

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000573-01

저알레르기 대두 발효기술개발 및 제품화

Development of new fermentation techniques for  
manufacturing soybean products with low allergy

주관연구기관 : 양지푸드(주)

협동연구기관 : 경상대학교

농 립 축 산 식 품 부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “저알레르기 대두 발효기술개발 및 제품화” 과제(세부과제 : 저 알레르겐 장류 제품 개발, 협동과제 : 알레르겐 함량 측정을 통한 알레르겐 저감화 대두 발효 공정 확립)의 보고서로 제출합니다.

2014 년 9 월 13 일

주관연구기관명 : 양지푸드

주관연구책임자 : 김 도 경

협동연구기관명 : 경상대학교

협동연구책임자 : 류 충 호

# 요 약 문

## I. 제 목 : 저알레르기 대두 발효기술개발 및 제품화

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 대두를 발효시킨 된장, 간장, 고추장 및 청국장 등의 장류제품은 현재 한국인들이 가장 선호하는 조미 식품. 사회적으로 기능성 혹은 건강성을 지향하면서 자연 식품인 장류의 소비가 증대되고 있는 시점에서 장류 제품은 상품적 가치를 높여 국내외에서 경쟁력의 제고가 필요
- 대두 알레르기의 유병률은 지역, 식습관, 노출 정도에 따라 다르지만 소아에서는 1~6% 정도 나타나며 아토피 피부염 환자의 6%, 우유알레르기 환자의 14%에서 대두알레르기가 나타남. 1,716명의 성인 알레르기 환자의 국내산 대두에 대한 감작률은 3.8%로 알려져 있다. 또한 우유 단백질에 감작된 알레르기 환자 18.3%에서 대두 특이 IgE가 양성을 나타냄. 대두 알레르기는 대체로 나이가 들면서 자연 소실되는 식품알레르기 중 하나로 알려져 있다. 3세경이면 대두에 내성을 획득하고 제한식이를 시행 1~2년 후에 40%는 대두 알레르기가 소실지만 평생 3년 이상 숙성시킨 된장만 구매하여 먹는 이도 드물지 않다.
- 식품알레르기에 대한 의학적 대책은 나타난 증상을 가라앉히고, 원인 식품의 섭취를 못하게 하는 것 외에는 없다. 그러나 현실적으로 불가능한 측면도 있어 대두의 알레르기성을 낮추는 다양한 연구가 시도 되고 있음
- 알레르기를 유발하는 원인 물질은 대부분 단백질로 알려져 있다. 인체에 해가 없는 미생물의 효소작용을 이용해서 특정 단백질을 감소시킨 저알레르기성 대두 발효물 제조, 유아식 및 환자식 등의 소재화, 대두 알레르기의 면역학적 진단 방법 확립 연구가 요구됨
- 국민 건강 증진을 위해 국산 대두 품종 중의 알레르겐 함량을 측정, 알레르기성 질환을 가진 영·유아나 성인을 위한 저알레르겐 장류생산 및 식품소재화로 대두에 과민 반응을 일으키는 환자들에게 식사의 즐거움을 제공해야 함

- 효소처리 및 화학 약품 처리 등의 방법이 알레르기 유발 단백질의 제거에 효과가 있다는 보고가 있지만 한국산 대두의 처리공정 혹은 발효 중 알레르겐의 변화에 대한 연구는 미비
- 대두의 항원성 단백질(알레르겐)의 변화에 대해 한약재 첨가 등을 통한 저 알레르겐 청국장 제조 등에 대한 연구가 이루어져 있지만 공정 중 저 알레르겐 장류 제조를 위한 체계적인 원료 콩의 선별, 증자, 발효 공정이 확립되어있지 않음
- 정량적인 알레르기성 평가를 위해 과민성 환자 혈청은 물론 대두의 주된 항원성 단백질의 정제, 유전자 재조합, 대량 발현 및 특이 항체 생산이 요구되나 현실적으로 어려움이 많음

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 저 알레르겐 장류제조를 위한 대두품종 및 증자조건 탐색

- 대두의 증자 조건 설정
  - 대두 증자를 위한 원료선별, 세척 및 침지 선행
  - 효율적인 자숙 및 증숙 시간 조사
- 증자 시료 채취 및 성분분석
  - 국내에 유통 중인 대두 품종 및 특정알레르겐이 결실된 대두 등 총 7종의 대두 확보
  - 수용성 단백질 함량, 아미노태질소 함량, 유리아미노산 등 성분 조사
- 시판 장류제품의 알레르겐함량의 정성적 확인
  - 시판 제품의 수집
  - SDS-PAGE를 통해 알레르겐을 정성적 확인

#### 2. 대두의 품종 및 증자조건에 따른 항원성변화 규명

- 장류용 대두의 항원성 조사
  - 7종의 장류용 대두 확보

- 대두 민감성 환자 혈청을 이용한 Immunoblotting으로 알레르겐의 항원성 조사
  - MALDI-TOF를 통한 주요 알레르겐의 종류 확인
- 대두 민감성 환자 혈청을 이용한 자숙(삶기) 및 증자조건에 따른 항원성 변화 확인
    - 삶는 시간에 따른 대두 단백질의 항원성 변화
    - 각 온도별 열처리 시간에 따른 대두 단백질의 추출의 항원성 변화
    - 항원성 단백질 함량이 적은 장류용 대두 2종 선발

### 3. 대두 발효법에 따른 항원성변화 규명

- 선발된 대두 및 증자 조건으로 대두 발효물 제조
  - 다양한 발효균주 이용 (황국균, 고초균, 다단발효)
- 최적 증자 조건하에서 발효 균주를 달리한 장류 제조
  - 다단 발효 대두 제조 및 발효 시간별 대두의 특성 조사
- 제조된 대두 발효물의 알레르겐 추출
  - 저알레르겐 장류 중간제품의 알레르겐의 항원성 확인

### 4. 대두 항원성 단백질의 특이항체 제조

- 주요 대두 알레르겐의 재조합 단백질 생산
  - 대장균을 이용한 재조합 대두 알레르겐의 발현 및 대량생산
  - 재조합 단백질의 정제
- 항원성 단백질의 특이항체 제조
  - polyclonal 항체 생산
- 대두 알레르겐 특이항체의 역가 및 반응성 확인
  - 대두 단백질과의 반응성 조사

### 5. 저 알레르겐 장류 제품 개발

- 알레르겐 함량 측정을 위한 시판 청국장 및 된장의 시료 수집 및 항원성 단백질 추출
- 확립된 최적 발효법을 적용한 저 알레르겐 장류 시제품 생산
  - 저알레르기성 청국장
  - 저알레르기성 된장

## 6. 알레르겐 저감화 대두 발효 공정 확립

- 효소면역분석법(ELISA)을 이용한 알레르겐 함량 측정
  - 시판 장류와 알레르겐 함량 비교 및 장류 시제품의 알레르겐 함량 측정
- 확립된 발효법으로 발효된 대두 발효물의 식품 소재화 시험
  - 건조품의 저장 안정성 검사

## IV. 연구개발결과

### 1. 저 알레르겐 장류제조를 위한 대두품종 및 증자조건 탐색

- 대두의 증자 조건 설정
  - 증숙 공정은 Autoclave, 121℃에서 10, 20, 30, 40, 50, 60분 실행
  - 차숙 공정은 100℃, 끓는 물에서 1, 2, 3, 4, 5, 6시간 중탕 가열 처리
- 증자 시료 채취 및 성분분석
  - 장류제조용 적합 품종으로 추천되는 대풍, 대원, 태광의 3 품종, 개척 2호(Kunitz trypsin inhibitor(KTI) 및 Lipoxygenase 결실 품종), CN628-15(1) (주요 대두 알레르겐인 Trypsin inhibitor 결실 품종), S-09 (주요 대두 알레르겐인 Kunitz,  $\beta$ -conglycin의  $\alpha$ -subunit 결실 품종), CN304-13의 4종 등 총 7종을 사용
  - 총질소 함량은 평균 41.13~ 44.23 %로 품종간 차이가 있음
  - 대두를 열처리하면 아미노태 질소 함량이 감소되는 경향을 보임

- 주요 아미노산은 Val, Tyr, Phe, His 등으로 나타났으며 열처리 조건에 따라 다양한 패턴으로 변화

○ 시판 장류제품의 알레르겐함량의 정성적 확인

- 대부분의 시판장류 중에 10~100 kDa의 다양한 분자량의 단백질이 분포

## 2. 대두의 품종 및 증자조건에 따른 항원성변화 규명

○ 장류용 대두의 항원성 조사

- 대두 민감성 환자 혈청 내 콩에 대한 특이 IgE 수치가 30 kU/L 이상을 보인 환자 7명을 대상으로 Immunoblotting으로 알레르겐의 항원성 조사
- 대두의 주요 항원으로 알려진 21 kDa에서 양성을 나타낸 환자가 3명, 34 kDa에서 3명, 43 kDa에서 4명, 52 kDa에서 2명, 72 kDa에서 양성을 나타낸 환자도 2명이었다. 또한, 혈중 IgE와 결합하는 단백질 성분은 환자에 따라 반응성을 보이는 성분의 차이가 있음
- Immunoblotting 결과를 바탕으로 환자 혈청과 반응성이 컸던 단백질 밴드의 N-terminal 아미노산 시퀀스를 확인하기 위해서 MALDI-TOF를 실시한 결과, 대두의 주요 알레르겐으로 알려진 약 70 kDa의  $\beta$ -conglycinin의  $\alpha$ -subunit으로 나타났고, 다른 하나는 43 kDa의 glycinin으로 확인

○ 대두 민감성 환자 혈청을 이용한 자숙(삶기) 및 증자조건에 따른 항원성 변화 확인

- 대원과 CN304-13 품종이 각각 3.145 mg/ml, 3.231 mg/ml로 다른 품종에 비해 높은 단백질 함량을 보임
- 43 kDa의 glycinin과 70 kDa의  $\beta$ -conglycinin의  $\alpha$ -subunit은 증숙 처리 시간에 따라 IgE 결합능이 감소하였지만 대부분의 품종에서 열처리만으로는 완전히 소실되지 않은 것으로 미루어 열 저항력을 가진 것으로 추측됨
- 대부분의 대두 품종에서 자숙 처리 시간이 길어짐에 따라 IgE 결합능이 감소
- 안전한 저 알레르기성 장류제품 제조를 위해서 대풍콩과 개척 2호 선발

## 3. 대두 발효법에 따른 항원성변화 규명

○ 선발된 대두 및 증자 조건으로 대두 발효물 제조

- 단일균을 이용한 단일 발효 뿐만 아니라, 장류용 황국균(*Aspergillus oryzae*)으로 1단 발효

후 고초균(*Bacillus subtilis* KCCM 11266P)으로 2단 발효시킴으로써 품종별 대두의 알레르기성 및 항원성 변화를 확인

- 최적 증자 조건하에서 발효 균주를 달리한 장류 제조
  - 중성 protease 활성은 2단 발효구에서 572~594 unit/g 으로 최대 활성을 나타냄
  - 아미노태질소 함량은 발효함에 따라 점점 증가하여 대풍 품종의 경우 487.55~764.94 mg%, 개척 2호의 경우 527.48~756.44 mg%로 나타남
  - 2단 발효법으로 제조한 대두에서 다른 단일 발효구 보다 총 유리 아미노산이 높게 검출
  
- 제조된 대두 발효물의 알레르겐 추출
  - 발효시간이 증가함에 따라 항원성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 2단 발효시 단일 발효구에 비해 낮은 IgE level을 나타냄

#### 4. 대두 항원성 단백질의 특이항체 제조

- 주요 대두 알레르겐의 재조합 단백질 생산
  - 대두 민감성 환자 혈청은 대두 단백질 9 kDa, 21 kDa 및 40 kDa를 비롯하여 다양한 밴드와 반응하는 것을 확인하였으며 복숭아 단백질에 대해서는 9 kDa와 반응
  - 항원성 단백질 Lipid transfer protein Pru p3를 발현함
  - 재조합 단백질의 정제하여 대두의 난분해성 알레르겐인 LTP 검출을 위한 특이항체 제조에 사용
  
- 항원성 단백질의 특이항체 제조
  - 재조합 단백질 LTP Pru p 3을 정제하여 rabbit에 면역시켜 polyclonal 항체 생산
  
- 대두 알레르겐 특이항체의 역가 및 반응성 확인
  - 발효대두에서 대두 품종, 발효방법에 따른 LTP 함량의 변화를 효율적으로 검출하는 것을 확인
  - 대풍 품종이 개척 2호 보다 좀 더 낮은 LTP level을 나타냄



## 5. 저 알레르겐 장류 제품 개발

- 알레르겐 함량 측정을 위한 시판 청국장 및 된장의 시료 수집 및 항원성 단백질 추출
  - 시판 청국장, 된장, 고추장, 쌈장을 수집하여 대두 민감성 환자 혈청을 이용하여 IgE 반응성을 조사한 결과 최적 증숙조건과 다단발효법을 거친 본 연구개발품에서 반응성이 낮은 수준으로 나타남
- 확립된 최적 발효법을 적용한 저 알레르겐 장류 시제품 생산
  - 저알레르기성 청국장 및 대두를 70℃에서 3일간 열풍건조하여 생산된 콩알메주를 이용한 된장을 시제품으로 생산

## 6. 알레르겐 저감화 대두 발효 공정 확립

- 효소면역분석법(ELISA)을 이용한 알레르겐 함량 측정
  - 시판 장류와 알레르겐 함량 비교 및 장류 시제품의 알레르겐 함량 측정
  - LTP Pru p 3을 항원으로 하여 생산된 LTP 항체와의 반응성은 시판제품에 비해, 본 연구 시제품에서 낮은 경향을 나타냄
- 확립된 발효법으로 발효된 대두 발효물의 식품 소재화 시험
  - 최적 발효법으로 생산한 대두 발효물을 70℃에서 3일간 열풍건조하여 생산된 건조 저알레르겐 대두는 3개월의 저장기간이 지난 후에도 수분함량 및 미생물수 등의 품질에서 큰 변화가 없는 것으로 나타나 장기저장이 가능
  - 대두 발효물 추출물을 알레르기 유발성이 높은 타 식품원료(밀)에 처리한 결과 밀 알레르겐이 감소되는 경향을 나타내어, 대두 발효물의 사용은 식품의 잠재적 알레르기 유발성을 감소시키는 가능성 발견

# V. 연구성과 및 성과활용 계획

## 1. 연구성과

### 가. 학술발표

- (1) 2011.11.7 Americal College of Allergy, Asthma & Immunology 국제학회 Boston, Massachusetts, USA, Effect of roasting and fermentation on soybean allergenicity, (발표자 : H.G. Seol, Y. Ko, C.H. Ryu) 포스터 발표
- (2) 2011.11.7 생명과학회, Reduction of Allergenic Protein in Soybean by Thermal Treatment (발표자 : Hui Gyeong Seol, Yu Jin Go, Jeong Suk Jo, Do Gyeong Kim, Chung Ho Ryu) 포스터 발표
- (3) 2012.06.27 한국미생물생명공학회, Change of Allergenicity by Thermal Processing according to Soybean Cultivars (발표자 : Hui-gyeong Seol, Eun-jung Kim, Yu-jin Ko, Eun-ja Kim<sup>1</sup>, Do-gyeong Kim, Byong-won Lee, Hyun-tae Kim, Jong-il Chung and Chung-ho Ryu) 포스터 발표
- (4) 류충호, 이정옥, 손대열. 2012. 3단계 발효에 의한 콩 알레르기성의 저하. 한국식품영양과학회지 41(8) 1066-1071
- (5) 설희경, 고유진, 김은정, 이경란, 김도경, 이정옥, 안강모. 2012. 열처리 방법에 따른 품종별 콩단백질의 항원성 변화. 생명과학회지. 22(4) 524-531
- (6) 2013. 7. 3, 한국미생물생명공학회, Attenuation of Allergen in Soybean Cultivars according to Fermentation Method (발표자 : Gyeong-ran Lee, Yu-jin Ko, Eun-ja Kim, Chung-ho Ryu) 포스터 발표
- (7) 2013. 10. 17, 한국생명공학회, Decrease of Allergen in Soybean according to Fermentation Method (발표자 : Gyeong-ran Lee, Eun-ja Kim, Chung-ho Ryu) 포스터 발표
- (8) Yu-jin Ko, Jin-woo Jeong, Yung-hyun Choi, Chung-ho Ryu. 2013. Soy soluble polysaccharide anduces apoptosis in HCT-116 human colon cancer cells via reactive oxygen species generation *Moi. Med. Reports* 8 1767-1772

#### 나. 인력양성 및 활용 결과

(1) 학위논문

(가) 설희경, 2012. 2. Change of Allergenicity by Thermal Processing according to Soybean Cultivars.

경상대학교 대학원 석사학위논문

(나) 이경란, 2013. 2. 발효 방법에 따른 품종별 대두의 알레르겐 감화, 경상대학교 석사학위논문

(다) 고유진, 2014. 8. Anti-inflammatory and anti-cancer properties of soy sauce polysaccharide.

경상대학교 대학원 박사학위논문

**다. 기술이전**

(1) 양지푸드-경상대학교 간 저알레르겐 된장 제조기술 이전(2014. 9. 1)

(2) 양지푸드-경상대학교 간 저알레르겐 청국장 제조기술 이전(2014. 9. 1)

**라. 언론 홍보**

(1) 저알레르겐 장류 개발 보도 10건

**마. 상품화**

(1) 「알레르기 걱정없는 우리 된장」 제품 생산 예정

**2. 성과활용 계획**

- 발효 조건을 달리하여 효율적으로 항원성 단백질 분해기술 개발
- 저 알레르겐 기능성 장류 제조를 위한 발효 공정의 확립
- 저 알레르겐 대두식품 제조를 위한 대두 발효 가공 및 발효 조건개선에 기여
- 식품의 알레르겐 함량 측정 방법 개발 확립
- 조직적이고 다 학문간 협력 연구를 수행함으로써 효율적 성과가 기대됨
- 대두 민감성 환자뿐만 아니라 대두 알레르기 유발의 사전방지를 위해 모든 소비자를 대상으로 한 저알레르기성 대두 발효제품의 생산 가능

- 우리 농산물을 이용한 식품 관련 산업의 활성화
- 저 알레르겐 대두 발효물을 이용한 식품 제조로 대두 발효 식품의 이미지 상승
- 알레르기 치료 및 예방을 도모함으로써 국민 보건 및 국민 건강을 향상 시킬 수 있으며, 의 료비 절감 등의 효과를 기대할 수 있음
- 식품전반의 알레르기성 평가 확인이 용이
- 대두 발효를 이용한 식품 가공 산업의 매출증대
- 저 알레르겐 식품의 제조 시 국내외적으로 시장 경쟁력이 우수
- 기존에 없던 저알레르기성 대두발효제품 시장을 개척함으로써 기존 년매출액 4,000 백만원 인 본 회사의 매출이 2배 이상 증가될 것이라 예상

# SUMMARY

## (영문요약문)

### I. Title

Development of new fermentation techniques for manufacturing soybean products with low allergy

### II. Objective and Necessity of Research and Development

○ Fermented soybean products such as soybean paste, soy sauce, red pepper paste, and rich soybean paste, which fermented soybeans, are one of the most preferred seasonings by Koreans these days. As consumption of fermented soybean products, which are natural food products, is increasing by the society's pursuit of functionality and health, enhancing competitiveness in and abroad by increasing commercial value of fermented soybean products is becoming necessary.

○ The prevalence rate of soybean allergy differs depending on the region, eating habits, and exposure level, however appears to be around 1~6% of minors, 6% of minor patients with atopic diseases, and 14% of minor patients with milk allergy. The sensitivity rate regarding domestic soybean by 1,716 adult allergy patients is known to be 3.8%.

In addition, the distinctive IgE of soybeans shows positive in 18.3% of minor patients with allergy sensitized with milk protein. Soybean allergy is known to be a type of food allergy that mostly naturally disappears by aging and tolerance to soybeans is mostly acquired when a person is three years old, thus, soybean allergies disappear from 40% of the soybean allergy patients after one or two years after implementing soybean restriction diet.

○ In order to handle food allergy, it would be the most effective to thoroughly avoid the food causing the allergy, however because it is hard to do so, various methods are

being undertaken to decrease the allergic feature of soybeans.

- Manufacturing various food products, such as baby food and diets for patients, by using low-allergic soybean fermented ingredients and researches establishing an immunological diagnostic method for soybean allergy patients is needed.
- Improvement of the dietary life of patients that show hypersensitive reaction to soybean protein is needed by producing fermented soybean products with reduced allergen while maintaining the taste and scent of traditional food, to discover food materials for consumers with allergic diseases by measuring the allergen contents within the domestic soybean variety to enhance public health.
- Although there is a report that methods such as enzyme treatment and chemical processing is effective to remove allergy-incurring protein, researches on the handling process of Korean soybeans or change of allergens during fermentation are insufficient.
- Although researches have been conducted on manufacturing of low-allergen rich soybean paste through adding medicinal herbs regarding changes of antigenic protein of soybean (allergen), however, the systematic selection, cooking, and fermentation process for the ingredient beans to produce fermented soybean products with low allergen within the process has not been established.
- A special antibody and gene recombination of the main antigenic protein of soybean, in addition to the serum of hypersensitive patients, is needed for quantitative allergic testing.

### **III. Contents and Scope of Research & Development**

- 1. Search of soybean varieties and cooking condition to produce fermented soybean product with low-allergen**

- Establishment of soybean cooking condition
  - Implementation of ingredient selection for soybean cooking, cleaning, and dipping in advance
  - Examination of efficient boiling and steaming time
- Collection of cooking sample and analysis of ingredient
  - Procurement of seven types of soybeans with distinctive allergens and soybean varieties distributed in Korea
  - Examination of the ingredients, such as water soluble protein contents, amino type nitrogen contents, and free amino acids
- Qualitative confirmation of allergen contents of fermented soybean products sold in market
  - Collection of products sold in the markets
  - Implementation of qualitative confirmation of allergen through SDS-PAGE

## **2. Investigation of antigenic change pursuant to varieties of soybean and cooking condition**

- Antigenicity survey on soybeans for fermented products
  - Procurement of seven varieties of soybeans for fermented products
  - Survey of antigenicity of allergen with Immunoblotting using serum of patients hypersensitive to soybeans
  - Confirmation of main types of allergen through MALDI-TOF
- Confirmation of antigenic change pursuant to steaming (boiling) and cooking time using serum of patients hypersensitive to soybean
  - Change of antigenicity of soybean protein pursuant to boiling time
  - Change of antigenicity of soybean protein extracts pursuant to heat processing per temperature
  - Selection of two breeds of soybean for fermented products having low contents of antigenicity protein

### **3. Investigation of antigenic change pursuant to soybean fermentation method**

- Soybean selection and production of soybean fermentation product under cooking condition
  - Use of diverse fermentation fungus (*Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*, multiple-stage fermentation)
  
- Production of fermented soybean products by changing the fermentation fungi under the optimum cooking condition
  - Production of soybean in multiple-stages and survey the characteristics of soybean per fermentation time
  
- Extraction of allergen from the produced fermented soybean
  - Examination of antigenicity of allergen in interim product of low-allergen fermented soybeans

### **4. Production of specific antibody of antigenicity protein of soybean**

- Production of recombinant protein of main soybean allergens
  - Revelation and mass production of recombinant soybean allergen using *Colitis bacillus*
  - Refinement of recombinant protein
  
- Manufacturing of specific antibody of antigenic protein
  - Production of polyclonal antibody
  
- Examination of reactivity and titer of distinctive antibody of soybean allergen
  - Examination on reactivity with soybean protein

### **5. Development of low-allergen fermented soybean products**

- Extraction of antigenic protein and collection of specimen of soybean paste and rich



soybean paste on the market to measure contents of allergen

- Production of trial products of low-allergen fermented soybean products applying the optimum fermentation method established
  - Low-allergenic soybean paste
  - Low-allergic fermented *chungkukjng*

## **6. Establishment of allergen reduced soybean fermentation process**

- Measuring of allergen content using ELISA
  - Comparison of allergen content with fermented soybean products in the market and measuring of allergen content of the trial goods of fermented soybean products
- Testing of using the fermented soybean products fermented in the established fermenting method as food ingredients
  - Testing of storage stability of dried goods

## **IV. Research and Development Result**

### **1. Search of cooking condition and soybean varieties to produce low-allergen fermented soybean products**

- Establishment of soybean cooking condition
  - The steaming process was implemented in 10, 20, 30, 40, 50, and 60 minute intervals at Autoclave, 121°C
  - The boiling process was implemented by heating in boiling water for 1, 2, 3, 4, 5, and 6 hours at 100°C
- Collection of cooking sample and analysis of ingredients
  - The use of a total of seven varieties was recommended as varieties suitable to produce fermented products, including three varieties from Daepung, Daewon, and Taegwang,

and four varieties of Gaechuk 2 (variety producing Kunitz trypsin inhibitor (KTI) and Lipoxygenase), CN628-15(1) (variety producing Trypsin inhibitor, which is a main soybean allergen), S-09 (variety producing Kunitz,  $\alpha$ -subunit of  $\beta$ -conglycin, a main soybean allergens), and CN304-13.

- The total nitrogen contents differed by an average of 41.13~ 44.23 % between varieties
  - A tendency of reduced amino type nitrogen contents among the soybeans after heat processing of raw soybeans appeared
  - The main amino acids appeared to be Val, Tyr, Phe, and His, which changed in various patterns pursuant to the heat processing conditions
- Quantitative confirmation of allergen contents of fermented soybean products in the market
- Proteins in diverse molecular weight from 10~100 kDa appeared to be distributed among most of the fermented soybean products in the market

## **2. Investigation of antigenic change pursuant to cooking condition and variety of soybeans**

- Survey of antigenicity of soybeans for fermented products
- An antigenicity survey for allergen was conducted through Immunoblotting over seven minor patients showing a specific IgE level of 30 kU/L regarding beans within the serum of patients hypersensitive to soybeans
  - There were three patients showing positive to 21 kDa, a main antigen of soybean, three to 34kDa, four to 43 kDa, two to 52 kDa, and two to 72 kDa. In addition, regarding the protein combined with IgE in blood, there were differences shown in reactivity based on the patient.
  - As a result of conducting MALDI-TOF in order to check the N-terminal amino acid sequence of a protein band, which had substantial reactivity with the serum of patients, based on the Immunoblotting result, it appeared to be  $\alpha$ -subunit of  $\beta$  - conglycinin in 70 kDa and glycinin in 43 kDa which are known as main types of allergen
- Confirmation of antigenic change pursuant to cooking condition and boiling condition

using the serum of patients hypersensitive to soybeans

- The varieties of Daewon and CN304-13 each showed 3.145 mg/ml and 3.231 mg/ml, showing a high protein content compared to other varieties.
- The glycinin in 43 kDa and  $\alpha$ -subunit of  $\beta$ -conglycinin in 70 kDa showed lower combining power of IgE as the boiling processing time increased, however, considering the fact that complete destruction was not available only by heat processing in most varieties, it can be estimated that there was heat resistance.
- The IgE combination ability reduced as the boiling process time increased in most of the soybean varieties.
- Gaechuk 2 and Daepung beans were selected to produce safe low-allergic fermented soybean products.

### **3. Investigation of antigenic change pursuant to soybean fermentation method**

- Manufacturing of soybean fermented products with the selected soybean and cooking method
  - The change of antigenicity and allergic character of soybean per variety was confirmed by fermenting with *Aspergillus oryzae* for fermented soybean products in the first stage and *Bacillus subtilis* KCCM 11266P in the second stage, in addition to fermenting by single stage process using a single bacillus.
- Production of fermented soybean products by differing the fermentation fungus under the optimum cooking condition
  - The neutral protease vitality appeared at its maximum with 572/594 unit/g at the second stage of fermentation.
  - The amino type nitrogen contents increased by the fermentation process, which showed 487.55 ~ 764.94mg% for the Daepung variety and 527.48 ~ 756.44 mg% for Gaechuk 2.
  - The total free amino acids produced from soybeans produced with the two-stage fermentation method appeared to be higher than other single fermenting sample.
- Extraction of allergen from the produced fermented soybean product
  - It could be confirmed that antigenicity decreased as the fermentation time increased. In

particular, it showed a lower IgE when fermenting by two stages, compared to when having single fermenting sample.

#### **4. Production of specific antibody of antigenic protein of soybeans**

- Production of recombined protein of main soybean allergen
  - It was confirmed that serums of patients hypersensitive to soybean reacted with various bands, including soybean proteins 9 kDa, 21 kDa and 40 kDa, and reacted with 9 kDa regarding peach protein.
  - Lipid transfer protein Pru p3, an antigenic protein, was revealed.
  - Used to produce specific antibody to detect LTP, a non-degradable allergen of soybean by refining the recombined protein.
  
- Manufacturing of specific antibody of antigenic protein
  - Polyclonal antibody was produced by immunizing a rabbit by refining LTP Pru p3, a recombined protein.
  
- Examination of reactivity and titer of distinctive antibody of soybean allergen
  - The efficient detecting of the change of LPT content changed pursuant to the variety of soybean and fermentation method from the fermented soybean was confirmed.
  - The Daepung variety showed a lower LTP level compared to Gaechuk 2.

#### **5. Development of fermented soybean products with low allergen**

- Collection of samples of doenjang (soybean paste) to measure allergen contents and extraction of antigenic protein
  - As a result of testing the reactivity of IgE by using the serum of patients hypersensitive to soybean by collecting specimen of rich soybean paste, soybean paste, red pepper paste, and processed soybean paste, the optimum steaming process and multiple stage fermentation method appeared to have low reactivity in the product under research and development here.

- Production of specimen for fermented soybean product with low allergen applying the established optimum fermentation method
  - Fermented soybean blocks were produced as specimen by drying low allergic rich soybean paste.

## 6. Establishment of allergen reduced soybean fermentation process

- Allergen content measuring using ELISA method
  - Contents of allergen contents and fermented soybean products on the market were compared and allergen contents of fermented soybean products on the market were measured.
  - The reactivity to the LTP antigen produced by having LTP Pru p 3 as the antigen appeared to have a lower trend than the trial goods in this research, compared to products on the market.
- Food materialization test of fermented soybean products through the established fermentation method
  - The dry and low-allergen soybeans produced by drying the produced fermented soybean products through the optimum fermentation method using hot air for three days at 70°C appeared not to have a substantial change in quality, such as moisture content and number of microorganisms, even after the storage period of three months had passed, thus, long-term storage appeared to be available.
  - As a result of handling the fermented soybean extracts with other food ingredients (wheat) with high likelihood of incurring allergy, a trend of reduced allergen appeared, thus, a possibility that using fermented soybean products may reduce the likelihood of potential allergy incurring character in food has been discovered.

## V. Research Result and Result Utilization Plan

- Development of efficient antigenic protein disassembling technology by differing the fermentation condition

- Establishment of a fermentation process to produce functional fermented soybean products with low allergen
- Contribution to soybean fermentation process to produce low-allergen soybean products and to improve the fermentation conditions
- Development and establishment of a method of measuring allergen content in food
- Expectation of an efficient result by implementing systematic and cooperative research between multiple studies
- Making available the production of low-allergic soybean fermented products for all consumers to prevent in advance the incurrence of soybean allergy, and not only for hypersensitive patients towards soybean
- Vitalization of industries relating to food using domestic agricultural products
- Improvement of perceptions towards soybean fermented food by producing food using low-allergen soybean fermented products
- Expectation of an effect reducing medical costs and improving public health by promoting the cure and prevention of allergy
- Facilitate evaluation and confirmation of allergic features of foods in general
- Enhancement of sales of food processing industry using fermented soybean
- Achieve outstanding market competitiveness in and out of the nation upon producing low-allergic food
- Expectation for the sales of this Company to increase by two times, from the existing annual sales of KRW 4,000 million, by pioneering a low-allergic fermented soybean product market, which has not existed previously

# CONTENTS

<b>PRESENTATION LETTER .....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY (Korean).....</b>	<b>2</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>12</b>
<b>CONTENTS .....</b>	<b>22</b>
<b>CONTENTS (Korean) .....</b>	<b>25</b>
<b>Chapter 1. Summary of project .....</b>	<b>28</b>
Section 1. Purpose .....	28
Section 2. Necessity .....	28
Section 3. Objective and contents .....	29
<b>Chapter 2. Status of technical development inside and outside of nation .....</b>	<b>33</b>
Section 1. Problem of allergy .....	33
Section 2. Development of anti-allergic food .....	35
Section 3. Importance of results .....	36
<b>Chapter 3. Results and discussion of project .....</b>	<b>38</b>
Section 1. Search of cooking condition and soybean varieties to produce low-allergen fermented soybean products .....	38
1. Introduction .....	38
2. Materials and method .....	39
3. Results .....	43

Section 2. Investigation of antigenic change pursuant to cooking condition and variety of soybeans .....	60
1. Introduction .....	60
2. Materials and method .....	61
3. Results .....	72
Section 3. Investigation of antigenic change pursuant to soybean fermentation method .....	87
1. Introduction .....	87
2. Materials and method .....	88
3. Results .....	93
Section 4. Production of specific antibody of antigenic protein of soybeans .....	104
1. Introduction .....	104
2. Materials and method .....	105
3. Results .....	109
Section 5. Development of fermented soybean products with low allergen .....	121
1. Introduction .....	121
2. Materials and method .....	121
3. Results .....	126
Section 6. Establishment of allergen reduced soybean fermentation process .....	132
1. Introduction .....	132
2. Materials and method .....	133
3. Results .....	138
<b>Chapter 4. The degree of accomplishment of the research .....</b>	<b>146</b>
Section 1. Achievement of purpose .....	146
Section 2. Contribution of related field .....	147
<b>Chapter 5. Plan for the application of the result .....</b>	<b>148</b>
Section 1. Research Results .....	148



Section 2. Result Utilization Plan .....	153
<b>Chapter 6. Information of scientific technique from abroad .....</b>	<b>154</b>
Section 1. Food allergen .....	154
Section 2. Development of anti-allergic food .....	155
<b>Chapter 7. Current state of research installations and equipments .....</b>	<b>159</b>
<b>Chapter 8. References .....</b>	<b>159</b>

# 목 차

제출문 .....	1
요약문 .....	2
SUMMARY .....	12
CONTENTS .....	22
목차 .....	25
<b>제 1장 연구개발과제의 개요 .....</b>	<b>27</b>
제 1절 연구개발의 목적 .....	28
제 2절 연구개발의 필요성 .....	28
제 3절 연구개발의 목표 및 내용 .....	29
<b>제 2장 국내·외 기술개발 현황 .....</b>	<b>33</b>
제 1절 알레르기 발생의 문제점 .....	33
제 2절 항알레르기 식품개발 현황 .....	35
제 3절 본 연구결과의 의의 .....	36
<b>제 3장 연구개발수행 내용 및 결과 .....</b>	<b>38</b>
제 1절 저 알레르겐 장류제조를 위한 대두품종 및 증자조건 탐색 .....	38
1. 서론 .....	38
2. 재료 및 방법 .....	39
3. 증자 조건에 따른 대두의 성분 분석 .....	43
4. 시판 장류제품의 알레르겐함량의 정성적 확인 .....	51

제 2절 대두의 품종 및 증자조건에 따른 항원성 변화 규명 .....	60
1. 서론 .....	60
2. 재료 및 방법 .....	61
3. 장류용 대두의 항원성 조사 .....	66
4. 대두 민감성 환자 혈청을 이용한 증숙 및 자숙조건에 따른 항원성 변화 .....	72
제 3절 대두 발효법에 따른 항원성변화 규명 .....	87
1. 서론 .....	87
2. 재료 및 방법 .....	88
3. 발효 균주를 달리한 저알레르겐 장류 제조 .....	93
제 4절 대두 항원성 단백질에 대한 특이항체 제조 .....	104
1. 서론 .....	104
2. 재료 및 방법 .....	105
3. 대장균을 이용한 재조합 대두 알레르겐의 발현 및 대량생산 .....	109
제 5절 저알레르기성 장류제품의 개발 .....	121
1. 서론 .....	121
2. 재료 및 방법 .....	121
3. 저알레르겐 발효대두 제품생산 .....	126
제 6절 알레르겐 저감화 대두 발효 공정 확립 .....	132
1. 서론 .....	132
2. 재료 및 방법 .....	133
3. 저알레르겐 발효대두의 식품소재화 및 저장성 .....	138
<b>제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....</b>	<b>146</b>
제 1절 목표달성도 .....	146
제 2절 관련분야에의 기여도 .....	147

제 5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	148
제 1절 연구개발 성과 .....	148
제 2절 연구 성과의 활용계획 .....	153
제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	154
제 1절 식품알레르겐 .....	154
제 2절 알레르겐 저감화 제품 개발 .....	155
제 7장 연구시설·장비 현황 .....	159
제 8장 참고문헌 .....	159

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

식물성 식품을 주로 섭취하는 한국인의 식생활에서 부족한 단백질을 보충하고 장기간 보존하여 맛을 내는 된장, 간장의 주원료인 대두가 과민반응을 일으킨다.

저 알레르겐 장류 제조를 위해 주원료인 대두의 증숙 또는 자숙(삶기) 조건, 발효 미생물에 따른 항원성의 변화, 항원성 단백질의 특이항체 제조, 효과적인 발효 공정을 확립하고 대두 알레르기 완화 제품 개발, 유아 및 대두 알레르기 환자가 안심하고 섭취할 수 있는 제품을 생산.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

- 대두를 발효시킨 된장, 간장, 고추장 및 청국장 등의 장류제품은 현재 한국인들이 가장 선호하는 조미 식품이다. 사회적으로 기능성 혹은 건강성을 지향하면서 자연 식품인 장류의 소비가 증대되고 있는 시점에서 장류 제품의 상품적 가치를 높여 국내외에서 경쟁력의 제고가 필요하다.
- 대두 알레르기의 유병률은 지역, 식습관, 노출 시기나 정도에 따라 다르지만 소아의 1~6%, 아토피 피부염 환자의 6%, 우유알레르기 환자의 14%가 대두알레르기가 나타난다고 한다. 성인 알레르기 환자의 대두에 대한 감작률은 3.8%로 알려져 있다. 또한 우유 단백질에 감작된 알레르기 환자의 혈청조사 결과 18.3%에서 대두 특이 IgE항체 양성반응이 나타난다고 한다. 대두 섭취 후 발증되는 대체로 나이가 들면서 자연소실되는 알레르기 증상은 3세경이면 대두에 대한 내성이 획득되지만 성인환자도 있다. 대두 알레르기 환자의 경우 대두가 함유된 식품의 섭취를 회피 또는 제한하여 식단 조절에 어려움이 많고 영양적 불균형으로 발육속도가 지연되는 등 1~2년 후 40%에서 대두 알레르기가 소실된다.
- 식품알레르기는 원인 식품을 철저히 피하는 것이 가장 효과적이거나, 저렴한 단백질 공급원인 대두를 첨가하여 개발된 제품이 워낙 많아서 현실적으로 힘들기 때문에 다양한 방법으로 대두의 알레르기성을 낮추는 방법이 시도 되고 있다. 전통발효 식품인 된장을 먹고 아토피 증상이 악화되어 식이제한 하는 특이 체질인 성인도 있으므로, 좀 더 효율적인 대두 발효법의 확립이 필요하다.
- 저 알레르기성 대두 발효물로 유아식, 환자식 등을 다양한 식품을 제조하고 알레르기 환

자의 혈청을 이용한 면역학적 진단 방법 연구가 요구된다.

- 국민 건강 증진을 위해 국산 대두 품종 중의 알레르겐 함량을 측정하여 알레르기성 질환을 가진 소비자용 식품소재를 발굴할 전통 식품의 맛과 향을 유지하고 알레르겐이 감소된 장류의 생산은 대두 단백질에 과민 반응을 일으키는 환자들의 식생활을 개선시킬 수 있을 것으로 기대된다.
- 효소처리 및 화학 약품 처리 등의 방법이 알레르기 유발 단백질의 제거에 효과가 있다는 보고가 있지만 한국산 대두의 처리공정 혹은 발효 중 알레르겐의 변화에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다.
- 대두의 항원성 단백질(알레르겐)의 변화에 대해 한약재 첨가 등을 통한 저 알레르겐 청국장 제조 등에 대한 연구가 이루어져 있지만 공정 중 저 알레르겐 장류 제조를 위한 체계적인 원료 콩의 선발, 증자, 발효 공정이 확립되어있지 않다.
- 대두 발효 식품 제조 공정 중의 대두중의 알레르겐의 함량 및 알레르겐 특이성 변화에 대한 연구가 부족한 실정이다.
- 정량적인 알레르기성 평가를 위해 과민증 환자 혈청은 물론 대두의 주요 항원성 단백질의 유전자 재조합 및 특이 항체가 요구된다.
- 국가 간 무역 활성화로 인한 무한경쟁에서 비교 우위를 차지하기 위해서는 장류의 알레르기성 평가는 선행 되어야 할 연구이다.

### 제 3절 연구개발의 목표 및 내용

- 대두의 가공 단계별 시료와 대두 민감성 환자 혈청을 이용한 항원·항체 반응의 측정 및 대두의 주요 알레르겐 검색 결과를 바탕으로 저 알레르겐 장류 제조 최적 품종 선발
- 열처리 조건 즉, 자숙(삶기) 또는 증숙 시간 및 온도를 달리한 증숙 대두의 항원성 변화를 측정하여 항원성 단백질의 열 안정성 및 분해정도를 확인하여 최적 자숙 또는 증숙 조건 확립
- 콩단백질인 7S globulin의 50%를 차지하며 주요 알레르기원으로 알려져 있는  $\beta$ -conglycinin의 분자량 57~72kDa의  $\alpha'$ 와  $\alpha$ -subunit가 결합한 syringolide인 Gly m Bd 30K (p34), 대부분의 식물에 존재하는 알레르겐인 LTP 등을 주요 타겟으로 하여 증자조건 및 발효과정에 따른 타겟 알레르겐의 저감화를 확인
- 알레르겐의 함량 측정을 위한 재조합 단백질의 생산, 정제 및 항원성 단백질에 대한 특이 항체 제조

- 선발된 대두 및 최적 증자 조건에서 균주 및 시간별 발효물에 대한 알레르겐 함량 변화를 측정함으로써 항원성 단백질 분해에 적합한 종균 선별
- 대두 품종, 열처리 조건 및 발효 균주 등의 요인에 따른 항원성 단백질 분해에 최적 조건을 적용한 저 알레르겐 발효법의 확립
- 저 알레르겐 장류 시제품 생산
- 생산된 주요 항원성 단백질의 특이 항체를 이용하여 효소면역분석법(ELISA)으로 제조된 저 알레르겐 장류 제품 및 시판 장류의 알레르겐 함량 비교
- 대두 알레르기 환자식 및 콩 알레르겐에 감작되기 쉬운 영·유아를 위한 이유식 개발을 위해 저 알레르겐 대두 발효물의 식품 소재화 시험

## 1. 저 알레르겐 장류제조를 위한 대두품종 및 증자조건 탐색

- 대두의 증자 조건 설정
  - 대두 증자를 위한 원료선별, 세척 및 침지 선행
  - 효율적인 자숙 및 증숙 시간 조사
- 증자 시료 채취 및 성분분석
  - 국내에 유통중인 대두 품종 및 특정알레르겐이 결실된 대두 등 총 7종의 대두 확보
  - 수용성 단백질 함량, 아미노태질소 함량, 유리아미노산 등 성분 조사
- 시판 장류제품의 알레르겐함량의 정성적 확인
  - 시판 제품의 수집
  - SDS-PAGE를 통해 알레르겐을 정성적 확인

## 2. 대두의 품종 및 증자조건에 따른 항원성변화 규명

- 장류용 대두의 항원성 조사
  - 7종의 장류용 대두 확보
  - 대두 민감성 환자 혈청을 이용한 Immunoblotting으로 알레르겐의 항원성 조사
  - MALDI-TOF를 통한 주요 알레르겐의 종류 확인
- 대두 민감성 환자 혈청을 이용한 자숙(삶기) 및 증숙조건에 따른 항원성 변화 확인

- 삶는 시간에 따른 대두 단백질의 항원성 변화
- 각 온도별 열처리 시간에 따른 대두 단백질의 추출물의 항원성 변화
- 항원성 단백질 함량이 낮은 저 알레르기 장류용 대두 2품종 선발

### 3. 대두 발효법에 따른 항원성변화 규명

- 선발된 대두 및 증자 조건으로 대두 발효물 제조
  - 다양한 발효균주 이용 (황국균, 고초균, 다단발효)
- 최적 증자 조건하에서 발효 균주를 달리한 장류 제조
  - 다단 발효 대두 제조 및 발효 시간별 대두의 특성 조사
- 제조된 대두 발효물의 알레르겐 추출
  - 저알레르겐 장류 중간제품의 알레르겐의 항원성 확인

### 4. 대두 항원성 단백질의 특이항체 제조

- 주요 대두 알레르겐의 재조합 단백질 생산
  - 대장균을 이용한 재조합 대두 알레르겐의 발현 및 대량생산
  - 재조합 단백질의 정제
- 항원성 단백질의 특이항체 제조
  - polyclonal 항체 생산
- 대두 알레르겐 특이항체의 역가 및 반응성 확인
  - 대두 단백질과의 반응성 조사

### 5. 저 알레르겐 장류 제품 개발

- 알레르겐 함량 측정을 위한 시판 청국장 및 된장의 시료 수집 및 항원성 단백질 추출
- 확립된 최적 발효법을 적용한 저 알레르겐 장류 시제품 생산



- 저알레르기성 청국장
- 저알레르기성 된장

## 6. 알레르겐 저감화 대두 발효 공정 확립

- 효소면역분석법(ELISA)을 이용한 알레르겐 함량 측정
  - 시판 장류와 알레르겐 함량 비교 및 장류 시제품의 알레르겐 함량 측정
- 확립된 발효법으로 발효된 대두 발효물의 식품 소재화 시험
  - 건조품의 저장 안정성 검사

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1절. 알레르기 발생의 문제점

- 알레르기 환자의 증가가 큰 사회적 문제가 되고있다. '03년 일본 후생 노동성 발표자료에 의하면 알레르기 증상을 보이는 사람은 전체의 35.9%에 달한다. 알레르기 증상에 의한 사망 예는 드물지만, 환자의 삶의 질 저하는 현저하다. 알레르기질환의 의료보험 등 국가적 의료비 부담도 막대하다(삼나무화분알레르기경우, 적어도 2,800억엔에 달함). 국내에서는 소아알레르기 호흡기 학회에서 5년에 한 번 전국적인 역학조사가 실시되고 있으며 의사의 진단에 의한 초중고생의 식품알레르기 발증율은 5% 정도인 것으로 나타났으나 조금씩 과학기술 발달, 선진화에 따라 다른 질병은 감소하고 있으나 알레르기 질환자 수는 반대로 증가하고 있는 것을 볼 수 있다.

