

## 토끼 항 $\beta$ -Lactoglobulin 항혈청에 대한 유청단백질 가수분해물의 항원성

이수원·하월규\*·전석락\*·김정완·손동화\*\*·이재영

성균관대학교 낙농학과, \*매일유업(주) 중앙연구소

\*\*한국식품개발연구원

### Antigenicity of Whey Protein Hydrolysates against Rabbit Anti $\beta$ -Lactoglobulin Antiserum

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

Department of Dairy Science, Sung Kyun Kwan University

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

\*\*Division of Food Science, Korea Food Research Institute

#### Abstract

In order 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(WPI) against rabbit anti  $\beta$ -LG 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  $10^{-1.7} \sim 10^{-4.1}$  and less by the hydrolysis. Especially, the antigenicity of OUP(hydrolysate by protease from *Asp. oryzae* with pretreatment of pepsin) was found almost to be removed. By the heterologous PCA the polyvalent antigenicity of the WPH was decreased to  $1/2 \sim 1/128$  and less. Especially, the polyvalent antigenicity of OUN(hydrolysate by protease from *Asp. oryzae* without pretreatments) was found almost to be removed, although OUN did not have so high degree of hydrolysis(DH) or so low monovalent antigenicity (reduced to  $10^{-3.2}$ ). Therefore, this result was assumed to come from effective destruction of antigenic determinants on  $\beta$ -LG in WPI, not to produce polyvalent antigenic peptides that are closely associated with induction of allergy. This finding suggested that WPH prepared by the treatment of microorganic protease from *Asp. oryzae* would be a material for hypoallergenic infant formula due to the removal of the polyvalent antigenicity of  $\beta$ -LG, the major milk allergen in WPI.

Key words: whey protein hydrolysate, antigenicity, rabbit anti  $\beta$ -Lactoglobulin antiserum, hypoallergenic infant formula

#### 서론

$\beta$ -Lactoglobulin( $\beta$ -LG)은 반추동물의 유청단백질중에서 가장 많이 함유되어있는 성분으로서 162개의 잔기로 구성되어 있고 두개의 disulfide결합과 하나의 free -SH group을 가지고 있으며 보통 우유중에는 약 37,000 dalton의 이량체로 존재한다<sup>(1,2)</sup>. 미변성  $\beta$ -LG는 두개의 retinol과 결합하는 단백질로서 pH 2.0~7.5사이의 광범위한 pH에서도 분자구조가 안정하게 유지된다<sup>(1,2)</sup>. 또한  $\beta$ -LG은 강산성하의 pepsin에 의해서 소화되기 어려운 뿐만 아니라(난소화성) 모유 중에는 거의 존재하지 않아(외래

성) 항원성이 매우 높다. 이 때문에  $\beta$ -LG는 유아가 우유나 우유를 원료로 한 infant formula의 섭취시 우유 알레르기를 가장 잘 일으키는 원인물질(allergen)의 하나로 작용할 수 있다.

실제로, Ratner 등<sup>(3)</sup>은 경구투여를 통한 guinea pig anaphylaxis의 연구에서  $\beta$ -LG가 casein이나  $\alpha$ -lactalbumin( $\alpha$ -LA)보다 항원성이 높았다고 보고하였으며, Parish<sup>(4)</sup>도 원숭이에 passive cutaneous anaphylaxis(PCA)를 행한 실험에서 알레르기성 유아의 항체는  $\beta$ -LG와 반응한다고 보고하였다. 그리고 우유에 과민반응을 보이는 유아의 혈청중 IgE항체는 다른 종류의 우유단백질보다  $\beta$ -LG과 가장 잘 결합하는 것으로 보고되고 있으며<sup>(5)</sup> 이와 비슷한 실험결과는 여러 우유알레르기 유아에서도 나타나고 있다<sup>(6-9)</sup>.

유청단백질에 생체내 소화효소를 처리하여 얻은 가수

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

분해물은 일반적으로 원래의 미변성단백질보다 항원성이 현저하게 낮아짐이 다수 보고되어 있는데<sup>(10-14)</sup>, 이는 단백질항원이 가수분해로 분자크기가 작아지거나 열변성이나 고압에 의하여 분자구조가 변형되어 특이항체와의 결합정도가 감소되는 성질을 이용한 것이다. 그러나, 가수분해시 저분자량의 펩타이드가 많이 생성됨에도 불구하고 여전히 IgE 항체와 결합가능한 것이 상당히 잔존하는 경우도 있어<sup>(11)</sup>, 가수분해시 효소의 종류와 사용량, 반응시간 그리고 기질의 종류나 상태 등 가수분해조건에 따라서 그 항원성은 다르게 나타날 수 있다.

본 일련의 연구는 가수분해에 의한 유청단백질의 항원성감소를 조사함으로써 저알레르기성 infant formula의 제조에 필요한 기초자료를 얻고자 실시하였다. 즉, 전보<sup>(15,16)</sup>에서는 생체내 단백질분해효소와 *Aspergillus oryzae* 유래의 효소처리에 의한 유청단백질 가수분해물의 항원성을 항WPI항혈청 및 항α-LA항혈청을 이용하여 검토하였으며, 본보에서는 항β-LG항혈청을 이용하여 가수분해물중 β-LG 유래의 monovalent 및 polyvalent 항원성을 검토하였다.

