

감마선 조사된 우유단백질에 대한 우유 알러지 환자의 IgE 결합능의 변화

조경환 · 육홍선 · 이주운 · 이수영* · 변명우[†]

한국원자력연구소 방사선식품·생명공학기술개발팀

*아주대학교 의과대학 소아과교실

Changes of Binding Ability of Milk-Hypersensitive Patients' IgE to Gamma-Irradiated Milk Proteins

Kyoung-Hwan Cho, Hong-Sun Yook, Ju-Woon Lee, Soo-Young Lee* and Myung-Woo Byun[†]

Team for Radiation Food Science and Biotechnology, Korea Atomic Energy Research Institute,
Daejeon 305-600, Korea

[†]Dept. of Pediatrics, School of Medicine, Ajou University, Suwon 442-749, Korea

Abstract

This study was carried out to evaluate the application of food irradiation technology as a method for reducing milk allergies. Bovine α -casein, β -casein, κ -casein, α -lactalbumin (ALA), β -lactoglobulin (BLG) and serum albumin (BSA) were used as model allergens of milk proteins and the protein solutions (2.0 mg/mL) with 0.01 M phosphate buffered saline (pH 7.4) was irradiated at 3, 5 and 10 kGy. Using milk-hypersensitive patients IgE (MHP-IgE), the changes of binding ability to irradiated proteins were observed by competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (Ci-ELISA). Affinity of MHP-IgE to milk proteins was higher in ALA and BLG than that of other proteins. Standard curve to each non-irradiated protein could be made with MHP-IgE for quantifying milk allergens. Binding abilities of MHP-IgE to the irradiated proteins, however, decreased with different slopes of the standard curves. Sensitivity of gamma irradiation was higher in ALA and BLG than that of other proteins. These results indicated that irradiation technology can be used to reduce the milk hypersensitivity.

Key words: gamma irradiation, milk hypersensitivity, IgE-binding ability, whey and casein proteins

서 론

우유알러지는 수유기 영아와 유아에게서 빈번히 발생하는 식품알러지로 우유속에 있는 casein 단백질과 유청단백질에 대해 체내에서 특이적으로 생산된 면역글로불린 E형 항체 (immunoglobulin E, IgE)가 관여하는 대표적인 면역과민반응 1형 (immune hypersensitivity type I)에 속한다(1). 우유알러지의 임상증상은 다른 식품알러지와 같이 환자가 우유, 유제품 또는 우유를 원료로 하는 가공식품을 섭취한 후 설사, 복통, 구토, 두드러기, 발진, 가려움증을 호소하거나 심하면 쇼크로 인한 호흡곤란이 발생되며, 사망하기도 한다(2-4). 우유의 알러젠 (allergen)은 우유에 존재하는 거의 모든 단백질이 알러젠으로 작용하는 것으로 보고되고 있으며, 그 중 β -lactoglobulin (BLG)과 casein 단백질들이 주요 알러젠으로 알려져 있다(5,6). 특히, BLG는 우유에만 존재하는 단백질로서 모유에는 존재하지 않고, 경구급여를 통한 임상시험 결과 전체 우유알러지 유발 단백질 중 66%, skin prick test 반응에서는 68%의 가장 높은 민감반응을 나타내며(7-9), 기타 다른 우유단백질들도 알러젠으로서 작용하는 것으로 보고되고 있

다. 유청단백질 중 bovine serum albumin (BSA)도 알러젠으로 보고되고 있는데(4), BSA의 경우 우유뿐만 아니라 쇠고기에도 존재하기 때문에 이 알러젠에 과민반응이 있는 환자는 쇠고기와 그 가공식품을 섭취하였을 경우 같은 증상을 유발할 가능성이 매우 높은 것으로 보고되고 있다. Casein 단백질은 cheese 등의 유가공제품의 주요단백질로 많이 이용되지만, casein에 대한 알러지 유발이 빈번히 보고되고 있어 우유 및 그 가공품의 섭취를 통한 균형적인 영양공급에 큰 어려움을 나타내고 있다. 이러한 우유알러지를 억제하고 감소시키기 위한 방법으로 다양한 단백질분해효소를 이용한 알러지 저감화 우유 (hypoallergic milk) 및 유제품의 개발이 시도되어 이용되고 있지만(10-12), 과도한 가수분해로 인한 제품의 손상 때문에 개선점이 요구되고 있다(13-15). 또한, 단백질 분해 효소의 이용은 우유알러지 억제 방법을 제외하고는 다른 식품군에 대한 이용이 극히 제한적이라 할 수 있다(11).

