

## 韓牛乳의 蛋白質에 關한 研究

### 第 1 報 DEAE-Cellulose 에 依한 韓牛乳蛋白質의 分別

金 榮 敏 · 張 桂 翊

高麗大學校 農科大學 畜產學科

(1974년 3월 19일 수리)

## Studies on Milk Protein of Korean Cattle

### I. Fractionation of Milk Protein on DEAE-Cellulose

by

Y.K. Kim and J.I. Chang

Department of Animal Science, College of Agriculture, Korea University

#### Abstract

An experiment has been carried out in order to analyze the main components of Korean Cattles' milk, and fractionate the milk proteins by DEAE-cellulose column. The results obtained were summarized as follows.

1) The average values of specific gravity, pH and acidity of Korean Cattles' milk which were negative in alcohol test were 1.036, 6.4 and 0.21, respectively.

2) The average values of total solids, solids-not-fat, protein, lactose and ash contents of Korean Cattles milk were 11.61%, 9.53%, 2.08%, 3.99%, 4.76% and 0.86%, respectively.

3) Distribution of casein, whey protein, N.P.N., protein precipitated in 12% TCA, lactoglobulin and lactalbumin contents of the milk were 3.07%, 1.13%, 0.10%, 4.06%, 0.34% and 0.66%, respectively.

4) Acid casein obtained from Korean Cattles milk was fractionated into four fractions on DEAE-cellulose column with 0.005M tris-citrate buffer containing 6M urea, pH 8.6, and the ratio of the fraction I,II,III and IV was 3.24%, 52.67%, 26.22% and 17.87%, respectively.

5) Whey protein obtained from Korean Cattles milk was also fractionated into four fractions on DEAE-cellulose column with 0.04M phosphate buffer, pH 5.8, and the ratio of the fraction I,II,III and IV was 41.74%, 10.17%, 1.50% and 46.59%, respectively.

#### 緒 論

韓牛는 1972年末 125萬頭로 1976년까지는 137萬頭를 目標로 増殖計劃을 세우고 있고 現在는 慶尙南北道와 江原道·京畿道가 主飼育地가 되고 있는데, 金<sup>(1)</sup>은 最初 飼育時期는 正確히 알 수 없으나 古代로부터 飼育한 史實이 있다고 記述하였다. 그러나 韓牛乳에 대한 成分 分析 및 理化學的 性質을 究明한 研究는 別로 없다.

Yaguchi와 Rose<sup>(2)</sup>에 의하면 外國에서는 지난 數年동

안 脫脂乳 및 casein, 乳清蛋白質, 酵素 등의 分別에 이은 交換 크로마토 그라피(ion exchange chromatography)가 많이 利用되고 있으며, 이러한 方法을 利用, 未知의 乳蛋白質의 分離 및 精製를 可能케 했다고 한다.

Sober와 Peterson<sup>(3)</sup>에 依해 考案된 ion exchange chromatography는 1959년에 처음으로 Yaguchi等<sup>(4)</sup>에 依해 乳蛋白質 分別에 利用되었으며 그후 많은 사람들이 活用하고 있다. (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13)

本 實驗에서는 現在까지 充分히 밝혀지고 있지 않은

韓牛乳의 理化學的 性質을 究明하기 爲하여 韓牛乳의 主要成分을 分析하고 anion exchange cellulose (diethylaminoethyl, DEAE)를 使用하여 酪 casein과 乳清蛋白質을 分別하는 것을 目的으로 하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 原料乳의 採取

本 實驗에 使用한 韓牛乳는 1972年 8월에 忠南 扶餘 郡 九龍面 一般農家에서 飼育中인 健康한 韓牛와 1973年 5~6월에 畜産試驗場에서 飼育하는 韓牛로부터 手搾乳에 依해서 採取하였고 Hoistein 乳는 高麗大學校 農科大學 附屬農場에서 採取하였다.

### 2. 脫脂乳의 調製

新鮮한 韓牛乳 및 Hoistein 乳를 각각 遠心分離器에 依해서 脫脂한 다음 試料로 使用하였다.

