

韓國在來山羊乳成分에 關한 研究

V. k-Casein의 性狀(2)

李 賢 鍾

Studies on Korean Native Goats Milk

V. Properties of k-Casein(2)

Hyun-jong Lee

Summary

Pure κ -casein of Korean native goat was obtained by DEAE-and CM-cellulose chromatography in buffers containing urea and 2-mercap to ethanol. The amino acid composition was determined and is very similar to those of goat and bovine κ -casein.

The heterogeneity of k-casein was investigated. κ -casein preparation was prepared from milk from Korean native goat by the modified urea-sulfuric acid method. κ -casein preparation was fractionated by diethylaminoethyl-cellulose chromatography to one fraction, p-1, eluted with the front and 6 fractions, p-2 to p-7, eluted with increasing salt concentration.

Fractions p-2 to p-7 showed the different mobility in disc gel electrophoresis containing urea and sialic acid.

緒 言

牛乳 κ -Casein은 Hippel과 Waugh(1955, 1956)에 의해 α -Casein複合체로부터 分離된 所謂 Calcium非感受性 Casein으로 169個의 아미노酸殘基로 構成되어 있고(Schmidt等, 1976), 單量體의 分子量은 19,000이며, 分子當 1~2個밖에 磷酸殘基를 갖고있지 않으나(Vreeman 等, 1977) 2個의 Cysteine殘基와 約 5%의 炭水化物을 包含하고 있으며 Calcium存在下에서 各 Casein과 相互作用하여 Calcium感受性이 높은 α_{S1} -이나 β -Casein의 沈殿形成을 防止하는 保護 Colloid 性을 갖고 있고 Cymosin의 作用을 받는 唯一의 Casein으로 알려져 있다.

한편 Doi等(1978)은 牛乳k-casein의 不均一性에 關한 研究한 結果, Zittle等(1963)의 尿素-硫酸法

과 Yaguchi等(1967)의 Gel 濾過法에 依해 分離한 κ -Casein을 再次 DEAE-cellulose를 利用하여 分離하면 아미노酸造成은 같으나 電氣泳動易動度와 炭水化物含量이 다른 5個의 成分으로 나누어지며 이들 사이에 Calcium이온에 對한 κ -Casein의 安定化力에는 差異가 없다고 報告하였다.

牛乳 全 Casein으로부터 κ -Casein을 分離하는 方法으로는 Waugh等(1956)이 처음 κ -Casein의 存在를 報告한 以來 Calcium의 溶解度의 差異에 依해 分離하는 方法(Mckenzie等 1961), Casein의 尿素溶液에 12% TCA를 添加해서 分離하는 方法(Swaisgood等, 1962) 및 Hill(1963)의 塩化칼시움 添加에 依해 沈殿하는 粗 κ -Casein을 DEAE-cellulose Chromatography에 依해 精製하는 方法 등이 있고 또 最近 Casein의 尿素溶液을 Sephadex gel濾過에 依해 α S-Casein과 κ -Casein을 分離하는 方法(Yaguchi等, 1967)도 報告되고 있다.

그러나上記의 방법들은 Zittle等(1963)의 尿酸法에 비해 操作이 煩雜하고 一回에 大量의 處理가 困難하며 더욱이 超遠心分離等の 操作을 必要로 하는 反面, 收量이 적은 결점을 갖고 있다. 따라서 Zittle等の 方法이 κ -Casein의 分離에 가장 많이 利用되어 왔으나 中西等(1967)은 Zittle의 方法을 檢討하고, ethanol에 依한 精製가 이 方法으로 分離된 κ -Casein의 酸化 및 分解를 일으킨다고 지적하고 있다. 한편 Richardson等(1973)은 山羊乳 κ -Casein의 効果的인 分離方法으로서 DEAE-와 CM-cellulose를 併用한 獨特한 方法을 發表하였다.

