

주요 농산물(콩, 옥수수, 감자, 밀 등)내 한국인 고유의 알레르겐 규명 및 항알레르기성 농산물 검색

- Identification of major allergens and anti-allergenic foods among the homemade agricultural products -

연구기관 : 아주대학교 의과대학

농 립 부

연구개발보고서

과 제 명	(국문) 주요 농산물(콩, 옥수수, 감자, 밀 등)내 한국인 고유의 알레르겐 규명 및 항알레르기성 농산물 검색 (영문) Identification of major allergens and anti-allergenic foods among the homemade agricultural products				
주관연구기관	아주대학교 의과대학		총괄연구 책임자	(소속) 아주의대 내과	
참여기업	백제 인터내셔널			(성명) 박해심	
총연구개발비 (240,000천원)	계	240,000	총연구기간	2004.5.25.~2006.05.24.(2년)	
	정부출연금	180,000	총참여 연구원수	총인원	5
	기업부담금	60,000		내부인원	2
	연구기관부담금	(39,840)		외부인원	3
<p>○ 연구개발 목표 및 내용</p> <p>한국인 알레르기 환자들의 주요 식품 알레르겐을 우리 농산물을 대상으로 분류하고 확인된 알레르겐의 생체내/실험실적 방법을 이용하여 알레르기 증상과 주요 알레르겐 성분을 검출하고, 생체내 환경 또는 열, 위액, 장액과 같은 외부 영향에 따른 알레르겐 성분의 변화를 관찰하여, 음식물 가공효과에 따라서 알레르겐 성분의 변화를 관찰함으로써 “저알레르기 식품의 개발”을 위한 기초 자료를 마련하고자 하였다. 또한 섭취량이 빈번한 우리 농산물 중에서 항알레르기 효과를 지닌 식품을 검색하기 위해 실험실적 방법으로 비반세포를 이용한 실험을 통해 검색하고, 생체 동물 모델에서 항알레르기 효과를 검증하여, 조정제 및 부분 분자 특정화를 거쳐 조추출된 농산물을 이용하여 항알레르기 효과가 있는 우리 농산물 식품의 개발과 실용화 가능성을 탐색하였다.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 한국인에게 알레르기를 일으키는 농산물 식품에 대한 조사 - 한국인 환자들에게서 주요 농산물에 대한 항원을 제조하여 알레르기 피부반응검사 - 한국산 식품 알레르겐을 분류와 한국 고유의 식품 알레르겐 규명 - 실험실내 방법으로 비반세포주를 이용한 식품 중에서 항알레르기 효과를 지닌 우리 농산물 검색 - 항알레르기 성상을 지닌 음식물 알레르기 동물모델 정립 - 농산물 내 항알레르기 효과 검증을 위한 면역학적 검사법 확립 - 동물 모델을 이용한 항알레르기 식품 검색 - 항알레르기 식품 개발을 위한 가공법 개발 - 식품 가공 효과에 대한 농산물내 알레르겐 성상의 변화 관찰 					

○ 연구결과

I. 우리 농산물내 알레르겐 성분 규명

우리 농산물에 대한 IgE 매개 반응을 확인하기 위하여, 주요 우리 농산물인 콩, 옥수수, 감자, 밤, 밀가루, 메밀, 땅콩 등에 대해 피부단자시험을 시행하여 피부반응도를 비교하고, A/H 비에 따른 혈청 내 특이 IgE 항체치를 ELISA로 측정하여 비교하였다. 피부반응도 (A/H 비율)가 증가할수록 혈청 내 특이 IgE 항체 양성률도 증가하는 것을 확인하였다. 또한 피부반응도와 혈청 특이 IgE치가 높은 환자의 혈청을 이용하여 농산물내 주요 알레르겐 성상을 규명하였다.

II. 우리 농산물의 항알레르기 효과 검색

1. 비만 세포주를 이용한 항알레르기 성상 검색

섭취량이 많은 주요 농산물로 들깨, 시금치, 마늘, 양파, 배추, 고추, 검은콩, 참깨, 녹차 (EGCG), 감자 (GMO 감자, Non-GMO 감자), 대두 (GMO 대두, Non-GMO 대두) 등을 이용하였다. 각 농산물의 항 알레르기 효과를 비반세포 (RBL-2H3) 에서의 히스타민 유리능의 지표인 β -hexosaminidase 분비 억제력 측정으로 평가한 결과, 고추와 들깨는 30%이상 알레르기 반응 억제력을 나타내었다.

2. 생체내 방법인 동물 모델을 이용한 항알레르기 농산물 검색

22가지의 농산물(땅콩, 가지, 조, 생강, 참깨, 애호박, 깻잎, 검은콩, 오이, 시금치, 양상추, 감자, 무우, 들깨, 마늘, 밀, 팥이버섯, 입쌀, 당근, 미나리, 양파, 보리, 고구마)을 이용하여 항알레르기 효과를 검증할 수 있는 과민면역반응 동물 모델을 수립하여 검색하였다.

항알레르기에 효과를 나타내는 농산물은 계란에 대해서는 없었고, 우유에 대해서 가지에서 가능성이 제시되었다. 식품화의 가능성을 탐색하기 위해 가지를 이용하여 조추출과 부분분자특정화를 통해 분획된 물질을 여러 제형으로 제작하여 실용화 여부를 탐색한 결과, 약보다는 식품으로 섭취하여 예방과 치료를 동시에 할 수 있는 식품의 원료가 적합한 것으로 판단되었다.

III. 항알레르기 식품 개발을 위한 가공품 수립

항알레르기가 있는 농산물 검색하여 검색된 농산물을 조정제 및 특정화해서 추출된 성분의 분석하여 항알레르기 식품 원료로의 이용 가능성 탐색하고자 함.

식품 원료로 이용하여 다음과 같은 제품을 제조하였다.

1. 식품원료의 추출 ; 가지에서 식품원료물질 추출
2. 음료의 제조 ; 추출된 물질을 이용 음료제조
3. 발효유의 제조 ; 추출된 물질을 이용 발효유 제조
4. 우리나라 사람의 기호에 가장 적합하고 추출된 물질을 이용한 가공 치즈 제조
5. 기타 tablet형, capsule형, gel형, 스넥의 제조

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 국내외 홍보 및 홍보자료 제작
- 국내외 학술지 발표
- 시작품 제작하여 기업에 기술이전하여 사업화 예정

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “주요 농산물(콩, 옥수수, 감자, 밀 등) 내 한국인 고유의 알레르겐 규명 및 항알레르기성 농산물 검색” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 5 월 31 일

주관연구기관명 : 아주대학교 의과대학

총괄연구책임자 : 박 해 심

세부연구책임자 : 박 해 심

연 구 원 : 김 승 현

연 구 원 : 윤 성 호 외

협동연구기관명 : 전 북 대

협동연구책임자 : 이 부 응

협동연구기관명 : 장 운 기 외

요 약 문

I. 제 목

주요 농산물(콩, 옥수수, 감자, 밀 등) 내 한국인 고유의 알레르겐 규명
및 항알레르기성 농산물 검색

II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리 농산물 중 항알레르기 효과가 있는 농산물을 검색하고 그 성분을 조정제 및 부분 분자 특정화시켜 추출해 냄으로써 항알레르기에 효과가 있는 식품을 제조하는데 있다. 이로써 우리 농산물의 우수성을 입증하고 농산물 수입개방에 대처함으로써 우리 농산물의 보호 및 경쟁력있는 항알레르기성 농산물을 적극 이용하고 생산하고자 한다.

1) 기술적 측면 : 생활 환경의 서구화에 따른 알레르기 질환 환자수의 급증에 대처하기 위한 항알레르기 효과를 지닌 기능성 식품의 검색 및 기능 연구를 위한 기초적인 연구와 기술적 보완이 필요하다. 이는 항알레르기 식품 개발에 필수적인 자료 및 기술을 제공한다.

2) 경제·산업적 측면 : 알레르기 질환 환자의 치료 및 예방을 위해 체계적인 식품 알레르기 연구가 필요하다. 또한 항알레르기성 식품 조사 및 개발을 통한 경쟁력 있는 우리 농산물의 생산을 촉진함으로써 농산물 수입 개방에 대한 대처 방안을 제공한다.

3) 사회·문화적 측면 : 환자들이 각종 화학물과 서구화된 음식을 섭취함에 따라서 알레르기 질환의 치료와 어떤 음식물이 식품 알레르기를 일으키는지에 대한 원인물 질과 예방에 대한 관심의 증가로 우리의 주식인 농산물내 항알레르기 효과 유무 검증은 필요하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 한국인 알레르기 환자들의 주요 식품 알레르겐을 우리 농산물을 대상으로 분류하고 확인된 알레르겐의 생체내 실험 방법을 통해 알레르겐 성분을 검출하고 섭취량이 빈번한 우리 농산물중에서 항알레르기 효과를 지닌 식품을 비반세포를

이용한 실험을 통해 검색한다. 한국인의 주요 식품 알레르겐의 가공효과와 생체내 환경 또는 열, 위액, 장액과 같은 알레르겐 변화 성분에 대해서 관찰하여, 음식물 가공효과에 따라서 알레르겐 성분의 변화를 관찰함으로써 “저알레르기 식품의 개발”을 위한 기초 자료를 마련하고자 한다.

우리 농산물에서 항알레르기 효과를 지닌 식품을 동물 모델에서 검증한 후 효과가 감정된 식품을 조정제 및 부분 분자 특정화를 거쳐 조추출된 농산물을 이용하여 항알레르기 효과가 있는 식품으로의 개발 가능성을 탐색하고 이용 공정을 도출시켜 음료, 발효유, 가공치즈 등을 제조한다. 또한 이는 저알레르기 식품개발의 기초자료로 사용하고자 한다.

우리의 농산물 22종을 이용(땅콩, 가지, 조, 생강, 참깨, 애호박, 깻잎, 검은콩, 오이, 시금치, 양상추, 감자, 무우, 들깨, 마늘, 밀, 팥이버섯, 입쌀, 당근, 미나리, 양파, 보리, 고구마) 시료를 추출하여 과민면역반응 모델에서 그 효과를 검증한다. 검증된 농산물에 대해 그 성분을 한외여과를 통해 분리 분획하여 부분 분자 특정화를 실시하여 항알레르기 식품 개발의 원료로 이용하고자 한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

○ 연구개발결과

농산물(콩, 밤, 메밀, 밀가루, 옥수수, 감자 등)에 대한 IgE 매개 반응을 확인하기 위하여 피부단자시험상 A/H 비를 측정하고, A/H 비에 따른 혈청 내 특이 IgE 항체치는 피부반응도 (A/H 비율)가 증가할수록 혈청 내 특이 IgE 항체 양성률도 증가하는 것을 확인하였다. 또한 이들에서 각각 한국인 고유의 알레르겐 성분을 규명하였고, 장내 위산, 열 성분에 의한 알레르겐 성분의 소실을 관찰하였다. 또한 최근 수입 농산물 중에 유전자 변형 식품(콩, 옥수수, 감자)의 알레르기 성상도 비교하여 자연산 농산물에 대해 유의한 차이가 없음을 확인하였다.

들깨, 시금치, 마늘, 양파, 배추, 고추, 검은콩, 참깨, 녹차 (EGCG), 감자 (GMO 감자, Non-GMO 감자), 대두 (GMO 대두, Non-GMO 대두) 등의 농산물의 항알레르기 효과를 비반세포 (RBL-2H3) 에서의 β -hexosaminidase 분비 억제력 측정으로 평가한 결과, 고추와 들깨는 30%이상 알레르기 반응 억제력을 나타내었다.

22가지의 농산물(땅콩, 가지, 조, 생강, 참깨, 애호박, 깻잎, 검은콩, 오이, 시금치, 양상추, 감자, 무우, 들깨, 마늘, 밀, 팥이버섯, 입쌀, 당근, 미나리, 양파, 보리, 고구마)을 이용하여 항알레르기 효과를 검증할 수 있는 과민 면역반응 동물 모델을 통해 검색하였다. 22가지 우리 농산물 중 항알레르기에 효과를 나타내는 농산물은 계란에 대한 반응에서는 효과가 없었지만, 가지의 경우 우유에 대한 반응모델에서 대해서 그 가능성이 관찰되었다. 항알레르기 기능이 제시된 식품으로 음료, 발효유, 가공치즈 등의 제품을 제조하였다.

○ 연구결과 활용에 대한 건의

알레르기 질환의 유병률은 급증하고 있으며, 적절한 치료 뿐 아니라 예방이 중요하다. 이를 위해 우리 농산물 중에서 항알레르기 효과가 있는 농산물을 이용하여 식품으로 개발되면 우리 농산물을 이용하므로 농가의 소득을 증가시키고 국민 건강을 향상 시키고 고유 농산물을 이용한 식품 관련 산업의 활성화 계기가 될 것으로 기대한다.

SUMMARY

(영문 요약문)

I. Title

Identification of major allergens and anti-allergenic foods among the homemade agricultural products

II. Purpose and necessity of research development

The aim of this study was to screen the major allergens and anti-allergenic foods among various kinds of homemade agricultural product produced in Korea. The prevalence of allergic diseases including food allergy and atopic dermatitis, are increasing rapidly for recent years, and development of anti-allergenic foods are required. We selected major Korean agriculture products such as peanut, eggplant, millet, ginger, sesame, pumpkin, sesame leaf, black soybean, cucumber, spinach, lettuce, potato, radish, perilla japonica, garlic, common wheat, top mushroom, rice, carrot, onion, barley, and sweet potato.

We tried to identify the allergenic food related with allergic diseases which may enhance unique diagnostic kit for early diagnosis and prevention. Secondly, through various process, we tried to develop anti-allergenic foods to prevent from allergic diseases and hypoallergenic foods among various homemade agricultural products which would protect farmers to survive well if they cultivate the their unique product fit in Korean situation. Furthermore, superiority of our product will provide a protection strategy from WTO invasion and preserve Korean farm industry.

We could also set up screening systems to evaluate anti-allergenic foods in both ways: in vitro system using mast cell line and in vivo animal model of anaphylaxis.

III. Contents and scope of research development

For evaluating allergenic risks of Korean agricultural products, homemade food allergens were prepared for allergy skin prick test and ELISA for detecting

serum specific IgE antibodies. Next, to identify IgE binding components within these allergenic foods, IgE immunoblot analysis was done. To clarify cross allergenicity, ELISA inhibition tests were done. To evaluate the effect of heating, and digestive enzymes, enzyme cocktail and heating process was done followed by IgE immunoblot analysis.

Second part of our research was to screen anti-allergenic foods using *in vivo* animal model of anaphylaxis and *in vitro* system using mast cell line. Red pepper, perilla seed extracts were suggested to have anti-allergenic effects *in vitro* system, while eggplant was suggested to have anti-allergenic effect *in vivo* system, which was characterized into partial structure of fraction and processed to be used for food fabrication such as drink, fermented milk, process cheese, etc.

IV. The research results and suggestion of practical use

○ The result of research development

We screened major allergenic foods including soybean, corn, potato, rice, ryegrain, wheat, buckwheat flour, etc and found that the sensitization rate to these agricultural products were ranged from 2 to 10%. The higher skin reactivity on skin prick test, the higher serum specific IgE level was noted using ELISA system and close correlations were found between A/H ratio and specific IgE level. One or two major allergens with 24 to 50 kDa of MW were identified from soybean, chestnut, corn, potato and wheat extracts. Second investigation was to screen anti-allergic effect of Korean agricultural products such as perilla seed, spinach, garlic, onion, pepper, black bin, EGCG, soybean, and potato using rat mast cell line (RBL-2H3) and found that pepper and perilla seed had more than 30% inhibitory effects on histamine releasability, suggesting that these two agricultural products might be used as anti-allergic foods.

We evaluated anti-allergenic effects through the product separation by use of Korean agricultural product such as peanut, eggplant, millet, ginger, sesame, pumpkin, sesame leaf, black soybean, cucumber, spinach, lettuce, potato, radish, perilla japonica, garlic, common wheat, top mushroom, unglutinous rice, carrot, oenanthe javanica, onion, barley, sweet potato in animal anaphylaxis model and found that eggplant had possible anti-allergic effect in milk induced allergy model. Eggplant was screened through use of economically crude separation and partial structure characterization of fraction in order to be used as food material

for fabrication of food which may contribute to protect and reduce allergic symptoms.

○ Suggestion

We can suggest that based on these results, further investigations will be needed to develop anti allergenic and hypoallergenic foods which will contribute to reduce and prevent allergic diseases and moreover, to enhance Korean agricultural industry to become more confident against global competition in the world wide market.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Outline of project

Chapter 2. The present situation of technology development in home and abroad

Chapter 3. Contents and results of the research

Paragraph 1. Contents

1. Study subjects and screening test
2. Preparation of food allergens, ELISA and ELISA inhibition tests
3. IgE immunoblot analysis
4. Screening anti-allergenic effects of food using in vitro system
5. Antibody preparation
6. Evaluation of animal model of hypersensitivity reaction
7. Crude purification and partial molecular characterization

Paragraph 2. Results

1. The sensitization rate to agricultural products
2. ELISA and ELISA inhibition tests
3. Identification of major allergens
4. Antiallergenic effect of foods on mast cells
5. Antiallergenic effect of foods in animal model of hypersensitivity reaction
 - a. PCA model
 - b. Anaphylaxis score
 - c. II-type hypersensitivity
 - d. III-type hypersensitivity

- e. IV-type hypersensitivity
- 6. Crude purification and partial molecular characterization
 - a. Extraction by ultrafiltration
 - b. Analysis of protein, fatty acid, carbohydrate, mineral and electronic nose
- 7. Use anti-allergic foods with material extractions
 - a. Process diagram
 - b. Fabrication of drink
 - c. Fabrication of fermented milk
 - d. Fabrication of process cheese
 - e. Others

Chapter 4. Achievement of aim and contribution in related fields

Chapter 5. Utilization of research results

Chapter 6. Degree of foreign science and technology

Chapter 7. References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발현황

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발 수행 내용

1. 대상 환자 및 선별검사
2. 음식물 항원 추출, ELISA 및 ELISA 억제시험
3. 알레르겐 성분 규명을 위한 분석
4. 비만세포주를 이용한 각 농산물의 항알레르기 성상 평가
5. 항 혈청 제조
6. 동물 모델 수립 및 이를 이용한 항 알레르기 효과 평가
7. 조정제 및 부분 분자특정화

제 2 절 연구개발 수행 결과

1. 농산물 감작율
2. ELISA 및 ELISA 억제시험
3. IgE immunoblot 분석에 의한 주요 알레르겐 성분 규명
4. 비만세포주를 이용한 항알레르기 성상 평가
5. 한국산 농산물에 대한 과민면역반응의 항알레르기 성상 평가
가. PCA 모델
나. 아나필락시스 점수
다. 제 II형 과민반응
라. 제 III형 과민반응
마. 제 IV형 과민반응
6. 조정제 및 부분 분자특정화
가. 추출

- 나. 분석
- 7. 분획된 물질의 원료로 이용되는 식품
 - 가. 도출된 공정도
 - 나. 음료의 제조
 - 다. 발효유의 제조
 - 라. 가공치즈의 제조
 - 마. 기타

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에 기여도

제 5 장 연구결과의 활용계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

알레르기를 일으키는 식품과 알레르기를 억제하는 항알레르기성 식품을 우리 농산물(땅콩, 가지, 조, 생강, 참깨, 애호박, 깻잎, 검은콩, 오이, 시금치, 양상추, 감자, 무우, 들깨, 마늘, 밀, 팽이버섯, 입쌀, 당근, 미나리, 양파, 보리, 고구마)중에서 검색하여 농산물을 수입개방에 보호하고 그에 대한 국민의 소비를 증대시키고 나아가 농가를 보호한다. 즉 농업에 종사하는 사람들이 경제력 있는 농업을 할 수 있게끔 다양한 기능성 (항알레르기성) 농산물을 이용하여 항알레르기성 식품을 생산하도록 한다.

