

## 산 · 학 · 연 논문

## 글루텐 분해 효소의 분리, 정제 및 특성 분석

윤 종 영

(주)동성식품 기술연구소

Studies on Identification, Purification and Characteristics of Gluten Degradable Enzyme Isolated from *Lactobacillus paracasei*

Jong-Young Yoon

Dongsung Foods Inc., Yongin, Gyeonggi 10742, Korea

## 서 론

글루텐은 보리나 밀 등 곡류에 들어 있는 불용성 단백질로, 탄력성이 있어 밀가루 반죽을 쫄깃하게 하고, 빵을 가볍고 부드럽게 만드는 역할을 한다. 하지만 글루텐은 그 자체로 소화가 잘 안 되고 글루텐 불내증에 걸리면 피부, 신경계, 면역계, 체력, 관절, 치아를 비롯하여 행동과 기분까지 악영향을 받게 된다. 글루텐 불내증의 실제 병명은 글루텐 과민성 장 질환(celiac disease)이다(1). 글루텐 과민성 장 질환은 글루텐을 소화하는 효소가 없거나 부족하여 생기는 증상으로, 글루텐을 섭취하면 장을 자극하고 장 점막의 돌기가 위축돼 영양소를 흡수할 수 없는 상태가 된다. 이러한 글루텐 불내증은 유전적인 요인이며, 선천적으로 글루텐 소화 효소가 없는 사람에게만 생기는 유전질환으로, 일단 글루텐 불내증으로 진단을 받으면 평생 식사를 통해 조절해야 한다. 불내증이란 영양분이 몸 안에 들어왔을 때 우리 몸이 영양분을 흡수하지 못하고 거부하는 반응이다. 대표적인 글루텐 불내증 증상으로는 설사, 복통, 변비, 복부팽만 등 소화기능 장애가 있다.

글루텐은 밀 전분 생산 시 발생하는 부산물로 물에 불용성인 단백질이다. 주로 글리아딘(gliadin)과 글루테닌(glutenin)으로 구성되어 있으며 글리아딘은 분자량이 30,000~80,000 Da이고, 글루테닌은 수백만 Da 정도다. 글루텐의 글리아딘은 알코올에 용해하나 글루테닌은 불용인데, 제빵에서 중요한 역할을 하는 것은 글루테닌이다(2).

밀가루를 물과 혼합하면 글리아딘과 글루테닌이 결합하여 글루텐을 형성하는데, 글루텐 단백질 중 글리아딘은 점성과 신장성이 있고 글루테닌은 탄력성을 가지고 있다. 이 2개의 단백질은 밀가루 종류에 따라 점유하는 비율이 다르다. 이러한 특성은 밀가루만이 가지고 있는 독특한 성질로서, 예를 들면 빵을 만드는데 사용하는 강력분용

밀에는 11~13%의 단백질이 함유되어 있는데 그중 글리아딘이 65%, 글루테닌이 35%이고, 케이크를 만드는데 사용하는 박력분용 밀에는 7~10%의 단백질이 함유되어 있는데 그중 글리아딘이 75%, 글루테닌이 25%이다. 이것의 역할은 빵의 부피와 관계가 있으며 반죽의 골격형성과 발효 중 생성되는 가스를 보유하는 기능을 갖게 된다.

밀가루에 물을 첨가하여 만든 반죽덩어리를 물로 씻어 내면 젖은 글루텐(wet gluten)이 되고 이것을 처리하여 수분을 제거한 것은 마른 글루텐(dry gluten)이 된다. 흔히 알려져 있듯이 글루텐 저항증인 글루텐 불내증은 소장에서 일어나는 알레르기 질환으로 장내 영양분 흡수를 저해하는 글루텐에 대한 감수성이 일어남으로써 증세가 나타나는 질병이다. 대부분 유아기에 시작하지만 드물게는 성인이 되어서 처음 나타나는 경우도 있다(2). 미국인들 가운데는 최소한 133명 중 1명의 비율로 글루텐 불내증을 겪고 있는 것으로 알려져 있으나 이보다 세 배 이상의 인구가 글루텐에 대한 예민 증상을 가진 것으로 추정하고 있으며 최근 유럽인(특히 북유럽), 라틴아메리카계인, 흑인 그리고 아시아인 또한 글루텐 불내증 인구가 증가하는 추세다(3,4). 글루텐 불내증의 일반적인 특징으로는 설사, 체중감소, 영양실조, 위 팽만감, 복부통증 등의 증상이 있고 대부분은 유전되며, 글루텐이 함유된 제품을 섭취하게 되면 이런 증상이 나타나기 시작하는데 글루텐 불내증의 해결을 위한 유일한 방법은 글루텐을 섭취하지 않는 것으로 환자들은 gluten-free 식이를 하고 있다.

