韓國在來山羊乳에 關한 硏究

—Ⅱ. Casein의 性狀(1)—

李 賢 鍾·康 太 淑

Studies on Korean Native Goats Milk

Ⅱ. Properties of Korean Goats Casein(1)

Lee, Hyun Jong · Kang, Tae Sook

Summary

This paper is a report on effect of polyacrylamide gel disc electrophoresis and Sephadex G-200 column chromatography on the composition of milk casein and casein micelle from the Korean native goat.

The results obtained were summarized as follows:

Korean native goat's casein consisted of 3 major components which were presumed to be a β-and k-casein, and αs-casein differed from cow casein in electric mobility.

Whey protein was separated into 8 fractions on disc gel electrophoresis and 4 fractions were obtained from goat's skim milk on the Sephadex G-200 column.

Most of casein was eluted in void vloumn (A, B) and whey protein was fraction C.D. The results indicated that Korean native goat's casein was existing as micelle which consisted of αs-, β-, k-and r-casein.

The effect of adding urea on casein micelle components it was assumed that most of β-casein existed on the surface of micelle and incorporated into micelle by hydrophobic bonding and hy drogen bonding, and had an important role in forming micelle.

Ⅰ. 序 論

牛乳蛋白質가운데 pH4.6에서 沈澱하는成分을 Casein이라 稱하고 그 主要構成分은 αS—, β— 및 K—Casein으로 이들 各 成分의 理化學的 性狀은 거의 밝혀져 있으며(whitney 1976) 또한 이들 Casein의 大部分은 Casein micelle이라고 불리우는 直徑 30~300 nm의 Colloid 狀態로 牛乳中에 分散해서 存在하며, 이들 Casein 外에 Calcium 및 有機燐酸鹽 等으로 構成되어 있다. 또 Casein micelle의 構造는 Calcium과 燐酸鹽을 通해서 各 Casein成分이 結合되어 構成되어 있다고 생각되며, 한편 Calcium을 通한 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 開與하고 있다고 推定되고 있다.

前報(李1979)에서는 韓國在來山羊의 初乳 및 常乳의 理化學的 性質을 究明하고 Sephadex G—200을 利用 脫脂在來山羊乳를 分別한데 이어 本實驗에서는 在來山羊乳의 蛋白質을 構成하고 있는 個個의 Casein 成分의 性狀을 究明하고 나아가 이들 Casein이 牛乳와 같

※ 1978年度 文敎部學術硏究補助費에 依한 硏究

이 micelle을 形成해서 存在하고 있는지의 여부 및 micelle의 形態로 存在時 그의 構成成分과 Casein micelle 構造를 解明하기 위해서 Polyacrylamide gel disc 電氣泳動法을 使用해서 實驗한 結果를 報告한다.

Ⅱ. 材料 및 方法

1. 原料乳의 採取

本 實驗에 使用한 在來山羊乳는 前報(李1979)에서와 같이 濟州大學 附屬 家畜飼育場에서 飼育中인 在來山羊으로부터 手搾乳에 依해서 採取하였다.

2. Casein micelle 溶液

新鮮한 在來山羊乳를 3,000r. p. m에서 20分間 遠心分離해서 얻은 脫脂乳를 20℃ 43,000×g로 70分間 超遠心分離해서 Casein micelle을 採取했다 얻어진 Casein micelle을 蒸溜水를 添加해서 Casein 濃度가 2%되도록 調整해서 試料로 使用하였다.

3. Casein에 對한 Rennet 및 Pepsin의 作用

0.2M Tris—HCl(pH 6.6)buffer에 溶解시킨 0.1% rennet 및 Pepsin液을 2% Casein溶液(0.2M Tris—HCl buffer使用)에 添加하여 37℃에서 一定時間 作用시킨 다음 끓는 물에서 10分間 加熱하여 酵素作用을 失活시킨 후 電氣泳動 試料로 使用하였다.

