

콜라겐펩티드-동착화합물의 안정성에 대한 연구

편정민, 김성곤

세포밖단백질인 콜라겐을 부분물작용분해하여 얻은 콜라겐펩티드는 콜라겐단백질보다 잘 흡수되며 항산화활성과 같은 유익한 생물활성을 가지[1, 12]는것으로 하여 건강식품 및 화장품의 첨가제로 널리 리용하고있다.

Cu^{2+} 은 필수미량원소로서 셀룰로플라즈민, 수퍼옥시디스무타제, 리질옥시다제, 티로시나제 등 여러가지 산화환원효소들의 도움인자로 들어있다. 몸안에 Cu^{2+} 이 부족하면 철의 대사가 장애되어 Cu^{2+} 결핍성빈혈이 오게 된다. 또한 항산화능력이 떨어지고 콜라겐 및 엘라스틴합성이 지장받으며 머리칼이 희여지고 피부에 흰 얼룩이 생기는 등 여러가지 장애가 나타나게 된다.[2, 3]

류산동과 같은 무기염을 리용하여 Cu^{2+} 결핍성장애를 해소할수 있지만 무기 Cu^{2+} 이 체내에 축적되면 히드록실라디칼이 생겨나 독성이 나타난다.[6, 7, 11]

동을 유기화하면 동의 독성을 낮출수 있다는데로부터 아미노산-동착화합물, 펩티드-동착화합물과 같은 유기동착화합물을 식료품, 먹이 및 화장품첨가제로 리용하기 위한 연구들[9, 10]이 널리 진행되였다. 그러나 콜라겐펩티드-동착화합물을 제조하여 Cu^{2+} 원천으로 리용하기 위한 연구는 진행된것이 없다.

우리는 콜라겐펩티드-동착화합물을 Cu^{2+} 원천으로 리용하기 위한 기초연구로서 콜라겐펩티드-동착화합물의 안정성을 검토하였다.

재료와 방법

실험에 리용한 콜라겐펩티드-동착화합물은 탈지한 돼지가죽에 5배량의 0.8mol/L HCl용액을 첨가하고 환류냉각시키면서 3h동안 가열분해한 다음 강염기성음이온교환수지《Ambelite IRA-400》으로 중화하여 얻은 콜라겐펩티드(평균펩티드길이 4.7)와 Cu^{2+} 을 반응시켜 제조[8]하였다. 요드환원적정법으로 결정한 콜라겐펩티드-동착화합물중 Cu^{2+} 농도는 0.01mol/L, 자외선분광광도법[4]으로 결정한 콜라겐펩티드의 농도는 4.0%(40.4mg/mL)였다.

기구로는 자외가시선분광광도계(《BECKMAN COULTER DU[®] 730》)를 리용하였다.

시약으로는 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (분석순), 0.1mol/L HCl과 0.1mol/L NaOH를 리용하였다.

콜라겐펩티드-동착화합물의 안정상수(착화합물형성반응의 화학평형상수)는 Cu^{2+} 농도를 일정하게 하고 콜라겐펩티드의 농도를 변화시키면서 착화합물을 형성시키고 흡수극대파장에서의 흡광도를 측정하는 평형이동법으로 결정하였다.

콜라겐펩티드-동착화합물용액을 10~100°C에서 20min동안 처리하거나 pH를 각이하게 맞추고 하루동안 방치한 다음 흡수극대파장 647nm에서의 흡광도를 측정하고 처리하기 전과 비교하여 콜라겐펩티드-동착화합물의 열안정성과 pH안정성을 평가하였다.

콜라겐펩티드-동착화합물을 4°C에서 보관하면서 일정한 시간간격으로 647nm에서의 흡광도를 측정하고 첫 흡광도값과 비교하여 콜라겐펩티드-동착화합물의 보관안정성을 평가하였다.

