

Chymosin의 작용에 의한 우유 para- κ -casein의 분해

尹 彰 焄*

Degradation of Bovine para- κ -casein by the Action of Chymosin

Yoon Chang-hoon*

Summary

The action of chymosin on κ -casein, one of the major components of milk protein, have been known so far to terminate its action with the cleavage of Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ peptide bond in κ -casein, which is consequently converted to para- κ -casein. However, it is revealed from this experiment that two peptides in addition to para- κ -casein, detectable by SDS-urea polyacrylamide gel electrophoresis, were formed on the prolonged reaction of chymosin on κ -casein. Chymosin used here was purified in combination with NaCl extraction and DEAE-cellulose chromatography. Two peptides observed on the electrophoretic gel were named para- κ -II and para- κ -III casein in order of the electrophoretic mobility. para- κ -II and para- κ -III casein were formed on four hours and eight hours after the incubation of κ -casein with chymosin, respectively. From these results it is suggested that chymosin could cleave at least two more peptide bonds in para- κ -casein besides one specific bond, Phe-Met, in κ -casein.

序 論

우유의 주요한 단백질인 casein은 micelle의 형태로 유즙(乳汁)중에 분산되어 존재하고 있다. 여기에 효소 Chymosin(EC 3, 4, 23, 4)을 작용시키면 응고하게 되는데, 이는 Chymosin의 작용에 의해 특이하게 일어나는 단백질분해작용의 결과라고

생각되고 있다(山内, 1965). 즉, casein중의 한 성분이며, casein micelle의 구조를 안정화시키는 역할을 하는 κ -casein이 chymosin의 작용에 의해 분해되므로써, casein micelle의 안정성이 상실되어 응고하게 된다. chymosin의 κ -casein에 대한 작용은 우선 κ -casein의 N말단으로 부터 105번째의 Phe. 과 106번째의 Met. 과의 peptide결합이 분해되어, para- κ -casein과 macropeptide라고 불리우는 2개의 fragment가 생성된다. (Jolles등

* 自然科學大學 食品營養學科

1962, Delfour 등 1965, Mercier 등 1973)

한편, chymosin은 상기의 반응보다는 늦지만, 역시 casein의 주요성분인 α s1-casein(Hill 등 1974, Mulvihill 등 1977)이나 β -casein(Creamer 등 1971)도 분해한다는 것이 알려져 있다. 즉, α s1-casein에서는 dsl-I ~ VII casein peptide가, β -casein에서는 β -I ~ III casein peptide가 생성된다고 보고하고 있다. 이 사실로 미루어 볼때 α -casein도 chymosin의 작용을 장시간 받으면, phe¹⁰⁵-met¹⁰⁶ 이외의 peptide 결합이 분해될 가능성을 충분히 생각할 수 있다. 따라서, 저자는 본 실험에서 chymosin을 장시간 α -casein에 작용시킨후 SDS-요소전기영동으로 분석한 결과, 지금까지 알려지지 않았던 복수개의 band가 나타나는 것을 새롭게 발견했으므로 이를 보고한다.

材料 및 方法

α -casein조제 및 효소

α -casein은 Zittle 등(1963)의 방법에 따라서 조제했으며, chymosin은 Nutritional Biochemicals(NB chymosin이라고 부름) 및 Sigma(SG chymosin이라고 부름)의 제품을, pepsin은 Sigma(SG pepsin이라고 부름)의 제품을 사용했다.

chymosin 정제

NB chymosin을 Fig. 1에 나타낸바와 같이 Ernstrom(1958)의 추출법 및 吉野 등(1966)의 DEAE-cellulose chromatography법을 병용해서 정제했는데 DEAE-cellulose chromatography는 다음과 같다. column(1×25cm)에 0.1M 인산완충액(KH₂PO₄-Na₂HPO₄, pH 5.7)으로 현탁시킨 DEAE-cellulose를 채운 다음, chymosin용액을 가한 후, 같은 완충액 100ml를 흘리어 넣고, 이어서 0.1M~0.4M NaCl과 0.1N HCl을 포함한 같은 완충액으로 stepwise로 용출시켰다. 유속은 0.5 ml/분이며, 5ml씩 시험관에 채취하여, 280nm의 흡광치를 측정했다.

