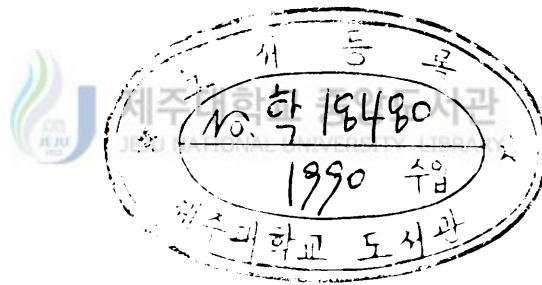


서
624.42
79510
=3

碩士學位論文



電氣泳動法을 利用한 濟州在來馬乳 蛋白質의 特性研究



濟州大學校 大學院
畜産學科

高 彰 完

1986年 12月

電氣泳動法을 利用한 濟州在來馬乳 蛋白質의 特性研究

指導教授 李 賢 鍾

高 彰 完

이 論文을 農學碩士學位 論文으로 提出함.

1986年 12月 日

高彰完의 農學碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____

委 員 _____

委 員 _____

濟州大學校 大學院

1986年 12月 日

**STUDIES ON ELECTROPHORETIC
CHARACTERISTICS OF PROTEINS
IN CHEJU NATIVE MARE'S MILK**



Chang-Oan Ko
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

(Supervised by Professor Hyun-Jong Lee)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF ANIMAL SCIENCE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1986

目 次

Summary	1
I. 緒 論	2
II. 研 究 史	4
III. 材 料 및 方 法	7
1. 實 驗 材 料	7
2. 酸 casein 의 調 製	7
3. 乳 清 蛋 白 質 의 調 製	7
4. 酸 casein 및 乳 清 蛋 白 質 의 PAGE 調 査	7
5. 乳 清 蛋 白 質 의 SDS - PAGE 調 査	8
6. Densitometry 에 의한 電 氣 泳 動 樣 相 調 査	9
7. k - casein 의 分 離	9
IV. 結 果 및 考 察	11
V. 摘 要	22
參 考 文 獻	23

Summary

This study was carried out to determine the physico-chemical properties of milk protein of Cheju native mare milk using polyacrylamide gel and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and to obtain fundamental information for the preservation of Cheju native horse.

The results obtained are summarized as follows;

1. Whey protein of Cheju native mare's milk were separated on polyacrylamide gel electrophoresis into immunoglobulin, serum albumin, α -lactalbumin, β -lactoglobulin, whey₁ protein.
 - 1) The whey₁ protein showed four variable bands which were considered to be different types (A, B, C and D).
 - 2) Seven whey₁ phenotypes (AA, BB, AB, AC, BD, BC and CD) were observed. The distribution of AA, AB and BB was 13.4%, 40% and 13.4%, respectively, and that of the other individual phenotypes was less than 10%.
2. Casein of Cheju native mare's milk was separated into three major components α_s -, β - and κ -casein on polyacrylamide gel electrophoresis.
 - 1) α_s -casein zone was found in a short distance with 4-7 zones.
 - 2) The ratio of α_s -casein to β -casein was 1:1.3 and similar to that reported on thoroughbred mare milk (1:1.6) but higher than that β -casein found in Holstein cow's milk (1:0.6).
 - 3) κ -casein was found the form of a polymer held together by intermolecular disulfide bond.
3. Whey protein of Cheju native mare's milk were separated on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis into 7 bands. The molecular weights correspond to approximately 66,500, 66,000, 65,000, 59,500, 19,500, 16,500, 12,000 daltons, respectively.

I . 緒 論

말(*Eguus caballus L.*)은 約 6,000 萬年前 第三期 始新世 初期에 北아메리카에서 發生하여 B.C. 3,000~2,400年 經인 靑銅期時代 黑海의 北部沿岸地帶에서 家畜化 된 것으로 알려져 있다(李, 1984).

韓國在來馬는 Tarpan系인 小型馬가 基礎를 이루고 蒙古系의 中型馬가 北方로 부터 導入 交雜되어 이루어진 것으로 推定하고 있고 그후 계속적으로 蒙古馬 등 北方系馬와 Arab系의 西域馬가 導入 되면서 交雜化 過程을 거치는 동안 韓國의 風土에 適應한 고유의 品種으로 成立 되었다고 보고 있다(姜, 1969).

濟州道는 古來로 부터 한국 唯一의 馬生産地로 利用 되었는데 濟州在來馬는 본래 棲息하고 있던 것을 家畜化 시킨 것이 아니고 大陸으로부터 流入된 馬가 장기간 濟州道의 지역 여건에 적응하여 純度높은 家畜으로 定着되었다고 推定하고 있다(鄭등, 1985).

우리나라 말(馬)의 飼育頭數 變遷은 제 2차 세계대전때인 1944년 일제의 병참기지 정책으로 83,000余頭까지 軍事用, 農耕用 및 貨物の 운반수단 등으로 많이 飼育되었으나 6.25사변등의 혼란 및 그후 농업의 기계화로 말의 경제적 가치가 하락되어 1960~1967年 사이에 20,000余頭로 감소 하였고 1985년에 와서는 3,000頭만이 飼育되고 있는 實情이며 品種別로는 改良種이 1,371頭 在來種이 1,563頭이다(農林水産 統計年報, 1986; 畜協調査季報, 1986). 현재(1985年)在來馬 1,563頭中 1,398頭(89%)가 濟州道에서 飼育되고 있으나 改良種과의 交雜으로 純度높은 濟州在來馬는 점차 감소되고 있는 실정이다. 그러나 文化公報部에서는 在來家畜의 保存과 家畜文化財로서의 純度높은 濟州在來馬 保存을 위해 외모심사 및 血統分析(鄭등, 1985)을 통하여 濟州在來馬 64頭(♀55頭, ♂9頭)를 순수 濟州在來馬로 선정, 天然記念物 第347號로 指定(1986. 2. 11)하여 濟州道 畜産開發事業所에서 保存 繁殖 시키고 있다(文化公報現況, 濟州道, 1986).

따라서 本 研究는 現在까지 거의 研究되어 있지 않은 濟州在來馬 乳成分의 理化學的 諸性狀中 蛋白質을 대상으로 PAGE (polyacrylamide gel electrophor -

esis) 및 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-PAGE)를 利用하여 改良馬
인 Thoroughbred 種과 比較 究明하여 濟州在來馬 品種保存에 基礎資料를 提供코
져 實施하였다.



II. 研究 史

牛乳蛋白質은 脫脂乳에 酸을 添加하여 20℃에서 pH4.6으로 調整했을때 沈澱하는 casein과 沈澱하지 않는 乳清蛋白質로 大別되며 (Jenness et al, 1956 ; Thompson et al, 1965) 종래 단일 성분으로 생각되던 것이 蛋白質 分離方法의 進歩에 따라 여러 成分의 混合物임이 밝혀졌다.

즉, 牛乳 casein에 관해 Linderstrom-lang(1925)이 最初로 그 不均一性을 示唆한 以來 Mellander (1939)가 Tiselius 自由界面 電氣泳動法에 의해 casein이 3가지 成分으로 構成되어 있음을 관찰하고 移動도가 빠른 順으로 α -casein (α -Cn), β -casein (β -Cn) 및 γ -casein (γ -Cn)으로 命名하였다.

그후 Waugh and Von Hippel(1956)은 종래 均일한 成分으로 생각 되었던 α -casein을 calcium 처리에 의해 沈澱하지 않고 casein micelle의 安定性에 關係하는 重要한 部分을 分離해서 이를 k-casein(k-Cn)이라고 命名하고 나머지 즉 calcium에 의해 沈澱하는 部分을 α_s -casein (α_s -Cn)이라고 하였다.

그 이후 牛乳 casein에는 α_{s1} -Cn, α_{s2} -Cn, β -Cn, k-Cn으로 構成되어 있고 乳清蛋白質은 β -lactoglobulin (β -Lg), α -lactalbumin (α -La), serum albumin (SA), immunoglobulin (Ig) 등이 主成分을 이루고 있음이 밝혀졌다(Eigel et al, 1984).

