

## 유청으로부터 고정화 트립신을 이용한 기능성 펩타이드의 생산

박윤주 · 윤여표\* · 이형주\*\* · 장해동

한남대학교 식품영양학과, \*충북대학교 약학과, \*\*서울대학교 식품공학과

### The Production of Functional Peptide from Whey Using Immobilized Trypsin

Yun-Joo Park, Yeon-Pyo Yun\*, Hyung-Joo Lee\*\* and Hae-Dong Jang

Department of Food and Nutrition, Hannam University

\*Department of Pharmacy, Chungbuk National University

\*\*Department of Food Science and Technology, Seoul National University

#### Abstract

Carbohydrate-free caseinomacropeptide (CMP) was isolated from the sweet whey powder by a precipitation method using 12% trichloroacetic acid. The yield of carbohydrate-free CMP was 2.7 g from 100 g sweet whey powder. The electrophoretic pattern and the amino acid analysis of CMP showed that isolated CMP was quite pure, indicating the precipitation with 12% trichloroacetic acid was very effective for isolating carbohydrate-free CMP from the sweet whey powder. Trypsin, covalently immobilized on pore glass beads by carbodiimide (EDC) method, was 20mg per 1g glass beads. CMP was almost completely hydrolyzed by soluble trypsin in 24hr, but not by immobilized trypsin. The tryptic hydrolysates were fractionated on a Bio-Gel P 4 column (1.5×120 cm) and separated peptides were tested for their capacities to inhibit platelet aggregation using a aggregometer. The hydrolysate obtained from CMP after 24hr digestion by immobilized trypsin showed the highest activity.

Key words: sweet whey powder, caseinomacropeptide, immobilized trypsin, platelet aggregation

#### 서 론

유청이란 치즈를 제조하거나 식품 및 공산품에 사용되는 케이스인을 생산하기 위해서 우유를 응유효소나 산으로 응고시킨후 형성된 커드를 분리해 낼 때 얻어지는 액상부분을 말한다. 따라서 유청은 원유에 함유된 성분 즉 단백질, 유당, 무기질, 비타민 등의 고형분을 많이 함유하고 있기 때문에 다양한 용도로 이용하는 방법이 개발되고 있다<sup>(1)</sup>. 치즈를 제조할때 얻어지는 유청을 감성유청(sweet whey)이라 하는데, 감성유청의 단백질은  $\beta$ -lactoglobulin과  $\alpha$ -lactalbumin을 주로 하는 유청단백질, 프로테우스 펩톤(proteose-peptone) 그리고 응유효소(chymosin)의 작용에 의해  $\kappa$ -카제인으로부터 생성된 친수성인 caseinomacropeptide(CMP) 등으로 구성되어 있다<sup>(2)</sup>.

Caseinomacropeptide는 응유효소인 chymosin이  $\kappa$ -

카제인의 Phe<sup>105</sup>-Met<sup>106</sup> 펩타이드 결합을 가수분해시킴으로써 생기는  $\kappa$ -카제인의 C-말단부분에 해당하는 펩타이드(Met<sup>106</sup>-Val<sup>109</sup>)로서 탄수화물을 갖고 있는 것이 전체의 60-66%를 차지하고 있다<sup>(3)</sup>. 최근에 알려진 바에 의하면 CMP는 이론적으로는 분자량이 7,000 dalton이지만 pH에 따라 CMP의 분자량이 달라지며 같은 pH에서도 탄수화물의 유무에 따라 그 분자량이 상당히 차이가 나는 특성을 지니고 있다<sup>(4)</sup>. CMP는 원료 및 분리방법에 따라 CMP의 종류 및 수율이 크게 차이가 나는 것으로 알려져 있는데, Saito 등<sup>(5)</sup>은 100g 감성유청분말로부터 알콜침전법과 이온교환크로마토그래피법을 사용해 1.1g의 탄수화물이 있는 CMP를 얻었다고 하였다.

