

## 효소가수분해에 의한 유청단백질의 항원성 저하

하월규 · 전석락 · 김정완\* · 이수원\* · 이재영\* · 손동화\*\*  
매일유업(주) 중앙연구소, \*성균관대학교 낙농학과, \*\*한국식품개발연구원

### Reduction of the Antigenicity of Whey Protein by Enzymatic Hydrolysis

Woel-Kyu Ha, Suk-Lak Juhn, Jung-Wan Kim\*, Soo-Won Lee\*,  
Jae-Young Lee\* and Dong-Hwa Shon\*\*

Central Research Lab., Maeil Dairy Industry Co. Ltd.

\*Department of Dairy Science, Sung Kyun Kwan University

\*\*Division of Food Science, Korea Food Research Institute

#### Abstract

As a preliminary study about the reduction of the antigenicity of whey protein isolate(WPI) by treatment of chymotrypsin, trypsin, pancreatin, and protease from *Aspergillus oryzae*, the properties and antigenicities of whey protein hydrolysates(WPH) were investigated. When degrees of hydrolysis (DH) were measured by use of trinitrobenzensulfonic acid(TNBS), the DH of the WPH treated by pancreatin or protease from *Aspergillus oryzae*(5.05~11.47) were much higher than those of the tryptic or chymotryptic WPH(15.67~20.20). And the pretreatments of heat(75°C, 20 min) and/or pepsin resulted in higher DH of WPH, generally. When the molecular distributions of the WPH were determined by high performance size exclusion chromatography(HPSEC), the ratios of polypeptides with molecular weight more than 10kDa ranged from 12% to 36%, and the average molecular weights and the average peptide lengths of the WPH were 4,252~9,132 dalton and 38~83 amino acids, respectively. And there was no bitter taste in all of the WPH. Results of SDS-PAGE showed that most of intact native proteins were eliminated by the enzymatic hydrolysis but there were a few bands of peptides larger than 14.2 kDa in some WPH. When antigenicity was assayed by competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay(cELISA), monovalent antigenicity of WPH to rabbit anti-WPI antiserum were lowered to  $10^{-1.7}$ ~ $10^{-4.9}$  times and less by the enzymatic hydrolysis. And the pretreatments of heat and pepsin resulted in the lowest antigenicity within a group of enzymatic hydrolysis, especially in case of the pancreatic hydrolysate(PDP) whose antigenicity was found almost to be removed.

Key word: Antigenicity, whey protein hydrolysate, degree of hydrolysis, molecular weight distribution, competitive inhibition ELISA

#### 서 론

치즈산업의 발달에 따라 부산물로서 건어지는 다량의 cheese whey 중에는 유당 및 유청단백질이 많이 함유되어 있다. 이중 유청단백질은 영양적으로 우수할 뿐 아니라 여러 식품의 소재로서 이용될 수 있으며, 최근에는 유가공기술이 발달함에 따라 유청단백질을 선택적으로 분리하여 이들을 단백질의 강화 혹은 기능성 부여의 목적에 이용되고 있다. 특히 유아용 조제분유에 유청단백질이 이용되는데, 카제인과 유청단백질의 mass balance를 40 : 60으로 조정하여 모유의 단백질 구성에 가깝게 하기 위해서 이용하고 있다<sup>(1)</sup>.

이와 같이 구성단백질의 조성을 바꾸므로써 threonine, tryptophan, cysteine 등이 영양적으로 증강되지만, 다른 한편으로는 항원성이 매우 높은 유청단백질이 소화계와 면역계의 발달이 미숙한 유아에게 우유알레르기를 일으키는 원인물질(allergen)로 작용하여 유아의 성장에 좋지 않는 영향을 줄 수 있다<sup>(2-4)</sup>.

이러한 우유알레르기를 유발하지 않으려면 allergen의 섭취를 피해야하나, 유아에게 우유성분의 섭취가 불가피한 경우에는 차선책으로 allergen의 항원성을 낮추므로써 우유알레르기를 최소한으로 억제시키는 방안이 강구되고 있다. 이중에서도 가장 용이한 방법이 효소에 의한 항원의 가수분해이다. 즉, trypsin, chymotrypsin, CNBr 등에 의해서 유청단백질을 부분적으로 가수분해하므로써 그 항원성을 낮출 수 있다<sup>(2,5-8)</sup>. 그러나 이들 연구에서는 유청단백질중 주로  $\beta$ -lactoglobulin을 사용하였으며 효소 등도 한 두 가지만을 이용하였고 항원성의

Corresponding author: Woel-Kyu Ha, Central Research Lab., Maeil Dairy Industry Co. Ltd., 480 Kagok-Ri, Jinwi-Myun, Pyungtek-Gun, Kyonggi-Do 451-860, Korea

시험도 radioallergosorbent test(RAST), enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), 또는 passive cutaneous anaphylaxis(PCA) test 등 각기 달라, 유청단백질 전체를 가수분해하였을 때의 항원성저하에 관한 종합적인 평가는 어려운 점이 있었다.

