

碩士學位論文

濟州馬乳의 一般成分과
FPLC에 의한 蛋白質 分離



濟州大學校 大學院
제주대학교 중앙도서관
JEJU動物資源科學科 LIBRARY

李 鍾 男

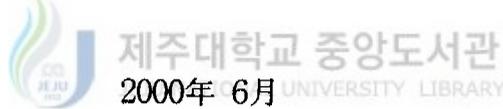
2000年 6月

濟州馬乳의 一般成分과 FPLC에 의한 蛋白質 分離

指導教授 李 賢 鍾

李 鍾 男

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함



李鍾男 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長
委員
委員

金 重 植
李 賢 鍾
梁 鍾 勳



濟州大學校 大學院

2000年 6月

Studies on Cheju Mare's Milk Composition
and Separation by Fast Protein Liquid
Chromatography(FPLC)

Jong-Nam Lee

(Supervised by Professor Hyun-Jong Lee)



제주대학교 중앙도서관

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

DEPARTMENT OF ANIMAL BIOTECHNOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

JUNE, 2000

목 차

SUMMARY

I. 서론	1
II. 연구사	3
1. 마유(馬乳)의 일반성분	3
2. 단백질 분포	4
3. 전기영동(PAGE, SDS-PAGE, IEF)	5
4. Fast Protein Liquid Chromatography(FPLC)	6
III. 재료 및 방법	7
1. 공시 재료	7
2. 실험 방법	7
IV. 결과 및 고찰	11
1. 제주마유의 일반성분 및 단백질분포	12
2. FPLC에 의한 casein 및 유청단백질의 분리	13
3. PAGE 전기영동에 의한 단백질 분리	22
4. SDS-PAGE 전기영동에 의한 단백질 특성	25
5. IEF에 의한 단백질 분리	28
V. 요약	31
참고문헌	33

SUMMARY

To define the Cheju horses, designated as a natural monument, many studies have been carried out in diverse filed of researches, but the research on the milk composition and the separation of milk protein of Cheju horse have not been reported.

The objective of these studies was to investigate the general composition of Cheju horse milk and the separation of milk protein by various electrophoresis methods.

The results are summarized as follows:



1. In the whole milk of Cheju horse the percentages of total milk solid, protein, milk fat and mineral were 11.31 , 2.66 , 1.65 and 0.19 % , respectively. The percentages of protein and lactose in milk were higher than those of any other species milk, but the inorganic substance was lower in Cheju horses.

2. Generally the percentages of casein and whey protein in whole milk of Cheju horses were lower than those from other reports, but higher in NPN percentage. The percentages of total protein substance, casein and whey protein were 2.57 , 2.14 and 0.18 % in the whole milk.

3. The casein band pattern of Cheju horse from electrophoresis was unique and different from other breeds and species, Thoroughbred and Holstein. The similar band patterns were also observed in FPLC.

4. From the result of SDS-PAGE, normal bands for α_s -casein(3 bands), β -casein(2 bands) and κ -casein were observed including other specific band(43,000 Kd). In addition to these bands one more specific band(about 60,000 Kd) was detected in Thoroughbred breed.

5. Whey protein of Thoroughbred and Cheju horse has higher molecular weight(20,100 Kd) than that of Holstein. There were the same specific bands for Serum albumin in Cheju horse, Thoroughbred and Holstein, but one specific band of 24,000 Kd and other a couple of bands showed up only in the milk of Cheju horse.

6. Cheju horses had more casein bands than Holstein by IEF of β - and κ -casein, but less κ -casein bands than Thoroughbred breed. There were some different bands of α_s -casein between Cheju horse and Thoroughbred.

7. In addition to these results additional studies on the PI of casein and whey protein and the genetic diversity of protein by amino acid sequencing will be required to specify the milk components of Cheju horses.

I. 서론

말의 기원은 약 6,000만년전 북아메리카 평원에서 최초로 발견된 *Eohippus*로서 채고는 여우 정도이었고 이것이 *Orohippus* → *Mesohippus* → *Miohippus* → *Pilohippus*의 단계로 진화되면서 현재의 마속(*Equus*)으로 약 100만년전에 출현하였다 이렇게 진화된 말은 세계 여러지역으로 분포되면서 홍적세 말부터 여러 종(species)으로 분화되어 *Przewalski*, *Tarpan*, *Equus germanicus* 종이 생겨났으며 이들이 가축화되면서 오늘날의 말의 품종이 형성되었다(강, 1996)

제주마의 기원에 대해서는 여러가지 학설이 있으나 체형상으로 보아 *Przewalski*종에서 유래된 몽고마와 가깝다고 알려지고 있다(강, 1998 ; 이, 1984).

현존하는 우리나라의 재래마는 제주마로 대표되는데, 이 품종은 향마가 오랜 세월을 지나오는 동안에 제주의 지역환경에 잘 적응되면서 여러 혈통, 특히 몽고말이나 아랍계의 영향을 받아 형성된 품종일 것으로 추측된다. 제주에서 말이 사육된 것은 선사시대로 추정되고 있으나 확실치는 않으며, 본격적으로 말을 사육하게 된 것은 고려 원종때 유목민족인 원이 제주에 들여와 목마장을 설치하고, 이어 1276년(고려 충렬왕 3년) 몽고마 160두가 원나라로부터 도입되어 수산봉 일대에서 사육되면서 부터이다 마 사육이 시작된 이래 1909년 33,098두에 이어 1917년에는 55,380두(강, 1996), 1936년 일제하에서도 18,729두에 이른적도 있으나 8.15 해방과 6.25 동란의 혼란기를 거치면서 감소하기 시작하였고 특히 1960년대 후반들어 제주마는 경제성장과 더불어 농기계의 보급 확대에 수요가 감소하고 말의 경제가치 감소에 따른 농가의 사육 의욕저하로 사육두수가 급격히 감소하여 한때 멸종 위기까지 처한바 있다.

그러나 1986년 정부가 제주마의 보존을 위해 천연기념물 제 347 호로 지정한데 이어, 1990년에는 보호육성책의 하나로 한국마사회를 통해 제주경마장을 운영한데 힘입어 사육두수가 점차 증가하여 1999년 6월말 현재 3,883 두에 이르고 있다. 이들의 이용실태는 천연기념물 보존 70두, 제주경마장 경주활용(등록

두수) 1,430두 및 관광승마장에서 836두로 외형상 전체의 50%를 상회하는 2,500여두가 활용되고 있으나(1999년 6월 현재) 경주마로 사육되고 있는 말도 2~3년 단위로 퇴역하게 되므로 경주마까지 합치면 제주마 전체의 약 80%가 불용마, 즉 식육자원이 된다고 볼 수 있다

특히 마육이용은 불용마의 활용면에서 그 필요성이 인정되고 있어, 가까운 일본을 비롯해 프랑스 등지에서 신선육으로 뿐만 아니라 햄, 소세지 등의 가공품을 제조해 이용하고 있다. 그러나 우리나라에서는 이 등(1992)의 마육성분 분석 및 마진포제조등의 기초적인 연구가 있을 뿐이다.

마유는 옛부터 그 성분이 우유와 사람젖에 가까워서 식품뿐만 아니라 치료용으로 이용되어 왔으며(Solaroli 등, 1993), 특히 마유이용을 목적으로 말을 키우는 나라는 소련 시베리아 지방의 Steppe 지역과 몽고이다. 몽고마는 1일 30ℓ 정도로 유량도 많아 음용유로서 뿐만 아니라 Airag 또는 Kumiss로 알려진 마유주라는 유산-알콜 발효유를 만들어 이용하고 있다.

마유에 대한 연구도 활발하여 일반성분(Solaroli 등, 1993)을 비롯하여 단백질(O'corner and Fox, 1973)의 특성에 관해서 많은 연구결과가 있으나, 제주마에 대해서는 채위(정 등, 1986), 모색(강 등, 1988)과 혈액 단백질 및 DNA다형형상을 이용한 특성구명(양, 1999) 및 번식분야에서 활발한 연구가 이루어지고 있을뿐 제주마유에 관해서는 김 등(1984)의 부분적인 보고 1건 외에는 연구결과가 전무한 실정이다.

본 연구는 제주마유의 일반성분과 단백질에 관해 전기영동을 비롯한 몇가지 분석기법을 이용, 그 특성을 구명하여 우유 및 타품종의 마유와 비교하므로써 제주마의 고유한 형질과 체계적인 보존에 유용한 자료를 얻고자 실시하였다.

II. 연구사

1. 마유의 일반성분

포유류는 1억 7천만년의 진화과정에서 약 4000여종으로 분화되고 체중도 작게는 2.5g의 쥐에서 크게는 100톤을 초과하는 고래까지 다종다양하다. 따라서 유 성분도 천차만별이지만 신생동물의 생후 일정기간 정상적인 발육을 담당하고 있다는 공통점을 갖고 있다.

일반적으로 유집의 조성은 착유시간, 비유기, 계절, 품종, 연령, 사료 및 질병 등에 따라 변하며(Roltri 등, 1956 ; Larson, 1957), 동물분류학상 근연의 동물 유집은 조성이 비슷하고 추운곳이나 물속에 사는 고래, 물개, 북극곰 등은 고형분과 지방함량이 높다. 이러한 유집의 조성과 동물의 발육과는 밀접한 관계가 있어 성장이 빠른 동물일수록 유집 중의 단백질과 무기물 특히 Ca와 P의 함량이 높은 것으로 알려져 있다(Tsuchiya, 1985).

마유의 일반성분에 관해서는 Naseni 등(1958)이 단백질 함량이 1.7~3.0%로 보고한 것을 필두로 Ullrey 등(1966)은 경용마인 Arabian 3두와 Quarter종 7두의 분만후 3개월령의 마유를 분석하여 총고형분, 지방, 단백질, 유당이 각각 10.4, 1.4, 2.0 및 6.6% 로 발표한 바 있다. 한편, Kulisa(1986b)는 마유중의 탄수화물의 중요성분은 유당 6.35%, glucose 0.0084% 및 galactose 0.0114% 라고 보고하였고, Davis등(1983)은 무기물 함량이 0.2~0.7%로 타가축에 비해 낮다고 하였다.

Doreau와 Boult(1989)는 최근 프랑스 중형마의 유성분을 분석하여 지방 1.25%, 단백질 2.06%, 유당 6.73%로 보고하였고, Solaroli 등(1993)은 마유의 일반성분을 젖소 및 인유와 비교하여 고형분은 9.3~11.6%로 우유나 인유보다 낮고, 단백질(1.5~2.8%)은 우유보다 낮았으나 인유보다 높았고, 지방은 0.5~2.0%로 우유와 인유보다 낮았으며, 유당은 우유보다 높았으나 인유보다 낮아 전체적으로 마유는 지방함량이 낮은 것을 제외하고는 우유보다 오히려 인유에 가깝다

고 발표한 바 있다. 그 외에 Csapo 등(1995)이 5개품종의 마유를 분석하여 비유기별로 보고하였고, 최근 Martuzzi(1995)가 일반성분을 분석한 바 있다.

2. 단백질 분포

마유의 단백질 분포에 관한 연구로는 Neseni 등(1958)이 casein함량을 1.3%라고 처음 보고한 이래, Doreau와 Boulot(1989)는 1989년까지 발표된 여러 연구자들(Minieri and Intrieri, 1970 ; Sokhtaev, 1970 ; Nordstrom, 1970 ; Urbinisov 등, 1981 ; Smoczynski and Tomczynski, 1982 ; Oftedal 등, 1983 ; Storch, 1985 ; Kulisa, 1988 ; Miraglia 등, 1986 ; Doreau 등, 1988c ; Doreau 등, unpublished data)의 결과를 종합하여, 1) 마유 단백질 함량은 1.7~3.0%, 2) 비단백태질소화합물 비율이 약 10%로 높고 3) casein은 일반적으로 전단백질의 50% 이하로 낮고 4) 유청단백질은 변이가 커서 함량이 serum albumin(2~15%), α -lactalbumin(26~50%) 및 β -lactoglobulin(28~60%)이라고 하였다 또한 Doreau 등(1989)은 프랑스의 중형마인 11두의 Bretonnes종을 조사하여 총단백질은 2.09%로, 그 중 casein이 1.18%, 유청단백질은 0.72%, 비단백태질소화합물(NPN)이 0.19%로 각각의 비율은 56:34:10로 NPN의 비율이 높음을 발표하였고, Mariani 등(1993)은 11두의 Saddle과 Trotter종을 조사하여 조단백질 2.3%, casein 1.27%, 비단백태질소화합물 0.24%로 보고하였다.

