



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0145067
(43) 공개일자 2015년12월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23B 7/155 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)

A23L 3/3571 (2006.01) C12N 9/50 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0074373

(22) 출원일자 2014년06월18일

심사청구일자 2014년06월18일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

오상석

서울특별시 용산구 녹사평대로 168-12 (이태원동)

성동은

서울특별시 중구 소공로 35, 102동 2602호 (회현동1가, 남산롯데캐슬아이리스)

(74) 대리인

유미특허법인

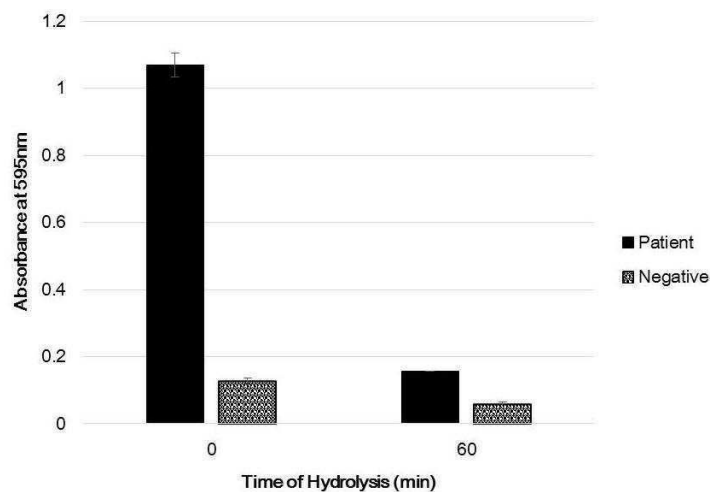
전체 청구항 수 : 총 5 항

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

(57) 요약

본 발명은 알칼리 프로테아제(alkaline protease)를 이용한 알레르기 저감화 대두의 제조 방법 및 상기 방법으로 제조된 알레르기 항원성이 저감화된 대두 식품 소재에 관한 것이다.

대표도 - 도9



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012R1A1A2020085

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 2014년도 상반기 일반연구자지원사업

연구과제명 대두 2S 단백질의 물리적 전처리 및 protease에 의한 가수분해물의 알레르기 특성연구

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2012.05.01 ~ 2015.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

대두에 알칼리 프로테아제(alkaline protease)를 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는, 알레르기 항원성이 저감화된 대두의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 대두는 대두 단백질 2S 분획, 또는 대두 쿠니츠 트립신 저해제(soybean Kunitz trypsin inhibitor)를 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 대두는 통대두, 대두 추출물, 대두 분획물, 분리된 대두 단백질, 대두 가루, 대두 건조물 또는 농축물 형태인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된, 알레르기 항원성이 저감화된 대두.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 알레르기 항원성이 저감화된 대두를 포함하는 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알칼리 프로테아제(alkaline protease)를 이용한 알레르기 저감화 대두의 제조 방법 및 상기 방법으로 제조된 알레르기 항원성이 저감화된 대두 식품 소재에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대두(soybean)는 건물량 중 약 40%가 단백질로 구성되어 있고, 필수 아미노산이 풍부하여 우리나라에서는 전통적으로 단백질의 급원으로 사용되어 왔다. 다른 곡류의 단백질량이 보통 8~12%이고, 다른 콩과 식품의 단백질량이 20~30% 정도인 것을 고려하면, 대두의 단백질 구성은 매우 높은 수준이다. 또한, 대두에는 최근 생리활성 기능이 보고된 이소플라본(isoflavones) 및 피트산(phytic acid) 등이 풍부하며, 전세계적으로 가공식품의 원료로 널리 사용되고 있다. 2013년 세계 대두 생산량은 2.6억톤에 달하며, 2011년 한국농촌경제연구원 자료에 따르면, 국내 콩의 공급량은 국민 1인당 연간 9.18kg이고, 국내 소비량은 1638천톤에 이른다.

[0003] 그러나 대두는 알레르기 항원성이 높은 식품으로 알려져 있다. 전세계적으로 대두는 8대 주요 알레르기 유발 식품에 포함되며, 국내에서는 5대 알레르기 유발 식품으로서 분류된다(Hefle SL, Nordlee JA, Taylor SL. Allergenic foods. Crit Rev Food Sci Nutr. 1996;36(S1):69-89; Son D, Yoon K, Lee S. Study of the most common allergic foods in Korea. Korean J Food Sci Technol. 2002;34(5):885-8). 특히, 국내에서 대두는 두부, 콩가루, 콩기름, 콩나물, 된장 및 고추장, 간장 등과 같은 발효 식품의 형태로 빈번하게 섭취되고 있으며, 이는 대두에 대한 감작을 증가시키는 요인이다. 국내에서 대두 알레르기의 유병률은 0.5% 정도이며, 3세 이하의 어린이에서는 더 빈번하게 나타난다.

[0004] 대두 알레르기는 식품 중에 들어 있는 아주 소량의 유발물질에 의해서도 일어날 수 있고 또한 현재 대두 알레르기를 치료할 수 있는 마땅한 방법들이 알려져 있지 않으므로, 이를 예방하기 위해서는 대두 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 대두에 포함된 알레르기 유발물질을 분해, 제거 또는 약화시킨 알레르기 저감화 대두 식품 소재에 관한 연구도 활발히 이루어지고 있다.

[0005] 대두 단백질은 침강계수에 따라 2S, 7S, 11S 및 15S로 나눌 수 있는데, 이 중 2S, 7S 및 11S가 알레르기성을 가진다고 보고되었다(Shibasaki M, et al., Int Arch Allergy Immunol. 61(4):441-8, 1980). 현재까지 보고된 대두의 원인 알레르겐은 34개 이상이며, 국제면역학회연합(International Union of Immunological Societies, IUIS)에 의해 대두 알레르겐으로 공식적으로 명명된 것은, 대두 유래 소수성 단백질 (Gly m 1), 디펜신 (Gly m 2), 프로필린 (Gly m 3), PR-10 단백질 (Gly m 4), 베타-콘글리시닌 (Gly m 5, vicilin, 7S globulin), 글리시닌 (Gly m 6, legumin, 11S globulin) 및 종자 비오틴화 단백질 (Gly m 7), 대두 2S 알부민 (Gly m 8) 등이 있다.

[0006] 본 발명자들은 대두 알레르겐 저감화에 대한 이전의 연구에서, 펩신 처리를 통해 대두 단백질의 알레르겐을 분해하고자 시도하였으나, 대두 단백질 2S 분획의 알레르겐은 90분간의 펩신 처리에도 가수분해되지 않고 여전히 SDS-PAGE에 남아있었으며, 대두 감작 환자 혈청과의 반응에서도 알레르기성이 남아있는 것으로 확인되었다(Sung DE, et al., J Sci Food Agric. 2014). 실제로, 대두 단백질의 침강계수 2S에 포함된 주요 알레르겐인 대두 쿠니츠 트립신 저해제(soybean Kunitz trypsin inhibitor, SKTI)는 효소 가수분해 및 열에 굉장히 안정적이어서 고도로 가공된 식품에도 잔류할 수 있고, 알레르겐이 거의 남아있지 않다고 알려진 대두유나 레시틴에서도 검출된 바 있다(Roychaudhuri R, et al., Biochim Biophys Acta. 1699(1-2):207-12, 2004; Gu X, et al., Int Arch Allergy Immunol. 126(3):218-25, 2001).

