

미생물효소에 의한 우유 casein의 항원성 저감화

김동운 · 채현석 · 안종남 · 정석근 · 함준상 · 인영민
농촌진흥청 축산기술연구소

Reduction of Antigenicity of Bovine Casein by Microbial Enzymes

D. W. Kim · H. S. Choe · C. N. Ahn · S. G. Jeong · J. S. Ham · Y. M. In
National Livestock Research Institute, R.D.A.

ABSTRACT

It is extremely important to destroy the antigenicity of milk proteins for dietetic treatment of infants with milk allergy. Enzymatic digestion of milk protein is not only effective for destroying antigenicity, but it also is less liable to alter the nutritive value. Bovine casein was hydrolyzed with eight different commercial proteases derived from bacterias or fungi, either individually or in combination to eliminate protein allergenicity. The average molecular weight of casein hydrolsates determined by size exclusion chromatography is about 550~2,300 dalton range. Antigenicity of the casein hydrolsates was not detected by heterologous passive cutaneous anaphylaxis in guinea pig-rabbit antiserum system. The inhibition test on the enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) showed that the antigenicity of casein hydrolsates is lowed up to 1/8,000 than that of intact bovine casein. As the enzyme reaction was carried out by the combination of bacterial and fungal protease, casein hydrolsates showed much lower bitterness and antigenicity. It suggests that these hydrolsates will be applied to many kinds of foods including the development of hypo-allergenic infant formula.

(Keyword : Casein hydrolysate, Antigenicity, Inhibition ELISA, PCA)

I. 서론

우유는 인류가 옛날부터 이용해온 식품으로서 현재에도 다양한 가공식품에 널리 이용되고 있고, 유아용 분유의 주원료로써 유아영양식의 중요한 자리를 차지하고 있다. 그러나 한편으로는 우유가 알레르기(allergy)의 원인 물질로써도 작용할 수 있으므로, 이것은 우유를 주요 영양원으로 하는 인공영양아에게

있어서는 커다란 문제가 되는 경우가 있다. 이와 같은 우유 알레르기는 우유에 포함되어 있는 단백질이 모유의 단백질과 다름에 의해 일어나는 면역학적 질환이다(Baldo 등, 1984; Hanson 등 1961; Savilahti, 1971). 사람에 따라서 이종단백질인 우유단백질이 소화관내에서 충분히 분해되지 않고 항원성을 가진채 체내에 흡수되기 때문에 일어나고 특히 소화관이나 면역기능이 미발달한 유유아(乳幼兒)에 발증하기 쉽다고 한다. 우유알레르기에 의한 임상증상으로는 구토나 설사 등 소화관 증상이 많고 식품에 의한 알레

Corresponding author : D. W. Kim, Nutrition Physiology Division National Livestock Research Institute RDA, Suwon, 441-706, Korea

르기에 나타나는 증상을 거의 망라하고 있다.

우유단백질에는 약 20종 이상의 단백질이 있는데 그 중에서 whey 단백질의 구성성분인 β -lactoglobulin이 항원성이 높고, 또 casein 단백질에서도 항원성이 있음이 보고 되었다(Goldman 등, 1963; Lebenthal, 1975). 우유알레르기에 민감한 유아에 우유단백질 이외의 단백질, 예를 든다면 대두 단백질을 이용하는 방법도 있지만, 영양가나 풍미의 면에서 문제가 있고, 우유알레르기에 민감한 유아는 다른 단백질에 의해서도 쉽게 알레르기가 일어난다고 한다. 우유중의 알레르겐(allergen)을 제거하는 방법으로 써 가열처리가 많은 연구자에 의해 검토되었다. 웨이 단백질은 가열에 의해 항원성이 저하하지만 casein에는 아무런 변화가 없는 것이 관찰 되었다(Ratner 등, 1958). 또 가열에 의해서는 메이라드 반응에 의해 β -lactoglobulin과 유당의 결합이 일어나고 이 생성물의 항원성을 원래의 β -lactoglobulin의 약 100배의 알레르겐성을 나타낸다고 한다(Bleumink 등, 1968). 가열처리만으로 우유단백질의 알레르겐을 제거하기에는 효과적이라고 말할 수 없다.

