



우유의 κ -Casein에서 분해된 Glycomacropeptide에 관한 연구; II. Trichloroacetic Acid의 농도에 따른 κ -Casein Macropeptide 분별 특성의 변화

문용일¹ · 이원재² · 오세종^{3*}

¹우석대학교 애완동물허브학부, ²Wisconsin 대학교 식품과학과,

³전남대학교 동물자원학부 농업과학기술연구소

Glycomacropeptide Hydrolysed from Bovine κ -Casein ; II. Chromatographic Changes of κ -Casein Macropeptide as Related to Trichloroacetic Acid Concentration

Yong-II Moon¹, Wonjae Lee², and Sejong Oh^{3*}

¹Division of Pet & Herb Science, Woosuk University

²Department of Food Science, University of Wisconsin-Madison, USA

³Department of Animal Science, Institute of Agricultural Science & Technology, Chonnam National University

Abstract

Bovine κ -casein macropeptide was prepared by adding TCA (3, 6, and 12%) treatment after chymosin reaction. Each TCA soluble macropeptide was fractionated into five peaks by ion exchange column chromatography. In proportion to TCA concentrations, the ratio of peak area showed different the elution pattern. At the 6 and 12% TCA concentration, area ratio of P-I which did not content carbohydrates was decreased to 19.9 and 17.0% of total peak area respectively. The area of P-III was changed from 10.2% to 26.2 and 13.2% when the TCA concentration was increased from 3 to 6 and 12%. Cholera toxin binding activity of κ -casein macropeptide eluted at 0.17~0.18M NaCl gradient, was not inhibited by 6 and 12% TCA treatments. The use of 6% TCA as extraction buffer was feasible and led to an effective separation of the peak III.

Key words : κ -casein macropeptide, glycomacropeptide, cholera toxin

서 론

Casein micelle의 직경은 20~600 nm정도로 다양하게 분포 하는데 micelle 크기에 따라 구성하고 있는 α_{s1} -casein, β -casein, 및 κ -casein의 구성비율도 다르게 나타난다. κ -Casein은 주로 casein micelle 표면에 존재하는 것으로 알려져 있으며, 아미노산 잔기에 phosphate와 carbohydrate가 결합되어 있는 것으로 보고되고 있다(Slattey, 1976; Kim, 1993). κ -Casein에 결합되어 있는 carbohydrate로는 N-acetylneuraminic

acid (AcNeu), galactose, N-acetylgalactosamine이 등이 있으며, 3당 또는 4당의 형태로 κ -casein 아미노산 서열 127~141의 영역에 o-glycoside 형태로 threonine 혹은 serine 잔기에 결합되어 있다. 또한 κ -casein은 최소한 한 개 이상의 phosphate group을 함유하며, 전체 κ -casein 중의 약 40%는 carbohydrate를 함유하고 있지 않은 것으로 추정되고 있다(Eigel *et al.*, 1984).

Chymosin은 κ -casein의 105번째 methionine과 106번째 phenylalanin의 결합을 분해시켜 2개의 macropeptide를 생성시키는데 κ -casein의 C-말단 쪽 부분 (f1~f105)을 para- κ -casein이라 부르며⁽⁴⁾, 친수성의 N-말단 부분을 κ -casein macropeptide 또는 carbohydrate의 결합 유무에 따라 caseinomacropeptide와 glycomacropeptide (GMP)로 구분해서 불려지기도

* Corresponding author : Sejong Oh, Department of Animal Science, Chonnam National University, PukGwanju, P.O. Box 205, Gwangju 500-757, Korea. Tel: +82-62-530-2116, Fax: +82-62-530-2129, E-mail: soh@chonnam.ac.kr

한다(El-Salam *et al.*, 1996; Lieske and Konrad, 1996).