한편 Solaroli 등(1993)은 casein이 0.72~1.86%로 우유(2.40~3.00%)보다는 낮았으나 인유(0.25~0.70%)보다 높았고, 유청단백질(0.5~1.30%)과 비단백태질소화합물(0.17~0.25%)은 우유나 인유보다 높았다고 발표한 바 있다.

또한 Csapo 등(1995)은 4품종, 16두의 마유종의 총단백질, 순단백질, casein, 유청단백질, 순유청단백질 및 NPN 함량을 조사하여 각각 2.31(100%), 2.11(91.4%), 1.20(51.9%), 1.11(48.1%), 0.91(39.4%) 및 0.20(8.62%)으로 유청단백질이 우유에 비해 높은 것으로 발표하였다. 또한 Martuzzi 등(1995)은 4두의 Trotter종과 7두의 Italian Saddle 총 11두의 조사에서 조단백질이 2.39%, casein은 1.29%이고 NPN은 0.24%라고 하였다.

3. 전기영동(PAGE, SDS-PAGE, IEF)

전기영동은 지지체로서 polyacrylamide가 도입된 이래 단백질 연구에 있어 폭넓게 이용되어 오고 있다(Kwai-hang 등, 1983). 이 Technique은 charge/mass에 기초를 둔 PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)와 molecular/mass의 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-PAGE) 및 Isoelectric point(등전점)의 IEF로 크게 나누어 볼 수 있다.

최근에는 precast ultrathin minigel과 영동, 염색 및 탈색이 자동으로 이루어지는 PhastSystem(pharmacia-LKB, Sweden)이 소개되면서 분석시간이 며칠 단위에서 몇 시간 단위로 짧아지고 1 ng의 소량시료까지 detection이 가능하게 되었다(Van hekken 등, 1992).

PAGE는 Davies (1964)가 개발한 방법이 지금까지 약간의 보완을 거쳐 사용되고 있다 즉 단백질은 buffer조건에 따라 \oplus 혹은 \ominus 로 하전되어 그들의 charge/mass 비율에 따라 이동하며 특히 casein에서 뇨소의 첨가(urea-PAGE)는 단백질의 응집과 산성 pH에서의 침전을 방지하고, band가 잘 분리되고 유전적 변이체 및 phosphorylation 정도의 차이를 쉽게 detect 하기가 가능하다.

O'cornor(1973)는 PAGE를 이용하여 마(馬) casein은 α_s - β - 비율이 당나귀와 비슷하고, 전기영동 pattern과 α_s -casein부위가 상당히 불균일 하며, 우유의 α_{s1} -casein에 해당하는 부위에는 minor zone 만을 가지고 있고 α_{s1} -casein 부위에 적어도 7개의 band가 관찰되었으며 α_s : β 의 비율은 1:1.6 이라고 보고하였다.

또한 Kingsburry와 Gaunt(1976)는 마유 유청단백질의 PAGE에서 whey1, α -lactalbumin, β -lactoglobulin 및 Immunoglobulin의 존재를 보고하였으며, Bell 등(1981)은 마유 whey에서 β -Lg , α -La 및 serum albumin외에 transferrin, lysozyme, lactoferrin의 존재를 확인하였다.

한편 Visser 등(1981)은 마유단백질로부터 3 group의 casein을 분리하여 각각의 특성을 조사하였으며, Chiofalo 등(1983)은 70두의 마유단백질을 조사하여 casein에 속하는 4개의 area 와 4개의 유청단백질을 확인하고, casein에서는 가장 이동도가 빠른 지역에서만이 유전적 변이체를 볼 수 있었고 나머지 3개

area에서는 각각 2개씩의 band가 나타났으며, 유청단백질은 β -lactoglobulin과 α -lactalbumin 및 serum albumin과 whey부위의 1개 area가 관찰되었다고 보고하였다.

또한 Ono 등(1989)은 α s-와 β -casein에 이어 κ -casein의 존재를 마유 단백질에서 확인하였으며, Bonomi와 Ianetti 등(1993)은 마유를 각각 80, 90, 110, 130, 150°C에서 처리후 그 변화를 SDS-PAGE로 확인하여 단백질 각 성분(lactoferrin, serum albumin, casein, β -lactoglobulin, lysozyme 및 α -lactalbumin)의 분자량 변화를 관찰한 바 있다.

4. Fast Protein Liquid Chromatography(FPLC)

우유단백질의 분리에 있어서 전기영동과 함께 이온교환 chromatography가 가장 많이 이용되어 왔는데(Haasnoot 등, 1986), 과거의 분리방법은 정확성은 있으나 시간이 오래 걸리고 시료량이 많이 소요되어 이러한 문제점을 해결하기 위해 다각도로 노력한 결과 High Pressure Liquid Chromatography(HPLC)가 개발되었다. 그러나 gel permeation chromatography를 응용한 HPLC를 이용해 4종류의 우유 casein을 분리한 결과, 분자량이 비슷해서 좋은 결과가 나오지 않아, 이온교환 column을 응용하여 분리속도가 빠르고 정확성 있는 소위 FPLC라는 방법이 최근에 우유단백질의 분리에 좋은 결과를 보여주고 있다(Barrefors and Ekstrand, 1985). Macha와 Novackova(1975)가 Zechoslovakian종의 마유단백질을 chromat하여 α s-casein 과 β -casein 및 X3 protein 에 각각 A, B, C 3개의 유전적 변이체가 있고, β -Lactoglobulin에는 A와 B 두 개의 변이체가 있다고 보고하였으며, Ono 등(1989)이 gel chromat을 실시하여 3개의 peak를 얻고, 각 peak를 전기영동으로 확인하여 α s-, β - 및 κ -casein이라고 발표하였다.

Ⅲ. 재료 및 방법

1. 공시재료

마유는 천연기념물 제 347호로 지정되어, 제주도 축산진흥원에서 사육중인 성빈마 29두로부터 1998년 5~7월, 1999년 5~7월 2회 수착유하여 ice box에 넣어 운반 즉시 일반성분과 단백질 분포 측정에 사용하였다.

1) Casein

2000 × g에서 45분간 원심분리한 탈지유에 1N-HCl을 첨가하여(25℃) pH 4.6에서 등전점 침전시켰으며 이 침전물을 1N-NaOH로 pH를 7.0까지 높여 용해후 재차 침전과 용해를 반복하였다. 다음 casein 용액을 증류수로 2일간 투석한 다음 동결건조시켜 시료로 사용하였다.



2) 유청단백질

등전점 침전시켜 응고물인 casein을 제거(filter paper No 5.A)한 whey를 증류수로 2일간 투석후 casein과 마찬가지로 동결건조시켰다.

2. 실험 방법

1) 단백질 분포

① Casein 및 유청단백질

casein함량은 신선한 마유를 4,000rpm에서 20분간 원심분리 후 얻어진 탈지유에 0.5 N-HCl을 가하여 pH 4.6에서 casein을 침전시킨후 여과하여 침전물의 질소를 kjeldahl 방법으로 측정하여 여기에 6.38을 곱해 산출하였으며, 유청단백질량은 전단백질량에서 casein량을 빼어서

표시하였다

② 총단백질(total protein)

마유 1ml에 황산 12ml을 넣은 후 전항의 촉매제를 첨가하여 ①과 같은 방법으로 실시하였으며, 계산식은 다음과 같다.

$$\% \text{ protein} = \frac{14.01 \times M \times 100}{\text{mg}(\text{sample})} \times (\text{ml titrant} - \text{blank ml})$$

(M : HCl의 농도 × factor)

③ 비단백태 질소 화합물(NPN)

시료 1ml 에 24% TCA 1ml를 첨가하여 0℃에서 15분간 방치 후, 4000rpm으로 15분간 원심분리 한 후 상정액을 수집하여 질소량을 % 로 표시하였다.

2) Polyacrylamide gel 전기영동(PAGE)  제주대학교 중앙도서관 UNIVERSITY LIBRARY

Polyacrylamide gel 전기영동(PAGE)은 PhastSystem을 이용하여 Pharmacia사의 native PAGE technique(file NO. 120)을 기초로 Van Hekken(1996)의 방법으로 실시하였다. 즉 8~25% gradient gel을 사용하기전 pH 6.4의 6.6M urea, 0.112M Tris, 0.112M acetate buffer에 15분간 침지후 3~5분간 실온에서 건조시켰으며, 시료(8~100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)는 10%의 2-mercaptoethanol과 0.025%의 bromophenol blue를 포함한 상기의 urea-Tris-acetate buffer에 용해하여 각 lane에 1 μl 씩 분주하였다. gel의 염색은 0.25% coomassie brilliant blue R(30:10:60 = methanol : acetic acid : distwater)액 용액에서 10분간 실시하였고, 탈색은 gel의 black-ground가 투명할 때까지 30:10:60의 비율의 methanol : acetic acid : distwater 용액을 사용하였다.

3) SDS(sodium dodecyl sulfate) -PAGE 전기영동

Sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) 는 Laemmli(1970)에 따라 Pharmacia 사의 PhastSystem을 이용하여 12.5% homogenous gel을 사용 하였다. 그리고 0.01M Tris-HCl EDTA buffer(pH 8.0)에 용해한 시료(10mg/ml) 50 μ l 에 stock solution (12% SDS, 6% 2-mercaptoethanol, 0.06M EDTA) 10 μ l를 첨가하여 3분간 수욕조에서 boiling 한후 2 μ l 의 0.25% bromophenol blue를 넣어 micro pipette 으로 각 lane 당 4 μ l 씩 분주하였다. 염색 및 탈색은 urea-PAGE와 동일하고 molecular weight standard는 Pharmacia의 LMW electrophoresis calibration kit를 사용하였다.

4) Isoelectric focusing(IEF)

등전점 전기영동은 Vegarud 등(1989)의 방법으로 실시하였다. 즉 Pharmacia 사의 PhastGels을 IEF pH 4.0~6.5를 치음 증류수에다 10분간, 다시 10% glycerol에 10분동안 침지하여 저온에서 hair dryer로 건조시킨 gel을 8M urea, 2.5% Triton x-100, 10% ampholyte(pH 3~9)에 15분간 담궜다가 PhastSystem 을 이용하여 실시하였다. 시료(10mg/ μ l)는 8M urea, 1% 2-mercaptoethanol 및 10% Triton X- 100 에 용해하여 각 lane 당 4 μ l를 micro pipette으로 분주하였다

그리고 유청단백질은 뇨소첨가없이 casein 과 동일한 방법으로 실시하였다. 전기영동 후 gel의 fixing은 20% TCA+1% sulphosalicylic acid에서 5분동안 침지 하였고, staining은 1% coomassie brilliant blue R350+1% C₅S₄ 에서 10분간 침지하여 다시 methanol : acetic acid : distwater 각 3:1:6 비율로 2분간 침지시켜 destaining은 wash와 같은방법에서 10분간 침지 시켰다

5) FPLC(Fast Protein Liquid Chromatography)

FPLC는 Anguita 등(1996) 방법에 따라 Pharmacia사(Sweden)의 anion-exchange column 인 Mono Q HR 5/5를 사용하였고 분석조건은 표 1과 같다.

시료는 50mg의 동결 건조된 마유 casein을 10 ml의 BTP(bis-tris-propane-HCl) buffer에 용해후 pH를 7.0으로 조정하여 10 μ l의 14 mM 2-mercaptoethanol을 첨가한 다음 0.22 μ m pore size 의 GV filter(Millipore, Bedford, MA, USA)로 여과후 사용하였다.

NaCl은 0.0~0.4 M의 stepwise로 실시하였으며 유청단백질은 노소 첨가없이 0.02 M Tris-HCl buffer를 사용하여 casein과 같은 방법으로 실시하였다.

Table 1 Operation conditions of FPLC for Cheju mare's casein and whey protein

Item	Condition(casein)	Condition(whey protein)
Column	Mono Q HR 5/5	Mono Q HR 5/5
Flow rate	1 ml/min	1ml/min
Fraction size	1 ml/min	1ml/min "
Mobile phase	bis-tris-propane-HCl (pH7.0), 0.0~0.4M NaCl gradient	0.02M Tris-HCl buffer pH7.0 0~0.35M NaCl gradient
Injection volume	1 ml	1 ml

6) Image analysis

전기영동 분석은 UVP사(USA)의 Image analysis system을 사용하여 분석하였다.

