

# 濟州 在來馬乳 成分에 關한 研究

李 賢 鍾\* 金 鎬 九\*\*

## 目 次

I. 緒 論	2. 酸 Casein 및 乳清蛋白質의 電氣泳動
II. 材料 및 方法	3. Sephadex Column 에 依한 分別
III. 結果 및 考察	4. DEAE-Cellulose 에 依한 Casein 의 分別
1. 理化學的 性狀 및 一般成分	摘 要
A. 理化學的 性狀	
B. 一般成分	
C. 蛋白質 分布	

## I. 緒 論

馬는 家畜中에서 가장 늦게 家畜化한 動物로서 일반적으로 新石器時代 末期(約 7,000年前)에서 青銅器時代 初期에 Ural 海 주변의 Ukraina 지방, 동부 Russia 초원 Kazak 지방 등을 중심으로 家畜化된 것으로 추측되며, 우리나라에 傳來된 시기는 명확하지 않으나 지금의 滿洲·蒙古지방으로 부터 生活條件이 좋은 동쪽으로 이동 定着하여 漁獵採取 및 原始的인 庭園耕作을 시작할 때로 推定되고 있으며, 소와 함께 우리 민족의 역사와 생활에 많은 영향을 끼쳐왔다.

즉, 馬는 여러가지 用途가운데서도 乘用에 적합한 동물인 까닭에 軍事上 중요한 위치에 놓이므로 각 시대를 통하여 馬產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 자체가 민족과 함께 살아있는 귀중한 文化財이며, 이와 같이 민족과 더불어 苦樂을 같이 해온 在來馬를 文化財로서 永久히 보존함은 물론, 우리나라와 같은 環境條件에서는 體質이 強健하고 飼育이 容易하며 局限된 用途에 적합한 在來馬의 改良 이용은 지극히 중요한 課題라고 확신한다.

그런데 現今 文明의 發展에 따라 馬의 飼育頭數 減少는 세계적으로 공통된 현상이기는 하나 특히 韓國 在來馬는 飼育頭數가 현재 2,900頭로 이 중 濟州道에 1,700頭가 飼育되고 있으며 이것은 1960年の 20,000頭, 1970年の 10,000頭에 비해 급격한 減少趨勢를 나타내고 있는데 이대로 放置하면 멀지않은 장래에 純粹한 韓國 在來馬는 찾아보기 힘들 것으로 생각된다.

우리나라의 중요한 在來 家畜으로서 牛, 馬, 豚, 鷄, 山羊 등을 列舉할 수 있으나 이 가운데 豚과 鷄는 李朝末 外國產 改良種의 導入과 이들과의 混血에 의해 特有的 形質을 잃고 이미 雜種化 되어 조사연구가 곤란한 상태에 있다.

또한 韓牛도 최근에 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 감소되어 가고 있는 반면, 馬와 在來山羊은 雜種化에 의한 改良이 되지 않았던

\* 農科大學 \*\* 西歸農高 教師

관계로 현재도 在來의 形質을 그대로 維持하고는 있으나 馬는 經濟性 缺如로 飼育頭數가 매년 減少되어 가고 있는 실정이다.

따라서, 정부당국에서는 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 금년에는 우선 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 차원에서 摸索하고 있다. 어떤 품종 혹은 系統의 순수성을 定立하는 방법으로는 다음 3 가지 방법이 活用되고 있다. 첫째는 外貌를 통해서 동일한 品種 및 系統을 定立하는 방법으로 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 의해서 분리하여 그 變異體의 出現頻度 및 出現有無에 의해 같은 系統 혹은 品種을 定立하는 방법으로 最近 電氣泳動方法의 발전으로 遺傳的 變異體의 分離能力이 향상됨에 따라 活潑히 이용되고 있으며, 세째는 乳蛋白質의 遺傳的 變異體를 둘째번과 같은 方法으로 분리하여 定立하는 방법이다.

濟州馬에 대한 研究報告는 姜(1960, 1961) 및 南(1961)의 韓國馬產의 역사적 考察에서 韓國馬產의 起源을 B. C 7世紀頃으로 推定하고, 북으로 부터 남하하여 韓半島 기후풍토에 適應할 수 있는 品種으로 형성되었으며 三國時代에는 馬政을 강화하여 상당수의 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 의해 본격적으로 飼育되었다고 報告하였다. 또한 姜(1965, 1969)은 韓國 在來馬의 系統을 Tarpan系와 蒙古馬가 基礎되어 交雜化 課程을 거쳐 성립된 固有 品種으로 推察하고 本土馬는 體高 116cm인 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 등으로 濟州馬보다 크며 그 系統은 1930년까지 區別되었으나 현재 南韓에는 本來의 南韓馬와 濟州馬의 區別조차 할 수 없고 현재 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 실시, 30個 部位를 測定 分析한 결과, 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 의해 一帶雜種의 能力을 비교하였는데 體軀面에서 상당한 雜種 強勢의 효과가 있었다고 보고하였다. 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 조사보고한 바 있다. 이어서 최근 鄭等(1981)의 濟州馬의 保護·增殖 및 利用性的 擴大방안을 조사 연구한 결과, 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 繁殖園地를 造成해야 한다고 주장하였으며, 또한 濟州 在來馬의 飼育現況과 經營實態에 관한 조사(鄭等, 1982)에서는 馬飼育 專業능가가 없고 대부분이 繁殖用으로 飼育하고 있으나, 年中 放牧形態가 대부분이고 營養水準이 극도로 악화되어 育成率이 떨어져 農家所得에 영향을 끼치고 있다고 보고하였다. 이와 같이 濟州馬에 관한 연구는 거의가 繁殖 및 育種 分野에 數件이 있을 뿐 濟州馬乳 成分에 대한 연구는 전혀 없는 상태이다.

