

## 새우(*Penaeus aztecus*)의 알러지 억제를 위한 감마선 조사

김재훈 · 이주운 · 육홍선 · 김정옥\* · 변명우<sup>†</sup>

한국원자력연구소 방사선식품 · 생명공학기술개발팀

\*세종대학교 가정학과

### Gamma Irradiation for the Inhibition of Shrimp (*Penaeus aztecus*) Allergy

Jae-Hun Kim, Ju-Woon Lee, Hong-Sun Yook, Jung-Ok Kim\* and Myung-Woo Byun<sup>†</sup>

Team for Radiation Food Science and Biotechnology,

Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon 305-600, Korea

\*Dept. of Home Economics, King Sejong University, Seoul 143-747, Korea

#### Abstract

Food irradiation technology was conducted to reduce shrimp allergy. The experiment was designated in 3 portions as follows; A, the irradiation of raw shrimp; B the irradiation of shrimp and then cooking; and C, cooking the shrimp and then irradiating. Gamma irradiation was done with doses of 1, 3, 5, 7, 10 kGy. A shrimp sarcoplasmic protein solution (SSPS) and a myofibrillar protein solution (SMPS) were prepared from A portion. Cooked shrimp protein solutions were also prepared from B and C portions. The binding abilities of the shrimp allergic patients' IgE and mouse monoclonal Ab 4.9.5 (mAb 4.9.5), produced to the shrimp heat-stable protein, to each sample solution were determined by ELISA. Binding abilities of patients' IgE and mAb 4.9.5 to irradiated shrimp fractions were dose-dependently reduced. The cooking treatment after irradiation was more effective than the irradiation treatment after cooking in the reduction of the binding abilities of IgE and IgG. SDS-PAGE was performed to compare irradiated shrimp proteins with non-irradiated shrimp proteins. SDS-PAGE showed that no bands were changed by gamma irradiation. The results indicated that food irradiation with an adequate dose can be reduce allergenicity of shrimp.

Key words: gamma irradiation, shrimp allergy

#### 서 론

새우는 우유나 계란에 비해 알러지 유발 빈도가 다소 낮은 식품이지만, 다른 해양 갑각류 식품(게, 가재 등)과 함께 알러지에 의해 발현되는 과민반응이 매우 민감하며, 성인에게서도 잘 발생하는 식품 알러지이다(1). 새우의 주요 알러젠은 tropomyosin으로, 열에 매우 안정하여 가열 후에도 그 항원성을 그대로 유지하는 열안정성 단백질(heat-stable protein, HSP)로 보고되었다(2,3). 식품 알러지는 IgE를 매개로 하는 전신적인 과민반응을 유도하여 식량자원의 효율적인 이용에 장애가 될 뿐만 아니라 환자에게는 고통과 대상식품의 기피를 야기하여 궁극적으로 바람직하지 않은 결과를 나타낸다(4,5). 식품 알러지를 억제하기 위해 효소적 가수분해법(6,7)이나 유전자 변형 기법을 이용한 방법(8)이 이용되고 있으나 광범위한 식품에 폭넓게 이용되지 못하는 실정이다. 특히 새우와 같은 종류의 식품은 위에서 소개한 기술을 이용하기는 거의 불가능하다. 전보(9)에서 보고한 바와 같이 새우 알러지를

억제할 방법으로 방사선 조사기술의 이용을 평가한 결과 새우의 HSP는 감마선에 대해 감수성이 매우 높은 것을 확인할 수 있었다.

본 연구는 방사선 조사기술을 이용하여 새우자체와 가열처리한 새우의 알러지성을 감소시키고 적정 조사선량의 탐색을 위해 실시하였다

#### 재료 및 방법

##### 새우 알러지 환자 혈청 및 단클론 항체

전보(9)와 같은 방법으로 환자의 혈청과 Jeoung 등(10)의 연구에서 사용된 mouse 단클론 항체(mAb 4.9.5)를 분양 받아 사용하였다. 환자의 혈청은 새우 알러지 병력이 있고 새우 allergen 추출물과 주요 새우 allergen인 Pen a 1에 대한 prick skin test에 양성인 20명의 환자에게 삼은 새우를 급여하여 과민반응을 유도한 후 즉시 혈액을 채취하고 혈청을 분리하여 실험에 사용하였다. 또한 비교구는 새우 알러지가 없는 5명으로부터 혈액을 채취하여

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

그 혈청을 사용하였다.

