

NaOH, 열, 및 효소 처리에 의한 계란 난백 중 ovomucoid와 ovalbumin의 항원성 변화

류주현^{1,2} · 박춘욱¹ · 이종미² · 손동화^{1,*}

¹한국식품개발연구원 식품기능연구본부, ²이화여자대학교 식품영양학과

Antigenicity Changes of Ovomucoid and Ovalbumin in Chicken Egg White by NaOH, Heat and Protease Treatments

Ju-Hyune Ryu^{1,2}, Chun-Wuk Park¹, Jong-Mee Lee², and Dong-Hwa Shon^{1,*}

¹Korea Food Research Institute, ²Department of Food and Nutrition, Ewha Woman's University

Antigenicities of ovomucoid (OM) and ovalbumin (OA) in chicken egg white (EW) before and after NaOH, heat, and protease treatments were examined by competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ciELISA), using rabbit anti-OM and -OA antibodies. Enzymatic hydrolysis of EW did not effectively reduce antigenicity of OM, whereas that of OA was decreased to 1/5,000-1/100,000 by treatment of plant-derived or microbial proteases. Heat treatment below 100°C for 30min did not decrease antigenicity of OM, whereas that of OA in heated EW increased maximally to 100 times. Antigenicity of OM in EW effectively decreased by NaOH treatment, disappearing at over 1% NaOH, whereas that of OA increased. Additional heat treatment of NaOH-treated EW at 70°C for 15min slightly reduced antigenicities of OM and OA.

Key words: ovomucoid, ovalbumin, antigenicity, ciELISA, NaOH

서 론

알레르기를 일으키는 식품으로는 사람이나 지역마다 차이가 있지만 우유, 계란, 대두 등이 주요 원인 식품으로 알려져 있다(1). 이 중 계란은 알레르기 위험성이 높은 식품이지만 장관에서의 소화흡수가 양호하며, 더욱이 가공적성이 우수하고, 가격이 싸기 때문에 오늘날의 식생활에서 널리 이용되는 중요한 식품이다(2). 식품알레르기를 유발하지 않으려면 원인 식품의 섭취를 피해야 하나, 계란과 같이 섭취가 불가피한 경우 알레르겐의 항원성을 낮춤으로써 알레르기를 최대한 억제시키는 방안이 강구되고 있다.

계란 알레르기를 유발하는 것은 주로 난백 단백질로서 ovomucoid(OM; 알레르겐명, Gal d 1)와 ovalbumin(OA; Gal d 2)이 주요 알레르겐으로 알려져 있으며 계란 난백 중 약 65% 이상을 차지하고 있다(1,3,4). OA는 난백 단백질 중 약 54%로 가장 많은 비율을 차지하며, 분자량은 45 kDa 가량으로 소량의 당과 인산을 함유하고 있는 단백질이며 열에 의해 쉽게 변성

된다(5,6). 한편, OM은 전체 난백중 약 11%를 차지하며 mannose와 glucosamine을 함유하고 있는 분자량 28 kDa 가량의 당 단백질로서, 열에 안정하며 단백질 분해효소인 trypsin 등의 작용을 저해한다(5,6).

앞선 연구(7)에서 계란 난백(EW)의 알레르기성을 감소시키기 위하여, 효소에 의한 단백질분해, 열에 의한 단백질 변성, 그리고 방사선, NaOH, succinic anhydride 및 trifluoromethanesulfonic acid 등의 처리를 이용하는 방안을 모색하였다. 그 연구에서 항EW 항체를 이용하여 난백의 항원성 변화를 비교한 결과, NaOH, 효소, 그리고 열처리에 의해 EW의 항원성이 상당히 감소한 것으로 보고되었다. 이에 본 연구에서는 앞선 연구에서와 같이 EW에 여러가지 처리를 하였을 때 EW 중의 구성성분인 OM 및 OA의 항원성은 각기 어떻게 변화하였는지 검토하고자, 항OM 및 항OA 항체를 이용한 간접경합 ELISA (ciELISA)를 각각 실시하고 그 결과를 비교하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 계란은 '알짜란'(제일제당)을, 난백 분말은 SKM Egg Product Export Ltd.(India) 제품을 사용하였다. 표준품 OM과 OA는 Sigma사 제품(St. Louis, USA)을 사용하였으며, 난백 분해용 효소 등 기타의 시약은 류 등(7)의 경우에 준하여 사용하였다. 즉, bromelain, papain, ficin, trypsin, pancre-