이러한 신토불이 농산물(천연물)을 이용하여 현재 급증하고 있는 알레르기에 대해 그 알레르기를 억제시킬 수 있고 알레르기가 많이 인정되는 고기, 우유, 계란에 적용시켜 그 알레르기를 억제할 수 있는 농산물도 이용하여 질병율을 감소시키고 나아가 국민 의료비 감소시킬 수 있다. 또한 알레르기가 있는 식품을 다른 농산물과 rotation 시킨 식단을 조절하는 새로운 food rotation system을 정립한다.

우리 농산물 중 항알레르기 효과가 있는 농산물을 검색을 통해 그 인자를 검색해 낸다. 검색된 농산물에서 그 성분을 조정제 및 부분 분자 특정화시켜 그 성분을 추출해내 식품으로의 가능성을 탐색하는데 있다.

이로써 우리 농산물의 우수성을 입증하고 수입되는 것과 비교하여 우리 농산물의 우월성을 입증할 수도 있다. 홍보를 통해 WTO에 대응할 수도 있으며 여러 농산물을 보호할 수 있을 것이다.

- 항알레르기가 있는 농산물 검색 → 검색된 농산물을 조정제 및 특정화 → 추출된 성분의 분석 → 항알레르기 식품 원료로의 이용 가능성 탐색 → 소비자

제 2 장 국내외 기술개발 현황

현재 대부분의 알레르기 질환(음식물 알레르기 포함)을 진단하고 치료하는 모든 시약이나, kit는 수입에 의존하고 있으며, 특히 음식물 알레르기를 진단하는 음식물 항원 또한 수입산을 사용하고 있다. 그러나 한국인의 식습관은 서양인에 비해 농산물 섭취량이 많은 편이나 이에 대한 기초 연구는 전무하다. 또한 한국인 고유의 음식물에 대한 알레르기 반응이나 또는 음식물내 알레르기를 일으키는 주된 단백질인 “알레르겐”으로 작용하는지에 대한 연구가 미비하며, 특히 다양한 단백질과 화학물이 포함된 음식물 내에 어떤 단백질이 알레르기 발생과 연관성에 대한 기초 자료도 전무하다.

본 연구를 통하여 지금까지 한국인에서 주된 음식물 알레르기, 특히 “농산물(콩, 옥수수, 밀, 감자 등) 섭취에 따른 알레르기”를 일으키는 물질에 대한 기초 자료를 구축하고, 또한 한국 농산물중 항알레르기성을 갖고 있는 유용한 농산물 검색 및 항알레르기성 식품 개발이 시급한 상황이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발 수행내용

1. 대상 환자 및 선별 검사

가. 대상 환자군

아주대학 병원 알레르기 클리닉을 방문한 15세 이상의 성인 환자를 대상으로 하였다.

나. 알레르기 피부반응 시험

대상 환자들은 선별검사로 각종 농산물 항원을 이용한 피부단자시험을 시행하였다. 각종 농산물 항원과 히스타민의 비율(A/H)을 구하여 팽진의 크기가 21mm이하이면서 A/H 비가 1이하인 경우를 1+, 팽진의 크기가 21mm 이상이면서 A/H 비가 1이하인 경우는 2+, A/H 비가 1이상인 경우를 3+, A/H 비가 2이상인 경우를 4+로 정하였다. 이때 피부반응검사 결과 2+ 이상인 환자를 양성으로 간주하여, 이 환자들의 혈청을 실험에 사용하였다.

2. 음식물 항원 추출, ELISA 및 ELISA 억제시험

가. 농산물 조항원의 제조(추출)

1) 곡류에 속하는 농산물(쌀, 보리, 검은깨, 들깨, 검은콩, 조)을 선정하여 다음과 같이 분획물을 조제.를 위해 중탕 추출하였다. 농산물 1kg을 5l의 증류수에 넣고 24시간 3회 추출한 것(열탕)과 그 잔사를 수욕상에서 2시간 2회 추출한 것을 합하여 감압 농축하였다.

2) 야채나 과일 : 마늘, 양파, 배추, 시금치, 상추, 감자, 풋고추 등에 대해서는 막자사발에서 곱게 분쇄시킨 후 시료와 PBS를 1 : 5의 비율로 넣어서 4℃에서 흔들어진 후 50000g에서 1시간동안 centrifuge 한다.

그런 후에 상등액을 취해 dialysis(5000-8000 da)에서 1일간 PBS에 담귀 투석시킨 후 0.45um filter로 여과한 후 사용한다.

나. 특이 IgE 측정을 위한 면역효소법(ELISA)

환자 혈청 속의 특이 IgE 항체치를 측정하기 위하여 plate에 항원을 붙인 후 4℃에서 12시간 방치한 후 환자의 혈청을 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. 0.05% PBST (phosphate buffered saline Tween20)로 3번 세척한 후 biotin labeled anti-human IgE antibody를 1:1000으로 희석하여 반응시키고, 실온에서 1시간 반응시켰다. 다시 PBST로

3회 세척 후 1:1000으로 희석한 streptavidine-peroxidase를 넣고 실온에서 30분 반응시켰다. 그 후 TMB를 넣고 5-10분 반응시키고 H₂SO₄로 반응을 정지시켰다. 그리고 405nm의 파장에서 OD값을 측정하였다.

다. 타 음식물과의 교차반응성 조사를 위한 면역효소역제시험

각 농산물 항원을 plate에 붙이고 4℃에서 12시간 방치한 후 억제제가 전처리 된 환자의 혈청을 넣고 상기 기술한 ELISA와 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

3. 알레르겐 성분 규명을 위한 분석

가. IgE immunoblot

각 항원과 각 혈청의 상호반응을 보기 위해 항원을 SDS-PAGE 전기영동을 하고 gel을 PVDF 막에 2시간 동안 transfer를 한 후 PVDF에 5% BSA-TBS (bovine serum albumin-TBS)를 넣고 1시간 이상 blocking 한 후 5% BSA-TBS와 환자 혈청 혼합물을 넣어 12시간 이상 반응시켰다. 0.1% TBST로 5분간 3회 세척 후 alkaline phosphate goat anti human IgE antibody를 1:1000으로 희석하여 1시간 반응시킨 후 기질을 넣어주어 발색시켜 양상을 관찰하였다.

나. 2D-electrophoresis

농산물 속 알레르기 성분이 단백질인 경우에 다음과 같은 방법으로 단백질을 분석하였다. 추출 항원 단백질을 rehydration buffer(+20mM DTT) 및 IPG buffer와 혼합한 후 시료를 7cm strip (pH 3-10)을 넣은 후 실온에서 12시간 이상 방치하였다. Focusing을 위하여 2D 장치(amersham phamacia, Sweden)를 이용하여 50V에서 30min, 500V에서 30min, 이어서 1000V에서 30min, 5000V에서 1.30h 동안 전기영동을 실시하였고, strip을 equilibration 시켰다. 그 후 12% polyacrylamide gel로 loading을 하였다. loading을 한 후 coomassie staining을 하였다.

다. 소화효소와 열에 의한 주요 알레르겐의 변화 양상 관찰

각 농산물을 D.W에 10-15분 간 끓인 후 상기 기술한 조항원 제조 방법으로 알레르겐을 추출하였다. 이 추출물을 이용하여 IgE immunoblot으로 생 농산물 항원과 반응의 변화 양상을 관찰하였다. 또한 pepsin이 포함된 위장효소인 SGF (gastric fluid, simulated)와 pancreatin이 포함된 췌장효소인 SIF (intesine fluid, simulated)를 각각 0, 30s, 1min, 10min, 30min, 1hr와 0, 1min, 10min, 30min, 1hr, 4hr의 시간 간격으로 농산물 항원 추출액에 처리하여 알레르겐의 변화양상을 비교 관찰하였다.

4. 세포주를 이용한 각 농산물의 항알레르기 성상 평가

가. Rat mast cell (RBL-2H3)에서 각 농산물의 β -hexosaminidase 분비 억제력 평가

24 well plate에 각 well 당 4×10^5 cell 을 분주하고 3시간 동안 배양한 후 그림 1, 2 와 Table 1에 나타낸 것과 같이 anti-DNP IgE 0.2 μ g/ml, dexamethason 100 nM 또는 각 농산물 분획물을 농도별로 처리한 후 Tyrode's buffer (Ca^{2+} , Mg^{2+} free) 를 이용하여 3회 세척한 후 calcium ionophore (A23187) 1 μ M 또는 DNP-BSA 0.5 μ g/mL 농도로 포함된 Tyrode's buffer 200 μ L에 30분간 반응시킨 후 상등액을 회수하여 β -hexosaminidase 분비능을 측정하였다. β -hexosaminidase 분비능은 96 well plate에 2 mM *p*-nitrophenyl-N- β -D-glucosaminide (in 0.4 M citrate and 0.2 M sodium phosphate buffer, pH4.5) 100 μ L 와 회수한 상등액 중 30 μ L를 37°C에 3시간 동안 반응시킨 후 0.2 M glycine-NaOH (pH 10.7) 200 μ L를 섞어주어 반응을 종료시킨 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm 파장으로 측정하였다. β -hexosaminidase 분비능은 농산물 분획물을 처리하지 않고 anti-DNP IgE/DNP-BSA 또는 calcium ionophore (A23187) 만을 처리한 것을 100%로 계산하여 비교하였으며, 30% 이상 차이가 있는 것만을 억제 효과가 있다고 판단하였다.

5. 항혈청의 제조

가. 면역

신선한 원유와 계란을 질소 증류 장치를 사용하여 질소 정량한 후 단백질이 5 mg/ml가 되도록 0.85%생리 식염수에 희석한 것 1ml와 동량의 Complete Freund's Adjuvant(Sigma 社)를 첨가하여 유회시킨 후 2.3kg의 토끼의 양 뒷발대퇴부 근육에 1ml씩 주사하였다. 7일 간격으로 10회 행하고 4주후부터 각각 주사하기 전날에 귀정맥에서 부분 채혈하여 immuno diffusion을 실시하여 항체가 생긴 것을 확인하였다.

나. 혈청분리

채혈한 혈액을 37°C에서 1시간, 4°C에서 하루 밤 방치한 후 원심분리(4°C, 3,000rpm, 30분)하여 혈청을 얻었다. 얻어진 혈청을 56°C에서 30분간 가열하여 補體 (complement)를 불활성화시킨후 -80°C의 냉동고에서 보관하였다.

6. 동물모델 수립 및 이를 이용한 항알레르기 효과 평가

가. PCA 모델(Passive cutaneous anaphylaxis model)

각 시료 항혈청을 PBS로 각각 10배, 50배, 100배, 150배 그리고 200배 희석한 후 약 250~300g체중의 건강한 Guinea pig등 피부에 주사하고 4시간 후 신선한 항원을 1% Evan's Blue를 혼합한 것을 정맥에 주사한다. 30분후 희생시켜 Guinea pig등에

나타난 blue spot을 관찰하여 희석배수를 이용하여 역가를 구하였다. 피부에 여러 다른 종류의 항혈청을 주사함으로써 각 시료간 cross reactivity도 판정할 수 있다. 항알레르겐성을 확인하는 in vivo 방법이라 할 수 있다.

나. 아나필락시스 점수(Anaphylactic shock score)

PCA가 국소적으로 일어나는 반응인데 비해 이 방법은 전신적으로 반응을 한다. 즉 약 20g 체중에 암수구별이 없는 mouse(ICR, 7주령)에 위의 토끼에서의 면역과 같은 방법으로 면역시킨다. 8주간 면역시킨 후 꼬리 정맥에 농산물 1ml를 주사하여 전신성 경력은 관찰하여 다음과 같이 등급을 평가한다.

- O : 변화없음
- + : 약한 anaphylactic reaction으로 온몸을 떨며 괴로워 하다가 회복
- ++ : 온몸에 경련과 호흡곤란 등으로 눈을 감고 괴로워 함
- +++ : 강한 anaphylactic shock로 신음하다가 즉시 사망

다. 제 II 형 과민면역반응 - 보체 의존성 cytolysis

제 II형은 양의 적혈구의 보체의존성 세포분해를 이용하는데 SRBC(sheep blood cell)는 5×10^{-4} CaCl₂와 1×10^{-1} MgCl₂을 제조하여 Cell의 농도가 1×10^9 cell/ml가 되게 희석하였다. 시험관에 0.1ml의 SRBC 농축부유물, 20배 희석한 anti-SRBC antiserum(Sigma, USA) 0.2ml, 10배 희석한 Guinea pig blood 0.2ml 그리고 0.2% 농산물을 각각 50, 100, 500, 1000ul씩 넣고 37°C에서 90분간 배양시키고 난 후 즉시 얼음물에서 5분간 냉각시킨 후 1,500rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 A₅₄₀에서 흡광도를 측정하였다. 한약재 검색액에 대한 SRBC 보체의존성 세포분해의 억제율은 다음과 같다(Otani와 Yamada, 1995).

억제율(%) = $100 - [\text{검색액이 있는 발색액의 흡광도}(4\text{회평균}) \times 100 / \text{검색액이 없는 발색액의 흡광도}(4\text{회평균})]$

라. 제 III 형 과민면역반응 - reverse passive Arthus reaction

250-300g된 Guinea pig의 정맥에 0.4% 우유나 계란(PBS에 녹임)을 1ml를 주입시키고 15분 후에 0.4% 농산물을 함유한 우유 혈청을 복강에 주입시키고 3, 6, 12시간이 지난 후에 희생시켜 피부에 출혈반의 직경을 측정하여 대조군과 비교하여 직경의 감소를 III형 억제율 %로 하였다(Tada와 Ishizaka, 1965).

마. 제 IV 형 과민면역반응 - 적혈구에 의한 delayed 과민반응

SRBC의 농도를 PBS 완충용액에서 2.5×10^8 cell/ml로 농축시켜 7 주령된 mouse 오른쪽 발바닥에 0.04ml를 주입하고 5일 후에 다시 왼쪽 발바닥에 0.04ml를 주입시

켰다. 6h 후에 0.15% 농산물 1ml와 0.05% prednisolone 1ml를 복강에 주입시키고 18h 후에 증가된 발바닥의 두께를 측정한다(Otani와 Yamada, 1995).

7. 조정제 및 부분분자특정화

가. 추출

농산물에서 검색된 것 중에 항알레르기가 있는 성분을 추출한다. 또 항알레르기 성분의 이화학적 특성을 규정하여 항알레르기 식품을 개발목적으로 조정제를 실시하였다.

1) 용매에 의한 알레르겐 추출

각 농산물을 아래 용매로 30분간 교반한 후 추출하였다. 여기에서는 알레르겐의 용해도에 의한 분획이 될 것이다.(Ether 1% KCl, 0.25N NaOH, 80% ethanol, 1% MgSO₄, Butanol, 2% NaCl)

2) 분자량에 의한 분획(한외여과)

2단계로 NaCl로 추출한 용액을 원심분리(6,000rpm, 30min)한 후 상등액을 한외여과(Ultrafiltration)하여 분자량 1,000이하, 1,000~10,000, 10,000~30,000, 30,000~300,000, 300,000이상으로 5개의 fraction을 전향에서와 같이 PCA를 실시하여 양성으로 나타난 fraction을 찾아 표적물질 알레르겐을 분자량 별로 분획하였다.

3) 전기영동

추출된 분획과 한외여과로 분획된 분획물을 단백질 함량이 0.2%가 되게 하여 SDS-PAGE로 실시한다. Gel은 12% polyacrylamide gel에 loading 한 후 전기영동장치(Eido, 일본)에서 3시간 전기영동 한다. 염색은 Coomassie blue R-250 용액으로 실시하며 탈색은 ethanol과 acetic acid를 용액으로 실시하였다.

4) Silica gel chromatography

Column에 silica gel(25Å)을 충전한 다음 용매로 메탄올을 column에 채운 후 약초 추출물을 통과시켰다. 약초 추출물은 column을 통과하면서 색소가 흡착되는지를 관찰하였다.

나. 분석

1) 단백질분석은 전기영동과 IEF 에 의한 2차 전기영동으로 하였다.

2) Immunoblotting

각 항원에 각 혈청의 상호반응을 보기 위해 항원을 SDS-PAGE전기영동을 한 후 gel을 nitrocellulose paper에 transfer를 한 후 nitrocellulose paper를 0.2% Tween 20으로 overnight 한 후 0.1%의 Tween 20으로 3회 세척하였다. 혈청을 0.05% Tween 20으로 1:100으로 반응시키고 난 후 또다시 세척하였다. 그 후에 Bovine

alkaline phosphate(IgG)로 희석하여 1시간 반응시킨 후 기질을 넣어주어 발생시켜 실온에서 건조하였다.

3) 지방산

추출 성분에서 ether 추출법 혹은 chloroform-methanol 혼합액 추출법으로 얻은 지방산을 Gas chromatography에 의해 분석하였다.

4) 당

각 추출된 성분을 Acetonitrile에 녹인 후 HPLC를 이용하여 분석하였다.

5) 무기질-ICP Mass 방법

성분 1ml를 유기물의 모든 침전을 피하기 위해서 5% Lanthan 용액 20ml로 희석하였다. Lanthan 용액을 넣기 전에 100ml의 증류수를 넣는다. 그런 후 이 용액을 증류수로 200ml까지 채운 뒤 분석하였다.

