

젖소 초유 Casein Micelle의 이화학적 성질에 관한 연구

이철원 · 김영교*

제주대학교 식품영양학과, *고려대학교 축산학과

Some Physicochemical Properties of Bovine Colostral Casein Micelles

Chul-Won Lee and Yong-Kyo Kim*

Department of Food Science and Nutrition, Cheju National University, Cheju

*Department of Animal Science, Korea University, Seoul

Abstract

This experiment was carried out to study the properties of casein micelles obtained from colostral skim milk. As lactation was progressed from parturition until 240h after calving, the content of total protein decreased while the proportion of casein to whey protein increased. Fractionalization according to the size of casein micelle was done by ultracentrifugation at 100,000 $\times g$ for 10 minutes(pellet 1), 30 minutes(pellet 2) and 60 minutes(pellet 3) and the serum casein was prepared by acid precipitation of final supernatant at pH 4.6. During the lactation period, the relative amount of pellet 1(large size) decreased, that of pellet 2(middle size) maintained nearly constant level except for pellet from parturition, that of pellet 3(small size) increased, and the serum casein showed almost constant level. The relative amounts of α_{s1} -casein and α_{s2} -casein and β -casein-5P in the pellets decreased and that of κ -casein increased markedly with decreasing micelle size, but the relative amounts of β -casein-1P(f 29-209), (f 106-209) and (f 108-209) showed little change. The composition of the serum casein was different from that of the skim milk casein.

Key words : colostral milk, casein micelle, physicochemical properties of milk

서 론

젖소의 초유는 정상유과 비교해서 각종 성분의 함량이 높고 또한 면역 globulin과 같은 단백질을 함유하고 있어서, 송아지의 영양 및 생리학상 중요한 의미를 가지며, 초유의 여러가지 단백질 성분 중에서 casein은 중요한 것으로써, 그것의 함량은 분만직후로부터 1주일 사이에 점차 감소하지만, 총단백질 함량에 대한 비율은 약 40%에서 약 70%로 증가하며, 그 후 정상유에 가깝게 된다^(1,2).

Corresponding author : Chul-Won Lee, Department of Food Science and Nutrition, College of Natural Science and Engineering, Cheju National University, Ara-dong, Cheju, Cheju-do 690-120

정상유의 casein은 casein micelle이라고 불리우는 복합체 (50~300nm)를 형성하여 유즙 중에 분산하고 있으며, 이 복합체는 α_{s1} -, β - 및 κ -casein과 칼슘, 인산 등에 의해서 구성되고 있다^(3~8). Casein micelle은 칼슘농도와 온도에 따라서 여러가지의 크기로 존재하며, micelle의 크기가 다르면 α_{s1} -, β - 및 κ -casein 등의 구성비율도 다른 것으로 알려져 있다^(9,10).

지금까지 정상유의 casein에 대한 연구는 많이 보고된 바 있지만 초유의 그것에 대한 연구는 별로 이루어지지 않고 있다. 그러므로 본 실험은 초원심분리, DEAE-cellulose column chromatography 및 Sephadex gel filtration에 의해 초유 casein micelle의 특성과 구성

성분을 조사하는 데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

탈지유의 조제

고대 농장에서 착유중인 Holstein 종에서 1마리를 선별하여 시간별(분만직후, 12시간 후, 24시간 후, 48시간 후)로 채취한 초유와 정상유(10일 후)를 $8,000 \times g$ 로 30분간(20°C) 원심분리하여 지방을 제거하였다.

산 casein 및 α -casein의 조제

산 casein은 상법에 의거하여 조제하였으며 α -casein은 Naguchi 등⁽¹¹⁾의 방법에 따라 Sephadex G-150 여과에 의하여 조제하였다.

Casein micelle 과 serum casein의 조제

탈지유를 초원심분리기(Beckman 사제 Model L 5-65, Rotor type 27sw)를 사용하여 Fig. 1에서 기술한 순서에 따라 $100,000 \times g$ 에서 각각 10분, 30분 및 60분 동안 초원심분리하여 micelle을 크기 별로 분리하였다.

