

## 면역 분석법을 이용한 발효 유제품의 알레르기원성 평가

†강 근 옥

한경대학교 영양조리학과

### Assessment of Allergenicity of Fermented Dairy Products by Immunoassay

†Kun-Og Kang

Dept. of Nutrition and Culinary Science, Hankyong National University

#### Abstract

Immunoblotting and competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay(Ci-ELISA) was used for detection of  $\beta$ -lactoglobulin(BLG) in dairy products, such as milk, dried milk and fermented milk. In immunoblotting, human IgE weakly recognized proteins of fermented milk, but still responded to dried milk even though become weak. Rabbit polyclonal antibody to BLG, used as a model of antigen, and milk allergic patients' IgE was used in the ELISA. Reactivities of Abs were the highest in market milk. BLG in fermented milk was detected in a low content. This result indicates the fermented milk have the lowest BLG content and could be used as hypo-allergenic food for milk-allergic individual.

Key words : immunoassay, allergenicity, fermented dairy product,  $\beta$ -lactoglobulin

#### 서 론

식품 알레르기는 특정한 알레르겐의 흡입 혹은 섭취 후 IgE 항체에 의해 매개되는 전신적인 과민 반응을 말하며 환자에게는 고통과 대상 식품의 기피 현상을 야기하게 된다<sup>1-4)</sup>. 특히 3세 이하의 영유아에게서 흔히 식품 알레르기를 일으키는 식품은 달걀 및 우유이다. 이와 같은 식품 알레르기 원인 식품의 회피는 성장 및 발육에 중요한 영양소 섭취에 불균형을 가져올 수 있다.

우유 알레르기는 1세 이하의 영아 중 2~3% 정도가 일어나며, 이는 영아의 장벽 구성에 영향을 주는 인자의 발달 및 면역 시스템의 미성숙을 일으켜서 장내 점막벽의 효율성이 떨어지게 되어 이로 인해 생후 1년 동안 소화기 감염 및 식품 알레르기 발병률이 증가하는 것으로 보고되고 있다<sup>5)</sup>. 우유 알레르기를 일으키는

주요 알레르겐은 카제인과 유청 단백질이며, 유청 단백질 중  $\beta$ -lactoglobulin (BLG)이  $\alpha$ -lactoglobulin보다 알레르기원성이 높은 것으로 알려져 있다. 특히, 인유에는 BLG가 1~150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 매우 소량 존재하며<sup>6)</sup>, 우유에는 BLG가 우유 단백질의 7~12% 정도로 우유 알레르기의 다른 알레르겐인 카제인보다 낮은 함량으로 존재한다. 그러나 위장에서 소화되는 동안 강한 저항성이 있어 그대로 장내로 투과되면서 우유 알레르기를 유도하게 된다<sup>7, 8)</sup>. 우유 알레르기를 저감화하기 위해 소화 효소를 이용하여 BLG를 가수분해시킬 경우 알레르기원성이 감소되며, 현재 단백질 가수분해 효소를 사용하여 제조한 저 알레르기원성 분유가 판매되고 있다<sup>9, 10)</sup>.

한편, 발효유는 임상적으로 아토피성 습진을 가진 아동에게 *Lactobacillus casei* GG가 함유된 단백질 가수분해 분유를 주었을 때 장관벽이 강화되고 Tumor

† Corresponding author : Kun-Og Kang, Dept. of Nutrition and Culinary Science, Hankyong National University, Seongjungdong, Ansongsi, Kyunggido  
Tel : +82-31-670-5181, Fax : +82-31-670-5187, E-mail : cocco-9522@hanmail.net

Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 도 감소한다고 보고된 바 있다<sup>11)</sup>. 발효유는 발효 과정 동안 미생물에 의해 우유 단백질의 변성이 일어날 수 있으며<sup>12)</sup>, Jedrychowski와 Wroblewska<sup>13)</sup>은 토끼에서 얻은 다클론 항체와 발효유의 결합능이 감소되었다고 보고하였다. 따라서 발효된 유가공품은 알레르기원성이 저감화된 유제품으로서 이용될 수 있을 것으로 추정된다.