**재료 및 방법**

**재료**

실험에 사용한 WPI 및 WPH는 전보에서와 같이 준비하여 사용하였다<sup>(15)</sup>. 즉, WPI는 Lacprodan-90<sup>®</sup>(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°C로 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)를 항원성시험에 사용하였다. 표준단백질 및 특별한 언급이 없는 기타의 시약은 Sigma사(U.S.A.) 제품을 사용하였다.

**β-LG에 대한 항혈청의 제조**

전보에서와 같은 방법으로 준비하였다<sup>(15)</sup>. 단 항원은 표준단백질 β-LG를 사용하였다.

**Competitive Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(cELISA)**

전보에서와 같은 방법으로 준비하였다<sup>(15)</sup>. 단 microplate에 coating한 항원은 표준단백질 β-LG를, 결합반응시의 1차항체는 위에서 준비한 항β-LG항혈청을 PBS-Tween으로 1/8000희석한 것을 각각 사용하였다.

시료중의 항원이 well에 coating된 항원과 항체와의 결합을 저해하는 비율은 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 전보<sup>(16)</sup>에서와 같이 松橋의 방법<sup>(17)</sup>에 의하여 guinea pig(Hartley系, 250~300g)를 실험동물로 한 heterologous PCA test로 실시하였다. 단 항혈청은 토끼 항β-LG항혈청을 사용하였다. 결과의 판정은 처리후 guinea pig피부의 안쪽에 나타난 청색반점의 직경이 5 mm 이상인 경우를 양성으로 5 mm 이하인 경우를 음성으로 하였다.

**결 과**

**Monovalent 항원성**

WPH중 β-LG에서 유래하는 펩타이드의 monovalent 항원성을 조사하기 위하여, cELISA에 의한 항β-LG항혈청(항체)과 가수분해물의 반응성을 조사하였다. 실험방법에 나타난 조건하에서 항β-LG항체의 결합을 50% 저해하는 β-LG의 농도는 약 10<sup>0.4</sup> μg/ml이었다(Fig. 1).

항체의 결합을 50% 저해하는 chymotrypsin 가수분해물의 농도는 CUN, CUP, CDN, 그리고 CDP의 경우 각각 10<sup>2.2</sup>, 10<sup>2.2</sup>, 10<sup>2.1</sup> 및 10<sup>4.2</sup> μg/ml 가량으로 나타났으며, 이들 값을 항체결합을 50% 저해하는 β-LG의 농도인 10<sup>0.4</sup> μg/ml로 나눈 수치로부터 가수분해에 의하여 β-LG의 항원성이 약 10<sup>1.7</sup>~10<sup>3.8</sup>배 감소되었음을 알 수 있었다(Fig. 1A).

Trypsin 가수분해물의 경우 항체의 결합을 50% 저해하는 TUN, TDN 및 TDP의 농도는 10<sup>4.4</sup>, 10<sup>2.8</sup>, 10<sup>4.5</sup> μg/ml 정도로 나타나 이들의 항원성이 약 10<sup>2.4</sup>~10<sup>4.1</sup>배 감소되었고, 특히 TUP는 그 항원성이 매우 미약하여 대부분 제거되었음을 알 수 있었다(Fig. 1B).

Pancreatin 가수분해물의 경우 항체의 결합을 50% 저해하는 PUN 및 PUP의 농도는 각각 10<sup>3.4</sup>, 10<sup>4.0</sup> μg/ml 정도로 나타나 항원성이 약 10<sup>3.0</sup>~10<sup>3.6</sup>배 감소되었으며, PDN, PDP의 경우 항원성이 모두 10<sup>4.6</sup>배 가량 감소되었다(Fig. 1C).

*Asp. oryzae* 유래의 효소에 의한 가수분해물의 경우 항체의 결합을 50% 저해하는 OUN, ODN 그리고 ODP의 농도는 각각 10<sup>3.6</sup>, 10<sup>2.6</sup> 및 10<sup>4.4</sup> μg/ml 정도로 나타나 항원성이 약 10<sup>2.2</sup>~10<sup>4.0</sup>배 감소되었으며, OUP는 항원성이 매우 미약하여 대부분 제거되었음을 알 수 있었다(Fig. 1D).

각 효소처리군내에서 pepsin 전처리는 대체로 항원성을 더욱 감소시키는 것으로 나타났으나, 열변성의 전처리에 의한 효과는 일정하게 나타나지 않았다. 효소처리군별로 항원성이 가장 낮게 나타난 WPH는 trypsin에 의한 가수분해물군이었다. 또한, 전보<sup>(15)</sup>의 평균분자량,