### 시료의 처리

지역 수산시장으로부터 냉장 갈색새우(*Penaeus aztecus*)를 구입하여 실험에 사용하였다. 처리 조건에 따른 알러지 억제 효과를 비교하기 위해 실험구를 감마선 조사구(A), 감마선 조사후 가열처리구(B), 가열처리 후 감마선 조사구(C)로 구분하였다.

A, B, C의 단백질 추출은 Lee 등(11)의 방법을 이용하였다. A는 껍질을 벗기고 머리 부위를 제거한 시료 20 g에 PBS 완충액(0.01 M phosphate buffer, 0.15 M NaCl, pH 7.2)을 200 mL 가하여 균질기(Diax 900, Heidolph, Germany)로 균질화하였다. 균질물을 4°C에서 하룻밤동안 교반하고 원심분리(10,000 rpm, 30 min)한 후 상등액을 여과하여 여액을 새우의 근혈장 단백질 용액(shrimp sarcoplasmic protein solution, SSPS)으로 사용하였다. 침전물에 다시 0.6 M NaCl을 함유한 PB 완충액(0.01 M phosphate buffer, pH 7.2) 200 mL을 가하고 위와 같은 방법으로 단백질을 추출하여 새우의 근섬유 단백질 용액(shrimp myofibrillar protein solution, SMPS)으로 사용하였다.

B와 C는 새우 20 g을 각각 취한 후 0.6 M NaCl을 함유한 PB 완충액 200 mL을 가하고 위와 같은 방법으로 단백질 용액을 준비하였다. B의 단백질 용액을 B-ICSP(irradiated and cooked shrimp protein)로 C의 단백질 용액을 C-CISP(cooked and irradiated shrimp protein)로 명명하였다.

전처리에서 얻어진 단백질 용액들의 단백질 농도를 bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)를 사용하여 측정하고, 단백질의 농도를 1.0 mg/mL로 보정한 후 4°C에 보관하였다.

### 감마선 조사

감마선 조사는 Co-60을 선원으로 하여 시간당 10 kGy의 선량율로 시료가 1, 3, 5, 7, 10 kGy의 흡수선량을 받도록 조사하였으며, 흡수선량의 확인은 ceric/cerous dosimeter를 사용하였고, 흡수선량의 오차는 ±0.1 kGy였다. 이때 조사실의 온도는 10°C였다.

### 단백질 용액에 대한 항체의 반응성

환자 IgE와 mAb 4.9.5의 각 단백질 용액에 대한 항체 반응성은 새우 HSP를 항원으로 하는 competitive indirect ELISA(Ci-ELISA)를 사용하여 측정하였다. HSP를 basic coating buffer(0.1 M sodium carbonate, pH 9.6)를 사용하여 1.0 µg/mL의 농도로 희석한 후 polystyrene flat-bottom microtiter plates(Maxisorp, Nunc, Kamstrup, Denmark)에 100 µL를 첨가하여 4°C에서 하룻밤 동안 well에 고정시켰고, 1%의 gelatine 용액 120 µL를 첨가하여