표 1. 초등학교생의 식품 알레르기빈도

	1995(95% CI)	2000(95% CI)	2005(95% CI)
증상 경험	12.4%(11.7~13.1)	9.5%(8.8~10.5)	11.7%(11.0~12.5)
최근 12개월 내 증상 경험	7.2%(6.6~7.8)	5.9%(5.3~6.4)	7.5%(6.9~8.1)
의사 진단	4.6%(4.1~5.1)	5.2%(4.7~5.7)	6.2%(5.7~6.8)
최근 12개월 내 치료 경험	2.9%(2.5~3.3)	2.7%(2.3~3.0)	2.8%(2.4~3.1)

- 알레르기란 외부에서 유입된 이물(異物)로부터 자신을 방어하기 위한 면역시스템 작용에 오류가 생겨 면역반응이 과잉으로 일어나서 자기에 몸에 상해를 유발시키는 상태라고 볼 수 있다. 알레르기반응은 그 증상 발현기전에 따라 I ~ IV형으로 분류된다. 알레르기는 대개 IgE의 존성인 I형을 의미하며, 화분증이나 음식물 알레르기도 주로 I형 반응에 의해 야기된다고 여겨진다.
- I형알레르기는 알레르기 원인물질(allergen)의 침입, T세포의 활성화 및 알레르겐의 인식, B세포의 IgE 특이 항체생산, 비만세포 표면에 IgE의 결합, 탈과립단계를 거쳐서 증상이 발현한다. 비만세포내 과립에 축적된 히스타민등의 화학물질이 방출되어 혈관투과성 항진, 기관지 평활근수축 등의 알레르기증상을 초래한다. 심한경우, 전신증상인 아나필락시스(anaphylaxis)

쇼크를 일으켜 사망에 이르는 경우도 있다.

- 알레르기를 유발하는 3대 음식물로 계란, 우유, 밀이 있다. 계란의 주 알레르기 항원은 ovomucoid와 ovalbumin(OVA)이고 열이나 트립신 등 소화효소 처리에 인정하며, 경구섭취 하여도 소화관 내에서 항원성이 잘 소실되지 않는다. 우유의 주요 알레르기 항원은  $\alpha$ 1-casein 과  $\beta$ -lactoglobulin으로서 모유에 들어있지 않기 때문에 알레르기를 유발하기 쉽다. 밀의 주요 알레르기 항원으로는  $\alpha$ -amylase 억제제(천식의 원인 물질)와 gluten이 있다. 다음의 표에서 볼 수 있듯이 계란이나 우유는 여러 나라에서 알레르기를 일으키는 식품으로 공통적으로 구분하고 있으나 렌틸, 겨자, 녹차 등과 같이 특정 나라에서만 나타나는 식품이 있다. 따라서 식품알레르기 원인 식품은 국가별 차이가 있을 수 있음을 인지하여야 한다.

표2. 국가별 주요 알레르기 식품

호주	프랑스	이스라엘	이탈리아	스페인	싱가포르	일본
계란	계란	계란	생선	계란	Bird's nest(제비집)	계란
우유	땅콩	우유	우유	생선	해물류	우유
땅콩	우유	참깨	견과유	우유	계란	해물류
견과유	겨자	땅콩	계란	복숭아	우유	밀
참깨	대구	대두	과일	견과류	중국차류	과자류
밀	헤이즐넛	견과류	곡류	렌틸		두류
대두	키위	딸기	야채류	땅콩		닭고기
생선	밀	쇠고기	염소우유			야채
		닭고기				견과류
		토마토				

- 대부분의 식품이 알레르기를 일으키는 원인 물질인 항원으로 될 수 있고 특히 땅콩은 아나필락시스-쇼크 등의 중증 증상을 유발한다. 특히 미국에서는 땅콩 섭취에 의한 아나필락시스로 인한 사망이 사회문제화 되고 있다. 땅콩의 주요 항원으로 Ara h 1, Ara h 2 등이 동정되었으며, 열처리로 그 양은 감소하지만 항원성은 반대로 증가한다고 한다.
- 또한 최근 들어 새우, 게를 위시한 갑각류에 의한 알레르기도 증가하고 있다. 갑각류나 연체류의 주요항원은 tropomyosin, 열에 안정한 단백질이다. 게는 음식물 의존성 운동유발 아나필락

시스의 원인식품 중 상위로 이런 문제가 되고 있다. 특정 과실이나 채소에 의한 구강알레르기 증후군도 증가 추세인 것으로 알려져 있다.

## 제 2절. 항알레르기 식품개발 현황

○ 알레르기 완호 또는 예방 대책은 대부분 「화분알레르기」를 표적으로 하고 있다. 일본에서 돈초(ragweed)와 삼목의 꽃가루에 기인한 알레르기 증상 즉, 화분증이 각각 61년과 64년에 보고된 이래 화분증발생률은 전국적으로 증가하고 있다. 원인은 전후(戰後) 인공 조립된 삼나무나 편백림의 다수가 착화수령에 도달해서 화분생산량이 급격히 증가하기 때문이라 본다. '04년 7월까지 화분 알레르기항원은 14과 40종 식물에서 보고되었다. 삼나무화분의 주항원으로 2 종류의 단백질이 Cry J 1과 Cry J 2의 동정되어있다.

○ 최근 알레르기 반응의 시작을 유발하는 원인 식품 내에서 알레르겐으로 작용하는 단백질을 순수 정제하여 아미노산의 배열을 밝힌 뒤 알레르겐의 기능적 특성을 규명하는 연구가 다양하게 이루어지고 있다. 식품 중의 항원성 단백질을 감소시켜 알레르기 예방을 위해 다양한 시도를 하고 있다.

첫 번째 방법은 농경학적 방법(arronomic method)으로 품종에 따라 중요한 알레르겐인 18 kDa 단백질의 양이 차이가 나므로 재배 품종 선택이 중요하다. 두 번째 방법인 열처리 가공(thermal processing)은 식품 소재를 열처리 하면 식품 항원 종류에 따라 항원성 소실 정도에 차이가 난다. 세 번째 방법으로는 효소를 이용한 단백질 분해방법(enzymatic proteolysis)으로 단백질 가수분해 시킨 저항원성 분유(Hypoallergenic formula with extensively hydrolyzed protein:eHP formula)가 개발되어 있다. 네 번째로 유전자 조작(genetic engineering)에 의한 방법으로 antisense RNA 유전자를 쌀에 삽입하여 16 kDa의 중요 알레르겐을 80% 정도 감소시키는 유전자 이식(transgenic)쌀을 개발하였다. 그러나 이러한 저알레르겐 식품들은 현재 개발 단계에 있으므로 환자들에게 실용화되기 이전에 안전성이 증명되어야 한다.

○ 알레르겐 제거 식품(레저식품)으로는 일본에서 계란, 우유를 제거한 「일본햄」 시리즈, 계란, 우유, 대두를 제거시킨 「모리나가제과의 아비농」 시리즈(비스켓 등) 등이 허가를 받았다.

○ 음식물 중의 항원 저감화시 고려사항으로는 알레르기 항원 자체가 식품가공에 중요한 역할을 하는 단백질인 경우, 그 제거나 분해에 의해 제조된 저알레르기 항원식품의 가공특성은 원재

료에 비해 저하 된다는 점을 고려해야 한다. 예로 계란의 주요한 알레르기 항원인 OVA과 ovomucoid 제거 시 계란의 가열 응고성·기포성 등의 중요한 가공특성이 현저히 저하된다. 밀알레르기 항원인 gluten을 효소 처리하여 저알레르기 밀가루를 만들면 밀 가공제품의 제조에 불가결한 gluten의 특성이 소실되어 제빵 특성이 감소된다.

- 저알레르기성 식품은 우유 단백질을 가수분해한 저알레르기 우유를 비롯하여 쌀을 염수에 침지, 가압하여 쌀의 주요 항원물질인 16k 글로부린 등을 제거한 저알레르기 쌀이 제작되어있다. 염수(鹽水) 세정(洗淨)에 의해 알부민/글로불린 등의 염용해성 단백질을 제거하는 저알레르기 밀제품 개발이 시도되고 있다. 가열·세정을 조합한 처리에 의해 ovomucoid의 제거도 가능한 것으로 알려져 있다.
- 항원성 단백질을 결실시킨 품종 개발연구로는 대두의 주요 항원인 Gly m Bd 60K와 Gly m Bd 28K가 제거된 변이주 「도후쿠 124호」가 개발되었다. 300종의 밀품종 중에서 밀에 감작된 환자혈청 IgE와 반응이 낮은 몇 개의 유망한 품종도 발견되었다.
- 저 알레르기에 관한 국내 특허로는 항알레르기 효능을 지닌 천연물 추출액을 첨가하면 항알레르기 효능과 함께 발효 과정을 거치면서 대두 항원의 양이 기존의 장류에 비해 크게 저하되어 저알레르기 효과
- 저알레르기 식품으로 일본에서 항원 저감화 쌀이 개발되어 특정 보건용식품(특보)의 제1호로서 허가되었다(현재는 환자용 식품으로 분류). 이러한 최근 국제적인 유발 원인단백질을 규명, 알레르기의 진단 및 치료제 또는 저 알레르기성 식품을 개발 노력에 편승하여 저알레르겐 장류 개발 기술의 확보가 절실하다.

### 제 3절. 본 연구결과의 의의

- 국민의 건강은 국가 경쟁력 증강과 밀접한 관계가 있으므로 건강유지에 필수적 에너지를 공급하는 식생활에 기인한 질환의 발생 방지가 중요하다. 과학화와 공업화에 따른 공기, 물, 흙 등의 상태 변화로 식품소재인 식물·동물성 원료는 물론 사람의 체질도 바뀌어 선진국이 개발도상국보다 알레르기 발증 비율이 높아지는 현상이 가속되고 있다.

식약처에서 한국인에게 발생하는 주된 식품 알레르기 원인 식품으로 지정한 대두를 소재로 가공한 제품인 장류 특히 된장을 식이 제한하고 있는 소수의 대두 알레르기 환자들은 콩 단백질을 섭취 후 극심한 피부, 소화기, 호흡기 장애를 겪을 수 있다는 두려움에 제품을 회피하고 있는 실정이다.

한식의 주된 맛을 내는 장류로 인해 고충받는 일부 콩 알레르기 환자나 가족의 안전하고 화목한 식생활 유지, 경쟁력 있는 전통장류 제품의 개발 분위기 선도, 국제 경쟁력 강화에 기여할 것으로 추측한다.

## 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

### 제 1절 저 알레르겐 장류제조를 위한 대두품종 및 증자조건 탐색

#### 1. 서론

대두를 주 원료로 발효시켜 장기간 저장하며 섭취하는 된장, 간장, 고추장 및 청국장 등의 장류제품은 현재 한국인들이 가장 선호하는 조미 식품이다. 사회적으로 기능성 혹은 건강성을 지향하면서 발효 식품인 장류의 소비가 증대되고 있는 시점에서 장류 제품의 상품적 가치를 높이고 국내외에서 경쟁력의 향상이 필요하다.

대두 알레르기의 유병률은 지역, 식습관, 노출 시기나 정도에 따라 다르지만 소아의 1 ~ 6%, 아토피 피부염 환자의 6%, 우유알레르기 환자의 14%가 대두 알레르기가 나타난다고 한다. 성인 알레르기 환자의 대두에 대한 감작률은 3.8%로 알려져 있다. 또한 우유 단백질에 감작된 알레르기 환자의 혈청조사 결과 18.3%에서 대두 특이 IgE항체 양성 반응이 나타난다고 한다. 대두 섭취 후 발증되는 대체로 나이가 들면서 자연소실되는 알레르기 증상은 3세경이면 대두에 대한 내성이 획득된다고 하여, 대두 알레르기 환자의 경우 대두가 함유된 식품의 섭취를 회피 또는 제한하여 식단조절에 어려움이 많고 영양적 불균형으로 발육속도가 지연되는 등 1 ~ 2년 후 40%에서 대두 알레르기가 소실된다.

식품알레르기는 원인 식품을 철저히 피하는 것이 가장 효과적이나, 저렴한 단백질 공급원인 대두를 첨가하여 개발된 제품이 워낙 많아서 현실적으로 힘들기 때문에 다양한 방법으로 대두의 알레르기성을 낮추는 방법이 시도되고 있다. 전통 발효 식품인 된장을 먹고 아토피 증상이 악화되어 식이 제한 하는 특이 체질의 성인도 있으므로, 좀 더 효율적인 대두 발효법의 확립이 필요하다.

저 알레르기성 대두 발효물로 유아식, 환자식 등을 다양한 식품을 제조하고 알레르기 환자의 혈청을 이용한 면역학적 진단 방법 확립 연구가 요구된다. 국민 건강 증진을 위해 국산 대두 품종의 알레르겐 함량을 측정하여 알레르기성 질환을 가진 소비자용 식품소재를 발굴하여 전통 식품의 맛과 향을 유지하고 알레르겐이 감소된 장류의 생산은 대두 단백질에 과민 반응을 일으키는 환자들의 식생활을 개선시킬 수 있을 것으로 기대된다.

효소처리 및 화학 약품 처리 등의 방법이 알레르기 유발 단백질의 제거에 효과가 있다는 보고가 있지만 한국산 대두의 처리공정 혹은 발효 중 알레르겐의 변화에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다. 또한 대두의 항원성 단백질(알레르겐)의 변화에 대해 한약재 첨가 등을 통한 저

알레르겐 청국장 제조 등에 대한 연구가 이루어져 있지만 공정 중 저 알레르겐 장류 제조를 위한 체계적인 원료 콩의 선발, 증자, 발효 공정이 확립되어있지 않다. 그리고 대두 발효 식품 제조 공정 중의 대두중의 알레르겐의 함량 및 알레르겐 특이성 변화에 대한 연구가 부족한 실정이다. 국가 간 무역 활성화로 인한 무한경쟁에서 비교 우위를 차지하기 위해서는 장류의 알레르기성 평가는 선행 되어야 할 연구이다.

당해년도 연구에서는 품종별 국내산 대두를 확보하고 저알레르겐 장류 제조를 위한 효율적인 증자 조건을 설정하여 그에 따른 성분 변화를 살펴보았다. 또한 국내 시판중인 장류제품의 알레르기 유발성 단백질의 존재여부를 조사하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 실험재료

본 실험에 사용된 대두 시료는 경남 밀양시 소재의 국립식량과학원으로부터 장류제조용 적합 품종으로 추천되는 대풍, 대원, 태광의 3 품종을 제공받았으며, 경상대학교 농학과(정종일 교수 팀)에서 육중한 개척 2호(Kunitz trypsin inhibitor(;KTI) 및 Lipoxygenase 결실 품종), CN628-15(1) (주요 대두 알레르겐인 Trypsin inhibitor 결실 품종), S-09 (주요 대두 알레르겐인 Kunitz,  $\beta$ -conglycin의  $\alpha$ -subunit 결실 품종), CN304-13의 4종 등 총 7종을 사용하였다.



Fig 1. 7품종의 대두 시료

### 나. 대두원료의 형태적 특성



품종별 원료 대두의 형태적 특성은 다음과 같이 측정하였다. 대두의 직경은 각 품종의 대두 낱알을 10반복으로 취하여 고정도 디지털 마이크로미터(Digimatic micrometer, Mitutoyo)를 이용하여 정밀하게 측정한 후 평균값으로 하였다.

대두의 천립중은 각 품종의 대두 1000개씩을 5반복으로 취하여 무게를 측정한 후 평균값으로 하였다.

#### 다. 증숙 및 자숙조건 설정

7가지 대두 품종의 열처리 방법에 따른 항원성의 변화를 확인하기 위해 증숙 공정은 Autoclave, 121°C에서 10, 20, 30, 40, 50, 60분 실행하였으며, 자숙 공정은 100°C, 끓는 물에서 1, 2, 3, 4, 5, 6시간 중탕 가열 처리하였다.

#### 라. 총질소 함량 측정

대두의 총질소(TN : Total nitrogen) 함량 측정은 균일하게 분쇄한 시료 1 g을 취하여 Kjeldahl flask에 넣고,  $K_2SO_4$ 와  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 를 9 : 1의 비로 혼합한 촉매제 2 ~ 3 g과 conc.  $H_2SO_4$  15 ml을 넣어 2시간 동안 분해시킨 후 증류수를 첨가하여 100 ml로 정용하고 소비된 0.02 N HCl의 ml수를 총질소로 환산하였다. 증류시 사용한 시약은 NaOH - Sodium thiosulfate ( $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ )용액과 2% Boric acid ( $H_3BO_3$ )용액 그리고 지시약은 Bromocresol green과 Methyl red를 에탄올에 2 : 1의 비로 섞은 혼합지시약을 사용하였다.

#### 마. 아미노태 질소 측정

청국장의 아미노태 질소(AN : Amino type nitrogen) 함량 측정은 균일하게 분쇄한 시료 5 g을 250 ml 메스플라스크에 넣고 증류수를 가하여 정용한다. 이 중 50 ml을 취하여 100 ml beaker에 넣은 후 0.1 N NaOH으로 pH 8.4가 될 때까지 중화한다. 여기에 중성포르말린 20 ml을 가하고 0.1 N NaOH으로 pH 8.4가 될 때까지 적정한다. 적정의 종점을 결정하기 위하여 pH meter (Orion 420A, USA)를 이용하였다.

#### 바. 유리아미노산 함량 분석

탈지시킨 대두 분해 시료 2.5g에 물 25 ml을 가하여 균질화한 후 100°C에서 15분간 가열처리

하여 아미노산을 용출시켰다. 시료를 Watman No.2 filter paper를 이용하여 filtering 한 후 회전식 진공증발 농축기를 사용하여 감압농축 한 후 이 농축액을 litium citrate buffer(pH 2.2)을 이용하여 10 ml로 정용하였다. 정용 후 0.22 um filter로 filtering 하고 sep-pak으로 색소를 제거하여 분석시료로 사용하였다. 분석은 아미노산 자동분석기 (amino acid autoanalyzer)를 사용하였으며, 그 조건은 다음과 같다.

Table 1. 아미노산 자동분석기의 구성과 분석 조건

Instrument	Sykam S433
Column size	4mm× 150mm
Absorbance	570 nm and 440 nm
Reagent flow rate	0.25 ml/min
Buffer flow rate	0.45 ml/min
Reactor temperature	120℃
Reactor size	15m

#### 사. 시판 장류제품의 수집

된장, 찜장 및 미소(일본 된장) 등 시판 장류제품은 H마트에서 16종을 구입하여 분석을 실시하였다.

#### 아. 산도측정

산도는 0.1N NaOH 용액으로 중화적정하여 초산으로 환산하였다.

#### 자. pH

pH는 시료 5g을 증류수 95 ml에 현탁시켜 pH meter(Orion model 420A; USA)로 측정하였다.

#### 차. 수분측정

청국장 제품의 수분함량은 적외선 수분측정기(FD-600, Kett)로 40분간 측정하였다

#### 카. 시판 장류제품의 아미노태 질소 측정

장류의 아미노태 질소 함량 측정은 시료를 5 g을 250 ml 메스플라스크에 넣고 증류수를 가하여 100 ml 까지 정용한다. 이 중 50 ml을 취하여 100 ml beaker에 넣은 후 0.1 N NaOH으로 pH 8.4가 될 때까지 중화한다. 여기에 중성포르말린 20 ml을 가하고 0.1 N NaOH으로 pH 8.4가 될 때까지 적정한다. 적정의 종점을 결정하기 위하여 pH meter (Orion 420A, USA)를 이용하였다.

#### 타. 단백질의 추출

시판 장류 중 단백질 함량 조사를 위해 수집된 장류를 동결건조 후, hexane과 1:8(w/v)비율로 혼합한 뒤 2시간 교반 후, hexane을 교체해가면서 총 3회 탈지하였다. 탈지된 장류 1 g을 30 mM Tris-HCl(pH 8.5) 또는 Phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)을 10 ml 가한 후 3시간 동안 교반 후 원심분리(12,000 rpm, 10 mins)하여 그 상정액을 본 실험의 단백질 추출물로 사용하였다.

#### 파. 단백질 농도

추출된 단백질은 Bradford법으로 표준물질을 BSA (bovine serum albumin)로 하여 농도를 측정하였다.

#### 하. 시판 장류 제품의 SDS-PAGE 전기영동

Gel은 15% separating gel과 5% stacking gel을 이용하였고, 시료와 샘플버퍼를 혼합한 후 끓는 물에서 5분간 가열한 뒤 well 당 4  $\mu$ g을 loading하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동은 100 volt에서 90분 시행하였으며 전기영동 후, gel은 Coomassie staining solution (1.0 g Coomassie Blue R-250, 450 ml methanol, 450 ml H<sub>2</sub>O, 100 ml glacial acetic acid, 800 ml H<sub>2</sub>O)로 20분간 염색하고 Coomassie destaining solution (100 ml methanol, 100 ml glacial

acetic acid, 800 ml H<sub>2</sub>O)로 적절히 탈색 후 구성단백들의 분포를 비교분석 하였다.

#### 거. 효소면역학적 분석법을 이용한 특이 IgE 및 IgA의 측정

ELISA는 Engvall와 Perlmann등의 방법에 준하여 실시하였다. 시판 장류제품의 단백질 추출물을 항원으로 사용하였고, 각각의 추출물을 96-well plate (NUNC, Denmark)에 최종 농도가 10 µg/ml이 되도록 PBS (20 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4)로 희석하여 각 100 µl씩 분주하고 4°C에서 하룻밤 coating하였다. 다음날 PBST (phosphate buffered saline containing 0.05% (v/v) tween 20)로 3회 세척하였으며, 비특이적 결합을 방지하기 위해 blocking buffer (10% fetal bovine serum-phosphate buffered saline)을 이용하여 1시간 blocking 한 후 다시 PBST로 3회 세척하였다. 여기에 PBS를 이용해 1:100으로 희석한 대두 민감성 환아혈청을 100 µl씩 가하고 37°C에 2시간 반응시켰다. PBST로 3회 세척한 후, 1000배로 희석시킨 peroxidase-conjugated anti-human IgE 및 IgA도 37°C에 2시간 반응시켰다. PBST로 4회 세척한 후, TMB substrate solution (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, citrate-phosphate buffer 10 ml, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>2µl)를 첨가하여 각 well에 100 µl 씩 넣고 10분간 발색시켰다. 1 M phosphoric acid를 첨가하여 발색을 정지시킨 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3. 증자 조건에 따른 대두의 성분 분석

#### 가. 대두 품종별 형태적 특성

대두의 품종에 따른 형태적 특성 조사 결과를 Table 2에 나타내었다. 대두의 크기는 대원, 개척, 대풍, 태광, CN628-15(1), S-05(진농1호), CN304-13은 순으로 나타나 품종별 직경의 차이가 있음을 알 수 있었다. 공시 대두의 천립중을 측정한 결과 대원콩, 개척 2호는 중립중(350~250 g), 대풍콩, 태광콩은 소립중(250~150 g), 또한 극소립중(>150 g)에 해당되는 품종은 CN628-15(1), S-09(진농1호), CN304-13으로 나타났다. 또한 배꼽색과 자엽색을 조사한 결과도 다양하게 나타나, 원료 대두의 크기 및 천립중, 색상의 선택은 영양성분 조성 뿐만 아니라 관능적, 기호적인 측면에 큰 영향을 미치기 때문에 장류 제조시 대두 품종의 선택은 목적에 적합하도록 선별하는 작업이 선행되어야 할 것이라 사료된다.

Table 2. 대두 품종별 직경, 백립중 및 색상

	품종	백립중 (g/100립)	배꼽색
노란콩	대풍콩	201.6 소립	백색
	대원콩	256.8 중립	황색
	태광콩	202.5 소립	백색
	개척2호	256.4 중립	흑갈색
	CN628-15(1)	103.6 극소립	백색
검정콩	S-09(진농1호)	80.3 극소립	검정색
	CN304-13	112.5 극소립	검정색

나. 증자조건에 따른 품종별 대두의 총질소 함량

증자조건에 따른 품종별 대두의 총질소 함량을 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 대풍, 대원, 태광, 개척 2호, CN628-15(1), S-09, CN304-13의 총질소 함량은 평균 41.13~ 44.23 %로 품종간 차이를 보였다. 특히 극소립종인 CN628-15(1)은 44.23 %로 비교적 높은 함량을 보였고, 검은콩 품종인 CN628-15(1), S-09, CN304-13은 비교적 낮은 함량인 41.13 % 정도로 나타났다. 일반적으로 많이 가공되는 소립, 중립 품종인 대풍, 대원, 태광콩의 총질소 함량은 41~43 % 였다. 대두를 물에 담근 상태로 열처리 해서 익히는 자숙법은 수용성 영양물질이 손실되고 익히는 시간이 장시간 소요되어 비경제적인 것으로 알려져 있다. 증숙 처리 30분, 자숙 처리 3시간 후 총질소 함량은 약간 감소되는 경향을 보였으나 큰 유의적 차이는 없었고, 이는 수용성 단백질이 가열처리 중 약간 용출되어 손실이 있었기 때문이라 사료된다.

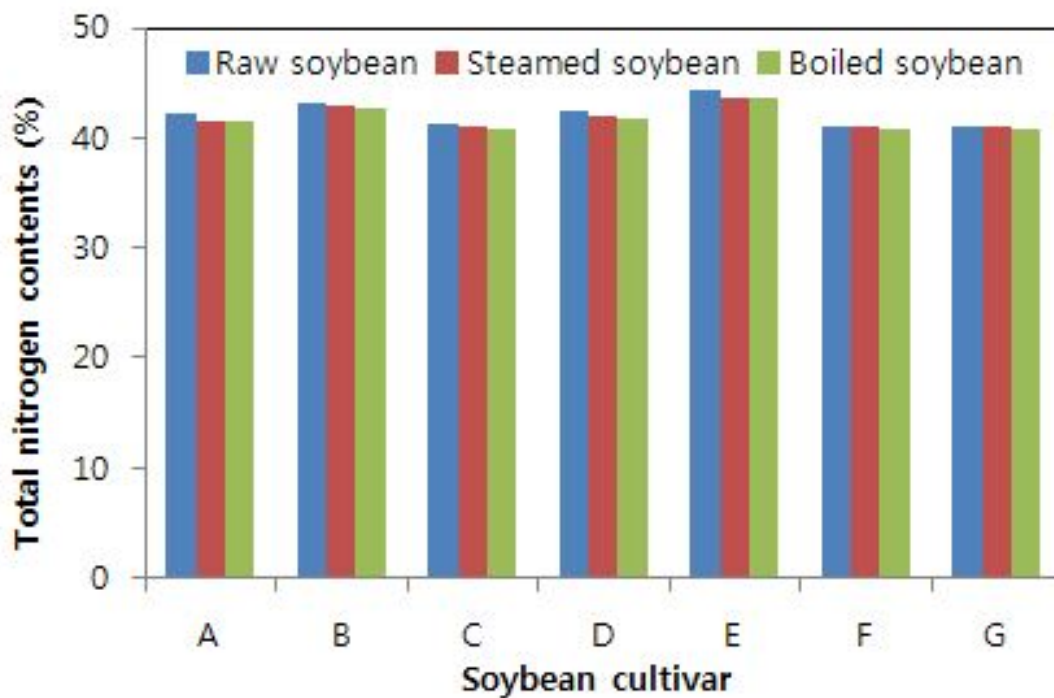


Fig. 2. 대두 품종별 증자 조건에 따른 총 질소 함량

A : 대풍, B: 대원, C : 태광, D : 개척 2호, E : CN628-15(1), F : S-09, G : CN304-13

다. 증자조건에 따른 품종별 대두의 아미노태 질소 함량

증자조건에 따른 품종별 대두의 아미노태 질소 함량을 측정한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 대풍, 대원, 태광, 개척 2호, CN628-15(1), S-09, CN304-13의 아미노태 질소 함량은 평균 160.5~378.65 mg%로 품종간 많게는 2배 이상의 큰 차이를 보였다. 121℃의 증숙 조건하에서 아미노태질소는 생 대두에 비해 현저히 감소하는 경향을 나타내었다. 자숙 처리 후에는 증숙처리보다 더 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 CN628-15(1), S-09 품종은 열처리 후에도 다른 품종에 비해 아미노태 질소 함량 감소가 적은 것으로 확인되었다. 생대두를 열처리 후 대두중 아미노태 질소 함량이 감소되는 이유는 가열에 의한 maillard 반응 결과 당과 질소화합물의 결합에 의해 불용성 화합물이 형성되기 때문으로 추측된다.

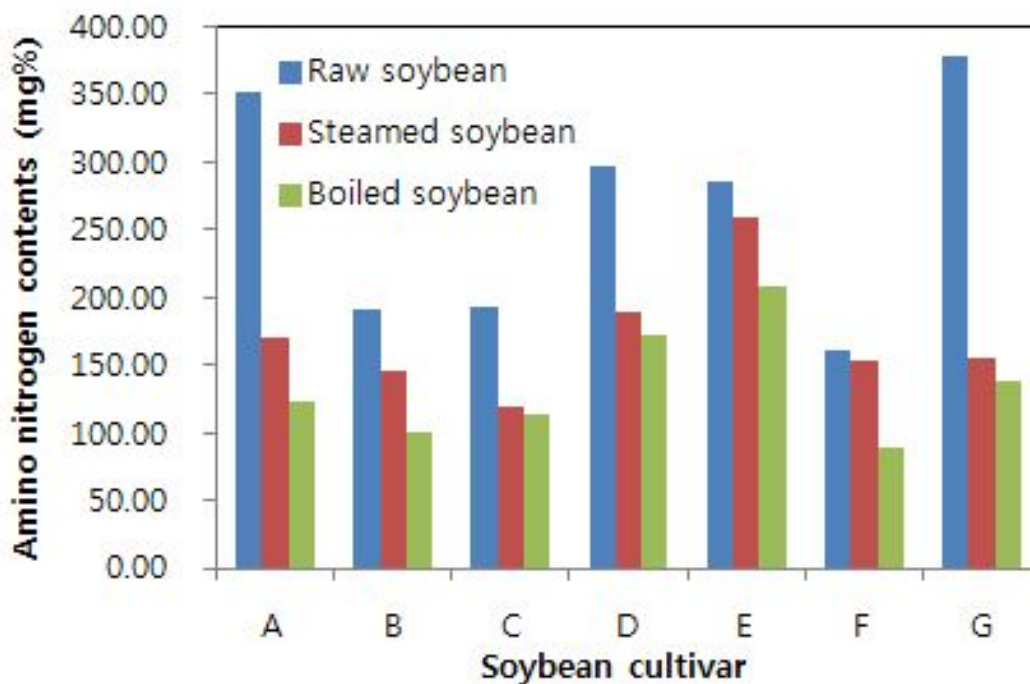


Fig. 3. 대두 품종별 증자 조건에 따른 아미노태 질소 함량

A : 대풍, B: 대원, C : 태광, D : 개척 2호, E : CN628-15(1), F : S-09, G : CN304-13

라. 증자조건에 따른 품종별 대두의 유리아미노산 함량

증자조건에 따른 품종별 대두의 유리아미노산 함량을 측정한 결과를 Table 3에 나타내었다. 대풍, 대원, 태광, 개척 2호, CN628-15(1), S-09, CN304-13의 필수 유리아미노산 함량을 비교한 결과 품종간 현저한 차이가 있음을 확인하였다. 또한 주요 아미노산은 Val, Tyr, Phe, His 등으로 나타났으며 열처리 조건에 따라 다양한 패턴으로 변화되는 것을 확인하였다. 일반적으로 121℃의 증숙 처리 후 생 대두와 비교하여 함량이 1.5~ 2 배, 크게는 3 배 이상 증가하여 영양성분 이용가능성이 효율적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 반면 100℃의 자숙 처리 후에는 증숙처리보다 유리아미노산 증가정도가 낮았으나, 생 대두에 보다는 약간 높았다. 이와 대조적으로 검은콩 품종인 S-09, CN304-13 품종을 가열처리한 경우에는 생 대두와 증숙 대두의 유리아미노산 함량이 큰 차이를 나타내지 않았으며, 자숙 후에는 오히려 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 검은콩의 유리아미노산 성분은 자숙처리에 의해 물로 용출되어 손실되는 경향이 크게 나타난 것이라 사료되며, 이는 성분 조성뿐만 아니라 대두를 구성하는 성분들의 구조적인 차이에 기인하는 것이라 추정되지만 확실한 원인 파악을 위해서는 구체적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Table 3 (A) 증자조건에 따른 대풍콩의 유리아미노산 함량 (mg%)

	Raw soybean	Steamed soybean	Boiled soybean
Thr	12.30	35.54	13.56
Gly	11.20	24.98	10.89
Val	57.20	152.73	70.31
Met	4.50	11.10	6.47
Ile	11.20	25.58	11.11
Leu	15.60	41.99	17.42
Tyr	22.40	65.25	27.24
Phe	31.30	78.82	33.66
His	32.50	72.42	33.36
Lys	15.20	31.15	16.23



Table 3 (B) 증자조건에 따른 대원콩의 유리아미노산 함량 (mg%)

	Raw soybean	Steamed soybean	Boiled soybean
Thr	15.96	22.65	31.35
Gly	13.48	23.74	18.33
Val	124.64	152.47	125.42
Met	11.04	15.44	19.70
Ile	15.13	32.61	27.06
Leu	22.12	0.16	42.09
Tyr	24.67	45.31	37.95
Phe	42.80	71.59	45.10
His	56.99	58.86	66.07
Lys	43.76	69.24	60.96

Table 3 (C) 증자조건에 따른 태광콩의 유리아미노산 함량 (mg%)

	Raw soybean	Steamed soybean	Boiled soybean
Thr	21.31	60.03	24.24
Gly	15.20	38.07	18.79
Val	58.24	180.90	81.07
Met	9.27	12.42	15.10
Ile	17.16	38.54	20.89
Leu	28.46	66.14	33.64
Tyr	85.91	317.12	154.99
Phe	33.05	121.17	62.04
His	41.60	96.33	50.58
Lys	22.61	57.28	35.46

Table 3 (D) 증자조건에 따른 개척 2호 콩의 유리아미노산 함량 (mg%)

	Raw soybean	Steamed soybean	Boiled soybean
Thr	13.92	32.59	65.44
Gly	7.37	23.75	45.56
Val	27.16	63.68	167.13
Met	5.83	14.63	24.73
Ile	10.19	21.63	37.88
Leu	13.81	33.52	58.90
Tyr	21.56	33.47	82.08
Phe	28.39	35.10	96.60
His	31.64	61.10	115.17
Lys	22.31	53.20	132.43

Table 3 (E) 증자조건에 따른 CN628-15(1) 콩의 유리아미노산 함량 (mg%)

	Raw soybean	Steamed soybean	Boiled soybean
Thr	31.63	38.88	28.95
Gly	22.03	32.37	14.16
Val	78.82	171.93	80.74
Met	12.00	23.44	13.30
Ile	18.71	32.07	18.08
Leu	29.07	50.15	26.76
Tyr	43.38	93.32	44.26
Phe	50.80	96.80	45.95
His	60.06	80.71	41.60
Lys	70.64	110.18	48.15

Table 3 (F) 증자조건에 따른 S-09 콩의 유리아미노산 함량 (mg%)

	Raw soybean	Steamed soybean	Boiled soybean
Thr	24.70	29.76	0.47
Gly	17.05	18.83	0.35
Val	130.18	136.05	3.28
Met	13.22	7.43	0.32
Ile	19.97	15.81	0.41
Leu	32.37	27.84	1.50
Tyr	26.22	45.25	1.33
Phe	40.30	66.94	1.98
His	53.36	47.90	6.23
Lys	30.85	28.90	2.39

Table 3 (G) 증자조건에 따른 CN304-13 콩의 유리아미노산 함량 (mg%)

	Raw soybean	Steamed soybean	Boiled soybean
Thr	36.39	36.67	12.30
Gly	20.10	20.15	5.34
Val	176.73	171.84	59.27
Met	21.76	12.63	4.82
Ile	33.37	24.81	9.12
Leu	49.98	38.35	13.92
Tyr	49.12	77.67	27.15
Phe	53.88	77.39	27.23
His	75.43	60.87	27.76
Lys	32.87	24.43	9.82

#### 4. 시판 장류제품의 알레르겐함량의 정성적 확인

##### 가. 시판 장류의 수집 및 성분

장류제품이 과민성 체질을 가진 소비자들에게 콩 알레르기 유발 가능성을 조사하기 위해서 국내에서 시판되고 있는 장류, 즉 된장(a ~ h), 찜장(i ~ n) 및 일본 된장인 미소(o, p) 16 시료를 수집하여 성분 분석을 실시하였다. 수집된 장류시료의 산도는 된장은 0.15~0.25 %범위였으며 찜장은 산도 0.20 %인 m 시료를 제외한 나머지 제품의 산도가 0.15 나타났다. 일본식 된장인 미소 제품의 경우 산도가 0.15 및 0.20 %로 한국에 시판되고 있는 개량식 대량 생산 장류와 비슷한 산도를 나타냈으며 16종의 모든 제품의 산도는 아주 낮았다. 구입한 모든 장류 시료의 pH는 5.02~5.66 이었으며 수분함량은 된장 제품군(a~h) 49.0 ~ 57.0% 비해 찜장 제품군(i~n)에서 38.3 ~ 47.1%로 낮은 수분함량을 보였다. 아미노태질소 함량을 측정한 결과 h 제품이 840.60 mg%로 가장 높았고 190.54 mg%인 n 제품의 약 4.4배에 해당하였다. 아미노태질소함량의 차이는 발효 미생물의 종류나 밀도와 발효 온도 및 시간 등의 생육상황, 생성된 효소의 종류 및 역가, 보관 숙성조건 등 여러 가지 요인에 따라 차이가 생길 수 있으며 제조회사별 발효 공정의 차이에 기인할 수도 있을 것으로 사료된다.

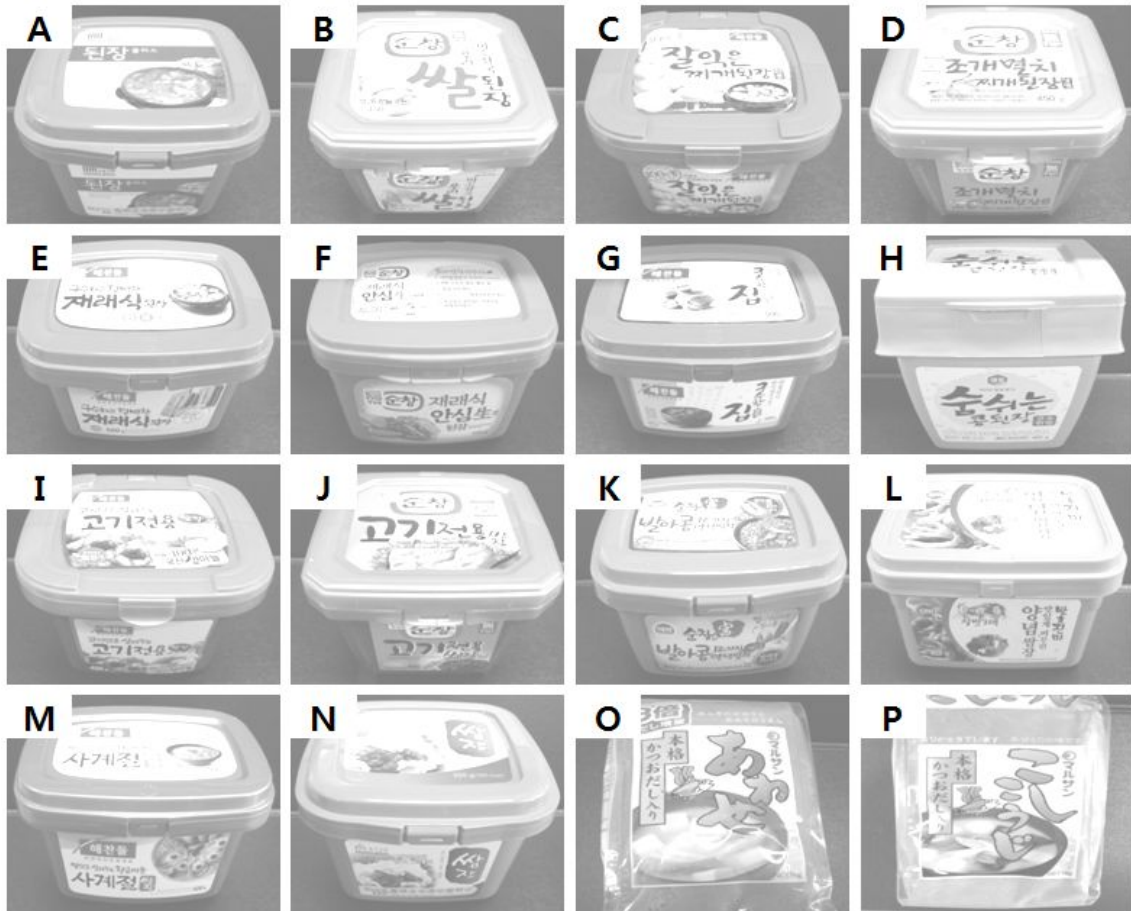


Fig 4. 시판장류의 수집

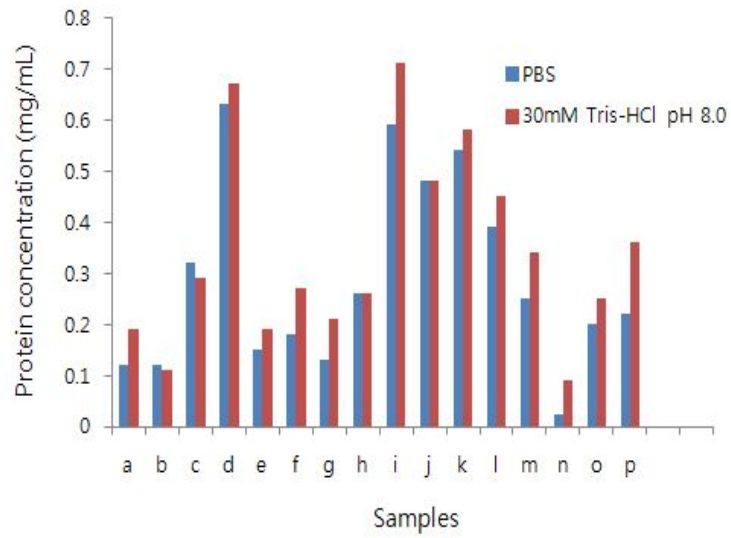
Table 4. 시판장류 16종의 일반성분 분석

Sample	산도	pH	수분함량 (%)	아미노태질소함량 (mg%)
a	0.20	5.21	49.0	271.79
b	0.25	5.17	51.8	294.21
c	0.15	5.16	57.0	470.74
d	0.20	5.31	55.7	493.15
e	0.15	5.43	48.5	341.84
f	0.30	5.27	50.7	495.95
g	0.20	5.13	54.3	392.28
h	0.25	5.27	51.9	840.60
i	0.15	5.13	47.1	252.18
j	0.15	5.66	41.4	235.36
k	0.15	5.32	43.1	302.61
l	0.15	5.23	43.0	240.97
m	0.20	5.46	43.4	252.18
n	0.15	5.02	38.3	190.54
o	0.15	5.45	50.8	347.44
p	0.20	5.49	50.0	305.42

## 나. 장류 제품 중의 단백질 추출

조미 식품으로 널리 사용되고 있는 콩 발효 염장제품의 알레르기 유발 가능성을 조사하기 위하여 현재 소비되고 있는 시판 된장 및 쌈장 등 16종의 장류 제품 중의 단백질을 추출하였다. 구입한 장류를 동결건조를 실시한 후 hexane을 이용하여 탈지를 실시하였다. 효과적인 장류의 단백질 추출을 위해 Phosphate buffered saline(PBS) 및 30mM Tris-HCl (pH 8.5)의 두가지 완충 용액을 이용하여 추출하였다. 추출액 중의 대두 단백질을 측정하는 결과 Tris-HCl을 용매로 했을 경우 PBS를 용매로 추출한 경우보다 대부분의 장류제품에서 높은 단백질 함량이 검출되었다(Fig. 5). 쌈장제품의 단백질 함량이 된장제품보다 높게 나타났는데 그 이유는 쌈장 제조시 참깨, 고춧가루, 마늘 등의 부재료의 첨가에 기인한 것으로 사료된다. 예외적으로 d 제품의 경우는 찌개용 된장으로 조개 엑기스, 고춧가루 등 다른 된장 제품군에 비해 조미가 많이 되어 있어 쌈장과 비슷한 단백질 함량을 보인 것으로 생각되며 n 쌈장의 경우 a 된장 제품과 같은 업체의 제품으로 원료 된장 자체의 단백질이 효율적으로 잘 분해되어 있는 것으로 사료된다. 일본산 o, p 제품은 한국의 장류 제품에 비해 다소 단백질 함량이 낮았다.

(A)



(B)

		(mg/ml)							
Buffer	Sample	a	b	c	d	e	f	g	h
PBS		0.12	0.12	0.32	0.63	0.15	0.18	0.13	0.26
30mM Tris-HCl pH 8.0		0.19	0.11	0.29	0.67	0.19	0.27	0.21	0.26
Buffer	Sample	i	j	k	l	m	n	o	p
PBS		0.59	0.48	0.54	0.39	0.25	0.23	0.20	0.22
30mM Tris-HCl pH 8.0		0.71	0.48	0.58	0.45	0.34	0.09	0.25	0.36

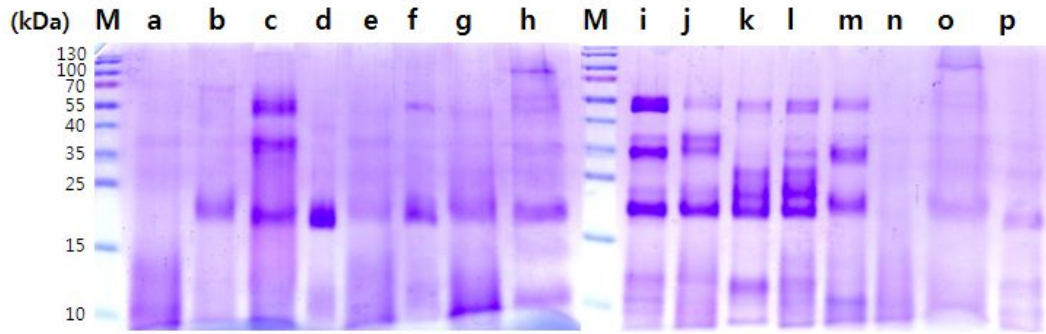
Fig. 5 . 시판장류 제품의 단백질 함량



#### 다. 시판 장류 제품 중의 SDS-PAGE 전기영동 분석

시판장류 16종에서 추출한 단백질을 각 well당 4 $\mu$ g를 loading 한 후 100V에서 90분간 전기영동 한 결과를 아래의 Fig. 6에 나타내었다. PBS를 용매로 한 경우, 추출액의 단백질 함량은 낮았으나 SDS-PAGE를 실시했을 시 Tris-HCl을 용매로 한 경우보다 단백질 밴드가 선명하게 나타났으나 장류샘플의 gel 상의 단백질 밴드 분포도의 차이는 없었다. 대부분의 시판장류 중에 10~100 kDa의 다양한 분자량의 단백질이 분포하는 것을 확인할 수 있었다. 된장 장류 제품군 중 a는 밴드의 수나 농도가 낮은 것으로 미루어 다른 장류 제품군에 비해 단백질 분해가 잘된 것으로 확인할 수 있었으나 37 kDa 및 70 kDa 부근 에서 고분자량의 단백질이 SDS-PAGE상에서 미약하게 확인이 되어 완전한 대두의 단백질 분해가 이루어지지 않은 것으로 사료된다. 찜장의 경우 대부분의 제품군에서 20 ~ 60 kDa 사이에 진한 밴드들이 분포하고 있었으며 찜장의 제조 특성상 다양한 부재료로부터 추출된 단백질들이 존재하는 것으로 판단된다. 찜장 n의 경우 다른 찜장제품에 비해 15 kDa 이하로 단백질이 많이 분해된 상태인 것을 확인할 수 있었으나 a와 마찬가지로 전체적으로 미약한 밴드가 검출됨을 확인할 수 있었다. 장류의 발효 및 숙성 공정 중 단백질의 분해가 원만히 이루어지지 않을 경우 콩 단백질에 과민 반응을 보이는 소비자가 섭취했을 시 대두 및 부재료에 의한 알레르기 유발을 증가시킬 수 있다고 사료되어 발효미생물의 선정 및 장류제조에서의 대두의 열처리조건 등의 설정이 저 알레르기 장류제품 개발을 위해 필요하다고 사료된다. 현재까지 장류 중 단백질 pattern에 관한 연구가 거의 없었다. 알레르기 환자가 증가하고 있는 현 상황에 비추어 장류 생산중 단백질의 변화 및 감화에 관한 연구는 꼭 수행되어야 할 것이다.