한편 乳蛋白質의 遺傳的 變異體에 관해서는 Aschaffenburg and Drewry (1957)가 最初로 β -Lg에 A, B 두 종류의 遺傳的 變異體의 存在를 報告한 以來 paper, starch gel, agar gel, polyacrylamide gel 電氣泳動法에 의해 α_{s1} -Cn에는 A, B, C, D, E (Schmidt et al, 1963; Thompson et al, 1964, 1971 ; Kiddy, 1975 ; Grosclaude et al, 1976, 1979)가, α_{s2} -Cn에는 A, B, C, D (Grosclaude et al, 1978, 1979)가, β -Cn에는 A¹, A², A³, B, C, D, E (Kiddy, 1975)의 變異體가 存在함을 확인하였으며 k-Cn에는 A, B (Nellin, 1964 ; Schmidt, 1964 ; Woychilk, 1964), β -Lg에는 A, B, C, D, E, F, G (Aschaffenburg, 1968 ; Bell et al, 1970, 1981 ; Grosclaude et al, 1976 ; Peterson, 1963) 및 α -La에는 A, B, C 3 종류의 變異體가 보고되어 있다

(Bhattacharya et al, 1963; Aschaffenburg, 1963).

이상의 遺傳的 變異體들은 Mendel의 遺傳法則에 따라 常同染色体上에 共優性 homozygote 對立 遺傳子에 의해 지배되고 그외에 heterozygote로 存在하는 것이 알려져 있다(Aschaffenburg, 1968).

한편 馬乳에 관한 研究로는 一般成分 分析에서 Przewalsk 馬乳의 總固形分, 脂肪, 無脂固形分, 蛋白質, 乳糖 및 灰分은 各各 10.5%, 2.5%, 8.3%, 2.0%, 6.1%와 0.4%이고 Arab 馬乳는 總固形分이 11.2%, 脂肪 1.9%, 無脂固形分 9.3%, 蛋白質 2.5%, 乳糖 6.2%와 灰分 0.5%라고 하였으며 牛乳에 비해 脂肪含量은 낮으나 乳糖含量은 높다고 하였다(Ullrey et al, 1966). 또한 馬乳 乳清蛋白質의 組成은 Ig, SA, β -Lg, α -La로 構成 되어있고(Kudryashov and Krybova, 1966; Kingsbury, 1975) 그중 β -Lg는 pH 2.0의 酸性條件에서 電氣泳動時 A, B 2가지 형태의 band가 存在한다고 하였다(Macha and Novackova, 1975). 그 후 分離方法의 進歩에 따라 Kingsbury and Gaunt(1977)는 馬乳 乳清蛋白質에는 β -Lg, α -La, SA, Ig 외에 牛乳에는 存在하지 않고 馬乳에만 들어있는 成分이 있음을 확인하여 whey₁ protein으로 命名하고 이 whey₁ protein에는 A, B, C, D 4가지 형태의 band가 존재 한다고 보고 하였다.

馬乳 casein의 組成은 α_s -, β -, γ -, k-casein으로 構成되어있음이 처음으로 보고된(Kudryashov and Krybova, 1966)이래 Kingsbury(1975)는 馬乳 casein을 α_s -casein과 β -casein으로 分離하고 β -casein은 β_1 과 β_2 로 分離되며 β_2 에는 A, B, C, D 4가지 형태의 band가 存在한다고 발표하였다.

또한 Lauer and Baker(1972)는 馬乳 α_s -, 및 β -casein은 牛乳와 分子量의 크기가 비슷하고 O'Connor and Fox(1973)는 α_s -casein 區分에서 7개의 band로 분리하였고, 牛乳의 α_s -casein과 移動도는 비슷하나 α_s -casein과 β -casein의 含量比는 牛乳의 1:0.6에 비해 馬乳는 1:1.6으로 β -casein 含量이 높다고 하였다.

Chiofalo et al(1983)은 urea를 含有한 pH 8.6의 starch gel 電氣泳動으로 改良馬 casein 및 乳清蛋白質을 各各 4개의 band로 分離하였다. casein은 제일 빠른 band에서 여러개의 band가 관찰되었고 나머지 3개의 分離帶는 各各 2개의 band로 나타났다. 乳清蛋白質은 α -La, β -Lg, SA 順으로 分離되며

casein 및 乳清蛋白質의 電氣泳動 樣相을 牛乳와 比較할 때 移動도가 서로 다르다고 하였다.

한편 Baker and Lauer (1971)는 改良馬 casein의 炭水化物的 組成을 分析한 結果 nitrogen 15.9%, total hexose 0.43%, hexosamine 0.17%, sialic acid 0.18%로 構成되어 있으며, Morrissey (1973)은 馬乳汁中 sialic acid는 牛乳의 17.7mg/100ml에 비해 0.1mg/100ml으로 매우 낮고 casein中的 sialic acid 含量도 牛乳의 14.2mg/100ml에 비해 3.1mg/100ml으로 매우 낮다고 발표하였다.

Lauer and Baker (1977)는 馬乳 casein의 아미노산 組成을 分析한 結果 glycine을 제외한 全아미노산 含量이 牛乳에 비해 낮다고 하였다. 그리고 O'Connor and Fox (1977)는 馬乳의 蛋白質 및 無機物 含量은 casein 1.33%, NCN (non-casein-nitrogen) 1.48%, soluble Pi 4.86 mM, colloidal Pi 9.23 mM, soluble Ca 12.6 mM, collidal Ca 15.98 mM, colloidal Ca casein 12.33 mM, collidal casein 17.11 mM 이었으며 casein과 NCN의 含量比는 牛乳의 2~3 : 1에 비해 馬乳는 1 : 1이라고 하였다.

한편 濟州在來馬에 관해서는 金 (1984)이 一般成分을 分析, 總固形分 10.15%, 無脂固形分 9.2%, 脂肪 0.98%, 蛋白質 2.62%, 乳糖 5.96%, 灰分 0.92%로 改良馬乳에 비해 脂肪含量은 낮으나 그의 總固形分, 蛋白質, 乳糖, 灰分은 비슷하다고 하였다. 그리고 李와 金 (1985)은 電氣泳動, Sepharose 6B™ 여과 및 DEAE-cellulose를 利用하여 濟州在來馬 casein을 分析한 結果 casein의 主成分은 α_s -, β -, k-casein이고 改良馬 및 牛乳 casein과 移動도가 비슷하며 Sepharose 6B™ (Pharmacia, Sweden) 여과에 의해서 3개의 分劃을 얻었고 DEAE-cellulose column을 통해서는 5개의 分劃을 얻었다.

Ⅲ. 材料 및 方法

1. 實驗材料

供試材料; 濟州在來馬 15 頭(天然記念物 第 347 號), 改良馬 2 頭(Thorou-ghbred 種), 乳牛 2 頭(Holstein) 計 19 頭를 擇하였고 個體別 手搾乳하여 試料로 利用하였다.

2. 酸 casein의 調製

試料를 3,000 rpm에서 20 分間 遠心分離하여 얻어진 脫脂乳에 0.5 N HCl를 添加하여 pH 4.6에서 沈澱시키고 上澄液을 제거한 후 알코올, 아세톤, 에탄 順으로 處理하여 試料로 利用하였다.

3. 乳清蛋白質의 調製

脫脂乳에 0.5 N HCl을 添加하여 pH 4.6에서 casein을 沈澱시키고 上澄液을 2,000rpm에서 20 分間 遠心分離 시킨후 여과하여 그 여액을 試料로 利用하였다.

4. casein 및 乳清蛋白質의 PAGE 調査

Casein의 PAGE는 Thompson et al (1964)의 方法을 일부 변경한 4 M urea, 8%(W/V) acrylamide, 0.213%(W/V) N, N'-methylene-bis-acrylamide, 0.05%(V/V) N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), 0.075% ammonium persulfate를 0.375 M tris-HCl (pH 8.9) 완충액에 포함된 용액으로 running gel을 사용하였으며 stacking gel은 3.75%(W/V) acrylamide, 0.1%(W/V) N, N'-methylene-bis-acrylamide, 0.05%(V/V) TEMED, 0.005% riboflavin이 포함된 0.125 M tris-HCl (pH 6.8) 완충액을 사용하였다.

전극용 완충액은 6g tris, 28g glycine을 증류수 1000ml에 溶解하여 pH 8.6으로 調整하고 사용시 10배 희석 하였다. 試料는 酸 casein 10 μ g을 4 M urea를 함유한 0.375 M tris-HCl (pH 8.9) 완충액에 용해시키고 30 μ l을 取하여 泳動시켰으며 電氣泳動은 vertical slab gel 장치(Korea Manhattan co.)

