

GOVP1200101551

664.6
L 293 등

최 종
연구보고서

BSAG890M-2000087-4

한국 재래가축의 유즙으로부터
유용자원(락토페린)의
탐색 및 활용기술에 관한 연구

Research on lactoferrin from Korean native livestock
and development of its utilization technique

연구기관
생명공학연구소

부 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “한국 재래가축의 유즙으로부터 유용자원(락토페린)의 탐색 및 활용기술에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 12. 20.

주관연구기관명 : 생명공학연구소

총괄연구책임자 : 유대열

연 구 원 : 정준기, 남명수, 김유경, 하혜영, 윤희식, 임소용,
강정현, 유성란, 김대영

제1 위탁연구기관명 : 성균관대학교

위탁연구책임자 : 이수원(박기문)

제2 위탁연구기관명 : 충남대학교

위탁연구책임자 : 성창근(이석건)

제3 위탁연구기관명 : 충남대학교,

위탁연구책임자 : 김종우

여 백

요 약 문

I. 제 목

한국 재래가축의 유즙으로부터 유용자원(락토페린)의 탐색 및 활용기술에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

본 과제는 우리나라 재래가축의 유즙으로부터 유용자원인 락토페린을 분리 정제하고 기능을 밝히며 유전공학기법으로 대량생산하고 활용하는 기술을 개발 하는데 목적이 있다. 락토페린은 항균, 항암, 면역조절작용 등의 다양한 활성을 지닌 생리활성물질로서 식품첨가제, 천연항생제, 사료첨가제 등의 용도로 활용되고 있어 락토페린을 활용한 상업적 연구가 활발히 진행되고 있다. 지금까지 주로 치즈 부산물로부터 정제하여 활용하고 있는데 생산되는 락토페린의 양이 한정되어, 상업적 수요가 확대됨에 따라 락토페린의 대량생산 및 활용연구가 매우 중요하게 되었다. 한편 우리나라 재래가축의 락토페린을 확보한다는 것은 고유의 유전자원을 확보한다는 차원에서 매우 의의가 있다고 생각된다.

III. 연구개발 내용 및 범위.

1. 재래가축의 유즙으로부터 락토페린(락토페리신)의 분리 정제 및 생리기능 연구

- 한우 및 흑염소의 유즙으로부터 락토페린을 분리정제하고 이화학적특성을 조사한다.
- 분리정제한 한우 및 흑염소 락토페린(락토페린 가수분해물, lactoferricin)의 항균성을 검색한다.
- 한우 락토페린의 생리활성을 검색한다.

2. 재래 가축유래의 락토페린 유전자 클로닝 및 1차구조 결정

한우 및 흑염소의 락토페린 cDNA를 클로닝하고 그 염기 서열을 결정하며 조직내 발현을 확인한다.

3. 재조합 락토페린의 생산 연구

한우 및 흑염소 락토페린 유전자를 효모 및 곰팡이 발현벡터에 재조합한 후 이들을 효모 및 곰팡이에 transformation시켜 transformants를 얻고 발현을 분석함.

4. 락토페린의 활용 연구

- 생체실험을 통한 락토페린 및 락토페리신의 생리활성 검정
- 락토페린의 제품 (식품, 사료 등)에의 활용 기술 탐색

IV. 연구 개발 결과

1. 재래가축의 유즙으로부터 락토페린(락토페리신)의 분리 정제 및 생리기능 연구

① 흑염소

- 흑염소 유즙(초유)을 CM-Toyopearl 650 ion exchange 및 AF-Heparin Toyopearl 650 ion exchange방법으로 분리정제하고 SDS-page한 결과, 분자량이 보고된 소의 락토페린과 거의 같은 80kD임을 알았다.
- Circular dichroism(CD) spectra를 사용하여 정제된 흑염소 lactoferrin의 2차 구조 및 철포화도를 밝혔다. α - helix는 흑염소가 24.5%, β -structure는 36%, 그리고 β - turn은 13.5%, Unordered는 흑염소가 26% 이었다. Fe의 포화도는 흑염소가 30.6% 이었다
- E. coli0111에 대한 흑염소 락토페린의 항균활성을 검정한 결과, 흑염소 락토페린의 Minimal Inhibitory Concentration(MIC)는 5mg/ml, 락토페린 가수분해물의 MIC는 0.1mg/ml, 그리고 HPLC에 의해 분리정제한 펩타이드의 MIC는 30 μ g/ml이다.
- 흑염소 락토페리신 (lactoferricin-KNG)을 분리정제하여 아미노산 서열

을 결정 하였음(YQWQRMRKLGAPSIT).

- 흑염소 락토페린의 아미노산 서열을 변형시켜 만든 펩타이드와 비교하여 항균력에 영향을 미치는 아미노산의 서열을 밝혀냈다

② 한우

- 한우 유즙(초유)을 CM-Sephadex C-50 ion exchange 및 Heparin-agarose 컬럼에 의해 정제하였다.
- 정제한 한우 락토페린은 분자량이 81,000Da이며 철함량은 0.56mg/g 으로서 철포화도는 약 40.6%로 측정되었다. 등전점은 pI 9였으며 항원 항체 반응으로 확인 한 결과 한우락토페린(K-Lf)와 소락토페린(B-Lf)간에는 상관성을 보였으나 H-Lf와는 상관성을 보이지 않았다.
- *E. coli* 0111 및 기타 미생물에 대한 항균성은 소 락토페린(B-Lf)이 한우락토페린(K-Lf)보다 높았으며, B-Lf-h(가수분해물)도 K-Lf-h(가수분해물)보다 마찬가지로 높았다. MIC에서는 *E. coli* 0111 경우 B-Lf가 1.5mg/ml, K-Lf은 2.75mg/ml이며 B-Lf-h은 0.125mg/ml, K-Lf-h은 0.25mg/ml로 항균성 실험과 동일하게 B-Lf-h의 항균활성이 더 높은 것으로 나타났다. 한편 Lf과 lysozyme의 첨가는 항균활성을 상승시키는 효과를 나타내었다.
- K-Lf는 그 자체만으로도 K-Lf농도가 증가함에 따라 RAW264.7 cell을 자극하여 TNF- α 의 생성을 증가시키지만, LPS자극에 의한 TNF- α 생성에는 영향을 주지 못하였다.
- K-Lf는 그 자체만으로 TNF- α 에서 보여 준 것처럼 농도가 높아짐에 따라 NO 생성을 증가시키는 경향을 보여주었다.
- K-Lf-h의 경우 항균성에서는 Lf로 존재할 때보다 더 높게 나타나지만 세포 내에서 TNF- α 나 NO 생성작용에는 약간의 증가를 나타내지만 별다른 영향을 보이지 않았다.

2. 재래 가축유래의 락토페린 유전자 클로닝 및 1차구조 결정

① 흑염소

흑염소 퇴화기 유선조직으로부터 Total RNA를 분리하고 Le Provost 등이 1994년 보고한 염소 락토페린 유전자를 주형으로 4 개의 primer를 합성하고 RT-PCR을 수행하여 락토페린 cDNA를 2.4kb를 클로닝하고 염기서열을 결정하였다. 염기서열은 Genbank Data Library에 accession number U53857로 등록되어 있다.

② 한우

한우의 고환으로 부터 Total RNA를 분리 하고 BM 社의 Titan™ one tube RT-PCR kit 및 기존의 소 락토페린 cDNA 염기서열을 template로 하여 락토페린 cDNA를 클로닝하고 염기서열을 결정하였다.

3. 재조합 락토페린의 생산 연구

① 흑염소

- *Aspergillus niger* 발현벡터에 흑염소 락토페린 유전자를 cloning하여 재조합벡터, 3종(pSGT, pSNT, pSCT)을 개발하였음
- *A. niger*에 흑염소 락토페린 발현벡터 감염 (150 colonies)
- Southern blot 분석을 이용하여 흑염소 락토페린 유전자 확인 (9/150)
- Northern blot 분석을 이용하여 흑염소 락토페린의 발현 확인 (1/9)

② 한우

- *A. oryzae* 발현벡터에 한우 락토페린 유전자를 cloning하여 pBLF 재조합 벡터를 개발하였음
- *A. oryzae*에 한우 락토페린 발현벡터 감염 (30 colonies)
- PCR을 이용하여 흑염소, 한우 락토페린 유전자 확인 (흑염소 130/150, 한우 10/30)

4. 락토페린의 활용 연구

① 생체실험을 통한 락토페린 및 락토페리신의 생리활성 검정

- 2% 락토페린 처치한 랫트군이 대조 랫트군에 비해 유의성있게 사염화탄소

에 의해 유도된 간장의 급성 염증반응을 억제하는 것으로 확인되었다.

- 간암유발마우스에 락토페린을 처리해 보았으나 대조군에 비해 항암효과를 확인할 수 없었다.

② 락토페린의 제품 (식품, 사료 등)에의 활용 기술 탐색

- 생물공학적으로 생산된 KLFC 처리에 의한 계분중 *Salmonella typhimurium*의 커다란 감소는 KLFC이 축산용의 항균제로서 가치가 있음을 보여주고 있다.
- 락토페린이 함유된 김치 및 김치 미생물에 대한 항균성 검색결과 보존성에 유의성이 있음을 확인함

IV. 연구개발결과의 활용에 대한 건의

한우 및 흑염소의 락토페린 유전자를 클로닝하고 재조합단백질의 생산에 관한 연구를 하였으며, 유즙으로부터 락토페린 단백질을 분리정제하여 생리활성을 연구하였다. 또한 락토페린의 활용을 위해 사료, 식품, 의약품으로서의 활용 가능성을 확인하였다. 본 연구 결과는 벤처기업에서 관심을 갖고 있어 상품화를 위한 연구가 더 필요하다고 생각된다.

SUMMARY

The present study aims at identifying lactoferrin from milk of Korean native livestock, cow and black goat, in the level of molecule, and developing mass production system by genetic engineering. Application techniques have been studied to extend its usage. The results are as follows.

1. Purification of lactoferrin proteins from milk of Korean native cow and its characterization.

The molecular weight of the purified Korean native cow lactoferrin(K-Lf) was 81kDa, and the content of iron was 0.56mg/g indicating 40.6% of iron saturation. The isoelectric point was 9. Bovine lactoferrin(B-Lf) showed a higher antibacterial activity level than that of K-Lf. The Minimal Inhibitory concentration(MIC) of B-Lf was 1.5mg/ml and the MIC of B-Lf was 1.6mg/ml in *E. coli* 0111. The same result was also observed between B-Lf-h(hydrolysate)(0.125mg/ml) and K-Lf-h(0.25mg/ml) Even though K-Lf increased the production of TNF- α in RAW264.7 cells with dose-dependency, it didn't affect on the production of TNF- α in LPS-stimulated RAW264.7 cells. K-Lf induced the production of NO similar to its role on the TNF- α production. Despite K-Lf-h has higher level of antibacterial activity comparing to Lf, it seems that Lf-h didn't significantly affect the production of TNF- α and NO in RAW264.7 cells.

2. Purification of lactoferrin proteins from milk of Korean native goat and its characterization.

Lactoferrin, 80kD, was purified from colostrum of Korean native goat by CM-Toyopearl 650 ion exchange and AF-Heparin Toyopearl 650 ion exchange. α -helix was 24.5%, β -structure was 36%, β -turn was 13.5% and unordered

form was 26% in KN goat lactoferrin. MIC against E.Coli was 5mg/ml in KN goat lactoferrin, 0.1mg/ml in pepsin hydrolysate of KN goat lactoferrin and 30µg/ml in KN goat lactoferrin peptide derived by HPLC from pepsin hydrolysate. Lactoferricin amino acid sequence was identified as YQWQRMRKLGAPSIT.

3. Cloning of KN cow lactoferrin gene and development of mass production system in yeast.

Lactoferrin gene was cloned by RT PCR using KN cow testis RNA and primer set derived from already reported bovine lactoferrin cDNA as a template. Its sequence was very similar to bovine lactoferrin sequence reported already by showing 97% homology.

Its peptide sequence corresponding to lactoferricin region was ligated into pichia pastori expression vector pPIC9 and recombinant peptide was produced in yeast transformants by inducing with alcohol. Transformant SLK-6 was verified to show strong anti-microbial activity against various pathogenic microorganism.

4. Cloning of KN goat lactoferrin gene and development of mass production system in fungus.

Lactoferrin was cloned by RT-PCR using KN goat mammary gland RNA and primer set derived from the reported goat lactoferrin cDNA sequence as a template. The nucleotide sequence of the lactoferrin gene of KN goat was found to differ in 15 sites from that of the goat lactoferrin reported earlier. The antibacterial activity of KN goat lactoferrin was found to be greater than that of Sannen goat. Lactoferrin cDNA was ligated into Fungus expression vector containing α -amylase promoter and signal peptide sequence, and KN goat lactoferrin expressing transformants were obtained.

5. Application study of lactoferrin

Lactoferrin has exhibited various biological function. Anticancer activity of lactoferrin was tested in transgenic mice exhibiting hepatocellular carcinoma by feeding waters containing lactoferrin for 8 months. However, any significant results were not obtained in the experiment.

Rat liver treated with lactoferrin for 2 weeks exhibited significant anti-inflammation effect when injected by CCL4 compared to control rat liver. KN cow recombinant lactoferrin peptide addition was also significant in growth inhibit of *Salmonella typhimurium*.

CONTENTS

Abstract-----	iii
Summary-----	viii
Contents(English)-----	xi
1. Introduction-----	1
2. Purification of lactoferrin from Korean native livestock milk and study of its biological function-----	3
3. Lactoferrin gene cloning of Korean native livestock and determination of its primary sequence-----	15
4. Studies on production of recombinant lactoferrin----	23
5. Studies on application of lactoferrin-----	35
6. Reference-----	41

목 차

요 약 문	iii
영문목차	xi
목차	xii
1. 서론	1
2. 재래가축의 유즙으로부터 락토페린(락토페리신)의 분리 정제 및 생리기능 연구	3
3. 재래 가축유래의 락토페린 유전자 클로닝 및 1차구조 결정	15
4. 재조합 락토페린의 생산 연구	23
5. 락토페린의 활용연구	35
6. 참고문헌	41
7. 위탁과제 I	45
8. 위탁과제 II	151
9. 위탁과제 III	179

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적과 범위

젖은 창조주가 만든 “완전식품”으로 신생아의 성장과 발달에 필요한 모든 영양성분이 균형 있게 함유되어 있을 뿐만 아니라 신생아를 외래 병원체로부터 보호하는데 필요한 각종생리활성물질이 젖 중에 포함되어 있음이 최근 밝혀지고 있어 이 분야의 연구가 활발히 전개되고 있다. 젖 생리활성 물질 중 가장 활발히 연구되고 있는 것은 락토페린이다. 1939년 Carlsberg Brewery 생화학연구실 교수였던 Soren Peter Lauritz Sorensen과 그의 부인 Margarethe Sorensen은 인유중에 함유되어 있는 “붉은 단백질”을 락토페린이라고 처음 발표하였다 (Sorensen 등 1939). 락토페린은 락토틀란스페린이라고도 불리며, 젖, 침, 눈물, 정액과 같은 외분비물과 호중구의 secondary granules에서 분비되어 유해한 미생물 및 바이러스의 감염으로부터 숙주를 보호하는 생체방어물질로 알려지고 있다. 오늘날까지 사람, 소, 생쥐, 산양 등의 락토페린이 분리정제되어 그 구조와 각종 생리활성 기능이 밝혀지고 있어, 락토페린을 대량 생산하려는 연구가 세계적으로 진행되고 있다.

우리나라 재래가축인 한우와 흑염소는 오랜동안 한반도에서 계속 사육해온 가축으로 한반도의 기후 풍토에 잘 적응하여 왔다. 체구는 작지만 힘이 있고 온순하여 역용유로 활용되어 왔으나 육질이 좋아 요즈음은 육용유로 널리 활용되고 있다. 그만큼 고유한 유전자원이라고 생각된다. 락토페린은 현재 치즈 부산물로부터 추출하여 산업적으로 이용하고 있으나, 흑염소와 한우의 경우에 유즙이 워낙 소량이기 때문에 유전공학기법을 활용하여 대량생산하는 기술을 개발하여야 한다. 최근 생명공학 기술의 발달에 따라 종래 생체로부터 미량밖에 얻을 수 없었던 생리활성물질을 미생물을 숙주로 이용하여 대량 생산 가능하게 되었다. 따라서 생명공학 기술을 이용하여 락토페린을 대량 생산하여 활용하려는 연구가 선진 과학국에서 진행중에 있으며, 본 연구팀은 우리나라 고유 유전자원인 한우와 흑염소의 락토페린 유전자를 클로닝하고 미생물 발현 시스템을 개발하여 대량생산 및 활용기술을 개발하고자 하였다.

여 백

제 2 장 재래가축의 유즙으로부터 락토페린의 분리 정제 및 생리기능 연구

제1절 서 설

1. 한우 락토페린(Lf)

본 연구는 한우 초유로부터 Lf을 분리, 정제하여 한우 Lf의 화학적 특성, 항균활성, 그리고 macrophage를 이용한 TNF- α 분비 및 NO 생성, Lf이 암세포 증식에 미치는 영향과 cytokine 발현에 미치는 영향에 대해서 연구하였다.

2. 흑염소 락토페린

본 연구는 흑염소 초유로부터 Lf을 분리, 정제하여 흑염소 락토페린의 분자량, 구조, 그리고 항균활성을 연구하였다. 또한 펩신처리에 의한 흑염소 락토페린펩타이드를 분리정제하고 항균활성이 가장 높은 펩타이드의 아미노산서열을 결정하였으며 항균활성에 영향을 미치는 아미노산도 확인하였다.

제2절 한우 락토페린의 분리정제

1. Chromatography에 의한 한우 Lf의 분리·정제(위탁과제 I 참조)
2. HPLC를 이용한 lactoferin의 순도 측정(위탁과제 I 참조)

제3절 한우 락토페린의 이화학적 특성

1. 한우 Lf의 생화학적 특성(위탁과제 I 참조)

제4절 한우 락토페린의 항균활성

1. 항균활성(위탁과제 I 참조)

제5절 한우 락토페린의 생리활성

1. RAW264.7 cell을 이용한 macrophage 활성 측정(위탁과제 I 참조)
2. 암세포 증식에 미치는 영향(위탁과제 I 참조)
3. Lf이 Cytokine 발현에 미치는 영향(위탁과제 I 참조)
4. 동물실험 모델을 이용한 Lf의 항균활성(위탁과제 I 참조)

제6절 흑염소 락토페린의 분리정제

* 재료 및 방법은 논문(Nam MS 등, 1998)에 상세히 설명되어 있음

1. 흑염소의 유즙 대량 채취

충남 당진 소재 흑염소 목장에서 초유 5kg을 채취하였다. 락토페린은 흑염소의 초유에 소량(0.02~0.2mg/ml) 존재하며 흑염소가 계절번식을 하므로 초유 채취가 매우 힘들었다.

2. 흑염소 락토페린의 분리·정제

가. 흑염소 whey protein 제조

흑염소 초유 3ℓ를 모아서 원심분리(3,000 rpm, 20분)하여 지방을 제거한 다음 pH 4.6으로 조정하여 casein을 침전시키고 원심분리하여 Whey(유청)을 얻었다. 이 유청을 증류수로 투석시킨 다음 동결건조하여 whey protein을 약 50g 얻었다.

나. CM-Toyopearl 650 ion exchange

CM-Toyopearl 650 ion exchange resin을 column에 충전후 starting buffer인 0.005M sodium phosphate buffer(pH 6.0)로 평형화시키고 whey protein을 starting buffer로 녹여서 column에 흡착시켰다. Starting buffer로 column을 씻어준 다음 0.1M NaCl을 함유한 0.005M sodium phosphate buffer로 elution하고 0.3M NaCl을 함유한 0.005M sodium phosphate buffer로 elution하고 다시 0.5M NaCl을 함유한 0.005M sodium phosphate로 elution 한 다음 각각의 peak 부분을 전기영동하여 band를 확인한 결과 0.5M NaCl로 elution 하였을때 crude Lf가 용출되었음을 알 수 있었다.

다. AF-Heparin Toyopearl 650 ion exchange

이 Lf를 회수하여 다시 AF-Heparin Toyopearl column을 이용하여 0.1M NaCl, 0.3M NaCl, 0.5 M NaCl로 step elution를 하여 Goat Lf를 약 200mg 정제하였다.

라. SDS-PAGE에 의한 정제 확인

정제된 Lf를 SDS-PAGE로 확인한 결과는 다음과 같다. Fig. 1은 CM-Toyopearl 650 Chromatography의 profile로서 3개의 peak를 얻었다. 이중 0.5M NaCl로 용출하였을때 peak가 Lf를 함유한 peak로 전기영동한 결과는 Fig. 2와 같다. Fig. 3은 Fig. 1의 0.5M NaCl fraction(82~94번)을 AF-Heparin Toyopearl 650 Chromatography을 한 profile이고, Fig. 4는 AF-Heparin Toyopearl 650 Chromatography로 0.5M NaCl로 용출된 peak을 전기영동한 결과, 단일 band를 나타내었으므로 Lf가 정제되었음을 확인할 수 있었다. Fig. 5는 bovine lactoferrin 항체를 이용하여 Western blotting했을 때 sannen goat와 같은 위치에 흑염소 락토펜린이 검출되었고 bovine lactoferrin보다 약간 크기가 큰 것으로 확인되었다.

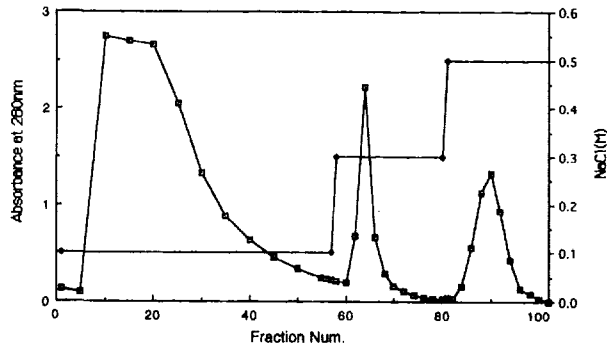


Fig. 1. Fractionation of Korean Native goat whey protein on CM-Toyopearl 650M chromatography. Whey protein dissolved in 0.005M sodium phosphate buffer(pH 6.0) was applied to the column. The column was washed with the same buffer and then eluted with a step gradient of NaCl as indicated. The flow rate was 20ml/hr and detection was performed by UV absorbance measurement at 280nm.

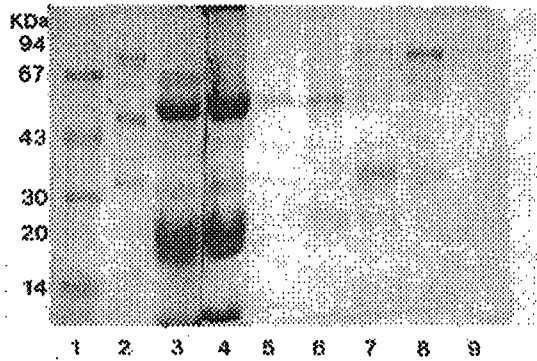


Fig. 2. Profiles of SDS-PAGE of fractions from CM-Toyopearl 650M chromatography. 1. MW Standard marker proteins ; 2. KN goat whey protein ; 3. Unbounded whey protein ; 4. Fraction No. 20 ; 5. Fraction No. 62 ; 6. Fraction No. 68 ; 7. Fraction No. 86 ; 8. Fraction No. 88 ; 9. Fraction No. 94.

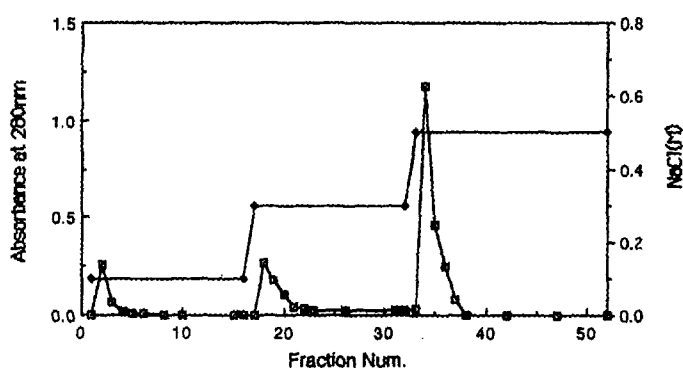


Fig. 3. Profile on AF-Heparin Toyopearl 650M chromatography of peak 3 fraction from CM-Toyopearl chromatography. Lactoferrin-enriched fractions dissolved against 0.005M sodium phosphate buffer(pH 6.0) was applied to the column. The column was washed with the same buffer and then eluted with a step gradient of NaCl as indicated. The flow rate was 20ml/hr and detection was performed by UV absorbance measurement at 280nm.

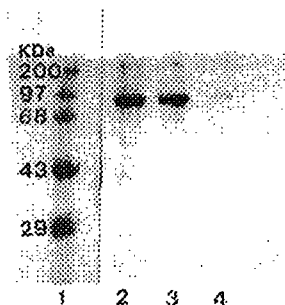


Fig. 4. Profiles of SDS-PAGE after AF-Heparin 650M chromatography. 1. MW Standard marker protein ; 2. Fraction No. 35 ; 3. Fraction No. 36 ; 4. Fraction No. 37 ; KNG LF ; Korean Native goat lactoferrin.

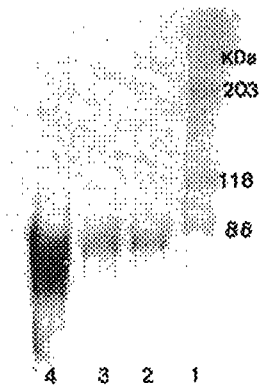


Fig. 5. Western blotting comparison of the KN goat lactoferrin, goat(Saanen) lactoferrin and bovine lactoferrin. KNG ; Korean Native goat. 1. MW Standard marker protein(pre-stained marker, Bio-Rad) ; 2. KN goat lactoferrin ; 3. Goat(Saanen) lactoferrin ; 4. Bovine lactoferrin.

제7절 흑염소 락토페린의 이화학적 특성

Circular dichroism(CD) spectra를 사용하여 정제된 흑염소 lactoferrin의 2차 구조 및 철포화도를 밝혔다. Fig. 6은 CD Spectra로 200-250nm에서 측정한 것으로, α -helix는 흑염소가 24.5%, Saanen이 15%로 흑염소가 높았고 β -structure는 흑염소가 36%, Saanen이 40%로 Saanen이 약간 높았다. 그리고 β -turn은 흑염소가 13.5%, Saanen이 12%로 비슷하였다. Unordered는 흑염소가 26%, Saanen이 33%로 Saanen이 높음을 알 수 있다. Fig. 7은 250-350nm에서 측정한 것으로 흑염소에 비해 Saanen이 방향족 아미노산 즉, Tyrosine, Phenylalanine이 많이 포함되어 있음을 알 수 있다. Fig. 8은 300-600에서 측정한 것으로 Fe의 포화도는 흑염소가 30.6%로 Saanen의 36%보다 다소 낮은 것으로 나타났다.

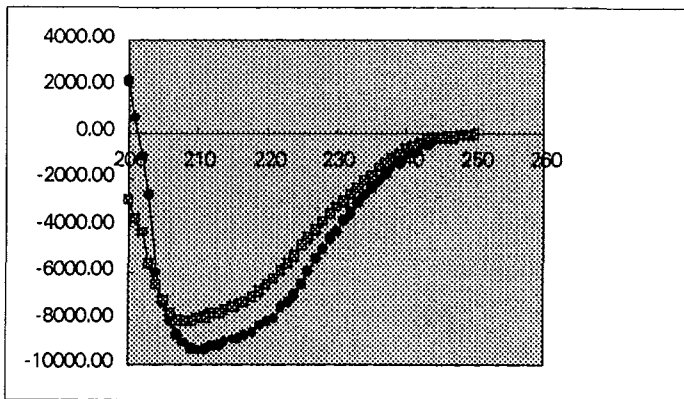


Fig. 6. CD Spectra로 200-250nm에서 측정한 것

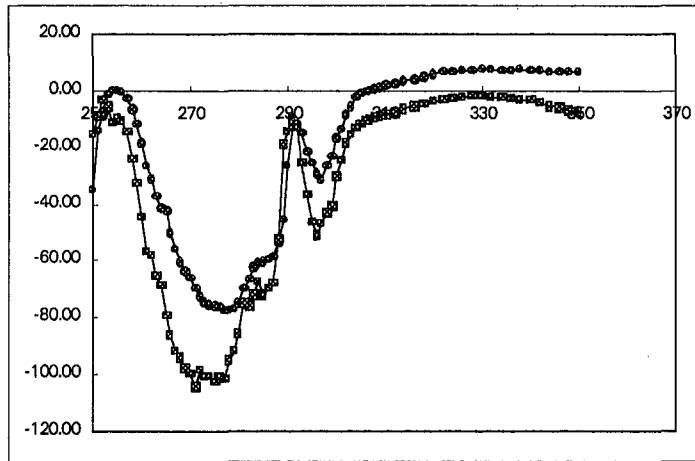


Fig. 7. CD Spectra로 250-350nm에서 측정한 것

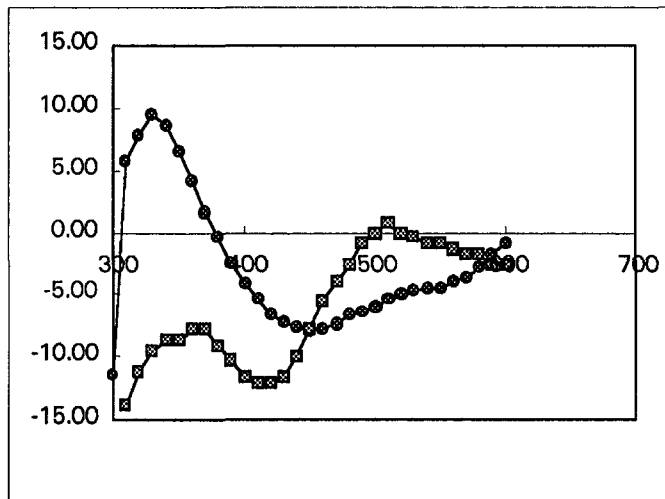


Fig. 8. CD Spectra로 300-600nm에서 측정한 것

제8절 흑염소 락토페린의 항균활성

1. 흑염소 락토페린 생물활성 검정

정제된 락토페린의 항균성을 *E. coli* 0111로 검정하였다. 항균성 검정방법은 Tomita 등(1991)의 방법에 준하였는데, 즉 1% bactopectone 0.25ml에 정제된 락토페린을 1~7.5mg/ml씩 첨가한 후 2×10^5 세포의 *E. coli* 0111을 접종하고 밤샘동안 37°C incubator 속에서 배양하고 대조구와 비교하여 *E. coli*의 농도를 검정하였다. 그 결과, 표 1과 같이 염소(Saenen)는 7.5mg/ml에서도 항균성이 검출되지 않았으나, 흑염소는 5mg/ml에서 항균성을 띠고 있었다.

표 1. *E. coli* 0111에서의 락토페린의 항균효과

락토페린	3.5	4	4.5	5	7.5(mg/ml)
염소(Saenen)	-	-	-	-	-
흑염소	-	-	-	+	+

+ : positive 항균효과

- : negative 항균효과

제9절 흑염소 락토페린펩타이드의 분리정제 및 항균활성

1. 흑염소 락토페린펩타이드의 분리정제

정제된 흑염소 락토페린을 0.1N HCl로 PH를 2.5 정도로 맞춰준 다음 3mg/ml의 pig pepsin을 첨가한 후 37°C에서 4시간 배양하고, 80°C에서 10분간 가열한 다음 1N NaOH로 PH를 중성으로 해주었다. 그 다음 원심분리시켜 현탁액을 얻어 Reverse-phase HPLC에 의해 fraction을 얻고, 각 fraction의 항균성을 *E. coli* 0111로 검색한 결과, 그림 9와 같은 결과를 얻었다.

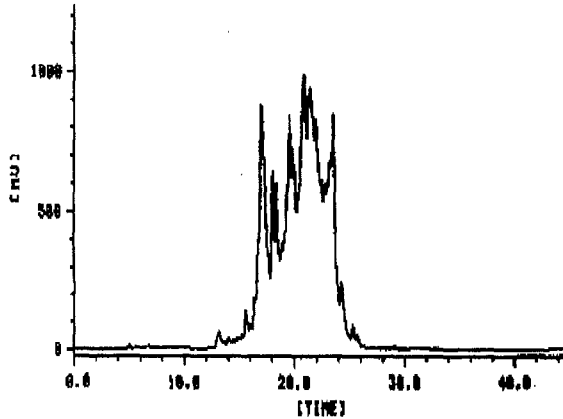


그림 9. 흑염소 락토페린의 펩신 가수분해물을 HPLC에 의해서 얻은 분획결과

상기에서 얻은 흑염소 락토페린 가수분해물의 항균성을 *E. coli* 0111로 검색한 결과, $280\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 MIC를 보여주었다.

2. 합성한 흑염소 락토페린 펩타이드의 항균활성

흑염소 락토페리신에 상당하는 펩타이드의 합성 및 항균활성 검색
 소의 락토페린을 펩신으로 가수분해시켜 얻은 peptide중에는 *E. coli* 0111을 비롯한 각종 병원균에 항균성이 매우 강한 peptide가 N말단 쪽에 위치하고 있음이 일본 모리나가 연구소에 의해 보고되어 있어, 흑염소락토페린 유전자의 염기서열과 비교해본 결과, 이 부분이 매우 유사하게 보존되어 있음이 관찰되어 이 부분의 아미노산 23mer를 고상합성 Fmoc법으로 합성하고 TSK gel ODS-prep을 이용한 역상 HPLC법으로 정제하여 *E. coli* 0111에 대한 항균성을 검색한 결과 다음과 같은 항균력을 관찰하였다.

합성한 peptide Sequence : CYQWQRMRKLGAPSITCIRRTS

분자량 : 2811.33

표 2. 흑염소 펩타이드의 항균력 측정 결과

	25 μ g/ml	30 μ g/ml	35 μ g/ml	40 μ g/ml	45 μ g/ml	50 μ g/ml
KNgLf peptide	-	-	+	+	+	-

+ : positive antibacterial activity

- : negative antibacterial activity

제3장 재래 가축유래의 락토펜린 유전자 클로닝 및 1차구조 결정

제1절 서 설

한우 및 흑염소와 같은 고유한 가축은 서양의 가축에 비해 여러 가지 특성이 있어 유전다양성이 보존되어 왔을 것으로 생각된다. 고로 이들 가축의 락토펜린 유전자를 클로닝하여 유전자원을 확보한다는 것은 매우 의미 있는 연구로 판단된다.

제2절 한우 락토펜린 유전자의 클로닝 및 염기 서열

1. 한우락토펜린 유전자의 클로닝 및 Sequencing(위탁과제 II 참조)

제3절 흑염소 락토펜린 유전자의 클로닝 및 염기서열

1. 흑염소의 락토펜린 cDNA의 클로닝 및 염기서열 결정

소 락토펜린 유전자는 소 유선발달단계 중 퇴화기의 유선에서 분리된 것이 발현이 제일 잘 되는 것으로 알려져 있다 (Schanbacher, F.L. et al., J Dairy Sci 76, 3812-3831, 1993). 따라서 본 발명의 흑염소 락토펜린 cDNA를 제조하기 위해, 흑염소 퇴화기 (involution)의 유선을 취하고, 염화칼슘법 (Chirgwin et al., Biochem., 18, 5294, 1979)으로 RNA 전체를 분리하였다.

1 μ g RNA을 75mM KCl, 1mM dithiothreitol, 3mM MgCl₂, 0.5mM each of dNTP, 100pM hexanucleotide primer (Promega), 10 U AMV reverse transcriptase (Promega)을 첨가한 50mM Tris, pH 8.3 30 μ l에서 42'C, 2시간 반응시켜 cDNA를 제조하였다.

cDNA 3 μ l를 1mM MgCl₂, 100pM 프라이머 1과 2 또는 프라이머 3과 4의 조합, 200 μ M each of dNTP, 2 U vent DNA polymerase (New England Biolabs)를 첨가

한 10mM Tris, pH 8.4과 혼합하고, 94°C에서 5분간 변성시킨 다음, 94°C 1분, 56°C 1분, 그리고 72°C 1분간씩 34회 반응시키고, 72°C에서 10분간 더 반응시키고 종지시켰다. PCR 반응액 10 μ l를 취하여 1% 아가로스 겔로 전기영동하여 정제하였다(Fig.10).



Fig 10. Amplification of lactoferrin gene fragments in mammary gland tissues, lanes : 1, pBR322/BstNI digest ; 2, negative control ; 3, 5' region of goat lactoferrin ; 4, 3' region of goat lactoferrin ; 5, pBR322/BstNI digest

primer는 염소 락토페린 유전자 (상기 le Provost et al.의 문헌)에 근거하여, 다음과 같이 제작하였다.

primer 1: 5'-GACCC CAGAC ATGAA GCTC-3' (64-83번)

primer 2: 5'-CCTCC GCGGT TTCCC TGAGG TT-3' (1118-1140번)

primer 3: 5'-AAACC GCGGA GGAGT TGAAG-3' (1128-1148번)

primer 4: 5'-AGGGA ATGAA AATCA ACAGC A-3' (2390-2411번)

PCR 반응으로 제조한 DNA 조각들을 dideoxy nucleotide chain termination

procedure (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463, 1977)과 Sequencing Version 2.0 DNA sequencing Kit (US Biochemical)을 이용하여 DNA 염기서열을 결정하였다(그림 11).

그림 11은 흑염소 락토페린 cDNA의 염기 및 아미노산 서열을 나타낸 것으로, 흑염소 락토페린염기서열 상부에 있는 것은 염소 락토페린 cDNA 염기서열중 흑염소의 것과 상이한 것을 표시한 것이고, 흑염소 락토페린 아미노산 서열 하부에 있는 것은 염소의 것으로 흑염소의 아미노산과 다른 것을 표시한 것이다. 흑염소의 염기서열과 아미노산서열을 기존에 보고된 염소(Saanen)의 염기서열 (Le Provost 등, 1994)과 비교해 볼 때 염기서열은 99% 정도의 유사성을 나타냈으며, 아미노산 서열은 98%의 수준에서 유사함이 확인되었다. 이는 6개의 아미노산이 변형된 결과가 나타났으며, 핵산염기는 15개가 다른 것으로 확인되었다 (표 3). 흑염소의 락토페린 유전자에 대한 염기서열은 Genbank Data Library에 accession number U53857로 등록되어 있다.

```

1      CCCCAGAC

9      ATG AAG CTC TTC GTC CCC GCC CTG CTG TCC CTT GGA GCC CTT GGA CTG TGT CTG
      Met Lys Leu Phe Val Pro Ala Leu Leu Ser Leu Gly Ala Leu Gly Leu Cys Leu

63     GCT GCC CCG AGG AAA AAC GTT CGA TCG GTG TGC ATC TCA CTG CCG GAG TGG TCC
      Ala Ala Pro Arg Lys Asn Val Arg Ser Val Cys Ile Ser Leu Pro Glu Trp Ser

117    AAA TGC TAC CAA TGG CAG AGG AGG ATG AGG AAG CTG GGT GCT CCC TCT ATC ACC
      Lys Cys Tyr Gln Trp Gln Arg Arg Met Arg Lys Leu Gly Ala Pro Ser Ile Thr

171    G G
      TGT ATA AGG AGG ACC TCT GCC TTG GAA TGT ATC CGG GCC ATC GCG GGA AAA AAT
      Cys Ile Arg Arg Thr Ser Ala Leu Glu Cys Ile Arg Ala Ile Ala Gly Lys Asn
      Val

225    G G
      GCG GAT GCT GTG ACC CTG GAT AGT GGC ATG GTG TTT GAG GCG GGC CTG GAC CCC
      Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp Ser Gly Met Val Phe Glu Ala Gly Leu Asp Pro
      Arg

279    TAC AAA CTG CCG CCA GTA GCG GCA GAG ATC TAT GGG ACA GAA AAA TCT CCC CAA
      Tyr Lys Leu Arg Pro Val Ala Ala Glu Ile Tyr Gly Thr Glu Lys Ser Pro Gln

333    A
      ACC CAC TAT TAT GCT GTG GCC GTC GTG AAG AAG GGC AGC AAC TTT CAG CTG GAC
      Thr His Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Gly Ser Asn Phe Gln Leu Asp
      Lys

387    T
      CAG CTG CAA GGC CAG AAG TCC TGC CAC ATG GGC CTT GGC AGG TCC GCT GGG TGG
      Gln Leu Gln Gly Gln Lys Ser Cys His Met Gly Leu Gly Arg Ser Ala Gly Trp

441    CC
      AAC ATC CCT GTG GGA ATC CTT CGC CCG TTC TTG AGC TGG ACA GAG TCG GCC GAG
      Asn Ile Pro Val Gly Ile Leu Arg Pro Phe Leu Ser Trp Thr Glu Ser Ala Glu
      Pro

495    CCC CTC CAG GGA GCT GTG GCT AGA TTC TTC TCT GCC AGC TGT GTT CCC TGC GTT
      Pro Leu Gln Gly Ala Val Ala Arg Phe Phe Ser Ala Ser Cys Val Pro Cys Val

549    GAT GGA AAA GCG TAC CCC AAC CTG TGT CAA CTG TGC AAG GGG GTG GGA GAG AAC
      Asp Gly Lys Ala Tyr Pro Asn Leu Cys Gln Leu Cys Lys Val Gly Glu Asn

603    AAG TGT GCC TGC TCC TCC CAG GAA CCA TAC TTT GGT TAT TCT GGT GCC TTC AAG
      Lys Cys Ala Cys Ser Ser Gln Glu Pro Tyr Phe Gly Tyr Ser Gly Ala Phe Lys

657    TGC CTG CAG GAC GGG GCT GGA GAC GTG GCT TTT GTC AAG GAG ACG ACA GTG TTT
      Cys Leu Gln Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys Glu Thr Thr Val Phe

```

711 GAG AAC TTG CCA GAG AAG GCT GAC AGG GAC CAG TAT GAG CTT CTC TGC CTA AAC
Glu Asn Leu Pro Glu Lys Ala Asp Arg Asp Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asn

765 AAC ACT CGG GCG CCA GTG GAT GCA TTC AAG GAG TGC CAC CTG GCC CAG GTC CCT
Asn Thr Arg Ala Pro Val Asp Ala Phe Lys Glu Cys His Leu Ala Gln Val Pro

819 TCT CAT GCT GTT GTG GCC CGC AGT GTG GAT GGC AAG GAG AAC TTG ATC TGG GAG
Ser His Ala Val Val Ala Arg Ser Val Asp Gly Lys Glu Asn Leu Ile Trp Glu

873 CTT CTC AGG AAG GCA CAG GAG AAG TTT GGA AAA AAC AAG TCT CAG AGC TTC CAG
Leu Leu Arg Lys Ala Gln Glu Lys Phe Gly Lys Asn Lys Ser Phe Gln
Arg

927 CTC TTT GGC TCT CCA GAA GGC CGG AGG GAC CTG CTA TTC AAA GAC TCT GCC CTT
Leu Phe Gly Ser Pro Glu Gly Arg Arg Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala Leu

981 GGG TTT GTG AGG ATC CCC TCA AAA GTA GAT TCG GCG CTG TAC CTG GGC TCC CGT
Gly Phe Val Arg Ile Pro Ser Lys Val Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Gly Ser Arg

1035 TAC TTG ACC GCC TTG AAG AAC CTC AGG GAA ACC GCG GAG GAG TTG AAG GCG CGG
Tyr Leu Thr Ala Leu Lys Asn Leu Arg Glu Thr Ala Glu Leu Lys Ala Ala

1089 TGC ACG CGG GTC GTG TGG TGC GCG GTG GGA CCC GAG GAG CAG AGT AAG TGC CAG
Cys Thr Arg Val Val Trp Cys Ala Val Gly Pro Glu Glu Gln Ser Lys Cys Gln

1143 CAG TGG AGC GAG CAG AGC GGC CAG AAC GTG ACC TGT GCC ACG GCC TCC ACC ACC
Gln Trp Ser Glu Gln Ser Gly Gln Asn Val Thr Cys Ala Thr Ala Ser Thr Thr

1197 GAC GAC TGC ATC GCC CTG GTG CTG AAA GGG GAA GCG GAC GCC CTG AGC TTG GAT
Asp Asp Cys Ile Ala Leu Val Leu Lys Gly Glu Ala Asp Ala Leu Ser Leu Asp
Gly

1251 GGA GGA TAT ATC TAC ACT GCC GGC AAG TGC GGC CTG GTG CCT GTC ATG GCA GAG
Gly Gly Tyr Ile Tyr Thr Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Met Ala Glu

1305 AAC CGG AAA TCC TCC AAA TAC AGT AGC CTA GAT TGT GTG CTG AGA CCA ACG GAA
Asn Arg Lys Ser Ser Lys Tyr Ser Ser Leu Asp Cys Val Leu Arg Pro Thr Glu

1359 GGG TAC CTT GCC GTG GCA GTT GTC AAG AAA GCA AAT GAG GGG CTC ACT TGG AAT
Gly Tyr Leu Ala Val Ala Val Val Lys Lys Ala Asn Glu Gly Leu Thr Trp Asn

1413 TCT CTG AAA GGC AAG AAG TCG TGC CAC ACC GCC GTG GAC AGG ACT GCA GGC TGG
Ser Leu Lys Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val Asp Arg Thr Ala Gly Trp

1467 AAC ATC CCC ATG GGC CTG ATC GCC AAC CAG ACA GGC TCC TGC GCA TTT GAT GAA
Asn Ile Pro Met Gly Leu Ile Ala Asn Gln Thr Gly Ser Cys Ala Phe Asp Glu

1521 TTC TTT AGT CAG AGC TGT GCC CCT GGG GCC GAC CCG AAA TCC AGC CTC TGT GCA
Phe Phe Ser Gln Ser Cys Ala Pro Gly Ala Asp Pro Lys Ser Ser Leu Cys Ala

1575 TTG TGT GCC GGC GAT GAC CAG GGC CTG GAC AAG TGT GTG CCC AAC TCT AAG GAG
Leu Cys Ala Gly Asp Asp Gln Gly Leu Asp Lys Cys Val Pro Asn Ser Lys Glu

1629 AAG TAC TAT GGC TAC ACC GGG GCT TTC AGG TGC CTG GCT GAG GAC GTT GGG GAC
Lys Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Asp Val Gly Asp

1683 GTT GCA TTT GTG AAA AAC GAC ACA GTC TGG GAG AAC ACG AAT GGA GAG AGC TCT
Val Ala Phe Val Lys Asn Asp Thr Val Trp Glu Asn Thr Asn Gly Glu Ser Ser

1737 GCA GAC TGG GCT AAG AAC TTG AAT CGC GAG GAC TTC AGG CTG CTC TGC CTC GAT
Ala Asp Trp Ala Lys Asn Leu Asn Arg Glu Asp Phe Arg Leu Leu Cys Leu Asp

1791 GGC ACC ACG AAG CCT GTG ACG GAG GCT CAG AGC TGC TAC CTG GCG GTG GCC CCG
Gly Thr Thr Lys Pro Val Thr Glu Ala Gln Ser Cys Tyr Leu Ala Val Ala Pro

1845 AAT CAC GCT GTG GTG TCT CGG AGC GAT AGG GCA GCG CAC GTG GAA CAG GTG CTG
Asn His Ala Val Val Ser Arg Ser Asp Arg Ala Ala His Val Glu Gln Val Leu

1899 CTC CAC CAG CAG GCT CTG TTC GGG AAA AAT GGA AAA AAC TGC CCG GAC CAG TTT
Leu His Gln Gln Ala Leu Phe Gly Lys Asn Gly Lys Asn Cys Pro Asp Gln Phe

1953 TGT TTG TTC AAA TCT GAA ACC AAA AAC CTT CTG TTC AAT GAC AAC ACT GAG TGT
Cys Leu Phe Lys Ser Glu Thr Lys Asn Leu Leu Phe Asn Asp Asn Thr Gly Cys

2107 CTG GCC AAA CTT GGA GGC AGA CCA ACG TAT GAA AAA TAT TTG GGG ACA GAG TAT
Leu Ala Lys Leu Gly Gly Arg Pro Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Thr Glu Tyr

2161 GTC ACG GCC ATT GCC AAC CTG AAA AAA TGC TCA ACC TCC CCG CTT CTG GAA GCC
Val Thr Ala Ile Ala Asn Leu Lys Lys Cys Ser Thr Ser Pro Leu Leu Glu Ala

2215 TGC GCC TTC CTG ACG AGG TAA AGC CTG CAA AGA AGC TAG CCT GCC TCC CCG GGC
Cys Ala Phe Leu Thr Arg *** ***

2269 CTC AGC TCC TCC CTG CTC TCA GCC CCA GTC TTC AGA GCG GAG GAC CCT TCC TCT
.
G G A

2323 CCC TTC CTG AAG TCG GAT TTT TGC CAA GCT CAT CAG TAT TCA CAA TTC CCT GCT
.

그림 11. 흑염소 락토페린 cDNA의 염기 및 아미노산 서열

흑염소 락토페린 cDNA 염기의 상단의 염기는 Le Provost의 결과중 흑염소의 것과 다른 것만 나타낸 것이고, 흑염소 락토페린 아미노산 sequence의 하단의 것은 Le Provost의 결과 중 흑염소의 것과 다른것만 나타낸 것이다.

표 3. 흑염소와 염소의 염기서열 및 아미노산 서열의 차이점

Nucleotide (Amino acid)		Goat (le Provost et. al. 1994)	KN goat (our results)
174;176	(56)	GTG(Val)	ATA(Ile)
271	(88)	CGG(Arg)	CTG(Leu)
378	(124)	AAG(Lys)	CAG(Gln)
398	(130)	GGT(Gly)	GGC(Gly)
468; 469	(154)	CCC(Pro)	TTC(Phe)
918	(304)	CGC(Arg)	AGC(Ser)
1249	(414)	GGT(Gly)	GAT(Asp)
1721	(571)	ACA(Thr)	ACG(Thr)
1919	(637)	TTT(Phe)	TTC(Phe)
2304		G	A
2312		G	A
2313		A	C
2395		T	A

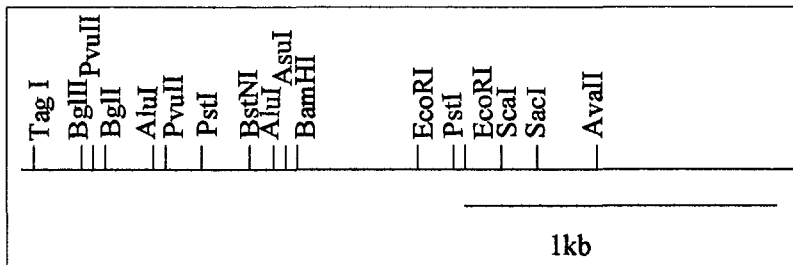


그림 12. 흑염소 락토페린 유전자의 제한효소 지도

제4절 흑염소 락토페린 유전자의 발현

흑염소의 유선발달시기에 따른 락토페린의 전사수준에서의 발현을 Northern blot 법에 의해 그림 14와 같이 확인하였다. 그결과, 락토페린은 유선의 퇴화기에 과발현되어 있음을 확인하였고, 다른 시기에는 매우 미약하게 발현되고 있음이 밝혀졌다.