CMP는 생물체에서 다양한 생리적 기능을 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 예를 들어 CMP는 위액의 분비 및 위와 소장의 주기적인 수축작용에 대한 억제작용<sup>(6-8)</sup>과, ADP처리된 혈소판의 응집억제작용<sup>(9,10)</sup>, *Bifidobacteria*의 성장 촉진작용<sup>(11)</sup>, *Actinomyces*의 세포막에 대한 부착저해작용<sup>(12)</sup>, Cholera독소의 receptor 부착

Corresponding author: Hae-Dong Jang, Department of Food and Nutrition Hannam University, 133 Ojung-dong, Taedok-gu, Taejeon 300-791, Korea

저해작용<sup>(13)</sup> 등이 있다. 이같은 CMP의 특이한 생리활성 때문에 CMP의 효과적인 분리생산을 위한 방법들이 개발되고 있으며 분리된 CMP를 첨가한 특수식품(dietetic foods)의 등장<sup>(14)</sup>이 예상된다.

CMP가 갖고 있는 생리활성 중에서 더욱 흥미로운 것은 CMP의 트립신 가수분해물 중에서 일부의 저분자량 펩타이드들이 혈소판의 응집에 대한 저해작용을 갖고 있음<sup>(6,10)</sup>이 보고 되었다. CMP는 유래된 κ-카제인의 탄수화물의 유무에 따라 어떤것은 탄수화물이 붙어 있는 것이 있는가 하면 탄수화물을 갖고 있지 않은 것도 있다. 이같은 CMP의 구조적인 차이는 트립신에 의한 CMP의 가수분해작용에도 영향을 미쳐 트립신에 의해 CMP로부터 생성된 혈소판 응집저해작용을 나타내는 펩타이드들의 종류가 다르게 나타나는 것<sup>(10)</sup>이 아닌가 추측되고 있다.

따라서 본실험에서는 탄수화물이 없는 CMP를 유청분말로 부터 분리하여 유청분말의 새로운 이용가능성을 타진하였으며 혈소판 응집저해작용을 나타내는 펩타이드를 생산하기 위해 CMP를 가수분해시킬 때 고정화 트립신을 사용하여 펩타이드 생산의 편리함을 도모하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

CMP의 분리에 사용된 감성유청분말(sweet whey powder)은 남양유업 공주공장에서 부터 공급받은 것(단백질함량 12%)을 사용하였다.

### 감성유청분말로 부터 CMP의 분리

감성유청분말을 2%(w/v) trichloroacetic acid(TCA) 용액에 녹여 CMP 이외의 단백질을 제거한 다음, 48%(w/v) TCA용액을 첨가하여 TCA의 농도를 12%(w/v)로 조절하였다. 탄수화물이 없는 CMP는 12% TCA에 용해되지 않기 때문에 9,000×g에서 30분간 원심분리 시킴으로써 분리한 다음 다시 증류수에 녹인후 Spectrum Medical Industries사의 Spectrum 투석막(M.C. 3000)에 넣어 3일간 증류수에 투석시킨 후 동결건조 하였다.

### 전기영동 및 아미노산 조성 분석

분리된 CMP의 단백질조성을 알아보기 위해 Melachouris<sup>(15)</sup>에 의한 전기 영동을 실시하였다. 표준 단백질로 사용된 카제인과 CMP를 spacer gel 용액 1 ml에 녹인후 1 ml의 증류수를 넣고 bromophenol blue용액

2방울과 10 μl의 β-mercaptoethanol를 첨가하여 시료를 제조하였으며 Tris-glycine buffer를 전극 buffer로 사용하여 200 V에서 4시간동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 10% sulfosalicylic acid와 25% TCA를 함유한 fixing용액에 1시간 담근 후 0.03% Coomassie brilliant blue로 염색한 다음 탈색용액, methanol/acetic acid/water(10/7/83)을 사용하여 탈색시켰다. CMP의 순도를 알아보기 위해서 아미노산 조성을 분석하였다. CMP를 정량하여 가수분해관에 넣고 6N HCl를 가한 다음 진공 밀봉한 후 110±1°C의 건조기에서 24시간 가수분해시켰다. LKB사 아미노산 자동분석기(Bromma, Sweden)에 의해서 가수분해시킨 CMP의 아미노산 조성을 분석하였다.

