

Chelate樹脂를 이용한 Casein micelle의 研究

李 賢 鐘

Influences of Chelating Resin on Casein micelle

Lee, Hyun Jong

Summary

Effect of chelating resin on calcium removal of casein micelle sedimented from raw milk was studied. Electron microscopic observation, ultracentrifugation and PAG(Polyacrylamide gel) electrophoretic technique were employed for the analysis.

The results obtained are summarized as follows:

1. Amount of soluble casein released from the micelle was much greater in the EDTA(Ethylene diamine tetraacetic acid) treatment than the chelating resin treated.
2. The electron microscopic study showed that smaller particle size of casein micelle was observed when the casein micelle treated with EDTA
3. PAG electrophoretic results indicated that the major constituents of soluble casein were β -casein and α_2 -casein in both EDTA and chelating resin treatment.
4. No calcium level change in the supernatants was found, unless the removal of 50% of total calcium from micelle in chelating resin treatment.

I. 結 論

牛乳蛋白質의 約 80%를 차지하는 Casein은 大部分 Casein micelle이라고 불리우는 直徑 30~300nm의 Colloid 狀態로 牛乳中에 分散해서 存在하며 α_1 -, β -, κ -Casein, Calcium 및 有機磷酸鹽等으로 構成되어 있다. 또 Casein micelle의 構造는 Calcium과 磷酸鹽을 통해서 各 Casein 成分이 結合하여 構成되어 있다고 생각되며 한편 Calcium을 통한 結合 以外에 Casein 成分은 共有結合 뿐만 아니라 疎水結合과 같은 非共有結合이 復雜하게 關與하고 있다고 推測된다. 特히 Casein micelle의 形成에 對한 Calcium의 役割에 關하여는 많은 研究報告가 있으나 아직 不明한 點이 많다. Bloomfield(1972) 등은 Casein micelle에 EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) 溶液을 透析에 依해 서서히 添加하면 Casein micelle의 骨格構造에 Calcium을 통해 結合하고 있던 可溶性 Casein이 유리되나 어느 程度 以上으로 Calcium이 除去되면 骨格構造도 崩壞되어 Casein micelle이 完全히 파괴된다

고 報告하고, Calcium은 α_2 -Casein에 可溶性 Casein 즉 주로 β -Casein과 κ -Casein을 結合시키는 役割과 α_1 -Casein 相互로 framework를 形成하는 두가지 役割을 갖고 있다고 示唆했다. 이에 對해 Ono等(1975)은 脫 Calcium劑로서 Sodium citrate와 Sodium oxalate를 Casein micelle 溶液에 添加하면 Casein micelle은 小粒子가 增加하며 그 小粒子는 大粒子와 거의 같은 Casein 組成을 갖고 있음에도 불구하고 安定하게 溶液中에 分散해 있는 것으로 미루어 subunit脫의 可能性을 示唆했다.

本 實驗에서는 종래의 Chelate 劑(EDTA)와 달리 Casein micelle 内部에 直接 들어가서 作用할 수 없는 Chelate 樹脂를 利用해서 Casein micelle의 變化에 對해 檢討했다.

I. 材料 및 方法

1. Casein micelle 溶液調製

Holstein 混合乳로부터 얻은 新鮮한 脫脂乳를 室溫에

서 43,000×g, 70분間 遠心分離해서 沈澱하는 Casein micelle pellet를 濃度가 2% 되도록 限外濾過乳清에懸濁해서 試料로 使用하였다.

2. 限外濾過乳清의 調製

新鮮脫脂乳에 Sodium azide를 0.02% 넣고 2°C에서 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가능한 membrane filter로 여과하여 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. 電子顯微鏡 觀察

EDTA와 Chelate 樹脂로 處理해서 遠心分離한 Casein micelle pellet를 glutaric aldehyde와 Osmium 酸으로 二重固定해서 P-C로 Shadowing 해서 觀察했다.

4. EDTA 및 chelate樹脂

① EDTA(Ethylenediamine tetra acetic acid); Casein micelle 溶液의 pH를 一定하게 즉 pH-6.7로 유지하기 위해 N_{04} EDTA와 N_{04} EDTA를 5:8로 섞어 使用했다.

② Chelate樹脂: 自動滴定장치로 pH를 6.7로 유지하면서 mitsubishs Diaion CR-10으로 Casein micelle中の Calcium을 제거했다. 두가지 모두 處理溫度는 25°C였다.

5. Calcium의 測定

① Total Calcium 및 Supernatant calcium: pH 4.6에서 Casein을 沈澱시켜 그 濾液中的 Calcium을 0.01 M. EDTA로 滴定했다.

