

감마선 조사된 난백 알부민의 항원성에 미치는 가열의 영향

이주운 · 육홍선 · 조경환 · 김미리* · 김천제** · 변명우[†]

한국원자력연구소 방사선식품·생명공학기술개발팀

*충남대학교 식품영양학과

**건국대학교 축산가공학과

Effects of Heat Treatment on the Antigenicity of Gamma-Irradiated Egg White Albumin

Ju-Woon Lee, Hong-Sun Yook, Kyoung-Hwan Cho, Mee-Ree Kim*, Cheon-Jei Kim** and Myung-Woo Byun[†]

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

*Dept. of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

**Dept. of Animal Products Science, Konkuk University, Seoul 143 701, Korea

Abstract

This research was conducted to study the effects on antigenicities (allergenicity) and structural changes of gamma-irradiated hen's egg albumin (ovalbumin, OVA) by heating. Three groups of OVA solution (2.0 mg/mL) were prepared; 1) heat treatment; 2) irradiation after heating; 3) heating after irradiation. Samples were isothermally heated and/or irradiated at the absorption dose of 10 kGy. Competitive indirect ELISA was individually formatted with egg-allergic patients IgE (P-IgE), and mouse murine monoclonal IgG (M-IgG) and rabbit polyclonal IgG (R-IgG) for evaluating binding abilities of antibodies to OVA in the sample solutions. Binding abilities of antibodies to thermally denatured OVA were changed: R-IgG to the sample treated with above 60°C, M-IgG to that above 70°C, and P-IgE to that above 80°C, respectively. P-IgE did not well recognize OVA heated at 80°C and the above. However, binding abilities of M-IgG and R-IgG highly increased. Significant differences of binding abilities were not observed in all samples with the combination of heat treatment and irradiation, regardless the order of the treatment. Turbidity of samples increased both by heating and by irradiation, and the increase by irradiation was much higher than by heating. These results showed that allergenicity of OVA reduced by gamma irradiation was not affected by heating.

Key words: ovalbumin, heating, gamma irradiation, allergenicity, antigenicity, turbidity

서 론

식품으로부터 유발되는 과민반응은 식품을 섭취하였을 때 유발되는 자가면역질환의 일종으로 소화불량, 구토, 설사, 두드러기, 호흡 곤란 등 다양한 임상적 증상을 나타내며, 환자에게는 대상식품의 기피 및 원인 식품을 함유한 가공식품의 이용성을 제한한다(1,2).

식품 알러지를 유발하는 원인식품 중에서 계란은 가장 발생빈도가 높은 식품들 중 하나로 작은 양으로도 섭취 후 몇 분안에 과민반응을 나타내며, 심한 경우는 전신발작(anaphylaxis)을 일으켜 생명을 위협하기도 한다(3). 계란 중 난백은 단백질 함량이 난황에 비해 상대적으로 높고, 계란 알러지를 유발하는 주요 원인물질로서 알려진 ovalbumin(OVA)이나 ovomucoid 등의 알러젠들은 대부분 난백에 함유되어 있다(4).

식품으로부터 발생하는 알러지를 억제하기 위해 단백질 분해 효소들을 이용한 알러젠의 가수분해 기술이 소개되어 알러지 저감화 분유제조 등에 사용되고 있다(5-7). 또한 계란 알러지 억제를 위한 방법으로서 효소가수분해법을 이용한 연구가 시도되기는 하였으나(8), 괄목할 만한 효과를 얻지 못하였고, 실용적으로 사용하기에는 여러 가지 문제점들이 있어 알러지 억제를 위한 적절한 기술 개발이 요구되고 있다.

한편 방사선 식품조사가 식품의 위생화와 식량자원의 효율적인 관리를 위한 기술로서 점차 그 사용이 국내외적으로 확대되고 있으며(9), 다양한 연구가 진행되고 있다. 특히 최근 미국소아과협회에서는 유·소아의 식중독을 방지할 수 있는 개선된 방법으로서 방사선 조사기술을 권고하여 이 기술의 발전 및 이용이 더욱 기대된다(10).