대부분의 우유 단백질이 2% trichloroacetic acid (TCA)에 침전되는 것과 다르게 κ-casein에서 유래된 macropeptide는 침전되지 않는 특성을 지닌다. TCA에 대한 κ-casein macropeptide의 용해도는 glycosylation 정도에 따라 영향을 받으며 결합된 carbohydrate 및 phosphate group에 따라 다르게 나타난다. κ-Casein macropeptide는 TCA 농도가 높아질수록 carbohydrate가 적게 결합된 peptide부터 침전되기 시작하여 carbohydrate가 많이 결합되어 있는 peptide는 상대적으로 높은 TCA 농도에서도 수용성 상태로 존재하는 것으로 보고되고 있다(Kim, 1971; Doi *et al.*, 1979).

Oh 등(1997)은 κ-casein에 chymosin을 반응시켜 얻어진 GMP를 분석한 결과 총 5개의 peak를 얻을 수 있었는데 주 peak는 carbohydrate를 함유하고 있지 않았으며 상대적으로 높은 NaCl gradient 농도에서 용출된 분획일수록 carbohydrate 함량이 높게 나타났다고 보고하였다. 또한 분획된 κ-casein macropeptide 분획 중에서 AcNeu의 함량이 가장 높은 peak 분획에서 cholera 독소를 *in vitro*에서 중화시키는 작용이 있음을 밝혀 기능성 첨가물로서의 역할이 기대된다고 보고하였다(Oh *et al.*, 2000).

본 실험은 생리적 활성 효과가 있는 것으로 보고되는 κ-casein macropeptide의 특성에 대한 후속 연구로서 전보에서 κ-casein을 정제한 후 여기에 chymosin을 반응시켜 얻어진 κ-casein macropeptide에 TCA 농도를 달리하여 ion exchange column으로 분별하여 chromatogram을 비교하였으며, 각각 분획된 fraction에 대한 cholera toxin과의 반응성을 확인하였다.

재료 및 방법

산 Casein의 제조

고려대학교 부속 농장에서 채취한 신선한 원유를 10℃에서 4000 × g의 조건에서 원심분리하여 탈지시켰다. 탈지유에 동량의 증류수를 첨가한 다음 1N HCl로 pH를 4.6으로 조정하여 침전물을 회수하였다. 이 침전물을 2회 증류수로 세척한 다음 1N NaOH로 pH를 7.0으로 재용해시켰다. 이러한 과정을 3회 반복한 다음 pH 4.6에서 침전되는 침전물을 회수하여 증류수로 4℃에서 투석 (MW cut-off 1 kDa)하여 냉동 건조시켰다.

Chymosin 처리

Oh 등(1997)의 방법을 이용하여 얻어진 κ-casein 100mg을 0.05M sodium citrate buffer (pH 6.6) 15mL에 용해시킨 다음, chymosin (EC 3.4.23.4; Sigma, USA) 20 unit을 첨가하여 35℃에서 15분 반응시켰다. 반응이 끝난 다음 즉시 4℃로 냉각하였다. κ-Casein과 chymosin 반응액을 저온실에서 교반시키

면서 4℃의 24% trichloroacetic acid (TCA)를 최종 농도가 3, 6 및 12% (w/v)가 되도록 천천히 첨가하여 4℃에서 20분 방치하였다.

Ion Exchange Column Chromatography

Chymosin을 반응시켜 얻어진 상등액을 여과지를 이용하여 여과한 다음 투석막(MW cut-off 1 kDa)을 사용하여 증류수로 4℃에서 24시간 투석시킨 후 냉동 건조하여 FPLC 시료로 사용하였으며, Oh 등(1997)에서 수행한 조건으로 실시하였다.

Cholera Toxin(CT)과의 반응성

CT와의 반응성은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. Nitro-cellulose membrane에 각각 분획된 시료 5 μL (preprotein양으로 100 μg/mL)를 spotting한 다음 건조시켰다. 여기에 3% bovine serum albumin 으로 37℃에서 2시간 blocking 시킨 후 25mM tris-0.15M NaCl-0.2% tween 20 (TBST; pH 7.5) buffer로 3회 세척하였다. CT-B subunit-HRP(peroxidase conjugate)를 TBST buffer로 1:400으로 희석한 다음 nitro-cellulose membrane에 2시간 (37℃) 반응시킨 후 phosphate-buffered-saline-tween 20으로 3회 세척하였다. 여기에 제조된 4-Chloro-1-naphthol 용액(Walker, 1988)을 넣고 암실에서 30분간 정치시킨 후 발색 여부를 관찰하였다.