따라서 本 研究는 豚, 鷄와 같이 在來種이 絶滅되기 전에 현재까지 충분히 究明되지 않은 濟州馬 乳成分의 理化學的인 諸性狀을 改良馬와 비교하여 그 性狀을 究明하므로써 濟州馬의 고유한 形質과 純粹한 在來馬의 정립에 基礎資料를 提示할 목적으로 실시하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 原料乳의 採取

#### A. 對象

- 1) 濟州在來馬는 濟州道 畜產開發事業所 種馬場에서 品種 保存을 위해 飼育中인 分娩後 1개월 이상된 牝馬 10頭로 하였으며
- 2) 改良馬는 濟州市 管內 個人 牧場에서 飼育中인 Thoroughbred 種 5頭를 供試畜으로 하였다.

#### B. 採取方法

個體別 手搾乳에 의해 搾乳 即時 密栓병으로 運搬, 試料로 사용하였다.

## 2. 酸度, pH, alcohol 檢査 및 比重測定

酸度は 試料 18ml에  $\text{CO}_2$ 가 함유되지 않은 同量의 蒸溜水를 첨가하여 혼합한 후 1% Phenolphthalein 溶液 0.5ml 넣고 0.1N-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 공식으로 산출하였다.

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

alcohol 試驗은 試料 2ml에 70% ethylalcohol 2ml를 가하여 15秒 後 凝固 沈澱하는 것을 alcohol 陽性乳 (+), 그렇지 않은 것을 陰性乳 (-)로 표시하였으며, 比重은 試料 200ml를 실린더(cylinder)에 조용히 옮긴 후 15°C에서 牛乳 比重計에 의하여 측정하였다. 15°C 이의 溫度의 경우는 比重補正表에 의하여 溫度補正을 하였으며, pH는 유리電極 pH meter 를 이용하여 측정했다.

## 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 의해 측정하였고 無脂固形分은 全固形分으로 부터 脂肪含量을 빼서 산출하였다.

## 4. 全 Casein 의 調製

全 Casein 은 20°C pH 4.6의 等電點에서 沈澱된 酸 Casein 으로, 採取 直後의 新鮮乳를 3,000 r.p.m 에서 20分間 원심분리하여 얻어진 脫脂乳에 蒸溜水를 가하여 2 배량으로 稀釋한 후 0.5N-HCl 을 첨가하여 pH 4.6에서 沈澱시키고 上澄液을 제거한 다음 蒸溜水로 懸濁하여 0.5 N-NaOH를 첨가, pH 7.0以下에서 在溶解하여 상기의 沈澱造作을 삼회반복하여 얻어진 Casein 을 alcohol, acetone, ether 의 순으로 처리하여 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.m 에서 20分間 遠心分離 후 얻어진 脫脂乳에 0.5 N-HCl 을 가하여 pH 4.6에서 Casein 을 沈澱시킨 후 濾過하여 沈澱部分의 窒素를 Kjeldahl 方法으로 측정하여 여기에 6.38을 곱해 산출하였으며, 또 沈澱蛋白質量은 全蛋白質量에서 可溶性蛋白質量을 빼서 표시하였다.

## 6. Gel chromatography

本 試驗에 사용한 Sephadex는 Pharmacia(Uppsala, Sweden) 제품으로 分別範圍가 5,000~800,000이고 水分含量能力(water regain)이  $20.0 \pm 2.0$  g water/g dry gel 인 Sephadex G-200을 사용하였으며 사용에 앞서 緩衝液(0.02 M phosphate buffer pH 7.0)으로 洗滌한 후 平衡化시켜서  $2.5 \times 45$ cm의 coloum 에 충전하였다. 試料는 같은 緩衝液에 24시간 透析 후 chromatography 를 실시하였다.

## 7. DEAE-cellulose ion 交換 chromatography

全 casein 分別에 쓰인 DEAE-Cellulose 는 Whatman 社의 DE-52로, 먼저 4.5M 尿素와 0.1%-2 mercaptoethanol 을 함유하는 0.01M imidazole-鹽酸緩衝液(pH 7.0)으로 洗滌해서 脫氣

後 平衡化시켰으며 이것을  $2 \times 50\text{cm}$ 의 column에 充塡한 다음 室溫에서 chromatography 用 緩衝液으로 안정화 시켰다. 한편 酸 casein 1g을 上同의 緩衝液에 溶解하여 44시간 透析한 다음 透析試料 180ml(1g의 酸 casein)를 column에 吸着시키고 食鹽濃度 0.05~0.25M의 1 linear gradient로 流速을 50ml/h로 10ml씩 分取하였으며 液중의 蛋白質 濃度는 280 mm의 吸收에 의해 측정, 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 실시하였다. 즉 4.5M 尿素를 함유하는 pH 8.9의 tris-鹽酸 緩衝溶液을 이용하였는데, 먼저 7%의 acrylamide의 下層 Gel은 A액, C액 및 過硫酸 ammonium을 함유하는 7.2M 尿素液을 1 : 2 : 5의 비율로 혼합해서 gel화 시켰으며 이 下層 gel에 3.5% acrylamide의 上層 gel을 重層하고, 試料는 1M sucrose를 함유하는 9M 尿素 溶液에 溶解시켜 사용하였다. 泳動은 室溫에서 실시하고 column 1本當 3mA로 約 90分間 通電하였으며 종료 후 gel을 1% amido black 10B의 7%醋酸溶液으로 20~30분간 染色한 후 7%醋酸溶液重에서 脫색시켰다.

## III. 結果 및 考察

### 1. 理化學的 性狀 및 一般成分

#### A. 理化學的 性狀

濟州 在來馬의 比重, 酸度, pH, alcohol 시험 결과는 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 등, 1966)로서 물보다 약간 무거우나 이것은 馬乳中에 함유되어 있는 물보다 무거운 無脂固形分(比重 1.62)이 물보다 가벼운 성분인 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 등, 1966) 및 Malopolski 1.0344(Kulisa, 1970)보다 높으며 牛乳의 1.032보다 훨씬 높은 결과를 나타내, 在來馬乳가 Arab馬나 Malopolski馬乳 보다 無脂固形分 함량이 높음을 추정할 수 있다.