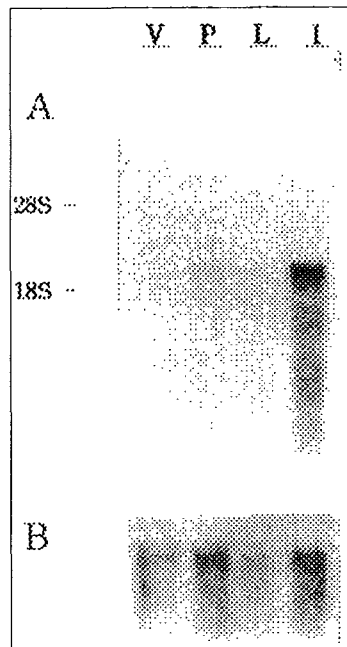


Fig 14. Northern blot hybridization of total RNA isolated from tissues of mammary gland. Total RNAs were transferred to a nylon membrane, and then hybridized with the ^{32}P labeled lactoferrin probe (A) and rehybridized with β -actin probe as the control for RNA loading (B). Lanes : V, virgin mammary gland; P, pregnancy mammary gland; L, lactation mammary gland; I, involution mammary gland

제 4 장 재조합 락토페린의 생산 연구

제1절 서 설

재래가축은 생산분비되는 유즙이 매우 적어(한우는 홀스타인의 수집분의 1정도이고 흑염소도 산양의 10분의 1이하) 유즙으로부터 락토페린을 분리정제하여 산업적으로 활용하기가 불가능하다. 따라서 락토페린 유전자를 재조합하여 락토페린을 생산하는 것이 바람직하다. 효모는 재조합단백질을 생산하기에 좋은 숙주이지만 모든 단백질이 잘 발현되어 생산되는 것이 아니다. 특히 효모가 생체방어 차원에서 proteinase를 많이 생산하기 때문에 생산되는 재조합단백질이 분해되는 경우가 많다. 따라서 세계적으로 보고된 바에 의하면 효모에 의한 락토페린의 생산은 매우 어려운 형편이었고, 생산되어도 매우 적은 양밖에 생산되지 않은 실정이었다. 곰팡이에 의한 락토페린생산은 이미 awamori에서 사람락토페린이 대량생산되고 있음이 보고되어 있으나, 다른 strain에서는 잘 발현되지 않은 것으로 보고되어 왔다.

본 연구에서는 한우 및 흑염소 락토페린을 효모 및 곰팡이에서 생산하는 기술을 개발하기 위해 노력하였다.

제2절 한우 락토페린 펩타이드의 효모에서의 발현 생산

1. 효모에서 한우락토페리신 발현 및 생산(위탁과제 II 참조)

제3절 흑염소 락토페린의 곰팡이에서의 발현 생산

1. 발현 벡터 재조합

곰팡이를 숙주로 하여 Korean native goat lactoferrin(KNgLF)을 발현시키기 위하여 발현 벡터를 재조합하였다. Promoter로 inducing promoter인 *Aspergillus oryze*의 α -amylase promoter를 사용하였고 signal sequence는 *A. oryze*의 α -amylase의 것을 증폭하여 사용하였으며 terminator는 glucose

oxidase를 증폭시켜서 pAGT를 재조합하였다. 또한 발현을 강화시키기 위하여 TATA box와 inverted repeat sequence가 포함되어 있는 promoter의 99bp로부터 327bp까지를 증폭시켜 만든 enhancer 1copy와 2copy를 pAGT의 promoter 중간에 각각 ligation하여 pAEGT17과 pAEGT16을 재조합하였다. 그리고 selection에 사용되는 벡터, pAN7-1을 발현 벡터와 함께 transformation하였다. 본 실험에 사용한 각각의 벡터를 Fig. 15에 도식화하였다.

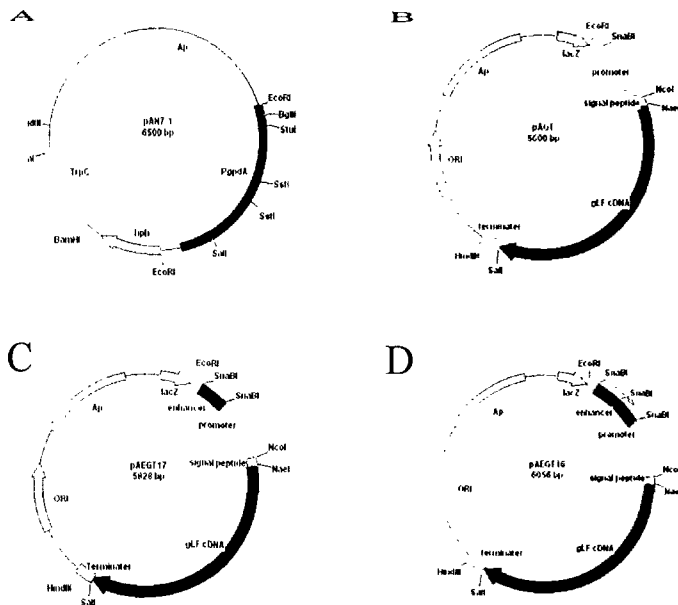


Fig. 15 Map of selection vector, pAN7-1 and expression vectors, pAGT, pAEGT17 and pAEGT 16

2. 미생물에 유전자 재조합된 transformant 선발

2-1. Protoplast 제조와 분리

본 실험에서 사용한 균주(NRRL3)는 Northern Regional Research Laboratories에서 분양받았다. CM-plate(2% glucose, 2% malt extract, 0.1% peptone, 1.5% agar)에서 증식한 *A. niger*의 포자를 10ml의 0.01% Tween 80으로 현탁시킨 후 500ml의 CD(Czapeck's dox) / 0.025%(W/V) casamino acid에 접종하여 30℃에서 150rpm으로 15-18시간동안 배양하였다. 배양 후 배양액을

Myra cloth filter로 filtering하여 균사체만 회수하였다. 그런 다음 200ml의 MP-buffer I(0.6M MgSO₄·7H₂O, 10mM potassium phosphate(pH5.8, 100mM KH₂PO₄, 100mM K₂HPO₄·3H₂O))으로 세척하고 균사체를 압축 건조시켜 무게를 측정하였다. 균사체 1g 당 5ml의 MP-buffer II(1.5M MgSO₄·7H₂O, 10mM potassium phosphate (pH5.8))를 넣고 현탁시켰다. 균사체 1g 당 20mg의 Novozyme과 15,000unit β-glucuronidase를 넣은 후 5 분 동안 얼음에서 배양하였다. 그런 후에 30℃에서 120rpm으로 2-3시간동안 배양하여 균사체의 외벽이 완전히 분해되게 하였다.

위에서 만들어진 반응액을 30ml cortexglass에 넣고 동량의 ST-buffer I(0.6M Sorbitol, 0.1M Tris.Cl, pH7.5)을 상층에 넣었다. 그리고 6,000rpm으로 원심분리하여 층 경계면의 흰 protoplast를 새 tube로 옮긴 후 10ml의 ST-buffer II(1M Sorbitol, 10mM Tris.Cl, pH7.5)를 첨가하여 다시 4,000rpm으로 원심분리하였다. 그리고 10ml의 STC-buffer (1M Sorbitol, 10mM Tris.Cl pH7.5, 50mM CaCl₂)로 세척한 후에 4,000rpm으로 원심분리하여 생긴 pellet에 STC-buffer를 첨가하여 protoplast의 농도를 1~5×10⁷개 protoplast /200μl STC buffer로 맞추었다.

2-2. Transformation

200μl의 protoplast에 selection vector, pAN7-1과 expression vector pAGT, pAEGT17, pAEGT16을 각각 10μg씩 넣고 5분 동안 실온에서 배양하였다. 50μl의 PTC-buffer(60% Polyethylenglycol 6,000, 10mM Tris.Cl(pH7.5), 50mM CaCl₂)를 첨가한 후 실온에서 배양하였고 20분 후 750μl의 PTC-buffer를 첨가한 후 20분 동안 실온에서 배양하였다. 그리고 microcentrifuge로 5분 동안 원심분리하였다. Pellet을 1ml의 STC-buffer로 세척한 후 200μl로 현탁하고 3ml의 top agar에 첨가하여 selection plate(CD-media + 1M sucrose + 100μg/ml Hygromycin B)에 배분하였다. 37℃에서 3-5일간 배양하여 얻어진 colony를 CM-hygromycin B plate에 3번 계대하였고 pAGT, pAEGT17, pAEGT16로부터 각각 28, 38, 42개의 colony를 얻었다.

2-3. Transformant 선발

2-3-1. Southern blot analysis

Transformation을 통하여 얻어진 colony의 포자를 50ml의 CD 액체배지에 접종하여 2일 동안 배양한 후에 곰팡이의 genomic DNA를 분리하였다. 배양액에서 균사체를 만을 모은 후 -70°C 에서 냉동시킨 다음 pre-cooling되어 있는 막자사발과 액체질소를 이용하여 균사체를 흰 분말이 될 때까지 갈았다. 이 분말을 Lysis buffer(0.5% SDS, 50mM EDTA)에 혼합하여 30분 동안 반응시킨 후에 동량의 phenol : chloroform : isoamylalcohol(25:24:1)을 첨가하여 단백질을 분리시켰다. 원심분리하여 깨끗한 상층액을 회수하고 ethanol로 침전시킨 후에 TE buffer로 pellet을 용해시킨 다음 RNase를 처리하여 RNA를 제거하였다. 분리된 genomic DNA는 Southern blot analysis에 사용하였다.

Transformation을 통하여 얻어진 106개의 colony를 Southern blot 하였다. PCR은 원하는 DNA가 한 copy만 존재하여도 증폭되어 detection되기 때문에 multicopy의 락토페린 유전자가 삽입되어 있는 균주를 찾기 위해서 Southern blot을 하였다. Southern blot은 DIG 방법으로 수행하였으며 probe를 합성하기 위하여 PCR DIG probe synthesis kit(BM社)를 이용하였다. Template로써 pAGT vector를 사용하였고 promoter의 510bp와 signal sequence 70bp를 포함하여 락토페린의 N-말단 100bp까지 약 680bp의 probe(Fig 16)를 합성하였다.

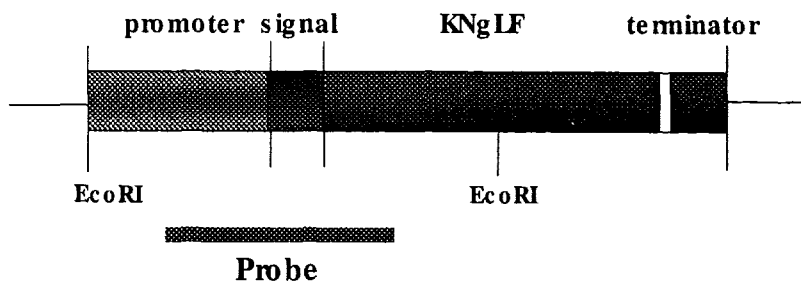


Fig. 16 Map of probe

곰팡이의 genomic DNA $40\mu\text{g}$ 을 제한효소 EcoRI으로 절단하였다. 1% agarose gel에 loading하여 80volt로 4시간동안 전기영동하고 ethidium bromide(EtBr)에 염색한 후 polaroid사진을 촬영하였다. Nitrocellulose membrane에 DNA를

transfer하기 위하여 gel을 0.5N NaOH, 1.5 M NaCl로 denaturation하였고 1M Tris·Cl(pH8), 1.5M NaCl로 neutralization하였다. 적당한 크기의 pyrex dish에 transfer buffer(10X SSC)를 붓고 3MM paper로 bridge를 만든 다음 gel을 올려놓고 gel과 같은 크기로 잘려진 membrane을 transfer buffer에 충분히 적셔 gel위에 올려 놓은 후에 기포가 생기지 않도록 하였다. 그 다음에 gel보다 1cm 가량 크게 자른 3MM paper를 buffer에 적셔 올려놓았다. 그 위에 paper towel을 쌓고 500g의 물건을 올려놓았다. 16-20시간 동안 capillary transfer방법으로 DNA를 membrane에 transfer한 후에 5X SSC로 washing하였다. 그런 다음 UV(254nm)로 2분 동안 cross-linking시켰다. Membrane은 42℃에서 2시간 동안 prehybridization (hybridization 용액 : 2% Blocking reagent, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.2% SDS, 50% formamide)하였고 여기에 boiling한 probe를 첨가하여 16시간동안 hybridization 하였다. 그런 후에 washing solution I(2X SSC, 0.1% SDS)과 II(0.5X SSC, 0.1% SDS)로 membrane을 washing하였다. Membrane은 washing buffer(3% Tween 20 in Maleic acid buffer: 100mM maleic acid, 150mM NaCl, pH 7)에 1분간 equilibration하였고 blocking solution(1% blocking reagent in maleic acid buffer)에서 1시간동안 blocking 하였다. 그 후에 membrane을 blocking buffer로 5,000배 희석한 anti-DIG-alkaline phosphatase에 1시간동안 처리한 후 washing buffer로 15분간 2회 washing하였다. Detection buffer(45 μ l NBT and 35 μ l X-phosphate solution in 10ml detection buffer. Detection buffer: 100mM Tris·Cl, 100mM NaCl pH9.5)에서 2분간 equilibration 한 후 color substrate용액으로 발색반응을 확인하였다.

Fig. 17은 probe가 각각의 vector에서 hybridization하여 생기는 band의 크기를 도식화한 것이다.

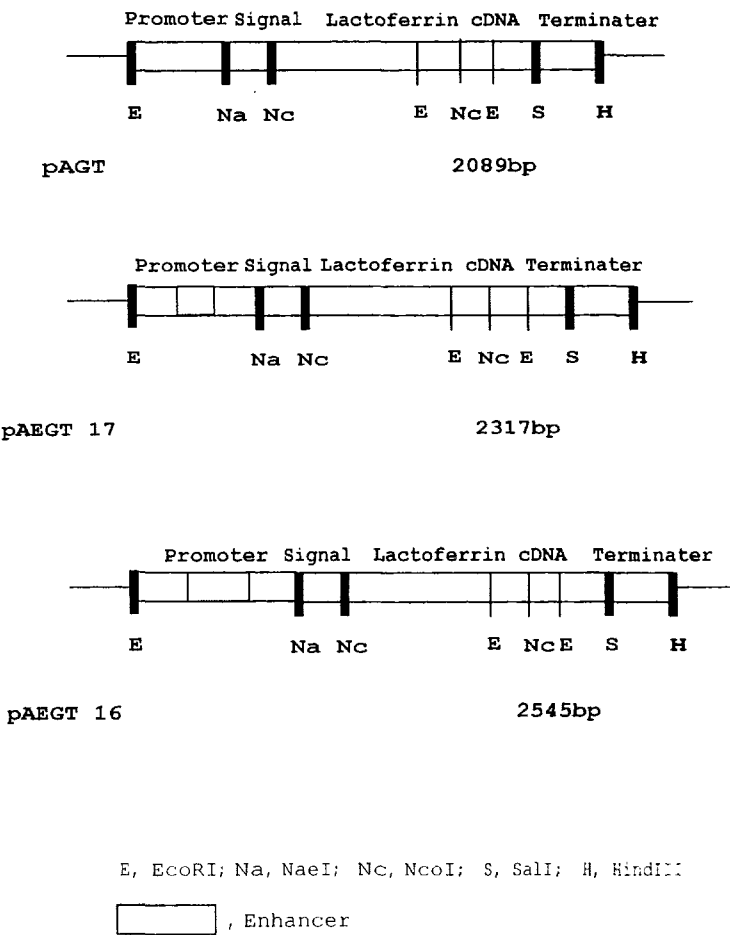


Fig. 17 Analysis of vectors for Southern blot

Southern blot analysis 결과에서 pAGT가 삽입된 clone은 10개, pAEGT17은 11개 pAEGT16은 14개인 것으로 분석되었고 이들은 정확하게 각각 2.1Kb, 2.3Kb, 2.5Kb에서 band를 나타내었다. Fig. 4는 Southern blot한 transformant중 일부이다. Positive 결과와 비교할 때 Fig. 18에서 panel A의 transformant 12-0와 47, panel B의 11과 20, 40, 47 그리고 panel C의 11과 15, 29, 30은 100copy이상의 락토페린 유전자가 삽입된 것으로 추측되었다.

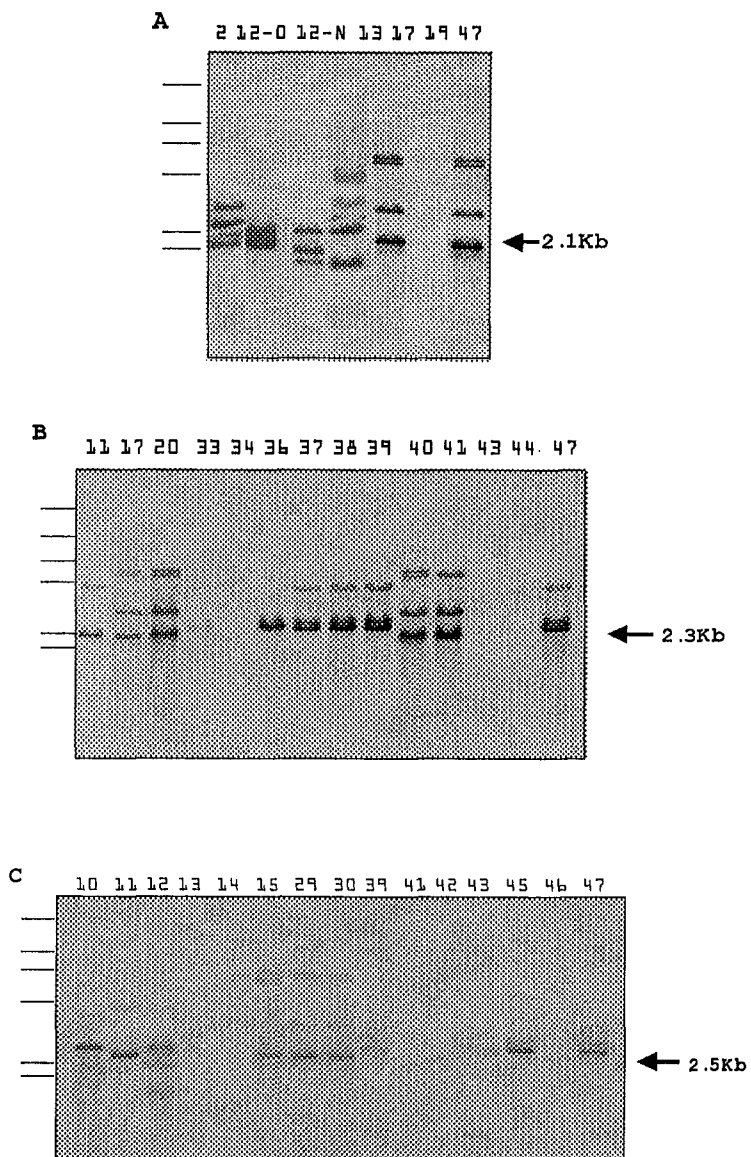


Fig. 18 Southern blot analysis of Transformants

Panel A, Transformants of pAGT; panel B, Transformants of pAEGT17
 panel C, Transformants of pAEGT16

(3) 재조합 미생물균주로부터 락토페린의 발현

Southern blot에서 분석된 clone을 transcription이 잘 되었는지 살펴보기 위하여 Northern blot analysis를 실시하였다. 먼저 RNA를 분리하기 위하여 CD(Czapek' dox) 배지에 포자 현탁액을 접종하고 37°C에서 2일간 배양한 후에 SY배지(5% starch, 2% yeast extract, 0.2% tryptone, 0.1% MgSO₄, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% KCl, 0.001% FeSO₄, 1.5% CaCO₃, pH 5.5)에서 24시간 배양하였다. 배양액에서 균사체를 거른 뒤 증류수로 배지의 성분을 씻어주고 물기가 없도록 종이 사이에 압착시켜 건조시켰다. 그런 다음 액체질소로 흰 분말이 될 때까지 분쇄시켜서 균사체 100mg당 Trizol(Gibco社) 1ml을 첨가하였다. 상온에서 5분간 반응시킨 후 Trizol 1ml당 0.2ml의 chloroform을 넣고 손으로 15초 동안 흔들어주었다. 이를 상온에서 3분간 반응시키고 12,000xg, 4°C에서 15분간 원심분리 하였으며 무색의 상등액을 회수하여 멸균된 새 tube로 옮겼다. 여기에 0.5ml의 isopropanol을 첨가하고 10분간 반응시켜 12,000xg, 4°C에서 10분간 원심분리 하였다. 흰 침전물에 75% 에탄올을 1ml 넣어 vortex한 후 7,500xg, 4°C에서 5분간 원심분리하여 생성된 pellet을 공기중에서 건조시켰다. 그리고 RNase가 없는 물을 첨가하여 RNA를 녹였다.

정제한 RNA 20µg는 DEPC-water로 전체부피가 3µl가 되도록 한 다음 3.3배의 sample buffer(65% formamide, 8.1% formaldehyde, 1.3X MOPS)를 첨가하였다. 65°C에서 5분 동안 배양한 다음 얼음에 방치한 후 0.7배의 loading dye를 혼합하여 1% agarose gel에 loading하였다. 80 volt로 4시간동안 전기영동한 후 EtBr에 염색하였고 Southern blot과 같은 방법으로 transfer하였다. Hybridization 용액은 5X SSC와 2% blocking solution, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.2% SDS, 50% formamide를 섞어서 사용하였다. Probe는 2.1kb의 LF cDNA를 ³²P-dCTP로 labeling하였고 42°C에서 16시간동안 hybridization한 다음 washing solution I(2x SSC, 0.1% SDS), II(1x SSC, 0.1% SDS)로 순차적으로 membrane을 washing하였으며 X-ray film에 노출시켜 24시간 후 발색하였다.

Northern blot 분석에는 total RNA를 사용하였으며 transformant pAGT12-0에서 락토페린의 mRNA가 형성됨을 볼 수 있었다. 또한 다른 발현 vector에서 유래한 clone, pAGT47, pAEGT17-11, pAEGT17-40에서도 약하지만 2.3kb에서 band를

확인하였다(Fig 19).

Northern blot analysis를 통해 여러 copy로 genomic DNA에 integration된 DNA가 mRNA로 transcription되었음을 추측할 수 있었다.

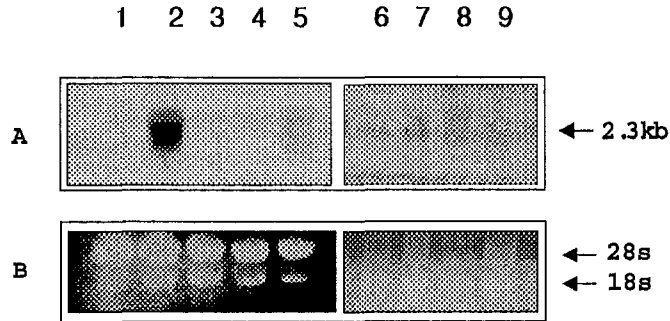


Fig. 19 Northern blot analysis of transformants

Panel A is Northern blot and panel B is total RNA.

1, NRRL3 (control); 2, pAGT12-0; 3, pAGT18; 4, pAGT19; 5, pAGT20; 6, pAGT-12-N; 7, pAGT47; 8, pAEGT17-11; 9, pAEGT17-40

제4절 흑염소 재조합 락토페린 대량생산 조건 연구

1. 미생물 배양에 있어서 발현최적화 조건 확립

Western blot의 결과를 바탕으로 락토페린이 발현되었는지를 다시 확인하기 위해 *E. coli* O111에 대한 항균력 test를 하였다. 50ml에 NRRL3, pAGT-12-0, pAGT-12-N, pAGT-47, pAEGT17-11, pAEGT17-40의 포자를 1×10^5 개/ml로 각각 접종하였다. 35°C에서 25시간동안 150rpm으로 배양한 후에 100ml의 SY배지에 다시 접종하여 30°C, 200rpm에서 7일간 배양하였다. 배양시 24시간마다 배양액을 1ml 회수하여 상등액만을 모은 후 pH의 변화와 *E. coli* O111에 대한 항균

력 test를 하였다. 항균력 test는 *E. coli* 0111의 survival rate(%)로 나타낼 수 있다. 1% peptone 100 μ l와 SY 배지 200 μ l에 1X10⁵개/ml의 *E. coli* 0111을 접종하여 20시간동안 증식한 *E. coli* 0111의 흡광도(595nm) 수치를 100%로 할 때 각 시간의 sample에 대한 흡광도 수치를 백분율로 환산하였다. Fig. 20에 서와 같이 90시간 이후의 pAGT-12-0, pAGT-12-N, pAGT-47, pAEGT17-11, pAEGT17-40에서는 *E. coli* 0111 survival rate가 60%이하로 급격히 감소하고 배양시간이 길어짐에 따라 140시간에는 *E. coli*의 survival rate가 10~20%로 감소함을 볼 수 있었다. pH가 4이하로 감소하면서 survival rate가 감소하였는데 이는 protein이 분비되는 시기가 pH 4이하로 떨어지는 시기, 즉 배양 후 약 90시간부터 락토페린이 발현, 분비된다는 것을 추측할 수 있다. 또한 배양 시간이 길어짐에 따라 축적된 항균물질 때문에 survival rate가 감소한 것으로 추측되었다.

이로써 SY배지에 최적 pH는 4, 30 $^{\circ}$ C, 200rpm에서 90시간이상 배양할 때 락토페린이 발현됨이 확인되었다.

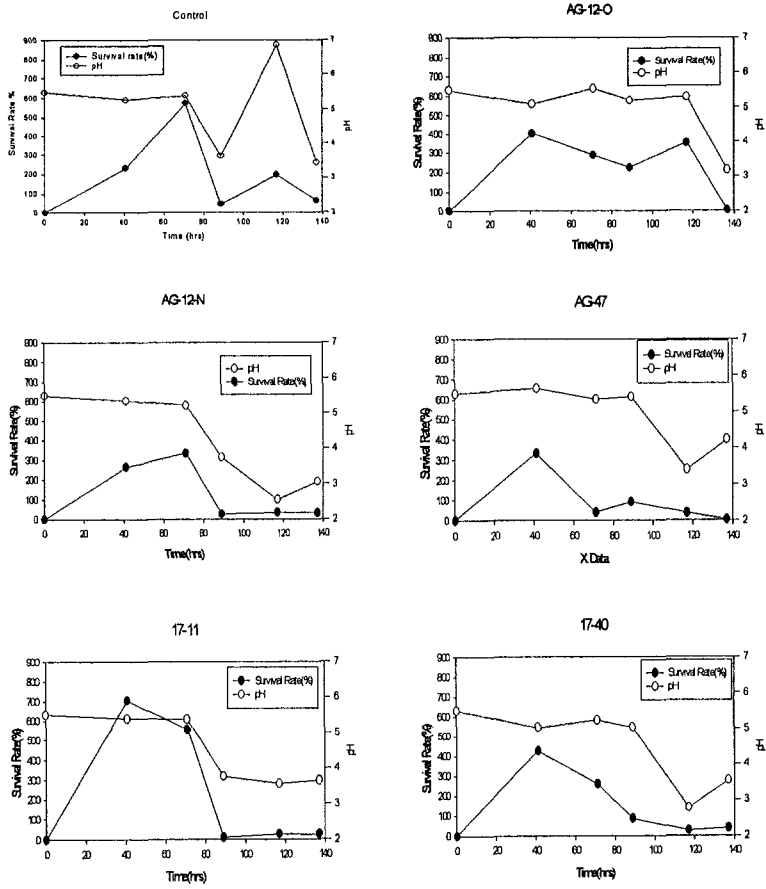


Fig. 20. Survival Rate of Transformants against *E. coli* 0111 and pH

여 백

제 5 장 락토페린의 활용 연구

제1절 서 설

오늘날 치즈부산물로부터 소락토페린을 정제하여 주로 조제분유의 첨가제로써 활용하고 있다. 최근 일본 모리나가 연구소는 소 락토페린이 참돔의 생체방어능력을 향상시킨 것으로 보고하여, 양식장에서 면역증강제 또는 항생보조제로써 활용될 수 있을 것으로 보인다. 또한 모리나가 연구소는 개와 고양이의 피부병 치료보조제(SK-1)를 개발하여 시판하고 있다.

락토페린은 다기능성 생리활성물질이므로 활용용도가 다양할 것으로 추측되므로 다음과 같은 연구를 실시하였다.

제2절 생체수준에서의 락토페린의 항암효과 연구

1. 실험목적 : 락토페린이 항암효과가 있다는 것은 1994년 미국 뉴욕대학의 Furumanski 팀이 solid tumor세포의 성장을 락토페린이 저해한다는 사실을 보고함으로서 처음 알려졌고, 또한 일본 국립암센터의 Tsuda 박사팀은 1997년 락토페린 및 락토페리신이 colon cancer세포의 성장을 저해한다는 결과를 보고함으로서 락토페린의 항암효과를 확인하게 되었다.

본 연구에서는 본 연구실에서 개발한 Hepatitis B virus 유전자 중 X단백질이 과발현됨으로서 간암이 생성되는 모델동물(HBx 마우스)을 개발하였는데 이 모델동물에 lactoferrin을 계속 투여함으로서 간암형성을 어느 정도 저해하는지 다음과 같이 조사해 보았다.

2. 실험방법 :

- 실험군 : HBx 마우스 (8주령) 락토페린 투여군 7군(각군당 3마리씩)
- 대조군 : HBx마우스 (8주령) 락토페린 비투여군 7군(각군당 3마리) 및 C57BL/6마우스 (8주령) 락토페린 비투여군
- 락토페린 투여 방법 : 실험군에는 bovine lactoferrin 2 g/liter(음용수)를 자유 급여하고 대조군에는 음용수를 자유급여함.

- 실험기간 : 3개월-8개월

3. 실험결과 : HBx마우스는 자연발생적으로 생후 6개월령이면 displastic nodule이 생성되고 1년이 지나면 85% 이상의 마우스가 간암을 발병한다. 고로 2개월령 마우스에 3-8개월 간, 락토페린을 투여해보면 락토페린이 간암발병을 억제하는지 아닌지를 확인할 수 있게 된다. 실험결과, 실험군과 대조군 간의 HBx 마우스에는 간암발병에 별로 차이가 없음이 확인되었다.

락토페린 섭취량이 적어서 그럴지도 모른다는 가정하에 락토페린의 함량을 10배 증가하고 4개월령 마우스를 사용하여 실험을 하여 보았으나, 결과는 전과 마찬가지로 종양발생억제 효과가 없음이 확인되었다. 즉, 3개월 후 생쥐들을 희생시켜 간 조직을 조사한 결과 대조군인 C57BL/6 생쥐의 경우, 락토페린투여여부에 관계없이 정상적이었다. HBx 형질전환생쥐의 경우 7개월령부터 nodule의 형성이 관찰되었으며 8개월령부터 일부 생쥐에서 종양이 직경 1 mm~4 mm 정도로 발생하는 것이 관찰되었으나 락토페린의 투여효과는 유의성있게 나타나지 않았다.

또한 6개월령에서 8개월령의 형질전환생쥐의 간에서 유발되는 염증의 경우에도 락토페린의 투여여부와 무관하게 모두 발생하는 양상을 보여 2%의 락토페린의 3개월간 자유급식에 의한 간염억제 혹은 종양발생억제 효과는 없는 것으로 추정된다.

제3절 생체수준에서의 락토페린의 항염효과 연구

1. 실험목적 : 사염화탄소 (CCl₄)에 의해 유도된 간장의 염증반응에 대한 락토페린의 간 보호 효과

2. 실험방법 :

1) 실험동물 : 생후 8주령의 웅성 Sprague-Dawley 랫드를 5 마리씩 4 군으로 나누어 실험에 사용하였다. 실험군 1군과 2군은 일반음수에 2% 락토페린을 첨가하여 2주간 자유급식하였고 대조군인 3군과 4군은 일반음수를 자유급식하였다.

각 랫드에 사염화탄소를 복강내에 1 ml/kg (1군과 3군) 혹은 0.5 ml/kg (2군과 4군)의 농도로 주사하고 24시간 후에 부검을 실시하였다.

2) 혈액생화학적 검사 : 실험 시작전, 14일, 15일에 후안와정맥총에서 채혈하여 혈청을 분리한 후 GOT, GPT, TG, AKP를 automatic chemical analyzer (Ciba-Corning, Express 550)을 이용하여 각각 검사하였다.

3) 병리조직학적 검사 : 부검을 실시하여 간의 무게를 측정된 후 병리조직학적 검사를 실시하기 위해 간장의 일부를 10% 중성포르말린에 고정하였다. 통상적인 조직처리과정을 거친 후 파라핀으로 포매를 실시하고 3~4 μ m 조직 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin 염색을 실시한 후 광학현미경으로 검사하였다. 사염화탄소에 의한 간장의 괴사 정도는 다음과 같은 방법으로 구분하였다. 간장의 괴사 정도가 0~25%일때 1로, 25~50%일 때 2로, 51~75%일때 3으로, 76~100%일때 4로 각각 구분하였다.

3. 결과

1) 체중의 변화 : 락토페린 투여군과 대조군의 체중은 사염화탄소 처리 전까지 지속적으로 증가하였고 사염화탄소 처리 후 약간의 감소를 보였다. 체중의 변화 측면에서 락토페린에 의한 유의적인 변화는 보이지 않았다.

2) 혈액생화학적 검사: 사염화탄소를 투여하여 24시간 후에 GOT는 처치군에서 440 ± 88 U/ℓ 이고 대조군에서는 $2,004 \pm 510$ U/ℓ 로 처치군이 대조군에 비해 유의성있게($0.01 < P$) 감소하였고, GPT는 처치군에서 196 ± 40 U/ℓ 이고 대조군에서는 $1,040 \pm 218$ U/ℓ 으로 처치군이 대조군에 비해 유의성있게($0.01 < P$) 감소하였다 (그림 21).

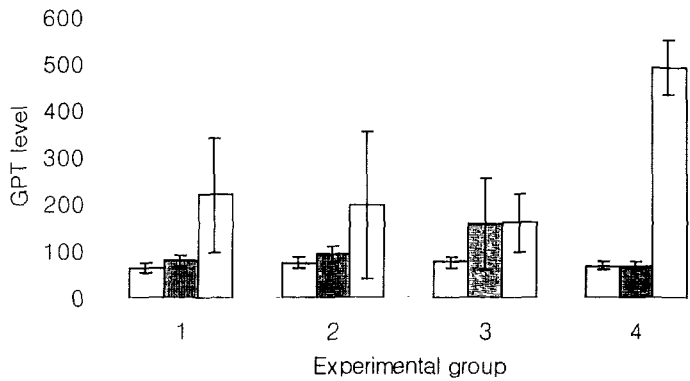


Figure 21. Serological assays of experimental rats. The levels of GOT and GPT raised very high after administration of 1 ml/kg CCL4 I.P. Note that the CCL4 effect was diminished in lactoferrin treated rats.

2) 병리조직학적 검사: 병리조직학적 검사결과 간장의 괴사정도는 처치군에서 2.60 ± 0.89 이고 대조군에서는 3.80 ± 0.45 로 처치군이 대조군에 비해 유의성 있게 ($0.05 < P$) 감소하였다.

4. 결론

이상의 혈액생화학적 검사 및 병리조직학적 검사 결과 2% 락토페린처리군이 대조군에 비해 유의성 있게 사염화탄소에 의해 유도된 간장의 급성 염증반응을 억제하는 것으로 확인되었다.

제4절 사료첨가제로서의 락토페린의 효과 연구

락토페린 투여에 따른 *Salmonella typhimurium* 균수변화
(위탁과제 II 참조)

제5절 식품보존제로서의 락토페린의 효과 연구

(위탁과제Ⅲ 참조)

여 백

참고문헌

1. Tomita M., Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kamase K. (1991) *Journal of Dairy Science* 74, 4137-4142.
2. Le Provost, F. LE., Nocart, M., Guerin, G., and Martin, P. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 203, 1324-1332.
3. Kakuta, I., Kurokura, H., Nakamura, H., and Yamauchi, K. (1996) *Suisanzoshoku*, 44, 197-202.
4. Masada, S., Yamane, Y., Shimoda, K., Shimoda, T., Nakaniwa, S., Uno, T., Hirose, T., Ishikawa, K., Kijima, M., and Yonezawa, H. (1995) *J. Anim. Clin. Res. Found.*, 3(2), 37-43
5. Fujihara, T., and Hayashi, K. (1995) *Arch. Virol.*, 140, 1469-1472.
6. T H Lee, K Shimazaki, S I Yu, M S Nam, S J Kim, K K Lee, D Y Yu(1997) Polymorphic sequence of korean native goat lactoferrin exhibiting greater antibacterial activity. *Animal Genetics*, 28, 367-369
7. Seyfert, H. M., Tuckoricz, A., Interthal, H., Koczan, D. and Hobom, G.(1994) *Gene*, 143, 265-269
8. Nam MS, Yu DY. Purification of Korean Native Goat Lactoferrin by using ion-exchange chromatography and affinity chromatography. *Korean J. Dairy S -ci.* 1998. 20(3) : 217-222
9. Nam MS, Yu DY, Shimazaki K. Comparison of antibacterial activities on Korean native goat, bovine, sheep and horse lactoferrin. *Korean J. Dairy S -ci.* 1998. 20(3) : 223-228
10. Nam MS, Shimazaki K, Kumura H, Lee KK, Yu DY. Characterization of Korean native goat lactoferrin. *Comparative Biochemistry and physiology part B* 1999 123, 201-208
11. Kimura M, Nam MS, Ohkouchi Y, Kumura H, Shimazaki K and Yu DY. Antimicrobial peptide of Korean native goat lactoferrin and identification of the part essential for this activity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2000, 268, 333-336

12. Sorenson, M. and S.P.L. Sorensen, C.R. Lab.(Carlsberg)(1939) [Ser Chim], 23 : 55-59.
13. Schanbacher, F.L., Goodman, R.E. and Talhouk, K.S. (1993) J.Dairy Sci., 76 : 3812-3831.
14. Sekine K, Watanabe E, Nakamura J, Takasuka N, Kim DJ, Asamoto M. et al. Jpn. J. Cancer Res. 1997, 88, 523-526
15. Bezault J, Bhimani, R, Wiprovnick J, Furmanski P. Cancer Res. 1994, 54, 2310-2312
16. Chirgwin et al. Biochem., 1979, 18, 5294
17. Sanger et al. PNAS USA, 1977, 74, 3463

위탁과제 I

한우 lactoferrin 및 가수분해 peptide의 생리활성
탐색 및 응용기술개발

위탁과제 II

한우 락토페린 유전자 클로닝 및 대량생산기술

위탁과제 III

락토페린 활용기술 탐색

여 백

위탁과제 I

한우lactoferrin 및 가수분해 peptide의 생리활성
탐색 및 응용기술개발

위탁연구기관 : 성균관대학교
생명공학부

위탁연구책임자 : 이 수 원

여 백

제 출 문

생명공학연구소장 귀하

본 보고서를 “한국 재래가축의 유즙으로부터 유용자원(락토페린)의 탐색 및 활용기술에 관한 연구” 과제의 위탁과제보고서로 제출합니다.

2000. 11. 30.

제1 위탁연구기관명 : 성균관대학교

위탁연구책임자 : 이수원 (박기문)

참여연구원 : 양희진, 유재우, 최윤혁, 이치희, 이승환

여 백

요 약 문

본 연구는 우리나라 재래종인 한우로부터 초유를 얻어 Lf을 분리·정제한 후 한우 Lf의 화학적 특성 및 항균활성, 그리고 macrophage를 이용한 TNF- α 분비 및 NO 생성을 확인하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. 한우 초유 1 liter에서 정제과정을 통하여 회수한 lactoferrin 량은 65mg로 회수율은 29.4% 였으며 정제도를 확인한 결과 순도가 높게 정제 되었음을 알 수 있었다.
2. 정제한 K-Lf은 분자량이 81,000Da이며 철함량은 0.56mg/g 으으로써 철 포화도는 약 40.6%로 측정되었다. 등전점은 pI 9였으며 항원 항체 반응으로 확인 한 결과 K-Lf와 B-Lf간에는 상관성을 보였으나 H-Lf와는 상관성을 보이지 않았다.
3. *E. coli* 0111및 기타 미생물에 대한 항균성은 B-Lf가 K-Lf보다 높았으며, B-Lf-h도 K-Lf-h보다 마찬가지로 높았다. MIC에서는 *E. coli* 0111 경우 B-Lf가 1.5mg/ml, K-Lf은 2.75mg/ml이며 B-Lf-h은 0.125mg/ml, K-Lf-h은 0.25mg/ml로 항균성 실험과 동일하게 B-Lf-h의 항균활성이 더 높은 것으로 나타났다. 한편 Lf과 lysozyme의 첨가는 항균활성을 상승시키는 효과를 나타내었다.
4. K-Lf는 그 자체만으로도 K-Lf농도가 증가함에 따라 RAW264.7 cell을 자극하여 TNF- α 의 생성을 증가시키지만, LPS자극에 의한 TNF- α 생성에는 영향을 주지 못하였다.
5. K-Lf는 그 자체만으로 TNF- α 에서 보여 준 것처럼 농도가 높아짐에 따라 NO 생성을 증가시키는 경향을 보여주었다.
6. K-Lf-h의 경우 항균성에서는 Lf로 존재할 때보다 더 높게 나타나지만 세포 내에서 TNF- α 나 NO 생성작용에는 약간의 증가를 나타내지만 별다른 영향을 보이지 않았다.

Summary

The purpose of this study is to demonstrate biochemical properties and antibacterial activity of the Lf obtained from the colostrum of Korean native cow by the process of isolation • purification and also verify the effect of K-Lf on the productions of TNF- α and NO in RAW264.7 cells by K-Lf. The results are as follows:

1. The amount of Lf collected from a liter of colostrum of Korean native cattle was 65mg and the recovery rate was 29.4%, showing relatively a high purity in K-Lf.
2. The molecular weight of the purified K-Lf was 81kDa, and the content of iron was 0.56mg/g indicating 40.6% of iron saturation. The isoelectric point was 9. In the immunodiffusion test and Western blotting, cross-reactivity was observed between K-Lf and B-Lf not between K-Lf and H-Lf.
3. In the measurement of antibacterial activity to *E. coli* 0111 and other microorganisms, B-Lf showed a higher antibacterial activity level than that of K-Lf. The MIC of B-Lf was 1.5mg/ml and the MIC of K-Lf was 1.6mg/ml in *E. coli* 0111. The same result was also observed between B-Lf-h(0.125mg/ml) and K-Lf-h(0.25mg/ml): the antibacterial activity of B-Lf-h was higher than that of K-Lf-h. In addition, mixture of Lf and lysozyme raised the antibacterial activity level higher as well.
4. Even though K-Lf increased the production of TNF- α in RAW264.7 cells with dose-dependency, it didn't affect on the production of TNF- α in LPS-stimulated RAW264.7 cells.
5. K-Lf induced the production of NO similar to its role on the TNF- α production.
6. Despite K-Lf-h has higher level of antibacterial activity comparing to Lf, it seems that Lf-h didn't significantly affect the production of TNF- α and NO in RAW264.7 cells.

목 차

I. 서론	53
II. 재료 및 방법	56
1. 공 시 재 료	56
2. Lactoferrin의 분리 및 정제	56
3. 한우 lactoferrin의 생화학적 특성	59
4. 한우 lactoferrin의 항균활성	66
5. RAW264.7 cell을 이용한 macrophage 활성 측정	69
6. Lf이 암세포 증식에 미치는 영향	71
7. Lf이 cytokine 발현에 미치는 영향	73
8. 동물실험 모델을 이용한 Lf의 항균활성	75
III. 결과 및 고찰	76
1. Chromatography에 의한 한우 Lf의 분리·정제	76
2. HPLC를 이용한 lactoferin의 순도 측정	82
3. 한우 Lf의 생화학적 특성	87
4. 항균활성	97
5. RAW264.7 cell을 이용한 macrophage 활성 측정	111
6. 암세포 증식에 미치는 영향	128
7. Lf이 Cytokine 발현에 미치는 영향	133
8. 동물실험 모델을 이용한 Lf의 항균활성	138

여 백

I. 서론

완전식품인 우유는 주요 영양소 외에도 다수의 생리활성 물질을 함유하고 있으며 immunoglobulin과 같은 여러 가지 특이적인 항균인자 뿐 아니라, lactoferrin(Lf) 및 lactoperoxidase, lysozyme, superoxide dismutase 등과 같은 비특이적인 항균인자 들도 함유하고 있다(Reiter 등, 1975). 이러한 단백질 중 Lf은 우유 내 여러 가지 생리적 기능을 가진 성분의 하나로 특히, 초유 중에 많이 함유 되어있고, 항균작용과 감염에 대한 방어작용에 중요한 역할을 하는 물질로 알려져 있다(Arnold 등, 1977; Oseas 등, 1981; Mansson 등, 1990).

Lf은 lactotransferrin이라고도 불리워지며(Montreuil과 Mullet, 1960), transferrin family 단백질 중의 한 종류로(Aisen과 Listowsky, 1980; Brock, 1985 ; Rose 등, 1986) 젖 및 침, 눈물 등에 들어 있으며, 유선, mucous에서 분비되고 neutrophil의 secondary granules에서도 분비된다. Lf은 1960년 Groves에 의해 우유에서 처음으로 분리되어졌고, 같은 해에 Johansson과 Montreuil 등에 의해 각각 인유에서 분리되었으며 다른 포유동물의 젖으로부터 분리가 이루어졌다.

Human-Lf(H-Lf)은 glycoprotein으로 2개의 glycan chain이 결합된 691개의 아미노산으로 구성되어 있고(Metz-Boutigue 등, 1984), Pierce 등 (1991)에 의하여 Bovine Lf(B-Lf)의 peptide를 구성하는 689개의 아미노산 서열이 규명되었다. 이러한 아미노산 서열에 따라 B-Lf의 분자량을 계산하면 약 76KDa이며, 당 사슬까지 포함하여 약 83KDa이다(島崎 등, 1993). 이 당단백질은 2개의 lobe로 구성되어 있으며, 각각의 lobe에 1분자씩 2개의 Fe^{3+} 결합 부위를 가지고 있다.

Lf의 기능이 완전히 밝혀지지는 않았지만 일반적으로 영유아가 포유할 때 철에 의존적인 미생물 성장을 억제시키며, 이것은 coliform enterobacteria와 같이 높은 철함량을 요구하는 대부분의 박테리아에 필요한 free iron을 chelating하기 때문이다(Arnold 등, 1977; Bullen, 1981; Nemet와 Simonovits, 1985). 또한, Lf은 그람 음성균의 외막에 손상을 주어 lipopolysaccharide(LPS) 방출시키며, 항생물질 침입과 정상

적인 장관흡수 능력을 방해하는 것으로 알려져 있다(Ellison 등, 1988; Nikaido, 1989).

Lf은 미생물 감염에 대한 방어작용(Arnold 등, 1977) 외에도 유아 장내에서의 철분흡수 촉진작용(Nemet와 Simonovits, 1985), myelopoiesis의 조절작용(Broxemeyer 등, 1980), 염증반응의 조절작용(Oseas 등, 1981; Mansson 등, 1990), lymphocytes의 성장촉진작용(Hashizume 등, 1983)과 macrophage 및 glanulocyte, neutrophil, leukocyte의 조절작용(Ambruso와 Johnston, 1981; Bullen와 Amstrong, 1979) 등 다양한 생리활성작용에 관여하고 있다. Lf은 또한 성숙백혈구의 항빈혈인자 전구세포(hemopoietic progenitor cell)의 증식 및 분열을 조절하는 complex regulatory network을 지닌 성분이다(Malmquist 등, 1978).

근래에는 macrophage를 Lf로 자극했을 때, tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 interleukin-8(IL-8), nitric oxide(NO) 등이 분비되고(Sorimachi 등, 1997), *in vivo*에서 Lf이 TNF- α 와 interleukin-6의 방출을 조절하는 등 cytokine의 조절작용에 관한 연구가 많이 행하여지고 있다(Machnicki 등, 1993). TNF- α 는 LPS나 phorbol-12-myristate-13-acetate의 자극에 의해 macrophage 또는 monocyte로부터 분비되는 대표적인 proinflammatory cytokine으로서(Manogue 등, 1992) 생성된 종양세포의 괴사와 apoptosis 등을 유도하는 antitumor 물질로 알려져 있었으나, 최근에는 많은 질환들에서 TNF- α 의 병리적 역할이 증명되면서 알러지나 염증반응의 주요 매개물질로 이해되고 있다(Vileek와 Lee, 1991). TNF- α 의 대표적인 병리작용은 천식이나 아토피성 피부염 등과 같은 알러지성 염증질환(Beutler, 1992)에서부터 그람음성균의 내독소에 의해 야기되는 패혈증이나 immunological liver injury 등(Tiegs 등, 1989)과 같은 급성질환들, 전신 홍반성 낭창, 장기 이식 및 류마티스성 관절염(Firestein, 1994) 등과 같은 autoimmune disease에서 확인되고 있다. 또한 최근에는 TNF- α 가 HIV(human immunodeficiency virus)의 DNA 복제를 촉진시키고, 암세포 전이시 필수적인 혈관신생에도 관여하는 것으로 보고되고 있다(Sekut와 Connolly, 1996). 그리고 활성화된 대식세포에서 분비하는 것으로 알려진 NO는 암세포의 미토콘드리아 호흡과 병원성 균류를 억제함으로써 숙주방어에서 중요한 역할을 하며(Nathan, 1992) 또한 혈관 내에서 NO는

acetylcholine과 다른 물질들이 평활근을 이완시켜 혈관 팽창을 유도하고(Ignarro, 1990; Moncada와 Higgs, 1991), 혈소판의 응집을 방지함으로써 혈액의 응고를 방지하는 역할을 하는 것으로 알려져 이들 cytokine에 대한 관심이 증가되고 있다(Furchgott와 Vanhoutte, 1989).

그리고 Lf에 관한 연구와 더불어 Lf를 효소로 가수분해한 lactoferrin hydrolysate(Lf-h)에 대한 연구도 많이 이루어지고 있는데 Tomita 등(1991) 과 Bellamy 등(1992)은 pepsin으로 가수분해한 B-Lf의 N-terminal의 17~41번의 25개의 amino acid 잔기로 이루어진 분자량 3,126Da의 항균성 domain인 lactoferricin(Lfcin)을 발견하였다. B-Lf의 대장균에 대한 최소저해농도(MIC)가 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인데 비하여 Lfcin은 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로서 약 300배 강한 항균작용을 나타내었으며, H-Lf에서 분리한 Lfcin보다 16배 강한 항균력을 갖는다고 보고하였다. 이러한 Lfcin에 관한 연구는 단백질 분자 내에서 실제로 항균작용을 나타내는 활성부위의 구조를 밝힐 수 있는 계기를 마련했다는 점에서 크게 주목되었다.