[0007] 따라서, 보다 효과적이고 안전한 대두 알레르기 저감화 기술의 개발이 요구되며, 특히 가수분해와 열에 안정하다고 알려진 대두 단백질 2S 분획까지 효율적으로 분해하면서도 대두 고유의 건강 기능성 활성 성분이나 물성을 그대로 유지할 수 있는 기술의 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 알칼리 프로테아제를 이용한 알레르기 저감화 대두 식품 소재를 제공하는 것이다.

[0009] 구체적으로, 본 발명의 하나의 목적은 대두에 알칼리 프로테아제를 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는, 알레르기 항원성이 저감화된 대두의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 방법으로 제조된 알레르기 항원성이 저감화된 대두를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 알레르기 항원성이 저감화된 대두를 포함하는 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 대두에 알칼리 프로테아제를 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는, 알레르기 항원성이 저감화된 대두의 제조 방법에 관한 것이다.

[0013] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 방법으로 제조된, 알레르기 항원성이 저감화된 대두에 관한 것이다.

[0014] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 알레르기 항원성이 저감화된 대두를 포함하는 식품 조성물에 관한 것이다.

[0015] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0016] 식품 알레르기란 식이 형태로 체내에 들어온 특정의 단백질인 알레르겐에 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 이

를 수 있다. 국내에서는 계란, 우유, 대두, 메밀 및 밀이 5대 알레르기 유발 식품으로 확인되었다.

[0017] 알레르겐이 알레르기를 나타내기 위해서는 면역학적으로 활성화된 형태로 위장관에 도달해야 하므로, 이러한 단백질들은 비교적 열처리나 산처리, 효소 가수분해 등에 저항력을 가지고 있다. 식품 알레르겐의 효소적 가수분해에 대한 연구로, Astwood 등 의 보고(Nat. Biotechnol. 14:1269-1273, 1996)에 따르면, 대두 단백질인 베타-콘글리시닌과 쿠니츠-트립신 저해제(Kunits-trypsin inhibitor), 우유의 주요 알레르겐인 베타-락토글로불린, 땅콩의 Ara h 2, 계란의 오브알부민 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.

[0018] 본 발명자들은 대두 알레르기 항원성 저감화 기술과 관련하여 대두 알레르겐의 단백질 가수분해 저항성에 관한 특징에 대하여 연구하던 중, 대두가 알칼리 프로테아제에 특이적으로 가수분해되며, 대두의 항원성 및 알레르기성을 감소시키는 효과가 탁월하다는 것을 확인하게 되었다.

[0019] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 대두 단백질 전체 시료, 대두 단백질 2S 분획 시료, 및 정제된 알레르겐 시료에 대하여 각각 알칼리 프로테아제를 처리할 경우 SDS-PAGE 상의 모든 단백질이 분해되는 것을 확인하였다. 특히, 대두 단백질 2S 분획은 90분간의 펩신 가수분해 후에도 여전히 SDS-PAGE에 잔류하였고 알레르기성을 가지고 있을 정도로 안정적이라고 보고된 바 있지만(Sung DE, et al., J Sci Food Agric. 2014), 본 발명에서 알칼리 프로테아제를 처리한 경우에는 대두 단백질 2S 분획 내 알레르겐들을 10분만에 모두 분해하는 우수한 활성을 나타내었다 (도 1 내지 도 4).

[0020] 또한, 알칼리 프로테아제 처리에 의한 대두 단백질 가수분해물의 항원성 변화를 확인하기 위해, 상기 가수분해물을 대두 2S 단백질의 주요 알레르겐인 SKTI에 대한 항체와 반응시킨 결과, 대두 단백질 전체 시료, 대두 단백질 2S 분획 시료, 및 정제된 알레르겐 시료 모두에서 항원성이 90% 이상 감소하였고 (도 5 내지 도 8), 나아가 대두 알레르기 환자 혈청과 반응시켰을 때 알레르기성을 90% 이상 감소하였음을 확인하였다 (도 9 및 도 10). 이는, 알칼리 프로테아제가 대두의 주요 알레르겐을 모두 가수분해시켜, 대두의 항원성 및 알레르기성을 모두 제거했음을 나타내는 결과이다.

[0021] 그러나, 알칼리 프로테아제 대신 플라보자임, 브로멜라인, 펩신, 프로테이나제 K 및 파파인을 사용하여 동일한 실험을 수행한 경우에는, 대두 알레르겐이 전혀 분해되지 않거나 부분적으로만 분해되었고, 대두 항원성이 오히려 높아지는 경우도 관찰되었다 (도 11 내지 도 21).

[0022] 결론적으로, 다양한 단백질 분해 효소 중 알칼리 프로테아제만이 SDS-PAGE상에서 대두 단백질 2S 분획을 모두 가수분해했을 뿐만 아니라, 알레르기 항원성을 90% 이상 감소시켜, 대두 알레르기 저감화에 탁월한 효과를 나타내었다.

[0023] 따라서, 대두가 알칼리 프로테아제에 특이적으로 가수분해되므로, 이를 이용하여 알레르기 항원성이 저감화된 대두 식품 소재를 개발하는 것이 가능하다.

[0024] 본 발명에서 알칼리 프로테아제는 상업적으로 구입하거나 천연에서 추출 또는 정제해서 사용할 수 있으며, 그 입수 방법에는 제한이 없다. 예를 들어, 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 바실러스 알칼로필러스(*Bacillus alcalophilus*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 아밀로리퀴파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*) 등의 바실러스 속 균주와 같이, 알칼리 프로테아제를 생산하는 균주로부터 분리한 것을 사용할 수 있다. 바람직하게는, 바실러스 리체니포르미스 유래의 알칼리 프로테아제를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 또한, 상기 알칼리 프로테아제의 최적 pH 범위는 pH 7.0~12.0 또는 pH 7.0~11.0일 수 있고, 최적 온도 범위는 40~80 도 또는 55~70 도일 수 있다.

[0026] 본원에서 용어, "알레르겐"이란 사람이나 동물에서 알레르기 증상을 일으키는 원인 단백질을 말한다.

[0027] 본원에서 용어, "알레르기 항원성의 저감화"란 알레르겐 단백질의 알레르기 유발 활성을 약화 내지는 소실시켜 알레르기 반응을 약화시키거나 일으키지 않는 것을 말한다.

[0028] 본 발명의 알레르기 저감화 기술은, 식품 소재로 사용되는 일반적인 대두류에 폭넓게 적용될 수 있다. 예를 들어, 대두로 분류되는 식물, 즉, 콩과, 접형화아과, 강낭콩족, 콩아족 및 콩아속에 속하는 식물로부터 얻어진 모든 열매에 대하여 적용될 수 있다. 대두는 형태와 빛깔 그리고 용도를 가지고 구분하였을 때 완두콩, 강낭콩, 서목태, 청태, 동부, 밤콩, 백태(메주콩), 나물콩, 밥밀콩, 작두콩, 서리태, 꽃콩 등으로 분류될 수 있고, 분류

학상으로는 *Glycine* 아속(예를 들어, *G. albicans* Tind. and Craven; *G. arenaria* Tind.; *G. argyrea* Tind.; *G. canescens* F.J. Herm; *G. clandestine* Wendl; *G. curvata* Tind.; *G. cyrtoloba* Tind.; *G. falcata* Benth; *G. hirticaulis* Tind. And Craven; *G. lactovirens* Tine. And Craven; *G. latifolia*(Benth.) Newell & Hymowitz; *G. latrobeana*(Meissn.) Benth; *G. microphylla*(Benth.) Tind; *G. pindanica* Tind. And Craven; *G. tabacina*(Labill) Benth)과 *Soja* 아속(*G. soja*Sieb. & Zucc; *G. max* (L.) Merr. forma *gracilis*Skvortz)으로 분류될 수 있는데, 본 발명에 사용될 수 있는 대두는 상기 열거된 모든 대두가 사용될 수 있다. 바람직하게는 분류학상으로는 재배종인 *G. max* 로 이해할 수 있다.