응고력측정

Foltmann(1970)의 방법에 따라서, 12g의 탈지분유를 10mM CaCl₂ 10ml에 용해시킨 것을 기질로 했는데 이 기질 10ml에 1ml의 효소액을 가해서 30℃에서 응고시간(초)을 측정했다. 활성은 1/응고시간으로 나타냈다.

효소반응

0.05M Tris-citrate 완충액(pH 6.6)으로 1% α -casein 용액을 조제하여, 이 용액 0.2ml에 효소용액 0.02ml를 가하여 37℃에서 반응시켰다. 효소용액의 활성은 응고력측정법과 같은 방법으로 측정했으며, 70초에서 응고시킬 수 있는 효소량으로 맞추었다.

SDS-urea polyacrylamide gel 전기영동

이 전기영동은 Swank 등(1971)의 방법에 따랐다. 즉, 8M 요소용액에 SDS 및 acrylamide를 각각 0.2% 및 12.5%가 되도록 용해시켰다. acrylamide 및 bis의 비는 15:1이 되도록 했다.

시료는 1% SDS와 1% 2-mercaptoethanol을 포함하는 tris-phosphate 완충액(pH 6.8)으로 용해시켰다. marker 색소로서는 bromophenol blue를 사용했고 column 1개당 6mA의 정전류(定電流)로 영동했다. 염색에는 coomassie blue-R 250을, 탈색에는 methanol, 초산과 물(30:10:60, v/v)의 혼합용액을 사용했다.

結果 및 考察

chymosin 정제

NB chymosin을 NaCl 추출법과 DEAE-cellulose chromatography를 병용해서 정제하여, Fig. 2에는 DEAE-cellulose chromatography를 실시한 결과를 나타냈다. 얻어진 획분(peak) 중에서 응유(凝乳) 활성이 있었던 것은 FI과 F