글루텐 소화효소의 경우 대부분 선천적으로 결정되며, 유전적으로 글루텐 소화효소가 없는 경우 글루텐 불내증 현상을 겪게 된다. 또한, 글루텐의 구조상 물을 흡수하는 성질이 뛰어나기 때문에 위에 들어가서 위장 안에서 소화에 도움이 되는 진액들이 제 기능을 다 하지 못하도록 만들며, 밀이 주식인 서양에서는 글루텐 불내증 환자들이 전체 인구의 0.5~1%를 차지하는 것으로 알려져 있다.

글루텐 불내증 환자들이 섭취하지 말아야 할 식품으로는 미국 등지에서 주식으로 섭취하는 빵을 만드는 밀, 호

밀, 보리 등이 있으며, 예전에는 귀리도 섭취제한 음식에 들어갔으나 과학계는 최근 귀리가 글루텐 불내증 환자들이 섭취하는 데 문제가 없다고 발표한 바 있다. 현재 미국, 유럽에서는 이러한 글루텐 불내증 환자들의 증가로 글루텐이 없는 식품에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 특히 쌀가루를 비롯하여 메밀, 수수 등을 이용하여 다양한 제품을 연구 개발하고 있고(5) 제품을 상용화하여 실제 생산판매가 되고 있다.

글루텐 불내증을 나타내는 만성 소화장애 환자들이 적지 않은 관계로 글루텐 함유를 배제한 빵과 과자류 등이 일종의 기능성 식품으로 존재감이 확대되고 있으며, 이는 밀가루가 들어간 식품만 드시면 속이 불편하다던 우리네 어르신들을 떠올리게 하는 대목이다.

2012년 8월, Packaged Facts가 실시한 소비자 조사에 따르면 성인 소비자의 18%는 글루텐 프리 식품을 구입, 소비하고 있고, 2010년 10월 조사 결과인 15%보다 증가했으며, 글루텐 프리 식품은 건강에 좋다는 소비자의 인식이 구입 동기가 되고 있다(6). 최근 글루텐 불내증과 식품 알레르기 질환에 대한 인식이 높아지고 있어 글루텐 프리에 대한 소비자들의 관심도도 지속적으로 이어지고 있으며, 글루텐 프리 식품은 갈수록 발 빠른 성장세를 거듭하고 있다. 영국 런던에 소재한 국제적 시장조사기관 유로모니터 인터내셔널社は 2012년 미국의 글루텐 프리 식품 매출 실적이 13억 1,000만 달러에 달해 지난 2005년과 비교했을 때 2배 이상 확대된 것으로 발표했으며, 또한 글루텐 프리 식품의 글로벌 마켓이 올해 총 26억 7,000만 달러 볼륨을 형성할 것으로 예상한다(7). 유로모니터 측은 아울러 오는 2017년에 이르면 미국의 글루텐 프리 식품 매출이 16억 8,000만 달러에 이르고, 세계시장은 33억 8,000만 달러 규모에 도달할 것이라며 앞으로도 거침없는 성장세를 낙관하고 있는 상황이다(8).

이에 밀가루를 주원료로 하는 가공식품의 제조에 있어 글루텐 형성을 억제할 수 있는 연구를 하고자 하였으며, 방법적으로는 첫걸로부터 글루텐 분해능을 가지는 천연 유산균을 선발하고, 선발된 천연 유산균으로부터 글루텐 분해 효소를 순수 분리 정제하여, 가공식품에 적용할 때 사용상의 편의성을 높일 수 있도록 하고자 하였다.

## 재료 및 방법

*Lactobacillus paracasei* 유래 글루텐 분해 효소의 분리 정제를 위한 시험 과정은 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 진행하였다.

### 유산균의 분리

전라북도 부안군에서 구입한 첫갈류 12종과 충청남도 강경에서 구입한 첫갈류 20종을 사용하였다. 국내 발효 식품 중 김치 등이 아닌 첫갈류로부터 유산균을 분리한 이유는 본 연구의 목적이 글루텐 분해용 유산균을 확보하

Production of proteinase by *L. paracasei* (incubated for 1 day at 37°C)

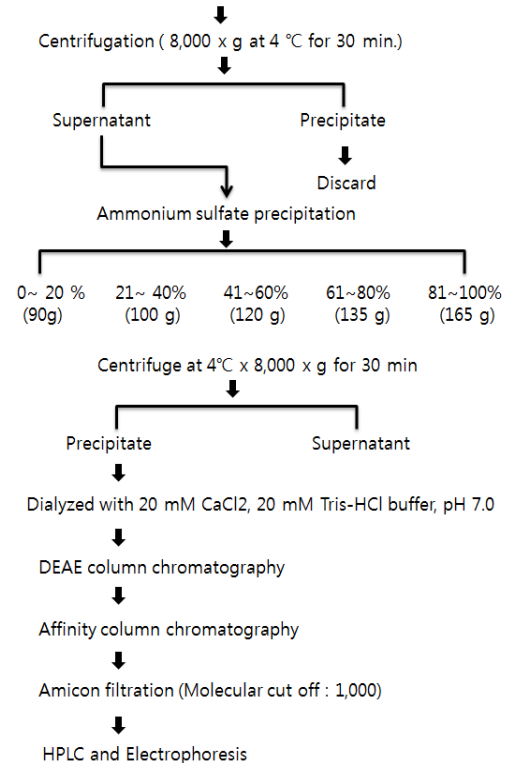


Fig. 1. Schematic diagram for the purification of gluten degradation enzyme of *Lactobacillus paracasei*.