**(A) 30mM Tris-HCl buffer (pH 8.5)**



**(B) Phosphate buffered saline(PBS) buffer**

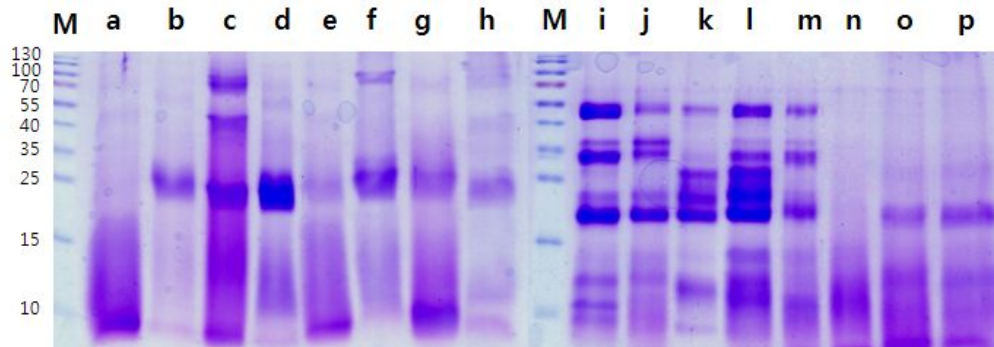


Fig. 6 . 시판장류의 SDS-PAGE

(A) 30 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) 추출 단백질

(B) Phosphate buffered saline (PBS) buffer 추출 단백질

라. 효소면역학적분석법(ELISA)에 따른 시판장류 제품의 알레르기성 탐색

시판 장류 제품 속에 함유된 대두 단백질과 민감하게 반응하는 특이성 항체를 가진 환아(대두 알레르기성 비특이체질 아이)의 혈청을 반응시킴으로써 면역학적으로 반응하는 특이 IgE 및 IgA 농도를 측정된 결과를 Fig. 7 나타내었다. 장류제품 d에 대한 혈청 중 특이 IgE 레벨이 3명의 환아 모두 높게 나타났으며 특히 i, k, o 및 p 제품에서 높은 특이 IgE 레벨을 보였다. 환자 개인의 대두에 대한 민감도나 특성에 따라 특이 IgE 수치의 차이가 있었으나 SDS-PAGE 상 단백질 밴드의 수나 농도가 낮았던, 즉 발효중 단백질 분해가 잘 된 제품군에 대해 상대적으로 낮은 IgE 반응성이 검출되었다. 장관면역계와 관련 있는 IgA의 경우 IgE 수치보다 비교적 모든 제품군에서 낮게 나타났으며 짬장제품군이 대체적으로 된장 제품군보다 다소 높은 IgA 레벨을 보였다. 하지만 ELISA 분석을 위해 사용한 환아의 수가 적으며, 1~2살 사이의 낮은 연령대에 국한되어 있고, 이중맹검경구유발시험을 통해 콩 알레르기로 확진된 환아가 아니라 혈청 속에 콩 특이 IgE 반응성을 가진 경우에 해당하기 때문에 이상의 결과를 바탕으로 실제로 항원성의 차이를 분석·판단하는데는 어려움이 있을 것으로 생각된다. 본 연구가 열처리 및 모든 가공공정을 거친 완제품 장류를 시료로 단백질을 추출하여 알레르기 유발가능성을 측정한 우리나라 최초의 연구 결과로 장류에 의한 콩 특이 식품알레르기 분야의 연구 발달에 큰 역할을 할 것으로 기대된다.

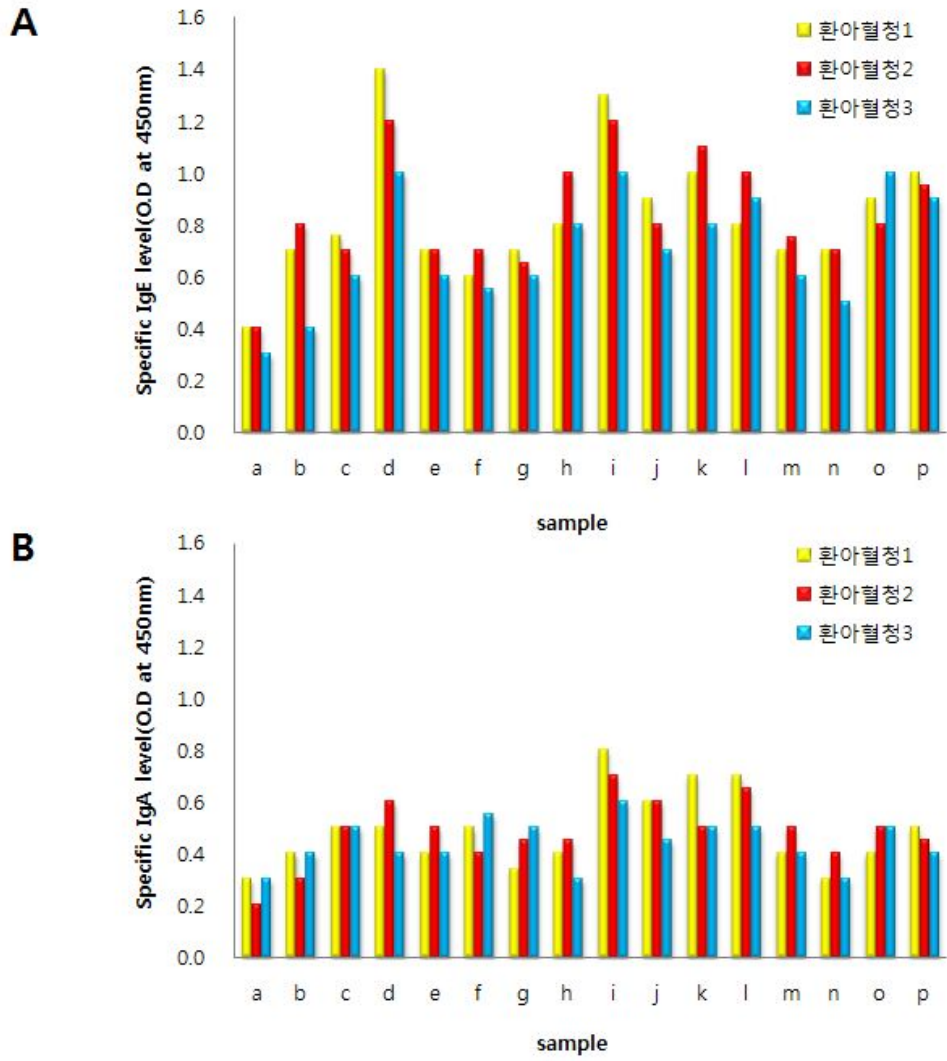


Fig. 7. 시판 장류제품에 대한 민감성 환아 혈청의 특이 IgE 및 IgA 레벨

## 2절 대두의 품종 및 증자조건에 따른 항원성변화 규명

### 1. 서론

대두는 *Leguminosae*과에 속하며 단백질 함량이 30-45%를 차지하고 지질이 풍부하여 밭에서 나는 쇠고기라고 불리는 대두는 경제적으로 매우 중요한 작물로, 우리나라를 비롯하여 중국, 일본, 유럽 각지와 미국 등에서 널리 재배되어 섭취되고 있는 식용자원이다. 곡류 위주의 식생활에서 부족하기 쉬운 단백질의 주요 공급원인 대두는 특별히 한국 사람의 식생활에서 큰 비중을 차지하는데 두부, 된장, 간장, 콩가루, 콩기름, 콩나물로 섭취하는 등 여러 형태의 음식으로 사용되고 있으며 아기들에게도 일찍부터 된장이나 두부 등의 형태로 영양 공급원으로 이용되었다<sup>1)</sup>. 그리고 최근에는 두유형태로 영유아용 영양보조 식품으로 많이 이용되고 있으며, 1985년 남양유업에서 '호프'라는 대두단백 제조유를 생산하면서 대량공급이 시작되었다. 서구에서는 1909년 대두 단백질이 우유대체 식품으로 처음 사용되었으며<sup>2)</sup>, 대두단백조제유가 우유 알레르기 환자의 대체식품으로 사용된 것은 1929년이다<sup>3)</sup>. 대두단백 조제유(남양 호프알러지, 매일 Soy-A, Soya, Infasoy, Isomil, Prosbee 등)는 분리대두단백, 식물성 유지, 당, 텍스트린이 주 원료이며, 대두에 부족한 methionine, taurine, carnitine, 철분 등이 첨가된 유아식으로 맛이 좋고 가격이 저렴하여 우유대체 식품으로 널리 이용되고 있다. 영유아가 대두단백 조제유를 섭취하는 경우 영양학적으로 정상이며, 정상적인 발육을 나타낸다는 보고<sup>4-7)</sup>가 있는 반면, Chan 등은 2-4개월 영아에서 뼈의 미네랄 저하, 혈중 아연 농도의 저하와 철분의 저하를 보고하였다<sup>8)</sup>.

대두 단백질의 80-90%를 차지하는 성분은 글로부린(globulin)이며, 이 단백질은 대두 알레르기 반응을 일으키는 환자에게 specific-IgE 항체 생성을 유도하며, 같은 *Leguminosae*과에 속하는 땅콩 등의 식품과 교차 반응성을 나타내는 단백질 성분이다<sup>9)</sup>. 대두에 포함된 알레르기를 일으키는 주요 단백질 항원으로는 30 kDa의 Gly m 1, 20 kDa의 Kunitz soybean tripsin inhibitor 등이 알려져 있다<sup>10-13)</sup>. 대두 단백질은 초원심분리기를 이용하여 침강계수에 따라 2S, 7S, 11S, 15S의 4가지 주요 분획으로 구분되며<sup>14)</sup>, 각각의 분획은 단백질의 복합체로 구성된다. 7S와 11S가 각각 추출된 단백질의 1/3을 차지하며, 2S가 20%, 15S가 10%를 차지한다. 2S는  $\alpha$ -conglycinin으로 구성되며 15S는 glycinin이 응집된 것으로 되어 있다<sup>15)</sup>. 7S는 180 kDa의 glycoprotein인  $\beta$ -conglycinin이 약 50%를 차지하고 있는데  $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$ 의 3개의 소단위의 조합으로 삼합체(trimer)를 형성하고 있다<sup>16)</sup>. 이 중에서  $\alpha$  소단위인 Gly m Bd 60K는 7S 글로부린 분획에 존재하는 대두의 주요 알레르겐 단백질의 하나이다<sup>17)</sup>. 11S는 대부분이 대두 저장 글로부

린인 glycinin으로 구성되어 있으며 이것은 350 kDa의 육합체(hexamer)로서 서로 다른 G1-G5의 5개의 소단위의 조합으로 이루어져 있는데 이 중에서 G1의 IgE 항원결정인자가 땅콩 glycinin Ara h 3의 IgE 항원결정인자와 유사한 것으로 알려져 있다<sup>18)</sup>. 식물에 함유된 단백질 중에는 식물체에 침입하여 질병을 일으키는 해충 등에 대항하여 방어 기능 수행을 위한 pathogenesis-related proteins (PRs)들이 음식물 알레르기를 일으키는 물질, 즉 항원과 관련성이 높은 것으로 알려져 있는데<sup>19)</sup>, 특별히 현재는 Gly m 4로 명명된 PR-10 protein starvation-associated message 22 (SAM22)가 자작나무 꽃가루의 주요 알레르겐인 Bet v 1과 관련성이 있어, 자작나무 꽃가루에 알레르기가 있으면서 대두 알레르기가 동반된 경우에 심한 구강알레르기 증후군과 아나필락시스를 유발하는 Gly m 4 (17 kDa)가 주요 알레르겐임이라고 보고된 바 있다<sup>20)</sup>. 이에 본 연구에서는, 열처리하지 않은 대두 단백질을 분리하여 대두에 대해 알레르기 반응을 일으키는 환자들의 혈청을 이용하여 품종별 대두의 항원성을 알아보았다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 실험재료

본 실험에 사용된 대두 시료는 국립 식량과학원으로부터 장류제조용 적합 품종으로 추천되는 대풍, 대원, 태광 품종을 제공받았으며, 경상대학교 농학과(정종일 교수팀)에서 육중한 개척 2호, CN628-15(1), S-09, CN304-13 등 총 7종으로 연구를 수행하였다.



Fig 1. 7품종의 대두 시료

### 나. 대상 환자 및 혈청

2010년 3월부터 2010년 8월까지 삼성서울병원에 내원하여 Hanifin의 진단기준<sup>21)</sup>에 따라 혈청 내 콩에 대한 특이 IgE 수치가 30 kU/L 이상을 보인 환자 7명을 대상으로 하였다. 이 중 실제로 대두에 대한 알레르기 증상을 보인 경우는 4명이었고, 나머지는 이전에 대두에 의한 증상 발현 경험이 없는 환자였다. 혈청 내 콩 특이 IgE는 CAP-FEIA (Pharmacia, Uppsala, Sweden)으로 측정하였고, 정상 대조군은 콩 특이 IgE가 없고 콩 섭취 후 어떠한 증상도 발현되지 않는 건강한 성인의 혈청을 사용하였으며 혈청은 -80°C에 보관하였다.

Table 1. 대두 민감성 환자 혈청 정보

Patient No.	Sex	Age (Years)	Total IgE (kU <sub>A</sub> /L)	Soybean specific IgE (kU <sub>A</sub> /L)
1	F	2	1376	49.2
2	M	2	5001	60.9
3	M	2	5001	54.1
4	F	1	765	39.7

#### 다. 대두 단백질 추출 및 정량

열처리하지 않은 대두를 시료 곱게 분쇄하고 시료 내 존재하는 지방성분을 제거하기 위하여 5배량의 n-Hexan을 넣고 실온에서 1시간 동안 교반시키는 과정을 두 번 반복하였다. 이렇게 하여 얻은 분말은 30 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 M NaCl과 함께 1:10 (w/v) 비율로 섞은 후 실온에서 micro tube mixer MT-360 (Tomy Seiko Co., Ltd., Japan)를 이용하여 3시간 동안 추출하여 단백질성분을 용출시켰다. 이 용액을 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후, 상정액을 사용 전까지 -20°C에서 보관하여 사용하였다. 추출된 단백질은 Bradford method에 근거한 Bio-Rad의 Protein Assay로 정량하였고, 표준물질로 BSA (bovine serum albumin)을 사용하였다.

#### 라. 대두 단백질의 SDS-PAGE

품종별 대두 알레르겐 함량의 변화를 추정하기 위하여 Laemmli의 방법<sup>22,23)</sup>에 준하여

SDS-PAGE를 실시하였다. Gel은 12% separating gel과 5% stacking gel을 이용하였고, 시료는 3배 농도의 sample buffer (1 M Tris-HCl: pH 6.8, 50% glycerol, 10% SDS, 2-mercaptoethanol, 1% bromphenol blue)와 2:1 (w/v)로 섞은 후 끓는 물에서 5분간 가열한 뒤 lane 당 3 µg/ml 분리하였다. 전기 영동은 100 volt에서 90분 시행하였으며 전기영동 후, gel은 Coomassie staining solution (1.0 g Coomassie Blue R-250, 450 ml methanol, 450 ml H<sub>2</sub>O, 100 ml glacial acetic acid, 800 ml H<sub>2</sub>O)로 20분간 염색하고 Coomassie destaining solution (100 ml methanol, 100 ml glacial acetic acid, 800 ml H<sub>2</sub>O)로 적절히 탈색 후 구성단백질의 분포를 비교분석 하였다.

#### 마. 대두 민감성 환자 혈청을 이용한 immunoblotting

Immunoblotting은 Son 등의 방법<sup>24)</sup>에 준하여 실시하였다. SDS-PAGE 후 분리된 단백질은 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (Bio-Rad, USA)에 transfer buffer (tris base 11.5 g, Glycine 58 g, 10% SDS 20 ml, Methanol 400 ml, 1500 ml H<sub>2</sub>O)를 사용하여 100 volt에서 60분 electrotransfer 하고 비특이적 결합을 방지하기 위해 5% skim milk가 포함된 TBST (tris buffered saline, pH 7.5 containing 0.05%(v/v) tween 20) 용액으로 4°C에서 하룻밤 blocking 하였다. TBST 용액으로 3회 세척 후, 환자 혈청은 2.5% skim milk가 포함된 TBST로 1:100으로 희석하여 실온에서 2시간 반응시키고 TBST 용액으로 3회 세척 후, 1:1000으로 희석시킨 peroxidase-conjugated anti human IgE와 실온에서 1시간 반응시켰다. TBST 용액으로 3회 세척 후, ECL(enhanced chemiluminescence, Amersham Pharmacia Biotech, Buck-inghamshire, UK)를 이용하여 X-ray 필름(Eastman Kodak, Rochester, N.Y., USA)에 감광시켜 발색 반응을 관찰하였다.

#### 바. MALDI-TOF MS 분석

대두 알레르겐의 N-terminal amino acid sequence를 확인하기 위해 경상대학교 공동실험실습관에 의뢰하여 분석하였다.

대두 단백질을 포함한 SDS-PAGE의 gel 조각은 단백질 가수분해 효소인 trypsin 0.015 µg/ml이 포함된 50 mM ammonium bicarbonate 용액에서 37°C에서 12시간 in-gel digest 과정을 거치고, Zip-tip을 이용하여 여과된 시료를 준비하였다. MALDI-TOF (Voyager DE-STR)를 이용하여 peptide mass fingerprinting (PMF)과 MS/MS ion search 방식의 분석을 통해 얻은 아미노산 서열 분석 자료를 NCBI non-redundant database의 Mascot (Matrix Science) software



를 이용하여 대두 알레르겐과 일치하는 단백질의 종류를 확인하였다.

#### 사. 증숙 및 자숙조건 설정

7가지 대두 품종의 열처리 방법에 따른 항원성의 변화를 확인하기 위해 증숙 공정은 Autoclave, 121°C에서 10, 20, 30, 40, 50, 60분 실행하였으며, 자숙 공정은 상온에서 삶는 방법 즉, 끓는 물에서 1, 2, 3, 4, 5, 6시간 증탕 가열 처리하였다.

#### 아. 증숙, 자숙 처리한 대두 단백질 추출 및 정량

증숙, 자숙 처리한 대두를 곱게 분쇄하고 시료 내 존재하는 지방성분을 제거하기 위하여 5배량의 n-Hexan을 넣고 실온에서 1시간 동안 교반시키는 과정을 두 번 반복하였다. 이렇게 하여 얻은 분말은 30 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 M NaCl과 함께 1:10 (w/v) 비율로 섞은 후 실온에서 micro tube mixer MT-360 (Tomy Seiko Co., Ltd., Japan)를 이용하여 3시간 동안 추출하여 단백질성분을 용출시켰다. 이 용액을 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후, 상정액을 사용 전까지 -20°C에서 보관하여 사용하였다. 추출된 단백질은 Bradford method에 근거한 Bio-Rad의 Protein Assay로 정량하였고, 표준물질로 BSA (bovine serum albumin)을 사용하였다.

#### 자. 증숙, 자숙 처리한 대두의 SDS-PAGE

열처리 방법에 따른 품종별 콩 알레르겐 함량의 변화를 추정하기 위하여 Laemmli<sup>10,11)</sup>의 방법에 준하여 SDS-PAGE를 실시하였다. Gel은 12% separating gel과 5% stacking gel을 이용하였고, 시료는 3배 농도의 sample buffer (1 M Tris-HCl: pH 6.8, 50% glycerol, 10% SDS, 2-mercaptoethanol, 1% bromphenol blue)와 2:1 (w/v)로 섞은 후 끓는 물에서 5분간 가열한 뒤 lane 당 3 µg/ml 분리하였다. 전기 영동은 100 volt에서 90분 시행하였으며 전기영동 후, gel은 Coomassie staining solution (1.0 g Coomassie Blue R-250, 450 ml methanol, 450 ml H<sub>2</sub>O, 100 ml glacial acetic acid, 800 ml H<sub>2</sub>O)로 20분간 염색하고 Coomassie destaining solution (100 ml methanol, 100 ml glacial acetic acid, 800 ml H<sub>2</sub>O)로 적절히 탈색 후 구성단백질의 분포를 분석하였다.

#### 차. ELISA

ELISA는 Engvall 등의 방법<sup>13)</sup>에 준하여 실시하였다. 품종별로 열처리하지 않은 생대두, 증숙 처리한 대두, 자숙 처리한 대두의 추출물을 항원으로 사용하였고, 각각의 추출물을 96-well plate (NUNC, Denmark)에 최종 농도가 10 µg/ml이 되도록 PBS (20 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4)로 희석하여 각 100 µl씩 분주하고 4°C에서 하룻밤 coating하였다. 다음날 PBST (phosphate buffered saline containing 0.05% (v/v) tween 20)로 3회 세척하였으며, 비특이적 결합을 방지하기 위해 blocking buffer (10% fetal bovine serum-phosphate buffered saline)을 이용하여 1시간 blocking 한 후 다시 PBST로 3회 세척하였다. 여기에 PBS를 이용해 1:100으로 희석한 혈청을 100 µl씩 가하고 37°C에 2시간 반응시켰다. PBST로 3회 세척한 후, 1000배로 희석시킨 peroxidase-conjugated anti-human IgE도 37°C에 2시간 반응시켰다. PBST로 4회 세척한 후, TMB substrate solution (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, citrate-phosphate buffer 10 ml, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>2µl)를 첨가하여 각 well에 100 µl 씩 넣고 10분간 발색시켰다. 1 M phosphoric acid를 첨가하여 발색을 정지시킨 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3. 장류용 대두의 항원성 조사

#### 가. 대두 단백질 함량

열처리하지 않은 생대두의 품종별 단백질 농도를 측정된 결과, Table 2에 나타난 바와 같이 대원과 CN304-13 품종이 각각 3.145 mg/ml, 3.231 mg/ml로 다른 품종에 비해 높은 단백질 함량을 보였다. 또한, 품종별로 단백질 농도 차이를 확인할 수 있었다.

Table 2. 품종별 대두 단백질의 함량

	(%)						
품종	대풍	대원	태광	개척2호	CN628-15(1)	S-09	CN304-13
단백질	37.4	49.8	36.1	37.5	38.1	39.5	38.3

나. SDS-PAGE

생대두의 품종별 단백질 구성을 알아보기 위하여 추출한 단백질을 사용하여 SDS-PAGE 실시한 후, Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하여 분리된 단백질의 양상을 비교, 관찰하였다. 그 결과, 9, 12-15, 19-21, 25, 30-35, 47, 52, 70-76 kDa에 걸쳐 다양한 분자량의 단백질 밴드들이 gel에서 골고루 분포하였다. 또한 이들 중에서 LTP (9 kDa), kunits inhibitor (21 kDa), Gly m Bd 30K (34 kDa),  $\beta$ -conglcinin ( $\beta$ -subunit: 52 kDa,  $\alpha$ -subunit: 72 kDa,  $\alpha'$ -subunit: 76 kDa) 등 콩의 주요 알레르겐으로 알려져 있는 단백질로 추정되는 밴드들도 뚜렷하게 관찰되었다.

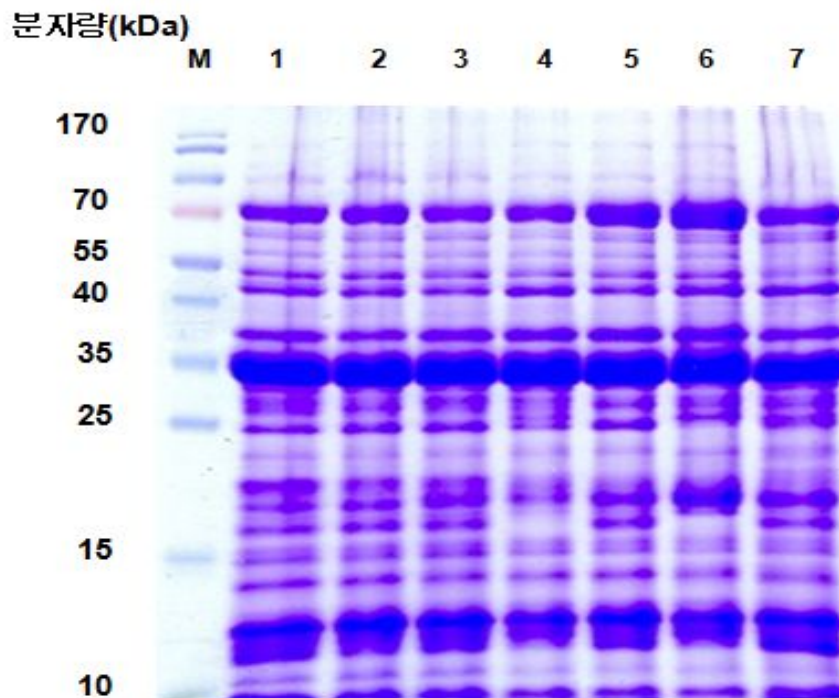


Fig. 2. 품종별 대두 단백질의 SDS-PAGE 전기영동

(M: Molecular weight marker, Lane 1: 대풍, 2: 대원, 3: 태광, 4: 개척2호, 5: CN628-15(1), 6: S-09, 7: CN304-13)

다. 대두 민감성 환자 혈청을 이용한 immunoblotting

열처리하지 않은 생대두와 대두 민감성 환자 혈청과의 immunoblotting 결과, 혈청 IgE와 반응하는 단백질 밴드의 분포는 환아마다 10 kDa에서 100 kDa에 걸쳐 다양하게 나타났다.(Fig. 3) 특히 대두의 주요 항원으로 알려진 21 kDa에서 양성을 나타낸 환자가 3명, 34 kDa에서 3명, 43 kDa에서 4명, 52 kDa에서 2명, 72 kDa에서 양성을 나타낸 환자도 2명이었다. 또한, 혈청 내 IgE와 결합하는 단백질은 환자에 따라 약간 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

지금까지 알려진 대두 유래의 알레르기 원인 단백질은 21개 이상이며, 가장 면역학적으로 우세한 주 항원은 Gly m Bd 30K 또는 P34로 알려져 있는 단백질로써 이 알레르겐은 분자량이 34 kDa 정도이며, 대두 알레르기 환자의 65% 정도가 immunoblot 분석에서 양성을 나타낸다<sup>25,26</sup>. 성인 알레르기 환자를 대상으로 했던 국내 연구에서도 대두에 감작을 보인 환자의 50%에서 34 kDa 위치에서 IgE 양성 반응이 나타났으며<sup>27</sup> 본 연구에서도 4명 중 3명의 환자혈청에 34 kDa 부근에서 양성을 보여서 본 연구와 일치되는 소견을 관찰할 수 있었다.

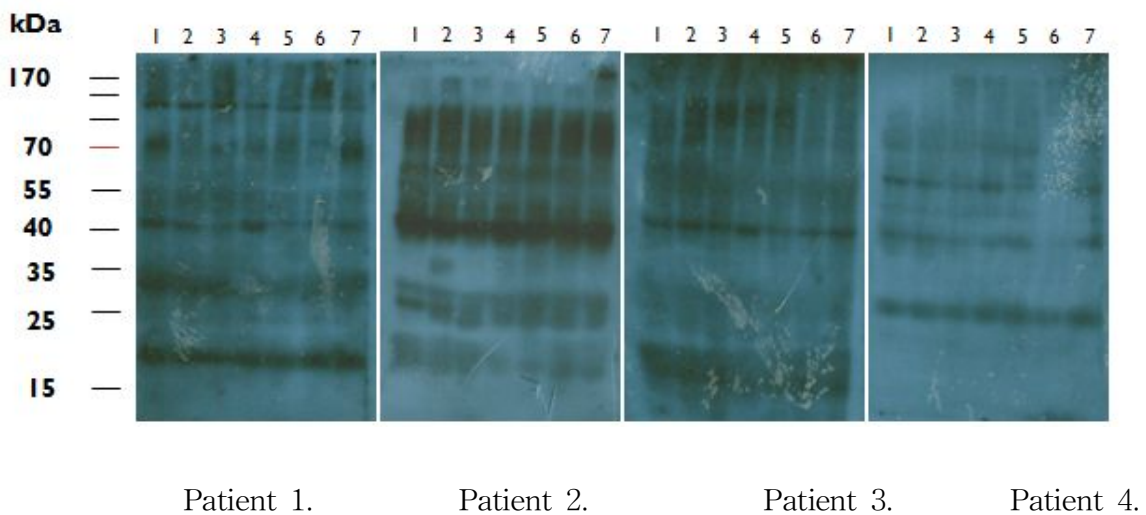
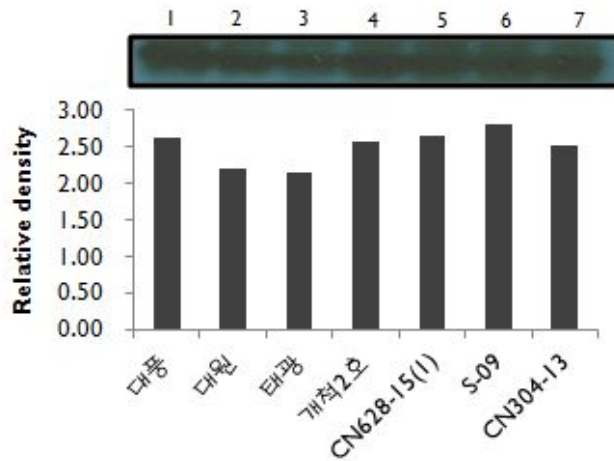


Fig. 3. 환자 혈청(1 ~ 4)을 이용한 품종별 대두 추출물과의 immunoblotting  
(Lane 1: 대풍, 2: 대원, 3: 태광, 4: 개척2호, 5: CN628-15(1), 6: S-09, 7: CN304-13)

라. Densitometer를 이용한 IgE 결합능의 정량화

7가지 품종별 대두와의 IgE 결합능을 확인하기 위해, Image j 프로그램을 이용하여 그래프로 나타낸 결과, 약 43 kDa 밴드의 반응성을 나타낸 Fig. 4(A)에서는 7가지 대두 품종 모두 유사한 반응성을 나타냈다. 70 kDa 부근 단백질 밴드의 반응성을 나타낸 Fig. 4(B)에서는, CN304-13 품종이 다른 품종과 비교했을 때, 강한 반응성을 보임을 확인할 수 있었고, S-09와 개척2호 품종의 경우 반응성이 상대적으로 높은 것을 알 수 있었다.

(A)



(B)

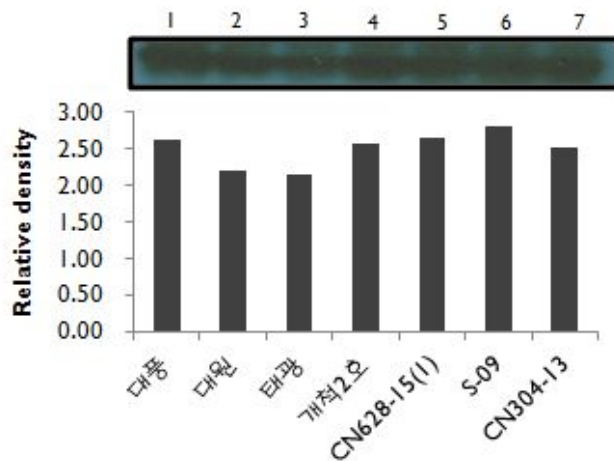


Fig. 4. 34, 70 kDa 부근에서 반응한 품종별 대두와 IgE 결합능의 비교

마. 대두 알레르겐의 N-terminal amino acid sequence

Immunoblotting 결과를 바탕으로 환자 혈청과 반응성이 컸던 단백질 밴드의 N-terminal 아미노산 시퀀스를 확인하기 위해서 MALDI-TOF를 실시한 결과, Fig. 5과 같이 (A)는 대두의 주요 알레르겐으로 알려진 약 70 kDa의  $\beta$ -conglycinin의  $\alpha$ -subunit으로 나타났고, (B)는 43 kDa의 glycinin으로 확인되었다.

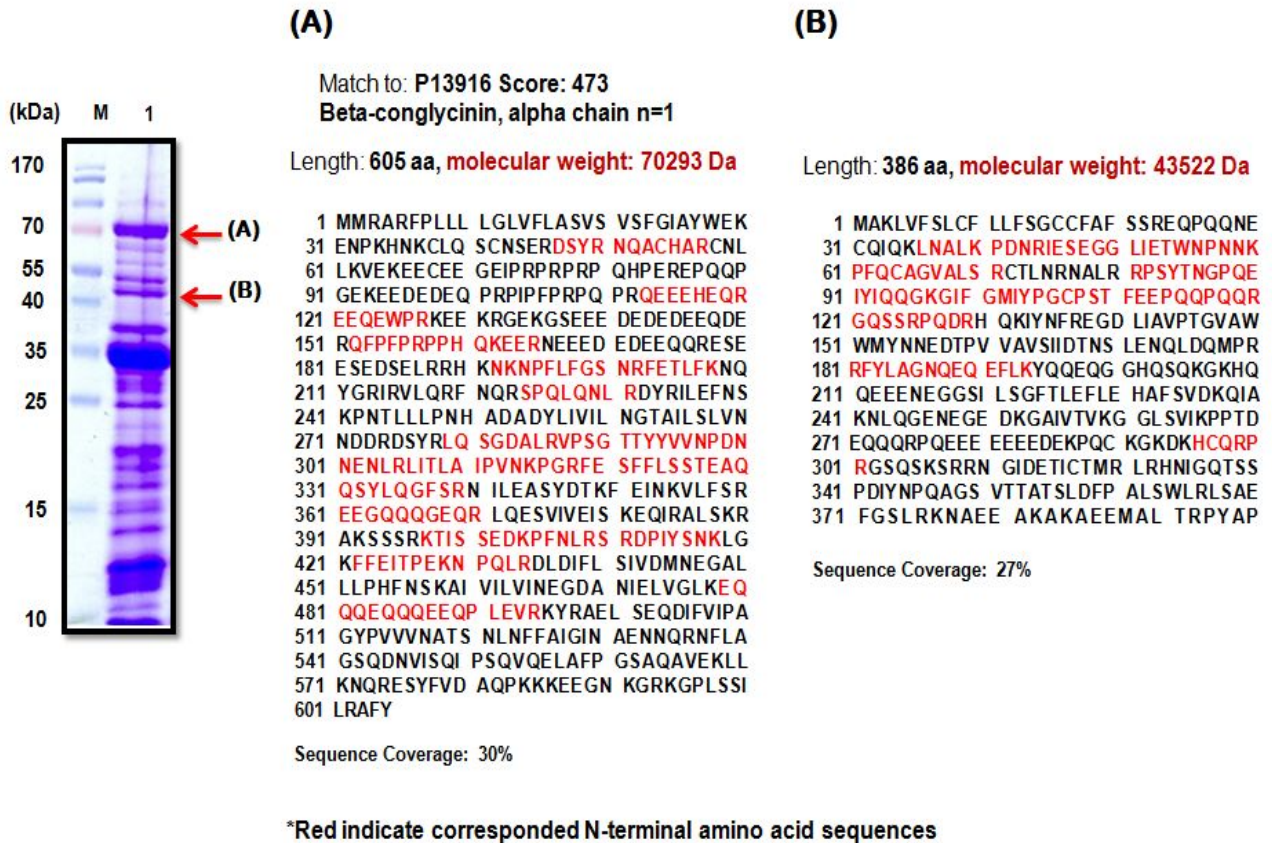


Fig. 5. 대두 단백질 추출물의 N-terminal amino acid sequence

## 바. 결론

국내에서 소비되는 7품종의 대두과 대두 알레르기 환자 혈청을 이용하여 항원성을 조사하였다. 열처리하지 않은 품종별 대두 단백질의 SDS-PAGE 결과, 9-100 kDa에 걸쳐 다양한 분자량의 단백질 밴드들이 나타났고, 그 중에서 대두의 주요 알레르겐으로 알려진 밴드도 확인되었다. immunoblotting의 결과, 주요 대두 알레르겐에 대한 양성 환자는 21 kDa 3명, 34 kDa 3명, 43 kDa 4명, 52 kDa 2명, 72 kDa 2명이었다. 7가지 품종별 대두와의 IgE 결합능을 확인한 결과, 품종별로 차이를 나타냈다. 43, 70 kDa의 N-terminal 아미노산 시퀀스를 확인하기 위해서 MALDI-TOF를 실시한 결과, 대두 주요 알레르겐인  $\beta$ -conglycinin의  $\alpha$ -subunit와 glycinin으로 확인되었다. 이러한 결과를 바탕으로 대두 품종에 따라 포함된 단백질의 알레르기성 차이가 있음을 알 수 있었으며, 대두를 원료로 하는 장류용 제품을 제조할 때 대두 품종의 선택이 알레르기 반응으로 인한 문제를 줄일 수 있을 것으로 사료된다.



#### 4. 대두 민감성 환자 혈청을 이용한 증숙 및 자숙조건에 따른 항원성 변화

알레르기는 항원성 단백질(allergen)과의 반복되는 접촉으로 발생하는 신체 과민반응(hypersensitivity)으로, 다음과 같은 세 단계를 거쳐 진행된다. 우선, allergen과의 처음 접촉에서 allergen을 인식하는 면역물질(antibody)이 체내에서 생성되고, 이 면역물질이 알레르기에 관여하는 세포에 부착되어, 이후 allergen과의 반복 접촉에서 면역물질과 allergen이 결합함으로써 알레르기 반응에 관여하는 비만 세포 과립 속의 화학물질인 히스타민이 세포 밖으로 분비되어 조직에서 여러 가지 알레르기 증상을 일으킨다<sup>1)</sup>. 산업화에 따른 알레르기 발병 증가는 세계적인 추세로서, 알레르기 환자의 대다수가 식품에도 알레르기 반응을 일으키는 것으로 보고되고 있다<sup>2,3)</sup>.

특히 식품 알레르기는 지난 20년간 전 세계적으로 중요한 건강관련 문제 중의 하나로 대두되고 있으며 삶의 질에 있어서도 심각한 부정적 효과를 낳고 있는 실정이다<sup>4)</sup>. 또한, 나라마다 그 빈도나 유발하는 원인식품들에 차이가 있는데 이는 그 나라의 유전적 특성, 문화, 식습관 및 조리법 그리고 생후 초기에 노출되는 알레르기 유발 식품의 종류와 깊은 연관이 있는 것으로 알려져 있다<sup>5)</sup>.

대두 알레르기의 증상은 땅콩 알레르기처럼 생명에 위협을 주는 반응을 일으키는 경우는 흔하지 않으나<sup>6)</sup>, 심한 음식물 알레르기 반응으로 인해 중환자실에서 치료가 필요했던 총 61건 중 원인 음식물로 땅콩 20건, 콩 16건이었다는 보고가 있다<sup>7)</sup>. 식품 알레르기를 일으키는 항원성 물질의 함량은 식품 소재의 수확, 건조와 조리법에 의해 달라질 수 있다. 식품 알레르기는 원인 식품을 철저히 회피하는 것이 알레르기 증상을 유발하지 않는 유일하고 가장 효과적인 방법으로 알려져 있지만, 이러한 항원성 식품성분이 hidden allergen으로 포함되기도 하며 완전한 회피가 힘들기 때문에 대두에 대한 저 알레르기 제품화 기술 개발이 다양하게 시도되고 있다. 여기에는 주요 알레르겐에 대한 열처리, 효소처리, 발효가공, 탄수화물 결합, 품종 개량, 유전자 재조합 등이 포함된다<sup>8)</sup>. 그 중에서도 가열 처리에 따른 식품의 알레르기성 변화에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는데 참치나 연어의 경우에는 가열 처리 후에 알레르기성을 상실하고, 계란의 경우에는 열처리 후에도 알레르기성이 계속 존재하는 것으로 알려져 있다<sup>9)</sup>. 열처리 과정은 식품 단백질의 항원성을 변형시킴으로써, 저 알레르기 식품 제조하는 방법으로 이용되고 있는데 실제, 같은 식품 소재일지라도 조리법에 따라 환자의 임상증상이 달라지는 점으로 미루어, 열처리 방법에 따른 알레르기 유발 항원성 단백질의 변화에 관한 연구는 저알레르기성 식품 개발을 위한 유효한 정보를 제공해줄 수 있을 것이라고 생각된다.

이에 본 연구에서는 대두를 스팀으로 익히는 증숙 과정과 삶아서 익히는 자숙 과정으로 구분해서 처리한 후 대두 단백질을 분리하여 대두에 대해 민감하게 알레르기 반응을 일으키는 환

자들의 혈청을 이용하여 열처리 방법에 따른 품종별 대두의 항원성 변화를 조사하였다.

가. 증숙 조건에 따른 대두 단백질 농도 변화

불린 대두를 스팀으로 익히는 과정 즉 증숙 시간에 따른 품종별 대두 단백질 함량을 측정한 결과, Fig 6에 나타난 바와 같이 단백질 농도 차이를 확인할 수 있었다. 증숙 처리 10분 경과 시 평균 3 mg/ml 가량의 농도를 보이던 대두 단백질은 1 mg/ml 정도로 약 67% 이상이 감소하였으며 이후 열처리 시간이 경과하여도 큰 변화를 보이지 않았다. 대원콩은 열처리 10분 쯤에 약 1.70 mg/ml 정도로 감소 정도가 미비하였으며 다른 품종과 비교했을 때 1.5 ~ 2배 가량 단백질 함량이 높았다. Son 등<sup>1)</sup>의 열처리에 따른 대두 단백질의 항원성 변화에 관한 연구에서 열처리에 따라 단백질의 미세한 농도 차이를 확인할 수 있었다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 나타냈다.

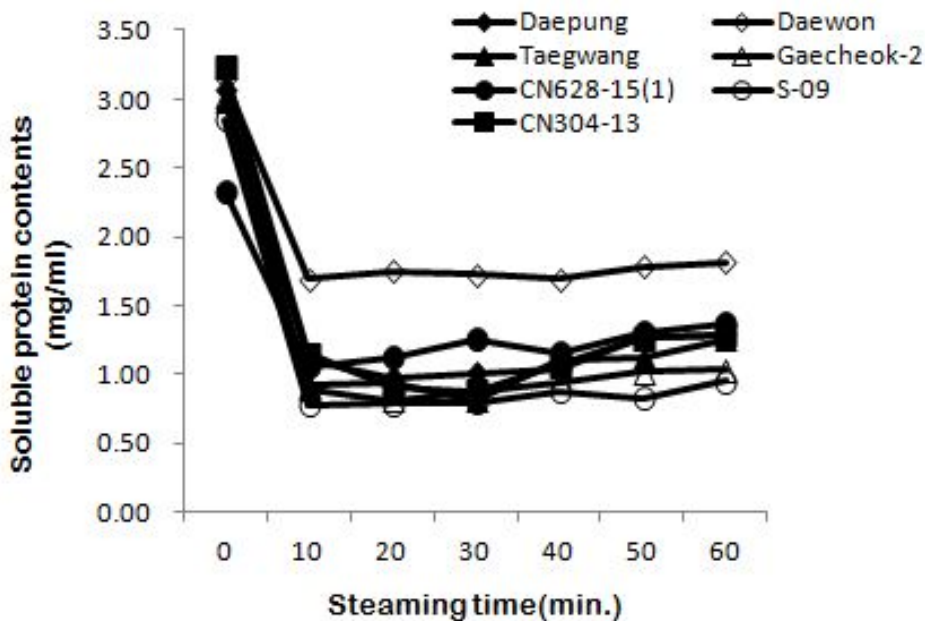


Fig. 6. 증숙 처리 시간에 따른 대두 품종별 단백질의 함량 변화

(0: 열처리하지 않은 대두, 10 ~ 60: 121 °C, 10분 ~ 60분 증숙 처리한 대두 단백질)

나. 자숙 조건에 따른 대두 단백질 농도 변화

자숙 시간에 따른 품종별 대두 단백질 함량을 측정한 결과, Fig 7에 나타난 바와 같이 단백질 농도 차이를 확인할 수 있었다. 자숙 처리 전 평균 3.1 mg/ml 가량의 농도를 보이던 대두 단백질이 자숙 1시간 후 0.7 ~ 1.4 mg/ml 로 약 60% 이상이 감소하였으며 이후 열처리 시간이 경과하여도 큰 변화를 보이지 않았다. 대원콩은 열처리 1시간째에 약 1.90 mg/ml 정도로 증속 시와 마찬가지로 그 감소정도가 미비하였으며 다른 품종보다 약 2배나 높은 단백질 함량을 나타냈다. 또한, 개척 2호와 태광 품종의 경우는 자숙 시간에 따른 단백질 농도가 다른 품종에 비해 큰 차이를 보임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 열처리에 의해 단백질이 변성되어 불용성으로 변함으로써 나타나는 결과라 추측된다.

