

α_{S1} -I 케이스인과 他케이스인成分과의 相互作用

尹 彰 焄

Interaction of α_{S1} -I casein with other Casein Components

Yoon Chang-Hoon

Summary

Interactions of α_{S1} -I-casein with α_{S1} -, β - and χ -casein were investigated using ultracentrifugation. The results showed a single peak having a S_{30} value of 19.8 between α_{S1} -I and β -casein, and also a single peak having a S_{37} value of 11.7 between α_{S1} -I casein and χ -casein in the absence of calcium. It is suggested that the associating site of α_{S1} -I-casein for complex formation remains when α_{S1} -casein is converted to α_{S1} -I casein.

In addition, the effect of α_{S1} -I casein on the precipitation of α_{S1} -, β - and para χ -casein in the presence of calcium was studied. It was revealed that α_{S1} -I casein had a ability to stabilize these casein components in the presence of calcium at a certain degree.

序 論

케이스인마이셀 (casein micelle)의 構造는 케이스인마이셀을 構成하고있는 여러가지 成分間의 相互作用 結果로 維持된다고 말해지고 있다. 이들 成分間의 相互作用에 의한 마이셀 形成機構는 매우 複雜하지만, 素反應으로써 α_{S1} -, β -, k -케이스인 및 칼슘의 相互作用이 마이셀 形成에 있어서, 主役을 擔當한다고 생각되어지고 있다. 즉 α_{S1} - 및 β -케이스인은 칼슘의 存在下에서 重合沈殿하는 性質을 가지나, k -케이스인은 칼슘에 의해 沈殿하지 않고, 칼슘의 共存下에서 α_{S1} - 및 β -casein을 마이셀狀으로 安定化시키는 能

力을 가지고 있다.

그러나 前報(Kaminogawa 등, 1980)에서 밝힌 바와같이 α_{S1} -I 케이스인으로 轉換하면 칼슘에 의한 重合機能의 一部가 喪失되어 沈殿하지 않게 된다. 그러면 α_{S1} -케이스인이 α_{S1} -I 케이스인으로 轉換됨에 따라서 他機能 즉 α_{S1} - k -케이스인間的 相互作用은 어떻게 바뀌어질 것인가? 혹은, α_{S1} -I 케이스인은 α_{S1} -케이스인이 가지고 있지 않은 機能을 가지게 될 것인가? 이와같은 問題는 케이스인 마이셀의 構造와 關聯해서 매우 興味있는 것이라고 생각 되어진다. 따라서 本實驗에서는 α_{S1} -I 케이스인과 他케이스인 成分과의 相互作用을 調査함과 同時에 α_{S1} -I 케이스인이 他케이스인成分의 칼슘에 沈殿성에 미치는 影響을 檢討했다.

材料 및 방법

1. 케이션調製

α_{S1} -I 케이션은 前報(Kaminogawa 등, 1980)의 같은 방법으로, α_{S1} - 및 k -케이션은 Zittle & Custer(1963)의 방법으로, β -케이션은 Aschaffenberg(1963)의 방법으로 각각 調製했다. 각각의 케이션의 純度는 Reisfeld(1962)의 방법에 의해 폴리아크릴 아마이드 電氣泳動으로 確認했다.

2. 超遠心分析

각각의 케이션을 0.07 M KOH를 포함하는 0.01M imidazole-HCl 緩衝液 (pH 7.1, 以下の 緩衝液을 標準緩衝液이라고 부른다)에 濃度가 1%가 되도록 溶解해서 兩液을 同量 混合했다. 分析은 Hitachi UCA-1A型 分析用 超遠心機로 55,430 rpm, Schlieren 光學系를 使用했다.

3. α_{S1} -I 케이션의 沈殿防止作用 測定

α_{S1} - 및 β - 및 $para k$ -케이션의 沈殿에 의한 沈殿에 있어서 α_{S1} -I 케이션의 防止作用을 測定하기 위하여 다음과 같은 세가지의 方法을 採用했다. 세가지의 方法 모두 溶媒로는 標準緩衝液을 使用했다.