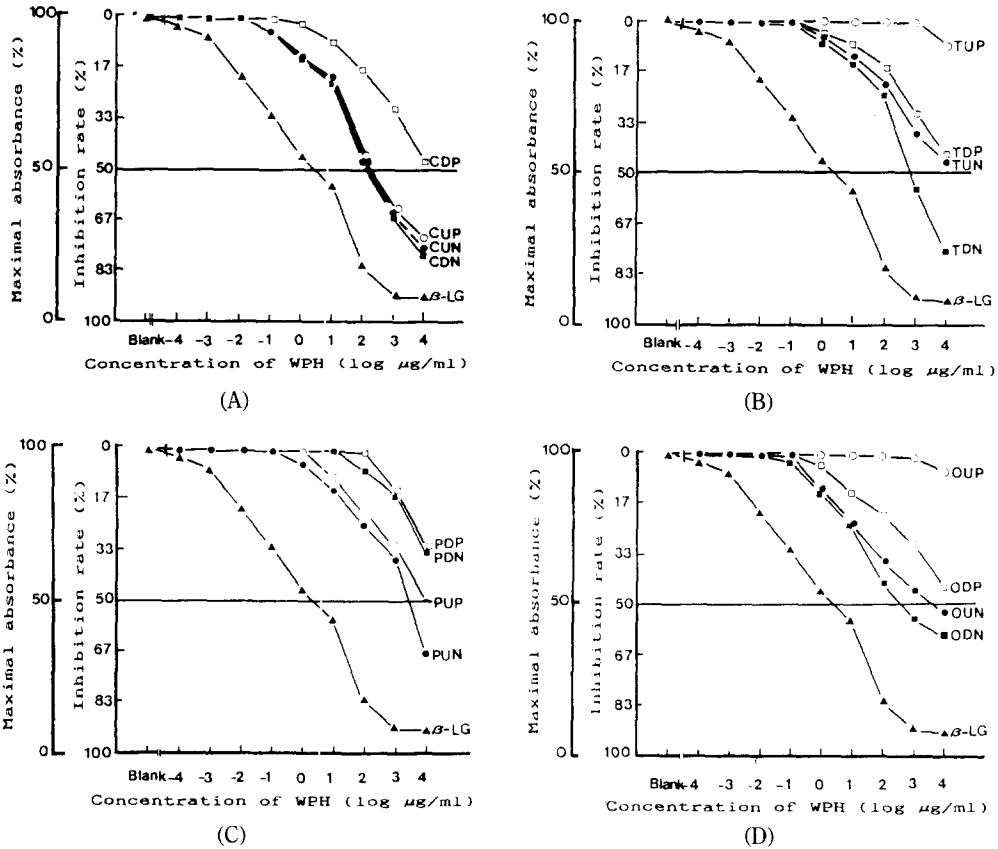


Fig. 1. Inhibition analyses of binding between rabbit anti β-LG antiserum and whey protein hydrolysates(WPH) by treatment of chymotrypsin (1A), trypsin (1B), pancreatin (1C), or *Asp. oryzae* protease(1D)

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

가수분해도(DH) 및 SDS-PAGE결과에서 분해의 정도가 가장 적게 나타난 chymotrypsin처리군은 그 항원성이 가장 높게 나타났다. 그러나 WPH의 monovalent항원성과 분해의 정도가 반드시 일치하지는 않았다.

**Polyvalent 항원성**

WPH중 β-LG유래 가수분해물의 polyvalent항원성을 guinea pig를 이용한 PCA test로 측정시 나타난 대표적인 청색반점을 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2A와 2B는 항원으로서 WPI 및 β-LG를 각각 사용한 경우이며, 2C와 2D는 chymotrypsin가수분해물중 polyvalent항원성이 가장 높게, 그리고 가장 낮게 나타난 CDN 및 CUP의 경우이다. Fig. 2E와 2F는 *Asp. oryzae*효소에 의한 가수분해물중 그 항원성이 가장 높게, 그리고 가장 낮게 나타난 ODP 및 OUN의 경우이다. Table 1에 PCA test결과를 종합하였다.

PCA test에서 토끼 항β-LG항혈청에 대한 WPI 및 β-LG는 1/640까지 희석한 항혈청처리에서 양성으로 나타

났다. WPH의 경우는 대체로 그보다는 낮은 항혈청의 희석배율에서 양성을 나타내어 항원성의 감소를 알 수 있으나, 전보<sup>(16)</sup>의 항α-LA항혈청을 사용한 경우에는 달리 여전히 높은 polyvalent항원성을 나타내었다.

Chymotrypsin 가수분해물에서는 pepsin전처리에 의해 polyvalent항원성이 감소되는 경향을 보였으며 CUP에서는 효소처리하지 않은 WPI에 비하여 그 항원성이 32배 감소하였고 CDP는 2배 감소하였으나 CUN과 CDN은 WPI와 같거나 약간 증가한 것으로 나타났다. Trypsin가수분해물에서는 WPI에 비하여 TUN과 TUP가 8배의 항원성저하를 보였으며 TDN은 16배 그리고 TDP는 4배의 항원성감소를 나타내었다.

Pancreatin가수분해물은 모두 WPI에 대해 2배의 항원성 저하효과가 나타났다. *Asp. oryzae*유래 단백질분해 효소에 의한 가수분해물중 ODN과 ODP는 WPI에 비하여 8배 항원성이 낮아졌으며 OUP는 16배의 항원성 저하 효과를 나타내었다. 그러나 OUN은 128배 이상 항원성이 감소되었거나 거의 제거된 것으로 나타났다.