그러므로 본 연구에서는 국내 시중에 판매되는 유제품 중 일반 분유 및 발효유에 대해 BLG를 모델 항원으로 하여 ELISA를 통한 면역 분석법으로 우유 가공품의 알레르기원성을 평가하여 발효유의 저 알레르기원성 식품으로서의 가능성을 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### 1. 항원 및 유제품의 준비

국내에서 시판되고 있는 우유(매일우유 ELS, 매일유업(주)), 분유(매일맘마 QT, 매일유업(주)) 및 발효유(gut, 매일유업(주))를 지역 시장에서 구입하였으며 모델 항원으로 사용된 BLG는 Sigma사(Sigma Chemical Co. Ltd., St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

### 2. 환자의 혈청 및 동물, 다클론 항체의 준비

우유 알레르기 환자의 혈청은 아주대학교 병원에 내원하는 환자의 혈청을 사용하였다. 즉, 우유 알레르기의 병력이 있으며 우유 단백질 중 BLG에 대한 skin prick test에 양성인 20명의 환자는 AlaSTAT RIA(DPC Co., LA, USA)로 분석하였을 때 모두 우유 특이 IgE가 2이상의 점수를 얻었다. 이들 혈청을 모은 후 각 유제품의 항원에 대한 IgE 반응성을 측정하였다. BLG에 대한 다클론 항체는 Lee 등<sup>14)</sup>의 방법에 의해 anti-BLG rabbit IgG를 생산하여 실험에 사용하였다.

### 3. Immunoblotting

우유, 분유 및 발효유 내의 BLG의 존재를 확인하기 위하여 Laemmli<sup>15)</sup>의 방법을 사용하여 SDS-PAGE(5~15% gradient gel)를 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 Towbin 등<sup>16)</sup>의 방법으로 nitrocellulose paper (0.45  $\mu$ m, Pharmacia Biotech.)에 옮긴 후 2% bovine serum albumin으로 비특이적인 결합을 방지하기 위해 blocking 하였다. 1:10으로 희석된 환자의 혈청을 사용하여 2시간 동안 반응시킨 후 2차 항체로서 anti-human IgE-Horseradish peroxidase(Sigma)를 사용하여 반응시키고 4-chloro-1-naphtol (Sigma) 기질을 사용하여 발색시켰다.

### 4. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

우유, 분유, 발효유에 존재하는 BLG의 함량을 측정하기 위해 competitive indirect ELISA 법을 사용하였다. Polystyrene flat-bottom microtiter plates (Maxisorp, Nunc, Kmstrup, Denmark)에 basic coating buffer (0.1M sodium carbonate, pH 9.6)를 사용하여 1.0  $\mu$ g/ml의 농도로 희석한 BLG를 100  $\mu$ L 가하여 4°C에서 하룻밤 동안 well에 고정시키고, 1%의 gelatin 용액 120  $\mu$ L를 첨가하여 blocking하였으며, 일정하게 희석한 시료 용액과 표준 BLG 용액 및 rabbit anti-BLG IgE를 1/1,000(1  $\mu$ g/ml)로 희석한 항체 용액을 각각의 well에 50  $\mu$ L씩 첨가하고 반응시켰다.

Goat anti-rabbit IgG에 horseradish peroxidase (HRP, Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, AL, USA)를 공액 결합시킨 2차 항체를 PBS 완충액을 사용하여 0.1  $\mu$ g/ml로 희석하고 well에 100  $\mu$ L를 첨가하여 반응시킨 후, 0.04% O-phenylenediamine (OPD, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 기질 용액을 사용하여 발색을 유도하고, 세척없이 그 well에 2.0M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액으로 반응을 종결시킨 후 492nm로 고정된 ELISA Reader (CERES UV-900C, BIO-TEK Instruments Inc., MI, USA)에서 흡광도를 측정하여 BLG와 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 90분간 반응시켰다.