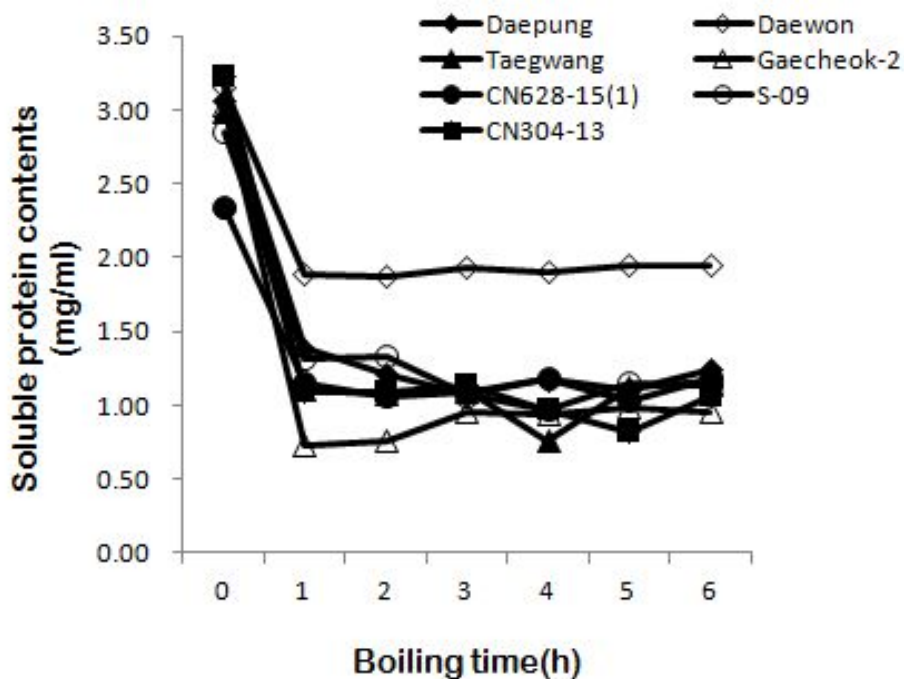


Fig. 7. 자숙 처리 시간에 따른 대두 품종별 단백질의 함량 변화  
(0: 열처리하지 않은 대두, 1 ~ 6: 100°C, 1 ~ 6시간 자숙 처리한 대두)

다. 증숙 조건에 따른 대두 단백질의 변화

증숙 처리한 대두의 품종별 단백질 구성을 알아보기 위하여 추출한 단백질을 사용하여 SDS-PAGE 실시한 후, Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하여 분리된 단백질밴드의 양상을 비교, 관찰하였다. 그 결과, 전체적으로 121℃, 30분 이상 증숙 처리 하면 단백질이 분해되어 70 kDa 이하의 밴드만 관찰되었으나, 121℃, 10분과 20분 처리한 구에서는 19-21, 25, 34, 52-55, 67 kDa에서 비교적 뚜렷한 단백질 밴드를 확인할 수 있었다. 증숙 시간이 길어짐에 따라 단백질 밴드의 강도가 약해지는 것을 알 수 있었고, 품종별 단백질 성분의 특별한 차이는 관찰되지 않았으나, 증숙 처리 시간이 길어지면 열변성에 의해 단백질 성분이 불용성으로 바뀌거나 분해되어 단백질량이 감소되는 듯하다. 증숙 처리시간은 121℃, 30분이면 충분한 조건으로 판단된다.

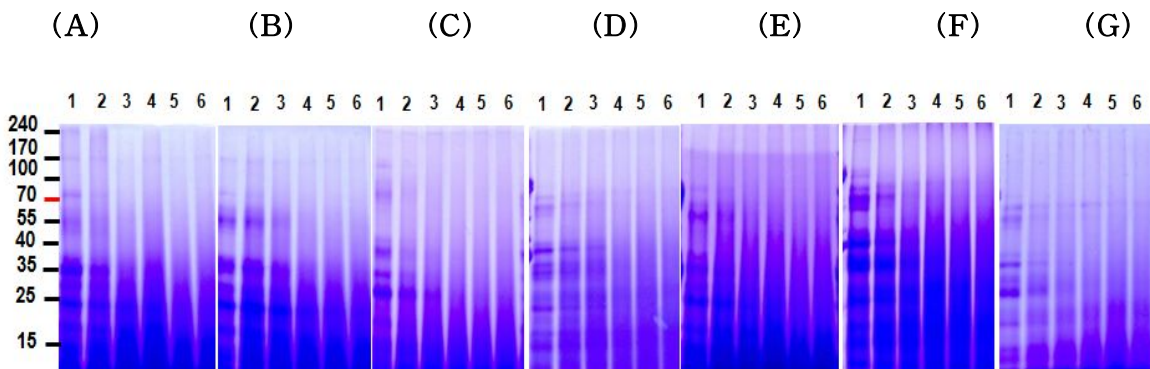


Fig. 8. 증숙 시간에 따른 품종별 대두 단백질의 SDS-PAGE 패턴(A: 대풍, B: 대원, C: 태광, D: 개척2호, E: CN628-15(1), 6: S-09, 7: CN304-13, Lane 1 ~ 6: 121℃, 10분 ~ 60분 증숙 처리한 대두)

라. 자숙 조건에 따른 대두 단백질 구성의 변화

자숙 처리한 대두의 품종별 단백질 구성을 알아보기 위하여 추출한 단백질을 사용하여 SDS-PAGE 실시한 후, Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하여 분리된 단백질의 양상을 비교 관찰하였다. 그 결과, 100℃, 6시간 자숙 처리 이후에도 대략 12-15, 21-25, 34-36, 52, 70-72 kDa 부근의 단백질 성분은 분해되지 않고 남아있는 것을 확인할 수 있었다. 증숙 처리와 비교했을 때, 대두 알레르겐의 분해정도에 있어서 물과 함께 가열하는 자숙 처리보다는 수증기를 이용한 증숙 처리가 열전달 정도나 속도가 빨라 가열시간이 단축되고 영양성분이 폐액으로의 용출이 적어 더욱 효율적인 방법이라고 사료된다. 자숙처리 시간은 6시간 이상이 적당한 것으로 판단된다.

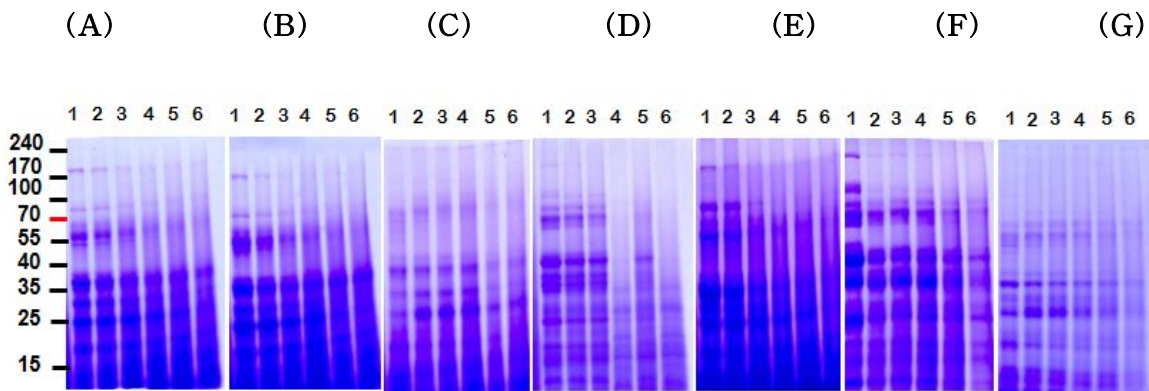


Fig. 9. 자숙 시간에 따른 품종별 대두 단백질의 SDS-PAGE 패턴(A: 대풍, B: 대원, C: 태광, D: 개척2호, E: CN628-15(1), 6: S-09, 7: CN304-13, Lane 1 ~ 6: 100℃, 1시간 ~ 6시간 자숙 처리한 대두)

마. 증숙 처리한 대두 단백질과 환자 혈청과의 immunoblotting

품종별 대두에 존재하는 알레르기 유발성분을 확인하고 각각의 알레르겐을 비교하기 위해서 SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질을 PVDF membrane에 전사시키고, 대두에 민감성을 가지는 환자의 혈청을 반응시킨 후 대두 특이 IgE에 특이적으로 결합하는 2차 항체에 결합되어 있는 효소에 기질을 작용하여 발색시켜 항원성을 확인하였다. 그 결과, SDS-PAGE 후 Coomassie로 염색한 gel에서 진하게 나타났던 대략 21 kDa의 대두 단백질은 환자 혈청에 의해 인식되지 않았으며, 태광 품종에서는 24-25, 34, 67-70 kDa에서 비교적 강한 반응을 보였고, 개척 2호에서는 34, 70 kDa, S-09에서는 34, 52, 70 kDa에서 반응성을 보임을 확인할 수 있었다.

Yamanishi 등<sup>14)</sup>은 발효 과정 중 전처리로 증자 또는 멸균 증자와 같은 단계를 거치는 것이 대두 알레르겐의 가수분해를 향상시킬 수 있다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다.

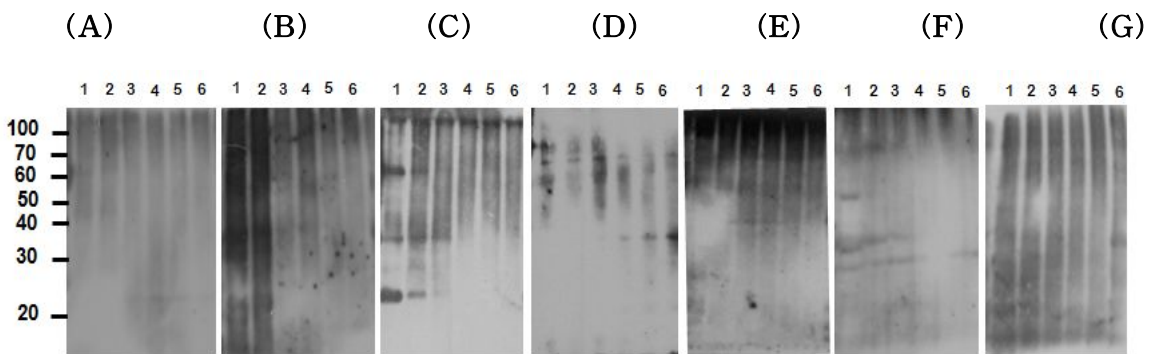


Fig. 10. 환자 혈청을 이용한 증숙 시간에 따른 품종별 대두 단백질의 immunoblot.(A: 대풍, B: 대원, C: 태광, D: 개척2호, E: CN628-15(1), 6: S-09, 7: CN304-13, Lane 1 ~ 6: 121°C, 10분 ~ 60분 증숙 처리한 대두 단백질)

바. 자숙 처리한 대두 단백질과 환자 혈청과의 immunoblotting

품종별 대두에 존재하는 알레르기 유발성분을 확인하고 각각의 알레르겐을 비교하기 위해서 SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질을 PVDF membrane에 전사시키고, 대두에 민감성을 가진 환자의 혈청과 반응시킨 후 대두 특이 IgE와 특이적으로 결합하는 2차 항체에 결합되어 있는 효소에 기질을 작용하여 발색시켜 단백질 성분을 확인하였다. 그 결과, 10 kDa에서 100 kDa에 걸쳐 다양한 단백질 밴드를 확인할 수 있었는데 대풍 품종에서는 43, 62 kDa에서 희미한 반응을 보였고, 대원 품종은 34 kDa, 태광은 21, 34, 52, 60 kDa에서 비교적 강한 반응성을 나타냈다. 개척 2호는 34, 43, 70 kDa, CN628-15(1)에서는 9, 43, 52, 70kD, S-09에서는 34, 70kDa, CN304-13은 43 kDa에서 반응성을 보임을 확인할 수 있었다. Maleki 등<sup>15)</sup>의 연구에서 땅콩, 새우, 우유, 어류와 같은 알레르기를 일으키는 많은 음식들이 열에 저항력을 갖고 있는 것으로 보고되어 있으며, 단백질의 종류 및 열처리 방법에 따른 차이가 있으므로 적합한 열처리 조건을 검색하여 적용시킬 필요가 있을 것으로 사료된다.

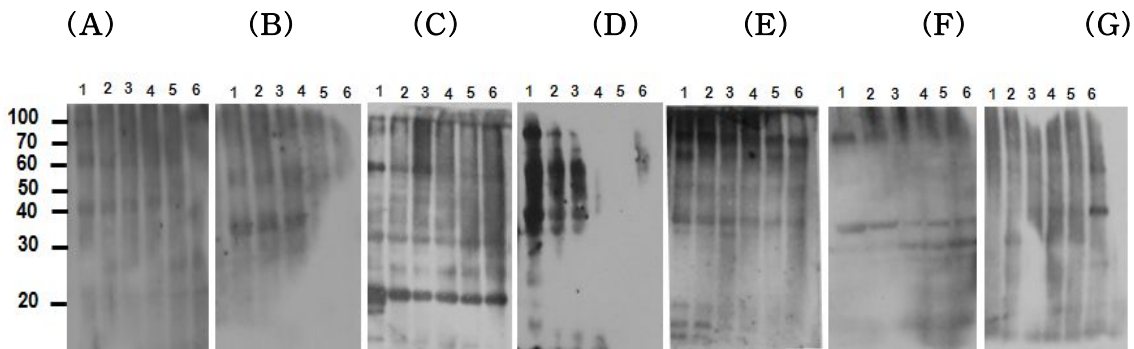


Fig. 11. 환자 혈청을 이용한 자숙 시간에 따른 품종별 대두 단백질 추출물의 immunoblot. (A: 대풍, B: 대원, C: 태광, D: 개척2호, E: CN628-15(1), 6: S-09, 7: CN304-13, Lane 1 ~ 6: 10 0°C, 1시간 ~ 6시간 자숙 처리한 대두 단백질)

## 사. 증숙 처리 대두와 IgE 결합능의 정량화

각 대두 품종에 상관없이 공통적으로 항원성을 나타낸 대표적 단백질인 43, 70 kDa의 두 단백질 밴드의 강도를 Densitometer를 이용하여 측정한 후 그래프로 나타낸 결과 (Fig. 13), 대부분의 대두 품종에서 증숙 처리 시간이 길어질수록 IgE 결합능이 감소하는 것으로 나타났다. 특히 증숙 처리(Fig. 12)한 경상대학교에서 개발한 CN62-15(1)과 S-09 품종은 43 kDa 부근의 단백질과의 43 kDa 부근의 단백질과의 IgE 반응성이 증숙 시간 경과에 따라 감소하여 121℃, 40분 이후에 반응성이 거의 없어지는 것을 확인할 수 있었고, 단백질도 S-09과 CN 628-15(1) 품종을 121℃ 증숙 가열 시, 40분 이후에 IgE 반응성이 거의 나타나지 않아 저알레르기성 장류개발용 품종으로 선택가능 할 것으로 예상된다.

약 70 kDa 단백질의 증숙 처리 시간에 따른 IgE 결합능을 측정한 결과를 Fig. 13에 나타냈다. 증숙 시간이 길어질수록 IgE 결합능이 약해지는 것을 Fig. 12처럼 확인할 수 있었다.

일반적으로 주요한 식품 알레르겐은 대부분 10 ~ 60 kDa의 범위에 있는 고분자량의 수용성 당단백질(glycoprotein)이며 알레르기 증상을 일으키기 위해서는 면역학적으로 활성화된 형태로 위장관에 도달하여야 한다. 그래서 알레르기를 유발하는 것으로 알려져 있는 대부분의 항원성 대두 단백질은 비교적 열처리나 산처리, proteolysis에 저항력을 갖고 있다고 알려져 있다<sup>16)</sup>. 본 연구에서 43 kDa인  $\beta$ -conglycinin의  $\beta$ -subunit과 70 kDa인  $\beta$ -conglycinin의  $\alpha'$ -subunit은 증숙 처리 시간에 따라 IgE 결합능이 감소하였지만 대부분의 품종에서 열처리만으로는 완전히 소실되지 않은 것으로 미루어 열 저항력을 가진 것으로 추측된다.



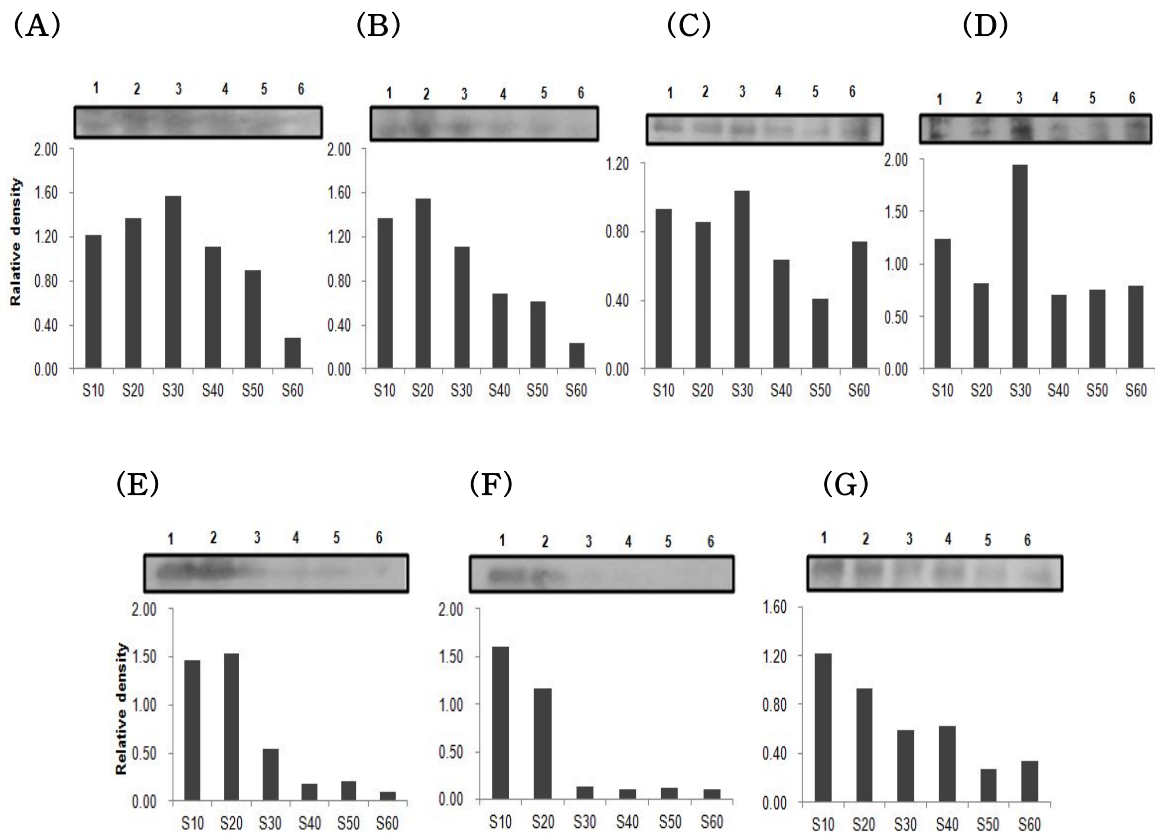


Fig. 12. 증숙 처리 대두의 43 kDa 단백질과 IgE 결합능의 비교

(A: 대풍, B: 대원, C: 태광, D: 개척2호, E: CN628-15(1), F: S-09, G: CN304-13, S10 ~ S60: 121°C, 10분 ~ 60분 증숙 처리한 대두 단백질)

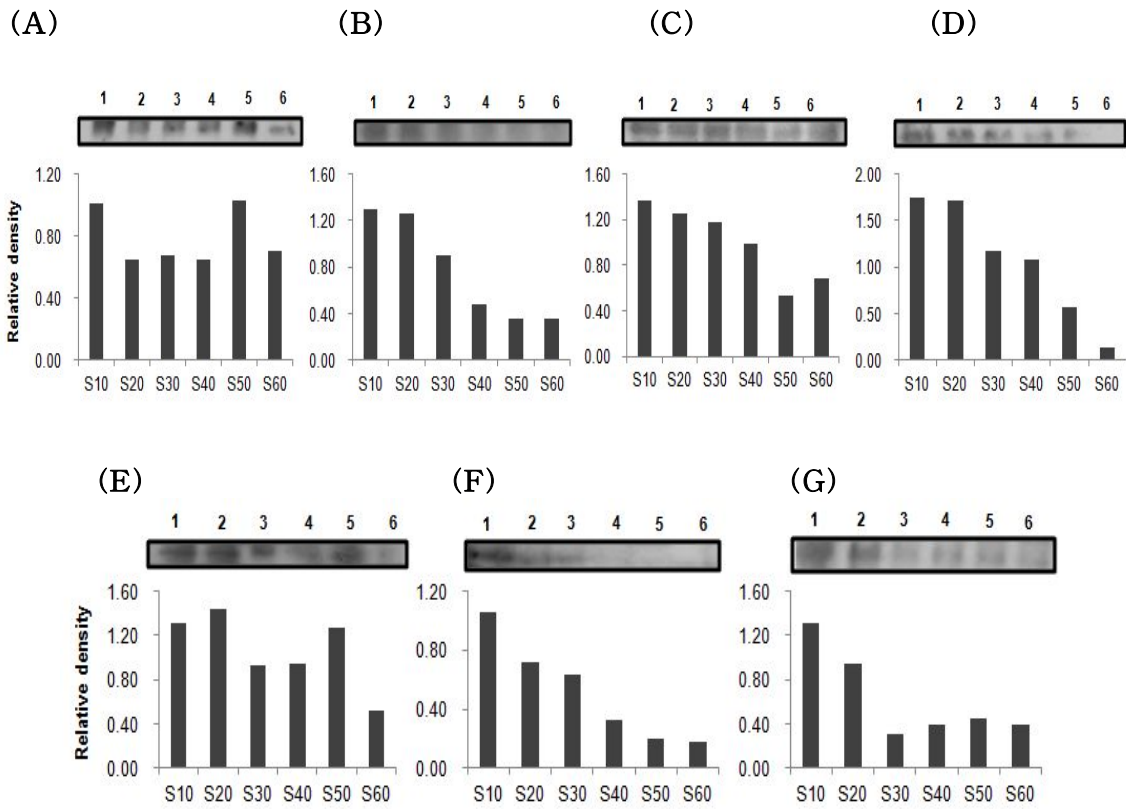


Fig. 13. 증숙 처리 대두의 70 kDa 단백질과 IgE 결합능의 비교

(A: 대풍, B: 대원, C: 태광, D: 개척2호, E: CN628-15(1), F: S-09, G: CN304-13, S10 ~ S60: 121°C, 10분 ~ 60분 증숙 처리한 대두 단백질)

아. 자숙 처리 대두와 IgE 결합능의 정량화

각 대두 품종에 상관없이 공통적으로 항원성을 보인 43, 70 kDa의 두 단백질 밴드의 강도를 densitometer를 이용하여 측정한 후 그래프로 나타낸 결과, 대부분의 대두 품종에서 자숙 처리 시간이 길어짐에 따라 IgE 결합능이 감소하는 것으로 나타났다. 하지만 증숙 처리한 대두와 비교했을 때, 자숙 시간에 따라 뚜렷한 감소를 나타내지는 않았고, Fig. 14의 (B), (C)와 Fig. 15의 (A), (F)와 같이 100°C, 4시간 이후에 IgE 반응성의 증가를 보이는 품종도 확인되었다.

정 등<sup>8)</sup>의 연구에서 단백질 가수분해가 일부 epitope를 파괴시킬 수 있지만 오히려 삼차원적인 구조에 묻혀있던 epitope를 노출시켜 IgE 결합을 가능하게 하여 알레르기 반응을 유도시키는 방향으로 갈 수도 있다고 보고하였는데, 본 연구의 결과도 이러한 이유로 IgE 반응성이 증가한 것으로 사료된다.

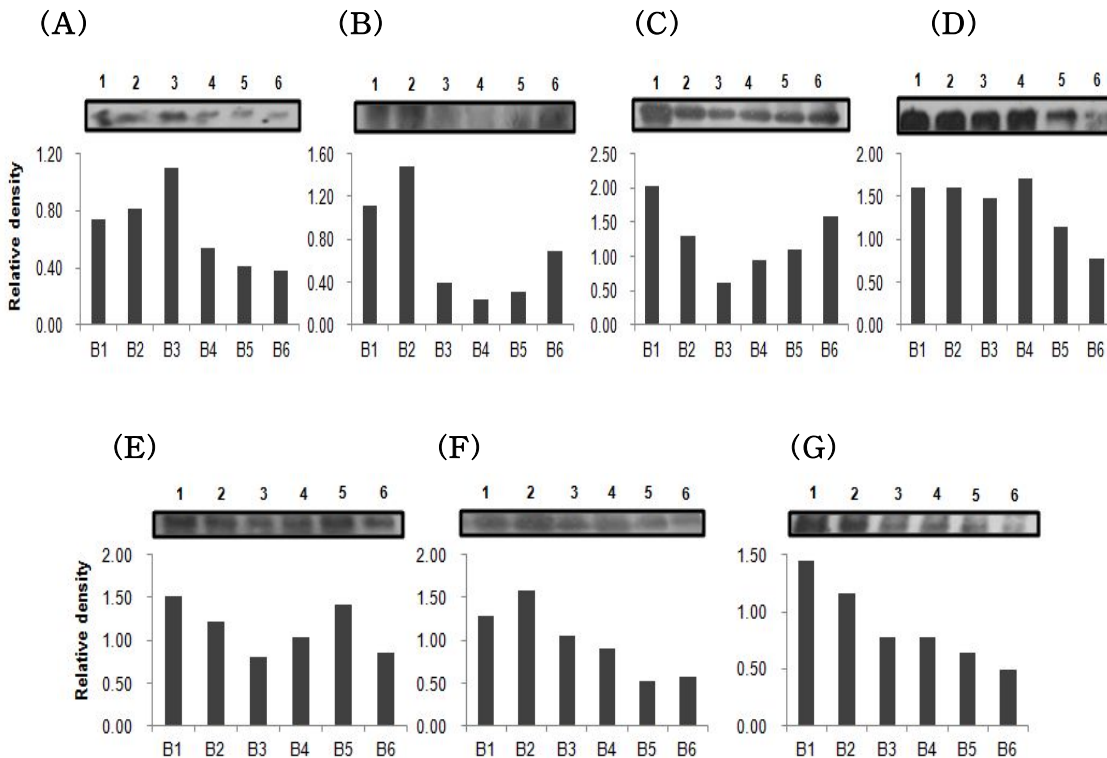


Fig. 14. 자숙 처리 대두의 43 kDa 단백질과 IgE 결합능의 비교

(A: 대풍, B: 대원, C: 태광, D: 개척2호, E: CN628-15(1), F: S-09, G: CN304-13, B1 ~ B6: 100°C, 1시간 ~ 6시간 자숙 처리한 대두 단백질)

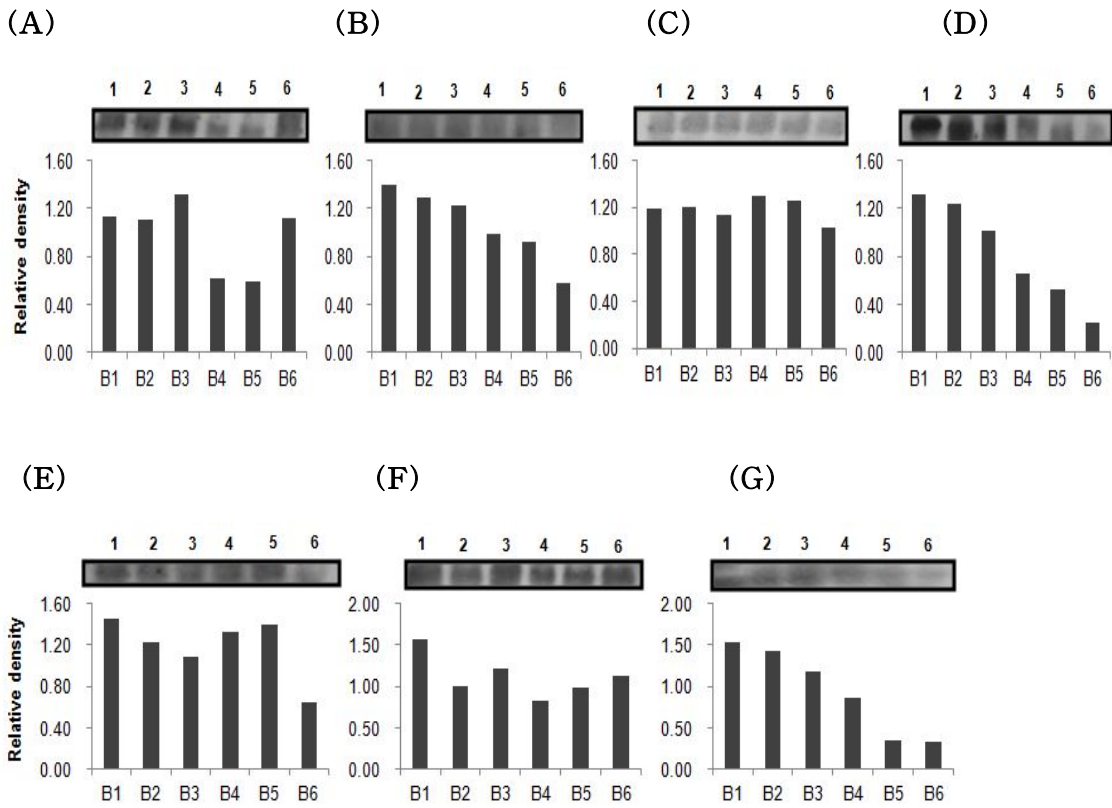


Fig. 15. 자숙 처리 대두의 70 kDa 단백질과 IgE 결합능의 비교

(A: 대풍, B: 대원, C: 태광, D: 개척2호, E: CN628-15(1), F: S-09, G: CN304-13, B1 ~ B6: 100°C, 1시간 ~ 6시간 자숙 처리한 대두 단백질)

자. ELISA를 이용한 증숙 처리 대두의 항원성 검사

품종별 대두의 증숙 처리에 따른 알레르기 환자의 특이 IgE 반응성을 측정, 비교하고자 대두에 대해 알레르기 반응을 일으키는 4명의 대두 알레르기 환자 혈청을 ELISA를 실시한 결과를 Fig. 16에 나타내었다. 열처리하지 않은 구와 비교했을 때 평균적으로 7가지 품종의 대두에서 증숙 시간이 증가함에 따라 대부분의 환자 혈청에서 특이 IgE 수치가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 대풍, S-09, CN304-13 품종이 다른 품종에 비해 낮은 IgE 수치를 나타냈으며 결론적으로, 증숙 처리가 대두 단백질의 항원성을 확실히 감소시키는 것으로 사료된다.

Burks<sup>17)</sup> 등은 대두에 대해 아토피성 피부염과 DBPCFD (Double-blind, placebo-controlled food challenge)에 양성인 아이들을 대상으로 연구한 결과, 어느 특정한 fraction이 주요 알레르겐이라고 결론내릴 수 없었지만 대두 단백질의 많은 fraction이 IgE나 IgG가 반응하는 것 같다고 발표한 바 있다.

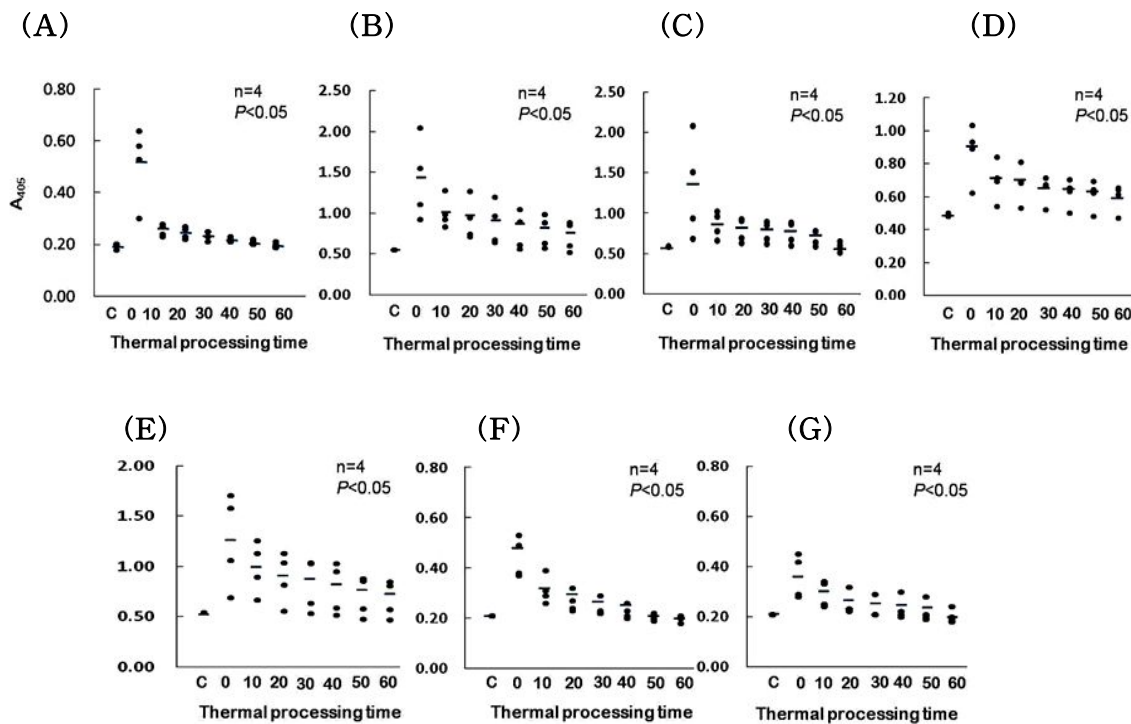


Fig. 16. 환자 혈청 중의 IgE와 증숙 처리 대두 단백질의 반응성

(A: 대풍, B: 대원, C: 태광, D: 개척2호, E: CN628-15(1), F: S-09, G: CN304-13, c: control buffer, 0: 생대두 단백질, 10 ~ 60: 121°C, 10, 20, 30, 40, 50, 60분 증숙 처리한 대두 단백질)

차. ELISA를 이용한 자숙 처리 대두의 대한 항원성 검사

품종별 대두의 증숙 처리에 따른 알레르기 환자의 특이 IgE 반응성을 측정, 비교하고자 대두에 대해 알레르기 반응을 일으키는 4명의 대두 알레르기 환자 혈청을 ELISA를 실시한 결과를 Fig. 17에 나타내었다. 열처리하지 않은 구와 비교했을 때 평균적으로 7가지 품종의 대두에서 자숙 시간이 증가함에 따라 대부분의 환자 혈청에서 특이 IgE 수치가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 대풍, S-09, CN304-13 품종이 다른 품종에 비해 낮은 IgE 수치를 나타내었다. 결론적으로, 자숙 처리가 대두 단백질의 항원성을 다소감소시키는 것으로 사료된다.

Hansen 등<sup>18)</sup>의 보고에 의하면 구운 hazelnut은 IgE 친화도 즉 반응성이 생대두에 비해 100배 감소하는 것은 열처리에 의한 단백질변성으로 항원성이 감소함을 밝혀, 본 연구와 유사한 결과를 보였다.

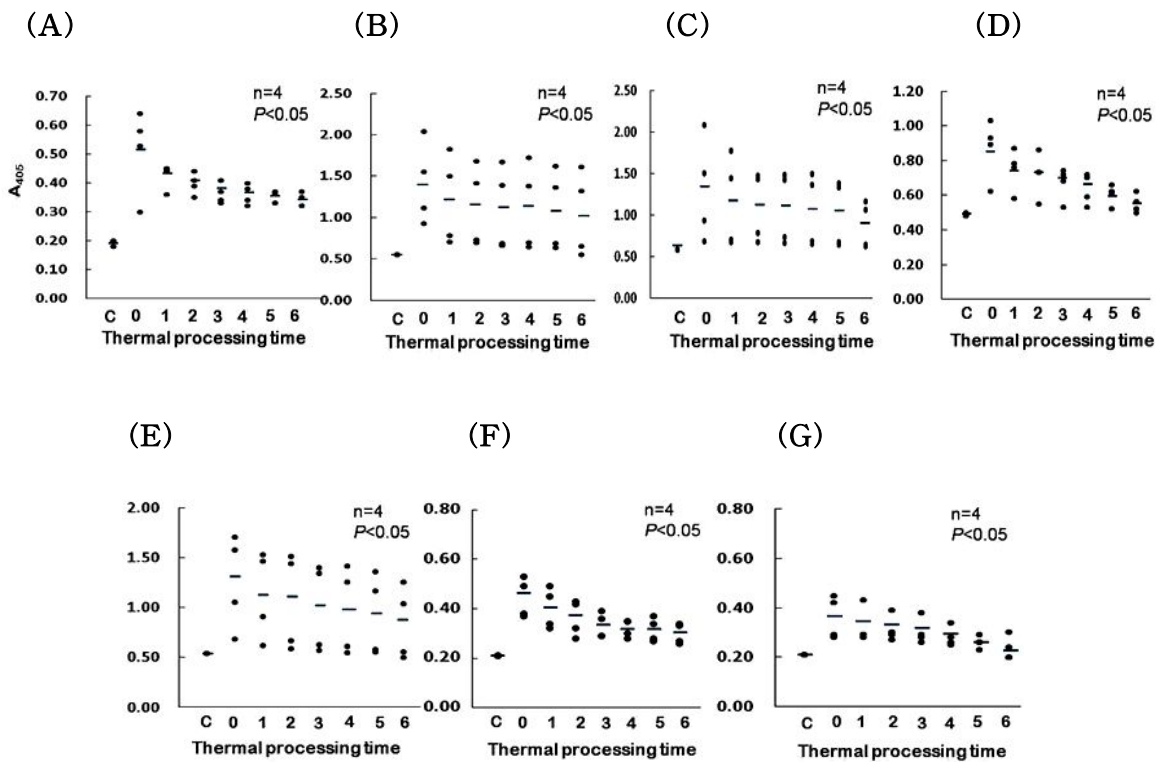


Fig. 17. 환자 혈청 중의 IgE와 자숙 처리 대두 단백질의 반응성

(A: 대풍, B: 대원, C: 태광, D: 개척2호, E: CN628-15(1), F: S-09, G: CN304-13, c: control buffer, 0: 생대두 단백질, 1 ~ 6: 100°C, 1, 2, 3, 4, 5, 6시간 자숙 처리한 대두 단백질)

## 카. 결론

대두는 성장기의 영유아에서부터 노인에 이르기까지 다양한 연령층의 소비자가 섭취하는 영양가가 풍부한 식품 소재로써 대부분의 고단백질성 가공식품 제조 시 값싼 단백질 증강제로 사용되고 있어 현실적으로 철저한 회피가 힘들다. 대두 속의 알레르겐을 찾아 그 구조를 불활성 형태로 바꿈으로써 대두에 의한 알레르기 발생을 줄이기 위한 시도들이 다양하게 이루어지고 있다. 본 연구에서 조사된 대두 단백질의 SDS-PAGE 결과, 대두 단백질은 증숙과 자숙 처리 및 그 시간경과에 따라 단백질 분해 정도에서 차이가 났으며, immunoblotting과 ELISA의 결과 단백질 함량의 감소뿐만 아니라 알레르기 유발성 즉 항원성의 변화에도 영향을 주는 것을 확인하였다. 그러나 43, 70 kDa의 단백질은 증숙, 자숙 처리 후에도 일부 환자의 경우 환자 혈청내의 IgE에 의해 인식되는 부위가 보존되었으며, 이러한 대두 알레르겐은 사과와 주요 알레르겐인 Mal d 1의 경우와는 달리 단백질의 공간적 3차원 구조와는 무관한 sequential epitope를 갖고 있을 것으로 추측된다. 또한, ELISA의 결과에서 나타났듯이 환자마다 알레르겐과의 반응성에 차이가 나는 것으로 보아, 개인에 따라 알레르기 반응 정도와 특이 항체가 알레르겐을 인식하는 부위(epitope)가 다를 수 있음을 본 실험결과를 통해 확인할 수 있었다.

최종적으로, 면역학적으로 중요한 일부 알레르겐을 감소시키면서 대두단백 자체의 기능적, 영양학적, 효율적 측면을 유지할 수 있는 가공 방법과 대두 품종의 선택이 저 알레르기성 장류 식품 생산을 위한 유용한 방법이 될 것이라 사료된다.

본 연구결과를 토대로, 대두 품종에 따라 일반성분 및 항원성에 차이가 있고 증숙 및 자숙법으로 처리와 같은 열처리하는 시간에 따라 알레르기를 유발하는 항원성 단백질의 감소 즉, 열분해 되는 비율의 차이가 있었지만 안전한 저 알레르기성 장류제품 제조를 위해서 대풍콩과 개척 2호를 선발하였다. 우리나라에서 가장 널리 재배되고 수확량이 다른 품종보다 많다는 의미에서 명명된 대풍콩은 다수확 품종으로 2009년 대한민국 우수 품종상을 획득하였고 다른 품종에 비해 재배지역이 증가하고 있는 추세이며 SDS-PAGE 결과 증숙 또는 자숙 시 단백질 분해 정도가 다른 콩에 비해 크고 환아혈청과의 반응성 또한 다소 미약한 것으로 면역학적 분석결과 확인되어 저알레르기성 장류 제조에 적합한 품종으로 기대된다. 생콩으로 섭취해도 비린내가 나지 않고 고레시틴 품종으로 종자 개량된 개척 2호 역시 일년차 연구결과 가공적성이 우수한 대두로써 immunoblotting 결과 환아혈청과의 반응성이 약하고 이미 대두 알레르기 주요 유발 단백질 중의 하나인 Kunitz trypsin inhibitor (KTI) 및 Lipoxigenase가 유전적으로 결실된 자연교배 품종으로 대두 알레르기를 줄일 수 있는 품종특성을 가지고 있다고 생각된다.

### 3절 대두 발효법에 따른 항원성 변화 규명

#### 1. 서론

알레르기는 항원성 단백질(allergen)과의 반복되는 접촉으로 발생하는 신체 과민반응(hypersensitivity)으로, 다음과 같은 세 단계를 거쳐 진행된다. 우선, allergen과의 처음 접촉에서 allergen을 인식하는 면역물질(antibody)이 체내에서 생성되고, 이 면역물질이 알레르기에 관여하는 세포에 부착되고, 이후 allergen과의 반복 접촉에서 면역물질과 allergen이 결합함으로써 알레르기 관여세포에서 화학매개체가 세포 밖으로 분비되어 조직에서 여러 가지 알레르기 증상을 일으킨다<sup>1)</sup>. 특히 식품 알레르기는 지난 20년간 전세계적으로 중요한 건강 관련문제 중 하나로 대두되고 있으며 삶의 질에 있어서도 심각한 부정적 효과를 낳고 있는 실정이며<sup>2)</sup>, 나라마다 그 빈도나 유발하는 원인식품들에 차이가 있는데 이는 그 나라의 유전적 특성, 문화, 식습관 및 조리법 그리고 생후 초기에 노출되는 알레르기 유발 식품의 종류와 깊은 연관이 있는 것으로 알려져 있다<sup>3)</sup>. 예를 들면 중국에서는 별로 유병률이 높지 않은 땅콩이 미국에서는 심각한 문제를 일으키는 알레르기 원인식품이며, 이러한 차이는 두 나라에서의 땅콩 조리법 차이 때문인 것으로 추정된다<sup>4-5)</sup>. 갑각류에 대한 알레르기 유병률의 경우 캐나다(0.5%)에 비해 싱가포르와 필리핀(4%)에서 높으며<sup>6)</sup>, 참깨 알레르기는 이스라엘에 많고<sup>3)</sup>, 메밀 알레르기는 주로 일본과 우리나라에서 높은 유병률을 나타낸다<sup>7)</sup>.

대두는 값싸고 질 좋은 단백질을 제공하며<sup>8)</sup> 다양한 기능성 성분이 포함되어 있는 것으로 밝혀지고 있다<sup>8-10)</sup>. 국내에서는 간장, 된장, 청국장, 두부, 콩가루, 콩기름 등 다양한 전통 식품으로 소비되는 건강식품이며, 우유에 의한 알레르기 문제가 있는 영유아에게 우유대체 식품으로도 흔히 사용되고 있다<sup>11-12)</sup>. 건강에 대한 국민들의 관심이 높아지면서 대두의 소비가 꾸준히 증가하였고, 그로 인해 대두 단백질에 대한 알레르기 발생 빈도도 증가하고 있는 것으로 보고되고 있다<sup>13)</sup>.

식품 알레르기는 원인 식품을 철저히 회피하는 것이 알레르기 증상을 유발하지 않는 유일하고 가장 효과적인 치료이지만, 이러한 철저한 회피가 힘들기 때문에 대두에 대한 저 알레르기성 물질의 개발이 다양하게 시도되고 있다. 여기에는 주요 알레르겐에 대한 열처리(thermal treatment), 효소처리(enzymatic treatment), 발효처리(fermentation), 탄수화물 결합(carbohydrate conjugation), 품종 개량(breeding), 유전자 재조합(genetic modification) 등이 포함되는데, 이중에서 국내 및 일본을 포함한 아시아권 나라에서는 다양한 효소를 생성하는 미생물을 이용하는 발효법으로 대두의 저 알레르기성을 유도시키는 연구가 활발하게 진행되고 있



다<sup>14</sup>). 특히 발효과정에 이용되는 미생물 및 발효 방법에 따라 대두 중의 알레르겐의 함량 및 알레르겐 특이성이 달라질 수 있다.

따라서 본 연구에서는 기존에 흔히 사용되고 있는 단일균을 이용한 단일 발효 뿐만 아니라, 장류용 황국균(*Aspergillus oryzae*)으로 1단 발효 후 고초균(*Bacillus subtilis* KCCM 11266P)으로 2단 발효시킴으로써 품종별 대두의 알레르기성 및 항원성 변화를 확인하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 실험재료

본 실험에 사용된 대두 품종은 국립 식량과학원으로부터 제공 받았으며, 개척 2호는 경상대학교 농학과 정종일 교수팀에서 제공받아 실험에 사용하였다.

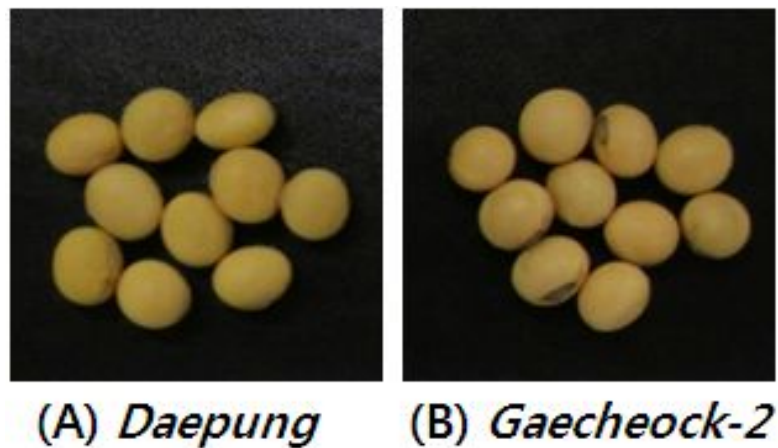


Fig. 1. 2품종의 대두 시료

### 나. 사용 균주

실험에 사용된 균주는 경상대학교 식품공학과 생물공학실험실에서 분리한 혈전용해효소 생성능과 단백질 분해능이 우수한 균주 *Bacillus subtilis* KCCM 11266P를 사용하였고, *Bacillus subtilis* (natto) (Culture Systems, Inc., IN, USA), *Aspergillus oryzae*는 (주) 충무발효화학에서 장류용 황국균을 구매하여 사용하였다.

다. 대상환자 및 혈청 확보

2012 년 1 월부터 2012 년 8 월까지 삼성서울병원 소아과에 내원하여 hanifin의 진단기준<sup>15)</sup>에 따라 혈청 내 대두에 대한 특이 IgE 수치가 30 kU<sub>A</sub>/L 이상을 보인 환자 8명을 대상으로 하였다(Table 1). 혈청 내 대두 특이 IgE는 CAP-FEIA (Pharmacia, Uppsala, Sweden)으로 측정하였고, 혈청은 -80℃에 보관하여 사용하였다.