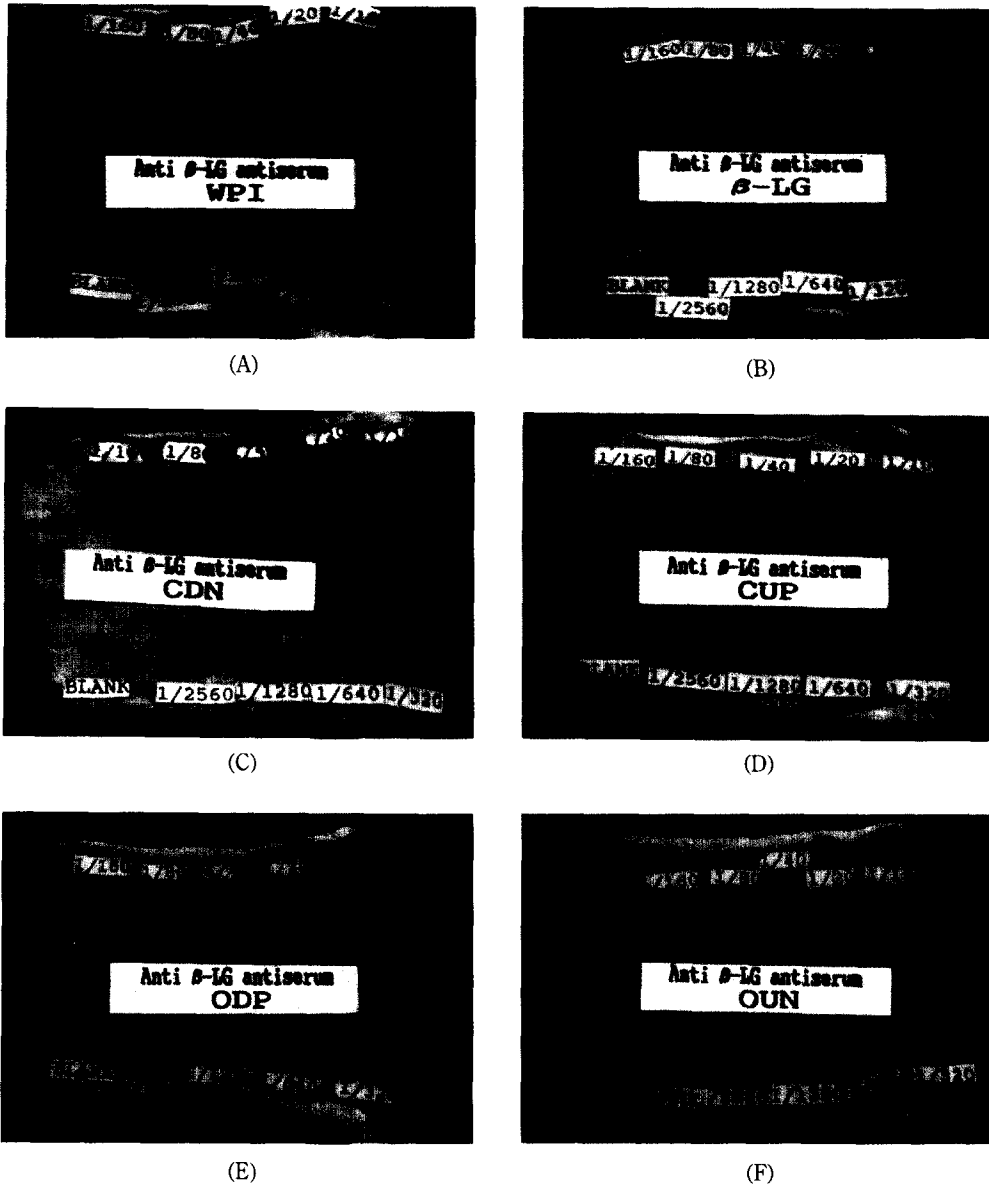


Fig. 2. Typical profiles of PCA tests of whey protein hydrolysates with rabbit anti  $\beta$ -LG antiserum

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. CUP, CDN, OUN, and ODP are same as shown in Fig. 1.

전체적으로 열변성이나 pepsin의 전처리에 의한 항원성 감소효과는 일정하게 나타나지 않았다. 효소처리군 별로 항원성이 대체로 낮게 나타난 WPH는 *Asp. oryzae* 유래 효소 및 trypsin에 의한 가수분해물군이었으며 pancreatin이나 chymotrypsin 처리군은 CUP의 경우를 제외하면 비교적 높게 나타났다. 또한 전보<sup>(15)</sup>의 결과에서 pancreatin 가수분해물의 경우 가수분해도(DH)가 높고 trypsin 가수분해물의 경우 DH가 낮았음에도 불구하고

polyvalent 항원성은 그 반대로 나타나는 등, DH와  $\beta$ -LG 유래의 polyvalent 항원성은 일치하지 않았다.

### 고 찰

WPH의 monovalent 항원성

Asselin 등<sup>(10,11)</sup>은 우유알레르기 유아의 혈청 IgE를 직접 이용한 radioallergosorbent test(RAST) 저해실험에서,

**Table 1. Antigenicity of whey protein hydrolysates (WPH) to rabbit anti  $\beta$ -lactoglobulin antiserum on guinea pig PCA**

| WPH challenged <sup>1)</sup> | 1/df <sup>2)</sup> | WPH challenged <sup>1)</sup> | 1/df <sup>2)</sup> |
|------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|
| CUN                          | 640                | PUN                          | 320                |
| CUP                          | 20                 | PUP                          | 320                |
| CDN                          | 1,280              | PDN                          | 320                |
| CDP                          | 320                | PDP                          | 320                |
| TUN                          | 80                 | OUN                          | - <sup>3)</sup>    |
| TUP                          | 80                 | OUP                          | 40                 |
| TDN                          | 40                 | ODN                          | 80                 |
| TDP                          | 60                 | ODP                          | 80                 |
| WPI                          | 640                | $\beta$ -LG                  | 640                |

<sup>1)</sup>Whey protein hydrolysates are same as shown in Fig. 1.  
<sup>2)</sup>Data are reciprocals of limiting dilution factor of antiserum showing positive PCA result. The reaction with blueing of more than 5 mm in a diameter was regarded as a positive.

