

감마선 및 전자선 조사에 따른 Ovalbumin의 구조 변화 비교

변명우^{1*} · 서지현¹ · 김재훈¹ · 김미리² · 오남순³ · 이주운¹

¹한국원자력연구소 방사선식품생명공학기술개발

²충남대학교 식품영양학과

³공주대학교 식품공학과

The Comparison of a Conformational Alteration of Ovalbumin Irradiated with Radiation of Gamma and Electron Beam

Myung-Woo Byun^{1*}, Ji-Hyun Seo¹, Jae-Hun Kim¹, Mee-Ree Kim², Nam-Soon Oh³ and Ju-Woon Lee¹

¹Dept. of Radiation Food Science and Biotechnology, Korea Atomic Energy Research Institute, Daejeon 305-600, Korea

²Dept. of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

³Dept. of Food Technology, Kongju National University, Chungnam 340-802, Korea

Abstract

This study was carried out to assess the effects of electron beam (EB) radiation on the conformational changes of ovalbumin (OVA), based on the early works using gamma irradiation. The applied doses of OVA used were 3, 5, 7, and 10 kGy, respectively. The conformational alterations were measured with SDS-PAGE, GPC-HPLC, and competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (Ci-ELISA) using monoclonal anti-OVA IgG antibody. Irradiation caused a degradation and/or an aggregation of OVA molecule. Immunochemical structures of irradiated OVA were altered by irradiation. Effects of gamma and electron beam radiation were similar at the same absorbed doses. These results may be used for inhibition of food allergy and development of immunogen with EB radiation.

Key words: gamma radiation, electron beam radiation, ovalbumin, conformational changes

서 론

식품 산업 및 공중보건에서 최종 산물의 안전한 저장 및 유통을 보장하기 위한 방법으로 방사선 조사기술의 이용이 국제적으로 점차 증가하고 있다(1). 식품 조사에 이용되는 방사선은 크게 Co-60과 Cs-137 등의 방사성동위원소에서 방출되는 감마선과 전자선 가속기에서 발생하는 10 MeV 이하의 전자(베타)선으로 크게 나눌 수 있다. 감마선은 투과력이 강하여 처리물품을 완전 포장한 후 bulk나 pallet 형태로 대량 처리할 수 있는 반면, 전자선은 투과도가 감마선보다 약하지만 고에너지와 고선량율에 의해 신속 처리와 처리공정이 용이한 특징을 갖고 있다(2). 현재 세계적으로 산업적 이용률은 감마선이 80%, 전자선이 20%이며, 연구보고도 전자선보다 감마선을 이용한 경우가 많이 보고되고 있고(3-11), 피조사체에 대한 두 선종간의 비교 연구는 거의 없다.

한편, 감마선이나 전자선과 같은 이온화 방사선은 피조사체의 구성 성분에 대한 작용에 큰 차이를 나타내지 않는 것으로 보고되어 있으나(12,13), 단백질과 같은 항원성을 갖는

물질에 미치는 영향은 충분히 연구되어야 한다(14). 방사선 분해(radiolysis)에 의해 물에서 생성된 활성화된 유리기(radical)는 단백질의 소편화, cross-linking, 응집화 및 산화작용과 같은 이화학적 변화를 일으켜 단백질의 구조 변화를 일으킬 수 있다(15-17). 최근 단백질의 구조변화에 대해 면역분석학적 기법을 이용한 방사선 조사식품의 검지기술 개발(18), 식품 알레르기 저감화 연구 및 새로운 면역원 제조에 대한 연구가 보고되고 있다(19-22).

그러나, 대부분의 연구가 방사선원으로 감마선을 이용하고 있어 전자선 조사에 대한 기초자료의 확보가 필요하다. Katial 등(17)은 전자선을 이용하여 단백질 알레르겐의 구조변화를 측정하여 알레르기원성이 유의적으로 감소된 결과를 보고하였는데, 이러한 결과는 방사선 주파수별 차이를 나타내고 있어 알레르기 연구나 면역원 개발에서 사용할 선종별 특성을 명확히 규명하여야 할 것이다.

