

# 한우와 젖소 초유로부터 분리한 Lactoferrin과 가수분해물의 항균활성

양희진 · 이수원

성균관대학교 식품생명공학과

## Antimicrobial Activities of Lactoferrin and its Hydrolysate Obtained from the Colostrum of Hanwoo and Holstein Cattle

H. J. Yang and S. W. Lee

Department of Food Science & Biotechnology, Sungkyunkwan University

### ABSTRACT

The purpose of this study is to demonstrate antimicrobial activities of the lactoferrin and its peptic hydrolysates obtained from the colostrums of Hanwoo(Korean native cattle) and Holstein cattle. In the measurement of antimicrobial activity to *E. coli* O111 and other microorganisms, bovine lactoferrin showed a higher antimicrobial activity than that of Hanwoo cow's lactoferrin. The minimal inhibitory concentration (MIC) of lactoferrin against *E. coli* O111 was exhibited 1.5 mg/ml(Holstein) and 2.75 mg/ml (Hanwoo). The same result was also observed between bovine lactoferrin hydrolysate (0.12 mg/ml) and Hanwoo cow's lactoferrin hydrolysate (0.25 mg/ml). In addition of lysozyme, antimicrobial activity of lactoferrin was increased.

(Key words : Lactoferrin, Hanwoo, Colostrum, Antimicrobial activity)

### I. 서론

Lactoferrin(Lf)은 우유에 존재하는 생리적 기능을 가진 성분들 중의 하나로서 초유 중에 특히 많이 함유되어 있다. 이것은 transferrin family에 속하는 단백질 중의 한 종류로 젖 및 침, 눈물 등에 들어 있으며, 유선, mucous에서 분비되고 neutrophil의 secondary granules에서도 분비된다(Aisen과 Listowsky, 1980; Brock, 1985; Rose 등, 1986).

생리적인 기능으로서는 미생물 감염에 대한

방어작용, 유아 장내에서의 철분흡수 촉진작용, myelopoiesis의 조절작용, 염증반응의 조절작용, lymphocytes의 성장촉진작용과 macrophage 및 granulocyte, neutrophil, leukocyte의 조절작용 등 다양한 생리활성작용에 관여하고 있다(Arnold 등, 1977; Nemet과 Simonovits, 1985; Broxmeyer 등, 1980; Mansson 등, 1990; Bullen과 Armstrong, 1979).

이러한 생리적인 기능 중에서 Lf은 직접 세균에 결합하여 항균작용을 나타낼 뿐만 아니라 Gram 음성균의 외막 중 lipopolysaccharide

Corresponding author : Soo-Won Lee, Faculty of Life Science and Technology, 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

를 유리시켜 막의 안정성을 파괴하거나, Lf이 lysozyme과 함께 세균을 응집시켜 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다(Suzuki, 1989). 또한 근래에는 Lf의 가수분해물로부터 더욱 강력한 항균력을 나타내는 antimicrobial peptide를 찾기 위한 연구가 진행되고 있다. Tomita 등(1991)과 Bellamy 등(1992)은 bovine lactoferrin을 pepsin으로 가수분해하여 생성된 amino acid 잔기가 25개로 이루어진 분자량 3,126 Da의 항균성 domain인 lactoferricin을 발견하였다. 이것은 bovine lactoferrin의 대장균에 대한 최소 저해농도(MIC)가 2,000 µg/ml인데 비하여 lactoferricin은 6 µg/ml로서 약 300배 이상 강한 항균작용을 보고하였다. 또한 Van der Kraan 등(2004)도 젖소 Lf 으로부터 lactoferricin과 유사한 lactoferrampin이라는 항균 peptide를 보고하였다.

Lf의 이러한 생물학적 특성들을 바탕으로 현재 조제분유의 모유화를 위해 첨가되고 있으며 기타 철분 보강, 방부효과를 지닌 식품첨가제, 동물 사료 첨가제, 염증예방, 세포의 성장 촉진제 등으로 국내에서도 실용화 하고 있는 단계이다.

