

제1차년도
최종보고서

우유로부터 생리활성물질의 분리 및 정제
Separation and purification of biologically
active material from bovine milk

연구기관 : 전남대학교

농림부

637.3
L2936
V.1

제 출 문

농림부장관 귀하

본 보고서를 “우유로부터 생리활성물질의 분리 및 정제”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

1996. 11. 30.

주관연구기관명: 전남대학교

총괄연구책임자: 홍 윤 호

연 구 원: 기 해 진

요 약 문

I. 제 목

우유로부터 생리활성물질의 분리 및 정제

II. 연구개발의 목적 및 중요성

우유중 생리활성물질의 하나인 알파-락트알부민은 모유에서도 중요한 단백질이며 알레르기를 유발하지 않고 소화가 잘 되며 어린이 및 노약자의 식사에 필요한 양질의 아미노산을 많이 함유하고 있다. 그러나 이 성분의 분리 및 정제가 용이하지 않아 실험용 시약형태로 판매되는 것은 매우 고가이므로, 국내의 기술개발로 건강식의 원료로 공급하고 외화를 절약하는데에 본 연구의 목적과 중요성이 있다고 하겠다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 우유에 존재하는 알파-락트알부민을 분리하기 위하여 시료를 원심분리하여 탈지시키고 산을 첨가하여 등전침전시킨 후 한외여과법으로 농축시켰다. 이 농축액을 원심분리하여 베타-락토글로블린을 제거하고 효소반응을 시킨 다음, 겔여과법으로 알파락트알부민을 분리하고 HPLC를 이용하여 정제한 후 동결건조시켰다. 이 과정들에서 단백질의 분해 양상을 점검하기 위해

SDS-PAGE 시스템으로 전기영동을 실시하였다. 생리활성펩타이드인 알파-락토피은 위에서 분리된 알파-락트알부민을 산성 조건하에서 펩신을 첨가하고 37°C에서 반응시킨후 약알칼리성 조건하에서 트립신을 첨가하여 반응시킨 다음 원심분리하고 겔여과법 및 HPLC를 이용하여 정제하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서 분리, 정제된 알파-락트알부민과 알파-락토피은 독성검사 및 생체실험 등을 거쳐 인체에 유해하지 않다고 판명될 경우, 식품소재로서 이유식, 노인식, 환자식 등에 쓰이고 의약품소재로도 이용될 수 있으리라 전망된다.

S U M M A R Y

(영문요약문)

In order to isolate and purify the biologically active α -lactalbumin(α -La) from the cheese whey, bovine milk was centrifuged and defatted. Thereafter casein was precipitated with 1N HCl and separated from the whey. The obtained whey was concentrated about 20 folds by ultrafiltration. And β -lactoglobulin(β -Lg) was hydrolyzed with trypsin at 35°C for 1 h. The hydrolyzed whey protein was electrophoretically identified. The isolated α -La content was measured by HPLC and the yield was about 0.25g/l milk.

α -La was hydrolyzed by addition of pepsin and trypsin at 37°C for 3 h. The sample was precipitated with TCA, centrifuged and filtered. The obtained α -lactorphin was analyzed by HPLC and the yield was about 6.42mg/g α -La.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chap. I. Introduction -----	9
Section 1. Purpose and extent of research and development -	9
1. Background of research -----	9
2. Purpose of research -----	9
3. Extent of research -----	10
Chap. II. Isolation and purification of α -lactalbumin -----	12
Section 1. Introduction -----	12
Section 2. Material -----	12
Section 3. Methods -----	12
1. Isolation and purification of α -lactalbumin -----	12
2. Electrophoresis -----	13
3. Gel filtration -----	15
4. High performance liquid chromatography(HPLC) -----	16
5. Calculation of α -lactalbumin in yield -----	16
Section 4. Results and discussion -----	17
Chap. III. Isolation and purification of α -lactorphin -----	23
Section 1. Introduction -----	23
Section 2. Material -----	23
Section 3. Methods -----	23
1. Isolation and purification of α -lactorphin -----	23
2. Analysis of α -lactorphin with HPLC -----	25

Section 4. Results and discussion -----	26
Chapter 4. Conclusion -----	29
Chapter 5. References -----	30

목 차

제 1 장	서 론	9
제1절	연구개발의 목적과 범위	9
1.	연구배경	9
2.	연구목적	9
3.	연구범위	10
제 2 장	알파-락트알부민의 분리 및 정제	12
제1절	서 설	12
제2절	실험재료	12
제3절	실험방법	12
1.	알파-락트알부민의 분리 및 정제	12
2.	전기영동실험	13
3.	겔여과	15
4.	고성능 액체 크로마토그래피	16
5.	알파-락트알부민의 수율 계산	16
제4절	결과 및 고찰	17
제 3 장	알파-락토판의 분리 및 정제	23
제1절	서 설	23
제2절	제 료	23
제3절	실험방법	23
1.	알파-락토판의 분리 및 정제	23
2.	알파-락토판의 HPLC에 의한 분석	25

