

가상 소화모델시스템 내에서 감마선 조사와 가열 처리된 Ovalbumin의 IgE-Binding Ability의 변화

서지현 · 김재훈 · 오상희 · 이주운 · 변명우

한국원자력연구소 방사선식품생명공학기술개발팀

서 론

식품 알레르기를 일으키는 단백질(알레르겐)의 대부분은 효소 분해 작용에도 안정하기 때문에 해당 원인 식품은 복통 및 설사와 같은 소화기 질환을 일으킬 수 있다⁽¹⁾. 계란의 ovalbumin(OVA)은 식품 알레르기를 일으키는 주요 알레르겐이며, pepsin과 trypsin의 소화 효소에 저항성이 있는 것으로 보고되고 있다^(2,3). 한편, 선행 연구에서 감마선 조사된 난백으로 만든 케이크의 알레르기원성은 상당히 감소되었으며⁽⁴⁾, 알레르기 저감 식품의 섭취 후의 안전성을 검토하기 위해 소화시스템 내에서 감마선 조사된 알레르겐의 알레르기원성의 변화를 살펴볼 필요가 있다. 따라서 본 연구는 계란의 주요 알레르겐인 ovalbumin(OVA)을 감마선 조사한 후 가열 처리하여 가상 소화모델 시스템 내에서의 IgE-binding ability의 변화를 살펴보고 알레르기 저감 식품의 가능성을 평가하였다.

재료 및 방법

알레르겐의 준비

OVA (Sigma Chemical Co.) 알레르겐은 10 mg/ml의 농도로 준비하였고 가열처리는 100℃의 끓는 물에 10분 동안 증탕하였다. OVA 시료의 감마선 조사는 10 kGy의 흡수선량을 얻도록 조사하였고, 감마선-가열 병용 처리된 OVA 시료는 감마선 조사 후 위와 동일한 방법으로 가열하였다.

가상 소화 모델 시스템

준비된 시료는 Kovacs-Nolan et al.⁽⁵⁾의 방법을 변형하여 pepsin과 trypsin으로 효소분해하였다. 즉, OVA 시료를 0.1 M HCl을 이용해 pH 2로 낮춘 후 OVA와 pepsin (1 mg/mL in 0.01 M HCl)의 비율이 1:200(w/w)가 되도록 pepsin을 첨가하여 37℃에서 30분 동안 가수분해하였다. 0.1 M NaOH으로 pH 8로 맞추어 pepsin을 불활성화 시킨 후, 1:200(w/w)의 비율로 trypsin (1 mg/mL in 0.01 M ammonium bicarbonate, pH 8.0)을 첨가하여 37℃에서 5, 10, 20, 30, 60, 120, 240분 동안 가수분해하였다. Trypsin inhibitor를 동량(w/w)으로 첨가하여 trypsin을 불활성화 시킨 후 실험 때까지 4℃에 저장하였다.

항체의 준비

준비된 시료의 소화성을 확인하기 위해 polyclonal rabbit anti-OVA IgG 항체를 사용하였고, IgE-binding ability를 측정하기 위해 아주대학교 소아과에 내원한 환자 중 계란에 대해 IgE 매개된 알레르기가 있는 환자 8명의 pooled 혈청을 사용하였다.

전기영동

단백질의 전기영동은 Laemmli의 방법⁽⁶⁾으로 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE, 10 - 20% gradient gel for intact OVA and heated OVA, 5 -15% for irradiated OVA and irradiated and heated OVA)를 실시하였다. 표준분자 marker는 Bio-Rad사에서 구입하였다. 전기영동한 젤은 Coomassie Brilliant Blue R250을 사용하여 염색한 후 감마선 조사 후 가열 처리된 OVA의 전기영동적 분리 형태를 관찰하였다.