감마선 조사에 의한 식품 알러젠의 구조적 변화가 알러젠

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

에 존재하는 IgE에 대한 항원결정기(epitope)들의 항원성 및 알러지성의 변화를 유발한다는 연구결과가 발표되면서, 알러지 저감화를 위한 방법으로서 감마선 조사기술의 이용이 고려되고 있다(11-14). 최근의 연구에서 계란 알러지 환자의 IgE의 감마선 조사된 OVA에 대한 항원-항체 반응력이 감소되는 것이 보고되어(15), 이 기술의 실용화를 위한 더 많은 연구가 필요하다. 대부분의 식품들은 가열처리되어 이용된다. 동물실험에서 가열처리된 OVA의 알러지성 및 항원성이 변화되어 감소되었다고 보고되었으나(16,17), 감마선 조사된 OVA가 가열처리 되었을 때 알러지성 및 항원성의 변화에 미치는 영향은 아직까지 조사되지 않았다. 따라서 알러지 저감화를 위한 감마선 조사의 적용은 가열처리와 같은 단백질의 구조가 변화되는 가공처리 공정에서도 감마선 조사된 OVA의 알러지성 및 항원성의 변화가 검사되어야만 실용화될 수 있다.

본 연구에서는 가열과 감마선 조사의 병용처리가 OVA의 항원성 및 알러지성의 변화에 미치는 영향을 조사하기 위한 연구의 일환으로, 감마선 조사된 OVA를 가열처리한 다음 3가지의 항체를 이용한 효소면역분석법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)을 사용하여 항원-항체 반응력의 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

항원과 항체

OVA는 Sigma사(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)의 제품이며, 이를 표준 항원과 알러젠으로 사용하였다. OVA에 대한 단클론 항체(M-IgG)로 상업적으로 판매되는 mouse anti-OVA IgG(Sigma사)를 구입하여 사용하였다. OVA에 대한 다클론항체(R-IgG)로는 이전 연구(15)에서 토끼에 면역원으로 OVA를 감작시켜 생산하여 사용된 항체를 이용하였다. 분석에는 임상 병력상 3회 이상의 즉시형 알러지 반응을 경험하였거나 1회 이상의 병력이 있으면서 개방형 식품유발 시험을 시행하여 양성 반응을 보였던 환자 중 radioimmunoassay 검사 결과 난백 단백질에 항원 특이성 IgE의 농도가 2+ 이상(0.7 IU/mL 이상)의 양성 반응을 보였던 환자의 혈청(P-IgE)을 사용하였다. 환자의 혈액을 채취하여 즉시 혈청을 분리한 후 -80°C에서 보관하며 실험에 이용하였으며, 음성 대조 혈청으로는 알러지 질환의 과거력이 없으며 난백 단백질 항원 특이 IgE 및 혈청 총 IgE 항체가 정상 범주인 5명으로부터 혈액을 채취하여 그 혈청을 사용하였다. 반응을 측정하기 위하여 horseradish peroxidase(HRP)가 공액 결합된 2차 항체를 각각 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다. 즉, M-IgG에 대해서는 rabbit anti-mouse IgG, R-IgG에 대해서는 goat anti-rabbit IgG, 그리고 P-IgE에 대해서는 rabbit anti-human IgE에 HRP가 결합된 것이었다.

시료의 준비

OVA를 0.01 M sodium phosphate buffered saline(PBS,

NaCl of 0.15 M, pH 7.4)에 2.0 mg/mL의 농도로 준비하였다. OVA 용액을 각각 가열처리구, 가열후 감마선 조사구, 그리고 감마선 조사후 가열처리구로 구분하여 실험에 사용하였다.

가열처리

시료의 가열처리를 위해 가열처리구와 가열후 감마선 조사구로 구분된 OVA 용액을 유리시험관(직경 1.0 cm)에 5 mL씩 담고 뚜껑을 닫은 후 thermocouple(CTF 9008, Ellab, Denmark)에 의해 온도가 유지된 waterbath(W 400, Büchi, Switzerland)에서 가열 처리하였다. 이때 설정온도는 37, 60, 70, 75, 80, 85와 90°C였으며, 정해진 온도에서 15분간 정치시켜 가열한 후 얼음물에 담가 냉각하였다. 한편 시료를 100°C의 가열처리와 가압멸균처리를 위해 각각의 tube를 끓는 물에 15분간 정치시키거나 가압멸균기(MLS 3000, Sanyo Co., Tokyo, Japan)에서 멸균시켰다. 가열 처리 후 같은 방법으로 냉각시켜 시험에 사용하였다.

감마선 조사

감마선 조사후 가열처리구로 준비된 용액을 5 mL씩 유리시험관에 옮겨 뚜껑을 닫아 준비하여, 가열처리후 감마선 조사구로 가열 처리된 시험관과 함께 10 kGy의 흡수선량을 받도록 감마선 조사시설(IR-79, Nordion International Ltd., Ontario, Canada, 100 KiloCurie activity)에서 조사하였다. 이때 조사실의 온도는 10°C였으며, 흡수선량의 확인은 Fricke dosimetry(ceric/cerous dosimeter)(18)를 사용하였고, 흡수선량의 오차는 ±0.1 kGy였다.