그러나 국내에서는 높은 가격임에도 불구하고 Lf을 전량 수입에 의존하여 사용하고 있는 실정이며, Lf에 대한 연구는 주로 외국에서 Holstein과 같은 외래 유종종을 대상으로 이루어져 있을 뿐이다. 국내에서는 Lf과 관련된 연구가 부족할 뿐만 아니라 우리나라 고유 재래종인 한우의 Lf에 대한 연구도 미흡한 실정이다. 같은 종이라고 하더라도 한우가 유전적 관계에서 Holstein과 차이가 있다는 보고(Lee 등, 1998)로 볼 때 젖소와 한우에서 분비되는 Lf 간에도 차이가 있을 것으로 생각되어진다.

본 연구에서는 유전적 차이를 보이는 한우와 젖소 Lf이 항균작용에 있어서는 어떠한 차이를 보이는지와 pepsin으로 가수분해한 lactoferrin 가용성 획득의 병원성 미생물에 대한 생육억제 효과를 검토하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. Lactoferrin의 분리 및 정제

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

한우와 젖소의 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 lactoferrin을 정제하였다. 각 단계별로 분리·정제된 Lf은 SDS-PAGE를 실시하여 정제도 및 분자량을 확인한 후 실험에 사용하였다.

### 2. Lactoferrin 가수분해물의 제조

Tomita 등(1991)의 방법에 따라 5% lactoferrin을 pH 3.0으로 조정한 후 pepsin(10 units/mg, sigma, USA)을 3% 첨가하여 37℃에서 4시간 가수분해하였다. 80℃에서 15분간 열처리하여 pepsin을 불활성화 시키고, pH를 7로 조정한 후 15,000×g에서 30 분간 원심분리하여 그 상등액을 동결건조하여 시료로 사용하였다.

### 3. Minimal inhibitory concentration(MIC) 측정

시험균주로는 *E. coli* O111, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Salmonella typhimurium* ATCC13311, *Candida tropicalis* KCTC7221를 생명공학연구원 유전자은행에서 분양 받아 사용하였다. MIC 측정은 Woods와 Washington(1995)의 microdilution 방법을 사용하였다. 먼저 시험균주를 nutrient

배지(Difco Co., USA)에서 2~3회 계대 배양하여 활력을 높인 후 16~20시간 배양시켜 대수기에 도달한 균을 실험에 사용하였다. 1% peptone 배지에 0.45 µm filter(Millipore Co., USA)로 여과 제균한 lactoferrin과 그 가수분해물을 각각의 농도로 첨가하고 접종 균수는 10<sup>6</sup> cfu/ml이 되도록 조절한 후 37°C에서 16시간 정도 배양한 후에 평판배지에서 균수를 측정하였다. 이때 측정된 균의 colony 수가 접종된 균수보다 작게 측정된 농도범위를 최소저해농도로 하였다.

#### 4. Lysozyme의 첨가 효과

Lactoferrin과 lysozyme을 각각의 농도로 배양 배지에 첨가하고, 시험균주 *E. coli* O111을 1×10<sup>6</sup> cfu/ml 수준이 되도록 접종하여 37°C에서 하룻밤 동안 배양하면서 시험균주의 증식을 관찰하였다.

#### 5. Transmission electron microscopy

1% peptone 배지에 *Candida tropicalis* KCTC7221를 10<sup>6</sup> cfu/ml 수준으로 접종하고 Lf은 5 mg/ml, Lf 가수분해물은 1 mg/ml의 농도로 첨가하여 4시간 동안 37°C에서 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 균체를 회수하고 10 mM phosphate buffer(pH 6.8)로 세척한 후에 1% agar에 섞어 균현 후 Karnovsky's 고정액에 하룻밤 동안 정치시킨다. 이것을 washing buffer(50 mM cacodylate buffer, pH 7.2)로 세척하고 1% OsO<sub>4</sub> buffer에 3시간 정치시킨 후 washing buffer로 세척하여 0.5% uranyl acetate에서 overnight 하였다. 50, 75, 90, 95, 100% 농도의 ethanol로 탈수시키고 propylene oxide에 1시간 처리 후 epon과 propylene oxide 혼합액으로 처리하여 수지가 시료 안에 충분히 스며들게 처리한 후 epon 수지로 embedding시켜 diamond knife로 ultrathin section하여 uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 후에 75 kV로

transmission electron microscopy (TEM) (H-800: Hitachi, Japan)으로 관찰하였다.