따라서, 본 연구는 ovalbumin(OVA)을 표준항원으로 사용하여 감마선과 전자선을 같은 흡수선량으로 조사하였을 때의 구조적 변화를 관찰하여 전자선 조사가 식품 알레르기의

*Corresponding author. E-mail: mwbyun@kaeri.re.kr
Phone: 82-42-868-8060, Fax: 82-42-868-8043

저감 및 새로운 면역원 개발에 미치는 영향을 비교 평가하고 실용화하기 위한 기초 자료를 확보하고자 수행하였다.

재료 및 방법

단백질 및 항체의 준비

OVA와 mouse monoclonal anti-chicken egg albumin clone OVA-14 IgG(mouse-IgG)는 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA)에서 구입하였고 horseradish peroxidase conjugated rabbit anti-mouse IgG는 DakoCytomation Denmark A/S(Glostrup, Denmark)로부터 구입하여 실험에 사용하였다. 시험용액은 OVA를 0.01 M phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)에 10 mg/mL의 농도로 용해시켜 준비한 후 방사선을 조사하였다.

감마선 및 전자선 조사

감마선 조사는 Co-60 감마선 조사시설(IR-79, Nordion International Ltd., Ontario, Canada)을 이용하여 $10 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 시간당 10 kGy의 선량률로 3, 5, 7 및 10 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 조사하였다. 흡수선량의 확인은 Ferick dosimetry(ceric/cerous dosimeter)(23)를 사용하였고 선량의 오차는 ± 0.1 kGy이었다.

전자선의 조사는 ELV4-eletron accelerator(Energy 1 MeV, beam power 40 kW)를 이용하여 감마선 조사와 동일한 총 흡수선량을 갖도록 조사하였다. 이 때 에너지는 1 MeV, conveyor의 속도는 10 m/min, beam current는 각각 1.9, 3.2, 4.5 및 6.4 mA였다.

감마선 및 전자선 조사된 OVA 시험용액은 4°C 에 저장하면서 실험에 사용하였다.

Gel permeation chromatography(GPC)-HPLC

Lee 등(7)의 방법을 변형하여 GPC-HPLC상에서 감마선 및 전자선 조사된 OVA 분자의 분자량 변화를 측정하였다. HPLC system은 Waters Alliance HPLC system (Mo. 2690, MA, USA)에 Protein KW-803 column(Shoko Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하였다. 0.01 M PBS (pH 7.4)를 이동상으로 하여 1 mL/min의 유속으로 40분 동안 이동시켰으며 260 nm 및 280 nm에서의 흡광도를 측정하였다. GPC용 표준물질(Thyroglobulin, MW 670,000; bovine IgG, MW 158,000; OVA, MW 44,000; myoglobin, MW 17,000; vitamin B12, MW 1,350)은 Bio-Rad사로부터 구입하여 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 사용하였다.

SDS-PAGE

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE, 5~15% gradient gel)는 Laemmli의 방법(24)에 따라 방사선원별로 조사된 OVA의 전기영동적 분리 형태를 관찰하였다. 표준분자량 marker는 Bio-Rad사의 pre-stained molecular weight marker(250, 150, 100, 75, 50, 37,

25, 15 및 10 kDa)를 사용하였다.

Competitive indirect ELISA

Mouse IgG를 사용하여 감마선 및 전자선 조사된 OVA의 반응성을 비교하기 위해 Competitive indirect ELISA(Ci-ELISA)법을 사용하였으며 native OVA와 조사된 OVA 간의 교차반응시험은 Lee 등(25)의 방법을 사용하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, Polystyrene flat-bottom microtiter plates (Maxisorp, Nunc, Kamstrup, Denmark)에 0.2 M bicarbonate buffer(pH 9.6)를 사용하여 native OVA를 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 100 μL 씩 첨가하여 하룻밤 동안 고정시키고, PBST (PBS containing 0.05%(v/v) Tween 20)로 3회 세척한 후 비 특이적 반응을 막기 위해 1%의 bovine serum albumin (BSA) 용액 120 μL 를 첨가하여 blocking하였다. PBST로 3회 세척 후 조사 OVA 수용액 50 μL 와 0.01 M PBS로 1:2,500으로 희석된 mouse IgG 용액 50 μL 를 첨가해 반응시킨 후 PBST로 세척하였다. Horseradish peroxidase conjugated rabbit anti-mouse IgG를 1:20,000으로 희석한 2차 항체를 100 μL 를 첨가하여 반응시킨 후 0.04% o-phenylenediamine (Sigma Chemical Co.) 기질 용액을 사용해 발색시킨 후 2 M H_2SO_4 로 반응을 종결시켜 ELISA reader(CERES UV-900C, BIO-TEK instruments Inc., MI, USA)를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하여 OVA와 항체와의 반응성을 비교하였다.

