

고정화 Chymosin을 이용하여 Whole Casein으로부터 분리한 Caseinomacropeptide(CMP)의 특성

김의수 · 장해동[†]

한남대학교 식품영양학과

Characteristics of Caseinomacropeptid(CMP) Purified from Whole Casein by Using Immobilized Chymosin

Eui-Su Kim and Hae-Dong Jang[†]

Dept. of Food and Nutrition, Hannam University, Taejon 300-791, Korea

Abstract

Chymosin was purified from commercial rennet with DEAE-Sephrose CL-6B and immobilized on Celite™ using glutaraldehyde. Whole casein from fresh raw milk was hydrolyzed by immobilized chymosin and total CMP was isolated by trichloroacetic acid(TCA) and ultrafiltration, and characterized. The amount of chymosin purified from 15g commercial rennet by DEAE-Sephrose CL-6B was 0.16g and 18mg of chymosin was immobilized on 1g of Celite™ by 5% glutaraldehyde. Immobilized chymosin hydrolyzed most of κ -casein on whole casein within 2 hours to leave para- κ -casein and caseinomacropeptide(CMP). The total CMP isolated from 10g of whole casein hydrolyzate by TCA and ultrafiltration was 0.4g and 0.1g, respectively. Results of electrophoresis, amount of sialic acid, composition of amino acid and ratio of A_{280} to A_{214} showed that total CMP by TCA was purer and had more CMP without carbohydrate than one by ultrafiltration. CMP isolated from total CMP by 12% TCA precipitation was 50% of total CMP and most of caseinoglycopeptide(CGP) was removed from total CMP, indicating less amount of sialic acid in CMP than in total CMP.

Key words: immobilized chymosin, whole casein, caseinomacropeptide

서 론

Milk casein의 κ -casein이 응유효소인 chymosin의 작용을 받으면 Phe(105)-Met(106) 펩티드 결합이 분해되어 소수성 성질을 갖는 para- κ -casein과 친수성 성질을 나타내는 caseinomacropeptide(CMP)로 나누어진다. 이때 para- κ -casein은 casein micelle에 남게 되지만 CMP는 친수성이기 때문에 수용액으로 용해된다. 치즈 제조시에 chymosin이 milk casein에 작용하면 CMP가 떨어져 나간 casein micelle은 표면소수성의 증가로 인해 서로 응집하여 침전하게 되고 CMP는 유청(whey)으로 이행된다.

κ -Casein으로부터 chymosin의 작용에 의해 생성되는 CMP는 이론적으로 계산된 분자량이 약 8,000Da이지만 gel filtration chromatography에 의해 측정된 분자량은 pH에 따라 변하는 것으로 알려져 있다(1,2). CMP

는 당을 갖고 있는 CMP 즉 caseinoglycopeptide(CGP)와 당을 함유하지 않는 CMP로 구성되어 있으며 이들의 구성비율은 CMP의 분리방법에 따라 다르게 나타난다(2). CMP가 관심의 대상이 되고 있는 것은 CMP가 나타내는 다양한 생리활성 때문이며, 이제까지 알려진 CMP의 생리활성에는 위액분비 억제작용(3-6), 적혈구와 polystyrene에 대한 oral actinomyces와 streptococci의 흡착억제작용(7,8), bifidobacteria에 대한 성장촉진효과(9,10), cholera독소의 receptor에 대한 반응 억제효과(11), 유산균의 성장촉진효과 등이 있으며(12-14), trypsin에 의해 분해된 CMP 가수분해물로부터 항혈전작용을 나타내는 펩티드의 존재가 확인되었다(15-20).

CMP는 유청 또는 유청분말로부터 alcohol 침전과 ion exchange chromatography에 의해서(20) 또는 sodium caseinate를 chymosin으로 가수분해시킨 분해물

[†]To whom all correspondence should be addressed

로부터 trichloroacetic acid(TCA) 침전법에 의해서 분리하거나(21-23) whole casein을 chymosin으로 가수분해시킨 다음 ultrafiltration법에 의해 분리되고 있다(24,25).

본 연구에서는 신선한 raw milk로부터 whole casein을 분리하고 순수분리된 chymosin을 고정화시켜서 반응시킨 다음 TCA 침전법과 ultrafiltration법에 따라 총 CMP를 분리하여 분리된 총 CMP로부터 TCA법에 따라 당을 갖고 있지 않는 CMP를 분리한 다음 총 CMP와 CMP의 특성을 조사하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료

CMP의 분리에 사용된 원유는 대전광역시 유성구에 소재한 충남대학교 동물사육장에서 사육 중인 젖소로부터 착유된 것을 사용하였다.