한편, 방사선에 의해 단백질의 구조가 변화된다는 보고(16-19)가 발표된 이래로 방사선 조사기술이 식품알러지를 억제하거나 제거할 수 있는 가능성에 대한 연구가 보고되고 있다(20-22). 본 연구에서는 방사선 조사기술을 이용하여 우

[†]Corresponding author. E-mail: mwbyun@nanum.kaeri.re.kr
Phone: 82-42-868-8065, Fax: 82-42-868-8043

유의 알러지성 감소를 위한 기초연구를 통하여 알러지 저감화 우유 및 유제품 개발에 이용할 수 있도록 하기 위해, 우유 단백질 중 casein 단백질과 유청단백질에 대한 감마선 조사가 우유알러지 환자의 IgE의 알러젠 인식 정도의 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

환자혈청의 준비

분석에 사용한 환자혈청은 임상 병력상 3회 이상의 즉시형 알러지 반응을 경험하였거나 1회 이상의 병력이 있으면서 개방형 식품유발시험을 시행하여 양성 반응을 보였던 환자 중 radioimmunoassay 검사 결과 우유 단백질에 항원 특이성 IgE의 농도가 2+ 이상(0.7 IU/mL 이상)의 양성 반응을 보였던 환자의 혈청을 사용하였다. 환자의 혈액을 채취하여 즉시 혈청을 분리한 후 -80°C에서 보관하며 실험에 이용하였으며, 음성 대조 혈청으로는 알러지 질환의 과거력이 없으며 우유 단백질 항원 특이 IgE 및 혈청 총 IgE 항체가 정상 범주인 5명으로부터 혈액을 채취하여 그 혈청을 사용하였다.

알러젠의 준비 및 감마선 조사

실험에 사용할 우유단백질은 casein 단백질 3종(α -casein, ACA, β -casein, BCA; κ -casein, KCA)과 유청단백질 3종(α -lactalbumin, ALA; BLG, BSA)을 Sigma사(Sigma Chemical Co., Ltd., St Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 각 단백질을 2 mg/mL의 농도로 0.01 M phosphate buffer(0.15 M NaCl, pH 7.4, PBS)를 사용하여 준비한 후 감마선을 조사하였다. 감마선 조사는 Co-60을 선원으로 하여 시간당 10 kGy의 선량율로 시료가 3, 5, 10 kGy의 흡수선량을 받도록 감마선을 조사하였으며, 흡수선량의 확인은 Fricke dosimetry(ceric/cerous dosimeter)(23)를 사용하였고, 흡수선량의 오차는 ± 0.1 kGy였다. 이때 조사실의 온도는 10°C였다. 조사 후 단백질 용액을 4°C 보관하면서 실험에 사용하였다.

감마선 조사된 단백질에 대한 IgE 결합능 시험

Milk-hypersensitive patients' IgE(MHP-IgE)에 대한 감마선 조사된 우유단백질과의 반응을 조사하기 위해 competitive indirect enzyme linked immunosorbent assay(Ci-ELISA)법을 사용하였다(16). Ci-ELISA는 MHP-IgE에 대한 6종의 단백질들에 대해 개별적으로 분석법을 완성하였고, Ci-ELISA의 시험과정은 다음과 같다. Polystyrene flat-bottom microtiter plates(Maxisorp, Nunc, Kamstrup, Denmark)에 각각의 단백질을 basic coating buffer(0.1 M sodium carbonate, pH 9.6)를 사용하여 1.0 μ g/mL의 농도로 희석한 후 100 μ L를 첨가하여 4°C에서 하룻밤 동안 microwell에 고정시켰고, 1%의 gelatine 용액 130 μ L를 첨가하여 blocking하였고, 일정하게 희석한 감마선 조사된 단백질 용액과 표준 단백질 용액, 그리고 4%로 희석한 MHP-IgE를 함유한 환자

