

韓國在來山羊乳에 관한 研究

— IV β -casein의 性狀 —

李 賢 鍾

Studies on Korean Native Goats Milk

— IV Properties of β -casein —

Hyun-jong Lee

Summary

Total casein obtained from Korean native goat's milk was fractionated into four group (S or Ts-, α s-, β -, k-casein) on DEAE-cellulose column with 0.01 M Imidazole-HCl buffer containing 3.3 M urea and 0.01 M 2-mercaptoethanol.

β -casein was separated by the Aschaffenburg method(1963) and purified by DEAE-cellulose chromatography.

Amino acid patterns of total and β -casein were similar to that of bovine's milk but were characterized by lower in valine, glycine, arginine and higher in glutamic acid.

Influence of lower temperature on the casein micelle was studied by the centrifugation method. Amount of casein, particularly β -casein in supernatants prepared by centrifuge increased at 4°C. It was assumed that β -casein has the temperature dependent dissociation and association.

I 序 論

Mellander(1939)가 牛乳蛋白質中の casein은 α -, β -, r-casein의 3가지 成分으로 構成되어 있다는 것을 報告한 以來 Waugh(1965), McKenzie(1959), Hipp(1952) 및 Warner(1944)에 依해 Alcohol, 尿素, DEAE-Cellulose 등을 利用한 各 casein의 單離, 精製方法이 研究되어 왔고 또한 各 casein의 分子量, 아미노酸 組成 및 含量과 calcium, rennet 添加에 依한 性狀變化 및 各 casien間의 相互作用 등 여러方面으로 研究되어 왔다.

특히 各 casein 中에서 β -casein은 全casein의 約 30%를 차지하는 蛋白質로서 2°C에서는 全casein의 等電點인 pH 4.6에서도 凝固하지 않으며 4°C 中性溶液에서는 分子量 25,000의 monomer로 存在하나 13.5°C

以上이 되면 서로 會合하여 糸狀의 Polymer를 形成한다는 事實이 確認되었으며 또한 Aschaffenburg(1961)는 pH7.15, 6.0M 尿素의 存在下에서 濾紙電氣泳動을 實施, β -casein에 3種의 遺傳的 變異體가 있음을 確認하고 移動度の 크기順으로 A, B, C로 命名하였으며 계속해서 Koning等(1965)은 各 遺傳的 變異體의 아미노酸 組成을, Ribadeau-Dumas는 一次構造를 決定 報告하였다.(1972)

한편 β -casein을 包含하는 大部分의 caesin이 牛乳 中에서 直徑 30~300 μ 크기의 micelle形態로 存在, 牛乳 및 乳製品의 製造 및 加工上 重要한 役割을 담당하고 있으나 現在까지 明確한 構造가 밝혀지지 않고 있으며 이 構造解明의 한 手段으로 β -casein의 特異한 性質 즉 溫度依存性을 利用, 低溫에서 여러가지 物理化學的인 方法으로 casein micelle의 構造를 究明

하려는 시도가 이루어져 왔다. (Niki等 1978, Watanabe等 1973)

前報(李1979)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 몇 가지 性質을 牛乳의 K-casein과 比較한 데 이어 本報에서는 在來山羊乳 全casein의 主要構成成分을 Imidazole添加 DEAE-Cellulose Chromatography에 依해 分別하고, 또 牛乳 β -casein 分離方法의 一種인 尿素法(Aschaffenburg 1963)을 利用해서 β -casein을 分離 精製하여 在來山羊乳 β -casein의 分離 方法으로서의 適用可能性 및 低溫에서의 舉動을 調査하고 나아가 全casein 및 純粹分離된 β -casein의 아미노酸 組成을 分析, 他家畜의 것과 比較하였다.