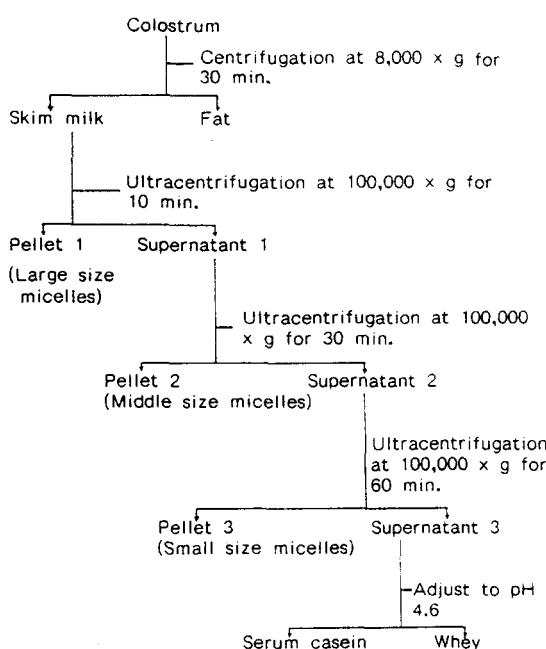


Fig. 1. Procedure for fractionation of casein micelles of different size from colostrum.

단백질의 정량

A.O.A.C.⁽¹²⁾에 준한 semi-micro-kjeldahl 방법으로 단백질을 정량하였다.

DEAE-cellulose column chromatography

Davies 및 Law⁽¹³⁾와 Rose 등⁽¹⁴⁾의 방법에 의하여 실시하였으며, 0.005 M tris-HCl-urea buffer(pH 8.6; 0.03-0.25M NaCl gradient)를 시간당 40-60 ml의 속도로 용출시켜서, 5ml씩 채집하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Sephadex G-150 여과

Naguchi 등⁽¹¹⁾의 방법에 준하여 실시하였으며, 0.005 M tris-citrate-urea buffer(pH 8.6)를 시간당 20-30ml의 속도로 용출시켜서, 10ml씩 채집하여 280nm에서 흡광도를 측정하였다.

Slab polyacrylamide gel electrophoresis

김 등⁽¹⁵⁾의 방법에 준하여 실시하였으며, 6% acrylamide gel과 0.1M NaCl 용액, 0.3M boric acid buffer(pH 8.6)를 사용하였다.

결과 및 고찰

단백질의 함량비교

본 실험에 사용한 초유(분만직후, 12시간 후, 24시간 후, 48시간 후)와 정상유(10일 후)의 단백질 함량을 정량한 결과는 Table 1과 같다.

분만직후의 초유로부터 정상유로 이행됨에 따라서 조단백질의 총량은 17.48%, 7.96%, 5.47%, 4.22% 및 3.29%로 급격히 감소하였으며, 충단백질 중 casein과 유청단백질의 구성비율을 분석한 결과, 분만직후의 초유로부터 정상유로 시간이 경과함에 따라서 충단백질 함량에 대한 casein의 비율은 43.88%, 44.47%, 57.77%, 71.33% 및 85.41%로 증가하였고, 유청단백질의 비율은 56.12%, 55.53%, 42.23%, 28.67% 및 14.59%로 감소하였다. 이러한 결과는 비유초기에는 종아지의 면역성 부여를 위하여 유청단백질의 85% 이상을 차지하는 면역단백질의 양이 많았다가 분만후 시간이 경과함에 따라서 면역단백질의 양이 감소하기 때문인 것으로 추정된다.

Table 1. Protein contents of colostrum and normal milk

(unit: %)

	Time after calving, (hour)				
	0	12	24	48	240 (normal milk)
Total protein	17.48	7.96	5.47	4.22	3.29
Casein in total protein	43.88	44.47	57.77	71.33	85.41
Whey protein in total protein	56.12	55.53	42.23	28.67	14.59