본 연구는 여러 효소로 유청단백질을 가수분해하고 이들의 항원성저하를 종합적으로 검토하므로써, 유청단백질 가수분해물을 유아식 식품소재로 사용하는데 필요한 정보를 얻고자 하였다. 일련의 연구중 그 첫번째 보고로서 생체내 효소와 유사한 단백질분해효소 및 미생물 (*Aspergillus oryzae*) 유래 효소를 유청단백질에 처리하여 얻은 가수분해물의 특성을 조사하였으며, 또한 유청단백질에 특이적인 토끼의 항혈청을 이용한 competitive inhibition ELISA에 의하여 유청단백질 가수분해물의 항원성변화를 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 유청단백질(WPI)은 ultrafiltration으로 제조된 단백질함량 96%(dry basis)의 Lacprodan-90 (Danmark Protein a.s., Denmark)을 사용하였으며, 단백질분해효소, 분자량 marker, trinitrobenzensulfonic acid(TNBS), caffein 등 기타의 시약은 Sigma사(U.S.A.) 제품을 사용하였다.

유청단백질 가수분해물의 제조

유청단백질의 전처리는 Fig. 1에서와 같이 실시하였고 그 처리조건에 따라서 시료의 명칭을 부여하였다. 즉, 증류수에 용해시킨 2.5%의 WPI용액을 pH 6.5로 조절하여 75℃에서 20분간 열변성시킨 것(D)과 시키지 않은 것(U)으로 나누고, 다시 이들에 각각 pH 2.0, 38℃에서 60분간 pepsin(기질의 1% 농도, w/w)으로 예비가수분해한 것(P)과 그렇지 않은 것(N)으로 나누었다. 이와 같이 전처리한 네종류의 WPI용액에 chymotrypsin(C), trypsin(T), pancreatin(P), 그리고 *Aspergillus oryzae* 유래의 protease(O)를 처리하였다. 이때 모든 효소는 기질의 1% 농도(w/w)로 첨가하였고, 각 효소의 반응온도는 각각 55℃, 55℃, 50℃ 및 45℃였으며, 반응 pH는 4 N NaOH와 4 N HCl를 자동주입하는 pH-stat system으로 각각 8.0, 8.0, 7.5 및 8.0을 유지하였다. 반응 4시간후 효소를 불활성화시키기 위하여 75℃에서 20분간 열처리한 다음 동결건조하였다<sup>9)</sup>. 단, 가수분해도 측정용 시료는 효소 반응 직후, 10분, 20분, 40분, 1시간, 2시간, 3시간 및 4시간후에 각각 채취하고, 채취 직후에 sodium dodecylsulfate(SDS)를 첨가하여 75℃에서 15분간 열처리하였다.

유청단백질 가수분해물의 분해도 측정

Alder-Nissen 방법<sup>10)</sup>에 준하여 실시하였다. 즉, 유청단백질 가수분해물 250 μ를 1%의 hot SDS용액 1.25

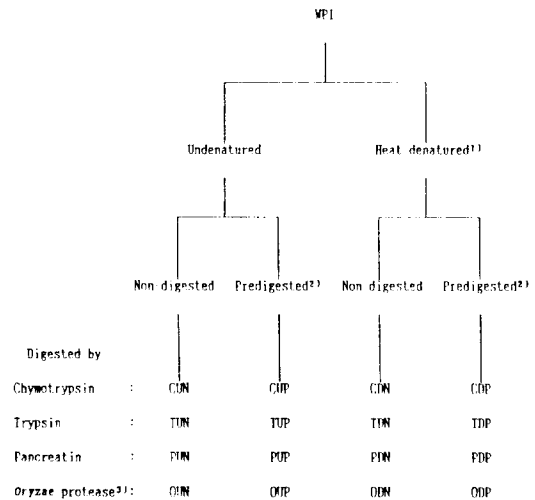


Fig. 1. Scheme of hydrolysis of whey protein isolate (WPI) by several proteases and the designation of its hydrolysates

- 1) Heat denaturation at pH 6.5 and 75℃ for 20 min,
- 2) Pepsin predigestion at pH 2.0 and 38℃ for 60 min,
- 3) Protease from *Aspergillus oryzae*.

m에 분산시켜 75℃의 수조에서 15분간 열처리한 다음 상기의 SDS용액 5 ml를 더 첨가하고 혼합하였다. 이중 250 μ를 2 ml의 0.2125 M phosphate buffer(pH 8.2)와 혼합하여 aluminum foil로 씌운 시험관에 넣고 여기에 0.1% TNBS 2 ml를 첨가하여 50℃의 수조에서 1시간 동안 정치하여 발색시켰다. 그리고 발색반응을 중지시키기 위하여 4 ml의 0.1 N HCl을 첨가하고 실온에서 30분간 방치한 다음 분광광도계(Beckman DU 68, U.S.A)로 340 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

α-Amino group의 정량을 위하여 L-leucine을 standard로 사용하였다. 즉, 여러 농도의 L-leucine을 위의 방법에 준하여 처리한 후 Beckman DU 68 linear quantitation II program으로 검량선을 작성하고, 각 시료의 α-amino group을 정량하여 다음과 같이 가수분해물의 가수분해도(Degree of hydrolysis, DH)를 측정하였다;

$$DH(\%) = \frac{h}{h_{tot}} \times 100$$

여기서 h : 가수분해중에 생성된 α-amino group protein의 농도(milliequivalent/g protein)  
 h<sub>tot</sub> : 단백질의 전체 구성아미노산의 농도(milliequivalent/g protein)를 나타내며, 유청단백질의 h<sub>tot</sub>는 8.8 meqv/g로 하여 계산하였다<sup>9)</sup>.