로 $4 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 V, 30 mA 正電壓하에서 약 3시간 동안 展開시켰으며 泳動이 끝난 gel 은 1% amido black 용액 (3.0g amido black, 50ml acetic acid, 250 ml methanol)에서 30분간 染色 시켰고 脫色은 7% acetic acid 용액에서 分離帶가 선명히 보일때까지 실시했다.

乳清蛋白質의 PAGE는 Kiddy and Rollins (1973)의 方法에 따라 실시했는데 즉, 7% (W/V) acrylamide, 0.186% (W/V) N, N' - methylene - bis - acrylamide, 0.01% (V/V) TEMED, 0.01% (W/V) ammonium persulfate가 함유된 0.38 M tris - HCl (pH 8.9) 완충액으로 running gel 을 사용하였으며, stacking gel 은 4% (W/V) acrylamide, 0.1% (W/V) N, N' - methylene - bis - acrylamide, 0.01% (V/V) TEMED, 0.01% (W/V) ammonium persulfate가 포함된 0.06 M tris - HCl (pH 6.8) 완충액을 사용하였다.

전극용 완충액은 1.2g tris, 5.8g glycine 을 증류수 2000ml 에 용해시킨후 pH 8.3 으로 調整하여 사용하였고 試料는 乳清蛋白質 1ml 에 전극용 완충액 0.5ml, sample dye maker (0.5ml Amido Black, 250ml 60% methanol, 150g sucrose) 0.3ml 을 혼합한후 40 μ l 을 取하여 泳動시켰다.

泳動은 $4 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 조건에서 試料를 running 하기 전에 100 V에서 1시간 pre-running 한후 試料를 넣고 30mA, 200 V에서 약 2시간 동안 展開시켰으며 泳動이 끝난 gel 의 染色 및 脫色은 casein의 PAGE에서와 同一한 方法으로 실시했다.

5. 乳清蛋白質의 SDS - PAGE 調査

Denaturing 電氣泳動에 의한 乳清蛋白質의 관찰은 Laemmli (1970)의 方法에 따라 실시 했는데 10% (W/V) acrylamide, 0.1% (W/V) N, N' - methylene - bis - acrylamide, 1% (W/V) SDS, 0.05% (V/V) TEMED, 0.075% (W/V) ammonium persulfate가 0.375 M tris - HCl (pH 8.9) 완충액에 포함된 용액으로 running gel 을 사용하였으며 stacking gel 은 3.75% (W/V) acrylamide, 0.1% (W/V) N, N' - methylene - bis - acrylamide, 0.1% (W/V) SDS, 0.075% (V/V) TEMED, 0.01% (W/V) ammonium persulfate가 포함된 0.125 M tris - HCl (pH 6.8) 완충액을 사용하였다.

전극용 완충액은 tris 30g, glycine 144g, SDS 10g 을 증류수 1000ml 에 용해한 후 사용시 10 배희석하여 사용하였다.

試料는 乳清蛋白質 0.5ml 를 0.0625 M tris-HCl (pH 6.8) 완충액에 2% (W/V) SDS, 10% (W/V) sucrose, 5% (V/V) 2-mercaptoethanol 을 함유한 용액에 용해 시킨다음 100°C에서 5분간 denaturing 시킨후 30 μ l 을 취하여泳動시켰다.

標準蛋白質은 bovine serum albumin (BSA, 66,000 daltons), egg albumin (EA, 45,000 daltons), pepsin (PEP, 34,700 daltons), trypsinogen (TRY, 24,000 daltons), β -lactoglobulin (β -Lg, 18,400 daltons), lysozyme (LYS, 14,300 daltons) 이 혼합된 蛋白質 (Dalton Mark VI, Sigma chemical co.) 을 試料用 완충액 1ml 에 1mg 을 용해 시킨후 100°C에서 5분간 denaturing 시킨다음 30 μ l 을 取하여泳動 시켰다.

泳動은 $4 \pm 2^\circ\text{C}$, 200 V, 30 mA 正電壓에서 4시간 展開 시켰으며泳動이 끝난 gel 은 50% trichloroacetic acid 용액에서 24시간 고정시킨 후 coomassie brilliant blue R 용액 (0.02% coomassie brilliant blue, 50% trichloroacetic acid) 에 1시간 染色시키고 脫色은 7% acetic acid 용액에서 蛋白質帶가 보일때 까지 실시하였다.

6. Densitometry에 의한 電氣泳動 樣相 調査

各各의 電氣泳動 gel 은 densitometer scanner (Helena, Quick Scan, Model No. 1020, U. S. A) 를 使用하여 흡수 스펙트럼을 調査 하였으며, 分析條件은 slit ; $0.2 \times 2 \text{ mm}$, wavelength ; 590 nm, chart speed ; 1.6 cm/sec, scan speed ; 2.5 cm/sec 로 하였다.

7. k-casein의 分離 및 精製

k-casein의 分離 및 精製는 Fig.1과 같이 Zittle and Cluster (1963) 의 方法에 따라 全 casein 으로 부터 粗 k-casein 을 分離하고 ethanol 로 5회 반복 精製했다.

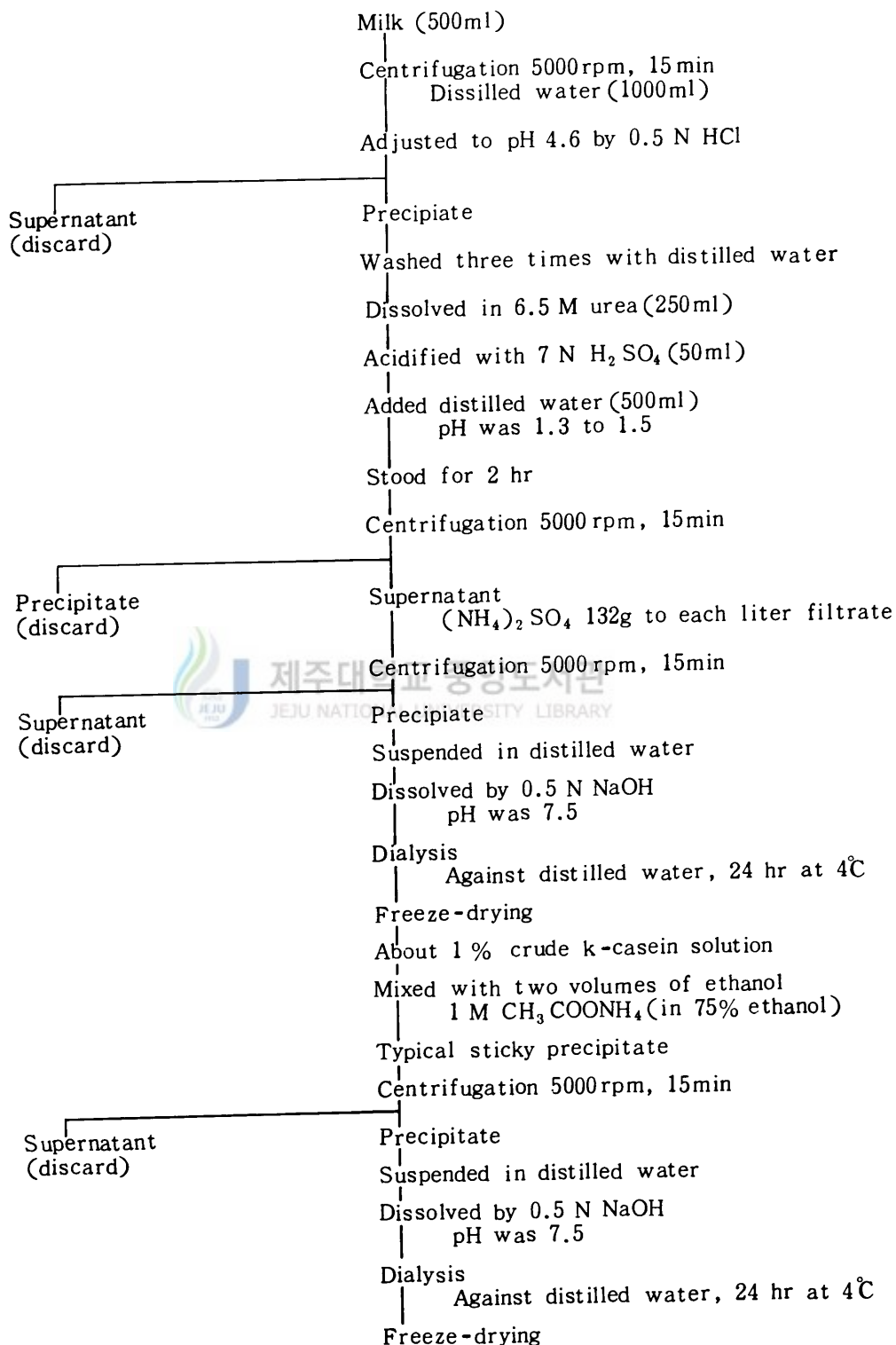


Fig.1. Flow sheet of preparation of k-casein

IV. 結果 및 考察

1. 乳清蛋白質의 PAGE 調査

濟州在來馬 乳清蛋白質의 構成成分 및 電氣泳動 樣相을 究明하기 위하여 pH 8.9의 7% acrylamide gel에서 電氣泳動을 實施하여 이를 牛乳(Holstein) 및 改良馬乳(Thoroughbred種)와 比較한 結果를 Fig.2에 나타내었다.

