

감마선 조사된 난백을 함유한 케이크의 계란 알러지원성 측정

서지현 · 이주운 · 김재훈 · 이유석 · 변명우
한국원자력연구소 방사선식품생명공학기술개발

서 론

식품 알레르기는 매년 증가 추세에 있으며, 이를 피하기 위한 방법으로 원인 해당 식품을 회피하는 방법이 요구되지만 식품 성분 표시의 부족으로 실질적인 회피는 어려운 실정이다. 식품 알레르기의 억제 및 저감화를 위해 효소 처리법⁽¹⁾과 알칼리 처리법⁽²⁾ 등이 사용되고 있으며, 최근에는 방사선 조사를 이용한 식품 알레르기의 저감화 연구가 보고되고 있다⁽³⁾. 계란은 영양적 가치가 높으며 응고제 및 유화제 등의 역할을 하여 식품의 가공 공정의 부재료로 사용되지만, 식품 알레르기를 일으키는 주요 원인 식품이기도 하다. 계란 난백은 난황보다 식품 알레르기 유발물질인 알러젠이 다량 함유되어 있으며 난백의 ovalbumin(OVA)과 ovomucoid(OM)가 주요 알러젠으로 보고되고 있다⁽⁴⁾. 따라서, 본 연구는 알레르기 저감화 식품 개발을 위한 연구의 일환으로, 감마선 조사된 난백을 이용하여 케이크를 제조한 후 OVA 및 OM에 대한 알레르기원성을 평가를 하였다.

재료 및 방법

제빵 재료 및 혈청

케이크 제조에 필요한 재료는 Lee 등⁽⁸⁾과 같이 준비하였으며 계란은 난백을 분리하여 감마선 조사를 한 후 케이크 제조에 사용하였다. 실험에 사용된 항혈청은 아주대학교 소아과에 내원한 환자 중 계란에 대해 IgE 매개된 알레르기가 있는 3세 이하의 환자 28명(남아 18명, 여아 10명)의 혈청을 pool 하였다. 환자의 혈청은 시료의 알러지원성을 측정하는데 사용하였다.

감마선 조사

난백의 감마선 조사는 Co-60 감마선 조사시설을 이용하여 $10 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 시간당 10 kGy의 선량률로 10 및 20 kGy의 흡수선량을 얻도록 조사하였다.

케이크의 제조 및 전기영동

Lee 등⁽⁵⁾의 방법으로 pound cake, sponge cake, white layer cake를 제빵한 후, 각 케이크 내의 단백질 을 추출하였다. 각각의 cake를 잘게 부순 후 10g을 취하여 6 M urea, 0.01 M EDTA 및 0.01 M DTT를 함유하는 0.1 M phosphate buffer 100 ml에 넣고 3분간 균질화 하였다. 각 시료는 4°C 에서 4시간동안

추출한 후 9,000×g에서 30분동안 원심분리하였다. 상층액은 Whatman No.4로 여과한 후 cellulose tube (pore size < 5,000, Spectrum® Medical Industries, Inc.)에 넣어 0.01 M PBS로 buffer를 교환하였다. 투석 후, polyethylene glycol 20,000로 농축한 용액은 0.45 μm filtration kit로 여과하여 protein assay kit (Sigma Chemical Co.)를 사용하여 단백질 농도를 측정한 후, 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다. 추출된 단백질의 전기영동은 Laemmli법⁽⁶⁾의 방법에 의해 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE, 5~15% gradient gel)를 실시하였다. 표준분자 marker는 Bio-Rad사에서 구입하였다. 전기영동한 젤은 silver-staining kit(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)를 이용하여 염색하여 케이크 내의 추출된 단백질의 전기영동적 분리 형태를 관찰하였다.