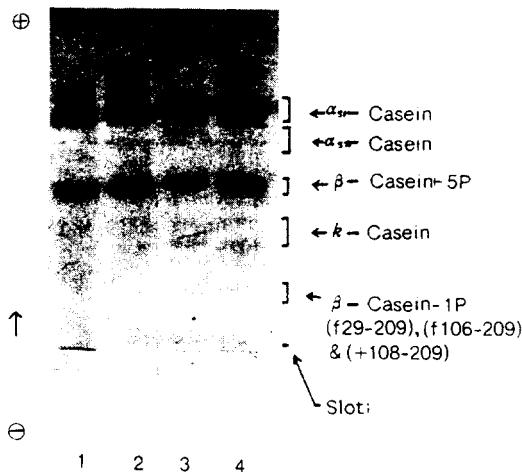


Fig. 2. Electrophoretic patterns of caseins obtained from normal milk and colostra with various time intervals after calving.

1. Casein from colostrum immediately after calving
2. Casein from colostrum 12 hours after calving
3. Casein from colostrum 48 hours after calving
4. Casein from normal milk

전기영동적 변화 비교

초유 casein의 성상을 알아보기 위하여 분만직후, 12시간 후 및 48시간 후의 시료를 각각 채취한 후, 산 casein을 조제하고, 정상유 산 casein과 비교하여 전기영동을 실시한 결과는 Fig. 2와 같다.

분만직후로부터 시간이 경과함에 따라 전기영동상 α_{s1} -및 α_{s2} -casein band에 변화가 나타났다. 첫째로 α_{s1} -casein-9P(구 α_{s0} -casein)⁽¹⁶⁾의 경우 분만직후의 초유 casein에는 전기영동상에 그 band가 명료히 나타났으나 그 후 비유기가 진행됨에 따라서 감소현상을 나타냈다. 이와같은 전기영동상의 결과는 α_{s1} -casein-9P의 함량은 정상유보다도 초유에 상대적으로 더 많이 함유되어 있는 것으로 해석할 수 있을 것이다. 다음에 α_{s1} -casein의 major band (α_{s1} -casein-8P)의 바로 밑에 나타나는 α_{s2} -casein A-13P(구 α_{s2} -casein)⁽¹⁶⁾는 분만직후의 초유에는 전기영동상 나타나지 않았으나 분만 2일 이후의 우유부터 나타나기 시작했다.

한편, κ -casein은 분만직후의 초유에서는 전기영동상 뚜렷한 band를 나타내지 않고 퍼지는 경향을 나타내었고 시일이 경과함에 따라 κ -casein band는 명료히 분리되었다. 이와같은 전기영동상의 차이점은 초유와 정상유의 κ -casein과 결합하고 있는 당의 종류와 양에 다른 점이 있고, 따라서 κ -casein의 糖鎖構造가 다르기 때문인 것으로 사료된다^(17,18).

초원심분리에 의한 초유(시간별)와 정상유의 casein micelle의 함량비교

분만직후로부터 정상유로 이행되는 과정에 있어서, 각 casein micelle의 함량에 어떤 차이가 있는지의 여부를 알아보기 위하여 분만시간별로 채취한 초유와 정상유를

Table 2. The percentage of casein micelles precipitated by ultracentrifugation at 100,000 × g (unit: %)

Fractions	Centrifuging time, minutes	0	Time after calving, (hour)				
			12	24	48	240 (normal milk)	
Pellet 1	10	40.13	30.38	28.09	22.84	23.13	
Pellet 2	30	24.61	30.88	30.11	30.35	30.96	
Pellet 3	60	16.59	19.24	23.42	26.00	28.11	
Serum casein (Non-precipitated)		18.67	19.50	18.38	20.81	17.80	

각각 10분간(pellet 1), 30분간(pellet 2) 및 60분간(pellet 3) $100,000 \times g$ 에서 초원심분리하였을 때, 전 casein 양에 대하여 침전된 각 casein micelle의 함량을 나타낸 표는 Table 2와 같으며, 분만직후로부터 시간이 경과함에 따라서 크기가 큰 micelle(pellet 1)의 양은 점차 감소하는 경향을 나타내었고, 중간크기의 micelle(pellet 2)의 양은 분만직후에는 적었으나 그 후부터는 큰 변화는 없었으며, 작은 크기의 micelle(pellet 3)의 양은 점차 증가하였고 serum casein의 양은 거의 일정한 수준을 유지하였다. 이와같은 결과를 볼 때 각 casein micelle의 조성에 차이가 있을 것으로 추정되었다.

