

효소 단백질 가수분해물의 항균 활성

주정현 · 이상덕 · 이정옥 · 오만진* · 이기춘¹

Antimicrobial activity of protein hydrolysate by protease

Jeong-Hyeon Joo · Sang-Duk Yi · Jeong-ok Lee · Man-Jin Oh* · KC Rhee¹

ABSTRACT

This study was carried out to investigate whether peptide produced from wheat protein by enzyme hydrolysis can be used as a natural antimicrobial agent. Antimicrobial peptide was obtained from wheat protein by protease of 7 species. The produced antimicrobial peptide was purified through ultrafiltration, membrane filtration and HPLC, and molecular weight and amino acid sequence of the purified antimicrobial peptide were determined. Among hydrolysate produced from wheat protein by protease of 7 species, antimicrobial activity was observed for the peptide obtained from *Asp. saito* protease. The *Asp. saito* protease did production antimicrobial hydrolysate showing the highest antimicrobial activity at reaction condition of 37°C and pH 6.0, but not at reaction condition above 50 °C. Wheat protein hydrolysate was fractionated by membrane filtration and showed antimicrobial activity between molecular weight 1,000 - 3,000. The antimicrobial activity fraction obtained by membrane filtration was separated through HPLC and showed antimicrobial activity in the peak of retention time 31.1 - 31.8 min. Since after wheat protein protease hydrolysate was heated during 15

본 논문은 2001년도 충남대학교 자체연구비 지원에 의하여 수행되었음.

충남대학교 농업생명과학대학 식품공학과(Dept. of Food Science and Technology, College of Agriculture and Life Science, Chungnam National University, Daejeon, Korea, 305-764)

¹ 미국 텍사스 A & M 대학교 단백질 연구소(Food Protein Research and Development Center, Texas A & M University, College Station, TX 77843-2476, U.S.A)

* 교신저자(E-mail : ohmj@cnu.ac.kr, Tel : 042-821-6728)

min at 121°C, antimicrobial activity was maintained, we could be conviction as heat-stable peptide. Molecular weight of antimicrobial peptide identified by MALDI-mass was 1,633. Amino acid sequence of antimicrobial peptide was cysteine, glycine, prolin, prolin, prolin, valine, valine, alanine, alanine and arginine.

서 론

식품은 저장 유통 과정 중 식품원료에 혼입되어 있던 미생물에 의한 오염에 의하여 품질이 저하되고 부패되어 인간의 건강을 위협하거나 경제적인 손실이 일어난다. 이와 같은 미생물을 사멸시키거나 성장을 억제하기 위해서는 건조, 냉동, 열처리, 가스처리, 방사선조사, 보존료 첨가 등이 쓰이고 있으나 열처리만큼 안전하면서도 효과적인 방법은 없으나 열처리에 의하여 식품 영양성분의 파괴되고 기능성 성분은 생리활성을 잃어버리므로 소비자들은 최소한의 가공처리를 요구하고 있다. 원료로부터 혼입된 미생물을 사멸하는 것은 쉬운 일이라 하더라도 한번 포장 식품을 개봉하면 외부로부터 미생물이 오염되어 식품을 안전하게 저장할 수 없으므로 최소한의 식품 보존료가 필요하게 되었다.

식품의 보존료로서는 식염, 당류, 목초, 염소, 오존, 인산염 등과 같은 전통적인 것(milieu preservatives), 유기산류, lactoferrin과 같은 lacto-microbial agent, lysozyme과 같은 ovo-microbial agent, catechin과 같은 phyto-phenolic agent, nisin과 같은 bacteriocin류 등을 들 수 있다(1). 이와 같은 보존료 가운데 가장 바람직한 것은 인체에 무해하면서 영양이 될 수 있고 각종의 생리활성을 가지고 있는 peptide류의 것으로 생각된다. 천연적으로 존재하는 항균성 peptide에 대한 연구는 과거 10여년간 많은 연구자들의 관심을 끌어들

으며(2) 천연적인 항균성 저분자 peptide류는 포유동물(3-6), 양서류(7,8), 절족 동물(9-11), 누에(12), 개미(13), 꿀(14) 등에 존재하는 것으로 알려져 왔다. 천연 저분자 peptide류의 항균기작은 영양분 이동 정지(stasis effect), 사멸효과(cidal effect), 흡착작용(adhesion-blockade effect), 상승효과(synergistic effect), 식작용 촉진 인자(opsonic effect) 양전하성 peptide가 미생물 세포벽의 음전하성 인지질과 결합(cationic effect)하는 등에 의하여 항균활성이 나타내는 것으로 보고되고 있다(15-17). 항균성 peptide류는 천연물 중에 그 함량이 적기 때문에 우유 단백질과 cethpsin에 단백질 분해 효소를 작용시켜 항균성, angiotensin-converting 효소의 생성억제, 면역 증강제 및 통증 제거제 등의 각종 생리활성이 높은 저분자 peptide를 생산, 이용하고자 하는 연구가 진행되고 있다.⁽¹⁸⁻²²⁾ 또한 콩 단백질과 유청 단백질에 단백질 분해효소를 작용시켜 얻어진 oligopeptide는 용해성, 유화안정성, 거품 형성능 등이 증가되어 식품소재로서의 다양한 성질을 가지게 된다고 보고한 바 있다(23-27).