6) NMR

Protein nuclear magnetic ($^1\text{H-NMR}$) spectra를 얻기 위하여 varian EM-390 spectrometer(Varian)와 QE-300 spectrometer(General Eletri)를 사용한다. 반응물들의 구조확인에는 chemical shift를 비교분석하여 설정하였다.

7) Electronic nose(전자 코)

각 농산물의 휘발성 성분을 전자전기적으로 그 향을 흡수하여 그 위치에 따라 성분을 표시하였다.

8) 전자현미경

sample를 채취한 후 2.5% Glutaraldehyde in Cacodylate Buffer 고정액으로 15시간 전 고정시킨 이후 PBS 세척하고 4시간 OsO_4 로 2차 고정하였으며, PBS로 세척하고 50, 70, 80, 90, 95% 의 alcohol로 10분씩 2차 각각 탈수하고 100%의 alcohol로 15분씩 2차 탈수를 실행한다. 다음 alcohol과 isoamyle acetate의 3:1, 1:1로 각각 10분 탈수한 후 isoamyle acetate로 10분씩 2차 탈수시킨다. Critical Point Drying & Mounting 실행 후 gold coating하여 JEOL JSM-5310LV(Japan)으로 관찰하였다.

제 2 절 연구개발 수행결과

1. 한국산 농산물에 대한 감작률

가. 각종 농산물 항원에 대한 피부반응도 결과

표 1과 표 2는 알레르기 환자들에게 피부단자시험을 시행하여 각 농산물에 대한 감작률을 나타낸 것으로, 보리가 9.5%로 감작률이 가장 높았고, 그 밖에 5%이상의 감작률을 보인 농산물은 감자(5.7%), 땅콩(5.4%), 밀가루(5.1%), 당근(5.1%) 등이었다.

Table1. Skin reactivity to the various foods derived homemade agricultural products

Food	Skin prick test (A/H)					Total
	2+	3+	4+	5+	6+	
Rye grain	145/1886(7.7)	32/1886(1.7)	2/1886(0.1)	0	0	179/1886(9.5)
Potato	38/1886(2.0)	48/1886(2.5)	12/1886(0.6)	7/1886(0.4)	3/1886(0.2)	108/1886(5.7)
Nut	80/1886(4.2)	21/1886(1.1)	0	1/1886(0.1)	0	102/1886(5.4)
Wheatflour	77/1886(4.1)	17/1886(0.9)	2/1886(0.1)	0	0	96/1886(5.1)
Carrot	80/1886(4.2)	15/1886(0.8)	1/1886(0.1)	0	0	96/1886(5.1)
Onion	53/1886(2.8)	8/1886(0.4)	0	0	0	61/1886(3.3)
Rice	31/1886(1.6)	8/1886(0.4)	1/1886(0.1)	1/1886(0.1)	0	41/1886(2.2)

() : Percentage of positive reactors on skin prick test

Table 2. Skin reactivity to the various foods derived homemade agricultural products

Food	Skin prick test (A/H)				Total
	2+	3+	4+	5+	
Buckwheat	67/1738(3.9)	14/1738(0.8)	2/1738(0.1)	1/1738(0.1)	84/1738(4.8)
Chestnut	51/1738(2.9)	12/1738(0.7)	3/1738(0.2)	0	66/1738(3.8)
Soybean	25/1716(1.5)	31/1716(1.8)	7/1716(0.4)	0	65/1716(3.8)
Corn	32/1716(1.9)	26/1716(1.5)	4/1716(0.2)	2/1716(0.1)	64/1716(3.7)

() : Percentage of positive reactors on skin prick test

Table 3. Skin prick test and specific IgE bindings to home made agricultural product extracts by ELISA

Food	Skin prick test (A/H)				Total
	2+	3+	4+	5+	
Buckwheat	67/1738(3.9)	14/1738(0.8)	2/1738(0.1)	1/1738(0.1)	84/1738(4.8)
Chestnut	51/1738(2.9)	12/1738(0.7)	3/1738(0.2)	0	66/1738(3.8)
Soybean	25/1716(1.5)	31/1716(1.8)	7/1716(0.4)	0	65/1716(3.8)
Corn	32/1716(1.9)	26/1716(1.5)	4/1716(0.2)	2/1716(0.1)	64/1716(3.7)

() : Percentage of positive reactors on skin prick test

표 3은 농산물에 대한 IgE 매개 반응을 확인하기 위하여 피부단자시험상 A/H 비에 따른 혈청 내 특이 IgE 항체치를 나타낸 결과이다. 특이 IgE 항체치는 평균±표준편차치로 나타내었고, 피부반응도 (A/H 비율)가 증가할수록 혈청 내 특이 IgE 항체양성률도 증가하는 것을 확인하였다.

2. ELISA 및 ELISA 억제시험 결과

가. 각 주요 농산물에 대한 A/H에 따른 혈청 특이 IgE 항체치 결과

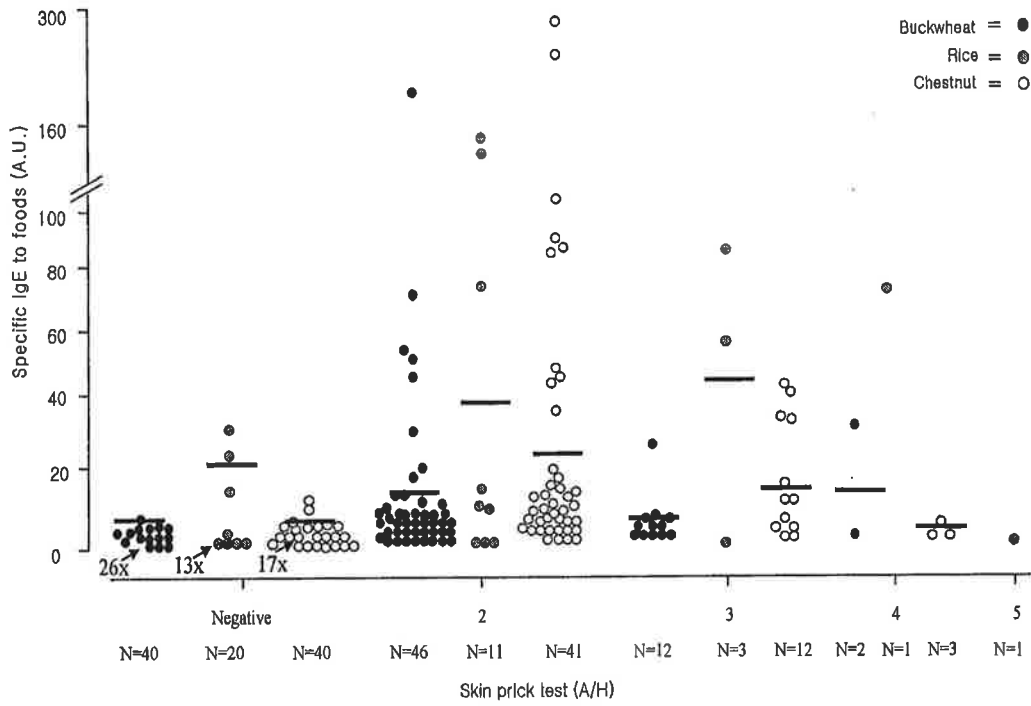


그림 1. Specific IgE binding to buckwheat, rice and chestnut by ELISA according to A/H ratio.

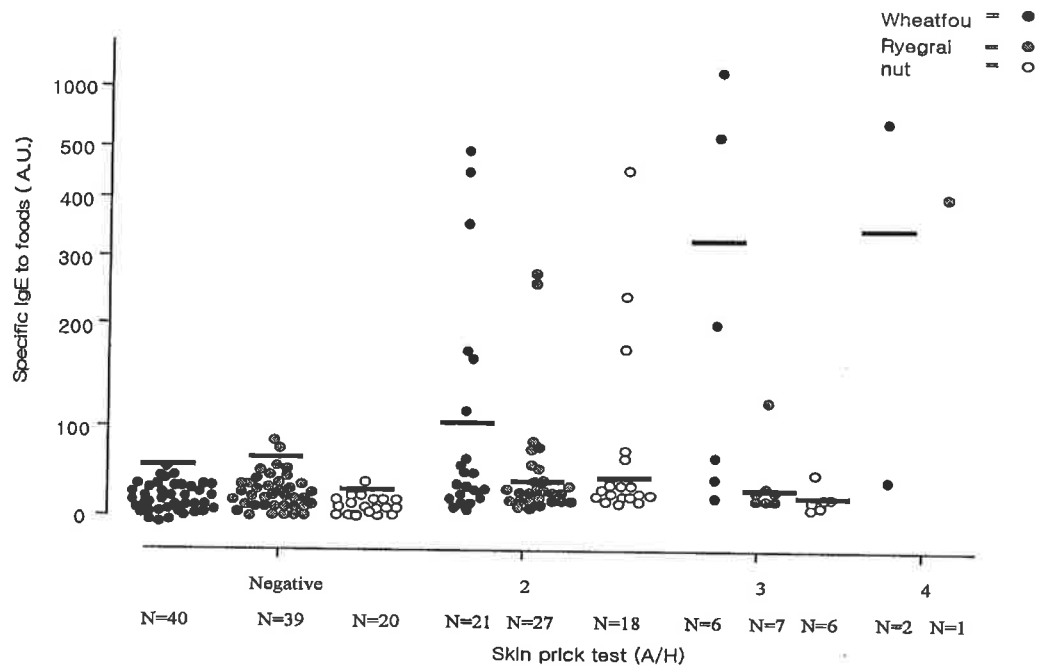


그림 2. Specific IgE binding to wheatflour, rye grain and nut extracts by ELISA according to A/H ratio.

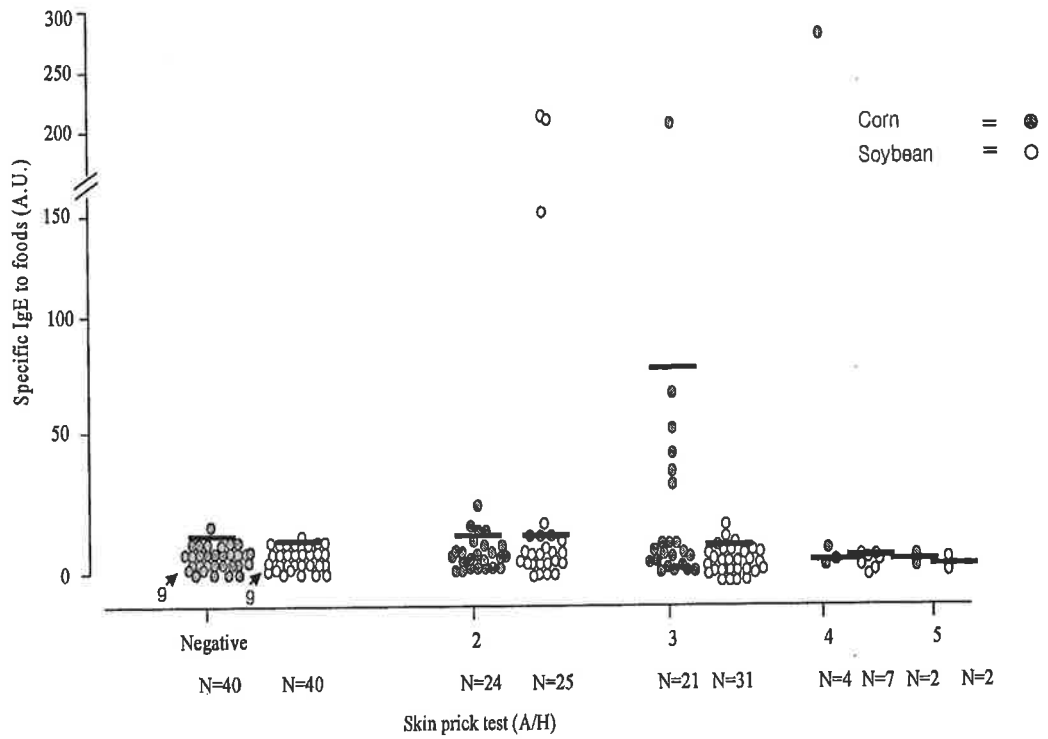


그림 3. Specific IgE binding to corn and soybean by ELISA according to A/H ratio.

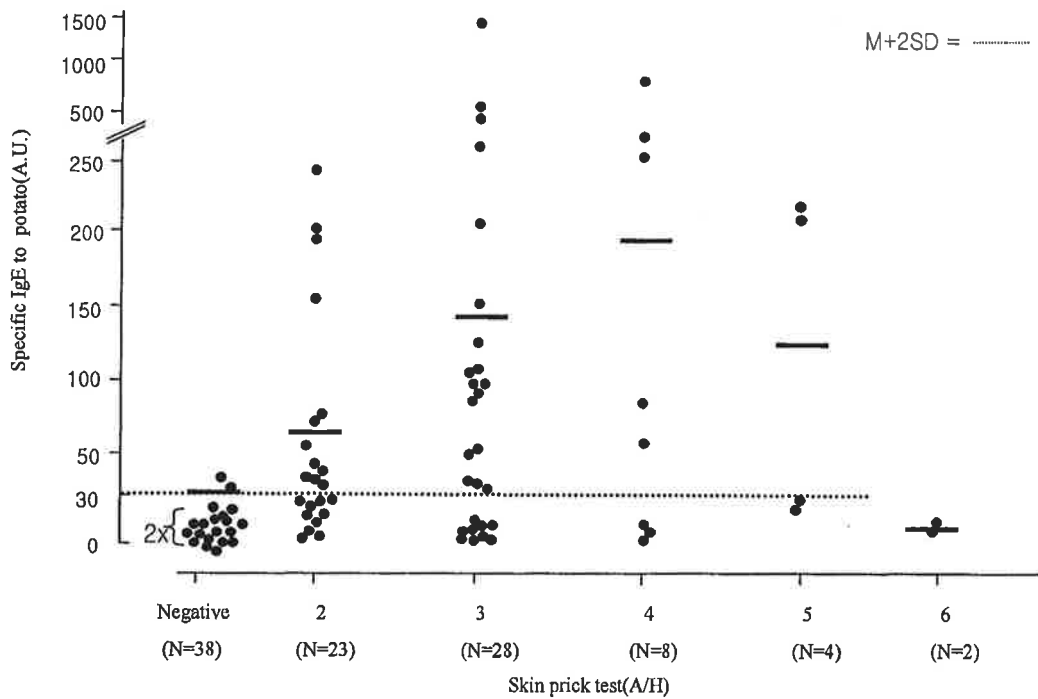


그림 4. Specific IgE binding to potato by ELISA according to A/H ratio of potato extracts

그림 1~4는 피부반응도인 A/H 비에 따른 각 농산물에 대한 혈청내 특이 IgE 항체치를 나타낸 그림이다. A/H 비율이 높을수록 특이 IgE 항체치가 증가하므로, 상기 농산물에 의한 음식물 알레르기가 특이 IgE 반응에 의한 것임을 알 수 있었다.

나. ELISA 억제시험을 통한 각 농산물 간의 교차 항원성

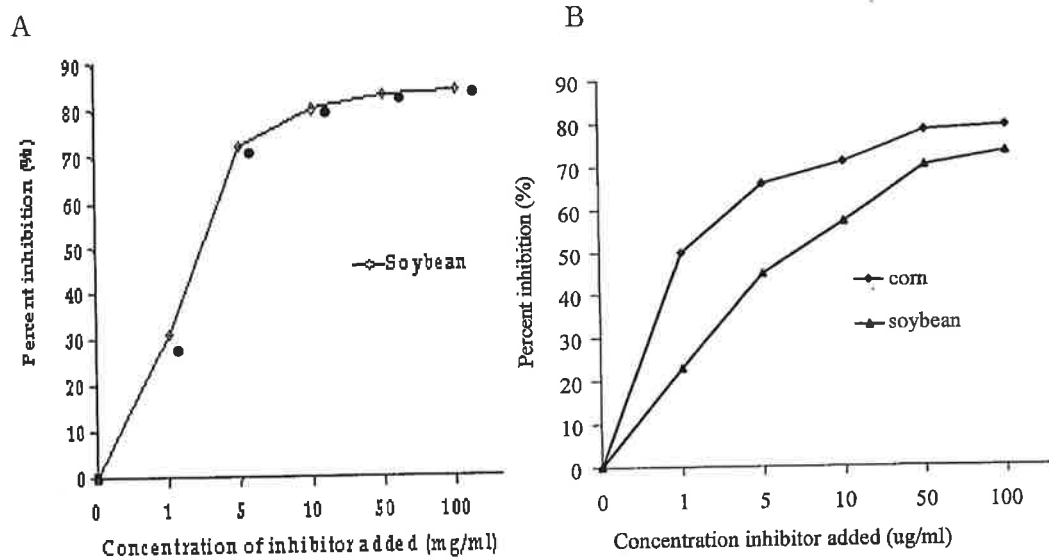
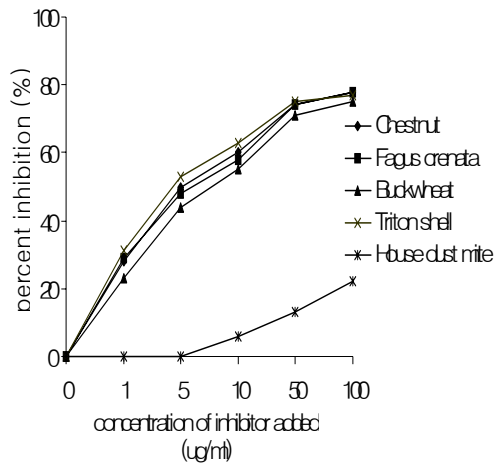


그림 5. A. Soybean IgE-ELISA inhibition result with serial additions of soybean (●). B. Corn-ELISA inhibition test with addition of soybean (▲)

콩은 콩을 억제제로 사용하였을 때 농도에 따라 용량반응곡선을 나타내었고, 옥수수 역시 옥수수 억제제의 농도 증가에 따라 유의하게 억제양상을 보였으며, 콩과도 10ug/ml의 농도에서 50% 이상의 억제양상을 보여 서로 비슷한 용량반응곡선을 나타내어 교차반응 가능성을 시사하였다.

A



B

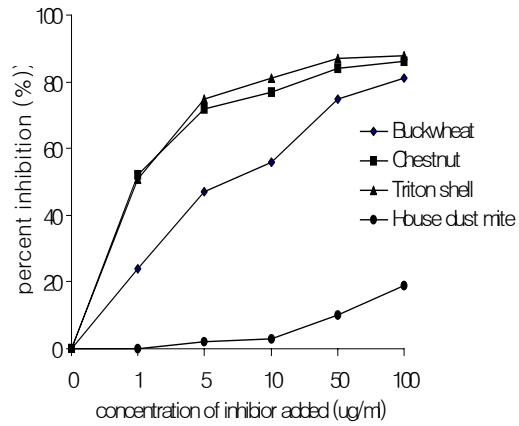


그림 6. A. Chestnut-ELISA inhibition tests with additions of *Fagus crenata* (■), Buckwheat (▲), Triton shell (×) and house dust mite (*) extracts.

