 있어서 어느 정도의 역할을 하는지 보여준다. Fig. 14은 pH에 따라 펩타이드에 결합된 인의 농도가 증가하는 것을 보여준다. 그래프 A에 pH에 따른 펩타이드의 농도와 결합된 인산의 농도를 함께 표시하였다. pH가 증가함에 따라서 수용성 펩타이드의 농도는 감소한다. 이는 아미노산으로 구성된 펩타이드가 수소 이온농도에 따라서 침전되기 때문으로 생각된

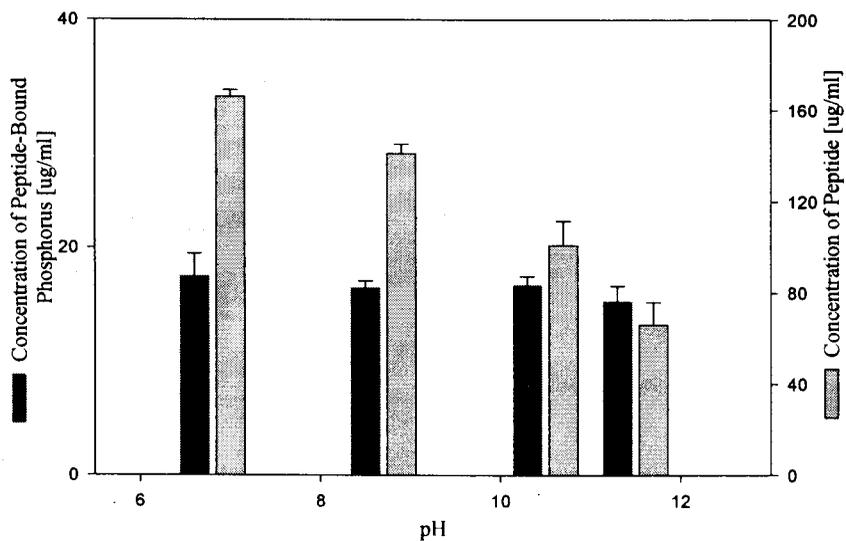


Figure 14-A. Effect of pH on phosphorylation level. Concentration of peptide and peptide bound phosphorus after phosphorylation at pH 6.8-11.5. Phosphorylation was increased continuously by increasing pH of reaction solution. The reaction mixture was continuously shaken at 35°C for 3 hrs before checking the amount of phosphorus.

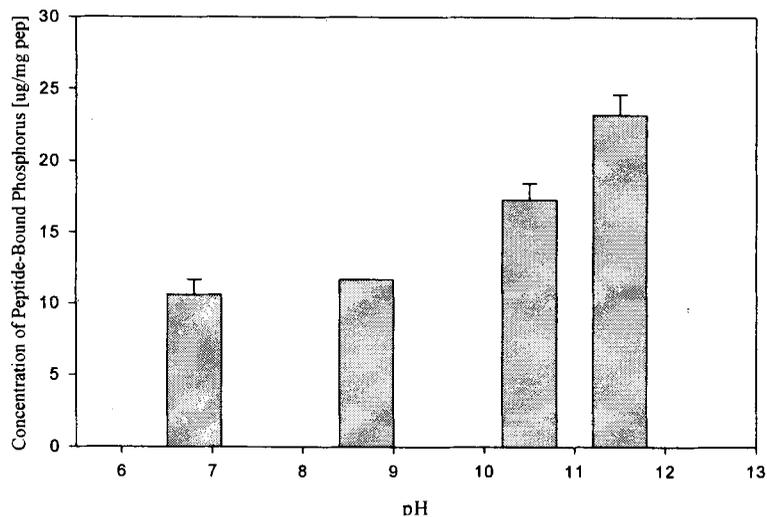


Figure 14-B. Effect of pH on phosphorylation level.

Concentration of peptide bound phosphorus per 1 mg peptide. Phosphorylation was increased continuously by increasing pH of reaction solution. The reaction mixture was continuously shaken at 35°C for 3 hrs before checking the amount of phosphorus.

다. 그래프 A에서 결합한 인의 농도는 pH에 따라 증가되는 양상을 보이지는 않지만 펩타이드의 농도가 감소하고 있기 때문에 상대적으로 단위 펩타이드 당 인의 농도는 증가하는 것으로 결과를 분석할 수 있다. 이와 같은 결과는 펩타이드 1 mg당 결합하는 인의 농도를 계산하여 그래프 B에 나타내었다. 그래프 B에서 볼 수 있듯이 펩타이드에 결합하는 인의 농도는 pH가 증가함에 따라 증가하는 양상을 보인다. 특히 pH 10.5와 11.5에서 최대의 증가량을 보인다. 높은 pH일수록, 즉 펩타이드 수용액이 염기성일수록 아미노산 작용기의 반응성이 커지므로 인산화의 가능성이 커지는 것은 당연한 결과라고 할 수 있다. pH 11.5에서 인산화 정도가 가장 높은 결과를 얻었지만 이것은 펩타이드 농도의 저하를 함께 초래하게 되므로 결국 수율 면에 있어서 불리하게 작용한다. 따라서 인산화 정도와 수득율을 적절히 만족시킬 수 있는 조건을 확립하는 것이 중요하다고 할 수 있다. 그러므로 이 실험에서 pH 11.5 가 아닌 pH 10.5를 인산화의 최적 조건으로 정하였다.

pH가 증가할수록 인산화의 정도도 증가한다는 것을 확인한 후 STMP의 적정 농도를 정하기 위해 각 농도 별로 인산화 정도를 측정하였다. 인산화 반응은 pH 6.8과 10.5의 두 가지 pH에서 진행시켰고 각각의 펩타이드 수용액에 STMP를 0%에서 1%까지 첨가하였다. 물론 STMP의 농도가 높을수록 인산화 정도가 증가하는 것으로 나타났다. Fig. 14의 데이터처럼 Fig. 15 또한 펩타이드의 농도별 결합된 인산의 농도를 정량한 그래프이다. 펩타이드의 농도는 pH 10.5일 때 pH 6.8 보다 감소하지만 pH 10.5일 때 인산화 정도는 훨씬 증가하는 것을 보여준다. B 그래프에서 펩타이드 1 mg당 펩타이드에 결합된 인의 농도를 나타내었다. pH 10.5일 때, STMP의 농도가 1%일 때 인산화가 가장 잘 되는 것으로 나타났다. 그러나 STMP의 농도의 경우, 첨가된 STMP의 농도에 비해서 결합된 인의 농도는 상대적으로 높지 않았다. 이러한 수득률과 경제적인 면을 고려했을 때 STMP의 최적 농도는 1%가 아닌 0.5%로 결정되었다. 따라서 앞으로의 실험에서 인산화 반응은 pH 10.5에서 0.5 % STMP의 조건으로 진행되었다.

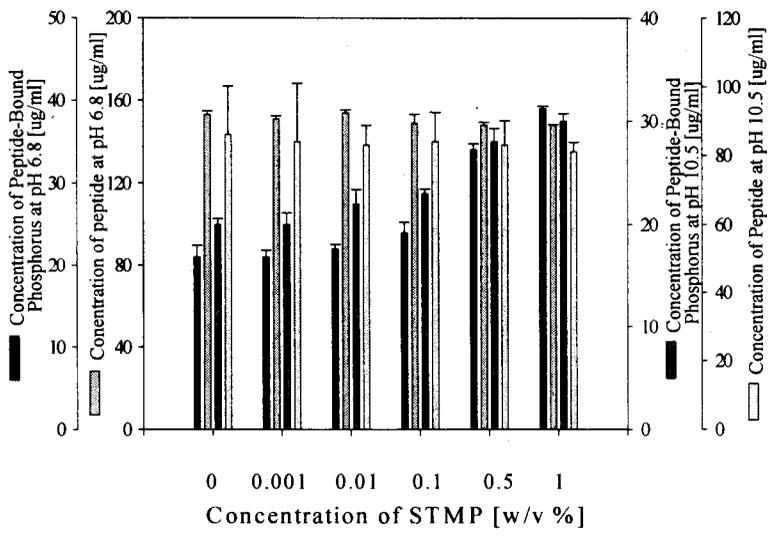


Figure 15 – A. Effect of pH and STMP concentration on phosphorylation level. Concentration of peptide and bound phosphorus after phosphorylation with the various concentration of STMP at pH 6.8 and 10.5. STMP was added to the soybean peptide solution as various concentrations at pH 6.8 and 10.5, 35°C for 3 hr with shaking.

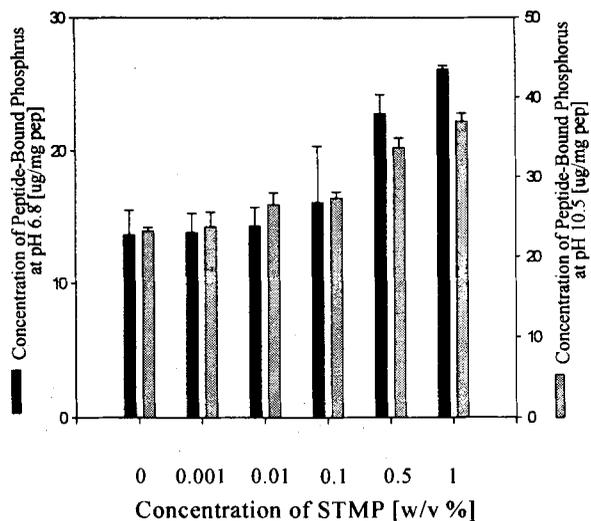


Figure 15 - B. Effect of pH and STMP concentration on phosphorylation level. Concentration of peptide bound phosphorus per 1 mg peptide at pH 6.8 and 10.5. STMP was added to the soybean peptide solution as various concentrations at pH 6.8 and 10.5, 35°C for 3 hr with shaking.

마. 칼슘 결합 반응의 조건 확립

1) 천연칼슘(Animal Bone Calcium phosphate)으로부터의 무기 칼슘의 제조 실험

우골분 및 어분으로부터 calcium을 얻기 위해서 질산, 인산, 염산, 황산 등으로 처리하여 칼슘을 추출하게 되는데 Ca-phosphate인 경우에는 공정은 비교적 쉬우나 불용성침전을 형성하기 때문에 free 칼슘을 확보하기 어려우므로 CaCl₂, CaSO₄ 형태로 추출한 경우 물에 대한 용해성이 좋아 추후의 공정에 적용하기에 용이하였다.

가) 수거된 우골을 가지고 세척을 한 후 분쇄하여 회화로 온도 800℃에서 1시간,2시간,3시간동안 회화를 시킨 우골분과 회화로 온도 1000℃에서 1시간,2시간,3시간 동안 회화한 우골의 유기물과 단백질, 불소(Fluoride)를 제거한 후 질산, 인산, 염산, 황산 등의 무기산으로 처리하여 무기 칼슘을 제조 하는 방법을 택하였다.

나) 우골을 800℃에서 회화를 한 우골분은 불소의 함유량이 높고 칼슘 및 인의 함량이 낮아 무기칼슘을 제조 하는데 있어 불소를 제거하여야 하는 공정을 다시 거쳐야 하는 번거로움이 있는 반면 1000℃에서 회화한 우골분은 그에 비해 양호한 제품을 얻을 수 있었다.

다) 우골분의 1000℃ 회화후의 분석결과이다.

(1) 회화전의 우골

칼슘(%)	인(%)	불소(ppm)	pH	구용률(%)	Ca/P 비율	수율(%)
27.38	10.76	2400	9.74	80	2.54:1	

(2) 1시간 회화

칼슘(%)	인(%)	불소(ppm)	pH	구용률(%)	Ca/P 비율	수율(%)
42.00	16.37	1655	11.97	50.05	2.57:1	61

(3) 2시간 회화

칼슘(%)	인(%)	불소(ppm)	pH	구용률(%)	Ca/P 비율	수율(%)
42.15	15.35	1046	11.60	49.14	2.75:1	53.6

(4) 3시간 회화

칼슘(%)	인(%)	불소(ppm)	pH	구용률(%)	Ca/P 비율	수율(%)
45.26	18.28	349	11.35	46.56	2.48:1	47.0

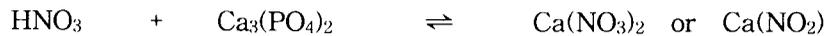
(5) 800°C 3시간 회화

칼슘(%)	인(%)	불소(ppm)	pH	구용률(%)	Ca/P 비율	수율(%)
40.15	14.31	1769	11.04	58.26	2.81:1	50.7

라) 무기산과의 반응에 의한 무기칼슘 제조 실험

(1) 질산 : HNO₃

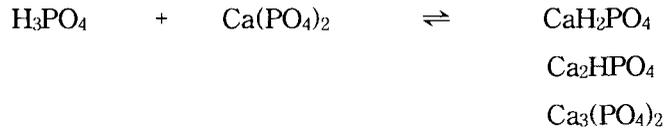
- 반응식



- 반응물인 Ca(NO₃)₂는 강력한 산화력을 가지며 유기화합물과 접촉을 하면 화재를 일으킬 수 있으며 열을 가하면 폭발 할 수도 있고 물에 대한 용해도 상당히 낮아 본 연구 과제에 적용하기에는 어려움이 있었다.

(2) 인산 : H₃PO₄

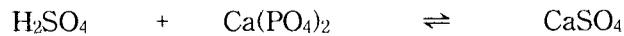
- 반응식



- 반응물인 인산염이 용액에 혼탁하게 분산되어 있는 것을 여과 하여 건조하고 분쇄를 하여 제품으로 하여 분석한 결과물에 대한 용해도가 떨어져 free 칼슘 이온을 얻기에는 부적합 한 것으로 판단되었다.

(3) 황산 : H_2SO_4

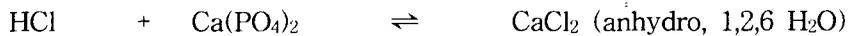
- 반응식



- 반응물인 CaSO_4 (일명 석고)는 약간의 양이 물에 용해가 되지만 많은 양이 분산되어 있어 free 칼슘을 얻고자 할 때는 부적합 한 것으로 판단되었다.

(4) 염산 : HCl

- 반응식



- 반응물인 CaCl_2 는 물에 대한 용해도가 상당히 높고 모든 형태의 반응물이 물에 대한 용해도가 높고 비교적 안전한 화합물로 free 칼슘을 얻는데 상당히 효과가 있을 것으로 본다.

마) 실험 결과

무기 칼슘을 제조하기 위한 무기산은 염산으로 설정을 하여 회화한 우골분과 반응을 한 후 세부 조건 변화별 무기칼슘 제조 실험을 하고 분석을 하였다.

(1) 무기칼슘 제조

- 염산 2몰과 우골분 1몰을 반응.
- 많은 열이 발생하여 냉각을 하면서 온도를 30℃이하로 조절을 하면서 서서히 반응.
- 원료의 투입 완료 후 반응시간 30 분간 유지 후 반응 종결.
- 농축 과정을 걸쳐(물로 세척) 상온 건조 후 분쇄
- 분석 결과

Ca 함량 : 34.35%

용해도 : 66.46%

pH : 8.16

(2) 무기 칼슘 제조시 spray 건조 효과

- 염산 2몰과 우골분 1몰을 반응.
- 많은 열이 발생하여 냉각을 하면서 온도를 30℃이하로 조절을 하면서 pH를 7.0~7.5로 조정하면서 서서히 반응.
- 원료의 투입 완료 후 반응시간 30 분간 유지 후 반응 종결.
- 농축 과정을 걸쳐 물로 세척을 한 후 Spray 건조기로 건조
- 분석 결과: Ca함량에는 영향이 없으나 용해도와 색상이 다소 향상 하였다.

Ca 함량 : 35.41%

용해도 : 71.32%

pH : 8.73

(3) 무기칼슘 제조 및 pH 조절 효과

- 염산 2몰과 우골분 1몰을 반응.
- 많은 열이 발생하여 냉각을 하면서 온도를 30℃이하로 조절을 하면서 pH를 8.0~8.5로 조정하면서 서서히 반응.
- 원료의 투입 완료 후 반응시간 60 분간 유지 후 반응 종결.
- 농축 과정을 걸쳐 여과하면서 물로 세척을 한 후 Spray 건조기로 건조
- 분석 결과: 용해도와 최종 pH에 약간 변화가 있을 뿐 Ca함량에는 영향이 없었음.

Ca 함량 : 35.88 %

용해도 : 72.09%

pH : 9.34

(4) Scale up 효과

- 염산 2몰과 우골분 1몰의 반응에서 함량을 2배로 증가.
- 많은 열이 발생하여 냉각을 하면서 온도를 30℃이하로 조절을 하면서 pH를 7.0~7.5로 조정하면서 서서히 반응.
- 원료의 투입 완료 후 반응시간 60 분간 유지 후 반응 종결.
- 농축 과정을 걸쳐 여과하면서 물로 세척을 한 후 Spray 건조기로 건조
- 분석 결과: Ca함량에는 영향이 없으나 용해도가 크게 향상되었음.

Ca 함량 : 35.12%

용해도 : 77.41%

pH : 8.66

2) 인산화 반응 상등액 속의 잔여 인산염 및 그 분해 유도체들의 침전방지 방

법 확립

중전에는 인산화 반응의 잔여물들은 투석을 통해서 제거시켰으나 투석은 대량 생산의 시점에서 공정 과정에 있어서 어렵고 적당하지 않은 방법이므로 칼슘 결합을 시도하기 전에 미리 칼슘을 넣어주어서 펩타이드와 칼슘의 결합을 방해하는 phosphate와 phytate를 제거하였다. Pre-precipitation을 이용한 calcium-phosphate, calcium-phytate 침전의 제거는 효과적으로 이루어지며 침전물을 제거한 다음, 상등액에 CaCl_2 를 첨가하여 칼슘과 펩타이드의 결합을 유도한다.

침전물 제거 후의 칼슘-펩타이드를 높은 수율로 얻기 위해 다음 연구가 수행되었다.

3) CaCl_2 를 이용한 칼슘 결합 반응

칼슘 결합에 있어서도 최적 조건을 정하기 위한 실험을 수행하였다.

가) P-ISP 가수 분해물과 ISP 가수분해물의 칼슘 결합능 비교

인산화시킨 ISP 펩타이드와 인산화시키지 않은 ISP 펩타이드의 칼슘 결합능을 비교 측정 하였다.

ISP를 인산화시킨 것과 인산화시키지 않은 것을 비교하여 칼슘 정량을 실시하였다. Fig. 16에서 보면 첨가된 염화칼슘의 증가에 따라 결합 칼슘의 양도 증가하는 동시에 인산화 가수 분해물의 칼슘 결합능이 비인산화 가수 분해물에 비해 1.5 배가량 증가한 것을 볼 수 있다. STMP를 이용하여 인산화하지 않은 펩타이드도 칼슘 결합능을 보이는 것으로 나타났는데 이것은 ISP에 자연적으로 들어있는 phytate에 의해 인산화되었거나 펩타이드의 특정 아미노산에 결합한 것으로 보여 진다. 칼슘은 특정 아미노산인 히스티딘(histidine)에 직접 결합한다고도 알려져 있다(33). ISP 펩타이드의 아미노산 중 히스티딘에 직접 결합한 칼슘이 전체적인 칼슘 결합도의 증가에 영향을 미친 것으로 볼 수 있다. 결과적으로 칼슘 결합능의 증가를 위해서는 펩타이드의 인산화가 필수적 요소라 할 수 있다.

