

## 효소 분해에 의한 밀가루의 항원성 저감화

박주연 · 안정엽<sup>1</sup> · 홍희옥<sup>2</sup> · 한영숙

성신여자대학교 식품영양학과, <sup>1</sup>(주)생그린 기술연구소, <sup>2</sup>건국대학교 한국건강영양연구소

## Reduction of Allergenicity of Wheat Flour by Enzyme Hydrolysis

Ju-Yeon Park, Jeung-Youb Ahn<sup>1</sup>, Hee-Ok Hong<sup>2</sup>, and Young-Sook Hahn

Department of Food and Nutrition, Sungshin Women's University

<sup>1</sup>SaengGreen R&D Institute

<sup>2</sup>Institute of Health and Nutrition, Konkuk University

Gluten was extracted from domestic wheat flour using UTH buffer (4 M urea in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.6) and validated by SDS-PAGE analysis for production of wheat flour products with reduced gluten content. Anti-gluten polyclonal antibody was made by administering extracted gluten fraction on animal model. Anti-gluten serum titer of extracted gluten fraction was evaluated by ELISA, and that of antibody titer according to administration period. Anti-gluten sera were used for ELISA and immunoblot analysis before and after hydrolysis of gluten fraction at optimal pH and temperature condition for each protease. Gluten fraction separated by SDS-PAGE showed several bands covering 75 to 10 kDa, in which anti-gluten sera were 25, 34, and 45 kDa. Enzyme hydrolysis of gluten fraction revealed protein band sizes to be lower than 15 kDa. Content of protease from bovine pancreas (b.p. protease) for gluten hydrolysis was estimated as 1 mg in 10 mL gluten fraction extracted for 4 hr.

**Key words:** domestic wheat flour, gluten, protease, hydrolysis, polyclonal antibody

### 서 론

근년 우리 나라에서 식품이나 화분, 진드기, 먼지 등 서로 다른 원인으로 인한 알레르기 환자가 급격히 증가하고 있고(1) 전 국민의 1/3이 알레르기 질환을 갖고 있다고 한다. 환경 악화를 주도하는 배기가스, 사회의 복잡화에 의한 스트레스 증대, 구미형 영양과잉 식사 등도 그 원인으로 생각할 수 있다. 이러한 알레르기 질환의 증가 중 영유아 및 성인에게 있어서 식품에 의한 알레르기도 날로 증가하고 있다. 한 조사에 의하면 전 국민의 10% 이상이 식품 알레르기의 발증 경험을 갖고 있다고 한다(2).

식품 알레르기에는 여러 알레르기와 마찬가지로 현재 근본적인 치료법은 없으며 성장하면서 알레르기 증상이 사라지는 시점까지 알레르기를 일으키는 식품을 적극적으로 회피하는 항원 제거요법이 채택되고 있다(3). 그러나 알레르기를 일으키기 쉬운 식품은 계란, 우유, 대두 등 주로 주요 단백질원 공급 식품들이고 가공 식품의 형태로도 폭넓게 유통되는 것들이다. 또

한 근래에는 전 세계적으로 인류의 주식을 담당하고 있는 쌀과 밀가루의 알레르기가 보고되고 있다. 일반적으로 평가되는 주된 식품 알레르겐의 특성은 비수용성 glycoproteins으로서 분자량이 10-60 kDa이며 가열, 산, protease 등에 안정하다(4). 식품 알레르기를 나타내는 연령의 폭은 넓어지는 추세이며 알레르기를 일으키는 식품이 다양하므로 원인 식품의 제거를 치료 방법으로 사용하기에는 매우 어려운 실정이다(5).

특히, 곡류와 소맥분의 섭취, 흡입은 천식, 습진, 피부염, 글루텐-민감성 장질환과 같은 알레르기성 질환의 원인이 되고 있다. 밀가루에 의한 천식은 유럽 지역에서 밀가루를 직접 취급하는 작업자들에게서 발견되어지며 "Baker's asthma"라는 직업병으로 알려져 있다. 이러한 밀가루에 의한 알레르기 발증의 원인으로  $\alpha$ -amylase inhibitor(20-25 kDa)가 동정되어 있으며 gliadin과 glutenin이 주요 성분으로 되어있는 gluten이 IgE 반응성 단백질로 확인된 바 있다(6).

국민 소득의 향상으로 우리나라에서도 서구식 식생활이 보급되어 밀은 쌀에 이어 우리 국민에게 제 2의 기본 식량으로 자리 잡게 되었다. 1990년대 이후 국내산 밀의 생산량이 증가하자 국내산 밀의 제빵성 및 제면성과 제과성에 대한 다양한 연구 등이 보고되고 있다. 이러한 끊임없는 품종 개량의 결과 제빵용으로도 적합한 국내산 밀이 재배되고 있으며 그 소비를 촉진시키기 위하여 제품의 다양화가 필요하다.