本實驗은 前報(李, 1980)에서 Zittle의 尿酸法을 利用하여 κ -Casein을 分離한데 이어서 Richardson等の 方法에 依해 κ -Casein을 分離함으로써 効果的인 在來山羊乳 κ -Casein의 分離方法을 確立함과 同時에 κ -Casein의 不均一性을 究明코져 施行하였다.

材料 및 方法

原料乳의 採取 및 全casein의 調製

本實驗에 使用된 原料乳 및 全 casein은 前報(李, 1980)와 같은 方法으로 採取 및 調製하여 使用하였다.

κ -Casein의 分離

κ -Casein의 分離는 Richardson等(1973)의 方法을 利用하여 먼저 4.5M 尿酸과 0.1% 2-Mercaptoethanol을 包含하는 0.01M Imidazole-鹽酸緩衝液(pH7.0)으로 Whatman DE-52 cellulose를 洗滌해서 脫氣한後 2.5×35cm의 column에 充塡, 크로마토用緩衝液으로 安定化시켰다. 다음 在來山羊 Casein 1g을 同上的 緩衝液에 溶解後 一晝夜 透析하였으며 透析終了後 試料 80ml(1g casein)을 column에 吸着시키고 食鹽濃度 0.05~0.25M의 linear gradient로 크로마토를 실시하였다. 流速 40ml/h로 10ml씩 分取한 後, 液中的 蛋白質濃度를 280nm의 吸收에 依해 測定, 各 peak의 純度를 電氣泳動으로 確認한 結果 夾雜物이 認定되었으므로 再次 whatman CM-52를 利用, 크로마토를 실시하였다.

아미노酸 分析

全아미노酸(Tryptophan, Cystine 除外)은 試料 1mg을 精粹해서 6N-鹽酸 2ml와 ocylalcohol 1滴을 添加한 後 減壓, 脫氣封管하여 110°C±1°C 加水分解爐에서 22時間 加水分解後 日本電子 JLC-6AH를 使用하여 測定하였다.

Sialic acid 測定

前報(李, 1982)의 Warren(1959)法을 利用하여 測定하였다.

Polyacrylamide gel 電氣泳動

알카리性域(pH8.9)에서의 電氣泳動은 前報(李, 1982)와 같은 方法으로, 酸性域에서의 電氣泳動은 pH4.0에서 施行하였다.

結果 및 考察

1. κ -Casein의 分離

在來山羊乳 Casein을 0.01 M Imidazole-HCl 緩衝液(pH7.0)을 利用하여 室溫에서 DEAE-cellulose Chromatography를 實施하여 그 結果를 圖1에 나타냈다.

最初의 peak는 非吸着性의 Casein(Unadsorbed Material, UAM)이고 이어서 연속적으로 溶出되어 나온 3個의 peak를 얻었으며 溶出된 各 peak의 成分을 確認하기 위해 polyacrylamide gel 電氣泳動에 依해 分析한 結果는 圖2와 같다.

Peak I의 非吸着性物質은 Wake等(1961)과 El-Negoumy(1967)가 報告한 r-casein 區分이고 室溫에서 白濁하는 所謂 Ts-casein의 性質을 갖고 있는 것으로 생각되나 Peak II, III, IV는 각각 κ -, β -, 및 α s-Casein에 相當하며 電氣泳動結果(圖2), Peak II에 주로 κ -Casein이 나타났으나 電氣泳動上 κ -Casein以外의 Casein의 共存이 推定되어짐으로 얻어진 粗 κ -Casein을 再次 0.01M Sodium-formate 緩衝液을 利用하여 CM-cellulose chromatography를 實施하여 그 結果를 圖3에, 純度를 確認하기 위한 電氣泳動結果를 圖4에 나타냈다.