High Performance Size Exclusion Chromatography (HPSEC)

가수분해물의 분자량 분포를 측정하기 위하여 Ultra-hydrogel-120, 250 및 500 column(각각 Φ7.8×300 mm,

Waters, U.S.A.)을 연속적으로 연결한 HPLC로 분석하였다. 이동상으로 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)를 사용하였으며, buffer에 0.05%(W/V)로 용해시킨 시료를 200  $\mu$ l씩 WISP 710B autosampler(Waters, U.S.A.)로 주입하였다. Column의 온도는 40°C를 유지하였으며 M410 refractive detector로 검출하였다. 분석된 결과는 Maxima 820 Datasystem(Waters, U.S.A.)으로 가수분해물중 peptide의 분자량분포와 평균분자량을 구하였다. 이때 분자량 marker로는 bovine serum albumin(BSA, M.W. : 66,300),  $\beta$ -lactoglobulin( $\beta$ -LG, M.W. : 18,300),  $\alpha$ -lactalbumin( $\alpha$ -LA, M.W. : 14,200), adrenocorticotrophic hormone(ACTH, M.W. : 4,390), 그리고 bacitracin(M.W. : 1,411)를 사용하였다.

### SDS-PAGE

유청단백질의 전기영동은 Phastsystem™(Pharmacia, Sweden)을 이용하였고 전기영동방법은 Pharmacia Separation Technique File No.110에 준하여 실시하였다. 즉, 동결건조된 가수분해 시료를 sample buffer(10 mM Tris/HCl과 1 mM EDTA, pH 8.0)에 30  $\mu$ g/ml로 용해한 다음 각각의 시료 용액에 SDS 2.5%와  $\beta$ -mercaptoethanol 5%를 첨가하여 100°C에서 5분간 열처리하였다. SDS-PAGE용 gel은 Phastgel Gradient 3-25(Molecular weight range: 6,000~300,000)을 사용하였다. 또한 분자량 marker로는 BSA와  $\beta$ -LG 그리고  $\alpha$ -LA를 사용하였다.

### 쓴맛의 평가

표준물질로서 카페인을 사용하여 쓴맛을 평가하였다. 5%의 유청단백질 수용액에 카페인을 0.02% 농도로 첨가하였을 때 쓴맛의 정도를 쓴맛평가 0으로, 0.04% 하였을 때를 1로, 0.06% 하였을 때를 2로 하였다. 관능검사는 훈련된 사내 패널 5명에 의하여 실시하였다.

### 유청단백질에 대한 항혈청의 제조

유청단백질(WPI)을 항원으로 하고, 2.5~3 kg의 토끼(New Zealand White 종) 4마리를 실험동물로 사용하였다. 즉, 500  $\mu$ g의 항원을 멸균한 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2) 1 ml에 용해하고 동량의 Freund's complete adjuvant(Difco, U.S.A.)와 혼합하여 W/O emulsion을 만들어 토끼의 등부위에 10군데 피하주사(i.m.)하였다. 최초면역후 2주 및 6주째에 추가면역(boosting)을 실시하였다. 이때 항원의 주입량은 일차면역과 같았으나 Freund's incomplete adjuvant(Difco, U.S.A.)를 사용하였고 2주째 및 6주째는 등부위 2군데에 피하주사(s.c.) 및 양 대퇴부에 근육주사(i.m.)하였다. 마지막 면역 10일후에 마리당 50 ml씩의 혈액을 귀정맥으로부터 채취하여 이로부터 항혈청을 분리하고, 이중 가장 높은 항체가의 항혈청을 실험에 사용하였다.

### Competitive Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(cELISA)

유청단백질 가수분해물의 항원성을 실험하기 위하여, 앞에서 준비한 토끼 항WPI항혈청(rabbit anti-WPI anti-serum)을 이용하여 川瀨의 방법<sup>(11)</sup>을 변형한 cELISA를 실시하였다. 즉, 항원으로 사용한 유청단백질을 0.1 M sodium bicarbonate buffer(pH 9.5)에 0.05%의 농도로 용해하여 microplate(Nunc, Denmark)에 각 well당 100  $\mu$ l씩 분주하여 37°C에서 2시간 incubation한 후 well당 150  $\mu$ l의 0.05% Tween-20을 함유하는 PBS(PBS-Tween)로 4회 세척하였다. PBS-Tween으로 1/1,000로 희석한 항혈청과 PBS-Tween에 용해한 여러 농도의 유청단백질 가수분해물 또는 유청단백질 용액을 동량혼합하여 well당 100  $\mu$ l씩 첨가하고, 37°C에서 한시간 incubation한 다음 PBS-Tween으로 앞에서와 같이 세척하였다. 그후 sheep anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase conjugate (Boehringer Mannheim, Germany)을 PBS-Tween에 1/1,000로 희석하여 well당 100  $\mu$ l씩 주입하고 37°C에서 1시간 incubation하였다. 그 다음 1 M diethanolamine buffer(pH 9.8)에 0.1% 농도로 용해시킨 *p*-nitrophenylphosphate용액을 well당 100  $\mu$ l씩 주입하고 37°C에서 30분간 incubation한 후, 5 N NaOH를 well당 20  $\mu$ l씩 첨가하여 효소반응을 중지시키고 ELISA reader(Multiscan MCC/340P, Dynatech, U.K.)로 흡광도(405 nm)를 측정하였다. 시료 중의 항원이 well에 coating된 항원과 항체와의 결합을 저해하는 비율(inhibition rate)은 다음의 식으로 나타내었다.

