



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년11월01일
(11) 등록번호 10-1324649
(24) 등록일자 2013년10월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 1/10 (2006.01) A23L 1/29 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0059870

(22) 출원일자 2012년06월04일

심사청구일자 2012년06월04일

(56) 선행기술조사문헌

JP2003274879 A

JP2005218362 A

KR100778103 B1

JP2006340658 A

(73) 특허권자

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

오상석

서울특별시 용산구 이태원동 34-107

이수진

서울특별시 서대문구 대현동 53-16번지 401호

성동은

서울특별시 중구 회현동 1가 남산 롯데캐슬 아이리스 102동 2602호

(74) 대리인

유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 6 항

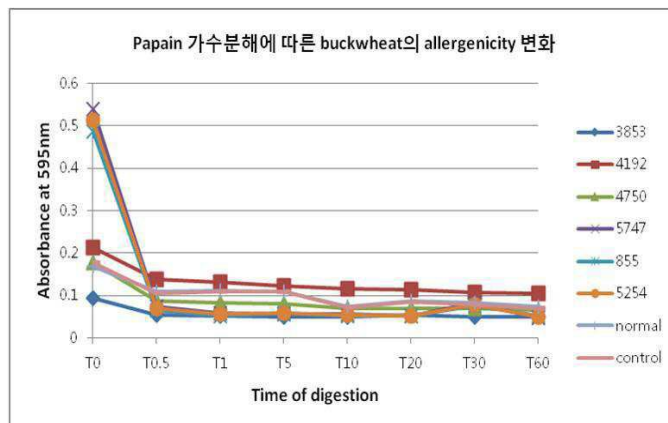
심사관 : 김태산

(54) 발명의 명칭 단백질 분해 효소를 이용한 알레르기 항원성이 저감화된 메밀의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 시스테인 단백질 분해 효소를 이용한 알레르기 저감화 메밀의 제조 방법 및 상기 방법으로 제조된 알레르기 항원성이 저감화된 메밀 식품 소재에 관한 것이다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-1664-1-2

부처명 교육과학기술부

연구사업명 국제기관 간 MOU 지원사업

연구과제명 (NRF공동연구)메밀 알레르겐의 특성 연구에 대한 ELISA와 reverse transcription PCR 방법
을 이용한 가공식품의 메밀 알레르겐 검출

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2011.09.16 ~ 2013.09.15

특허청구의 범위

청구항 1

메밀에 시스테인 단백질 분해 효소를 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는, 알레르기 항원성이 저감화된 메밀의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 시스테인 단백질 분해 효소는 파파인인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 반응은 pH 6 내지 7, 및 온도 37 내지 40 °C의 조건 하에 수행되는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 메밀은 통메밀, 메밀 추출물 또는 분획물, 메밀 가루, 메밀 건조물 또는 농축물 형태인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 알레르기 항원성이 저감화된 메밀.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 알레르기 항원성이 저감화된 메밀을 포함하는 식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 시스테인 단백질 분해 효소를 이용한 알레르기 저감화 메밀의 제조 방법 및 상기 방법으로 제조된 알레르기 항원성이 저감화된 메밀 식품 소재에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 메밀은 마디풀과(Polygonaceae family)에 속하는 일년생 초본으로 식물 분류학적으로는 쌀, 밀, 옥수수과 같은 곡물이 속하는 화본과(Gramineae family) 식물과 구분된다. 메밀의 품종은 다양하나 주로 보통메밀(*Fagopyrum esculentum*)과 달단메밀(*Fagopyrum tataricum*)이 메밀 식품의 주원료로 많이 사용된다.

[0003] 메밀은 식물학적 특성상 생육기간이 짧고 척박한 땅에서도 재배가 가능하며 다른 작물의 작황이 좋지 않을 때 대체 작물로서의 활용이 가능하여 전 세계적으로 폭넓게 재배되고 있다. 또한 고혈압, 심혈관 질환 등을 예방하는 효과가 있는 것으로 알려져 있고, 다양한 연구들을 통해 영양학적 가치가 과학적으로 입증되었으며, 독특한 맛과 향이 있어 과자류, 빵류, 당과류, 국수류 및 죽류 등 식품으로 많이 이용되고 있다.

[0004] 그러나 메밀은 알레르기 항원성이 높은 식품으로 알려져 있다. 일본에서 1990년대에 92680명의 어린이를 대상으로 메밀 알레르기를 연구한 결과 194명(약 0.22%)에게서 알레르기 증상이 관찰되었는데, 이 중 37.3%가 두드러기 증상을 보였고, 26.5%가 호흡곤란 증세를 보였으며, 3.9%는 아나필락시스 증세를 나타내었다. 또한, 1960년

대에 실행한 임상 보고에 따르면 메밀 알레르기에 대해 169 사례를 연구한 결과 86%가 어린이였으며, 식품 알레르기와 호흡기 알레르기 증상을 보였다. 가장 흔한 증상은 메밀 천식(82%)이었고, 18 사례(11%)가 아낙필락시스 증상을 보였다 (Jeong-Lim Kim et al., Proceedings of the 9th International Symposium on Buckwheat, Prague 2004). 국내에서는 502명의 소아알레르기 환자를 대상으로 메밀 알레르기 피부 시험을 시행한 결과 3.8%가 강양성 반응을 보여 메밀이 식품 항원 중 5위를 차지하였다 (손대열 등, 한국식품과학회지 제34권 제5호 제751-934면, 2002).