㉑法: α_{S1} -케이션의 沈殿에 의한 沈殿에 있어서 α_{S1} -I 케이션의 防止作用 測定에는 다음과 같은 方法을 使用했다. 즉 여러가지 濃度の α_{S1} -I 케이션 및 α_{S1} -케이션 溶液을 25 °에서 10分間 放置한 後, 蛋白質의 最終濃度가 0.0075 %가 되도록 混合했다. 이 混合液 1ml에 여러가지 濃度の 鹽化칼슘 0.1ml를 攪拌하면서 加하여

30分 放置한 後, 320nm의 吸光值를 測定했다.

㉒法: β -케이션의 沈殿에 의한 沈殿에 있어서 α_{S1} -I 케이션의 防止作用은 Zittle & Walter (1963)의 方法에 의해 測定했다.

㉓法: $para k$ -케이션의 沈殿에 의한 沈殿에 있어서 α_{S1} -I 케이션의 防止作用 測定은 다음과 같은 方法을 使用했다. 즉 α_{S1} -케이션과 k -케이션을 最終濃度가 0.0075 %가 되도록 混合했다. 이 混合液 0.9ml에 100mM 鹽化칼슘 0.1ml를 攪拌하면서 加해 37 °에서 30分間 放置한 後, 카이모신 (Chymosin) 溶液 10 μ l (이 酵素液 1ml는 脫脂乳 10ml를 凝固시키는데 46秒 걸림)을 加해서 經時的으로 反應시킨 後, 320 nm의 吸光值를 測定했다.

結 果

1. α_{S1} -I 케이션과 他케이션成分과의 相互作用

α_{S1} -케이션은 沈殿의 非存在下에서 β - 및 k -

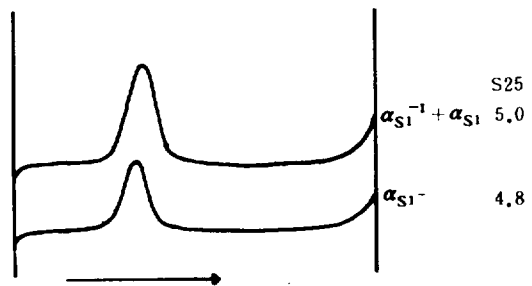


Fig 1. Sedimentation Pattern

10 mg of each casein component was dissolved in one ml of 0.01 M imidazol-hydrochloride buffer containing 0.07 M potassium chloride (pH 7.1). Centrifugation was performed at 25 °C. The pictures were traced from the photographs which were taken at 20 min after reaching full speed (55,430 rpm).

케이스인과 複合體를 形成하지만, α_{S1} -케이스인이 α_{S1} -I 케이스인으로 轉換해서도 複合體를 形成하는지의 如否를 超遠心分析에 의해 檢討했다.

α_{S1} -I 케이스인과 α_{S1} -케이스인의 混合物를 25°C에서 超遠心分析한 結果, 單一피크(peak)가 觀察되었다.

α_{S1} -I 케이스인과 β -케이스인의 混合物를 30°C에서 分析한 結果, Fig 2에 나타낸 바와같이 單一피크가 觀察 되었으며, 複合體의 形成이 認定되었다. α_{S1} - β -케이스인 複合體와 α_{S1} -I- β -케이스인 複合體들 比較 해보면, 沈降패턴에 있어서 兩者가 類似하지만, 沈降係數에 있어서는 α_{S1} -I- β -케이스인 複合體가 α_{S1} - β -케이스인 複合體보다 훨씬 크다.

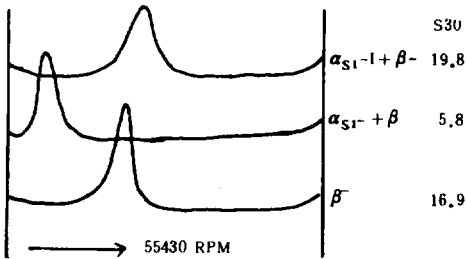


Fig 2. Sedimentation Pattern

10 mg of each casein component was dissolved in one ml of imidazole-hydrochloride buffer containing 0.07 M potassium chloride (pH 7.1). Centrifugation was performed at 30°C. The pictures were traced from the photographs which were taken at 10 min after reaching full speed.

