

난백처리물의 알레르기성 저감화 Reduction of the Allergenicity of Egg White

손 등 외

한국식품개발연구원

식품 알레르기는 영유아에게 흔한 질환으로서 심하면 사망에 이르게 된다. 특히, 국민의 대다수가 즐겨 섭취하는 대표적인 영양원인 계란이 알레르기의 원인물질(알레르겐, allergen)로 작용함으로써 그 심각성이 더욱 높아지고 있다. 따라서, 계란의 주요 알레르겐을 함유하고 있는 난백을 여러 방법으로 처리함으로써 계란 알레르기의 유발을 억제하는 방안을 모색하였다.

난백 알레르기의 저감화를 위하여 효소처리, 물리적 처리, 화학적 처리를 실시하였다. 효소처리에는 동물성, 식물성, 미생물성 효소 12종을 사용하였고, 물리적 처리에는 열, 방사선을 사용하였으며, 화학적 처리에는 NaOH, succinic anhydride(SA), trifluoromethanesulfonic acid(TFMS)를 사용하였다. 알레르기성의 평가는 ELISA, westernblotting, PCA, 동물모델실험 등을 행하였다.

계란알레르기 환자의 IgE를 이용한 ciELISA로 여러 방법으로 처리한 난백의 알레르기성 변화를 조사한 결과, 효소를 이용한 가수분해는 효과적이지 못하였으며, TFMS 처리는 난백의 알레르기성을 1/20 정도만 감소시켰다. 열처리는 121°C에서만 알레르기성이 1/100 정도로 감소되었다. NaOH를 3%(w/v)의 농도로 처리한 난백은 그 알레르기성은 대부분 사라진 것으로 나타났다. NaOH 처리 후 열처리(70°C, 15분)를 추가해 주면, 0.3%(w/v) NaOH 농도부터 알레르기성이 거의 제거되는 것으로 확인되었다.

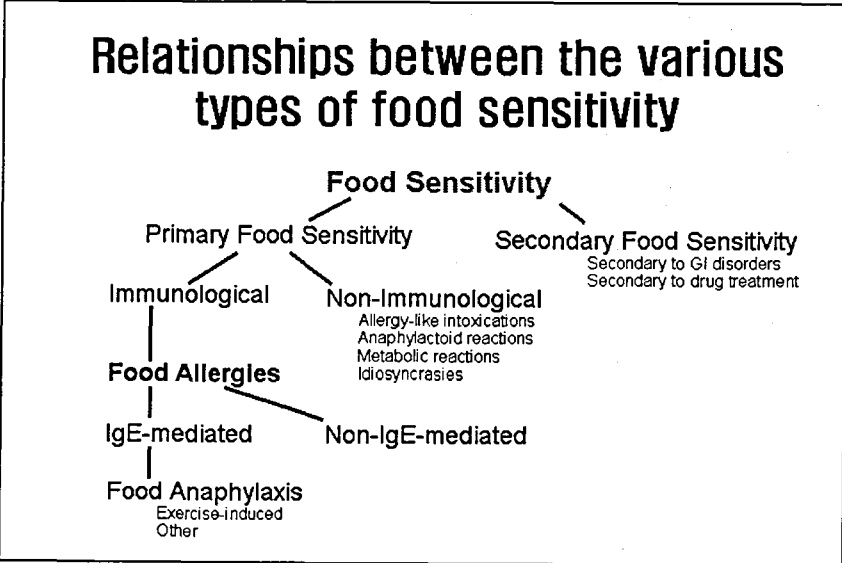
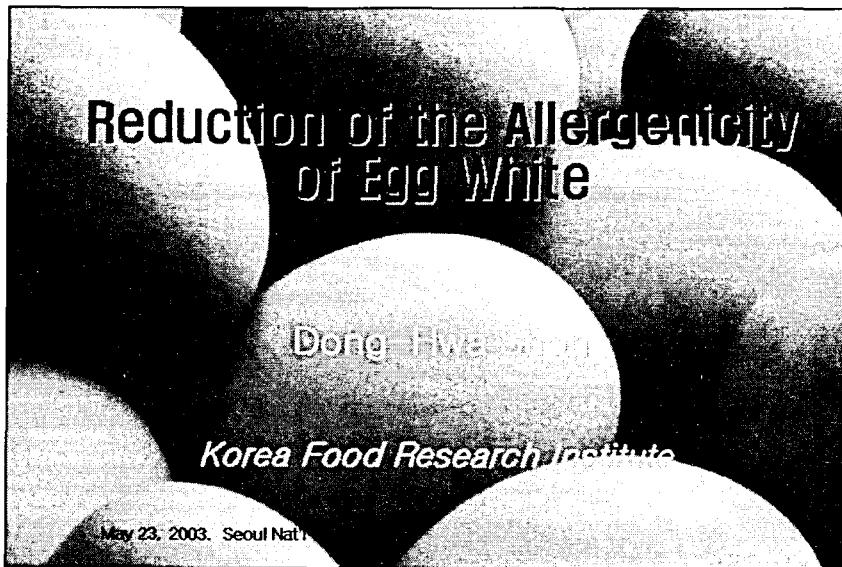
Western blot을 이용한 난백 처리물의 알레르기성 저감효과를 조사한 결과, 난백의 알레르기성은 121°C의 열처리에서만 조금 감소된 것으로 나타났으나, 나머지 처리에서는 그 효과를 확인하기 어려웠다. 또한, 사람의 IgE형 항체를 이용한 결과와 토끼의 IgG형 항체를 이용한 결과를 직접 비교하기 어려웠다.