결과 및 고찰

방사선 조사된 OVA의 분자량 변화

Native OVA의 main peak의 retention time은 24.91분이었고 감마선과 전자선 조사된 OVA 용액에 존재하는 native OVA는 각각 24.84분, 24.71분에 검출되어 실험에 사용한 GPC-HPLC 조건은 만족할 만한 신뢰를 제공하였다. 감마선 및 전자선 조사된 native OVA의 면적 및 최고 높이의 값은 조사선량이 증가할수록 급격히 감소하였다(Fig. 1). 대조구의 main peak의 면적 및 최고 높이의 값을 100으로 환산하였을 때, 10 kGy로 조사된 OVA의 면적 및 최고 높이는 81~84% 감소되는 결과를 얻을 수 있었다. 이 결과는 Lee 등(7)이 보고한 감마선 조사된 새우 tropomyosin의 결과와 유사한 경향을 나타냈다. 이온화 방사선에서 생성된 유리기는 황(S)을 함유하는 아미노산의 잔기 및 방향족 잔기와 반응이 가장 잘 일어나는 것으로 알려져 있다(2). 또한, tyrosine과 tryptophan의 아미노산은 280 nm에서 최대 흡광도를 가지며 260 nm에서는 phenylalanine이 최대 흡광도를 갖는다(26). 280 nm의 흡광도에서는 감마선과 전자선 모두 유사한 형태로 감소하였지만 260 nm에서는 전자선 조사된 OVA가 더 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 280 nm와 같은 방법으로 계산하면, 대조구의 main peak 보다 10 kGy로 흡수되도록 조사하였을 때 감마선 조사는 약 65% 감소한 반면 전자선 조사는