馬乳 乳清蛋白質은 電氣泳動法에 의해 移動度 順으로 β -Lg, α -La, SA, Ig로 分離되며(Kudryashov and krybova, 1966) 그 외에 牛乳에는 存在하지 않고 β -Lg보다 移動도가 빠른 whey₁ protein이 확인 되었다(Kingsbury and Gaunt, 1977).

Fig.2에서 나타난 바와 같이 濟州在來馬 乳清蛋白質을 構成하는 主成分은 β -Lg, α -La, SA, Ig, whey₁ protein 임이 확인되었다. 이와같은 결과는 Kudryashov and Krybova(1966)가 馬乳 乳清蛋白質에서 α -La, β -Lg, SA, Ig로 構成되어 있다는 보고와 Kingsbury and Gaunt(1977)가 馬乳에는 牛乳에 存在하지 않는 whey₁ protein이 존재 한다는 報告와 일치하였다. 그러나 移動도에 있어서 Chiofalo et al(1983)은 urea를 처리한 pH 8.6의 starch gel 電氣泳動에서 α -La이 β -Lg보다 移動도가 빠르다고 한 반면 Kingsbury and Gaunt(1977)의 報告와 本 研究 結果는 β -Lg이 α -La보다 移動도가 빠르게 나타나서 차이를 보였는데 이는 Morr(1967) 및 Melachouris and Tuckey(1966)가 報告한 試料 및 gel에 urea를 처리하면 disulfide基 분자內的 轉換反應에 따라서 移動도가 달라진다는 것과 연관성이 있는 것으로 생각된다.

또한 Fig 2에서 濟州在來馬(1)는 牛乳 乳清蛋白質(2)에 비해서 電氣泳動上 β -Lg 및 α -La의 移動도가 느린데 이와같은 結果는 Chiofalo et al(1983)가 牛乳와 馬乳의 乳清蛋白質은 移動도가 다르다는 報告와 本 實驗의 改良馬 乳清蛋白質(3)의 結果와 일치 하였다. 그리고 各 乳清蛋白質을 구성하는 成分의 含量比에 있어서 차이가 있었으며 또한 在來馬에는 存在하는 whey₁ protein이 牛乳에서는 나타나지 않음을 알 수 있었다.

濟州在來馬(1)와 改良馬(3) 사이에 α -La, β -Lg, SA, Ig는 電氣泳動上 移動度의 차이는 없었으나 whey₁ protein의 band數는 改良馬에서는 1개, 濟州在來馬는 2개가 나타나 차이를 보였다. 따라서 濟州在來馬와 改良馬간에 whey₁ protein의 差異를 더 明確히 究明하기 위해 濟州在來馬 乳清蛋白質을 個體別로 電氣泳動을 실시, 그 結果를 Fig.3에 나타내었다.

Fig.3에서 whey₁ protein은 A, B, C, D 4가지 형태의 band가 存在하고 있어 Kingsbury and Gaunt(1977)가 보고한 改良馬 whey₁ protein은 4가지 형태의 band 즉 A, B, C, D가 存在한다는 報告와 本 研究 結果와 일치하였고 各 表現型에 있어서는 AA, AB, BB, BD, CD, AC, BC 型 모두 7개가 出現됨을 알 수 있었다.

다음 Fig.4는 사진에 나타난 whey protein의 表現型을 模式圖로 나타냈는데 移動度 順에 따라 A, B, C, D 4가지 형태의 band가 2개의 homo型 band, 5개의 hetero型 band로 7개의 表現型이 나타남을 재확인 할 수 있었다.

Table 1은 表現型別 出現分布를 調査한 結果, 供試 濟州在來馬 15頭中 AB型이 6頭(40%)로 가장 많았고 AA, BB型은 각각 2頭(13.4%), 그밖의 表現型은 各各 1頭(6.7%)였다. 그러나 homo型인 CC, DD 및 hetero型인 AD型은 나타나지 않았으나 앞으로 나머지 天然記念物로 指定된 濟州在來馬 40頭를 전부 調査한 후에야 순수 濟州在來馬 乳清蛋白質中 whey₁ protein의 變異體에 關係 綜合적인 結論을 내릴 수 있을 것으로 사료된다.

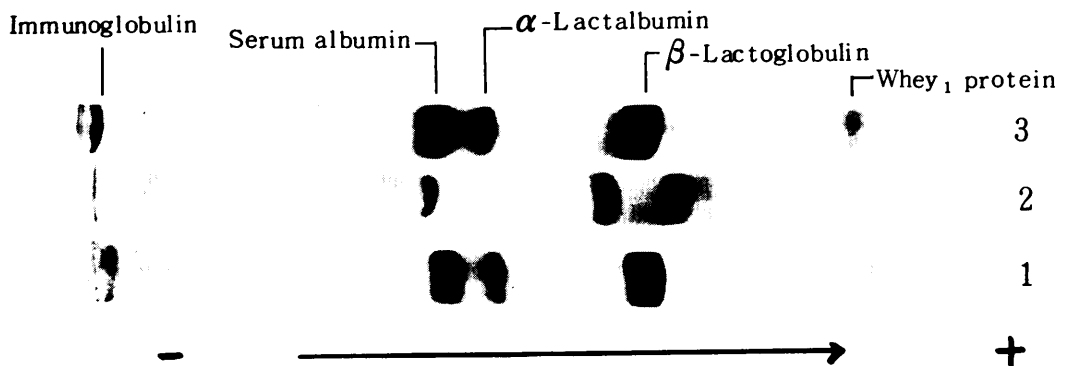


Fig.2. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns comparison among Cheju native mare, Holstein cow and Thoroughbred mare whey. Lanes: 1; Cheju native mare, 2; Holstein cow, 3; Thoroughbred mare.