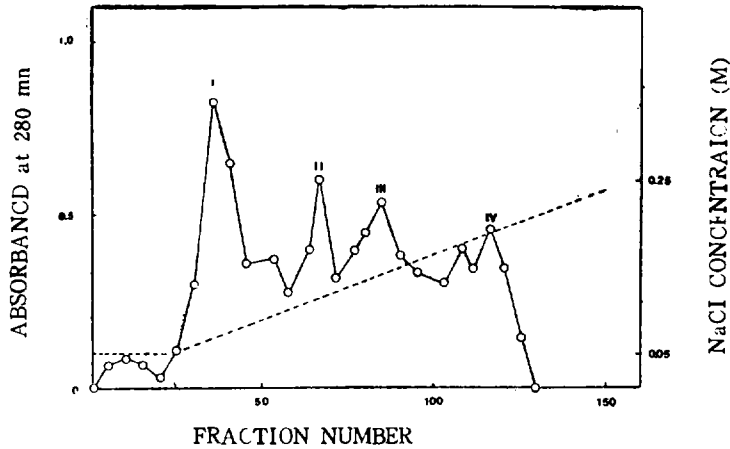


Fig 1. Chromatography of Korean native goat's whole casein (1g) on a DEAE-cellulose column (2.5×3.5cm) in 0.01 M imidazole-HCl buffer, pH 7.0, containing 4.5 M urea and 2-mercaptoethanol (0.1%, v/v). The casein was eluted using a 1-1 linear gradient from 0.05 to 0.25 M NaCl at a flow rate of 40 ml/h.

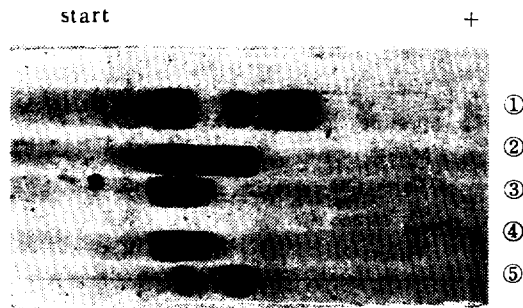


Fig 2. Alkaline gel-electrophoretic pattern of caseins.

- ① Bovine whole casein.
- ② Korean native goat's casein.
- ③ Korean native goat's k-rich casein (peak II)
- ④ " β- " (peak III)
- ⑤ " α- " (peak IV)

圖3과 4에 나타낸바와 같이 Chromatography에서 단 1個의 Peak가 나타났고, 또한 電氣泳動의으로 순수함이 立證되었다. 一般山羊乳의 경우 알카리性域에서의 電氣泳動에서는 β-와 κ-Casein의 易動도가 거의 같아서 區別하기 어려우나 Richardson等(1973)은 酸性域에서 電氣泳動을 實施하여 兩者의 差異를

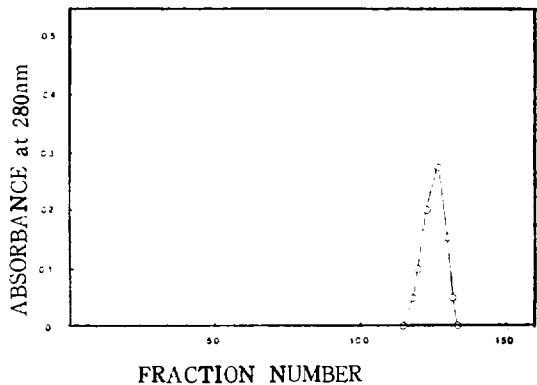


Fig 3. Chromatography of Korean native goats' crude κ-casein on a CM-Cellulose column (2.5×35 cm) using a linear gradient from 0-0.12 M NaCl at a flow rate of 40 ml/h.

분명히 하고 있다. 在來山羊乳의 경우에 있어서도 圖5에 나타낸 바와 같이 β-와 κ-Casein의 易動도를 區別하기 어려움으로 酸性域(pH4.0)의 電氣泳動을 實施, 그 結果는 圖6과 같다. 圖6에 β-와 κ-casein의 易動도의 차이가 確實히 나타났다. 以上の 結果, 在

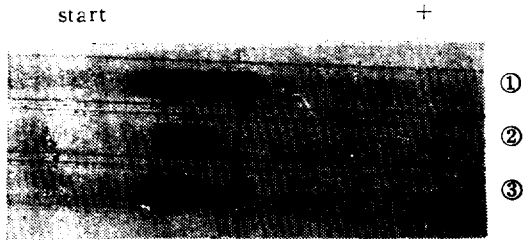


Fig 4. Alkaline gel-electrophoretic pattern of caseins.