Whole casein의 분리

착유된 원유를 4,080×g에서 30분간 원심분리하고 cheese cloth를 통과시켜 skim milk를 얻은 다음 1N HCl을 가해 pH를 4.6으로 조정하여 casein을 침전시키고 증류수로 3번 씻은 후 1N NaOH를 가해 pH 7.0으로 조정하여 casein을 용해시키고 동결건조한 다음 -20°C에서 냉동·보관하면서 사용하였다.

Chymosin의 분리 및 전기영동

시판되는 효소 rennet(Sigma사, USA)는 chymosin 이외에도 소량의 pepsin을 함유하고 있기 때문에 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 chymosin을 순수분리하였다(26). DEAE-Sephrose CL-6B(Pharmacia사, Sweden) 수지를 3×30cm column에 충전시킨 다음 0.1 M phosphate buffer(pH 5.7)로 평형화시킨 후 4°C에서 탈이온수로 24시간 투석시킨 15g의 rennet을 loading 하였다. 연동펌프를 사용하여 500ml의 0.1M phosphate buffer(pH 5.7)를 1ml/min 유속으로 흘려보낸 다음 NaCl 농도를 달리한(0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 2.0M) 0.1M phosphate buffer를 사용하여 동일한 유속으로 흘려주면서 8ml씩 분획을 받아 280nm에서 흡광도를 측정함으로써 단백질의 양을 측정하고 1.2g의 탈지분유를 10mM CaCl₂ 10 ml에 용해시킨 것을 기질로 사용하여 응고력을 측정하였다(27,28). Chymosin의 분리된 정도를 알아보기 위해 Melachouris방법에 따라 전기영동을 실시하였다(29). 각 시료 5mg을 5% spacer gel 용액 0.1ml에 녹인 후 1

ml의 증류수를 넣고 bromophenol blue용액 20μl와 β-mercaptoethanol 10μl을 첨가하여 시료를 처리하였으며 0.046M tris-glycine buffer(pH 8.3)를 전극 buffer로 사용하여 200V에서 1시간 30분 동안 전개시켰다. 전개가 끝난 gel은 10% sulfosalicylic acid와 25% TCA를 함유한 fixing 용액에 1시간 동안 담근 후 0.03% Coomassie brilliant blue G-250으로 염색시키고 methanol/acetic acid/water(10/7/83)로 구성된 탈색용액을 사용하여 탈색시켰다.

Chymosin의 고정화

Chymosin 분해작용의 조절과 CMP의 분리를 용이하게 하기 위하여 chymosin을 값싼 고정지지체인 Celite™(Denver사, USA)에 고정화시켰다. Celite™의 silanization은 Duval 등(30)이 제시한 nonaqueous 방법에 따라 시행하여 aminopropyl기를 Celite™에 첨가시켰다. Silanization의 확인은 amino기와 정성적으로 반응하여 오렌지색을 나타내는 TNBS(2,4,6-trinitrobenzene sulfonate)방법을 사용하였다. Aminopropyl기가 첨가된 Celite™을 5% glutaraldehyde와 반응시킴으로써 활성화시키고 chymosin을 가해 Celite™에 chymosin을 고정시켰다(31). 고정화시킨 chymosin은 0.02% sodium azide를 첨가한 0.01M phosphate buffer(pH 7.0)에서 냉장보관하였으며(4°C), Celite™에 고정화된 chymosin의 양은 6N HCl을 가해 110°C에서 24시간 가수분해시킨 다음 Hernandez 등의 o-phthalaldehyde(OPA)방법에 의해 측정하였다(32,33).

고정화 chymosin에 의한 whole casein의 가수분해

Chymosin이 고정화된 Celite™ 2.2g을 column(2.5×30cm)에 충전시키고 15°C에서 하루 동안 정치해 둔 2.5% whole casein 150ml을 연동펌프를 이용하여 순환시킴으로써 가수분해를 시켰으며, CMP가 떨어져나간 whole casein이 침전되지 않도록 온도를 15°C로 유지하였다. 반응시키는 동안 일정시간별로 가수분해물을 채취하여 탈이온수로 투석시킨 다음 가수분해 경향을 알아보기 위해 Melachouris 방법(29)에 따른 전기영동을 실시하였다.

총 CMP의 분리

Chymosin에 의한 whole casein의 가수분해물로부터 총 CMP는 2가지 분리방법 즉 TCA법(21,23)과 ultrafiltration법(24,25)을 사용하여 분리하였다. TCA법은 2시간 동안 chymosin에 의해 분해된 whole casein 가수

