J Korean Soc Food Sci Nutr
33(2), 229~235(2004)

콩 단백 효소 가수분해물의 항균활성

주정현 · 이상덕 · 이규희 · 이기택 · 오만진†
충남대학교 식품공학과

Antimicrobial Activity of Soy Protein Hydrolysate with *Asp. saitoi* Protease

Jung-Hyun Joo, Sang-Duk Yi, Gyu-Hee Lee, Ki-Teak Lee and Man-Jin Oh†
Dept. of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract

Soy protein was hydrolyzed by 5 different proteases and determinated antimicrobial activity of each hydrolysate. The soy protein hydrolysate treated by protease from *Aspergillus saitoi* showed the highest antimicrobial activity among the protease studied and was used for further analysis. Soy protein hydrolysate was fractionated by ultrafiltration for M.W. 10,000, 3,000 and 1,000. The M.W. 1,000~3,000 showed the highest antimicrobial activity. The minimum inhibition concentrations of obtained fraction were 0.5~0.8 mg/mL for gram positive and negative microbials, and its activity was even observed after heating at 121°C for 10 min, suggesting that hydrolyzed protein having antimicrobial activity is quite heat-stable. Reverse-phase HPLC was further applied to separate the fraction and 8 peaks were found. Each 8 peaks were separated and pooled and measured antimicrobial activity. Among them, retention time of peak at 16.02 min showed the prominent antimicrobial activity.

Key words: soy protein hydrolysate, protease, antibacterial activity

서 론

식품은 저장 유통 과정 중 미생물의 오염에 의하여 부패, 변질을 일으킬 수 있으므로 식품보존료를 첨가하여 저장성을 높이고 있다. 식품 보존료로는 인공 합성품이 많이 사용되고 있으나 천연물 중에도 상당한 항균성 물질이 존재하여 이의 검색과 식품의 이용에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다(1-3). 여러 종류의 보존료들 가운데 가장 바람직한 것은 인체에 무해하면서 영양이 될 수 있고 각종의 생리활성을 가지고 있는 peptide류의 것으로 생각된다.

천연적으로 존재하는 항균성 peptide에 대한 연구는 많은 연구자들의 관심을 끌어 왔으며(4) 천연적인 항균성 저분자 peptide류는 포유동물(5-8), 양서류(9,10), 절족동물(11-13), 누에(14), 개미(15), 꿀(16) 등에 존재하는 것으로 알려져 왔다. 이와 같은 항균성 peptide류는 그 함유량이 적기 때문에 우유 단백질과 cethepsin에 단백질 분해효소를 작용시켜 저분자 peptide를 생산하여 이용하고자 하는 연구가 현재 진행되어 왔다(17,18).

Dionysius 등(18), Tomita 등(19)은 bovine lactoferrin에 pepsin을 작용시켜 항균성이 높은 lactoferricin을 제조하고 Isidra와 Visser(20)는 bovine casein에 pepsin을 작용시켜 두 개의 항균활성 분획을 제조하였으며 Pellegrini 등(17)은 bovine β-lactoglobulin에 trypsin을 작용시켜 4개의 항균 peptide를 분리하여 항균활성을 보고하였다.

저분자 peptide 항균활성 물질을 얻기 위한 시도는 주로 동물성 단백질에 단백질 분해효소를 작용시켜 제조하여 왔으므로 본인 등(21)은 식물 단백질을 이용하여 항균성 peptide를 제조하기 위하여 기초연구로서 전보에서 밀 단백질을 효소 가수분해하여 얻어진 가수분해물의 항균활성을 측정하여 보고한 바 있고 된장의 항균활성을 확인하여 보고한 바 있다.

본 실험은 콩 단백질을 기질로 단백 분해 효소를 작용시켜 저분자 peptide를 제조하여 실용적이면서도 인체에 무해한 항균제를 개발하고 식품 소재로서 사용하기 위한 기초자료를 얻고자 수행하였다. 콩 단백질에 여러 종류의 단백질 가수분해 효소를 가하여 반응시켜 얻어진 peptide를 분자량별로 분획한 후 MIC(Minimum inhibitory concentration)와 첨가량에 따른 균의 생육도 및 항균활성을 측정하고 분자량별 활성 분획을 HPLC로 분취하여 얻어진 peptide의 항균 활성을 측정하였다.

재료 및 방법

실험재료

분리콩 단백질은 미국, IC Food사 제품을 사용하였으며

†Corresponding author. E-mail: ohmj@cnu.ac.kr
Phone: 82-42-821-6728, Fax: 82-42-821-6728

그 일반성분은 단백질이 91.5%, 지방이 0.5%, 조섬유가 0.2%, 회분이 4.0%이었다.

Trypsin을 비롯한 단백질 가수분해 효소는 Sigma Aldrich 사 제품, Ultrafiltration cell은 Amicon사 제품, membrane은 regenerated cellulose(molecular weight cut-off 10,000 3,000 1,000, Millipore사 제품), 항균활성 측정용 paper disc(8 mm)는 Toyorhoshi사 제품, HPLC 용매로는 Sigma Aldrich사 제품, 기타 모든 시약은 1급 이상 제품을 사용하였다.