경합간접효소면역분석법

이전에 보고된 Lee 등(19)의 방법을 약간 수정하여 각각의 항체로 ELISA법을 확립하였다. 각 항체별 최적 조건을 확립하여 OVA를 정량할 수 있는 표준곡선을 작성하였으며, 이때 ELISA의 실험조건은 다음과 같다(Table 1). 즉, polystyrene flatbottom microtiter plates(Maxisorp, Nunc, Kamstrup, Denmark)에 OVA를 basic coating buffer(0.1 M sodium carbonate, pH 9.6)를 사용하여 일정한 농도로 희석한 후 100 µL/well씩 첨가하여 4°C에서 하룻밤 동안 microwell에 고정시켰고, 1%의 gelatine 용액 130 µL를 첨가하여 blocking하여 준비하였다. 일정한 농도로 희석된 표준 OVA 용액과 희석된 항체용액을 각각의 well에 50 µL 첨가하고 반응시켰다. HRP를 공액결합한 2차 항체를 PBS 완충액으로 희석하여 well에 100 µL를 첨가하여 반응시킨 후, 0.04% o-phenylenediamine(Sigma Chemical Co.) 기질용액을 사용하여 발색을 유도하고, 세척없이 그 well에 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 OVA에 결합된 항체의 양을 상대적으로 구하였다. 각 단계별 반응 후 well을 0.05%(v/v) Tween 20을 함유한 PBS 완충액으로 4회 세척하였고, coating을 제외한 모든 반응은 37°C에서 100분간 반응시켰다. 반응 후 얻

Table 1. The conditions of ELISA for establishing standard curves of three antibodies and the characteristics

Antibody	Concentration of coated antigen ($\mu\text{g/mL}$)	Dilution rate of primary Ab	Dilution rate of secondary Ab-HRP	Detection range ($\mu\text{g/mL}$)	Detection limit ($\mu\text{g/mL}$)
Patients' IgE	10	1:50	1:1,000	3.9~125	0.1
Mouse IgG, monoclonal	1	1:10,000	1:20,000	7.8~62.5	0.01
Rabbit IgG, polyclonal	10	1:2,000	1:10,000	7.8~1,000	0.1

어진 흡광도를 사용하여 각 항체별 OVA 정량용 표준곡선을 작성하였다.

OVA의 정량

시료용액내에 항체와 반응하는 OVA를 정량하기 위해 위와 같은 방법으로 ELISA를 실시하였다. 즉, OVA가 고정되고 blocking되어 있는 well에 각각의 시료용액을 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 희석하여 항체용액과 함께 50 μL 씩 주입하고 반응시켜 시료용액에 존재하는 OVA와 항체와의 반응성을 조사하여 표준곡선에서 얻은 방정식에 대입하여 OVA의 농도를 산출하였다.

시료용액의 혼탁도 변화

감마선 조사와 가열처리에 의한 시료용액의 혼탁도 변화를 관찰하기 위해 Chan 등(20)의 방법을 사용하여 측정하였다. 가열 및 감마선 조사된 시험용액을 340 nm로 고정된 spectrophotometer(PC-1600, Shimadzu Co., Inc., Tokyo, Japan)에서 흡광도를 측정하여 그 값을 시료의 혼탁도로 사용하였다.

결과 평가 및 통계처리

표준곡선 작성을 위해 각 항체에 대해 동일한 실험을 5회 반복 실시하였으며, OVA의 정량 및 시료용액의 혼탁도 검사를 각각 5회 반복 실시하여 얻어진 결과들을 SAS[®] software(21)에

서 프로그램된 general linear procedures, least square 평균값을 Duncan의 multiple range test법을 사용하여 평가하였다.

결과 및 고찰

OVA 정량을 위한 표준곡선

시료용액에 존재하는 OVA를 정량하기 위한 표준곡선을 각 항체별로 작성하였다(Fig. 1). 각 표준곡선에서 얻어진 OVA의 검출 범위 및 검출 한도는 Table 1에 나타났다. M-IgG가 가장 높은 항원에 대한 친화성을 나타냈으며, P-IgE와 R-IgG는 거의 같은 수준의 친화성을 나타냈다. 항원에 대한 항체친화성은 면역분석법의 이용시 매우 중요한 요소로서 일반적으로 항체의 친화성이 높을수록 미량 항원을 좀더 정확하게 정량할 수 있다(22). 단클론 항체의 경우 다클론 항체보다 항체친화성이 높은 것은 낮은 농도에서도 쉽게 표적항원을 인식하기 때문이며(11), 본 연구에서도 M-IgG가 P-IgE나 R-IgG보다 더 높은 항체친화성을 나타냈다.