Dionysius등(18), Domita등(28)은 우유중에 존재하는 bovine lactoferrin에 pepsin을 작용시켜 3개의 항균성 peptide를 분리, 정제하여 lactoferricin으로 명명하고 분자량은 3,195, 2,673, 5,851 이었으며 양전하를 가지고 있고 원 단백질에 비하여 8배 이상 항균활성이 높았다고 보고한 바 있다. Isidra등(19)은 bovine casein에 pepsin을 작용시켜 두개의 항균 활성 분획, 아미노산 결합 183-207, 164-179를

각각 분리하고 MIC는 8-99 μ M이었으며 hemolytic effect를 나타내었다고 한 바 있다. Pellegrini등(20)은 bovine β -lactoglobulin에 trypsin을 작용시켜 4개의 항균성 peptide를 분리하여 아미노산 결합순서를 밝혔으며 gram-positive 세균에만 항균활성을 나타내었다고 한 바 있다.

이상에서 보는 바와 같이 지금까지 항균성 peptide류에 관한 연구는 천연물이나 동물성 단백질 peptide에 한정되어 있을 뿐 식물성 저분자 peptide에 대한 연구는 시도된 바 없다. 본인 등은 가격이 저렴한 밀 단백질을 기질로 저분자 peptide을 제조하여 실용적이고 인체에 무해한 항균제를 개발하고 식품소재로 이용가능성을 조사하기 위하여 밀 단백질인 gluten에 *Aspergillus saitoi*가 분비하는 protease를 가하여 반응시키고 얻어진 peptide를 분자량별로 분획하고 분자량별 항균활성 분획을 HPLC로 분취하여 얻어진 peptide의 아미노산 결합순서를 분석하여 새로운 결과를 얻었으므로 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 밀 단백질인 gluten, *Aspergillus saitoi* protease (EC 3.4.23.18), pepsin(porcine stomach, EC 3.4.23.1), trypsin(porcine pancreas, EC 3.4.21.41), α -chymotrypsin(bovine pancreas, EC 3.4.21.1), bromelain(pineapple stem, EC 3.4.22.32), *Streptomyces griseus* protease, *Bacillus licheniformis* protease는 Sigma사 제품을 사용하였으며 ultrafilteratin cell(Amicon)과 membrane은 regenerated cellulose (molecular weight cut-off 10,000 3,000 1,000) Millipore사 제품, Sephadex G-25는 Pharmacia사

제품, 항균활성 측정용 paper disc(9mm)는 Toyorhoshi사 제품, 기타 시약은 특급 분석용 시약을 사용하였다.

2) 항균활성 측정용 균주는 *Escherichia coli* ATCC 10536, *Staphylococcus aureus* ATCC 6633, *Streptococcus faecalis* ATCC 13301, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894, *Bacillus subtilis* ATCC 11778, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 효소반응

Gluten 10g, 증류수 100ml를 삼각 플라스크에 넣고 80 $^{\circ}$ C에서 10분간 열 처리한 후, 이에 단백질 효소 분말 50mg을 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 6시간 진탕 반응시켜 80 $^{\circ}$ C에서 5분간 열처리하여 효소를 파괴시킨 후 10,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 상정액을 항균활성 측정용 시료로 하였다.

2) 가수분해율 측정 (degree of hydrolysis, DH)

효소에 의한 gluten의 가수분해정도는 Yamashita 등(31)의 방법으로 측정하였다.

즉, 100ml의 물에 gluten 10g을 넣어 현탁시키고 micro-Kjeldahl 법(32)에 따라 질소를 정량하고 효소로 작용시킨 gluten 가수분해물 10ml에 동량의 10% TCA 용액을 가하고 12,000g에서 15분간 원심분리 하여 상정액 중의 질소를 정량하여 가수분해율을 표시하였다.