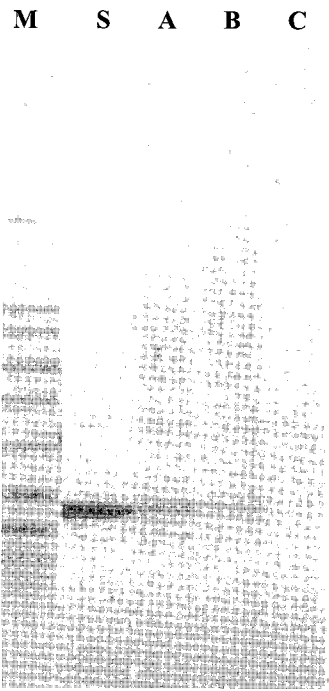
### 5. 통계처리

얻어진 결과들은 SAS<sup>®</sup> software<sup>17)</sup>에서 프로그램 된 general linear procedures, least square means와 Duncan의 multiple range test 법을 사용하여 평가하였으며, human 혈청(IgE)과 rabbit IgG의 차이를 분석하기 위해 two-tailed Student's *t*-test를 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 유제품내의 BLG의 Immunoblotting

환자의 IgE와 결합하는 우유, 분유 및 발효유 내의 BLG의 존재를 확인하기 위해 immunoblotting을 실시한 결과는 Fig. 1과 같았다. 표준항원, 우유 및 분유 시료에서는 환자의 IgE와 결합한 BLG 단백질이 관찰되었지만 발효유에서는 관찰되지 않았다. 우유를 발효시킨 유청 단백질로 피부 시험을 실시한 경우, 피부 단자 반응이 매우 적게 감소되었다는 보고가 있다<sup>18)</sup>. 이러한 결과의 원인은 발효유내의 젖산균의 단백질 가수



**Fig. 1. Immunoblotting of human IgE to commercial  $\beta$ -lactoglobulin.** M, S, A, B and C indicate standard marker(M),  $\beta$ -lactoglobulin standard(S), market milk(A), dried milk(B) and fermented milk(C).

분해에 의해 우유 단백질을 oligopeptides로 분해시키는 것으로 알려져 있다<sup>18)</sup>.

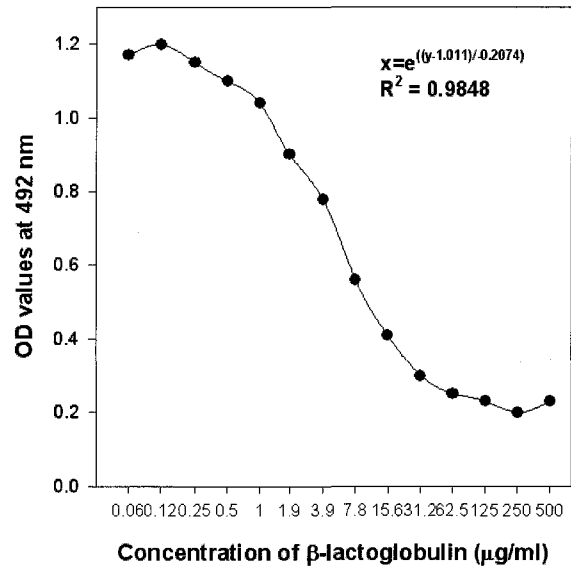
따라서 환자의 IgE와 결합이 관찰되지 않은 발효유는 가공품 내 미생물에 의해 BLG가 polypeptides로 가수분해된 것으로 확인할 수 있었다.

**2. 최적 항체 희석 농도의 결정 및 표준 곡선의 작성**

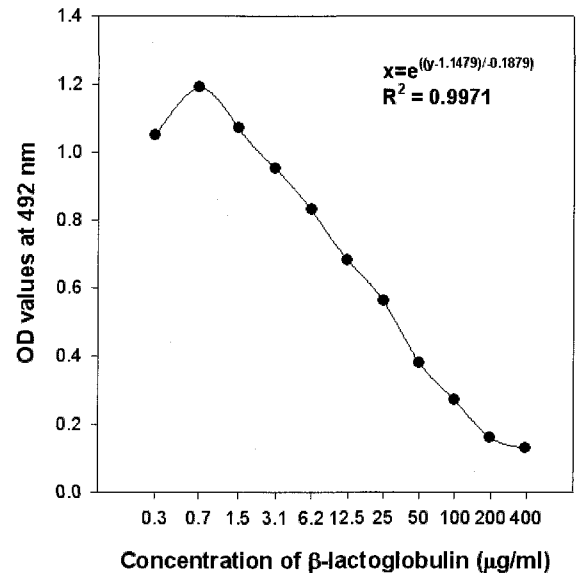
우유, 분유 및 발효유 내의 BLG의 함량을 측정하기 위해 우유 알레르기 환자의 혈청과 rabbit IgG를 사용한 ELISA법을 실시하였다. 표준 항원으로 사용된 BLG에 대한 환자 혈청의 IgE와 rabbit IgG의 최적 희석 농도를 구하기 위해 human IgE는 1/10~1/100까지 희석한 항체 용액으로, rabbit IgG는 1/500~1/5,000까지 희석하여 그 중 BLG와의 반응성이 492 nm에서의 흡광도 값이 1.0~1.2인 희석 배수를 측정하였다. 실험 결과 각 항체에 대한 최적 희석 농도는 각각 1/50 및 1/2,500으로 결정하였다. 이 희석비를 이용하여 각 항체에 대한 유제품 내의 BLG를 정량하는데 사용하였다.