Inhibition rate(%)=

$$\left[ 1 - \left( \frac{\text{시료를 처리한 well의 흡광도}}{\text{Blank well의 흡광도}} \right) \right] \times 100$$

또한, 항원성 저해도는 다음의 식과 같이 나타 내었다.

Reduction rate=

$$\frac{\text{항체의 결합을 50\% 저해하는 시료의 농도}}{\text{항체의 결합을 50\% 저해하는 표준단백질의 농도}}$$

## 결과 및 고찰

### 효소처리에 의한 유청단백질의 가수분해도

유청단백질을 chymotrypsin, trypsin, *Aspergillus oryzae* 유래의 protease, 그리고 pancreatin으로 4시간동안 처리하였을 때의 가수분해도(DH) 변화를 조사하였다 (Table 1).

또한, 각 효소의 처리시간의 경과에 따른 가수분해도의 변화는 대부분의 경우 4시간 경과시 그 가수분해도가 거의 최고에 달하였으나 pancreatin의 경우는 계속 증가하는 것으로 나타났다(data 생략).

효소의 처리에 따른 유청단백질의 가수분해도(DH)는

**Table 1. Degree of hydrolysis and Molecular weight distributions of whey protein hydrolysates(WPH)**

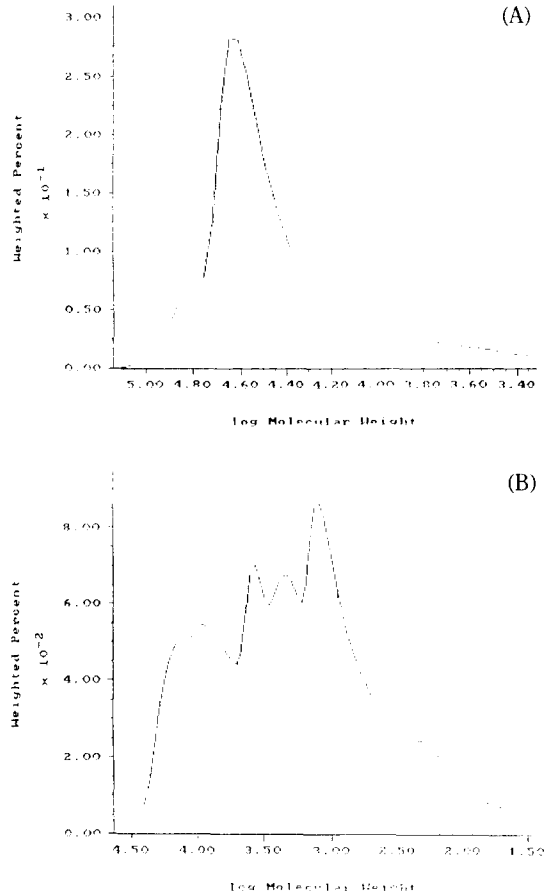
WPH	Molecular weight (dalton)				Average M.W. (dalton)	Degree of hydrolysis (%)
	>10k	10k-5k	5k-2k	<2k		
	%					
WPI	88.55	6.71	4.67	0.07	29,475	0
CUN	32.98	19.28	16.69	31.05	9,132	5.05
CUP	26.74	18.29	21.76	33.17	7,370	7.71
CDN	36.28	16.05	17.87	29.80	9,990	6.71
CDP	20.59	19.37	20.85	39.19	6,405	6.76
TUN	23.85	16.39	20.15	39.61	7,298	8.22
TUP	20.93	17.74	21.94	41.39	6,479	11.39
TDN	26.23	18.00	20.75	34.67	7,885	7.28
TDP	18.31	15.95	21.03	44.71	5,883	11.47
PUN	19.93	17.63	19.94	42.47	6,110	16.35
PUP	16.43	17.08	20.70	45.79	5,317	19.09
PDN	17.85	17.32	19.97	44.88	5,603	17.55
PDP	11.62	13.91	21.46	53.01	4,252	17.21
OUN	14.34	15.53	20.65	49.47	4,908	15.67
OUP	13.13	16.30	21.40	49.17	4,707	19.35
ODN	15.91	17.27	20.44	45.38	5,244	16.69
ODP	15.65	17.67	20.57	46.11	5,244	20.20

chymotrypsin이나 trypsin을 처리한 경우보다 *Aspergillus oryzae* 유래의 protease 및 pancreatin을 처리한 경우가 훨씬 높게 나타났다. 이는 후자의 효소들이 여러 효소의 복합체로 구성되어 있기 때문인 것으로 생각된다. 즉, *Aspergillus oryzae* 유래의 효소는 세포내에 존재하는 여러 endo- 및 exopeptidase로, 포유동물 유래의 pancreatin도 trypsin, chymotrypsin 및 여러 peptidase 등 광범위한 소화작용을 나타내는 효소로 구성되어 있어 단백질의 여러 부위를 절단할 수 있다. 따라서, 이들 효소들은 기질특이성이 강한 chymotrypsin이나 trypsin보다 유청단백질을 더 잘 분해시킨 것으로 생각된다.