Competitive indirect ELISA

감마선·가열 병용 처리된 OVA의 소화성(IgG) 및 IgE-binding ability를 측정하기 위해 Competitive indirect ELISA법을 사용하여 실시하였다. 즉, Polystyrene flat-bottom microtiter plates (Maxisorp, Nunc, Kamstrup, Denmark)에 0.2 M bicarbonate buffer (pH 9.6)를 사용하여 intact OVA를 2 µg/ml의 농도로 100 µl씩 첨가하여 하룻밤 동안 고정시켰다. PBST (PBS containing 0.05% (v/v) Tween 20)로 3회 세척하였으며 각 단계마다 동일하게 세척하였다. 비특이적 반응을 막기 위해 1%의 BSA 용액 120 µl를 첨가하여 blocking시킨 후, 표준 물질(intact OVA) 및 시료 50µl와 0.01 M PBS로 희석된 항체 용액 50 µl를 첨가해 반응시켰다. Tracer 용액을 100 µl첨가하여 반응시킨 후, 0.04% *o*-phenylenediamine (Sigma Chemical Co.) 기질 용액을 사용해 발색시킨 후 2 M H₂SO₄로 반응을 종결시켜 ELISA reader (CERES UV-900C, BIO-TEK instruments Inc., MI, USA)를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

단백질 밴드 패턴 분석

효소분해 전 즉, 가열처리 직후의 OVA는 control과 비교할 때 변화가 없는 것으로 나타났으나, 감마선 조사 처리 및 감마선·가열 병용 처리구는 단백질의 응집화 현상에 의해 고분자량으로 넓게 끌리는 현상이 관찰되었다. Pepsin 및 trypsin으로 효소처리 한 후에는 control의 OVA band의 농도가 감소하였으나 최종 240분까지 완전히 분해되지 않았지만 그 외의 처리구에서는 pepsin만 처리해도 OVA band가 많이 사라졌으며 특히, 감마선·가열 병용 처리된 OVA band의 농도는 pepsin 처리 이후 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

항원성 및 알레르기원성의 변화

감마선·가열 병용 처리된 OVA의 항원성 및 알레르기원성을 측정하기 위해 intact OVA에

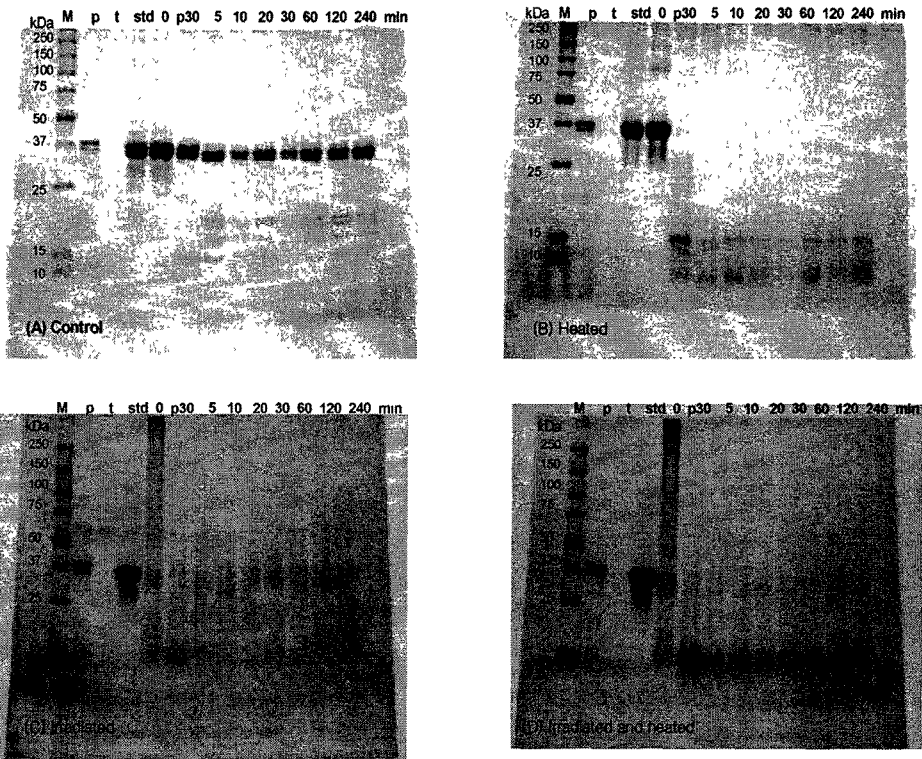


Fig. 1. Digestibility of ovalbumin in the simulated gastrointestinal fluid system. M: Molecular weights markers, p: pepsin, t: trypsin, std: intact OVA, p30: OVA treated with pepsin for 30 min at 37°C, Numbers show minutes during tryptic digestion after peptic digestion.

