

## 계란 알레르기 환자의 IgE 항체를 이용한 처리 난백 중 ovomucoid의 알레르기성 조사

류주현 · 김현정 · 안강모<sup>1</sup> · 이상일<sup>1</sup> · 손동화\*

한국식품연구원, <sup>1</sup>성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 소아과

### The Allergenicity of Ovomucoid in Treated Egg Whites to Human IgE Antibody from Egg-Allergic Patients

Ju-Hyune Ryu, Hyun-Jung Kim, Gangmo Ahn<sup>1</sup>, Sang-Il Lee<sup>1</sup>, and Dong-Hwa Shon\*

Korea Food Research Institute

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Sungkyunkwan University School of Medicine, Samsung Medical Center

**Abstract** The ovomucoid (OM) of egg whites is recognized as a major allergen. Here, the allergenicity of OM in egg whites (EW) treated by chemical, enzymatic, and physiological methods were investigated by competitive inhibitory ELISA using human IgE antibody acquired from egg-allergic patients. Enzymatic hydrolysis, irradiation, and succinic anhydride treatments did not reduce the allergenicity of the OM effectively. Allergenicity was reduced to only 1/20 by deglycosylation with trifluoromethanesulfonic acid (TFMS). Heat treatment of the OM at 121°C for 10 min reduced allergenicity to 1/100. Furthermore, NaOH (over 3%) treatment reduced allergenicity to 1/10,000, and the combinatory treatment of NaOH (over 0.3%) and heat (70°C, 15 min) reduced it to less than 1/10,000, which was the most effective method. In this study, which analyzed treated EW using ELISA and patient-derived IgE, the OM allergenicity was nearly the same as its antigenicity according to ELISA using rabbit IgG. However, in the case of the TFMS-treated EW, the antigenicity was much lower than the allergenicity. These results suggest that the allergenicity of OM is slightly different from its antigenicity.

**Key words :** egg white, ovomucoid, allergenicity, immunoglobulin E, NaOH, trifluoromethanesulfonic acid

## 서 론

면역계는 자기와 비자기를 정확히 식별하여 인체에 해가 되는 외부침입물질 즉, 바이러스, 세균, 기생충 등의 병원체는 제거하고, 필요한 물질은 관용적으로 받아들이는 시스템을 작동시켜 신체를 건강하게 지탱해 주고 있다(1,2). 식품이 체내로 섭취되었을 때 일반적으로는 면역관용이 유도되지만 어떤 종류의 식품성분은 면역계를 비정상적으로 항진시켜 알레르기를 일으킬 수도 있다(3,4).

식품알레르기연구 및 자원프로그램(Food Allergy Research and Resource Program; FARRP)의 데이터베이스에 따르면 2008년 1월 현재 식품 알레르겐은 동물성 79종과 식물성 334종 등 총 414종이 알려져 있다(5). 이중 계란과 우유 중의 알레르겐에 의한 알레르기의 발증 빈도가 가장 높은 것으로 알려져 있다. 특히, 계란의 알레르기 발증기구는 IgE 항체가 관여하는 즉시형 반응(type I)인 경우가 많으며, 그 원인물질은 난백 중의 단백질로서 ovomucoid(OM)와 ovalbumin(OA)으로 알려져 있다. 이러한 식품알레르기 중 즉시형 알레르기 증상과 혈청 IgE 항체간의 명확한 상

관관계가 인정되고 있으며, IgE 항체의 분석은 알레르기의 진단에 이용되고 있다(6).

식품알레르기에 대한 적극적인 대응방법은 원인 식품을 식생활에서 제거시키는 회피요법이 있는데, 식품알레르기를 일으키는 대부분의 원인물질이 영양학적으로 우수하고 이용 빈도가 높은 우유, 계란 등의 식품임을 감안할 때 그러한 식품을 완전히 제거한다는 것은 환자의 식생활에 지장을 초래할 우려가 있다. 이러한 배경에서, 알레르기환자가 안심하고 섭취할 수 있는 알레르기성을 저하시킨 식품의 개발이 현재 절실히 요구되고 있는 실정이다(7,8). 한편, 이와 더불어 알레르기성 저감화의 평가방법도 매우 중요한데 비교적 간단하면서 정량적인 방법으로써 ELISA가 이용될 수 있다. 그 방법으로는 동물의 IgG 항체를 이용하는 방법과 환자의 IgE 항체를 이용하는 방법을 들 수 있고 우리는 전보(9)에서 토끼 IgG 항체를 이용하여 처리 난백중에 존재하는 OM에 대한 반응성을 분석한 바 있다.