IV. 결과 및 고찰

1. 제주마유의 일반성분 및 단백질 분포

1) 제주마유의 일반성분

제주마유의 일반성분을 측정된 결과는 표 2와 같이 우유(Braun, 1990)에 비하여 단백질, 지방, 및 무기물함량이 낮고, 유당함량은 높았다. 또한 마유와 비교할 때 총고형분 함량은 11.31%로 Arabian 및 Quarter종(Ullrey 등, 1966) 10.4% 및 Solaroli 등(1993)의 9.3~11.0% 보다 약간 높은 것으로 나타났다.

Table 2. Comparison of Cheju mare's milk components with other species.

(unit : %)

Components	Cheju(Korea)	Solaroli et al.
Total solids	11.31±0.40	9.3~11.0
Protein	2.66±0.44	1.5~2.8
Fat	1.65±0.44	0.3~0.5
Lactose	6.10±0.24	5.8~7.0
Mineral	0.19±0.01	0.5~2.0

단백질함량은 2.66%로 Ullrey 등(1966)의 2.0%와 Doreau 등(1990)의 2.06보다는 훨씬 높았으나, Naseni 등(1958)의 1.7~3.0% 및 Solaroli 등(1993)의 1.5~2.8%와는 차이가 있었다.

지방함량은 1.65%로 Arabian 및 Quarter종(Ullrey 등, 1966)의 1.4% 및 Bretonnes종(Dorcau 등, 1990)의 1.25% 보다 높았으며, Solaroli 등(1993)의 0.5~2.0% 와 비교해도 상위권에 있음을 알 수 있다.

유당은 6.10%로 다른 연구자들의 결과 즉, 6.6%(Ullrey 등, 1966), 6.35%(Kulisa, 1980) 및 6.73%(Doreau 등, 1990) 보다 낮았으며, 무기물은 0.19%로 Davis(1983)의 0.2~0.7% 보다 낮았다. 이러한 결과로 제주마유의 일반

성분은 타품종에 비해 단백질, 지방함량은 높고 유당과 무기물함량은 낮음을 나타내었다

2) 단백질 분포

제주마의 단백질 비율은 Table 3에 제시한바와 같이 총단백질은 2.57%이고 전단백질중 casein 2.14, 유청단백질(whey protein) 0.18 및 비단백태질소화합물(NPN)의 함량은 0.08 %로 나타났다.

Table 3. Protein Percentage of Cheju mare's milk

(unit : %)

Item	Cheju mare's
Total protein	2.57±0.05
Casein	2.14±0.06
Whey protein	0.18±0.06
NPN(non-protein-nitrogen)	0.08±0.01

casein 함량은 2.14%로 전단백질의 80%를 상회하고 있어 O'corner 와 Fox(1977)이 보고한 Holstein(70%), 산양유(75%), 면양유(72%)보다 약간 높은 반면 Thoroughbred(47%) 및 당나귀(49%)보다 훨씬 높았다.

이같은 결과는 Neseni 등(1958)의 casein함량 1.3%, Bretonnes 종(Doreau 등, 1993)의 1.18% Saddle 및 Trotter 종(Marianie 등, 1993)의 1.27% Csapo 등(1995)의 1.20% 보다 높다는 결과와 일치함을 알 수 있다. 반면 Doreau와 Boulot(1989)가 여러 연구자들의 발표를 그의 review 논문에서 casein의 비율이 50%이하라고 밝힌것과 상치된다.

한편 유청단백질은 0.18%로 Bretonnes 종의 0.72% (Csapo 등,1995)의 1.11%

및 Solaroli 등(1993)의 0.50~1.30% 보다 훨씬 낮았다.

비단백태질소화합물(NPN)은 0.08%로 Mariane 등(1993)의 0.24% 및 Solaroli 등(1993)의 0.17~0.25% 보다 훨씬 낮았다.

이러한 결과로 제주마유의 단백질은 타품종에 비해 casein 비율은 높았으나 유청단백질 및 비단백태 질소화합물 함량은 낮은 것으로 보이며 품종간의 변이가 큰 것으로 사료된다.

2. FPLC에 의한 casein 및 유청단백질의 분리

Anguita 등(1996)의 방법에 따라 제주마 casein을 Holstein 및 Thoroughbred 와 비교하여 FPLC에 의해 분리한 결과는 Fig. 1, 2, 3. 과 같다. Holstein(Fig. 1)은 6-7개의 peak를 얻어 NaCl stepwise 순서대로 κ -, β -, α s₂- 및 α s₁-casein으로 확인되었으며, 제주마(Fig. 2)는 8개의 peak가 나타나 각각의 성분을 확인하기 위해 Native-PAG 전기영동을 실시한 결과 (Fig. 4), fraction 순서대로 첫 번째 peak(lane No.2)에서 κ -casein과 일부의 β -casein 이, 제2 peak(No. 3)는 κ -casein과 일부의 β - 및 α s₂-casein, 제3 peak(No.4)는 β -casein과 α s₂- 및 일부의 α s₁-casein, 제4 peak(No. 5)는 주로 β - 및 α s₂-casein이 용출되었고, 제5(No.6)에서는 β - 와 α s₂-casein 1부의 α s₁-casein이 그리고 No. 7, 8, 9에서는 약간의 β - 이외에 주로 α s₁-casein이 분리되어 결과적으로 제주마유 casein은 전기영동 결과에서와 같이 α s-, β -, 및 κ -casein으로 구성되었음이 확인되었다. 그러나 Holstein casein에서는 FPLC가 순수분리에 좋은 결과를 얻었으나(Anguita 등, 1996), 제주마유 casein에서는 위와 같은 방법으로는 순수분리가 어려워 앞으로 제주마유, casein의 연구를 위해 butter의 종류 및 조건, NaCl의 gradient와 stepwise 등 다각도로 최적의 분리 조건을 찾도록 노력해야 할 것으로 생각된다.

Thoroughbred casein(Fig. 3)은 6개의 peak로 분리되어 전기영동 결과에서와 같이 제주마 casein과 차이를 나타내었다.

다음 유청단백질의 FPLC결과는 각각 Fig 5(제주마), Fig. 6(Holstein), Fig.

7(Thoroughbred)와 같으며 casein과 마찬가지로 제주마와 Holstein, 제주마와 Thoroughbred사이에 분리 pattern 차이를 알 수 있다.

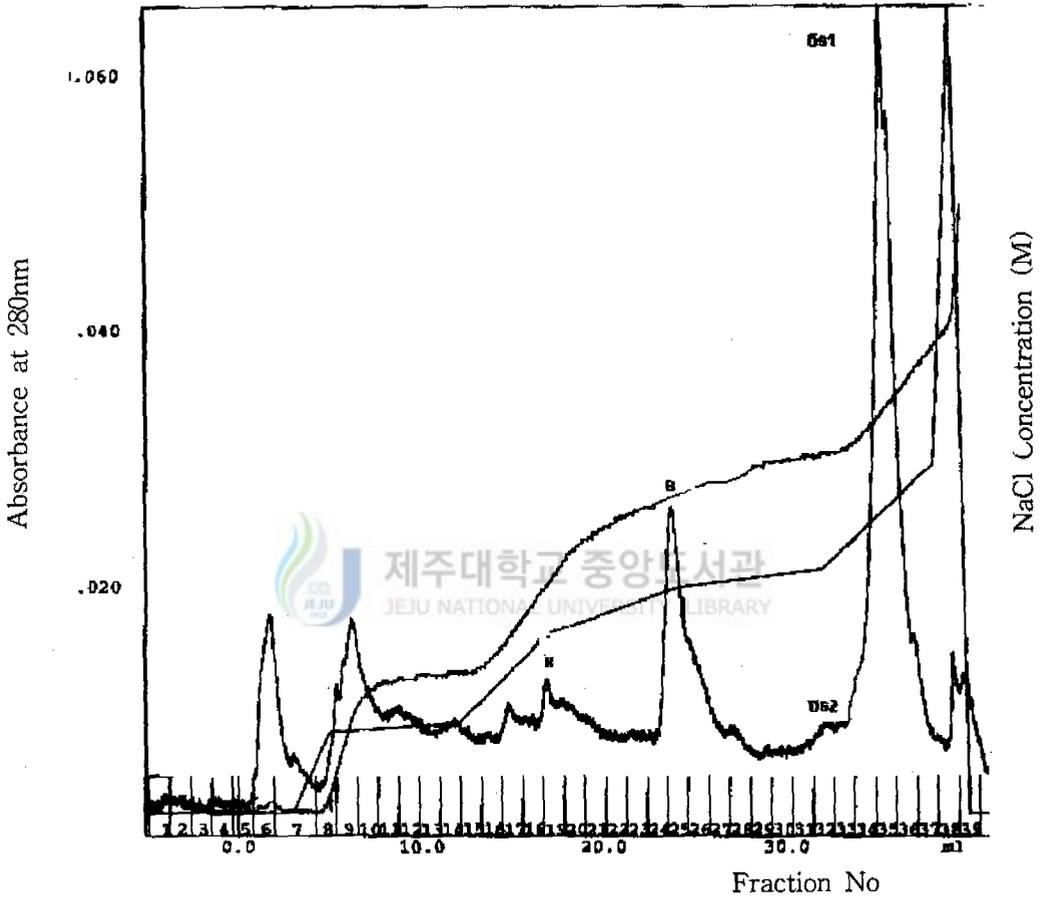


Fig. 1. FPLC chromatography of Holstein casein on Mono Q HR 5/5 column and using 5 mM bis-tris-propane-HCl (BTP)(pH7.0) containing 3.3M urea, 14mM 2-mercaptoethanol.

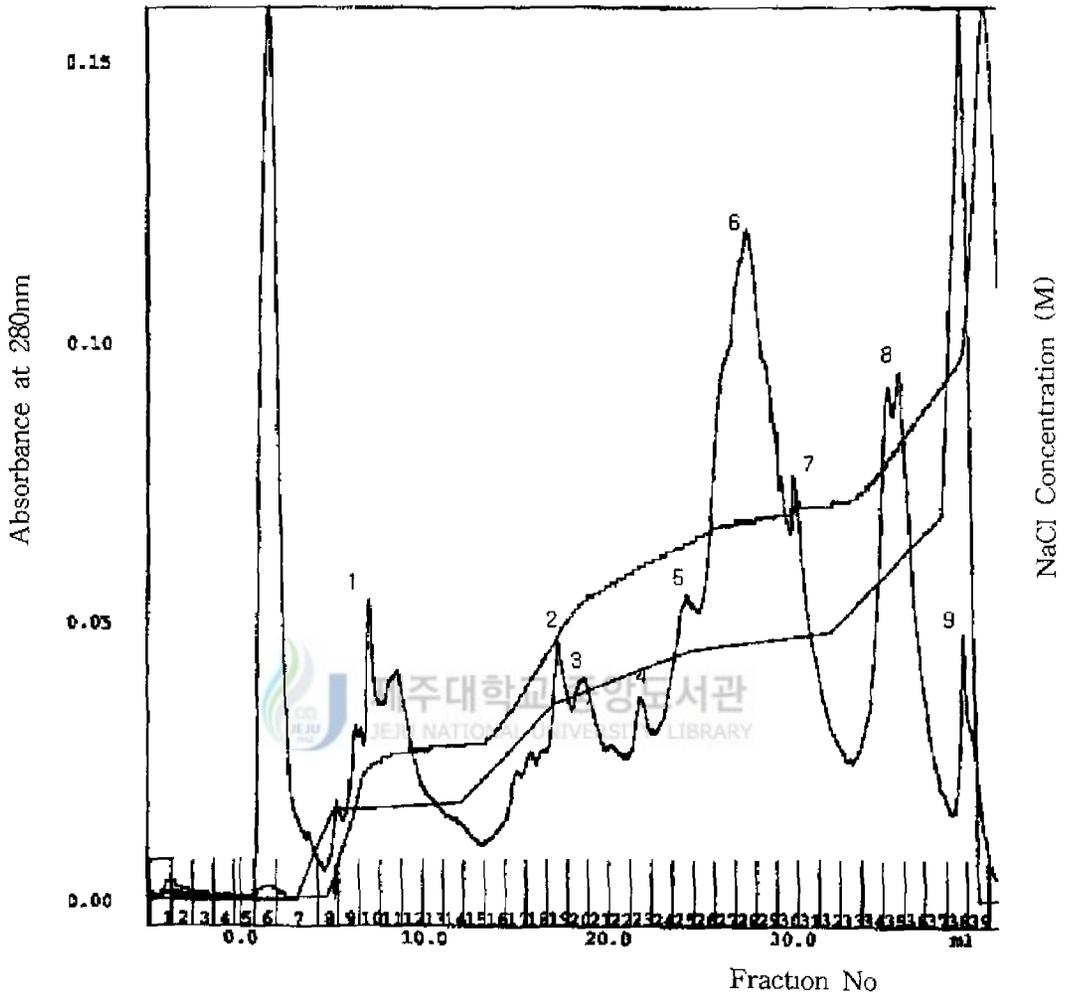


Fig. 2. FPLC chromatography of Cheju mare's casein on Mono Q HR 5/5 column and using 5 mM bis-tris-propane-HCl (BTP) (pH7.0) containing 3.3M urea, 14 mM 2-mercaptoethanol