분해물에 24% TCA 용액을 자석교반기를 사용하여 천천히 가해 TCA 농도를 2%로 조정하고 TCA에 의해 침전된 para- κ -casein과 다른 단백질을 제거하기 위해 3,000×g에서 30분간 원심분리시킨 다음 0.45 μ m 막을 통과시킴으로써 상정액을 얻고 TCA를 제거하기 위해 4°C에서 증류수와 탈이온수로 투석한 후 동결건조시켜 -20°C에서 보관하였다. Ultrafiltration법은 CMP의 분자량이 약 8,000Da에 해당하지만(1) gel filtration chromatography 방법에 의하면 pH 7.0에서는 20,000~30,000Da, pH 3.5에서는 10,000~30,000Da을 나타낸다는 사실에 근거하였다. 고정화 chymosin에 의해 가수분해된 whole casein 용액에 1N HCl을 첨가하여 pH 4.6으로 조정하고 실온에서 1시간 정치시킨 후 3,000×g에서 30분간 원심분리시키고 0.45 μ m 막을 통과시켰다. 얻은 상정액을 다시 1N HCl을 가해 pH 3.5로 조정하고 YM30 막(30kDa cut off, Amicon사, USA)이 장치된 Amicon 농축기(Amicon사, USA)를 통과시킴으로써 30kDa 이상의 단백질을 제거하였다. YM30 막을 통과시켜 얻은 용액을 1N NaOH를 사용하여 pH 7.0으로 조정하고 YM10 막(10kDa cut off, Amicon사, USA)이 장치된 Amicon 농축기를 통과시켜 10kDa 이하의 단백질을 제거하였으며 얻어진 농축액을 4°C에서 탈이온수로 투석한 후 동결건조시켜 -20°C에서 보관하면서 분석에 사용하였다.

TCA법에 의한 CMP의 분리

당을 갖고 있지 않은 CMP를 분리하기 위해서는 총 CMP를 먼저 분리하여야 한다. 총 CMP의 분리를 위해서는 ultrafiltration 방법보다 TCA법이 효과적인 방법임이 입증됨에 따라 TCA법에 따라 총 CMP를 분리한 다음 48% TCA 용액을 4°C에서 자석교반기를 사용하여 천천히 가해 TCA 농도를 12%로 조정함으로써 당을 함유하지 않은 CMP를 침전시켰으며 침전된 CMP는 9,000×g에서 30분간 원심분리하여 회수하고 탈이온수에 용해시킨 후 3일간 증류수와 탈이온수로 투석시킴으로써 TCA를 제거하고 동결건조시켜 -20°C에서 보관하였다.

총 CMP와 CMP의 특성 분석

분리된 CMP의 성분조성을 알아보기 위해 running gel 용액의 농도를 12%로 조정하여 전기영동을 실시하였으며, 아미노산 조성 분석은 분리된 CMP에 6N HCl를 가하고 진공밀봉한 후 110°C에서 24시간 가수분해시키고 Pico-Tag free amino acid analysis column이

장치된 HPLC(Waters사, USA)를 사용하였다. 총 CMP와 CMP는 아미노산 조성을 이론적으로 볼 때 방향족 아미노산(Phe, Trp, Tyr)을 갖고 있지 않기 때문에 280nm에서 흡광도를 나타내지 않는 성질을 이용하여 분리된 CMP의 순도를 확인하기 위하여 280nm와 214nm에서 흡광도를 측정하여 A_{280}/A_{214} 비율을 비교하였으며, 80°C에서 45분간 0.1M sulfuric acid로 산가수분해시킨 다음 thiobarbituric acid법(34)에 따라 sialic acid를 정량하여 CMP의 당 함유량을 측정하였다.

결과 및 고찰

음이온 교환 크로마토그래피에 의한 chymosin의 분리

보통 시약으로 판매되고 있는 rennet은 chymosin 외에 소량의 pepsin을 함유하고 있어 whole casein을 가수분해시킬 경우 원하는 CMP 외에 다른 펩티드를 생성할 수 있기 때문에 본 실험에서는 시판되고 있는 Sigma사 rennet를 시료로 하여 음이온 교환 수지인 DEAE-Sephacel CL-6B에 의해 chymosin을 분리하였으며 그 결과는 Fig. 1과 같다. NaCl 농도를 달리하여 시판 rennet을 용출시켜 얻은 분획들을 280nm에서 흡광도를 측정한 결과 5개의 단백질 peak를 얻을 수 있었으며 그 중에서 skim milk에 대해 응고활성을 나타낸 것은 2개의 peak였다. 응고활성을 나타낸 peak, 즉 F₁과 F₂를 회수하여 YM3 막이 장치된 Amicon 농축기로 농축시켜 탈이온수로 24시간 투석한 다음 동결건조시킨 결과 15g의 시판 rennet으로부터 얻은 F₁과 F₂의 중량은 각각 0.16g, 0.07g이었다. F₁과 F₂의 전기영동 결과(Fig. 2), F₁은 chymosin의 순수효소라 할 수 있으며 F₂는 0.4M NaCl과 2M NaCl에 의해 용출된 pepsin임을 알 수 있다. 이상의 결과로부터 rennet으로부터 DEAE-

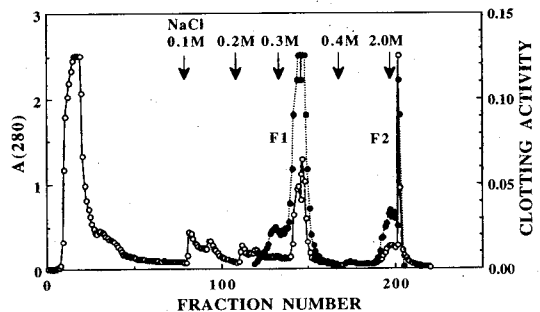


Fig. 1. Chromatographic pattern of chymosin on DEAE-Sephacel CL-6B.