[0029]

또한 본 발명에서 대두는, 통대두, 대두 추출물, 대두 분획물, 분리된 대두 단백질, 대두 가루, 대두 건조물, 농축물 등 다양한 형태에 적용될 수 있다. 대두 원료의 일례로서, 온전한 대두나 탈지 대두 등으로부터 단백질 성분을 물로 추출하고, 비지 성분을 제거한 대두 추출물(예컨대, 전지 두유나 탈지 두유)를 들 수 있다. 대두 원료의 다른 일례로서, 이들 두유로부터, 한외 여과막에 의한 처리나 산을 이용한 등전점 침전 등에 의해 단백질을 농축시킨 분리 대두 단백질을 들 수 있다. 대두 원료의 또 다른 예로서, 대두로부터 산 세정이나 에탄올 세정에 의해 웨이 성분을 제거하고 단백질을 농축한 농축 대두 단백질이나, 대두를 분쇄한 대두 가루를 들 수 있다. 이들 대두 원료는 살균 및 건조한 것이어도 좋다. 또한, 최종적으로 얻어지는 대두 원료는, 단백질을 건조 중량으로 80 중량% 이상 포함하는 것이 바람직하고, 예컨대 분리 대두 단백질 등이 바람직하다.

[0030]

본 발명은 대두에 알칼리 프로테아제를 첨가하여 반응시킴으로써 대두의 알레르기 항원성을 저감화하는 방법을 제공한다.

[0031]

상기 효소 반응에서, 알칼리 프로테아제의 첨가량은 대두에 포함되는 단백질량의 0.1~0.5% 가 바람직하나 이에 제한되지 않고 당업자가 적절히 선택할 수 있으며, 효소는 대두의 가공 과정 중 어느 단계에나 첨가할 수 있다. 반응 시간은 1분~60분 정도를 예시할 수 있으나 대두의 양과 품종에 따라 적절히 변경할 수 있다.

[0032]

또한, 상기 반응은 해당 알칼리 프로테아제의 최적 pH 및 온도 조건에서 행해지는 것이 바람직하며, 예를 들어 pH 7.0~12.0 또는 pH 7.0~11.0의 조건, 및 40~80 도 또는 55~70 도의 온도 조건에서 반응시킬 수 있다.

[0033]

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

[0034]

본 발명에서 제공하는 식품은, 대두를 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.

[0035]

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, 라면스프 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 대두 알레르기 항원성 저감화 기술에 의하여, 가수분해와 열에 안정하다고 알려진 대두 단백질 2S 분획의 알레르겐까지 효율적으로 분해할 수 있고, 대두 고유의 건강 기능성 활성 성분이나 물성을 그대로 유지할 수 있어, 이와 같이 개발된 대두를 건강 식품 소재로서 폭넓게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038]

도 1은 대두 단백질 2S 분획에 알칼리 프로테아제를 처리하여 가수분해하기 전(T0)과 가수분해 반응시간 60분 후(T60)에 대두 단백질의 분해 여부를 SDS-PAGE 로 확인한 결과를 나타낸다. M은 분자량 마커(molecular weight marker)를 나타내고, AKA 는 알칼리 프로테아제를 나타낸다.

도 2는 대두 단백질 2S 분획에 알칼리 프로테아제를 처리하여 가수분해하기 전(T0)과 10, 30, 60, 90, 120 분간 또는 밤새(overnight) 가수분해시킨 경우 (T10, T30, T60, T90, T120, T O/N), 대두 단백질의 분해 여부를

SDS-PAGE 로 확인한 결과를 나타낸다. M은 분자량 마커(molecular weight marker)를 나타낸다.

도 3은 정제된 알레르겐 SKTI(soybean Kunitz trypsin inhibitor)에 알칼리 프로테아제를 처리하여 가수분해하기 전(T0)과 가수분해 반응시간 60분 후(T60)에 알레르겐의 분해 여부를 SDS-PAGE 로 확인한 결과를 나타낸다. M은 분자량 마커(molecular weight marker)를 나타내고, AKA 는 알칼리 프로테아제를 나타낸다.

도 4는 대두 단백질 전체에 알칼리 프로테아제를 처리하여 가수분해하기 전(T0)과 가수분해 반응시간 60분 후(T60)에 대두 단백질의 분해 여부를 SDS-PAGE 로 확인한 결과를 나타낸다. 또한, 대두 단백질 전체에 알칼리 프로테아제가 들어가지 않은 반응액을 처리하기 전(P0)과 처리하고 60분 후(P60) 대두 단백질의 분해 여부를 SDS-PAGE 로 확인한 결과를 나타낸다. M은 분자량 마커(molecular weight marker)를 나타낸다.

도 5는 대두 단백질 2S 분획에 알칼리 프로테아제를 처리하여 60분간 가수분해 시킨 경우 항원성의 감소 여부를 ELISA 로 확인한 결과를 나타낸다.

도 6은 대두 단백질 2S 분획에 알칼리 프로테아제를 처리하여 10, 30, 60, 90, 120 분간 또는 밤새(overnight, O/N) 가수분해 시킨 경우 항원성의 감소 여부를 ELISA 로 확인한 결과를 나타낸다.

도 7은 정제된 SKTI(soybean Kunitz trypsin inhibitor)에 알칼리 프로테아제를 처리하여 60분간 가수분해 시킨 경우 항원성의 감소 여부를 ELISA 로 확인한 결과를 나타낸다.

도 8은 대두 단백질 전체에 알칼리 프로테아제를 처리하여 60분간 가수분해 시킨 경우 항원성의 감소 여부를 ELISA 로 확인한 결과를 나타낸다.

도 9는 대두 단백질 2S 분획에 알칼리 프로테아제를 처리하여 60분간 가수분해 시킨 경우 알레르기성의 감소 여부를 ELISA 로 확인한 결과를 나타낸다. Patient 는 대두 알레르기 환자의 혈청을, Negative 는 대두 알레르기를 가지지 않은 정상인의 혈청을 반응시킨 결과를 나타낸다.

도 10은 정제된 SKTI(soybean Kunitz trypsin inhibitor)에 알칼리 프로테아제를 처리하여 60분간 가수분해 시킨 경우 알레르기성의 감소 여부를 ELISA 로 확인한 결과를 나타낸다. Patient 는 대두 알레르기 환자의 혈청을, Negative 는 대두 알레르기를 가지지 않은 정상인의 혈청을 반응시킨 결과를 나타낸다.

도 11은 대두 단백질 2S 분획에 펩신을 처리하여 가수분해하기 전(T0)과 가수분해 반응시간 60분 후(T60)에 대두 단백질의 분해 여부를 SDS-PAGE 로 확인한 결과를 나타낸다. M은 분자량 마커(molecular weight marker)를 나타내고, PEP 는 펩신을 나타낸다.

도 12는 대두 단백질 2S 분획에 플라보자임을 처리하여 가수분해하기 전(T0)과 가수분해 반응시간 60분 후(T60)에 대두 단백질의 분해 여부를 SDS-PAGE 로 확인한 결과를 나타낸다. M은 분자량 마커(molecular weight marker)를 나타내고, FLA 는 플라보자임을 나타낸다.

