



## 한우와 젖소 초유로부터 분리한 Lactoferrin의 생화학적 특성

양희진 · 손동화<sup>1</sup> · 하월규<sup>2</sup> · 이수원\*

성균관대학교 식품생명공학과, <sup>1</sup>한국식품연구원, <sup>2</sup>파스퇴르유업(주)

### Biochemical Properties of Lactoferrins from Korean Native Cow and Bovine Colostrum

Hee-Jin Yang, Dong-Hwa Son<sup>1</sup>, Woel-Kyu Ha<sup>2</sup>, and Soo-Won Lee

Department of Food Biotechnology, Sungkyunkwan University

<sup>1</sup>Korea Food Research Institute

<sup>2</sup>Food Research & Development Lab., Pasteur Milk Co., Ltd.

#### Abstract

The purpose of this study was to demonstrate biochemical properties of lactoferrin (Lf) obtained from the colostrum of Korea native cow. The molecular weight of the purified Korean native cow's Lf (K-Lf) was 81kDa, the isoelectric point was 9, and the content of iron was 0.56 mg/g, which is indicated that iron saturation of the lactoferrin was 40.6%. Amino acid composition and  $\alpha$ -helix content were different K-Lf from bovine Lf (B-Lf). Immunological cross reactivity was observed between K-Lf and B-Lf but not between K-Lf and human Lf (H-Lf) by immunodiffusion test and Western blot analysis. Our results indicate that structure of K-Lf is different from that of B-Lf although K-Lf and B-Lf were immunologically cross-reactive.

Key words : lactoferrin, colostrum, Korean native cow, biochemical property

#### 서 론

Lactoferrin(Lf)은 lactotransferrin이라고도 불리워지며, transferrin family 단백질 중의 한 종류로(Aisen and Listowsky, 1980; Brock, 1985 ; Rose et al., 1986) 젖 및 침, 눈물 등에 들어 있으며, 유선, mucous에서 분비되고 면역세포 중에서 neutrophil의 secondary granules에서도 분비되어 비면역학적 생체방어 기구의 기능을 가지고 있다. 특히, 초유 중에 많이 함유되어 있는데 bovine 초유에서는 5 mg/mL 이상이지만 비유가 진행됨에 따라 정상유에서는 0.02~0.035 mg/mL로 Lf의 함량이 급격히 감소된다.

Human-Lf(H-Lf)은 glycoprotein으로 2개의 glycan chain이 결합된 691개의 아미노산으로 구성되어 있고(Metz-Boutigue et al., 1984), Pierce 등(1991)에 의하여 bovine Lf(B-Lf)의 pep-

tide를 구성하는 689개의 아미노산 서열이 규명되었다. 이러한 아미노산 서열에 따라 B-Lf의 분자량을 계산하면 약 76 KDa이며, 당 사슬까지 포함하여 약 83 KDa이다. 이 당단백질은 2개의 lobe로 구성되어 있으며, 각각의 lobe에 1분자씩 2개의 Fe<sup>3+</sup> 결합 부위를 가지고 있다.

생리적인 기능으로서는 미생물 감염에 대한 방어작용, 유아 장내에서의 철분 흡수 촉진작용, myelopoiesis의 조절작용, 염증반응의 조절작용, lymphocytes의 성장촉진작용과 macrophage 및 granulocyte, neutrophil, leucocyte의 조절작용 등 다양한 생리활성작용에 관여하고 있다(Arnold et al., 1977; Broxmeyer et al., 1980; Bullen and Armstrong, 1979; Mansson et al., 1990; Nemet and Simonovits, 1985).

