

韓國在來 山羊乳에 관한 研究

(Ⅲ) K - Casein 의 性狀

李 賢 鍾

Studies on Korean Native Goats Milk

III. Properties of k-Casein

Lee, Hyun Jong

Summary

k-casein was isolated and purified to investigate the physico-chemical properties of each composing ingredients of casein in Korean native goats milk. Enzyme rennin and a reducing agent were added into the k-casein and its results are as follows.

Pure k-casein could be obtained through urea-sulfuric acid method following five times purification, and it was diffused and distributed more evenly than milk k-casein in electrophoretic pattern.

Addition of 2-mercaptoethanol made distinct band to be appeared and this indicates that k-casein contains s-s bond as in milk.

It was observed that adding rennin into whole casein made obvious compositional changes such as appearance of an ingredient which showed characteristic movement forwards the direction of anion and also an ingredient whose mobility is a little slower than α_s -casein or β -casein.

It was also confirmed that k-casein is the main ingredient which receives the effects of rennin among other casein constituents and its coagulating property is a little slower than milk.

I. 序 論

前報(李等 1979)에서 在來山羊乳의 Casein을 disc 電氣泳動法을 利用하여 分析한 結果 Casein 構成成分으로서 β - 및 k-Casein과 微量成分으로 γ -, TS-, 및 S-Casein의 存在는 確認되었으나 α_s -Casein은 牛乳의 α_s -Casein보다 電氣易動도가 낮아 電氣의으로 在來山羊과 乳牛의 α_s -Casein 사이에 多少의 差異가 있음을 發見할 수 있었다.

本報에서는 在來山羊乳의 Casein을 構成하고 있는 各成分을 分離, 이들의 理化學的 性質을 究明하기 위한 첫단계로 全Casein으로 부터 k-Casein을 分離 精製하고 이 k-Casein의 몇가지 性質을 究明, 牛乳와 比較 檢討하였다.

牛乳 Casein에서 k-Casein을 分離하는 方法으로는 Waugh等(1956)이 처음으로 k-Casein의 存在를 確認한 以來 塩化칼시움에 對한 溶解度의 差異에 依해 分離하는 McKenzie等의 方法(1961), Casein의 尿素溶液에 Trichloroacetic acid (TCA)를 添加해서 分離하는 方法(Swaisgood等 1962) 및 Hill(1963)의 塩化칼시움 添加에 依해 沈澱된 粗 k-Casein을 DEAE-Cellulose Column Chromatography에 依해 精製하는 方法 등이 있고 또 最近에 와는 Casein의 尿素溶液을 Gel Filtration 해서 α_s -Casein과 k-Casein을 分離하는 方法(Yaguchi等 1967)도 報告되고 있다.

그러나 이들 方法은 Zittle等의 方法(1963)에 比해 操作이 煩雜하고 한번에 多量의 處理가 困難하며 超遠心分離等의 操作이 必要하고 取量이 적은 결점이

있기때문은 最近에는 操作도 比較的 簡單하고 한번에 多量의 處理가 可能한 Zittle等의 方法이 많이 利用되고 있다.

따라서 本實驗에서는 Zittle等의 尿素-黃酸法에 依해 k-Casein을 分離, 精製하고 이의 純度를 polyacrylamide gel disc 電氣泳動法에 依해 檢討하고 나아가 單離된 k-Casein의 몇가지 性質을 究明하여 牛乳 k-Casein과 比較하였다.

II. 材料 및 方法

1. 原料乳의 採取

本實驗에 使用된 牛乳 (Holstein 乳), 山羊乳 (saanen 乳) 및 在來山羊乳는 前報 (李等 1979)에서와 같이 濟州大學 附屬 家畜飼育場에서 飼育中인 家畜들로부터 手搾乳에 依해 採取하였다.

2. 全 Casein

新鮮한 在來山羊乳를 3,000 r.p.m에서 20分間 遠心分離해서 얻은 脫脂乳에 蒸溜水를 添加 3倍로 희석한후 0.1 N-HCl을 넣어 pH 4.6에서 等電點沈澱시켰것을 2回 再沈澱시켜서 試料로 使用했다.

3. k-Casein

k-Casein의 分離 및 精製는 圖 1과 같이 Zittle等의 方法에 依해 全Casein으로부터 粗 k-Casein을 分離하고 ethanol法에 依해 5回 반복해서 精製했다.