다음으로, 각 효소 처리군내에서 가장 높은 DH를 나타낸 것은 pepsin으로 전처리한 경우(CUP, TDP, PDP, OUP)이었다. 이는 pepsin의 처리에 의하여 유청단백질의 내부가 밖으로 노출되므로서, 각기 다른 특이성을 가진 효소의 2차적인 접근이 가능하여졌기 때문으로 생각된다.

또한, trypsin 가수분해물을 제외하고는 열변성이나 pepsin의 전처리를 전혀 하지 않은 경우(CUN, PUN, OUN)에 DH가 가장 낮게 나타나, 일반적으로 예비로 열처리를 한 유청단백질의 효소분해가 더 용이하였다. 이는 열처리에 의한 변성으로 분자 내부에 묻혀 있던 소수성 잔기들이 외부로 노출되어 효소의 접근이 가능하게 되었기 때문으로 생각된다<sup>(12,13)</sup>.

그러나, 위에서 본 바와 같이 유청단백질의 분해특성은, 각기 특성이 다른 구성단백질에 대하여 분해특성이 각기 다른 효소의 작용에 의한 것으로서 일률적인 설명은 쉽지 않다. 또한, 기질인 유청단백질에 대한 열처리의 정도나 효소반응시 pH, 기질의 농도 등에 의하여도 영향을 받는다. 그럼에도 불구하고 효소에 의한 유청단백



**Fig. 2. Typical chromatographic analysis on HPSEC Ultrahydrogel-120/250/500 tandem column of WPI (A) and OUP which is one of whey protein hydrolysates by treatment of protease from *Aspergillus oryzae* (B).**

질의 가수분해는 열이나 pepsin으로 예비처리하므로써 더욱 높일 수 있을 것으로 나타났다<sup>(14, 16)</sup>.

**가수분해물의 peptide 분자량분포 및 쓴맛의 평가**

효소반응 4시간후 각 가수분해물의 peptide분포를 HPSEC에 의하여 분석하였다. 이때의 대표적인 chromatogram으로서 분해전(WPI)과 가장 분해가 심한 ODP의 경우를 Fig. 2A, 2B에 각각 나타내었다. 또한 이들의 결과를 정리하여 Table 1에 나타내었다.

대조구인 WPI의 경우 분자량 10 kDa 이상의 폴리펩타이드는 88.55%였고 평균분자량은 29,475 dalton이었다. 유청단백질 가수분해물의 경우는 가수분해 방법에 따라 차이가 있었는데 10 kDa 이상의 폴리펩타이드가 차지하는 비율은 그 범위가 11.62~36.28%였고 평균분자량의 범위는 4,252~9,132 dalton으로 나타났다.

유청단백질에 2차로 처리한 효소가 포유동물 유래의 것

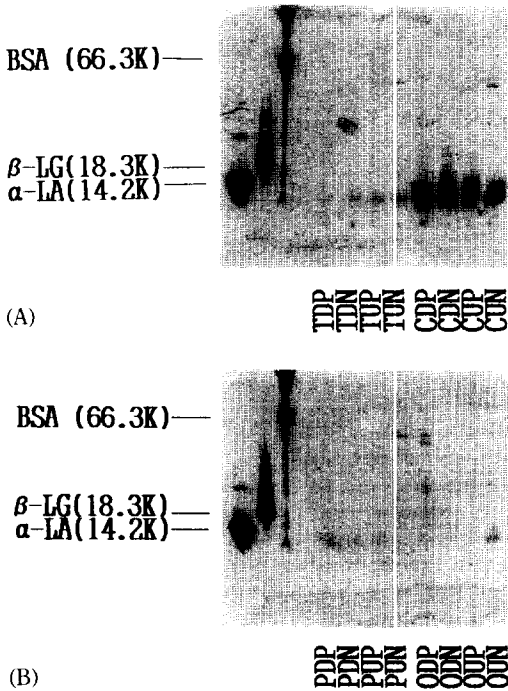


Fig. 3. SDS-PAGE patterns of whey protein hydrolysates by treatment of trypsin(T), chymotrypsin(C), pancreatin(P), and protease from *Aspergillus oryzae*(O).

(chymotrypsin, trypsin 및 pancreatin)인 경우는 전처리 방법에 따라 10 kDa 이상의 폴리펩타이드 비율 및 평균분자량에서 비교적 큰 차이를 보였으나, *Aspergillus oryzae* 유래의 효소를 처리한 경우는 그 차이가 그다지 크지 않았다.

유청단백질 가수분해물의 평균분자량 분포는 예비열처리에 의하여 일정한 영향을 받지 않았으나, pepsin의 전처리에 의해서는 거의 대부분이 그 평균분자량이 더 작아지는 것으로 나타났다. 또한 가수분해물의 펩타이드 분자량 분포와 가수분해도간에는 대체로 음의 상관성이 있는 것으로 나타났다( $r = -0.875$ ).

통상 단백질의 가수분해에 의하여 쓴맛 펩타이드가 생성되는데 이는 특히 치즈제조시 카세인 펩타이드에서 잘 보고되어 있다. 이 쓴맛은 통상 2~23개의 아미노산 잔기로 구성된 펩타이드에서 나타나며 일반적으로 소수성을 함유하고 있다<sup>(16)</sup>. 본 연구에서 준비한 유청단백질 가수분해물의 경우 평균 펩타이드 길이(M.W./110)는 38~83개의 아미노산으로 나타났으나, 2 kDa 이하의 peptide 비율이 30~50%로 나타나 쓴맛에 대한 검토가 필요하였다. 실험방법에 명시한 바와 같이 5% 가수분해물 용액에 대하여 쓴맛 관능검사를 실시한 결과 모든 처리에서 쓴맛평가가 0로 나타나 쓴맛 펩타이드는 그다지 생성되지 않음을 알 수 있었다. 따라서 식품소재로 상기의 가수분해물을 사용하여도 쓴맛의 문제는 없는 것으로

나타났다.