α_{S1} -케이스인과 k -케이스인 사이에 重量比 1:1의 複合體가 形成된다고 알려져 있지만, Fig 3에 나타낸 바와같이 α_{S1} -I 케이스인과 k -케이스인 사이에도 重量比 1:1로 混合했을때 역시 單一피크가 觀察 되었으며, 複合體의 形成이 認定되었다.

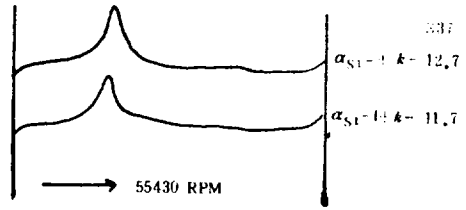


Fig 3. Sedimentation Pattern

10 mg of each casein component was dissolved in one ml of 0.01 M imidazole-hydrochloride buffer containing 0.07 M potassium chloride (pH 7.1). Centrifugation was performed at 37°C. The picture were traced from the photographs which were taken at 15 min after reaching full speed.

α_{S1} -I- k -케이스인의 沈降패턴은 α_{S1} - k -케이스인 複合體의 그것과 類似하며, 沈降係數에 있어서도 α_{S1} -I- k -케이스인 複合體가 조금 적지만, 兩者의 사이에 大差는 없었다.

2. α_{S1} -I 케이스인의 沈殿防止 作用

1) α_{S1} -케이스인의 沈殿性

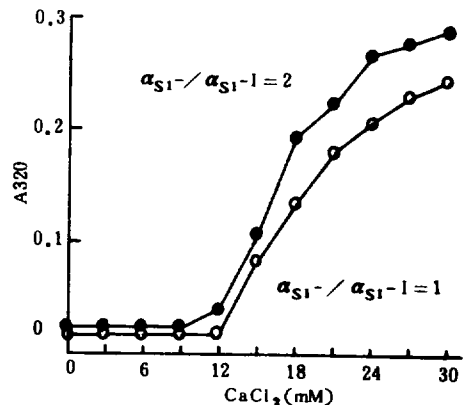


Fig 4. Effect of α_{S1} -I Casein on the Solubility of α_{S1} -Casein at Various Concentration of Calcium.

α_{S1} -I 케이스인과 α_{S1} -케이스인의 혼합비 (α_{S1} - / α_{S1} -I) 를 1 로하고 칼슘 농도를 변화시킬 경우, α_{S1} -케이스인의 沈殿性이 칼슘 농도 12mM 까지 는 完全히 抑制되었다. 혼합비를 2 로한 경우 (α_{S1} - / α_{S1} -I = 2) 에는 칼슘 농도 8mM 까지 밖 에 完全히 抑制되지 않았다.

칼슘 농도를 一定 (10mM) 하게하여 α_{S1} -I 케 이신과 α_{S1} -케이스인의 혼합비를 變化 시켰을때, 혼합비 1 까지는 α_{S1} -케이스인의 沈殿性이 完全 히 抑制되었으나 혼합비가 增加함에 따라서 濁 度가 서서히 增加했다. 혼합비 5 까지는 顯著하 게 抑制되었지만, 혼합비 5 以上이 되면 濁度가 急激하게 增加했다.

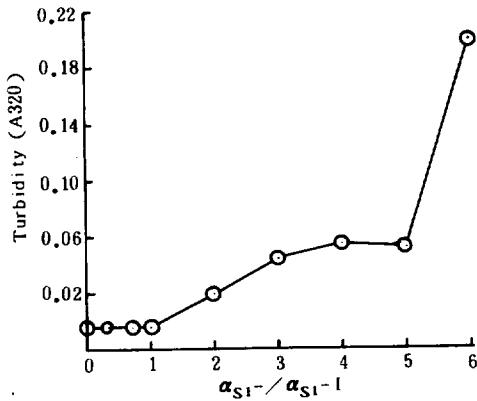


Fig 5. Effect of α_{S1} -I Casein on the Solubility of α_{S1} -Casein in the Presence of 10 mM Calcium.

칼슘 10mM 共存下에서 α_{S1} -I 케이스인과 β - 케이스인의 혼합비를 變化 시켰을 경우, 혼합비가 增加함에 따라서 沈殿하는 β -케이스인량이 顯著 히 減少했다. 혼합비 (α_{S1} -I / β -) 가 0.6 以下 인때는 α_{S1} -I 케이스인에 의해 安定化되는 β -케 이신량은 적어지며 그의 50% 以上이 沈殿했다. 그러나 0.6 以上인때는 安定化되는 β -케이스인량 은 많아지며, 沈殿量은 10% 밖에 되지 않았다.