PCA test를 이용한 난백 처리물의 polyvalent 알레르기성 변화를 조사한 결과, 효소처리는 난백의 알레르기성을 약간 감소시켰지만, SA 처리와 TFMS 처리는 난백의 알레르기성에 영향을 주지 못했다. 방사선 조사와 0.3%(w/v) NaOH 처리는 알레르기성을 1/4 정도로 감소시켰으며, 121°C 열처리와 1%(w/v) NaOH 처리는 난백의 알레르기성을 1/8 정도로 감소시켰다. 1%(w/v) NaOH 처리에 열처리(70°C, 15분)를 추가해 주면, 난백의 알레르기성이 1/16으로 감소되어, 이러한 복합처리가 난백의 알레르기성 감소에 가장 효과적인 것으로 나타났다.

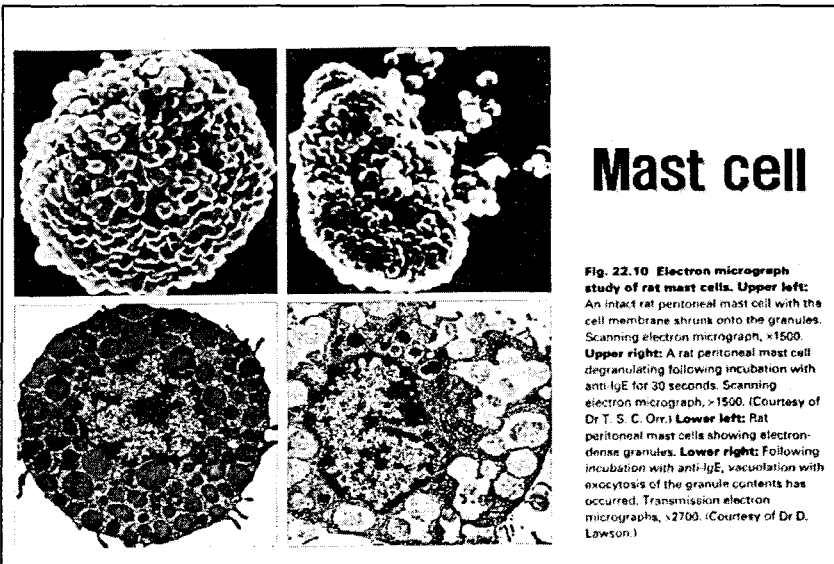
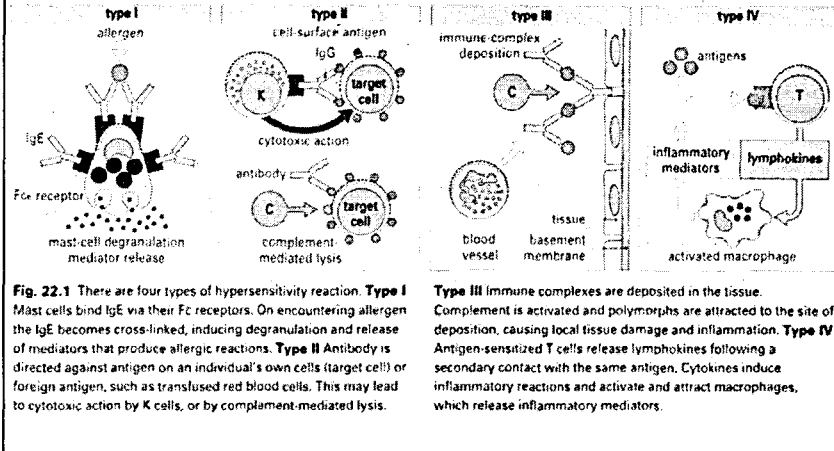
난백을 경구적으로 감작시킨 동물모델을 이용한 난백 처리물의 알레르기성 저감효과를 평가하고자 하였다. 난백으로 감작된 생쥐군이 그렇지 않은 생쥐군에 비해 혈중 난백특이 IgE항체 수준이 높게 나타났다. 또한, 난백으로 감작된 생쥐에게 다시 난백을 섭취시켰을 때 나타나는 알레르기 증상

을 scoring system으로 평가한 결과, 10mg으로 감작된 저용량군과 50mg으로 감작된 고용량군의 평균 점수는 각각 2점과 1.69점으로 나타나, 두 군간에 차이는 크지 않았다. 이와는 반대로 1%와 3%(w/v) NaOH로 처리한 후 열처리한 난백으로 challenge 하면 평균이 0.13~0.25점으로 나타나 이 처리가 난백의 알레르기성 감소에 효과적임이 확인되었다.

이상의 결과를 종합하면, 시험한 모든 방법 중 NaOH 및 열처리를 병행하여 처리하는 것이 난백의 알레르기성을 효과적으로 감소시키는 방안으로 나타났다.



Hypersensitivity reaction (Type I ~ IV)



Common Allergenic Foods

- Legumes, especially peanuts and soybeans
- Crustacea: Shrimp, crab, lobster, crayfish
- Milk, including cows' milk and goats' milk
- Eggs from all avian species
- Tree nuts: Almonds, walnuts, Brazil nuts, hazelnuts, etc.
- Fish: Cod, haddock, salmon, trout, etc.
- Molluscs: Clams, oysters, scallops, etc.
- Wheat

