

토끼 항 α -Lactalbumin 항혈청에 대한 유청단백질 가수분해물의 항원성

하월규 · 전석락 · 김정완* · 이수원* · 이재영* · 손동화**

매일유업(주) 중앙연구소, *성균관대학교 낙농학과, **한국식품개발연구원

Antigenicity of Whey Protein Hydrolysates Against Rabbit Anti α -Lactalbumin Antiserum

Woel-Kyu Ha Suk-Lak Juhn, Jung-Wan Kim*, Soo-Won Lee*,
Jae-Young Lee* and Dong-Hwa Shon**

Central Research Lab., Maeil Dairy Industry Co. Ltd.

*Department of Dairy Science, Sung Kyun Kwan University

**Division of Food Science, Korea Food Research Institute

Abstract

To investigate the lowering effects of *in vitro* enzymatic hydrolysis by the treatment of chymotrypsin, trypsin, pancreatin, or protease from *Aspergillus oryzae* on the antigenicity of whey protein isolate (WPI) against rabbit anti α -LA antiserum, competitive inhibition ELISA (cELISA) and passive cutaneous anaphylaxis (PCA) test using guinea pig were performed. The results of cELISA showed that the monovalent antigenicity of the whey protein hydrolysates (WPH) to the antiserum was decreased to $10^{-2.5}$ - $10^{-5.5}$ and less by the hydrolysis. The monovalent antigenicity of the WPH hydrolyzed by trypsin, or protease from *Asp. oryzae* was much lowered by the pretreatment of heat denaturation. The antigenicity of the WPH hydrolyzed by chymotrypsin, trypsin, or pancreatin was much lowered by the pretreatment of pepsin. Especially, the antigenicity of TDP (tryptic hydrolysate with pretreatment of heat and pepsin) was found almost to be removed. However, there was not consistency between degree of hydrolysis(DH) and the monovalent antigenicity of the WPH. By the heterologous PCA it was found that all of the WPH lost the polyvalent antigenicity regardless of the pretreatments although WPI and α -LA had the positive high antigenicity. The results suggested that the peptides derived from α -LA in WPH could bind specific antibodies but they could not induce allergy. Therefore, it was elucidated that the allergenicity of α -LA in whey protein could be destroyed easily by the enzymatic hydrolysis.

Key words: whey protein hydrolysate, antigenicity, rabbit anti α -lactalbumin antiserum, competitive inhibition ELISA, heterologous PCA

서 론

우유중에는 인간에게 특이항체를 유도할 수 있는 18~25 종류의 단백질이 함유되어 있으며^(1, 3), 이들 중에서 특히 casein, α -lactalbumin(α -LA), β -lactoglobulin(β -LG) 그리고 bovine serum albumin(BSA)은 우유알레르기를 유발할 수 있는 원인물질로 보고되고 있다^(4, 6). 그중 α -LA는 casein과 비슷한 항원성을 나타내며 유청단백질을 구성하는 주요성분으로서 모유의 α -LA와는 약 72% 정도의 상동성을 갖는 것으로 보고되고 있다⁽⁷⁾.

α -LA의 분자구조 특성은 칼슘을 함유하고 있는 접인체⁽⁸⁾, 우유중의 α -LA를 열처리하더라도 냉각시 칼슘이온이 존재하면 가역적으로 renature 상태로 된다⁽⁹⁾. 이는 칼슘이온이 α -LA의 아미노산서열중 79번의 lysine과 84번 aspartic acid를 carboxyl화하여 두개의 물분자와 결합하므로써 분자구조를 안정하게 유지하기 때문이다⁽⁹⁾.

그러나 α -LA가 pH 4.0 이하에서는 칼슘이온이 해리되어 분자구조가 변화된 apo-form으로 된다^(10, 11). 이러한 unfolding 상태의 α -LA는 특히 pH 3.5 이하에서 pepsin에 의해서 쉬 분해된다⁽¹²⁾. 한편 우유알레르기환자에게 α -LA를 투여했을 때 양성의 알레르기증상을 나타내는 빈도가 약 41~53%로 보고되고 있다^(4, 6).