乳酸表示法에 의한 乳汁의 酸度는 固有酸度和 醱酵酸度로 구별되나 보통 양자를 합한 全酸度로서 나타내며, 固有酸度는 乳汁 본래의 酸度로서 Rice 등, (1924)에 따르면 乳成分中の casein, albumin, 枸橼酸, 炭酸 gas 및 磷酸에 의해 결정되고, 醱酵酸度는 分泌 後 시간이 경과함에 따라 乳酸菌의 乳酸醱酵로 생성되는 乳酸에 기인하는 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 표시한 Malopolski馬乳의 3.5 (신선한 牛乳의 S. H

酸度は 5~8)와 비슷한 수치를 나타내고 있다. 이와 같이 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 결정되기 때문에 在來馬乳 成分中の 이들 함량이 牛乳에 비해 낮은 것이 추찰된다.

pH는 6.80으로서 里等(1932)이 측정한 7.22보다 낮으며 牛乳의 6.6보다 약간 높은 경향을 보여주고 있다. alcohol 檢査는 牛乳의 경우 乳汁의 가열에 대한 安定性を 알기위해 폭넓게 이용되고 있는 방법으로 이 방법에 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 凝乳酸素가 생긴 汚染乳, 乳房炎乳, 低酸度 alcohol 不安定乳를 檢出할 수 있으며 일반적으로 alcohol 檢査에서 陰性인 乳汁은 熱安定성이 높다. 本 實驗의 在來馬乳는 약한 陽性反應을 나타내고 있는데 이와같은 결과로 在來馬乳의 熱安定성이 낮은 것으로 생각 되어지나 그 원인을 구명하는데 앞으로 다방면의 追究가 필요하다.

### B. 一般成分

本 實驗에서 사용한 濟州 在來馬乳의 一般造成成分의 분석 결과는 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Main components of Cheju 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

一般的으로 乳汁의 組成은 搾乳時間, 泌乳期, 季節, 品種, 年齡, 飼料 및 疾病 등에 따라 변한다고 보고되었으며 (Rolleri 等, 1956; Larson, 1957), 각종 동물의 乳汁을 비교하여 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 동물의 乳汁은 固形分과 脂肪含量이 높다. 이러한 乳汁의 組成과 동물의 발육과는 密接한 관계가 있는데 발육이 빠른 동물은 蛋白質과 灰分, 특히 Ca 과 P의 함량이 높다고 알려져 있다.

在來馬乳, Arab 馬乳(Ullrey, 1966) Przewalski 馬乳(Masek, 1938)의 一般組成을 비교하여 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 현저한 차이를 나타내고 있고, 기타 蛋白質, 乳糖은 약간의 차이를 보여주고 있으며, 無機物은 함량면에서 비슷하나 無機物의 종류 및 存在樣式 예를들면 ion 性, 可溶性, Colloid 性 등에 관해서는 좀 더 상세한 研究가 필요하다.

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

	Total solids	Fat	S.N.F.	Protein	Lactose	Ash
A r a b 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

한편 牛乳와의 차이는 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 수준을 나타내고 있다. 이상과 같이 一般成分 중에서 他品種의 馬乳와 명확한 차이를 나타내는 것은 脂肪인데, 이것은 前述한 品種間의 차이에 기인되는 것으로 생각되고 기타 成分에 있어서는 커다란 차이점을 발견할 수 없었다.

### C. 蛋白質의 分布

Table 4 에 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 대한 casein 의 비율은 약 52%로 O'corner 等(1976)이 보고한 Hostein 乳(70%), 山羊乳(75%), 緬羊乳(72%)보다는 낮았으나 馬(47%) 및 당나귀乳(49%)와 거의 비슷하거나 다소 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 약간 높았다.

## 2. 酸 casein 및 乳清蛋白質의 電氣泳動

Kudryalov(1966) 等이 처음으로 馬乳 casein 의 不均一性에 대하여 보고한 이래, 이의 이용 상 문제점 등으로 牛乳나 山羊乳에 比하여 理化學的 性狀에 관한 연구는 활발치 못하여 各構成 成分의 分離 및 性狀 究明이 완전히 이루어져 있지 않으나, 그 이후 O'corner 等(1973) 및 Kingsbury 等(1976)이 電氣泳動變에 의해 馬乳를 構成하는 주요 蛋白質은  $\beta$ -Lactoglobulin  $\alpha$ -Lactalbumin, k-casein,  $\beta$ -casein 및  $\alpha$ <sub>s1</sub>-casein 이고 電氣泳動的 舉動은 牛乳와 거의 비슷한 樣象을 보여주고 있으나, casein 區分에서  $\alpha$ <sub>s1</sub>과  $\beta$ -casein 分離帶가 폭넓게 자리를 차지하고 있으며 특히  $\alpha$ <sub>s1</sub>-casein 은 적어도 7개 이상의 minor zone 들이 짧은 거리를 두고 존재한다고 발표하였다.

또한 馬乳 casein 의  $\alpha$ <sub>s1</sub>: $\beta$ -casein 의 量的 比率는 1:1.6으로  $\beta$ -casein 의 함량이 높는데 이와같은 결과는 山羊(1:1.4), 緬羊(1:1.5) 및 당나귀(1:1.2)와는 거의 비슷하나 牛乳(1:0.6)와는 차이를 보여주고 있다.

이와같은 조사가 濟州 在來馬에 관해서는 전혀 이루어져 있지 않았으므로 蛋白質의 약 52%를 차지하는 casein 의 構成 成分을 究明하기 위하여 다음 實驗을 실시하였다.

먼저 在來馬 脫脂乳, casein 및 whey 蛋白質의 電氣泳動 Pattern 을 알아보기 위하여 Polyacrylamide gel 電氣泳動을 실시하였으며 (Fig. 1), Thoroughbred 乳 및 牛乳 casein 의 泳動圖와 定性的으로 비교한 결과는 Fig. 2 와 같다.