본 연구에서는 선행된 국내산 밀 품종의 제빵 적성에 대한 연구(7)에서 제빵성이 우수한 밀을 선정하여 밀의 대표적인 항

\*Corresponding author : Young-sook Hahn, Department of Food and Nutrition, Sungshin Women's University, Dongseon-dong 3-ga, Sungbuk-gu, Seoul 136-742, Korea  
Tel: 82-2-920-7210  
Fax: 82-2-921-3197  
E-mail: yshan@sungshin.ac.kr

원으로 보고되고 있는 gluten fraction을 분리하였다. Mouse를 이용하여 분리된 gluten fraction을 경구 투여하여 항혈청을 제작하였으며 gluten fraction은 4가지 효소로 처리하여 제작된 항체를 이용하여 gluten fraction의 항원성 저감화에 대한 생화학적 검토를 실시하였다.

### 재료 및 방법

#### 재료

본 실험에 사용된 밀가루는 농촌진흥청 작물시험장에서 분양 받은 6품종의 국내산 밀(답동, 은과, 고분, 우리, 올그루, 금강밀) 중 선행연구(7)에서 제빵적성 등이 우수하다고 판명된 금강밀을 사용하였으며 Buhler Test Mill(Buhler Bros., Inc., Uzwil, Switzerland)로 AACCC(8)법에 의하여 60% 제분율로 제분하여 -70°C에 저장한 후 시료로 사용하였다.

Gluten, 단백질 분해효소 및 기타 시약은 Sigma 제품을 사용하였으며 분자량 marker, membrane 및 전기영동 관련 시약은 Bio-rad 제품을 사용하였다.

또한 본 실험에 사용한 동물은 SLC(Japan)사의 식품알레르기의 평가법과 그 응용연구(9,10)에 적합하다고 등재되어 있는 ddY mouse(국립예방위생연구소, Japan, 1963) 4주령을 사용하였다.

#### 밀가루 gluten-fraction의 추출

밀 단백질의 주성분인 gluten 추출은 PBS(pH 7.2, 140 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 70% alcohol, UTH buffer<sup>(11)</sup>(4 M Urea/pH 8.6, 0.1 M Tris-HCl buffer)로 각각의 추출용매 100 mL에 금강밀 5 g을 넣어 실온에서 30분간 stirring한 후 10분 동안 원심분리(1,300×g)하여 상등액을 취하였다. 이와 같이 처리된 각각의 sample은 증류수로 투석한 후 PBS로 투석하여 시료로 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였다.

#### 단백질 정량

추출된 단백질은 Bradford method(12)에 근거한 Bio-Rad의 Protein Assay(13)로 정량하였고, 표준물질로 BSA(bovine serum albumin)를 사용하였다. 단백질 정량은 시료 20 µL에 1:4의 비율로 희석한 dye reagent 1 mL를 넣은 후 잘 혼합하여 실온에서 최소 5분간 방치한 후 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 BSA 표준 곡선을 이용하여 단백질 함량을 정량하였다.

#### Sodium dodesylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE는 15% separating gel과 4% stacking gel을 이용하였다(14). Bradford method로 정량된 시료는 5배 농도의 sample buffer(1M Tris-HCl: pH 6.8, 50% glycerol, 10% SDS, 2-mercaptoethanol, 1% bromophenol blue)와 1:1(v/v)로 섞은 후 끓는 물에서 5분간 증탕 가열한 뒤 lane 당 1 µg의 gluten fraction을 사용하였다.

전기영동은 100 volt에서 2시간 시행하였으며 전기영동 후, gel은 CBB staining solution(1.0 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 450 mL methanol, 450 mL H<sub>2</sub>O, 100 mL glacial acetic acid)로 염색하고 Coomassie destaining solution(100 mL methanol, 100 mL glacial acetic acid, 800 mL H<sub>2</sub>O)로 적절히 탈색

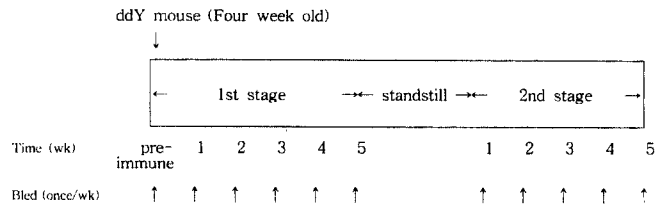


Fig. 1. The schemes of animal experimental schedule.

후 건조 보관하였다.