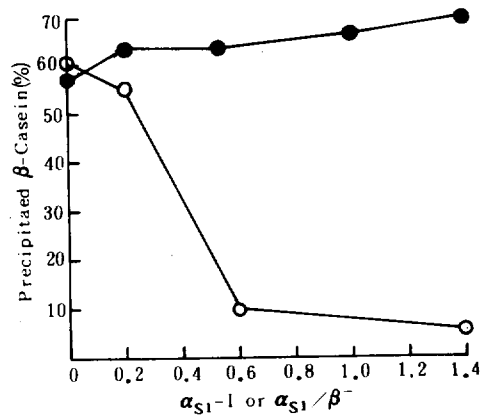


Fig 6. Effect of α_{S1} -I Casein on the Solubility of β -casein in the presence of 10 mM Calcium.

이 事實들로부터, α_{S1} -I 케이스인은 β -케이스인의 칼슘에 의한 沈殿性을 顯著히 防止하는 것을 알 수 있다.

Fig 7 에는 para-k-케이스인의 沈殿性에 미치 는 α_{S1} -I 케이스인의 影響을 칼슘非存在下에서 調 査한 結果를 나타냈다. α_{S1} -I 케이스인과 k-케이스인

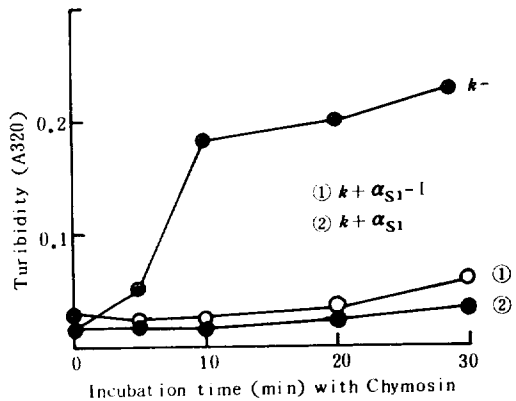


Fig 7. Effect of α_{S1} -I Casein on the Solubility of para-k-Casein in the Absence of Calcium.

의 混合液 또는 α_{S1} -케이스인과 k -케이스인의 混合液에 카이모신을 作用 시켰을때 양쪽 모두 濁도가 增加하지 않았다. 이 事實은 α_{S1} -I 및 α_{S1} -케이스인이 para k -케이스인의 沈殿性を 防止하는 것을 가르킨다.

그러나 Fig 8에서 나타낸 바와 같이, 칼슘存在下에서 α_{S1} -케이스인과 k -케이스인의 混合液은 酵素反應이 進行됨에 따라서 濁도가 增加 했지만, α_{S1} -I 케이스인과 k -케이스인의 混合液은 濁도가 變化하지 않았다.

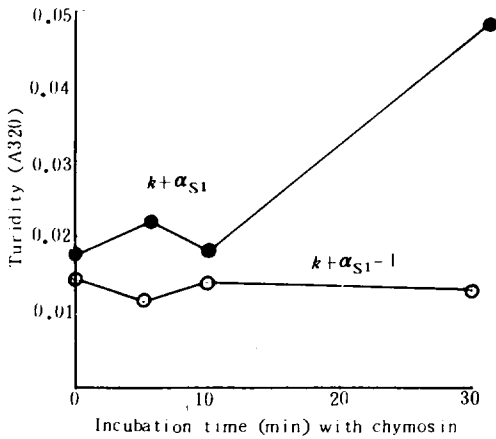


Fig 8. Effect of α_{S1} -I Casein on the Solubility of para- k -Casein in the Presence of 10 mM Calcium.

따라서 칼슘의 存在下에서도 α_{S1} -I 케이스인은 para k -케이스인의 沈殿性を 防止 한다는 것을 알 수 있다.