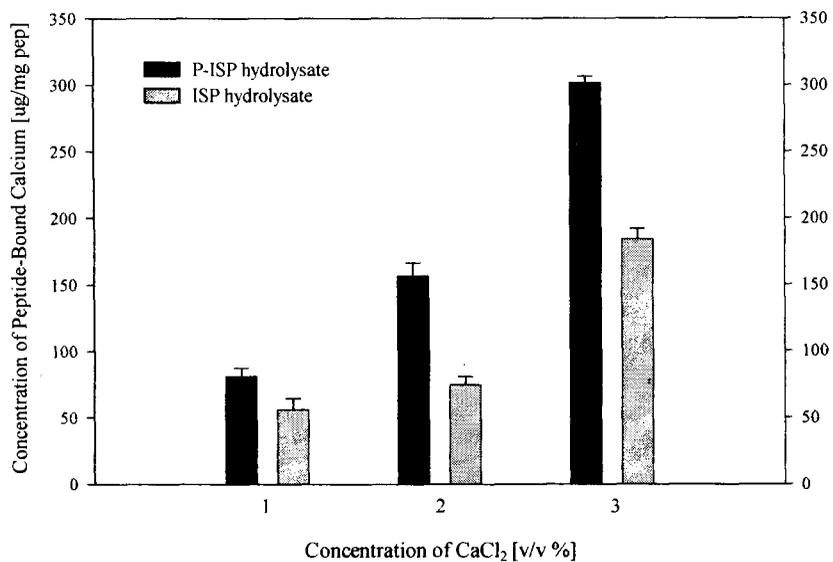


Figure 16. Effect of phosphorylation on calcium binding.

Concentration of peptide bound calcium per 1 mg peptide. Compared with nonphosphorylated ISP hydrolysates, calcium binding ability of phosphorylated ISP hydrolysates was increased with increasing the extent of phosphorylation. ISP hydrolysates was phosphorylated with 1% of STMP at pH 11.5.

나) 인산화 정도에 따른 칼슘 결합능의 비교

앞서서 pH와 STMP의 농도에 따른 인산화 정도를 측정하였었다. 이에 이어서 이번에는 인산화의 정도에 따른 칼슘의 결합 정도를 측정하기 위하여 pH와 STMP 농도에 따른 칼슘 결합능의 차이를 비교 실험하였다. 조건은 앞의 인산화 반응 실험과 같다.

Fig.17에서 볼 수 있듯이 pH 10.5에서 인산화 시켰을 경우 칼슘 결합능이 증가한다. 이는 인산화가 잘 될수록 칼슘의 펩타이드에 대한 결합도 증가한다는 것으로 생각할 수 있다. pH와 마찬가지로 STMP의 농도도 같은 결과를 얻을 수 있었다. Figure A에서 보면, 앞서 기술한 대로 첨가된 STMP의 농도가 높을수록 인산화의 정도가 증가하며 따라서 칼슘의 결합능도 증가한다는 것이다. B의 그래프는 1 mg 펩타이드당 결합하는 칼슘의 양을 나타낸 것이다. 일정량의 펩타이드 중 증가하는 칼슘의 양은 pH와 STMP의 농도에 비례한다. 이 실험에서도 앞의 인산화 실험에서와 마찬가지로 칼슘 펩타이드의 수율을 고려했을 때 pH와 STMP의 농도에 있어서 최적 조건을 pH 10.5와 0.5% STMP로 결정할 수 있었다.

다) pH에 따른 칼슘 결합능의 비교

인산화 펩타이드와 칼슘의 결합에 있어서 pH의 영향을 알아보았다. 염화칼슘을 최종 농도가 3% 되도록 첨가 한 후 TCA 침전을 통하여 펩타이드만을 분리 한 후 칼슘 정량을 실시하였다. pH에 따른 칼슘의 결합능은 Fig. 18의 그래프에 제시하였다. pH가 증가함에 따라 칼슘의 결합도 증가한다. 이는 염기성에서 펩타이드에 결합한 인산기의 탈수소화가 일어나기 때문인 것으로 생각되는데 인산기 anion의 형성으로 칼슘과 tight하게 결합하게 되는 것이다. 따라서 칼슘 결합 반응의 과정에서 pH는 상당히 중요한 요인으로 작용한다고 볼 수 있다. 그러나 역시 pH의 증가에 따라 펩타이드의 농도는 감소하기 때문에(A) 적당한 pH로 조절하는 것이 바람직하다고 본다. 따라서 pH 9와 10 사이에서 칼슘 결합 반응을 진행하는 것이 수율을 증가시키기 위한 최적 조건이라 할 수 있겠다. 앞에서도 SDS PAGE를 통해서 보여주었지만 인산화가 되면

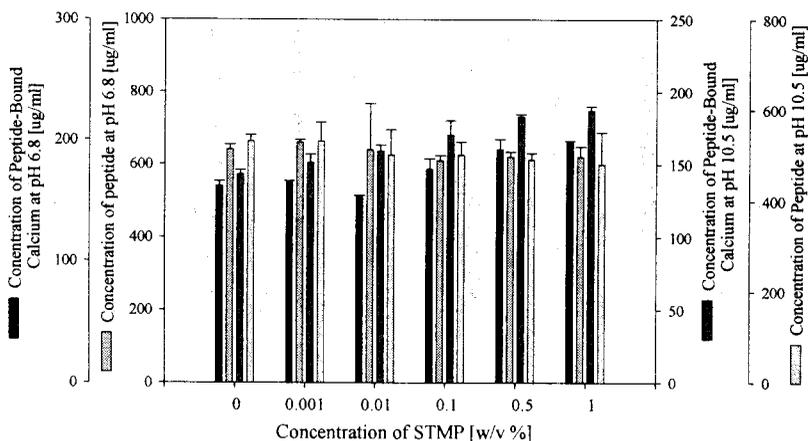


Figure 17 – A. Calcium binding ability depending on level of phosphorylation. Concentration of peptide and bound calcium after phosphorylation with various concentration of STMP at pH 6.8 and 10.5. Calcium binding ability was increased with increasing the extent of phosphorylation. After phosphorylation, 3% CaCl₂ was added.

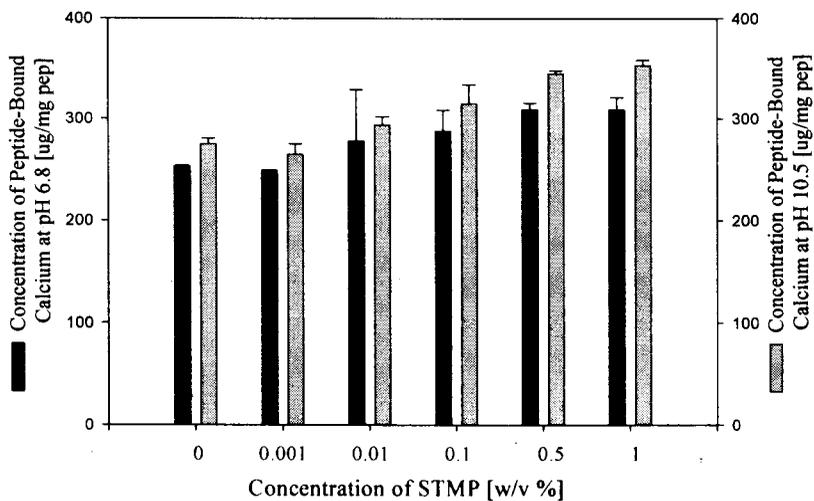


Figure 17 – B. Calcium binding ability depending on level of phosphorylation. Concentration of peptide bound calcium per 1 mg peptide at pH 6.8 and 10.5. Calcium binding ability was increased with increasing the extent of phosphorylation. After phosphorylation, 3% CaCl₂ was added.

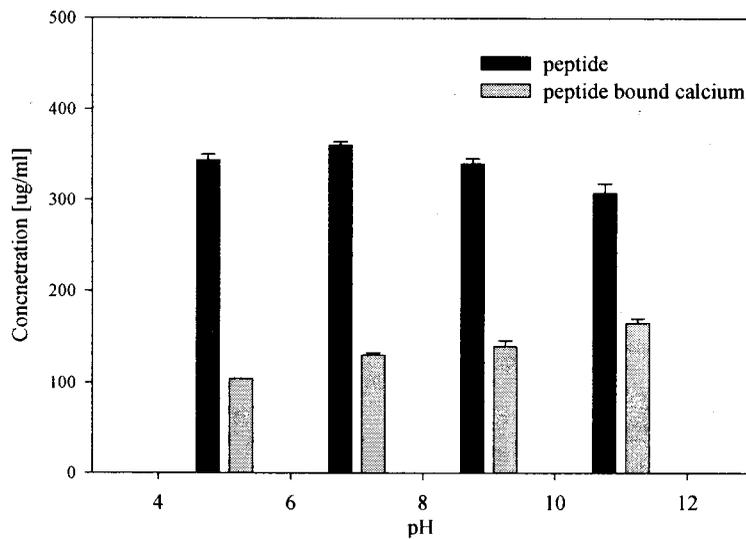


Figure 18 – A. Effect of pH on Calcium binding. Concentration of peptide and amount of bound calcium in various pH. 3%CaCl₂ was added to phosphorylated soybean peptide mixture at pH 5-11. Unbound form of phosphates was removed by pre-precipitation using 1% CaCl₂.

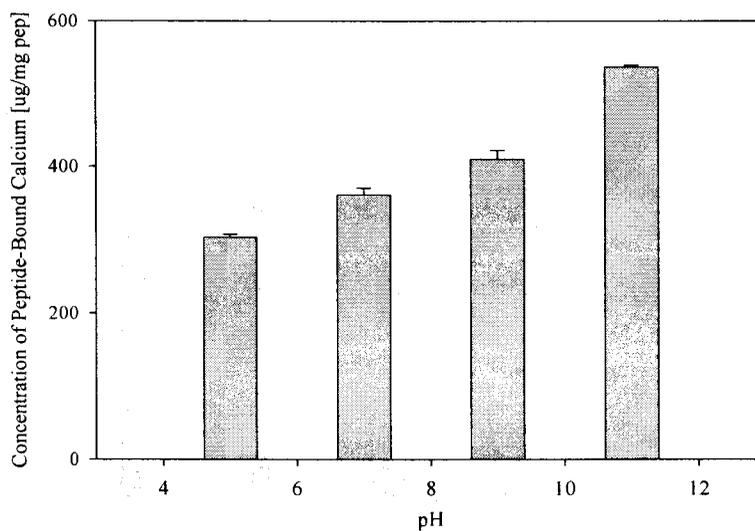


Figure 18 – B. Effect of pH on Calcium binding. Concentration of peptide bound phosphorus per 1 mg peptide at pH 5-11. Calcium binding was increased with increasing pH. 3% CaCl₂ was added to phosphorylated soybean peptide mixture at pH 5-11. Unbound form of phosphates was removed by pre-precipitation using 1% CaCl₂.

pH는 약간 감소한다. 앞서 인산화의 최적 조건을 pH 10.5로 결정했는데 인산화 후 pH가 약간 감소하여 pH 9-10 정도가 된다. 이는 칼슘 결합 반응을 진행시킴에 있어 다른 pH의 조절을 필요로 하지 않기 때문에 대량 생산해야 하는 공정에서 더 유리할 것으로 생각된다.

라) 염화칼슘 농도에 따른 칼슘의 결합능 측정

염화칼슘을 칼슘의 원료로써 사용할 때 그 적정 농도를 결정하는 것도 칼슘 펩타이드의 제조에 있어 중요한 요소로 작용한다. Fig. 19은 첨가된 염화칼슘 농도에 따른 칼슘 결합능을 측정한 것이다. 염화칼슘의 농도가 3%정도 되었을 때 인산화 펩타이드 용액은 칼슘으로 인한 포화상태에 이른다. 3% 이상에서는 칼슘 결합이 더 이상 증가하지 않을 뿐 아니라 불용성 침전을 형성하므로 칼슘 결합에 있어 적절하지 못하다. 따라서 염화칼슘은 pre-precipitation에서 1%를 사용하고 calcium phosphate의 침전 제거 후에 3% 염화칼슘을 첨가하여 반응시킴으로 칼슘 결합능을 증가시킬 수 있다.

마. IMAC (Immobilized metal affinity chromatography)를 이용한 proglycinin 유래의 phosphopeptide의 분리

1) Phosphopeptide의 분리

정제된 proglycinin을 trypsin을 이용하여 가수분해 후 인산화를 시킨 후 IMAC을 이용하여 phosphopeptide를 분리하였다. 본 실험에서는 HiTrap chelating (1ml) column의 iminodiacetic acid에 칼슘을 결합시킨 후 흡착용매를 이용하여 칼슘과 친화력이 없는 unbound 분획을 분리한 후 용출용매의 phosphate에 의해서 칼슘과 결합되어 있는 phosphopeptide 분획을 분리하였다. 시료는 인산화만 시킨 proglycinin 용액과 가수분해와 인산화를 모두 실시한 것을 사용하였는데 인산화만 시킨 시료는 IMAC에서 unbound 분획만 분리되고 bound 분획은 분리할 수 없었고 그 결과는 Fig. 20에 잘 나타나있다. 인산화로 인해 대두 단백질은 내부의 공유결합에 의하여 aggregation이 일어난다

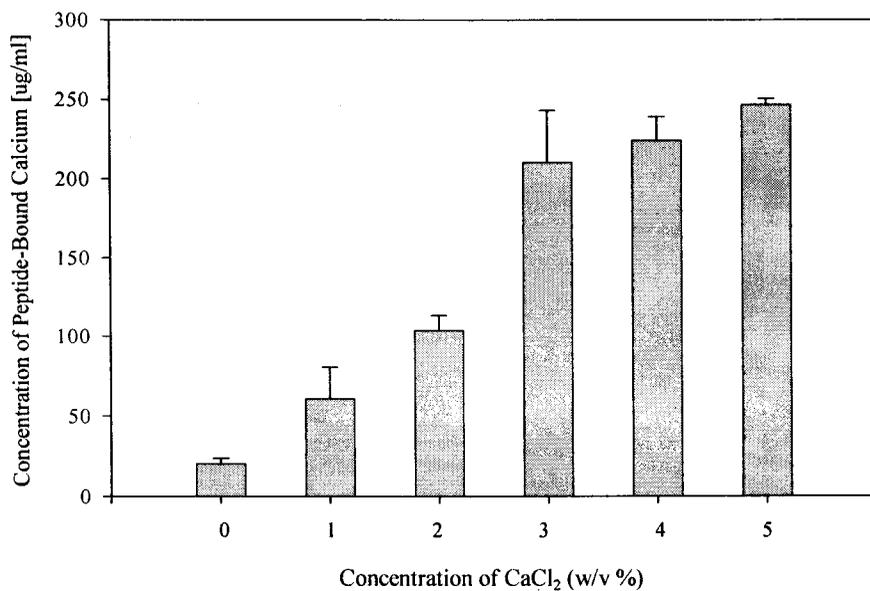


Figure 19. Calcium binding ability depending on various concentration of CaCl₂. CaCl₂ solution was added to phosphorylated soybean peptide solution as final concentration of 1-5%. With increasing CaCl₂ concentration, the amount of phosphopeptide bound calcium was increased.

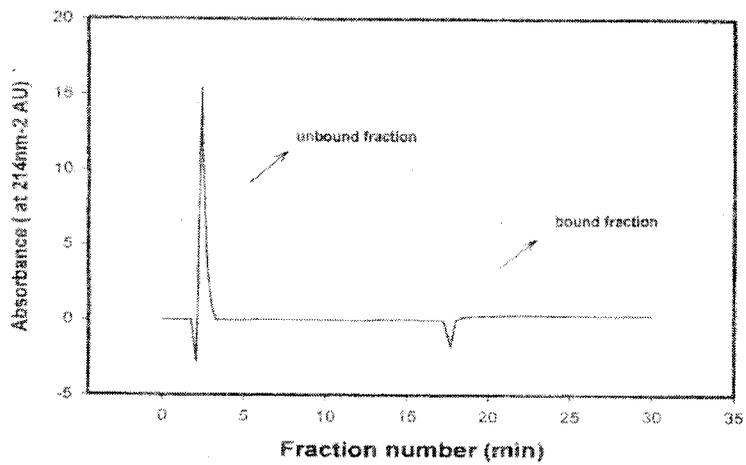


Figure 20. Fractionation of phosphorylated proglycinin on a HiTrap Chelating by FPLC system

고 보고 되었다(25). 따라서 bound 분획을 분리할 수 없었던 이유는 가수분해가 되지 않은 단백질에서는 인산화에 의해 charge의 변화는 생겼지만 단백질 자체의 구조로 인해 외부로 드러나지 않기 때문이라 생각된다. 그리고 가수분해 정도에 따른 분리의 형태는 큰 차이는 아니지만 가수분해도가 낮은 1 : 1000 (E : S)에서 unbound 분획에 대한 bound 분획의 비율이 약간 높았고 그 결과는 Fig. 21과 같다. 이것은 가수분해 정도에 따른 칼슘 결합능의 측정 결과와 거의 일치한다고 할 수 있다.

2) Proglycinin phosphopeptide의 칼슘 결합능 측정

1 : 1000 (E : S) unbound 분획과 bound 분획에 대해서 칼슘 결합능을 측정하였다. IMAC에서 사용하는 용출용매인 phosphate는 bound 분획에 포함되어 칼슘과 불용성 침전물을 형성하여 결합능 측정에 영향을 미침으로 분자량 1,000 Da의 투석막을 사용하여 투석한 후에 실시하였고, peptide의 농도가 낮아 10% TCA의 농도에도 침전이 거의 생기지 않으므로 칼슘과의 결합능이 낮은 단백질인 conalbumin을 사용하여 같이 침전시킨 후 실험을 실시하였다. 그 결과 Fig. 22에 나타났듯이 bound 분획이 unbound 분획에 비해 첨가한 칼슘에 대해 약 40% 이상 높은 결합능을 보였다. 따라서 IMAC의 결과 bound 분획에서 칼슘과의 결합능이 높은 phosphopeptide임을 확인할 수 있었다. Scanff 등(30)은 IMAC을 이용하여 phosphopeptide를 분리하였는데 bound분획을 역상 크로마토그래피 후 아미노산 조성을 확인한 결과 대부분의 peptide가 칼슘과의 결합능을 가지는 phosphopeptide임이 확인되었다.