B. Buckwheat-ELISA inhibition test with addition of chestnut (■), Triton shell (▲) and House dust mite (●) extracts

밤은 같은 과인 너도밤나무 뿐 아니라 메밀, 골뱅이와도 유의한 억제양상을 나타내었고, 메밀은 5ug/ml의 농도에서 50%이상 억제양상을 보이며, 밤과 골뱅이에서 농도 의존적인 용량반응곡선을 보여 교차반응성을 시사하였다.

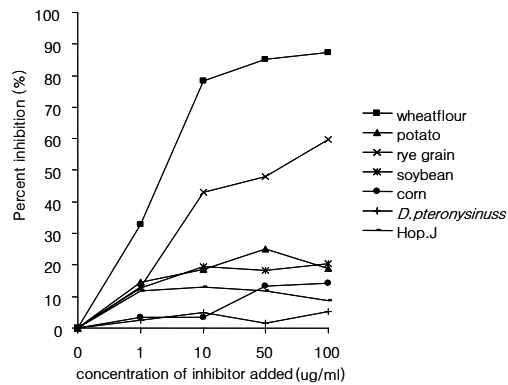
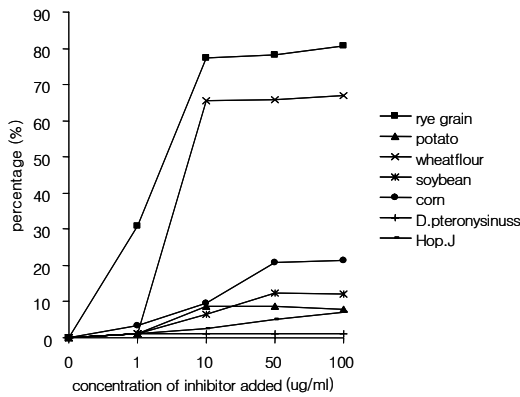


그림 7. A. Rye grain-ELISA inhibition tests with additions of potato (▲),

wheatflour (×), soybean (*), corn(●), *D.pteronysinuss* (+) and Hop.J (-) extracts.
 B. Wheatflour-ELISA inhibition tests with additions of potato (▲), rye grain (×), soybean (*), corn(●), *D.pteronysinuss* (+) and Hop.J (-) extracts

보리는 밀가루와 50ug/ml의 농도에서 50% 이상의 억제양상을 보이며, 서로 유의한 용량반응곡선을 그렸다. 밀가루 역시 보리와 50ug/ml의 농도에서 50%이상의 억제 양상을 보이며, 서로 유의한 용량반응곡선을 그렸다.

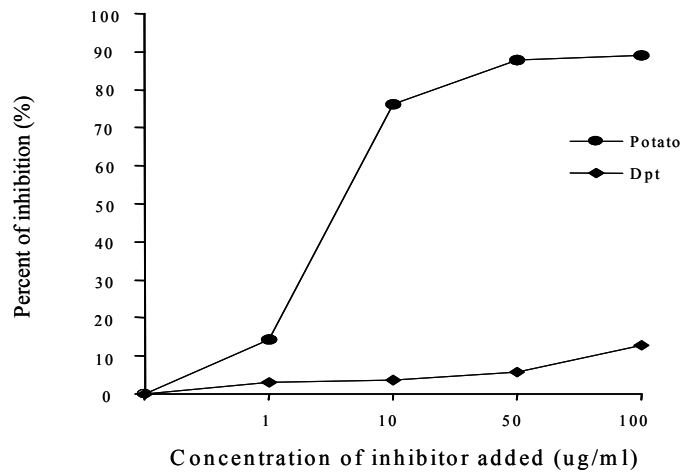


그림 8. Potato-ELISA inhibition tests with additions of *D.pteronysinuss* (□□) extracts.

감자는 농도에 따라 용량반응곡선을 그렸으며, 10ug/ml의 농도에서 80% 정도의 억제양상을 보였고, 집먼지진드기와는 유의한 억제양상을 보이지 않았다.

3. 환자 혈청을 이용한 농산물內 주요 알레르겐 성분 규명
 특히 IgE immunoblot 결과 (콩, 밤)

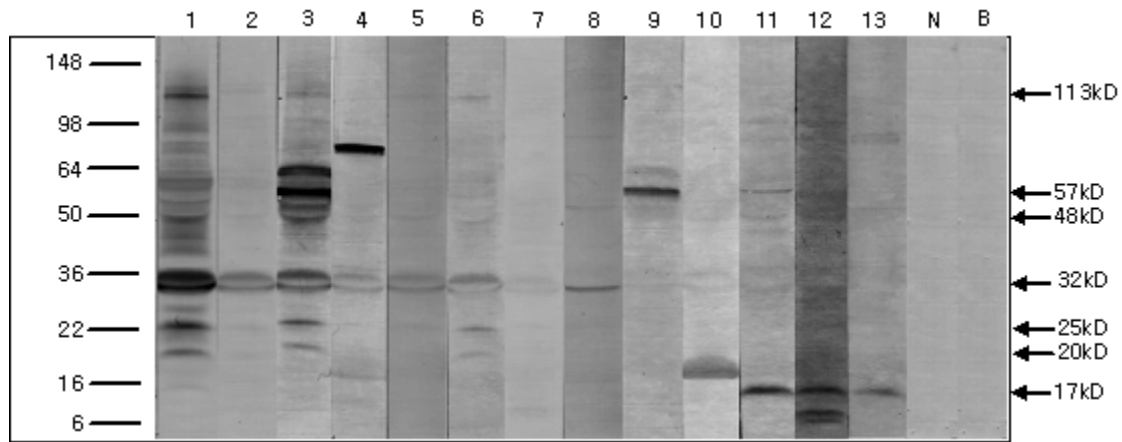


그림 9. IgE-immunoblot analysis of soybean extracts using sera from the sensitized patients (1-13), non-atopic control (N), and buffer control (B)

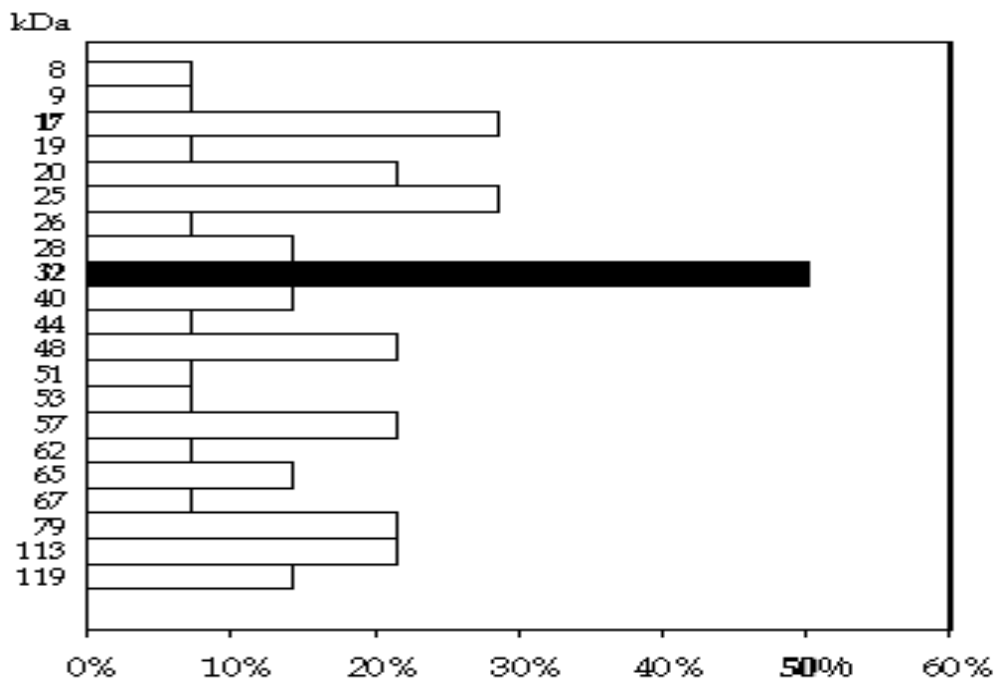


그림 10. IgE-immunoblot analysis results of soybean using sera of the sensitized patient

그림 9와 10은 콩을 이용한 IgE-immunoblot 결과나, 각 알레르겐 성분에 대한 결합 빈도를 나타낸 것으로서, 대상 환자 혈청의 50%이상에서 32kDa 부위의 단백질이 가장 많이 반응하고, 또 강하게 IgE 항체반응을 나타내었다. 따라서 콩의 주 알레르겐은 32kDa 크기의 단백질이라고 생각한다.

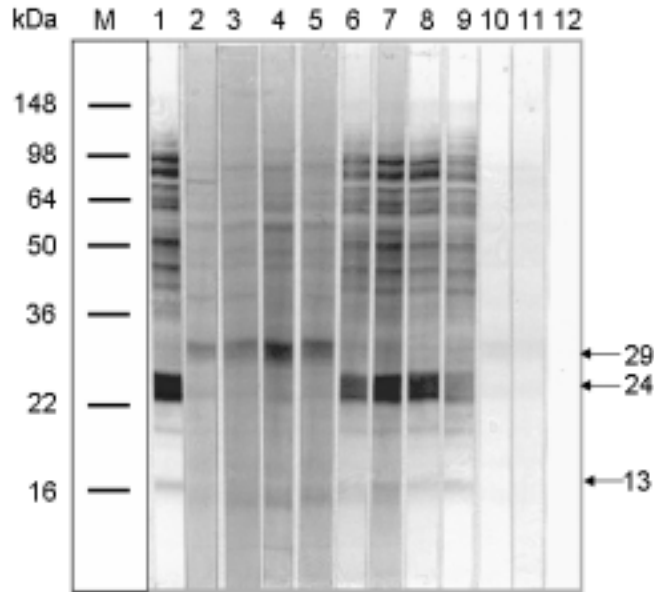


그림 11. IgE-immunoblot analysis of chestnut extracts in the sera from the sensitized patients. M: standard marker. Lane 1-9: subjects of the sensitized patients. Lane 10,11: control. Lane 12: buffer. Arrows indicate the major IgE binding component (24 kDa)

그림 11은 밤의 IgE-immunoblot 결과나, 각 알레르겐 성분에 대한 결합 빈도를 보면 50% 이상에서 반응하고, 또 가장 강하게 IgE 항체반응을 나타내었다. 따라서 밤의 주 알레르겐은 24kDa 크기의 단백질이라고 생각한다.

4. 비반세포를 이용한 각 농산물의 항알레르기 성분 검색

들깨, 시금치, 마늘, 양파, 배추, 고추, 검은콩, 참깨, EGCG, 감자 (GMO 감자, Non-GMO 감자), 대두 (GMO 대두, Non-GMO 대두) 등의 농산물의 항알레르기 효

과를 알아보기 위해 RBL-2H3 에서의 β -hexosaminidase 분비 억제력을 측정하여 평가하였다.

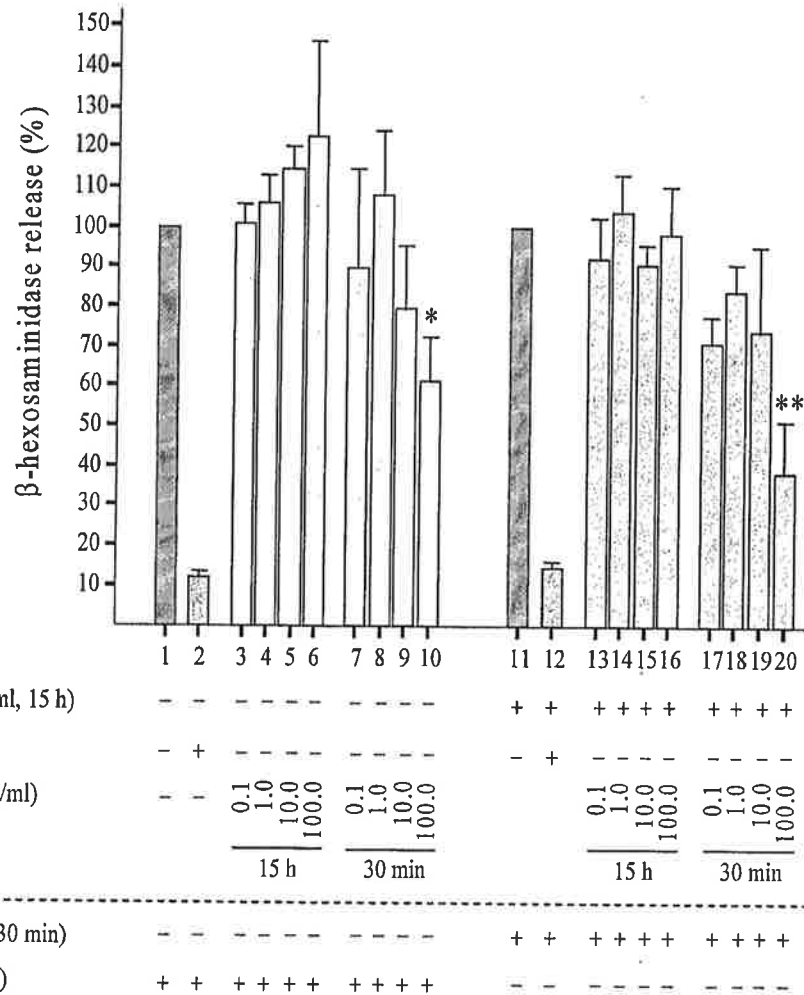


그림 12. Effect of hot pepper extract on A23187 or anti-IgE induced β -hexosaminidase release from RBL-2H3 cells. Each experiment was conducted in triplicate for each sample, and the results are expressed as the mean \pm SE of two independent experiments. *, Inhibition effect > 30%; **, Inhibition effect >50%; Dex., dexamethason.

고추에 의한 β -hexosaminidase 분비 억제력에서는 calcium ionophore (A23187)와

anti-DNP IgE/DNP-BSA로 자극한 것 모두 고추 분획물 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 30 분간 처리한 것에서 30%이상 억제력을 나타내었다(그림 12).

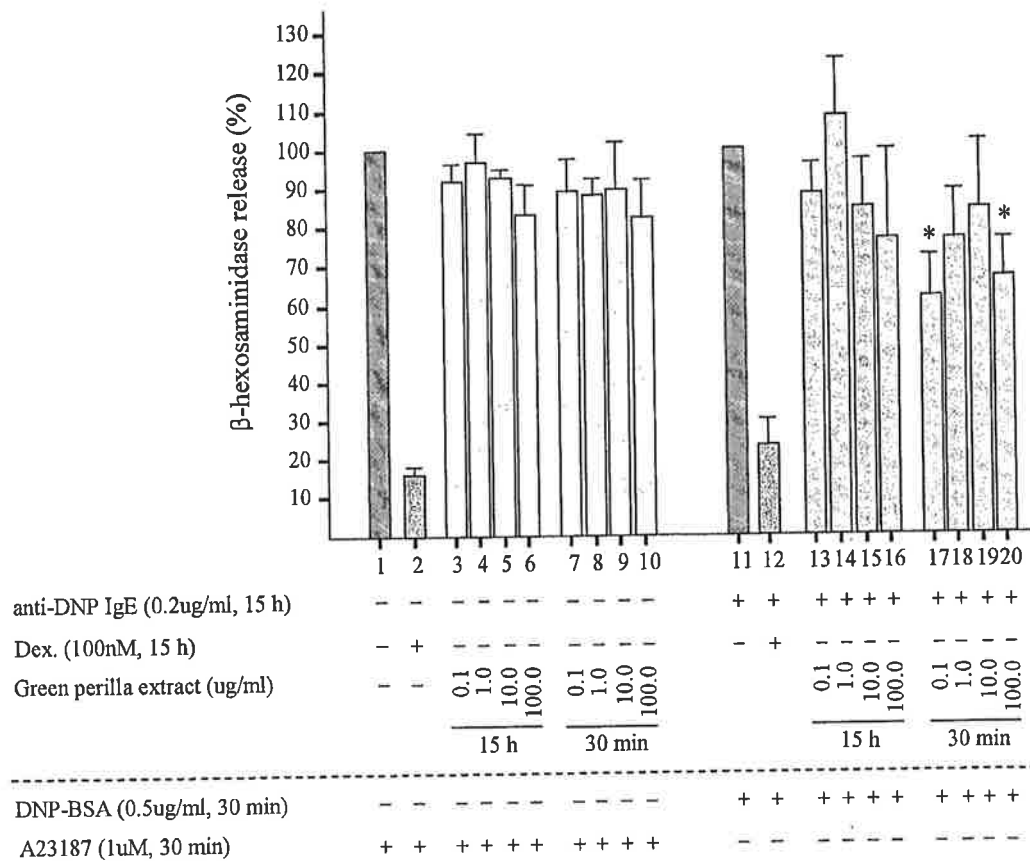


그림 13. Effect of green perilla extract on A23187 or anti-IgE induced β -hexosaminidase release from RBL-2H3 cells. Each experiment was conducted in triplicate for each sample, and the results are expressed as the mean \pm SE of two independent experiments. *, Inhibition effect $>$ 30%; Dex., dexamethason.

들깨는 calcium ionophore (A23187) 자극에 의한 β -hexosaminidase 분비 억제력에서는 큰 효과가 없었으나 anti-DNP IgE/DNP-BSA로 자극한 것에서는 들깨 분획물 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 30 분간 처리한 것에서 30%이상 억제력을 나타내었다(그림 13).

고추와 들깨를 제외한 나머지 농산물들의 β -hexosaminidase 분비 억제력은 표 1에서 나타내었다. Non-GMO 감자는 anti-DNP IgE/DNP-BSA로 자극한 것에서 분

획물 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 30 분간 처리한 것에서 30%이상 억제력을 나타내었으나 GMO 감자의 것과 비교시 큰 차이는 없었다.

Table 4. Effect of agricultural product extract on A23187 or anti-IgE induced β -hexosaminidase release from RBL-2H3 cells.