분자량 marker로는 Precision Protein Standard(Prestained broad range, Bio-rad, CA)를 사용하였다.

#### Gluten fraction에 대한 항혈청 제작

UTH buffer로 추출(11)한 gluten fraction을 PBS로 투석하여 실험에 사용하였다.

4주령된 ddY mouse(SLC, Japan)를 실험동물(9,10)로 사용하여 gluten fraction을 경구 투여하였다. 경구 투여에는 마우스 3마리를 사용하였으며 각 마우스에게 1회 200 µL(1 mg/mL)씩 1일 3회 투여하였다(Fig. 1).

채혈은 매주 1회 5주간 정기적으로 시행하였고, 4주간의 휴식을 두고 다시 동일한 농도의 gluten fraction을 투여하여 매주 1회 5주간 규칙적으로 채혈하였다. 채혈 schedule은 Fig. 1에 나타내었으며 휴식기는 경구투여를 하지 않은 기간을 설명한다. 채혈한 혈액은 혈청을 분리하여 실험에 사용하기 전까지 -80°C에서 보관하였다.

#### Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)

96-well plate(Costar, NY)의 well에 최종 농도가 50 µg/mL이 되도록 PBS로 희석한 시료를 각 100 µL씩 분주하고 4°C에서 16시간 coating하였다. 항원이 coating된 plate를 0.05% Tween20이 포함된 PBS로 3회 세척한 후 1% BSA가 포함된 PBS/Tween20을 사용하여 1:100으로 희석한 primary antibody(mouse anti-gluten serum)를 100 µL씩 가하고 37°C에서 2시간 반응시켰다. 0.05% Tween20이 포함된 PBS로 3회 세척 후 1,000배 희석시킨 secondary anti-IgE antibody(goat anti-mouse IgE; KOMA biotech, Korea), 10,000배 희석시킨 secondary anti-IgG antibody (goat anti-mouse IgG; Calbiochem, CA)를 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 0.05% Tween20이 포함된 PBS로 3회 세척 후 o-phenylenediamine과 citrate-phosphate buffer(pH 5.0, 0.05 M citric acid/monohydrate, 0.1 M sodium phosphate/dibasic/12-hydrate)를 2:5로 혼합한 용액에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 0.003% 농도로 첨가하여 각 well에 100 µL씩 넣고 암소에서 30분 발색시켰다. 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 ELISA reader (Microlog system, Biolog, CA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### Western blot

SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (Bio-rad, CA)에 electrotransfer하고 3% BSA가 포함된 PBS로 실온에서 blocking을 실시하였다(14). Primary antibody(mouse anti-gluten serum)는 0.5% BSA가 포함된 PBS로 1:500 희석하여 실온에서 2시간 반응시키고 PBS 용액으로 3회 세척 후 1:1000으로 희석시킨 secondary antibody(goat anti-mouse IgE, IgG)를 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. PBS 용액으로 3회 세

척 후 develop solution(1 mL chloronaphthol solution, 10 mL methanol, 50 mL PBS, 30  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)을 넣어 30분 후 정지하여 발색 정도를 관찰하였다.

### 효소처리에 의한 gluten fraction의 분해

밀가루 gluten-fraction 추출 방법에서 설명한 것과 같이 금강 밀 5g을 UTH buffer 100 mL에 넣어 30분간 stirring한 후 1,300×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액을 일정량 취하여 각 효소의 적정 조건에서 1 mg/mL 농도의 gluten fraction 10 mL에 1 mg의 효소를 첨가하여 최적 온도에서 0, 4, 8, 24시간 동안 반응시킨 후 PBS에서 투석하였다.

이 때 사용된 효소는 bromelain(EC 3.4.22.4, Sigma, MO), papain(EC 3.4.22.2, Sigma, MO), ficin(EC 3.4.23, Sigma, MO), protease from bovine pancreas(b.p. protease, Sigma, MO)이다.

효소는 각각의 최적 조건에 따라 실험하였으며 그 조건은 다음과 같다. Bromelain; pH 4.5, 45°C, papain; pH 6.2, 30°C, ficin; pH 7.0, 37°C, b.p. protease; pH 7.5, 37°C(15,16)이다.