### 3. 酪 casein의 調製

脫脂乳를 증류수로 3倍量으로 희석한 다음 自動攪拌器로 攪拌하면서 10% acetic acid를 添加하면서 pH 4.6에서 casein을 沈澱시켰다. 上澄液을 除去하고 증류수로 4回 洗滌한 다음 alcohol과 ether 處理로 室溫에서 乾燥시켰다.

### 4. 乳清蛋白質의 調製

脫脂乳를 pH 4.6으로 調節하고, 2000 r.p.m.에서 30分間 遠心分離한 다음, 여과하여 그 여액을 試料로 使用하였다.

### 5. 酪 casein 및 乳清蛋白質의 chromatography

蛋白質分別은 日本 牛井化學藥品株式會社 製品인 anion exchange cellulose인 DEAE를 使用하였으며 column에 充填하기 前에 다음과 같은 處理를 하였다. 一定量의 DEAE-cellulose를 約 10倍量의 1N NaOH 溶液속에서 24時間 담근다음 沈전된 DEAE-cellulose를 中性이 될때까지 증류수로 洗滌하여 Tris-citrate-urea buffer (以下 T.C.U. buffer, pH 8.6)에 24時間以上 담가 두었다가 column에 充填하였다.

T.C.U. buffer는 Kim等에<sup>(13)</sup> 依한 方法에 따랐으며, 0.005M Tris溶液에 0.1M citric acid를 添加하여 pH 8.6으로 해서 最終濃도가 6M가 되게 尿素를 添加하여 溶解시켜서 使用하였다.

以上과 같이 準備된 DEAE-cellulose는 높이 30cm, 直徑 1.5cm의 column에 樹脂의 높이 25cm가 되게 充填하여 0.3g의 casein을 T.C.U buffer 約 5ml에 2-mercap

toethanol 1滴을 加해 溶解시킨다음 column에 넣었다. 溶出用 buffer는 같은 2個의 500ml/三角 flask에 T.C.U buffer 300ml, 또 다른 한쪽의 flask에는 同量의 T.C.U buffer에 0.3M의 食鹽을 溶解시켜 두개의 flask를 siphon으로 連結시켜 鹽濃도가 一定한 比率로 增加하면서 溶出되게 하였다. 이때 兩 buffer에도 1000m/當 4ml의 2-mercaptoethanol을 添加하였다. 溶出速度는 1時間에 20~25ml를 溶出し었으며 溶出液은 Gilson社의 micro-fractionator에 依해서 7.5ml씩 採取하였으며 蛋白質濃度는 280 $\mu$ 에서 測定하였다.

6. 一般成分分析은 A.O.A.C.에 準하였으며 脂肪測定은 Babcock 法, 乳糖은 Lane Eynon 法에 依해서 定量하였다. 無脂固形分 含量은 全固形分으로부터 脂肪含量을 빼어서 算出하였다.

7. Sialic acid는 Warren's thiobarbituric acid method<sup>(14)</sup>에 따라 測定하였다.

또한 蛋白質分布는 Rowland<sup>(15)</sup>의 方法에 따라 分析하였고, 蛋白質量은 窒素含量에 factor 6.38을 곱해 算出하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 韓牛乳의 理化學的性質 및 一般成分

本實驗에서 使用한 韓牛乳의 理化學的인 性質 및 一般成分을 分析한 結果는 Table 1 및 2와 같다.

Table 1. Physico-chemical properties of Korean Cattles milk

Sample No.	Specific gravity	Acidity	pH	Alcohol test (70%)
3	1.036	0.21	6.4	—(normal)

乳牛에 있어서 理化學的 性狀 및 一般成分은 搾乳時間 泌乳期 季節 午前과 午後 搾乳過程 및 狀態 또는 飼養管理狀態等에 따라서 變한다고 報告되었다. (16, 17, 18, 19, 20, 21, 22)

金과全<sup>(23)</sup>이 서울近郊에서 採集한 新鮮한 Holstein乳의 比重, 酸度, pH는 각각 1.031, 0.155, 6.7인데 比해서 韓牛乳의 경우는 Table 1에 表示된 바와같이 1.036, 0.21 및 6.4이었다. 이러한 結果는 Table 2에 表示된 一般成分에서도 볼 수 있으며 品種의 差異에 依한 것이라 할 수 있다.