blocking하였다. 일정하게 희석된 단백질 용액 또는 표준 HSP용액과 적절히 희석한 항체용액을 각각의 well에 50 µL 첨가하고 반응시킨 후 0.1 µg/mL로 희석한 2차 항체 mouse anti-human IgE/IgG에 horseradish peroxidase (HRP, Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, AL, USA)를 공액결합한 2차항체 용액(환자 IgE의 경우) 100 µL를 첨가하여 반응시킨 후, 0.04% o-phenylenediamine(OPD, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) 기질용액을 사용하여 발색을 유도하고 2.0 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액으로 반응을 종결시킨 후 492 nm로 고정된 ELISA Reader(CERES UV-900C, BIO-TEK Instruments Inc., NY, USA)에서 흡광도를 측정하여 microwell에 고정된 HSP와 항체의 반응정도를 구하여 HSP를 이용한 표준곡선에서 각 단백질 용액에 존재하는 HSP를 정량하였다. 각 단계별 반응 후 well을 0.05%(v/v) Tween 20을 함유한 PBS 완충액(PBST)으로 3회 세척하였고 coating을 제외한 모든 반응은 37°C에서 90분간 반응시켰다. mAb 4.9.5를 1차 항체로 사용하였을 때 2차 항체는 mouse anti-rabbit IgG-HRP를 사용하였다

### 전기영동

Laemmli(12)의 방법에 따라 감마선 조사된 새우로부터 추출한 SSPF와 SMPP에 대한 SDS-PAGE(5~15% gradient acrylamide gel)를 하여 새우 단백질의 전기영동적 분리 형태의 변화를 관찰하였다. 표준분자량 marker는 Pharmacia Biotech.(Uppsala, Sweden)로부터 구입하여 사용하였고, marker는 phosphorylase b(94 KD), albumin(67 KD), ovalbumin(43 KD), carbonic anhydrase(30 KD), trypsin inhibitor(20.1 KD) 및 α-lactalbumin(14.4 KD)이었다.

## 결과 및 고찰

### 감마선만 조사된 새우 추출액과 항체와의 결합력

환자 IgE는 갈색 새우로부터 추출한 SSPS와 SMPS 모두에서 알러젠을 인식하였고, 각 분획에 대한 IgE의 반응성은 감마선 조사선량이 증가할수록 감소되었다(Fig. 1). 10 kGy 조사구에 대한 환자 IgE의 결합력은 두 용액 모두 비조사구에 비해 30% 이하로 나타났다. 전보(9)의 결과에서 지적했듯이 HSP의 감마선 감수성과 감마선 조사된 새우 알러젠의 감마선 감수성의 비교는 임상적으로 매우 중요하다. 새우 근육에 대한 감마선 조사의 효과는 IgE 결합력이 선량에 의존하며 감소되는 것으로 나타났다. 흥미있는 것은 IgE-specific 알러젠이 두 용액에 모두 존재한다는 것이다. 본 연구에서 사용한 환자 IgE는 근섬유 단백질인 tropomyosin(13) 뿐만 아니라 수용성인 새우의 다른 알러젠도 인식하였다(1). 이 결과로 볼 때 감마선 조사에 의해 새우 근육에 존재하는 다른 알러젠의 구조도 변화된 것으로 추측할 수 있다. 한편, 이 결과는 새우

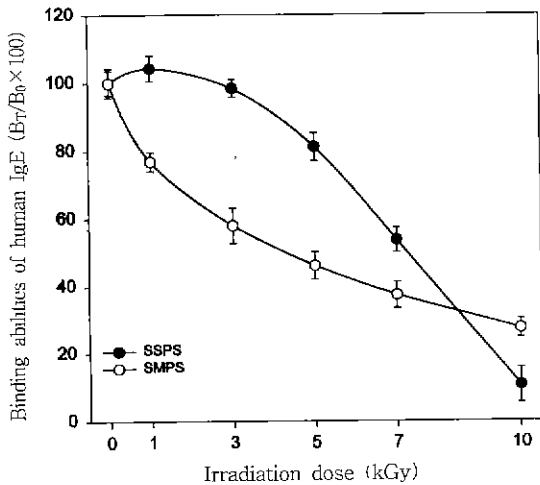


Fig. 1 Binding abilities of patients' IgE to shrimp sarco-plasmic protein solution (SSPS) and shrimp myofibrillar protein solution (SMPS) prepared from irradiated shrimp.