결과 및 논의

1) 콜라겐펩티드-동착화합물의 안정상수결정

0.1mol/L의 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 용액 0.2mL에 콜라겐펩티드용액을 각이한 체적으로 첨가하고 증류수로 총체적을 5mL로 맞춘 다음 10°C에서 30min동안 반응시켜 콜라겐펩티드-동착화합물을 제조하고 흡수스펙트르를 측정하였다. 콜라겐펩티드첨가량에 따르는 흡수스펙트르변화는 그림 1과 같다.

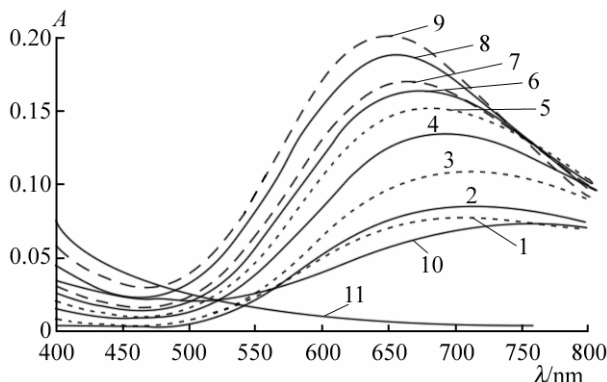


그림 1. 콜라겐펩티드첨가량에 따르는 흡수스펙트르변화

1-9는 콜라겐펩티드첨가량이 각각 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.5, 4.5mL인 경우, 10-CuSO₄, 11-콜라겐펩티드

그림 1에서 보는바와 같이 CuSO_4 (흡수극대파장 751nm)에 콜라겐펩티드를 첨가할 때 새로운 흡수극대가 생겨났으며 첨가하는 콜라겐펩티드량이 많아질수록 흡수극대가 짧은 파장쪽으로 약간씩 이동하고 흡광도가 커졌다. 이것은 Cu^{2+} 과 콜라겐펩티드가 반응하여 콜라겐펩티드-동착화합물이 형성되었다[8]는것을 보여준다. 콜라겐펩티드첨가량에 따라 647nm(9번 시험구의 흡수극대파장)에서 CuSO_4 구와의 흡광도차 ΔA_{647} 변화를 보면 그림 2와 같다.

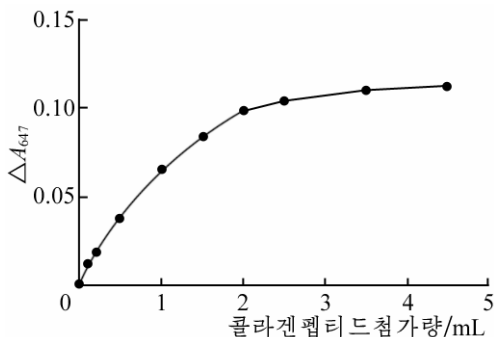
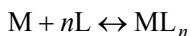


그림 2. 콜라겐펩티드첨가량에 따르는 ΔA_{647} 변화

그림 2에서 보는바와 같이 콜라겐펩티드첨가량이 증가함에 따라 흡광도차가 거의 선형적으로 증가하다가 첨가량 2mL이상에서부터는 거의나 증가하지 않았다. 이것은 0.1mol/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 와 콜라겐펩티드용액(40.4mg/mL, 평균펩티드길이 4.7, 평균분자량 535)을 1 : 10의 체적비(Cu^{2+} 과 콜라겐펩티드의 물질량비 1 : 7.5, 질량비 1 : 63.6)로 반응시킬 때 거의 모든 Cu^{2+} 이 콜라겐펩티드와 착화합물을 형성한다는것을 보여준다.

위의 실험자료로부터 콜라겐펩티드-동착화합물의 안정상수를 구하였다.



$$\frac{[\text{ML}_n]}{[\text{M}] \cdot [\text{L}]^n} = \beta \quad (1)$$

$$\frac{[ML_n]}{[M]} = \frac{A}{A_{\max} - A} \quad (2)$$

여기서 A_{\max} 는 제일 큰 흡광도, A 는 임의의 흡광도이다.