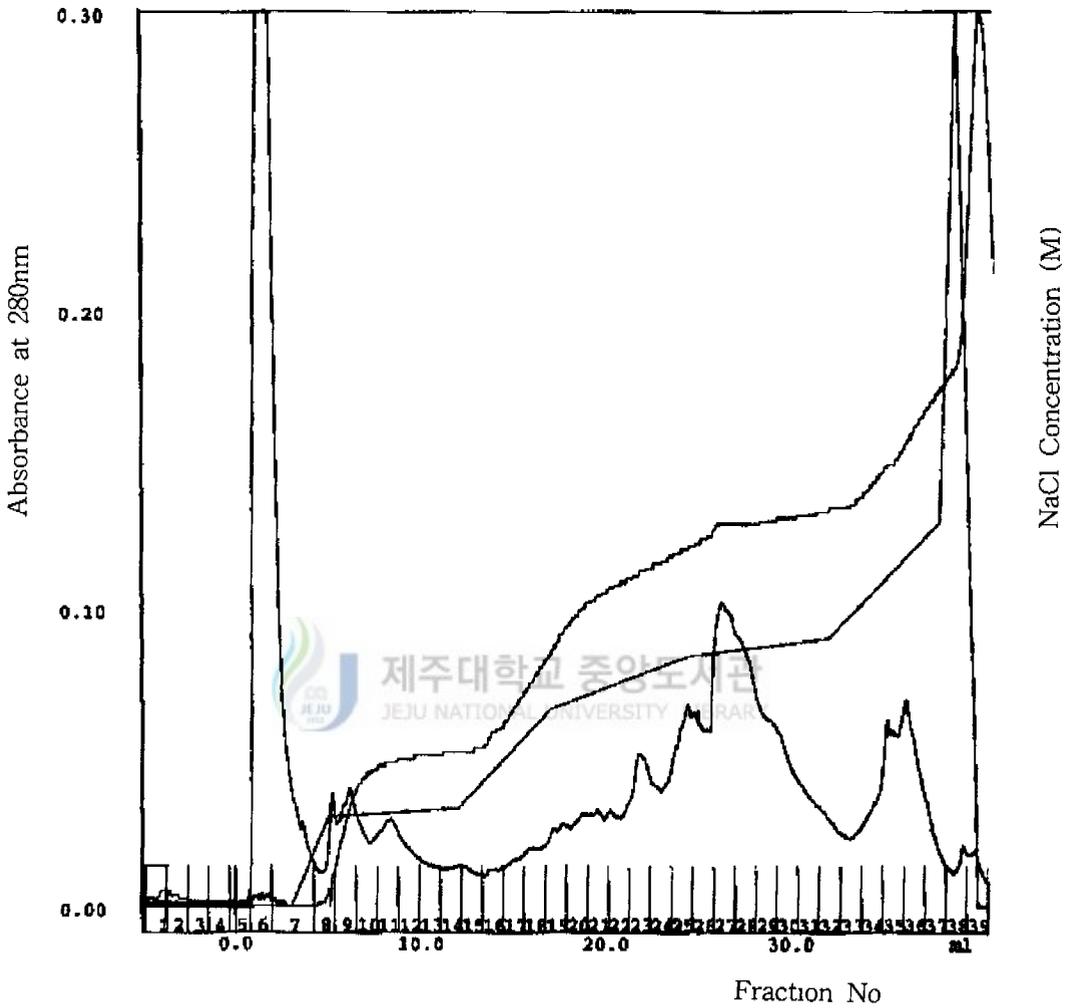


Fig. 3. FPLC chromatography of Thoroughbred casein on Mono Q HR 5/5 column and using 5 mM bis-tris-propane-HCl (BTP)(pH7.0) containing 3.3M urea, 14mM 2-mercaptoethanol.

1 2 3 4 5 6 7 8 9

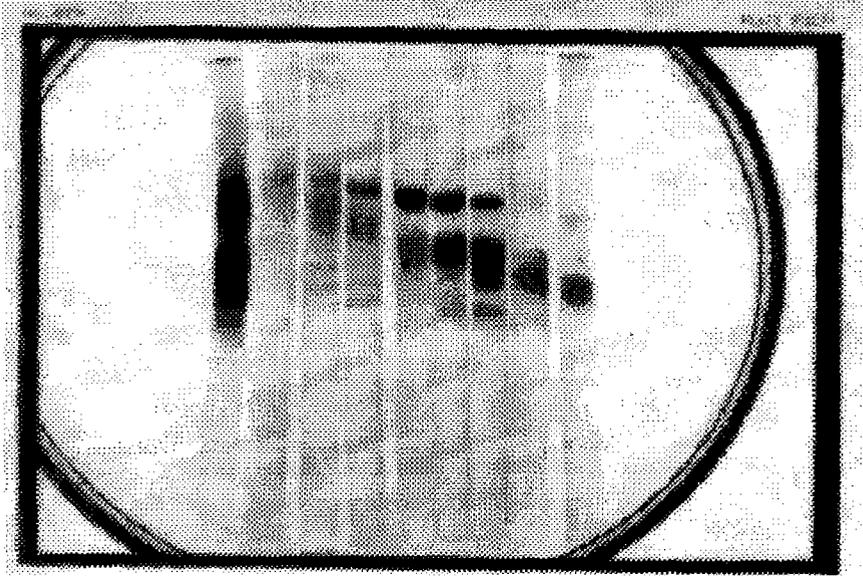


Fig. 4. Native-PAGE profile of the Cheju mare's casein fractionated by FPLC. lane 1, whole casein ; lane 2~9, Cheju mare's casein

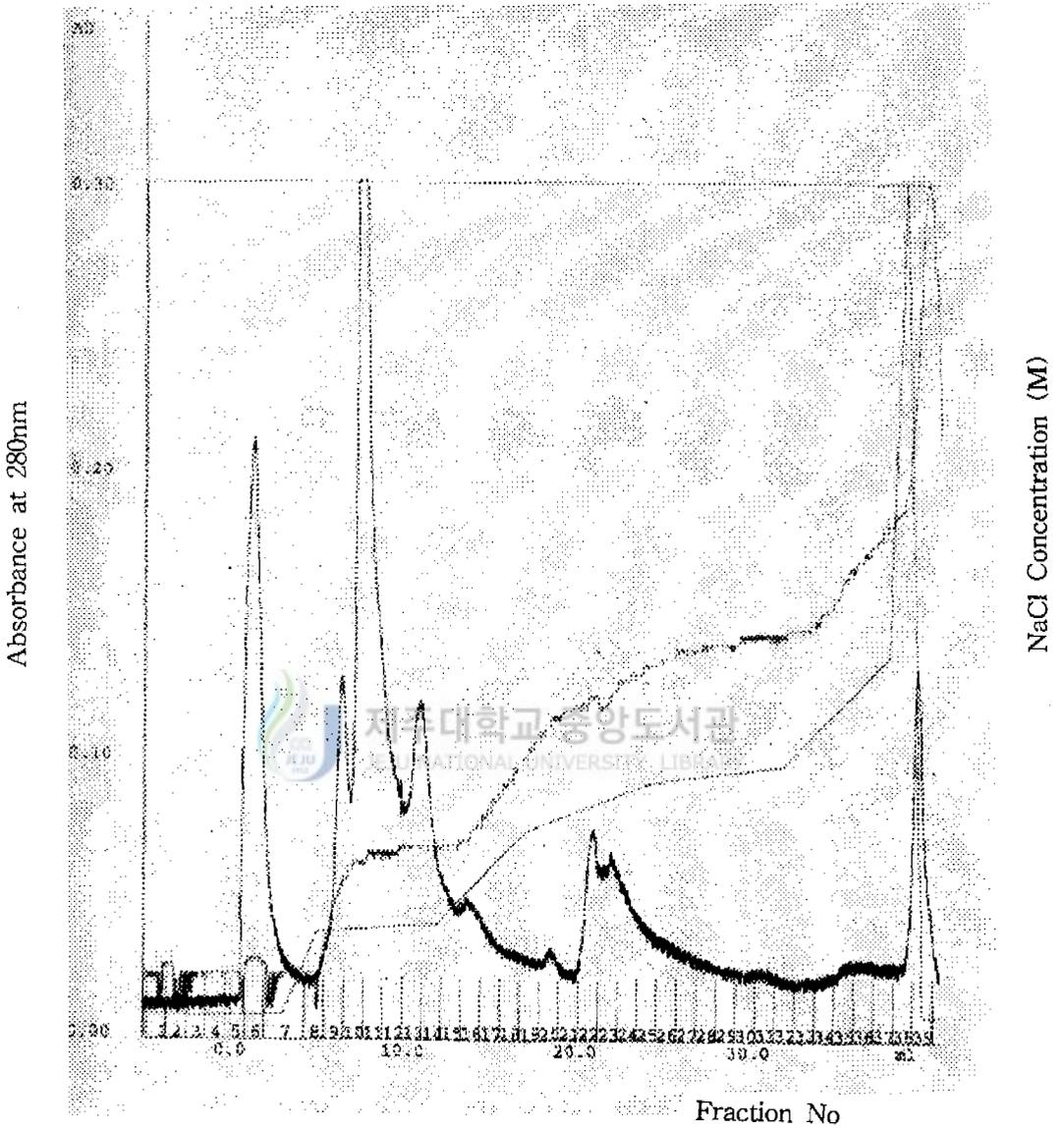


Fig. 5. FPLC chromatography of Cheju mare's whey protein on Mono Q HR 5/5 column and using BTP buffer and a NaCl gradient (sample volume 1ml, flow rate 1ml/min)

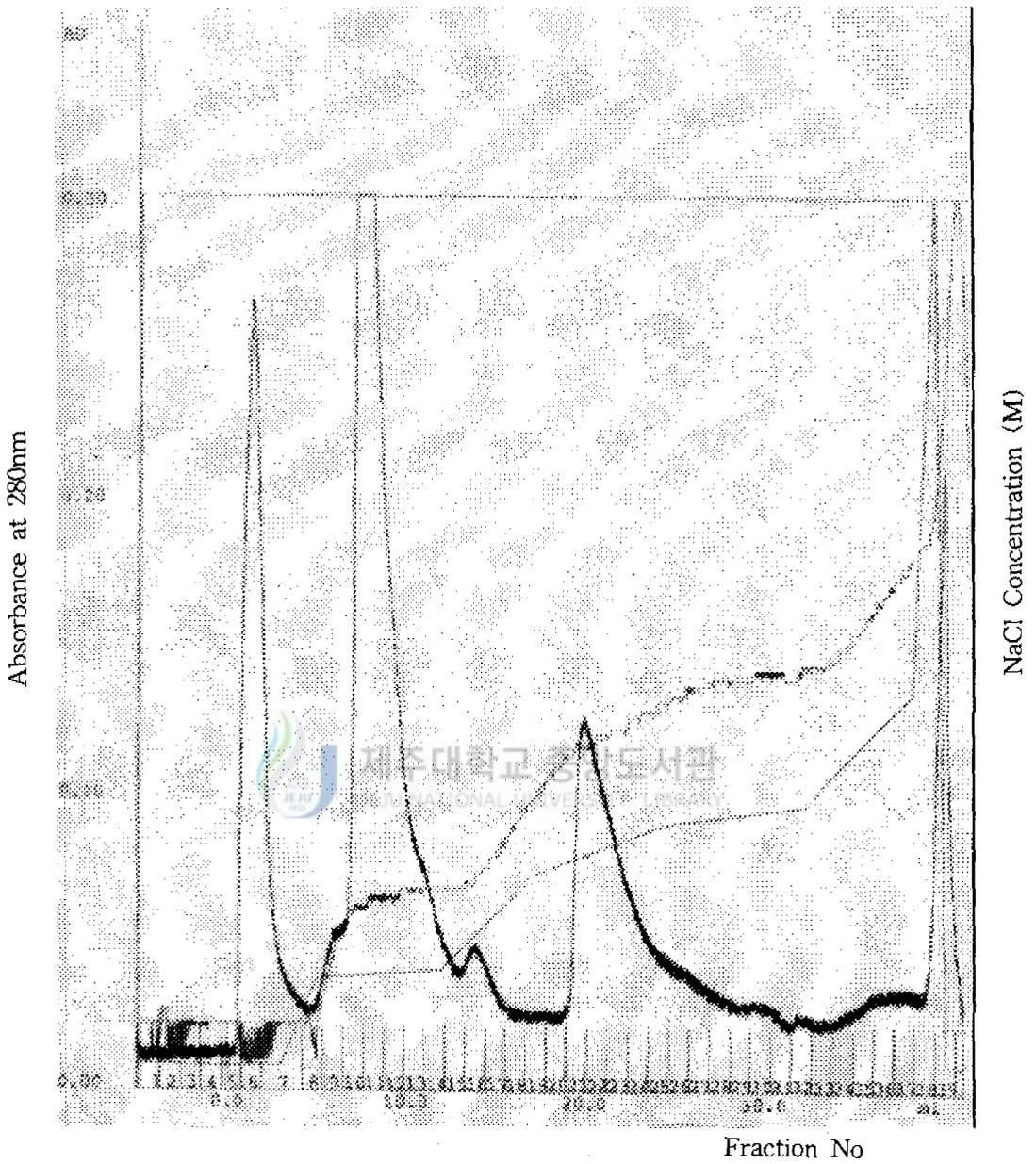


Fig. 6. FPLC chromatography of Holstein whey protein on Mono Q HR 5/5 column and using 0.02M Tris-HCl buffer pH 7.0 (sample volume 1 ml, flow rate 1ml/min)