제4절 결과 및 고찰	26
제 4 장 결 론	29
제 5 장 참고문헌	30

본 문

제 1 장 서 론

제 1절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구배경

우리나라의 낙농업은 30여년의 짧은 기간에도 불구하고 장족의 발전을 하여 최근에는 연간 약 200만 MT의 우유를 생산하고 소비하기에 이르렀다⁽¹⁾. 그러나 UR 및 WTO의 협정으로 다른 공산품들과 함께 농, 축산물들의 시장개방이 이미 시작되어 물밀 듯이 들어오고 있다. 따라서 국내에서 생산되는 우유 및 유제품들은 품질 및 가격면에서 선진국 제품들과 경쟁하지 않으면 안된다. 우리나라 유제품들은 많은 경우에 품질 및 가격면에서 불리한 여건에 처해 있는데, 이는 낙농업 및 유가공업계에 심각한 타격을 줄 수 있는 가능성이 큰 것을 의미한다. 그러므로 국내 낙농업계는 국제경쟁력이 높은 제품의 개발, 품질관리, 경영의 합리화 등 생존을 위한 자구노력이 절실한 시점에 와 있다.

2. 연구목적

우유에는 여러 종류의 단백질이 함유되어 있으며 이들은 면역기능, 항 미생물기능, 약리작용, 효소활성작용, 성장기능 등을 조절하고 생리활성기능들을 갖는 펩타이드들의 전구체로서 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있다^(2,3).

본 연구에서는 우유로부터 치즈제조시 유청에 존재하고 있는 알

파-락트알부민(α -lactalbumin, α -La)과 이로부터 유래되는 펩타이드를 분리, 정제하는 기술을 개발함으로써 우리나라의 낙농산업 및 식품산업에 도움을 주고 제품의 국제경쟁력을 높이고자 한다. 우유 중 생리활성물질을 분리, 정제하려는 노력이 진행되어 왔으나⁽⁴⁻¹³⁾, 저렴한 가격으로 순도 높은 제품을 대량으로 상품화할 수 있는 기술은 국내외에 거의 없으므로 이들의 제품화 기술의 개발이 요망된다. 생화학 실험용으로 미국 Sigma사에서 제조, 판매하는 알파-락트알부민의 가격은 μ 당 약 20만원인데⁽¹⁴⁾ 이를 우유로부터 대량생산하여 식품첨가물 또는 의약품의 원료로 판매될 경우 그 부가가치는 매우 높으며 낙농가와 낙농식품산업계는 경제적으로 큰 도움이 될 것이다. α -La과 펩타이드는 건강식품류, 식품첨가물질, 의약품 등의 소재로 다양하게 이용되어 건강증진에 기여할 것이며 이로 인한 의료비의 절감은 물론 건강사회의 건설에 도움이 될 수 있으리라 사료된다. 따라서 본 연구에서는 우유로부터 순도높은 α -La을 저렴한 비용으로 분리, 정제하고 이 α -La으로부터 알파-락토펜(α -lactorphin)을 분리, 정제하는 기법을 개발하고자 하였다.

3. 연구범위

우유로부터 생리활성물질을 분리하기 위한 연구의 범위는 다음과 같다.

- 가. 우유로부터 치즈를 제조하는 과정에서 유청의 생성
- 나. 유청으로부터 단백질 성분의 분획
- 다. 알파-락트알부민의 분리
- 라. 베타-락토글로블린의 제거
- 마. 알파-락트알부민의 정제

- 바. 전기영동법으로 단백질의 확인
- 사. 알파-락트알부민의 효소적 가수분해
- 아. 알파-락트알부민으로부터 알파-락토판의 분리
- 자. 알파-락토판의 정제
- 차. 알파-락토판의 확인

제 2 장 알파-락트알부민의 분리 및 정제

제 1절 서 설

우유로부터 치즈제조시 생성되는 유청에는 유당, α -La, 베타-락토글로블린(β -lactoglobulin, β -Lg), 우혈청알부민(bovine serum albumin, BSA), 면역글로블린, 락토페린, 트랜스페린 등과 무기질들이 많이 함유되어 있다⁽³⁾. α -La 을 분리하려면 유청중의 다른 성분들을 적절한 방법으로 제거, 분해 또는 침전시켜야 하므로 여러가지 분리방법들⁽⁴⁻¹⁰⁾이 시도되어 왔다.

제 2절 실험재료

본 연구에 사용된 우유는 살균 및 균질화된 후 냉장 중인 것으로 백화점 식품부에서 시판되고 있는 유통기간내의 신선한 제품으로 구입되었다. 표준물질로 사용된 α -La, β -Lg, BSA, 전기영동용 시약 등은 Sigma사(St.Louis, U.S.A.)에서 구입하였다. 기타 시약들은 화학실험실용 특급시약으로 구입하여 사용하였다.

제 3절 실험방법

1. α -La의 분리 및 정제

우유로부터 α -La의 분리 및 정제는 그림 1과 같이 Millart와 Ribadeau-Dumas⁽¹⁵⁾의 방법을 수정하여 실시하였다. 즉, 우유를 5,000rpm으로 4°C에서 20분간 원심분리시켜 탈지하였다. 이 탈지유에 1N HCl을 첨가하여 pH를 4.6으로 조정해 단백질을 등전침전

시켰다. 침전을 촉진시키고 완성하도록 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 다시 원심분리한 후 미세한 체로 바쳐 산성 유청을 얻었다. 이 유청을 한외여과하여 농축시킨 다음 1N HCl로 pH를 2.0으로 조정하였고 NaCl을 첨가하여 7%가 되게 한 후 15,000rpm으로 4°C에서 30분간 원심분리해서 침전물을 얻었다. 이 침전물의 pH를 1N NaOH로 8.0~9.0에 맞추는 다음, β -Lg을 분해시키기 위하여 트립신을 단백질에 대해 1/1000(W/W)을 첨가하여 35°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그후 60°C에서 3분간 효소작용을 불활성화시켰다. 이렇게 처리한 시료를 전기영동, 겔여과, HPLC 등에 이용하였다.

