

## 황기 종자의 천연 항진균성 단백질의 분리정제 및 특성검정

구본성\* · 류진창 · 정태영 · 김교창<sup>1</sup>

농업과학기술원 생물자원부 분자유전과, <sup>1</sup>충북대학교 농과대학 식품공학과

**Purification and Characterization of Natural Antifungal Protein from Astragal Seeds (*Astragalus membranaceus* L.).** Koo, Bon-Sung\*, Jin-Chang Ryu, Tae-Young Chung, and Kyo-Chang Kim<sup>1</sup>. Department of Molecular Genetics, Agricultural Science and Technology, Suwon 441-707, Korea, <sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea - Deterioration of food is in general caused by the presence of microorganisms and chemical compounds of food itself. There exists antimicrobial compound in the food, however, addition of food antiseptics, additives, or physico-chemical processing is a common practice. The safety of artificial chemical antiseptics became a serious public concern, therefore, new natural antiseptic compounds are in need to be developed. We have isolated a new natural antifungal protein (KBS-B2) from Astragal seed through ammonium sulfate precipitation and column chromatography using FPLC Mono-S and Superose 12HR. The purified protein inhibited growth of *Candida albicans*, and spore germination of food spoiling fungi such as *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium expensum*, *P. digitatum* and *Botrytis cineria*. Antifungal effect of the KBS-B2 protein could be directly assayed by bioautography overlaying the fungal spores on the electrophoresed acrylamide gel. The comparison of N-terminal amino acid sequences of the KBS-B2 with known antifungal protein revealed that had 50% homology to thaumatin and zeamatin like proteins.

**Key words:** antifungal, chromatography, bioautography, thaumatin, zeamatin

식품의 질은 식품에 존재하는 미생물의 수와 종류 뿐만 아니라 화학적 조성에 의해서도 영향을 받는다. 식품에는 항 미생물 성분이 식품 자체에 존재하는 것도 있지만 일반적으로 유통 과정 중의 식품 오염을 막기 위해서는 식품 첨가물의 첨가 혹은 물리 화학적 가공 처리에 의하여 식품 오염을 방지하고 있다. 그 중에서도 특히 인공 합성 첨가물 일부의 안정성에 대한 염려가 팽배해짐에 따라 규제가 강화되고 있으며 소비자들의 안전과 건강에 대한 욕구 증대에 따라 기업에서도 인공 합성품의 사용을 제한하려는 추세에 있어 천연물에 존재하는 항균 성분을 이용한 식품저장 분야는 많은 연구가 필요하다고 생각된다[1, 5, 20]. 지금까지 사용되어온 저장법으로는 저온저장, CA (Controlled atmosphere) 저장, film 저장, 방사선 조사, 강압처리, 대체가스 치환, 피막제 처리, 화학약제 처리법 등이 주로 사용되고 있으나 대부분 고가의 시설비 및 경영비가 소요되며 저온저장 시설이 갖추어져 있지 않은 농촌에서는 농작물을 수확기에 일시에 판매해야 하는 어려움에 직면하고 있어 별 도움이 되지 못하고 있는 실정이다. 따라서 농작물의 저장 중 부패 미생물의 감염 및 성장을 억제할 수 있고 인체에 무해하며 강력한 항균력을 갖는 천연 생리활성 물질 이용에 관한 연구에 관심이 증대

되고 있는바, 이는 매우 적은 양으로도 현저한 활성을 나타내는 고부가가치 물질로서 많은 종류가 유용하게 이용되고 있으며 계속 연구 개발되고 있다[6, 8, 21].

지금까지 사용되어온 천연물 중 항균활성을 나타내는 대표적인 물질로는 conalbumin과 casein 등의 효소 및 단백질[3, 4], pH를 산성으로 바꾸거나 기질의 세포막 통과를 방해하여 효과를 나타내는 유기산과[22] 그람 양성균에 효과가 좋은 것으로 알려진 지방산[8, 16, 19] 및 식물의 정유성분[21]과 색소관련 화합물[27] 등이 많이 이용되었으며 그 기작이 완전히 밝혀지지 않는 것임이나 세포막의 성질을 바꾸거나 미토콘드리아의 전자전달을 방해하여 항균효과를 나타내는 것으로 밝혀진 phytoalexin 이라는 물질[32]과 낮은 수분 함량을 가진 식물 종자가 발아하면서 수분을 흡수하는 과정 중에 딱딱한 피막 등의 물리적 장벽이 서서히 파괴되면서 생성되는 효소 억제제인 lectin, 곰팡이 세포벽의 구성 성분인 chitin과 glucan을 분해시키는 chitinase와  $\beta$ -1,3 glucanase 등의 가수분해제들에 관한 연구 또한 많이 이루어지고 있다[7, 9, 24, 28].