알레르기를 저감시키기 위해서는 원인물질인 단백질의 제거가 효과적인데, 단백질분자 중에서도 항체와 결합하거나, 림프세포와 반응하는 등 실제로 알레르기 반응에 관여하는 부분인 에피토프(epitope)라고 불리는 부분을 파괴, 제거 또는 수식함으로써 단백질의 항원성을 저감하는 것이 가능하며, 가장 일반적인 방법은 효소분해(Asselin 등, 1988; Asselin 등, 1989; Jost 등, 1987; Pahud 등, 1985)에 의해 에피토프를 절단하고 파괴하는 것이다. 따라서 효소에 의한 casein 단백질의 분해정도를 높여주면 동시에 항원성 저하도 가능하다. 그러나 이때 생성된 펩타이드의 말단에 결합되어 있는 소수성 아미노산에 의한 쓴맛 때문에 식품소재로서 큰 문제가 되기도 한다. 단백질을 가수분해하면 쓴맛을 나타낸다는 것은 일반적으로 알려진 것이다. 단백질분자의 바깥쪽은 친수성 아미노산으로 덮혀 있고, 안쪽은 소수성 아미노산이 자리 잡고 있다. 따라서 단백질은 이 상태에서는 무맛이지만, 단백질을 가수분해하면 구상의 구조는 파괴되고 안쪽에 존재하는 소수성 아미노산을 많이 포함한 부분이 노출하게 된다. 이 소수성 아미노산을 많이 포함한 펩타이드가 쓴맛의 원인이 된다(Matoba & Hata 1972). 따라서 한번 생성된 쓴맛 펩타

이드의 말단에 결합되어 있는 소수성 아미노산을 선택적으로 제거하는 펩티다제효소로 가수분해하면 쓴맛은 저감 또는 소실한다(Minagawa et al. 1989; Umetsu et al. 1983). 본 연구에서는 풍미도 좋으면서 항원성이 감소된 peptide 혼합물이 얻어질 수 있도록 박테리아 및 곰팡이 유래의 효소를 단독 또는 복합사용하여 만들어진 가수분해물의 특성과 항원성 저감을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

본 실험에 사용한 Alcalase, Neutrase, Protamex, Flavourzyme은 Novo Nordisk사의 효소이며, LP, MP는 신일본화학, Promod192는 Biocatalyst 제품이다. Casein은 Merk사의 제품을 사용 하였다.

2. casein 가수분해물의 제조

펩타이드 혼합물을 제조하기 위하여 Alcalase, Neutrase, Protamex, Flavourzyme 등 효소 1%(W/W)를 5% casein 용액에 첨가하고 50℃에서 24시간 반응하였다. 반응 후 90℃ 20분간 가열하여 효소를 실행시키고 4℃에서 하룻밤 방치하였다. 침전물을 원심으로 제거한 후 상등액을 건조기에서 건조한 것을 펩타이드 혼합물로 하였다.

3. 분해물의 분자량 측정

분해물의 분자량 측정은 TSKgel G3000PWXL(Toso사, 7.8mm×30cm)칼럼이 2개 연결된 HPLC(Jasco사)를 사용하여 측정하였다. 표준분자량 측정에 사용된 표준물질은 β -lactoglobulin(18,400), α -lactalbumin(14,000), aprotinin(6,500), insulin B fragment(3,450), α -MSH(1,665), bradykinin(1,060)를 사용하였다. 용출용액은 0.1% TFA: acetonitril(50:50)을 사용하였고 유량은 0.3ml/min, 검출은 220nm의 자외선흡수에 의해 측정하였다.

4. 유리아미노산 측정

유리아미노산의 정량은 증류수 8ml에 1ml의 casein 가수분해물(0.1g/ml)과 1ml의 20% sulfosalicylic acid를 넣고 교반 시킨 후 3,000rpm에서 15분간 원심분리

하였다. 원심분리 후 상층액을 0.4 μ m의 마이크로필터로 여과한 후 아미노산 자동분석기(Hitachi L-8500A)를 사용하여 분석하였다.

5. 쓴맛의 평가

관능검사는 훈련된 패널 5명으로 하여금 쓴맛을 4점 평점법으로 평가하게 하였다. 평가결과는 쓴맛이 전혀 없다-0, 약하게 감지할 수 있다-1, 보통 감지할 수 있다-2, 강하게 감지할 수 있다-3, 극도로 강하게 감지할 수 있다-4로 평가하였다.