Fig. 2 에서 各 band 의 易動度는 Yaguchi 等(1967)의 방법에 따라 확인했는데, 在來馬乳 casein 의 電氣泳動的 舉動(易動度)은 Thoroughbred 乳 및 牛乳와 거의 유사했으며, 이의 主要構成成分은  $\alpha$ <sub>s1</sub>-,  $\beta$ - 및 k-casein 임을 확인할 수 있었다. 한편 牛乳 casein 에 있어서 微量成分인 r-, Ts- 및 s-casein 에 대응하는 band 도 Thoroughbred 乳의 경우 이에 대한 보고가



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

없이 확인할 수 없었으나, 本 實驗의 결과에서는 출현되지 않은 반면 在來馬乳에 있어서는 뚜렷이 확인할 수 있는 차이점을 보여주었다.

또한 馬乳  $\alpha$ s-casein이 최소한 칠개의 성분으로 구성되어 있는데(O'corner, 1973), 이에 비해 在來馬의  $\alpha$ s-casein의 성분은 그 이상으로 추정되며 電氣泳動 Pattern의 濃度分布로 미루어 볼때 在來馬乳 casein의  $\alpha$ s-casein對  $\beta$ -casein의 量的 관계는 O'corner等(1973)이 보고한 1:1.6과 비슷함을 관찰할 수 있으나, 보다 정확한  $\alpha$ s-:  $\beta$ -casein의 比率 및  $\alpha$ s<sub>1</sub>-casein의 minor 성분을 위시한 각 casein의 성분 究明은 위의 電氣泳動 결과만으로는 확인할 수 없고 앞으로 Densitometer를 이용한 量的 比率 및 각 성분의 單離 등을 통해 더욱 상세히 구명해야 할 것으로 생각된다. Fig. 3은 在來馬乳 casein의 構成成分中 Fig. 2에서 나타난 k-casein의 존재를 확인하고, k-casein이 牛乳에서와 같이 s-s結合을 갖고 있는지를 究明하기 위해 casein溶液에 2-mercaptoethanol을 첨가해서 시행한 電氣泳動 결과인 바, Downey(1972)가 牛乳에서 보고한 바와 같이 在來馬乳의 casein에서도 k-casein이 확인되었으며 2-mercaptoethanol의 첨가에 의해 k-casein이 分解된 사실로 在來馬乳의 k-casein도 還元性이 s-s結合을 갖고 있음을 알 수 있다.

다음 Fig. 4는 在來馬乳 乳清蛋白質이 어떠한 성분으로 구성되어 있는지를 확인하고 牛乳 乳清蛋白質의 대부분을 차지하는  $\beta$ -Lactoglobulin이 s-s結合을 함유하고 있는지를 확인하기 위해 실시한 電氣泳動 결과이다. Fig. 4의 1에서  $\beta$ -Lactoglobulin 및  $\alpha$ -Lactoalbumin과

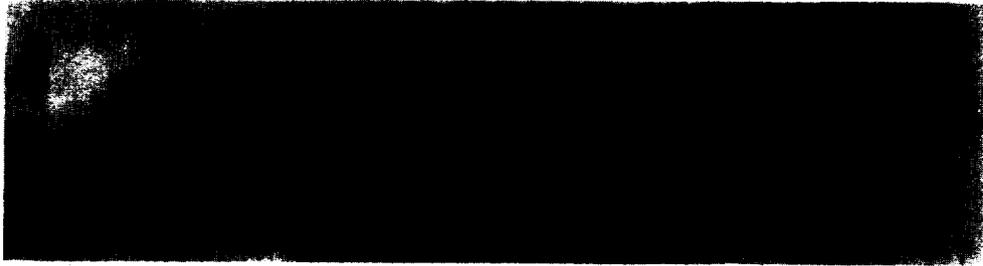


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of Cheju native horse's casein with and without addition of 2-mercaptoethanol

1, casein                      2, casein with 2-mercaptoethanol

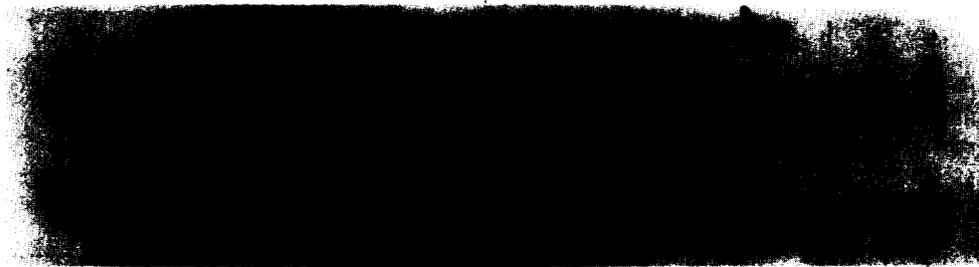


Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of Cheju native horse's whey protein with and without addition of 2-mercaptoethanol.

1, whey protein                      2, whey protein with 2-mercaptoethanol

serum albumin 으로 추정되는 band 가 출현하였다.

Kingsbury 等(1976)의 보고에 의하면 馬乳의 乳清蛋白質은 電氣泳動圖上 易動度の 순으로,  $\beta$ -Lactoglobulin,  $\alpha$ -Lactalbumin 및 serum albumin 으로 構成되며, 牛乳나 山羊乳 乳清에서는 존재하지 않으나  $\beta$ -Lactoglobulin 보다 빠른 成分이 존재함을 확인하여 그의 理化學的性質이 究明되지 않은 관계로 whey<sub>1</sub>이라 命名하였으며, whey<sub>1</sub>이 거의 全馬乳에 출현하는 반면 serum albumin 은 존재를 확인하지 못하였다. 在來馬의 경우 whey<sub>1</sub>의 존재가 電氣泳動圖上 확인되지 않았으나  $\beta$ -Lactoglobulin 및  $\alpha$ -Lactalbumin 이 출현을 볼 수 있었으며 특히  $\alpha$ -Lactalbumin 은 Kingsbury 等(1976)이 2 개의 band 가 출현함을 보고 하였는데 반하여 在來馬는 3 개로 나타나는 한편 뚜렷하지는 않으나 serum albumin 의 易動度에 해당되는 부분에 分離帶의 흔적을 인지할 수 있어서 이의 존재 가능성을 제시하였다.