항균활성 측정용 균주 및 배지

항균활성 측정에 사용된 Gram(-) 균은 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC10536, *Escherichia coli 0157:h7* ATCC43894이었고 Gram(+)균은 *Bacillus subtilis* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 6633, *Strptococcus faecslis* ATCC 13301을 사용하였으며 항균활성 측정용 배지는 Difco사의 nutrient agar를 기층용 배지, Mueller Hinton medium을 중층용 배지, nutrient broth 배지는 계대 배양용 액체배지로 사용하였다.

분리 콩 단백질 가수분해물의 제조

분리 콩 단백질 가수분해물의 조제는 다음과 같이 실시하였다. 즉, 분리 콩 단백질 시료 10 g에 증류수를 약 10배 가량 가하여 균질화한 다음, 90°C의 물에서 10분간 중탕하여 살균처리하고, 냉각시킨 후 기질 : 효소 비율이 50 : 1(w/w)이 되도록 효소를 첨가하여 각 효소의 최적 반응 온도인 37°C에서 shaking water bath를 이용하여 가수분해시켰다. 3시간, 6시간, 12시간, 24시간마다 채취한 시료를 80°C에서 5분간 열처리하여 효소반응을 정지시킨 다음 12,000×g에서 15분간 원심분리한 후 상징액을 취하여 사용하였다.

항균 활성 측정

항균 활성은 paper disc법(22)으로 측정하였다. 항균활성 검색에 사용한 균주는 10 mL nutrient broth 배지에 접종하고 37°C에서 18~24시간씩 2회 계대 배양하여 사용하였다. 항균성 시험용 평판 배지의 조제는 nutrient broth에 1.5%의 agar를 가하여 살균한 후 petri dish에 15 mL씩 분주하여 기층배지로 하고, 이에 0.75% agar함유 nutrient 배지를 각각 2.5 mL씩 시험관에 분주하여 멸균한 후 45°C의 수욕상에 보존하면서 각종 시험균액 0.1 mL을 무균적으로 첨가하여 잘 혼합한 후 기층용 배지 위에 고르게 퍼지도록 도포한 뒤 응고시켜 2중의 균 접종 평판배지를 만들어 사용하였다.

시료의 항균력 검색은 한천배지 확산법(disc. plate method)으로 측정하였다. 즉, 각각의 시료용액을 0.45 μm membrane filter로 여과하여 제균하고, 멸균된 paper disk에 50 μL씩을 loading하여 흡수시킨 후 건조시킴을 반복하여 시험용 평판배지 위에 밀착시킨 후, 75 μL의 멸균된 증류수를 paper disk 위에 떨어뜨려 확산시킨 다음 4°C 냉장고에서 1시간 방치 후 37°C incubator에서 16~24시간 배양 후 disk주변의 inhibition clear zone의 직경을 mm단위로 측정하여 비교하였다.

최소저해농도 측정

최소저해농도(MIC: Minimum inhibitory concentration) 측정은 고체배지의 한천배지 확산법(agar diffusion method)으로 측정하였는데, 항균활성을 나타낸 반응물을 동결 건조하여 이를 고형분으로 하여 그 함량이 각각 0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 5 mg/mL이 되도록 조절한 고체배지를 petri dish에 부어 고르게 펴서 응고시킨 후 배양된 균 현탁액을 0.1 mL씩 접종한 다음 37°C에서 24시간 배양하여 육안적으로 증식이 되지 않는 농도로 결정하였다.

항균성 물질의 미생물 생육 저해도 측정

항균활성을 나타내는 반응물을 동결건조하고, 고형분 함량을 각각 0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 5 mg/mL의 농도구간으로 조절한 액체배지를 준비하여 균 현탁액을 각각 0.1 mL씩 접종하고 37°C에서 배양하여 6시간 간격으로 36시간까지 배양한 후, 620 nm에서 흡광도를 측정하여 균 증식이 나타나지 않는 농도로 결정하였다.

항균성 물질의 분리 및 정제

항균활성을 나타내는 효소 반응액을 다음과 같은 순서에 따라 정제하였다.

항균성 peptide의 분자량별 분획

한외여과장치(Amicon Co.)를 사용하였으며, 여과한계량(molecular weight cut-off, MWCO)이 각각 10,000, 3,000, 1,000인 membrane filter를 장착하고 질소가스로 60 psi의 압력을 가하여 한외여과 하고, 분리된 각 분획의 항균활성을 측정하였다.

High performance liquid chromatography에 의한 항균성 peptide의 분리

Gel Permeation Chromatography(GPC)에 의해 분리된 분획 중 항균활성을 갖는 분획을 선택하여 농축한 후, HPLC를 이용하여 분리하였으며, HPLC 조건은 Table 1, 2와 같다.

