

치즈 유청으로부터 Glycomacropeptide의 분리 · 정제

윤여창 · 조진국* · 송중화 · 이 성** · 정충일
건국대학교 축산대학 낙농학과, *동물자원연구센터,
**한서대학교 식품생명공학과

Purification of the Glycomacropeptide from Cheese Whey

Y. C. Yoon, J. K. Cho*, C. H. Song,
S. Lee**, C. I. Chung

Department of Dairy Science and *Animal Resources Research Center, Konkuk University,
Seoul, Korea, and **Department of Food and Biotechnology, Hanseo University

Abstract

Glycomacropeptide(GMP) was purified from cheese whey which is obtaining as a byproduct in cheese producing. Cheese whey was first concentrated 10 times with a ultrafiltration apparatus, and then heated at 95°C for 5 min. The concentrated fraction was centrifuged at 20,000×g for 30 min to remove fat layer. The supernatant layer enriched GMP protein was fractionated by ion exchange chromatography on DEAE-Sepharose Fast Flow column. GMP was bound to DEAE resin and eluted with 0.1~0.25 M NaCl when using a linear NaCl gradient from 0 M to 0.5 M.

The purified GMP gave a single band of 24 kDa which seems to be trimer molecular weight in SDS-PAGE, and migrated to the same molecular weight with control GMP obtained commercially. Its amino acid composition were consistent with that of standard GMP. About 0.71 g of GMP was recovered from 1 L of cheese whey.

These results indicate that glycomacropeptide could be simply purified from cheese whey by using ultrafiltration and DEAE column chromatography.

Key word : GMP, cheese whey, ultrafiltration, purification.

서 론

치즈 제조시 부산물로 얻어지는 치즈 유청은 고형분 함량이 6.0~6.5% 정도로 각종 기능성 단백질과 아미노산, 유당 및 미네랄 등을 함유하고 있다⁽¹⁾. 특히, 단백질 면에서 보면 치즈 유청은 lactoglobulin을 비롯하여 lactalbumin과 lactoferrin, lactoperoxidase, glycomacropeptide(GMP) 등의 생리활성 단백질을 포함하고 있다. 그러나 치즈 유청을 완전히 이용하는 실정은 아니며 폐기처분되는 양도 많아 환경오염의 문제가 되고 있다. 이러한 시점에서 치즈 유청으로부터 생리활성 물질인 GMP를 추출

하여 이용하는 것은 치즈 유청의 부가가치성을 높이는 일환이 될 것으로 사료된다.

GMP는 chymosin효소가 κ -casein 중의 Phe-Met 사이의 peptide 결합을 분해할 때 생기는 생성물로 κ -casein의 Met 잔기(106번)부터 C-terminal Val 잔기(169번)까지를 포함하는 heterogenous 집합체이며, GMP마다 당과 인의 함량에 상당한 변화가 있다⁽²⁾. 특히, GMP는 기능적인 측면에서 다양함을 보여 주고 있는데 phenylketonurine 환자의 diet 배합시 좋은 아미노산 소재로 이용될 수 있고, GMP의 풍부한 측쇄 아미노산(Val, Ile)과 낮은 Met는 간질환 치료에 이용될 수 있다고 보고되고 있다⁽³⁾.

또, Neeser⁽⁴⁾에 의해서는 GMP가 치아의 프러그 형성을 방지하여 충치를 예방하는 효과가 있고, 콜레라 독소에 대한 결합 억제와 인플루엔자 바이러스의 적혈구 응집소 작용 억제효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 이외에 Otani 등

Corresponding author : Yoh-Chang Yoon, Department of Dairy Science, Konkuk University, 1 Hwayang-dong, Kwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea.

⁽⁵⁾은 mitogen에 의해 자극된 mouse spleenocytes의 증식 억제에 대해서 보고하였다.

이와 같이, 독특한 생리학적 기능을 가지며 동시에 영양 단백질원인 GMP에 대한 관심이 증가하고 있어 whey로부터 대량으로 GMP를 분리할 수 있는 방법의 개발이 요구되고 있는 실정이다. 이미 GMP 분리를 위한 몇 가지 방법^(6,7)이 제안되어 있으나, 산업적 규모로의 생산을 위해 연구가 필요한 시점이다.