6. casein에 대한 항혈청의 제조

Casein을 항원으로 하고 2.5~3kg의 토끼(New Zealand White 종) 3마리를 실험동물로 사용하였다. 즉, 500 μ g의 항원을 멸균한 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2) 1ml에 용해하고 동량의 Freund's complete adjuvant(Difico, U.S.A)와 혼합하여 W/O emulsion을 만들어 1.5ml를 토끼의 등부위 10군데 피내주사 하였다. 최초 면역후 2주 및 6주째에 추가면역(boosting)을 실시하였다. 이때 항원의 주입량은 일차면역과 같았으나 Freund's incomplete adjuvant(Difico, U.S.A)를 사용하였다. 마지막 면역 10일 후 혈액을 채취하여 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 정치시킨 후 항혈청을 분리하고, 이중 가장 높은 항체가의 항혈청을 실험에 사용하였다.

7. Competitive Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(cELISA)

Casein 가수분해물의 항원성을 실험하기 위하여, 앞에서 준비한 토끼 항-casein 항혈청(rabbit anti-casein antiserum)을 이용하여 川瀬(1990)의 방법을 변형한 cELISA를 실시하였다. 즉, 항원으로 사용한 casein을 0.1M sodium bicarbonate buffer(pH9.5)에 0.01%의 농도로 용해하여 microplate의 각 well당 200 μ l씩 분주하여 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 이상 coating한 후 well당 200 μ l의 0.05% Tween-20을 함유하는 PBS(PBS-Tween)로 3회 세척하였다. PBS-Tween으로 1/70,000로 희석한 항혈청과 PBS-Tween에 용해한 여러농도의 casein가수분해물 또는 casein 용액을 동량 혼합하여 well당 100 μ l씩 첨가

하고, 37 $^{\circ}$ C에서 한시간 incubation한 다음 Tween-20으로 앞에서와 같이 세척하였다. anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate(Sigma)를 Tween-20에 1/1,000로 희석하여 well당 100 μ l씩 주입하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. 그 다음 1M diethanolamine buffer(pH9.8)에 0.1% 농도로 용해시킨 p-nitrophenylphosphate용액을 well당 100 μ l씩 주입하고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 incubation한 후, 5N NaOH를 well당 20 μ l씩 첨가하여 효소 반응을 중지시키고 ELISA reader로 흡광도(405nm)를 측정하였다. 시료 중의 항원이 well에 coating된 항원과 항체의 결합을 저해하는 비율(inhibition rate)은 다음의 식으로 나타내었다.

Inhibition rate(%)=

$$\left[1 - \left(\frac{\text{시료를처리한well의흡광도}}{\text{시료를처리하지않은well의흡광도}} \right) \right] \times 100$$

8. Passive Cutaneous Anaphylaxis(PCA) test

수동피부아나필렉시스 반응은 松橋(1986)의 방법에 의한 heterologous PCA test로 실시하였다. 즉 건강한 guinea pig(Hartley系, 250~300g)를 실험동물로 하여 등의 털을 제거하고, 미리 phosphate buffered saline (PBS, pH7.6)으로 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/100으로 희석하여 둔 토끼 anti-casein 항혈청을 각각 100 μ l씩 guinea pig의 등부위에 여러군데 나누어 피내주사하여 4시간동안 감각시켰다. 다음으로 PBS에 용해한 항원용액을 1%의 Evans blue용액과 동량 혼합하고 마리당 2.5mg씩의 항원을 심장에 0.5ml주사하였다. 30분 후에 guinea pig를 처사하고 피내주사한 부위의 피부를 절개하여 피부의 안쪽에 나타난 청색반점의 직경을 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 분해물의 쓴맛 및 평균분자량

우유 알레르기의 원인물질(allergen) 중의 하나인 casein 단백질의 항원성을 저감시키기 위해서는 분자량의 크기가 중요하다. 단백질의 항원결정부위가 일정한 크기를 갖기 때문에 분자구조를 작게 하면 할수록 항원성이 저하될 것이 예상된다. 따라서 casein을 생체가 allergen으

Table 1. Molecular weight and bitterness of casein hydrolysates.

Enzymes	Bitterness	Average molecular weight (dalton)
Alcalase	4	1,100
Neutrased	4	2,300
Protamex	4	1,500
Pescalase	4	1,200
Flavourzyme	2	920
LP	2	1,050
MP	2	1,140
Promod	1.5	770
Fla+Prota	1	550
Pro+Prota	1	690

로 인식할 수 없는 수준의 저분자로까지 가수분해하여 항원성을 저감시키고 또한 풍미가 좋은 casein 분해물을 제조하기 위하여 분해 특성이 다른 각종 효소를 사용하였다. 만들어진 가수분해물의 평균분자량을 size-exclusion chromatography 방법을 이용하여 측정하였고 관능검사를 통한 쓴맛평가를 검토하였다(Table 1).

