

卵白단백질에 대한 감마선 조사의 영향

임성일* · 육홍선 · 윤혜현** · 김영지*** · 변명우†

한국원자력연구소 방사선식품공학연구팀, *한국식품개발연구원 생물공학연구부
충남대학교 식품영양학과, *영남전문대학 식품영양과

Effect of Gamma Irradiation on Egg White Protein

Seong-Il Lim*, Hong-Sun Yook, Hye-Hyun Yoon**, Yeung-Ji Kim*** and Myung-Woo Byun†

Dept. of Food Irradiation, Korea Atomic Energy Research Institute, Taejeon 305-600, Korea

*Div. of Food Biotechnology, Korea Food Research Institute, Seongnam 463-420, Korea

**Dept. of Food and Nutrition, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea

***Dept. of Food Science and Nutrition, Yeungnam Junior College, Taegu 705-037, Korea

Abstract

The ovalbumins obtained from hen's and duck's egg white were irradiated with up to 100 kGy at room temperature. The purified proteins were evaluated for their *in vitro* digestibility by incubating successively with pepsin and pancreatin conjugate. Amino acid compositions and SDS-PAGE pattern in these proteins were also analyzed. The obtained results indicated that gamma irradiation within the tested dose range (up to 100 kGy) produced no statistically significant changes in the *in vitro* digestibility and amino acid compositions. Analysis of gamma-irradiated ovalbumins by SDS-PAGE revealed radiolysis of ovalbumin into proteins or peptides of low molecular weights.

Key words: ovalbumins, gamma irradiation, *in vitro* digestibility, SDS-PAGE

서 론

1980년 방사선 조사식품의 건전성에 대해 FAO/IAEA/WHO의 합동전문가위원회(JECFL)에서는 10kGy 이하의 선량으로 조사된 식품은 독성이 없기 때문에 더 이상의 독성실험이 필요없으며 특별한 영양학적, 미생물학적인 문제가 없다고 보고한 바 있다(1,2). 그 후 세계 각국에서 방사선 식품조사가 허가되어 실용화되기 시작하였고, 현재는 고선량(10~70kGy) 조사에 의한 육제품의 보존, 식품의 무균화 등의 실용화 연구가 진행되고 있다. 지금까지 방사선 조사식품의 건전성에 관하여 기초적, 실용적 차원에서 많은 연구가 이루어져 왔으나 고선량으로 방사선 조사된 식품의 영양성이나 특수한 경우에서의 건전성에 관한 검토는 아직 부족한 실정이다. 특히 단백질이 주성분인 식품에 고선량의 방사선을 조사할 경우, 생성된 라디칼이 연쇄반응을 일으켜 단백질분자가 고분자화 또는 단편화되고(3-7), 수분을 높게 함유한 경우에는 물분자로부터 생성된 hydroxyl rad-

ical(OH·)에 의해 단백질을 구성하는 아미노산과 각종 결합이 생성된다(8). 예를 들면, 반응성이 높은 아미노산의 하나인 phenylalanine은 orthotyrosine, metatyrosine을 생성한다(9). 이와 같이 고선량의 방사선 조사는 단백질의 구조변화나 구성아미노산의 화학적 변화를 일으켜 단백질의 영양면이나 안전성에 영향을 미칠 것으로 예상된다. 방사선 조사식품의 소화성에 관해서는 지금까지 몇가지 모델 peptide를 이용한 각종 단백질분해효소의 반응성을 검토해 왔지만 영양학적 건전성의 견지에서 볼 때 실제적인 내용은 아니다.

한편, 최근 난류에 오염된 균, 특히 *Salmonella enteritidis*에 의한 식중독이 세계 각국에서 문제가 되고 있는 시점에서 감마선 조사기법은 이러한 식중독균의 제거에 매우 효과적인 방법으로 대두되고 있다. 이러한 관점에서 1990년부터 프랑스에서는 난류에 감마선 조사(4kGy)가 허용되고 있으며 조사된 난백 단백질에 대한 안전성 및 영양학적 연구가 계속되어 오고 있다(10-12).