따라서, 본 연구에서는 치즈 제조시의 부산물인 치즈 유청으로부터 GMP를 산업적 규모로 생산하는 방법을 개발하고자 한외여과 방법과 이온교환 크로마토그래피를 이용하여 정제를 하였고 순도와 수율을 비교하였다.

재료 및 방법

재 료

cheese whey는 서울우유 안산공장에서 치즈 제조 후 분리된 부산물인 유청을 제공받았다. Tris (hydroxymethyl) amino methane, sodium dodecyl sulfate, Folin-ciocalteu phenol reagent, acrylamide, bovine serum albumin, phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)는 Sigma chemical Co. 에서 구입하였으며 그 밖의 시약들은 순도가 높은 분석용급을 사용하였다. 대조 GMP는 비교용으로 매일유업(주)으로부터 제공받았다.

DEAE-Sepharose Fast Flow 수지는 Pharmacia Biotech(Sweden)의 제품을 이용하였다. UV detector(모델 EM-1)와 chart recorder(모델 SS-100F)는 각각 Bio-Rad사(미국)와 Eylela사(일본)의 것을 이용하였다.

Cheese whey 획분의 전처리

1L의 cheese whey를 ultrafiltration(DDS Mini-Lab 10, Denmark)장치에 membrane(ETNA 20A, 20,000)을 이용하여 유속 27.5 (l/m²×hour)로 4°C에서 여과시켜 10배로 농축하였다. 농축한 시료는 Saito 등⁽⁷⁾의 GMP 분리를 위한 가열처리 방법 중 시간을 단축하여 98°C에서 5분간 가열 처리한 후, 20,000×g, 30분간 4°C에서 원심분리하여 지방과 침전물을 제거하였다. GMP를 포함하고 있는 상층액을 다음의 chromatography에 이용하였다.

이온교환 크로마토그래피에 의한 GMP분리 시료 20ml를 0.2mM PMSF를 포함하는 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0)으로 미리 평형화한 DEAE-Sepharose Fast Flow column(2×30cm, bed vol. 75ml)에 주입하였다. 미결합 단백질을 50mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0)으로 용출하였고 chart recorder의 단백질 용출곡선이 baseline까지 돌아온 것을 확인한 후, 결합 단백질에 대하여 0 M에서 0.5 M의 NaCl 직선 농도 구배로 8시간 용출시켰다. 유속은 21ml/h 이었으며, fraction collector를 이용하여 7ml씩 분획하였다. 용출단백질은 peak 구획분별로 투석막(Spectrum, M.W 6~8,000)을 이용하여 50mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0)에 대하여 4°C에서 24시간 동안 투석한 후 SDS-PAGE와 아미노산 분석에 이용하였다.

아미노산 분석

Llames와 Fontaine⁽⁸⁾의 Pico-Tag 방법을 변형하여 정제 GMP와 대조 GMP 1ml를 per-formic acid와 6N HCl로 12시간 가수분해시키고 건조용액 (2:1:1=EtOH : D.I. water : Triethylamine) 10 μl를 넣어 재건조시킨 후, phenyl isothiocyanate(PITC)를 약알카리로 α-amino산에 coupling하였다.

유도화된 GMP시료는 과잉의 PITC를 제거하고 200 μl로 재조정하여 Waters 486 Tunable Absorbance Detector(absorbance, 254 nm)와 Waters Module 510 HPLC dual pump system을 사용해서 아미노산을 분석하였다. 아미노산 칼럼은 Pico-TagTM(Waters, U.S.A)를 사용하였다. Running time(RT)과 유속은 각각 25분과 1.0ml/min이었고 mobile phase로는 Sodium acetate 완충액(Eluent A)과 여기에 60% acetonitrile를 포함하는 완충액(Eluent B)을 사용하였다.

표준 아미노산으로는 amino acid standard H (PIERCE, U.S.A)를 이용하였고, 표준면적과 시료의 peak에서 나타난 면적과 비교함으로써 아미노산 조성을 측정하였다.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)

SDS-PAGE는 Laemmli⁽⁹⁾ 방법에 따라 15%

의 separating gel을 사용하여 25mA, 100V에서 약 90분간 수행하였다. 전기영동이 끝난 gel은 0.1% coomassie brilliant blue R250(w/v)로 5분간 염색하여, 20% methanol/acetic acid (20/80, v/v)로 2시간 이상 탈색 후 단백질 band를 관찰하였다.

