

한우 Lactoferrin 가수분해물의 항균 활성

이 수 원 · 양 회 진
성균관대학교 식품·생명자원학과

Antibacterial Activity of Enzymatic Hydrolyzates of Lactoferrin derived from Korean Native Cattle

S. W. Lee and H. J. Yang

Dept. of food & life science, Sungkyunkwan university

Abstract

In this study, we carried out to isolate lactoferrin from Korean native cattle and Holstein cow by batch extraction, ion exchange chromatography, gel filtration, and affinity chromatography. The purity of the isolated lactoferrin was higher than that of lactoferrin purchased from Sigma, when determined by SDS-PAGE and HPLC analysis.

Antibacterial activity of *E. coli* O111 by Korean native cattle lactoferrin was lower than that of Holstein lactoferrin. A minimal inhibitory concentration(MIC) of Korean native cattle lactoferrin and Holstein lactoferrin was 2.75 mg/ml and 1.5 mg/ml respectively. The lactoferrin hydrolyzate of Korean native cattle exhibited antimicrobial activity at 0.25 mg/ml, whereas that of Holstein cow exhibited antimicrobial activity at 0.12 mg/ml. The antibacterial potency of the hydrolyzate was at least tenfold greater than that of undigested lactoferrin with strains tested. The effect of hydrolyzate was bactericidal as indicated by rapid loss of viability of *E. coli* O111.

Key words : lactoferrin, hydrolyzate, antimicrobial, korean native cattle.

서 론

우유는 어떤 식품보다도 영양성분이 균형있게 함유되어 있는 완전식품이며, 주요 영양소 이외에도 다수의 생리활성 물질을 함유하고 있는 것으로 밝혀지고 있다. Immunoglobulin, lymphocytes와 같은 여러 가지 특이적인 항균 인자 뿐 아니라, lactoferrin(Lf), lactoperoxidase, lysozyme 및 superoxide dismutase 등과 같은 비특이적인 항균인자 등도 함유하고 있다(Reiter 등, 1978). 이러한 단백질 중 lactoferrin은 우유 내 여러 가지 생리적 기능을 가진 성분의 하나로 특히, 초유 중에 많이 함유되어 있고, 항균작용과 면역반응 등에 중요한 역할을 하는 물질로 알려져 있다. lactoferrin은 lactotransferrin이라고도 불리워지며

transferrin family 단백질 중의 한 종류로 (Aisen과 Listowsky, 1980; Brock, 1985; Rose 등, 1986) 젖, 침, 눈물 등에 들어 있으며, 유선, mucous에서 분비되고 neutrophile의 secondary granules에서도 분비된다. lactoferrin은 1960년 Groves에 의해 우유에서 처음으로 분리 되어졌고 같은 해 Johannsson이 인 유에서 분리해 내는데 성공하였으며 이후 돼지, 쥐, 양, 말, 원숭이의 젖으로부터도 분리가 이루어졌다.

Lactoferrin은 glycoprotein으로 2개의 glycan chain이 결합된 691개의 아미노산으로 구성되어 있다(Metz-Boutigue 등, 1984). 최근 Pierce 등(1991)에 의하여 bovine lactoferrin의 peptide를 구성하는 689개의 아미노산 서열이 규명되었다. 이러한 아미노산 서열에 따라 bovine lactoferrin의 분자량을 계산하면 약 76 KDa이며, 당 사슬까지 포함하여 약 83 KDa이다(Shimazaki 등, 1991). 이 당단백

Corresponding author : S. W. Lee, Dept. of food & life science, Sungkyunkwan university, 300 chunchundong, Suwon, 440-746, Korea.

질은 2개의 lobe로 구성되어 있으며, 각각의 lobe에 1분자씩 2개의 Fe^{3+} 결합 부위를 가지고 있다.