혈청을 각각의 microwell에 50 μ L 첨가하고 반응시켰다. Mouse anti-human IgE에 horseradish peroxidase(HRP, Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA)를 공액결합한 2차 항체를 PBS 완충액을 사용하여 0.1 μ g/mL로 희석하여 well에 100 μ L를 첨가하여 반응시킨 후, 0.04% *o*-phenylenediamine(OPD, Sigma Chemical Co.) 기질용액을 사용하여 발색을 유도하고, 세척없이 그 microwell에 2.0 M H₂SO₄ 용액으로 반응을 종결시킨 후 492 nm로 고정된 ELISA Reader(CERES UV-900C, BIO-TEK instruments Inc., MI, USA)에서 흡광도를 측정하여 microplate well에 고정된 단백질과 항체의 반응을 구하였다. 각 단계별 반응 후 well을 0.05%(v/v) Tween 20을 함유한 PBS 완충액으로 3회 세척하였고, coating을 제외한 모든 반응은 37°C에서 120분간 반응시켰다. 각 단백질과 MHP-IgE와의 반응에서 얻어진 흡광도 결과를 시료의 첨가 없이 microwell에 고정된 단백질과 항체의 반응값을 100으로 하여 감마선 조사된 시료와의 반응곡선을 구하여 반응성을 비교하였다.

결과 평가 및 통계처리

동일한 우유단백질 시험구에 대해 Ci-ELISA를 5회 반복 실시하였으며, 감마선 조사 시험을 3회 반복 실시하여 얻어진 결과들을 SAS[®] software(24)에서 프로그램된 general linear procedures, least square 평균값을 Duncan의 multiple range test법을 사용하여 평가하였다.

결과 및 고찰

MHP-IgE를 이용한 우유단백질들의 정량용 표준곡선 작성

MHP-IgE를 이용한 각 우유단백질의 정량곡선을 Ci-ELISA를 사용하여 작성하였다(Fig. 1~6). 단백질이 일정농도(1.0 μ g/mL)로 고정된 microwell에 다양한 농도로 첨가된 단백질과 일정량의 MHP-IgE(최종농도 2% 혈청 희석액)의 결합에 의해 고정된 단백질에 대한 항체의 반응을 곡선으로 나타낸 후 곡선이 직선으로 나타나는 부분을 단백질 검출범위로 정하였을 때, 본 연구에서 사용한 MHP-IgE를 이용한 우유단백질의 검출 범위는 casein 단백질의 경우 ACA가 15.62에서 250 μ g/mL, BCA가 1.95에서 62.5 μ g/mL, 그리고 KCA가 3.9에서 125 μ g/mL으로 나타났고, 유청단백질의 경우 ALA가 0.03에서 1.0 μ g/mL, BLG가 0.03에서 2.0 μ g/mL, 그리고 BSA가 0.98에서 125 μ g/mL으로 나타나, 이 표준곡선을 이용하면 우유 및 유제품에 존재하는 알러젠 단백질을 정량할 수 있어 알러젠의 정확한 양을 식품에 표기할 수 있다(22,24). ACA와 BLG의 검출농도한계가 매우 낮은 농도에서 나타나 본 연구에서 사용된 MHP-IgE의 항체 친화성이 다른 단백질들보다 이들 단백질들에서 매우 높은 것으로 나타났다. 이 결과는 우유의 주요알러젠으로 BLG와 ALA가 인식된 후(7, 8) 환자에 대한 알러지 반응 유발성이 가장 높다는 것을 설명하는 자료로서 이전 연구보고와 일치하고 있다(4,5). 그러나,

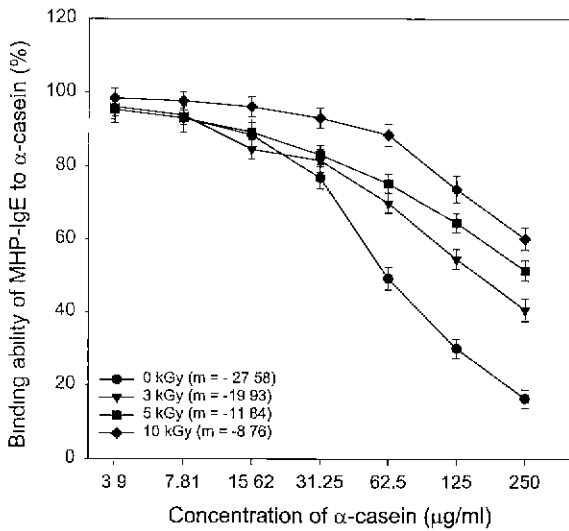


Fig. 1. Binding ability of milk hypersensitive patients IgE to irradiated α -casein by Ci-ELISA. The protein solutions (2.0 mg/mL) were irradiated, serially diluted, and then tested. The slope of the curve (m) obtained from binding rate of IgE to coated standard protein.