### 트립신의 고정화

트립신의 가수분해작용의 조절과 가수분해물로부터 원하는 펩타이드의 분리를 용이하게 하기 위하여 트립신을 glass beads에 Janolino와 Swaisgood<sup>(16)</sup>의 방법에 따라 고정화시켰다. 고정화에 사용된 트립신과 γ-aminopropyltriethoxysilane, succinic anhydride, 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino) propyl] carbodiimide (EDC), triethylamine은 Sigma사의 것을, 지지체로 사용된 porous glass beads (CPG)는 Electro-Nucleonics사의 것을 사용하였다. CPG에 고정화된 트립신의 양은 6 N HCl로 110°C에서 24시간 가수분해시킨 다음 Hernandez 등<sup>(17)</sup>의 o-phthalaldehyde 방법(OPA)에 의해 측정되었다.

### 수용성 및 고정화 트립신에 의한 CMP의 가수분해

CMP와 트립신의 몰비가 100 : 1이 되도록 일정량의 CMP를 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) 50 ml에 용해시켰다. 40°C로 온도가 일정하게 유지되는 column에 고정화 트립신을 넣고 연동펌프를 이용해 CMP용액을 일정한 속도로 순환시킴으로써 CMP를 가수분해시켰으며 일정 시간마다 가수분해물을 채취하여 OPA방법에 따라 트립신의 작용에 의해 새로이 생성되는 amino기를 정량함으로써 고정화 트립신에 의한 CMP의 가수분해 정도를 측정하였다. 수용성 트립신의 경우에는 CMP 가수분해를 위해 40°C로 유지되는 shaking incubator를 사용하였다.

### 가수분해물의 분획화 및 혈소판 응집억제능 측정

CMP 가수분해물은 Bio-Rad사의 Bio-Gel P4를 이용한 gel filtration법<sup>(18)</sup>에 따라 분획하였다. Bio-Gel P4를 1.5×120 cm column에 충전한 다음 증류수를 유

속 0.8 ml/min으로 흘러보냄으로써 가수분해물을 분획화하였으며 용출된 분획들을 모아 동결건조시킨 후 혈소판 응집 억제능 측정에 사용하였다. 얻어진 분획들의 혈소판 응집 억제작용은 aggregometer를 이용<sup>(9)</sup>하여 측정되었다. 혈소판 기능이 정상인 건강한 사람으로부터 채혈한 혈액과 3.8% sodium citrate(항응고제)를 9:1의 비율로 tube에 넣고 platelet rich plasma (PRP)를 얻기 위해 160×g에서 10분간 원심분리하였으며 platelet poor plasma (PPP)는 2,000×g에서 10분간 원심분리하여서 얻었다. 이때 혈소판수는 200,000-400,000/mm<sup>3</sup>가 되도록 PPP를 사용하여 조절하였다. Aggrecoeder TN PA3220을 이용하여 37°C에서 회전수 1,000 rpm으로하여 혈소판 응집억제능을 측정하였으며 응집촉진물질로는 ADP (20 μM)을 사용하였고 억제능(%)은 다음과 같은 식에 의해 계산되었다.

$$\text{inhibition}(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A: 대조구의 응집(%)

B: 시료첨가시의 응집(%)

### 결과 및 고찰

#### 분리된 CMP의 특성

유청 또는 유청분말로부터 CMP를 분리하는 방법에는 이온교환수지법<sup>(2,18)</sup>, TCA 침전법<sup>(10,19,20,21,22)</sup>, 초여과 (ultrafiltration)법<sup>(4,23)</sup> 등 여러가지가 있지만 사용하는 방법에 따라 CMP의 종류와 조성이 다를 뿐 아니라 수율에 있어서도 많은 차이가 있다. 따라서 본 실험에서는 탄수화물이 없는 CMP를 분리하기 위하여 Creamer 등