따라서 본 연구에서는 예로부터 민가에서 식품에 사용하여 그 안정성이 알려진 생약제 및 식물 종자를 대상으로 항균력을 검색하여 딸기 및 감귤류의 저장시에 많이 발생하는 *Botrytis cinerea*, *Penicillium sp.*와 빵, 건어물 및 쌀의 저장중에 많이 발생하는 *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium expensum*, *P. digitatum*의 생육을 강력히 저

\*Corresponding author  
Tel. 82-331-290-0327, Fax. 82-331-290-0307  
E-mail: bskoo@niast.go.kr

해시키며 특히 nikkomycin[1]이란 항생제와 동시에 사용하면 효모(yeast)에 대한 항균력의 상승효과(synergistic activity)를 나타내는 황기 종자의 저장 단백질 중 항균력을 가진 단백질(KBS-B2)을 분리하고 그 특성을 검정하여 몇가지 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 사용균주

본 실험에 사용한 공시재료는 농촌진흥청 농업과학기술원 생물자원부 유전자원과 및 작물시험장 약용작물과로부터 수집한 황기(*Astragalus membranaceus* L.) 종자를 공시재료로 사용하였으며 항균성 검정에 사용한 효모(yeast) 및 병원균 *Botrytis cinerea*는 농업과학기술원 분자유전과, *Aspergillus ocraceus*, *Penicillium expansum*, *P. digitatum*은 충북대학교 식품공학과에서 분양받아 사용하였다.

### 사용시약 및 배지

본 실험에 사용한 대장균은 LB 배지, 효모는 YM배지, 곰팡이는 PDA 배지에서 배양 하였으며, 항균력 측정을 위한 top agar배지는 0.7% carrot extract 배지 및 PDA top agar배지를 사용하였다.

### 조단백질 추출

천연 항균 단백질을 분리하기 위하여 수집한 식물체의 종자 80 g을 food mixer(삼성 CR 481 W)로 완전히 분쇄한 다음 160 ml의 완충액(5 mM sodium phosphate, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.0)에 현탁시킨후 4℃에서 1시간 동안 조단백질을 침출 후 1000×g, 4℃에서 20분간 원심분리하여 침전물을 제거한 상정액을 취해, 0.45 μm filter(녹십자사)를 이용하여 제균한 뒤 항균역가를 측정하는데 사용하였다.

### 항균력 측정

단백질 분리단계에서의 항균력 측정은 곰팡이성 효모인 *Candida albicans*(ATCC 56884)를 지시균으로 사용한 Roberts 등[33]의 방법을 이용하였으며 병원균에 대한 항균력 측정은 곰팡이들을 포자 형성 배지에서 먼저 포자를 형성시킨 다음 각각의 포자를 50℃ 부근으로 식혀둔 0.7% PDA top agar에 5×10<sup>6</sup> spores/ml되게 현탁하고 82 mm petri-dish에 골고루 부어 응고시켰다. 그 위에 지름 6 mm의 paper disc를 올려 놓은 다음 extraction buffer로 추출한 조단백질을 0.45 μm filter에 통과시킨 후 20 μl씩 일정하게 loading하여 28℃ 항온기에서 하룻밤 배양하여 항균력을 측정하였다.

### 항균 단백질 분리정제

황기종자 80 g을 food mixer로 미세하게 파쇄하여 완충액(5 mM sodium phosphate, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.0)으로 추출한 조단백질을 ammonium sulfate 포화도를 0.2부터 1.0까지 증가시키면서 침전시킨 후 투석막(spectrum사, 10,000 cut)에 넣어 4℃에서 하룻밤 교반하면서 염을 제거한 뒤 ammonium sulfate 포화도 별로 침전된 단백질의 항균역가를 검정하였다. 항균역가가 높게 나타난 0.3에서 0.6사이의 포화도에서 침전되는 조단백질을 다량분리하여 투석한 후 양이온 교환수지인 Mono-S에 흡착시킨뒤 10 mM NaCl로 A280에서 base line이 0.2이하가 될때까지 충분한 양으로 세척한 다음 10-500 mM의 NaCl linear gradient로 Fast Protein Liquid Chromatography(Pharmacia사)를 이용하여 0.5 ml/min씩 분획한 후 각각의 피크에 따른 분획에 대하여 항균력을 검정하고 SDS-전기영동을 실시하여 단백질의 분리정도를 확인 하였다. Mono-S를 통과시킨 후 항균력을 검정하고 농축시킨 항균 단백질을 Superose 12HR column을 이용하여 gel filtration을 하였다. Flow rate는 0.4 ml/min/tube로 80 fraction까지 분획한 후 생성된 peak를 중심으로 각각의 분획에 대한 항균역가 및 SDS-PAGE를 실시하였다.

### 단백질 정량

Varsha Kaushal[31] 등의 BCA방법으로 정량하였으며 표준물질로는 bovine serum albumin(1 mg/ml)을 사용하였다.

### SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

분리된 항균 단백질의 SDS-PAGE는 Laemmli[18]방법에 준하여 실시하였다.

### Bio-autography

Bio-Autography는 Alison J. Viger[1] 등의 방법에 따라 실시하였다.

15% polyacrylamide gel에 분리 정제한 항균 단백질을 10 μl와 100 μl씩 2반복으로 전기영동을 실시한 후 10 μl씩 전기영동한 gel을 coomassie blue에 염색한 후 탈색하였고 100 μl씩 전기영동한 gel은 triton X-100과 4% carrot extract에 10-20분간 세척한 후 150×150 mm 사각 petri-dish 상에 놓고 살균 후 50℃ 부근으로 녹혀진 30 ml의 0.7% carrot extract top agar에 5×10<sup>5</sup> cells/ml의 *C. albicans* 및 0.2 μg/ml의 nikkomycin을 첨가하여 잘 혼합한 후 polyacrylamide gel 위에 고르게 부어 굳히고 28℃에서 하룻밤 배양하였다.

### 항균 단백질의 군사 선단부위 파괴 검정

식품 부패 곰팡이의 포자를 28℃에서 6시간 동안 4%

carrot extract 배지에서 발아시킨 다음 2000×g에서 10분간 원심분리하여 농축시킨 후 0.005% methylene blue와 혼합하여 28℃에서 10분간 배양 후 광학 현미경으로 400× 확대하여 검정하였다.