[0005] 메밀 알레르기는 식품 중에 들어 있는 아주 소량의 유발물질에 의해서도 일어날 수 있고 또한 현재 메밀 알레르기를 치료할 수 있는 마땅한 방법들이 알려져 있지 않으므로, 이를 예방하기 위해서는 메밀 관련 식품의 섭취를 엄격하게 피하는 것이 최선의 방안이다. 그러나 식품의 부정확한 표시나 가공식품의 제조과정 중 알레르기 유발물질의 비의도적 혼입에 의해 소비자들이 항상 알레르기 유발물질을 확인하고 섭취를 피하기는 현실적으로 쉽지 않다. 따라서 메밀에 포함된 알레르기 유발물질을 분해, 제거 또는 약화시킨 알레르기 저감화 메밀 식품 소재에 관한 연구도 활발히 이루어지고 있다.

[0006] 메밀 알레르겐에 대한 연구는 아시아 지역에서 많이 이루어지고 있으며 주로 일본에서 많은 연구가 진행 중에 있지만, 다른 식품 알레르겐에 비해서는 알려진 바가 많지 않다. 주요 메밀 알레르겐으로는 10, 16, 19, 24 kDa 이 알려져 있으며 펩신에 분해 저항력을 가진 16 kDa이 현재 주요 알레르겐이라고 언급하는 추세이다 (Tanaka et al., Int Arch Allergy Immunol. 129(1):49-56, 2002). 현재 ALLERGEN NOMENCLATURE에 등재되어 있는 메밀 알레르겐은 16 kDa (Fag e 2)와 19 kDa (Fag e 3)의 두 종류이다.

[0007] 지금까지의 보고된 메밀 알레르겐 저감화 연구로는 곰팡이 효소를 이용하는 방법 (Gong G. et al., Food industry 2004-05-006), 알레르겐 성분이 많은 배아를 제거하는 방법 (Licen M. et al., Proceedings of the international symposium on buckwheat, 2007), 아미노산 서열 변이 방법 (Satoh R. et al., Biol Pharm Bull. 31(6):1079-85, 2008), 사상균 스타터나 사상균을 직접 첨가하고 발효시키는 방법 (일본 특허공개 제 2005-218362호) 등이 알려져 있다. 그러나 균을 직접 접종하는 경우 알레르겐 뿐만 아니라 메밀 내 다른 활성 성분까지 분해 또는 변성되거나 발효물의 물성이 크게 변화할 수 있고, 배아를 제거하는 경우 메밀의 영양학적 효능이 크게 떨어질 수 있으며, 아미노산 변이의 경우 안정성의 검증이 필요한 문제가 있다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 보다 효과적이고 안전한 메밀 알레르기 저감화 기술을 제공하고자 노력한 결과, 메밀에 시스테인 단백질을 분해 효소인 파파인을 처리할 경우, 메밀 내 알레르겐 단백질은 아미노산과 같은 저분자까지 효율적으로 분해하면서도 메밀 고유의 건강 기능성 활성 성분이나 물성을 그대로 유지할 수 있어 건강 식품 소재로의 폭넓은 활용이 가능하다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 시스테인 단백질 분해 효소를 이용한 알레르기 저감화 메밀 식품 소재를 제공하는 것이다.

[0010] 구체적으로, 본 발명의 하나의 목적은 메밀에 시스테인 단백질 분해 효소를 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는, 알레르기 항원성이 저감화된 메밀의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 방법으로 제조된 알레르기 항원성이 저감화된 메밀을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 알레르기 항원성이 저감화된 메밀을 포함하는 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 메밀에 시스테인 단백질 분해 효소를 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는, 알레르기 항원성이 저감화된 메밀의 제조 방법에 관한 것이다.

[0014] 바람직한 양태로서, 상기 시스테인 단백질 분해 효소는 파파인일 수 있다.

[0015] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 알레르기 항원성이 저감화된 메밀에 관한 것이다.

[0016] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 알레르기 항원성이 저감화된 메밀을 포함하는 식품 조성물에 관한 것이다.

