

碩 士 學 位 論 文

濟州 在來馬乳 成分에 關한 研究

Studies on Cheju Native Horse's Milk



濟州大學校大學院

畜 產 學 科

金 鎬 九

1984年 12月 日

認 准 書

碩 士 學 位 論 文

濟州 在來馬乳 成分에 關한 研究

Studies on Cheju Native Horse's Milk

指 導 教 授 李 賢 鍾

이 論文을 農學碩士學位 論文으로 提出함.

1984 年 12 月 日

 제주대학교 중앙도서관
濟州大學校大學院

畜 產 學 科

金 鎬 九

위 農學碩士學位 論文을 認准함.

1984 年 12 月 日

委 員 長 :

委 員 :

委 員 :

目 次

Summary	2
I. 緒 論	4
II. 材料 및 方法	8
III. 結果 및 考察	12
1. 理化學的 性狀 및 一般成分	12
1) 理化學的 性狀	12
2) 一般成分	13
3) 蛋白質 分布	15
2. 酸 casein 및 乳清蛋白質의 電氣泳動	16
3. Sephadex column 에 依한 分別	20
4. DEAE - cellulose 에 依한 casein 의 分別	25
摘 要	30
參 考 文 獻	32

Summary

This study was carried out to clarify the physico-chemical properties of Cheju native mare's milk.

The main components of the milk were analyzed.

Acid casein, whey protein and skim milk were fractionated by acrylamide gel electrophoresis, DEAE-cellulose and Sephadex G-200 column chromatography.

The results are as follows;

1. The average values of S.P, pH and acidity of Cheju native mare's milk found positive in the 70% alcohol test were 1.037, 6.8 and 0.08 respectively.
2. The percentage of total solids, SNF, fat, protein, lactose and ash was 10.15, 9.20, 0.98, 2.62, 5.96 and 0.59 respectively.
3. The distribution of casein, whey protein, NPN and protein precipitated in 12% TCA content of the milk was 1.36, 0.26, 0.08 and 2.54 respectively.
4. Acid casein was separated into three major components, α_s - , β - and k-casein and minor components, r- , Ts- and S-casein by polyacrylamide gel electrophoresis. Whey protein consists of 2-major components, β -Lactoglobulin and α -Lactalbumin and another component presumed to be serum albumin, but no whey₁ protein was observed.



-
5. The addition of 2-mercaptoethanol on acid casein and whey protein formed distinct bands. These indicate that k-casein and β -Lactoglobulin contain s-s bond, as in milk.
 6. On Sephadex G-200 column, 2 fractions were obtained from acid casein and most of the casein was diluted in void volume.
 7. Acid casein was fractionated into five fractions on DEAE-cellulose column with 0.01M-Imidazole-Hcl buffer (pH 7.0). The major components of the identified fractions are: fraction A, k-casein; B to C, β -casein ; D to E, α s-casein.

I. 緒 論

馬는 家畜中에서 가장 늦게 家畜化한 動物로서 一般的으로 新石器時代 末期(約 7,000 年前)에서 靑銅器時代 初期에 Ural 海 周邊의 Ukraine 地方, 東部 Russia 草原 kazak 地方 등을 中心으로 家畜化된 것으로 推測되며, 우리나라에 傳來된 時期는 明確하지 않으나 지금의 滿州·蒙古地方으로 부터 生活條件이 좋은 東쪽으로 移動 定着하여 漁獵採取 및 原始的인 庭園耕作을 始作할 때로 推定되고 있으며, 牛와 함께 우리 民族의 歷史와 生活에 많은 影響을 끼쳐왔다.

即, 馬는 여러가지 用途가운데서도 乘用에 適合한 動物인 까닭에 軍事上 重要한 位置에 놓이므로 各 時代를 通하여 馬産의 盛衰如何는 곧 社稷의 運命을 左右해온 것이다.

그러므로 韓國의 在來馬는 그 自體가 民族과 함께 살아있는 貴重한 文化財이며, 이와같이 民族과 더불어 苦樂을 같이 해온 在來馬를 文化財로서 永久히 保存함은 勿論, 우리 나라와 같은 環境條件에서는 體質이 强健하고 飼育이 容易하며 局限된 用途에 適合한 在來馬의 改良 利用은 至極히 重要한 課題라고 確信한다.

그런데 現今 文明의 發展에 따라 馬의 飼育頭數 減少는 世界的으로 共通된 現象이기는 하나 特히 韓國 在來馬는 飼育頭數가 現在 2,900 頭로 이 중 濟州道에 1,700 頭⁴⁴⁾가 飼育되고 있으며 이것은 1960 年の 20,000 頭, 1970 年の 10,000 頭에 비해 急激한 減少趨勢를 나타내고 있는데 이대로 放置하면 먼지않은 將來에 純粹한 韓國 在來馬는 찾아보기 힘들 것으로 생

각된다.

우리 나라의 重要한 在來 家畜으로서 牛, 馬, 豚, 鷄, 山羊 等を 列舉할 수 있으나 이 가운데 豚과 鷄는 李朝末 以來 外國產 改良種의 導入과 이들과의 混血에 依해 特有의 形質을 잃고 이미 雜種化 되어 調究가 困難한 狀態에 있다.

또한 韓牛도 最近에 들어와서 經濟性向上을 위해 外國產 肉牛 또는 乳牛와 交雜되어 純種은 점차 그 數가 減少되어 가고 있는 反面, 馬와 在來山羊은 雜種化에 依한 改良이 되지 않았던 關係로 現在도 在來의 形質을 그대로 維持하고는 있으나 馬는 經濟性 缺如로 飼育頭數가 每年 減少되어 가고 있는 實情이다.

따라서, 政府當局에서는 在來馬의 保護增殖 및 利用性 擴大方案을 마련하고자 여러가지 對策을 講究中인 바 今年에는 優先 增殖 및 利用性 擴大에 앞서 保護方案의 하나로 純粹在來馬의 定立을 文化財的 次元에서 摸索하고 있다.

어떤 品種 혹은 系統의 純粹性을 定立하는 方法으로는 다음 3가지 方法이 活用되고 있다. 첫째는 外貌를 통해서 同一한 品種 및 系統을 定立하는 方法으로 가장 普遍的이고 널리 活用되고 있으며, 둘째는 血清蛋白質의 遺傳的 變異體를 電氣泳動 等の 生化學的 方法에 依해서 分離하여 그 變異體의 出現頻度 및 出現有無에 依해 같은 系統 혹은 品種을 定立하는 方法으로 最近 電氣泳動方法의 發展으로 遺傳的 變異體의 分離能力이 向上됨에 따라 活潑히 利用되고 있으며, 세째는 乳蛋白質의 遺傳的 變異體를 둘째번과 같은 方法으로 分離하여 定立하는 方法이다.

濟州馬에 對한 研究報告는 姜(1960, 1961) 및 南(1961)의 韓國馬產의 歷史的 考察에서 韓國馬產의 起源을 B.C 7 世紀頃으로 推定하고, 北으로부터 南下하여 韓半島 氣候風土에 適應할 수 있는 品種으로 形成되었으며 三國時代에는 馬政을 強化하여 相當數의 牧馬場을 設立하고 飼育法을 定하여 馬產을 獎勵하였고 高麗때에는 濟州馬가 元에 依해 本格的으로 飼育되었다고 報告하였다. 또한 姜(1965, 1969)은 韓國 在來馬의 系統을 Tarpan 系와 蒙古系 馬가 基礎되어 交雜化 過程을 거쳐 成立된 固有 品種으로 推察하고 本上馬는 體高 116 cm인 低方型 前低後高의 役用型的 矮馬이며 飼養 管理의 向上과 優良馬의 流入 等으로 濟州馬보다 크며 그 系統은 1930 年까지 區別되었으나 現在 南韓에는 本來의 南韓馬와 濟州馬의 區別조차 할 수 없고 現在 飼育中인 大部分의 馬는 濟州道에서 導入한 것으로 報告하였다.