대조구인 casein의 경우 평균분자량은 약 23,00 ~ 24,000 dalton 부근이고 쓴맛이 없을 뿐만 아니라 casein 특유의 맛을 나타낸다. 박테리아유래의 효소인 Alcalase, Neutrased, Protamex, Pescalase를 처리한 casein 가수분해물의 평균분자량은 1100, 2300, 1500, 1200 dalton 정도이었고 박테리아 효소 중에서는 Alcalase가 단백질의 저분자화에 가장 효과적이었으나 역시 쓴맛은 강한 편이었다. 그러나 곰팡이 유래의 효소인 MP, Flavourzyme, LP, Promod에 의한 가수분해물의 평균분자량은 1140, 920, 1050, 770 dalton으로서 더욱 분자량이 작았으며 쓴맛도 현저히 감소하였다. 특히 *Aspergillus* 기원의 Flavourzyme과 Promod는 1000이하의 저분자 펩타이드의 생성이 가장 많았고 쓴맛도 현저히 감소하여 이들 효소가 쓴맛이 적고 저분자화 가수분해물을 얻는데 효과적이었다. 한편 쓴맛과 분자량을 더욱 줄이기 위하여 분해 특성은 다르나 중성부근에서 반응하는 2종류의 효소를 조합하는 방법을 검토하였다. 먼저 저분자화와 쓴맛을 나타내는 Protamex(Prota)와 저분자화도 강하고 쓴맛이 적은 Flavourzyme(Fla), Promod(Pro)를 함께 사용하여 살펴본다. Fla+Prota처리구와 Pro+Prota 처리구의 평균분자량은 각각 550과 690 dalton으로 분자량이 저하하였고 쓴맛도 약간 감소하였다.

2. 유리아미노산 함량

쓴맛과 관련된 아미노산의 유리정도를 조사하기 위하여 casein 가수분해물의 유리아미노산조성을 Table 2에 나타내었다. LP, MP, Promod, Flavourzyme, Fla+Prota, Pro+Prota처리구에서의 유리아미노산의 함량은 각각 11.7, 11.2, 20.9, 24.4, 29.3, 27.8%로 Fla+Prota처리구가 가장 높았다. Endopetidase활성만을 가진 박테리아 효소의 처리구에서는 유리아미노산의 생성이 없었다(결과생략). 곰팡이 효소처리 가수분해물이 가장 좋았던 것은 이 효소가 endoprotease와 exoproteinase의 두 가지 활성을 동시에 가지기 때문에 단백질의 여러 부위를 절단하여 저분자화 시킬 뿐만 아니라, 쓴맛펩타이드의 말단에 붙어있는 소수성 아미노산을 제거하기 때문이라고 생각된다. Leucine, isoleucine, valine, lysine 등의 소수성 아미노산의 유리는 효소 단독처리구중에서 Promod와 Flavourzyme처리구가 MP나 LP에 비하여 높았으며, 효소 단독처리구보다는 효소복합처리구가 높았다. 또 하나 특이적인 것은 Promod와 Flavourzyme처리구에서 유리아미노산 중 Glu의 함량이 높았으며, 효소복합처리구는 단독처리구보다 글루타민산을 훨씬 많이 유리하는 특성을 보였다. 이것은 이들 효소들이 Glu에 대한 기질 특이성이 높다는 것을 의미한다. 글루타민산은 정미성 아미노산으로 좋은 맛을 내는 물질이며, 효소를 적절히 처리함으로써 글루타민산의 유리를 조절하여 식품소재로서 사용이 가능하다고 생각된다. 저분자화 및 쓴맛이 적은 단백질 가수분해물을 제조하기 위하여 한 종류의 효소를 사용하여 목적으로 하는 결과를 얻지 못할 경우 여러 종류의 효소를 조합하여 사용하는 경우가 있는데, Ena등(1995)은 곰팡이 유래의 단백질분해

Table 2. The amount of free amino acids of casein hydrolysates.