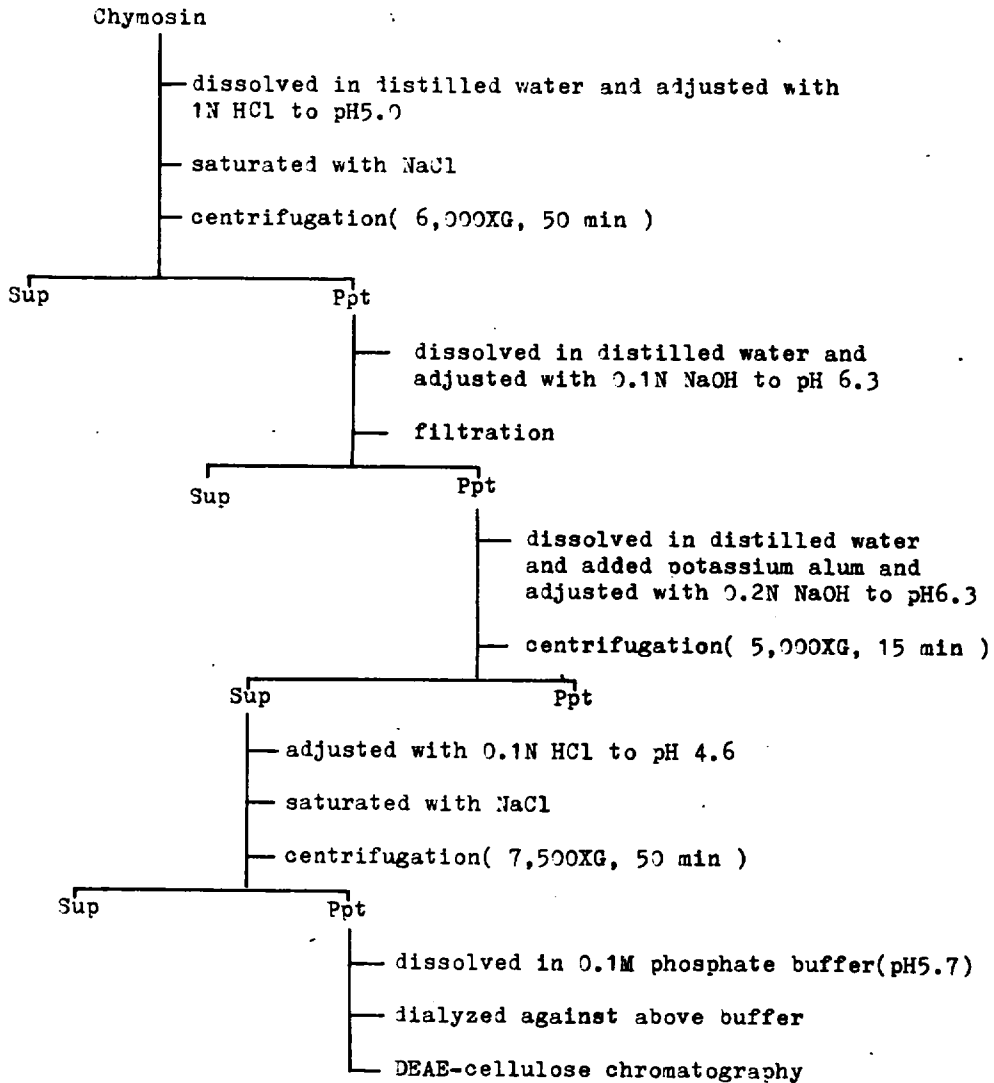


Fig.1. Procedure for the Purification of Chymosin

II 뿐이었다.

이들 펩신의 순도를 알아보기 위하여 정제하지 않은 chymosin 및 pepsin을 대조(對照)로 하여, urea polyacrylamide gel 전기영동(PAGE)과 SDS-urea polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)을 하여, 그 결과를 Fig.3에 나타냈다. 정제한 NB chymosin(FI)은 PAGE(Fig.3. a) 및

SDS-PAGE(Fig.3. b) 양쪽 모두에서 균일하다는 것을 알 수 있다. 이 결과는 DEAE-cellulose chromatography에 의해 chymosin을 정제한 吉野 등(1966)의 보고와 거의 일치했지만, 본실험의 chromatography에서는 0.1N 염산에 의해 용출된 펩신에는 용유활성이 없었다.

Fig.3. a의 PAGE에서 정제하지 않은 chy-

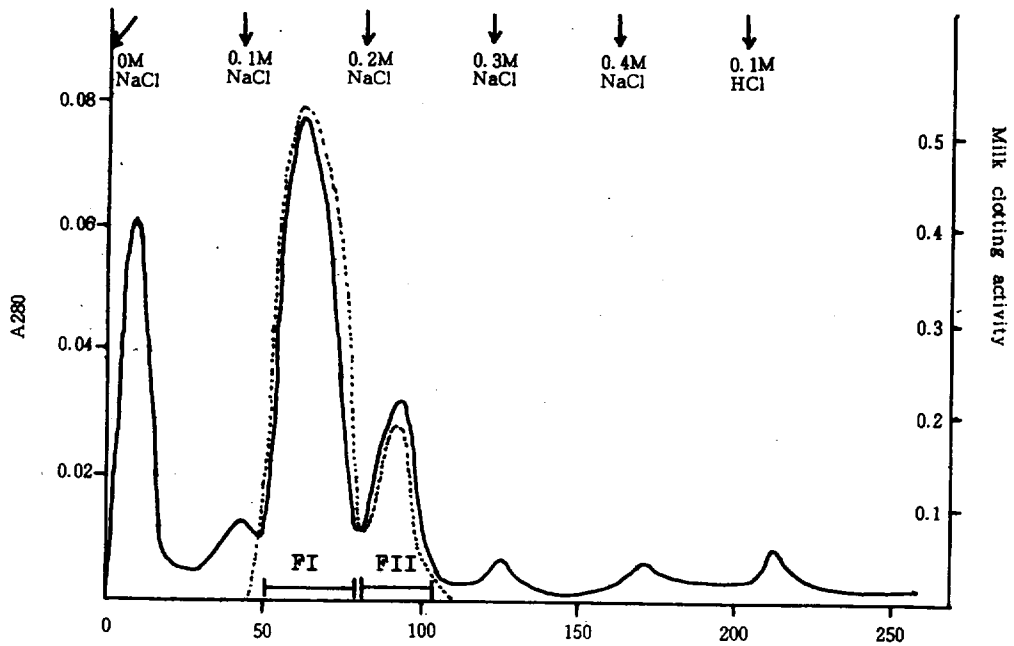


Fig.2. Chromatographic Pattern of Chymosin on DEAE-cellulose by Stepwise Elution.
The arrows show the point of change of the eluting solution added to DEAE-cellulose column(1×25cm).