## 결과 및 고찰

### 금강밀의 gluten fraction의 추출

밀 자체의 단백질 함량은 보통 8-10%로, 대부분이 gluten fraction에 속하며 이 중 gliadin과 glutenin이 주요 성분이다. 이들은 밀가루를 물과 함께 반죽할 때 가소성 형성에 필요한 중요 단백질이나 이 gluten fraction이 밀 알레르기의 주된 원인 단백질이 포함된 분획으로 보고되고 있다(5). 그 예로, 밀 알레르기는 기도를 경유한 항원 자극으로 발증하여 천식이나 비염을 일으키는데,  $\alpha$ -amylase inhibitor(20-25 kDa)가 주요 알레르겐으로 동정되었으며 경구섭취에서는 밀의 주요 단백질인 gluten도 알레르기 증상을 일으킴이 증명되었다(6). 또한 예로부터 celiac disease라는 매우 심한 위장 증상을 나타내는 질환이 알려져 있다. 이 질환은 밀을 섭취함으로써 발증하고 특히, 소장에서의 염증, 전반적인 흡수불량을 특징으로 하며 밀 gluten 특히 gliadin이 원인 단백질로 보고되었다(5).

알레르겐의 저감화를 위해서는 원인 단백질이 정제되어 구조가 밝혀져야 연관된 연구에 도움을 줄 수 있다. 그러나 밀의 대부분의 단백질은 변성됨이 없이 순수한 상태로 정제하기가 매우 어려우며 단백질의 화학적 구조 또한 매우 복잡하기 때문에 현재까지도 많은 분자구조가 밝혀져 있지 않은 상태이다. Gluten의 경우 분자량은 gliadin이 약 30-40 kDa(18)이고 glutenin은 HPLC 결과 20개의 peak가 나타나 이것을 HMW(high molecular weight), MMW(middle molecular weight), LMW(low molecular weight)로만 구분(19-20)하고 있으며 LMW의 allergenic peptide origin(AAB35353, NCBI)이 보고 되어있다.

위 문헌들에서 언급된 밀가루의 항원으로써 반응하는 단백질은 gluten fraction을 구성하는 분자들으로써 본 연구에서도 항원성 저감화를 위해 먼저 gluten fraction의 추출을 위해 여러 용매를 시도하여 gluten fraction 분리에 적합한 buffer를 선정하였다. 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

Fig. 2에서는 추출 용매로 PBS(lane A), ethanol(lane B), UTH buffer(lane C and D)를 사용하였으며 SDS-PAGE를 통하여 gluten fraction 정제 정도를 비교하여 제시하였다. 각각의 추출 용매에 용출된 단백질은 다른 pattern을 나타내었으며 이 중 UTH buffer에 추출된 gluten fraction은 45 kDa 부근이 강하고 37, 35 kDa, 25 kDa 이하에서도 단백질 band가 확인되었다. 이

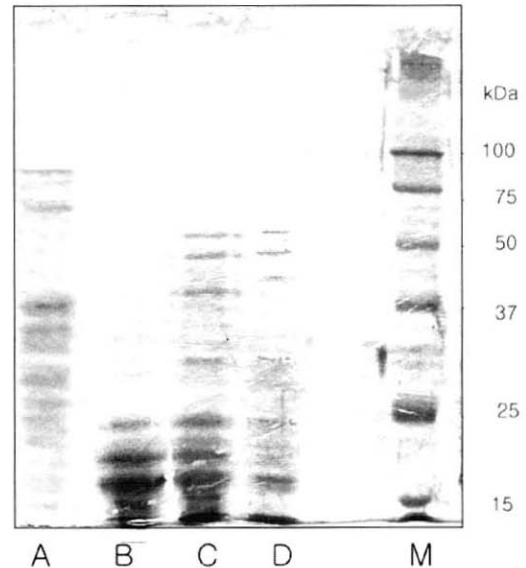


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of extracted gluten-fraction using various solvents.

The extracted molecular patterns were analysed in 15% of separating gel. The solvents were used PBS (lane A), ethanol (lane B) and UTH buffer (lane C and D). Lane D was presented gluten-fraction from Sigma as a standard. The position of marker standard is lane M and molecular masses (in kDa) are indicated to the right of lane M.

는 Petr. Werner 및 Gao(18-20) 등의 연구에 제시된 분자들과 유사하였다. 또한 Sigma에서 구입한 gluten과도 유사한 pattern을 나타내었다. 반면 PBS를 사용하여 추출한 경우(lane A) 25 kDa 이하에서 band가 나타나지 않았으며 ethanol로 추출한 경우(lane B)는 25 kDa 이상의 band가 나타나지 않아 gluten fraction에 포함되는 단백질이 용출 분리되지 않은 조건으로 판단된다. 따라서 본 실험에서는 염기성인 gluten fraction의 단백질의 분리가 UTH buffer에 의해 이루어졌음을 확인하고 이후 모든 실험에 UTH buffer에 의해 직접 조제한 gluten 분획을 사용하였다.