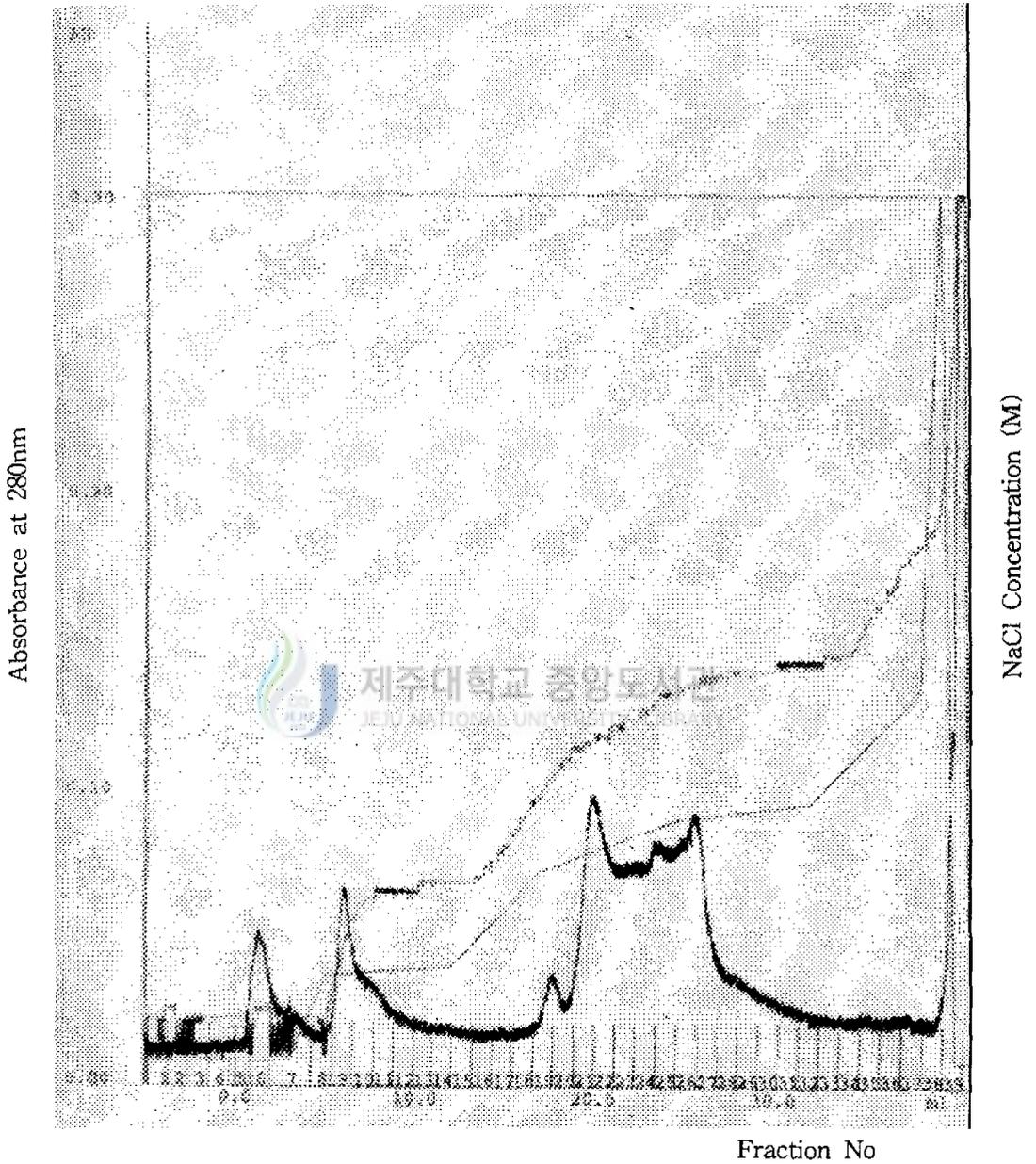


Fig. 7. FPLC chromatography of Thoroughbred whey protein on Mono Q HR 5/5 column and using 0.02M Tris-HCl buffer pH 7.0 (sample volume 1ml, flow rate 1ml/min)

Kingsburry와 Gaunt (1976)는 마유의 유청단백질이 α -lactoglobulin, β -lactoglobulin, immunoglobulin 외에 serum album 과 transferrin, lysozyme 및 lactoferrin으로 구성되어 있다고 전기영동 결과를 토대로 발표한 바 있으며, 그의 많은 연구자들도 유사한 결과를 보고했다.

마유 유청단백질(Fig. 5)은 분리된 peak 가 8개가 나타나 Thoroughbred(Fig. 7) 와의 6개에 차이를 나타내 앞으로 제주마 각 peak의 성분을 전기영동 등을 통해 확인해야 할 것으로 생각한다.

3. Polyacrylamide gel 전기영동에 의한 단백질 분리

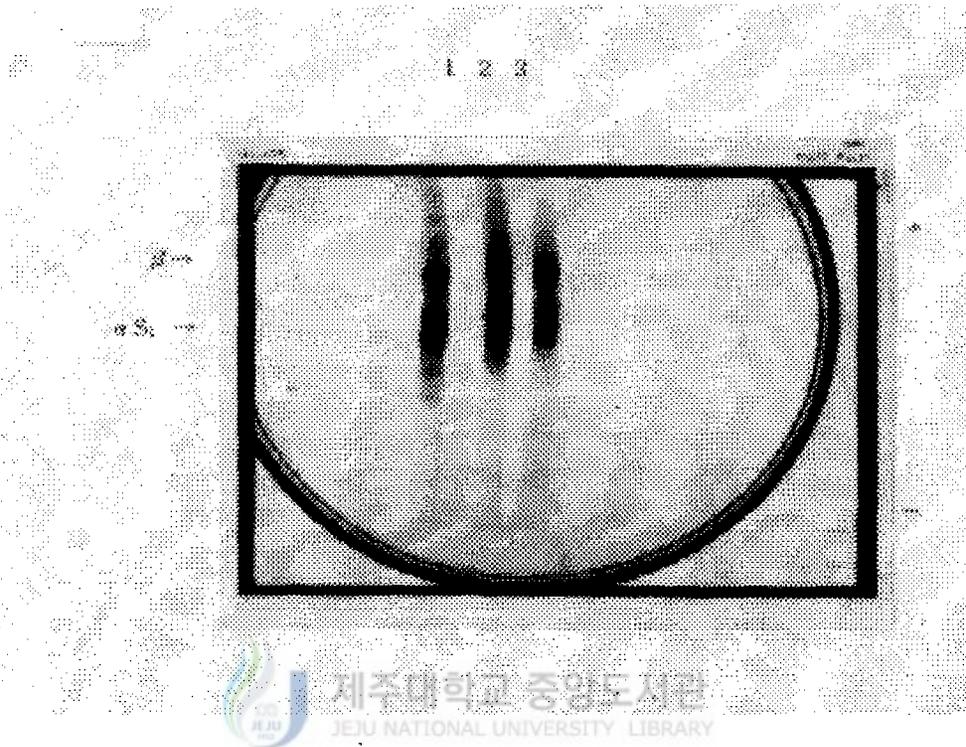


Fig. 8. Electrophoretic comparison among Holstein, Cheju mare, and Thoroughbred casein. lane 1, Holstein casein; lane 2, Cheju mare's casein ; lane 3, Thoroughbred casein

Fig. 8은 제주마 casein을 Holstein 및 Thoroughbred의 casein과 비교한 urea-PAGE 결과이다. 본 Fig에서 보여준 바와같이 Holstein(1번)과 제주마(2번), 제주마(2번)와 Thoroughbred(3번)사이에 분리 pattern의 차이를 볼 수 있었다. 각각의 gel을 확대하여 Image analysis 한 결과(Fig. 9, 10, 11)에서 볼 수 있는바와 같이 각 개체간의 차이를 나타냈다.

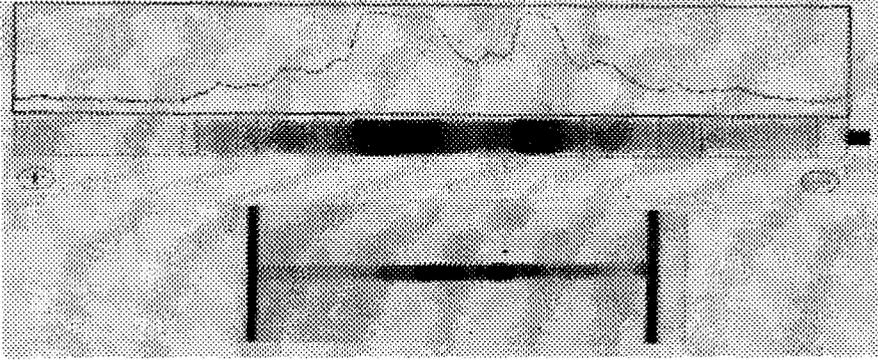


Fig. 9. Electrophoretogram of Holstein casein.

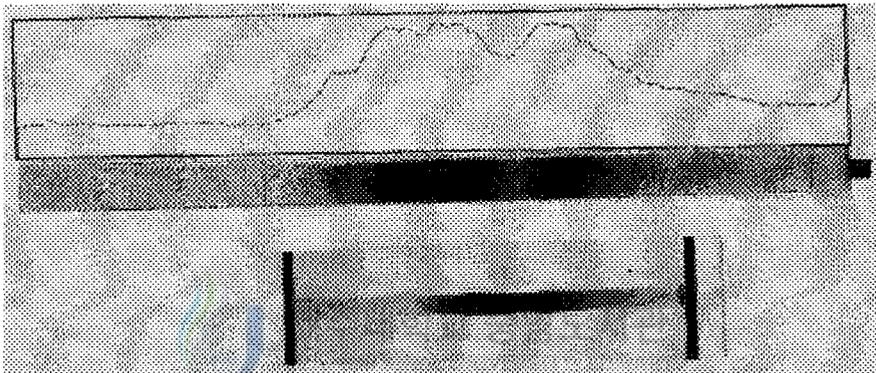


Fig. 10. Electrophoretogram of Cheju mare's casein.

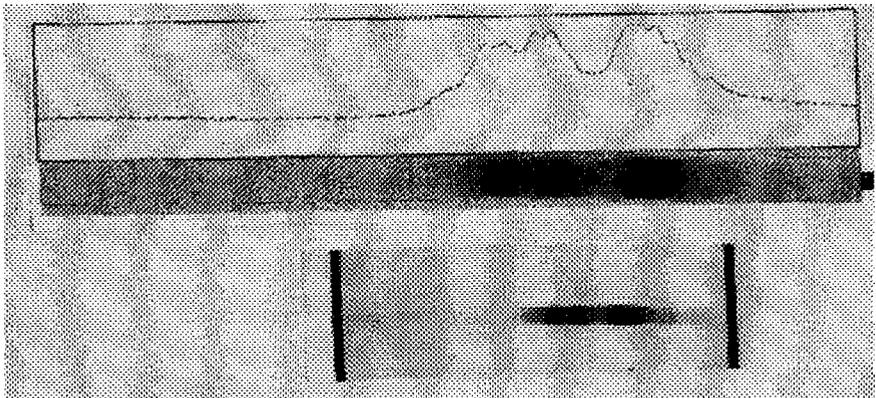


Fig. 11. Electrophoretogram of Thoroughbred casein.