면적비의 계산

Chromatogram의 면적비는 EZLogic chromatography analysis software (Bio-Rad, USA)를 이용하여 계산하였으며, Oh 등(1997)에서 보고된 1M NaCl gradient 농도와 retention time을 기준으로 peak를 구분하여 면적비를 산출하였다.

결 과

TCA의 농도에 따른 κ-Casein Macropeptide의 Chromatogram

Fig. 1과 2는 TCA의 농도에 따른 GMP의 분별 특성의 차이를 조사하기 위하여 6%와 12%의 TCA에 GMP를 처리하여 수용성 부분을 ion exchange column으로 분석한 결과를 나타낸 것이다. Chromatogram에서 나타난 peak들의 경향은 Oh 등(1997)에서 보고된 chromatogram과 비교했을 때 peak들의 상대적 크기에는 다소 차이가 있었으나, 분획된 5개의 peak들은 각각 유사한 NaCl gradient 농도에서 용출되었다.

P-I의 경우, 다른 peak들 보다 TCA에 영향을 크게 받는 것으로 나타났는데, 3% TCA에서는 전체 면적의 46.7%를 차지하였으나, 6% 및 12% TCA에서 각각 19.9%와 17%로 나타나 TCA에 의하여 침전이 된 것으로 나타났다. P-II의 경우에

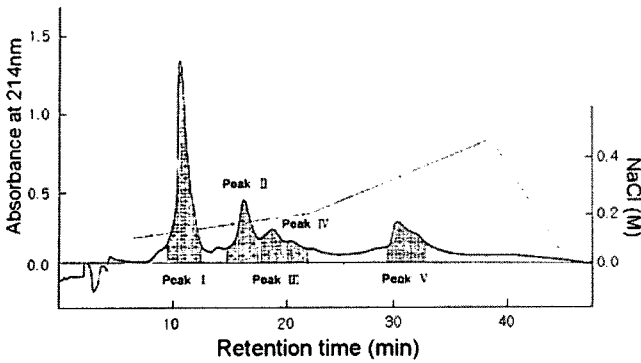


Fig. 1. FPLC separation of κ -casein hydrolysate soluble in 3% TCA solution by ion exchange on a Bioscale Q₂ column (7 × 52mm). Elution with 50mM Tris-HCl buffer with a 0M to 1M NaCl gradient(--) at a flow rate of 1ml/min. Elution profile of CMP from Oh *et al* (1997).

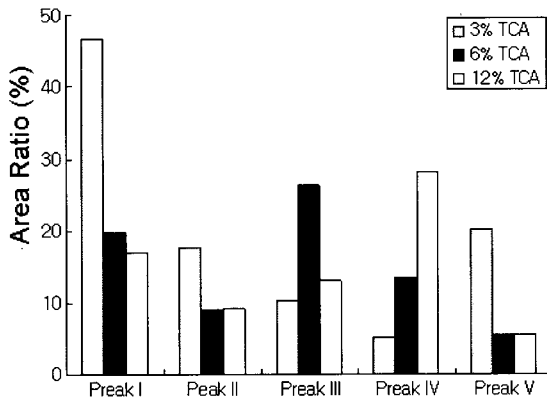


Fig. 2. The fraction area of κ -casein hydrolysate soluble in trichloroacetic acid (TCA) solution by ion exchange chromatography.