본 일련의 연구는 가수분해에 의한 유청단백질(WPI)의 항원성감소를 조사하므로써 저알레르기성 유아용 조제

Corresponding author: Woel-Kyu Ha, Central Research Lab., Maeil Dairy Industry Co. Ltd., 480 Kagok-Ri, Jinwi-Myun, Pyungtaek-Gun, Kyonggi-Do 451-860, Korea

분유제조에 필요한 기초자료를 얻고자 실시하였다. 전보⁽¹³⁾에서 토끼 항WPI항혈청을 이용한 competitive inhibition ELISA(cELISA)로 여러 처리에 의해 준비한 유청단백질가수분해물(WPH)의 monovalent 항원성을 검토하였을 때, 대체로 pancreatin 가수분해의 경우 그 항원성이 가장 낮게 나타났다. 본보에서는 유청단백질 가수분해물중 α-LA 유래의 monovalent 및 polyvalent 항원성 변화를 검토하기 위하여, 토끼 항 α-LA 항혈청을 이용한 cELISA 및 guinea pig에의 passive cutaneous anaphylaxis(PCA) test를 각각 실시하였다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 WPI 및 WPH는 전보에서와 같이 준비하여 사용하였다⁽¹³⁾. 즉, WPI는 Lacprodan-90[®](Denmark Protein a.s., Denmark)을, WPH는 WPI용액을 chymotrypsin(C), trypsin(T), pancreatin(P), 그리고 *Aspergillus oryzae* 유래의 protease(O) 등 네 효소를 각각 4시간 처리하였는데 이들은 효소처리전에 WPI용액을 75℃에서 20분간 열로 전처리 하거나 하지 않은 것(D/U)으로 나눈 다음, 1%의 pepsin으로 처리하거나 하지 않은 것(P/N)을 사용하였다. 따라서 최종적으로 모두 16종류의 WPH(예, CDP 등)을 항원성시험에 사용하였다. 표준단백질 및 특별한 언급이 없는 기타의 시약은 Sigma사(U.S.A.) 제품을 사용하였다.

α-LA에 대한 항혈청의 제조

전보에서와 같은 방법으로 준비하였다⁽¹³⁾. 단 항원은 표준단백질 α-LA를 사용하였다.

Competitive Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(cELISA)

전보에서와 같은 방법으로 준비하였다⁽¹³⁾. 단 microplate에 coating한 항원은 표준단백질 α-LA를, 결합반응시의 1차항체는 위에서 준비한 항 α-LA항혈청을 각각 사용하였다. 시료중의 항원이 well에 coating된 항원과 항체와의 결합을 저해하는 비율(inhibition rate)은 다음의 식으로 나타내었다.

Inhibition rate(%)=

$$\left[1 - \left(\frac{\text{시료를 처리한 well의 흡광도}}{\text{Blank well의 흡광도}} \right) \right] \times 100$$

또한, 항원성 저하도는 다음의 식과 같이 나타내었다.

Reduction rate=

$$\frac{\text{항체의 결합을 50\% 저해하는 시료의 농도}}{\text{항체의 결합을 50\% 저해하는 표준단백질의 농도}}$$

Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA) test

수동피부아나필락시스 반응은 松橋의 방법⁽¹⁴⁾에 의한 heterologous PCA test로 실시하였다. 즉, 건강한 guinea pig(Hartley系, 250~300g)를 실험동물로 하여 등의 털을 제거하고 ether로 국부마취시킨 다음, 마리 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.6)로 1/10에서 1/2, 560까지 2배씩 9단계로 희석하여 둔 토끼 항 α-LA항혈청을 각각 100 μl씩 guinea pig의 등부위에 여러 군데 나누어 피내주사하여 4시간 동안 감각시켰다. 다음으로 PBS에 용해한 항원용액을 1%의 Evans blue용액과 동량 혼합하고 마리당 3 mg씩의 항원을 뒷다리 정맥에 1 ml 주사하였다. 30분 후에 guinea pig를 처사하고 피내주사한 부위의 피부를 절개하여 피부의 안쪽에 나타난 청색반점의 직경을 측정하였으며, 직경 5 mm 이상의 반점을 양성으로 판정하였다.