Table 1. Operation conditions of HPLC for the purification of antimicrobial activity of the hydrolysate in the soybean protein treated with protease

Instrument	Hewlett Packard 1100 Series
Detector	Diode Array Detector 220 nm, 280 nm
Column	Vydac C_{18} (10×300 mm)
Mobile phase	Solvent A) 10 mM phosphate buffer (pH 7.0) Solvent B) ACN
Flow rate	2.0 mL/min
Injection volume	100 μL

Table 2. Linear gradient condition of HPLC for analysis of antimicrobial peptide of the hydrolysates in the soybean protein treated with protease

Time (min)	Solv. A (%)	Solv. B (%)
0.0	95.0	5.0
10.0	95.0	5.0
50.0	50.0	50.0

유출 시간별 peak의 유출물을 수집하여 항균활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

효소 종류에 따른 콩 가수분해물의 항균활성

분리 콩 단백질에 Trypsin을 비롯한 5종의 protease를 가하여 pH 7에서 6시간 작용시킨 가수분해물의 항균활성은 다음과 같았다.

Table 3과 Fig. 1에서 보는 것과 같이 분리 콩 단백질 효소 가수분해물의 항균력은 *Asp. saitoi* protease로 가수분해시킨 것이 가장 높았으며 효소의 종류에 따른 항균활성에 차이가 보였다. 미생물 기원의 단백질 가수분해 효소가 분리 콩 단백질에 작용하여 항균성 물질을 생산하는 것으로 보아, 콩 단백질 가수분해물은 곰팡이를 이용하는 고 단백질 함유 식품의 보존에 유용한 보존제로서의 가능성이 있을 것으로 생각되었다.

Tomita 등(19)은 인간 및 소의 lactoferrin에 pepsin을 작용시켜 얻어진 peptide 물질을 lactoferricin이라 명명하고 Gram 양성, Gram 음성 균주에 대하여 강한 항균활성을 나타내었다고 보고한 바 있다.

Pellegrini 등(17)은 bovine beta-lactoglobulin에 trypsin을 작용시켜 4개의 항균성 peptide를 얻어 아미노산의 결합순서를 밝혔고 bovine alpha-lactoalbumin에 trypsin, pepsin, chymotrypsin을 작용시켜 3개의 항균성 peptide를 얻어 아미노산 결합순서를 검토하였다. 그 결과 하나는 penta-peptide였고, 다른 하나는 disulfide 구조를 갖는 peptide로서 그람양성균 세균에 대해서는 강한 항균 작용을 나타내지만 그람음성균 세균에 대해서는 거의 활성을 나타내지 않았다고 보고한 바 있다.

본 실험의 결과는 값이 저렴한 식물성 단백질과 미생물 기원의 protease를 이용하여 항균성 peptide를 생산하는데 기초 연구자료로서 활용될 것이며, 분리 콩 단백질 가수분해물의 항균성에 대한 지금까지 타 연구자들의 연구 시도가 이루어진 바가 없어 연구 결과의 비교가 어려웠다.

Table 3. Antimicrobial effect of hydrolysates of soybean protein slurry treated with various protease adjusted with pH 6.7 (diameter of inhibitor zone: mm)

Enzyme source	Plate incubation at 37°C					
	EC[1]	EH	SA	SF	BS	ST
Trypsin (porcine pancreas)	-[2]	++	++	+	+	+
Aspergillus saitoi protease	+++	+++	+++	+++	+++	++
Aspergillus sojae protease	+	-	+	+	+	-
Aspergillus oryzae protease	+	+	+	±	+	+
Rhizopus species protease	+	+	±	+	±	±

[1]EC=*Escherichia coli* ATCC 10536, EH=*Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894, SA=*Staphylococcus aureus* ATCC 6633, SF=*Streptococcus faecalis* ATCC 13301, BS=*Bacillus subtilis* ATCC 11778, ST=*Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

[2]-: negative activity, ±: very weak activity (9~10 mm), +: weak activity (10~12 mm), ++: strong activity (12~14 mm), +++: very strong activity (>15 mm).

Fig. 1. Antimicrobial activity of the hydrolysate of soybean protein.
*A: Trypsin (porcine pancreas), B: *Aspergillus sojae* protease, C: *Rhizopus species* protease, D: *Aspergillus saitoi* protease, E: *Aspergillus oryzae* protease.

항균성 peptide의 생산 조건

pH : 5가지 다른 종류의 protease를 사용하여 분리 콩 단백질을 가수분해 한 결과 *Asp. saitoi* protease를 사용한 분리 콩 단백질 가수분해물의 항균력이 가장 큰 결과를 얻었다. 그래서, 가장 활성이 크다고 판단된 *Asp. saitoi* protease만을 사용하여 작용 pH를 달리하여 콩 단백질을 가수분해하였다. 10 mM glycine-HCl buffer를 사용하여, pH를 3~7까지 조정한 다음 37°C에서 6시간 진탕 반응 시켜 얻어진 가수분해물의 항균활성을 *Staphylococcus aureus* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 10536에 대하여 측정한 결과는 다음 Table 4와 같았다.