서도 peak의 상대면적이 3, 6, 및 12% TCA에서 각각 17.7, 8.89, 9.11%로 나타났다. P-III는 3% TCA에서는 10.2%이었으나 6% TCA 경우에는 26.3%로 상대적 면적이 증가한 것으로 보아 6% TCA에 대한 안정성이 P-I과 P-II보다 높은 것을 알 수 있었다. 그러나 12% TCA로 처리한 경우에는 13.2%로 감소하여 12% TCA에서는 다소 침전하는 것으로 나타났다. Peak-IV의 경우, 3% TCA에서는 5.2% 이었으나, 6%와 12% TCA에서는 각각 13.5%와 28.1%로 상대적 비율이 증가하는 것으로 보아 TCA에 대하여 안정한 peak임을 확인할 수 있었다. P-V는 3, 6 및 12% TCA에서 peak 면적비가 각각 20.21, 5.42 그리고 5.47%로 나타났다.

Cholera 독소와의 반응성

Table 1은 CT-B HRP와의 반응성을 나타낸 것으로 P-III은 6%와 12%의 TCA 처리시에도 cholera 독소와의 결합작용을 확인할 수 있었으며, P-IV는 6% TCA에서만 활성이 존재하였다. 그러나 본 연구에서 수행한 실험은 cholera 독소와의 간단한 반응성만을 확인한 것으로 정확한 반응기작을 구명

Table 1 Binding ability of κ -casein macropeptide fractions (Fig. 3, 4.) to cholera toxin B subunit by immunoassay*

	Peak	Binding Activity (%)
6% TCA	P-I	-
	P-II	-
	P-III	+
	P-IV	+
	P-V	-
12% TCA	P-I	-
	P-II	-
	P-III	+
	P-IV	-
	P-V	-

* Immunoassay of Nitro-cellulose membrane using cholera toxin B subunit-HRP conjugate as antibody.

하기에는 다소 무리가 있으나, 분획된 GMP가 6%와 12%의 TCA 처리시에도 cholera 독소와의 결합하는 작용을 유지하는 것으로 생각된다.

산 Casein에서 유래된 Macropeptide의 Chromatogram

산 casein으로부터 macropeptide를 얻기 위하여 산 casein에 chymosin을 처리하여 3, 6 및 12% TCA에 침전되지 않는 부분을 FPLC를 이용하여 동일한 조건에서 분리한 결과, κ -casein macropeptide와는 다르게 상당히 많은 peak가 나타났으며 gradient buffer로 사용하는 NaCl 농도가 0.1M에서 0.2M사이에서 용출되는 peak의 pattern은 유사한 점이 있어 보였다(data not shown). 그러나 TCA 농도가 높아질수록 전체적인 peak는 작아졌으며. 특히, chromatography 초기에 나타났던 peak가 가장 작아졌다. NaCl gradient의 농도가 증가함에 따라 용출되는 peak의 상대적 양은 커지고 있는 경향을 보였다(Table 2). 그러나 분획별 면적 비율은 TCA 농도에 따라 커다란 차이를 보이지 않았다.

Table 2. The fraction area of acid casein hydrolysate soluble in TCA solution by ion exchange chromatography

	Gradient (%)	Area (%)
3% TCA	0(I)	25.32
	11~14(II)	25.09
	15~20(III)	26.59
	25~35(IV)	23.00
6% TCA	0(I)	26.47
	11~14(II)	23.63
	15~20(III)	23.50
	25~35(IV)	26.40
12% TCA	0(I)	23.90
	11~14(II)	22.40
	15~20(III)	23.60
	25~35(IV)	30.10

고 찰

일반적으로 TCA는 lysine의 ε-아미노기와 같은 하전된 아미노기에 결합하여 단백질의 침전을 일으키는 물질로 당 단백질인 경우 결합된 당에 의하여 침전이 잘 되지 않는다. TCA에 대한 안정성은 단백질의 당화(glycosylation) 정도, 분자량의 크기, 및 소수성에 따라 다르게 분포하는데 이러한 용해도의 차이를 이용하여 단백질과 peptide의 분리 정제에 효과적으로 이용되어 왔다. 10% TCA에서는 평균 330~380 Da 즉, 아미노산의 3~4개 잔기의 peptide만이 침전되지 않는 것으로 알려져 있다(Chang, 1992).