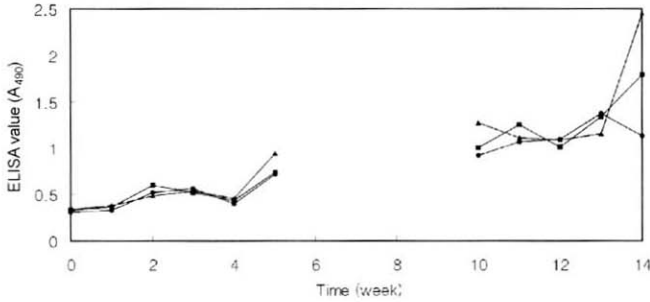
### 경구 투여에 의해 생성된 gluten fraction의 항원형

본 연구에서는 단백질 항원에 대한 항체 생성의 면역반응 유도를 위하여 gluten fraction을 1 mg/mL의 농도로 200  $\mu$ L씩 하루에 3회 경구 투여하여 항 gluten 혈청을 얻었다. 혈청의 anti-gluten IgE 측정을 위하여 ELISA를 실시하였으며 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

그 결과 경구 투여의 경우, 휴식기 전 1st-stage의 5주 동안 gluten에 대한 항체가는 경구 투여 전에 비하여 증가를 나타내었으며, 4주의 휴식기를 둔 후 실시한 2nd-stage에서는 ELISA value가 1st-stage 보다 계속적인 증가를 나타내었다. 이러한 현상은 gluten fraction의 반복적 섭취에 따른 계속적인 항체가의 상승을 유도한 것으로 평가할 수 있다.

Fig. 3에서 사용된 동일한 혈청을 사용하여 anti-gluten IgG의 ELISA value를 측정하였으며 결과는 anti-gluten IgE와 같이 경구 섭취에 따른 ELISA value의 상승을 나타내었다(데이터 생략).

대부분 항원에 대해 체내의 IgG 생성이 이루어지며 항원에 대한 IgE 항체가는 제 4형 지연형 알레르기(식품 알레르기)를 판단하는 진단요인으로 사용되고 있으므로 본 연구 결과는 경구 투여에 의해 항원 감작이 유발되어 항체가 생성되었음을 시



**Fig. 3. The ELISA analysis of polyclonal antibody against extracted gluten fraction.**

Production of antibodies by mice, ddY was oral immunized (●: mouse 1, ■: mouse 2, ▲: mouse 3) with isolated gluten fraction from domestic flour. The mice blood was gathered from ocular vein on once a week. The ELISA titer shown anti-gluten IgE value in sera. The serum from oral immunized mice was used as a primary antibody and secondary antibody was used anti-mouse IgE.

사하는 것으로 이 항체를 다음 실험에 사용하였다.

**경구 투여에 의해 생성된 항체의 항원 인식**

Mouse를 이용한 gluten fraction의 경구 투여에 의해 생성된 항체가 gluten fraction을 인식하는 정도를 관찰하기 위하여 western blot을 실시하였다(Fig. 4).

Fig. 4에 나타난 바와 같이 경구 투여기간이 경과함에 따라 gluten 분획에 포함된 단백질 중 anti-gluten 혈청이 인식하는 밴드는 경구 투여 1st-stage 다섯째 주 와 그 이후에 얻은 혈청에서 항체가 gluten fraction을 인식하는 정도는 유사하게 나타났다. 이것은 Fig. 4에서 panel B의 gluten fraction의 CBB staining에서 나타난 분자들을 거의 인식하는 것으로 볼 수 있다.

IgE에 대한 western blot과 같은 방법으로 anti-gluten IgG의 western blot을 실시하였는데 anti-gluten IgE와 비슷한 양상의 결과를 나타냈다(데이터 생략).

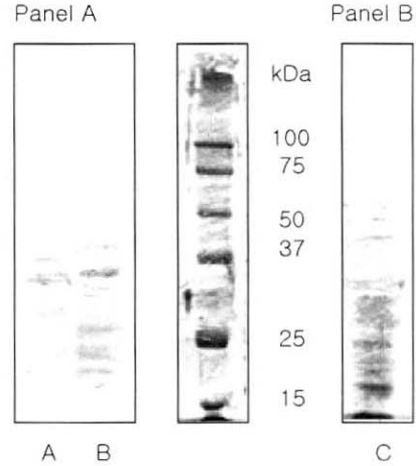
Fig. 3과 4의 ELISA와 western blot의 실험 결과를 종합하여 보면 gluten fraction의 경구 투여로 밀 gluten 분획 구성 단백질을 항원으로 하는 항체가 생성되었음을 확인할 수 있었다. 따라서 gluten에 의해 생성된 항혈청은 항원-항체 반응을 실시하여 효소 처리에 의한 항원성 저감화를 관찰하는데 사용하였다.