또한 Fig. 4 의 gel<sub>2</sub>로 미루어 乳清蛋白質에도 還元性的 s-s 結合을 함유하는 成分이 있는 것을 알 수 있었으며 乳清蛋白質 各 構成成分의 含量, amino 酸 및 遺傳的 變異體 등에 관해 앞으로 계속적인 연구가 필요하다.

### 3. Sephadex Column 에 依한 分別

在來馬乳 脫脂乳 3 ml를 Sephadex G-200을 이용해서 分別한 결과를 Fig. 5 에, 分別된 各 分割의 電氣泳動 결과를 Fig. 6 에 나타냈다.

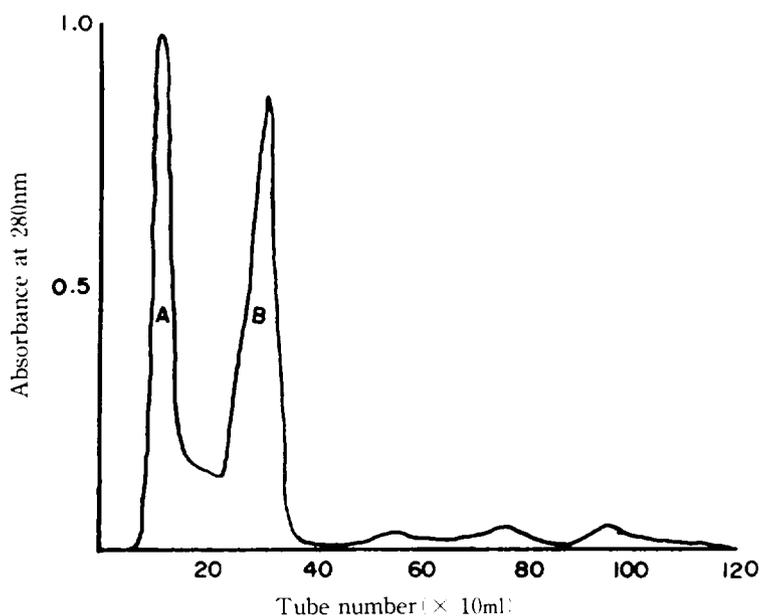


Fig. 5. Elution patterns obtained by exclusion chromatography of Cheju native horse's skim milk, 2.5 cm by 40cm column of Sephadex G-200, 0.02 M phosphate buffer, pH 8.0.



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 4 개의 分割으로 구분되어 第一分割은  $\alpha$ s-,  $\beta$ - 및 k-casein, 第二分割은  $\alpha$ s-과  $\beta$ -casein, 第三分割은  $\beta$ -Lactoglobulin 과  $\alpha$ -Lactalbumin 이 溶出되었는데 (Yaguchi 等 1967) 반하여, 在來馬 脫脂乳는 2 개의 分割으로 나누어져 第一分割은 牛乳와 마찬가지로  $\alpha$ s-,  $\beta$ - 및 k-casein 이, 第二分割에서는  $\beta$ -Lactoglobulin 과  $\alpha$ -Lactalbumin 의 乳清成分이 대부분 溶出되고 있다. 또 在來馬乳 casein 은 대부분 void volume (第一分割)에서 溶出되어 Sephadex G-200의 分別能力이 分子量 5,000~800,000인 점을 생각하면 在來馬乳 casein 이 分子量 800,000 이상의 casein 複合體 상태로 乳中에 존재할 가능성을 추정할 수 있다. 그러나 casein 成分이 거의 대부분 void volume 에 溶出한다는 점에서 gel chromatography 에 의한 分別에는 보다 큰 分子量의 分別이 가능한 gel 의 선택이 필요하다고 생각된다.

또한 酸 casein 의 chromato 결과를 Fig.7 에 나타내고 있는데, 牛乳에서 2 개의 分割으로 나누어져 第一分割은  $\alpha$ s-,  $\beta$ - 및 k-casein 이, 第二分割에 k-casein 을 除外한  $\alpha$ s-casein 과

$\beta$ -casein 이 溶出된다고 보고되었으나 (Yaguchi 等, 1965), 在來馬 casein 은 各 casein 成分을 함유한 1 개의 分割만을 나타내고 있는데 (Fig. 7), 이와같은 결과는 牛乳 casein 과 在來馬乳 casein 間에 構成 amino 酸 및 構造上의 차이가 기인되는 것으로 思料된다.

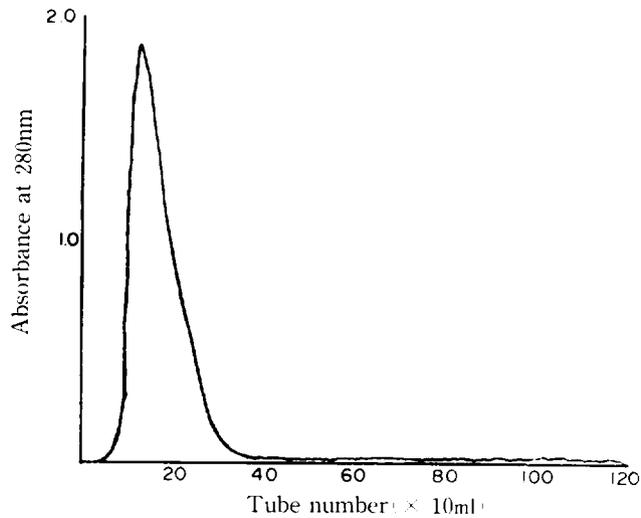


Fig. 7. Elution patterns obtained by exclusion chromatography of Cheju native horse's casein, 2.5cm by 40cm column of Sephadex G-200, 0.02M phosphate buffer, pH 8.0.

한편 在來馬乳 乳清蛋白質은 Fig. 8 과 같이 2 개의 分割으로 分離되어 牛乳의 3 개 (金 等, 1974)에 비해 1 개가 적으며 대부분의 乳清蛋白質은 두번째 分割에서 溶出되었다.