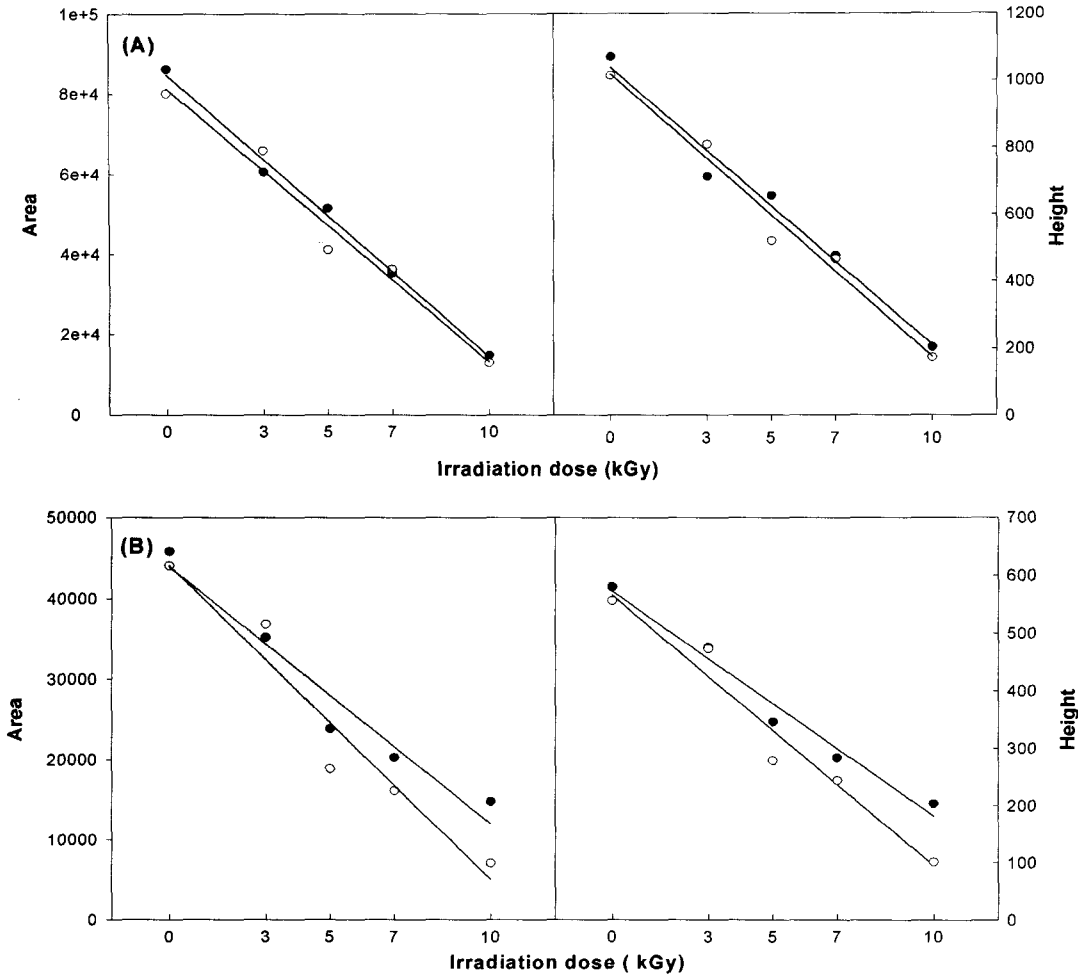


Fig. 1. Area and height of peak of the gamma- (●) and electron beam-irradiated OVA (○) by analysis of GPC-HPLC at (A) 280 nm and (B) 260 nm.

대략 84% 감소하였다. 따라서 같은 선량으로 흡수된 OVA는 각 파장에 따라 다른 형태를 나타내며 선종에 따른 미세한 차이가 있는 것으로 사료되었다.

Davies(27)는 hydroxyl radical($\cdot\text{OH}$)에 의해 tryptophan이 감소하고 bityrosine이 생성이 되며, tyrosyl radical은 공유결합으로 응집 현상을 일으킨다고 보고하였다. 본 결과에서, main peak는 방사선 조사로 감소하였고 동시에 고분자량대로 새로운 물질이 형성되었다(Fig. 2). 이것은 감마선 및 전자선 조사에서 생성된 유리기가 OVA의 구조에 영향을 주었으며 구조의 풀림(unfolding)에 따라 노출된 아미노산 작용기들 사이의 소수성 및 공유 결합에 의해 고분자량으로 응집현상이 일어난 것으로 사료된다.

SDS-PAGE

감마선 및 전자선 조사한 OVA 단백질(43 kDa)은 조사선량이 증가할수록 band 크기가 감소하였으나, 선종별 차이는 없는 것으로 나타났다(Fig. 3). 감마선 조사된 단백질의 변화는 OVA(8,11) 이외에도 우유 단백질(9)이나 BSA(28)에서도 유사하게 보고되었다. 산소의 존재 하에서 단백질에 방사

선을 조사하게 되면 저분자량으로 소편화되거나 고분자량으로 응집하며, 이는 단백질간의 cross-linking과 소수성 결합에 의해 일어난다고 보고된 바 있다(15,16,29). 또한, Tuce 등(30)은 OVA를 N_2O 로 충전된 상태에서 조사하였을 때, 단백질은 소편화가 일어나지 않았고 산소가 존재할 경우 단백질이 크게 손상됨을 보고한 바 있다. 본 연구 결과에서, 감마선이나 전자선 조사된 모든 시료는 3 kGy에서부터 소편화되었으며, 새로운 부분들이 생기면서 고분자량으로 끌리는 흔적을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 결과는 이전의 보고와 일치하였다(7,15,19). Davies(27)는 17종의 단백질에서 $\cdot\text{OH} + \text{O}_2^-(+\text{O}_2)$ 에 의한 소편화가 일어났으며 $\cdot\text{OH}$ 에 의해 형성된 공유결합으로 응집현상이 나타났다고 보고하였다. 최근에는 $\cdot\text{OH}$ 에 의한 응집현상에 대해 Tuce 등(30)은 $\cdot\text{OH}$ 에 의해 OVA 분자에서 수소가 이탈되고 OVA·가 형성된 후 ($\text{OVA} + \cdot\text{OH} = \text{OVA}\cdot + \text{H}_2\text{O}$), $\text{OVA}\cdot$, $\text{OVA}\cdot$ 간의 결합이 발생되지 않고 $\text{OVA}\cdot$ 과 native OVA의 결합에 의한 radical의 grafting 과정에 의해 고분자물질이 형성된다고 보고하였다.