현재 Lf은 이러한 생물학적 특성들을 바탕으로 하여 조제 분유의 모유화를 위해 첨가되고 있으며 기타 철분 보강, 방부 효과를 지닌 식품첨가제, 동물 사료 첨가제, 염증예방, 세포의 성장 촉진제 등으로 국내에서도 점차 실용화 하고 있는 단계이다. 그러나 국내에서는 높은 가격임에도 불구하고 Lf을 전량 수입에 의존하고 있는 실정이며 Lf과 Lf 가수분해물

\* Corresponding author : Soo-Won Lee, Department of Food Biotechnology, Sungkyunkwan University, 300 Chunchun-dong, Suwon 440-746, Korea. Tel: 82-31-290-7805, Fax: 82-31-290-7815, E-mail: leesw@skku.ac.kr

의 기능들에 관한 연구도 주로 외국에서 Holstein과 같은 외래의 유종종의 Lf를 대상으로 대부분 이루어졌다. 국내에서는 이에 관련된 연구도 부족할 뿐만 아니라 B-Lf의 대체 가능성을 가진 고유 재래종인 한우의 Lf에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 같은 종이라고 하더라도 한우가 유전적 관계에서 Holstein과 차이가 있다는 보고(Lee et al., 1998)로 볼 때 젖소와 한우의 Lf 간에도 차이가 있을 것으로 생각되어진다.

본 연구는 한우 Lf를 분리·정제하여 생화학적 특성을 파악하고, 기존에 알려져 있는 젖소 Lf과의 비교를 통하여 유전적 관계에서 차이를 보이는 한우와 젖소 Lf 간에는 어떠한 차이점을 나타내는지 검토하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### Lactoferrin의 분리 및 정제

Lactoferrin 정제에 사용한 한우 시료는 축산연구소 고냉지 시험장에서 착유한 한우 초유를 사용하였고, 젖소 lactoferrin 정제를 위해서는 경기도 부근 목장의 젖소 초유를 제공받아 사용하였다.

한우유와 젖소 탈지유를 등전 침전시켜, 유청을 얻은 후 batch extraction, CM-Sephadex C-50 ion exchange chromatography, Sephadex G-150 gel filtration chromatography, heparin agarose affinity chromatography를 이용하여 lactoferrin을 정제한 후 분획하였다. 정제도 확인 및 분자량 측정을 위해 SDS-PAGE를 실시하여 확인한 후 실험에 사용하였다.

### Lactoferrin 가수분해물의 제조

Tomita 등(1991)의 방법에 따라 5% Lf를 pH 3.0으로 조정 한 후 pepsin(10 units/mg, sigma, USA)을 3% 첨가한 후 37°C에서 4시간 가수분해하였다. 효소를 불활성화하고, pH를 7로 조정한 후 15,000×g에서 30 분간 원심분리하여 그 상등액을 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

### 한우 Lactoferrin의 아미노산 조성 분석

아미노산 분석은 HPLC로 취한 Lf 시료를 건조하여 이를 HCl로 110°C 24시간동안 가수분해한 후 Pico-Tag 방법을 이용하여 HPLC(Waters, USA)로 분석하였다. 분석된 측정치를 각 아미노산의 분자량을 참고로 하여 각각의 아미노산 잔기 수를 산출하였다.

### 등전점 측정(Isoelectric focusing)

Robertson 등(1987)의 방법으로 등전점 전기영동을 실시하였다. 5%의 acrylamide gel (3.3%, pH 3.5~10.0)을 제조한 후

Mini-Protein II(Bio-rad, USA)을 사용하여 IEF-PAGE를 하였다.

### 철분 함량 측정

정제된 Lf에 함유되어 있는 철 함량을 serum iron analysis kit(Wako Pure Chemical Industries, Japan)를 사용하여 측정하였다.

### Circular Dichroism 측정

Shimazaki 등(1993)의 방법을 변형하여 PS 150J power supply를 장착한 JASCO J-715 automatic recording spectropolarimeter(日本分光工業, Japan)를 이용하였다. 측정하는 cell은 1 mm의 것을 사용하였으며, 시료 단백질은 증류수에 150 µg/900 µL이 되도록 용해하여 200~250 nm에서 CD를 측정하였다.