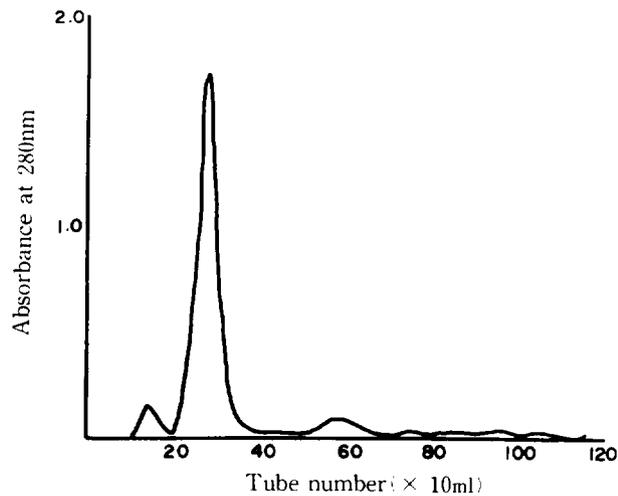


Fig. 8. Elution patterns obtained by exclusion chromatography of Cheju native horse's whey protein, 2.5cm by 40cm column of Sephadex G-200, 0.02M phosphate buffer, pH 8.0.

#### 4. DEAE-Cellulose 에 의한 casein 의 分別

蛋白質은 生體의 構造維持, 代謝技能에 불가결한 成分인데, 약 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 casein 과 沈澱하지 않는 乳清蛋白質로 大別되며 그 含量은 牛乳인 경우 2.8~4.0%, 本 試驗의 在來 馬乳는 2.62%이다.

牛乳蛋白質은 다방면에 걸쳐 현재까지 수많은 연구 결과들이 보고되고 있는 바, casein 에는  $\alpha$  s-casein,  $\beta$ -casein, k-casein 및 各種 minor 成分으로 이루어지며 이들 각 Casein 은 여러 형태로 結合된 複合蛋白質로 構成되어 있으며 (Pavies 等, 1960; Farrell, Jr 等, 1973), 이러한 casein 의 物理化學的 변화를 究明하기 위하여 각 casein 의 分別方法이 확립되었다. 卽, Mellander (1939)가 Tiselius(1937)에 의해 개발된 電氣泳動法을 이용하여  $\alpha$  -,  $\beta$  -, r-casein 의 分離에 適用한 이후 여러 연구자들에 의해서 各 casein 成分의 分離法도 改良되어 乳蛋白質 연구에 커다란 進전을 이루었다(wake 等, 1961; Zittle 等, 1963; Aschatfenburg, 1963). 특히 Raymond 等(1960)에 의한 Polyacrylamide gel 電氣泳動法의 개발은 종래의 自由界面電氣泳動法에 비해 훨씬 예민하여 성질이 유사한 成分의 分離, 檢出이 가능하게 되었는데 최근에 와서 DEAE-Cellulose chromatography 나 Sephadex gel filtration 등의 방법과 병용되고 있다.

이와같이 蛋白質의 分離에 이용되고 있는 ion 交換 Chromatography 중에서 가장 많이 이용되는 것은 DEAE-Cellulose 로 Peterson 等(1958)에 의해 血清蛋白質의 分離에 사용된 이래, Tarassk 等(1962)이 처음으로 乳蛋白質의 分離에 응용하였다. 後 Dumas 等(1964)은 尿素를 포함하는 緩衝液을 사용해서 casein 의 DEAE-Chromatography 를 실시, 완전히 균일치는 않으나  $\alpha$  s-,  $\beta$  - 및 k-casein 으로 分離하였고, Rose 等(1969)은 DEAE-Cellulose(Whatman DE-11)을 이용하여 casein 複合體의 주성분을 分別한 후, 電氣泳動을 통하여 casein 의 定量分析이 Morr 等(1971)의 gel electrophoresis pattern 에 의한 분석보다는 精確하다는 結果를 얻었다. 그러나 Davis 等(1977)은 DE-11보다 分離能力이 우수한 DE-52를 이용하여 Rose 等(1969)보다도 精確하다고 結果를 얻었다. 즉 DE-11을 사용한 경우 4개의 畫分으로 分離되었고 k-casein 과 r-casein 의 分別이 명확하였고 특히  $\alpha$  s<sub>1</sub>-casein 의 minor 成分이 分別되어 지금까지 보고된 것 중 가장 分離能力이 우수한 것으로 보고되고 있다.

또한 金 等(1983)은 DE-52를 이용 Column 의 길이, NaCl 의 濃度, 2-mercaptoethanol 의 첨가 및 試料의 alkylation 등이 分別에 미치는 影響을 검토한 바 있는데 아직 馬乳에 관하여는 상기와 같은 연구 보고가 全無한 實情이다. 따라서 本 實驗은 在來馬乳의 全 casein 으로 부터  $\alpha$  s-,  $\beta$  - 및 k-casein 을 分離하여 이들의 효과적인 分別法을 확립함과 동시에 各 casein 의, 物理化學的인 變化를 究明하기 위한 方法의 일환으로 分別能力이 우수한 DEAE-Cellulose (Whatman DE-52)를 사용하여 全 casein 을 分別하였다.

먼저 在來馬乳 casein 을 0.01M imidazole-鹽酸 緩衝液(pH 7.0)을 이용하여 室溫에서 DEAE-cellulose chromato 를 실시, 그 結果를 Fig.9 에 나타냈다.

그림에서 보는바와 같이 5개의 分劃으로 分別되었으며, 各 分劃의 溶出成分을 확인하기 위해 polyacrylamide gel 電氣泳動으로 분석한 結果를 Fig.10에 표시하였다.