Treatments of Egg White

Enzymatic hydrolysis : 12 Proteases

Physical treatments : γ -Irradiation, Heat

Chemical treatments : NaOH, Succinic anhydride,

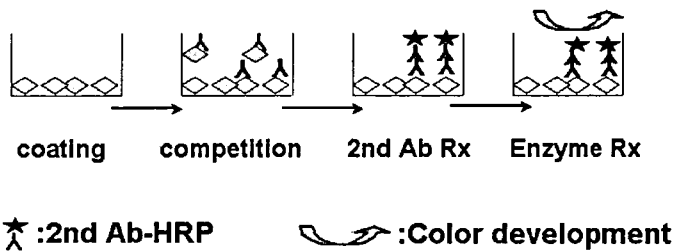
Trifluoromethanesulfonic acid

Combinatory treatments

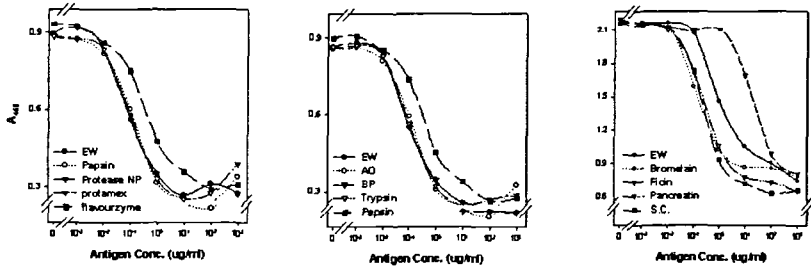
Evaluation of the Allergenicity