II 材料 및 方法

1. 原料乳의 採取 및 全casein의 調製

本實驗에 使用된 在來山羊乳는 濟州大學 附屬牧場에서 飼育中인 家畜들로부터 手搾乳에 依해 採取, 3,000 r. p. m에서 20分間 遠心分離해서 얻은 脫脂乳에 蒸溜水를 添加하여 3倍로 희석한 後 0.1N-HCl을 넣어 pH 4.6에서 等電點 沈澱시킨 것을 2回 再沈澱시켜서 試料로 使用하였다.

2. β -casein의 調製

尿素法(Aschaffenburg 1963)에 依해 全casein으로 부터 粗 β -casein을 分離한 후 Rose等(1969)의 DEAE-Cellulose Column Chromatography에 依해 β -casein을 精製, 그 純度を Polyacrylamide gel 電氣泳動法으로 確認하였다.

3. DEAE-Cellulose Column Chromatography

全casein의 分別은 Nagasawa等(1972)의 3.3M 尿素와 0.01M 2-Mercaptoethanol을 包含시킨 0.01M Imidazole-HCl buffer, β -casein의 精製에는 Rose等(1969)의 Urea-Tris-Citrate buffer를 各各 使用하였으며 溶出液의 濃度는 日立 分光光度計를 使用, 280mu의 吸光值에서 測定했다.

4. 低溫處理에 依한 casein micelle의 變化

前報(李1979)와 같은 方法으로 實施하였다.

5. 아미노酸 分析

在來山羊乳의 全casein 및 β -casein의 아미노酸 組成(Typtophan 및 Cystene 除外)은 試料 5mg을 精秤하여 Cap tube에 넣고 6N HCl 10ml을 加한 다음 N_2 gas로 7分間 充塡 脫氣 封管後 110°C oven에서 22時間 加水分解하여 日立 自動아미노酸分析機 KLA-3形을 使用 分析하였다.

6. Polyacrylamide gel(PAG) 電氣泳動

前報(李1979)와 같은 方法으로 實施하였다.

III 結果 및 考察

1. DEAE-cellulose에 依한 分別

在來山羊乳 全casein 0.5g을 DEAE-cellulose column에 依해서 分別한 結果는 圖1과 같으며 全casein 및 分別된 各 Fraction의 電氣泳動 結果는 圖2와 같다.

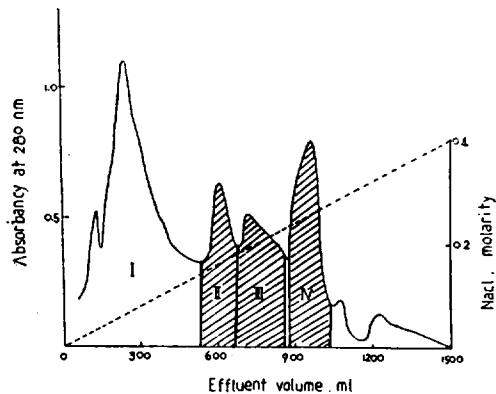


Fig 1. Chromatogram of a 0.5g sample of Korean native goat's casein, eluted from a DEAE-cellulose column by a gradient of sodium chloride(0. to 0.40M). Dotted line and shaded area indicate the concentration of sodium chloride and pooled sample respectively.

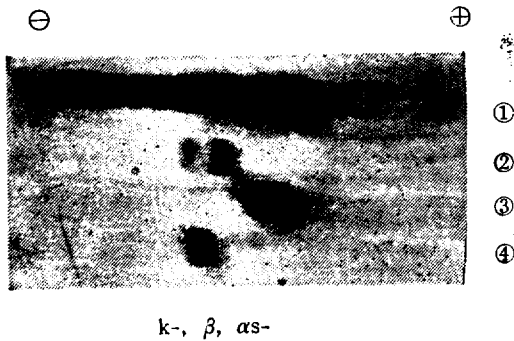


Fig 2. Acrylamide gel electrophoretic patterns of Korean native goat's whole casein and casein fractions obtained by DEAE-cellulose column chromatography.