[0017] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

- [0018] 식품 알레르기란 식이 형태로 체내에 들어온 특정의 단백질(알레르겐)에 대하여 면역계가 과잉으로 반응하여 여러 가지 증상을 일으키는 것을 말한다. 식품 알레르기는 1차 접촉 기관인 소화기와 2차 접촉 기관인 피부, 코, 및 혈관 등 모든 기관에서 급성 또는 만성으로 나타날 수 있으며, 주요 증상으로는 두드러기, 맥관부종, 아토피 피부염의 악화, 설사, 복통 등의 소화기 질환, 천식, 비염 같은 호흡기 질환과 결막염 등이 있으며 이 중 두드러기 같은 피부 질환이 흔하게 나타난다. 이러한 식품 알레르기에 의한 증상이 심각할 경우 사망에까지 이를 수 있다. 국내에서는 계란, 우유, 대두, 메밀과 밀이 5대 알레르기 유발 식품으로 확인되었다.
- [0019] 알레르겐이 알레르기를 나타내기 위해서는 면역학적으로 활성화된 형태로 위장관에 도달해야 하므로, 이러한 단백질들은 비교적 열처리나 산처리, 단백질 가수분해 등에 저항력을 가지고 있다. 식품 알레르겐의 효소적 가수분해에 대한 연구로, Astwood 등의 보고(Nat. Biotechnol. 14:1269-1273, 1996)에 따르면, 대두 단백질인 베타-콘글리시닌과 쿠니츠-트립신 저해제(Kunitz-trypsin inhibitor), 우유의 주요 알레르겐인 베타-락토글로불린, 땅콩의 Ara h 2, 계란의 오보알부민 및 포스비틴은 단백질 가수분해에 대한 강한 저항성을 나타내었다. 이와 같이 식품 알레르겐이 물리화학적으로 안정할 수 있는 이유는 수많은 이황화 결합, 올리고머화, 응집 또는 당화 등을 통한 구조적 특징과 IgE 결합 에피토프의 변화 등을 생각해볼 수 있다.
- [0020] 본 발명자들은 메밀 알레르기 항원성 저감화 기술과 관련하여 메밀 알레르겐의 단백질 가수분해 저항성에 관한 특징에 대하여 연구하던 중, 메밀이 파파인과 같은 시스테인 단백질 분해 효소에 특이적으로 가수분해되나, 펩신이나 카이모트립신과 같은 다른 종류의 단백질 분해 효소에는 저항성을 나타냄을 확인하게 되었다.
- [0021] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 메밀 조추출물에 파파인을 처리한 결과 주요 알레르겐인 37-53kDa 및 24kDa 단백질이 바로 분해되는 것을 확인하였으며 (도 1), 이와 같이 파파인에 의해 분해된 메밀 조추출물 용액을 메밀 알레르기 환자의 혈청과 ELISA 반응시킨 결과, 환자 6명의 혈청 모두 반응성을 나타내지 않았음을 확인하였다 (도 2). 이는, 파파인이 메밀의 주요 알레르겐을 모두 가수분해시켜, 메밀의 알레르기 항원성을 제거했음을 나타내는 결과이다.
- [0022] 그러나, 또 다른 단백질 분해 효소인 카이모트립신과 펩신의 경우, 메밀 조추출물과 반응시 60분이 경과하여도 알레르겐이 확인되었으며 (도 3 및 도 4), 해당 효소들을 처리한 메밀 조추출물을 메밀 알레르기 환자의 혈청과 ELISA 반응시킨 결과에서도 60분이 경과하여도 여전히 알레르기 반응성을 나타내었다 (도 5 및 도 6).
- [0023] 따라서, 메밀이 파파인과 같은 시스테인 단백질 분해 효소에 특이적으로 가수분해되므로, 이를 이용하여 알레르기 항원성이 저감화된 메밀 식품 소재를 개발하는 것이 가능하다.
- [0024] 본원에서 용어, "시스테인 단백질 분해 효소(cystein protease)"란 활성 중심에 시스테인을 가지고 있어, 시스테인 잔기의 티올기(-SH)가 친핵체로 작용하여 기질의 가수분해를 일으키는데 필수적인 역할을 하는 단백질 분해 효소를 말한다. 본 발명에서 시스테인 단백질 분해 효소는 파파인, 피신, 브로멜라인, 카텝신류 등을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 파파인이다.
- [0025] 대표적인 시스테인 단백질 분해 효소인 파파인은, 남아메리카 지역에 자생하는 파파야 나무의 열매 과즙에 있는 단백질 분해 효소로, 아르기닌, 글루타민, 글리신, 라이신 등의 카르복시 말단의 펩타이드 결합을 분해하는 펩타이드내부분해효소(endopeptidase)에 해당한다.
- [0026] 일반적으로 단백질 분해 효소는 효소 작용에 필수적인 활성부위의 특성에 따라 시스테인 단백질 분해 효소, 세린 단백질 분해 효소, 금속 단백질 분해 효소, 및 아스파티딜 단백질 분해 효소로 구분된다. 본 발명에서 파파인과는 대조적으로 메밀이 카이모트립신과 펩신에 의해서는 가수분해 저항성을 나타내었는데, 카이모트립신은 세린 단백질 분해 효소의 대표적인 예로, 활성 중심에 세린 잔기를 가지며 트립토판, 티로신, 페닐알라닌, 메티오닌 등의 카르복시 말단의 펩타이드 결합을 분해한다. 또한, 펩신은 아스파티딜 단백질 분해 효소의 대표적인 예로, 활성 중심에 아스파르트산 잔기를 가지며 산성 아미노산의 카르복시기와 방향족 아미노산의 아미노기 사이의 펩타이드 결합을 분해한다.
- [0027] 본 발명에서 확인된 바와 같이, 메밀은 파파인과 같은 시스테인 단백질 분해 효소에 특이적으로 가수분해된다.
- [0028] 본원에서 용어, "알레르기 항원성의 저감화"란 알레르겐 단백질의 알레르기 유발 활성을 약화 내지는 소실시켜 알레르기 반응을 약화시키거나 일으키지 않는 것을 말한다.
- [0029] 본 발명의 알레르기 저감화 기술은, 식품 소재로 사용되는 일반적인 메밀류에 폭넓게 적용될 수 있으며, 예를 들어, 식물 분류학적으로는 주 재배종인 보통메밀(*Fagopyrum esculentum*)과 달단메밀(*Fagopyrum tataricum*)를 비롯하여 *Fagopyrum rotundatum*, *Fagopyrum emarginatum*, *Fagopyrum cymosum*, *Fagopyrum triangulae* 등에 적