#### 6. Lactoferrin 가수분해물로부터 항균성 peptide 분획

Lf 가수분해물을 5 mg/ml 용액으로 제조한 후 HPLC를 이용하여 C<sub>18</sub> column으로 1분 간격으로 분획한 후 evaporator로 농축하고 filtration (0.45 µm)한 후 항균성을 측정을 하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 최소 저해 농도(Minimal inhibitory concentration) 측정

본 연구의 앞선 실험으로 한우 Lf과 젓소 Lf 간에는 같은 종 사이의 상동성은 인정되지만, 아미노산 조성과 α-helix 함량에 있어서 다소간 차이가 있는 것으로 확인 되었다(Yang 등, 2005). 이런 차이가 Lf 자체가 가지는 항균력에 어떠한 차이가 있는지 알아보기 위하여 각각의 Lf과 가수분해물을 이용하여 실험하였다.

젓소와 한우의 및 한우 그 가수분해물들을 배지에 각각의 농도별로 첨가하여 *E. coli* O111, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Candida tropicalis* 균의 성장을 억제하는 최소 저해 농도(MIC)를 측정하였다(Table 1).

*E. coli* O111 에 대한 실험 결과, MIC가 젓소 Lf은 1.50 mg/ml, 한우 Lf은 2.75 mg/ml, 젓소 Lf 가수분해물은 0.12 mg/ml, 한우 Lf 가수분해물은 0.25 mg/ml로 모두 젓소보다 한우 Lf의 경우 MIC가 2배 가까이 더 높은 것으로 나타났다. Tomita 등(1991)과 Bellamy 등(1992)의 보고에 의하면 젓소 Lf의 MIC는 2 mg/ml 정도였으며, 젓소 Lf 가수분해물은 0.1 mg/ml 정도라고 보고하였으며 본 실험의 결과는 이들의 연구결과와 비슷한 MIC 수준을 보여주었다. *Staphylococcus aureus*에 대한 젓소와 한우 Lf의

Table 1. Inhibitory sensitivity of lactoferrin and lactoferrin peptic hydrolysates to microorganism

	MIC(mg/ml)			
	<i>E. coli</i> O111	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. tropicalis</i>
B-Lf	1.50	>50	0.30	1.75
H-Lf	2.75	>50	18.0	2.50
B-Lf-hydrolysate	0.12	0.70	0.40	0.40
H-Lf-hydrolysate	0.25	1.80	1.60	0.65

저해는 50 mg/ml 농도까지 균의 성장을 억제하지 못하였다. 그러나 lactoferrin 가수분해물의 *Staphylococcus aureus*에 대한 저해농도 측정 결과, 젖소 Lf 가수분해물이 0.7 mg/ml, 한우 Lf 가수분해물이 1.8 mg/ml로 젖소가 한우보다 2 배 이상 항균력이 높게 나타났다. *Salmonella typhimurium*에 대한 경우 Lf의 저해는 특히 젖소 Lf에서 MIC가 0.3 mg/ml으로 특이적인 저해능력을 보여 주었고, *Candida tropicalis*에서도 한우 Lf 보다 젖소 Lf의 저해 효과가 더 높았으며 가수분해물이 Lf 보다 항균력이 높은 것을 알 수 있었다.

실험에 사용한 모든 균주에서 젖소 Lf이 한우 Lf 보다 항균성이 높은 것을 알 수 있었으며 가수분해물 역시도 젖소 Lf 가수분해물이 한우 Lf 가수분해물 보다 항균성이 앞서는 것

으로 나타났다.

## 2. Lactoferrin의 항균활성에 대한 lysozyme 첨가효과

Lysozyme를 첨가했을 때 *E. coli* O111의 항균력에 미치는 효과를 Table 2에 나타내었다. Lysozyme은 모유 중에 약 0.39 mg/ml 정도 함유되어 있는데 그 자체로 항균성을 가지고 있다 (Gurr, 1981), Lf과 lysozyme을 각각 단독으로 처리하였을 때 *E. coli* O111에 대한 MIC는 젖소 Lf는 1.5 mg/ml, 한우 Lf는 2.75 mg/ml, lysozyme은 0.25 mg/ml로 나타났다. Lf과 lysozyme을 단독 첨가할 때 보다 항균력을 보이지 않는 농도의 수준에서 두 물질을 혼합 첨가했을 경우, 원래에는 나타나지 않았던 항균성을 나타내었으며

Table 2. Minimal inhibitory concentration of Hanwoo cow's and bovine lactoferrin with lysozyme on *E. coli* O111

Lysozyme (µg/ml)	Control	B-Lf(mg/ml)				K-Lf(mg/ml)			
		0.6	0.9	1.2	1.5	1.0	1.5	2.0	2.5
0	-	-	-	-	+	-	-	-	-
40	-	-	-	-	+	-	-	-	-
80	-	-	+	+	+	-	-	-	+
120	-	-	+	+	+	-	-	+	+
160	-	+	+	+	+	-	+	+	+
200	-	+	+	+	+	-	+	+	+

- : no antimicrobial effect.