- ① korean native goat's whole casein
- ② " " k-rich casein
- ③ " " purified k-casein

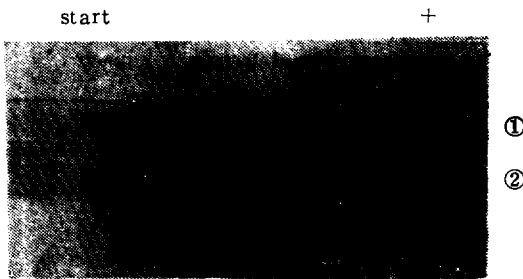


Fig 5. Alkaline gel-electrophoretic pattern of caseins.

- ① Korean native goat's β -casein.
- ② " " k-casein.

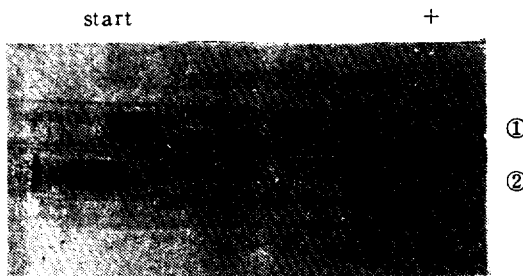


Fig 6. Acid gel electrophoresis (pH 4.0) of Kcrean native goat's β -casein ① and k-casein ②.

來山羊乳 κ -casein의 分離精製法으로 Richardson의 方法이 適用可能함이 確認되었다.

다음 表 1은 在來山羊乳 κ -casein의 아미노酸 分析 結果이다. 牛乳 및 山羊乳와 比較하여 거의 同一한 組成을 보여주고 있다.

Table 1. Amino acid composition of Korean native goat's k-casein(g/100g)

Amino acid	Korean native goat
Alanine	3.4
Arginine	3.2
Aspartic acid	6.4
Glycine	1.0
Glutamic acid	18.7
Histidine	2.9
Isoleucine	4.7
Leucine	7.3
Lysine	5.7
Methionine	1.8
phenylalanine	4.1
proline	12.5
serine	5.1
Threonine	5.8
Tyrosine	3.7
Valine	6.5

2. κ -Casein의 不均一性

在來山羊乳 κ -Casein의 不均一性을 究明하기 위해 Zittle等(1963)의 方法으로 分離한 在來山羊乳 κ -Casein을 再次 3M 尿素를 包含하는 0.05M Imidazole-一鹽酸緩衝液을 利用하여 DEAE-cellulose chromatography를 實施, 그 結果를 圖7에 나타냈다. 圖7에서 7個의 畫分이 나타났으나 그 가운데 B~G까지 6個의 畫分이 電氣泳動分析結果 κ -Casein으로 確認되었다. 얻어진 各畫分 사이에 어떠한 相異點이 있는지를 究明하기 위해 各畫分의 電氣泳動과 Sialic acid含量을 測定하여 그 結果를 圖8 및 表2에 나타냈다.

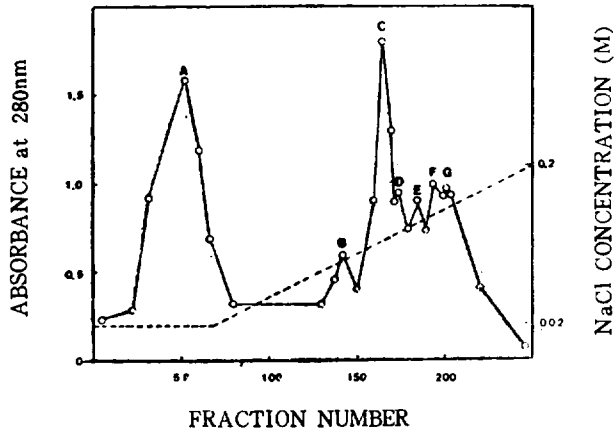


Fig 7. DEAE-cellulose chromatographic pattern of k-casein prepared by the modified urea-sulfuric acid method. 300 mg of k-casein were dissolved in 15ml of the starting buffer and reduced with 2-mercaptoethanol at 5°C for 24 h. Reduced k-casein was applied to a DEAE-cellulose column (2.5×24cm). Flow rate was maintained at 40 ml per hour. A tube contained 6 ml eluate.