초원심분리에 의한 초유 casein micelle의 조성

초유 전 casein에 함유되어 있는 각 casein 성분의 구성비율을 조사하기 위하여 DEAE-cellulose column chromatography를 실시한 결과는 Fig. 3과 같다.

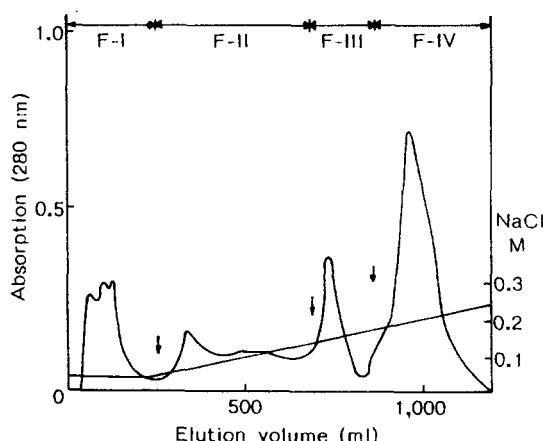


Fig. 3. The fractionation of alkylated colostral whole casein (200 mg) obtained by DEAE-cellulose column chromatography (Whatman DE 52, 1.5x 50cm) with THU buffer (pH 8.6) and a linear NaCl gradient (0.03-0.25 M NaCl). (Arrows indicate demarcation between peaks for area calculation)

초유의 전 casein은 4개의 분획으로 분별되었는데, F-I은 β -casein-1P(f29-209), (f106-209) 및 (f108-209)/(구 γ -casein)⁽¹⁶⁾, F-II는 κ -casein, F-III는 β -casein-5P(구 β -casein), F-IV는 α_{s1} - 및 α_{s2} -casein 이었다. 이와같은 chromatography의 유형은 申 등⁽¹⁹⁾의 본 실험과 같은 조건에서 정상유의 전 casein에 대하여 얻은 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 또 분만직후의 초유를 Fig. 1의 방법으로 초원심분리하였을 때, 얻은 pellet 1, 2, 3, 및 serum casein을 각각 DEAE-cellulose column chromatography에 의해서 분별한 결과, 초유의 전 casein의 chromatography 유형(Fig. 3)과 유사하였으며, 전 casein에 대한 각 casein 성분의 구성비율(optical density로부터 면적비 계산)⁽¹⁴⁾은 Table 3과 같다. 각 casein 성분함량 중에서 α_{s1} - 및 α_{s2} -casein과 β -casein-5P는 casein micelle의 크기가 작아짐에 따라 감소하였고, β -casein-1P(f29-209), (f106-209) 및 (f108-209)는 큰 차이를 보이지 않았으며, κ -casein은 micelle의 크기가 작아짐에 따라 현저히 증가하였고 serum casein은 전 casein에 비해서 α_{s1} - 및 α_{s2} -casein의 양은 적었지만, κ -casein의 양과 β -casein-1P(f29-209), (f106-209) 및 (f108-209)의 양은 많았고, β -casein-5P의 양은 차이가 없었다. 이러한 결과는 casein micelle의 크기가 작아짐에 따라 κ -casein의 상대적인 함량이 증가되며, β -casein-5P의 상대적인 함량은 감소되는 것을 알 수 있으며, 이와같은 결과는 casein micelle의 크기별에 따른 β - 및 κ -casein의 함량을 조사한 Dumas 등⁽¹⁰⁾의 보고와 일치하였다.