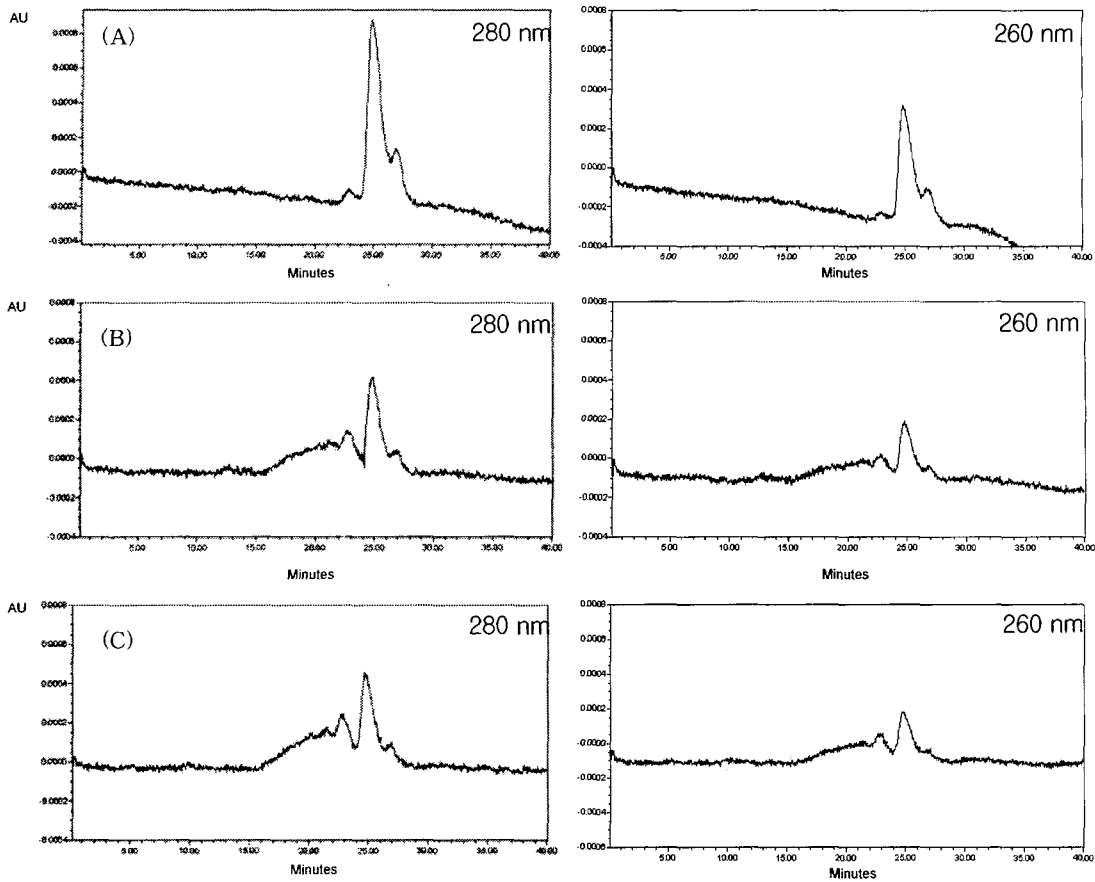


Fig. 2. Changes of chromatograms of gamma- and electron beam-irradiated OVA: (A) non-irradiated OVA; (B) 7 kGy-gamma-irradiated OVA; (C) 7 kGy-electron beam-irradiated OVA.

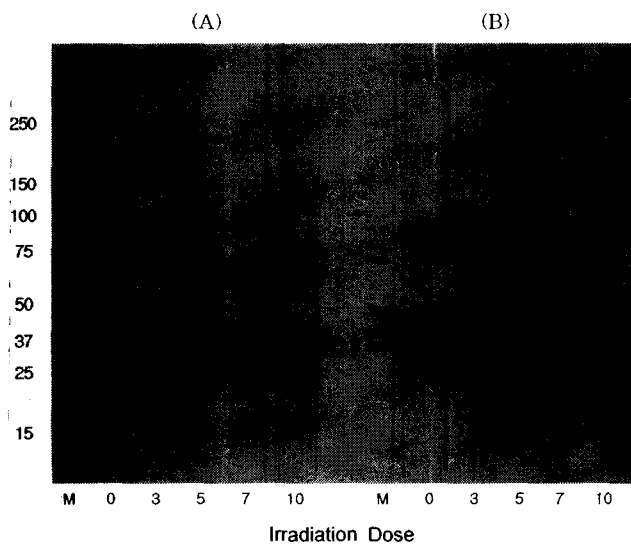


Fig. 3. SDS-PAGE of the gamma and electron beam-irradiated OVA: (A) gamma-irradiated OVA; (B) electron beam-irradiated OVA.