한편 李(1961)는 濟州馬의 體格 및 體型에 對한 生物統計學的 研究를 實施, 30 個 部位를 測定 分析한 結果, 濟州馬는 小型馬에 屬하고 蒙古馬와 類似하다고 報告하였으며, 金(1963)은 濟州馬와 導入馬와의 交雜에 依해 一代雜種의 能力을 比較하였는데 體軀面에서 相當한 雜種 強勢의 效果가 있었다고 報告하였다. 또한 李(1970)는 濟州馬의 毛色分布를 40 種으로 區分하고 그의 在來名稱을 調查報告한 바 있다. 이어서 最近 鄭等(1981)의 濟州馬의 保護·增殖 및 利用性的 確大方案을 調查 研究한 結果, 保護法 制定과 國家의 支援對策, 觀光產業과의 連繫, 體型的 改良 및 繁殖團地를 造成해야 한다고 主張하였으며, 또한 濟州 在來馬의 飼育現況과 經營實態에 關한 調查(鄭等, 1982)에서는 馬飼育 專業農家가 없고 大部分이 繁殖用으로

飼育하고 있으나, 年中 放牧形態가 大部分이고 營養水準이 極도로 惡化되어 育成率이 떨어져 農家所得에 影響을 끼치고 있다고 報告하였다. 이와같이 濟州馬에 關한 研究는 거의가 繁殖 및 育種 分野에 數件이 있을 뿐 濟州馬乳 成分에 對한 研究는 全혀 없는 狀態이다.

따라서 本 研究는 豚, 鷄와 같이 在來種이 絶滅되기 前에 現在까지 充分히 究明되지 않은 濟州馬 乳成分의 理化學的인 諸性狀을 改良馬와 比較하여 그 性狀을 究明하므로서 濟州馬의 固有한 形質과 純粹한 在來馬의 定立에 基礎資料를 提示할 目的으로 實施하였다.



II. 材 料 및 方 法

1. 原料乳의 採取

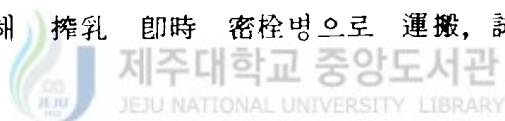
1) 對 象

① 濟州在來馬는 濟州道 畜産開發事業所 種馬場에서 品種 保存을 爲해 飼育中인 分娩後 1個月 以上된 牝馬 10頭로 하였으며

② 改良馬는 濟州市 管内 個人 牧場에서 飼育中인 Thoroughbred 種 5頭를 供試畜으로 하였다.

2) 採取方法

個體別 手搾乳에 依해 搾乳 即時 密栓병으로 運搬, 試料로 使用하였다.



2. 酸度, pH, alcohol 檢査 및 比重 測定

酸度는 試料 18 ml에 CO₂가 含有되지 않은 同量의 蒸溜水를 添加하여 混合한後 1% Phenolphthalein 溶液 0.5 ml 넣고 0.1 N - NaOH (f=1.000)로 滴定하여 微紅色이 30秒間 消失되지 않은點을 終末로 하여 다음 公式으로 算出하였다.

$$\text{酸度(乳酸\%)} = \frac{0.1 \text{ N-NaOH ml數} \times f \times 0.009}{\text{試料(g)}} \times 100$$

alcohol 試驗은 試料 2 ml에 70% ethylalcohol 2 ml를 加하여 15秒 後 凝固 沈殿하는 것을 alcohol 陽性乳(+), 그렇지 않는 것을 陰性乳(-)로

表示하였으며, 比重은 試料 200ml를 실린더(cylinder)에 조용히 옮긴 후 15℃에서 牛乳 比重計에 의하여 測定하였다. 15℃ 以外 溫度의 境遇는 比重 補正表에 의하여 溫度補正을 하였으며, pH는 유리電極 pH meter 를 利用하여 測定했다.

3. 一般成分 分析

一般成分 分析은 A.O.A.C法(1975), 脂肪은 Babcock 法, 乳糖은 Lawrence 法(1968)에 依해 測定하였고 無脂固形分은 全固形分으로 부터 脂肪含量을 빼서 算出하였다.

4. 全 casein 의 調製

全 casein은 20℃ pH 4.6의 等電點에서 沈澱된 酸 casein으로, 採取 直後의 新鮮乳를 3,000 r.p.m에서 20分間 遠心分離하여 얻어진 脫脂乳에 蒸溜水를 加하여 2倍量으로 稀釋한 後 0.5N-HCl을 添加하여 pH 4.6에서 沈澱시키고 上澄液을 除去한 다음 蒸溜水로 懸濁하여 0.5N-NaOH를 添加, pH 7.0 以下에서 再溶解하여 上記의 沈澱造作을 三回反復하여 얻어진 casein을 alcohol, aceton, ether 의 順으로 處理하여 精製하였다.

5. 蛋白質의 分布

casein 含量은 新鮮한 在來馬乳를 3,000 r.p.m에서 20分間 遠心分離 後 얻어진 脫脂乳에 0.5N-HCl을 加하여 pH 4.6에서 casein을 沈澱시킨 후 濾過하여 沈澱部分의 窒素를 Kjeldahl 方法으로 測定하여 여기에 6.38을 곱해

算出하였으며, 또 沈澱蛋白質量은 全蛋白質量에서 可溶性 蛋白質量을 빼어서 表示하였다.

6. Gel chromatography

本 試驗에 使用한 Sephadex 는 pharmacia (uppsala, Sweden) 製品으로 分別範圍가 5,000 ~ 800,000 이고 水分含有能力(water regain)이 $20.0 \pm 2.0 g$ water / g dry gel 인 Sephadex G-200 을 使用하였으며, 使用에 앞서 緩衝液(0.02 M phosphate buffer pH 7.0)으로 洗滌한 後 平衡化시켜서 2.5×45 cm 의 column 에 충전하였다. 試料은 같은 緩衝液에 24時間 透析後 chromatography 를 實施하였다.



7. DEAE-cellulose ion exchange chromatography

全 casein 分別에 쓰인 DEAE-cellulose 는 Whatman 社의 DE-52 로, 먼저 4.5 M 尿素와 0.1% - 2 mercaptoethanol 을 含有하는 0.01 M imidazol- 鹽酸 緩衝液(pH 7.0)으로 洗滌해서 脫氣後 平衡化시켰으며 이것을 2×50 cm 의 column 에 充填한 다음 室溫에서 chromatography 用 緩衝液으로 安定化 시켰다. 한편 酸 casein 1 g 을 上同의 緩衝液에 溶解하여 44時間 透析한 다음 透析試料 180ml (1g의 酸 casein)를 column 에 吸着시키고 食鹽濃度 0.05 ~ 0.25 M의 linear gradient 로, 流速을 50ml/h 로 10ml씩 分取하였으며 液 中の 蛋白質 濃度는 280 nm의 吸收에 依해 測定, 溶離曲線을 얻었다.

8. Poly-acrylamide gel (PAG) 電氣泳動

PAG 電氣泳動은 Davis (1964)의 變法으로 實施하였다. 즉 4.5M 尿素를 含有하는 pH 8.9의 tris-鹽酸 緩衝溶液을 利用하였는데, 먼저 7%의 acrylamide의 下層 Gel 은 A액, C액 및 過硫酸 ammonium을 含有하는 7.2 M 尿素液을 1:2:5의 比率로 混合해서 gel 化 시켰으며 이 下層 gel 에 3.5% acrylamide의 上層 gel 을 重層하고, 試料는 1M sucrose 를 含有하는 9 M 尿素 溶液에 溶解시켜 使用하였다. 泳動은 室溫에서 實施하고 column 1本 當 3mA 로 約 90分間 通電하였으며 終了後 gel 을 1% amido black 10 B의 7% 酢酸溶液으로 20~30分間 染色한後 7% 酢酸溶液中에서 脫色시켰다.



Ⅲ. 結 果 및 考 察

1. 理化學的 性狀 및 一般成分

1) 理化學的 性狀

濟州 在來馬乳의 比重, 酸度, pH, alcohol 試驗 結果는 Table 1과 같다.

Table 1. Physico-chemical properties of Cheju native horse's milk

Sample No	Specific gravity	Acidity	pH	Alcohol test (70%)
10	1.037	0.08	6.8	+

Arab 種 馬乳의 比重은 1.035(Ullrey 等, 1966)로서 물보다 若干 무거우나 이것은 馬乳中에 含有되어 있는 물보다 무거운 無脂固形分(比重 1.62)이 물보다 가벼운 成分인 脂肪(比重 約 0.92)보다 많기 때문이다.

本 實驗의 在來馬乳의 比重은 1.037로서 Arab 馬乳 1.035(Ullrey 等, 1966) 및 Malopolski 乳 1.0344(Kulisa, 1970)보다 높으며 牛乳의 1.032보다 훨씬 높은 結果를 나타내, 在來馬乳가 Arab 馬나 Malopolski 馬乳 보다 無脂固形分 含量이 높음을 推定할 수 있다.