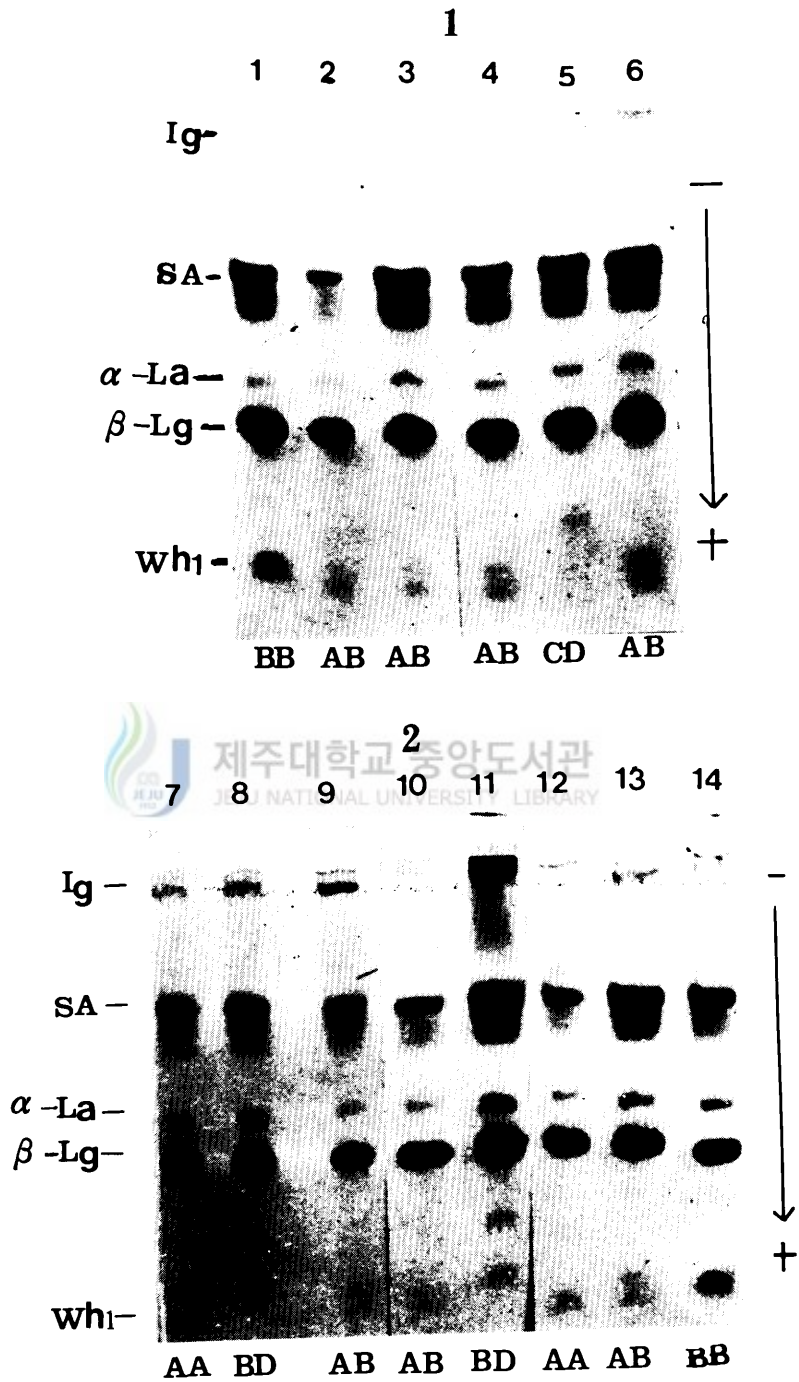


Fig.3. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of whey proteins from individuals Cheju native mare. Ig; Immunoglobulin, SA; serum albumin, α -La; α -Lactalbumin, β -Lg; β -Lactoglobulin, Wh₁; whey₁ protein.

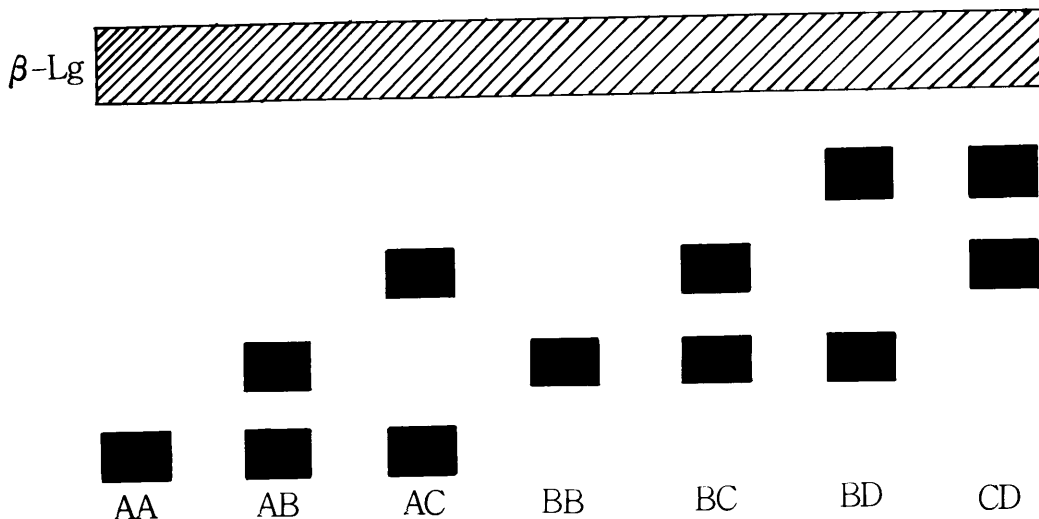


Fig.4. Schematic diagrams of whey₁ protein types in Cheju native mare

Table 1. Phenotypic distribution of whey₁ protein polymorphism in Cheju native mares.

breed	No. of animals	Whey ₁ phenotypes									
		AA	BB	CC	DD	AB	AC	AD	BC	BD	CD
Cheju native mare	15	2	2	-	-	6	1	-	1	2	1

Table 2는 濟州在來馬 whey₁ protein band의 出現樣相을 他品種의 實驗結果 (Chiofalo et al, 1983)와 比較한 것이다.

Table 2. Observed distribution of the utilized subjects and presence of one or two bands in the whey protein ;

breed	No. of animals	1 band(homo)	2 bands(hetero)
Anglo-Arab	34	20	14
Trotter	10	10	-
Cheju native mare	15	4	11

改良種인 Anglo-Arab種과 Trotter種에 있어서 1 band 즉 homo型和 2 band 즉 hetero型の 比는 各各 20 : 14, 10:0 로서 濟州在來馬의 4:11에 비해 homo型 出現頻도가 높은 경향을 나타내었다.

Table 3 및 Fig.5는 濟州在來馬 乳清蛋白質을 構成하는 各 成分의 含量을 百分比로 densitometer에 의해 측정하여 改良馬인 Thoroughbred種과 비교한 結果이다. a는 whey₁ protein, b는 β-Lg, c는 α-La, d는 SA, e는 Ig인데 이 成分들의 含量比는 濟州在來馬(A)가 4:42:12:32:10인 반면 Thoroughbred種(B)은 5:37:13:33:12로 濟州在來馬가 β-Lg이 약간 높고 그외 whey₁ protein, α-La, SA, Ig는 Thoroughbred種과 같은 含量을 나타 내었다.

Table 3. Percent of whey protein bands calculated on densitometric reading

breed	Whey bands				
	Wh ₁	β-Lg	α-La	SA	Ig
Cheju native mare	4	42	12	32	10
Thoroughbred mare	5	37	13	33	12

2. 酪 casein의 PAGE 調査

一般的으로 馬乳 casein은 牛乳와 casein과 3가지 면에서 차이점이 있는 것으로 알려져 있다. 첫째는 casein의 出現 band數의 차이로, O'Connor and Fox(1973)는 α_S-casein區分에 7개 이상의 band가 出現한다고 하여 牛乳 보다 많고, 둘째 k-casein의 存在 有無로 牛乳에는 필수적으로 존재하는 k-casein이 研究者 및 馬品種에 따라 電氣泳動上 나타나지 않는 경우도 있고, 셋째 α_S-casein과 β-casein의 含量比가 牛乳는 1 : 0.6으로 α_S-casein이 많으나 馬乳는 1:1.6으로 β-casein이 높게 나타난다고 보고 되어있다(O Connor and Fox, 1973). 따라서 본 實驗은 이 세가지 점에 重點을 두어 실시 하였다.

Fig.6은 在來馬(1) casein의 電氣泳動 結果를 牛乳(2) 및 改良馬(3)와 比較한 結果이다. 첫째, 濟州在來馬의 α_S-casein과 β-casein의 含量比를 알기 위해 densitometer로 측정한 결과 1:1.3으로 改良馬(O'Connor and