+ : antimicrobial effect.

이것은 Ellison 등(1991)의 결과와 일치하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 lysozyme이 우유 중의 Lf과 함께 작용하여 항균효과를 상승시키는 것으로, 그 원인이 lysozyme에 의하여 변형된 세포벽에 Lf이 응집하기 때문이라는 보고가 있다(Suzuki, 1989). 한우 Lf과 젖소 Lf에 lysozyme을 첨가하여 비교 실험한 결과는 젖소 Lf에 lysozyme을 첨가한 것이 한우 Lf에 첨가한 것 보다 항균력을 더 증가시키는 것으로 나타났다.

### 3. TEM을 이용한 lactoferrin과 가수분해물이 세포에 미치는 영향

1% peptone 배지에 Lf은 5 mg/ml로 Lf 가수분

해물은 1 mg/ml의 농도로 *Candida tropicalis* KCTC7221를  $10^6$  cfu/ml 수준으로 접종하여 4시간 동안 37°C에서 배양한 후 세포의 형태에 어떤 변화를 주는지 Transmission electron microscopy (TEM)로 관찰하였다(Fig. 1).

무첨가 대조구는 그림에서 보는 것처럼 아무런 변화 없이 정상적인 상태를 유지하였다. 그러나 Lf과 Lf 가수분해물을 처리한 실험구의 경우에는 배양시간이 지남에 따라 세포벽과 세포질 막이 붕괴되고 세포내에 있는 cytoplasmic 물질들이 응집되어서 밖으로 확산되어 나오는 것을 보여주었는데 이것은 Bellamy 등(1993, 1994)의 실험에서 lactoferricin B를 yeast와 fungi에 처리했을 때, 본 실험의 결과와 비슷한 양상을 보여주었다. 하지만 각각의 Lf과 Lf 가수