항균 단백질의 아미노말단 아미노산서열 분석

200-400 pmol의 단백질을 흡착한 PVDF membrane 조각을 Applied Biosystem사의 476A liquid phase sequenator cartridge에 놓고 Edman Degradarion 방법으로 항균 단백질의 아미노 말단 아미노산 서열을 분석하였다[20].

결과 및 고찰

조단백질의 항균력 검정

황기종자에서 추출한 조단백질의 항균력을 측정하기

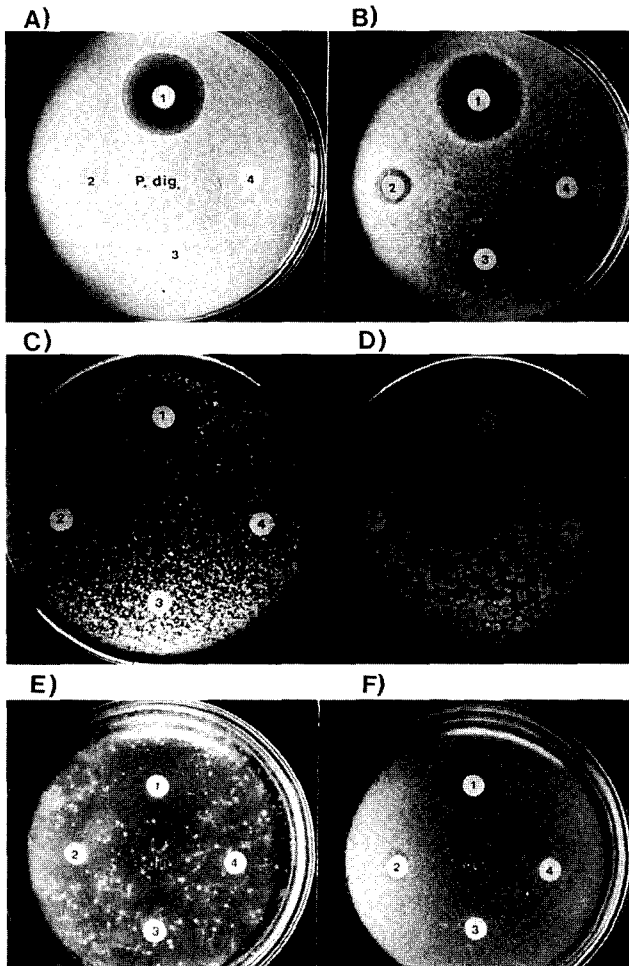


Fig. 1. Growth inhibition of food spoiling mold and yeast by crude protein extract from Astragal seeds. Paper disc containing 10 µl of protein extract (10 µg/µl). 1~4: 10<sup>-1</sup>~10<sup>-4</sup> dilution. A: *P. digitatum*, B: *P. expansum*, C: *A. ocraceous*, D: *A. flavus*, E: *B. cinerea*, F: *C. albicans*.

위하여 딸기나 감귤류 및 빵, 건어물, 쌀 등의 저장시에 잘 발생하는 *B. cinerea*, *P. expansum*, *P. digitatum* 및 *A. ochraceus* 등 식품에 부패 및 변질을 일으키는 원인이 되는 곰팡이 포자의 발아억제력을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. *A. ochraceus*, *P. expansum*, *P. digitatum*, *C. albicans*, *B. cinerea* 등의 포자는 발아가 완전히 억제되었으나 *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma spp.* 등의 포자 발아는 약하게 억제시킴을 관찰할 수 있었다. 그러나 *A. flavus*나 사과 저장시에 자주 발생하는 *Botryosphaeria dothidea* 등에는 전혀 항균력이 없었다.

Ammonium sulfate 포화도에 따른 단백질의 항균력 검정

황기종자에서 추출한 조단백질을 ammonium sulfate 포화도별로 침전시킨 뒤 투석막으로 4℃에서 16-24시간 투석시켜 염을 제거한 후 단백질을 정량하고 항균력을 조사한 결과는 Fig. 2에 나타내었다.

Fig. 2에서 나타낸 바와 같이 ammonium sulfate로 침전시킨 단백질의 양은 포화도가 0.4일 때 122.6 µg/ml로 가장 많았고 그 다음으로는 0.6포화도에서 98.4 µg/ml로 많았으나 곰팡이 포자발아 억제력은 저지원이 15.2 mm인 포화도 0.4 다음으로 0.2 포화도에서 침전된 단백질이 0.6 포화도일 때 침전된 단백질보다 높게 나타남을 알수 있었다.