정제한 GMP의 함량(%)은 SDS-PAGE 결과로부터 phosphoimager (Bio-Rad사)의 densitometric computer program을 이용하여 면적비로 계산하였다.

단백질농도측정

단백질농도는 Lowry 등⁽¹⁰⁾의 방법을 개량한 Markwell 등⁽¹¹⁾의 방법으로 750nm에서 측정하였고 표준물질로는 bovine serum albumin을 이용하였다.

결과 및 고찰

GMP의 전처리 및 정제

각 정제단계별 GMP단백질의 회수율은 치즈유청을 출발시료로 하여 Table 1에 나타내었다. 치즈유청 1L를 한외여과하여 10배로 농축할 수 있었고, 단백질은 약 5.6배로 농축이 되었다. 이중 1/5의 양을 취하여 98°C에서 5분간 가열 처리한 후, 20,000 rpm에서 30분간 원심분리하였다. GMP를 함유한 상층액을 취해 다음의 이온 교환 chromatography에 이용하였다. 이때 얻어진 희분의 단백질 함량은 약 174.2mg으로 62.2%가 회수되었다.

Fig. 1은 DEAE-Sepharose Fast Flow chromatography의 분리결과를 나타내고 있다.

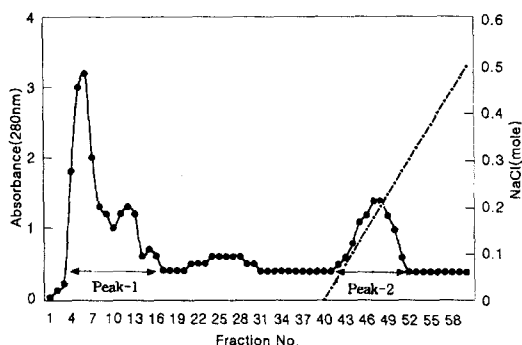


Fig. 1. Elution profiles for GMP purification by DEAE-Sepharose Fast Flow chromatography. Peak-1 was unbound fraction and Peak-2 fraction pooled from the fraction No. of 42nd to the fraction No. of 52nd was collected as the final purified GMP.

DEAE-Sepharose Fast Flow에 공시 시료 20ml를 주입한 후 미결합 단백질이 2개의 peak를 이루며 용출되었다(Peak-1). 단백질의 용출곡선이 chart recorder의 base line으로 돌아왔을 때 0M에서 0.5M의 NaCl 직선농도구배(100ml)로 결합 단백질의 용출을 시작하였다. 결합 단백질은 약 0.1M에서부터 용출되기 시작하였고, 약 0.25M까지 용출되는 넓은 peak를 이루었다(peak-2). 특히 GMP는 0.1M과 0.25M NaCl 사이에서 용출되었다. 이러한 용출 pattern은 Tanimoto 등⁽¹²⁾이 GMP를 분리하기 위하여 NaCl을 0~1.0 M로 첨가하였을 때, GMP가 0.25M에서 용출된 것과 비슷한 결과이다. 이온교환 chromatography column에 결합하

Table 1. Summary for purification of GMP from cheese whey fraction

	Protein concentration (mg/ml)	Volume (ml)	Total protein amount(mg)	Recovery (%)
C.C.- whey	14.0	20	280	100.0
Sup- whey	8.71	20	174.2	62.2
Peak-1	0.18	70	12.3	4.4
Peak-2	2.25	63	142.2	50.8

C.C.-whey means concentrated whey, and Sup-whey means supernatant whey in the centrifuged fraction after heating at 98°C for 5 min. Peak-2 pooled from fraction of No. 42 to fraction of No. 52 was expressed as purified GMP fraction.

여 용출된 peak-2의 단백질량은 주입하기 전의 총단백질의 50.8%를 함유한 것으로 나타났다 (Table 1). 본 실험에 사용된 치즈유청 11로 환산하면 약 0.71g의 GMP량이 회수된 것으로 분석되었다.