즉, Fig. 10에 나타난 바와 같이 제주마 casein도 Ono 등(1989)이 보고한 바와 같이 α s-casein, β -casein 및 κ -casein으로 구성되어 있음을 알 수 있었으며, densitometer에 의한 측정결과는 없으나 그림상에서 α s-casein : β -casein의 비율이 O'corner(1973)의 1:16과 비교하여 볼 때 오히려 α s-casein 이 더 많게 보였으며, α s1-casein 부위에 적어도 5~6 개의 band가 관찰되어 7개를 발표한 상기 저자의 발표와 유사하였다. 그러나 Chiofalo 등(1983)은 70두의 마유 단백질을 조사하여 casein에 4개의 area 존재를 발표하였는데 이는 품종에 따른 차이가 아니면 α s1-casein 부위가 넓어 2개의 area로 계산하지 않았나 생각된다. 또한 β -casein에 있어서도 제주마유는 3~4개가 관찰되었으며, 본 실험의 Thoroughbred(Fig. 11)와 비교하면 α s-casein 부위에서 이동도가 빠른 부위의 band에서 차이를 확인할 수 있었다.

4. SDS-PAGE 전기영동에 의한 단백질 특성

Holstein과 Thoroughbred 및 제주마 casein 의 SDS전기영동 결과는 Fig. 12 와 같다.

Fig. 12 에서 제주마(1, 2)는 우유(5)의 α s-, β - 및 κ -casein에 상응하는 band 이외에 분자량 43,000 Kd 정도의 band를 포함 6개의 band가 나타났으나 주 band인 α s-casein부위에는 3개(30,000, 29,000, 27,000 Kd), β -casein에는 2개(20,100, 20,000Kd)의 미세 band를 관찰할 수 있었고, Thoroughbred는 43,000 이외에 60,000 부근의 band 출현도 관찰되었다.

Chiofalo 등(1983)에 의하면 마유 casein에 속하는 4개의 area와 4개의 whey protein을 확인했으며, casein에는 가장 이동도가 빠른 지역에서만이 유전적 변이체를 볼 수 있었고 나머지 3개 area에서는 각각 2개씩의 band가 나타났다고 하였다.

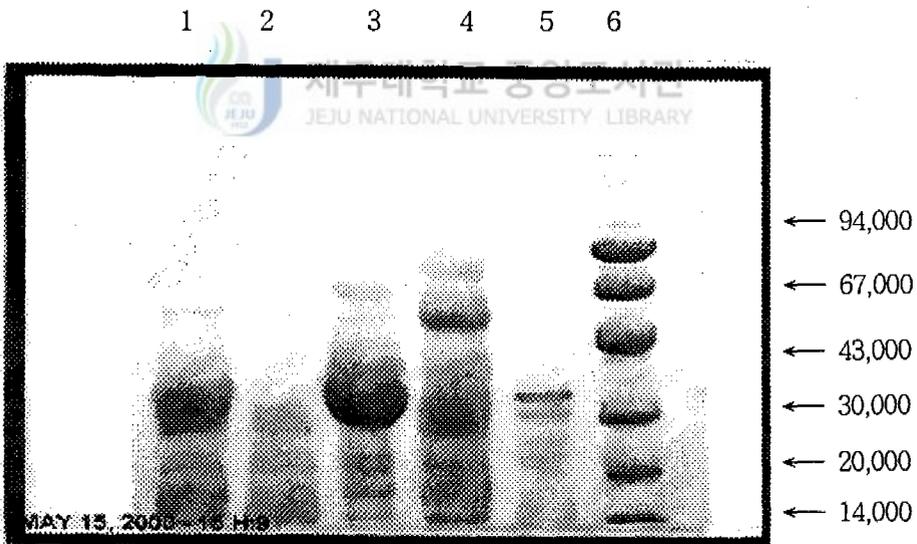


Fig. 12. SDS-PAGE patterns of casein

lane 1, 2, Cheju mares ; lane 3, 4, Thoroughbred ; lane 5, Holstein; lane 6, Marker (low molecular weight maker)

유청단백질의 SDS-PAGE의 결과는 Fig. 13 과 같다. β -lactoglobulin은 우유에서 분자량은 28,000~30,000 Kd에서 나타났고, 제주마와 Thoroughbred는 각각 40,000Kd 와 43,000 Kd 에서 확인되었다

결과적으로 우유의 β -lactoglobulin의 분자량 보다 제주마와 Thoroughbred 분자량이 높은 것을 알 수 있으며, 또 serum albumin은 세품종 모두 같았으나 분자량 20,100 부근의 band는 제주마에서 만이 특이하게 검출되었으며 band 수는 제주마가 20,000부근에서 1~2개가 Thoroughbred 에 비해 더 검출되었다. 유청단백질을 전기영동으로 분리하는 것은 대개 요소가 없는 천연 alkaline PAGE을 요한다. 왜냐하면 요소를 사용하면 결과적으로 선명치 않고 용해도가 저하된 유청단백질이 나타나기 때문에 α s1-CN 으로부터 α -lactalbumin이나 β -CN으로부터 β -lactoglobulin이 잘 분해되지 않기 때문이다

Chiofalo 등(1983)은 유청단백질에서 β -lactoglobulin과 α -lactalbumin 및 serum albumin과 whey부위의 1개 area가 관찰되었다고 했는데, Bonomi 등(1993)의 발표에서 마유를 각각 80, 90, 110, 130, 150℃에서 처리후의 변화를 SDS-PAGE로 확인하여 단백질 각 성분(lactoferrin, serum albumin, β -lactoglobulin, lyozyme 및 α -lactalbumin) 의 분자량의 변함을 보고하였다.

또한 오(1991)의 보고에 의하면 우유 유청단백질의 전기영동 분석결과에서 우유 유청단백질은 β -lactoglobulin이 가장 많은 양을 차지하고 있고 인유에서는 β -lactoglobulin이 전혀 검출되지 않았고 α -lactalbumin이 가장 많은 양을 차지하고 있다고 보고했다.

Kingsburry 와 Gaunt(1976)의 보고에 의하면 마유의 유청단백질을 전기영동 상 易動度 순으로 β -Lactoglobulin, α -Lactoalbumin 및 serum albumin으로 구성되며, 우유나 산양유의 유청단백질에서는 존재하지 않으나 β -Lactoglobulin 보다 빠른 성분이 존재함을 보고했다.

제주마의 유청단백질에서는 Kingsburry와 Gaunt(1976)가 보고 한것 보다 1~2 개의 band 더 출현되었고 serum albumin의 band 출현도 명백히 확인되었으며, 또한 이온 전기영동법상에서 Polyacrylamide gel electrophoresis 방법보다 SDS-PAG의 방법이 분리도면에서 뛰어난 것으로 확인되었다.

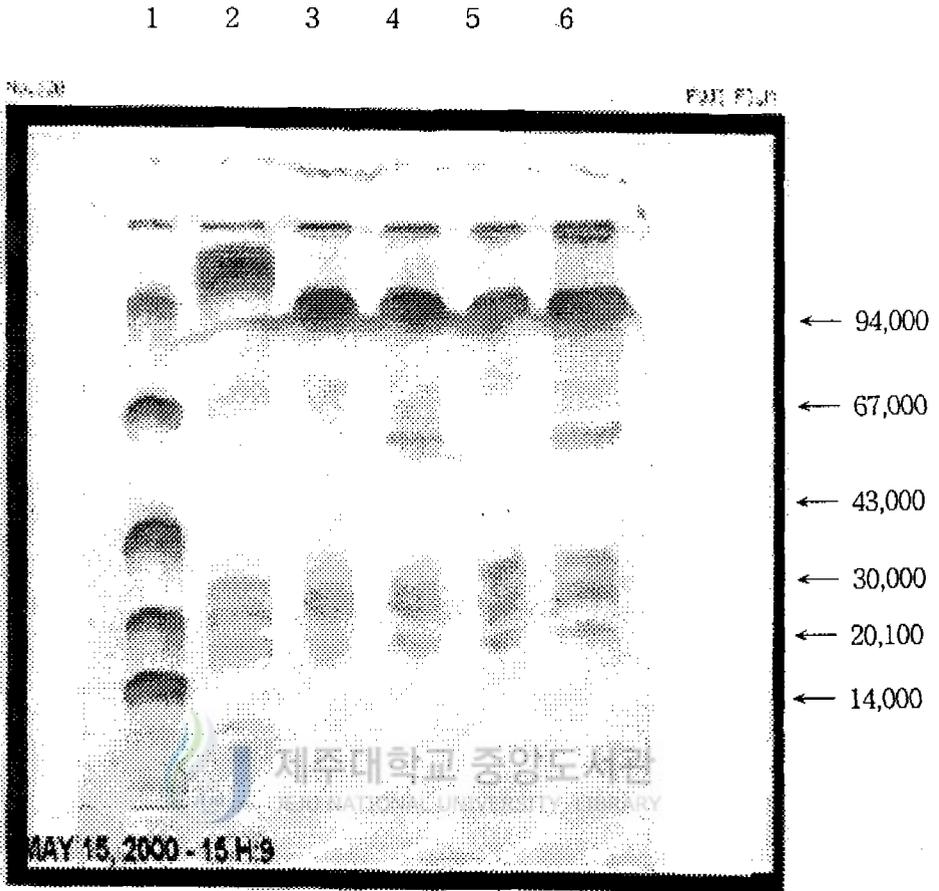


Fig 13. SDS-PAGE patterns of whey proteins

lane 1, low molecular weight marker ; lane 2~4, Cheju mare ;

lane 5 ; Holstein ; lane 6, Thoroughbred

5. Isoelectric focusing에 의한 단백질 분리

제주마 casein의 등전점 전기영동결과는 Fig. 14에, 모식도는 Fig. 15에 나타내었다. 제주마 casein은 우유에 비해 차이가 많으나 Thoroughbred와는 pH 5.0 이상과 pH 4.0 부근에서 band의 차이를 나타냈고, 많은수의 band로 분리되어 앞으로 제주마 각 band를 standard casein과 대조함으로써 각 casein은 유전적 변이체 구명에 좋은 결과가 있을 것으로 기대된다. 제주마는 Holstein에 비해 β - 및 κ -casein 사이에 많은 band가 나타난 반면, κ -casein은 적었으며 Thoroughbred와는 α s-casein 부위를 비롯해 많은 차이를 발견할 수 있었다.

O'corner와 Fox(1977)의 초기 연구보고에 의하면 마유 α s-casein이 최소한 7개의 성분으로 구성되어 있다고 보고했는데, 제주마의 α s-casein의 성분은 그 이상으로 분리되었고 또한 전기영동상의 pattern의 분포도로 미루어 볼 때 제주마유의 casein의 α s-casein 및 β -casein의 는 비슷한 양상을 나타냈다

유청단백질(Fig. 16, 17)은 casein과 마찬가지로 Holstein과 차이가 컸으나 Thoroughbred 와는 pH 4.0부근에서 제주마유의 band가 출현하는 등 차이를 나타내었다.

casein과 마찬가지로 Holstein과는 차이가 낮고 Thoroughbred와 비교해 볼 때 serum albumin부위에 차이를 확인할 수 있었으며, 상기 casein과 유청단백질의 IEF 결과 앞으로 PI가 확인된 표준품과 함께 IEF를 실시하고 또한 본 실험에서는 Ampholyte를 pH 3~10의 넓은 범위의 것을 사용하였으나 Vegarud 등(1989)이 pH 4.0~6.0, 4.5~5.0 : 5.0~7.0을 1 : 1 : 1로 섞어 사용함으로써 분리가 잘되었다는 보고로 응용한다면 제주마 casein과 유청단백질의 PI, 나아가 유전적 변이체까지도 확인할 수 있을 것이다.