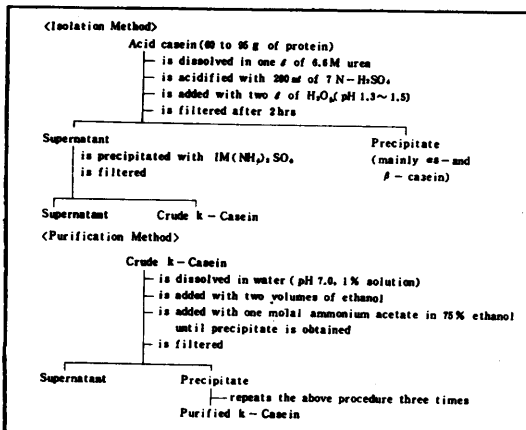


Fig. 1. Isolation and purification of k-casein by urea-sulfuric acid method.

4. 全 Casein 및 k-Casein에 對한 rennet의 作用

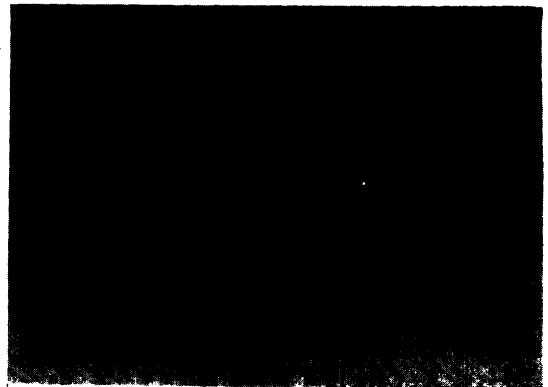
Hansen社 (Denmark)의 rennet 粉末 100mg을 蒸溜水에 녹여 24時間 透析 (蒸溜水)後 100 ml로 量을 調整해서 rennet 溶液으로 하였으며 2% 全casein 및 k-Casein 溶液에 1:100의 比率로 添加 37°C의 Incubator에서 一定時間 經過후의 變化를 電氣泳動에 依해 觀察했다.

5. Polyacrylamide gel (PAG) disc 電氣泳動

7.5% Polyacrylamide gel에 最後濃度 4.5 M의 尿素와 0.5M의 Sucrose를 添加해서 電氣泳動을 實施했다. 泳動條件은 0.05 M Trisaminomethane - 0.04 M glycine 緩衝液 (pH 8.6)을 使用하고 gel 1本당 3 mA의 電流가 흐르도록 했으며 終了後 1% Amido black 10 B의 7% 酢酸水溶液으로 15分間 染色後 7% 酢酸水溶液으로 脱色했다.

III. 結果 및 考察

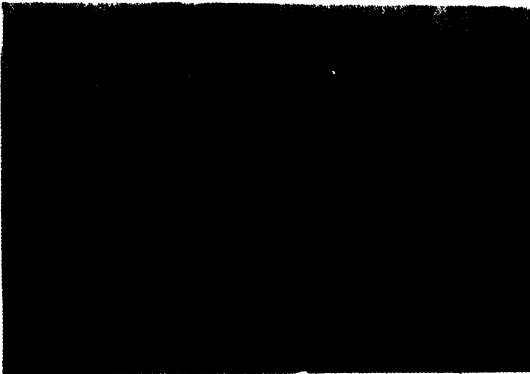
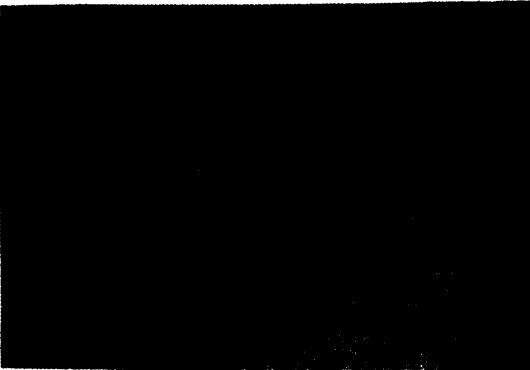
在來山羊乳 k-Casein의 理化學的 性質을 究明하기 위해 全Casein으로부터 k-Casein을 分離 및 精製하기에 앞서 在來山羊乳 全Casein을 牛乳 및 山羊乳 Casein과 比較, 그 結果를 圖 2에 나타냈다.