3) Mono Q 음이온 교환 크로마토그래피를 이용한 phosphopeptide의 분리 및 칼슘 결합능 측정

전 단계의 bound 분획을 평형화 buffer로 투석한 후 Mono Q 음이온 교환 크로마토그래피를 실시한 후(Fig. 23) 각 분획을 5개의 분획으로 나누어 칼슘 결합능을 측정하였다. 그 결과 2번 분획이 가장 높은 결합능을 보이고, 그 외에 Fraction 1, 4, 3 순으로 결합능이 높음을 확인하였고 5번 분획은 결합능이 거

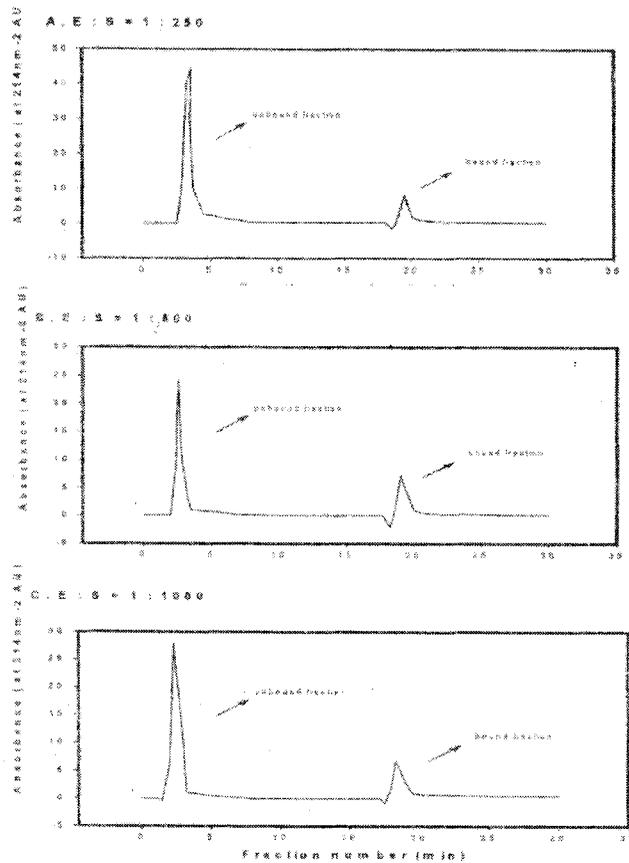


Figure 21. Fractionation of phosphorylated proglycinin hydrolysates on a HiTrap Chelating by FPLC system

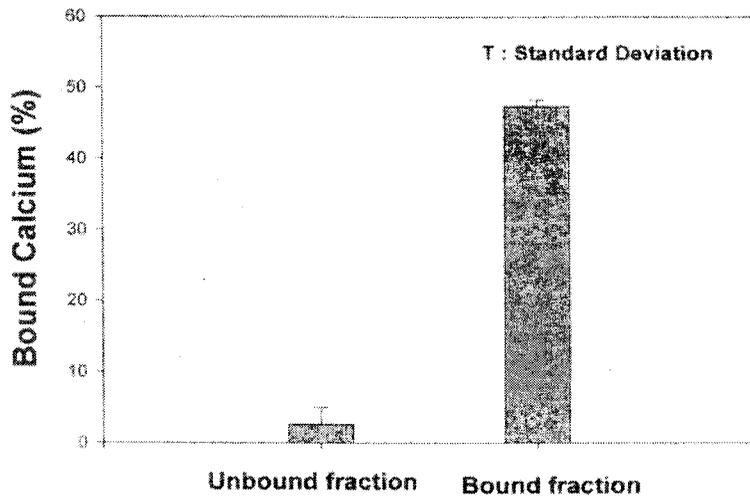


Figure 22. Calcium binding activity of IMAC fraction (E:S=1:1000). After TCA precipitation, the Ca of the supernatant was measured. The amount of added CaCl₂ is 5 ug. (Bound calcium (%) = $\frac{\text{Added Ca} - \text{Ca of supernatant}}{\text{Added Ca}}$)

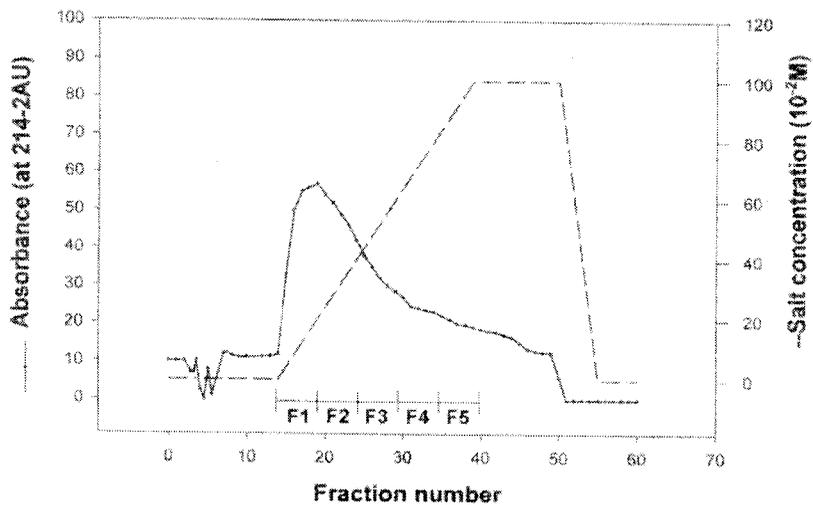


Figure 23. Ion exchange chromatography of bound fraction on IMAC chromatography (F1;15-19min, F2:20-24min, F3:25-29min, F4:30-34min, F5:35-39min)

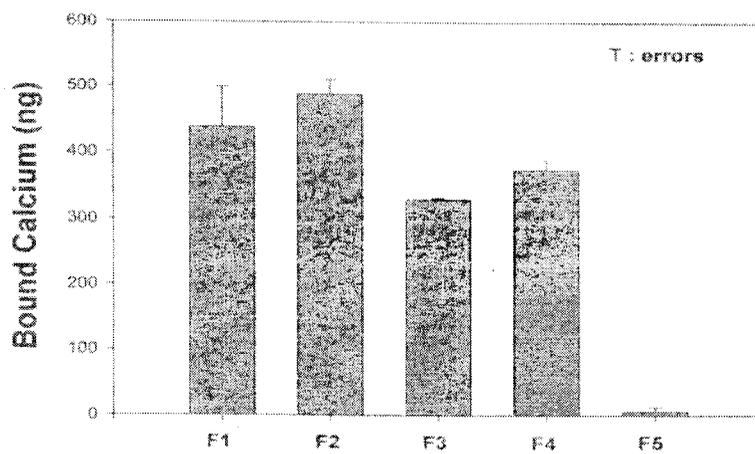


Figure 24. Calcium binding activity of Mono Q fraction. After TCA precipitation, the Ca of the supernatant was measured. The amount of added CaCl_2 is 2.5 ug. (Bound calcium (ng) = Added Ca - Ca of supernatant)

의 없음을 확인하였다(Fig. 24).

사. 우수칼슘결합성 펩타이드의 합성

본 과제를 더 효율적으로 수행하기 위해서 칼슘 결합 펩타이드의 유전자 클로닝 대신 칼슘 결합성 펩타이드를 합성하였다. 칼슘 결합성 펩타이드는 세린잔기를 6개 포함하는 13개 아미노산으로 구성되어있는 펩타이드로 기초과학연구원에서 합성하였다. 13개의 아미노산은 Ser-Asn-Asn-Gly-The-Ser-Lys-Ser-Gln-Tyr-Ser-Ser-Ser 로 구성되어있다. 합성한 칼슘결합성 펩타이드의 칼슘 결합능은 calcium binding assay를 통하여 확인하였다. Table 16과 Fig. 25는 펩타이드의 농도가 증가함에 따라 칼슘 결합능도 증가하고 있음을 보여준다. 따라서 이 펩타이드의 세린잔기가 칼슘 결합에 있어 중요한 요소임을 알 수 있다.

이와 같이 칼슘 결합성 펩타이드의 합성을 통해 칼슘 결합성 펩타이드의 대량 생산이 가능하다고 할 수 있겠다.

Table16. 합성 펩타이드의 칼슘결합도 측정

concentration of peptide [ppm]	concentration of peptide-bound calcium [ppm]
0	0
20	3
50	5
100	11
150	13
200	22

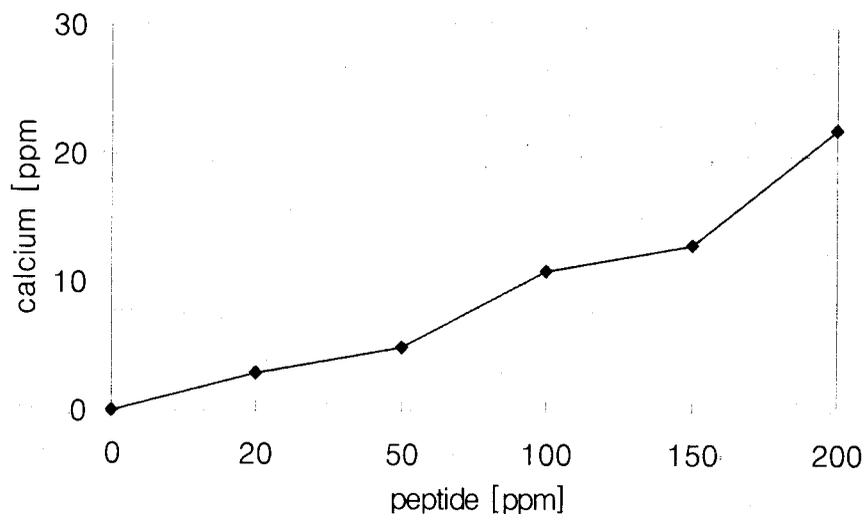


Figure25. 합성 펩타이드의 칼슘결합도

2 절 인산화 펩타이드의 인산칼슘 침전 저해

1. 실험적 접근 방법 및 연구 내용

인체 내에서 칼슘이 흡수되지 않는 이유는 소장 내에 있는 인산과 결합하여 불용성 침전을 만들기 때문이다. 또한 칼슘과 인산화 펩타이드에 대한 결합에 있어서 가장 문제시 되었던 점은 인산화 반응 후에도 용액 내에 잔재하는 인산이 첨가된 염화칼슘과 반응하여 침전을 일으키는 것이었다(34,35).

본 과제에서 우리가 목표로 삼은 것 중의 하나가 인산과 칼슘의 불용성 침전을 방지하기 위한 수용성 펩타이드를 이용한 칼슘의 결합이었다. ISP peptide를 이용하여 수용성 펩타이드를 원료로 수용성 칼슘 펩타이드의 제작을 위한 최적 조건을 결정하였고 인산화 펩타이드가 칼슘 결합을 증가시킨다는 결과를 실험을 통하여 얻어낼 수 있었다.

이와 같은 결과는 곧 인산염의 존재 하에서도 칼슘 결합 펩타이드가 침전되지 않고 수용성을 유지한다는 것을 말한다. 이것은 ISP peptide가 인산칼슘의 침전을 저해한다는 간접적인 증거가 될 수 있지만 이것에 대한 더욱 확실한 결론을 얻기 위하여 펩타이드의 size, 아미노산 조성이 다른 여러 종류의 펩타이드를 사용하여서 실험하였다.

실험에서 사용된 여러 종류의 기질은 O-phosphoserine, Ser-Ser-Ser와 13 amino acids (Ser-Asn-Asn-Gly-Thr-Ser-Lys-Ser-Gln-Tyr-Ser-Ser-Ser), ISP peptide 이다. 13 amino acids는 한국기초과학연구원에서 합성하였다. 이 실험에서 인산화 세린을 제외한 다른 펩타이드는 STMP를 이용하여 화학적으로 인산화한 후 prep HPLC를 이용하여 인산화 펩타이드만을 분리하였다. 분리된 인산화 펩타이드는 다음의 과정을 통하여 *in vitro* calcium binding assay를 실시하였다.

각각의 아미노산과 펩타이드를 인산화와 비인산화 펩타이드(혹은 아미노산)으로 구분하여 20 ppm에서 200 ppm의 농도의 수용액 상태로 준비한 후 3 mM의 염화칼슘을 이용하여 1시간동안 35°C에서 칼슘 결합반응을 시킨다. 반응 후

칼슘과 칼슘 펩타이드, 펩타이드의 혼합 용액에 phosphate buffer (pH 8.0)을 첨가하여 4℃에서 1시간 동안 방치한 후 14,000g에서 30분간 원심분리하고 상등액만을 취하여 수용액 내 펩타이드 결합 칼슘의 농도를 측정한다.

2. 연구결과

가. 인산화 펩타이드의 인산칼슘 침전 저해 - P-Ser, P-SerSerSer vs. Ser, SerSerSer

먼저 P-Ser과 P-SerSerSer을 Ser과 SerSerSer와 비교하여 실험하였다. P-Ser과 P-SerSerSer의 칼슘 결합능이 Ser과 SerSerSer에 비해 월등하게 증가하는 것을 볼 수 있다(Table 17-20 and Fig. 26-30). 앞에서 강조하였던 칼슘 결합에 있어 인산화가 중요하다는 것과 일치하는 결과이다. 인산화 펩타이드와 결합한 칼슘은 수용성의 상태를 유지하기 때문에 인산의 존재 하에서도 침전하지 않는다. Ser과 SerSerSer의 칼슘 결합능이 현저히 낮은 것은 역시 칼슘 결합에 있어서 인산화가 필수불가결한 요소라는 사실을 보여주는 결과라 할 수 있다.

나. 인산화 펩타이드의 인산칼슘 침전 저해 - P-13 amino acids vs 13 amino acids

13 amino acids는 Ser-Asn-Asn-Gly-Thr-Ser-Lys-Ser-Gln-Tyr -Ser-Ser-Ser로 구성되어 있다. 이 펩타이드는 세린잔기를 6개 포함하는 13개의 아미노산으로 구성되어 있다. 이 펩타이드는 인산화가 가능한 세린 이외에 트레오닌(Threonine)을 포함하기는 하지만 이 아미노산은 인산화반응이 잘 일어나지는 않는다. STMP는 트레오닌의 secondary hydroxyl group보다는 세린의 primary hydroxyl group에 우선하는 것으로 알려져 있다(24).

이 실험에서도 역시 인산화 펩타이드가 비인산화 펩타이드에 비해 칼슘 결합능이 상당히 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 펩타이드의 농도가 증가할수록 그에 비례해서 칼슘 결합의 기회가 커지므로 칼슘 결합능도 증가하는 것을 볼

Table 17. The inhibition of calcium phosphate precipitation (Ser)

Concentration of Serine	Concentration of bound calcium (Serine-Ca)
0	0
20	0.8
50	0.9
100	0.7
200	0.8

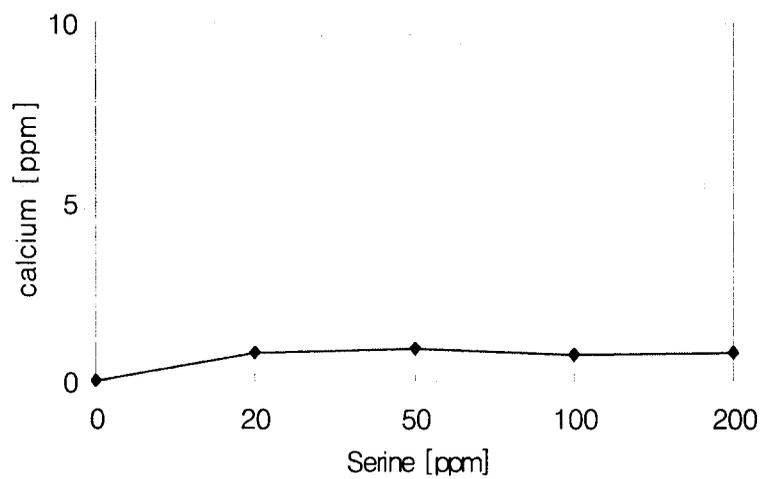


Figure.26 The inhibition of calcium phosphate precipitation (Ser)

Table 18. The inhibition of calcium phosphate precipitation (P-Ser)

Concentration of P-Serine	Concentration of bound calcium (P-Serine-Ca)
0	0
20	6
50	9
100	22
200	47

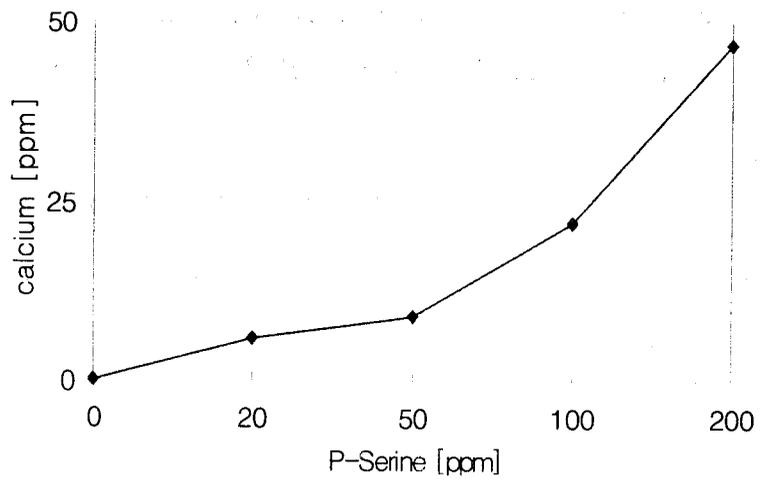


Figure27. The inhibition of calcium phosphate precipitation (P-Ser)

Table 19. The inhibition of calcium phosphate precipitation (SSS)

Concentration of SSS	Concentration of bound calcium (SSS-Ca)
0	0
20	0.8
50	0.9
100	0.7
200	0.8

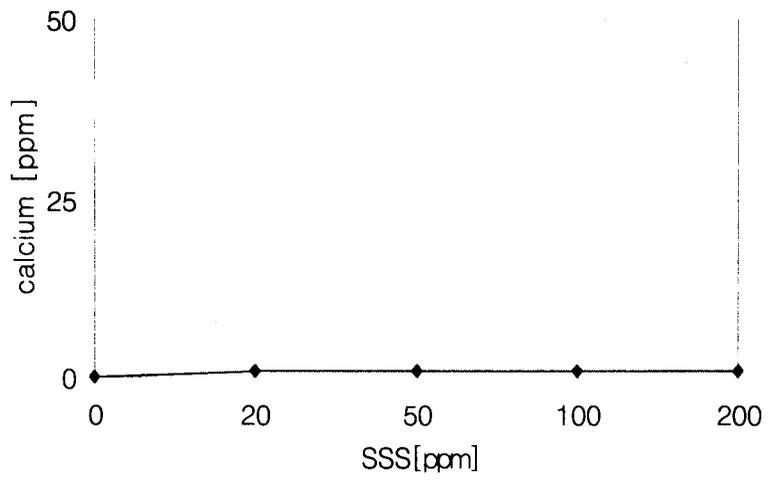


Figure28. The inhibition of calcium phosphate precipitation (SSS)

Table 20. The inhibition of calcium phosphate precipitation (P-SSS)

Concentration of P-SSS	Concentration of bound calcium (P-SSS-Ca)
0	0
20	6
50	16
100	28
200	47