본 연구에서는 사람 알레르기 반응과 직접적으로 관계되는 환자의 IgE 항체를 이용하여 전보와 같이 처리된 난백의 OM에 대한 반응성으로 OM의 알레르기성의 변화를 조사하고 아울러 두 가지 방법에 의한 평가 결과를 비교하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

본 실험에서 사용한 계란은 알짜란(CJ, Seoul, Korea)을, 난백

\*Corresponding author: Dong-Hwa Shon, Korea Food Research Institute, Seongnam, Gyeonggi-do 463-746, Korea

Tel: 82-31-780-9133

Fax: 82-31-709-9876

E-mail: dhs95@kfri.re.kr

Received February 22, 2008; revised May 1, 2008;

accepted May 7, 2008

**Table 1. Clinical history of egg allergic patients whose sera were used in this study**

Serum No.	Age (years)	Sex	RAST <sup>1)</sup> , PRU/mL	CAP <sup>2)</sup> , kUA/L	Score <sup>3)</sup>	
					Egg white	Egg yolk
1	0	M	16.7	-	2	0
2	0	M	17.6	-	3	0
3	2	M	436	-	2	0
4	1	F	-	73.7	2	2
5	0	M	-	269	4	4
6	0	M	178	-	3	0
7	0	F	-	25.2	2	1
8	0	M	-	28	3	1
9	1	F	-	69.2	2	2
10	1	M	2001	-	6	5

<sup>1)</sup>Radio-allergosorbent test<sup>2)</sup>Capsular allergen product test<sup>3)</sup>Test results were interpreted to score according to the manufacturers directions; negative: 0, borderline: 1, positive: 2, strong positive: 3, highly positive: 4-6.

분말은 SKM Egg Product Export Ltd.(New Delhi, India) 제품을 사용하였다. 단백질은 OA, OM, egg yolk(EY), conalbumin(CA), lysozyme(LZ), 탈지유(SM), 분리대두단백(ISP), bovine serum albumin(BSA)(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 효소는 bromelain, papain, ficin, trypsin, pancreatin, pepsin, *Aspergillus oryzae* 유래의 protease(A.O.), *Streptomyces caespitosus* 유래의 protease(S.C.), *Bacillus polymyxa* 유래의 protease(B.P.)(Sigma Co.), Flavourzyme(Daejong, Seoul, Korea), Protease NP(Pacific Chemical, Seoul, Korea), Protamex(Novo Korea, Seoul, Korea) 등을 사용하였다. 계란 알레르기 환자의 혈청은 삼성서울병원 소아과에 내원하였던 0-2세의 계란 알레르기 증상을 보였던 환자의 혈청으로 capsular allergen product test(CAP kit, Pharmacia-Upjohn AB, Uppsala, Sweden)와 radio-allergosorbent test(RAST)에서 양성 반응을 보인 10점을 분석에 사용하였다(Table 1).

### 환자 혈청 중 IgE 항체 특이성

계란 알레르기 환자 혈청 중 IgE 항체의 특이성을 조사하기 위해 비 경쟁 간접 ELISA를 실시하였다. EW, EY, OA, OM, CA, LZ, SM, ISP, BSA를 코팅버퍼에 2 µg/mL로 희석하여 사용하였다. 코팅액을 100 µL씩 microplate well에 각각 분주하여 냉장고에서 하룻밤 정치하였다. 이것을 세척버퍼로 세 번 세척하여, well에 부착되지 않은 잔여 단백질을 제거하였다. 1차 항체는 환자 혈청, 2차 항체는 goat anti-human IgE, 그리고 3차 항체는 anti-goat IgG-HRP conjugate를 사용하여 위의 토끼 항체와 같은 방법으로 항체를 측정하였다. 같은 특이성을 나타내는 항혈청 중 가장 높은 항체가를 나타낸 항체를 다음의 항원성과 알레르기성 조사에 사용하였다. 공실험을 포함하여 각 시료 당 3회씩 반복실험을 실시하였다.

### 효소처리

효소는 bromelain, papain, ficin, trypsin, pancreatin, pepsin, A.O., S.C., B.P., Flavourzyme, protease NP, Protamex로 총 12종을 사용하였다. 단백질을 균질화시킨 후 각 효소의 최적 반응 pH로 조절하였다. 단백질의 단백질 농도가 6%(w/v)되게 맞추고 여기

에 단백질 농도 1%의 효소를 첨가하였다. 효소반응은 각 효소의 최적반응 온도에서 24시간 반응시켰고 효소반응 종결을 위하여 90°C에서 10분간 열처리하였다.

### 열처리

전보(9)와 같이 분말단백을 증류수에 1%(w/v) 농도로 녹인 후 60, 80, 100, 121°C에서 30분간 열처리하였다. 이때, 100°C 처리까지는 항온수조를 이용하였고, 121°C 처리는 열균살을 이용하였다.

### NaOH 처리

단백의 알레르기성을 감소시키기 위해 Hisatomi 등(11)의 방법을 참조하여 Ryu 등(9)의 방법과 동일하게 NaOH를 단백질의 처리에 사용하였다. 분말 단백을 증류수에 녹여 5%(w/v) 단백질 농도로 만든 후, NaOH를 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3%(w/v)의 농도로 첨가하여 50°C 항온수조에서 2시간 동안 반응시켰다. NaOH로 처리한 단백질의 일부는 증류수로 투석하였으며 나머지는 항온수조에서 70°C에서 15분간 열처리를 추가한 후, 증류수로 투석하였다.