이에 본 연구에서는 계란과 오리알로부터 정제된 ov-

† To whom all correspondence should be addressed

albumin을 대상으로 10kGy에서 100kGy의 고선량의 감마선을 조사하여 이들의 몇가지 단백질 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

Ovalbumin의 정제

계란 및 오리알은 충북 홍성의 민간농장에서 산란지 후 구입하여 본 실험에 사용하였다. 난으로부터 ovalbumin의 정제는 난백에 100ml의 포화(NH₄)₂SO₄를 첨가하여 1시간 방치 후 원심분리(13,000rpm, 10min)한 상등액 100ml에 7ml의 (NH₄)₂SO₄를 재차 첨가하고 0.2N H₂SO₄로 pH를 4.85로 조정하여 각각 1시간 동안 진탕 및 정치한 후 재원심분리(13,000rpm, 10min)하였다. 원심분리한 침전물은 30ml의 증류수에 용해하여 투석, 동결건조한 다음 이를 ovalbumin 시료로 사용하였다.

방사선 조사

시료의 방사선 조사는 실온에서 선원 10만 Ci, Co-60 감마선 조사시설을 이용하여 분당 71.5Gy의 선량률로 10, 30, 100kGy의 범위의 총 흡수선량을 얻도록 하였으며, 흡수선량 확인은 ceric cerous dosimeter(USA)를 사용하였고 총 흡수선량 오차는 ±0.2kGy였다.

SDS-PAGE 패턴비교

Polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)은 Laemmli(13)의 방법에 준하여 실시하였다. 이때 stacking gel과 separating gel의 농도는 각 4.5%, 12.5%이었으며, 전기영동은 20mA에서 50분간 행하였다.

아미노산 조성분석

감마선 조사 및 비조사된 각 시료의 총 아미노산 함량은 시험관(2×20cm)에 시료 50mg과 6N HCl 10ml를 가하고 질소충진 후 15 lb, 121°C에서 3시간 가수분해한 다음 Whatman filter paper No. 2와 membrane filter (0.45μm)로 각각 여과한 후 cartridge C₁₈을 사용하여 지방질과 색소를 제거하고 아미노산 자동분석기(Hitachi model 835, Japan)로 분석하였다.

인공소화물

인공소화에는 Sigma사로부터 구입한 pepsine, pancreatin을 이용하였다. 이때의 소화방법은 Fig. 1과 같다(14). Pepsin-pancreatin 소화물을 trichloroacetic acid

Dried sample(100mg)

pepsin digestion
0.1N HCl(15ml), pepsin(1.5mg)
37°C for 24hr. with occasional shaking
neutralized with 0.2N NaOH
pancreatin digestion
7.5ml of pancreatin solution*

TCA(final concentration at 6%,v/v)
centrifugation at 15,000rpm for 1hr.

Precipitate

(TCA insoluble)

TCA total N determination

Supernatant

(TCA soluble)

Total N, NH₂ determination

Fig. 1. Procedure of pepsin-pancreatin digestion test.

*Supernatant of pancreatin(67mg) suspended in 0.1M phosphate buffer, pH 8.0(100ml)

(TCA) 불용성물 및 가용성물로 분획하였으며 각각의 분획은 Kjeldahl법에 의해 총 질소량을 정량하여 소화율을 산출하였다.

총 질소량에 의한 소화율(%)

$$= \frac{\text{TCA 가용성분획물 중의 질소량}}{\text{총 질소량}} \times 100$$

결과 및 고찰

SDS-PAGE패턴 비교

난으로부터 분리한 ovalbumin의 정제여부를 확인하기 위해 전기영동한 결과, 계란이나 오리알 모두 정제 ovalbumin은 분자량 45,000에서 주밴드가 검출되었으나, 오리알에서는 분자량 약 70,000에서 약한 밴드가 검출되어 약 95% 이상의 순도로 정제되었음이 확인되었다(Fig. 2). 정제된 이들 ovalbumin의 감마선 조사에 따른 변화는 Fig. 3과 같다. 감마선 조사선량의 증가와 더불어 peptide 결합이 절단됨으로서 단백질의 저분자화가 일어났으며, 특히 100kGy 조사선량에서는 그 정도가 심하였다. 단백질의 방사선에 의한 분해반응으로는 탈아미노, 탈탄산, SH기의 산화, S-S 결합의 분해, 아미노산잔기의 수식, peptide 결합의 분해나 중합 등을 들 수 있으며(15), Kume(16)는 10kGy, 50kGy의 선량으로 조사된 난백단백질의 절단된 peptide fragment를 면역화학적 방법으로 확인한 바 있다. 이와 같은 반응이 식품단백질의 생리적 기능이나 가공특성에 미치는 영향은 지금까지 밝혀지지 않았으며, 또한 고선량 조사된 ovalbumin의 SDS-PAGE 패턴의 차이로부터 감마선 조사에 의해 단백질구조상에 변화가 일어났다는 것이