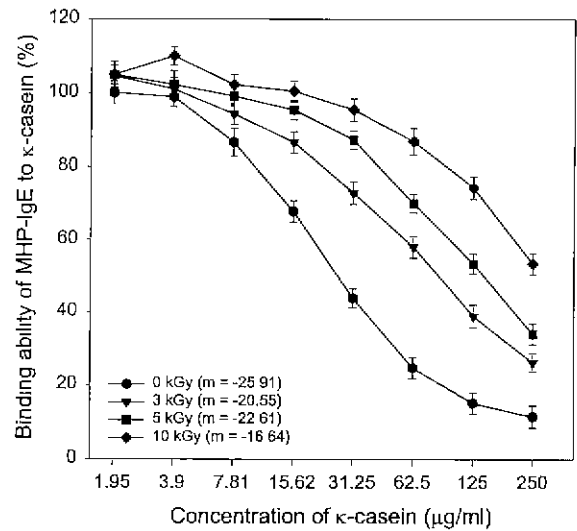


Fig. 3. Binding ability of milk hypersensitive patients IgE to irradiated κ -casein by Ci-ELISA. The protein solutions (2.0 mg/mL) were irradiated, serially diluted, and then tested. The slope of the curve (m) obtained from binding rate of IgE to coated standard protein.

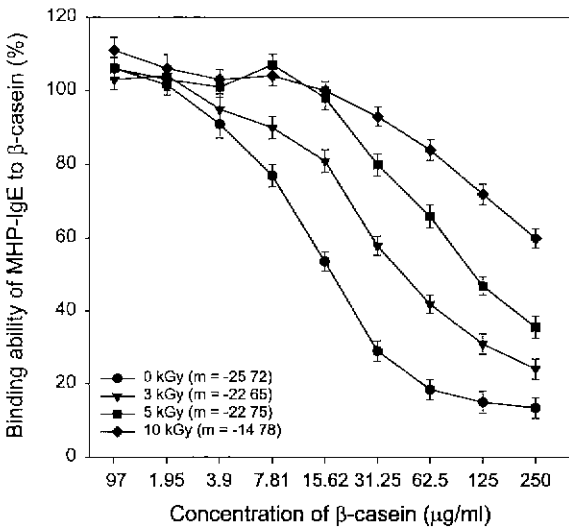


Fig. 2. Binding ability of milk hypersensitive patients IgE to irradiated β -casein by Ci-ELISA. The protein solutions (2.0 mg/mL) were irradiated, serially diluted, and then tested. The slope of the curve (m) obtained from binding rate of IgE to coated standard protein.

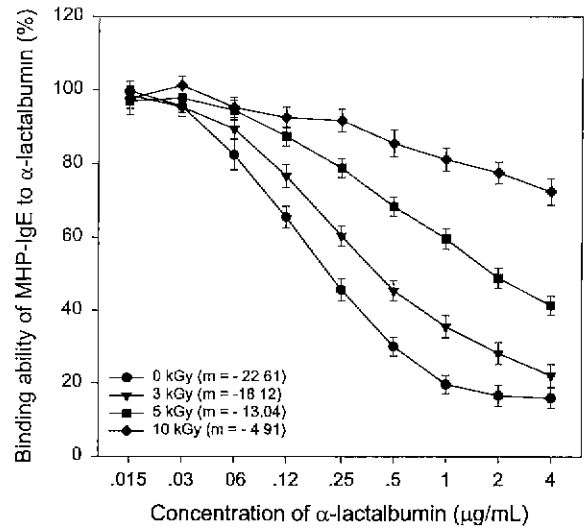


Fig. 4. Binding ability of milk hypersensitive patients IgE to irradiated α -lactalbumin by Ci-ELISA. The protein solutions (2.0 mg/mL) were irradiated, serially diluted, and then tested. The slope of the curve (m) obtained from binding rate of IgE to coated standard protein.

casein 단백질도 주요 알러젠으로 보고되어 있으나, 본 연구에서 사용된 MHP-IgE의 친화도는 낮았다. 일반적으로 항체의 친화도가 높을수록 낮은 농도의 항원도 검출할 수 있기 때문에, 항체 친화도가 높은 항체를 사용하면 미량 성분분석이나 정밀분석에 이용될 수 있다(12).