山羊乳 全Casein은 Tangl (1908)의 酸添加法에 依해 처음 分離된 以來 自由界面 電氣泳動法 및 濾紙 電氣泳動方法으로 αs- 및 β-Casein이, 尿素-黃酸法에 依해 k-Casein이 各各 單離되었으며 (Parkash等, 1968, Woodward 1976) 이들의 化學的 組成은 牛乳 Casein과 거의 비슷하나 γ-Casein이 量的으로 적고 αs-Casein에 있어서 電氣泳動度가 낮고, 不均一한 數個의 分離帶가 나타나는等, 牛乳 ca-

sein과 差異를 나타내고 있는데 이와같은 事實은 圖 2의 電氣泳動結果로 더욱 확실하게 알 수 있다.

한편 圖 2에서 在來山羊과 乳山羊은 電氣易動度는 대체로 一致하나 α_2 -Casein의 分離帶數가 山羊乳에 비해 적은데 이는 α_2 -Casein의 構成成分 및 遺傳的 變異體組成에 差異가 있음을 推定할 수 있고 또 α_2 -와 β -Casein의 量的比率에 있어서도 在來山羊乳은 外觀上 거의 同一한 反面 山羊乳은 β -Casein의 比率이 높은 등의 差異를 보여주고 있는데 이는 앞으로 各 Casein成分을 單離, 遺傳的變異體의 組成을 究明함으로써 같은 羊科에 屬하는 在來山羊과 乳山羊을 遺傳學的인 面에서 分類하는데 도움이 될 것이다.

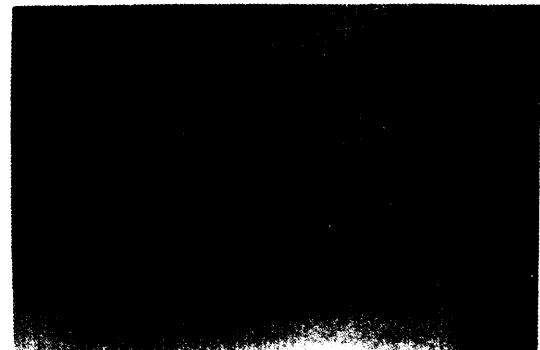
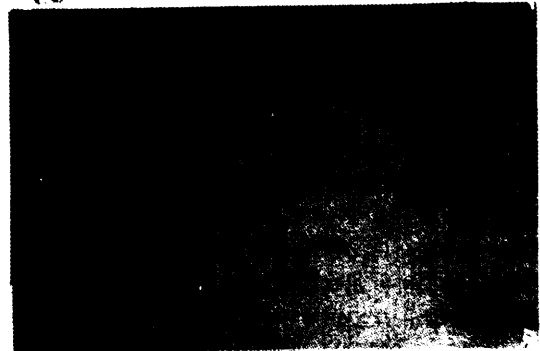


다음 圖 3은 圖 1의 原素-黃酸法에 의해 分離된 k-Casein을 全Casein 및 α_2 , β -Casein과 比較한 電氣泳動圖이다.

이 方法에 의해 分離된 k-Casein中에 β -Casein成分은 거의 제거되었으나 α_2 -Casein이 相當量 남아있음을 알 수 있는데 이 殘存部分이 k-Casein의 構成成分인지 k-Casein 以外의 成分인지를 확인하기 위해 圖 1의 ethanol法에 의해 精製를 實施, 5회까지의 各단계별 電氣泳動結果를 圖 4에 나

타냈다.