Table 2. Main components of Korean Cattles milk

Sample No.	Moisture (%)	Total solids (%)	S.N.F. (%)	Fat (%)	Protein (%)	Lactose (%)	Ash (%)	Sialic acid (%)
3	88.39	11.61	9.53	2.08	3.99	4.76	0.86	0.25

韓牛乳의 主成分은 김동이<sup>(24)</sup> 分析한 結果와 比較할 때 水分과 總固形分에서 2%前後의 差異가 났으며 無脂固形分은 비슷한 傾向을 나타내었다.

alcohol test는 新鮮한 Holstein乳<sup>(23)</sup>와 같은 陰性乳로 正常이었으며 이結果 熱에 대한 安定도가 높다고 할 수 있다.

Table 3. Protein distribution of Korean Cattles milk

Sample No.	Total protein %	Casein %	Whey protein %	N.P.N. %	Protein pptd in 12% TCA	Lacto-globulin %	Lact-albumin %
3	4.20	3.07	1.13	0.10	4.06	0.34	0.66

Table 3에 表示된 蛋白質分布는 Rowland<sup>(15)</sup>가 報告한 Holstein乳의 casein比率 (2.5%)과 蛋白質含量은 비슷했고 乳糖은 1%가 낮았으며 灰分은 0.18%가 높게 나타났다. 特別 脂肪含量은 個體간의 差異가 크게 나타났다. 그리고 總固形分量은 Kim等<sup>(19)</sup>이 日本 北海道에서 分析한 Holstein乳의 結果와 비슷했으며, 蛋白質, 乳糖 및 灰分은 높았다. 總固形分量은 Friesian cow<sup>(25)</sup>와 비슷했고, 蛋白質은 Holstein 3.14%<sup>(19)</sup>, Guernsey 3.81%<sup>(22)</sup>, Friesian cow 3.1%<sup>(25)</sup>보다 높았고 Buffalo 4.28%<sup>(20)</sup>보다는 낮았다. 乳清蛋白質은 다소 높았고, 非蛋白質窒素量은 낮았으며, lactoglobulin, lactalbumin은 韓牛가 Holstein보다 높았다.

이러한 結果는 搾乳時間 個體間 및 品種間의 差異에 起因되는 것으로 생각된다.

2. DEAE-cellulose 에 의한 分別

Holstein乳와 韓牛乳의 酸casein 0.3g을 DEAE-cellulose column에 依해서 각각 分別한 結果는 Fig 1과 같다.

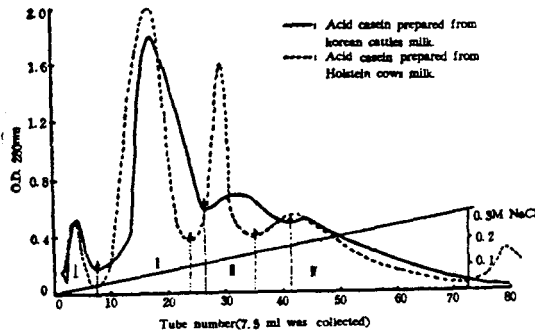


Fig. 1. Effluent patterns for 300 mg samples of casein from DEAE-cellulose column (1.5 by 27 cm) with NaCl gradient in buffer, 0.005M tris-citrate-buffer, pH 8.6 containing 6M Urea

分別結果 韓牛乳 및 Holstein乳의 casein은 각각 4 個의 fraction으로 分別되었으나 面積比率에 있어서 fraction II가 가장 컸고 fraction III, fraction IV, fraction I의 順序로 나타났는데, Holstein乳에서는 fraction II, fraction II, fraction III, fraction I의 順序로서, 각 fraction의 面積比率은 Table 4와 같다.

Table 4. Ratio of each fraction area fractionated by DEAE-cellulose column.