○-○ : Absorbance at 280nm
●-● : Milk clotting activity.

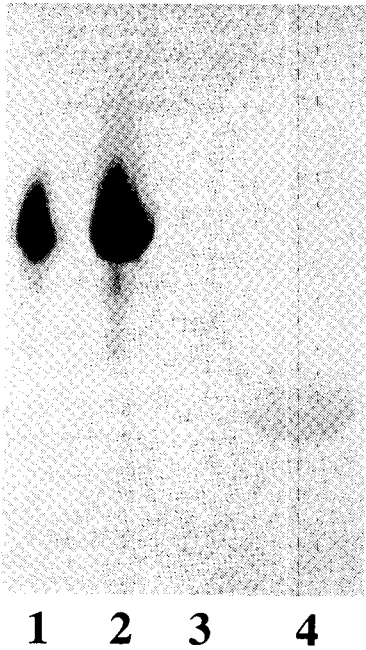


Fig. 2. Electrophoretic diagram of chymosin isolated on DEAE-Sephrose CL-6B.
Lane 1, Rennet(Sigma Co.); Lane 2, F1;
Lane 3, F2; Lane 4, Pepsin(Sigma Co.).

Sephrose CL-6B에 의해 분리된 chymosin이 pepsin의 오염이 없는 순수한 chymosin임을 확인할 수 있어서 고정화에 사용하였다.

고정화 chymosin의 특성과 whole casein의 가수분해 경향

Amino기와 특이적으로 반응하는 OPA 시약을 이용하여 측정된 Celite™에 고정화된 chymosin 양은 Celite™ 1g당 18mg으로 나타났다. 이같은 양은 응유효소를 고정화시킨 박 등(35)의 결과 및 tannase를 glutaraldehyde법으로 고정화시킨 Weetall과 Detar(36)의 결과와 비슷한 수준이었다. 고정화 chymosin에 의해 whole casein을 가수분해시켰을 때 Fig. 3에 나타난 바와 같이 대부분의 κ -casein이 2시간 안에 가수분해되어서 para- κ -casein과 CMP로 되는 것을 알 수 있다. 이같은 chymosin의 효소활성은 가용성 chymosin에 비해 적진 하지만 본 실험에서 casein의 응고를 방지하기 위해 15°C에서 반응시킨 것을 고려한다면 고정화된 이후에도 chymosin의 κ -casein 분해활성이 잘 유지되었다고 할 수 있다. 고정화 chymosin이 고정지지체인 Celite™로부터 유리되는가를 확인하기 위해 10회 반복사용한 후 OPA법에 의해 측정된 결과 대부분의 chymosin이 Ce-

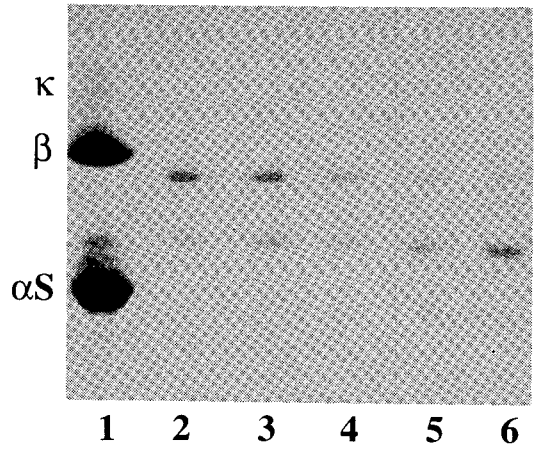


Fig. 3. Electrophoretic diagram of hydrolyzed whole casein with immobilized chymosin.
Lane 1, 0 hr; Lane 2, 1 hr; Lane 3, 2 hr;
Lane 4, 4 hr; Lane 5, 8hr; Lane 6, 12 hr.

lite™로부터 유리되지 않고 고정화되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 이같은 결과는 본 실험에 사용된 고정지지체인 Celite™와 고정화방법인 glutaraldehyde법이 chymosin의 고정화에 매우 적합함을 말해 준다.

