

碩 士 學 位 論 文

韓牛乳 β - Casein 에 關한 研究

Studies on β - Casein in Korean Native Cow's Milk



濟州大學校大學院

畜 產 學 科

崔 世 鉉

1983年 12月 日

認 准 書

碩 士 學 位 論 文

韓 牛 乳 β -Casein 에 關 한 研 究

Studies on β -Casein in Korean Native Cow's Milk

指 導 教 授 李 賢 鍾

이 論 文 을 農 學 碩 士 學 位 論 文 으 로 提 出 함 .

1983 年 12 月 日



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

濟 州 大 學 校 大 學 院

畜 產 學 科

崔 世 鉉

의 農 學 碩 士 學 位 論 文 을 認 准 함 .

1983 年 12 月 日

委 員 長 :

委 員 :

委 員 :

目 次

摘 要	2
I. 緒 論	3
II. 研 究 史	5
III. 材 料 및 方 法	10
1. 原料乳의 採取	10
2. 酸 casein의 調製	10
3. poly acrylamide gel (PAG) disc 電氣泳動法	10
4. β -casein의 分離 및 精製	11
5. 溫度影響 試料의 調製	13
6. 尿素影響 試料의 調製	14
IV. 結 果 및 考 察	15
1. β -casein의 分離 및 精製	15
2. 溫度 및 尿素에 依한 casein micelle의 變化	23
Summary	30
參 考 文 獻	33

摘 要

本 研究는 現在까지 充分히 研究되어 있지 않은 韓牛의 乳汁成分에 關한 理化學的인 性質을 casein 中の β -casein을 中心으로 一般乳牛 (Holstein)의 β -casein과 比較해서 究明하고, 그 性狀을 學問的으로 確立함과 同時에 韓牛改良의 基礎資料를 提供코자 實施하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 電氣泳動을 利用한 韓牛乳 全 casein의 分析結果 α_s -, β - 및 k casein이 主要 構成成分으로 判明되었고, γ -, T_s - 및 S-casein의 存在가 確認되었으며, β -casein의 易動度는 乳牛보다 빠르고, α_s -, β -casein의 含量比는 外觀上 거의 類似하였다.
2. 韓牛乳 β -casein의 效果的인 分離方法을 確立하기 爲하여 Aschaffenburg의 方法과 Richardson의 方法을 比較한 結果, 乳牛에서는 有効하다고 認定되고 있는 Aschaffenburg의 方法으로는 純粹한 β -casein을 分離·精製하기에는 不充分하였고, Richardson의 方法에 依해 可能하였다.
3. 低溫保存에 따른 韓牛乳 casein micelle의 變化를 調査한 結果, 低溫에 依해서 非沈降性으로 移行하는 casein은 乳牛에서와 같이 大部分 β -casein이었다.
4. urea 添加에 依한 casein micelle의 變化에 있어서도 β -casein을 主로한 非沈降性 casein의 增加가 나타났으며, 特히 urea 濃度 2M에서 急激히 增加하였다.
5. 上記의 溫度 및 urea에 依한 casein micelle의 變化에서 韓牛乳 β -casein은 主로 疎水結合으로 micelle成分과 相互作用하고 있음을 推定할 수 있었다.

I. 緒 論

韓牛 (*Bos taurus coreanae*)는 유럽原牛 (*Bos primigenius*)와 印度原牛 (*Bos zebu*)의 混血種에서 起原하여, 우리나라에 傳來된 時期는 明確치 않으나 北部中國·滿洲를 거쳐 約 2,000 餘年 前으로 推定되며 (陸, 1959), 韓半島에 들어온 後 他 品種과의 交雜됨이 없이 繼續된 純種交配方式을 通하여 成立된 우리 固有의 在來家畜으로서, 體質 및 抗病性이 強하고 粗放飼養에 對한 耐性과 飼養管理가 容易한 長點이 있는 反面 繁殖 및 泌乳能力이 낮고, 特히 外國產 肉用牛에 比하여 體形이 작아서 中部地方牛에 있어서 種牝牛가 平均 488.2 kg, 種牝牛는 385.8 kg로 (金, 1978), 產肉能力이 不良한 短點을 가지고 있다.

過去 韓牛의 飼育은 우리民族이 原來 農耕民族이었던 까닭에 農業經營面에서 畜力과 自給肥料 生産이 가장 重要視되어 왔으며, 附隨的으로 農村金融 役割을 遂行하는 經濟的 側面과 牛肉供給을 爲한 肉資源으로서의 價値를 함께하여 왔다.

그러나, 最近들어 우리나라의 農業도 先進國型的 機械化 營農으로 轉換期에 있기 때문에 韓牛는 自然히 農耕과의 密着度가 멀어지고, 따라서 經濟的 價値가 低下되는 反面 國民所得의 增大에 따른 生活의 向上과 營養知識의 補給에 힘입어, 乳·肉類 等의 畜產物 消費量이 增加함에 따라 牛肉의 消費도 急激히 늘어나, 國內에서 生産되는 韓牛肉만으로는 需要를 充當하지 못하여, 每年 莫大한 外貨를 들여 外國에서 輸入하고 있는 實情이다.

따라서 近來에 韓牛를 基礎畜으로 하여 肉用牛로 改良하려는 試驗이 많이

이루어지고 있다.

우리나라의 在來家畜으로는 牛, 馬, 豚, 鷄, 山羊 등을 들 수 있으나, 이
中 豚과 鷄 등은 李朝末 以來 外國産 改良種의 導入과 이들과의 混血에 依
하여 特有의 形質을 잃어버리고, 이미 雜種化되어 純粹한 在來種은 전혀 찾
아볼 수 없어서 調査·研究가 몹시 곤란한 狀態에 있다.

그러나 馬와 在來山羊은 雜種化에 依한 改良이 전혀 試圖되지 않았던 關
係로 現在까지 在來의 形態로 維持되고 있으나, 韓牛의 境遇는 最近에 와
서 經濟性 向上을 爲하여 外國産 肉牛 및 乳牛와 交雜되어, 韓牛純種은 지
난 10餘年 間의 統計에 依하면 그 數는 每年 減少하여, 1981年末 現在
約 130萬頭가 飼育되고 있는 것으로 나타났다.

따라서, 滅種 및 雜種化 前에 韓牛에 對한 基礎的 調査를 하는 것은 韓
牛改良을 爲해 根本的 課題라고 할 수 있다.

이미, 韓牛에 關하여는 育種을 爲한 交雜試驗을 비롯하여 繁殖, 飼養, 經
營分野에는 相當한 研究가 이루어지고 있으나, 韓牛改良의 基礎가 되는 産
乳量 및 乳組成에 關한 研究는 數件에 不過할뿐 極히 적은 實情이다.

本 研究는 豚, 鷄 등과 같이 在來種이 滅種되기 前에 現在까지 充分히 研
究되지 않은 韓牛의 乳汁成分에 對한 理化學的인 諸性狀을 牛乳蛋白質의
主成分이라 할 수 있는 casein을 中心으로, 特히 β -casein을 從來의
乳牛 β -casein과 比較하여 究明하고, 그 性狀을 學問的으로 確立함과 同
時에 韓牛改良의 基礎資料로 提供코져 實施하였다.

II. 研 究 史

牛乳蛋白質은 脱脂乳에 酸을 添加하여 pH 4.6으로 調整했을때, 沈澱하는 casein과 沈澱하지 않는 whey蛋白質로 大別되며 (Jenness 等, 1956; Tompson 等, 1965), casein은 全乳蛋白質의 約 80%를 차지하는 比較的 安定된 成分으로 牛乳 및 乳製品의 品質을 左右하는 가장 重要한 成分으로 取扱되며, 또한 加熱에 依한 凝固와 沈澱現象을 비롯하여 cheese 製造時 rennet에 依한 凝固, 練乳의 gel化 및 粉乳의 不溶化 現象等과 關係가 깊은 것으로 알려져 있으며, 乳中에서는 Ca, Mg, 枸橼酸 및 Ca-phosphate 와 함께 複合物을 形成해서 colloid狀으로 分散하여 存在하고 있다 (Ramsdell, 1944; Davies, 1960).

이 colloid粒子는 casein micelle 이라고 불리며 直径이 40~280 nm 의 크기를 갖는 球狀粒子로서 乳中에 存在하고 있으나 (Nitschmann, 1949), 그 構造는 아직 完全히 究明되어 있지 않다.

한편 蛋白質化學 特히 分離方法의 進歩와 함께, 從來 單一成分의 蛋白質로 取扱되던 것이 많은 研究結果, 여러 蛋白質의 混合物이었음이 밝혀짐에 따라서, 牛乳 casein에 있어서도 Linderström-Lang (1925)이 最初로 그 不均一性を 示唆한 以來 Mellander (1939)가 物理化學的인 方法에 依해 처음으로 casein에 不均一성을 發表하였는데, 即 그는 Tiselius의 自由界面 電氣泳動法에 依해 casein이 3가지 成分으로 構成되어 있음을 觀察하고, 易動度の 빠른 順으로 α -, β - 및 γ -casein으로 命名하였다.