현재 Lf은 이러한 생물학적 특성들을 바탕으로 하여 인공 영양의 모유화를 위한 첨가 성분으로 조제분유 등에 첨가되고 있으며 기타 철분 보강, 방부효과를 지닌 식품첨가제, 동물 사료 첨가제, 염증예방, 세포의 성장 촉진제 등으로 국내에서도 점차 실용화 하고있는 단계이다. 그러나 지금 국내에서는 높은 가격임에도 불구하고 Lf의 전량을 수입에 의존하고 있는 실정이며 앞서 말한 Lf와 Lf-h의 기능들에 관한 연구도 주로 외국에서 Holstein과 같은 외래의 유종종의 Lf를 대상으로 대부분 이루어졌다. 국내에서는 이에 관련된 연구도 부족하며 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(이 등, 1998)로 볼 때 젖소와 한우의 Lf 간에도 차이가 있을 것으로 생각되어진다.

본 연구는 한우 초유로부터 Lf을 분리, 정제하여 한우 Lf의 화학적 특성, 항균활성, 그리고 macrophage를 이용한 TNF- α 분비 및 NO 생성, Lf이 암세포 증식에 미치는 영향과 cytokine 발현에 미치는 영향에 대해서 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공 시 재 료

한우 Lf을 분리·정제를 하기 위한 시료는 강원도 대관령 소재 축산기술 연구소 고랭지 시험장에서 분만 후 2~3일 내의 초유를 채취하여 실험에 사용하였다. Bovine lactoferrin과 human lactoferrin은 Sigma Co.에서 구입하여 실험에 사용하였으며 그 중 bovine lactoferrin은 초유로부터 분리·정제된 것을 구입하여 사용하였다.

2. Lactoferrin의 분리 및 정제

한우 초유를 4℃에서 5,000×g로 30분간 원심분리하여 탈지유를 회수하였고, 회수한 탈지유를 20℃에서 1N HCl용액으로 pH 4.6으로 조정하여 casein을 침전시킨 후, 5,000×g로 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하여 whey를 분리하였다. 분리된 whey는 1N NaOH용액을 사용하여 pH 8.0으로 중화시킨 후 다시 5,000×g로 20분간 원심분리하여 상등액을 취해 정제용 시료로 사용하였다.

2.1. Batch extraction(정제 1단계)

Dionysius 등(1991)과 진 등(1994)의 방법을 변형하여, whey 1 liter을 50mM Na-phosphate buffer(pH 8.0)로 미리 평형화시킨 CM-Sephadex C-50(Sigma, Co.) 200ml에 혼합하고, 실온에서 1시간 동안 교반한 다음 1시간 동안 정치시켜 상등액을 제거하였다. 여기에서 회수된 slurry를 aspirator와 연결된 funnel로 옮기고, buffer을 제거한 다음, 0.2M NaCl을 함유한 동일 buffer 200ml를 사용하여 slurry를 세척하였다. 세척한 slurry는 column(φ3cm×30cm)에 충전한 후 0.5M NaCl을 함유한 동일 buffer 400ml를 30ml/hr의 유속으로 흘려주면서 용출하고 10ml씩 분획하여 UV monitor system(Econo system: Bio-rad, USA)을 사용하여 280nm에서 각 분획의 흡광도를 측정하였다. 각 분획은 4℃ cold room에서 ultrafiltration system(Amicon, USA)를 사용하여 탈염한 후 동결건조하였다.

2.2. Ion exchange chromatography(정제 2단계)

정제 1단계에서 얻은 crude Lf fraction을 50mM Na-phosphate buffer(pH 8.0)에 녹여, 동일한 buffer로 평형화된 CM-sephadex C-50 수지로 충전된 column(ϕ 3cm \times 30cm) 상단에 흡착시켰다. gradient는 stepwise gradient로서 1단계는 0.1M NaCl을 함유한 50mM Na-phosphate buffer(pH 8.0) 250ml, 2단계는 0.3M NaCl을 함유한 동일 buffer 250ml, 3단계는 0.5M NaCl을 함유한 동일 buffer 250ml를 30ml/hr의 유속으로 흘려주면서 10ml/tube의 양으로 분획하였으며, 이 과정은 4 $^{\circ}$ C에서 UV monitor system을 사용하여 280nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 분획은 4 $^{\circ}$ C cold room에서 ultrafiltration 장치를 사용하여 탈염한 후 동결건조 하였다.

2.3. Gel filtration chromatography(정제 3단계)

정제 2단계에서 얻은 crude Lf를 50mM Na-phosphate buffer(pH 8.0)에 녹여, Sephadex G-150(Pharmacia, Sweden) 수지가 충전된 column(ϕ 2.5cm \times 40cm)에 loading 시키고, 50mM Na-phosphate buffer(pH 8.0) 1 liter를 30ml/hr의 유속으로 흘려주면서 10ml/tube의 양으로 분획하였다. 이 과정 또한 4 $^{\circ}$ C에서 UV monitor system을 사용하여 280nm에서 흡광도를 측정하였고 각 분획은 cold room에서 ultrafiltration 장치를 사용하여 탈염하고 동결건조 하였다.

2.4. Heparin agarose affinity chromatography(정제 4단계)

Chen 등(1991)의 방법을 변형하여 affinity chromatography를 실시하였다. Heparin-agarose를 binding buffer(5mM Tris-HCl containing 50mM NaCl, pH 8.0)로 평형화시킨 후 column(ϕ 3cm \times 20cm)에 충전하고, 정제 3단계에서 얻은 Lf를 binding buffer에 용해하여 loading하였다. Washing buffer(5mM Tris-HCl, containing 0.2M NaCl, pH 8.0)로 평형화시킨 다음 0.2M~0.7M NaCl 농도구배법을 적용하여 30ml/hr 속도로 용출시키면서 10ml씩 분획하였다. 흡광도 측정은 UV monitor를 사용하여 280nm에서 측정하였고, 각 분획은 cold room에서 ultrafiltration 장치를 사용하여 탈염한 후 동결건조 하였다.

2.5. 단계별 정제도 확인

1) Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

각 단계별 정제과정에서 용출된 각 분획과 Lactoferrin의 정제도와 분자량을 확인하고자 Laemmli (1970)의 방법을 응용하여, Mini-Protein II(Bio-rad, USA)로 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 실시하였다.

SDS-PAGE는 0.1% SDS를 함유한 10% acrylamide gel로 0.025M Tris, 0.192M glycine를 함유한 electrode buffer(pH 8.3)을 사용하여 well당 constant current 4mA로 전기영동을 하였고, 전기영동을 마친 gel은 0.25% coomassie blue R-250을 함유하는 methanol:acetic acid:water(3:1:6, v/v/v)의 staining solution으로 상온에서 1시간 염색시키고 acetic acid:methanol:water(1:3:6)의 destaining solution으로 탈색시켰다.

2) High performance liquid chromatography에 의한 순도측정

정제된 Lf의 순도를 측정하기 위하여 각각의 정제 단계별로 얻은 Lf를 HPLC(SP8800, Spectra-Physics, USA)를 사용하여 reverse phase column chromatography 하였고 기기의 분석조건은 Table 2와 같다.

2.6. Lactoferrin 가수분해물 제조

Lf-hydrolysate 제조는 Tomita 등(1991)의 방법에 따라 정제된 Lf을 5%(w/v)의 농도가 되도록 3차 증류수에 녹인 다음, 용액의 pH를 2.5로 조절하였다. 여기에 10mM HCl에 용해된 pepsin 용액을 Lf의 3%(w/w)가 되도록 첨가한 후 37°C shaking water bath에서 4시간 동안 가수분해하였다. 가수분해가 끝난 시료를 80°C water bath에서 15분간 가열하여 효소를 불활성화 시킨 후 pH를 7.0으로 조절하여 15,000×g 에서 30분간 원심분리하여 상등액을 동결건조하여 실험의 재료로 사용하였다.

3. 한우 lactoferrin의 생화학적 특성

3.1. 한우 lactoferrin의 아미노산 조성 분석

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

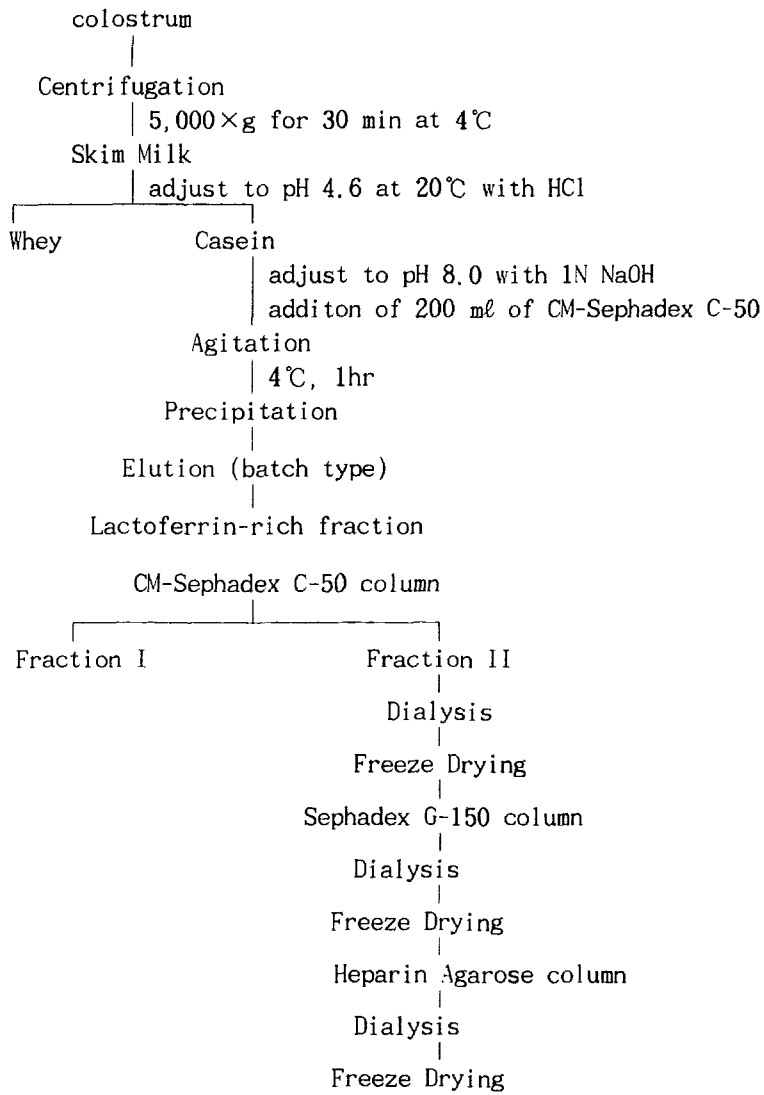


Fig. 1. Schematic diagram of purification lactoferrin

Table 1. Gel preparation for SDS-PAGE

Stock solution	10% gel
deionized water	5.9ml
30% acrylamide solution	5.0ml
1.5M Tris (pH 8.8)	3.8ml
10% SDS	0.15ml
10% ammonium persulfate	0.15ml
TEMED	0.006ml

Table 2. Operation condition of HPLC

Column	Symmetry(C ₁₈ reverse, Waters)
Detector	UV 280nm
Flow rate	1.00 ml/min
Mobile phase	(A) 0.1% TFA/H ₂ O (B) 0.1% TFA/CH ₃ CN
Gradient	0 min A : B (80 : 20) 35 min A : B (55 : 45)

Table 3. Gel preparation for isoelectric focusing

Stock solution	5% gel
deionized water	7.87ml
30% acrylamide mix	2.2ml
ampholytes(3.5/10)	0.72ml
glycerol	1.2ml
10% ammonium persulfate	0.05ml
TEMED	0.023ml

3.2. 등전점 측정(isoelectric focusing)

정제된 Lf의 등전점을 측정하기 위하여 Robertson 등(1987)의 방법으로 등전점 전기영동을 실시하였다. 5%의 acrylamide gel (3.3%, pH 3.5~10.0)을 제조하여 Mini-Protein II(Bio-rad)을 사용하여 IEF-PAGE를 하였다. cathode buffer는 20mM NaOH를 anode buffer는 10mM phosphoric acid를 사용하였으며 current voltage로 200V에서 1시간 30분, 400V에서 1시간 30분을 전개시킨 후 10%의 trichloroacetic acid 에서 20분간 고정시켰다. 그런 후 1% trichloroacetic acid에서 2시간 동안 정치시킨 후 SDS-PAGE에서 사용한 것과 같이 염색과 탈색을 하였다.

3.3. 철분 함량 측정

정제된 Lf에 함유되어 있는 철 함량을 serum iron analysis kit (Wako Pure Chemical Industries, Japan)를 사용하여 측정하였다. 환원제(L-ascorbic acid) 15mg에 buffer(tween80을 포함한 0.18M Acetic acid, pH 5.0) 2ml를 넣고 잘 혼합하여 완전히 용해시켰다. 여기에 1% Lf용액 0.5ml를 넣고 즉시 혼합하여 증류수를 blank로 535nm에서 흡광도(E_{SBI})를 측정한 다음 발색시약 (bathopenanthroline sulfonic acid disodium salt, 19mM/liter) 한 방울을 떨어뜨리고 잘 혼합하여 535nm에서 흡광도(E_S)를 측정하였다. 철 표준액(Fe : 200g/dl)의 흡광도(E_{STD})와 증류수의 흡광도(E_{BI})도 같은 방법으로 측정하였으며 각각 측정된 흡광도로 Lf 용액 중의 철분 함량을 계산하는 방법은 다음과 같다.

$$\text{철 함량}(\mu\text{g}/\text{dl}) = \frac{E_S - E_{SBI} - E_{BI}}{E_{STD} - E_{BI}} \times 200$$

3.4. Circular dichroism 측정

Circular dichroism(CD) 측정은 Shimazaki 등(1993)의 방법을 변형하여 PS 150J power supply를 장착한 JASCO J-715 automatic recording spectro-polarimeter(日本分光工業, Japan)를 이용하였다. 측정하는 cell은 1 mm의 것을 사용하였으며, 시료 단백질은 증류수에 150 $\mu\text{g}/900\mu\text{l}$ 이 되도록 용해하여 200~250nm에서 CD를 측정하였다.

3.5. 한우 lactoferrin의 항체 제조

1) 항혈청의 제조

1차 면역은 정제한 K-Lf 500 μ g/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 immuno diffusion test로 특이 항체 생성을 확인하였다.

1차 면역 실시 2주일 후에 Freund's incomplete adjuvant(Difco, USA)로 같은 방법으로 유화시킨 K-Lf을 접종하여 1주일 후에 다시 특이 항체 생성을 확인하였고 다시 2주일 후에 동일한 K-Lf을 추가 접종하였으며 일주일 후에 채혈하여 K-Lf와의 항원 항체 반응을 조사하였다. 토끼의 귀에서 50ml씩 채혈하였고 원심분리 후 항혈청을 얻었다.

2) Ouchterlony immunodiffusion test

PBS buffer로 1% agarose gel을 제조하고 직경 1.5mm의 well을 만들어 중앙에 rabbit anti-K-Lf-antiserum 10 μ l를 주변에 각각의 Lf 시료를 10 μ l씩 주입하여 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 반응시켜서 침강 반응을 관찰하였다.

3) Antibody titer

항원을 0.05M carbonate buffer(pH 9.0)에 2 μ g/ml이 되도록 희석한 후 EIA용 96-well plate에 100 μ l씩 분주하고 4 $^{\circ}$ C에서 overnight하여 coating하였다. Tween 20이 0.05% 함유된 PBS(PBST)으로 3회 세척하여 완전히 제거시킨 다음 혈청을 적당히 희석하여 100 μ l씩 분주한 후 실온에서 1시간 반응시키고 PBST로 3회 세척하였다. 2차 항체(horse radish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG)를 PBST에 1:10,000의 비율로 희석하여 100 μ l씩 분주한 후 실온에서 1시간 반응시킨 뒤 PBST로 3회 세척하여 물기를 완전히 제거하였다. 발색기질용액 (TMB substrates buffer, 30% H₂O₂, TMB 1 mg/ml methanol)을 100 μ l로 30분 발색시킨 다음 2M H₂SO₄ 50 μ l로 발색반응을 정지시킨 뒤 ELISA reader(ELx800 : Bio-tec, USA)로 파장 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Western blot analysis

각각의 Lf를 SDS-PAGE을 한 후 gel을 transfer buffer (25mM Tris, 192mM glycine, 20% methonal, pH 8.3)에 담가두었다가 nitrocellulose membrane에 얹어 electrotransfer kit(Bio-rad, USA)에 장치한 후 transfer buffer를 채워 constant voltage 100V로 1시간 30분간 전개하였다. 전개 후에 membrane을 분리하여 blocking buffer(TBS buffer+5% BSA)에 담그어 4°C에서 하룻밤동안 정치시켰다. 1:2,000 비율로 TBS buffer에 희석한 primary antibody solution에 4°C에서 overnight 한 후 TBS buffer로 10분간 3번씩 세척한 후 biotinylated secondary antibody reagent에 30분간 상온에서 교반하고 TBS buffer로 10분간 3번씩 세척하였다. straptavidin alkaline phosphatase reagent에 30분간 상온에서 교반한 후 TBS buffer로 10분간 3번씩 세척하고 BCIP/NBT(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium) 기질 발색 시약으로 처리하여 물로 세척하여 반응을 종료 시킨 후 밴드를 확인하였다.

4. 한우 lactoferrin의 항균활성

4.1. 시험균주

시험균주로는 *E. coli* 0111, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Salmonella typhimurium* ATCC13311, *Candida tropicalis* KCTC7221를 생명공학 연구소에서 분양 받아 사용하였고 미생물 시험용 배지 등은 Difco Co.의 제품을 사용하였다. 시험균주는 nutrient 배지에서 계대 배양한 후 37°C에서 배양하였으며, 이를 1% peptone 배지에 1차 배양 후 균주의 생육억제 실험에 사용하였다.

4.2. 항균력 측정

1% peptone 배지에 0.45 μ m filter (Millipore Co.)로 여과 제균한 Lf 용액을 첨가 한 후 시험균주의 최종 농도가 6×10^6 cfu/ml 수준이 되도록 시험균주 배양액을 접종하여 37°C에서 24시간 배양하면서 2시간 간격으로 균체의 증식을 660nm에서 탁도로 관찰하였다.

4.3. Minimum inhibitory concentration 측정

시험균주를 nutrient 배지에서 2~3회 계대 배양하여 활력을 높인 후 16~20시간배양 시켜 대수기에 도달한 균을 실험에 사용하였다. 1% peptone 배지에 Lf와 가수분해물을 각각의 농도로 첨가하고 접종 균수는 10^6 cfu/ml이 되도록 조절한 후 37°C에서 16시간 정도 배양한 후에 평판배지에서 균수를 측정하였다. 이때 측정한 균의 colony 수가 접종한 균수보다 작게 측정된 농도범위를 최소저해농도로 하였다.

4.4. Lysozyme 의 첨가 효과

Lf와 lysozyme를 배지에 첨가하고 시험균주 *E. coli* 0111을 1×10^6 cfu/ml 수준이 되도록 접종하여 37°C에서 하룻밤 동안 배양하면서 시험균주의 증식을 관찰하였다.

4.5. Transmission electron microscopy

1% peptone 배지에 Lf는 5mg/ml로 Lf-h는 1mg/ml의 농도로 첨가하고 *Candida tropicalis* KCTC7221를 10^6 cfu/ml 수준으로 접종하여 4시간 동안 37°C에서 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 균체를 회수하고 10mM phosphate buffer (pH 6.8)로 세척한 후에 1% agar에 균일하게 분포하도록 섞어 굳힌 후 1mm×1mm×3mm의 크기로 잘라서 Karnovsky's 고정액에 하룻밤동안 정치시킨다. 이것을 washing buffer (50mM cacodylate buffer, pH 7.2)로 세척하고 1% OsO₄ buffer에 3시간 정치시킨 후 washing buffer로 세척하여 0.5% uranyl acetate에서 overnight하였다. 50, 75, 90, 95, 100% 농도의 ethanol로 탈수 시키고 propylene oxide에 1시간 처리 후 epon과 propylene oxide 혼합액으로 처리하여 수지가 시료 안에 충분히 스며들게 처리한 후 epon수지로 embedding시켜 diamond knife로 ultrathin section하여 uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 후에 75kV로 Transmission electron microscopy(TEM)(H-800: Hitachi, Japan)으로 관찰하였다.

4.6. Lactoferrin 가수분해물로부터 항균성 peptide 분획

Lf-h을 5mg/ml용액으로 제조한 후 HPLC를 이용하여 C₁₈ column으로 1분

간격으로 분획한 후 evaporator로 농축하고 filtration($0.45\mu\text{m}$)한 후 항균성을 측정을 하였다. HPLC 분리조건은 앞서 명기한 Table 3과 동일하다.

5. RAW264.7 cell을 이용한 macrophage 활성 측정

5.1. 세포 배양

세포배양을 위한 재료로 cell line은 한국 세포주 은행(KCLB)으로부터 분양 받아 사용하였으며 culture medium은 Gibco/BRL Co.의 제품을 사용하였고, 그 외 모든 시약은 Sigma Co.의 제품을 사용하였다.

실험에 사용한 RAW264.7(KCLB 40071) cell은 murine macrophage cell로 10%(v/v) fetal bovine serum(FBS)과 항생제(penicillin(100units/ml)/streptomycin (100mg/ml))을 함유하는 DMEM culture medium(pH 7.2)를 사용하여 세포가 culture dish(ϕ 100)의 90% 정도 자랐을 때 scraping하여 1:10의 비율로 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

L929(KCLB 10001:NCTC clone 929) cell은 murine fibroblast cell로 10%(v/v) FBS와 1% penicillin/streptomycin을 함유하는 RPMI1640 medium(pH 7.2)를 사용하여 세포가 culture dish(ϕ 100)의 90%정도 자랐을 때 1% trypsin/EDTA를 가하여 cell을 떼어낸 후 1:5의 비율로 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

5.2. 시료 및 시약의 제조

각각의 Lf와 Lf-h을 culture medium에 녹여 10mg/ml가 되게 용해하고 0.22 μ m filter(Millipore, USA)로 여과하여 실험에 사용하였고, LPS와 actinomycin D는 각각 100 μ g/ml이 되게 PBS(Phosphate buffer saline)에 용해하였다.

MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol -2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)는 5mg/ml이 되게 PBS에 용해하여 실험에 사용하였다.

5.3. 세포독성(cytotoxicity) 측정

RAW264.7 cell은 1×10^5 cells/well, L929 cell은 3×10^4 cells/well 농도로 96-well microplate에 분주 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 동안 전배양 하였다. 배양에 사용된 배지를 제거한 다음 시료를 농도별로 배지에 첨가하여 각 well 당 전체 volume이 100 μ l가 되도록 조절하고 24 시간 동안 배양한 후 MTT (5mg/ml)를 각각 5 μ l씩 첨가하였다. 4시간 경

과 후 배지를 제거한 다음 각 well에 PBS buffer 100 μ l와 20% SDS 50 μ l를 첨가하고 CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하면서 발색을 유도하였다. ELISA microplate reader(ELx800 : Bio-tec, USA)를 이용하여 540nm에서 발색의 정도를 측정하였다.

5.4. *in vitro* TNF- α 의 생성 및 활성 측정

TNF- α 의 생성 및 활성의 측정은 조 등(1998)의 방법을 변형하여 실시하였다. Lf와 LPS 자극에 의한 RAW264.7 cell의 TNF- α 의 생성정도를 측정하기 위해 96-well plate에 RAW264.7 cell을 2×10^5 cells/well 농도로 주입하였다. 각각의 well에 Lf과 Lf-h를 농도별로 첨가하고 여기에 LPS를 1 μ g/ml 농도로 함께 첨가하여 각 well의 부피를 100 μ l로 맞추어 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 6시간 동안 배양시켜 상등액을 취하였다. 이 상등액에 분비된 TNF- α 활성의 측정을 위해 TNF- α 에 민감한 L929 cell을 사용하였으며 L929 cell을 3×10^4 cells/well로 조절하여 96-well microplate에 100 μ l씩 분주하였다. 5% CO₂ incubator에서 4시간 배양한 후 배지를 제거하고 새로운 배지 75 μ l와 RAW264.7 cell을 자극하여 취한 상등액 25 μ l를 각각 첨가하였다. 여기에 actinomycin D(4 μ g/ml)를 함유한 배지를 25 μ l 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 18시간 배양하였다. 18시간 경과 후 MTT(5mg/ml)를 각 well에 5 μ l씩 첨가한 후 4시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 4시간 후 상등액을 제거하고 여기에 PBS buffer 100 μ l와 20% SDS solution 50 μ l를 처리하였다. CO₂ incubator에서 24시간 동안 발색시킨 후 ELISA microplate reader를 이용하여 540nm에서 발색의 정도를 측정하였다.

5.5. TNF- α 정량 측정

RAW264.7 cell을 자극시켜 생성된 TNF- α 의 정량을 위하여 R&D systems(USA)의 mouse TNF- α immunoassay를 위한 Quntikine M ELISA kit를 사용하였다.

5.6. *in vitro* Nitric oxide의 생성 및 정량

Lf에 의한 RAW264.7 cell의 NO 생성량의 변화를 측정하기 위해 배양한

cell을 scraping한 후 1.0×10^5 cells/well의 농도로 조절하여 96-well microplate에 넣고 Lf과 Lf-h을 농도별로(0~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 첨가하였으며 interferon- γ (IFN- γ)는 10unit/ ml , LPS는 100ng/ ml 의 농도로 각각 첨가하였으며, 이때 각 well의 전체 volume은 100 μl 가 되도록 조절하였다. 이것을 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 incubator에서 배양하면서 24시간 후에 상등액 100 μl 를 취하여 새로운 96-well microplate에 옮긴 후 Griess reagent I액(0.2% naphthyethylene diamine)과 II액(10% phosphoric acid containing 2% sulfanilamide)을 각각 50 μl 씩 첨가하였다. 상온에서 10분간 방치한 후 ELISA microplate reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 sodium nitrite의 검량선으로부터 nitric oxide의 대사물인 nitrite의 농도를 산출하였다.

6. Lf이 암세포 증식에 미치는 영향

Lf의 암세포에 대한 세포독성을 측정하기 위해서 사용한 세포주들은 한국세포주은행(KCLB)으로부터 분양 받아 사용하였다. 실험에 사용한 암세포주들은 모두 human 유래로서 A427(lung carcinoma, KCLB 30053), A498(kidney carcinoma, KCLB 30044), HeLa(cervix adenocarcinoma, KCLB 10002), HepG2(liver hepatoblastoma, KCLB 58065), HT29(colon adenocarcinoma, KCLB 30038), MCF7(breast adenocarcinoma, KCLB 30022), SK-HEP-1(liver adenocarcinoma, KCLB 30052), WiDr(colon adenocarcinoma, KCLB 10218)을 사용하였다.

6.1. 세포의 배양

Cytotoxicity 측정을 위한 동물 세포주들은 A427, A498, SK-HEP-1, WiDr는 56 $^\circ\text{C}$ 에서 30분간 heat inactivation을 시킨 10%(v/v) fetal bovine serum(FBS)과 항생제(penicillin(100units/ ml)/streptomycin(100mg/ ml))를 함유하는 Dulbeco's modified Eagle's medium(DMEM, pH 7.2)에 배양하였고, HeLa, HT29, HepG2, MCF-7은 56 $^\circ\text{C}$ 에서 30분간 heat inactivation을 시킨 10%(v/v) fetal bovine serum(FBS)과 항생제(penicillin(100units/ ml)/streptomycin(100mg/ ml))를 함유하는 RPMI1640(pH 7.2)medium에 배양하였다. 모든 세포주들은 세포가 culture dish(ϕ 100)에 90%정도 자랐을 때 0.05% trypsin/EDTA를 가하여 세포를 떼어낸 뒤 1 : 5의 비율로 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

6.2. *in vitro* cytotoxicity 의 측정

Lf의 동물세포에 대한 cytotoxic effect를 측정하기 위해서 MTT assay를 실시하였다.

동물세포를 1×10^4 cells/well 농도로 96 well plate에 분주 후 세포가 plate 바닥에 붙을 수 있도록 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간동안 전 배양을 하였다. 전 배양에 사용된 배지를 제거 후 새 배지를 180 μ l씩 분주하고 1 μ g/ml~1mg/ml로 제조한 H-Lf, B-Lf, K-Lf를 20 μ l씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 96시간 배양하였다. 96시간 배양 후 MTT용액(5mg/ml)을 각 well에 10 μ l씩 첨가하고 동배양 조건에서 4시간을 더 배양하였다. 4시간 후 상등액을 제거하고 여기에 PBS 100 μ l와 20% SDS solution 50 μ l를 처리하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간동안 발색을 유도시킨 후 ELISA microplate reader(ELx800 : Bio-tec, USA)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 암세포 증식억제효과(Growth inhibitory effect(%))=[(대조구의 흡광도-시료처리구의 흡광도/대조구의 흡광도)] \times 100을 구하여 세포독성 활성의 지표로 하였다. 대조구는 시료대신 배지를 첨가한 것으로 하였다.

7. Lf이 cytokine 발현에 미치는 영향

7. 1. 세포 배양 및 Cytokines 분비 유도

Lf이 T cell 유래 cytokine인 IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ cytokine 발현에 미치는 영향에 대하여 실험하였다.

mouse T cell인 EL-4(KCLB 40039)는 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였으며 56°C에서 30분간 heat inactivation을 시킨 10%(v/v) horse serum과 항생제(penicillin(100units/ml)/streptomycin(100mg/ml))를 함유하는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, pH 7.2)에서 배양하였고, culture flask (T-75)에서 충분히 성장하였을 때 1 : 20의 비율로 계대 배양하며 실험에 사용하였다.

6 well plate에 3×10^6 cells/well의 농도로 세포를 분주하고, Lf을 1mg/ml의 농도로 처리하였다. Cytokine 발현의 양성대조군으로써는 PMA(phorbol-12-myristate-13-acetate) 100ng/ml로만 자극한 것으로 하였고, 37°C 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후, 세포자극에 의해 분비된 cytokine들의 발현의 유무 검색에 사용하였다.

7. 2. Total RNA의 조제

Lf에 의해 cytokines을 유도한 EL-4 cell로부터 total RNA는 AGPC(acid guanidinium thiocyanate-PhOH-chloroform extraction)법으로 추출하였다. 즉, Lf를 첨가하고 24시간 동안 배양한 EL-4 cell을 원심분리로 침전시킨 후, 0.5% sarcosyl을 함유한 RNA추출용액을 사용하여 세포로부터 total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA를 isopropyl alcohol로 침전시킨 후, 70% ethanol을 이용하여 3회 세척하였다. Total RNA의 순도 및량은 260nm에서 측정하였으며, 이를 이용하여 RT-PCR을 실시하였다.

7. 3. RT-PCR

Cytokines의 분비 유도 능력은 RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction)로 확인하였다. 즉 AGPC법으로 추출한 total RNA 15 μ g을 역전사 효소를 사용하여 cDNA를 합성하였으며, 합성된 cDNA와 각각의 cytokines 특이적 primer (Table. 1)를 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR은 94°C/3분간 열변성시킨 후, 94°C/30초, 58°C/1분, 72°C/2분씩 25회 실시한 후, 72°C/5분간 반응시켰다. PCR에 의해 생성된 최종 PCR 산물 10 μ l를 1.5% agarose 전기영동을 실시하여, cytokines의 분비 유도능력을 분석하였다.

Table. 4. Nucleotides sequences of oligosaccharide primers for RT-PCR.

	Upstream	Downstream
IL-2	5'-CCTTGCTAATCAC TCCTCAC-3'	5'-TTGAAGGTGAGCA TCCTGG-3'
IL-4	5'-AGGACCACGATTA TGACC-3'	5'-TTGTTGAGTGCCAT CTGG-3'
IL-6	5'-GAGTTGTGCAATG GCAATTC-3'	5'-TGGATGGTCTTGGT CCTTAG-3'
IFN-γ	5'-CAGCTGTCACCAG AATCTAGCC-3'	5'-CAGCACCTCACGGG GTCATTGC-3'

8. 동물실험 모델을 이용한 Lf의 항균활성

Mouse는 C57BL/6 (6-7 weeks, 대한실험동물센터)를 구입하여 사용하였으며, kidney 감염을 위한 *Staphylococcus aureus*(ATCC 25923)는 생명공학연구소로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

Lf(10mg/ml)는 0.22 μ m로 여과한 후, 균을 접종하기 1일전에 0.1ml(1mg/mouse)을 혈관주사하였다. 이때 대조군은 0.9% saline용액을 사용하였다. Kidney infection을 유도하기 위하여 Lf 면역 1일 후에 *S. aureus* 배양액 0.1ml (10^6 cell/ml nutrient broth)를 혈관 주사하였으며, 면역 14일째 경추탈골의 방법으로 죽인 후 kidney를 적출하였다. 적출한 kidney의 무게를 칭량한 후, 3ml PBS를 넣고 homogenizer로 조직을 분쇄하여 간(幹)세포를 추출하였다. 추출한 간세포를 salt mannitol agar에 접종한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양하여 형성된 *Staphylococcal* colony를 counting하였다.

Mouse diets는 다음과 같이 조제하여 사용하였다. Lf는 증류수, 우유에 2% (최종농도)가 되도록 혼합한 후, 50ml/day씩 경구 투여하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Chromatography에 의한 한우 Lf의 분리·정제

Lf의 정제에는 Nagasawa 등(1972)의 DEAE-Cellulose, Spik 등(1982)의 SP-Sephadex, Dionysius 등(1991)의 CM-Sephadex C-50 ion exchange chromatography 방법과, Ena 등(1990)이 사용한 β -lactoglobulin을 이용한 affinity chromatography 방법 등이 사용되어 왔으나, 본 연구에서는 정제 공정상 편의를 위해 고안한 batch식 흡착법을 사용하여 한우의 유성분으로부터 lactoferrin을 분리하였다.

정제 1단계에서 batch식 추출로 회수한 K-Lf rich fraction의 평균 흡광도는 280nm에서 0.294였으며, Dionysius 등(1991)의 정제방법으로 얻은 Lf 분획에는 lactoperoxidase가 혼재한다는 보고처럼 이 단계에서도 buffer의 NaCl 농도가 0.2~0.5 부근일 때 수지로부터 용출되는 Lf 외에 lactoperoxidase 등을 포함한 여러가지 물질들이 혼재되어 있었다.

정제 2단계는 2개의 분획으로 분리되었고(Fig. 2), fraction I은 0.3M NaCl 농도에서 갈색을 띤 물질로 분획되었으며 fraction II는 0.5M NaCl 농도에서 분홍 빛깔을 띤 물질로 분획되어졌다. fraction II는 Fig. 5에서 보이는 것처럼 밴드가 거의 단일 밴드로 나타나 있어 정제 2단계에서 이미 Lf의 분리가 대부분 이루어짐을 알 수 있었고 여기에는 fraction II 내에 존재하는 Lf과 비슷한 이온 강도에서 용출되지만 Lf보다 분자량이 조금 작은 물질들이 같이 혼재하고 있는 것으로 나타났다.

정제 3단계의 분획을 gel filtration chromatography로 분석한 결과, Fig. 3과 같이 단일 peak를 확인하였고 SDS-PAGE로 확인한 결과 Lf보다 분자량이 작은 물질들이 미량으로 존재하는 것으로 나타났다.

정제 4단계에서는 Fig. 4에서와 같이 heparin agarose affinity chromatography 한 결과 용출 초기에는 Lf와 결합되어 있던 물질이 분리되고, 0.5M NaCl 농도에서 단일 peak를 얻을 수 있었으며 SDS-PAGE로 확인한 결과 단일 밴드를 얻었고, 밴드의 위치나 정제도가 대조구로 사용한 Sigma Co.에서 구입한 bovine lactoferrin과 같은 양상을 보여주었

다. 정제한 K-Lf의 분자량은 SDS-PAGE로 측정하였으며 그 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 상대적인 이동 거리에 대한 표준 단백질 분자량의 logarithm을 검량선으로 계산한 결과 K-Lf의 분자량은 약 81KDa 이었으며, B-Lf의 분자량 80KDa과 비슷한 것으로 나타났다.

정제 단계별에 K-Lf의 회수율은 Table 4와 같고 whey 1리터에서 65mg의 K-Lf를 얻었다. 최종 회수율은 29.4%로 정제 단계를 거칠 수록 회수율간의 차이가 줄어드는 것으로 보아 이미 정제 초기 단계에서 Lf과 공존하던 물질들이 대부분 제거되며 정제 후반부에서는 분리되기 어렵고 분자량과 affinity가 lactoferrin과 거의 비슷한 소량의 물질들이 제거되는 것으로 보여진다. 정제된 Lf의 순도를 높이기 위해서 sephadex G-150 gel filtration과 heparin agarose affinity chromatography와 같은 정제 단계가 필요하긴 하지만 이러한 단계에서는 순도의 증가에 비해 회수율의 감소가 더 크다고 할 수 있다. 유용종 초유의 경우 Lf의 함량이 5 mg/ml 정도로 알려져 있으며, Tsuchi 등(1990)의 보고에 의하면 우리나라 한우와 유사한 일본의 육용종 소들의 초유의 경우 Lf의 함량은 약 0.5mg/ml 정도라고 보고하였다. 하지만 이러한 보고 역시 본 실험에서 얻어진 K-Lf 함량과는 어느 정도 차이를 보여주었다. 그러나 Tsuchi 등의 보고는 초유에서 정제 단계를 거쳐 직접 분리해낸 실험법이 아니라 전유(whole milk)에서 항체로 정량을 한 것이기 때문에 본 실험에서 분리해낸 Lf의 양보다는 높게 검출되었을 것으로 생각된다. 또한 초유 중 Lf의 함량은 분만 후 제일 높다가 비유기간이 진행됨에 따라 급격히 감소하는데 본 실험에 정제 재료로 사용한 초유가 분만 후 24시간 이전의 것이 아니기 때문에 회수율이 낮게 나타났다는 사실을 배제할 수 없다.

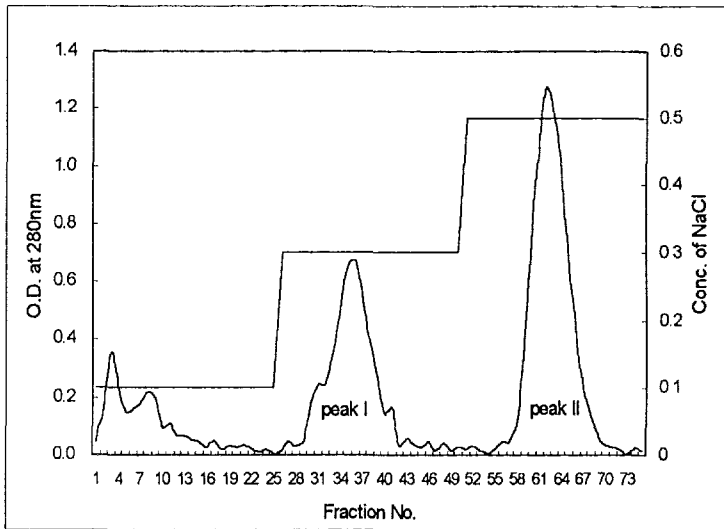


Fig. 2. CM-sephadex C-50 ion exchange chromatography of lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum following batch extraction with CM-sephadex C-50

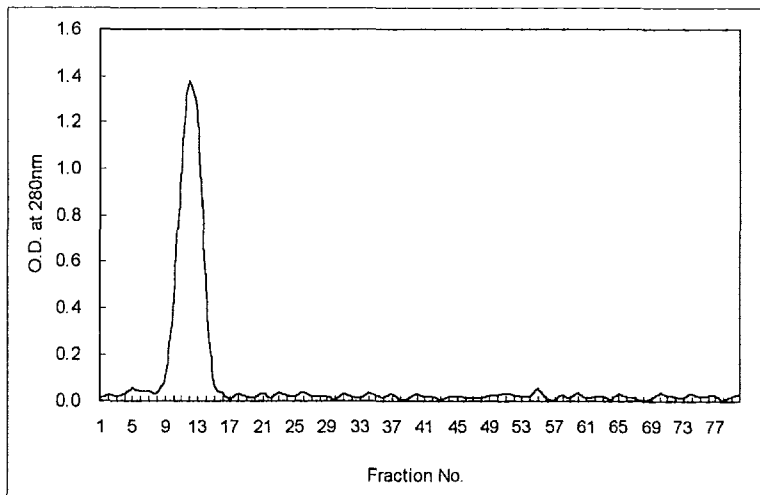


Fig. 3. Sephadex G-150 gel filtration chromatography of lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum following CM-sephadex C-50 ion exchange chromatography

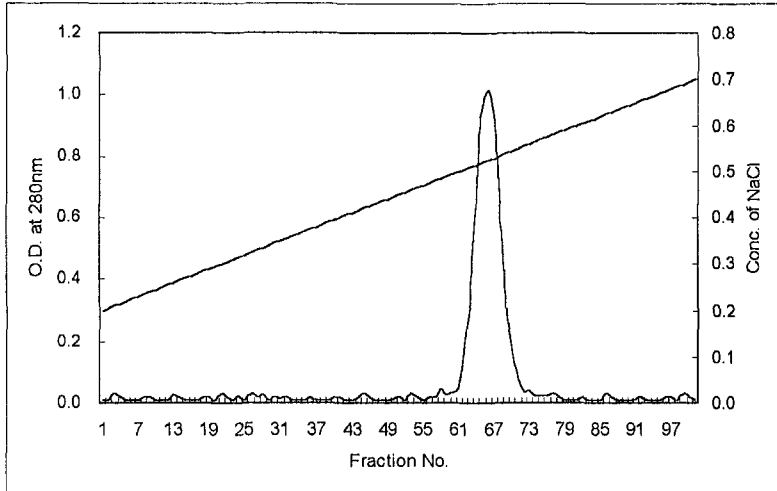


Fig. 4. Heparin agarose affinity chromatography of lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum following sephadex G-150 gel filtration chromatography

Table 5. Recovery rate of lactoferrin from Korean native cow's whey by purification steps

Purification Step	(mg)	(mg)	Recovery rate(%)
I	whey 1L	221	100.0
II	221	98	44.3
III	98	77	34.8
IV	77	65	29.4



Fig. 5. SDS-PAGE analysis of lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum by purification step

Lane 1 : molecular weight marker(Sigma. Co.)

Lane 2 : lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum by
CM-sephadex ion exchange chromatography

Lane 3 : lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum by
G-150 gel filtration chromatography

Lane 4 : commercial bovine lactoferrin

Lane 5 : lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum by
heparin agarose affinity chromatography

A : β -galactosidase (MW 116,000)

B : fructose-6-phosphate kinase (MW 84,000)

C : pyruvate kinase (MW 58,000)

D : ovalbumin (MW 45,000)

E : lactic dehydrogenase (MW 36,500)

F : triosephosphate isomerase (MW 26,000)

2. HPLC를 이용한 lactoferin의 순도 측정

각 단계별로 정제한 한우 Lf의 순도를 HPLC를 사용하여 분석하였다. 정제 1단계에서는 여러 개의 peak가 존재하고 있음을 보여주었으나(Fig. 6) 정제 2단계에서는 몇 개의 peak가 붙어서 분획되긴 하지만 batch식 추출일 때보다 peak의 수가 줄어들었다(Fig. 7). 이러한 사실은 앞서 설명한 ion exchange chromatography의 정제단계에서 Lf와 같은 이온 강도의 용출액에 의해 섞여 용출되는 물질들이 HPLC에 의한 분리 pattern에서도 거의 동일한 retention time에 용출되었다. 정제 3단계의 HPLC에 의한 분리 pattern(Fig. 8)에서는 거의 단일 peak를 보이고 있지만 Lf의 peak에 가깝게 작은 미지의 peak가 함께 용출되었다. 정제 4단계를 거친 결과 매우 적은 양이지만 미지의 peak들이 제거되는 것으로 나타났고(Fig. 9) 정제 4단계에 의한 분리 pattern 역시 chromatography의 정제 단계에서 보인 것과 같은 경향을 보여주었다. 최종 정제된 K-Lf와 B-Lf의 HPLC에 의한 분리 pattern을 비교해 보면 SDS-PAGE에서는 차이가 나타나지 않았지만 affinity chromatography를 거친 것이 더욱 더 단일한 peak를 보여주었고 retention time도 거의 동일하였다(Fig. 10). 그러나 H-Lf의 HPLC에 의한 분리 pattern(Fig. 11)과 비교해 보면 H-Lf의 retention time이 K-Lf와 B-LF보다 조금 빨랐으며 peak의 모양도 K-Lf와 B-LF과는 다른 양상을 보여주어 종에 따른 이질성을 나타내는 것으로 판단된다.

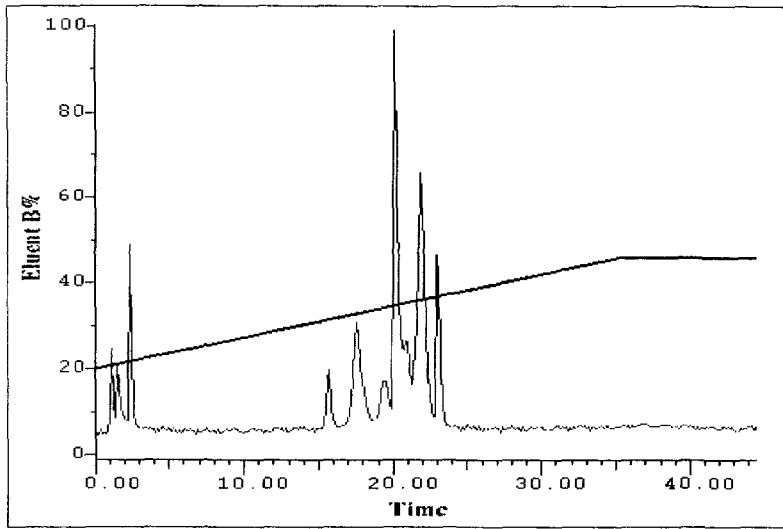


Fig. 6. HPLC analysis pattern of crude lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum following batch extraction with CM-sephadex C-50

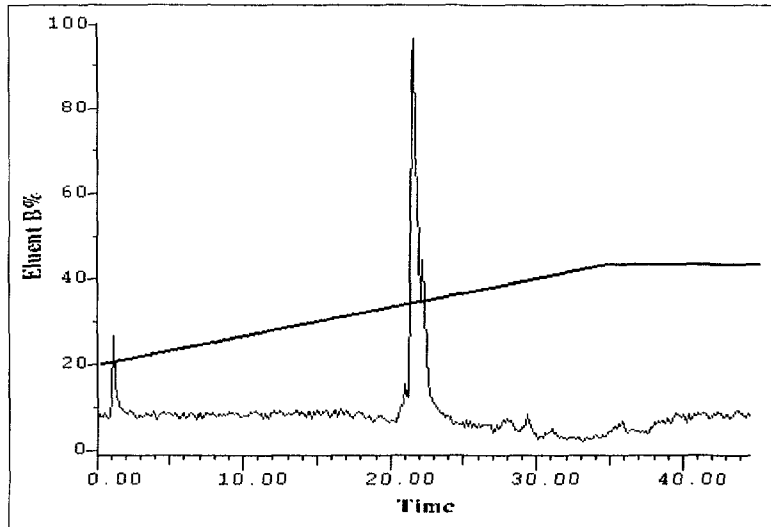


Fig. 7. HPLC analysis pattern of crude lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum following CM-sephadex C-50 ion exchange chromatography

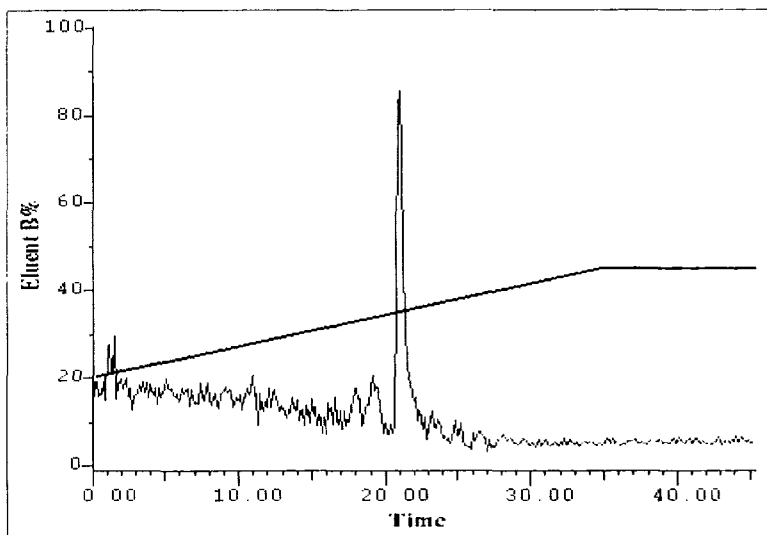


Fig. 8. HPLC analysis pattern of crude lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum following G-150 gel filtration chromatography

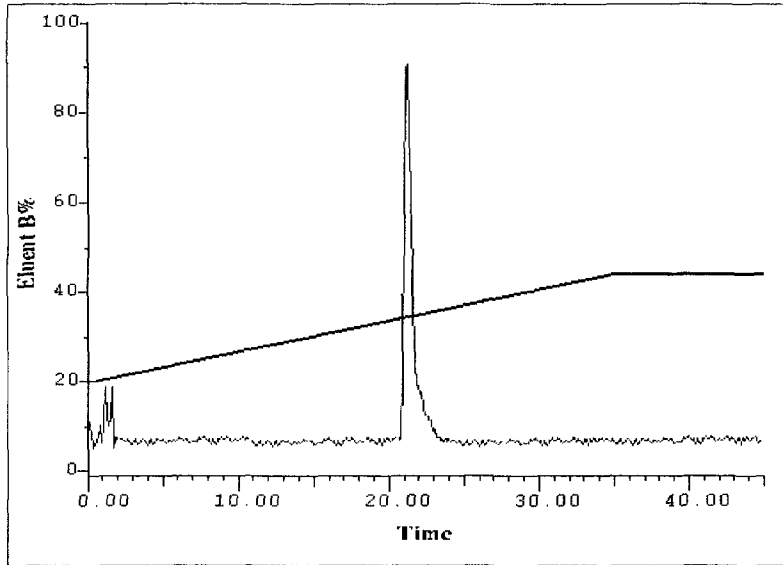


Fig. 9. HPLC analysis pattern of lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum following heparin agarose affinity chromatography

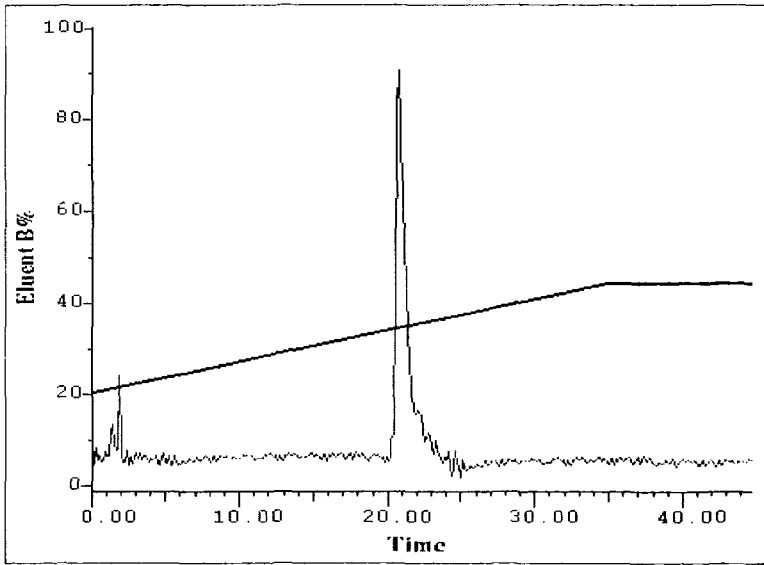


Fig. 10. HPLC analysis pattern of commercial bovine lactoferrin

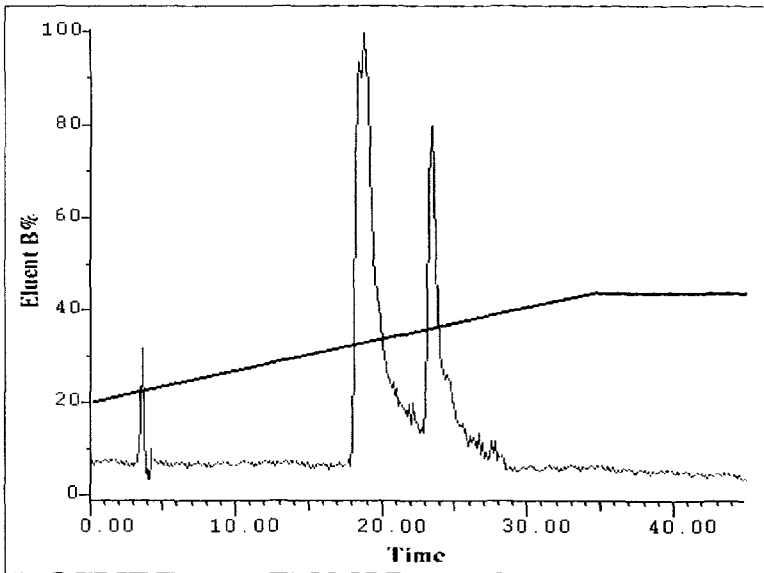


Fig. 11. HPLC analysis pattern of commercial human lactoferrin

3. 한우 Lf의 생화학적 특성

3.1. 한우 lactoferrin의 amino acid 조성

K-Lf의 amino acid 조성을 Pierce 등(1991)이 보고한 B-Lf의 amino acid 조성과 비교하면 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 다를 것으로 추정되었다.