- ① Total casein ② Fraction II
- ③ Fraction III ④ Fraction IV

分別 結果 在來山羊乳 casein도 Holstein乳와 같이 4個의 Fraction으로 分別되었으나 Fraction I은 DEAE-cellulose에 吸着되지 않고 溶出된 蛋白質로서 牛乳에 있어서는 S-casein 또는 Ts-casein으로 推定 (Ribadeau-Dumas 1964)되고 있으나 在來山羊乳의 경우 電氣泳動上 아무런 變動도 보이지 않아 앞으로 더 究明해야 할 問題로 생각되며 Fraction II 및 III IV는 各各 K-casein β-casein 및 αs-casein에 해당되고 各 fraction別 食鹽濃度는 0.19~0.20, 0.20~0.23, 0.23~0.28M임이 圖1과 2에서 뚜렷이 나타나고 있다.

2. β-casein의 精製

牛乳 β-casein의 分離方法으로는 물에 對한 溶解度法(warner, 1944), 알콜법 및 尿素法(Hipp, 1952) 등이 있으나 純粹 β-casein을 分離하는데는 上記 方法이 다른 casein에 依한 contamination 등의 問題 때문에 最近에는 Aschaffenburg(1963)의 尿素法이 널리 利用되고 있다. 즉 一名 尿素變法이라 불리우는 이 方法은 β-casein이 4.6M 尿素溶液(pH 4.6)에서 溶解되지만 3.3M 尿素溶液에서는 溶解되지 않으며 37°C이상(pH 7.0)에서는 칼슘 ion에 依해 침전되고 低溫에서 溶解되는 性質을 利用해서 分離하는 것으로 牛乳 β-casein 分離의 경우 좋은 結果를 보여 주고 있다.

따라서 이 方法을 在來山羊乳 casein에 適用해서 β-c. sein을 分離하고 그 結果를 PAG電氣泳動(Fig 3)에 依해 檢討함으로써 在來山羊乳 β-casein 分離方法으로서의 適用 可能性을 밝히고 나아가 牛乳의 경우와 比較, 性狀의 差異를 밝히켜져 한다.

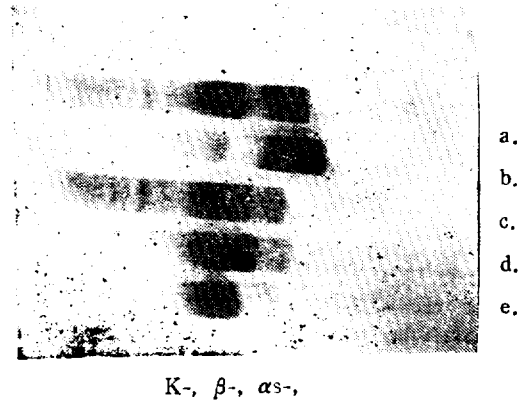


Fig 2. Fraction of Korean native.
a. Total casein
b. Component insoluble in 3.3M urea
c. Component soluble in 3.3M urea
d, e. β-casein

그림에서 C는 3.3M 尿素溶液에서 沈澱하는 成分으로 αs-casein을 主軸으로 상당량의 β-casein이 남아 있으며 b는 3.3M 可溶性 成分으로 牛乳의 경우와 마찬가지로 β-casein이 主成分을 이루고 있으나 이 方法에 依해 最終으로 分離 精製된 β-casein(d)를 보면 αs-casein部位에 contamination이 나타나 있어 牛乳의 경우와 달리 이 方法만으로는 純粹 β-casein의 分離가 不可能함을 알 수 있다. 따라서 純粹 β-casein을 分離하기 위해 이 方法에서 얻어진 粗β-casein을 Rose等(1968)의 DEAE-cellulose chromatography에 의해 分別하고 PAG電氣泳動을 實施하여 純度を 確認, 그 結果를 Fig 4 및 5에 나타냈다.