분리방법에 따른 총 CMP의 특성

CMP를 분리하기 위해서는 TCA법, ultrafiltration법 및 이온교환크로마토그래피를 이용할 수 있으나 분리방법에 따라 분리된 CMP의 조성 및 순도에 있어서 약간씩 차이를 나타낸다고 보고되고 있다. 이제까지 시도된 방법 중에서 비교적 간단하여 편리하게 사용되는 방법으로 알려진 TCA법과 ultrafiltration법에 따라 총 CMP를 분리하여 비교하여 보았다. 고정화 chymosin에 의해 10g의 whole casein을 2시간 동안 15°C에서 반응시켜 얻은 whole casein 가수분해물로부터 TCA법과 ultrafiltration에 의해 분리된 총 CMP의 양은 각각 0.4g과 0.1g이었다.

분리된 총 CMP의 구성성분을 확인하기 위해 전기영동을 실시한 결과 Fig. 4에서와 같이 TCA법에 의해 얻은 총 CMP는 β -casein 근처에 나타나는 당을 갖고 있지 않은 CMP가 주요 band로 나타났으며 β -casein 아래에서 당을 갖고 있는 CGP로 추정되는 2개의 작은 band를 보여주었다. 한편 ultrafiltration법에 따라 처리하여 얻은 총 CMP는 CMP와 함께 CGP로 추정되는 2개의 band 그리고 여러개의 작은 band로 구성되어 있는 것으로 나타나 단백질 조성상으로 볼 때 CMP를 분리하기 위해서는 TCA법이 본 실험에 사용된 ultrafiltration법보다 효과적임을 나타내었다.

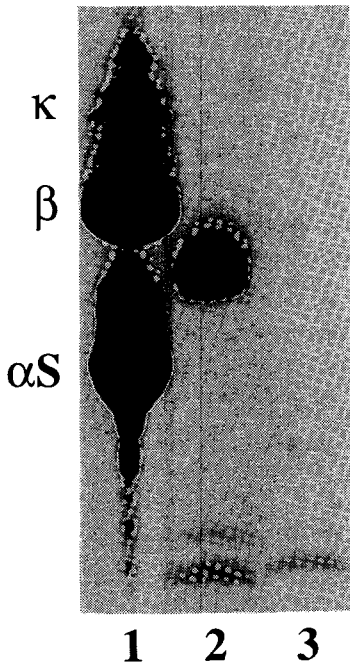


Fig. 4. Electrophoretic pattern of total caseinomacropeptide(CMP).
Lane 1, Whole casein; Lane 2, Total CMP by TCA;
Lane 3, Total CMP by ultrafiltration.

CMP는 아미노산 구성상으로 볼 때 280nm에서 흡광도를 나타내는 방향족 아미노산 즉 tryptophane, tyrosine, phenylalanine을 갖고 있지 않기 때문에 A_{280}/A_{214} 비는 CMP의 순도를 간접적으로 표시한다고 할 수 있다. Table 1에 나타난 바와 같이 두 가지 방법에 따라 분리된 총 CMP는 다른 단백질 또는 펩티드의 혼입이 적었기 때문에 비교적 적은 값을 나타내었다. 이같은 결과는 Table 2에 나타난 아미노산 조성의 분석결과와 일치함을 알 수 있다.

총 CMP에 함유된 당(sialic acid) 함량은 Table 3에 표시된 바와 같이 TCA법에 의해 분리된 것은 1.91%, ultrafiltration법에 의해 분리된 것은 2.93%이었다. TCA법에 의한 총 CMP의 분리가 당을 갖고 있지 않은 CMP를 더 많이 함유하는 효과적인 분리방법임을 보여주는

Table 1. The comparison of U.V absorption of total CMP and CMP at 280 and 214nm

Sample	$A_1=280nm$	$A_2=214nm$	A_1/A_2
Total CMP(T) ¹⁾	0.005	0.254	0.019
Total CMP(U) ²⁾	0.002	0.251	0.009
CMP	0.003	0.632	0.005

¹⁾TCA treatment

²⁾Ultrafiltration

Table 2. Amino acid composition of total CMP and CMP

Amino acid ¹⁾	Theoretical value(% ²⁾	Experimental value(%)		
		Total CMP (T) ³⁾	Total CMP (U) ⁴⁾	CMP
Aspartic acid	8.5	3.5	3.0	7.9
Threonine	18.2	10.4	10.2	10.3
Serine	7.8	7.8	9.0	6.1
Glutamic acid	19.2	16.4	17.4	17.4
Proline	11.6	11.5	12.1	11.6
Glycine	0.9	2.3	2.1	2.1
Alanine	5.3	7.9	7.0	8.3
Cystine	0	0	0	0
Valine	8.9	8.5	8.9	9.6
Methionine	2.0	2.1	2.1	1.6
Isoleucine	10.1	8.4	8.7	9.5
Leucine	1.7	4.0	2.8	8.2
Tyrosine	0	0.2	0.1	0.7
Phenylalanine	0	0.8	0.7	2.3
Histidine	0	0.4	0.3	1.1
Lysine	5.7	5.3	3.3	5.3
Arginine	0	1.9	2.0	1.8

¹⁾Tryptophan was not analyzed.