### 기타 화학적, 물리적 처리

Ryu 등(9)와 같이 trifluoromethane sulfonic acid(TFMS)의 처리는 단백을 화학적으로 변형시키기 위해 Edge 등(12)과 Gu 등(13)의 방법을 근거로 처리하였다. TFMS 2 mL과 anisole 1 mL을 넣고 혼합한 후, 0°C로 급냉 시켰다. 10 mL 반응용기에 분말 단백질 30 mg과 anisole-TFMS 혼합액 3 mL를 넣은 후, 질소가스로 30초 동안 치환하였다. 혼합물을 섞으면서 0°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 2배 부피의 차가운 diethyl ether(-40°C)를 위의 혼합물에 넣어 잘 섞어준 후 상온에서 방치하여 ether층을 제거하였다. Diethyl ether 희석과 ether층 제거를 2회 더 반복하였다. 반응물을 증류수로 투석한 후, table top centrifuge MF-80(Hamil Science, Seoul, Korea)로 원심분리(3,000 rpm, 10 min)하여 상정액을 취하고, 농도를 보정하였다. 아울러 succinic anhydride 처리와 방사선조사도 Ryu 등(9)의 방법에 따라 행하였다.

### 간접 경합 ELISA

처리 단백질의 알레르기성 변화를 조사하기 위해서 간접 경합 ELISA(competitive indirect ELISA, ciELISA)를 이용하였다. 단백질의 알레르기성 변화를 조사하기 위해서는 단백을, OM의 알레르기성은 OM을 코팅버퍼에 2 µg/mL로 희석하였다. 이를 100 µL씩 microplate well에 각각 분주하여 냉장고에서 하룻밤 정치하였다. 이것을 세척버퍼로 세 번 세척한 다음, 일정 농도의 환자혈청과 단계별(10<sup>-3</sup>-10<sup>3</sup> mg/mL)로 희석한 단백질 처리물을 동량 혼합하였다. 이 혼합액을 각 well 당 100 µL씩 넣고 1시간 반응시킨 다음, 2차 항체는 goat anti-human IgE를 사용하였고 3차 항체는 anti-goat IgG-HRP conjugate를 사용하였다. 각 시료 당 3회씩 반복실험을 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 환자혈청 중 IgE 항체의 항원특이성 비교

임상적으로 계란 알레르기 증상을 보인 환자 혈청 내에 존재하는 IgE 항체와 주요 식품 알레르겐과의 반응성을 알아보고자 하였다. 이를 위하여, 계란 단백질인 EW, EY, OM, OA, CA, LZ, 우유 단백질인 SM, BSA, 대두 단백질인 ISP과 환자혈청과의 반응성을 조사하였다. 모든 혈청과 낮은 반응성을 나타낸 BSA를 기준 단백질로 하였을 때 계란 단백질에서 더 높은 반응을 나타

**Table 2. Reactivity of human IgE antibody from egg allergic patients toward various allergens determined by ELISA<sup>1</sup>**

Serum No.	EW	OM	OA	CA	LZ	EY	SM	ISP	BSA
1	0.1637	0.1323	0.1430	0.1820	0.1930	0.1720	1.5347	0.2310	0.3587
2	0.2057	0.1383	0.1417	0.3127	0.1847	0.1670	1.6360	0.2083	0.1980
3	2.0063	2.1830	0.6313	0.9387	0.6623	0.5827	1.3603	0.3943	0.3213
4	0.4540	0.6780	0.2287	0.2083	0.2230	0.2350	1.4303	0.2970	0.3233
5	0.5893	0.4940	0.2130	0.2373	0.2690	0.2310	0.9990	0.3233	0.2477
6	0.4910	0.3123	0.3487	0.3423	0.4017	0.3437	1.8210	1.3800	0.3233
7	0.1863	0.1627	0.1723	0.1800	0.2417	0.1853	0.7750	0.2280	0.3240
8	0.2187	0.1717	0.2010	0.1887	0.2077	0.2363	0.5830	0.2667	0.1797
9	0.9823	0.9337	0.3410	0.5317	0.5497	0.3830	0.9233	0.4107	0.4020
10	2.1663	1.968	0.3737	2.0207	1.2307	1.1723	1.6587	1.5087	0.3540

<sup>1</sup>Plates were coated with egg white (EW), ovomucoid (OM), ovalbumin (OA), egg yolk (EY), conalbumin (CA), lysozyme (LZ), skim milk (SM), isolated soy protein (ISP), and bovine serum albumin (BSA). Every valves of IgE were shown.