3.2. 등전점 측정 전기영동

정제된 K-Lf의 pI 값을 측정하기 위하여 isoelectric focusing 결과 한우 초유에서 정제한 Lf의 pI 값은 9로 나타났다(Fig. 12). 이러한 결과는 진(1994)이 보고한 K-Lf의 pI 값이 8.7 이라고 한 결과와는 차이가 있으나 같이 분석한 B-Lf의 pI 값도 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 의 H-Lf 의 pI 값이 8~9 사이라는 보고와 거의 일치하였다.

3.3. 철분 함량 측정

Lf에 결합되어있는 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 7).

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 Frasson 등(1980)은 인유중 철의 포화도는 1~4%정도로 인유 중에 포함되어있는 철들이 지질 분획이나 저분자 물질과 결합되어 있어 적은 량의 철만 Lf과 결합된 상태로 존재하고 있다고 하였다.

3.4. Circular dichroism spectra 측정

Circular dichroism(CD) 측정한 결과 Fig. 13에서 2차 구조상 α -helix

함량은 K-Lf이 약 18%의 α -helix를 함유하고 있는 것으로 나타났고 B-Lf가 15 % 정도의 α -helix를 함유하고 있는 것으로 나타났다. 이 결과는 Brown 등(1974)의 B-Lf가 α -helix 15% 함유하고 있다는 보고와 동일하였고 Shimazaki 등(1991)의 보고에서는 B-Lf는 12%, apo-B-Lf는 14%, holo-B-Lf는 12%의 α -helix를 함유하고 있다고 하였는데 이러한 보고들은 본 실험에서 측정된 B-Lf의 α -helix의 함량과 유사함을 나타내었다. 실험 결과에서 α -helix 함량의 수치적 차이는 K-Lf은 B-Lf와 구조가 다소 다른 것으로 여겨진다.

3.5. Ouchterlony immunodiffusion test

K-Lf와 다른 포유 동물의 유즙에서 유래한 lactoferrin과 상관관계를 분석하기 위하여 K-Lf를 토끼에 면역하여 얻은 K-Lf 항혈청과 B-Lf, K-Lf, H-Lf, B-Lf-h 그리고 BSA를 이용하여 Ouchterlony immunodiffusion test를 실시하여 면역 교차반응을 확인하였다(Fig. 14)

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 항원결정 부위가 존재하는 것으로 판단된다. 그러나 K-Lf 항혈청과 H-Lf사이에는 면역 교차반응이 나타나지 않았다. 위의 결과는 포유 동물의 동일 종에서 유래한 Lf 간에는 상동성이 높아 면역교차반응이 나타나는 것으로 인정되지만 이종 간에는 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 다른 어떤 Lf과도 침강선을 나타내지 않았다.

3.6. Antibody titer

토끼에서 채혈한 항혈청의 역가를 측정한 결과 3차 boosting과 4차 boosting 후 채혈한 혈액중 역가가 높았으며 3차 boosting보다는 4차 boosting 후에 역가가 더 높았다. 적절한 항원 항체 비율을 알기 위해서 ELISA법을 이용하여 적절한 항체 역가를 측정하였다. Antibody의 titer를 측정한 결과 흡광도 1.5정도를 적절한 항체 역가 기준으로 하였을 때 항혈청의 농도가 10^{-5} 일 때 적절한 항체 역가를 나타내는 것으로

나타났다(Fig. 15).

3.7. Western blot analysis

B-Lf, K-Lf과 H-Lf을 SDS-PAGE 한 다음 Lf간의 cross-reactivity를 시험하기 위한 K-Lf 항혈청을 이용하여 Western blotting을 한 결과는 Fig. 16과 같다. B-Lf, K-Lf에 대해서는 면역반응 밴드가 검출되었으나 H-Lf에 대해서는 밴드가 검출되지 않았다. 이러한 결과는 ouchterlony test의 결과와 일치하는 것으로 B-Lf과 K-Lf 사이에는 구조적 상동성이 높은 것으로 생각되어지지만 H-Lf과는 한우와 젖소에서 유래하는 lactoferrin과 구조적 상동성이 아주 낮은데 기인하는 것으로 생각된다.

Table 6. Amino acids composition of Korean native cow's lactoferrinand 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

• Data were calculated from the amino acid sequence of bovine lactoferrin(Pierce, 1991)

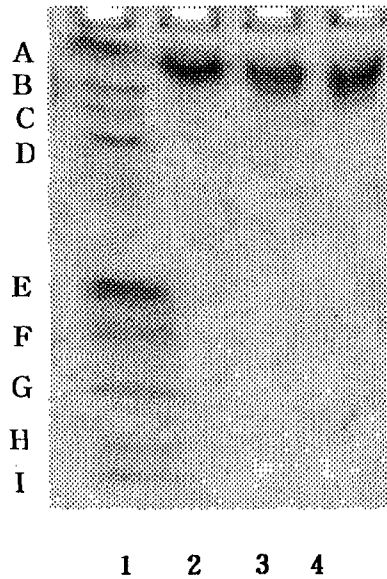


Fig. 12. Isoelectric focusing gel electrophoresis of lactoferrins

1. pI standard marker
2. K-Lf
3. B-Lf
4. H-Lf

A : Trypsinogen(pI 9.3) B : Lectini (pI 8.8)
 C : Lectinii(pI 8.6) D : Lectiniii(pI 8.2)
 E : Myoglobulin(pI 7.2) F : Carbonic Anhydrase(pI 6.6)
 G : Carbonic Anhydrase(pI 5.9) H : β -lactoglobulin A(pI 5.1)
 I : Trypsin inhibitor(pI 4.6) J : Amyloglucosidase(pI 3.6)

Table 7. Iron content and iron saturation 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(%)	39.1	34.2	15.4	10.5

- K-Lf Fe saturation 100% = 1.38mg/g Lf
- B-Lf Fe saturation 100% = 1.43mg/g Lf

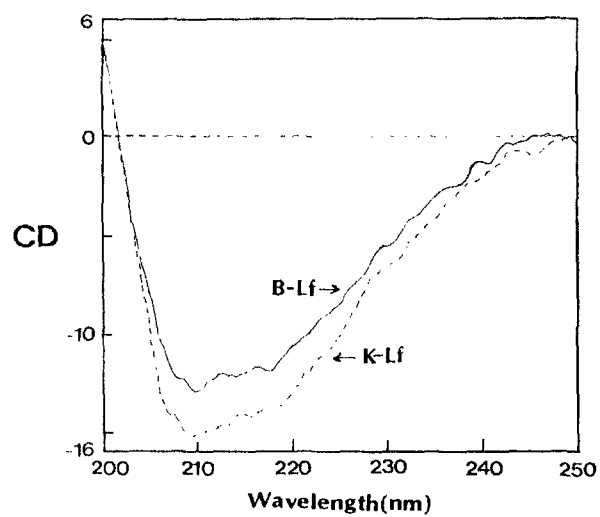


Fig. 13. CD-spectra of Korean native cow's lactoferrin and commercial bovine lactoferrin

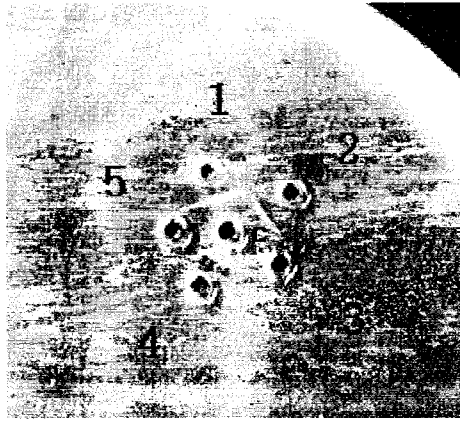


Fig. 14. Ouchterlony immunodiffusion pattern of rabbit anti-K-Lf-antiserum against B-Lf, K-Lf, H-Lf, B-Lf-h and BSA

c : rabbit anti-K-Lf-antiserum

1 : B-Lf

2 : K-Lf

3 : H-Lf

4 : B-Lf-h

5 : BSA

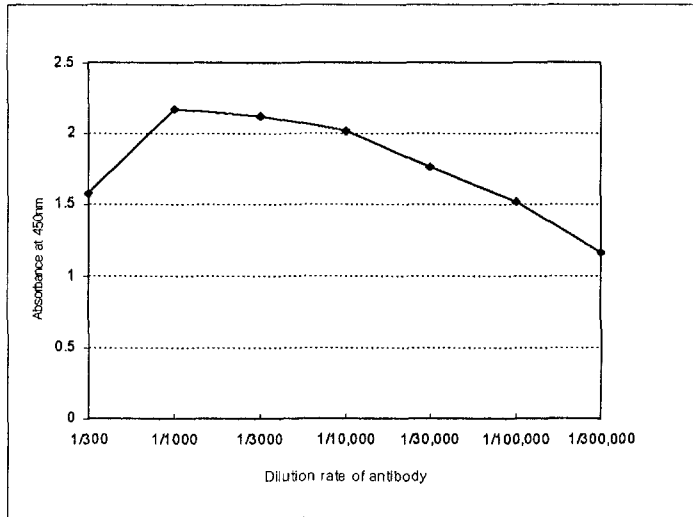


Fig. 15. Quantitative analysis of K-Lf and its antibody complex by ELISA on the basis of amount of the rabbit anti-K-Lf-antiserum

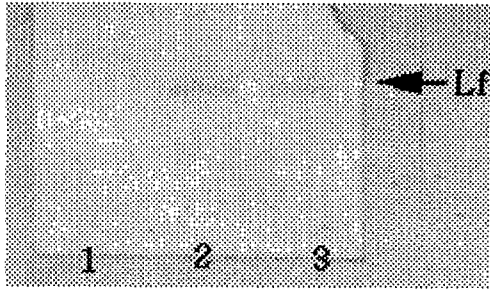


Fig. 16. Western blot analysis comparison of lactoferrins

1. H-Lf
2. K-Lf
3. B-Lf

4. 항균활성

4.1. 항균력 측정

Lf 과 Lf-h의 항균력을 알아보기 위하여 B-Lf과 K-Lf를 각각 1mg, 2mg, 3mg, 4mg/ml 의 농도로 첨가하였고, 이들의 가수분해물인 B-Lf-h와 K-Lf-h는 0.05mg, 0.1mg, 0.5mg, 1mg/ml의 농도로 첨가한 후 *E. coli* O111의 균수의 변화를 경시적으로 측정하였다. B-Lf 와 K-Lf의 경우 첨가한 Lf의 농도가 증가할수록 균의 성장이 억제되는 것으로 나타났다. 그러나 B-Lf의 경우에는 1mg/ml에서부터 균의 성장 속도가 느려졌고 그 이상의 농도에서는 균의 성장을 현저하게 저해하는 경향을 나타내었다. K-Lf에 의한 균의 성장억제 정도는 같은 농도에서 B-Lf에 비해 낮게 나타났다(Fig. 17, 18). 이러한 결과는 K-Lf가 B-Lf보다 항균성이 낮다는 것을 의미한다. Lf 가수분해물의 경우 Fig. 19 와 Fig. 20에서와 같이 B-Lf-H의 농도가 0.5mg/ml일 때 현저하게 *E. coli* O111의 성장을 저해하였으며 K-Lf-H는 0.5mg/ml, 1mg/ml에서 B-Lf-H보다 낮은 항균력을 나타내었다.

4.2. 최소 저해 농도(Minimum inhibitory concentration)

측정

B-Lf 및 K-Lf, B-Lf-h, K-Lf-h를 배지에 각각의 농도별로 첨가하여 *E. coli* O111, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Candida tropicalis* 균의 성장을 억제하는 최소 저해 농도(MIC)를 측정하였다.

E. coli O111 에 대한 실험 결과, MIC가 B-Lf은 1.50mg/ml, K-Lf은 2.75 mg/ml, B-Lf-h는 0.12mg/ml, K-Lf-h는 0.25mg/ml으로 모두 젖소보다 한 우 Lf의 경우 MIC가 2배 정도 더 높은 것으로 나타났다(Table 7). Tomita 등(1991)과 Bellamy 등(1992)의 보고에 의하면 B-Lf의 MIC는 2 mg/ml 정도였으며, B-Lf-h는 0.1mg/ml 정도라고 보고하였으며 본 실험의 결과는 이들의 연구결과와 비슷한 MIC 수준을 보여주었다.

*Staphylococcus aureus*에 대한 B-Lf, K-Lf 의 저해는 50mg/ml 농도까지 균의 성장을 억제하지 못하였다. 그러나 lactoferrin 가수분해물의 *Staphylococcus aureus*에 대한 저해농도는 B-Lf-H이 0.70mg/ml, K-Lf-H이 1.80mg/ml로 B-Lf-h이 K-Lf-h보다 2배 이상 항균력이 높게 나타났다

(Table 8).

*Salmonella typhimurium*에 대한 경우 Lf의 저해는 특히 B-Lf에서 MIC가 0.3mg/ml로 특이적인 저해 능력을 보여 주었고(Table 9), *Candida tropicalis*에서도 K-Lf 보다 B-Lf의 저해 효과가 더 높았으며 가수분해물이 Lf보다 항균력이 높은 것을 알 수 있었다(Table 10).

전반적으로 실험에 사용한 모든 균주에서 B-Lf가 K-Lf보다 항균성이 높은 것을 알 수 있었으며 가수분해물 역시 B-Lf-h가 K-Lf-h보다 항균성이 앞서는 것으로 나타났다.

4.3. Lactoferrin의 항균활성에 대한 lysozyme 첨가효과

Lysozyme은 모유 중에 약 0.39mg/ml 정도 함유되어 있으며 항균성을 갖으며(Gurr, 1981) 이러한 lysozyme은 우유 중의 Lf과 함께 작용하여 항균효과를 상승시키는 것으로 보고되고 있는데, 그 원인은 lysozyme에 의하여 변형된 세포벽에 Lf이 응집하기 때문이라는 보고가 있다(Suzuki, 1989).

lysozyme를 첨가했을 때 *E. coli* O111의 항균력에 미치는 효과를 Table 11에 나타내었다. Lf와 lysozyme을 단독으로 처리하였을 때 *E. coli* O111에 대한 MIC는 B-Lf는 1.5mg/ml, K-Lf는 2.75mg/ml, lysozyme은 0.25mg/ml으로 Table에서 보는 것처럼 Lf과 lysozyme을 단독 첨가할 때보다 두 물질을 혼합하여 첨가한 경우가 항균력이 synergistic effect에 의해 높았으며, 이와 같은 결과는 Ellison(1991)등의 결과와 일치하는 경향을 보였다. 그러나, K-Lf와 B-Lf에 lysozyme을 첨가하여 비교 실험한 결과는 B-Lf에 lysozyme을 첨가한 것이 K-Lf에 첨가한 것보다 항균력을 더 증가시키는 것으로 나타났다.

4.4. TEM을 이용한 Lf 와 가수분해물이 세포에 미치는 영향 관찰

1% peptone 배지에 Lf는 5mg/ml로 Lf-h는 1mg/ml의 농도로 *Candida tropicalis* KCTC7221를 10^6 cfu/ml 수준으로 접종하여 4시간 동안 37°C에

서 배양한 후 세포의 형태에 어떤 변화를 주는지 Transmission electron microscopy (TEM)로 관찰 하였다.

무첨가 대조구는 아무런 변화가 없음을 알 수 있다(Fig.21). 그러나 Lf와 Lf-h의 처리를 받은 실험구(Fig. 22, 23)의 경우에는 배양시간이 지남에 따라 세포벽과 세포질 막이 붕괴되고 세포내에 있는 cytoplasmic 물질들이 응집되어서 밖으로 확산되어 나오는 것을 보여주었으며 Bellamy 등(1993, 1994)의 보고에서도 lactoferricin B를 yeast와 fungi에 처리했을 때 본 실험의 결과와 비슷한 양상을 보여주었다. yeast의 형태 변화가 각각의 Lf와 Lf-h의 처리에 따라 별다른 차이를 관찰 할 수 없었다.

4.5. Lactoferrin 가수분해물로부터 항균성 peptide 분석

Lf 가수분해물로부터 항균성을 지닌 peak를 선별하기 위하여 가수분해물을 HPLC로 gradient한 후, 분리된 peptide 중 항균성을 지닌 peak를 찾아 Fig. 24에 표시하였다. K-Lf 가수분해물과 B-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.

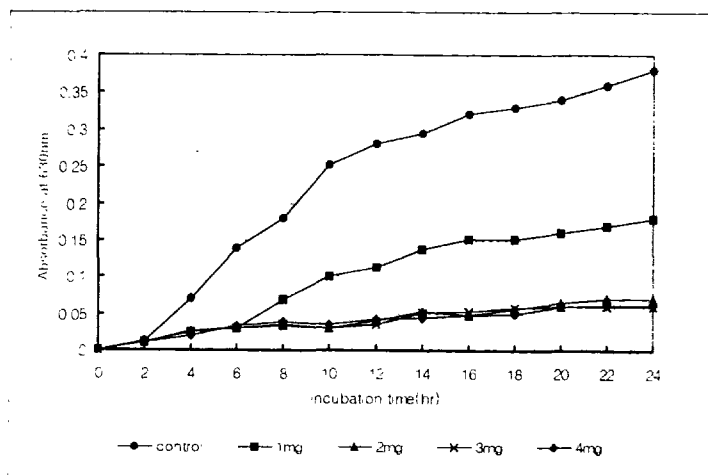


Fig. 17. Bacteriostasis of *E. coli* 0111 by B-Lf in 1% peptone broth at 37°C

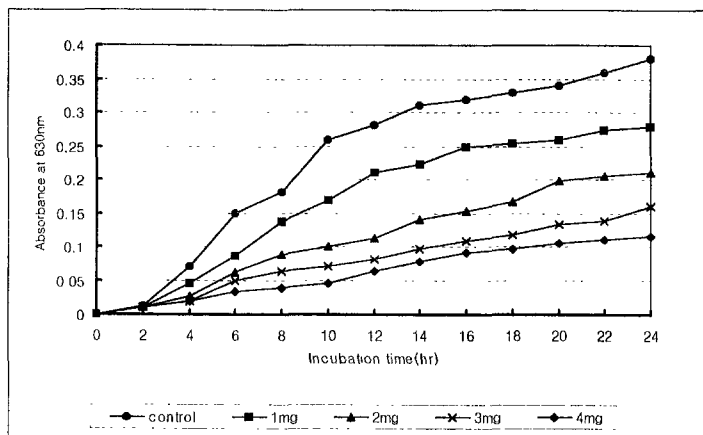


Fig. 18. Bacteriostasis of *E. coli* 0111 by K-Lf in 1% peptone broth at 37°C

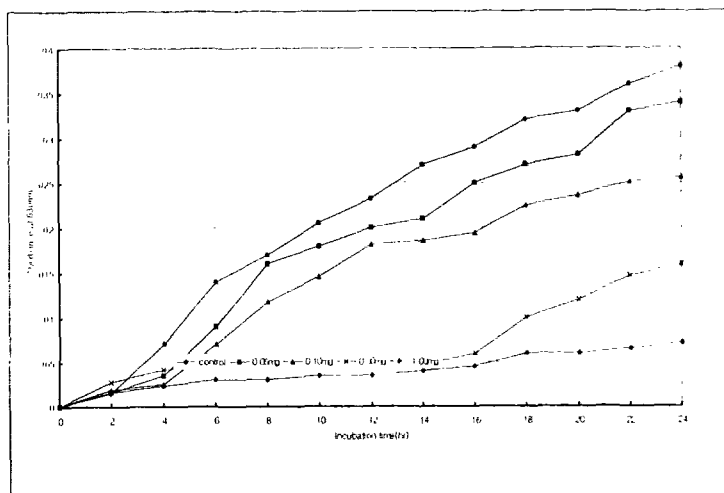


Fig. 19. Bacteriostasis of *E. coli* 0111 by B-Lf-H in 1% peptone broth at 37°C

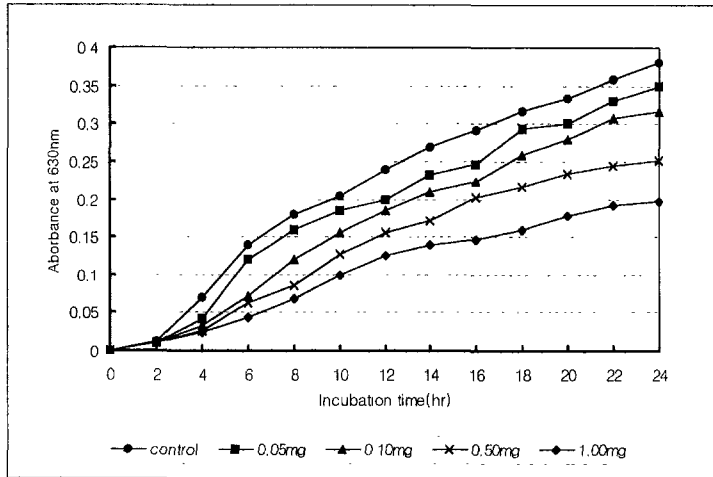


Fig. 20. Bacteriostasis of *E. coli* 0111 by K-Lf-h in 1% peptone broth at 37°C

Table 8. Inhibitory sensitivity of lactoferrin and peptic lactoferrin hydrolysates to *E. coli* 0111

	MIC(mg/ml)
B-Lf	1.50
K-Lf	2.75
B-Lf-H	0.12
K-Lf-H	0.25

Table 9. Inhibitory sensitivity of lactoferrin and peptic lactoferrin hydrolysates to *Staphylococcus aureus*

	MIC(mg/ml)
B-Lf	>50
K-Lf	>50
B-Lf-H	0.70
K-Lf-H	1.80

Table 10. Inhibitory sensitivity of lactoferrin and peptic lactoferrin hydrolysates to *Salmonella typhimurium*

	MIC(mg/ml)
B-Lf	0.30
K-Lf	18.0
B-Lf-H	0.40
K-Lf-H	1.60

Table 11. Inhibitory sensitivity of lactoferrin and peptic lactoferrin hydrolysates to *Candida tropicalis*

	MIC(mg/ml)
B-Lf	1.75
K-Lf	2.50
B-Lf-H	0.40
K-Lf-H	0.65

Table 12. Minimum inhibitory concentration of lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum and commercial bovine lactoferrin with or without lysozyme

Lysozyme ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	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 antibacterial effect

+ : antibacterial effect

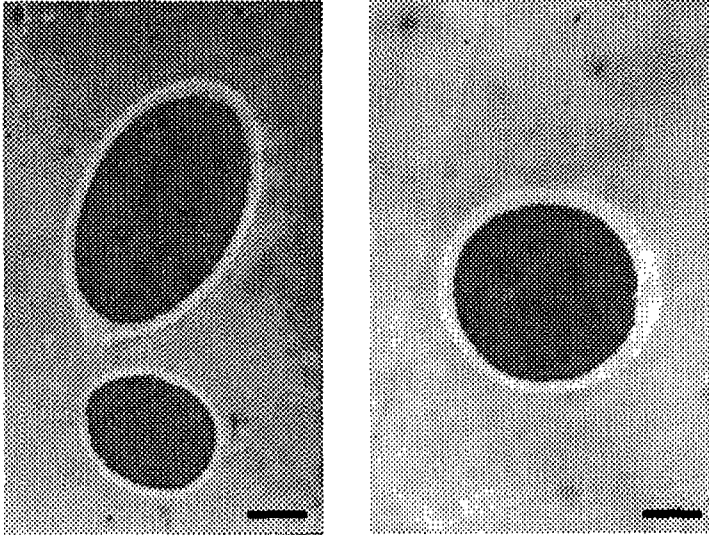


Fig. 21. Electron micrographs of Lf-untreated *Candida tropicalis*

Cells were cultured in 1% peptone broth at 37°C for 4hrs
bar 1 μ m

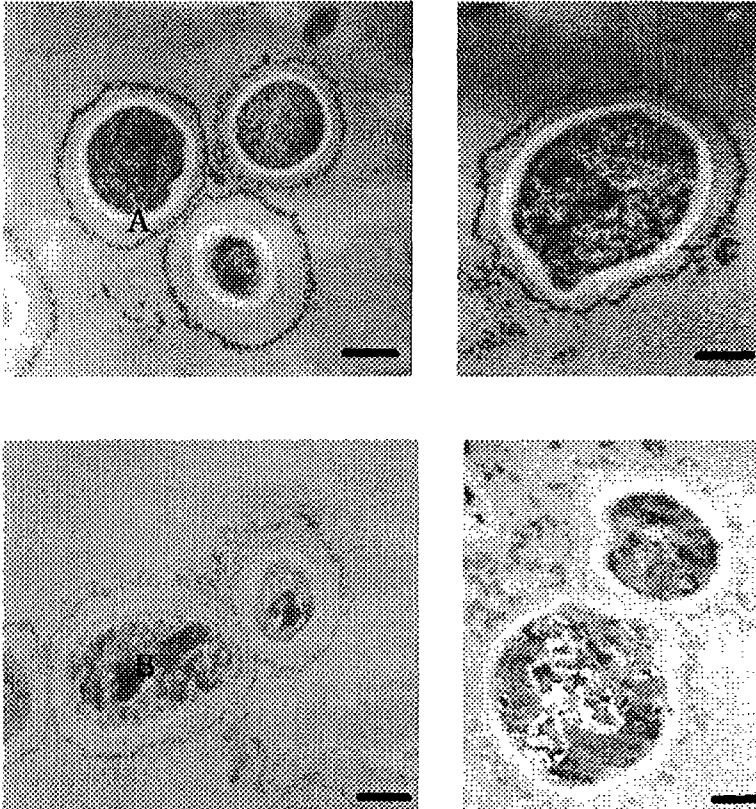
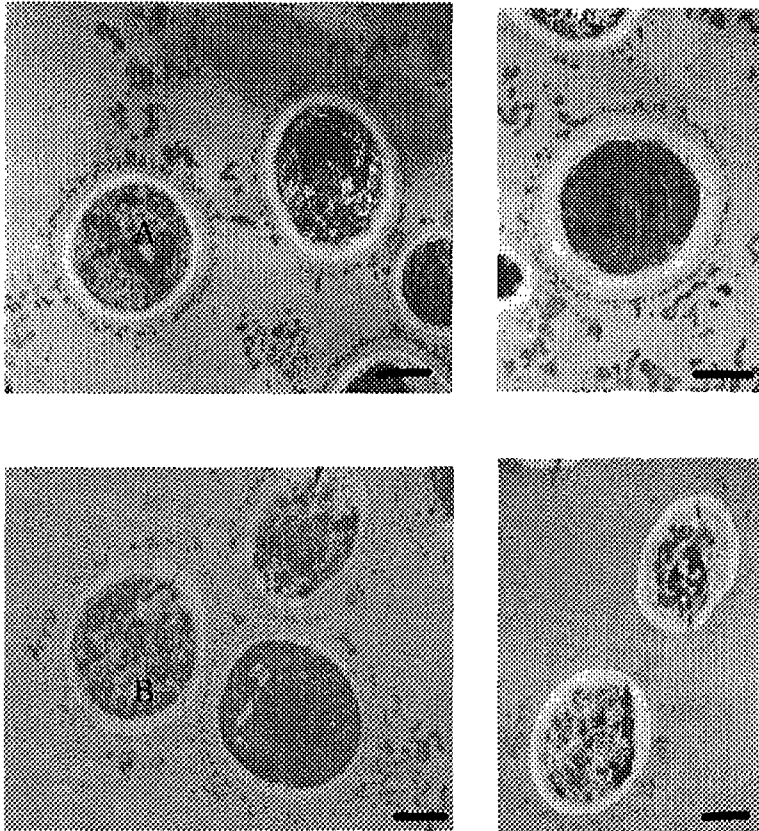


Fig. 22. Electron micrographs of *Candida tropicalis* showing morphological changes induced by lactoferrins

(A) Cells were cultured in 1% peptone broth supplemented with 5mg/ml commercial bovine lactoferrin at 37°C for 4hrs

(B) Cells were cultured in 1% peptone broth supplemented with 5mg/ml Korean native cow's lactoferrin at 37°C for 4hrs

bar 1 μ m



A

Fig. 23. Electron micrographs of *Candida tropicalis* showing morphological changes induced by peptic lactoferrin hydrolysates ^B

(A) Cells were cultured in 1% peptone broth supplemented with 1mg/ml peptic bovine lactoferrin hydrolysate at 37°C for 4hrs

(B) Cells were cultured in 1% peptone broth supplemented with 1mg/ml peptic Korean native cow's lactoferrin hydrolysate at 37°C for 4hrs
bar 1 μ m

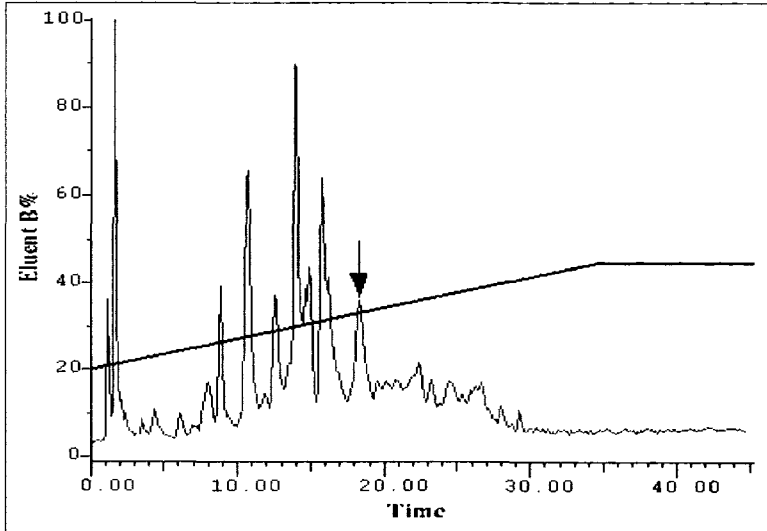
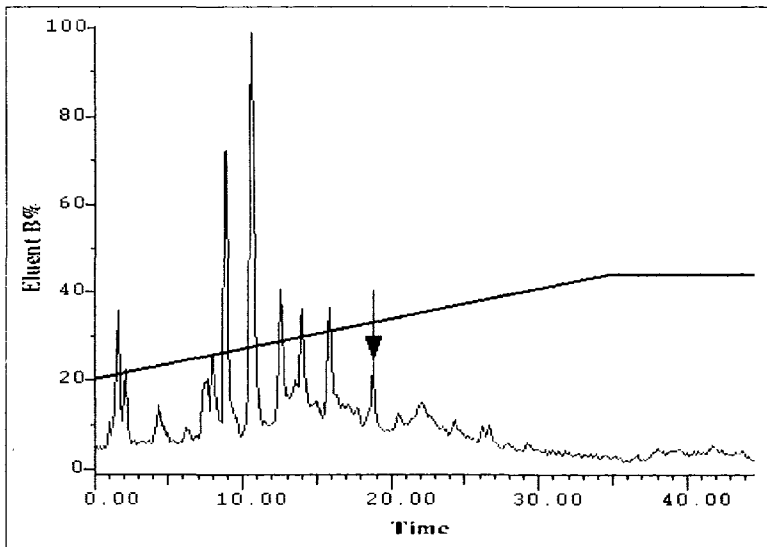


Fig. 24. Reverse-phase HPLC profile of the lactoferrin hydrolysates

A : K-Lf-h

B : B-Lf-h

• Arrow indicates the position of the active peptide recovered for sequence analysis.

5. RAW264.7 cell을 이용한 macrophage 활성 측정

5.1. Lf에 의한 세포 독성 측정

Lf과 Lf-h의 세포 독성은 RAW264.7 cell과 L929 cell에 직접 Lf와 Lf-h를 $1\mu\text{g}\sim 1.0\text{mg}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하여 검정하였다. RAW264.7 cell과 L929 cell에 시료들을 농도별로 처리하고 24시간 후 MTT 처리를 하여 얻은 결과는 Fig. 25, Fig. 26과 같다. 무처리구의 세포 생존율을 100%로 환산하였을 때 Lf에 의한 RAW264.7 cell과 L929 cell의 생존율이 무처리구에 비해 별다른 감소되지 않는 것으로 나타나 Lf에 의한 세포독성이 없는 것으로 판단하였다.

5.2. Lf이 RAW264.7 cell의 TNF- α 생성에 미치는 영향

Macrophage는 LPS의 자극에 의해서 proinflammatory cytokine 인 IL-1, IL-6, 및 TNF- α 를 분비한다. 본 연구에서는 Lf에 의한 macrophage TNF- α 생산에 대한 역할을 연구하기 위하여 murine macrophage cell line 인 RAW264.7 cell를 이용하였다.

먼저 LPS 자극 없이 RAW264.7 cell을 Lf(K-Lf, B-Lf, H-Lf)만 처리하여, 세포가 TNF- α 를 생성할 수 있는지를 보았다. 생성된 TNF- α 에 의해 사멸하는 L929 cell을 이용하여 cell survival rate로 나타내었다(Fig. 27). $1\text{mg}/\text{ml}$ 의 K-Lf, B-Lf, 그리고 H-Lf을 각각 RAW264.7 cell에 6시간 처리한 결과, K-Lf을 처리한 세포의 생존율은 약 22%였다(Fig. 27-A). B-Lf과 H-Lf을 처리군에서는 각각 85%와 90%의 세포 생존율을 보임으로써, K-Lf에 의한 효과와는 현저한 차이를 나타내었다. 본 실험에 사용한 K-Lf은 다단계 정제 과정과 순도 테스트를 거쳐 제조되었으므로, 생존율 감소효과는 LPS 오염과는 관계가 없다고 생각된다. K-Lf 자체가 bioassay 방법에 사용된 L929 cell에 직접적인 세포독성효과를 나타내어 위와 같은 결과를 얻었을 가능성은 cytotoxic effect 테스트 결과(Fig. 26)에 의해서 배제되어질 수 있다. 따라서 K-Lf은 macrophage로부터 TNF- α 분비를 유도할 수 있는 능력을 가졌다고 판단된다.

K-Lf의 농도에 따른 TNF- α 의 생성량은 Fig. 27-B와 같다. K-Lf의 농도가 증가할수록 세포 생존율이 감소하여 TNF- α 생성량이 증가함을 알 수 있다. K-Lf의 최소 처리수준인 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 의하여 세포 생존율이 약 6% 감소했으며, $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 세포의 16%가 세포가 생성된 TNF- α 에 의하여 사멸한 것을 보여주고 있다. 이 실험 결과 수치의 오차는 3% 이내로, $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 K-Lf은 유의차 있게

TNF- α 를 분비한 것으로 보인다. 동일한 수준의 B-Lf과 H-Lf은 각각 11%와 6%의 세포 생존율의 감소를 보였으나, 이들은 고농도에서도 16% 이상의 생존율 감소는 보이지 않음으로써 K-Lf에 비하여 전체적으로 TNF- α 의 생성량이 낮은 것으로 나타났다(Fig. 27-C, 27-D).

지금까지 Lf은 그 자체만으로 macrophage의 TNF- α 생성 유도에는 그다지 효과가 없는 것으로 생각하는 것이 일반적인 견해였다. 그러나 본 실험 결과는 K-Lf가 macrophage로부터 TNF- α 생성을 유도하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 아직 명확하게 규명되지는 않았지만 간접적으로는 소의 종간의 차이에 의해서 기인하는 것으로 추측된다. 이러한 차이에 대해서는 장차 더욱 더 연구되어야 할 과제로 생각된다.

5.3. Lf이 LPS 자극에 의하여 유도된 TNF- α 생성량에 미치는 영향

RAW264.7 cell은 LPS 자극에 의하여 다량의 TNF- α 를 생성한다. 본 실험에서는 Lf이 LPS 자극에 의하여 RAW264.7 cell에서 다량 유도되는 TNF- α 생성량에 어떤 영향을 미치는 지 실험하였다. 1 μ g/ml의 LPS로 RAW264.7 cell을 6시간동안 자극하여 bioassay 방법으로 TNF- α 의 생성 정도를 확인한 결과, 약 28%의 세포 생존율을 나타내었다(Fig. 28-A). 이를 기준으로 하여, K-Lf, B-Lf, H-Lf을 각각 LPS와 함께 처리한 RAW264.7 cell에서 분비된 TNF- α 생성량을 Fig. 30에서 세포 생존율로 나타내었다.

LPS자극에 의한 세포생존율이 약 28%였으나 K-Lf, B-Lf, H-Lf의 첨가에 의하여 각각 31%, 51%, 63%로 증가함을 알 수 있다(Fig. 28-A). 세포 생존율의 증가는 자극에 의하여 생성되는 TNF- α 의 감소로 볼 수 있는데, LPS 자극에 의한 세포 생존율을 기준으로 할 때 K-Lf이 약 3%, B-Lf이 약 23%, H-Lf이 약 35%의 TNF- α 생성량이 감소하였다. 실험에 사용한 세가지의 Lf이 전부 TNF- α 생성량을 감소시키는 영향이 있으며, 그 중 H-Lf이 가장 큰 TNF- α 생성 억제력이 있음을 알 수 있다.

그리고, 각 Lf의 처리 농도를 변화시켜서 이에 따른 세포 생존율의 변화를 살펴보았다. Fig. 28-B는 LPS와 함께 K-Lf의 농도에 따른 세포 생존율을 나타낸 것으로 농도가 증가하더라도 세포 생존율의 증가는 처리한 Lf의 최고 농도에서도 거의 변화가 없었다. B-Lf와 H-Lf의 경우에는 처리한 Lf의 농도가 증가할수록 LPS의 자극에 의한 TNF- α 생성을 억

제하는 경향을 보였고 H-Lf의 경우는 좀 더 억제력이 높아지는 것으로 나타났다(Fig. 28-C, 28-D).

Lf의 처리가 LPS에 의하여 유도된 TNF- α 생성량을 감소시키는 본 실험 결과는 다음과 같이 생각해 볼 수 있다. 첫째, Lf 자체가 bioassay 과정에서 TNF- α 에 의하여 L929 cell 사멸과정에 영향을 미쳤을 수 있다. 이 경우에는 Lf이 RAW264.7 cell이 TNF- α 생산에 직접 작용했을 수도 있고, L929 세포에 작용하여 TNF- α 의 기능을 억제했을 가능성도 있다. 그러나 이러한 가능성은 recombinant TNF- α 를 Lf과 함께 L929 cell에 처리했을 때 TNF- α 단독 처리한 세포와 비교하여 생존율에 아무런 차이를 보이지 않는 것(Choe and Lee, unpublished data)으로 배제할 수 있었다. 둘째, Lf이 LPS의 RAW264.7 cell의 TNF- α 생성 유도를 저해하였을 가능성이 있다. 이 경우 Lf이 LPS와 직접 결합하여 LPS와 세포의 상호작용을 직접적으로 방해한다고 가정할 수 있다. 그러나 LPS가 비록 Lf에 결합한다고 해도 이들의 세포 자극 효과가 크게 감소되지는 않으며 H-Lf의 처리에서 보는 것처럼 35% 정도의 TNF- α 생성량 억제 효과를 나타내기는 어려우리라 생각한다. 셋째, Lf이 RAW264.7 cell의 TNF- α 유전자의 발현에 영향을 미침으로써 생성량의 감소를 가져왔다고 생각해 볼 수 있다. 오래 전부터 Lf이 DNA와 직접적으로 결합하는 특성을 지니고 있다고 알려져 왔으며, 이런 특성은 Lf의 분리, 정제 과정에서도 널리 이용되어져 왔다. 이러한 Lf의 성질을 고려해 볼 때 Lf이 TNF- α 유전자의 발현 조절부위에 직접적으로 결합하여 그 생성량을 조절했다고 가정해 볼 수 있다. 이미 몇몇 연구에서 Lf이 유전자의 발현 조절에 직접적으로 관여하는 조절인자의 역할을 한다는 보고가 있으며 이러한 가설을 지지해주는 증거들이라 할 수 있다. 그러나, 이 경우에도 Lf이 TNF- α 의 유전자 발현 조절에 직접 관여하였는지 혹은 TNF- α 유전자 발현을 조절한다고 알려진 Nuclear Factor- κ B(NF- κ B)와 같은 인자의 발현 조절 등을 통하여 간접적으로 그 역할을 하였는지는 명확하지 않다. TNF- α 의 기능이 다양하고, 생체 내에서 미치는 영향이 매우 넓기 때문에 TNF- α 생성량의 조절은 병리생리학적으로 매우 중요한 연구중의 하나이다.

Zagulski 등(1989)은 B-Lf을 mouse에 투여하고 24시간 후 *E. coli*를 mouse에 치사량 주입했을 때 TNF- α 의 분비를 억제하여 사망률을 낮추었

다고 하였으며, Machnicki 등(1993)도 *in vivo*상에서 Lf이 TNF- α 분비에 억제효과가 있음을 입증하였다. 또한 Sawatzki와 Rich(1989)는 LPS를 주입 후 Lf의 농도가 급격히 증가(5~6배)하는 것을 확인하였으며 Guttenberg 등(1989)은 염증부위에 Lf의 농도가 급격히 증가하는 것을 확인함으로써 Lf이 생체 내에서 항염증인자로서 중요한 역할을 한다는 것을 보여주었다. Lf에 의한 생체 내에서의 방어효과는 설명하기 어려우나 현재까지는 IL-1 β (Silva와Cohen, 1992), TNF- α (Beutler 등, 1985)와 같은 proinflammatory cytokine의 분비를 저해하여 감염동물의 치사율을 감소시킨다고 보고되어 있다.

5.4. ELISA 방법에 의한 TNF- α 생성량 측정

RAW264.7 cell을 Lf로 자극시킨 다음 상등액을 ELISA로 생성된 TNF- α 의 정량 하였다. 무첨가구의 TNF- α 생성량을 0으로 환산하여 TNF- α 의 함량을 계산하였다.

Table 12에서 나타난 것처럼 RAW264.7 cell은 LPS 자극에 의해서 TNF- α 를 212ng/ml정도 생산하였고 K-Lf와 B-Lf의 처리에 의한 TNF- α 생성량을 비교해보면 bioassay의 결과와 마찬가지로 K-Lf에 의한 TNF- α 의 생성량이 B-Lf에 의한 것보다 훨씬 높은 것으로 확인되었다. LPS와 Lf의 혼합 처리구 경우 ELISA reader로 측정할 수 있는 흡광도의 범위를 벗어나 TNF- α 생성량의 정량이 불가능하였다. Lf과 LPS를 함께 RAW264.7 cell에 처리하였을 때 Lf이 TNF- α 생성에 영향을 미치지 못하는 bioassay의 결과와 비교하여보면 LPS 자체만으로도 자극이 너무 크기 때문에 Lf의 영향이 나타나지 못한 것으로 생각되어진다.

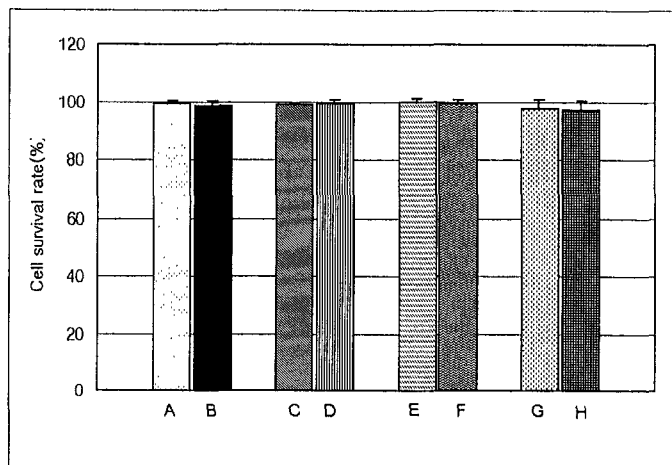


Fig. 25. Effect of lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum, commercial bovine lactoferrin, peptic hydrolysate of K-Lf and peptic hydrolysate of B-Lf on the growth of RAW264.7 cells

A : 1 μ g/ml K-Lf

B : 1mg/ml K-Lf

C : 1 μ g/ml B-Lf

D : 1mg/ml B-Lf

E : 1 μ g/ml K-Lf-h

F : 1mg/ml K-Lf-h

G : 1 μ g/ml B-Lf-h

H : 1mg/ml B-Lf-h

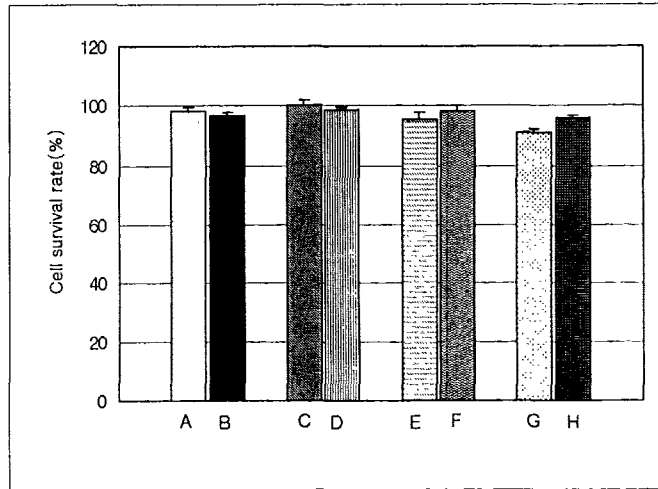


Fig. 26. Effect of lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum, commercial bovine lactoferrin, peptic hydrolysate of K-Lf and peptic hydrolysate of B-Lf on the growth of L929 cells

A : 1 μ g/ml K-Lf

B : 1mg/ml K-Lf

C : 1 μ g/ml B-Lf

D : 1mg/ml B-Lf

E : 1 μ g/ml K-Lf-h

F : 1mg/ml K-Lf-h

G : 1 μ g/ml B-Lf-h

H : 1mg/ml B-Lf-h

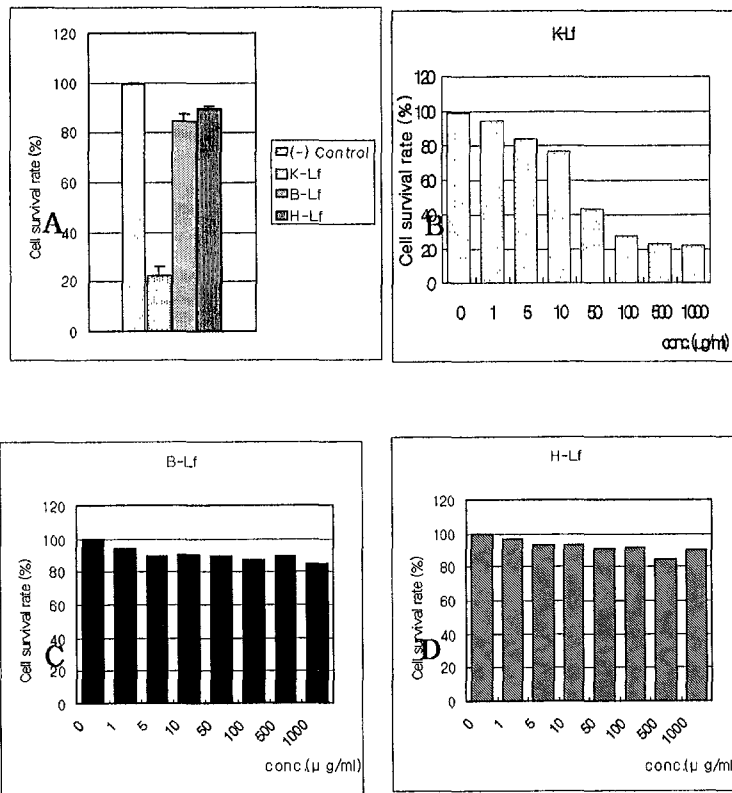


Fig. 27. TNF- α production of RAW264.7 cells by different kinds of lactoferrin

A : RAW 264.7 cells were incubated with lactoferrin at 1mg/ml in DMEM with 10% FBS

B-D : RAW264.7 cells were incubated with different level of lactoferrin (at 0 to 1000 μ g/ml)

- TNF- α production was expressed by growth inhibition of L929 cells
- Survival rates were measured by MTT assay in which supernatant of cultured RAW 264.7 cells for 6hrs was applied to L929 cells

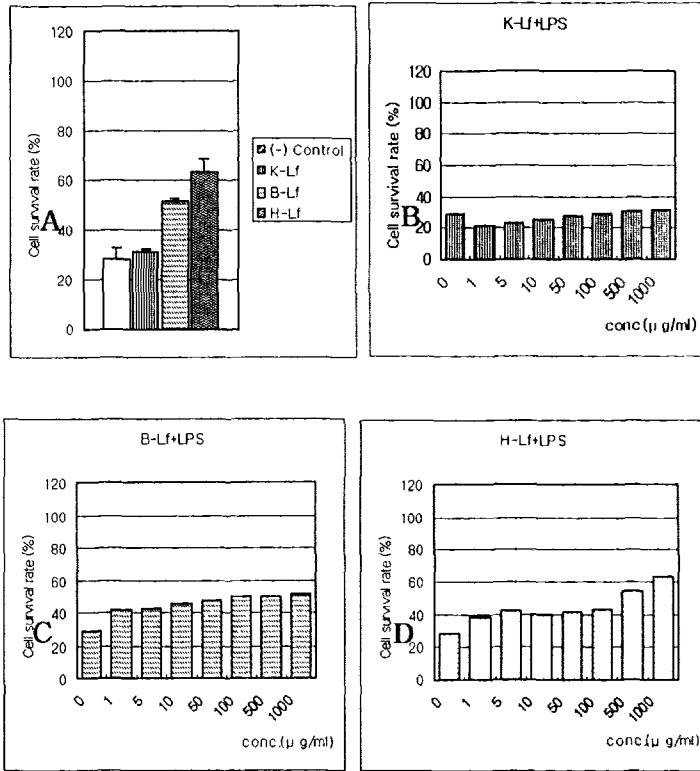


Fig. 28. TNF- α production of RAW264.7 cells by different kinds of lactoferrin with LPS stimulation

RAW264.7 cells were stimulated by 1 μ g/ml LPS(A-D)

A : RAW264.7 cells were incubated with lactoferrin at 1mg/ml in DMEM with 10% FBS

B-D : RAW264.7 cells were incubated with different level of lactoferrin(at 0 to 1000 μ g/ml)

- TNF- α production was expressed by growth inhibition of L929 cells
- Survival rates were measured by MIT assay in which supernatant of cultured RAW 264.7cells for 6hrs was applied to L929 cells

Table 13. Quantitation of TNF- α production from the stimulated RAW264.7 cells by lactoferrins

Treatment conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	K-L (ng/ml)	B-Lf (ng/ml)	LPS($1\mu\text{g}/\text{ml}$)
1	2.25	0.32	212 ng
5	3.02	0.55	
10	3.51	0.71	
50	4.84	1.61	
100	6.92	1.87	
500	8.01	2.27	
1000	9.21	3.01	

5.5. Lf이 RAW264.7 cell의 NO 생성에 미치는 영향

Lf이 RAW264.7 cell의 NO 생성에 미치는 영향은 Lf를 단독으로 처리하였을 경우 K-Lf의 첨가(1mg/ml)에 의해 3배정도 NO 생성량을 증가시켰으나 B-Lf의 첨가는 NO 생성에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Fig. 30-A). 또한 Fig. 30-B와 같이 K-Lf는 처리농도가 증가함에 따라 NO 생성량이 증가하였으나 B-Lf는 거의 영향을 주지 않았다(Fig. 30-B, 30-C). TNF- α 와는 달리 LPS(100ng/ml)가 단독으로는 NO 생성을 크게 유도하지 않았고, LPS와 IFN- γ (10 units/ml)를 동시에 처리할 경우에는 IFN- γ 단독으로 NO를 유도하는 것보다 synergistic effect에 의해 NO 생성량을 증가시키는 결과를 보여주었다. 이러한 결과를 기준으로 Lf을 각 농도별로 첨가했을 때 LPS를 동시에 처리한 실험구에서는 약간의 차이는 있지만 K-Lf와 B-Lf에서 NO 생성에 영향을 주지 않았던 것으로 생각되어진다. IFN- γ 와 동시에 처리한 경우, K-Lf은 첨가한 Lf가 높을수록 NO 생성이 증가되었으나 B-Lf는 첨가수준에 따라서 NO 생성에 영향을 주지 않았다(Fig. 31-A, 31-B). Lf을 IFN- γ 와 LPS를 함께 처리하였을 경우에는 전반적으로 NO 생성량이 IFN- γ 첨가구보다는 약간 높지만 비슷한 경향을 나타내었다.