3) 항균활성 측정

항균활성은 paper disc법(33)으로 측정하였다. Nutrient broth에 1.5%의 한천을 가하여 살균한 후 petri dish에 분주하여 기층 배지로 하고 이에 0.75% 한천 함유 nutrient 배지에 항균활성 피검균

주를 10^7 /ml의 농도가 되도록 가하여 증층 하였다. 이에 paper disc에 항균활성 피검 용액을 10 μ l loading 하고 건조한 후 반복하여 10회 loading 한 후 nutrient agar 배지위에 놓고 멸균수 70 μ l를 가하여 4°C의 냉장고에서 1시간 방치하여 paper disc를 고정시켜 확산되도록 한 후, 37°C에서 48시간 배양하면서 paper disc 주위의 clear zone 직경을 측정하여 항균력을 측정하였다.

4) 항균성 물질의 확인 및 정제

상기의 효소반응액을 다음과 같은 순서에 따라 정제하였다

(1) 항균성 peptide의 분자량 별 분획

Membrane filter(molecular weight cut-off 10,000, 3,000, 1,000)가 장착된 Amicon kit에 효소 반응액을 넣고 질소가스로 60 psi 압력을 가하여 분자량별로 분획하고 항균활성을 측정하였다.

(2) Sephadex G -25 겔 여과

항균활성을 가지고 있는 분자량 3,000이하의 것을 Sephadex G-25가 충전된 column(18mm \times 750mm)에 loading 하고 3ml씩 분획하여 220nm, 280nm에서 흡광도를 측정하여 분획물을 얻었으며 이 분획물을 동결 건조하여 상기와 같은 방법으로 항균활성을 측정하였다.

(3) High performance liquid chromatography에 의한 항균성 peptide의 분리

Gluten 효소 가수분해물을 분자량 3,000 이하의 membrane filter로 여과하여 이를 다음 같은 HPLC 분석 조건으로 gradient 하였으며 유출시간 별 유출물을 분획수집기로 수집하여 질량과 항균 활성을 측정하였다.

Table 1. Operating 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 220nm, 280nm
Column	Vydac C ₁₈ (10 \times 300mm)
Mobile phase	Solvent A) 100.0 % 10mM phosphate buffer(pH 7.0)
	Solvent B) 0 % ACN
Flow rate	1.0 ml/min
Injection volume	100 μ l

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

6) 항균성 peptide의 mass 측정

Gluten 효소 가수분해물을 HPLC로 분취하여 각 분획물의 mass spectrum을 applied biosystem MALDI-TDF, STR Voyager model, Matrix : α -cyanohydroxy cinnamic acid, reflector mode, accelerating voltage : 25,000 의 조건으로 분석하였다.

7) 항균성 peptide의 아미노산 서열 분석

Gluten의 효소 가수분해물을 HPLC로 분취하여 항균활성을 나타내는 peak 분획물의 아미노산 결합순서를 Hewlett Packard G 1000A automated protein sequencer, automated Edman chemistry에

서 liquid peptide sample을 2% TFA로 loading하여 method 3.5 방법으로 분석하였다.

8) 항균성 Peptide의 열 안정성

항균활성을 가지는 가수분해물로부터 분자량 3,000 이하를 분획하여 용액상태로 한 다음 80°C에서 10분, 100°C에서 10분, 121°C에서 15분 열처리하여 항균활성을 비교하였다.

결과 및 고찰

1. 효소 종류에 따른 밀 단백질 가수분해물의 항균활성

Gluten에 trypsin을 비롯한 6종의 protease를 가

Table 3. Antimicrobial effect of hydrolysates of wheat gluten slurry treated with various protease adjusted with pH 6.7.

Enzyme source	plate incubation at 37°C					
	EC*	EH	SA	SF	BS	ST
Trypsin	-**	-	-	-	-	-
<i>Asp. saitoi</i> protease	+	+	+++	+++	++	++
Pepsin	-	-	-	-	-	-
α-Chymotrypsin	-	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces griseus</i> protease	-	-	-	-	-	-
Bromelain	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> protease	+	+	++	+	-	-

* 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

** - : negative activity, + : weak activity(10~12mm), ++ : strong activity(12~14mm), +++ : very strong activity(>15mm).

Table 4. Antimicrobial effect of hydrolysates of wheat gluten slurry treated with various protease adjusted with pH 3.5.

Enzyme source	plate incubation at 37°C					
	EC*	EH	SA	SF	BS	ST
Trypsin	-	-	-	-	-	-
<i>Asp. saitoi</i> protease	+	+	+++	+++	++	++
Pepsin	+	+	+	+	+	+
α-chymotrypsin	+	-	+	-	+	++
<i>Streptomyces griseus</i> protease	-	-	-	-	-	-
Bromelain	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> protease	+	+	++	+	-	-

* 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

** - : negative activity, + : weak activity(10~12mm), ++ : strong activity(12~14mm), +++ : very strong activity(>15mm).

하여 pH 6.7과 pH 3.5, 37°C에서 6시간 작용시킨 가수분해물의 항균활성은 다음과 같다.