는 것으로써 식물성 발효식품보다는 동물성 발효식품에서 단백질 분해 효소의 확보가 용이하기 때문이었다.

유산균 배양을 위해 사용한 배지는 MRS(1% skim milk) 배지(Difco, St. Louis, MO, USA), TSA(1% skim milk) 배지(Difco), BCP(Bromocresol purple, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), Nutrient agar(Difco), GBM 배지(gluten based medium, Sigma-Aldrich Co.), 글루텐 배지(glucose 1%, fructose 0.5%, maltose 0.5%, yeast extract 0.3%, dipotassium phosphate 0.2%, tween 80 0.1%, magnesium sulfate 0.01%, manganese sulfate 0.005%, L-cysteine HCl 0.05%, gluten 1%, pH 6), MRS 0.3% oxgall 배지(Difco) 등을 사용하였다.

첫갈로부터 유산균을 분리하기 위해 MRS(1% skim milk) 배지 100 mL에 첫갈 10 g을 넣고 overnight 하여 배양하였다. 0.1% peptone 희석액에  $10^{-5}$ 까지 십진 희석하여 원액, 희석액을 각각 MRS pH 5.4 배지에 도말하였다. 48시간 배양한 후 육안으로 관찰하여 서로 다른 콜로니를 선별하였다. 선별한 콜로니를 MRS 배지에 streaking 하여 단일 균주를 얻은 후 다음 실험에 사용하였다.

첫갈로부터 분리한 유산균은 TSA(1% skim milk) 배지에 streaking 하여 콜로니 주변에 clear zone 생성 유무를 확인하였다. 또한, paper disc assay를 통해 clear zone 생성 유무를 확인하는 실험을 하였다. 이에 본 연구에서는 단백질 분해 효소를 분비하는 유산균을 우선적으

로 선별하였다. 선별한 콜로니가 유산균임을 확인하기 위해 BCP 0.004%가 포함된 MRS 한천배지에 각각의 유산균을 streaking 하여 24시간 배양한 후 배지 색의 변화로 유산균임을 확인하였다. 또한, 분리한 유산균은 각각 단일 콜로니로 분리하여 MRS 고체 배지에 배양한 후, 냉장 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 유산균의 글루텐 분해능 측정

TSA skim milk 배지에서 clear zone 생성을 보여준 유산균을 선별하여 MRS 배지에서 24시간 배양한 후, 글루텐 배지(glucose 1%, fructose 0.5%, maltose 0.5%, yeast extract 0.3%, dipotassium phosphate 0.2%, tween 80 0.1%, magnesium sulfate 0.01%, manganese sulfate 0.005%, L-cystein HCl 0.05%, gluten 1%, pH 6)에 배양액 1% 접종하여 72시간 배양하였다.

배양 후 각각의 시료에서 불투명한 글루텐 배지로부터 글루텐 변화에 따른 변화를 확인하였다. 글루텐 배지에서 시험균 배양 후, 글루텐 양을 측정하는 assay 분석(gluten assay kit, Neogen, Lansing, MI, USA)을 실시하였다. 시험균은 시간별로 샘플링 하였으며, 샘플링 한 배양액은 dilution solution과 섞어주고 gluten microwell plate에 100  $\mu$ L 분주하였다. Microwell은 plate shaker에서 60분 배양한 후, microwell의 상층액은 버리고 wash solution으로 세 번 세척하였다. 그리고 anti-gliadin peroxidase conjugate(monoclonal antibody)를 100  $\mu$ L 분주하고 30분 동안 plate shaker에서 배양하였다. Wash solution을 이용해 세 번 세척한 후 TMB substrate 100  $\mu$ L를 분주하고 평편한 바닥에서 strip을 충분히 섞어주었다. 상온에서 30분 배양한 후 stop solution 50  $\mu$ L를 분주하고 충분히 섞은 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