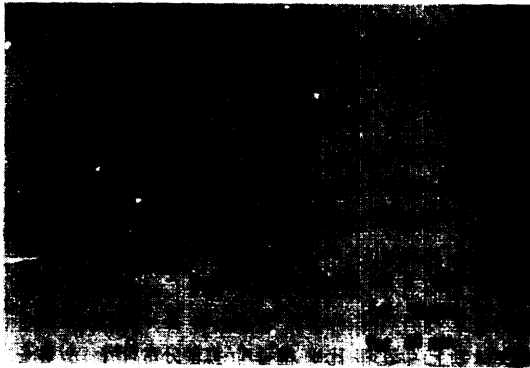
불순물의 大部分은 2회 精製로 제거되었으나 4회 精製를 해도 極小量의 불순물이 남아있는것을 볼수 있고 陰極方向으로 泳動하는 2個의 分離帶를 觀察할 수 있는데 이것은 牛乳의 경우와 같이 分離 精製過程에서 k-Casein의 一部가 Para-k-Casein과 같은 成分으로 分解되기 때문에 나타나는것으로 推定되며 5회以上 精製해도 α_2 -Casein 部位에 一定量의 成分이 남아있는 것으로 미루어 k-Casein의 一構成成分으로 생각되며 따라서 在來山羊 k-Casein 은 電氣泳動上 牛乳에 비해 幅 넓게 拡散分布되어 있음을 圖 5에서 牛乳와 比較 더욱 확실히 알 수 있다.



다음은 一般的으로 S-S結合還元劑가 存在하지 않으면 電氣泳動時 不明確한 分離帶로 拡散되어 나타나는 k-Casein에 還元劑로 2-mercaptoethanol을 添加 電氣泳動을 實施한 結果는 圖 6과 같다.

1% Mercaptoethanol 添加에 의해 k-Casein의 鮮명한 分離帶가 나타난 事實로 미루어 在來山羊乳도 牛乳와 마찬가지로 S-S結合을 含有하는 k-Casein을 갖고 있음을 알 수 있다.

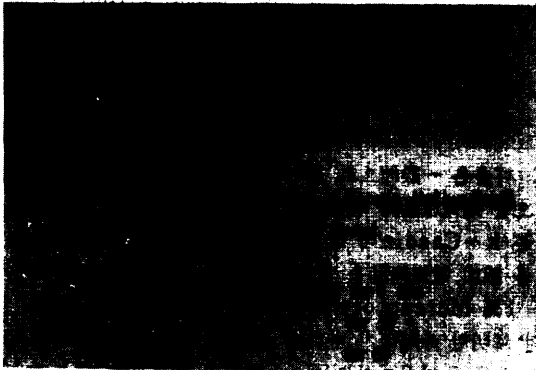
한편 牛乳 k-Casein의 特徵은 凝乳酵素인 rennin의 作用은 받는 点인데 在來山羊乳 Casein에 이와같은 成分이 存在하는지를 全Casein에 rennin을



作用시켜 Poly acrylamide gel 電氣泳動을 實施 그 變化에 依해 檢討한 結果는 圖7과 같다.

牛乳 全Casein의 경우 rennet 添加後 30분부터 電氣泳動上에 뚜렷한 變化가 일어나 陰極方向으로 移動하는 成分과 α_s - β -Casein보다 易動度가 약한 다른 成分이 出現하는데 (Nishikawa 1969) 在來山羊乳 Casein도 圖7에 나타난대로 rennet 添加後 30분부터 γ -및 TS-Casein位置와 α_s -및 β -Casein 附近에 약간의 分離帶가 나타나기 始해서 添加後 60分에는 出現分離帶數가 增加하는等 뚜렷한 變化가 나타난 點으로 미루어 在來山羊乳Casein 中에도 rennin 作用을 받는 成分이 確實히 存在함을 알 수 있다.

다음 在來山羊乳 Casein 中에서 rennin 作用을 받는 成分이 k-Casein 인지를 確認하기 위해 全Casein으로부터 分離 精製한 k-Casein에 rennet 을 添加 그 變化를 圖8에, 牛乳 k-Casein에 rennet 處理한 것 과 比較한 結果를 各各 나타냈다.



牛乳 k-Casein과 마찬가지로 在來山羊乳 k-Casein도 rennin 作用을 받는 成分이 圖8에서 확인되었으며 rennin 凝集性은 牛乳에 비해 약간 낮

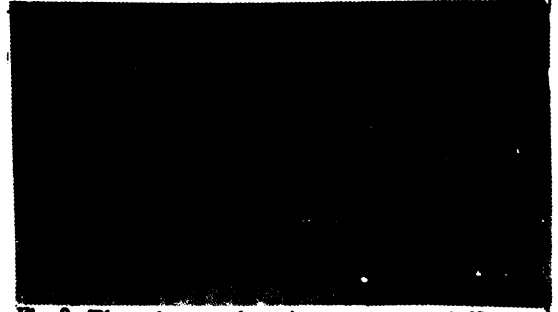


Fig 8. The electrophoretic patterns of Korean Native Goats k-casein(A) and bovine k-casein(B)