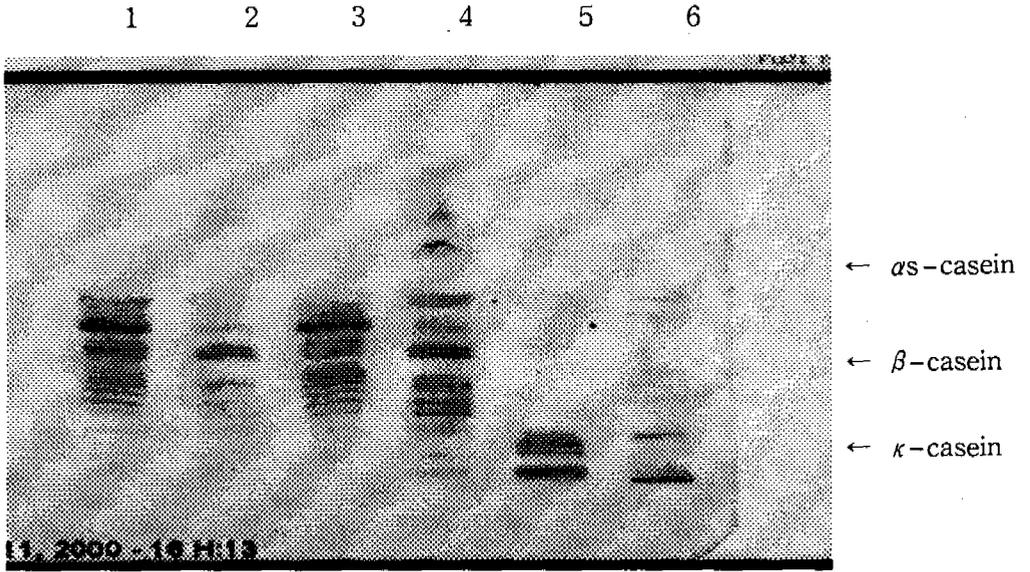


Fig. 14. Isoelectric focusing patterns of caseins from Cheju mare(1,2,3), Thoroughbred(4), Holstein(5) and PI kit in pre-cast Phastgels IEF pH 4.0~6.5(servalyt 3~10)

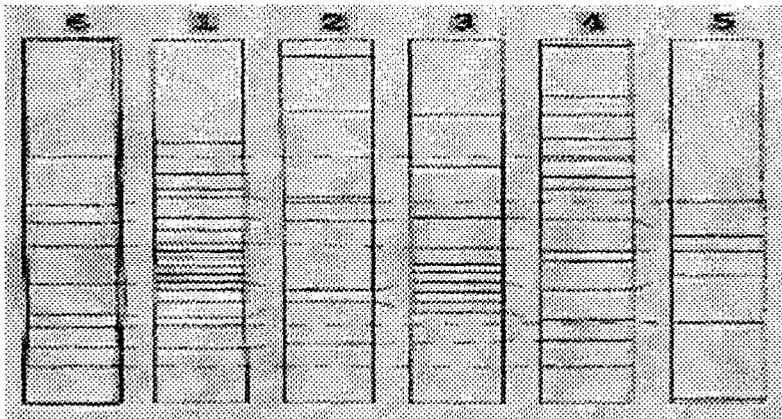


Fig. 15. Isoelectrophoretograms obtained of Fig 14.

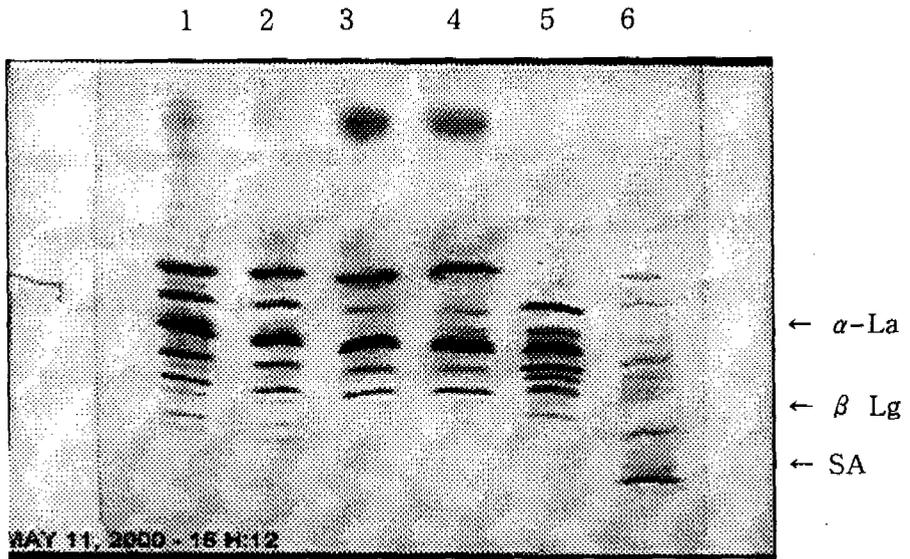


Fig. 16. Isoelectric focusing of Whey proteins from Cheju mare(1,2), Thoroughbred(3,4) Holstein(5) and Low PI kit in Pre-cast Phastgels IEF pH 4.6~6.5 (servalyt 3~10)

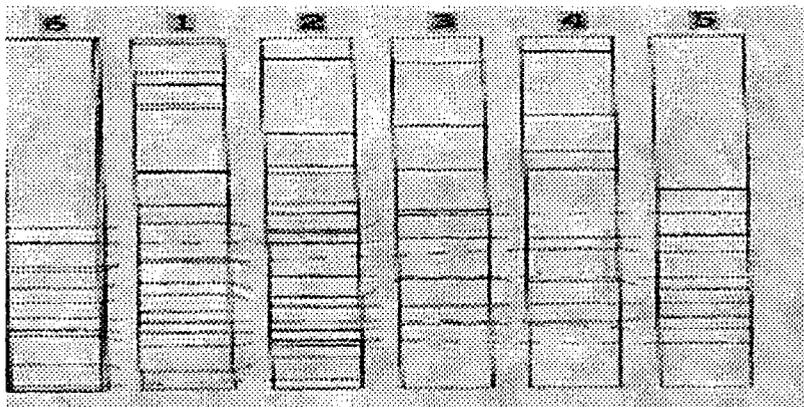


Fig. 17. Isoelectrophoretograms obtained of Fig 16.

V. 요약

본 연구는 제주마유(馬乳)의 일반성분과 유(乳)단백질에 관해 전기영동을 비롯한 몇가지 분석기법을 이용하여 그특성을 구명하고 Holstein 및 타품종의 마유와 비교함으로써 제주마유의 고유한 특성을 구명하고 제주마의 체계적인 보존에 유용한 자료를 얻고저 실시하였다.

1. 제주마유의 일반성분은 총고형분, 단백질, 지방, 유당 및 무기물 이 각각 11.31, 2.66, 1.65, 및 0.19%로 나타났고, 단백질과 유당함량은 타품종에 비하여 약간 높은 반면 무기물 함량은 낮은 경향을 보였다.
2. Total protein과 NPN(non-protein-nitrogen), casein 및 유청단백질은 각각 2.57, 0.08, 2.14, 0.18 %로 나타났다,
3. SDS-PAGE 결과, 제주마, Thoroughbred 및 Holstein 의 casein 은 각각 α s-, β - 및 κ -casein에 상응하는 band 와 분자량 43,000 kd 정도의 band가 나타났으며, 주 band인 α s-casein 부위에는 3개, β -casein에는 2개의 미세 band를 관찰할 수 있었고, Thoroughbred 는 43,000 kd band이외 에 60,000 kd부근의 band출현이 관찰되었다.
4. FPLC 상에서의 casein 분리결과는 개체간의 분리도를 비교해 볼 때 우유와 마유간에 차이가 있었으며 제주마와 Thoroughbred 마 사이에도 분리 Pattern에 차이를 보였다. 또한 이 Pattern의 차이는 전기 영동상에서의 차이와 유사함을 나타냈다.

5. 유청단백질의 전기영동 결과는 제주마와 Thoroughbred의 β -lactoglobulin 은 Holstein 보다 molecular weight 이 높은 것으로 나왔고, 20,100 kd 이상 에서 band가 검출되었으며 serum albumin 은 세 품종 모두 같았으나 분자량 24,000 kd 부근의 band는 제주마에서만 검출되었다. 또한 추가 의 band 도 1~2개가 제주마에서 관찰되어졌다.

6. 제주마 casein의 등전점 전기영동(IEF)는 제주마는 Holstein에 비해 β -casein 에서 많은 band가 나타난 반면, κ -casein의 band 수는 적었으며 Thoroughbred와는 α s-casein 부위를 비롯해 많은 차이를 발견할 수 있었다.

7. 이상의 연구결과는 제주마유의 특성을 구명하는데 중용한 자료로 이용할 수 있다고 생각하며 추가로 제주마 casein과 유청단백질의 PI와 나아가 아미노산 서열을 이용한 유전적 변이체에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다.



참고문헌

Anguita, G., R., T. G, Martin, P . M, Anal. Haza, Gonza'lez, Bernabe' Sanz and P. E. Herna' Ndez. 1996. Immunological characterization of bovine casein fractionated by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC). *Milchwissenschaft*.51(1): 21~25.

A.O.A.C, 1995. Official method of analysis . Association official analytical chemists, Washington, D. C.

Ashworth, U. A. S. & M. A. Chaudry. 1962. Dye- binding capacity of milk proteins for Amino-black 10 B and Orange G. *J. Dairy Sci.*, 45, 952-957

Ashcraft, A., and W. J. Tyznik, 1976. Effect of diet on volume and composition in mare's milk. *J. Anim. Sci.*, 43: 248

Barrefors, P., B. Ekstrand., 1985. Fast protein liquid chromatography (FPLC) of bovine caseins. *Milchwissenschaft*. 40 (5): 257-261

Barrefors, P., B. Ekstrand, L. Fagerstam, m. Larsson-raznikiewicz, J. Scharr and P. Steffner., 1985. Fast Protein liquid Chromatography(FPLC) of Bovine Caseins. *Milchwissenschaft* ,40 (5): 257-261

Bonomi, F. and S. Iametti. 1993. Thermal sensitivity of mare's milk proteins. *J of Dairy Res.* 61: 419~422.

Braun, F., I. Krause, and Klostermeyer, H. 1990. Efficient determination of skim milk powder, casein, wheyprotein and total milk protein in

compound feeding stuffs by isoelectric focusing and laser densitometry. *Milchwissenschaft*, 45, 3-9

Chilliard, Y., M. Doreau,, 1985. Characterization of lipase in mare milk. *J. Dairy Sci.*, 68: 37~39

Chiofalo, L ., Micari , pane sturniolo, G., 1983. Polimorfismo delle protein del latte in popolazioni cavalline allevate in sicilia. *zootech. nutr. Anim.*, 9: 311~318

Csapo, J. J. Stefler, T. G Martin, S. Majrat and Zscaspo kiss. 1995. Compostion of mare's Colostrum and mil. fat content fatty acid compostion and vitamin content. *Int. Dairy J.*, 393-402

Cogourdant, B. C. Drogoul, 1988. Projct de l'earl des Monts Feuillots "Mettre enplace une jumenterie laitiere avec commercialisation de produits a base de lait dejument: lait de jument ferment'e dt produits cosmetiques", Corcellesles-Monts, Dijon. France.

Davied, D. T. and J. C. D. White. 1960. The use of ultra- filtration and dialysis in Isolation the Equus phase of milk and in determining the paratition of milk constituents between the aqueous and disperse phases, *J Dairy Res.*, 27: 171

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/

Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis-II, method and application to human serum protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121:404

Davis, D. T., C. Holt, and Christie, W. W., 1983. The composition of milk. In: T.B Mepham(Editor), Biochemistry of Lactation. Elsevier, Amsterdam, P. 71-77

Doreau, M., Martin-Rosset, W. and S. Boulot, 1988c. Energy requirements and the feeding of mares during lactation: a review. Livest. Prod. Sci., 20:53-68

Doreau D. M. and S. Boulot. 1989. Recent Knowledge on Mare Milk Production: A Review. Livestock Production science (22): 213-235

Eeva-Liisa Syvaaja. 1992. Quantitative determination of the main casein components and purification of α -s2 and κ -Casein from bovine milk. Milchwissenschaft. 47: 563-566

Elozabeth D. Strange, Edyth L. Malin, Diane L. Van Hekken and Jay J. Basch. 1992. Chromatographic and electrophoretic methods used for analysis of milk proteins. J. Chromatography. 624:81-102

Feist, J. D. and D. McCullough. 1976, Behaviour patterns and lactogenic hormones in the mare. J. Reprod. Fert., Suppl., 23:631-635

Francesco Bonomi, Stefanla Iametti, Ella Pagliarini and Gianlaolo Solaroli. 1993 Thermal sensitivity of mare's milk proteins. 419-422

Glass, R.L., H. A. Troolin, and Jenness, R., 1967. Comparative Biochemical studies of milks. IV. Constituent fatty acids of milk fats. Comp. Biochem. Physiol., 415-425

Haasnoot, W., D. P., Venema, and Elenbass, H.L., 1986. Determination of cow milk in the milk and cheese of ewes and goats by fast protein liquid chromatography. *Milchwissenschaft* 41(10) 642~646

H.oh, J. Y. lee and S. W. lee. 1991. Studies on chemical composition and protein components of human milk. *Kor. J .Dairy Sci.* (2).13: 141~147.