이상에서 보는 바와 같이 *Asp. saitoi* protease는 중성부근에서 항균성 peptide를 잘 생성하였으며 항균활성은 *Staphylococcus aureus* ATCC 6633에 대하여 그 clear zone의 size가 19 mm, *Escherichia coli* ATCC 10536에 대하여 21 mm를 나타내었다.

Asp. saitoi protease의 제조사 제품 설명서를 따르면, *Asp. saitoi* protease는 37°C의 최적온도와 약 3의 최적 pH를 나타

Table 4. Effect of pH on the production of antimicrobial substance of soybean protein treated with protease (diameter of inhibiting zone: mm)

Strain	pH				
	3	4	5	6	7
Staphylococcus aureus ATCC 6633	11	14	16	19	17
Escherichia coli ATCC 10536	10	11	19	21	18

내는 것으로 알려져 있다. 그러나 실험 결과, 최적 pH를 벗어난 범위인 pH 6에서 최고의 항균활성을 나타내었으며 pH 3보다 pH가 높은 쪽의 항균력이 높았다.

작용온도 : 콩 단백질 가수분해물 현탁액에 *Asp. saitoi* protease를 가하여 pH 6.7로 조정한 다음 작용 온도에 따른 생성 가수분해물의 항균활성을 측정한 결과는 Table 5와 같았다.

Table 5에서와 같이 항균성 peptide 생산의 최적 온도는 37°C였으며 50°C이상의 온도에서는 생성량이 급격히 감소하여 60°C에서의 항균활성은 보이지 않았다. 이는 효소 제조사의 제품 설명서에 기재된 효소의 최적 온도와 일치하였다. 이로써 *Asp. saitoi* protease는 온도에 비교적 민감하게 작용한다는 사실을 알 수 있었다.

Manachini 등(23)의 *Bac. licheniformis* protease가 50~60°C에서 잘 작용한다는 보고와 비교해 볼 때, 효소의 종류에 따른 작용 최적 온도가 각기 다름을 알 수 있었다.

반응시간 : 콩 단백 현탁액을 90°C에서 10분간 열처리하여 살균하고, 냉각시킨 후 *Asp. saitoi* protease를 가하고 pH 6.7, 37°C에서 진탕 반응시키면서 반응 시간에 따른 항균활성을 측정한 결과는 Table 6과 같았다. 두 균주 모두 시간이 경과할수록 항균활성이 증가하였으며 12~24시간 반응시켰을 때가 제일 높은 항균활성을 보였다.

Table 5. Effect of temperature on the production of antimicrobial substance of soybean protein treated with protease (diameter of inhibiting zone : mm)

Strain	Temperature (°C)			
	37	45	50	55
Staphylococcus aureus ATCC 6633	18	13	-	-
Escherichia coli ATCC 10536	19	14	-	-

Table 6. Degree of hydrolysis and antimicrobial activity of soybean protein treated with *Asp. saitoi* protease at 37°C and pH 6.7 (diameter of inhibiting zone : mm)

Strain	Incubation time (hr)				
	3	6	9	12	24
Staphylococcus aureus ATCC 6633	12	16	19	21	22
Escherichia coli ATCC 10536	14	17	20	21	21

항균성 peptide의 열에 대한 안정성

항균활성을 가지는 콩 단백질 가수분해물을 용액 상태로 한 다음 항균 peptide의 열에 대한 안전성을 실험하기 위하여 80°C에서 10분간, 100°C에서 10분간, 121°C에서 15분간 각각 열처리한 후, 그람 양성균인 항균활성을 측정하여 비교한 결과는 Table 7과 같았다.

콩 단백질을 가수분해하였을 때 생산되는 항균성 peptide의 열에 대한 안정성을 실험해 본 결과, 열에 대해 대단히 안정함을 알 수 있었다. 즉, 100°C에서 10 min의 열처리와 121°C에서 15 min 열처리에 의해서도 두 균주의 생육 저해환의 크기가 대조구와 비슷한 것으로 보아 콩 단백질의 *Asp. saitoi* protease 가수분해물은 열에 매우 안정하였다.

최소저해농도 측정

콩 단백질 가수분해물의 공시균주 6종에 대한 MIC 결과는 Table 8과 같았다.

콩 단백질 가수분해물의 최소저해농도는 0.5~0.8 mg/mL로 나타났다. Isidra와 Visser(20)는 우유 casein에 pepsin을 작용시켜 두 개의 항균성 peptide를 분리, 정제하고 그 MIC는 8~99 μM이었으며, 높은 항균활성과 용혈작용이 있고, 이는 peptide의 구조와 소수성에 관계가 있다고 보고한 바 있다.

또한, Tomita 등(19)은 lactoferrin의 효소적 가수분해물에서 항균성 peptide를 밝혀내고 대장균에 대한 B-Lf의 MIC를 2 mg/mL로 보고하였다. 이와 비교하여, 콩 단백질의 *Aspergillus saitoi* protease 가수분해물은 B-Lf보다 항균활성이 높다고 할 수 있다.