1. Competitive indirect ELISA
2. Western blot
3. Passive cutaneous anaphylaxis test (PCA)
4. Murine model of egg hypersensitivity

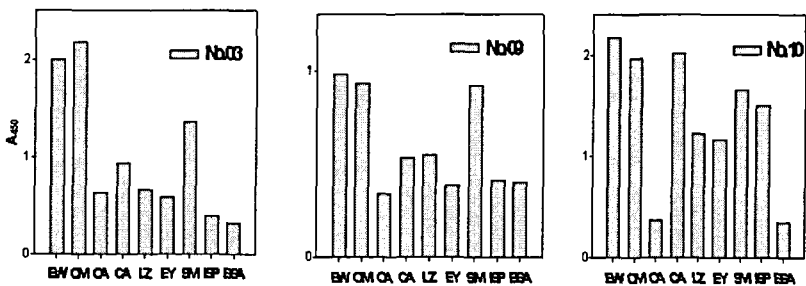
Competitive indirect ELISA



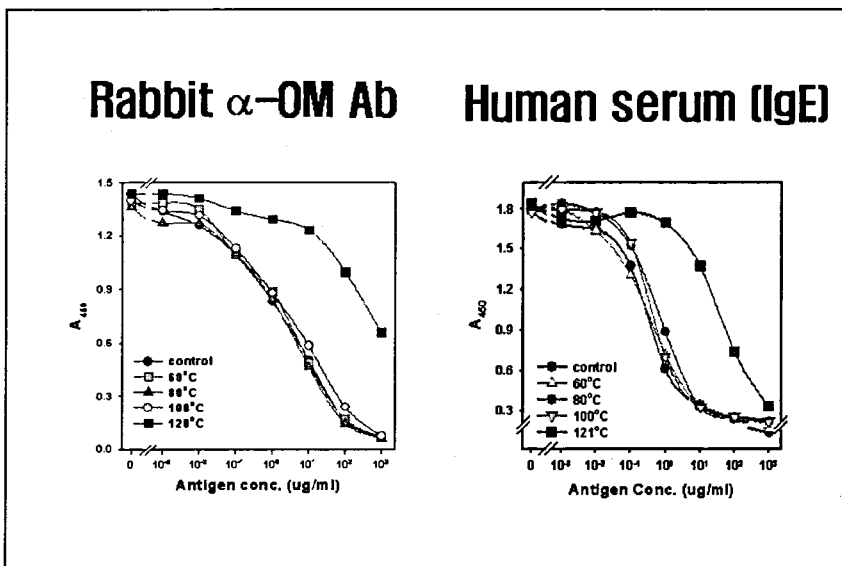
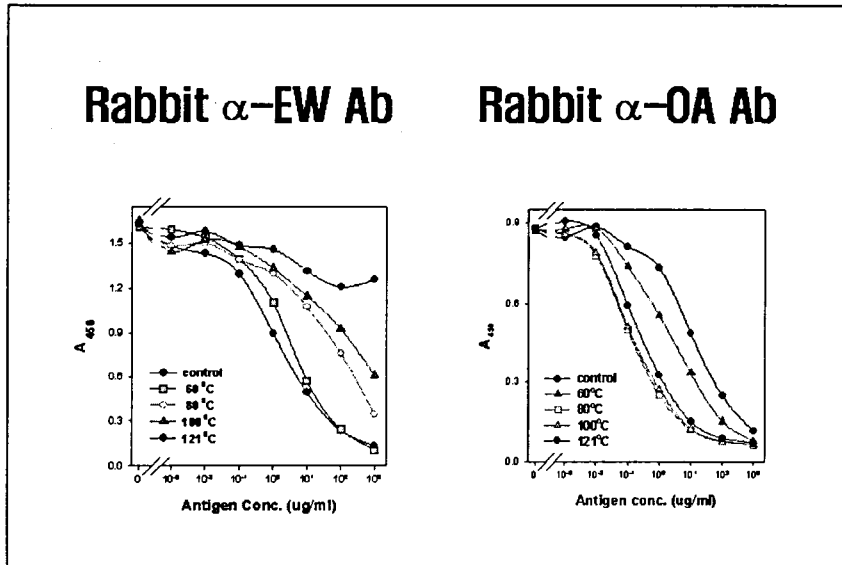
Human serum (IgE) → hydrolyzed EW