Saito 등⁽⁶⁾은 유청분말 100g으로부터 1.1g의 GMP를 정제하였고, Tanimoto 등⁽¹²⁾은 유청 100L 중에서 180g의 GMP를 회수한 것으로 보고하였다. 이들 결과와 비교하면 GMP단백질의 회수율은 Tanimoto 등의 결과의 약 40%가 얻어진 것으로 나타났으나, Saito 등의 결과보다는 좋으며 순도면에서 회수율이 상당히 좋은 것으로 사료되었다. 회수율을 높이기 위하여 전처리 단계에서 생략해도 좋은 과정이 있는가를 좀더 점검하여 개선시킬 필요가 있는 것으로 판단되었다.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동

Fig. 2는 각 정제단계에서 얻어진획분의 SDS-polyacrylamide 전기영동결과이다. 치즈유청과 column에 결합하지 않은 단백질 peak와 column에 결합한 단백질을 각각 나누어 전기영동에 의한 정제도를 분석하였다.

원래의 치즈유청과 비교할 때 한외여과로 농축한 단백질 성분은 커다란 차이가 없었다 (Fig. 2, lane 2와 3). 이는 한외여과법을 이용하여 산업적 규모로 GMP를 정제하는 데 이용 가능성이 있음을 시사하였다. DEAE-Sephacose fast flow수지를 이용하여 분리하였을 때 DEAE column에 미결합한 분획 peak에는 선명하지는 않지만 치즈 유청의 단백질의 고분자로부터 저분자까지의 단백질이 포함되어 용출되었다 (lane 4).

Fig. 2에 나타난 것처럼 결합 후 용출된 단백질 peak에 GMP가 포함되어 SDS-PAGE에서 거의 단일한 band로 나타났다 (lane 5).

Marshall 등⁽³⁾은 GMP의 peptide chain은 64개의 아미노산 잔기를 소유하며 분자량은 약 7kDa라고 하였고, Fiat 등⁽¹³⁾과 Saito 등⁽⁶⁾은 탄수화물과 관련하여 4개의 상이한 올리고당과 추가의 단당류들이 GMP에 존재한다고 하였고, Vreeman 등⁽¹⁴⁾은 GMP에 phosphate ester group이 존재한다고 보고했다.

결합한 peak에서 나타난 GMP의 분자량은 약 24kDa으로 나타났으며, 극소수의 다른

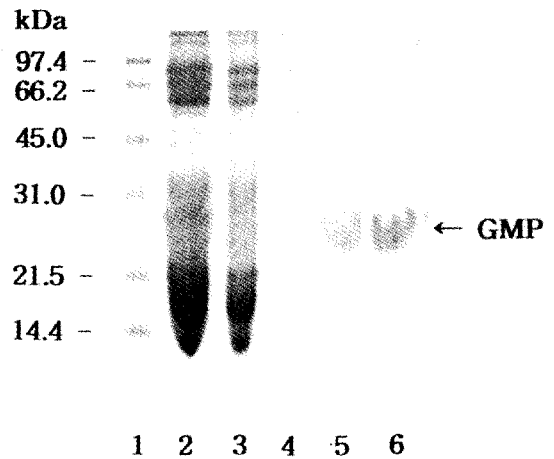


Fig. 2. SDS-PAGE pattern of the fractions obtained from each purification step. Figure shows the Coomassie brilliant blue R-250 staining for the fractions obtained from cheese whey to the DEAE-Sephacose Fast Flow chromatography. Lane 1: molecular weight marker, lane 2: cheese whey, lane 3: concentrated cheese whey, lane 4: unbound fraction, lane 5: purified GMP from DEAE-Sephacose Fast Flow chromatography, lane 6: control GMP obtained from Maeil Dairy Industry Co.

band가 보이나 순도 높게 정제된 것으로 나타났다. 이 분자량은 기준에 보고된 GMP의 분자량인 7kDa의 분자량보다 약 3.4배 큰 것으로 나타나 trimer로 회합하여 당을 포함한 것으로 사료되며, 매일 유업에서 제공받은 대조 GMP를 함께 영동하여 비교하였을 때 동일한 분자량으로 나타났다 (Fig. 2, lane 6).

최종적으로 얻어진 GMP의 단백질 회수율은 약 142.2mg이고 순도는 95.1%인 것이 densitometric 측정에 의해 나타났다 (data not shown).