용될 수 있고, 품종 면에서는 보통종, 달단종, 유시종, 구체적으로는 양절메밀, 대산메밀, 약선메밀, 다원메밀, 평창재래종 등 각종 기능성 품종들에 적용될 수 있다.

[0030] 또한 본 발명에서 메밀은, 통메밀, 메밀 추출물 또는 분획물, 메밀 가루, 메밀 건조물, 농축물 등 다양한 형태에 적용될 수 있다. 바람직하게, 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 메밀 추출물일 수 있으며, 바람직하게는 용매 추출, 열수 추출, 가압 추출, 환류 추출, 온침 추출, 또는 초음파 추출 등에 의해 제조된 추출물일 수 있고, 이후 감압 여과과정을 수행하거나 추가로 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 농축하거나 용매가 제거된 형태일 수 있다. 또한, 통상적 방법으로 건조된 건조물과 추출 용매가 제거된 농축된 액상의 추출물 또는 고형상의 추출물의 형태일 수 있다.

[0031] 본 발명은 메밀에 시스테인 단백질 분해 효소를 첨가하여 반응시킴으로써 메밀의 알레르기 항원성을 저감화하는 방법을 제공한다.

[0032] 상기 효소 반응에서, 시스테인 분해 효소의 첨가량은 메밀에 포함되는 단백질량의 0.1~0.5% 가 바람직하나 이에 제한되지 않고 당업자가 적절히 선택할 수 있으며, 효소는 메밀의 가공 과정 중 어느 단계에나 첨가할 수 있다. 반응 시간은 1분~60분 정도를 예시할 수 있으나 메밀의 양과 품종에 따라 적절히 변경할 수 있다.

[0033] 또한, 상기 반응은 해당 시스테인 분해 효소의 최적 pH 및 온도 조건에서 행해지는 것이 바람직하며, 예를 들어 파파인의 경우 pH 4.0~8.0, 바람직하게는 pH 6~7의 조건 및 25~45 도, 바람직하게는 37~40 도의 온도 조건에서 반응시킬 수 있다.

[0034] 이와 같이 제조된 본 발명의 메밀은, 주요 알레르겐들이 저분자화되어 알레르기 유발 활성이 약화 내지는 소실된 특징이 있으며, 식품으로 섭취시 알레르기 반응성을 현격하게 감소 내지는 제거시킬 수 있다.

[0035] 본 발명에서 제공하는 식품은, 메밀을 소재로 한 모든 종류의 식품을 의미한다. 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 각종 식품, 건강기능 식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제를 모두 포함하는 의미로 사용된다. 상기 식품의 예로서 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 목류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 발효 음료류, 아이스크림류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등), 비타민 복합제, 알코올 음료, 주류 및 그 밖의 건강보조식품류를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 건강기능식품, 음료, 식품첨가제 또는 음료첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0036] 상기 식품 조성물은 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0037] 본 발명에서 제공하는 메밀 알레르기 항원성 저감화 기술에 의하여 메밀 내 알레르겐 단백질을 아미노산과 같은 저분자까지 효율적으로 분해하면서도 메밀 고유의 건강 기능성 활성 성분이나 물성을 그대로 유지할 수 있고, 이와 같이 개발된 메밀을 건강 식품 소재로서 폭넓게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 파파인으로 메밀 조추출물을 가수분해한 뒤 반응시간(분)에 따라 메밀 단백질의 분해 여부를 SDS-PAGE 로 확인한 결과를 나타낸다. T0~T60 은 파파인 용액을 메밀 조추출물에 반응시킨 경우를, P0 및 P60은 파파인이 들어가지 않은 반응액을 메밀 조추출물에 반응시킨 경우를, N0 및 N60은 파파인 용액을 메밀 조추출물이 들어있지 않은 수용액에 반응시킨 경우를 나타내며, 각 숫자는 반응시간(분)을 나타낸다.