이 結果에서 Fig.9 의 第一分劃(peak A)에는 k-casein 이, 第二, 三分劃(peak B, C)에  $\beta$  - 및  $\beta$ -rich casein, 第四·五分劃(peak 4, 5)에는  $\alpha$  s- 및  $\alpha$  s-rich casein 이 溶出되고 있음을

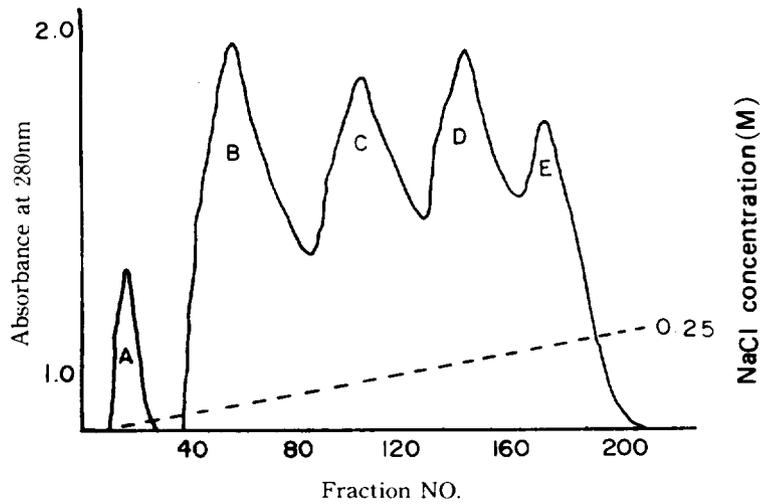


Fig. 9. Chromatography on a DEAE-cellulose column ( $2 \times 50\text{cm}$ ) of Ig of Cheju native horse's casein using a linear gradient from 0.05-0.25M NaCl. Flow rate was maintained at 50ml per hour. A tube contained 10ml elute.



Fig.10. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of Che ju 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.

알 수 있으며 peak 4 에는  $\beta$ -casein 에 상당하는 夾雜物이 보여 牛乳의 경우와는 달리 순수한  $\alpha$ s-casein 과  $\beta$ -casein 을 分離하기 위해서는 本 實驗의 DE-52를 이용한 chromat 만으로는 불가능하고 Richardson 等(1975)이 山羊乳에 적용한 研究에서 報告한 바와같이 재차 CM-Cellulose chromat 을 실시하여 가능할 것으로 생각된다.

한편, 第一分劃(peak A)에서 얻어진 成分이 k-casein 인지를 확인하는 한 방법으로 2-mercaptoethanol 를 첨가하여 電氣泳動을 실시한 결과는 Fig.11에서와 같이 第一分劃이 k-casein 임이 확인되었다.

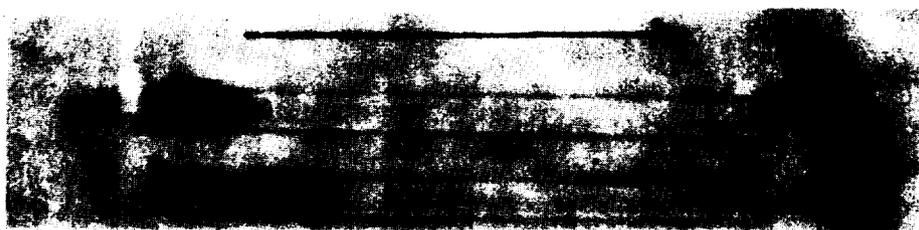


Fig.11. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of k-like casein (fractin A of Fig. 9) with and without addition of 2-mercaptoethanol.

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 위하여 主要 成分을 분석하고 電氣泳動과 Sephadex G-200으로 脫脂乳, 乳清蛋白質 및 casein을 分別하는 한편 DEAE-Cellulose를 사용하여 酸 casein을 分別 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 濟州 在來馬乳의 比重은 1.037, 酸度 0.08%, pH 6.8이었고 70%알콜 試驗은 약한 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 casein의 主要成分은  $\alpha$ s-,  $\beta$ -, k-casein이었고 微量成分으로 r-, Ts-, 및 s-casein의 존재가 관찰되었으며 乳清蛋白質은  $\beta$ -lactoglobulin과  $\alpha$ -lactalbumin이 主成分을 이루고 whey<sub>1</sub>은 확인되지 않았으나 Serum albumin의 존재 가능성을 제시 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현상을 나타내어 k-casein 및  $\beta$ -Lactoglobulin 共히 s-s 결합이 존재함을 알 수 있었다.

6. 0.02M phosphate buffer를 사용하여 Sephadex G-200 Column에 의한 各 蛋白質의 分別에서 脫脂乳는 2개의 fraction을 나타내고 대부분의 casein이 第一分劃에서, 乳清蛋白質이 第二分劃에서 溶出되었고, 全 casein은 1개의 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-casin, 第二·三分劃에는  $\beta$ -casein, 第四·五分劃에는  $\alpha$ s-casein이 各各 溶出되었다.