또한 ammonium sulfate의 포화도를 0.3, 0.6, 0.9로 첨가시켜 침전된 단백질에 대한 항균력을 측정했을 때는 포화도가 0.3-0.6사이에서 침전되는 단백질의 포자발아

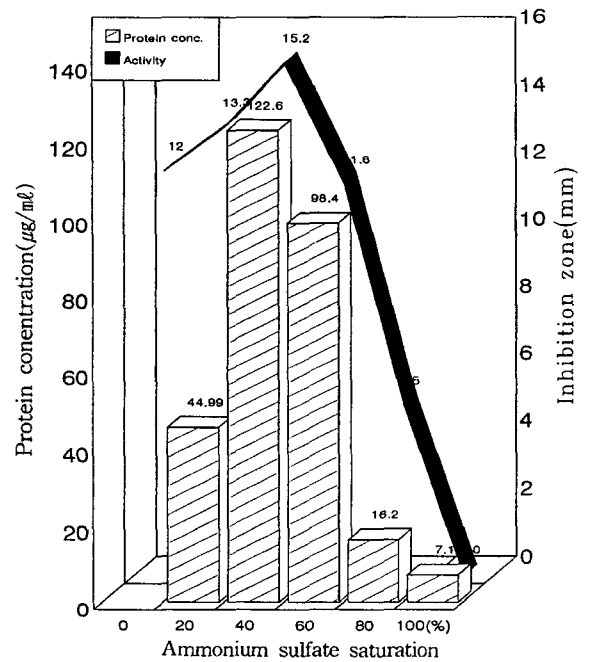
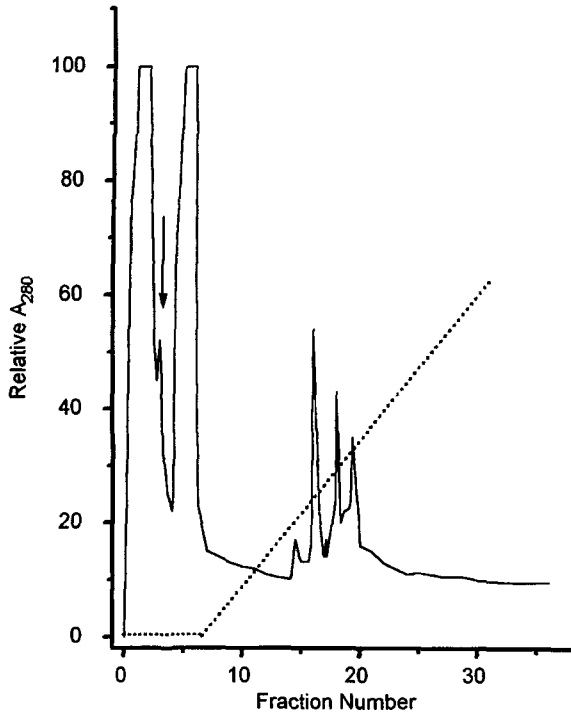


Fig. 2. Antifungal activity of protein precipitated with different ammonium sulfate saturation.



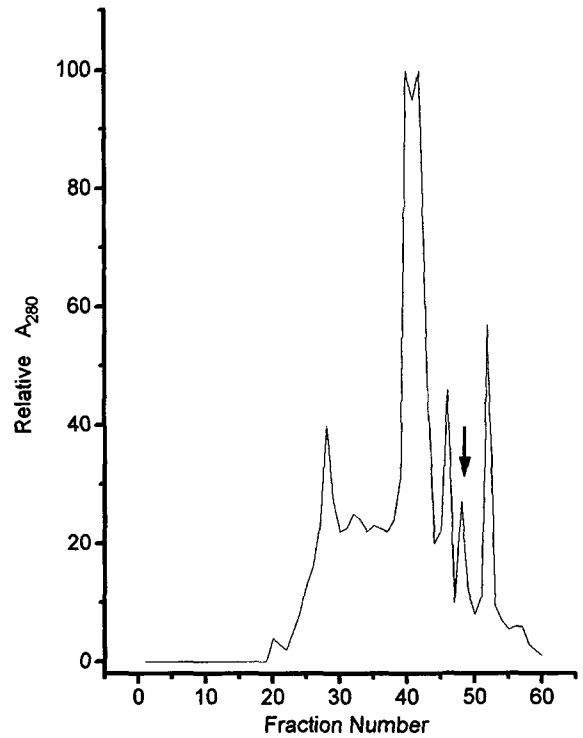
**Fig. 3.** Partial purification of antifungal protein by Mono-S ion exchange chromatography. Elution was done with linear gradient from 10 mM to 500 mM sodium chloride.

억제력이 다른 포화도에서 침전된 단백질보다 현저하게 높게 나타남을 알 수 있었다(data not shown). 따라서 차후 실험은 ammonium sulfate 포화도가 0.3-0.6에서 침전되는 단백질만을 회수하여 실시하였다.

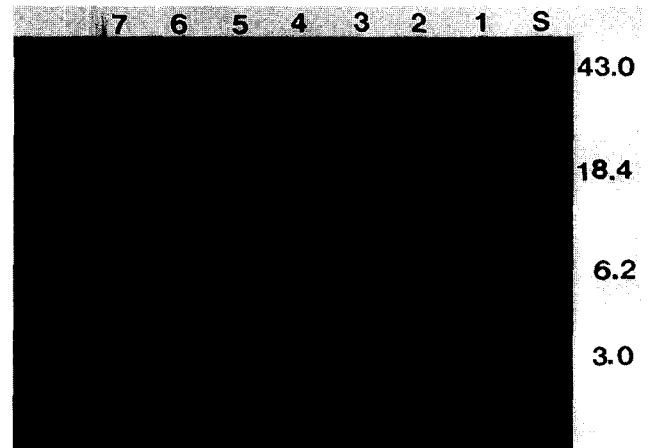
**항균단백질 분리, 정제**

Ammonium sulfate 포화도 0.3-0.6에서 침전시켜 투석한 단백질을 강력한 양이온 교환수지인 Mono-S에서 분리한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 크게 4개 group으로 나뉘어졌으며, 각각의 분획에 대한 항균력을 측정된 결과 첫번째 peak의 후미에서 항균력이 높게 나타났다. Mono-S에 흡착시켜 분획한 단백질들중 항균 활성을 나타내는 분획들만을 모아 Centriprep-10(Amicon사)으로 농축한 다음 Superose 12HR gel filtration column으로 분획한 결과는 Fig. 4와 같이 10여개의 단백질군으로 분리되어 나타났는데 각각의 분획들에 대한 항균력을 측정된 결과 6번째 단백질군 주위에서만 항균력이 나타났으며, 각 단백질군을 SDS 전기영동을 한 결과는 Fig. 5와 같이 항균력을 나타낸 단백질군에 약 19 kDa 정도되는 단백질이 주 단백질로 존재하고 있으며 이 단백질이 항균력을 나타내는 단백질임을 추측할 수 있었다.

