低溫處理에 의한 Casein micelle의 硏究

李 賢 鍾

Influences of Low Temperature on Casein Micelle

Lee, Hyun Jong

Summary

Study was conducted to elucidate the properties, the equilibrium of soluble casein under low temperature condition(4℃).

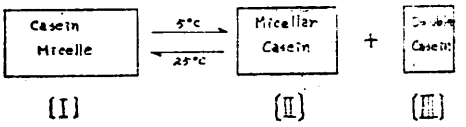
The results obtained are summarized as follows:

1. The low temperature treatment affected to the constituents of soluble casein, mainly increased the amount of β-casein. However, within the micelle two types of casein were found by solubility under low temperature.
2. It was found that the equilibrium was exsisted between micellar and soluble casein under low temperature.
3. It was assumed that the β-casein which released from the micelle bonds on the surface of micelle and contribute to the stability of casein micelle for the various circumstances.

1. 序 論

우리나라는 酪農의 規模가 적어 現在로서는 本格的인 冷藏의 体制가 거의 없다고 할 수 있으나 이미 先進 歐美諸國에서는 勞動力 不足에 依한 集乳回數의 節減, 牛乳工場의 大型化와 都市集中 等에 수반하여 점차로 bulk cooler가 普及됨에 따라 必然的으로 原料乳의 低溫 保存에 따라 일어나는 몇가지의 問題, 그 중에도 低溫性 細菌에 依한 乳質의 變化가 問題視되고 있다. 低溫性 細菌에 依한 乳質의 變化로서는 風味의 變化, 粘質化, 脂肪分解 및 蛋白質 그 중에도 特히 Casein micelle의 物理化學的인 變化를 생각할 수 있으며 細菌에 依한 變化는 原料乳의 乳質로부터 乳製品의 品質에 이르기까지 그 影響이 크기 때문에 一般的으로 폭넓은 關心이 주어지고 있다.

한편 最近 Casein micelle의 低溫保存에 따른 影響도 純學問的 問題로서 뿐만 아니라 乳製品 特히 Cheese 製造時 Curd의 굳기에 變化를 준다는 實際的인 問題로서 注目을 받고 있다. 牛乳 또는 Casein micelle 溶液을 低溫에 保存했을 때 β-Casein을 主된 成分으로 하는 可溶性 Casein이 溶出한다는 事實은 여러 學者들에 依해 확인됐다. (Downey and Murphy 1970, Rose 1968). 즉 Downey 等(1970)은 脫脂乳를 冷却했을때 Casein micelle로부터 遊離되어 나오는 可溶性 Casein의 性質에 關해 硏究한 結果 다음과 같은 Scheme을 提案하고 Casein micelle과 低溫에서 유리하는 Casein 사이에는 어느 程度의 平衡關係가 있다고 報告했다.



Scheme 1. Suggested equilibrium between micellar and soluble casein

이에 對해 Rose 等(1968)은 平衡關係의 存在에 關해 否定的인 結論을 내리고 있다. 本 實驗에서는 牛乳 低溫保存이 乳蛋白質에 미치는 影響에 關한 硏究의 하나로서 Casein micelle을 低溫에 保存할 때 Casein

micelle로부터 유리하는 可溶性 Casein의 性質 및 平衡關係의 存在 可能性을 確認하고 이에서 얻어진 結果를 토대로 Casein micelle의 構造를 究明코자 시행하였다.

Ⅱ. 材料 및 方法

1. Casein micelle 溶液의 調製

Holstein 混合乳로부터 얻은 新鮮한 脫脂乳를 室溫에서 43,000×g, 70分間 遠心分離해서 沈澱하는 Casein micelle pellet를 glass homogenizer로 脫脂乳와 同量이 되도록 限外濾過乳淸에 懸濁해서 4℃에서 stirrer로 攪拌하면서 24時間 유지 試料로 使用했다.

2. 限外濾過乳淸의 調製

新鮮脫脂乳에 Sodium azide를 0.02% 넣고 2℃에서 限外濾過機를 利用, 먼저 分子量 20萬을 濾過할 수 있는 membrane filter로 濾過하고 그 濾液을 다시 分子量 1萬이 濾過可能한 membrane filter로 濾過해서 그 濾液을 利用했으며 micro-kjeldahl 및 polyacrylamide gel 電氣泳動法에 依해 蛋白質이 포함되어 있지 않음을 確認했다.