결과 및 고찰

Monovalent 항원성

WPH중 α-LA에서 유래하는 peptide의 monovalent 항원성을 조사하기 위하여, cELISA에 의한 항 α-LA항혈청(항체)과 가수분해물의 반응성을 조사하였다. 실험방법에 나타난 조건하에서 항 α-LA항체의 결합을 50% 저해하는 α-LA의 농도는 약 10^{0.6} μg/ml이었다(Fig. 1). 항체의 결합을 50% 저해하는 chymotrypsin 가수분해물의 농도는 CUN, CDN 그리고 CDP의 경우 각각 10^{2.9}, 10^{1.9} 및 10^{3.6} μg/ml 가량으로 나타났으며, 이들 값을 항체결합을 50% 저해하는 α-LA의 농도인 10^{-0.6} μg/ml으로 나눈 수치로부터 가수분해에 의하여 α-LA의 항원성이 약 10^{2.5}-10^{4.2}배 감소되었음을 알 수 있었다(Fig. 1A). 그러나, CUP의 경우는 항체결합을 50% 저해하는 농도가 매우 높아, 항원성이 상당히 감소되었음(10^{4.2}배 이상)을 알 수 있었다.

Trypsin 가수분해물의 경우 항체의 결합을 50% 저해하는 TUN의 농도는 10^{3.2} μg/ml 정도로 나타나 TUN의 항원성이 약 10^{3.8}배 감소되었고, TUP 및 TDN은 항원성이 10^{5.8}배 이상 감소되었으며 특히 TDP는 항원성이 거의 상실되었음을 알 수 있었다(Fig. 1B).

Pancreatin 가수분해물의 경우 항체의 결합을 50% 저해하는 PUN, PDN 그리고 PDP의 농도는 각각 10^{3.0}, 10^{3.4}, 10^{3.9} μg/ml 정도로 나타났고 PUP의 경우는 외삽법에 의하여 약 10^{4.9} μg/ml로 나타나, 항원성이 약 10^{3.6}-10^{5.9}배 감소되었다(Fig. 1C).

Asp. oryzae 유래의 효소에 의한 가수분해물의 경우 항체의 결합을 50% 저해하는 OUN, OUP 그리고 ODP의 농도는 각각 10^{2.0}, 10^{3.7} 및 10^{4.0} μg/ml 정도로 나타나 항원성이 약 10^{2.6}-10^{4.6}배 감소되었으며, ODN은 항원성이 극히 미약하여 거의 제거되었음을 알 수 있었다(Fig. 1D).

각 효소처리군내에서 항원성이 가장 낮은 WPH는 대체로 pepsin으로 전처리한 경우(CUP, TDP, PUP)였으며, 이들의 가수분해정도(DH)는 처리군내에서 가장 높은