단백질 분해능이 확인된 선별 균주의 글루텐 분해능을 확인하기 위해 SDS-PAGE를 실시하였다. SDS-PAGE는 질량 차이를 이용한 단백질 분리 방법이며, 결과에 나타난 밴드의 위치로 단백질 분자량을 확인할 수 있다. 글루텐이 함유된 GBM(gluten based medium) 배지에서 선별 균주들을 배양하였다. GBM의 조성은 gluten from wheat flour(9%), glucose(2%), dipotassium phosphate(1%), tween-80(0.1%, v/v)이며, 100 mL씩 제조하여 전배양액 1%를 접종한 후 37°C에서 24시간, 140 rpm으로 배양하였다. 0시간, 12시간, 24시간 배양액을 샘플링 하였고, control은 GBM 배지를 사용하였다. 원심분리(6000 rpm, 20 min, 4°C)하여 얻은 상층액을 sample loading buffer로 2배 희석 후 5분간 열처리하여 SDS-PAGE Gel의 sample well에 각각 주입하였다. Sample이 stacking gel을 내려갈 때는 전압을 60 V로 유지했다가 separating gel을 내려올 때는 110 V로 전압을 올려주었다.

### 글루텐 분해 효소의 분리, 정제

글루텐 분해 효소의 분리, 정제를 위해 MRS 배지 1.5 L를 배양하였다. *L. paracasei* 배양액을 4°C, 5,000 rpm으로 30분간 원심분리한 후, 상층액 1 L만을 취하여 여기에 ammonium sulfate를 이용하여 4°C 조건에서 0~20%, 20~40%, 40~60%, 60~80% 및 80~100%로 포화되도록 첨가하고, 4°C에서 12시간 동안 방치하면서 각 단계별 농도로 단백질을 침전시켰다(9).

그 결과 단백질 분해효소 활성은 ammonium sulfate 40~60% 포화 구간에서만 측정되었으므로 단백질 분해효소정제를 위해 위 구간을 선택하였다(Fig. 2).

Ammonium sulfate(40~60%)에서 회수된 단백질들은 ion exchange chromatography의 초기 완충액 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl(pH 7.0) buffer로 투석하였다. 각각의 투석물은 효소 활성 측정 방법에 따라 활성을 측정하였고 활성이 가장 높은 구간을 ammonium sulfate 분획 농도로 선택하였다. 생성된 침전물을 증류수로 용해시켜 선택된 기질과 반응하여 가장 활성이 높은 농도의 분획을 모아 이를 조효소로 하고 -20°C에 보관하면서 제반 실험의 시료로 사용하였다.

글루텐 분해 효소의 부분 정제: Ammonium sulfate의 침전 농도가 40~60%인 조효소로부터 글루텐 분해효소를 순수분리하기 위해 *L. paracasei*를 MRS 배지에서 1.5 L를 배양하여, ammonium sulfate 40~60% 조건 하에서 조효소를 확보하였다. 확보한 조효소를 DEAE column chromatography를 실시하여 정제실험을 수행하였다. 이때 유속은 0.4 mL/min, 분획은 5 mL/tube로 실시하였으며, 비결합 단백질은 column 전체 부피의 약 2배 정도의 완충용액을 통과시켜 추출하고 결합단백질의 유출은 0에서 1 M NaCl까지 농도구배를 주어 흡착된 단백질을 유출시켰다. 이때 농도 구배는 0.1 M, 0.15 M, 0.25 M, 0.5 M, 0.75 M, 1 M로 실시하였다.

유출된 단백질 분획 100  $\mu$ L, 기질 100  $\mu$ L, 완충용액 200  $\mu$ L를 각각 첨가하여 37°C에서 16시간 반응시킨 후

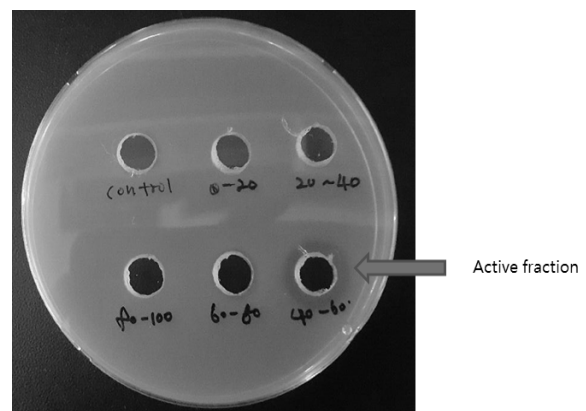


Fig. 2. Active fraction from ammonium sulfate precipitant.

분광측광기로 선택한 기질에 따른 과장의 흡광도를 측정하여 활성도가 높은 분획을 수집하였다. 수집된 효소액을 증류수에 2시간 간격으로 3번 투석한 후 amicon membrane(MW 1,000)을 사용하여 amicon concentrator(Amicon)로 농축하였다. 농축된 시료는 20 mM Tri-HCl 완충용액으로 용해시켜 다음 실험의 시료로 사용하였다.