### 한우 Lactoferrin의 항혈청 제조

1차 면역은 정제한 한우 lactoferrin(K-Lf) 500 µg/mL를 멸균 PBS용액에 용해하고 동량의 Freund's complete adjuvant(Difco, USA)를 가하여 유화액을 제조하여 토끼(New Zealand White)의 등에 근육 주사하고 1주일 후에 immunodiffusion test로 특이 항체 생성을 확인하였다. 1차 면역 실시 2주일 후에 Freund's incomplete adjuvant(Difco, USA)로 같은 방법으로 유화시킨 K-Lf를 접종하여 1주일 후에 다시 특이 항체 생성을 확인하였고 다시 2주일 후에 동일한 K-Lf를 추가 접종하였으며 일주일 후에 채혈하여 K-Lf와의 항원 항체 반응을 조사하였다. 토끼의 귀에서 50 mL씩 채혈하였고 원심분리 후 항혈청을 얻었다.

### Immunodiffusion Test

PBS buffer로 1% agarose gel을 제조하고 직경 1.5 mm의 well을 만들어 중앙에 rabbit anti-K-Lf-antiserum 10 µL를 주입한 다음, 그 주변에 각각의 Lf 시료를 10µL씩 주입하여 37°C에서 24시간 반응시켜서 침강 반응을 관찰하였다.

### Western Blot Analysis

각각의 Lf를 SDS-PAGE를 한 후, gel을 nitrocellulose membrane(0.45 µm)에 얹어 electrotransfer kit(Bio-rad, USA)에서 constant voltage 100 V로 1시간 30분간 전개하였다. 전개를 마친 membrane은 blocking buffer에서 overnight 시킨 후, 다시 1 : 2,000 비율로 희석한 primary antibody solution에 overnight 시켜 washing buffer로 3번 세척하였다. Membrane을 biotinylated secondary antibody solution에서 30분간 상온 교반한 후 washing buffer로 3번 세척하였다. 그런 다음 streptavidin

alkaline phosphatase reagent에 30분간 상온에서 교반한 후 washing buffer로 3번 세척하고 BCIP/NBT(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium)를 처리하고 물로 세척하여 반응을 종료시킨 후 밴드를 확인하였다.

### 결과 및 고찰

한우 Lactoferrin과 젖소 Lactoferrin의 생화학적 특성

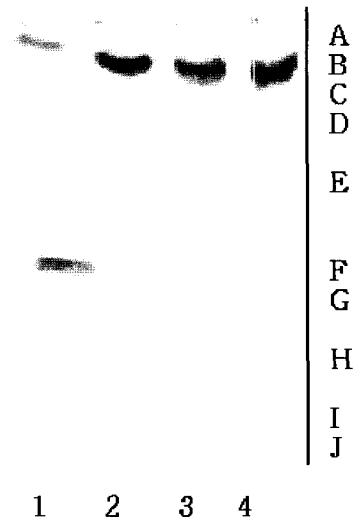
K-Lf의 amino acid 조성을 Pierce 등(1991)이 보고한 B-Lf의 amino acid 조성과의 비교하면(Table 1) 총 아미노산 함량은 lysine을 제외하고는 큰 차이를 보이지 않았으나, K-Lf의 각 amino acid 함량들이 B-Lf의 amino acid 함량과 전반적으로 차이를 보여 K-Lf와 B-Lf는 구조가 다소 다른 것으로 추정되었다.

정제된 K-Lf의 pI 값을 측정하기 위하여 isoelectric focusing 결과 한우 초유에서 정제한 Lf의 pI 값은 9로 나타났다(Fig. 1). 이러한 결과는 Jin 등(1995)이 보고한 K-Lf의 pI 값이 8.7 이라고 한 결과와는 차이가 있으나 같이 분석한 B-Lf의 pI 값

**Table 1. Amino acids composition<sup>1)</sup> of Korean native cow's lactoferrin and bovine lactoferrin**

Amino acids	B-Lf	K-Lf
Alanine	67	76
Arginine	38	35
Asparagine	29	59
Aspartic acid	36	
Cysteine	34	30
Glutamine	29	71
Glutamic acid	40	
Glycine	48	54
Histidine	9	8
Isoleucine	15	16
Leucine	66	68
Lysine	54	74
Methionine	4	1
Phenylalanine	27	22
Proline	30	37
Serine	45	41
Threonine	36	34
Tryptophan	13	10
Tyrosine	22	26
Valine	47	47
Total A.A. residues	689	709

<sup>1)</sup> Data were calculated from the amino acid sequence of bovine lactoferrin (Pierce, 1991).