Sephadex G-150 여과에 의한 초유와 정상유 casein의 분별

초유 및 정상유의 전 casein을 분별한 결과, 초유 및 정상유의 전 casein은 Fig. 4에 나타난 바와같이 대체

Table 3. Composition of centrifugally fractionated micellar and serum caseins of colostral skim milk (unit: %)

Individual casein	Pellet			Serum casein	Whole acid casein
	1	2	3		
α_{s1} -, α_{s2} - Casein	52	50	39	28	44
β - Casein - 5p	20	19	17	17	17
κ - Casein	13	15	29	25	21
β - Casein - 1p(f29-209), (f106 - 209)&(f108 - 209)	15	16	15	30	18

로 2개의 분획으로 분별되었으며, 각 분획을 전기영동한 결과(Fig. 5), F-I은 κ -casein만을 함유하고 있었고, F-II는 α_{s1} -, α_{s2} -casein, β -casein-5P 및 β -casein-1P(f29-209), (f106-209) 및 (f108-209)를 함유하고 있었다. 또한 초유 및 정상유의 전 casein 중 κ -casein의 함량을 면적비로 계산한 결과, 각각 21.5%와 12.5%로 나타나 초유의 κ -casein이 정상유의 κ -casein에 비하여 높은 비율을 나타내었다. 이러한 결과는 rennin에 의하여 초유의 전 casein으로부터 유리되는 non-protein nitrogen의 양이 정상유의 양보다 많았다는 Guérin 등⁽¹⁸⁾의 보고와 일치하는 것이었다.

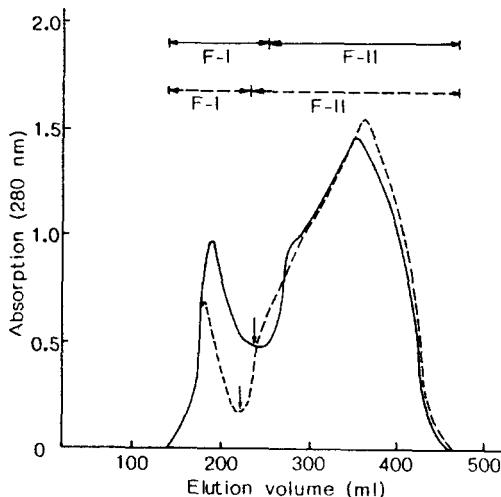


Fig. 4. Elution profiles obtained by exclusion chromatography of acid casein from colostrum and normal milk (400mg casein, 2.5×95cm column of Sephadex G-150, 25°C, 0.005M tris-HCl buffer, pH8.6, containing 6M ureal).

(Arrows indicate demarcation between peaks for area calculation)

— : Colostral casein
---- : Casein from normal milk

요 약

초유 casein micelle의 특성을 조사하였다. 분만직 후의 초유로부터 정상유로 이행됨에 따라서 총단백질의 함량은 감소하였으며, casein과 유청단백질의 비율에 있어서 casein은 증가한 반면 유청단백질은 감소하였

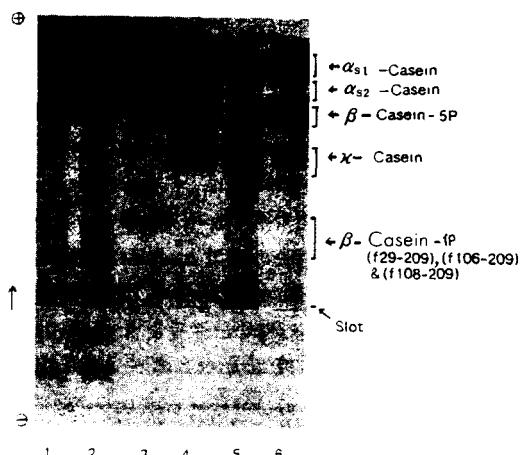


Fig. 5. Slab polyacrylamide gel electrophoretic patterns of casein obtained from normal milk and colostrum filtrated from Sephadex G-150 column chromatography with 0.005 M tris-citrate urea buffer (pH 8.6).