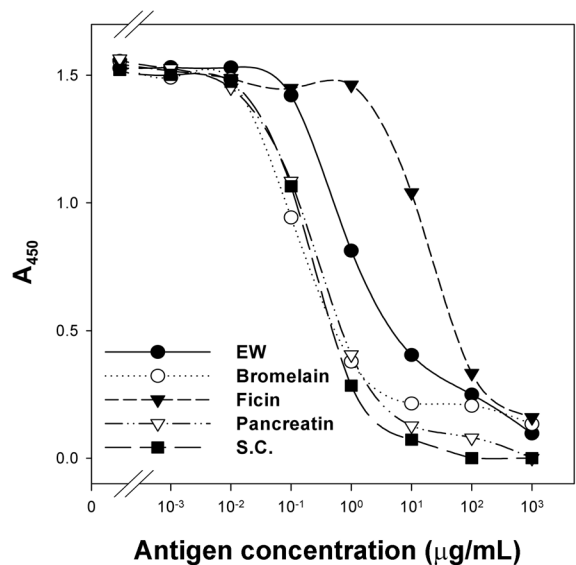
낸 것은 3, 4, 5, 6, 9, 10번 혈청이었다(Table 2). 계란 알레르기 증상을 보였고 CAP시험이나 RAST법으로 양성을 보였던 환자 혈청이었음에도 불구하고 1, 2, 7, 8번의 혈청은 계란 구성 단백질에 미약한 반응을 보였다. 그리고 SM에 대해서는 모든 환자 혈청에서 높은 반응성을 나타내고 있음을 확인 할 수 있었다. 3, 4, 5, 9, 10번 환자의 IgE 항체는 난백의 OM과 매우 강하게 결합하는 것으로 나타났고 이에 비해 난황은 대체적으로 반응성이 낮게 나타났다. 이는 OM이 난백 중 가장 주된 알레르겐이라 보고한 기존 연구보고(14,17,18)와 일치하였으며, Ryu 등(9)과 Ryu 등(10)의 항원성 실험결과와도 같은 경향을 나타내었다. 또한 Ryu 등(9)에서 계란 난백을 면역하여 생산된 토끼의 IgG 항체는 EW, OM, OA에 대해서 모두 반응성을 보였던 반면, 계란 알레르기 환자들의 IgE 항체는 EW, OM의 반응성에 비하여 OA의 반응성은 약 2-7배 정도 낮게 나타났다.

따라서 난백처리물의 알레르기성 변화 연구를 위해서는 OM을 분석대상으로 하는 것이 바람직하다고 판단되었다. 이에 본 연구에서는 계란 단백질 중 가장 강력한 계란 알레르겐인 OM에 대한 반응성이 특히 높게 나타난 3, 9, 10번 환자 혈청을 이용하여 난백처리물 중 OM의 알레르기성을 분석하였다.

### 효소처리에 의한 알레르기성 변화

항원성이란 항체와 결합하는 항원의 능력을 말하는데 그 분석을 위해서는 대개 토끼나 사람의 IgG 항체를 이용한다. 반면에, 알레르기성이란 일반적으로 알레르겐이 IgE 항체를 매개로 비만 세포와 결합함으로써 알레르기(type I)를 유발하는 성질을 말한다. 따라서 알레르기성 분석을 위하여 알레르기 환자의 IgE 항체를 이용한다(15-17). Ryu 등(9)와 Ryu 등(10)의 항원성 조사에서는 토끼에서 생산한 특이 IgG 항체와 난백 처리물과의 반응성을 조사하였으나, 본 연구에서는 난백 처리물의 알레르기성 변화를 조사하기 위하여 인체에서 알레르기 반응의 유발에 필요한 계란 알레르기 환자의 IgE 항체와 처리물 간의 반응성을 검토하였다.

우선 12종의 효소를 이용하여 난백을 가수분해한 다음, 난백분해물 중 OM의 알레르기성 변화를 조사하였다. 3번 혈청을 사용 시 Fig. 1에서와 같이, ficin 가수분해물의 경우 1/50 정도로 알레르기성이 감소되었고, bromelain, pancreatin, S.C. 효소처리는 오히려 10배 정도 알레르기성을 증가시키는 것으로 나타났다(Table 3). 이는 다른 효소처리와는 달리 OM이 bromelain, pancreatin, S.C.의 효소에 반응하여 구조적으로 숨어 있던 항원결정기가 노출이 됨으로써 알레르기성이 증가한 것으로 생각된다. 나머지 효소인 papain, trypsin, pepsin, A.O., B.P., Flavourzyme, Protease



**Fig. 1. Inhibition analysis of binding between egg white hydrolysate and the serum of egg allergic patient.** The binding of human serum (No. 3) to ovomucoid was inhibited competitively by EW hydrolysate. EW was hydrolyzed with botanical proteases (bromelain, ficin), animal proteases (pancreatin), and microbial proteases (*Streptomyces caespitosus* (S.C.)).

NP, Protamex의 처리는 알레르기성에 변화를 보이지 않았다(Table 3). 본 연구에서 사용한 다른 2종의 환자 혈청과의 반응에서도 거의 비슷한 경향을 나타내었다. Hisatomi 등(11)의 연구에서 알레르기성은 간접경합 ELISA로 측정 시 반응성이 1/1,000 이하로 감소되어야 효과적으로 제거되었다고 할 수 있음을 보고하였다. 이러한 관점으로 볼 때 효소분해처리는 계란 중 OM의 알레르기성 감소에 효과적이지 못함을 알 수 있었다. 또한, 이러한 결과는 효소의 종류에 따라 약간의 차이는 있었지만, 대체적으로 전보에서의 결과와 유사하였다. 이와 같이, 효소 처리된 OM의 알레르기성이 쉽게 감소되지 않는 원인은 난백 중 트립신저해제의 활성을 갖는 OM(19-21)과 ovoinhibitor(22)등에 의해 효소 분해 작용이 방해를 받았기 때문으로 생각된다.