Agricultural product		Ca ²⁺		anti-IgE	
		15 h	30 min	15 h	30 min
Spinich	0.1 μ g/ml	0.3 \pm 8.7	0.4 \pm 12.6	-3.1 \pm 12.2	15.7 \pm 17.7
	1 μ g/ml	-7.0 \pm 13.5	0.4 \pm 9.1	-12.5 \pm 14.6	3.6 \pm 23.9
	10 μ g/ml	-12.1 \pm 10.9	-4.0 \pm 13.8	-27.4 \pm 33.1	1.2 \pm 22.0
	100 μ g/ml	-15.2 \pm 12.2	9.1 \pm 5.2	-67.7 \pm 38.2	18.7 \pm 15.8
Garlic	0.1 μ g/ml	-3.8 \pm 9.3	7.9 \pm 5.9	-2.5 \pm 2.8	1.7 \pm 3.4
	1 μ g/ml	-3.0 \pm 1.3	7.2 \pm 3.0	-5.3 \pm 1.8	-1.2 \pm 1.9
	10 μ g/ml	-14.8 \pm 5.0	-0.3 \pm 1.7	-4.5 \pm 1.6	10.3 \pm 5.3
	100 μ g/ml	-1.9 \pm 7.4	9.4 \pm 3.7	6.1 \pm 1.4	12.5 \pm 1.9
Onion	0.1 μ g/ml	-0.4 \pm 3.2	1.3 \pm 5.5	8.3 \pm 7.5	22.4 \pm 14.4
	1 μ g/ml	-3.7 \pm 3.3	-3.2 \pm 8.2	-2.7 \pm 4.2	15.4 \pm 9.9
	10 μ g/ml	2.3 \pm 5.3	-0.4 \pm 6.0	6.4 \pm 14.1	16.9 \pm 25.5
	100 μ g/ml	-9.4 \pm 11.8	-4.4 \pm 6.5	-8.3 \pm 14.7	28.9 \pm 14.0
Chinese cabbage	0.1 μ g/ml	10.6 \pm 5.0	9.6 \pm 6.2	-9.3 \pm 22.1	9.4 \pm 24.4
	1 μ g/ml	5.7 \pm 3.1	13.3 \pm 3.1	-3.9 \pm 5.4	17.4 \pm 11.1
	10 μ g/ml	-1.5 \pm 7.4	10.2 \pm 6.2	-0.4 \pm 15.0	14.4 \pm 13.9
	100 μ g/ml	0.1 \pm 14.4	10.6 \pm 4.8	-25.9 \pm 46.5	10.1 \pm 12.1
Black soybean	0.1 μ g/ml	3.9 \pm 7.2	6.2 \pm 10.9	3.8 \pm 8.9	20.4 \pm 21.8
	1 μ g/ml	-1.6 \pm 5.4	4.6 \pm 5.8	-1.1 \pm 18.4	24.4 \pm 12.9
	10 μ g/ml	-2.3 \pm 8.9	5.9 \pm 7.4	0.1 \pm 12.5	19.1 \pm 8.4
	100 μ g/ml	2.8 \pm 16.7	7.1 \pm 9.6	3.0 \pm 32.4	20.1 \pm 10.3
Sesame	0.1 μ g/ml	2.8 \pm 9.4	6.3 \pm 7.6	6.0 \pm 13.7	22.0 \pm 8.8
	1 μ g/ml	2.3 \pm 3.9	2.3 \pm 5.3	-5.1 \pm 9.0	7.6 \pm 9.5
	10 μ g/ml	11.8 \pm 9.4	8.4 \pm 6.2	-2.4 \pm 18.1	13.3 \pm 8.4
	100 μ g/ml	8.3 \pm 6.5	13.4 \pm 2.2	1.4 \pm 7.4	25.2 \pm 6.1
EGCG	1 μ M	2.0 \pm 6.1	4.1 \pm 6.8	9.5 \pm 6.3	21.4 \pm 7.9
	10 μ M	-0.8 \pm 7.1	0.5 \pm 5.5	-7.5 \pm 11.6	8.2 \pm 15.2
	50 μ M	-7.1 \pm 11.1	-0.9 \pm 3.1	5.3 \pm 10.8	14.4 \pm 10.2
	100 μ M	-12.3 \pm 3.5	0.5 \pm 5.3	4.2 \pm 12.6	24.2 \pm 9.6

Each experiment was conducted in triplicate for each sample, and the results are expressed as the mean \pm SE of two or three independent experiments.

5. 동물모델을 이용한 항 알레르기 식품 검색

가. 우유와 계란에 대한 PCA 모델에서 농산물의 항알레르기 효과

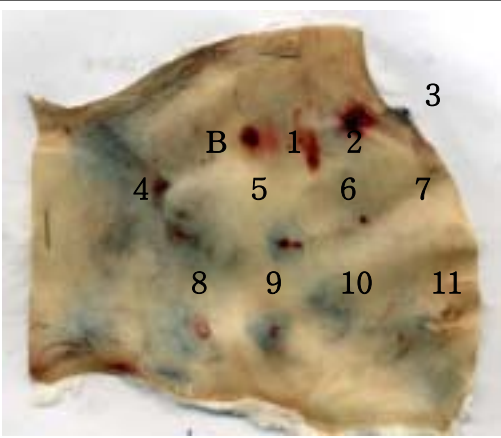
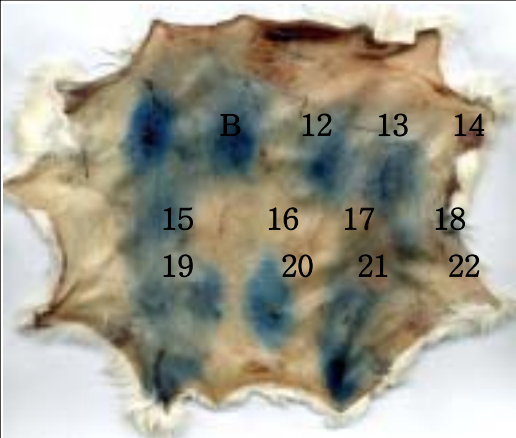

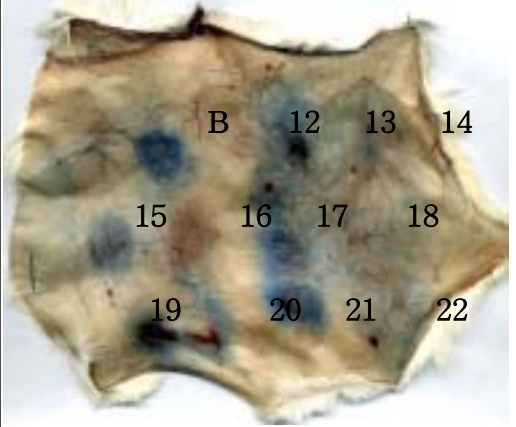
		농산물에 대한 PCA	
우 유			
	A	B	
계 란			
	A	B	
순서	Blank, 땅콩, 가지, 조, 생강, 참깨, 애호박, 깻잎, 검은콩, 오이, 시금치, 양상추, 감자	Blank, 무우, 들깨, 마늘, 밀, 팽이버섯, 입쌀, 당근, 미나리, 양파, 보리, 고구마	

그림 14. 각 농산물(땅콩, 가지, 조, 생강, 참깨, 애호박, 깻잎, 검은콩, 오이, 시금치, 양상추, 감자, 무우, 들깨, 마늘, 밀, 팽이버섯, 입쌀, 당근, 미나리, 양파, 보리, 고구

마)에 대한 PCA 결과로, 우유에 대해서 효과가 있는 것은 애호박과 가지로 나타났다. 애호박과 가지를 선택하고 억제가 안되는 미나리 가지고 II형, III형 그리고 IV형의 과민반응을 실시하였다.

계란에 대해서는 거의 모든 농산물에 대해 효과가 없는 것으로 나타났다. 그 중 억제효과가 있다고 판단되는 마늘과 당근 그리고 전혀 효과가 없다고 판단되는 밀을 선택하여 과민반응 모델 연구를 진행하였다.

나. 아나필락시스 점수

항원인 우유와 계란은 토끼에서와 같이 단백질 함량이 1mg/ml가 되게 하여 복강에 6주간 면역시켜 면역이 된 후 꼬리정맥에 항원을 주사하기 2시간 전 복강에 농산물, 즉 우유에 대해서는 PCA에서 효과가 있는 가지, 애호박, 미나리를 선택하여 실시하였고 계란에 대해서는 당근과 마늘에 대해 실시하였다. 대조군은 농산물을 복강에 주입하지 않은 군이었다. PCA에서 국소적 반응으로 알레르기에 효과가 있는 농산물이 있었지만, 전신성 아나필락시스에 의해서는 모두 억제시키지 못하였다. 가지나 애호박 같은 경우 우유에 대해서 알레르기 억제효과가 있는 것으로 판단되었으나 역시 전신성 anaphylaxis에서는 그 효과는 없었다. 그렇지만 항알레르기에 효과가 있을 가능성은 있었다.

우유에 대한 anaphylatic shock score

		세기(grade)
우유	대조군	3+
	가지	2+
	애호박	2+
	미나리	3+
계란	대조군	3+
	당근	2+
	마늘	2+

O : 변화없음

1+ : 약한 anaphylatic reaction으로 온몸을 떨며 괴로워하다가 회복

2+ : 온몸에 경련과 호흡곤란 등으로 눈을 감고 괴로워하다 사망

3+ : 강한 anaphylatic shock로 신음하다가 즉시 사망

다. 제 II형 과민반응

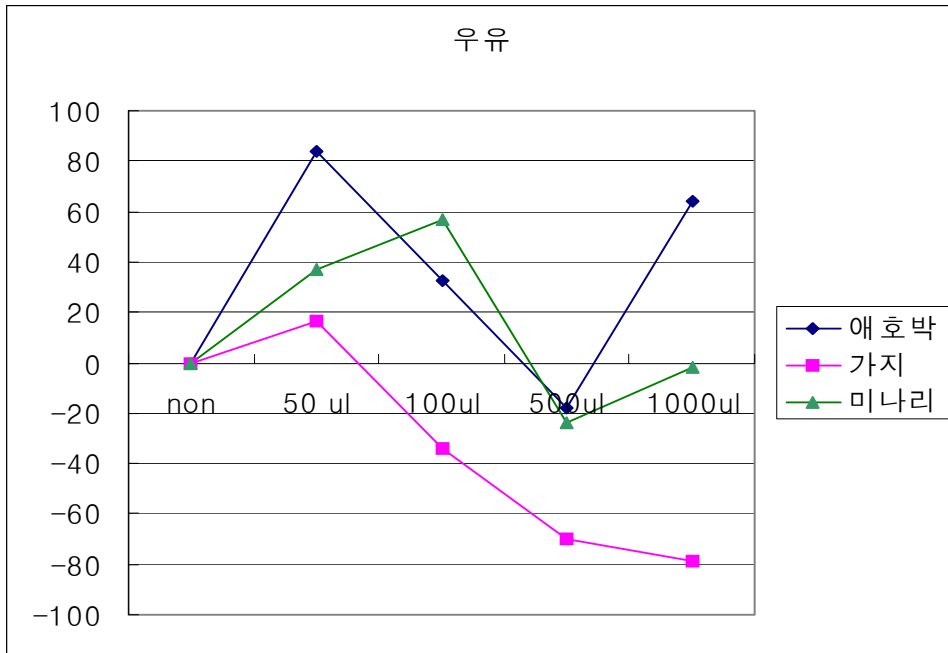


그림 15. PCA 결과로부터 우유에 대해 억제효과가 있는 애호박, 가지 그리고 효과가 없는 미나리를 가지고 II형에 대해 억제효과를 관찰하였다. 각 농산물이 50ul를 첨가 하였을때 억제율이 높음을 볼 수 있다. II형에서는 애호박이 가장 높은 억제율을 보이고 있다.

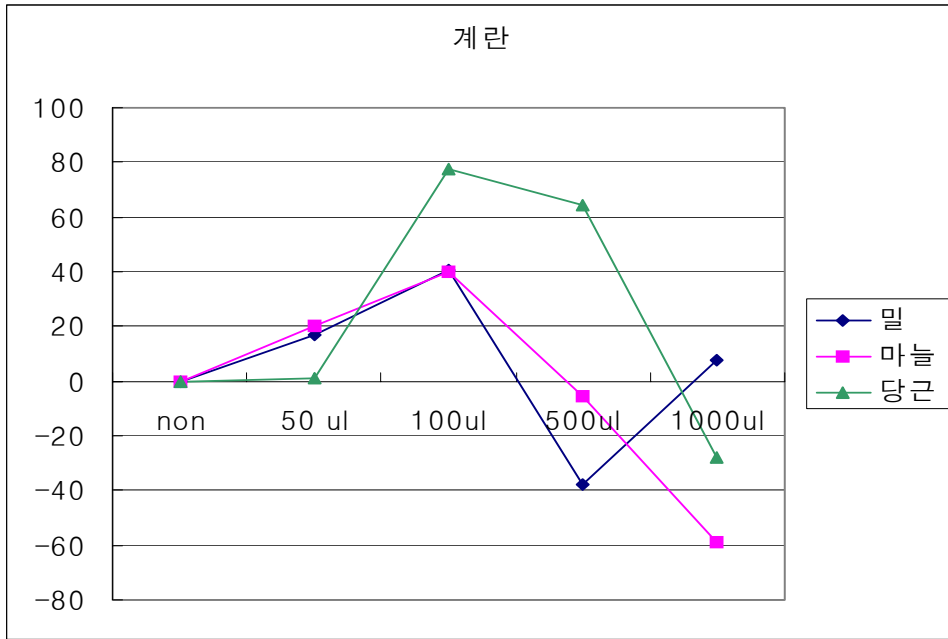


그림 16. 계란에 대해서는 농산물을 100ul를 첨가했을때 그효과가 가장 높게 나타났다. 이중 당근에서 가장 높은 억제율을 보이고 있다.

제 II형 과민반응에 대한 억제효과는 우유와 계란에서 각각 선택된 농산물에 대해 억제효과가 있다고 사료된다.

라. 제 III 형 과민반응







		제 III형 과민반응	
		우유	계란
3h			
6h			
12h			

그림 17. 제 III형 과민반응에서는 II형에서 실시된 시료들을 실시하였다. 각 농산물은 출혈(염증)반점의 직경을 감소시키지 못하는 것으로 나타났다. PCA에서 효과가 있는 농산물일지라도 우유나 계란에 대해 실시된 농산물은 III형 과민반응에 대해 효과는 없는 것으로 나타났다.

마. 제 IV형 과민반응

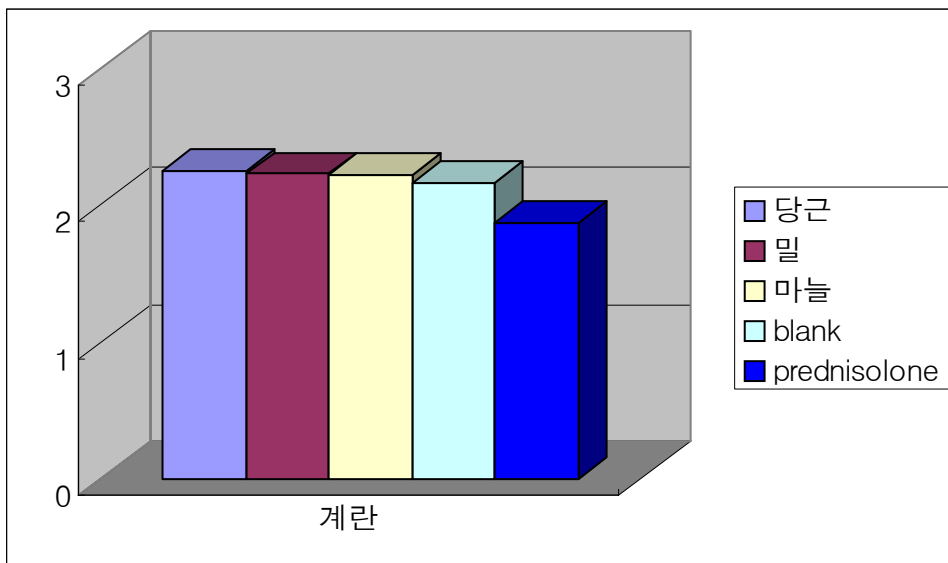
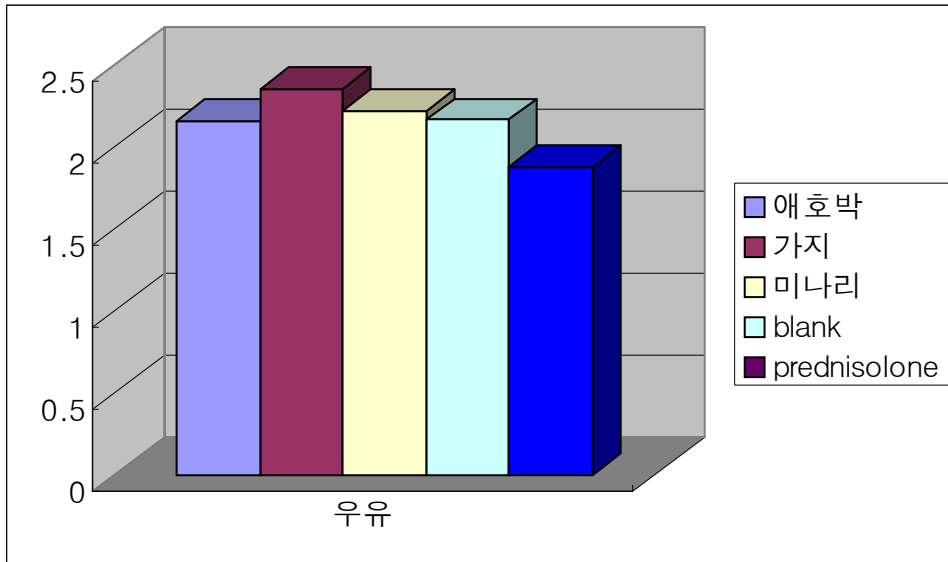


그림 18. 제 IV형 지연형 과민반응에 대해서 우유나 계란에 있어서 어떠한 것도 억제하지 못했다. 이들 농산물들은 대조군과 prednisolone보다 발바다의 두께가 낮아지지 않았기 때문이다. PCA에서 효과가 있더라도 각각의 과민반응의 기작이 다르기 때문에 억제하지 못하는 것으로 보여진다.

6. 조정제 및 부분 분자 특정화

가. 추출

1) 분자량에 의한 분획의 특정화(한외여과)

한외여과에 의해 300,000>분자량, 300,000<분자량<100,000, 100,000<분자량<30,000, 30,000<분자량<10,000, 10,000<분자량<1,000, 1,000<분자량의 분획은 순차적으로 분리하여 각 분획은 10ml DW에 용해시켜 각 분획을 가지고 우유에 대해 효과가 있는 (PCA결과) 농산물 가지와 애호박, 계란에 대해서는 당근과 마늘에 대해 분자량별에 의한 PCA를 실시하였다.