*Corresponding author : Dong-Hwa Shon, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 463-746 Korea
Tel: 82-31-780-9133
Fax: 82-31-709-9876
E-mail: dhs95@kfri.re.kr

atin, pepsin 및 *Aspergillus oryzae* 유래의 protease(A.O.), *Streptomyces caespitosus* 유래의 protease(S.C.), *Bacillus polymyxa* 유래의 protease(B.P.)들은 Sigma사 제품을 사용하였다. Flavourzyme은 (주)대중(서울, 한국), Protease NP는 태평양화학(서울, 한국), Protamex는 Novo Korea(서울, 한국)로부터 입수하여 사용하였다.

OA, OM에 대한 특이항체의 생산

항원으로써 OM 또는 OA를 phosphate buffered saline(PBS: 0.01 M phosphate buffer with 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl)에 1 mg/mL로 준비한 후 Freund's complete adjuvant와 1:1로 혼합하여 만든 유탁액을 매회 1 mL씩 피하 주사하였다. 2주 간격으로 총 5회 면역을 실시하였다. 단, 2차부터 adjuvant로서 Freund's incomplete adjuvant를 사용하였다. 면역 1주일 후 채혈하고 높은 항체가의 항혈청을 모아 다음 실험에 특이 항체로 사용하였다.

간접경합 ELISA

ciELISA를 이용하여 조사하였다. Microplate에 coating한 항원은 표준단백질 OM 또는 OA를 사용하였으며 농도는 2 µg/mL로 coating buffer(tris hydroxymethyl aminomethane 0.05 M, pH 9.0)로 희석하여 microplate well당 100 µL를 분주하고 4°C에서 하룻밤 정치하였다. 이것을 washing buffer(phosphate buffered saline with Tween 20, PBST; 0.01 M phosphate buffer with 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.05% Tween 20)로 3번 세척한 다음, well에 난백 처리물과 특이항체를 1:1로 혼합한 용액을 100 µL 넣고서 경합반응을 유도하였다. 이때 특이 항체는 앞에서 제조한 항OA, 항OM 항혈청을 5,000배 가량 희석하여 각각 사용하였다. 실온에서 1시간 반응 후 washing buffer로 3번 세척한 후 여기에 goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate 100 µL를 첨가하고 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응 후 앞의 방법으로 3번 세척한 다음 여기에 기질용액(0.01% TMB in phosphate-citrate buffer pH 5.0, 0.001% H₂O₂) 100 µL를 첨가하여 30분 반응후 2 M H₂SO₄를 50 µL를 가하여 반응을 정지시키고 microplate reader(Emax, Molecular Devices)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

효소처리

난백의 효소분해는 류 등(7)의 방법으로 행하였다. 간략히 말하면 난백을 균질화 시킨후 70 mesh체를 통과시켜 알끈을 제거하였으며, 위의 재료에서 언급한 동물성, 식물성, 미생물성 유래의 12종 효소를 사용하여 각각의 최적조건에서 가수분해하였다. 이때, 기질로서 사용한 난백의 농도는 6%(w/v)로 조절하고, 각 효소는 기질대비 1%를 첨가하여 적절한 pH와 온도에서 24시간 동안 반응하였다⁽⁷⁾.

열처리

난백 분말을 1%(w/v) 단백질 농도로 증류수에 녹인 후 60, 80, 100, 121°C에서 각각 30분간 열처리하였다.

NaOH처리

난백 분말을 5%(w/v) 단백질 농도로 증류수에 녹인 후 NaOH를 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3%(w/v)농도로 첨가하여, 50°C로 2시간 처리한 후 일부는 증류수로 투석하였으며, 일부는 70°C로 15분간 추가로 가열한 후 투석하였다.