## 參 考 文 獻

- A. O. A. C. (1975) Official method of analysis(12th ed.),  
Association of official agricultural chemists, Washington, D. C.
- Aschaffenburg, R. (1963) Preparation of  $\alpha$ -casein by a modified urea fraction method, J. Dairy Res., 30 : 259.
- Davied, D. T. and J. C. D. White. (1960) The use of ultra-filtration and dialysis in isolating the aqueous phase of milk and in determining the partition of milk constituents between the aqueous and disperse phases, J. Dairy Res., 27 : 171.
- Davies, B. J. (1964) Disc electrophoresis- Method and application to human serum proteins Ann. N. Y. Acad. Sci., 59 : 994.
- 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.
- Downey, W. K. (1972) Structure of bovine casein micelles, Neth. Milk Dairy J., 26 : 219.
- Dumas, B. R., J. L. Maubois, G. Mocquot and Garnier. (1964)  
Etude de la constitution de la casein de beche par chromatographie sur colonnes de diethylaminoethyl-cellulose en milieu uree, Biochim. Biophys. Acta, 82 : 494.
- Farrell, H. M. Jr. (1973) Model for casein micelle formation. J. of Dairy Sci., 56 : 1195.
- 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.
- Kudryaslov, A. and O. Krylova. (1966) Kouevodstvo i Konny1 Sport, 35(4) : 27 : cited from Dairy Sci., Abstr. 28 : 2299.
- Larson, B. L. and K. A. Kendall. (1957) Dairy production of the specific milk proteins during the lactation period, J. Dairy Sci. 40 : 377.
- La wrence, B. L. (1968) The determination of the Lactose in the milk products. Australion J. of Dairy Tech. 23 : 103.
- Mellander, O. (1939) Electrophoretische untersuchung Von casein Biochem, J., 300 : 240.
- Morr, C. V., H. C. Lin and R. V. Jesophson, (1971) Fractionation of skin milk casein micelles by the rate Zone and Isopycnic-zone Ultracentrifugation in sucrose gradients, J. Dairy Sci. 59 : 994.
- O'coner, P. and P. F. Fox. (1977) The proteins and salt and some non bovine milk, J. of Dairy Res. 44 : 607.
- O'conor, P. and P. F. Fox. (1973) Temperature-dependent dissociation of casein micelles. From the milk of variants species. Neth. Milk D. J. 29 : 199.
- Peterson, F. R. Nauman, L. W. and T. L. Mcmeekin, (1958) J. Am, chem, soc. 80 : 95.
- Raymond, S. any Y. wang. (1960) Anal, Biochem. 1 : 199
- Rice, F. E. and Markley, A. L. (1924) J. Dairy Sci. 7 : 468.
- Richardson, B. C. and L. K. Creamer, (1975) Comparative micelle : IV. The simility between Caparine  $\alpha$ s-casein and bovine  $\alpha$ s<sub>3</sub>-casein Biochmi. Biophys. Acta. 393 : 37.
- Rollri, G. D., B. L. Larson and R. W. Touchberry. (1956) Protein production in the bovine breed and individual variation inthe specific protein constituents of milk, J. Dairy Sci. 39 : 1683.

- Rose, D., D. T. Davies and M. Yaguchi. (1969) Quantitative determination of the major components of casein mixtures by the column chromatography on DEAE-cellulose, J. Dairy Sci. 52 : 8.
- Tarassuk, N. P. and M. Yaguchi. (1962) Chromatography on milk protein on DEAE-cellulose, J. Dairy Sci. 45 : 253.
- Tiselius, A., (1937) Trans, Faraday Soc. 33 : 529.
- Ullrey, D. E., R. P. Struthers, D. G. Hendricks and B. E. Brent. (1966) Composition of mare's milk, J. Dairy Sci. 25 : 217.
- Wake, R. G. and Baldwin, R. L. (1961) Analysis of casein fraction by zone electrophoresis in concentrated urea. Biochim. et Biophys Acta. 47 : 225.
- Yaguchi, M. and N. P. Tarassuk. (1956) a Gel filtration of acid casein on skim milk on Sephadex J. Dairy Sci. 50 : 1985.
- Yaguchi, M. and N. P. Tarassuk. (1965) b Gel filtration of casein on sephadex, J. Dairy Sci. Abstr 27 : 3222.
- Yaguchi, M. and N. P. Tarassuk. (1967) Gel filtration of acid casein and skim milk on sephadex, J. Dairy Sci. 50 : 1985.
- Zittle, C. A. and J. H. Custer. (1963) Purification and some of the properties of  $\alpha$ s-casein and kcasein, J. Dairy Sci. 46 : 1183.
- 姜晚熙. (1960) 韓國馬産의 歷史的研究. 第1報 : 先史 三國時代の 馬産. 韓畜誌. 2 : 14-18.
- \_\_\_\_\_. (1961) 韓國馬産의 歷史的研究. 第2報 : 高麗時代の 馬産. 韓畜誌. 3 : 21-25.
- \_\_\_\_\_. (1965) 韓國在來馬의 系統에 관한 研究. 韓畜誌. 7 : 92-97.
- \_\_\_\_\_. (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.
- 金榮教·張柱翊. (1974) 韓牛乳 蛋白質에 관한 研究. 第一報 : DEAE-cellulose 에 의한 韓牛乳 蛋白質의 分別. 韓國食品科學會誌. 6 : 75.
- 金遇辰·申東澈·金榮教. (1983) DEAE-cellulose 에 의한 casein 의 分別에 관한 檢討. Korean J. Dairy Sci. 5 : 135.
- 金宗圭. (1963) 濟州馬와 導入馬의 交雜試驗. 濟州試驗報告.
- \_\_\_\_\_. 原種馬保存 및 生産能力向上에 관한 研究. 濟州試驗報告. 175 : 180.
- 南都泳. (1961) 朝鮮時代 濟州島牧場. 韓國牧畜業研究의 一端一.
- 李基萬. (1961) 濟州馬體型에 관한 生物測定學的研究. 韓畜誌. 3 : 63-73.
- \_\_\_\_\_. (1970) 濟州馬의 毛色의 在來名稱 및 分布에 관한 研究. 韓畜誌. 12(2) : 140.
- 鄭昌朝·朴英·金承浩·康太淑. (1981) 濟州馬의 保護增植 및 利用性 擴大方案에 관한 研究. 濟州道 研究報告.
- 鄭昌朝·康太淑. (1982) 濟州在來馬의 飼育現況과 經營實態에 관한 調查研究. 濟州大學 論文集. 14 : 15-64.
- 濟州道. (1983) 濟州統計年報.
- 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.
- 里正義·材田喜. (1932) 日畜會報. 1977.

## Summary

# Studies on Cheju Native Horse's Milk

H. J. Lee and H. K. Kim

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 value of S. P, pH and acidity of Cheju native mare's milk found positive in the 70% alcohol test 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, NPH 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, s- - and k-casein and minor components, r- , Ts- and S-casein by polyacrylamide gel electrophoresis. Whey protein consists of 2-major components, -Lactoglobulin and -Lactalbumin and another component presumed to be serum albumin, but no whey protein was observed.
5. The addition of 2-mercaptoethanol on acid casein and whey protein foamed distinct bands. These indicate that k-casein and -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 0.01 M < -Imidazole-HCl buffer (pH 7.0). The major components of the identified fractions are: fraction A, k-casein ; B to C, -casein ; D to E, s-casein.