Table 1. 대두 민감성 환자 혈청 정보

Patient No.	Sex	Age (years)	Total IgE (kU <sub>A</sub> /L)	Soybean specific IgE (kU <sub>A</sub> /L)
1	M	4	1089	38.4
2	F	1	57	7.7
3	M	1	174	21.1
4	M	0	1899	25.7
5	F	0	357	7.8
6	F	3	1019	5.0
7	M	1	105	17.0
8	M	4	527	5.1

라. 발효방법에 따른 품종별 대두의 발효

대두를 수돗물로 2~3회 세척하여 대두의 무게가 2.2배가 될 때까지 실온에서 수침하여 1시간 이상 물빼기 한 후 121℃에서 25분간 가압 증자하였으며 충분히 냉각한 대두에 단일 발효 중 고초균(*B. subtilis*)과 낫토균(*B. subtilis* (natto))은 1g당 10<sup>6</sup> CFU 되도록 접종하여 각각 37℃에서 48시간 발효하였다. 황국균(*A. oryzae*)은 대두 1 g당 10<sup>6</sup> spore가 되도록 전분과 함께 접종하고 30℃에서 48시간 발효하였다. 대두의 2단 발효는 황국균(*A. oryzae*)을 1 g당 10<sup>6</sup> spore가 되도록 α화전분과 함께 접종하고 대두의 표면에 균사가 덮일 때까지 30℃에서 24시간 이상 발효한 후 고초균(*B. subtilis*)을 접종하여 42℃에서 24시간 발효 시켰다. 단일 발효와 2단 발효된 대두를 60℃ 열풍 건조하여 냉장 보관하며 실험에 사용하였다. 발효공정도(그림 2)

는 아래와 같다.

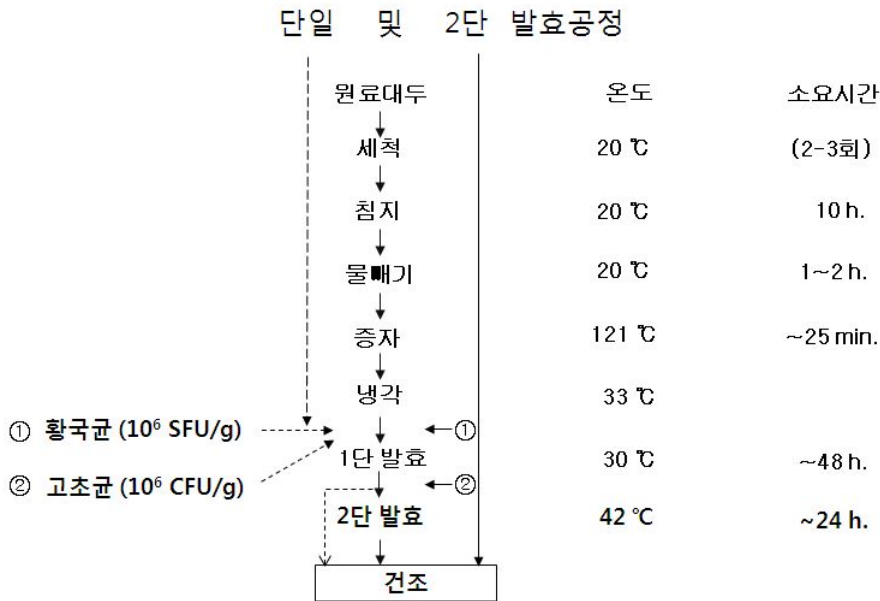


Fig. 2. 단일 및 2단 발효 공정도(점선;1단 발효, 실선; 2단 발효)

#### 마. 대두 단백질 추출 및 정량

발효한 대두를 곱게 분쇄하고 시료 내 존재하는 지방성분을 제거하기 위하여 5배의 n-Hexan을 넣고 실온에서 1시간 동안 교반시키는 과정을 세 번 반복하였다. 이렇게 하여 얻은 분말은 30 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 M NaCl과 함께 1:10 (w/v) 비율로 섞은 후 실온에서 micro tube mixer MT-360 (Tomy Seiko Co., Ltd., Japan)를 이용하여 3시간 동안 단백질성분을 용출시켰다. 이 용액을 4℃, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후, 상정액을 -20℃에서 보관하여 사용하였다. 추출된 단백질은 Bradford method<sup>16)</sup>에 근거한 Bio-Rad의 Protein Assay (BioRad Laboratories, USA)<sup>17)</sup>로 정량하였고, 표준물질로 BSA (bovine serum albumin)을 사용하였다.

#### 바. 단백질 protease 활성 측정

단백질 protease 활성은 Park과 Oh<sup>18)</sup>의 방법으로 측정하였다. 기질로는 산성 protease (pH

3.0)는 lactic acid를, 중성 protease (pH 6.0)와 알칼리성 protease (pH 9.0)는 0.1 N NaOH를 첨가하여 제조한 2 % casein (Hummarstein, USA)용액을 사용하였으며, buffer는 protease 종류에 따라 산성 protease와 중성 protease는 McIlvaine buffer (0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  + 0.1 M citric acid, pH 3.0, pH 6.0)를, 알칼리성 protease는 boric acid-borex buffer (pH 9.0)를 사용하였다. 효소액은 대두 시료 10 g과 3차 증류수 100 mL을 천천히 혼합하면서 4시간 동안 용출 시킨 후 여과한 액을 사용하였다.

각각의 buffer에 용해시킨 2% casein 용액 1.5 mL과 각 pH별 buffer 1.0 mL씩 시험관에 넣은 다음 효소액 0.5 mL을 넣고 40°C에서 60분간 반응시킨 후 0.4 M trichloroacetic acid (TCA)용액 3 mL을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 실온에서 10분간 방치한 다음 여과하여 얻은 여액 1 mL에 0.4 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액 5 mL과 5배 희석한 Folin-ciocalteu 용액 1 mL을 첨가하여 40°C에서 30분간 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 60분간 tyrosine 1 ug을 생성하는 효소량을 1 unit로 하였다.

#### 사. 아미노태 질소 측정

시료 5 g에 증류수 95 mL를 가하여 100 mL로 정용한 후 160 rpm으로 1시간 동안 추출한 뒤 여과(Whatman No.2, Germany)하였다. 이 중 여액 50 mL을 취하여 0.1N NaOH으로 pH 8.4까지 중화 하였다. 중성포르말린 20 mL를 가하여 0.1N NaOH으로 pH 8.4가 될 때 까지 적정한다. 적정의 종점을 결정하기 위하여 pH meter (Orion 420A, Thermo, Beverly, MA, USA)를 이용하였다.

#### 아. 유리 아미노산 분석

탈지가 완료된 대두 파우더 2 g에 물 25 mL을 가하여 균질화한 후 100°C에서 15분간 가열 처리하여 아미노산을 용출시켰다. 시료를 Watman No.2 filter paper를 이용하여 filtering 한 후 회전식 진공증발 농축기를 사용하여 감압농축 한 후 이 농축액을 littum citrate buffer (pH 2.2)을 이용하여 10 mL로 정용하였다. 정용 후 0.22 um filter로 filtering 하고 sep-pak으로 색소를 제거하여 분석 시료로 사용하였다. 분석은 아미노산 자동분석기(amino acid autoanalyzer S433, Sykam, Germany)로 분석 하였다.

#### 자. SDS-PAGE

발효 방법에 따른 품종별 대두 알레르겐 함량의 변화를 추정하기 위하여 Laemmli의 방법<sup>19-20)</sup>에 준하여 SDS-PAGE를 실시하였다. Gel은 15% separating gel과 5% stacking gel을 이용하였고, running buffer (1.44 % glycine, 0.3 % Tris-HCl (pH 8.0), 0.2 % SDS)는 pH 8.3으로 조정하여 사용하였다. 시료는 5배 농도의 sample buffer (1 M Tris-HCl: pH 6.8, 50% glycerol, 10% SDS, 2-mercaptoethanol, 1% bromphenol blue)와 4:1 (w/v)로 섞은 후 끓는 물에서 5분간 가열한 뒤 lane 당 8 ug/mL로 분리하였다. 전기영동은 100 V에서 90분 시행하였으며 전기영동 후, gel은 Coomassie staining solution (1.0 g Coomassie Blue R-250, 450 mL methanol, 450 mL H<sub>2</sub>O, 100 mL glacial acetic acid, 800 mL H<sub>2</sub>O)로 20분간 염색하고 Coomassie destaining solution (100 mL methanol, 100 mL glacial acetic acid, 800 mL H<sub>2</sub>O)로 적절히 탈색 후 단백질 밴드를 확인하였다.

#### 차. 특이 IgE 측정

ELISA는 Engvall와 Perlmann등<sup>21)</sup>의 방법에 준하여 실시하였다. 발효시킨 품종별 대두의 추출물을 항원으로 사용하였고, 각각의 추출물을 96-well plate (NUNC, Denmark)에 최종 농도가 10 ug/mL이 되도록 PBS (20 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4)로 희석하여 각 100 uL씩 분주하고 4°C에서 하룻밤 coating하였다. 다음날 PBST (phosphate buffered saline containing 0.05% (v/v) tween 20)로 3회 세척하였으며, 비특이적 결합을 방지하기 위해 blocking buffer (10% fetal bovine serum-phosphate buffered saline)를 이용하여 1시간 blocking 한 후 다시 PBST로 3회 세척하였다. 여기에 PBS를 이용해 1:200으로 희석한 혈청을 100 uL씩 가하고 37°C에 2시간 반응시켰다. PBST로 3회 세척한 후, 1,000배로 희석시킨 biotinylated goat anti-human IgE (Sigma, USA)도 37°C에 2시간 반응시켰다. PBST로 4회 세척한 후, 1 % FBS와 avidin peroxidase를 1:400으로 희석하여 40분 반응시켰다. 다시 PBST로 3회 세척한 후 ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline- 6-sulfonic acid), Sigma, USA) 와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 각 well에 100 uL 씩 넣고 10분간 발색시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3. 결과 - 발효 균주를 달리한 저알레르겐 장류 제조

#### 가. 대두의 가용성 단백질 농도 변화

발효 방법에 따른 품종별 대두의 가용성 단백질 농도를 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 대풍 품종의 경우 발효전의 생대두는 2.48 mg/mL였으나 모든 구에서 발효함에 따라 농도가 낮아져 0.99~1.11 mg/mL로 나타났다. 개척 2호도 대풍 품종과 마찬가지로 2.38 mg/mL에서 발효시간에 따라 가용성 단백질 농도가 점점 낮아져 0.92~1.34 mg/mL로 나타났다. 두 품종 모두 발효함에 따라 발효하지 않은 구에 비해 2배 가량 단백질 농도가 낮았다. 이것은 단백질이 열처리에 의해 불용화 된 후 다시 amino acid, peptide 등으로 분해됨으로써 나타는 결과라 사료된다.

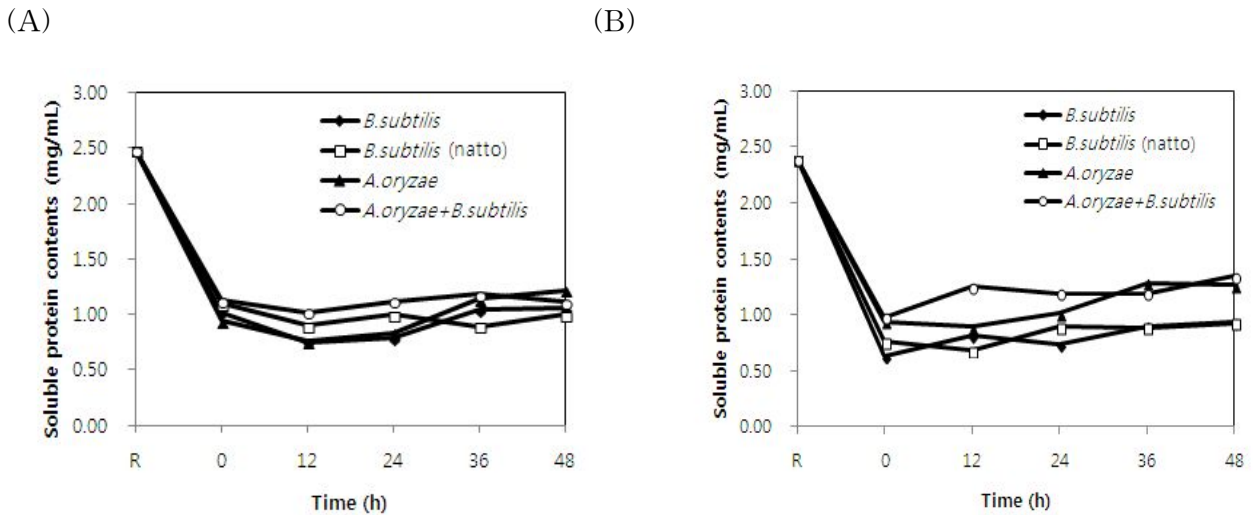


Fig. 2. 품종별 대두의 발효방법에 따른 가용성 단백질의 변화. (A) 대풍, (B) 개척 2호.

나. 대두의 protease 활성 변화

발효 방법에 따른 품종별 대두의 protease의 활성을 최적 pH에 따라 산성, 중성, 알칼리성으로 구별하여 측정하였다(Fig. 3).

발효가 완료된 품종별 대두의 protease 활성을 살펴본 결과, 산성 protease의 활성은 두 품종 모두 2단 발효구에서 110~125 unit/g 으로 가장 높게 나왔으며, 황국균, 고초균, 낫토균을 단일 발효한 순으로 높게 나타났다.

중성 protease 활성 또한 2단 발효구에서 572~594 unit/g 으로 최대 활성을 나타내었으며, 황국균, 고초균, 낫토균을 단일 발효한 순으로 나타냈다.

알칼리성 protease 활성은 고초균과 낫토균을 단일 발효한 구에서 가장 높게 나타났으며, 2단 발효구와 황국균 단일 발효구는 낮은 활성을 나타내었다.

Protease 활성 변화를 종합해 보면 2단 발효구에서 산성과 중성 protease에서 다른 단일 발효구보다 높은 활성을 나타내었고, 고초균과 낫토균을 단일 발효한 구에서 알칼리성 protease 활성이 가장 높게 나타났다. 따라서 2단 발효에 의해 생성된 protease에 의해 항원성 단백질이 효율적으로 분해된 것이라 사료된다. Oh 등<sup>22)</sup>은 *A. oryzae*를 증자 대두분에 접종하여 27°C 에서 72시간 동안 발효시킨 koji 중에서 protease 활성이 300 unit/g 였다고 하였지만, 본 연구에서 황국균을 접종한 2단 발효구의 활성은 600 unit/g 정도로 높게 나타났다.

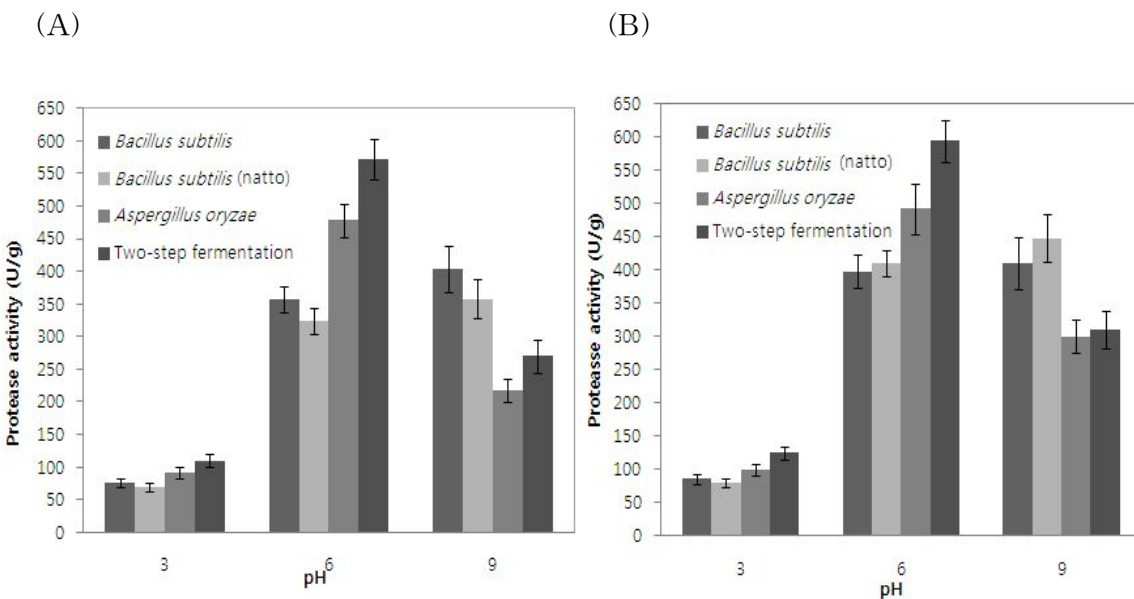


Fig. 3. 발효한 대두의 protease 활성. (A) 대풍, (B) 개척 2호.

다. 대두의 아미노태 질소 분석

아미노태 질소는 발효식품의 효소 분해로 생성된 아미노산 함량을 측정하여 발효정도와 맛을 판단하는 간접적인 지표 성분으로 사용된다. 일반적으로 아미노태 질소의 함량이 높은 장류가 맛이 좋은 것으로 평가된다<sup>23)</sup>.

발효 방법에 따른 품종별 대두의 아미노태 질소 함량 변화는 Fig. 4와 같다. 발효하지 않은 구의 아미노태 질소는 36.43~44.83 mg%으로 나타났으며 모든 발효구에서 발효함에 따라 점점 증가하여 대풍 품종의 경우 487.55~764.94 mg%, 개척 2호의 경우 527.48~756.44 mg%로 나타났다. 특히 2단 발효시 발효 36시간 이후 점차 증가해 48시간에는 동일 시간대 다른 단일 발효구에 비해 월등히 높은 아미노태 질소 함량을 나타냈다. 본 실험에서 2단발효시 protease 활성이 다른 단일 발효구에 비해 산성과 중성에서 가장 높게 나타났다. 따라서 본 연구결과는 기존의 보고들<sup>24-25)</sup>과 마찬가지로 아미노태 질소 함량이 단백질분해 효소의 활성에 의하여 결정된다는 것을 확인시켜준 것이라 할 수 있다.

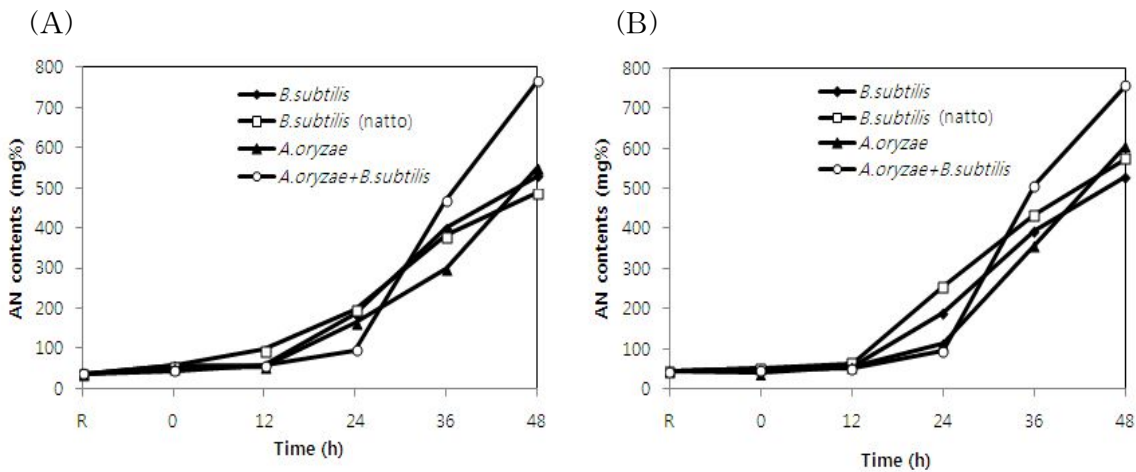


Fig. 4. 품종별 대두의 발효방법에 따른 아미노태 질소 함량 변화. (A) 대풍, (B) 개척 2호.



## 라. 대두의 유리 아미노산 함량

대풍 품종을 단일 발효와 2단 발효한 유리 아미노산의 함량을 측정한 결과를 Table 2에 나타냈다. 총 유리 아미노산의 함량은 2단 발효시 1553.90 mg%로 가장 높게 나타났으며, 단일 발효한 황국균 발효구 903.01 mg%, 고초균 발효구 518.64 mg%, 낫토균 발효구 473.95 mg% 순으로 높게 검출 되었다. 이는 고초균과 낫토균 단일 발효구 보다 3배 높게 나타났다. 또한 2단 발효구에서 특히 glutamic acid, threonine, proline, alanine 함량이 높게 검출 되었다.

개척 2호를 단일 발효와 2단 발효한 유리 아미노산의 함량을 측정한 결과를 Table 3에 나타내었다. 총 유리 아미노산의 함량은 대풍 품종과 마찬가지로 2단 발효구에서 2801.66 mg%로 가장 높은 함량을 나타내었다. 단일 발효한 황국균 발효구 1310.26 mg%, 낫토균 발효구 984.75 mg%, 고초균 발효구 680.57 mg%에 비해 각각 2배, 3배, 4배 이상 높게 나타났다.

따라서 2단 발효법으로 제조한 대두에서 다른 단일 발효구 보다 총 유리 아미노산이 높게 검출되는 점으로 미루어 이는 단백질이 발효에 의해 아미노산으로 효율적으로 분해된 것이라 사료된다.

Kim 등<sup>26)</sup>은 *B. subtilis*를 이용한 메주 제조시 glutamic acid와 phenylalanine의 함량이 높았다고 보고 하였고, Park 등<sup>27)</sup>은 볏짚에서 분리 동정한 *B. subtilis* S-16, *B. subtilis* K-27의 두 균주를 이용하여 제조한 메주 중 glutamic acid, leucine 및 lysine의 함량이 높았다고 보고 하여 본 실험의 결과와 비교하여 볼 때 glutamic acid는 공통적으로 높은 함량을 나타내었다.

Table 2. 발효시킨 대풍대두의 유리 아미노산 함량 (mg%)

	Raw soybean	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i> (natto)	<i>A. oryzae</i>	Two-step fermentation
Threonine	12.30	9.99	28.52	25.94	48.90
Serine	0.23	5.24	28.35	12.03	30.37
Asparagine	0.00	0.14	0.00	0.11	0.16
Glutamic acid	1.64	100.94	95.80	214.22	476.28
Proline	0.01	68.55	32.34	134.42	154.53
Glycine	11.20	17.07	13.12	55.68	60.02
Alanine	0.89	20.42	46.88	65.24	107.04
Valine	57.20	41.98	34.06	68.57	186.67
Methionine	4.50	19.29	10.87	26.13	30.96
Isoleucine	11.20	26.22	25.66	47.97	51.73
Leucine	15.60	59.03	53.75	5.99	60.94
Tyrosine	22.40	45.17	27.70	73.40	51.17
Phenylalanine	31.30	68.15	37.59	106.06	131.21
Lysine	15.20	26.05	1.98	53.77	21.80
Histidine	32.50	1.67	0.00	1.72	1.98
Arginine	0.85	8.73	37.34	11.75	40.12
Total (mg%)	217.02	518.64	473.95	903.01	1453.90

Table 3. 발효시킨 개척2호대두의 유리 아미노산 함량 (mg%)

	Raw soybean	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i> (natto)	<i>A. oryzae</i>	Two-step fermentation
Threonine	13.92	12.51	106.96	19.94	150.06
Serine	0.50	3.61	0.00	10.57	16.08
Asparagine	0.00	0.36	1.27	0.15	1.45
Glutamic acid	0.47	146.15	185.52	404.09	950.59
Proline	0.02	104.57	132.36	95.91	269.68
Glycine	7.37	35.90	53.47	64.78	78.23
Alanine	2.00	36.32	59.79	82.56	140.65
Valine	27.16	63.75	51.96	71.82	170.38
Methionine	5.83	16.69	51.88	31.08	54.29
Isoleucine	10.19	26.89	26.05	45.56	175.86
Leucine	13.81	58.53	95.61	173.71	183.31
Tyrosine	21.56	52.79	35.01	77.32	193.09
Phenylalanine	28.39	75.52	82.98	113.85	234.04
Lysine	22.31	39.11	44.26	98.34	104.17
Histidine	31.64	1.18	0.00	2.60	2.86
Arginine	1.60	6.68	57.62	17.98	66.93
Total (mg%)	186.77	680.57	984.75	1310.26	2791.66

#### 마. 대두의 단백질 분해도

발효 방법에 따른 2가지 저 알레르기 품종 대두의 단백질 분해정도를 알아보기 위하여 단백질을 추출하여 SDS-PAGE를 실시한 결과는 Fig. 5와 같다. 발효하지 않은 생대두는 10~170 kDa 에 걸쳐 다양한 분자량의 단백질 밴드들이 gel에서 골고루 분포하였다. 또한 이들 중에서 LTP (9 kDa), kunitz trypsin inhibitor (21 kDa), Gly m Bd 30K (34 kDa),  $\beta$ -conglycinin ( $\beta$ -subunit: 52 kDa,  $\alpha$ -subunit: 72 kDa,  $\alpha'$ -subunit: 76 kDa) 등<sup>28-29)</sup> 대두의 주요 알레르겐으로 알려져 있는 단백질로 추정되는 밴드들이 관찰되었다.

단백질 밴드를 발효하지 않은 구와 비교해 보았을 때, 발효시간이 증가함에 따라 고초균과 낮토균을 단일 발효한 구에서는 17 kDa 이하의 저분자량은 물론 30kDa이상의 고분자량의 단백질 밴드도 분해됨을 알 수 있었다. 또한 황국균 단일 발효구와 2단 발효구에서는 발효시간이 증가함에 따라 43 kDa, 34 kDa의 특정 단백질 밴드가 점점 진해지는 것을 볼 수 있는데, 이는 황국균이 분비하는 protease 밴드가 발효시간이 경과함에 따라 점점 짙어지는 것으로 추정된다.

대두의 알레르기성을 감소시키기 위해서 주 항원인 Gly m Bd 30 K의 구조를 변형시키는 여러 다양한 방법들이 시도되고 있으며, 국내 및 일본에서는 대두를 발효시킨 형태의 식품들이 널리 이용되기 때문에 발효를 통해 대두의 알레르기성을 감소시키는 시도가 보다 활발하게 진행되고 있다.

발효 과정은 미생물로부터 분비되는 효소에 의한 가수분해 과정으로 큰 분자량을 가진 단백질 성분을 펩타이드나 아미노산 형태로 줄여 항원성을 최소화 하는 방식인데<sup>30)</sup>, 일본에서 시행된 연구 중에서 natto발효와 유사한 방식으로 *B. subtilis*로 부터 분비된 protease를 추출한 물질로 멸균 증자 대두를 발효시킨 결과 대두단백이 분자량 10 kDa 이하로 분해됐다<sup>31)</sup>고 보고되어 본 연구와 유사한 결과를 보였다.

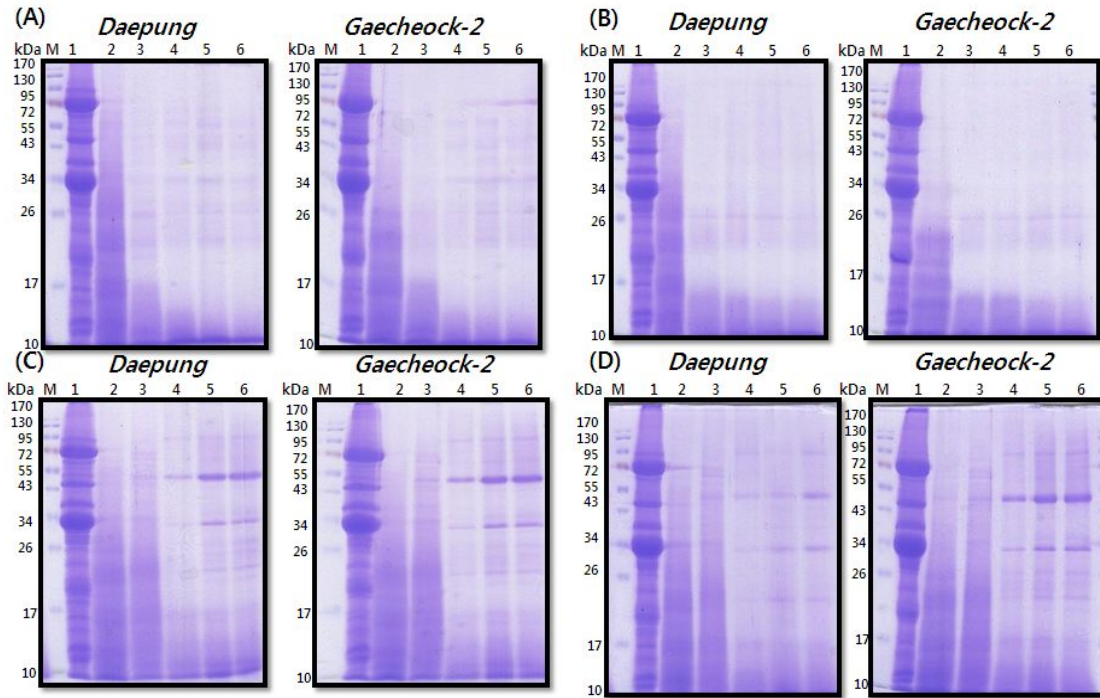


Fig. 5. 발효 대두의 SDS-PAGE. *B. subtilis* 발효 (A), *B. subtilis* (natto) 발효 (B), *A. oryzae* 발효 (C), 2단 발효 (D); M, molecular weight marker; lane 1, 발효하지 않은 대두; lane 2, 0 시간 발효한 대두; lane 3, 12 시간 발효한 대두; lane 4, 24 시간 발효한 대두; lane 5, 36 시간 발효한 대두; lane 6, 48 시간 발효한 대두

## 바. 대두의 특이 IgE 항원성 변화

혈청 내 대두에 대한 특이 IgE 수치가 30 kU<sub>A</sub>/L 이상을 보인 8명의 대두 민감성 환아 혈청을 이용하여 ELISA법으로 대풍 품종과 개척 2호의 발효 방법에 따른 항원성의 변화를 조사한 결과는 각각 Fig. 7, Fig. 8와 같다. 먼저 대풍 품종(Fig. 7)에서는 대조군과 비교하여 대두 항원에 대하여 비교적 높은 특이적 반응을 보였으며, 발효시간이 증가함에 따라 항원성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 2단 발효시 단일 발효구에 비해 낮은 IgE level을 나타냈다.

개척 2호(Fig. 8)의 경우에서도 발효시간이 증가함에 따라 항원성이 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 대풍 품종과 마찬가지로 단일 발효구보다 2단 발효구에서 더 낮은 IgE level을 나타냈다. 또한 닛토균과 황국균 단일 발효구의 경우 환아 혈청에 따라 IgE level 차이가 크게 나타났는데, 이는 알레르기 반응 정도와 특이 항체가 알레르겐을 인식하는 epitope가 다르기 때문에 모든 환자들이 동일하게 반응을 일으키지 않는 점<sup>32)</sup> 때문이라 생각된다.

대두 단백질은 이미 사람과 동물에서 알레르기반응을 일으킨다고 보고되었는데, Bock 등<sup>33)</sup>은 대두에 알레르기를 가진 사람은 대두 추출물에 대한 IgE와 IgG의 level이 증가한다고 보고한 바 있다. 대두의 어떤 fraction이 더 항체를 많이 생산하는지는 아직 밝혀진 바가 없는데 Burks 등<sup>34)</sup>은 대두에 대해 아토피성 피부염과 DBPCFC (Double-blind, placebo-controlled food challenge)에 양성인 아이들을 대상으로 연구한 결과, 어느 특정한 fraction이 주요 allergen이라고 결론 내릴 수 없었으며 대두 단백질의 많은 fraction에 대해 IgE와 IgG가 반응하는 것 같다고 발표한 바 있어 본 연구와 유사한 결과를 나타냈다.

본 연구의 제한점으로, 대상 환아 8 명은 혈청 특이 IgE 수치가 30 kU<sub>A</sub>/L 이상으로 이 수치는 Sampson 등<sup>35)</sup>이 제시한 CAP system을 이용한 “diagnostic decision point”로 73%의 양성 예측치를 가질 수 있기 때문에 임상적으로 대두 알레르기로 진단되었다. 그러나 환아의 수가 적으며, 1~4살 사이의 연령대로 국한되어있고, 이중맹검경구유발시험을 통해 대두 알레르기로 확진된 환아가 아니라 혈청 대두 특이 IgE 반응성을 가진 경우이기 때문에 실제로 항원성의 차이를 분석하는데 어려움이 있다고 보여진다. 추후 발효 방법에 대한 영향의 평가에 있어서 대두 알레르기 환자를 대상으로 피부시험 등을 시행한 연구가 이루어진다면, 본 연구의 실험적인 결론을 뒷받침할 수 있는 임상연구가 될 것이라 사료된다.

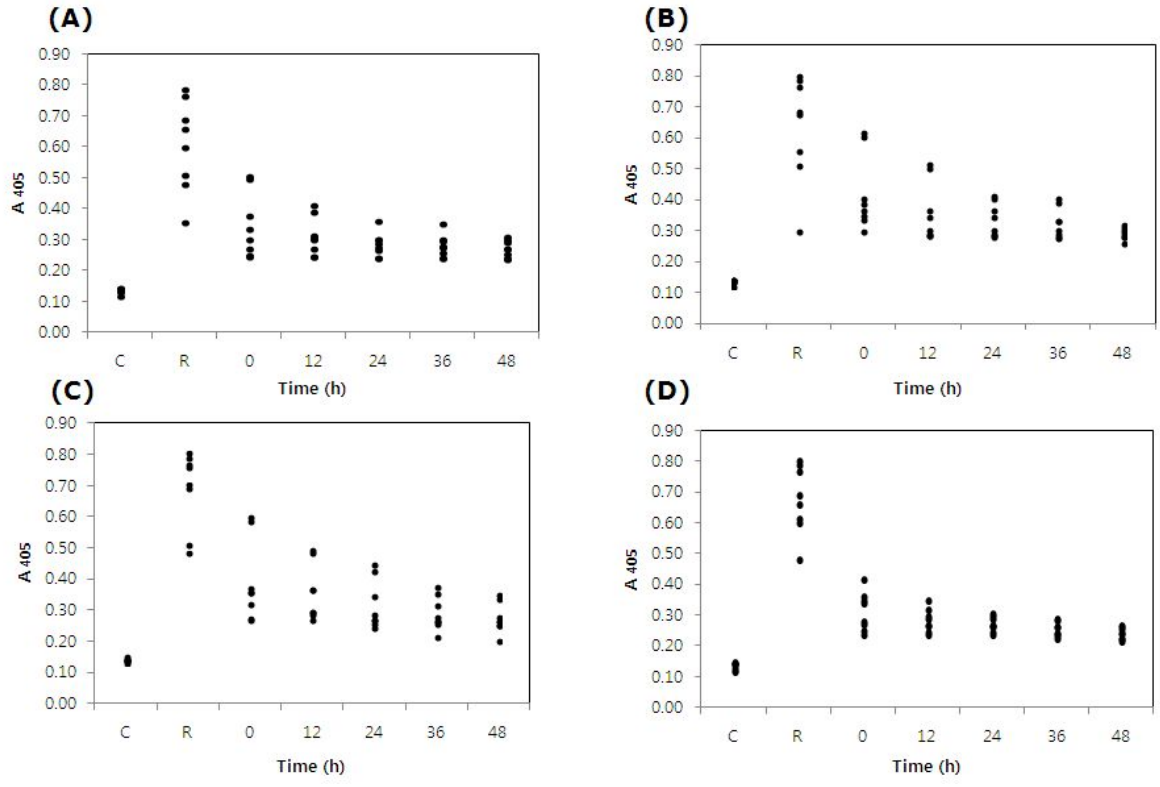


Fig. 7. 환자 혈청중의 IgE와 대풍 대두 발효물의 반응성. *B. subtilis* 발효 (A), *B. subtilis* (natto) 발효 (B), *A. oryzae* 발효 (C), 2단 발효 (D).

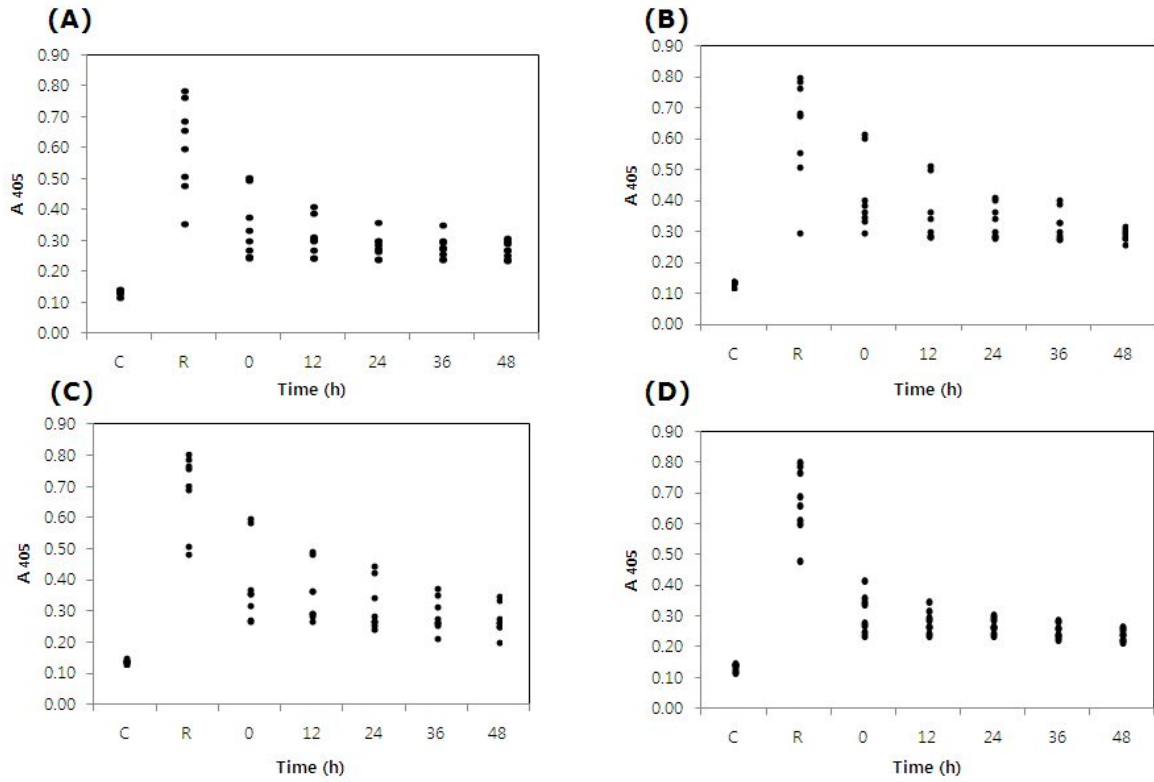


Fig. 8. 환자 혈청중의 IgE와 개척 2호 대두 발효물의 반응성. *B. subtilis* 발효 (A), *B. subtilis* (natto) 발효 (B), *A. oryzae* 발효 (C), 2단 발효 (D).



## 4절 대두 항원성 단백질에 대한 특이항체 제조

### 1. 서론

대두를 발효시킨 된장, 간장, 고추장 및 청국장 등의 장류제품은 현재 한국인들이 가장 선호하는 조미 식품이다. 사회적으로 기능성 혹은 건강성을 지향하면서 자연 식품인 장류의 소비가 증대되고 있는 시점에서 장류 제품은 상품적 가치를 높여 국내외에서 경쟁력의 재고가 필요하다. 대두 알레르기의 유병률은 지역, 식습관, 노출 정도에 따라 다르지만 소아에서는 1~6% 정도 나타나며 아토피 피부염 환자의 6%, 우유알레르기 환자의 14%에서 대두알레르기가 나타난다고 한다. 1,716명의 성인 알레르기 환자의 국내산 대두에 대한 감작률은 3.8%로 알려져 있다. 또한 우유 단백질에 감작된 알레르기 환자 18.3%에서 대두 특이 IgE가 양성을 나타내었다고 하였다. 대두 알레르기는 대체로 나이가 들면서 자연소실되는 식품알레르기 중 하나로 알려져 있으며 3세경이면 대두에 대한 내성이 대부분 획득된다고 하여, 대두 알레르기 환자에서 대두 제한식을 시행하고 1~2년 후 40%에서 대두 알레르기가 소실된다. 식품알레르기는 원인 식품을 철저히 피하는 것이 가장 효과적이거나, 이는 힘들기 때문에 다양한 방법으로 대두의 알레르기성을 낮추는 방법이 시도 되고 있다. 아시아권에서는 발효법을 이용한 연구가 활발하나, 된장이나 간장에 의해 아토피 증상이 악화되는 보고도 있으므로 더욱 효율적인 발효법의 확립이 필요하다. 저 알레르기성 대두 발효물을 이용하여 유아식, 환자식 등을 다양한 식품을 제조하고 대두 알레르기 환자의 면역학적 진단 방법을 위한 확립 연구가 요구된다. 국민 건강 증진을 위해 국산 대두 품종 중의 알레르겐 함량을 측정하여 알레르기성 질환을 가진 소비자용 식품소재를 발굴하며 전통 식품의 맛과 향을 유지하고 알레르겐이 감소된 장류의 생산은 대두 단백질에 과민 반응을 일으키는 환자들의 식생활을 개선시킬 수 있을 것으로 기대된다. 대두 발효 식품 제조 공정 중의 여러 요인들에 대한 대두중의 알레르겐의 함량 및 알레르겐 특이성 변화에 미치는 영향에 대한 연구가 부족한 실정이다. 정량적인 알레르기성 평가를 위해 과민성 환자 혈청은 물론 대두의 주요 항원성 단백질의 유전자 재조합 및 특이 항체가 요구된다. 국가 간 무역 활성화로 인한 무한경쟁에서 비교 우위를 차지하기 위해서는 장류의 알레르기성 평가는 선행 되어야 할 연구이다. 1년차 연구에서 대두의 열처리 방법에 의하여 대두 알레르겐을 최소화 시키는 증자법을 확립하였다. 그러나 열처리에 의해서도 분해되지 않거나 소화효소에서도 분해되지 않는다고 알려진 Lipid transfer protein (LTP)와 같은 난분해성 단백질의 확인이 요구된다. 따라서 본 연구에서는 LTP가 다량 존재하는 복숭아를 이용하여 RNA를 분리한 후 LTP 재조합 단백질을 제조하고 콩 LTP와의 상동성을 조사한 다음, 이를 활용하여 항체를 생산함으로써 대두 및 장류제품 속에 존재하는 난분해성 단백질의 검출을 위한 기초자료를 마련하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 사용균주, 플라스미드, 배지

Top 10 *E.coli* competent cell, *E. coli* BL21 (DE3)와 recombinant *E. coli*는 37°C, LB 배지 및 적당한 항생제를 첨가하여 배양하였다. 모든 항생제는 Sigma로부터 구입하였으며 다음과 같은 농도로 사용하였다 : ampicillin 50 µg/ml; kanamycin 50 µg/ml. 배지는 Difco (Detroit, Mich), pBluescript II SK+ (Stratagene), 벡터는 pJET 1.2 blunt cloning vector G를 사용하였다.

### 나. 대장균을 이용한 LTP 발현 및 대량 생산

#### (1) Total RNA의 분리

복숭아의 Total RNA의 분리는 RNeasy Plant Mini Kit(Quagen Inc, CA, USA)를 이용하였다. 액체질소로 동결 상태에서 분쇄한 복숭아 100 mg에 450 µl의 RLT를 첨가하고 vortex하여 56°C에서 3분간 반응하였다. 용균물을 2 ml e-tube에 들어있는 Qiashredder sign column에 넣고 원심분리한다. 분획된 상정액을 새 e-tube에 세포과편이 혼입되지 않도록 옮긴다. 깨끗한 용균물을 회수하기 위해 0.5배의 ethanol을 첨가하고 혼합한다. 형성된 침전물을 포함하여 2 ml 수집관에 있는 sample을 RNeasy mini column에 옮긴 후 8,000 g에서 15초간 원심분리하여 통과액을 제거한다. RNeasy 칼럼에 RW1 buffer 700 µl를 첨가하여 8,000 g에서 15초간 원심분리한다. RNeasy column을 새로운 2 ml의 e-tube로 옮긴 후 RPE buffer 500 µl를 넣는다. tube를 닫고 column을 세척하기 위해 8,000 g에서 15초간 원심분리하여 통과액을 제거한다. RNeasy column에 RPE buffer 500 µl를 첨가하여 8,000 g에서 2분간 원심분리 한다. 새 e-tube에 RNeasy spin column을 넣고 RNase free water를 50 µl를 첨가하고 RNA 용출을 위해 8,000 g에서 1분간 원심분리한다.

#### (2) cDNA의 합성

분리된 total RNA를 이용하여 ImProm-II™ Reverse Transcription System(Promega Copertation, WI, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 알려진 복숭아 lipid transfer protein Pru p 3 유전자 (GenBank Accession No. AJ 277163)를 바탕으로 sense primer 5' - GAATTCATAACATGTGGCCAAGTGTCC - 3'와 anti-sense 5' - -

CTCGAGCTTCACGGTGGCGCAGTTGGT - 3'를 제작하여 Eco RI/Xho I 제한효소 부위를 가지도록 PCR을 실시하였다. LTP cloning을 위한 primer 서열은 Table 1과 같고, PCR 조건은 1 step 94°C, 2 min, 2 step 94°C 20 sec, 55°C 30 sec, 72°C 30 sec, total 30 cycle, 3 step 72°C 5min)으로 실시하였다.

Table 1. LTP gene 클로닝을 위한 PCR에 사용된 primer의 서열

Primer	Sequences (5'-3')
5'-LTP (Forward)	5' - <u>GAATTC</u> CATAACATGTGGCCAAGTGTCC - 3' (Eco RI)
3'-LTP (Reverse)	5' - <u>CTCGAGCTTCACGGTGGCGCAGTTGGT</u> - 3' (Xho I)

### (3) LTP 유전자의 클로닝

PCR 산물은 0.8%의 agarose gel에 전기영동하여 검출된 단편을 Wizard SV Gel and PCR clean-up System (Promega, USA)을 이용하여 용출하였다. PCR 산물을 pJET 1.2 blunt cloning vector에 subcloning 한 후 Top 10 *E. coli* competent cell에 transformation 실시하여 50 ug/ml의 ampicillin이 함유된 LB 배지에서 37°C, overnight 배양하여 양성 클론을 선별하였다.

### (4) DNA sequencing

원하는 유전자가 삽입된 양성클론을 선별하기 위하여 PRISM Ready Reaction Dye terminator/primer cycle sequencing kit (Perkin-Elmer, USA)를 사용하여 dideoxy-chain termination 방법으로 sequence를 조사하였다. 샘플은 automated DNA sequencer (Model 3100, Applied biosystems)을 이용하여 분석하였다. nucleoted sequence와 amino acid sequence의 조성분석은 DNAMAN analysis system (Lynnon Bisoft, Canada)를 이용하였으며, BLAST program으로 protein-coding region을 조사하였다.