콩 효소 가수분해물의 미생물 생육 저해

콩 단백 효소 가수분해물의 실용성을 검토하기 위하여 가

Table 7. Heat stability of the antimicrobial peptide of soybean protein hydrolysate (diameter of inhibiting zone : mm)

Strain	Heating treatment			
	Control	80°C 10 min	100°C 10 min	121°C 15 min
Staphylococcus aureus ATCC 6633	19	20	19	20
Escherichia coli ATCC 10536	20	21	21	22

Table 8. Effect of concentration on the antimicrobial activities of the hydrolysate of soybean protein

Strain	Concentration (mg/mL)					
	0.5	0.8	2.5	4	6.5	8
Bacillus subtilis ATCC 11778	-[1)]	-	+	+	++	+++
Staphylococcus aureus ATCC 6633	-	-	+	++	+++	+++
Streptococcus faecalis ATCC 13301	-	±	+++	+++	+++	+++
Salmonella typhimurium ATCC 14028	±	+	++	+++	+++	+++
Escherichia coli ATCC 10536	-	±	++	+++	+++	+++
Escherichia coli O157:H7 ATCC 43894	-	-	+	+++	+++	+++

[1)] -: negative activity, ±: very weak activity (9~10 mm), +: weak activity (10~12 mm), ++: strong activity (12~14 mm), +++: very strong activity (>15 mm).

수분해물을 동결건조하여 액체배지에 일정농도로 첨가하여 공시균주를 접종하고 시간에 따른 생육정도를 측정한 결과는 Fig. 2, 3과 같았다.

액체배지에서 측정한 최소저해농도와 비슷한 수준인 <0.8 mg/mL 의 농도에서 균의 증식을 억제하는 결과를 보였으며, 그람 양성, 음성 모든 균주에 대해서 생장을 저해하는 것으로 보였다.

항균성 peptide의 분리 및 정제

콩 단백질에 *Asp. saitoi* protease로 작용시킨 가수분해물의 항균성 물질을 분리, 정제하기 위하여 ultrafiltration 분획, HPLC를 행한 결과는 다음과 같았다.

Ultrafiltration fractionation : 콩 단백질의 효소 가수분해물의 원심 분리액을 여과한계량 10,000, 3,000, 1,000의 membrane으로 cut off하여 얻어진 각 분획의 항균 활성을 측정한 결과는 Fig. 4와 같았다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 분자량 3,000 이하 분획물의 항균활성이 가장 높았다. Clear zone의 size는 가수분해물 원액이 18 mm, 분자량 10,000 이하의 fraction이 12 mm, 분

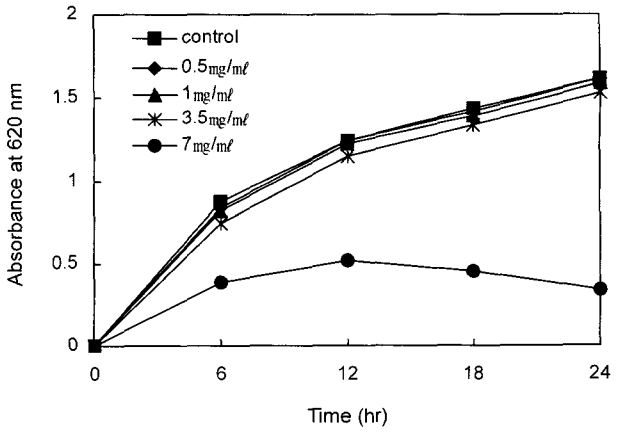


Fig. 2. Growth inhibition of soybean protein hydrolysate on *Bacillus subtilis* ATCC 6633 in nutrient broth media.

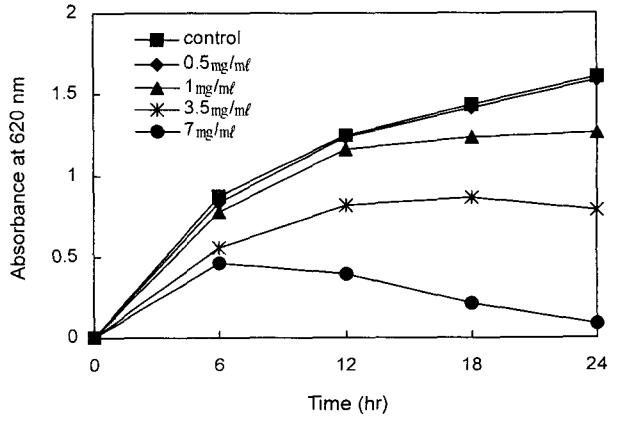


Fig. 3. Growth inhibition of soybean protein hydrolysate on *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894 in nutrient broth media.