<sup>(22)</sup>과 Shammet 등<sup>(21)</sup>이 제시한 12% TCA 침전법을 사용하였으며 100 g의 감성유청분말로부터 2.7 g의 CMP를 얻었다. 분리된 CMP의 조성을 acrylamide gel 전기영동에 의해 분석한 결과 Fig. 1에 나타난 것처럼 β-casein과 비슷한 위치에 하나의 큰 band와 3개의 아주 작은 bands을 보여 주었다. 이것은 분리된 CMP가 주로 한 종류의 단백질로 구성되어 있다는 것을 말해 준다고 할 수 있다. 그러나 보다 효과적인 CMP 분리법을 개발하기 위해서는 TCA 농도에 따른 CMP 이외의 다른 단백질의 용해도와 두 종류의 CMP의 용해도에 관한 보다 정확한 정보가 필요하다고 생각된다.

전기영동상에서 CMP는 β-casein과 아주 비슷한 위치에 나타나기 때문에 단백질의 순도를 알아보기 위해 아미노산 조성을 분석하였으며 그 결과를 Table 1에 나타내었다. CMP의 아미노산 서열로부터 계산한 이론치와 비교해 볼 때 threonine, proline, serine, isoleucine이 이론치보다 적은 것으로 나타났고 proline, alanine, tyrosine, phenylalanine, histidine은 높게 나타났다. 특히 이론값에서는 0인 tyrosine, phenylalanine, histidine이 분리된 CMP에 상당히 함유된 것으로 볼 때 분리된 CMP가 κ-casein에서 chymosin에 의해 떨어져 나온 κ-casein의 C-말단에 해당되는 펩타이드이긴 하지만 분리과정에서 소량의 다른 단백질 또는 펩타이드들이 함께 분리되었음을 알 수 있다. Kawakami 등<sup>(6)</sup>과 Kawasaki 등<sup>(23)</sup>에 의하면 초여과법에 의해 분리

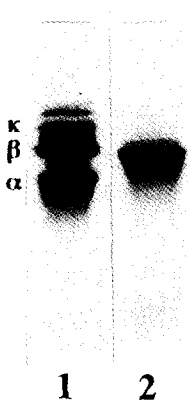


Fig. 1. The electrophoretic diagram of caseinoma-cropeptide (CMP) isolated from whey (Lane 1; whole casein, Lane 2; CMP)

Table 1. Amino acid composition of the CMP isolated from whey

Amino acid <sup>1)</sup>	Calculated(%) <sup>2)</sup>	Found(%)
Aspartic acid	8.5	7.82
Threonine	18.2	13.77
Serine	7.8	8.16
Glutamic acid	19.2	17.67
Proline	1.6	16.27
Glycine	0.9	3.31
Alanine	5.3	9.28
Cystine	0	0
Vline	8.9	8.54
Methionine	2.0	1.17
Isoleucine	10.1	7.59
Leucine	1.7	2.84
Tyrosine	0	0
Pheylalanine	0	0
Histidine	0	0.49
Lysine	5.7	3.15
Ammonia	-	∞
Arginine	0	0

<sup>1)</sup>Tryptophan were not analyzed

<sup>2)</sup>Theoretical values of CMP are based on the primary structure of CMP

된 CMP가 전기영동과 HPLC (high performance liquid chromatography)에 의한 분석에서는 하나의 펩타이드를 나타내었지만 아미노산 조성을 이론치와 비교해 보았을 때 이론치와의 사이의 5~6개 아미노산이 약간씩 차이를 보여 주었다고 하였다. 이상의 사실로 볼 때 12% TCA법에 의해 분리된 CMP는 아미노산 조성으로 볼 때 다른 단백질 또는 펩타이드들이 약간 오염되긴 하였지만, 비교적 순도가 높은 CMP에 해당되며 12% TCA침전법은 탄수화물을 갖고 있지 않은 CMP를 분리하는데 있어서 효과적인 방법임을 입증한다고 할 수 있다.