Lactoferrin의 기능이 완전히 밝혀지지는 않았지만 일반적으로 영유아가 포유할 때 철에 의존적인 미생물 성장을 저해하는데, 이것은 coliform enterobacteria와 같은 높은 함량의 철을 요구하는 대부분의 박테리아에 필요한 free iron을 chelating하기 때문이다(Arnold 등, 1977; Bullen, 1981; Nemet와 Simonovits 등, 1985). 또한, lactoferrin은 lipopolysaccharides (LPS) 방출에 의하여 대장균의 외막에 손상을 주고 항생물질 침입과 정상적인 장관흡수 능력을 방해하는 것으로 알려져 있다(Ellison 등, 1988; Nikaido, 1989).

Lactoferrin은 여러 가지 미생물의 표면에 직접 결합할 수 있으며 철 결핍 배지에 노출되었을 때 세포의 치사원인이 될 뿐만 아니라 이러한 현상은 외인성 철을 첨가하여도 반전시킬 수 없다고 하였다. 이와 같이 lactoferrin이 직접 세균에 결합하여 항균 작용을 나타내는 것 이외에도 그랩 음성균의 외막중 lipopolysaccharide를 유리시켜 막의 안정성을 파괴하거나, lactoferrin이 lysozyme과 함께 세균을 응집시켜 증식을 억제하는 메카니즘이 밝혀지고 있다. 최근 Tomita 등(1991)과 Bellamy 등(1992)은 pepsin으로 가수분해한 bovine lactoferrin의 N-terminal의 17~41번의 25개의 amino acid 잔기로 이루어진 분자량 3,126 Da의 항균성 domain인 lactoferricin을 발견하였는데 bovine-Lf의 대장균에 대한 최소 저해농도(MIC)가 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인데 비하여 lactoferricin은 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로서 약 300배 강한 항균 작용을 나타내었으며, human-lactoferrin에서 분리한 lactoferricin보다 16배 강한 항균력을 갖는다고 보고하였다.

이러한 lactoferricin에 관한 최근의 연구는 단백질 분자내에서 실제로 항균작용을 나타내는 활성부위의 구조를 밝힐 수 있는 계기를 마련했다는 점에서 크게 주목되는 것이다.

본 연구에서는 항균활성을 지닌 이러한 lactoferrin을 한우의 초유로부터 분리, 정제하여 Holstein 우유 유래 lactoferrin과 함께 효소를 이용하여 가수분해하여 가용성 획득의 병원성 미생물에 대한 생육억제 효과를 검토하고

자 실시하였다.

재료 및 방법

재 료

Column chromatography용 resin 및 기타 시약은 Sigma 제품을 사용하였고 미생물 배양용 media로는 Difco 제품을 사용하였다. lactoferrin 정제에 사용한 한우 시료는 대관령 소재 고냉지 시험장에서 착유한 한우 초유를 사용하였고, 젖소 lactoferrin 정제를 위해서는 서울우유의 탈지유를 사용하였다.

Lactoferrin의 분리 및 정제

한우유와 젖소 탈지유를 등전 침전시켜, 유청을 얻은 후 Dionysius 등(1991)의 방법을 변형한 batch extraction, CM-Sephadex C-50 ion exchange chromatography, Sephadex G-150 gel filtration chromatography, heparin agarose affinity chromatography(Chen 등, 1991)를 이용하여 정제한 후 분획된 단백질용액을 4°C cold room 내에서 72시간 동안 투석하여 탈염한 후 동결건조하였다.

Electrophoresis에 의한 정제도 확인 및 분자량 확인

Laemmli (1970)의 방법을 응용하여, Mini-Protein II(BIO-RAD)을 사용하여 SDS-PAGE를 실시하였다.

HPLC 분석

Symmatry C_{18} column(3.9×150mm, waters, USA)을 사용하여 reverse phase HPLC(Young in, Korea) 분석을 행하였다. 0.1% trifluoroacetic acid(TFA)와 0.1% TFA를 함유한 acetonitrile을 이용하여 단계적 농도 구배(acetonitrile 농도: 0~5min 20%, 5~35min 50%, 35~50min 60%)를 주어 0.7 ml/min의 유속으로 용출시켰다.