Amino Acid	LP	MP	Promod	Flavourzyme	Fla+Prota	Pro+Prota
Cys	0.134	0.143	0.159	0.148	0.228	0.129
Met	0.282	0.248	0.590	0.831	1.047	1.019
Asp	0.336	0.371	0.293	0.355	0.392	0.232
Thr	0.654	0.442	1.525	1.696	2.042	1.656
Ser	0.417	0.222	0.621	0.752	0.931	0.658
Glu	0.252	0.190	0.704	0.457	1.446	2.307
Gly	0.052	0.025	0.086	0.094	0.160	0.251
Ala	0.188	0.102	0.397	0.513	0.751	0.588
Val	0.549	0.552	1.094	1.309	1.829	1.491
Ile	0.357	0.358	1.178	1.578	1.851	1.389
Leu	1.668	1.808	3.802	4.309	4.960	4.184
Tyr	1.175	0.843	2.013	2.336	2.997	2.669
Phe	2.458	3.581	3.788	4.501	4.216	3.087
Lys	1.889	1.217	2.673	2.432	2.930	3.660
His	0.944	0.581	1.269	1.324	1.433	1.263
Arg	1.167	0.536	0.168	1.296	1.593	1.895
Pro	0.262	0.029	0.572	0.494	0.582	1.337
Total (g/100g)	11.783	11.248	20.932	24.425	29.388	27.816

효소와 동물성 소화효소의 조합처리로 유청단백질을 저 분자화하여 항원성이 저하된 가수분해물을 얻었다.

3. 유리아미노산의 경시적 변화

Table 3에 Fla+Prota복합효소처리에 의한 분해물중

의 유리아미노산의 경시적 변화를 나타냈다. 반응시간 0, 6, 12, 24, 48, 72시간 후에 유리아미노산의 생성량은 0, 13, 19, 29, 38, 43%로 증가 하였다. 전반적으로 반응 시간이 경과함에 따라 유리아미노산의 함량이 증가하였고 특히 tyrosine의 경우 반응 46~72시간사이에 많

Table 3. Changes in the amount of free amino acids during casein hydrolysis with Flavourzyme plus Protamex.

Amino Acids	0 (hour)	6	12	24	48	72
Cys	0.001	0.075	0.081	0.104	0.137	0.155
Met	0.000	0.549	0.699	1.094	1.613	1.804
Asp	0.000	0.129	0.162	0.306	0.585	0.713
Thr	0.000	0.417	0.746	1.533	2.288	2.501
Ser	0.000	0.288	0.460	0.898	1.551	1.668
Glu	0.000	0.420	0.709	1.308	2.452	3.475
Gly	0.000	0.030	0.055	0.118	0.270	0.309
Ala	0.000	0.241	0.386	0.755	1.228	1.559
Val	0.001	0.901	1.217	1.865	2.593	2.902
Ile	0.000	0.773	1.255	1.943	2.580	2.828
Leu	0.000	2.631	3.490	5.567	6.997	7.485
Tyr	0.000	1.354	1.962	2.757	2.412	4.315
Phe	0.000	1.950	2.557	3.150	3.474	3.658
Lys	0.003	1.491	2.106	3.340	4.646	5.356
His	0.000	1.006	1.343	1.757	2.070	2.205
Arg	0.000	0.707	1.327	2.052	2.628	1.361
Pro	0.000	0.208	0.335	0.615	1.006	1.210
Total (g/100g)	0.005	13.169	18.890	29.164	38.528	43.501

이 증가하였다. 유리아미노산의 함량이 반응 48시간째까지는 거의 비례적으로 증가하였으나 반응 72시간째에는 증가량이 감소되었다. 이것은 효소의 활성이 서서히 저하되었거나 효소와 반응할 수 있는 기질의 양이 감소하였기 때문으로 생각된다.