The binding ability was measured by competitive indirect ELISA. Br and B<sub>0</sub> indicate binding ability of irradiated shrimp and that of non-irradiated shrimp, respectively.

를 이용한 스낵, 라면류 등의 가공식품에도 알러진이 존재한다는 것을 나타내며, 새우 알러지의 적절한 저감화없이 제조된 식품에서 알러지가 유발된다는 의학계의 보고를 뒷받침한다. 새우 알러지를 효과적으로 억제하기 위해서는 10 kGy 이상의 감마선 조사선량이 요구된다. Thayer (14)는 10 kGy 정도의 선량으로 감마선 조사된 식품내 주요 영양소인 단백질과 지방은 영양학적 가치가 감소되지 않는다고 보고하였다. 또한 Yook의 보고(15)에서 쇠고기를 대상으로 감마선 조사의 영향에 대한 연구에서 영양학적 변화가 관찰되지 않았다. 또한, 최근의 국제 방사선 식품조사 자문위원회의 연구보고서는 10 kGy 이상의 선량으로 조사된 식품의 전전성 평가 결과 70 kGy 이하의 선량에서 조사된 어떠한 식품도 독성학적, 영양학적으로 안전하다는 것이 보고되었다(16).

mAb 495를 이용한 감마선 조사된 새우로부터 추출한 SSPS와 SMPS에 존재하는 HSP와의 반응성을 비교한 결과(Fig. 2), SSPS에서는 항원-항체 반응이 발견되지 않았으나, SMPS에서는 mAb 4.9.5와의 반응이 높게 나타났다. 항원-항체의 반응은 조사선량이 증가할수록 감소하는 것으로 나타나 감마선 조사에 의해 mouse의 특이 B 세포가 인식하는 HSP의 epitope이 파괴되는 것을 의미한다. 또한 이 결과는 감마선 조사된 새우를 검지할 수 있는 새로운 방법으로서 단클론 항체를 이용한 면역분석법의 이용 가능성을 시사한다(17).

감마선 조사후 가열처리한 새우에 대한 항체의 반응 감마선 조사후 가열처리하여 준비한 B-ICSP에 대한

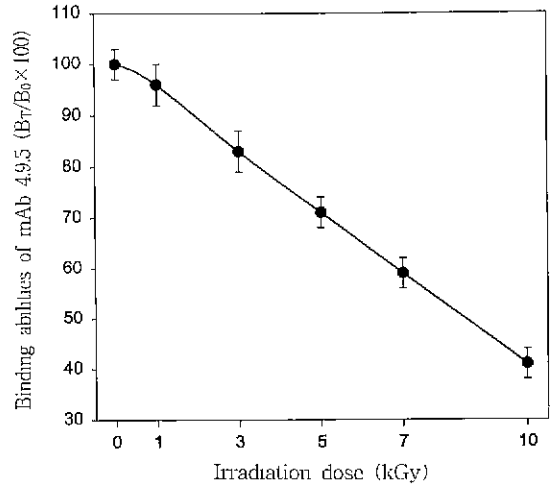


Fig. 2. Binding ability of mouse IgG (monoclonal mAb 4.9.5) to shrimp myofibrillar protein solution (SMPS) prepared from irradiated shrimp.

The binding ability was measured by competitive indirect ELISA. Br and B<sub>0</sub> indicate binding ability of irradiated shrimp and that of non-irradiated shrimp, respectively.