② Soluble Calcium: 分子量 1萬 以上 濾過할 수 있는 membrane filter로 여과하여 濾液中的 Calcium을 0.01 M. EDTA로 滴定했다.

6. 그의 窒素 및 電氣泳動은 各各 micro-kjeldahl 및 Polyachylamide gel 電氣泳動法을 利用했다.

II. 結果 및 考察

脫Calcium劑로서 지금까지 Casein micelle의 構造 詳細에 利用되어 온 EDTA나 oxalate 等に 比較 分子

量이 커서 micelle内部에 直接 들어가지 못하고 外側에서 作用할 것으로 기대되어 本實驗에 依해 처음으로 利用된 Chelate 樹脂의 一種인 Mitsubishi Diaion CR-10은 Fig 1 및 2에 나타낸 바와 같은 構造 및 特性을 갖고 있다.

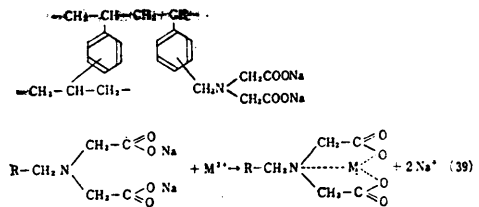


Fig. 1 Structure and Property of Diaion CR-10

특히 Diaion CR-10은 Polystyrene을 基體로 하고 iminodi-acetyl基를 Chelate基로 하는 Chelate 樹脂이며 重金屬-ion에 對한 選擇性은 pH에 依存하고 各 ion에 對해서는 Fig 2와 같은 傾向이 있다.

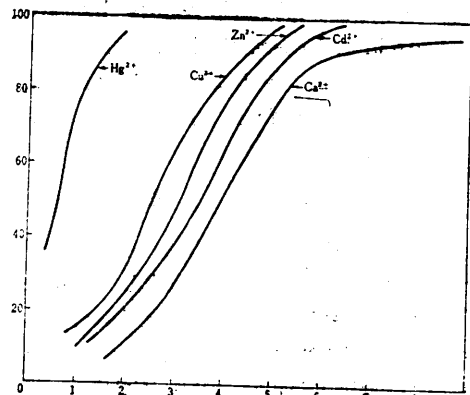


Fig 2. Effect of PH on the-absorption of metal ions in the Present of Diaion CR-10

따라서 Diaion CR-10을 効果的으로 使用하기 위해서는 被處理液의 pH를 調整할 必要가 있으나 Calcium 吸着의 경우 pH 6.5 以上에서 最高를 나타내 本實驗의 試料는 pH 6.7에 유지했으므로 特別히 調整할 필요는 없었다.

1. 可溶性 Casein의 遊離에 미치는 EDTA와 Chelate 樹脂의 影響

Casein micelle pellet를 限外濾過乳清에 懸濁해서 一夜室溫에서 攪拌한 溶液에 EDTA 및 Chelate 樹脂

물 各各 添加해 25°C 2時間 作用시킨후 43,000× 9, 70分間 遠心分離해서 上澄液中的 可溶性 Casein의 變化를 調査한 結果는 圖 3과 같다.

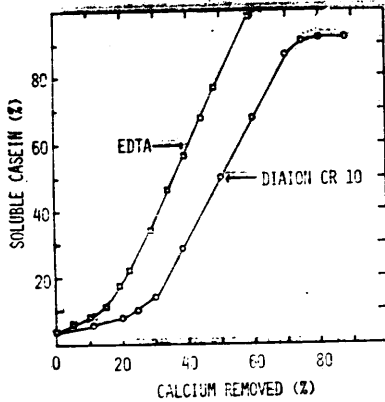


Fig 3 Effects of EDTA and Chelating resin on the released soluble casein

EDTA 添加의 경우 Calcium의 除去와 同時에 上澄液의 可溶性 Casein이 增加하고 全 Calcium의 約 50%가 除去되면 casein micelle은 完全히 上澄液에 移行한다. 한편 chelate 樹脂를 添加한 경우 全 Calcium의 約 70%를 除去하기까지는 可溶性 Casein이 增加하나 그 以上 約 80% 除去해도 增加하지 않고 거의 一定值을 유지한다.

2. 電子顯微鏡 觀察

Casein micelle 溶液에 EDTA 및 Chelate 樹脂를 添加全 calcium의 約 50%정도 除去시킨 후 43,000× 9, 70分間 遠心分離하여 沈澱部分을 電子顯微鏡으로 觀察한 結果는 圖4 및 5와 같다.