乳酸表示法에 依한 乳汁의 酸度는 固乳酸度和 醱酵酸도로 區別되나 보통 兩者를 合한 全酸度로서 나타내며, 固有酸度は 乳汁 本來의 酸度로서 Rice 等, (1924)에 따르면 乳成分中の casein, albumin, 枸橼酸, 炭酸 gas 및 磷酸에 依해 決定되고, 醱酵酸度は 分泌後 時間이 經過함에 따라 乳酸菌의 乳

酸醱酵로 生成되는 乳酸에 起因하는 것으로 알려져 있다.

本 實驗에서 測定한 在來馬乳의 酸度는 0.08%로서 牛乳의 0.16%(Holstein 乳) 및 0.18%(Jersey 乳)보다 훨씬 낮으며 S.H 酸度도 表示한 Maloposki 馬乳의 3.5 (新鮮한 牛乳의 S.H 酸度는 5~8)와 비슷한 數値를 나타내고 있다. 이와같이 馬乳의 酸도가 낮은 것은 新鮮乳의 酸도가 주로 乳成分中の 蛋白質과 無機鹽에 의해 決定되기 때문에 在來馬乳 成分中の 이들 含量이 牛乳에 비해 낮은 것이 推察된다.

pH는 6.80 으로서 里等(1932)이 測定한 7.22 보다 낮으며 牛乳의 6.6 보다 若干 높은 傾向을 보여주고 있다. alcohol 檢査는 牛乳의 境遇 乳汁의 加熱에 對한 安定性を 알기위해 폭넓게 利用되고 있는 方法으로 이 方法에 의해 여러 가지 異常乳 卽, 高酸度乳, 灰分平衡이 나쁜乳, 初乳, 末期乳, 細菌에 의해 凝乳酵素가 생긴 汚染乳, 乳房炎乳, 低酸度 alcohol 不安定乳를 檢出할 수 있으며 一般的으로 alcohol 檢査에서 陰性인 乳汁은 熱安定성이 높다. 本 實驗의 在來馬乳는 弱한 陽性反應을 나타내고 있는데 이와같은 結果로 在來馬乳의 熱安定성이 낮은 것으로 생각되어지나 그 原因을 究明하는데 앞으로 多方面의 追究가 必要하다.

2) 一般成分

本 實驗에서 使用한 濟州 在來馬乳의 一般組成成分의 分析 結果는 Table 2에 나타내었다.

一般的으로 乳汁의 組成은 搾乳時間, 泌乳期, 季節, 品種, 年令, 飼料 및 疾病等에 따라 變한다고 報告되었으며 (Rolleri 等, 1956; Larson 等, 1957), 各種

Table 2. Main components of Cheju native horse's milk

Sample No	Moisture (%)	T. S (%)	S. N. F (%)	Fat (%)	Protein (%)	Lactose (%)	Ash (%)
10	89.85	10.15	9.20	0.98	2.62	5.96	0.59

동물의乳汁을比較하여 보면 動物分類學上 近緣의 動物乳汁은 組成이 비슷한데, 寒地나 水中에 사는 動物의 乳汁은 固形分과 脂肪含量이 높다. 이러한 乳汁의 組成과 動物의 發育과는 密接한 關係가 있는데 發育이 빠른 動物은 蛋白質과 灰分, 特히 Ca 과 P의 含量이 높다고 알려져 있다.

在來馬乳, Arab 馬乳(Ullrey, 1966) Przewalski 馬乳(Masek, 1938)의 一般組成을 比較하여 보면 (Table 2, 3), 在來馬乳의 總固形分含量은 10.15%로 Arab 馬乳(11.5%) 보다 낮았으며, 脂肪은 0.98%로 他品種의 乳汁보다 1% 정도 낮은 顯著的한 差異를 나타내고 있고, 其他 蛋白質, 乳糖은 若干의 差異를 보여주고 있으며, 無機物은 含量面에서 비슷하나 無機物의 種類 및

Table 3. Main componets of horse and bovine milk(%)

	Total solids	Fat	S. N. F.	Protein	Lactose	Ash
Arab horse	11.2	1.9	9.3	2.5	6.2	0.5
Przewalski horse	10.5	2.2	8.3	2.0	6.1	0.4
Bovine	12.69	3.67	9.02	3.42	4.78	0.73

存在樣式 예를들면 ion性, 可溶性, colloid性 등에 關係서는 좀 더 詳細한 研究가 必要하다 하겠다.

한편 牛乳와의 差異는 脂肪 2.5%, 蛋白質 0.8%, 灰分 0.2%가 낮은 反面, 乳糖은 1.2%가 높아 總固形分含量에서 2.5% 낮은 水準을 나타내고 있다. 以上과 같이 一般成分 中에서 他品種의 馬乳와 明確한 差異를 나타내는 것은 脂肪인데, 이것은 前述한 品種間의 差異에 起因되는 것으로 생각되고 其他 成分에 있어서는 커다란 差異點을 發見할 수 없었다.

3) 蛋白質의 分布

Table 4에 蛋白質의 分布를 나타냈다.

Table 4. Protein distribution of Cheju native horse's milk

Sample No	Total protein (%)	Casein (%)	Whey protein (%)	N. P. N. (%)	Protein pptd in 12% TCA
10	2.62	1.36	0.26	0.08	2.54

在來馬乳의 全蛋白質에 對한 casein의 比率은 約 52%로 O'corner 등 (1976)이 報告한 Holstein乳 (70%), 山羊乳 (75%), 緬羊乳 (72%) 보다는 낮았으나 馬乳 (47%) 및 當나귀乳 (49%)와 거의 비슷하거나 多少 높았으며, 金等 (1974)의 韓牛乳 (73%) 보다는 낮았다. 또한 非蛋白態窒素는 3.1%로 牛乳의 5% 및 山羊乳의 8% 보다 낮았고 韓牛乳 (2.4%)에 비해 若干 높았다.

2. 酸 casein 및 乳清蛋白質의 電氣泳動

Kudryalov (1966) 등이 처음으로 馬乳 casein의 不均一성에 對하여 報告한 以來, 이의 利用上 問題點 等으로 牛乳나 山羊乳에 比하여 理化學的 性狀에 關한 研究는 活潑치 못하여 各 構成 成分의 分離 및 性狀 究明이 完全히 이루어져 있지 않으나, 그 以後 O'corner 等 (1973) 및 Kingsbury 等 (1976)이 電氣泳動變에 依해 馬乳를 構成하는 主要 蛋白質은 β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin, k-casein, β -casein 및 α_{s1} -casein이고 電氣泳動的 舉動은 牛乳와 거이 비슷한 樣象을 보여주고 있으나, casein 區分에서 α_{s1} -과 β -casein 分離帶가 폭넓게 자리를 차지하고 있으며 特히 α_{s1} -casein은 적어도 7개 이상의 minor zone 들이 짧은 거리를 두고 存在한다고 發表하였다.

또한 馬乳 casein의 α_{s1} -: β -casein의 量的 比率은 1:1.6으로 β -casein의 含量이 높은 데 이와같은 結果는 山羊(1:1.4), 緬羊(1:1.5) 및 當나귀(1:1.2)와는 거이 비슷하나 牛乳(1:0.6)와는 差異를 보여주고 있다.

이와같은 調査가 濟州 在來馬에 關해서는 전혀 이루어져 있지 않았으므로 蛋白質의 約 52%를 차지하는 casein의 構成 成分을 究明하기 위하여 다음 實驗을 實施하였다.

먼저 在來馬 脫脂乳, casein 및 whey 蛋白質의 電氣泳動 pattern을 알아보기 위하여 polyacrylamide gel 電氣泳動을 實施하였으며 (Fig. 1), Thoroughbred 乳 및 牛乳 casein의 泳動圖와 定性的으로 比較한 結果는 Fig. 2와 같다.

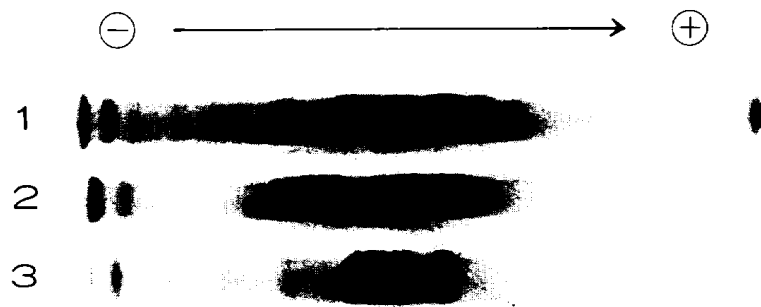


Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of Cheju native horse's skim milk, casein and whey protein.