그 後 Warner (1944)는 β -casein이 pH 4.4, 2°C에서 溶解도가

α -casein보다 높은것을 利用, 두 casein을 分離하는 方法을 考案하였고, Hipp等(1952)은 50% alcohol 또는 尿素溶液에서의 溶解度 差에 따라 α - β - 및 γ -casein을 分離하였으며, 이어서 Waugh等(1956)은 從來 均一한 成分으로 생각되었던 α -casein을 Ca에 依해 沈殿하지 않고, casein micelle의 安定性에 関与하는 重要한 部分을 分離해서 이를 k-casein이라고 命名하고, 나머지 即 Ca에 依해 沈殿하는 部分을 α_s -casein 이라고 하였다.

이와같은 k-casein의 發見은 牛乳蛋白質의 研究發展에 크게 寄与하게 되었으며, 그 後 Wake等(1961)은 7.6 M 尿素를 含有하는 starch gel 電氣泳動法을 利用하여, 只今까지 4~5個의 成分밖에 分離하지 못했던 것을 約 20個의 成分으로 分離하게 되었는데, 이것은 尿素에 依해 各 casein 成分間의 相互作用이 抑制되고, starch gel에 依한 分子篩 效果에 依해 分離能力이 增大된 것으로 報告하였으며, 以後 各 casein의 遺傳的 變異체가 確認되기 始作하여, Aschaffenburg(1961)가 濾紙電氣泳動法을 利用해서 β -casein의 遺傳的 變異체 A·B·C가 存在함을 報告한 以來, α_s - 및 k-casein 에도 여러 種類의 遺傳的 變異체가 存在함이 確認되고 있다 (Tompson, 1962; Mackinlay, 1964; Nellin, 1964; Woychick, 1964).

한편, β -casein은 全 casein의 約 30%를 차지하며, Wake等(1961)의 starch gel 電氣泳動에서는 易動도가 0.80으로 나타나는 成分인데 209個의 amino 酸으로 構成되어 있고, monomer의 分子量은 24,000으로 알려져 있으며 (Ribadeau-Duman等, 1972; Brignon, 1970), 分子當 5個의 磷酸基를 가지고 있으나, α_{s1} -casein과 마찬가지로 cysteine 殘基와 炭水化

물은 함유하고 있지 않다.

一般的으로 casein의 各成分은 proline 含量이 높고, 또한 이들이 分子全体에 分布하고 있기 때문에 規則性 二次構造를 갖을 確率이 낮고, random 構造를 가지고 있을 것으로 생각되는데, 특히 β -casein은 이와같은 傾向이 強하고 分子當 35個의 proline을 가지고 있다.

또한, β -casein은 自己會合하기 쉽고 室溫下의 中性溶液에서는 monomer와 polymer가 平衡狀態를 維持하는데, 이와같은 性質은 溫度와 蛋白質의 濃度에 依存하는 것으로 알려졌다 (Payens等, 1963).

即, 5°C에서는 大部分의 β -casein이 monomer로 存在하나 10°C에서는 12分子, 20°C에서는 約 50分子로 構成되어서 自己會合體로 存在하며 이 會合은 主로 疎水結合에 依한것으로 報告되었고, 또한 Ca感受性은 α_{s1} - 및 α_{s2} -casein보다 弱해서 中性溶液에 Ca를 添加하면 低溫에서는 凝固하지 않으나 室溫 以上에서는 凝固·沈殿한다 (Zittle等, 1963; Noomen, 1978).

β -casein의 遺傳的 變異體로는 A·B·C·D (Aschaffenburg, 1961, 1968)와 E (Vogline, 1972) 및 B_2 (Aschaffenburg等, 1968), 그리고 $A^1 \cdot A^2 \cdot A^3$ 의 存在 (Kiddy等, 1966; Peterson, 1966)가 現在까지 알려지고 있다.

한편, 最近에 와서 bulk cooler의 普及과 長距離 輸送에 依한 生乳의 低溫保存 機會가 많아짐에 따라 乳質의 溫度에 依한 變化가 重要的 研究 課題로 抬頭되고 있는데, 勿論 乳質變化의 原因으로서는 低溫性 細菌을 비롯한 여러가지가 생각될 수 있으나, 아직 未解決의 重要的 課題인 溫度에 依한 casein micelle의 變化亦是 牛乳 및 乳製品의 品質을 左右하는

가장 큰 要因으로 여겨진다.

이와같은 低温保存에 依한 casein micelle의 變化는 micelle의 構造解明이라고 하는 學問的인 關心에서뿐만 아니라, 應用面에 있어서도 process의 改良, 製品의 改善에 큰 影響을 미치고 있는데, 例를들면 cheese의 製造時 rennet에 依한 凝固時間의 延長, curd tension의 低下, whey 排出의 遲延과 關聯을 가지고 있다.

한편, casein은 乳中에서 주로 micelle 形態로 存在하고 있으나, 一部는 超遠心分離에 依해서도 沈降하지 않는 比較的 작은 polymer나 monomer로 되어 있어서, casein micelle과 이 非沈降性 casein部分과의 사이에 平衡關係가 存在하고 (McMeekin 等, 1965), 이 平衡關係는 溫度의 變化에 依해서 影響을 받는데 (Bohren, 1961), 即 牛乳를 低温에 保存하면 β -casein을 主成分으로 한 一部의 casein이 可溶性으로 되어 micelle로부터 遊離하며 (Rose, 1968; Downey 等, 1970; Niki 等, 1978), 다시 加溫하면 低温에서 可溶性이었던 casein이 可逆적으로 micelle에 吸着되어, 兩者사이에 溫度에 依存하는 平衡關係가 있는 것으로 알려졌다.

이와같이 牛乳를 冷却 및 加溫했을때에, micelle의 部分的인 解離·會合에 따라서 micelle 表面狀態가 變化하는 것이 電子顯微鏡 觀察로 確認까지 되고 있는데 (Rose 等, 1966), 이러한 micelle의 溫度에 依한 變化는 micelle을 構成하는 α_s -, β -, 및 k-casein 사이의 相互作用과, Ca 等 無機 ion 과의 結合樣式에 關係하고 있음을 나타내고 있으나, 이들의 性狀을 究明하는 研究가 困難한 主要한 理由는 casein이 서로 모여 自己會合을 일으키기 쉽고, 또한 會合된 各 casein은 鹽類와 다시 相互作用

하여 複合物を 形成하기 쉬운 때문이다. 따라서, micelle 中の 各 casein 에 對한 挙動을 追究하는 手段으로는 어떠한 解離劑를 使用해야 하는데, casein 의 解離·會合이 上記한대로 強한 溫度依存性을 갖는다는 意味는 casein 間의 相互作用에 疎水結合이 크게 關与한다는 것을 뜻하므로, 이런 點에서 尿素가 解離劑로 가장 広範圍하게 利用되고 있는 바, 安藤等(1972) 은 牛乳 casein micelle 溶液에 尿素를 添加해서 超遠心分離에 依해 遊離된 casein 成分을 調査한 結果, 그 主成分은 β -casein 이라고 報告 하였으며, 渡辺等(1972) 도 尿素處理에 依해 β -casein 이 micelle 로 부터 比較的 쉽게 遊離되어 나오는 것을 觀察하였다.

以上 牛乳 β -casein 의 分離方法 및 性狀 그리고 casein micelle 中の β -casein 舉動에 關한 研究結果를 要約하여 보았는데, 韓牛의 乳成分에 關한 研究는 거의 이루어지고 있지 않으나, 金等(1974) 과 張等(1974) 의 韓牛 乳 蛋白質에 關한 研究가 있었던바, 全 casein 의 電氣泳動結果, α_s -, β - 및 k-casein 의 組成을 確認하고, 乳牛 casein 에 비해 k-casein 의 含量이 적을 것이라고 考察했으며, DEAE-cellulose 에 依한 分別은 4 個의 fraction 을 提示하였으나, 各 fraction 別 溶出成分에 關한 確認은 되지 않았다.

Ⅲ. 材 料 및 方 法

1. 原料乳의 採取

本 試驗에 使用된 韓牛乳는 農村振興廳 濟州試驗場에서 韓牛의 品種維持와 改良을 爲하여 保存中인 純粹 韓牛로부터 分娩 後 1個月 以上の 常乳를 手搾乳에 依하여 採取하였으며, Holstein乳는 濟州大學 附屬牧場에서 飼育中인 個體에서 採取, 試料로서 使用하였다.

2. 酸 casein의 調製

採取直後の 新鮮乳를 3,000 rpm에서 20分間 遠心分離하여 얻어진 脫脂乳에 蒸溜水를 添加하여, 3倍量으로 稀釈한 後, 0.1 N - HCl을 添加하여 casein의 等電点인 pH 4.6에서 沈澱시키고 上澄液을 除去한 다음, 蒸溜水를 利用한 2回의 再沈澱 過程을 거쳐, alcohol, acetone, ether 順으로 處理하여 室溫에서 乾燥시켰다.