3. 그의 蛋白質量과 電氣泳動은 各各 micro-kjeldahl 및 polyacrylamide gel 電氣泳動法을 利用했다.

4. 實驗은 다음과 같이 둘로 나누어 시행했다.

實驗 1: 遠心管에 Casein micelle 懸濁液을 32cc 넣고 4℃에서 43,000×g, 70分間 遠心分離後 遠心管 最上部의 上澄液 5cc를 채취하여 遠心上澄液 部分으로 하고 나머지 上澄部分은 沈澱部分上部에 있는 弱한 沈澱部分이 흔들리지 않도록 조용히 버린 다음 沈澱部分은 原來의 量이 되도록 限外濾過乳淸을 넣어 glass homogenizer로 懸濁한 후 再次 4℃에서 stirrer로 攪拌하면서 24時間 保存하고 上記의 方法으로 再次 遠心分離하는 式으로 8~10回 반복하여 시행했다.

實驗 Ⅱ: 많은 量의 Casein micelle 懸濁液을 stock solution으로서 4℃에서 stirrer로 攪拌을 계속하면서 保存하고 24時間마다 一定量을 채취하여 實驗 Ⅰ과 마찬가지로 遠心分離해서 沈澱部分과 上澄部分으로 나누어 試料로 했다.

Ⅲ. 結果 및 考察

Fig 1에는 上澄液中에 溶出하는 可溶性 Casein量의 變化를 나타냈다. 圖上의 A는 實驗1의 結果로 各 단계까지 溶出한 可溶性 Casein量의 總和를 나타내고 있

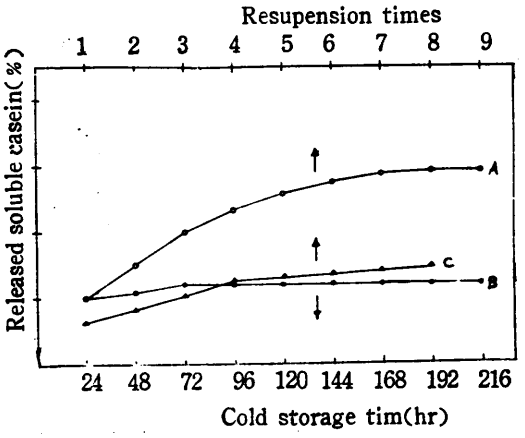


Fig 1. Influences of low temperature on the amountof soluble casein and β-casein released from casein micelle.
A○-○: Experiment Ⅰ
B●-●: Experiment Ⅱ
C△-△: Amount of β-casein calculated from experiment Ⅰ

으며 이와 같은 結果는 上澄液에 溶出되어 나오는 部分(scheme 1의 Ⅲ의 部分)을 系로부터 除去하면 그 除去된 部分을 보충하기 위해 micelle 部分으로부터 새로 可溶性 部分이 溶出되어 나오는 것을 暗示하고 있다. 特히 4回째까지는 그 傾向이 현저하나 그 이후는 增加現象이 거의 보이지 않고 있다.

한편 實驗Ⅱ(圖上의B)에서는 3回까지는 약간 可溶性 Casein量이 增加하였으나 그 以後는 전연 變化를 보이지 않고 있다. Scheme 1에 依據해서 以上의 結果를 分析해 보면 低溫에서 Casein micelle로 부터 溶出되어나오는 部分(Ⅲ)을 遠心分離의 方法으로 계속하여 除去하면 除去部分을 補充하듯 새로 Casein micelle로부터 Ⅲ의 部分이 乳淸部分으로 移行해 온다. 이에 比해서 實驗 Ⅱ에서와 같이 系로부터 Ⅲ의 部分을 除去하지 않는 경우는 可溶性 Casein의 增加가 보이지 않는데 이와 같은 事實은 micelle 懸濁液中에서는 micelle狀의 Casein과 可溶性 Casein과의 사이에 어느 程度의 平衡이 存在하고 있을 可能性을 나타내고 있다. 그러나 實驗Ⅰ에 있어서 溶出되어 나오는 可溶性 Casein도 2回이상이 되면 增加量도 鈍化되고 또 8回 以後는 全然 增加하지 않는데 이와 같은 사실은 micelle 狀 Casein으로 부터 可溶性 Casein으로 移行해 오는 Casein量에는 限界가 있음을 암시하며 이와 같은 事實은 다음의 電氣泳動 pattern에서 8回째의 micelle狀 Casein中에 可溶性 Casein의 主成分인 β- Casein이