1. pI standard marker, 2. K-Lf, 3. B-Lf, 4. H-Lf  
 A : Trypsinogen (pI 9.3), F : Carbonic Anhydrase (pI 6.6)  
 B : Lectin i (pI 8.8), G : Carbonic Anhydrase (pI 5.9)  
 C : Lectin ii (pI 8.6), H :  $\beta$ -lactoglobulin A (pI 5.1)  
 D : Lectiniii (pI 8.2), I : Trypsin inhibitor (pI 4.6)  
 E : Myoglobulin (pI 7.2), J : Amyloglucosidase (pI 3.6)

**Fig. 1. Isoelectric focusing gel electrophoresis of lactoferrins.**

도 8.9로 K-Lf와 비슷한 값을 나타내었고 H-Lf 역시 pI 값이 8.8 정도로 Moguilevsky 등(1985)의 8.7, Foley 등(1987)과 O'connor 등(1987)이 보고한 H-Lf의 pI 값이 8~9 사이라는 것과 거의 일치하였다.

Lf에 결합되어 있는 철분의 함량을 측정하기 위해 serum iron analysis kit를 이용하여 Lf와 결합할 수 있는 철의 최대 함량을 각 Lf의 분자량에 맞추어 계산한 후 철분 포화도를 산출하였다(Table 2). K-Lf와 B-Lf의 철 포화도는 각각 40.6%와 34.2%였으며 이러한 결과는 정상유에서 분리해낸 B-Lf와 H-Lf의 15.4%와 10.8%에 비해 훨씬 높은 포화도를 보여주었다. 이러한 결과는 K-Lf와 B-Lf가 초유로부터 분리된 것이므로 다소 높게 함유하고 있는 것으로 생각되어지며 Frasson과 Lonnerdal(1980)은 인유 중 철의 포화도는 1~4% 정도로 인유 중에 포함되어 있는 철들이 지질 분획이나 저분자 물질과 결합되어 있어 적은 양의 철만 Lf과 결합된 상태로 존재하고

**Table 2. Iron content and iron saturation<sup>1)</sup> of different kinds of lactoferrin**

	K-Lf (colostrum)	B-Lf (colostrum)	B-Lf (normal milk)	H-Lf (normal milk)
Fe content (mg/g)	0.56	0.49	0.22	0.15
Fe saturation (%)	40.5	34.2	15.4	10.5

<sup>1)</sup> K-Lf Fe saturation 100% = 1.38 mg/g Lf.  
 B-Lf Fe saturation 100% = 1.43 mg/g Lf.

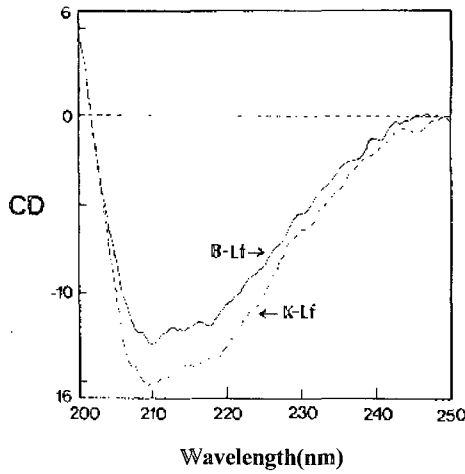


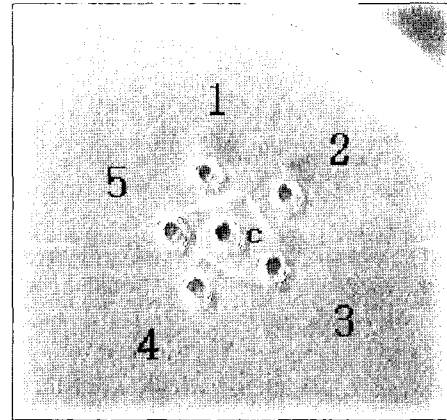
Fig. 2. CD-spectra of Korean native cow's lactoferrin and commercial bovine lactoferrin.

있다고 하였다.