3. poly acrylamide gel(PAG) disc 電氣泳動法

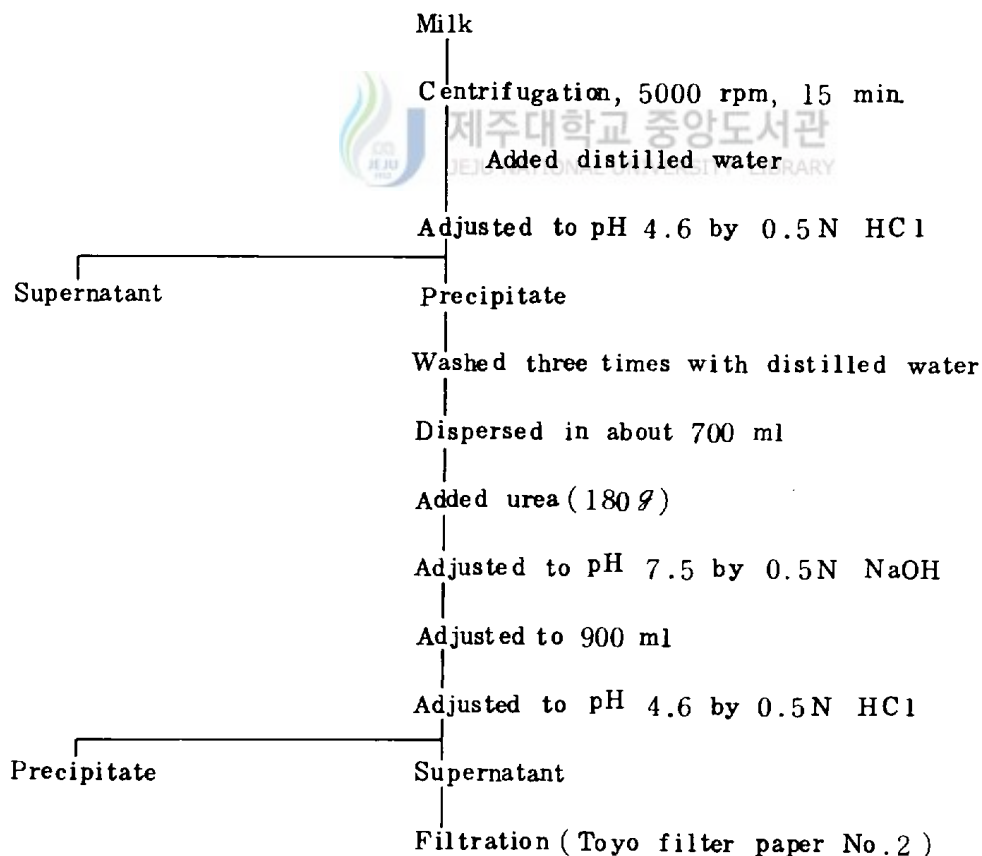
PAG 電氣泳動은 Davis (1964)의 變法으로 實施하였는데, 即 4.5 M 尿素를 含有하는 pH 8.9의 tris - 塩酸緩衝液을 利用하였다.

7%의 acrylamide의 下層 gel은 Davis (1964)의 A液 C液 및 過硫酸 amonium을 含有하는 7.2 M 尿素液을 1:2:5의 比率로 混合해서 gel 化시켰으며, 이 下層 gel에 3.5% acrylamide의 上層 gel을 重層하고, 試料는 1 M sucrose를 含有하는 9 M 尿素溶液에 溶解시킨뒤, 泳動은 室溫에서 實施하였는데, column 1本當 3 mA로 約 90分間 通電하였으며,

終了後 gel 을 1% amido black 10 B 의 7% 酢酸溶液으로 20~30分
間 染色한 後, 7% 酢酸溶液中에서 脱色하였다.

4. β -casein 의 分離 및 精製

韓牛乳 全 casein 으로부터 β -casein 을 分離하는 方法에 関하여는, 全
히 報告되어 있지 않기 때문에 分離, 精製方法을 確立할 目的으로 乳牛
의 境遇에 많이 利用되고 있는 2가지 方法을 使用하여 比較, 檢討하였다.
即, 第一의 方法은 Aschaffenburg (1963) 의 方法으로 그림 1에 表示한
바와 같다.



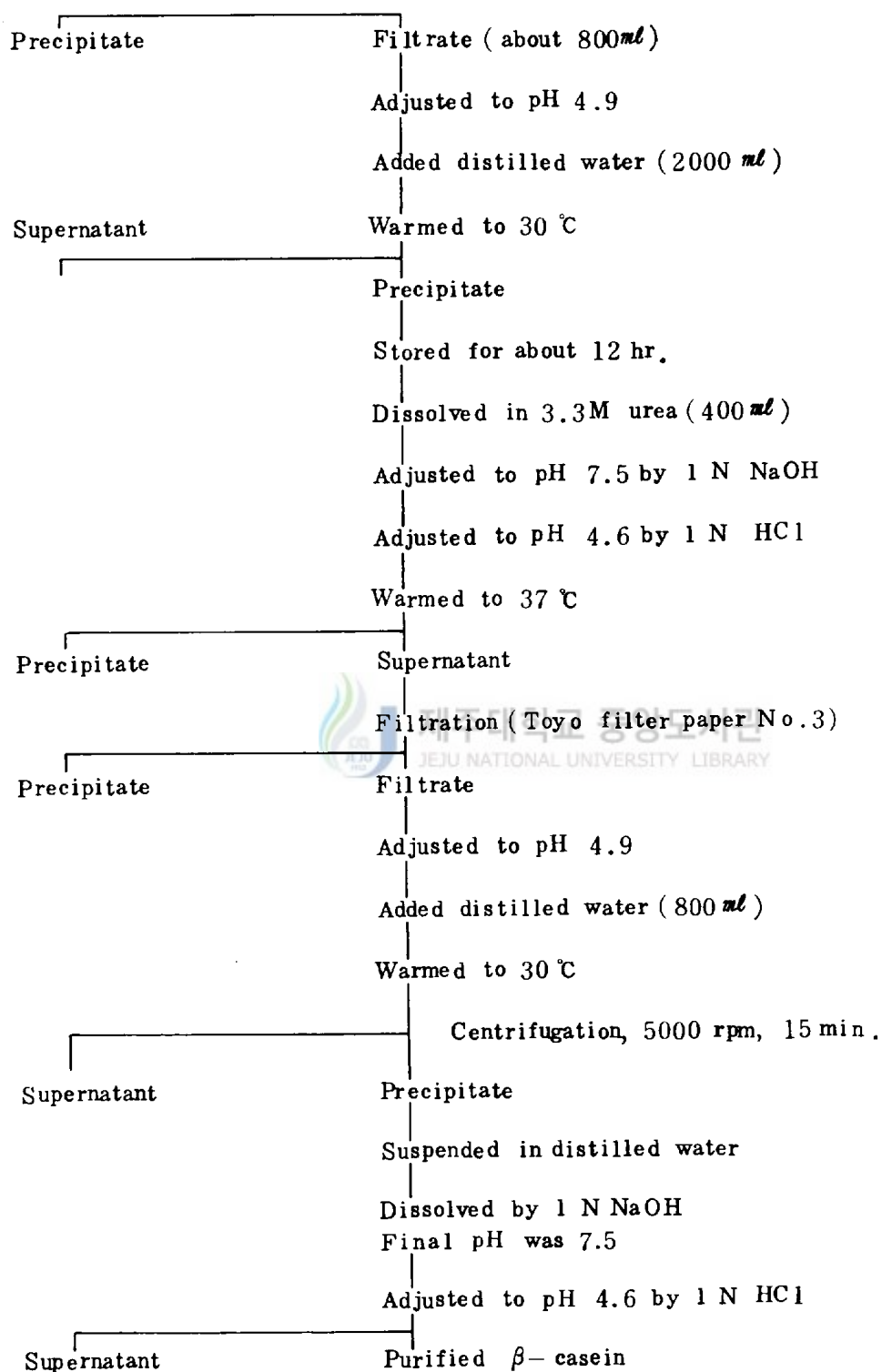


Fig. 1. Flow sheet of preparation of β -casein

第二의 方法은 Richardson (1973)의 方法으로 DEAE - cellulose chromatography에 依해서 얻어진 分割을 再次 CM - cellulose chromatography에 依해 分離·精製하는 方法으로, 利用된 DEAE - cellulose는 Whatman社 DE-52로 먼저, 4.5 M 尿素와 0.1% 2-mercaptoethanol을 含有하는 0.01 M imidagol- 鹽酸緩衝液 (pH 7.0)으로 洗滌해서 脫氣한 後 平衡化시켰으며, 이것을 2×50cm의 column에 充填한 다음, 室溫에서 chromatography用 緩衝液으로 安定化시키는 한편, 韓牛乳 酸 casein 1g을 同上의 緩衝液에 溶解하여 一夜透析한 다음, 透析試料 80ml (1g의 酸 casein)를 column에 吸着시키고, 食鹽濃度를 0.05~0.25 M까지 linear gradient로 實施하여, 流速은 50 ml/h로 10ml씩 分取한 다음, 液中の 蛋白質濃度는 280nm의 波長에 依해 吸收, 測定하여 溶離曲線을 求하였으며, 繼續해서 曲線上에 나타난 各 peak의 純度를 電氣泳動으로 確認한 結果, β-casein 區分에는 β-casein 以外の 不純物이 包含되어 있음이 認定되어. 再次 Whatman社 CM-52를 利用하여 chromatography에 依해 精製하였다. 即, 4.5 M 尿素와 0.01% 2-mercaptoethanol을 含有하는 0.01 M sodium formate 緩衝液을 使用하여 食鹽濃度 0~0.12 M의 linear gradient로 chromatography를 實施하여 β-casein을 採取하였다.