1. Casein from normal milk: fraction II
2. Casein from normal milk: fraction I
3. Casein from normal milk: Whole casein
4. Colostral casein: Fraction II
5. Colostral casein: Fraction I
6. Colostral casein: Whole casein

다. 한편 탈지시킨 초유를 100,000×g에서 10분(pellet 1), 30분(pellet 2) 및 60분(pellet 3)동안 초원심분리하여 casein micelle을 크기별로 분리하였고, 상정액 중의 casein(serum casein)을 pH4.6에서 산침전 시킴으로 제조하였다. 분만직후의 초유로부터 정상유로 시간이 경과함에 따라서 크기가 큰 micelle(pellet 1)의 양은 점차 감소하는 경향을 나타내었고, 중간크기의 micelle(pellet 2)의 양은 분만직후의 것을 제외하면 거의 일정한 수준을 유지하였으며, 작은 크기의 micelle(pellet 3)의 양은 점차 증가하였고, serum casein의 양은 거의 일정하게 나타났다. 또 초원심분리에 의하여 얻은 각 casein micelle의 casein 함량 중 α_{s1} - 및 α_{s2} -casein과 β -casein-5P의 양은 micelle의 크기가 작아짐에 따라 감소하였으나, κ -casein의 양은 현저히 증가하였으며, β -casein-1P(f29-209), (f106-209) 및 (f108-209)의 양에 있어서는 큰 차이가 없었다. 또 serum casein의 조성은 전 casein과 비교하여 볼 때 차이가 있었다.

문 헌

1. Webb, B.H., Johnson, A.H. and Alford, J.A. : *Fundamentals of dairy chemistry*, AVI, Westport Connecticut, p. 14(1974)
2. 김영교, 김영주, 김현숙 : 우유와 유제품의 과학, 선진문화사, 서울, p.37(1979)
3. Addeo, F., Mercier, J.C. and Ribadeau-Dumas, B. : The caseins of buffalo milk. *J. Dairy Res.*, **44**, 455(1977)
4. von Hippel, P.H. and Waugh, D.F. : Casein ; Monomers and polymers. *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 4311(1955)
5. Rose, D. : Relation between micellar and serum casein in bovine milk. *J. Dairy Sci.*, **51**, 1897(1968)
6. Talbot, B. and Waugh, D.F. : Micelle-forming characteristics of monomeric and covalent polymeric κ -caseins. *Biochemistry*, **9**, 2807(1970)
7. 김영교 : 우유 단백질, 한국식품과학회지, **4**, 224(1972)
8. 김영교 : Casein micelle 의 구성성분, 성상 및 구조 한국유가공연구회지, **2**, 6(1982)
9. Davies, D.T. and Law, A.J.R. : Variation in the protein composition of bovine casein micelles and serum casein in relation to micellar size and milk temperature. *J. Dairy Res.*, **50**, 67(1983)
10. Ribadeau Dumas, B. and Garnier, J. : Structure of the casein micelle. *J. Dairy Res.*, **37**, 269(1970)
11. Yaguchi, M., Davies, D.T. and Kim, Y.K. : Preparation of κ -casein by gel filtration. *J. Dairy Sci.*, **51**, 473(1968)
12. A.O.A.C. : *Official Methods of Analysis*, 13th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.D., p.15(1980)
13. Davies, D.T. and Law, A.J.R. : An improved method for the quantitative fractionation of casein mixtures using ion-exchange chromatography. *J. Dairy Res.*, **44**, 213(1977)
14. Rose, D., Davies, D.T. and Yaguchi, M. : Quantitative determination of the major component of casein mixtures by column chromatography on DEAE-cellulose. *J. Dairy Sci.*, **52**, 8(1969)
15. Kim, Y.K., Yaguchi, M. and Rose, D. : Isolation and amino acid composition of para- κ -casein. *J. Dairy Sci.*, **52**, 316(1969)
16. Eigel, W.N., Butler, J.E., Ernstrom, C.A., Farrell, Jr., H.W., Harwalkar, V.R., Jenness, R. and Whitney, R. McL. : Nomenclature of proteins of cow's milk : fifth revision. *J. Dairy Sci.*, **67**, 1599(1984)
17. 伊藤敏敏, 足立達, 齊藤忠夫 : 牛乳 κ -カゼインの 糖鎖構造, 化學と生物, **21**, 543(1983)
18. Gúerin, J., Alais, C., Jolléa J. : κ -Casein from bovine colostrum. *Biochim. Biophys. Acta.*, **351**, 325(1974)
19. 신동철, 전우민, 김영교 : Casein micelle 의 조성에 관한 연구. 한국낙농학회지, **6**(1), 71(1984)

(1987년 10월 5일 접수)