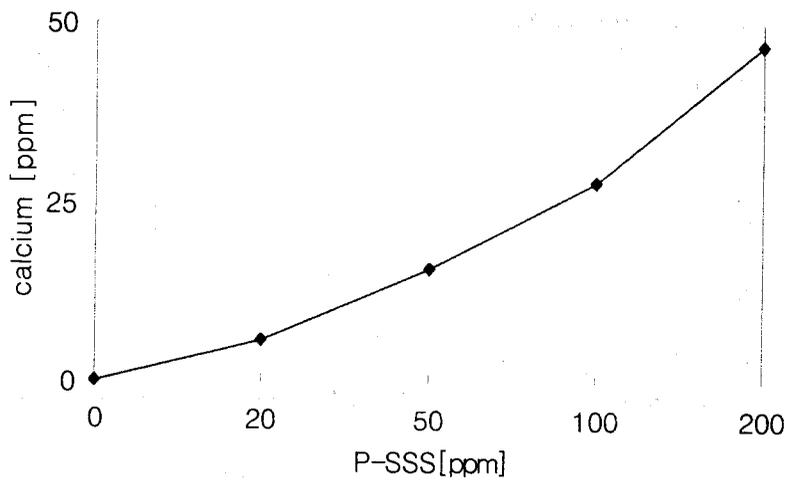


Figure 29. The inhibition of calcium phosphate precipitation (P-SSS)

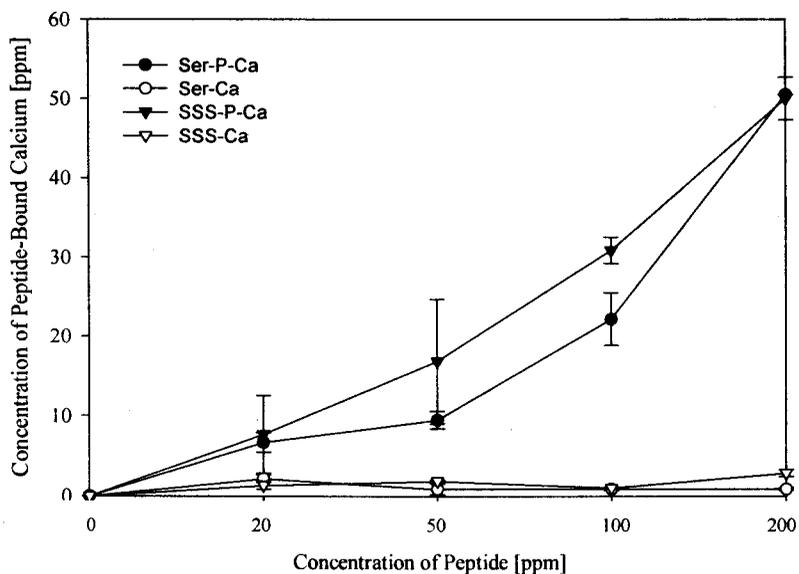


Figure 30. Effect of phosphorylation on the inhibition of calcium phosphate precipitation in *in vitro* calcium binding assay. Calcium binding ability of various amounts of Ser, phospho-ser, Ser-Ser-Ser and phospho-Ser-Ser-Ser up to 200ug/ml were determined. Compared with non-phosphopeptide, calcium-binding ability of phosphopeptide shows increase in 10 folds. Calcium binding ability was performed after treatment with 3 mM of CaCl_2 followed by addition of 10 mM of phosphate buffer (Na_2HPO_4 , pH 8.0).

수 있다(Table 21, 22 and Fig. 31-33).

13 amino acids의 실험결과에서 앞의 Ser이나 SerSerSer의 경우와 다른 것은 앞의 Ser이나 SerSerSer에서는 인산화되지 않았기 때문에 결합한 칼슘의 농도가 3 ppm이하로 매우 낮았지만 13 amino acid의 경우에는, 물론 오차 범위를 고려해야하긴 하지만 6 ppm 정도까지 증가하는 것을 볼 수 있다. 이러한 결과는 이 펩타이드내의 어떤 특정 아미노산에 칼슘이 직접적으로 결합할 수 있기 때문인 것으로 생각할 수 있다.

다. 인산화 펩타이드의 인산칼슘 침전 저해 - P-ISP hydrolysates vs. ISP hydrolysates

ISP hydrolysates는 ISP 유래의 트립신에 의해 가수분해 된 펩타이드이다. 따라서 이 펩타이드의 정확한 크기나 아미노산의 조성은 알 수 없다. 앞의 실험과 마찬가지로 ISP hydrolysates 역시 인산화와 비인산화로 나누어 실험 하였다(Table 23, 24 and Fig. 34-36). 마찬가지로 인산화 펩타이드의 경우 펩타이드 결합 칼슘의 농도가 증가하는 양상을 보인다. 즉 인산의 존재 하에서도 침전되지 않고 용해된 상태로 유지된다고 설명할 수 있다. ISP의 경우도 결합 칼슘의 농도가 약간 증가하는 것을 볼 수 있는데 이 역시 앞에서 설명했듯이 칼슘이 결합할 수 있는 특정 아미노산을 포함하고 있기 때문인 것으로 설명할 수 있다.

이와 같은 결과로 칼슘 결합에 있어서 인산화의 중요성과 인산화반응이 성립될 수 있는 특정 아미노산인 세린의 존재의 중요성을 다시 한번 확인 할 수 있었다.

Table21. The inhibition of calcium phosphate precipitation (13 amino acids)

Concentration of 13 a.a	Concentration of bound calcium (13 a.a-Ca)
0	0
20	0.9
50	2
100	3.1
150	4
200	5.7

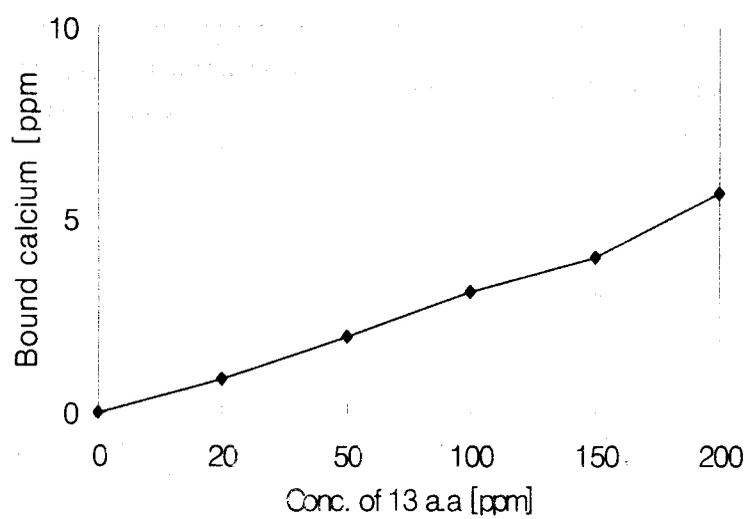


Figure31. The inhibition of calcium phosphate precipitation (13 amino acids)

Table 22. The inhibition of calcium phosphate precipitation (P-13 amino acids)

concentration of peptide [ppm]	concentration of peptide-bound calcium [ppm]
0	0
20	3
50	5
100	11
150	13
200	22

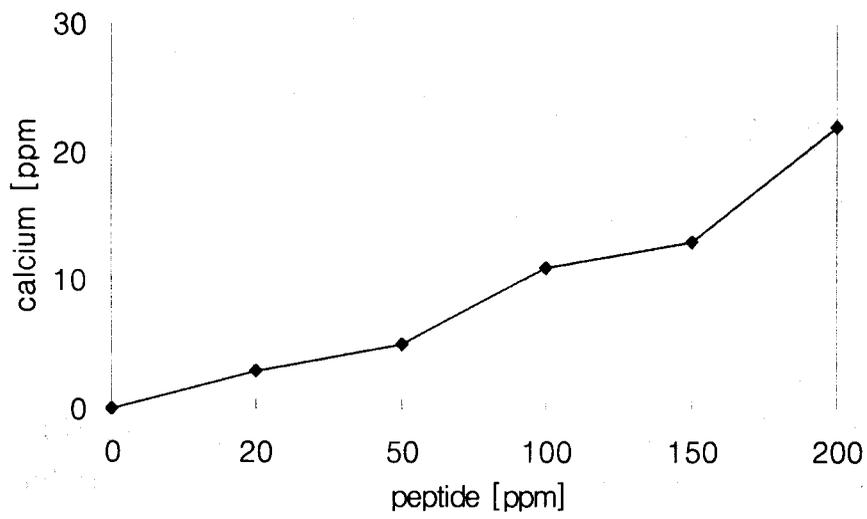


Figure32. The inhibition of calcium phosphate precipitation (P-13a.a)

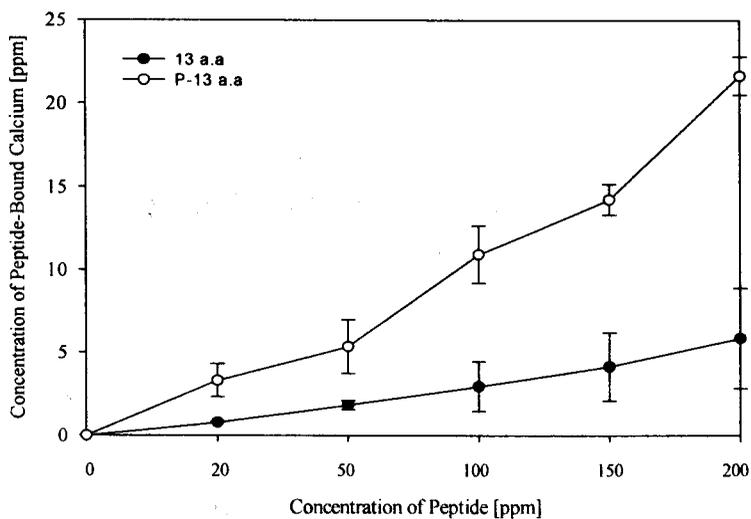


Figure 33. Inhibition of calcium phosphate precipitation by a moderate size of phosphopeptide in *in vitro* calcium binding assay. Calcium binding ability of moderate size of phosphopeptide (containing SNNGTSKSQYSSS) is superior to that of non-phosphopeptide. Calcium binding ability was performed after treatment with 3 mM of CaCl_2 followed by addition of 10 mM of phosphate buffer (Na_2HPO_4 , pH 8.0).

Table 23. The inhibition of calcium phosphate precipitation (ISPhydrolysate)

concentration of peptide [ppm]	concentration of peptide-bound calcium [ppm]
0	0
20	2
50	2.2
100	3.6
150	5
200	7.8

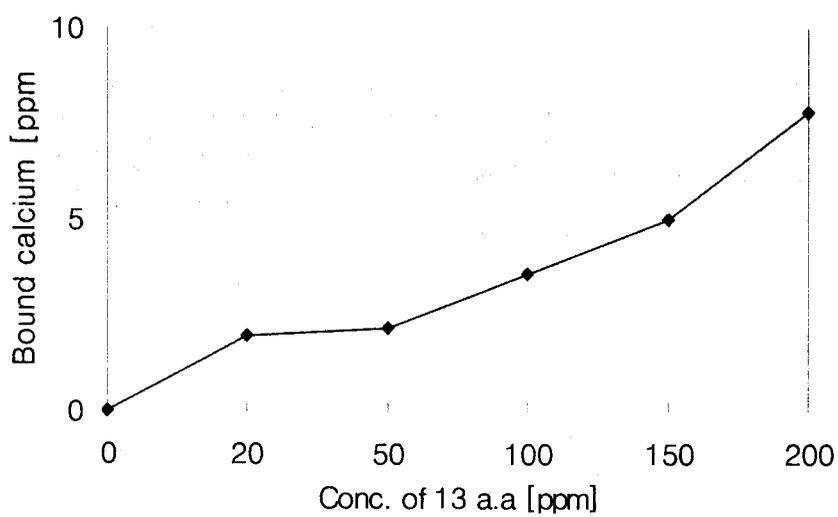


Figure34. The inhibition of calcium phosphate precipitation (ISPhydrolysate)

Table 24. The inhibition of calcium phosphate precipitation (P-ISP hydrolysate)

concentration of peptide [ppm]	concentration of peptide-bound calcium [ppm]
0	0
20	6
50	9
100	16
150	21
200	26

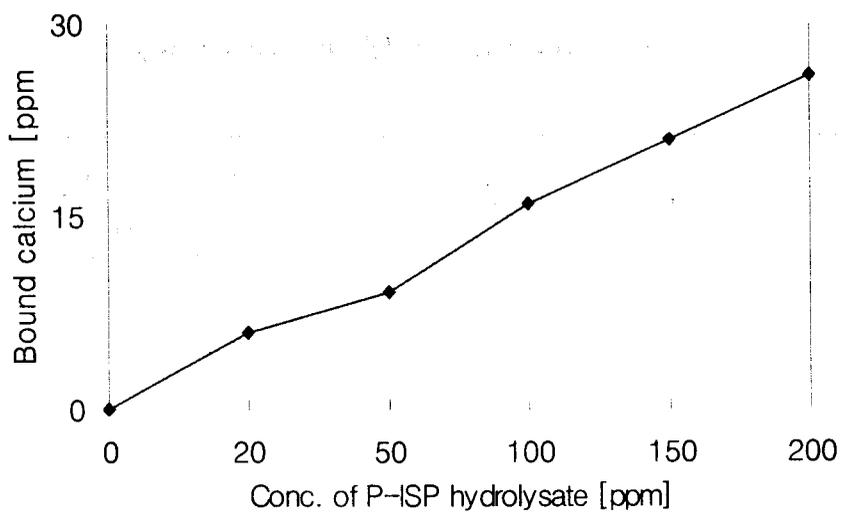


Figure35. The inhibition of calcium phosphate precipitation (P-ISP hydrolysate)

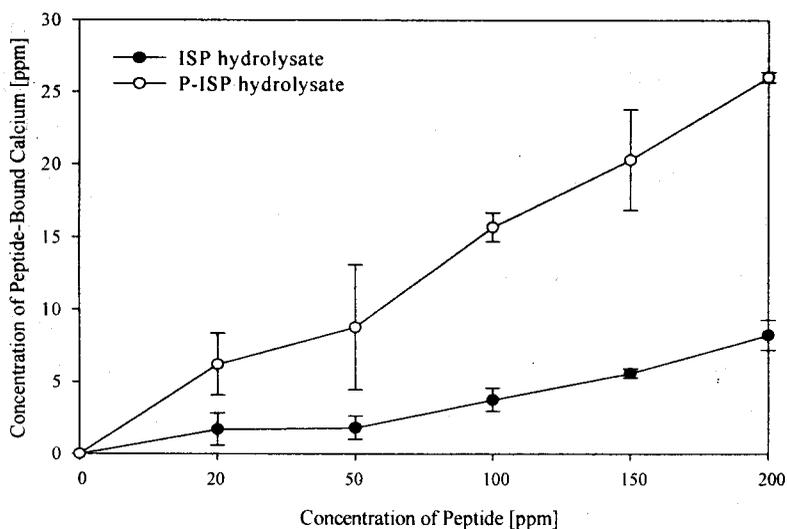


Figure 36. Inhibition of calcium phosphate precipitation by phosphopeptides with multiple sizes in *in vitro* Calcium binding assay. Calcium binding of phospho-ISP hydrolysates was better than that of ISP hydrolysates itself and the result is similar to that of CPP.

3 절 동물 및 조직 배양에 의한 칼슘 펩타이드의 흡수도

1. 실험적 접근 방법 및 연구 내용

본 과제에서 분리 대두 단백을 이용해 칼슘 결합 펩타이드를 생산하였고 칼슘 펩타이드가 얼마만큼 조직 내로 흡수되는지에 관한 연구를 진행하였다. 흡수도를 측정함에 있어서 동물 실험 내지는 보다 정밀한 흡수도 측정을 위하여 가능하다면 조직 배양법의 개발을 통한 칼슘흡수도를 측정하도록 노력하였다. 특히 본과제의 특성이 수용성 칼슘에 대한 연구이기 때문에 기존 사용된 동물 섭취에 의한 골격조성에 대한 간접 실험보다는 직접적으로 세포내로 유입되는 칼슘을 monitoring하는 동물 세포에 의한 실험의 개발을 모색하였다. 동물 실험에 비해 동물 세포를 이용한 실험은 칼슘원에 따른 정확한 흡수 경로를 통해 구분할 수 있다. 생체내의 여러 조절 기작을 고려할 때 동물 실험으로는 정확히 소장 세포내로 칼슘이 유입되었는지를 알기는 쉽지 않으나 동물 세포를 통한 실험은 칼슘의 흡수 정도를 정확히 알 수 있는 이점이 있다.

칼슘 펩타이드의 흡수는 소장의 상피세포를 통해 제일 먼저 이루어지는데 본 과제에서는 소장 세포인 Caco-2라는 세포주를 이용하여 흡수되는 양을 새로운 방법으로 측정하였다. Caco-2는 human colon adenocarcinoma cell로써 칼슘 수송체(Calcium transporter)와 펩타이드 수송체(peptide transporter)를 동시에 포함하는 세포주이다(36-38). Caco-2 cell이 펩타이드 수송체를 포함하고 있기는 하지만 over expression을 위해 펩타이드 수송체의 cDNA를 cell 내로 transfection시켰다.

본 실험에서 칼슘의 흡수도 실험을 위해 칼모듈린(Calmodulin)을 사용하였다. 칼모듈린은 칼슘과 결합하는 전형적인 칼슘 의존적 단백질이다(39). 칼슘에 의존적으로 발현되기 때문에 칼모듈린의 발현정도를 측정하면 유입된 칼슘의 양을 간접적으로 알 수 있다. 칼모듈린 프로모터(Calmodulin promoter) linked luciferase gene을 포함한 vector를 Caco-2 cell에서 발현시키는데 칼슘이 cell 내로 uptake되면 cell내에서 유입된 칼슘의 정도에 따라 calmodulin-luciferase가 발현이 될 것으로 가정하고 실험하였다.

자세한 실험 과정은 다음에 기술하였다.

가. 조직배양

Cell growth media, glutamine, penicillin streptomycin and serum은 Sigma (Co. USA)로부터 구입하였고 Caco-2 cells, human colon adenocarcinoma cell 은 American type culture collection (ATCC)로부터 구입하였다. Caco-2 cells는 3.7 g/L sodium bicarbonate, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 2 mM glutamine, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양되었다.

Cells는 37°C, 5% CO₂의 humidified atmosphere조건에서 배양되었고 adherent cells의 trypsinization은 cells의 healthy status를 유지하기 위해 일주일에 한번 실시하였다. 모든 실험은 passages 5-20에서 진행되었다. 조직배양을 위한 labware는 Falcon Labware (Beckton Dickinson Co. USA) 와 NUNC (nalgene Nunc international Co. Denmark)를 사용하였다.

나. Plasmids

Human peptide transporter plasmid hPEPT1 은 Bryan Mackenzie(40)로부터 제공 받았으며 Plasmid CM1-Luc, calmodulin promoter fragment in a promoterless luciferase expression vector는 Sonja L. Toutenhoofd(41)로부터 제공받았다.

다. Transient transfection

Caco-2 cell에 실험을 위한 hPEPT1과 CM1-Luc을 transfection시켜서 흡수도를 측정하고자 하였다.