도 13은 대두 단백질 2S 분획에 알칼리 파파인을 처리하여 가수분해하기 전(T0)과 가수분해 반응시간 60분 후(T60)에 대두 단백질의 분해 여부를 SDS-PAGE 로 확인한 결과를 나타낸다. M은 분자량 마커(molecular weight marker)를 나타내고, PAP 는 파파인을 나타낸다.

도 14는 대두 단백질 2S 분획에 브로멜라인을 처리하여 가수분해하기 전(T0)과 가수분해 반응시간 60분 후(T60)에 대두 단백질의 분해 여부를 SDS-PAGE 로 확인한 결과를 나타낸다. M은 분자량 마커(molecular weight marker)를 나타내고, BRO 는 브로멜라인을 나타낸다.

도 15는 대두 단백질 2S 분획에 프로테이나제 K를 처리하여 가수분해하기 전(T0)과 가수분해 반응시간 60분 후(T60)에 대두 단백질의 분해 여부를 SDS-PAGE 로 확인한 결과를 나타낸다. M은 분자량 마커(molecular weight marker)를 나타내고, PK 는 프로테이나제 K를 나타낸다.

도 16은 대두 단백질 2S 분획에 펩신을 처리하여 60분간 가수분해 시킨 경우 항원성의 감소 여부를 ELISA 로 확인한 결과를 나타낸다.

도 17은 대두 단백질 2S 분획에 플라보자임을 처리하여 60분간 가수분해 시킨 경우 항원성의 감소 여부를 ELISA 로 확인한 결과를 나타낸다.

도 18은 대두 단백질 2S 분획에 파파인을 처리하여 60분간 가수분해 시킨 경우 항원성의 감소 여부를 ELISA 로 확인한 결과를 나타낸다.

도 19는 대두 단백질 2S 분획에 브로멜라인을 처리하여 60분간 가수분해 시킨 경우 항원성의 감소 여부를 ELISA

로 확인한 결과를 나타낸다.

도 20은 대두 단백질 2S 분획에 프로테이나제 K를 처리하여 60분간 가수분해 시킨 경우 항원성의 감소 여부를 ELISA 로 확인한 결과를 나타낸다.

도 21은 대두 단백질 2S 분획에 파파인을 처리하여 60분간 가수분해 시킨 경우 알레르기성의 감소 여부를 ELISA 로 확인한 결과를 나타낸다. Patient 는 대두 알레르기 환자의 혈청을, Negative 는 대두 알레르기를 가지지 않은 정상인의 혈청을 반응시킨 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. 대두 단백질의 준비

대두 단백질 전체 시료, 대두 단백질 2S 분획 시료, 및 정제된 알레르겐(soybean Kunitz trypsin inhibitor, SKTI; Sigma) 시료를 각각 준비하였다. 대두 단백질 2S 분획은 이전에 보고된 방법(Rao MN., Prepar Biochem. 7(2):89-101, 1977)에 따라 분리하였다. 구체적으로, 탈지 대두분말(Sigma, USA)의 원심분리, 염석 및 투석을 반복한 후 동결건조하여 1차 샘플을 얻었으며, 이후 4℃에서 3차 증류수에 48시간 투석하고 100K membrane filter를 이용하여 최종샘플을 제조하였고, -70℃에서 보관 후 분석을 진행하였다. 단백질의 농도는 Pierce사의 BSA protein assay Kit를 사용하여 결정하였다.

1-2. 단백질 분해효소의 준비

단백질 분해 효소로는 알칼리 프로테아제(Alkaline protease), 플라보자임(Flavourzyme), 브로멜라인(Bromelain), 펩신(Pepsin), 프로테이나제 K(Proteinase K) 및 파파인(Papain)을 사용하였으며, 위의 각 효소의 특징은 다음과 같이 정리할 수 있다.

표 1

순번	효소명	구입처	유래	특징
1	알칼리 프로테아제	Genencor	<i>Bacillus licheniformis</i>	Serine-type peptidase
2	플라보자임	Novo	<i>Aspergillus oryzae</i>	Aminopeptidase
3	브로멜라인	Great food (Biochem)	Pineapple stem	Cysteine-type peptidase
4	펩신	Sigma	Porcine gastric mucosa	Aspartate protease
5	프로테이나제K	Sigma	<i>Tritirachium album</i>	Serine-type peptidase
6	파파인	Sigma	<i>Carica papaya</i>	Cysteine-type peptidase

실시예 2. 알칼리 프로테아제를 이용한 대두 알레르겐의 분해

대두 단백질 전체 시료, 대두 단백질 2S 분획 시료, 및 정제된 알레르겐 시료에 대하여 각각 알칼리 프로테아제를 처리하여 알레르겐의 분해 여부를 확인해보았다.

2-1. 알칼리 프로테아제의 처리

가수분해는 Clemente et al. 의 방법(J Agric Food Chem. 1999;47(9):3776-81)을 참고하여 각 시료의 농도를 2.5 mg/ml 로 조정하고, 단백질 농도의 10% 비율로 효소를 처리할 수 있도록 10 mM PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)를 이용하여 준비하였다. 알칼리 프로테아제의 최적온도 조건을 고려하여 60±2℃ 에서, 0, 10,

30, 60, 90, 120 분간 또는 밤새(overnight) 가수분해 반응을 진행하였다.

2-2. SDS-PAGE

알칼리 프로테아제로 처리된 각 시료를 샘플 버퍼(50mM Tris-HCl : pH 6.8, Glycerol, 10% SDS, reducing agent, 1% bromophenol blue)와 함께 95℃에서 5분간 가열하여 변성시킨 후, Bis-Tris gradient gels (NuPAGE, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 에서 200V로 35분간 전기영동하고, Coomassie Brilliant Blue(Bio-Rad, UK)로 염색하여 결과를 확인하였다. 단백질의 크기 확인을 위해 Smart Color Protein Markers (ELPiS, Taejeon, Korea)를 함께 전기영동 하였다.

2-3. 실험결과

대두 단백질 2S 알칼리 프로테아제로 60분간 가수분해한 경우 SDS-PAGE 상에서 아무런 밴드도 보이지 않아, 모든 알레르겐이 분해되었음을 확인하였다 (도 1). 반응시간을 좀 더 세분화하여 알칼리 프로테아제로 10, 30, 60, 90, 120 분간 또는 밤새 가수분해시킨 결과, 10분 이내에 SDS-PAGE 상의 모든 단백질이 제거됨을 확인할 수 있었다 (도 2).

또한, 대두 단백질 2S 분획의 주요 알레르겐인 정제된 SKTI(soybean Kunitz trypsin inhibitor)에 대하여 알칼리 프로테아제로 가수분해한 경우 (도 3) 및 대두 단백질 전체에 대하여 알칼리 프로테아제로 가수분해한 경우 (도 4)에도 모두, 60분간 가수분해 후에는 SDS-PAGE 상에서 아무런 밴드도 보이지 않아, 모든 알레르겐이 분해되었음을 확인하였다