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

chymotrypsin, trypsin, pepsin 및 pancreatin을 개별 또는 조합처리하여 얻은 WPH중 주요항원인  $\alpha$ -LA와  $\beta$ -LG유래의 항원성은 가수분해도가 높아짐에 따라 대체로 낮아지지만 완전히 제거되지 않고, 최저 24.9% 및 11.1%의 항원성<sup>(11)</sup>이 각각 잔존하는 것으로 보고하였다. 여기서 그들은 잔존항원성을 IgE가 고상화된  $\alpha$ -LA나  $\beta$ -LG와 결합시, 그 결합을 저해하는 WPH(10  $\mu$ g/ml의 일 정농도)의 정도로 나타내었다.

본 연구에서는  $\alpha$ -LA나  $\beta$ -LG의 결합을 50% 저해하는 WPH농도의 비율차이로 항원성을 나타내었고, 사용한 항체도 다르기 때문에 양자간에 그 결과를 직접 비교 하기는 곤란하다. 하지만 전보<sup>(11)</sup>와 본보에서 WPH중  $\alpha$ -LA 및  $\beta$ -LG유래의 monovalent항원성을 그들의 잔존 항원성 표시방식으로 나타내면 최저 0%로 각각 나타나, 본 연구에서의 열변성이나 pepsin처리에 의한 효소처 리는 항원성감소에 보다 효과적임을 알 수 있다.

본 일련의 연구에서 cELISA에 의한 monovalent항원 성을 검토할 때, 사용한 항혈청에 따라 개개의 WPH는  $\alpha$ -LA나  $\beta$ -LG, 또는 WPI전체 유래의 항원성의 감소정 도가 일정하지 않았다. 즉, 효소처리군별로 세 항혈청에 대한 상대적인 반응이 일정하게 높거나 낮게 나타나지 않고 있으며 처리군내에서도 마찬가지로의 경향을 나타내 었다. 이는 효소의 특이성 등, 각 처리조건에 따라서 최종적으로 WPI중 여러 구성단백질의 가수분해 부위나 정도, 또는 열변성에 의한 구조변화가 각기 달라 항원 결정기(antigenic determinant)의 잔존율이 다르게 나타 나기 때문으로 생각된다.

**Polyvalent 항원성의 중요성**

유청단백질의 *in vitro* 가수분해에 의한 항원성 변화에 대해서 Pahud 등<sup>(18)</sup>은 solid phase RIA에 의하여 tryp-

sin으로 60분간 처리한 탈염유청단백질 가수분해물중  $\beta$ -LG유래의 항원성을 상대적적인  $\beta$ -LG의 양으로 나타내었 는데,  $\beta$ -LG의 항원결정기는 1시간 가수분해후 대부분 분해되지만 소량(0.34%)의 monovalent antigen이 잔존 한다고 하였다. 그러나 우유나 유청단백질, 또는 trypsin가수분해물을 guinea pig에 경구투여하여 감작시킨 다음 이 가수분해물의 polyvalent항원성을 전신과민반응 및 PCA로 시험한 결과에서는 전혀 양성반응을 나타내지 않았다. 이러한 결과를 바탕으로 그들은 RIA시험에서 1/1,000정도로 monovalent항원성이 저하되면 경구감작시 킨 guinea pig의 PCA시험에서 polyvalent항원성이 제거 되는 데 충분하다고 보고하였다.

또한, Brocklehurst<sup>(19)</sup>는 한 개의 항원결정기를 가지고 있는 항원 단편은 PCA에서는 검출되지 않았다고 보고 하였다. Stanworth<sup>(20)</sup>는, 과민반응(hypersensitivity, allergy)중 제1형은 하나의 항원(또는, 항원조각)이 둘 이상의 IgE항체분자와 결합하고 이것이 mast cell표면의 IgE receptor를 통하여 mast cell과 결합하기 때문이므로, 제1 형의 즉시형 알레르기를 유발하려면 항원분자내에 적절 하게 위치하는 둘 이상의 항원결정기가 존재하여야 한 다고 보고하였다. 대부분의 식품알레르기를 유발하는 알레르기의 유형은 주로 IgE가 관여하는 제1형으로 보 고되고 있으므로<sup>(21,22)</sup>, 위의 보고들은 생체내에서 식품알 레르기를 유발하는 항원의 성질에는 monovalent항원성 보다 polyvalent항원성이 보다 중요함을 보여주고 있다.