항균력이 존재하는 것으로 확인된 6번째 단백질군의 분획들만 모은 후 Superose 12HR column으로 한번 더 filtration한 결과는 Fig. 6과 같이 단일 피크로 순수하게



**Fig. 4.** Partial purification of antifungal protein by Superose 12HR gel filtration chromatography.



**Fig. 5.** Analysis of gel filtration column chromatography samples by SDS-PAGE. Electrophoresis was done in 12% polyacrylamide gel under nonreducing condition and protein bound were detected by staining with Coomassie Brilliant Blue. Lane S: low molecular weight standard, lane 1-7: protein peak numbers from Superose gel filtration chromatography.

분리되었으며, 2차 분리한 단백질을 SDS-PAGE한 결과 19 kDa 크기의 단백질만 존재함을 확인할 수 있었다 (KBS-B2로 명명).

본 실험에서 분리한 KBS-B2 단백질은 J. S. Graham [11] 등이 1991년 대두잎에서 분리한 P21 이라 명명한 PI 값이 4.6인 21 kDa의 Thaumatin like polypeptide와

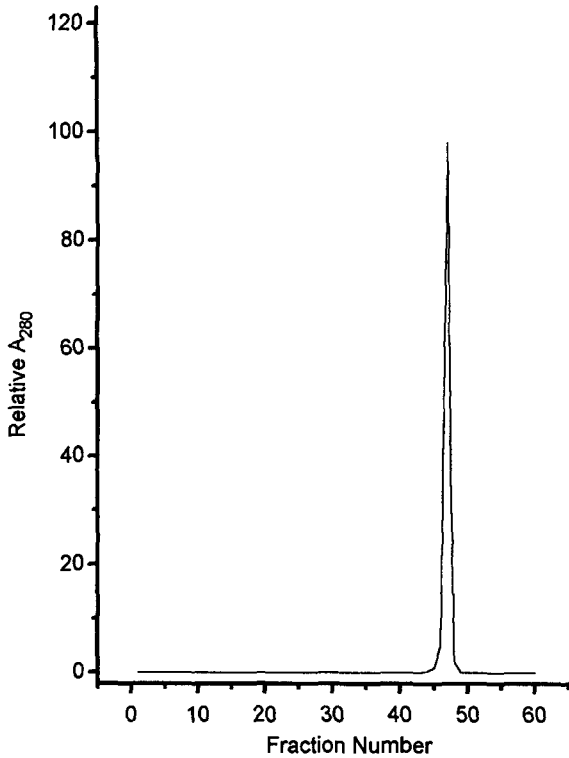


Fig. 6. FPLC profile from Superose 12HR gel filtration chromatography.

W. K. Roberts 등[33]이 옥수수에서 분리한 Zeamatin 및 John Heigard 등[15]이 보리에서 분리한 chitinase 등과는 그 분리되는 양상이나 성질이 유사한 것으로 생각되지만 SDS 전기영동시에는 5 kDa의 trimer인 15 kDa의 Rs-AFP2와 tetramer인 20 kDa의 Rs-AFP1의 두가지 형태로 나타나는 R. Franky 등[10]이 무우씨로부터 분리한 polypeptide와 1991년 Bruno 등이 Mirabilis씨에서 분리한 dimer 형태의 Mj-AMP1 및 Mj-ANP2 항세균 단백질 등과는 그 특성이 다른 것으로 생각된다[7].

**Bio-autography**

분리된 KBS-B2 단백질의 항균력 측정은 재료 및 방법란에서 기술한 bio-autography 방법으로 확인하였는데 Fig. 7과 같이 분리 정제된 KBS-B2 단백질 밴드에서만 항균력을 나타냄을 알 수 있었다.

이와 같은 방법은 1991년 Alison 등이 옥수수에서 Zeamatin 분리시 항균력을 측정하는 방법으로 사용하였으나 이 보다 앞선 1988년 Jean Trudel과 Alian Asselin[14]은 native 및 denaturing PAGE를 행한 후 lysozyme 및 chitinase 역가를 polyacrylamide gel상에서 직접 검정하는데 성공하였다고 보고한 바 있어 새로운 항균 물질 탐색시 유용하게 이용할 수 있다고 사료된다.