K-Lf는 TNF- α 와 같이 보여 준 것처럼 농도가 높아짐에 따라 NO 생성을 증가시키는 경향을 보여주었지만 B-Lf는 NO의 생성에는 별다른 영향을 미치지 못하였다. Lf이 LPS와 IFN- γ 처리에 의해서 다소 NO 생성이 증가되는 것 같지만 이러한 결과는 Lf의 첨가의 영향보다는 IFN- γ 와 LPS의 효과로 인한 증가로 생각되며 K-Lf의 첨가에 의해서 약간의 증가효과를 보이는 것 같았으나 B-Lf의 첨가에 의해서는 무첨가구와 차이를 보이지 않았다. 이런 결과는 Sorimachi 등(1997)이 쥐의 bone marrow에서 분리한 macrophage에 Lf만을 처리하여 NO의 생성을 유도한 결과와 비슷한 경향을 보여주었으나, LPS를 함께 처리하였을 때는 NO의 생성을 증가시킨 것과는 다른 결과를 보여주었다.

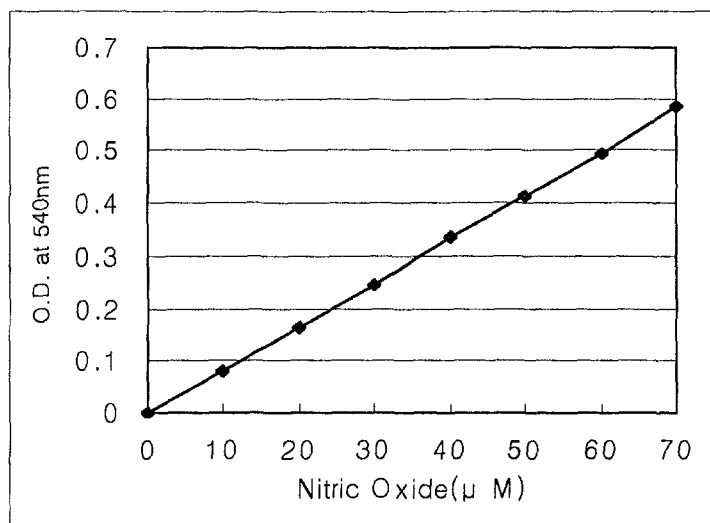


Fig. 29 . Standard curve for measurement of nitric oxide using sodium nitrite

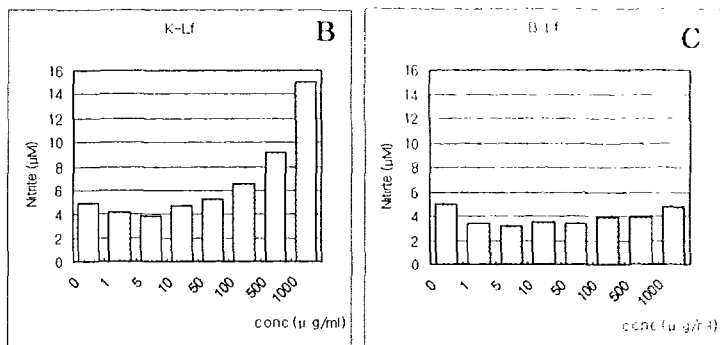
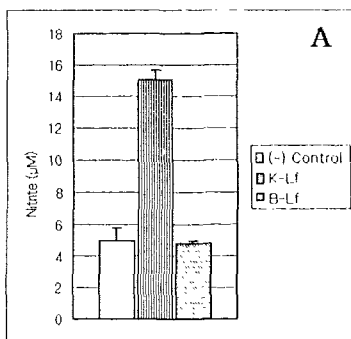


Fig. 30. NO production of RAW264.7 cells by lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum and commercial bovine lactoferrin.

A : RAW264.7 cells were incubated with lactoferrin at 1mg/ml in DMEM with 10% FBS

B, C : RAW264.7 cells were incubated with different level of lactoferrin(at 0 to 1000µg/ml)

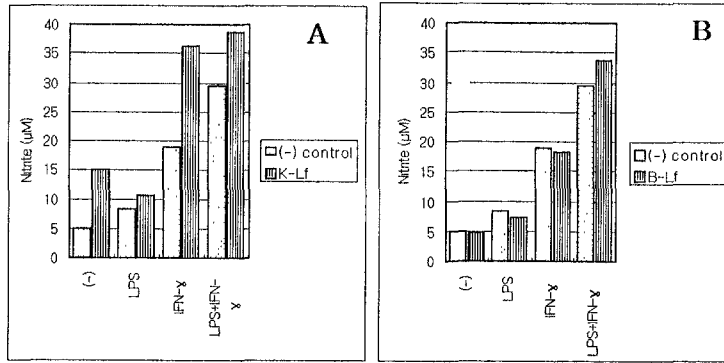


Fig 31. NO production of RAW264.7 cells by lactoferrin purified from Korean native cow's colostrum(A) and commercial bovine lactoferrin(B) with stimulants

- Concentration of lactoferrin was 1mg/ml, respectively
- LPS : 100ng/ml, IFN- γ : 10unit/ml,
- LPS+IFN- γ : combination of equivalent amounts LPS and IFN- γ

5.6. Lactoferrin 가수분해물이 RAW264.7 cell의 TNF- α 생성량에 미치는 영향

Lf과 Lf-h의 macrophage cell에 의한 TNF- α 생성량의 차이를 알아보기 위하여 TNF- α 의 bioassay 에 의해 TNF- α 의 생성량 변화를 살펴보았다. K-Lf-h의 첨가는 K-Lf 첨가에서와 같이 K-Lf-h 만 단독첨가에 의해서 TNF- α 생성을 유도하였다(Fig. 32-A). 즉, K-Lf에 의한 세포 생존율이 22% 였던 결과표에 비하여 K-Lf-h는 43%의 세포 생존율을 보여줌으로써 가수분해물이 TNF- α 생성 유도 능력을 가지고 있음을 알 수 있다. Lf-h와 LPS를 동시에 첨가한 경우에는 K-Lf-h와 B-Lf-h 모두 LPS 처리한 것과 TNF- α 의 생성량이 거의 비슷하여 Lf-h첨가가 TNF- α 생성에 거의 영향을 끼치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 32-B). Lf-h를 농도별로 달리 첨가하였을 때, K-Lf-h의 경우는 첨가 농도가 증가함에 따라 TNF- α 의 생성량을 증가시켰고 B-Lf-h도 같은 경향을 나타내지만 K-Lf-h보다는 낮은 수준이었다(Fig. 32-C, 32-D). 항균성 테스트에서 더 높은 항균력을 나타냈던 Lf-h가 TNF- α 생성 유도에서는 K-Lf의 약 75 % 밖에 미치지 못하였다. 이러한 결과는 Lf의 두가지 기능, 즉 항균 기능과 TNF- α 의 생성 기능은 서로 연관성이 없는 독립된 작용 기전에 의해서 유도되는 것으로 나타났다. 그러나 현재까지 Lf의 이러한 기능들이 Lf 구조의 어느 부위에서 어떻게 관련이 있는지 확인되지 않았다.

5.7. Lactoferrin 가수분해물이 RAW264.7 cell의 NO 생성량에 미치는 영향

Lf와 Lf-h 첨가에 의한 macrophage cell의 NO 생성량은 Fig. 33와 같다. Lf-h를 단독으로 첨가했을 경우 Fig. 33-A에서처럼 K-Lf-h의 첨가는 약간의 NO 생성을 유도하였으나 B-Lf-h의 처리는 농도에 따른 증가를 거의 보이지는 않았다. 가수분해물과 LPS의 혼합첨가에 의해서도 역시 Lf 첨가시와 마찬가지로 NO 생성에는 거의 영향을 주지 못한 것으로 보여지며 IFN- γ 과 IFN- γ 와 LPS를 동시에 첨가한 경우에도 Lf 첨가와 거의 같은 경향을 보여 주었다(Fig. 33-B, 33-C).

Lf 가수 분해물의 항균력은 Lf보다 더 높게 나타나지만 macrophage cell에 의한 NO 생성에 거의 영향을 나타내지 못하는 것은 항균성을 나타내는 부위가 TNF- α 나 NO 생성작용에 영향을 주는 부위가 서로 다른 것에서 기인하는 것으로 생각되어진다. Lfcin이 Human monocytic cell에서 endotoxin에 의해 증가된 IL-6를 억제한다는 Mattsby-baltzer등(1996)의 보고나 human polymorphonuclear leukocytes로부터 IL-8을 분비하는 영향(Shinoda, 1996)에 관한 보고 같이 본 실험에서의 결과는 별다른 영향을 나타내지 못했지만 Lf-cin이 다른 종류의 세포와 세포 내에서 TNF- α 나 NO 생성작용 외에 다른 조절 작용을 할 가능성을 배제해서는 안될 것으로 사료된다

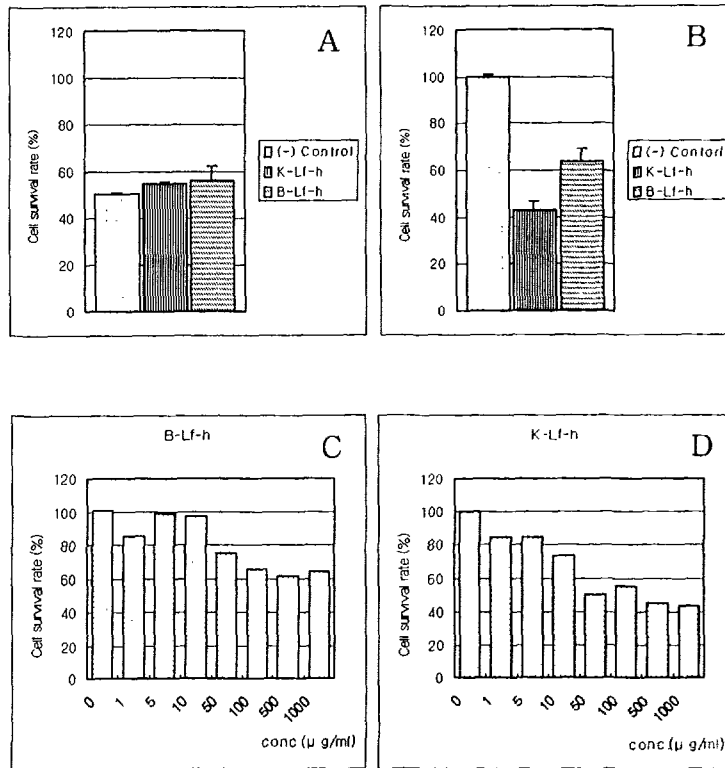


Fig 32. TNF- α production of RAW264.7 cells by peptic hydrolysate of Korean native cow's lactoferrin and peptic hydrolysate of commercial bovine lactoferrin

- A : RAW 264.7 cells were incubated with peptic lactoferrin hydrolysate at 1mg/ml in DMEM with 10% FBS
- B : RAW 264.7 cells were incubated with peptic lactoferrin hydrolysate at 1mg/ml with 1µg/ml LPS
- C, D : RAW264.7 cells were incubated with different level of peptic lactoferrin hydrolysate(at 0 to 1000µg/ml)

- TNF- α production was expressed by growth inhibition of L929 cells
- Survival rates were measured by MTT assay in which supernatant of cultured RAW264.7 cells for 6hrs was applied to L929 cells

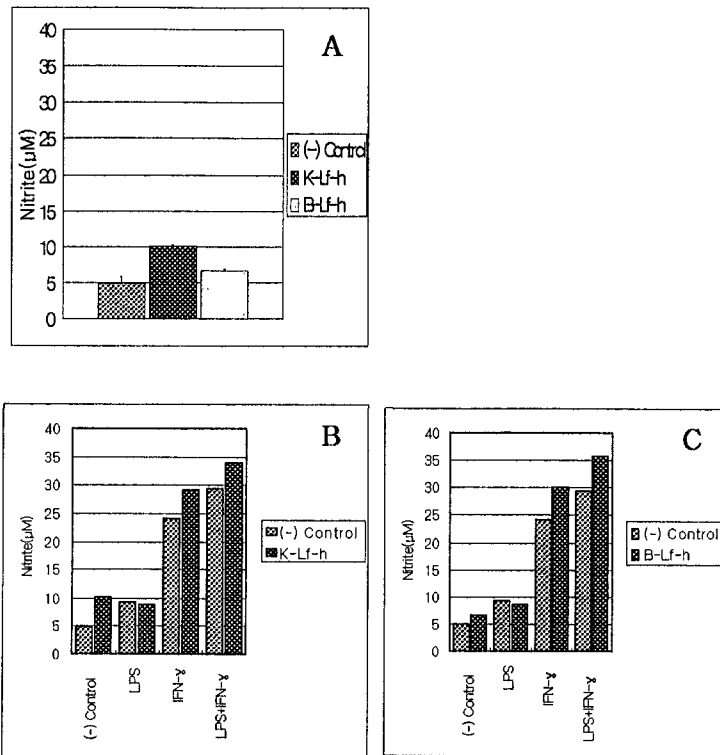


Fig. 33. NO production of RAW264.7 cells by peptic hydrolysate of Korean native cow's lactoferrin and peptic hydrolysate of commercial bovine lactoferrin

A : RAW264.7 cells were incubated with peptic lactoferrin hydrolysate at 1mg/ml in DMEM with 10% FBS

B, C : RAW264.7 cells were incubated with peptic hydrolysate of lactoferrins with stimulants

- Concentration of lactoferrin was 1mg/ml, respectively

- LPS : 100ng/ml, IFN- γ : 10unit/ml,

- LPS+IFN- γ : combination of equivalent amounts LPS and IFN- γ

6. 암세포 증식에 미치는 영향

Lf이 발현된 암조직에 세포에 작용하여 세포괴사를 유발하고, 또한 Demian 등(1998)에 의하면 Lf이 암 발생의 초기단계에서 암세포의 증식을 억제한다고 보고되어있다. 본 실험에서는 H-Lf, B-Lf, K-Lf가 human 유래 8종의 암세포에 대하여 세포 증식에 미치는 영향을 in vitro에서 $1\mu\text{g}/\text{ml} \sim 1\text{mg}/\text{ml}$ 의 농도로 96hrs을 자극한 후 MTT 처리한 결과는 Fig. 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 에 나타내었다. 세포 증식억제율은 실험대조군인 양성 대조군 평균값에서 시험군의 값에 대한 백분율로 산출하여 50% 생존율을 나타내는 농도를 항암효과의 지표로 사용하였다.

Fig. 34.에서 나타낸바와같이 $1\text{mg}/\text{ml}$ 의 농도에서 K-Lf가 폐암 세포주인 A427에서 71% 증식억제 효과를 나타내었고, b-Lf는 53%의 증식억제를 나타내었으나, H-Lf는 48%의 증식억제를 나타내었다. 또한 Fig. 39에서 나타낸바와같이 유방암 세포주인 MCF-7에 대하여는 k-Lf가 62%, b-Lf가 50%의 증식억제효과를 나타내었지만, h-Lf는 약38%의 억제효과를 나타냄으로써 암세포 증식억제 효과가 미약함을 알수 있다. 또한 Fig. 37, Fig. 40에서 나타난 바와 같이 간암 세포주인 HepG2와 Sk-Hep-1에 대하여 K-Lf가 $1\text{mg}/\text{ml}$ 에서 약 50% 이상의 증식억제를 나타내었지만, K-Lf가 $0.1\text{mg}/\text{ml}$ 에서 51%, 47%의 증식억제효과를 나타낸 것과 비교할때 b-Lf이 $1\text{mg}/\text{ml}$ 에서 38%, 42%의 증식억제를 나타냄으로써, K-Lf가 b-Lf, H-Lf와 비교할때 암세포에 대한 증식 억제효과가 높게 나타남을 알수 있다. 또한 다른 모든 암세포주들에 대하여도 K-Lf가 b-Lf, H-Lf와 비교하였을때 암세포 증식 억제효과가 높게 나타내었다. 이것은 Furmanski(1994)등에 의해 Lf의 암세포 증식억제효과가 미생물 증식억제 mechanism과 유사하게 iron chelation이 암세포의 성장을 억제한다고 보고하였는데, 본 연구에서 K-Lf이 b-Lf, h-Lf에 비해 높은 철 포화도를 나타낸 것으로 미루어볼때 K-Lf가 b-Lf, h-Lf에 비하여 높은 암세포 증식 저해 효과를 나타낸 것과 상관관계가 있는것으로 사료된다.

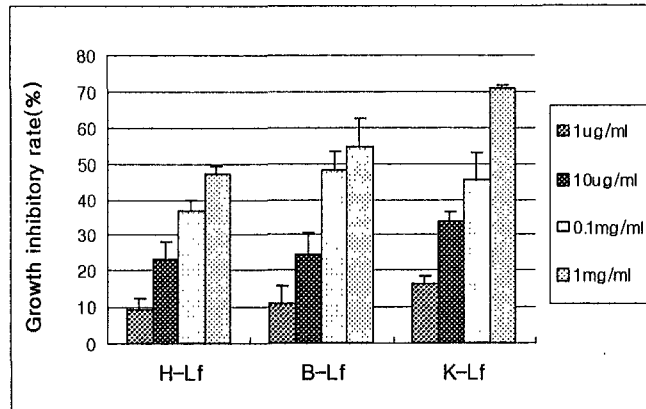


Fig. 34. Cytotoxicity of Lactoferrin on A427

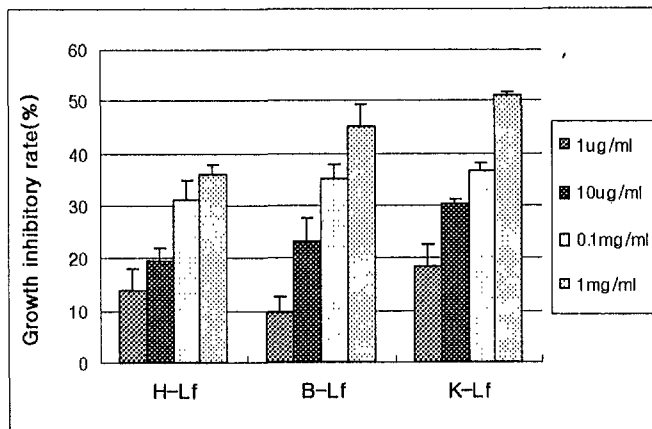


Fig. 35. Cytotoxicity of Lactoferrin on A498

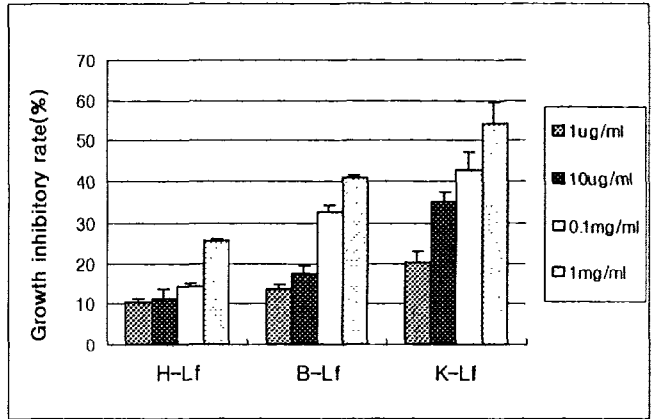


Fig. 36. Cytotoxicity of Lactoferrin on HeLa

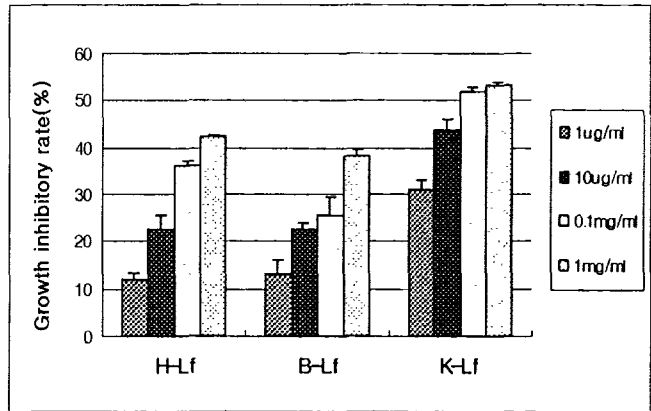


Fig. 37. Cytotoxicity of Lactoferrin on HepG2

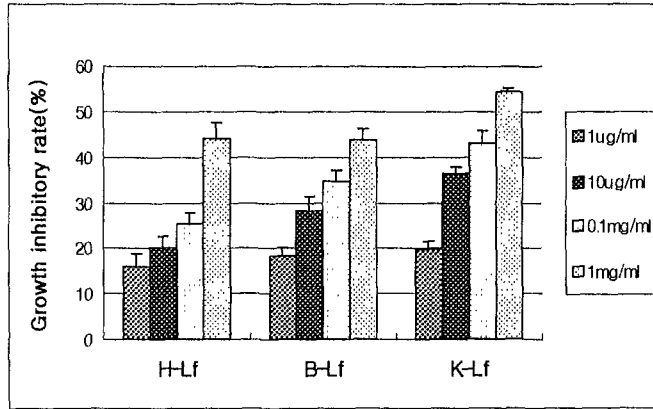


Fig. 38. Cytotoxicity of Lactoferrin on Ht29

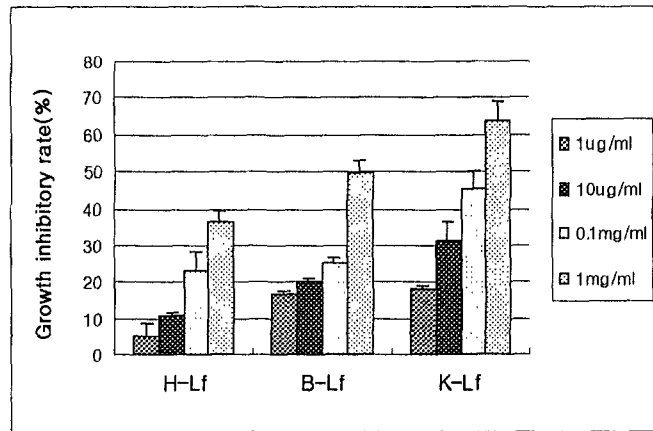


Fig. 39. Cytotoxicity of Lactoferrin on MCF-7

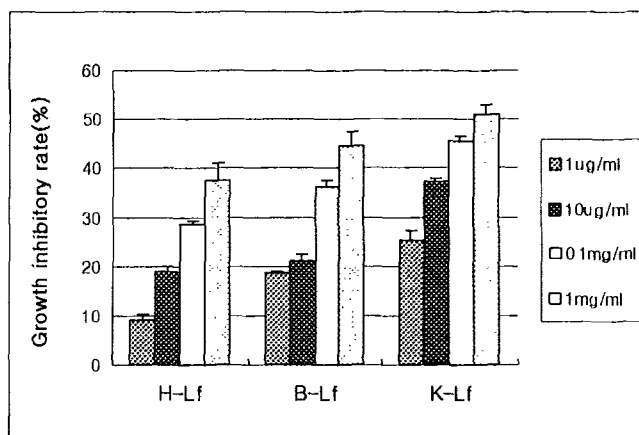


Fig. 40. Cytotoxicity of Lactoferrin on SK-Hep-1

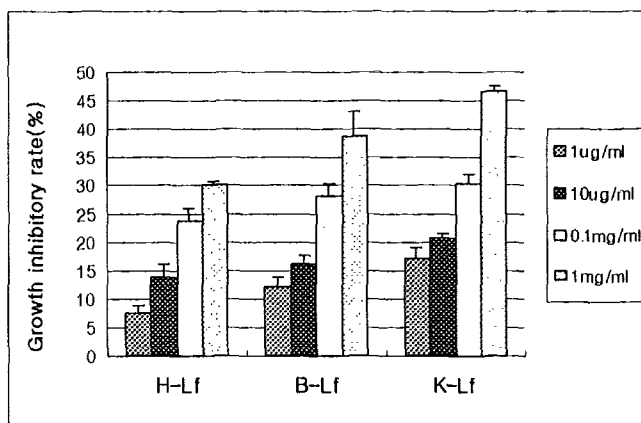


Fig. 41. Cytotoxicity of Lactoferrin on WiDr

7. Lf이 Cytokine 발현에 미치는 영향

Lf이 병원성 미생물의 침입시 숙주방어에 있어서 여러가지 면역 조절기능을 하고, 생체내에서 항염증 인자로서 중요한 역할을 하는것으로 알려져 있다. Lf이 cytokine 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 mouse T cell인 EL4 cell을 이용하여 RT-PCR, PCR을 통한 IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ 의 분비 유도능력은 Fig. 42, 43, 44, 45에 나타내었다.

생체내에 면역 조절 반응에서 외부물질 침입에 T cell 증식을 유도하는 cytokine인 IL-2 분비가 높아지는데, Fig. 42에서 나타난 바와 같이 Lf이 IL-2 분비유도능력을 실험한 결과 K-Lf, H-Lf, B-Lf, B-Lf 모두 IL-2를 유도하고 있는 것으로 확인되었다. 이러한 유도 능력은 양성대조군인 PMA와 비교할 때 거의 동일한 수준이었으며, 그 중 K-Lf, H-Lf는 B-Lf보다 IL-2 유도능력이 강한 것으로 나타났다.

IL-4 분비유도에 있어서는 Fig. 43에서 나타난 바와 같이 K-Lf, B-Lf가 IL-4를 유도하고 있는 것으로 확인되었다. IL-4의 분비도 양성대조군인 PMA로만 자극한 것과 비교해 보면 거의 동일한 수준이었으며, 그 중 B-Lf가 K-Lf보다 IL-4 유도 능력이 다소 높은 것으로 나타났다.

IL-6 분비유도에 있어서 Fig. 44에 나타난 바와같이 K-Lf, B-Lf이 IL-6를 유도하고 있는 것으로 확인되었으나 양성대조군인 PMA로만 자극한 것과 비교하면 K-Lf, B-Lf로 자극한 것이 IL-6 분비유도능력이 다소 낮게 나타났다.

Fig. 45에 나타난 바에 의하면, IFN- γ 의 분비유도에 있어서는 B-Lf가 IFN- γ 분비를 유도하였고 K-Lf는 IFN- γ 를 유도하지 않는 것으로 확인되었다. K-Lf가 IFN- γ 를 유도하지 않은 것은 소의 품종간의 차이에 따른 유전적 변이에 의한 것이라 생각된다.

Lane 1 2 3 4 5 6 7
 ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓

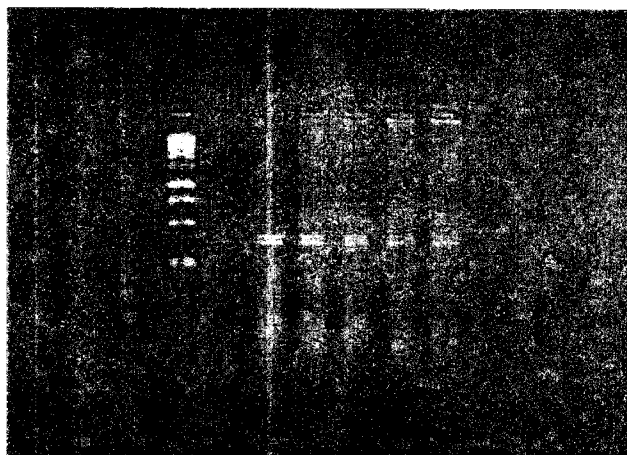


Fig. 42. Agarose(1.5%) gel electrophoresis of IL-2 products induced from different kinds of lactoferrin.

- Lane 1 : 1kb DNA ladder
- Lane 2 : Negative control (EL-4 itself)
- Lane 3 : Positive control (PMA 100ng/ml)
- Lane 4 : Korean native cow Lf (1mg/ml)
- Lane 5 : Sigma human Lf (1mg/ml)
- Lane 6 : Sigma bovine Lf (1mg/ml)
- Lane 7 : Morinaga bovine Lf (1mg/ml)

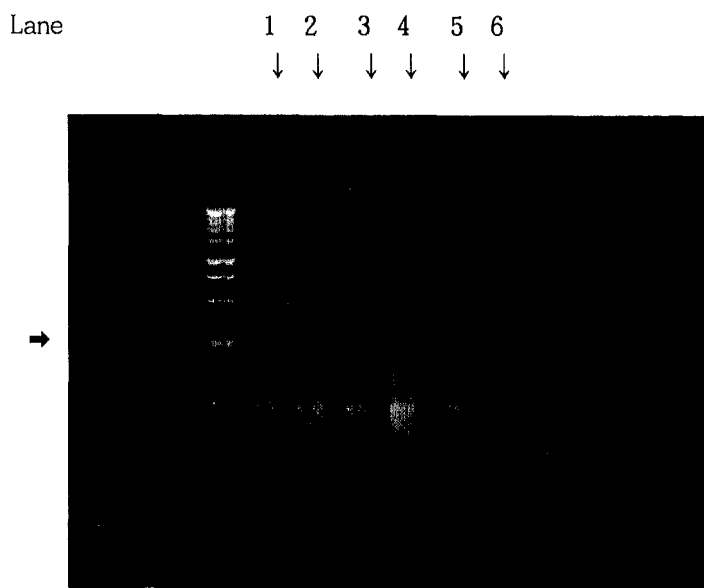


Fig. 43. Agarose(1.5%) gel electrophoresis of IL-4 products induced from different kinds of lactoferrin.

- Lane 1 : 1kb DNA ladder
- Lane 2 : Negative control (EL-4 itself)
- Lane 3 : Positive control (PMA 100ng/ml)
- Lane 4 : Korean native cow Lf (1mg/ml)
- Lane 5 : bovine Lf (1mg/ml)
- Lane 6 : humanLf (1mg/ml)

Lane 1 2 3 4 5 6
 ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓

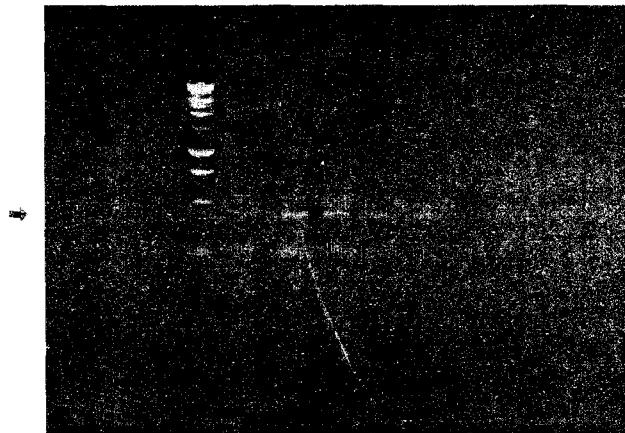


Fig. 44. Agarose(1.5%) gel electrophoresis of IL-6 products induced from different kinds of lactoferrin.

- Lane 1 : 1kb DNA ladder
- Lane 2 : Negative control (EL-4 itself)
- Lane 3 : Positive control (PMA 100ng/ml)
- Lane 4 : Korean native cow Lf (1mg/ml)
- Lane 5 : Sigma bovine Lf (1mg/ml)
- Lane 6 : Morinaga bovine Lf (1mg/ml)

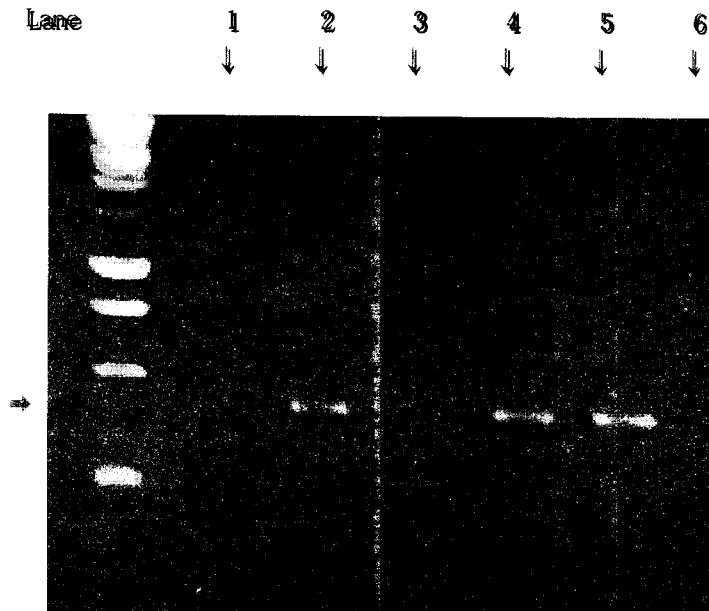


Fig. 45. Agarose(1.5%) gel electrophoresis of IFN- γ products induced from different kinds of lactoferrin.

- Lane 1 : 1kb DNA ladder
- Lane 2 : Negative control (EL-4 itself)
- Lane 3 : Positive control (PMA 100ng/ml)
- Lane 4 : Korean native cow Lf (1mg/ml)
- Lane 5 : Sigma bovine Lf (1mg/ml)
- Lane 6 : Morinaga bovine Lf (1mg/ml)

8. 동물실험 모델을 이용한 Lf의 항균활성

Lf의 생리학적인 기능을 밝히기 위하여 *S. aureus*를 혈관주사를 통하여 mouse에 감염시킨 후, 일정기간 Lf를 투여함으로써, *S. aureus*의 kidney infection에 미치는 감염 억제 효과를 검증하고자 실시하였다. 간에 대한 *S. aureus*의 감염에 대한 hLf와 bLf의 효과를 측정한 결과, 두 Lf는 거의 동일한 효과가 있는 것이 확인되었다. 감염에 대한 저해능도는 1mg Lf/mouse를 경구투여하는 것이 가장 효과적이었으며, *S. aureus*감염억제를 위한 Lf의 혈관투여는 감염 1일전에 주사하는 것이 가장 이상적인 것으로 나타났다.

S. aureus 주사 후 bLf를 14일간 경구투여할 경우, control과 비교했을 때, *S. aureus*의 감염에 의한 kidney 간세포의 성장은 약 40~60% 양호하였으며, kidney 간세포조직을 일정기간 배양한 후 측정한 *S. aureus*의 균 수는 5-12배 적은 것으로 나타났다. 따라서, Lf는 경구투여되더라도 일정한 양은 위에서 완전히 소화되지 않으며, 그 중 일부의 Lf는 장관을 통한 흡수 등으로 생체방어 시스템에 직접적으로 관여하고 있을 것으로 생각한다. 또한, *in vivo*에 의해 병원성 균의 조직 침투성을 방어한다는 측면에서는 본 연구결과가 Lf의 생체내 기능을 해석하는데 크게 기여할 것으로 생각된다.

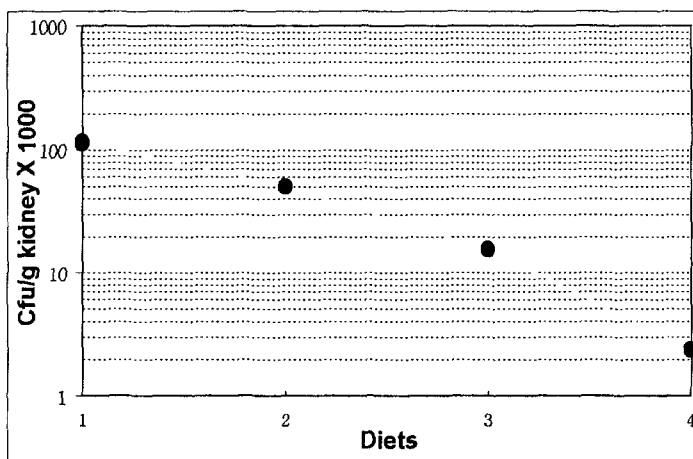


Fig. 46. Effect of feeding bLf on the development of kidney infections by *Staphylococcus aureus* in C57BL/6 mice.

Mice were divided into four randomized groups with six or more animals per group. Group 1, pelleted diet and water; 2, pelleted diet and 2% bLf; 3, supplied with milk; 4, fed milk containing 2% bLf.

All the animals were injected iv with 10^6 viable *staphylococci*.

V. 참고문헌

- Aisen, P., and I. Listowsky. 1980. Iron transport and storage proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 49 : 357
- Arnold, R. R., J. E. Russell., W. J. Champion., and J. J. Gauthier. 1981. Bactericidal activity of human lactoferrin: Influence of physical conditions and metabolic state of the target microorganisms. *Infect Immu.* 32 : 665
- Arnold, R. R., M. F. Cole and J. R. Mcghee. 1977. A bactericidal effect of human lactoferrin. *Science* 197 : 263.
- Baer, A., M. Oroz., and B. Blanc. 1979. Serological and fluorescence studies if the heat stablitiy of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.* 46 : 83
- Baggiolini, M., C. DeDuve., P. L. Masson., and J. F. Heremans. 1970. Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes. *J. Exp. Med.* 131 : 559
- Baker, E. N., S. V. Rumball and B. F. Anderson. 1987. Transferrins : insight into structural and function from studies on lactoferrin. *Trends. Biochem. Sci.* 12 : 350.
- Baynes, R. D., W. R. Bezwoda., Q. Khan., and M. Mansoor. 1986. Relationship of plasma lactoferrin content to neutrophil regeneration and bone marrow infusion. *Scand. J. Haematol.* 37 : 353
- Bellamy W., M. Takase, H. Wakabayashi, K. Kawase and M. Tomita. 1992. Antibacterial spectrum of Lactoferrin B, a Potent Bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J. Applied Bacteriologie.* 73: 472.
- Bellamy, W., K. Yamauchi, H. Wakabayashi, M. Takase, K. Kawase, S. Shimamura and M. Tomita. 1994. Antifungal properties of lactoferricin B, a peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin *Appl. Microbiology* 18 : 230.
- Bennett, R. M. and C. Mohla. 1976. A solid-phase radioimmunoassay for the measurement of lactoferrin in human plasma : Variations with age, sex and disease. *J. Lab. Clin. Med.* 88 : 156.
- Beutler, B., I. W. Milsark and A. C. Cerami. 1985. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect

- of endotoxin. *Science* 229 : 869.
- Beutler, P. B. 1992. Tumor necrosis factors : The molecules and their emerging role in medicine. Raven press, New York.
- Birgens, H. S. 1984 The biological significance of lactoferrin in haematology. *Scand. J. Haematol.* 33 : 225
- Birgens, H. S., N. E. Hansen., H. Karle., and L. O. Kristensen. 1983. Receptor binding of lactoferrin by human monocyter. *Br. J. Haematol.* 54 : 383
- Boxer, L. A., B. Bjorkstein., J. Bjork., H. Yang., J. M. Allen., And R. L. Baehner. 1982a. Neutropenia induced by systemic infusions of lactoferrin. *J. Lab. Clin. Med.* 99 : 866.
- Boxer, L. A., T. D. Coates., R. A. Haak., J. B. Wolach., S. Hoffstein., and R. L. Baehner. 1982b. Lactoferrin deficiency associated with altered cell function. *New Engl. J. Med.* 307 : 404.
- Brentwood, B. J., and P. M. Henson. 1980. the sequential release of granule constituents from human neutrophils. *J. Immunol.* 124 : 885.
- Breton-Gorius, j., D. Maason., D. Buriot., J. Vilde., and C. Griscelli. 1980. Lactoferrin deficiency as a consequence of a lack of specific granules in neutrophils from a patient with recurrent of infections. *Am. J. Pathol.* 99 : 413.
- Brine, R. D., and J. H. Brock. 1983. The effect of trypsin and chymotrypsin on the *in vitro* antimicrobial and iron-binding properties of lactoferrin in human milk lytic digestion. *Biochim. Biophys. Acta.* 759 : 229.
- Brock, J. H. 1985. Metal proteins with non-redox roles. *Topics in molecular and structural biology.* 7 : 183.
- Broxmeyer, H. E., A. Smithyman., R. R. Eger., P. A. Meyers., and M. DeSoursa. 1978. Identification of lactoferrin as the granulocyte-derived inhibitory of colony-stimulating activity production. *J. Exp. Med.* 148 : 1052.
- Broxmeyer, H. E., M. De Sousa, A. Smithyman, P. Ralph, J. Amilton, J. Kurland and Bognack. 1980. Specificity and modulation of the action of lactoferrin, a negative feedback regulator of myelopoiesis. *Blood* 55 :

324.

- Broxmeyer, H. E. 1989. Iron in Immunity. Cancer and Inflammation. Edited by M. DeSousa and J. M. Brock., John Wiley & Sons Ltd. New York, PP. 199.
- Bullen, J. J. 1981. The significance of iron in infection. Rev. Infect. Dis. 3 :1127.
- Bullen, J. J. and J. A. Amstrong. 1979. The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leukocyte. J. Immunol. 36 : 781.
- Bullen, J. J., H. J. Rogers and L. Legih. 1972. Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants. Br. Med. J. 1 : 69.
- Chen, J. P., and C. H. Wang. 1991. Microfiltration affinity purification of lactoferrin and immunoglobulin G from cheese whey. J. Food Sci. 56 : 701.
- Dalmastri, C., P. Valenti., P. Visca., P. Vittorioso., and N. Orsi. 1988. Enhanced antimicrobial activity of lactoferrin by binding to the bacterial surface. Microbiologica. 11 : 225.
- Davidson, L. A., and B. Lonnerdal. 1986. Isolation and characterization of rhesus monkey milk lactoferrin. Pediatr. Res. 20 :197.
- Dionysius, D. A., J. B. Herse and P. A. Grieve. 1991. Extraction of lactoperoxidase and lactoferrin from whey using batch ion exchange techniques. Aust. J. Dairy Technol. Nov. : 72.
- Ellison, R. T., and T. J. Giehl. 1991. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. J. Clin. Invest. 88 :1080.
- Ellison, R. T., T. J. Giehl., and F. W. Laforce. 1988. Damage of the outer membrane of enteric Gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. Infect. Immunol. 56 :2774.
- Ena, J. M., H. Castillo, L. Sanchez., and M. Calvo. 1990. Isolation of human lactoferrin by affinity chromatography using insolubilized bovine β -lactoglobulin. J. Chromatogr. 525 : 442.
- Fiat, A. M., L. T. Sylviane., J. P. caen., and P. Jolles. 1989. Biologically active peptides of casein and lactotransferrin implicated in platelet function. 56 : 351.

- Finkelstein, R. A., C. V. sciortino., and M. A. Mcintosh. 1983. Role of iron in microbe-host interactions. *Rev. Infect. Dis.* 5 : S759.
- Firestein, G. S. 1994. : Rheumatoid synovitis and pannus. *Reumatology*.
- Fransson, G. B., B. Lonnerdal. 1980. Iron in human milk. *J. Pediatr.* 96 : 380.
- Furchgott, R. F. and P. M. Vanhoutte. 1989. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *J. FASEB.* Jul. 3(9) : 2007.
- Gallin, J. I., M. P. Fletcher., B. E. Seligmann., S. Hoffstein., K. Cehrs., and N. Mouriessa. 1982. Human neutrophil specific granule deficiency: A model to assess the role of neutrophil specific granules in the evolution of the inflammatory response. *Blood.* 59 : 1317.
- Gentile, P., and H. E. Broxmeyer. 1983. Suppression of mouse myelopoiesis by administration of human lactoferrin *in vivo* and the comparative action of human transferrin. *Blood.* 61 : 982.
- Gnezditskaya, E. V., V. P. Bukhova., N. A. Zakharova., and L. A. Malkina. 1987. Lactoferrin-induced stimulation of Fcu and Fc receptor expression on the surface of human thymus lymphocytes *in vitro*. *Bull. Exp. Biol. Med.* 103 : 447.
- Goldman, A. S., and L. G. Young. 1981. Immunological identification of lactoferrin as a shared antigen on radioiodinated human sperm surface and in radioiodinated human seminal plasma. *J. Reprod. Immunol.* 3 : 99.
- Goodman, R. E., and F. L. Schanbacher. 1991. Bovine lactoferrin mRNA : Sequence, analysis and expression in the mammary gland. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 180(1) : 75.
- Groves, M. L. 1960. Isolation of a red protein from milk. *J. Am. Chem. Soc.* 82 : 3345.
- Gurr, M. I. 1981. Review of the progress of dairy science : Human and artificail milks for infant feeding. *J. Dairy Res.* 48 : 519.
- Guttenberg, T. J., O. Rokke, O. Andersen and T. Jorgensen. 1989. Early fall of circulating iron and rapid rise of lactoferrin in septicemia and endotoxemia an early defence mechanism. *Scand. J. Infect. Dis.* 21 : 709.
- Hansen, N. E., J. Malmquist., and J. Thorell. 1975. Plasma myeloperoxidase and lactoferrin measured by radioimmunoassay : relations to neutrophil

- kinetics. *Acta Med. Scand.* 198 : 437.
- Hanson, L. A., B. Andersson., and B. Carlsson. 1984. Defence of mucous membranes by antibodies, receptor analogues and non-specific host factors. *Infect. Immunol.* 12 : 111.
- Hutchens, T. W., J. F. Henry., and T. T. Yip. 1989. Purification of intact lactoferrin found in the urine of human milk fed preterm infants. *Clin. Chem.* 35 : 1928.
- Ignarro, L. J. 1990. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30 : 535.
- Johansson, B. G. 1960. Isolation of crystallin lactoferrin from human milk. *Acta. Chem. Scand.* 14 : 510.
- Jolles, J., A. Donda., P. Amiguet., and P. Jolles. 1984. Mare lactotransferrin: purification, analysis and N-terminal sequence determination. *FEBS Lett.* 176 : 185.
- Kijlstra, A., A. Kuizenga., M. Velde., and N. J. Haeringen. 1989. Gel electrophoresis of human tears reveals various forms of tear lactoferrin. *Curr. Eye Res.* 8 : 581.
- Kijlstra, A., and L. Broersma. 1984. Lactoferrin stimulates the production of leukocyte migration inhibitory factor by human peripheral mononuclear leukocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 55 : 459.
- Kirkpatrick, C. H., I. Green., R. R. Rich., and A. L. Schode. 1971. Inhibition of growth of *Candida albicans* by iron-unsaturated lactoferrin: relationship to host defense mechanisms in chronic microcutaneous candidiasis. *J. Infect. Dis.* 124 : 539.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680.
- Lash, J. A., T. D. coates., J. Lafuze., R. L. Baehner., and L. A. Boxer. 1983. Plasma lactoferrin reflects granulocyte activation *in vivo*. *Blood.* 61 : 885.
- Leclereq, Y., G. Sawatzki., J. M. Wieruszeski., J. Montreuil., and G. Spik. 1987. Primary structure of the glycans from mouse serum and milk transferrins. *Biochem. J.* 247 : 571.
- Lomax, K. J., J. Gallin., D. Rostrosen., G. D. Raphael., M. A. Kalinge.,

- E. Benz., L. A. Boxer., and H. L. Malech. 1889. Selective defect in myeloid cell lactoferrin gene expression in neutrophil specific granule deficiency. *J. Clin. Invest.* 83 : 514.
- Machnicki, M., M. Zimecki and T. Zagulskit. 1993. Lactoferrin regulates the release of tumour necrosis factor alpha and interleukin-6 *in vivo*. *Int. J. Path.* 74 : 433.
- Malmquist, J., N. E. Hansen and H. Karle. 1978. Lactoferrin in Heamatology. *Scand. J. Heamatol.* 21 : 5.
- Manogue, K. R., J. H. V. Denventer and A. Cerami. 1992. Tumor necrosis factor or cachetin. *The Cytokine Handbook*. Thomson, A.(Ed). Academic press, Inc. Sandiego.
- Mansson, B., P. Geborek, T. Saxne and S. Bjornsson. 1990. Cystidine deaminase activity in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis : relation to lactoferrin, acidosis and cartilage proteoglycan release. *Ann. Rheum. Dis.* Aug. 49(8) : 594.
- Mansson, P. L., J. F. Heremans., and J. Ferin. 1968. Presence of an Iron-binding protein (lactoferrin) in the genital tract of the human female. I. Its immunohistochemical localization in the endometrium. *Fertil. Steril.* 19 : 697.
- Mansson, P. L., J. F. Heremans., J. J. Prignot., and G. Wauters., 1966b. Immunochemical localization and bacteriostatic properties of iron-binding protein from bronchial mucus. *Thorax.* 21 : 538.
- Masson, P. L., and J. F. Heremans. 1966. Studies on lactoferrin, the iron binding protein of secretions. *Protides Biol. Fluids.* 14 : 115.
- Masson, P. L., J. F. Heremans., and E. Schonne. 1969. Lactoferrin an iron binding protein in neutrophilic leukocytes. *J. Exp. Med.* 130 : 643.
- Mattsby-baltzer, I., A. Roseanu, C. Motas, J. Elverfors, I. Engberg, and L. A. Hanson. 1996. Lactoferrin or a fragment there of inhibits the edotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells. *Pedatric Res.* 40(2) : 257~262.
- Mazurier, J., D. Lagrand., H. Hu., J. Montreuil., and G. Spik. 1989. Expression of human lactotraqsferin receptors in phytochemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes.