	Fraction I (%)	Fraction II (%)	Fraction III (%)	Fraction IV (%)
Korean cattle	3.24	52.67	26.22	17.87
Holstein	4.63	43.37	24.10	27.90

이온交換樹脂(DEAE)에 의한 分別結果(Fig. 1) fraction I은 樹脂에 吸着되지 않고, 溶出된 蛋白質로서 para-kappa-casein like material로 추측되며 fraction II는 그 面積比率이 52.67%로서 牛乳蛋白質中の αs-casein量에 해당된다. 그리고 各 fraction의 食鹽濃도를 보면 fraction I은 韓牛乳 0.030M NaCl, Holstein乳는 0~0.032 M NaCl에서 溶出되었고, fraction II는 韓牛乳 0.030M~0.102M NaCl, Holstein乳 0.032M~0.096M NaCl, fraction III은 韓牛乳 0.102M~0.165M, Holstein乳 0.096M~0.145M NaCl이었고, fraction IV는 韓牛乳 0.165M~0.3 M의 NaCl濃度에서, Holstein乳는 0.145M~0.3M의 NaCl濃度에서 溶出되었다.

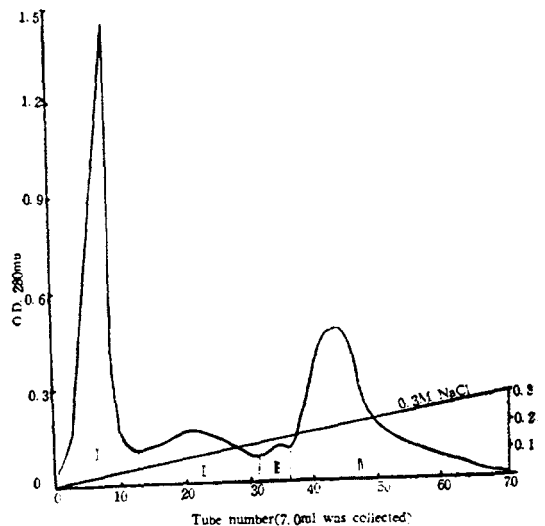


Fig. 2. Effluent patterns for 8 ml samples of Korean Cattles' acid whey from DEAE-cellulose column (1.5 by 20 cm) with NaCl gradient in buffer, 0.04M phosphate buffer, pH 5.8

한편 Fig 1을 Yaguchi와 Rose<sup>(2)</sup>의 實驗結果와 比較할 때 각 fraction의 溶出範圍 및 peak의 面積比는 相異하였다. 이러한 事實은 Holstein乳와 韓牛乳의 差異 및 試料 處理의 差異에 依한 結果라 할수 있다.

Fig. 2는 韓牛乳의 乳清蛋白質(whey protein)을 pH 5.8 의 0.04M phosphate buffer로 分別시킨 結果이다.

乳清蛋白質은 4個의 peak를 이루었고 各 fraction別의 比率는 fraction I 41.74%, fraction II 10.17%, fraction III 1.50%, fraction IV 46.59%로서 fraction IV가 全體 fraction 面積의 半程度의 比率를 차지하였다.

食鹽濃도에 依해 各 fraction의 分布는 fraction I이 0~0.054M NaCl에서 溶出되었고 fraction II는 0.054M~0.140M NaCl에서 溶出되었고, fraction III은 0.140M~0.163M NaCl이었고, fraction IV가 0.163M~0.30M 의 食鹽濃度에서 溶出되었다.

이상과 같이 分別된 各 fraction의 同定과 理化學的 性質에 關해서는 앞으로의 계속적인 研究가 必要하다고 생각된다.