P-IgE의 ELISA에서 OVA를 3.9에서 125.0 $\mu\text{g/mL}$ 의 희석 범위에서 OVA를 검출할 수 있었으며, 이때의 검출 한계는 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. M-IgG로 확립된 ELISA에서는 7.8에서 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 검출 범위를 나타냈고, 검출 한계는 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 이었고, R-IgG를 사용한 표준곡선에서 OVA는 7.8에

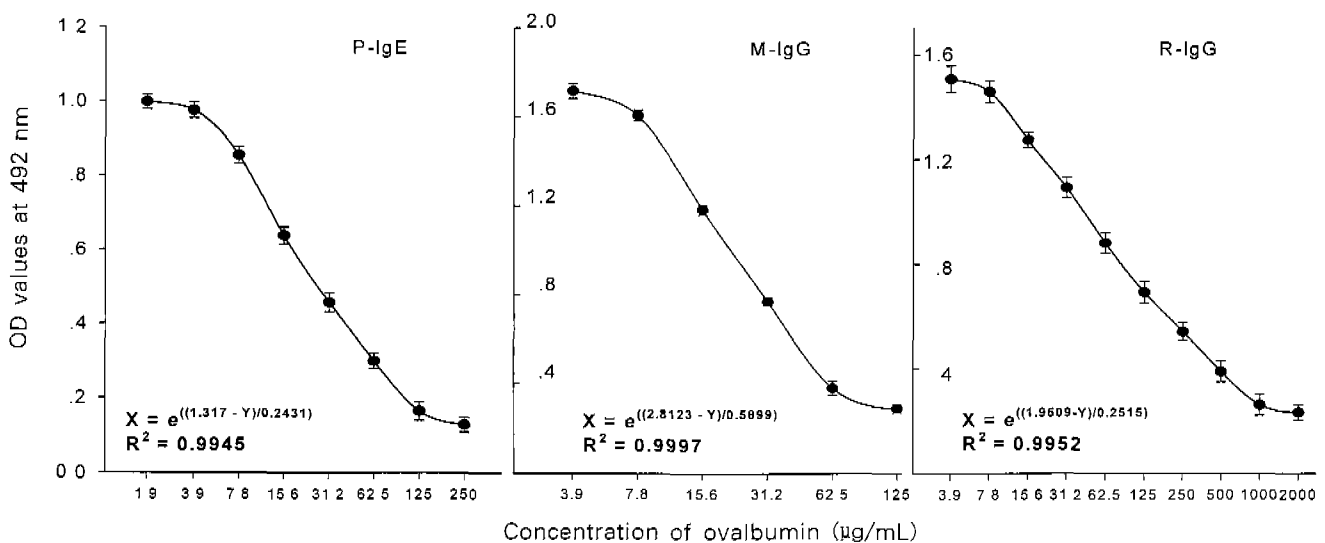


Fig. 1. Standard curves for quantifying intact ovalbumin (OVA).

The curves were made by Ci-ELISA individually formatted with egg-allergic patients' IgE (P-IgE), mouse monoclonal IgG (M-IgG) and rabbit polyclonal IgG (R-IgG) against OVA. Standard solution was prepared by dilution of intact OVA solution (2.0 mg/mL). The equations in figures were used to determine the amount of OVA in sample solution recognized by Ab: X = Concentration of OVA; Y = OD value obtained from immune reaction of each Ab and coated OVA.

서 1,000 µg/mL의 범위에서 검출될 수 있었으며, 검출 한계는 0.1 µg/mL이었다.