항원성 조사 방법

난백처리물의 항원성 변화를 검토하기 위하여 상기 ciELISA의 결과로부터 처리전 난백의 IC₅₀ 값과 처리후 난백의 IC₅₀ 값을 각각 구한 다음, 전자를 후자로 나누어서 얻은 상대적인 수치로써 항원성의 변화를 조사하였다.

결과 및 고찰

효소처리에 의한 항원성 변화

12종의 효소로 처리한 난백 분해물 중 OM 및 OA의 항원성 변화를 ciELISA를 이용하여 조사하였다. 그 중 가장 효과가 좋았던 protease의 결과를 대표적으로 Fig. 1에 나타내었다. 항OM의 항체를 이용한 ciELISA의 경우 효소를 처리하지 않은 난백의 IC₅₀은 2 µg/mL 정도였고 식물성, 동물성, 미생물성 효소 분해물의 IC₅₀은 2-4 µg/mL로써 난백에 이들 효소처리시 OM의 항원성 변화는 거의 없는 것으로 나타났다. 그러나, 항OA 항체를 이용한 ciELISA의 경우 효소를 처리하지 않은 난백의 IC₅₀

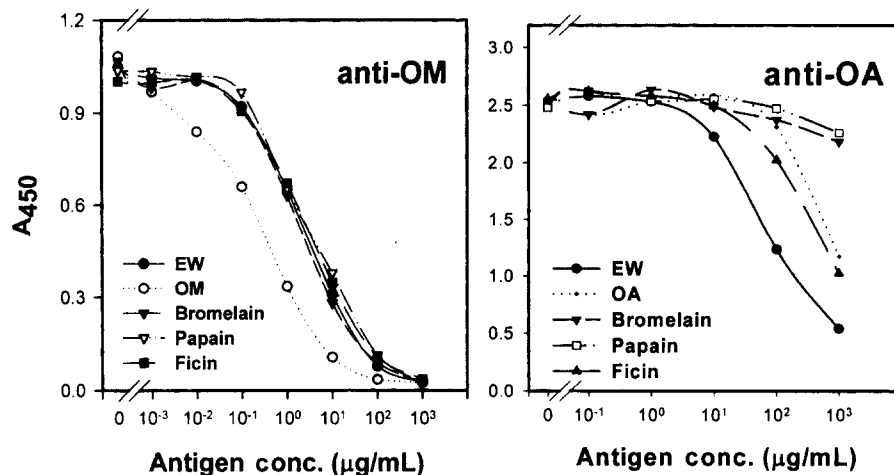


Fig. 1. Inhibition analysis for the reactivity of the protease-treated egg white (EW) to the anti-ovomucoid (OM), and anti-ovalbumin (OA) antibodies by ciELISA.

EW was hydrolyzed with botanical proteases such as bromelain, papain and ficin.

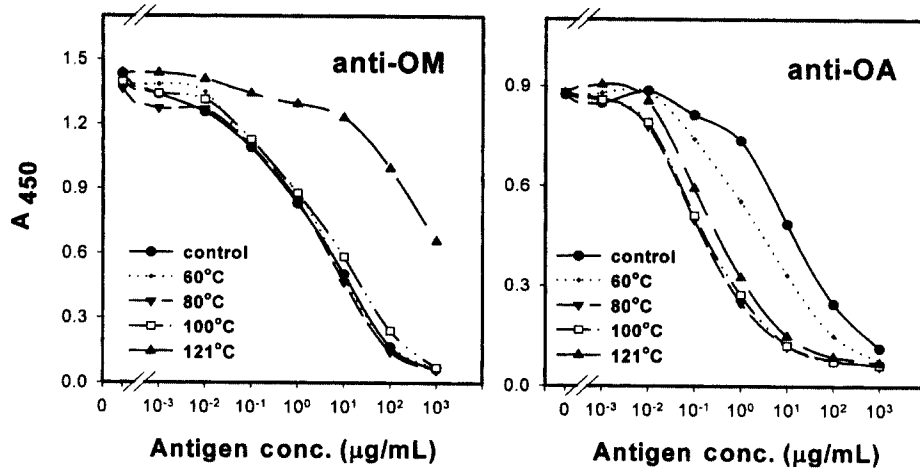


Fig. 2. Inhibition analysis for the reactivity of the heat-treated egg white (EW) to the anti-ovomuroid (OM), and anti-ovalbumin (OA) antibodies by ciELISA.