²⁾Theoretical values were based on the primary structure of CMP.

³⁾TCA treatment, ⁴⁾Ultrafiltration

Table 3. The amount of sialic acid of total CMP and CMP

Sample	Sialic acid(%)
Total CMP(T) ¹⁾	1.91
Total CMP(U) ²⁾	2.93
CMP	0.27

¹⁾TCA treatment

²⁾Ultrafiltration

결과로 Fig. 4에 나타난 전기영동 결과와 매우 일치한다고 할 수 있다.

TCA법에 의해 분리된 CMP의 특성

혈소판 응집저해작용을 나타내는 기능성 펩티드의 전구물질로 알려진 당을 갖고 있지 않은 CMP를 분리하기 위해 TCA법에 따라 whole casein의 chymosin 가수분해물을 처리하여 10g의 whole casein으로부터 0.2g의 CMP를 얻었다. 이같은 수율은 Tanimoto 등(24)에 의한 실험결과와 비슷한 수준이며 총 CMP의 50%가 12% TCA에 의해 침전되는 당을 함유하지 않은 CMP임을 알 수 있다.

CMP생산을 위한 chymosin의 최적가수분해시간은 Fig. 5에서와 같이 2시간이었으며 이같은 결과는 고정화 chymosin에 의해 whole casein의 κ-casein이 대부분 가수분해되는 시간과 일치하였다.

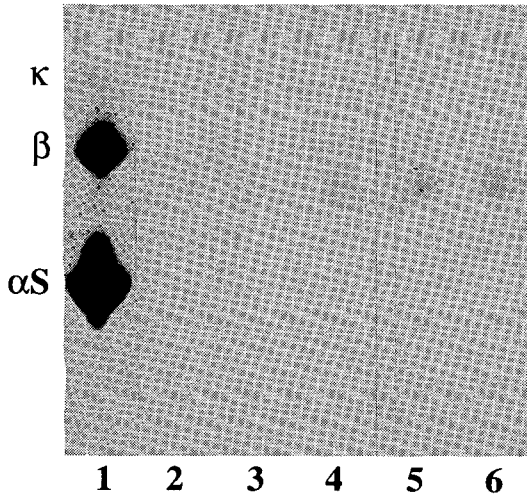


Fig. 5. Electrophoretic diagram of isolated CMP with hydrolyzing time.
Lane 1, Whole casein; Lane 2, 1 hr; Lane 3, 2 hr;
Lane 4, 4 hr; Lane 5, 8 hr; Lane 6, 12 hr.

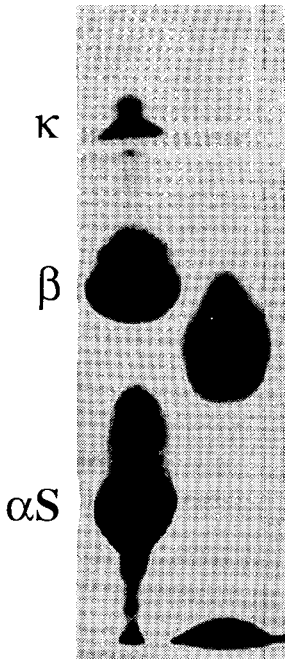


Fig. 6. Electrophoretic diagram of isolated CMP.
Lane 1, Whole casein; Lane 2, CMP.

CMP의 전기영동 결과(Fig. 6)는 12% TCA에 침전된 CMP의 대부분이 당을 함유하지 않은 CMP이지만 여전히 소량의 당을 함유한 CMP 즉 CGP가 포함되어 있음을 보여주었다. 이와 같은 결과는 CMP의 sialic

acid 함량 측정 결과(Table 3)를 통해서 확인할 수 있었다. Table 3에 의하면 총 CMP의 sialic acid 함량은 1.91%이었고 12% TCA에 의해 총 CMP로부터 분리된 CMP의 sialic acid 함량은 0.27%이었다.

분리된 CMP의 다른 단백질 또는 펩티드에 의한 오염도를 A_{280}/A_{214} 비를 통해 분석하였을 때(Table 1), CMP의 값(0.005)이 총 CMP(0.019)에 비해 적게 나타난 것은 12% TCA에 의해 분리된 CMP는 방향족 아미노산을 구성성분으로 하는 다른 단백질 또는 펩티드의 혼입이 적었음을 말해준다고 할 수 있다. 이같은 결과는 Table 2에 나타난 아미노산 조성을 통해서도 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 볼 때 whole casein의 chymosin 가수분해물로부터 2% TCA에 의해 총 CMP를 분리한 다음 TCA 농도를 12%로 조절하여 당을 갖고 있지 않은 CMP를 침전시켜 당을 함유한 CGP를 제거함으로써 CMP를 분리하는 방법은 매우 효과적인 CMP 분리방법으로 사료된다.