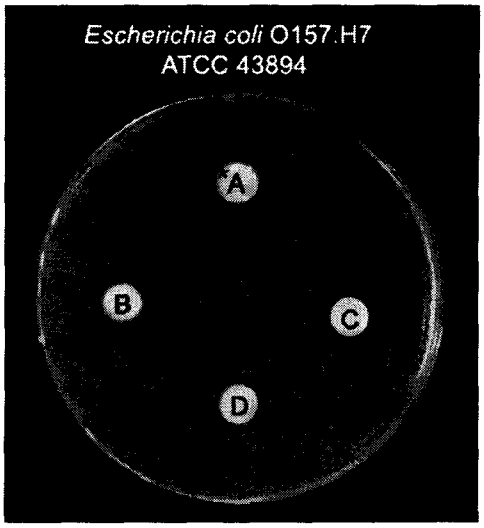


Fig. 4. Antimicrobial activities of fractionated soybean protein hydrolysates by ultrafiltration against *Eschericia coli* O157:H7 ATCC 43894.

*A: Supernatant of soybean protein hydrolysate, B: Filtrate of soybean protein hydrolysate by 10,000 molecular weight membrane, C: Filtrate of soybean protein hydrolysate by 3,000 molecular weight membrane, D: Filtrate of soybean protein hydrolysate by 1,000 molecular weight membrane.

자량 3,000 이하의 fraction이 15 mm, 1,000 이하의 fraction이 12 mm였다.

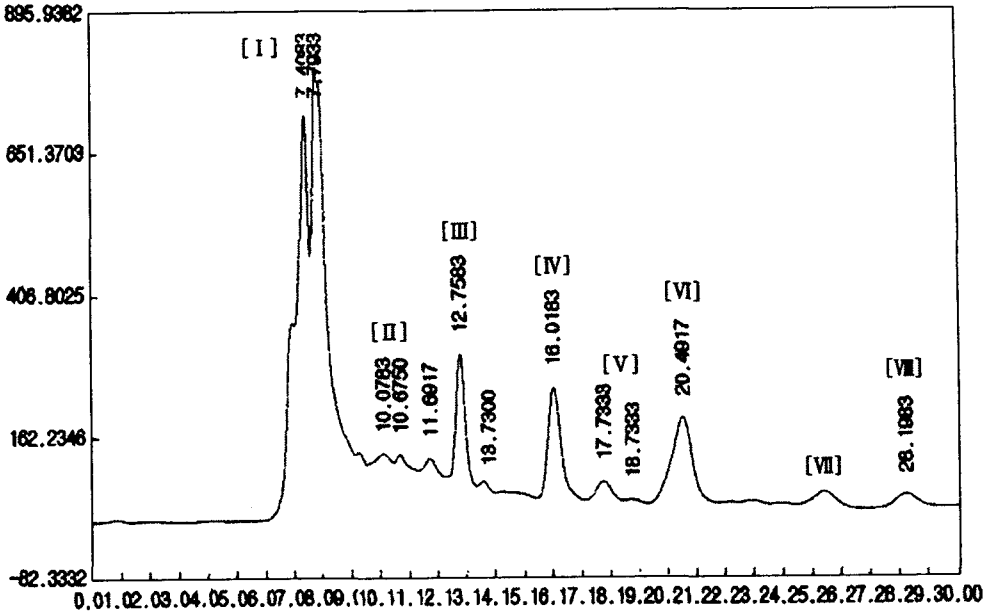
분자량 1,000 이하의 fraction은 3,000 이하의 fraction보다 항균활성이 작았으므로 콩 단백질 가수분해물의 항균활성 peptide는 그 분자량이 분자량 1,000 이상 3,000 이하임을 알 수 있었다. 또한, 각 분획물의 수율은 효소반응 원액이 반응기질에 대하여 56.8%, 분자량 10,000 이하의 분획물이 32.6%, 분자량 3,000 이하 분획물이 26.3%, 분자량 1,000 이하 분획물이 20.5%로서 비교적 높은 수준이었다.

High performance liquid chromatography : 분자량별 활성분획의 HPLC chromatogram은 Fig. 5(a,b)과 같았으며 각 peak의 유출물을 여러 차례 반복하여 분취하고 이의 항균활성을 측정하였다.