Table 3 과 4에서 보는 것과 같이 gluten 효소 가수분해물의 항균력은 *Asp. saitoi* protease로 가수분해시킨 것이 가장 높았으며 효소의 종류에 따라 항균활성에 심한차이가 있었다. gluten에 미생물 기원의 단백질 가수분해 효소를 작용하였을 때 항균성 peptide을 생산하는 것으로 보아, 밀 단백질 가수분해물은 곰팡이 protease를 이용하는 고 단백질 식품의 보존에 유용한 보존제로서의 가능성이 있을 것으로 생각되었다. Tomita 등(37)은 인간 및 소의 lactoferrin에 pepsin을 작용시켜 얻어진 peptide 물질을 lactoferricin이라 명명하고 Gram

양성, Gram 음성 균주에 대하여 강한 항균활성을 나타내었다고 보고한 바 있다. Pelligrini 등(35)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 pentapeptide였고, 다른 하나는 disulfide 구조를 갖는 peptide로서 Gram-positive 세균에 대해서는 강한 항균 작용을 나타내지만 Gram-negative 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, 단백질 가수분해물의 항균성에 대한 지금까지 타 연구자들의 연구가 시도된 바 없어 결과의 비교가 어려웠다.

2. 항균성 peptide의 생산 조건

1) 작용 pH

Gluten 현탁액에 *Asp. saitoi* protease를 가하여 pH 4-8까지 조정된 다음 37°C, 6시간 진탕반응 시켜 얻어진 가수분해물의 항균활성을 *Sta. aureus*, *E. coli*에 대하여 측정한 결과는 다음과 같았다.

Table 5. Effects of pH on the production of antimicrobial peptide of soybean protein treated with protease at 37°C. (Dia. of inhibiting zone : mm)

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

이상에서 보는 바와 같이 *Asp. saitoi* protease는 중성부근에서 항균성 peptide를 잘 생성하였으며 항균활성은 *Sta. aureus*에 대하여 19mm, *E. coli*에 대하여 21mm를 나타내었다.

2) 작용 온도

밀 gluten 현탁액에 *Asp. saitoi* protease를 가하여 pH 6.7로 조정된 다음 작용 온도에 따른 생성 가수분해물의 항균활성을 측정한 결과는 Table 6과 같았다.

Table 6. Effect of temperature on the production of antimicrobial substance of wheat gluten treated with protease in pH 6.7. (Dia. of inhibiting zone : mm)

Strain	Temperature(°C)			
	37	45	50	55
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6633	23	18	14	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	21	17	13	-

Table 6에서와 같이 항균성 peptide의 생산 최적 온도는 37°C였으며 55°C 이상의 온도에서는 생성량이 급격히 감소하여 60°C에서는 효소활성이 정지되었다. 이는 열에 의한 효소 단백질의 변성에 기인된 것이라 하겠다. Manachini 등(26)의 *Bac. licheniformis* protease가 50~60°C에서 잘 작용한다는 보고와 비교해 볼 때, 효소의 종류에 따른 작용 최적 온도가 각기 다를 수 있었다.

3) 효소 반응 시간

Gluten 현탁액을 80°C에서 5분간 열처리하여 *Asp. saitoi* protease를 가하고 pH 6.7, 45°C에서 진탕반응 시키면서 반응 시간에 따른 가수분해물과 항균활성을 측정한 결과는 다음과 같았다.

Table 7. Antimicrobial activity of wheat gluten treated with *Asp. saitoi* protease at 37°C in pH 6.7. (Dia. of inhibiting zone : mm)

Strain	Incubation time at 37°C				
	3h	6h	9h	12h	24h
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6633	10	16	19	21	22
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	11	18	19	20	22

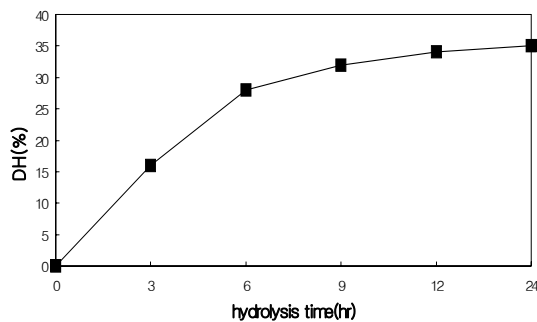


Fig. 1. Degree of hydrolysis of wheat gluten treated with *Asp. saitoi* protease at 37°C in pH 6.7.