Human IgE 및 rabbit IgG에 대한 표준 곡선을 작성하기 위해 competitive indirect ELISA법을 이용하였다. human IgE 및 rabbit IgG에 대해 미리 고정된 BLG 항원과 일정하게 희석하여 첨가된 BLG 항원간의 경쟁

을 통해 얻어진 흡광도 값으로 표준 곡선을 작성하였다. Human IgE에 대해서는 BLG를 0.06~500  $\mu\text{g/ml}$ 의 범위로, rabbit IgG에 대해서는 0.39~400  $\mu\text{g/ml}$ 의 범위로 희석하여 사용하였다(Fig. 2, Fig. 3). 확정된 표준 곡선의 방정식은 Human IgE는  $x=e^{((y-1.011)/-0.2074)}$  ( $R^2 = 0.9848$ ), rabbit IgG는  $x=e^{((y-1.1479)/-0.1879)}$  ( $R^2 = 0.9971$ )이며, 이들



**Fig. 2. Standard curve for quantifying  $\beta$ -lactoglobulin in milk and milk products.** The curve was formatted by Ci-ELISA based with human IgE.



**Fig. 3. Standard curve for quantifying  $\beta$ -lactoglobulin in milk and milk products.** The curve was formatted by Ci-ELISA based with rabbit's polyclonal immuno-globulin G(IgG).

표준 곡선을 이용하여 유제품 내에 존재하는 BLG을 정량하였다.

### 3. 유제품 내의 BLG의 정량

표준 곡선을 이용하여 유제품에 존재하는 BLG의 함량을 측정하였다 (Table 1). 각 시료에서 ammonium sulfate를 이용하여 단백질을 침강시킨 후 단백질 농도를 일정하게 희석하여 단백질 농도를 구하였는데 단백질 농도는 PBS를 사용하여 1.0 mg/ml로 보정한 후 그 용액에 존재하는 BLG을 정량하였다. Human IgE에서 검출된 BLG의 함량은 우유, 분유 및 발효유에서 각각 16.4, 10.6, 3.18  $\mu\text{g/ml}$ 로 측정되었으며, rabbit IgG 표준 곡선으로부터도 유사한 농도로 측정되었으며, 통계학적으로도 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

또한 BLG 항원과 유제품간의 환자 및 토끼 항체에 대한 결합능을 평가한 결과는 Fig. 4 및 Fig. 5에 나타내었다. Human IgE의 결과에서 50%의 결합능을 보이는 시유, 분유, 발효유의 농도는 15.6, 62.5, 125  $\mu\text{g/ml}$ 였으며, 이 결과는 발효유에서의 BLG의 함량이 시유에 비해 낮다는 것을 보여준다. Rabbit IgG의 결과에서도 이와 같은 경향이 나타났으며, 각 시료의 50% 결합능을 보이는 농도는 시유에서 1.0  $\mu\text{g/ml}$ , 분유에서 3.9  $\mu\text{g/ml}$ , 발효유에서는 31.25  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도를 나타내어 rabbit IgG의 결과에서도 BLG의 함량이 발효유에서 낮게 나타나는 것을 알 수 있었다.