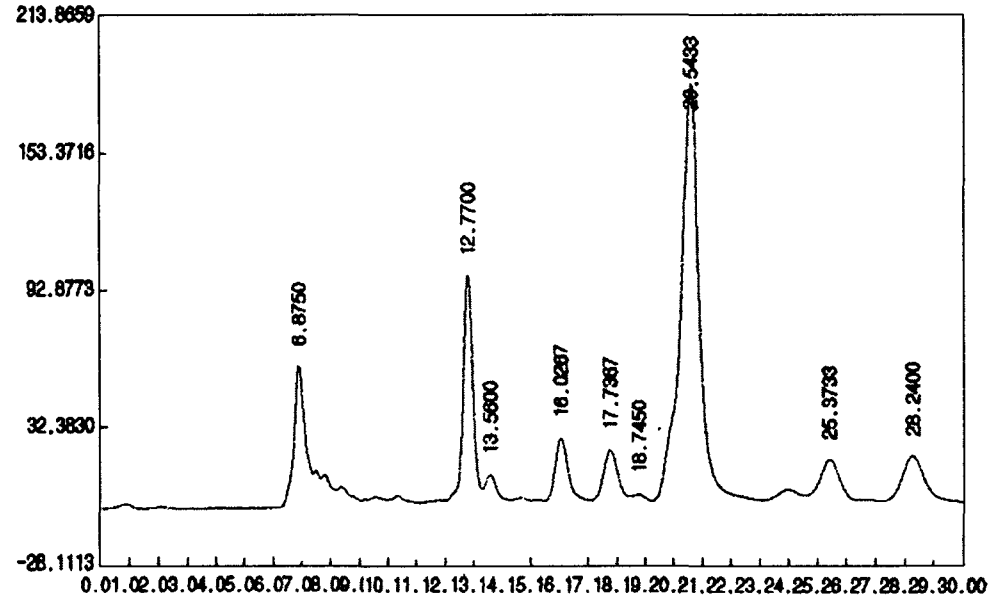
콩 단백의 효소적 가수분해물의 HPLC 유출물을 retention time 1~3분 간격으로 8개의 fraction으로 분획한 다음(Fig. 5) 항균 활성을 측정한 결과(Fig. 6) retention time 16.02 min (peak [IV])에서 활성이 나타났다.

요 약

콩 단백질을 효소로 가수분해하였을 때 생성되는 항균활성 peptide를 조사하고 천연 항균제로서의 이용 가능성을 조사하기 위하여 본 실험을 실시하였다. 분리 콩 단백질에 5종의 단백질 가수분해 효소를 작용시켜 생성된 가수분해물의 항균력을 측정하고, membrane filter를 이용해서 한외여과 하여, 분자량별로 분리된 각 fraction의 항균활성을 측정하였



a) The elution was monitored at 220 nm. Each fractions obtained were tested for antimicrobial activity against *Sta. aureus* by an agar diffusion method.



b) The elution was monitored at 280 nm. Each fractions obtained were tested for antimicrobial activity against *Sta. aureus* by an agar diffusion method.

Fig. 5. High performance liquid chromatogram of the peptide fragments derived from soybean protein hydrolysate by membrane filter (molecular weight cut-off 3,000).

으며, 항균활성이 가장 높은 분획을 high performance liquid chromatography로 분취한 항균성 peptide의 항균활성을 측정하였다. 분리 콩 단백질에 5종의 단백질 분해 효소를 작용시켜 제조한 가수분해물 중 *Aspergillus saitoi* protease로 작용시킨 것이 항균활성이 가장 높았다. *Aspergillus saitoi* protease로 작용시킨 콩 단백질의 가수분해물을 여과 한계량 10,000, 3,000, 1,000 membrane filter로 cut-off하여 한외여과한 각 fraction의 항균활성을 측정한 결과 분자량 1,000~3,000인 fraction의 항균활성이 가장 높게 나타났다. *Aspergillus saitoi* protease로 작용시킨 콩 단백질의 분자량 1,000~3,000 범위 가수분해물의 MIC는 0.5~0.8 mg/mL였으며 그람 양성균과 음성균 모두의 증식을 억제하는 경향을 보였다. *Aspergillus saitoi* protease로 작용시킨 콩 단백질의 가수분해물을 121°C, 10분간 열처리하였을 때도 그 항균활성을 유지하는 것으로 보았을 때 이는 열에 대단히 안정함을 알 수 있었다. 한외여과하여 얻어진 콩 단백질의 분자량

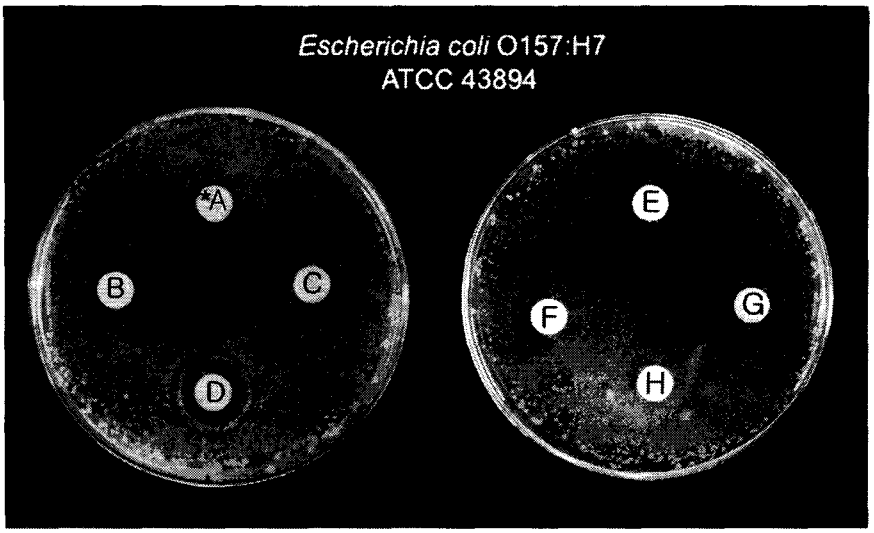


Fig. 6. Antimicrobial activities of the peak fractions by HPLC against *Eschericia coli* O157:H7 ATCC 43894.
*A: Peak [Ⅰ], B: Peak [Ⅱ], C: Peak [Ⅲ], D: Peak [Ⅳ], E: Peak [Ⅴ], F: Peak [Ⅵ], G: Peak [Ⅶ], H: Peak [Ⅷ].