1. k-casein
2. k-casein treated with rennet for 0 min
3. " " " " " 30 "
4. " " " " " 60 "

음을 알 수 있다. 그러나 在來山羊乳 Casein 中에서 rennin 作用을 받는 成分이 牛乳에서와 같이 k-Casein 하나만인지는 앞으로 나머지 α_s - β - 및 γ -Casein 등을 分離 精製해서 rennin 을 作用시켜 그 結果를 보아야 斷言을 내릴 것으로 생각된다.

以上 在來山羊乳 Casein으로부터 k-Casein의 分離 精製에 牛乳의 k-Casein 分離方法中의 하나인 尿素-黃酸法의 適用可能性을 檢討하고 또한 rennet 酵素 및 還元劑 添加에 依한 變化를 電氣泳動上으로 觀察, 在來山羊乳 k-Casein의 理化學的 性質 몇가지를 究明하였다. 앞으로 k-Casein의 α_s -Casein을 安定化시키는 能力 및 糖含有여부 그리고 rennin 添加에 依한 安定化能力 상실 및 遺傳的 變異 體의 存在와 Casein micelle 中의 k-Casein의 役割等에 關해 繼續해서 究明해야 할 것이다.

IV. 摘 要

在來山羊乳의 Casein을 構成하는 各成分을 分離 이들의 理化學的 性質을 究明하기 위해 全Casein으로부터 k-Casein을 分離 精製하고 얻어진 k-Casein에 rennin 酵素 및 還元劑를 添加 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 尿素-黃酸法으로 分離, 5回精製한 結果 순수한 k-Casein을 얻을 수 있었으며 電氣泳動上 牛乳 k-Casein에 비해 幅 넓게 拡散 分布되어 있었다.

2. 2-mercaptoethanol 添加에 依해 鮮명한 分離帶로 나타나 牛乳에서와 같이 k-Casein에 S-S結合이 含有되어 있음을 알 수 있다.

3. 全Casein에 rennet를 添加한 結果 陰極方向으로 移動하는 成分과 α_s -, β -Casein보다 易動度가 약간 빠른 成分이 나타나는等 뚜렷한 變化가 있었다.

4. k-Casein이 Casein成分中 rennin作用을 받는 主成分임이 確認되었으며 凝集性이 牛乳에 비해 약간 낮은 경향을 나타냈다.

引 用 文 獻

- Hill, R.D. 1963. Preparation of k-Casein by DEAE-Cellulose column chromatography. *J. Dairy Res.*, 30, 101.
- 李賢鍾·康太淑. 1979. 韓國在來山羊乳에 관한 研究. II. Casein의 性状(1). *濟大論文集*. 10, 101.
- Nishikawa, I., Murata, N., Yoshida, H. and Saito, K. 1969. Studies on human milk Proteins. II. Properties of human casein. *J. Agric. Chem. Soc.*, 43, 1969.
- McKenzie, H. A. and R. G. Wake. 1961. Preparation of k-Casein. *Biochim. Biophys. Acta.*, 47, 240.
- Parkash, S. and R. Jenness. 1968. The Composition and Characteristics of goats milk. A review. *Dairy Sci. Abstr.*, 30, 67.
- Swaisgood, H. E. and J. R. Brunner. 1962. *J. Dairy Sci.*, 45, 1.
- Langl, F. 1908. *Pflugers Arch. ges. Physiol.*, 121, 534.
- Laugh, D. E. and Von Hippel, P. H. 1956. *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 4576.
- Woodward, D. R. 1976. The Chemistry of mammalian caseins: A review. *Dairy Sci. Abstr.*, 38, 137.
- Yaguchi, M., D. T. Davies, and Y. K. Kim. 1968. Preparation of k-Casein by gel filtration. *J. Dairy Sci.*, 51, 473.
- Zittle, C. A. and J. H. Custer, 1963. Purification and some of the properties of α_s -Casein and k-Casein. *J. Dairy Sci.*, 46, 1183.
- Zittle, C. A. and J. H. Custer. 1966. Identification of the k-Casein among the components of whole goat casein. *J. Dairy Sci.*, 49, 788.