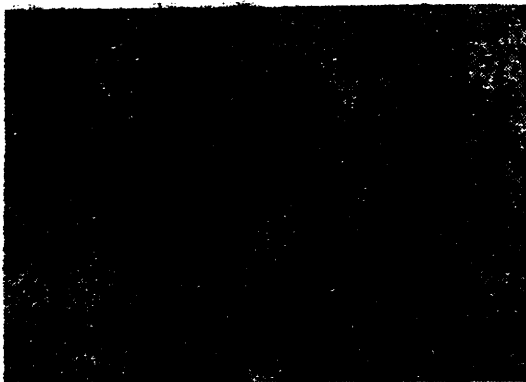


Fig 4 Electron microscope of the casein micelle treated with chelating resin

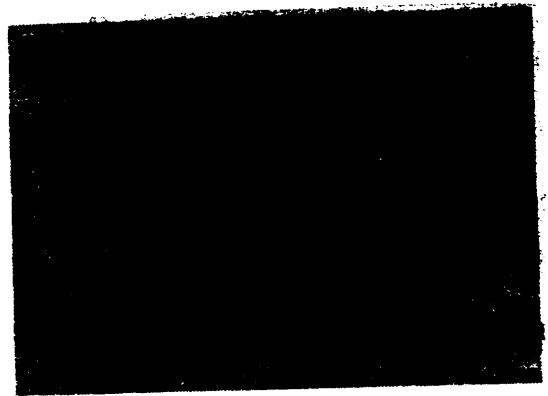


Fig 5 Electron microscope of the casein micelle treated with EDTA

chelate樹脂의 경우는 사진에서 볼 수 있듯이 casein micelle에 相當하는 정도의 커다란 粒子가 많이 보이는 반면 EDTA의 경우는 몹시 작은 粒子가 많이 보인다.

이와 같이 같은量의 Calcium을 除去한 경우라도 Chelate 樹脂 添加가 EDTA에 비해 커다란 粒子가 많이 觀察되었다.

3. 電氣泳動

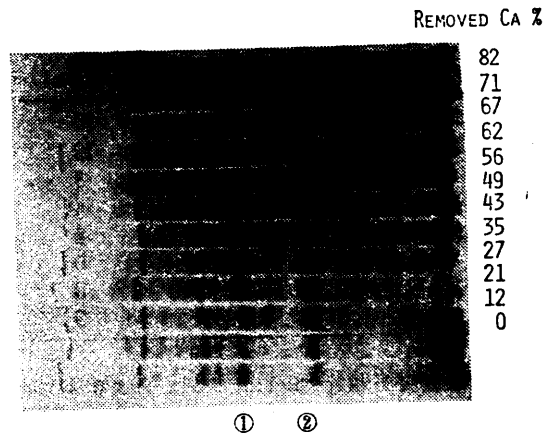


Fig 6 Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of soluble casein treated with chelating resin
① β-casein
② α₁-casein

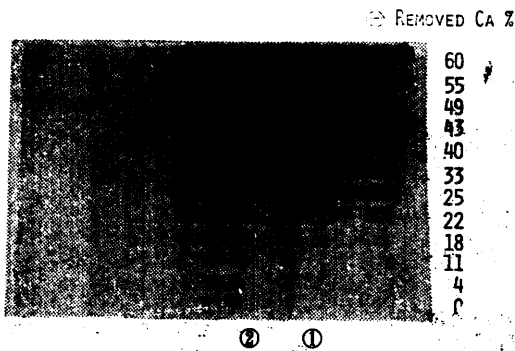


Fig 7 Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of soluble casein treated with EDTA
 ① β -casein
 ② α_2 -casein

圖 6 및 7은 chelate樹脂 및 EDTA를添加한 경우 上澄液中的 可溶性 casein의 變化를 電氣泳動에 依해 관찰한 結果이다. 圖 3과 마찬가지로 같은 量의 calcium을 除去해도 EDTA의 경우가 chelate樹脂보다 變化가 크고 두 경우 모두 최초로 부터 β -casein과 함께 α_2 -casein이 溶出되어 나온다.

4. Calcium의 變化

Table 1. Changes of calcium content of casein micelle treated with chelating resin.

Whole Ca (mg/100ml)	Supernatant Ca (mg/100ml)	Soluble Ca (mg/100ml)
109	36	26
49	33	13
40	31	8
32	29	4
25	24	1
19	19	0
13	13	0
8	8	0

Chelate樹脂에 依한 calcium이 50% 除去될 때까지는 上澄液中的 Calcium은 變化가 거의 보이지 않으나 그 이상 除去하면 減少하며 한편 Soluble calcium은 Calcium이 除去됨에 따라 上澄液中的 Calcium에 對한 比率이 낮아진다.