트립신에 의한 CMP의 가수분해 경향

Glass beads에 silanization과 succinylation에 의해 COOH기를 붙인 다음 EDC에 의해 COOH기를 활성화 시키고 동시에 트립신의 NH<sub>2</sub>기와 반응시켜 amide 결합에 의해 트립신을 고정화하였으며, 고정화된 트립신의 양을 6 N HCl로 가수분해시킨 후 OPA법에 의해 측정된 결과 beads 1 g당 20 mg의 트립신이 고정화되었다. 이같은 고정화 수율은 Janolino와 Swaisgood<sup>(16)</sup>이 얻은 수치와 비슷한 것으로 트립신은 효과적으로 glass beads에 고정화되었음을 말한다.

트립신이 고정화된 CPG 3 g을 column에 충전한 후 40°C에서 CMP용액을 순환시킴으로써 CMP를 가수분해하였으며 OPA법에 의해 측정된 고정화 트립신에 의한 CMP의 가수분해 경향은 Fig. 2와 같다. CMP는 6시간 이후부터 고정화 트립신에 의해 가수분해가 서서히 진행되어 24시간이 지난 후에도 여전히 CMP가

수분해는 계속 진행되고 있었다. 수용성 트립신에 의한 가수분해 경향과 비교해 볼 때 수용성 트립신은 대략적으로 24시간이 지나면 가수분해가 거의 완료되었다(Fig. 2). 즉 고정화 트립신은 수용성 트립신에 비해 기질인 CMP와의 접촉기회가 적음으로 인해서 가수분해 속도가 늦어진다고 할 수 있다. 이와 같은 결점을 해소하기 위해서는 column 대신에 fluidized bed 반응기를 사용함으로써 해결될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 CMP와 트립신의 몰비를 100 : 1에서 더욱 낮춤으로써 가수분해 시간을 단축시킬 수도 있을 것이다.

Gel filtration에 의해 혈소판 응집억제 펩타이드를 분리하기 위하여 800~4,000 dalton 펩타이드의 분리

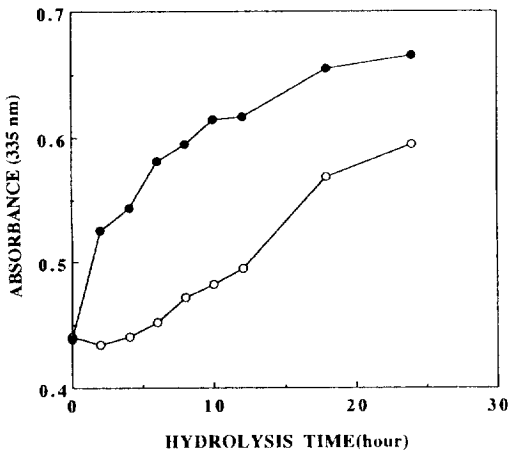


Fig. 2. The hydrolysis pattern of caseinomacropепptide (CMP) isolated from whey ●—●; soluble trypsin, ○—○; immobilized trypsin

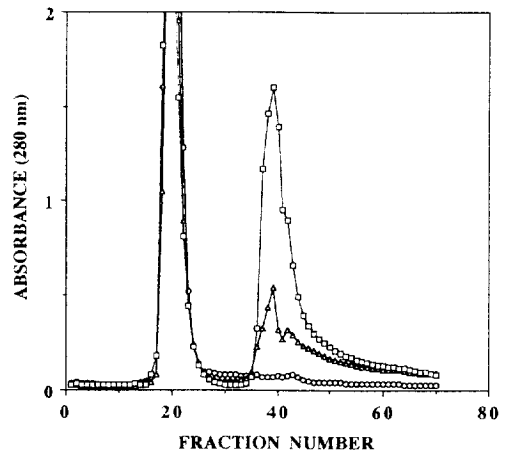


Fig. 3. Gel filtration chromatogram of CMP hydrolyzed by soluble trypsin on Bio-Gel P4 column (1.5×120 cm) ○—○; 0 hr, △—△; 12 hr, □—□; 24 hr