감마선 조사된 우유단백질에 대한 MHP-IgE의 결합반응성의 변화

우유단백질들에 대한 감마선 조사는 MHP-IgG의 알러젠 인식정도를 감소시키는 것으로 나타났다. 감마선 조사에 의

해 대부분의 단백질에서 비조사구에서 얻은 표준곡선의 기울기의 절대값(m)이 감소되는 것으로 나타났다. 기울기의 감소는 항체의 친화도가 감소되는 것을 나타내며, 항원표면의 항원결정기(epitope)의 파괴로 인해 항체가 항원을 인식할 수 없게 되는 것을 말한다(25). 대부분의 단백질들에 대한 Ci-ELISA 측정결과, epitope의 파괴로 인한 표준곡선 기울기의 감소와 함께 표준곡선이 위와 오른쪽으로 이동하는 것이 관찰되었다. 이것은 단백질의 구조변화로 인한 epitope의 수가 감소되어 항체가 잘 결합할 수 없기 때문에 발생하는 것으로(26). Casein 단백질의 경우 10 kGy의 감마선 조사로 MHP-

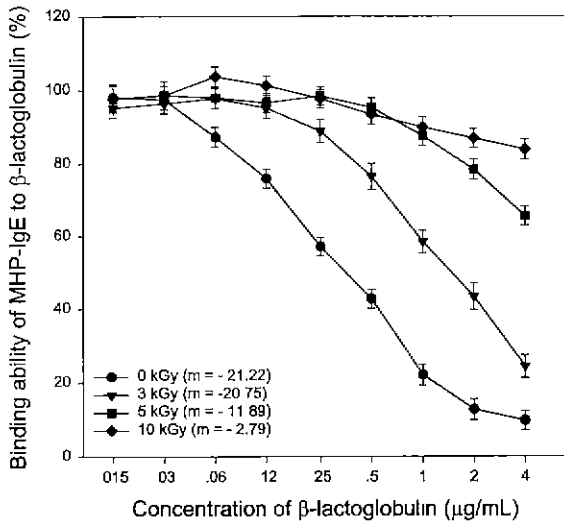


Fig. 5. Binding ability of milk hypersensitive patients IgE to irradiated β-lactoglobulin by Ci-ELISA.
The protein solutions (2.0 mg/mL) were irradiated, serially diluted, and then tested. The slope of the curve (m) obtained from binding rate of IgE to coated standard protein.

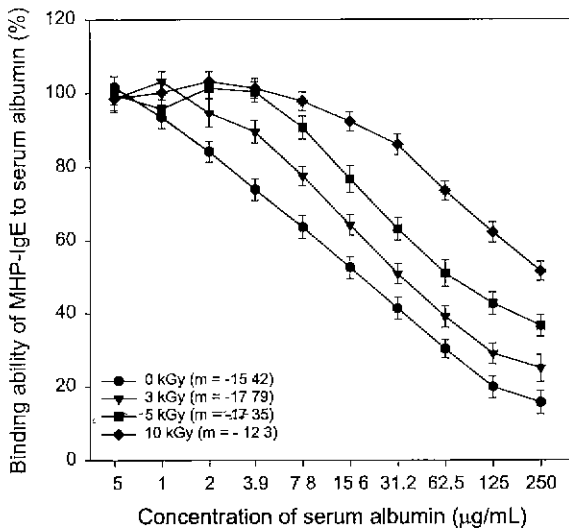


Fig. 6. Binding ability of milk hypersensitive patients IgE to irradiated bovine serum albumin by Ci-ELISA.
The protein solutions (20 mg/mL) were irradiated, serially diluted, and then tested. The slope of the curve (m) obtained from binding rate of IgE to coated standard protein.