실시예 3. 알칼리 프로테아제에 의한 대두의 항원성(antigenicity)의 변화

3-1. ELISA

알칼리 프로테아제를 처리하여 0, 10, 30, 60, 90, 120 분간 또는 밤새 반응시킨 대두 단백질 가수분해물에 대하여, 대두 2S 단백질의 주요 알레르겐인 SKTI(soybean Kunitz trypsin inhibitor)에 대한 항체(anti-trypsin inhibitor)와의 반응성, 즉 항원성(antigenicity)의 변화를 확인해보았다. 이를 위하여, HRP-conjugated rabbit polyclonal antibody to soybean trypsin inhibitor (Abcam, Cambridge, UK)를 1:150,000으로 희석하여 사용하였다. 알칼리 프로테아제를 처리한 대두 단백질 가수분해물을 10 μ g/ml 농도로 희석하여 50 μ l 하룻밤 동안 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 well당 200 μ l 넣어 1시간 blocking하였다. 3회 세척 후 2% BSA-PBS를 이용하여 희석한 항체를 100 μ l씩 넣고 두 시간 동안 두었다. 다시 3회 세척 후 TMB peroxidase(3,3',5,5'-tetraethylbenzidine, KPL, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 발색시키며, 30분 후 1 M H₂SO₄ 를 100 μ l 넣어 발색을 정지시키고, 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

3-2. 실험결과

알칼리 프로테아제 처리에 의한 대두 단백질 가수분해물의 항원성 변화를 확인하기 위해, 상기 가수분해물을 대두 2S 단백질의 주요 알레르겐인 SKTI에 대한 항체와 반응시켰다. 그 결과, 알칼리 프로테아제 처리에 의해 대두 단백질 2S 분획의 항원성이 90% 이상 감소한 것으로 나타났다 (도 5). 반응시간을 좀 더 세분화하여 알칼리 프로테아제로 10, 30, 60, 90, 120 분간 또는 밤새 가수분해시킨 결과, 10분 이내에 항원성이 90% 이상 감소함을 확인할 수 있었다 (도 6).

또한, 정제된 SKTI에 대하여 알칼리 프로테아제로 가수분해한 경우 (도 7) 및 대두 단백질 전체에 대하여 알칼리 프로테아제로 가수분해한 경우 (도 8)에도 모두, 60분간 가수분해 후에는 항원성이 90% 이상 감소한 것으로 나타났다.

실시예 4. 환자 혈청에서 알칼리 프로테아제에 의한 대두의 알레르기성(allergenicity)의 변화

4-1. 환자 혈청

서울삼성병원에서 아토피성 피부염으로 진료받은 45명의 대두 감작 환자의 혈청(0~7세, 남 36명 여 9명, 총 IgE 372~15,740 kUA/L, 대두 특이 IgE 11.8~101 kUA/L) 중, 대두 단백질 2S 분획에 대한 펩신 가수분해물에도 여전히 알레르기 반응성을 보이는 3명의 혈청을 연구에 사용하였다(표 2). 이하의 실험에서는, 환자 3명의 혈청을 합쳐서 하나의 혈청으로 사용하는 pooled serum을 이용하였다. 또한, 총 IgE 및 대두 특이 IgE는 Phadia UniCAP-system(Uppsala, Sweden) 으로 측정하였다.

표 2

환자 번호	나이(y)	성별	총 IgE (kUA/L)	대두 특이적IgE (kUA/L)
4442	2	M	15,740	101
3480	1	M	5,001	81.5
4145	2	M	5,001	101

4-2. ELISA

알칼리 프로테아제 처리에 의한 대두 단백질 가수분해물의 알레르기성을 확인하기 위해, PBS(phosphate-buffered saline, pH 7.4)를 이용하여 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 희석한 시료를 96-well microplate(BD Biosciences, USA)에 well당 100 μl 씩 넣고 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 well당 200 μl 넣어 1시간 blocking하였다. 3회 세척 후 2% BSA-PBS를 이용하여 1/20로 희석한 환자혈청을 100 μl 씩 넣고 2시간 반응시켰다. 다시 3회 세척 후 Goat anti-human IgE-HRP(KPL, Gaithersburg, MD, USA, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 2% BSA-PBS와 1:2500의 비율로 섞어 100 μl 씩 well에 분주하고 1시간 반응시켰다. 3회 세척 후 well당 100 μl 씩 발색제 TMB peroxidase(3,3',5,5'-tetraethylbenzidine, KPL, Gaithersburg, MD, USA)를 넣고 빛을 차단하여 상온에서 30분간 발색 후 ELISA reader를 이용하여 흡광도(595nm)를 측정하였다.

4-3. 실험결과

알칼리 프로테아제 처리에 의한 대두 단백질 가수분해물의 알레르기성을 확인하기 위해, 대두 단백질 2S 분획을 90분간 펩신 가수분해 후에도 여전히 알레르기성을 보였던 환자 혈청과의 반응성을 확인하였다. 그 결과, 알칼리 프로테아제를 처리하여 60분간 가수분해시킨 대두 단백질 2S 분획의 알레르기성이 90% 이상 감소되어, 음성 대조군(알레르기성 질환을 가지지 않은 정상인의 혈청) 수준까지 낮아졌다 (도 9). 이러한 결과는 대두 단백질 2S 분획의 주요 알레르겐인 정제된 SKTI(soybean Kunitz trypsin inhibitor)만을 이용한 실험에서도 동일한 결과로 나타났다 (도 10).

실시예 5. 다른 단백질 분해 효소에 의한 대두 알레르겐 저감화 여부 확인

알칼리 프로테아제에 의한 대두의 알레르겐 저감화 효과가 다른 단백질 분해 효소에 의해서도 달성될 수 있는 것인지 아니면 알칼리 프로테아제에 특이적인 것인지 여부를 확인하기 위하여, 알칼리 프로테아제 대신 플라보자임, 브로멜라인, 펩신, 프로테이나제 K 및 파파인을 사용하여 상기와 동일한 실험을 진행하였다.

5-1. 효소의 처리

가수분해는 Clemente et al. 의 방법(J Agric Food Chem. 1999;47(9):3776-81)을 참고하여 대두 단백질 2S 분획의 농도를 2.5 mg/ml 로 조정하고, 단백질 농도의 10% 비율로 효소를 처리할 수 있도록 10 mM PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)를 이용하여 준비하였다. 각 효소의 최적온도 조건을 고려하여 플라보자임 및 브로멜라인은 60 $\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$ 에서, 파파인 및 프로테이나제 K 는 37 $\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60 분간 가수분해 반응을 진행하였다. 펩신은 2 mg/mL 의 NaCl을 포함하는 pH 1.2인 SGF(simulated gastric fluid)를 이용하여 가수분해를 진행하였다. 펩신은 단백질 1 μg 당 10 units을 처리하였으며 37 $\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60분간 가수분해 후 0.7M sodium carbonate buffer 를 샘플 100 μl 당 35 μl 씩 넣어 반응을 정지시켰다.

5-2. 대두 단백질 추출물의 소화성 테스트

실시에 2와 동일한 방법으로 분리된 대두 단백질 2S 분획에 대하여 플라보자임, 브로멜라인, 펩신, 프로테이나제 K 및 파파인을 각각 처리하여 알레르겐의 분해 여부를 확인해보았다.

펩신을 처리한 경우 60분간의 가수분해 반응 후 여전히 알레르겐이 SDS-PAGE에 남아있는 것을 확인할 수 있었다 (도 11). 플라보자임을 처리한 경우에도, 60분간의 가수분해 반응 후 알레르겐이 모두 SDS-PAGE에 남아있어, 대두 단백질 2S 분획을 거의 가수분해하지 못하였음을 확인하였다 (도 12). 파파인 및 브로멜라인을 각각 처리한 경우, 20kDa 단백질은 가수분해되었으나 9~15kDa 단백질은 여전히 잔류하는 것으로 나타났다 (도 13 및 도 14). 프로테이나제 K를 처리한 경우, 20kDa 및 9~15kD 단백질이 분해되었으나 분해의 결과 10kDa 이하의 단백질을 생성되어 여전히 알레르겐이 존재함을 확인하였다 (도 15).