감마선 조사 및 가열처리에 의한 OVA의 항원성 변화

가열처리 후 시료용액에 존재하는 OVA에 대한 각 항체의 반응성의 변화는 Table 2에 나타났다. 각 항체가 인식하는 OVA의 열변성은 항체의 종류에 따라 다르게 나타났는데, R-IgG는 60°C, M-IgG는 70°C부터, 그리고 P-IgE의 경우 80°C부터 항체반응성이 변화되는 것으로 관찰되었다. 지금까지 보고된 OVA의 열변성은 약 70°C부터 시작하여 85°C 전후에서 최고의 변성도를 나타낸다고 보고되었다(23,24). P-IgE의 경우 가열에 의해 OVA의 반응성은 80°C부터 급격히 감소하여 85°C부터 변화가 거의 없었고, IgE의 반응성이 매우 약화되었다. 이 결과는 OVA의 알리지성이 가열처리에 의해 감소된다는 이전의 보고들(16,17)과 일치하였다. 흥미있게도 M-IgG와 R-IgG에서는 가열처리된 OVA에 대한 항체의 반응성이 급격히 증가하는 것으로 나타났다. M-IgG의 경우 85°C 처리구에서 최고의 반응성을 나타냈으며, 이때 항체반응성은 37°C 처리구에 비해 약 34.7배 정도 높은 값을 나타냈다.

더 높은 온도에서의 가열처리구에 대한 항체반응성이 점차 감소하였으나, 멸균조건에서도 M-IgG의 epitope는 완전히 파괴되지 않고 오히려 37°C보다 약 20배 정도 항체가 더 잘 인식할 수 있는 구조를 형성한 것으로 나타났다. R-IgG의 항원과의 반응성은 80°C 처리 OVA에 대해 가장 높게 나타났으며, 급격히 감소하여 90°C 처리부터는 반응성이 37°C와 거의 같게 유지되었다. 단백질은 가열에 의해 그 구조가 변할 수 있으며, 그에 따라 항원성도 변화된다(25). 가열에 의한 OVA의 구조적 해리는 70°C부터 80°C 이하의 가열에서 활발히 진행되고 단백질 표면에 존재하는 항원결정기의 노출이 변성 전보다 더 많이 진행되어 항체가 쉽게 결합할 수 있는 조건으로 변화하여, M-IgG나 R-IgG의 경우와 같은 항체반응성의 증가를 나타낼 수 있다(19).

감마선 조사와 가열처리의 병용처리가 P-IgE의 항원-항체반응성에 미치는 영향은 처리 순서와는 관계없이 모든 가열온도에서 큰 변화를 나타내지 않았고 더 감소하는 것으로 나타났다(Table 3, 4). 이전보고(15)에서와 같이 감마선 조사(10 kGy)가 M-IgG의 항원-항체 반응성을 증가시켰으며, 가

Table 2. Detected concentration (µg/mL) of ovalbumin in sample solutions heated at the designated temperatures by ELISA individually formatted with the different antibodies

Antibodies ¹⁾	Temperature (°C)								
	37	60	70	75	80	85	90	Boiled (100)	Autoclaved (121)
Patients' IgE	10.3 ^a	9.9 ^{aX}	10.5 ^{aX}	9.5 ^{aX}	6.1 ^{bX}	1.9 ^{cX}	1.2 ^{dX}	1.3 ^{dX}	1.3 ^{dX}
Mouse IgG, monoclonal	11.2 ^a	12.1 ^{aX}	17.1 ^{bY}	121.4 ^{cY}	258.3 ^{dY}	346.9 ^{eY}	289.9 ^{dY}	204.4 ^{dY}	170.7 ^{eY}
Rabbit IgG, polyclonal	10.3 ^a	35.6 ^{bY}	171.6 ^{bZ}	867.4 ^{cZ}	1,653.6 ^{dZ}	75.3 ^{eZ}	13.3 ^{eZ}	9.3 ^{eZ}	10.4 ^{eZ}

Means (n=5).

¹⁾Heat treatment to samples was isothermally processed in the designated temperatures for 15 min.

^{a-e}Means in the same row with different letters are significantly differences (p<0.05).

^{X-Z}Means in the same column with different letters are significantly differences (p<0.05).

Table 3. Detected concentration (µg/mL) of ovalbumin in sample solutions 10 kGy gamma-irradiated after heating at the designated temperatures by ELISA individually formatted with the different antibodies

Antibodies ¹⁾	Temperature (°C)								
	37	60	70	75	80	85	90	Boiled (100)	Autoclaved (121)
Patients' IgE	1.5 ^{aX}	1.2 ^{aX}	1.7 ^{aX}	1.4 ^{aX}	1.4 ^{bX}	0.5 ^{bX}	0.5 ^{bX}	0.5 ^{bX}	0.6 ^{bX}
Mouse IgG, monoclonal	49.5 ^{aY}	57.4 ^{bY}	50.8 ^{aY}	52.3 ^{aY}	47.6 ^{aY}	43.4 ^{aY}	40.3 ^{aY}	36.1 ^{aY}	47.6 ^{aY}
Rabbit IgG, polyclonal	41.4 ^{aY}	44.3 ^{aZ}	64.5 ^{bZ}	47.1 ^{aY}	39.8 ^{aY}	9.3 ^{cZ}	11.0 ^{cZ}	7.3 ^{cZ}	1.3 ^{dX}

Means (n=5).