2. 전기영동실험

Sodium dodecyl sulfate(SDS)-Polyacrylamide electrophoresis (PAGE)는 Laemmli 법⁽¹⁶⁾에 준하여 15%의 분리겔을 사용하여 실시하였다. 전기영동은 20mA의 전류에서 60분간 실온에서 수행한 후, 겔은 0.25% Coomassie brilliant blue(R-250)로 발색시킨 다음, 탈색시켰다.

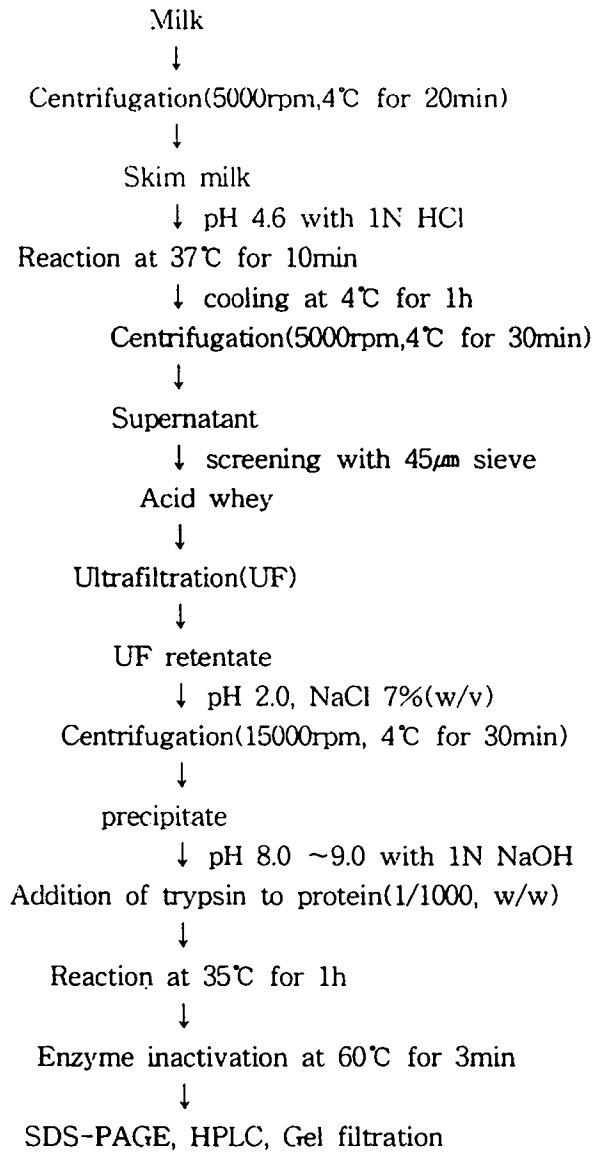


Figure 1. Separation and purification of α -La from milk.

3. 겔여과

시료중 α -La을 분리하기 위해서 겔여과(gel filtration)를 실시하였는데 실험조건은 표 1과 같다.

Table 1. Purification conditions of α -La from milk
by gel filtration

Gel type : Sephadex G-100
Eluent : 0.1M Tris-HCl (with 0.5 N NaCl, 10mM NaN ₃ , pH 7.0)
Flow rate : 0.9 ml/min
Sample : trypsin-treated UF retentate
Sample volume : 4ml
Void volume : 60ml
C-column : 16cm x 92cm

4. 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)

시료에서 생리활성물질을 정량하기 위하여 Protein-Pak™ 125 칼럼을 사용해 크로마토그래피를 표 2와 같은 조건으로 실시하였다.

Table 2. Analysis conditions of α -La from milk by HPLC

Instrument	: HPLC with Waters
Column	: Protein-Pak™ 125
Mobile phase	: 0.1N KH ₂ PO ₄ (pH 7.0)
Flow rate	: 0.8ml/min
Wavelength	: 280nm
AUFS	: 0.5
Attenuation	: 16
Chart speed	: 0.5cm/min
Injection volume	: 50 μ l

5. 알파-락트알부민의 수율 계산

우유로부터 그림1에 준하여 분리, 정제한 알파-락트알부민의 함량을 HPLC의 peak 면적을 표준물질의 peak 면적과 비교하여 계산하였다.

제 4 절 결과 및 고찰

겔여과법을 이용하여 분리한 α -La의 크로마토그램은 그림 2에 나타낸 바와 같다. 여기서 얻은 peak들은 크게 a, b, c 등이다. Peak a는 분획 6~8, b_1 은 분획 11~13, b_2 는 분획 14~16 그리고 c는 17~22로부터 각각 10ml씩 분취한 후 흡광도를 측정하는 것이다.