EW was heated for 30 min at each temperature.

은 90 µg/mL이었고 효소처리물의 IC₅₀이 7-10,000,000 µg/mL 이상으로 나타나 항원성이 감소하였음을 알 수 있었다. 특히 bromelain, papain, S.C. protease 처리물은 IC₅₀이 각각 360,000, 400,000, 10,000,000 µg/mL로 나타나 이들 처리에 의한 OA 항원성이 약 1/5,000-1/100,000 정도로 감소되었음을 알 수 있었다. 다만, Protease NP 가수분해물의 경우는 IC₅₀이 7 µg/mL로 OA 항원성이 대략 10배 정도 증가하였다(data 생략). 효소처리에 의한 난백 중 OM의 항원성 변화는 거의 나타나지 않았으나, OA의 경우 식물성, 미생물성 protease를 사용하였을 때 항원성이 가장 많이 저하된 것으로 나타났다.

두 항원 중 효소에 의하여 OM 항원성이 쉽게 변하지 않는 이유는 OM이 trypsin inhibitor로 작용하여 효소 분해작용이 원활히 이루어지지 못하고(4,6,8), OM의 당쇄부분이(14) 효소작용을 방해하였기 때문에 OM 표면에 존재하는 항체결합부위(항원결정기, antigenic determinant site)가 그대로 보존되어 OM 항원성이 유지된 것으로 생각된다.

OM의 가수분해 효과를 높이기 위한 방안으로써 당쇄의 구조변화를 유도할 목적으로(9) 10 kGy의 방사선을 조사한 후 효소분해를 실시하였으나, 방사선 조사에 의한 추가적인 항원성 감소는 거의 없었다(data 생략). 이러한 결과는 류 등(7)의 항EW 항체를 이용한 EW의 항원성 변화 결과와 같은 경향을 보였다.

열처리에 의한 항원성 변화

난백의 항원성 감소를 위하여 난백을 60-121°C에서 30분간 가열하여 항OM 항체와 항OA 항체와의 반응성을 조사하였다(Fig. 2). 항OM 항체를 이용하여 항원성 변화를 조사한 경우, 처리전 난백의 IC₅₀은 3 µg/mL, 60-100°C로 처리한 난백의 IC₅₀은 3-4 µg/mL로써 OM 항원성이 거의 변화되지 않았다. 하지만, 121°C 고온 처리시 IC₅₀은 650 µg/mL로 나타나 OM의 항원성이 약 1/250로 감소한 것을 알 수 있었다. 항OA 항체를 이용하여 항원성 변화를 조사한 경우, 처리전 난백의 IC₅₀은 20 µg/mL 정도였고 처리 온도가 높아질수록 IC₅₀가 작아져서 처리난백의 IC₅₀은 0.2 µg/mL의 값을 보여, OA의 항원성은 열처리에 의해 최고 100배정도 증가하는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 정리해 보면, OM의 항원성은 열처리에 의해 효과적으로 감소되지 않았으며, 이런 결과는 OM이 다른 단백질

질과는 달리 열에 매우 안정하여 열에 대한 저항성이 크기 때문인 것으로 생각된다(4,6,10-13). 반면, OA는 열처리에 의해 항원성이 증가하는 특이한 성질을 가진 단백질로 나타났다. 그러나, 류 등(7)의 연구에서 계란 난백 전체의 항원성은 온도가 상승할수록 감소하여 121°C 열처리에 의해서는 난백 항원성이 상당히 감소된 것으로 나타났다. 이러한 현상은 난백 내에 존재하는 conalbumin이나 lysozyme 등의 항원성이 감소되었기 때문에 나타난 결과로 추측된다.