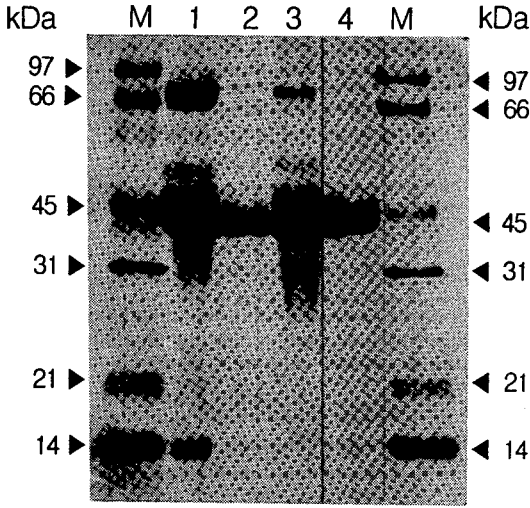


Fig. 2. SDS-PAGE of ovalbumins purified from hen's and duck's egg white. M, molecular weight markers; lane 1, hen's egg white; lane 2, ovalbumin purified from hen's egg white; lane 3, duck's egg white; lane 4, ovalbumin purified from duck's egg white.

시사되어 이러한 변화가 인체에 어떠한 영향을 미칠 것인가에 대해서는 앞으로 수행되어야 할 연구과제이다.

아미노산 조성 및 인공소화계에서 소화율의 변화 감마선 조사에 의한 ovalbumin의 단백질을 구성하는

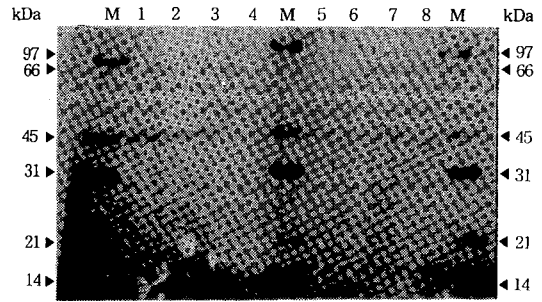


Fig. 3. SDS-PAGE patterns of hen's and duck's egg white ovalbumins irradiated with up 100kGy. M, molecular weight markers; lane 1 and 5, 0kGy; lane 2 and 6, 10kGy; lane 3 and 7, 30kGy; lane 4 and 8, 100kGy. Lane 1~4 are ovalbumins from hen's egg white. Lane 5~8 are ovalbumins from duck's egg white.

아미노산 조성 변화는 Table 1과 같다. 일반적으로 식품단백질은 가공·저장과정에 있어 그 구성아미노산, 특히 methionine이 가장 손상을 받기 쉬우며, 그 다음으로 lysine, histidine, tryptophane으로 알려져 있다(17). 그러나 본 실험의 결과, 100kGy까지의 감마선 조사는 tryptophane, threonine, valine, methionine, isoleucine과 phenylalanine 등의 필수아미노산 또는 tyrosine 등의 방향족 아미노산들의 변화는 없는 것으로 나타났다. Yasumoto 등(18)은 ovalbumin에 500kGy 선량까지 감마선을 조사하여 아미노산 조성 변화를 검토한 결과 250kGy까지는 아미노산 조성의 변화가 없었으나 500kGy

Table 1. Amino acid compositions of hen's and duck's egg white ovalbumins irradiated with up to 100kGy (unit : %)