환자 IgE와 mAb 4.9.5의 항체 반응성은 조사선량이 증가할수록 감소되었다(Fig. 3). 새우 알러지는 원인 알러젠인 tropomyosin이 열에 매우 안정하기 때문에 가열 후에도 알러지성을 그대로 유지한다. 따라서 가공적인 측면에서 볼 때 감마선 조사 후 가열처리한 새우의 알러지성이 감소된다는 결과는 감마선 조사에 의해 HSP를 포함한 알러젠의 구조가 변화하고 가열처리에 의해 다시 복원되지 않는다는 것을 나타내며, 가열처리한 새우의 항원성 및 알

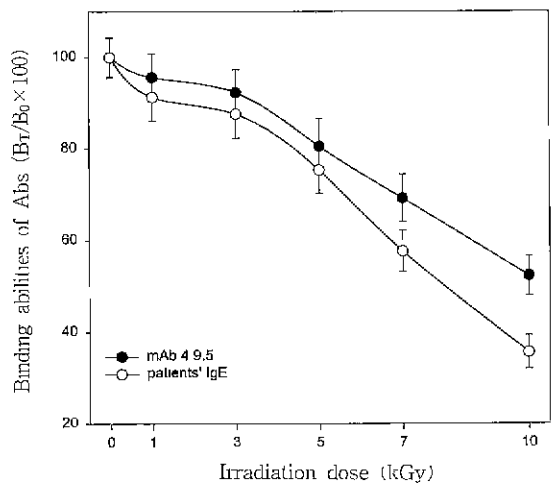


Fig. 3. Binding abilities of mouse IgG (monoclonal mAb 4.9.5) and patients' IgE to protein solution from irradiated and cooked shrimp.

The binding ability was measured by competitive indirect ELISA. Br and B<sub>0</sub> indicate binding ability of irradiated shrimp and that of non-irradiated shrimp, respectively.

러지성을 효과적으로 억제시키기 위해서는 10 kGy이상의 선량이 요구된다.

가열처리 후 감마선 조사한 새우에 대한 항체의 반응

B-ICSP와 같이 C-CISP에 대한 IgE와 mAb 4.9.5 항체의 반응은 감마선 조사선량이 증가할수록 감소되었으나, 결합력의 감소는 B-ICSP의 경우보다는 다소 적게 나타났다(Fig. 4). 이 결과는 새우 단백질 특히, HSP의 경우 감마선 조사 후 열처리 하였을 때 알러젠의 구조변화에 더 효과적임을 나타냈다. 방사선 조사가 단백질 등의 식품구성성분에 미치는 효과는 직접적인 효과와 방사선 조사시 수분이 이온화하여 생성된 활성 유리기에 의해 구성성분이 영향을 받는 간접적인 효과가 있는데, 식품에서 발견되는 변화는 대부분 간접적인 영향에 의한 것이다(18). 일반적으로 수분함량이 높을수록 구성성분에 영향을 미치는 효과가 더 크다(19). 본 실험에서 가열처리한 새우의 수분함량은 50%정도로 생새우의 수분함량(75~80%)보다 낮아 삶은 새우에 대한 감마선 조사가 항원의 변화를 더 적게 유도한 것은 수분함량이 낮았기 때문일 것으로 사료된다.

전기영동

감마선 조사된 새우로부터 추출한 SSPS와 SMPS의 전기영동 pattern은 감마선 조사에 의해 차이를 나타내지 않았다(Fig 5). 이 결과는 새우 자체에 대한 감마선 조사가 새우 단백질의 3차원적 구조변화를 일으킬 뿐, 구성단백질의 파괴나 절단 등을 일으키지 않는다는 다른 연구

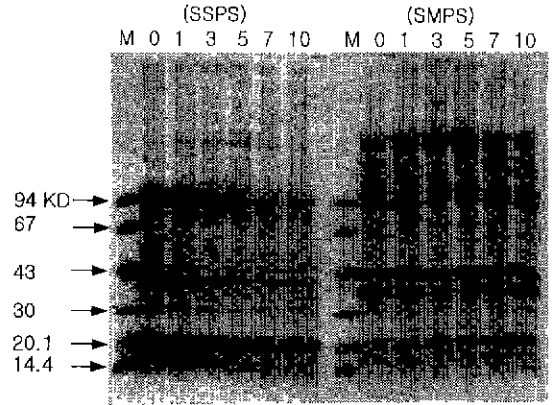


Fig. 5. Results of SDS-PAGE (5~15% gradient acrylamide) of shrimp sarcoplasmic protein solution (SSPS) and shrimp myofibrillar protein solution (SMPS) prepared from irradiated shrimp. M and numerals indicate molecular weight standard and the irradiation doses (kGy), respectively.