식 (1)을 고려하면

$$\frac{A}{A_{\max} - A} \cdot \frac{1}{[L]^n} = \beta$$

$$\lg \frac{A}{A_{\max} - A} = n \lg [L] + \lg \beta$$

이로부터 착화합물의 조성과 안정상수를 구하기 위한 그래프를 그리면 그림 3과 같다.

그림 3에서 보는바와 같이 1개의 Cu^{2+} 에 평균 1.4개의 콜라겐펩티드가 배위결합되어 착화합물이 형성된다. 그리고 착화합물의 안정상수는 $10^{2.66} \approx 4.6 \times 10^2$ 으로서 반응의 평형은 착화합물이 형성되는 쪽으로 기울어져 있다.

착화합물형성반응의 표준기브즈에네르기는 $\Delta G'_0 = -RT \ln K \approx -14 \text{ kJ/mol}$ 로서 열역학적으로 정반응이 유리한 반응이다.

그림 2의 그래프모양과 안정상수로부터 콜라겐펩티드-동착화합물이 비교적 안정한 착화합물이라는 것을 알 수 있다.

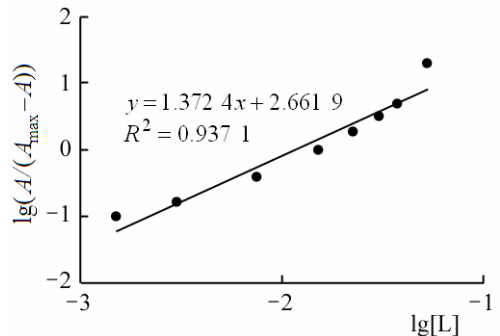


그림 3. 착화합물의 조성과 안정상수를 구하기 위한 그래프

2) 콜라겐펩티드-동착화합물의 열안정성

콜라겐펩티드-동착화합물을 각이한 온도($10 \sim 100^\circ\text{C}$)에서 20min동안 처리하고 흡수극 대파장 647nm에서 흡광도를 측정하였다. 온도에 따르는 콜라겐펩티드-동착화합물의 흡광도는 그림 4와 같다.

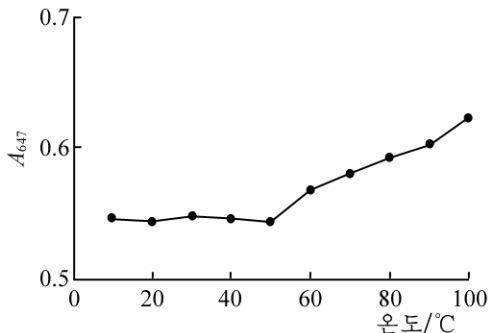


그림 4. 온도에 따르는 콜라겐펩티드-동착화합물의 흡광도

그림 4에서 보는바와 같이 50°C 까지는 흡광도에서 변화가 없다가 60°C 에서부터는 흡광도가 점점 높아졌으며 용액은 약간 뿌옇게 되었다. 60°C 이상의 높은 온도에서 흡광도가 증가한데 대하여 콜라겐펩티드-동착화합물형성반응의 평형이 정반응쪽으로 기울어져 착화합물이 더 형성되었다고는 보기 힘들다. 오히려 착화합물형성반응의 표준기브즈에네르기가 부의 값인것으로 하여 열을 주면 반응의 평형은 열을 흡수하는 방향 즉 착화합물이 해리되는 방향으로 옮겨지게 된다. 용액이 약간 뿌옇게 된 관찰결과와 열을 주면 반응의 평형이 착화합물의 해리방향으로 이동한다는것, 아미노산이나 펩티드와 동의 착화합물형성반응에서 온도가 높아지면 $Cu(OH)_2$ 의 생성량이 많아진다[8]는것을 고려하면 온도가 높아질 때 흡광도가 높아지는것은 용액속에 미세한 $Cu(OH)_2$ 이 생긴 결과라고 볼 수 있다. 이로부터 콜라겐펩티드-동착화합물이 50°C 까지는 안정하지만 그 이상의 온도에서는 안정성이 떨어진다는 것을 알 수 있다. 따라서 콜라겐펩티드-동착화합물은 50°C 이하의 온도에서 보관하는 것이 좋다고 볼 수 있다.