Human serum (IgE) → Egg allergen

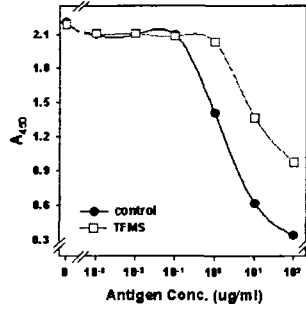
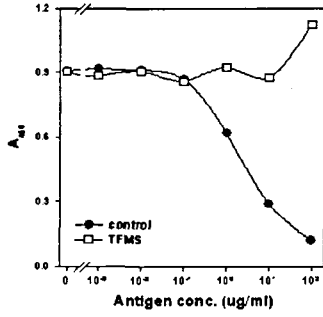


Egg white(EW), ovomucoid(OM), ovalbumin(OA), egg yolk(EY), conalbumin (CA), lysozyme(LZ), skim milk(SM), ISP, and BSA



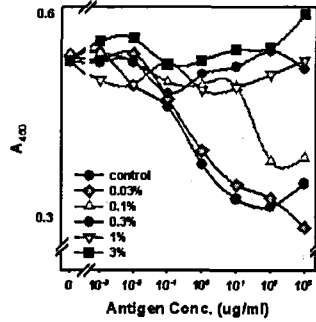
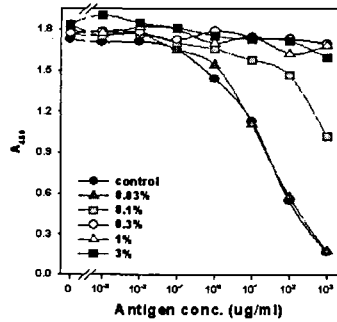
Rabbit α -OM Ab

Human Serum (IgE)

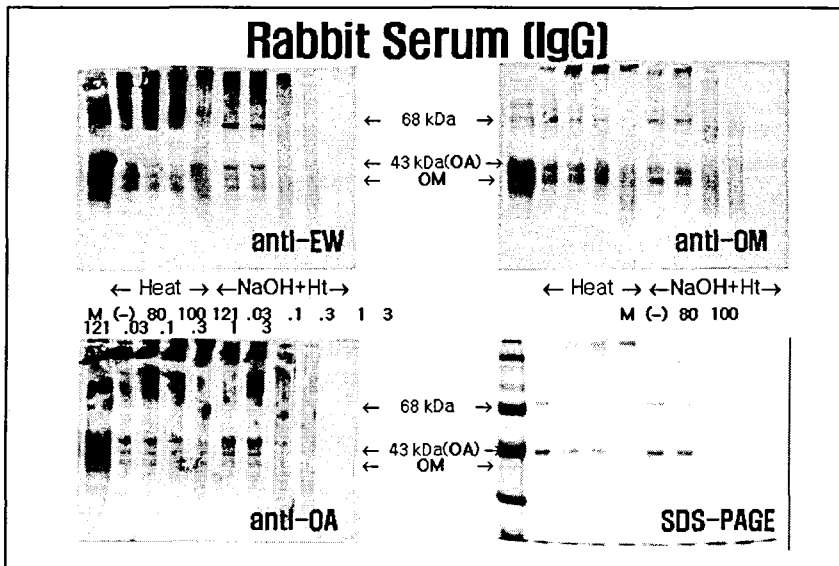
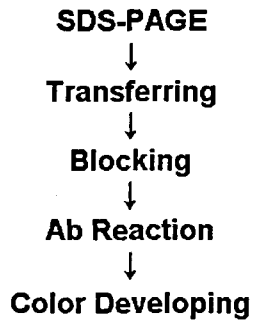