분유의 BLG의 함량이 시유에 비해 적게 나타난 것은 공정 과정 중에 의한 단백질의 손상에 의한 것으로 사료가 되며, BLG가 여전히 존재하는 것은 BLG에 대한 특이 알레르기를 일으킬 수 있다.

한편, BLG는 발효유에서 가장 낮게 검출되었는데 이는 발효 미생물에 의한 가수분해가 BLG를 파괴하여 표면에 존재하는 epitope에 변형을 가져온 것으로 판단된다<sup>19)</sup>. Bahna와 Heiner<sup>20)</sup>는 원유나 시유보다는 발효

**Table 1.** The concentration of  $\beta$ -lactoglobulin in a market milk, dried milk and fermented milk solution (1.0 mg/ml) ( $\mu\text{g/ml}$ )

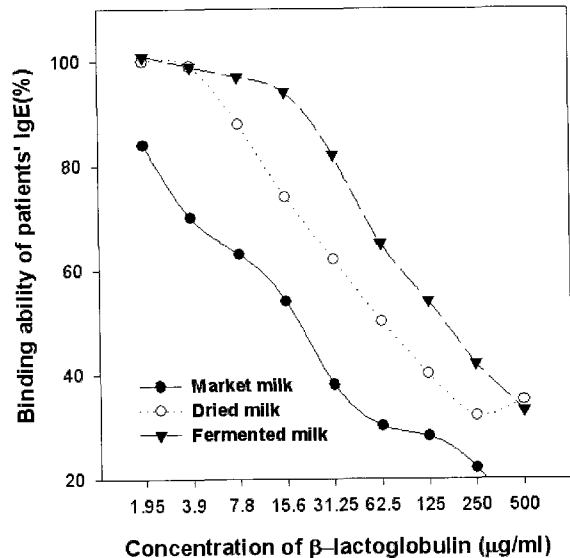
| Type of antibody | Market milk                     | Dried milk                     | Fermented milk                  |
|------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Human IgE        | 16.4 $\pm$ 0.14 <sup>a1)</sup>  | 10.6 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>   | 3.18 $\pm$ 0.25 <sup>c</sup>    |
| Rabbit IgG       | 18.6 $\pm$ 0.57 <sup>a,ND</sup> | 9.5 $\pm$ 0.24 <sup>b,ND</sup> | 2.98 $\pm$ 0.33 <sup>c,ND</sup> |

1) Means $\pm$ SD.

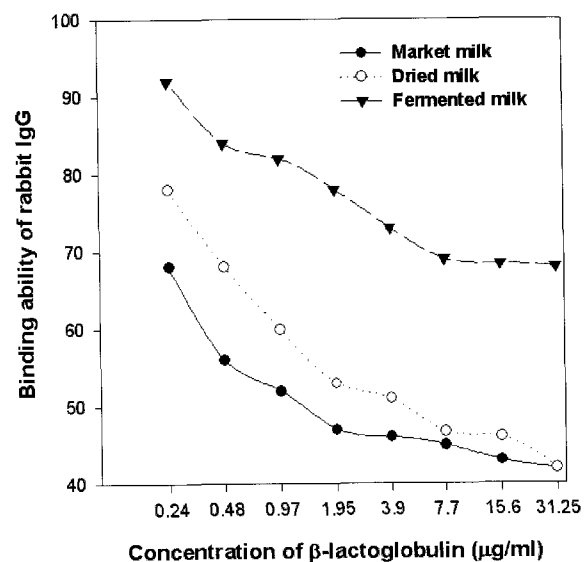
<sup>a-c</sup> values in the same row with unlike superscript are significantly different at  $p < 0.05$ .

유가 우유 알레르기가 적절히 억제된 유제품이며 우유 알레르기가 있는 유아에게 급여할 수 있는 식품으로 보고한 바 있다.

따라서 BLG를 함유한 유제품 및 그 가공품 중 발효유에서 알레르기원성이 가장 낮게 나타났으며, 발효유는 시유와 비교하여 영양학적 분포가 달라 우유 알레르기가 있는 환자에게 시유에 대한 완전한 대체제품이 될 수 없지만 알레르기원성이 저감화된 식품으로



**Fig. 4.** Binding ability of patients' IgE to market milk, dried milk and fermented milk.



**Fig. 5.** Binding ability of rabbit immunoglobulin G (IgG) to market milk, dried milk and fermented milk.

이용할 수 있을 것으로 사료된다.