4. In vitro 항원성

각종 효소처리에 의하여 만들어진 casein 가수분해물들의 항원성 저감정도를 측정하기 위하여 토끼 항-casein 항혈청을 사용하여 ELISA 억제시험을 실시하였다. 항체결합을 50% 저해하는 미분해 casein 단백질의 농도는 $10^{3.6}$ ng/ml였으며, 박테리아 효소인 Neutrase, Alcalase, Protamex, Pescalase에 의한 casein 가수분해물의 경우 각각 $10^{4.8}$, $10^{5.5}$, $10^{5.9}$, $10^{6.1}$ ng/ml이었고(Fig. 1), 곰팡이 효소인 MP, Flavourzyme, LP, Promod 경우에는 각각 $10^{6.3}$, $10^{6.3}$, $10^{6.5}$, $10^{6.8}$ ng/ml로 나타났다(Fig. 2). 박테리아와 곰팡이효소의 조합인 Fla+Prota, Pro+Prota 처리구에서는 $10^{7.4}$, $10^{7.3}$ 로 나타났다(Fig. 3). 따라서 미분해 casein의 항원성을 1로 하면, 박테리아 효소에 의한 casein 분해물의 항원성은 최고 1/600로 저하되었고 박테리아 효소 처리구 중에서 Pescalase처리가 항원성 저감에 효과적이었다. 곰팡이 효소 처리구에서는 박테리아 효소처리구보다 더욱 항원성이 저감되어 약 1/3,000까지 저하되었다. 박테리아와 곰팡이효소의 조합인 경우에는 항원성은 최고 약 1/8,000까지 저하되어 endopeptidase 효소 단독보다는 exopeptidase 활성을 보유한 효소를 조합하여 사용함으로써 더욱 분자량을 감소시킬 수 있고, casein 단백질의 에피토프부분을 더욱 효과적으로 파괴하여 항원성을 저감시키는데 효과적이었다고 생각된다. 이것은 분자량 5,000dalton 이하의 polypeptide는 아주 약하게 면역원성을 나타내거나 거의 나타내지 않는 경향이 있고 아미노산이 10개 이하로 구성되어 있는 oligopeptide는 면역원성이 없는 것으로 간주되고 있다는(Adda와 Skehel, 1985) 보고와 일치한다.

5. In vivo 항원성

Casein과 가수분해물의 항원성 정도를 guinea pig을 이용한 PCA 시험결과를 Fig. 4에 나타냈다. 이 실험은 rabbit anti-casein antiserum을 guinea pig의 등부위에

주사하여 국소적으로 면역되었을 때 혈류를 통해 해당 항원과 색소를 혼합주사하면 알러지가 있는 경우에 anaphylaxis반응이 국소적으로 일어나면 그 부위에 청색반점이 생긴다. 대조구로서 casein의 경우 항혈청의

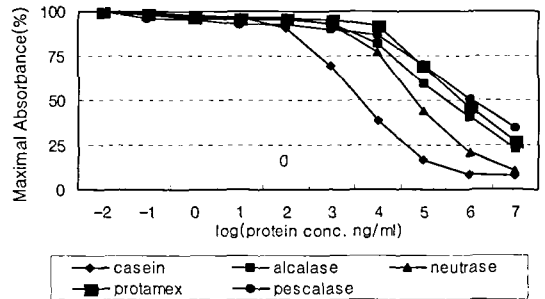


Fig. 1. Inhibition analyses of binding between rabbit anti-casein antiserum and casein protein hydrolysates by treatment of bacterial enzymes.

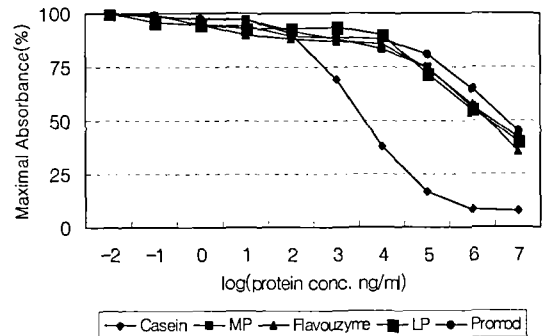


Fig. 2. Inhibition analyses of binding between rabbit anti-casein antiserum and casein protein hydrolysates by treatment with fungal enzymes.

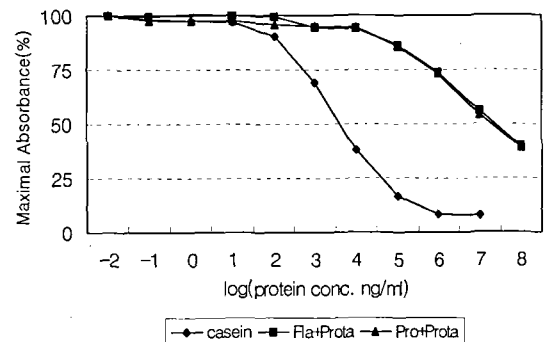


Fig. 3. Inhibition analyses of binding between rabbit anti-casein antiserum and casein protein hydrolysates by treatment with bacterial and fungal enzymes.