1. skim milk
2. casein
3. whey protein

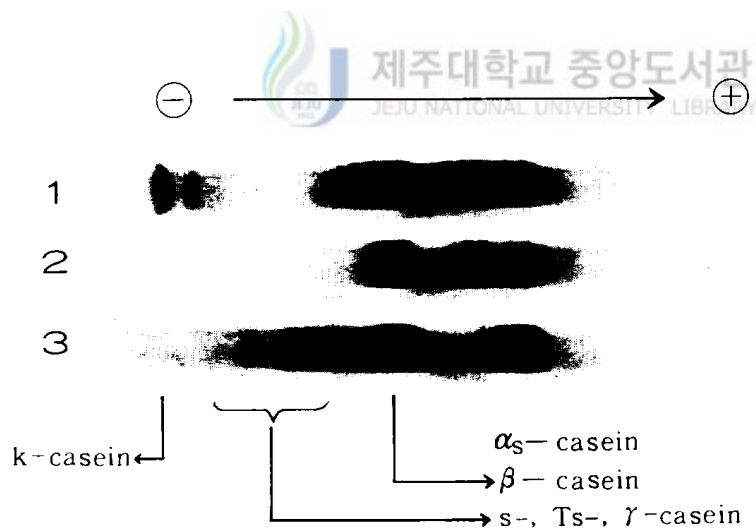


Fig. 2. Electrophoretic comparison of Cheju native horse, Thoroughbred and bovine whole casein.

1. Cheju native horse
2. Thoroughbred
3. bovine

Fig. 2에서 각 band의 易動度는 Yaguchi 等(1967)의 方法에 따라 確認
했는 바, 在來馬乳 casein의 電氣泳動的 學動(易動度)은 Thoroughbred 乳
및 牛乳와 거의 類似했으며, 이의 主要構成成分은 α_{s1} -, β - 및 k-casein임
을 確認할 수 있었다. 한편 牛乳 casein에 있어서 微量成分인 γ -, Ts- 및
S-casein에 對應하는 band도 Thoroughbred 乳의 境遇 이에 對한 報告가 없
어 確認할 수 없었으나, 本 實驗의 結果에서는 出現되지 않은 반면 在來馬
乳에 있어서는 뚜렷이 確認할 수 있는 差異點을 보여주었다.

또한 馬乳 α_s -casein이 最小한 七個의 成分으로 構成되어 있는데 (O'corner,
1973), 이에 比해 在來馬의 α_s -casein의 成分은 그 以上으로 推定되며
電氣泳動 pattern의 濃度分布로 미루어 볼때 在來馬乳 casein의 α_s -casein
對 β -casein의 量的 關係는 O'corner 等(1973)이 報告한 1:1.6 과 비슷
함을 觀察할 수 있으나, 보다 正確한 α_s : β -casein의 比率 및 α_{s1} -casein
의 minor 成分을 위시한 各 casein의 成分 究明은 위의 電氣泳動 結果만
으로는 確認할 수 없고 앞으로 Densitometer를 利用한 量的 比率 및 各
成分의 單離等을 通해 더욱 상세히 研究해야 할 것으로 생각된다. Fig.3
은 在來馬乳 casein의 構成成分中 Fig. 2에서 나타난 k-casein의 存在를
確認하고, k-casein이 牛乳에서와 같이 S-S結合을 갖고 있는지를 究明하
기 爲해 casein 溶液에 2-mercaptoethanol을 添加해서 施行한 電氣泳動 結
果인 바, Downey(1972)가 牛乳에서 報告한 바와같이 在來馬乳의 casein에
서도 k-casein이 確認되었으며 2-mercaptoethanol의 添加에 依해 k-casein
이 分解된 事實로 在來馬乳의 k-casein도 還元性的 S-S結合을 갖고 있음
을 알 수 있다.

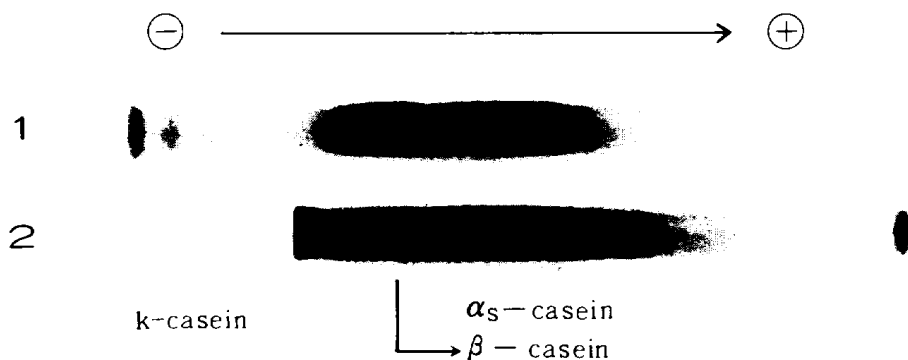


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of Cheju native horse's casein with and without addition of 2-mercaptoethanol.

1. casein
2. casein with 2-mercaptoethanol

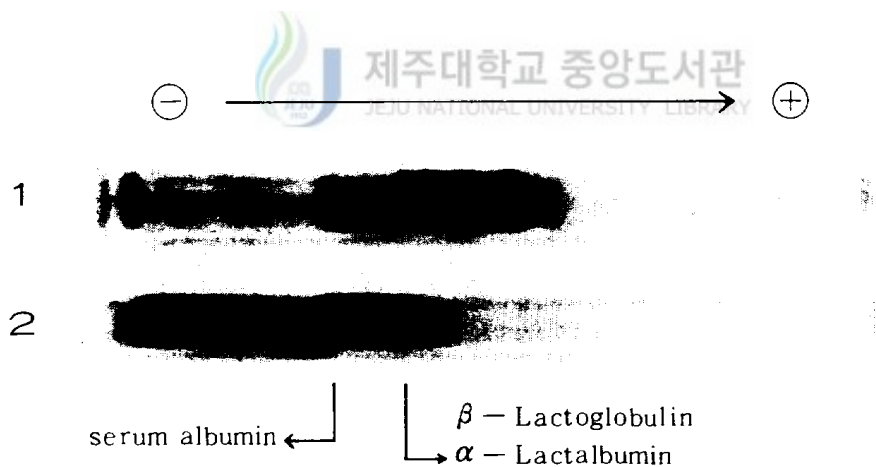


Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of Cheju native horse's whey protein with and without addition of 2-mercaptoethanol.

1. whey protein
2. whey protein with 2-mercaptoethanol

다음 Fig.4는 在來馬乳 乳清蛋白質이 어떠한 成分으로 構成되어 있는지를 確認하고 牛乳 乳清蛋白質의 大部分을 차지하는 β -Lactoglobulin이 S-S結合을 含有하고 있는지를 確認하기 위해 實施한 電氣泳動 結果이다. Fig. 4의 1에서 β -Lactoglobulin 및 α -Lactalbumin과 serum albumin으로 推定되는 band가 出現하였다.

Kingsbury等(1976)의 報告에 依하면 馬乳의 乳清蛋白質은 電氣泳動圖上 易動度の 順으로, β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin 및 serum albumin으로 構成되며, 牛乳나 山羊乳 乳清에서는 存在하지 않으나 β -Lactoglobulin보다 빠른 成分이 存在함을 確認하여 그의 理化學的 性質이 究明되지 않은 關係로 whey₁이라 命名하였으며, whey₁이 거의 全馬乳에 出現하는 反面 serum albumin은 存在를 確認하지 못하였다. 在來馬의 境遇 whey₁의 存在가 電氣泳動圖上 確認되지 않았으나 β -Lactoglobulin 및 α -Lactalbumin이 出現을 볼 수 있었으며 특히 α -Lactalbumin은 Kingsbury等(1976)이 2개의 band가 出現함을 보고 하였는데 反하여 在來馬는 3개로 나타나는 한편 뚜렷하지는 않으나 serum albumin의 易動도에 該當되는 部分에 分離帶의 흔적을 認知할 수 있어서 이의 存在 可能性을 提示하였다. 또한 Fig. 4의 gel 2로 미루어 乳清蛋白質에도 還元性的 S-S結合을 含有하는 成分이 있는 것을 알 수 있으며 乳清蛋白質 各 構成成分의 含量, amino 酸 및 遺傳的 變異體 等に 關해 앞으로 계속적인 研究가 必要하다.