**Gluten fraction의 효소 분해**

본 연구에서는 식용이 가능한 천연 식물에서 추출한 단백 분해 효소 3가지, papain(EC 3.4.22.2), ficin(EC 3.4.22.3), bromelain(EC 3.4.22.4)와 소의 췌장에서 유래된 단백 분해 효소 1가지, b.p. protease, 를 선택하여 실험에 적용하였다. 이는 선행연구에서 collagenase가 gluten 분해에 가장 뛰어나다는 보고(21)가 있었으나 이 때 사용된 collagenase가 식중독 균인 Clostridium속에서 분리된 효소이기 때문에 식품 첨가로 사용하기에 적합하지 못했기 때문이다.

Gluten fraction을 각 효소의 최적 pH와 온도(15,16)에서 0, 4, 8, 24시간 처리하였다. 이 때 gluten의 효소 분해 정도를 항 gluten 항체를 이용하여 ELISA를 실시한 결과를 Fig. 5A에 나타내었다.

각 효소 처리에 의해 얻어진 단백질 항원을 coating하여 gluten fraction에 의해 생성된 anti-gluten 혈청과 ELISA를 실시하였다. 각 효소의 처리 시간 경과에 따른 ELISA value는 bromelain과



**Fig. 4. Characterization of polyclonal antibody against gluten fraction.**

Western blot analysis shown lane A (5th week of 1st stage) and B (5th week of 2nd stage) against polyclonal antibody of oral immunized gluten. The detection was carried out with secondary anti- mouse IgE antibody. Lane C is CBB staining of gluten fraction from wheat flour. The position of marker standard are indicated to the between A and B panel.

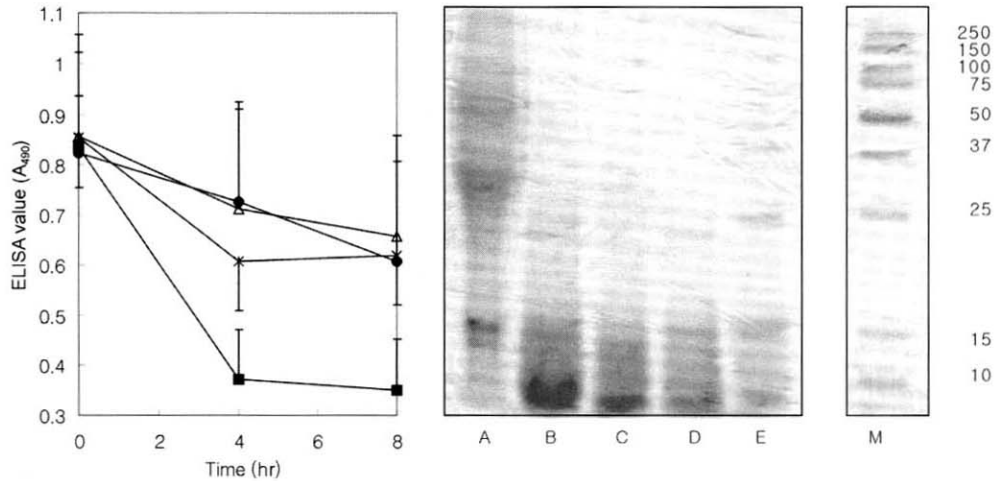
ficin은 4시간보다 8시간 처리에서 감소하였으며 b.p. protease의 경우에는 4시간과 8시간 처리에서 같은 효소 분해력을 나타내었다. 실험에 사용된 효소 중 b.p. protease를 처리한 경우가 bromelain, papain, ficin을 처리한 경우보다 분해가 우수하였다. 이것은 gluten fraction이 여러 효소중 b.p. protease에 의해 가장 효율적으로 저분자화 된 것을 시사한다. 또한 b.p. protease가 다른 endopeptidase(22)에 비하여 활성이 크게 나타난 것은 소화 작용을 나타내는 trypsin, chymotrypsin을 포함한 여러 효소로 구성되어 있기 때문이라고 생각된다. 모든 효소 분해는 8시간 이후 거의 변화를 보이지 않았으며, 24시간 반응하였을 경우 이취가 발생하여 식용으로 사용할 경우 저 알레르겐 밀가루 제조에 적합하지 않은 조건으로 판단하고 8시간 반응까지 실험 결과를 제시하였다.

Tanabe 등은(11) bromelain에 의해 항체 반응의 저하를 보고한 바 있으며 b.p. protease가 분해력이 가장 우수하다고 나타난 본 연구의 결과와 비교된다. 또한 본 연구는 동물에서 얻어진 항체로 항원성 저감화를 관찰하였으므로 효소 처리된 gluten을 항원으로 사용하여 밀 알레르기 환자의 항 gluten 혈청에 대한 검토를 필요로 하겠다.