**항원성과 분자량**

본 연구의 PCA시험결과 OUN을 제외한 모든 WPH 에서  $\beta$ -LG유래의 polyvalent항원성이 정도의 차이는 있 으나 여전히 잔존하였다. 이는 앞에서 인용한 바 있는 Pahud 등<sup>(18)</sup>의 실험결과와는 차이를 보였다. 그 원인은 아마도 사용한 항체의 차이에서 기인하는 바가 큰 것으로 생각된다. 즉, 본 연구에서는  $\beta$ -LG를 adjuvant와 함께 면역함으로써 얻은 상대적으로 높은 역가(titer)의 항- $\beta$ -LG항혈청을 PCA시험에 사용하였으나, 그들은 15일간 WPH의 경구투여로 guinea pig를 감작시켜 얻은 비교적 낮은 항체가의 항혈청을 사용하였다. 또 반응에 관여된 항체의 class가 각기 다른데, 전자는 항혈청중의 IgG가, 후자는 IgE항체가 관여하고 있어 서로 다를지 모르는 이들 항체의 특이성의 차이가 결과에 영향을 미쳤을 가능성이 있다.

한편, Jost 등<sup>(14)</sup>은 guinea-pig를 감작시키는 능력이 없다고 해서 완전히 항원성이 존재하지 않는 것을 의 미하지는 않지만 guinea pig에 경구투여를 통한 항원성 검사는 열변성이나 효소처리에 의한 단백질의 항원성변 화를 비교하는 *in vivo* 실험으로 적합하다고 하였다.

그러나, 일반적으로 polyvalent항원성은 본 연구에서와 같이 인위적인 면역으로 얻은 항혈청을 이용한 PCA에 의하여 많이 검출되고 있는데, 비교적 감도가 높은 이 실험으로 얻어진 대부분의 결과로부터, 가수분해에 의

하여 유청단백질의 항원성이 완전히 제거되기는 어려운 것으로 보고되고 있다. 그래서, Kurisaki 등<sup>(23)</sup>은 trypsin, chymotrypsin, 또는 pepsin으로  $\beta$ -LG를 가수분해한 후 존재하는  $\beta$ -LG나  $\beta$ -LG의 큰 조각을 gel filtration으로 제거하면 polyvalent 항원성이 나타나지 않았다고 하였다.

대谷<sup>(24)</sup>은  $\beta$ -LG를 pepsin, trypsin, 또는 chymotrypsin으로 24시간 가수분해하여 생성된 분자량 10 kDa 이하의 폴리펩타이드는 competitive inhibition PCA시험에서 항원성을 거의 나타내지 않았다고 하였다. 그런가하면, Monti 등<sup>(25)</sup>은 guinea pig의 PCA시험에서 trypsin에 의한 가수분해물로부터 분리한 분자량 2.7 kDa의 disulfide bridged fragment를 최대 2 mg/ml을 투여해도 음성반응을 나타냈지만 10  $\mu$ g/ml씩 연속적으로 투여하면 양성반응을 나타낸다고 하였다. 통상 항체와 결합할 수 있는 펩타이드(B세포 항원결정기)의 최소크기는 아미노산 5~6개이며, T세포의 T cell receptor와 반응가능한 펩타이드(T세포 항원결정기)의 최소크기는 아미노산 10개가량으로 보고되고 있다<sup>(26,27)</sup>.

이점을 감안하면 이론적으로 알레르기환자에서 알레르기를 유발할 수 있는 펩타이드는 그 크기가 최소한 아미노산 약 10개 이상의 것으로서, (1) 동일분자내에 둘이상의 특이항체와 결합이 가능하거나 (2) T세포와 반응가능한 것으로 말할 수 있다. 전자는 제1형과 항원항체복합체의 형성에 의한 제3형의 면역복합반응형 알레르기의 필요조건이고, 후자는 지연형T세포에 의한 제4형의 지연형 알레르기의 필요조건이라고 할 수 있다. 따라서 보통의 가수분해만으로 펩타이드의 allergenicity (넓은 의미로 보면, 면역원성)를 완전히 제거하는 것은 무리라고 생각할 수 있다.

그러나, 식품알레르기의 증상의 정도는 환자에 따라 차이가 심하고, 혈중 IgE의 존재와 알레르기는 반드시 일치하지 않는 경우도 있으며<sup>(21)</sup>, 제1형이외에 제3형이나 제4형의 알레르기가 관여할 수도 있는 등 단순하지 않으므로<sup>(21,22,28)</sup>, 환자에 따라 WPH를 섭취시켰을 때 WPH의 특성이나 섭취량 및 횟수에 따라 알레르기의 유발여부가 다르게 나타날 수 있다. 따라서, 우유 알레르기환자용 WPH의 제조를 위하여는 단백질항원의 분자크기를 10 kDa 또는 그보다 훨씬 작게 조절함으로써 가능하다고 생각한다.

실제로 최근 Siemensma 등<sup>(29)</sup>은 효소처리로 얻은 WPH를 ultrafiltration 등으로 처리하여, 유리 아미노산의 비율을 20 mol% 이하로, di- 및 tri-peptide의 mol비율을 50% 가량으로, 펩타이드의 최대크기를 아미노산 10~15 가량으로 조절함으로써, 흡수가 용이하여 영양성이 우수하고 쓴맛이 배제된 저알레르기성 infant formula의 소재를 소개하고 있다.