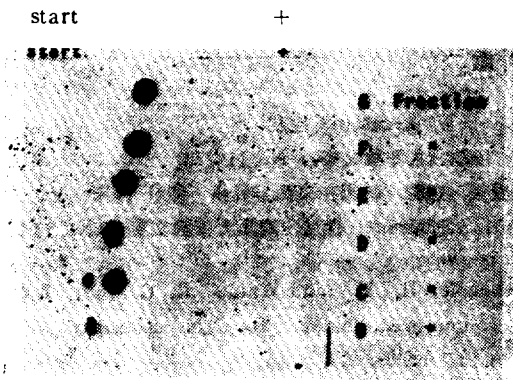


Fig 8. Disc gel-electrophoretic patterns of k-casein fractions from DEAE-cellulose chromatography of Fig. 7.

牛乳의 경우 DEAE-cellulose chromatography에서 5個의 畫分으로 分離되었으며 各畫分 Casein의 尿素 gel 電氣泳動結果, 各試料間에 易動度의 差異가 있고 各畫分의 sialic acid 含量은 食塩濃度가 높을수록 多量含有하고 있으나 아미노산 組成과 SDS電氣泳動 및 κ -casein이 갖는 安定化作用에는 전혀 差異가 없다고

Table 2. Sialic acid contents of Korean native goat and bovine's k-casein and its components($\mu\text{g}/\text{mg}$)

Components	Korean native goat	Bovine *
κ -casein	2.16	22.97
P-1 (B)	0.30	1.02
P-2 (C)	0.68	4.61
P-3 (D)	2.77	13.80
P-4 (E)	1.93	30.00
P-5 (F)	0.55	44.29
P-6 (G)	0.64	—

* : Doi et al. 1978.

보고 되고 있다(Doi等, 1978).

一般山羊乳의 경우에도 DEAE-cellulose chromatography에서 5個의 畫分으로 分離되었으며 各畫分의 아미노酸 組成에는 差異가 없었으나 Sialic acid를 包含하는 糖含量에 差異가 있고 溶離液中的 食塩濃度에 比例하여 sialic acid를 많이 含有하는 κ -Casein의 畫分이 溶出된다(Addeo等, 1978). 그러나 水牛乳의

경우 食塩濃度の 中間部分에서 sialic acid의 含量이 가장 많은 κ -Casein 畫分이 溶出된다고 報告하고 있다(Addeo等, 1978).

本實驗의 在來山羊乳 κ -Casein에서는 6個의 畫分으로 分離되어 牛乳 및 山羊乳보다 1個 많고 各畫分은 電氣泳動的으로 易動도에 差異가 나타났으나 各畫分の sialic acid含量은 牛乳 및 山羊乳와 달리 食塩濃度の 中間部分(0.12~0.14M)에서 가장 많고, 즉 水牛乳의 경우와 비슷한 傾向을 보여주고 있다. 以上の 結果로 在來山羊乳 κ -Casein은 6個의 sialic acid 含量이 다른 成分으로 構成되어 있음이 確認되었으나 今後 sialic acid 以外の 糖, 各畫分の 아미노酸 組成等の 보다 詳細한 研究가 必要하다고 생각된다.