요 약

Chymosin을 시판 rennet으로부터 DEAE-Sepharose CL-6B에 의해 분리하고 5% glutaraldehyde에 의해 Celite™에 고정화시킨 다음 raw milk로부터 분리된 whole casein에 작용시켜 얻은 whole casein 가수분해물로부터 TCA법과 ultrafiltration법에 따라 총 CMP를 분리하고 이들의 특성을 비교분석하였다. DEAE-Sepharose CL-6B에 의해 15g의 시판 rennet으로부터 순수분리된 chymosin의 양은 0.16g이었으며 5% glutaraldehyde에 의해 Celite™에 고정화된 chymosin은 Celite™ 1g당 18mg이었다. 고정화 chymosin은 2시간 이내에 대부분의 whole casein상의 κ -casein을 가수분해시켜 para- κ -casein과 caseinomacropeptide로 만들었다. 10g의 whole casein 가수분해물로부터 TCA법과 ultrafiltration법에 따라 분리된 총 CMP의 양은 각각 0.4g과 0.1g이었다. 전기영동, sialic acid함량, 아미노산 조성 및 A_{280}/A_{214} 비율의 결과로 보아 TCA법에 따라 분리된 총 CMP가 ultrafiltration법에 의해 분리된 것보다 당을 갖고 있지 않은 CMP의 함량이 높고 순수하였다. 총 CMP로부터 12% TCA 침전에 의해 분리된 CMP는 총 CMP보다 sialic acid 함량이 적은 것으로 보아 당을 함유한 CGP의 대부분이 제거된 CMP이며 중량은 총 CMP의 50%에 해당하였다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 핵심전문연구과제(951-

0603-037-2)로 수행된 내용의 일부로서 이에 감사드립니다.