#### 유청단백질 가수분해물의 전기영동적 특성

일반적으로 native protein은 peptide보다 항원성이 높기 때문에 가수분해물중에 native protein이 존재하는지를 조사할 필요가 있다. 효소반응 4시간후의 각 가수분해물의 SDS-전기영동도를 Fig. 3A와 3B에 나타내었다.

Chymotrypsin의 처리시는 CUN의 경우 BSA의 약간 아래쪽과  $\alpha$ -LA부근에 band가 존재하였고 분자량 14.2 kDa 이하의 펩타이드가 많이 생성되었음을 알 수 있었다. 그리고 CUP, CDN 및 CDP 에서는 BSA부근의 band가 보이지 않은 점 이외는 CUN의 경우와 유사한 전기영동도를 나타내었다.

그리고 trypsin 가수분해물은 chymotrypsin의 처리시에 비하여 가수분해의 정도가 심한 것을 알 수 있었으며, TUN의 경우 BSA의 약간 아래쪽에 band가 존재하였고 작은 크기의 펩타이드가 소량 확인되었다. TUP와 TDN에서는 펩타이드 band가 소량 존재하였으나 TDP 에서는 그 band가 거의 나타나지 않았다.

Pancreatin 가수분해물의 PUN의 경우 BSA의 약간 아래쪽 band가 확인되었으나 그보다 작은 분자량의 band는 거의 보이지 않았고, PUP, PDN 및 PDP에서는 작은 분자량의 펩타이드 band만 소량 존재하였다.

*Aspergillus oryzae* 유래의 효소에 의한 가수분해물의 경우, OUN에서는  $\alpha$ -LA부근의 band가 소량 존재하며, OUP와 ODN에서는 band가 거의 존재하지 않았으나 ODP에서는 BSA의 약간 아래쪽에(66.3~18.3 kDa)에 몇 개의 band가 존재하였다.

이와 같이 펩타이드들이 완전히 해리된 조건에서 행한 SDS-PAGE에서 분자량 14.2 kDa 이상의 폴리펩타이드는 일부 처리구서 소량 존재하기도 하였으나 native protein은 대부분 제거되었음을 확인할 수 있었다.

#### 유청단백질 가수분해물의 항원성

일반적으로 단백질 또는 그 가수분해물의 항원성을 조사하는 데는 특이항체에 의한 항체항원반응을 이용한다. 그 대표적인 방법으로 ELISA 및 PCA test가 있는데, 전자에 의하여 monovalent 항원성을, 후자에 의하여 polyvalent 항원성을 알 수 있다. 본 연구에서는 유청단백질 가수분해물의 항원성의 변화를 조사하기 위하여 우선적으로 cELISA에 의한 항WPI 항혈청(항체)과 가수분해물의 반응성을 검토하였다.

우선 방법에 명시된 조건하에서 항체의 결합을 50% 저해하는 표준단백질(WPI)의 농도는 약  $10^{0.5}$   $\mu\text{g/ml}$ 이었다(Fig. 4). 항체의 결합을 50% 저해하는 chymotrypsin 가수분해물의 농도는 CUN, CUP, CDN 그리고 CDP의 경우 각각  $10^{3.1}$ ,  $10^{2.9}$ ,  $10^{2.2}$  및  $10^{4.3}$   $\mu\text{g/ml}$  가량으로 나타났으며(이들의 대수평균값은 약  $10^{3.1}$   $\mu\text{g/ml}$ ), 이들 값을 항체의 결합을 50% 저해하는 WPI의 농도인  $10^{0.5}$   $\mu\text{g/ml}$ 으로 나눈 수치로부터 가수분해물의 항원성이 약  $10^{1.7}$