다음은 Casein micelle溶液에 Chelate樹脂를 넣고 一定時間 作用시킨 溶液을 遠心分離해서 上澄中の 可

溶性 Casein의 變化를 圖 8에 나타냈다.

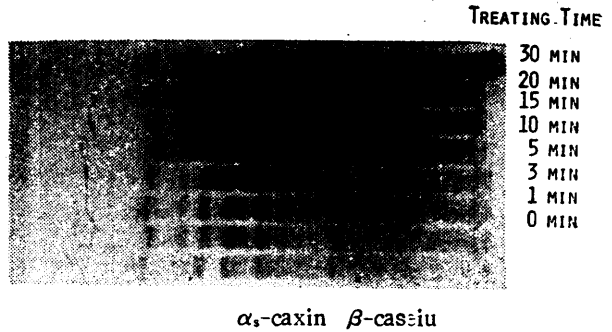


Fig 8 Effect of treating time on soluble casein in the chelating treatment

全 Calcium의 約 65%를 除去할 수 있을 程度의 Chelate樹脂를 添加하여 各各 1分, 3, 5, 10, 15, 20, 30分後 一定量을 取해 濾過後 43,000×g, 70分間 遠心分離하여 上澄液의 Casein의 變化를 보면 Chelate樹脂를 添加하고 나서 30分後 平衡에 到達하고 α_2 -Casein과 함께 β -Casein이 비교적 빨리 溶出되어 나오는 것을 알 수 있다.

No.	TREATING TIME (HOUR)	TOTAL CA (MG/100 ML)	SUPERNATANT CA (MG/100 ML)	SUPERNATANT N (MG/100 ML)
1	24	76	46	60
	2		33	65
2	24	81	46	40
	2		33	45
3	24	83	46	38
	2		33	46

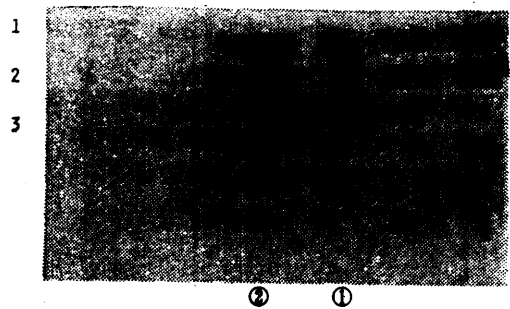


Fig 9 Effect of contents of calcium and treating time on soluble casein
 ① β -casein ② α_2 -casein

圖 9는 Chelate樹脂의 作用 Pattern을 알기 위해 3種類의 Calcium濃도가 다른 限外濾過乳清에 micelle Pellet를 懸濁해서 2時間, 24時間後의 上澄液의 可溶性

Casein의 變化이다. 乳清中の Calcium 濃도가 낮을수록 可溶性 Casein이 많이 유리되고 作用時間이 길수록 많은 變化를 나타내고 있다. 이것으로 미루어 乳清中の Calcium濃도가 變化하면 micelle이 變化하고 따라서 Chelate樹脂에 의해 Calcium이 除去되면 그 結果 Casein micelle이 파괴될 可能性을 생각할 수 있다.

以上 EDTA와 Chelate樹脂에 의한 上澄液中的의 可溶性 Casein의 變化와 電子顯微鏡觀察의 結果로부터 확실히 알 수 있듯이 Casein micelle로부터 같은 量의 Calcium을 除去해도 EDTA가 Chelate樹脂보다 可溶性 Casein量이 많이 溶出되는 것과 電子顯微鏡사진에서 작은 粒子가 數많이 나타난 것은 EDTA가 micelle 内部에 直接 들어가서 Calcium을 除去하는 것에 비해서 Chelate樹脂는 Casein micelle의 外側 環境 즉 乳清中에서부터 천천히 Calcium을 除去하는 結果라고 생각할 수 있으며 그 위에 Chelate樹脂는 處理도중 언제라도 反應을 中止시킬 수 있기 때문에 앞으로의 Casein micelle 研究에 有効히 利用할 수가 있다고 생각되며 本 實驗의 結果 上澄液의 空素分布 및 電氣泳動 Pattern으로부터 Casein micelle 構造로 Subunit 脫을 생각할 수도 있겠으나 次後 Chelate樹脂를 利用해서 여러가지 物理的 生化學的인 實驗을 하지 않고서는 速斷하기 어려우며 本 實驗은 그 基礎資料를 얻은데 그치고자 한다.