觀察되므로 더욱 확실히 알 수 있었다.

다음 實驗 I 에서 溶出되어 나오는 可溶性 Casein 및 沈澱部分의 micelle狀 Casein에 관해 그 構成하는Casein 成分을 알기 위해 gel 電氣泳動을 해서 그 結果를 圖2에 나타냈다.

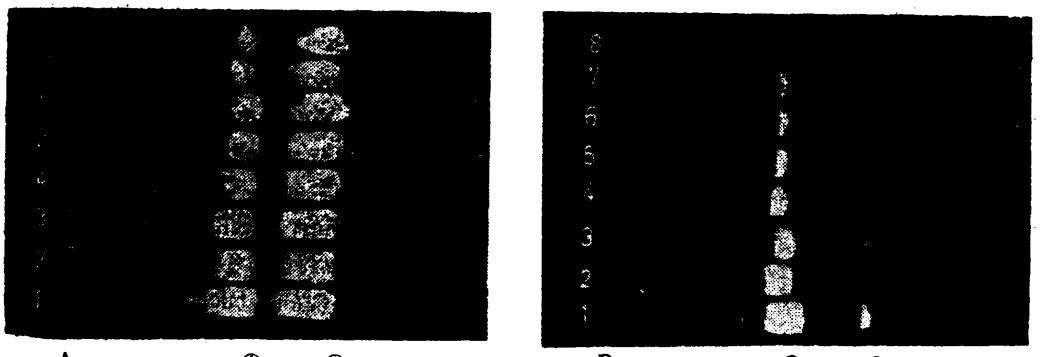


Fig 2 Polyacrylamide gelelectrophoretic patterns of experiment I.
A: micellar casein. B soluble casein
①: B-casein ② :α_s-casein 1~8: Resuspension time

圖2에 나타난 바와 같이 β-Casein이 可溶性 Casein의 主成分으로 이것은 수많은 硏究者에 依해 확인되었고 β-Casein이 溫度依存性 있는 會合性을 갖고 있다는 사실을 立證하고 있다. 沈澱部分은 8回까지 반복해서 可溶性 Casein을 除去해도 micelle狀 Casein에 β-Casein이 남아 있음을 보여주고 있다.

Table 1 Percentage of β-casein to total soluble casein releasedfrom casein micelle in experiment I.

1st	Resuspension	59.5(%)
2nd	〃	63.8
3rd	〃	56.3
4th	〃	48.3
5th	〃	45.2
6th	〃	40.9
7th	〃	37.5
8th	〃	25.8

表1은 圖2의 上澄部分의 電氣泳動圖로부터 Densitometer에 依해 얻어진 β-Casein部分의 全体可溶性 Casein 部分에 대한 比率을 計算한 것인데 3回째까지는 全可溶性 Casein의 約 60%를 β-Casein이 차지하고 있으나 그 이후 점차로 減少하는 傾向을 나타내고 있다. 이 比率을 利用해서 實驗 I 의 上澄液中의 β-Casein의 量을 計算해서 圖 1의 C에 나타냈다. 最終回의 8回째에서 約 15%의 β-Casein이 可溶性 Casein으로 乳淸中에 移行됨을 나타내 만약 全 Casein中에서 차지하는 β-Casein의 比率을 35%라고 하면 그 중 約 43%가 低溫處理에 依해 溶出된다고 볼 수 있다

다음 實驗 II의 경우 上澄液中의 可溶性 Casein의 電氣泳動圖를 圖 3에 나타냈다.