보고들(11,15,19,20)과 같은 것으로 적정선량에서의 감마선 조사가 구성성분의 큰 변화없이 항체가 인식하는 단백질의 표면 epitope들만을 변화시킨다는 것을 나타낸다.

결론적으로, 새우 알러지 억제를 위한 감마선 조사기술의 사용은 새우의 가공방법과 특성에 맞게 적절한 방사선 조사선량과 가공 처리에 의해 바람직한 효과를 얻을 수 있다. 현재 본 연구의 결과와 기타 연구자료(16)를 기초로 하여 10 kGy 이상의 고선량에서 새우 알러지 억제 효과와 동물 임상시험 및 이 선량에서 조사된 새우의 독성학적, 영양학적 동물실험을 진행 중에 있다.

요 약

감마선 조사기술을 이용하여 새우 알러지를 감소시키기 위해 본 연구를 실시하였다. 감마선 조사구(A), 감마선 조사후 가열처리구(B), 가열처리 후 감마선 조사구(C)로 실험구를 설정하고 1, 3, 5, 7, 10 kGy의 감마선을 조사하여 실험에 사용하였다. A 처리구로부터 새우의 근철장 단백질 용액과 근섬유 단백질 용액을 준비하였고, B와 C 처리구에서도 각각의 단백질 용액을 준비하였다. 각 단백질 용액에 대한 환자 IgE와 mAb 4.9.5의 결합력을 ELISA로 조사하였다. 두 항체 모두 감마선 조사구의 단백질 용액과의 결합력이 감마선 조사선량이 증가할수록 낮게 나타났다. 감마선 조사후 가열처리가 항체의 결합력을 감소시키는데 더 효과적이었다. SDS-PAGE 결과 감마선 조사된 새우 단백질의 전기영동 분리 pattern에는 변화가 없었다. 이 결과는 적절한 선량의 감마선 조사가 새우 알러지를 감소시킬 수 있다는 것을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 원자력 중장기 연구개발과제의

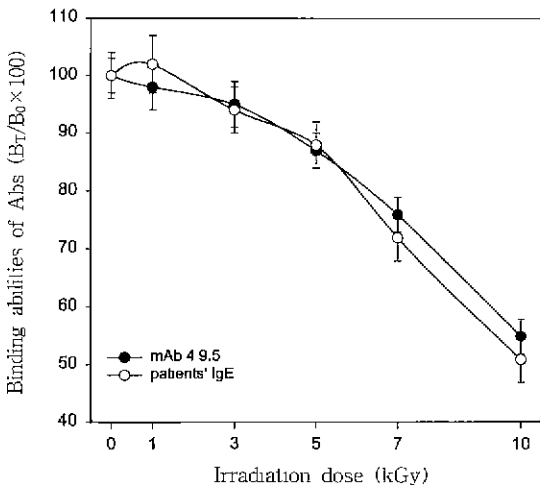


Fig. 4. Binding abilities of mouse IgG (monoclonal mAb 4.9.5) and patients' IgE to protein solution from cooked and irradiated shrimp.

The binding ability was measured by competitive indirect ELISA. B<sub>T</sub> and B<sub>0</sub> indicate binding ability of irradiated shrimp and that of non-irradiated shrimp, respectively

지원으로 수행되었으며, 그 지원에 감사드립니다. 본 저자들은 본 연구에 자문과 환자 혈액 확보 및 mAb 4.9.5를 공급해 주신 故연세대 의과대학 정병주 선생께 감사드리며, 고인의 명복을 기원합니다.