도 2는 파파인을 처리한 메밀 조추출물 용액을 6명의 환자의 혈청과 각각 반응시켜 알레르기 항원성 변화를 확인한 ELISA 결과를 나타낸다.

도 3은 펩신으로 메밀 조추출물을 가수분해한 뒤 반응시간(분)에 따라 메밀 단백질의 분해 여부를 SDS-PAGE 로 확인한 결과를 나타낸다. T0~T60 은 펩신 용액을 메밀 조추출물에 반응시킨 경우를, P0 및 P60은 펩신이 들어가지 않은 반응액을 메밀 조추출물에 반응시킨 경우를, N0 및 N60은 펩신 용액을 메밀 조추출물이 들어있지 않은 수용액에 반응시킨 경우를 나타내며, 각 숫자는 반응시간(분)을 나타낸다.

도 4는 카이모트립신으로 메밀 조추출물을 가수분해한 뒤 반응시간(분)에 따라 메밀 단백질의 분해 여부를 SDS-PAGE 로 확인한 결과를 나타낸다. T0~T60 은 카이모트립신 용액을 메밀 조추출물에 반응시킨 경우를, P0 및 P60 은 카이모트립신이 들어가지 않은 반응액을 메밀 조추출물에 반응시킨 경우를, N0 및 N60은 카이모트립신 용액을 메밀 조추출물이 들어있지 않은 수용액에 반응시킨 경우를 나타내며, 각 숫자는 반응시간(분)을 나타낸다.

도 5는 펩신을 처리한 메밀 조추출물 용액을 6명의 환자의 혈청과 각각 반응시켜 알레르기 항원성 변화를 확인한 ELISA 결과를 나타낸다.

도 6은 카이모트립신을 처리한 메밀 조추출물 용액을 6명의 환자의 혈청과 각각 반응시켜 알레르기 항원성 변화를 확인한 ELISA 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 실험 재료의 준비

1-1. 메밀 조추출물의 제조

본 실험에서 사용한 메밀시료는 봉평농업협동조합 강원도 평창군 봉평면에서 생산되는 봉평 메밀가루 100%(국산)를 사용하였다. 메밀가루 5g을 0.033M NaHCO_3 를 함유하는 0.086M NaCl solution 50ml에 4℃에서 밤새 교반하여 추출한 다음 3,000 dalton이하의 분자량을 제거하기 위해 원심분리 필터(Amicon Ultra)를 사용하여 12000g에서 30분 원심분리하였다. 단백질의 농도는 Bio-Rad protein assay Kit를 사용하여 Bradford method로 결정하였다.

1-2. 시약 및 기기

단백질 분해 효소로는 펩신(SIGMA)과 카이모트립신(SIGMA) 및 파파인(WAKO)을 사용하였다. 모든 SDS-PAGE는 Electrophoresis 기기(BIO-RAD)를 사용하였다. HCl, NaCl을 비롯한 대부분의 시약은 Ducksan pure Chemical Co., SHOWA Chemical Co.의 제품을 사용하였다.

실시예 2. 메밀 조추출물의 파파인 소화 테스트

메밀 조추출물을 Kato 등 (J Nutr Sci Vitaminol 32:55-65, 1986)의 방법을 약간 변형하여 소화성 테스트를 진행하였다.

2-1. 샘플의 준비

먼저 1mM EDTA와 50mM 인산나트륨을 사용하여 pH 7.0의 소화 버퍼(digestion buffer)와 10mg/ml의 파파인 용액을 만들었다. 메밀 조추출물은 3mg/ml의 농도로 증류수를 이용하여 희석하여 준비하였다. 파파인 용액과 메밀 조추출물 용액을 6:1의 비율로 만든 반응액을 37℃ Water bath에서 0/0.5/1/5/10/20/30/60분 마다 일정량의 샘플을 취하여 0.7M 탄산나트륨과 같은 양의 5X 샘플 버퍼를 넣고, 95℃에서 5분간 열처리 한 뒤, 사용할 때까지 -20℃에서 보관하였다. 샘플은 반응시간(분)에 따라 0(T0), 0.5(T0.5), 1(T1), 2(T2), 5(T5), 10(T10), 20(T20), 30(T30), 60(T60)로 설정하였다.

대조군으로 파파인 용액 대신 파파인이 들어가지 않은 반응액을 메밀 조추출물 용액과 혼합하여 상기와 같은 방법으로 샘플을 제조하였으며, 샘플은 반응시간(분)에 따라 0(P0) 및 60(P60)으로 설정하였다.