**효소 처리된 gluten fraction의 SDS-PAGE pattern**

ELISA value의 저하를 통하여 gluten fraction의 항원성이 분해되었다는 것이 확인되었다. 각각의 효소 bromelain(lane B), papain(lane C), ficin(lane D), b.p. protease(lane E)로 처리된 gluten fraction의 단백질의 저분자화 pattern을 알아보기 위하여 separating gel을 18%로 조절하여 분석하였으며 그 SDS-PAGE 결과를 Fig. 5B에 나타내었다.

45 kDa 부근과 37, 35 kDa 그리고 25 kDa 부근에서 단백질 band를 보이던 gluten fraction(lane C, Fig. 2)과는 달리 주로 15 kDa 이하의 저분자화된 단백질 band가 확인되었다. Bromelain과 papain으로 처리한 lane B, C는 band가 저분자화된 것으로 보이며 효소처리 전과 비교하여 ELISA value도 낮게 나타났



**Fig. 5. ELISA and SDS-PAGE analysis for enzyme digested gluten fraction.**

The whole gluten fraction protein was introduced fragmentation with four different endopeptidase, bromelain (pH 4.5, 45°C, panel A: ●, panel B: lane B), papain (pH 6.2, 30°C, panel A: ×, panel: lane C), ficin (pH 7.0, 37°C, panel A: △, panel B: lane D), and protease from bovine pancreas (b.p. protease, pH 7.5, 37°C, panel A: ■, panel B: lane E). Enzymes were added 1 mg in 10 mL of gluten fraction solution at optimal condition for each enzyme. ELISA value represented anti-gluten IgE (panel A) and SDS-PAGE (15% separate gel) was used (panel B). In panel B, lane A is gluten fraction before enzyme digestion.

나 b.p. protease에 비하여 높은 수준이었다. B.p. protease로 처리한 lane E는 25 kDa 부근의 band가 희미하게 보이나 다른 lane과 비교하여 15 kDa 이하에서도 band가 저분자화한 것으로 나타났다. B.p. protease 처리로 gluten fraction이 10 kDa 이하의 작은 peptide로 분해 되어 밀의 항원성 저감화가 이루어졌음을 시사하였다.

**Bovine pancreas 유래의 protease의 분해 능력**

4가지 효소 중 gluten fraction의 분해력이 우수하며 anti-gluten 항체와의 반응에서도 항원성 저감화 정도를 크게 나타낸 b.p. protease에 대하여 효소 첨가량에 따른 분해 능력을 검토하였다 (Fig. 6).

Gluten fraction 10 mL에 1, 2, 3 mg의 효소로 각각 첨가량을 달리하였다. 그러나 첨가량에 따른 분해 능력은 거의 차이가 나지 않았다. 이 결과로부터 최소 1 mg/10 mL의 농도에서 충분한 gluten fraction 분해 효과를 나타낸 것으로 평가하였다. 이 결과는 밀가루 10 g당 1 g의 bromelain(1030 units/mg)을 첨가하여 37°C에서 4시간 가수 분해로 밀의 항원성 저감화를 보고한 Tanabe의 연구(11)와 비교된다. 본 연구에 사용된 b.p. protease는 mg당 7.3 unit로 Tanabe의 연구에서 사용한 bromelain보다 낮은 unit 농도에도 불구하고 높은 활성을 나타내었다. 또한 산업적으로 scale-up할 시 특정 지역에서 재배되는 파인애플에서 추출된 bromelain보다 소의 체장에서 추출된 b.p. protease가 사용에 편의를 제공할 것이라고 생각된다.

**요 약**

효소에 의한 단백질 분해로 우리 밀의 저 알레르겐화를 시도하기 위한 기초 연구로서 금강밀에서 gluten fraction을 추출하여 동물 실험을 통하여 경구 섭취된 gluten에 대한 항체 생성을 유도하였다. Gluten fraction은 UTH buffer로 추출하여 10-50 kDa 사이의 분자량에서 여러 밴드가 확인된 분획을 얻었으며 약 25 kDa, 34 kDa 그리고 45 kDa 부근의 밴드가 주요하게 나타났다. 그리고, 경구 투여로 유도된 gluten에 대한 항체는

ELISA와 western blot의 항원-항체 반응을 실시하여 anti-gluten IgG, IgE를 확인하였다. 또한 경구 투여의 투여 시간 경과에 따라 항체는 상승하였다.