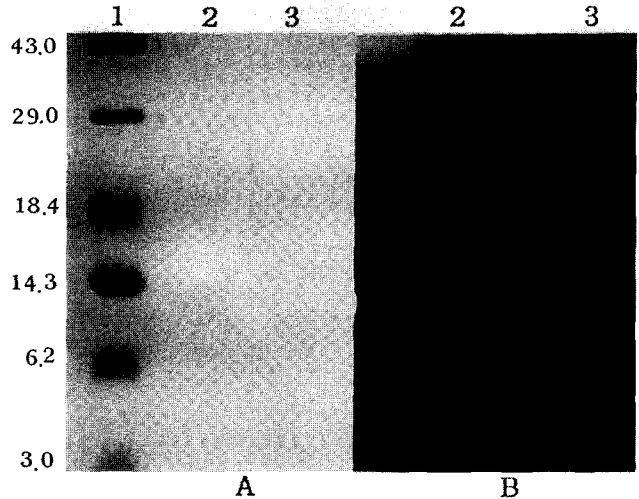


Fig. 7. Bioautography of purified antifungal protein KBS-B2 from Astragal seed extracts. A: SDS-PAGE, B: Bioautography, 1: Low molecular weight standard, 2, 3: Purified antifungal protein. Arrows indicate growth inhibition zones of *Candida albicans*.

**KBS-B2 단백질의 항균 기작**

KBS-B2 항균 단백질의 부패 곰팡이나 효모에 대한 항균기작을 조사하기 위하여 *B. cineria*의 곰팡이 포자를 28℃에서 6시간 동안 배양한 다음 원심 분리하여 농축시키고 0.005%의 methylene blue와 항균 단백질 10 μl를 첨가하여 28℃에서 다시 10분간 배양시킨 후 광학 현미경으로 400배 확대하여 검정한 결과는 Fig. 8에 나타내었다. 그림에서 보는 것처럼 곰팡이가 성장하는 균사의 선단부위부터 먼저 염색되는 것으로 보아 곰팡이가 성장하는 균사의 선단부위를 가장 먼저 파괴시키는 것을 알 수 있었으며(Fig. 8의 B), 포자가 발아하지 못하고 터져버리는 현상도 관찰할 수 있었다(Fig. 8의 C). 또한 효모가 출아로 분열할 때도 항균 단백질이 침투하는 것으로 관찰 되었으나(Fig. 8의 D) *A. flavus*같이(Fig. 8의 A) KBS-B2 단백질에 영향을 받지않는 곰팡이의 균사 선단 부위는 염색되지 않음을 알 수 있었다. 이와 같은 현미경 검정 결과는 세포의 membrane에 침투하여 channel을 형성함으로써 osmolysis를 일으켜 곰팡이들의 성장을 억제하는 것으로 알려진 zeamatin[1] 등의 항균 기작과 일치 하였으며 대장균과 같은 세균에는 거의 효과가 없었다[23, 33]. 한편 zeamatin의 경우는 1 μg/ml 보다 적은 양으로 23℃에서 15초의 짧은시간 동안에도 곰팡이의 균사가 파괴되며 효모인 *C. albicans*의 경우는 10 μg/ml정도 처리하여야 효과가 있다고 보고하였다. 1992년 Franky R. G.등[10]이 무우씨에서 분리한 단백질도 곰팡이에는 효과가 있으나 효모나 세균에는 거의 효과가 없다고 보고한 바 있는데 본 실험에서 분리한 KBS-B2 항균 단백질도 곰팡이나 세균에 대한 항균 기능

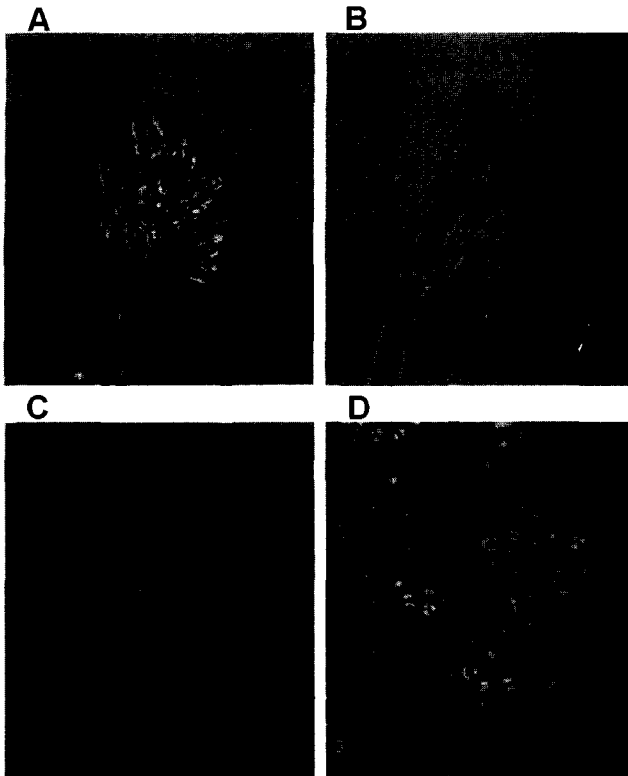


Fig. 8. Effect of antifungal protein on hyphal morphology of food spoiling fungi and yeast. Hyphae from germinated fungal spore were incubated at 28°C for 10 min in the present of 0.005% methylene blue.