문헌

- Kawasaki, Y., Kawakami, H., Tanimoto, N., Dosako, S., Tomizawa, A., Kotake, M. and Nakajima, I. : pH-dependent molecular weight changes of κ -casein glycomacropeptide and its preparation by ultrafiltration. *Milchwissenschaft*, **48**, 191(1993)
- Abd El-Salam, M. H., El-shibiny, S. and Buchheim, W. : Characteristic and potential uses of the caseinomacropeptide. *Int. Dairy J.*, **6**, 327(1996)
- Aleink, S. I. : Study of the κ -casein peptide action on rat gastric secretion by using atomatic quantitative recording of acid production. *Fiziol. Zh. SSSR Im. I. M. Sechenova*, **72**, 685(1986)
- Aleink, S. I., Stan, C. Y. and Cherinkov, M. P. : Study of the mechanism of acid secretion inhibition and κ -casein peptides in the stomach. *Fiziol. Zh. SSSR Im. I. M. Sechenova*, **72**, 799(1986)
- Stan, C. Y. and Zhuravlev, B. V. : Isolation, amino acid composition and biological effect of a peptide bioregulator from bovine κ -casein. *Bull. Eksp. Biol. Med.*, **102**, 652(1986)
- Stan, C. Y. and Elkimovskii, A. P. : Peptidic bioregulator from cow κ -casein. *Vopr. Med. Khim.*, **33**, 111(1987)
- Neeser, J. R. : Caseinoglycopeptides as dental plaque and dental caries inhibiting agents. *Eur. Pat. Appl. EP.*, **283**, 675(1987)
- Neeser, J. R., Chambez, A., Delvedova, S., Prigent, M. I. and Guggenheim, B. : Specific and nonspecific inhibition of adhesion of oral actinomycetes and streptococci to erythrocytes and polystyrene by caseinoglycopeptide derivatives. *Infect. Immunity*, **56**, 3201(1988)
- Azuma, N., Yamauch, K. and Mitsuoka, T. : Bifidus growth-promoting activity of a glycomacropeptide derived from human κ -casein. *J. Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2159(1984)
- Poch, M. and Bezkorovainy, A. : Bovine milk κ -casein trypsin digest is a growth enhancer for the genus Bifidobacterium. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 73(1991)
- Kawakami, H., Kawasaki, Y., Dosako, S., Tanimoto, M. and Vakajima, I. : Determination of κ -casein glycomacropeptide by high performance liquid chromatography without trichloroacetic acid pretreatment. *Milchwissenschaft*, **47**, 688(1992)
- Ito, O., Kamato, S., Yamano, W. and Yokojama, K. : Effect of bovine κ -casein on the growth of lactic acid bacteria. *Igaku to Seibutsugaku*, **115**, 223(1987)
- Lahav, E., Edelsten, D., Sode-Mogensen, M. T. and Safer, E. : Properties of basic glycopeptides released from cow milk protein by heat. *Milchwissenschaft*, **26**, 489(1971)
- Bouhallab, S., Favrot, C. and Maubois, J. L. : Growth promoting activity of tryptic digest of caseinomacropeptide for *Lactococcus lactis ssp. lactis*. *Le Lait*, **73**, 73(1993)
- Léonil, J. and Mollé, D. : Liberation of tryptic fragments from caseinomacropeptide of bovine κ -casein involved in platelet function. *Biochem. J.*, **271**, 247(1990)
- Bouhallab, S., Mollé, D. and Léonil, J. : Tryptic hydrolysis of caseinomacropeptide in membrane reactor: preparation of bioactive peptides. *Biotechnol. Letters*, **14**, 805(1992)
- Jollés, P., Levy-Toledano, S., Fiat, A.-M., Soria, C., Gillessen, D., Thomaidis, A., Dunn, F. W. and Caen, J. P. : Analogy between fibrinogen and casein. *Eur. J. Biochem.*, **158**, 379(1986)
- Maubois, J. L., L'éonil, J., Trove, R. and Bouhallab, S. : Le peptides du lait a activite physiologique. III peptides de lait á effet cardiovasculaire: activités antithrombotique et antihypertensive. *Le Lait*, **71**, 249(1991)
- Droust, L., Solliear, C., Mazoyer, E., Levy-Toledano, S., Jollés, P. and Fiat, A. M. : Use of the caseinoglycopeptide particularly from cow milk in the manufacture of a composition and particularly of a medicine for use in the prevention and treatment of thrombosis. *French Pat. Appl.* FR 2646775 A1.(1990)
- Saito, T., Yamaji, A. and Itoh, T. : A new isolation method of caseinomacropeptide from sweet cheese whey. *J. Dairy Sci.*, **74**, 2831(1991)
- Morr, C. V. and Seo, A. : Fractionation and Characterization of glycomacropeptide from caseinate and skim milk hydrolysates. *J. Food Sci.*, **53**, 80(1988)
- Schammet, K. M., Brown, R. J. and McMahon, D. J. : Proteolytic activity of proteinases on macropeptide isolated from κ -casein. *J. Dairy Sci.*, **75**, 1380(1992)
- Schammet, K. M., McMahon, D. J. and Brown, R. J. : Characteristics of macropeptide fraction isolated from whole casein and purified κ -casein. *Milchwissenschaft*, **47**, 615(1992)
- Tanimoto, M., Kawasaki, Y., Dasako, S., Ahiko, K. and Nakajima, I. : Large-scale preparation of κ -casein glycomacropeptide from rennet casein whey. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 140(1992)
- Chu, L., Macleod, A. and Ozimek, L. : Isolation of glycomacropeptide from sodium caseinate hydrolyzate solution by ultrafiltration. *Milchwissenschaft*, **51**, 303(1996)
- Ernstrom, C. A. : Heterogeneity of crystalline rennin. *J. Dairy Sci.*, **40**, 1633(1958)
- Yoon, C. H. : Degradation of bovine para- κ -casein by the action of chymosin. *Cheju National University J.*, **8**, 87(1991)
- Brown, R. J. and Swaisgood, H. E. : Preparation of an active form of immobilized rennin. *J. Dairy Sci.*, **58**, 796(1975)
- Melachouris, N. : Discontinunous gel electrophoresis of whey proteins, casein and clotting enzymes. *J. Dairy Sci.*, **52**, 456(1969)
- Duval, G., Swaisgood, H. E. and Horton, H. R. : Preparation and characterization of thionyl chloride activated succinamidopropyl glass as a covalent immobilization matrix. *J. Applied Biochem.*, **6**, 240(1984)

31. Mosbach, K. : Immobilized enzymes. *Method in Enzymology*, **44**, 546(1976)
32. Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H. and Catignani, G. L. : Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.*, **66**, 1219 (1983)
33. Hernandez, M. J. M., Domingo, E. B., Camanas, R. M. V. and Alvarez-Coque, M. C. G. : Use of the o-phth-
aldehyde and N-acetyl-L-cysteine reagent in the evaluation of milk proteins. *J. Dairy Sci.*, **74**, 1779(1991)
34. Warren, L. : The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J. Biol. Chem.*, **234**, 1971(1959)
35. 박종대, 이준엽, 고영숙 : Mucor SPP L42 응유효소의 고정화에 관한 연구. *한국낙농학회지*, **8**, 185(1986)
36. Weetall, H. H. and Detar, C. C. : Immobilized tannase. *Biotech. Bioeng.*, **16**, 1095(1974)

(1998년 8월 22일 접수)