본 일련의 연구에서, WPH를 가수분해하면  $\alpha$ -LA유래의 polyvalent 항원성은 쉽게 제거되나<sup>(16)</sup>,  $\beta$ -LG유래의 polyvalent 항원성은 대부분의 경우 여전히 잔존하였다. 또한, 유청단백질중 bovine serum albumin(BSA)나 immuno-

globulin(Ig) 등의 단백질은 allergenicity가 비교적 약한 것으로 알려져 있으나 이들에서 유래한 항원성이 문제가 될 수도 있으므로<sup>(18)</sup>, gel filtration이나 ultrafiltration으로 일정한 크기이상의 펩타이드나 미분해 단백질을 WPH로부터 제거하면 유청단백질유래의 allergenicity는 상당히, 또는 완전히 제거할 수 있으리라 생각한다.

#### 항원성과 항원결정기

본 실험에서 나타난 유청단백질 가수분해물의 polyvalent 항원성은 전처리 및 처리한 효소에 따라 펩타이드의 항원성은 다르게 나타났으며, DH나 펩타이드의 분자량 분포도 항원성과 그다지 상관관계가 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 처리에 따른 가수분해 효소의 특이성과 분해조건, 그리고 열변성에 의한 유청단백질의 구조변화의 차이 등에 의한 것으로, 최종적으로 제거되지 않은 항원결정기의 존재 양상이나 정도에 기인하였다고 추측된다.

특히 OUN의 경우 cELISA시험에서는  $\beta$ -LG유래의 항원성이 여전히 존재하였고 전보<sup>(15)</sup>의 high performance size exclusion chromatography(HPSEC) 결과에서 분자량이 5 kDa 이상의 펩타이드가 30% 가량 존재하는 것으로 보아 polyvalent 항원성도 상당히 남아 있을 것으로 추측되나, guinea pig를 이용한 PCA시험에서는 polyvalent 항원성이 거의 나타나지 않았다. 이는 아마도 열변성이나 pepsin 전처리없이 WPI를 *Asp. oryzae* 유래의 효소로 가수분해하였을 때 분해효율이 아주 높지는 않았으나  $\beta$ -LG상의 항원결정기가 보다 효과적으로 파괴되어 polyvalent 항원성이 제거되었기 때문으로 추측된다. 또 이는 이 효소가 광범위 알카리성 단백질분해효소라는 사실에서 기인하는 것으로 보여진다. 따라서, OUN은 우유 알레르기의 주요 allergen인  $\beta$ -LG유래의 polyvalent 항원성이 효과적으로 제거됨으로써, 저알레르기성 infant formula의 제조에 이용될 수 있으리라 생각한다.

그러나, 토끼 항혈청을 이용한 PCA는 주로 IgG항체에 의한 피부반응(local anaphylaxis)을 본 것이므로, OUN을 비롯한 WPH나 난분해성 고분자를 제거한 WPH를 우유알레르기 환자에게 섭취시켰을 때 이것들이 우유알레르기의 발증을 억제하는 예방효과가 있는지에 대하여는 추가로 임상실험이 필요하다고 생각한다.

#### 요 약

Chymotrypsin, trypsin, pancreatin, 그리고 *Aspergillus oryzae* 유래 단백질분해효소의 *in vitro* 처리에 의하여 유청단백질(WPI)의 가수분해물(WPH)중  $\beta$ -LG유래의 항원성변화를 조사하기 위하여 토끼 항 $\beta$ -LG항혈청을 이용한 competitive inhibition ELISA(cELISA)와 heterologous PCA를 실시하였다. cELISA에 의하여 WPH의 monovalent 항원성을 분석한 결과, 전체적으로  $\beta$ -LG유래의

monovalent 항원성은 효소처리에 의하여  $10^{-1.7} \sim 10^{-4.1}$  배 또는 그 이하로 저하되었으며, 특히 pepsin 전처리후 *Asp. oryzae* 유래의 효소로 가수분해한 경우(OUP)의 항원성은 거의 상실되었다.

Guinea pig를 이용한 PCA test에 의하여  $\beta$ -LG 유래의 polyvalent 항원성을 분석한 결과, WPH의 항원성은 1/2 ~ 1/128 또는 그 이하로 저하되었다. 특히, WPH 중에서 열변성이나 pepsin의 전처리가 없이 *Asp. oryzae* 유래의 효소로 가수분해한 경우(OUN), 가수분해도(DH)가 그다지 높지 않고 monovalent 항원성도 여전히 잔존하였음에도 불구하고( $10^{-3.2}$  배로 저하) 알레르기의 발증과 밀접한 관련이 있는 polyvalent 항원성은 거의 상실되었다. 이는 OUN의 분해효율이 아주 높지는 않으나  $\beta$ -LG 상의 항원결정기가 효과적으로 파괴되어, polyvalent 항원성이 제거되었기 때문으로 추측된다. 이 결과는, *Asp. oryzae* 유래의 효소를 WPI에 처리하면 우유 알레르기의 주요 원인물질인  $\beta$ -LG의 polyvalent 항원성이 제거됨으로써 저알레르기성 infant formula용 WPH가 제조될 수 있음을 시사하고 있다.