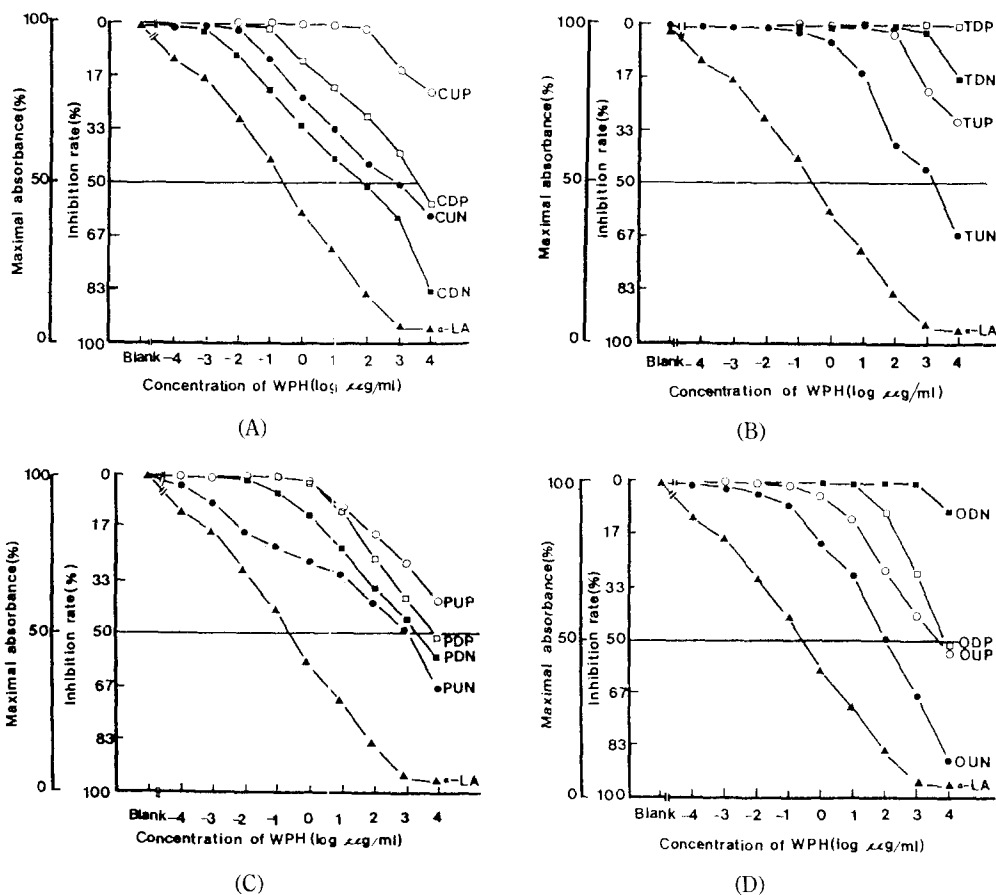


Fig. 1. Inhibition analyses of binding between rabbit anti α -LA antiserum and whey protein hydrolysates.

WPI was hydrolysed by chymotrypsin (C; pH 8.0, 55 $^{\circ}$ C), trypsin (T; pH 8.0, 55 $^{\circ}$ C), pancreatin (P; pH 7.5, 50 $^{\circ}$ C), or *Asp. oryzae* protease (O; pH 8.0, 45 $^{\circ}$ C) for 240 min with or without pretreatment of heat denaturation (D/U; pH 6.5, 75 $^{\circ}$ C, 20 min) and/or subsequent pepsin-predigestion (P/N; pH 2.0, 38 $^{\circ}$ C, 60 min)

것으로 나타났¹³⁾. 또한, WPH중 항원성이 가장 높게 나타난 것은 CDN, TUN, PUN, OUN으로 DH가 가장 낮고 pepsin 전처리를 하지 않은 점으로 미루어, WPI중의 α -LA는 pepsin 전처리에 의하여 효과적인 가수분해가 일어나고 그로 인하여 항원구조가 잘 파괴됨을 알 수 있었다. 즉, pH 4.0 이하에서 α -LA는 calcium이온이 해리되어 분자구조가 apo-form으로 unfolding되므로^{10,11)} pepsin에 의한 분해가 용이하게 되었다¹²⁾. 이러한 현상은 Asselin 등¹⁵⁾의 보고와 일치한다.

한편, Heppell 등¹⁶⁾은 열변성에 의한 유청단백질의 항원성 감소를 보고하였으나 본 연구에서 trypsin과 *Asp. oryzae* 효소처리의 경우만 열 전처리에 의한 항원성 감소를 확인할 수 있었다. 또한 이들 효소처리에 의한 가수분해물인 TDP, TDN 및 OUN은 다른 처리에 비하여 항원성의 저하가 급격하였다. Trypsin에 의한 가수분해물의 경우는 DH가 비교적 낮음에도 불구하고 그 항원성은 낮게 나타났으나, pancreatin에 의한 가수분해물의

경우는 DH가 상당히 높음에도 불구하고 그 항원성은 비교적 높게 나타났다. 이는 전보에서 항WPI항체에 의한 분석시 pancreatin에 의한 가수분해물의 항원성이 낮게 나타난 결과와 일치하지 않았다. 따라서, WPH의 가수분해도가 높다고 해서 반드시 α -LA의 항원성이 낮아지는 것이 아님을 알 수 있었다.

이와 유사한 결과를 Asselin 등¹⁵⁾이 보고한 바 있는데, 그들은 pepsin과 pancreatin에 의한 유청단백질의 가수분해가 비교적 장시간(4시간) 진행됨에 따라 단시간(60분) 반응시보다 WPH의 가수분해도가 약간 증가하고 α -LG의 항원성이 다시 높아졌다고 하였으며, 그 까닭은 이미 생성된 peptide간의 cross-linking 혹은 plastein 반응에 의한 것으로 추측하였다.