- Isolation of the receptors by antilignad-affinity chromatography. Eur. J. Biochem. 179 : 481.
- Mead, P. E., and J. Tweedie. 1990. cDNA and protein sequence of bovine lactoferrin. Nucleic Acids Res. 18 : 7167.
- Metz-Boutigue, M. H., J. Jolles., J. Mazurier., F. Schoentigen., D. Legrand., G. Spik., J. Montreuil., And P. Jolles. 1984. Human lactoferrin: amino acid sequence and structural comparison with other transferrins. Eur. J. Biochem. 145 : 659.
- Montreuil, J., J. Tonelat., and S. Mullet. 1960. Proprietes de la lactosiderophile du lait de femme. Biochem. Biophys Acta. 45 : 413.
- Multigner, L., C. Figarella., J. Sahel., and H. Saries. 1980. Lactoferrin and albumin in human pancreatic juice. Dig. Dis. Sci. 25 : 173.
- Nagasawa, T., I. Kiyosawa and K. Kuwahara. 1972. Amounts of lactoferrin in human colostrum and milk. J. Dairy Sci. 55 : 1651.
- Nathan, C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. J. FASEB. 6 : 3051.
- Nemet, K. and I. Simonovits. 1985. The biological role of lactoferrin. Haematol. 18 : 3.
- Nikaido, H. 1989. Outer membrane barrier as mechanism of antimicrobial resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 33 : 1831.
- Nonnecke, B. J., and L. K. Smith. 1984. Inhibition of mastitic bacteria by bovine milk apo-lactoferrin evaluated by *in vitro* microassay of bacterial growth. J. Dairy Sci. 67 : 606.
- O'connor, C. J., and B. M. Sutton. 1987. Interfacial interactions between proteins and mammalian lipases. Advances in Colloid Interface Science. 28 : 1.
- Oram, J. D., and B. Reiter. 1968. Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents. Biochim. Biophys Acta. 170 : 351.
- Pentecost, B. T., and C. T. Teng. 1987. Lactotransferrin is the major estrogen inducible protein of mouse uterine secretions. J. Biol. Chem. 262 : 10134.
- Pierce, A., d. Colavizza., M. Benaissa., P. Maes., A. Tartar., J. Montreuil., and G. Spik. 1991. Molecular cloning and sequence analysis of

- bovine lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* 196 : 177.
- Powell, M. J., and J. E. Ogden. 1990. Nucleotide sequence of human lactoferrin cDNA. *Nucleic Acids Res.* 18 : 4013.
- Rado, T. A., W. Wei., and E. J. Benz. 1987. Isolation of lactoferrin cDNA from a human myeloid library and expression of mRNA during normal and leukemic myelopoiesis. *Blood.* 70 : 989.
- Raha, S., C. Dosquet., J. F. Abgrall., P. Jolles., A. M. Fiat., and J. P. Caen. 1988. Lys-Arg-Asp-Ser a tetrapeptide derived from lactoferrin inhibits binding of monoclonal antibody against glycoprotein IIb-IIIa on ADP-stimulated platelets and megakaryocytes. *Blood.* 72 : 172.
- Reiter, B., J. H. Brock., and E. d. Steel. 1975. Inhibition of *E. Coli* by bovine colostrum and post-colostrum milk. II. The bacteriostatic effect of lactoferrin on a serum-acceptable and serum-resistant strain of *E. coli*. *Immunology.* 28 : 83.
- Rey, M. W., S. L. Woloshrk., H. A. deBoer., and F. R. Pieper. 1990. Complete nucleotide sequence of human mammary gland lactoferrin. *Nucleic Acids Res.* 18 : 5288.
- Richard T. Ellison III and Theodore J. Giehl. 1991. Killing of Gram-negative bacteria by Lactoferrin and Lysozyme. *J. Clin. Invest.* , 88 : 1080.
- Roberts, T. K., and J. C. Bournsnel. 1975. The isolation and characterization of lactoferrin from cow milk and boar seminal plasma. *J. Reprod. Fertil.* 42 : 579.
- Robertson, E. F., H. K. Dannelly, P. J. Malloy, and H. C. Reeves 1987. Rapid isoelectric focusing in vertical polyacrylamide minigel system. *Anal. Biochem.* 167 : 290
- Rohard, E., D. Legrand, J. Mazurier, J. Montreuil and G. Spik. 1989. The N-terminal domain I of human lactotransferrin binds specifically to phytohemagglutinin stimulated peripheral blood human lymphocyte receptors. *FEBS. Lett.* 255 : 201.
- Rose, T. M., G. D. Plowman., D. B. Teplow., W. J. Dryer., K. E. Hellstrom., and J. P. Brown. 1986. Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97 (melanotransferrin) deduced from the mRNA

- sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83 :1261.
- Sawatzki, G. and I. N. Rich. 1989. Lactoferrin stimulates colony stimulating factor production in vitro and in vivo. Blood cells 15 : 371.
- Sekut, L. and K. M. Connolly. 1996. Pathophysiology and regulation of TNF- α in inflammation. Drug News Perspect 9 : 261.
- Shimazaki, K., Kawano, N. and Yoo, Y. C. 1991. Comparison of bovine, sheep, and goat milk lactoferrin in their electrophoretic behavior, conformation, immunochemical properties and lectin reactivity. Comp. Biochem. Physiol. 98B : 417.
- Shimazaki, K., T. Tanaka., H. Kon., K. Oota., A. Kawaguche., Y. Make., T. Sato., Y. Ueda., T. Tomimura., and S. Shimamura. 1993. Separation and characterization of the C-terminal half molecule of bovine lactoferrin. J. Dairy Sci. 76(4) : 964.
- Shinoda, I., M. Takase, Y. Fukuwatari. S. Shimamura. M. König. 1996. Effect of lactoferrin and lactoferricin on the release on interleukin-8 from human polymorphonuclear leucocytes. Biosci. Biotech. Biochem., 60(3) : 521.
- Silva, A. T. and J. Cohen. 1992. Role of interferon-gamma in experimental gram-negative sepsis. J. Infect. Dis. 166 : 331.
- Sorimachi, K., K. Akimoto, Y. Hattori, T. Ieiri and A. Niwa. 1997. Activation of macrophages by lactoferrin : secretion of TNF- α , IL-8 and NO. Int. J. Biochem. Mol. Biol. 43. Sep. : 79~87.
- Spik, G., A. Cheron., J. Montreuil., and J. M. Dolby. 1978. Bacteriostasis of a milk sensitive strain of *Escherichia coli* by immunoglobulins and iron-binding protein in association. Immunology. 35 : 663.
- Spik, G., G. Strecker, B. Fournet, S. Bouguellet and J. Montreuil. 1982. Primary structure of the glycans from human lactotransferrin. Eur. J. Biochem. 121 : 413~419.
- Suzuki, T., K. Yamauchi. K Kawase, M. Tomita, I. Kiyosawa, and S. Dkonogi. 1989. Collaborative bacteriostatic activity of bovine lactoferrin with lysozyme against *Escherichia coli* 0111. Agric. Biol. Chem. 53 : 1705.
- Teuwissen, B., K. Schank., P. L. Masson., P. A. Osinski., and J. H. Heremans, 1974. The denaturation of lactoferrin and transferrin by urea.

- Eur. J. Biochem. 42 : 411.
- Tiegs, G., M. Wolter and A. Wendel. 1989. Tumor necrosis factor is a terminal mediator in galactosamine/endotoxin-induced hepatitis in mice. Biochem. Pharmacol. 38 : 627.
- Tomita, M., M. Tagase, W. Bellamy and S. Shimamura. 1994. The active peptide of lactoferrin. Acta Paediatrica 36 : 585.
- Tomita, M., W. Bellamy, M. Takase, K. Yamaguchi, H. Wakabayashi and K. Takase. 1991. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. J. Dairy Sci. 74 : 4137.
- Tsuji, S., U. Hirata., and K. Matsroka. 1990. Comparison of lactoferrin content in colostrum between different cattle breeds. J. Dairy Sci. 72 : 1130.
- Van Snick J. L., and P. L. Masson. 1976. The binding of lactoferrin to mouse peritineal cells. J. Exp. Med. 144 : 1568.
- VanHalbeek, H., L. Dorland., J. F. G. Vliegenthart., G. Spik., A. Cheron., and J. Montreuil. 1981. Sturcture determination of two oligomannoside-type glycopeptides obtained from bovine lactotransferrin, by 500 MHz 1H-NMR spectroscopy. Biochem. Biophys Acta. 685 : 293.
- Venge, P., T. Foucard., j. Henrickson., L. Hakansson., an A. Kreuger. 1984. Serum-leves of lactoferrin, lysozyme and myeloperoxidase in normal, infertion-prone and leukemic children. Clin. Chem. Acta. 136 : 121.
- Vileek, J. and T. H. Lee. 1991. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanism of its multiple actions. J. Biol. Chem. 266 : 7313.
- Willems, J., M. Joniau, S. Cinque and J. V. Damme. 1989. Human granulocyte chemotatic peptide(IL-8) as a specific neutrophil degranulator : comparison with other monkeys. J. Immunol. 67 : 540.
- Wright, D. G., and J. U. Gallin. 1979. Secretory responses of human neutrophils. Exocytosis of specific (secondary) granules by human neutrophils during adhersence *in vitro* and during exudation *in vivo*. J. Immunol. 123 : 285.
- Zagulski, T., P. Lipinski, A. Zagulska, S. Broniek and Z. Jarzabek. 1989. Lactoferrin can protect mice against a lethal dose Eschechia coli in

- experimental infection in vivo. Bri. J. Exp. Med. 167 : 1987.
- Zucali, J. R., H. E. Broxmeyer., D. Levy., and C. morse. 1989. Lactoferrin decreases monocyte-induced fibroblast production of myeloid colony-stimulating activity by suppressign monocyte release of interleukin-1. Blood. 74 : 1531.
- 이성수, 고서봉, 오운용, 양영훈, 김규일, 조병욱. 1998. 미토콘드리아 DNA D-loop Region의 PCR-RFLP를 이용한 한우 제주 재래 한우와 타품종과의 유전적 관계분석. 한국축산과학회지. 40(4) : 335
- 조재열, 박지수, 유은숙, 백경업, 박명환. 1998. 간보호제 및 담즙산류들이 마크로파지 세포주에서 TNF- α 분비에 미치는 효과. 약학회지. 42(1) : 82.
- 진현석. 1994. 한우 초유중 Lactoferrin의 정제와 특성. 忠南大學校 博士學位論文.
- 진현석, 금종수, 김종우. 1994. Lactoferrin의 생물학적 특성. Korean Dairy Technol. 11(2) : 31.
- 島崎敬一, 1993. ラクトフェリンその構造と機能. バイオサイエンスとイソタストリ 51 : 25.

위탁과제 II

한우 락토펜린 유전자 클로닝 및 대량생산 기술개발

위탁연구기관 : 충남대학교 식품공학과

위탁연구책임자 : 성창근

여 백

제 출 문

생명공학연구소장 귀하

본 보고서를 “한국 재래가축의 유즙으로부터 유용자원(락토페린)의 탐색 및 활용기술에 관한 연구” 과제의 위탁과제(Ⅱ)보고서로 제출합니다.

2000. 11. 30.

제Ⅱ 위탁연구기관명 : 충남대학교

위탁연구책임자 : 성창근 (이석건)

참여연구원 : 주인선, 권일, 이병로, 우문숙, 민대규, 김상규, 이정현

여 백

요 약 문

확보한 한우 락토페린 cDNA로부터 한우 락토페리신(KLFc)을 증폭하여 pPIC9KLFc 구축한 후 *Pichia sp*에 도입하여 KLFc의 발현 및 대량생산을 시도한 본 연구에서 얻어진 결과는 다음과 같다.

한우의 여러조직 중 고환조직에서 Total RNA를 분리하고 RT-PCR을 이용해 cDNA를 정제하였다. 한우 LF cDNA full length을 pUC118 vector에 insertion 시켜 cDNA cloning을 시행 후 그 sequence를 밝혔다. KLFc의 Amino acid homology search 결과, KNC와 Cow LF는 80.4%, KNC와 Goat LF는 75.6%, KNC와 Human LF는 57.6%의 homology가 있음을 확인하였다.

KS1E, KS2E primer를 이용하여 이미 확보한 KLF cDNA로부터 한우 lactoferricin 부위를 증폭시킨 후 pPIC9 vector에 ligation시켜 제한효소 처리로 insertion을 확인하고 expression vector pPIC9KLFc을 만들었다. pPIC9KLFc를 electroporation방법으로 *Pichia sp*에 형질전환시켜 한우 lactoferricin을 보유하며 알콜 대사능이 빠른 형질전환체 SKL6를 확보하였다.

SKL6를 배양하여 얻은 상등액은 다양한 유해미생물(*Streptococcus mutants*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Enterobacter aerogenos*, *Escherichia coli* JM109, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* 0157:H7)에 대해 강한 항균활성을 보였으며, SDS-PAGE결과 한우 lactoferricin이 발현됨을 확인하였다.

형질전환체 SKL6를 통해 생산된 KLFc을 닭에게 투여한 결과 계분중 *Salmonella typhimurium*의 커다란 감소를 보였고, 체중증가, 사료섭취량

과 유해가스의 감소를 보여 가축질병 방지를 위한 사료첨가제 및 , 축사환경개선편제 등으로의 가능성을 확인하였다.

SUMMARY

After pPIC9KLFC harboring lactoferricin core domain was constructed from lactoferrin cDNA, this vector was transformed in *Pichia* sp, rendered it expressed, and analyzed its application of antibiotic activity. This results are summarized as follows;

First, cDNA was obtained from the RT-PCR techniques. The cell of Korean native cattle was used for the total RNA preparations. Cloned fragment of DNA insert was give rise to be sequenced. Homology search show the identity of 80.4% between Korean native cattle and cow LF reported.

Expressed vector named pPIC9KLFC was constructed. This vector was successfully transformed into the host cell by the electroporation. This transformed cell were confirmed th have lfc gene and named to SKL6.

The filtrate of SKL6 culture revealed the strong antibacterial activity against *Streptococcus mutants*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Enterobacter aerogenos*, *Escherichia coli* JM109, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* 0157:H7. The result od SDS-PAGE demonstrated specific band of lfc clearly indicating that SKL6 strain confirmed sure expression.

Salmonella typhimurium was significantly decreased from the treated chicken that infected seriously from the *Salmonella typhimurium*. Also follow the weight gaining, decreasing toxic gas, and increasing the feed intaking.

It could be concluded that lfc may possible to use as a feed additive in order to prevent livestock disease.

CONTENTS

1. Mass production techniques and DNA sequence of korean native cattle	161
1> Introduction	161
2> Material and methods	161
2.1. Material	161
2.2 Methods	162
2.2.1. Cloning and sequencing of LFC gene from korean native cattle	162
2.2.2. Expression and production of KLFC from yeast cell	163
2.2.3. Application and activity test of LFC	164
3> Results and discussion	165
3.1. Cloning and sequencing the KLFC gene	165
3.2. Production and expression of KLFC from yeast cell	170
3.3. Activity test for the LFC	173
4> Results and summary	175

목 차

제 1장 한우락토페린 서열과 대량생산 기술	161
제 1절 서설	161
제 2절 재료 및 방법	161
1. 공시재료	161
2. 연구방법	162
가. 한우락토페린 유전자의 클로닝 및 sequencing	162
나. 효모에서 한우락토페리신 발현 및 생산	163
다. 생체실험을 통한 락토페리신의 생리활성검정 및 활용방안	164
제 3절 결과 및 고찰	165
가. 한우락토페리신 유전자의 클로닝 및 sequencing	165
나. 효모에서 한우락토페리신 발현 및 생산	170
다. 생체실험을 통한 락토페리신의 생리활성 검정	173
제 4절 결론 및 요약	175

제1장 한우락토페린 서열과 대량생산 기술

제 1절 서설

LF에 관한 연구는 산업적 중요성 때문에 거의 실용화 단계에 있음에도 불구하고 국내의 관련연구는 극히 미약하며 이에 따른 국내생산기술의 부족으로 식품산업등에서 그 수요를 충족하기 위하여 약 340억원에 상당하는 양을 일본의 모리나가, 스위스의 세레락등으로부터 전량수입에 의존하고 있어(식품통계연감, 농수산신문, 1994) 외화낭비의 큰 원인이 되고 있다. 한편 일본을 비롯한 생물공학의 선진 외국은 유전공학적 방법에 의존하여 HLF를 대량생산을 위한 연구가 거의 실용화단계에 있는 것으로 추정된다. 이런 시점에서 독자적인 생산을 위한 기초로서 한우 Lf를 유전공학 적 방법들을 통하여 KNC Lf 유전자를 cloning하고 이를 적합한 발현 벡터 들을 제조한 후 여러 숙주들에서 최적 생산조건을 탐구하여 대량생산, 정제, 그리고 생리활성기능을 검토하고 실제 산업화에 응용될수 있도록 System을 개발함이 시급한 문제로 사료된다. 이에 본 연구에서는 한우 (Korean Native Cattle)에서 생리학 적 활성을 지닌 방어 단백질인 LF의 cDNA를 확보하고 각종 미생물로부터 대량생산을 시도하여 국내는 물론 해외시장 개척을 위하여 의약품 및 식품첨가물 등으로서 이용될 수 있도록 의약품 산업, 유가공 산업, 식품산업, 동물사료산업 등의 분야에 기술 이전을 하는 것을 주요 내용으로 한다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 공시재료

본 연구를 위해 사용한 공시재료는 한우의 간, 고환, 유선조직, 턱, 침샘 조직 등으로 도축장에서 구입하였다. 신선도를 유지하기 위하여 채취한 조직은 곧바로 액체질소로 동결시킨다음 -70℃에 보존하였다

2. 연구방법

가. 한우락토페린 유전자의 클로닝 및 Sequencing

1) Total RNA 정제

QIAGEN 社의 RNeasy Mini kit을 사용하여 한우의 간, 고환, 유선조직, 턱, 침샘조직 등으로부터 Total RNA를 분리 하였다.

2) RT-PCR에 의한 한우 락토페린 cDNA의 확인

BM 社의 Titan™ one tube RT-PCR kit을 이용하여 LF cDNA를 Amplification시켰으며, 사용한 primer 염기서열은 다음과 같다. RT-PCR products를 template로 사용하여 PCR한 후 *Pst* I, *Hind* III, *Bam*H I, *Kpn* I 등으로 처리하여 Lf의 유무를 확인하였다.

가) Full length Primer

KCN25(Forward) : 27-mer A+T=12 G+C=15

5' - AAGGATCCAGGTGGCAGACCTTCGTC - 3'

KCC(Reverse) : 28-mer A+T=14 G+C=14

5' - TCTCTAGAGGCTTTACCTCGTCAGGAAG - 3'

나) Internal Primer

BOF500 : 28-mer A+T=17 G+C=11

5' - AGGATATCTGTGGCTAAATTCTTCTCTG - 3'

BOF14 : 20-mer A+T=7 G+C=13

5' - GTGCCTGGCTGAGGACGTTG - 3'

BOF15 : 19-mer A+T=8 G+C=11

5' - AGAGAGCACTGCAGACTGG - 3'

BOR 1 : 20-mer A+T=11 G+C=9

5' - TTGAAGGCACCAGAATAACC - 3'

3) cDNA Cloning 및 KLF의 sequencing

분리된 한우 PCR product을 template로 하여 얻어진 plasmid를

Sequencing 할 목적으로 Subcloning을 시행하였다. Subcloning시, Vector 는 pUC118을 사용 하였고, KLF full length(2.18Kb)를 500bp전후로 잘라 7개의 fragment를 Insert로 하여 각각 Cloning 하였다. 구축된 plasmid를 Bioneer社에 의뢰하여 sequencing하였다(Dye primer 방법과 Dye terminator 방법).

나. 효모에서 한우락토페리신 발현 및 생산

1) 한우락토페리신(KLFC) 증폭을 위한 primer작성

현재까지 밝혀진 모든 lactoferrin amino acids서열의 N-말단 LFC region에는 disulfide bridge를 형성할 수 있는 cystein 잔기들이 공통적으로 존재한 disulfide bridge를 중심으로 homology를 비교, 분석하여 모든 포유동물의 LFC region만을 증폭시킬 수 있는 degenerate primer KS1E, KS2E primer를 작성, 합성을 하였다.

KS1E : 5'-GGCTCGAGAAAAGACTTGGACTGTGTCTGGCT-3'

KS2E : 5'-GGCTCGAGTTAATCM*AGGGTCACAGCATC-3'

*M(A, C)

2) KLFC gene 증폭 및 발현벡터 구축

한우 LF cDNA를 포함하는 pHKF DNA(30ng)와 KS1E, KS2E primer(20pmole)로 AccuPower™PCR Premix(BIONEER, cat. K-2010) 20μl짜리를 이용하여 94℃ 5min, (94℃ 1min, 52℃ 1min 30sec, 72℃ 1min 30sec) 25cycles, 72℃ 7min의 PCR 조건으로 반응 시켰다. 증폭된 KLFC gene는 pPIC9 vector에 ligation(42℃, heat shock 방법)시켰다 (pPIC9KLFC).

3) *Pichia pastoris*로의 형질전환

KLFC을 보유한 pPIC9KLFC을 electrophoration방법(charging voltage 1500V, capacitance 50μF, resistance 200Ω)으로 *Pichia pastoris*에 형질전환시켰다(SKL6). 형질전환체의 유무와 형태는 3'AOX, 5'AOX primer를 사용하여 PCR증폭(94℃ 5min 1cycle, 94℃ 1min 55℃ 1min, 72℃ 1min

25cycles, 72°C 7min 1 cycle)된 size band로 판명하였다.

4) KLFc 발현 및 항균활성

SKL6를 10ml의 BMGY에서 30°C, 150-200rpm조건으로 OD₆₀₀=2-6까지 되도록 전배양한다. 원심분리(1,500-3,000g, RT, 5min)후 cell만 수거하여 500ml baffled flask에 BMMY 100ml로 본배양한다. 본배양 0시간부터 24시간 간격으로 매일 100% methanol을 전체 부피의 0.5%가 되도록 induction한다. 최초 methanol induction후 매 24시간마다 induction 전에 70μl씩 sampling하여 cell down 시킨 후 상등액 60μl만을 가지고 *E. coli* JM109에 paper disc법으로 발현된 KLFC의 항균 활성을 확인하였다. 활성이 확인된 배양액을 이용하여 Gram(+), Gram(-) bacteria, fungi 등 다양한 strains에 대하여 항균활성을 측정하였다. 또한 발현된 KLFc를 확인하기 위하여 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, 14% acrylamide gel 사용)법을 이용하였다.

다. 생체실험을 통한 락토페리신의 생리활성검정 및 활용방안

1) 락토페리신 투여에 따른 *Salmonella typhimurium* 군수변화

생후 10주의 레그혼계 닭 120마리에 대하여 *Salmonella typhimurium*을 매일 2ml(10⁶cfu/ml)씩 1주일 동안 투여하여 *Salmonella typhimurium*에 감염되도록 하였다. 이때에 감염은 계분 중 *Salmonella typhimurium*의 계수로서 최종 확인하였다.

감염된 닭을 4마리씩 T1, T2, T3의 3개 group으로 나눈 후 T1군은 control로 DW 5ml/day, T2군은 DW 4.5ml + KLFc배양액 0.5ml/day, T3군은 KLFc배양액 5ml/day을 3주간 매일 구강 투여하면서 1주, 2주, 3주 후 각각 계분 중의 *Salmonella typhimurium*을 계수하여 KLFc가 얼마나 효과가 있는지를 살펴보았다. 이 연구는 3차 반복에 의해 이루어졌다.

2) 락토페리신 투여에 따른 육계생산성 및 계분내 유해가스 변화

SKL6를 통해 생산된 락토페리신 배양액을 축산기술연구소(대전지소)와 연계하여 5주간 육계에 투여(음수 10%)하고 그 변화를 살펴보았다. 실

험은 항생제 및 항콕시들통제의 유무에 따라 2가지 처리구로 실시하였으며 그 조건은 다음과 같다.

시험구 배치: 6반복 × 30수

사육방법: 전기간 평사

투여방법: 총음수량 중 10% 락토펜리신 배양액 첨가

주요연구내용: 체중변화, 사료섭취량, 장내미생물 조사,

분내 유해가스 발생량 및 깔짚성상조사, 경제성

항생제, 항콕시들통제 투여방법: 0-4주령까지 항생제는 0.05%,

항콕시들통제는 0.03%수준으로 첨가하고 종료시까지 전처리구

무첨가.

제 3절 결과 및 고찰

가. 한우락토펜리신 유전자의 클로닝 및 Sequencing

1) Total RNA 정제 및 RT-PCR에 의한 cDNA의 확인

한우의 고훈조직으로부터 Total RNA를 분리(그림. 1)하였고, RT-PCR하여 LF cDNA를 Amplification시키고, 이를 template로 사용하여 Full length(KCN25-KCC : 2.18kb)가 증폭 되었는지를 확인하였으며 2⁰ PCR을 이용하여 각각의 Internal primer로부터 예상 size가 증폭 됨을 제한효소 처리로 확인 하였다(그림 2, 3). 이 증폭된 cDNA의 제한효소 절단 pattern은 Bovine LF cDNA의 pattern과 유사하였다.

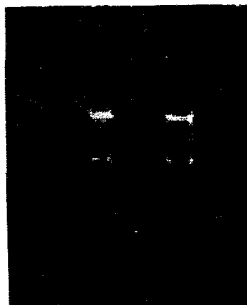


그림1. 한우 고환으로부터 분리한 total RNA

1 2 3 4 5 6



그림 2. internal primers를 사용하여 증폭된 2차 PCR 조각들

lane 1 : Marker DNA(perfect DNA of Takara)

lane 2 : KCN25 - KCC Estimated size : 2.18Kb

lane 3 : BOF500 - KCC Estimated size : 1.64Kb

lane 4 : KCN25 - BOR1 Estimated size : 0.69Kb

lane 5 : BOF14 - KCC Estimated size : 0.49Kb

lane 6 : BOF15 - KCC Estimated size : 0.42kb

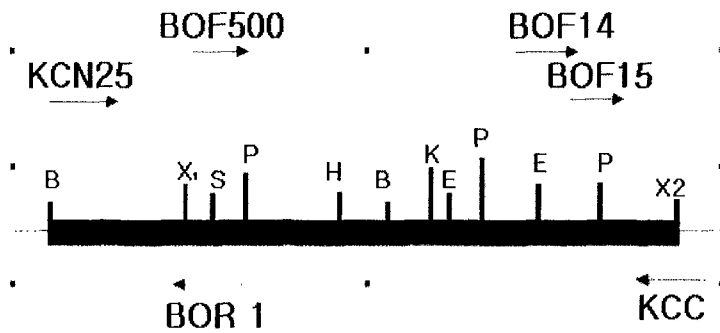


그림 3. RT-PCR에 사용된 primer 위치와 KLF cDNA의 restriction enzyme map

2) cDNA Cloning 및 KLF의 sequencing

KLF full length(2.18Kb)를 500bp 전후로 잘라 7개의 fragment(그림 4)를 pUC118 vector에 각각 subcloning하여 구축된 pHKF를 plasmid sequencing하여 KLF의 서열을 밝혔다(그림 5). 한우 LF과 Bovine LF과의 Homology search(NCBI Database) 결과 88.2%의 Homology가 있음을 확인 하였다.

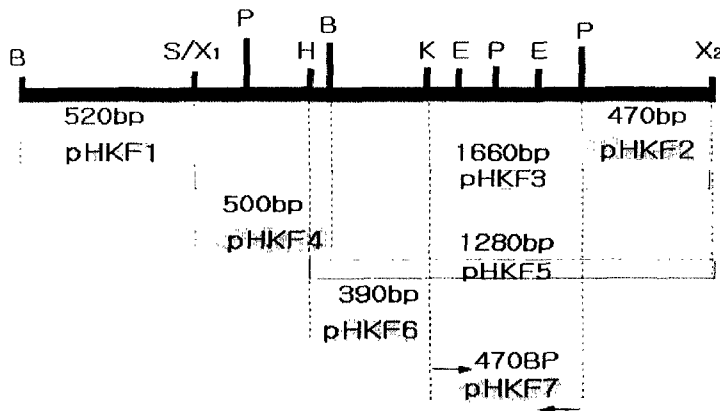


그림 4. KLF cDNA의 restriction map과 sequencing 전략

-126 ggctggggcgcttataggaccacagggcggggcaaacctcgtgaggtcaccgagcactggata
-63 aaggggacgcagaacgagcgcaggtggcagaccttcgttccggagtcgccccaggacgccagcc
KCN25, MHW-1
1 atgccgctcttcgtccccgccctgctgcccttggagcccttggactgtgtctggctgccccg
M P L F V P A L L P L G A L G L C L A A P
64 agggaaaacgttcgatgggtgtaccatctcccaaccggagtggttcaaatgccagccyatgca
R K N V R W C T I S Q F E W F R C Q P E
127 gtagggatgangaagctgggtgctcctctatcaccctgtgtgaggaggcccttggccttggaa
KLFcin
V T L F F A G C S S I T T V E R A F A L E
190 tgtgtccgggccatggcggagaaaaaggcgaatgctgtgaccctggatgggtggcatgggtttt
C V R A M A E K K A N A V T L D G G M V F
253 gaggcgggcccgggacccctacaaactcggccagtagcagcagagatctatgggacgaaagag
E A G R D P Y K L R P V A A E I Y G T K E
316 tctcccaaaccactattatgctgtggccgtcgtgaagaaggcagcaacttccagctggac
S P Q T H Y Y A V A V V K K G S N F Q L D
379 cagctgcaaggccgaaagtcctgccataccggcccttggcaggtccgctgggtgggtcatccct
Q L Q G R K S C H T G L G R S A G W V I P
442 atgggaaatccttcgcccgtacttgagctggacagagtcactcgagcccctccaggagctgtg
Xho I
M G I L R P Y L S W T E S L E P L Q G A V
505 gctaaattcttctctgccagctgtgtccatacatgatagacaagcataccccaacctgtgt
A K F F S A S C V P Y I D R Q A Y P N L C
568 caactgtgcaagggggagggggagaaccagtgtgctgtcctctcccgggaaccatacttcggt
Sma I
Q L C K G E G E N Q C A C S S R E P Y F G
631 tattctgggtgccttcaagtgtctgcaggacggggctggagacgtggcttttgttaaagtgtcg
BOR1 Pst I
Y S G A F K C L Q D G A G D V A F V K V S
694 acagtgtttgagaacttgccagagaaggctgacaggaccagtatgagcttctctgcctgaac
T V F E N L P E K A D R D Q Y E L L C L
757 aacagtcggcggccagtggtatcgttcaaggagtgccacctggccaggtcccttctcatgctgtc
glycosylation site
R R Q W I V Q G V P P G Q V P S H A V
820 gtggcccgaagtgtggatggcaaggaagacttgatctcggaagcttctcagcaaggcgcagga
HindIII
V A R S V D G K E D L I S E A S Q Q G A G
883 gaatttggaaaaaacaagtctcggagcttccagctctgggctctccgccctccagtgggacc
E I W K K Q V S D L P A L G S P P S S G T
946 tgctgttcatattctctgctctatggtttttttggaccctcgaaggtagatcggcgcgtgta
C C S Y S L L Y G F F W T L E G R F G A V
1009 ccttggctcccgtacttgaccaccttgaagaacctcagggaaactcgggaggaggtgaaggc
P W L P L L D H L E E P Q G N C G G G E G
N-Jobe C-Jobe

1072 gcatgtacaccagggcgtgtggtgtgccgtgggacccgaggagcagaagaagtgccacagtgg
 A C T P G R V V C R G T R G A E E V P Q W
 1135 aaccagcagagcggccagaacgtgacctgtgccgaggcgtccaccaccgactactgcatcgtc
 N Q Q S G Q N V T C A A A S T T D Y C I V
 glycosylation site
 1198 ctggtgctgaaaggggaagcagatgccctgaacttggatggaggatatactacactgcccggc
 L V L K G E A D A L N L D G G Y I Y T A G
 1261 aagtgtggcctggtgctgtcctggcagagaaccggaatcctccaatacagtagcctagat
 K C G L V P V L A E N R K S S K Y S S L D
 1324 tgtgtgctgagaccaacagaagggtaccttggcgcggcagttgtcaagaagaacaaatgagggg
 pHKF7-A Kpn I
 C V L R P T E G Y L G A A V V K K A N E G
 1387 ctcatatggaattctctgaaagacaagaagtcgtgcacatgtgtggacaggactcagcgtgg
 EoR I Pst I
 L I W N S L K D K K S C T C V D R T A G W
 1450 aacatccccatgggcctgatgtaacagacaggtcctgcgcatttcgtgaattcttagtcaga
 EcoR I
 K H P H G P D V T D R S C A F R E F F S Q
 1513 gctgtgcccttggggctgaccgaaatccagactctgtgccttgtgtgcctggcgatgaccag
 S C A P G A D P K S R L C A C V P G D D Q
 1576 ggcctgggcaagtgtgtgcccaactctaaggagaagtactatggctataccggggctttcagg
 G L G K C V P N S K E K Y Y G Y T G A F R
 1639 tgcctggctgaggacgttggggacgttgcctttgtgaaaaacgacacagtcctgggagaacacg
 BOF14
 C L A E D V G D V A F V K N D I V W E N T
 glycosylation site
 1702 aatggagagagcactgcagactgggctaagaaattgaaatcgtgaggacttcaggttgctctgc
 BOF15 pHKF7-B
 N G E S T A D W A K K L N R E D F R L L C
 1765 ctcgatggcaccaggaagcctgtgacggaggctcagagctgccacctggcggtggccccgaat
 L D G T R K P V T E A Q S C H L A V A P N
 1828 cacgctgcgggtgtctcggagcgatagggcagcacacgtgaaacaggtgctgctccaccagcag
 H A A V S R S D R A A H V K Q V L L H Q Q
 1891 gctctgtttgggaaaaatggaaaaaactgcccggacaagttttgtttgttcaaatctgaaacc
 A L F G K N G K N C P D K F C L F K S E T
 1954 aaaaaccttctgttcaatgacaacactgagtgtctggccaaacttggaggcagaccaacgtat
 K V L L F N D N T E C L A K L G G R P T Y
 2017 gaagaatatttggggacagagtatgttacggccattgccaacctgaaaaatgctcaacctcc
 E E Y L G T E Y V T A I A N L K K C S T S
 2080 ccgcttctggaagcctgcgccttctgactaggtaagcctgcaaagaagctagcctgcctcc
 KCC, MHW-2
 P L L E A C A F L T R Stop
 2143 ctgggcctcagctcctcctgctctcagcccaatctccaggcgcgaggggaccttctct
 tcttgaagt

그림 5. 한우락토페린 cDNA 염기서열과 아미노산 서열

나. 효모에서 한우락토페리신 발현 및 생산

1) KLFc gene 증폭 및 발현벡터 구축

KS1E, KS2E primer를 이용해서 220bp의 KLFc을 증폭할 수 있었다(그림 6.) 증폭된 KLFc은 pPIC9 vector에 ligation시켰다. ligation의 유무는 KLFc을 증폭시켰던 KS1E, KS2E primer로 다시 증폭시켜 220bp size band를 살펴봄으로써 결정하였다. 그 결과 KLFc이 포함된 pPIC9LFC벡터를 구축할수 있었다(그림 7.).

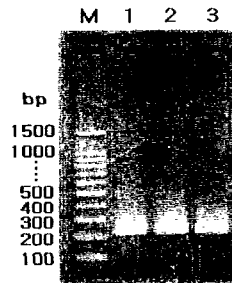


그림 6. KS1E, KS2E primer를 이용하여 증폭한 KLFc

M, DNA size marker; lane 1,2,3, estimated KLFC gene.

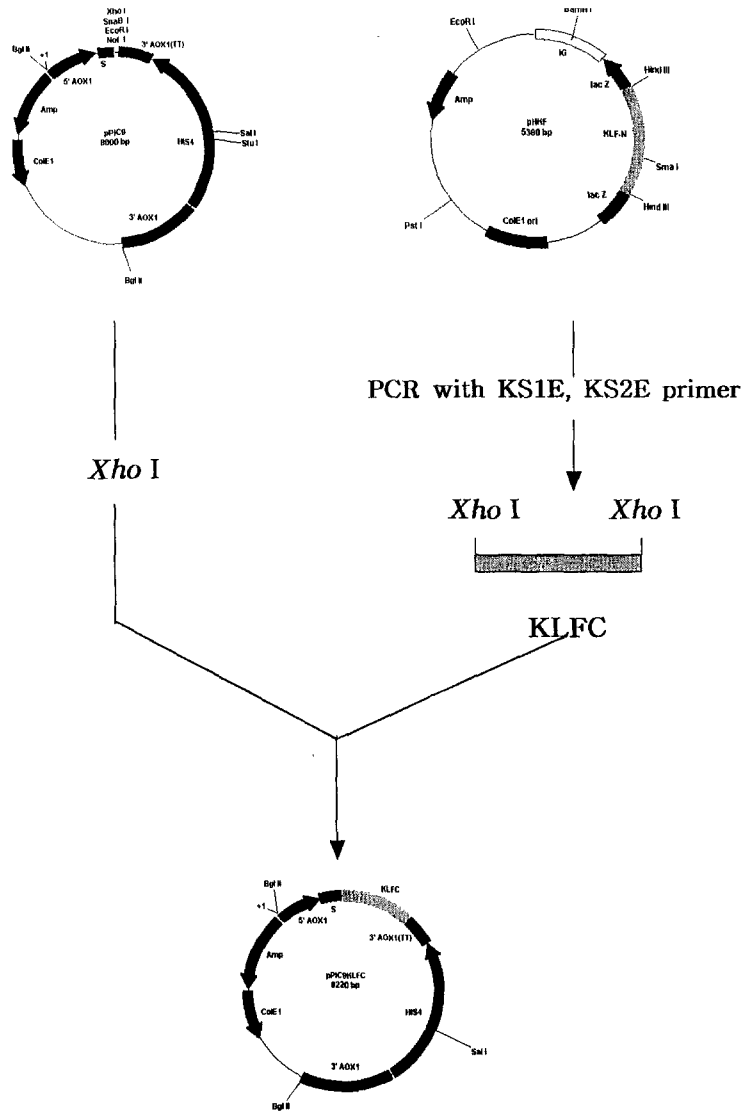


그림 7. KLFc을 포함한 pPIC9KLFc 구축

2) *Pichia pastoris*로의 형질전환

KLFC를 함유한 pPIC9KLFC가 *Pichia pastoris* genome내에 형질전환될 때 알콜대사능에 따라 두가지 phenotype을 가지게 된다(Mut^r, Mut^s). 본 연구의 형질전환체는 알콜 대사에 의해 KLFC이 유도되므로 많은 양의 KLFC발현을 위해 Mut^r의 선별이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 5' AOX, 3' AOX primer를 이용하여 PCR을 실시한 결과 Mut^r의 SKL6를 얻을 수 있었다(그림 8.).

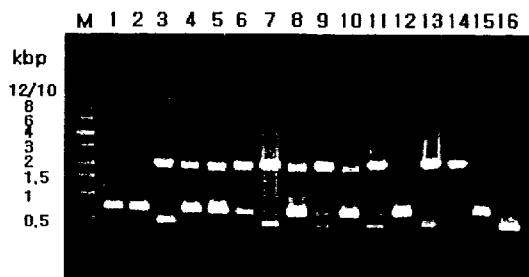


그림 8. Mut^r, Mut^s 형질전환체의 선별

M, DNA size marker(12, 10, 8, 6, 4, 3, 2, 1.5, 1, 0.5 kbp) : lane 1-13, his⁺ transformants SKL1-13; lane 14, native host; lane 15, positively recombinant plasmid S57(pPIC9KLFC); lane 16, pPIC9

Mut^r transformants : SKL4, 5, 6, 8, 10. Mut^s transformants : SKL1, 2, 12

3) KLFC 발현 및 항균활성

SKL6를 BMGY, BMMY배지에 배양해서 methanol induction으로 KLFC gene의 발현을 유도한 배양액을 paper disc법으로 *Streptococcus mutants*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Enterobacter aerogenos*, *Escherichia coli* JM109, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* 0157:H7 에 항균활성을 측정하고 결과 모두 항균활성을 나타내었다.

이때 Electroporation시키지 않은 host를 negative control로

transformants와 똑같이 배양했을 때에는 항균활성을 나타내지 않는 것으로 보아 형질전환된 host인 SKL6는 항균활성을 나타내는 물질, 즉 한우 lactoferricin을 발현시킴을 추측할 수 있다.

발현된 한우 lactoferricin을 확인하기 위한 또 다른 방법으로 transformant SKL6를 동시에 500ml짜리 baffle flask 5개에 배양해서 항균활성을 가진 배양액과 항균활성이 없는 배양액을 각각 동결건조하여 10X 농축액을 만든 후 14% separating gel에 SDS-PAGE를 실시하였다. 그 결과 항균활성을 나타내는 배양액에서는 항균활성을 나타내지 않는 배양액과는 달리 발현된 KLFC로 추정되는 8kDa정도의 band를 볼 수 있었다.

다. 생체실험을 통한 락토페리신의 생리활성검정

1) 락토페리신 투여에 따른 *Salmonella typhimurium* 군수변화

효모를 통해 생산된 KLFC을 닭에게 투여 후 *Salmonella typhimurium* 군수변화의 그 수치를 평균한 결과는 아래 표 1, 그림 9와 같다. 즉 생물공학적으로 생산된 KLFC 처리에 의한 계분중 *Salmonella typhimurium*의 커다란 감소는 KLFC이 축산용의 항균제로서 가치가 있음을 보여주고 있다.

표 1. KLFC 투여 닭에 대한 *Salmonella typhimurium* 수

Treatment	Number of <i>Salmonella typhimurium</i>			
	Before	1Week	2Weeks	3Weeks
Control (DW 5ml/day)	4.3×10^4	2.7×10^5	3.9×10^2	8.4×10^2
T1 (DW 4.5ml + LF culture 0.5ml/day)	4.3×10^4	6.5×10^2	7.1×10^1	0
T2 (LF culture 5ml/day)	4.3×10^4	5.8×10^1	0	0



그림 9. KLFc 투여량에 따른 *Salmonella typhimurium*의 감소

2) 락토페리신 투여에 따른 육계생산성 및 계분내 유해가스 변화

SKL6를 통해 생산된 락토페리신이 육계에 미치는 영향을 살펴보면 다음과 같다.

가) 체중변화(단위: %)

	1일	2일	3일	4일
대조구, 항생제	3.33	3.33	5.67	3.33
10%, 무항생제	2.67	10.0	12.0	2.00
10%, 항생제	2.67	3.33	10.3	2.00
Pooled SE	3.84	4.12	3.98	0.67

나) 사료섭취량(단위 : g/수)

	0~1주령	0~3주령	0~5주령
대조구, 항생제	143.2 ^a	971.1 ^a	2586 ^a
10%, 무항생제	118.1 ^b	912.9 ^b	2532 ^b
10%, 항생제	123.7 ^{ab}	944.6 ^{ab}	2416 ^c
Pooled SE	13.38	24.23	21.26

다) 암모니아(단위:ppm)

	1일	2일	3일	4일
대조구, 항생제	3.33	3.33	5.67	3.33
10%, 무항생제	2.67	10.0	12.0	2.00
10%, 항생제	2.67	3.33	10.3	2.00
Pooled SE	3.84	4.12	3.98	0.67

라) 이산화탄소(단위:ppm)

	1일	2일	3일	4일
대조구, 항생제	767 ^b	667 ^b	367	500
10%, 무항생제	1300 ^{ab}	1333 ^a	600	333
10%, 항생제	2000 ^a	733 ^b	433	367
Pooled SE	466.7	126.9	108.0	81.6

(P<0.05).

처리구는 대조구보다 체중증가를 보이는 반면 사료섭취량은 대조구보다 작은 것으로 나타나 락토페리신 처리에 따른 육계생산성이 있음을 나타내었다. 항생제를 함께 처리한 경우 그 효과가 더 높은 것으로 보아 생산된 락토페리신은 다른 항생제와 상승작용을 나타낸다고 할 수 있다. 또한 락토페리신을 음수한 닭의 경우 계분에서 암모니아, 이산화탄소등 유해가스의 발생이 대조구보다 작게 검출되었다. 이러한 결과로부터 락토페리신이 축사내 오염을 방지하고 환경개선에 유용함을 알 수 있었다.

제 4절 결론 및 요약

본 연구에서는 여러가지 생리적 기능을 갖는 한우 락토페린(KLF)의 염기서열을 결정했다. 확보한 한우 락토페린 cDNA로부터 한우 락토페리신(KLFC)을 증폭하여 pPIC9KLFC 구축한 후 *Pichia pastoris*에 도입하여 KLFC의 발현 및 대량생산을 시도한 본 연구에서 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 한우의 여러조직 중 고환조직에서 Total RNA를 분리하고 RT-PCR을 이용해 cDNA을 정제하였다. 이것이 우리가 원하는 LF 유전자인가를 확인하기 위하여 cDNA full length(2.18 kb)에 internal primer를 design 하여 예상 size에서 증폭이 됨을 확인하였고 각 internal primer에 제한효소를 처리한 결과 LF binding site가 존재함을 확인하였다.

2. sequencing을 위하여 한우 LF cDNA full length을 pUC118 vector에 insertion 시켜 cDNA cloning을 시행후 그 sequence를 밝혔다.

3. KLFc의 Amino acid homology search 결과, KNC와 Cow LF는 80.4%, KNC와 Goat LF는 75.6%, KNC와 Human LF는 57.6%의 homology가 있음을 확인하였다. DNA homology search 결과는 KNC와 Cow LF는 97%, KNC와 Goat LF는 92.1%, KNC와 Human LF는 70%의 homology가 있었다.

4. 현재까지 밝혀진 총 8종의 lactoferrin 서열을 바탕으로 lactoferricin 부위의 homology를 비교, 분석하여 공통서열을 찾아 그에 대한 primer를 design하여 다수의 포유동물 lactoferricin 부위를 증폭시킬 수 있는 KS1E, KS2E primer를 제작하였다.

5. KS1E, KS2E primer를 이용하여 이미 확보한 KLF cDNA로부터 한우 lactoferricin 부위를 증폭시킨 후 pPIC9 vector에 ligation시켜 제한효소 처리로 insertion을 확인하고 expression vector pPIC9KLFc을 만들었다.

6. pPIC9KLFc를 electroporation방법으로 *Pichia pastoris*에 형질전환시켜 한우 lactoferricin을 보유하며 알콜대사능이 빠른 형질전환체 SKL6를 확보하였다.

7. SKL6를 배양하여 얻은 상등액은 다양한 유해미생물(*Streptococcus mutants*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Enterobacter aerogenos*, *Escherichia coli* JM109, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7)에 대해 강한 항균활성을 보였으며, SDS-PAGE결과 한우 lactoferricin이 발현됨을 확인하였다.

8. 형질전환체 SKL6를 통해 생산된 KLFC를 닭에게 투여한 결과 계분중 *Salmonella typhimurium*의 커다란 감소를 보였고, 체중증가, 사료섭취량과 유해가스의 감소를 보여 가축질병 방지를 위한 사료첨가제 및 , 축사환경 개선제 등으로의 가능성을 확인하였다.

여 백

위탁과제 III

락토페린 활용기술 개발

위탁연구기관 : 충남대학교

위탁연구책임자 : 김 종우

여 백

제 출 문

생명공학연구소장 귀하

본 보고서를 “한국 재래가축의 유즙으로부터 유용자원(락토페린)의 탐색 및 활용기술에 관한 연구” 과제의 위탁과제보고서로 제출합니다.

2000. 11. 30.

제Ⅲ 위탁연구기관명 : 충남대학교

위탁연구책임자 : 김종우

참여연구원 : 이조운, 금종수, 한수연, 박미자, 정옥

여 백

요 약 문

I. 제 목

한국재래가축의 유즙으로부터 유용유전자원(락토페린)의 탐색 및 활용기술 개발
(락토페린 활용기술 탐색)

1. 살균방법 및 pH 조건에 따른 Bovine Apo-Lactoferrin의 항균성 변화에 관한 연구
2. 살균방법 및 pH 조건에 따른 pepsin-hydrolyzed bovine apo- lactoferrin의 항균성 변화에 관한 연구
3. 김치 제조에 있어서의 Lactoferrin의 첨가효과

II. 연구개발의 목적 및 중요성

본 연구과제는 우리나라 고유 생물자원인 한우와 흑염소의 유즙으로부터 분리 정제된 lactoferrin의 활용성 검정을 위하여 다양한 생리적 기능을 갖고있는 lactoferrin을 유제품에 적용하는 시험이다. 그 중에서도 특히 면역체계가 불완전하고 인공영양을 주로하는 영아 및 유아에게 공급되는 조제분유와 이유식에 대한 lactoferrin의 활용성 검정은 2세의 건강 측면에서 매우 중요하다. 또한 김치의 산패가 보관상의 문제로 되고 있는데 이를 개선하는 연구는 매우 중요하다고 생각한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 유제품 수입개방에 따른 경쟁력과 현재 시장성이 가장 높은 시유에 적용하는 방법을 중점적으로 검토하였으며, 특히 지금까지 보고된 바에 의하면 pH 2 - 4 범위에서 항균효과가 월등한 것으로 나타나 이에 적용하는 방법도 아울러 검토하였다.

또한 열처리에 따른 lactoferrin의 hydrolysis degree와 HPLC pattern을 분석하므로써 2차년도 시험수행 예정인 lactoferricin의 항균효과시험을 위한 아래의 기초 시험을 수행하였다.