3. Sephadex column에 依한 分別

在來馬乳 脫脂乳 3 ml를 Sephadex G-200을 利用해서 分別한 結果를 Fig. 5에, 分別된 各 分劃의 電氣泳動 結果를 Fig. 6에 나타냈다.

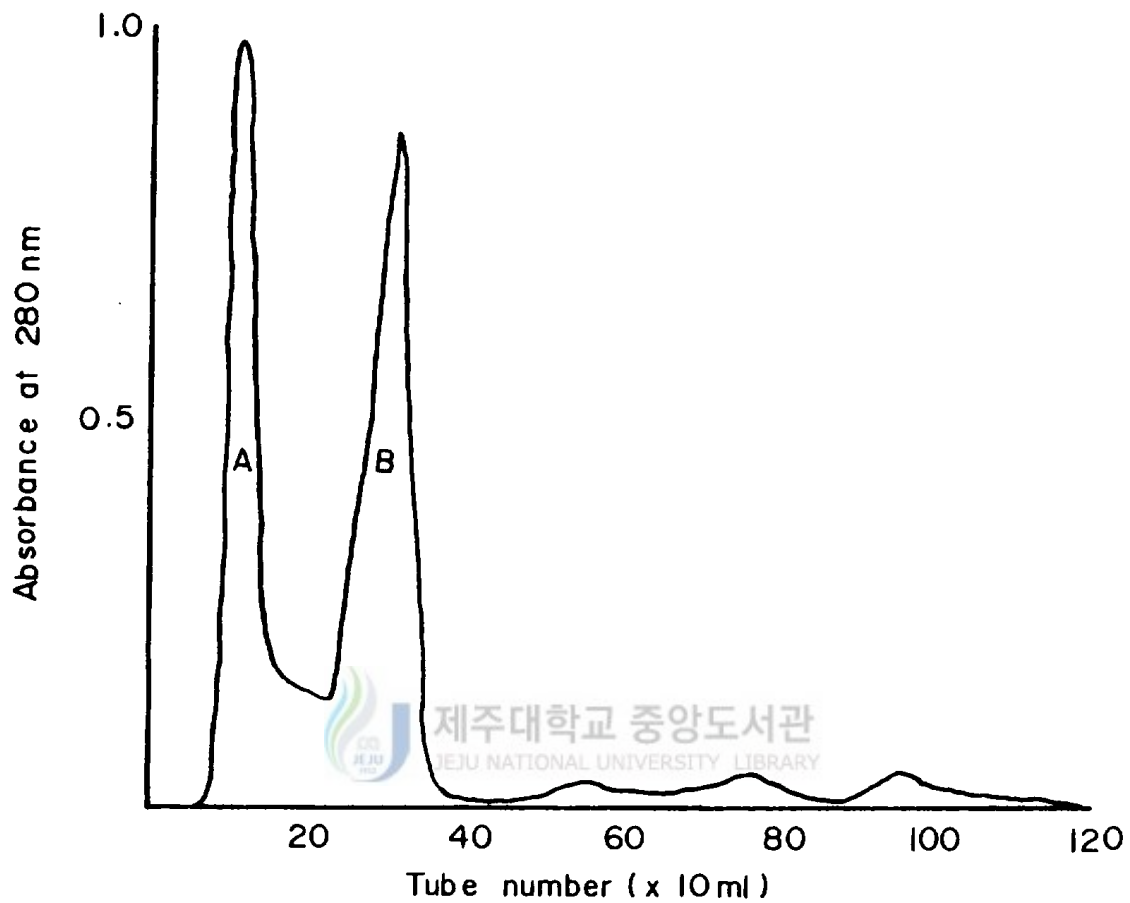


Fig. 5. Elution patterns obtained by exclusion chromatography of Cheju native horse's skim milk, 2.5cm by 40cm column of Sephadex G-200, 0.02 M phosphate buffer, pH 8.0.

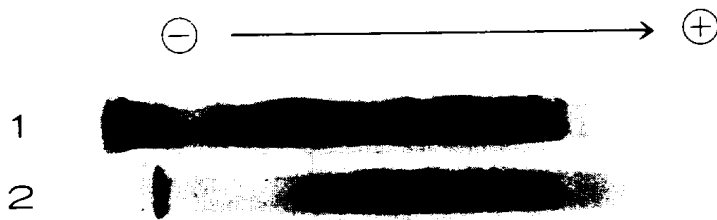


Fig. 6. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of fractions from gel filtration of

Fig. 5.

1. fraction A
2. fraction B

牛乳에 있어서 脫脂乳는 四個의 分劃으로 區分되어 第一分劃은 α s-, β - 및 k-casein, 第二分劃은 α s- 과 β -casein, 第三分劃은 β -Lactoglobulin과 α -Lactalbumin이 溶出되었는데 (Yaguch 等 1967) 反하여, 在來馬 脫脂乳는 二個의 分劃으로 나누어져 第一分劃은 牛乳와 마찬가지로 α s-, β - 및 k-casein이, 第二分劃에는 β -Lactoglobulin과 α -Lactalbumin의 乳清成分이 大部分 溶出되고 있다. 또 在來馬乳 casein은 大部分 void volume (第一分劃)에서 溶出되어 Sephadex G-200의 分別能力이 分子量 5,000~800,000인 點을 생각하면 在來馬乳 casein이 分子量 800,000 以上の casein 複合體 狀態로 乳中에 存在할 可能性을 推定할 수 있다. 그러나 casein成分이 거의 大部分 void volume에 溶出한다는 點에서 gel chromatography에 依한 分別에는 보다 큰 分子量의 分別이 可能한 gel의 選擇이 必要하다고 생각된다.

또한 酸 casein의 chromato 結果를 Fig. 7에 나타내고 있는데, 牛乳에서 二個의 分劃으로 나누어져 第一分劃은 α s-, β - 및 k-casein이, 第二分

劃에 k-casein 을 除外한 α_s -casein 과 β -casein 이 溶出된 다고 報告되었으나 (Yaguchi 等, 1965), 在來馬 casein 은 各 casein 成分을 含有한 1個의 分劃만을 나타내고 있는데(Fig.7), 이와같은 結果는 牛乳 casein 과 在來馬乳 casein 間에 構成 amino 酸 및 構造上의 差異가 起因되는 것으로 思料된다.