考 察

α_{S1} -I 케이스인은 칼슘에 의한 沈殿性は 喪失되어 있지만, k -케이스인과의 複合體 形成能은 保持하고 있다.(Fig 3) 前報(Yoon, 1984)에서 나타낸 바와 같이, α_{S1} -케이스인 및 α_{S1} -I 케이스인

에서 各各의 Site I 및 Site I'가 α_{S1} - k -케이스인 複合體 形成에 關與하는 部位라고 假定한다면, 이 部位는 α_{S1} -I 케이스인으로 轉換해도 保持되고 있을 것이며, 오히려 當然한 結果이라고 생각 할 수 있다. 따라서, 이 結果는 前報에서의 推定을 支持하는 것이며, 또한 α_{S1} -케이스인이 α_{S1} -I 케이스인으로 轉換해도 α_{S1} - k -케이스인 複合體 形成에 必要한 Site I에 相互作用을 不可能하게 하는 高次構造의 變化는 생기지 않았다는 것을 示唆하는 것이다.

α_{S1} -I 케이스인과 β -케이스인은 複合體를 形成하지만 (Fig 2), 이 複合體의 沈降係數는 α_{S1} - β -케이스인 複合體의 그것보다 상당히 크다. 이 相互作用에 關하는 情報는 現在까지 充分히 얻어지지 않기 때문에, 明言은 避하지만, 다음과같이 說明할 수 있다. α_{S1} -, β -의 複合體 形成時에 β -케이스인의 解離가 일어나고 있다고 생각된다. β -케이스인은 溫度에 依存해서 解離, 會合하는 蛋白質로서 30 °C에서는 22개 以上の 모노머 (monomer)가 會合하고 있다. (payens 등, 1963) 이것에 α_{S1} -케이스인이 會合할 경우에는 β -케이스인이 會合하고 있는 部位(疎水領域)에 浸透하여 β -케이스인間的 疎水結合을 切斷해서, 이 疎水領域에 α_{S1} -케이스인이 結合하는 形態를 取한다고 생각 되어 진다.

Waugh 등(1970)도 α_{S1} - β -間 相互作用은 疎水結合이라고 報告하고 있다. 이와같이 생각 하지 않으면 α_{S1} - β -케이스인 複合體의 沈降係數가 β -케이스인의 그것보다 매우 적고, α_{S1} -케이스인의 그것에 가깝다는 實驗結果를 說明할 수 없다. 複合體 形成에 따라서 沈降係數가 減少하는 傾向은 α_{S1} -, k -케이스인間的 複合體 形成 反應에 있어서도 보여지며 (Garnier 등, 1964) 複合體 形成에 따라서 k -케이스인이 解離 한다는 것이 알려져 있다.(Kaminogawa 등, 1977) 이것과 거의 같은 形態로 α_{S1} -, β -間에 複合體가 形成

된다고 생각 되어진다.

그런데, α_{S1} -I- β -케이신 複合體의 沈降係數는 β -케이신의 그것보다 커지고 있다. 이것은 複合體 形成時에 β -케이신폴리머 (polymer) 가 解離되지 않기 때문이라고 생각된다.

α_{S1} -, α_{S1} -I 케이신 사이의 複合體 形成 如否는 Fig 1에서 나타낸 超遠心分析의 結果만으로는 結論을 낼 수 없었다. 그러나 Fig 4 또는 Fig 5에서 나타난 結果는 α_{S1} -, α_{S1} -I 사이에 複合體가 形成된다는 것을 示唆하는 것이다. 즉 α_{S1} -I 케이신이 α_{S1} -케이신의 칼슘沈殿性을 一定한 칼슘濃度 範圍內에서는 抑制하고 있는데, 이것은 α_{S1} -, α_{S1} -I 사이에 複合體가 形成되고 있다고 생각하지 않으면 理解하기 어려운 現象인 것이다. α_{S1} -, α_{S1} -I間的 複合體形成에 關해서는 다른方法으로 더 確認해 보는 것이 바람직하다.

α_{S1} -I 케이신은 β -케이신의 칼슘 沈殿性을 抑制하고 있지만 (α_{S1} -I/ β - > 0.6), 이것은 칼슘에 安定한 α_{S1} -I 케이신이 β -케이신과 複合體를 만들고, β -케이신의 沈殿機能에 어떠한 形態의 影響을 주기 때문이라고 推定된다.