5ml fractions were collected at a flow rate of 0.5ml/min.

— 280nm, milk clotting activity

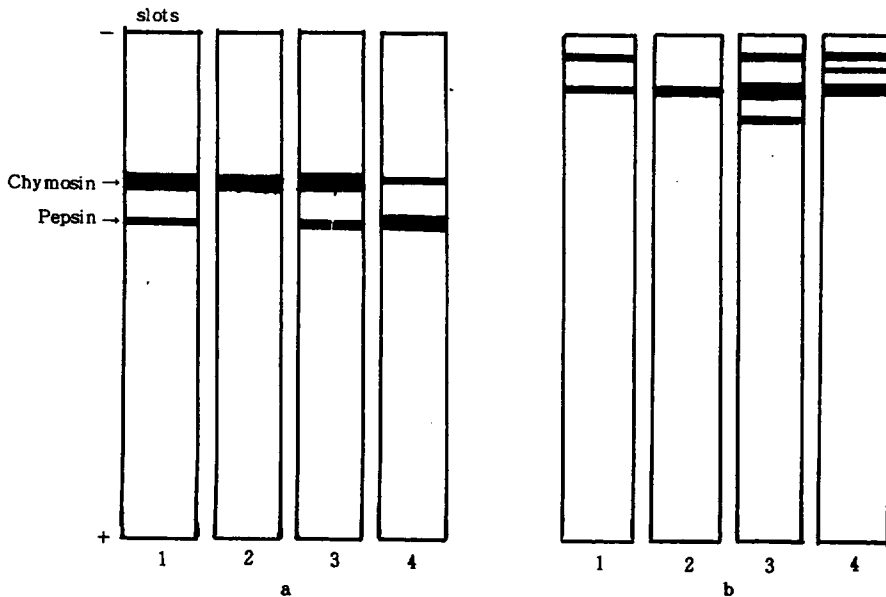


Fig.3. Electrophoretic Patterns of Urea polyacrylamide(a) and SDS-Urea polyacrylamide gel (b) of Chymosin and Pepsin.

1 : NB chymosin 2 : Purified NB chymosin(FI) 3 : SG chymosin 4 : SG Pepsin.

mosin 및 pepsin의 전기영동 pattern을 비교해 보면, NB와 SG chymosin에 모두 소량의 pepsin이 포함되어 있지만, 양적으로는 SG chymosin에 비해 NB chymosin에 포함된 pepsin이 훨씬 적었다.

또한, SG pepsin에도 소량의 chymosin이 함유되었다는 것을 관찰할 수 있다. 그러나 SDS-PAGE에서는 chymosin과 pepsin을 구별할 수 없었다. 이것은 chymosin 및 pepsin의 분자량은 각각 35,700, 34200이라고 보고되어 있는데(Fruton, 1971), 이와같이 양자의 분자량 사이에는 차이가 적기 때문에, SDS-PAGE상에서 이 두 효소가 매우 근접할 것이고, 따라서 구별하기가 곤란한 것이다.

그러나 정제된 NB chymosin의 경우는 SDS-PAGE상에서도 역시 1개의 band만을 나타내고 있으므로, 정제에 의해 타효소 및 불순물이 완전히 제거된 것으로 판단되었다.