Lactoferrin 가수분해물의 제조

5% lactoferrin을 pH 3.0으로 조정 한 후 pepsin(10 units/mg, sigma, USA)을 3% 첨가한 후 37°C에서 4시간 가수분해하였다. 효소를 불활성화하고, pH를 7로 조정 한 후 15,

000×g에서 30분간 원심분리하여 그 상등액을 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

항균력 측정

1) 시험균주

시험균주로는 *E. coli* O111를 KIST, 생명공학 연구소에서 분양받아 사용하였다.

시험균주는 1% peptone 배지에서 계대 배양한 후 MRS배지에 접종하여 37℃에서 배양하였으며, 이를 1% peptone 배지에 1차 배양 후 균주의 생육억제 실험에 사용하였다.

2) 항균력 측정

1% peptone broth에 Millipore filter(0.45 μm)로 제균한 lactoferrin를 각각의 농도로 첨가하고 균의 최종농도가 10⁶ cfu/ml 수준이 되도록 시험균주 배양액을 접종한 후 37℃에서 2시간 간격으로 24시간 배양하면서 ELISA reader로 630 nm에서의 흡광도로 균의 증식을 관찰하였다.

3) 최소저해농도(Minimal inhibition concentration: MIC) 측정

1% peptone broth에 Millipore filter (0.45 μm)로 제균한 lactoferrin를 각각의 농도로 첨가하고 균의 최종농도가 10⁶ cfu/ml 수준이 되도록 시험균주 배양액을 접종한 후 37℃에서 배양했다. 12시간 정도 배양 후 눈으로 균의 생장 여부를 관찰하고 이 배양액을 희석해 PYG 배지에 접종하여 균수를 측정하였다. 이때 측정된 균수가 배양전 균의 농도보다 낮거나 같으면 이때 첨가한 lactoferrin의 농도를 MIC로 판단하였다.

결과 및 고찰

Lactoferrin(Lf)의 순도 측정 및 가수분해물의 HPLC pattern

Lactoferrin의 정제에 Nagasawa 등(1972)의 DEAE-Cellulose, Spik 등(1982)의 SP-Sephadex, Dionysius 등(1991)의 CM-Sephadex C-50 Ion Exchange Chromatography 방법과, Ena(1990) 등이 사용한 β-lactoglobulin을 이용한 Affinity Chromatography 방

법 등이 사용되어져 왔으나, 본 연구에서는 예비실험 결과, 제일 먼저 본 연구실에서 고안한 batch식 흡착법이 수율이 높고 공정상 간편한 것으로 확인되어 이 방법을 사용하여 분리하였다.

SDS-PAGE로 순도를 확인한 결과 한우 Lf와 마찬가지로 순도가 높은 것이 확인되었다. Lf의 Sigma 표준품을 함께 SDS-PAGE를 실시하였을 때 이동 거리상의 차이가 없으므로 한우 lactoferrin(K-Lf)의 분자량은 전기영동법에 의하여는 Sigma 표준품과의 차이가 없는 것으로 관찰되었다(data 생략). 정제한 한우 lactoferrin의 순도를 Symmetry (C₁₈ Reverse) column이 부착된 HPLC (Younglin 9200, Korea)를 이용하여 분석한 결과는 다음 Fig. 1와 같으며, Sigma Lf보다 순도가 높은 단일 peak를 보여 주었다. 한편 K-Lf 가수분해물의 HPLC 결과는 Fig. 2와 같다.