α_{S1} -I 케이신은 k -케이신이 카이모신의 作用에 의해 不溶性인 para k -케이신으로 變化한 경우에도 para k -케이신의 沈殿性을 顯著하게 抑制하고 있다.(Fig 7, 8 참조) α_{S1} -I 케이신과 k -케이신과의 사이에 複合體가 形成된다는 事實이 (Fig 3) α_{S1} -I 케이신과 para k -케이신 사이에도 複合體가 形成된다는 直接的인 證據

는 되지 않지만, para k -케이신이 k -케이신보다 疎水度가 높다는 것 (Berry 등, 1976)으로부터 k -케이신 및 para k -케이신이 他케이신 成分과 結合할때는 兩者의 共通部分이 關與하고 있다고 생각된다. 이러한 事實과 本實驗의 結果를 종합해 보면, α_{S1} -I 케이신은 para k -케이신과 複合體를 形成하고 있다고 推定된다. k -케이신이 카이모신의 作用에 의해 para k -케이신이 되면, 重合해서 沈殿하지만, 重合物(沈殿物)은 尿素에 의해 再溶解한다. 따라서 para k -케이신의 重合은 分子間的 疎水結合에 의한 것이라고 생각 할수 있다. α_{S1} -I 케이신이 共存하면 para k -케이신의 沈殿이 抑制되는 것은 α_{S1} -I 케이신이 para k -케이신의 疎水領域에 結合해서, para k -케이신의 重合部位를 遮斷시키기 때문이라고 推察된다.

摘 要

α_{S1} -I 케이신과 α_{S1} -, β -, k -케이신과의 相互作用을 檢討했다. α_{S1} -I 케이신은 β -, k -케이신과 複合體를 形成했다. 따라서 α_{S1} -케이신으로부터 α_{S1} -I 케이신으로 變換되어도 이들 케이신과의 結合사이트는 保持되고 있다는 것이 確認되었다. 또 α_{S1} -I 케이신이 α_{S1} -, β -, para k -케이신과 共存하는 系에서의 칼슘의 影響을 檢討했다. α_{S1} -I 케이신은 共存하는 他成分의 칼슘에의 한 沈殿性을 어느정도까지는 抑制하는 能力을 가지고 있는것으로 밝혀졌다.

參 考 文 獻

- Aschaffenberg R., 1963, Preparation of β -Casein by a modified Urea fractionation method, *J. Dairy Res.*, 30, 259.
- Berry G.P. and Creamer L.K., 1976, A Comparison between the protein-protein association in caseinate and in rennet-treated caseinate solution, *N.A.J. Dairy Sci. Technol.* 11, 127.
- Garnier J. Yon J. and Mocquot G. 1964, Contribution de L'association entre la caseine χ et la caseine α_{S1} pH neutre, *Biochim. biophys. Acta*, 82, 481.
- Kaminogawa S., Dosako S. and Yamauchi K., 1977, Interaction of α_{S1} - χ Casein Complex with Alkaline earth metal Ions., *Agric. Biol. Chem.*, 41, 697.
- Kaminogawa, S, Yamauchi K, Yoon C.H. 1980, Calcium Insensitivity and Other Properties of α_{S1} -I Casein, *J. Dairy Sci.* 63, 223.
- Payens T.A.J. and Van Markwijk B.W., 1963, Some features of the Association of-Casein, *Biochem. Biophys. Acta*, 71, 517.
- Reisfeld R.A. Lewis U.J. and Williams D.E., 1962 Disk electrophoresis of Basic proteins and peptides on Polyacrylamide gels, *Nature*, 195, 281.
- Waugh D.F., Creamer L.K. Slattery C.W. and Dresdner G.W., 1970, Casein Micelles. Formation and Structure II, *J. Amer. Chem. Soc.*, 9, 786.
- Yoon C.H., 1984, Polymerization of α_{S1} -I Casein by Calcium ions, *Cheju Nat. Univ. Faculty Pub.* 18, 57.
- Zittle C.A., Custer J.H., 1963 Purification and some of the Properties of α_{S1} -Casein and χ -Casein, *J. Dairy Sci.*, 46, 1183.
- Zittle C.A. and Walter, 1963, Stabilization of β -Casein by χ -Casein against Precipitation by Calcium chloride, *J. Dairy Sci.*, 46, 1189.