Caco-2 cells는 Plasmids for expression of human peptide transporter and

calmodulin linked to luciferase gene으로 lipofectamine (Gibco BRL U.S.A)을 사용하여 transfection되었다. The cells는 transfection하기 24 시간 전에 4 ml of DMEM medium이 있는 60 mm culture plate에 seeding하였다. Caco-2 cells는 2 μ g of plasmid씩 cotransfection하였고 incubation을 한 후에 4 ml of DMEM (w/ FBS)를 각각의 plate에 첨가하여 주었다. Cells는 37°C CO₂ incubator에 incubation하였다.

라. Stable transfection

Long-term cell line의 establishment를 위해 transfection이 calcium phosphate method를 통해 시행되었다. Calcium phosphate method의 실험 과정은 다음과 같다. Caco-2 cells는 transfection 하루 전에 60-80%의 confluent로 100mm plate에 seeding되었다. Transfection하기 한 시간 전에, transfection solution을 준비하였다. DNA mixtures는 10 μ g of hPEPT1 expression plasmid, 10 μ g of CA1-luc expression plasmid와 neomycin phosphotransferase gene을 포함하는 0.5 μ g of pCI-neo mammalian expression vector (Promega)와 60 μ l의 2.5 M CaCl₂를 mix한 후에 상온에서 20분간 incubation한다. 그런 다음 mixed solution에 1 ml의 HEPES buffered saline (HBS; 21 mM HEPES [N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid] [pH 6.95], 150 mM NaCl, 0.7 mM Na₂HPO₄)을 첨가한다. Neomycin phosphotransferase는 transfected cell을 항생제인 G418로 selection을 위해 사용된다. 각각의 DNA-CaCl₂ solution은 Caco-2 cell이 있는 7 ml의 growth medium에 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 12시간가량 incubation한다. Incubation 후 medium을 제거한 다음 cells는 PBS로 washing하고 serum을 포함한 fresh medium을 넣어준다. Transfection후에 neomycin resistant colonies는 다음과 같은 과정에 의해 selection된다. Transfected cells는 2일 정도 fresh medium에서 incubation 된 후 500 μ g/ml geneticin (G418) (Gibco BRL U.S.A)을 포함한 medium으로 교체한다. Selection medium에서 2 주 가량 배양 한 후 colonies는 sterile cloning cylinder에 trypsinization으로 collection하고 24-well plates로 transfer한다.

마. Cell treatment

Transfected cells는 DMEM containing 10% FBS로 dilution된 calcium chelating agent인 1.5mM EDTA로 treatment된 후 2시간 동안 incubation하였다. Calcium absorption study에서 incubated cells는 24 시간동안 여러 농도의 calcium peptide (P-Ser-Ser-Ser-Ca and P-Ser-Ca)를 처리하였다. Control cells는 calcium peptide 대신 phosphopeptide를 사용하여 실험하였다.

바. Luciferase assay

60 mm culture dish의 cell을 cold PBS buffer로 washing한 후 attached cell을 scrap하여 micro centrifuge tube로 transfer하여 원심 분리하여 cell만을 수거하였다. Minimal volume의 cell culture lysis reagent (25 mM Tris pH 7.8 with H₃PO₄, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 10% glycerol, 1% triton X-100)로 cell을 30분간 4℃에서 lysis한 후 extracts를 원심분리를 통하여 얻어냈다. 원심분리 후 supernatant는 액화질소에서 freezing하여 70℃에 보관하였다. Cell extract proteins의 농도는 Bradford assay method로 정량하였다. Cell extracts의 동량의 단백질을 5배 volume의 luciferase assay reagent (Promega)와 mix하였다. Luciferase activity는 luciferIn과 결합하는 luciferase의 양을 scintillation counter로 측정하여 결정하였다.

2. 연구 결과

칼슘 흡수도의 측정은 luciferase assay를 통하여 시행하였고 실험에 사용된 칼슘 펩타이드는 Ca-P-SerSerSer과 Ca-P-Ser이었다.

가. EDTA의 농도 결정

칼슘 흡수도를 측정하는데 있어 문제가 되었던 점은 cell growth medium내에 칼슘이 존재하고 있는 것이었다. Growth medium으로 사용한 DMEM은 염화칼슘을 0.265 g/L의 농도로 포함하고 있는데 이 칼슘이 cell 내로 uptake되면 칼슘 펩타이드의 uptake를 정확히 측정할 수 없다. 따라서 medium내의 칼슘을 제거해야했는데 칼슘을 chelating 할 수 있는 EDTA를 사용하여 제거하는 방법을 선택하였다. EDTA는 여러 농도로 첨가하여 예비 실험을 하였는데 먼저 0 mM에서 0.6 mM을 사용해서 실험하였다. medium 내의 칼슘이 얼마만큼 제거 되었는지 확인하기 위하여 luciferase assay를 실시하였다. 다음의 Table 25와 Fig. 37에서 볼 수 있듯이 EDTA의 농도가 높아질수록 luciferase activity가 감소하는 것으로 보아 EDTA가 medium 내에서 chelating 작용을 잘 하는 것으로 확인되었다.

0 mM에서 0.6 mM까지 사용했지만 0.6 mM에서도 luciferase activity가 높게 나타났으므로 EDTA의 농도를 높여 다시 실험하였다(Table 26, Fig. 38). 0 mM에서 2 mM까지 0.5의 간격으로 실험하였는데 그 결과 2 mM을 사용한 경우 cell이 죽는 현상이 나타났다. 따라서 2 mM 이하 즉 1.5 mM의 EDTA를 chelating의 목적으로 사용하게 되었다.

나. Ca-P-SerSerSer의 흡수도 측정

이 실험에서 사용된 hPEPT1은 소장세포인 Caco-2 cells에서 발현되는 peptide transporter로써 di/tri peptide만을 선택적으로 uptake한다(42-44). 이에 근거하여 tri peptide인 Ca-P-SerSerSer를 칼슘원으로 먼저 사용하였다. 그러나 실험 결과 Ca-P-SerSerSer는 uptake가 잘 일어나지 않는 것으로 나타났다. SerSerSer가 tri peptide이기는 하지만 Ca-P가 결합하여 tri peptide보다 그 size가 훨씬 더 크게 되므로 size specific한 peptide transporter를 통과하지 못하는 것 같다. 다음의 Table 27과 Fig. 39에 나타내었다. 이 실험에서 peptide transporter인 hPEPT1의 효과를 설명하기 위해 hPEPT1대신 backbone plasmid인 pBluscript를 transfection하였다.

Table 25. EDTA 농도(0 mM-0.6 mM)에 따른 칼슘의 Chelating
EDTA를 각 농도별로 처리 한 후 Caco-2 cells의 luciferase 발현을 luciferase assay로 측정하였다.

EDTA의 농도(mM)	Luciferase activity(RLU)
0	89.2
0.2	81.3
0.4	75.5
0.6	69.5

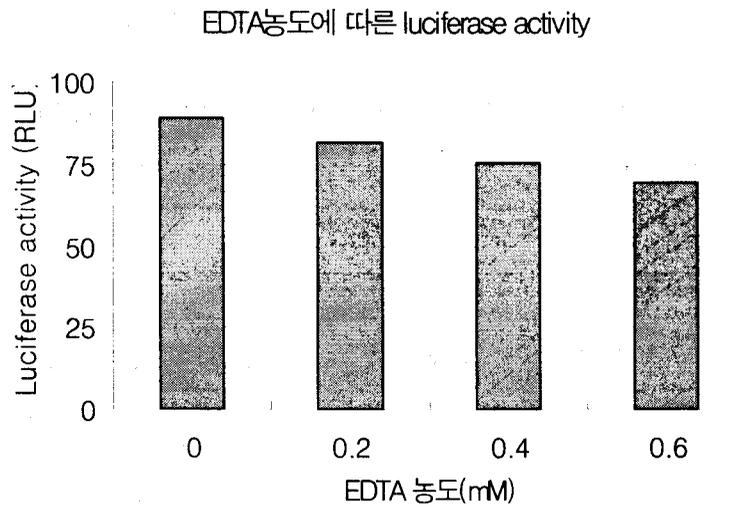


Figure 37. EDTA 농도(0 mM-0.6 mM)에 따른 칼슘의 Chelating EDTA를 각 농도별로 처리 한 후 Caco-2 cells의 luciferase 발현을 luciferase assay로 측정하였다.

Table 26. EDTA 농도(0 mM-2 mM)에 따른 칼슘의 Chelating
EDTA를 각 농도별로 처리 한 후 Caco-2 cells의 luciferase 발현을 luciferase assay로 측정하였다.

EDTA의 농도 (mM)	Luciferase activity(RLU)
0	85.5
0.5	65.03
1	52.1
1.5	45.3
2	34.7

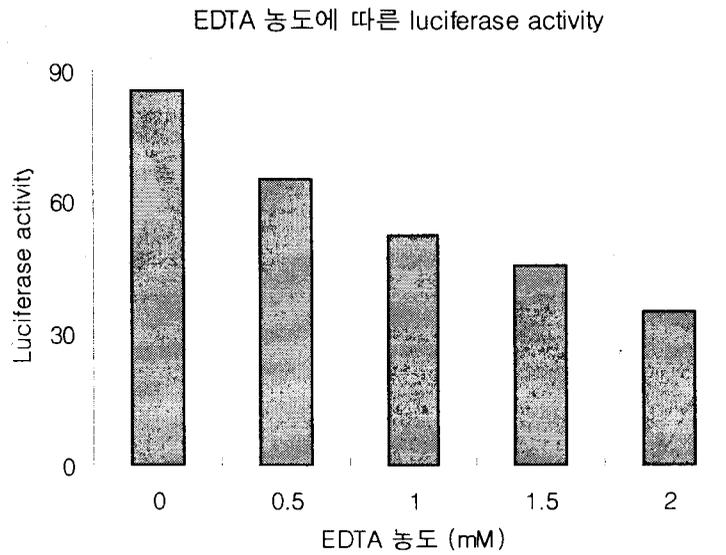


Figure 38. EDTA 농도(0 mM-2 mM)에 따른 칼슘의 Chelating EDTA를 각 농도별로 처리 한 후 Caco-2 cells의 luciferase 발현을 luciferase assay로 측정하였다.

Table 27. Expression of calcium dependent calmodulin-luciferase in response to extracellular concentration of P-Ser-Ser-Ser-Ca. hPEPT1, CM1-luc, and Bluescript were transfected into Caco-2 cells and then treated with 1.5 mM EDTA and various concentration of P-Ser-Ser-Ser-Ca as calcium source. Expression of calmolulin was determined by luciferase assay.

Plasmids	Ca 농도 (ug/ml)	Luciferase activity
pBS, CM1-Luc	20	11.65
hPEPT1, CM1-Luc	0	15.06
hPEPT1, CM1-Luc	5	14.15
hPEPT1, CM1-Luc	10	16.28
hPEPT1, CM1-Luc	20	17.28

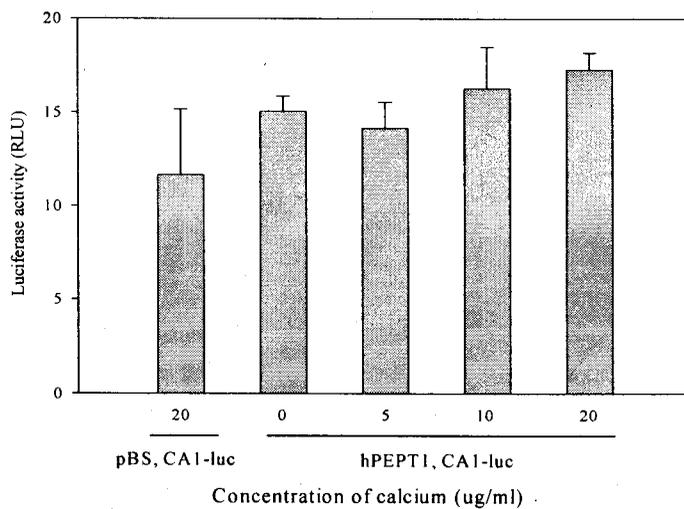


Figure 39. Expression of calcium dependent calmodulin-luciferase in response to extracellular concentration of P-Ser-Ser-Ser-Ca. hPEPT1, CM1-luc, and Bluescript were transfected into Caco-2 cells and then treated with 1.5 mM EDTA and various concentration of P-Ser-Ser-Ser-Ca as calcium source. Expression of calmodulin was determined by luciferase assay.

다. Ca-P-Ser의 흡수도 측정

Ca-P-SerSerSer의 uptake가 제대로 일어나지 못하기 때문에 Ca-P-Ser을 칼슘원으로 사용하였다. Ca-P-Ser은 single 아미노산이기는 하지만 Ca-P의 결합으로 size에 있어서 de/tri peptide와 유사하므로 흡수가 가능할 것으로 생각되었다.

실험 결과를 보면 첨가된 Ca-P-Ser의 농도에 따라 luciferase activity도 증가하는 것을 볼 수 있다(Table 28, Fig. 40-42). 이것은 Ca-P-Ser의 cell 내로의 흡수가 일어난다는 것을 말하며 이로 인해 calmodulin-luciferase가 발현된다는 것을 말한다.

이어서 peptide transporter의 효율을 검증하고자 Ca-P-Ser의 흡수도를 hPEPT1을 over-expression시킨 cell과 그렇지 않은 cell을 비교하여 luciferase assay를 통하여 확인하였다. 다음의 Table 29과 Fig. 43에 결과를 나타내었다. hPEPT1을 over-expression했지만 over-expression하지 않은 cell과 결과는 크게 다르지 않았다. 아마도 Caco-2 cell이 자연적으로 hPEPT1을 상당량 발현하고 있을 것이고 따라서 over-expression한다 하더라도 그 차이가 크게 나타나지는 않는 것으로 보인다. 제 1 절에서 대두 펩타이드의 칼슘 결합에 관한 최적 조건을 수립하였는데(Fig. 42에 mechanism 제시) 흡수도 실험에서는 대두 펩타이드가 아닌 P-Ser을 사용하였다. 칼슘 펩타이드는 섭취를 목적으로 만들어 질 것인데 섭취했을 경우 소화 과정에서 아미노산 혹은 디/트리 펩타이드의 단위로 분해되므로 결국 흡수 또한 아미노산이나 짧은 펩타이드의 형태로 이루어질 것이다. 따라서 Ca-P-Ser을 이용한 흡수도의 측정은 ISP peptide를 이용한 흡수도 증진을 위한 칼슘 펩타이드 제작과 일치하는 실험이라 할 수 있겠다.

Table 28. Expression of calmodulin-luciferase in response to extracellular concentration of P-Ser-Ca. Caco-2 cells were transfected with CM1-luc and then treated with 1.5 mM EDTA and various concentration of P-Ser-Ca as calcium source for 24 hr. Luciferase assay was performed to determine expression level of calmodulin.

Plasmids	Ca 농도 (ug/4 ml media)	Luciferase activity
CM1-Luc	0	22.25
CM1-Luc	10	36.82
CM1-Luc	20	42.77
CM1-Luc	30	49.78

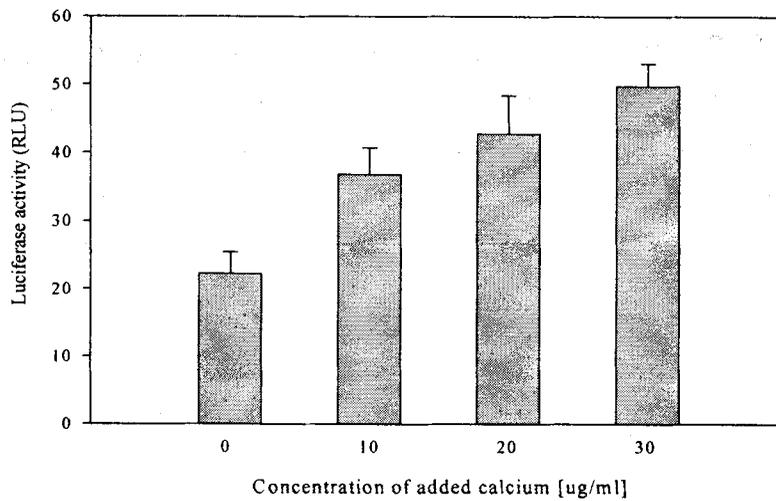


Figure 40. Expression of calmodulin-luciferase in response to extracellular concentration of P-Ser-Ca. Caco-2 cells were transfected with CM1-luc and then treated with 1.5 mM EDTA and various concentration of P-Ser-Ca as calcium source for 24 hr. Luciferase assay was performed to determine expression level of calmodulin.

Table 29. Expression of calmodulin-luciferase in response to extracellular concentration of P-Ser-Ca (Caco-2 cells). Caco-2 cells were transfected with CM1-luc and then treated with 1.5 mM EDTA and various concentration of P-Ser-Ca as calcium source for 24 hr. Luciferase assay was performed to determine expression level of calmodulin.

Plasmids	Ca 농도 (ug/4 ml media)	Luciferase activity
CM1-Luc	0	87
CM1-Luc	10	126
CM1-Luc	20	144
CM1-Luc	30	154

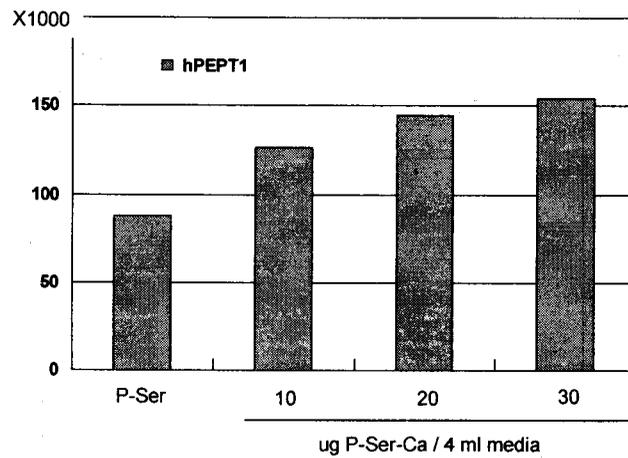


Figure 41. Expression of calmodulin-luciferase in response to extracellular concentration of P-Ser-Ca. Caco-2 cells were transfected with CM1-luc and then treated with 1.5 mM EDTA and various concentration of P-Ser-Ca as calcium source for 24 hr. Luciferase assay was performed to determine expression level of calmodulin.

Table 30. Expression of calmodulin-luciferase in response to extracellular concentration of P-Ser-Ca (HEK293T cells).

HEK293T cells were transfected with CM1-luc and then treated with 1.5 mM EDTA and various concentration of P-Ser-Ca as calcium source for 24 hr. Luciferase assay was performed to determine expression level of calmodulin.