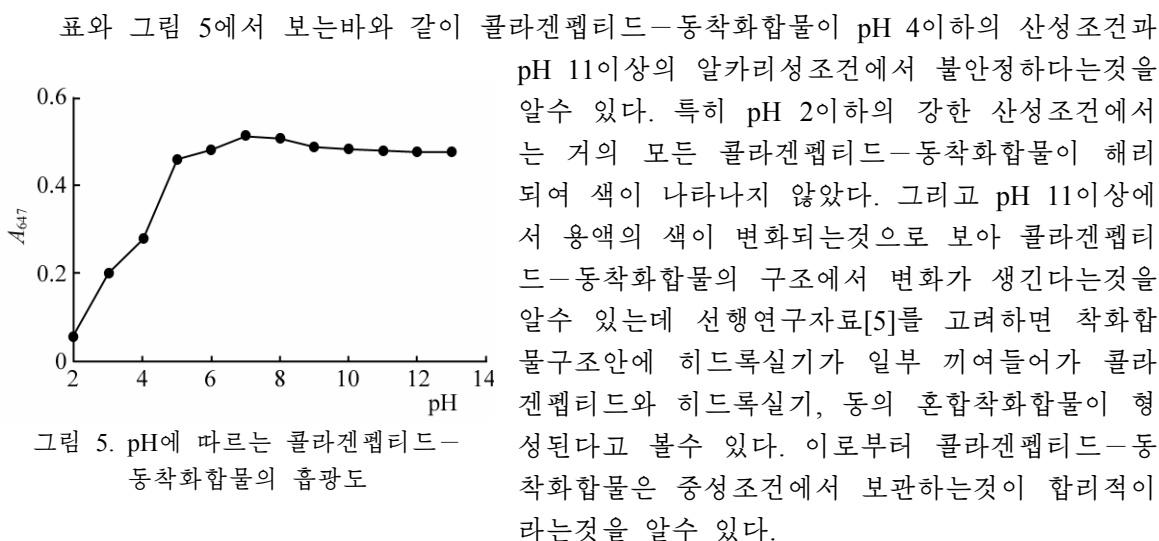
액이 약간 뿌옇게 된 관찰결과와 열을 주면 반응의 평형이 착화합물의 해리방향으로 이동한다는것, 아미노산이나 펩티드와 동의 착화합물형성반응에서 온도가 높아지면 $Cu(OH)_2$ 의 생성량이 많아진다[8]는것을 고려하면 온도가 높아질 때 흡광도가 높아지는것은 용액속에 미세한 $Cu(OH)_2$ 이 생긴 결과라고 볼 수 있다. 이로부터 콜라겐펩티드-동착화합물이 50°C 까지는 안정하지만 그 이상의 온도에서는 안정성이 떨어진다는 것을 알 수 있다. 따라서 콜라겐펩티드-동착화합물은 50°C 이하의 온도에서 보관하는 것이 좋다고 볼 수 있다.

3) 콜라겐펩티드-동착화합물의 pH안정성

콜라겐펩티드-동착화합물용액 4mL에 0.1mol/L의 HCl 혹은 NaOH를 첨가하여 pH를 각이하게(2~13) 맞추고 증류수로 총체적을 5mL로 맞추는 다음 하루동안 방치하고 색변화와 흡광도를 측정하였다. pH에 따르는 콜라겐펩티드-동착화합물의 색변화를 표에 주고 pH에 따르는 콜라겐펩티드-동착화합물의 흡광도를 그림 5에 보여주었다.