5. 溫度影響 試料의 調製

低溫保存時 遊離하는 casein 成分을 追究하는 試料는 韓牛脫脂乳를 攪拌하면서 24時間 2°C에 保存한 後, 35ml의 遠心管에 담아 2°C, 43,000×g에서 70分間 遠心分離하고, 그 上澄液을 採取하여 試料로 使用하였으며, 室溫保存時의 試料는 溫度를 20°C로 調整하고, 低溫保存時의 試料調製

와 같은 방법으로採取하였다.

6. 尿素影響 試料의 調製

韓牛脫脂乳를 最終濃度가 0.025, 0.25, 0.5, 1, 2 및 4 M이 되도록 尿素를 添加한 後, 43,000 × g에서 70分間 遠心分離하여, 5.와같은 方法으로 上澄液을 採取, 試料로 利用하였다.



IV. 結果 및 考察

1. β -casein의 分離 및 精製

Mellander(1939)가 Tiselius에 의해 開發된 電氣泳動法을 α -, β - 및 γ -casein의 分離에 適用한 以來, 여러 研究者에 의해 casein 成分의 分離法이 改良되었으며 特히 最近에 Smithies(1959)의 澱粉 gel 電氣泳動法과 Davis(1964)의 polyacrylamide gel 電氣泳動法이 開發되어 蛋白質의 研究는 큰 進展을 이루게 되었는데, 即 澱粉 gel, polyacrylamide gel 등의 支持體를 使用한 zone 電氣泳動法은 從來의 自由界面 電氣泳動法에 比해서 越等히 銳敏하게 性質이 類似한 成分까지 分離, 檢出을 可能하게 하였다.

또한, DEAE-cellulose chromatography 나 sephadex gel filtration의 方法이 並用되게 됨에 따라, Warner(1944), Hipp等(1950, 1952) 및 Zittle等(1962, 1963)의 各 casein 分離法이 보다 優秀한 分離, 精製法으로 確立되게 되었으며, 또한 全 casein 으로 부터 β -casein을 分離하는 方法으로는 물에 對한 溶解度法(Warner, 1944)과 alcohol 및 尿素法(Hipp等, 1952) 등이 있으나, 이들 方法에 依해서 얻어진 β -casein에는 他 成分이 混入되어, 純粹한 β -casein을 얻기가 어려워 近來에는 Hipp等の 方法을 改良한 Aschaffenburg(1963)의 尿素法이 널리 利用되고 있는데, 一名 尿素變法이라고도 불리우는 이 方法은 β -casein이 3.3M의 尿素溶液(pH 4.6)에 可溶性인 性質을 利用해서 分離하는 方法으로 乳牛의 境遇 이 方法으로 分割된 β -casein은 電氣泳動

的으로 均一함이 立証되었다.

한편, 最近에 와서는 Richardson(1974)이 DEAE- 와 CM-cellulose chromatography 를 利用하여 純粹한 β -casein 이 分離되었음을 報告하고 있는바, 本 實驗에서는 Aschaffenburg 와 Richardson 의 2 가지 方法을 通하여, 韓牛乳 β -casein 의 分離方法으로서의 良否를 檢討하고 아울러 casein 의 性状을 考察하였다.

β -casein 의 分離, 精製에 앞서 韓牛乳 whole casein 의 構成成分을 究明하기 爲해 7% acrylamide gel 로 電氣泳動을 實施하고, 이를 Holstein 乳의 casein 과 定性的으로 比較한 結果는 그림 2 와 같다.

牛乳 蛋白質의 大部分을 차지하는 casein 은 α_s - , β - , γ - 및 k-casein 으로 構成되어 있으며 (Mellander, 1939; Waugh, 1956), 이들 각 casein 成分의 構成比率은 品種, 泌乳期 및 個體 等に 따라 變하나 (Rolleri, 1956; Larson, 1957), 乳牛의 境遇 一般的으로 α_s - : β - : k-casein 의 比率이 50 : 30 : 15 로 되어있고, 此外 微量成分으로 γ - , R- , T_s - 및 S-casein 의 存在가 確認되고 있다 (Whitney, 1958; Grove, 1969).

그림 2 에서 韓牛乳의 casein 을 構成하는 主要 成分으로는 α_s - , β - k-casein 임을 辨 수 있어, 金等 (1974) 의 報告와 一致하였고, 微量成分인 γ - , T_s - 및 S-casein 에 相當하는 分離帶도 確認할 수 있었으며, Holstein 乳와 比較하여 α_s - : β - casein 의 量的 比率이 外觀적으로 거의 同等함을 나타내어 乳牛의 境遇와 差異를 보여주고 있으며, 電氣泳動 易動度에 있어서도 α_s - casein 은 類似하나, β - casein 에 있어서는 韓牛乳가 Holstein 乳보다 빠른 易動도를 보여주고 있다.

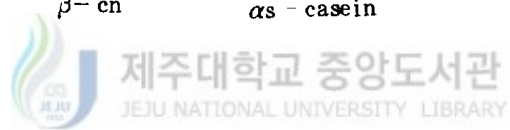
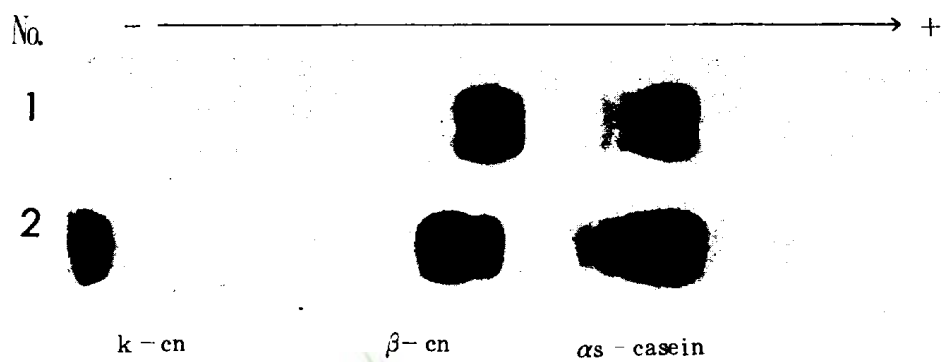


Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns
of Korean native cow's and Holstein's whole casein.

1. Korean native cow's casein

2. Holstein's casein

Electrophoresis at pH 8.9.

이 β -casein의 純化에 關한 目的의 比率 및 變異體의 性状等에 關한 爲의 試驗, 本 實驗에서 使用한 電氣泳動 結果만으로는 判別 可 無 缺, 實으로 보다 多量한 泳動條件의 設定과 各 casein의 二次 및 一次構造的 變異 等을 通하여 더욱 明瞭되야 할 事으로 생각된다.

1) Aschaffenburg의 方法에 依한 β -casein의 分離

韓牛脫脂乳 1ℓ에 1N-HCl을 添加하여 pH를 4.6으로 調整했을 때 生成된 沈澱物(casein)을 180g의 尿素와 總體 積 70ml의 水에 分散시킨 後 1N-NaOH를 添加하여 pH를 7.5로 하여 最終的 으로 尿素濃度가 3.3M이 되도록 蒸溜水를 添加한 다음 pH를 4.6으로 하여, 3.3M 尿素에 不溶性 成分은 가시운 凝集物로서 沈澱하 나, 그 成分은 2에서 나타낸 것 처럼 α_s -casein을 主 成分으로 하여 어느 정도 的 β -casein을 含有하고 있으며, 3.3M의 尿素可溶性 成分은 乳牛의 境遇처럼 大部分이 β -casein을 主成分으로 하고 있었다.

그러나 이 方法에 依해서 最終的으로 分離·精製된 β -casein (그림 3의 3)에는 α_s -casein으로 推定되는 相當量의 夾雜物을 볼 수 있어서 乳牛의 境遇와는 달리, Aschaffenburg의 方法만으로는 純粹한 韓牛乳의 β -casein分離가 困難한 것으로 생각된다.