Amino acid	Irradiation dose (kGy)							
	0		10		30		100	
	H ¹⁾	D ²⁾	H	D	H	D	H	D
Asp	6.296	5.272	6.151	5.448	6.241	5.526	6.351	5.455
Glu	9.673	8.874	9.717	8.907	9.548	8.903	9.550	9.067
His	6.252	6.498	6.062	6.402	6.017	6.680	6.123	6.569
Ser	5.795	4.730	5.827	4.732	5.783	4.692	5.666	4.691
Arg	7.340	6.572	7.306	6.561	7.272	6.203	7.220	6.360
Gly	5.165	4.593	5.041	4.652	5.110	4.970	5.163	4.786
Thr	2.662	3.716	2.869	3.762	2.509	3.857	2.493	3.822
Ala	5.108	4.641	5.372	4.555	5.265	4.596	5.275	4.631
Tyr	2.532	3.182	2.376	3.181	2.521	3.042	2.924	3.173
Met	3.634	7.126	3.600	7.039	3.641	6.959	3.672	6.955
Val	2.275	1.782	2.196	1.750	2.083	1.868	2.128	1.744
Phe	6.152	7.909	6.141	7.873	6.589	7.715	6.233	7.744
Ile	2.575	1.745	2.679	1.790	2.421	1.788	2.485	1.639
Leu	5.065	5.235	5.289	5.209	5.200	5.169	5.120	5.166
Lys	15.695	12.439	15.689	12.415	16.003	12.406	15.853	12.574
Total	86.219	84.313	86.314	84.276	86.203	84.374	86.255	84.376

¹⁾H: hen's egg white ovalbumin, ²⁾D: duck's egg white ovalbumin

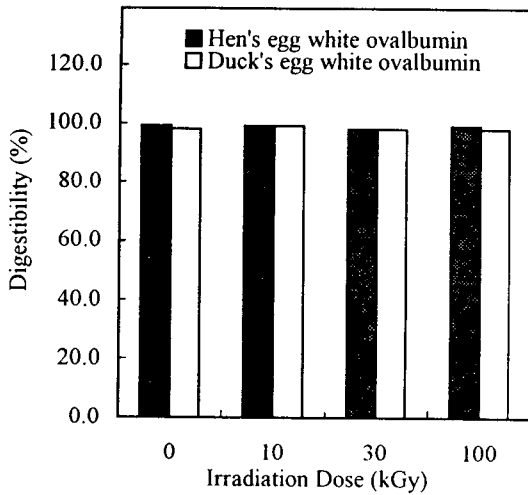


Fig. 4. Digestibility of gamma irradiated-hen's and duck's egg white ovalbumins by pepsin-pancreatin system as assessed from TCA-soluble-N.

의 고선량 조사군에서는 tyrosine, lysine, histidine이 유의적으로 감소하였다고 하였으며, Katusin-Razen 등 (19)은 10kGy로 조사된 난황분말의 아미노산 조성은 비조사된 것과 유의적인 차이가 없었다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사하였다. 본 실험의 이러한 결과는 건 조상태에서 감마선 조사된 시료에 대한 것이므로 앞으로 단백질이 변화를 받기 쉬운 수용액 혹은 수분을 높게 함유한 상태에서의 검토가 필요할 것으로 생각된다.

실온에서의 TCA 가용성 질소량으로 평가한 계란과 오리알 ovalbumin의 감마선 조사선량에 따른 소화율 변화에서는 100kGy까지의 조사선량으로도 소화율에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 4). 그러나 방사선 조사에 의해 생성되는 휘발성 물질유래의 조사취 등은 기호적 측면에서 방사선 조사식품의 수용성을 검토하는데 있어서 중요한 요인으로 생각된다(20,21).

요 약

계란과 오리알로부터 ovalbumin을 분리·정제하고 실온에서 0에서 100kGy까지의 감마선을 조사하여 비 조사군과의 *in vitro* 소화율, 아미노산 조성 및 SDS-PAGE 패턴변화를 비교분석하였다. 100kGy까지의 감마선 조사는 소화율 및 아미노산 조성에 있어서 비조사군과 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. SDS-PAGE 패턴에서 10kGy조사는 거의 변화가 없었으나 30kGy에서는 약 20%, 100kGy에서는 약 80%의 단백질이 분해되는 것으로 나타나 감마선 조사선량의 증가에 따라 단백질의 저분자량화가 일어났음이 시사되었다.