장시간의 chymosin 작용에 따른 κ -casein의 변화

κ -casein에 위에서 정제된 NB chymosin을 장시간(48시간) 작용시켜서 κ -casein의 변화를 조사했다. 또한 κ -casein에 대한 분해패턴을 비교하기 위하여 정제하지 않은 chymosin과 pepsin에 대해서도 κ -casein에 작용시킨 후 SDS-PAGE에 의해 조사했다(Fig. 4). chymosin의 작용에 의해 κ -casein으로부터 생성하는 두개의 fragment 중에서 glycomacropeptide는 전기영동 gel상에 나타나지 않으므로(Kalan, 1965) 조사할 수 없었지만, para- κ -casein은 Fig. 4에서 관찰할 수 있듯이 κ -casein의 바로 밑에 위치하고 있다. 이것은 SDS 전기영동(Doi, 1979)이나 산성 pH(3.0)에서 행하는 전기영동(Bingham, 1975)에 있어서도 para- κ -casein은 κ -casein보다 양극쪽으로 더 이동한다는 보고와 일치하는 것이다.

어느 효소에 의해서도 반응시간의 경과와 동시에 κ -casein의 band는 점차로 감소해지고, para- κ -casein의 band는 증가해졌다. 그러나, chymosin과 pepsin과의 사이에서 para- κ -casein 페

턴에서 명백하게 다르다는 것을 알 수 있었다. 즉, 정제된 NB chymosin 및 정제하지 않은 NB chymosin의 경우는 반응초기에 para- κ -casein band가 한개 생성했지만, SG pepsin의 경우에는 2개 생성되었다. 또 SG chymosin의 경우에는 전술한 chymosin과는 분해패턴이 다르고, SG pepsin의 경우와 같이 para- κ -casein에 근접하고 있는 넓은 band가 관찰되었다. 이 band가 생성된 것은 SG chymosin에 포함되어 있는 pepsin의 작용에 의한 것이라고 추측된다.

정제된 NB chymosin과 정제하지 않은 NB chymosin과의 사이에 차이가 거의 없었다는 것은 정제하기 전의 NB chymosin에 포함되어 있는 pepsin양이 극히 적었기 때문에 그다지 영향을 받지 않았다는 것을 시사하고 있다.

pepsin의 경우는 반응시간의 경과와 함께 몇개의 band가 생성했지만, chymosin의 경우는 이미 보고되어 있는 para- κ -casein 이외에 2개의 band가 더 생성되어 있는 것을 명백하게 알 수 있다. 이것을 이동도(移動度)가 낮은 쪽부터 para- κ -II casein 및 para- κ -III casein이라고 명명했다. para- κ -II casein은 반응 4시간후, para- κ -III casein은 반응 8시간후에 생성되기 시작하였다.

오래전부터 chymosin의 작용에 의해 κ -casein으로부터 생성하는 para- κ -casein의 균일성을 둘러싸고 연구자에 따라서 견해가 달랐다. 처음에는, 음극 gel상에 보이는 2개의 band는 chymosin이 para- κ -casein에 작용하여서 생성시키는 것이라고 생각되었었다. 그후에 Mackinlay 등(1965)은 para- κ -casein이 다시 분해되는 것이 아니고, chymosin 유전변이체 A 및 B의 동일한 peptide 결합이 chymosin의 작용에 의해 결합되어서 생성하는 것이라고 보고했다. Kim 등(1969)은 κ -casein의 분리조제시 사용하는 요소중에 존재하는 시안산염에 의해 para- κ -casein 분자중의 lysine이 homocitrulline으로 변화하여 전하가 바뀌기 때문에 para- κ -casein과 함께 하나의 외전상의 band가 생성하게 되는 것이라고 지적했으며, 또한 κ -casein A 및 B에서 유래하는 para- κ -casein A, B는 동일한 것이라는 사실을 명백하게