1,000~3,000 범위 가수분해물을 동결건조하여 HPLC의 결과 얻어진 peak 별로 분획 수집을 반복하여 항균 활성을 측정한 결과 retention time 16.02[Ⅳ]의 peak에서 최고 항균활성을 확인하였다.

문 헌

1. Bass GK. 1977. Method of testing disinfectans. In *Disinfection, Sterilization*. 2nd ed. Block SS, ed. Lea and Febiger, Philadelphia. p 49.
2. Beuchat LR, Golden DA. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol* 43: 134-139.
3. Davidson PM, Post LS. 1983. Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. In *Antimicrobials in Foods* Branen AL, Davidson PM, eds. Marcel Dekker, Inc. New York. p 371.
4. Boman HG. 1995. Antimicrobial activity of peptide. *Annu Rev Immunol* 13: 61-92
5. Lehrer RI, Lichtenstein AK, Geanz T. 1993. Defensin, antimicrobial and cytoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol* 11: 105-128
6. Gennaro R, Skerlavai B, Romeo D. 1989. Purification, composition and activity of two bactenecins, antimicrobial peptides of bovine neutrophils. Insect. *Immunol* 57: 3142-3146.
7. Elsbach P, Weiss J. 1993. Bactericidal/permeability increasing protein and host defense against Gram-negative bacteria and endotoxin. *Curr Opin Immunol* 5: 103-107
8. Lee JY, Boman A, Chuanxin S, Andersonn M, Jornvall H, Mutt V, Boman HG. 1989. Antimicrobial peptides from pig intestine- isolation of a mammalian cecropin. *Proc Natl Acad Sci* USA 86: 9159-9162.
9. Bevins CL, Zasloff M. 1990. Peptide from frog skin. *Annu Rev Biochem* 59: 395-414.
10. Simmaco M, Mignogna G, Barra D, Bossa F. 1994. Antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana esculenta*. *J Biol Chem* 269: 11956-11961.
11. Boma G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* 13: 61-92.
12. Hoffmann JA, Hetru C. 1992. Insect defensins inducible antimicrobial peptides. *Immunol Today* 13: 411-415.
13. Casteels P, Ampre C, Jacobs F, Tempst P. 1993. Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antimicrobial polypeptide that is infection inducible honeybee. *J Biol Chem* 268: 7044-7054.
14. Hara S, Yamakawa M. 1995. Moricin, a novel type of antimicrobial peptide isolated from silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem* 270: 29923-29927.
15. Orivel J, Rederker V, Caer JL, Krier F. 2001. Ponericins, new antimicrobial and insecticidal peptide from the venom of the ant pachycondvla goeldii. *J Biol Chem* 276: 17823-17829.
16. Bilikova K, Wu GS, Simuth J. 2001. Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor. *Apidologie* 32: 275-283.
17. Pellegrini A, Thomas U, Bramaz N, Hunziker P, Fellenberg RV. 1999. Isolation and identification of three bacterial domains in the bovine α-lactoalbumin molecule. *Biochemica et Biophysica Acta* 1426: 439-448.
18. Dionysius DA, Milne JM. 1997. antimicrobial peptides of bovine Lactoferrin. Purification and characterization. *J Dairy Sci* 80: 667-674.
19. Tomita M, Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabashi H, Kawase K. 1991. Potent antimicrobial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J Dairy Sci* 74: 4137-4141.
20. Isidra R, Visser S. 1999. Identification of two distinct antimicrobial domains within the sequence of bovine αs2-casein. *Biochemica et Biophysica Acta* 1428: 314-326.
21. Yi SD, Ju JH, Lee GH, Lee KT, Oh MJ. 2003. Antimicrobial activity of gluten hydrolysate with *Asp. saitoi* protease. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 745-751.
22. MacLowry JD, Jaqua MJ. 1970. Detailed methodology and implementation semiautomated serial dilution microtechnique for antimicrobial susceptibility testing. *Appl Mecrobiol* 20: 46-53.
23. Manachini PL, Fortina MG, Parini C. 1988. Enzymatic modification of vegetable protein by a crude preparation from a strain of *Bacillus licheniformis*. *J Sci Food Agrc* 45: 263-266.

(2003년 9월 17일 접수; 2004년 1월 14일 채택)