우유 1ℓ를 산처리하여 유청을 분리한 후 pH를 산성으로 하고 NaCl을 처리하여 대부분의 β -Lg을 제거한 다음 trypsin을 첨가하여 반응시킨 시료 중 α -La의 함량을 HPLC로 정량한 결과 약 0.25g을 얻었다. 이것은 Yoshida⁽⁹⁾가 보고한 수율과 유사한 양이다.

겔 여과로부터 얻어진 분획들을 전기영동한 결과는 그림 3과 같다. a부분과 c부분은 α -La과 β -Lg의 band가 나타나지 않았고 b부분 중 b_1 분획은 α -La과 β -Lg이 섞여 있었고 b_2 분획에는 α -La band만 나타났다. 위의 결과에 근거하여 순도높은 α -La를 보다 많이 분리하기 위해서는 분리능에 영향을 주는 인자들을 다양하게 체계적으로 조합시켜 연구해 보아야 할 것으로 생각된다.

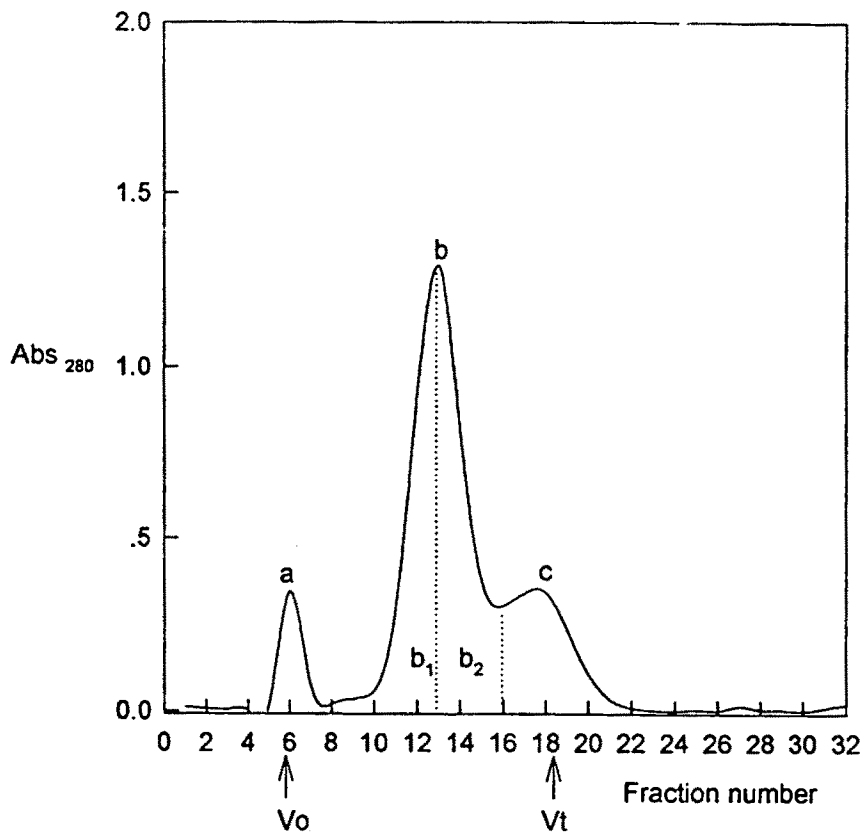


Figure 2. Sephadex G-200 column chromatography
of trypsin-treated UF retentate
a, c : no peak by SDS-PAGE
b₁ : mixture of β -Lg and α -La
b₂ : α -La
V₀ : void volume, V_t : total volume