3. 항균성 peptide의 분리 및 정제

밀 gluten에 *Asp. saitoi* protease로 작용시킨 가수분해물의 항균성 물질을 분리, 정제하기 위하여 ultrafiltration 분획, gel 여과, HPLC를 행한 결과는 다음과 같았다.

1) Ultrafiltration fractionation

효소 가수분해물의 원심분리액을 분자량 10,000, 3,000, 1,000 cut-off membrane으로 여과하여 얻어진 여액의 항균활성을 측정 한 결과는 Fig. 2와 같았다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 분자량 1,000이상의 분획에서 항균활성이 있었고 1,000이하에서는 항균활성이 나타나지 않는 점으로 보아 분자량 1,000-



Fig. 2. Antimicrobial activity of fractionating wheat gluten hydrolysates by ultrafiltration against *E. 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.

3,000의 peptide가 항균활성이 있는 것으로 확인할 수 있었다. 각 분획물의 수율은 효소반응 원액이 반응 기질에 대하여 56.8%, 분자량 10,000 이하의 분획물이 32.6%, 분자량 3,000이하 분획물이 26.3%, 분자량 1,000 이하의 분획물이 20.5%로서 비교적 높은 수준이었다. 또한, 가수분해물과 membrane filter 여과물에 공존하고 있는 peptide의 분포를 확인하기 위하여 membrane filter로 여과시켜 분 결과 분자량 cut-off 별로 분획되었음을 알 수 있었다.

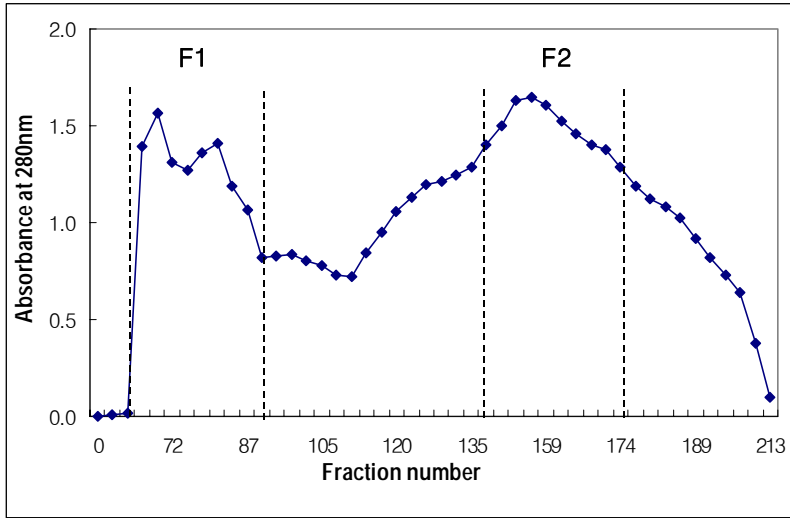


Fig. 3. Sephadex G-25 chromatogram of the wheat gluten hydrolysate by *Asp. saitoi* protease.

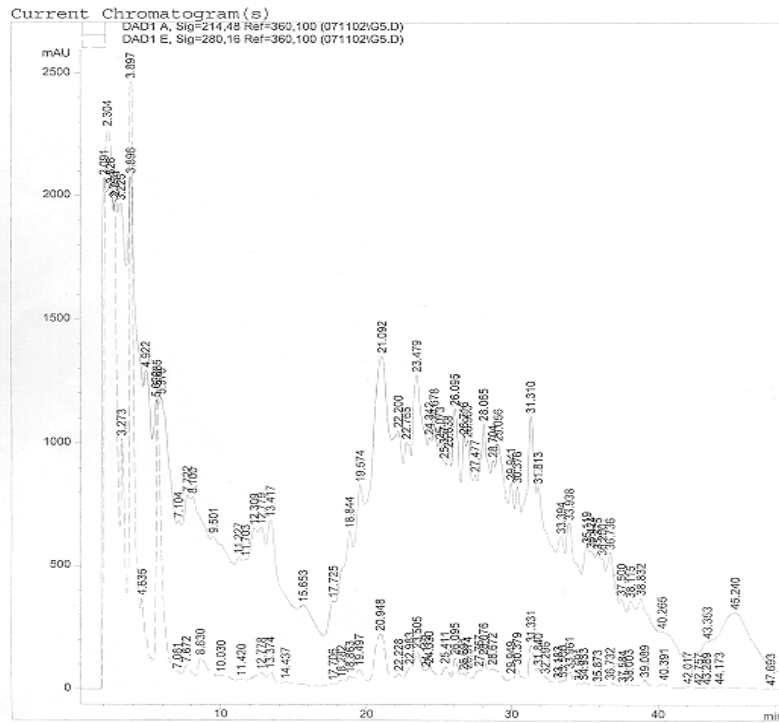


Fig. 4. High performance liquid chromatogram of the wheat gluten hydrolysate by membrane filter (molecular weight cut-off 3,000). The elution was monitored at 220nm. Each fractions obtained were tested for antimicrobial activity against *Sta. aureus* by an agar diffusion method.