## 문 헌

1. Daul, C.B., Morgan, J.E. and Mc Cants, M.L. 'Crustacea allergy' immunologic evaluation shrimp-allergic individuals *J Allergy Clin Immunol*, **80**, 716-721 (1987)
2. Nagpal, S.L., Rajappa, S.L., Metcalfe, D.D. and Subba Rao, P.V. 'Isolation and characterization of heat stable allergens from shrimp (*Penaeus indicus*). *J. Allergy Clin Immunol*, **83**, 26-32 (1989)
3. Daul, C.B., Slattery, M., Reese, G. and Lehrer, S.B. : Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin *Int. Arch Allergy Immunol.*, **105**, 49-55 (1994)
4. Yunginger, J.W. Food antigens. In *Food allergy: adverse reactions to food and food additives*. Blackwell Scientific Publications, Boston, p.50 (1997)
5. David, T.J. *Food and food additive intolerance in childhood*. Blackwell Scientific Publication, Oxford, p.157-159 (1993)
6. Maruyama, N., Sugiura, F., Kishimoto, T., Ichise, K., Takeuchi, Y., Sawada, T., Tsuda, A. and Utsumi, S. : Decrease IgE-binding with wheat gluten by deamination. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 567-569 (1999)
7. Asselin, A., Hebert, J. and Amiot, J. : Effects of *in vitro* proteolysis on the allergenicity of major whey proteins. *J. Food Sci.*, **4**, 1037-1039 (1989)
8. Astwood, J.D., Fuchs, R.L. and Lavrik, P.B. : Food biotechnology and genetic engineering. In *Food allergy: adverse reactions to food and food additives*. Blackwell Scientific Publications, Boston, p.65-92 (1997)
9. Byun, M.W., Kum, J.H., Lee, J.W., Park, J.W., Honh, C.S., Kang, I.J. and Kang, K.O. : Effects of gamma irradiation on the conformational and antigenic properties of heat-stable major allergen in brown shrimp *J. Food Prot.*. In printing
10. Jeoung, B.J., Reese, G., Hauck, P., Oliver, J.B., Daul, C. B. and Lehrer, S.B. : Quantification of the major brown shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin) by a monoclonal antibody-based sandwich ELISA. *J Allergy Clin Immunol.*, **100**, 229-234 (1997)
11. Lee, J.W., Yook, H.S., Lee, K.H., Kim, J.H., Kim, J.O. and Byun, M.W. : Conformational changes of myosin by gamma irradiation. *Radiat. Phys Chem*, Ref. No.: RPC-JF-60, In press
12. Laemmli, U.K. . Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature*, **227**, 680-685 (1970)
13. Phillips, G.N., Fillers, J.P. and Cohen, C. : Tropomyosin crystal structure and muscle regulation. *J. Mol. Biol.*, **192**, 111-131 (1986)
14. Thayer, D.W. : Food irradiation: benefits and concerns. *J. Food Qual.*, **13**, 147-169 (1990)
15. Yook, H.S. 'Effect of gamma irradiation on the microbiological, biochemical, morphological, nutritional, toxicological and food processing characteristics of beef. *Ph.D Thesis*. Chungnam National Univ, Korea (1999)
16. WHO : *High-dose irradiation: Wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy*. Report of a Joint FAO/IAEA/WHO Study Group, WHO Technical Report Series 890, Geneva, Swiss (1999)
17. Kume, T., Ishii, T. and Matsuda, T. : Immunochemical identification of irradiated chicken eggs. *J. Sci. Food Agric*, **65**, 1-4 (1994)
18. Urban, W.M. : Food irradiation: the past fifty years as prologue to tomorrow *Food Technol.*, **43**, 6-92 (1989)
19. Hajos, G., Matrai, B., Szerdahelyi, E. and Orsi, F. : Differences in the electrophoretic patterns of soluble pork proteins as a consequence of pig rearing conditions. *Meat Sci.*, **41**, 77-87 (1995)
20. Jhu, L.G. and Brewer, M.S. : Discoloration of fresh pork as related to muscle and display conditions. *J. Food Sci.*, **63**, 763-767 (1998)

(2000년 3월 9일 접수)