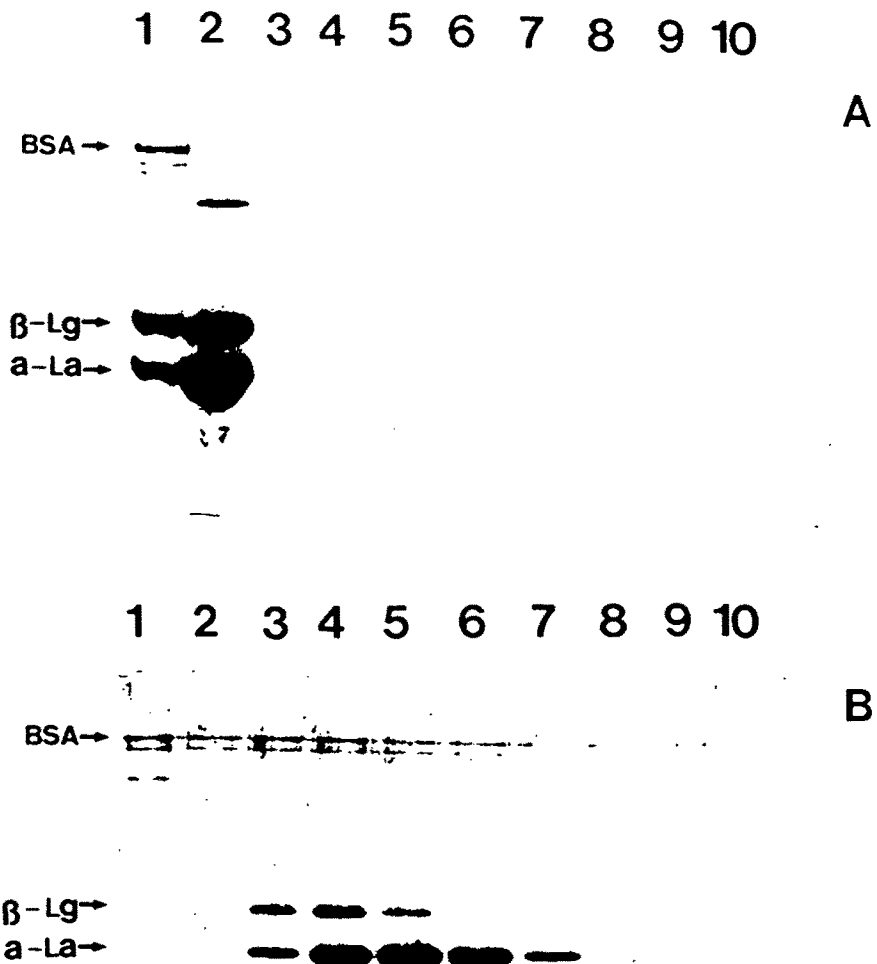


Figure 3. SDS-PAGE patterns of fractions by gel filtration using Sephadex G-100

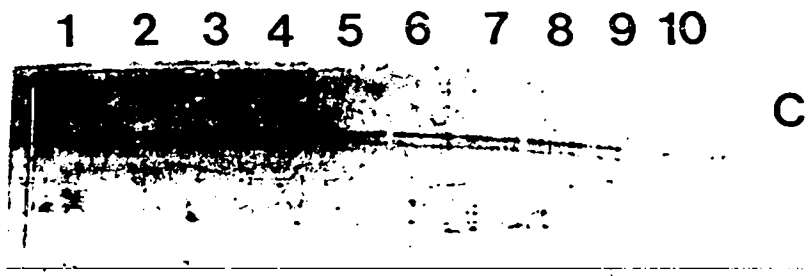


Fig 3. (continued) SDS-PAGE patterns of fractions
 by gel filtration using Sephadex G-100

A. lane 1 ; mixture of BSA, β -Lg and α -La
 lane 2 ; trypsin-treated UF retentate
 lane 3~8 ; fraction 1~8

B. lane 1~10 ; fraction 9~18

C. lane 1~10 ; fraction 19~28

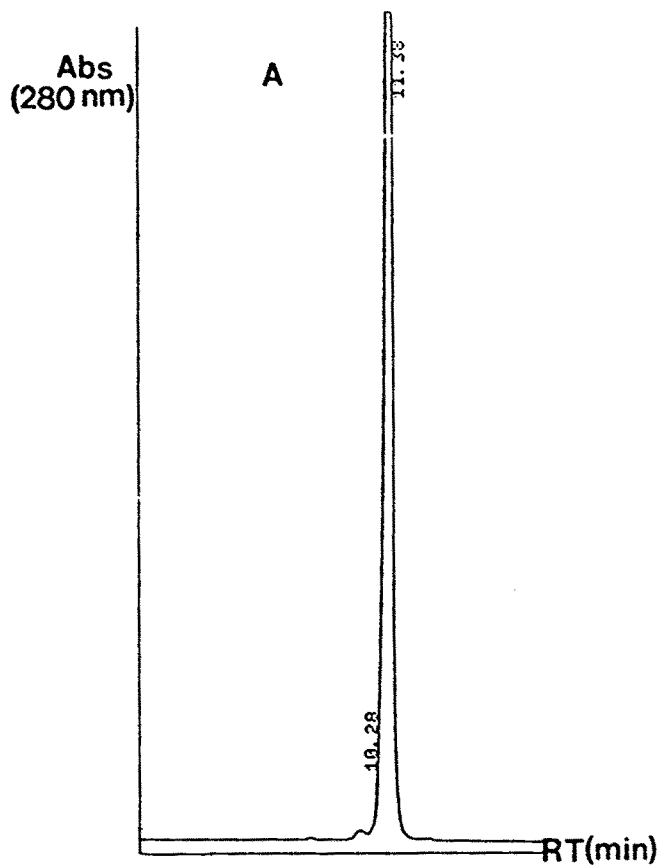


Fig 4. HPLC chromatograms of standard α -La(A) and trypsin-treated UF retentate with pH 2.0, NaCl 7%(w/v)(B)