## 문 헌

- Taylor, S.V., Lemanske, R.F., Bush, R.K. and Busse, W.W.: Food allergen: Structure and immunologic properties. *Ann. Allergy*, **59**(2), 93(1987)
- Papiz, M.Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E.E., North, A.C.T., Findlay, J.B.C., Sivaprasadarao, R., Jones, T.A., Newcomer, M.E. and Kraulis, P.J.: The structure of  $\beta$ -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol binding protein. *Nature*, **324**, 383(1986)
- Ratner, B., Dworetzky, M., Oguri, S. and Aschheim, L.: Studies on the allergenicity of cow's milk. I. The allergenicity of  $\alpha$ -casein,  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin. *Pediatr.*, **22**, 449(1958)
- Parish, W.E.: Detection of reagenic and short term sensitizing anaphylactic or anaphylactoid antibodies to milk in sera of allergic and normal persons. *Clin. Allergy*, **1**, 369(1971)
- Kletter, B., Grey, I., Freier, S. and Davis, M.: IgE antibodies to milk protein. *Clin. Allergy*, **1**, 249(1971)
- Davidson, M., Burnstine, R.C., Kugler, M.M. and Bauer, C.H.: Malabsorption defect induced by ingestion of beta lactoglobulin. *J. Pediatr.*, **66**, 545(1965)
- 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)
- Kuitunen, P., Visakorpi, J.K., Savilahti, E. and Pelkonen, P.: Malabsorption syndrome with cow's milk intolerance. Clinical findings and course in 54 cases. *Arch. Dis. Child.*, **50**, 351(1975)
- Lebenthal, E., Laor, J., and Lewitus, L.: Gastrointestinal protein loss in allergy to cow's milk  $\beta$ -lactoglobulin. *Israel J. Med. Sci.*, **6**, 506(1970)
- Asselin, J., Aniot, J., Gauthier, S.F., Maurad, W. and Hebert, J.: Immunogenicity and allergenicity of whey protein hydrolysates. *J. Food Sci.*, **53**, 1208(1988)
- Asselin, J., Hebert, J. and Amiot, J.: Effect of in vitro proteolysis on the allergenicity of major whey protein. *J. Food Sci.*, **54**, 1037(1989)
- Huang, Q., Coleman, J.W., and Stanworth, D.R.: Investigation of the allergenicity of  $\beta$ -lactoglobulin and its cleavage fragments. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **78**, 337(1985)
- Okamoto, M.O., Hayashi, R., Enomoto, A., Kamino-gawa, S., and Yamauchi, K.: High-pressure proteolytic digestion of food selective elimination of  $\beta$ -lactoglobulin in bovine milk whey concentrate. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1253(1991)
- Jost, R., Monti, J.C. and Pahud, J.J.: Whey protein allergenicity and its reduction by technological means. *Food Technol.*, **41**(10), 118(1987)
- 하월규, 전석락, 김정완, 이수원, 이재영, 손동화: 효소 가수분해에 의한 유청단백질의 항원성 저하. 한국식품과학회지, **26**, 74(1994)
- 하월규, 전석락, 김정완, 이수원, 이재영, 손동화: 토끼 항 $\alpha$ -Lactalbumin 항혈청에 대한 유청단백질 가수분해물의 항원성. 한국식품과학회지, **26**, 343(1994)
- 松橋直:過敏症反應, 續生化學實驗講座, Vol.5:免疫生化學研究法(東京化學同人編). 東京. p271(1986)
- Pahud, J.J., Monti, J.C. and Jost, R.: Allergenicity of whey protein: Its modification by tryptic *in vitro* hydrolysis of the protein. *J. Gastroenterol. Nutr.*, **4**, 408(1985)
- Brocklehurst, W.E.: Passive cutaneous anaphylaxis. *Handbook of Experimental Immunology*, (Weir, B.M. ed), Vol.1. Blackwell Scientific Publication, Inc., Oxford, p21-1(1973)
- Stanworth, D.R.: Immediate hypersensitivity: the molecular basis allergic reaction. *Front. Biol.* Vol.28, Elsevier/North. Amsterdam, Holland(1973)
- Taylor, L.S.: Food allergies and sensitivities. *Food Technol.*, **39**(9), 65(1985)
- 中村良:食品蛋白質とアレルギー. 食品と開発, **28**(3), 16(1993)
- Kurisaki, J., Nakamura, S., Kaminogawa, S., Yamauchi, K., Watanabe, S., Hotta, K. and Hattori, M.: Antigenicity of modified  $\beta$ -lactoglobulin examined by three different assays. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1733(1975)
- 大谷元:プロテアゼ 처리  $\beta$ -락토글로블린의天然抗原性. 日畜會誌, **52**(1), 47(1981)
- Monti, J.C., Jost, R., Pahud, J.J. and Hughes, G.: Antigenic sites in bovine beta-lactoglobulin. *Abstr. Experientia*, **42**, 670(1986)
- 孫東和:  $\alpha$ -<sub>s1</sub>-카ゼ인およびその部分ペプチド의抗體生産とエピトプ構造について. 東京大學校, 博士學位論文(1989)
- Adda, G. and Skehel, J.J.: Are peptides good antigens? *Nature*, **316**, 764(1985)
- Barrett, K.E. and Metcalfe, D.D.: Immunologic mechanisms in food allergy. In *Food allergy*. (Chiamonte, L.T., et al. eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, p23(1988)
- Siemensma, A.D., Weijer, W.J., and Bak, H.J.: The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae. *Trends Food Sci. Technol.*, **4**, 16(1993)