그림 4에서 分離된 fraction(dotted line)은 食鹽濃度 0.10~0.15M 사이에서 溶出, 牛乳와 유사함을 나타내고 있으며 이 部分을 電氣泳動한 結果(그림 5), 純粹 β-casein임이 確認되었다.

따라서 在來山羊乳 β-casein의 分離는 牛乳의 경우와 달리 尿素法만으로는 不可能하고 이 方法과 DEA

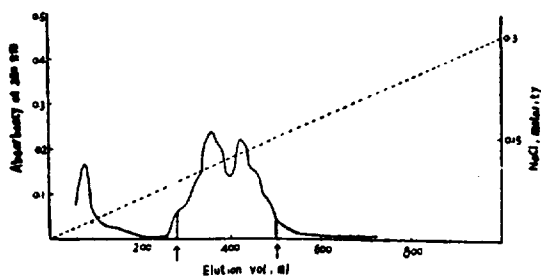


Fig 4. Elution diagram of Korean native goat's crude β -casein(500mg) from DEAE-cellulose using tris-citrate buffer, PH 8.6, 6M urea, and a sodium chloride gradient(...). Arrows indicate the limits of the major peak which contained β -casein.



K-, β -, α s-,

Fig 5. Acrylamide gel electrophoretic patterns of Korean native goat's whole casein and casein fractions.

1. whole casein
2. Crude β -casein obtained by a method of Aschaffenburg.
- 3.4. casein fractions obtained by DEAE-cellulose chromatography.

Table 1. Amino acid composition of bovine, buffalo and Korean native goat's whole casein, g/100g.

Sample	Bovine *	Buffalo **	Korean native goat
Amino acid			
Lysine	8.2	7.2	6.5
Histidine	3.1	2.9	2.2
Arginine	4.1	3.0	2.8
Aspartic acid	7.1	6.9	7.3
Threonine	4.9	4.4	4.0
Serine	6.3	6.1	5.1
Glutamic acid	22.4	22.7	27.5
Proline	11.3	11.9	11.7
Glycine	2.7	1.8	1.4
Alanine	3.0	3.0	2.8
Valine	7.2	7.1	2.8
Methionine	2.8	2.7	1.9
Isoleucine	6.1	6.0	4.4
Leucine	9.2	10.1	9.5
Tyrosine	5.3	5.8	4.9
Phenylalanine	5.0	5.4	5.1

* Data in entire column are from Gordon et al (1965) and

** are Nagasawa et al(1972)

E-cellulose chromatography를 병용하여 目的하는 純粹 β -casein을 얻을 수 있다.

(Aschaffenburg 1963) 및 DEAE-cellulose chromatography에 의해 純粹 分離한 β -casein의 아미노酸 組成을 分析, 乳牛와 Buffalo의 全casein 및 β -casein과 比較한 結果는 表1 및 2와 같다.

3. 아미노酸 分析

在來山羊의 混合乳로부터 調製한 全casein과 尿素法

Table 2. Amino acid composition of bovine, buffalo and Korean native goat's β -casein, g/100g.

Sample	Bovine*	Buffalo**	Korean native goat
Amino acid			
Lysine	6.5	6.7	5.8
Histidine	3.1	2.7	2.3
Arginine	3.4	1.8	1.5
Aspartic acid	4.9	4.4	4.3
Threonine	5.1	3.4	4.7
Serine	6.8	6.4	5.1
Glutamic acid	23.2	21.8	30.9
Proline	16.0	15.9	16.2
Glycine	2.4	1.5	1.3
Alanine	1.7	1.7	1.3
Valine	10.2	8.0	10.9
Methionine	3.4	3.3	2.1
Isoleucine	5.5	5.1	4.1
Leucine	11.6	12.2	12.4
Tyrosine	3.2	2.8	1.9
Phenylalanine	5.8	5.9	6.1

* Data in entire column are from Gordon et al (1965) and

** are Nagasawa et al (1972)

全casein의 경우 牛乳 및 buffalo乳 casein에 比較 全體的으로 아미노酸 組成이 거의 같거나 약간 낮은 경향을 나타내고 있으나 Valine은 牛乳의 7.2 및 buffalo乳의 7.1에 比較 2.84로 상당히 낮은 反面 glutamic acid는 27.48로 牛乳(22.4) 및 buffalo乳(22.7)에 比較 높은 組成을 보여주고 있다.