### 열처리에 의한 알레르기성 변화

열처리한 난백의 OM 알레르기성은 처리 전(IC<sub>50</sub>은 0.4 µg/mL)에 비하여 100°C로 처리한 경우에도 큰 변화가 없었다(Fig. 2).

**Table 3. Comparison of change rates of antigenicity and allergenicity determined by ciELISA**

Treatment	Change rate <sup>1)</sup>	
	Antigenicity <sup>2)</sup>	Allergenicity <sup>3)</sup>
EW (control) <sup>4)</sup>	1	1
Ficin (enzyme)	1	1/50
S.C. (enzyme) <sup>5)</sup>	1	10
Bromelain	1	10
Pancreatin (enzyme)	10	10
Other enzymes <sup>6)</sup>	1	1
Heat (100°C)	1	1
Heat (121°C)	1/250	1/100
NaOH (0.3%)	1/50	1/50
NaOH (1%)	< 1/10,000	1/5,000
NaOH (3%)	< 1/10,000	< 1/10,000
NaOH (0.3%)+Heat	< 1/10,000	1/10,000
NaOH (1%)+Heat	< 1/10,000	< 1/10,000
TFMS <sup>7)</sup>	< 1/10,000	1/20
Succinic anhydride	1	1
Irradiation (10 kGy)	1	1

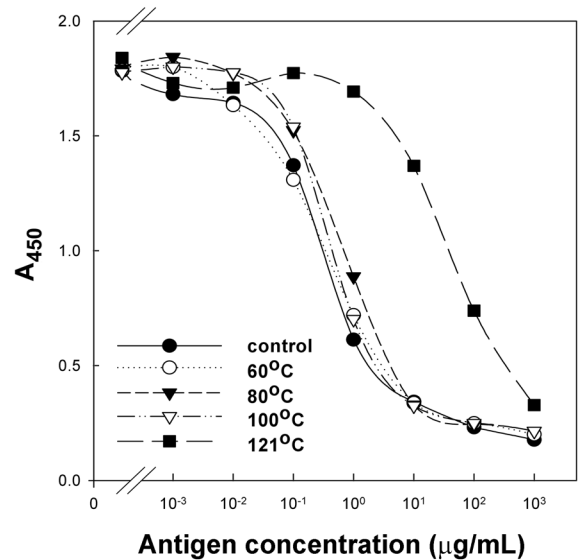
<sup>1)</sup>Change rate = IC<sub>50</sub> of native EW / IC<sub>50</sub> of the treated EW  
<sup>2)</sup>Antigenicity was determined by ciELISA using rabbit anti-OM antibody.  
<sup>3)</sup>Allergenicity was determined by ciELISA using allergic patient's serum (No. 3).  
<sup>4)</sup>Egg white  
<sup>5)</sup>Protease from *Streptomyces caespitosus*  
<sup>6)</sup>They are papain, trypsin, pepsin, *Aspergillus oryzae* protease, *Bacillus polymyxa* protease, Flavourzyme, Protease NP, and Protamex.  
<sup>7)</sup>Trifluoromethanesulfonic acid

다만 121°C로 10분간 고온 처리된 난백의 경우, IC<sub>50</sub>은 60 µg/mL 정도로 나타나 OM 알레르기성이 1/100 정도 감소된 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 이 결과는 전보(10)의 OM 항원성이 1/250 정도로 감소한 것에 비하면 대체로 비슷한 경향을 보였다(Table 3).

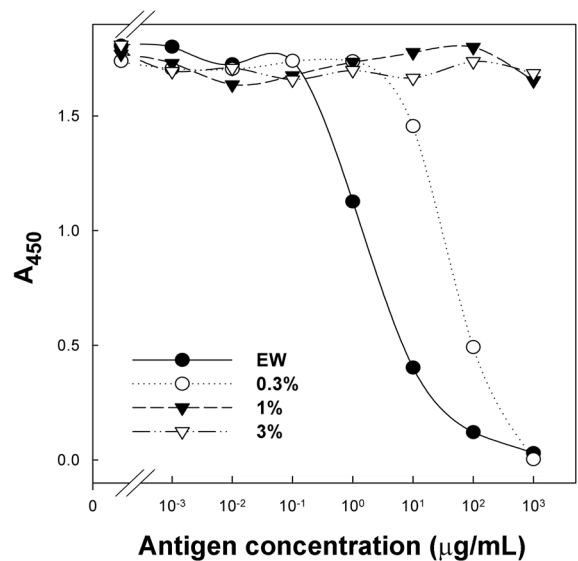
한편, 10번 환자의 혈청을 사용한 경우, 100°C의 열처리에서도 알레르기성이 1/1,000 정도로 감소하였고, 121°C에서는 1/10,000 정도로 감소하여 선발된 3번과 9번 환자의 혈청과는 달리, 열처리된 난백의 OM 알레르기성이 크게 감소된 것으로 나타났다(자료 미제시). 이제까지의 연구들에 따르면 이러한 성질은 OM 내에 연속적 항원결정기가 존재하여 OM의 항원성과 알레르기성은 열변성에 극히 안정적인 것으로 알려져 있고(13,22) 이에 반하여, 구조적 항원결정기는 열처리에 의해 구조가 쉽게 변하여 epitope의 성질을 잃어버리는 것으로 알려져 있다. 따라서 앞의 결과는 10번 환자의 IgE 항체가 열처리에 의해 구조가 변성되는 구조적 항원결정기에 반응하고 3번과 9번 환자의 IgE 항체는 상대적으로 열에 안정한 연속적 항원결정기와 주로 반응하는 것으로 생각된다. OM내 연속적 항원결정기가 존재한다는 것은 여러 연구에서 확인되었는데, Cooke와 Sampson(23)은 OM을 구성하는 89개의 decapeptide를 만든 후 환자혈청과 반응시킨 결과, 50% 이상의 환자 혈청에서 인식되는 3개의 펩티드서열을 발견하였고, Mine와 Zhang(24)도 OM의 3개 domain에 공통으로 존재하는 연속적 항원결정기를 보고하였다.