Plasmids	Ca 농도 (ug/4 ml media)	Luciferase activity
CM1-Luc	0	422
CM1-Luc	10	418
CM1-Luc	20	416
CM1-Luc	30	497

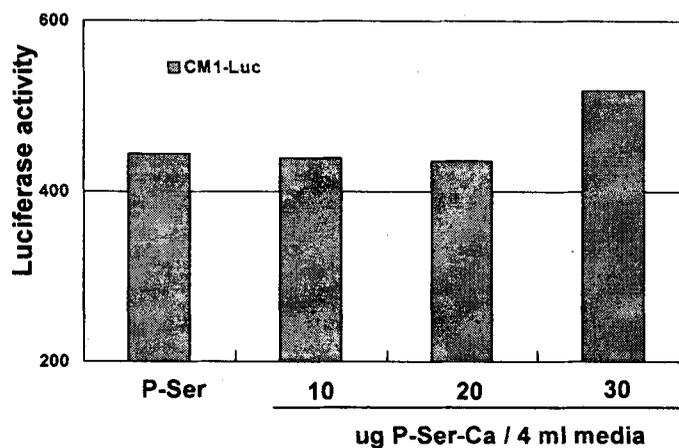


Figure 42. Expression of calmodulin-luciferase in response to extracellular concentration of P-Ser-Ca. HEK293T cells were transfected with CM1-luc and then treated with 1.5 mM EDTA and various concentration of P-Ser-Ca as calcium source for 24 hr. Luciferase assay was performed to determine expression level of calmodulin.

Table 31. Expression of calmodulin-luciferase by the amount of P-Ser-Ca uptaken through cellular peptide transporter. hPEPT1, CM1-luc, and Bluescript were transfected into Caco-2 cells and then treated with 1.5 mM EDTA and various concentration of P-Ser-Ca as calcium source. Expression of calmolulin was determined by luciferase assay. Control : 80 μ g/ml P-Ser, 5 mM phosphate buffer

Plasmids	Ca 농도 (ug/4 ml media)	Luciferase activity (RLU)
Bluescript, CM1-Luc	P-Ser, P	67.93
	10	56.79
	20	77.46
	30	125.5
hPEPT1, CM1-Luc	P-Ser, P	68.77
	10	62.73
	20	87.52
	30	142.5

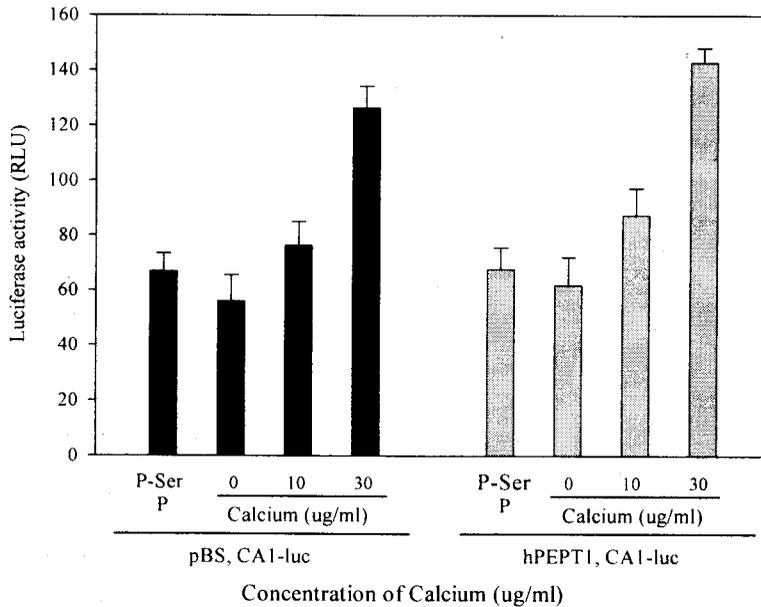


Figure 43. Expression of calmodulin-luciferase by the amount of P-Ser-Ca uptaken through cellular peptide transporter. hPEPT1, CA1-luc, and Bluescript were transfected into Caco-2 cells and then treated with 1.5 mM EDTA and various concentration of P-Ser-Ca as calcium source. Expression of calmodulin was determined by luciferase assay. Control : 80 µg/ml P-Ser, 5 mM phosphate buffer

Structure of Calcium-Phosphopeptide

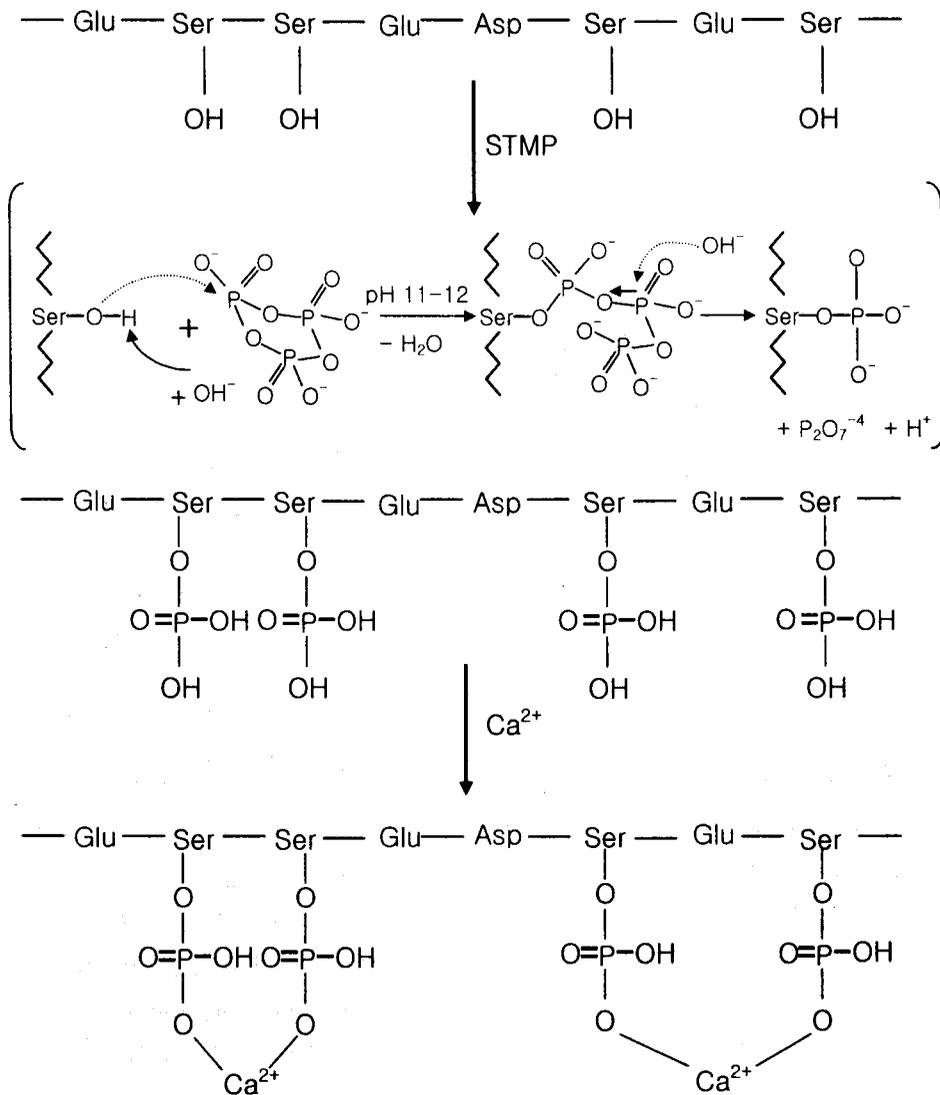


Figure 44. Mechanism of phosphorylation and calcium binding of soybean peptide

	<p>· 칼슘-SPP 예비시제품 제조</p>	<p>strength에서 glycinin과 β-conglycinin을 분리</p> <p>2). 칼슘의 분리 및 정제</p> <p>① 우골분을 퇴화 처리하여 칼슘을 추출, 불소 등 유용성분 제거</p> <p>② Ca-phosphate인 경우 불용성침전을 제거</p> <p>2. 인산염 중합체 제조 및 최적 인산화반응 조건 확립</p> <p>1). 인산염 중합체 제조: Na-phosphate 형태의 n=1-3의 저중량의 인산염을 제조, 안전성 기초시험</p> <p>2). 인산화: 인산기의 중합도 별 분리대두와 반응시킨 후 가수분해 혹은 가수분해 후 인산화를 하여 칼슘 결합 시험</p> <p>3. 대두로부터 분리 혹은 대장균 내 대량발현에 의한 glycinin의 칼슘 결합 최적화 예비실험</p> <p>○ 인산화된 분리대두단백질 혹은 proglycinin 펩타이드에 분리 정제된 칼슘을 결합하는 조건에 대한 실험</p> <p>4. 예비 시제품제조</p>
--	--------------------------	--

2. 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도(1999)	◦ 원료 대두단백질과 칼슘 분리, 정제	20
	◦ 인산염 중합체 제조 및 단백질 인산화 반응 최적조건 확립	40
	◦ ISP 및 대장균발현 proglycinin의 칼슘 결합 최적화	30
	◦ 예비 시제품제조	10

3. 연구개발 목표의 달성도

가. 원료 대두단백질 및 칼슘 정제

- ISP 제조: 수입 가격에 비해 너무 높은 가공비용을 물어야 하는 이유로, 보다 고품질의 국산 soy flour를 사용하거나 원료 대두로부터 직접 ISP를 제조하여 사용하고자 한다. 식품용 ISP의 제조는 minimum-heat treated soy flour를 원료로 사용하는데 먼저, pH 8의 약 알칼리 상태에서 soy flour를 용해시키고 원심 분리하여 불용성 침전물을 제거한다. 남은 상등액의 pH를 4.5로 낮추어 등전점 침전을 유도하여 생성된 curd를 회수한 다음, 그대로 말리거나 NaOH로 중성화 한 후, spray dry시켜 ISP를 성공적으로 얻을 수 있었다.
- Glycinin의 분리 및 정제: 제조된 ISP는 저장 단백질 globulin(90%)과 저분자량 성분들로 구성된 2S component(10%)로 구분된다. Globulin의 절반 이상을 차지하는 glycinin을 β -conglycinin으로부터 분리하는 방법으로 저온에서 대부분의 glycinin이 침전을 형성하는 원리를 이용한 cryoprecipitation과 낮은 ionic strength 조건에서 pH에 따라 glycinin과 β -conglycinin의 용해도가 다른 점을 이용한 isoelectric precipitation의 방법을 사용하여 침전을 얻

어 trypsin으로 분리하기 전단계의 원료 대두단백질을 얻을 수 있었다.

- 무기 칼슘의 분리 및 정제: Ca-phosphate인 경우에 비하여 CaCl_2 , CaSO_4 형태의 경우는 물에 대한 용해성이 좋아 추후의 공정이 용이하므로 특히 CaCl_2 의 칼슘원을 확보하고자 하였다. 우골분 및 어분을 퇴화시키거나 질산, 인산, 염산, 황산 등으로 처리하여 칼슘을 추출하였다.
- Proglycinin A_{1a}B_{1b} subunit의 cDNA를 사용하여 대장균에서 발현시켜, column을 사용하긴 하나 비교적 간단한 정제과정을 통하여 균 전체 단백질량의 약 12%의 수율로 proglycinin을 얻을 수 있었다.

나. 인산염 중합체 및 인산화 대두펩타이드의 제조

- 인산염 중합체 제조: 인산화 대두펩타이드 제조시 사용될 sodium polymetaphosphates ($n= 3\sim 18$)를 합성한다. 합성 후 정제처리 과정을 거친 다음 중합도를 측정하였다.
- 단백질 인산화 반응의 최적 조건 확립하기 위해 STMP를 이용해 각 pH 별 농도별 실험을 통해 높은 pH에서 1%의 농도로 처리하였을 때 효과적으로 인산화시킬 수 있음을 알았다. 인산염의 중합도 별 인산화 정도를 비교하였다.
- 대두단백질의 전하차에 따른 인산화정도의 분석을 위해 isoelectric focussing gel analysis 방법으로 인산화 정도를 확인할 수 있었다.
- 효소에 의한 단백질의 가수분해 정도에 따른 인산화 정도의 분석을 위해 trypsin을 단백질과의 농도비로 비교하여 최적농도를 구하였다.

다. 칼슘-SPP 결합 및 예비시제품 제조

- ISP 칼슘 결합 최적화 : 분리대두단백을 10% 농도로 증류수에 녹이고 pH를 중성으로 조정하여 혼합한 후 원심분리를 통해서 그 상등액을 분리, 가수분해효소인 트립신을 이용하여 가수분해하였다. 인산염을 적절한 농도로 첨가하여 인산화 반응종결 후 칼슘 결합하는 조건 설정이 진행 중이다. 한편, 트립신처리를 인산화 반응 후에 하여 칼슘을 결합시키는 공정도 병행하였다. 반응종결 후, 잔존하는 인산염(sodium phosphate)과 반응 부생성물을 제거하기 위해서 투석막(dialysis membrane)으로 펩타이드를 정제하는 과정에 시간이 많이 소모되었다.
- 대장균발현 proglycinin의 칼슘 결합 최적화 : 대장균에서 대두단백질 subunit 유전자를 발현시켜 얻은 고도의 정제 proglycinin에 trypsin 처리를 하여 peptide fragments들을 분리하여 칼슘과 결합을 시도하여 본 결과, 높은 결합력이 있는 분획을 획득하였다.
- 인산화 반응 상등액 속의 잔여 인산염 및 유도체들의 침전방지와 그에 따른 손실량을 확인한 결과 많은 손실 없이 칼슘과 결합에 적합한 인산염을 제조할 수 있었다.
- 칼슘 처리에 있어서 필요한 칼슘염의 처리농도를 확립하고자 역시 농도별 pH 별 비교를 통해 높은 수율의 칼슘 결합 peptide를 확인할 수 있었다.

4. 관련 분야의 기술발전예의 기여도

가. 천연 칼슘 원료로부터 무기 칼슘의 추출 기술: 본 과제 참여 기업인 (주)서도 화학의 자체 보유 기술을 사용하여 현재, 국내 칼슘 원료의 최저 공급 단가인 7,000원 (kg 당)에 대해 가격경쟁력 있는 고품질의 무기 칼슘의 생산이 가능하며 97년 기준, 칼슘 제재 분야의 국내생산 업체 57개 사, 수입 업체 22개 사에 기초 원료인 무기 칼슘을 공급 할 수 있다.

나. 대두 단백질의 인산화 기술: 대두 glycinin 단백질 또는 그 효소 분해 가수물인 oligopeptide에 대한 효율적 인산화 기술의 확보는, 후속 공정인 SPP의 분리 정제와 밀접히 연관되어 본 과제의 성공 여부에 중요한 단계가 된다. 칼슘 펩타이드 공정에 있어서 인산화와 칼슘 결합에 있어 최적 조건의 확립은 compact 한 형태로 folding되어 있는 여러 종류의 저장 단백질의 물성 및 기능성 향상을 위한 화학적 modification (예: 아세틸화 등)의 효율을 높일 수 있으며 이 기술의 적용 시 적합한 단백질의 구조면에서 최적화 된 조건을 제공할 수 있다고 사료된다.

다. 유전자 재조합 기술을 이용한 대장균으로부터 대두 glycinin, 또는 칼슘 결합 가능 대두 peptide의 대량 생산 기술: 유전자 재조합 기술로 칼슘 결합 SPP의, 미생물에서의 대량 생산이 실현 될 경우, 재조합 균주를 이용한 기능성 peptide의 대량 발현 기술을 현실화시킴으로써 국내 재조합 단백질 생산 분야에 현실성 있는 기술을 제공함과 더불어, 그 사용의 국내 규약이 까다롭지 않은 국내 대두 사료 시장에 기능성 생물 공학 제품을 출시할 수 있을 것으로 예측된다.

2 절 2차년도

1. 연구개발 목표

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차년도 (2000)	<ul style="list-style-type: none"> · 인산화대두펩타이드의 최적 결합조건 확립 · 칼슘 결합 펩타이드 구조분석 	1. 중합도별 인산염을 이용하는 단백질 인산화 반응 및 칼슘결합의 최적 조건 확립 가. 대두단백질의 아미노산서열 및 구조에 따른 인산화 정도의 분석과 최적 칼슘 결합 조건 확립 1). 인산염 중합체 제조: Na-phosphate 형태의 n=1-3의 저중량 및 중중량(n>3)의 인산염을

		<p>제조</p> <p>2). 인산화 및 칼슘 결합: 인산기의 중합도 별 분리대두와 반응시킨 후 칼슘 결합 시험</p> <p>3). 인산화 펩타이드의 아미노산서열 및 구조 분석</p> <p>4). 인 및 칼슘 비율조절: 인 및 칼슘 정량</p> <p>나. 효소에 의한 단백질의 가수분해정 도에 따른 인산화 정도의 분석과 최적 칼슘 결합 조건 확립</p> <p>1). 선인산화 및 후 가수분해에 의한 칼슘 결합도 분석</p> <p>2). 선 가수분해 및 후인산화에 의한 칼슘 결합도 분석</p> <p>2. 인산화 반응 상등액 속의 잔여 인산염 및 그 분해 유도체들의 침전방지 방법 확립</p> <p>가. 인산화 반응 후 반응물의 투석시 투석막 pore size 별 침전도 분석</p> <p>나. 인산화 반응 후 반응물내의 인산염 잉여분 제거법 확립</p> <p>다. Spray drying에 의한 침전도 변화 분석</p> <p>3. 우수 칼슘 결합성 대두 peptide 관련 대장균에서의 대량 발현 기초실험</p> <p>가. 칼슘 결합력이 우수한 proglycinin 유래 대두펩타이드 분리 및 분석</p>
--	--	--

2. 연구 평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
2차년도(2000)	◦ 중합도별 인산염을 이용하는 단백질 인산화 반응의 최적 조건 확립	40
	◦ 인산화 반응 상등액 속의 잔여 인산염 및 유도체들의 침전방지안 확립	40
	◦ 대장균에서의 대량 발현 기초실험	20

3. 연구개발 목표의 달성도

가. 중합도별 인산염을 이용하는 단백질 인산화 반응의 최적 조건 확립

1) 대두 단백질의 아미노산서열 및 구조에 따른 인산화 정도의 분석과 최적 칼슘 결합 조건 확립

아미노산의 특성에 따라 인산화 반응의 최적조건을 확립하려 하였다. 이미 알려진 대로 STMP를 사용하고 있지만 중합도별 칼슘 결합 능력을 확인해보기 위해 중합도가 높은 sodium polyphosphate, sporix를 사용하여 비교하였고 이로부터 ISP peptide의 인산화를 위한 최적 조건을 확립할 수 있었다.

2) 단백질의 효소가수분해정도에 따른 인산화 정도의 분석과 최적 칼슘 결합 조건 확립

ISP 용액의 용해도를 높여서 수용성 단백질의 농도를 높임으로 전체적인 칼슘 결합 펩타이드의 수율을 높이기 위해 ISP 용액의 용해도를 높이기 위한 최적 조건을 확립하였다. 단백질 특성상 3차 구조를 형성하고 있으므로 최적의 인산화 조건을 확립하기 위해서는 효소 처리를 통해 아미노산이 최대한 많이 노출되어야 한다. 효소와 기질의 비율을 달리 하여 가수분해를 실시한 후 인산화의 정도를 측정하였다. 효소에 대한 기질의 비율이 낮은 1 : 250 와 1 : 500, 1 : 1000 (E : S)의 비율로 인산화도와 칼슘 결합 능력을 측정하였다. 이 세 가지 조건의 반응에서 특히 1 : 1000 일 때의 칼슘 결합능이 가장 뛰어난 것으로 조사되었다. 이것은 가수 분해가 높은 경우 비 특이적인 가수 분해에 의해 칼슘과 결합 할 수 있는 아미노산 서열을 가지지 못하는 peptide 가 생성되어 가수 분해가 낮을 때 보다 칼슘 결합능이 떨어진다고 할 수 있다. 또한 칼슘 반응시 트립신의 작용 여부를 측정하였다.