NaOH 처리에 의한 항원성 변화

실험방법에 명기한 바와 같이 50°C에서 NaOH를 처리한 난백 중 OM과 OA의 항원성 변화를 ciELISA로 조사하였다. 항OM 항체를 이용하여 항원성을 조사한 경우 처리전 난백의 IC₅₀은 40 µg/mL이었으며, 0.3% NaOH를 처리한 난백의 IC₅₀은 2,000 µg/mL로 나타나 이 처리에 의하여 OM의 항원성이 약 1/50로 감소되었음을 알 수 있었다(Fig. 3). 1% 이상의 농도를 처리한 난백은 항OM 항체와 반응하지 않아 OM 항원성이 거의 사라진 것으로 나타났다. 하지만, 항OA 항체를 이용한 ciELISA에서는 처리전 난백의 IC₅₀이 50 µg/mL이었고, 0.03-3% NaOH 농도를 처리한 난백의 IC₅₀은 2-20 µg/mL로 나타나, OA 항원성은 오히려 증가했음을 알 수 있었다(Fig. 3). 이는 NaOH 처리시 거치게 되는 가온 과정에 의한 OA의 항원성이 급격하게 증가된 반면, NaOH처리에 의한 OA의 항원성 변화는 미약하였기 때문이라고 생각한다.

난백 중 OM의 경우 NaOH 농도 증가에 따라 항원성이 감소하는 것으로 나타난 반면, OA의 경우 NaOH 농도가 높을수록 항원성이 오히려 증가하였다. 이를 항EW 항체를 이용하여 처리난백 전체의 항원성 변화를 조사한 류 등(7)의 결과와 비교하여 볼 때, OM의 항원성 변화는 난백의 항원성 변화와 유사한 경향을 나타내고 있는 것을 알 수 있었다. 이러한 현상은 난백 전체의 항원성 변화 조사에 사용한 항EW 항체 중 OM에 대한 항체가 OA에 대한 항체보다 주종을 이루고 있기 때문으로 생각한다. 또한, 난백 전체 단백질 중 OM(약 11%)은 OA(약 54%)에 비하여 적은 양을 차지함에도 불구하고 위와 같은 현상이 나타남은 OM의 항원성이 OA의 항원성 보다 월등히 높다는 것을 뜻한다.

따라서 OM이 난백의 대표 항원이며, 처리에 의하여 난백 중

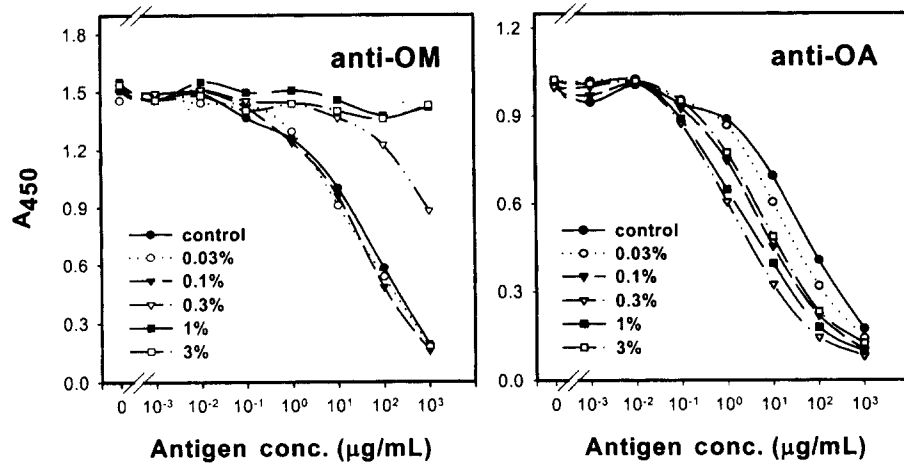


Fig. 3. Inhibition analysis for the reactivity of the NaOH-treated egg white (EW) to the anti-ovomucoid (OM), and anti-ovalbumin (OA) antibodies by ciELISA. EW was treated at 0.03, 0.1, 0.3, 1, and 3% (w/v) of NaOH, and it was dialyzed against distilled water.