감사의 글

이 논문은 1997년도 과학기술처 원자력연구개발과제의 연구비에 의해 수행된 연구결과의 일부로, 그 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Food Irradiation Newsletter : IAEA, Vienna, September(1987)
2. Department of Health and Human Services : Irradiation in the production, processing, handling of food. FDA 21 CFR part-179 Federal Register, 51, 13376, April 18(1986)
3. 川岸舜朗 : 食品成分의 相互作用(並木滿夫, 松下雪郎編). 講談社, p.33(1989)
4. Didiehl, J. F. : Safety of irradiated foods. Marcel Dekker, Inc., New York, p.62(1990)
5. El-Moneim, A., Afify, M. R. and Shousha, M. A. : Effect of low-dose irradiation on soybean protein solubility, trypsin inhibitor activity, and protein patterns separated by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 810(1988)
6. Krumhar, K. C. and Berry, J. W. : Effect of antioxidant and conditions on solutions. *J. Food Sci.*, 55, 1127 (1990)
7. le Maire, M., Thauvette, L., de Foresta, B., Biel, A., Beauregard, G. and Totier, M. : Effects of ionizing radiations on proteins. Evidence of nonrandom fragmentations and a caution in the use of the method for determination of molecular mass. *Biochem. J.*, 267, 431(1990)
8. Simic, M. G. : Radiation chemistry of amino acids and peptides in aqueous solutions. *J. Agric. Food Chem.*, 26, 6(1978)
9. Kaur, J., Fagerheim, I., Grootveld, M., Puppo, A. and Halliwell, B. : Aromatic hydroxylation of phenylalanine as an assay for hydroxyl radicals : Application to activated human neutrophils and to the heme protein leghemoglobin. *Anal. Biochem.*, 172, 360(1988)
10. Imai, C., Kurihara, K. and Umezawa, T. : Egg and Salmonella. *New Food Indust. Jpn.*, 35, 81(1993)
11. Kume, T. and Ishigaki, I. : Functional molecular size of trypsin inhibitors as determined by radiation inactivation analysis. *Biochem. Biophys. Acta.*, 914, 101 (1987)
12. Kume, T., Sato, Y. and Umamoto, Y. : Effect of γ -irradiation on egg white lysozyme in aqueous solution. *Nihon Nougakagaku Kaishi.*, 47, 549(1973)
13. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680(1970)
14. Matoba, T., Doi, E., Yonezawa, D., Osre, R. and Nair, B. M. : An approach to assessing the gastro-intestinal digestion of rice and wheat proteins: Use of a model system with pepsin, pancreatin and intracellular peptidases. *Agr. Biol. Chem.*, 46, 465(1982)

15. Matoba, T., Yoshida, H. and Yonezawa, D. : Changes in casein and egg albumin due to reactions with oxidizing methyl linoleate in dehydrated systems. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 979(1982)
16. Kume, T. : Immunochemical identification of irradiated chicken eggs. *J. Sci. Food Agric.*, **65**, 1(1994)
17. 久米民和 : Radiolytic products(放射線分解生成物)について. *食品照射*, **22**, 1(1987)
18. Yasumoto, K., Ueda, M. and Suzuki, T. : Evaluation of γ -irradiation on nutritional quality of protein foods. The Food Irradiation Research Committee, The Japan Radioisotope Association, p.51(1992)
19. Katusin-Razen, B., Razem, D., Matic, S., Mihokovic, V., Kostromin-Soos, N. and Milanovic, N. : Chemical and organoleptic properties of irradiated dried whole egg and egg yolk. *J. Food Prot.*, **52**, 781(1989)
20. Hansen, T. J., Chen, G. and Shieh, J. J. : Volatiles in skin of low dose irradiated fresh chicken. *J. Food Sci.*, **52**, 1180(1987)
21. Wick, E. L., Murray, E., Mizutani, J. and Koshika, M. : Irradiation flavour and the volatile components of beef. In Radiation Preservation of Food, P. 12. Advances in Chemistry Series 65. Washington D.C., USA: American Chemical Society(1967)

(1997년 11월 19일 접수)