¹⁾Heat treatment to samples was isothermally processed in the designated temperatures for 15 min.

^{a-e}Means in the same row with different letters are significantly differences (p<0.05).

^{X-Z}Means in the same column with different letters are significantly differences (p<0.05).

Table 4. Detected concentration (µg/mL) of ovalbumin in sample solutions heated at the designated temperatures after gamma irradiation of 10 kGy by ELISA individually formatted with the different antibodies

Antibodies ¹⁾	Temperature (°C)								
	37	60	70	75	80	85	90	Boiled (100)	Autoclaved (121)
Patients' IgE	1.8 ^{aX}	1.4 ^{aX}	1.3 ^{aX}	0.9 ^{bX}	0.9 ^{bX}	0.7 ^{bX}	1.0 ^{bX}	1.1 ^{bX}	1.1 ^{bX}
Mouse IgG, monoclonal	52.2 ^{aY}	69.5 ^{bY}	76.4 ^{bY}	82.8 ^{cY}	92.6 ^{dY}	107.3 ^{eY}	111.9 ^{eY}	100.5 ^{dY}	105.9 ^{eY}
Rabbit IgG, polyclonal	23.7 ^{aZ}	55.8 ^{bY}	14.8 ^{cZ}	8.9 ^{cZ}	12.5 ^{cZ}	6.3 ^{dZ}	15.9 ^{cZ}	22.7 ^{aZ}	20.5 ^{aZ}

Means (n=5).

¹⁾Heat treatment to samples was isothermally processed in the designated temperatures for 15 min.

^{a-e}Means in the same row with different letters are significantly differences (p<0.05).

^{X-Z}Means in the same column with different letters are significantly differences (p<0.05).

Table 5. Optical densities at 340 nm of ovalbumin solution (2.0 mg/mL) treated with the combination treatment of heat and gamma irradiation of 10 kGy

Treatment ¹⁾	Temperature (°C)								
	37	60	70	75	80	85	90	Boiled (100)	Autoclaved (121)
Heated	0.013 ^{aX}	0.023 ^{bX}	0.020 ^{bX}	0.026 ^{bX}	0.069 ^{cX}	0.178 ^{dX}	0.200 ^{eX}	0.210 ^{eX}	0.214 ^{eX}
Heated and irradiated	1.124 ^{aY}	1.185 ^{bY}	1.193 ^{bY}	1.314 ^{cY}	2.121 ^{dY}	1.950 ^{eY}	1.841 ^{eY}	1.841 ^{eY}	1.681 ^{fY}
Irradiated and heated	1.290 ^{aZ}	1.299 ^{abY}	1.313 ^{bZ}	1.337 ^{bY}	1.327 ^{bZ}	1.266 ^{dZ}	1.364 ^{cZ}	1.302 ^{abZ}	1.211 ^{eZ}

Means (n=5).

¹⁾Heat treatment to samples was isothermally processed in the designated temperatures for 15 min.

^{a-f)}Means in the same row with different letters are significantly differences (p<0.05).

^{x-z)}Means in the same column with different letters are significantly differences (p<0.05).

열처리와 병용처리에서 처리 방법에 따라 증가(감마선 조사 후 가열처리)하거나, 감소(가열처리 후 감마선 조사)하는 경향을 나타냈다. R-IgG의 경우도 M-IgG에서와 같이 감마선 조사에 의해 항원-항체 반응성이 증가되었다.