나. 인산화 반응 상등액 속의 잔여 인산염 및 그 분해 유도체들의 침전방지 방법 확립

인산화 공정을 중심으로 SPP를 생산하는 방법은 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 그 하나는 분리된 glycinin을 전 처리를 통해 인산화 한 다음 인산화된 glycinin을 분리 한 후 효소 가수분해 시켜서 SPP를 얻는 방법이고 다른 하나는 인산화 수준을 높이기 위해 먼저 효소 가수 분해를 통해 glycinin을 oligopeptide로 전환시킨 후 인산화한 다음 SPP를 분리해 내는 방법이다. 이 두 방법 중에서 인산화의 효율을 높이기 위해 후자의 방법을 선택해서 실험하였다. 그런데 이러한 방법을 사용 할 경우 가수 분해 후 인산화 반응을 시킨 상등액에 남아있는 작은 분자량의 수용성 SPP를 인산염들과 그 반응 산물이 pyrophosphate 혹은 polyphosphate가 녹아 있는 반응액으로부터 분리, 정제해야 하는 어려움이 있다. 미처 완전히 반응하지 못한 pyrophosphate 혹은 polyphosphate는 칼슘이 첨가됨과 동시에 calcium-phosphate를 형성하여 침전하게 되므로 칼슘의 결합률을 떨어뜨리게 된다. 따라서 이러한 문제를 해결해야 했는데 이러한 문제는 calcium-phosphate 침전을 역이용함으로써 해결할 수 있었다.

다. 우수 칼슘 결합성 대두 peptide의 유전자 클로닝 및 재조합 대장균에서의 대량 발현 관련 기초 실험

우수한 칼슘 결합력을 나타내는 oligopeptide만을 대량으로 생산해 내기 위해서 대장균 내에서 대량 발현시키는 기초실험을 수행하였다. 대량 발현을 위해 우선적으로 우수 결합 peptide을 분리하여 이의 아미노산 서열을 분석하고 유전자 클로닝을 해야 한다. 대두 내에 혼합되어 있는 여러 가지 peptide를 모두 사용하는 것이 아니라 정제되어 있는 proglycinin만을 선택적으로 분리하여 칼슘을 결합시키는 것이 우수 결합성 peptide를 얻을 수 있는 방법을 응용하고 있다. 따라서 우리가 보유하고 있는 Glycinin subunit AlaB1b를 대장균에서 대량 발현시켜 선택적으로 분리, 정제를 통해 순수한 proglycinin만을 얻어서 칼슘 결합 능력을 시험하였다. 이를 바탕으로 아미노산 서열을 밝히고 유전자를 클로닝하여 만족할만한 펩타이드를 얻을 수 있을지 가능성 여부를 조사하게 된다.

4. 관련 분야의 기술발전예의 기여도

본 과제가 성공적으로 수행될 경우, 값싼 대두('98.12.14 현재 톤당 213.9 US\$, 전년 대비 26.6% 하락)와 IMF이전 환율기준 비교적 저가에 생산되는 무기 칼슘 원료('97 기준 kg당, 유청 칼슘: 8,500-11,000원, 우골분: 5,000-7,000원, 해조 칼슘: 7,000-8,000원, 난각칼슘(국내산): 7,000원 이하)를 참여 기업과 공동연구로 kg당 7,000원 이하의 단가로 생산하여 본 과제의 최종 생산물인 고부가가치의 고밀도 칼슘 결합 대두peptide 재제를 대량생산 할 수 있다. 현재, 칼슘 함유 건강 보조 식품으로써 국내 시판 중인 제품을 살펴보면, 97년 상반기를 기준으로 국내 칼슘 함유 식품 판매 수위를 차지한 한국 암웨이사의 '칼D' 제품의 경우, 완전 수입제품으로서 칼슘의 주원료인 골겍질 분말에 칼슘 흡수를 돕는 비타민 D를 소량 첨가하였고 부피제로써 포도당을 70% 사용하였다. 국내 제품으로는 (주)풀무원의 '풀무원 칼슘'이 있는데 우골분을 주성분으로 포도당과 유당을 사용하였고 칼슘 흡수 촉진을 위해 전량수입에 의존하는 CPP와 비타민 D를 소량 첨가하는 실정이다. 진술한 바와 같이 흡수 가능한 수용성 칼

슉의 체내 공급량은 무기 칼슉의 첨가량과는 무관하며 CPP와 같은 기능성 oligopeptide의 함량과 밀접한 관련을 갖고 있다. 따라서 본 연구팀에서 계획하고 있는 SPP를 이용한 칼슉 제재 제조 기술이 개발되어 칼슉 결합 SPP의 고효율 분리 제품을 생산하게 되면 아래와 같은 효과를 기대하게 된다. 기존의 국내 칼슉 함유 보조식품에 필수적으로 첨가되는 고가의 CPP 및 비타민 D 성분을 완벽히 대체 할 수 있고 대두를 원료로 한 자체 칼슉 제재도 생산 할 수 있어 97년 기준, 약 1300억원 규모의 국내 칼슉 함유 건강보조식품시장의 판매량 대비, 77%에 이르는 수입 제품을 효율적으로 대체 할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 건강보조식품으로의 기존용도 이외의 고부가가치의 다양한 소비 형태(예: 대두 사용 식품(장류, 두부, 두유 등) 및 사료)를 발굴하여 대두 소비를 촉진시킴으로써 특히, 식품 재료용 대두의 경우, 국내 농가에 의한 대두 재배를 장려 할 수 있는 효과를 기대 할 수 있다.

3 절 3차년도

1. 연구개발 목표

<p>3차년도 (2001)</p>	<ul style="list-style-type: none"> · 칼슉 밀도 및 용해도 증진 방법 확립 · 칼슉-SPP의 흡수율 측정 · 최종 칼슉-SPP 제조 	<p>1. Affinity chromatography 기법을 이용한 칼슉 결합 가능 대두펩타이드의 분리 및 정제</p> <p>가. 단백질과 금속 이온 (Fe^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{3+}, Ca^{2+}, Ni^{2+}, Hg^{2+} 등)간의 친화성(affinity)을 이용하여 SPP를 분리</p> <p>나. Fe^{2+}, 또는 Ca^{2+}가 chelate된 hydrophilic gel (Sephacrose 6B, Superose 등) column을 이용하여 SPP나 칼슉 결합 가능 oligopeptide를 고효율로</p>
--------------------	--	--

		<p>분리</p> <p>2. 칼슘 밀도 및 용해도 최적화 방법 확립</p> <p>가. 칼슘 밀도를 증진시킬 수 있는 최적 조건의 확립</p> <p>나. 칼슘 펩타이드의 용해도를 증진시키기 위한 조건의 확립</p> <p>3. 동물 및 조직배양에 의한 칼슘-SPP의 흡수율 측정</p> <p>가. 칼슘-SPP의 최적 용해도 확립</p> <p>나. 조직 배양을 통한 흡수도 측정을 위한 세포주의 선정과 시스템 개발</p> <p>다. 흡수도 측정에 있어서 최적 조건의 확립</p> <p>4. 칼슘-SPP의 최적 제조 조건에 따른 최종시제품 제조</p> <p>가. 대량생산</p> <p>나. 칼슘-SPP의 최종 시제품 완성</p>
--	--	---

2. 연구 평가의 착안점

3차년도(2001)	◦ 칼슘 밀도 및 용해도 최적화 방법 확립	30
	◦ 칼슘-SPP의 흡수율 측정과 증진안	40
	◦ 칼슘 결합 가능 대두펩타이드의 분리 및 정제	10
	◦ 최종시제품 제조	20

3. 연구 개발목표의 달성도

가. Affinity chromatography를 이용한 칼슘 결합 가능 대두 펩타이드의 분리

및 정제

효소적 가수분해를 이용한 ISP로부터 대두 펩타이드를 대량 얻을 수 있는 반면, 우수한 칼슘 결합성 peptide를 대장균에서 발현시켜 순수한 proglycinin으로부터 효소 처리를 통해 peptide를 효과적으로 얻을 수 있다. 대장균에서 대두단백질 subunit 유전자를 발현시켜 얻은 고도의 정제 glycinin에 trypsin처리를 하여 peptide fragments들을 분리하여 칼슘과 결합을 시도하여 본 결과, 높은 결합력이 있는 분획을 관찰하였다. 본 과제 종료 후에도 각 칼슘결합 펩타이드의 성상을 규명하여, 해당 펩타이드를 이용한다면 식용은 물론 그 외에 특수용도의 제약용 펩타이드-칼슘 제조가 가능하리라 본다. 칼슘 결합이 용이한 β -casein과 α s1-casein유래의 CPP구조에 대한 상당한 정보가 알려졌으므로 이를 참고할 것이다. Glycinin의 경우에는 glycosylation과 같은 post-translational modification이 없기 때문에 재조합 유전자 기술로 생산할 경우에도 그 구조나 기능성에 큰 변화가 없을 것으로 예측된다.

금속을 이용하여 금속과 결합할 수 있는 peptide를 효과적으로 분리해 내는 방법을 immobilized metal affinity chromatography (IMAC) 이라 하는데 본 과제에서도 펩타이드를 순수 분리해 내는 방법으로 칼슘 이온을 이용하는 IMAC을 SPP 분리에 사용하고자 시도하였다. 칼슘과 결합하는 펩타이드의 아미노산 서열을 분석하기 위해 affinity chromatography를 이용하여 펩타이드군을 분리하였다. 칼슘과 펩타이드의 결합 정도에 따라서 칼슘에 결합하는 펩타이드를 분리해 낼 수 있는 방법을 사용함으로써 원하는 펩타이드만을 분리 정제하는데 용이한 방법이었다. 이렇게 분리해 낸 펩타이드군을 분석하여 아미노산 서열을 재확인하고 칼슘과 결합하는 아미노산을 정확히 규명하고 결합의 물리 화학적 성질까지 밝혀 학문적으로도 기여할 수 있을 것으로 보인다. 그러나 대두단백질 유전자의 heterogeneous한 성질 때문에 수많은 유사펩타이드를 분리하기는 어려웠다. 또한 분리하여도 homogeneity를 갖는 펩타이드를 분리 시 그 yield 또한 문제가 되었다. 그러나 기존 유전자서열로부터 밝혀낸 아미노산서열에 대한 정보와 아미노산 조성비 등을 고려하여 합성펩타이드를 제조하여 칼슘 결합에 대한 기초실험을 행하였다.

나. 칼슘 밀도 및 용해도 최적화 방법 확립

1) 고밀도 칼슘결합 펩타이드 생산의 최적화

칼슘 흡수율이 뛰어난 것으로 알려진 β -casein 유래의 CPP의 구조를 보면, 4개의 phosphoserine을 포함하는 25개의 아미노산 (MW 3,100)으로 이루어졌으며 α s1-casein 유래의 CPP의 경우에는 7개의 phosphoserine기를 함유하는 37개의 아미노산 (MW 4,600)으로 이루어졌음이 알려졌다. 소장 내에서 칼슘과 수용성 복합체를 이루는 역할을 하는 부분이 바로 이 세린 잔기의 인산인 것으로 밝혀졌다. 따라서 효율적인 칼슘 유도하기 위해서는 대두 단백질 내에 약 5.4% (중량 %)의 함량으로 존재하는 세린 잔기에 얼마나 효율적으로 인산화를 시킬 수 있는가의 문제와 칼슘 결합 능력이 뛰어난, 인산화된 세린 잔기를 포함하는 대두 oligopeptide를 효과적으로 분리해 내는 기술의 개발이 중요하다. 고밀도 칼슘 결합 펩타이드의 제조는 칼슘 결합 펩타이드의 수율과 직접적으로 연관되어 있다. 따라서 얼마만큼의 칼슘이 일정 수준의 펩타이드에 결합하는지에 따른 칼슘 펩타이드 생산의 높은 수율이 중요한 관건으로 여겨지고 이러한 칼슘의 결합률을 높이기 위한 방안으로 인산화제의 농도와 칼슘의 농도를 적절히 조절하여 최적 조건을 확립하였다.

2) 고수용성 칼슘의 제조

칼슘의 흡수가 소장에서 잘 이루어지지 않음은 이미 알려져 있고 흡수도를 좀더 높이기 위한 방법으로 물에 완전히 녹을 수 있고 소장 내 인산에 의해 침전을 일으키지 않는 펩타이드에 결합되어 있는 칼슘의 형태를 제조하는 방안을 마련하였다. 칼슘의 펩타이드에 대한 결합력을 증진시키기 위해서는 펩타이드를 먼저 인산화시키는 것이 중요함은 이미 여러 차례 언급한 바 있다. 앞서 언급했지만 인산화 과정 중 가장 문제가 되었던 것이 인산화 반응 후 잔재해 있는 인산염을 제거하는 것이었다. 미처 완전히 반응하지 못한 pyrophosphate 혹은 polyphosphate는 칼슘이 첨가됨과 동시에 calcium-phosphate를 형성하여 침전하게 되므로 칼슘의 결합률을 떨어뜨리게

된다. 이러한 문제는 calcium-phosphate 침전을 역이용함으로 해결하였고 따라서 침전이 제거 된 이후의 칼슘 결합 반응에서는 완전히 soluble한 반응으로 진행하게 되므로 추후의 공정에서도 칼슘의 용해도는 보장할 만 하며 체내에서의 흡수에도 큰 영향을 미칠 것으로 기대된다.

3) 조직배양에 의한 칼슘-SPP의 흡수율 측정

인산화 대두 펩타이드 칼슘이 기존 일반 칼슘 제품에 비하여 밀도와 수용성이 우수하므로 인체 내 흡수가 높을 것이라고 예상할 수 있으나 실질적으로 그 정도를 정량화하기 위하여 동물 실험을 대체하여 동물 실험보다 흡수율 측정에 있어서 더 효율성이 높은 조직 배양을 이용한 본 연구실 고유의 방법을 개발 적용하였다. 특정조직세포를 이용하여 칼슘 펩타이드와 결합하는 세포내 수용체 등을 발현시킴으로써 칼슘 펩타이드가 결합으로 인한 흡수율을 수치화하는 방법을 사용하였다. 소장 상피세포인 Caco-2 cell에 펩타이드를 선택적으로 흡수하는 peptide transporter와 칼슘 의존성 단백질인 calmodulin-luciferase를 발현시켜 luciferase 발현 정도로 칼슘의 흡수 정도를 측정할 수 있는 시스템을 개발하여 실험하여 기대했던 결과를 얻어 낼 수 있었다.

4) 칼슘-SPP의 최적 조건에 따른 최종 시제품 제조

지금까지 언급한 대로 칼슘-SPP를 최적 조건에서 반응시켜 최종 시제품으로 분말화하였다. 우리 실험실에서 진행되는 ISP의 분리에서 최종 칼슘 결합 펩타이드 생산까지의 실험 과정을 통해서 기존의 국내 칼슘 함유 보조식품에 필수적으로 첨가되는 고가의 CPP 및 비타민 D 성분을 완벽히 대체 할 수 있고 대두를 원료로 한 자체 칼슘 제재도 생산 할 수 있어 건강 보조식품으로의 기존용도 이외의 고부가가치의 제품도 개발 할 수 있을 것으로 생각된다.

4. 관련 분야의 기술발전예의 기여도

IMAC 기법을 이용한 SPP의 분리 정제 기술: SPP에 대한 특이적 분리를 위해 단백질과 금속 이온 (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{3+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} 등)간의 친화성 (affinity)을 이용하여 SPP를 분리하고자 한다. 더욱이, CPP의 구조에서 나타났듯이 phosphoserine 잔기 속의 인산과 칼슘 간의 선택적이고 안정적인 결합성이 밝혀졌기 때문에 Fe^{2+} , 또는 Ca^{2+} 가 chelate된 hydrophilic gel(Sepharose 6B, Superose 등) column을 이용하여 SPP나 칼슘 결합 가능 oligopeptide를 고효율로 분리 할 수 있는 기술이 확보 될 경우, 기존의 CPP분리 공정에도 사용될 수 있고 금속 친화성 단백질의 생화학적 순수 분리 시에도 적용 할 수 있다.

연구 개발결과 식용 칼슘 제재로서 만족스러운 평가를 얻은 경우, 곧 다음 단계의 개발이 시급하다고 본다. 즉 본 연구에서 사용한 대두단백질 펩타이드에 관한 연구에 기초를 두어 일종의 펩타이드 디자인을 통하여 각 용도에 맞는 별도의 약용 칼슘 제재 개발로 전환한다. 즉 칼슘을 흡수하는 매개체로 사용한 대두단백질 펩타이드를 수용체 특이결합을 토대로 펩타이드를 합성 혹은 추출하여 고도로 정제된 작용특이성 있는 칼슘 제재 개발로 확대 혹은 전환함으로써 가격 면에서도 경쟁력 있는 고부가가치의 제품생산이 가능하다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1 절 추가 연구의 필요성

1. 대두단백질의 가수분해 및 인산화에 의한 칼슘 결합능과 제품수율 향상

본 연구의 타당성과 효율성을 위하여 순수 분리 정제된 glycinin에 대한 가수분해 및 인산화 glycinin의 칼슘 결합 능력을 조사하였다. 재조합 대장균에서 발현시켜 분리한 glycinin과 인산화제를 사용하여 반응시킨 결과 인산화시키지 않은 glycinin에 비해 칼슘 결합 능력이 현저히 증가되는 것은 비교적 쉽게 확인 할 수 있었다. 또한 본 생산개발 단계에서도 연구개발의 효율적인 진행을 위하여 초기 주원료로서 대두보다는 분리대두단백질(ISP)을 많이 사용하였고, 가수분해 및 펩타이드 인산화 제조공정도 ISP에 대한 최적조건이 확립된 상황이다. 그러나 전공정 수행에서 가장 어려웠던 점은 경제성 있는 수율의 확립이었다. 하나의 단일 공정만을 위한 최고 수율을 얻는 조건이 다음 공정에서 가장 저조한 수율을 초래할 수 있었다. 또한 반응조건에 따른 인산화 정도를 정량적으로 얻지 못하였으며 효소에 의한 가수분해 정도와 연관지어 보다 정밀한 인산화 조건을 확립해야 한다고 사료된다. 경제성을 확립하기 위하여 각 공정에 대한 실험을 통하여 제품의 수율 향상은 필수라고 본다.