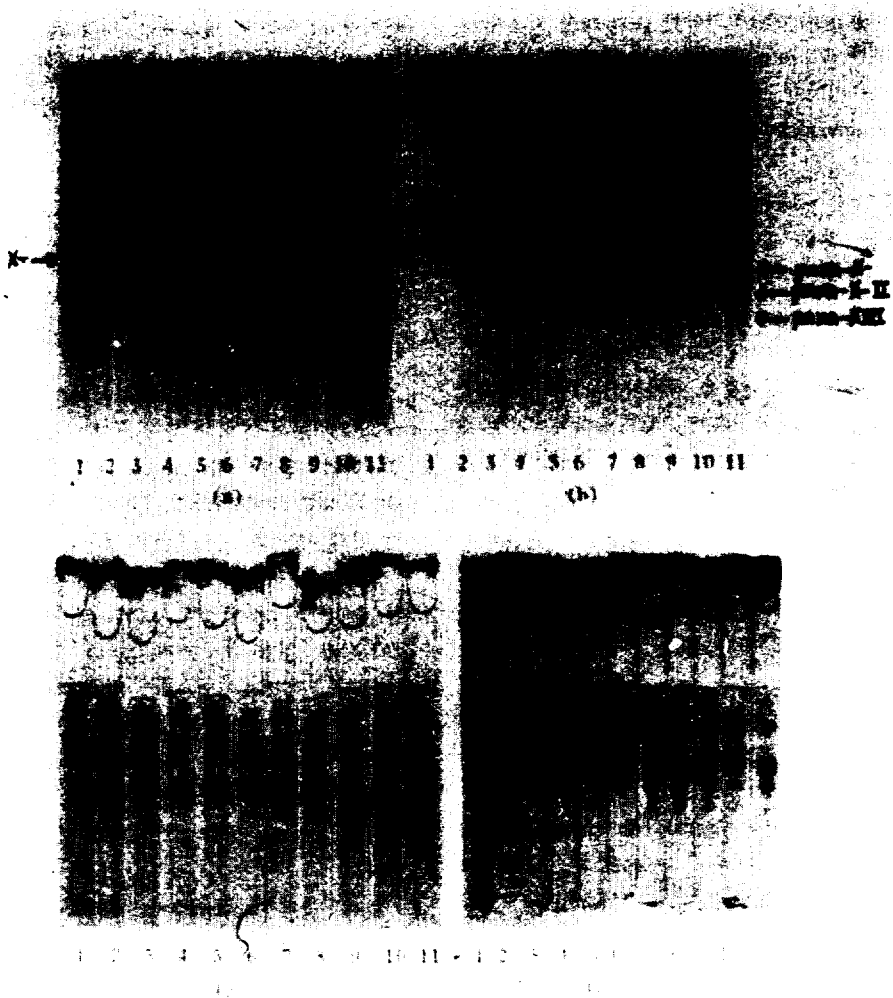


Fig.4. SDS-Urea Electrophoretic Patterns of Hydrolysate of α -casein by NB chymosin (a), NB Purified chymosin (b), SG chymosin (c), and SG pepsin (d).

Reaction time(1: 0min, 2: 5min, 3: 10min, 4: 30min, 5: 1hr, 6: 2hrs, 7: 4hrs, 8: 8hrs, 9: 16hrs, 10: 24hrs, 11: 48hrs)

하였다. 이들 보고는 결국 para- α -casein이 chymosin의 작용에 의해 더 분해된다는 것을 부정하는 것이다.

그러나, 위와같은 결론을 도출하게 된 실험에서는 α -casein에 chymosin을 작용시킨 시간이 짧고, 또한 경시적으로 검토하고 있지 않다.

본실험은 장시간에 걸쳐서 경시적 변화를 조사

한 것으로써 단시간반응에서는 지금까지의 보고와 같이 para- α -casein의 band가 하나밖에 보이지 않았지만, 장시간반응에서는 원래의 para- α -casein 이외에 2개의 band가 SDS-PAGE상에 처음으로 관찰되었다. 장시간 반응에서 생성하는 2개의 band는 단시간반응에서 생성하는 para- α -casein보다 분자량이 작은 것으로 생각된다. 그리

고 para- κ -casein에서 para- κ -II 및 para- κ -III casein이 생성하는 분해반응은 κ -casein \rightarrow para- κ -casein의 반응과 비교하면, 그의 반응속도가 상당히 늦을 것으로 생각된다. 따라서 이 반응은 cheese 제조시의 curd 형성에는 영향을 주지 않겠지만, cheese 숙성중에는 이 반응이 일어날 것이며, cheese의 조직이나 풍미의 형성에 관여할 가능성이 높다고 사료된다.