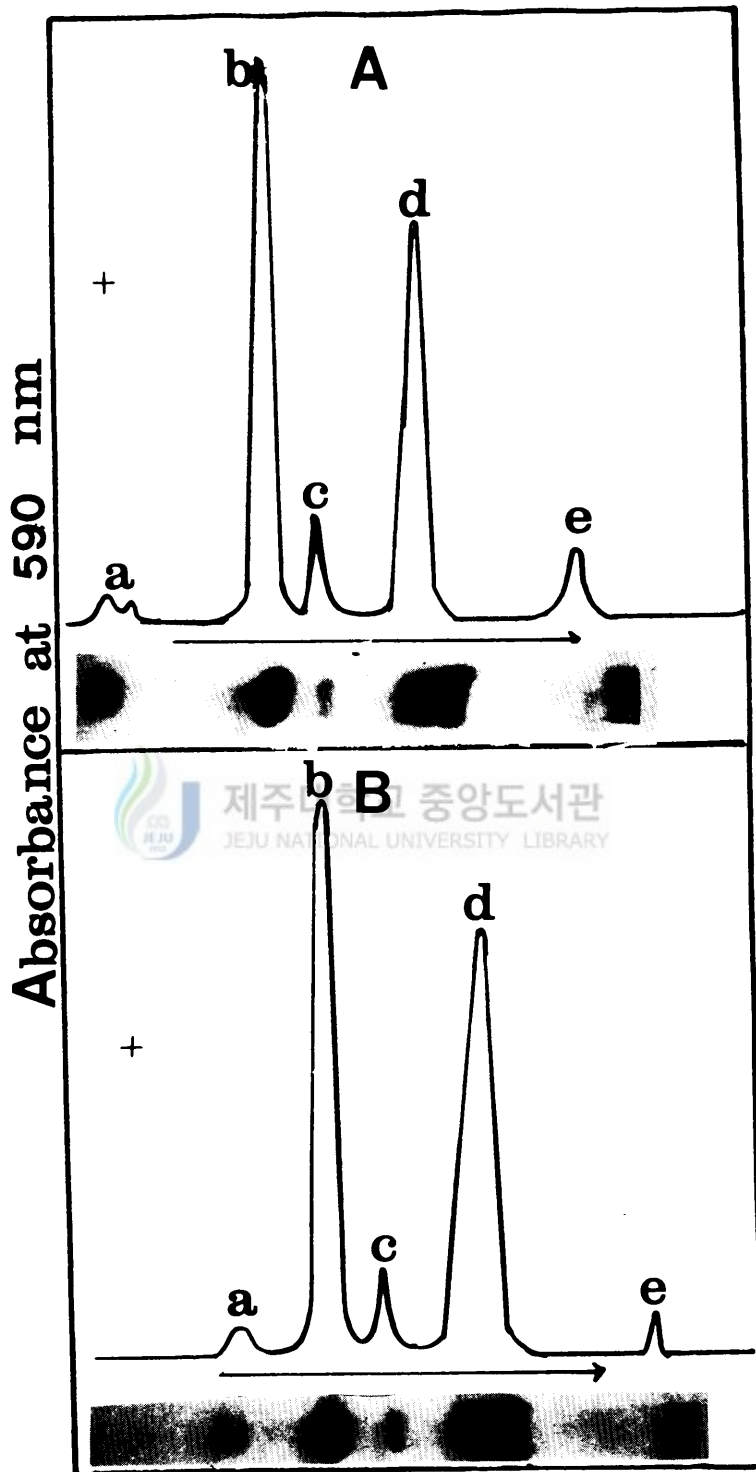


Fig.5. Absorption spectra of whey protein separated by PAGE from Cheju native mare(A) and Thoroughbred(B). a; whey₁ protein, b; β -Lactoglobulin, c; α -Lactalbumin, d; serum albumin, e; Immunoglobulin.

Fox 1973)의 1:1.6보다 β -casein 함량이 낮았으나 牛乳에 比하여 β -casein 함량이 改良馬와 같이 높음을 알 수 있었다. 둘째, k-casein의 存在 有無로 Fig.6에서 牛乳의 경우(2) k-casein이 뚜렷이 나타났으나 濟州在來馬에는 확실치 않아 이것을 明確히 究明하기 위해 Zittle and Cluster(1963)의 方法으로 k-casein을 單離하여 電氣泳動을 實施하고 더 나아가 在來馬 k-casein도 牛乳와 같이 이황화물 결합을 含有하는지를 알기 위해 2-mercaptoethanol을 添加하여 電氣泳動을 實施한 結果를 Fig.7에 나타내었다.

Fig.7에서 보는 바와 같이 濟州在來馬 casein도 k-casein의 存在를 確실히 알 수가 있었고(Fig.7의 2), 2-mercaptoethanol을 添加한 結果(Fig.7의 1) 移動度の 變化를 일으켜 濟州在來馬 k-casein도 이황화물(s-s)결합이 함유하고 있음을 間接적으로 추정할 수가 있었다.

一般的으로 牛乳의 k-casein은 分子內에서 이황화물 결합에 의해 複合體를 形成하여 존재하는데(Swaissgood and Brunner, 1963) oxalate나 EDTA(ethylenediaminetetracetate)를 처리하여 calcium(Ca^{++})을 제거하면 thiol基는 환원상태로 된다고 하였다(Beeby, 1964).

Fig.7에서 2-mercaptoethanol을 처리하면 k-casein의 thiol基는 還元狀態로 되어서 移動度の 變化를 일으키고 또한 單一 分離帶로 分離 되었다고 사료된다.

셋째 α_s -casein區分の 出現 band數를 확인하기 위해 濟州在來馬 個體別로 電氣泳動을 실시, 그 結果를 Fig.8에 나타 내었다.

α_s -casein區分の band數는 4~7개로 나타나 O'Connor and Fox(1973)가 보고한 改良馬 band數 7개와는 큰 차이가 없음을 알 수 있었다. 또한 β -casein은 개체간 移動度の 差異를 보여주고 있으나 一般的으로 β -casein의 遺傳的 變異體는 알칼리 조건에서 전기영동으로는 分離가 어렵고 산성조건에서만 가능한데(Kiddy, 1975), 본 實驗은 알칼리 조건(pH8.9)에서 실시했기 때문에 Kingsbury(1975)가 보고한 β -casein은 β_1 과 β_2 로 분리되고 β_2 에서 A, B, C, D 4개의 band를 확인할 수가 없어 앞으로 산성조건하에서 電氣泳動을 실시하여 分離 究明 해야할 것으로 생각된다.

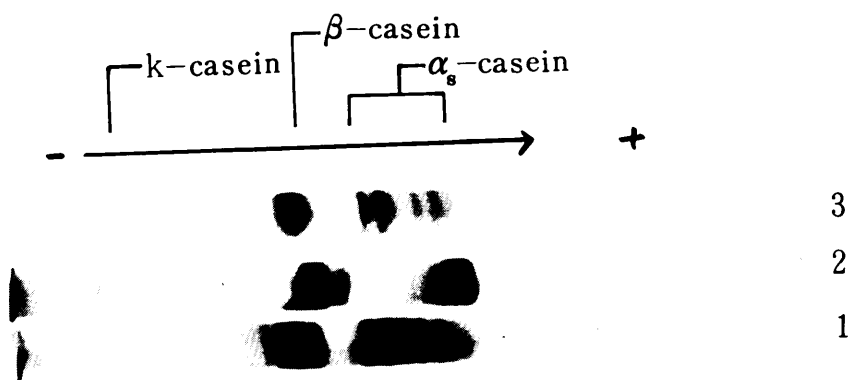


Fig.6. Comparison of mobility of Cheju native mare, Holstein cow and Thoroughbred mare casein. Lanes: 1; Cheju native mare, 2; Holstein cow, 3; Thoroughbred mare.

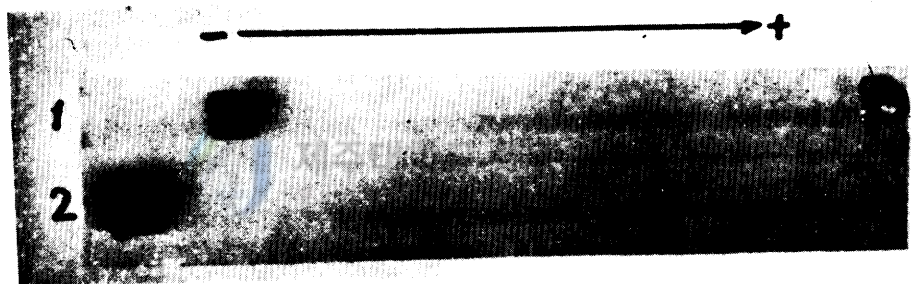


Fig.7. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of Cheju native mare k-casein with and without addition of 2-mercaptoethanol. Lanes: 1; casein with 2-mercaptoethanol, 2; casein without 2-mercaptoethanol.

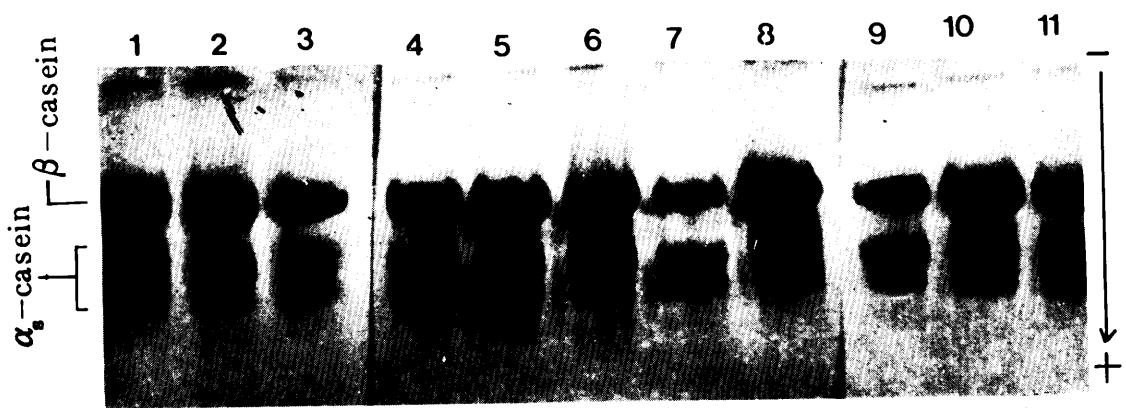


Fig.8. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of casein from individual Cheju native mare.