2) Richardson 등의 方法에 依한 β -casein의 分離·精製

乳蛋白質의 分離에 利用되고 있는 ion 交換 chromatography 中에서 가장 많이 使用되는 것은 DEAE-와 CM-cellulose 인데 Sober (1951)가 開發한 DEAE-cellulose chromatography는 Peterson 等

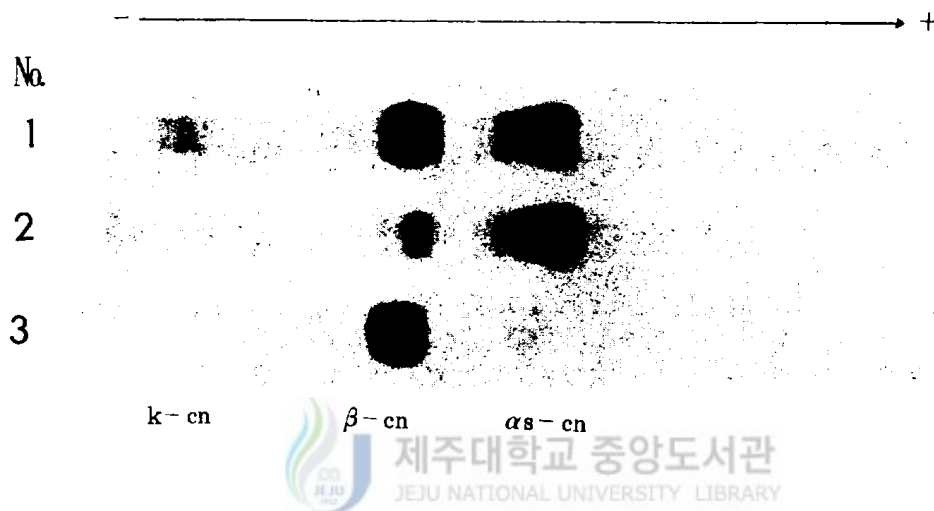


Fig. 3. Fraction of Korean native cow's β -casein according to the modified urea method of Aschaffenburg.

1, whole casein ; 2, components insoluble in 3.3 M - urea at pH 4.6 ; 3, β - casein which is soluble these condition.

Polyacrylamide gel electrophoresis is at pH 8.9.

(1958)에 의해 처음으로 血清蛋白質의 分離에 使用되었으며, Tarassuk (1962)에 의해 乳蛋白質의 分離에 應用하게 되었고, Dumas 等(1964)은 尿素를 包含한 緩衝液을 利用하여 casein의 DEAE-cellulose chromatography를 實施, 完全히 均一하지는 않으나 各各의 α_s -, β - 및 k-casein에 相當하는 peak를 얻었다.

Tarassuk(1962)도 磷酸緩衝液을 使用하여 DEAE-cellulose chromatography를 stepwise 法과 gradient 法으로 實施하였던바, gradient 法에 의한 casein의 溶出曲線은 stepwise 法과 大体로 비슷한 7個의 peak로 나타냈으나, gradient 法에서는 緩衝液中의 食鹽濃度가 直線的으로 增加하기 때문에 蛋白質의 溶離가 連續적으로 되어 stepwise 法보다 溶出曲線을 正確하게 解析할 수 있다고 報告하였다.

한편, 最近 Richardson 等(1975)은 DEAE-와 CM-cellulose chromatography를 利用하여, casein을 보다 純粹하게 分離·精製할 수 있다고 報告하고 있는 바, 本 實驗에서는 이 方法을 韓牛乳 casein에 適用하여 分離의 適合성을 檢討코져 施行하였다.

먼저 韓牛乳 casein을 0.01 M imidazol - 鹽酸緩衝液 (pH 7.0)을 使用하여 室溫에서 DEAE-cellulose chromatography를 實施하고 그 結果를 그림 4에 나타냈는데 本 그림에서 最初의 peak는 非吸着性의 casein (unabsorbed material, AM)이고, 이어서 結合 peak(A·B·C)가 얻어질바, 各 peak의 成分을 確認하기 爲하 施行한 PAG 電氣泳動 結果는 그림 5와 같다.

最初 peak의 非吸着性 物質은 Rose 等(1970)과 El-Negoumy(1967)

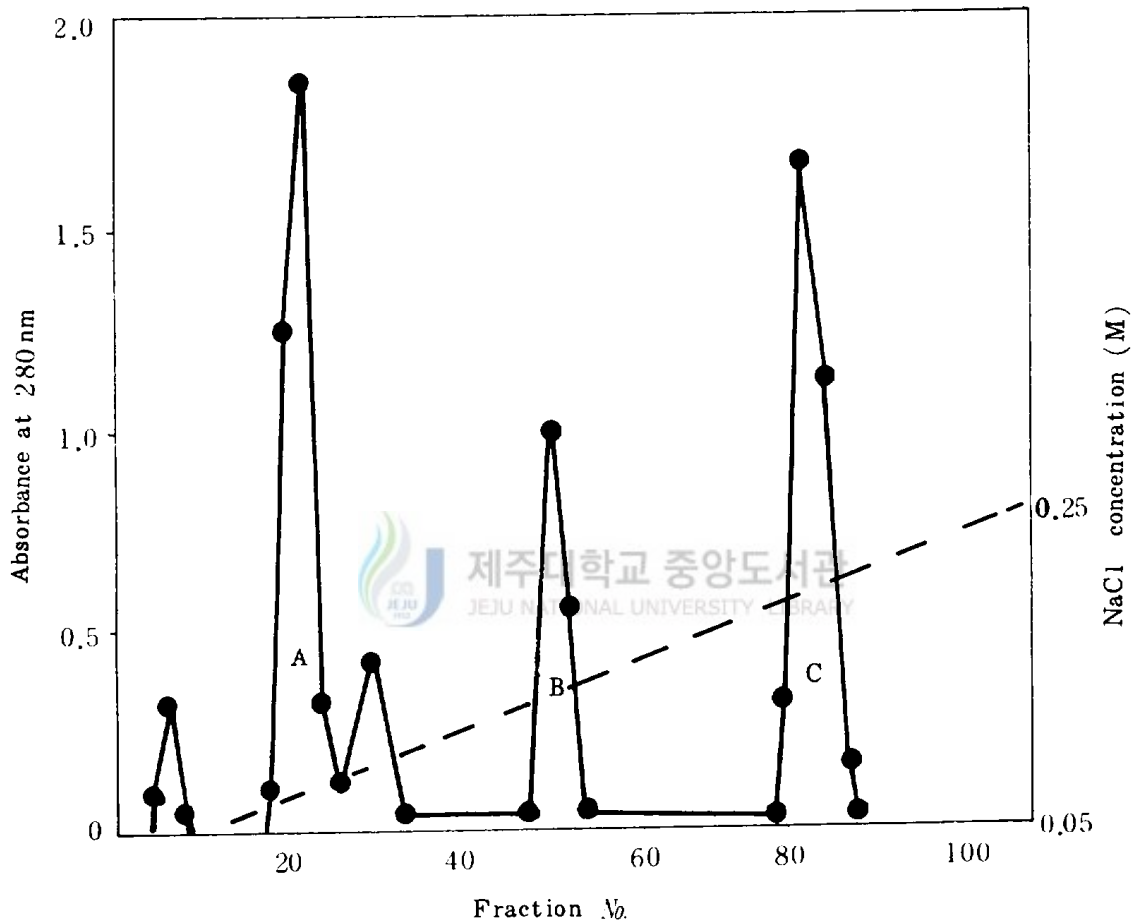


Fig. 4. Chromatography on a DEAE-cellulose column (2 × 50 cm) of 1 g of Korean native cow's whole casein using a linear gradient from 0.05~0.25 M - NaCl. Flow rate was maintained at 50 ml per hour. A tube contained 10 ml elute.

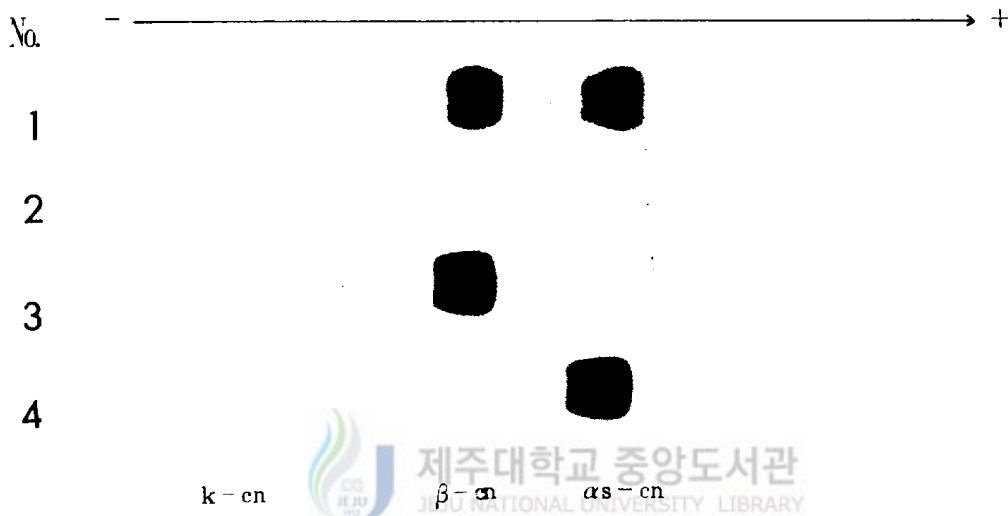


Fig. 5. Polyacrylamide gel urea electrophoretic patterns of Korean native cow's whole casein and casein fraction obtained by DEAE -cellulose chromatography (Fig. 4)

1, whole casein ; 2, fraction A ; 3, fraction B ; 4, fraction C.