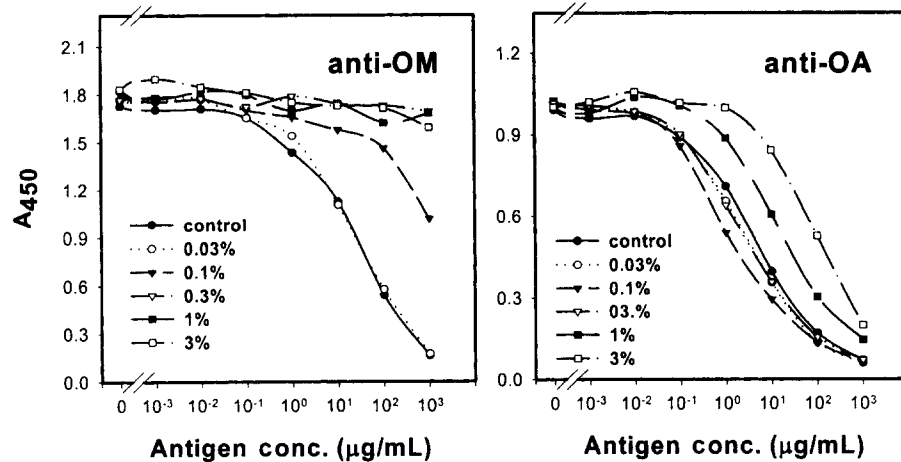


Fig. 4. Inhibition analysis for the reactivity of the additional heat treatment of the NaOH-treated EW to the anti-ovomucoid (OM), and anti-ovalbumin (OA) antibodies by ciELISA. NaOH treatment was done for 2 hr at 50°C, followed by heating at 70°C for 15 min, and it was dialyzed against distilled water.

OM의 항원성을 감소시키면 전체 난백의 항원성이 효과적으로 감소될 수 있을 것으로 생각한다. 본 연구는 실험동물의 항체를 이용하여 실시하였는데 사람의 경우에도 난백 중 OM이 OA보다 주요 알레르겐으로 작용하는지에 대하여는 별도의 검토가 필요하다.

NaOH와 열처리에 의한 항원성 변화

NaOH를 처리한 후, 추가로 70°C에서 15분간 열처리한 난백 중 OM 및 OA의 항원성 변화를 ciELISA로 살펴보았다. 그 결과, 항OM의 항체를 이용하여 항원성 변화를 조사한 경우, 처리된 난백의 IC₅₀은 30 µg/mL이었고 0.1% NaOH를 처리한 난백의 IC₅₀은 2,000 µg/mL로 나타나, OM 항원성이 1/70 정도로 감소되었음을 알 수 있었다(Fig. 4). 0.3% NaOH 농도에서는 IC₅₀이 10,000,000 µg/mL로 나타나, OM 항원성이 약 1/350,000로 감소되었으며, 이 농도 이상에서는 OM 항원성이 대부분 제거된 것으로 나타났다. 따라서 NaOH를 단독으로 처리한 난백 중 OM의 항원성 감소가 0.3% 이상의 농도에서 나타

났지만, 추가적인 열처리(70°C 15분)를 해주면 0.1% 이상의 농도부터 항원성 감소가 나타났다. 또한 NaOH 단독 처리시에는 1% 이상으로 처리한 난백 중 OM의 항원성이 대부분 사라졌지만(Fig. 3), 열처리를 추가해 주면, 0.3% 농도부터 이들 항원성이 대부분 제거된 것으로 나타났다(Fig. 4).

항OA 항체를 이용한 항원성 변화를 조사한 경우, 0.3% 이상의 농도까지 처리한 난백의 IC₅₀은 처리전 난백의 IC₅₀인 5 µg/mL로 차이가 없었으나, NaOH 1% 이상 처리 난백의 IC₅₀이 증가하기 시작하여 3%로 처리한 난백의 IC₅₀이 150 µg/mL로 나타나 이 경우 OA 항원성이 1/100 정도 저하되었다. 따라서, NaOH 단독 처리시보다 열처리를 추가함으로써, OA 항원성도 다소 감소되었다.