A: *A. flavus*, B: *B. cinerea*, C: *P. digitatum*, D: *C. albicans*

Protein	N-Terminal Amino Acid Sequence																		
KBS- B2	A	R	F	D	I	T	N	R	G	S	Y	T	V	G	T	G	A	G	S
Zeamatin	A	V	F	T	V	V	N	Q	C	P	F	T	V	W	A	A	S	V	P
Sormatin	A	V	F	T	V	V	N	R	C	P	Y	T	V	W	A	A	S	V	P
Avematin	T	T	I	T	V	V	N	K	C	S	Y	T	V	W	P	G	A	L	P
Trimatin	A	T	I	T	V	V	N	R	C	S	Y	T	V	W	P	G	A	L	P
Thaumatoin	A	T	F	E	I	V	N	R	C	S	Y	T	V	W	A	A	A	S	K
PRR	A	T	F	D	I	V	N	Q	C	T	Y	T	V	W	A	A	A	S	P
Osmotin	A	T	I	E	V	R	N	N	C	P	Y	T	V	W	A	A	S	T	P
P21	A	R	F	E	I	T	N	R	C	T	Y	T	V	W	A	A	S	V	P

Fig. 9. Comparison of N-terminal amino acid sequence between the purified antifungal protein (KBS-B2) and other proteins.

이 이들과 유사하다고 생각된다.

**KBS-B2 항균 단백질의 아미노산 서열분석**

KBS-B2 단백질을 Applied Biosystem사의 476A/Poot/120A liquid phase sequenator로 아미노 말단의 아미노산을 분석한 결과 22개의 아미노산까지 읽을 수 있었다[29, 30].

이 아미노산 서열을 EMBL protein data base에 등록

된 항균 단백질의 N-terminal 부위와 상동성을 비교한 결과는 Fig. 9에서 보는 바와 같이 처음 아미노산이 대부분 alanine으로 시작되며 그 뒤로 두 부분에 걸쳐 conserve된 부위가 존재하고 있었으며 thaumatin like protein인 Taboc와 50%, CP-ORYSA와 59.1%, thaumatin protein과 69.2%의 상동성을 보였고, zeamatin과 49%, bean leaf P21 protein과도 51%의 상동성을 보였으며 이외에도 콩이나 벼 등에서 분리한  $\beta$ -1,3 glucanase 등 과도 상동성을 보였다. John S. Graham 등[11]은 콩에서 분리한 P21 단백질이 담배에서 분리한 PR-R과 osmotin, 옥수수로부터 분리한 bifunctional inhibitor 및 thaumatin과 64%의 상동성을 보였다고 보고하였으며, Alison 등이 분리한 zeamatin은 trypsin/a-amylase bifunctional inhibitor와 N-말단의 아미노산 배열이 60개까지 동일하였으며 수수나 귀리, 밀 등에서 추출한 유사 단백질과 매우 homology가 높다고 보고한 바 있다[1, 25].

**요 약**

본 연구에서는 천연 항균물질의 개발 이용을 위해 황기 종자로부터 인체에 무해한 천연 항균 단백질을 ion exchange chromatography 및 gel filtration을 이용하여, 순수 분리하고 특성을 조사하였다. 황기종자로부터 추출한 천연 항균 단백질은 *Aspergillus ocraceus*, *Penicillium expensum*, *P. digitatum*, *Botrytis cineria*의 포자 발아 및 효모인 *Candida albicans*의 생육을 현저하게 저해하였으며 ammonium sulfate 포화도가 0.4일 때 단백질의 침전량이 122.6  $\mu$ g/ml로 가장 많았고 항균력도 15.2 mm로 가장 높게 나타났다. 강력한 cation exchange chromatography인 Mono-S를 이용하여 FPLC에서 단백질을 분획하였을 때 첫번째 peak에서 분획된 단백질군이 항균력을 보였으며 Superose 12HR gel filtration column을 이용하여 2차 분획 하였을 때 분자량이 19 kDa되는 단일 단백질을 순수분리 할 수 있었다. 전기영동한 polyacrylamide gel위에 곰팡이 포자를 증충하는 bio autography로 19 kDa 단백질 band의 항균력을 직접 확인하였으며 분리된 항균 단백질의 아미노 말단의 아미노산 22잔기를 sequencing하고 thaumatin 및 zeamatin 유사 단백질들과 상동성을 측정한 결과 50%내외의 homology를 나타내었다. 분리된 항균 단백질은 곰팡이 균사가 성장하는 선단부위에 가장 먼저 침투하여 channel을 형성함으로 osmolysis를 일으켜 곰팡이의 생육을 억제하는 것으로 추측할 수 있었다.