摘 要

本實驗은 韓國在來山羊乳의 理化學的 諸性狀을 究明, 學問的으로 定立하기 위한 研究의 一環으로 在來

山羊乳 Casein으로부터 κ -Casein을 分離하여 이의 効果的인 分離, 精製方法을 確立함과 同時에 分離된 κ -Casein의 性質을 調査하여 牛乳 및 山羊乳의 경우나 比較할 目的으로 遂行하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

在來山羊乳 κ -Casein의 分離精製方法으로서 Richardson의 方法이 有効함을 確認하였으며 分離精製된 κ -Casein의 아미노酸含量을 測定한 結果 牛乳 및 山羊乳의 κ -Casein과 비슷한 傾向을 나타냈다. κ -Casein의 不均一性을 檢討하기 위해 分離精製한 κ -Casein을 DEAE-cellulose chromatography로 再次 分離한 結果 電氣泳動易動度 및 sialic acid含量에 差異가 있는 6個의 成分을 얻었으며 各成分의 sialic acid含量은 溶出食塩濃도에 比例하여 높은 牛乳나 山羊乳의 경우와 달리 0.12~0.14M 食塩濃度에서 溶出하는 畫分에 最高의 sialic acid含量이 認定되었다.

引 用 文 獻

- Addeo, F., S. Soulier, J. P. Pelissier, J. M. Chobert, J. C. Mercier and B. Ribadeau-Dumas. 1978. Preparation and fractionation of goat κ -casein: Analysis of the glycan and peptide components. J. Dairy Res., 45: 191.
- Doi, H., Ibuki, F. and M, Kanamori. 1978. Heterogeneity of reduced bovine κ -casein. J. Dairy Sci., 62: 195.
- El-negoumy, A. M. 1967. Polymorphism in γ -caseins from the milk of individual cows. Biochim. Biophys. Acta., 140: 503.
- Hill, R. D. 1963. The preparation of κ -casein. J. Dairy Res., 30: 101.
- Von Hippel, H. P. and F. D. Waugh. 1955. J. Am. Chem. Soc., 77: 4311.
- 李賢鍾. 1980. 韓國在來山羊乳에 關한 研究. (Ⅲ) κ -casein의 性狀. 濟州大學論文集., No. 11: 73.
- 李賢鍾. 1982. 韓國在來山羊乳에 關한 研究. V. α s-casein의 性狀. 濟州大學論文集., No. 14: 79.
- Mckenzie, H. A. and Wake, R. G. 1961. An improved method for the isolation of κ -casein. Biochim. Biophys. Acta, 47: 225.
- 中西武雄, 伊藤敬敏. 1969. 各種處理による牛乳カゼインの變化に關する研究(第9報). Zittleの尿素-硫酸法による κ -Caesin 一調製法と, 分離した κ -カゼインの 2, 3의 性質について. 月農化., 43: 866.
- Richardson, B. C., L. K. Creamer, and R. E. Munford. 1973. Comparative micelle structure. I. The isolation and chemical characterization of caprine κ -casein. Biochim. Biophys. Acta, 310: 111.

- Schmidt, D. G. and T. A. J. Payens. 1976. in Surface and colloid Science. Vol. 9. New York, Wiley and son.
- Swaisgood, H. E. and J. R. Bruner. 1962. Characterization of κ -casein obtained by fractionation with trichloroacetic acid in concentrated urea solution. J. Dairy Sci., 45:1.
- Vreeman, H. J., P. Both, J. A. Brinkhuis, and C. van der spek. 1977. Purification and some physicochemical properties of bovine κ -casein. Biochim. Biophys. Acta, 491:93.
- Wake, R. G. and Bladwin, R. L. 1961. Analysis of casein fractions by zone electrophoresis in concentrated urea. Biochim. Biophys. Acta, 47:225.
- Warren, L. 1959. Thiobarbituric acid assay of sialic acid. J. Biol. Chem., 234:1971.
- Waugh, D. F. and von Hippel, P. H. 1956. κ -casein and stabilization of casein micelles. J. Am. Chem. Soc., 78:4576.
- Yaguchi, M and N. P. Tarassuk. 1967. Gel filtration of acid casein and skim milk on Sephadex. J. Dairy Sci., 50:1985.
- Zittle, C. A. and Custer, J. H. 1963. Purification and some of the properties of α_s -casein and κ -casein. J. Dairy Sci., 46:1183.