이상과 같이 항 α -LA 항혈청에 의한 cELISA로 WPH의 monovalent 항원성을 검토하였을 때, α -LA 유래의 monovalent 항원성을 낮추기 위한 가장 효과적인 효소분해방법은 열 및 pepsin에 의한 전처리에 이어서

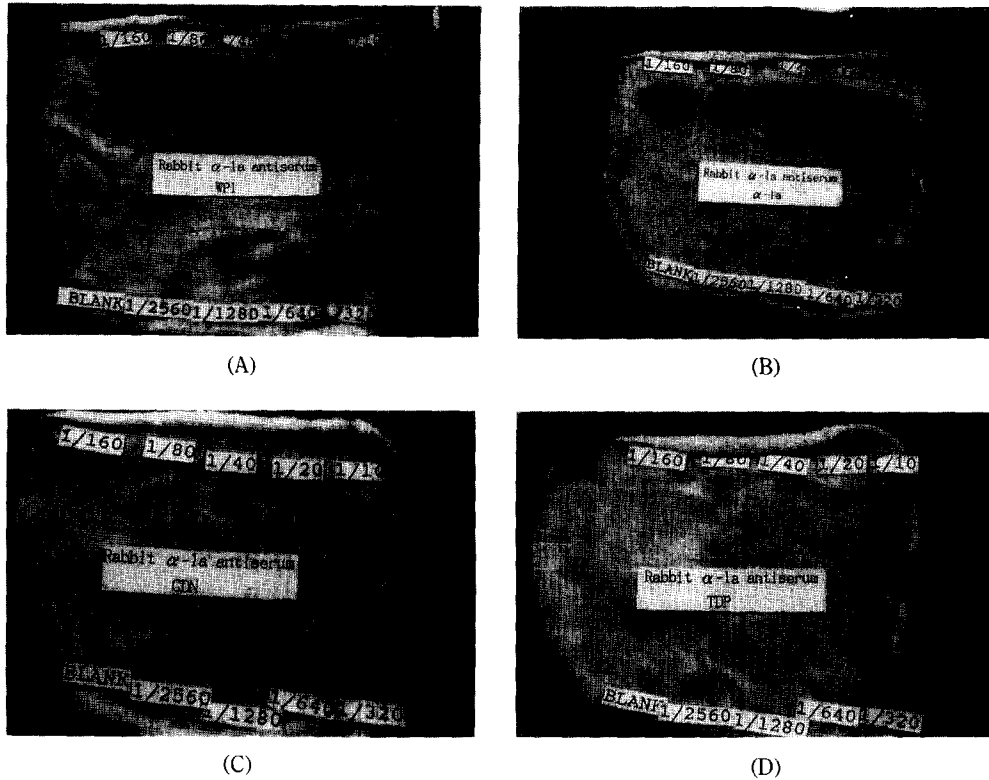


Fig. 2. Typical profiles of PCA tests of whey protein hydrolysates with rabbit anti α -LA antiserum

0.1 ml of serially two-fold diluted antiserum (1/10~1/2,560) was injected into guinea pig intracutaneously. Four hours later, 1 ml of 0.5% Evans blue solution containing 3 mg of WPH was injected intravenously. The animal was sacrificed 30 min later. CDN and TDP are same as shown in Fig. 1.

trypsin으로 가수분해하는 것(TDP)임을 알 수 있었다.

Polyvalent 항원성

알레르기를 유발하는 성질(allergenicity)을 분석하기에 cELISA에 의한 항원성시험이 비교적 간단하기는 하지만 항원의 특이항체와의 결합정도(항원의 monovalent 항원성)를 알게 된다. 그러나, 생체내에서는 하나의 항원(또는 항원조각)에 둘 이상의 특이항체가 결합하여 항원항체복합체(immune complex)를 형성하고 여기에 이차적으로 mast cell이나 보체(complement)가 작용하므로써 각각 type I이나 type III allergy를 일으킨다⁽¹⁷⁾. 따라서 둘 이상의 특이항체와 결합할 수 있는 항원의 성질인 polyvalent항원성이 보다 중요한 의미를 갖는다.

WPH중 α -LA 유래 가수분해물의 polyvalent 항원성을 guinea-pig를 이용한 PCA test로 측정시 나타난 대표적인 청색반점을 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2A와 2B는 항원으로서 WPI 및 α -LA를 각각 사용한 경우이며, 2C와 2D는 앞의 cELISA에서 항원성이 가장 높게, 그리고 가장 낮게 나타났던 CDN 및 TDP를 각각 사용한 경우이다. Table 1에 PCA test 결과를 종합하였다.