**NaOH 처리에 의한 알레르기성 변화**

NaOH를 이용하여 난백을 분해 및 가용화하였고 OM의 알레르기성 변화를 3번 환자혈청으로 조사한 결과는 Fig. 3에 나타나

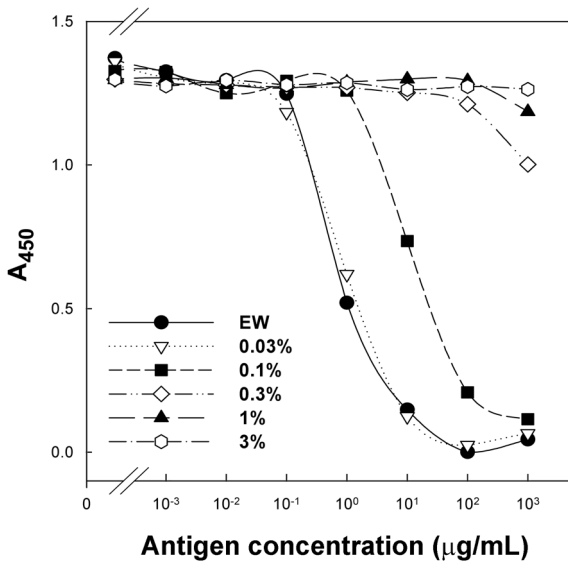


**Fig. 2. Inhibition analysis of binding between the heated egg white and the serum of egg allergic patient.** The bindings of human serum (No. 3) to ovomucoid were inhibited competitively by the heated EW. EW was heated at 60, 80, 100, and 121°C for 30 min.



**Fig. 3. Inhibition analysis of binding between NaOH treated egg white and the serum of egg allergic patient.** The bindings of human serum (No. 3) to OM were inhibited competitively by NaOH treated EW. EW was treated at 0.3, 1, and 3% (w/v) of NaOH for 2 hr at 50°C and dialyzed against distilled water.

있는데, OM의 알레르기성과 비슷하게 0.3% (w/v) NaOH 농도부터 난백의 알레르기성도 감소되기 시작하여, 1% 농도에서는 효과적으로 감소되는 것으로 나타났다. 난백의 알레르기성 변화와 OM의 알레르기성 변화 양상이 유사하였으며 이는 열처리를 이용한 OM 알레르기성과 난백의 알레르기성의 감소와 유사한 결과였다. 또한, Ryu 등(10)의 NaOH 처리가 항원성과 마찬가지로 알레르기성 감소에도 효과적임을 알 수 있었다. 하지만, 난백과 OM의 항원성은 1% (w/v) NaOH 농도부터 1/10,000 이상으로 감소된 반면, 난백과 OM의 알레르기성은 1% (w/v) NaOH 농도에



**Fig. 4.** Inhibition analysis of binding between the egg white treated with NaOH, followed by heating, and the serum of egg allergic patient. The bindings of human serum (No. 3) to ovomucoid were inhibited competitively by the treated EW. NaOH treatment was done for 2 hr at 50°C, followed by heating at 70°C for 15 min.

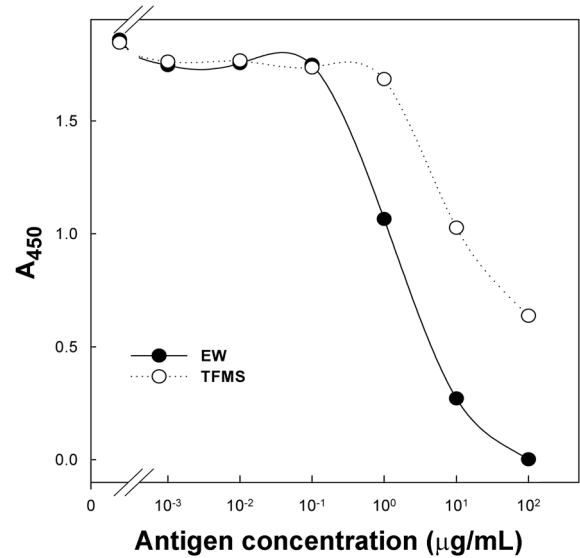
서 1/5,000 정도로 감소되었고 3%(w/v) NaOH 농도에서 거의 사라지는 것으로 나타났다. 이 결과는 9, 10번 환자 혈청을 이용한 분석에서도 대체로 유사하게 나타났고 결과적으로 알레르기성이 항원성보다 쉽게 감소되는 것을 알 수 있었다(Table 3).