Yvon 등(1989)은 TCA의 농도에 따른 α_s-casein, β-casein 및 κ-casein 분획들의 용해도를 비교한 결과 κ-casein f106~169 분획 즉, GMP 부분은 5%에서도 침전되지 않았으며, 8%의 TCA 농도에서는 GMP의 86%가 침전되지 않았다고 보고하였다. 그러나 β-casein f125~143 분획은 8%의 TCA 농도에서 모두 침전되었으며, α_{s1}-casein f1~23은 8% 농도에서 92%가 침전된 반면에 α_{s1}-casein f166~199 분획은 8% TCA 농도에서 18%만이 침전되었다. 이러한 TCA에 의한 침전도의 차이는 casein 분획들의 소수성과 결합된 carbohydrate의 유무에 따라 다르게 나타났다고 하였다(Yvon *et al*, 1989). McKenzie (1971)는 2~12% TCA를 GMP에 처리한 결과 carbohydrate를 함유한 peptide는 2% TCA에서는 침전되지 않았으나, 12% TCA에서 침전되는 것으로 나타났다고 보고하였다.

본 실험에서도 0.2~0.3M의 NaCl에서 용출되는 peak들은 12% TCA에서도 안정성이 있었으나 0.12M에서 용출되었던 P-I은 6% TCA에서 상당히 침전되는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 Oh 등(2000)이 보고한 바와 같이 P-I은 carbohydrate를 함유하지 않기 때문인 것으로 생각되었으며, P-III와 IV는 AcNeu를 함유하기 때문에 TCA에 안정성이 있는 것으로 판단되었다. 그러나 총 당함량은 많으나 AcNeu를 함유하지 않은 P-V는 6%와 12%의 TCA에 불안정한 것으로 보아 결합된 AcNeu가 TCA에 대한 κ-casein macropeptide의 안정성에 중요한 역할을 수행하는 것으로 생각되었다.

Lieske와 Konrad(1996)는 rennet whey와 whole casein에서 6%와 12% TCA 농도에서 κ-casein macropeptide의 함량을 측정된 결과 TCA 농도에 따라 다르게 측정되었고, 동일한 TCA 농도에서도 0.175M Na₂SO₄의 첨가 여부에 따라 많은 차이가 있었다고 보고하였다.

TCA의 첨가는 용액을 매우 낮은 pH로 만들어 단백질의 가수분해를 일으킬 수 있는데(Pohl, 1993), 본 실험에서도 κ-casein macropeptide에 대한 부분적인 가수분해로 인한 용출 변화를 배제할 수 없으나, 6%와 12% TCA 처리에서도 cholera 독소와의 반응성은 그대로 존재하는 것으로 보아 높은 농도

의 TCA에 상당한 안정성이 있는 것으로 판단되었다. Oh 등(2000)은 κ-casein macropeptide중에서 0.18M의 NaCl gradient에서 용출되는 P-III가 cholera 독소와 결합작용이 있었고 이의 분자량은 8.9 kDa라고 보고하였다.

이상의 결과로 볼 때 cholera 독소와 반응하는 GMP의 정제는 분획되는 P-III의 상대 면적이 높게 나타난 6%의 TCA가 적절한 것으로 판단되었으며 상기 조건에서 cholera 독소와 결합하는 특성 또한 소실되지 않았기 GMP의 정제시 유용하게 이용될 수 있다고 생각되었다. 또한 산 casein에 시료의 처리 조건을 적절하게 적용한다면 κ-casein을 정제해서 반응시키지 않아도 macropeptide를 얻을 수 있을 것으로 추측되었으나, GMP 분획의 순도를 높이기 위한 좀더 많은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