3차 연도 연구과제는 김치제조 및 보존에 있어서의 lactoferrin의 활용성 검토를 위하여 아래 항목과 같이 김치 발효에 관계하는 *Lactobacillus*속, *Leuconostoc*속, *Streptococcus*속 등의 미생물에 대한 항균성을 시험하고 발효 및 보존에 있어서의 산도, 관련 미생물의 변화 상태, 관능검사 및 보존시험 등을 실시하므로써 우수한 김치제조에의 lactoferrin의 적정량 및 작용상태 등을 검토하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

실험 종결과 함께 전문학술지에 논문 게재하였으며, 한국 재래 가축 유즙으로부터 분리한 lactoferrin 및 lactoferricin의 활용 기술 탐색을 위한 연구수행에 있어서 적정량의 sample 확보가 필수적으로 요구되어, 이와같은 문제점을 해결하기 위하여 본 연구에서 한국 재래 가축의 유즙으로부터 lactoferrin 및 lactoferricin을 분리 및 정제할 경우 타 세부과제 연구의 중복과 더불어 시간과 경제적인 측면에서 연구의 효율성이 떨어진 것으로 사료된다.

또한 본 연구의 특성 상 in vivo test가 긴요하게 요구되나 sample의 수득 문제, 연구 수행 기간, 연구비 등의 현재 여건 상 in vitro test에 의존하게 되었다.

2차 연도 연구에서는 다음과 같은 연구 목표를 두고 연구를 수행하였다.

- Pepsin-hydrolyzed bovine lactoferrin과 pepsin-hydrolyzed Korean native cattle lactoferrin의 동일한 농도 수준에서 기능성 비교 시험

- 주부 lactoferricin의 활용에 있어 경제적인 측면을 감안할 때, 순수 분리된 lactoferricin 보다 crude lactoferrin hydrolysates을 활용하는 문제를 검토하였다.

3차 연도 연구에서는 lactoferrin의 식품에의 활용기술 탐색을 위하여 김치 제조에 적용하는 실험을 실시한 바 적용 가능성을 기대할 수 있었으나 lactoferrin의 실용상 가격문제가 대두되어 앞으로 양산에 따른 가격인하 문제를 해결하는 방안이 검토되어야 할 것으로 생각한다.

SUMMARY

1. Study on the Practical Application of Lactoferrin in Dairy Product

This study was carried out to examine that bovine apo-lactoferrin has applicabilities which are market milk and infant formulas especially relevant for the newborn. In order to develop a practical method for pasteurization of lactoferrin, the influence of pH on the heat stability of bovine apo-lactoferrin was studied.

The results obtained were summarized as follows:

The HPLC pattern of bovine apo-lactoferrin heat-treated at pH 2.0 was slightly increased in size to that of unheated bovine apo-lactoferrin. However, the pattern of apo-lactoferrin heat-treated at pH 4 or 6.8 and UHT was a small peak that differed from the unheated apo-lactoferrin.

The antibacterial activity expressed as a percent of their growth in basal medium. Increasing the concentration of apo-lactoferrin to 400 ppm against test strains at pH 2.0 in the basal medium resulted in a progressive increase of growth inhibition.

The bactericidal effect of heat-treated apo-lactoferrin against test strains at pH 2.0 and LTLT, HTST, UHT, was stronger than that of untreated apo-lactoferrin, but that the activity of apo-lactoferrin was lost after treatment at pH 4.0 or pH 6.8 and UHT.

Addition of freeze dried apo-lactoferrin to the basal medium at pH 6.8 did not inhibit growth of test strains. However, addition of freeze dried apo-lactoferrin to the basal medium at acidic condition were inhibited higher than the native basal medium by all apo-lactoferrin concentrations.

This results suggests that lactoferrin contains a antibacterial domain

that is released and activated when lactoferrin is hydrolyzed by heat treatment under acidic conditions.

2. A Study on Changes in Antibacterial Activity of Pepsin-hydrolyzed Bovine apo-lactoferrin at Various Method for Pasteurizations and pH Values.

This study was carried out to examine that pepsin-hydrolyzed bovine lactoferrin has applicabilities which are market milk and dairy products. The results obtained were summarized as follows: After fractionation of pepsin-hydrolyzed bovine lactoferrin by gel filtration, several peptide fractions were found that had strong antibacterial activity. SDS-PAGE showed that the one of these fractions with strong antibacterial activity, which had a molecular mass a range of 30 - 33KDa. The MBCs for pepsin-hydrolyzed bovine lactoferrin fraction No. 2 against *E. coli* required to cause complete inhibition of growth varied within the range of 200 ~ 400 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$, depending on heat treatments and pH conditions. The peptide fraction No. 2 showed strong bacteriocidal activity against *E. coli* at LTLT and HTST treatments under acidic pH conditions, and was reduced activity at UHT treatment under pH 6.8 condition.

3. Effect of Microbacterium by Addition Lactoferrin in Kimchi

Antibacterial of microorganism about both kimchi making and utilization of preservation of lactoferrin have been made trial of *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*.

The result from the study.

- 1) After investigating microorganism which takes out during kimchi is

fermentating, it makes difference between amount and kind.

- 2) After investigating both pH of the precocious kimchi and acitivity of the precocious, the study improve that treatment's point is less than untreatment point.
- 3) According to measurment of amount of total bacteria, amount of bacteria with treatment is less than amount of bacteria with untreatment.
- 4) In *Lactobacillus* and *Leuconostoc* of bacteria's measurment, both of them is decreasing with adding lactoferrin in accordance with treatment.
- 5) In *pediococcus* and *Streptococcus*, lactoferrin treatment can make less bacteria than untreatment.
- 6) With yeast and colitis germs, lactoferrin is decreasing so much.
- 7) The result from functional examination can be proof that something with adding 5~10mg/g lactoferrin is better than untreatment.
- 8) The result from adding lactoferrin between 4 degree and 20 degree can show that both acitivity and microorganism condition in 4 degree are not increasing so much but increasing in 20 degree.

Both kimchi with lactoferrin can prevent kimchi making from bacteria and polluttional substance with natural antibacteria can be decreased -(preserve taste of kimchi from the research)- can think that developing the food industry but also accomplishing utilization of lactoferrin.

CONTENTS

Part 1. Study on the Practical Application of Lactoferrin in Dairy Product -----	191
Part 2. A Study on Changes in Antibacterial Activity of Pepsin-hydrolyzed Bovine apo-lactoferrin at Various Method for Pasteurizations and pH Values.-----	215
Part 3. Effect of Microbacterium by Addition Lactoferrin in Kimchi-----	229

목 차

- 제 1 장. 살균방법 및 pH 조건에 따른 Bovine Apo-Lactoferrin의
항균성 변화에 관한 연구-----191
- 제 2 장. 살균방법 및 pH 조건에 따른 pepsin-hydrolyzed bovine
apo- lactoferrin의 항균성 변화에 관한 연구-----215
- 제 3장. 김치 제조에 있어서의 Lactoferrin의 첨가효과-----229

제1장. 살균방법 및 pH 조건에 따른 Bovine Apo-Lactoferrin의 항균성 변화에 관한 연구

제1절. 서 론

최근 많은 연구 보고를 통해서 생리 기능물질로 주목받고 있는 Lactoferrin 은 철과 결합한 당단백질로서 사람의 초유 중에는 대략 5~7 mg/ml 정도의 높은 농도로 존재하며 출산 후 1-2 주일 사이의 이행유 중에 2~3 mg/ml 그리고 그 후 성숙유 중에 1~2 mg/ml의 농도를 유지하고 있는 것으로 알려져 있는데 Masson 등(1969)에 의하면 Immunodiffusion 방법에 의하여 10종의 포유류 젖 중에 함유된 lactoferrin의 농도를 분석한 결과 인유에서 가장 높은 것으로 보고 하였다. 아울러 그 기능 면에서 밝혀진 바로는, Nemet 등(1985)은 인체 내에서 철의 흡수를 증강시킴으로써 철결핍 또는 빈혈에 예방 및 치료효과가 있으며, 특히 정균 및 살균효과 등과같은 강력한 항균력을 갖고있어 유아의 장질환 예방에도 효과가 있는 것으로 알려져있으며 림프구의 성장촉진 효과(Hashizume et al, 1983)와 macrophage, granulocyte, neutrophil leukocyte에 대한 생산 조절 능력도 갖고있는 것으로 알려져 있다(Goldman et al, 1973). 또한 최근 보고에 따르면 Influenza Herpes, HIV 등과 같은 바이러스에 대한 antiviral 효과가 있는 것으로 밝혀지고 있다.

특히 Lactoferrin의 항균효과에 대한 연구가 많이 수행되었는데(Arnold et al, 1980, Bellamy et al, 1992, 1993, Nonnecke et al, 1984, Paulsson et al, 1993, Saito et al, 1991, Yamauchi et al, 1993), Ellison 등(1988)은 lactoferrin과 transferrin이 갖고있는 그람음성균의 항균특성에 대한 기전에 대하여 보고하였는바, 이 연구에서 킬레이트제인 EDTA와 유사한 어떤 종류가 그람 음성균의 세포외막에 영향을 주는 것으로 보고하였다. 또한 Suzuki 등(1989)은 lactoferrin과 lysozyme의 공존 하에서 *E. coli*에 대한 항균효과를 보고하였

는데, 배지 내에 lysozyme과 Fe-lactoferrin이 단독으로 존재할 때에는 균에 대한 성장억제효과가 없었으나 배지 내에 lysozyme과 apo-lactoferrin이 공존할 경우, 매우 강력한 성장억제효과를 보였으며, 이 때 배지 내에서의 세포를 위상차현미경으로 관찰한 결과 뚜렷한 응집효과를 관찰하였다고 보고하였다.

이처럼 다양한 생리적 기능을 갖고있는 lactoferrin은 비록 인유 중에 존재하는 농도보다는 훨씬 적은 양이지만 포유류의 대부분 젖에 존재하는 것으로 알려져있다. 특히 우유 중에 존재하는 lactoferrin은 invitro 및 동물실험을 통하여 human lactoferrin과 그 기능의 유사성을 보고하고 있으며(Brock et al, 1983), 이미 신생아와 유아식에 활용되고 있는 실정이다. 그러나 lactoferrin이 인체에 미치는 다양한 이점에도 불구하고 아직까지 많은 연구 보고들이 포유류 종에 따른 lactoferrin의 분리, 정제 및 생리 기능적 특성에 관한 연구 (Shimazaki et al, 1988, 남 등, 1993, 진 등, 1995, 1996)가 진행되고 있을 뿐, 식품이나 의약 등과 같은 실생활에 직접적으로 이용할 수 있는 활용성 검토에 대한 연구는 매우 미미한 실정이다. 그러나 생명과학 분야의 급속한 발전과 더불어 빠른 시일 내에 다양한 종의 젖으로부터 lactoferrin의 대량생산이 가능할 것으로 전망되며 따라서 이에 대한 활용성 검토 문제가 시급히 해결되어야 할 과제로 여겨진다.

이에 본 연구는 우리나라 고유 생물자원인 한우와 흑염소의 유즙으로부터 분리 정제된 lactoferrin의 활용성 검토를 시험하기에 앞서 우선 양적인 면에서 활용의 기대도가 가장 높고 현재까지 여러 가지 생리적 특성에 대하여 연구 보고된 bovine lactoferrin을 유제품에 활용하는 문제를 검토하고자 하였다. 그 중에서도 특히 면역체계가 불완전하고 인공영양을 주로하는 신생아 및 유아에게 공급되는 조제분유와 이유식에 대한 lactoferrin의 활용성 검토 외에도 일반 성인들이 일상적으로 음용하고 있는 시유에 대한 활용성을 개발하는 문제는 lactoferrin이 갖고있는 기능적 특성을 국민의 보건적 측면에서 보편화 시킬 수 있다는 점에서 그 활용 가치가 충분하다고 생각된다.

그러나 이러한 유제품으로의 적용은 제품공정의 특성상 다양한 열처리가 필요하게 되어 그에 따른 lactoferrin의 기능 실활이 우려되고 더불어 인체 내에

서 기능을 극대화 할 수 있는 적절한 농도를 함유하고 유지할 수 있어야 한다. 따라서 본 연구는 시유의 경우, 살균방법, pH 조건, lactoferrin의 농도에 따라 공시균주 *Escherichia coli* 0111, *Bacillus subtilis*에 대한 antibacterial activity, bactericidal effect 등의 항균력 시험을 수행하였고 처리된 lactoferrin의 HPLC pattern을 분석하였다. 또한 분유의 경우, 현재 시중에 유통되고 있는 조제분유를 구입하여 일반적인 환원 상태에서 공시균주에 대한 항균력 시험을 lactoferrin 첨가구와 무첨가구를 비교하여 시험하였고, pH의 조건에 따라 용해된 lactoferrin을 동결건조 방법으로 분말화하여 농도 별로 항균력 시험을 수행하였다. 이렇게하여 현재 bovine lactoferrin의 시유, 조제분유 등에 대한 활용성 검정을 우선 수행하므로써 추후 한우와 흑염소 유즙에서 분리된 lactoferrin을 재조합하여 미생물에 의해 대량생산하게 될 lactoferrin의 활용 방안을 미리 모색하고, 이들을 비교 검토하여 보다 효율적인 활용방안을 연구할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 지금까지 수행된 시유와 분유에 대한 시험 결과를 기초로하여 또 다른 유제품에 활용 확대를 꾀할 수 있을 것으로 기대된다.

제2절. 재료 및 방법

1. 공시 재료

1) Strains

공시균주 *Escherichia coli* 0111 와 *Bacillus subtilis*는 생명과학연구소에서 분양받아 시험에 사용하였다.

2) Lactoferrin

Bovine apo-Lf은 일본 Morinaga社의 것을 구입하여 사용하였다.

2. 열처리 lactoferrin 용액의 조제

Bovine apo-Lf을 0.1N HCl 또는 0.1 N NaOH로 pH 2.0, 4.0 및 6.8로 조정된 증류수에 1% wt/vol의 농도로 용해하고 각각의 용액은 running waterbath상에서 LTLT 방법 (65°C/30 min.) 및 HTST 방법 (75°C/15 sec.)으로 열처리를 하였으

며, UHT처리 (135℃/3 sec.)는 oil bath에서 열처리 하였다. 이렇게 열처리 된 test tube는 냉각수에서 급속히 냉각을 시킨 후, 항균성시험에 사용하였다.

3. 열처리 lactoferrin 우유의 조제

시험에 이용한 원유는 충남대학교 부속 동물사육장에서 착유 직후의 신선한 원유를 사용하였으며, 이 원유에 bovine apo-Lf을 1% wt/vol. 농도로 첨가하여 용해한 후, 상기 Lf 용액의 열처리 방법과 동일한 방법으로 수행하였다.

4. Lactoferrin의 가수분해도 측정

pH 및 열처리에 의한 Lactoferrin의 가수분해 정도는 Levy(1957)의 방법에 따라 formal titration법으로 측정하였으며, 분해도는 다음 식에 의하여 계산 하였다.

$$\text{Degree of hydrolysis (\%)} = \frac{\text{formal-titration N}}{\text{total N}} \times 100$$

5. 열처리 lactoferrin의 Antibacterial activity 측정

공시균주에 대하여 열처리된 Lf의 성장억제효과를 시험하기 위하여 *E. coli*의 basal medium으로서 1% peptone water를 pH 6.8로 조정하여 Autoclave에서 멸균하여 사용하였으며, *B. subtilis*는 nutrient broth를 Autoclave에서 멸균하여 사용하였다. 멸균된 basal medium에 균주를 접종하여 shaker-incubator waterbath에서 *E. coli*의 경우 37℃로 배양하였으며, *B. subtilis*는 30℃로 배양하였다.

열처리된 Lf 용액은 0.45µm membrane filter로 여과하고 basal medium의 최종 농도가 100, 200, 300 및 400 ppm이 되도록 첨가하였다.

그런 다음 미리 배양된 배양액을 basal medium에 접종하고 37℃에서 20시간 배양하면서 660nm에서 spectrophotometer로 4시간 간격으로 측정하고 antibacterial activity는 다음 식에 의하여 산출하였다.

Growth inhibition(%) = absorbance at 660nm(control) -

$$\frac{\text{absorbance at 660nm (experiment)}}{\text{absorbance at 660nm (control)}} \times 100$$

6. 열처리 lactoferrin의 bactericidal effect 측정

공시균주에 대한 살균효과를 시험하기 위하여 열처리된 Lf 용액을 0.45 μ m membrane filter로 여과하였고 최종 농도가 100, 200, 300 및 400 ppm이 되도록 basal medium에 첨가한 다음 미리 배양된 배양액 10⁷/ml을 basal medium에 접종하고 37°C에서 8시간 배양한 후, *E. coli*는 Desoxycholate agar 배지에서, *Bacillus subtilis*는 Nutrient agar 배지에서 평판계측법(Collins, 1995)으로 생균수를 측정하였다.

7. High Performance Liquid Chromatography 분석

pH 2, pH 4 및 pH 6.8로 조정된 용액에 현재 시유의 살균방법으로 이용되는 LTLT, HTST 및 UHT의 열처리 조건에 따라 열처리한 bovine apo-Lf의 HPLC 분석 기기 조건은 Table 1과 같이 수행하였다.

Table 1. Condition of HPLC operation

Column : Asahipak C 4P-50 reverse-phase column (4.5mm × 150mm)

Running condition :

Buffer A : acetonitrile : 0.5M NaCl (1:9) containing 0.03% trifluoroacetic acid

Buffer B : acetonitrile : 0.5M NaCl (5:5) containing 0.03% trifluoroacetic acid

Gradient : a Mixture of buffer A : buffer B (50:50) to 0 : 100 in 25 min.

Detection 280nm (a flow rate 0.8ml/min.)

Gradient : 0 min. A : B (50 : 50)

Linear Gradient

25 min. A : B (50 : 50)

25.1 min. A : B (50 : 50)

an unheated apo-Lf sol. (same procedure)

8. Lactoferrin 첨가 동결건조분유의 제조

UHT 멸균 시유와 acetic acid로 pH 3으로 조정된 UHT 멸균 시유에 1%에 해당하는 apo-bovine Lf을 첨가하여 완전히 용해시킨 후, 이를 10ml 씩 petri dish에 분주하고, -20℃에서 24시간 동결하여 동결건조기 (Chemlab, England)에서 12시간 동결건조 하였다. 한편 대조구로 사용하기 위하여 Lf을 첨가하지 않은 UHT 멸균시유를 동일한 방법으로 동결건조 하였다.

9. Lactoferrin 첨가 동결건조분유의 bactericidal effect 측정

공시균주인 *E. coli* 0111과 *Bacillus subtilis*에 대한 Lactoferrin 첨가 동결건조분유의 bactericidal effect를 측정하기 위하여 1%의 Bactopectone broth와 0.8%의 Nutrient broth에 0, 100, 200, 300 및 400 ppm의 농도로 첨가하고 여기에 이미 배양된 각각의 공시균주 배양액을 접종하여 37℃ 및 30℃에서 8시간 배양한 후, *E. coli*는 Desoxycholate agar 배지에서, *Bacillus subtilis*는 Nutrient agar 배지에서 평판계측법으로 측정하였다.

또한 시중에 유통되고 있는 국내 2개 유업회사의 Lactoferrin 첨가 조제분유와 Lactoferrin이 첨가되지 않은 조제분유를 구입하여 동결건조분유와의 bactericidal effect 측정을 위한 시료로 사용하였다. Lactoferrin 첨가 조제분유의 경우 Lf 농도가 100 ppm이 되도록 basal medium에 환원하였으며, Lactoferrin이 첨가되지 않은 조제분유의 경우 Lactoferrin 첨가 조제분유와 같은 양을 환원하여 대조구로 하였다. 동결건조분유의 경우 마찬가지로 Lf 농도가 100 ppm이 되도록 정량한 후, 부족한 건물량은 Lactoferrin이 첨가되지 않은 조제분유로 충당하여 처리구로 시험에 이용하였다.

제3절. 결과 및 고찰

1. 열처리 Bovine apo-lactoferrin 첨가 원유의 HPLC pattern 분석

1. 열처리 Bovine apo-lactoferrin 첨가 원유의 HPLC pattern 분석

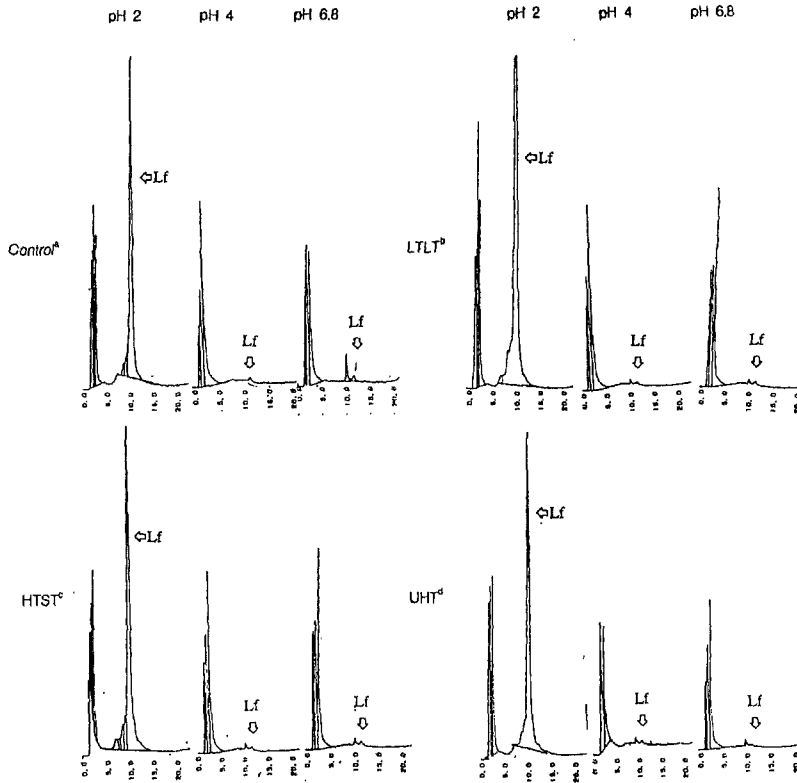


Fig 1. The HPLC patterns of heat-treated bovine apo-lactoferrin.

^a Control ; unheated

^b LTLT pasteurization ; 65°C/30 min.

^c HTST pasteurization ; 75°C/15 sec.

^d UHT treatment ; 135°C/3 sec.

Fig. 1에 나타난 결과에서 각각의 pH 용액에 LTLT, HTST 및 UHT 방법으로 열처리한 bovine apo-Lf의 HPLC pattern은 용액의 pH 조건에 따라 큰 차이를 나타내고 있으며 pH 2 용액에서 열처리 하지 않은 apo-Lf 용액의 peak area보다 LTLT 열처리 용액에서 2배 가량 증가하였으며, LTLT와 HTST는 다소 증가한 양상을 보여주고 있다. pH 4와 pH 6.8의 용액에서 LTLT와 HTST의 경우 열처리하지 않은 대조구에 비하여 유사한 pattern을 보여주고 있으나, UHT 경우에는 pH 4와 6.8에서 peak가 감소하는 것으로 나타났다.

Abe 등(1991)은 bovine apo-Lf을 100℃에서 5분간 열처리 하고나서 HPLC의 pattern을 분석한 결과, pH 4.0 및 pH 5.0에서 열처리 하지 않은 대조구와 유사한 결과를 보여주었으며 pH 6.0에서는 peak가 작아졌고, pH 2.0과 pH 3.0에서는 대조구에서 나타나지 않은 minor peak가 나타났다고 보고한 바 있다. 또한 Saito 등(1991)은 reverse-phase HPLC 분석에서 몇가지 분획이 매우 강력한 항균효과를 보여주었는데 이 분획을 SDS-electrophoresis로 분석한 결과 분자량은 대략 5,000 정도이며 산과 열처리에 의해 가수분해된 glycoprotein의 oligo saccharide에 기인하는 것으로 보고한 바 있다.

이와같은 결과로 미루어 볼 때, 본 연구의 경우 산성 조건 (pH 2.0 및 pH 3.0)에서 어떠한 살균 처리에서도 열처리 하지 않은 대조구에 비하여 가수분해에 의한 항균성물질이 방출되는 것으로 보여지며 그 중에서 특히 LTLT의 저온살균방법으로 열처리 하였을 경우 이와 같은 가수분해물의 증가가 가장 높은 것으로 보여진다. 또한 pH 6.8의 Lf 용액을 135℃의 초고온 살균법으로 열처리할 경우 열처리 하지 않은 대조구에 비하여 뚜렷하지는 않지만 감소하면서 또 다른 minor peak가 나타나는 것으로 생각된다.

2. 열처리 lactoferrin 첨가 용액의 Antibacterial activity 시험

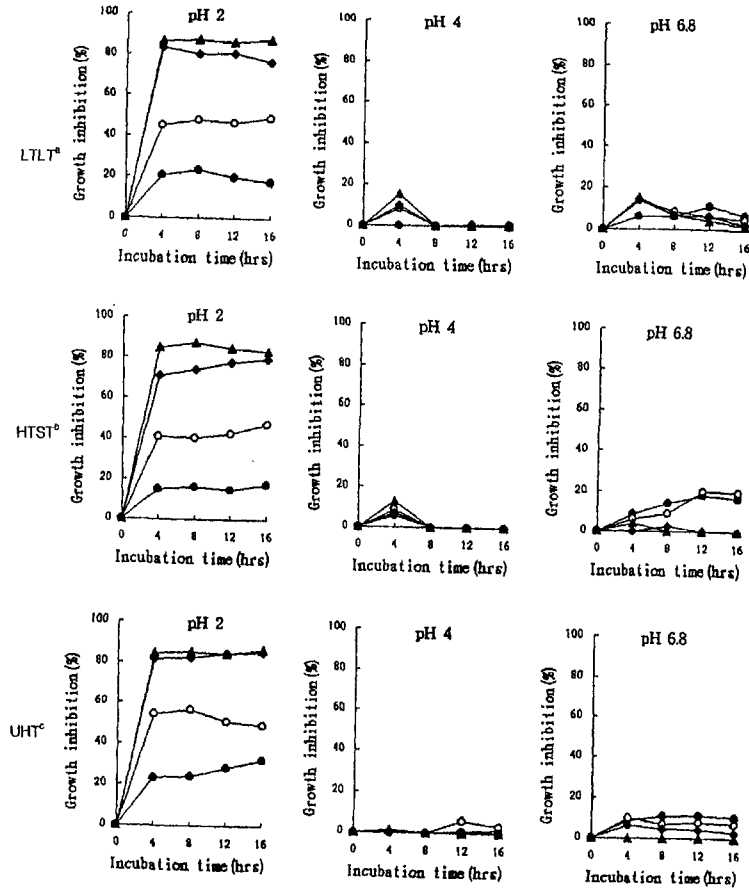


Fig. 2. Growth inhibition of heat-treated bovine apo-lactoferrin against *Escherichia coli* O111. Apo-lactoferrin solution unheated or heat treated at various pH conditions, were added to the basal medium to give concentrations of 100 (●), 200 (○), 300 (◆), 400 (▲) ppm.

^a LTLT pasteurization : 65°C/30 min.

^b HTST pasteurization ; 75°C/15 sec.

^c UHT treatment ; 135°C/3 sec.

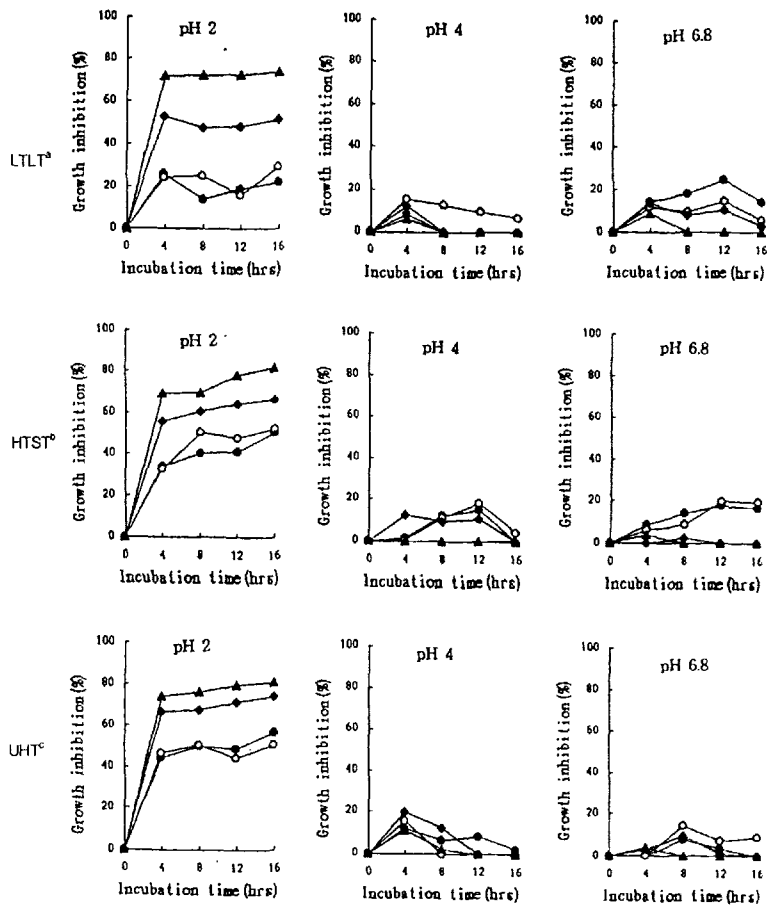


Fig. 3. Growth inhibition of heat-treated bovine apo-lactoferrin against *Bacillus subtilis*. Apo-lactoferrin solution unheated or heat treated at various pH conditions, were added to the basal medium to give concentrations of 100 (●), 200 (○), 300 (◆), 400 (▲) ppm.

^a LTLT pasteurization : 65°C/30 min.

^b HTST pasteurization : 75°C/15 sec.

^c UHT treatment : 135°C/3 sec.

열처리 Lf 첨가 용액의 pH 2, pH 4 및 pH 6.8의 조건에 따른 *E. coli*와 *B. subtilis*에 대한 antibacterial activity 시험 결과는 Fig. 2 및 Fig. 3과 같

다.

Fig. 2의 *E. coli*에 대한 시험결과에서 65°C, 30분간 LTLT 방법으로 열처리한 경우, pH 2의 조건에서는 control구에 비하여 배양초기 부터 300 ppm 이상의 농도에서 80% 이상의 강력한 성장억제효과를 보여주었으며, 100 ppm에서는 20%, 200ppm에서는 45% 정도의 성장억제효과를 보여주었다 그러나 300 ppm 이상의 농도에서는 농도 간의 차이는 별로 없는 것으로 보여진다. 또한 pH 4 및 pH 6.8의 조건에서 배양초기에 200 ppm 이상의 농도에서 10 ~ 20% 정도의 미약한 성장억제효과를 보여주었다.

75°C에서 15 sec. 동안 HTST 방법으로 열처리한 경우, pH 2의 조건에서 control구에 비하여 농도의 증가에 따라 뚜렷한 성장억제효과를 보여주었으며 pH 4의 조건에서 배양초기에 10% 내외의 미약한 효과를 보인 반면, pH 6.8에서는 100 ~ 200 ppm의 저농도에서 배양시간이 경과함에 따라 20% 정도의 성장억제효과를 나타내었다.

또한 135°C에서 3 sec. 동안 UHT 방법으로 열처리한 경우, pH 2의 조건에서는 LTLT 경우와 유사한 성장억제효과를 보여주었으며, pH 4의 조건에서는 거의 효과가 없었으며, pH 6.8에서도 매우 미약한 억제효과를 보여주었다.

이와 같은 결과는 Saito 등(1991)이 *E. coli*에 대하여 pH 2.0 및 pH 3.0에서 80 ~ 120°C로 열처리 했을 경우 점차 증가하면서 강력한 성장억제효과를 나타냈으나 pH 1.0은 100°C에서, pH 4.0은 60°C에서 매우 미약한 성장억제효과를 나타냈다고 보고한 결과와 유사하였으며, Tomita 등(1991)은 pepsin 분해에 의한 bovine Lf의 항균력 시험을 한 결과, *E. coli*의 경우 효소처리하지 않은 Lf의 농도 0.5 mg/ml에서는 성장억제효과를 보이지 않았으나 동일한 농도에서 산성 조건으로 효소처리를 하면 성장억제효과가 있었다고 보고하였다.

Fig. 3의 *B. subtilis*에 대한 시험결과에서 65°C, 30분간 LTLT 방법으로 열처리한 경우, pH 2의 조건에서는 control구에 비하여 배양초기 부터 300 ppm 이상의 농도에서 농도의 증가에 따라 50% 이상의 강력한 성장억제효과를 보여주었으며, 100 ppm과 200ppm에서는 농도간의 차이 없이 20% 정도의 성장억제효과를 보여주었다. 또한 pH 4의 조건에서 배양초기에 10 ~ 20% 정도의 미약한 성장억

제효과를 보여주었으며 pH 6.8에서는 100 ~ 200 ppm의 저농도에서 배양시간이 경과함에 따라 15 ~ 25% 정도의 성장억제효과를 나타내었다. HTST 와 UHT의 경우는 LTLT와 유사한 경향을 보여주었는데 *E. coli*에 대한 시험결과에 비하여 *B. subtilis*에 대한 시험의 경우 100 ppm과 200ppm에서는 농도 간의 차이가 없었으며 농도의 증가에 따라 성장억제효과가 높아졌다.

또한 열처리 간의 비교에 있어서는 두 공시균주에 대하여 pH 2의 조건에서 LTLT, HTST 및 UHT의 살균방법으로 열처리 하였을 경우 400 ppm의 농도에서 거의 차이가 없었으나, 100ppm 과 200 ppm의 농도에서는 UHT 열처리에서 약간 높은 성장억제효과가 있는 것으로 나타났으며, pH 4와 pH 6.8의 경우 열처리 간에는 뚜렷한 차이가 나타나지 않았다.

3. 열처리 lactoferrin 첨가 용액 및 원유의 Bactericidal effect 시험

Table 2. Viability of *E. coli* 0111 strain after incubation with varying concentrations of heat-treated bovine apo-lactoferrin for 8 hr. at 37°C

Heat treatment	pH conditions	CFU/ml ^a				
		Apo-lactoferrin concentration				
		control	100ppm	200ppm	300ppm	400ppm
LTLT ^b	2.0	3.05 × 10 ⁸	3.80 × 10 ⁸	5.50 × 10 ⁸	ND	ND
	4.0	3.27 × 10 ⁸	1.67 × 10 ⁸	1.50 × 10 ⁸	1.38 × 10 ⁸	1.32 × 10 ⁸
	6.8	3.49 × 10 ⁸	2.45 × 10 ⁸	1.70 × 10 ⁸	1.37 × 10 ⁸	1.35 × 10 ⁸
HTST ^c	2.0	2.37 × 10 ⁸	4.25 × 10 ⁸	6.25 × 10 ⁸	ND	ND
	4.0	2.91 × 10 ⁸	2.88 × 10 ⁸	1.82 × 10 ⁸	1.64 × 10 ⁸	1.23 × 10 ⁸
	6.8	3.43 × 10 ⁸	3.14 × 10 ⁸	2.71 × 10 ⁸	2.45 × 10 ⁸	2.41 × 10 ⁸
UHT ^d	2.0	2.34 × 10 ⁸	3.25 × 10 ⁸	1.25 × 10 ⁸	ND	ND
	4.0	2.35 × 10 ⁸	2.24 × 10 ⁸	1.92 × 10 ⁸	1.91 × 10 ⁸	1.07 × 10 ⁸
	6.8	2.65 × 10 ⁸	2.65 × 10 ⁸	2.05 × 10 ⁸	1.98 × 10 ⁸	1.92 × 10 ⁸

^a Viable counts (CFU/ml) were determined by plating serial dilutions on desoxycholate agar.

^b LTLT pasteurization ; 65°C/30 min.

^c HTST pasteurization ; 75°C/15 sec.

^d UHT treatment ; 135°C/3 sec.

Table 3. Viability of *Bacillus subtilis* strain after incubation with varying concentrations of heat-treated bovine apo-lactoferrin for 8 hr. at 30°C

Heat treatment	pH conditions	CFU/ml ^a				
		Apo-lactoferrin concentration				
		control	100ppm	200ppm	300ppm	400ppm
LTLT ^b	2.0	1.28×10 ⁷	5.50×10 ⁷	ND	ND	ND
	4.0	1.29×10 ⁷	7.84×10 ⁷	6.65×10 ⁷	4.14×10 ⁷	3.51×10 ⁷
	6.8	1.25×10 ⁷	6.25×10 ⁷	4.48×10 ⁷	4.34×10 ⁷	4.03×10 ⁷
HTST ^c	2.0	1.26×10 ⁷	2.75×10 ⁷	1.33×10 ⁷	ND	ND
	4.0	1.28×10 ⁷	1.24×10 ⁷	1.19×10 ⁷	1.17×10 ⁷	1.19×10 ⁷
	6.8	1.25×10 ⁷	1.22×10 ⁷	1.14×10 ⁷	1.14×10 ⁷	1.15×10 ⁷
UHT ^d	2.0	1.26×10 ⁷	3.25×10 ⁷	ND	ND	ND
	4.0	1.29×10 ⁷	1.28×10 ⁷	1.28×10 ⁷	1.25×10 ⁷	1.24×10 ⁷
	6.8	1.28×10 ⁷	1.20×10 ⁷	1.12×10 ⁷	1.13×10 ⁷	1.22×10 ⁷

^a Viable counts(CFU/ml) were determined by plating serial dilutions on Nutrient agar.

^b LTLT pasteurization ; 65°C/30 min.

^c HTST pasteurization ; 75°C/15 sec.

^d UHT treatment ; 135°C/3 sec.

pH 2, pH 4 및 pH 6.8로 조정된 Lf 첨가 용액을 LTLT, HTST 및 UHT 살균방법으로 열처리하여 Bactericidal effect를 시험한 결과는 Table 2 및 Table 3과 같다. Table 2에서 *E. coli* 에 대한 Bactericidal effect의 경우, 65°C, 30분간 LTLT 방법으로 열처리하였을 때, pH 2의 조건에서는 Lf 무첨가구에 비하여 농도가 증가할수록 균의 사멸효과가 뚜렷이 나타났으며 pH 4 및 pH 6.8의 조건에서도 Lf 무첨가구에 비하여 균의 감소를 볼수 있었다. 또한 pH 4에서는 100 ppm의 농도에서 pH 6.8보다 균의 사멸효과가 높았으나, 농도의 증가에 따라 균의 사멸효과가 유사하게 증가하는 것으로 보여진다.

75°C에서 15 sec. 동안 HTST 방법으로 열처리한 경우, pH의 모든 조건에서 LTLT 방법으로 열처리한 경우보다 사멸효과는 낮았으나 pH 조건에 따른 비교에서는 LTLT와 거의 유사한 경향을 보여주었다.

135°C에서 3 sec. 동안 UHT 방법으로 열처리한 경우, pH 2의 조건에서 LTLT

와 HTST 경우와 유사한 성장억제효과를 보여주었으나 pH 4의 조건에서는 400 ppm의 농도에서 약간의 사멸효과를 보여주었을 뿐 거의 살균효과가 나타나지 않는 것으로 보여지며 이는 Growth inhibition 측정으로 시험한 bacteriostatic effect의 결과와 일치됨을 알수 있었다. 또한 pH 6.8의 조건에서도 사멸효과는 나타나지 않는 것으로 보여진다.

이와 같은 결과로 미루어 보아 *E. coli*에 대한 열처리 Lf의 살균효과는 pH 2의 용액에서 모든 열처리 방법에 따라 강력한 살균효과를 보인 반면, pH 4의 용액에서는 LTLT 및 HTST의 열처리에 따라 약간의 살균효과를 보여주었고 pH 6.8의 용액에서는 LTLT 열처리에서 매우 약한 살균효과를 보여주었을 뿐, HTST 및 UHT 열처리에서 뚜렷한 살균효과가 나타나지 않았다. 한편 Arnold 등(1980)은 다양한 균에 대한 bactericidal effect를 측정하여 lactoferrin sensitive microorganism과 lactoferrin insensitive microorganism으로 구별을 하였는데 *Streptococcus mutans*, *Vibrio cholerae* 등의 균에 대하여는 직접적인 살균 효과가 있으며, *Escherichia coli* 0111과 같은 병원성 대장균에 대하여 저항성이 있는 것으로 보고하였으나 배지의 중성조건에서 배양한 결과는 본 보고와 일치하나 본 연구의 결과 산성조건에서는 저항성이 없는 것으로 나타났다.

Table 3에 나타난 *B. subtilis*의 시험결과, pH 2의 조건에서 열처리한 경우, control구에 비하여 강력한 사멸효과를 보여주고 있으며 특히 200 ppm 이상의 농도에서 10^{-5} 으로 희석하여 plate count method 방법으로 시험한 결과 colony가 나타나지 않았다. 이에 대한 결과로 미루어 보아 pH 2의 조건에서는 bovine apo-Lf의 농도를 증가할수록 강력한 살균효과가 나타나는 것으로 여겨진다. 또한 pH 4의 경우 LTLT 및 HTST 열처리에서 농도의 증가에 따라 매우 약한 살균효과가 있었으며, pH 6.8의 경우에는 *E. coli*에 대한 시험결과와 거의 유사한 결과를 보여주었다.

이상의 결과로 미루어보아 두가지 공시균주 모두 pH 2의 조건에서는 bovine apo-Lf의 산과 가열처리에 의한 가수분해물에 의하여 어떠한 열처리 조건에서도 강력한 사멸효과를 나타내는 것으로 생각된다. 한편 pH 4 및 pH 6.8의 조건에서는 LTLT 방법의 저온살균법에서 bovine apo-Lf농도의 증가에 따라 사멸효과가

증가하는 경향을 보여주었고 HTST 및 UHT의 경우 *E. coli*에 대하여 HTST 및 UHT 열처리에서 pH 4의 경우 높은 농도에서 약간의 사멸효과가 있었을 뿐, 사멸 효과가 거의 나타나지 않는 것으로 보여진다.

Table 4. Viability of *E. coli* strain after incubation with varying concentrations of heat-treated bovine apo-lactoferrin in raw milk for 8 hours.

Bacterial strain	Heat treatment	CFU/ml ^a				
		Apo-lactoferrin concentration				
		control	100ppm	200ppm	300ppm	400ppm
	LTLT ^b	3.27 × 10 ⁸	2.48 × 10 ⁸	2.24 × 10 ⁸	1.88 × 10 ⁸	1.78 × 10 ⁸
<i>E. coli</i>	HTST ^c	3.37 × 10 ⁸	2.65 × 10 ⁸	2.45 × 10 ⁸	2.37 × 10 ⁸	2.28 × 10 ⁸
	UHT ^d	3.25 × 10 ⁸	2.90 × 10 ⁸	2.05 × 10 ⁸	1.88 × 10 ⁸	1.63 × 10 ⁸

^a Viable counts (CFU/ml) were determined by plating serial dilutions on Nutrient agar.

^b LTLT pasteurization ; 65°C/30 min.

^c HTST pasteurization ; 75°C/15 sec.

^d UHT treatment ; 135°C/3 sec.

착유한 직후의 신선한 원유(pH 6.8)에 bovine apo-Lf을 첨가하고 시유의 살균 처리 방법인 LTLT, HTST 및 UHT 방법으로 열처리하여 *E. coli*에 대한 Bactericidal effect를 시험한 결과는 Table 4와 같다.

Table 4에 나타난 결과에 의하면 LTLT의 경우 농도의 증가에 따라 살균효과가 증가하는 것으로 나타났으며, 이와 같은 결과는 LTLT 열처리에 대한 HPLC pattern 분석 결과 및 pH 6.8의 조건에서 Lf 첨가용액에 대한 antibacterial activity와 bactericidal effect 시험 결과와 일치하는 것으로 보여지며, UHT의 경우 200 ppm의 농도 이상에서 살균효과가 나타났는데 이는 일정 농도 이상에서 열처리에 의하여 항균력을 가진 가수분해물의 생성에 기인하는 것으로 생각된다. 따라서 이에 대한 결과로 미루어 볼 때, Lf을 시유에 활용하기 위해서는 경제적인 효율을 생각할 때, 낮은 농도에서 LTLT 살균방법이 적절하다고 여겨지며, 다른 열처리의 경우 보다 많은 연구를 통하여 효율적인 Lf의 농도가 검토되

어야 될 것으로 생각된다.

4. 열처리 lactoferrin 첨가 용액의 hydrolysis degree 측정

열처리한 Lf의 *E. coli*에 대한 성장억제효과를 시험한 후, Lf용액에 대한 hydrolysis degree를 측정하여 상관관계를 분석한 결과, pH 2의 조건에서 열처리된 hydrolysis degree는 대략 5 ~15%의 범위에 존재하면서 강력한 성장억제효과를 보여주는 것으로 나타났으며 열처리 간의 가수분해도는 UHT가 LTLT 및 HTST에 비하여 13 ~ 11% 정도 높은 것으로 formal titration 결과 나타났다. 이는 bovine apo-Lf의 항균력 시험에서 나타난 성장억제효과 시험 결과에서 나타난 것처럼 성장억제효과와 hydrolysis degree와의 상관관계가 유의성이 있는 것으로 보여진다. 그러나 pH 4 및 pH 6.8의 조건에서 열처리된 Lf의 hydrolysis degree는 4 ~ 25%로 나타났으며 이에 대한 성장효과와 hydrolysis degree와의 상관관계는 그 유의성이 없는 것으로 보여진다.

5. Lactoferrin 첨가 동결건조분유의 bactericidal effect 시험

Lactoferrin 첨가 동결건조분유의 bactericidal effect 에 대한 결과는 Table 5와 같다.

Table 5. Viability of *E. coli* O111 and *Bacillus subtilis* strains after incubation with varying concentrations of freeze-dried powder added bovine apo-lactoferrin for 8 hr. at 37°C

Strains	CFU/ml ^a				
	Apo-lactoferrin concentration				
	control	100ppm	200ppm	300ppm	400ppm
<i>E. coli</i> O111	1.52×10^8	1.22×10^8	1.17×10^8	1.67×10^8	1.69×10^9
<i>Bacillus subtilis</i>	7.50×10^8	1.33×10^9	1.45×10^9	1.66×10^9	1.76×10^9

^a Viable counts (CFU/ml) were determined by plating serial dilutions on Desoxycholate agar and Nutrient agar.

Table 5에 나타난 결과에 따르면 Lf을 첨가하지 않은 대조구와 Lf을 첨가한 처리구를 비교할 때, 두 군주 모두 처리구에서 항균효과를 보여주지 못했으며 농도를 증가시킨 처리구 간에도 항균효과는 전혀 나타나지 않았다. 이와같은 결과로 미루어 보아 Lf을 동결건조 시키기 위해 용해시키는 용액의 pH 조건이 중성인 경우 아무런 항균효과를 보이지 않는 것으로 사료된다.

6. Lactoferrin 첨가 동결건조분유와 시중 Lactoferrin 첨가 조제분유와의 bactericidal effect 비교 시험

Lactoferrin 첨가 동결건조분유와 시중 Lactoferrin 첨가 조제분유와의 bactericidal effect 비교 시험에 대한 결과는 Table 6과 같다.

Table 6. Viability of *E. coli* O111 and *Bacillus subtilis* strains after incubation with varying milk powder for 8 hr.

Strains	CFU/ml ^a			
	Infant formulas			
	IF-1 ^b	IF-2 ^c	IF-3 ^c	F.D.P. ^d
<i>E. coli</i> O111	3.55×10^8	4.13×10^8	6.42×10^8	4.86×10^8
<i>Bacillus subtilis</i>	1.53×10^9	1.59×10^9	2.78×10^9	1.43×10^9

^a Viable counts (CFU/ml) were determined by plating serial dilutions on Desoxycholate agar and Nutrient agar.

^b Reconstituted at 13.0% (no apo-Lf)

^c Reconstituted at 13.0% (with apo-Lf 100ppm)

^d Reconstituted at 13.0% (freeze dried powder with apo-Lf 100ppm + IF-1)

Table 6에 나타난 결과에 따르면 Lf이 첨가되지 않은 IF-1을 대조구로 하여 Lf의 첨가 농도가 100 ppm이 되도록 동결건조분말을 환원한 처리구와 동일한 농도로 환원한 Lf 첨가 조제분유를 비교할 때, 두 군주 모두 어떠한 처리구에서도 성장억제효과를 보여주지 못했으며 건조법의 차이에 따른 처리구 간에도 성장억제효과는 나타나지 않았다. 이와같은 결과로 미루어 보아 Lf을 조제분유에 이용하는 방법에 관한 연구가 지속적으로 검토되어야 할 것으로 생각된다.

제4절. 적 요

본 연구는 가까운 장래에 Lactoferrin의 대량생산 기술이 개발될 것으로 예상되는 가운데 현재 한정적으로 이용되고 있는 Bovine lactoferrin을 다양한 유제품에 적용시키기 위한 방법을 모색하는데 연구의 중점을 두었다. 특히 유제품의 수입개방에 따른 경쟁력과 현재 시장성이 가장 높은 시유에 활용하는 방법을 중점적으로 검토하였으며, 현재 실용화되고있는 조제분유에 대한 활용성 문제를 아울러 검토하였다.

연구수행을 위한 실험적 접근 방법으로는 우선 시유 및 음용유에 적용시키기 위하여 bovine apo-Lf을 pH 2, 4, 및 6.8로 조정된 증류수에 100~400 ppm의 농도로 첨가하고 이를 LTLT, HTST 및 UHT 살균방법으로 열처리하여, 그에 따른 HPLC pattern을 분석하였고, *E. coli*와 *B. subtilis*에 대한 항균성 측정을 위하여 antibacterial activity 및 bactericidal effect 시험을 수행하였으며 그 연구 결과는 다음과 같다.

열처리한 bovine apo-Lf의 HPLC 분석 결과는 열처리하지 않은 bovine apo-Lf과 비교하여 pH 2의 조건에서 lactoferrin fragment의 농도가 LTLT에서 2배 가량 증가하였으며, HTST 및 UHT에서 다소 증가하는 유사한 양상을 보인 반면, pH 4와 pH 6.8의 조건에서 UHT의 경우 거의 나타나지 않았다.

열처리 Lf 첨가 용액의 pH 조건에 따른 *E. coli*와 *B. subtilis*에 대한 성장억제 시험 결과는 Lf를 첨가하지 않은 대조구와 비교하여 두 균주 공히 pH 2의 조건에서 살균방법에 관계없이 농도의 증가에 따라 강력한 성장억제 효과를 보인 반면, pH 4 및 pH 6.8의 조건에서 LTLT 및 HTST의 경우 배양초기에 미약한 억제효과를 보였으며, UHT의 경우 성장억제효과가 나타나지 않았다.

열처리 Lf 첨가 용액의 pH 조건에 따른 *E. coli*와 *B. subtilis*에 대한 bactericidal effect 측정 결과는 두 균주 공히 pH 2에서 강력한 살균효과를 보여주었고, pH 4의 조건에서 LTLT의 경우 약간의 살균효과를 보인 반면 다른 처리구에서는 효과가 나타나지 않았다. 또한 pH 6.8인 원유에 Lf을 첨가하고 시유의 살균처리 조건에 따른 *E. coli*에 대한 bactericidal effect 측정 결과는

LTLT의 경우 농도의 증가에 따라 살균효과가 증가하는 것으로 나타났으며, UHT의 경우 200 ppm의 농도 이상에서 살균효과가 나타났다. 따라서 Lf를 시유에 활용하기 위해서는 LTLT 살균방법이 적절하다고 여겨진다.