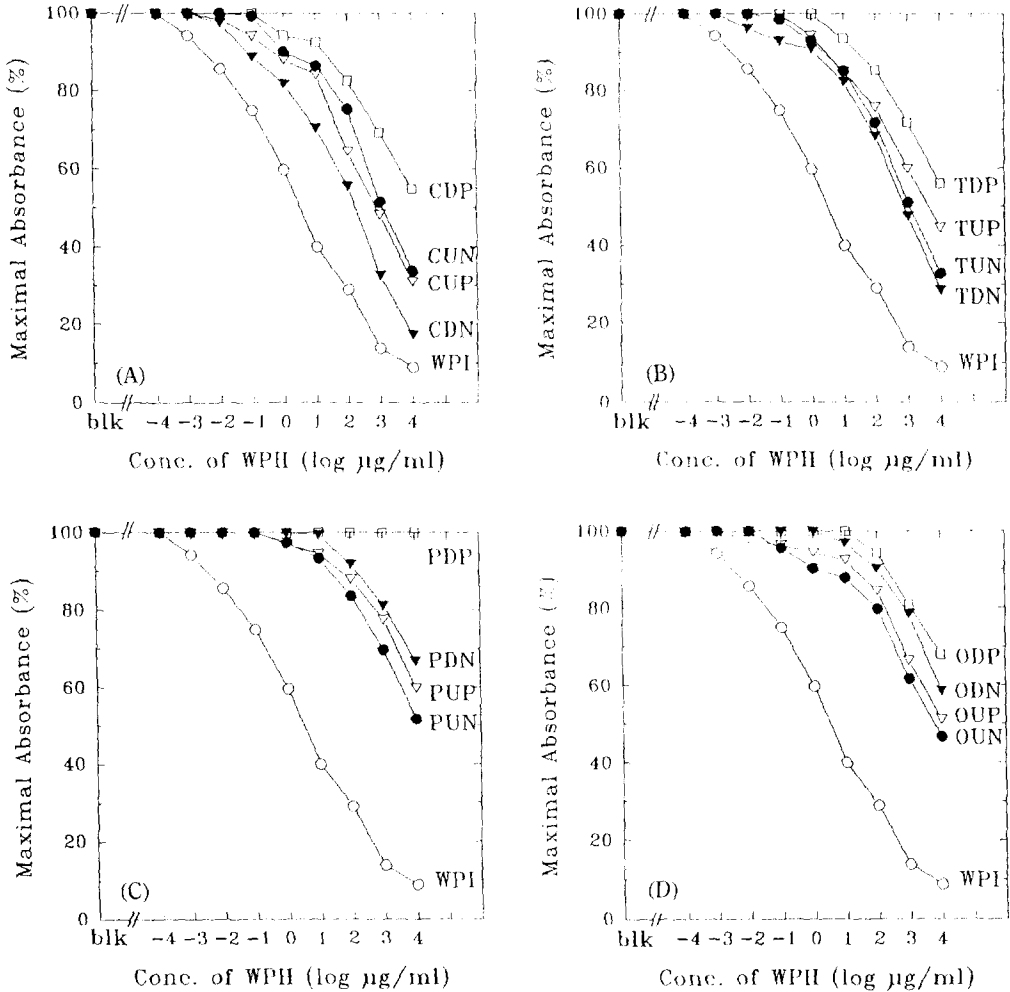


Fig. 4. Inhibition analyses of binding between rabbit anti-WPI antiserum and whey protein hydrolysates by treatment of trypsin(T), chymotrypsin(C), pancreatin(P), and protease from *Aspergillus oryzae*(O).

~ $10^{3.8}$ 배 감소되었음을 알 수 있었다(Fig. 4A). Trypsin 가수분해물의 경우 항체의 결합을 50% 저해하는 TUN, TUP, TDN 그리고 TDP의 농도는 각각  $10^{3.1}$ ,  $10^{3.6}$ ,  $10^{2.9}$  및  $10^{4.4}$  µg/ml 가량으로 나타나 이들 가수분해물의 항원성은  $10^{2.4}$ ~ $10^{3.9}$ 배 감소하였음을 알 수 있었다(Fig. 4B). Pancreatin 가수분해물의 경우 항체의 결합을 50% 저해하는 PUN, PUP, PDN 그리고 PDP의 농도는 각각  $10^{4.1}$ ,  $10^{4.5}$ ,  $10^{5.1}$  및 ∞ µg/ml 가량으로 나타나 이들 가수분해물의 항원성은  $10^{3.6}$ 배 이상 감소하였음을 알 수 있었으며, PDP의 항원성은 거의 상실된 것으로 나타났다(Fig. 4C). *Aspergillus oryzae* 유래의 효소에 의한 가수분해물의 경우 항체의 결합을 50% 저해하는 OUN, OUP, ODN 그리고 ODP의 농도는 각각  $10^{3.8}$ ,  $10^{4.1}$ ,  $10^{4.5}$  및  $10^{5.4}$  µg/ml 가량으로 나타나 이들 가수분해물의 항원성은  $10^{3.3}$ ~ $10^{4.9}$ 배 감소하였음을 알 수 있었다(Fig. 4D).

각 처리군내에서는 열 및 pepsin으로 전처리한 다음 효소분해한 유청단백질 가수분해물(CDP, TDP, PDP, ODP)의 경우 그 항원성이 가장 낮았다. 또한 이들의 가수분해정도(DH)는 처리군내에서 가장 높은 것도 있으나(TDP, ODP) 그렇지 않은 것도 있어(CDP, PDP) DH와 항원성간에는 명확한 상관성을 보이지는 않았다. 마찬가지로 평균분자량과 항원성간에도 같은 경향을 나타내어 평균분자량의 크기가 작은 가수분해물의 항원성이 반드시 작지는 않았다.

그러나 효소처리간에는 pancreatin과 *Aspergillus oryzae* 유래의 효소에 의한 가수분해물의 경우 나머지 두 경우보다 항원성의 저하가 급격한 경향을 나타내어, 대체로 가수분해가 많이 일어난 분해물의 항원성이 낮아지는 것으로 나타났다.

이상의 결과로부터 항WPI 항혈청에 의한 cELISA로

monovalent 항원성을 검토하였을 때, 유청단백질 가수분해물은 효소분해에 의하여 항원성이 상당히 감소되었으며 특히 PDP의 경우 항원성이 거의 나타나지 않음을 알 수 있었다.