M and numerals indicate molecular weight standard and the irradiation doses (kGy), respectively.

방사선 조사된 OVA에 대한 항체의 반응성
Native OVA를 대조구로 감마선 및 전자선 조사한 OVA

에 대한 mouse IgG의 반응성을 비교한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 감마선 및 전자선 조사한 OVA는 큰 차이 없이 유사한 결과를 나타내었다. 일반적으로 산소가 존재하는 조건에서 단백질은 표면에 존재하는 항원결정기의 노출에 의해 항체가 쉽게 결합할 수 있는 조건으로 변화하여 항체 반응성의 증가가 나타난다(25). 감마선 및 전자선 조사된 OVA의 기울기는 native OVA의 기울기보다 대부분 증가하였으며, 방사선종 간에는 차이가 없었다. Ci-ELISA법에서 얻어진 곡선의 기울기는 방사선 조사에 의해 일어날 수 있는 항원결정기의 구조적인 변화를 나타낸다(19). 본 실험결과에서는 방사선 조사된 OVA와 항체와의 반응성이 감소하였고 감마선 및 전자선종 간에는 항원결정기가 유사하게 변형된 것으로 판단되었다. Lee 등(19)과 Byun 등(20)은 감마선 조사한 단백질 용액의 항체 결합능은 조사 선량에 따라 감소한다고 보고하였지만, 본 실험에서는 감마선 및 전자선 조사된 OVA은 흡수 선량에 따른 유의적인 경향은 없는 것으로 나타나 실험에 사용된 항원 및 항체에 대한 차이에 의한 것으로 사료된다.

본 연구에서 구조적인 분석법을 이용하여 방사선 조사된 OVA의 구조변화를 측정된 결과, 방사선종에 따른 차이는 나타나지 않았다. 유류(12,13) 및 젤라틴(14)과 같은 식품에 대한 연구에서도 방사선종 간의 물리적 화학적인 차이가 없