가 報告한 γ -casein 區分이고, 室溫에서 白濁하는 所謂 Ts-casein 의 性質을 가지고 있는 것으로 생각되며, peak A·B·C는 各各 k -, β - 및 α_s -casein 에 相當하는 成分으로 電氣泳動 結果 確認되었으나, β -casein 區分 (peak B)에는 α_s -casein 에 相當하는 少量의 夾雜物이 나타났으므로 純粹한 β -casein 을 얻기 爲하여 이것을 再次 0.01 M sodium formate 緩衝液을 利用하여 CM-cellulose chromatography 를 實施하였다.

그 結果를 그림 6 에 나타냈고 純度を 確認하기 爲하여 施行한 電氣泳動 結果는 그림 7 에 나타냈는데, 그림에서 보는 것처럼 chromatography 에서 單一個의 peak 가 나타났고 또한, 電氣泳動的으로 다른 成分이 全혀 含有되어 있지 않은 純粹함이 立證되어(그림 7 의 3), 韓牛乳 β -casein 分離·精製法으로는 Richardson 等の 方法이 適合하다고 생각된다.

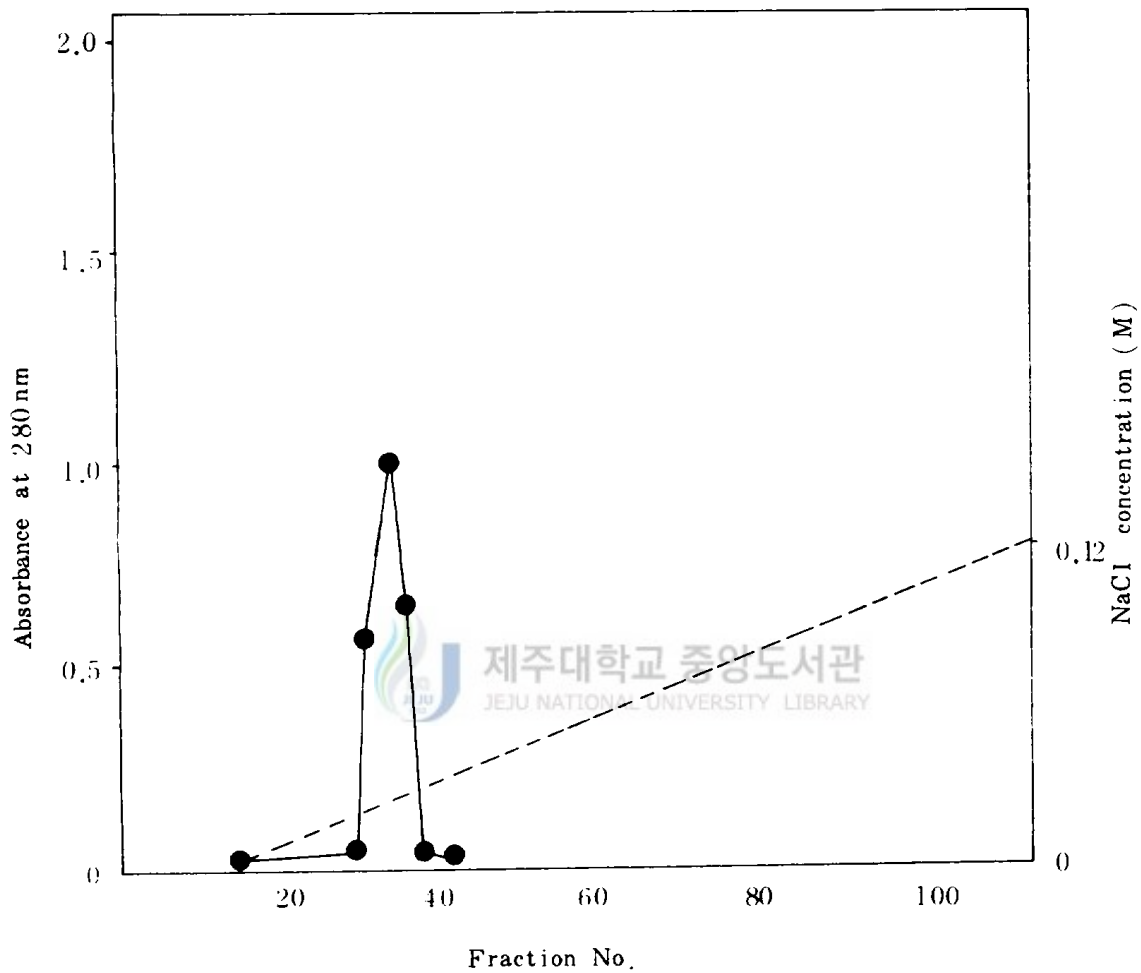


Fig. 6 . Chromatography of Korean native cow's β -casein on a CM-cellulose column (2×50) using a linear gradient from 0~ 0.12 M - NaCl. Flow rate was maintained at 50 ml per hour. A tube contained 10 ml elute.

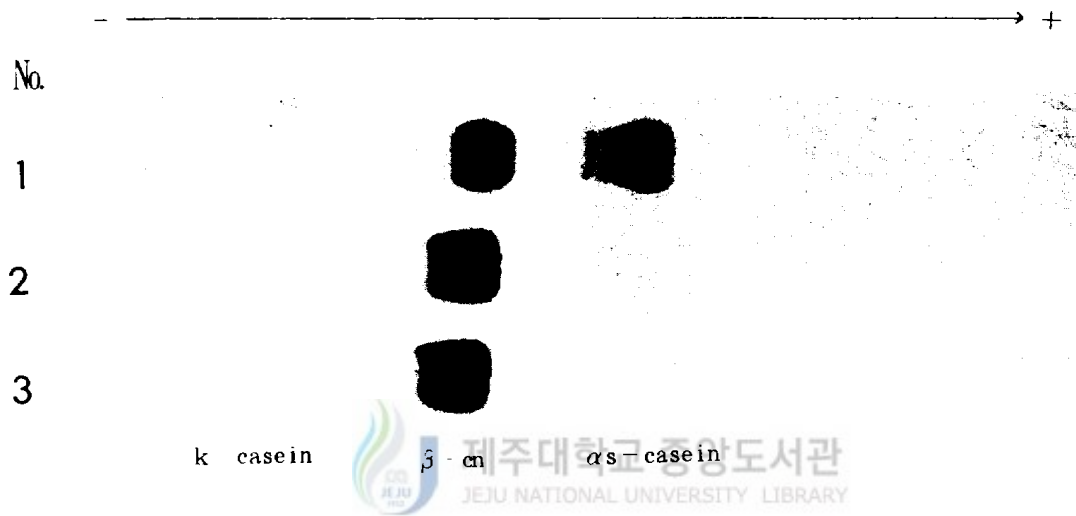


Fig. 7. Acrylamide gel urea electrophoretic patterns of Korean native cow's whole casein and β casein fraction obtained by DEAE- and CM-cellulose column chromatography
 1, whole casein ; 2, fraction B (Fig. 4) ; 3, fraction A (Fig. 6)

2. 溫度 및 尿素에 의한 casein micelle의 變化

低溫保存에 따라 casein micelle로부터 遊離하는 casein 成分을 調査하기 爲해서, 韓牛 脫脂乳를 2°C와 이의 對照區로서 室溫 (20°C)에서 24時間 保存한 後 43,000 × g에서 70分間 遠心分離하여 非沈降性, 部分을 얻었는데, 이 遠心上澄液 (非沈降性 部分)의 成分을 究明하기 爲해서 尿素 gel 電氣泳動을 實施하여 그 結果를 그림 8 (2°C)과 9 (20°C)에 各各 나타냈다.

그림 8에서 보면 그림 9에서와는 달리, 溫度에 依한 差異를 알수 있는데 이는 韓牛乳의 境遇에 있어서도 乳牛와 마찬가지로 β -casein의 變化가 顯著히 나타나는 한편 低溫에서 micelle 變化의 主要한 成分을 차지하고 있음을 알 수 있는데, 이와같은 大部分의 β -casein이 低溫에서 casein micelle로부터 非沈降性 部分으로 遊離되어 나온다는 事實은 casein micelle 中에서 β -casein이 比較的 溶出되기 쉬운 位置에 存在하고 있고, 이들 β -casein이 主로 疎水結合으로 micelle과 相互作用하고 있다고 생각되어 지는데, 即 乳牛의 境遇 β -casein의 重合體가 低溫에 依해 發熱的인 脫解合을 일으켜서 單量體로 移行하는 現象이 報告되고 있는데, 이와같은 類似한 現象이 低溫處理時 韓牛乳 casein micelle에 있어서도 나타나고 있다고 思料된다.