#### NaOH와 열처리에 의한 알레르기성 변화

전보의 실험(10)에서 NaOH 처리와 열처리를 병행하는 방법이 항원성 감소에 가장 효과적인 것으로 나타나, 난백을 NaOH로 처리한 후, 70°C에서 15분간 열처리한 난백의 알레르기성 변화를 조사하였다. Fig. 4와 같이 처리 전 난백의  $IC_{50}$ 은 2 µg/mL 정도였고 0.1%(w/v) 농도로 처리한 난백의  $IC_{50}$ 은 45 µg/mL로 나타나 OM의 알레르기성이 1/25 정도로 감소하였다. 0.3%(w/v) 농도로 처리한 난백의  $IC_{50}$ 은 외삽하여 분석한 결과 170,000 µg/mL 정도로 나타나 알레르기성이 1/100,000 정도로 낮아졌으며 1%(w/v) 농도 이상에서는 OM의 알레르기성이 대부분 사라진 것으로 나타났다. NaOH 처리와 열처리를 병행하는 방법이 같은 NaOH 농도에서 NaOH 단독처리 시보다 알레르기성 감소에 더욱 효과적인 것으로 나타났다. 다른 환자혈청을 이용한 결과도 유사한 양상을 보여 주었으며, 이러한 결과는 전보의 NaOH와 열처리에 의한 난백의 항원성 변화와도 일치하였다.

#### 기타 처리에 의한 알레르기성 변화

TFMS, succinic anhydride 처리 및 방사선조사에 대한 OM의 알레르기성 변화를 조사하였다. TFMS를 사용하여 난백을 처리하면 TFMS가 OM의 당쇄를 제거하고 트립신저해활성의 감소 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(13). TFMS처리 후 환자혈청을 이용하여 알레르기성을 알아본 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 난백의  $IC_{50}$ 은 2 µg/mL였고, TFMS로 처리한 난백의  $IC_{50}$ 은 40 µg/mL였으므로 OM의 알레르기성이 약 1/20 정도만 감소된 것으로 나타났다(Table 3). 이러한 결과는 Ryu 등(9)과 Ryu 등(10)의 세 종류의 토끼항체(anti-EW, anti-OM, anti-OA)를 이용한 난백의 항



**Fig. 5.** Inhibition analysis of binding between the serum of egg allergic patient and the egg white treated with trifluoromethanesulfonic acid. The bindings of human serum (No. 3) to ovomucoid were inhibited competitively by TFMS treated EW. TFMS treatment was done at 0°C for 60 min.

원성이 모두 1/10,000 이상으로 감소된 것과 매우 대조적인 결과였다. 이는 TFMS 처리로 당쇄가 소실된 OM에 대해 환자의 IgE 항체는 여전히 반응할 수 있었지만 토끼의 IgG 항체는 반응할 수 없었음을 의미한다. 따라서 계란 알레르기 환자의 IgE 항체에 대한 항원 결정기는 OM의 당쇄부분을 거의 포함하지 않았으나 토끼의 IgG 항체의 항원결정기는 상당부분의 당쇄를 포함하고 있음을 추측할 수 있었다. 이러한 결과는 Besler 등(25)이 OM의 알레르기성은 당쇄가 아닌 단백질부분에 존재한다고 지적한 연구결과와 일치한다. TFMS 처리는 인간의 IgE 항체와 토끼의 IgG 항체의 OM에 대한 반응성 차이를 극명하게 보인 것으로 이에 대한 후속연구가 필요하다고 생각된다. 9, 10번 환자 혈청도 3번과 거의 유사한 결과를 보였다. 또한, succinic anhydride 처리와 방사선조사에 의한 알레르기성 변화는 항원성 변화와 마찬가지로 거의 나타나지 않았다(자료 미제시).

## 요 약

여러가지 방법으로 난백을 처리하고 난백 중 주요한 알레르겐인 OM의 알레르기성 변화를 계란 알레르기 환자의 IgE 항체를 이용한 간접경합 ELISA로 조사하였다. 12종의 효소를 이용한 가수분해, 방사선조사, succinic anhydride 처리는 OM의 알레르기성을 효과적으로 감소시키지 못 하였다. OM의 당쇄를 제거하는 TFMS의 처리는 OM의 알레르기성을 1/20 정도로 감소시켰다. 100°C에서 10분간의 열처리는 알레르기성을 감소시키지 못하였으나 121°C(10분)의 처리는 난백 중 OM의 알레르기성을 1/100 정도로 감소시켰다. NaOH 단독 처리는 3%(w/v) 이상에서 알레르기성이 대부분 사라졌고, NaOH(0.3%(w/v) 이상)와 열(70°C, 15 min)의 복합처리는 알레르기성을 1/10,000 이하로 낮춤으로써 가장 효과적인 감소를 보였다. 본 연구에서 환자의 IgE 항체를 이용한 ELISA 분석결과와 동일 시료에 대한 토끼 IgG 항체의 ELISA 결과는 대체적으로 비슷한 결과를 보였지만, TFMS 처리

물에 대한 반응성은 후자에서 훨씬 많이 감소되어(1/10,000) 대조적이었다. 이는 식품의 항원성과 알레르기성 간에는 약간의 차이가 있음을 시사하였다.