4. Polyacrylamide gel(PAG)disc電氣泳動法

7.5% Polyacrylamide gel에 最終濃度 4.5M의 尿素와 0.5M의 Sucrose를 添加해서 電氣泳動을 實施했다. 泳動條件을 0.05M Trisaminomethane—0.04M glycine 緩衝液(pH 8.6)을 使用하고 gel 1本當 3mA의 電流가 흐르도록 했으며 終了後 1% Amido Black 10B의 7% 酢酸水溶液으로 15分間 染色後 7%, 酢酸水溶液으로 脫色했다.

5. Casein micelle로부터 遊離한 Casein의 分離

2% Casein micelle 水溶液에 最終濃度가 0.02, 0.2, 2M이 되도록 尿素水溶液을 添加直後 43,000×g 70分間 20℃에서 超遠心分離해서 上澄液을 얻었으며, 上澄液中에 遊離되어 나온 Casein 成分은 PAG電氣泳動法으로 確認했다.

Ⅲ. 結果 및 考察

1. 在來山羊乳 蛋白質의 電氣泳動

在來山羊乳 蛋白質의 約 75%를 차지하는 Casein의 構成成分을 究明하기 위해 7%, Acrylamide gel로 電氣泳動을 施行하고 이것을 Holstein乳의 Casein과 比較한 結果는 圖 1과 같다.

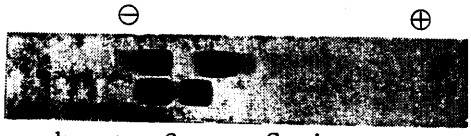


Fig 1. Poly-acrylamide gel disc-electrophoretic patterns of cow and Korean native goats acid casein

牛乳의 主要蛋白質인 Casein은 αS—, β—, k—casein으로 構成되어 있으며(mellander 1939) 이들 各 Casein 成分의 構成比率은 品種, 泌乳期, 個體等에 따라 變하나(Larsonetal 1957, Rollerietal 1956) Holstein乳의 경우 平均 50:35:15로 되어 있고 그의 微量成分으로 r—, TS—, S—Casein의 存在가 確認되고 있다(Groves 1971. Mikami 1971, whitney 1958).

圖 1에서 在來山羊乳의 Casein 構成成分으로서 β—Casen 및 k—Casein의 存在를 確認할 수 있었고 또한 微量成分인 r—, TS—, S—Casein에 相當하는 分離帶가 나타났으나 αS—Casein은 Holstein乳에 比해 電氣移動度에 差異를 나타내고 있고 또한 Holstein乳가 4本의 分離帶로 αS—Casein을 構成하고 있는데 (Thmooson 1962) 對해 在來山羊乳는 單一 分離帶를 보여주고 있어 앞으로 各 Casein成分을 單離, 一次構造解明 等을 通해 究明해야 할 點으로 생각된다.

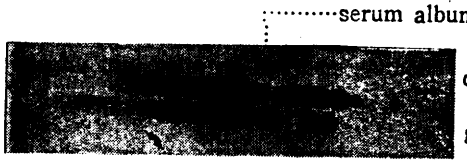


Fig 2. Polyacrylamide gel disc-electrophoretic patterns of cow and Korean native goats whey protein.

다음 圖2는 在來山羊乳의 乳淸蛋白質을 Holstein乳와 比較한 電氣泳動圖이다.

牛乳의 乳淸蛋白質은 電氣泳動的으로 β—Lactoglobulin, α—Lactoalbumin 및 血淸 albumin을 포함

해서 8個의 成分으로 分離되는데(Larson 1957) 在來山羊乳의 乳淸蛋白質도 그림에 나타난 것과 같이 分離帶數에 있어서는 牛乳와 같으나 αS—casein의 경우와 마찬가지로 各 乳淸蛋白質 成分이 電氣 移動度에서 牛乳와 差異를 나타내 앞으로 더욱 究明해야 할 問題로 생각된다.

2. Sephadex에 依한 分別

前報(李1978)에서 Sephadex G—200을 使用하여 在來山羊脫脂乳를 分別하였는데 圖 3은 分別된 各 Fraction(A. B. C. D)의 構成成分을 究明키 위해 施行한 電氣泳動結果이다.