Tanimoto 등⁽¹²⁾은 치즈 유청에서 정제한 GMP가 SDS-PAGE에서 이동도가 적으며 명확한 band로 나타나지 않았다고 보고하였다. GMP의 분자량은 이론적으로는 7kDa이지만 buffer의 pH에 따라 실험적으로 다르게 평가되며 정제방법에 따라 당함량도 다르게 평가된다⁽¹⁷⁾. 따라서 전기영동을 통한 GMP분자량 측정 은 다소 어려움이 있으며 화학적 가수분해 반

Table 2. Comparison of amino acid composition of GMP from cheese whey with the result of control GMP obtained commercially

Amino acid	Molar ratio	
	Control GMP	Purified GMP
Aspartic acid	5	4.9
Glutamic acid	9	8.4
Serine	6	4.7
Glycine	1	2.1
Threonine	10	10.6
Lysine	3	2.8
Proline	8	7.2
Valine	6	4.5
Methionine	1	1.3
Isoleucine	6	6.1
Leucine	1	1.0
Alanine	5	6.0

응을 별도로 필요한 것으로 사료된다.

아미노산 분석

정제한 GMP를 확인하기 위하여 대조 GMP와 함께 HPLC 방법으로 아미노산의 함량을 분석하였다. 표준 아미노산과 비교하여 계산한 두 GMP의 아미노산 조성은 Table 2에 나타난 바와 같다.

이전의 연구자들에 의하면 GMP를 구성하는 주요 아미노산은 aspartic acid, glutamic acid, serine, glycine, threonine, alanine, proline, tyrosine, valine, methionine, isoleucine, leucine과 lysine인 것으로 보고되었다^(3,7,12,14). GMP에는 비극성 잔기를 가진 소수성 아미노산인 Ala 및 Val, Met, Leu, Ile, Pro 등이 약 25.6 mol% 함유되어 있으며, 중성에서 비전하의 측쇄를 갖는 Gly 및 Ser, Thr이 약 17.4 mol% 함유되어 있어, 비교적 소수성 아미노산들이 친수성 아미노산들 보다 약간 높게 포함된 단백질인 것으로 나타났다.

다른 GMP 아미노산 분석결과와 비교할 때 cheese whey로부터 분리한 GMP는 Ser 및 Val이 약간 적었으며, Gly는 반대로 약 2배의 높은 함량을 나타냈다. 미량의 함량 차이는 있으나 전체적인 조성비에서는 대조 GMP와 거의 유사한 것으로 나타났다.

따라서, 정제한 GMP는 대조GMP와 비교하여 전기영동상의 분자량 차이는 없었으나, 아미노산 조성은 다소 차이가 있는 것으로 나타났다. 이는 GMP의 유전적 변이체 A와 B가 혼합된 bulk우유를 사용하였기 때문에 아미노산의 조성의 차이가 발생한 것으로 사료된다. 이외에 세포내 ribosome에서 GMP의 아미노산이 생성될 때, miss match가 발생하는 개체별의 차이에 의할 수도 있으며, 또한 매일의 유량, 지방, 또는 조제법 등의 변동에 따라 아미노산 조성이 달라질 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과들로부터 cheese whey 확보로부터 정제한 GMP는 이전의 이온교환 chromatography의 분리도⁽¹⁶⁾와 같으며 대조 GMP와 아미노산 조성과 분자량에 있어서 동일한 단백질로 확인되었다.

다른 연구결과와 비교하였을 때 cheese whey를 한외여과로 농축하여 이용한 점이 틀리나 여러 peak로 GMP가 분산되지 않았는데, 이는 GMP와 이온교환 수지의 결합에 영향을 주는 인자들이 제거되었기 때문으로 사려되며, 결과적으로 높은 단백질 회수율을 보이며 비교적 효율적으로 정제하였다고 고찰된다.

따라서, 부산물인 cheese whey로부터 GMP를 한외여과한 후, DEAE-Sepharose Fast Flow chromatography로 정제할 수 있는 것으로 확인되었다. 이 결과는 생리적 기능을 갖고 있는 GMP를 산업적 규모로 정제하는 데 유용한 자료가 되리라 사료된다.

요 약

본 연구에서는 치즈 제조시의 부산물인 치즈 유청으로부터 glycomacropeptide(GMP)를 정제하려고 하였다. 치즈 유청을 한외여과 장치를 이용하여 10배로 농축하여 공시시료로 하였고, 95°C에서 5분간 가열한 후 20,000rpm에서 30분간 원심분리하였다. 원심분리 후 혼합된 지방층을 제거하였고, GMP를 포함하고 있는 상층액은 DEAE-Sepharose Fast Flow 크로마토그래피 칼럼에 주입하였다. GMP는 DEAE 수지의 관능기에 결합하였으며, 0에서 0.5M의 NaCl 직선농도 구배를 실시하였을 때 약 0.1~0.25M에서 용출되었다.