또한 韓牛脫脂乳를 最終濃도가 0.025, 0.25, 0.5, 1, 2 및 4 M이 되도록 尿素를 添加한 後, 43,000 × g에서 70分間 (20°C) 遠心分離를 施行하여

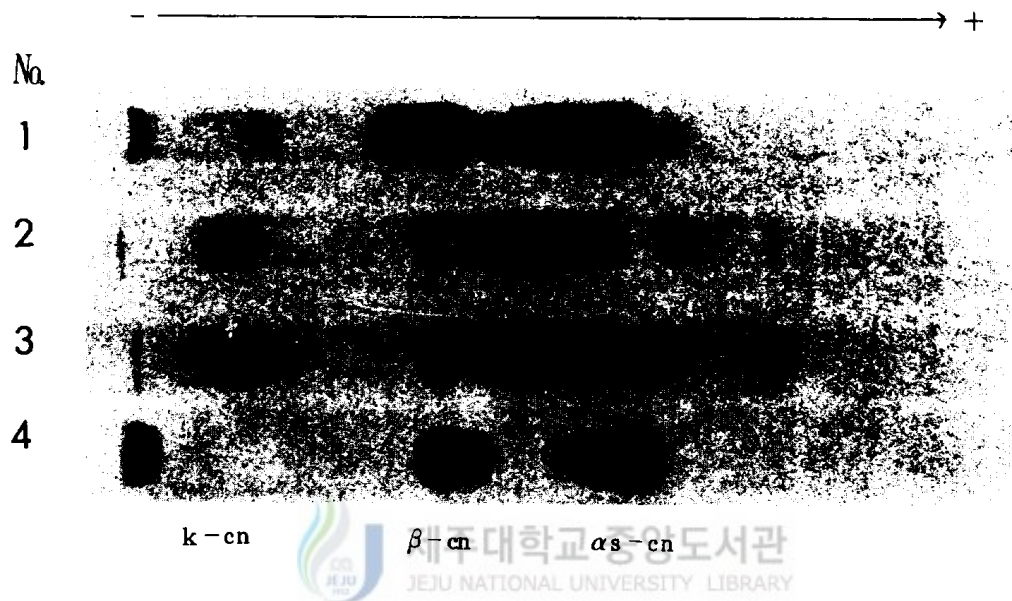


Fig. 8. PAE of (1) Korean native cow's skim milk, (2) (3) supernatant separated by centrifugation at $43,000 \times g$, 70 min. from skim milk and skim milk which was stored at low temperature (2 °C, 24 hrs), and (4) whole casein.

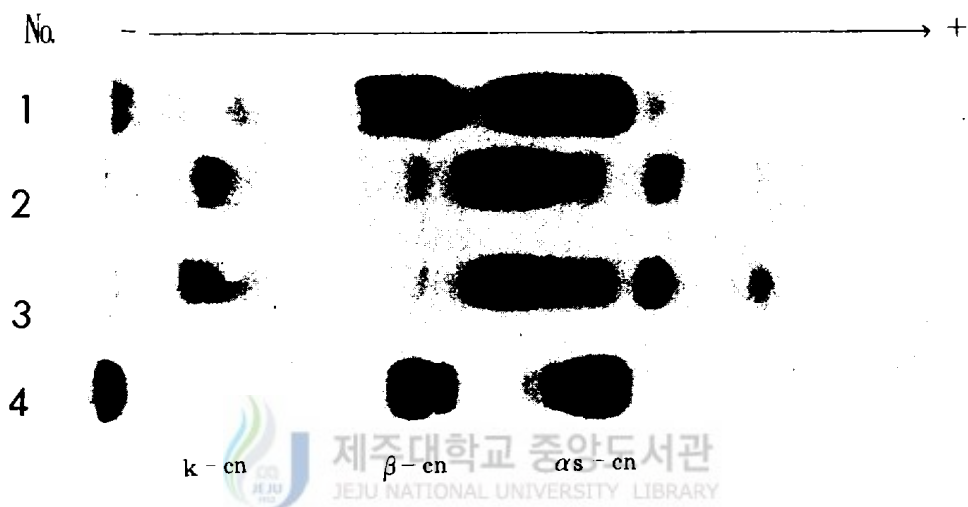


Fig. 9, PAG of (1) Korean native cow's skim milk, (2) (3) supernatant separated by centrifugation at $43,000\times g$, 70 min. from skim milk and skim milk which was stored room temperature (20 C, 24 hrs.) and whole casein (4).

上澄液中の casein 成分을 尿素 gel 電氣泳動을 通하여 觀察하고 그 結果를 그림 10에 提示하였다.

그림에서 볼 수 있는 것처럼 添加하는 尿素濃度가 增加함에 따라서 非沈降性 casein 成分이 增加함을 觀察할 수 있어, 亦是 乳牛의 境遇와 類似한 傾向을 보여주고 있으나, β -casein의 挙動에 關하여는 乳牛 casein micelle의 境遇 1 M以上の 尿素存在下에서 急激한 變化가 觀察된데 (渡辺, 1972) 比하여, 韓牛의 境遇는 電氣泳動的으로 보아서 2 M以上에서 顯著한 增加가 나타났다.

以上の 低温保存과 尿素添加에 依해 非沈降性 部分에의 casein 成分 移行이 β -casein을 主 成分으로 일어나는 點으로 미루어, 韓牛乳의 境遇에 있어서도 casein micelle과 非沈降性 casein의 結合에 疎水結合이 크게 關与하고 있을 것으로 思料된다.

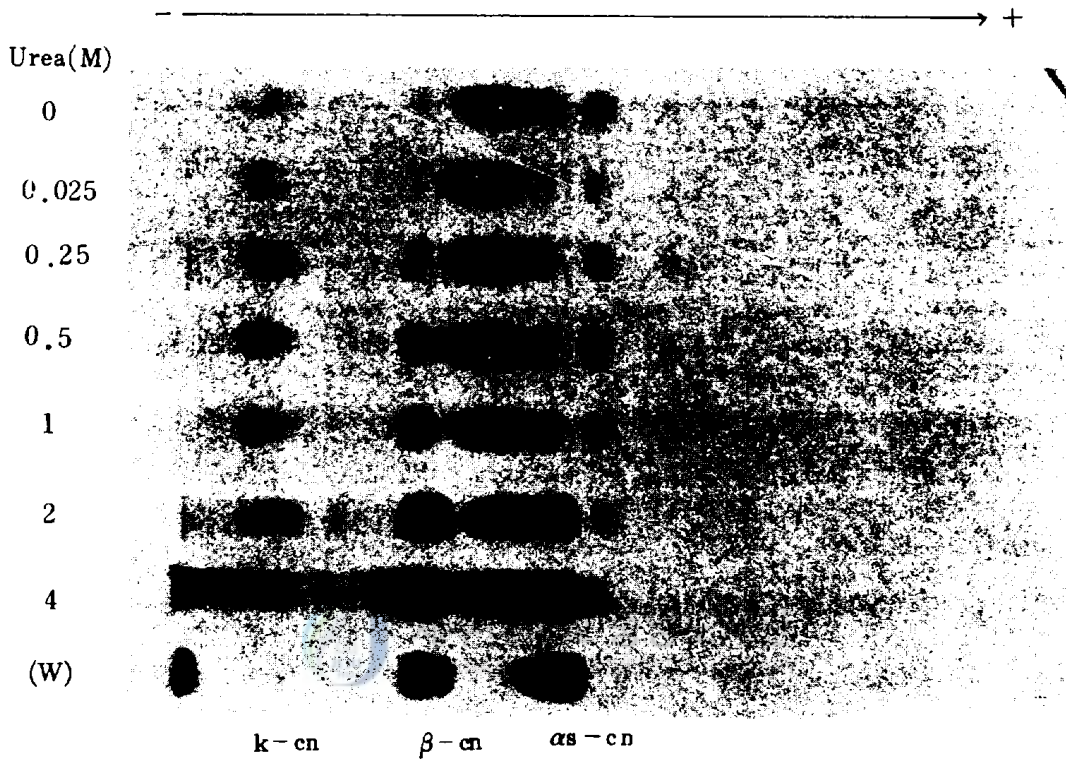


Fig.10. PAE of supernatant separated by centrifugation at $43,000 \times g$, 70 min. from the Korean native cow's skim milk with addition of urea and whole casein (W).

Summary

This study was carried out to clarify the physico-chemical properties of Korean native cow's milk and to offer fundamental information for the improvement of Korean native cattle.

Whole casein, isolation and purification of β -casein, and the influence of temperature and urea on casein micelle components was studied using PAG-electrophoresis.

The results are as follows:

1. Korean native cow's milk casein was separated into major three components (α_s -, β - and κ -casein) and minor components (γ -, T_s - and S -casein) using PAG-electrophoresis.

The β -casein in Korean native cow's milk had a slower mobility than that of Holstein.

The ratio of α_s -: β -casein in Korean native cow's milk was 1:1 in appearance.

2. In the PAG-electrophoretic pattern, β -casein prepared by modified urea fractionation method showed traces of α_s -casein with the exception of β -casein.

However, pure β -casein was obtained by DEAE- and CM-cellulose chromatography in a buffer containing urea and 2-mercaptoethanol.

3. The low temperature treatment affected to the

constituents of soluble casein, mainly increased the amount of β -casein.

4. The effects of urea resembled those of reducing temperature and the amount of supernatant casein increased distinctly in the presence of 2M urea. From these results it assumed that β -casein micelle was accessible to solvents and incorporated into micelle by hydrophobic bonding.