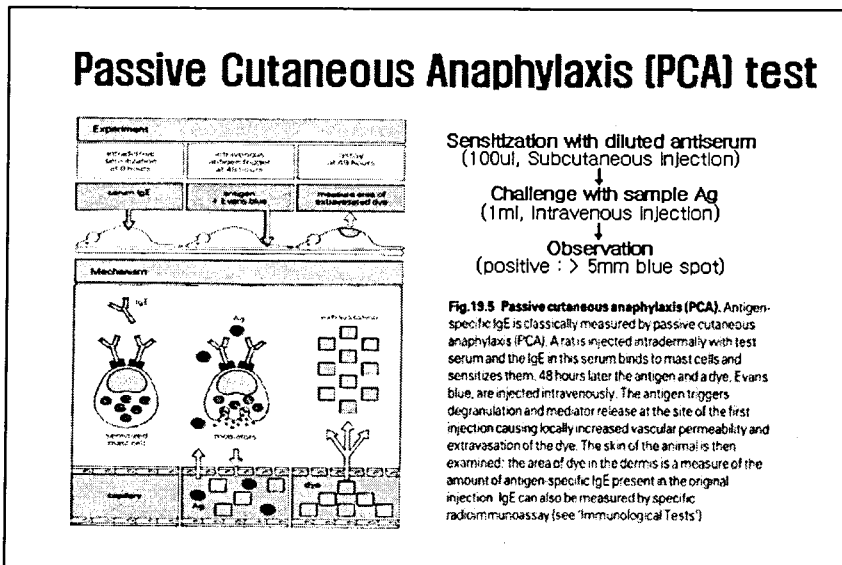
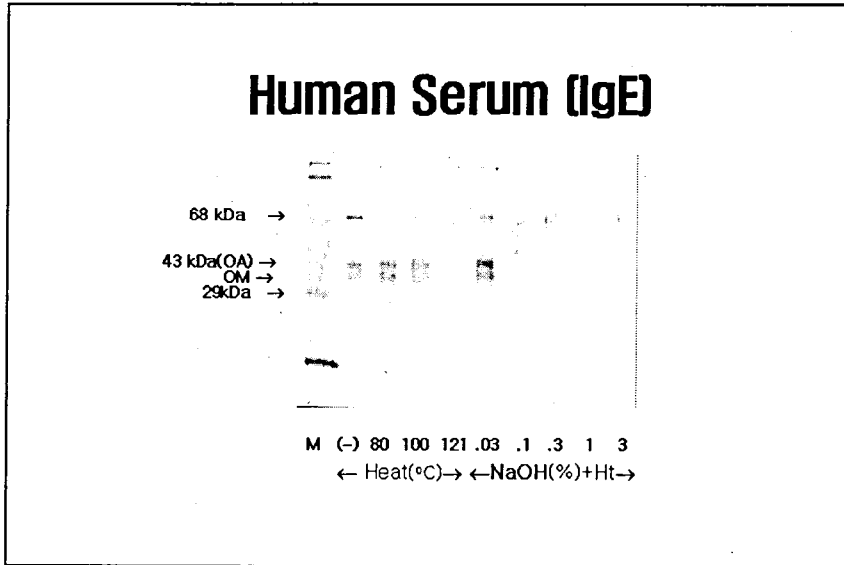
Rabbit α -OM Ab