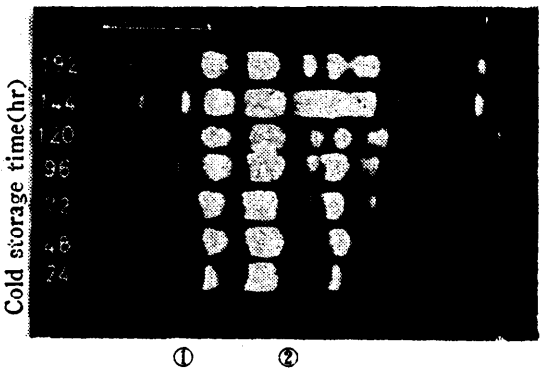


Fig 3 Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of soluble casein in experiment II
①:β-casein ②:α_s-casein

圖 1에 있어서 實驗 II (圖上의 B)의 경우 上澄液中의 Casein量은 低溫保存의 時間이 增加해도 거의 變化하지 않았으나 電氣泳動의 結果에서는 약간의 變化를 나타내고 있고 特히 6, 8回(144時間192時間)에서는 β-Casein에 相應하는 2개의 Band가 減少하고 α_s-와 Ts-Casein에 相應하는 Band가 增加함을 볼 수 있는데 이와같은 事實은 實驗 I 의 電氣泳動圖에서도 마찬가지였으며 長時間 低溫에 保存했기 때문에 Yamauchi 等(1972)이 지적했듯이 micelle 固有의 protease의 影響을 받은 것으로 推測된다.

이상 얻어진 結果를 토히 β-Casein의 거동을 中心으로 Casein micelle의 構造에 關해 考察하면 實驗 I (圖1)에 있어서 8回 以上 반복해서 懸濁한 結果 그 以上에서는β-Casein이 可溶化되어 乳淸中으로 移行되어 나오지 않았으나 電氣泳動을 한 結果(圖2) 沈澱部分 즉 micelle狀 Casein에는 8回에도 β-Caseinol 남아 있는 것이 確認되었다. 이와같은 事實은 Casein micelle中의 β-Caseni은 低溫에 保存해도 모두가 乳淸部分으로 移行하지 않는 것을 뜻하며 換言하면 Casein micelle中의 β-Casein은 적어도 2개의 다른 형태로 存在한다고 생각할 수 있다. 즉 低溫이라고 하는 hydrophobic bond를 弱化시키는 作用의 影響을 받은 狀態에 놓여져 있는 β-Casein과 低溫處理라는 影響을 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 β-Casein의 存在가 생각되어 진다. 이와 같은 생각은 hydrophobic bond에 作用해서 蛋白質을 變性시키는 變性劑로서 使用되는 guanidine 鹽酸으로 Casein micelle을 處理했을 때 比較的 低濃度에서 溶出하는 β-Casein 部分과 高濃度에서 溶出되는 β-Casein 部分이 있다는 事實로도 더욱 確信된다. 또 低溫處理에 依해 溶出되어 나오는 成分이 主로 β-Casein이라 한 점에도 micelle 中에서의 役割, 다른 micelle 成分과의 相互作用 및 micelle 構造 자체의 복잡성 때문에 어떤 형태의 平衡關係가 存在할 것인가에 關해서는 本實驗의 結果만으로는 結論을 내리기 어려우나 實驗 II 에서 觀察된 바와 같이 可溶性 部分을 全然 除去하지 않으면 상당한 期間 4℃에 放置해도 可溶性 部分의 增加가 나타나지 않음으로 미루어 적어도 어느 程度의 平衡關係의 存在를 認定할 수 있다. 또한 Casein micelle 中에서의 β-Casein의 役割에 關하여 아직도 不明한 點이 많고 提案된 몇개의 Casein micelle model 中에도 硏究者에 따라 見解를 달리하고 있다. Waugh (1965)는 β-Casein은 α_s-Casein과 함께 Casein micelle과 Casein micelle의 核을 構成한다고 했으며 Rose(1969)는 β-Casein의 會合体가 系狀이라고 하는 생각에 基礎를 두고 Casein micelle은 β-Casein의 會合体에 α_s-, k-Casein이 結合한 形態로 構成되어 있다고 報告했다. 한편 Moor(1967)의 model 에서는 sub-unit를 α_s-, β-, k- Casein이 만들고 이것이 Calcium에 依해 結合되어 Casein micelle의 構造를 形成하고 있다고 했으며 한편 Buchheim(1973)은β-Casein이 없어도 micelle은 存在하는 것으로 미루어 Casein micelle의 構成에 β-Casein은 그다지 重要치 않다고 하였다. 어느 model 이든 Rose의 model을 除外하곤 micelle 中에서 α_s- Casein이 中心的인 役割을 하고 또 k-Casein이 micelle의 安定化에 不可缺한 成分이라는 사실 以外에는 명확히 說明되어 있지 않다.