参 考 文 献

1. Aschaffenburg, P. 1961. Inherited casein variants in cow's milk. *Nature*, 192:431.
2. Aschaffenburg, R. 1963. Preparation of β -casein by a modified urea fractionation method. *J. Dairy Res.*, 30:259.
3. Aschaffenburg, R., A. Sen and M. P. Thompson. 1968. Genetic variants of casein in Indian and African Zebu cattle. *Comp. Biochem. Physiol.*, 25:177.
4. Bohren, H. U. and V. R. Wenner. 1961. Natural state of milk protein; I. Composition of the micellar and soluble casein of milk after ultracentrifugal sedimentation. *J. Dairy Sci.*, 44:1213.
5. Brignon, G., B. Ribadeau-Dumas, F. Grosclaude and J. C. Mercier. 1970. Structure primaire de la caséine β bovine. *Eur. J. Biochem.*, 22:179.
6. Davies, D. T. and J. C. D. White. 1960. The use of ultrafiltration and in determination the partition of milk constituents between the aqueous and disperse phase. *J. Dairy Res.*, 27:171.
7. Davis, B. J. 1974. Disc electrophoresis - II; Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121:404.
8. Downey, W. K. and R. F. Murphy. 1970. The temperature-dependent dissociation of β -casein from bovine casein micelles and complexes. *J. Dairy Res.*, 37:361.
9. Dumas, B. R., J. L. Maubois, G. Mocquot and Garnier. 1964. Etude de la constitution de la casein de vache par chromatographie sur colonnes de

- diethylaminoethyl-cellulose en milieu uree. *Biochim. Biophys. Acta*, 82: 494.
10. El-Negoumy, A. M. 1967. Polymorphism in γ -caseins from the milk individual cow. *Biochim. Biophys. Acta*, 140: 503.
 11. Grove, M. L. 1969. Some minor components of casein and other phosphoprotein in milk. A review. *J. Dairy Sci.*, 52: 1155.
 12. Hipp, N. J., Groves, M. L., Guster, J.H. and T. L. McMeekin. 1950. Separation of γ -casein. *J. Am. Chem. Soc.*, 72: 4928.
 13. Hipp, N. J., Groves, M. L., Guster, J. H. and T. L. McMeekin. 1952. Separation of α -, β -, and γ -casein. *J. Dairy Sci.*, 35: 272.
 14. Jenness, R., B. L. Larson, T. L. McMeekin, A. M. Swanson, G. H. Whitnah and R. McL Whitney. 1956. Nomenclature of the protein of bovine milk. *J. Dairy Sci.*, 39: 536.
 15. Kiddy, C. A., R. F. Peterson and F. C. Kopfler. 1966. Genetic control of the variants of β -casein A. *J. Dairy Sci.*, 49: 742.
 16. Larson, B. L. and K. A. Kendall. 1957. Daily production of the specific milk proteins during the lactation period. *J. Dairy Sci.*, 40: 377.
 17. Linderström-Lang, K. 1925. Study on casein; II. Is casein a homogeneous substance? *Compt. Trav. Carlsberg Ser. Chim.*, 16(1): 48.
 18. Mackinlay, A. G. and R. G. Wake. 1964. The heterogeneity of k-casein. *Biophys. Acta*, 93: 378.
 19. Masumitsu Watanabe, Isao Kato, Keiichi Shimazki, Ryoya Niki and Shunrokuro Arima. 1973. Influence of temperature and urea on casein micelle components. *Japanese J. Zootechnical Sci.*, 44(3): 148.

20. McMeekin, T. and M. L. Groves. 1965. Fundamentals of dairy chemistry. The AVI publishing Co. Inc. P. 374.
21. Mellander, O. 1939. Elektrophoretische untersuchung von casein. Biochem. J., 300 : 240.
22. Neelin, J. M. 1964. Variants of k-casein revealed by improved starch gel electrophoresis. J. Dairy Sci., 47 : 506.
23. Niki, R., H. J. Lee and S. Arima. 1978. Einfluß der kühlung auf die casein-micellen der kuhmilch. Milchwissenschaft, 33 : 473.
24. Nitschmann, H. 1949. Electron mikroskopische grossen-bestimmung der calcium - caseinatteilchenin kuhmilch. Helv. Chim. Acta, 32 : 1258.
25. Noomen, A. 1978. Activity of calf rennet. Neth. Milk Dairy J., 49 : 68.
26. Payens, T. A. J. and B. W. Van Markwijk. 1963. Some factors of the association of μ -casein, Biochim. Biophys. Acta, 71 : 517.
27. Peterson, R. F. and F. C. Kopfler. 1966. Detection of new types of β -casein by polyacrylamide gel electrophoresis at acid pH: a proposed nomenclature. Biochem. Biophys. Res. Commun., 22 : 388.
28. Ramsdell, G. A. and E. O. Whittier. 1944. J. Biol. Chem., 154 : 413.
29. Ribadeau-Duman, B., G. Brignon, F. Grosclaude and J. C. Mercier. 1972. Structure primaire de la caséin β bovine. Eur. J. Biochem., 25 : 505.
30. Richardson, B. C., L. K. Creamer and R. E. Munford. 1973. Comparative micelle structure; I. The isolation and chemical characterization of caprine k-casein. Biochim. Biophys. Acta, 310 : 111.
31. Richardson, B. C., L. K. Creamer, K. N. Pearce and R. E. Munford. 1974. Comparative micelle structure; II. Structure and composition of casein

- micelle in bovine and caprine milk as compared with those in bovine milk. *J. Dairy Res.*, 41:239.
32. Richardson, B. C. and L. K. Creamer. 1975. Comparative micelle; IV. The similarity between caprine α s-casein and bovine α s₃-casein. *Biochim. Biophys. Acta*, 393:37.
33. Rollri, G. D., B. L. Larson and R. W. Touchberry. 1956. Protein production in the bovine. Breed and individual variations in the specific protein constituents of milk. *J. Dairy Sci.*, 39:1683.
34. Rose, D. and J. R. Colvin. 1966. Appearance and size of micelles from bovine milk. *J. Dairy Sci.*, 49:1091.
35. Rose, D. 1968. Relation between micellar and serum casein in bovine milk. *J. Dairy Sci.*, 51:897.
36. Rose, D., D. T. Davies and M. Yaguchi. 1968. Quantitative determination of casein mixture by column chromatography on DEAE-cellulose. *J. Dairy Sci.*, 51:8.
37. Smithies, O. 1959. *Advances in protein chemistry*. Academic Press. Inc., New York.
38. Sober, H. A. and E. A. Peterson. 1958. Chromatography of protein on cellulose ion exchangers. *J. Am. Chem. Soc.*, 80:665.
39. Tarassuk, N. P. and M. Yaguchi. 1962. Chromatography of milk proteins on DEAE-cellulose. *J. Dairy Sci.*, 45:253.
40. Tompson, M. P., C. A. Kiddy, L. Pepper and C. A. Zittle. 1962. Variations in the α s-casein fraction of individual. *Nature*, 195:100.
41. Tompson, M. P., N. P. Tarassuk, R. Jenness, H. A. Lillevic, U. S.

- Ashworth and D. Rose. 1965. Nomenclature of the proteins of cow's milk—Second revision. J. Dairy Sci., 48:159.
42. Voglino, G. F. 1972. A new β -casein variations in Piedmont cattle. Anim. Blood Groups Biochem. Genet., 3:61.
43. Wake, R. G. and R. L. Baldwin. 1961. Analysis of casein fractions by zone electrophoresis in concentrated urea. Biochim. Biophys. Acta, 47:225.
44. Warner, R. C. 1944. Separation of α - and β -casein. J. Am. Chem. Soc., 66:1725.
45. Waugh, D. F. and P. H. Von Hippel. 1956. k-casein and stabilization of casein micelles. J. Am. Chem. Soc., 78:4576.
46. Whitney, R. M. 1958. The minor proteins of bovine milk. J. Dairy Sci., 41:1303.
47. Woychik, J. H. 1964. Polymorphism in k-casein of cow's milk. Biochem. Biophys. Research Commun., 16:267.
48. Zittle, C. A. 1962. Procedure for isolation of k-casein by use of sulfuric acid. J. Dairy Sci., 15:650
49. Zittle, C. A. and M. Walter. 1963. Stabilization of β -casein by k-casein against precipitation by calcium chloride. J. Dairy Sci., 46:1189.
50. Zittle, C. A. and J. H. Guster. 1963. Purification and some of the properties of α s-casein and k-casein. J. Dairy Sci., 46:1183.
51. 安藤功一, 遊佐効五. 1974. カゼインミセルの形態に関する研究; Ⅲ. 尿素およびアセトアミドの影響. 日畜会報, 44(3):129.

52. 金榮教, 張柱翊. 1974. 韓牛乳 蛋白質에 關한 研究. 第 I 報 : DEAE-cellulose 에 依한 韓牛乳 蛋白質의 分別. 韓國食品科學會誌, 6:75.
53. 金煥卿. 1978. 韓牛改良에 關한 基礎的 研究. 韓畜誌, 20(6):592.
54. 陸鍾隆. 1959. 韓牛의 歷史的 背景. 畜產, 3(2~3號).
55. 張柱翊, 金榮教. 1974. 韓牛乳 蛋白質에 關한 研究. 第 II 報 : Sephadex-column 에 依한 韓牛乳 蛋白質의 分別. 韓畜誌, 16(2) : 134.