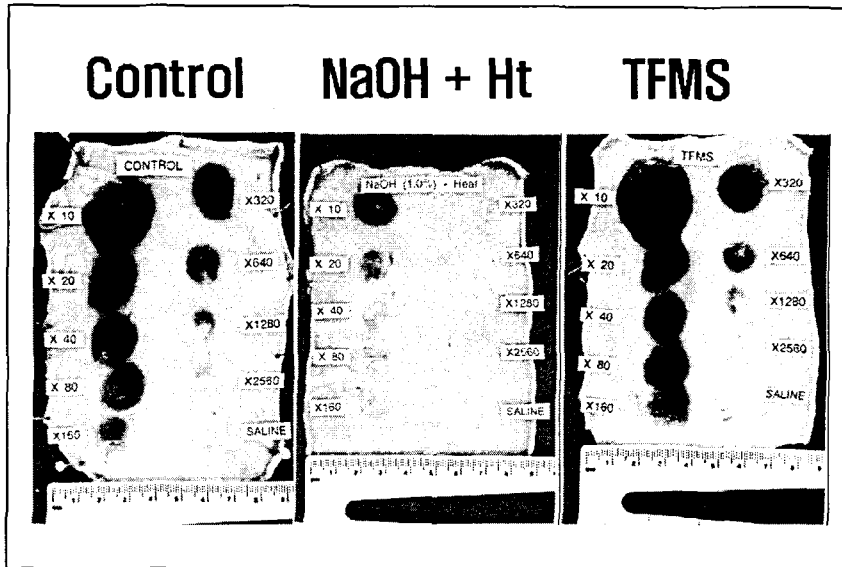
Human Serum (IgE)



Western Blot







Allergenicity of the treated EW on guinea pig PCA

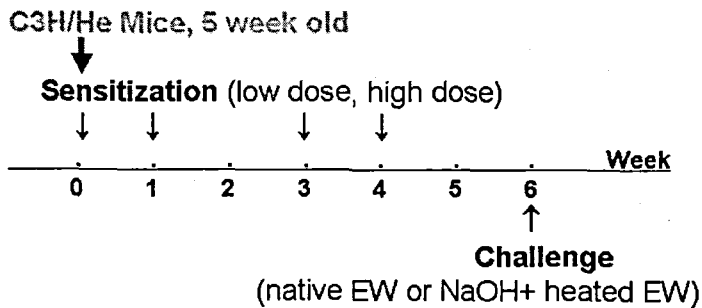
Challenged Ag	1/df	Challenged Ag	1/df
EW(control)	2560	Irradiation	640
Ficin	1280	Heat(121°C)	320
S.C	640	0.3%NaOH	640
Pancreatin	1280	1%NaOH	320
TFMS	2560	0.3%NaOH+H	320
SA	2560	1%NaOH+H	80

df : Limiting dilution factor of antiserum showing positive PCA result

Comparison of PCA test and ELISA

Treatment	Test	PCA test (Rabbit serum)	ELISA-1 (Rabbit IgG)	ELISA-2 (Human IgE)
EW(control)		1	1	1
Ficin		1/2	1	1/50
S.C		1/4	1	10
Pancreatin		1/2	10	10
Heat(121°C)		1/8	1/250	1/100
0.3%NaOH		1/4	1/50	1/50
1%NaOH		1/8	< 1/10,000	1/5,000
0.3%NaOH + H		1/8	< 1/10,000	1/10,000
1%NaOH + H		1/32	< 1/10,000	< 1/10,000
TFMS		1	< 1/10,000	1/20
SA		1	1	1
Irraditaion(10kGy)		1/4	1	1