요 약

κ-casein을 정제한 후 여기에 chymosin을 반응시켜 얻어진 κ-casein macropeptide에 대한 trichloroacetic acid 처리에 대한 영향을 조사하고자 ion exchange column으로 분별하여 chromatogram을 비교하였다. P-I의 경우 3% TCA에서는 전체 peak 면적 대비 46.64%이었으나, 6%와 12% TCA로 영향을 크게 받아 많이 침전되었으며, 상대적으로 당 함량이 높은 peak들은 TCA의 영향을 비교적 적게 받는 것으로 나타났다. Cholera 독소와 결합하는 것으로 보고된 P-III는 3% TCA에서는 10.2%이었으나 6% TCA 경우에는 26.3%로 상대적 면적이 증가하였으나 12% TCA로 처리한 경우에는 13.2%로 감소하였다. 0.2~0.3M의 NaCl에서 용출되는 peak는 12% TCA에서도 상당한 안정성을 보였다. 0.18M의 NaCl gradient에서 용출되는 P-III는 6% 및 12% TCA 처리시에도 cholera 독소와 반응하는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 연구되었기에 이에 감사드립니다(02-PJ1-PG3-22005-0018).

참고문헌

- Slattery, C. W. (1976) Casein micelle structure: A examination of models. *J. Dairy Sci.* **59**, 547.
- Kim, Y. K. (1993) Structure and some properties of bovine casein micelles. *Natural Resources Research* **1**, 138-152.
- Eigel, W. N., Butler, J. E., Ernstrom, C. A., Farrell, Jr. H.

- M., Harwalkar, V. R., Jenness, R. and Whitney, R. McL. (1984) Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision. *J. Dairy Sci.* **67**, 1599-1631.
4. Kim, Y. K., Yaguchi, M., and Rose, D. (1968) Isolation and amino acid composition of para-kappa-casein. *J. Dairy Sci.* **52**, 316-320.
 5. El-Salam, M. H. A., El-Shibiny, S., and Buchheim, W. (1996) Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. *Int. Dairy Journal* **6**, 327-341.
 6. Lieske, B. and Konrad, G. (1996) A new method to estimate caseinomacropeptide and glycomacropeptide from trichloroacetic acid filtrates. *Milchwissenschaft*. **51**, 431-434.
 7. Kim, Y. K. (1971) Fractionation of κ -casein macropeptide. *Korean J. Ani. Sci.* **13**, 82-86.
 8. Doi, H., Ibuki, F., and Kanamori, M. Heterogeneity of reduced bovine κ -casein. *J. Dairy Sci.* **62**, 195 (1979).
 9. Oh, S. J., Kim, S. H., Jeon, W. M., Kim B. C., and Kim, Y. K. (1997) Glycomacropeptide hydrolysed from bovine κ -casein; I. The fractionation of glycomacropeptide. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **17**, 51-57.
 10. Oh, S., Worobo, R. W., Kim, B. C., Rheem, S., and Kim, S. Detection of cholera-toxin-binding activity of macropeptide from bovine κ -casein and optimization of its production by use of response surface methodology. *Biosci. Biotech. Biochem.* **64**, 516-522.
 11. Walker, J. M. and Gaastra, W. (1988) Detection of protein blots using enzyme-linked second antibodies or Protein A. In: *Methods in Molecular Biology Vol 3 : New protein techniques*. Walker, J. M. (ed), Humana Press, Clifton, New Jersey, pp.427-440.
 12. Chang, Y. C. (1992) Efficient precipitation and accurate quantitation of detergent-solublized membrane proteins. *Anal. Biochem.*, **205**, 22-26.
 13. Yvon, M., Chabanet, C., and Pelissier, J. P. (1989) Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions: Hypothesis on the precipitation mechanism. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **34**, 166-176.
 14. McKenzie, H. A. (1971) *Milk proteins II, chemistry and molecular biology*. Academic Press, New York.
 15. Pohl, T. (1993) Concentration of proteins and removal of solutes. In: *Method in enzymology vol. 182. Guide to protein purification*. Deutscher, M. P. (ed), Academic Press. London, pp.68-83.

(2005. 7. 9. 접수 ; 2005. 10. 29. 채택)