3. 乳清蛋白質의 SDS-PAGE 調査

濟州在來馬 乳清蛋白質의 구성 성분의 分子量을 推定하기 위해 10% poly-acrylamide gel (pH 8.9)에서 電氣泳動을 실시한 結果를 Fig.9에 나타내었으며 各 蛋白質 分離帶의 分子량을 측정한 結果는 Fig 10과 같다.

牛乳 乳清蛋白質은 Ig 160,000 daltons, SA 66,000 daltons, β -Lg 18,400, α -La 14,300 daltons 인데 (Basch et al, 1985) 본 실험의 結果 얻은 濟州在來馬의 乳清蛋白質은 牛乳에서와는 달리 14,300 dalton의 lysozyme 과 18,400 dalton의 β -lactoglobulin 범위에 3개의 band로 분리되었고 그 分子량을 측정한 結果 各各 12,000, 16,000, 19,500 daltons 이었다. 그리고 66,000 dalton의 bovine serum albumin band의 위치에 4개가 분리되었는데 그 分子량은 各各 66,500, 66,000, 65,000, 59,500 daltons 이었다.

또한 그 分離 樣相을 densitogram으로 확인한 結果, Fig 11과 같이 牛乳와 差異가 있음을 재확인 할 수가 있었다. 따라서 在來馬와 牛乳 (Holstein)의 乳清蛋白質 構成은 서로 다르다고 思料된다.

앞으로 各 蛋白質 band의 成分을 單離하여 SDS-PAGE 을 실시함으로써 濟州在來馬 乳清蛋白質 各 成分의 精確한 分子量을 추정할 수 있을 것으로 생각 된다.

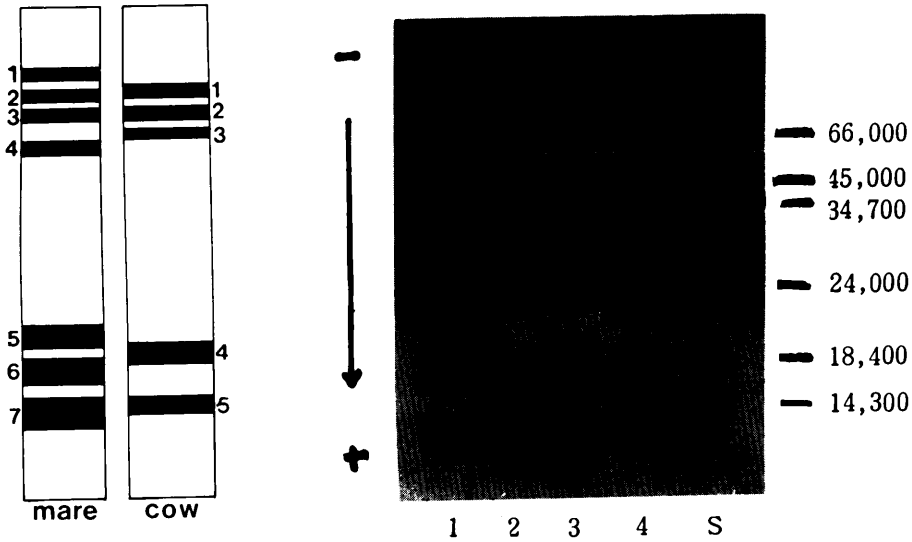


Fig.9. Mobility of whey protein from Cheju native mare during SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (10% acrylamide, 1% SDS) with several reference of known molecular weights was carried out to determine the molecular size of each whey protein as described in methods. Lanes: 1; Holstein cow, 2, 3, 4; Cheju native mare S; reference protein. bovine serum albumin (66,000), egg albumin (45,000), pepsin (34,700), trypsinogen (24,000), β -lactoglobulin (18,400), lysozyme (14,300).

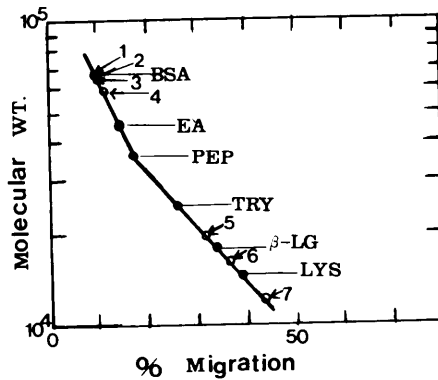


Fig.10. Plot of migration rates of whey protein against molecular weights for proteins. Molecular weights of subunits were determined from plots of relative migration rates (%) of reference proteins to bromophenol blue dye maker on denaturing gel vs. Log molecular weights for each reference as described in methods. The migration rate for bromophenol blue was set as 100%. BSA; bovine serum albumin, EA; egg albumin, PEP; pepsin, β -Lg; β -lactoglobulin, TRY; trypsinogen, LYS; lysozyme.

V. 摘 要

本 研究는 濟州在來馬 品種保存에 基礎資料를 提供코져 馬乳(mare milk)의 casein과 乳清蛋白質을 PAGE 및 SDS-PAGE 方法으로 分析한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 濟州在來馬 乳清蛋白質은 immunoglobulin, serum albumin, α -lactalbumin, β -lactoglobulin, whey₁ protein으로 構成되어 있고 whey₁ protein에는 A, B, C, D 4가지 형태의 band가 存在하며 이들의 表現型은 AA, AB, BB AC, BC, BD, CD型으로 모두 7개 었다.

2. 濟州在來馬 casein은 α _S-, β -, k-casein으로 構成되어 있고 α _S-casein과 β -casein의 含量比는 在來馬가 1:1.3으로 改良馬의 1:1.6과 유사 하였으나 牛乳의 1:0.6에 비해 β -casein 含量이 높았다. 그리고 α _S-casein은 4~7개의 band로 分離되었고 k-casein에 있어서는 牛乳에서와 같이 이황화물 結合을 함유하고 있었다.

3. SDS-PAGE 로 濟州在來馬 乳清蛋白質을 分離한 結果 7개의 蛋白質 band로 나타났는데, 66,000 daltons 부근에 4개의 band로, 14,300~18,400 daltons 범위에 3개의 band로 分離되었다. 各 蛋白質 band의 分子量은 대략 66,500, 66,000, 65,000, 59,500, 19,500, 16,000 그리고 12,000 daltons 이었다.

參 考 文 獻

- Aschaffenburg, R. and J. Drewry, 1957. Genetics of the β -Lactoglobulins of Cow's milk., *Nature.*, 180:376.
- _____, 1963. Milk protein polymorphisms in "man and cattle" A.E. Mourant and F.E. Zeuner. eds. London. Hoyal Anthypological Institute. 50pp.
- _____, 1968. Reviews of the progress of dairy science. Section G. Genetic variants of milk proteins: their breed distribution. *J. Dairy Res.*, 35:447.
- Baker, D.E. and B.H. Lauer, 1971. The carbohydrate content of casein prepared from the milks of different species. *Canadian J. of Zoology.*, 49:551-554.
- Basch, J. J., F.W. Douglas, Jr.G. Procino, V.H. Holsinger and H. M. Farrell, Jr. 1985. Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey protein concentrate, application of gel electrophoresis and comparison with Harland-Ashworth procedure. *J. Dairy Sci.*, 68:23-31.
- Beeby, R., 1964. The presence of sulfhydryl groups in k-casein. *Biochem. Biophys. Acta.*, 82:418.
- Bell, K., H.A Mckenzie, V. Muller, C. Rogers and D.C shaw, 1981. *Comp. Biochem. Physiol.*, 68:225.
- _____, E. Hopper, and H.A. Mckenzie, 1981. Bovine α -Lactalbumin C and α s -, β - and k-caseins of Bali (banteng) cattle, BOS(bibos) JAVANICUS. *Aust. J. Biol. Sci.*, 34:149.
- _____, A. Mckenzie, W.H. Murphy, and D.C. Shaw, 1970. β - Lactoglobulin (droughtmaster): A unique protein variant. *Biochem. Biophys. Acta.*, 214:417.
- Bhattacharya, S. D., A.K. Roychoudhury sinha and A. Sen, 1963. Inherited