정제한 GMP는 SDS-PAGE에서 단일한

band를 나타냈으며, 분자량은 24kDa으로 trimer형태로 상업적으로 제공받은 대조 GMP와 같은 분자량 위치로 영동하였다. 정제한 GMP의 아미노산 조성은 대조GMP의 결과와 비교하였을 때 Ser, Val이 약간 적었으며 Gly은 반대로 2배의 함량을 나타냈으나 전체적인 조성비에서는 거의 일치하였다. 단백질의 회수율은 유청 1L에서 약 0.71g의 GMP를 효과적으로 분리한 것으로 나타났다.

이 결과로부터 한외여과와 DEAE-Seph-
arose Fast Flow chromatography를 이용하여
GMP를 산업적으로 대량 정제할 수 있는 것이
확인되었다.

참고문헌

- Kosikowski, F. : Cheese and fermented milk foods, Brooktondale, New York. Second edition milk (1982).
- Mercier, J. C., Brignon, G. and Ribadeau-Dumas, B. Structure primaire de la caseine B bovine. Sequence complete. *Eur. J. Biochem.*, 35, 222 (1973).
- Marshall, S. C. : Casein macropeptide from whey. A new product opportunity. *Food Res. Quar.*, 51, 86 (1991).
- Neeser, J. R. : Caseinoglycopeptides as dental plaque and dental caries inhibiting agents. *Eur. Pat. Appl. EP.*, 283, 675 (1987).
- Otani, H., Monnai, M. and Hosono, A. : Bovine κ -casein as inhibitor of the proliferation of mouse splenocytes induced by lipopolysaccharides stimulation. *Milchwissenschaft*, 47, 512 (1992).
- Saito, T. and Itoh, T. : Variations and distribution of O-glycosidically-linked sugar chain in bovine κ -casein. *J. Dairy Sci.* 75, 1768 (1992).
- Saito, T., Yamaji, A. and Itoh, T. : A new isolation method of caseinoglycopeptide from sweet cheese whey. *J. Dairy Sci.* 75, 2831 (1991).
- Llames, C. R. and J. Fontaine. : Determination of amino acid in Feeds: Collaborative Study. *J. AOAC International*, 77(6), 1362 (1994).
- Laemmli, U. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680 (1970).
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
- Markwell, M. A. K., Hass, S. M., Bieberand, L. L. and Tolbert, N. E. : A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.*, 87, 206 (1978).
- Tanimoto, M., Kawasaki, Y., Shinmoto, H., Dosako, S., & Tomizawa, A. : Process for producing κ -casein glycomacropeptide. *Eur. Pat. Appl. EP* 0398 850A2 (1990).
- Fiat, A. M., Chevan, J., Jolles, P., Waard, P. De., Vliegenthart, F. G., Piller, F. and Caron, J. P. : Structural variability of the neutralcarbohydrate moiety of cow colostrum κ -casein as a function of time after parturition. Identification of a tetrasaccharide with blood group 1 specificity. *Eur. J. Biochem.*, 173, 253 (1988).
- Vreeman, H. J., Visser, S., Slangen, C. and Van Riel, J. A. M. : Characterization of bovine κ -casein fraction and the kinetics of chymosin-linked macropeptide release from carbohydrate-free and carbohydrate-containing fractions determined by high performance gel permeation chromatography. *Biochem. J.* 240, 87 (1986).
- Leonil, J., and D. Molle. : A method for determination of glycomacropeptide by cation-exchange fast performance liquid chromatography and its use for following the action of chymosin in milk. *J. Dairy Sci.* 11, 70 (1990).
- Tanimoto, M., Kawasaki, Y., Dosako, S., Ahiko, K. and Nakajima, I. : Large scale preparation of κ -casein glycomacrope-

ptide from rennet casein whey. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 140 (1990).

alent polymeric κ -casein. *Biochemistry.* 9, 2087 (1970).

17. Talbot, B. and Waugh, D. F. : Micelle forming characteristics monomeric and cov-

(2000년 6월 19일 접수)