시료용액의 혼탁도 변화

가열처리와 감마선 조사와의 병용처리에 의한 단백질의 구조변화 정도를 관찰하기 위해 시료용액의 혼탁도 변화를 측정하였다(Table 5). 가열처리에 의해 시료용액의 혼탁도가 증가하였고, 90°C 이상에서는 큰 차이를 나타내지 않았다. 감마선 조사에 의해 혼탁도가 매우 높게 증가하는 것이 관찰되었다. 이 결과는 다른 식품 단백질에서 발견된 것과 유사한 경향을 나타냈는데(11,14), 감마선 조사에 의한 용액내 단백질의 구조가 매우 심하게 변형되었으며, 감마선 조사에 의한 구조변성은 일반적인 가열처리와는 다른 형태로 진행된다는 것을 예측할 수 있다(8). 가열처리와 감마선 조사의 병용처리에서 가열 후 감마선 조사구에서 80°C까지 혼탁도의 증가가 관찰되었고, 가열처리된 OVA에 대한 감마선 조사가 계속적인 구조변화를 일으킨 것으로 판단된다. 감마선 조사 후 가열처리구에서도 역시 혼탁도의 변화가 관찰되었지만, 가열처리 후 감마선 조사구에 비해 처리 온도에 따라 큰 차이를 나타내지는 않았다. 이 결과는 감마선 조사된 후 가열처리공정에서 단백질 분자의 재형성, 또는 반복적인 변성이 진행되지 않는다는 것을 시사하며, 감마선 조사 후 가열처리구에서 항원-항체 반응성의 변화가 거의 관찰되지 않은 결과들(Table 4)과 매우 유사하게 나타났다. 또한, 시료의 혼탁도에 미치는 영향은 열변성보다는 감마선 조사에 의한 영향이 더 크다는 것을 나타내었다.

현재까지 가열처리와 감마선 조사의 병용처리에서 식품알러지 항원의 구조적 변화 및 항원성(알러지성)에 대한 연구는 보고되고 있지 않아 대부분의 식품가공 공정 중 사용되는 가열처리가 알러지 억제에 대해 감마선 조사된 식품 단백질의 항원성 및 알러지성에 미치는 영향과 그 변화가 식품알러지에 미치는 효과를 이해할 수 있는 자료의 확보가 매우 필요하였다. 그러므로, 이 연구로부터 얻어진 결과들은 가공식품의 원료에 사용되는 계란의 알러지성을 억제시키기 위한 방사선 조사가 가공 중 가열처리에서도 그 알러지성의 변화를 나타내지 않는다는 기초자료를 제공하였다.

요 약

이 연구는 난백단백질의 알러지성을 없애기 위해 감마선 조사된 OVA에 대한 가열처리가 항원성(알러지성) 및 구조변화에 미치는 영향을 조사하기 위해 수행되었다. OVA 용액(2.0 mg/mL)을 1) 가열처리; 2) 가열 후 조사; 3) 조사 후 가열처리로 준비하였다. 시료를 개별적으로 가열처리하였고, 감마선 조사는 10 kGy의 흡수선량을 얻도록 조사하였다. 계란알러지가 있는 환자의 혈청과 OVA에 대해 생산된 단클론항체(M-IgG)와 다클론항체(R-IgG)를 사용하여 확립된 경합간접효소면역분석법을 사용하여 시료용액에 있는 OVA의 항원-항체 반응성을 측정하였다. 열변성된 OVA에 대한 항체반응성은 R-IgG가 60°C, M-IgG가 70°C부터, 그리고 P-IgE의 경우 80°C부터 변화하기 시작하였다. P-IgE는 80°C 이상의 온도에서 가열된 OVA를 잘 인식하지 못하였다. 반면에, M-IgG와 R-IgG의 경우 가열처리된 OVA에 대한 항체의 반응성이 급격히 증가하는 것으로 나타났다. 감마선 조사와 가열처리의 병용처리된 OVA에 대한 P-IgE의 항원-항체 반응성에 미치는 영향은 처리 순서와는 관계없이 모든 가열온도에서 가열처리에 의한 큰 변화를 나타내지 않았다. 가열처리와 감마선 조사에서 시료용액의 혼탁도가 모두 증가하였고, 가열처리보다는 감마선 조사에 의한 혼탁도의 증가가 매우 높았다. 이 결과들은 가열처리가 감마선 조사되어 감소되어 있는 OVA의 알러지성에 큰 영향을 미치지 않는 것을 나타내었다.