결과적으로, 알칼리 프로테아제만이 대두 단백질 2S 분획을 가장 효율적으로 분해하여 SDS-PAGE 상에서 모든 단백질을 사라지게 만들었고, 그 외의 효소들은 알레르겐을 전혀 분해하지 못하거나 부분적으로만 분해하는 것으로 나타났다.

5-3. 대두 단백질의 항원성의 변화

실시에 3과 동일한 방법으로 항-SKTI 항체를 이용하여 ELISA 를 수행하였다. 플라보자임, 브로멜라인, 펩신, 프로테이나제 K 및 파파인을 각각 처리한 대두 단백질 2S 분획과 항-SKTI 항체를 ELISA 반응시켜, 대두의 항원성 감소 여부를 확인해보았다.

펩신을 처리하여 60분간 가수분해시킨 대두 단백질 2S 분획의 경우 항원성이 일부 감소하였으나 (도 16), 그 효과가 알칼리 프로테아제를 처리한 경우보다 크지 않았다. 또한, SDS-PAGE 결과에서 대두 2S 단백질을 거의 가수분해 하지 못한 것으로 나타났던 플라보자임의 경우, 오히려 대두의 항원성을 약간 증가시킨 것으로 나타났다 (도 17). 파파인 및 브로멜라인은 SDS-PAGE 결과에서는 대두 단백질을 일부 분해하는 것처럼 보였지만, 항원성을 거의 감소시키지 못한 것으로 나타났다 (도 18 및 도 19). 프로테이나제 K는 SDS-PAGE 결과에서 대두 단백질을 2S 분획을 효과적으로 분해하는 것처럼 보였지만, 항원성은 오히려 증가시키는 것으로 나타났다 (도 20). 이와 같이, 플라보자임 및 프로테이나제 K에 의한 가수분해 후 항원성이 오히려 증가한 이유는, 가수분해로 인해 새로운 항원결정기(epitope)가 생성되었거나 또는 내부에 숨겨져 있던 항원결정기가 노출되었기 때문으로 생각된다.

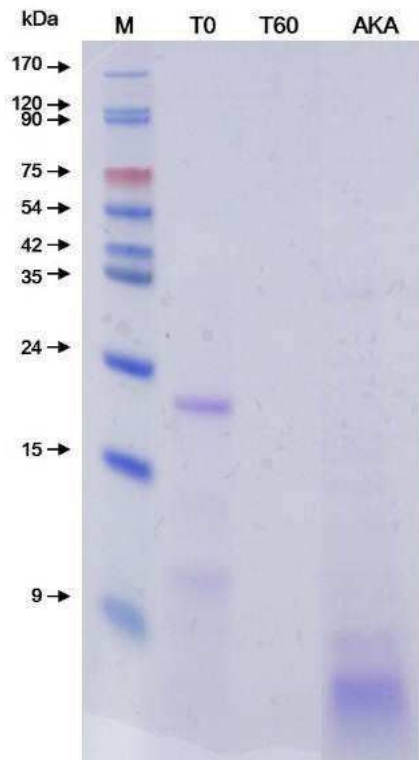
결과적으로, 알칼리 프로테아제가 SDS-PAGE상에서 대두 단백질을 2S 분획을 모두 가수분해했을 뿐만 아니라, 알레르기 항원성을 90% 이상 감소시켜, 대두 알레르기 저감화에 탁월한 효과를 나타내었다.

5-4. 환자 혈청에서 대두 단백질의 알레르기성의 변화

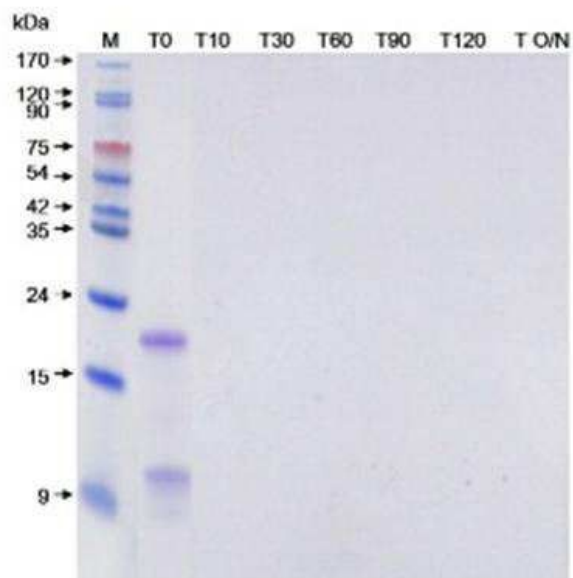
실시에 4와 동일한 방법으로 환자 혈청을 이용하여 ELISA 를 수행하였다. 파파인을 처리한 대두 단백질 2S 분획과 환자 혈청을 ELISA 반응시켜, 대두의 알레르기성 저감화 여부를 확인해보았다. 그 결과, 파파인을 처리하지 않은 경우와 대비했을 때, 파파인에 의한 가수분해가 일어난 후에도 알레르기성이 70% 이상 잔류하는 것으로 나타나, 대두 단백질 2S 분획의 알레르기성을 효과적으로 감소시키지 못하였다 (도 21).