에 대한 표준곡선을 작성하였다. 표준곡선의 linear 부분에서 함수를 구하여 rabbit IgG와 human IgE의 결합능을 측정하였다(IgG: $x=e^{(0.8863-y)/0.1169}$, $R^2=0.9969$, IgE: $x=e^{(1.4345-y)/0.2562}$, $R^2=0.9906$).

가상 소화모델시스템내의 OVA의 소화성은 pepsin 처리 후 분해되어 항원성이 감소하였으며 특히, 가열처리된 OVA와 감마선·가열 병용처리된 OVA는 pepsin처리 후 급격히 감소하였으며 최종 효소분해까지 일정농도를 나타냈다(Fig.2 (A)). 한편, 각 시료의 IgE-binding ability의 결과는 pepsin 처리 후 모든 시료의 IgE-binding ability가 급격히 감소하는 것으로 나타났으나, trypsin 처리 10분까지 병용 처리구를 제외하고 IgE-binding ability가 증가하였다가 20분 이후부터 다시 감소하는 경향을 보였다(Fig.2(B)). 즉, 효소처리 후 감마선·가열 병용처리구 > 가열 처리구 > 감마선 조사구 > control 의 순서대로 IgE-binding ability의 감소폭이 큰 것으로 나타났다.

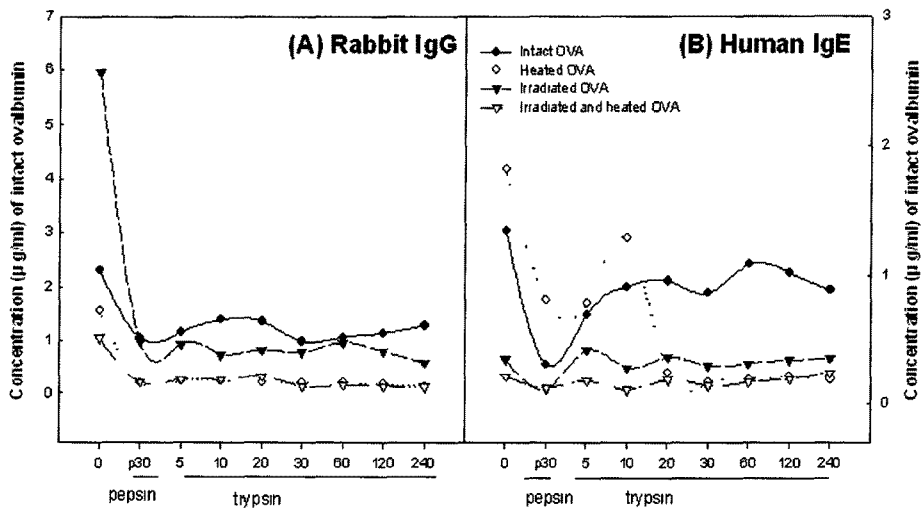


Fig.2. Digestibility measured by rabbit anti-ovalbumin IgG (A) and binding ability of ovalbumin-specific IgE (B) against ovalbumin. The sample solutions were added the concentration of 1 µg/ml.

요 약

본 연구는 감마선 조사를 이용한 알레르기 저감화 식품을 개발하기 위한 실용화 방법의 안전성을 검토하기 위해 실시되었다. 감마선 조사 후 가열 처리된 OVA는 전기영동상에서 pepsin에 의해서 상당히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. IgG 항체를 통해 살펴본 소화성은 intact OVA보다 증가하여 가수분해되기 쉬운 형태임을 알 수 있었다. 또한 효소처리 전의 IgE-binding ability는 현저히 감소하였고 최종 효소분해까지 일정하게 낮은 농도가 유지되어 가장 소화모델 시스템 내에서의 안전성을 확인할 수 있었다. 이상의 결과에서 감마선 및 가열 처리를 단독으로 시행하는 공정보다는 감마선과 가열을 병용하는 방법이 알레르기 저감 식품을 개발에 더욱 효과적일 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Metcalfe, D.D. et al.(1992) *Food Technol.* May, 136-139.
2. Astwood, J.D. et al.(1996) *Nat. Biotechnol.* 14, 1269-1273.
3. Fu, T.J. et al.(2002) *J. Agric. Food Chem.* 50, 7154-7160.
4. Seo, J. H. et al.(2004) *J. Food Prot.*, 67, 1463-1468.
5. Kovacs-Nolan, J. et al.(2000) *J. Agric. Food Chem.*, 48, 6261-6266.
6. Laemmli, U. K.(1970) *Nature*, 227, 680-685.