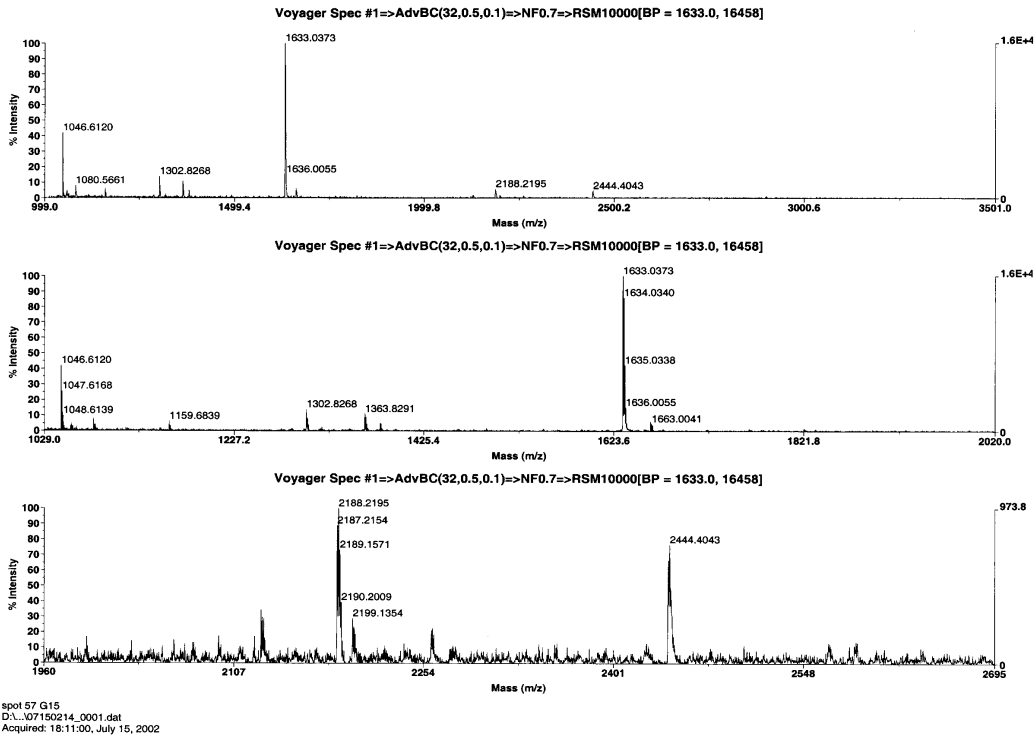


Fig. 5. Mass spectrum of the antimicrobial peptide obtained wheat gluten treated with *Asp. saitoi* protease. The peptide fragment was collected in high performance liquid chromatography fraction.

2) Gel filtration

효소 가수분해물의 항균성 물질을 Sephadex-G 25로 여과하여 3 ml씩 분취하고 220nm, 280nm에서 흡광도를 측정하고 각 분취물을 모아 poly ethylene glycol 6,000으로 농축하여 항균활성을 측정하였다. 그 결과는 Fig. 3, table 8과 같았다.

Gluten 효소 가수분해물의 gel 여과 유출물을 peak 별로 동량 분취하여 항균활성을 측정한 결과 F2 분획에서 항균활성을 확인할 수 있었다. Gel 여과는 ultrafiltration membrane에 비하여 효율적으로 분획이 어렵기 때문에 차후의 실험에서는 membrane filter를 이용하여 분획하였다.

3) High performance liquid chromatography

효소 가수분해물을 분자량 3,000 cut-off membrane filter로 여과하여 얻어진 여액의 HPLC chromatogram는 Fig. 4와 같았으며 여러 차례로 반복하여 분취하고 이의 항균활성을 측정하였다.

Table 8. Antimicrobial activity of peaks isolated from Sephadex G-25 against *St. aureus* ATCC 1320.

Fraction No.	Clear zone size on plate(mm)
F1	11
F2	15

Gluten의 효소적 가수분해물의 HPLC 유출물을 retention time 1~3분 간격으로 반복하여 분획한 다음 항균 활성을 측정한 결과 retention time 31.1-31.8min에서 활성이 나타났다.