Circular dichroism(CD) 측정 결과 Fig. 2에서 2차 구조상  $\alpha$ -helix 함량은 K-Lf이 약 18%의  $\alpha$ -helix를 함유하고 있는 것으로 나타났고 B-Lf이 15 % 정도의  $\alpha$ -helix를 함유하고 있는 것으로 나타났다. 이 결과는 Brown과 Parry(1974)의 B-Lf이  $\alpha$ -helix 15% 함유하고 있다는 보고와 동일하였고, Shimazaki 등(1991)의 보고에서는 B-Lf은 12%, apo-B-Lf는 14%, holo-B-Lf은 12%의  $\alpha$ -helix를 함유하고 있다고 하였는데 이러한 보고들은 본 실험에서 측정된 B-Lf의  $\alpha$ -helix의 함량과 유사함을 나타내었다. 실험 결과에서  $\alpha$ -helix 함량의 수치적 차이로 볼 때, K-Lf은 B-Lf와 구조와는 다소 차이가 있는 것으로 생각되어진다.

한우 Lactoferrin의 항원 항체 반응 측정

K-Lf와 다른 포유 동물의 유즙에서 유래한 Lf과 상관관계를 분석하기 위하여 K-Lf을 토끼에 면역하여 얻은 K-Lf 항혈청과 B-Lf, K-Lf, H-Lf, pepsin으로 가수분해시킨 젖소 lactoferrin의 가수분해물(B-Lf-H) 그리고 BSA를 이용하여 immunodiffusion test를 실시하여 면역 교차반응을 확인하였다(Fig. 3). B-Lf은 K-Lf 항혈청과 면역교차반응을 보였고 B-Lf-H도 K-Lf 항혈청과 면역 교차반응을 보였다. 이러한 사실은 B-Lf-H에도 K-Lf 항혈청과 결합할 수 있는 항원 결정 부위가 존재하는 것으로 판단된다. 그러나 K-Lf 항혈청과 H-Lf 사이에는 면역 교차반응이 나타나지 않았는데 이것은 포유 동물의 동일종에서 유래한 Lf 간에는 상동성이 높아 면역교차반응이 나타나는 것으로 인정되지만 이종간에는 상동성이 낮아 면역 교차반응이 없었던 것으로 판단되어진다. Shimazaki 등(1991)의 immunodiffusion 결과에 의하면 B-Lf은 sheep-Lf 및 goat-Lf과 침강선을 형성하였으나 H-Lf과 horse-Lf과는 아무런 반응을 보이지 않았고 H-Lf의 경우에는



c : rabbit anti-K-Lf-antiserum, 1 : B-Lf, 2 : K-Lf, 3 : H-Lf, 4 : B-Lf-h, 5 : BSA

Fig. 3. Ouchterlony immunodiffusion pattern of rabbit anti-K-Lf -antiserum against B-Lf, K-Lf, H-Lf, B-Lf-h and BSA.



Fig. 4. Western blot analysis comparison of lactoferrins.

다른 어떤 Lf과도 침강선을 나타내지 않았다.

B-Lf, K-Lf과 H-Lf을 SDS-PAGE 한 다음 Lf간의 교차반응을 시험하기 위한 K-Lf 항혈청을 이용하여 Western blotting을 한 결과는 Fig. 4와 같다. B-Lf, K-Lf에 대해서는 면역반응 밴드가 검출되었으나 H-Lf에 대해서는 밴드가 검출되지 않았다. 이러한 결과는 immunodiffusion test의 결과와 일치하는 것으로 B-Lf과 K-Lf 사이에는 구조적 상동성이 높은 것으로 생각되어지지만 H-Lf과 한우와 젖소에서 유래하는 Lf과는 구조적 상동성이 낮는데 기인하는 것으로 여겨진다.

요 약

본 연구는 우리나라 재래종인 한우로부터 초유를 얻어 Lf을 분리·정제한 후 한우 Lf의 생화학적 특성을 확인하였다. 정제된 한우 Lf은 분자량이 81,000Da이고 등전점은 pI 9였으며, 철함량이 0.56 mg/g으로 철 포화도는 약 40.6%로 측정되었다. 한우 Lf과 젖소 Lf은 아미노산 조성과  $\alpha$ -helix 함량에서 서로 다르게 나타났다. 또한, 항원 항체 반응으로 확인한 결

과, K-Lf과 B-Lf 간에는 교차반응을 보였으나 H-Lf과는 교차 반응을 보이지 않았다.