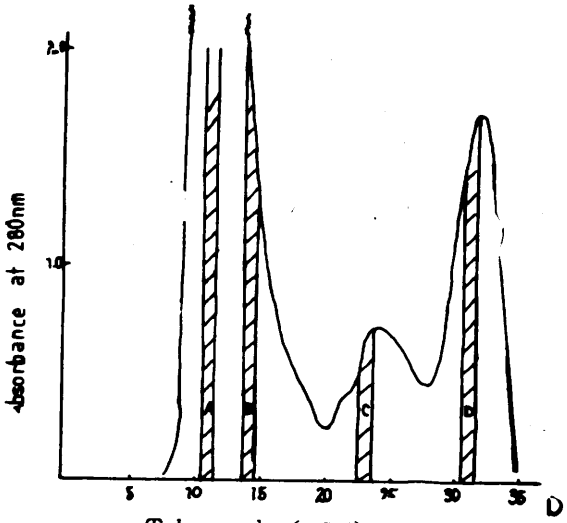


Fig 3. Elution patterns obtainded by exclution Chromatography of Korean native goats skim milk.
2.5cm by 40cm column of sephadex G-200, 0.02M phosphate buffer, pH8.0

圖3에서 Casein의 大部分은 Void Volume(A. B)에서 溶出되는 反面 乳淸蛋白質 成分은 C. D部位에서 分離되어 나옴을 알 수 있는데 Sephadex G—200의 分別能力이 分子量 5,000~800,000인 것을 생각하면 在來山羊乳의 Casein은 分子量 800,000 以上의 Polymer 狀態로 micelle을 形成해서 乳中에 存在하고 있을 可能性을 일단 推定할 수도 있으나 앞으로 더욱 硏究해야 할 問題로 생각된다.

3. Casein에 對한 Rennet 및 Pepsin의 作用

다음 圖4 및 5는 Casein 性質 究明의 一手段으로 酸 Casein 溶液에 rennet 및 Pepsin을 添加一定時間 經過後 電氣泳動을 施行한結果이다.

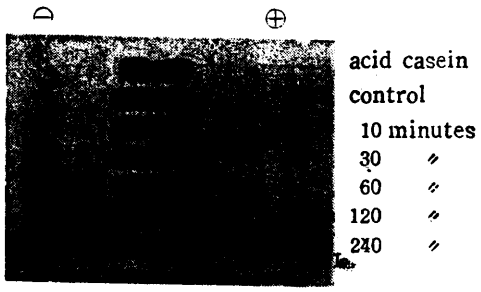


Fig 4. Polyacrylamide gel disc-electrophoretic patterns of the degradation products of Korean native goats acid casein, at different time intervals, by rennet at 37℃ and pH6.6.

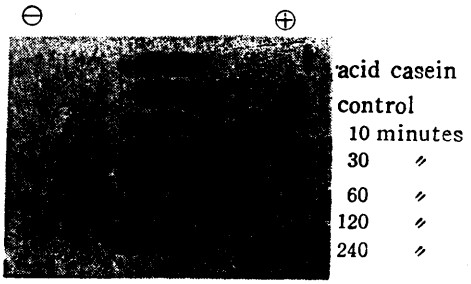


Fig 5. Polyacrylamide gel disc-electrophoretic patterns of the degradation products of Korean native goats acid casein, at different time intervals, by pepsin 37℃ and pH6.6.

圖4 및 5에서 rennet 添加後 60分부터 αs—Casein의 變化를 관찰할 수 있고 Pepsin 添加의 경우는 rennet보다 늦어 240分부터 αs—Casein 部位에 變化가 일어남을 알 수 있는데 牛乳의 경우(Safi naz 1977)와 比較할 때 rennet 및 Pepsin의 作用을 받는 部位는 다같이 αs—Casein이나 反應 速度에 있어서는 牛乳에 比해 在來山羊乳가 늦어 이 點 αs—Casein 成分上의 差異點에 原因이 있지 않나 생각된다.