4. 항균성 peptide의 아미노산 결합순서

항균활성이 있는 분획 HPLC Rt 31.31인 peak를 MALDI-TDF, STR Voyager로 mass spectrum을 측정한 결과는 Fig. 5와 같았다.

그림에서 보는 바와 같이 항균성 peptide의 질량은 1,633.03으로 측정되었다. 본 실험에서 얻어진 항균성 물질의 질량은 Dionysius 등(20)이 보고한 lactoferrin의 질량 3,195, 2,673, 5,851보다 적었으며 Pellegrini(22)이 보고한 lactoglobulin의 trypsin 가수분해물인 항균성 peptide보다는 큰 것이었다. 또한, 항균성 peptide의 아미노산 결합 순서를 HP G1000 A automated protein sequence를 측정한 결과는 Fig.6과 같이 10개의 아미노산의 결합이었다.

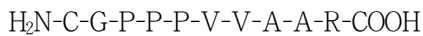


Fig. 6. Amino acid sequence of the antimicrobial peptide obtained from the digestion of wheat gluten by *Asp. saitoi* protease.

5. 항균성 peptide의 열 안정성

항균활성을 가지는 gluten 가수분해물을 용액 상태로 한 다음, 80°C에서 10분간, 100°C에서 10분간, 121°C에서 15분간 각각 열처리 한 후, 그람 양성균의 항균활성을 측정하고 열에 대한 안정성을 비교하였다. 그 결과는 table 9와 같았다.

Gluten을 가수분해하였을 때 생산되는 항균성 peptide의 열에 대한 안정성을 실험해 본 결과, 열

에 대해 대단히 안정함을 알 수 있었다. 즉, 100°C에서의 열처리와 121°C에서 15min 열처리에 의해서도 두 균주의 생육 저해환의 크기가 대조구와 비슷한 것으로 보아 gluten의 *Asp. saitoi* protease 가수분해물은 열에 매우 안정하였다.

Table 9. Heat stability of the antimicrobial peptide of soybean protein hydrolysate. (Dia. of inhibiting zone : mm)

Strain	Heating treatment			
	control	80°C 10min	100°C 10min	121°C 15min
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6633	19	20	19	20
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	20	21	21	22

적 요

밀 단백질에 효소가수분해 할 때 생산되는 peptide의 항균활성과 천연항균제로서의 이용가능성을 검토하기 위하여 실험을 행하였다. 밀 단백질에 7종의 단백질가수분해효소를 작용시켜 생성된 가수분해물의 항균활성을 측정하고 한의외과, membrane filtration, HPLC를 이용하여 항균성 peptide를 분리 정제한 후 분자량과 아미노산 결합 순서를 측정한 결과는 다음과 같다. 밀 단백질에 7종의 단백질 분해효소를 적용시켜 제조한 가수분해물중 *Asp. saitoi* protease를 적용시켜 얻어진 peptide 만이 항균활성을 나타내었다. *Asp. saitoi* protease는 37°C, pH 6.0에서 작용시킨 경우에 항균활성이 가장 높았으며, 50°C 이상에서는 활성을 나타내지 않았다. 밀단백 효소가수분해물은 membrane filtration에 의하여 분자량 1,000~3,000에서 항균활성이 나타났다. Membrane filtration으

로 얻어진 항균활성분획을 HPLC로 분리한 결과 retention time 31.1~31.8 min에서 항균활성을 나타내었다. 밀단백 효소가수분해물은 121℃에서 15분간 가열하여도 효소활성이 유지되는 매우 안정한 화합물이었다. 항균활성분획을 MALDI-mass로 질량을 분석한 결과 1,633이었다. 항균성 peptide의 아미노산 결합순서는 cysteine, glycine, prolin, prolin, prolin, valine, valine, alanine, alanine, arginine 의 순서였다.