한편 표2에서 β -casein도 全casein과 같은 경향을 나타내 glutamic acid가 30.85로 牛乳(23.2) 및 buffalo(21.8)에 比較 높은 反面 Valine, arginine 및 lysine含量에서 현저한 差異를 보여주고 있으며 分析 室 事情으로 Tryptophan 및 Cystene은 次회에 分析 比較코자 한다.

4. 低溫處理에 의한 Casein micelle의 變化

牛乳의 casein은 주로 micelle形態로 存在하나 一部는 超遠心分離에 依해서도 沈降하지 않는 比較的 작은 casein polymer나 monomer의 形態로 存在하고 있을 뿐 아니라 casein micelle과 이 非沈降性 casein과의 사이에 平衡關係가 存在하고 이 平衡關係는 溫度의 變化에 影響을 받아 低溫에서는 非沈降性 casein部分이 增加하고 溫度가 上昇하면 減少하며 이 非沈降性 casein成分의 主成分은 β -casein임이 수 많은 研究者에 依해 밝혀졌다(Niki 1978等).

한편 在來山羊乳casein의 大部分도 乳中에서 micelle

形態로 存在하며 尿素 및 β -Mercaptoethanol과 같은 還元劑에 依한 變化도 牛乳 casein micelle과 비슷한 樣狀을 나타내고 있음을 밝힌 데(李1978)이여 本 實驗에서는 低溫處理에 依한 casein micelle中の 非沈降性 casein成分에의 影響을 究明코져 前報(李1978)에서와 같이 調製한 casein micelle懸濁液을 4°C에서 43,000

$\times g$, 70分間 遠心分離後 最上部的 上澄液(非沈降部分, soluble casein)과 沈澱部分(micellar casein)으로 「나누고 다시 沈澱部分은 蒸溜水로 懸濁한 후 再次 4°C에서 24時間 攪拌하면서 24時間 上記의 方法으로 再次 遠心分離하는 式으로 3回 반복하여 施行 그 結果를 그림 6에 나타냈다.



1st micellar casein
2nd " "
3rd " "
1st soluble casein
2nd " "
3rd " "

Fig 6. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of micellar and soluble casein under low temperature condition(4°C).

遠心分離에 依해 얻어진 非沈降性 casein의 主成分은 β -casein임을 알 수 있으며 이와 같은 事實은 在來山羊乳 β -casein이 牛乳 β -casein과 같이 溫度依存性 있는 會合性을 갖고 있다는 事實을 推定할 수 있고 그림(1a-3a)에서 沈澱部分을 3回 반복해서 非沈降性 casein을 除去해도 micelle狀 casein에 β -casein이 남아 있는 事實은 3回 반복 실험만으로는 速斷하기 어려우나 casein micelle中の β -casein이 牛乳 β -casein과 마찬가지로 低溫에 影響은 받는 部分과 받지 않는 部分, 換言하면 低溫이라고 하는 hydrophobic bond를 弱화시키는 作用의 影響을 받는 狀態에 있는 部分과 低溫의 影響은 받지 않고 아마도 calcium에 依해 共有結合으로 α s-casein과 結合해 casein micelle의 核을 形成하고 있는 部分의 두가지 形態로 存在하고 있음을 推定할 수 있다.