Fig. 3에서 나타난 바와 같이 column 내 NaCl 함량이 높아질수록 용출되는 효소단백질의 양은 점차 증가함을 알 수 있었다. 효소 활성 부분은 49~55 fraction에서 용출되었으며 효소 활성은 단백질 함량이 가장 높은 fraction number 52에서 최대 활성을 나타내었다. 49~55 fraction에서 수집한 효소액을 증류수에 2시간 간격으로 3번 투석한 후 amicon membrane(MW 1,000)을 사용하여 amicon concentrator(Amicon)로 농축하였다. 농축된 시료는 20 mM Tri-HCl 완충용액으로 용해시켜 다음 실험의 시료로 사용하였다.

**글루텐 분해 효소의 2차 정제:** DEAE column chromatography에 의해 부분 정제한 시료를 대상으로 affinity chromatography를 실시하였다. 이때 affinity ligand로 gelatin이 부착된 bead를 사용하였다. 실험조건은 유속 0.1 mL/min, 분획은 5 mL/tube로 실시하였으며, 비흡착 단백질은 충분히 완충용액을 통과시켜 추출하고 ligand

에 흡착된 단백질은 linear NaCl 농도구배를 주어 유출시켰다. 유출된 단백질 분획을 기질로 반응시켜 활성이 높은 분획을 선택하여 DEAE column chromatography 실험과 동일하게 투석한 후 농축하여 제반실험에 시료로 사용하였다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 9~16 fraction에서 글루텐 분해 활성을 갖는 peak를 확인할 수 있었다. Fig. 5에서는 다른 종류의 단백질 peak가 있어 얻어진 9~16 fraction을 모아 2차 affinity column chromatography 실험을 수행하여 단일 peak의 active fraction을 수집하였다.

단백질 정량은 Lowry 등의 방법에 따라 분광광도계(UV-1700, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다(10). 표준 단백질 bovine serum albumin(BSA, Sigma-Aldrich Co.)을 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 단백질 함량을 계산하였다(Fig. 6).

#### 글루텐 분해효소의 활성 측정

효소 활성 측정은 기질인 casein의 가수분해 정도를 tyrosine 정량법을 이용하여 측정하였다(11). 시료액 100  $\mu$ L를 40°C의 water bath에서 5분간 pre-incubation 시킨 다음 1% 기질용액 900  $\mu$ L를 첨가하여 동일한 온도에서 60분간 가수분해시키고 10% TCA 용액 1 mL를 첨가

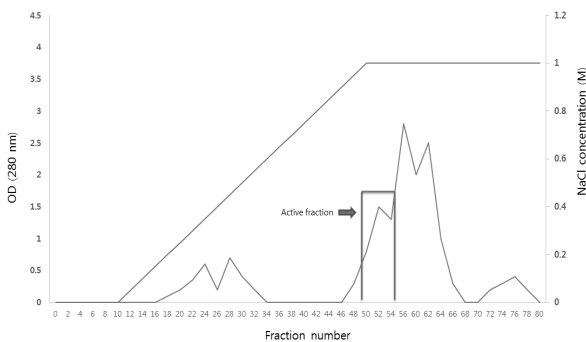


Fig. 3. DEAE-sepharose column chromatogram after salt-ing-out by saturated ammonium sulfate solution in the range of 40~60%.

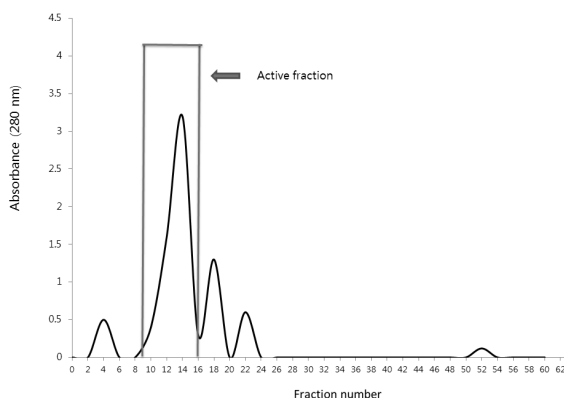


Fig. 4. 1st filtration chromatogram (1.6×60 cm) of active fraction from affinity column chromatography.

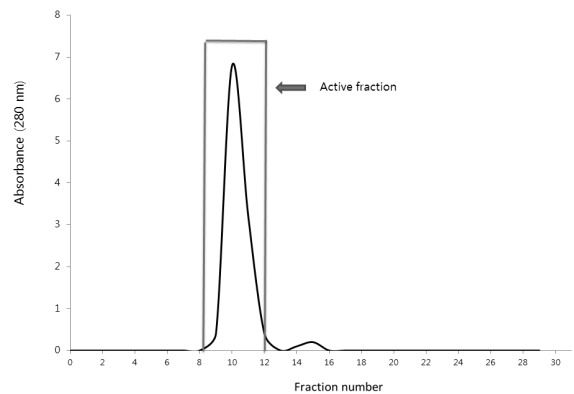


Fig. 5. 2nd filtration chromatogram (1.6×60 cm) of active fraction from Affinity column chromatography.