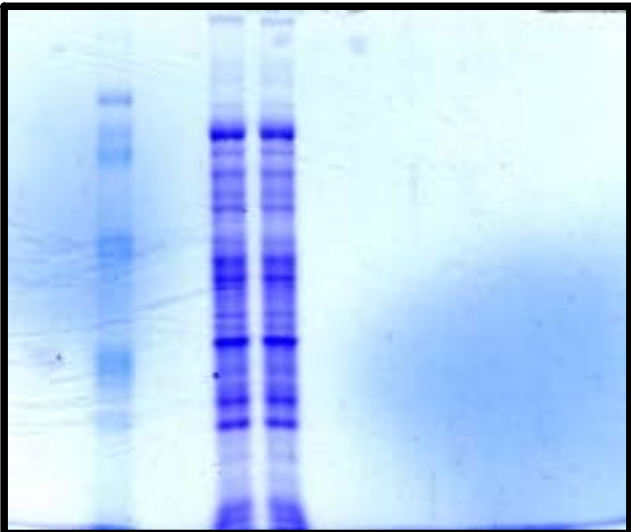
한외여과에서 얻은 분획들의 PCA		
우유		
	가지	애호박
계란		
	당근	마늘

그림 19. 각 분획들에서 대조군은 각각 우유와 계란으로 억제시료가 첨가되지 않아 청색으로 나타난다. 우유에 있어서 애호박은 각 분자량 분획별에서 모두 청색으로 나타내어 사실상 우유에 대한 알레르기를 억제하지 못하는 것으로 항알레르기 인자가 없는 것으로 사료되며 가지에서는 약하긴 하지만 분자량 100,000-30,000와 10,000-1,000사이에서 효과가 있는 것으로 보인다.

계란에 있어서 당근이나 마늘 모두에게서 항알레르기에 효과가 있는 분자량 분획은 나타나지 않은 것으로 보인다. 각 농산물 PCA 결과에서도 계란에 대해 알레르기 억제를 못하는 것으로 보인다.

2) 전기영동 결과

	
	<p>Std : a-phosphorylase B(94kDa), b-BSA(67kDa), c-Ovalbumin(43kDa), d-Carbonic anhydrase(30kDa), e-Soybean trypsin inhibitor(20.1kDa), f-Lysozyme(14kDa)</p> <p>1 ; 100,000<MW<30,000, 2 ; 100,000<MW<30,000, 3 ; 10,000<MW<1,000, 4 ; 10,000<MW<1,000</p>

분획 중에 존재하는 생리활성 화합물은 크게 단백질, 지질, 탄수화물로 생각할 수 있는데 그중 한외여과 분획한 가지의 단백질의 정성을 시도하였다. 2가지의 분획 100,000<MW<30,000과 10,000<MW<1,000은 SDS-PAGE(12%)로 실시하였다. 단백질의 의 band가 여러개가 나타난 것을 볼 수 있다. 그렇지만 분자량이 작은 10,000<MW<1,000분획에서는 너무 단백질의 분자량이 작아 나타나지 않았다. 어떠

한 물질이 항알레르기에 영향을 미치는가에 대해서는 아직 확신 할 수 없다.

3) Slica gel chromatography


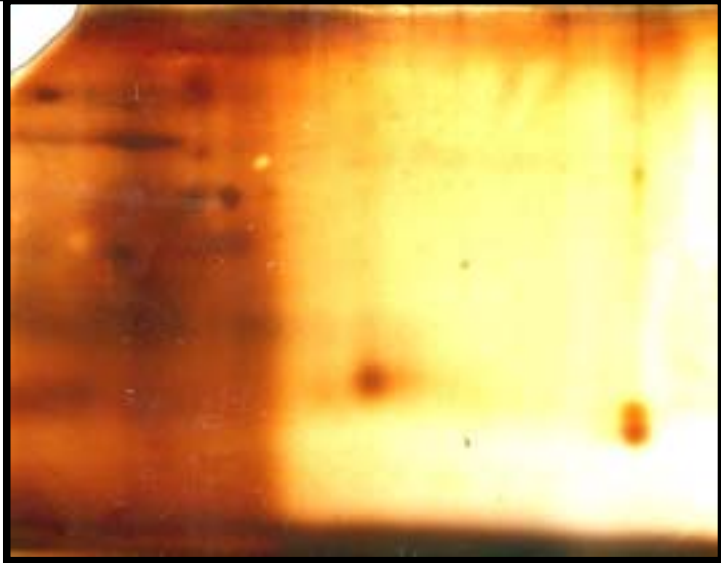
한외여과 추출된 가지의 fraction들을 gel chromatography를 통해 그 색소를 제거하여 정제하려고 한 것이다. silica gel이 충전된 column에 이동상을 methanol로 하여 tolgren을 column을 통과시키면 그림에서 보듯이 색깔이 윗부분에서보다 아랫부분에서 연해짐을 볼 수 있다. 이는 tolgren들이 column을 통과하면서 silica gel이 그 색소를 흡착하여 tolgren만 통과하는 것이다. 이렇게 하여 tolgren을 정제하였다.



나. 분석

1) 단백질 분석

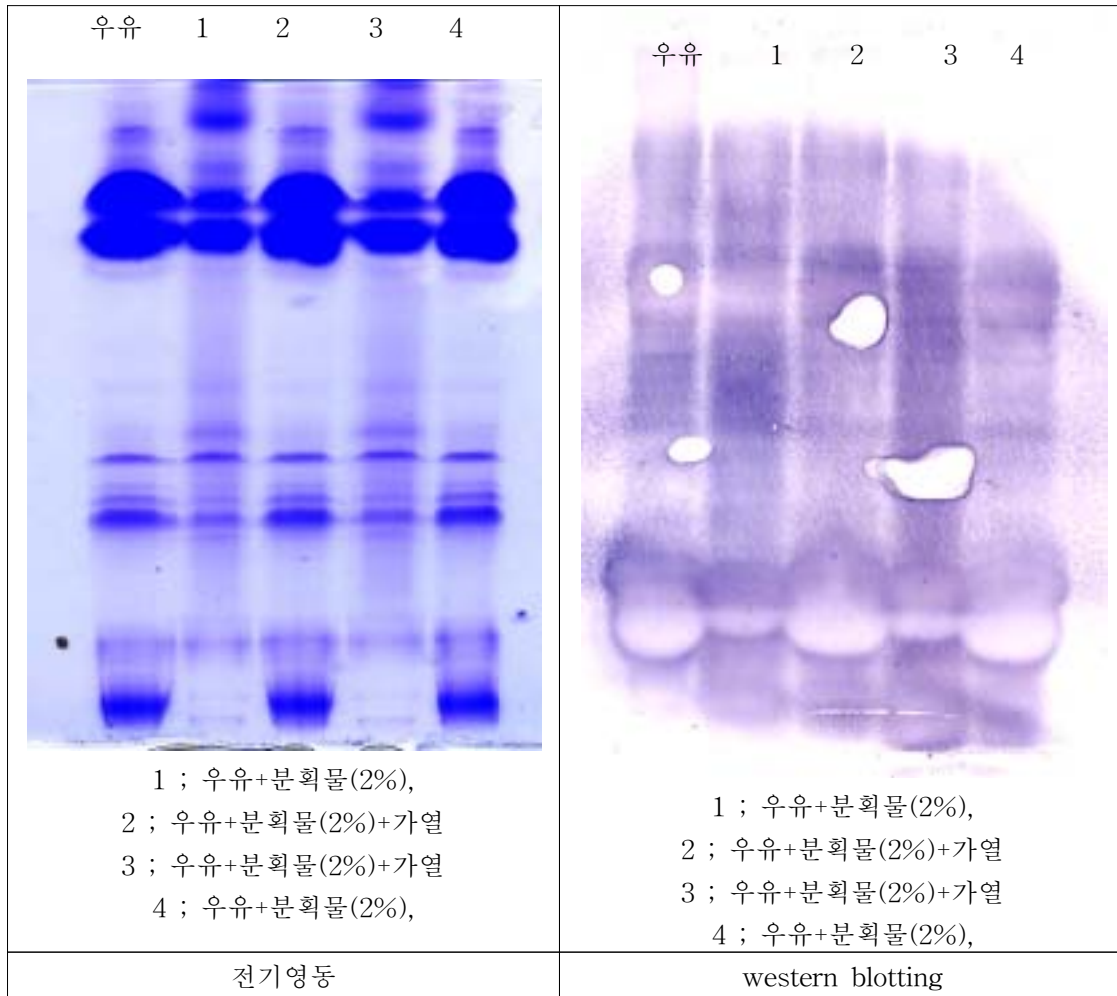
1차 전기영동에서 나타난 $100,000 < MW < 30,000$ 의 fraction으로 2차 전기영동 isofocusing을 실시하였다. 가지의 fraction과 비교시 차이는 없는 것으로 보인다.

한 외 여 과 안된 가지 의 fraction	
$100\text{kDa} < MW < 30\text{kDa}$ 분획	

2) Immunoblotting 소견

한외여과된 fraction을 이용 항알레르기에 효과를 위해 immunoblotting을 실시하였다.

처리는 우유에 직접 분획된 fraction 100,000<MW<30,000 추출액을 2%되게 첨가하였으며 또 다른 처리로 위에서처럼 처리한 시료를 3분간 가열 처리하였다.



우유에 대해 가지의 100,000<MW<30,000 fraction에서 항알레르기 효과는 가열하지 않고 우유에 직접 2%의 가지의 분획물을 첨가했을때 단백질들이 우유와 2%의 분획물 첨가 후 가열한 것에 비해 효과가 있는 것으로 보인다. 따라서 가지의 분획물 100,000<MW<30,000의 것으로 식품의 원료물질로 사용하였다.

3) 지방산 분석

추출 성분을 GC/Mass에 의해 지방산을 분석하였다.

농진청에서 발행하는 식품성분표(가지 생것)와 비교시 지방의 함량이 0.1%이고 18:2(리놀렌산)이 지방산 중에서 49.0%로 반을 차지하고 있으며 그 다음이 16:0(팔미트산), 18:3(리놀렌산), 18:0(스테아르산), 18:1(올레산), 등의 순으로 그 함량이 표시되었다. 본 연구에서는 18:1(올레산), 16:0(팔미트산), 18:2(리놀렌산), 18:0(스테아르산)만 그양이 측정되었다. 생것의 가지와 비교시 함량의 차이는 있지만 필수지방산과 불포화지방산이 많은 것으로 나타났다.

지방산 조성(g/100g 지방산)																		
10:0	12:0	14:0	14:1	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:2	20:1	20:3	20:4	20:5	22:0	22:1	24:0
카프라산	라우산	미리스틴산	미리스톨산	팔미트산	팔미트레산	스테아르산	올레산	리놀레산	리놀렌산	아라카드산	에이코세노산	에이코사디엔산	에이코사트리에노산	아라키돈산	에이코사펜타엔산	베헨산	도코사산	리그노세산
-	-	-	-	20.9	-	5.7	62.5	10.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4) 당 분석

한외여과 추출된 가지의 100,000<MW<30,000의 fraction을 HPLC에 의해 실시하였다.

생가지에 당이 약 4.5%(농진청 발행 성분분석표 참고했음)가 들어있는데 가지의 가용화 시킨 후 한외여과를 통해 당성분이 많이 빠져나가 어떠한 Peak도 나타나지 않았다.

5) 무기질-ICP Mass 소견

- 질소 정량(켈달법)

가지의 2가지 fraction내 질소함량은 Kjeldhal 법으로 실시하였다.

2 분획의 질소의 함량은 별 차이는 없는 것으로 나타났다. 단백질로 환산하면 각각 15.5%와 15.87%로 나타나 전체 단백질 중 일부분인 것으로 보였다.

질소함량

	10~3만	1만~1천
NT%	2.48	2.54

- 무기질 함량,

한외여과에서 얻어진 분획물은 일단 단백질로 확인될 물질들에 대해서 무기질은 Ca, Mg, Na, K을 ICP Mass에 의해 정량하였다.

한외여과 fraction에 존재하는 무기질의 양은 전체의 양과 비교할때에 훨씬 적게 나타났다. 예를 들면 생 가지(Chungyang)일 때에는 Na의 경우 100g 중에 Na이 156mg,

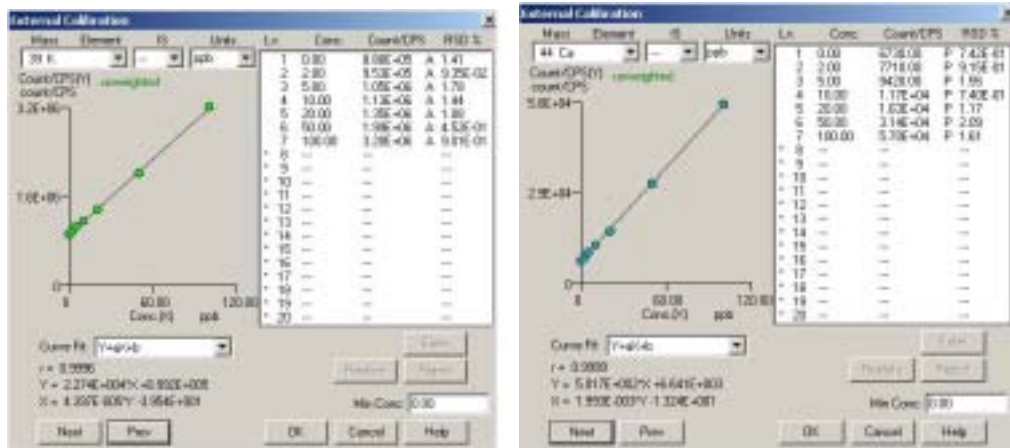
K가 235mg, Mg이 15mg 그리고 Ca이 10mg 포함되어 있는데(남 등, 2002) 본 연구에 서는 한외여과로 인해 그 양이 아주 적게 나타났다.

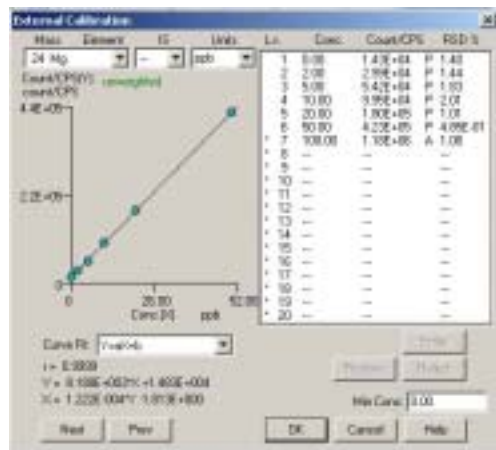
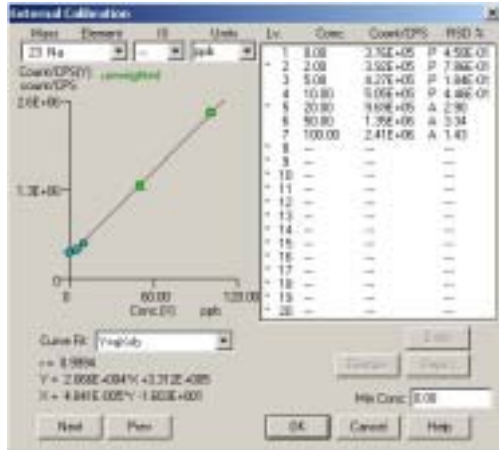
전반적으로 10,000<MW<1,000 fraction에서 농도가 높은 것으로 나타났다.

한외 여과된 2 fraction 가지의 무기질 mg %

	100,000<MW<30,000	10,000<MW<1,000
K	0.015	0.024
Ca	0.006	0.003
Na	0.037	0.055
Mg	0.0003	0.0008

Standard 곡선





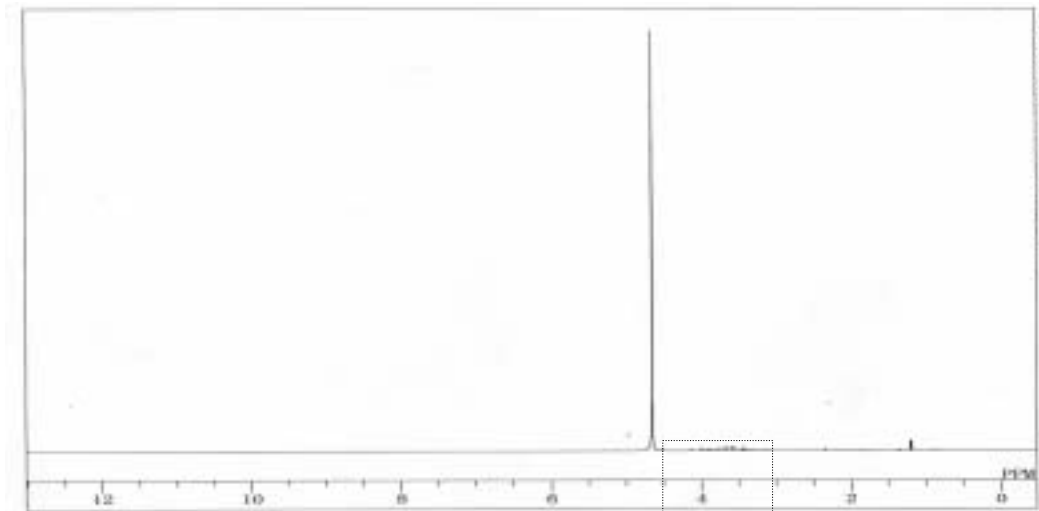
6) NMR

한외여과된 fraction의 구조 정성 분석을 위해 NMR을 실시하였다.

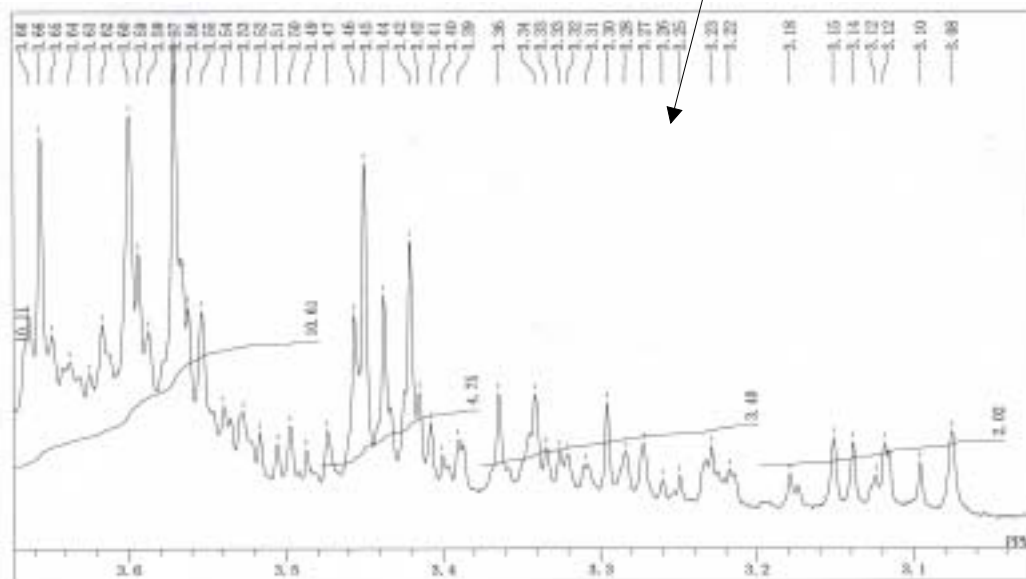
proton과 carbon에 대해서 2 fraction에서의 큰 차이는 없었다. carbon에서는 peak 주변 노이즈가 많았다.