IgE의 반응성이 약 50% 정도로 낮아졌고(Fig. 1, 2, 3), 이 중 ACA가 감마선에 가장 민감한 것으로 나타났다. 유청단백질의 경우 ALA와 BLG가 감마선에 매우 민감한 것으로 나타났다(Fig. 4, 5). 5 kGy의 감마선 조사로 표준곡선의 기울기가 50% 정도 감소하였고 10 kGy의 조사로 5이하의 기울기를 나타내. MHP-IgE의 친화도가 거의 없는 것으로 나타났다. 이 결과는 ALA와 BLG가 감마선 조사로 쉽게 표면 항원결정기가 파괴되어 항체가 인식할 수 없게 된다는 것을 나타내고 있으며, 우유 알러지 억제력을 위한 감마선 조사의 이용가능성을 매우 높게 하는 결과라고 할 수 있다. 반면, BSA는 구조적

변화로 인한 항원결정기 수의 감소가 더 많이 진행된 것으로 나타났는데(Fig. 6). 이것은 곡선이 오른쪽으로 이동하는 경향으로 알 수 있다(25). 항원결정기 수의 감소는 단백질 분자가 감마선 조사로 구조적인 변화를 일으켜서 발생하는 것으로 분자간 수소결합과 S-S 결합의 파괴 및 새로운 결합의 생성으로 분자간 응집현상이 발생되어(17-19) 표면에 존재하는 항원결정기가 새로운 분자 형성에서 내부로 끼어 들어가기 때문에 발생하는 것이다(26). BSA에 대한 표준곡선의 변화는 곡선의 기울기가 3과 5 kGy에서 오히려 약간 증가하였는데, 저선량의 감마선 조사로 BSA 구조가 MHP-IgE가 더 잘 인식할 수 있도록 구조적으로 변성되었기 때문이다(27). 동물항체를 이용한 감마선 조사된 단백질의 구조변화에 대한 연구에서도 대체적으로 3에서 5 kGy 이하의 저선량 조사로 인해 단백질의 구조적 해리가 주요하게 발생하는 것으로 보고되고 있는데(16,22), BSA의 경우 MHP-IgE의 표면항원결정기가 감마선 조사에 쉽게 파괴되지는 않는 것을 알 수 있었다.

요 약

감마선 조사기술을 이용하여 우유알러지를 억제하기 위한 방법으로 감마선 조사에 의한 우유단백질의 MHP-IgE 결합능의 변화를 조사하였다. 우유단백질 중 ACA, BCA, KCA, ALA, BLG 그리고 BSA를 모델 알러젠으로 사용하여 3, 5, 10 kGy의 선량으로 감마선을 조사하고 각 단백질의 알러지성의 변화를 MHP-IgE를 이용한 Ci-ELISA로 측정하였다. 우유단백질들에 대한 MHP-IgE의 친화도는 ALA와 BLG가 매우 높았다. MHP-IgE를 이용한 우유 알러젠 정량을 위한 표준곡선을 작성할 수 있었다. 감마선 조사된 단백질들에 대해 MHP-IgE의 결합능은 다른 기울기를 나타내며 감소하였다. Casein 단백질과 BSA보다 ALA와 BLG가 매우 높은 감마선 감수성을 갖는 것으로 나타났다. 이 결과는 우유 알러지를 감소시키기 위해 감마선 조사기술의 이용가능성을 나타내고 있다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 원자력 중장기 연구개발과제의 지원으로 수행되었으며, 그 지원에 감사드립니다.

문 헌

- David, T.J. : *Food and food additive intolerance in childhood*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p 157-159 (1993)
- Docena, G.H., Fernandez, R., Chirido, F.G. and Fossati, C.A. Identification of casein as the allergenic and antigenic protein of cows milk *Allergy* (Copenhagen), **51**, 412-416 (1996)
- Sampson, H A IgE-mediated food intolerance *J Allergy Clin. Immunol.*, **81**, 495-504 (1986)