항균력 측정

Lactoferrin과 lactoferrin 가수분해물의 항균력을 알아보기 위하여 한우 lactoferrin(K-Lf)와 젖소 lactoferrin(B-Lf)를 각각 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg/ml의 농도로 첨가하였고, 이들의 가수분해물인 K-Lf-hydrolyzate(K-Lf-H)와 B-Lf-hydrolyzate (B-Lf-H)는 0.05 mg, 0.1 mg, 0.5 mg, 1 mg/ml의 농도로 첨가한

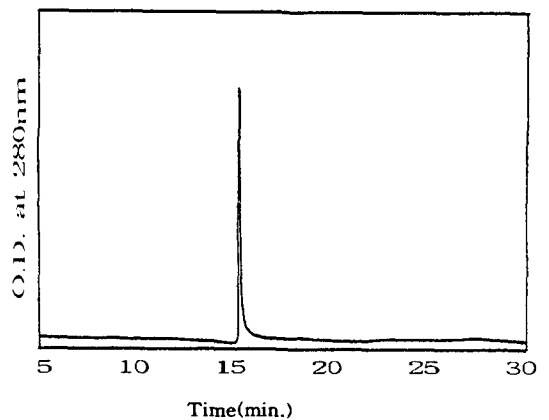


Fig. 1. HPLC analysis of lactoferrin from korean native cattle. (Symmetry column(C₁₈ reverse), UV 280nm, Flow rate : 0.7ml/min Mobile phase : (A)0.1% TFA/H₂O, (B)0.1% TFA/CH₃CN).

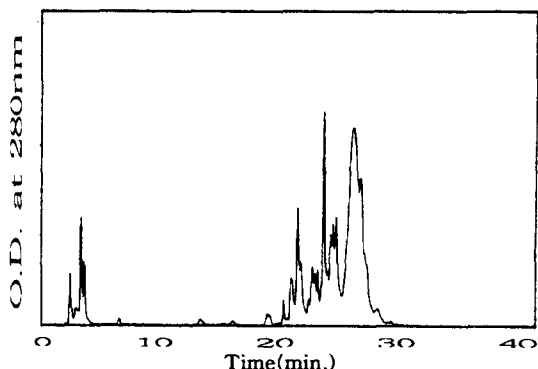


Fig. 2. HPLC analysis of lactoferrin hydrolysates from Korean native cattle. (Symmetry column(C₁₈ reverse), UV 280nm, Flow rate : 0.5ml/min Mobile phase : (A)0.1% TFA/H₂O, (B)0.1% TFA/CH₃CN).

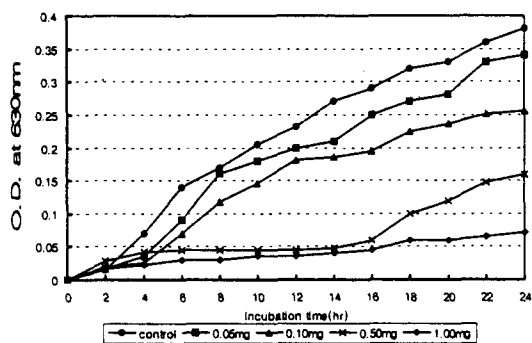


Fig. 3. Bacteriostasis of *E. coli* O111 by Lactoferrin hydrolysate from Holstein cow B-Lf-H in 1% peptone at 37°C.

후 *E. coli* O111의 성장 상태를 경시적으로 조사하였다(Fig. 3, Fig. 4).

K-Lf와 B-Lf의 경우 둘 다 첨가한 Lf의 농도가 증가할수록 균의 성장이 억제되는 것으로 나타났다. 그러나 B-Lf의 경우에는 1 mg/ml 농도에서부터 균의 성장 속도가 느려졌고 그 이상의 농도에서는 균의 성장을 현저하게 저해하는 경향을 나타내었지만 K-Lf에서는 균의 성장억제 정도가 같은 농도일 때의 B-Lf에 비하여 조금씩 낮은 것으로 관찰되어 K-Lf가 B-Lf보다 항균성이 좀 낮은 경향을 나타내었다(Data 생략). 이는 K-Lf와 B-Lf는 항균력에

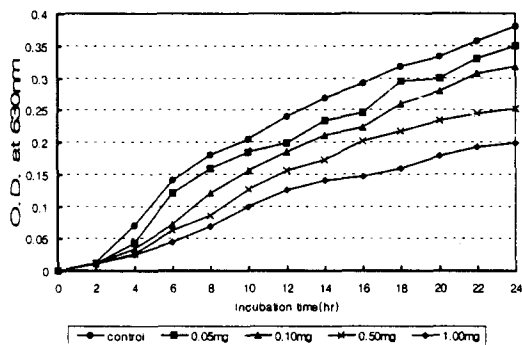


Fig. 4. Bacteriostasis of *E. coli* O111 by Lactoferrin hydrolysate from Korean native cattle in 1% peptone at 37°C.