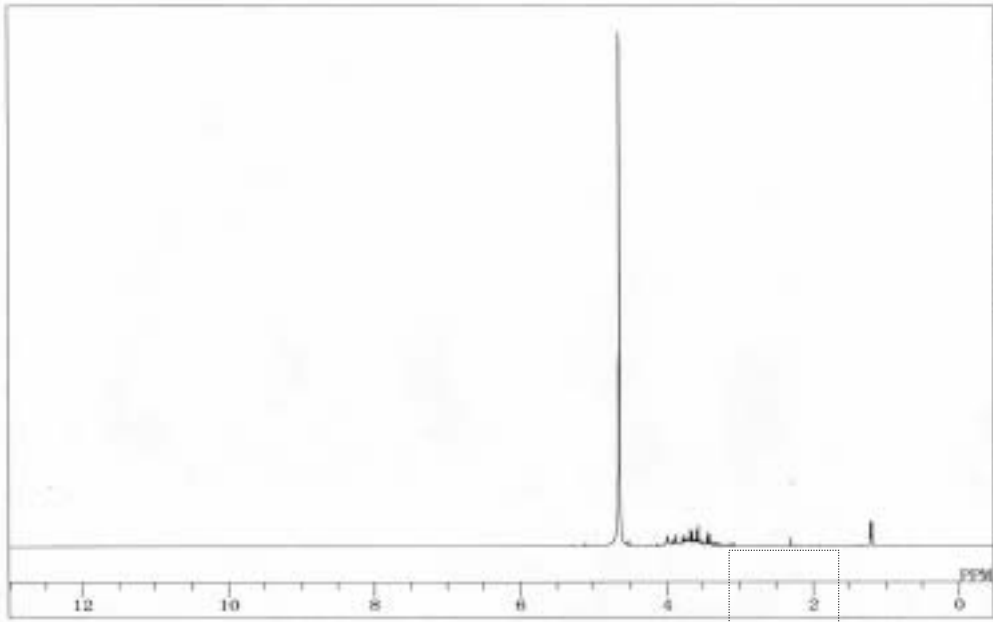
Proton의 경우 peak의 수소원자 개수가 2-10개 정도를 나타내고 있다. carbon의 경우 탄소의 대칭정도가 1개 정도를 보이고 있다.

- Proton

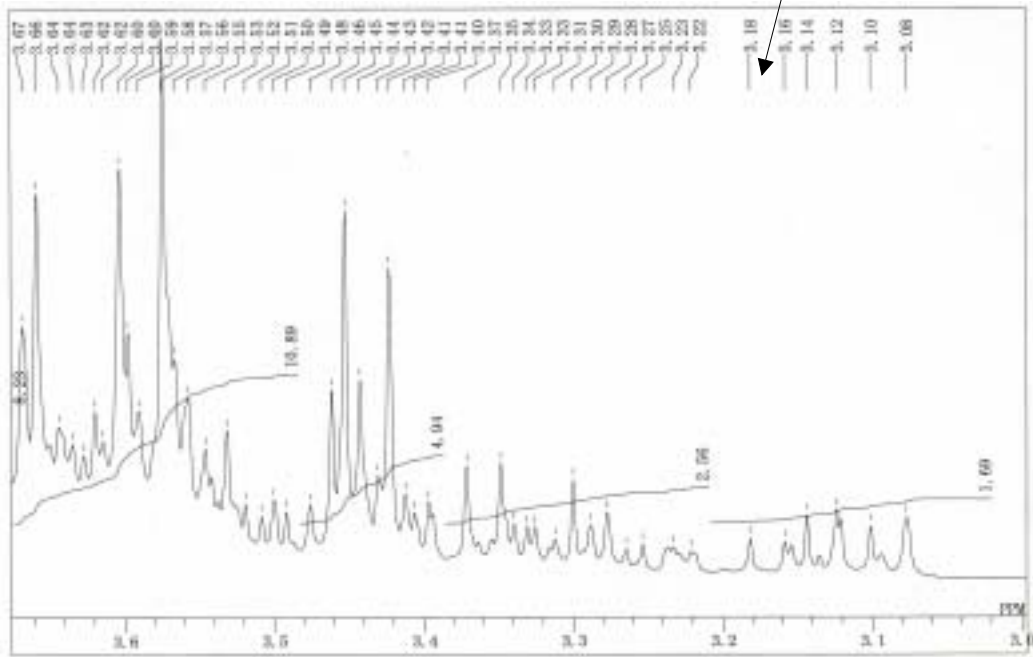


100,000<MW<30,000의 Proton의 spectrum

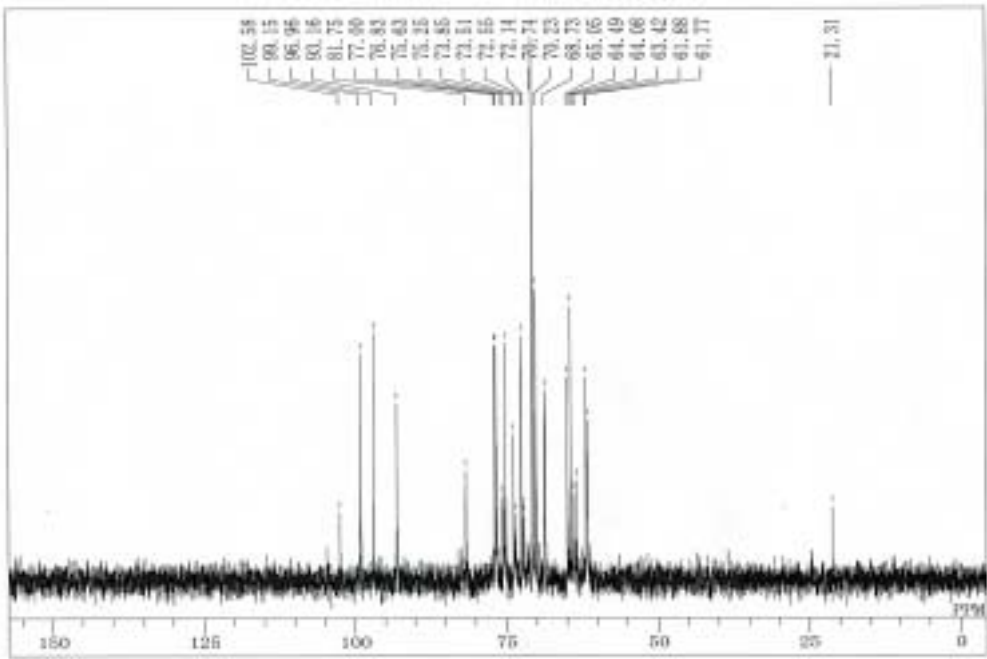




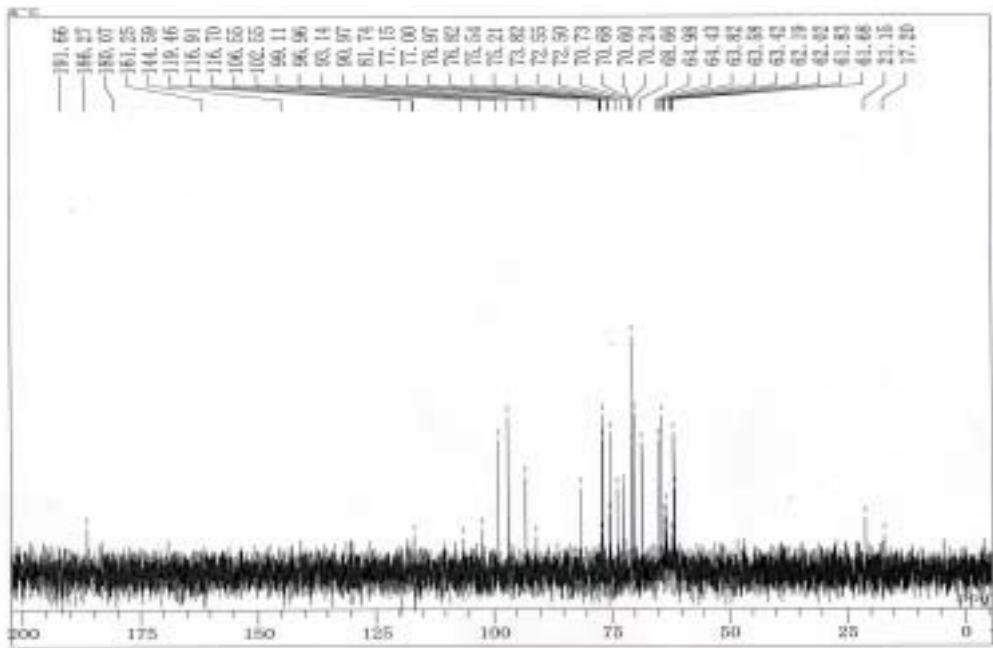
10,000 < MW < 1,000 의 Proton 의 spectrum



- Carbon



100,000<MW<30,000의 Proton의 spectrum



10,000<MW<1,000의 Proton의 spectrum

7) Electronic nose

본 연구에서 가지의 한외여과 fraction에서는 휘발성 물질이 없어 electronic nose(전자코)를 이용한 휘발성 성분을 측정을 할 수 없다.

8) 전자현미경

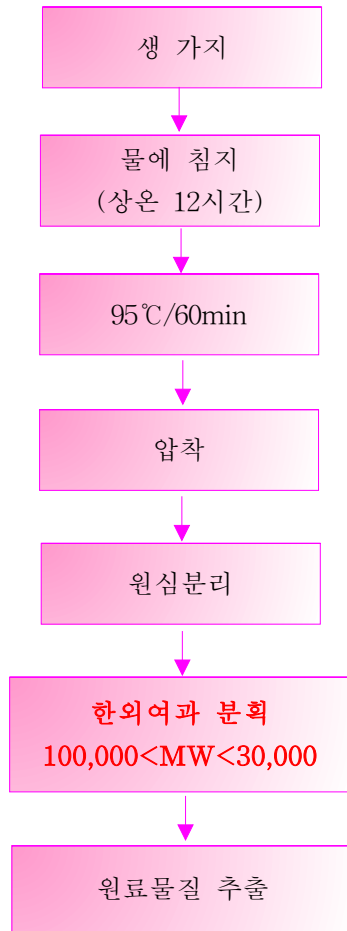
전자현미경적 비교도 역시 별 차이가 없다.

7. 분획된 물질의 원료로 이용되는 식품의 제조

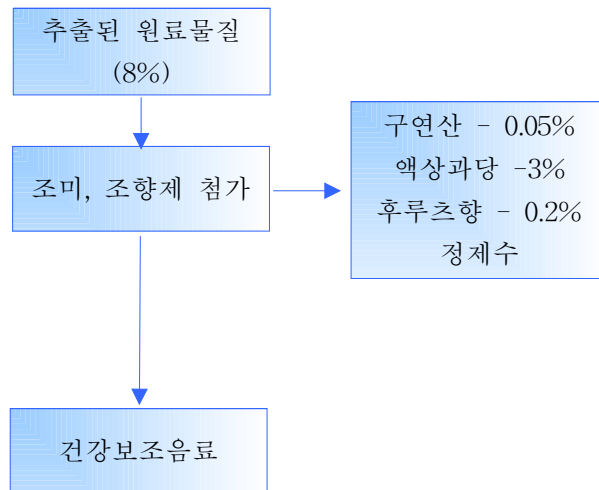
가. 도출된 가공공정도

높은 농도의 단기가내 약보다 평상시 음료로써 상음함으로써 예방 치료를 겸비하고자 함. 알콜로 사용하지 않고 분리단계도 일반적인 경로가 아닌 한외여과를 실시함으로써 신속하게 공정에 접근할 수 있도록 시도하였다. 만일 초기에 알콜 추출을 시도하였다면 이 추출물은 여러 방법에 분리해야 하고 확인되면 공정에 적용할 때 알콜 추출의 문제(알콜 회수)인 정제성 및 원가상승요인이 있다.

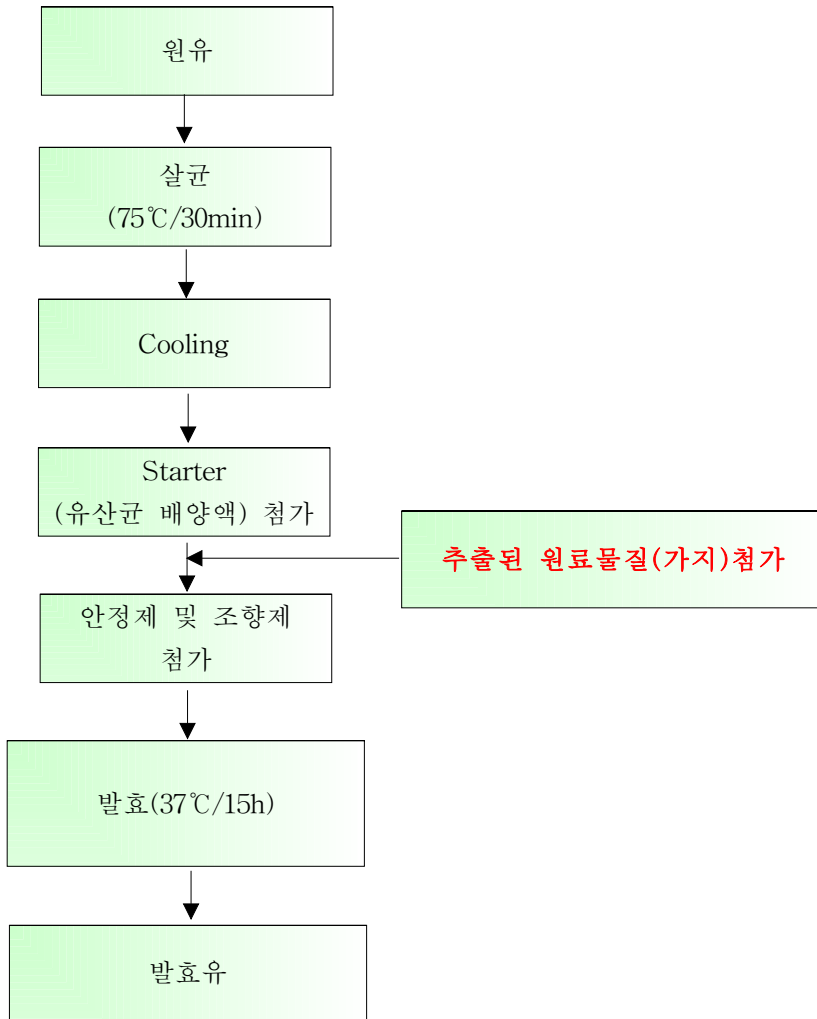
본 연구에서는 추출방법에서 도출된 한외여과는 직접 공정에 적용된다. 추출경비, 회수 손실원가 등의 경제적 이점이 있어 상온에서 물에 담그었다가(침지 12시간) 95℃에서 가열하여 완전히 용출시킨 후 압착으로 수분을 제거하고 그 추출액을 분자량 100,000<MW<30,000을 한외여과하여 음료원료물질로 이용한다. 원료살균이 생략되어 원가절감의 효과가 있고 이 원료에 적당량 조향, 조미 물질을 첨가하면 보건음료로 생산될 수 있다.



나. 음료 제조

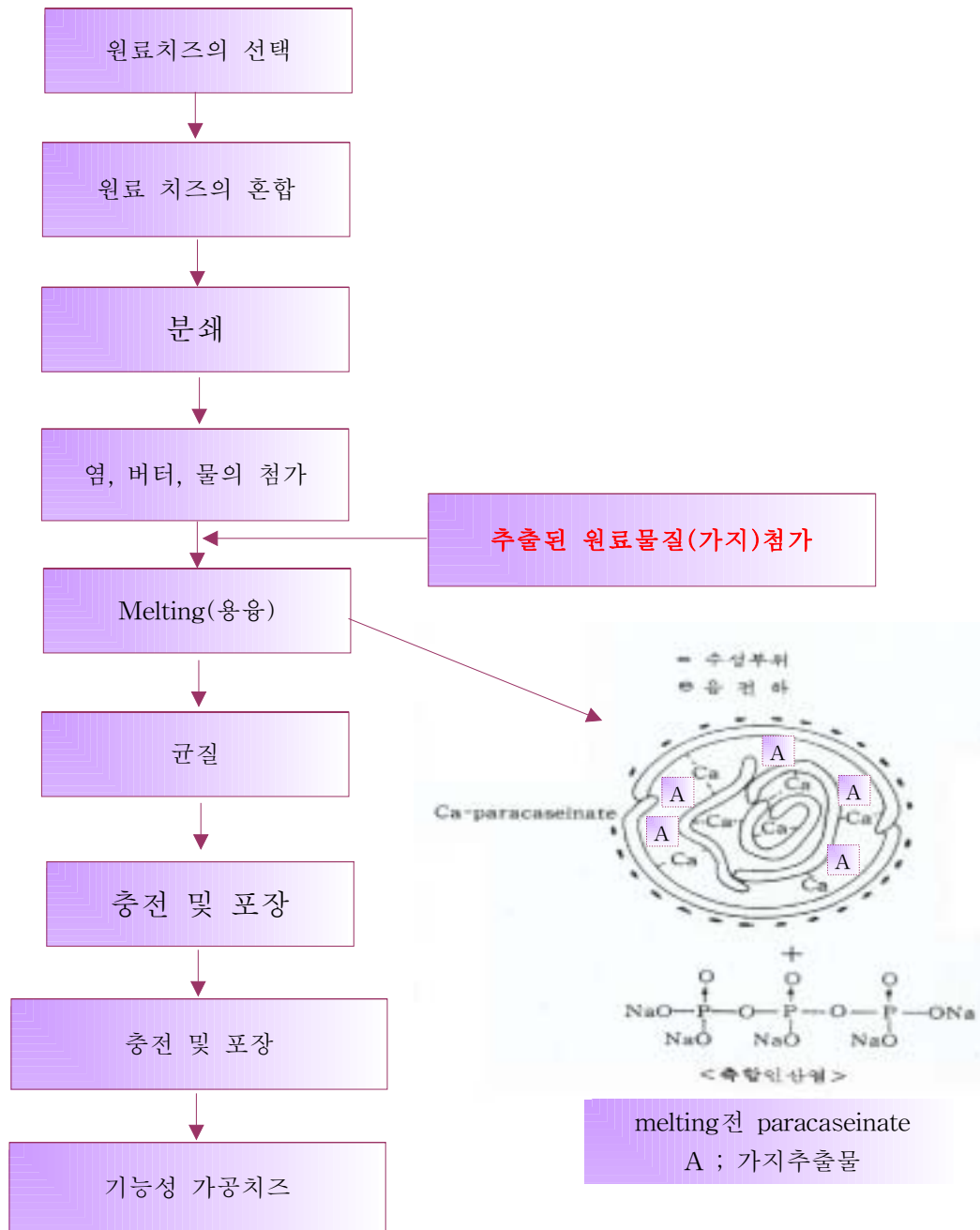


다. 발효유의 제조



라. 가공치즈의 제조

가공치즈는 경질의 숙성치즈를 분쇄하여 물과 유지방 및 용융염(인산염)을 가한 후 가열 한다. 그런 후에 성형하고 냉각하여 만든 제품으로 공정은 다음과 같다. melting(용융) 중 우유단백질(Ca-paracaseinate)안에 가지의 추출물이 첨가한다.