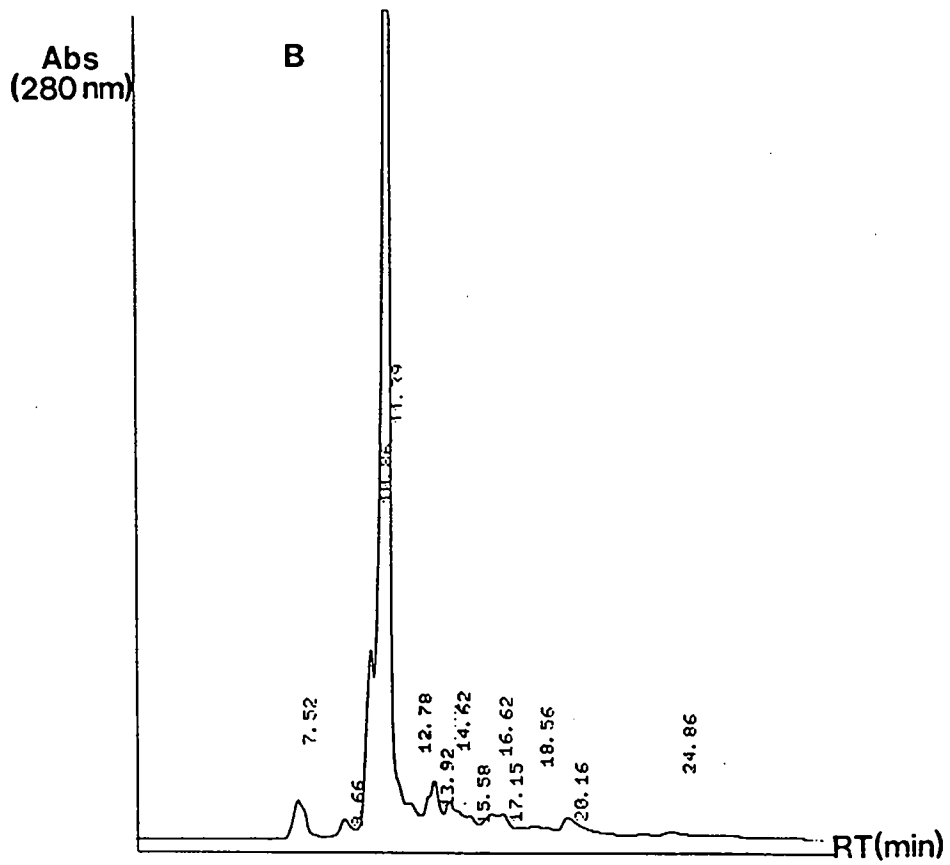


Fig 4. (continued) HPLC chromatograms of standard α -La(A) and trypsin-treated UF retentate with pH 2.0, NaCl 7%(w/v)(B)

제 3 장 알파-락토판의 분리 및 정제

제 1 절 서설

α -La를 효소로 가수분해시키면 α -lactorphin이 생성될 수 있는데 이 펩타이드는 opioid 활성을 갖는다고 알려져 있다⁽¹³⁾. 이 펩타이드의 제조를 체계적으로 수행하고 그 성분을 확인하고자 실험을 수행하였다.

제 2 절 재료

본 연구에서 시료는 제 2장에서와 같이 분리, 정제한 α -La과 표준물질로는 Peninsula Lab. Co.(Merseyside, UK)에서 구입한 α -Lactorphin을 사용하였다. 가수분해용으로 사용한 효소, 펩신과 트립신은 Sigma사(St. Louis, U.S.A.)에서, 그외의 시약은 대리점에서 특급으로 구입하였다.

제 3 절 실험방법

1. 알파-락토판의 분리 및 정제

α -La으로부터 테트라 펩타이드인 알파-락토판(Tyr-Gly-Leu-Phe)의 분리, 정제는 그림 4와 같이 Antila 등⁽¹³⁾의 방법을 일부 보완하여 수행하였다.

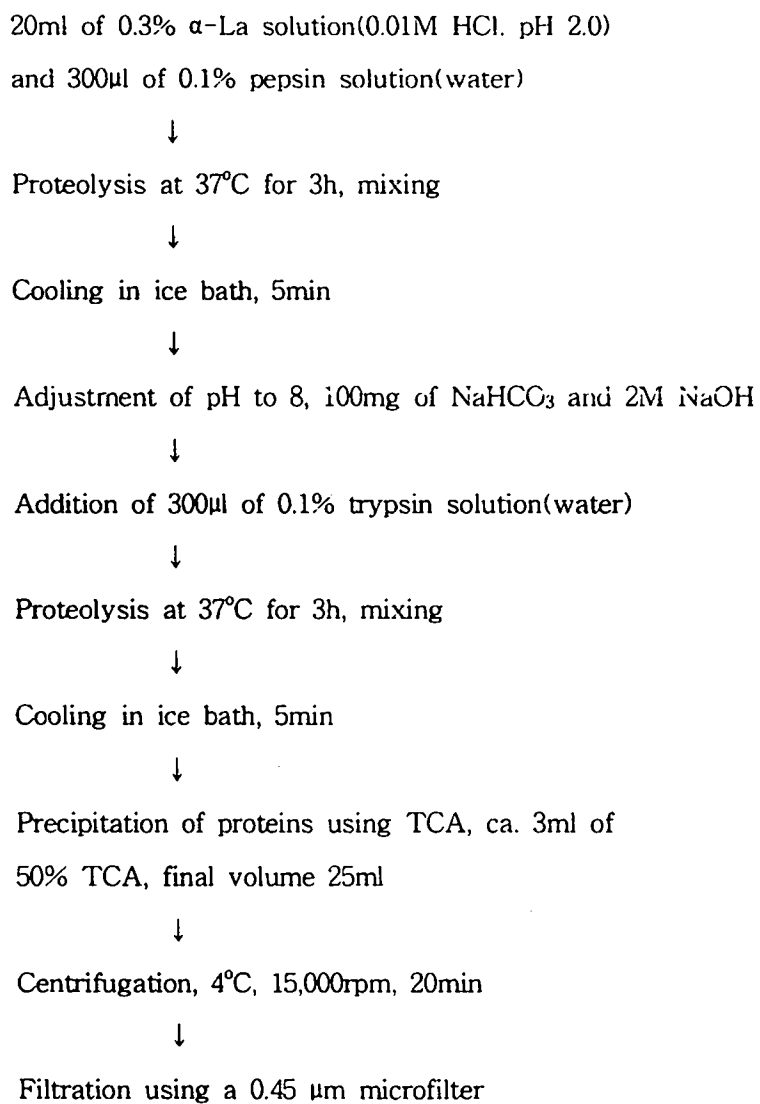


Fig 5. Separation scheme of α -lactorphin by proteolysis
with pepsin and trypsin from α -La.