IV. 摘 要

本 實驗은 종래의 Chelate(EDTA等)와 달리 Cas-

ein micelle内部에 直接 들어가서 作用할 수 없는 Chelate樹脂를 利用해서 Calcium을 除去함으로써 發生하는 Casein micelle의 變化를 EDTA 處理區와 比較 檢討함으로써 尙차 Casein micelle 構造解明에 有効히 利用할 수 있는지를 調査하고 Casein micelle 構造 究明의 基礎的 資料를 얻고자 遂行한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1) 上澄液中的의 可溶性 Casein은 同量의 Calcium을 除去해도 EDTA 處理가 Chelate樹脂보다 溶出量이 많았다.

2) 電子顯微鏡으로 沈澱部分을 觀察한 結果 EDTA 處理에서 많은 數의 작은 粒子를 볼 수 있었다.

3) 上澄液中的의 可溶性 Casein의 電氣泳動 Pattern에 있어서도 EDTA 處理가 變化가 크며 두 處理 모두 처음부터 β -Casein과 함께 α_1 -Casein이 溶出되어 나왔다.

4) Chelate樹脂에 의한 Calcium 變化에 있어서는 50% 除去까지는 上澄液中的의 Calcium의 變化가 보이지 않으나 그 以上 除去하면 減少한다.

5) 이와 같은 結果로 EDTA가 micelle 内部에 直接 들어가 作用하는 것에 비해 Chelate樹脂는 乳清中에서 Calcium을 천천히 除去하는 結果라고 생각되며 그 위에 處理도중 언제라도 反應을 中止시킬 수 있기 때문에 앞으로의 Casein micelle 研究에 有効하게 利用할 수 있을 것으로 생각된다.

References

- Carroll, R. J., M. P. Thompson, and G. C. Nutting. 1968. Glutaraldehyde fixation of casein micelles for electron microscopy. *J. Dairy Sci.* 51:1903.
- CHIBA, H., K. TATSUMI, R. SASAKI, and E. SUGIMOTO. 1970. Effect of Calcium on α_1 - and K-caseins. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* 44:364.
- Dewan, R. K., V. A. Bloomfield, A. Chudgar, and C. V. Morr. 1973. Viscosity and voluminosity of bovine milk casein micelles. *J. Dairy Sci.* 56:699.
- Dewan, R. K., A. Chudgar, V. A. Bloomfield, and C. V. Morr. 1974. Size distribution and solvation of casein micelles in bovine milk containing α_{s1} -casein A. *J. Dairy Sci.* 57:394.
- Dewan, R. K., A. Chudgar, R. Mead, V. A. Bloomfield, and C. V. Morr. 1974. Molecular weight and size distribution of bovine milk casein micelles. *Biochim. Biophys. Acta* 342:313.
- Downey, W. K. 1972. Structure of bovine casein micelles. Paper presented at NIZO/IDF Casein Symposium, Ede.
- Edo. Lin, S. H. C., R. K. Dewan, V. A. Bloomfield, and C. V. Morr. 1972. Inelastic lightscattering study of the size distribution of bovine milk casein micelles. *Biochemistry* 10:4788.
- Lin, S. H. C., L. Leong, R. K. Dewan, V. A. Bloomfield, and C. V. Morr. 1972. Eff-

- ect of calcium ion on the structure of native bovine casein micelles. *Biochemistry* 11:1818.
- Morr, C. V. 1967. Effects of Oxalate and Urea upon Ultracentrifugation properties of Raw and Heated Skimmilk casein micelles. *J. Dairy Sci.*, 50:1744.
- Morr, C. V., S. H. C. Lin, R. K. Dewan, and V. A. Bloomfield. 1973. Molecular weights of fractionated bovine milk casein micelles from analytical ultracentrifugation and diffusion measurements. *J. Dairy Sci.* 56:415.
- Morr, C. V., S. H. C. Lin, and R. V. Josephson. 1971. Fractionation of skimmilk casein micelles by rate-zone and isopycnic-zone ultracentrifugation in sucrose gradients. *J. Dairy Sci.* 54:994.
- ONO, T., Y. HAYAGAWA, and S. ODAGIRI. 1975. The changes of the constituents of Bovine Casein micelles by Calcium complexing Agents. *Nippon Nogekagaku Kaishi* 49:417.
- Parry, R. M., Jr., and R. S. Carroll. 1969. Location of k-casein in milk micelles. *Biochim. Biophys. Acta* 194:138.
- Rose, d., and J. R. Colvin. 1966. Appearance and size of micelles from bovine milk. *J. Dairy Sci.* 49:1091.
- Saito, J., and Y. Hashimoto. 1964. Electron microscopic studies on the shape and size of calcium caseinate phosphate particles in milk. *J. Fac. Agric. Hokkaido University* 54, part 1:17.