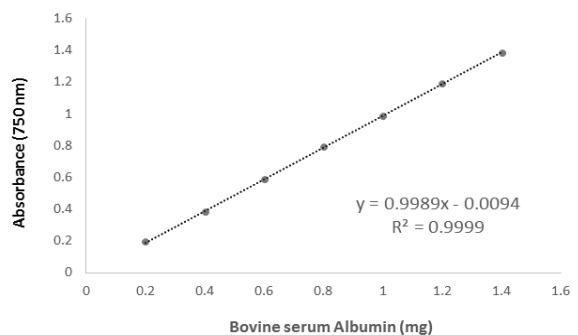


Fig. 6. Standard curve for determination of protein concentration.

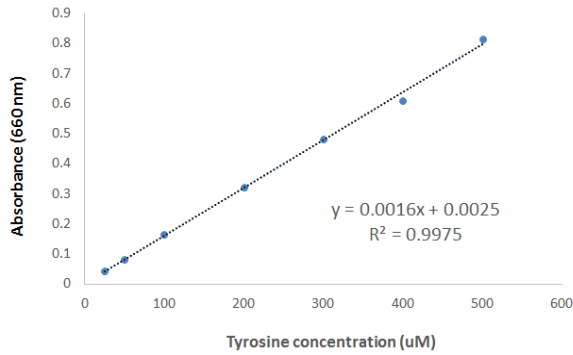


Fig. 7. Standard curve for determination of tyrosine concentration.

하여 효소반응을 중지시켰다. 가수분해되지 않은 단백질은 상온에서 10분간 방치한 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 제거했다. 상등액 200  $\mu$ L와 0.55 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  800  $\mu$ L를 첨가한 후 혼합하여 15분 동안 방치하였다. 여기에 1.0 N Folin Ciocalteu's phenol 용액 200  $\mu$ L를 첨가하여 혼합하고 30분 동안 방치한 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성 단위는 시료액 1 mL가 1 분당 생성하는 tyrosine 1  $\mu$ M을 1 unit으로 정의하였으며, tyrosine을 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 units을 계산하였다(Fig. 7).

*L. paracasei* 유산균 유래 글루텐 분해 효소의 specific activity는 49.4 unit/mg, 수율은 4.9%, 정제도는 17.4 배로 나타났다(Table 1).

#### 글루텐 분해효소의 분자량 측정

정제된 효소의 분자량 측정은 최의 방법에 따라 다음과 같은 방법으로 진행하였다(12). 분자량 계산은 DEAE column chromatography(2.5 $\times$ 100 cm)를 이용하여 void volume에 대한 글루텐 분해 효소의 용출 부피의 비로 측정하였다. 분자량 측정을 위한 표준곡선은 표준 단백질 cytochrome C(MW 12,400), carbonic anhydrase(MW 29,000), albumin(MW 66,000), alcohol dehydrogenase(MW 150,000) 및 apoferritin(MW 443,000)으로 작성하였다.

이때 표준곡선은 지수식으로 작성하였고, 표준곡선은

$y = 1E+07e^{-2.932x}$ 이었으며, 신뢰도는  $R^2 = 0.9968$ 로 나타났다. 이렇게 작성한 표준곡선의 지수식에 정제한 글루텐 분해 효소의 용출부피를 도입하여 분자량을 계산하였으며, *L. paracasei*가 생산하는 글루텐 분해효소의 분자량 측정을 위한 계산식은 다음과 같다.

$$\begin{aligned} 1. & V_r = V_m + KV_s \\ 2. & K = \frac{V_r - V_m}{V_s} = \frac{V_r - V_0}{V_s} \\ 3. & K_{av} = \frac{V_r - V_0}{V_t - V_0} \end{aligned}$$

$V_t$ =total bed volume, column 내 total volume

$V_0$ =void volume, DEAE column chromatography 내 gel 입자 사이의 공간 volume

$V_i$ =inner volume, 수분을 포함하는 gel 입자들의 volume

$V_e$ =elution volume, 글루텐 분해효소가 용출될 때까지의 volume

$V_t = V_0 + V_i$

$K$ =분배계수, 단백질이 gel 입자내부를 통해 이동한 부피량/정지상의 부피량

$K_{av}$ =평균 분배계수

$V_m$ =이동상의 부피= $V_0$

$V_s$ =정지상의 부피= $V_i$

$V_r$ =글루텐 분해효소가 머무른 부피= $V_e$

따라서 상기와 같은 식을 통해 *L. paracasei*가 생산하는 글루텐 분해효소의 분자량을 측정한 결과, Fig. 8에 나타난 바와 같이 글루텐 분해효소의 용출 부피의 비( $V_e/V_0$ )는 1.8, 분자량은 약 67,000 Da으로 나타났다.