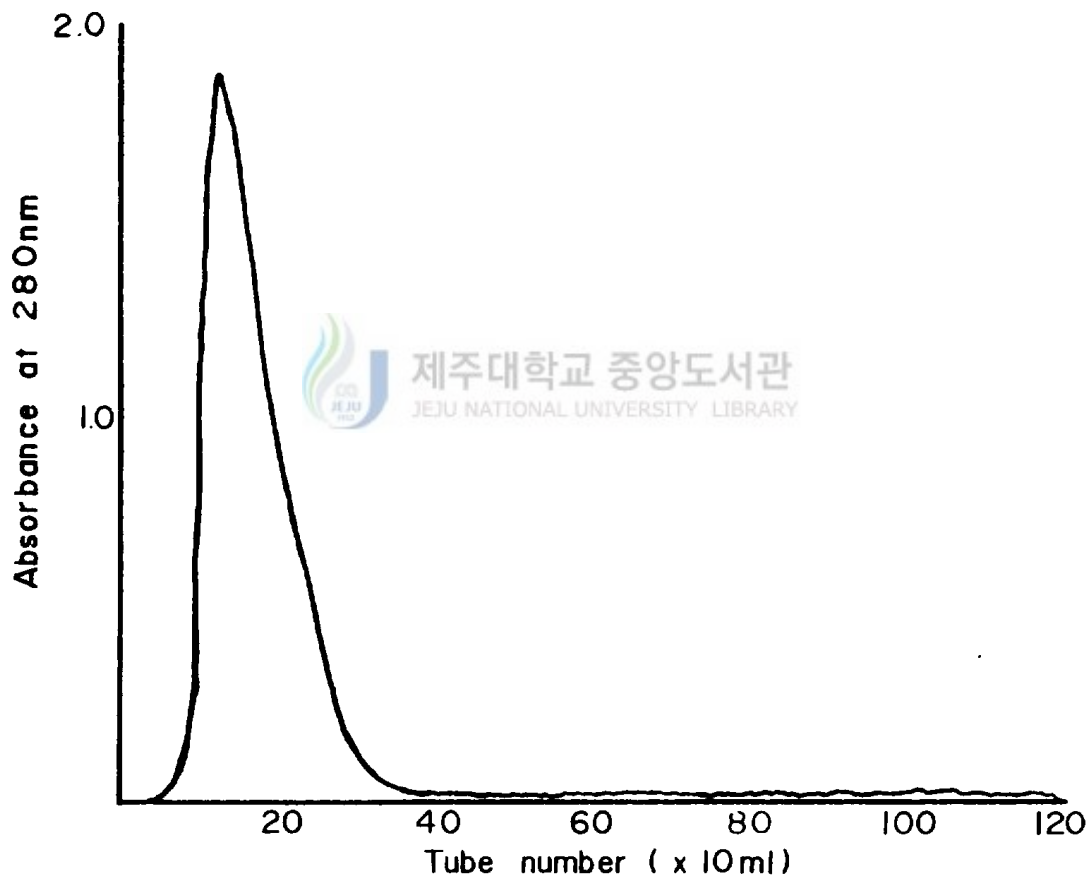


Fig. 7. Elution patterns obtained by exclusion chromatography of Cheju native horse's casein, 2.5cm by 40cm column of Sephadex G-200, 0.02M phosphate buffer, pH 8.0.

한편 在來馬乳 乳清蛋白質은 Fig. 8 과 같이 2 個의 分劃으로 分離되어 牛乳의 3 個(金等, 1974)에 비해 1 個가 적으며 大部分의 乳清蛋白質은 두 번째 分劃에서 溶出되었다.

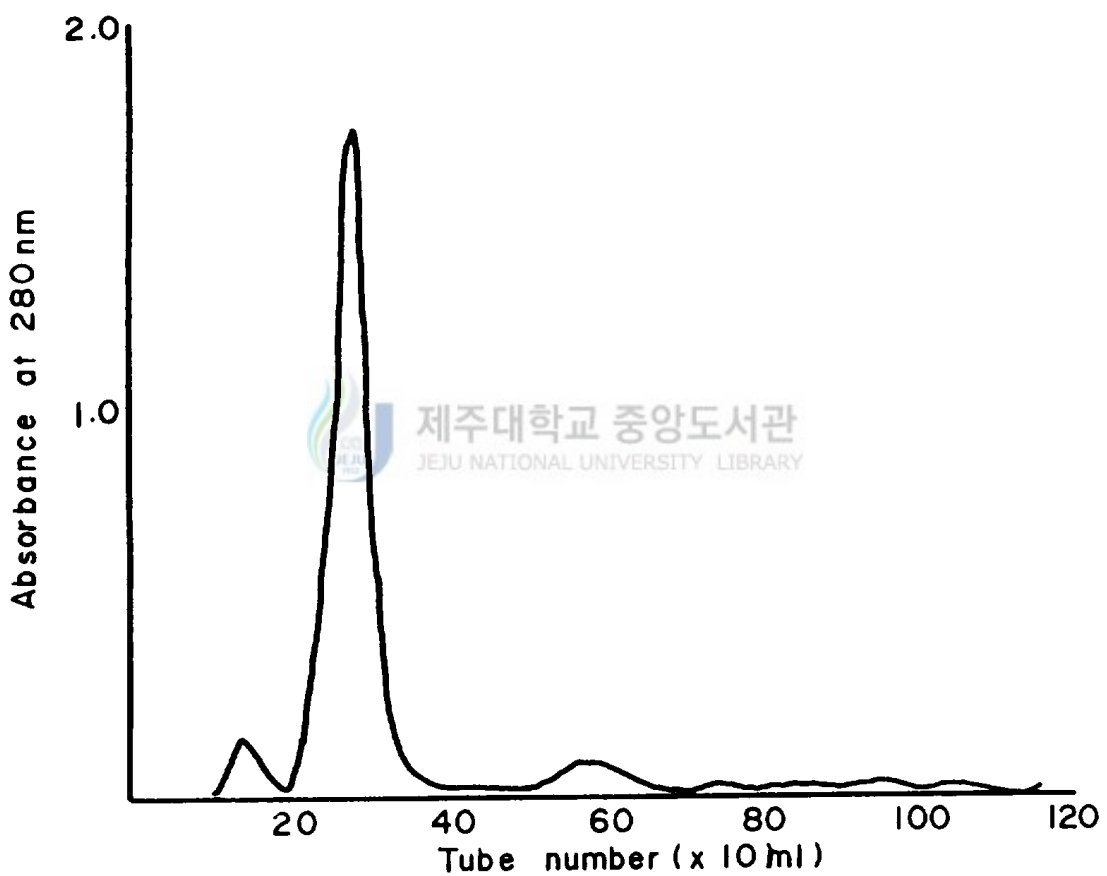


Fig. 8. Elution patterns obtained by exclusion chromatography of Cheju native horse's whey protein, 2.5cm by 40cm column of Sephadex G-200, 0.02M phosphate buffer, pH 8.0.

4. DEAE-cellulose에 의한 casein의分別

蛋白質은 生體의 構造維持, 代謝機能에 不可缺한 成分인데, 約 20여種의 amino酸이 peptide結合으로 分子構造를 이룬 高分子 化合物로 乳汁中에는 pH 4.6에서 沈澱하는 casein과 沈澱하지 않는 乳清蛋白質로 大別되며 그 함량은 牛乳인 境遇 2.8~4.0%, 本 試驗의 在來馬乳는 2.62%이다.

牛乳蛋白質은 多方面에 걸쳐 現在까지 數많은 研究 結果들이 報告되고 있는바, casein에는 α s-casein, β -casein, k-casein 및 各種 minor 成分으로 이루어지며 이들 各 casein은 여러 形態로 結合된 複合蛋白質로 構成되어 있으며 (Pavies等, 1960; Farrell, Jr等, 1973), 이러한 casein의 物理化學的 變化를 究明하기 爲하여 各 casein의 分別方法이 確立되었다. 卽, Mellander (1939)가 Tiselius(1937)에 依해 開發된 電氣泳動法을 利用하여 α -, β -, γ -casein의 分離에 適用한 以後 여러 研究者들에 依해서 各 casein 成分의 分離法도 改良되어 乳蛋白質 研究에 커다란 進展을 이루었다(Wake等, 1961; Zittle等, 1963; Aschaffenburg, 1963). 特히 Raymond等(1960)에 依한 polyacrylamide gel 電氣泳動法の 開發은 從來의 自由界面電氣泳動法에 比해 훨씬 銳敏하여 性質이 類似한 成分의 分離, 檢出이 可能하게 되었는데 最近에 와서 DEAE-cellulose chromatography나 Sephadex gel filtration 등의 方法과 並用되고 있다.

이와같이 蛋白質의 分離에 利用되고 있는 ion交換 chromatography中에서 가장 많이 利用되는 것은 DEAE-cellulose로 Peterson等(1958)에 依해 血清蛋白質의 分離에 使用된 以來, Tarassuk等(1962)이 처음으로 乳蛋

白質의 分離에 應用하였다. 그후 Dumas 等(1964)은 尿素를 包含하는 緩衝液을 使用해서 casein의 DEAE-chromatography를 實施, 完全히 均一치는 않으나 α_s - β - 및 k-casein으로 分離하였고, Rose 等(1969)은 DEAE-cellulose(Whatman DE-11)을 利用하여 casein 復合體의 主成分을 分別한 後, 電氣泳動을 通하여 casein의 定量分析이 Morr 等(1971)의 gel electrophoresis pattern에 依한 分析보다도 正確하다는 結果를 얻었다. 그러나 Davis 等(1977)은 DE-11보다 分離能力이 優秀한 DE-52를 利用하여 Rose 等(1969)보다도 正確하다고 結果를 얻었다. 即 DE-11을 使用한 境遇 4 個의 畫分으로 分離되었고 k-casein과 γ -casein의 分別이 좋지 않았는데 比하여 DE-52는 7 個의 分劃으로 分離되었으며 k-casein과 γ -casein의 分別이 明確하였고 특히 α_{s1} -casein과 α_s -casein의 minor 成分이 分別되어 지금까지 報告된것 中 가장 分離能力이 優秀한 것으로 報告되고 있다. 또한 金等(1983)은 DE-52를 利用 column의 길이, NaCl의 濃度, 2-mercapt-oethanol의 添加 및 試料의 alkylation 等이 分別에 미치는 影響을 檢討한 바 있는데 아직 馬乳에 關하여는 上記와 같은 研究報告가 全無한 實情이 다. 따라서 本 實驗은 在來馬乳의 全 casein으로 부터 α_s - β - 및 k-casein을 分離하여 이들의 效果的인 分別法을 確立함과 同時에 各 casein의 物理化學的인 變化를 究明하기 爲한 方法의 一環으로 分別能力이 優秀한 DEAE-cellulose(Whatman DE-52)를 使用하여 全 casein을 分別하였다.