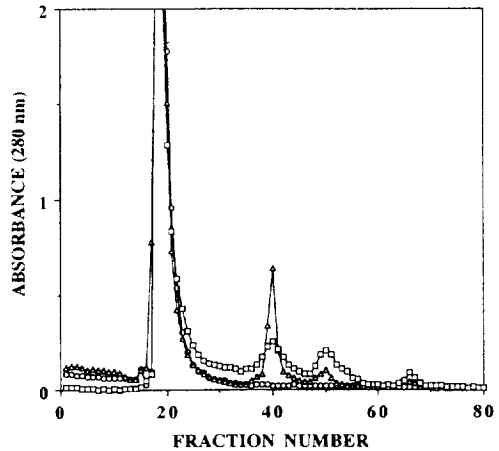


Fig. 4. Gel filtration chromatogram of CMP hydrolyzed by immobilized trypsin on Bio-Gel P4 column (1.5×120 cm) ○—○; 0 hr, △—△; 12 hr, □—□; 24 hr

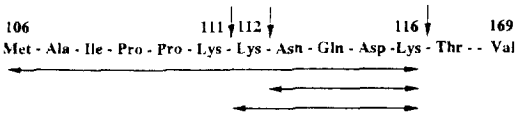


Fig. 5. Tryptic cleavage sites of caseinomacropeptide and peptides inhibiting platelet aggregation<sup>(10)</sup>

능이 있는 Bio-Gel P4를 사용하였으며 이에 의해 얻어진 결과가 Fig. 3과 4에 나타나 있다. CMP는 분자량이 4,000 이상의 펩타이드로 되어 있으나 12시간 가수분해 후에는 3개의 peaks를 보여주었다. 즉 일정시간이 지난 후에야 트립신의 작용에 의해 생긴 저분자량의 펩타이드들을 측정할 수 있었으며 24시간 가수분해시킬 경우 고정화 트립신은 2번째 peak와 3번째 peak가 합쳐져서 거의 하나의 peak로 나타났으나 수용성 트립신은 3개의 peak를 보여 주었다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 트립신은 CMP를 3부위에서 가수분해시킬 수 있는데 Leonil과 Molle<sup>(10)</sup>와 Bouhallab 등<sup>(24)</sup>의 연구에 의하면 111-112결합과 112-113결합은 116-117결합에 비해 쉽게 가수분해 된다고 한다. 트립신의 가수분해에 의해서 CMP로부터 생길수 있는 펩타이드의 종류는 106-116, 117-169, 106-111, 112-116, 106-112, 113-116, 112-169, 113-169 펩타이드의 8종류가 있는데 이 중에서 분자량 1,300 dalton이하의 저분자량 펩타이드는 5가지이며 나머지 3종류의 펩타이드는 분자량 5,000 dalton이상의 펩타이드에 해당된다. Maubois 등<sup>(25)</sup>에 의하면 5종류의 저분자량 펩타이드 중에서 112-116, 113-116, 106-116 펩타이드가 혈소판 응집 저해작용을 갖고 있는 것으로 알려져 있는데 본 실험에서 사용된 Bio-Gel P4에 의해서 이들을 크기별로 분획화하는 것은 어렵지만 Fig. 3과 4에 나타난 바와 같이 분자량 5,000 dalton 이상의 펩타이드로부터 분자량 1,300이하의 펩타이드를 성공적으로 분리할 수 있음을 알 수 있다. 표 2에 나타난 저분자량 펩타이드의 혈소판 응집 저해작용을 보면 수용성 트립신의 경우 24시간 가수분해물만이 혈소판 응집 저해작용을 보여 주었고 고정화 트립신은 12, 24시간 가수분해물이 혈소판 응집 저해작용을 갖고 있었으며 수용성 트립신에 의한 가수분해물보다 높은 저해작용을 보여 주었다. 이와같은 결과는 트립신을 고정화시켜서 사용하는 것이 CMP로부터 혈소판 응집 저해작용을 갖는 기능성 펩타이드를 생산하는데 있어서 효과적임을 말해 준다고 할 수 있다. 그러나 고정화트립신에 의한 가수분해물중에서 혈소판 응집 저해작용을 나타내는 펩타이드들이 어떤 것들이며 이들의 효율적인 생산을 위해서는 보다 더 체계적인 연구가 필요하다고 생각된다.