### 참고문헌

- Aisen, P. and Listowsky, I. (1980) Iron transport and storage proteins. *Annu Rev Biochem.* **49**, 357-393.
- Arnold, R. R., Cole, M. F., and McGhee, J. R. (1977) A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science* **197**, 263-265.
- Brock, J. H. (1985) Metal proteins with non-redox roles (Part II). Topics in molecular and structural biology. In: Metalloproteins. Harrison, P. (ed), Macmillan Press, London, UK, pp. 183-262.
- Brown, E. M. and Parry, R. M. Jr. (1974) A spectroscopic study of bovine lactoferrin. *Biochemistry* **13**, 4560-4565.
- Broxmeyer, H. E., DeSousa, M., Smithyman, A., Ralph, P., Hamilton, J., Kurland, J. I., and Bognacki, J. (1980) Specificity and modulation of the action of lactoferrin, a negative feedback regulator of myelopoiesis. *Blood* **55**, 324-33.
- Bullen, J. J. and Armstrong, J. A. (1979) The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* **36**, 781-91.
- Foley, A. A. and Bates, G. W. (1987) The purification of lactoferrin from human whey by batch extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 296-300.
- Fransson, G. B. and Lonnerdal, B. (1980) Iron in human milk. *J. Pediatr.* **96**, 380-384.
- Jin, H. S., Keum, J. S., Kim, J. H., and Choi, W. Y. (1995) Purification and physicochemical characterization of lactoferrin from Korean native cattles. *Kor. J. Dairy Sci.* **17**, 146-160.
- Lee, S. S., Ko, S. B., Oh, W. Y., Yang, Y. H., Kim, K. I., and Cho, B. W. (1998) Determination of phylogenetic relationships of Korean native and Cheju native cattle to other breeds using PCR-RFLP of mtDNA D-loop region. *Kor. J. Anim. Sci.* **40**, 335-344.
- Mansson, B., Geborek, P., Saxne, T., and Bjornsson, S. (1990) Cytidine deaminase activity in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis: relation to lactoferrin, acidosis, and cartilage proteoglycan release. *Ann. Rheum. Dis.* **49**, 594-597.
- Metz-Boutigue, M. H., Jolles, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J., and Jolles, P. (1984) Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur. J. Biochem.* **145**, 659-676.
- Moguilevsky, N., Retegui, L. A., and Masson, P. L. (1985) Comparison of human lactoferrins from milk and neutrophilic leucocytes. Relative molecular mass, isoelectric point, iron-binding properties and uptake by the liver. *Biochem. J.* **229**, 353-359.
- Nemet, K., and Simonovits, I. (1985) The biological role of lactoferrin. *Haematologia* **18**, 3-12.
- O'Connor, C. J., and Sutton, B. M. (1987) Interfacial interactions between proteins and mammalian lipases. *Adv. Colloid Interface Sci.* **28**, 1-34.
- Pierce, A., Colavizza, D., Benaissa, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J., and Spik, G. (1991) Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* **196**, 177-84.
- Robertson, E. F., Dannelly, H. K., Malloy, P. J., and Reeves, H. C. (1987) Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Anal. Biochem.* **167**, 290-294.
- Rose, T. M., Plowman, G. D., Teplow, D. B., Dreyer, W. J., Hellstrom, K. E., and Brown, J. P. (1986) Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97 (melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1261-1265.
- Shimazaki, K., Kawano, N., and Yoo Y. C. (1991) Comparison of bovine, sheep and goat milk lactoferrins in their electrophoretic behavior, conformation, immunochemical properties and lectin reactivity. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **98**, 417-22.
- Shimazaki, K., Tanaka, T., Kon, H., Oota, K., Kawaguchi, A., Maki, Y., and Sato, T. (1993) Separation and characterization of the C-terminal half molecule of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.* **76**, 946-55.
- Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., and Kawase, K. (1991) Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.* **74**, 4137-42.