도면

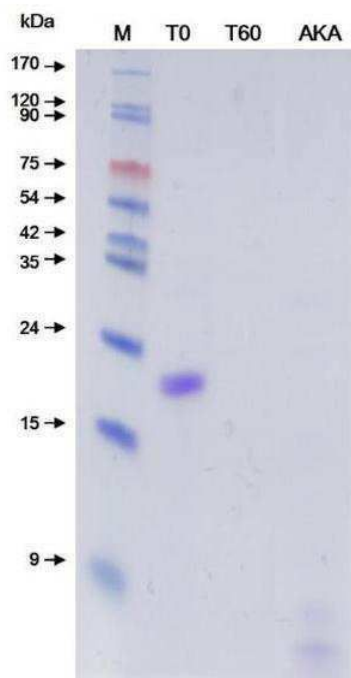
도면1



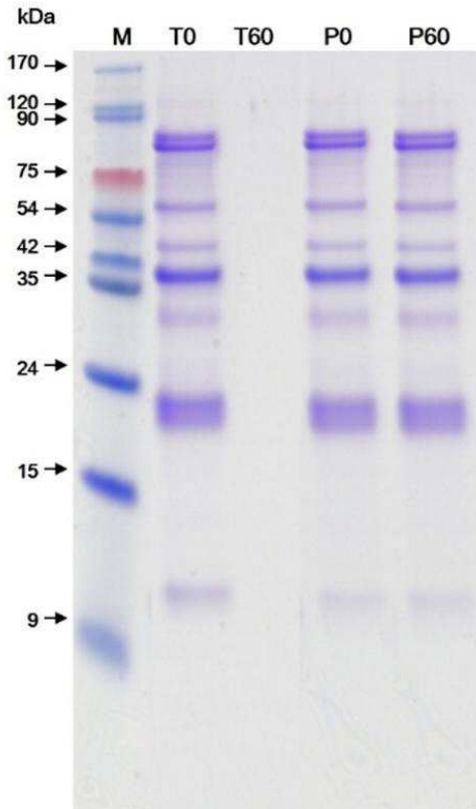
도면2



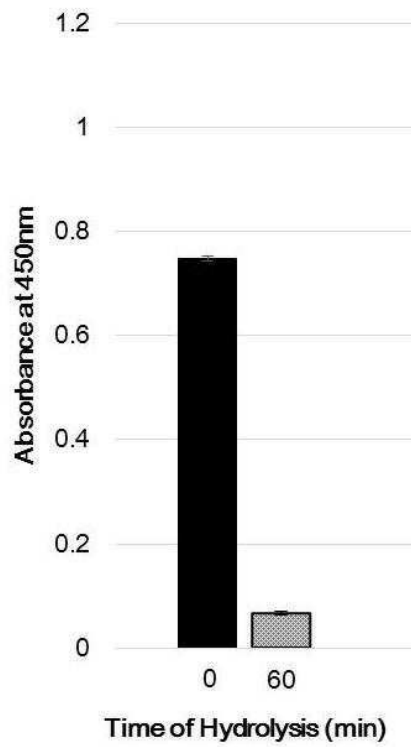
도면3



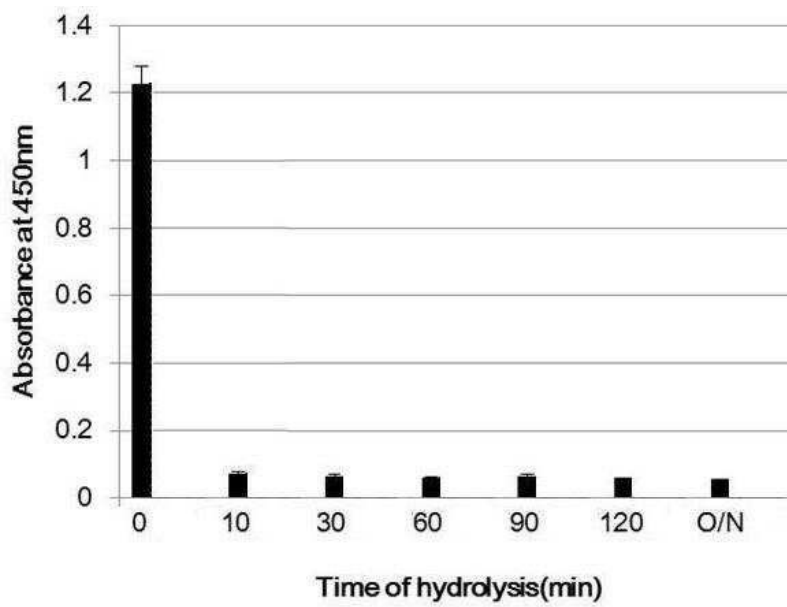
도면4



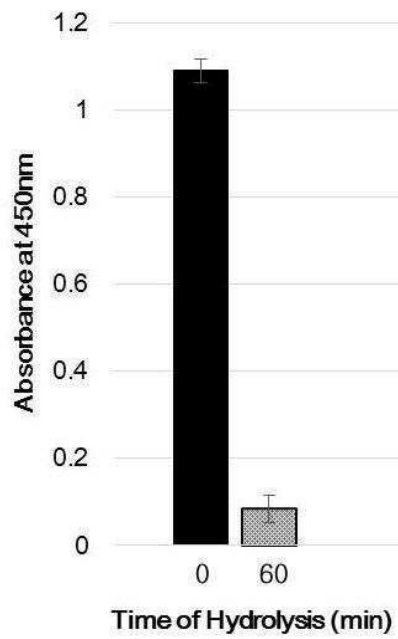
도면5



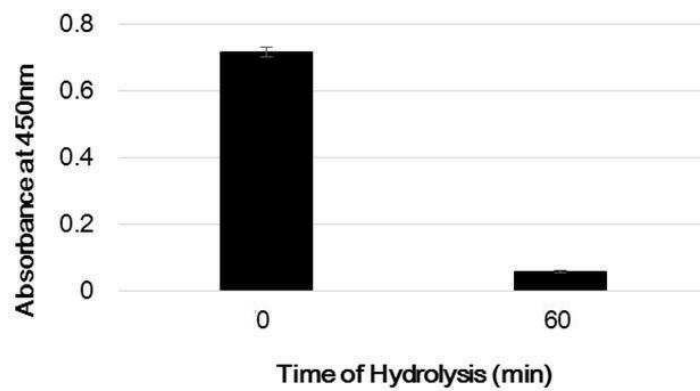
도면6



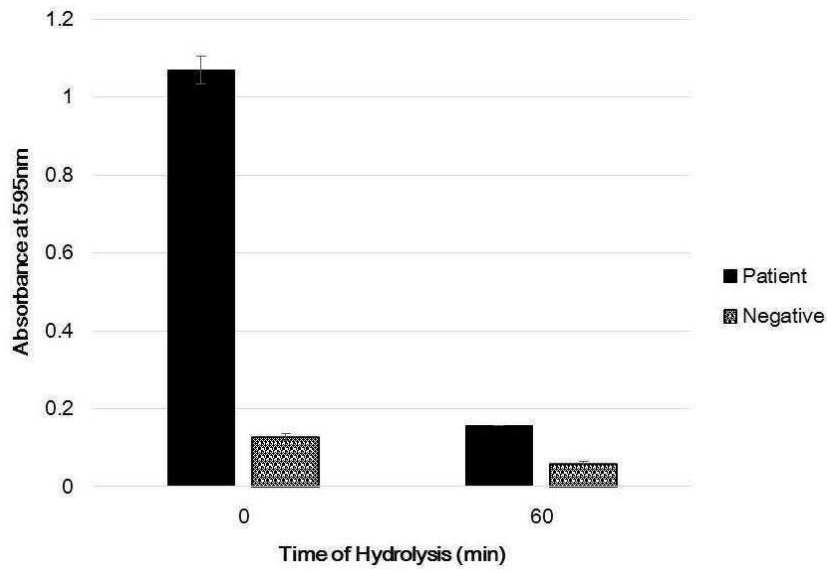
도면7



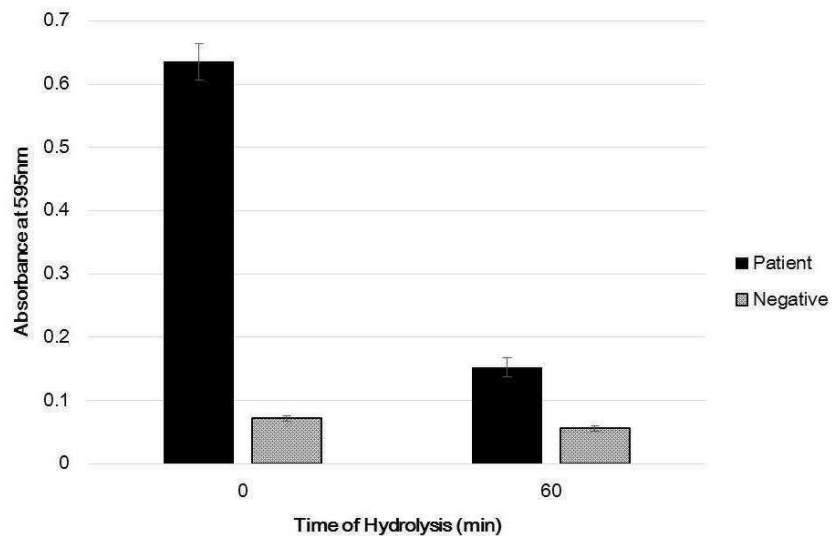
도면8



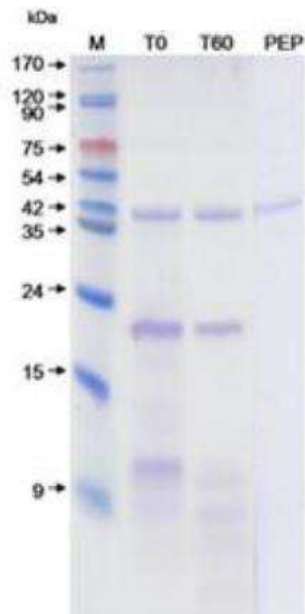
도면9