- β -Lactoglobulin and α -Lactalbumin polymorphism in zebu cattle. Nature., 197:797.
- 濟州道, 1986. 文化公報現況. 22pp.
- Chiofalo, L., P. Micari and G. Sturniolo, 1982. Caseins polymorphism in acid buffer in sanfratellano horse and in other horse populations breed in sicily (preliminary note). Annali Della Facolta Di Med. Veter., XIX:109-119.
- _____, P. Micari and G. Sturniolo. 1983. Polymorphism of milk proteins in horses raised in Sicily. Zoot. Nutr. Anim., 9:311-318.
- 畜産業協同組合, 1986. 畜協調査季報. 94pp.
- Eigel, W.N., J.E. Butler, C.A. Ernstrom, H.M. Farrell, jr. V.R. Harwalkar, R. Jenness and R. Mcl. and Whitney, 1984. Nomenclature of proteins of cow milk; fifth revision. J. Dairy Sci., 67:1599-1631.
- Grosclaude, F., M.F. Mahe, J.C. Mere and J.H. Teissier. 1976. Polymorphisme des lactoprotéines de bovines N. I. Mise en évidence, chez le Yak et caractéristiques biochimiques de deux nouveaux variants β -Lactoglobulin D (Yak) et Caseine-E. Genet. Sel. Anim., 6:305.
- _____, 1978. Polymorphisme de la caseine α_s - bovine étroite liaison du locus. α_s -Cn avec les β -Cn et k-Cn: mise en évidence de délétion dans le variant α_s -Cn D. Ann. Genet. Sel. Anim., 10:313.
- _____, P. Joudrier and M.F. Made. 1979. A genetic and biochemical analysis of polymorphism of bovine α_{s2} -Casein. J. Dairy Sci., 46:211.
- Jenness, R., B.L. Larson, T.L. Mcmeekin, A.M. Swanson, G.H. Whithan and R. Mcl. Whithan. 1956. Nomenclature of the proteins of bovine milk. J. Dairy Sci., 39:536.
- 鄭昌朝, 金承浩, 金重桂, 李賢鍾, 康太淑, 金文哲, 康珉秀, 鄭坪林. 1985. 濟州馬의 血統定立 및 保存에 關한 研究. 濟州大學校 畜産問題研究所. pp.1-19.

- Kiddy, C.A. and R.E. Rollins, 1973. Discontnious poylacrylamide gel electrophoresis of cows milk. *J. Dairy Sci.*, 55:1506-1507.
- _____, 1975. Gel electrophoresis in vertical polyacrylamide gels. Procedures I and II. Page 14 in methods of gel dectrophoresis of milk. *Dairy Sci. Associ.*, pp.14-18.
- Kingsbury, E.T. 1975. *Anim. Breed. Abstr.*, 43:578 n. 5001.
- _____, and S.N. Gaunt, 1977. Heterogeneity whey proteins of mare's milk. *J. Dairy Sci.*, 60:274-277.
- 姜免熙, 1969. 韓國在來馬에 관한 歷史的 및 形態學的 研究. *韓畜誌*, 11(4): 351-379.
- 金鎬九, 1984. 濟州在來馬 乳成分에 관한 研究. 濟州大學校大學院, 碩士學位論文. pp.12-15.
- Kudryashov, A. and O. Krybova, 1966. *Dairy Sci. Abstr.*, 28:382 n. 2299.
- Laemmlli, U.K., 1970. Cleavage of Structural proteing the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature.*, 227:680-685.
- Lauer, D.H. and B.E. Baker, 1972. Polyacrylamide gel disc electrophoresis of caseins isolated from milks of different species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 42:238.
- _____, 1977. Amino acid composition of casein isolated from the milks of different species. *Can. J. Zool.*, 55:231-236.
- 李賢鍾, 金鎬九, 1985. 濟州在來馬 乳蛋白質에 관한 研究.(1) Casein의 性狀(I) *韓畜誌*, 27(6): 413-415.
- 李基萬, 1984. 馬와 乘馬, 鄉文社. pp.18-19.
- Linderstrom-lang, K., 1925. Study on casein: II. Is cassin a homogeneous substance *Compt. Trav. Carisberg Ser. Clim.*, 16(1):48.
- Macha J. and J. Novackova, 1975. *Zivocisna. Vryoba.*, 20:73.
- Melachouris, N.P. and S.L. Tuckey, 1966. Denaturation of whey proteins in milk heated at high temperature for short times. *J. Dairy Sci.*, 49:1154.

- Mellander, O., 1939. Elektrophoretische untersuchung von casein. *Biochem. J.*, 300:240.
- Morrissey, P.A., 1973. The N-acetyl neuraminic-acid content of the milk of various species. *J. of Dairy Res.*, 40:421-425.
- Morr, C.V., 1967. Effect of urea upon the physical properties of β -Lactoglobulin A and B. *J. Dairy Sci.*, 50:1752.
- Nellin, J.M., 1964. Variants of k-casein revealed by improved starch gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.*, 47:506.
- 農水産部, 1986. 農水産統計年報. pp.100.
- O'Connor, P. and P.F. Fox, 1973. Temperature-dependent dissociation of casein micelles from the milk of various species. *Neth. Milk Dairy J.*, 27:199-217.
- _____, 1977. The proteins and salts of some non-bovine milks. *J. Dairy Res.*, 44:607-609.
- Peterson, R.F., 1963. High resolution of milk proteins and salts of some non-bovine milks. *J. Dairy Sci.*, 46:1136-1139.
- Schmidt, D.G. and T.A. J. Payens, 1963. The purification and properties calcium sensitive α -casein. *Biochem. Biophys. Acta.*, 78:492.
- _____, 1964. Starch gel electrophoresis of k-casein, *Biochim. Biophys. Acta.*, 90:411.
- Swaisgood, H.E. and J.R. Brunner, 1963. Characteristics of k-casein in the presence of various dissociating agents. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 12:148.
- Thompson, M.P., C.A. Kiddy, J.O Johnston and R.M. Weinberg, 1964. Genetic Polymorphism in caseins of Cow's milk. II. Confirmation of the genetic control of β -Casein variation. *J. Dairy Sci.*, 47:378-381.
- _____, N.P. Tarassuk, R. Jenness, H.A. Lillevic, U.S. Asbworth and D. Rose, 1965. Nomenclature of the proteins of Cow's milk. second Revision. *J. Dairy Sci.*, 48:159.

- _____. 1971. α_s - and β -casein in milk proteins. Vol. II. H.A. Mcken academic press, New York, N.Y., pp.117.
- Ullrey, U. Z., R.P. Struthers, D.G. Hendricks and B.E. Brent, 1966. Composition of mare's milk. J. Dairy Sci., 25:217.
- Waugh, D. F. and P.H. Von Hippel, 1956. k-casein and stabilization of casein of casein micelles. J. Am. Chem. Soc., 78:4576.
- Woychik, J.H., 1964. Polymorphism in k-casein of Cow's milk. Biochem. Biophys. Rec. Comm., 16:267.
- Zittle, C.A. and J.H. Cluster, 1963. Purification and some of the properties of α_s -casein and k-casein. J. Dairy Sci., 46:1183.



謝 辭

本 論文이 完成되기 까지 始終 이끌어 주시고 指導하여 주신 李賢鍾 指導教授님
께 깊은 感謝를 드립니다.

또한 평소에 깊은 關心을 가지시고 격려와 助言을 아끼지 않으셨던 本 大學 畜
産學科 여러 教授님과 本 論文을 審査하여 주신 金承浩 教授님, 鄭忠德 教授님께
고마움의 뜻을 전합니다.

아울러 바쁜 일정중에서도 論文을 完成할 수 있도록 배려하고 격려하여 주신 濟
州試驗場 鄭順圭場長님, 白潤基 畜産科長님, 李熙碩, 金東哲 研究士님 이하 畜産
室 여러 同僚職員께도 진심으로 感謝드립니다.

끝으로 늘 염려해주신 부모님, 형님, 형수님의 은덕을 깊이 간직하며 어려운 생
활 역경을 슬기롭게 내조하여준 아내와 함께 感謝드리는 바입니다.