2. 알파-락토펜의 HPLC에 의한 분석

효소적으로 가수분해된 시료는 HPLC를 이용하여 다음 표 3과 같은 조건으로 분석하였다.

Table 3. Analysis conditions of α -lactorphin by HPLC

Instrument : HPLC, waters
Column : Resolve 5 μ l Spherical C18 (3.9mm x 150mm)
Buffer A : 0.1% TFA in H ₂ O
Buffer B : 0.1% TFA in CH ₃ CN
Gradient : 0-30% B in 35 min. linear
Flow rate : 0.8ml/min
Detection : 280 nm
AUFS : 0.05
Attenuation : 16
Chart speed: 0.25 cm/min
Sample volume : 25 μ l

제 4 절 결과 및 고찰

분석조건에 의거하여 분리한 표준물질 및 시료 중 알파-락토피의 크로마토그램은 그림 5와 6에 나타낸 바와 같다. 표준물질인 α -lactorphin의 peak는 주입후 머무른 시간은 49.91분으로 나타났으며 α -La을 효소처리하여 얻은 시료의 경우에 α -lactorphin은 거의 유사한 머무름 시간인 50.15분에 분리되었다. 1g의 α -La을 효소적으로 가수분해하여 얻은 α -lactorphin의 양은 6.42mg이었다.