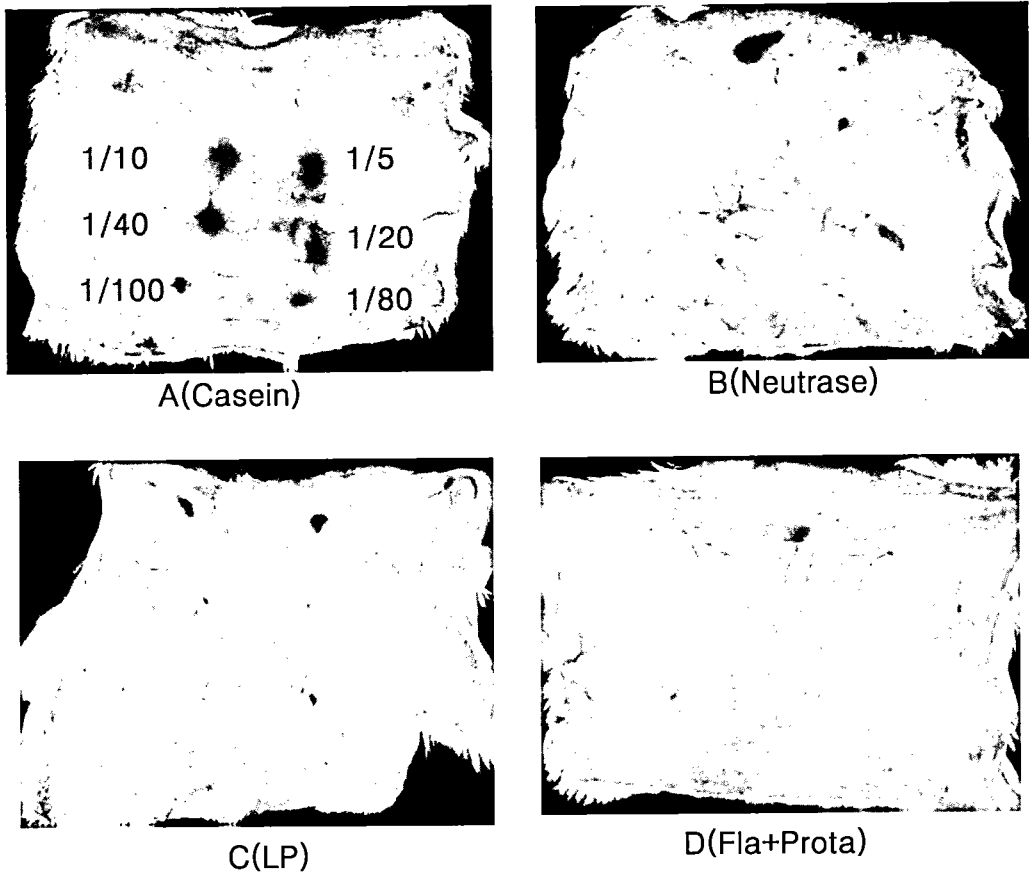


Fig. 4. Typical profiles of PCA test of casein hydrolysates with rabbit anti-casein antiserum. 100 μ l of antiserum was injected into guinea pig intracutaneously. Four hours later 0.5ml of 0.5% Evans blue containing of 2.5mg of casein hydrolysate was injected into heart. The animal was sacrificed 30min later.

희석배율 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80에서는 guinea pig의 등부위에 청색 반점이 나타났으나 1/100에서는 관찰되지 않았다. 한편 Neutrased 처리구에서는 약간의 흔적이 관찰되고, LP, Fla+Prota 효소처리구에서는 이러한 청색반점이 나타나지 않아, 이들 가수분해물은 충분히 항원성이 저감화 되었다고 생각된다.

IV. 요약

본 연구에서는 우유 알러지의 원인물질중의 하나인 casein 단백질질을 생체가 알르겐 물질로 인식할 수 없는 수준의 분자까지 분해하여 항원성을 저감시키고 또한 풍미가 좋은 casein 분해물을 제조하기 위하여 분해 특성이 다른 효소를 사용하여 만들어진 분해물의 특성

과 항원성을 조사하였다. 박테리아 효소인 Neutrased, Alcalase, Protamex, Pescalase을 처리한 casein 가수분해물의 평균분자량은 1,100~2,300 dalton이었고 곰팡이 효소인 MP, Flavourzyme, LP, Promod 경우에는 거의 770~1,140 dalton 범위였다. 항원성 저감정도를 측정하기 위하여 토끼항 casein 항혈청을 이용하여 ELISA 억제시험을 실시한 결과 항체결합을 50% 저해하는 미분해 casein 단백질의 농도는 10^{3.6} ng/ml였다. 박테리아 효소인 Neutrased, Alcalase, Protamex, Pescalase에 의한 casein 가수분해물의 값은 각각 10^{4.8}, 10^{5.5}, 10^{5.9}, 10^{6.1} ng/ml이었고, 곰팡이 효소인 MP, Flavourzyme, LP, Promod 경우에는 각각 10^{6.3}, 10^{6.3}, 10^{6.5}, 10^{6.8} ng/ml로 나타났다. 박테리아와 곰팡이 효소의 조합인 Fla + prota, Pro + prota 처리구에서는 10^{7.4}, 10^{7.3} ng/ml