摘 要

지금까지 우유단백질의 주요성분의 하나인 κ -casein에 대한 효소chymosin의 작용은 κ -casein의 phe¹⁰⁵-met¹⁰⁶ peptide 결합이 절단되어 para- κ -casein으로 변환되므로서 종료된다고 알려져 있었다. 그러나, 본실험에서 κ -casein에 대한

chymosin의 작용을 장시간에 걸쳐서 경시적으로 조사하여 sodium dodecyl sulfate와 요소를 포함하는 gel상에서 전기영동을 실시한 결과, 종래의 para- κ -casein 이외에 2개의 band가 더 출현한다는 것을 처음으로 발견하였다. 여기에서 사용한 chymosin은 NaCl 추출법 및 DEAE-cellulose chromatography를 병용해서 정제했으며, 전기영동에 의해 순도를 확인했다. 이 두개의 band에 대해서 전기영동 이동도의 순으로 para- κ -II 및 para- κ -III casein이라고 명명했다.

para- κ -II casein은 반응개시 4시간 후에, para- κ -III casein은 8시간후에 생성하기 시작한다는 것이 인정되었다. 이 사실로부터 장시간반응에 의해 phe¹⁰⁵-met¹⁰⁶ 이외의 peptide 결합이 분해되므로써 para- κ -casein보다 분자량이 적은 peptide가 생성된다는 것이 강력히 시사된다.

參 考 文 獻

- Bingham, E. W., 1975. Action of rennin on κ -casein, *Journal of Dairy Research*, 58 : 13-18.
- Creamer, L. K., O. E. Mills and E. L. Richards, 1971. The action of rennets on the casein I. Rennin actin on β -casein B in solution, *Journal of Dairy Research* 38 : 269-280.
- Delfour, A., J. Jolles, C. Alais and P. Jolles, 1965. Characterization of a methionine residue and of the N-terminal sequence, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 19 : 452-455.
- Doi, H., F. Ibuki and M. Kanamori, 1979. Heterogeneity of reduced bovine κ -casein, *Journal of Dairy Science* 62 : 195-203.
- Ernstrom, C. A., 1958. Heterogeneity of crystalline rennin, *Journal of Dairy Science* 40 : 1633-1670.
- Foltmann, B., 1970. *Methods in Enzymology*, ed. G. E. Perlmann and L. Lorand, Academic Press, New York, London, 19 : 421-430.
- Fruton, J. S., 1971. *The Enzyme*, third edition, ed. Boyer, Academic Press, New York 3 : 126-163.
- Hill, R. D., E. Lahab and D. Givol, 1974. A rennin-sensitive bond in α_{s1} B-casein, *Journal of Dairy Research* 41 : 147-153.
- Jolles, P., C. Alais and J. Jolles, 1962. Amino acids of κ - and para- κ -casein, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 98 : 56-57.
- Kalan, E. B. and J. H. Woychik, 1965. Action of rennin on κ -casein, The amino acid compositions of the para- κ -casein, and glycomacropptide fractions, *Journal of Dairy Science* 48 : 1423-1428.

- Kim, Y. K., M. Yaguchi and D. Rose, 1969. Isolation and amino acid composition of para- κ -casein, *Journal of Dairy Science* 52 : 316-320.
- Mackinlay, A. G. and R. G. Wake, 1965. Fractionation of S-carboxymethyl- κ -casein and characterization of the components, *Biochim. Biophys. Acta* 104 : 167-180.
- Mercier J.-C., G. Brignon and B. Ribadeau-Dumas, 1973. Structure primaire de la caseine κ B bobine, *European Journal of Biochemistry* 35 : 222-235.
- Mulvihill, D. M., and P. F. Fox, 1977. Proteolysis of α_{s1} -casein by chymosin: influence of pH and urea, *Journal of Dairy Research* 44 : 533-540.
- Swank, R. T. and K. D. Munkers, 1971. Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate, *Analytical Biochemistry* 39 : 462-477.
- 山内邦男, 1965. 牛乳凝固の化学, *化学と生物* 3 : 458-465.
- 吉野梅夫, 中谷延二, 所洋, 山内邦男, 1966. DEAE-セルロースクロマトグラフィーによるレンネットの精製, *日本農藝化学会誌* 40 : 52-57.
- Zittle, C. A. and J. H. Custer, 1963. Purification and some of the properties of α s-casein and κ -casein, *Journal of Dairy Science* 46 : 1183-1188.