있어서 차이가 없다고 보고한 진(1994)의 결과와는 다른 결과를 나타내었다.

가수분해물의 경우에서도 K-Lf-H와 B-Lf-H는 첨가한 Lf의 농도가 증가함에 따라 균의 성장이 낮아지는 것이 관찰되었다. Fig. 2, 3에서 보는 것처럼 B-Lf-H의 경우는 0.5 mg/ml의 농도에서 현저하게 성장을 저해하는 것으로 나타났지만 K-Lf-H의 경우에는 B-Lf-H에 비해 성장을 저해하는 정도가 낮음을 보여주었다.

이와 같은 결과로 보아 K-Lf는 B-Lf와 분자구조상에 있어 차이가 있는 것으로 생각되며, 앞으로 아미노산 분석, amino acid sequence 등의 실험을 통해 밝혀질 수 있을 것이다.

저해 농도(Minimal inhibition concentration : MIC) 측정

한우 lactoferrin(K-Lf), 젖소 lactoferrin(B-Lf), K-Lf-hydrolysate(K-Lf-H), B-Lf-hydrolysate(B-Lf-H)를 배지에 여러 가지 농도로 첨가하여 균의 성장을 억제하는 최소 저해 농도(MIC)를 측정하였다(Table 1).

실험 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 MIC는 B-Lf 1.50 mg/ml, K-Lf 2.75 mg/ml로 젖소 Lf가 항균성이 더 높은 것으로 나타났으며, 가수분해물의 경우, B-Lf-H의 MIC는 0.12 mg/ml인데 비해 K-Lf-H는 0.25 mg/ml로 젖소 LF 가수분해물에 비해 MIC가 1/2 정도로 낮게 나타났다. Tomita(1991)와 Bellamy

Table 1. Antibacterial activity of bovine lactoferrin and its hydrolyzates against *Escheria coli* O111.

	MIC(mg /ml)
B-Lf	1.50
K-Lf	2.75
B-Lf-H	0.12
K-Lf-H	0.25

B : denotes Bovine, Lf : denotes Lactoferrin, K : denotes Korean cattle H : Hydrolyzate, MIC : denotes minimal inhibition concentration.

(1992)의 보고에서는 B-Lf의 경우 MIC가 2 mg/ml 정도로 측정되었으며, B-Lf-Hydrolyzate는 0.1 mg/ml 정도라는 이들의 연구결과들과 비교하여 볼 때 유사한 결과를 보여 주었다.

요 약

한우 초유로부터 lactoferrin(Lf)을 분리하기 위해서 batch extraction, ion exchange chromatography, gel filtration chromatography, affinity chromatography 등의 정제과정을 실시하였고 분리 정제한 lactoferrin의 순도는 SDS-PAGE와 HPLC에 의하여 확인한 결과 Sigma사의 젖소 lactoferrin보다 높았다.