2. 기능성 인산화 대두펩타이드-칼슘 제조

고단백식품으로 간주되어온 대두단백질은 CPP와 비슷한 수준의 serine잔기(최소 5% 이상)를 함유하며 화학적 인산화방법을 통한 SPP를 개발하여 칼슘과 결합할 수 있는 phosphopeptide를 경제적으로 분리함으로써 흡수가 용이한 고밀도 칼슘 제제를 생산, 전량수입에 의존하는 CPP공급을 대체 할 수 있다고 본다. 최근 대두에 포함된 여러 가지 생리활성 물질들이 확인되고 있으므로, 이 확인된 기능성 펩타이드를 재조합 대장균에서의 cDNA 발현시스템 혹은 식물숙주를 통하여 대량생산한 후 칼슘 결합에 의한 기능성 칼슘 대두 펩타이드

드를 생산하는 연구개발이 요구된다. 재조합 대장균을 이용한 생산법은 이미 본 연구팀에서 적절한 glycinin 발현 vector를 확보해 놓은 상태이며 대장균으로부터 분리된 glycinin이 대두 추출 천연 glycinin에 비해 trypsin 가수분해 및 STMP에 의한 화학적 인산화에 불리하지 않음을 검증한 바 있다. 이미 확보한 glycinin subunit 유전자의 대장균에서 대량 발현시켜 회수하는 방법에 따라 기능성 oligopeptide를 생산하는데 필요한 cDNA 발현 vector system에 대한 개발이 필요하다. Oligopeptide의 추출기술은 어느 정도 보편화되어 있는 상태로 방법상에 큰 어려움은 없으나 실험을 통해 scale-up의 용이성과 경제성에 기준을 두어 분리체계를 확립할 필요가 있다고 본다.

2 절 타 연구에의 응용

현재 거의 모든 칼슘 제제의 필수 원료로 사용되는 수용성 칼슘 원료 CPP의 대체효과 뿐 아니라 본 SPP를 사용한 제품의 칼슘 밀도, 수용성 및 흡수도 증진 등의 효과가 입증되었으므로, 본 기술이 특히 철분 혹은 다른 무기염류 영양소 등 관련 연구에도 유사하게 적용할 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구에서 확립한 고농도 고효율의 미네랄 제제 생산, 기타 미네랄 원자재의 정제기술, 대두 펩타이드 제조 및 인산화 기술, 펩타이드와 미네랄의 효율적 결합기술, 조직배양을 이용한 흡수도 측정기술이 응용되어 관련 분야에 큰 기여를 할 것으로 기대된다. 그럼으로써 기존 미네랄 제제보다 기능과 효율이 진보된 고효능 완제품을 생산하는데 기술적으로 응용이 가능하리라 본다.

3 절 기업화 추진방안

본 연구의 결과로서 우선 국내 및 국제특허를 각각 출원하였다. 이는 본 연구의 결과의 산업화 가능성을 강력히 시사하는 것이라 볼 수 있으며, 산업화를 신중히 검토할 필요가 있다고 판단한다.

현재 각종 건강보조식품 및 칼슘 보강 의약품에 사용하는 CPP원료 공급은

전량 수입에 의존한다. 따라서 본 과제수행을 통하여 적게는 최근 적어도 약 2,000억원 규모의 국내 칼슘 함유 건강보조식품 시장에 경쟁력 있는 국산 제품을 공급 할 수 있으며 완제품 경우 근 80%에 달하는 수입 제품의 대체 효과를 기대할 수 있다. 그럼으로써 각종 식, 의약품 제조용 원료구입에 대한 외화 낭비를 감소시키고, 더 나아가 고부가가치의 제품생산 know-how를 자체 개발함으로써 원료와 idea 부재의 국내 경제 및 산업 육성에 기여한다.

80년대에 들어 개인 소득의 증대에 힘입어 기능성 건강식품에 대한 관심이 급격히 증대되고 있으며 94년 이후 97년까지 매년 두 자리 수 이상의 높은 성장률을 보였다. 특히, 우리나라 사람에게 가장 부족한 영양소 중의 하나라고 알려진 칼슘의 경우, 90년 칼슘 제품이 건강보조식품으로 첫 선을 보인 이래, 건강보조식품시장에서 칼슘 제품이 매출 수위를 차지한 97년 기준, 총 79개사에서 136개의 다양한 제품이 시판되고 있다. 대체로 굴껍질, 우유분, 유청 등에서 추출한 칼슘에 흡수촉진 보조제로서 CPP, 혹은 비타민D를 첨가한 제품이 대부분을 차지하고 있다. 본 과제가 성공적으로 이루어진다면, 값싼 대두를 원료로 인산화 기술을 도입함으로써 칼슘과 효과적으로 결합 할 수 있는 인산화 대두peptide SPP를 경제적으로 대량 생산할 수 있으며 칼슘의 체내 유입에 필수적인 CPP를 완벽히 대체할 수 있다. 인산화된 대두 가수 분해물로부터 분리 정제한 고순도 SPP에 칼슘을 결합시킨 고밀도 칼슘 제재를 생산할 경우, 질병 예방 및 건강보조의 단순 기능 외에 골다공증, 골연화증, 구루병 등의 특정 질환 회복을 목적으로 하는 특정 질환 영양제로서의 활용도 기대해 볼 수 있다. 대두 유래의 peptide형 칼슘 제재를 생산하여 값싸게 공급하게 된다면 골다공증, 퇴행성관절염 등, 대표적 칼슘 부족 노인성 질환의 예방과 치료에 큰 기여를 할 수 있으며 더 나아가 대두 소비를 촉진시킴으로써 국내 농가에서 재배되는 두류를 가공하여 고부가가치의 제품으로 판매할 수 있는 새로운 수요를 제공하게 된다.

칼슘-SPP 복합체의 생산을 위한 주원료인 무기 칼슘과 대두 peptide는 천연 칼슘 원료와 대두로부터 경제적으로 확보 생산할 수 있다. 따라서 대두 단백질에 대한 효과적인 인산화 방법과 SPP의 효율적 결합 및 흡수력증진 방법을

확보하여 보다 scale-up 단계에서 경제성 있는 천연 칼슘 제재를 생산할 조건을 확립하여야 한다고 본다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

미국과 일본 등에서는 대두 단백질과 칼슘에 관련된 연구가 이미 오래 전부터 진행되어 왔다. 선행된 연구로는 대두 단백을 이용한 연구와 인산화, 칼슘 결합 등 본 과제와 유사

한 기술의 개발이 꾸준히 이어져 왔다. 이 장에서는 국내외 기술개발 현황을 제시하고 우리의 기술과 비교하여 서술하도록 한다.

1. Method for treating aqueous solution of soybean protein with enzymes

미국특허 4,687,739 (1987. 8. 18)

본 기술에서는 대두단백질을 효소로 가수분해하여 생성된 대두펩타이드를 인산화시킨 후 칼슘을 결합시키고 비결합의 잉여분 칼슘과 분리한 순수 가용성 칼슘 제제 원료가 최종 제품이다. 본 과제는 선행기술에서 칼슘 함량을 증진시킬 용도로 효소 처리한 대두단백질 혼합soup drink 완제품과는 전혀 구분된다.

2. Preparation of chemically phosphorylated soy proteins and the products therefrom

미국특허 4,322,344 (1982. 3. 30)

선행기술에서는 변성 대두단백질을 인산화 반응의 기질로 사용하여 인산화 단백질의 생산법을 다루었다. 본 기술에서는 대두단백질이 인산염으로 직접 인산화되는 공정도 포함하나, 그 보다는 효소가수분해물인 대두펩타이드가 좀더 효율적으로 인산화되는 새로운 방법을 제시하였다.

3. 인산화대두단백

일본공개특허 소59-120056 (1984. 7. 11)

본 기술에서는 다른 종류의 인산염을 쓰기도 하였지만, 그 자체보다는 대두단백질을 직접 인산화하는 것에 비하여 효소가수분해물인 대두펩타이드가 좀더 효율적으로 인산화되는 새로운 방법을 제시하였다. 또한 그러한 인산화 대두펩

타이드를 칼슘과 결합시키는 것에 응용한 것이 특징이다.

4. 인산화단백질화합물, 인산화단백질-인산칼슘복합물 및 이를 사용한 칼슘 강화제

일본공개특허 평05-239100 (1993. 9. 17)

선행기술에서 사용한 대두단백질보다 본 기술에서는 분리대두단백질의 효소가 수분해물인 대두펩타이드를 인산화 및 칼슘 결합 반응 후, 잉여분의 인산염, 칼슘 및 인산칼슘침전물 각각을 제거, 정제하여 복합물이 아닌 순도 높은 수용성 칼슘 결합 대두펩타이드 제재 생산법을 제시하였다.

5. 두유단백질고분자화분 또는 두유펩타이드를 포함한 칼슘 흡수 촉진 조성물
일본공개특허 평7-075525 (1995. 3. 20)

선행 기술에서는 두유에 함유되어 있는 단백질 및 일부 펩타이드에 칼슘을 첨가하여 칼슘 흡수를 증진시키는 혼합액에 대한 것에 대비, 본 기술에서는 인산화 대두펩타이드-칼슘 제재 원료의 분리제조기술에 대한 것이다.

6. Process for the production of a mineral fortified protein composition
미국특허 4,642,238 (1987. 2. 10)

본 기술에서는 인산화 대두펩타이드-칼슘 제재 원료의 분리제조기술에 대한 것이며, 선행기술의 칼슘 보강 가공식품제조법에 대한 것과 구분된다.

7. 미네랄흡수촉진효과를 가진 대두단백질의 제조법

일본공개특허 평7-227215 (1995. 8. 29)

선행기술에서는 대두단백질에 칼슘염을 첨가 결합시킨 후 전기투석을 통한 미네랄 흡수 증진 대두단백질의 생산에 대한 것이지만 본 기술에서는 대두단백질 및 그 효소가수분해물인 대두펩타이드를 인산화시킨 후 칼슘을 결합시키고 비투석법으로 비결합의 잉여분 칼슘과 분리한 순수 가용성 칼슘 제재 원료품에 대한 기술이다.

제 7 장 참고문헌

1. **Linder, M. C.** (1991) Nutritional biochemistry and metabolism with clinical application (2nd edition). *Elsevier*. 202-214.
2. **Bronner, F.** (1998) Calcium absorption - a paradigm for mineral absorption. *J. Nutr.* **128**:917-920
3. **Mykkanen, H. M. and Wassenrman, R. H.** (1980) Enhanced absorption of calcium by casein phosphopeptides in rachitic and normal chicks. *J. Nutr.* **110**:2141-2148.
4. **Lee, Y. S., Noguchi, T. and Naito, H.** (1983) Intestinal absorption of calcium in rats given diets containing casein or amino acid mixture : the role of casein phosphopeptides. *Br. J. Nutr.* **49**:67-76
5. **Manson, W. and Annan, W. D.** (1971) The structure of a phosphopeptide derived from β -casein. *Arch. Biochem. Biophys.* **145**:16-26.
6. **Reeves. R. E. and Latour, N. G.** (1958) Calcium phosphate sequestering phosphopeptide from casein. *Science.* **128**:472.
7. **Fukazawa, C., Udaka, K., Murayama, A., Higuchi, W. and Totsuka, A.** (1987) Expression of soybean glycinin subunit precursor cDNA in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **224**:125-127.
8. **Kwon, T. W. and Song, Y. S.** (1996) Health functions of soybean foods. Proceeding of IUFOST '96 regional symposium on non-nutritive health

factors for future foods. 118-13

9. Han, Y. J., Lee, H. J., and Son, D. H. (1993) Effect of surface hydrophobicity of soybean peptides on the concentration of serum cholesterol and fecal steroid excretion in rats. *Korean J. Food Sci. Technol.* 25:571-575.
10. Lee, H. J. (1996) Health functional peptides from foods. Proceedings of IUFOST '96 regional symposium on non-nutritive health factors for future foods. 192-200.
11. Murphy, P. A. and Resurreccion, A. P. (1984) Varietal and environmental difference in soybean glycinin and β -conglycinin content. *J. Agric. Food Chem.* 32:911-915
12. Tsutomu, S., Mitsutaka, K., Kazunobu, T., Wataru, K., and Makoto, K. (2001) Novel method using phytase for separating soybean β -conglycinin and glycinin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65(4), 884-887
13. Staswick, P. A., Hermondson, M. A. and Nielsen, N. C. (1981) Identification of the acidic and basic subunit complexes of glycinin. *J. Biol. Chem.* 256:8752-8755.
14. Staswick, P. A., Hermondson, M. A. and Nielsen, N. C. (1984) The amino acid sequence of the A₂B_{1a} subunit of glycinin. *J. Biol. Chem.* 259:13424-13430.
15. Barton, K. A., Thompson, J. F., Madison, J. T., Rosenthal, R.,

- Jarvis, N. P. and Beachy, R. N. (1982) The biosynthesis and processing of high molecular weight precursors of soybean glycinin subunits. *J. Biol. Chem.* 257:6089-6095
16. Kim, C. S., Kamiya, S., Kanamori, J., Utsumi, S. and Kito, M. (1990) High-level expression, purification and functional properties of soybean proglycinin from *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.* 54:1543-1550.
17. Nielsen, N. C., Dickson, C. D., Cho, T. J., Thanh, V. H., Scallon, B. J., Fischer, R. L., Sims, T. S., Drews, G. N. and Goldberg, R. B. (1989) Characterization of the glycinin gene family in soybean. *Plant Cell.* 1:313-328.
18. Fukazawa, C., Udaka, K., Murayama, A., Higuchi, W. and Totsuka, A. (1987) Expression of soybean glycinin subunit precursor cDNA in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 224:125-127.
19. Utsumi, S., Kim, C. S., Sato, T. and Kito, M. (1988) Signal sequence of preproglycinin affects production of the expressed protein in *Escherichia coli*. *Gene.* 71:349-358.
20. Manson, W. and Annan, W. D. (1971) The structure of a phosphopeptide derived from β -casein. *Arch. Biochem. Biophys.* 145:16-26.

21. **Sato, R., Noguchi, T. and Hiroshi, N.** (1983) The necessity for the phosphate portion of casein molecules to enhance Ca absorption from the small intestine. *Agri. Biol. Chem.* **47**:2415-2417.
22. **Bingham, E. W., Parris, N. and Farrell, H. M. Jr.** (1988) Phosphorylation of β -casein and α -lactalbumin by casein kinase from lactating bovine mammary gland. *J. Dairy. Sci.* **71**:324-336
23. **Matheis, G. and Whitaker, J. R.** (1984) Chemical phosphorylation of food proteins : an overview and a prospectus. *J. Agric. Food Chem.* **32**:699-705
24. **Sung, H. Y., Chen, H. J., Liu, T. Y. and Su, J. C.** (1983) Improvement of the functionalities of soy protein isolate through chemical phosphorylation. *J. Food Sci.* **48**:716-721.
25. **Kim, N. S., Kwon, D. Y. and Nam, Y. J.** (1988) Effects of phosphorylation and acetylation on functional properties and structure of soy protein. *Korean J. Food Sci. Technol.* **20**:625-630.
26. **Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. and Belfrage, G.** (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation.

Nature. **258**:598-599.

27. **Muszynska, G., Andersson, L. and Porath, J.** (1986) Selective adsorption of phosphoproteins on gel-immobilized ferric chelate. *Biochemistry*. **25**:6850-6853.

28. **Andersson, L. and Porath, J.** (1986) Isolation of phosphoproteins by immobilized metal(Fe^{3+}) affinity chromatography. *Anal. Biochem.* **154**:250-254.

29. **Al-mashiki, S. A. and Nakai, S.** (1988) Separation of immunoglobulin and transferrin from blood serum and plasma by metal chelate interaction chromatography. *J. Dairy. Sci.* **71**:1756-1763.

30. **Scanff, P., Yvon, M. and Pelissier, J. P.** (1991) Immobilized Fe^{3+} affinity chromatographic isolation of phosphopeptides. *J. Chromatography*. **539**:425-432.

31. **Kroll, R. D.** (1984) Effect of pH on the binding of calcium ions by soybean proteins. *Cereal chemistry* **61**(5):490-495

32. **Wallace, G. W. and Satterlee, L. D.** (1977) Calcium binding and its effect on the properties of several food protein sources. *J Food Sci.* **42**(2):473-478

33. **Pacheco, M. T. B., Francisco, C., and Valdemiro, C. S.** (1999) Study of calcium binding to different preparations of yeast protein by using an ion selective electrode. *Food Chem* **66**:249-25
34. **Bronner, F.** (1998) Calcium absorption - a paradigm for mineral absorption. *J. Nutr.* **128**:917-920
35. **Reeves, R. E. and Latour, N. G.** (1958) Calcium phosphate sequestering phosphopeptide from casein. *Science.* **128**:472.
36. **Kennefick, S. and Cashman, K. D.** (2000) Inhibitory effect of fiber extract on calcium absorption in Caco-2 cells: evidence for a role of associated phytate rather than fiber per se. *Eur. J. Nutr.* **39**(1): 12-17
37. **Monica, J., Reyes, B., Rosaura, F., and Esperanza, M. A.** (2001) Calcium, iron, and zinc uptake from digest of infant formulas by Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 3480-3485
38. **Surendran, N., Nguyen, L. D., Giuliano, A. R., and Blanchard, J.** (1995) Enhancement of calcium transport in the Caco-2 cell monolayer model. *J. Pharm. Sci.* **84**(4):410-414

39. **Chin, D. and Anthony, R. M.** (2000) Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *trends in Cell Biol.* **10**:322-32
40. **Bryan, M., Donald D. F. L., Yoo, J. F., and Valivel, G.** (1996) Mechanisms of the human intestinal H-coupled oligopeptide transporter hPEPT1. *J. Boil. Chem* **271**(10):5430-5437
41. **Sonja, L. T., Davide, F., Roland, W., and Emanuel, E. S.** (1998) Characterization of the human CALM2 calmodulin gene and comparison of the transcriptional activity of CALM1, CALM2 and CALM3. *Cell Calcium* **23**(5):323-338
42. **Bryan, M., Donald D. F. L., Yoo, J. F., and Valivel, G.** (1996) Mechanisms of the human intestinal H-coupled oligopeptide transporter hPEPT1. *J. Boil. Chem* **271**(10):5430-5437
43. **Carsten, U. N., Rikke, A., Birger, B., Sven, F., Mitchell, E. T., Bente, S.** (2001) Dipeptide model prodrugs for the intestinal oligopeptide transporter. Affinity for and transport via hPEPT1 in the human intestinal Caco-2 cell line. *J. Controlled Release* **76**:129-13
44. **Rong, L., You, J. F., and Putter, D. P.** (1995) Human intestinal H/peptide cotransporter. *J. Boil. Chem.* **270**(12):6456-646

45. Momma, T., Negoro, T., Hirano, H., Matsumoto, A., Udaka, K. and Fukazawa, C. (1985) Glycinin A₅A₄B₃ mRNA : cDNA cloning and nucleotide sequencing of a splitting storage protein subunit of soybean. J. Biochem. **149**:491-496.
46. Utsumi, S., Kohno, M., Mori, T. and Kito, M. (1987) An alternate cDNA encoding glycinin A_{1a}B_x subunit. J. Agric. Food Chem. **35**:210-214.