本實驗의 結果로부터 micelle中에서는 2개의 다른 存在狀態의 β-Casein이 있고 적어도 β-Casein의 約 43%를 차지하는 可溶性 Casein 部分은 Casein micelle 中에서 環境變化(特히 溫度變化)에 對해 어떠한 安定化作用에 關與하고 있다고 생각할 수 있으며 micelle中에서 表面 또는 表面 근처에 存在하고 있을 것으로 추측할 수 있다.

Ⅳ. 摘 要

本 實驗은 牛乳를 低溫에 保存할 때 Casein micell$_e$로부터 遊離하는 可溶性 Casein의 性質 및 Casein micelle과 可溶性 Casein과의 사이에 平衡關係의 存在可能性을 確認하고 나아가 얻어진 結果를 토대로 Casein micelle의 構造를 究明코저 遂行한 結果 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 可溶性 Casein의 主成分은 β-Casein이며 Casein micelle中에서 β-Casein은 低溫(4℃)에서 遊離하는 것과 하지 않는 두가지 形態로 存在한다.

2. Casein micelle과 可溶性 Casein 과의 사이에는 어느 程度의 平衡關係의 存在를 認定할 수 있다.

3. 低溫에서 유리하는 β-Casein은 micelle의 表面 또는 表面近處에 存在한다고 생각되며 Casein micelle 中에서 環境變化 特히 溫度變化에 어떤 安定化 作用을 갖고 있다고 생각할 수 있다.

References

Bloomfield, V.A. and R.J. Mead, JR. 1974. Structure and stability of casein micelles. J. Dairy sci., 58:592.

Buchheim, W. and U. Welsch. 1973. Evidence for the submicellar composition of casein micelles on the basis of electron microscopical studies. Neth. Milk. Dairy J., 27:163.

Connor, P.O. and P.F. Fox. 1973.
Temperature-dependent dissociation of casein micelles from the milk of various species. Neth. Milk. Dairy J., 27: 199.

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.

Niki, R. and S. Arima. 1975.
Volume changes in β-casein. Nippon Nogeigakaku. 49:125

Morr, C. V.1967.
Effect of oxalate and urea upon ultracentrifugation properties of raw and heated skim milk casein mi celles. J. Dairy Sci. 50:1744.

Richardson, B.C.and L.K. Creamer. 1974.
Comparative micelle structure. Biochim. Biopiys. Acta., 365:133.

Rose, D. 1968.
Relation between micellar and serum casein in bovine milk. J. Dairy Sci., 51:1897.

Rose, D. 1969.
A proposed model of micelle structure in bovine milk. Dairy Sci. Abstr., 31:171 (1969).

Sood, S. M., K.S. Sidhu, and R. K.Dewan. 1976.
Voluminosity of bovine and buffalo casein micelles at different temperatures. Milchwissenschaft 31:470.

Watanabe, M., I. Kato, K. Shimazaki, R. Niki and S.Arima. 1973.
Influences of temperature and urea on casein micelle component. Jap. J. Zootech. Sci., 44:148.

Waugh, D. F. and R. W. Noble. 1965.
Casein micelles. Formation and structure. J. Am. Chem. Soc., 87:2246.

Waugh, D.F. and Bernard Talbot. 1971.
Equilibrium casein micelle systems. Biochemistry, 10:4153.

Yamauchi, K. and S. Kaminogawa. 1972.
Decomposi tion of milk proteins by milk protease. Agr. Biol.Chem., 36:249.