다른 대조군으로 파파인 용액을 메밀 조추출물 용액 대신 메밀 조추출물이 들어있지 않은 수용액(3차 증류수)과 혼합하여 상기와 같은 방법으로 샘플을 제조하였으며, 샘플은 반응시간(분)에 따라 0(N0) 및 60(N60)으로 설정하였다.

[0051] 2-2. SDS-PAGE

[0052] SDS-PAGE는 Laemmli(1970)의 방법을 사용하였으며, 20% running gel과 7% stacking gel을 Cassettes(Invitrogen, USA)에 제조하여 이용하였다. 샘플은 sample buffer(50mM Tris-HCl : pH 6.8, 글리세롤, 10% SDS, 2-머캅토에탄올, 1% 브로모페놀블루)에 4:1로 희석하여 95℃에서 5분간 열처리 한 후 로딩하였다. 전기영동은 마커와 함께 샘플을 로딩한 다음 200V에서 1시간 30분 동안 시행하였으며, 전기영동 후의 Gel은 쿠마시 브릴리언트 블루로 2시간 염색한 후 적절한 시간 탈색하였다. 마커는 pre-stained protein marker(ELPIS-Biotech. Inc., Korea)를 사용하였다.

[0053] 2-3. 실험결과

[0054] 메밀 단백질의 전기 영동적 특성을 살펴보면 크게 30-50kDa의 분자량을 가진 단백질 밴드와 주요 알레르겐이라고 알려져 있는 24, 19, 16, 10kDa의 밴드가 확인되었다 (도 1의 P0, P60 lane).

[0055] 파파인으로 메밀 조추출물을 가수분해 한 결과 가수분해 30초 후 메밀 단백질의 37-53kDa이 바로 분해되었으며 메밀의 주요 알레르겐인 24kDa도 즉시 분해된 것을 확인하였다. 하지만, 파파인의 단백질 밴드와 겹치는 부분이 있었으므로 메밀 단백질이 완전히 분해되었는지 확인할 수 없어 전기 영동 실험 후, 메밀 환자의 혈청을 이용하여 ELISA 방법으로 확인하기로 하였다 (도 1).

[0056] 실시예 3. 환자 혈청에서 파파인에 의한 메밀 알레르기 항원성의 변화

[0057] 3-1. 환자 혈청

[0058] 본 실험에 사용된 환자 혈청은 식품 알레르기 증상으로 서울삼성병원에 내원한 환자 중 항원 쿵에 대한 CAP 검사에서 양성 반응을 나타내는 6명의 환자 혈청이다. 평균나이는 7세이며, CAP IgE FEIA법(Pharmacia, Sweden)을 이용하여 측정된 특이 IgE 농도는 13kUA/L의 값을 나타냈다 (표 1).

표 1

[0059]

환자 번호	나이(y)	CAP IgE FEIA buckwheat (kUA/L)
3853	12	58.2
4192	1	33
4750	7	16.4
5747	16	41
855	3	13
5254	4	47.2

[0060] 3-2. ELISA

[0061] PBS(phosphate-buffered saline, pH 7.4)를 이용하여 50μg/ml농도로 희석한 항원을 96-웰 마이크로플레이트(BD Biosciences, USA)에 웰당 100μl씩 넣고 4℃에서 16시간 코팅한 후 이를 0.05% PBS-Tween(Sigma Chemical company, USA)으로 3회 세척하였다. 비특이적 결합을 방지하기 위해 2% BSA-PBS(Sigma Chemical Company, USA)를 각 웰 당 200μl 넣어 1시간 blocking하였다. 3회 세척 후 2% BSA-PBS를 이용하여 1/80으로 희석한 환자혈청을 100μl씩 넣고 2시간 반응시켰다. 다시 3회 세척 후 Goat anti-human IgE-HRP(1μg/ml)를 2% BSA-PBS와 1:2500의 비율로 섞어 100μl씩 well에 분주하고 1시간 반응시켰다. 3회 세척 후 웰 당 100μl씩 발색제 TMB peroxidase (3,3',5,5'-tetraethylbenzidine, Sigma Chemical Company, USA)를 넣고 빛을 차단하여 상온에서 30분간 발색 후 ELISA reader를 이용하여 흡광도(595nm)를 측정하였다.

[0062] 3-3. 실험결과

[0063] 실시예 2-1 에서 준비한 파파인 처리한 메밀 조추출물 용액과, 6명의 메밀 알레르기 환자의 혈청을 ELISA 반응시킨 결과, 파파인 처리한 메밀 조추출물은 가수분해 30초 후부터 모든 환자의 혈청과 반응성을 나타내지 않았

으며, 이 결과는 파파인이 메틸의 주요 알레르겐을 모두 가수분해시켰음을 나타내는 것이다 (도 2).