감사의 글

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

문 헌

1. Samartín, S., Marcos, A. and Chandra, R.K. : Food hypersensitivity. *Nutr. Res.*, **21**, 473-497 (2001)
2. Yunginger, J.W. : Food antigens. In *Food allergy: adverse reactions to food and food additives*, Blackwell Scientific Publications, Boston, p.50-53 (1997)
3. Langeland, T. and Aas, L. : Allergy to hens egg white : clin-

- ical and immunological aspects. In *Food allergy and intolerance*, Brostoff, J. and Callacombe, S.J. (eds.), Baillière Tindall, London, p.367-374 (1987)
4. Hefle, S.L. : The molecular biology of food allergy. *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, **16**, 565-590 (1996)
 5. Asselin, A., Hebert, J. and Amiot, J. : Effects of *in vitro* proteolysis on the allergenicity of major whey proteins. *J. Food Sci.*, **54**, 1037-1039 (1989)
 6. 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)
 7. Taylor, S. : Food allergy-The enigma and some potential solutions. *J. Food Prot.*, **43**, 300-306 (1980)
 8. Matsuda, T., Tsuruta, K., Nakabe, Y. and Nakamura, R. : Reduction of ovomucoid immunogenic activity on peptic fragmentation and heat denaturation. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2237-2241 (1985)
 9. Thayer, D.W. : Wholesomeness of irradiated foods. *Food Technol.*, **48**, 132-135 (1994)
 10. Shea, K.M., Balk, S.J., Gitterman, B.A., Miller, M.D., Shannon, M.W., Weil, W.B., Galson, S.K., Linet, M., Miller, R.W., Rogan, W., Coven, B., Bearer, C.F., Etsel, R.A., Goldman, L., Halbrook, B., Kaferstein, F., Keener, K., Thayer, D.W. and Hall, L.A. : Technical report: Irradiation of food. *Pediatrics*, **106**, 1505-1510 (2000)
 11. Byun, M.W., Kim, J.H., Lee, J.W., Park, J.W., Hong, C.S. and Kang, I.J. : Effects of gamma irradiation on the conformational and antigenic properties of a heat-stable major allergen in brown shrimp. *J. Food Prot.*, **63**, 940-944 (2000)
 12. 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)
 13. Kume, T. and Matsuda, T. : Changes in structural and antigenic properties of proteins by radiation. *Radiat. Phys. Chem.*, **46**, 225-231 (1995)
 14. Lee, J.W., Kim, J.H., Yook, H.S., Kang, K.O., Lee, S.Y., Hwang, H.J. and Byun, M.W. : Effects of gamma radiation on the allergenic and antigenic properties of milk proteins. *J. Food Prot.*, **64**, 272-276 (2001)
 15. 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 2*) by gamma irradiation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **30**, 500-504 (2001)
 16. Koch, C., Jensen, S.S., Oster, A. and Houen, G. : A comparison of the immunogenicity of the native and denatured forms of a protein. *APMIS.*, **104**, 115-125 (1996)
 17. Peng, H.J., Chang, Z.N., Tsai, L.C., Su, S.N., Shen, H.D. and Chang, C.H. : Heat denaturation of egg-white proteins abrogates the induction of oral tolerance of specific Th2 immune responses in mice. *Scan. J. Immunol.*, **48**, 491-496 (1998)
 18. Holm, N.W. and Berry, R.J. : *Manual on Radiation Dosimetry*. Marcel Dekker Inc., New York (1970)
 19. Lee, J.W., Park, J.H., Kim, C.J. and Shin, H.K. : Monitoring thermally induced conformational changes in bovine muscle myosin solutions by competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (Ci-ELISA). *Int. J. Food Sci. Technol.*, **33**, 411-418 (1998)
 20. Chan, J.K., Gill, T.A. and Paulson, A.T. : Thermal aggregation of myosin subfragments from cod and herring. *J. Food Sci.*, **58**, 1057-1061 (1993)
 21. SAS : *SAS/STAT: User's Guide*. 6th edition, SAS Institute Inc., Cary, NC (1988)
 22. Kim, J.B. : Development of chemiluminescence immunoassay for the measurement of plasma steroid and urinary steroid glucuronides. *Ph.D. Thesis*, University of London, UK (1983)
 23. Galazka, V.B., Smith, D., Ledward, D.A. and Dickinson, E. : Interactions of ovalbumin with sulphated polysaccharide: effects of pH, ionic strength, heat and high-pressure treatment. *Food Hydrocol.*, **13**, 81-88 (1999)
 24. Koike, A., Nemoto, N. and Doi, E. : Structure and dynamics of ovalbumin gels : 1. Gel induced by high-temperature heat treatment. *Polymer*, **37**, 587-593 (1996)
 25. Kaminogawa, S., Shimizu, M., Ametani, A., Hattori, M., Ando, O., Hachimura, S., Nakamura, Y., Totsuka, M. and Yamauchi, K. : Monoclonal antibodies as probes for monitoring the denaturation process of bovine β -lactoglobulin. *Biochim. Biophys. Acta.*, **998**, 50-56 (1989)

(2001년 7월 28일 접수)