#### 글루텐 분해효소의 최적 반응 조건 측정

**최적 반응 온도:** 정제된 글루텐 분해 효소의 최적 반응 온도를 확인하기 위하여 pH 7의 조건 하에서 1% casein 기질용액 500  $\mu$ L와 정제 효소액 200  $\mu$ L를 혼합하여 10~80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60분간 반응시킨 후 25% TCA(Tri-chloro-acetic acid) 용액 300  $\mu$ L를 첨가하여 효소 반응을 중지시켰다. 상온에서 30분간 방치한 후 생성된 침전물을 6,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후, 상등액의 효소

Table 1. Purification step of gluten degradation enzyme produced from *Lactobacillus paracasei*

Purification step	Total activity (unit)	Total protein (mg)	Specific activity <sup>1)</sup> (unit/mg)	Yield <sup>2)</sup> (%)	Purification fold
Supernatant	38,456	13,564	2.9	100	1
Ammonium sulfate	16,877	1,856	9.1	43.9	3.2
DEAE-sepharose	6,587	448	14.7	17.1	5.2
1st Affinity chromatography	2,566	66	38.8	6.7	13.7
2nd Affinity chromatography	1,878	38	49.4	4.9	17.4

<sup>1)</sup>Specific activity=total activity / total protein.

<sup>2)</sup>Yield=(total activity)/(total activity of supernatant) $\times$ 100.

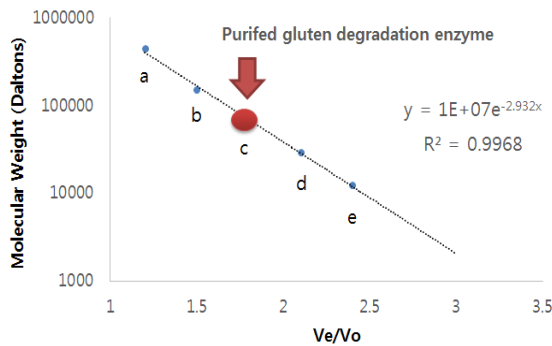


Fig. 8. Determination of the molecular weight of the purified gluten degradation enzyme. a: Apoferritin (443,000), b: Alcohol dehydrogenase (150,000), c: Albumin (66,000), d: Carbonic anhydrase (29,000), e: Cytochrome C (12,400).

활성을 측정하였다.

Fig. 9에 나타난 바와 같이 글루텐 분해효소의 활성도는 30~40°C에서 상대적으로 높은 활성을 나타내었고, 37°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 이는 글루텐 분해 효소를 생산하는 *L. paracasei* 유산균의 배양 온도와 일치함을 알 수 있었다. 또한, 반응 온도가 50°C 이상에서는 활성이 급격히 떨어지는 현상이 나타났으며, 이는 *L. paracasei* 유산균 유래 글루텐 분해 효소는 열에 대해 안정하지 않음을 확인할 수 있었다.

**최적 반응 pH:** 정제된 효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위해 sodium phosphate buffer(pH 5~7), Tris-HCl buffer(pH 7~9), sodium carbonate-HCl(pH 9~11)를 20 mM 농도가 되도록 제조하여 각각의 시험구에 완충액 500  $\mu$ L, 정제 효소액 200  $\mu$ L, 1% casein 기질 용액 500  $\mu$ L를 첨가하여 30°C에서 60분간 반응시킨 후 25% TCA 용액 300  $\mu$ L를 첨가하여 효소반응을 중지시켰다. 상온에서 30분간 방치한 후 생성된 침전물을 8,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 제거한 후, 상등액의 효소 활성을 측정하였다.

Fig. 10에 나타난 바와 같이 글루텐 분해효소의 활성도

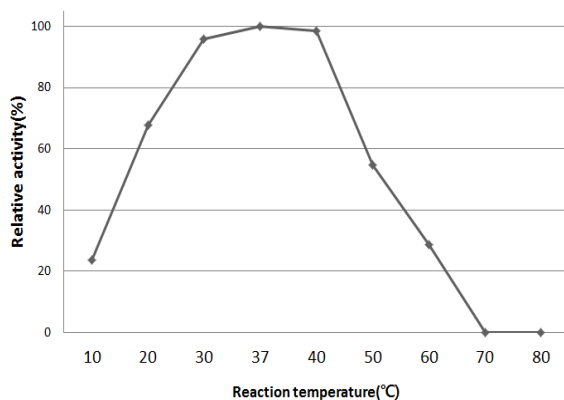


Fig. 9. Effect of temperature on the activity of the purified gluten degradation enzyme. The used buffer in the reaction mixtures was 50 mM Tris-HCl (pH 7.0).