인용문헌

1. Association of official analytical chemists, 2000. Official of Analysis, 17th ed., Washington DC, 297-297
2. Bevins, C. L. and Zasloff, M. 1990. Peptide from frog skin, *Annu. Rev. Biochem.* 59 : 395-414
3. Bilikova, K., Wu, G .S. and Simuth, J. 2001. Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor. *Apidologie*, 32 : 275-283
4. Boman, G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity, *Annu. Rev. Immunol.* 13 : 61-92
5. Boman, H. G. 1995. Antimicrobial activity of Peptide. *Annu. Rev. Immunol.* 13 : 61-92
6. Casteels, P., Ampre, C., Jacobs, F. and Tempst P. 1993. Functional and chemical chacterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection inducible honeybee. *J. Biol. Chem.* 268 : 7044-7054
7. Chiba, H. and Yoshikawa, M. 1986. Biologically functional peptides from food protein: New opioid peptides from milk protein. Marcel Deker Inc., New york, P. 123-153
8. Chobert, J. M., Bertrand-Harb, C. and Nicolas, M. G. 1988. Solubility and emulsifying properties of casein and whey proteins modified enzymatically by trypsin, *J. Agric. Food. Chem.* 36 : 883-892
9. Deeslie, W. D. and Cheryan, M. 1991. Fractionation of soy protein hydrolysates using ultrafiltration membrane. *J. Food Sci.* 57 : 411-413
10. Dionysius, D. A. and Milne, J. M. 1997. Antibacterial peptides of bovine Lactoferrin: Purification and characterization. *J. Dairy Sci.* 80 : 667-674
11. Elsbach, P. and Weiss, J. 1993. Bactericidal/permeability increasing protein and host defense against Gram-negative bacteria and endotoxin. *Curr. Opin. Immunol.* 5 : 103-107
12. Fennema. O. R. 1996. Food chemistry. Marcel Deker Inc., new york, P. 423
13. Gennaro, R., Skerlavai, B. and Romeo, D. 1989. Purification, composition and activity of two batenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. *Insect. Immunol.* 57 : 3142-3146
14. Hara, S. and Yamakawa, M. 1995. Moricin, a novel type of antibacterial peptide isolated from Silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 270(50) : 29923-29927
15. Hoffmann, J. A. and Hetru, C. 1992. Insect defensins inducible antibacterial peptides,

- Immunol. Today 13 : 411-415
16. Hsieh, D. S. T., Lin, C., Lang, E. R. and Catsimpoalas, Rha, N. 1979. Molecular-weight distribution of soybean globulin peptides produced by peptic hydrolysis, *Cereal Chemistry*, 56 : 227-231
 17. Kim, S. Y., Park, P. S. W. and Rhee, K. C. 1990. Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* 36 : 651-656
 18. Lee, J. Y., Boman, A., Chuanxin, S., Andersonn, M., Jornvall, H., Mutt, V. and Boman, H. G. 1989. Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, P. 9159-9162
 19. Lehrer, R. I., Lichtenstein, A. K. and Geanz, T. 1993. Defensin: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu. Rev. Immunol.* 11 : 105-128
 20. Manachini, P. L., Fortina, M. G. and Parini, C. 1988. Enzymatic modification of vegetable protein by a crude preparation from a strain of *Bacillus licheniformis*. *J. Sci. Food Agric.* 45 : 263-266
 21. Naidu, A. S. 2000. *Natural Food Antimicrobial Systems*, CRC press, P. 31-44
 22. Naidu, A. S. 2000. *Natural Food Antimicrobial Systems*. CRC press, P. 1-11
 23. Norrell, S. A. and Messley, K. E. 1997. *Microbiology laboratory manual : principles and applications*. Prentice-Hall, Inc., New Jersey, P. 191-196
 24. Orivel, J., Rederker, V., Caer, J. L. and Krier, F. 2001. Ponericins, new antibacterial and insecticidal peptide from the venom of the ant *pachycondvla goeldii*. *J. Biol. Chem.* 276(21) : 17823-17829
 25. Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U. and Hunziker, P. 2001. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. *Biochemica et Biophysica Acta.* 1526 : 131-140
 26. Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Hunziker, P. and Fellenberg, R. V. 1999. Isolation and identification of three bacterial domains in the bovine α -lactoalbumin molecule. *Biochemica et Biophysica Acta.* 1426 : 439-448
 27. Puski, G. 1975. Modification of functional properties of soy proteins by proteolytic enzyme treatment. *Cereal Chemistry*, 52 : 655-664
 28. Recio, I. and visser, S. 1999. Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine α ₂-casein, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1428 : 314-326
 29. Simmaco, M., Mignogna, G., Barra, D. and Bossa, F. 1994. Antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana esculenta*. *J. Biol. Chem.* 269 : 11956-11961
 30. Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabashi, H. and Kawase, K. 1991. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.* 74 : 4137-4141
 31. Weber, K. and Osborn, M. 1969. The reability of molecular weight determination by dodecyl

-
- sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244 : 4406
32. Wu, M. and Hancock, R. E. W. 1999. Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane. J. Biol. Chem. 274 : 29-34
33. Wu, M., Maier, E., Benz, R. and Hancock, R. E. W. 1999. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. Biochemistry, 38 : 7235-7242
34. Yamashita, M., Arai, S., Matsuyama, J., Gonda, M., Kato, H. and Fujimaki, M. 1970. Phenomenal survey alpha-chymotrypsin plastein synthesis, Agric. Biol. Chem. 34 : 1484-1488