[0064] 실시예 4. 다른 단백질 분해 효소(펩신, 카이모트립신)에 의한 메틸 알레르겐 분해 여부 확인

[0065] 파파인에 의한 메틸의 알레르겐 분해 효과가 다른 단백질 분해 효소에 의해서도 달성될 수 있는 것인지 아니면 파파인에 특이적인 것인지 여부를 확인하기 위하여, 파파인 대신 펩신과 카이모트립신을 사용하여 상기와 동일한 실험을 진행하였다.

[0066] 4-1. 펩신 샘플의 준비

[0067] 먼저 12M HCl 33.6 μ l 및 NaCl 80mg을 넣고 40ml(Total Vol. 40ml 기준)로 맞춘 뒤 pH 1.2 로 맞춘 용액을 제조하고, 이 용액 5ml를 기준으로 펩신 4.1125mg을 넣어 2632unit/ml의 stock solution을 만들었다. stock solution은 1ml 기준으로 앞서 pH를 맞춘 용액 616 μ l를 넣어 최종적으로 1628unit/ml의 가수분해 용액(인공 위액)을 만들었다(1.157mg/1ml). 메틸 조추출물은 3mg/ml의 농도로 증류수를 이용하여 희석하여 준비하였다. 인공 위액과 메틸 조추출물 용액을 6:1의 비율로 만든 반응액을 37℃ Water bath에서 0/0.5/1/5/10/20/30/60분 마다 일정량의 샘플을 취하여 0.7M 탄산나트륨과 같은 양의 5X 샘플 버퍼를 넣고, 95℃에서 5분간 열처리 한 뒤, 사용할 때까지 -20℃에서 보관하였다. 샘플은 펩신을 첨가한 후 반응시간(분)에 따라 0(T0), 0.5(T0.5), 1(T1), 2(T2), 5(T5), 10(T10), 20(T20), 30(T30), 60(T60)로 설정하였다.

[0068] 대조군으로 펩신이 들어가지 않은 반응액을 메틸 조추출물 용액과 혼합하여 상기와 같은 방법으로 샘플을 제조하였으며, 샘플은 반응시간(분)에 따라 0(P0) 및 60(P60)으로 설정하였다.

[0069] 다른 대조군으로 펩신 용액을 메틸 조추출물이 들어있지 않은 수용액(3차 증류수)과 혼합하여 상기와 같은 방법으로 샘플을 제조하였으며, 샘플은 반응시간(분)에 따라 0(N0) 및 60(N60)으로 설정하였다.

[0070] 4-2. 카이모트립신 샘플의 준비

[0071] NaCl 2mg/ml을 이용하여 pH 8.0의 소화 버퍼(digestion buffer)와 2.5mg/5ml의 카이모트립신 용액을 만들었다. 메틸 조추출물은 3mg/ml의 농도로 증류수를 이용하여 희석하여 준비하였다. 카이모트립신 용액과 메틸 조추출물 용액을 6:1의 비율로 만든 반응액을 37℃ Water bath에서 0/0.5/1/5/10/20/30/60분 마다 일정량의 샘플을 취하여 0.7M 탄산나트륨과 같은 양의 5X 샘플 버퍼를 넣고, 95℃에서 5분간 열처리 한 뒤, 사용할 때까지 -20℃에서 보관하였다. 샘플은 반응시간(분)에 따라 0(T0), 0.5(T0.5), 1(T1), 2(T2), 5(T5), 10(T10), 20(T20), 30(T30), 60(T60)로 설정하였다.

[0072] 대조군으로 카이모트립신이 들어가지 않은 반응액을 메틸 조추출물 용액과 혼합하여 상기와 같은 방법으로 샘플을 제조하였으며, 샘플은 반응시간(분)에 따라 0(P0) 및 60(P60)으로 설정하였다.

[0073] 다른 대조군으로 카이모트립신 용액을 메틸 조추출물이 들어있지 않은 수용액(3차 증류수)과 혼합하여 상기와 같은 방법으로 샘플을 제조하였으며, 샘플은 반응시간(분)에 따라 0(N0) 및 60(N60)으로 설정하였다.