### (5) LTP 유전자의 발현

Cloning된 균주를 배양하여 mini prep으로 plasmid를 분리한후 *EcoRI*과 *XhoI* 제한효소를 처리하여 2% agarose gel에 전기영동하여 원하는 DNA 단편을 얻은 다음 elution 하여 발현용 pET 21 a vector에 ligation하였다. 이때 pET-21 a vector는 T7 RNA polymerase responsive promoter로써 His<sub>6</sub>-tagged fusion protein을 생산한다. 그리고 ampicillin 내성 유전자를 가지며 N-terminal T7-Tag® sequence plus His<sub>6</sub>-Tag® sequence가 재조합 단백질의 C-terminus에 생기게 된다. 클로닝된 pET 21a vector는 발현용 균주인 BL 21 *E.coli* competent cell에 transformation하였으며, 50 ug/ml의 ampicillin을 함유한 LB 배지에서 37°C, 200 rpm으로 배양하였다. OD<sub>600</sub>이 0.5일 때 IPTG (isopropyl-β-D-galactoside)를 최종농도 0,1 mM이 되도록 첨가하여 재조합 유전자의 발현을 유도하였다. IPTG 첨가후 동일한 조건에서 4시간을 배양하여 배양액으로부터 균체를 회수하였다. LTP 유전자의 클로닝 및 발현은 Fig.1 에 나타내었다.

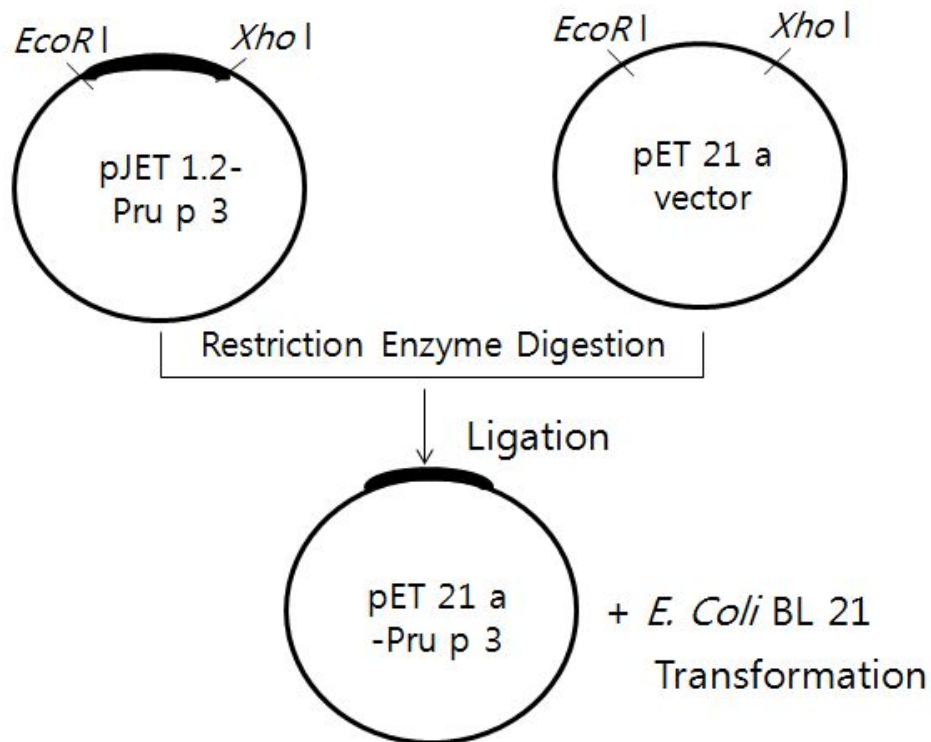


Fig. 1. LTP 유전자의 발현을 위한 plamid map

(6) his-tagged T 7 antibody(B)를 이용한 western blotting

발현된 단백질이 LTP임을 확인하기 위하여 his-tagged T 7 antibody를 이용하여 western blotting을 수행하였다.

(7) 재조합 단백질의 정제

Ni-NTA Superflow(Quagen, USA) 6x His 흡착 칼럼을 이용하여 항원을 정제하였다. Buffer 조성은 다음과 같다.

Equilibration Buffer : 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 0.5M NaCl, 10 mM imidazole

Washing Buffer : 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 0.5M NaCl, 20 mM imidazole

Elution Buffer : 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 0.5M NaCl, 300 mM imidazole

(8) 재조합 단백질 특이 항체생산

재조합 단백질을 정제한 후 (주) 코스모진텍에 제공하여 rabbit polyclonal 항체를 제조하였다. Rabbit 2 마리를 면역시키기 위해서 총 3.5 mg/mL의 단백질을 SDS-PAGE 후 해당 밴드를 잘라서 PBS에 침지하여 제공하였다.

(9) LTP 특이항체를 이용한 대두의 LTP 함량 측정

세부기관에서 제공받은 품종별 대두의 LTP 측정은 앞서 생산된 LTP 특이항체를 이용하여 ELISA 방법에 준하여 실시하였다. 발효시킨 품종별 대두의 추출물을 항원으로 사용하였고, 각각의 추출물을 96-well plate (NUNC, Denmark)에 최종 농도가 10 ug/mL이 되도록 PBS (20 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4)로 희석하여 각 100  $\mu$ L씩 분주하고 4°C에서 하룻밤 coating하였다. 다음날 PBST (phosphate buffered saline containing 0.05% (v/v) tween 20)로 3회 세척하였으며, 비특이적 결합을 방지하기 위해 blocking buffer (10% fetal bovine serum-phosphate buffered saline)를 이용하여 1시간 blocking 한 후 다시 PBST로 3회 세척하였다. 여기에 PBS를 이용해 1:500으로 희석한 1차 LTP 항체를 100 uL씩 가하고 37°C에 2시간 반응시켰다. PBST로 3회 세척한 후, 2,000배로 희석시킨 Peroxidase labelled specific antibody도 37°C에 2시간 반응시켰다. PBST로 4회 세척한 후, TMB substrate solution (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, citrate-phosphate buffer 10 mL, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 uL)를 첨가하여 각 well에 100 uL씩 넣고 10분간 발색시켰다. 1 M phosphoric acid를 첨가하여 발색을 정지시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3. 결과 - 대장균을 이용한 재조합 대두 알레르겐의 발현 및 대량생산

#### 가. 대두와 복숭아 LTP 단백질의 교차반응성

대두와 복숭아 단백질간의 교차반응성을 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 실시하였다(Fig. 2). 대두 품종별 단백질 추출물을 확인한 결과 5 kDa부터 100 kDa까지 다양한 크기의 단백질이 고루 분포하는 것을 확인할 수 있었다. 복숭아 단백질 추출물의 패턴을 확인한 결과 주요 알레르겐 lipid transfer protein로 알려져 있는 9 kDa 부근에 진한 단백질 분자를 확인할 수 있었고 그 외 약한 단백질 밴드들을 확인할 수 있었다.

대두 민감성 환자 혈청이 대두와 복숭아 단백질에 어떻게 반응하는지 확인하기 위하여 immunoblotting을 실시하였다 (Fig. 3). 대두 민감성 환자 혈청은 대두 단백질 9 kDa, 21 kDa 및 40 kDa를 비롯하여 다양한 밴드와 반응하는 것을 확인하였으며 복숭아 단백질에 대해서는 9 kDa와 강하게 반응하였다. 또한 Fig. 4에서 대두의 glycine과 복숭아의 sequence의 상동성을 확인하였다. 전년도 연구결과 9 kDa 단백질이 대두의 알레르겐 중의 하나였다. 9 kDa 복숭아 단백질이 대두 단백질과 교차반응성이 확인되어 복숭아와 대두 단백질의 에피토프가 유사하다고 사료되어 본 연구에서 복숭아 단백질 중의 9 kDa에 해당하는 LTP를 재조합 후 발현시켜서 대두 알레르겐 확인 및 검출에 사용하기로 하였다.

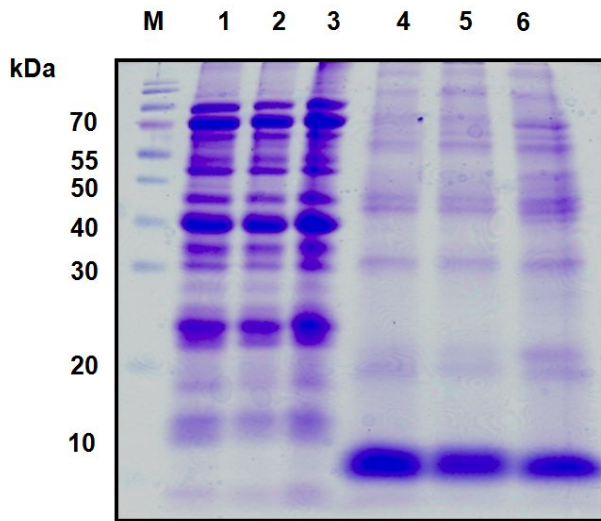


Fig. 2. 대두와 복숭아의 SDS-PAGE (1~3 : 대두, 4~6 : 복숭아)

*M: molecular weight marker, Lane 1: Daepung, Lane 2: Daewon, Lane 3:Taegwang, Lane 4: Mibaekdo, Lane 5: Odoroki, Lane 6: Nagasawa Hakuho*

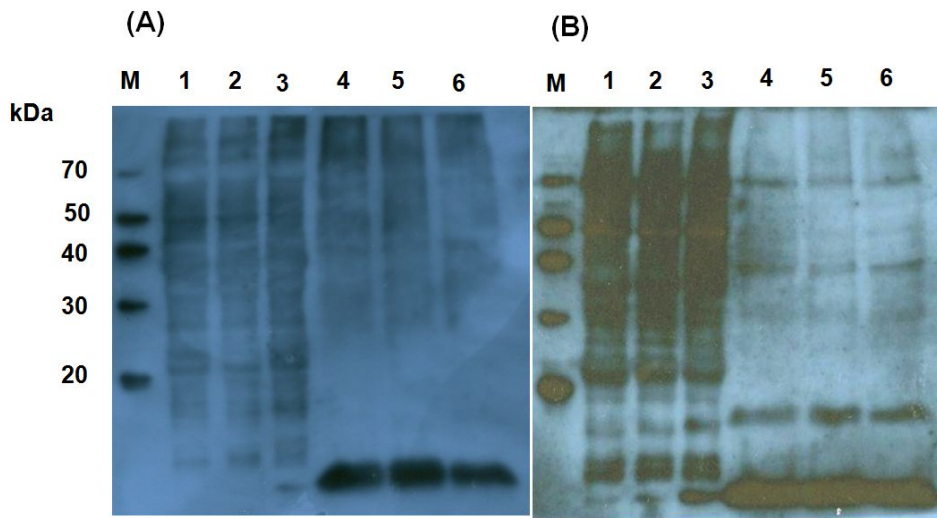


Fig. 3. 대두와 복숭아 단백질과 대두 민감성 환자 혈청의 immunoblotting (1~3 : 대두, 4~6 : 복숭아)

*M: molecular weight marker, Lane 1: Daepung, Lane 2: Daewon, Lane 3:Taegwang, Lane 4: Mibaekdo, Lane 5: Odoroki, Lane 6: Nagasawa Hakuho*

```

↵
Glycine      MGKSVVEKLLWMAIVCLVLGVISITPKAQAAVTCNQVVSNLTPCISYVLNGGKTVPGPCC 60↵
Peach      -----ITCGQVSSSLAPCIPYV-RGGGAVPPACC 28↵
                ** ** * * ** ** ** ** **
↵
Glycine      NGIKTLFNLAHSTPDRQTVCKCIKNAVSAFHYGKSNVDRAAALPKQCGVNI PCQISPSTD 120↵
Peach      NGIRNVNNLARTTPDRQAACNCLKQLS--ASVPGVNPNNAAALPGKCGVSI PYKISASTN 86↵
***      *** ***** * * *          * ***** ** ** ** ** ↵
↵
Glycine      C-TRVQ 125↵
Peach      CATVK- 91↵

```

Fig. 4. 대두 Glycine과 복숭아LTP의 상동성 분석



나. 복숭아 LTP (Lipid transfer protein Pru p3)의 클로닝

RNeasy Plant Mini Kit (Quagen Inc, Ca. USA)를 이용하여 복숭아의 total RNA를 추출하였다. 알려져 있는 복숭아 LTP의 mRNA 서열을 확인 (accession, No. AJ277163)하여 제작한 프라이머를 이용하여 cDNA 합성 아가로스 겔 전기영동 한 결과 약 280 bp 부근의 밴드를 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

증폭된 PCR 산물을 pET21a-d(+) vector에 삽입하여 Top 10 cell에 transformation하여 cloning하였다 (Fig. 6). 클로닝 후 sequencing 한 결과 복숭아 LTP Pru p3와 일치하는 것을 확인하였다.

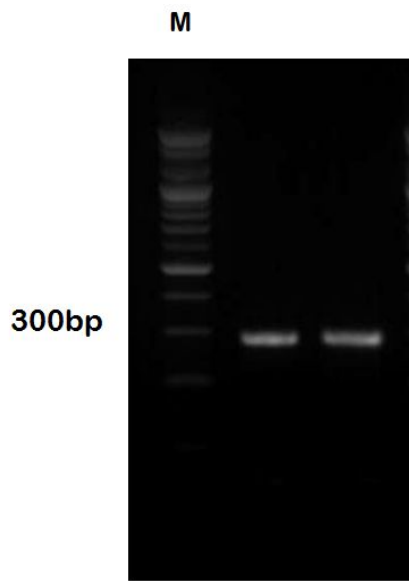


Fig. 5. 복숭아 LTP Pru p3를 RT-PCR한 전기영동 결과  
M : Marker(100bp Ladder)

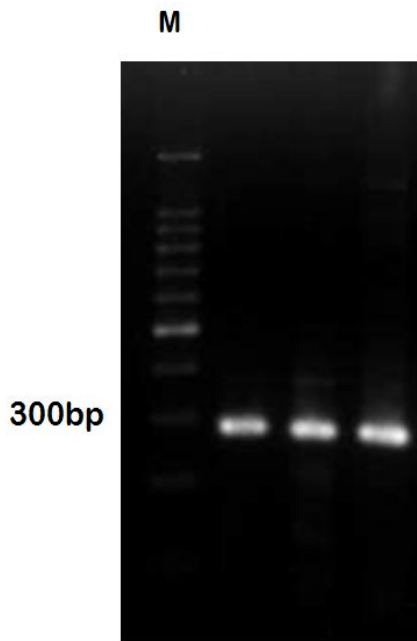


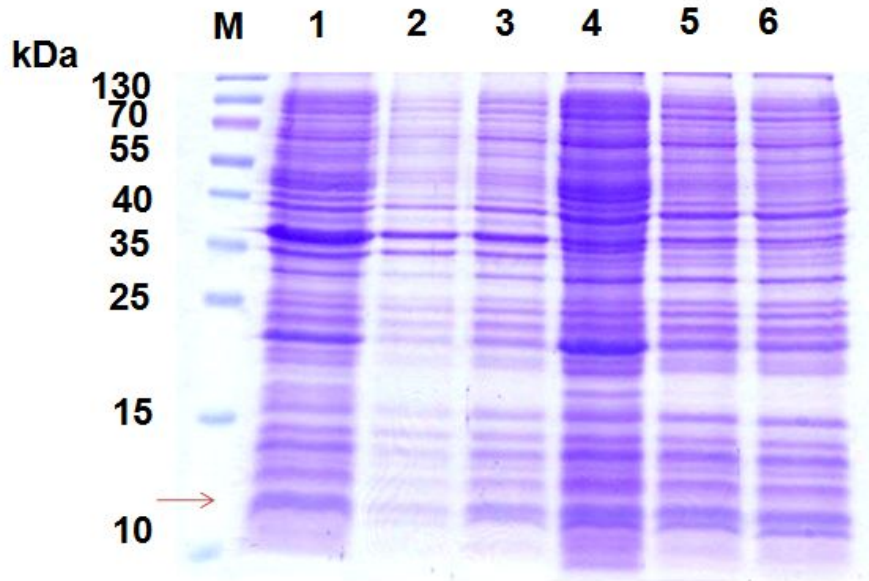
Fig. 6. pET 21 vector를 이용하여 cloning한 LTP의 전기영동 결과  
M : Marker(100bp Ladder)

Lane 1, 2: *E. coli* Top 10 confident cell transformed with vector pET-21a with Pru p 3

#### 다. 복숭아 단백질 Lipid transfer protein Pru p3의 발현

Cloning 한 것을 발현용 균주인 *E.coli* BL21에 transformation 한 후 액체배양하면서 isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG)를 이용하여 induction하였다. Fig. 7 (A)는 IPTG 농도를 달리하여 발현한 후 SDS-PAGE를 실시한 결과이며 his-tagged T 7 antibody를 이용하여 발현이 제대로 이루어졌는지 western blotting을 통해 확인한 결과를 Fig. 7 (B)에 나타내었다. IPTG를 첨가하지 않았을 시에는 발현이 이루어지지 않았으며 IPTG를 첨가하였을 때 농도에 상관없이 발현은 잘 이루어졌으나 발현이 0.1 mM에 비해 1 mM일때 더 잘 이루어지는 것을 확인하였다. 또한 SDS-PAGE 상에서 발현 유무를 정확하게 확인하기 어려워 T 7 antibody를 사용한 결과 12 kDA부근에서 LTP가 발현되는 것을 확인하였다.

(A)



(B)

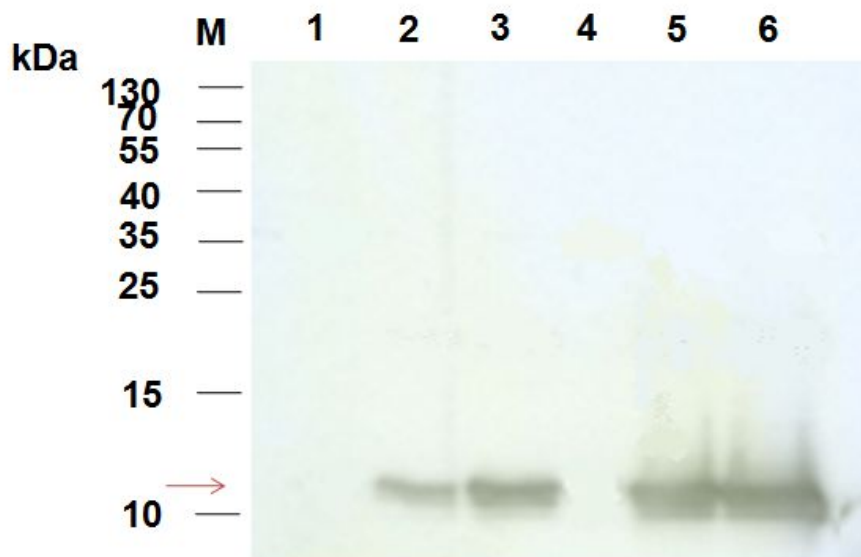


Fig. 7. IPTG induction(A)을 실시한 재조합 단백질의 SDS-PAGE상의 발현 및 his-tagged T7 antibody(B)를 이용한 western blotting.

M: Marker, Lane 1: Pellet without IPTG, Lane 2: Pellet treated IPTG 0.1mM, Lane 3: Pellet treated IPTG 1mM, Lane 4: Supernatant without IPTG, Lane 5: Supernatant treated IPTG 0.1mM, Lane 6: Supernatant treated IPTG 1mM

라. 복숭아 단백질 Lipid transfer protein의 정제

Ni - sepharose (GE Healthcare) gravity column를 이용하여 정제한 후 SDS-PAGE를 실시하여 Fig. 8에 나타내었다. Elution 한 fraction을 SDS-PAGE한 결과 Lane 2에서 6까지 elution 초기에 육안으로 많은 양의 단백질이 정제되는 것을 확인할 수 있었다. 정제된 단백질이 복숭아 LTP가 맞는지 확인하기 위해 N-terminal amino sequence을 실시 한 결과 62%의 sequence coverage로 복숭아 LTP Pru p 3 인 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 9). 또한 Fig. 10에 나타낸 바와 같이 LTP Pru p 3은 대두의 Glycine과 상동성을 나타내었으므로, 대두의 난분해성 알레르겐인 LTP 검출을 위한 특이항체 제조에 사용될 수 있음을 확인하였다.

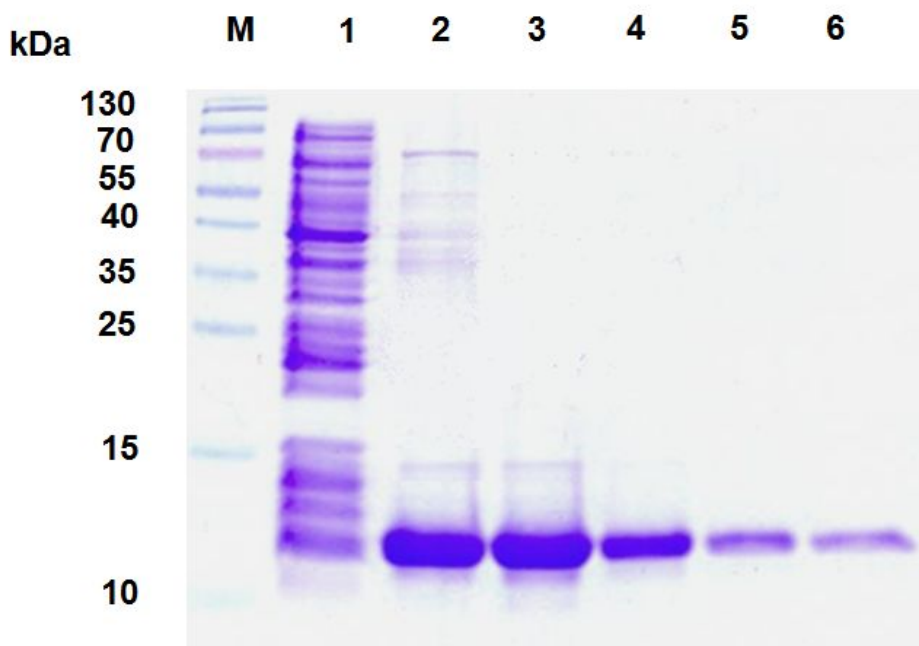


Fig. 8. 정제된 재조합 단백질 LTP Pru p3 SDS-PAGE 결과

M: Marker, Lane 1: Supernatant of BL21 treated IPTG, Lane 2~6: fraction 1~5

Gi | 17974195 Mass: 9138 Score: 88 Matches: 8  
 Pru p 1 (*Prunus persica*) **Sequence Coverage: 62%**

**1 ITCGQVSSSL APCIPYVRGG GAVPPACCNG**  
**31 IRNVNNLART TPDRQAACNC LKQLSASVPG**  
**61 VNPNNAAALP GKCGVSIPIK ISASTNCATV K**

Fig. 9. 정제된 LTP Pru p3의 N-terminal amino sequence.

```

Prup3      -----ATG-----TGG-- 6
Glycine    ATGGGCAAGTCTGTAGTTGAGAAGCTACTTTGGATGGCAATTGTGTGCTTGGTGCTGGGT 60
          ***                               ***

Prup3      -----CCAAG-----TGT-----CCAG-----CAGC 22
Glycine    GTAATTTCCATTACTCCAAGGCCAAGCAGCAGTGACATGCAACCAGGTGGTGAGCAAC 120
          *****      **:      ***      **.*

Prup3      CTTGCACCATGCATACCCTACGTG---AGAGGCGGTGGAGCTGTGCCTCCAGCTTGCTGC 79
Glycine    CTCACCCCATGCATTTCTTATGTGCTCAATGGTGGCAAACCGTGCCTGGCCCTTGCTGC 180
          ** .* *****: * * * * * *.* ** * * * * * * * * * * * * * * *

Prup3      AACGGCATTAGGAACGTCAACAACCTGGCAAGGACCACCCCTGACCGCCAGGCCGCTTGC 139
Glycine    AATGGGATCAAGACCCTCTTTAACCTCGCTCACTCCACACCAGACCGCAAACCGTTTGC 240
          ** * * * * *.**.* **:: *** * **::.. :****.**:*****.*** * * * *

Prup3      AACTGCCTGAA-ACAGCTTTCGCCAGCGTCCCCG-----GAGTCAACCCT-AACAATG 191
Glycine    AAGTGCATAAAGAACGCTGTTAG--TGCCTTCCATTATGGCAAGTCCAATGTGGACCGTG 298
          ** ***.*** *.*** * .* :**** ** .*****.* * **.***

Prup3      CCGCAGCGCTTCCCGCAAGTGTGGAGTTAGTATTCCCTTACAAGATTAGCGCCTCCACCA 251
Glycine    CTGCTGCTCTTCCCTAAGCAGTGTGGGGTTAATTCCTTGCCAGATCAGCCCTTCCACCG 358
          * **:* ** ***** .. .*****.*****.*****.*.***** * * * * * * *

Prup3      ACTGCGCCACCGTGAAG--- 268
Glycine    ACTGTACCAGAGTGCAGTGA 378
          **** .*** .***.* **
  
```

Fig. 10. LTP pru 3과 대두 Glycine의 상동성

마. 재조합 LTP를 이용한 항체제조

재조합 단백질 LTP Pru p 3를 이용한 polyclonal 항체 생산을 위해 rabbit에 정제된 항원을 면역시켰다. 정제된 단백질을 1.5mg/mL을 각각 rabbit에 면역을 시킨 결과 Boosting 횟수가 증가할수록 항체의 역가가 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

항원-항체 반응시 희석 비율은 1:100에서 1:1000 사이가 적당할 것으로 사료되나 1:1000으로 희석해 항원성 단백질을 검출을 위해 사용하였을 때 더욱 효율적일 것이라 생각된다. 또한 복숭아와 대두간의 교차반응성이 있으므로 본 항체를 이용하여 대두의 주요 알레르겐인 LTP의 함량 또한 측정가능 할 것이다.

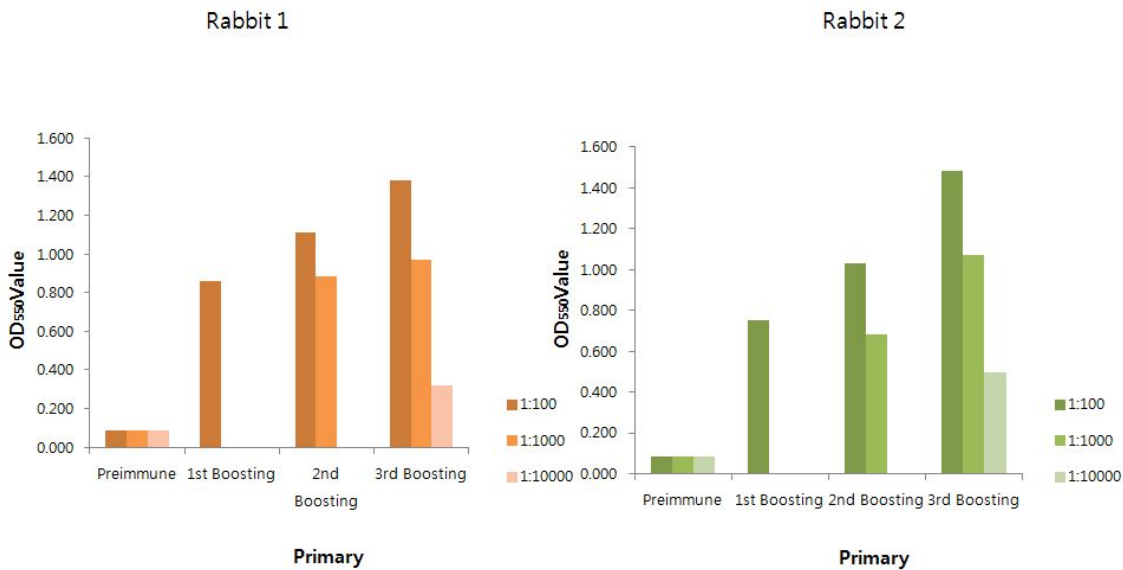


Fig. 11. LTP rabbit polyclonal antibody의 역가

## 바. 대두의 LTP 항원성 변화

생산된 LTP 특이항체를 이용한 대두 및 대두 이용 제품의 LTP 검출 가능성을 조사하기 위하여, 주관기관에서 발효시간별 대풍 품종과 개척 2호의 샘플을 제공받아 발효 방법에 따른 LTP 항원성의 변화를 ELISA법으로 측정한 결과를 Fig. 12에 나타내었다. 그 결과 발효대두에서 대두 품종, 발효방법에 따른 LTP 함량의 변화를 효율적으로 검출하는 것을 확인하였다.

LTP는 대부분의 식물에 존재하는 9 kDa의 저분자량 방어 protein으로 liposome, microsome 등에서 mitochondria로 phospholipid 등과 같은 물질을 운반시키는 기능을 하는 단백질이다. 열처리나 소화효소에 의해 잘 분해되지 않는 난분해성 단백질이지만, 두 품종의 대두에서 발효과정에 따라 LTP level이 감소함을 알 수 있었다. 특히 단일 발효구보다 2단 발효시 분해정도가 가장 효율적으로 나타나, 발효 과정 중 분비되는 단백질 분해 효소에 의한 것이라 사료된다.

또한 대체적으로 대풍 품종이 개척 2호 보다 좀 더 낮은 LTP level을 나타내었는데 이는 대두에 포함된 LTP 단백질의 알레르기성 차이가 있음을 확인할 수 있다. 따라서 대두를 원료로 식품을 제조할 때 대두 품종을 고려함으로써 알레르기 반응으로 인한 문제를 줄일 수 있는 가능성을 제시한다.



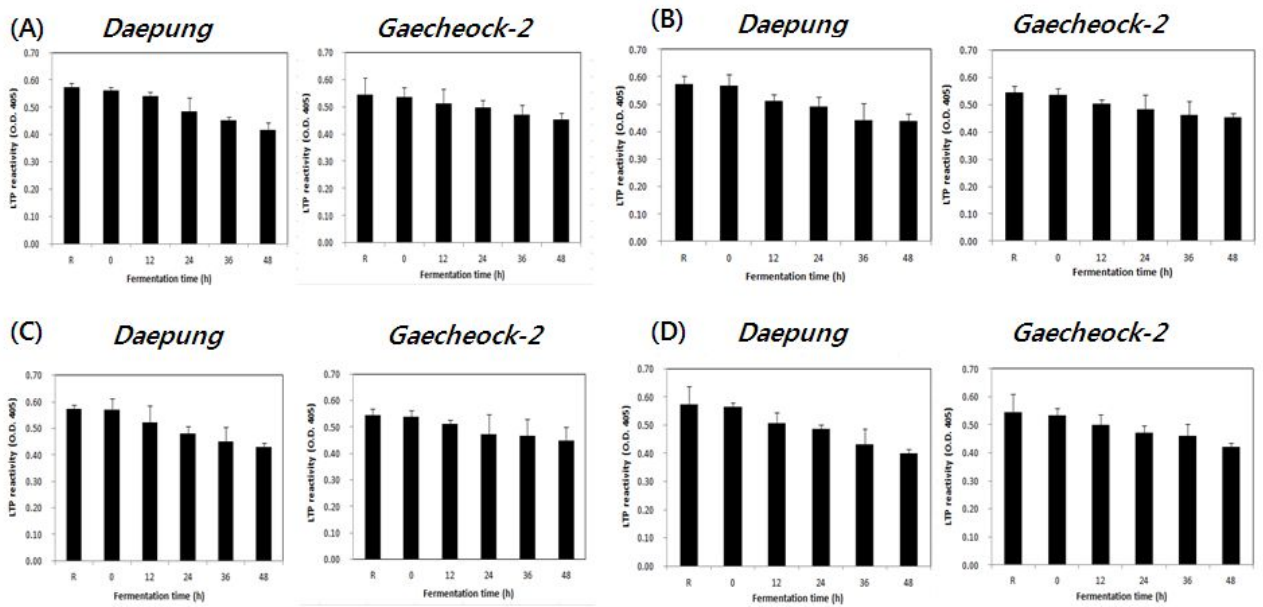


Fig. 12. 발효한 대두와의 LTP의 반응성. *B. subtilis* 발효 (A), *B. subtilis* (natto) 발효 (B), *A. oryzae* 발효 (C), 2단 발효 (D).

## 5절 저알레르기성 장류제품의 개발

### 1. 서론

대두를 발효시킨 된장, 고추장 및 청국장 등의 장류제품은 현재 한국인들이 가장 선호하는 조미 식품이다. 사회적으로 기능성 혹은 건강성을 지향하면서 자연 식품인 장류의 소비가 증대되고 있는 시점에서 장류 제품은 상품적 가치를 높여 국내외에서 경쟁력의 재고가 필요하다.

전통장류의 주원료인 대두는 알레르기를 유발하는 주요 식품군으로 알려져 있다. 대두 알레르기의 유병률은 지역, 식습관, 노출 정도에 따라 다르지만 소아에서는 1~6% 정도 나타나며 아토피 피부염 환자의 6%, 우유알레르기 환자의 14%에서 대두알레르기가 나타난다고 한다. 1,716명의 성인 알레르기 환자의 국내산 대두에 대한 감작률은 3.8%로 알려져 있다. 또한 우유 단백질에 감작된 알레르기 환자 18.3%에서 대두 특이 IgE가 양성을 나타내었다고 하였다.

식품알레르기는 원인 식품을 철저히 피하는 것이 가장 효과적이거나, 이는 힘들기 때문에 다양한 방법으로 대두의 알레르기성을 낮추는 방법의 개발이 요구된다. 우리가 생활하는 환경과 피할 수 없는 식품의 오염 속에서 전통 식품의 장점은 살리면서 나아가 항 알레르기성 기능을 부여하는 것이 필요하다고 판단된다. 저 알레르기성 기능을 갖춘 된장이나 간장 등의 장류를 섭취한다면 그 자체로도 우리의 식생활의 큰 개선을 가져올 것이며, 알레르기 유발가능성을 감소시킴으로써 대두 알레르기 환자의 안정적인 식생활 유지에 기여할 수 있을 것으로 추측된다.

### 2. 재료 및 방법

#### 가. 실험재료

##### (1) 원료

대두를 이용한 장류제품에 함유된 알레르겐 함량 측정을 위하여 시판 청국장 제품 4점(C1~C4), 된장 제품 4점(D1~D4), 고추장 3점(G1~G3), 쌈장 3점(S1~S3)을 국내 주요 유통센터에서 구매하여 사용하였다.



Fig. 1. 국내 시판 장류제품

(2) 사용균주

실험에 사용된 균주는 경상대학교 식품공학과 생물공학실험실에서 분리한 혈전용해효소 생성능과 단백질 분해능이 우수한 균주 *Bacillus subtilis* KCCM 11266P을 사용하였고, *Bacillus subtilis* (natto) (Culture Systems, Inc., IN, USA), *Aspergillus oryzae*는 (주) 충무발효화학에서 장류용 황국균을 구매하여 사용하였다.

나. 시제품의 생산

(1) 청국장

대두를 수돗물로 2~3회 세척하여 대두의 무게가 2.2배가 될 때까지 실온에서 수침하여 1시간 이상 물빼기 한 후 121℃에서 25분간 가압 증자하였으며 충분히 냉각한 대두에 황국균(*A. oryzae*)은 대두 1 g당  $10^6$  spore가 되도록 전분과 함께 접종하고 대두의 표면에 균사가 덮일 때까지 30℃에서 24시간 발효한 후 고초균(*B. subtilis*)을 42℃에서 24시간 발효 하였다.

## (2) 된장

청국장 제조와 동일한 방법으로 대두를 발효시킨 후 60℃ 열풍 건조하여 콩알메주를 제조하였다. 제조된 콩알메주를 이용하여 된장을 제조하였다. 콩알메주와 20%의 염수를 1:2(w/v) 비율로 혼합하여 숙성용기에 넣고 15℃에서 3개월간 숙성시켰다. 숙성이 완료된 후 고형물을 된장으로 생산하였으며, 액상은 간장으로 제조한다.

## 다. 단백질 추출 및 정량

수집한 시판 장류제품 및 시제품을 분쇄하고 시료 내 존재하는 지방성분을 제거하기 위하여 5배의 n-Hexan을 넣고 실온에서 1시간 동안 교반시키는 과정을 세 번 반복하였다. 이렇게 하여 얻은 분말은 30 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 M NaCl과 함께 1:10 (w/v) 비율로 섞은 후 실온에서 micro tube mixer MT-360 (Tomy Seiko Co., Ltd., Japan)를 이용하여 3시간 동안 단백질성분을 용출시켰다. 이 용액을 4℃, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후, 상정액을 -20℃에서 보관하여 사용하였다. 추출된 단백질은 Bradford method<sup>1)</sup>에 근거한 Bio-Rad의 Protein Assay (BioRad Laboratories, USA)<sup>2)</sup>로 정량하였고, 표준물질로 BSA (bovine serum albumin)을 사용하였다.

## 라. 아미노태질소 측정

시료 5 g에 증류수 95 mL를 가하여 100 mL로 정용한 후 160 rpm으로 1시간 동안 추출한 뒤 여과(Whatman No.2, Germany)하였다. 이 중 여액 50 mL을 취하여 0.1N NaOH으로 pH 8.4까지 중화 하였다. 중성포르말린 20 mL를 가하여 0.1N NaOH으로 pH 8.4가 될 때 까지 적정한다. 적정의 종점을 결정하기 위하여 pH meter (Orion 420A, Thermo, Beverly, MA, USA)를 이용하였다.

마. 특이 IgE 측정

특이 IgE 측정은 Engvall와 Perlmann<sup>등3)</sup>의 방법에 준하여 실시하였다. 발효시킨 품종별 대두의 추출물을 항원으로 사용하였고, 각각의 추출물을 96-well plate (NUNC, Denmark)에 최종 농도가 10 ug/mL이 되도록 PBS (20 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4)로 희석하여 각 100 uL씩 분주하고 4°C에서 하룻밤 coating하였다. 다음날 PBST (phosphate buffered saline containing 0.05% (v/v) tween 20)로 3회 세척하였으며, 비특이적 결합을 방지하기 위해 blocking buffer (10% fetal bovine serum-phosphate buffered saline)를 이용하여 1시간 blocking 한 후 다시 PBST로 3회 세척하였다. 여기에 PBS를 이용해 1:200으로 희석한 혈청을 100 uL씩 가하고 37°C에 2시간 반응시켰다. PBST로 3회 세척한 후, 1,000배로 희석시킨 biotinylated goat anti-human IgE (Sigma, USA)도 37°C에 2시간 반응시켰다. PBST로 4회 세척한 후, 1 % FBS와 avidin peroxidase를 1:400으로 희석하여 40분 반응시켰다. 다시 PBST로 3회 세척한 후 ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline- 6-sulfonic acid), Sigma, USA) 와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 각 well에 100 uL 씩 넣고 10분간 발색시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 연구에 사용된 환자의 혈청은 2012 년 1 월부터 2012 년 8 월까지 삼성서울병원 소아과에 내원하여 hanifin의 진단기준<sup>15)</sup>에 따라 혈청 내 대두에 대한 특이 IgE 수치가 30 kU<sub>A</sub>/L 이상을 보인 환자 8명을 대상으로 하였다(Table 1). 혈청 내 대두 특이 IgE는 CAP-FEIA (Pharmacia, Uppsala, Sweden)으로 측정하였고, 혈청은 -80°C에 보관하여 사용하였다.

Table 1. 대두 민감성 환자 혈청 정보

Patient No.	Sex	Age (years)	Total IgE (kU <sub>A</sub> /L)	Soybean specific IgE (kU <sub>A</sub> /L)
1	M	4	1089	38.4
2	F	1	57	7.7
3	M	1	174	21.1
4	M	0	1899	25.7
5	F	0	357	7.8
6	F	3	1019	5.0
7	M	1	105	17.0
8	M	4	527	5.1

바. 시제품의 성분분석

(1) 수분 측정

시제품의 수분함량은 적외선 수분측정기(FD-600, Kett)로 40분간 측정하였다.

(2) 염도 측정

시제품의 염도는 측정은 분쇄한 시료 5 g을 증류수로 현탁하여 250 ml로 정용하고 이 중 10 ml을 취하여 2%  $K_2CrO_4$  1 ml을 넣고 0.1 N  $AgNO_3$ 로 적정하였다.

(3) 총질소 측정

시제품의 총질소 함량 측정은 시료 1 g을 취하여 Kjeldahl flask에 넣고,  $K_2SO_4$ 와  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 를 9 : 1의 비로 혼합한 촉매제 2~3 g과 conc.  $H_2SO_4$  15ml을 넣어 2시간 동안 분해시킨 후 증류수를 첨가하여 100 ml로 정용하고 소비된 0.02 N HCl의 ml수를 총질소로 환산하였다. 증류시 사용한 시약은 NaOH - Sodium thiosulfate ( $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ )용액과 2% Boric acid ( $H_3BO_3$ )용액 그리고 지시약은 Bromocresol green과 Methyl red를 에탄올에 2 : 1의 비로 혼합하여 계산하였다.

5) 총당 함량

시제품의 총당 함량은 Phenol- $H_2SO_4$ 법<sup>4)</sup>에 따라 시료 1 mL에 5% phenol(Yakuri pure chemicals Co., Ltd., Kyoto, Japan) 1 mL와  $H_2SO_4$ (Samchyn pure chemicals Co., Ltd., Pyeongtaek, Korea) 5 mL를 가하여 상온에서 30분간 반응시킨 후 460 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준물질로는 glucose(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

6) 환원당 함량

시제품의 환원당 함량은 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid)법<sup>5)</sup>을 사용하여 시료 1 mL에 0.75% DNS(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액 1 mL을 첨가하고 100°C에서 5분간 반응시킨 다음 증류수 8 mL을 가한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3. 결과 - 저알레르겐 발효대두 제품생산

#### 가. 장류제품의 가용성 단백질 함량

시판 장류제품과 본 연구에서 확립된 최적 발효법으로 제조된 청국장과 된장의 가용성 단백질 농도를 측정한 결과를 Fig.2에 나타내었다. 대두발효 장류제품에 함유된 가용성 단백질은 원재료인 대두 및 밀, 첨가물 등의 함량에 의해 현저한 차이가 나타난다. 주로 청국장, 된장, 쌈장제품에서 가용성 단백질 함량이 1 mg/ml 내외로 검출되었다. 본 연구에서 제조된 청국장과 된장의 가용성 단백질 함량은 각각 1.28, 1.26 mg/ml로 비교적 높은 함량을 나타내었다.

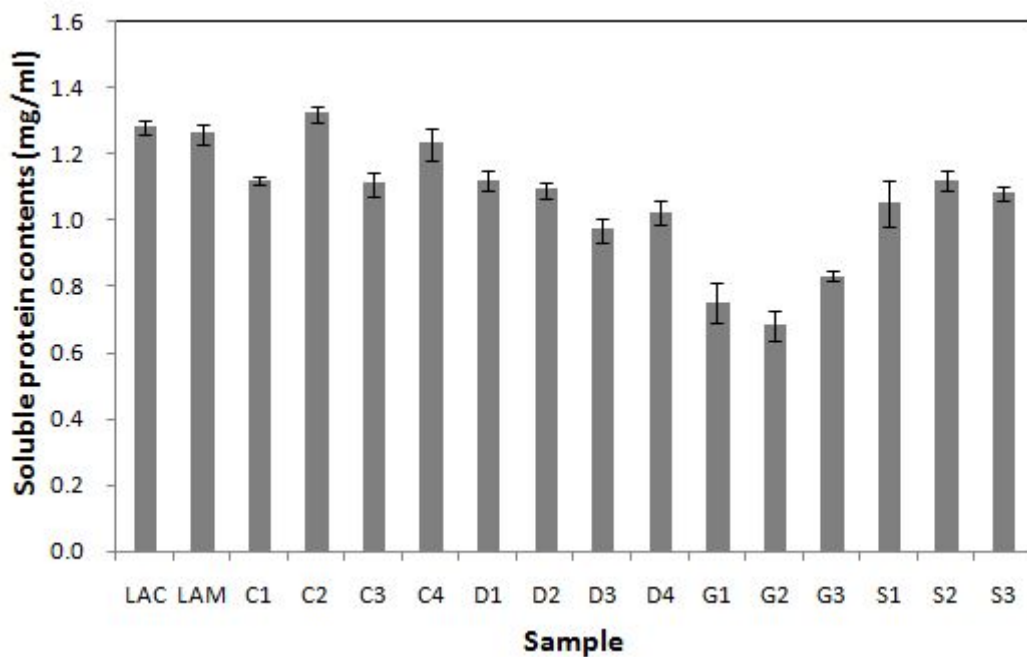


Fig. 2. 장류제품의 가용성 단백질 함량

※ LAC (Low allergenic *chungkukjng*) : 저알레르겐 청국장, LAM (Low allergenic *meju*) : 저알레르겐 된장, C1~C4 : 청국장 제품, D1~D4 : 된장 제품, G1~G3 : 고추장 제품, S1~S3 : 쌈장제품

나. 장류제품의 아미노태 질소 함량

아미노태 질소는 발효과정 중에 대두 단백질이 효소작용(protease)으로 가수 분해되어 맛을 내는 아미노산을 생성하게 된다. 일반적으로 아미노태 질소의 함량이 높은 장류가 성분 면에서 좋은 것으로 평가된다<sup>6)</sup>. 또한 효소에 의한 단백질의 분해정도를 가늠하는 척도가 될 수 있다.

대두를 이용한 시판 장류제품과 본 연구에서 확립된 최적 발효법으로 제조된 청국장과 된장의 아미노태 질소 함량을 조사한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 본 연구에서 제조된 청국장과 된장의 아미노태 질소 함량은 각각 732.32, 725.12 mg%로 비교적 높은 함량이었다. 이는 발효 중 대두의 단백질이 아미노산으로 효율적으로 분해되어 아미노태 질소 함량이 높게 나타나는 것으로 사료되며, 시판 제품들에 비교하였을 때 함량이 높았다.

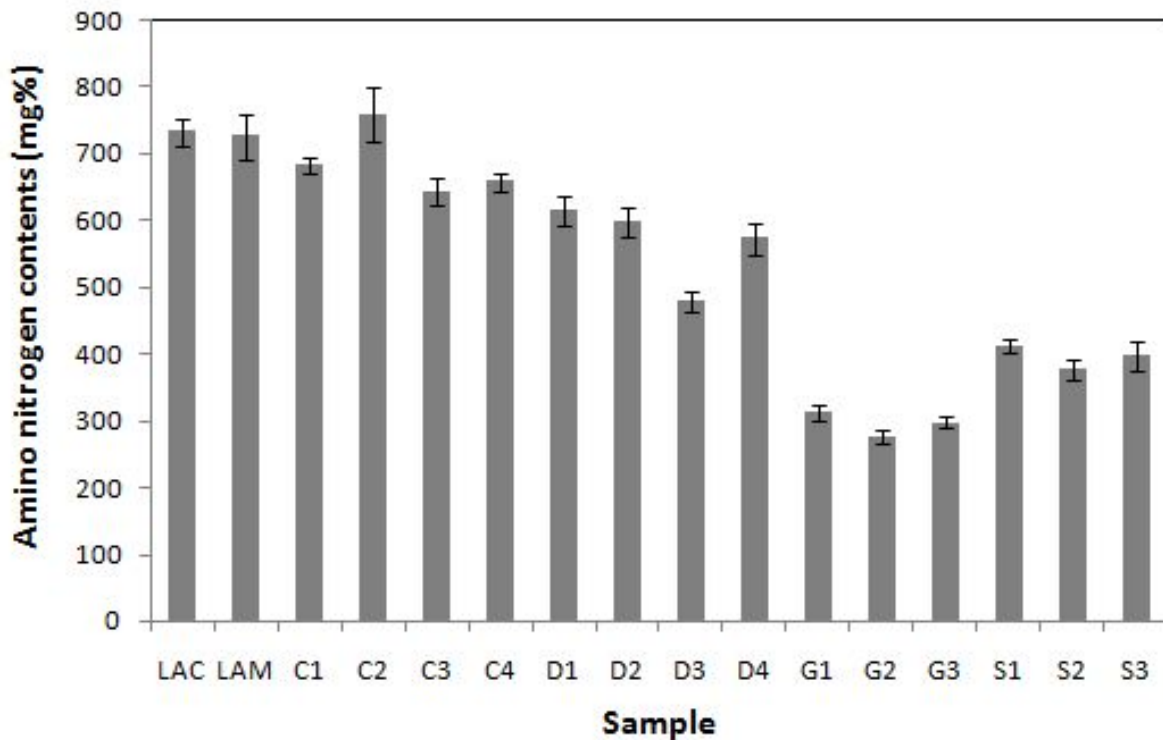


Fig. 3. 장류제품의 아미노태 질소 함량

※ LAC (Low allergenic *chungkukjng*) : 저알레르겐 청국장, LAM (Low allergenic *meju*) : 저알레르겐 된장, C1~C4 : 청국장 제품, D1~D4 : 된장 제품, G1~G3 : 고추장 제품, S1~S3 : 쌈장제품



다. 장류제품의 특이 IgE 항원성

대두를 이용한 시판 장류제품과 본 연구에서 확립된 최적 발효법으로 제조된 청국장과 된장의 항원성의 변화를 조사한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 혈청 내 대두에 대한 특이 IgE 수치가 30 kU<sub>A</sub>/L 이상을 보인 8명의 대두 민감성 환자 혈청을 이용하여 ELISA법으로 측정하였다. 환자 개인의 대두에 대한 민감성의 차이에 의해 IgE 수치의 차이가 있으나, 단백질 분해가 잘된 제품은 대체적으로 낮은 반응성을 나타내는 것으로 사료된다. 특히 본 연구에서 제조된 청국장과 된장의 반응성은 비교적 낮은 것으로 나타내었다.