분유에 대한 활용성 시험은 현재 시중에 유통되는 Lf 첨가 조제분유와 동결건조법으로 제조한 Lf 첨가 동결건조분유를 농도별로 첨가하여 평판계측법으로 살균효과를 측정한 결과, 동결건조분유를 비롯하여 상업적 조제분유 또한 두 균주 모두에서 아무런 살균효과가 나타나지 않았다. 그러나 Lf 첨가 동결건조분유의 경우 산성조건에서 환원하였을 때, Lf을 첨가하지 않은 동결건조분유와 비교하여 강력한 살균효과를 보여 주었다.

참 고 문 헌

1. Abe. H. , H. Saito, H. Miyakawa, Y. Tamura, S. Shimamura, E. Nagao, and M. Tomita. 1991. Heat stability of bovine lactoferrin at acetic pH. J. Dairy Sci. 74:65~71
2. Arnold R.R., M. Brewer and J.J. Gauthier. 1980. Bactericidal activity of human lactoferrin : Sensitive of a variety of microorganisms. Infection and Immunity. 28: 893~898.
3. Bellamy. W. , M. Takase, H. Wakabayashi, K. Kawase. and M. Tomita. 1992. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. J. Applied Bacteriology. 73:472~479
4. Bellamy. W. , M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase and M. Tomita. 1992. Idenyfication of the bactericidal domain of lactoferrin. Biochimica et Biophysica Acta 1121:130~136
5. Bellamy. W. , H. Wakabayashi, M. Takase, K. Kawase, S. Shimamura, and M. Tomita. 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
6. Bellamy, W. , H. Wakabayashi, M. Takase, K. Kawase, S. Shimamura and M. Tomita. 1993. Role of cell-binding in the antibacterial mechanism of lactoferrin B. J. Applied Bacteriology. 75:478~484.
7. Brock J.H., M.G. Pickering, M.C. McDowall, A.G. Deanon. 1983. Role of antibody and enterobactin in controlling growth of *E. coli* in human milk and acquisition of lactoferrin and transferrin bound iron by *E. coli*. Infect Immun. 40:453~459.
8. Collins C.H., P.M. Lyne and J.M. Grange. 1995. Microbiological methods. Butterworth-Heinemann Ltd. GB, Oxford: 91.

9. Ellisohn R.T., T.J. Giehl and F.M. LaForce. 1988. Damage of the outer membrane of enteric Gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infection and Immunity*. 56:2774~2781.
10. Goldman, A.S. and C.W. Smith. 1973. Host resistance factors in human milk. *J. Pediatr.* 82:1082.
11. Hashizume, S., K. Kuroda and H. Murakami. 1983. Identification of lactoferrin as an essential growth factor for human lymphocytic cell lines in serum-free medium. *Biochem. Biophys. Acta* 763:377.
12. Kakuta, I. and H. Kurokura. 1995. Defensive effect of orally administered bovine lactoferrin against cryptocaryon irritans infection of red sea bream. *Fish Pathology*. 30:289~290.
13. Levy M., 1957. *Methods in enzymology III*. Academic press. New York:454.
14. Masson P.L., J.F. Heremans, J.J. Prignot, G. Wauters. 1969. Lactoferrin in milk from different species. *Comp. Biochem. Physiol* 39b:119~129.
15. Nagasako, Y. , H. Saito, Y. Tamura, S. Shimamura, and M. Tomita. 1993. Iron-binding properties of bovine lactoferrin in iron-rich solution. *J. Dairy Sci.* 76:1876~1881
16. Naidu, A.S. , M. Andersson, J. Miedzobrodzki, A. Forsgren, and J. L.Watts. 1991. Bovine lactoferrin receptors in *Staphyrococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 74:1218~1226
17. Nemet K., I. Simonovits. 1985. The biological role of lactoferrin. *Haematologia* 18:3~12.
18. Nonnecke B.J., K.L. Smith. 1984. Inhibition of mastitic bacteria by bovine milk apo-lactoferrin evaluated by in vitro microassay of bacterial growth. *J. Dairy Sci.* 67:606~613.
19. Paulsson. M.A.. 1993. Thermal behavior of bovine lactoferrin in water

- and its relation to bacterial interaction and antibacterial activity.
J. Dairy Sci. 76:3711~3720
20. Saito. H. , H. Miyakawa, Y. Tamura, S. Shimamura, and M. Tomita. 1991.
Potent bactericidal activity of bovine lactoferrin hydrolysate produced
by heat treatment at acidic pH. J. Dairy Sci. 74:3724~3730
 21. Shimazaki. K. and Y. Yoshimoto. 1988. Distribution of bovine
lactoferrin in curd and whey. Japanese J. Dairy and food Science. 37:A
106~108
 22. Shinoda. I. , M. Takase, Y. Fukuwatari, S. Shimamura, M. Koller, and
W. Kong. 1996. Effects of lactoferrin and lactoferricin on the release
of interleukin from Human polymorphonuclear leukocytes. Biosci. Biotech.
Biochem. 60:521~523
 23. Suzuki T., K. Yamauchi, K. Kawase, M. Tomita, I. Kiyosawa and S.
Okonogi, 1989. Collaborative bacteriostatic activity of bovine
lactoferrin with lysozyme against *Escherichia coli* O111. Agric. Biol.
Chem. 53:1705~1706.
 24. Tomita. M. , W. Bellamy, M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, and K.
Kawase. 1991. Potent antibacterial peptides generated by pepsin
digestion of bovine lactoferrin. J. Dairy Sci. 74:4137~4142
 25. Wakabayashi, H. , W. Bellamy, M. Takase, and M. Tomita. 1992.
Inactivation of *Listeria monocytogenes* by lactoferrin, a potent
antimicrobial peptide derived from cow's milk. J. Food Protection.
55:238~240
 26. Yamauchi K., M. Tomita, T.J. Giehl and R.T. Ellison III. 1993.
Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin - derived
lactoferrin peptide fragment. Infection and Immunity. 61:719~728.
 27. 山内恒治. 1995. 乳たんぱく質の微量構成成分について乳業技術. 45:45~52
 28. 남명수, 남경수, 최인성, 김종우, 이수원. 1993. Lactoferrin의 생리적 특

- 성에 관한 연구. I. Human lactoferrin의 효율적인 정제 및 항원 항체 반응을 이용한 확인. 한국낙농학회지. 15:209~215.
29. 진현석, 금종수, 박종수, 최우영. 1996. 한우 락토페린의 항균성에 관한 연구. 한국낙농학회지. 18:31~40.
30. 진현석, 금종수, 김정희, 최우영. 1995. 한우 락토페린의 정제와 이화학적 특성. 한국낙농학회지. 17:146~160.
31. 한수연. 1996. Pepsin, 및 Chymotrypsin 처리에 의한 Bovine lactoferrin fraction의 항균 효과에 관한 연구. 충남대학교대학원 석사학위 논문.

제2장. 살균방법 및 pH 조건에 따른 pepsin-hydrolyzed bovine apo-lactoferrin의 항균성 변화에 관한 연구

제1절. 서론

Lactoferricin B는 N-terminal region으로부터 유래된 25개의 아미노산 잔기로 구성되어 있으며 이는 사람으로부터 유래된 47개의 아미노산 잔기로 구성된 lactoferricin H와 상동성을 갖는 부분이 포함되어 있다고 Bellamy 등⁽¹⁾이 보고한 이래 Lactoferricin B 및 bovine Lf hydrolysates의 생화학적 특성 및 항균 특성에 대하여 많은 연구^(2~5)가 수행되어 왔다.

특히 최근 들어서 lactoferrin의 안정성과 항균 특성 유지에 대하여 활발한 연구가 진행되고 있는데, 그 중에서 단백질가수분해효소 처리가 Lf의 기능에 미치는 영향에 대하여 보고된 바에 의하면, bovine apolactoferrin의 항균성과 철 결합능력은 chymotrypsin과 trypsin의 처리에 의해 상실된다고 보고되었으며⁽⁶⁾, 그 밖에도 papain, actinase AS, protease P, protease A 및 biopraxe와 같은 효소 처리에도 bovine apolactoferrin의 항균성과 철 결합능력이 상실되었다고 보고하였다⁽⁷⁾.

한편 Lf의 pH 및 열안정성에 관한 연구에서, pH 2, 120℃의 처리에서도 철 결합 능력과 항균성을 유지한 가수분해물을 생산했다고 보고하였으며⁽⁸⁾, pepsin 효소 처리한 Lf의 경우 항균력은 유지하였으나 철결합능력이 상실한 가수분해물을 생산하였다고 보고하였다⁽⁹⁾. 또한 가수분해물로부터 bovine Lf의 residues 17-41에서 lactoferricin B를 분리하였는데⁽¹⁰⁾, 이 lactoferricin B는 단일 disulfide bond를 가지고 있으며 철결합 능력이 없고 세균을 포함한 yeast, fungi 등의 미생물에 대하여 광범위한 항균 능력을 갖고있다고 보고하였다 (1,10,11,12,13)

이상과 같은 연구 결과들을 고찰해 볼 때, lactoferricin B 및 bovine Lf 효소 가수분해물을 다양한 유제품에 적용하기 위해서는 살균에 따른 다양한 열처리를 필요로 하고 따라서 그에 따른 bovine Lf 가수분해물의 기능 실패 문제가 우선적으로 검토되어야 한다. 아울러 고도의 순수한 분리를 요구하는 lactoferricin B에 대하여 활용성 검토를 하기 전에 bovine Lf 가수분해물을 직접 이용하는 방법 또한 활용 가치가 충분히 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구는 bovine lactoferrin을 단백질 분해효소인 porcine pepsin으로 분해한 후, 그 가수분해물 분획을 수집하여 동결건조하였고, 다양한 pH 조건 하에서 LTLT, HTST, UHT 등과 같은 살균방법에 따라 열처리하여, 공시균주 *Escherichia coli* O111에 대한 minimal bacteriocidal concentrations(MBCs) test 및 bacteriocidal effect 등의 항균력 시험을 수행하였으며, 추후 시유 및 유제품 등에 적용할 수 있는 결과를 얻는데 그 목적을 두었다.

제2절. 재료 및 방법

1. 공시재료

1) Strains

공시균주 *Escherichia coli* 0111 KCTC 1021는 생명과학연구소에서 분양 받아 시험에 사용하였다.

2) Lactoferrin

Bovine apo-Lf은 벨기에 Sodelac CO. (Purity : 90% by HPLC)것을 구입하여 사용하였다.

2. Bovine apo-Lf 가수분해물의 제조

Tomita 등⁽⁷⁾의 방법에 따라, Bovine apo-Lf을 증류수에 5% (wt/vol) 농도로 용해하고 pH를 2.5로 조정 한 후, porcine pepsin (10 units/mg, Sigma Chem. CO., USA)을 최종농도 3% (wt/wt of substrate)가 되도록 첨가하고, 37°C에서 4 시간 반응시키고 80°C에서 15분간 열처리하여 반응을 종료하였다. 반응 종료 후 혼합물에 1N NaOH를 첨가하여 중화하고 15,000 x g로 원심분리하여 침전물 제거 한 뒤 상등액을 모아서 동결건조하여 lyophilized powder를 제조하였다.

3. Lf 가수분해물의 Gel filtration

Porcine pepsin으로 효소 처리한 bovine Lf 가수분해물을 저온실(4°C)에서 120mg/ml 농도로 PBS 용액에 용해하여 Sephadex G-200 (Sigma Chem. CO. USA) column(2 x 90cm)을 통하여 pH 6.0, 5mM Na-phosphate buffer로 gel filtration을 수행한 후 fraction collector(Bio-rad 2110, USA)로 각각의 분획을 모아서 동결건조하여 항균성 시험에 이용하였다.

4. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Gel filtration을 수행한 후, 회수한 분획의 분자량을 확인하기 위하여 Tomita 등⁽⁷⁾의 방법에 따라 SDS-PAGE를 수행하였으며, molecular weight marker

는 galactosidase(116,000 Da)~lysozyme(14,000Da) Sigma CO. 제품을 이용하였다.

5. 살균방법에 따른 pepsin-hydrolyzed bovine Lf 용액의 조제

pepsin-hydrolyzed bovine Lf을 0.1N HCl 또는 0.1N NaOH로 pH 2.0, 4.0 및 6.8로 조정된 증류수에 농도 별로 용해하고 각각의 용액은 running water bath 상에서 저온살균(LTLT; 65°C/30 min.), 고온살균(HTST; 75°C/15 sec.) 처리하였으며, UHT처리 (135°C/3 sec.)는 water bath에서 85°C까지 온도가 도달하도록 예비가열을 한 후, oil bath를 이용하여 실험실에서 제작한 UHT lab. system을 통하여 열처리하였다. 이렇게 열처리 된 시료는 냉각수에서 급속히 냉각을 시킨 후, 항균성시험에 사용하였다.

6. Pepsin-hydrolyzed bovine Lf의 bacteriocidal activity 측정

공시균주에 대하여 열처리된 pepsin-hydrolyzed bovine Lf의 bacteriocidal effect를 시험하기 위하여 *E. coli*의 basal medium으로서 1% peptone water를 pH 6.8로 조정하여 Autoclave에서 멸균하여 사용하였다. 멸균된 basal medium에 균주를 접종하여 shaker-incubator water bath에서 37°C로 배양하였다.

열처리된 pepsin-hydrolyzed bovine Lf용액은 0.45 μ m membrane filter로 여과하고 basal medium의 최종 농도가 200, 400, 600 및 800 μ g/ml이 되도록 basal medium에 첨가한 다음 미리 배양된 배양액 10⁷/ml을 basal medium에 접종하고 37°C에서 12시간 배양한 후, *E. coli*는 Desoxycholate agar (DIFCO Lab. USA) 배지에서 평판계측법으로 생균수를 측정하였다.

제3절. 결과 및 고찰

1. Pepsin-hydrolyzed bovine Lf의 분리 및 확인

Porcine pepsin으로 효소 처리한 bovine Lf를 Sephadex G-200을 통하여 gel filtration을 수행한 결과는 Fig.1과 같다. Fig.1에서 나타난 결과를 4개의 분획으로 나누어 수집한 후, 이를 cellulose tube(Sigma co.)를 이용하여 24시간 투석한 후, 동결건조하여 항균성 시험에 이용하였다.

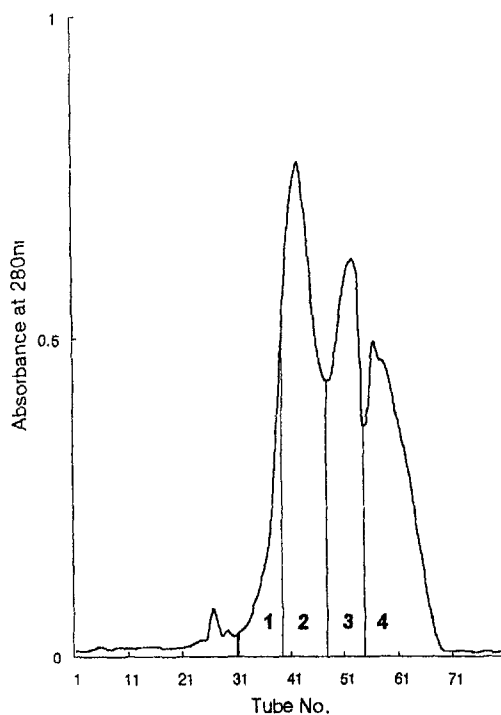


Fig.1. Gel filtration fractionation of peptides generated by porcine pepsin hydrolysis of bovine lactoferrin

2. Gel filtration 분획의 항균성 검정

Table 1. Effect of pepsin-hydrolyzed bovine Lf fractions (380 μ g/ml) on the growth of *Escherichia coli* strain at 37°C for 12 hours

control	lactoferrin	fraction No.1	fraction No.2	fraction No.3	fraction No.4
5.3 x 10 ⁵	8.67 x 10 ³	5.25 x 10 ⁵	ND	1.03 x 10 ⁴	9.25 x 10 ⁵

Porcine pepsin으로 효소 처리한 bovine Lf 가수분해물 분획을 bovine apo-Lf와 항균성을 비교 시험한 결과는 Table 1과 같다. Table 8에서 나타난 것처럼 fraction No.2와 fraction No.3에서 대조구에 비하여 강력한 항균력을 갖고 있는 것으로 나타났으며, 또한 bovine apo-Lf보다 항균력이 강한 것으로 나타났다. 따라서 fraction No.2와 fraction No.3을 분리 수집하여 본 시험의 항균성 검정에 이용하였다.

3. SDS-PAGE electrophoresis

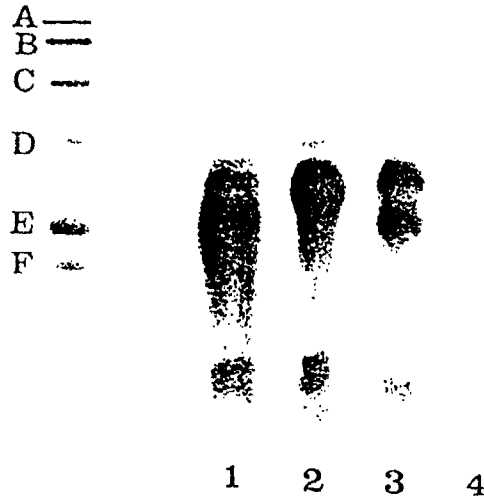


Fig. 2. SDS-PAGE patterns of pepsin-hydrolyzed bovine lactoferrin fractions

Molecular maker: A: Phosporylase b (MW: 97,400), B: Bovine serum albumin (MW: 66,200), C: Ovalbumin (MW: 45,000), D: Carbonic anhydrase (MW: 31,000), E: Soybean trypsin inhibitor (MW: 21,500), F: Lysozyme (MW: 14,400)

Lane 1 : fraction 1, Lane 2 : fraction 2, Lane 3 : fraction 3, Lane 4 : fraction 4

Porcine pepsin으로 효소 처리한 bovine Lf 가수분해물 분획을 SDS-PAGE를 수행한 결과는 Fig. 2와 같다.

Fraction No.2의 경우, 표준단백질에 대한 상대적인 이동거리를 계산한 결과 약 31KDa ~ 33KDa의 band가 나타났으며 이는 다른 분획에서는 나타나지 않은 물질이다. 또한 fraction No.3의 경우, fraction No.2와 함께 약 25KDa ~ 28KDa의 분자량을 가진 물질이 높은 농도로 존재하고 있음을 보여 주었다. 이와 같은 결과는 pH 3.0에서 pepsin 처리에 의해 iron-saturated Lf이 대략 33KDa의 분자량으로 분해되었다는 보고⁽¹⁴⁾와 유사한 결과를 보여 주었는데, 특히 fraction No.1과 fraction No.4에서 나타나지 않은 band가 fraction No.2와 fraction No.3에서 나타나는 것으로 미루어 보아 table 8에 나타난 결과와 비교

할 때, 이 물질들이 매우 강력한 항균력을 갖고 있는 것으로 보여진다.

4. 열처리 pepsin-hydrolyzed bovine Lf 첨가 용액의 Bacteriocidal effect 시험

Table 2. Viability of *E. coli* O111 strain after incubation with varying concentrations of heat-treated pepsin-hydrolyzed bovine Lf fraction No.2 for 12 hr. at 37°C

Heat treatment	pH conditions	CFU/ml ^a				
		pepsin-hydrolyzed bovine Lf fraction concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
		control	200	400	600	800
LTLT ^b	2.0	4.30×10^7	3.80×10^6	ND	ND	ND
	4.0	4.30×10^7	1.20×10^7	ND	ND	ND
	6.8	4.30×10^7	2.45×10^7	ND	ND	ND
HTST ^c	2.0	4.30×10^7	5.80×10^6	ND	ND	ND
	4.0	4.30×10^7	8.25×10^6	ND	ND	ND
	6.8	4.30×10^7	1.21×10^7	6.20×10^4	ND	ND
UHT ^d	2.0	4.30×10^7	1.26×10^7	ND	ND	ND
	4.0	4.30×10^7	1.72×10^7	1.05×10^6	ND	ND
	6.8	4.30×10^7	2.51×10^7	2.44×10^6	1.22×10^4	ND

^a Viable counts (CFU/ml) were determined by plating serial dilutions on desoxycholate agar.

^b LTLT pasteurization ; 65°C/30 min.

^c HTST pasteurization ; 75°C/15 sec.

^d UHT treatment ; 135°C/3 sec.

Table 3. Viability of *E. coli* 0111 strain after incubation with varying concentrations of heat-treated pepsin-hydrolyzed bovine Lf fraction No.3 for 12 hr. at 37°C

Heat treatment	pH conditions	CFU/ml ^a				
		pepsin-hydrolyzed bovine Lf fraction concentration (μg/ml)				
		control	200	400	600	800
LTLT ^b	2.0	5.26 × 10 ⁷	3.80 × 10 ⁷	6.09 × 10 ⁶	1.70 × 10 ⁵	ND
	4.0	5.26 × 10 ⁷	5.69 × 10 ⁷	8.05 × 10 ⁶	2.80 × 10 ⁶	ND
	6.8	5.26 × 10 ⁷	4.88 × 10 ⁷	6.16 × 10 ⁶	1.52 × 10 ⁵	2.95 × 10 ⁶
HTST ^c	2.0	5.26 × 10 ⁷	5.80 × 10 ⁷	8.32 × 10 ⁶	5.24 × 10 ⁵	ND
	4.0	5.26 × 10 ⁷	6.25 × 10 ⁷	9.24 × 10 ⁶	3.85 × 10 ⁶	6.30 × 10 ⁵
	6.8	5.26 × 10 ⁷	4.21 × 10 ⁷	1.03 × 10 ⁷	8.62 × 10 ⁶	3.25 × 10 ⁶
UHT ^d	2.0	5.26 × 10 ⁷	6.42 × 10 ⁷	2.24 × 10 ⁷	9.40 × 10 ⁶	1.36 × 10 ⁶
	4.0	5.26 × 10 ⁷	4.40 × 10 ⁷	3.36 × 10 ⁷	6.70 × 10 ⁶	4.52 × 10 ⁶
	6.8	5.26 × 10 ⁷	2.51 × 10 ⁷	1.22 × 10 ⁷	8.55 × 10 ⁶	5.06 × 10 ⁶

^a Viable counts (CFU/ml) were determined by plating serial dilutions on desoxycholate agar.

^b LTLT pasteurization : 65°C/30 min.

^c HTST pasteurization : 75°C/15 sec.

^d UHT treatment ; 135°C/3 sec

살균 처리 및 pH 조건에 따른 pepsin-hydrolyzed bovine Lf의 두 분획에 대하여 MBCs 및 bacteriocidal effect를 측정된 결과는 Table 2과 Table 3과 같다.

Table 2과 Table 3에서 나타난 결과와 같이 우선 두 분획 간의 bacteriocidal effect는 fraction No.2에서 월등히 높은 것으로 나타났으며, 살균 처리 간에는 fraction No.3에서 UHT로 살균 처리했을 경우 bacteriocidal 효과를 상당히 손실하는 것으로 나타났으나, fraction No.2의 경우 UHT 처리에서도 bacteriocidal 효과를 유지하는 것으로 보여지며, 특히 pH 2의 조건에서 강한 항균활성력을 유지하는 것으로 나타났는데 이와 같은 결과는 Saito 등⁽⁸⁾이 pH 2, 120°C 열처리에서 강한 항균활성력을 유지하는 가수분해물이 생산되었다는 보고로 미루어보아 본 시험에서도 동일한 결과가 나타난 것으로 생각된다. 그러나 LTLT 및 HTST 살균 처리 간에는 pH 조건 및 농도에 따라 항균활성력에 별 차

이가 없는 것으로 여겨진다. pH 조건에 따른 bacteriocidal effect는 두 분획 모두에서 pH 2의 조건에서 pH 6.8에 비하여 매우 강력한 bacteriocidal 효과를 보여주었고 pH 4에 비하여 약간 우세한 bacteriocidal 효과를 보여주었다. 또한 이와 같은 결과로 미루어 fraction No.2의 경우, LTLT 및 HTST 살균 처리를 했을 때 pH 2 및 pH 4의 조건에서 MBCs가 약 200 ~ 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 범위에 있는 것으로 보여지나 pH 6.8의 경우, MBCs가 pH 조건에 따라 다소 높게 나타나는 것으로 보여진다. 또한 fraction No.3의 경우, LTLT방법으로 살균 처리를 했을 때 pH 2 및 pH 4의 조건에서 MBCs가 600 - 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 범위에 있는 것으로 보여지나 UHT의 경우, 농도를 증가시켜도 bacteriocidal 효과가 별로 나타나지 않는 것으로 나타났다.

이와 같은 결과는 Dionysius⁽¹⁵⁾ 등이 bovine Lf의 항균성 peptides를 분리 정제하여 특성을 시험한 결과에서 pepsin 가수분해물의 경우 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 최소저해농도를 나타냈다는 보고와 일치하는 것으로 나타났다.

제4절. 적 요

본 연구는 Pepsin-hydrolyzed bovine Lf 수용액을 시유의 살균방법인 L.T.L.T. pasteurization (65°C/30min.), H.T.S.T. pasteurization (75°C/15sec.), Ultra-high temperature treatment (135°C/3sec.) 방법으로 열처리하여 *Escherichia coli* 0111 (pathogenic type)에 대한 MBCs test 및 항균 특성을 시험하여 pepsin-hydrolyzed bovine Lf의 활용성 여부를 검정하는데 그 목표를 두었으며, 그 결과는 다음과 같다.

Pepsin으로 효소처리 된 Lf 가수분해물을 gel filtration(Sephadex G-200)을 통하여 분리 수집하고 각 분획을 SDS-PAGE로 분자량을 측정된 결과, 매우 강력한 항균력을 갖고 있는 분획에서 약 33KDa의 분자량을 가진 물질이 있는 것으로 나타났다.

살균 처리 및 pH 조건에 따른 pepsin-hydrolyzed bovine Lf의 두 분획에 대하여 MBCs test 및 bacteriocidal effect를 측정한 결과, fraction No.2에서 pH 2의 산성 조건에서 살균방법에 따른 열처리와 관계없이 매우 강력한 항균효과가 있는 것으로 보여지며, LTLT 살균처리의 경우 pH 조건과 관계없이 가수분해물 농도가 200~400 µg/ml의 범위에서 강한 항균활성력을 유지하는 것으로 보여지나, UHT 살균처리의 경우 pH의 조건이 증가하면서 항균활성력이 약화되는 것을 확인 할 수 있었다.

fraction No.3에서는 LTLT 살균처리의 경우 산성 조건에서 가수분해물의 농도를 증가시킬수록 항균활성력이 증가되는 것으로 보여지나, UHT 살균처리의 경우 가수분해물의 농도를 증가시킬수록 약하게 항균활성력이 유지되는 것을 확인 할 수 있었다.

본 연구 결과를 종합할 때, Lf 가수분해물의 분획에 대한 MBCs의 농도를 설정할 수 있었고 아울러 pH 조건 및 살균방법에 따른 Lf 가수분해물 분획의 안정성을 파악할 수 있었으며, 고도의 정제를 요구하는 lactoferricin B를 활용할 수 없는 경우, pepsin으로 효소처리한 Lf 가수분해물로서 시유 및 유제품 등에 적용할 수 있을 것으로 여겨진다.

여 백

참고문헌

1. Bellamy, W., H., Wakabayashi, M. Takase, K. Kawase, S. Shimamura, and M. Tomita. : 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(1993).
2. Jones, E. M., A. Smart, G. Bloomberg, L. Burgess, and M. R. Millar. : Lactoferricin, a new antimicrobial peptide. *J. of Appl. Bacteriology.* 77, 208(1994).
3. Hoek, K. S., J. M. Milne, P. A. Grieve, D. A. Dionysius, and R. Smith. : Antibacterial activity of bovine lactoferrin-derived peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41(1), 54(1997).
4. Shinoda, I., M. Takase, Y. Fukuwatari, S. Shimamura, M. Koller, and W. Kong. : Effects of lactoferrin and lactoferricin on the release of interleukin from Human polymorphonuclear leukocytes. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 521(1996).
5. 한수연 : Pepsin, 및 Chymotrypsin 최저에 의한 Bovine lactoferrin fraction의 항균효과에 관한 연구. 충남대학교대학원 석사학위논문. (1996)
6. Brines, R. D. and J. H. Brock. : The effect of trypsin and chymotrypsin on the *in vitro* antimicrobial and iron-binding properties of lactoferrin in human milk and bovine colostrum. *Biochem. Biophys. Acta.* 759, 229(1983).
7. Todhunter, D., K. L. Smith, and J. S. Hogan. : Growth of Gram-negative bacteria in dry cow secretion. *J. Dairy Science.* 73, 363(1990)
8. Saito, H., H. Miyakawa, Y. Tamura, S. Shimamura, and M. Tomita. : Potent bactericidal activity of bovine lactoferrin hydrolysate produced by heat treatment at acidic pH. *J. Dairy Science.* 74, 3724(1992).
9. Tomita, M., W. Bellamy, M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, and K.

- Kawase. : Potent Antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. *J. Dairy Science*. 74, 4137(1991).
10. Bellamy, W., M. Takase, H. Wakabayashi, K. Kawase, and M. Tomita. : Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J. Applied Bacteriology*. 73, 472(1992).
 11. Bellamy, W., M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase and M. Tomita. : Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1121, 130(1992).
 12. Wakabayashi, H., W. Bellamy, M. Takase, and M. Tomita. : Inactivation of *Listeria monocytogenes* by Lactoferrin, a potent antimicrobial peptide derived from cow's milk. *J. Food Protection*. 55, 238(1992).
 13. Yamauchi, K., M. Tomita, T.J. Giehl and R.T. Ellison III. : Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin - derived lactoferrin peptide fragment. *Infection and Immunity*. 61, 719(1993).
 14. Line, W. F., Sly, D. A. and Bezkorovainy, A. : Limited cleavage of human lactoferrin with pepsin. *Int. J. Biochem*. 7, 203(1976).
 15. Dionysius, D. A. and J. M. Milne. : Antibacterial peptides of bovine lactoferrin : Purification and characterization. *J. of Dairy Sci*. 80, 667(1997)

제3장. 김치 제조에 있어서의

Lactoferrin의 첨가효과

제1절. 서론

김치는 가정에서 담귀 이용하는 것이 당연시 되었으나 최근 경제 성장과 함께 외식경향이 높아지고 김치 수출을 위한 대량제조 방식이 개발되면서 포장김치의 수요가 증가되고 있다. 그러나 김치는 관여하는 미생물과 효소의 작용이 다양하고 이에 따른 성분변화 및 상온에서의 유통에 따른 과숙현상 및 과산화는 김치의 산업화에 문제점으로 제기되고 있다. 김치의 과숙현상은 유기산 농도의 증가 및 조직의 연무현상의 발생으로서 식용화 하기에 어려운 상태에 이르게 된다.

그간에 이러한 문제점의 해결방안으로서 김치숙성관련 젖산균 살균에 대한 가열처리와 방사선 조사(변 등, 1989), 열처리 및 겨자유의 첨가(홍 등, 1989), 염 혼합물의 첨가(김 등, 1991), 효소 및 염첨가(강 등, 1991) 천연항균 물질의 검색(이 등, 1991), 대나무 추출물의 항균력 검토(정 등, 1995), 부추의 향미물질 검토(김 등, 1995, 1996), 김치의 선도유지를 위한 천연 보존제의 탐색(문 등, 1995)등 다양하게 검토된 바 있다. 그러나 방사선조사 및 방부제 첨가, 염 혼합물 등은 소비자들이 기피하게 되고 산초유 등(윤 등, 1995) 향신료 식물은 김치맛과 향미에 영향을 미치기 때문에 실용화에 문제점으로 남고 있다. 따라서 이 등(1991)도 제시한 천연항균성 물질인 lactoferrin의 김치 제조에의 활용도 기대할 만한 연구로 생각된다.

본 연구에서는 김치제조 및 보존성에의 lactoferrin의 활용성 검토를 위하여 김치제조 관련 *Lactobacillus*속, *Leuconostoc*속, *Streptococcus*속 등의 미생물에 대한 항균성을 시험하고, 공시 김치는 김 및 박(1995)이 실시한 방법에 따라 배추를 씻어 2~4cm로 절단하여 15%의 식염수로 2시간 절인후 물로 2~3회

행군후 10분간 탈수하고 100g씩 칭량하여 파 2.0g, 생강 1.0g, 고춧가루 2.0g, 마늘 2.0g을 섞어 유리병에 담고 15℃의 Incubator에서 숙성시키되 lactoferrin을 재료에 대하여 5mg~15mg/g를 발효 개시전 및 숙성완료후에 첨가하고 숙성간격을 두고 숙성김치의 pH, 산도의 측정, 김치발효 관련 미생물(*Lactobacillus*속, *Luconostoc*속, *Peoliococcus*속, *Streptococcus*속) 및 대장균과 효모수의 측정, 관능검사 및 보존성시험 등을 실시하여 우수한 김치 제조에의 lactoferrin의 적정량 및 작용정도를 확인하였다.

lactoferrin의 이화학적 특성과 항균성에 대한 연구는 Yamauchi 등(1992, 1993), Paulsson 등(1993), Shimazaki (1989), 진 등(1995, 1996), 남 등(1996)에 의하여 다수 연구된바 있으나 이의 이용성에 대한 연구는 별로 찾아 볼 수 없다.

따라서 lactoferrin의 활용 기술탐색을 위하여 전년도에 lactoferrin 분해물에 대한 항균성과 이의 이용성을 검토한 바 있으며, 3차 연도에는 lactoferrin의 폭 넓은 활용기술을 검토하기 위하여 우리나라 특산식품인 김치의 제조와 보존에 이용하므로서 우수한 김치의 제조와 미생물의 항균성 활용에 따른 보존성 향상을 도모하고자 하였다.

제2절. 재료 및 방법

김치제조 및 보존에 있어서의 lactoferrin 의 활용성 검토를 위하여 김치 발효에 관계하는 *Lactobacillus*속, *Leuconostoc*속, *Streptococcus*속 등의 미생물에 대한 항균성을 시험하고 발효 및 보존에 있어서의 산도, 관련 미생물의 변화상태, 관능검사 및 보존시험 등을 실시하므로서 우수한 김치제조에의 lactoferrin의 적정량 및 작용상태 등을 검토하였다.

제3절. 결과 및 고찰

1. 김치 발효시에 발현하는 미생물군에 대한 항균성 검토

김치 발효과정중에 다수 발현하는 10여종의 미생물군에 대한 lactoferrin의 항균성을 확인하기 위하여 멸균배지 10ml에 전 배양액 0.1ml를 옮겨 혼합한 후 직경이 9.0cm인 petri dish에 옮겨 응고시킨 후 여기에 lactoferrin을 5.0mg~20.0mg/ml 함유한 paper disc를 올려 놓고 0.85% 식염수 75 μ l로 확산 시켜 각 미생물의 적정온도에서 12-24시간 배양한 후 paper disc 주위의 저해환의 크기 (mm)로 활성의 정도를 측정하였는바 Table 10에 나타난바와 같이 함량의 증가 및 미생물의 종류에 따라 항균성의 차이를 나타내었다.

Table 1. Comparison of antimicrobial activities of lactoferrin with that of sorbic acid

Microorganisms	Diameter of inhibitory zones on plate(mm)				
	Additive				
	Sorbic acid (10mg/ml)	Lactoferrin (5mg/ml)	Lactoferrin (10mg/ml)	Lactoferrin (15mg/ml)	Lactoferrin (20mg/ml)
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 40061	12	9	10	10	14
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 12116	12	12	12	12	12
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCCM 11324	11	12	13	13	13
<i>Streptococcus faecalis</i> KCCM 11814	9	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 11215	22	10	10	11	12
<i>Escherichia coli</i> KCCM 11234	9	9	9	9	10
<i>Pichia Membranaefaciens</i> KCCM 12468	9	10	10	10	14
<i>Pediococcus acidilactici</i> KCCM 11728	11	9	9	9	9
<i>Klebsiella oxytoca</i> KCCM 11418	11	9	9	9	10
<i>Brettanomyces custersii</i> KCCM 11490	15	10	12	13	13

2. 숙성 김치의 pH 및 산도 측정

김치 발효중의 pH는 김치를 마쇄한 후 직접 pH meter로 측정하고 산도 측정은 여과액 10ml를 phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.1N NaOH 용액으로 적정, 유산량으로 환산하였는바 Table 11에 나타난바와 같이 발효 4일에 무처리구에 비하여 처리구가 비슷하거나 낮은 수치를 나타내었다.

Table 2. The change of pH and titratable acidity of Kimchi with and without lactoferrin and fermented at 15°C

Treatment	pH		Titratable acidity	
	Fermentation time (hrs.)		Fermentation time (hrs.)	
	0	96	0	96
Control	5.15	4.07	0.16	0.56
L 5	5.15	4.07	0.16	0.57
L10	5.15	4.12	0.16	0.57
L15	5.15	4.12	0.16	0.58

3. 총균수 계수

김치즙액을 0.1% peptone수에 희석한 후 희석액 0.1ml를 plate count agar에 접종, 30°C에서 3일간 배양한 후 계수하였는바 Table 12에 나타난바와 같이 발효 종료후 처리구가 무처리구에 비하여 낮은 균수를 나타내었다.

Table 3. Effect of lactoferrin on changes in total viable cell count during Kimchi fermentation at 15°C

Treatment	Number of Microorganisms (C.F.U/ml)	
	Fermentation time (hrs.)	
	0	96
Control	2.4×10^3	2.0×10^6
L 5	2.4×10^3	1.9×10^6
L10	2.4×10^3	7.9×10^5
L15	2.4×10^3	4.5×10^5

4. *Lactobacillus*속 및 *Leuconostoc*속의 균수측정

0.1% bromophenol blue 0.1ml와 김치즙액을 0.1% peptone수로 희석한 시료를 0.1ml 취하여 *Lactobacilli* MRS agar 배지 10ml에 접종, 30°C에서 2-3일 배양하고 colony의 발색에 따라 *Lactobacillus*속과 *Leuconostoc*속으로 계수 하였는바, Table 4 및 Table 5에 나타난바와 같이 *Lactobacillus*속과 *Leuconostoc*속 모두 무처리구에 비하여 처리구가 첨가량 증가에 따라 감소하는 현상을 나타내었다.

Table 4. Effect of lactoferrin on changes in *Lactobacillus* during Kimchi fermentation at 15°C

Treatment	Number of Microorganisms (C.F.U/ml)	
	Fermentation time (hrs.)	
	0	96
Control	8.5×10^4	1.9×10^6
L 5	8.5×10^4	1.5×10^6
L10	8.5×10^4	8.0×10^5
L15	8.5×10^4	6.2×10^4

Table 5. Effect of lactoferrin on changes in *Leuconostoc* during Kimchi fermentation at 15°C

Treatment	Number of Microorganisms (C.F.U/ml)	
	Fermentation time (hrs.)	
	0	96
Control	2.0×10^4	4.1×10^5
L 5	2.0×10^4	1.2×10^5
L10	2.0×10^4	1.1×10^5
L15	2.0×10^4	6.0×10^4

5. *Pediococcus*속 및 *Streptococcus*속의 계수

m-Enterococcus agar 배지에 김치 즙액을 0.1% peptone수로 희석한 시료를 0.1ml 취하여 접종하고 37°C에서 4일간 배양한 후 발현색에 따라 *Pediococcus*속과 *streptococcus*속을 구분하여 계수하였는바 Table 6 및 Table 7에 나타난바와 같이 *Pediococcus*속과 *Streptococcus*속 다 같이 lactoferrin처리구가 무처리구에 비하여 감소하여 항균력이 나타남을 알 수 있었다.

Table 6. Effect of lactoferrin on changes in *Pediococcus* during Kimchi fermentation at 15°C

Treatment	Number of Microorganisms (C.F.U/ml)	
	Fermentation time (hrs.)	
	0	96
Control	1.0×10^1	7.4×10^4
L 5	1.0×10^1	3.5×10^4
L10	1.0×10^1	3.6×10^4
L15	1.0×10^1	3.5×10^4

Table 7. Effect of lactoferrin on changes in *Streptococcus* during Kimchi fermentation at 15°C

Treatment	Number of Microorganisms (C.F.U/ml)	
	Fermentation time (hrs.)	
	0	96
Control	1.0×10^1	1.0×10^5
L 5	1.0×10^1	5.7×10^4
L10	1.0×10^1	3.9×10^4
L15	1.0×10^1	2.8×10^4

6. 효모의 계수

10% Tartartic acid를 첨가하여 pH가 3.5 ± 0.1 로 조정된 Potato dextrose agar에 0.1% peptone수로 희석한 시료를 0.1ml 취하여 접종하고 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 3일간 배양한 후 특징적인 colony수를 효모수로 하였는바, Table 8에 나타난바와 같이 lactoferrin첨가구가 크게 감소하였다.

Table 8. Effect of lactoferrin on changes in Yeast during Kimchi fermentation

at 15°C

Treatment	Number of Microorganisms (C.F.U/ml)	
	Fermentation time (hrs.)	
	0	96
Control	1.0×10^1	1.4×10^2
L 5	1.0×10^1	1.3×10^2
L10	1.0×10^1	9.0×10^1
L15	1.0×10^1	5.0×10^1

7. 대장균의 계수

대장균수는 Table 9에 나타난바와 같이 발효가 진행됨에 따라 무처리구에 비하여 처리구가 크게 감소하였다.

Table 9. Effect of lactoferrin on changes in Coliform bacteria during Kimchi fermentation at 15°C

Treatment	Number of Microorganisms (C.F.U/ml)	
	Fermentation time (hrs.)	
	0	96
Control	1.0	3.0×10^2
L 5	1.0	1.8×10^2
L10	1.0	1.1×10^2
L15	1.0	1.1×10^2

8. 관능검사

훈련된 10명의 패널요원을 구성하여 김치의 조직감, 맛 및 냄새 등을 5점법을 사용하여 검사한 후 Duncan's multiple range test로 유의성을 검정하였는바 lactoferrin 5-10mg/g 첨가구에서 우수함을 나타내었다.

9. 보존시험

시료는 lactoferrin 첨가 및 발효후 첨가구별로 4°C 및 20°C에서 보존하면서 pH, 산도 및 미생물상태 등을 시험 검토하였는 바, 4°C에서는 Table 10 및 Table 11에 나타난바와 같이 산도 및 미생물 상태가 크게 증가하지 않았고, 20°C보존에 있어서는 Table 12 및 Table 13에 나타난바와 같이 산도 및 미생물수 모두 증가하였으나 균종에 따라 처리구편이 감소하는 현상을 나타내었다.

Table 10. Effect of lactoferrin on the quality of Kimchi stored 10days at 4°C

Treatment	pH		Titratable acidity	
	Storage time (days)		Storage time (days)	
	0	10	0	10
Control	4.07	4.00	0.56	0.59
L 5	4.07	4.10	0.57	0.62
L10	4.12	4.10	0.57	0.60
L15	4.12	4.10	0.58	0.60

Table 11. Effect of lactoferrin on total viable cell count of Kimchi stored 10days at 4°C

Treatment	Total of viable cell count (C.F.U/ml)	
	Storage time (days)	
	0	10
Control	2.0×10^6	3.8×10^6
L 5	1.9×10^6	2.9×10^6
L10	7.9×10^5	2.6×10^6
L15	4.2×10^5	1.1×10^6

Table 12. Effect of lactoferrin on the quality of Kimchi stored 10days at 20°C

Treatment	pH		Titratable acidity	
	Storage time (days)		Storage time (days)	
	0	10	0	10
Control	4.00	3.45	0.56	1.80
L 5	4.20	3.55	0.57	1.79
L10	4.20	3.50	0.57	1.70
L15	4.20	3.80	0.58	0.97

Table 13. Effect of lactoferrin on total viable cell count of Kimchi stored 10days at 20°C

Treatment	Number of Microorganisms (C.F.U/ml)	
	Storage time (days)	
	0	10
Control	2.0×10^6	2.1×10^7
L 5	1.9×10^6	1.8×10^7
L10	7.9×10^5	1.7×10^7
L15	4.2×10^5	6.0×10^6

제4절. 적요

김치는 가정에서 담궈 이용하는 것이 당연시 되었으나 최근 경제 성장과 함께 외식경향이 높아지고 김치 수출을 위한 대량제조 방식이 개발되면서 포장김치의 수요가 증가되고 있다. 그러나 김치는 관여하는 미생물과 효소의 작용이 다양하고 이에 따른 성분변화 및 상온에서의 유통에 따른 과숙현상 및 과산화는 김치의 산업화에 문제점으로 제기되고 있다. 김치의 과숙현상은 유기산 농도의 증가 및 조직의 연무현상의 발생으로서 식용화 하기에 어려운 상태에 이르게 된다.

본 연구에서는 김치제조 및 보존성에의 lactoferrin의 활용성 검토를 위하여 김치제조 관련 *Lactobacillus*속, *Leuconostoc*속, *Streptococcus*속 등의 미생물에 대한 항균성을 시험하고, 공시 김치는 김 및 박(1995)이 실시한 방법에 따라 배추를 씻어 2~4cm로 절단하여 15%의 식염수로 2시간 절인후 물로 2~3회 행군후 10분간 탈수하고 100g씩 칭량하여 파 2.0g, 생강 1.0g, 고춧가루 2.0g, 마늘 2.0g을 섞어 유리병에 담고 15°C의 Incubator에서 숙성시키되 lactoferrin을 재료에 대하여 5mg~15mg/g를 발효 개시전 및 숙성완료후에 첨가하고 숙성간격을 두고 숙성김치의 pH, 산도의 측정, 김치발효 관련 미생물(*Lactobacillus*속, *Leuconostoc*속, *Pediococcus*속, *Streptococcus*속) 및 대장균과 효모수의 측정, 관능검사 및 보존성시험 등을 실시하여 우수한 김치 제조에의 lactoferrin의 적정량 및 작용정도를 확인하였다.

1. 김치 발효시에 발현하는 미생물에 대한 항균성을 검토한 결과 lactoferrin의 함량 증가 및 미생물의 종류에 따라 항균성의 차이를 나타내었다.
2. 숙성 김치의 pH 및 산도를 측정한 결과 무처리구에 비하여 처리구가 낮은 수치를 나타내었다.
3. 총균수 측정결과 처리구가 무처리구에 비하여 낮은 균수를 나타내었

다.

4. *Lactobacillus* 및 *Leuconostoc* 속의 균수 측정에 있어서는 양속 모두 무처리구에 비하여 처리구가 lactoferrin 첨가량 증가에 따라 감소하는 현상을 나타내었다.
5. *Pediococcus*속 및 *Streptococcus* 속의 계수에 있어서는 양균류 다같이 lactoferrin 첨가구가 무처리구에 비하여 감소하여 항균력이 나타남을 알 수 있었다.
6. 효모 및 대장균의 계수에 있어서는 lactoferrin 첨가구가 크게 감소하였다.
7. 관능검사결과 5-10mg/g lactoferrin 첨가구가 무처리구에 비하여 우수함을 알 수 있었다.
8. 4℃ 및 20℃에서 lactoferrin을 첨가한 김치를 보존한 결과 4℃에서는 산도 및 미생물 상태가 크게 증가하지 않았으나 20℃ 보존에 있어서는 산도 및 미생물수가 증가하였고 균종에 따라 처리구편이 감소하는 현상을 나타내었다.

lactoferrin을 활용한 김치 제조에서의 유해미생물의 배제 및 천연항균제를 이용한 공해물질의 감소화와 김치 특유의 맛을 유지할 수 있는 기초적인 연구를 실시한 것은 우리나라 식품산업 발전에 기여할 수 있을 것이며 lactoferrin의 이용성 증진면에서 큰 성과를 얻은 것으로 생각 된다. 따라서 실제적인 활용방안을 검토하고 학회지에의 게재도 추진할 것이다.

참고문헌

1. Paulsson, M.A.. 1993. Thermal Behavior of bovine lactoferrin in water and its relation to bacterial interaction and antibacterial activity. *J. dairy Science*. 76:3711-3720
2. Tomita, M. M. Takase, W. Bellamy and S. Shimamura. 1994. The active peptide of lactoferrin. *Acta Paediatrica Japonica*. 36:585-591
3. Yamauchi, K., M. Takase and K. Kawase. 1992. Antibacterial Activity of bovine lactoferrin and hydrolysate of bovine lactoferrin. *Japanese J. of Dairy and Food Science*. 41:A196-200
4. Yamauchi, K., M. Tomita, T. J. Giehl, and R. T. Ellison III. 1993. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infection and Immunity*. p.719-728
5. 島崎敬-. 1989. ラクトフェリンの分離と利用. *日本酪農・食品科學會誌*. 38:A277-283
6. 강근옥, 구경형, 이형재, 김우정. 1991. 효소 및 염의 첨가와 순간 열처리가 김치 발효에 미치는 영향. *한국식품과학회지*. 23:183-187
7. 김선재, 박근형. 1995. 부추추출물의 김치 발효지연 및 관련 미생물 증식 억제. *한국식품과학회지*. 27:813-818
8. 김선재, 박근형. 1996. 부추의 항미생물 활성물질. *한국식품과학회지*. 28:604-608
9. 김우정, 강근옥, 경규향, 신재익. 1991. 김치의 저장성 향상을 위한 염 혼합물의 첨가. *한국식품과학회지*. 23:188-191
10. 남명수, 島崎敬-. 1996. Lactoferrin의 생리적기능과 Lactoferrincin의 항원결정기. *한국유가공기술과학회지*. 14:229-245
11. 문광덕, 변정아, 김석중, 한대석. 1995. 김치의 선도유지를 위한 천연보존제의 탐색. *한국식품과학회지*. 27:257-263
12. 변명우, 차보숙, 권중호, 조한옥, 김우정. 1989. 김치의 숙성관련 주요 젖

산균 살균에 대한 열처리와 방사선 조사의 병용 효과. 한국식품과학회지. 21:185-191

13. 윤석인, 박길동, 김영찬, 임영희, 이철. 1990. 산초추출물을 첨가한 김치류의 보존 연장방법. 특허공보 제 1766호
14. 이병완, 신동화. 1991. 식품 부패미생물의 증식을 억제하는 천연항균성 물질의 검색. 한국식품과학회지. 23:200-204
15. 정대균, 유리나. 1995. 김치발효 미생물에 대한 대나무잎 추출물의 항균력. 한국식품과학회지. 27:1035-1038
16. 진현석, 금종수, 김정희, 최우영. 1995. 한우락토페린의 정제와 이화학적 특성. 한국낙농학회지. 17:146-160
17. 진현석, 금종수, 박종수, 최우영. 1996. 한우 락토페린의 항균성에 관한 연구. 한국낙농학회지. 18:31-40
18. 홍완수, 윤선. 1989. 열처리 및 겨자유의 첨가가 김치발효에 미치는 영향. 한국식품과학회지. 21:331-339