## 요 약

효소에 의한 단백질분해가 유청단백질의 항원성의 저하에 미치는 영향을 조사하기 위한 기본연구로서, 유청단백질의 가수분해특성을 조사하고 competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay(cELISA)에 의한 항원성의 변화를 검토하였다. 유청단백질의 가수분해는 chymotrypsin, trypsin, pancreatin, 그리고 *Aspergillus oryzae* 유래의 protease를 각기 4시간 동안 행하였다. TNBS(trinitrobenzensulfonic acid)법에 의하여 측정된 유청단백질의 가수분해도(DH)는 chymotrypsin이나 trypsin을 처리한 경우(5.05~11.47)보다 *Aspergillus oryzae* 유래의 protease 및 pancreatin을 처리한 경우(15.67~20.20)가 훨씬 높게 나타났으며, 각 효소의 처리전에 열처리(75°C, 20분)나 pepsin의 처리를 한 경우에 대체로 약간 높게 나타났다. High performance size exclusion chromatography(HPSEC)에 의하여 분자량분포를 조사한 결과, 가수분해물에 따라 10 kDa 이상의 polypeptide가 12~36% 정도 존재하였고, 평균분자량은 4,252~9,132 dalton, 평균길이는 아미노산 38~83개로 나타났다. 또한 쓴맛은 형성되지 않았다. SDS-PAGE의 결과 처리구에 따라 분자량 14.2 kDa 이상의 polypeptide가 일부 존재하였으나 native 유청단백질은 대부분 가수분해에 의하여 제거되었음을 확인하였다. 토기 항WFI항형체에 의한 cELISA로 검토한 유청단백질 가수분해물의 monovalent 항원성은 효소처리에 의하여 약  $10^{-1.7}$ ~ $10^{-4.9}$ 배 또는 그 이하로 저하되었으며 대체로 가수분해가 많이 일어난 분해물은 그 항원성이 낮아지는 것으로 나타났다. 또한 각 처리구내에서는 열 및 pepsin의 전처리후 다음 효소분해한 유청단백질 가수분해물(CDP, TDP, PDP, ODP)의 경우 그 항원성이 가장 낮았다. 그중에서도 pancreatin 가수분해물(PDP)의 경우 항원성이 거의 상실된 것으로 나타났다.

## 문 헌

- Anderson, S.A., Chinn, H.I. and Fisher, K.D.: History and current status of infant formula. *Am. J. Clin. Nutr.*, **35**, 381(1982)
- Jakobsson, I.T., Lindberg, T. and Benedikson, B.: *in vitro* digestion of cow's milk proteins by duodenal juice from infant with various gastrointestinal disorder.

- J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **1**, 183(1982)
- Jost, R.: Physicochemical treatment of food allergy, In *Food Allergy*. Nestle Nutrition workshop series vol. 17.(Schmidt, E. Ed.) Raven Press, New York, p.187 (1988)
- Soothill, J.F.: Predisposing to food allergy. In *The immunology of infant feeding* (Wiekinson, A.W. Ed.), Plenum Press, New York, p.63(1981)
- Asselin, J., Hebert, J. and Amiot, J.: Effect of *in vitro* proteolysis on the allergenicity of major whey protein. *J. Food Sci.*, **54**, 1037(1989)
- Fushiki, T., Yamamoto, N., Naeshiro, I. and Iwai, K.: Digestion of  $\alpha$ -lactalbumin in rat gastrointestinal tracts. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 95(1986)
- Okamoto, M., Hayashi, R., Enomoto, A., Kaminogawa S. and Yamauchi, K.: High pressure proteolytic digestion of food proteins: Selective elimination of  $\beta$ -lactoglobulin in bovine milk whey concentrate. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1253(1991)
- Pahud, J.J., Monti, J.C. and Jost, R.: Allergenicity of whey protein: Its modification by tryptic *in vitro* hydrolysis of the protein. *J. Gastroenterol. Nutr.*, **4**, 408 (1985)
- Alder-Nissen, J.: *Enzymic hydrolysis of food proteins*, Elsevier Applied Science Publishers, New York (1986)
- Alder-Nissen, J.: Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 1256(1979)
- 川瀬興三: 牛乳蛋白質への酵素利用. 酪科・食研, **39** (6): A-283(1990)
- de Witt, J.N. and Klaarenbeek, G.: Effect of various heat treatments of structure and solubility of whey proteins. *J. Dairy Sci.*, **67**, 2701(1984)
- Ribadeau-Dumas, B.: Structure and variability of milk proteins, In *Milk proteins: nutritional, clinical, functional and technological aspects* (Barth, C. and Schlimme, E. Eds.), Springer-Verlag, New York (1988)
- Antila, p.: *In vitro* digestion of bovin milk proteins by trypsin hydrolysis and pH-stat analysis, In *Milk proteins: Nutritional, clinical, functional and technological aspects* (Barth, C. and Schlimme, E. Eds.) Springer-Verlag, New York, p.223(1988)
- Porter, D.H., Swaisgood, H.E. and Catignani, L.: Characterization of an immobilized digestive enzyme system for determination of protein digestibility. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 334(1984)
- Rotrhenbuhler, E. and Kinsella, J.E.: The pH-stat method for assessing protein digestibility: An evaluation. *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 433(1985)
- Nakamura, T., Syukuunobe, Y., Doki, R., Hirano, K. and Itoh, H.: Production of peptide mixture from milk casein by enzymatic hydrolysis. *Nippon Kogyo Gc<sup>o</sup>-bashi*, **38**, 377(1991)

(1993년 11월 25일 접수)