먼저 在來馬乳 casein을 0.01 M imidazole- 鹽酸 緩衝液(pH7.0)을 利用해서 室溫에서 DEAE-cellulose chromato를 實施, 그 結果를 Fig. 9에 나타 냈다.

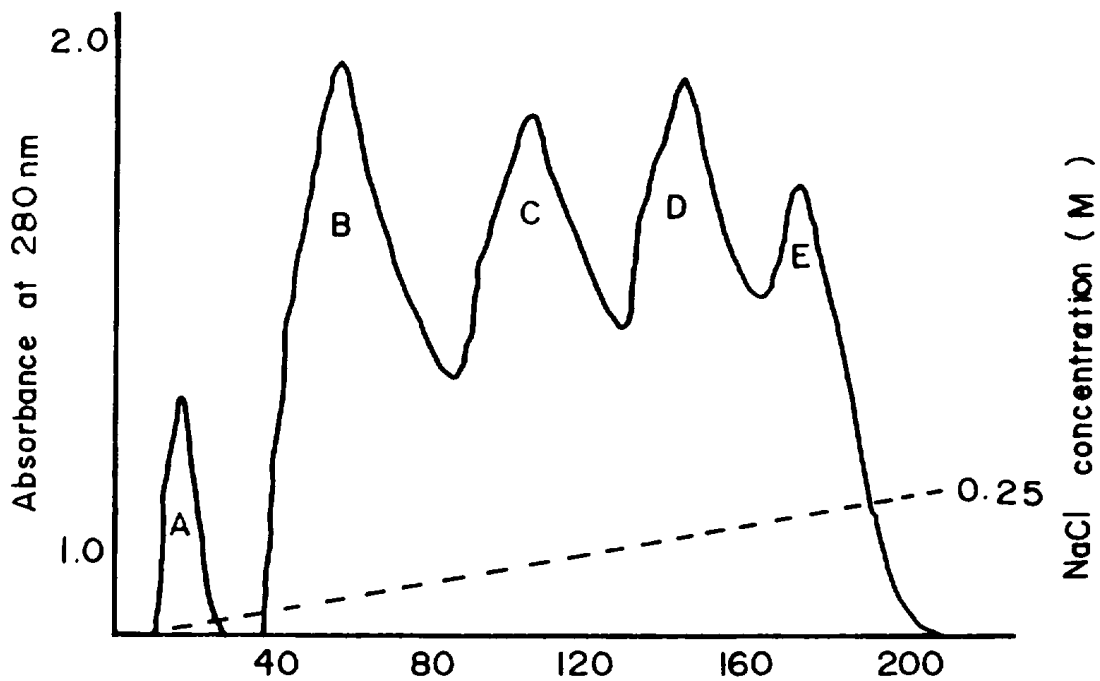


Fig. 9. Chromatography on a DEAE-cellulose column ($2 \times 50\text{cm}$) of 1g of Cheju native horse's casein using a linear gradient from 0.05 - 0.25M NaCl. Flow rate was maintained at 50 ml per hour. A tube contained 10ml elute.

그림에서 보는바와 같이 五個의 分劃으로 分別되었으며, 各 分劃의 溶出成分을 確認하기 爲해 polyacrylamide gel 電氣泳動으로 分析한 結果를 Fig. 10에 表示하였다. 이 結果에서 Fig. 9의 第一分劃 (peak A)에는 k-casein이, 第二, 三分劃 (peak B.C)에 β - 및 β -rich casein, 第四·五分劃 (peak 4, 5)에는 α s- 및 α s-rich casein이 溶出되고 있음을 알 수 있으며 peak 4에는 β -casein에 相當하는 夾雜物이 보여 牛乳의 境遇와는 달리 純粹한

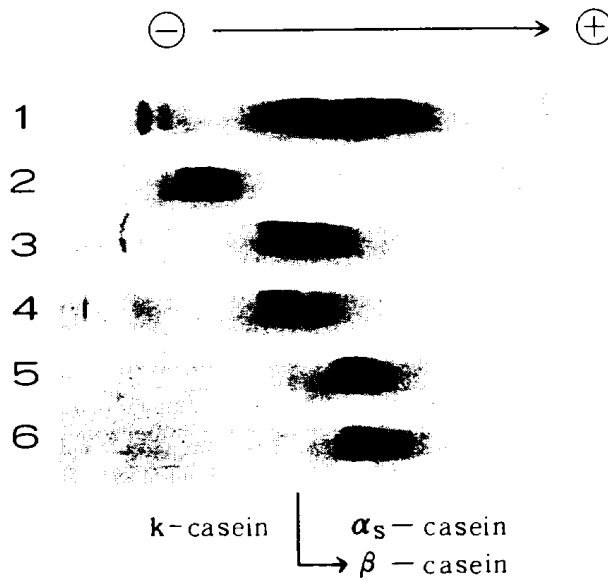


Fig. 10. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of Cheju native horse's whole casein and casein fractions obtained by DEAE-cellulose column chromatography.

1. whole casein; 2. peak A; 3. peak B;
4. peak C; 5. peak D; 6. peak E.

α_s -casein 과 β -casein 을 分離하기 爲해서는 本 實驗의 DE-52 를 利用한 chromatography 만으로는 不可能하고 Richardson 等(1975)이 山羊乳에 適用한 研究에서 報告한 바와같이 再次 CM-cellulose chromatography 를 實施하여야만 可能할 것으로 생각된다.

한편, 第一分劃(peak A)에서 얻어진 成分이 k-casein 인지를 確認하는 한 방법으로 2-mercaptoethanol 을 添加하여 電氣泳動을 實施한 結果는 Fig. 11 에서와 같이 第一分劃이 k-casein 임이 確認되었다.

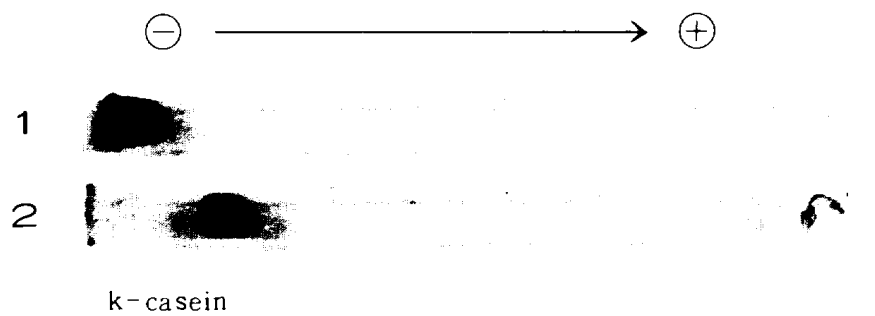


Fig. II. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of k-like casein (fractin A of Fig. 9) with and without addition of 2-mercaptoethanol.

1. k-like casein
2. k-like casein with 2-mercaptoethanol

摘 要

本 試驗은 濟州馬乳의 理化學的 性狀을 究明하기 爲하여 主要 成分을 分析하고 電氣泳動과 Sephadex G-200 으로 脫脂乳, 乳清蛋白質 및 casein을 分別하는 한편 DEAE-cellulose 를 使用하여 酸 casein 을 分別 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 濟州 在來馬乳의 比重은 1.037, 酸度 0.08 %, pH6.8 이었고 70 % 알콜 試驗은 弱한 陽性反應을 나타냈다.

2. 乳汁中の 主要 成分은 總固形分 10.15 %, 無脂固形分 9.20 %, 脂肪 0.98 %, 蛋白質 2.62 %, 乳糖 5.96 %, 無機物은 0.59 %였다.

3. 蛋白質의 窒素分布는 casein이 2.36 %, 乳清蛋白質 0.26 %, 非蛋白態窒素 0.08 %, 12 % TCA 沈澱蛋白質은 2.54 %였다.