[0074] 4-3. 메틸 조추출물의 소화성 테스트

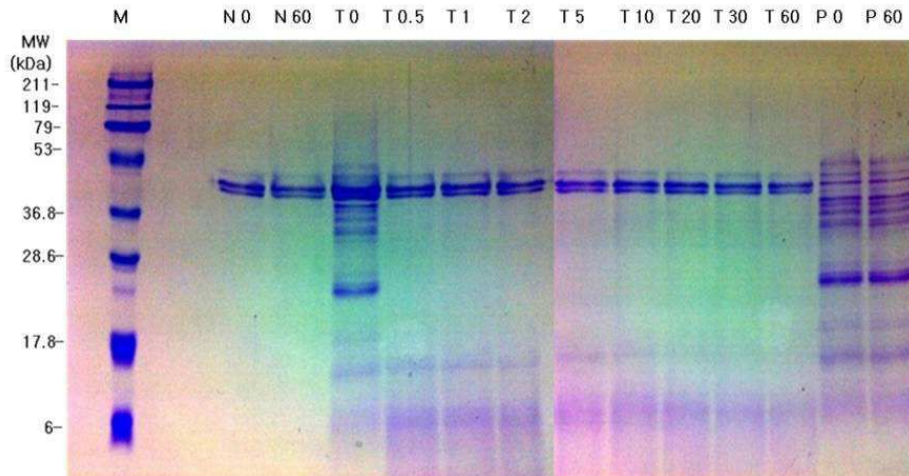
[0075] 실시예 2와 동일한 방법으로 메틸 조추출물의 소화성 테스트를 수행하였다.

[0076] 펩신으로 메틸 조추출물을 가수분해 한 결과 메틸 단백질의 16kDa은 가수분해 10분까지 미세한 단백질 밴드가 남아있었으며 나머지 단백질 밴드는 분해 30초 후 모두 사라졌다. 펩신 가수분해 20분부터 16kDa은 서서히 분해되었으나 가수분해 60분이 되어도 미세한 밴드가 나타났다 (도 3).

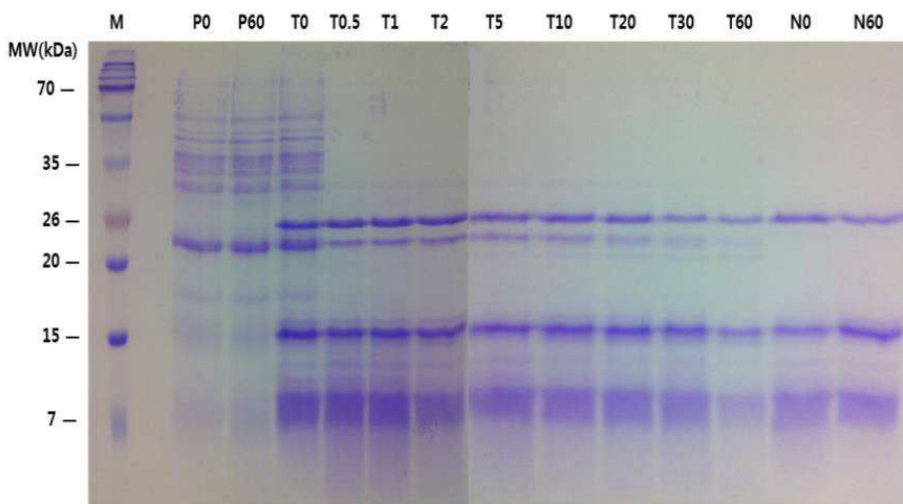
[0077] 카이모트립신으로 메틸 조추출물을 가수분해 한 결과 펩신보다 약한 가수분해력을 보였으며 가수분해 60분이 지나도 여전히 24kDa 부분의 미세한 메틸 단백질의 밴드를 확인할 수 있었다 (도 4).

[0078] 4-4. 환자 혈청에서 메틸 알레르기 항원성의 변화

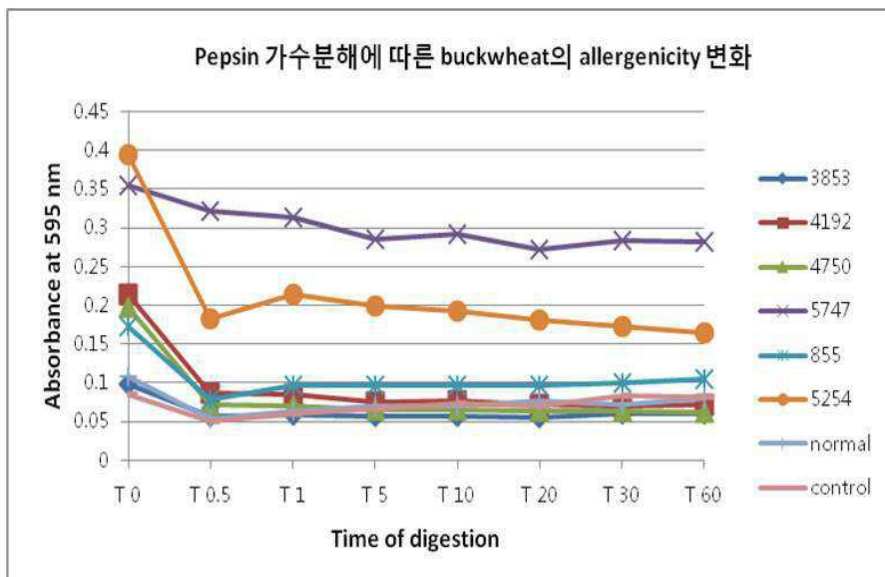
도면3



도면4



도면5



도면6