## 요 약

시유, 분유, 발효유에 존재하는 우유알레르겐인  $\beta$ -Lactoglobulin (BLG)를 측정하기 위해 면역 blotting 및 간접결합면역 분석법(Competitive-indirect Enzyme linked Immunosorbent Assay; Ci-ELISA)으로 분석하였다. Immunoblotting 결과, 발효유에서는 우유 알레르기 환자의 IgE와의 반응이 나타나지 않았고 분유 및 시유에서는 약하지만 반응이 나타났다. 다크론 항체 및 우유 알레르기 환자의 IgE로 이들의 BLG 함량을 정량한 결과, BLG 함량은 시유가 가장 높았으며 발효유는 매우 낮았다. 이상의 결과에서 발효유에서는 가장 낮은 BLG 함량이 측정되어 우유 알레르기 환자에 대한 저알레르기원성 식품으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Yunginger, JW. Food antigens. *In: Food allergy: adverse reactions to food and food additives*, pp.50-53 Blackwell Scientific Publications. Boston, USA. 1997
2. David, TJ. Food and food additive intolerance in childhood, pp. 157-159. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. 1993
3. Docena, GH, Fernandez, R, Chirido, FG and Fossati, CA. Identification of casein as the allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy (Copenhagen)* 51(6): 412-416. 1996
4. Sampson, HA. IgE-mediated food intolerance. *J. Allergy Clin. Immunol.* 81(3):495-504. 1986
5. Sampson, HA. Food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111(2):540-547. 2003
6. Exl, BM and Fritsché, R. Cow's milk protein allergy and possible means for its prevention. *Nutrition* 17(8): 642-651. 2001
7. Asselin, A, Hebert, J and Amiot, J. Effects of *in vitro* proteolysis on the allergenicity of major whey proteins. *J. Food Sci.* 54(4):1037-1039. 1989
8. Savilahti, E and Kuitunen, M. Allergenicity of cow milk proteins. *J. Pediatrics* 121(5):12-20. 1992
9. Moneret-Vautrin, A, Humbert, G, Alais, C and Gril-liat, JP. Donees recentes sur proprietes immunoallergologiques des proteins lactieres. *Le. Lait.* 62(2):396. 1982
10. Maruyama, N, Sugiura, F, Kishimoto, T, Ichise, K, Takeuchi, Y, Sawada, T, Tsuda, A and Utsumi, S. Decrease IgE-binding with wheat gluten by deamination. *Biosci. Biotech. Biochem.* 81(2):207-211. 1999
11. Boudraa, G, Touhami, M, Pochart, P, Soltana, R, Mary, JY and Desjeux, JF. Effect of feeding yogurt versus milk in children with persistent diarrhea. *J. perdiatr. Gastroenterol. Nutr.* 11(4):509-512. 1990
12. Breslaw, ES and Kleyn, DH. *In vitro* digestibility of protein in yogurt at various stages of processing. *J. Food Sci.* 38(4):1016-1021. 1973
13. Jedrychowski, L and Wroblewska, B. Reduction of the antigenicity of whey proteins by lactic acid fermentation. *Food Agric. Immunol.* 11(9):91-99. 1999
14. Lee, JW, Yook, HS, Lee, KH, Kim, JH and Byun, MW. Conformational changes of myosin by gamma irradiation. *Radiat Phys. Chem.* 58(3): 271-277. 2000
15. Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685. 1970
16. Towbin, H, Steahelin, T and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76(9):4350-4354. 1979
17. SAS Institute. SAS/STAT™ User's Release 6.03 Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC. 1988
18. Kunji, ER, Mierau, I, Hagting, A, Poolman, B and Konings, WN. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *AntonieVan Leeuwenhoek* 70(2-4):187-221. 1996
19. Taylor, S. Food allergy-The enigma and some potential solutions. *J. Food Prot.* 43:300-306. 1980
20. Bahna, SL and Heiner, DC. Allergies to milk, pp. 28-46. Grune and Stratton. New York. 1980

(2006년 6월 22일 접수; 2006년 9월 15일 채택)