Competitive indirect ELISA

감마선 조사된 난백을 함유하는 케이크의 알러지원성의 평가를 하기 위해 Lee 등⁽⁷⁾의 방법을 사용하여 실시하였다. 즉, Polystyrene flat-bottom microtiter plates (Maxisorp, Nunc, Kamstrup, Denmark)에 0.2 M bicarbonate buffer (pH 9.6)를 사용하여 native OVA 및 OM을 10 μg/ml의 농도로 100 μl씩 첨가하여 하룻밤 동안 고정시켰다. PBST (PBS containing 0.05% (v/v) Tween 20)로 3회 세척한 후 비특이적 반응을 막기 위해 1%의 BSA 용액 120 μl를 첨가하여 blocking시켰다. PBST로 3회 세척 후 시료 50 μl와 0.01 M PBS로 1:20으로 희석된 human IgE 용액 50 μl를 첨가해 반응시킨 후 PBST로 세척하였다. 2차 항체로 biotinlyted mouse anti-human IgE을 사용하여 1:1,000으로 희석한 후 반응시킨 후 1:1,000으로 희석된 HRP-Avidin D를 첨가하여 반응시켰다. 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 측정하여 OVA 및 OM과 항체와의 반응성을 비교하였다.

결과 및 고찰

단백질 밴드 패턴 분석

감마선 조사된 난백으로 만든 케이크의 단백질의 전기영동적 분리 형태를 Fig. 1에 나타내었다. 추출된 대부분의 단백질은 75 kDa 이하의 단백질 band가 관찰되었으며, 계란의 주요 알러젠인 OVA(43 kDa)과 OM(28 kDa)의 band가 존재하였다. Pound cake과 sponge cake은 20 kGy로 조사된 난백에서 OVA과 OM가 뚜렷이 나타났고 고분자량대로 끌리는 흔적이 나타났다. White layer cake에서는 모든 선량에서 단백질 band이 동일하게 나타났으며 조사된 난백으로 만든 케이크(10과 20 kGy)에서 100~150 kDa사이에 고분자량의 물질이 발견되었다.

케이크의 알러지원성 평가

감마선 조사된 난백으로 만든 케이크의 알러지원성을 측정하기 위해 native OVA과 OM에 대한 표준곡선을 작성하였다(OVA: $X=e^{((0.3778-y)/0.1017)}$, R=0.9966; OM: $X=e^{((3.2993-y)/0.5902)}$, R=0.9986). 표준곡선의 linear 부분에서 함수를 구하여 각 케이크에서 추출된 단백질의 OVA과 OM에 대한 human IgE의 결합

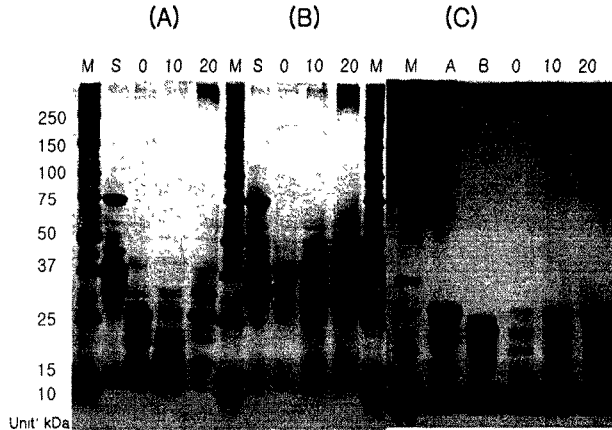


Fig.1. SDS-PAGE analysis with the silver staining of proteins in the cakes. (A) Pound cakes (B) Sponge cakes, (C) White layer cakes, M: protein standard marker, S: standard material (ovotransferrin, 68 kDa; ovalbumin, 43 kDa; ovomucoid, 28 kDa), A: ovalbumin, B: ovomucoid, Numbers mean the gamma-irradiated dose.