IV 摘 要

本 實驗은 在來山羊乳의 理化學的 性質을 究明하기 위하여 DEAE-cellulose를 使用, 全casein을 分別하고 β -casein을 分離, 精製하여 아미노산 組成을 分析하였

으며 또한 低溫處理에 依한 casein micelle成分의 變化를 電氣泳動에 依해 관찰하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 3.3M 尿素와 0.01M 2-mercaptoethanol을 含有한 0.01M Imidazole-HCl buffer를 使用하여 DEAE-cellulose에 依해 在來山羊乳의 全casein을 分別한 結果 4個의 fraction에 α s-, β -, k- casein으로 分離되었다.

2. β -casein의 精製는 尿素法과 DEAE-cellulose chromatography를 병용해야 純粹한 β -casein을 分離할 수 있다.

3. 全casein 및 β -casein의 아미노酸 組成은 牛乳에 비해 glutamic acid含量이 높은 反面 Valine, glycine, arginine은 낮았다.

4. 低溫處理에 依해 casein micelle成分中 β -casein을 主成分으로 한 非沈降性 casein이 增加한 事實에서 在來山羊乳 β -casein도 牛乳와 마찬가지로 溫度依存性 있는 會合性을 갖고 있음을 推定할 수 있다.

引 用 文 獻

- Aschaffenburg, R. 1961. Inherited casein variants in cow's milk.
- Aschaffenburg, R. 1963 Preparation of β -casein by a modified urea fractionation method. *J. Dairy Res.*, 30: 259.
- Gordon, W. G., J. J. Basch and M. P. Tompson. 1965. Genetic Polymorphism in casein of cow milk. N. Amino acid composition of α s-casein A, B and C. *J. Dairy Sci.*, 48: 1010.
- Hipp, N. J., M. L. Groves., J. H. Custer and T. L. Memeecken, 1952. Separation of α -, β -, γ -casein. *J. Dairy Sci.*, 35: 272.
- De Koning, P. J. and Van Rooijen, P. J., 1965. Location of amino acid difference in the genetic variants of k-casein A and B. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 20: 241.
- 李賢鍾·康大淑, 1979. 韓國在來山羊乳에 關한 研究. II k-casein의 性狀, 濟州大學 論文集., 11: 73
- 李賢鍾, 1977. 低溫處理에 의한 casein micelle의 研究. 濟州大學 論文集, 9: 103.
- Mckenzie, H. A. and R. G. Wake, 1959. *Australian J. Chem.*, 12: 712.
- Mellander, O., 1939. *Biochem. J.*, 300: 240.
- Nagasawa, T., I. Kiyosawa and K. Kuwahara. 1972. Fractionation of buffalo milk casein by acryamide gel electrophoresis and DEAE-cellulose column chromatography. *J. Dairy Sci.*, 56: 61.
- Nisi, R., H. J. Lee and S. Arima, 1978. Einfluß der kühlung auf die caseinmicellen der kuhmilch. *Milchwissenschaft.*, 33(8): 473.
- Ribadeau-Dumas, B. G., Brignon, G., Grosclaude, F and J. C. Mercier, 1972. Structure primaire de la cashin k bovine. Sequence complhte. *Eur. J. Biochem.*, 25: 505.
- Ribadeau-Dumas, B. G., J. L. Maubois, G. Mocquot and J. Garnier, 1964. Etude de la constitution de la caseine de vache par chromatographic sur colonnes de diethyl-aminoethyl-cellulose en milieu uree. *Biochem. Biophys. Acta.*, 82: 494.
- Rose, D., D. T. Davis and M. Yaguchi, 1968. Quantative determination of the major components of casein mixtures by column chromatography on DEAE-cellulose. *J. Dairy Sci.*, 52: 8.
- Warner, R. C., 1944, *J. Am. Che. Soc.*, 66: 1725.
- Watanabe, M., I. Kato., K. Shimazaki., R. Niki and S. Arima, 1973. Influences of temperature and urea on casein micelle components. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 44: 148.
- Waugh, D. F. and P. H. Von Hippel, 1965. K-casein and the stabilization of casein micelles. *J. Amer. Chem. Soc.*, 78: 4576.