4. 電氣泳動을 통한 casein 의 主要 成分은 α_s -, β -, k-casein이었고 微量成分으로 γ -, Ts- 및 S-casein의 存在가 觀察되었으며 乳清蛋白質은 β -lactoglobulin 과 α -lactalbumin이 主成分을 이루고 whey₁은 確認되지 않았으나 serum albumin의 存在 可能性을 提示하였다.

5. casein과 乳清蛋白質에 2-mercaptoethanol 添加試驗은 電氣泳動圖上 뚜렷한 反應現象을 나타내어 k-casein 및 β -Lactogloblin 共히 S-S結合이 存在함을 알 수 있었다.

6. 0.02 M phosphate buffer 를 使用하여 Sephadex G-200 column에 依한 各 蛋白質의 分別에서 脫脂乳는 2個의 fraction을 나타내고 大部分의 casein이 第一分劃에서, 乳清蛋白質이 第二分劃에서 溶出되었고, 全 casein은 1個

의 fraction이 얻어졌다.

7. 3.3M 尿素와 0.01M 2-mercaptoethanol을 함유한 0.01M Imidazole-HCl buffer를 사용하여 DEAE-cellulose에 의한 酸 casein의 分別結果는 5개의 fraction으로 나타났으며 第一分劃은 k-casein, 第二·三分劃에는 β -casein, 第四·五分劃에는 α s-casein이 各各 溶出되었다.



参 考 文 献

1. A.O.A.C. 1975. Official method of analysis(12th ed.).
Association of official agricultural chemists. Washington, D.C.
2. Aschaffenburg, R. 1963. Preparation of β -casein by a modified urea fraction method. J. Dairy Res., 30 : 259.
3. Davies, D.T. and J.C.D. White. 1960. The use of ultra-filtration and dialysis in isolating the equous phase of milk and in determining the partition of milk constituents between the aqueous and disperse phases. J. Dairy Res., 27 : 171.
4. Davies, B. J. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 59 : 994.
5. Davies, D. T. and A. J. R. Law. 1977. The composition of whole casein from the milk of Ayrshire cows. J. Dairy Res., 44 : 447.
6. Downey, W.K. 1972. Structure of bovine casin micelles. Neth. Milk Dairy J., 26 : 219.
7. Dumas, B. R., J. L. Maubois, G.Mocquot and Garnier. 1964. Etude de la constitution de la casein de veche par chromatographie sur colonnes de diethylaminoethyl-cellulose en milieu uree. Biochim. Biophys. Acta, 82 : 494.
8. Farrell, H.M. Jr. 1973. Model for casein micelle foration. J. of Dairy Sci., 56 : 1195.
9. Kulisa, M. 1970. Effect of some non-heritable factors on mare's milk

- composition during lactation. Zeszyty Naukowe Wyzszej Szkoły Rolniczej W. Krakowie, NO. 61, Zootechnika, 10 : 17.
10. Kudryaslov, A. and O. Krylova. 1966. Kouevodstoo i Konnyl Sport, 35(4) : 27: cited from Dairy Sci., Abstr. 28 : 2299.
 11. Larson, B. L. and K. A Kendall. 1957. Daily production of the specific milk proteins during the lactation period. J. Dairy Sci., 40 : 377.
 12. Lawrence, A. J. 1968. The determination of lactose in milk products. Austalion J. of Dalry Tech., 23: 103.
 13. Mellander, O. 1939. Electrophoretiche untersuchung von casein. Biochem. J., 300 : 240.
 14. Morr, C. V., H. C. Lin and R. V. Josephson. 1971. Fractination of skim milk casein micelles by rate-zone and isopycnic-zone ultracentrifugation in sucrose gradients. J. Dairy Sci., 59 : 994.
 15. O'coner, P. and P. F. Fox. 1977. The proteins and salts of some non-bovine milk. J. of Dairy Reserch, 44 : 607.
 16. O'conor, P. and P. F. Fox. 1973. Temperature-dependant dissociation of casein micelles from the milk of various species. Neth. Milk Dairy J., 27 : 199.
 17. Perterson, F. R., Nauman, L. W. and T. L. Mcmeekin. 1958. J. Am. Chem. Soc., 80 : 95.
 18. Raymond, S. and Y. Wang. 1960. Anal. Biochem., 1 : 391.
 19. Rice, F. E. and Markley, A. L. 1924. J. Dairy Sci., 7 : 468.

20. Richardson, B.C. and L.K. Creamer. 1975. Comparative micell : IV. The simility between caprine α_s -casein and bovine α_{s3} -casein. Biochim. Biophys. Acta, 393 : 37.
21. Rollri, G.D., B.L. Larson and R.W. Touchberry. 1956. Protein production in the bovine. Breed and individual variation in the specific protein constituents of milk. J. Dairy Sci., 39 : 1683.
22. Rose, D., D.T. Davies and M. Yaguchi. 1969. Quantiative determination of the major components of casein mixtures by column chromatography on DEAE-cellulose. J. Dairy Sci, 52 : 8.
23. Tarassuk, N.P. and M. Yaguchi. 1962. Chromatography of milk proteins on DEAE-cellulose. J. Dairy Sci, 45 : 253.
24. Tiselius, A. 1937. Trans. Faraday Soc., 33 : 529.
25. Ullrey, D.E., R.D. Struthers, D.G. Hendricks and B.E. Brent. 1966. Composition of mare's milk. J. Anim. Sci., 25 : 217.
26. Wake, R.G. and Baldwin, R.L. 1961. Analysis of casine fraction by zone electrophoresis in concentrated urea. Biochim. et Biophys. Acta, 47 : 225.
27. Yaguchi, M. and N.P. Tarrassuk. 1965 a. Gel filtration of acid casein an skim milk on Sephadex. J. Dairy Sci, 50 : 1985.
28. Yaguchi, M and N.P. Tarassuk. 1965b. Gel Filtration of casein on sephadex J. Dairy Sci. Abstr., 27 : 3222.
29. Yaguchi, M. and N.P. Tarassuk. 1967. Gel filtration of acid casein and skim milk on Sephadex. J. Dairy Sci, 50 : 1985.

30. Zittle, C.A. and Custer, J. H. 1963. Purification and some of the properties of α s-casein and k-casein. J. Dairy Sci, 46 : 1183.
31. 姜冕熙. 1960. 韓國馬產의 歷史的研究. 第1報: 先史 三國時代의 馬產. 韓畜誌. 2 : 14 - 18.
32. _____. 1961. 韓國馬產의 歷史的研究. 第2報: 高麗時代의 馬產. 韓畜誌. 3 : 21-25.
33. _____. 1965. 韓國在來馬의 系統에 關한 研究. 韓畜誌. 7:92-97.
34. _____. 1969. 韓國在來馬에 關한 歷史的 및 形態學的 研究. 韓畜誌. 11(4) : 351-379.
35. 金榮教·張柱翊. 1974. 韓牛乳 蛋白質에 關한 研究. 第1報 : DEAE - Cellulose 에 依한 韓牛乳 蛋白質의 分別. 韓國食品科學會誌. 6 : 75.
36. 金遇珉·申東澈·金榮教. 1983. DEAE - cellulose 에 依한 casein 의 分別에 關한 檢討. Korean, J. Dairy Sci. 5:135.
37. 全宗圭. 1963. 濟州馬와 導入馬의 交雜試驗. 濟州試驗報告.
38. _____. 原種馬保存 및 生産能力向上에 關한 研究. 濟州試驗報告. 175-180.
39. 南都泳. 1961. 朝鮮時代 濟州島牧場. 韓國牧畜業研究의 一端-.
40. 李基萬. 1961. 濟州馬體型에 關한 生物測定學的研究. 韓畜誌. 3 : 63-73.
41. _____. 1970. 濟州馬의 毛色의 在來名稱및 分布에 關한 研究. 韓畜誌. 12(2) : 140.
42. 鄭昌朝·朴英一·金承浩·康太淑. 1981. 濟州馬의 保護增殖 및 利用性 擴大方案에 關한 研究. 濟州道 研究報告.
43. 鄭昌朝·康太淑. 1982. 濟州在來馬의 飼育現況과 經營實態에 關한 調查研

- 究. 濟州大學 論文集. 14 : 53 - 64.
44. 濟州道. 1983. 濟州統計年報.
45. 朝鮮總督農事試驗場. 1929. 馬匹改良에 관한 試驗. 農事試驗場 25 週紀念誌
(上) 614.
46. 里正義·材田喜. 1932. 日畜會報. 1977.