E. coli O111에 대한 항균성은 젖소 Lf(B-Lf)가 한우 Lf(K-Lf)보다 높았으며, pepsin 가수분해물 중 lactoferrin rich fraction에서도 같은 경향을 보여 주었다. 최소저해농도(MIC)는 B-Lf가 1.5 mg/ml, K-Lf은 2.75 mg/ml이며 B-Lf 가수분해물은 0.125 mg/ml, K-Lf 가수분해물은 0.25 mg/ml로 항균성 실험과 동일하게 B-Lf 가수분해물의 항균활성이 더 높은 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 핵심전문 연구비(961-0607-064-1) 지원으로 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Arnold, R. R., Cole, M. F. and McGhee, J. R. : A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science*, 197, 263 (1977).
2. Asien, P. and Listowsky, I. : Iron transport and storage proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 49, 357 (1980).
3. Bellamy, W., Takase, M., Wakabayashi, H., Kawase K. and Tomita, M. : Antibacterial spectrum of lactoferrin B, a Potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J. Applied Bacteriology*, 73, 472 (1992).
4. Brock, J. H. : Transferrins. Metall-oproteins. part 2. Metal proteins with non-redox roles. P. M. Harrison, ed. Verlag Chemie. GmbH, Weinheim (1985).
5. Bullen, J. J. : The significance of iron in infection. *Rev. Infect. Dis.*, 3, 1127 (1981).
6. Chen, J. P. and Wang, C. H. : Microfiltration affinity purification of lactoferrin and immunoglobulin G from cheese whey. *J. Food Sci.* 56, 701 (1991).
7. Dionysius, D. A., Herse, J. B. and Grieve, P. A. : Extraction of lactoperoxidase and lactoferrin from whey using batch ion exchange techniques. *Aust. J. Dairy Technol.*, Nov., 72 (1991).
8. Ellison, R. T., Giehl, T. J. and Laforce, F. M. : Damage of the outer membrane of enteric gram negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect. Immunol.*, 56, 2744 (1988).
9. Ena, J. M., Castillo, H., Sanchez, L. and Calvo, M. : Isolation of human lactoferrin by affinity chromatography using insolubilized bovine β -lactoglobulin. *J. Chromatogr.*, 525, 442 (1990).

10. Groves, M. L. : The isolation of a red protein from milk. *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3345 (1960).
11. Johansson, B. : Isolation of an iron-containing red protein from human milk. *Acta. Chem. Scand.*, **14**, 510 (1960).
12. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, **227**, 680 (1970).
13. Metz-Boutigue, M. H., Jolles, J., Mazurier, J., Schoentingen, F., Legrand, D. Spik, G., Montreuil, J. and Jolles, P. : Human lactoferrin : Amino acid sequence and structural comparison with other transferrins. *Eur. J. Biochem.*, **145**, 659 (1984).
14. Nagasawa, T., Kiyosawa, I. and Kuwahara, K. : Amounts of lactoferrin in human colostrum and milk. *J. Dairy Sci.*, **55**, 1651 (1972).
15. Nemet, K. and Simonovits : The Biological role of lactoferrin. *Haematol.*, **18**, 1213 (1985).
16. Nikaido, H. and Vaara, M. : Outer membrane. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. Neidhardt. F. C., J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger editors. American Society for Microbiology. Washington. D. C. p. 7 (1987).
17. Pierce, A., Colavizza, D., Benaissa, M., Maes, P., Tartar, A. and Montreuil, J. : Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* **196**, 177 (1991).
18. Reiter, B. : Review of the progress of dairy science antimicrobial system in milk. *J. Dairy Res.*, **45**, 131 (1978).
19. Rose, T. M., Plowman, G. D., Teplow, D. B., Dryer, W. J., Hellstrom, K. E. and Brown, J. P. : Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97 deduced from the mRNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **83**, 1261 (1986).
20. Shimazaki, K., Kawano, N. and Yoo, Y. C. : Comparison of bovine, sheep, and goat milk lactoferrin in their electrophoretic behavior, conformation, immunochemical properties and lectin reactivity. *Comp. Biochem. Physiol.*, **98B**, 417 (1991).
21. Spik, G., Strecker, G., Fournet, B., Bouguellet, S. and Montreuil, J. : Primary structure of the glycans from human lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.*, **121**, 413 (1982).
22. Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H. and Kawase, K. : Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.*, **74**, 4137 (1991).
23. 진현석 : 한우 초유 중 lactoferrin의 정제와 특성. 忠南大學校 博士學位 論文(1994).

(1998년 10월 7일 접수)