표. pH에 따르는 콜라겐펩티드-동착화합물의 색변화

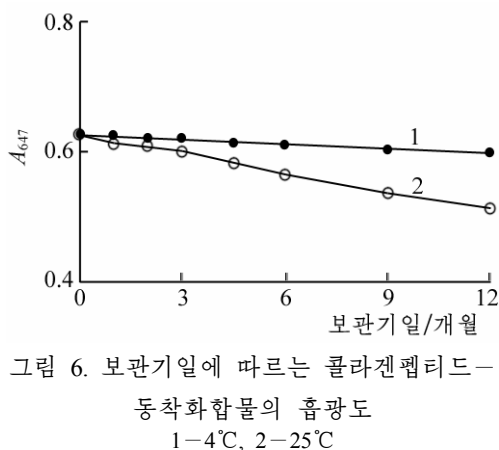
pH	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
색	무색	연청색	연청색	청색	청색	청색	청색	청색	청색	청자색	청자색	청자색



4) 콜라겐펩티드-동착화합물의 보관안정성

콜라겐펩티드-동착화합물을 4 및 25°C의 온도, pH 7에서 보관하면서 보관기일에 따르는 흡수극대파장(647nm)에서의 흡광도를 측정하였다.(그림 6)

그림 6의 그래프 1에서 보는바와 같이 4°C에서 1년이 지나도록 흡광도변화가 거의 없었다. 이로부터 콜라겐펩티드-동착화합물을 4°C에서 1년동안 안전하게 보관할수 있다는것을 알수 있다. 그러나 그래프 2에서 보는바와 같이 25°C에서는 3개월까지는 흡광도변화가 얼마 없었지만 그 이후에는 변화가 컸다. 이로부터 25°C에서는 콜라겐펩티드-동착화합물을 3개월동안만 안전하게 보관할수 있다는것을 알수 있다. 이로부터 콜라겐펩티드-동착화합물을 4°C에서 보관하는것이 합리적이라고 보았다.



총적으로 콜라겐펩티드-동착화합물이 아주 안정한것은 Cu²⁺의 착화합물형성능력이 매우 높기때문이며 또한 콜라겐펩티드의 평균길이가 4.7이므로 Cu²⁺을 둘러싸면서 Cu²⁺과 견고한 착화합물을 형성하기때문이라고 볼수 있다.

맺 는 말

콜라겐 펩티드-동착화합물 형성 반응의 화학평형상수 즉 안정상수는 4.6×10^2 으로서 착화합물 형성 반응은 열역학적으로 유리한 반응이다.

콜라겐 펩티드-동착화합물은 50°C 이하 및 중성 pH에서 안정하며 4°C 및 pH 7에서 1년, 25°C 및 pH 7에서 3개월 보관하여도 변화되지 않는다.

참 고 문 헌

- [1] 김일성 종합대학학보(자연과학), 63, 6, 133, 주체 106(2017).
- [2] A. C. Rinaldi; Biometals, 13, 9, 2000.
- [3] A. Pihlanto; International Dairy Journal, 16, 1306, 2006.
- [4] B. M. Dunn et al.; Peptide Analysis Protocols, Humana Press, 30~52, 1994.
- [5] E. Lodyga-Chruscinska et al.; Polyhedron, 20, 1915, 2001.
- [6] Fumiko Hayakawa et al.; Biosci. Biotechnol. Biochem., 68, 9, 1825, 2004.
- [7] Kazuo Nakagawa et al.; Journal of Health Science, 53, 5, 591, 2007.
- [8] Laura Habasescu et al.; Rev. Roum. Chim., 58, 6, 501, 2013.
- [9] Lijuan Zhang et al.; Clinics in Dermatology, 27, 485, 2009.
- [10] Loren Pickart et al.; Journal of Aging Research and Clinical Practice, 1, 1, 13, 2012.
- [11] Yong-Liang Zhuang et al.; Food Technol. Biotechnol., 48, 2, 222, 2010.
- [12] Yuki Uzawa et al.; Health, 3, 3, 129, 2011.

주체 106(2017)년 10월 5일 원고접수

Stability of Collagen Peptide-Copper Complex

Phyon Jong Min, Kim Song Gon

Stability constant of collagen peptide-copper complex is 4.6×10^2 , which indicates that the complex forming reaction is thermodynamically favorable.

Collagen peptide-copper complex is stable at neutral pH range and below 50°C . The complex almost doesn't change for 1 year at 4°C and pH 7, and for 3 months at 25°C and pH 7.

Key words: collagen peptide-copper complex, stability