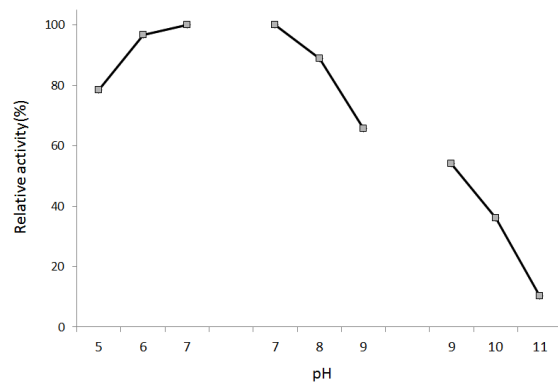


Fig. 10. Effect of pH on the activity of the purified gluten degradation enzyme. The used buffers in the reaction mixtures were 20 mM sodium phosphate buffer (pH 5~7), Tris-HCl buffer (pH 7~9), sodium carbonate-HCl (pH 9~11).

는 pH 5부터 증가하기 시작하여 20 mM sodium phosphate buffer, 20 mM Tris-HCl buffer pH 7에서 최대 활성을 나타냈다.

## 결론

*L. paracasei* 유산균 유래 글루텐 분해 효소의 specific activity는 49.4 unit/mg, 수율은 4.9%, 정제도는 17.4 배로 나타났고(Table 1), 글루텐 분해효소의 활성도는 30~40°C에서 상대적으로 높은 활성을 나타내었으며, 37°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다. pH에 따른 활성도는 pH 5부터 증가하기 시작하여 20 mM sodium phosphate buffer, 20 mM Tris-HCl buffer pH 7에서 최대 활성을 나타냈다.

*L. paracasei* 유산균 유래 글루텐 분해 효소는 대부분 단백질 분해 효소와 마찬가지로 열에 대해서는 안정하지 않았다. 한 가지 특이한 점은 유산균 유래 효소이기 때문에 중성 pH에서 최대 활성을 나타냈으며, 산성에서는 활성도가 크게 떨어지지 않지만 알칼리 조건에서는 활성도가 급격히 떨어지는 것을 알 수 있었다. *L. paracasei* 유산균 유래 글루텐 분해 효소의 경우 분리 정제 프로세스가 정립되어 있지 않은 상황에서 본 연구를 통해 최초로 시도하였는바, 효소의 순수 분리 정제에 어려움이 있었다. 따라서 효소의 기질특이성(specific activity)은 49.4 unit/mg, 수율은 4.9%, 정제도는 17.4배로 기존에 분리 정제 프로세스가 정립되어 있는 단백질 분해 효소에 비하면 상대적으로 낮은 활성 및 정제도를 나타내었다. 향후 분리 정제 기술이 고도화됨에 따라 효소의 활성도 및 정제도는 높아질 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 고부가가치식품기술개발사업(과제번호: 314049-3)에 의해 이루어진 것이며, 이에

감사드립니다.

### 참고문헌

1. Gujral N, Freeman HJ, Thomson ABR. 2012. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J Gastroenterol* 18: 6036-6059.
2. Wrigley C, Békés F, Bushuk W. 2006. *Gliadin and Glutenin: The Unique Balance of Wheat Quality*. AACC International, Eagan, MN, USA.
3. Cummins AG, Roberts-Thomson IC. 2009. Prevalence of celiac disease in the Asia-Pacific region. *J Gastroenterol Hepatol* 24: 1347-1351.
4. Cataldo F, Montalto G. 2007. Celiac disease in the developing countries: A new and challenging public health problem. *World J Gastroenterol* 13: 2153-2159.
5. MINTEL Oxygen. Gluten-free Foods—US—September 2013. 2013. [http://reports.mintel.com/sinatra/oxygen/list/id=637717&type=RCItem#0\\_1\\_page\\_RCItem=0](http://reports.mintel.com/sinatra/oxygen/list/id=637717&type=RCItem#0_1_page_RCItem=0) (accessed Dec 2016).
6. Packaged Facts. 2012. *Gluten-Free Foods and Beverages in the U.S.* 4th ed. Packaged Facts, New York, NY, USA.
7. Euromonitor International. 2011. Gluten-free remains one of the most dynamic health and wellness categories. <http://blog.euromonitor.com/2011/02/gluten-free-remains-one-of-the-most-dynamic-health-and-wellness-categories.html> (accessed Dec 2016).
8. Statista. 2014. Retail dollar sales of gluten-free products in the United States from 2011 to 2016. <http://www.statista.com/statistics/301621/us-retail-dollar-sales-of-gluten-free-products> (accessed Dec 2016).
9. Scopes RK. 1982. *Protein Purification: Principles and Practice*. Springer-Verlag, New York, NY, USA.
10. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
11. Wrolstad RE. 2000. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA.
12. 최경임. 2008. 해양으로부터 단백질 분해효소 생산 균주의 동정 및 단백질 분해효소의 특성. 경상대학교 석사학위 논문.