로 나타났다. 따라서 미분해 casein의 항원성을 1로 하면, casein 분해물의 항원성은 최고 1/8,000 이하로 저하되었다. 수신피부아나피렉시스반응(PCA)을 이용한 항원성시험에서 casein으로 피하 감각할 경우 푸른색 반점이 나타났으나 효소처리구에서는 이러한 반점이 나타나지 않아 충분히 항원성이 저감화 되었음을 확인하였다.

V. 참고문헌

- Adda, G. and Skehel, J.J. 1985. Are peptides good antigens? *Nature*, 316:764.
- Asselin, J., Amiot, J., Gauthier, S.F., Mourad, W. and Hebert, J. 1988. Immunogenicity and allergenicity of whey protein hydrolysates. *J. Food Sci.*, 53:1280-1211.
- Asselin, J., Hebert, J. and Amiot, J. 1989. Effects of in vitro proteolysis on the allergenicity of major whey proteins. *J. Food Sci.*, 54:1037-1039.
- Baldo, B.A. 1984. Milk allergies. *Aust. J. Dairy Technol.*, 39:120.
- Bleumink, E. and Young, E. 1968. Identification of the atopic allergen in cow's milk. *Int. Arch. Allergy*. 34:521-543.
- Ena, J.M., Van Beresteijn, E.C.H., Robben, A. and Schmidt, D.G. 1995. Whey protein antigenicity reduction by fungal proteinases and a pepsin/pancreatin combination. *J. Food Sci.*, 60:104-110.
- Goldman, A.S., Anderson, D.W., Sellers, W.A., Sapersteine, S., Kniker, W.K. and Halpen, S.T. 1963. Milk allergy. I. Oral challenge with milk and isolated milk protein in allergic children. *Pediatr*, 22:425-443.
- Goldman, A.S., Sellars, W.S., Halpern, S.R., Anderson, D.W., Furlow, T.E. and Johnson, C.H. 1963. Milk allergy. II. Skin testing of allergic and normal children with purified milk proteins. *Pediatr*, 32:572-579.
- Hanson, L.A. and Mansson, I. 1961. Immune electrophoretic studies of bovine milk and milk products. *Acta Paediatr. Scand.*, 50:484-490
- Jost, R., Monti, J. C. and Pahud, J. J. 1987. whey protein allergenicity and its reduction by technological means. *Food Technol.*, 41:118-121.
- Lebenthal, E. 1975. Cow's milk protein allergy. *Pediatr. Clin. North Am.*, 22:827-833.
- Matoba, T. and Hata, T. 1972. Relationship between bitterness of peptides and their chemical structure. *Agri. Bio. Chem.* 36:1423.
- Minagawa, E., Kaminogawa, S., Tsukasaki, F. and Yamauchi, K. 1989. Debitting mechanism in bitter peptides of enzymatic hydrolysates from milk casein by aminopeptidase T. *J. Food Sci.*, 54:1225-1229.
- Pahud, J.J., Monti, J.C. and Jost, R. 1985. Allergenicity of whey protein: Its modification by tryptic in vitro hydrolysis of the Protein. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 4:408-413.
- Ratner, B., M. Dworetzky, S. Oguri and L. Aschreim. 1958. Studies on the allergenicity of cow's milk:III. Effect of heat treatment on the allergenicity of milk and protein fractions from milk as tested in guinea pigs by sensitization and challenge by the oral route. *Pediatrics*. 22:653-658.
- Savilahti, E. 1971. Cow's milk allergy. *Allergy*, 36:73.
- Umetsu, H., Matsuoka, H. and Ichishima, E. Debitting mechanism of bitter peptides from milk casein by wheat carboxypeptidase. *J. Agric. Food Chem.*, 31:50-53.
- 川瀬興三. 1990. 牛乳蛋白質への酵素利用. 酪科・食研, 39:283-290.
- 松橋直. 1986. 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.