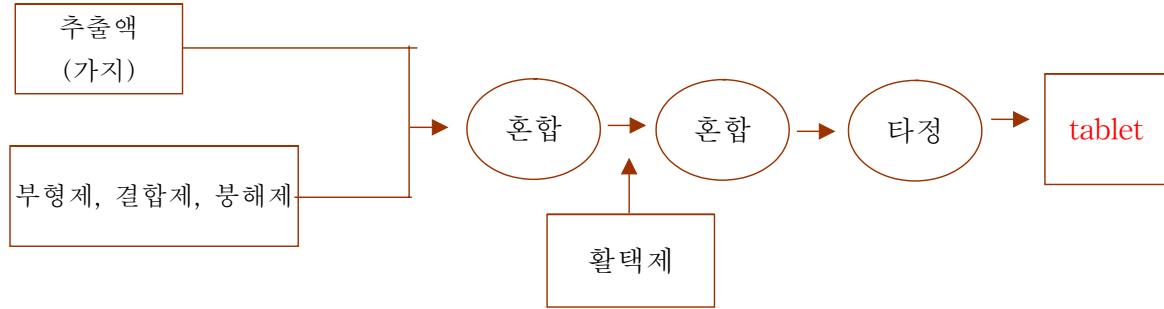
가공치즈의 제조과정

마. 기타

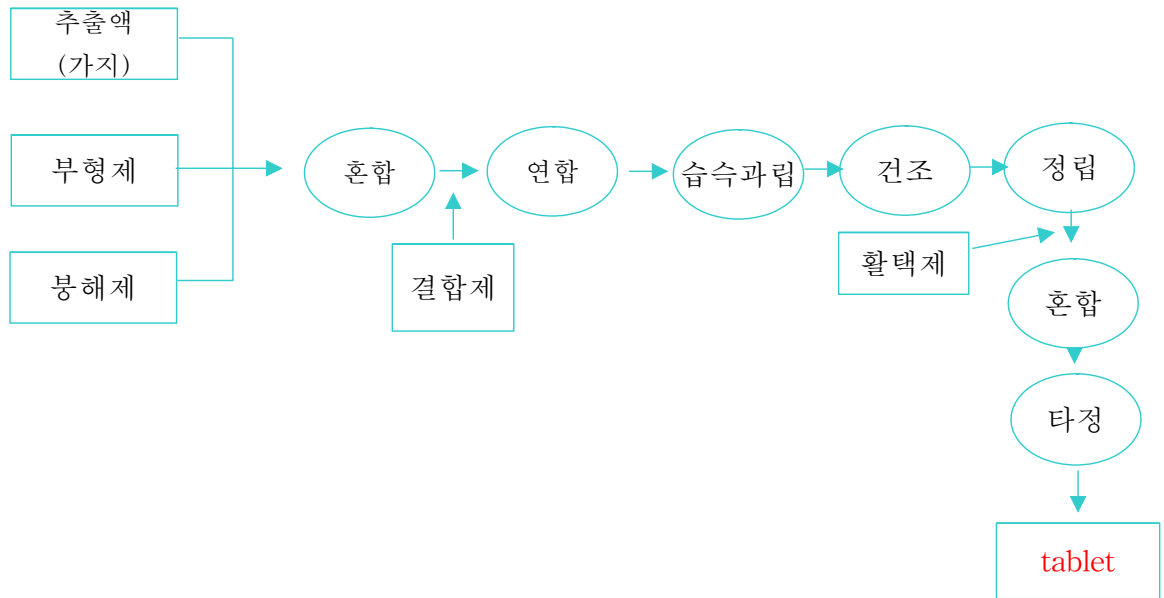
tablet형, capsule형, gel형, 간식용 스펙이나 비스켓에서도 이용될 수 있다.

1) tablet 제조

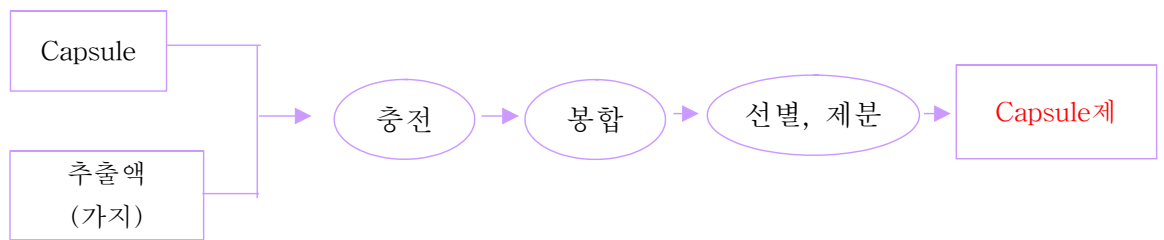
- 직타법



2) 습식과립압축법



3) Capsule 제의 제조 공정



4) Gel 제의 제조 ; 알루미늄염(염산염 또는 황산염 등)과 알칼리 용액(탄산수소나트륨 또는 탄산염)의 상호작용에 의해 제조되어진다. 여기에 만든 가지 한외여과 추출액과 혼합한 후 균질화 될 때까지 교반하여 제조한다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

착안사항											관련분야 기여도
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
○ 한국인에서의 주요 농산물 식품 알레르겐 현황	—————										100%
○ 항알레르기 효과를 지닌 식품 알레르겐의 검색	—————										100%
○ 한국인 고유의 식품내 주요 알레르겐 성분 규명	—————										100%
○ 항알레르기 효과를 나타내는 식품의 효과를 검 하기 위하여 동물 모델에서 효과 검증	—————										100%
○ 검색된 항알레르기 효과를 지닌 농산물의 조정제 및 원료이용성 가능성 탐색	—————										100%
○ 항알레르기 성상을 지닌 농산물의 원료성분의 이용성 가능성 탐색	—————										100%

* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에의 기여도 등을 기술

제 5 장 연구개발결과의 성과 및 활용계획

제 1절 연구 개발 성과

1. 김상하, 김현미, 남동호, 서창희, **박해심**. 성인 알레르기 환자에서 콩(soybean) 항원에 대한 특이 IgE 항체 측정 및 알레르겐 규명. 천식 및 알레르기. 2004;24:331-36
2. 윤성호, 김현미, 예영민, 강영미, 서창희, 남동호, 김승현, **박해심**. 성인 알레르기 환자에서 자연산과 유전자 재조합 감자에 대한 특이 IgE 항체 측정 및 알레르기 증상 비교. 대한내과학회 잡지 2005;69:651-659
3. Soo-Keol Lee, Sung-Ho Yoon, Seung-Hyun Kim, Jeong-Hee Choi, **Hae-Sim Park**. Chestnut as a food allergen: Identification of major allergens. J Korean Med Sci. 2005;20:573-8
4. 윤성호, 강영미, 예영민, 김승현, 서창희, 남동호, **박해심**. 한국인 성인 알레르기 환자에서 국내산 농산물과 교차반응성 조사. 천식 및 알레르기 2005;25:269-275
5. Lee SK, Ye YM, Suh CH, Nahm DH, **Park HS**. Evaluation of the sensitization rates and identification of IgE-binding components in wild and genetically modified potatoes. Clinical Molecular Allergy 2006 (in press)
6. Jung IY, **Park HS**, Choi JH, Kim SH, Min KU, Two cases of anaphylaxis caused by perilla seed . J Allergy Clin Immunol 2006 (in press)
7. Kim SH, Kim HM, Ye YM, Kim SH, Nahm DH, Park HS, Ryu SR, Lee BO. Evaluating the allergic risk of genetically modified soybeans. Yonsei Med J (2006 in press)
8. Sung-Ho Yoon, Young-Mi Kang, Young-Min Ye, Seung-Hyun Kim, Chang-Hee Suh, Dong-Ho Nahm, **Hae-Sim Park**. The sensitization rate to major homemade agricultural products in adult allergy patients. 2005년 춘계 천식 및 알레르기 학회 초록발표.
9. Sung-Ho Yoon, Hyun-Mi Kim, Sang-Ha Kim, Chang-Hee Suh, Dong-Ho Nahm, **Hae-Sim Park**. IgE sensitization and identification of IgE binding components of the corn allergen in adult allergy patients : comparison between wild and genetically modified corn. 2005년 춘계 천식 및 알레르기 학회 초록발표.
10. 이수걸, 윤성호, 예영민, 서창희, 남동호, **박해심**. Evaluation of allergenic risks of genetically modified potato: a comparative study with wild potato. 대한 천식 및 알레르기학회 춘계학술대회. 2005, 5, 27-28

11. Jae-Young Lee, Sung Ho Yoon, Young-Min Ye, Seung Hyung Kim, **Hae-Sim Park**. Circulation specific IgE to gliadin can be a useful marker for diagnosing wheat dependent exercise induce anaphylaxis patients among the wheat-sensitized patients. 2006년 AAAAI (American academy of allergy asthma and Immunology) abstract 발표

제 2절 연구 개발 결과의 기대 효과

1. 기술적 측면

- 1) 우선 한국인 고유의 음식물 특히 주요 농산물(콩, 옥수수, 밀, 감자 등) 섭취에 따른 알레르겐성분에 대한 기본 data를 구축하여, 이에 대한 주요 식품 알레르겐을 검색하였고, 식품 내 주요 알레르겐 성분을 규명하는 전반적인 기술 개발이 가능하였다.
- 2) 농산물의 항알레르기 효과를 다양하게 검증할 수 있는 기술을 구축하였다.
- 3) 우리 농산물중 항알레르기 효과를 지닌 식품을 검색하여 기본 데이터를 구축하는 기반을 조성하였다.
- 4) 각종 식품 가공 효과에 따른 알레르기 발생을 감소시키는 기술을 구축하였다.
- 5) 한국인 고유의 농산물 알레르기에 대한 진단 kit를 개발할 수 있는 기술 구축을 가능하게 하였다.
- 6) 타 농산물과의 교차반응성에 관한 기본 데이터를 구축하여 식품 알레르기의 예방 및 알레르기 유발 가능 요소를 차단할 수 있는 기술 개발이 가능토록 하였다.
- 7) 임상적인 결과와 실험적인 결과의 비교 분석을 통하여 식품 알레르기 진단 및 치료법을 정립하였다.

2. 경제 · 산업적 측면

- 1) 한국인 고유의 음식물 알레르겐을 진단할 수 있는 진단적 kit 개발이 가능하며, 또한 저 알레르기 식품을 개발할 수 있는 기초 자료를 제공하였다.
- 2) 본 연구를 통해 확립된 농산물 내 항알레르기 효과 검증법을 통해 보다 효율적으로 항알레르기성을 갖는 국산 농산물을 발굴할 수 있게 되며, 나아가서는 국내 환경과 문화가 유사한 아시아 국가 (일본, 중국, 동남아)에 항알레르기성을 갖는 국산 농산물들을 수출할 수 있는 기초 자료를 제공할 수 있다.
- 3) WTO 대응대책 및 우리 농산물 보호를 위한 기반 자료 제공할 수 있다.
- 4) 음식물 종류에 따른 발병 기전을 밝힘으로써, 그에 맞는 진단 kit 개발 및 새로운

치료 모형 개발의 기초를 마련할 수 있다.

제 3절 연구 개발 결과의 활용 계획

1. 식품 알레르기 환자들에게 항알레르기 식품 섭취를 가능하게 해 준다.
2. 항알레르기 식품의 발굴로 식품 알레르기 발생을 감소시킴.
 - 가. 국내외 홍보
 - 나. 국내외 특허출원
 - 다. 국내외 학술지 발표
 - 라. 홍보자료의 제작
3. 항알레르기 식품의 발굴을 통해 항알레르기 기능 식품의 개발과 관련된 식품산업의 발전 기회를 제공
 - 가. 항알레르기 원료 물질을 이용 시작품 제작
 - 나. 기업에 기술이전
 - 다. 기술료 납부
4. 식품 내 주요 알레르겐을 검색함으로써 저 알레르기 식품 개발의 기초를 제공

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
없음

제 7 장 참고문헌

1. Moneret-Vautrin DA, Morisset M. Adult food allergy. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2005;5:80-5
2. Palmer DJ, Gold MS, Makrides M. Effect of cooked and raw egg consumption on ovalbumin content of human milk: a randomized, double-blind, cross-over trial. *Clin Exp Allergy.* 2005;35:173-8
3. Kopper RA, Odum NJ, Sen M, Helm RM, Stanley JS, Burks AW. Peanut protein allergens: the effect of roasting on solubility and allergenicity. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005;136:16-22
4. Saavedra Y, Vergara P. Hypersensitivity to ovalbumin induces chronic intestinal dysmotility and increases the number of intestinal mast cells. *Neurogastroenterol Motil.* 2005;17:112-22
5. Meredith C. Allergic potential of novel foods. *Proc Nutr Soc.* 2005;64:487-90
6. Boden M, Dadswell R, Hattersley S. Review of statutory and voluntary labelling of food allergens. *Proc Nutr Soc.* 2005;64:475-80
7. Norrman G, Tomicic S, Bottcher MF, Oldaeus G, Stromberg L, Falth-magnusson K. Significant improvement of eczema with skin care and food elimination in small children. *Acta Paediatr.* 2005;94:1384-8
8. Guarneri F, Guarneri C, Benvenga S. Identification of potentially cross-reactive peanut-lupine proteins by computer-assisted search for amino acid sequence homology. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005;138:273-7
9. Akkerdaas JH, Wensing M, Asero R, Rivas MF, Knulst AC, Bolhaar S, et al. IgE binding to pepsin-digested food extracts. *Int Arc Allergy Immunol.* 2005;138:203-8
10. Borghesan F, Borghesan N .Maize-flour induced rhinitis. *Allerg Immunol.* 2005;37:283-4
11. Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:805-19
12. Fiocchi A, Bouygue GR, Sarratud T, Terracciano L, Martelli A, Restani P. Clinical tolerance of processed food. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2004;93(5 Suppl 3):S38-46
13. Bannon GA. What makes a food protein an allergen?. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2004;4:43-6
14. Fernandez RM. Cross-reactivity between fruit and vegetables. *Allergol*

- Immunopathol. 2003;31:141-6
15. Lehrer SB, Ayuso R, Reese G. Current understanding of food allergens. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;964:69-85
 16. Milanowski J, Gora A, scorska C, Mackiewicz B, Krysinska-Traczyk E, Cholewa G, Sitkowska J, Dutkiewicz J. The effects of exposure to organic dust on the respiratory system of potato processing workers. *Ann Agric environ Med.* 2002;9:243-9
 17. Simonato B, Pasini G, Giannattasio M, Peruffo AD, De Lazzari F, Curioni A. Food allergy to wheat products: the effect of bread baking and in vitro digestion on wheat allergenic proteins. A study with bread dough, crumb, and crust. *J Agric Food Chem.* 2001;49:5668-73
 18. Quirce S, Maranon F, Umpierrez A, de las Heras M, Fernandez-Caldas E, Sastre J. Chicken serum albumin (Gal d 5*) is a partially heat-labile inhalant and food allergen implicated in the bird-egg syndrome. *Allergy.* 2001;56:754-62
 19. Okamoto M, Mitsunobu F, Ashida K, Mifune T, Hosaki Y, Tsugeno H, Harada S, Tanizaki Y, Kataoka M, Niiya K, Harada M. Effects of perilla seed oil supplementation on leukotriene generation by leucocytes in pateints with lipometabolism. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000;122:137-42
 20. Helm RM, Burks AW. Mechanism of food allergy. *Curr Opin Immunol.* 2000;12:647-53
 21. Yagami T, Haishima Y, Nakamura A, Osuna H, Ikezawa Z. Digestibility of allergens extracted from natural rubber latex and vegetable foods. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106:752-62
 22. Yamamura H, Kohon S and Ohata K. Effect of SN-408(Slameterol Hydroxynaphtholate) on Passive Cutaneous Anaphylactic chemical mediator release in Rats and Guinea pig. *J Allergol.* 1991;40:669
 23. 김세훈, 강혜련, 김경목, 김태범, 김선신, 장윤석 외. 알레르기 증상으로 내원한 한국인에서의 음식물 알레르겐에 대한 감각률 조사: 다기관 공동연구. *천식 및 알레르기.* 2003;23:502-14
 24. 서유진, 윤성호, 신유섭, 최정희, 서창희, 남동호 외. 성인 알레르기 환자에서 메틸 항원에 대한 특이 IgE 항체 측정 및 알레르겐 규명. *천식 및 알레르기.* 2003;23:474-82
 25. 이영목, 서유진, 이수걸, 남동호, 박해심. 피부반응시험 결과에 따른 축 화분과 식품 알레르겐과의 연관성. *천식 및 알레르기.* 2002;22:410-17
 26. 이수영. 식품 알레르기의 동물모델. *천식 및 알레르기.* 2000;20:164-73

27. 박기범, 은희철, 이유신. 우유 및 계란 알레르기 1예. 알레르기학회지. 1986;6:51
28. 정은자. 달걀단백질의 allergenicity에 관한 연구. 한국식품영양학회. 1998;2:228-36
29. 최인선, 최병휘, 민경엽, 강석영. 성인에 발생한 우유 알레르기의 1예. 알레르기학회지. 1982;2:116

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.