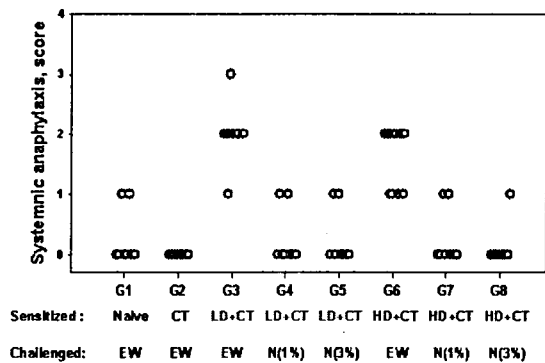
Murine model of egg hypersensitivity



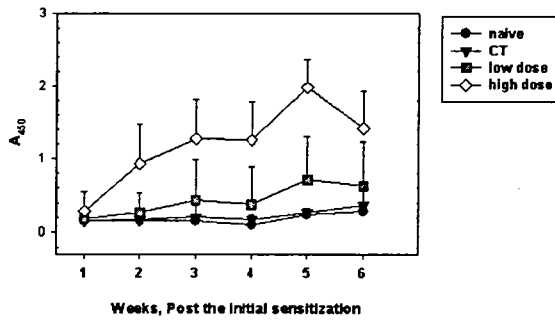
Symptoms of systemic anaphylaxis

Score	증상
0	아무런 증상 없음(자유롭게 뛰어다님)
1	코와 머리 주위를 scratching 또는 rubbing
2	눈과 입주위가 부푼 / activity↓ / 호흡수↓ / 설사
3	숨을 헐떡임 / 힘든호흡 / 입과 꼬리의 청색증
4	자극 후 no activity / 경련 / 떨림
5	죽음

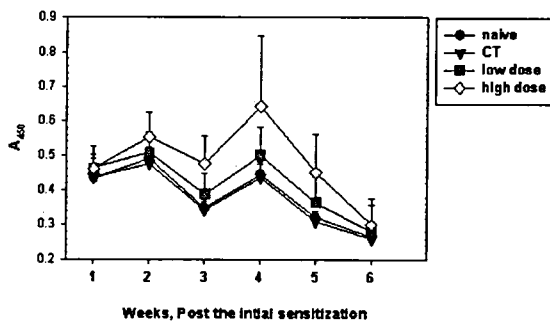
EW-induced systemic anaphylaxis



Levels of EW-specific IgG



Levels of EW-specific IgE



요 약

- 계란난백의 알레르기의 저감화 처리
 - 1) 효소에 의한 가수분해
 - 2) 열처리
 - 3) 방사선 조사
 - 4) NaOH 처리
 - 5) Succinic anhydride (SA) 처리
 - 6) Trifluoromethane sulfonic acid (TFMS) 처리
 - 7) 위 방법의 조합에 의한 복합처리
- EW, OA, OM 등에 대한 토끼항체 생산 → ELISA 분석
: 항원성 저감효과를 분석결과
: 2), 4), 6), 7)처리가 유효 / 1)효소처리는 효과 미약
- 계란 알레르기 환자 혈청을 확보 → ELISA 분석
: 알레르기성 저감효과를 분석결과
: 4), 7)처리가 가장 효과 큼

- 알레르기 환자혈청(IgE항체)으로 조사한 계란 알레겐을 조사하였을 때, 주요 알레르겐 성분은 ovomucoid (OM)로 나타났다.
- 토끼항체와 기니픽을 이용하여 PCA test로 처리난백의 알레르기 유발성을 평가하였을 때, 효과적인 난백의 처리는 Heat, NaOH, NaOH+heat 처리로 나타났다.
- 생쥐를 이용한 동물모델실험에서 난백의 NaOH+heat 처리가 알레르기성 저감화에 효과적임을 확인하였다.
- 상기의 여러 방법에 의한 항원성과 알레르기성 실험결과는 방법에 따라 일부 차이가 있으나, NaOH+heat 처리가 알레르기성 저감화에 가장 효과적이었다.

계란난백 → **NaOH+Ht** → 알레르기 저감화

•처리: ~~효소~~, 물리적, 화학적, 복합

•평가: ELISA, PCA, Western blot,
Animal model, (임상시험)