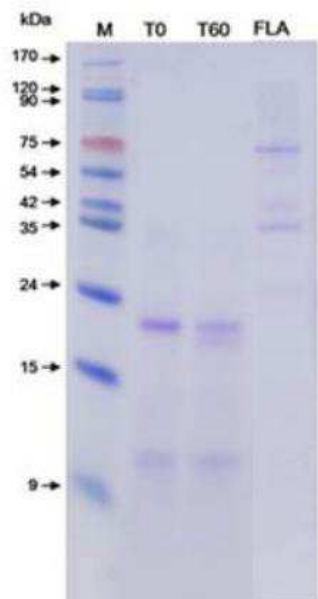
도면10



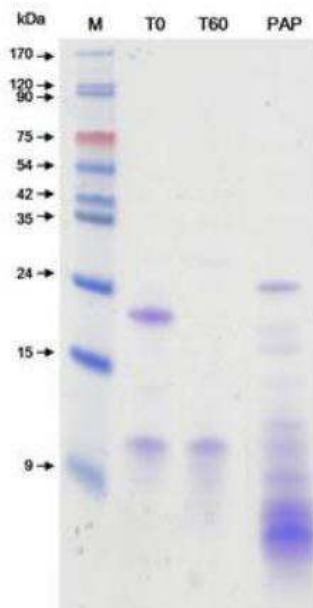
도면11



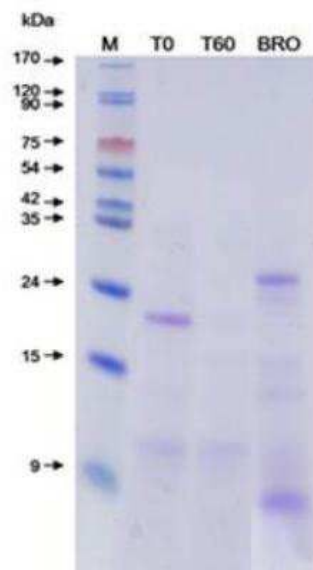
도면12



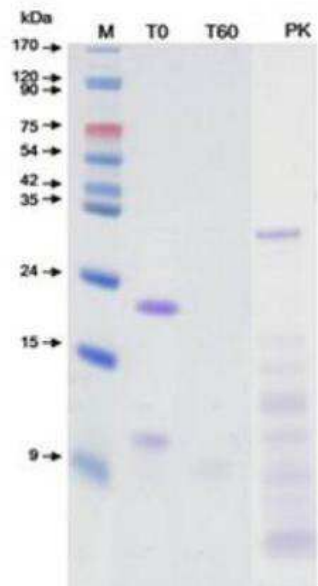
도면13



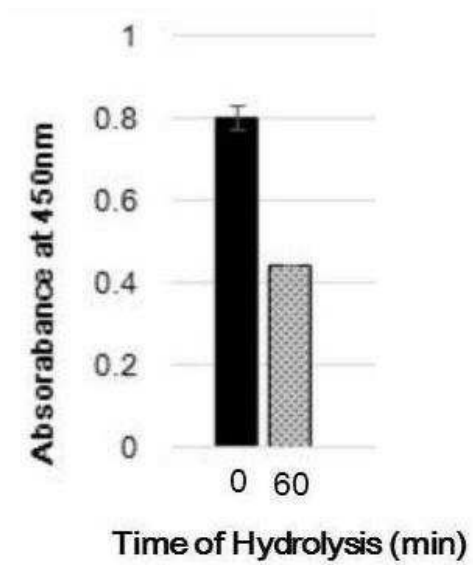
도면14



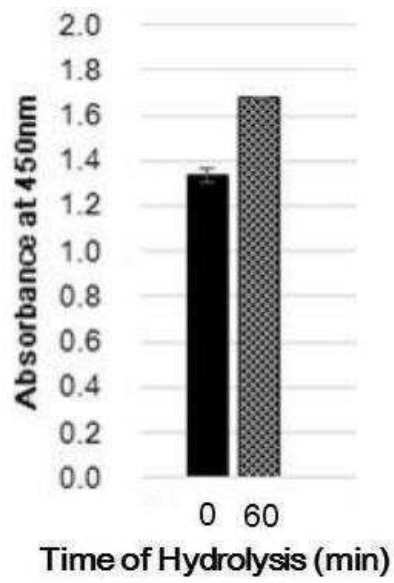
도면15



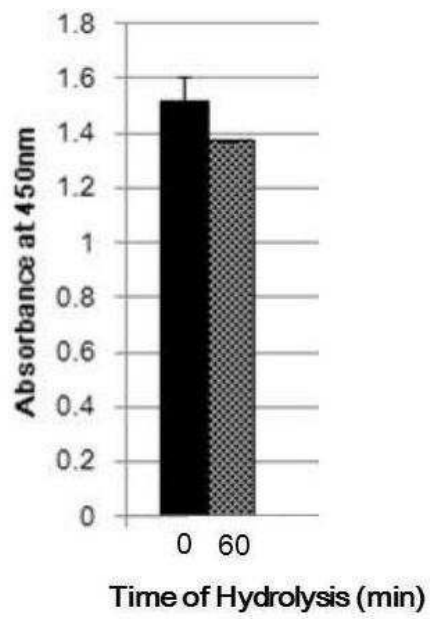
도면16



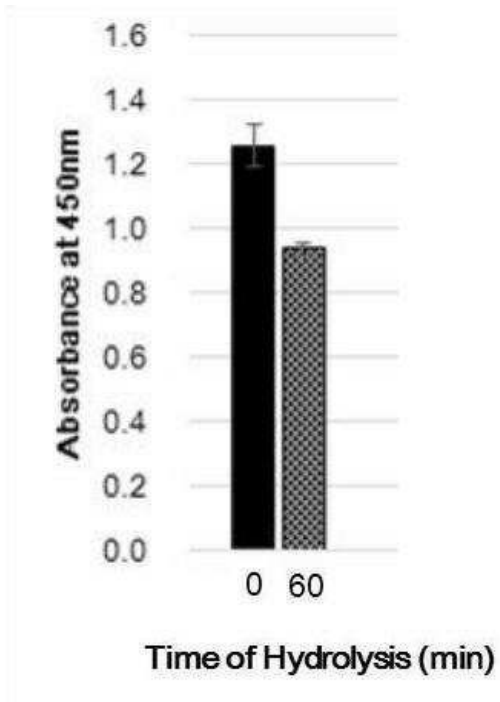
도면17



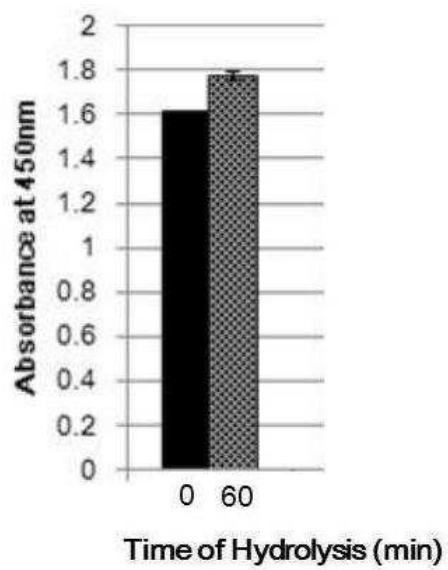
도면18



도면19



도면20



도면21