Table 2. Effects of fractionated peptides obtained from whey on the ADP-stimulated aggregation of human platelets

Fraction	Inhibition(%)					
	Soluble trypsin			Immobilized trypsin		
	0	12	24(hr)	0	12	24(hr)
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	14.7	52.5
3	0	0	28.1	0	23.9	0
4	0	0	0	0	0	0

## 요 약

탄수화물을 갖고 있지 않은 caseinomacropeptide (CMP)를 감성유청분말로 부터 12% TCA법에 의해 분리한 결과 100 g의 감성유청분말로 부터 2.7 g을 얻을 수 있었다. 분리된 CMP는 전기영동과 아미노산 조성을 분석한 결과 매우 순도가 높은 CMP로 나타나 12% TCA침전법은 감성유청분말로 부터 CMP를 분리하는 효과적인 방법임을 알 수 있었다. 트립신을 pore glass beads에 carbodiimide (EDC) 방법으로 amide결합에 의해 고정화시켰으며 고정화된 트립신의 양은 1 g glass beads당 20 mg이었다. 수용성 트립신에 의한 CMP 가수분해는 24시간이 지나면 거의 완료되었으며 고정화 트립신은 24시간이 지난 후에도 가수분해가 진행되고 있었다. 가수분해물을 Bio-Gel P4 column에 의해 분획한 후 혈소판 응집 저해작용을 측정된 결과 고정화 트립신에 의해 24시간 가수분해시킨 CMP 분해물이 가장 높은 혈소판 응집 억제능을 보였다.

## 감사의 글

이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 이형주 : 식품산업에서의 whey의 이용. 한국낙농학회지, 5, 106 (1988)
2. Saito, T., Yamaji, A and Itoh, T.: A new isolation method of caseinoglycopeptide from sweet cheese whey. J. Dairy Sci., 74, 2831 (1991)
3. Vreeman, H.J., Visser, S., Slangen, C. and Van Riel, J. A.M.: Characterization of bovine  $\kappa$ -casein fraction and the kinetics of chymosin-induced macropeptide release from carbohydrate-free and carbohydrate-containing fractions determined by high-performance gel-permeation chromatography. Biochem. J., 240, 87 (1986)