알레르겐의 분해를 위해 효율적인 열처리 조건의 적용, 우수 품종의 대두 사용, 다단발효를 통한 분해효소의 다량 생산이 발효대두 제품의 알레르기 유발성을 현저히 감소시켜 줄 것으로 기대되며, 대두 특이 알레르겐 환자를 위한 식품소재 개발에 기여할 것으로 사료된다.

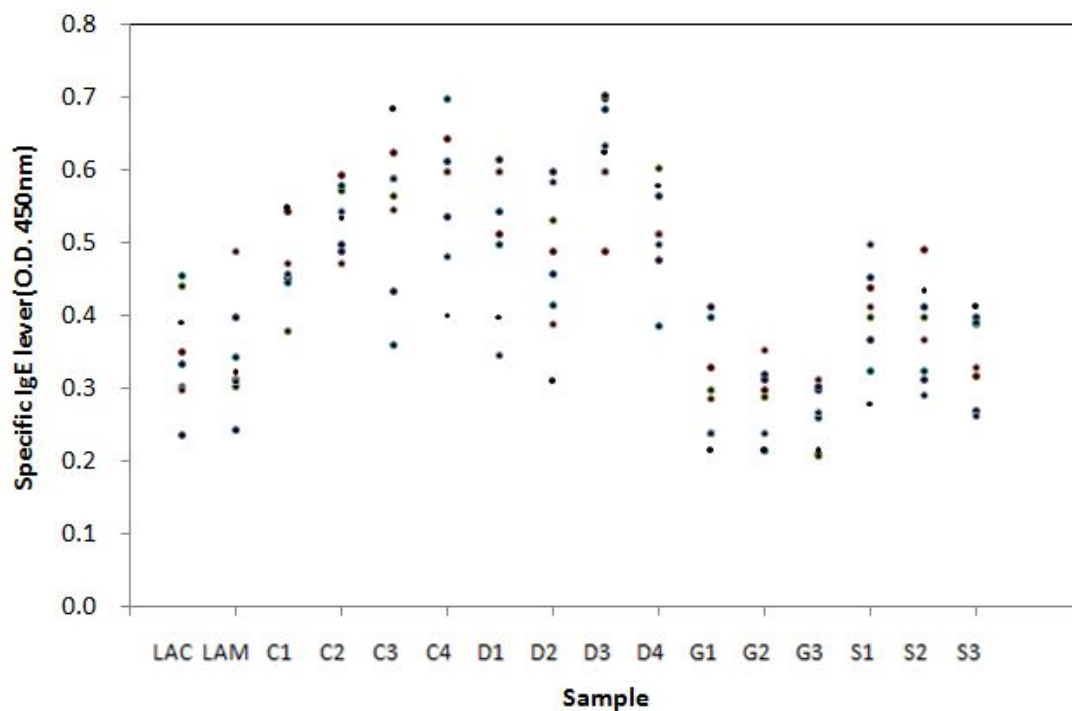


Fig. 4. 환자 혈청중의 IgE와 장류제품의 반응성

※ LAC (Low allergenic *chungkukjng*) : 저알레르겐 청국장, LAM (Low allergenic *meju*) : 저알레르겐 된장, C1~C4 : 청국장 제품, D1~D4 : 된장 제품, G1~G3 : 고추장 제품, S1~S3 : 찜장제품 *B. subtilis* 발효 (A), *B. subtilis* (natto) 발효 (B), *A. oryzae* 발효 (C), 2단 발효 (D).

## 라. 저알레르겐 발효대두의 시제품 생산

확립된 최적 발효법을 이용하여 대두 발효제품인 청국장과 된장을 제조하였다.

### (1) 저알레르겐 대두제품의 일반성분

본 연구에서 개발된 저알레르겐 대두 발효제품인 청국장과 된장의 일반성분을 비교한 결과 수분은 각각 52.6%, 60.3%로 나타났으며, 총질소함량은 17.23% 및 15.30%로 나타났다. 제품의 아미노태질소함량은 청국장은 732.32 mg%, 된장은 725.12 mg%로 두 제품 모두 비교적 높은 함량을 나타내었다. 아미노태질소는 protease의 작용에 의하여 생성된 아미노산의 함량을 나타내며, 청국장의 아미노태질소의 함량은 280 mg% 이상으로 규정되어 있고<sup>7)</sup>, 숙성온도와 사용 균주에 따라 차이가 있는 것으로 알려져 있다<sup>8)</sup>.

염도는 청국장 1.24%, 된장 17.8%로, 염수가 가해진 된장에서 높은 함량을 나타내었다. 총당과 환원당의 함량을 측정한 결과 청국장은 총당 26.61 mg/g, 환원당은 16.40 mg/g이었으며, 된장의 총당은 24.40 mg/g, 환원당은 20.50 mg/g으로 나타났다.

발효균주로 사용된 *Bacillus subtilis*는  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -amylase를 생성하여 청국장 발효 중 대두 중의 전분을 당으로 전환시키며, 생성된 당은 청국장의 단맛에 중요한 인자로 작용한다<sup>9)</sup>. 또한 *Bacillus* 속 균주가 생성하는 유당분해효소인  $\beta$ -galactosidase의 생산<sup>10)</sup> 및  $\alpha$ -galactosidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -mannosidase,  $\beta$ -mannosidase,  $\beta$ -N-acetyl-glucosaminidase,  $\beta$ -xylosidase,  $\gamma$ -glutamyl transferase 등 다양한 효소<sup>11)</sup>는 대두속에 존재하는 난분해성 다당류를 효율적으로 가수분해함으로써 청국장의 이취를 감소시키고 맛을 향상시키는 단맛의 첨가 등이 기대된다. 따라서 청국장 발효 중 생성된 당이 환원당 함량에도 영향을 끼칠 수 있을 것으로 사료된다.

Table 2. 저알레르겐 장류제품의 일반성분

	청국장	된장
수분 (%)	55.60	51.30
총질소 (%)	16.23	15.30
아미노태질소 (mg%)	523.32	725.12
염도 (%)	<1.00	17.80
총당 (mg/g)	26.61	24.40
환원당 (mg/g)	16.40	18.37

(2) 저알레르겐 대두제품의 제품화

확립된 최적 발효법을 이용하여 대두 발효제품인 된장제품의 판매를 위한 시제품 생산을 완료하였다.



Fig. 5. 저알레르겐 된장 시제품

된장제품의 대두 민감성 환자와의 반응성 조사, 세부기관에서 개발된 LTP 알레르겐 함량 측정 결과 알레르기 유발성이 현저히 낮은 것을 확인하였으며, 「알레르기 걱정없는 우리 된장」이라는 이름으로 제품 생산을 앞두고 있다.

## 6절 알레르겐 저감화 대두 발효 공정 확립

### 1. 서론

원인 물질이 함유된 식품을 섭취함으로써 인해 피부, 소화기, 구강, 장관, 전신 등의 증상이 나타나는 식품알레르기를 예방할 수 있는 최상의 대책은 알레르기 원인물질인 들어있는 식품의 섭취를 제한하는 것이다. 그러나 알레르기 발증 비율이 높은 영·유아 및 어린이에게 제한식을 장기간 실시하면 영양 공급 부족으로 인한 성장 장애, 체력 및 면역력 저하 등으로 인해 여러 가지 심각한 부작용이 우려 되므로 전문가의 진단을 받고나서 제한식을 해야 하고 식품업체가 제조한 제품에는 안전하게 식품을 선택할 수 있는 정보를 기재해야 한다. 본문에서 제시한 일본의 경우처럼 우리나라에도 알레르기 유발식품에 대한 표시제도가 있고 한국인에 주로 알레르기를 유발하는 것으로 밝혀진 식품은 난(가금알)류, 우유, 메밀, 땅콩, 대두, 밀, 고등어, 게, 돼지고기, 복숭아, 토마토 등 11개 품목이고 향후 품목이 계속적으로 늘어날 전망이다.

중요한 단백질공급원인 콩과 쌀이나 밀처럼 주식에 해당하는 곡류 식품의 섭취 제한은 심각한 영양적 불균형을 초래할 수 있어 더욱 조심해야 한다. 따라서 알레르기 유발 물질 즉 항원의 기능적 특성 규명과 이를 기초로 한 다양한 항원 저감화 수법이 시도되고 있다. 항원 저함 유 품종육성을 비롯하여 가열·가압 및 염수처리 등의 물리화학적 방법, 그리고 효소를 이용한 단백질 가수분해 등 여러 방법에 의한 항원성을 저감화시킨 식품의 제조기술이 개발되고 있다. 그러나 효소처리 및 화학 약품 처리 등의 방법이 알레르기 원인 단백질의 제거에 효과적이란 보고가 있지만 이 방법 자체가 인공적인 수단이라서 예측하지 못하는 다른 위험인자의 출현도 우려된다.

한국산 대두를 이용한 가공품 제조 공정 중의 알레르겐 함량 변화에 대한 연구는 아직 보고되어 있지 않다. 대두의 항원성 단백질(알레르겐)의 정량, 대두 알레르기 발증 비율 등에 대한 연구가 이루어져 있지만 공정 중 저 알레르겐 장류 제조를 위한 체계적인 원료 콩의 선발, 증자, 발효 공정에 관한 연구는 없었다. 본 연구에서는 저알레르겐 대두제품 생산을 위해 적합한 대두 품종을 선발하였고, 알레르겐을 효율적으로 분해하기 위한 열처리 조건을 확립하였다. 또한 다단발효법을 통해 난분해성 알레르겐을 분해하는 발효공학적 방법을 적용하였으며, 대두민감성 환자혈청과의 반응, 특히 알레르겐 재조합 항체를 이용한 반응으로 효율적인 항원성 감소를 확인하였다. 최종적으로 확립된 발효방법에 의해 제조된 대두 발효물을 다른 식품소재와 혼합하여 가공품을 제조하면 발효물 속에 잔존하는 효소의 작용에 의한 항원성 저감화 효과도 기대된다. 또 콩이나 장류의해 알레르기 증상이 나타나는 사람들은 저알레르겐 장류제품을 통

해 전통 장류의 좋은 맛과 향기 성분을 즐기는 동시에, 알레르기 증상도 완화되는 효과뿐만 아니라, 타 식품소재의 알레르기 유발증상 또한 완화시키는 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 발효 균주별 대두 발효물의 생산

#### (1) 사용균주

실험에 사용된 균주는 경상대학교 식품공학과 생물공학실험실에서 보관중인 단백질 분해능이 우수한 균주 *Bacillus subtilis* KFCC 11293을 사용하였고, *Bacillus subtilis* (natto) (Culture Systems, Inc., IN, USA), *Aspergillus oryzae*는 (주)충무발효화학에서 장류용 황국균을 구입하여 사용하였다.

#### (2) 대두의 발효

대두 표면의 오염물을 수돗물로 2~3회 세척하여 대두의 무게가 2.2배가 될 때까지 실온에서 수침하고 1시간이상 물빼기를 실시한 후 121℃에서 25분간 가압 증자하였으며 충분히 냉각한 대두에 황국균(*A. oryzae*)은 대두 1 g당  $10^6$  spore가 되도록 전분과 함께 접종하고 30℃에서 24시간 발효하여 황국균 단일 발효대두를 생산하였다. 또한 증자 및 냉각이 끝난 대두에 고초균(*B. subtilis*)을  $10^6$  CFU/g 으로 접종하고 42℃에서 24시간 발효하여 고초균 단일 발효대두를 생산하였다. 대두의 2단 발효는 황국균을 1 g당  $10^6$  spore가 되도록 전분과 함께 접종하고 대두의 표면에 균사가 덮일 때까지 30℃에서 24시간 발효한 후 고초균을 42℃에서 24시간 발효하여 2단 발효대두를 생산하였다.

### 나. 대두 발효물의 단백질 추출 및 정량

균주별 대두 발효물을 분쇄하고 시료 내 존재하는 지방성분을 제거하기 위하여 5배의

n-Hexan을 넣고 실온에서 1시간 동안 교반시키는 과정을 세 번 반복하였다. 이렇게 하여 얻은 분말은 30 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 M NaCl과 함께 1:10 (w/v) 비율로 섞은 후 실온에서 micro tube mixer MT-360 (Tomy Seiko Co., Ltd., Japan)를 이용하여 3시간 동안 단백성분을 용출시켰다. 이 용액을 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후, 상정액을 -20°C에서 보관하여 사용하였다. 추출된 단백질은 Bradford method<sup>1)</sup>에 근거한 Bio-Rad의 Protein Assay (BioRad Laboratories, USA)<sup>2)</sup>로 정량하였고, 표준물질로 BSA (bovine serum albumin)을 사용하였다.

#### 다. LTP 특이항체를 이용한 발효대두의 LTP 함량 측정

2차년도 연구에서 생산된 LTP 특이항체를 이용하여 대두의 특이 알레르기 유발성 단백질인 LTP의 함량변화를 ELISA 방법에 준하여 실시하였다. 발효시킨 대두의 단백질 추출물을 항원으로 사용하였고, 각각의 추출물을 96-well plate (NUNC, Denmark)에 최종 농도가 10 ug/mL 이 되도록 PBS (20 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4)로 희석하여 각 100  $\mu$ L씩 분주하고 4°C에서 하룻밤 coating하였다. 다음날 PBST (phosphate buffered saline containing 0.05% (v/v) tween 20)로 3회 세척하였으며, 비특이적 결합을 방지하기 위해 blocking buffer (10% fetal bovine serum-phosphate buffered saline)를 이용하여 1시간 blocking 한 후 다시 PBST로 3회 세척하였다. 여기에 PBS를 이용해 1:500으로 희석한 1차 LTP 항체를 100 uL씩 가하고 37°C에 2시간 반응시켰다. PBST로 3회 세척한 후, 2,000배로 희석시킨 Peroxidase labelled specific antibody도 37°C에 2시간 반응시켰다. PBST로 4회 세척한 후, TMB substrate solution (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, citrate-phosphate buffer 10 mL, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 uL)를 첨가하여 각 well에 100 uL씩 넣고 10분간 발색시켰다. 1 M phosphoric acid를 첨가하여 발색을 정지시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 라. 발효대두에 의한 식품 알레르겐 감소 측정

##### (1) 발효대두의 추출액 제조

최적 발효조건으로 발효가 완료된 대두로부터 추출액을 제조하였다. 발효된 대두는 증류수에 1:10(w/v)의 비율로 혼합한 후 실온에서 4시간동안 추출하여, 효소가 함유된 추출액을 제조하였다.

##### (2) 발효대두 추출물 중의 단백질 분해효소 활성 측정

단백질 protease 활성은 Park과 Oh<sup>3)</sup>의 방법으로 측정하였다. 기질로는 산성 protease (pH 3.0)는 lactic acid를, 중성 protease (pH 6.0)와 알칼리성 protease (pH 9.0)는 0.1 N NaOH를 첨가하여 제조한 2 % casein (Hummarstein, USA)기질 용액을 사용하였으며, buffer는 protease 종류에 따라 산성 protease와 중성 protease는 McIlvaine buffer (0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O + 0.1 M citric acid, pH 3.0, pH 6.0)를, 알칼리성 protease는 boric acid-borex buffer (pH 9.0)를 사용하였다. 각각의 buffer에 용해시킨 2% casein 용액 1.5 mL과 각 pH별 buffer 1.0 mL씩 시험관에 넣은 다음 효소액 0.5 mL을 넣고 40°C에서 60분간 반응시킨 후 0.4 M trichloroacetic acid (TCA)용액 3 mL을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 실온에서 10분간 방치한 다음 여과하여 얻은 여액 1 mL에 0.4 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 5 mL과 5배 희석한 Folin-ciocalteu 용액 1 mL을 첨가하여 40°C에서 30분간 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 60분간 tyrosine 1 ug을 생성하는 효소량을 1 unit로 하였다.

### (3) 식품원료에 대한 발효대두추출물 처리 효과

발효대두로부터 추출된 추출액의 단백질 분해효소 역가를 50 U/ml로 희석한 후 대표적인 알레르기 유발물질인 밀 추출액에 1:9의 비율로 혼합하였다. 처리 후 37°C에서 30시간동안 반응시키면서 시간에 따른 단백질 분해정도를 관찰하였다.

### (4) 식품원료 중의 단백질 변화

단백질 분해정도의 관찰은 SDS-PAGE를 통해 관찰하였다. SDS-PAGE에는 15%의 separating gel과 5%의 stacking gel을 사용하여, 150V에서 1시간 30분동안 전기영동하였다.

### (5) 환자 혈청

식품알레르기가 의심되어 서울삼성병원 아토피환경보건센터에 내원한 0~4세의 환자 중 clinical test 결과 밀 알레르기가 있는 것으로 추정되는 환자 15인의 혈청을 지원받아 실험에 사용하였다.

Table 1. 환자의 성별, 연령, total IgE 및 추정 원인식품

Patients	Sex	Age (yr)	Total IgE	Egg	Milk	Wheat	Buck-wheat	Soy-bean	Pea-nut	Dp.	Df.
1	F	1	462.00	3.81	1.66	2.44	4.53	2.69	4.58	0.43	0.47
2	M	0	1076.00	101.00	1.66	12.00	1.00	47.50	36.00	0.00	0.00
3	F	1	1301.00	101.00	101.00	1.25	0.83	12.80	12.70	0.00	0.00
4	M	0	537.00	71.50	4.89	37.90	0.45	35.30	1.80	0.38	0.00



5	F	4	3737.00	101.00	101.00	35.50	29.80	69.40	101.00	64.40	62.00
6	M	0	2118.00	101.00	4.86	24.99	8.26	101.00	36.60	0.47	1.41
7	M	3	359.00	101.00	1.24	3.85	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	F	0	1669.00	101.00	101.00	42.80	2.15	15.60	3.92	0.39	0.00
9	M	1	340.00	33.10	3.56	3.63	14.7	24.10	21.6	0.00	0.00
10	M	2	488.00	18.20	1.19	3.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
11	F	0	151.00	0.00	0.00	3.96	1.80	2.36	0.00	0.00	0.00
12	M	4	656.00	4.23	2.02	0.95	0.00	0.53	0.00	18.10	80.40
13	F	0	27.00	4.82	0.00	0.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
14	M	1	458.00	7.33	3.05	0.77	0.00	0.79	2.05	5.41	27.00
15	M	0	1717.00	92.5	23.3	4.21	0.55	2.13	2.48	0.00	0.00

#### (6) 발효대두 추출물 처리에 따른 밀의 반응성 측정

Immunoblotting은 Son 등의 방법<sup>4)</sup>에 준하여 실시하였다. SDS-PAGE 후 분리된 단백질은 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (Bio-Rad, USA)에 transfer buffer (tris base 11.5 g, Glycine 58 g, 10% SDS 20 ml, Methanol 400 ml, 1500 ml H<sub>2</sub>O)를 사용하여 100 volt 에서 60분 electrotransfer 하고 비특이적 결합을 방지하기 위해 5% Skim milk가 포함된 TBST (tris buffered saline, pH 7.5 containing 0.05%(v/v) tween 20) 용액으로 4°C에서 하룻밤 blocking 하였다. TBST 용액으로 3회 세척 후, 환자 혈청은 2.5% Skim milk가 포함된 TBST 로 1:100으로 희석하여 실온에서 2시간 반응시키고 TBST 용액으로 3회 세척 후, 1:1000으로 희석시킨 peroxidase-conjugated anti human IgE (Sigma, USA)와 실온에서 1시간 반응시켰다. TBST 용액으로 3회 세척 후, ECL(enhanced chemiluminescence, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 X-ray 필름(Eastman Kodak, Rochester, N.Y., USA)에 감광시켜 발색 반응을 관찰하였다.

#### (7) 발효대두 추출물 처리에 따른 밀의 IgA, IgE 반응성 측정

발효대두 추출물이 처리된 밀 알레르겐을 항원으로 사용하였고, 처리시간별로 채취된 시료를 96-well plate (NUNC, Denmark)에 최종 농도가 10 ug/mL이 되도록 PBS (20 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4)로 희석하여 각 100 uL씩 분주하고 4°C에서 하룻밤 coating하였다. 다음날 PBST (phosphate buffered saline containing 0.05% (v/v) tween 20)로 3회 세척하였으며, 비특이적 결합을 방지하기 위해 blocking buffer (10% fetal bovine serum-phosphate buffered saline)를 이용하여 1시간 blocking 한 후 다시 PBST로 3회 세척하였다. 여기에 PBS를 이용해 200배 희석한 환자혈청을 100 uL씩 가하고 37°C에 2시간

반응시켰다. PBST로 3회 세척한 후, 1,000배로 희석시킨 biotinylated mouse anti-human IgA (Zymed, San Francisco, CA, USA, diluted 1:10,000) 혹은 biotinylated goat anti-human IgE (Vector, Burlingame, CA, USA, diluted 1:1,000) 를 100 uL 가하여 37°C에 2시간 반응시켰다. PBST로 4회 세척한 후, 1 % FBS와 avidin peroxidase를 1:400으로 희석하여 40분 반응시켰다. 다시 PBST로 3회 세척한 후 ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline- 6-sulfonic acid), Sigma, USA) 와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 각 well에 100 uL 씩 넣고 10분간 발색시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다

마. 발효대두의 저장 안정성 검사

(1) 수분

발효대두 제품의 수분함량은 적외선 수분측정기(FD-600, Kett)로 40분간 측정하였다

(2) pH

발효대두의 시료 5g을 증류수 95 ml에 현탁시켜 pH meter (Orion model 420A; USA)로 측정하였다.

(3) 미생물수 측정

발효대두의 생균수 측정은 발효대두 1 g을 단계 희석한 후 TSA (Tryptic Soy Agar) 평판 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양시킨 후 나타난 colony를 계수하여 생균수를 측정하였다

### 3. 결과 - 저알레르겐 발효대두의 식품소제화 및 저장성

#### 가. 최적발효조건으로 제조된 대두 발효물 시제품의 LTP 반응성

2차년도에 생산된 LTP 특이항체를 이용한 대두 및 대두 이용 제품의 LTP를 검출하기 위하여 대두를 이용한 시판 장류제품과 본 연구에서 확립된 최적 발효법으로 제조된 청국장과 된장의 특이 알레르겐 LTP 반응성을 측정된 결과를 Fig.1에 나타내었다.

열처리나 소화효소에 의해 잘 분해되지 않는 난분해성 단백질이지만, 대두 발효물 시제품에서는 LTP level이 다른 시판제품에 비해 낮은 비율로 검출되는 것으로 확인하였다. 이는 다단 발효 과정 중 분비되는 단백질 분해 효소에 의해 알레르겐이 효율적으로 분해된 것이라 사료된다. 대두를 원료로 식품을 제조할 때 효율적인 발효방법을 적용함으로써 알레르기 반응으로 인한 문제를 줄일 수 있는 가능성을 제시한다.

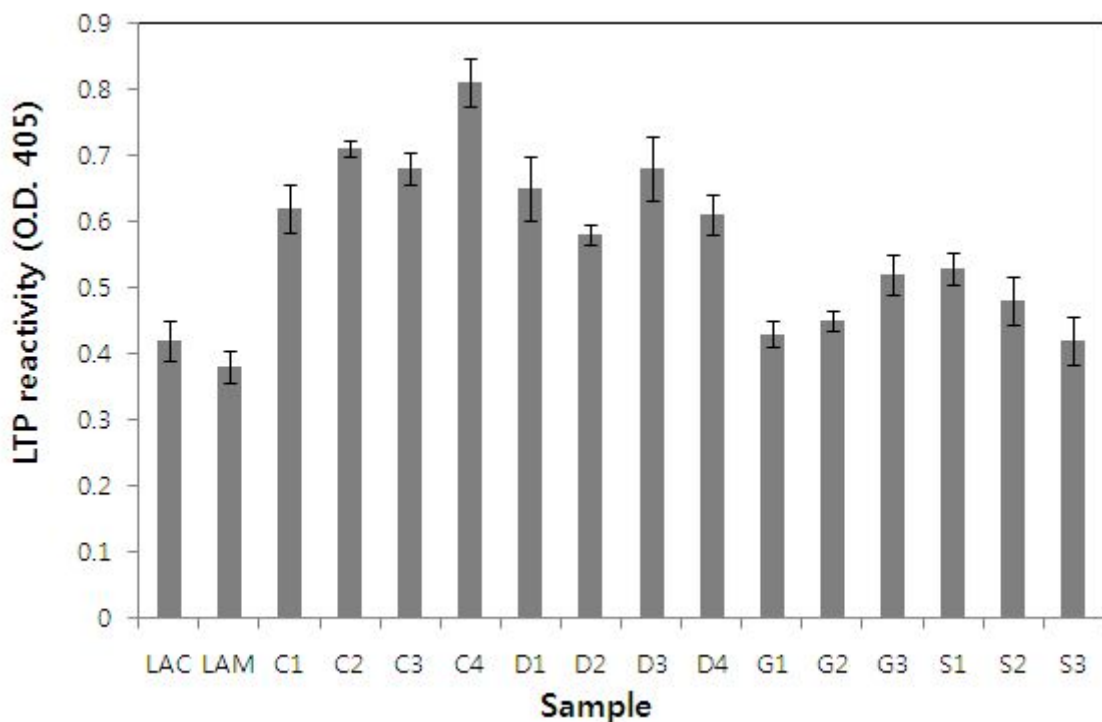


Fig. 1. 장류제품의 LTP 반응성

※ LAC (Low allergenic chungkukjng) : 저알레르겐 청국장, LAM (Low allergenic meju) : 저알레르겐 된장, C1~C4 : 청국장 제품, D1~D4 : 된장 제품, G1~G3 : 고추장 제품, S1~S3 : 쌈장제품

나. 대두발효에 따른 식품 알레르겐 감소 측정

(1) 발효대두의 단백질 분해효소 활성 측정

발효대두를 첨가하여 식품가공시 발효대두에 함유된 분해효소의 작용으로 인해 타 식품 속의 알레르겐의 분해에 영향을 미칠 수 있는지를 확인하기 위하여, 발효대두를 추출하여 대표적인 알레르기 유발식품인 밀에 처리하여 단백질의 분해정도를 확인하였다. 균일한 효소역가 상태로 발효대두 추출물을 반응시키기 위하여 발효대두 추출물의 단백질 분해효소 활성을 측정한 결과, 산성 protease는  $75 \pm 5$  U/g, 중성 protease는  $185 \pm 8$  U/g, 알칼리성 proteasesms  $242$  U/g이었다. 발효대두추출물을 50 U/g으로 희석하여 효소액으로 사용하였다.

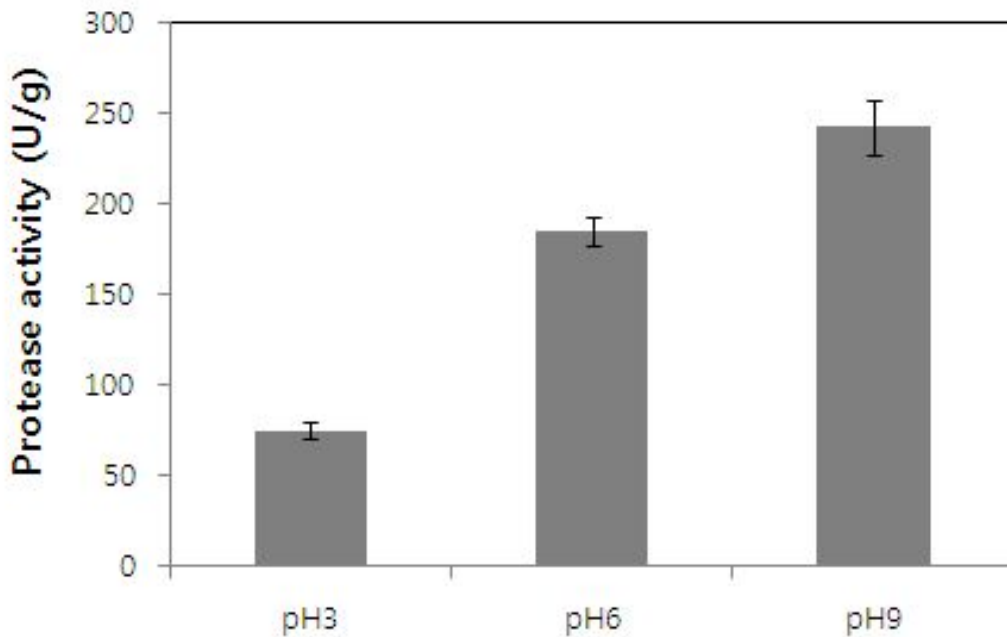


Fig. 2. 발효대두 추출물의 단백질 분해효소 역가

(2) 발효대두 추출물 처리에 따른 밀 알레르겐 분해도

발효대두를 추출물을 대표적인 알레르기 유발식품인 밀에 처리하여 처리시간에 따른 알레르겐의 분해도를 SDS-PAGE를 통해 확인하였다. 발효대두 추출물을 효소액으로 사용하여 밀 단백질과 반응시킨 결과, 처리시간이 경과함에 따라 단백질 밴드가 분해되어 30시간째에는 고분자 밴드가 현저히 감소됨을 확인할 수 있었다. 이 결과로 미루어 발효대두를 식품소재로 활용한 2차 가공식품을 제조할 경우 혼합할 주 원료에 함유된 단백질의 분해를 도와 항원성의 감소를 기대할 수 있을 것으로 추측된다.

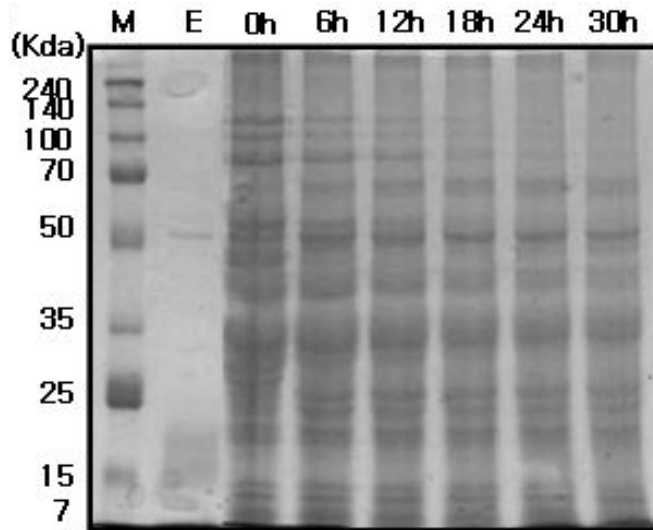


Fig. 3. 발효대두추출물을 처리한 밀단백질의 경시적 SDS-PAGE

(M : marker, E : 발효대두추출물, 0~30h: 반응시간)

(3) 발효대두추출물 처리 밀단백질과 알레르기 환자혈청과의 반응성

발효대두를 추출하여 대표적인 알레르기 유발식품인 밀 단백질에 추출물을 처리하여 처리시간에 따른 알레르기 환자혈청과의 반응성을 immunoblotting을 통해 확인하였다. 발효대두 추출물과 밀 단백질을 반응시킨 후 SDS-PAGE를 통해 단백질을 전개시키고, 밀 알레르기 환자혈청과 반응시켜 반응성을 확인한 결과, 처리시간이 경과함에 따라 밀단백질과 환자혈청과의 반응성이 감소하여 30시간째에는 반응하는 단백질 밴드가 현저히 감소하였다. 따라서 발효대두 추출물의 첨가로 알레르기 원인이 되는 밀 단백질이 효율적으로 분해됨을 확인하였다.

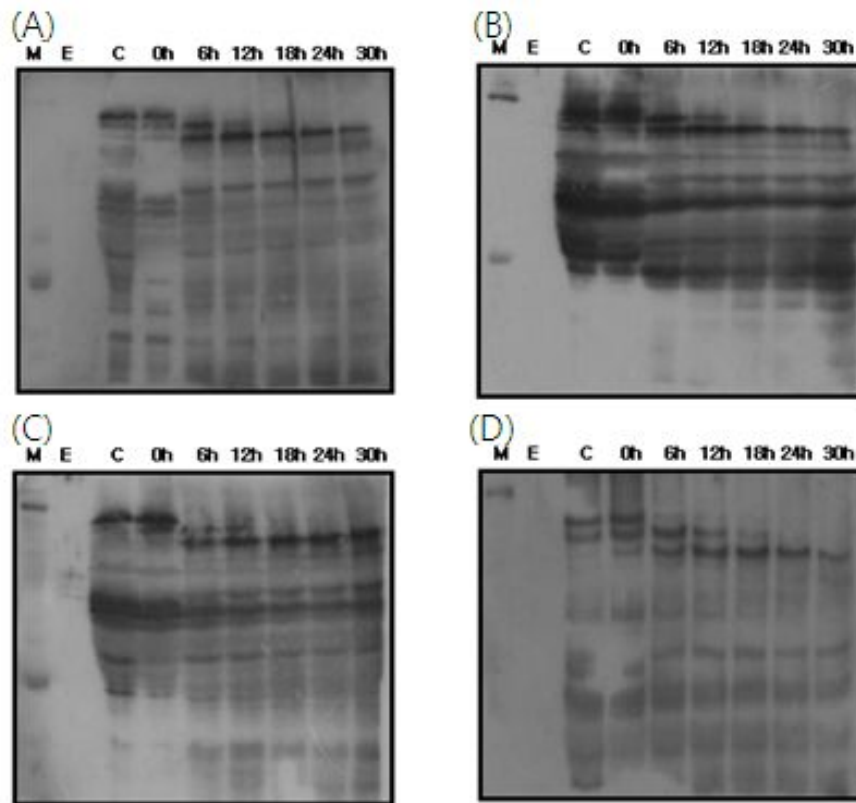


Fig. 4. 발효대두추출물을 처리한 밀과 밀알레르기 환자혈청의 immunoblotting 결과  
(A) 환자 5 혈청, (B) 환자 8 혈청, (C) 환자 12 혈청, (D) 환자 13 혈청

(4) 발효대두 추출물 처리에 따른 밀 알레르기 환자혈청과의 IgA, IgE 반응성

발효대두를 추출하여 대표적인 알레르기 유발식품인 밀 단백질에 추출물을 처리하여 처리시간에 따른 알레르겐과 환자혈청과의 IgA, IgE 반응성을 ELISA 법을 통해 확인하였다. 발효대두 추출물과 밀 단백질을 반응시킨 후 단백질을 96 well에 코팅시키고, 밀 알레르기 환자 15인의 혈청과 반응시켜 반응성을 확인한 결과, 처리시간이 경과함에 따라 밀단백질과 환자혈청과의 IgA, IgE 반응성이 감소하여 30시간째에는 반응성이 현저히 감소하였다. 따라서 발효대두 추출물의 처리가 알레르기 유발성 밀 단백질을 효율적으로 분해시키며, 발효대두의 사용은 저알레르겐 식품소재의 개발 가능성을 제시한다.

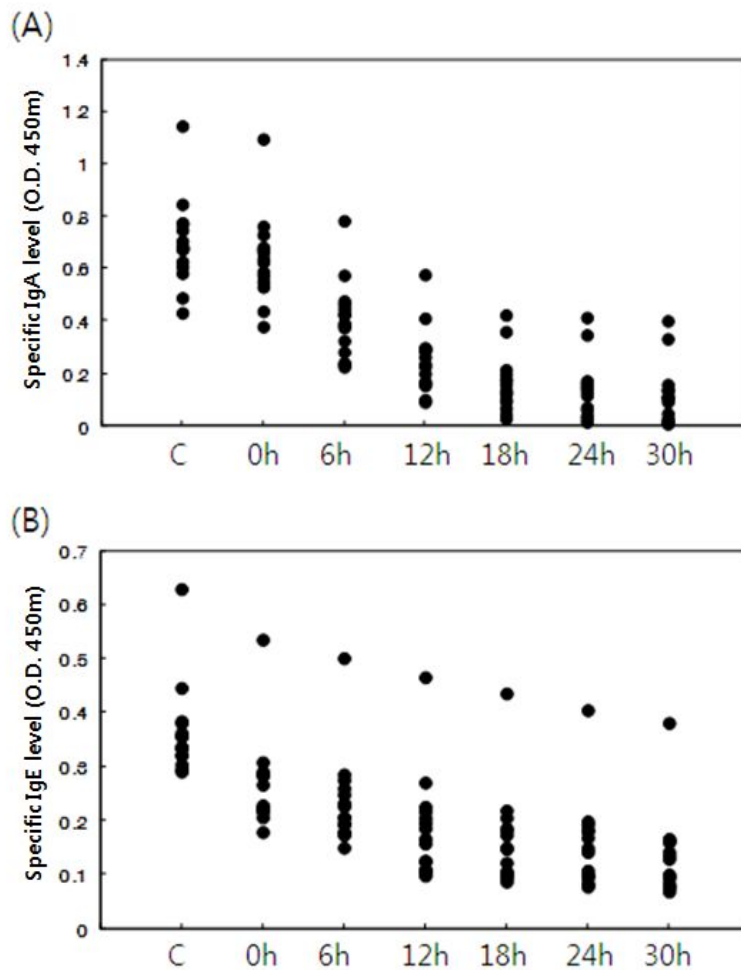


Fig. 5. 발효대두추출물을 처리한 밀알레르겐과 15인의 밀알레르기 환자혈청을 이용한 IgA(A) 와 IgE(B) 반응성

## 다. 발효대두의 저장 안정성 검사

최적발효법으로 제조된 발효대두의 저장성을 향상시키기 위하여 70℃에서 3일간 열풍건조시킨 콩알메주 형태의 발효물을 가공한 후 저장 온도와 저장기간에 따른 성분 변화를 조사하였다.

### (1) 발효대두의 저장 온도 및 저장 기간에 따른 수분 및 pH의 변화

발효대두의 안정성 확보를 위하여 발효대두의 저장 온도 및 저장 기간을 설정하기 위해 발효 완료 후 건조된 콩알메주를 각각 4℃, 실온, 37℃에서 보관하면서 2, 4, 6개월 후 제품의 수분 함량 및 pH 변화를 비교하여 Fig. 3 에 나타내었다. 초기 콩알메주의 수분함량은 27.5%였으며, 4℃에서 보관한 후 2개월째에 수분함량은 27.8%, 4개월에는 28.2%, 6개월째에는 29.5%%로 나타났다. 또한 실온에서 보관한 후 2개월째에 수분함량은 27.5%, 4개월에는 28.0%, 6개월째에는 28.4%%로 나타났으며, 37℃에서 보관하였을 때 2개월째에 수분함량은 28.0%, 4개월에는 28.5%, 6개월째에는 30.5%%로 나타나, 보관온도 및 저장기간이 경과하여도 콩알메주의 품질특성에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 보관 온도 및 기간에 따른 콩알메주의 pH는 Fig. 4 에 나타낸 바와 같이 pH 5.75~5.88 사이로 큰 변화가 나타나지 않았으나 37℃에서 6개월 보관 시 pH가 6.12로 약간의 변화만 확인되었다. 따라서 건조된 대두발효제품인 콩알메주는 실온에서 6개월 이상의 장기보관이 가능할 것으로 추정된다.



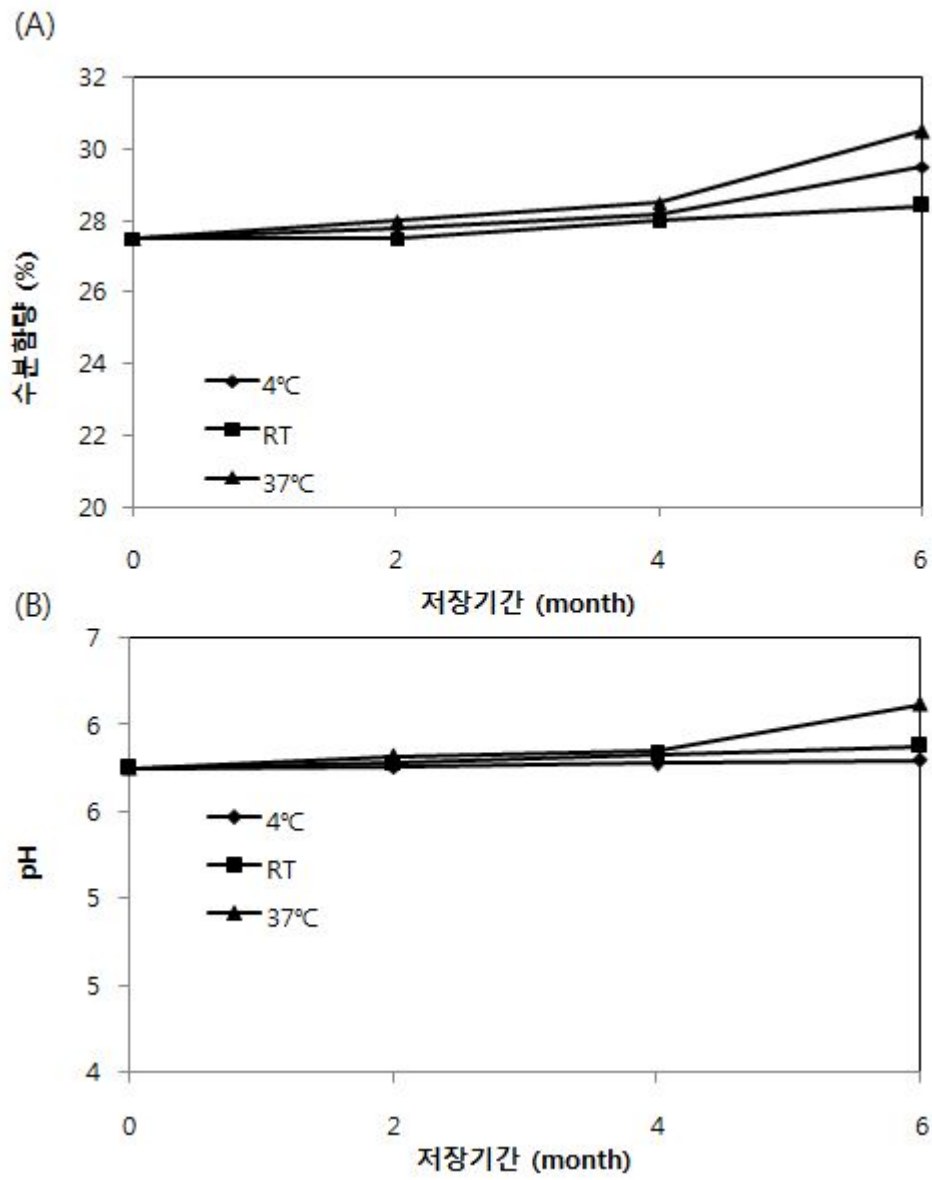


Fig. 6. 발효대두의 저장 온도 및 저장 기간에 따른 수분 및 pH의 변화

(2) 발효대두의 저장 온도 및 저장 기간에 따른 미생물수의 변화

발효대두의 안정성 확보를 위하여 발효대두의 저장 온도 및 저장 기간을 설정하기 위해 발효 완료후 건조품인 콩알메주를 각각 4℃, 실온, 37℃에서 보관하면서 2, 4, 6개월 후 제품의 생균수의 변화를 확인하여 Fig. 7 에 나타내었다. 초기 콩알메주의 생균수는  $1.7 \times 10^9$  CFU/g으로 나타났으며 4℃에서 보관한 후 2개월째는  $1.82 \times 10^9$  CFU/g, 4개월에는  $1.90 \times 10^9$  CFU/g, 6개월째에는  $1.97 \times 10^9$  CFU/g로 나타났다. 또한 실온에서 보관한 후 2개월째는  $1.85 \times 10^9$  CFU/g, 4개월에는  $1.95 \times 10^9$  CFU/g, 6개월째에는  $2.05 \times 10^9$  CFU/g로 나타났으며, 37℃에서 보관하였을 때 2개월째는  $1.94 \times 10^9$  CFU/g, 4개월에는  $2.10 \times 10^9$  CFU/g, 6개월째에는  $2.85 \times 10^9$  CFU/g로 나타나, 보관온도 및 저장기간이 경과하여도 콩알메주의 생균수에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 따라서 건조된 대두발효제품인 콩알메주는 실온에서 6개월 이상의 장기보관이 가능할 것이다.

초기 생균수는 대두 발효제품의 유통·보관 중 과발효의 진행 및 부패를 유발하는 주요 원인이며 바이오제닉 아민의 생성에도 큰 영향을 미치므로, 초기 생균수 및 제어는 품질 향상을 위한 중요한 인자가 될 것으로 추정된다.