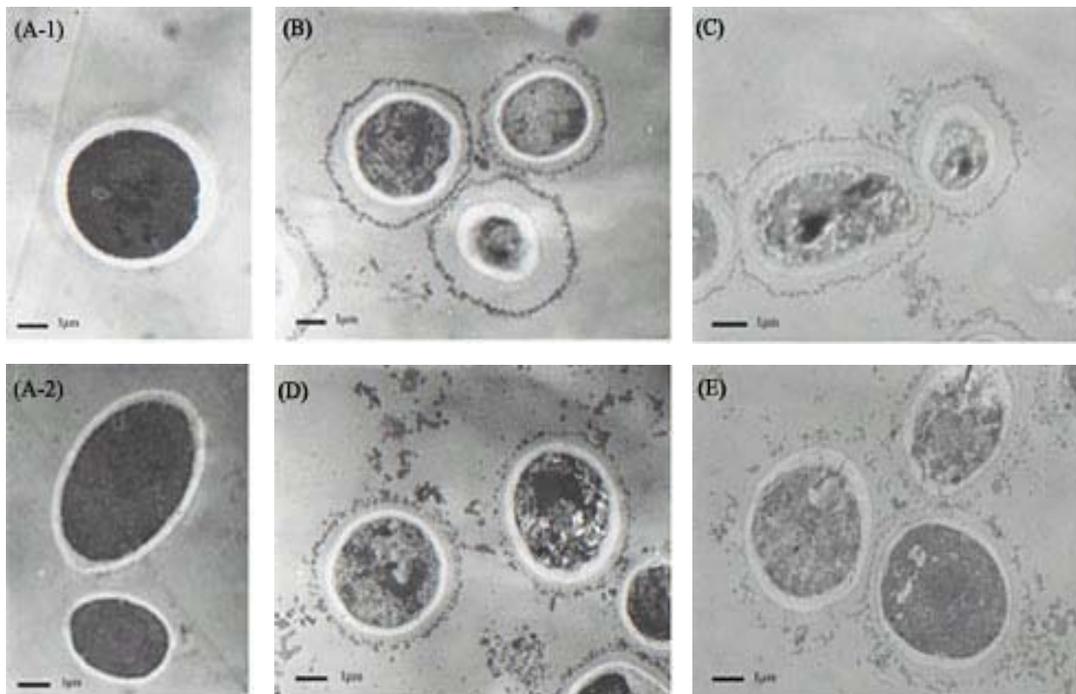


Fig. 1. Electron micrographs of *Candida tropicalis* showing morphological changes induced by lactoferrins and lactoferrin hydrolysates. Cells were cultured in 1% peptone broth at 37°C for 4 hrs. A; non treatment, B; 1% peptone broth supplemented with 5 mg/ml bovine lactoferrin, C; 1% peptone broth supplemented with 5 mg/ml Hanwoo cow's lactoferrin, D; 1% peptone broth supplemented with 1mg/ml peptic bovine lactoferrin hydrolysate, E; 1% peptone broth supplemented with 1mg/ml peptic Hanwoo cow's lactoferrin hydrolysate.

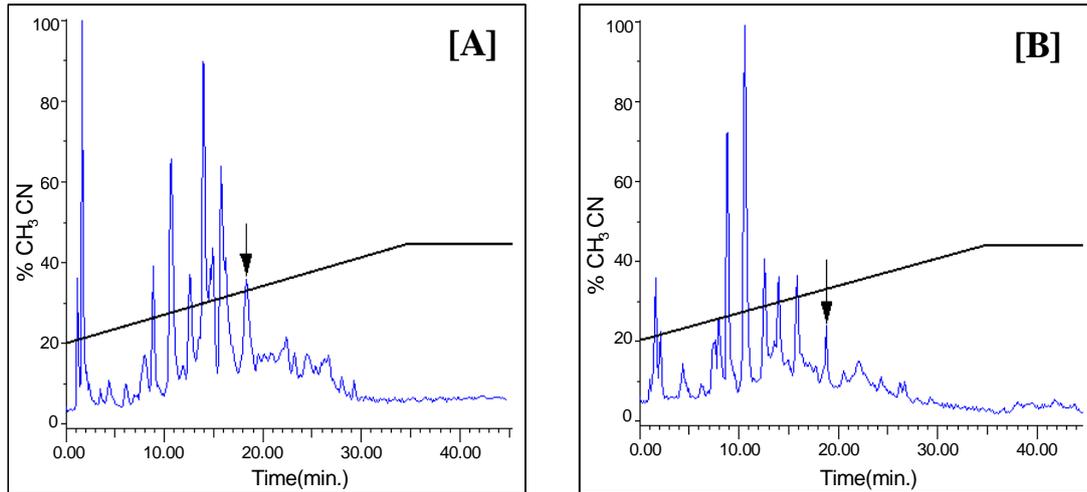


Fig. 2. Reverse-phase HPLC profile of the lactoferrin hydrolysates.  
 Arrow indicates the position of the active peptide recovered for sequence analysis.  
 [A]; Hanwoo lactoferrin hydrolysate, [B]; Bovine lactoferrin hydrolysate.

분해물의 처리에 따른 yeast의 형태 변화에서는 별다른 차이를 관찰 할 수 없었다.

#### 4. Lactoferrin 가수분해물로부터 항균성 peptide 분획

Lf 가수분해물로부터 항균성을 지닌 peak를 선별하기 위하여 가수분해물을 HPLC로 gradient한 후, 분리된 peptide 중 항균성을 지닌 peak를 찾아 Fig. 2에 표시하였다. 한우 Lf 가수분해물과 젓소 Lf 가수분해물의 항균성을 지닌 부분은 비슷한 retention time에서 용출되어 나오는 것을 확인할 수 있었으며 Tomita 등(1994)이 reverse phase column으로 분리한 lactoferricin B와 비슷한 gradient에서 용출되는 것으로 나타났다.