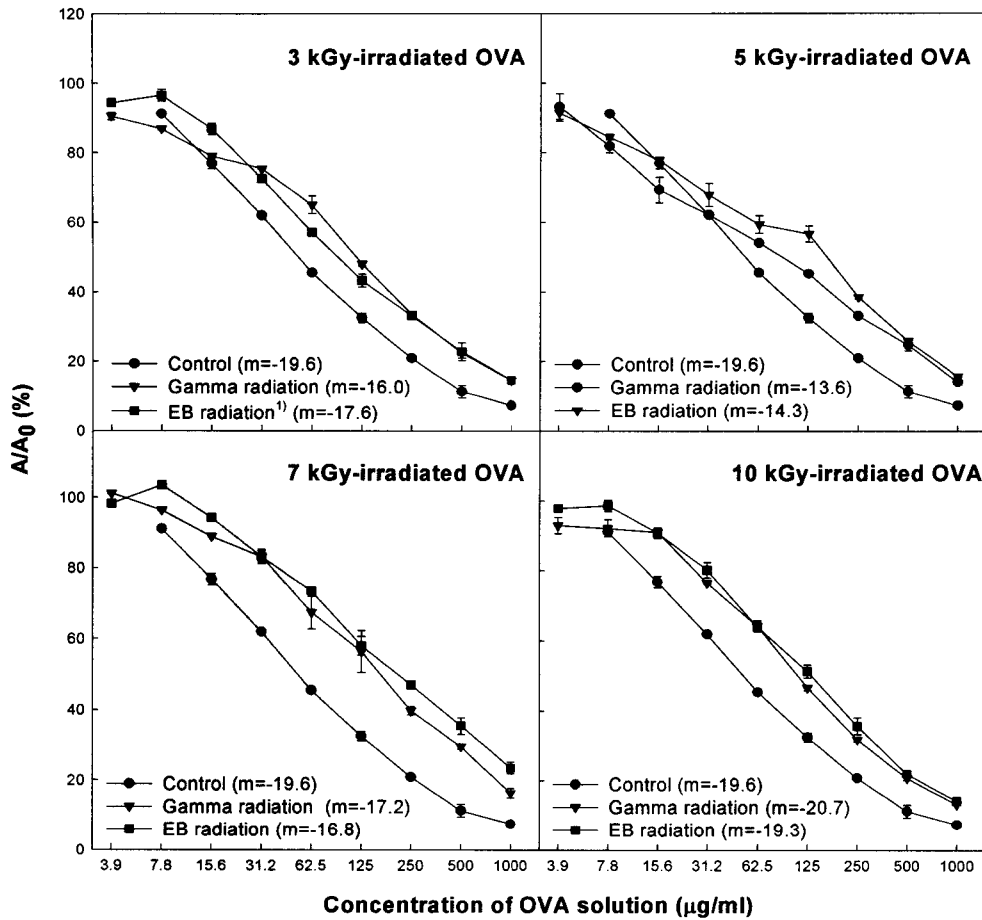


Fig. 4. Binding abilities of monoclonal mouse anti-OVA IgG antibody to the gamma- and electron beam-irradiated OVA. A/A₀ means (absorbance at the last steps of ELISA in the presence of various concentrations of antigens)/(absorbance in absence of competitive antigens).

m is the slope of the curve obtained from binding rate of IgG to coated standard protein.

¹⁾EB radiation means electron beam radiation.

었다고 보고하였다. 이상의 결과들을 종합하여 볼 때, 전자선 또한 특정 단백질에 대해 감마선과 유사한 작용을 나타내는 것으로 사료되므로, 본 연구 결과는 감마선 및 전자선을 이용한 식품알레르기의 억제 및 면역원 제조 기술 개발의 기초 연구자료로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 감마선 및 전자선종이 ovalbumin(OVA)의 구조 변화에 미치는 영향을 비교 평가하였다. 표준항원 OVA를 3, 5, 7 및 10 kGy의 흡수선량으로 감마선 및 전자선 조사하였으며 그에 따른 구조적인 변화는 SDS-PAGE, GPC-HPLC 및 단클론 항체를 사용한 Ci-ELISA법으로 측정하였다. Native OVA 분자는 감마선 및 전자선 조사에 의해 소편화 및 응집화 되었으며, 조사 선량이 증가할수록 OVA의 분자량이 감소하였다. 또한 OVA의 면역화학적 구조는 방사선 조사에 의해 항원-항체 간의 결합능이 감소하는 것으로 나타났으나 감마선 및 전자선종에 따른 차이는 없었다. 이상

의 결과들은 식품 알레르겐의 제거 및 면역원의 개발에 대한 전자선 조사의 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 원자력 연구개발사업의 지원으로 수행되었으며, 그 지원에 감사 드립니다.

문 헌

1. WHO/HPP/FOS. 1992. *Review of the safety and nutritional adequacy of irradiated food*. World Health Organization. Organisation Mondiale De La Sante. Provisional Edition. p 24-25.
2. Hayes DJ, Murano EA, Murano PS, Olson DG, Sapp SG. 1995. *Food irradiation: a source book*. Iowa State University Press, Ames. p 3-16.
3. Byun MW, Lee JW. 2003. Application of irradiation technology for food safety and security. *Food Sci Ind* 36: 25-41.
4. Lee JI, Lee M. 1999. Effects of electron-beam irradiation and storage on cholesterol 7-derivatives products of meat. *Ko-*