PCA test에서 토끼 항 α -LA 항혈청에 대한 WPH의 polyvalent 항원성은 열이나 pepsin 전처리에 관계없이 모든 가수분해물에서 거의 나타나지 않았다. 그러나, WPI는 1/640까지 희석한 항혈청처리에서 양성으로 나타났으며 α -LA의 경우도 1/320까지는 양성으로 나타났다.

즉, 위 cELISA의 결과에서 WPH중 α -LA의 monovalent 항원성이 감소하는 하였으나 대부분 여전히 존재 하였던 점과 매우 대조적으로, polyvalent 항원성은 전처리나 효소의 종류에 관계없이 모든 WPH에서 거의 상실되었다. 이는 WPI의 가수분해로 생성되는 α -LA 유래의 peptide 중에는 여전히 특이항체와 결합하는 것이 존재하나, 둘 이상의 특이항체가 결합가능한 peptide는 거의 존재하지 않음을 뜻한다.

따라서, 유청단백질을 혼합사용한 저항원성 유제품을 제조할 때 chymotrypsin이나 trypsin, pancreatin 또는 *Asp. oryzae* 유래 protease 등의 효소를 열이나 pepsin의 전처리없이 사용하여도 α -LA에서 유래하는 allergenicity는 쉽게 제거될 수 있음을 시사하고 있다.

그러나, Asselin 등⁽¹⁸⁾은 우유알레르기 유아 6명의 혈

Table 1. Antigenicity of whey protein hydrolysates to rabbit anti α -lactalbumin antiserum on guinea pig PCA

WPH challenged ¹⁾	1/df ²⁾	WPH challenged	1/df
CUN	- ³⁾	PUN	-
CUP	-	PUP	-
CDN	-	PDN	-
CDP	-	PDP	-
TUN	-	OUN	-
TUP	-	OUP	-
TDN	-	ODN	-
TDP	-	ODP	-
WPI	640	α -LA	320

¹⁾Whey protein hydrolysates are same as shown in Fig. 1.

²⁾Data are reciprocals of limiting dilution factor of antiserum showing positive PCA result. The reaction with blueing of more than 5 mm in diameter was regarded as a positive.

³⁾ '- ' means negative PCA result when antiserum was diluted to 1/10.

청을 함께 섞어 사용한 radioallergosorbent test(RAST) 저해실험에서 WPH중 α -LA유래의 allergenicity는 30~60% 가량 잔존하는 것으로 보고하였다. 이러한 불일치는 실험에 사용한 WPH의 차이 및 allergenicity assay 방법상의 문제에 기인하는 것으로 생각된다. 즉, 그들의 연구에서는 pepsin 전처리없이 WPH를 준비하므로써 효과적인 α -LA의 가수분해가 일어나지 않았을 것으로 생각된다. 또한, RAST 저해실험에서는 환자혈청중의 α -LA 특이적인 IgE항체에 의한 monovalent antigenicity를 검출하고 있으나, 본보의 heterologous PCA test에서는 guinea-pig에 정맥주사한 토끼 항혈청중의 IgG항체에 의한 polyvalent antigenicity를 검출하고 있다¹⁴⁾. 따라서, 동일한 WPH를 실험에 사용하였다고 하더라도, 항체를 생산한 host 동물의 차이, 항체생산을 위한 감작방법의 차이(경구투여/인위적인 면역), 검출대상 항체의 class차이(IgE/IgG), 그리고 이러한 차이에서 유래하는 특이항체들의 항원인식부위(epitope, antigenic determinant)의 유형차이 및 항혈청의 titer의 차이 등에 의한 것으로 생각된다. 이점에 대하여는 더 검토할 필요가 있다고 생각한다.

요 약

Chymotrypsin, trypsin, pancreatin, 그리고 *Aspergillus oryzae* 유래 단백질분해효소의 *in vitro* 처리에 의하여 유청단백질(WPI)의 가수분해물(WPH)중 α -LA유래의 항원성변화를 조사하기 위하여 토끼 항 α -LA 항혈청을 이용한 competitive inhibition ELISA(cELISA)와 heterologous PCA를 실시하였다. cELISA에 의하여 WPH의 monovalent 항원성을 분석한 결과, pepsin 전처리는 chymotryp-