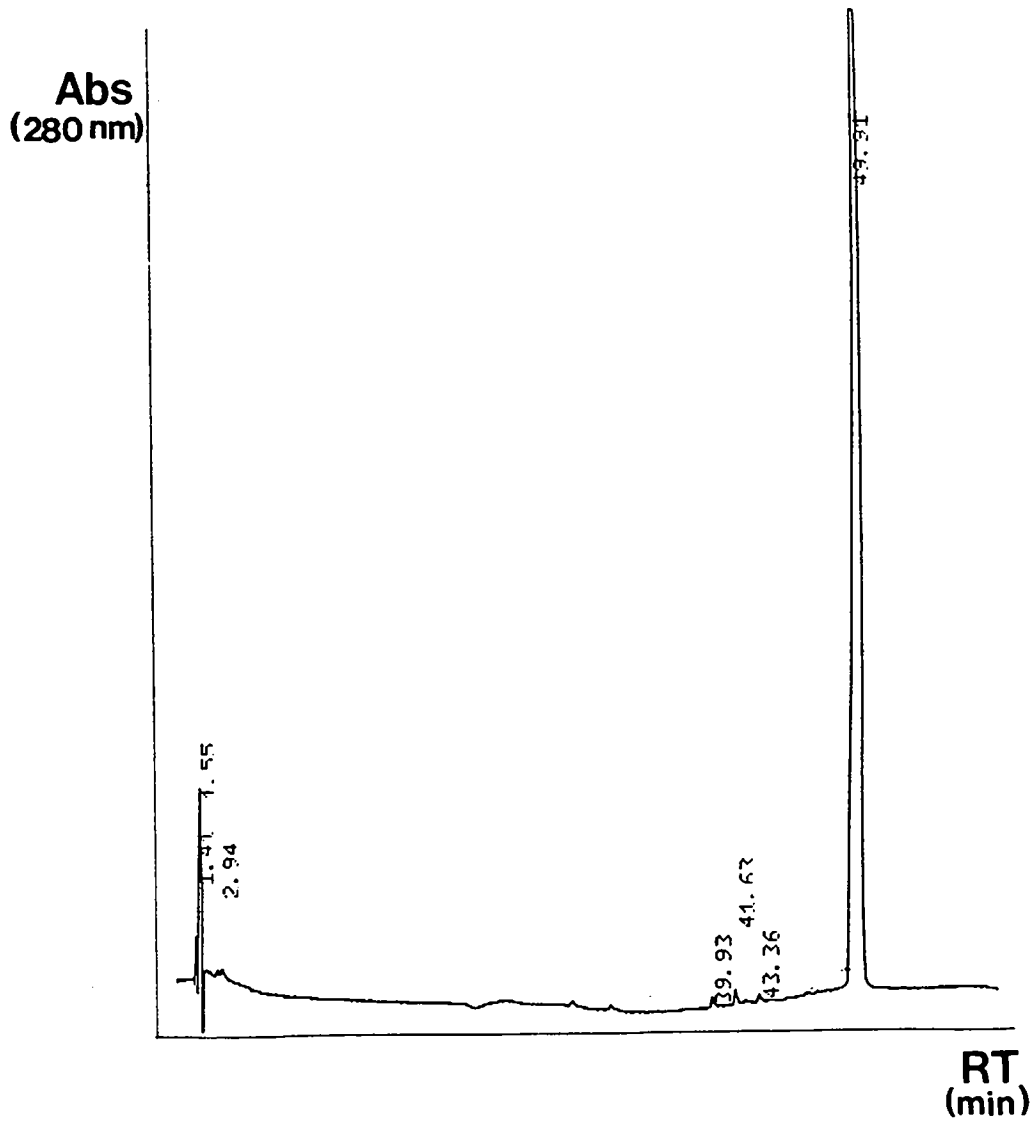


Figure 6. Chromatogram of standard α -lactorphin

제 4장 결 론

우유를 이용하여 치즈를 생산하는 공정중에 양질의 영양성분들이 많이 함유된 유청이 다량 생산되는데 여기에서 생리활성물질인 α -La를 분리, 정제하고자 하였다. 우유를 원심분리하여 탈지시키고 1N 염산으로 카제인을 침전시켜 제거한 후, 얻은 유청을 직경 45 μ m 체를 이용하여 잔류되어 있는 카제인을 더 깨끗이 제거하였으며, 이 산유청을 한외여과하여 15배 내지 20배 정도 농축하였다. 유청중에는 β -Lg이 많이 존재하므로 이 단백질을 분리하기 위해서 pH를 2.0으로 조정한 후, NaCl를 7%가 되게 첨가하였고, 이 β -Lg을 더 분해하기 위해서 트립신을 단백질 농도의 1/1000정도 가하고 35 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응시킨 후 60 $^{\circ}$ C에서 3분간 열처리하여 효소를 불활성화시켰다. 이 효소처리한 유청단백질을 전기영동(SDS-PAGE, 15% acrylamide gel)하여 변화양상을 확인하였고 분리관 Protein-PakTM 125를 이용한 HPLC로 유청단백질을 분리, 정량하였다. 우유 1 l로부터 분리, 정제한 α -La의 양은 약 0.25g이었다.

알파-락토피를 얻기 위하여 α -La에 펩신과 트립신을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 반응시켰다. 그후 TCA로 침전시키고 원심분리한 후 여과하였다. 생성된 알파-락토피는 HPLC로 분석하였는데 수율은 α -La 1g당 6.42mg이었다.

우유로부터 α -La 및 알파-락토피의 대규모로 분리, 정제시 수율을 높이기 위해서는 분리능에 영향을 미치는 인자들을 체계적으로 조합시켜 탐색하고 최적조건을 찾아야 할 것으로 사료된다.

제 5장 참고문헌

1. 한국유가공협회: 유업통계. 64, p. 59 (1996)
2. Meisel, H. and Schlimme, E. : Milk proteins : precursors of bioactive peptides. Trends in Food Sci. Technol., 1, 41-43 (1990)
3. Fox, P. F. and FLynn, A.: Biological properties of milk proteins. p. 255-284, In Advanced Dairy Chemistry. Vol. 1. Fox, P .F.(ed.), Elsevier Applied Science, London and New York (1992)
4. Aschaffenburg, R. and Drewry, H. A.: Improved method for the preparation of crystalline β -lactoglobulin and α -lactalbumin from cow's milk. Bioch., 65, 273-277 (1957)
5. Armstrong, J. M., Mckenzie, H. A. and Sawyer, W. H.: On the fraction of β -lactoglobulin and α -lactalbumin. Biochim. Biophys. Acta., 147, 60-72 (1967)
6. Manji, B., Hill, A., Kakuda, Y. and Irvine, D.M.: Rapid separation of Milk whey proteins by anion exchange chromatography. J. Dairy Sci., 68, 3176-3179 (1985)
7. Hill, A. R., Irvine, D. M., Kakuda, Y., and Manji, B.: Separation and quantification of whey proteins by size exclusion chromatography. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 19, 5, 227-230 (1986)

8. Maubois, J. L., Pierre, A., Fauquant, J. & Piot, M.: Industrial fractionation of main whey protein. Bulletin of IDF, 212, 154-159 (1987)
9. Yoshida, S.: Isolation of β -lactoglobulin and α -lactalbumin by gel filtration using Sephacryl S-200 and purification by dimethylaminoethyl ion-exchange chromatography. J. Dairy Sci., 73, 2292-2298 (1990)
10. Weinbrenner, W. F. and Etzel, M. R.: Competitive adsorption of α -lactalbumin and bovine serum albumin to a sulfopropyl ion-exchange membrane. J. Chromatogr. A, 662, 414-419 (1994)
11. Schlimme, E. and Meisel, H.: Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. Die Nahrung, 39, 1-20 (1995)
12. Herraiz, T., Casal, V. and Polo, M. C.: Reversed-phase HPLC analysis of peptides in standard and dairy samples using on-line absorbance and post-column OPA-fluorescence detection. Z. Lebensm. Unters. Forsch, 1199, 265-269 (1994)
13. Antila, P., Paakkari, I., Jaervinen, A., Mattila, M. J., Laukkanen, M., Philanto-Leppaelae, A., Maentsaelae, P. and Hellman, J.: Opioid peptides derived from in-vitro proteolysis of bovine whey proteins. Int. Dairy J., 1, 215-229 (1991)
14. Sigma: Biochemicals organic compounds and diagnostic reagents. Sigma Co. p. 614 (1996)

15. Maillart, P. and Ribadeau-Dumas, B.: Preparation of β -lactoglobulin and β -lactoglobulin-free proteins from whey retentate by NaCl salting out at low pH. J. Food Sci., 53, 743-752 (1988)
16. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural protein during the assembly off the head of bacteriophage. Nature, 227, 680-685 (1970)