- rean *J Food Sci Technol* 31: 74-82.
5. Koh KH, Whang K. 2002. Effect of electron beam irradiation on the oxidative and microbiological stability of ground pork during storage. *Korean J Food Sci Ani Resour* 22: 316-321.
 6. Ahn HJ, Yook HS, Rhee MS, Lee CH, Cho YJ, Byun MW. 2002. Application gamma irradiation on breakdown of hazardous volatile N-nitrosamines. *J Food Sci* 67: 596-599.
 7. Lee JW, Kim JH, Sung CK, Kang KO, Shin MG, Byun MW. 2000. The changes of allergenic and antigenic properties of major allergen (Pen a 1) of brown shrimp (*Penaeus aztecus*) by gamma irradiation. *Korean J Food Sci Technol* 32: 822-827.
 8. Lee JW, Yook HS, Cho KH, Lee SY, Byun MW. 2001. The changes of allergenic and antigenic properties of egg white albumin (Gal d 1) by gamma irradiation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 500-504.
 9. Cho KH, Yook HS, Lee JW, Lee SY, Byun MW. 2001. Changes of binding ability of milk-hypersensitive patients' IgE to gamma-irradiated milk proteins. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 505-509.
 10. Byun MW, Lee JW, Yook HS, Jo C, Kim HY. 2002. Application of gamma irradiation for inhibition of food allergy. *Radiat Phys Chem* 63: 369-370.
 11. Jeon GR, Lee JW, Byun MW, Lee SY. 2002. Reduced allergenicities of irradiated egg white ovalbumin determined by skin prick test and ELISA inhibition test. *J Asthma Allergy Clin Immunol* 22: 711-719.
 12. Hayashi T. 1991. Comparative effectiveness of gamma-rays and electron beams in food irradiation. In *Food Irradiation*. 2nd ed. Elsevier, London. p 169-206.
 13. Kim WS, Chung MS, Ko YT. 1998. Effects of low dose gamma ray and electron beam irradiation on growth of microorganisms in beef during the refrigerated storage. *Korean J Food Sci Ani Resour* 18: 232-239.
 14. Vieira FF, Del Mastro NL. 2002. Comparison of γ -radiation and electron beam irradiation effects on gelatin. *Radiat Phys Chem* 63: 331-332.
 15. Davies KJ, Delsignore ME. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals: III. Modification of secondary and tertiary structure. *J Biol Chem* 262: 9908-9913.
 16. Moon S, Song KB. 2001. Effect of γ -irradiation on the molecular properties of ovalbumin and ovomucoid and protection by ascorbic acid. *Food Chem* 74: 479-483.
 17. Katial RK, Grier TJ, Hazelhurst DM, Hershey J, Engler RJM. 2002. Deleterious effects of electron beam radiation on allergen extracts. *J Allergy Clin Immunol* 110: 215-219.
 18. Kim KS, Yang JS, Kwon JH. 2003. Method of detection for irradiated foods. *Korean J Food Preserv* 10: 427-434.
 19. Lee JW, Kim JH, Yook HS, Kang GO, Lee SY, Hwang HJ, Byun MW. 2001. Effects of gamma radiation on the allergenic and antigenic properties of milk proteins. *J Food Prot* 64: 272-276.
 20. Byun MW, Kim JH, Lee JW, Park JW, Hong CS, Kang IJ. 2000. Effects of gamma radiation on the conformational and antigenic properties of a heat-stable major allergen in brown shrimp. *J Food Prot* 63: 940-944.
 21. Kume T, Matsuda T. 1995. Changes in structural and antigenic properties of proteins by radiation. *Radiat Phys Chem* 46: 225-231.
 22. Byun MW, Lee JW, Sep JH, Kim JH, Jo C, Kim DH, Chung HW. 2004. Changes of the immune reactivities of antibodies produced against gamma-irradiated antigen. *Radiat Phys Chem* in press.
 23. Holm NW, Berry RJ. 1970. *Manual on radiation dosimetry*. Marcel Dekker Inc., New York.
 24. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
 25. Lee JW, Park JH, Kim CJ, Shin HK. 1998. 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.
 26. Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG. 1999. *Biochemistry*. 3rd ed. Addison Wesley Longman, San Francisco. p 133.
 27. Davies KJ. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals: I. General aspects. *J Biol Chem* 262: 9895-9901.
 28. Lee S, Lee S, Song KB. 2003. Effect of gamma-irradiation on the physicochemical properties of porcine and bovine blood plasma proteins. *Food Chem* 82: 521-526.
 29. Garrison WM. 1987. Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem Review* 87: 381-398.
 30. Tuce Z, Janata ER, Milosavljevic BH. 2001. A kinetic study of the mechanism of radiation induced agglomeration of ovalbumin in aqueous solution. *Radiat Phys Chem* 62: 325-331.

(2004년 5월 14일 접수; 2004년 8월 2일 채택)