능을 측정하였다(Table 1). 그 결과 감마선 조사 선량이 증가할수록 IgE 항체와 결합하는 항원(알러젠)의 함량이 급격히 감소하는 것으로 나타났다. 이는 감마선 조사에 의한 난백 단백질의 구조 변화에 의한 것으로 human IgE와 반응하는 알러젠(OVA, OM 등) epitopes의 구조가 변화하여 항원-항체간의 결합성이 감소하였기 때문으로 사료된다⁽⁸⁾. Lee 등⁽³⁾의 연구에서 감마선 조사에 의해 우유의 알러젠인 casein 과 lactoglobulin에 대한 알러지원성이 감소되었다고 보고한 바 있으며, Jeon 등⁽⁹⁾은 피부 단자 시험 및 ELISA inhibition test에서 감마선 조사된 OVA의 알러지원성이 대조구에 비해 유의적으로 감소

Table 1. Concentrations^a of ovalbumin and ovomucoid in the sample solution prepared from white layer cake, sponge cake and pound cake containing with 10 or 20 kGy gamma-irradiated egg white detected by egg allergic patients IgE (unit: $\mu\text{g/g}$ sample)

Cakes	Allergen	Irradiation dose (kGy)		
		0	10	20
White layer cake	Ovalbumin	432.88 \pm 1.67	14.27 \pm 1.16	8.78 \pm 1.02
	Ovomucoid	191.12 \pm 2.16	5.43 \pm 0.87	2.42 \pm 0.84
Sponge cake	Ovalbumin	433.13 \pm 3.54	21.81 \pm 2.06	7.21 \pm 0.97
	Ovomucoid	163.11 \pm 1.21	6.18 \pm 1.34	2.56 \pm 0.88
Pound cake	Ovalbumin	390.74 \pm 2.94	13.18 \pm 2.11	6.04 \pm 0.89
	Ovomucoid	128.67 \pm 1.17	3.65 \pm 3.47	1.95 \pm 0.87

^a The concentrations were calculated by the equations of standard curves obtained from ELISA formatted with egg allergic patients IgE.

되었다고 보고하였다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 감마선 조사된 난백을 첨가하여 제조된 케이크는 효과적으로 알러지원성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

요 약

본 연구는 알레르기 저감화 식품을 개발하기 위한 실용화 방법의 일환으로 실시되었다. 계란으로부터 난백을 분리하여 감마선을 10 및 20 kGy로 조사한 후 케이크를 만들어 알러지원성을 측정하였다. 감마선 조사된 난백으로 만든 케이크에서 추출된 단백질은 전기영동을 통해 확인하였으며 각 시료에 대한 알러지원성은 계란 알레르기가 있는 환자의 혈청을 사용하여 측정한 결과, 난백에 대한 조사 선량이 증가할수록 알러지원성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 볼 때, 감마선 조사된 난백으로 만든 케이크는 대조구에 비해 알러지원성을 감소시킬 수 있었으며 방사선 조사를 통해 알레르기가 저감화된 식품을 개발할 수 있을 것으로 보인다.

참고문헌

1. Svenning, C. et al.(2000) *Int. Dairy J.*, **10**, 699-711.
2. Ryu, J. H. et al.(2000) *J. Food Sci. Technol.*, **32**, 720-725.
3. Byun, M. W. et al.(2000) *Radiat. Phys. Chem.*, **63**, 369-370.
4. Hoffman, D. R. (1983) *J. Allergy Clin. Immunol.*, **71**, 481-486.
5. Lee, J. W. et al. (2003) *J. Korean Soc. Food Sci. Nuri.*, **32**, 311-314.
6. Laemmli, U. K.(1970). *Nature*, **227**, 680-685.
7. Lee, J. W. et al.(1998) *Int. Food Sci. Technol.*, **33**, 411-418.
8. Davies, K. J. and Delsignore, M. E.(1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 9908-9913.
9. Jeon, G. R. et al.(2002) *J. Asthma Allergy Clin. Immunol.*, **22**, 711-719.