## 감사의 글

본 연구를 수행함에 있어서 시료의 방사선조사에 도움을 준 한국원자력연구원 변명우 박사와 이주운 박사께 감사합니다.

## 문 헌

1. Strobel S. Oral tolerance: Immune responses to food antigens. pp. 107-36 In: Food Allergy: Adverse Reactions to Foods and Food Additives. Metcalfe DD, Sampson HA, Simon RA (eds). Blackwell Science, Boston, MA, USA (1997)
2. Brandtzaeg P. History of oral tolerance and mucosal immunity. *Ann. NY Acad. Sci.* 778: 1-27 (1996)
3. Hanson DG. Ontogeny of orally induced tolerance to soluble proteins in mice. I Priming and tolerance in newborns. *J. Immunol.* 127: 1518-1524 (1981)
4. Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. Central tolerance: Learning self-control in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 772-782 (2005)
5. AllergenOnline: Home of the FARRP allergen protein database. Available from: <http://www.allergenonline.com/default.asp>. Accessed Apr. 7, 2008.
6. Tang RB, Wu KK. Total serum IgE, allergy skin testing and the radioallergosorbent test for the diagnosis of allergy in asthmatic children. *Ann. Allergy* 62: 432-435 (1989)
7. Sicherer SH, Noone SA, Koerner CB, Christie L, Burks AW, Sampson HA. Hypoallergenicity and efficacy of an amino acid-based formula in children with cow's milk and multiple food hypersensitivities. *J. Pediatr.* 138: 688-693 (2002)
8. Murakami H, Kaminogawa S. Food allergy and hypoallergenic food. Vol. 1, pp. 61-76 In: Food and Immunology. Koudanshya Scientific Inc., Tokyo, Japan. (1992)
9. 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)
10. Ryu JH, Park CW, Lee JM, Shon DH. Antigenicity changes of ovomucoid and ovalbumin in chicken egg white by NaOH, heat, and protease treatments. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 147-151 (2004)
11. Hisatomi M, Kimera M, Inukai S, Oshida K, Morikawa A. Development of hen's egg with low antigenicity for allergic patients. *Arerugi.* 40: 1454-1463 (1991)
12. Edge AB, Faltynek CR, Hof L, Reichert LE Jr, Weber P. Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid. *Anal. Biochem.* 118: 131-137 (1981)
13. Gu JX, Mastuda T, Nakamura R, Ishiguro. H, Ohkubo I, Sasaki M, Takahashi N. Chemical deglycosylation of hen ovomucoid. *J. Biochem.* 106: 66-70 (1989)
14. Urisu A, Ando H, Morita Y, Wada E, Yasaki T, Yamada K, Komada K, Torii S, Goto M, Wakamatsu T. Allergenic activity of heated and ovomucoid-depleted egg white. *J. Allergy Clin. Immunol.* 100: 171-176 (1997)
15. Elsayed S, Hill DJ, Do TV. Evaluation of the allergenicity and antigenicity of bovine-milk  $\alpha_{s1}$ -casein using extensively purified synthetic peptides. *Scand. J. Immunol.* 60: 486-493 (2004)
16. Yasuko K, Eri O, Tsukasa M. Decrease in antigenic and allergenic potentials of ovomucoid by heating in the presence of wheat flour: Dependence on wheat variety and intermolecular disulfide bridges. *J. Agr. Food Chem.* 49: 3661-3665 (2001)
17. Mine Y, Zhang JW. Comparison studies on antigenicity and allergenicity of native and denatured egg white proteins. *J. Agr. Food Chem.* 50: 2679-2683 (2002)
18. Bleumink E, Young E. Studies on the atopic allergen in hen's egg. Further characterization of the skin reactive fraction in egg-white immunoelectrophoretic studies. *Int. Arch. Allergy* 40: 72-88 (1971)
19. 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)
20. Yang JS, Oh BY. The property of chicken egg white. *Food Sci. Ind.* 32: 42-55 (1999)
21. Lee SL, Shin HS. Animal food. Recent Food Chemistry. 2nd ed. Shin-kwang Publishing Co. Seoul, Korea. pp. 487-531 (1994)
22. Matsuda T, Watanabe K, Nakamura R. Immunochemical studies on thermal denaturation of ovomucoid. *Biochim. Biophys. Acta* 707: 121-128 (1982)
23. Cooke SK, Sampson HA. Allergenic properties of ovomucoid in man. *J. Immunol.* 159: 2026-2032 (1997)
24. Mine Y, Zhang JW. Identification and fine mapping of IgG and IgE epitopes in ovomucoid. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 292: 1070-1074 (2002)
25. Besler M, Steinhart H, Paschke A. Allergenicity of hen's egg-white proteins: IgE binding of native and deglycosylated ovomucoid. *Food Agric. Immunol.* 9: 277-288 (1997)