**REFERENCES**

1. Alison J. Vigers, Walden K. Roberts, and Claude P. Sel-

- ityennikoff. 1991. A new family of plant antifungal proteins. *Molecular Plant Microbe Interactions* **4**: 315–323.
2. Benchat, L. R., R. V. Lechowich, S. H. Schanderl, D. Y. C. Co., and R. F. McFeeters. 1966. Inhibition of bacterial growth by chlorophyllide a. *Bull. Mich. Agric. Exp. Sta.* **48**: 411.
  3. Bjorck L. 1978. Antibacterial effect of lactoperoxidase on psychrotrophic bacteria in milk. *J. Dairy Sci.* **45**: 109.
  4. Board, R. G. 1969. The microbiology of the hen's egg. *Advances in Applied Microbiology*, Vol II. Academic Press, New York.
  5. Byung-Wan Lee and Dong-Hwa Shin. 1991. Screening of natural antimicrobial plant extracts on food spoilage microorganisms. *Korean J. Food Sci. Technol.* **23**(2): 200–204.
  6. Byung-Wan Lee and Dong-Hwa Shin. 1991. Antimicrobial effect of some plant extract and their fractionates for food spoilage microorganisms. *Korean J. Food Sci. Technol* **23**(2): 205–211.
  7. Bruno P. A. Cammue, Miguel F. C. De Boller, Franky R. G. Terrast, Paul Prosst, Jo Van Damme, Sarch B. Rees, Jozef Vanderleyden, and Willem F. Broekaert. 1992. Isolation and characterization of novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J. Bio. Chem.* **267**(4): 2228–2233.
  8. Ching, J. U., W. Sheu, and E. Freese. 1972. Effects of fatty acids on growth and envelope proteins of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **111**(2): 516–524.
  9. Felix Mauch, Brigitte Mauch-Mani, and Thomas Boller. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue. *Plant Physiol.* **88**: 936–942.
  10. Franky R. G. Terras, Hilde M. E. Schoofs, Miguel F. C. De Bolle, Fred Van Leuven, Sarch B. Ress, Jozey Vanderleydent, Bruno P.A. Cammute, and Willem F. Broekaert. 1992. Analysis of two-novel classes of plant antifungal proteins from radish(*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.* **267**(22): 15301–15309.
  11. John S. Graham, William Burkhart, Jin Xiong, and Jeffrey W. Gillikin. 1992. Complete amino acid sequence of soybean leaf P21: Similarity to the thaumatin-like polypeptides. *Plant Physiol.* **98**: 163–165.
  12. Jern Hejgaard, Susanne Jacobsen, and Ib Svendsen. 1991. Two antifungal thaumatin-like proteins from barley grain. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* **291**(1): 127–131.
  13. Jonathan P. Durvick, Tracy Rood, A. Gururaj Rao, and Daniel R. Marshak. 1992. Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize(*Zea may* L.) kernels. *J. Biol. Chem.* **267**(26): 18814–18820.
  14. Jean Trudel and Alain Asselin. 1989. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **178**: 362–366.
  15. Jorn Hejgaard, Susanne Jacobsen, and Ib Svendsen. 1991. Two antifungal thaumatin-like proteins from barley grain. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* **291**(1): 127–131.
  16. Kabara, J. J. 1985. Medium chain fatty acids and esters, p. 109. *Antimicrobial in Foods*. Marcel Dekker Inc., New York.
  17. Kato, N. and I. Shibasaki. 1975. Comparison of antimicrobial activities of fatty acids and their esters. *J. Ferment. Technol.* **53**: 793.
  18. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* **227**: 680–685.
  19. Lee, B. Y., I. H. Yoon, Y. B. Kim, P. J. Han, and C. M. Lee. 1985. Studies on storing chest-nut (*Castanea crenata* var. *dulcis Nakai*) sealing with polyethylene film. *Korean J. Food. Sci. Technol.* **17**(5): 331–335.
  20. Lindsay, R. C. 1985. Food additives, p. 115. In O. R. Fenemma (ed.), *Food Chemistry*. Marcel Dekker Inc. New York.
  21. Larry, R. B. and A. G. David. 1988. Antimicrobial and their use in foods, pp. 136–144. *Annual Meeting of Institute of Food Technologist*. New Orleans.
  22. Mark A. Daeschel. 1985. *Antimicrobial Substances from Lactic Acid Bacteria for Use as Food Preservatives*. Oregon State University, Corvallis, OR 97331.
  23. Parker, M. W., F. Pattus, A. D. Tucker, and D. Tsernoglou. 1989. Structure of the membrane-pore-forming fragment of colicin A. *Nature* **337**: 93–96.
  24. Robert Leah, Henrik Tommerup, Ib Svendsen, and John Mundy. 1991. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. *J. Biol. Chem.* **266**(3): 1564–1573.
  25. Rober Lean and John Mundy. 1989. The bifunctional  $\alpha$ -amylase/subtilisin inhibitor of barley: Nucleotide sequence and patterns of seed-specific expression. *Plant Molecular Biology* **12**: 673–682.
  26. Sharma, A., G. W. Tewari, A. J. Shrikhande, Padwal Desai, S. R., and C. Bandyopadhyay. 1979. Inhibition of aflatoxin producing fungi by onion extracts. *J. Food Sci.* **44**: 1545.
  27. Somaatmadia, D., J. J. Powers, and M. K. Hamdy. 1964. Anthocyanins. VI. Chelation studies on anthocyanins and other related compound. *J. Food Sci.* **29**: 644.
  28. Cho, S. H., I. W. Seo, and K. H. Lee. 1993. Prevention from microbial post-harvest injury of fruits and vegetables by using grapefruit seed extract, a natural antimicrobial agent. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **36**(4): 265–270.
  29. Sylvia, W. Y., A. H. Chui, K. J. Wilson, and P. M. Yuan. 1988. Microanalysis of SDS-PAGE electroblotted proteins, pp. 1–17. *Applied Biosystems*.
  30. Tous, G. I., J. L. Fausnaugh, O. Akinyosoye, H. Lackland, P. Winter-Cash, F. I. J. Vitorica, and S. Stein. 1989. Amino acid analysis on polyvinylidene difluoride membranes. *Anal. Biochem.* **179**: 50–55.
  31. Varsha Kaushal and Larry D. Barnes, 1970. Effect of zwitterionic buffer of small masses of protein with bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **157**: 291–294.
  32. Weinstein, L. I. and P. Albersheim. 1983. Host pathogen

interactions XXIII. The mechanism of antibacterial action of glycinol, a plerocarpan phytoalexin synthesized by soybeans. *Plant. Physiol.* **72**: 557.

33. Walden K. Roberts and Claude P. Selitrennikoff. 1990.

Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1771–1778.

(Received June 13, 1998)