sin, trypsin 그리고 pancreatin 가수분해물의 항원성을 더욱 감소시키는 효과가 있었으며, 열 전처리는 *Asp. oryzae* 유래효소 및 trypsin 가수분해물의 항원성을 더욱 감소시켰다. 전체적으로 α -LA유래의 monovalent 항원성은 효소처리에 의하여 $10^{-2.5}$ - $10^{-5.5}$ 배 또는 그 이하로 저하되었으며, 특히 열 및 pepsin 전처리후 trypsin으로 가수분해한 경우(TDP)의 항원성은 거의 상실되었다. WPH의 가수분해도와 α -LA유래의 monovalent 항원성 감소는 그다지 일치하지 않았다. Guinea pig를 이용한 PCA test에 의하여 α -LA유래의 polyvalent 항원성을 분석한 결과 WPI 및 α -LA는 양성으로 높게 나타났으나, WPH는 전처리유무에 관계없이 모두 음성으로 나타났다. 이는 WPI의 가수분해로 생성된 α -LA유래의 peptide가 특이항체와 결합은 가능하나 생체내에서 알레르기를 유발하지 않음을 뜻하였다. 따라서, 유청단백질을 효소로 가수분해하면 유청단백질중 α -LA의 allergenicity는 위 파괴됨을 알 수 있었다.

문 헌

- Baldo, B.A.: Milk allergies. *Aust. J. Dairy Technol.*, **39**, 120(1984)
- Hanson, L.A. and Mansson, I.: Immune electrophoretic studies of bovine milk and milk products. *Acta Paediatr. Scand.*, **50**, 484(1961)
- Savilahti, E.: Cow's milk allergy. *Allergy*, **36**, 73(1971)
- Goldman, A.S., Anderson, D.W., Sellers, W.A., Sapersteine, S., Kniker, W.K. and Halpen, S.T.: Milk allergy. I. Oral challenge with milk and isolated milk protein in allergic children. *Pediatr.*, **22**, 425(1963)
- Goldman, A.S., Sellars, W.S., Halpern, S.R., Anderson, D.W., Furlow, T.E. and Johnson, C.H.: Milk allergy. II. Skin testing of allergic and normal children with purified milk proteins. *Pediatr.*, **32**, 572(1963)
- Lebenthal, E.: Cow's milk protein allergy. *Pediatr. Clin. North Am.*, **22**, 827(1975)
- Findlay, J.B.C and Brew, K.: The complete amino acid sequence of human α -lactalbumin. *Eur. J. Biochem.*, **27**, 65(1972)
- Hiraoka, T., Seawa, T., Kuwajima, K., Sugai, S. and Murai, N.: α -Lactalbumin; A calcium metaloprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 1098(1980)
- Stuart, D.L., Acharya, K.R., Walker, N.P.C., Smith, S.G., Lewis, M., and Phillips, D.C.: α -Lactalbumin possesses a novel calcium binding loop. *Nature*, **324**, 84(1986)
- Kronman, M.J., Sinha, S.K., and Brew, K.: Characterization of the binding of Ca^{2+} and other divalent metal ions to bovine α -lactalbumin. *J. Biol. Chem.*, **256**, 8582 (1981)
- Swaigood, H.E.: Structural changes in milk protein. In *Milk proteins: nutritional, clinical, functional and technological aspects* (Barth, C. and Schlimme, E. eds.). Springer-Verlag, New York (1988)
- Fushiki, T., Yamamoto, N., Naeshiro, I. and Iwai, K.: Digestion of α -lactalbumin in rat gastrointestinal tracts. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 95(1986)

13. 하월규, 전석락, 김정완, 이수원, 이재영, 손동화: 효소가수분해에 의한 유청단백질의 항원성 저하. 한국식품과학회지, **26**, 74(1994)
14. 松橋直: 過敏症反應. In 續生物化學實驗講座, Vol.5. 免疫生化學研究法 (日本生化學會編). 東京化學同人, 東京, P.271(1986)
15. Asselin, J., Hebert, J. and Amiot, J.: Effect of *in vitro* proteolysis on the allergenicity of major whey proteins. *J. Food Sci.*, **54**, 1037(1989)
16. Heppell, L.M., Cant, A.J. and Kilshaw, P.J.: Reduction in the antigenicity of whey protein by heat treatment: A possible strategy for producing a hypoallergic infant milk formula. *British J. Nutr.*, **51**, 29(1984)
17. Breneman, J.C.: Basic of Food Allergy, 2nd ed., Charles C. Tomas Publishers, Springfield, Illinois(1984)

(1994년 4월 15일 접수)