4. Casein micelle의 性狀

圖 6은 Casein micelle을 構成하고 있는 成分을 究明하기 위해 新鮮한 脫脂在來 山羊乳를 43,000×g, 70分間 超遠心分離해서 얻은 沈澱部分의 Casein micelle과 Casein micelle 成分中 k—Casein의 存在 및 k—Casein이 S—S結合을 갖고 있는지를 確認하기 위해 2—Mercaptoethnol을 添加해서 施行한 電氣泳動 結果이다.

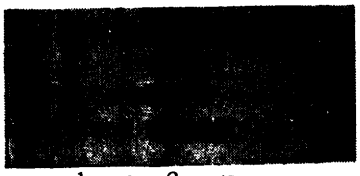
casein micelle
casein micelle+
2-ME

k- r- β- αs-

Fig 6. Polyacrylamide gel disc-electrophoretic patterns of Korean native goats casein micelle with and without addition of 2-mercaptoethanol.

윗 그림에서 在來山羊乳의 Casein micelle은 牛乳(Downey 1972)와 마찬가지로 αs—, β—, k— 및 r—Casein으로 構成되어 있으나 酸Casein에서와 마찬가지로 αs—Casein 部位가 Holstein乳에 比해 電氣移動度에 差異가 있음이 다시 한번 確認되었고 2—Mercaptoethanol 添加에 依해 k—Casein이 分解된 사실로 在來 山羊乳의 k—Casein은 還元性의 S—S結合을 갖고 있음을 알 수 있다. 또한 αs—, β—, k—Casein의 構成比率은 Densitometer에 依해 測定되어야 하겠으나 外觀的으로 Holstein乳에 比해 β—Casein 含量이 αs—Casein보다 높음을 알 수 있다.

다음 圖7은 在來山羊乳 Casein micelle 構造解明의 一手段으로 Casein micelle 溶液에 尿素를 添加한 후 43,000×g, 70分間 超遠心離해서 上澄液中에 遊離되어 나오는 成分을 電氣泳動한 結果이다.



casein micelle
0.02 Murea
0.2M 〃
2M 〃

k- r- β- αs-

Fig 7. Polyacrylamide gel disc-electrophoretic patterns of non sediment casein separated by centrifugation at 43,00×g from the casein micelle with addition of urea.

尿素濃度에 關係없이 어느 경우이든 β—Casein이 上澄液의 大部分을 點하며 0.02, 0.2M의 尿素濃度에서는 αs— 및 k—Casein이 上澄液中에 遊離되어 나오지 않으나 2M 濃度가 되면 적은 量이나마 αs— 및 k—Casein이 遊離되어 나옴을 알 수 있다.

이상의 結果로 蛋白質의 水素結合과 疎水結合을 切斷하는 試藥으로서 一般的으로 尿素가 利用되고 있는데 本 實驗에서와 같이 溫度條件 및 蛋白質濃度를 一定하게 했을 때 遊離되어 나오는 Casein 成分의 大部分이 β—Casein이란 사실은 β—Casein이 牛乳의 Casein micelle (安藤 1973, 渡邊 1973)과 마찬가지로 micelle의 表面에 存在하고 尿素가 表面에서부터 作用하고 있다고 생각할 수 있고 尿素濃度 2M에서 적은量이나마 αs— 및 k—Casein이 遊離되어 나오는 것은 牛乳에서 小粒子의 Casein micelle 일수록 αs—및 k—Casein의 含量이 많은 事實(小野 1915)로 미루어 在來山羊乳의 Casein micelle 中에서도 比較的 적은 粒子에 原因이 있든가 혹은 Casein micelle 表面에 位置하는 微粒子에 依한 것으로 생각할 수 있으나 앞으로 계속 硏究해야 할 課題로 생각된다.