4. Kawasaki, Y., Kawakami, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Tomizawa, Y., Kotake, M. and Nakajima, I.: pH-dependent molecular weight changes of  $\kappa$ -casein glycomacropeptide and its preparation by ultrafiltration. *Milchwissenschaft*, **48**, 191 (1993)
5. Aleink, S.I.: Study of the  $\kappa$ -casein peptide action on rat gastric secretion by using automatic quantitative recording of acid production. *Fiziol. Zh. SSSR Im. I. M. Sechenova*, **72**, 685 (1986)
6. Aleink, S.I., Stan, C.Y. and Cherinkov, M.P.: Study of the mechanism of acid secretion inhibition and  $\kappa$ -casein peptides in the stomach. *Fiziol. Zh. SSSR Im. I. M. Sechenova*, **72**, 799 (1986)
7. Stan, C.Y. and Zhuravlev, B.V.: Isolation, amino acid composition and biological effect of a peptide bioregulator from bovine  $\kappa$ -casein. *Byull. Eksp. Biol. Med.*, **102**, 652 (1986)
8. Stan, C.Y. and Elkimovskii, A.P.: Peptidic bioregulator from cow  $\kappa$ -casein. *Vopr. Med. Khim.*, **33**, 111 (1987)
9. Jolles, P., Levy-Toledano, S., Fiat, A.M., Soria, C., Gillissen, D., Thomaidis, A., Dunn, F.W. and Caen, J.P.: Analogy between fibrinogen and casein : Effect of an undecapeptide isolated from  $\kappa$ -casein on platelet function. *Eur. J. Biochem.*, **158**, 379 (1986)
10. Leonil, J. and Moole, D.: Liberation of tryptic fragments from caseinomacropeptide of bovine  $\kappa$ -casein involved in platelet function. *Biochem. J.*, **271**, 247 (1990)
11. Azuma, N., Yamauchi, K. and Mitsuoka, T.: Bifidus growth-promoting activity of glycomacropeptide derived from human  $\kappa$ -casein. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2159 (1984)
12. Neeser, J.R., Chambaz, A., Vedovo, S.D., Prigent, M.J. and Guggenheim, B.: *Infect. Immun.*, **56**, 3201 (1988)
13. Kawasaki, Y., Isoda, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Ido, T. and Ahiko, K.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 195 (1992)
14. Tanimoto, M., Kawasaki, Y., Dosako, S. and Ahiko, K.: Large-scale preparation of  $\kappa$ -casein glycomacropeptide from rennet casein whey. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 140 (1992)
15. Melachouris, N.: Discontinuous gel electrophoresis of whey proteins, casein and clotting enzymes. *J. Dairy sci.*, **52**, 456 (1969)
16. Janolino, V.G. and Swaisgood, H.E.: Analysis and optimization of methods using water-soluble-carbodiimide for immobilization of biochemicals to porous glass. *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1069 (1982)
17. Hernandez, M.J.M., Bonet Domingo, E., Camanas, R.M. V. and Alvarez-Coque, M.C.G.: Use of the *o*-phthalaldehyde and N-acetyl-L-cysteine reagent in the evaluation of milk proteins. *J. Dairy Sci.*, **74**, 1779 (1991)
18. Otani, H., Monnai, M. and Hosono, A.: Bovine  $\kappa$ -casein as inhibitor of the proliferation of mouse splenocytes induced by lipopolysaccharide stimulation. *Milchwissenschaft*, **47**, 593 (1992)
19. Morr, C.V., Seo, A.: Fractionation and characterization of glycomacropeptide from caseinate and skim milk hydrolysate. *J. Food Sci.*, **53**, 80 (1988)
20. Shammet, K.M., Brown, R.J. and McMahon, D.J.: Proteolytic activity of proteinases on macropeptide isolated from  $\kappa$ -casein. *J. Dairy Sci.*, **75**, 1380 (1992)
21. Shammet, K.M., McMachon, D.J. and Brown, R. J.: Characteristics of macropeptide fraction isolated from whole casein and purified  $\kappa$ -casein. *Milchwissenschaft*, **47**, 615 (1992)
22. Creamer, L.K., Wheelock, J.V. and Samuel, D.: *Biochem. Biophys. Acta*, **317**, 202 (1973)
23. Kawakami, H., Kawasaki, Y., Dosako, S., Tanimoto, M. and Nakajima, I.: Determination of  $\kappa$ -casein glycomacropeptide by high performance liquid chromatography without trichloroacetic acid pretreatment. *Milchwissenschaft*, **47**, 688 (1992)
24. Bouhalab, S., Molle, D. and Leonil, J.: Tryptic hydrolysis of caseinomacropeptide in membrane reactor: preparation of bioactive peptides. *Biotechnology Letters*, **14**, 805 (1992)
25. Maubois, J.L., Leonil, J., Trouve, R. and Bouhallab, S.: Milk peptides with cardiovascular activity: Antithrombotic and antihypertensive. *Lait*, **71**, 249 (1991)

---

(1995년 8월 28일 접수)