#### IV. 要 約

本 實驗에서는 現在까지 學問的으로 充分히 밝혀지고 있지 않은, 韓牛乳의 理化學的 性質을 究明하기 爲하여 韓牛乳의 主成分을 分析하고, 또한 DEAE-cellulose를 使用하여 酸 casein, 乳清蛋白質을 分別하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 韓牛乳의 比重은 1.036, 酸度 0.21, pH는 6.4였고 알콜試驗에서는 正常이었다.
2. 韓牛乳의 水分含量은 88.39%였고, 無脂固形分 9.53%였고, 脂肪은 2.08%, 蛋白質은 3.99%, 乳糖은 4.76%였고 Sialic acid는 0.25%였다.
3. 總蛋白質中 casein이 3.07% 乳清蛋白質이 1.13%, lactoglobulin 0.34%, lactalbumin은 0.66%였다.
4. 6M 尿素를 含有한 0.005M TCU-buffer를 使用하여 DEAE-cellulose column에 依해서 韓牛乳의 酸 casein을 分別한 結果 4個의 fraction을 얻었다.
5. 0.04M phosphate-buffer를 使用하여 DEAE-cellulose column에서 乳清蛋白質을 分別한 結果 4個의 fraction을 얻어 各 fraction의 面積을 냈다.

#### 文 獻

- 1) 金煥卿: 韓牛乳牛飼育法, 富民文化社(서울) p. 91 (1973).
- 2) Yaguchi, M. and D. Rose: *J. Dairy Sci.*, 51:1725 (1971).
- 3) Sober, H. A. and E. A. Peterson: *J. Amer. Soc.*, 76:1711 (1954).
- 4) Yaguchi, M., W. G. Jennings, and N. P. Tarassuk:

- J. Dairy Sci.*, 42:1395 (1959).
- 5) Zittle, C.A.: *J. Dairy Sci.*, 43:855 (1960).
- 6) Yaguchi, M., N.P. Tarassuk, and H.G. Hunziker: *J. Dairy Sci.*, 44:589 (1961).
- 7) Yoshimatsu, A: *Dairy Sci. Abstr.*, 28:1314 (1963).
- 9) Koike, K., H. Ariga, and K. Osumi: *Dairy Sci. Abstr.*, 26:3023 (1964)
- 10) Ribadeau Dumas, B., J. L. Maubois, G. Mocquot, and Garnier: *Dairy Sci. Abstr.*, 16:2030 (1964).
- 11) Yaguchi, M., N. P. Tarassuk, and N. Abe: *J. Dairy Sci.*, 47:1167 (1964).
- 12) Tompson, M. P: *J. Dairy Sci.*, 49:792 (1966).
- 13) Kim, Y.K., M. Yaguchi, and D. Rose: *J. Dairy Sci.*, 52:316 (1969).
- 14) Warren, L.: *J. Biol. Chem.*, 234:1971 (1959).
- 15) Robert Jenness, and Stuart Patton: *Principles of Dairy Chemistry*, John Wiley & Son, Inc., p.113 (1959).
- 16) Buecher, M.: *Dairy Sci. Abstr.*, 28: 1657 (1965).
- 17) Ghosh, S. N., and C. P. Anantakrishnan.: *Dairy Sci. Abstr.*, 27:1869 (1963).
- 18) Gilmore, H.C & S.N. Gaunt: *Dairy Sci. Abstr.*, 27:531 (1963).
- 19) Kim, Y.K., Arima Shunrokuro, and Hashimoto Yoshio: *J. Facul. Agr., Hokkaido Univ., Sapporo.* 53:228 (1963).
- 20) Malossini, F.: *Dairy Sci. Abstr.*, 28:2297 (1964).
- 21) Volgtjander, K. H.: *Dairy Sci. Abstr.*, 26:2357 (1964).
- 22) Castillo, L. S., G. W. Trimforger, C.R. Henderson., B. L. Herrington and K. L. Turk: *Dairy Sci. Abstr.*, 28:977 (1963).
- 23) 金榮教, 全文鎮: 高麗大學校 農科大學 農林論集 第13輯 p.129 (1972).
- 24) 김상철, 김영주, 박종래: 축산시험장 연구보고서 (1971).
- 25) Pilla, A. M. & F. Malossini: *Dairy Sci Abstr.*, 28:2288 (1964).
- 26) Rose, D. & J.R. Marier: *J. Dairy Sci.*, 46:1323 (1963).