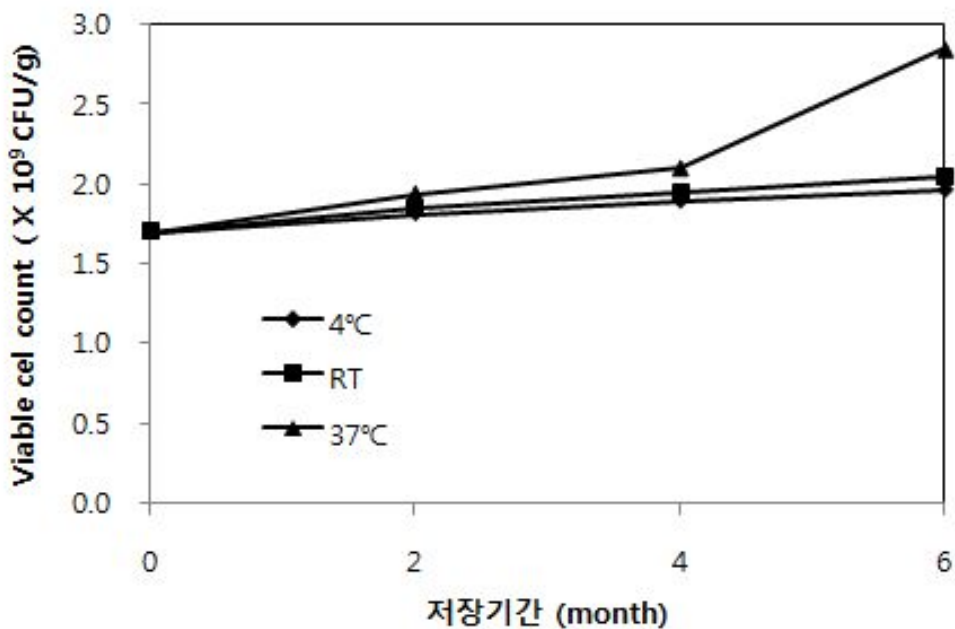


Fig. 7. 발효대두의 저장 온도 및 저장 기간에 따른 미생물수의 변화

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1절 목표달성도

구분	연도	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	달성도
1차 년도	2011	○ 장류용 대두의 품종별 알레르겐 검색	- 장류용 대두 품종의 수집 - 대두의 항원성 및 주요 알레르겐 검색을 위한 대두 민감성 환자 혈청의 확보	- 장류발효를 위한 대두 7품종 확보 - 대두 민감성 환자 혈청 4종 확보
		○ 알레르겐 저감화를 위한 대두 가공 조건 확립	- 대두와 물의 비율과 삶는 시간에 따른 대두 단백질의 항원성 변화 - 증자 온도와 시간에 따른 항원성 변화	- 증자 및 자숙 조건 및 시간에 따른 항원성 확인
		○ 자숙(삶기) 또는 증자 시료 채취 및 성분분석	- 총아미노산, 아미노태질소, 암모니아태질소, 질소용해율, 유리 아미노산 함량 측정	- 증자 및 자숙 조건에 따른 성분분석 완료
2차 년도	2012	○ 대두 주요 알레르겐의 재조합 단백질 생산	- 대두 주요 알레르겐 유전자 클로닝 후 서열 확인 - 대장균을 이용한 재조합 단백질 발현 조건 탐색 - 재조합된 단백질의 대량 생산	- 주요 알레르겐 LTP 클로닝 - 재조합 단백질 발현 및 생산
		○ 재조합 단백질을 이용한 항원성 단백질의 특이 항체 생산	- polyclonal 항체의 제조 및 역가 확인	- LTP 특이항체 제조
		○ 최적 증자 조건하에서 발효 균주를 달리한 장류 제조	- 황국균, 고초균, 낫토균을 이용한 발효 대두 제조 - 황국균+ 고초균을 이용한 다단 발효 대두 제조	- 황국균+ 고초균 다단발효의 발효조건 확립
3차 년도	2013	○ 저 알레르겐 장류 제조를 위한 발효법의 확립 및 시제품 제조	- 발효 균주별 대두 발효물의 알레르겐 함량 측정 - 확립된 공정으로 발효시킨 장류의 항원성 조사 - 저 알레르겐 장류 시제품 개발	- 다단발효조건으로 발효된 대두 발효제품 개발 및 항원성 조사 완료
		○ 시판 청국장 항원성 평가	- 시판 청국장의 수집 - 시판 장류의 알레르겐 함량 측정 및 저 알레르겐화 발효 대두와의 비교	- 시판 대두 발효제품 수집 및 항원성 비교
		○ 저 알레르겐 대두 발효물의 식품 소재화 시험	- 건조품의 저장 안정성(4℃, 25℃) - 된장, 청국장 제조 특성 조사	- 대두 발효물의 저장 안정성(4℃, RT, 37℃) 확인 - 대두 발효 시제품의 환자반응성 및 LTP 함량 측정

## 2절 관련분야에의 기여도

### 1. 기술적 측면

- 발효 조건을 달리하여 효율적으로 항원성 단백질 분해기술 개발
- 저 알레르겐 기능성 장류 제조를 위한 발효 공정의 확립
- 저 알레르겐 대두식품 제조를 위한 대두 발효 가공 및 발효 조건개선에 기여
- 식품의 알레르겐 함량 측정 방법 개발 확립
- 조직적이고 다 학문간 협력 연구를 수행함으로써 효율적 성과가 기대됨
- 대두 민감성 환자뿐만 아니라 대두 알레르기 유발의 사전방지를 위해 모든 소비자를 대상으로 한 저알레르기성 대두 발효제품의 생산 가능

### 2. 경제적 · 산업적 측면

- 우리 농산물을 이용한 식품 관련 산업의 활성화
- 저 알레르겐 대두 발효물을 이용한 식품 제조로 대두 발효 식품의 이미지 상승
- 알레르기 치료 및 예방을 도모함으로써 국민 보건 및 국민 건강을 향상 시킬 수 있으며, 의료비 절감 등의 효과를 기대할 수 있음
- 식품 중의 알레르기성 평가 확인이 용이
- 대두 발효를 이용한 식품 가공 산업의 매출증대
- 저 알레르겐 식품의 제조 시 국내외 시장 경쟁력 상승
- 기존에 없던 저알레르기성 대두발효제품 시장을 개척함으로써 기존 년매출액 4,000 백만원인 본 회사의 매출이 2배 이상 증가될 것으로 예상됨

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 연구개발 성과

#### 1. 학술발표

- 가. 2011.11.7 Americal College of Allergy, Asthma & Immunology 국제학회 Boston, Massachusetts, USA, Effect of roasting and fermentation on soybean allergenicity, (발표자 : H.G. Seol, Y. Ko, C.H. Ryu) 포스터 발표
- 나. 2011.11.7 생명과학회, Reduction of Allergenic Protein in Soybean by Thermal Treatment (발표자 : Hui Gyeong Seol, Yu Jin Go, Jeong Suk Jo, Do Gyeong Kim, Chung Ho Ryu) 포스터 발표
- 다. 2012.06.27 한국미생물생명공학회, Change of Allergenicity by Thermal Processing according to Soybean Cultivars (발표자 : Hui-gyeong Seol, Eun-jung Kim, Yu-jin Ko, Eun-ja Kim, Do-gyeong Kim, Byong-won Lee, Hyun-tae Kim, Jong-il Chung and Chung-ho Ryu) 포스터 발표
- 라. 류충호, 이정록, 손대열. 2012. 3단계 발효에 의한 콩 알레르기성의 저하. 한국식품영양과학회지 41(8) 1066-1071
- 마.. 설희경, 고유진, 김은정, 이경란, 김도경, 이정옥, 안강모. 2012. 열처리 방법에 따른 품종별 콩단백질의 항원성 변화. 생명과학회지. 22(4) 524-531
- 바. 2013. 7. 3, 한국미생물생명공학회, Attenuation of Allergen in Soybean Cultivars according to Fermentation Method (발표자 : Gyeong-ran Lee, Yu-jin Ko, Eun-ja Kim, Chung-ho Ryu) 포스터 발표
- 사. 2013. 10. 17, 한국생명과학회, Decrease of Allergen in Soybean according to Fermentation Method (발표자 : Gyeong-ran Lee, Eun-ja Kim, Chung-ho Ryu) 포스터 발표

아. Yu-jin Ko, Jin-woo Jeong, Yung-hyun Choi, Chung-ho Ryu. 2013. Soy soluble polysaccharide induces apoptosis in HCT-116 human colon cancer cells via reactive oxygen species generation. *Mol. Med. Reports* 8 1767-1772

## 2. 인력양성 및 활용결과

가. 설희경, 2012. Change of Allergenicity by Thermal Processing according to Soybean Cultivars, 경상대학교 석사학위논문

나. 이경란, 2013. 발효 방법에 따른 품종별 대두의 알레르겐 감화, 경상대학교 석사학위논문

다. 고유진, 2014. 8 Anti-inflammatory and anti-cancer properties of soy sauce polysaccharide. 경상대학교 대학원 박사학위논문

## 3. 기술컨설팅

가. 계약일 : 2014.09.01 업체 : 양지푸드 (공동연구기관)

내용 : 저알레르겐 된장 제조기술 이전

나. 계약일 : 2014.09.01 업체 : 양지푸드 (공동연구기관)

내용 : 저알레르겐 청국장 제조기술 이전

다. 향후 계획

- 저알레르겐 대두 발효기술 상용화 (2015년 이후)
- 청국장 제조업체에 저알레르겐 대두 발효기술을 보급하여 기술 상용화
- 본 보급과제 기술을 상용화하여 전통장류의 고급화를 통한 제품의 안정화, 안전성, 기능성의 대두발효제품을 생산. 보급하여 국민보건향상 증진.

## 4. 언론홍보





바. 알레르기 없는 된장·간장 개발 (경남신문, 2014.09.06.)

경남신문 > 경제

**알레르기 없는 된장·간장 개발**

기사입력 : 2014-09-06

경상대학교 생물공학연구소 류중호(농업생명과학대학 식품공학과) 교수 연구팀은 알레르기 없는 간장 된장 제품을 개발했다고 6일 밝혔다.

류 교수에 따르면 이 제품은 부산권 항균균·고초균의 3가지 미생물을 차례로 접종하는 발효 공정에 미생물이 생산하는 천연효소가 알레르기 유발하는 단백질을 분해시킨 제품이다.

이 연구팀의 연구결과는 국내외 6개 학술지에 발표했으며 '속성 단계 발효법으로 제조된 효물 및 이의 제조방법'을 특허등록했다.

사. 알레르기 걱정 없는 간장·된장 개발 (경남도민일보, 2014.09.02.)

domin.com

HOME > 경제 > 연구

**알레르기 걱정 없는 간장·된장 개발**

경상대학교 생물공학연구소 류중호(농업생명과학대학 식품공학과) 교수 연구팀은 알레르기 걱정 없는 간장·된장 제품을 개발했다고 밝혔다.

류중호 교수에 따르면, 이 제품은 부산권 항균균·고초균의 3가지 미생물을 차례로 접종하는 발효공정을 거쳐 미생물이 생산하는 천연효소가 알레르기 유발하는 단백질을 분해한 제품이다.

알레르기성 질환을 앓는 환자나 민감성 체질의 어린이도 안심하고 먹을 수 있는 장 제품이다. 이 연구팀의 연구결과는 국내외 6개 학술지에 발표되었으며 '속성 단계 발효법으로 제조된 효물 및 이의 제조방법'을 특허등록했다.

류중호 교수는 구조장장 생산업체인 양지푸드(주)대표 김도권(2011년 8월부터 10월 8일까지 3년간 연구 끝에 이 제품을 개발하게 됐다)고 설명했다. 제품이 실제 시판되는 것은 내년 가을쯤으로 예상하고 있다.

아. 알레르기 걱정 없는 간장·된장 개발 (경남일보, 2014.09.02.)

**경남일보**

**알레르기 걱정 없는 간장·된장 개발**

경상대학교 생물공학연구소 류중호(농업생명과학대학 식품공학과) 교수 연구팀은 알레르기 걱정 없는 간장·된장 제품을 개발했다고 6일 밝혔다.

류중호 교수에 따르면 이 제품은 부산권 항균균·고초균의 3가지 미생물을 차례로 접종하는 발효공정을 거쳐 미생물이 생산하는 천연효소가 알레르기 유발하는 단백질을 분해한 제품이다.

알레르기성 질환을 앓는 환자나 민감성 체질의 어린이도 안심하고 먹을 수 있는 장 제품이다. 이 연구팀의 연구결과는 국내외 6개 학술지에 발표되었으며 '속성 단계 발효법으로 제조된 효물 및 이의 제조방법'을 특허등록했다.

류중호 교수는 구조장장 생산업체인 양지푸드(주)대표 김도권(2011년 8월부터 10월 8일까지 3년간 연구 끝에 이 제품을 개발하게 됐다)고 설명했다. 제품이 실제 시판되는 것은 내년 가을쯤으로 예상하고 있다.



자. 알레르기 없는 간장·된장 개발 (동양일보, 2014.09.02.)

**동양일보**

**알레르기 없는 간장·된장 개발**

류중호 교수, 다산에 발표된 논문

경상대학교 생물공학연구소 류중호(농업생명과학대학 식품공학과) 교수 연구팀은 알레르기 걱정 없는 간장·된장 제품을 개발했다고 6일 밝혔다.

이 제품은 부산권 항균균·고초균 등 3가지 미생물을 차례로 접종하는 발효공정을 거쳐 미생물이 생산하는 천연효소가 알레르기 유발하는 단백질을 분해한 제품이다. 류 교수는 설명했다.

알레르기성 질환을 앓는 환자나 민감성 체질의 어린이도 안심하고 먹을 수 있는 것이다.

류 교수는 '속성 단계 발효법으로 제조된 효물 발효 및 제조방법'이란 제목으로 특허등록했다.

연구팀은 농림수산식품부로부터 3천여만원의 연구비를 지원받아 구조장장 생산업체인 양지 푸드(주)와 공동으로 제품을 개발해 시판할 계획이다.

이 업체는 제품을 내년 가을쯤 시판할 계획이다.

류 교수는 "발효기법을 통해 천연 항균균·고초균의 효능을 극대화하고 알레르기성 제품을 생산하는 데 기여할 수 있는 기술 개발에 나서겠다"고 말했다.

차. 경상대 교수, 알레르기 없는 간장·된장 개발 (연합뉴스, 2014.09.01.)



경상대 교수, 알레르기 없는 건강원장 개발

news | 기사입력 2014-09-01 14:48

(민주·연방뉴스) 지성호 기자 - 경남 진주 경상대학교(GNU) 생물공학연구소 유종호(농업생명과학대학 식품공학과) 교수 연구팀은 알레르기 걱정 없는 건강과 원장 제품을 개발했다고 1일 밝혔다.

이 제품은 유산균 발효균 고추균 등 3가지 미생물을 차례로 접종하는 발효기법을 적용, 천연효소가 알레르기 유발하는 단백질을 분해한다고 유 교수는 설명했다.

알레르기성 질환을 일으키는 환자나 민감성 식품의 섭취에도 안심하고 먹을 수 있다는 것이다.

유 교수는 "숙성 단계에 발효법으로 제조된 콩 발효물 및 제조방법"이란 제목으로 특허 등록했다.

연구팀은 농림수산식품부로부터 3천여원의 연구비를 지원받아 고추장 원장 생산업체와 지난 3년간 공동연구 끝에 제품 개발에 성공했다.

이 제품은 제품을 내년 9월경에 시판할 계획이다.

알레르기 관련 제품의 시장 규모는 연간 2천억 원으로 집계는 예상하고 있다.

유 교수는 "현재 전체 유아의 18%가량이 콩 알레르기를 갖고 있지만 이와 관련한 연구나 제품은 거의 없다"라며 "발효기법을 통해 한국 전통 콩발효 식품의 안전성을 추적하고 콩 알레르기성 질환을 가진 유아나 환자를 위한 식품 개발에 나서겠다"고 말했다.

○ 「알레르기 걱정없는 우리 된장」 제품 생산 및 판매 예정 (2015)



5. 상품화

## 제 2 절 연구 성과의 활용계획

- 발효 조건을 달리하여 효율적으로 항원성 단백질 분해기술 개발
- 저 알레르겐 기능성 장류 제조를 위한 발효 공정의 확립
- 저 알레르겐 대두식품 제조를 위한 대두 발효 가공 및 발효 조건개선에 기여
- 식품의 알레르겐 함량 측정 방법 개발 확립
- 조직적이고 다 학문간 협력 연구를 수행함으로써 효율적 성과가 기대됨
- 대두 민감성 환자 뿐만 아니라 대두 알레르기 유발의 사전방지를 위해 모든 소비자를 대상으로 한 저알레르기성 대두 발효제품의 생산 가능
- 우리 농산물을 이용한 식품 관련 산업의 활성화
- 저 알레르겐 대두 발효물을 이용한 식품 제조로 대두 발효 식품의 이미지 상승
- 알레르기 치료 및 예방을 도모함으로써 국민 보건 및 국민 건강을 향상 시킬 수 있으며, 의료비 절감 등의 효과를 기대할 수 있음
- 식품전반의 알레르기성 평가 확인이 용이
- 대두 발효를 이용한 식품 가공 산업의 매출증대
- 저 알레르겐 식품의 제조 시 국내외적으로 시장 경쟁력이 우수
- 기존에 없던 저알레르기성 대두발효제품 시장을 개척함으로써 기존 년매출액 4,000 백만원 인 본 회사의 매출이 2배 이상 증가될 것이라 예상

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1절 식품 알레르겐

- 많은 식품 알레르겐의 1차 구조가 결정되었으며 국제면역학회연합(IUIS)은 식품 알레르겐의 권장명을 제시하였다. 중요 식품 알레르겐을 표 1에 나타내었다. 그 중에서도 계란, 우유, 대두 등 일반적으로 흔하게 나타나는 알레르겐을 다음에 서술하였다.

Table 1. 중요 식품 알레르겐

Food allergen	Allergen name*	Mass (kDa)
Chicken egg	<i>Gal d 1</i> (ovalbumin)	45
	<i>Gal d 2</i> (ovomucoid)	28
Cow's milk	$\alpha_{s1}$ -casein	23
	$\beta$ -lactoglobulin	18.4
Soybean	<i>Gly m 1A</i> , <i>Gly m 1B</i>	8
	<i>Gly m Bd</i> (7S globulin)	30
Peanut	<i>Ara h 1</i>	63.5
	<i>Ara h 2</i>	17.5
Brazil nut	<i>Ber e 1</i> (2S albumin)	16 - 16.4
Yellow mustard	<i>Sin a 1</i> (2S albumin)	15
Oriental mustard	<i>Bra j 1</i> (2S albumin)	16
Codfish	<i>Gad c 1</i>	13
Shrimp	<i>Pen a 1</i> (tropomyosin)	36
	<i>Met e 1</i> (tropomyosin)	34
	<i>Par f 1</i>	39
Apple	<i>Mal d 1</i>	17.7

\*According to the recommendations of the IUSI Subcommittee for Allergen Nomenclature.

출처 : Kaminogawa, S., Hachimura, S., Nakajima-Adachi, H., and Totsuka, M. Food allergens and mucosal immune systems with specific reference to recognition of food allergens by gut-associated lymphoid tissue. *Allergology Int'l.* 48: 15-23 (1999)

- 대두에 의한 알레르기는 계란이나 우유와 함께 많이 발견된다. 대두는 한국인의 식생활에서 중요한 역할을 하고 있다. 즉, 된장, 간장, 두부 등 전통가공식품은 우리 식생활에서 없어서 안 될 중요한 식품이다. 대두는 영양적으로 단백질이 풍부한 식품인데, 식품 알레르기의 원인이 되는 대두 단백질은 대두종자 자엽조직중의 저장단백질이다. 대두 단백질은 원심분리법에 의하여 분리되며, 침강계수 (S)의 크기에 따라 2S-, 7S-, 11S-globulin으로 분류된다. 대두 알레르기 환자 혈청중의 IgE와 강하게 결합하는 성분은 대부분이 7S-globulin 획분에 존재한다. 더욱이 그중에서도 *Gly m Bd 30K*, *Gly m Bd 28K*,  $\alpha$ -subunit 획분에 대두 알레르기 환자의 IgE와 높은 결합성이 인정된다. 대두 알레르겐으로서 흥미로운 것은 대두 외피중의 성분이다.
- 스페인의 바르셀로나에서 천식이 유행한 적이 있는데, 항구에서 대두의 하역시 비산한 대두성분이 그 원인이 밝혀졌다. 그 알레르겐이 동정되어 *Gly m 1A*, *Gly m IB*로 명명되었다. 그러나, 이들 알레르겐은 식품 알레르기 환자의 경우 알레르겐이 아니었다. 코나 입으로 흡입한 경우에만 알레르겐으로 작용한다.

## 2절 알레르겐 저감화 제품 개발

- 알레르기항원 제거식품(레저식품)으로는 영양 개선법에 근거해 알레르기항원 제거식품의 표시 허가 예로는 계란, 우유를 제거한 「일본 햄」 시리즈, 계란, 우유, 대두를 제거시킨 「모리나가 제과의 아비농」 시리즈(비스킷 등) 등이 있다. 한편 인가를 받지 못한 것으로써 항원 제거식품과 유사한 명칭으로 시판되는 것도 있어 금후 정비가 요망되고 있다.
- 음식물의 알레르기항원 저감화 시 고려사항으로 알레르기항원이 식품가공에 중요한 역할을 하는 단백질인 경우, 그 제거나 분해에 의해 제조된 저 알레르기항원 식품의 가공 특성은 원재료에 비해 저하된다는 점을 고려해야 한다. 예로 계란의 주요한 알레르기항원인 OVA과

ovomucoid 제거 시 계란의 가열 응고성·기포성 등의 중요한 가공 특성이 현저히 저하된다. 밀 알레르기항원인 gluten을 효소처리 하여 저 알레르기항원 밀가루를 만들면 밀 가공제품의 제조에 불가결한 gluten의 가공특성은 소실된다.

- 저 알레르기항원 함유 식품으로 우유단백질을 가수분해한 저 알레르기항원 우유를 비롯하여 쌀을 염수에 침지, 가압하여 쌀의 주요 알레르기항원인 16k 글로부린 등을 제거한 저 알레르기항원 쌀이 제작되었다. 염수(鹽水) 세정(洗淨)에 의한 알부민/글로부린 등의 염용해성 단백질을 제거하는 밀의 저 알레르기 항원화가 시도되고 있다. 가열·세정을 조합한 처리로서 ovomucoid의 제거가 가능한 것으로 알려지고 있다.
- 알레르기항원 저함유 품종으로 대두의 주요 알레르기항원으로 함유량이 가장 많은 Gly m Bd 60K와 함께 Gly m Bd 28K가 걸여된 변이주 「도후쿠 124호」가 개발되었다. 300종의 밀 품종에 대한 밀 알레르기 환자혈청 IgE와 반응성 평가에서 몇 개의 유망한 품종이 발견되었다.
- 신생아나 영아기에 식품 알레르기의 발생빈도가 높은 이유는 소화기의 면역계의 발달 미숙으로 인하여 항원성을 지닌 분자량이 큰 단백질이 장점막을 비교적 잘 투과하기 때문이다. 그리하여 이러한 항원성을 가진 단백질에 의해 특이항체가 형성되므로 인해 피부, 호흡기, 소화기계통의 알레르기 질환이 나타나게 된다. 이와 같은 이유는 이들 단백질의 장점막투과성을 억제시키는 분비 항체(SIgA)가 부족하고 이들 단백질로 인해 신체내 특이항체(specific IgE)의 생성을 억제시키는 기능이 미숙하기 때문이다. 따라서 이러한 문제점 때문에 저 알레르기 분유가 많이 개발되고 있으며 다음 표에서 회사별로 개발된 저 알레르기 분유 및 우유 알레르기를 회피하기 위하여 대두를 이용하여 제조된 분유에 관하여 나타내었다.

Table 2. 저알레르기 분유제품

회사	분해정도	분유명	특징	용도
매일	완전 가수분해	Babywell HA : 구 HA	엔과밀 LactoFree보다 한단계 업그레이드된 신제품. 쌀, 바나나 등 소화가 잘되는 탄수화물이 에너지원인 분유. 대개 1~2주 이내에 일시적인 이용은 가능하나 장기간 먹이기에는 영양면에서 부적당함.	우유알레르기, 대두 단백질 알레르기, 유당 불내성, 흡수 장애 증후군, 만성 설사, 성장장애, 구토, 우유 뿐 아니
씨밀락	완전 가수분해	엘리멘텀 어드밴스	0~12개월 된 유아들을 위해 바로 먹일수 있도록 개발한 단백질 가수분해 특수제주 분유	

엔과밀	완전 가수분해	엘리멘텀	카제이나트륨이 주원료인 단백질 가수분해 특수조제분유. 모유를 먹일 수 없는 경우에 사용하며, 사용 전 반드시 소아과 전문의와 상의해야 함. 단백질 가수분해 특수분유를 먹이는 경우 우유 단백질뿐 아니라 콩, 고기, 생선, 닭고기, 쌀 등에도 예민한 반응을 보이는 경우에 사용.	라 콩, 고기, 생선, 닭고기, 쌀 등에도 예민한 반응을 보이는 경우
매일	불완전 가수분해	Babywell 아토키어 : 구 HA-21	알레르기 가족력이 있는 아기의 알레르기 관리를 위한 저 항원성 특별식(저항원성 분유). 분유조제분유의 90%보다는 낮춥니다. 60%의 유당을 함유하고 있어 HA의 값이 비싸고 맛이 없는 점을 보완.	아토피, 우유 알레르기 가족력이 있는 신생아에서 알레르기 질환의 예후 가능성이 있는 경우
남양	불완전 가수분해	호프알레르기 1-2	2월2일자 조선일보//저 알레르기성분유임에도 일반분유의 정도의 우유단백이 검출과장, 저항원성분유는 우유단백질이 완전 제거되지 않음을 기억할 것	

Table 3. 우유 알레르기 환자용 대체식품으로 개발된 대두 분유

회사	단백질	분유명	특징	용도
매일	대두단백	Babywell 쏘이	콩으로 만든 식물성 유아식으로 우유단백 알레르기, 유당불내증, 갈락토세미아로 모유나 조제분유 수유가 어려운 아기를 위한 유아식	유단백 알레르기나 유당을 선천적으로 소화하지 못하는 유당불내증, 감기, 설사 등 감염후에 오는 2차성 유당불내증으로 인해 일어나는 알레르기, 설사 등으로 모유나 분유를 못먹이는 아기를 위한 대두단백 유아식
일동	대두단백	유기농 쏘이	우유알레르기, 유당불내증 영유아식 대두 알레르기 환아는 피하도록 함	
씨밀락	대두단백	아이소밀 어드벤스	우유 단백질이 주원료인 다른 분유와는 달리 대두 단백질이 주원료인 분유 대두 단백질, 무유당 분유로 모유나 일반유와 영양면에서 동등하여 장기간 수유에 적합	
엔과밀	대두단백	프로소비	대두 단백질, 무유당 액상유로서 모유나 일반 분유와 영양학적 측면에서 동등. 장기간 수유에 적합함	

\* 출처 : 블로그 식생활 카운셀- 각 회사별 특수분유 비교

(<http://atopyhanbang.tistory.com/entry/비공개-수정필요회사별-특수분유-비교>)

- 식품 알레르기에 대한 최상의 대책은 알레르기를 일으키는 식품을 회피하는 것이다. 이에선 안전한 식품을 선택할 수 있는 정보가 필요하다. 본문에서 제시한 일본의 경우처럼 우리나라에도 알레르기 유발식품에 대한 표시제도가 있다. 그 품목은 한국인에 주로 알레르기를 유발하는 것으로 밝혀진 계란류, 우유, 메밀, 땅콩, 대두, 밀, 고등어, 게, 돼지고기, 복숭아, 토마토 등 11개 식품이다.
- 그러나 단백질 공급 식품과 쌀이나 밀처럼 주식에 해당하는 식품의 제한은 영양적 측면에서 문제가 된다. 따라서 알레르기항원의 기능적 특성 규명과 이를 기초로 한 다양한 알레르기항원 저감화 수법이 시도되고 있다. 알레르기항원 저함유 품종육성을 비롯하여 가열·가압 및 염수처리 등의 물리화학적 방법, 그리고 효소를 이용한 단백질 가수분해등 여러 방법에 의한 항원성 저감화 식품 제조기술이 개발되고 있다.
- 저 알레르기 장류에 관한 특허로는 항알레르기 및 저알레르기 효능을 지닌 장류의 제조 방법(The preparation method of anti-allergic and hypoallergic fermented soybean foods)이 특허가 있다. 본 발명은 항알레르기 및 저알레르기 효능을 지닌 장류의 제조 방법에 관한 것으로, 항알레르기 효능을 지닌 천연물의 추출액을 첨가한 후 발효시킴을 특징으로 한다.
- 본 발명의 장류 제조 방법으로 제조된 장류는 발효 과정 이후에도 첨가된 천연물 자체의 항알레르기 효능이 그대로 유지되는 동시에, 발효 과정을 거치면서 대두 알레르겐을 포함한 전체 항원의 양이 기존의 장류에 비해 크게 저하되어 저알레르기 효과도 함께 나타낸다. 따라서 본 발명의 장류 제조 방법으로 제조된 장류는 콩이나 장류에 대해 알레르기를 나타내는 사람들도 전통 장류의 좋은 성분을 섭취하는 동시에, 알레르기 증상도 완화되는 효과를 얻을 수 있다고 한다.
- 우리나라 국민의 건강에는 우리나라 고유의 전통 자연식의 섭취가 중요하다. 우리가 생활하는 환경과 피할 수 없는 식품의 오염 속에서 전통 식품의 장점은 살리면서 나아가 항 알레르기성 기능을 부여하는 것이 필요하다고 판단된다. 저 알레르기성 기능을 갖춘 된장이나 간장 등의 장류를 섭취한다면 그 자체로도 우리의 식생활의 큰 개선을 가져올 것이며, 알레르기 성향을 중화 또는 감소시킴으로써 환자들의 식생활을 개선할 수 있을 것이다.

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

- 해당사항 없음

## 제 8 장 참고문헌

제 2절 대두의 품종 및 증자조건에 따른 항원성 변화 규명

1. SH Kim, HM Kim, YM Ye, DH Nahm, CH Suh and HS Park. 2004. IgE sensitization and identification of IgE binding components of soybean allergen in adult allergy patients. *천식 및 알레르기*. 24(3): 331-336
2. J Ruhrah. 1909. The soybean in infant feeding: preliminary report. *Arch. Rediatr.* 26: 496-501
3. L Hill, H Sturat. 1929. Soybean food preparation for feeding infants with milk idiosyncrasy. *JAMA*. 93: 985-987
4. P Juto, S Engberg and J Winberg. 1978. Treatment of infantile atopic dermatitis with a strict elimination diet *Clin. Allergy*. 8: 493-500
5. L Kohler, G Meeuwisse and W Mortensson. 1984. Food intake and growth of infants between six and twenty-six weeks of age on breast milk, cow's milk formula, or soy formula. *Acta. Paediatr. Scand.* 73: 40-48
6. BT Maidoo, BT Chunterpurshad and ABG Mayooden. 1981. The use of a soy isolate based formula in the treatment of infantile diarrhea. *J. Int. Med. Res.* 9: 232-235
7. JJ Steichen, RC Tsang. 1987. Bone mineralization and growth in term infants fed soy-based or cow milk-based formula. *J. Pediatr.* 110: 687-692
8. GM Chan, L Leeper and S Linda. 1987. Effect of soy metabolism in term infants. *AJDC*. 141: 572-530
9. J Bernhisel-Broadbent, S Taylor and HA Sampson. 1989. Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 84: 701-709
10. H Awazuhara, H Kawai and N Maruchi. 1997. Major allergens in soybean and clinical



- significance of IgG4 antibodies investigated by IgE and IgG4-immunoblotting with sera from soybean-sensitive patients. *Clin. Exp. Allergy*. 27: 325-332
11. AW Burks, JR Brooks and HA Sampson. 1988. Allergenicity of major component protein of soybean determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting in children with atopic dermatitis and positive soy challenges. 1988. *J. Allergy Clin. Immunol.* 81: 1135-1142
  12. R Codina, RF Kicjtm, E Fernandez-Calds and R Rama. 1997. Purification and characterization of a soybean hull allergen responsible for the Barcelona asthma outbreaks. II. Purification and sequencing of the Gly m 2 allergen. *Clin. Exp. Allergy*. 27: 424-430
  13. M Samoto, C Miyazaki, T Akasaka, H Mori and Y Kawamura. 1996. Specific binding of allergic soybean protein Gly m Bd 30K with ( $\alpha'$ - and  $\alpha$ -subunits of conglycinin in soy milk. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 1006-1010
  14. WJ Wolf, DR Briggs. 1956. Ultracentrifugal investigation of the effect of neutral salts on the extraction of soybean protein. *Arch Biochem Biophys.* 63: 40-49
  15. NC Nielsen. 1985. Structure of soy proteins, In Altschul AM, Wilcke HL(ed.): New protein foods. *Academic Press, Orlando*. 5: 27-64
  16. H Breiteneder, C Radauer. 2004. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 113: 821-830
  17. T Ogawa, N Bando, H Tsuji, K Nishikawa and K Kitamura. 1995. Alpha-subunit of beta-conglycinin and allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 59: 831-833
  18. TA Beardslee, MG Zeece, G Sarath and JP Markwell. 2000. Soybean glycinin G1 acidic chain shares IgE epitopes with peanut allergen Ara h 3. *Int Arch Allergy Immunol.* 123: 299-307
  19. T Midoro-Horiuti, EG Brooks and RM Goldblum. 2001. Pathogenesis-related proteins of plants as allergens. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 87: 261-271
  20. J Kleine-Tebbe, L Vogel, DN Crowell, UF Haustein and S Vieths. 2002. Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a Bet v 1-related PR-10 protein in soybean. SAM22. *J Allergy Clin Immunol.* 110: 797-804
  21. JM Hanifin, G Rajka. 1980. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 92: 44-47
  22. UK Laemmli. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685

23. WS Chun, KS Lee, CH Hong and SY Lee. 2000. A study on the cross-allergenicity between buckwheat and rice flour using IgE- immunoblot inhibition and ELISA-inhibition test. *Pediatr. Allergy Respir. Dis (Korea)*. 10: 161-170
24. DY Son, S Scheurer, D Haustein and S Vieths. 1999. Follen-related food allergy: cloning and immunological analysis of isoforms and mutants of Mal d 1, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Eur J Nutr*. 38: 201-215
25. RM Helm, G Cockrell, C Connaughton, CM West, E Herman and HA Sampson. 2000. Mutational analysis of the IgE-binding epitopes of P34/Gly m Bd 30K. *J Allergy Clin Immunol*. 105: 378-384
26. R Yamanishi, H Tsuji, N Bando, Y Yamada, Y Nadaoka and T Huang. 1996. Reduction of the allergenicity of soybean by treatment with proteases. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 42: 581-587
27. T Ogawa, H Tsuji, N Bando, K Kitamura, YL Zhu and H Hirano. 1993. Identification of the soybean allergenic protein, Gly m Bd 30K, with the soybean seed 34 kDa oil-body-associated protein. *Biosci Biotechnol Biochem*. 57: 1030-1033

제 3절 대두 발효법에 따른 항원성 변화 규명

1. DY Son, BR Lee, DW Shon, KS Lee, KM Ahn, SY Nam and SI Lee. 2000. Allergenicity change of soybean proteins by thermal treatment. *Korean J food Sci Technol*. 32(4): 959-963
2. HA Samson, CC McCaskill. 1985. Food hypersensitivity in atopic dermatitis: evaluation of 113 patients. *J Pediatr*. 107: 669-675
3. AW Burks, SB Mallory, LW Williams and MA Shirrell. 1988. Atopic dermatitis: clinical relevance of food hypersensitivity reactions. *J. Pediatr*. 113: 447-451
4. B Marklund, S Ahlstedt and G Nordstrom. 2006. Health-related quality of life in food hypersensitive schoolchildren and their families: parents' perceptions. *Health Qual Life Outcomes*. 4: 48
5. I Dalal, I Binson, R Reifen, Z Amitai, T Shohat and S Rahmani. 2002. Food allergy is a matter of geography after all: sesame as a major cause of severe IgE-mediated food allergic reactions among infants and young children in Israel. *Allergy*. 57: 362-365

6. SH Sicherer, HA Sampson and AW Burks. 2000. Peanut and soy allergy: a clinical and therapeutic dilemma. *Allergy*. 55: 515-521
7. E Engvall, P Perlmann. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. *Immunochemistry*. 8: 871-877
8. YH Chung, JH Kwon, JA Jung, JO Lee, KS Lee, JY Kim, KM Ahn, SI Lee and CH Ryu. 2008. Evaluating the allergenicity of soyeam by the fermentation. *소아알레르기 호흡기*. 18(1): 37-45
9. J Bernhisel-Broadbent, S Scanolon, D Strause and HA Sampson. 1992. Clinical relevance of altered fish allergenicity secondary to various preparation methods. *J Allergy Clin Immunol*. 90: 622-629
10. UK Laemmli. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685
11. WS Chun, KS Lee, CH Hong and SY Lee. 2000. A study on the cross-allergenicity between buckwheat and rice flour using IgE- immunoblot inhibition and ELISA-inhibition test. *Pediatr. Allergy Respir. Dis (Korea)*. 10: 161-170
12. DY Son, S Scheurer, D Hausteiner and S Vieths. 1999. Follen-related food allergy: cloning and immunological analysis of isoforms and mutants of Mal d 1, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Eur J Nutr*. 38: 201-215
13. E Engvall, P Perlmann. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. *Immunochemistry*. 8: 871-877
14. R Yamanishi, H Tsuji, N Bando, Y Yamada, Y Nadaoka and T Huang. 1996. Reduction of the allergenicity of soybean by treatment with proteases. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 42: 581-587
15. SJ Maleki, SY Chung and ET Champagne. 2000. The effects of roasting on the allergic properties of peanut proteins. *J Allergy Clin Immunol*. 106: 763-768
16. HB Krishnan, WS Kim, SC Jang and MS Kerley. 2009. All three subunits of soybean  $\beta$ -conglycinin are potential food allergens. *J Agric Food Chem*. 57: 938-943
17. AW Burks, JR Brooks and HA Sampson. 1998. Allergenicity of major component proteins of soybean determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting in children with atopic dermatitis and positive soy challenges. *J Allergy Clin Immunol*. 81: 1135-1142
18. KS Hansen, BK Ballmer-Weber and D. Luttkope. 2003. Roasted hazelnuts-allergenic

activity evaluated by double-blind, placebo-controlled food challenge. *Allergy*. 58: 132-138

제 4절 대두 항원성 단백질에 대한 특이항체 제조

1. Son, D. Y., Lee, B. R., Shon, D. W., Lee, K. S., Ahn, K. M., Nam, S. Y. and Lee, S. I. 2000. Allergenicity change of soybean proteins by thermal treatment. *J. Food Sci. Technol.* 32 : 959-963.
2. Marklund, B., Ahlstedt, S. and Nordstrom, G. 2006. Health-related quality of life in food hypersensitive school children and their families: parents' perceptions. *Health Qual Life Outcomes*. 4 : 48.
3. Dalal, I., Binson, I., Reifen, R., Amitai, Z., Shohat, T. and Rahmani, S. 2002. Food allergy is a matter of geography after all: sesame as a major cause of severe IgE-mediated food allergic reactions among infants and young children in Israel. *Allergy*. 57 : 362-365.
4. Hill, D. J., Hosking, C. S. and Heine, R. G. 1999. Clinical spectrum of food allergy in children in Australia and South-East Asia: Identification and targets for treatment. *Ann Med* 31 : 272-281.
5. Beyer, K., Morrow, E., Li, X. M., Bardina, L., Bannon, G. A., Burks, A. W. and Sampson, H. A. 2001. Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107 : 1077-1081.
6. Shek, L. P., Cabrera-Morales, E. A., Soh, S. E., Gerez, I., Ng, P. Z., Yi FC, Ma. S. and Lee, B. W. 2010. A population-based questionnaire survey on the prevalence of peanut, tree nut, and shellfish allergy in 2 Asian populations. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126 : 324-331.
7. Wieslander, G. and Norbaeck, D. 2001. Buckwheat allergy. *Allergy*. 56 : 703-704.
8. Lusas, E. W. and Riaz, M. N. 1995. Soy protein products: Processing and use. *J. Nutr.* 125 : 573-580.
9. He, J., Gu, D., Wu, X., Chen, J., Duan, X., Chen, J. and Whelton, PK. 2005. Effect of soybean protein on blood pressure: A randomized controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 143 : 74-75.
10. Park, E., Shin, J. I., Park, O. J. and Kang, M. H. 2005. Soy isoflavone supplementation alleviates oxidative stress and improves systolic blood pressure in male spontaneously

- hypertensive rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 51 : 254-259.
11. Arato, A. and Horvath, J. 1995 Soy formula in the feeding of infants with milk allergy. *Orv Hetil.* 136 : 1433-1437.
  12. Cantani, A. Ferrara, M., Rangno, V. and Vusenco, L. 1990 Efficacy and safety of a soy-protein-formula for feeding babies with atopic dermatitis and cow's milk hypersensitivity. *Riv. Eur. Sci. Med. Farmacol.* 12 : 311-318.
  13. Anderson, J. A. and Song, D. D. 1984. Adverse reaction to foods. NIH Publication No. 84-2442. National Institute of Health, Hyattsville, MD, USA.
  14. Chung, Y. H., Kwon, J. H., Jung, J. A., Lee, J. O., Lee, K. S., Kim, J. Y., Ahn, K. M., Lee, S. I. and Ryu, C. H. 2008. Evaluating the allergenicity of soybean by the fermentation. *Pediatr Allergy Respir Dis(Korea).* 18 : 37-45.
  15. Hanifin, J. M. and Rajka, G. 1980. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta. Derm. Venerol.* 92 : 44-47.
  16. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
  17. Bio-Rad Laboratories. 1998. Bio-Rad protein assay. Bio-Rad Lab., Hercules. CA, USA.
  18. Park, J. M. and Oh, H. I. 1995. Change in microflora and enzyme activities of traditional *kochujang meju* during fermentantion. *J. Food Sci. Technol.* 24 : 56-52.
  19. Chun, W. S., Lee, K. S., Hong, C. H. and Lee, S. Y. 2000. A study on the cross-allergenicity between buckwheat and rice flour using IgE-immunoblot inhibition and ELISA-inhibition test. *Pediatr. Allergy Respir. Dis (Korea).* 10 : 161-170.
  20. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 : *Nature* 227: 680-685.
  21. Engvall, E. and Perlmann, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. *Immunochemistry* 8 : 871-877.
  22. Oh, K. K., Jung K. W., Park J. J., Lim, J. K. and Kim, J. C. 1993. Effects of extrusion-texturization on defatted soy flour for soy sauce fermentation. *J. Food Sci. Technol.* 25 : 1-8.
  23. Rho, J. D., Choi, S. Y. and Lee, S. J. 2008. Quality characteristics of soybean pastes (doenjang) prepared using different types of microorganisms and mixing ratios. *Korean J. Food Cookery Sci.* 24 : 243-250.

24. Shu, J. S., Lee, S. G. and Ryu, M. K. 1982. Effect of Bacillus strains on the chungkookjang processing II. Change of the components and enzyme activities during the storage of chungkook-jang. J. Food Sci. Technol. 14 : 309-314.
25. Seok, Y. R., Kim, Y. H., Kim, S., Woo, H. S., Kim, T. W., Lee, S. H. and Choi, C. 1994. Change of protein and amino acid composition during chungkook-jang fermentation using Bacillus licheniformis CN-115. Agric Chem biotechnol. 32 : 936-941.
26. Kim, K. J., Ryu, M. K. and Kim, S. S. 1982. Chungkook-jang koji fermentation with rice straw. J. Food Sci. Technol. 14 : 301-308.
27. Park, K. I. 1972. Studies on the N-compounds during chungkook-jang *meju* fermentation ( I ). J. Korean Agricultural chemical Society, 15 : 93-109.
28. Krishnan, H. B., Kim, W. S., Jang, S. C. and Kerley, M. S. 2009. All three subunits of soybean  $\beta$ -Conglycinin are potential food allergens. J. Agric. Food Chem. 57 : 938-943.
29. Oh, M. H. and Noh, Y. H. 1999. Expression and purification of soybean  $\beta$ -Conglycinin from Escherichia coli. J. Food Nutr. 12 : 184-190.
30. Tsai, E., Yeung, J., Gold, M., Sussman, G., Perelman, B. and Vadas, P. 2003. Study of the allergenicity of plant protein hydrolysates. Food Allergy Intolerance 4 : 117-126.
31. Yamanishi, R., Huang, T., Tsuji, H., Bando, N., Kimoto, M. and Ogawa, T. 1995. Reduction of the soybean allergenicity by the fermentation with Bacillus natto. Food Sci. Technol. 1 : 14-17.
32. Lee, J. H., Lee, Y. W., Shin, Y. S., Park, H. S., Hong, C. S. and Park, J. W. 2010. Measurement specific IgE against recombinant 16-kD and 19-kD buckwheat allergens for the diagnosis of buckwheat allergy. J. Asthma Allergy Clin. Immunol. 30 : 209-215.
33. Bock, S. A., Lee, Y., Remigo, L. K. and May, C. D. 1978. Studies of hypersensitivity reactions to foods in infants and children. J. Allergy Clin. Immunol. 62 : 327-332.
34. Sicherer, S. H., Sampson, H. A. and Burks, A. W. 2000. Peanut and soy allergy: a clinical and therapeutic dilemma. Allergy. 55 : 515-521.
35. Sampson, H. A. 1999. Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. J. Allergy Clin. Immunol. 103 : 717-728.

제 5절 저알레르기성 장류제품의 개발

1. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
2. Bio-Rad Laboratories. 1998. Bio-Rad protein assay. Bio-Rad Lab., Hercules. CA, USA.
3. Engvall, E. and Perlmann, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. *Immunochemistry* 8 : 871-877.
4. G.K. Dubois M, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F, Colorimetric method for determination of sugar and related substance, *Anal Chem* 28 (1956) 350-352.
5. G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical chemistry* 31 (1959) 426-428.
6. Rho, J. D., Choi, S. Y. and Lee, S. J. 2008. Quality characteristics of soybean pastes (doenjang) prepared using different types of microorganisms and mixing ratios. *Korean J. Food Cookery Sci.* 24 : 243-250.
7. 연구춘, 김동호, 김정옥, 육홍선, 조재민, 변명우, *Bacillus natto*와 *B. licheniformis* 혼합 Starter로 제조된 청국장의 품질특성, *Journal of the Korean society of food science and nutrition* 31 (2002) 204-210.
8. 인재평, 이시경, 유카(*Yucca shidigera*)추출물의 첨가가 *Bacillus subtilis* p01을 이용한 청국장의 품질 특성에 미치는 영향, *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 47 (2004) 176-181.
9. H.S. Lee Jo, Kim AJ, Yuh CS, Bang IS, Park SH, Industrial application and physiological functions of Chongkukjang, *Food Sci IND* 38 (2005) 69-78.
10. 홍성욱, 김주영, 이봉기, 정건섭, 면역증강물질 강화 청국장 발효, *한국식품과학회지* 38 (2006) 548-553.
11. M.H. Joo, S.H. Hur, Y.S. Han, J.Y. Kim, Isolation, Identification, and Characterization of *Bacillus* strains from the Traditional Korean Soybean-fermented Food, Chungkookjang, *Journal of applied biological chemistry* 50 (2007) 202-210.

#### 제 6절 알레르겐 저감화 대두 발효 공정 확립

1. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram

- quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
2. Bio-Rad Laboratories. 1998. Bio-Rad protein assay. Bio-Rad Lab., Hercules. CA, USA.
  3. Park, J. M. and Oh, H. I. 1995. Change in microflora and enzyme activities of traditional kochujang *meju* during fermentantion. *J. Food Sci. Technol.* 24 : 56-52.
  4. DY Son, S Scheurer, D Haustein and S Vieths. 1999. Follen-related food allergy: cloning and immunological analysis of isoforms and mutants of Mal d 1, the major apple allergen, and Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Eur J Nutr.* 38: 201-215



## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.