- 4 Savilahti, E. and Kuitunen, M. : Allergenicity of cow milk proteins *J. Pediatr.*, **121**, S12-20 (1992)
- 5 Taylor, S.L. : Immunologic and allergic properties of cows milk proteins in humans. *J. Food. Prot.*, **49**, 239-250 (1986)
- 6 Yunginger, J.W. Food antigens In *Food allergy: adverse reactions to food and food additives*, Blackwell Scientific Publications, Boston, p.50-53 (1997)
- 7 Bahna, S L and Heiner, D.C. : *Allergies to milk*. Grune and Stratton, New York, p 28-46 (1980)
- 8 Goldman, A.S., Anderson, D.W., Sellars, W.A., Halpern, S R., Saperstein, S. and Knicker, W T. . Milk allergy. I. Oral challenge withmilk and isolated milk proteins in allergic children. *Pediatrics*, **32**, 425-443 (1963)
- 9 Goldman, A.S., Sellars, W.A., 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 *Pediatrics*, **32**, 572-579 (1963)
- 10 Asselin, A., Hebert, J. and Amot, J . Effects of *in vitro* proteolysis on the allergenicity of major whey proteins *J Food Sci.* **54**, 1037-1039 (1989)
- 11 Schmidl, M.K., Taylor, S.L. and Nordlee, J.A. Use of hydrolysate-based products in special medical diets. *Food Technol.*, **48**, 77-85 (1994)
- 12 Taylor, S Food allergy-The enigma and some potential solutions *J. Food Prot* , **43**, 300-306 (1990)
- 13 van Beresteijn, E.C.H., Meijer, R J G M and Schmidt, D G. : Residual antigenicity of hypoallergenic infant formulas and the occurrence of milk-specific IgE antibodies in patients with clinical allergy *J Allergy Clin. Immunol.*, **96**, 365-374 (1995)
- 14 van Hoeyveld, E.M., Escalona-Monge, M , de Swert, L F A. and Stevens, E.A.M. Allergenic and antigenic activity of peptide fragment in a whey hydrolysate formula. *Clin. Exp. Allergy*, **28**, 1131-1137 (1998)
- 15 Nilsson, C., Oman, H and Harfast, B. : A case of allergy to cow's milk hydrolysate. *Allergy*, **54**, 1322-1325 (1999)
- 16 Lee, J.W., Yook, H.S., Lee, K.H., Kim, J.H., Kim, W.J. and Byun, M.W. Conformational changes of myosin by gamma irradiation. *Radiat. Phys. Chem.* , **58**, 271-277 (2000)
- 17 Al-kahtani, H.A., Abu-tarbouch, H.M., Atia, M., Bajaber, A S. Ahmed, M A and El-mojaddidi, M A. : Amino acid and protein changes in tilapia and spanish mackerel after irradiation and storage *Radiat. Phys. Chem.* , **51**, 107-114 (1998)
- 18 Filali-mouhim, A , Audette, M , St-louis, M , Thauvette, L., Denoroy, L., Penin, F. Chen, X , Rouleau, N., Le Caer, J.P., Rossier, J., Potier, M. and Le Maire, M. Lysozyme fragmentation induced by γ -radiolysis. *Int. J Radiat. Biol.*, **72**, 63-70 (1997)
- 19 Horowitz, R., Kempner, E.S., Bisher, M.E and Podolsky, R J. . A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle *Nature*, **323**, 160-164 (1986)
- 20 Kume, T, Ishii, T. and Matsuda, T Immunochemical identification of irradiated chicken eggs *J. Sci. Food Agric.* , **65**, 1-4 (1994)
- 21 Kume, T and Matsuda, T. : Changes in structural and antigenic properties of proteins by radiation *Radiat Phys. Chem.*, **46**, 225-231 (1995)
- 22 Byun, M W., Kim, J.H, Lee, J.W., Park, J.W., Hong, C.S. and Kang, I J. . Effects of gamma radiation on the conformational antigenic properties of a heat-stable major allergen in brown shrimp. *J. Food Prot* , **63**, 940-944 (2000)
- 23 Holm, N.W. and Berry, R J. *Manual on Radiation Dosimetry*. Marcel Dekker Inc., New York (1970)
- 24 SAS *SAS/STAT: User's Guide*. 6th edition, SAS Institute Inc., Cary, NC (1988)
- 25 Heran, A.M., Taylor, S.T. and Bush, R K. . Allergenic reactivity of various soybean products as determined by RAST inhibition. *J. Food Sci.*, **58**, 385-388 (1992)
- 26 Lee, J W., Yook, H S , Cho, K.H, Lee, S.Y. and Byun, M W. . The changes of allergenic and antigenic properties of egg white albumin (Gal d I) by gamma irradiation *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* , **30**, 500-504 (2001)
- 27 Kamnogawa, S., Shimizu, M., Ametani, A , Hattori, M . Ando, O . Hachimura, S , Nakamura, Y., Totsuka, M. and Yamachi, K Monoclonal antibodies as probes for monitoring the denaturation process of bovine β -lactoglobulin. *Biochim. Biophys. Acta*, **998**, 50-56 (1989)

(2001년 2월 15일 접수)