이러한 결과는 난백에 대한 NaOH처리에 추가하여 열처리를 하는 것이 NaOH 단독 처리시보다 OM과 OA의 항원성을 감소시키는데 다소 효과가 있음을 말하며, 이는 항EW 항체를 이용하여 처리 난백 전체의 항원성 변화를 조사한 결과와 일치하였다(7).

요 약

난백에 NaOH, 열, 및 효소를 처리하였을 때, 난백 중의 ovomucoid(OM) 및 ovalbumin(OA)의 항원성 변화를 항OM 및 항OA 항체를 이용하여 간접경합 ELISA로 조사하였다. 효소 처리는 OM의 항원성을 효과적으로 감소시키지 못한 반면 OA의 항원성은 식물성, 미생물성 protease를 사용하였을 때 약 1/5,000-1/100,000로 감소되었다. 열처리를 한 난백 중 OM은 100°C까지 거의 변화하지 않으나 121°C 처리에서는 난백의 항원성이 OM은 1/250으로 감소되었다. OA의 항원성은 열처리에 의해 오히려 증가되었으며 최고 100배까지 증가되는 것으로 나타났다. NaOH를 농도별로 처리한 난백 중 OM의 항원성 변화는 0.3%부터 감소하기 시작하여 1%이상에서 항원성이 거의 제거되었다. 반면 OA의 경우는 모든 NaOH 처리농도에서 항원성이 증가하였다. NaOH 처리에 추가적인 열처리(70°C, 15분)를 실시한 것은 난백중 OM과 OA의 항원성 감소에 다소 효과적인 것으로 나타났다.

문 헌

1. Lee KY, Kim KE, Jeong BJ. Immediate type reaction of food allergy confirmed by open food challenge test: Diagnostic value of history and skin test in food allergy. *Pediatr. Allergy Respir. Dis.* 7: 14 (1997)
2. Murakami H, Kaminogawa S. Food allergy and hypoallergenic food. pp. 61-76. In: *Food and Immunology*. Koudanshya Scientific Inc., Tokyo, Japan (1992)
3. Kaminogawa S. Food Allergy is the origin of all allergy. pp. 19-37. In: *Food allergy*. Nexus Inc., Seoul, Korea (1997)
4. Yang JS, Oh BY. The property of chicken egg white. *Food Sci. Ind.* 32: 42-55 (1999)
5. Doi E, Kitabataje N. Structure and functionality of egg proteins. *Food Sci. Technol.* 80: 325-340 (1997)
6. Lee SL, Shin HS. Animal food. pp. 487-531. In: *New Food Chemistry*, 2nd ed. Shin-Kung Publishing Co., Seoul, Korea (1994)
7. Ryu JH, Lee JM, Shon DH. Changes in the antigenicity of chicken egg white by the treatments of protease, trifluoromethanesulfonic acid, heat, and NaOH. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 720-725 (2000)
8. Tomimatsu Y, Clary JJ, Bartulovich JJ. Physical characterization of ovoinhibitor, a trypsin and chymotrypsin inhibitor from chicken egg white. *Arch. Biochem. Biophys.* 115: 536-544 (1996)
9. Lee YK, Matsuhashi S, Kume T. Change in carbohydrates of chicken and quail ovomucoids by gamma radiation. *Rad. Phys. Chem.* 54: 285-290 (1999)
10. Gu JX, Matsuda T, Nakamura R, Ishiguro H, Ohkubo I, Sasaki M, Takahashi N. Chemical deglycosylation of hen ovomucoid. *J. Biochem.* 106: 66-70 (1989)
11. Matsuda T, Watanabe K, Nakamura R. Immunochemical studies on thermal denaturation of ovomucoid. *Biochim. Biophys. Acta.* 707: 121-128 (1982)
12. Matsuda T, Watanabe K, Nakamura R. Immunochemical and physical properties of peptic-digested ovomucoid. *J. Agric. Food Chem.* 31: 942-946 (1983)
13. Cooke SK, Sampson HA. Allergenic properties of ovomucoid in man. *J. Immunol.* 159: 2026-2032 (1997)

(2003년 7월 11일 접수; 2004년 1월 8일 채택)