Humphrey, R. S. and L. J. Newsome. 1984. High Performance Ion-Exchange Chromatography of the Major Bovine Milk Proteins. *New Zeland J of Diry and Tech.* 19:197~204

Kei-Ichi Shimazaki, Kazunary Oota, Katsutoshi Nitta and Yue Ke. 1994. Comparative study of the iron-binding strengths of eqyine, bovine and human lactoferrins. *J of Dairy Res* 61:563~566

Kingsburry, E.T. S. N. Gaunt, , 1976. Heterogeneity in whey protein of mare's milk. *J. Dairy Sci.*, 60: 274~277

Kudryaslov, A. and O. Krylova. 1966. Kouevodstoo I Honny (1) Sport, 35(4) :27 cited from *Dairy Sci.*, 28: 2299

Kulisa, M. 1986b. selected amino acids, fatty acids and N-acetylneuraminic acid in mare milk. *Proc. 37th Annu . Meet . Europ, Assoc. Anim . Prod budapest , 1P*

Kwai-Hang, K. F. and E. M. Kroker. 1984. Rapid Separation and Quantification of Major Caseins and Whey Protein of Bovine Milk by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. 67: 3052~3056

Kwai-Hang, K. F., J. F. Hayes, J. E. Moxley, and H. G. Monardes. 1984 Association of Genetic Variants of Casein and Milk Serum Proteins With Milk, and Protein Production by Dairy Cattle. *J Dairy Sci* 67: 835~840

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680~685.

Law, A. J. R., and Athina Tziboula. 1993. Fractionation of caprine κ -Casein and examination of Polymorphism by FPLC. *Milchwissenschaft* 48: 68~7129.

Larson, B L., and K. A. Kendall. 1957. Dairy production of the specific milk proteins during the lactation period, *J. Dairy Sci.* 40 :377

Liton, R. G., 1937 The Composition of mare's milk. *J. Dairy Sci.*, 8: 143-172

Ma'cha, J. and Novackova. 1975. Polymorphismes bilkovin Mlece klisen. *Aivoc. Vyroba.*, 20, 73~78

Makoto Yaguchi, D.T. Davies, and Y. K. KIM 1967 Preparation of κ -Casein by Gel Filtration *J Dairy Sci* 51: 473-477

Mariani. P , F. Martuzzi , A. L. Catalano. 1993. Composizione E proprieta' fisico-chimiche del latte di cavalla; variazione del costituenti azotati e minerali nel corso della lattazione. *Ann. Facolta' Med. Vet., univ. Parma*, 13: 43~58

Martuzzi. F , P. Mariani, G. Zanzucchi, A.L. Catalano. 1995. Composizione Azotata E minerale E valore energetico del latte de cavalla nel corso del primi 4 mesi di lattazione. Riv. Soc. Ital. Ippologia, 1, 15~25(1995)

Masson, P. L, J. F. Heremans. 1971. Lactoferrin in milk from different species. Comparative Biochemistry and Physiology 39B: 119-129

Michel Doreay, Sylviane Boulot, Jean · Pierre Barlet AND Philippe Patureau-Mirand. 1990. Yield and composition of milk from lactation amres: effects of lactation stage and individual differences. J.of. Dairy. Res 57: 449~454

Minieri, L., F. Intrieri, , 1970. Ricerche ellettroforetiche sulle frazioni proteiche del colostro e del latte dicavalle di razza avelignese, in rapporto alla distanza dal parto. Acta Met, Vet. Napoli, 16: 73~88

Miraglia, N., F. Quintavalla, , Mariani, P, and Catalano, A.I., 1986. Plasma biochemistry changes in mares and foals in relation to nutritional aspects. Preliminary trials. Proc. 37th Annu. Meet. Europ. Assoc. Anim. Prod., 11pp

Morrissey, P. A., 1973. The N-acetylneuraminic acid contenet of the milk of varoious species. J. Dairy Res., 40 :421-425

Neseni, R., E Flade, , Heidler, G. and steger, H., 1958. Milchleistung und milchzusammensetzung von stuten im verlaufe der laktation. Arch Tierzucht., 1: 91 ~129.

Nordstorm, A., 1970. On the growth of young horses and on factors

affecting the growth. Masters Thesis, university of Helsinki

O'coner, P. P. F. Fox. 1973. Temperature-dependent dissociation of casein micelles. From the milk of varients species. Neth. Milk Dairy. J 29:199

O'coner, P. P. F. Fox. 1977. The proteins and salt and some non bovine milk, J. Dairy Res. 44 : 607.

Oftedal, O. T., H. F. Hintz, and Schryver, H.F., 1983. Lactation in the horse:milk composition and intake by foals. J. Nutr., 113: 2196~2206

Olav, T. Oftedal. 1987. Interspecies variation in milk composition among horses, zebras and asses(Perissodactyla:Eauidae). J. Food .sci 57~66

Ono, Tomata, Hideaki Kohno, Satoshi Odagiri and Toshio Takagi. 1989. Subunit Components of casein micelles from bovine, ovine, caprin and equine milks. J. of Dairy. Res 56:

Peltonen, T., V. Kossila, , Antila, V. and Huida, L., 1980. Effect of protein supplementation on milk composition of the mare and growth rate of their foals. Proc. 31st Annu. Meet. Europ Assoc. Anim. Prod., 6pp.

Peterson, F. R Nauman, L.W. and T.L. McmeeKin. 1958. J, Anim. Chem, Soc 80: 95

PhastSystem. 1996. Native PAGE Separation Technique method 120. Pharmacia LKB Biotechnology.

PhastSystem. 1996. SDS_PAGE Separation Technique method file No 110. Pharmacia LKB Biotechnology.

Robert Jenness. 1979. Comparative aspects of milk proteins. *J of Dairy Res*79:1699-2093

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

Rowland, S. J. 1938. the determination of the nitrogen distribution in milk. *Journal of Dairy Research* 9: 42-46

Schryver, H. F., O. T. Oftedal, Williams, J., Cymbaluk, N. F., Antczak, D. and Hintz, H. F., 1986a. A comparison of the mineral composition of milk of domestic and captive wild equids (*Equus preaeawalski*, *e. zebra*, *e. burchelli*, *e. caballus*, *e. assinus*). *comp. Biochem. Physiol.*, 85A :233-235

Schryver, H. F., Oftedal, O. T., Williams, J., Soderholm, L. V. and Jintz, H. F., 1986B. Lactation in the horse: the mineral composition if mare milk. *J Nutr.*, 116: 2142-2147

Solaroli, G., E. Pagliarini and C. Peri., 1993. Compostion and Nutritional Quality of mare.s milk. *Ital. J. Food Sci.*, n.1: 3-10

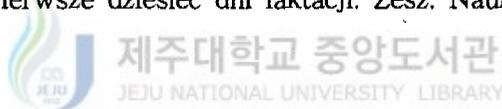
Sokhtaev, M. K., 1970. Milk composition of karabair mares. *Doki. Mosk. Sel'skokhoz. Akad. K.A Timiryazeva(Zootech)*, 157: 211~215 (in Russian)in *dairy Sci. Abs.*, 33:72

Storch, G. 1985. Influence of level of energy and nutrient in take by mares on reproductive performance and blood serum composition of the mares and foals, can. J. Anim Sci., 57: 551-558

Sutton, E. I., Bowland, J. P. and Ratcliff, W. D., 1977. Influence of level of energy and nutrient intake by mares on reproductive performances and blood serum composition of the mares and foals. Can. J. Anim. Sci., 57: 551-558

Servaas Visser, Vharles J. Slangen and Harry S. Rollema 1991. Phenotyping of bovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J. Chromatography. 548: 361-370

Smoczynski, S. and Tmoczynski, R., 1982. Badania skladu chemicznego mleka klaczy I. Pierwsze dziesiec dni laktacji. Zesz. Nauk. Akad. Roln. Tech. Olszt., 17: 77~83



Tarassuk, N. P. and M. Yaguchi. 1962. Chromatography on milk protein on DEAE-cellulose. J. Dairy Sci., 52: 8

Tsuchiya, f. 1985. Modern formulation and processing technology of infant formula based on milk. Meiji Milk Products Co., Ltd. 5(2,3) :1

Tiselius, A., 1937 Trans, Faraday Soc. 33: 529

Tsuji, H, H. Otani and A. Hosono. 1985. Characteristics of body measurement and milk composition of Kiso horse. Jap. J. Dairy and Food sci., (34): 118-122

Ullrey, D. E., Struthers, R. D., Hendricks, D. G. and Brent, B. E., 1966. Composition of mare's milk. J. Anim. Sci., 25:217-221.

Ullrey, D. E., Ely, W. T. and Covert, R. I., 1974. Iron, Zinc and copper in mare's milk. J Anim. Sci., 38: 1276-1277.

Urbinisov, Zh. K., servetnik-chalaya, G. K. and Izatullaev, E. A., 1981. Protein content of mare's milk. Molochnaya Promyshlennost, 2: 45(in russian)

Van Hekken, D. L. and M. P. Thompson. 1992. Application of PhastSystem to the Resolution of Bovine Milk Proteins on Urea-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. J dairy Sci 75: 1204-1210

Visser, S., Jenness, R. and Mullin, J. R., 1981. Isolation and characterization of beta and gamma caseins from horses milk. Biochem. J., 203: 131-139

Vegarud G. E., T. S. Molland, M. J. Brovold, T. G. Dovold, P. Alestrom, T. Steine, S. Rogne, and T. Langsrud. 1989 . Rapid separation of genetic variants fo Caseins and Whey proteins using urea-modified gels and fast electrophoresis. Milchwissenschaft. 44(11): 689-691

강민수. 1996. 제주의 말. . 제주대학교 박물관. 322-339

강민수. 1998 제주말(馬) 연구. 열림문화

강면희. 한국재래마에 관한 역사적 형태학적 연구. 학축지 11(4) : 352-379

이기단. 1984 마와 승마. 향문사.

이현종 , 김호구 1984 제주재래마유 성분 에 관한 연구. 제주대학교 석사
논문

이현종, 1992 국산마 이용에 관한 연구. 한국식품개발연구원

양영훈. 1999. 제주마 표준체형, 혈액단백질 및 DNA 다형현상을 이용한 특
성규명. 제주마의 보존 및 활용심포지움

정창조, 강민수, 강태숙. 1986. 제주마의 체형에 관한 연구, 제주대 축산 논
총 1 집 P. 23~29



감사의 글

항상 부족한 제게 본 논문을 마무리 할 수 있었던 것은 주변의 여러 분들의 도움과 배려가 있었기 때문에 가능할 수 있었습니다. 우선 이해와 인내와 수용으로써 항상 저의 길을 지켜봐 주시고, 큰가르침을 일깨워 주신 지도교수 이현종 교수님께 진심으로 감사드립니다.

바쁘신 가운데도 좋은 논문이 될 수 있도록 다듬어 주시고 많은 고견을 주신 김종계 교수님, 양영훈 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 제가 어려운 중에도 도움을 청할때마다 너그러이 이해해주시고 따뜻하게 배려해 주신 오숙희 조교 선생님과 강기봉 조교님에게 깊은 감사를 드립니다.

본 논문을 수행하는 과정에 있어서 같이 고민해주시고 논문에 관해 많은 조언을 해주신 한라우유 고석용 과장님 께도 깊은 감사를 드립니다. 그리고 목초자원학 실험실의 황경준 원우님, 유가공학 실험실의 김진구 선배님과 이상원, 이정훈, 문성민, 그리고 저에 논문을 위해 같이 밤을 지새워주며 도와준 이정규 후배들에게도 고마움을 전합니다.

마지막으로 제가 힘들때나 어려울때 저의 큰 버팀목이 되어주시며 자상한 관심과 깊은 사랑을 주시는 저의 용남, 부남 형님과 두 형수님에게 깊은 감사를 드리며, 고향을 떠나 객지에서 공부하는 저를 항상 걱정해주시고 또, 항상 부모님에게 실망만 끼쳐드려 혹시나 잘못된 길로 가지 않을까 염려해주시며 자식에 대한 모든 사랑과 수고로움을 아끼지 않으시는 저의 아버님(이춘섭)과 어머님(김효순)에게 부족하나마 이 작은 결실을 바치고자 합니다.

2000년 6월

이 종 남