#### IV. 요약

본 연구는 우리나라 재래종인 한우로부터 초유를 얻어 Lf을 분리·정제한 후 한우 Lf와 젓소 Lf의 항균활성을 확인하였다. *E. coli* O111

및 기타 미생물에 대한 항균성은 젓소 Lf가 한우 Lf 보다 높았으며, 젓소 Lf 가수분해물도 한우 Lf 가수분해물보다 마찬가지로 높았다. MIC에서는 *E. coli* O111 경우 젓소 Lf가 1.5 mg/ml, 한우 Lf는 2.75 mg/ml이며 젓소 Lf 가수분해물은 0.12 mg/ml, 한우 Lf 가수분해물은 0.25 mg/ml로 항균성 실험과 동일하게 젓소 Lf 가수분해물의 항균활성이 더 높은 것으로 나타났다. 한편 Lf과 lysozyme의 첨가는 항균활성을 상승시키는 효과를 나타내었다.

#### V. 사 사

본 연구는 2001년 농림부 첨단기술개발사업과제(과제번호 : 0020439-100)의 지원에 의하여 이루어진 것이며 연구비 지원에 감사드립니다.

#### VI. 인용 문헌

1. Aisen, P. and Listowsky, I. 1980. Iron transport and storage proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 49:

- 357-393.
2. Arnold, R. R., Cole, M. F. and McGhee, J. R. 1977. A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science*. 197:263-265.
  3. Bellamy, W., Takase, M., Wakabayashi, H., Kawase, K. and Tomita, M. 1992. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J. Appl. Bacteriol.* 73:472-479.
  4. Bellamy, W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S. and Tomita, M. 1993. Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Med. Microbiol. Immunol.* 182:97-105.
  5. Bellamy, W., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Takase, M., Takakura, N., Shimamura, S. and M. Tomita. 1994. Antifungal properties of lactoferricin B, a peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Lett. Appl. Microbiol.* 18: 230-233.
  6. Brock, J. H. 1985. Part II: Metal proteins with non-redox roles: In *Metalloproteins*, P. Harrison (Ed.), Macmillan Press, London, U.K., p183-262.
  7. 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.
  8. Bullen, J. J. and Armstrong, J. A. 1979. The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leucocytes. *Immunology*. 36: 781-791.
  9. Chen, J. P. and Wang, C. H. 1991. Microfiltration affinity purification of lactoferrin and immunoglobulin G from cheese whey. *J. Food Sci.* 56:701-706.
  10. Dionysius, D. A., Herse, J. B. and Grieve, P. A. 1991. Extraction of lactoperoxidase and lactoferrin from whey using batch ion exchange techniques. *Aust. J. Dairy Technol.* 46(Nov): 72-76.
  11. Ellison, R. T. 3rd and Giehl, T. J. 1991. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin. Invest.* 88:1080-1091.
  12. Gurr, M. I. 1981. Review of the progress of dairy science: human and artificial milks for infant feeding. *J. Dairy Res.* 48:519-554.
  13. 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.
  14. 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.
  15. Nemet, K. and Simonovits, I. 1985. The biological role of lactoferrin. *Haematologia.* 18:3-12.
  16. 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. U.S.A.*, 83:1261-1265.
  17. Suzuki, T., Yamauchi, K., Kawase, K., Tomita, M., Kiyosawa, I. and Dkonogi, S. 1989. Collaborative bacteriostatic activity of bovine lactoferrin with lysozyme against *Escherichia coli* O111. *Agric. Biol. Chem.* 53:1705-1707.
  18. 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.* 74:4137-4142.
19. Tomita, M., Takase, M., Bellamy, W. and Shimamura, S. 1994. A review: the active peptide of lactoferrin. *Acta Paediatr. Jpn.* 36:585-591.
20. Van der Kraan M. I. A, Groenink, J., Nazmi, K., Veerman, E. C., Bolscher, J. G. and Nieuw Amerongen, A. V. 2004. Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides.* 25:177-183.
21. Woods, G. L. and Washington, J. A. 1995. Antibacterial susceptibility tests: Dilution and diffusion methods. : In *Manual of clinical microbiology.* P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (Ed.), 6th ed., ASM Press, Washington D. C., p1327-1341.
22. Yang, H. J., Son, D. H., Ha, W. K. and Lee, S. W. 2005. Biochemical properties of lactoferrins from Korean native cow and bovine colostrum. *Korean. J. Food Sci. Ani. Resour.* 25:98-102.
- (접수일자 : 2006. 5. 3. / 채택일자 : 2006. 7. 13.)