Ⅳ. 摘 要

本 實驗은 韓國 在來山羊乳의 理化學的 性質을 究明하기 위해 蛋白質을 構成하고 있는 個個의 Casein 成分의 性狀을 究明하고 나아가 Casein micelle의 構造를解明하기 위해 Polyacrylamide gel disc 電氣泳動法을 使用해서 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 在來山羊乳의 Casein을 電氣泳動한 結果 β— 및 k—Casein과 微量成分으로 r—, Ts— 및 S—Casein은 確認되었으나 αs—Casein은 牛乳의 αs—Casein과 電氣移動度에서 差異가 있었다.

2. 乳淸蛋白質은 電氣泳動上 8個의 成分으로 分離되었으나 電氣移動度에서 牛乳와 차이를 나타냈다.

3. Sephadex G—200을 使用하여 分別된 各 Fraction을 電氣泳動한 結果 Casein은 大部分이 Void Volume에서 溶出돼 Casein이 分子量 800,000 以上을 Polymer 狀態로 micelle을 形成 乳中에 存在하고 있을 것으로 推定할 수 있다.

4. Casein에 rennet을 添加한 結果 牛乳와 같이 αs—Casein 部位에 變化를 觀察할 수 있었으나 反應速度는 牛乳보다 늦었으며 Pepsin 添加의 경우도 rennet과 마찬가지였다.

5. Casein micelle構成은 αs—, β—, k— 및 r—Casein으로 되어 있고 外觀的으로 牛乳에 比해 β—Casein이 αs—Casein보다 含量이 높았다.

6. Casein micelle 構造解明의 一手段으로 Casein micelle 溶液에 尿素를 添加한 結果 β—Casein이 micelle 表面에 存在하며 또한 疎水結合 및 水素結合에 依해 다른 成分과 연결되어 있는것으로 推定됨

引 用 文 獻

安藤功一. 遊佐孝五. 1973. Casein micelle の形態に 關する 硏究 Ⅲ. 尿素および acetamide の影響 日畜會報, 44(3):129—142

Downey, W.K. 1972. Structure of bovine casein micelles. Neth. Milk Dairy J., 26:219

小野伴忠. 早川美次. 小田切 敏. 1975. 脫 Ca劑によるCasein micelle の 組成變化に ついて. 日農化, 49(8):417～424

Groves, M.L. 1971. Minor proteins and enzymes, p. 367. In H.A. Mckenzie(ed). Milk proteins. vol. Ⅱ. Academic press, N.Y.

Larson, B. L., and K.A. Kendall. 1957. Daily production of the specific milk proteins during the lactation period. J. Dairy Sci., 40:377

李賢鍾. 康太淑. 1979 韓國在來山羊乳에 開한 硏究 Ⅰ. Sephadex—Column에 依한 在來山羊乳蛋白質의 分別. 濟大論文集 vol. 10

Mellander, O. 1939. Electrophoretische unters uchung von casein. Biochem. Z., 300: 240

Mikami, M. 1971. Studies on gamma—casein Ⅱ. On the isolation and the propertie. of r—casein components. Jap. J. Zootech. Sci., 42:281—288

Rolleri, 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.

Safinaz EL—Shibiny and M.H. Abd EL—Salam. 1977. Action of milk clotting enzymes on αs—caseins from buffalo's and cow's milk. J. Dairy Sci., 60:1519

Thompson, M.P., C.A, Kiddy, L. Pepper, and C.A. Zittle. 1962. Variations in the αs—casein fraction of individual cow's milk Nature, 195:1001

渡邊益光, 加藤 勳, 島崎苟一, 仁木良哉, 有馬俊六郎, 1973. Casein micelle成分に およぼす溫度と 尿素の 影響. 日畜會報, 44(3):148～154.

Whtiney, R.M. 1958. The minor proteins of bovine milk. J. Dairy Sci., 41:1303.

Whitney, R.M., J.R. Brunner, K.E. Ebner, H.M Farrell, R.V. Josephson, C.V. Morr and H.E. Swaisgood. 1976. Nomenclature of the proteins of cow's milk: Fourth revision. J. Dairy Sci., 59:795～815