추출된 gluten fraction은 bromelain, papain, ficin 그리고 b.p. protease 각 효소의 최적 pH와 온도에서 가수 분해하여 gluten fraction의 알레르겐 저감화를 시도하였다. 효소 분해 후 gluten fraction의 저분자화 정도는 anti-gluten 항체에 대한 ELISA를 실시하여 검토하였다. 그 결과 bromelain, papain, ficin의 경우보다 b.p. protease를 처리한 경우가 ELISA value를 크게 저하시켰다. 이것은 gluten fraction이 b.p protease 효소 가수분해에 의해 생성된 항체가 인식하는 amino acid 서열(epitope)이 분해되었음을 나타낸 것이다. 마지막으로 b.p. protease의 분해능력을 1 mg, 2 mg, 3 mg/10 mL로 첨가량을 달리하여 검토한 결과 첨가량에 따른 변화는 거의 나타나지 않았다.

따라서 금강밀의 gluten fraction 10 mL에 b.p protease 1 mg으로 4시간 처리하여 단백질을 분해하여 우리밀의 항원성 저하 가능성이 탐색되었다.

**감사의 글**

본 연구는 2001년 한국과학기술기획평가원의 특정연구개발사업의 연구기반구축사업(과제번호 M10022030003-01G0508-00610) 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

**문 헌**

1. Sampson HA. Adverse reactions to foods. In: Allergy: Principal and Practice. Mosby, Philadelphia, PA, USA (1998)
2. Nam SY, Lee SI. The prevention and treatment of food allergy. Food Sci. Ind. 33(4): 16-21 (2000)
3. Metcalfe DD, Sampson HA, Simon RA. Food allergy. In: Adverse Reaction to Foods and Food Additives. Blackwell Science, New York, NY, USA (1997)
4. Yoon HK, Choi EM, Ku SJ. Food allergy. Food Sci. Ind. 30(3): 120-142 (1997)
5. Son DH. The food and allergy. Food Sci. Ind. 33(4): 2-9 (2000)

6. Usui Y, Nakasw M, Hotta H, Urisu A, Aoki N, Kitajima K, Matsuda T. A 33-kDa allergen from rice (*Oryza sativa* L. Japonica). *J. Biol. Chem.* 276(14): 11376-11381 (2000)
7. Nam JK, Hahn YS. Bread-making properties of domestic wheat cultivars. *Korean J. Soc. Food Sci.* 16(1): 1-8 (2000)
8. AACC. Cereal Laboratory Milling Methods for Flour. 26-10. 7th ed.. American Association of Cereal Chem. Inc., St. Paul, MN, USA (1969)
9. Hiromi K, Reiko H, Yoshie T, Tomomi I, Akiko K, Yuki K, Noriko S, Masanori S, Yoshio I. Improving the method of detecting allergens in food. *Jpn. J. Food Chem.* 3(1): 47-51 (1996)
10. Yoshie T, Tomomi I, Akiko K, Yuki K, Noriko S, Hiroko I, Reiko H, Hiromi K, Masanori S, Yoshio I. Development of the methods for detection of allergic components in food. *Jpn. J. Food Chem.* 3(1): 52-56 (1996)
11. Tanabe S, Arai S, Watanabe M. Modification of wheat flour with bromelain and baking hypoallergenic bread with add ingredients. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(8): 1269-1272 (1996)
12. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976)
13. Bio-Rad Laboratories. Bio-Rad Protein Assay. Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA (1998)
14. Bollag MD, Rozycki MD, Edelstein SJ. *Protein Methods.* Wiley-Liss, Inc., New York, NY, USA (1991)
15. IUB. *Enzyme Nomenclature.* Elsevier Scientific Pub. Co., Amsterdam, Netherlands (1972)
16. IUB. *Enzyme Nomenclature.* Academic Press Inc., New York, NY, USA (1984)
17. Petr K, Premysl F, Marie KH. Isolation and analysis of peptide fragments of  $\alpha$ -gliadin using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 434: 429-438 (1988)
18. Wernner S, Herbert W, Hans-Dieter B. High-performance liquid chromatography of reduced glutenin: amino acid composition of fractions and components. *Z. Lebensm Unters Forsch.* 185: 487-489 (1987)
19. Gao L, Bushuuk W. Polymeric glutenin of wheat lines with varying number of high molecular weight glutenin subunits. *Cereal Chem.* 70: 475-480 (1993)
20. Watanabe M, Suzuki T, Ikezawa Z, Arai S. Controlled enzymatic treatment of wheat proteins for production of hypoallergenic flour. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58(2): 388-390 (1993)
21. Lynn KR. Definition of the site of reactivity of the ancestral protease of the papain type. *Phytochemistry* 22(11): 2485-2487 (1983)

---

(2003년 7월 28일 접수; 2004년 2월 7일 채택)